

果王素对大鼠阿霉素心肌损伤的保护作用及抗氧化机制

谭小进, 陶辉宇, 李 丽, 陈杰彬, 李双杰

(南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 猕猴桃; 果仁油; 不饱和脂肪酸; α 亚麻酸; 心肌损伤; 氧自由基; 阿霉素

[摘要] 目的 观察果王素对大鼠阿霉素心肌损伤的保护作用, 并探讨其作用机理。方法 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 对照组大鼠胃饲和腹腔注射生理盐水, 阿霉素组大鼠胃饲生理盐水和腹腔注射阿霉素, 阿霉素+果王素低剂量组(ADR+Lg 组)大鼠胃饲低剂量果王素和腹腔注射阿霉素, 阿霉素+果王素高剂量组(ADR+Hg 组)大鼠胃饲高剂量果王素和腹腔注射阿霉素。观察大鼠心率和体重变化, 计算死亡率; 测定各组大鼠肌酸激酶同工酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和铜-锌-超氧化物歧化酶活力; 免疫组织化学与半定量逆转录聚合酶链反应分别检测铜-锌-超氧化物歧化酶蛋白及其 mRNA 表达水平。结果 与阿霉素组比较, 阿霉素+果王素高剂量组心率变化率显著下降($P < 0.05$), 体重无显著性变化($P > 0.05$), 肌酸激酶同工酶显著性下降($P < 0.01$), 谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和铜-锌-超氧化物歧化酶活力增加($P < 0.05$), 铜-锌-超氧化物歧化酶蛋白及其 mRNA 表达增加($P < 0.05$), 死亡率下降; 与阿霉素组比较, 阿霉素+果王素低剂量组以上指标均无显著性差异。结论 果王素对大鼠阿霉素心肌损伤有明显疗效, 其疗效成剂量依赖性, 可能为一种有效的心脏保护药物。其机制可能与其清除氧自由基、抑制氧化应激等作用有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Protective Role of Unsaturated Fatty Acid of Actinidia Chinesis Planch Seed Oil on Adriamycin-Induced Myocardium Injury in Rat and mechanism of its Action

TAN Xiao Jing, TAO Hu-Yu, LI Li, CHEN Jie Bin, and LI Shuang Jie

(Department of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, 421001 China)

[KEY WORDS] Actinidia Chinesis; Planch seed Oil; Unsaturated Fatty Acid; α -Linolenic Acid; Myocardium Injury; Oxygen Radical; Adriamycin

[ABSTRACT] **Aim** To observe the protective role of unsaturated fatty acid of actinidia chinesis planch seed oil (UFAACP-SO) on adriamycin induced myocardium injury in rat and clarify the mechanism of its action. **Methods** Forty SD rat were randomly divided into four groups: Control group (physical salts filled into stomach and injected into pleural), ADR group (physical salts filled into stomach and adriamycin injected into pleural), ADR+Lg group (low concentration UFAACP-SO filled into stomach and adriamycin injected into pleural), ADR+Hg group (high concentration UFAACP-SO filled into stomach and adriamycin injected into pleural). The death rate was calculated. Creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), copper-zinc-superoxide dismutase (Cu-Zn-SOD) were detected. The expression level of Cu-Zn-SOD protein and mRNA were detected by immunohistochemical method and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The change rate of heart rate of ADR+Hg group was obviously lower than ADR group ($P < 0.05$), the activity of Cu-Zn-SOD, CAT and GSH-Px of ADR+Hg group were obviously higher than ADR group ($P < 0.05$), serum CK-MB concentration of ADR+Hg group was obviously lower than ADR group ($P < 0.01$), Cu-Zn-SOD protein, mRNA expression were up-regulated remarkably in ADR+Hg group ($P < 0.05$), and the death rate was reduced in ADR+Hg group. But no significantly difference was not found between ADR group and ADR+Lg group and adriamycin group. **Conclusion** UFAACP-SO could significantly decrease adriamycin induced myocardium injury in rat, the mechanism of its action may related to its activity of reducing oxygen radical and inhibiting oxidative stress.

