

β -细辛醚对阿霉素诱导乳鼠心肌细胞损伤的影响

王睿^{1*}, 金明顺², 王伟¹, 刘建华¹, 刘韩¹, 王晓丽¹

(1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 温州医学院, 浙江 温州 325035)

[摘要] **目的:**探讨 β -细辛醚对阿霉素(ADR)所致心肌细胞损伤的保护作用及机制。**方法:**分离培养出生 1~3 d 大鼠心肌细胞,随机分为正常对照组、ADR($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)模型组、 β -细辛醚($10, 20, 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)剂量组。72 h 后,观察心肌细胞形态及搏动频率,MTT 比色法检测细胞存活率,试剂盒检测培养基中乳酸脱氢酶(LDH)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量,免疫组织化学法检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2 相关蛋白(Bax)表达。**结果:**与正常对照组比较,ADR 模型组心肌细胞皱缩变形,不规则,细胞间隙变大,搏动节律不齐,频率明显减慢;心肌细胞存活率明显减少;LDH 漏出量增加;SOD 活力降低;MDA 含量增高;Bcl-2 蛋白表达降低、Bax 蛋白表达增高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与 ADR 模型组比较, β -细辛醚各剂量组心肌细胞形态较规则,细胞搏动频率规则、增高,呈现向心性同步化搏动;心肌细胞存活率明显增高;LDH 漏出量降低;SOD 活力增高;MDA 含量降低;Bcl-2 蛋白表达增高、Bax 蛋白表达降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:** β -细辛醚对阿霉素诱导心肌细胞损伤具有保护作用,其机制可能与抗自由基,减轻脂质过氧化及抑制细胞凋亡有关。

[关键词] β -细辛醚; 阿霉素; 心肌细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0202-04

[doi] 10.11653/syjf2013160202

Effect of Beta-asarone on Adriamycin-induced Cardiomyocyte Injury in Suckling Mouse

WANG Rui^{1*}, JIN Ming-shun², WANG Wei¹, LIU Jian-hua¹, LIU Han¹, WANG Xiao-li¹

(1. Institute of Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China;

2. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of beta-asarone on adriamycin-induced cardiomyocyte injury in suckling mouse. **Method:** Cardiomyocytes of neonate rat were cultivated for 72 hours and randomly divided into normal control group, adriamycin (ADR, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) model group, and beta-asarone ($10, 20, 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) dose groups. MTT colorimetric method was deployed to detect cardiocyte survival rate, activities of medium lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were detected, and protein expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) were detected by immune histochemical method. **Result:** Compared with normal control group, model group ADR cardiomyocyte shrinkage deformation, irregular, beat rhythm irregularities, frequency obviously slow down, numbers of survival cells were decreased, the leakage of LDH was increased; SOD activity was decreased; the contents of MDA were increased; protein expressions of Bcl-2 were reduce, protein expressions of Bax were increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). And compared with ADR model group and ADR model group, each dose group of beta-asarone had no changes in cardiomyocytes cell pulsation frequency, present centrality synchronization pulsing; cardiomyocytes survival rate was increased; the leakages of LDH was decreased; and the activity of SOD was increased; contents

[收稿日期] 20121217(007)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511617)

[通讯作者] *王睿,博士,副研究员,从事心血管药理学研究, Tel:13763517168, E-mail: wrkjc@sina.com

of LDH and MDA were decreased; protein expression of Bcl-2 was increased, protein expression of Bax were reduced ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** Beta-asarone protects mice from adriamycin-induced cardiotoxicity by reduction of oxygen free radicals and apoptosis in mouse cardiac tissues.

