

## 参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤 大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响

范颖<sup>1?</sup>, 才丽平<sup>2</sup>, 于彩娜<sup>1</sup>, 徐丹<sup>1</sup>, 林庶茹<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学中医分子生物实验室, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 探讨参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响。方法: 采用酶联免疫测定法(ELISA)测定心肌线粒体抗凋亡基因(Bcl-2), 促凋亡基因(Bax), 细胞色素 c(cytc), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Caspase-9), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)含量。结果: 阿霉素组心肌线粒体 Bcl-2 含量降低、Bax 含量提高, cytc, Caspase-9, Caspase-3 含量上升, 均有统计学意义( $P < 0.05$ )。参附汤、芪附汤、姜附汤 3 组心肌线粒体 Bcl-2 含量提升、Bax 含量下降, cytc, Caspase-9, Caspase-3 含量下降, 均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: Bcl-2, Bax, cytc, Caspase-9, Caspase-3 与阿霉素心脏毒性损伤发生、发展过程有关, 参附汤、芪附汤、姜附汤通过抑制线粒体途径的细胞凋亡保护心肌抑制阿霉素心脏毒性损伤。

[关键词] 阿霉素; 心肌毒性损伤; 线粒体; 细胞凋亡; 参附汤; 芪附汤; 姜附汤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0135-04

## Effects of Shenfu Decoction, Qifu Decoction, Jiangfu Decoction on Cardiomyocyte Apoptosis Through Mitochondrion Signaling Pathway of Cardial Injury Model Induced by Adriamycin in Rat

FAN Ying<sup>1?</sup>, CAI Li-ping<sup>2</sup>, YU Cai-na<sup>1</sup>, XU Dan<sup>1</sup>, LIN Shu-ru<sup>2</sup>

(1. Prescription Department, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Laboratory of Molecular Biology, Liaoning University of Traditional Chinese  
Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenfu Decoction, Qifu Decoction, Jiangfu Decoction on cardiomyocyte apoptosis through the mitochondrion signaling pathway of cardiac injury model induced by adriamycin in rat. **Methods:** Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was applied to measure the content of Caspase-9, Caspase-3, Bcl-2, Bax and cytochrome C in cardiomyocyte mitochondria. **Results:** In adriamycin-induced rat group: the content of Bcl-2 in myocardial mitochondria decreased, the content of Bax increased, the content of Caspase-9, Caspase-3 and cytochrome C increased, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). In Shenfu Decoction group, Qifu Decoction group and Jiangfu Decoction group: the content of Bcl-2 in myocardial mitochondria increased, the content of Bax decreased, the content of Caspase-9, Caspase-3 and cytochrome C decreased, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** There is relationship between the content of Caspase-9, Caspase-3, Bcl-2, Bax and cytochrome C and the occurrence and development of adriamycin-induced cardiac injury. Shenfu Decoction, Qifu Decoction, Jiangfu Decoction can protect myocardium by inhibiting adriamycin-induced cardiomyocyte apoptosis through the mitochondria signaling pathway.

[收稿日期] 20100223(001)

[基金项目] 辽宁省教育厅创新团队项目(2007T117)

[通讯作者] 范颖, 教授, 博士生导师。研究方向: 方剂配伍规律及其效应机制研究。Tel: (024) 31207104; E-mail: lnzyfy@126.com

**[ Key words ]** adriamycin; cardiotoxic injury; mitochondrion; apoptosis; Shenfu Decoction; Qifu Decoction; Jiangfu Decoction

阿霉素(adriamycin, 简称 ADR)是一种有效的抗恶性肿瘤药物,但其心脏毒性限制了该药的广泛应用。大量的临床研究表明,中药复方可以有效改善化疗药的毒副作用。参附汤、芪附汤、姜附汤是中医临床常用的经典方剂,现代药理研究证实其具有改善心肌功能的作用。本文从抗凋亡基因 Bcl-2 与促凋亡基因 Bax、细胞色素 c(cytc 线粒体细胞凋亡分子)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Caspase-9)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)等线粒体途径细胞凋亡环节入手,探讨中药小复方参附汤、芪附汤、姜附汤干预阿霉素心脏毒性损伤及其对化疗药阿霉素的减毒作用。

## 1 实验材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠 84 只,雄性,体重(240 ±20) g,一次性购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)200810016。在辽宁中医药大学动物实验室饲养。