阿霉素是一种广泛应用于实体瘤和血液肿瘤的广谱高效的抗肿瘤药物, 但它呈剂量依赖性的心肌损伤使其临床应用受到很大限制。因此, 寻找对阿

霉素引起的心肌损伤具有保护作用的药物非常必要。有研究认为阿霉素引起心肌损伤与活性氧和自由基^[1]有关。而 α 亚麻酸及其代谢产物具有抗炎作用^[2] 和抗脂质过氧化作用。果王素(即猕猴桃果仁油脂酸)为猕猴桃果仁经临界 CO_2 萃取法提取的果仁油, 主要成分为 α 亚麻酸, 含有一定量的维生素 E 及微量元素硒等物质, 具有很高的药用和保健价值^[3]。因此, 本实验以大鼠阿霉素心肌损伤为研究

[收稿日期] 2005-09-09 [修回日期] 2006-01-20

[基金项目] 湖南省卫生厅中医药科研基金资助(204116)

[作者简介] 谭小进, 主任医师, 教授, 主要从事心肌疾病的防治, 联系电话 13974755486。陶辉宇, 硕士研究生, 联系电话 13087343705, E-mail for taohy76@163.com。通讯作者李双杰, 博士后, 副主任医师, 副教授, 主要从事病毒性心脏病的研究, 联系电话 13016913056, E-mail for lesjie62@vip.sina。

对象,观察果王素对大鼠阿霉素心肌损伤保护作用,并从抗氧化方面探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

果王素由吉首大学提供,为黄色油性液体,浓度60%。阿霉素由浙江海正药业股份有限公司生产,批号H33021980。铜-锌-超氧化物歧化酶(copper-zinc-superoxide dismutase, Cu-Zn-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。兔抗大鼠Cu-Zn-SOD一抗购自武汉博士德公司,SP超敏免疫组织化学检测试剂盒购自福州迈新公司。RNA提取试剂盒及逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒均购自Promega公司。引物由上海生工公司合成。其他化学试剂均为分析纯,购自Sigma公司。

1.2 动物分组及处理

SD大鼠40只,清洁级,雌雄各半,体重 242 ± 28 g,由南华大学实验动物部提供。随机分为4组:对照组、阿霉素(ADR)组、阿霉素+果王素低剂量组(ADR+Lg组)、阿霉素+果王素高剂量组(ADR+Hg组),每组10只。ADR+Lg组和ADR+Hg组分别灌胃果王素,共3天,对照组及阿霉素组予等量生理盐水灌胃。第4天阿霉素组、ADR+Lg组和ADR+Hg组分别予阿霉素2.5 mg/kg,隔日腹腔注射,共6次,建立阿霉素心肌损伤模型^[4]。对照组予等量生理盐水腹腔注射,同时ADR+Lg组和ADR+Hg组隔日分别灌胃果王素60 mg/(kg·d)或180 mg/(kg·d),体积为0.1 mL或0.3 mL,共6次,对照组及阿霉素组予等量生理盐水灌胃。最后一次腹腔注射后24 h处死全部大鼠。球后眶静脉丛取血,并迅速开胸取出心脏、肝脏和肺脏,心脏分成3部分,上部分放入无酶EP管,-70℃保存;中间部分放入普通EP管,-20℃保存;下部分放入10%甲醛固定,石蜡包埋。

1.3 心率及体重变化、死亡率测定

大鼠每次腹腔注射前做心电图测心率,空腹(禁食6 h)称体重,大鼠处死前再次做心电图测心率、称空腹体重,求差值,计算心率变化率。心率变化率=(第一次腹腔注射前心率-处死前心率)/第一次腹腔注射前心率 $\times 100\%$;每日清点大鼠生存数,计算大鼠死亡率,死亡率=死亡数/每组总数 $\times 100\%$ 。

