

[文章编号] 1000-4718(2006)12-2349-06

## S-甲基异硫脲对阿霉素致大鼠心肌组织超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性改变的影响\*

阳冠明<sup>1</sup>, 孙胜涛<sup>1</sup>, 李树全<sup>1</sup>, 林伟雄<sup>1</sup>, 叶司原<sup>2</sup>, 利基林<sup>2</sup>, 林善修<sup>1</sup>( <sup>1</sup>广西医科大学第一附属医院儿科, 广西南宁 530021; <sup>2</sup>广西肿瘤研究所生化室, 广西南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 探讨 S-甲基异硫脲(SMT)对阿霉素(ADM)所致大鼠心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性改变的影响。方法: 给大鼠腹腔注射 ADM(10.0 mg·kg<sup>-1</sup>)1次, 给 ADM 处理的大鼠静脉注射不同剂量的 SMT(每天1次, 共3次)进行干预。用分光光度法测定心肌组织丙二醛(MDA)含量、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)活性、铜-锌超氧化物歧化酶(Cu-ZnSOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性、一氧化氮合酶活性; 用酶的速率法测定血清肌酸激酶(CK)的同功酶 CK-MB 活性; 用逆转录-聚合酶链反应方法检测心肌组织 MnSOD mRNA、Cu-ZnSOD mRNA、GPx mRNA、诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 表达。结果: SMT(5.0, 10.0, 20.0 mg·kg<sup>-1</sup>)3个干预组心肌组织 MDA 含量、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量、iNOS 活性及血清 CK-MB 活性明显低于 ADM 组(P<0.01), 而其心肌组织 MnSOD mRNA、Cu-ZnSOD mRNA、GPx mRNA 表达水平及其酶活性明显高于 ADM 组(P<0.01)。结论: SMT 拮抗 ADM 抑制心肌组织 MnSOD mRNA、Cu-ZnSOD mRNA、GPx mRNA 表达而拮抗 ADM 抑制这些酶的活性。

**[关键词]** S-甲基异硫脲; 多柔比星; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 基因表达

[中图分类号] R979.1; R977.3

[文献标识码] A

## Effect of S-methylisothiourea on activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in myocardial tissues of rats treated with adriamycin

YANG Guan-ming<sup>1</sup>, SUN Sheng-tao<sup>1</sup>, LI Shu-quan<sup>1</sup>, LIN Wei-xiong<sup>1</sup>, YE Si-yuan<sup>2</sup>, LI Ji-lin<sup>2</sup>, LIN Shan-xiu<sup>1</sup>(<sup>1</sup> Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China. E-mail: yangguanming123@yahoo.com.cn; <sup>2</sup> Department of Biochemistry, The Guangxi Cancer Institute, Nanning 530021, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the effect of S-methylisothiourea (SMT) on adriamycin (ADM)-induced changes of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in myocardial tissue of rats. **METHODS:** Rats were treated with ADM by intraperitoneal injection (10.0 mg/kg body weight), and then the ADM-treated rats were intervened by SMT at different dosages by intravenous injection (once a day for three days). The contents of malondialdehyde (MDA) and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, the activities of manganese superoxide dismutase (MnSOD), copper-zinc superoxide dismutase (Cu-ZnSOD), glutathione peroxidase (GPx) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were determined by spectrophotometry in myocardial tissue. The activity of isoenzymic CK-MB of creatine kinase (CK) was determined by enzymic rate method in serum. The expression of MnSOD mRNA, Cu-ZnSOD mRNA, GPx mRNA and iNOS mRNA were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. **RESULTS:** The contents of MDA, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and iNOS activity of myocardial tissue, the activity of CK-MB in serum in SMT (5.0, 10.0, 20.0 mg/kg) intervention groups were significantly lower than those in ADM-treated group (P<0.01). However, the activities of MnSOD, Cu-ZnSOD and GPx in myocardial tissue and levels of mRNA expression were significantly higher than those in ADM-treated group (P<0.01). **CONCLUSION:** SMT antagonizes the inhibitory effects of ADM on the expression of MnSOD mRNA, Cu-ZnSOD mRNA and GPx mRNA in myocardial tissue, thereby antagonizes the inhibitory effects of ADM on the activities of MnSOD,

[收稿日期] 2005-03-25 [修回日期] 2005-05-16

\* [基金项目] 广西自然科学基金资助项目(No. 0447050)

Tel: 0771-5358130; E-mail: yangguanming123@yahoo.com.cn

Cu - ZnSOD and GPx in myocardial tissue.

