

# 硫辛酸对多柔比星致大鼠心肌细胞损伤凋亡的保护作用研究

张志刚<sup>1\*</sup>, 陈建忠<sup>1#</sup>, 欧 扬<sup>2</sup>, 刘 平<sup>1</sup>(1.聊城市人民医院药学部, 山东 聊城 252000; 2.山东大学齐鲁医院药学部, 济南 250000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1180-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.10

**摘要** 目的:研究硫辛酸对多柔比星致大鼠心肌细胞损伤凋亡的保护作用。方法:将大鼠随机分为正常对照组、模型组和低、中、高剂量[10、20、40 mg/(kg·d)]硫辛酸组,每组10只,后4组腹腔注射多柔比星3 mg/kg,隔日1次,连用6次建模。硫辛酸组于注射多柔比星第2天起腹腔注射相应浓度的硫辛酸,每日1次,连用10 d。多柔比星末次给药24 h后处死大鼠,观察各组大鼠心肌结构变化,检测心肌细胞凋亡情况和心肌细胞中抑制细胞凋亡因子Bcl-2、凋亡基因Bax蛋白表达情况。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠肌丝排列疏松、紊乱,大部分线粒体形成空泡,其心肌细胞凋亡指数和Bax蛋白表达均明显增强,Bcl-2蛋白表达明显降低( $P<0.01$ );与模型组比较,低、中、高剂量硫辛酸组心肌细胞病理形态学变化均改善,且凋亡指数和Bax蛋白表达均明显降低,Bcl-2蛋白表达明显增强( $P<0.01$ )并呈剂量依赖性。结论:硫辛酸可拮抗多柔比星所致大鼠心肌细胞损伤,其作用机制可能与抑制Bax蛋白表达、增强Bcl-2蛋白表达有关。

**关键词** 硫辛酸;多柔比星;大鼠;心肌细胞;凋亡;Bcl-2;Bax;表达

## Protective Effects of Lipoic Acid on Myocardial Cell Apoptosis Induced by Doxorubicin in Rats

ZHANG Zhi-gang<sup>1</sup>, CHEN Jian-zhong<sup>1</sup>, OU Yang<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Liaocheng People's Hospital, Shandong Liaocheng 252000, China; 2.Dept. of Pharmacy, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective effect of lipoic acid (LA) on doxorubicin-induced myocardial cell apoptosis in rats. METHODS: Rats were randomized into normal control group, model group and LA low-dose, medium-dose and high-dose groups [10, 20, 40 mg/(kg·d)] with 10 rats in each group. Latter 4 groups were given doxorubicin 3 mg/kg by intraperitoneal injection once a day for 6 times to establish model. LA groups were given corresponding concentrations of LA intraperitoneally after 2 days once a day for consecutive 10 days. Those rats were sacrificed 24 h after last administration. The changes of myocardial structure were observed, and myocardial cell apoptosis, the protein expressions of Bax and Bcl-2 were detected. RESULTS: Compared with normal control group, loose and disordered myofibril arrangement were found in model group, most of mitochondria vacuoles formed, apoptosis index and the protein expressions of Bax increased significantly, but the protein expressions of Bcl-2 decreased ( $P<0.01$ ); compared with model group, pathomorphology change of cardiac cell in LA groups improved and apoptosis index and the protein expressions of Bax decreased significantly while the protein expressions of Bcl-2 increased in dose-dependant manner ( $P<0.01$ ). CONCLUSIONS: LA could suppress the myocardial cell apoptosis induced by doxorubicin, which may be related to the expression down-regulation of Bax and expression up-regulation of Bcl-2.

**KEY WORDS** Lipoic acid; Doxorubicin; Rats; Myocardial cell; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Expression

多柔比星(Doxorubicin)是肿瘤化疗中常用的一种广谱有效的抗肿瘤药物,但其严重的心脏毒性效应,使其临床应用受到限制。寻找对多柔比星所致心肌损伤具有保护作用、又不影响多柔比星抗肿瘤作用的药物实为必要。有证据<sup>[1]</sup>证明,多柔比星所致心脏毒性中,氧化应激和细胞凋亡发挥着极其重要的作用。有文献<sup>[2]</sup>报道,硫辛酸(Lipoic acid, LA)可以对抗缺血再灌注脑神经元凋亡,但是硫辛酸对多柔比星所致心肌损伤凋亡的保护作用机制,目前文献报道不多。本研究应用不同剂量硫辛酸对多柔比星所致大鼠心肌细胞凋亡相关基因抑制细胞凋亡因子Bcl-2、凋亡基因Bax蛋白表达的影响,并探讨

其可能的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TDK-4离心机(上海安亭科学仪器制造厂);JEM-1200EX透射电子显微镜(日本电子公司);垂直电泳仪和转膜槽(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 药品与试剂