1.4 肌酸激酶同工酶测定

肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)用放射免疫方法检测,取全血放入生物化学管送检验科检测。

1.5 铜-锌-超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活性测定

铜-锌-超氧化物歧化酶(Cu-Zn-SOD)采用黄嘌呤氧化酶法,GSH-Px采用DTNB法,CAT采用可见光法,步骤均按试剂盒说明书进行。将心脏中间部分按心肌比生理盐水为1:3.9的重量比例加入4℃预冷生理盐水。剪碎,捻磨,制成10%组织匀浆。10 kr/min、4℃离心15 min。取上清液测定Cu-Zn-SOD、GSH-Px和CAT活性。采用双宿豚法测定心肌组织中蛋白含量。

1.6 铜-锌-超氧化物歧化酶蛋白的检测

按SP法免疫组织化学试剂盒说明书操作,光镜下观察结果。用PBS代替一抗作阴性对照。胞浆内呈颗粒状或均质状棕黄色反应为阳性,计算细胞阳性表达率。阳性表达率=视野阳性细胞数/视野总细胞数 $\times 100\%$,每个标本取5个视野。

1.7 铜-锌-超氧化物歧化酶mRNA的检测

铜-锌-超氧化物歧化酶mRNA采用半定量RT-PCR方法检测。从-70℃冰箱取出心室肌标本,称取100 mg,在低温下(液氮)尽可能研磨粉碎。按RNA提取试剂盒说明书操作提取RNA。A260/280 nm测mRNA浓度和纯度,样品在波长260 nm和280 nm测吸光度,二者比值大于1.80,小于2.0为RNA样品纯度符合要求。RNA电泳观察28S和18S带。cDNA的合成按Promega逆转录试剂盒说明书进行,反应体系为10 \times buffer 2 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, digo(dT) 1 μ L, RNase inhibition 0.5 μ L, 25 Mm/L 反转录酶 0.5 μ L, 无酶水 10 μ L, RNA 2 μ L, 共22 μ L, 反应程序为42℃ 90 min \rightarrow 70℃ 10 min。逆转录产物进行PCR扩增,PCR总反应体系为20 μ L, 包括master-mix 10 μ L、无酶水 8.4 μ L、10 mmol/L引物 0.8 μ L、cDNA 0.8 μ L。引物序列为:Cu-Zn-SOD上游引物为5'-TTC GAG CAG AAG GCA AGC GGT CAA-3',下游引物5'-AAG CCC AAT CAC ACC ACA AGC CAA-3',产物长度396 bp;分析内参 β -actin上游引物为5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3',下游引物5'-CGA TAG TGA TGA CCT GAC CGT-3',产物长度138 bp。PCR反应条件为95℃预变性3 min后,95℃变性50 s \rightarrow 55℃退火50 s \rightarrow 72℃延伸50 s,31个循环后72℃延伸10 min,4℃保存。PCR产物用1.25%琼脂糖凝胶进行电泳,在紫外灯下观察,摄片,并测定目的带灰度值。

1.8 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较用 t 检验, 多组均数比较用单因素方差分析, 显著性检验水准 $\alpha = 0.05$, 全部资料用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 果王素对大鼠的心率、体重、死亡率的影响

对照组大鼠心率、体重处死前后无明显变化; 阿霉素组心率变化率显著性增大 ($P < 0.01$), 与阿霉素组比较, ADR+ Lg 组大鼠心率变化率无显著性差异 ($P > 0.05$), ADR+ Hg 组之间大鼠有显著性差异 ($P < 0.05$), ADR+ Lg 组和 ADR+ Hg 组之间有显著性差异 ($P > 0.05$); 阿霉素组体重显著性减小 ($P < 0.01$); 与阿霉素组比较, ADR+ Lg 组、ADR+ Hg 组大鼠体重下降值均无显著性差异 ($P > 0.05$), 此两组之间体重下降值亦无显著性差异 ($P > 0.05$)。阿霉素组大鼠死亡 4 只, ADR+ Lg 组大鼠死亡 4 只, ADR+ Hg 组大鼠死亡 1 只 (表 1)。