[ KEY WORDS ] S - methylisothiourea; Doxorubicin; Nitric oxide synthase; Nitric oxide; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase; Gene expression

阿霉素 ( adriamycin, ADM) 属蒽醌类抗生素, 是临床上常用的一种高效、广谱抗肿瘤药物, 但对心肌有损伤作用<sup>[1]</sup>。为此, 研究并阐明 ADM 的心肌损伤机制对寻找有效的防治措施具有重要意义。吴伟康等<sup>[2]</sup>的研究表明 ADM 导致心肌细胞处于氧化应激 (oxidative stress) 状态, 以致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 氧化损伤心肌。金凯等<sup>[3]</sup>的研究证实 ADM 导致心肌细胞超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 活性降低, 使心肌细胞的抗氧化能力降低, 是其导致心肌细胞处于氧化应激状态, 以致 ROS 氧化损伤心肌的重要因素。Weinstein 等<sup>[4]</sup>的研究证实 ADM 诱导心肌细胞诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 生成, 使心肌细胞产生一氧化氮 (nitric oxide, NO) 增加而致心肌损伤。Sazuka 等<sup>[5]</sup>用抗氧化剂谷胱甘肽、α - 生育酚干预 ADM 所致心肌损伤小鼠, 证实抗氧化剂的抗氧化作用不能拮抗 ADM 抑制心肌细胞 SOD、GPx 活性。S - 甲基异硫脲 (S - methylisothiourea, SMT) 是 iNOS 的选择性抑制剂<sup>[6]</sup>, 本实验复制 ADM 性心肌损伤大鼠模型, 用 SMT 干预, 旨在研究 SMT 选择性地抑制 iNOS 的作用是否能拮抗 ADM 抑制心肌细胞 SOD、GPx 活性及其可能机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验动物、药品及主要试剂、仪器

Sprague - Dawley (SD) 大鼠 40 只, 210 - 250 g, 雌雄各半, 由广西医科大学动物实验中心提供。ADM: 广东深圳万乐药业有限公司产品 (批号: 0312E1); SMT: 美国 Sigma 公司产品 (批号: 67730); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD)、铜 - 锌超氧化物歧化酶 (copper - zinc superoxide dismutase, Cu - ZnSOD)、GPx、NO、一氧化氮合酶测定试剂盒: 南京聚力生物医学工程研究所产品; 肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 的同功酶 CK - MB 测定试剂盒: 日本第一化学药品株式会社产品; Trizol 试剂盒 (RNA 提取试剂盒): 美国 Invitrogen 公司产品; Taq DNA 聚合酶、Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (逆转录反应试剂盒): 立陶宛 Fermentas 公司产品; dNTPs: 上海生工生物工程技术有限公司产品; PTC - 220 型 PCR 仪: 美国 MJ Research 公司产品。