硫辛酸(注射液,山西亚宝药业有限公司,批号:H20055869,规格:每支150 mg);盐酸多柔比星(注射用,浙江海正药业股份有限公司,批号:030702,规格:每瓶10 mg);原位缺口末端标记(TUNEL)试剂盒,Bcl-2、Bax多克隆抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗均由武汉博士德公司提供。

### 1.3 动物

\* 主管药师,硕士。研究方向:药理学和临床药学。E-mail: zgz751108@163.com

# 通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0635-8276238。E-mail: lchenjianzhong@163.com

SD大鼠,清洁级,♂,体质量250~280g,由北京维通利华实验动物中心提供,许可证号:SCXK(京)2006-0009。大鼠实验前适应性喂养14d。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

将大鼠随机分为正常对照组、模型组和低、中、高剂量[10、20、40 mg/(kg·d)]<sup>[9]</sup>硫辛酸组,每组10只。后4组腹腔注射多柔比星3 mg/kg<sup>[9]</sup>,隔日1次,连用6次建模。硫辛酸组于注射多柔比星第2天起腹腔注射相应剂量的硫辛酸,每日1次,连用10d。正常对照组腹腔注射生理盐水10 mg/kg,隔日1次,共6次。

### 2.2 心肌细胞病理形态学观察

多柔比星末次给药24h后处死大鼠,取出心脏,取心尖部米粒大小心脏,2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,丙酮脱水,环氧树脂包埋,聚合,修块,制成超薄组织切片,铅铀电子染色,透射电镜观察心肌细胞超微结构。

### 2.3 心肌细胞凋亡的检测

每组随机选取5个心肌标本用10%甲醛溶液固定,石蜡包埋切片后,每个蜡块连续2张切片,切片经脱蜡后按照TUNEL试剂盒说明书操作,以细胞核呈棕褐色表示心肌细胞凋亡阳性。将切片于光镜下放大400倍,每张切片随机选取5个视野,分别计数细胞核总数和凋亡细胞核数,计算凋亡指数(AI,%)=凋亡阳性细胞核数/细胞核总数×100%。

### 2.4 蛋白质印迹(Western blot)法检测心肌细胞Bax、Bcl-2蛋白表达

取待测心肌,冰预冷PBS洗涤至缓冲液清澈,加入冰预冷的组织裂解缓冲液,4℃超声粉碎,12 000 r/min离心30 min,吸取上清,分装,-70℃保存。用Lowry法<sup>[9]</sup>测定蛋白质含量。以牛血清白蛋白(BSA)为标准品,将各组蛋白浓度调成一致。用12%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分离蛋白质,每个泳道蛋白上样量为50 μg,电泳后转硝酸纤维素膜,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(TBS)冲洗,封闭,TTBS(加入吐温20的TBS)冲洗。将膜放入Bcl-2、Bax多克隆抗体(1:500稀释),4℃过夜,TTBS冲洗后,将膜放入用HRP标记的羊抗兔二抗(1:500稀释)中,室温孵育1~2h,然后用TTBS洗膜3次,每次10 min。四唑氮蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(NBT/BCIP)显色液中避光显色,显色后终止反应。将蛋白质印迹显影图扫描,利用凝胶自动分析成像软件Chem Image 5500对蛋白带进行灰度值(A)分析。以β-肌动蛋白(β-actin)为内参蛋白,用目标蛋白表达量的灰度值与β-actin的灰度值比值表示目标蛋白的相对表达量。

### 2.5 数据统计

数据资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,实验数据应用SPSS 11.0软件进行统计学分析,采用方差分析及LSD-*t*检验进行统计学处理。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性, $P < 0.01$ 表示差异具有极显著性。

## 3 结果

### 3.1 心肌细胞超微结构变化

正常对照组大鼠心肌细胞肌丝排列整齐,肌节明暗带清晰,线粒体饱满,嵴致密排列规则。与正常对照组比较,模型组大鼠心肌细胞肌丝排列疏松、紊乱,大部分肌丝呈断裂溶解状,线粒体排列紊乱、肿胀、大小不等,嵴变短变少甚至消失,

大部分线粒体形成空泡。低剂量硫辛酸组大鼠心肌细胞部分肌丝溶解,线粒体排列紊乱,线粒体嵴不清晰,局部线粒体空化,有空泡形成。高剂量硫辛酸组大鼠心肌细胞可见肌丝排列整齐,少数肌丝溶解,肌节明暗带清晰,线粒体有少数空化。除中剂量硫辛酸组外的其余各组大鼠心肌细胞的超微结构电镜图见图1。