**1.2 药物** 人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、黄芪 *Astragalus mongholicus* Bge.、干姜 *Zingiber officinale* Rosc.、制附子 *Aconitum camichaeli* Debx. (人参产地吉林;黄芪产地内蒙古;干姜产地贵州;制附子产地四川,均一次性购于辽宁大石药业有限公司),生药经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定。生脉饮(人参方)由北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂提供(国药准字 9263494, 10 mL/支),作为本实验中中药阳性对照药。造模药:阿霉素由山西普德药业有限公司提供。

**1.3 试剂与仪器** Bcl-2, Bax, cytc, Caspase-9, Caspase-3 酶联免疫试剂盒均购自美国 ADL 公司。DY89- 电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂);MR18-22 低温高速离心机(法国 JuanSA)。550 型酶标仪(美国 BLO-RAD 公司)。

## 2 方法

**2.1 阿霉素心脏毒性损伤动物模型的制作方法** 参照文献<sup>[1]</sup>并加以改良,建立阿霉素心脏毒性损伤动物模型。给 SD 大鼠 ip 阿霉素 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>,每周 1 次,连续 4 周,累计量 10 mg·kg<sup>-1</sup>。同时观察心电图 QRS 波群电压变化,较用药前降低 30%,且 Q-T

间期明显延长,出现各种心律失常,超声心动图显示左室心腔明显扩大、左室短轴缩短率(FS%)及射血分数(EF%)降低,说明心肌受到损害。

**2.2 分组处理** 将 84 只小鼠按体重随机分为 6 组,每组 14 只。正常组:不予特殊处理,正常饲养。模型组,每周 1 次 ip 阿霉素 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>。正常组、模型组分别于造模同时按 1 mL·(100 g)<sup>-1</sup>体重 ig 蒸馏水,每日 1 次,连续 ig 蒸馏水 30 d。中药对照组:于造模同时按 3.5 mL·kg<sup>-1</sup>体重 ig 生脉饮;参附汤、芪附汤组分别于造模的同时均按 2.625 g·kg<sup>-1</sup>体重分别 ig 参附汤、芪附汤水煎液;姜附汤组于造模的同时按 3.5 g·kg<sup>-1</sup>体重 ig 姜附汤水煎液;每日 1 次,给药 30 d。于第 31 d 处死大鼠,取材检测指标。

**2.4 心肌线粒体凋亡因子检测** ELISA 法检测大鼠心肌线粒体 Bcl-2, Bax, cytc, Caspase-9, Caspase-3 含量。检测方法参照试剂盒说明书,其单位为 pg·mL<sup>-1</sup>。

**2.5 统计学方法** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS15.0 软件包进行统计。组间比较用方差齐性检验和方差分析用 One-Way ANOVA 程序分析。 $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对心肌线粒体 Bcl-2, Bax 含量的影响** 结果见表 1。与正常组比较,模型组、中药对照组及各治疗组心肌线粒体 Bcl-2 含量均明显降低,而 Bax 含量均明显升高,有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,对照组与各治疗组 Bcl-2 含量明显提升,均有统计学意义( $P < 0.05$ );除对照组外,各治疗组线粒体 Bax 含量均明显下降,有统计学意义( $P < 0.05$ );与对照组比较,仅姜附汤组 Bcl-2 含量处于低水平,有统计学意义( $P < 0.05$ );而各治疗组 Bax 含量明显减少,均有统计学意义( $P < 0.05$ )。各治疗组之间比较,无统计学意义。各组 Bcl-2/ Bax 比值较正常组明显降低,有统计学意义( $P < 0.05$ );各治疗组提升 Bcl-2/ Bax 比值优于模型组、中药对照组,有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**3.2 对心肌线粒体细胞色素 C(cytc)含量的影响** 结果见表 2。与正常组比较,除对照组外,其余各组 cytc 含量均明显升高,有统计学意义( $P < 0.05$ );与模

型组比较, 对照组与各治疗组 cytc 含量明显下降, 均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 芪附汤组、

姜附汤组 cytc 含量仍处于高水平, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各治疗组之间比较, 无统计学意义。

表 1 对模型大鼠线粒体 Bcl-2, Bax 含量的影响 (聊±s, n=10)

