

苦参碱对阿霉素诱导大鼠心肌损伤的保护作用及其机制研究

卢均坤¹, 王燕琴², 初而复³, 李欣³, 邓范艳^{4*}

1. 佳木斯大学附属第一医院 心内二科, 黑龙江 佳木斯 154003

2. 佳木斯大学附属医院 超声科, 黑龙江 佳木斯 154003

3. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154002

4. 佳木斯大学附属第一医院 高压氧中心, 黑龙江 佳木斯 154003

摘要: **目的** 研究苦参碱对阿霉素诱导大鼠心肌损伤的保护作用及其机制。**方法** SD大鼠随机分为对照组、模型组和苦参碱25、50、100 mg/kg组, 每组各20只。模型组大鼠ip注射用阿霉素2.5 mg/kg, 1次/周, 连续给药6周, 累积剂量15 mg/kg, 建立心肌损伤模型。对照组ip等量生理盐水。苦参碱组造模前2 d ip注射用苦参碱25、50、100 mg/kg, 连续给药5 d。观察大鼠心肌细胞病理学, 采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清线粒体偶联因子CF6水平, 应用分光光度法测定 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活力, 采用试剂盒检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、总超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量。**结果** 苦参碱各组心肌组织肿胀, 肌束间、间质有灶性出血现象显著减轻。与模型组比较, 苦参碱各组血清CF6水平显著降低($P<0.05$); 线粒体 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性显著升高($P<0.05$); 心肌组织GSH-px活性及SOD活力升高, MDA含量显著降低($P<0.05$)。**结论** 苦参碱能保护阿霉素引起的大鼠心肌损伤, 其作用机制与改善线粒体ATP酶活性、降低线粒体偶联因子6水平、减轻氧化应激水平有关。

关键词: 苦参碱; 心肌损伤; 阿霉素; 机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2016)05-0572-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.05.002

Protection of matrine against cardiac injury induced by doxorubicin in rats and its mechanism

LU Jun-kun¹, WANG Yan-qin², CHU Er-fu³, LI Xin³, DENG Fan-yan⁴

1. Department of Cardiology Division II, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, China

2. Department of Ultrasonography, Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, China

3. Jiamusi University, Jiamusi 154002, China

4. Center of Hyperbaric Oxygen, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, China

Abstract: Objective To study the protective effects of matrine against cardiac injury induced by doxorubicin in rats and explore its mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, and matrine (25, 50, and 100 mg/kg) groups, and each group had 20 rats. Rats in model group were ip administered with Adriamycin Injection 2.5 mg/kg, once per week, cumulative reach to 15 mg/kg, and treated for 10 d to establish cardiac injury model. Rats in control group were ip administered with equivalent normal saline. Rats in the matrine groups were ip administered with Matrine for injection 25, 50, and 100 mg/kg 2 d before models were established, and treated for 5 d. Pathological changes of cardiac muscle cells in rats were observed. The serum levels of CF6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ were detected by electromicroscope. Activities of GSH-px and SOD, and contents of MDA were determined by corresponding kits. **Results** Myocardial tissue swelling, muscle and interstitial hemorrhage in the matrine groups were significantly reduced. Compared with the model group, serum levels of CF6 in the matrine groups were significantly decreased ($P<0.05$), and activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ in mitochondrion of the matrine groups were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model

收稿日期: 2016-01-14

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(H201365); 佳木斯大学科学技术重点项目(Sz2013-004)

作者简介: 卢均坤, 男, 博士在读, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床及心肌病的分子机制研究。E-mail: ljkuuu@163.com

*通信作者 邓范艳

group, activities of GSH-px and SOD in myocardial tissue of the matrine groups were significantly increased, contents of MDA were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Matrine has protective effects against cardiac injury induced by doxorubicin in rats, whose mechanism may be related to improvement of activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$, reduction of CF6 levels, and release of oxidative stress levels.

