

当归超滤物抗阿霉素致心肌细胞损伤的作用研究

畅艳娜 李伟君 孙少伯 刘 凯 李应东

摘 要 **目的** 探讨当归超滤物抗阿霉素致乳鼠心肌细胞损伤的作用及其可能机制。**方法** 用阿霉素诱导 Wistar 乳鼠原代培养的心肌细胞建立损伤模型,用不同浓度的当归超滤物进行干预,实验分为正常对照组、阿霉素损伤模型组、当归超滤物不同浓度(3.75、7.5、15g/L)干预组。四氮唑蓝(MTT)法检测各组心肌细胞的存活率,2,4-二硝基苯肼显色法检测各组细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量, Ca^{2+} -ATP 酶试剂盒测定 Ca^{2+} -ATP 酶活性,蛋白印迹半定量测定各组细胞内 caspase-3、caspase-12 蛋白的表达。**结果** 与阿霉素损伤模型组比较,当归超滤物各干预组心肌细胞存活率明显升高,LDH 含量显著降低($P < 0.05$), Ca^{2+} -ATP 酶活性显著提高($P < 0.05$),caspase-3、caspase-12 表达显著降低($P < 0.05$)。**结论** 当归超滤物具有拮抗阿霉素致心肌细胞损伤的作用,其机制与其增强细胞 ATP 酶活性、降低细胞内 LDH 释放、抑制凋亡因子释放有关。

关键词 当归 阿霉素 心肌细胞 Caspase-3 Caspase-12

[中图分类号] R287 [文献标识码] A

Study on the Effect of Angelica Eextract on Ultrafiltration Membrane on Adriamycin Damage in Cardiomyocytes. Chang Yanna, Li Weijun, Sun Shaobo, Liu Kai, Li Yingdong. College of Combination of Chinese Traditional with Western Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Gansu 730000, China

Abstract Objective To investigate whether the administration of the angelica extract on ultrafiltration membrane able to protect cardiomyocytes from adriamycin injury of rats and its potential mechanism. **Methods** Myocardial cells from 2 to 3 days neonatal rats were cultured in DF medium and the cellular injury was induced by adriamycin. The angelica extract on ultrafiltration membrane was given in different concentrations. The experiments were divided into normal control group, adriamycin damage model group and medicine of different concentrations intervention group. Survival rate of myocardial cells was assessed by MTT, and the release of lactate dehydrogenase (LDH) in culture medium was evaluated by means of 2,4 dinitro-phenylhydrazine colorimetric reaction. Ca^{2+} -atpase release quantity was using Ca^{2+} -atpase kit methods detected, caspase-3, caspase-12 proteins were observed and determined with immunohistochemical western blot method. **Results** The angelica extract on ultrafiltration membrane could protect the cardiomyocytes from adriamycin injury, decrease LDH ($P < 0.05$), increase Ca^{2+} -atpase activity ($P < 0.05$), and downregulate caspase-3, caspase-12 proteins expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The angelica extract on ultrafiltration membrane has protection on cardiomyocytes injured by adriamycin through improving cell atpase content, reducing the intracellular LDH release and inhibiting apoptosis related factor release.

Key words Angelica; Adriamycin; Cardiomyocytes; Caspase-3; Caspase-12

阿霉素(ADR)是临床上一种常见的高效抗肿瘤药物,其主要不良反应以心脏毒性较多见,且呈剂量依赖性,所以在一定程度上限制了该药在临床上的长期应用。中药当归有效成分具有清除自由基、抗氧化、抗心律失常、改善心肌细胞代谢活动等作用^[1-3]。本实验以阿霉素诱导 Wistar 乳鼠原代培养的心肌细胞建立损伤模型,用不同浓度的当归超滤物进行干预,探讨其对阿霉素致乳鼠心肌细胞损伤的作用及可能机制。

材料与方法

1. 材料:(1)实验药物:当归超滤物由兰州佛慈制药厂与甘肃省膜科所联合制备。(2)实验动物:新生 1~3 天 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄不拘,由甘肃中医学院 SPF 级实验动物中心提供,实验动物合格证号:scxk(甘)2011-0001。(3)试剂和仪器:DMEM 培养基、HamF12 培养基(Sigma 公司产品),阿霉素(浙江海正药业股份有限公司,H33021980),四氮唑蓝(MTT)(华美生物工程公司产品),LDH 试剂盒(南京建成生物工程公司), Ca^{2+} -ATP 酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,20120714),caspase-3(北京中杉金桥生物技术有限公司,2104658),caspase-12(北京中杉金桥生物技术有限公司,2103812)。

