

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0603-04

• 实验研究 •

依达拉奉对阿霉素诱导的心肌细胞毒性的影响及其机制

林连枝¹, 程飞², 张辉³, 杨震², 徐索文⁴, 廖新学²

(1. 广州市番禺区第二人民医院, 广东省广州市 511470; 2. 中山大学附属第一医院高血压血管病科, 广东省广州市 510080;

3. 中山大学中山医学院解剖教研室, 广东省广州市 510080; 4. 中山大学药学院, 广东省广州市 510006)

[关键词] 依达拉奉; 阿霉素; 心肌保护; 氧化应激; 细胞凋亡

[摘要] 目的 观察依达拉奉对蒽环类抗癌药阿霉素诱导的乳鼠心肌细胞毒性的影响及其机制。方法 用不同浓度的阿霉素处理乳鼠心肌细胞, 建立蒽环类抗癌药心脏毒性的体外模型。依达拉奉在阿霉素处理心肌细胞前 1 h 加入培养液中作为预处理。应用 CCK-8 比色法检测细胞存活率; 谷胱甘肽试剂盒检测细胞内还原型谷胱甘肽的水平; 双氯荧光素染色/荧光显微镜照相检测细胞内活性氧的含量; Western blot 法检测胞浆中细胞色素 C 和 Cleaved Caspase-3 的表达。结果 阿霉素在 1~8 mg/L 浓度范围内处理乳鼠心肌细胞 24 h 可剂量依赖性地降低细胞存活率。在 2 mg/L 阿霉素处理心肌细胞前 1 h 应用不同浓度的依达拉奉预处理可明显地抑制阿霉素诱导的心肌细胞毒性损伤, 使细胞存活率显著升高。20 μmol/L 依达拉奉预处理 1 h 可抑制 2 mg/L 阿霉素引起的氧化应激反应, 使胞内还原型谷胱甘肽水平升高, 活性氧含量降低。在阿霉素损伤心肌细胞前, 给予依达拉奉预处理也可降低胞浆中 Cytochrome C 含量及 Cleaved Caspase-3 表达。结论 依达拉奉可显著减弱阿霉素诱导的心肌细胞毒性, 此保护作用可能与抗氧化及抑制凋亡相关蛋白的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Edaravone on Adriamycin-induced Myocardial Toxicity and Its Possible Mechanisms

LN Lian-Zhi¹, CHENG Fei², ZHANG Hui³, YANG Zhen², XU Suo-Wen⁴, and LIAO Xin-Xue²

(1. The Second People's Hospital of Panyu, Guangzhou 511470 China; 2. Department of Hypertension and Vascular Disease, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080 China; 3. Department of Anatomy, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080 China; 4. College of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006 China)

[KEY WORDS] Edaravone; Adriamycin; Myocardial Protection; Oxidative Stress; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of edaravone (EDA) on myocardial toxicity induced by anthracycline antitumor adriamycin (ADR) and the mechanisms underlying. **Methods** Primary cultured myocardial cells were treated with ADR at different concentrations as a cardiac toxicity model of anthracycline antitumor. EDA was administered 1 h before ADR as pretreatment. Cell viability was measured by using cell counter kit (CCK-8). The level of intercellular reduced glutathione (GSH) was detected according to commercial kit. Intercellular reactive oxygen species (ROS) was observed by DCFH-DA staining and photofluorography. The expressions of Cytochrome C and cleaved Caspase-3 were detected by western blot. **Results** ADR at the concentrations from 1 to 8 mg/L for 24 h damaged myocardial cells in a dose-dependent manner. Preconditioning of 5~20 μmol/L EDA protected myocardial cells against ADR-induced injury, increasing cell survival rate. The preconditioning of EDA inhibited oxidative stress induced by 2 mg/L ADR, increasing the level of GSH and decreasing the content of ROS, and attenuated the expressions of Cytochrome C and cleaved Caspase-3. **Conclusion** EDA can attenuate the myocardial toxicity induced by ADR, which may be associated with its antioxidant and antiapoptosis action.

阿霉素 (adriamycin, ADR) 是临床常用的蒽环类抗肿瘤药物, 然而其心脏毒性的不良反应严重影响其广泛应用^[1]。大量研究表明, 氧化应激在阿霉素化疗过程中引起的心脏毒性起着重要的作用, 如

阿霉素能明显升高脂质过氧化物的水平, 降低还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 的含量, 抑制超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性^[2,3]。

依达拉奉 (edaravone, EDA) 是近年发现的一种自由基清除剂, 它能保护 PC12 神经细胞株对抗氯化钴 (cobalt chloride, CoCl₂) 诱导的细胞凋亡^[4]。EDA 也能保护脑组织对抗缺血引起的脑梗死, 研究显示这种神经保护作用与清除自由基、抑制脂质过

