基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1806-04

# 促红细胞生成素对阿霉素诱导的心肌细胞凋亡的预防作用研究

唐汉博,高百顺,宋 兵,李天成,杨小芳
(兰州大学第一医院心血管外科,兰州 730000)

【摘 要】目的:研究促红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)预防阿霉素(Doxorubicin,DOX)诱导的心肌细胞凋亡的作用。方法:原代培养乳鼠心肌细胞,随机分为空白对照组、模型对照组及不同浓度(6.25、25、100 IU/ml)EPO 预处理组,各组预处理 24 h 后加入 5 μg/ml 的 DOX。24 h 后采用流式细胞术检测细胞凋亡率,甲基噻唑基四唑(Methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)法检测细胞活力,流式细胞术检测凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果:与空白对照组相比模型对照组细胞活力明显减低,凋亡率显著增高。不同浓度 EPO 预处理的心肌细胞活力较模型对照组显著增高,细胞凋亡率显著降低,并且凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达增高,凋亡蛋白 Bax 的表达降低。结论:EPO 对 DOX 诱导的心肌细胞的损伤具有预防作用,其机制可能与调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 有关。

【关键词】促红细胞生成素;阿霉素;心肌细胞;凋亡
【中国图书分类法分类号】R969.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-10

# Attenuation of erythropoietin to doxorubicin-induced apoptosis in myocardial cells of rats

*TANG Han-bo, et al*
(*Department of Cardiovascular Surgery, the First Hospital of Lanzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the preventive effect of erythropoietin (EPO) on doxorubicin (DOX)-induced apoptosis in myocardial cells of rats. *Methods*: Cells were cultured in vitro and treated with different concentrations (6.25, 50, 100 IU /ml) of EPO for 24 hours, then the myocardial cells were exposed to DOX (5 μg/ml). After 24 hours, the apoptosis ratio was detected by flow cytometry, and cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium. The expression of apoptotic protein Bcl-2/Bax was detected by flow cytometry. *Results*: The antiapoptotic effect of EPO was in a concentration manner. The survival rate of cells was increased, and the apoptosis ratio decreased. *Conclusion*: EPO has protective effect against DOX -induced apoptosis in myocardial cells. EPO may increase the expression of apoptosis protein Bcl-2/Bax and decrease the apoptosis ratio.

【Key words】Erythropoietin; Doxorubicin; Myocardial cell; Apoptosis

当机体处于缺氧状态时促红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)可以由缺氧诱导因子(Hypoxia inducible factor,HIF)家族诱导产生,EPO 是一种多功能细胞因子超家族成员,不仅存在于血液系统,还存在于人体的其它组织如肝脏、大脑、子宫、血管内皮细胞、平滑肌细胞、心肌细胞等。EPO 与其受体(Erythropoietin receptor,EPO-R)结合后通过一系列信号转导途径减少细胞凋亡,提高细胞的生存率。心血管系统疾病大多与细胞凋亡有关,如心衰、心肌炎、各种类型的心肌病以及缺血-缺氧再灌注损伤等均为心肌细胞凋亡所导致的。最近的许多研究都利用阿霉素(Doxorubicin,DOX)来诱导心肌细胞凋亡模型,进行心肌细胞凋亡机制以及药物应用方面的研究。在大鼠自身免疫性心肌炎模型中,EPO 可以通过减弱炎症细胞的浸润和细胞因子的表达改善心功能和心脏炎症,本研究将研究 EPO 对 DOX 诱导的心肌细胞凋亡的预防作用。

作者介绍:唐汉博(1975-),男,主治医师,硕士,研究方向:心血管外科。
通讯作者:宋 兵,男,副教授,E-mail:joyees@sina.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

Sprague Dawley 0~2 d 龄乳鼠 20~30 只(兰州大学医学院实验动物中心提供)。注射用盐酸阿霉素(浙江海正药业股份有限公司),Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco,DMEM)(GIBCO 公司);胰蛋白酶 Difcol(250 GIBCO 公司);胎牛血清(浙江杭州四季青公司);重组促红细胞生成素(Recombinant human erythropoietin,rhEPO)(以色列 ProSpec-Tany TechnoGene Ltd 公司);双抗(Penicillin/Strepto

mycin)(美国 Sigma 公司);噻唑蓝(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Fluka 公司);十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)(Sigma 公司)。

