

辅酶 Q10 在他克莫司诱导的 β 细胞损伤过程中对线粒体功能障碍的治疗潜力

罗康^{1,2} 朴林虎¹ 林善宇² 梁哲宇²

(1. 中国吉林省延边朝鲜族自治州 延吉市医院 心血管肾内科 延吉市友谊路 519 号 133000;

2. 韩国加图立大学 首尔圣母医院 脏器移植研究所 首尔瑞草区盘浦大路 222 号 06591)

The therapeutic potential of Coenzyme Q10 in mitigating mitochondrial dysfunction during tacrolimus-induced β -cell injury.

Luo Kang^{1,2} Pu Linhu¹ Lin Shanyu² Liang Zheyu²

(1. China: Yanji City Hospital, Department of Cardiovascular and Nephrology, Yanbian Korean Autonomous Prefecture, Yanji City, No.519 Youyi Road, Postal Code: 133000; 2. South Korea: Katull University, Seoul St. Mary's Hospital, Organ Transplantation Research Institute, 222 Panpu-da-ro, Seocho District, Seoul, Postal Code: 06591.)

我们先前报道过，长期他克莫司治疗引起的氧化应激会损害胰腺 β 细胞的线粒体功能。本研究旨在探讨辅酶 Q10 (Coenzyme Q₁₀) 在他克莫司诱导的糖尿病大鼠模型中改善线粒体功能障碍的治疗潜力。在大鼠他克莫司诱导的糖尿病模型中，(Coenzyme Q₁₀) CoQ₁₀ 治疗改善了胰腺 β 细胞功能；CoQ10 可增强胰岛内的胰岛素免疫反应性，同时伴随氧化应激和细胞凋亡的减轻。通过电子显微镜对线粒体超微结构的评估显示，与单独使用他克莫司治疗相比，CoQ10 治疗显著增加了线粒体的大小、数量和体积，以及胰岛素颗粒的数量。一项使用胰腺 β 细胞系的体外研究表明，他克莫司治疗会增加细胞凋亡及线粒体活性氧的产生，而与 CoQ10 联合治疗则能有效减轻这些变化。在亚细胞水平上，CoQ10 显著改善了他克莫司引起的线粒体呼吸功能损伤，具体表现为线粒体耗氧量和 ATP 产量的增加。我们的数据表明，CoQ10 在减轻他克莫司诱导的氧化应激及保护胰腺 β 细胞线粒体方面发挥重要作用。这些结果提示，补充 CoQ10 对他克莫司诱发的糖尿病具有有益作用。

We previously reported that oxidative stress induced by long-term tacrolimus treatment impairs mitochondrial function in pancreatic β -cells. This study aimed to investigate the therapeutic potential of Coenzyme Q10 (CoQ10) in ameliorating mitochondrial dysfunction in a tacrolimus-induced diabetic rat model. In the rat tacrolimus-induced diabetes model, CoQ10 treatment improved pancreatic β -cell function; CoQ10 enhanced insulin immunoreactivity within the islets, accompanied by reduced oxidative stress and apoptosis. Electron microscopy evaluation of mitochondrial ultrastructure revealed that CoQ10 treatment significantly increased mitochondrial size, number, volume, and the quantity of insulin granules compared to tacrolimus monotherapy. An in vitro study using pancreatic β -cell lines demonstrated that tacrolimus treatment increased apoptosis and mitochondrial reactive oxygen species production, whereas combination therapy with CoQ10 effectively mitigated these changes. At the subcellular level, CoQ10 significantly improved thymoside-induced

mitochondrial respiratory dysfunction, manifested as increased mitochondrial oxygen consumption and ATP production. Our data demonstrate that CoQ10 plays a crucial role in mitigating thymoside-induced oxidative stress and protecting pancreatic β -cell mitochondria. These findings suggest that CoQ10 supplementation exerts beneficial effects on thymoside-induced diabetes.

他克莫司 (Tac) 作为一种钙调磷酸酶抑制剂 (CNI)，是最常用的免疫抑制剂。然而，肾移植术后长期使用他克莫司会导致移植后新发糖尿病 (NODAT) 的发生率升高 1。一项针对移植后接受他克莫司 (Tac) 治疗患者的 5 年随访研究显示，糖尿病 (DM) 发生率为 41%²。他克莫司的致糖尿病作用机制尚未明确，但其药理学钙调神经磷酸酶抑制作用 (在器官移植中对预防排斥反应至关重要) 与移植后 β 细胞功能衰竭相关 3 - 10。多项研究表明，该现象部分与他克莫司对胰腺 β 细胞的毒性作用有关，其中氧化损伤在他克莫司诱导的 β 细胞功能障碍中起核心作用 11 - 13。

辅酶 Q10 (CoQ10) 在线粒体呼吸链中充当可扩散的电子载体 14。CoQ10 还是一种强效抗氧化剂，能够清除自由基、抑制细胞生物膜中脂质过氧化的启动与进展，并促进 α -生育酚的再生 15, 16。先前的研究已揭示了 CoQ10 在多种氧化性组织实验性疾病中的有益作用 17 - 23。因此，CoQ10 具有保护细胞免受 Tac 诱导的氧化应激及胰腺 β 细胞损伤的潜力。

近期研究表明，Tac 对 β 细胞中的线粒体功能具有有害影响。线粒体 Ca²⁺ 摄取受损 (其机制与线粒体功能障碍相关) 已被证实发生在细胞色素 c 氧化酶活性降低之后，而 Tac 治疗后糖尿病 (DM) 患者的该酶活性降低发生率会升高 24。基于这一认知，本研究旨在探讨联合使用 CoQ10 是否能通过其抗氧化特性减轻 Tac 诱导的 DM，从而降低氧化应激。我们还评估了 CoQ10 的保护作用是否与维持线粒体功能相关，例如防止 Tac 治疗期间线粒体耗氧量和 ATP 生成受损，以及活性氧 (ROS) 生成增加。

材料与方法



伦理声明。所有操作均严格遵循相关建议进行。

动物研究的伦理指南。所有实验动物护理方案均获得韩国天主教大学动物护理与使用委员会批准（批准号：CUMC -2015-0028-02）。动物在 xylazine/rompun 麻醉下实施安乐死，实验过程中已竭尽全力减轻动物痛苦。

实验用大鼠模型。使用雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠（韩国 Seongnamsi Orient Bio 公司提供）。

