

蒺藜提取物对阿霉素所致大鼠心肌细胞凋亡的影响

张晓丹*, 吕高照, 蔡瑞雪
(哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

[摘要] 目的:研究蒺藜提取物对阿霉素(ADR)所致大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法:将蒺藜提取物灌胃于 ADR 所致心肌细胞凋亡的大鼠,采用电镜对大鼠心肌细胞进行超微结构观察,采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数,免疫组化 SP 法检测心肌细胞 Bax,Bcl-2 蛋白的表达。结果:ADR 累积用量 20 mg·kg⁻¹可致大鼠心肌细胞凋亡,蒺藜提取物中、高剂量组(40,60 mg·kg⁻¹)可减轻心肌细胞超微结构的损伤,蒺藜提取物中、高剂量组较模型组均可显著降低细胞凋亡率($P<0.05$)。蒺藜提取物中、高剂量组可显著上调 Bcl-2 表达($P<0.01$)、下调 Bax 表达($P<0.05$)。结论:蒺藜提取物可抑制 ADR 所致大鼠心肌细胞的凋亡,对阿霉素所致的心脏毒性有保护作用。

[关键词] 蒺藜提取物;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(2011)06-0213-04

Effect of Extract from *Tribulus terrestris* on Myocardial Cell Apoptosis
Caused by Adriamycin in Rats

ZHANG Xiao-dan*, LV Gao-zhao, CAI Rui-xue
(School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of extract from *Tribulus terrestris* on myocardial cell apoptosis caused by adriamycin in rats. **Method:** Rats were given intraperitoneal injection of adriamycin (ADR) to induce cardiocyte apoptosis. After continuous ig of extract from *T. terrestris*, myocardial ultrastructure in every experimental group was observed with electron microscope. The apoptotic rate of myocardial cells was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), and the expression of Bcl-2 and Bax was detected by using immuno-histochemical method. **Result:** ADR of 20 mg·kg⁻¹ induced cardiocyte apoptosis. Extract from *T. terrestris* middle-and high-dosage groups (40,60 mg·kg⁻¹) could reduce cardiotoxicity injury by ADR. Extract from *T. terrestris* middle-and high-dosage groups could significantly increase the Bcl-2 expression ($P<0.01$), reduced Bax expression ($P<0.05$). **Conclusion:** Extract from *T. terrestris* may decrease the cardiocyte apoptosis induced by adriamycin, and it has a protective effect on adriamycin-induced cardio-toxicity.

[Key words] extract from *Tribulus terrestris*; adriamycin; myocardial cells; apoptosis

阿霉素(adriamycin,ADR)属于蒽醌类抗生素,是一种高效广谱的抗肿瘤药物,临床上常用于治疗多种肿瘤,但由于其对心肌有毒性损伤作用,严重时致阿霉素性心脏病^[1],使其临床应用受到一定的限制,故研究和寻找减轻 ADR 对心肌毒性损伤的药物具有重要的意义。近年来的研究证实 ADR 导致心肌细胞凋亡在其对心肌的毒性损伤机制中起重要的作用。蒺藜提取物中主要的活性成分是蒺藜皂苷,其药理活性强,药效明确,毒副作用少,相关研究表明,蒺藜提取物具有降血压、舒张血管、降低胆固醇和抗动脉粥样硬化、改善血液流变性等作用,其对离体大鼠心脏缺血再灌注损伤、急性脑缺血损伤^[-2-5]等均具有保护作用,对大鼠脑缺血后神经细胞凋亡也有抑制作用。而在蒺藜提取物对阿霉素引起的大