1.2 乳鼠心肌细胞培养

取 1~3 d 龄的 SD(Sprague-Dawle,SD)乳鼠,雌雄不拘。无菌条件下取心室肌,剪成 1 $mm^3$ 大小的碎块,用 DMEM 洗 1 次。弃去带血的上清液,组织碎块中加入 0.125%的胰蛋白酶与 0.1% 二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetie acid,EDTA)的消化液分次消化为单细胞悬液。经洗涤离心后悬浮与含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液,采用差速贴壁 90 min以纯化心肌细胞,加入 0.1 mmol/L 5- 溴脱氧核苷以抑制成纤维细胞的增殖,接种于 25 ml 细胞培养瓶中,置 37℃,95%空气,5%$CO_2$ 的孵育箱中进行原代培养。隔日换培养基,第 4 d 的细胞即可用于实验,实验前用无血清的 DMEM 培养 24 h,可使细胞周期同步化。

1.3 心肌细胞分组

将培养 4 d 的心肌细胞随机分组,包括空白对照组、模型对照组及不同浓度(6.25、25、100 IU/ml)rhEPO 处理组。各组预处理 24 h 后加入 5 μg/ml 的 DOX。

1.4 MTT 检测细胞活力

各组细胞培养 24 h 后 DMEM 培养液调整细胞浓度至 $6\times10^4$ 个/ml,在 96 孔培养板中以 90 μl /孔加入细胞悬液,每组细胞设 5 个复孔;培养 24 h 后以 10 μl /孔加入 EPO 或溶媒,继续培养 24 h 再加入 DOX 培养 24 h 终止实验。于实验终止前 4 h 加入 MTT(10 μl /孔),实验终止时加入 10% SDS (100 μl/孔),放置 12 h 后震荡 10 min,于波长 570 nm 处测定吸光度值(OD 值)。根据下列公式计算存活率:

细胞存活率(%)=(处理组平均 OD 值 - 空白对照组平均 OD 值)/(正常对照组平均 OD 值 - 空白对照组平均 OD 值)×100%

按照存活率初步了解 EPO 对 DOX 诱导的心肌细胞凋亡的抑制作用。

1.5 流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测凋亡

各组细胞培养 24 h 后 DMEM 培养液细胞浓度至 $1\times10^5$ 个/ml,每 100 ml 培养瓶加入细胞悬液 8 ml,置 37℃、5% $CO_2$ 培养箱培养 24 h 后 1 ml/瓶加入不同浓度 EPO 或溶媒,继续培养 24 h 再加入 1 ml/瓶 DOX(5 μg/ml),于 37℃、5% $CO_2$ 培养箱继续培养 48 h 后加入 0.25%胰蛋白酶消化细胞,离心(1 000 r/min,5 min)收集细胞,弃上清,将细胞转移至 1.5 ml Eppendorf 管中,然后按下述步骤操作:①用预冷的 PBS(pH 7.4)将细胞沉淀离心(800 r/min,5 min)洗 2 次,弃上清;②加入 100 μl Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin V(200 μg/ml) 10 μl,室温避光静置 30 min;③再加入 PI(50 μg /ml)5 μl,避光反应 5 min 后,加入 400 μl Binding Buffer,立即用 FACScan 进行流式细胞术检测分析。

1.6 流式细胞仪检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达

细胞的培养、实验分组及细胞沉淀的收集如 Annexin V/PI 双染法所述,然后按下述步骤操作:①用预冷的 PBS 洗 2 次;②收集好的细胞沉淀中加入 100 ml PBS,制备为细胞悬液,加入破膜剂 A 100 ml,避光固定 15 min;③加入 PBS 洗 2 遍,保留细胞沉淀;④加入固定剂 B 100 ml。在 Bax 样品中加入 Bax 抗体 2 ml;在 Bcl-2 样品中加入 Bcl-2 抗体 5 ml;⑤摇匀后置 37℃、5% $CO_2$ 孵箱中孵育 15 min; ⑥离心 (1 000 r/min,5 min),弃上清,保留细胞沉淀,后用 0.5 ml 洗涤缓冲液重悬细胞沉淀,再次离心弃上清,保留细胞沉淀,后用 0.5 ml 洗涤缓冲液重悬细胞沉淀,流式细胞仪检测,用 Multicycle 软件分析 Bax 和 Bcl-2 的表达。