| 组别  | 剂量 /g·kg <sup>-1</sup>  | Bcl-2 /pg·mL <sup>-1</sup>     | Bax /pg·mL                 | Bcl-2 / Bax                  |
|-----|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 正常  | —                       | 5.00 ±0.94 <sup>2,3)</sup>     | 0.63 ±0.22 <sup>2,3)</sup> | 9.08 ±4.20 <sup>2,3)</sup>   |
| 模型  | —                       | 1.13 ±0.19 <sup>1,3)</sup>     | 4.84 ±1.59 <sup>1)</sup>   | 0.25 ±0.06 <sup>1)</sup>     |
| 生脉饮 | 3.5 mL·kg <sup>-1</sup> | 3.50 ±1.13 <sup>1,2)</sup>     | 4.28 ±2.59 <sup>1)</sup>   | 1.20 ±0.86 <sup>1)</sup>     |
| 参附汤 | 2.625                   | 3.72 ±1.07 <sup>1,2)</sup>     | 0.92 ±0.28 <sup>2,3)</sup> | 4.46 ±1.86 <sup>1,2,3)</sup> |
| 芪附汤 | 2.625                   | 3.25 ±0.79 <sup>1,2)</sup>     | 0.96 ±0.33 <sup>2,3)</sup> | 4.12 ±2.10 <sup>1,2,3)</sup> |
| 姜附汤 | 3.50                    | 2.49 ±0.72 <sup>1,2,3,4)</sup> | 1.15 ±0.65 <sup>2,3)</sup> | 2.78 ±1.69 <sup>1,2,3)</sup> |

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与生脉饮比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ; 各治疗组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$  (表 2, 3 同)。

表 2 对心肌线粒体 cytc 含量的影响 (聊±s, n=10)

| 组别  | 剂量 /g·kg <sup>-1</sup>  | Cytc /Pg·mL <sup>-1</sup>     |
|-----|-------------------------|-------------------------------|
| 正常  | —                       | 1.42 ±0.22 <sup>2)</sup>      |
| 模型  | —                       | 3.77 ±0.93 <sup>1,3)</sup>    |
| 生脉饮 | 3.5 mL·kg <sup>-1</sup> | 1.32 ±0.56 <sup>2,3)</sup>    |
| 参附汤 | 2.625                   | 2.11 ±0.12 <sup>1,2)</sup>    |
| 芪附汤 | 2.625                   | 2.248 ±0.47 <sup>1,2,3)</sup> |
| 姜附汤 | 3.50                    | 2.12 ±0.17 <sup>1,2,3)</sup>  |

**3.3 对心肌线粒体 Caspase-9, Caspase-3 含量的影响** 结果见表 3。与正常组比较, 模型组 Caspase-9, Caspase-3 含量明显升高, 均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 对照组与各治疗组 Caspase-9, Caspase-3 含量明显下降, 均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 各治疗组 Caspase-9, Caspase-3 含量无明显变化, 无统计学意义。各治疗组之间比较, 参附汤组 Caspase-3 含量较芪附汤组、姜附汤组降低, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 3 对模型大鼠线粒体 Caspase-9, Caspase-3 含量的影响 (聊±s, n=10)

| 组别  | 剂量 /g·kg <sup>-1</sup>  | Caspase-9 /pg·mL <sup>-1</sup> | Caspase-3 /pg·mL <sup>-1</sup> |
|-----|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 正常  | —                       | 1.21 ±0.23 <sup>2)</sup>       | 1.02 ±0.37 <sup>2)</sup>       |
| 模型  | —                       | 8.35 ±1.83 <sup>1)</sup>       | 3.30 ±0.54 <sup>1)</sup>       |
| 生脉饮 | 3.5 mL·kg <sup>-1</sup> | 1.47 ±0.42 <sup>2)</sup>       | 1.11 ±0.52 <sup>2)</sup>       |
| 参附汤 | 2.625                   | 1.48 ±0.28 <sup>2)</sup>       | 0.83 ±0.33 <sup>2,4)</sup>     |
| 芪附汤 | 2.625                   | 1.36 ±0.20 <sup>2)</sup>       | 1.47 ±0.11 <sup>2)</sup>       |
| 姜附汤 | 3.50                    | 1.27 ±0.16 <sup>2)</sup>       | 1.27 ±0.22 <sup>2)</sup>       |

#### 4 讨论

ADR 引起心脏毒性的主要靶点是心肌线粒体<sup>[2-5]</sup>。Bcl-2 家族参与的细胞凋亡的“线粒体途径”是心肌细胞凋亡发生的主要机制, Bcl-2/Bax 参与调

控细胞凋亡并发挥重要作用。Bcl-2 能抑制许多因素引起的细胞凋亡, Bax 的过量表达可抑制 Bcl-2 功能而促进细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。cytc 是线粒体的细胞凋亡分子, 在正常细胞中位于线粒体内、外膜之间, 在电子呼吸传递链中起重要作用。当细胞被诱导凋亡时, cytc 可以从线粒体释放进入细胞质, 启动胱解酶活化<sup>[8]</sup>。细胞线粒体 cytc 及其他凋亡分子的释放受 Bcl-2 蛋白家族的调控。Bcl-2 是位于线粒体外膜中的抗凋亡蛋白, 其高表达可阻止 cytc 等促凋亡因子的释放, 从而抵抗细胞凋亡。相反 Bax 作为一种促凋亡蛋白一旦接受细胞凋亡信号时才诱导性插入线粒体膜, 兴奋 Caspase-3 引起细胞凋亡<sup>[9]</sup>。

