

注射用苦参碱对阿霉素致大鼠心脏重构的影响

王燕琴¹, 初而复², 李欣², 张明亮², 卢均坤^{2*}

1. 佳木斯大学校医院, 黑龙江 佳木斯 154003

2. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154003

摘要: **目的** 研究注射用苦参碱对阿霉素引起大鼠心脏重构的影响。**方法** 将 52 只大鼠随机分为: 对照组、模型组、苦参碱 (100 mg/kg) 组, 尾 iv 阿霉素制备心肌梗死模型, 采用超声心动图检测大鼠心脏左室舒张末期内径 (LVEDd)、左室射血分数 (LVEF) 和缩短分数 (FS); 生理记录仪检测大鼠左室舒张末期压 (LVEPD)、收缩压 (LVPS)、室内压最大收缩/舒张速率 ($\pm dp/dt_{max}$); 称大鼠体质量, 脊髓离断法处死大鼠, 称大鼠心脏质量并计算心脏指数; 试剂盒法检测大鼠心脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性以及丙二醛 (MDA) 水平; 应用流式细胞术检测大鼠心肌细胞凋亡水平。**结果** 与模型组比较, 苦参碱组大鼠 LVEDd 值显著降低、EF 和 FS 值显著升高; LVEPD 显著降低, LVPS、 dp/dt_{max} 及 $-dp/dt_{max}$ 均显著升高; 心脏指数、心肌细胞凋亡率显著降低; 心肌细胞内 GSH-Px、SOD 活性明显升高, MDA 水平显著降低。**结论** 注射用苦参碱减轻阿霉素引起的心肌细胞凋亡, 改善心脏重构及心脏功能, 可能与改善心肌细胞氧化应激水平有关。

关键词: 苦参碱; 阿霉素; 心脏重构; 凋亡; 氧化应激

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2016) 02-0193-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.007

Effects of matrine on cardiac remodeling in rats induced by Adriamycin

WANG Yan-qin¹, CHU Er-fu², LI Xin², ZHANG Ming-liang², LU Jun-kun²

1. Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, China

2. 1st Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, China

Abstract: Objective To study the regulation of matrine on adriamycin-induced cardiac remodeling in rats. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into control group, model group, and matrine group. The cardiac LVEDd, LVEF, and FS values of three groups were detected by echocardiography. The values of LVEPD, LVPS, $\pm dp/dt_{max}$ were detected by physiological recorder. The weights of rats were measured. The rats were killed by the method of spinal cord transection, the weight of the heart of rat was measured and the heart index was calculated. The levels of oxidative stress were evaluated by using reagent kit of glutathione peroxidase (GSH-Px), total superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA). Flow cytometry is used to test the apoptosis of rat myocardial cells. **Results** Compared with model group, the value of LVEDd in matrine group decreased significantly, the value of EF and FS increased significantly; The value of LVEPD decreased significantly, the values of LVPS, dp/dt_{max} , and $-dp/dt_{max}$ increased significantly; The heart index and myocardial apoptosis levels significantly decreased; The expression levels of SOD and GSH were decreased, and MDA content was significantly increased. **Conclusion** Matrine reduced the apoptosis of cardiac cells induced by adriamycin in rats and improved cardiac remodeling and function which changes may be caused by oxidative stress levels improvement.

Key words: matrine; Adriamycin; cardiac remodeling; apoptosis; oxidative stress

注射用苦参碱 (Matrin) 是一类含有氧化苦参碱和极少量氧化槐果碱的混合物, 主要从豆科植物苦参、苦豆子及广豆根中提取, 其中氧化苦参碱

(oxymatrin) 质量分数在 98% 以上。注射用苦参碱是我国自主开发完成, 享有完全知识产权的纯天然生物碱类药物^[1], 具有抗肿瘤^[2]、双向免疫调节、

收稿日期: 2016-01-15

基金项目: 黑龙江省卫生计生厅科研项目 (2014-267); 佳木斯大学科研项目 (S2014-004)

作者简介: 王燕琴 (1970—), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: wyqdoctor@163.com

*通信作者 卢均坤, 男, 副主任医师, 硕士研究生导师。E-mail: ljkuuu@163.com

抗心律失常、强心、抗纤维化等作用^[3]。阿霉素引起心肌毒性反应,导致致命性心力衰竭,其引起心肌病/心力衰竭的发病机制复杂,包括氧化应激、线粒体功能障碍、激动-收缩耦联改变、丝裂激活蛋白酶激活等^[4-6]。本研究建立大鼠阿霉素心肌损伤模型,探讨注射用苦参碱对心脏重构的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 动物

健康 14 周龄 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 180~220 g,由佳木斯大学动物实验中心提供,动物生产许可证号 SYXK(黑)2011-021。大鼠均给予正常饲料及高压灭菌自来水饲养。