Key words: matrine; cardiac injury; doxorubicin; mechanism

化疗在临床肿瘤治疗中起到重要作用, 蒽环类抗生素如阿霉素在恶性肿瘤中应用广泛, 但在治疗过程中伴随着一系列副作用及耐药问题, 尤其心脏毒性引起的致命性心力衰竭, 限制了其在临床中的应用。目前, 研究阿霉素心肌损伤的方法很多, 引起能量代谢损害主要是由于线粒体损伤所致, 线粒体是心肌能量产生的主要场所, 阿霉素心肌损伤线粒体功能变化发挥了重要作用。苦参碱类生物碱是以苦参碱为代表的化学结构相似的一类生物碱, 包括苦参碱、氧化苦参碱、槐国碱、槐醇碱等, 广泛存在于豆科植物苦参、苦豆子和广豆根中, 是这几种常用中草药的主要有效成分^[1]。研究发现苦参碱对酸化条件及长期心肌缺血后心室肌细胞表现出明显的抑制作用, 提示其对心肌梗死后心律失常有效^[2]。另外研究还发现苦参碱、氧化苦参碱均能对抗乌头碱、哇巴因、肾上腺素、氯化钡及冠状动脉结扎等所诱发的动物实验性心律失常^[3]。本课题组前期研究发现苦参碱、氧化苦参碱具有显著保护阿霉素引起的心肌损伤作用^[4-5], 因此本研究通过建立大鼠阿霉素心肌损伤模型, 利用苦参碱进行干预, 探讨苦参碱对阿霉素致心肌损伤的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

成年健康 SD 大鼠 100 只, 体质量 200~350 g, 雌雄各半, 正常饲料喂养, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药品和试剂

注射用苦参碱 (山东瑞阳药业有限公司, 规格 0.15 g/支, 批号 15020406), 注射用阿霉素 (浙江海正药业有限公司, 规格 10 mg/支, 批号 15023020), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、总超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒均购自南京碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 20121210、20121218、20121219。线粒体偶联因子 6 (CF6) 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司, 货号为 ml-elisa-1018。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP 酶}$ 活性试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 批号为

20120301。

2 方法

2.1 动物分组及给药

SD 大鼠随机分为对照组、模型组和苦参碱 25、50、100 mg/kg 组, 每组各 20 只。模型组将注射用阿霉素 10 mg 以 10 mL 生理盐水稀释后, ip 大鼠 2.5 mg/kg, 1 次/周, 连续给药 6 周, 累积剂量 15 mg/kg, 建立心肌损伤模型。对照组 ip 等量生理盐水。苦参碱组将注射用苦参碱 0.15 g 以 10 mL 生理盐水稀释, 在大鼠 ip 注射用阿霉素前 2 d ip 注射用苦参碱 25、50、100 mg/kg, 连续给药 5 d。

2.2 血液和心肌组织匀浆的处理

6 周给药结束后, 立即对各组大鼠进行处理, 摘除眼球取血, 将取得的血液 4 °C, 3 000 r/min 离心 15 min 后, 取上清液-80 °C 冻存备用。

大鼠处死后, 取心脏组织约 0.5 g, 用生理盐水漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称定质量, 用小剪刀尽快剪碎组织块。将剪碎的组织倒入玻璃匀浆器中充分磨碎, 使组织匀浆化。将制备好的 10% 组织匀浆用低温离心机 3 000 r/min 离心 10~15 min。将离心好的心肌组织匀浆取上清液备用, 并保存于-80 °C 的冰箱中。

2.3 组织病理学检查

将心肌组织使用 4% 甲醛固定 24 h 后, 以石蜡包埋, 切成 5 μm 左右薄片, 用苏木精-伊红进行染色, 显微镜观察心肌组织变性、肥大程度以及充血肿胀程度。

2.4 血清 CF6 水平的测定

采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清线粒体偶联因子 CF6 水平, 所有操作均按照试剂盒说明书进行。

