文章编号:1000-5404(2013)13-1341-04

论著

环维黄杨星D对阿霉素致小鼠心脏毒性的保护作用

郭 茜[1],郭家彬[2],杨 嵘[2],袁海涛[2],彭双清[2],李 梨[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学和分子生物学教研室[1];100071 北京,军事医学科学院疾病预防控制所,毒理学评价研究中心[2])

[摘要] **目的** 研究环维黄杨星D(cyclovirobuxine D,Cvb-D)对阿霉素(doxorubicin,DOX)所致小鼠心脏毒性的影响。**方法** 52只C57小鼠分为4组($n=12$):正常对照组(Control)、Cvb-D组、DOX组和Cvb-D+DOX组,每天灌胃给予Cvb-D(1 mg/kg)或生理盐水,连续给药4d,第5天单次腹腔注射DOX(15 mg/kg)或生理盐水。心肌组织切片进行Masson's染色,光镜下观察各组小鼠心肌组织纤维化改变;测定血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)水平及组织Caspase-3活性;采用末端标记TUNEL法检测各组心肌细胞凋亡情况;利用Western blot法检测Bcl-2和Bax蛋白表达水平及其比值。**结果** 与正常对照组相比,Cvb-D预处理可明显抑制DOX引起的体质量下降($P<0.05$)以及心肌纤维化等组织形态学改变,显著抑制DOX引起的LDH、CK及Caspase-3活性升高($P<0.05$),缓解DOX引起的心肌细胞凋亡,并显著提高DOX诱导的Bcl-2/Bax蛋白表达比值降低($P<0.05$)。**结论** Cvb-D对DOX心脏毒性具有保护作用,并能够改善DOX引起的细胞凋亡。

[关键词] 环维黄杨星D;阿霉素;心肌细胞;凋亡;心肌纤维化
[中图法分类号] R282.71; R322.11; R979.14 [文献标志码] A

Protective effect of cyclovirobuxine D on mice suffered from doxorubicin-induced cardiotoxicity

Guo Qian[1], Guo Jiabin[2], Yang Rong[2], Yuan Haitao[2], Peng Shuangqing[2], Li Li[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Evaluation and Research Centre for Toxicology, Beijing Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100071, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of cyclovirobuxine D (Cvb-D) on mice suffered from doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity. **Methods** Adult C57 mice were randomly divided into four groups ($n=12$) including a control group, a Cvb-D group, a DOX group and a Cvb-D + DOX group. Mice were given Cvb-D (1 mg/kg) intragastrically once a day for 4 consecutive days, followed by a single intraperitoneal injection of DOX (15 mg/kg) or saline, and the body weight was recorded thereafter. Four days later, the serum levels of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) and the activity of myocardial caspase-3 were determined, and cardiac tissue sections were stained with Masson's trichrome to observe the morphology of myocardium. Apoptotic cells in cardiac tissues were observed by TUNEL assay. The protein expression levels of Bcl-2 and Bax were determined by Western blotting, and the ratio of Bcl-2/Bax was calculated. **Results** Cvb-D administered alone had no obvious effect on mice as compared with the control group. Pretreatment with Cvb-D significantly rescued DOX-induced decrease of body weight in mice ($P<0.05$), and alleviated myocardial fibrosis. Cvb-D significantly inhibited DOX-induced increase in serum levels of LDH and CK and caspase-3 activity ($P<0.05$) in cardiac tissues, and relieved DOX-induced myocardial apoptosis. Cvb-D also improved the ratio of Bcl-2/Bax expression decreased by DOX. **Conclusion** Cvb-D has a protective effect against DOX-induced cardiotoxicity possibly by inhibiting cell apoptosis.

[**Key words**] cyclovirobuxine D; doxorubicin; myocardial cells; apoptosis; myocardial fibrosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81072711, 81102424). Corresponding author: Li Li, E-mail: lili_cq@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(81072711, 81102424)
[通信作者] 李 梨,E-mail:lili_cq@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130329.1016.012.html(2013-03-29)