[收稿日期] 2010-06-17 [修回日期] 2010-08-12

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2007B080701030)

[作者简介] 林连枝, 主治医师, 主要从事心血管内科方面的临床与基础研究, E-mail 为 807405875@qq.com。程飞, 博士, 主治医师, 主要从事心脏介入方面的临床与基础研究, E-mail 为 mdc2006@126.com。廖新学, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为心血管内科等临床与实验, E-mail 为 master0@126.com。

氧化物的形成等有关^[5-6]。

然而,依达拉奉是否能保护心肌细胞对抗阿霉素诱导的毒性损伤尚未见报道。本文旨在观察 EDA 对阿霉素诱导的乳鼠心肌细胞毒性的影响,并着重从氧化应激方面探讨 EDA 保护心肌细胞对抗阿霉素诱导损伤的机制,为阿霉素在临床上广泛应用提供新的实验资料。

1 材料和方法

1.1 材料

健康 SD 乳鼠,1~3 天龄,由中山大学动物实验中心提供。依达拉奉由济南中科化工有限公司提供、盐酸阿霉素和 DCFH-DA 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, Cytochrome C 和 Cleaved Caspase-3 抗体购自于 Cell Signaling Technology 公司, CCK-8 细胞活力检测试剂盒和谷胱甘肽检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所, DMEM 培养基购自 Gibco 公司。胰蛋白酶和 Ⅲ型胶原酶购自广州威佳科技有限公司。

1.2 乳鼠心肌细胞培养

取 SD 大鼠(雌雄不限),经 75% 酒精消毒后,开胸取出心脏,用眼科剪剪成 1~2 mm 大小的块状物,再用胰蛋白酶和 Ⅲ型胶原酶消化,将消化的心肌细胞接种在培养皿中作原代细胞培养。采用差速贴壁法进行分离纯化心肌细胞,48 h 后更换培养液。

1.3 细胞存活率的检测

将乳鼠心肌细胞接种于 96 孔培养板中,分别给予不同浓度的阿霉素处理 24 h 或在阿霉素处理前给予不同浓度的 EDA 预处理 1 h 后,再用有效损伤浓度的阿霉素处理 24 h 处理完成后,每孔加 10 μ L CCK-8 轻摇,37℃ 孵育 2 h 用酶标仪记录 450 nm 波长处的吸光度(OD)。取 4 孔 OD 值的平均数按公式计算细胞存活率,即细胞存活率(%) = $OD_{\text{处理组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$,重复 3 次。

1.4 还原型谷胱甘肽的检测

乳鼠心肌细胞接种于 6 孔培养板,每组 3 个复孔,2 mg/L 阿霉素处理 24 h 和 / 或 20 μ mol/L EDA 预处理 1 h 后再用 2 mg/L 阿霉素处理 24 h 将细胞裂解,5 kr/min 离心,去除蛋白,取上清液,加入 DTNB, GSH 可以与其反应生成黄色的 TNB,用酶标仪检测 420 nm 波长处各样品的吸光度。

1.5 细胞内活性氧含量的检测

DCFH-DA 是一种本身没有荧光的物质,细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)可将其氧化成发出绿色荧光的 DCF。绿色荧光的强弱可以间

接反映细胞内 ROS 的水平。将乳鼠心肌细胞接种于 96 孔培养板内,经 2 mg/L 阿霉素处理 4 h 和 / 或 20 μ mol/L EDA 预处理 1 h 后再用 2 mg/L 阿霉素处理 4 h 用 PBS 洗两次,在含 10 μ mol/L DCFH-DA 的无血清培养液中 37℃ 孵育 60 min。在荧光显微镜下随机摄片,绿色荧光强度用 ImageJ 1.410 软件的 Color Histogram 模块进行分析。

1.6 Western blot 法检测蛋白表达

乳鼠心肌细胞接种于培养皿内,在 2 mg/L 阿霉素处理 24 h 和 / 或 20 μ mol/L EDA 预处理 1 h 后再用 2 mg/L 阿霉素处理 24 h 用预冷的 PBS 洗两次,常规方法将细胞裂解,4℃ 静置 30 min。12 kr/min 离心 10 min,取上清,采用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经 SDS-PAGE 分离后,转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h。随后加入兔抗大鼠 cytochrome C 或 cleaved caspase-3 抗体(1:1 000),4℃ 轻摇过夜,用 TBST 洗 3 次,加入羊抗兔二抗,室温孵育 1 h 漂洗 3 次。ECL 显色后,用 ImageJ 1.410 进行灰度分析。