### 2 寡核苷酸引物

Mn SOD 引物参照文献<sup>[7]</sup>: 上游引物序列为 5' - ATT AAC GCG CAG ATC ATG CAG - 3'; 下游引物序列为 5' - TTT CAG ATA GTC AGG TCT GAC GTT - 3'; 扩增产物片段长度为 483 bp。Cu - Zn 引物序列按文献<sup>[3,7]</sup>: 上游引物序列为 5' - TTC GAG CAG AAG GCA AGC GGT GAA - 3'; 下游引物序列为 5' - AAT CCC AAT CAC ACC ACA AGC CAA - 3'; 扩增产物片段长度为 396 bp。GPx 引物序列按文献<sup>[3]</sup>: 上游引物序列为 5' - CAG TCC ACC GTG TAT GCC TTC - 3'; 下游引物序列为 5' - ATC GTC ACT GGG TGC TGG CAA - 3'; 扩增产物片段长度为 384 bp。iNOS 引物序列按文献<sup>[8]</sup>: 上游引物序列为 5' - GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG - 3'; 下游引物序列为 5' - CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC - 3'; 扩增产物片段长度为 576 bp。核糖体蛋白 S16 (ribosomal protein S16, rp S16) 引物序列按文献<sup>[7]</sup>: 上游引物序列为 5' - CGT TCA CCT TGA TGA GCC CAT T - 3'; 下游引物序列为 5' - TCC AAG GGT CCG CTG CAG TC - 3'; 扩增产物片段长度为 97 bp。所有引物均由上海生工生物工程服务有限公司合成。

### 3 方法

3.1 动物分组及处理 SD 大鼠 40 只随机分成 5 组, 每组 8 只。ADM 组: ADM 的给药按文献<sup>[3]</sup>, 即 ADM (10.0 mg · kg<sup>-1</sup>, ip), 1 次。ADM + SMT 组: 分成 3 组, ADM 的剂量及用法同 ADM 组; SMT 的给药参考文献<sup>[9]</sup>的方法, 采用尾静脉注射 (SMT 在 3 组的剂量分别为: 5.0、10.0、20.0 mg · kg<sup>-1</sup>, 每天 1 次, 共 3 次), SMT 的首次给药为与 ADM (ip) 的同时 iv; 该 3 组分别称为 ADM + SMT ( I ) 组, ADM + SMT ( II ) 组, ADM + SMT ( III ) 组。对照组: 首次分别 ip 和 iv 相同容积的无菌生理盐水, 以后每天 iv 相同容积的无菌生理盐水 1 次, 共 2 次。于 ADM (ip) 后第 72 h<sup>[3]</sup>, 用戊巴比妥钠 (40 mg · kg<sup>-1</sup>, ip) 麻醉所有大鼠, 打开腹腔, 腹主动脉取血, 分离血清; 打开胸腔和心包, 取出心脏用无菌生理盐水冲洗, 取左、右心室游离壁心肌。一部分心肌用磷酸缓冲液制成匀浆, 蛋白定量用考马斯亮蓝 G - 250 法; 一部分心肌用 Trizol 试剂盒提取总 RNA (按说明书操作)。

3.2 逆转录 - 聚合酶链反应 (reverse transcription - polymerase chain reaction, RT - PCR) ①取各样品心肌组织的总 RNA 3 μg, 用 Revert Aid™ First Strand

cDNA Synthesis 试剂盒进行 RT 反应(按说明书操作)。②PCR 体系:分别含 10.0  $\mu\text{mol/L}$  的 MnSOD、Cu - ZnSOD、GPx、iNOS 的上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ; 含 10.0  $\mu\text{mol/L}$  的 rpS16 的上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ; 含 25.0 mmol/L 的  $\text{MgCl}_2$  3  $\mu\text{L}$ ; 含 10.0 mmol/L 的 dNTPs 1  $\mu\text{L}$ ; 含 100.0 mmol/L 的 Tris - HCl(10  $\times$  PCR buffer)5  $\mu\text{L}$ ; 含  $5.0 \times 10^6$  U/L 的 Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ ; 含 RT 反应产物 2  $\mu\text{L}$ 。加去离子水 34.6  $\mu\text{L}$ , PCR 体系的总容积为 50  $\mu\text{L}$ 。③PCR 的反应条件:94  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^\circ\text{C}$  变性 30 s, 60  $^\circ\text{C}$  退火 1 min, 72  $^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72  $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。