2.5 线粒体 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP 酶}$ 活性的测定

取心肌组织匀浆上清液, 采用无机磷比色法测定线粒体 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP 酶}$ 活性。以 721 分光光度计于 660 nm 处测定吸光度值, 通过磷标准曲线来推算 ATP 酶活力, 均采用复管测定, 严格按试剂盒说明操作。

2.6 氧化应激水平的测定

取心肌组织匀浆上清液,测定心脏中 GSH-Px、SOD 活力,以及 MDA 含量。所有操作均按照试剂盒说明书进行。

2.7 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的数据比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 病理学检查

模型组大鼠心肌组织出现肿胀,肌束间、间质有灶性出血现象,心肌间质水肿。苦参碱各组心肌组织肿胀,肌束间、间质有灶性出血现象显著减轻,见图 1。

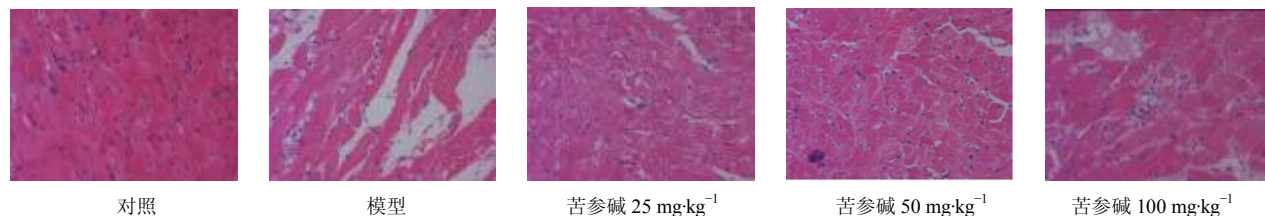


图 1 大鼠心肌细胞病理学 (HE 染色)

Fig. 1 Histopathology of cardiac muscle cells of mice (HE staining)

3.2 血清 CF6 水平变化

与对照组比较,模型组大鼠血清 CF6 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,苦参碱各组血清 CF6 水平显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明阿霉素可引起大鼠心肌组织释放 CF6,苦参碱可抑制阿霉素引起的 CF6 释放,见表 1。

表 1 苦参碱对大鼠血清 CF6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)
Table 1 Effect of matrine on CF6 levels in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CF6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	136.24 ± 18.37
模型	—	283.52 ± 26.41 ^{##}
苦参碱	25	197.38 ± 21.53*
	50	201.59 ± 20.97*
	100	194.68 ± 22.18*

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

^{##} $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

3.3 线粒体 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP 酶活性比较

与对照组比较,模型组大鼠 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活性显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,苦参碱各组 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活性显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明阿霉素可抑制大鼠心肌代谢,苦参碱可显著改善阿霉素引起的 ATP 酶活性降低,见表 2。

3.4 氧化应激指标比较

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织 GSH-Px 活性及 SOD 活力下降,MDA 含量上升 ($P < 0.01$);

表 2 苦参碱对大鼠线粒体 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 2 Effect of matrine on activities of Na⁺-K⁺-ATP and Ca²⁺-ATP enzyme in mitochondrion of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP/(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	Ca ²⁺ -ATP/(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)
对照	—	2.32 ± 0.21	0.18 ± 0.03
模型	—	0.98 ± 0.19 ^{##}	0.07 ± 0.02 ^{##}
苦参碱	25	1.86 ± 0.27*	0.13 ± 0.03*
	50	1.91 ± 0.41*	0.20 ± 0.05*
	100	1.79 ± 0.15*	0.17 ± 0.02*

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

与模型组比较,苦参碱各组大鼠心肌组织 GSH-Px 活性及 SOD 活力升高,MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$),结果表明苦参碱可以降低阿霉素所导致大鼠机体内的氧化应激水平,从而起到保护心肌作用,见表 3。