1.7 统计学处理

实验数据用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 依达拉奉对抗阿霉素诱导的心肌细胞毒性

不同浓度的阿霉素作用心肌细胞 24 h 后,细胞存活率显著降低,与对照组比较差异有统计学意义,经相关性分析显示,具有明显的剂量依赖关系($r = -0.98$ 表 1)。在 2 mg/L 阿霉素处理心肌细胞前,给予不同浓度的 EDA 预处理 1 h 可明显对抗阿霉素引起的细胞存活率降低,其中 20 μ mol/L EDA 可使细胞存活率从 67.3% \pm 2.2% 显著提高到 83.3% \pm 3.5% (表 2)。

表 1 不同浓度的阿霉素对心肌细胞存活率的影响

分 组	细胞存活率
对照组	100%
1 mg/L ADR	85.6% \pm 4.9% ^a
2 mg/L ADR	67.3% \pm 2.2% ^b
4 mg/L ADR	39.8% \pm 5.2% ^b
8 mg/L ADR	25.5% \pm 3.2% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2 依达拉奉对阿霉素诱导的心肌细胞毒性的影响

分 组	细胞存活率
对照组	100%
2 mg/L ADR	67.3% ± 2.2% ^a
5 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR	72.5% ± 4.1%
10 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR	78.1% ± 5.6% ^b
20 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR	83.3% ± 3.5% ^c

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$, c为 $P < 0.01$, 与单独使用阿霉素组比较。

2.2 依达拉奉对心肌细胞内还原型谷胱甘肽水平的影响

用 2 mg/L 阿霉素处理 24 h 后, 心肌细胞内 GSH 水平降低, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。在用阿霉素损伤心肌细胞前, 给予 20 μmol/L EDA 预处理 1 h 可明显升高还原型谷胱甘肽含量 (表 3)。

表 3 依达拉奉预处理对阿霉素引起的还原型谷胱甘肽水平的影响

分 组	GSH 的相对含量
对照组	1.00
2 mg/L ADR	0.57 ± 0.08 ^a
20 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR	0.80 ± 0.04 ^b
20 μmol/L EDA	1.01 ± 0.06

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与单独使用阿霉素组比较。

2.3 依达拉奉对心肌细胞内活性氧含量的影响

2 mg/L 阿霉素作用心肌细胞 4 h 后, 细胞内 ROS 的含量明显升高, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 4)。20 μmol/L EDA 预处理 1 h 本身不改变细胞内 ROS 的水平, 却可明显降低细胞内 ROS 的含量。

表 4 依达拉奉预处理对阿霉素引起的细胞内氧自由基堆积的影响

分 组	DCF 相对荧光强度
对照组	1.00
2 mg/L ADR	1.68 ± 0.11 ^a
20 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR	1.34 ± 0.05 ^b
20 μmol/L EDA	0.91 ± 0.08

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与单独使用阿霉素组比较。

2.4 依达拉奉对细胞色素 C 释放作用的影响

2 mg/L 阿霉素处理 24 h 可使胞浆中细胞色素

C 的含量约升高 1 倍。20 μmol/L EDA 预处理可明显抑制细胞色素 C 从线粒体释放入胞浆, 使胞浆细胞色素 C 的相对含量从 1.57 ± 0.08 降低到 0.98 ± 0.13 ($P < 0.01$), 而 EDA 本身不影响其含量 ($P > 0.05$, 图 1 和表 5)。

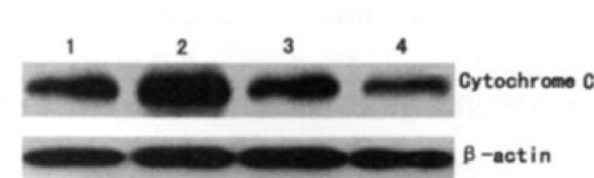


图 1 依达拉奉预处理对阿霉素引起的胞内细胞色素 C 水平的影响 (免疫印迹) 1 为对照组, 2 为 2 mg/L ADR 组, 3 为 20 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR 组, 4 为 20 μmol/L EDA 组。

表 5 依达拉奉预处理对阿霉素引起的胞内细胞色素 C 水平的影响 (定量分析)

分 组	Cytochrome C/β-actin
对照组	0.85 ± 0.14
2 mg/L ADR	1.57 ± 0.08 ^a
20 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR	0.98 ± 0.13 ^b
20 μmol/L EDA	0.65 ± 0.06

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与单独使用阿霉素组比较。

2.5 依达拉奉对 Caspase-3 活化的抑制作用

Cleaved Caspase-3 (活化形式) 的表达在阿霉素 (2 mg/L) 处理 24 h 后明显上调 ($P < 0.01$), 而 Cleaved Caspase-3 表达上调可被 20 μmol/L EDA 预处理 1 h 所减弱。EDA 本身对 Caspase-3 的活化影响较弱, 与对照组比较差异无显著性 (图 2 和表 6)。

