文章编号:1000-5404(2008)11-1071-04

论著

大鼠阿霉素所致心肌病过程中 PI3K/AKT 以及 ERK1/2 信号通路表达的改变

向 平[1],涂 柳[2],陈 沅[1] (重庆医科大学:[1]附属儿童医院心血管内科,重庆 400014;[2]生理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 研究阿霉素对心脏结构功能的影响以及此过程中部分相关信号通路的变化。方法 用 20 只 SD 大鼠分为两组:阿霉素组(10 只)和正常组(10 只),观察阿霉素对心脏结构及功能改变,心肌细胞凋亡以及 p-AKT 与p-ERK1/2的蛋白水平。结果 阿霉素注射 11 周后造成肌纤维排列紊乱,肌纤维丢失及肌浆空泡化,心脏功能尤其是收缩功能下降(FS 与 CO 比较,$P<0.01$),心肌细胞凋亡增加,p-AKT 与p-ERK1/2的蛋白水平较正常明显下降。结论 阿霉素能明显造成心脏结构及功能的损伤,心肌细胞凋亡,PI3K/AKT 与 ERK1/2 两条信号通路的变化可能参与到阿霉素的心脏毒性过程中。

关键词:阿霉素;心肌病;心脏毒性;细胞凋亡;信号通路
中图法分类号:R329.28;R542.2;R979.14 **文献标识码**:A

PI3K/AKT and ERK1/2 signaling pathways in the process of cardiomyopathy induced by doxorubicin

XIANG Ping[1], TU Liu[2], CHEN Yuan[1] ([1]Department of Cardiology, Children's Hospital, [2]Department of Physiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the role of PI3K/AKT and ERK1/2 signaling pathways in the process of cardiomyopathy induced by doxorubicin (DOX). Methods Twenty SD rats were divided into two groups: DOX group (10 rats that were injected through caudal vein with 2.5 mg/kg DOX, once a week, for 6 weeks) and control group (10 rats). At 5th week after the end of DOX injection, the structural changes and functional damage were examined, and the apoptosis rate of cardiomyocytes and the expression levels of p-AKT and p-ERK1/2 were determined. Results Eleven weeks after the DOX injection, the myocardial pathological changes were mainly myofibrillar loss and cytoplasmic vacuolization. DOX could induce compensated heart function (the value of FS% was 34, $P<0.01$ as compared with control group). DOX caused cardiac cell apoptosis and the apoptosis ratio was 28.4% ($P<0.01$, as compared with control group). The expression of Bcl-2 increased to 126% ($P>0.05$) and Bax to 338% ($P<0.05$) of control level. In DOX group, phosphorylation of Akt was reduced to 12% ($P<0.05$) and that of ERK1/2 was reduced to 24% ($P<0.05$) of control level. Conclusion DOX can induce the damage of cardiac function and the apoptosis of cardiomyocytes, in which the PI3K/AKT and ERK1/2 signaling pathways may play important roles.

Key words: doxorubicin; cardiomyopathy; cardiotoxicity; apoptosis; signaling pathway

阿霉素(doxorubicin,DOX)是目前最有效的抗肿瘤药物之一,广泛用于恶性肿瘤的治疗,包括实体肿瘤及造血系统肿瘤,但其化疗后可能导致心肌病及充血性心力衰竭等,使之临床运用受限。阿霉素致心脏毒性的机制尚不清楚,大多认为与较强氧化应激状态引起心肌细胞的凋亡有关[1]。有学者在体外研究中发现,磷脂酰肌醇 3-激酶/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B,PI3K/AKT)与细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases,ERK1/2)信号通路参与了阿霉素所致心肌细胞凋亡过程[2];而在体内这些信号通路是否同样与阿霉素所致心肌病甚或心力衰竭发病过程有关,目前报道甚少而且存在争议。本实验采用大鼠建立体内心肌病模型,研究阿霉素对心脏结构功能的损伤以及此过程中 PI3K/AKT 与 ERK1/2 两条信号通路的变化。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