4 讨论

阿霉素在治疗肿瘤的同时,可以引起心血管系统损害,这是由于氧化应激以及钙超载所致^[6],大量研究表明,在蒽环类药物引起的心脏毒性发病过程中,线粒体是主要靶器官^[7]。线粒体是生物体的 ATP 来源,约 90% ATP 来自线粒体氧化磷酸化。阿霉素抑制 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性,使 Na⁺-K⁺交换减少,Na⁺-Ca²⁺交换增加,进而加速 Ca²⁺内流,进一

表 3 苦参碱对大鼠心肌细胞内 GSH 活性、MDA 含量及 SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 3 Effect of matrine on activities of GSH and SOD, and content of MDA in cardiac muscle cells of mice ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	78.79 ± 4.32	24.52 ± 1.56	1.97 ± 0.09
模型	—	36.62 ± 4.09 ^{##}	13.56 ± 1.11 ^{##}	3.45 ± 0.16 ^{##}
苦参碱	25	59.52 ± 4.51 [*]	21.17 ± 2.45 [*]	2.72 ± 0.29 [*]
	50	55.11 ± 5.01 [*]	20.56 ± 1.83 [*]	2.66 ± 0.23 [*]
	100	56.02 ± 6.63 [*]	21.57 ± 2.07 [*]	2.64 ± 0.33 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

步加重心肌细胞内钙超载及 Ca²⁺-ATP 酶活性降低。线粒体偶联因子 6 (mitochondrial coupling factor-6, CF6) 是 ATP 合成酶组成成分, 存在于体内多种组织之中, 且以心肌组织含量最高, 血管内皮细胞膜也含有丰富的 CF6, 并成为循环中 CF6 的重要来源之一。CF6 在原发性高血压、急性冠脉综合症、终末期肾病以及糖尿病中均显著升高^[8], 阿霉素抑制 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性, 使 Na⁺-K⁺交换减少、Na⁺-Ca²⁺交换增加而加速 Ca²⁺内流, 而长期的 Ca²⁺内流增加可能是阿霉素导致心衰的机制之一^[9]。

苦参碱对异丙肾上腺素致大鼠心力衰竭模型心室重构及心功能衰竭具有保护作用, 随着苦参碱剂量增加, 减轻异丙肾上腺素致大鼠肥厚性心肌组织病理学结构的异常改变越来越显著, 其心肌细胞排列逐渐整齐, 肥大心肌细胞范围变小, 纤维化、间质水肿和炎细胞浸润减少, 心肌细胞直径和横截面积减小^[10]。本研究发现, 阿霉素使大鼠 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP 酶活性显著降低, 而苦参碱显著提高 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP 酶活性。观察大鼠应用阿霉素后 CF6 的变化, 结果显示血清 CF6 水平较对照组显著增加; 应用苦参碱干预后, 血清 CF6 水平显著下降, 苦参碱能够保护线粒体功能, 提高线粒体 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性及 Ca²⁺-ATP 酶活性, 降低血清 CF6 水平, 减轻阿霉素引起的心肌损伤。

有研究发现^[11]苦参碱可以降低细胞内活性氧 (ROS) 含量, 从而导致 MDA 含量也降低, 同时提高 SOD 的活性, 进一步清除细胞内的 ROS。本实验结果显示阿霉素组大鼠心肌组织 GSH 活性及 SOD 活力下降, MDA 含量上升; 苦参碱显著提高 GSH 及 SOD 活力, 降低 MDA 含量, 减轻阿霉素引起的心肌组织氧化应激反应, 表明苦参碱能够减轻阿霉素对心肌组织的损害。在正常细胞中, 线粒体整合了能量产生和生物合成的分子途径, 维持氧