[收稿日期] 20100804(005)
[通讯作者] * 张晓丹,教授,博士,硕士生导师, E-mail: zhangxd85@163.com

鼠心肌细胞凋亡抑制作用机制的研究,还很少报道。本课题旨在通过研究蒺藜提取物对阿霉素引起的心肌细胞凋亡的影响,从而为蒺藜提取物临床防治阿霉素心脏毒性提供药理学依据。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠 50 只,雌雄各半,体重 (180 ± 20) g(哈尔滨医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黑)2008-0001)。实验饲养条件:室温 $20 \sim 26$ $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40% ~ 70%,人工昼夜(12 h 白昼,12 h 黑夜),自由饮水,常规适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 试药 蒺藜提取物购于西安天一生物技术有限公司(纯度为 90%,批号 TYT080228),注射用盐酸阿霉素购于深圳万乐药业有限公司(批号 H090621);原位细胞凋亡检测试剂盒购于华莱生物公司;抗 Bax 抗体(兔 IgG 多抗)、抗 Bcl-2 抗体(兔 IgG 多抗)购于武汉博士德公司(批号分别为 090201,090117)。

1.3 仪器 JEM-100CX II 透射电镜(日本电子公司);SM-2000R 型石蜡切片机(武汉海瑞特科技有限公司)、BTR-M187123 摄影显微镜(北京中西泰安技术有限公司);Image Pro Plus 4.5 图像分析系统(上海申腾信息技术有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 健康 Wistar 大鼠随机分成 5 组,每组 10 只。ADR + 蒺藜提取物各组中蒺藜提取物的低、中、高剂量分别为 20,40,60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。ADR 组:于实验开始后第 2,4 天腹腔注射 ADR $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 6,8 天腹腔注射 ADR 2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 10,12 天腹腔注射 ADR 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 14,16 天腹腔注射 ADR 4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,16 d 累计用药剂量达 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [12-13];ADR + 蒺藜提取物 I 组:蒺藜提取物每日灌胃给药 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;ADR + 蒺藜提取物 II 组:蒺藜提取物每日灌胃给药 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;ADR + 蒺藜提取物 III 组:蒺藜提取物每日灌胃给药 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组蒺藜提取物于实验第 1 天起开始给药,每日灌胃 1 次,连续 16 d,同时,ADR 给药剂量、给药时间、给药次数同 ADR 组。蒺藜提取物灌胃给药是在腹腔注射 ADR 前 30 min 进行;正常组:实验处理同 ADR 组,腹腔注射等剂量生理盐水。

2.2 心肌组织的电镜观察 大鼠心脏分离后,迅速取心尖部分约 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm,2.5% 戊二醛固

定 1.5 h,1% 锇酸固定 1 h,经 50%,70%,80%,90%,100% 丙酮逐级脱水,以包埋剂环氧树脂 821 包埋聚合,超薄切片机切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,透射电镜观察。

2.3 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡率 根据试剂盒的说明书进行操作,大致过程如下:用蛋白酶 K 消化以暴露 DNA,在末端转移酶介导下,用连接碱性磷酸盐的 dUTP 对 DNA 裂解部分进行标记,然后再用免疫组织化学方法显色,正常心肌细胞核呈蓝色,而凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。阴性对照用双蒸水代替试剂盒中的反应混合物,不用苏木素复染,其余步骤不变。每组随机选取 6 只大鼠,每只大鼠观察 5 张切片,按说明书操作,400 倍光镜下计算阳性细胞数和细胞总数,按公式:阳性细胞/细胞总数 $\times$ 100%,取其比值的平均值为心肌细胞凋亡率。

2.4 免疫组化检测 Bax, Bcl-2 蛋白表达 按照试剂盒说明书进行免疫组化操作。主要步骤:组织切片在室温中放置 60 min 或 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烘烤 20 min,然后进行脱腊、水化;3% H_2O_2 室温孵育 10 min,清除内源性过氧化物酶活性,蒸馏水清洗;将切片放入 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ (pH 6.0) 枸橼酸缓冲液中,置微波炉内修复抗原 15 min;滴加适当比例稀释的一抗(1:100),阴性对照用 PBS 代替一抗。冰箱中过夜,滴加生物素化 IgG(二抗)工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温下孵育 30 min,应用 DAB 溶液显色,镜下出现棕色反应,即用自来水终止反应,苏木精复染,脱水,透明,封片。每组随机选取 6 只大鼠,每只大鼠观察 5 张切片,用 Image Pro Plus 4.5 图像分析系统检测阳性染色吸光度(A),每张切片随机检测 5 个视野,计算平均吸光度。