阿霉素(doxorubicin,DOX)是从灰练丝菌浅灰色变株(Str. peucetius-var. caseus)中提取的广谱高效的抗肿瘤药物,但DOX严重的剂量依赖性心脏毒性使其临床应用受到限制。从20世纪70年代以来,国内外众多学者对DOX心脏毒性作用机制及防治措施进行了有益探索[1-2],但目前仍没有较理想的药物能够预防和治疗DOX心脏毒性。研究表明,DOX心脏毒性与其诱导心肌细胞凋亡密切相关[3]。环维黄杨星D(cyclovirobuxine D,Cvb-D)是提取自黄杨科植物小叶黄杨(*Buxus microphylla Sieb. et Zucc. Var. Rehd. Et Wils.*)及其同属植物的一种生物碱。其化学机构为孕甾烷衍生物,分子式为:$C_{26}H_{46}N_2O$。近年来研究证实,Cvb-D具有抗心肌缺血、提高心肌耐缺氧量、改善冠脉循环和防治心律失常等作用[4-5],对于心律失常、冠心病、心力衰竭等心血管疾病具有良好的预防和治疗效果,其机制可能与清除自由基、提高抗氧化能力、抗细胞凋亡相关[6]。基于Cvb-D的心血管保护作用和DOX心脏毒性特点,本研究旨在观察Cvb-D对DOX心脏毒性的影响并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 注射用盐酸多柔比星注射液(浙江海正药业股份有限公司,批号:20110630);环维黄杨星D(纯度99%,南京泽朗医药科技公司合成,批号:20101223);TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒(Roche公司,批号:110654);Caspase-3活性试剂盒(北京普利来基因技术有限公司,批号:110226);兔抗鼠Bcl-2抗体、Bax抗体(美国Santa Cruz公司),β-actin抗体(北京中杉生物技术有限公司)。

1.1.2 主要仪器 MK3型酶标仪(美国THERMO公司);RM2235型转轮式石蜡切片机(LEICA公司);BX61型荧光显微镜(德国OLYMPUS公司);PL6001-L型电子天平(梅特勒-托利多仪器公司);5417R型低温离心机(美国EPPENDORF公司);7100型全自动生化分析仪(日本HITACHI株式会社);凝胶电泳仪(美国BIO-RAD公司)。

1.1.3 实验动物 健康C57小鼠52只,雌雄各半,体质量(18±2)g,由军事医学科学院动物中心提供,合格证号SCXK-(军)2007-004。动物饲养于SPF环境中,室温20~26 ℃,相对湿度40%~70%,人工昼夜(12 h白昼,12 h黑夜),自由饮水,常规适应性饲养5 d后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药 小鼠分为4组,每组12只,分别为正常对照组(Control组)、Cvb-D组、DOX组和Cvb-D+DOX联合用药组。Control组:生理盐水(NS)预处理,灌胃体积10 mL/kg。Cvb-D组:实验前4 d连续灌胃给予Cvb-D(1 mg/kg),第5天腹腔注射NS;DOX组:实验1~4 d给药生理盐水,第5天腹腔注射DOX(15 mg/kg);Cvb-D+DOX组:实验第1~4天连续灌胃给予Cvb-D(1 mg/kg),第5天腹腔注射DOX(15 mg/kg)。DOX给药后第4天采集血清及组织样本进行后续实验。

1.2.2 血清中LDH和CK活性 末次给药后第4天,采用眼眶取血制备血液上清。血液室温静置30 min,3 500×*g*离心10 min,吸取上清。立即取200 μL放入全自动生化检查仪中,质控血清作为空白对照,进行全自动数据分析。

1.2.3 心脏组织纤维化染色 迅速将小鼠脱颈处死后打开胸腔摘取心脏,预冷的PBS(磷酸盐溶液,pH 7.4)冲洗3次,洗净残血,用锋利的刀片沿长轴将心脏切开,一部分制备组织匀浆,另一部分固定于10倍体积的10%中性福尔马林溶液中。取出固定好的心肌组织进行常规包埋,4 μm连续切片,采用Masson's三步法[3]检测心肌组织纤维化改变,胶原纤维被染成蓝色,正常肌纤维呈红色。

1.2.4 TUNEL法检测心肌细胞凋亡 根据试剂盒说明进行操作,利用荧光素标记的dUTP对凋亡细胞中断裂的DNA的进行标记。将石蜡切片37 ℃孵育30 min,梯度脱水,每样本加50 μL TdT酶,37 ℃孵育60 min,PBS漂洗3次,再滴加50 μL anti-fluorescein antibody工作液,37 ℃孵育30 min。PBS漂洗后,在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.2.5 心肌组织样本制备及Caspase-3活性 用WIP裂解液制备10%心肌组织匀浆,14 000×*g*离心5 min,取上清进行BCA蛋白定量。通过比色法测定p硝基苯胺(pNA)含量。严格按照试剂盒说明进行操作,酶标仪检测405 nm处的光密度。

