

文章编号: 1007- 2985(2008) 06- 0104- 03

# 黄芪甲甙对大鼠阿霉素心肌细胞凋亡的影响<sup>\*</sup>

钟 飞, 李 辉, 周卫华

(吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000)

**摘要:** 目的 探讨黄芪甲甙对大鼠阿霉素心肌病心肌细胞凋亡及其端粒酶活性表达的影响. 方法 雄性 SD 大鼠, 体重 250 g 左右. 建立阿霉素心肌病模型, 随机分为黄芪甲甙干预组、模型组(阿霉素组)、正常对照组、正常大鼠黄芪甲甙对照组. 用原位末端标记法(TUNEL)标记凋亡的心肌细胞, 用 TRAP-PCR-ELISA 法检测端粒酶活性. 结果 阿霉素组凋亡指数明显高于对照组( $P < 0.05$ ), 黄芪甲甙干预组凋亡指数明显低于阿霉素组( $P < 0.05$ ), 但仍高于对照组( $P < 0.05$ ); 黄芪甲甙干预组与阿霉素组比较, 端粒酶活性明显升高( $P < 0.05$ ), 但仍低于对照组( $P < 0.05$ ). 结论 心肌细胞凋亡是阿霉素心肌病的重要机制, 黄芪甲甙干预治疗可减少阿霉素心肌病的心肌细胞凋亡, 可能与黄芪甲甙能提高端粒酶活性有关.

**关键词:** 黄芪甲甙; 阿霉素; 心肌; 凋亡; 端粒酶

中图分类号: R542.2

文献标识码: B

阿霉素(Adriamycin, ADR)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, 但其对心肌有损伤, 严重时可能导致阿霉素性心脏病<sup>[1]</sup>.

端粒是位于真核细胞染色体末端的特殊蛋白复合物, 可防止双链打开时染色体末端被识别, 以保持其完整性和稳定性. 端粒酶及其相关蛋白共同调节端粒结构、长度及其末端复制功能. 端粒酶由端粒逆转录酶和端粒酶成分组成, 后者系合成新的端粒序列的模板. 近来研究发现, 原发性高血压、动脉粥样硬化、心力衰竭等心血管疾病发生发展过程中存在端粒长度、端粒酶活性的相关变化, 表达增加, 促进心肌细胞增生, 减少细胞凋亡.<sup>[2]</sup>但端粒酶在阿霉素损伤心肌病理中的作用, 目前尚未见报道.

黄芪甲甙为黄芪有效成分皂甙类的一单体成分. 笔者通过观察大鼠阿霉素损伤心肌端粒酶活性及其催化亚基的表达以及黄芪甲甙干预后的改变, 探讨黄芪甲甙对阿霉素损伤心肌细胞端粒酶活性的作用. 研究表明, 黄芪甲甙可抑制病毒的复制, 减轻心肌纤维化与心肌细胞凋亡, 防止心功能紊乱、心衰; 比较不同剂量黄芪甲甙对阿霉素损伤心肌端粒酶的影响, 发现低黄芪甲甙及中黄芪甲甙剂量对端粒酶活性无影响, 而只有高剂量黄芪甲甙才能增强端粒酶活性.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

黄芪甲甙购于 Sigma 公司; SD 大鼠, 4 周龄、雄性、近系纯种、清洁级, 为吉首大学医学院自己饲养; TRIzol 试剂、逆转录酶和 Taq 聚合酶、原位细胞凋亡检测试剂盒均购于 Invitrogen 公司; 端粒酶活性试剂盒购自 Millipore 公司.