给予 0.05% 钠饮食（Research Diets，美国新泽西州新不伦瑞克市），并自由饮水。7 天后，将小鼠随机分为 4 组（n=8 只/组），分别给予 1.5 mg/(kg·天) Tac（Astellas，日本茨城县）或 1 mL/(kg·天) 皮下注射溶媒（Vh：橄榄油；Sigma-Aldrich，美国密苏里州圣路易斯市），并联合/不联合辅酶 Q10（CoQ10；20 mg/kg·天，溶于橄榄油后每日口服灌胃；Chong Kun Dang Pharm.，韩国首尔）持续 4 周。给药途径和剂量参照早期研究报告 25,26 确定。

基本治疗方案。实验动物采用配对喂养方式，并监测其体重变化。大鼠被用于实验。

将大鼠分别饲养于代谢笼（Tecniplast，意大利加扎达）中，用于评估为期 4 周治疗后 1 天内的饮水量和尿量。次日对大鼠实施麻醉，并采集其血液和组织用于后续实验。全血中的 Tac 浓度采用液相色谱-串联质谱法（Abbott Diagnostics，美国伊利诺伊州雅培帕克）进行测定 27。

胰腺功能及胰岛内 β 细胞面积。经过 4 周治疗后，腹腔注射葡萄糖。

采用耐量试验（IPGTT）测定血糖水平。IPGTT 获得的数据通过梯形法计算葡萄糖曲线下面积（AUC_g）。血清空腹胰岛素水平使用 ELISA 试剂盒（Millipore Corp）检测。全血 HbA1c 采用 Cobas Integra 800 仪器（Roche Instrument Center AG，瑞士罗特克鲁兹）测定。为量化 β 细胞面积，通过胰岛素免疫组化染色后的图像（使用 TDI Scope Eye Version 3.6 for Windows 软件，韩国首尔）对各样本中的 β 细胞数量进行评估。通过从每组八只动物中随机选取 20 个胰岛，对胰岛素阳性细胞进行随机筛选和计数。

免疫组织化学法。经复原液（pH 6.0）、甲醇 H2O2 及 0.5% 溶液处理后。

将组织切片分别与 Triton X-100 及 10% 正常血清（Jackson ImmunoResearch，美国宾夕法尼亚州西格罗夫）混合，在 4° C 条件下孵育 1 天，分别加入针对胰岛素（18-0067，Invitrogen，美国加利福尼亚州卡尔斯巴德）、8-羟基-2,-脱氧鸟苷（8-OHdG；MOG-100P；JaICA，日本

静冈）、4-羟基己烯醛（4- HHE : MHH -030n；JaICA）或 Ki67（ab15580，Abcam，英国剑桥）的一抗，随后加入过氧化物酶标记抗体（Molecular Probes，美国加利福尼亚州卡尔斯巴德）。过氧化物酶活性采用 3,3'-二氨基联苯胺（DAB；Vector Laboratories，美国伯灵格姆）进行评估。对于胰岛素双标记实验，经 8-OHdG 和 4- HHE 染色的组织切片先用磷酸盐缓冲盐水洗涤，再分别与抗胰岛素抗体（Invitrogen）及花菁 3（Cy 3）标记抗体（Jackson ImmunoResearch）进行孵育。染色后的组织切片使用蔡司 LSM700 共聚焦显微镜（Carl Zeiss MicroImaging GmbH，德国耶拿）进行观察。通过测量每组八只动物中随机选取的约 20 个不重叠胰岛，确定了 8-OHdG 或 4- HHE 标记细胞的数量。采用直方图均衡化技术，在相同光强度条件下（TDI Scope Eye 系统）进行定量分析，计算出阳性区域百分比。

β 细胞质量的测量。通过点计数法估算了 β 细胞的相对体积。

方法 28：通过将胰岛素阳性区域匹配的点数除以与剩余胰腺区域匹配的点数，计算得出相对 β 细胞体积。细胞质量通过将 β 细胞比例乘以胰腺总重量进行测定 29。

葡萄糖刺激的胰岛素分泌（GsIs）检测。如前所述，从雄性动物中分离出胰岛。

采用胶原酶 30,31 对 SD 大鼠（体重 250 - 300 克）进行消化。胰岛在条件培养基 RPMI 1640 中于 37° C 预孵育 24 小时。随后，将分离出的胰岛用 Tac（1 μ g/mL）和 CoQ10（10 - 1000 ng/mL）处理 12 小时，之后进行胰岛素分泌分析。收集的胰岛被分为每组 30 个，用 Krebs-Ringer 改良缓冲液（KRB）洗涤，随后加入 2.8 mM 葡萄糖（基础浓度）。经 KRB 洗涤后，胰岛在含 16.7 mM 葡萄糖的 KRB 中孵育 1 小时。溶液中的胰岛素水平使用 ELISA 试剂盒（Millipore Corp.，St. Charles, Mo., USA）进行检测。

血清中 8-OHdG 的测定。通过测定氧化性 DNA 损伤的终产物来实现。

测定血清中 8-OHdG 的浓度。8-OHdG 水平采用 ELISA 试剂盒（Cell Biolabs，美国加利福尼亚州圣地亚哥）进行检测。

末端脱氧核糖核酸转移酶 dUTP 缺口末端标记（TUNEL）检测法。TUNEL

采用细胞凋亡检测试剂盒（Millipore Corp.）对组织切片进行检测，具体操作步骤如下：

表 1

	Vh	CoQ10	Tac	Tac + CoQ10
体重（克）	332 ± 4	326 ± 7	288 ± 41,2	317 ± 33
饮水量（mL/day）	28 ± 1	22 ± 11	39 ± 31,2	27 ± 13
尿量（mL/day）	14 ± 3	12 ± 11	32 ± 31,2	20 ± 23
Trough Tac（ng/mL）	—	—	10.6 ± 0.9	10.7 ± 1.1

