

# 1, 6-二磷酸果糖对阿霉素心肌损伤的保护作用

高顺利<sup>1</sup>, 王北冰<sup>2</sup>, 王立忠<sup>3</sup>, 陈 瑶<sup>1</sup>

(南华大学 1. 附属第一医院小儿科; 2. 诊断学教研室;

3. 附属第一医院呼吸内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 1, 6-二磷酸果糖; 阿霉素; 心肌损伤; 抗氧化; 铜-锌-超氧化物歧化酶; 肌酸激酶同工酶

[摘要] 目的 研究 1, 6-二磷酸果糖对阿霉素心肌损伤的保护作用。方法 30 只 SD 大鼠随机分为对照组、阿霉素组和阿霉素+1, 6-二磷酸果糖组。观察大鼠心率和肝、肺干湿重比变化, 测定各组大鼠肌酸激酶同工酶水平。检测心肌铜-锌-超氧化物歧化酶活力, 免疫组织化学法测定铜-锌-超氧化物歧化酶蛋白水平表达, 半定量聚合酶链反应测定铜-锌-超氧化物歧化酶基因表达水平。结果 与阿霉素组比较, 阿霉素+1, 6-二磷酸果糖组心率变化率明显下降( $P < 0.05$ ), 肝、肺干湿重比明显上升( $P < 0.05$ ), 肌酸激酶同工酶显著下降( $P < 0.01$ )。心肌铜-锌-超氧化物歧化酶活力明显提高( $P < 0.05$ ), 铜-锌-超氧化物歧化酶基因表达及蛋白表达增加( $P < 0.05$ )。结论 1, 6-二磷酸果糖对阿霉素心肌损伤有保护作用, 其机制可能与其抑制氧化应激有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Protective Effect of Fructose-1, 6-Diphosphate on Adriamycin-induced Myocardial Damage

GAO Shun-Li, WANG Bei-Bing, WANG Li-Zhong, and CHEN Yao

(Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Fructose-1, 6-Diphosphate; Adriamycin; Myocardial Damage; Anti-Oxidation; Cu-Zn Super Oxide Dismutase; Creatine Kinase Isoenzyme MB

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of fructose-1, 6-diphosphate(FDP) on adriamycin (ADR)-induced myocardial damage. **Methods** 30 SD rats were divided into three groups randomly: control group, ADR group and ADR+ FDP group. The changes of heart rate and dry and wet ratio of pulmonary and liver were observed, and the level of creatine kinase isoenzyme MB(CK-MB) were measured. The active level of CuZn SOD was examined and its protein level was measured by immunohistochemistry, its gene level expression was measured by half-quantitative polymerase chain reaction. **Result** Compared with ADR group, the heart rate change of ADR+ FDP group was decreased ( $P < 0.05$ ), the dry and wet ratio was increased ( $P < 0.05$ ), and CK-MB was decreased ( $P < 0.01$ ) obviously. The active level of Cu-Zn SOD was up ( $P < 0.05$ ), the gene and protein expression of Cu-Zn SOD was down ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** FDP has a protective effect on adriamycin-induced myocardial damage. Its mechanism is possibly related with inhibiting oxidation.

蒽醌类抗生素有明显的心脏毒性从而限制了其在临床的使用, 李萍等<sup>[1]</sup>报道 4 例白血病患者用蒽醌类抗生素化疗时引起扩张型心肌病。阿霉素(adriamycin, ADR) 属蒽醌类抗生素, 是一种高效、广谱抗肿瘤药物, 临床和实验研究发现阿霉素可导致严重的心脏毒性, 表现为用药早期出现各种心律失常, 晚期出现剂量依赖性充血性心力衰竭, 使其应用受到限制<sup>[2]</sup>, 其心脏毒性的机制之一是阿霉素产生的自由基导致心肌损伤<sup>[3]</sup>。阿霉素性心肌病模型是一种经典的心肌病实验性模型。1, 6-二磷酸果糖

(fructose-1, 6-diphosphate, FDP) 是细胞内葡萄糖代谢的中间产物, 外源性 1, 6-二磷酸果糖可进入细胞内参与糖酵解产生 ATP。FDP 能减轻阿霉素所致心肌损伤, 但其保护机制尚未阐明。阿霉素产生的自由基可引起心肌损伤, 因而推测 FDP 可以通过抗氧化而保护心肌。本实验观察 1, 6-二磷酸果糖对 SD 大鼠阿霉素心肌损伤的保护作用, 并对其抗氧化机制进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物和试剂