1.2.6 Bcl-2和Bax蛋白表达 取30 μg总蛋白进行电泳,电压为8 V/cm凝胶,约15 min,进入分离胶后增加到15 V/cm凝胶,当染料到达分离胶底部时结束。随后转印至PVDF膜,电流的大小(mA)用膜面积(cm^2)×2计算。转膜后用10%脱脂奶粉封闭,加入1∶500的Bcl-2抗体和1∶1 000的Bcl-2抗体4 ℃孵育过夜。TBST洗膜3次,每次10 min,二抗(稀释度1∶2 000)室温孵育1 h,最后ECL显影。利用Quantity One软件进行半定量分析,光密度扫描半定量分析显影条带。

1.3 统计学分析

实验结果采用$\bar{x}\pm s$进行描述,用SPSS 18.0统计软件对数据进行分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差别检验(LSD test)。

2 结果

2.1 小鼠体征及体质量

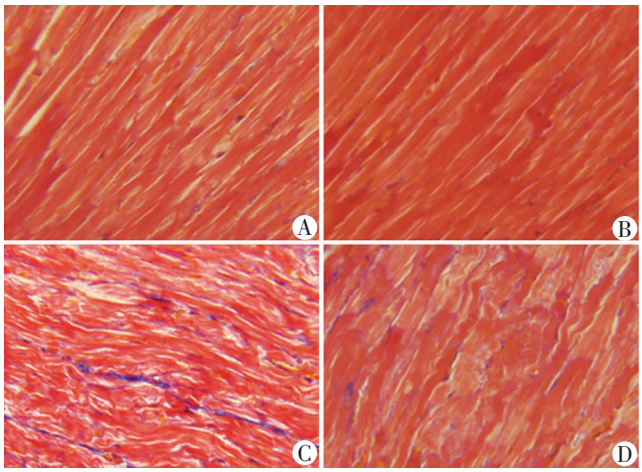
Control组及Cvb-D组小鼠状况良好,无不良体征出现;DOX组小鼠出现行动迟缓、皮毛不光顺、眼角有分泌物等情况;Cvb-D+DOX动物一般状况较DOX好。每天按时称量动物体质量,DOX给药后第4天体质量与实验第1天相比,Control组及Cvb-D组小鼠体质量分别增长(5.45±0.33)%、(5.57±0.98)%,其余2组均出现体质量下降,其中DOX组体质量下降(7.20±0.71)%,Cvb-D+DOX组降低(3.48±0.34)%,与DOX组相比降低程度显著减轻($P<0.05$)。

2.2 血清中 LDH 和 CK 水平

与 Control 组(272.14 ± 66.48,423.00 ± 40.71)相比,DOX 组血清中的 LDH(596.29 ± 72.19)和 CK(1 233.20 ± 91.91)酶活力显著上升($P<0.05$)。与 DOX 组相比,Cvb-D + DOX 组两种血清酶的活力(383.38 ± 21.61,480.86 ± 38.81)显著降低($P<0.05$)。与 Control 组相比,Cvb-D 组 LDH 和 CK 活力(277.63 ± 39.97,672.33 ± 47.33)无明显差异($P>0.05$)。

2.3 心肌组织纤维化改变

Control 组和 Cvb-D 组心肌纤维排列整齐,呈束状,结构正常。DOX 组心肌纤维呈波浪状,排列紊乱,部分心肌纤维断裂,并有部分心肌纤维化的蓝染。Cvb-D + DOX 组心肌心肌纤维排列不齐,心肌纤维化现象减少。单独给予 Cvb-D 不影响心肌组织结构。见图 1。

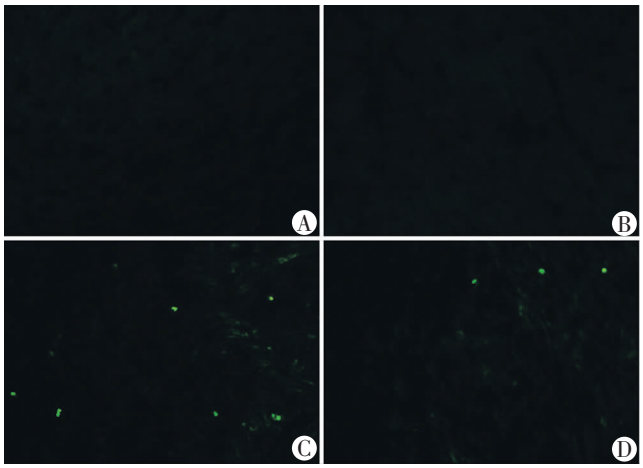


A:Control 组;B:Cvb-D 组;C:DOX 组;D:Cvb-D + DOX 组

图 1 各组小鼠心肌组织纤维化改变 (Masson's ×400)