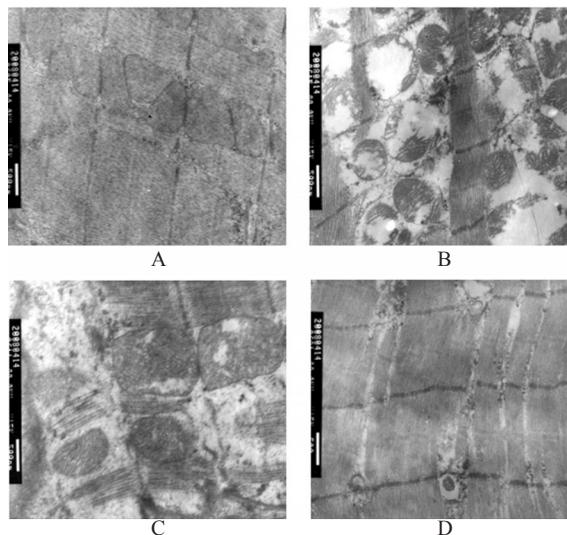


图1 各组大鼠心肌细胞的超微结构电镜图(×15 000)

A.正常对照组;B.模型组;C.低剂量硫辛酸组;D.高剂量硫辛酸组

Fig 1 Ultrastructural electron microscope of myocardial cell of rats in each group(×15 000)

A. normal control group; B. model group; C. LA low-dose group; D. LA high-dose group

### 3.2 心肌细胞凋亡指数变化

与正常对照组比较,模型组大鼠心肌细胞凋亡指数明显增加( $P < 0.01$ )。与模型组比较,低、中、高剂量硫辛酸组大鼠心肌细胞凋亡指数明显降低( $P < 0.01$ )。各组大鼠心肌细胞凋亡指数见表1。

表1 各组大鼠心肌细胞凋亡指数和Bcl-2、Bax蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 1 Comparison of apoptosis index of myocardial cell and protein expression of Bcl-2 and Bax of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	AI, %	$A_{Bcl-2}/A_{\beta-actin}$	$A_{Bax}/A_{\beta-actin}$
正常对照组	4.77±0.93	1.50±0.10	0.77±0.03
模型组	33.40±1.23*	0.41±0.05*	1.40±0.03*
低剂量硫辛酸组	24.13±2.08#	0.81±0.06#	1.13±0.08#
中剂量硫辛酸组	17.98±1.66#▲	1.04±0.05#▲	0.98±0.06#▲
高剂量硫辛酸组	6.54±1.03#*	1.36±0.03#*	0.83±0.04#*

与正常对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: # $P < 0.01$ ;与低剂量硫辛酸组比较: ▲ $P < 0.01$ ;与中剂量硫辛酸组比较: ◆ $P < 0.01$

vs. normal control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: # $P < 0.01$ ; vs. LA low-dose group: ▲ $P < 0.01$ ; vs. LA medium-dose group: ◆ $P < 0.01$

### 3.3 心肌细胞Bax、Bcl-2蛋白表达的变化

与正常对照组比较,模型组大鼠心肌细胞的Bcl-2蛋白表达明显减弱,Bax蛋白表达明显增强( $P < 0.01$ )。与模型组比较,低、中、高剂量硫辛酸组大鼠心肌细胞的Bcl-2蛋白表达明显增强,Bax蛋白表达明显减弱( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性。

各组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达见表 1, 电泳图见图 2。

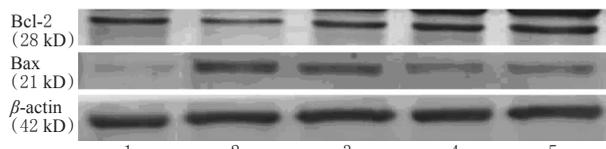


图 2 各组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达电泳图

1. 正常对照组; 2. 模型组; 3. 低剂量硫辛酸组; 4. 中剂量硫辛酸组; 5. 高剂量硫辛酸组

Fig 2 Electrophoretogram of protein expression of Bcl-2 and Bax in myocardial cell of rats in each group

1. normal control group; 2. model group; 3. LA low-dose group; 4. LA medium-dose group; 5. LA high-dose group

#### 4 讨论

硫辛酸是一种很强的抗氧化、抗自由基的化合物, 其在体内吸收进入细胞后, 可还原成二氢硫辛酸并释放到细胞外, 还可以进入细胞的脂相与水相部分, 在任何部位清除自由基, 发挥“全能抗氧化剂”的作用。有研究<sup>[6]</sup>表明, LA 通过上调 Bcl-2 蛋白表达, 减少活性氧的产生, 从而抑制大鼠脑细胞的凋亡。硫辛酸可以拮抗环磷酸胺所致大鼠心肌线粒体酶和线粒体外膜的改变<sup>[7]</sup>。但是, 硫辛酸对多柔比星所致大鼠心肌毒性有无保护作用, 国内外鲜见文献报道。