化还原平衡, 调节细胞内钙信号并参与细胞死亡。ROS 可能诱导线粒体内膜上心磷脂过氧化损伤, 导致呼吸链复合体及 ATP 合酶活性下降, 氧化磷酸化功能减弱, 最终使得 ATP 产量减少。线粒体呼吸链是 ROS 产生的主要部位, 氧化应激是许多类型疾病的损伤机制的一个过程, 它是肌体 ROS 生成和体内抗氧化防御系统失衡的结果^[12]。心脏的 ROS 主要是超氧化物 (O₂⁻)、过氧化氢 (H₂O₂)、羟基自由基 (·OH) 和过氧亚硝基 (ONOO⁻)。ROS 可以由正常氧代谢副产品的产生, 是随着线粒体 ATP 产生的产物。多种心血管疾病可以产生 ROS 及氧化应激, 有报道认为阿霉素可以引起心肌组织产生 ROS 及氧化应激反应^[13]。氧化应激和炎症是众所周知的 DNA 损伤的致病因素, 诱导细胞凋亡, 同时也是阿霉素诱导的心肌病致病因素^[14], 氧化应激和钙超载是心肌再灌注损伤的原因, 氧化应激与 ROS 的增加密切相关, 氧化应激导致细胞膜功能受抑制, 引起细胞功能障碍, Ca²⁺-ATP 和 Na⁺-K⁺-ATP 酶泵激活引起钙离子内流增加, 氧化应激抑制肌质网 Ca²⁺-ATP 酶, 从而抑制 Ca²⁺从心肌细胞胞浆外流, 这些改变明显被抗氧化剂过氧化氢酶和超氧化物歧化酶减轻。

阿霉素对心肌的影响最直接的证据是心肌活检, 本研究表明在应用阿霉素后大鼠心肌充血水肿, 心肌组织出现肿胀, 肌束间、间质有灶性出血现象, 心肌间质水肿最明显, 在给予苦参碱干预后, 大鼠心肌组织出现肿胀现象, 肌束间、间质有灶性出血情况显著减轻。

通过本研究表明, 苦参碱减轻阿霉素引起的心肌损伤, 通过保护线粒体功能、提高 ATP 酶活性、降低血清 CF6 水平、减轻氧化应激反应, 从而达到保护心脏的作用, 但是苦参碱对放疗心肌损伤的保护机制仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 700.
- [2] 张婉, 潘振伟, 冯铁明, 等. 苦参碱对缺血性心肌细胞快速延迟整流钾电流的作用 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(3): 322-326.
- [3] 张丽华, 陈邦恩, 潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 1000-1003.
- [4] 刘洋, 杨益鹏, 姚忠林, 等. 氧化苦参碱对阿霉素所致大鼠心肌损伤的保护作用研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(27): 5267-5270.
- [5] 王燕琴, 初而复, 李欣, 等. 注射用苦参碱对阿霉素致大鼠心脏重构的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 193-197.
- [6] Arai M, Yoguchi A, Takizawa T, *et al.* Mechanism of doxorubicin-induced inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene transcription [J]. *Circ Res*, 2000, 86(1): 8-14.
- [7] Zhou S, Starkov A, Froberg M K, *et al.* Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 771-777.
- [8] Li X L, Xing Q C, Gao Y Y, *et al.* Plasma level of mitochondrial coupling factor 6 increases in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Cardiol*, 2007, 117(3): 411-412.
- [9] Torii M, Ito H, Suzuki T. Lipid peroxidation and myocardial vulnerability in hypertrophied SHR myocardium [J]. *Exp Mol Pathol*, 1992, 57(1): 29-38.
- [10] 郑萍, 张伟, 买淑霞, 等. 苦参碱对慢性心力衰竭大鼠心肌重构的干预作用 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(12): 979-984.
- [11] 王瑞霞. 苦参碱对 H9C2 细胞缺氧复氧损伤的保护作用及机制 [J]. 中国心血管杂志, 2015, 20(4): 290-294.
- [12] Juránek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2005, 24(3): 263-278.
- [13] 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.
- [14] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49(5): 330-352.