2. 方法:(1)心肌细胞原代培养:心肌细胞原代培养方法,取新生 1~3 天 Wistar 乳大鼠(雌雄兼用),在无菌的条件下,

基金项目:甘肃省中医药科研基金资助项目(07-gzk-31)

作者单位:730000 兰州,甘肃中医学院中西医结合学院

通讯作者:李应东,博士生导师,电子信箱:lydj412@163.com

取出心脏,将心肌组织剪成约 1mm^3 大小,加入 0.04% 的胰蛋白酶消化 2 次, 37°C 水浴,振荡 10min,换用 0.05% 的 II 型胶原酶消化, 37°C 水浴,振荡 8min,直至组织块消化完全^[4]。收集除前 2 次以外的消化液移入离心管,加等量的完全培养基终止消化,离心机离心 10min, 1000r/min,用完全培养基吹悬细胞沉淀,培养于 5% CO_2 细胞培养箱中。1.5h 后差速贴壁法纯化心肌细胞,并调整细胞浓度 1×10^6 个/毫升,继续培养于 5% CO_2 培养箱中。36 ~ 48h 换液 1 次,培养 48 ~ 72h 后进行实验。倒置相差显微镜观察心肌细胞成长过程,对活细胞进行照相。(2)实验分组:正常对照组,常规培养 48h 后换液 1 次,加含与药物组等体积生理盐水的完全培养基继续培养 24h;阿霉素损伤模型(ADR 损伤模型)组,常规培养 48h 换液,加含浓度为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 阿霉素的完全培养基,继续培养 24h;当归超滤物不同浓度处理 ADR + 当归组,取低、中、高(3.75、7.5、15g/L)浓度分别加入培养基中孵育 48h 后换液,加含浓度为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 阿霉素的完全培养基,继续培养 24h。(3)细胞活性检测:于 96 孔板培养心肌细胞,密度 10^5 个/孔,每孔细胞悬液 $100\mu\text{l}$ 。经处理后每孔加入 MTT $100\mu\text{l}$, 37°C 孵育 4h 后,移弃培养液,每孔加入 DMSO $150\mu\text{l}$,振荡 10min,充分溶解结晶物。在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(OD 值),所测 OD 值可定量反映活细胞数量。(4)LDH 含量测定:各组细胞经处理后,收集上清液,参照试剂盒说明书,采用 2,4 - 二

硝基苯胍显色法,在可见分光光度计上通过比色法检测 LDH 含量。(5) Ca^{2+} - ATP 酶活性测定:各组细胞经处理后,弃去培养液,胰酶消化后弃上清,留下层细胞,加入 PBS 液稀释成 $10^7/\text{cm}^3$ 的细胞悬液,置于 EP 管中,用超声破碎细胞。制备好的细胞悬液在测试前摇匀取样 $200 \sim 300\mu\text{l}$ 。参照试剂盒说明测定细胞活性。(6)Western blot 测心肌细胞 caspase - 3、caspase - 12 蛋白含量^[5]:用预冷的 PBS 漂洗心肌细胞,单去污剂裂解液提取细胞蛋白质(冰上操作),考马斯亮蓝测定蛋白浓度。分别取 $5\mu\text{l}$ 蛋白量经 SDS PAGE 电泳后转至 PVDF 膜,考马斯亮蓝染色观察蛋白质转移情况。5% 脱脂奶粉封闭 1h,后与 caspase - 3、caspase - 12 抗体 4°C 孵育过夜。 β - actin 作为内标,加辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 37°C 孵育 1h,加 ECL 发光试剂孵育 1min,在暗室将膜在感光胶片上曝光并用相纸显影洗像。结果用 Alpha Imager 2200 图像分析系统进行灰度扫描,分别计算 caspase - 3、caspase - 12 与 β - actin 灰度比值代表其相对表达量。

3. 统计学方法:计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 19.0 统计软件分析,组间比较采用单因素方差分析 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 心肌细胞形态学观察:见图 1。

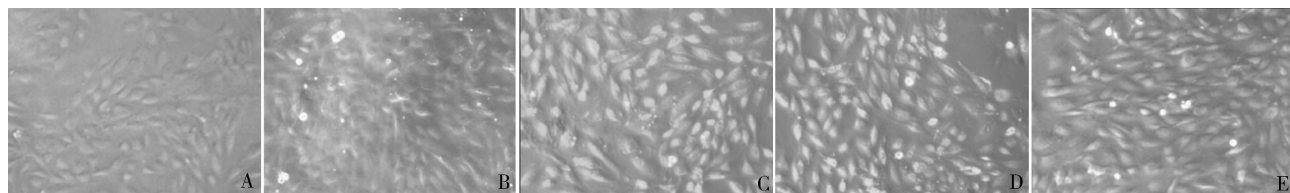


图 1 心肌细胞形态学($\times 100$)