[**Key words**] beta-asarone; adriamycin; cardiomyocyte; apoptosis

作为萜醌类抗肿瘤药物的代表,阿霉素(adriamycin,ADR)因其高效广谱的特点被广泛应用于多种肿瘤的治疗,由于ADR与心肌组织的亲和力明显高于其他组织,具有严重的心脏毒性并具剂量依赖性,从而严重限制其临床应用^[1]。 β -细辛醚(β -asarone)为天南星科多年生草本植物石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott)含量最高的挥发油成分之一^[2]。研究表明: β -细辛醚对心肌细胞具有明显的保护作用^[3],具有抗心律失常、抑制血小板凝聚、抑制线粒体膜损伤等多种药理活性,其机制可能与抗自由基、抗氧化及抑制细胞凋亡等因素有关^[4]。本实验以ADR制备心肌细胞损伤模型,观察 β -细辛醚对心肌细胞损伤的保护作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药品和试剂 β -细辛醚(中药石菖蒲购自齐齐哈尔市药材公司中药饮片厂长春堂药店,经齐齐哈尔医学院中药系鉴定为石菖蒲的干燥根茎。严格按照《中国药典》一部附录挥发油提取甲法的工艺方法提取挥发油,采用冷冻结晶法制备 β -细辛醚,面积归一法测定纯度达98%以上)。ADR(浙江海正药业股份有限公司,批号20090201B);乳酸脱氢酶(LDH),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20091105);DMEM培养基(Gibco公司);胰蛋白酶(Gibco公司);胎牛血清(Gibco公司);兔抗鼠B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)单克隆抗体、DBA显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 仪器 550型酶标仪(美国Bio-Rad公司),电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),CO₂培养箱(日本Sanyo公司),倒置显微镜(日本Olympus公司),高温低速离心机(美国Beckman公司),721分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),全自动免疫组化仪(美国Dakocymstion公司)等。

1.3 动物 SPF级新生1~3 d Wistar乳鼠,购自齐齐哈尔医学院实验动物中心,合格证号齐医动字第0218-03。

2 方法

2.1 新生大鼠心肌细胞培养 取出生1~3 d的

Wistar乳鼠心脏,经0.25%胰蛋白酶分3次消化成单细胞悬液,离心、洗涤后加入含10%胎牛血清的DMEM培养基中,差速贴壁法于37℃、5%CO₂孵箱中培养2 h。将富含心肌细胞的培养液再次接种于含10%胎牛血清、1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿糖胞苷的高糖DMEM中,细胞密度约为 $5 \times 10^5/\text{L}$ 。24 h换液,去除阿糖胞苷,72 h后细胞达融合状态,取生长状态佳者加干预药物,各组 $n=8$ 。

2.2 分组及给药 实验分为正常对照组:加入含10%胎牛血清的DMEM培养基;ADR模型组:加入ADR(以培养液配制,终质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); β -细辛醚低,中,高剂量组(10,20,40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。继续于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

2.3 指标检测

2.3.1 普通光镜、倒置显微镜观察细胞形态 各组细胞培养72 h后,普通光镜,倒置显微镜下观察细胞的生长状态、收缩性及搏动频率。

2.3.2 MTT检测细胞存活率 培养于96孔板中的细胞,ADR损伤细胞24 h,弃上清液,每孔加入MTT溶液20 μL ,37℃继续孵育4 h,弃上清,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min,使结晶物完全溶解。选择490 nm波长,酶标仪检测各孔吸光度(A)。

$$\text{存活率} = (\text{实验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

2.3.3 培养液中生化指标测定 采用试剂盒检测培养液中LDH,SOD,MDA酶的活性或含量,并按试剂盒说明书进行操作、检测和计算。

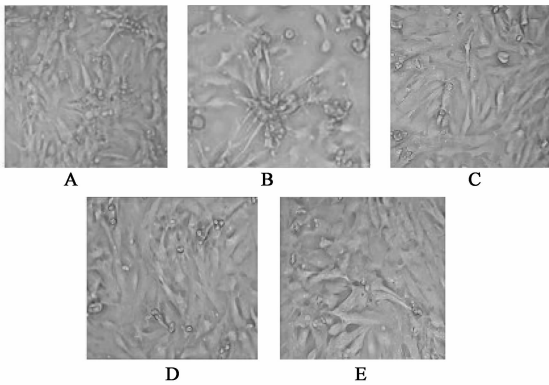
2.3.4 心肌细胞Bcl-2,Bax蛋白表达 取出24孔板内的玻片,0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS洗2 min \times 3次,多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗,Triton作用15 min,蒸馏水新鲜配制3% H₂O₂,室温5~10 min,以灭活内源性过氧化物酶,0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS洗2 min \times 3次,置0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液(pH 6.0 \pm 0.1)加热抗原修复,冷却,0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS洗2 min \times 3次,滴加5~10%正常山羊血清封闭,室温孵育10 min,倾去血清,滴加Bcl-2一抗或Bax一抗37℃,2 h,0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS洗2 min \times 3次,滴加二抗(山羊抗小鼠),37℃,20 min,0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS洗2 min \times 3次,二氨基联苯胺(DAB)显色,5~10 min(阳性反应胞浆棕黄色),0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS洗2 min \times 3次,苏木