阿霉素(DOX,Ebewe Pharma Ges,奥地利);TUNEL 试剂盒(Sigma,美国)RIPA lysis buffer(Sigma,美国);蛋白酶抑制剂(Merck,德国);磷酸化酶抑制剂(Pierce,美国);伯乐 DC 蛋白测定试剂盒(Bio-Rad,美国);兔抗鼠磷酸化 AKT(p-AKT,Ser473),ERK(p-ERK,Thr202/Tyr204),总 AKT(T-AKT),ERK

作者简介:向 平,男,四川省仁寿县人,博士研究生,主要从事心脏功能损伤与修复方面的研究。电话:13032374273,E-mail:xiangping.hh@gmail.com
通信作者:陈 沅,电话:(023)63631938
收稿日期:2008-03-05;修回日期:2008-04-14

(T-ERK)(cell signaling,美国);兔抗鼠 Bcl-2,Bax 以及 α-tubulin(cell signaling,美国)ECL 免疫印迹发光试剂购自 Amersham(GE Healthcare,美国);超声心动图仪(Sonos 7500, Philips Ultrasound,美国)。

1.2 动物分组以及模型制备

选取健康雄性 SD 大鼠 20 只,体质量(175 ± 5) g,由香港中文大学实验动物中心提供。分为 2 组:阿霉素处理组(n = 10),尾静脉注射阿霉素 2.5 mg/kg,1 周 1 次,连续 6 周,总剂量为 15 mg/kg;正常对照组(n = 10),注射相等容量生理盐水。建模 11 周后将大鼠断颈处死,取出心脏,低温 PBS 洗尽血液并将其横切均分为 2 份,心底部放入 4% 多聚甲醛溶液固定,心尖部存入 -80 ℃冰箱备用。

1.3 大鼠心脏功能的检测

所有大鼠于建模前及建模第 6、9、11 周,均行经胸超声心动图检测[3,4],探头频率 12 mHz,在左心室乳头肌水平短轴切面测量左室舒张末期内径(left ventricular internal dimensions at end-diastole,LVEDD)、收缩末期内径(left ventricular internal dimensions at end-systole,LVESD)、左室短轴缩短率[(fractional shortening,FS,FS(%) = (LVEDD − LVESD)/LVEDD × 100%]、心输出量(cardiac output,CO),用体质量修饰的左心舒张末期内径 LVEDD/BW。各组的原始数据均取自 3 个连续心动周期的平均值。

1.4 心肌组织病理学的检测

心肌组织经 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后,常规脱水、浸蜡包埋,4 μm 组织切片,HE 染色后进行组织病理学的检测。

1.5 TUNEL 心肌细胞凋亡检测

末端 dUTP 缺口标记(TUNEL)的检测按产品说明书进行操作,玻片脱蜡,PBS 洗涤,蛋白酶 K 消化,0.3% H_2O_2 封闭,加末端脱氧核苷酸转化酶溶液孵育将染好的片子置于镜下,选择 3 个不同的视野,计数表达阳性的细胞核个数,计算阳性率。

1.6 Western blot 检测心肌组织信号蛋白的表达

心肌组织(n = 3)用液氮研磨至粉末,加入含蛋白酶及磷酸化酶抑制剂的 RIPA Lysis Buffer(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;150 mmol/L 氯化钠;1.0% Np-40;0.5% 脱氧胆酸钠;0.1% SDS),裂解 30 min 后,4 ℃ 14 000 r/min,离心 15 min,取上清,检测蛋白浓度后分装,于 -80 ℃冰箱保存备用。100 μg 蛋白质样品用 10% 的 SDS-PAGE 分离后,100 V 恒压湿法电转 1.5 h 至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h;一抗包括磷酸化 AKT,ERK 及 Bcl-2,BAX(1∶1 000),总 AKT,ERK 及 α-tubulin(1∶2 000)4℃过夜,二抗室温 1 h,化学发光试剂显影,暗室曝光冲片。所有目的条带与内参均在同一张膜上检测,利用 Bio-Rad 图像分析系统进行条带的分析。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