1.2 药物及主要试剂

注射用苦参碱(山东瑞阳药业有限公司,规格 0.15 g,批号 15020406);阿霉素(海正药业有限公司,规格 10 mg,批号 15023020);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京碧云天生物技术有限公司);Annexin V 流式细胞试剂盒(美国 BD 公司)。

1.3 主要仪器

Philips IU22 彩色多普勒超声诊断仪(荷兰飞利浦公司);高速低温离心机(美国 Sigma 公司);TGL-16G 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);FA2004 电子分析天平(上海衡平电子仪器公司);全自动酶标仪(美国 BioTek 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);MiLi-Q plus 高纯水制备仪(法国 Milipore 公司);超净工作台(苏州净化有限公司);SLY-BSLY-B 四道生理记录仪(上海标普实验室设备有限公司)。

2 方法

2.1 心肌损伤模型的制备、分组及给药

52 只大鼠随机分成 3 组:对照组、模型组、苦参碱组,每组 14 只。模型组将阿霉素(粉剂)用生理盐水稀释后,2.5 mg/kg 缓慢尾 iv 给予大鼠,每天 1 次,连续 6 d,累积剂量 15 mg/kg。苦参碱组,于造模结束次日开始给予苦参碱注射液,给药剂量为 100 mg/kg^[7],缓慢尾 iv,每天给药 1 次,连续给药 5 d。对照组不造模,同法注射等量生理盐水。

2.2 超声心动图检测左心功能

给药结束后,ip 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠,使用彩色多普勒超声诊断仪动物小探头,测量左室舒张末期内径(LVEDd)、左室射血分数(LVEF)和缩短分数(FS),评价大鼠左心功能。

2.3 血流动力学指标测定

给药结束后,ip 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠,分离右颈动脉,结扎远心端,用充满肝素生理盐水的、内径 0.5 mm 的聚乙烯微测压导管,自右颈动脉插入至左心室,经压力转换器接 SLY-BSLY-B 四道生理记录仪,稳定 5 min 后,使用 MP150 系统软件和硬件,分别测定大鼠左心室的舒张末期压(LVEPD)、收缩压(LVPS)、室内压最大收缩/舒张速率($\pm dp/dt_{max}$)^[4]。

2.4 心脏指数的测定

于给药结束后称各组大鼠体质量并记录,采用脊髓离断法处死大鼠,取出心脏称心脏质量并记录,计算心脏指数。

心脏指数=心脏质量/体质量

2.5 氧化应激水平测试

取心脏组织块约 0.5 g,用生理盐水漂洗,除去血液,滤纸拭干,称质量、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、加入磷酸缓冲液(PBS)充分磨碎,使组织匀浆化。将制备好的 10%组织匀浆 4℃、3 000 r/min 离心 10~15 min,取上清备用,并保存于一 80℃的冰箱中。严格按照试剂盒说明书检测 GSH-Px、SOD 活力和 MDA 水平。

2.6 Annexin V 法检测心肌细胞的凋亡情况

给药结束后,ip 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠,于剑突下作切口取出心脏,立即放入 4℃灌流液中,于液面下进行主动脉插管,采用 Langendorff 离体心脏灌流装置,并在灌流液中加入胶原酶(浓度为 0.2 g/L),用剪刀取心室肌组织,浸入高钾 KB 液中,轻轻吹打,过 300 μm 的不锈钢筛网,室温静置 6~7 h 备用,采用 Annexin V 流式细胞试剂盒检测凋亡情况^[5-6]。

2.7 统计分析

数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件对各组数据进行 *t* 检验。

3 结果

3.1 对大鼠左心功能的影响

与对照组比较,模型组大鼠 LVEDd 值显著增加、LVEF 和 FS 值显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,苦参碱组大鼠 LVEDd 值显著降低、LVEF 和 FS 值明显增加($P < 0.05$);与对照组比较,苦参碱组 LVEDd、LVEF 和 FS 值差异不显著。结果见表 1。

3.2 对心脏血流动力学的影响

与对照组比较,模型组大鼠 LVEPD 显著升高,

LVPS、 dp/dt_{max} 及 $-dp/dt_{max}$ 均显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 注射用苦参碱对上述指标均发挥显著改善作用 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.3 对心脏指数的影响

给药前各组大鼠心脏指数差异均不显著 ($P < 0.05$); 模型组大鼠体质量增长缓慢, 但心脏质量显著增加, 心脏指数明显增加, 同苦参碱组及对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.4 对心肌内氧化应激水平的影响

模型组大鼠心肌组织内 GSH-Px、SOD 活性明显低于对照组及苦参碱组 ($P < 0.05$), MDA 水平明显高于对照组及苦参碱组 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