表 1。CoQ10 给药对基础参数的影响。Vh：溶媒；CoQ10：辅酶 Q10；Tac：他克莫司；Scr：血清肌酐；

BUN：血尿素氮。所示数值为平均值 ± 标准误（n=8）。采用单因素方差分析处理数据。1 P < 0.05（与 Vh 组相比）；

2 $P < 0.05$ (与 CoQ10 组相比); 3 $P < 0.05$ (与 Tac 组相比)。

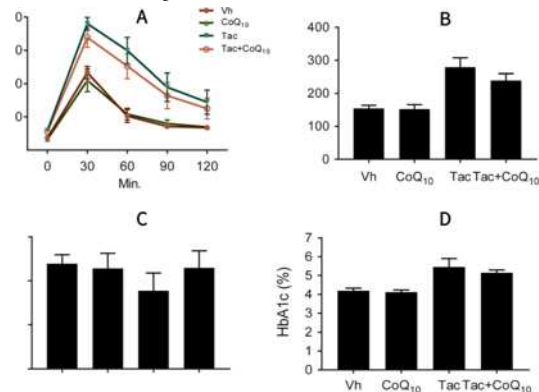


图 1

图 1.给予 of CoQ10 对大鼠他克莫司诱导的糖尿病 (Tac-induced DM) 的影响。血糖水平采用以下方法测定:

IPGTTs (a)、基于 IPGTTs 计算的 AUCg (b)、各组血浆胰岛素水平 (c) 及 HbA1c。数据以均值 $\pm$ 标准误差表示 ($n=8$)。采用单因素方差分析处理数据: & $P < 0.05$ (与 Vh 组相比); $^{\#}P < 0.05$ (与 CoQ10 组相比); $^{\#}P < 0.05$ (与 Tac 组相比)。

按照制造商说明书操作。对于胰岛素双标记实验,组织切片先与胰岛素抗体 (Invitrogen) 孵育,随后与 Cy 3 标记抗体 (Jackson ImmunoResearch) 孵育。每组每个动物随机选取约 20 个不重叠的胰岛,对双标记细胞进行计数。

透射电子显微镜观察。电子显微镜检查的操作流程同前。

如 32 所述,采用图像分析仪 (TDI Scope Eye) 对 40 个随机选取的 β 细胞中每个细胞的线粒体面积及数量进行了评估。

线粒体的三维 (3D) 重建。长达约 20 个切片的长条状图像。

经药物处理的分离胰岛在超薄切片机 (Leica Microsystems Ltd.) 上以 70-90 纳米的厚度进行切片。选定目标区域后,使用电子显微镜 (JEM 1010; JEOL, 日本东京) 对连续连续切片进行成像。随后通过 Photoshop 软件 (Adobe Systems, 美国加利福尼亚州圣何塞) 在图像堆栈中以不同颜色手动勾勒出单个线粒体的轮廓。所有图像均经过对齐处理,标记结构被屏蔽后导出至三维建模软件 Mimics v.19.0 (Materialise 公司,比利时鲁汶),同时附带切片厚度、实际像素尺寸及图像方向等信息。此外,使用 Mimics v.19.0 还计算了由等数量切片组成的堆栈中的线粒体体积与表面积。

细胞培养。INS-1 (大鼠胰岛素瘤细胞系) 在湿润条件下使用 RPMI-1640 条件培养基进行培养。

该大气中含有 5% 的二氧化碳。将细胞接种于培养皿中,并分别用 Tac (50 μ g/ml,溶于 DMSO) 和 CoQ 10 (1 μ g/ml-10 μ g/ml,溶于 DMSO) 处理 12 小时。

细胞活力与凋亡。为评估细胞活力,将 INS-1 细胞接种于培养皿中。

细胞汇合度达 90%。次日,用 Tac (50 μ g/ml) 及 1 μ g/ml-10 μ g/ml CoQ10 处理细胞 12 小时。向每孔加入 CCK-8

溶液 (Dojindo, 美国马里兰州罗克维尔) 以评估细胞活力。为检测细胞凋亡,经胰蛋白酶消化分离的细胞用膜联蛋白 V (BD Biosciences, 美国圣何塞) 进行处理。

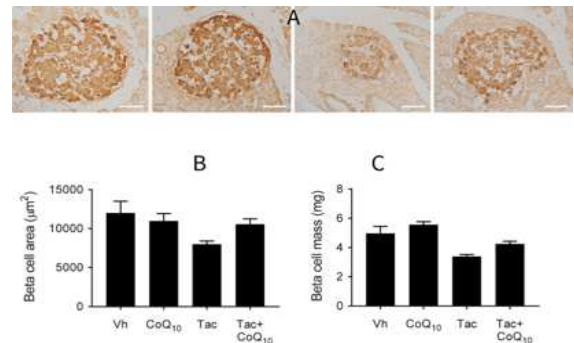


图 2

图 2.在 tac 诱导的糖尿病模型中,CoQ10 给药对胰岛形态与大小的影响。

在大鼠体内。(a)胰腺切片中胰岛素染色的代表性图像。比例尺 = 50 μ m (所有图版)。(b) β 细胞胰岛面积的定量分析。Tac 组显示胰岛较小,且胰岛素染色强度较低。胰岛内的染色程度高于溶剂 (Vh) 组。相比之下,联合使用 CoQ10 和 Tac 可逆转这些现象变化。(c) 通过点计数法对估算的胰腺 β 细胞质量进行定量分析。数据以均值 $\pm$ 标准误差表示 ($n=8$)。采用单因素方差分析对数据进行处理: & $P < 0.05$ (与 Vh 组相比); $^{\#}P < 0.05$ (与 CoQ10 组相比); $^{\#}P < 0.05$ (与 Tac 组相比)。

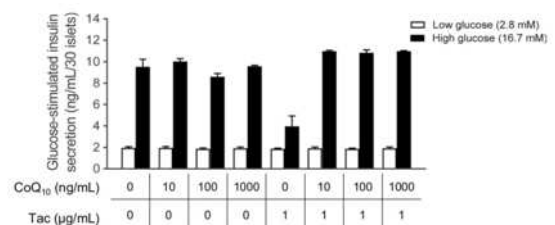


图 3

图 3.CoQ10 联合治疗对葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 的直接影响。

在 tac 诱导的胰岛损伤过程中,将原代大鼠离体胰岛在培养条件下直接用 tac 和 CoQ10 进行处理。值得注意的是,所有参数在 CoQ10 联合处理组中均得到恢复。 $n=8$ /组。采用单因素方差分析法处理数据。& $P < 0.05$ 表示与其他组相比具有统计学差异。

细胞 (美国加利福尼亚州) 在结合缓冲液 (BD Biosciences) 中进行处理。使用 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 对细胞进行分析。数据以荧光细胞占总细胞数的百分比形式报告。

线粒体 ROS 测定。细胞用 MitoSOX Red (Invitrogen) 处理 30 分钟。

在 37 $^{\circ}$ C 条件下,使用 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 检测线粒体活性氧 (超氧阴离子) 水平。获取了侧向散射和前向散射数据 (每个样本 10,000 个事件)。