SD 大鼠, 清洁级, 30 只, 8~10 周龄, 体重 250 g 左右, 雌雄各半, 购于南华大学动物实验部。常规颗粒饲料喂养, 自由饮水。阿霉素, 10 mg/支(浙江海

[收稿日期] 2006-04-29

[修回日期] 2006-09-12

[作者简介] 高顺利, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为小儿急救医学, 联系电话为 0734-8279057。王北冰, 副教授, 研究方向为心血管疾病诊断学研究。王立忠, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为心肺基础与临床研究。

正药业股份有限公司,批号:20040416)。FDP,购自广东省振康医药有限公司,批号:20040523。Taq 酶 Master Mix 购自天为时代公司,逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自 Fermentas 公司,DNA Marker 购自 Promega 公司,Trizol 购自 Promega 公司,引物由上海生工合成。铜-锌-超氧化物歧化酶(Cu-Zn superoxide dismutase, Cu-Zn SOD)测定试剂盒购于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,S-P 超敏免疫组织化学检测试剂盒购自福州迈新公司。

## 1.2 分组及干预方法

30 只大鼠随机分为对照组、阿霉素组和阿霉素+1,6-二磷酸果糖组(ADR+ FDP 组),每组 10 只。阿霉素组采用阿霉素 2.5 mg/kg,腹腔注射,隔日一次,共 6 次。ADR+ FDP 组阿霉素的用量及用法同阿霉素组,FDP 600 mg/kg,腹腔注射,每日 1 次,共 12 次<sup>[4]</sup>。与阿霉素同天注射时在阿霉素注射前 20 min 进行。对照组给相同容量生理盐水,腹腔注射,每日一次,共 12 次。

最后一次阿霉素处理 24 h 后,球后眶静脉取血,1%戊巴比妥钠 0.3 mL 腹腔注射麻醉大鼠,无菌条件下处死。取心脏称重后分 3 等份,上部心肌置于普通 EP 管中,-20℃保存;中部置于 10% 甲醛固定;下部置于无酶 EP 管中,-80℃保存。取一部分肝脏及肺脏,生理盐水中洗净残留血液,滤纸吸干。

## 1.3 心率及肝、肺干湿重比测定

大鼠第 1 次腹腔注射阿霉素前做心电图测心率,处死前再做心电图测心率,计算心率变化率。心率变化率=(处死前心率-第 1 次腹腔注射前心率)/第 1 次腹腔注射前心率×100%。

将取下的肝脏、肺脏置于质量已知的小瓶中,电子秤称其质量,计算湿重。置小瓶于烤箱中,72 h 后取出,电子秤称其质量,计算干重。算出干、湿重比。

## 1.4 肌酸激酶同工酶的测定

肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)水平采用放射免疫方法测定,取全血送检验科检测。

## 1.5 心肌铜-锌-超氧化物歧化酶活力的测定

采用黄嘌呤氧化酶法,步骤按试剂盒说明书进行。将上部心肌按心肌:生理盐水为 1:9 的质量比加入 4℃预冷生理盐水。剪碎,捻磨,制成 10% 组织匀浆。10 000 r/min,4℃离心 15 min。取上清液测定 Cu-Zn SOD 活性。采用双宿脬法测定心肌组织中蛋白含量。

## 1.6 心肌铜-锌-超氧化物歧化酶蛋白表达水平的检测

采用免疫组织化学方法。中部心肌 4% 多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,然后按 SP 免疫组织化学试剂盒进行操作。封片后光镜下观察。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,切片于光镜下 200 倍放大,经图像分析仪随机选择 10 个视野检测阳性染色平均吸光度和阳性细胞百分比。蛋白表达指数(protein expression index, PEI)=平均吸光度×阳性细胞百分比×100。阳性细胞百分比=视野阳性细胞数/视野总细胞数×100%。