### 1.2 方 法

1.2.1 阿霉素心肌病模型建立及分组 雄性 SD 大鼠, 体重 250 g 左右, 阿霉素剂量每次 20 mg/kg 溶于注射用水 0.5 mL 中, 腹腔注射, 隔天 1 次, 共 6 次, 总剂量为 120 mg/kg 于 2 周内注射.<sup>[3]</sup>检测血清肌磷酸激酶、血清脑钠素(BNP)水平作为心力衰竭生化指标, 彩色超声心动图测定心功能参数. 以左室射血分数、左室缩短分数较正常参考值下降 30%, 同时有血清肌磷酸激酶升高、血清脑钠素升高作为心肌病模型并心力衰竭建立成功的标准. 然后按随机分组原则进行分组.

A 组(黄芪甲甙干预组): 在造模完成 2 周后(即最后 1 次注射阿霉素 2 周)开始每天给予黄芪甲甙 5 mg/kg 用 1% 甲基纤维素钠 0.1 mL 溶解, 灌胃, 每天 1 次, 疗程 14 d. B 组(模型组(阿霉素组)): 在造模完成 2 周后(即最后 1 次注射阿霉素 2 周), 给予 1% 甲基纤维素钠 0.1 mL, 灌胃, 每天 1 次, 共 14 d. C 组(正常对照组): 正常大鼠, 腹腔注射与阿霉素等体积的注射用水, 隔天 1 次, 共 6 次. 治疗开始后每天给予 1% 甲基纤维素钠 0.1 mL, 灌胃, 每天 1 次, 共 14 d. D 组(正常大鼠黄芪甲

\* 收稿日期: 2008-08-07

基金项目: 湖南省卫生厅资助项目(2007171); 吉首大学校级重大项目(08ZDW T001)

作者简介: 钟 飞(1954-), 男, 湖南吉首人, 吉首大学医学院教授, 主要从事中医药的生物化学机理研究.

甙对照组): 正常大鼠处理同 D 组, 治疗开始后每天给予黄芪甲甙, 剂量、用法同 A 组。第 15 天处死全部大鼠。

1.2.2 凋亡细胞原位标记 (TUNEL) 与半定量分析 心肌组织行常规石蜡包埋, 每个标本取 3 个不同部位的切片, 厚 4  $\mu\text{m}$ , 采用 TUNEL 法标记凋亡细胞核中的 DNA 3'-OH 末端。凋亡细胞半定量分析: 镜下正常心肌细胞核呈蓝色, 凋亡细胞核呈深浅不一的红色颗粒状。在计算机图像分析仪上, 在 400 倍视野下, 每张切片拍摄 5 个阳性视野, 每个视野计数 200 个细胞核, 根据阳性细胞所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数 (AI)<sup>[4]</sup>。AI 等于凋亡阳性细胞数 / 总细胞数  $\times 100$ 。AI 作为心肌细胞凋亡数量的半定量参数。

1.2.3 TRAP-PCR-ELISA 法检测端粒酶活性的影响 收集大鼠外周血 0.5 mL, 经 Ficoll 梯度离心分离单个核细胞 (约  $1 \times 10^6$ ), 按试剂盒说明制备端粒酶提取液。取提取液上清 2  $\mu\text{L}$ , 加入含有 50  $\mu\text{L}$  反应混合物的 TRAP 反应管中, 混匀, 加入 50  $\mu\text{L}$  液体石蜡, 置 25  $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 30 min, 在 PCR 仪上经 94  $^{\circ}\text{C}$  和 2 min 灭活后, 再分别经 94  $^{\circ}\text{C}$  和 30 s, 48  $^{\circ}\text{C}$  和 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  和 90 s 共 35 次循环扩增; 于 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min 后, 分别取扩增产物 30  $\mu\text{L}$  加入含有杂交反应液的微孔板各孔中, 混匀, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温反应 1 h, 加入显色剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 10 min, 加入终止液终止反应, 测 450 nm 的光吸收值, 以光吸收值的大小反映端粒酶活性的高低<sup>[5-6]</sup>。

1.2.4 统计学处理 所有数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS13.0 for windows 专业统计软件进行数据分析处理, 两样本均数间比较用 *t* 检验, 多个样本均数间的比较用方差分析, 多个样本均数间的两两比较用 *q* 检验 (Newman-Keuls 法)。