活细胞延时成像。将 INS-1 细胞培养于 12 孔板中,随后加入 1 μ M。

使用 MitoSOX Red (Invitrogen 公司) 及相应药物。活细胞自动化成像实验采用 Lionheart FX 自动化显微镜 (BioTeck Instruments Inc. 公司) 完成。(美国佛蒙特州温努斯基市) 配备平板处理仪和活细胞培养箱, 使用 10 倍物镜。荧光图像每小时采集一次, 持续 12 小时, 光学发射波长和激发波长分别为 580 nm 和 510 nm。

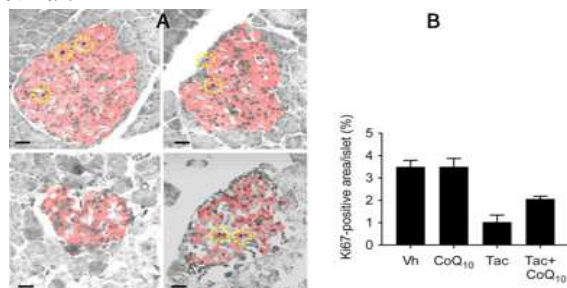


图 4

图 4. CoQ10 对 Tac 诱导的胰岛损伤过程中 Ki67 表达的影响。

代表性图像 (a) 及对大鼠组织切片中 Ki67 (灰色, 细胞增殖标志物) 与胰岛素 (红色荧光, β 细胞标志物) 的双重免疫组化信号进行定量分析 (b)。黄色虚线圆圈标示 Ki67 阳性细胞。比例尺 = 20 μ m (所有图版)。数据以均值 $\pm$ 标准误差表示 ($n=8$)。采用单因素方差分析处理数据: $\&P<0.05$ (与 Vh 组相比); $\$P<0.05$ (与 CoQ10 组相比); $\#P<0.05$ (与 Tac 组相比)。

耗氧率 (OCR) 实验。采用实时监测技术对细胞内的 OCR 进行了评估。

XF24 细胞外通量分析仪 (Seahorse 公司, 美国马萨诸塞州比勒里卡)。在非 CO₂ 培养箱中, 细胞培养基在与药物或 Vh 共同孵育后更换为流动培养基, 并于 37 $^{\circ}$ C 条件下处理 1 小时。所使用的线粒体抑制剂包括: 1 μ M 寡霉素 (ATP 合酶抑制剂)、0.5 μ M 羰基氰化物-4 (三氟甲氧基) 苯胺 (FCCP) 以及 0.5 μ M 罗替农/抗霉素 A (复合体 I 和 III 抑制剂)。实验结束后立即用磷酸盐缓冲液冲洗各孔, 随后加入裂解缓冲液 (Pierce Biotechnology, 美国伊利诺伊州罗克福德) 以裂解孔内的细胞。总蛋白含量采用

BCA 蛋白测定试剂盒 (Pierce Biotechnology) 进行检测, 随后将 OCR 数据根据各样本的总蛋白含量进行标准化处理。通过测定这些线粒体抑制剂作为调节剂对 ATP 生成量、基础呼吸速率、备用呼吸能力及最大呼吸速率的影响, 评估线粒体功能参数 33。每组实验设置 3-4 个孔。

统计分析。数据值以至少三次独立实验的平均值 $\pm$ 标准误差表示。

在检验过程中, 使用 Prism 软件 (版本 7.03, 适用于 Windows 系统, GraphPad Software 公司, 美国加利福尼亚州拉霍亚) 通过单因素方差分析结合 Bonferroni 事后检验进行了多重比较。P 值 <0.05 的结果被认为具有统计学显著性。

结果

CoQ10 在 Tac 诱导的糖尿病实验模型中的作用。

表 1 显示经 Tac 和 CoQ10 治疗 28 天后, 各实验组的功能参数出现变化。Tac+CoQ10 组的摄入水量和尿量减少幅度大于 Tac 组。因此, CoQ10 并未影响 Tac 的全血谷浓度, 表明在此剂量下未发生药物相互作用。与给予 Vh 的动物相比, 接受 Tac 治疗的大鼠表现出糖尿病 (DM) 特征, 具体表现为更高的 AUC_g 和 HbA1c 值以及更低血浆胰岛素水平。of CoQ10 可逆转这些变化 (图 1)。与 Vh 组相比, Tac 处理的胰岛表现出更低的胰岛素免疫反应性和更少的 β 细胞数量, 而这些效应可通过 CoQ10 治疗得到缓解 (图 2)。我们还对各组的 β 细胞质量进行了定量分析, 发现 Tac 治疗引起的 β 细胞质量减少可通过联合使用 CoQ10 得到逆转, 如图 2c 所示。

为评估 Tac 诱导的胰岛损伤过程中 of CoQ10 对胰岛素分泌功能的确切影响, 我们在培养条件下用 Tac 和 CoQ10 处理原代大鼠胰岛, 并检测了 GSIS。如预期所示, Tac 显著降低了 GSIS。如图 3 所示, 与单独使用 Tac 相比, 添加 of CoQ10 可显著提高胰岛素分泌水平。

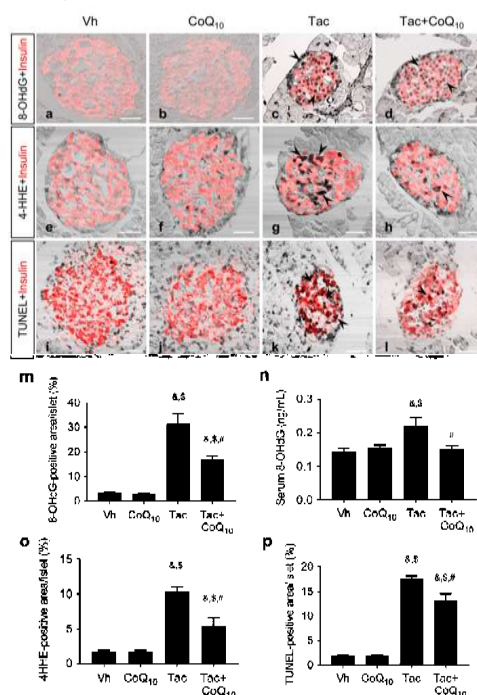


图 5

图 5. CoQ10 对大鼠 Tac 诱导的糖尿病模型中胰岛及血清氧化应激与细胞凋亡的影响。of CoQ10 对大鼠 Tac 诱导的糖尿病模型中胰岛及血清氧化应激与细胞凋亡的影响。采用大鼠组织切片进行的 8-OHdG (a-d、m)、4-HHE (e-h、o) 及 TUNEL 检测 (i-l、p) 的代表性图像及定量结果。(n) 血清 8-OHdG 排泄量。箭头指示 8-OHdG、4-HHE 及 TUNEL 阳性细胞。比例尺 = 50 μ m (所有图版)。数据以均值 $\pm$ 标准误差表示 ($n=8$)。采用单因素方差分析处理数据。 $\&P<0.05$ 对比 Vh 组; $\$P<0.05$ 对比 CoQ10 组; $\#P<0.05$ 对比 Tac 组。