阿霉素组较正常组活动及饮食均减少,体质量在 2、3、4 周时仅缓慢增长,后出现不增并维持到第 6 周;随后开始缓慢下降并持续到 11 周(图 1);而正常组体质量增加理想,于建模第 2 周起即出现统计学差异(P = 0.01),并持续到第 11 周。建模期间阿霉素组大鼠死亡 2 只(在第 10 周的 2、4 d),尸检判断死亡原因为阿霉素所致心力衰竭。

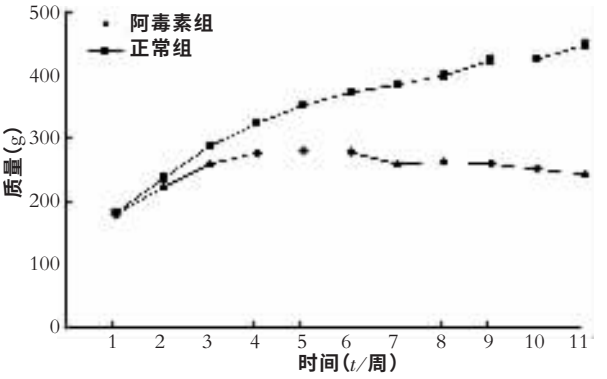


图 1 大鼠体质量变化图

2.2 大鼠心功能连续检测

两组大鼠建模前心功能各参数均无统计学差异;第 6 周时阿霉素组 CO 下降[(0.10 ± 0.01) L/min *vs* (0.14 ± 0.00) L/min, P < 0.01],LVEDD/BW 升高[(2.2 ± 0.1) cm/kg *vs* (1.7 ± 0.0) cm/kg, P < 0.01],提示心功能已经出现异常;第 9 周时阿霉素组大鼠 FS 较正常组明显下降[(38.1 ± 4.1)% *vs* (44.5 ± 1.0)%, P < 0.05],同时 CO 继续下降而 LVEDD/BW 继续增大;11 周时,阿霉素组大鼠心功能的变化与第 9 周相似,心功能受损更加明显(表 1)。

表 1 两组大鼠心功能连续检测

时间点	组别	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	FS (%)	CO (L/min)	LVEDD/BW (cm/kg)
基础值	阿毒素组	5.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1	49.7 ± 0.7	0.11 ± 0.00	3.3 ± 0.1
	对照组	5.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	50.9 ± 0.9	0.11 ± 0.01	3.3 ± 0.1
6 周	阿毒素组	5.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	44.0 ± 2.1	0.10 ± 0.01	2.2 ± 0.1
	对照组	6.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	46.6 ± 1.1	0.14 ± 0.00[b]	1.7 ± 0.0[b]
9 周	阿毒素组	6.1 ± 0.3	3.8 ± 0.4	38.1 ± 4.1	0.09 ± 0.01	2.3 ± 0.1
	对照组	6.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	44.5 ± 1.0[a]	0.15 ± 0.01[b]	1.6 ± 0.1[b]
11 周	阿毒素组	6.3 ± 0.2	4.2 ± 0.3	33.7 ± 2.8	0.09 ± 0.01	2.6 ± 0.1
	对照组	7.3 ± 0.1	4.1 ± 0.1	44.1 ± 1.1[b]	0.19 ± 0.01[b]	1.6 ± 0.1[b]