## 2 结果

### 2.1 心肌细胞凋亡指数的变化

阿霉素组凋亡指数明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 黄芪甲甙干预组凋亡指数明显低于阿霉素组 ( $P < 0.05$ ), 但仍高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (见表 1)。

### 2.2 黄芪甲甙对心肌细胞端粒酶活性的影响

黄芪甲甙干预组与阿霉素组比较, 端粒酶活性明显升高 ( $P < 0.05$ ), 但仍低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (见表 1)。

表 1 凋亡指数、端粒酶光吸收检测比较

	A 组	B 组	C 组	D 组
细胞凋亡率	19.77 $\pm$ 2.93 <sup>a</sup>	40.05 $\pm$ 1.96	3.75 $\pm$ 0.16	3.30 $\pm$ 0.11
端粒酶阳性表达率	74.82 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	30.17 $\pm$ 1.30	80.45 $\pm$ 1.51	81.27 $\pm$ 0.13

注: 肩标 a 表示  $P < 0.05$  有显著差异

## 3 讨论

阿霉素引起的心肌损伤的机制尚未完全阐明, 有报道<sup>[7]</sup>认为阿霉素心肌病的心肌损伤与其所引发的心肌细胞凋亡有关, 心肌细胞凋亡是阿霉素心肌病的重要机制。该研究显示, 阿霉素组心肌细胞凋亡指数明显高于黄芪组和对照组, 进一步说明细胞凋亡机制参与了阿霉素心肌病的病理过程。

阿霉素是一种高效广谱抗肿瘤药物, 但是同时对心肌的损伤不容忽视, 它能引发心肌细胞的凋亡, 加速心肌毒性。该实验研究人员在发现阿霉素在引起心肌细胞凋亡的过程中, 同时观测了端粒酶的变化, 发现阿霉素会同时降低心肌细胞端粒酶的活性; 心肌端粒酶活性的表达能够让心肌细胞具有复制功能<sup>[8-9]</sup>, 能够进行有丝分裂和修复, 获得增殖的能力, 有效地保护心肌细胞的新陈代谢<sup>[10-14]</sup>。端粒酶活性的降低会加速心肌细胞的凋亡, 实验中阿霉素组心肌的凋亡明显大于正常细胞, 其端粒酶的表达也远远低于正常细胞。

黄芪是一种传统的补气药物, 黄芪甲甙为黄芪有效成分皂甙类的一单体成份。实验中发现黄芪甲甙对阿霉素心肌损伤有良好的改善作用, 能显著降低阿霉素对心肌细胞的凋亡作用, 增强端粒酶的活性, 改善心脏功能, 从而推测黄芪甲甙可能具有促进心肌细胞再生和修复功能<sup>[15-16]</sup>。

实验研究表明, 黄芪甲甙能有效抑制阿霉素引起的心肌细胞凋亡, 从而为黄芪甲甙临床防治阿霉素心脏毒性提供可靠的药理学依据。其机制可能是通过提高端粒酶活性, 上调其催化亚基的表达, 增强心肌细胞的有丝分裂和修复, 从而减少心肌细胞坏死和凋亡, 改善阿霉素毒性心肌病理损伤程度。

### 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): 19-21
- [2] OGAMI M, KURA Y, OHSAWA M, et al. Telomere Shortening in Human Coronary Artery Diseases [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2004, 24: 546-549.
- [3] SIVESK FLISKOVIC N, HILL M, CHOW D A, et al. Probucol Protects Against Adriamycin Cardiomyopathy Without Interfering with Its Antitumor Effect [J]. Circulation, 1995, 91(1): 10-15.