CoQ10 辅酶 Q10 给药对他克莫司诱导的胰腺 β 细胞氧化应激及凋亡的影响。

实验组组织中 Ki67 的表达证实了 β 细胞的增殖 (图

4)。与 Vh 组和 CoQ10 组相比, Tac 治疗降低了胰岛素阳性区域中 Ki67 阳性细胞的数量,而同时给予 CoQ10 治疗则恢复了 Ki67 染色。图 5 展示了 8-OHdG (图 5a - d) 和 4-HNE (图 5e - h) 的共免疫组化染色结果,以及胰岛素(红色荧光)与血清 8-OHdG 水平(图 5n)。Tac 组组织切片中 8-OHdG 和 4-HNE 的免疫反应性以及血清 8-OHdG 水平均显著升高。

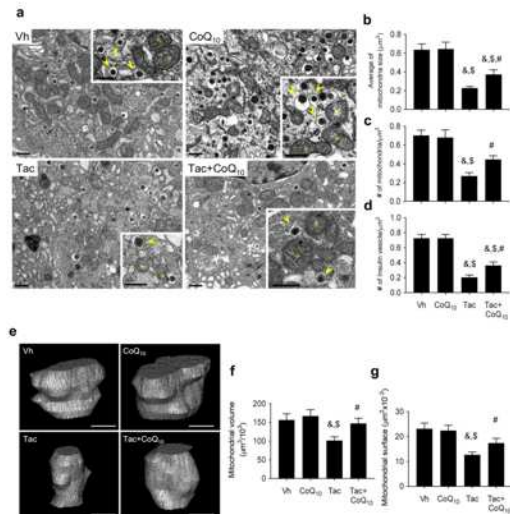


图 6

图 6.透射电子显微镜观察。(a) 胰腺β细胞中的线粒体超微结构。白色星号表示线粒体。箭头指示胰岛素颗粒。比例尺=0.5 μm (a 图)。(b - d) 实验组中线粒体面积与胰岛素颗粒数量的定量分析。(e - g) 经药物处理的分离胰岛中线粒体的三维(3D)重建。(e) 线粒体的代表性 3D 重建图,显示其形态特征。该重建基于超薄切片机切割的约 20 张切片序列。比例尺=200 nm (e 图)。线粒体体积(f)与表面积(g)的定量分析。数据以均值±标准误差表示(n=8)。采用单因素方差分析处理数据。&P<0.05 (与 Vh 组相比); \$P<0.05 (与 CoQ10 组相比); #P<0.05 (与 Tac 组相比)。

经 CoQ10 治疗后功能得以恢复。我们还研究了 CoQ10 是否能对抗 Tac 处理引起的细胞凋亡。Tac 组的 TUNEL 阳性细胞数量显著高于 Vh 组,而联合 of CoQ10 治疗后该数值有所下降(图 5i - l, p)。

CoQ10 给药对泛素酶抑制剂(pan)诱导的他克莫司(tac)所致线粒体超微结构改变的影响胰岛β细胞。

为评估线粒体功能,采用电子显微镜观察线粒体超微结构并量化线粒体数量。对于来自本实验大鼠的胰岛细胞, Tac 处理降低了线粒体的平均面积和数量(图 6a)。相比之下,给予 CoQ10 可恢复线粒体的平均面积和数量。电子显微镜还显示, Tac 处理显著减少了胰岛素颗粒的数量。CoQ10 能有效减轻颗粒数量的减少,证实了 CoQ10 治疗在 Tac 处理后保护胰岛功能(图 6b - d)。通过对离体大鼠胰岛β细胞中单个线粒体连续切片进行三维重建,评估了 of CoQ10 对线粒体体积和表面积的影响。与先前结果一致, Tac 处理引起的线粒体体积和表面积减小可通过 CoQ10 联合

治疗显著逆转(图 6e, f)。

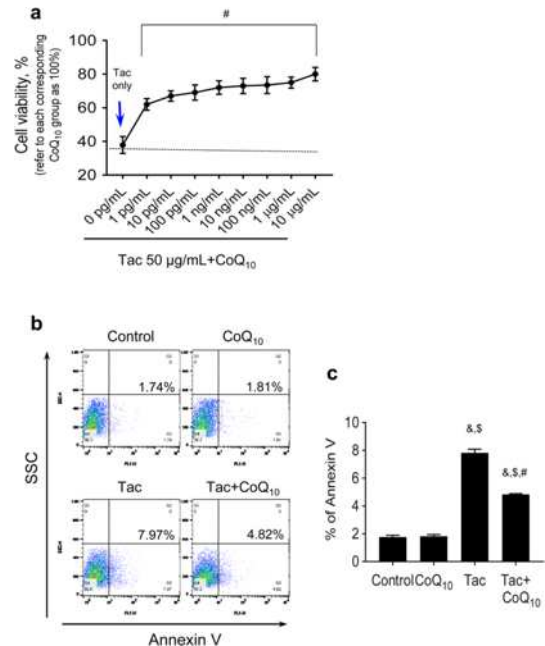


图 7

图 7. CoQ10 在 Tac 诱导的 INS-1 细胞损伤中的保护作用。(a) 通过 CCK-8 法评估的细胞存活率。(b 和 c) 通过膜联蛋白 V 染色和流式细胞术检测的细胞凋亡情况。数据以均值±标准误差表示(n=5)。采用单因素方差分析处理数据:&P<0.05 表示与对照组相比;\$P<0.05 表示与 CoQ10 组相比;#P<0.05 表示与 Tac 组相比。