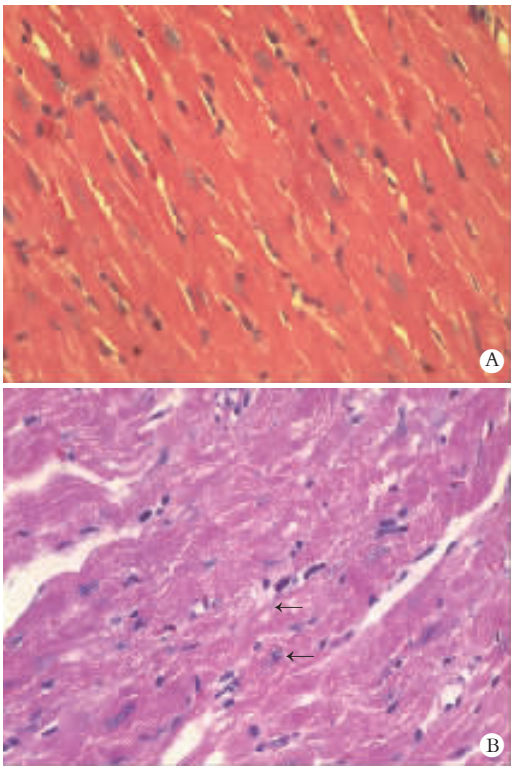
a:P < 0.05,与相同时间点阿霉素组比较;b:P < 0.01,与相同时间点阿霉素组比较

2.3 心肌组织病理学改变

正常组大鼠心肌组织形态结构正常(图 2A);阿霉素注射 11 周后,大鼠心肌病理切片上可见明显的肌纤维排列紊乱,肌纤维丢失以及胞浆空泡化(图 2B 中箭头所示)。

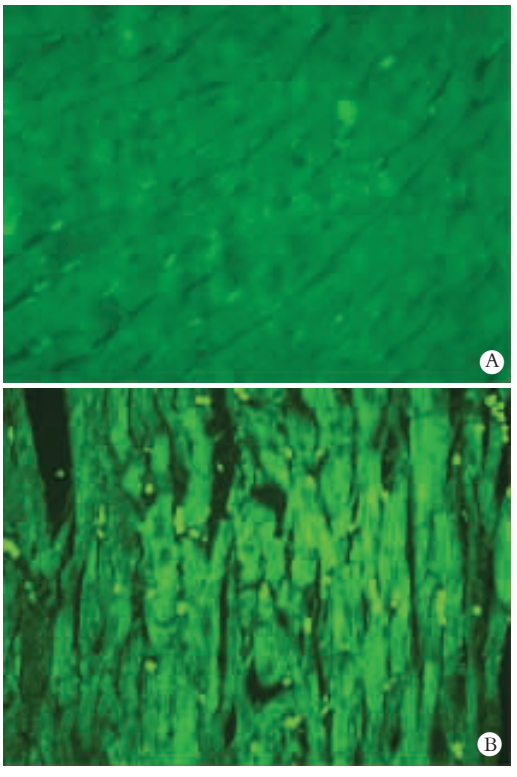
2.4 TUNEL 实验检测结果

TUNEL 实验结果用阳性率来表示,正常组大鼠凋亡细胞阳性率为[(4.7 ± 0.6)%, n = 10],DOX 组凋亡细胞阳性率则为[(28.4 ± 5.6)%, n = 8],二者比较存在明显差异(P < 0.01)(图 3)。