**3.3 心肌组织 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、GPx mRNA、iNOS mRNA 表达水平分析** 取 RT - PCR 扩增产物(上样量为 5  $\mu\text{L}$ )用 2.0% (质量分数)的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 参考文献<sup>[7]</sup>的方法, 用 Gel Doc - 2000 型凝胶成像分析仪(美国 Bio Rad 公司产品)扫描测定 RT - PCR 扩增产物电泳带的平均吸光度值, 分别以 MnSOD、Cu - ZnSOD、GPx、iNOS 引物的 RT - PCR 扩增产物电泳带与 rp S16 引物的 RT - PCR 扩增产物电泳带的平均吸光度值的比值作为 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、GPx mRNA、iNOS mRNA 表达水平的半定量参数。

**3.4 心肌组织 MDA 含量、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量、SOD 活性、GPx 活性、一氧化氮合酶活性测定** 取心肌组织匀浆, 用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量、硝酸还原酶法测定  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量(以反映 NO 的含量)、黄嘌呤氧化酶法测定 MnSOD 及 Cu - ZnSOD 活性、二硫代二硝基苯甲酸法测定 GPx 活性、血红蛋白氧化法测定 iNOS 及结构型一氧化氮合酶(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)活性(均按试剂盒说明书操作)。

**3.5 血清酶学指标测定** 取血清, 用酶的速率法测定 CK - MB 活性(按试剂盒说明书操作)。

#### 4 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较用方差分析, 两组间均数比较用  $q$  检验, 相关分析采用直线相关分析。

## 结 果

**1 SMT 对 ADM 所致心肌组织  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 、MDA 含量及 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、GPx mRNA、iNOS mRNA 表达水平及其酶活性改变的影响**

对照组未检测出 iNOS mRNA 表达及其酶活性。

ADM 组心肌组织 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、GPx mRNA 表达水平及其酶活性明显低于对照组( $P < 0.01$ ), 心肌组织  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量及 MDA 含量明显高于对照组( $P < 0.01$ ); ADM + SMT(I, II, III)3 组心肌组织 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、GPx mRNA 表达水平及其酶活性明显高于 ADM 组( $P < 0.01$ ), 心肌组织 iNOS 活性、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量及 MDA 含量明显低于 ADM 组( $P < 0.01$ ), iNOS mRNA 表达水平与 ADM 组差异无显著( $P > 0.05$ ), 见表 1、2、3。在 ADM + SMT(I, II, III)3 组, 上述心肌组织 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、GPx mRNA 表达水平及其酶活性变化与 SMT 的剂量呈量效关系( $r$  分别为: 0.997、0.993、0.991、0.978、0.986、0.975,  $P < 0.01$ ), 上述心肌组织 iNOS 活性及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量的变化与 SMT 的剂量呈量效关系( $r$  分别为: -0.786、-0.991,  $P < 0.01$ )。

RT - PCR 方法检测心肌组织 Cu - ZnSOD mRNA、MnSOD mRNA、GPx mRNA、iNOS mRNA 表达分别见图 1、2、3、4。

#### 2 相关性分析

ADM 组心肌组织 iNOS 活性与  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量呈明显正相关( $r = 0.947$ ,  $P < 0.01$ ), 心肌组织  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量与 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、GPx mRNA 表达水平呈明显负相关( $r$  分别为: -0.822、-0.961、-0.933,  $P < 0.01$ ), 心肌组织 MDA 含量与 MnSOD mRNA、Cu - ZnSOD mRNA、

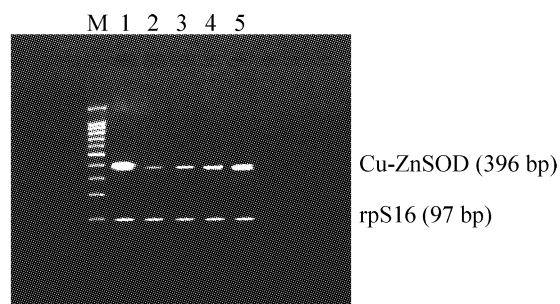


Fig 1 The expression of Cu - ZnSOD mRNA was detected by RT - PCR in myocardial tissue of rats. Lane M: molecular weight marker (from bottom to top: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 000 bp, 1 500 bp); Lane 1: control group; Lane 2: ADM treated group; Lane 3: ADM + SMT(5.0 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 4: ADM + SMT(10.0 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 5: ADM + SMT(20.0 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) treated group.