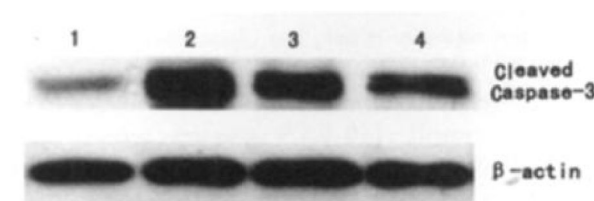


图 2 依达拉奉预处理对阿霉素引起的 Caspase-3 活化的影响 (免疫印迹) 1 为对照组, 2 为 2 mg/L ADR 组, 3 为 20 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR 组, 4 为 20 μmol/L EDA 组。

3 讨论

本文结果显示, 1~8 mg/L 阿霉素处理原代培养的心肌细胞 24 h 可明显地降低细胞存活率, 这与刘晓健等^[7]的报道相一致。有意义的是, 本文研究

表 6 依达拉奉预处理对阿霉素引起的 Caspase-3活化的影响 (定量分析)

分 组	Cleaved Caspase-3/β-actin
对照组	0.24 ± 0.08
2 mg/L ADR	1.16 ± 0.09 ^a
20 μmol/L EDA + 2 mg/L ADR	0.82 ± 0.05 ^b
20 μmol/L EDA	0.33 ± 0.06

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与单独使用阿霉素组比较。

表明氧自由基清除剂 EDA 能保护心肌细胞对抗阿霉素诱导的心肌细胞损伤, 这在国内尚未见报道。

本文进一步证实, 阿霉素损伤心肌细胞的同时, 明显诱导氧化应激反应, 使细胞内 ROS 大量产生, GSH 严重消耗。H idleg 等^[8]报道, 氧化应激是阿霉素心脏毒性的重要机制之一, 通过给予一些抗氧化剂可以缓解阿霉素的毒性作用。本文的结果也支持此观点, EDA 能清除过量产生的 ROS, 减少还原当量 GSH 消耗。国内很多学者也发现^[7], 冬虫夏草、人参茎叶皂甙和参麦注射液等对阿霉素的心脏毒性均具有一定的疗效, 这有力支持了本文的结果。

氧化应激常常引起线粒体膜的受损, 导致线粒体通透性增高, 引起细胞色素 C 从线粒体释放出来^[9]。本文通过提取胞浆蛋白, 进行免疫印迹检测显示, 在阿霉素损伤组, 细胞色素 C 的水平明显升高。值得注意的是, EDA 能显著抑制细胞色素 C 从线粒体释放, 因此本文推测, 这可能与 EDA 清除过多的氧自由基, 使线粒体免遭氧化应激损伤有关。

凋亡是细胞死亡的方式之一, 常常引起细胞存活率的降低, 而 Caspase-3 是凋亡的最后执行者。EDA 可以保护神经组织, 对抗氧化应激诱导的神经

细胞炎症反应和凋亡等^[10]。本文为了进一步明确 EDA 保护心肌细胞对抗阿霉素诱导的毒性损伤是否与抗凋亡有关, 又进一步检测了裂解型 Caspase-3 的表达。结果发现, EDA 通过清除氧自由基、抑制细胞色素 C 释放, 这避免 Caspase-3 的活化、抑制细胞凋亡, 从而提高了细胞存活率。

综上所述, 本文证实 EDA 能保护乳鼠心肌细胞对抗阿霉素引起的毒性损伤, 此作用可能与 EDA 抗氧化应激及抑制 Caspase-3 活化有关。这为临床上阿霉素的广泛应用提供新颖的实验依据。

[参考文献]

- [1] Ferreira AI, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Hematol Agent Med Chem*, 2008, 6 (4): 278-281.
- [2] Chulalongitron L, Ihara Y, Muroi E, et al. Cytoprotective role of Phyllanthus urinaria L. and glutathione-S transferase Pi in doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cells [J]. *J Med Assoc Thai*, 2009, 92 (Suppl 3): S43-51.
- [3] Ito T, Muraoka S, Takahashi K, et al. Beneficial effect of taurine treatment against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, 643: 65-74.
- [4] Chen JX, Zhao T, Huang DX. Protective effects of edaravone against cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Neurosci Bull*, 2009, 25 (2): 67-74.
- [5] Higashi Y. Edaravone for the treatment of acute cerebral infarction: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2009, 10 (2): 323-331.
- [6] 李晓峰, 海花. 依达拉奉治疗急性脑出血的临床疗效评价 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (7): 545-547.
- [7] 刘晓健, 刘义, 胡长宏, 等. 参脉注射液对阿霉素所致心肌细胞毒性的影响 [J]. *中国现代药物应用*, 2008, 2 (7): 11-13.
- [8] H idleg K, Kalai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2007, 7 (2): 160-164.
- [9] Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, et al. Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23 (3B): 2445-450.
- [10] Kaur C, Ling EA. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system [J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15 (29): 3068-080.

(此文编辑 李玲玲)