

稀荳蔻醇提物对多柔比星致小鼠慢性心肌损伤的保护作用^Δ

于 静^{1*}, 苏素文², 杨继章^{1#}, 何林峰², 王可欣², 张晓飞² (1. 河北医科大学第一医院临床药学部, 石家庄 050031; 2. 河北医科大学基础医学院药理教研室, 石家庄 050017)

中图分类号 R969.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1320-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.06

摘要 目的: 探讨稀荳蔻(HS)醇提物对多柔比星(DOX)致小鼠慢性心肌损伤的影响。方法: 将48只小鼠随机分为3组, 即空白对照(Con)组小鼠每天ig 1次蒸馏水(2 mL/100 g), 并每周ip 1次生理盐水, 持续8周; DOX组小鼠每天ig 1次蒸馏水(2 mL/100 g), 并每周ip 1次DOX(3 mg/kg), 持续8周; DOX+HS醇提物组小鼠每天ig 1次HS(340 mg/kg), 并每周ip 1次DOX(3 mg/kg), 持续8周。给药结束后, 测定小鼠体质量、心脏系数、心功能变化以及血清生化指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸磷酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)及总胆固醇(TC)]水平。结果: 与Con组比较, DOX组小鼠体质量减轻($P<0.01$); 心脏系数升高($P<0.05$); 心率减慢、R波增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 血清中生化指标均有所升高, 其中AST差异有统计学意义($P<0.01$)。与DOX组比较, DOX+HS醇提物组小鼠心脏系数降低($P<0.01$); 心率增加($P<0.01$); 血清中生化指标均有所降低, 其中CK、LDH、TC差异有统计学意义($P<0.01$)。结论: HS醇提物对DOX致小鼠慢性心肌损伤有一定的保护作用。

关键词 稀荳蔻醇提物; 多柔比星; 慢性心肌损伤; 小鼠

Protective Effects of Ethanol Extracts from *Siegesbeckiae herba* on Doxorubicin-induced Chronic Myocardial Injury in Mice

YU Jing¹, SU Suwen², YANG Jizhang¹, HE Linfeng², WANG Kexin², ZHANG Xiaofei² (1. Dept. of Clinical Pharmacy, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 2. Teaching and Research Section, Basic Medical College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of extracts from *Siegesbeckiae herba* (HS) on doxorubicin (DOX)-induced chronic myocardial injury in mice. **METHODS:** 48 mice were randomly divided into 3 groups. Mice in blank control (Con) group received distilled water once every day, ig, and normal saline (2 mL/100 g) once every day, ip, for 8 weeks; mice in DOX mice received distilled water (2 mL/100 g) once every day, ig, and DOX (3 mg/kg) once every week, ip, for 8 weeks; mice in DOX+HS group received HS (340 mg/kg) once every day, ig, and DOX (3 mg/kg) once every week, ip, for 8 weeks. After administration, body mass, heart coefficient, cardiac function changes, serum biochemical index levels [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine phosphokinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH) and total cholesterol (TC)] of mice were determined. **RESULTS:** Compared with Con group, body mass of mice in DOX group was decreased ($P<0.01$); heart coefficient was increased ($P<0.05$); heart rate slowed down, R-wave was increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); serum biochemical indexes were increased, there was significant difference in AST ($P<0.01$). Compared with DOX group, heart coefficient of mice in DOX+HS group was decreased ($P<0.01$); heart rate was increased ($P<0.01$); serum biochemical indexes were decreased, there was significant differences in CK, LDH, TC ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** HS has certain protective effects on DOX-induced chronic myocardial injury in mice.

KEYWORDS Ethanol extracts from *Siegesbeckiae herba*; Doxorubicin; Chronic myocardial injury; Mice

多柔比星(DOX)是一种高效、广谱的抗肿瘤药,临床上用于急性白血病、淋巴瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌等的治疗。与大多数抗肿瘤药一样,DOX的不良反应较多,最严重的不良反应是剂量依赖性心脏毒性,根据发

生时间长短分为急性和慢性心脏毒性。慢性心脏毒性反应的发生与DOX的累积剂量密切相关。当DOX的总量超过400 mg/m²时,约有1%患者出现心肌病变,引起急性心力衰竭;当DOX的累积总量大于550 mg/m²时,心力衰竭的发生率超过4%,病死率可达20%,此为给药上限剂量;当DOX的累积总量大于600 mg/m²时,心力衰竭的发生率达36%^[1]。稀荳蔻(HS)醇提物对DOX所致急性心肌损伤和肝、肾损伤均有保护作用已得到证实^[2-3],但HS醇提物对DOX所致慢性心肌损伤的作用尚未见报道。故本研究拟以多次注射DOX致小鼠慢

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81273600); 河北省自然科学基金资助项目(No.C2011206145); 河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(No.2012008)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 临床药理学。电话: 0311-85917354。E-mail: 38565914@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士生导师, 教授。研究方向: 临床药理学。电话: 0311-85917352。E-mail: yjzh1957@163.com

性心肌损伤来探讨HS醇提物对DOX慢性心肌损伤小鼠的影响。

1 材料

1.1 仪器

CHEMIX-180全自动生化分析仪(日本Sysmes公司);PICO 17小型台式离心机(德国Thermo公司);AL104电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Allegra 64R高速离心机(美国Beckman Coulter公司);RM-6240BD多通道信号采集处理系统(成都仪器厂)。