3.5 心肌细胞的凋亡情况

Annexin V 法检测心肌细胞的凋亡情况, 模型组凋亡率明显高于对照组及苦参碱组, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

表 1 各组大鼠 LVEDd、EF 和 FS 值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Table 1 Values of LVEDd, EF, and FS of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LVEDd/mm	EF/%	FS/%
对照	—	4.84 ± 0.31	61.83 ± 4.36	42.09 ± 3.85
模型	—	7.26 ± 0.14*	43.47 ± 4.28*	20.83 ± 3.29*
苦参碱	100	5.82 ± 0.43 [#]	58.35 ± 4.62 [#]	36.37 ± 2.94 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group, below as same

表 2 苦参碱对阿霉素大鼠血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

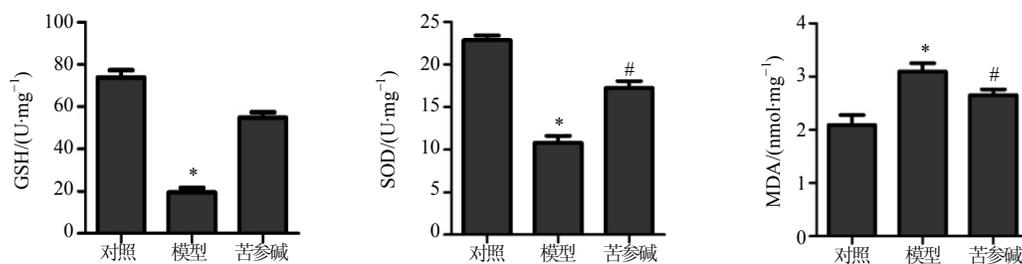
Table 2 Effect of matrine on hemodynamics of rats with Adriamycin ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LVEPD/ kPa	LVPS/ kPa	dp/dt_{max} /kPa	$-dp/dt_{max}$ / kPa
对照	—	0.122 7 ± 0.037 3	16.843 9 ± 0.790 6	831.566 3 ± 33.887 9	-661.790 9 ± 39.631 4
模型	—	3.625 0 ± 0.365 3*	11.023 1 ± 1.129 2*	286.544 4 ± 27.112 4*	-311.777 0 ± 13.766 9*
苦参碱	100	1.250 6 ± 0.176 0 [#]	13.890 9 ± 0.854 6 [#]	688.786 0 ± 27.751 1 [#]	-558.124 8 ± 17.162 6 [#]

表 3 注射药物前后各组大鼠心脏指数变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Table 3 Changes of heart index of rats in each group before and after drug injection ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

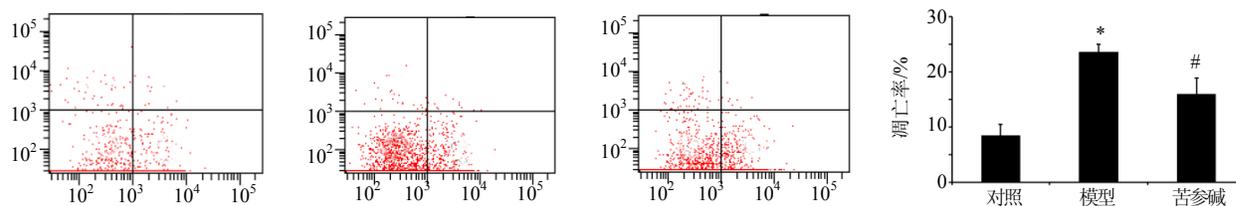
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心脏质量/mg	体质量/g	心脏指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	168.54 ± 31	489.27 ± 34	0.34 ± 0.05
模型	—	238.43 ± 29*	349.47 ± 37*	0.68 ± 0.07*
苦参碱	100	172.61 ± 34 [#]	452.46 ± 38 [#]	0.38 ± 0.07 [#]



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group, below as same

图 1 各组大鼠心肌组织内 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 水平检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Fig.1 Activities of GSH and SOD and level of MDA in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

图2 各组大鼠心肌细胞凋亡率检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)Fig 2 Results of apoptosis rate of myocardial cells of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