1.7 统计方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 进行统计分析。总体组间比较用单因素 ANOVA 分析,多样本两两之间均数比较采用 SNK-$q$ 检验,$P<0.01$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 MTT 法检测细胞活力

仅加入 DOX 的模型对照组与空白对照组相比对细胞的损伤较大有显著差异($P<0.01$)。不同浓度 EPO 处理组细胞活力与模型对照组之间差异具有统计学意义($P<0.01$),各处理组之间也有显著性差异($P<0.01$)(表 1)。

**表 1 DOX 毒性作用下 EPO 对大鼠心肌细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | OD 值 | 细胞存活率(%) |
|---|---|---|
| 空白对照组 | 0.678 ± 0.008 | 97.55 ± 1.07 |
| 模型对照组 | 0.283 ± 0.005# | 53.82 ± 0.89# |
| 低 EPO 预处理组 | 0.479 ± 0.004* | 58.85 ± 0.44* |
| 中 EPO 预处理组 | 0.508 ± 0.006* | 64.87 ± 0.83* |
| 高 EPO 预处理组 | 0.583 ± 0.004* | 76.79 ± 0.94* |

注:与空白对照组比较,#$P$ 均 <0.01;与模型对照组比较,*$P$ 均 <0.01;低、中、高 EPO 组组间比较 $P$ 均 <0.01

2.2 流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测凋亡

EPO 干预细胞培养过程可以减少细胞凋亡,DOX 处理组细胞凋亡率为 60.16% ± 1.57%,随着 EPO 浓度由 6.25 IU/ml 增加到 25 IU/ml 和 100 IU/ml,细胞凋亡率分别下降至 27.13% ± 2.48%,19.27% ± 2.47%,10.79% ± 0.54%,EPO 抗凋亡作用呈浓度依赖性(表 2,图 1)。

**表 2 DOX 毒性作用下 EPO 对大鼠心肌细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 细胞凋亡率(%) |
|---|---|
| 空白对照组 | 8.61 ± 0.04 |
| 模型对照组 | 60.18 ± 0.05# |
| 低 EPO 预处理组 | 27.10 ± 0.11* |
| 中 EPO 预处理组 | 19.26 ± 0.41* |
| 高 EPO 预处理组 | 10.77 ± 0.42* |

注:与空白对照组比较,#$P$ <0.01;与模型对照组比较,*$P$ 均 <0.01;低、中、高 EPO 组组间比较 $P$ 均 <0.01

2.3 流式细胞仪检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达

DOX 和空白对照组相比可以诱导 HUVECs 凋亡,凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达下降、Bax 的表达增高($P<0.01$),并且当加入不同浓度的 EPO 时凋亡蛋白的表达呈浓度依赖性(表 3、图 2、3),各组均与 DOX 组及各组之间差异具有统计