2.5 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件进行随机区组设计的单因素方差分析,组间多重比较采用最小显著差法(LSD), $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 蒺藜提取物对心肌细胞超微结构的影响 电镜下观察结果见图 1。

模型组:细胞有很大程度的形态改变,线粒体弥漫性肿胀,嵴变短、断裂,甚至成空泡样,肌浆网扩张,肌丝紊乱;细胞膜内陷核染色质浓缩、凝集成团块状,还可见核碎裂,细胞器变化不明显。正常组:

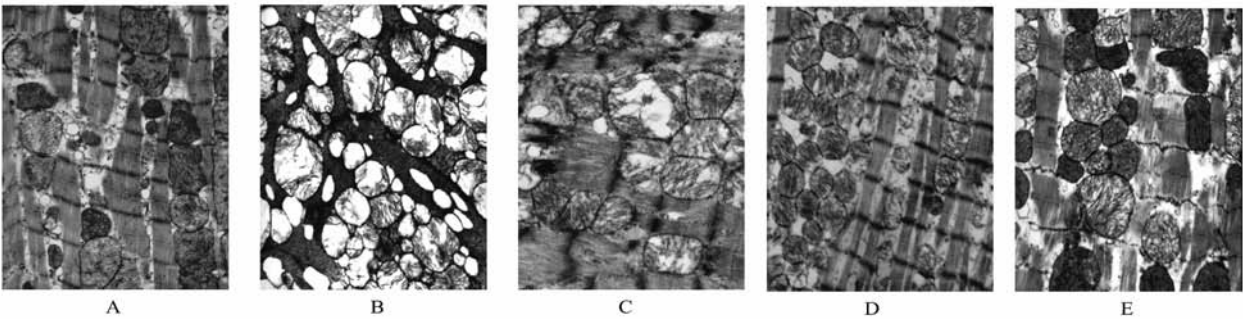


图1 蒺藜提取物对心肌细胞超微结构的影响 (×10 000)

A. 正常组;B. ADR 模型组;C. ADR + 蒺藜提取物 I 组;D. ADR + 蒺藜提取物 II 组;E. ADR + 蒺藜提取物 III 组(图2,3 同)

心肌细胞超微结构正常。心肌纤维肌膜完整,肌原纤维排列整齐,明、暗带清楚,线粒体结构清楚,膜完整,嵴致密,排列规则,其上附着之基粒结构清晰,肌浆网、横小管清晰可见。ADR + 蒺藜提取物 I 组:线粒体肿胀有一定的减轻,线粒体嵴仍有所改变,有空泡形成,基质密度有一定的增强。ADR + 蒺藜提取物 II 组:心肌纤维肿胀进一步减轻,仍有个别线粒体出现空泡、肿胀,部分嵴模糊,排列尚规则。ADR + 蒺藜提取物 III 组:心肌纤维结构基本恢复正常:线粒体结构较完整,嵴致密集,排列较整齐,线粒体肿胀明显减轻,接近阴性对照组。

3.2 对细胞凋亡率的影响 结果显示,正常组大鼠[凋亡细胞率(0.71 ± 0.32)%]偶见心肌细胞凋亡的阳性标记;ADR 组大鼠[凋亡细胞率(29.47 ± 3.28)%]心肌细胞核内可见到较多棕黄色核染,与正常组比较有显著差异性($P < 0.01$);所有给药组细胞凋亡均有不同程度的下降,其中中[凋亡细胞率(14.86 ± 2.15)%]、高[凋亡细胞率(12.63 ± 1.97)%]剂量组的下降程度更加明显,与模型组比较有统计学意义($P < 0.01$)。

3.3 各组心肌细胞 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达 Bax, Bcl-2 蛋白阳性反应为黄色或棕黄色颗粒,定位于胞膜、胞浆。结果显示正常组有少量 Bax 蛋白表达;与正常组比较,模型组 Bax 蛋白表达显著增加($P <$