A：正常组大鼠；B：阿霉素组大鼠

图 2　正常组与阿霉素组大鼠心肌组织病理学改变　（HE ×400）

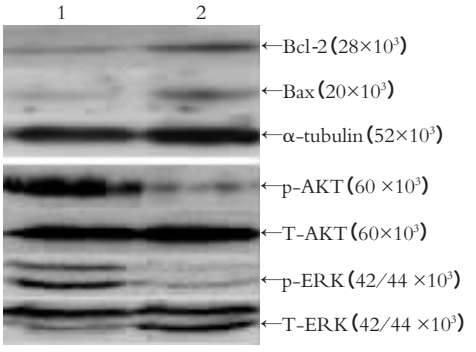


A：正常组大鼠；B：阿霉素组大鼠

图 3　正常组与阿霉素组大鼠心肌细胞 TUNEL 检测结果　（×200）

2.5　心肌组织 AKT 以及 ERK 信号通路的变化

从第 1 次阿霉素注射开始 11 周后，阿霉素大鼠心肌组织 Bcl-2 增加至正常 126%（$P>0.05$）；而 Bax 增加至正常水平的 338%（$P<0.05$）。阿霉素组大鼠心肌组织 p-AKT 的水平降低至正常的 12%（$P<0.05$）；而 p-ERK 的水平则降至正常的 24%（$P<0.05$）（图 4）。



1：正常组；2：阿霉素组

图 4　心肌组织中 p-AKT 以及 p-ERK1/2 表达水平的变化（$n=3$）

3　讨论

阿霉素临床运用受限的主要原因在于其剂量相关的、且具有积累性和不可逆转性的心脏毒性效应。据统计，一个正常人的心脏能够代偿的阿霉素累积剂量大致在 400～550 mg/m^2，超出此水平即可能发生心脏形态结构和功能的严重损伤[5,6]。我们的研究发现，阿霉素组大鼠体质量增长明显减缓，模型后期甚至体质量下降；11 周时阿霉素组心肌细胞排列紊乱，纤维化、空泡变性以及肌纤维丢失，提示心肌结构严重受损。而在心功能检测中，随着建模时间延长，阿霉素组大鼠表现出日益加重的左室收缩功能障碍，提示阿霉素所致心肌病甚或心力衰竭是渐进性的，呈逐渐加重的趋势，甚至引起大鼠死亡。

阿霉素所致心脏损伤机制尚不完全清楚，多数学者认为与较强氧化应激状态触发内源性线粒体依赖性心肌细胞凋亡有关[7,8]。线粒体可通过释放细胞色素 c 调控心肌细胞凋亡，而其对细胞色素 c 的释放受某些促凋亡与抑凋亡蛋白相互作用的影响。我们的实验显示，阿霉素组心肌细胞凋亡明显增加，促凋亡蛋白 BAX 的表达显著升高（抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达与正常组比较虽有升高但是没有统计学差异），这与其他一些研究者的结果比较一致[9]。而在心肌细胞中，某些信号通路（如 AKT 及 ERK 信号通路）正是通过相关激酶的活化影响促凋亡与抑凋亡蛋白的状态，进而影响二者的相互作用，从而起到调控细胞凋亡，保护心肌细胞的作用。研究表明，PI3K/AKT 信号通路的活化能使促凋亡蛋白如 Bad，Bim 和 Bax 发生磷酸化，从而

使其失活；AKT 还能通过抑制 caspase 9 直接调控细胞凋亡[10]。ERK 信号通路的激活可使蛋白激酶 p90RSK 活化，后者可使 Bad 及其它促凋亡蛋白失活，抑制凋亡[11]。我们的结果显示，阿霉素组大鼠心肌组织 p-AKT 及 p-ERK 水平较正常组大鼠明显下降，这与这两条信号通路在阿霉素所致心肌病过程中扮演保护性角色的理论比较一致。但是 Li 等[12]报道小鼠一次注射 15 mg/kg 阿霉素后，p-ERK 的水平明显下降，而 p-AKT 的水平则没有变化；而 Gabrielson 等[9]用雌性大鼠模型观察到 p-AKT 的水平较正常大鼠更高。因此阿霉素在体内对 AKT 及 ERK 两条信号途径的影响并不完全肯定，各研究结果间的差异或许可能与心肌损伤程度，检测的时间以及动物品系、性别有关。

阿霉素致心脏毒性是多条信号途径综合作用的结果，其具体的机制十分复杂，充分了解这些信号途径在阿霉素致心脏毒性中的作用，对于临床开发研制相关药物具有重要的指导意义。能否选择适当的药物抑制或阻断介导阿霉素心脏毒性的某条关键信号通路甚至几条信号通路，为心肌细胞提供持久而有效的保护作用，将成为药物研发新的可能方向。

参考文献：

[1] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, *et al*. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity[J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(2): 185 – 229.