CoQ10 可减少 Tac 诱导的 INS-1 细胞凋亡及线粒体 ROS 生成。使用在 INS-1 胰腺β细胞系中,我们进一步评估了 CoQ10 在 Tac 处理期间对线粒体损伤的保护作用。在 Tac 诱导的毒性作用下, INS-1 细胞分别暴露于不同浓度(1 pg/ml - 10 μg/ml) CoQ10 中 12 小时。CoQ10 在所有剂量下均提高了 INS-1 细胞的存活率,优于单独使用 Tac 的处理组(图 7a)。为探究 CoQ10 是否抑制与细胞凋亡相关的线粒体通路,我们采用膜联蛋白 V 染色进行了流式细胞术分析。CoQ10 处理显著减弱了 Tac 诱导的膜联蛋白 V 阳性细胞百分比的升高(图 7b, c)。

接下来,我们评估了 CoQ10 治疗是否能减少 Tac 治疗期间线粒体 ROS 的积累。通过使用 MitoSOX Red 检测 INS-1 细胞中的线粒体超氧化物(O₂⁻)并结合流式细胞术分析,结果显示 CoQ10 显著减弱了 Tac 诱导的 MitoSOX Red 荧光(图 8a, b)。为观察 CoQ10 对线粒体内 O₂⁻积累的保护作用,我们在同一视野下对存在或不存在 Tac 及 CoQ10 的条件下进行了 MitoSOX Red 荧光强度的延时监测。如图 8c 所示, Tac 组的 MitoSOX Red 荧光强度显著升高,但该效应被 CoQ10 处理所减弱。

CoQ10 Tac 处理的 INS-1 细胞中线粒体呼吸作用增强。线粒体生物能量通过依次添加线粒体功能抑制剂后计算随时间变化的耗氧量,确定了完整细胞的代谢动力学。该分析显示 Tac 组与 Tac+CoQ10 组之间存在显著差异(图 9a)。与单独使用 Tac 处理相比, Tac+CoQ10 处理组的基础

线粒体呼吸速率更高，这通常表明线粒体数量增加或线粒体活性增强（图 7b）。此外，与单独使用 Tac 处理相比，Tac+CoQ10 处理组的 ATP 关联呼吸和最大呼吸速率均显著提高。

讨论

本研究旨在探讨联合使用 CoQ10 是否能有效改善 Tac 引起的胰腺 β 细胞功能障碍。研究结果表明，CoQ10 通过减轻 Tac 诱导的氧化应激，缓解了高血糖症状并恢复了胰岛素分泌功能。这些研究结果表明，在他克莫司（Tac）诱导的 β 细胞损伤过程中，CoQ10 通过其抗氧化特性对减轻线粒体损伤具有积极作用（图 10）。因此，本研究结果为在临床实践中将 CoQ10 作为他克莫司所致糖尿病（Tac-induced DM）的补充疗法提供了理论依据。

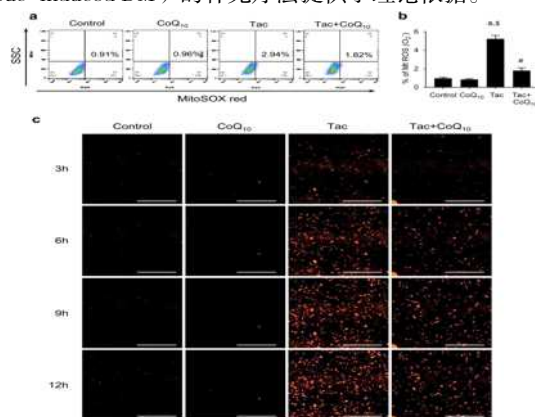


图 8

图 8. CoQ10 在 Tac 诱导的 INS-1 细胞线粒体 ROS 生成过程中的作用。(a)、(b) 采用 MitoSOX Red 染色通过流式细胞术检测线粒体超氧阴离子 (O_2^-) 水平。(c) 在相同视野下拍摄了经 MitoSOX Red 处理 12 小时、并存在或不存在 Tac 与 CoQ10 的细胞代表性延时图像。比例尺=1000 μm （所有图版）。数据以均值 $\pm$ 标准误表示 ($n=5$)。采用单因素方差分析处理数据：&P<0.05（与对照组相比）；\$P<0.05（与 CoQ10 组相比）；#P<0.05（与 Tac 组相比）。

在本研究中，我们首先评估了在实验性 Tac 诱导的糖尿病模型中，CoQ10 的给药是否能有效控制高血糖。近期多项临床研究表明，CoQ10 治疗可降低糖尿病 34-36。本研究发现，长期他克莫司（Tac）治疗可提高基于 IPGTT 的 AUC_g 值，同时降低血浆胰岛素水平及胰岛内的胰岛素免疫反应性。然而，与单独使用他克莫司治疗相比，联合使用 CoQ10 能显著降低 AUC_g 值，并提高血浆胰岛素和胰岛素原（GSIS）水平。此外，胰岛胰岛素免疫染色结果显示：联合使用 CoQ10 可增大胰岛体积、增强胰岛素免疫反应性，并通过更规整的胰岛边界和减少的空泡化现象证实了胰岛形态的保存。这些结果表明，CoQ10 对他克莫司治疗期间保护 β 细胞具有积极作用。

为阐明 CoQ10 在控制高血糖中的潜在机制，我们评估了各实验组中氧化应激标志物的表达水平，因为氧化应

激已被认为是胰腺 β 细胞损伤发病机制中的重要通路。给予 Tac 所诱导的高水平氧化应激会导致胰岛细胞死亡和功能障碍，短期及长期 Tac 治疗均会引发这一效应。

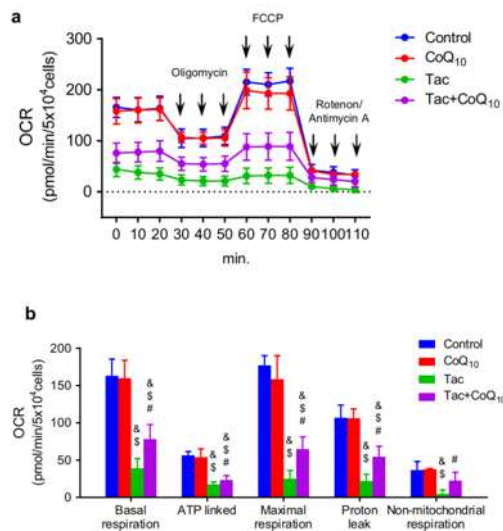


图 9

图 9. CoQ10 对 INS-1 细胞中 Tac 诱导损伤期间线粒体功能的影响。(a) 根据 OCR 计算了基础呼吸、(b) ATP 生成、最大呼吸、质子泄漏及非线粒体呼吸的曲线下面积。数据以均值 $\pm$ 标准误表示 ($n=5$)。采用单因素方差分析对数据进行处理：&P<0.05 表示与对照组相比；\$P<0.05 表示与 CoQ10 组相比。#P<0.05（与 Tac 组相比）。