A. 正常对照组:细胞贴满瓶底,可见细胞呈梭形、菱形、多角形生长,轮廓清晰,折光性好,可见明显波动;B. ADR 损伤模型组:细胞裂解、变圆,肌间隙增宽,肌原纤维溶解消失,可见大量细胞碎片,部分悬浮,轮廓不清,波动消失;C. ADR + 当归低剂量组:心肌细胞变性坏死略减轻,轮廓不清,细胞间隙略增宽,可见少部分细胞悬浮,无波动;D. ADR + 当归中剂量组:心肌细胞坏死减轻明显,细胞轮廓清楚,波动不明显;E. ADR + 当归高剂量组:心肌细胞形状规则,轮廓清晰,折光性略减弱,波动略慢

2. 当归超滤膜提取物对 ADR 损伤乳鼠心肌细胞 MTT 的影响:结果见表 1,与正常对照组比较,ADR 损伤组心肌细胞的存活率明显下降,差异有统计学意

义($P < 0.05$);与 ADR 损伤模型组相比,当归超滤膜提取物干预组心肌细胞存活率均明显升高($P < 0.05$)。

3. 当归超滤膜提取物对 ADR 损伤乳鼠心肌细胞 LDH 的影响:与正常对照组比较,ADR 损伤后心肌细胞培养液上清中 LDH 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 ADR 损伤模型组相比,当归超滤膜提取物干预组心肌细胞培养液上清中 LDH 有不同程度的降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 ADR 损伤模型组相比,高剂量当归超滤膜提取物干预组心肌细胞培养液上清中 LDH 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 2。

表 1 不同剂量当归对 ADR 心肌细胞损伤后细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ADR 浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	当归浓度	心肌细胞 存活率(%)
正常对照组	0	$0\mu\text{g}/\text{ml}$	100.1 ± 0.047
ADR 损伤模型组	5	$0\mu\text{g}/\text{ml}$	$41.8 \pm 1.311^{\#}$
ADR + 当归低剂量组	5	$3.75\text{g}/\text{L}$	$49.3 \pm 0.483^*$
ADR + 当归中剂量组	5	$7.5\text{g}/\text{L}$	$58.9 \pm 1.271^*$
ADR + 当归高剂量组	5	$15\text{g}/\text{L}$	$69.8 \pm 2.355^*$

与正常对照组比较, $^{\#}P < 0.05$;与 ADR 损伤模型组比较, $^*P < 0.05$

表 2 不同剂量当归对 ADR 损伤心肌细胞 LDH 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ADR 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	当归浓度	LDH 酶活性
正常对照组	0	0 $\mu\text{g/ml}$	28.00 $\pm$ 2.620
ADR 损伤模型组	5	0 $\mu\text{g/ml}$	46.05 $\pm$ 3.468 *
ADR + 当归低剂量组	5	3.75g/L	44.63 $\pm$ 2.787
ADR + 当归中剂量组	5	7.5g/L	44.46 $\pm$ 2.186
ADR + 当归高剂量组	5	15g/L	38.04 $\pm$ 2.904 #

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与 ADR 损伤模型组相比较, # $P < 0.01$

4. 当归超滤膜提取物对 ADR 损伤心肌细胞 Ca^{2+} - ATP 酶活性的影响: 结果见表 3, 与正常对照组比较, ADR 损伤后心肌细胞中 Ca^{2+} - ATP 酶活性明显下降, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 与 ADR 损伤模型组相比, 当归超滤膜提取物干预组心肌细胞中 Ca^{2+} - ATP 酶活性有不同程度的升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 不同剂量当归组的钙离子 ATP 酶活性($\bar{x} \pm s$)

组别	ADR 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	当归浓度	Ca - ATP 酶活性
正常对照组	0	0 $\mu\text{g/ml}$	100 $\pm$ 0.894
ADR 损伤模型组	5	0 $\mu\text{g/ml}$	41.47 $\pm$ 1.553 *
ADR + 当归低剂量组	5	3.75g/L	49.69 $\pm$ 1.870 #
ADR + 当归中剂量组	5	7.5g/L	62.09 $\pm$ 2.453 #
ADR + 当归高剂量组	5	15g/L	66.03 $\pm$ 1.255 #