- [4] 尹瑞兴, 杨德寨, 李佳荃. 心肌营养素 - 1 对心肌梗死大鼠心功能和心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(3): 273
- [5] MOR N G B. The Implications of Telomerase Biochemistry for Human Disease [J]. Eur J Cancer 1997 33(5): 750- 760
- [6] TATSUMOTO N, H YAMA E, MURAKAM I Y, et al High Telomerase Activity is an Independent Prognostic Indicator of Poor Outcome in Colorectal Cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000 6(7): 2 696- 2 701.
- [7] NAKAMURA T, UEDA Y, JUAN Y, et al Fas-M ediated Apoptosis in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in Rats In Vivo Study [J]. Circulation 2000, 102(5): 572- 578
- [8] KRUPP G, KLAPPER W, PARWARESCH R. Cell Proliferation, Carcinogenesis and Diverse Mechanisms of Telomerase Regulation [J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(3): 464- 486
- [9] CH IANG Y, J HEMANN M T, HATHCOCK K S, et al Expression of Telomerase RNA Template But Not Telomerase Reverse Transcriptase is Limiting for Telomere Length Maintenance in Vivo [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(16): 7 024- 7 031.
- [10] 任晓庆, 王方正, 浦介麟, 等. 心肌细胞再生与心肌移植修复 [J]. 中华心律失常学杂志, 2004, 4(3): 125- 128
- [11] KAJSTURA J, PERTOLDI B, LERIA, et al Telomere Shortening is an in Vivo Marker of Myocyte Replication and Aging [J]. Am J Pathol 2000 156(3): 813- 819
- [12] HAMET P, THORN-TRESCASES N, MOREAU P, et al Workshop Excess Growth and Apoptosis Is Hypertension a Case of Accelerated Aging of Cardiovascular Cells [J]. Hypertension, 2001, 37(2 Part 2): 760- 766
- [13] BLASCO M A, GASSER SM, LINGNER J. Telomeres and Telomerase [J]. Genes Dev, 1999 13(18): 2 353 - 2 359.
- [14] ANVERSA P, KAJSTURA J. Ventricular Myocytes are Not Terminally Differentiated in the Adult Mammalian Heart [J]. Circ Res, 1998, 83(1): 1- 14
- [15] 钟 飞, 杜九中, 于小华. 黄芪甲甙对病毒性心肌炎细胞凋亡作用的研究 [J]. 南华大学学报: 医学版, 2004, 32(1): 182- 183.
- [16] 李 丽, 陶辉宇, 陈杰斌, 等. 黄芪甲甙保护阿霉素心肌损伤的抗氧化机制研究 [J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(1): 58- 61.

## Effects of Astragaloside on Cardiomyocyte Apoptosis in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in Rats

ZHONG Fei LIH uij ZHOU W erhua

(Medical College of Jishou University, Jishou 416000, Hunan China)

**Abstract Objective** To explore the effects of Astragaloside on cardiomyocyte apoptosis and the expression of telomerase in adriamycin (ADR)-induced cardiomyopathy in rats. **Methods** Male SD rats weighing about 250 g were used to establish the model of Adriamycin-induced Cardiomyopathy, then randomized into groups Astragaloside group, ADR group, control group and control+ Astragaloside group. Apoptotic cardiomyocytes were detected using the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling method (TUNEL). The expression of telomerase was determined by TRAP-PCR-ELISA method. **Results** Compared with control group, ADR group had significantly higher index of apoptotic cardiomyocytes ( $P < 0.05$ ). The apoptotic index in Astragaloside group was less than that in ADR group ( $P < 0.05$ ), however significantly higher than that in control group and control+ Astragaloside group ( $P < 0.05$ ). The expression of telomerase in Astragaloside group was significantly higher than that in ADR group ( $P < 0.05$ ), however significantly lower than that in control group and control+ Astragaloside group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Myocardial apoptosis is an important mechanism of adriamycin-induced cardiomyopathy. Astragaloside therapy can inhibit cardiomyocyte apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy partly because it might increase expression of telomerase.

**Key words** astragaloside; adriamycin; myocardium; apoptosis; telomerase

(责任编辑 向阳洁)