素复染 1 min,蒸馏水冲洗蓝化,烤干,树胶封片,光镜观察。

2.3.5 统计学分析 实验数据采用 SPSS 13.0 软件对数据进行单因素方差分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差不齐时采用秩和检验,组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.01$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌细胞形态学的观察及搏动频率 倒置显微镜观察显示,与正常对照组比较,ADR 模型组心肌细胞皱缩变形,不规则,细胞间隙变大,搏动节律不齐,频率明显减慢,差异显著 ($P < 0.01$);与 ADR 模型组比较, β -细辛醚各剂量组心肌细胞形态较规则,细胞搏动频率规则,改善并增高,差异显著 ($P < 0.05$),呈现向心性同步化搏动,见图 1,表 1。



A. 正常组;B. ADR 模型组;C. ADR + β -细辛醚 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
D. ADR + β -细辛醚 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
E. ADR + β -细辛醚 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2,3 同)

图 1 新生大鼠心肌细胞的形态学观察 ($\times 150$)

表 1 各组心肌细胞搏动频率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	搏动频率/次/min
正常	-	62.2 \pm 14.2
模型	-	41.2 \pm 10.3 ¹⁾
β -细辛醚	10	46.1 \pm 11.1 ²⁾
	20	49.6 \pm 9.6 ²⁾
	40	53.2 \pm 12.3 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 心肌细胞存活率 与正常组相比,ADR 损伤后心肌细胞存活数明显下降,差异显著 ($P < 0.01$);与模型组比较, β -细辛醚各剂量组均能增加心肌细胞活力 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 各生化指标变化 与正常组比较,ADR 模型组 LDH 漏出量增多,SOD 活力下降,MDA 含量增加 ($P < 0.01$);与 ADR 模型组比较, β -细辛醚各剂量

表 2 β -细辛醚对新生大鼠心肌细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	心肌细胞存活率/A
正常	-	0.601 7 \pm 0.007 7
模型	-	0.184 7 \pm 0.014 8 ¹⁾
β -细辛醚	10	0.211 8 \pm 0.008 4 ²⁾
	20	0.216 8 \pm 0.013 2 ²⁾
	40	0.225 3 \pm 0.007 6 ²⁾

组 LDH 漏出量明显减少,SOD 活力增加,MDA 含量降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组心肌细胞培养液中 LDH 漏出量、MDA 含量、SOD 活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{KU} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	1.4 \pm 0.1	36.1 \pm 1.2	8.7 \pm 0.5
模型	-	4.1 \pm 0.3 ¹⁾	30.4 \pm 2.3 ¹⁾	17.3 \pm 1.2 ¹⁾
β -细辛醚	10	3.6 \pm 0.2 ³⁾	32.7 \pm 1.0 ²⁾	15.7 \pm 1.0 ²⁾
	20	2.9 \pm 0.3 ³⁾	34.2 \pm 1.1 ²⁾	13.8 \pm 1.0 ²⁾
	40	3.3 \pm 0.2 ³⁾	33.8 \pm 1.7 ²⁾	14.8 \pm 1.8 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;
³⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 心肌细胞 Bcl-2, Bax 蛋白表达及阳性细胞指数比较 镜下可见,有 Bcl-2, Bax 蛋白表达的心肌细胞胞浆内含棕黄色颗粒。与正常组 Bcl-2 (16.1 \pm 1.1) 比较,ADR 模型组 (4.0 \pm 0.7) 心肌细胞 Bcl-2 阳性染色细胞指数减少 ($P < 0.01$); β -细辛醚组 (20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Bcl-2 阳性染色细胞指数 (13.4 \pm 1.2) 增多 ($P < 0.01$)。见图 2。与正常组 Bax (20.2 \pm 1.5) 比较,ADR 模型组 (38.4 \pm 1.8) 心肌细胞 Bax 阳性染色细胞指数增加 ($P < 0.01$); β -细辛醚组 (20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Bax 阳性染色细胞指数减少 ($P < 0.01$)。见图 3。

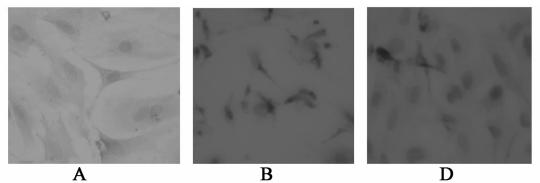


图 2 3 组心肌细胞 Bcl-2 表达比较 ($\times 1000$)