## 1.7 心肌铜-锌-超氧化物歧化酶基因表达水平的检测

采用 RT-PCR 方法。取心肌组织约 100 mg,加入 Trizol 1 mL 低温下研磨,按说明书提取心肌总 RNA,A260/280 测 RNA 浓度和纯度,各管 RNA 浓度调为 1.0 g/L。RNA 电泳观察 28S 和 18S 带。cDNA 合成按照 Fermentas 逆转录试剂盒说明书进行。逆转录产物进行 PCR 扩增,PCR 反应总体积为 20 μL,包括去离子水 7.6 μL、2×Taq PCR MasterMix 10 μL、10 mmol/L 引物各 0.8 μL 和 cDNA 0.8 μL。Cu-Zn SOD 引物序列,正义 5'-TTC GAG CAG AAG GCA AGC GGT CAA-3',反义 5'-AAT CCC AAT CAC ACC ACA AGC CAA-3',扩增产物长度为 396 bp;内参 β-actin 正义 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AG-3',反义 5'-CGA TAG TGA TGA CCT GAC CGT-3',扩增产物长度为 138 bp。反应条件为 95℃ 3 min,一个循环;95℃变性 50 s→55℃退火 50 s→72℃延伸 50 s,31 个循环;最后 72℃延伸 10 min。反应后取终产物 6 μL,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶分析系统观察、分析实验结果;测出目的基因及内参照的积分吸光度(A)值,并计算二者的比值,为 mRNA 相对表达量。

## 1.8 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$  被认为有统计学意义。全部资料用 SPSS10.0 统计软件分析。

## 2 结果

### 2.1 1,6-二磷酸果糖对大鼠心率、肝脏肺脏干湿重比的影响

对照组大鼠心率无明显变化,与对照组比较,阿霉素组心率变化率增大( $P < 0.01$ ),ADR+ FDP 组与

阿霉素组比较, 心率变化率明显减小 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 阿霉素组肝脏干湿重比减小 ( $P < 0.05$ ), 用 FDP 干预治疗后, 与阿霉素组比较, ADR+ FDP 组肝脏干湿重比增加 ( $P < 0.05$ )。肺脏有同样的变化(表 1)。

表 1. 1, 6-二磷酸果糖对大鼠心率、肝脏肺脏干湿重比的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	心率变化率	肝脏干湿重比	肺脏干湿重比
对照组	2.2% $\pm$ 1.5%	0.2813 $\pm$ 0.0125	0.2091 $\pm$ 0.0213
阿霉素组	34.3% $\pm$ 8.5% <sup>a</sup>	0.2485 $\pm$ 0.0172 <sup>b</sup>	0.1486 $\pm$ 0.0364 <sup>b</sup>
ADR+ FDP 组	9.8% $\pm$ 3.2% <sup>c</sup>	0.2788 $\pm$ 0.0263 <sup>c</sup>	0.2052 $\pm$ 0.0065 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.01$ , b 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与阿霉素组比较。

## 2.2 1, 6-二磷酸果糖对大鼠肌酸激酶同工酶水平的影响

对照组、阿霉素和 ADR+ FDP 组 CK-MB 水平分别为  $394 \pm 91$ 、 $1\ 823 \pm 215$  和  $958 \pm 125$  mmol/L。与对照组比较, 阿霉素组血清中 CK-MB 显著增高 ( $P < 0.01$ )。用 FDP 干预治疗后, 与阿霉素组比较, ADR+ FDP 组血清中 CK-MB 明显下降 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 1, 6-二磷酸果糖对铜-锌-超氧化物歧化酶活力的影响

与对照组比较, 阿霉素组大鼠心肌 Cu-Zn-SOD 活力明显下降 ( $P < 0.05$ )。用 FDP 干预治疗后, 与阿霉素组比较, ADR+ FDP 组大鼠心肌 Cu-Zn-SOD 活力明显提高 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

## 2.4 1, 6-二磷酸果糖对铜-锌-超氧化物歧化酶蛋白及 mRNA 表达水平的影响

阿霉素组心肌组织中 Cu-Zn-SOD 表达及其 mRNA 水平明显降低, 而 FDP 干预治疗组 Cu-Zn-SOD 蛋白与 mRNA 水平均明显升高(表 2, 图 1 和图 2)。

表 2. 1, 6-二磷酸果糖对大鼠心肌铜-锌-超氧化物歧化酶活力、蛋白及 mRNA 水平表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	活力(U/g)	蛋白表达指数	mRNA 灰度比值
对照组	67.07 $\pm$ 7.63	18.32 $\pm$ 0.64	0.6421 $\pm$ 0.021
阿霉素组	40.35 $\pm$ 5.26 <sup>a</sup>	7.69 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	0.3561 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>
ADR+ FDP 组	54.21 $\pm$ 4.95 <sup>b</sup>	16.34 $\pm$ 2.31 <sup>b</sup>	0.5576 $\pm$ 0.105 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与阿霉素组比较。