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 ADR 损伤模型组比较, # $P > 0.05$

5. 蛋白印迹法测定各组心肌细胞 caspase - 3、caspase - 12 蛋白含量的表达: 结果见图 2, 与正常对照组比较, ADR 损伤组心肌细胞 caspase - 3、caspase - 12 的表达水平上调 ($P < 0.05$)。与 ADR 损伤模型组比较, 当归超滤膜提取物干预组心肌细胞 caspase - 3、caspase - 12 表达水平不同程度下调, 高剂量当归组 caspase - 3 下调差异具有显著性 ($P < 0.05$); 低中高剂量当归组 caspase - 12 下调均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

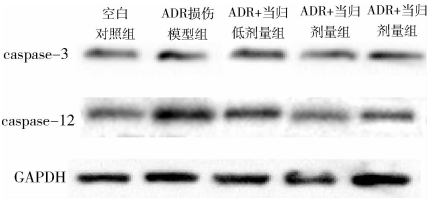


图 2 各组心肌细胞 caspase - 3、caspase - 12 蛋白的表达

讨 论

阿霉素 (ADR) 是临床上一种常见的高效抗肿瘤药物, 属蒽环类药物。目前认为蒽环类抗癌药的心脏毒性分为两种类型: 一是急性心脏毒性, 不良反应包括心律失常, 一般在用药后短时间内出现, 为暂时性可逆性改变; 另外一种为慢性心脏毒性, 常见特征包括充血性心力衰竭和心肌病, 发生率以及毒性都与用药剂量有关, 为不可逆改变; 病死率为 30% ~ 60%。张三典^[6]在研究阿霉素心脏毒性时发现, 阿霉素浓度在 0.31 ~ 10.00 $\mu\text{g/ml}$ 范围内均能抑制心肌细胞活性, 并具有很强的剂量和时间依赖趋势。同时, 心肌细胞乳酸脱氢酶检测发现该酶与阿霉素浓度大小呈正相关, 并呈浓度与时间依赖趋势。寻找一种能有效缓解阿霉素心脏毒性的药物但又不影响其抗肿瘤疗效的药物尤为迫切。

中医理论认为, 在化疗中由阿霉素所引起的各种不良反应其根本原因在于“邪之所凑, 其气必虚”, 反过来本病的发生是由于体质虚弱、正气不足, 复感温热病邪, 温度之邪入侵, 内舍于心, 损伤心之肌肉、内膜所致。因此从扶正的角度入手是研究减毒增敏药物的关键思路。国内外许多临床试验研究证实扶正中药对阿霉素所引起的毒性疗效显著。本实验所用的当归是传统的活血化瘀药, 中医早已明确其具有增加组织血流量, 减小氧耗, 促进核酸、蛋白质合成, 改善心肌氧供, 缓解急性心肌缺血, 保护缺血心肌的作用^[7,8]。正如清代《本草经百种录》所说: “当归为血家必用之药, 实为养血之要品”。现代研究对当归有了新的认识。它含有挥发油、有机酸、氨基酸、维生素、微量元素等多种物质, 能显著促进机体造血功能, 升高红细胞、白细胞和血红蛋白含量; 抑制血小板凝聚, 抗血栓, 调节血脂; 抗心肌缺血、心律失常, 扩张血管, 降低血压; 调节子宫平滑肌。还能增强免疫、抗炎、保肝、抗辐射、抗氧化和清除自由基等。杨静微等^[9]研究表明, 当归还可减少细胞凋亡的发生, 已被广泛用于血液系统、心脑血管系统及其肿瘤的治疗。

MTT 可被活细胞吸收, 并在线粒体被还原成蓝紫色的颗粒, 测定标本蓝紫色颗粒溶解后的值, 可定量反映活细胞数量。LDH 系胞质酶, 正常情况下不能透过细胞膜, 但当细胞受到损伤时, 细胞膜通透性增强, LDH 会从细胞质内漏出, 培养液中 LDH 增多, 测定培养液中 LDH 浓度可反映心肌细胞的损伤情况^[10,11]。 Ca^{2+} - ATP 酶本身对于 ATP 的合成有着十分重要的作用, 当心肌细胞受到损伤时, 其表达量就

会减少^[12]。caspase - 3、caspase - 12 蛋白是细胞凋亡途径中诱发表达的两个重要蛋白质分子。ADR 本身可以激活 FAS 以及 FASL 的蛋白表达,从而进一步的激活 caspase - 8 最终激活 caspase 的级联反应使得细胞开始凋亡。