4 讨论

体内外实验均表明,阿霉素引起心脏功能、左心室压力及心率改变^[7-8]。研究发现,超声心动图在左心室功能检测中,LVEF、FS、舒张功能参数(E/A值、减速时间、等容舒张时间)、左室后壁厚度、左室后负荷与晚期心毒性致死率相关性好,并且随着随访时间的延长,阳性率逐渐升高^[9]。本研究表明,模型组大鼠LVEDd值显著增大,LVEF和FS值降低,体质量增长缓慢,心脏质量显著增加,心脏指数显著增大,表明阿霉素引起大鼠心脏显著重构,左心功能下降。对大鼠进行血流动力学检测发现,阿霉素引起大鼠LVEPD升高,LVPS、 dp/dt_{max} 及 $-dp/dt_{max}$ 均显著降低,与心脏彩超测量结果相符,注射用苦参碱可以显著改善心脏功能。近10年的研究表明,化疗后的病人出现心肌毒性反应,有5%~20%的病人因扩张型心肌病出现充血性心力衰竭^[10]。在慢性阿霉素心肌损伤模型中,由于心肌细胞凋亡坏死,可导致进行性心脏功能下降引起不可逆的充血性心力衰竭^[11],阿霉素引起心肌细胞凋亡是细胞死亡的触动因素^[12]。阿霉素引起的心肌细胞凋亡与氧化应激有关,阿霉素引起线粒体细胞核因子信号通路激活产生活性氧,导致凋亡受体FasL转录增加,启动凋亡^[13]。氧化应激是心力衰竭的病理生理过程,活性氧簇是阿霉素心肌损害的机制。本研究表明,阿霉素引起大鼠心脏结构重构、心功能下降,同时伴有氧化应激现象,说明氧化应激在心脏恶性重构中发挥重要作用。

阿霉素在治疗肿瘤的同时,引起心血管系统损害,这是由于氧化应激及钙超载所致^[14]。研究表明,阿霉素引起心肌组织MDA、容量性羟蛋白水平显著增加,谷胱甘肽水平显著下降^[15]。铁螯合剂右丙亚胺,可以抑制活性氧的产生,改善阿霉素引起的心肌损伤^[16]。本研究表明,在阿霉素大鼠心脏损伤模型中,心肌组织GSH、SOD活性显著下降,MDA水平显著上升,随着心肌细胞凋亡程度的增

加,氧化应激反应也发生显著改变,注射用苦参碱发挥显著改善作用。

多种病理机制导致阿霉素引起心肌损伤,包括自由基产生、氧化应激诱导脂质过氧化反应、线粒体损伤、儿茶酚胺释放以及内皮细胞凋亡等^[17-18]。病理性重构和血流动力学改变可能是大剂量阿霉素心肌损伤持续的原因,超声心动图的测量对心室重构、血流动力学的检测具有重要意义。注射用苦参碱能减轻阿霉素引起的心肌细胞凋亡,改善心脏重构及心脏功能,可能与其改善心肌细胞氧化应激水平有关。

参考文献

- [1] 黄赞松,周喜汉,韦星,等.苦参素与顺铂联合应用诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡及其机制[J].辽宁中医杂志,2008,35(9):1284-1286.
- [2] 王程程,姜新道.苦参素药理作用研究进展[J].齐鲁药事,2008,27(2):106-108.
- [3] 鄂裘恺,郁林曦,朱歆鑫,等.苦参素对实验性肝纤维化的干预作用[J].南通医学院学报,2009,29(2):95-97.
- [4] Van Dalen E C, van der Pal H J, Kok W E, et al. Clinical heart failure in a cohort of children treated with anthracyclines: a long term follow-up study [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(18): 3191-3198.
- [5] 石晓路,柳絮,郭会彩,等.大鼠心肌细胞分离方法的改进[J].中国药理学通报,2010,26(5):687-690.
- [6] 戴小燕,方秋娟.Langendorff体心脏灌注模型的制备及应用[J].医学综述,2012,1138(13):2036-2039.
- [7] Koka S, Das A, Zhu S G, et al. Long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy without interfering with chemotherapeutic effect [J]. *J Pharmacol*, 2010, 334(3): 1023-1030.
- [8] Cai C, Lothstein L, Morrison R R, et al. Protection from doxorubicin-induced cardiomyopathy using the modified anthracycline N-benzyladriamycin-14-valerate (AD 198) [J]. *J Pharmacol*, 2010, 335(1): 223-230.
- [9] Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al. Targeted

- deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(3): 1229-1235.
- [10] Van Dalen E C, van der Pal H J, Kok W E, *et al.* Clinical heart failure in a cohort of children treated with anthracyclines: a long-term follow-up study [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(18): 3191-3198.
- [11] Xiao J, Sun G B, Sun B, *et al.* Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro [J]. *Toxicology*, 2012, 292(1): 53-62.
- [12] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49(5): 330-352.
- [13] Kalivendi S V, Konorev E A, Cunningham S, *et al.* Doxorubin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium [J]. *Biochem J*, 2005, 389(2):527-539.
- [14] 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.
- [15] Ashour O M, Elberry A A, Alahdal A, *et al.* Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats [J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(4): BR110-115.
- [16] Simůnek T, Stěrba M, Popelová O, *et al.* Anthracycline-induced cardio-toxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron [J]. *Pharmacol Rep*, 2009, 61(1): 154-171.
- [17] Takemura G, Fujiwara, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49 (5): 330-352.
- [18] Wu S, Ko Y S, Teng M S, *et al.* Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(12): 1595-1607.