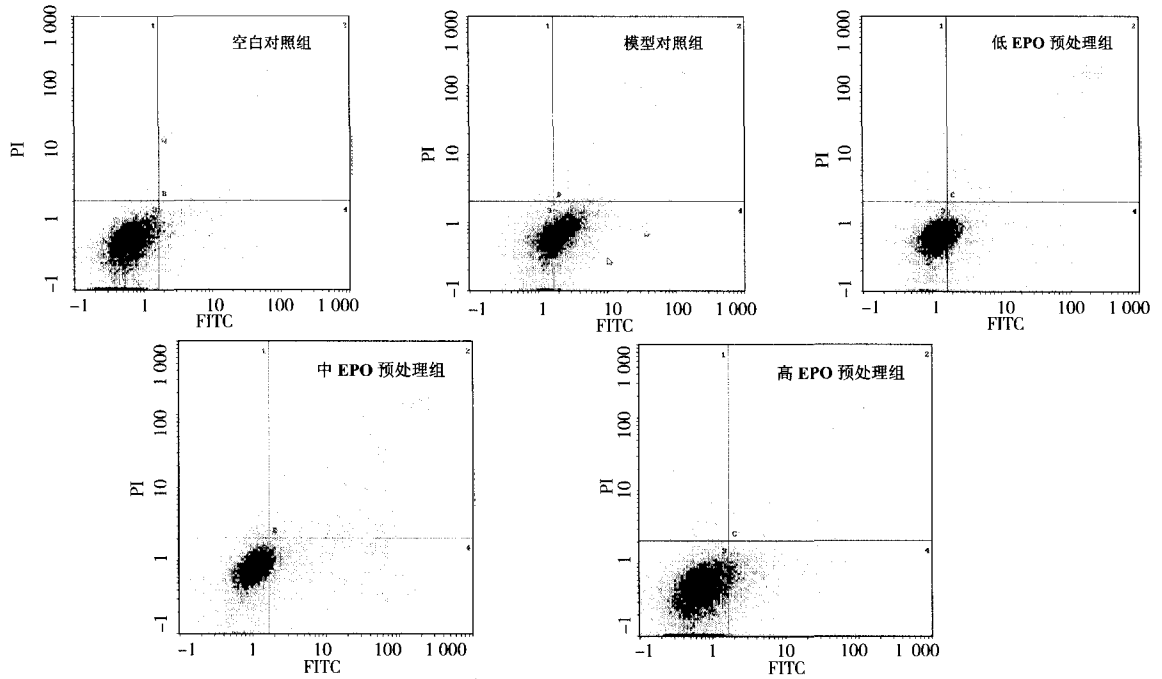



图 1 DOX 毒性作用下,EPO 对大鼠心肌细胞凋亡率的影响

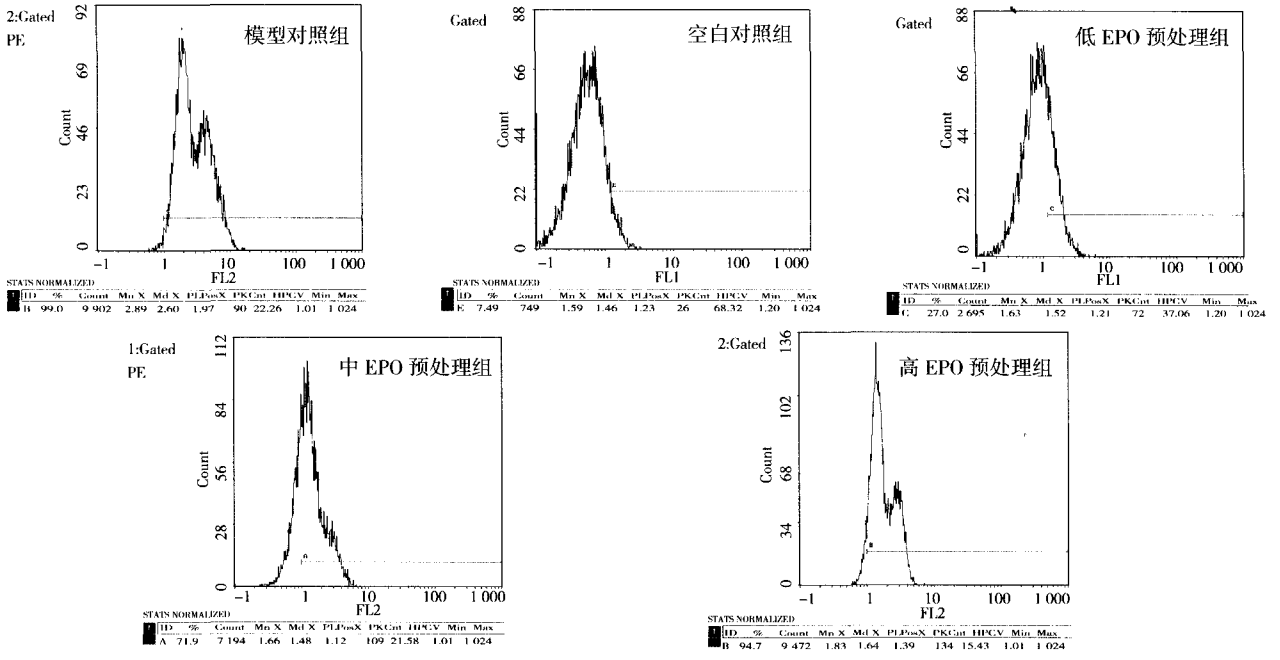



图 2 DOX 诱导的心肌细胞凋亡 Bcl-2 蛋白的表达

学意义($P<0.01$)。

表 3 DOX 诱导的心肌细胞凋亡时 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达($\bar{x}\pm s$,%)

| 组 别 | Bcl-2 | Bax |
|---|---|---|
| 空白对照组 | 98.31 ± 0.52 | 52.78 ± 0.90 |
| 模型对照组 | 7.79 ± 0.49# | 98.16 ± 1.07# |
| 低 EPO 预处理组 | 24.90 ± 0.46* | 82.96 ± 0.57* |
| 中 EPO 预处理组 | 72.35 ± 0.42* | 72.34 ± 0.49* |
| 高 EPO 预处理组 | 92.07 ± 0.43* | 64.10 ± 1.23* |

注:与空白对照组比较,#$P<0.01$;与模型对照组比较,*$P$ 均 $<0.01$;低、中、高 EPO 组组间比较 $P$ 均 $<0.01$。

## 3 讨 论

阿霉素是一个有效的抗肿瘤药物,但是因其心脏毒性而受到使用限制。由于阿霉素的抗肿瘤作用与其心脏毒性无明显关系[1],所以已有许多研究将 DOX 与阻断其心脏毒性的制剂联合应用,以期望即减少毒性又不影响其抗肿瘤活性。目前的研究对阿霉素的心脏毒作用的发病机制仍有争议[2]。有一部分学者认为,其发生的可能机制是自由基[3]、钙超载、铁代谢失衡及线粒体损伤等多因素共同作用的结果[4],但在 DOX 诱导的心肌炎的发生发展过程中细胞凋亡可能发挥更重要的作用。EPO 可以抵抗 DOX 的这一作用,用 DOX 诱导心肌