2.4 心肌细胞凋亡

经 TUNEL 染色发现,Control 组及 Cvb-D 组仅见极少数散在的凋亡细胞;给予 DOX 后凋亡心肌细胞数明显增加,Cvb-D 预处理后凋亡细胞数明显下降。见图 2。



A:Control 组;B:Cvb-D 组;C:DOX 组;D:Cvb-D + DOX 组

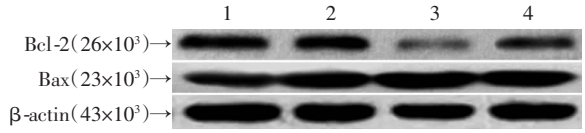
图 2 TUNEL 法检测各组小鼠心肌细胞凋亡 (×200)

2.5 心肌组织 Caspase-3 活性

与 Control 组(16.92 ± 2.29)相比,DOX 组(27.62 ± 2.67)心肌组织 Caspase-3 水平显著上升($P<0.05$)。给予 Cvb-D 治疗(24.52 ± 1.38),能够抑制 Caspase-3 水平升高,与 DOX 组相比差异显著($P<0.05$)。Cvb-D 组(19.82 ± 0.99)与 Control 组相比无明显差异($P>0.05$)。

2.6 心肌组织中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达变化

与 Control 组比较,DOX 组 Bcl-2 蛋白表达显著降低、Bax 表达显著升高($P<0.05$),其中 Bcl-2/Bax(0.36 ± 0.03)比正常组(1.47 ± 0.28)减少($P<0.05$);Cvb-D + DOX 组 Bcl-2 降低程度比 DOX 组相比明显减少、Bax 表达升高程度明显降低($P<0.05$),其中 Bcl-2 与 Bax 比值(0.83 ± 0.09)比 DOX 增加 1 倍($P<0.05$)。Cvb-D 组(1.59 ± 0.14)与 Control 组相比无统计学差异($P>0.05$)。见图 3。



1:Control 组;2:Cvb-D 组;3:DOX 组;4:Cvb-D + DOX 组

图 3 Western blot 检测各组小鼠心肌组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

3 讨论

本研究通过整体动物实验证明,Cvb-D 可以通过调控凋亡过程关键蛋白的水平与表达抑制其引起心肌细胞凋亡,并有效地减轻 DOX 诱导的心肌损伤。Cvb-D 预处理可以明显抑制 DOX 引起的动物体质量降低及血清 LDH、CK 等指标升高,并缓解 DOX 引起的心肌组织纤维化病变。同时,Cvb-D 能够拮抗 DOX 引起的 Caspase-3 活性升高、Bcl-2 表达下调以及 Bax 表达上调,从而抑制 DOX 引起的心肌细胞凋亡。

Cvb-D 心脏保护作用研究通常主要应用大鼠、豚鼠以及猪等作为实验动物模型,常用缺血再灌注、异丙肾上腺素(Iso)[7-8]等方法建立心肌损伤模型,观察其对于心肌缺血、心律失常等心肌病的作用。在本课题中,我们采用小鼠作为实验模型对 Cvb-D 抗 DOX 诱导心肌损伤作用进行研究,验证了 Cvb-D 对于 DOX 心脏损伤小鼠的心脏保护作用。

血清中肌酸激酶(creatine kinase,CK)及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)的活力是检测心功能损伤的敏感指标,可准确的反映心脏受损的程度[8]。通过对 CK、LDH 进行检测,能够较为特异性地反映 DOX 引起的心肌细胞的损伤情况以及 Cvb-D 对其的保护作用。本研究结果提示,DOX 给药后 LDH 和 CK 变化趋势一致,验证了 DOX 单次给药建立小鼠心肌损伤模型的可行性。此外,Cvb-D 可以保护 DOX 引起的细胞膜通透性改变,减轻心肌酶的漏出,对心肌细胞具有保护作用。

心肌纤维化(myocardial fibrosis)是 DOX 心脏毒性典型的心肌病理学改变。有研究表明心肌纤维化与细

胞凋亡有着紧密的联系,细胞凋亡参与了病毒感染、高血压、心肌病以及超氧化物作用等情况下出现的心肌纤维化过程。Hong 等[9]研究发现,扩张型心肌病导致的心肌细胞减少主要与心肌细胞以及心肌间质的凋亡有关。Cvb-D 可显著减轻 Iso 诱发的心肌缺血导致的心肌肌纤维排列紊乱,坏死细胞胞浆溶解等病理改变[10]。研究结果提示,Cvb-D 对 DOX 引起心肌纤维化的保护作用可能与抗细胞凋亡有关。