图 1 RT - PCR 法检测大鼠心肌组织 Cu - ZnSOD mRNA 表达

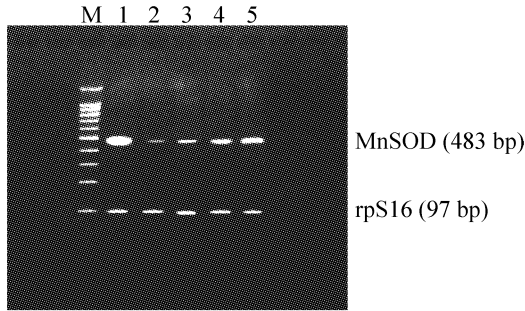


Fig 2 The expression of MnSOD mRNA was detected by RT – PCR in myocardial tissue of rats. Lane M: molecular weight marker (from bottom to top: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 000 bp, 1 500 bp); Lane 1: control group; Lane 2: ADM treated group; Lane 3: ADM + SMT (5.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 4: ADM + SMT(10.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 5: ADM + SMT(20.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group.

图2 RT – PCR 法检测大鼠心肌组织 Mn SOD mRNA 表达

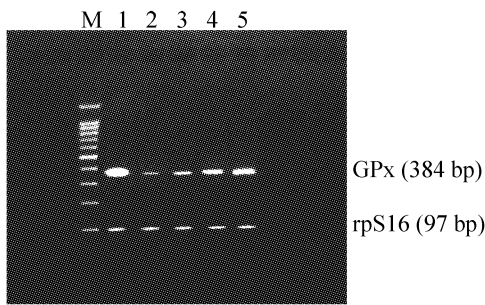


Fig 3 The expression of GPx mRNA was detected by RT – PCR in myocardial tissue of rats. Lane M: molecular weight marker (from bottom to top: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 000 bp, 1 500 bp); Lane 1: control group; Lane 2: ADM treated group; Lane 3: ADM + SMT (5.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 4: ADM + SMT(10.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 5: ADM + SMT(20.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group.

图3 RT – PCR 法检测大鼠心肌组织 GPx mRNA 表达

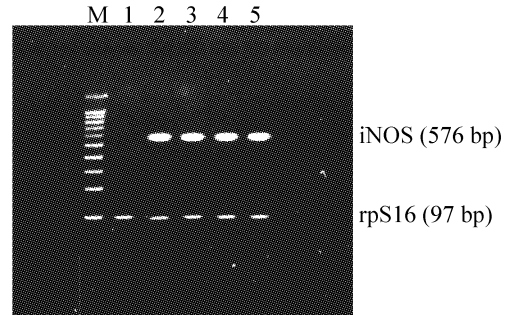


Fig 4 The expression of iNOS mRNA was detected by RT – PCR in myocardial tissue of rats. Lane M: molecular weight marker (from bottom to top: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 000 bp, 1 500 bp); Lane 1: control group (The expression of iNOS mRNA was not found); Lane 2: ADM treated group; Lane 3: ADM + SMT (5.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 4: ADM + SMT(10.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group; Lane 5: ADM + SMT(20.0 mg · kg<sup>-1</sup>) treated group.