0.01);与模型组比较,蒺藜提取物中、高剂量组 Bax 蛋白表达显著减少($P < 0.05$)。正常组有少量 Bcl-2 蛋白表达;与正常组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,蒺藜提取物低剂量组 Bcl-2 蛋白表达明显增加($P < 0.05$),蒺藜提取物中、高剂量组 Bcl-2 蛋白表达显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。从 Bcl-2/Bax 也可以看出,模型组与正常组比较,Bcl-2, Bax 表达均显著增加,但 Bcl-2 增加的幅度小于 Bax,故模型组凋亡率上升,而各给药组 Bcl-2/Bax 明显上升,抑制了心肌细胞凋亡,细胞凋亡率下降。结果提示蒺藜提取物可能通过下调 Bax 蛋白表达、上调 Bcl-2 蛋白表达而起到抗凋亡作用。各组心肌细胞内 Bax, Bcl-2 蛋白表达图像见图 2,3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的 A 比较见表 1。

表1 各组 Bax, Bcl-2 蛋白表达(A) 的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常	38.27 ± 8.60	94.31 ± 7.25	2.46 ± 0.78
ADR	417.18 ± 65.33 ²⁾	208.46 ± 21.84 ¹⁾	0.50 ± 0.13
ADR + 蒺藜提取物 I	292.35 ± 27.68 ³⁾	334.65 ± 38.09 ³⁾	1.07 ± 0.24
ADR + 蒺藜提取物 II	230.34 ± 21.37 ⁴⁾	427.47 ± 72.20 ⁴⁾	1.86 ± 0.49
ADR + 蒺藜提取物 III	207.40 ± 22.51 ⁴⁾	448.29 ± 85.93 ⁴⁾	2.16 ± 0.65

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

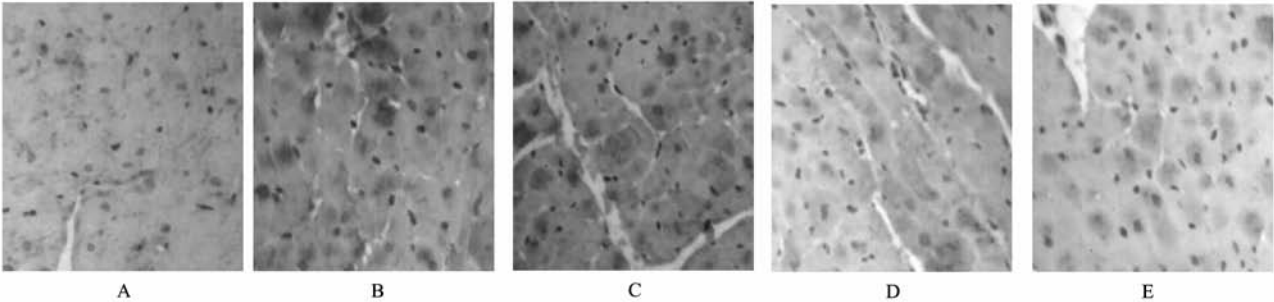


图2 各组 Bax 蛋白表达 (×400)

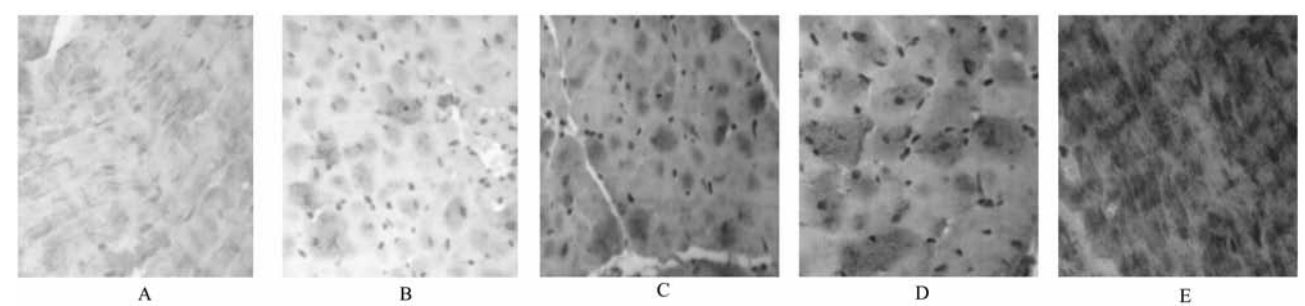


图 3 各组 Bcl-2 蛋白表达 (×400)