当归多种主要成分如挥发油、多糖、有机酸类化合物、氨基酸具有抗氧化损伤、阻止细胞凋亡的作用。本实验结果显示,与正常对照组比较,ADR 损伤组细胞存活率明显下降,培养液中 LDH 浓度明显上升,钙离子 - ATP 酶活性明显降低,caspase - 3、caspase - 12 蛋白表达上调。与 ADR 损伤组比较,药物干预组细胞存活率明显上升,培养液中 LDH 浓度明显下降,钙离子 - ATP 酶活性明显升高,caspase - 3、caspase - 12 蛋白表达下调。实验结果提示当归超滤物具有拮抗 ADR 致心肌细胞损伤的作用,其机制与其增强细胞 ATP 酶活性、降低细胞内 LDH 释放、抑制凋亡因子释放有关,为其防治 ADR 致心肌损伤应用提供了一定依据。本实验结果是益气活血中药在化疗中具有减毒增敏效应的有利佐证。

参考文献

- 刘颖. 浅议当归的化学成分与临床药理作用[J]. 中国医药指南, 2010,8(27):51-52
- 倪竹南,吕圭源,楼招欢. 当归挥发油化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(7):93-94
- 仇平,张端莲. 当归注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤后 FAK 表达的研究[J]. 基础医学研究,2010,23(1):28-30
- Mussi SV, Silva RC, Oliveira MC, *et al.* New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles [J]. Eur J Pharm, 2013,48(1):282-190
- 王桂敏,翟宏颖. 菟丝子黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 Bcl-2、Caspase-3 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(2):343-345
- 张三典. 阿霉素与 X 射线对体外培养乳鼠心肌细胞损伤的初步实验研究[D]. 苏州:苏州大学,2005
- 刘微. 阿霉素心脏毒性中心肌细胞凋亡发生机制及抗凋亡的研究进展[J]. 中国医学文摘:儿科学,2007,26(3):193
- 谢玲,杨凌红,李晓惠. 当归药理作用研究进展[J]. 中医药研究,2000,16(6):56-58
- 杨静薇,欧阳静萍,廖维靖,等. 当归对大鼠局灶性脑缺血损伤保护作用的研究[J]. 中国病理生理杂志,2000,10:36-38
- Lei X, Chen Y, Du G, *et al.* Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2 [J]. FASEB J, 2006, 20(12):2147-2149
- Hu X, Jiang H, Ma F, *et al.* Similarities between ischemic preconditioning and postconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2010,144(1):135-136
- Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, *et al.* Suppression by metallothionein of doxorubicin induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen activated protein kinases [J]. J Biol Chem, 2000, 275:13690-13698

(收稿日期:2013-11-18)

(修回日期:2013-12-25)

Mus81 和 GEN1 基因在肺癌组织中的表达及其临床意义

喻光懋 吴云路 钱颖 董学君

摘要 目的 研究肺癌组织中 Mus81 及 GEN1 的表达及其临床意义。方法 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测 30 例肺癌组织及其相应癌旁组织中 Mus81 及 GEN1 mRNA 和蛋白的表达情况,分析其临床意义。结果 30 例肺癌组织中 Mus81 mRNA 和蛋白表达水平低于相应癌旁组织,差异具有统计学意义($t = -3.529, P < 0.05; t = -4.273, P < 0.05$);30 例肺癌组织中 GEN1 mRNA 和蛋白表达水平同癌旁相比无统计学差异($t = -2.006, P > 0.05; t = 0.957, P > 0.05$)。30 例肺癌组织中 Mus81 表达水平和 GEN1 表达水平无明显相关性($P > 0.05$)。结论 肺癌组织中 Mus81 表达低于癌旁组织,提示 Mus81 表达下调可能和肺癌的发生相关;GEN1 在肺癌组织中的表达水平同癌旁相比无统计学差异,提示 GEN1 在肿瘤的发生、发展过程中可能不起主要作用;肺癌组织中 Mus81 的表达水平和 GEN1 的表达水平无明显相关性。

基金项目:浙江省市共建重点学科(GJSX-010-003);浙江省医药卫生平台基金资助项目(2011ZDA025);浙江省医药卫生平台重点资助计划(2013ZDA024);绍兴市科技计划重点项目(2011A23009)

作者单位:312000 浙江省绍兴市人民医院/浙江大学绍兴医院(喻光懋、吴云路、钱颖、董学君);325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(吴云路、钱颖)

通讯作者:董学君,电子信箱:dxj9666@163.com