图 10

图 10. CoQ10 在 Tac 诱导的胰腺 β 细胞损伤中发挥保护作用的机制示意图。

活性氧 (ROS) 的产生会引发细胞凋亡 32,37。因此，有研究提出，减轻氧化应激可保护胰腺 β 细胞免受损伤。基于这一假设，我们重点研究了 CoQ10 对 Tac 诱导的胰腺 β 细胞氧化损伤的抗氧化作用。为此，我们检测了氧化性 DNA 损伤和脂质损伤标志物 8-OHdG 与 4-HHE 的表达水平，发现虽然 Tac 处理小鼠的 β 细胞中这两种标志物表达水平均升高，但给予 CoQ10 可抑制其表达水平的升高。事实上，有证据表明糖尿病的发生发展与氧化应激密切相关。

这与氧化应激增强相关，而 CoQ10 能够清除活性氧 (ROS)，从而产生抗高血糖作用 25。总体而言，我们的数据表明口服 CoQ10 能有效减轻他克莫司 (Tac) 诱导的胰腺 β 细胞氧化应激。

我们进一步评估了 CoQ10 的抗氧化作用是否能改善 Tac 治疗期间的线粒体损伤。线粒体在胰腺 β 细胞中发挥着

重要作用，从葡萄糖代谢到胰岛细胞吐过程均依赖其参与，从而确保葡萄糖刺激的胰岛素分泌得到精确调控³⁸。线粒体功能受损会影响这种代谢耦联机制，最终导致细胞凋亡和 β 细胞死亡。此外，线粒体易受氧化损伤，在疾病状态下可能成为超氧化物的主要来源³⁹。基于这些知识，我们首先检测了细胞凋亡（一种体内和体外的线粒体死亡途径）的发生率，发现与 Tac 组相比，CoQ10 降低了 TUNEL 和膜联蛋白 V 阳性细胞的数量。超微结构分析显示，Tac 处理导致线粒体的数量、面积、大小和体积以及胰岛素颗粒数量减少，而 CoQ10 给药则减轻了这些变化。CoQ10 还减少了线粒体活性氧和超氧阴离子的积累，并恢复了基础呼吸、ATP 关联呼吸以及随时间变化的氧耗最大呼吸速率。这些数据表明，CoQ10 的给药有助于在 Tac 诱导的氧化应激期间维持线粒体功能，从而随后减少细胞凋亡性死亡。

除 Tac 外，雷帕霉素类似物、西罗莫司（SRL）和依维

莫司（EVR）已被广泛用作移植手术中的免疫抑制剂，但这些药物也会增加糖尿病风险。许多研究已证实，这两种药物均会导致胰腺 β 细胞线粒体功能障碍，最终引起胰岛素释放减少⁴⁰⁻⁴³。我们也在动物模型中证实，单独使用 SRL 或 EVR 治疗会导致高血糖的发生，同时伴随胰岛素颗粒数量减少及氧化应激标志物表达增加^{27,30,31}。然而，在大鼠模型中，CoQ10 的添加可减轻 SRL 诱导的高血糖及氧化应激。在亚细胞水平上，CoQ10 不仅能改善线粒体形态，还能增强线粒体呼吸功能²⁵。基于这些发现，CoQ10 补充剂对雷帕霉素诱导的糖尿病治疗亦具有积极作用。

总之，CoQ 10 在减轻他克莫司（Tac）诱导的氧化应激及保护胰腺 β 细胞线粒体方面发挥着重要作用。这些研究结果表明，CoQ10 未来可能有助于治疗他克莫司（Tac）诱导的糖尿病（DM）。

参考文献:

- [1]Kasike, B. L., Snyder, J. J., Gilbertson, D. & Matas, A. J. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 3, 178 - 185 (2003).
- [2]Weir, M. Impact of immunosuppressive regimes on posttransplant diabetes mellitus. *Transplant Proc* 33, 23s - 26s (2001).
- [3]Heit, J. J. et al. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 443, 345 - 349 (2006).
- [4]Soleimanpour, S. A. et al. Calcineurin signaling regulates human islet {beta}-cell survival. *J Biol Chem* 285, 40050 - 40059 (2010).
- [5]Demozay, D., Tsunekawa, S., Briaud, I., Shah, R. & Rhodes, C. J. Specific glucose-induced control of insulin receptor substrate-2 expression is mediated via Ca^{2+} -dependent calcineurin/NFAT signaling in primary pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* 60, 2892 - 2902 (2011).
- [6]Yang, J. et al. PANDER binds to the liver cell membrane and inhibits insulin signaling in HepG2 cells. *FEBS Lett* 583, 3009 - 3015 (2009).
- [7]Donelan, M. J. et al. Ca^{2+} -dependent dephosphorylation of kinesin heavy chain on beta-granules in pancreatic beta-cells. Implications for regulated beta-granule transport and insulin exocytosis. *J Biol Chem* 277, 24232 - 24242 (2002).
- [8]Lawrence, M. C., Bhatt, H. S., Watterson, J. M. & Easom, R. A. Regulation of insulin gene transcription by a Ca^{2+} -responsive pathway involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells. *Mol Endocrinol* 15, 1758 - 1767 (2001).
- [9]Redmon, J. B., Olson, L. K., Armstrong, M. B., Greene, M. J. & Robertson, R. P. Effects of tacrolimus (FK506) on human insulin gene expression, insulin mRNA levels, and insulin secretion in HIT-T15 cells. *J Clin Invest* 98, 2786 - 2793 (1996).
- [10]Harbeck, M. C., Louie, D. C., Howland, J., Wolf, B. A. & Rothenberg, P. L. Expression of insulin receptor mRNA and insulin receptor substrate 1 in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* 45, 711 - 717 (1996).
- [11]Ishizuka, J. et al. Effects of FK506 and cyclosporine on dynamic insulin secretion from isolated dog pancreatic islets. *Transplantation* 56, 1486 - 1490 (1993).
- [12]Piao, S. G. et al. Combined treatment of tacrolimus and everolimus increases oxidative stress by pharmacological interactions. *Transplantation* 98, 22 - 28 (2014).
- [13]Trinanes, J. et al. Deciphering Tacrolimus-Induced Toxicity in Pancreatic beta Cells. *Am J Transplant* 17, 2829 - 2840 (2017).
- [14]Lenaz, G., Fato, R., Formigini, G. & Genova, M. L. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* 7(Suppl), S8 - 33 (2007).
- [15]Crane, F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 20, 591 - 598 (2001).
- [16]Bentinger, M., Brismar, K. & Dallner, G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7(Suppl), S41 - 50 (2007).
- [17]Huo, J. et al. Coenzyme Q10 Prevents Senescence and Dysfunction Caused by Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 3181759 (2018).
- [18]Venegoni, W. et al. The use of antioxidants in the treatment of traumatic brain injury. *J Adv Nurs* 73, 1331 - 1338 (2017).
- [19]Ishikawa, A. & Homma, Y. Beneficial effect of ubiquinol, the reduced form of coenzyme Q10, on cyclosporine nephrotoxicity. *Int Braz J Urol* 38, 230 - 234; discussion 234 (2012).