表 1. 果王素对大鼠心率、体重、死亡率的影响

分 组	心率变化率	体重下降值(g)	死亡率
对照组	2.3% \pm 1.6%	6.6 \pm 24.3	0%
阿霉素组	34.1% \pm 9.4% ^a	58.3 \pm 10.4 ^a	40%
ADR+ Lg 组	21.5% \pm 4.2% ^c	53.6 \pm 4.7 ^c	40%
ADR+ Hg 组	11.6% \pm 2.2% ^{df}	51.0 \pm 17.8 ^{be}	10%

b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P > 0.05$, d 为 $P < 0.05$, 与阿霉素组比较; e 为 $P > 0.05$, f 为 $P < 0.05$, 与 ADR+ Lg 组比较。

2.2 果王素对大鼠肌酸激酶同工酶的影响

阿霉素组大鼠血清中 CK-MB 显著升高 ($P < 0.01$), ADR+ Lg 组 CK-MB 低于阿霉素组, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), ADR+ Hg 组则有显著性差异 ($P < 0.05$), 与 ADR+ Lg 组比较, ADR+ Hg 组也有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 2)。

2.3 果王素对大鼠心肌铜—锌—超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活性的影响

阿霉素组大鼠心肌中 Cu-ZnSOD、GSH-Px 和 CAT 活性均明显低于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。ADR+ Lg 组 Cu-ZnSOD、GSH-Px 和 CAT 活性高于阿霉素组, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), ADR+ Hg 组则有显著性差异 ($P < 0.05$); ADR+ Lg 组与 ADR+ Hg 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$, 表 2)。

2.4 铜—锌—超氧化物歧化酶蛋白的检测结果

阿霉素组 Cu-ZnSOD 表达较对照组明显下降 ($P < 0.01$), ADR+ Lg 组较阿霉素组升高, 但无显著

性差异 ($P > 0.05$), ADR+ Hg 组较阿霉素组明显升高 ($P < 0.01$), 且高于对照组。ADR+ Lg 组、ADR+ Hg 组间有显著性差异 ($P < 0.01$, 表 3, 图 1)。

表 2. 果王素对肌酸激酶同工酶、铜—锌—超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活性的影响

分 组	CK-MB (mmol/l)	Cu-ZnSOD (ku/g)	GSH-Px (u)	CAT (ku/g)
对照组	394 \pm 95	65.8 \pm 11.1	66.5 \pm 9.8	38.1 \pm 8.1
阿霉素组	1 768 \pm 234 ^b	40.0 \pm 8.9 ^a	44.9 \pm 7.1 ^a	19.5 \pm 3.3 ^b
ADR+ Lg 组	1 559 \pm 92 ^c	51.6 \pm 4.9 ^c	51.5 \pm 4.3 ^c	25.6 \pm 3.8 ^c
ADR+ Hg 组	1 307 \pm 173 ^{dh}	52.2 \pm 3.7 ^{de}	55.2 \pm 5.2 ^{de}	27.2 \pm 3.8 ^{de}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P > 0.05$, d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与阿霉素组比较; g 为 $P > 0.05$, h 为 $P < 0.05$, 与 ADR+ Lg 组比较。

2.5 铜—锌—超氧化物歧化酶 mRNA 的检测结果

阿霉素组 Cu-ZnSOD 表达较对照组明显下降 ($P < 0.01$), ADR+ Lg 组较阿霉素组升高, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), ADR+ Hg 组则有显著性差异 ($P < 0.05$)。ADR+ Lg 组与 ADR+ Hg 组间无显著性差异 (表 3、图 2)。