[2] Negoro S, Oh H, Tone E, *et al*. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction[J]. Circulation, 2001, 103(4): 555 – 561.

[3] Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, *et al*. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes *in vitro* and rat cardiac ventricles *in vivo*[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 101(2): 151 – 158.

[4] Li K, Sung R Y, Huang W Z, *et al*. Thrombopoietin protects against *in vitro* and *in vivo* cardiotoxicity induced by doxorubicin[J]. Circulation, 2006, 113(18): 2211 – 2220.

[5] Hequet O, Le Q H, Moullet I, *et al*. Subclinical late cardiomyopathy after doxorubicin therapy for lymphoma in adults[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(10): 1864 – 1871.

[6] Lipshultz S E, Lipsitz S R, Sallan S E, *et al*. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(12): 2629 – 2636.

[7] Kluza J, Marchetti P, Gallego M A, *et al*. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells[J]. Oncogene, 2004, 23(42): 7018 – 7030.

[8] Childs A C, Phaneuf S L, Dirks A J, *et al*. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio[J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4592 – 4598.

[9] Gabrielson K, Bedja D, Pin S, *et al*. Heat shock protein 90 and ErbB2 in the cardiac response to doxorubicin injury[J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1436 – 1441.

[10] Clerk A, Cole S M, Cullingford T E, *et al*. Regulation of cardiac myocyte cell death[J]. Pharmacol Ther, 2003, 97(3): 223 – 261.

[11] Sugden P H. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte[J]. Circ Res, 2003, 93(12): 1179 – 1192.

[12] Li L H, Takemura G, Li Y, *et al*. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-Induced cardiomyopathy[J]. Circulation, 2006, 113(4): 535 – 543.

（编辑 汪勤俭）

（上接 1070 页）

防患者出现脱水、低血糖等症状，可要求患者家属陪同检查。因冲洗或阅读患者影像资料技师离开患者时，应嘱咐其他工作人员或家属观察好患者，一旦出现紧急情况应立即通知技师及上级医师进行急救[4]。

各项规章制度应规范化、制度化，抢救措施悬挂或贴于醒目处，造影技师应具备较高的急救素质：① 高度的责任心，抢救中忙而不乱，杜绝差错事故的发生，造影前做好各项核对工作；② 敏锐的观察力和判断力，具备症状判断认识能力及各类急症病员的观察要点；③ 造影前应详细了解病史，改善高危患者的基础状况，操作过程中密切观察；④ 熟练掌握各种抢救技术，常见抢救药物的剂量及用法、氧气及器械、报警系统等存放点，定期检查并消毒；作为医疗文件记录及过敏患者所用的造影剂瓶应短期保留。

总之，应用非离子造影剂在 IVP 检查中仍存在一定的过敏反应，由于 IVP 检查的特殊性，我们在该检查中的仔细观察和及时急救就显得更加重要。

关键词：非离子型造影剂，静脉尿路造影 过敏反应
中图法分类号：R445.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张秀英. 静脉肾盂造影中碘过敏反应的防治及护理[J]. 中国现代药物应用, 2007, 1(9): 62.

[2] 曹绒霞，王养民，乔够梅. 碘造影剂推注过程中不良反应观察[J]. 西北国防医学杂志, 2006, 27(4): 303.

[3] 郭海峰. 静脉肾盂造影注意事项[J]. 中国民康医学, 2006, 18(3B): 237 – 238.

[4] 沈 辉，潘 军，汪 军，等. 欧乃派克引发特殊迟发过敏反应的分析及对策[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(5): 710 – 711.

（编辑 龙 亮）