在 DOX 心肌病发生和发展的过程中,细胞凋亡发挥着至关重要的作用,而 Cvb-D 能够显著降低心肌细胞凋亡率[11]。体内细胞凋亡的过程受到一系列基因的严格调控,在凋亡信号介导的线粒体途径中,当细胞受到凋亡信号的刺激后,凋亡诱导因子从线粒体释放到胞浆,激活 Caspase 级联反应,从而诱导凋亡发生。其中,Caspase-3 被证实处于该级联反应的下游,是细胞凋亡过程中关键的蛋白酶。Bcl-2 家族蛋白是由抗凋亡蛋白(如 Bcl-2 等)和促凋亡蛋白(如 Bax 等)组成,作为凋亡调节蛋白能够调节 Caspase-3 活性。Bcl-2 和 Bax 可通过形成同源或异源二聚体,双向调节细胞凋亡,其具有促进和抑制细胞凋亡的双重作用[12]。Bcl-2/Bax 比值对于决定细胞是否进入凋亡状态具有重要意义。本研究表明,Cvb-D 具有拮抗 DOX 心脏毒性引起的心肌细胞凋亡的作用,我们的结果与 Kalyanaraman 等[13]的报道相一致,提示 Cvb-D 可能通过调控凋亡过程中关键因子 Caspase-3 的活性,对 DOX 心脏毒性引起的心肌细胞凋亡起到保护作用。此外,调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平可能是 Cvb-D 抗 DOX 细胞凋亡的分子作用机制之一。关于 Cvb-D 抗 DOX 心脏毒性以及改善 DOX 诱导心肌细胞凋亡的机制还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Berthiaume J M, Wallace K B. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity[J]. Cell Biol Toxicol, 2007, 23(1): 15 – 25.

[2] Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, *et al*. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes *in vitro*[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(4): 837 – 846.

[3] Arola O J, Saraste A, Pulkki K, *et al*. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis[J]. Cancer Res, 2000, 60(7): 1789 – 1792.

[4] Yu B, Fang T, Lu G H, *et al*. Beneficial effect of Cyclovirobuxine D on heart failure rats following myocardial infarction[J]. Fitoterapia, 2011, 82(6): 868 – 877.

[5] 陈爱芳, 崔志清. 黄杨宁的临床和实验研究近况[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 767 – 769.

[6] 杨芳芳, 胡申江. 环维黄杨星 D 对大鼠心脏功能及血压的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(4): 255 – 258.

[7] 周玖瑶, 孙毅东, 邓素坚, 等. 环维黄杨星 D 对心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(4): 285 – 288.

[8] Hu D, Liu X, Wang Y, *et al*. Cyclovirobuxine D ameliorates acute myocardial ischemia by K(ATP) channel opening, nitric oxide release and anti-thrombosis[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 569(1/2): 103 – 109.

[9] Hong B K, Kwon H M, Byun K H, *et al*. Apoptosis in dilated cardiomyopathy[J]. Korean J Intern Med, 2000, 15(1): 56 – 64.

[10] 裴天仙, 徐长庆, 于靖, 等. 槲皮素抗阿霉素诱导的培养心肌细胞的凋亡[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 534 – 538.

[11] Zhao J, Wang Q, Xu J, *et al*. Cyclovirobuxine D inhibits the currents of HERG potassium channels stably expressed in HEK293 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 660(2/3): 259 – 267.

[12] Konorev E V, Vanamala S, Kalyanaraman B. Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45(12): 1723 – 1728.

[13] Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, *et al*. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 234 – 235(1/2): 119 – 124.

(**收稿**:2012-12-19;**修回**:2013-03-05)

(编辑 张 维)

2013 重庆心血管临床科研设计与论文发表学术交流会通知

由《第三军医大学学报》、The American Journal of Medicine 联合主办的“2013 重庆心血管临床科研设计与论文发表学术交流会”将于 7 月 21 日 14:00 – 18:00 在第三军医大学第二教学馆学术厅召开。本次会议以“提高心血管专业人员临床科研和论文发表能力”为主题,邀请 The American Journal of Medicine 现任主编 Joseph S. Alpert 教授、北京阜外心血管病医院荆志诚教授及重庆市心血管内科知名专家、流行病学专家做专题演讲,促进心血管专业临床科研学术交流与成果展示。诚邀本刊审者、读者、作者参加!

联 系 人:龙 亮 **通信地址**:重庆市沙坪坝区第三军医大学学报编辑部

联系电话:(023)68752189-87 **邮政编码**:400038 **E-mail**:longliang81@163.com