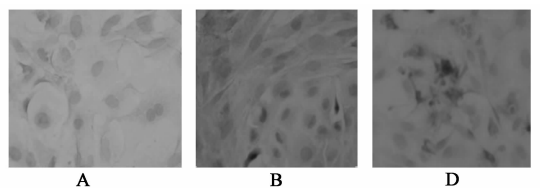


图 3 3 组心肌细胞 Bax 阳性表达比较 ($\times 1000$)

4 讨论

ADR 导致心脏毒性的机制尚未阐明,目前较为公认的是自由基产生、线粒体损伤、钙超载及细胞凋亡学说^[5]。 β -细辛醚为天南星科植物石菖蒲的主要挥发成分,现代药理研究表明, β -细辛醚对心脑血管系统有明显的保护作用,具有抗心律失常、抑制血小板凝聚、抗缺氧、抗心肌缺血、改善血液流变性等多种药理作用^[6]。

心脏是血液循环的动力器官,而心肌酶含量的变化是反映心肌坏死的重要指标,也是细胞膜完整的生化标准^[7]。ADR 在体内经过一系列的氧化酶/还原酶催化,生成半醌自由基,并将电子传递给 O^2 生成 O^{2-} , O^{2-} 可消耗体内的抗氧化酶 SOD,使其活性减低,机体抗氧化能力降低,导致膜系统的不饱和脂质过氧化,细胞膜损伤,LDH 漏出,MDA 生成,最终引起心肌细胞损伤性变化^[8]。其中,LDH 是胞内酶,漏出量的多少可反映细胞膜的通透性及受损程度;MDA 是氧自由基攻击生物膜不饱和脂肪酸的终产物,其变化可反映心肌细胞产生活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的情况。SOD 是细胞内源性的抗氧化酶类,用于对抗 ROS 的损伤作用,可将 ROS 转变为相对低毒性的物质。因此,测定细胞培养液中心肌酶 LDH、SOD 及 MDA 的水平能够反映细胞膜损伤的程度及细胞膜脂质过氧化水平。实验结果显示: β -细辛醚在形态学上显著减轻 ADR 所致心肌细胞损伤,逆转 LDH、SOD 及 MDA 心肌酶的变化,减轻细胞膜脂质过氧化水平,有效维持心肌细胞膜完整性,对心肌细胞具有保护作用。

细胞凋亡为细胞程序性死亡,是细胞在一系列内源性基因的调控下发生的自然或生理性死亡的过程。参与影响细胞凋亡的基因很多,如:Fas, Bcl-2, Bax, c-myc, p⁵³等,其中 Bcl-2 为抑制细胞凋亡基因,主要分布在线粒体内膜、细胞膜内表面等处,而 Bax 为促进凋亡基因。Bcl-2/Bax 将决定细胞是否发生凋亡。当 Bcl-2/Bax 降低,Bax 蛋白自身形成同源二聚体,可以促进细胞凋亡;反之,Bcl-2 与 Bax 形成异

源二聚体,则抑制细胞凋亡^[9]。实验结果显示: β -细辛醚可逆转 ADR 损伤所致的心肌细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达及凋亡指数,具有抗凋亡作用。

综上,ADR 导致心肌细胞损伤与自由基产生及细胞凋亡有关, β -细辛醚可能具有抗自由基生成,减轻细胞膜脂质过氧化及抑制细胞凋亡作用,对心肌细胞具有保护作用。

[参考文献]

- [1] Yi Wei Zhang, Ianjian Shi, Yuan Jian, et al. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009, 57 (6):435.
- [2] 魏刚,林双峰,方永奇,等. GC-MS 建立石菖蒲挥发油质量标准研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(10):794.
- [3] 吴启端,王绮雯,陈奕芝,等. β -细辛醚对缺血-再灌注损伤心肌细胞的保护作用[J]. 广州中医药大学学报, 2009,26(3):251.
- [4] 吴启端,吴清和. 石菖蒲的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(6):477.
- [5] Neilan T G, Blake S L, Ichinose F, et al. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin [J]. Circulation,2007,116(5):506.
- [6] 吴启端,方永奇,陈奕芝,等. 石菖蒲挥发油及 β -细辛醚对心血管的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2005,16(4):244.
- [7] 王绮雯,吴启端,陈奕芝. β -细辛醚对缺血/再灌注损伤心肌细胞的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2008,15(12):44.
- [8] Kalyanaraman B, Joseph J, Kalvendi S, et al. Doxorubicin - induced apoptosis: implications in cardiotoxicity [J]. Mol Cell Biochem,2002,234(2):119.
- [9] Oltvai Z N, Millimau C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell,1993,74 (4):609.

[责任编辑 聂淑琴]