在本研究中, 笔者建立了多柔比星致心肌细胞损伤模型。电镜下可见模型组大鼠心肌细胞肌丝断裂溶解, 线粒体弥散肿胀, 嵴排列紊乱, 局部或整个线粒体断裂溶解和空泡化, 显示作为心肌能量的细胞器线粒体功能不良, 药品的不良反应对心肌细胞造成了损伤。已有研究<sup>[1]</sup>证实, 在多柔比星所致心肌损伤过程中, 细胞凋亡发挥着极其重要的作用, 心肌细胞暴露在多柔比星中会发生细胞凋亡, 而过度的细胞凋亡会引起心功能损害。细胞凋亡在个体正常发育成熟、维持机体内环境稳定以及多种疾病的发生、发展的病理生理过程中具有很重要的生物学意义。凋亡加速基因 Bax 和凋亡抑制基因 Bcl-2 被认为与氧化应激和细胞凋亡关系密切<sup>[8]</sup>。Wu S 等<sup>[9]</sup>用多柔比星处理培养的乳鼠心肌细胞和脐静脉内皮细胞, 结果发现, 细胞内 Bcl-2 表达下降, 且与多柔比星的剂量相关。促进凋亡的 Bax 能与 Bcl-2 形成异源二聚体并通过抑制后者活

性促进凋亡发生。多柔比星通过上调 Bax, 使线粒体膜间腔的细胞色素 C 释放入胞浆, 启动凋亡程序。本实验中, 用 Western blot 法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平, 结果显示硫辛酸保护心肌细胞的作用机制可能与增强心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达和抑制 Bax 蛋白表达有关。

#### 参考文献

- [1] 孙习鹏, 万丽丽, 郭澄. 多柔比星心脏毒性机制研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(9): 853.
- [2] 尹志奎, 郑斌, 崔旭, 等.  $\alpha$ -硫辛酸对缺血再灌注脑神经元凋亡的作用[J]. 山东医药, 2005, 45(23): 18.
- [3] Mythili Y, Sudharsan PT, Selvakumar E, et al. Protective effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac injury[J]. *Chem Biol Interact*, 2004, 151(1): 13.
- [4] 赖平, 马郁文, 杜军保, 等. 1,6 二磷酸果糖对大鼠阿霉素心肌病的防治作用及机理的探讨[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35(7): 368.
- [5] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265.
- [6] Antonio AM, Gillespie RA, Druse-Manteuffel MJ. Effects of lipoic acid on antiapoptotic genes in control and ethanol-treated fetal rhombencephalic neurons[J]. *Brain Res*, 2011(1383): 13.
- [7] 于洋, 海春旭, 梁欣, 等.  $\alpha$ -硫辛酸对大鼠心肌缺血再灌注氧化损伤的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(7): 631.
- [8] Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis[J]. *Cell*, 1993, 75(2): 241.
- [9] Wu S, Ko YS, Teng MS, et al. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(12): 1595.

(收稿日期: 2012-06-07 修回日期: 2012-07-13)

## 卫生部医疗服务监管司举办国家级医院评审员第三期培训班

本刊讯 为推动医院评审工作的专业化、规范化、科学化, 卫生部医疗服务监管司于 2013 年 2 月 21-22 日在天津举办国家级医院评审员第三期培训班。培训班由卫生部医院评审评价项目办公室副主任陈晓红主持。卫生部副部长马晓伟出席培训班并作重要讲话。

马晓伟指出, 现阶段医院评审工作要紧密结合“医改”要求, 不断吸取新经验、形成新思路、探索新方法、引导新方向, 要“穿新鞋, 走新路”, 逐步与国际先进经验接轨。

马晓伟要求, 下一步评审要做好 4 项重点工作: 一是建立专业化的医院评审员制度; 建立完善评审员资质认定、分级管理等制度, 打造一支标准化的评审员队伍, 科学、正确、独立地

把握评审要求。二是继续探索以患者为中心的评审体系: 创新应用追踪方法学、信息数据分析等多种方法, 探索建立定性评价与定量评价相结合的评价体系。三是逐步构建第三方评审机构: 适应政府职能转变的要求, 进一步明确政府与评审机构的关系, 建立具有公信力的独立的国际化第三方评审机构, 开展满足多方需求的评价工作。四是建立评价结果公布制度: 逐步尝试将评价结果对行业、社会公开, 形成评价结果定期公布制度, 使医院评审工作不断走向专业化、公开化、透明化。

来自全国 21 个省、自治区、直辖市的 52 名学员和来自上海市、天津市、福建省、湖南省的十余名院长参加了培训和讨论。