- [20]Chen, H. & Tappel, A. L. Vitamin E, selenium, trolox C, ascorbic acid palmitate, acetylcysteine, coenzyme Q, beta-carotene, canthaxanthin, and (+)-catechin protect against oxidative damage to kidney, heart, lung and spleen. *Free Radic Res* 22, 177 - 186(1995).
- [21]Upaganlawar, A., Farswan, M., Rathod, S. & Balaraman, R. Modification of biochemical parameters of gentamicin nephrotoxicity by coenzyme Q10 and green tea in rats. *Indian J Exp Biol* 44, 416 - 418 (2006).
- [22]Sohet, F. M. et al. Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. *Biochem Pharmacol* 78, 1391 - 1400 (2009).
- [23]Spindler, M., Beal, M. F. & Henchcliffe, C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 5, 597 - 610(2009).
- [24]Lombardi, A., Trimarco, B., Iaccarino, G. & Santulli, G. Impaired mitochondrial calcium uptake caused by tacrolimus underlies beta-cell failure. *Cell Commun Signal* 15, 47 (2017).
- [25]Sun, I. O. et al. The effects of addition of coenzyme Q10 to metformin on sirolimus-induced diabetes mellitus. *Korean J Intern Med* (2017).12Scientific Reports | (2019) 9:7995 |
- [26]Jin, J. et al. Effect of Empagliflozin on Tacrolimus-Induced Pancreas Islet Dysfunction and Renal Injury. *Am J Transplant* 17, 2601 - 2616 (2017).
- [27]Piao, S. G. et al. Drug interaction between cyclosporine and mTOR inhibitors in experimental model of chronic cyclosporine nephrotoxicity and pancreatic islet dysfunction. *Transplantation* 93, 383 - 389 (2012).
- [28]ER, W. Stereological methods vol 1. Academic Press Inc.: London, 1979.
- [29]Bonner-Weir, S. Beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* 50(Suppl 1), S20 - 24 (2001).
- [30]Jin, J. et al. Effects of metformin on hyperglycemia in an experimental model of tacrolimus- and sirolimus-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med* 32, 314 - 322 (2017).
- [31]Jin, L., Lim, S. W., Jin, J., Chung, B. H. & Yang, C. W. Effects of addition of a dipeptidyl peptidase IV inhibitor to metformin on sirolimus-induced diabetes mellitus. *Transl Res* 174, 122 - 139 (2016).
- [32]Lim, S. W., Jin, L., Luo, K., Jin, J. & Yang, C. W. Ginseng extract reduces tacrolimus-induced oxidative stress by modulating autophagy in pancreatic beta cells. *Lab Invest* 97, 1271 - 1281 (2017).
- [33]Dott, W., Mistry, P., Wright, J., Cain, K. & Herbert, K. E. Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity. *Redox Biol* 2, 224 - 233 (2014).
- [34]Yen, C. H., Chu, Y. J., Lee, B. J., Lin, Y. C. & Lin, P. T. Effect of liquid ubiquinol supplementation on glucose, lipids and antioxidant capacity in type 2 diabetes patients: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 120, 57 - 63 (2018).
- [35]Gholami, M., Zarei, P., Sadeghi Sedeh, B., Rafiei, F. & Khosrowbeygi, A. Effects of coenzyme Q10 supplementation on serum values of adiponectin, leptin, 8-isoprostane and malondialdehyde in women with type 2 diabetes. *Gynecol Endocrinol*, 1 - 5 (2018).
- [36]Stojanovic, M. & Radenkovic, M. A meta-analysis of randomized and placebo-controlled clinical trials suggests that coenzyme Q10 at low dose improves glucose and HbA1c levels. *Nutr Res* 38, 1 - 12 (2017).
- [37]Lim, S. W., Jin, L., Jin, J. & Yang, C. W. Effect of Exendin-4 on Autophagy Clearance in Beta Cell of Rats with Tacrolimus-induced Diabetes Mellitus. *Sci Rep* 6, 29921 (2016).
- [38]Supale, S., Li, N., Brun, T. & Maechler, P. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 23, 477 - 487(2012).
- [39]Smith, R. A. et al. Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 105 - 111 (2008).
- [40]Suzuki, L. et al. Everolimus Directly Suppresses Insulin Secretion Independently of Cell Growth Inhibition. *J Endocr Soc* 2, 589 - 596(2018).
- [41]Manzia, T. M. et al. Ab initio Everolimus-based Versus Standard Calcineurin Inhibitor Immunosuppression Regimen in Liver Transplant Recipients. *Transplant Proc* 50, 175 - 183 (2018).
- [42]Lombardi, A. et al. Sirolimus induces depletion of intracellular calcium stores and mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells. *Sci Rep* 7, 15823 (2017).
- [43]Constantinescu, A. A. et al. Differential influence of tacrolimus and sirolimus on mitochondrial-dependent signaling for apoptosis in pancreatic cells. *Mol Cell Biochem* 418, 91 - 102 (2016).

致谢:

这项工作得到了大韩民国保健福祉部韩国健康技术研发项目 (H114C3417, H116C1641)的支持, 以及韩国科学技术信息通信与未来规划部资助、韩国国家研究基金会 (NRF)实施的基础科学研究计划(项目编号: NRF-2018R1D1A1A02043014)的支持。通讯作者: 罗康, 延吉市医院, 心血管肾内科, 邮箱: luokangmd@163.com。