图4 RT – PCR 法检测大鼠心肌组织的 iNOS mRNA 表达

GPx mRNA 表达水平无明显负相关 ( $r$  分别为:  $-0.231$ 、 $-0.245$ 、 $-0.217$ ,  $P > 0.05$ ), 心肌组织 MnSOD mRNA、Cu – ZnSOD mRNA、GPx mRNA 表达水平分别与其酶活性呈明显正相关 ( $r$  分别为:  $0.878$ 、 $0.837$ 、 $0.973$ ,  $P < 0.01$ )。

### 3 SMT 对 ADM 所致心肌组织 cNOS 活性及血清 CK – MB 活性改变的影响

ADM 组血清 CK – MB 活性明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 心肌组织 cNOS 活性与对照组差异无显著 ( $P > 0.05$ ); ADM + SMT ( I, II, III ) 3 组血清的 CK – MB 活性明显低于 ADM 组 ( $P < 0.01$ ), 心肌组织 cNOS 活性与 ADM 组差异无显著 ( $P > 0.05$ )。见表 2、3。ADM + SMT ( I, II, III ) 3 组, 上述血清 CK – MB 的活性变化与 SMT 的剂量呈量效关系 ( $r = -0.912$ ,  $P < 0.01$ )。

表1 SMT 对 ADM 所致大鼠心肌组织 MnSOD mRNA、Cu – ZnSOD mRNA、GPx mRNA、iNOS mRNA 表达水平的影响

Tab 1 Effect of SMT on ADM – induced changes of levels of MnSOD mRNA, Cu – ZnSOD mRNA, GPx mRNA and iNOS mRNA in myocardial tissue of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Group	Ratio of average absorbance values of expressive mRNA			
	MnSOD/rp S16	Cu – ZnSOD/rp S16	GPx/rp S16	iNOS/rp S16
Control	2.158 ± 0.147	2.255 ± 0.171	2.341 ± 0.175	0
ADM(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	0.432 ± 0.016 **	0.411 ± 0.027 **	0.465 ± 0.028 **	2.392 ± 0.173
ADM(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> ) + SMT(mg · kg <sup>-1</sup> )				
( I )(5.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	0.845 ± 0.055 $\Delta\Delta$	0.867 ± 0.059 $\Delta\Delta$	0.923 ± 0.068 $\Delta\Delta$	2.389 ± 0.186 $\Delta$
( II )(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	1.135 ± 0.078 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.238 ± 0.085 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.246 ± 0.082 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	2.383 ± 0.182 $\Delta\Delta$
( III )(20.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	1.581 ± 0.093 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.715 ± 0.096 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.648 ± 0.088 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	2.387 ± 0.168 $\Delta\Delta\Delta$

rpS16: ribosomal protein S16. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta$   $P > 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$  vs ADM group;  $\Delta$   $P > 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$  vs ADM + SMT( I ) group; #  $P > 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs ADM + SMT( II ) group.

表2 SMT对ADM所致大鼠心肌组织MnSOD、Cu-ZnSOD、GPx、iNOS、cNOS活性改变的影响

Tab 2 Effect of SMT on ADM-induced changes of activities of MnSOD, Cu-ZnSOD, GPx, iNOS and cNOS in myocardial tissue of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Group	MnSOD ( $10^3U \cdot g^{-1} \text{protein}$ )	Cu-ZnSOD ( $10^3U \cdot g^{-1} \text{protein}$ )	GPx ( $10^3U \cdot g^{-1} \text{protein}$ )	iNOS ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot g^{-1} \text{protein}$ )	cNOS ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot g^{-1} \text{protein}$ )
Control	5.585 ± 0.418	7.841 ± 0.591	68.812 ± 5.848	0	291.645 ± 28.815
ADM(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	1.325 ± 0.047**	2.386 ± 0.135**	22.513 ± 1.758**	325.162 ± 22.338	293.126 ± 28.902*
ADM(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> ) + SMT(mg · kg <sup>-1</sup> )					
(I)(5.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	2.281 ± 0.116 <sup>△△</sup>	3.492 ± 0.368 <sup>△△</sup>	33.763 ± 3.949 <sup>△△</sup>	255.815 ± 17.344 <sup>△△</sup>	288.283 ± 22.733 <sup>△*</sup>
(II)(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	3.432 ± 0.241 <sup>△△▲▲</sup>	4.817 ± 0.373 <sup>△△▲▲</sup>	45.082 ± 3.982 <sup>△△▲▲</sup>	158.731 ± 13.912 <sup>△△▲▲</sup>	284.892 ± 25.498 <sup>△▲*</sup>
(III)(20.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	4.518 ± 0.294 <sup>△△▲▲##</sup>	6.258 ± 0.547 <sup>△△▲▲##</sup>	55.286 ± 4.613 <sup>△△▲▲##</sup>	47.774 ± 3.282 <sup>△△▲▲##</sup>	287.557 ± 28.112 <sup>△▲##</sup>