4 讨论

胞凋亡。

阿霉素是一种高效的广谱抗肿瘤药物,临床上常用于治疗多种肿瘤,但其具有严重的心脏毒性,对心肌有损伤,阿霉素所引起的心肌损伤机制尚未完全阐明,目前已经证实 ADR 进入心肌细胞后产生活性氧(reactive oxygen species,ROS),并由这些 ROS 引起心肌损伤是 ADR 对心肌毒性损伤的重要机制^[6],近年来的研究证实 ADR 导致心肌细胞凋亡而损伤,有报道^[7]认为阿霉素对心肌的损伤作用与其所引发的心肌细胞凋亡有密切关系,心肌细胞凋亡是阿霉素心肌病的重要机制。本实验研究显示,阿霉素组心肌细胞凋亡率明显高于正常组,进一步说明细胞凋亡参与了阿霉素对心肌的损伤作用。

Bax 是与 Bcl-2 结构相似的一种蛋白,但它的作用与 Bcl-2 完全相反,有促进细胞凋亡的作用。Hochhauser 等^[8]用转基因鼠实验证实,Bax 基因高表达可促进心肌细胞凋亡,表达的程度与心肌凋亡的程度呈正相关。Bax 通过与线粒体上 Bcl-2 蛋白形成二聚体发挥作用,当 Bax 高表达时,形成同源二聚体 Bax/Bax 促进心肌细胞凋亡;Bcl-2 高表达时,形成异源二聚体 Bcl/Bax 抑制凋亡发生^[9]。

本实验结果显示:ADR 造模后的大鼠心肌细胞凋亡率显著升高,ADR + 蒺藜提取物各剂量组与 ADR 组相比较,凋亡指数明显下降,提示蒺藜提取物能抑制阿霉素所致的大鼠心肌细胞凋亡。ADR + 蒺藜提取物各剂量组与 ADR 组相比较,Bcl-2 的蛋白表达升高,bax 的蛋白表达下降,结果提示蒺藜提取物可能通过下调 Bax 蛋白表达、上调 Bcl-2 蛋白表达,提高 Bcl-2/Bax,从而抑制阿霉素所致的心肌细

[参考文献]

[1] 章敏,吕宝经,荣烨之. 福辛普利对阿霉素中毒心肌的保护作用[J]. 上海第二医科大学学报, 2001, 22 (1):19.

[2] 侯俊英,王秀华,李红,等. 蒺藜皂苷对缺血再灌注损伤心肌细胞保护作用实验研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20 (4):418.

[3] 姜宗文,吕文伟,刘芬,等. 蒺藜果总皂苷对实验性大鼠脑缺血的保护作用[J]. 中草药, 2002, 33 (11): 1120.

[4] 王秀华,李红,温克,等. 注射用蒺藜皂苷抗脑缺血作用及其机制的研究[J]. 吉林大学学报:医学版, 2004, 30 (1):60.

[5] 王秀华,李红,杨世杰,等. 注射用蒺藜皂苷的抗脑缺血作用[J]. 吉林大学学报:医学版, 2003, 29 (1): 5.

[6] Weimtein D M, Mihm M J, Bauer J A. Cardiac liac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice[J]. J Pharmacal Exp Ther, 2000, 294 (1):396.

[7] Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, et al. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats; *In vivo* study[J]. Circulation, 2000, 102 (5):572.

[8] Hochhauser E, Kivity S, Offen D, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia -reperfusion injury in transgenic mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284 (6): H2351.

[9] Adams J M, Cory S. The Bcl₂ protein family: arbiters of cell survival[J]. Science 1998, 281 (5381): 1322.

[责任编辑 邹晓翠]