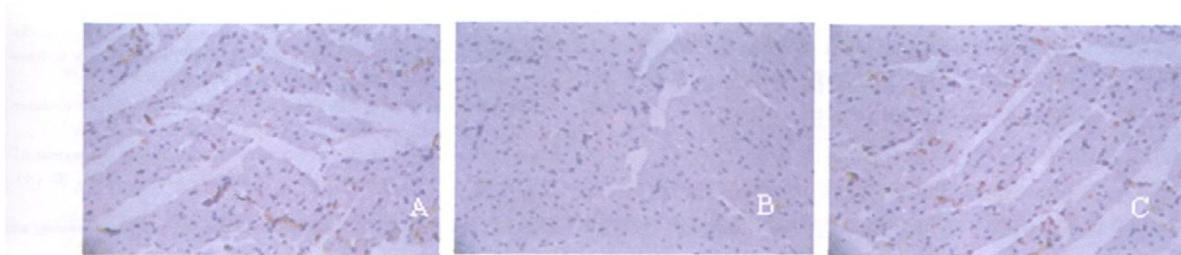


图 1. 铜-锌-超氧化物歧化酶蛋白表达免疫组织化学图(SP 染色  $\times 400$ ) A 为对照组, B 为阿霉素组, C 为 ADR+ FDP 组。

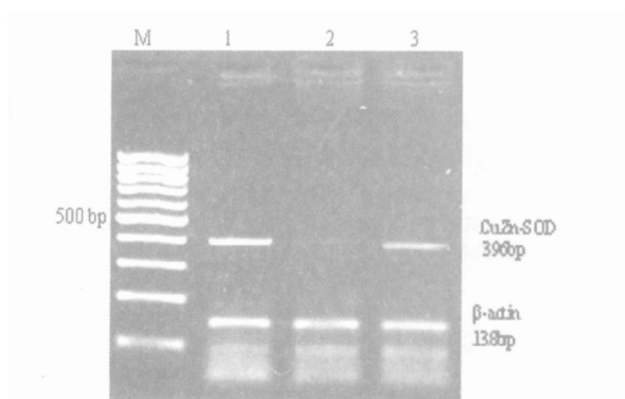


图 2. 心肌组织铜-锌-超氧化物歧化酶 mRNA 逆转录聚合酶链反应电泳图 M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为阿霉素组, 3 为 ADR+ FDP 组。

## 3 讨论

目前研究证实, 阿霉素性心肌病实验模型主要机制是氧化应激损伤。内源性 MnSOD 的过量表达可以使心肌细胞对氧自由基的耐受性增强<sup>[5]</sup>。用表达人类 MnSOD 的转基因小鼠为研究对象, 来研究线粒体上阿霉素介导的氧自由基的产生情况。在非转基因小鼠中, 用阿霉素后心肌细胞显示明显的剂量依赖性超微结构的改变, 而转基因小鼠改变并不明显。生物化学检查则显示, 非转基因小鼠血清肌酸激酶和乳酸脱氢酶明显增加。说明阿霉素所致心肌毒性与氧自由基有关, 而且线粒体是心肌损伤的主要部位<sup>[6]</sup>。

阿霉素的化学结构有利于氧自由基的产生。在心肌线粒体上有一种不同于其他组织细胞的独特的酶,它位于线粒体内膜,此酶使阿霉素还原为半醌,引起严重的氧化应激<sup>[7]</sup>,应用阿霉素后,内源性抗氧化物质因清除氧自由基而减少<sup>[8]</sup>,其结果使心肌病及心力衰竭的发生成为可能<sup>[9]</sup>。阿霉素进入心肌细胞后,产生活性氧,引起氧化应激,产生大量氧自由基、超氧阴离子、过氧化氢或反应性极强的羟自由基。心肌细胞中产生的这些氧自由基作用于细胞膜及各种细胞器膜,引起脂质过氧化,使膜的结构发生改变,影响膜上功能蛋白质的位置及构型,导致膜完整性的破坏,从而严重影响其各种功能,引起心肌损伤。另外,氧自由基的氧化修饰可对抗 CAT、SOD 和 GSH-PX 的活性而造成损伤,损伤的机制可能是通过改变其酶蛋白及辅基的结构及状态<sup>[10]</sup>,而使酶功能低下<sup>[11]</sup>。以往研究表明,GSH-PX 在保护心肌细胞免受氧化攻击中发挥着重要的作用<sup>[12,13]</sup>。

我们的研究中,给 SD 大鼠应用累积剂量达 15 mg/kg 的阿霉素 24 h 后,心肌细胞的 Cu-Zn-SOD 活性明显下降。进一步证实了阿霉素对心肌细胞的损伤由氧化应激引起。进一步试验研究表明,阿霉素除了影响抗氧化酶的活性外,对 Cu-Zn-SOD 的基因转录和蛋白表达有明显的抑制作用。因此,Cu-Zn-SOD 在阿霉素所引起的心肌氧化应激损伤中亦起着重要的作用。其具体的分子机制有待进一步研究。