\*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup>  $P > 0.05$ , <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs ADM group; <sup>▲</sup>  $P > 0.05$ , <sup>▲▲</sup>  $P < 0.01$  vs ADM + SMT(I) group; <sup>#</sup>  $P > 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs ADM + SMT(II) group.

表3 SMT对ADM所致大鼠心肌组织MDA含量、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量及血清CK-MB活性改变的影响

Tab 3 Effect of SMT on ADM-induced changes of contents of MDA and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in myocardial tissue, and activity of CK-MB in serum of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Group	MDA ( $\mu\text{mol} \cdot g^{-1} \text{protein}$ )	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{mol} \cdot g^{-1} \text{protein}$ )	CK-MB (U/L)
Control	2.341 ± 0.132	72.131 ± 4.168	25.321 ± 1.372
ADM(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	7.213 ± 0.632**	158.135 ± 13.852**	883.355 ± 77.647**
ADM(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> ) + SMT(mg · kg <sup>-1</sup> )			
(I)(5.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	6.146 ± 0.482 <sup>△△</sup>	132.362 ± 8.696 <sup>△△</sup>	523.351 ± 41.083 <sup>△△</sup>
(II)(10.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	4.811 ± 0.418 <sup>△△▲▲</sup>	95.851 ± 8.338 <sup>△△▲▲</sup>	222.256 ± 15.268 <sup>△△▲▲</sup>
(III)(20.0 mg · kg <sup>-1</sup> )	3.403 ± 0.196 <sup>△△▲▲##</sup>	80.746 ± 2.711 <sup>△△▲▲##</sup>	95.451 ± 6.213 <sup>△△▲▲##</sup>

\*\*  $P < 0.01$  vs control group; <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs ADM group; <sup>▲▲</sup>  $P < 0.01$  vs ADM + SMT(I) group; <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs ADM + SMT(II) group.

### 讨论

ADM导致心肌细胞SOD、GPx活性降低,在其对心肌损伤机制中起重要作用<sup>[3,10]</sup>。ADM导致心肌细胞SOD、GPx活性降低与其导致SOD mRNA、GPx mRNA表达降低有关<sup>[3]</sup>。Sazuka等<sup>[5]</sup>用抗氧化剂谷胱甘肽、α-生育酚干预ADM所致心肌损伤的小鼠,证实抗氧化剂的抗氧化作用不能拮抗ADM导致心肌细胞SOD、GPx活性降低,即ADM导致心肌细胞SOD、GPx活性降低并非由于其在心肌细胞内产生ROS增加所致。ADM进入心肌细胞后产生ROS,使心肌细胞产生ROS增加,ROS攻击富含多价不饱和脂肪酸的心肌细胞的生物膜系统而引发脂质过氧化反应,是ADM致心肌组织产生MDA的最主要场所<sup>[1,10]</sup>;ADM诱导心肌细胞iNOS mRNA表达致心肌细胞iNOS生成,使心肌细胞产生NO增加,是ADM致心肌组织产生NO的最主要场所<sup>[4,11]</sup>;ADM导致心肌细胞SOD、GPx活性降低是其导致心肌组织中SOD、GPx活性降低的最主要场所<sup>[10]</sup>。故在本实验:心肌组织MDA量的变化可反