表 3. 铜—锌—超氧化物歧化酶蛋白及其 mRNA 检测结果

分 组	Cu-ZnSOD 细胞阳性表达率	Cu-ZnSOD mRNA 灰度比值
对照组	19.8% \pm 1.7%	0.645 \pm 0.013
阿霉素组	7.8% \pm 2.2% ^b	0.348 \pm 0.033 ^b
ADR+ Lg 组	10.4% \pm 1.3% ^c	0.40 \pm 0.04 ^c
ADR+ Hg 组	27.0% \pm 3.2% ^{dh}	0.45 \pm 0.06 ^{de}

b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P > 0.05$, d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与阿霉素组比较; g 为 $P > 0.05$, h 为 $P < 0.01$, 与 ADR+ Lg 组比较。

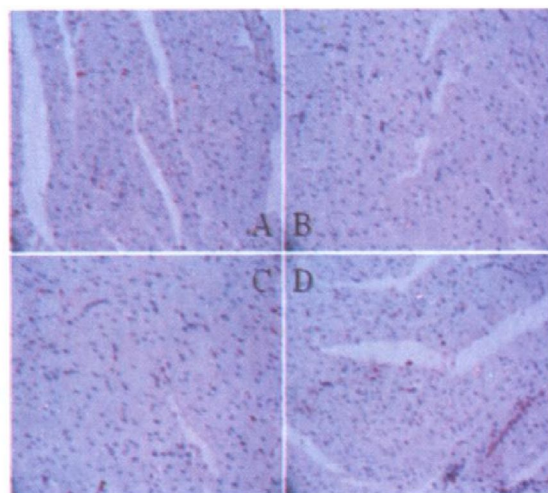


图 1. 铜—锌—超氧化物歧化酶蛋白检测结果图 (SP 染色 $\times 400$) A 为对照组, B 为阿霉素组, C 为 ADR+ Lg 组, D 为 ADR+ Hg 组。

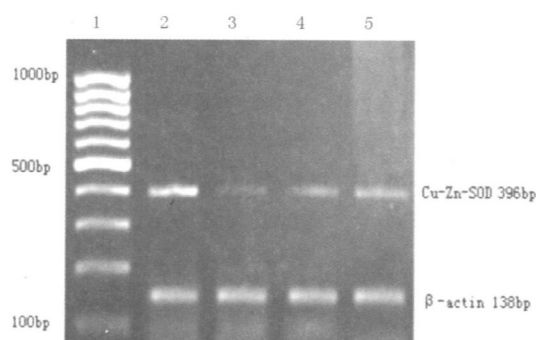


图2. 铜-锌-超氧化物歧化酶 mRNA 检测电泳图 1 为 Marker, 2 为对照组, 3 为阿霉素组, 4 为 ADR+ Ig 组, 5 为 ADR+ Hg 组。

3 讨论

阿霉素引起心肌损伤的机制仍不完全明了,但目前认为与氧自由基有关。阿霉素的化学结构易于产生自由基和氧化应激,导致细胞损伤。阿霉素在心肌细胞中通过细胞色素 P450 和黄素单氧化酶转化为半醌阿霉素。半醌阿霉素有毒,半衰期短,并可与分子氧相互作用,触发级联反应,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)。另有报道阿霉素诱导氧化应激的机制之一是阿霉素- Fe^{2+} -自由基复合物的形成。最后与过氧化氢反应产生羟自由基($\cdot\text{OH}$)。ROS 与脂质、蛋白质和别的细胞成分相互作用,导致线粒体和心肌细胞膜的损伤,从而严重影响细胞各种功能^[5]。而在正常情况下,体内存在清除自由基和抑制自由基反应的酶系统,如 SOD、GSH-Px 和 CAT 等,使之维持自由基产生和清除的动态平衡,防止自由基损伤。