我们成功建立了阿霉素性心肌损伤并心力衰竭的实验模型。给予一定剂量的阿霉素,大鼠表现为逐日萎靡,饮食少,消瘦,毛色灰暗,毛发变得粗糙,活动明显减少,肝肺淤血明显,肝肺干/湿重比值减小,测定大鼠血清 CK-MB 的浓度,发现其明显降低,大鼠心率变化率明显增大。研究发现阿霉素通过降低心肌细胞抗氧化酶 Cu-Zn-SOD 活性、Cu-Zn-SOD 的转录以及蛋白质表达导致心肌损伤。

外源性 1,6-二磷酸果糖可提高细胞内三磷酸腺苷和磷酸肌酸的浓度、促进钾离子内流、增加红细胞内二磷酸甘油酸的含量、抑制组织胺释放等,能减轻机体因缺血、缺氧造成的损害,尤其是对缺血性心脏病更显出良好的保护作用。赖平等<sup>[14]</sup>研究发现,

FDP 可能通过抑制自由基产生和自由基引起的组织过氧化机制而发挥心肌保护作用。本实验研究用 1,6-二磷酸果糖对阿霉素心肌损伤进行干预治疗,发现 1,6-二磷酸果糖对阿霉素性心肌损伤并心力衰竭有明显的保护作用,不但改善实验模型大鼠的心率变化率,使肝肺淤血消失,大鼠心功能改善,血清 CK-MB 的浓度降低至正常,而且发现心肌细胞内 Cu-Zn-SOD 活性增加,心肌细胞 Cu-Zn-SOD 的转录和蛋白质表达增强。1,6-二磷酸果糖对阿霉素性心肌损伤的保护作用与其抑制氧化应激有关,可能与促进心肌细胞 Cu-Zn-SOD 的转录和蛋白质表达、增强心肌细胞内 Cu-Zn-SOD 活性有关。

#### [参考文献]

- [1] 李萍,胡满振,张乾忠. 柔红霉素与扩张型心肌病:附 4 例报告[J]. 小儿急救医学, 2004, 11 (3): 182-183
- [2] Singal PK, Li T, Kumar D. Adriamycin induced heart failure: mechanism and modulation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 207 (1-2): 77-86
- [3] Mohamed HE, El-Sweify SE, Hagar HH. The protective effect of glutathione administration on adriamycin-induced acute cardiac toxicity in rats[J]. *Pharmacol Res*, 2000, 42 (2): 115-121
- [4] 赖平,马郁文,杜军保. 1,6-二磷酸果糖对大鼠阿霉素心肌病的防治作用及机理的探讨[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35 (7): 368-370
- [5] Suzuki K, Sawa Y, Ichikawa H. Myocardial protection with endogenous overexpression of manganese superoxide dismutase[J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68 (4): 1266-271
- [6] Yen HC, Oberley TD, Vichithandha S. The Protective Role of Manganese Superoxide Dismutase Against Adriamycin-induced Acute Cardiac Toxicity in Transgenic Mice[J]. *J Clin Invest*, 1996, 98 (5): 1253-260
- [7] Conklin KA. Coenzyme Q10 for Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity[J]. *Integr Cancer Ther*, 2005, 4 (2): 110-130
- [8] Singal PK, Siveski IN, Hill M. Combination therapy with probucol prevents Adriamycin-induced cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27 (4): 1055-063
- [9] Singal PK, Iliskovic N, Li T. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention[J]. *FASEB J*, 1997, 11 (12): 931-936
- [10] 姜招峰,杨翰仪. 氧自由基对 CAT、SOD 和 GPX 的氧化修饰研究[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2003, 17 (3): 12-17
- [11] Headlam HA, Davies MJ. Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34 (1): 544-551
- [12] Siveski Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probuco promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats[J]. *Circulation*, 1994, 89 (6): 2829-835
- [13] Siveski Iliskovic N, Hill M, Chow DA. Probuco protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect[J]. *Circulation*, 1995, 91 (1): 10-15
- [14] 赖平,张洪泉,马郁文. 1,6-二磷酸果糖对阿霉素心肌损伤防治作用的实验研究[J]. 山东医科大学学报, 1997, 35 (3): 242-244

(此文编辑 朱雯霞)