映心肌细胞产生ROS的情况;心肌组织iNOS mRNA表达改变、iNOS活性变化、NO代谢产物NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>量的变化可分别反映心肌细胞iNOS mRNA表达改变、iNOS活性变化、NO产生情况;心肌组织MnSOD mRNA、Cu-ZnSOD mRNA、GPx mRNA表达改变及其酶活性变化可反映心肌细胞这些酶的mRNA表达改变及其酶活性变化。本实验结果显示:SMT拮抗ADM抑制心肌细胞MnSOD、Cu-ZnSOD、GPx活性与其拮抗ADM抑制心肌细胞MnSOD mRNA、Cu-ZnSOD mRNA、GPx mRNA表达有关。Igarashi等<sup>[12]</sup>用NO供体S-亚硝基-乙酰青霉胺作用于大鼠心肌细胞,证实NO导致GPx活性降低;Joe等<sup>[13]</sup>用脂多糖刺激大鼠腹膜巨噬细胞,证实NO导致SOD活性降低。在本实验,SMT拮抗ADM抑制心肌细胞MnSOD mRNA、Cu-ZnSOD mRNA、GPx mRNA表达与其选择性地抑制心肌细胞的iNOS活性使心肌细胞产生NO减少,而减少NO抑制这些酶的mRNA表达有关。

ADM导致心肌细胞产生ROS增加、NO增加致心肌损伤<sup>[1,4]</sup>。Koedel等<sup>[14]</sup>分别用SMT、抗氧化剂

N-乙酰半胱氨酸干预肺炎球菌性脑膜炎大鼠进行对比性研究,证实 SMT 不具有抗氧化作用。在本实验,血清的 CK-MB 活性增加和降低是 ADM 致心肌损伤和 SMT 减轻 ADM 对心肌损伤的指标,SMT 减轻 ADM 对心肌损伤与其拮抗 ADM 抑制心肌细胞的 SOD、GPx 活性及选择性地抑制心肌细胞 iNOS 活性而使心肌细胞产生 ROS、NO 减少有关。

(本文初稿承蒙哈尔滨医科大学心脏病理生理研究室王孝铭教授精心审阅。特此致谢!)

#### [参 考 文 献]

- [1] Muraoka S, Miura T. Free radical mediate cardiac toxicity induced by adriamycin[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2003, 123(10): 855-866.
- [2] 吴伟康,杨 辉,赵明奇. 阿霉素性心力衰竭模型的氧化应激和凋亡机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(8): 1437-1439.
- [3] 金 凯,陈中军,罗华荣. 盐酸阿霉素对大鼠心肌损伤的分子机制研究[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2002, 23(3): 191-194.
- [4] Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294(1): 396-401.
- [5] Sazuka Y, Tanizawa H, Takino Y. Effect of adriamycin on the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in tissues of mice[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1989, 80(1): 89-94.
- [6] Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(26): 12357-13068.
- [7] Sugino N, Hirose T, Takamori M, Zhong L, et al. Hormonal regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid in the rat corpus luteum: induction by prolactin and placental lactogens[J]. *Biol Reprod*, 1998, 59(3): 599-605.
- [8] Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, et al. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(18): 13183-13186.
- [9] 郑惠珍,蔡 波,冯有辉,等. SMT 对大鼠在体心脏缺血-再灌注损伤超微结构的保护作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2000, 16(4): 314-317.
- [10] Dorr RT. Cytoprotective agents for anthracyclines [J]. *Semin Oncol*, 1996, 23(4 Suppl 8): 23-34.
- [11] 阳冠明,李树全,叶司原,等. 1,6-二磷酸果糖抑制阿霉素致大鼠心肌细胞凋亡的实验研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(3): 386-390.
- [12] Igarashi J, Nishida M, Hoshida S, et al. Inducible nitric oxide synthase augments injury elicited by oxidative stress in rat cardiac myocytes[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(1 Pt 1): C245-C252.
- [13] Joe B, Lokesh BR. Studies on the inactivation of superoxide dismutase activity by nitric oxide from rat peritoneal macrophages[J]. *Mol Cell Biochem*, 1997, 168(1-2): 87-93.
- [14] Koedel U, Pfister HW. Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat[J]. *Neurosci Lett*, 1997, 225(1): 33-36.