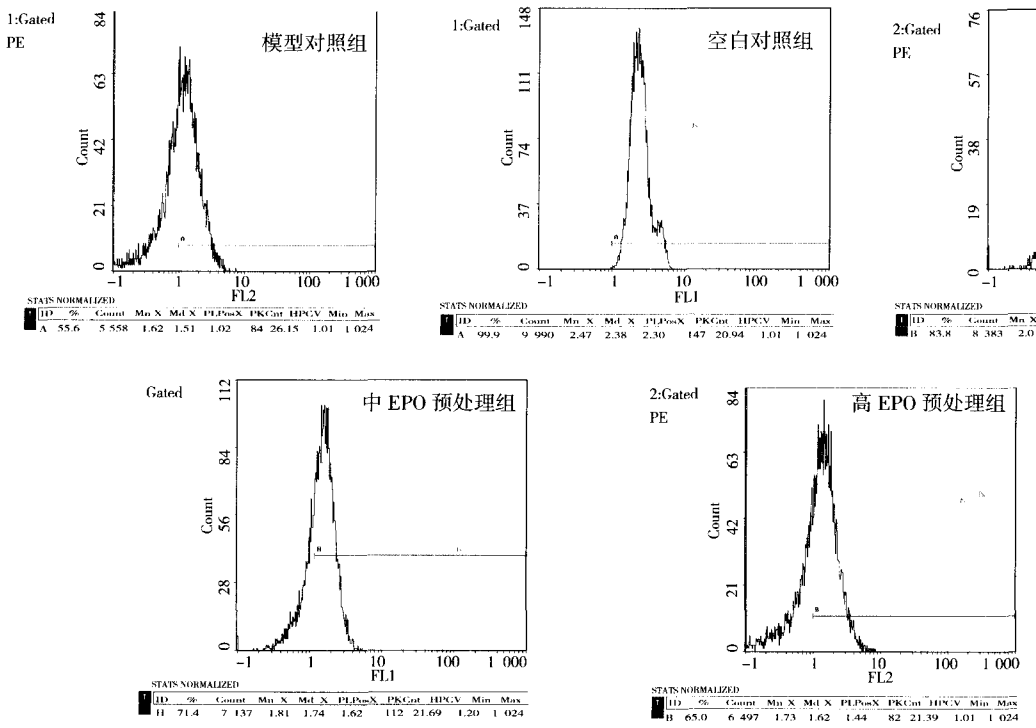



**图 3 DOX 诱导的心肌细胞凋亡 Bax 蛋白的表达**

细胞凋亡模型，给予 EPO 预处理的乳鼠心室肌细胞可以很大地减轻心肌细胞的凋亡[5]。

本实验结果表明，DOX 导致心肌细胞损伤时胞活力显著降低，并且 EPO 可以提高 DOX 诱导的大鼠心肌细胞的活力及降低凋亡率。在大鼠自身免疫性心肌炎模型中，EPO 可以通过减弱炎症细胞的浸润和细胞因子的表达改善心功能和心脏炎症[6]。但是本实验对 EPO 抗心肌细胞凋亡的传导通路未做研究，有待我们进一步探索。

另外，本研究还发现 EPO 可以增高凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达，降低凋亡蛋白 Bax 的表达。有实验表明促凋亡蛋白 Bax 在阿霉素组中明显增高，抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达在阿霉素组中明显下降，结果提示阿霉素引起的心肌细胞损伤与细胞凋亡有密切的关系[7]。2006 年 Mitsuma 等人首次提出 EPO 在实验性的自身免疫性心肌炎中的心肌保护作用，主要是通过调节炎症和抑制细胞凋亡实现的。通过心肌肌浆球蛋白免疫 7 周的 Lewis 大鼠制成自身免疫性心肌炎模型，随后分为 EPO 治疗组和对照组。22 d 后，EPO 明显改善了自身免疫性心肌炎的心功能和组织学病变程度；同时抑制了炎症介质 TNF$\alpha$ 和 IL-6 的表达；并且降低了心肌细胞的凋亡。与正常鼠相比，EPO 的受体在自身免疫性心肌炎大鼠中的表达上调[8]。

总之，本结果表明 EPO 预处理的的心肌细胞可下调凋亡蛋白 Bax 及上调 Bcl-2 的表达，以减轻 DOX 诱导的细胞凋亡，提高细胞活力，提示 EPO 对 DOX 诱导的心肌细胞凋亡有一定的抑制作用。EPO 的这一作用可用于心肌炎的治疗和预防，并且也可预防 DOX 等蒽环类药物抗肿瘤时对心肌的损害。

## 参 考 文 献

[1] 李少波，陈 武.药源性心血管疾病[M].北京：中国医药科技出版社，1998.121-127.

[2] Muraoka S, Miura T. Free radicalsmediate cardiac toxicity induced by adriamycin[J]. Yakugaku Zasshi, 2003, 123(10): 855-866.

[3] Yang G M, Sun S T, Li S Q, et al. Effect of beta-carotene on adriamycin induced changes of expression of mRNA of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in myocardial tissue of rats[J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(4): 465-470.

[4] Wu S, Ko Y S, Teng M S, et al. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endiothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies[J]. Mol Cell Cardiol, 2002, 34(12): 1959-1607.

[5] Kim K H, Oudit G Y, Backx P H. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324(1): 160-169.

[6] Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, et al. Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2007, 21(1): 17-27.

[7] 朱 玲，金正勇.凋亡细胞因子在阿霉素心肌病模型中的表达[J].中国妇幼保健，2007，22(17)：2373-2376.

[8] Mitsuma W, Ito M, Kodama M, et al. Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344(3): 987-994.

（责任编辑：冉明会）