本研究结果显示, 模型组 Bax 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 含量显著下降 ( $P < 0.05$ ), 提示阿霉素所致心脏毒性损伤与细胞凋亡有密切关系。在下调促凋亡基因 Bax 含量方面, 参附汤、芪附汤、姜附汤优于中药对照组, 在提升抗凋亡基因 Bcl-2 含量方面, 中药对照组、参附汤优于姜附汤, 提示参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤的保护作用与其减少心肌细胞凋亡有关, 其效应强度有一定差异。其作用机制可能与下调促凋亡基因 Bax、提升抗凋亡基因 Bcl-2 含量与 Bcl-2/Bax 比值有关。由此可见, 诱导心肌细胞表达 Bcl-2 可能成为探索心肌保护措施的新途径<sup>[10]</sup>。从三首方剂干预阿霉素心脏毒性损伤的作用可以反映出, 中药小复方与化疗药阿霉素合用可以明显降低阿霉素心脏毒性, 是否还可以降低对肾脏、血液系统等其他方面的毒性, 有待于今后进一步深入研究。

实验结果显示, 模型组 cytc, Caspase-9, Caspase-3 含量均升高 ( $P < 0.05$ ), 经参附汤、芪附汤、姜附汤治疗后 cytc, Caspase-9, Caspase-3 含量均下降 ( $P <$

0.05), 提示 cytc, Caspase-9, Caspase-3 参与了阿霉素心脏毒性损伤的过程, 表明阿霉素所致心肌损害与线粒体途径的细胞凋亡密切相关。在降低 cytc 含量方面, 中药对照组(生脉饮) 优于其他给药组 ( $P < 0.05$ ), 由此提示, 长期服用含附子的中药小复方在一定程度上可以造成心脏毒性损害, 这为中医临床运用含附子的中药复方治疗心肌受损病变提供了实验参考, 避免因长时间服用而产生不良反应。Caspase-9, Caspase-3 的活化在心脏损伤中起到重要作用, 它可以抑制心肌的收缩功能。从研究结果推测参附汤、芪附汤、姜附汤保护心肌的作用机制之一可能与抑制线粒体途径的细胞凋亡有关。三首经典的中药小复方对线粒体通路的细胞凋亡环节与关键因子, 如胱蛋白酶活化、线粒体的细胞凋亡分子 (cytc), Bcl-2/Bax 的作用各有所侧重, 其明确的作用靶点, 有待于今后深入研究。

随着蒽环类化疗药物的广泛应用, 其心脏毒性的早期发现与防治日益受到重视, 随着科学研究的深入, 寻找有效防治 ADR 心脏毒性、高效保护心脏的中药复方制剂是今后中药复方减毒研究中一个新的探索方向。

#### [参考文献]

- [ 1 ] Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin [ J ]. Yakugaku Zasshi, 2003, 123( 10 ): 85.
- [ 2 ] Zhou S, Starkov A, Froberg M K, et al. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin[ J ]. Cancer Res, 2001( 61 ): 771.

- [ 3 ] Oliveira P J, Santos M S, Wallace K B. Doxorubicin-induced thiol-dependent alteration of cardiac mitochondrial permeability transition and respiration[ J ]. Biochem ( Mosc ), 2006, 71( 2 ): 194.
- [ 4 ] Green P S, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis [ J ]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1588( 1 ): 94.
- [ 5 ] Childs A C, Phaneuf S L, Dirks A J, et al. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio[ J ]. Cancer Res, 2002, 62: 4592.
- [ 6 ] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival[ J ]. Science, 1998, 281: 1322.
- [ 7 ] Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, et al. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax[ J ]. J Biol Chem, 1995, 270( 20 ): 11962.
- [ 8 ] Liu X, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c[ J ]. Cell, 1996, 86: 147.
- [ 9 ] Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections[ J ]. Cell Tissue Res, 2000, 301 ( 1 ): 19.
- [ 10 ] Q U Chao-fa, M A Li-kun, X U Shao-dong, et al. Cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax protein after acute myocardial infarction and late reperfusion in dogs [ J ]. Chinese J Pathophysiology, 2007, 23( 4 ): 656.

[责任编辑 聂淑琴]