α 亚麻酸系多不饱和脂肪酸,研究发现, α 亚麻酸具有显著的调脂作用^[6]和抗脂质过氧化作用^[2]而发挥心血管的保护作用。近年来还发现 α 亚麻酸及其代谢产物可减少、抑制炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 与白细胞介素 1β (IL- 1β) 的产生,发挥抗炎作用^[2]。另外,果王素还含有一定量的维生素 E 及微量元素硒等物质, GSH-Px 的活性中心是硒半胱氨酸,硒是 GSH-Px 的必需部分,因此果王素可以增加 GSH-Px 合成原料而促进 GSH-Px 合成,增加其活力。而维生素 E 本身也有抗氧化作用。

在本实验中,阿霉素组大鼠心肌中 Cu-Zn-SOD、GSH-Px、CAT 活性及 Cu-Zn-SOD 蛋白含量均明显低

于对照组 ($P < 0.01$), CK-MB 减小。这表明阿霉素在心肌中产生了大量自由基,消耗了 Cu-Zn-SOD、GSH-Px 和 CAT 等抗氧化酶,导致含量减少,活力减低,这又使自由基大量蓄积,形成恶性循环,结果造成心肌损伤。研究表明,与阿霉素组比较, ADR \pm Ig 组大鼠心肌中 Cu-Zn-SOD、GSH-Px 和 CAT 活性等均无显著性差异 ($P > 0.05$), CK-MB 值亦无显著性差异 ($P > 0.05$),说明此剂量果王素保护作用不明显;而 ADR \pm Hg 组以上指标均有显著性差异 ($P < 0.05$)。因此我们推测通过调控 SOD 等抗氧化酶蛋白及其 mRNA 的表达水平而调节其活性是果王素发挥作用的机制之一。

综上所述,果王素有很强的抗过氧化作用,能够增加心肌内抗氧化酶的 mRNA 和蛋白水平的表达,增加其清除氧自由基、抑制氧化应激等能力,减轻阿霉素的心肌细胞毒性,从而保护心脏,其保护作用呈剂量依赖性。目前已知氧自由基参与的病理过程有缺血、缺血再灌注损伤、心脏手术、心力衰竭等^[7]。还有研究表明心肌梗死后心肌间质重塑和心力衰竭进行性发生发展的主要机制之一是心肌局部中炎性细胞因子 TNF- α 和 IL- 1β 的增多^[8]。因此,我们猜测果王素不但能减轻阿霉素化疗导致的心肌损伤,而且对其他原因导致的心肌损伤可能也有一定保护作用,这是今后继续研究的方向,但无疑果王素是一种心脑血管疾病治疗中有前途的药物。

[参考文献]

- [1] Hrelia S, Fiorentini D, Maraldi T, Angeloni C, Bordoni A, Biagi PL, et al. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2002, **1**: 567 (1-2): 150-156
- [2] James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production[J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, **71**: 434-438
- [3] 张永康, 蒋剑波, 陈莉华, 王 蓓, 周乐舟. 猕猴桃果仁油脂脂肪酸的测定及其利用[J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2001, **22** (1): 37-39
- [4] Siveski Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probuocol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect[J]. *Circulation*, 1995, **91** (1): 10-15
- [5] 梁荣华. 阿霉素心脏毒性作用机制的研究进展[J]. *心血管病学进展*, 1998, **19** (2): 108-110
- [6] Ana Baylin, Kabagambe EK, Alberto Ascherio, Donna Spiegelman, Hannia Campos. Adipose tissue α -linolenic acid and nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica[J]. *Circulation*, 2003, **107**: 1586-1592
- [7] 姜振宇, 宣素娟, 郝克倩, 郑伟符, 尚贵民. 氧自由基与心肌损伤[J]. *心血管康复医学杂志*, 2001, **10** (1): 82-84
- [8] 谢 萍, 徐义先, 祝善俊, 杨 铮, 高志凌. 肿瘤坏死因子 α 介导大鼠心肌梗死后心功能变化的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 662-663

(此文编辑 胡必利)