1.2 药品、试剂与试剂盒

注射用盐酸DOX(浙江海正药业股份有限公司,批号:110703,规格:5 mL:10 mg);肌酸磷酸激酶(CK,批号:ZG3002)、肌酸激酶同工酶(CK-MB,批号:ZG1001)、乳酸脱氢酶(LDH,批号:120815)、总胆固醇(TC,批号:ZG3003)、天冬氨酸转氨酶(AST,批号:ZG3001、ZG3002)、丙氨酸转氨酶(ALT,批号:ZG3011、ZG3012)测定试剂盒均购自日本Sysmex公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 药材

HS由河北祁新中药颗粒饮片有限公司提供(产地:湖北,批号:20120701-1),由河北医科大学第一医院临床药学部杨继章主任药师鉴定其符合2010年版《中国药典》(一部)标准。

1.4 动物

清洁级C57小鼠48只,♀♂各半,由河北省实验动物中心提供,动物合格证号:1510484。

2 方法

2.1 HS醇提物的制备

将2 kg HS水煎2次后浓缩至4 L,加入95%乙醇,边加边剧烈搅拌至乙醇体积分数为70%。过滤后回收乙醇,烘干,收集粉碎并称质量,共得HS醇提物70 g,每1 g HS醇提物相当于28.57 g生药。实验前用蒸馏水溶解制备成所需质量浓度样品溶液。

2.2 分组、给药与造模

实验动物适应性喂养1周后随机分为3组,即空白对照(Con)组、DOX组和DOX+HS醇提物组,每组16只(♀♂各半)。ig给药,给药体积均为2 mL/100 g,Con组和DOX组小鼠ig等体积蒸馏水,DOX+HS醇提物组小鼠ig HS醇提物340 mg/kg^[2-3],每天1次,连续8周。在给药同时,DOX组与DOX+HS醇提物组小鼠均ip DOX(3 mg/kg),每周1次,连续8周,以诱导慢性心肌损伤模型^[4];Con组小鼠则ip等体积生理盐水。

2.3 症状和体征的观察

观察小鼠一般精神状况、饮食、皮毛等情况,并于末次给予DOX 48 h后称定小鼠体质量。

2.4 心电图的测定

各小鼠均ip 1%戊巴比妥钠(5 mg/kg)麻醉,仰卧固

定,将刺激电极插入小鼠的肢体皮下,采用肢体II导联,用RM6240 BD多道生理信号采集处理系统进行心电图图像采集,分析小鼠心率、R波、PR间期和QT间期的变化。

2.5 血清生化指标及心脏系数的测定

小鼠经眼眶取血约5 mL,静置约30 min后,以离心半径为8 cm、3 000 r/min离心10 min,取上层血清。分别测定血清中ALT、AST、TC、CK、CK-MB和LDH水平,所有操作步骤均按测试盒的说明书进行。小鼠经眼眶取血后剖开胸腔,取出心脏,称定各组小鼠心脏质量,计算心脏系数[心脏质量(g)/体质量(g)]。

2.6 统计学方法

采用SPSS 15.0对数据进行统计分析。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HS醇提物对DOX致慢性心肌损伤小鼠一般状况、体质量的影响

Con组小鼠摄食及一般活动在给药期间未见异常;DOX组给药后小鼠摄食量减少,出现竖毛、肢冷、活动时平衡度差的症状,体质量明显减轻($P < 0.01$);而DOX+HS醇提物组小鼠的一般状况优于DOX组,但体质量变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。Con组、DOX组、DOX+HS醇提物组小鼠的体质量变化分别为(2.90 ± 2.10)、(-2.59 ± 1.99)、(-2.39 ± 1.37) g。

3.2 HS醇提物对DOX致慢性心肌损伤小鼠心功能的影响

与Con组比较,DOX组小鼠ECG表现为心率减慢、R波增加、PR间期和QT间期延长,其中心率和R波变化差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与DOX组比较,DOX+HS醇提物组小鼠心率增加、R波减少、PR间期和QT间期缩短,其中心率变化差异有统计学意义($P < 0.01$),结果见表1。

表1 各组小鼠心电图的检测结果($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Tab 1 Detection results of electrocardiogram of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 16$)

| 组别 | 心率,次/min | R波,mV | PR间期,ms | QT间期,ms |
|------------|----------------------------|-------------|------------|--------------|
| Con组 | 409.28±23.60 | 0.34±0.07 | 17.93±4.77 | 67.81±22.95 |
| DOX组 | 377.45±36.45* | 0.47±0.08** | 23.48±5.68 | 106.13±49.99 |
| DOX+HS醇提物组 | 464.89±66.52 ^{##} | 0.43±0.11 | 20.92±5.43 | 80.68±48.48 |

注:与Con组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与DOX组比较,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. Con group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; vs. DOX group,^{##} $P < 0.01$

3.3 HS醇提物对DOX致慢性心肌损伤小鼠血清生化指标的影响

与Con组比较,DOX组小鼠血清中ALT、AST、CK、CK-MB、LDH、TC水平均升高,其中AST差异有统计学

意义($P<0.01$);与DOX组比较,DOX+HS醇提物组小鼠血清中上述指标水平均降低,其中CK、LDH、TC差异有统计学意义($P<0.01$),结果见表2。

表2 各组小鼠血清生化指标的测定结果($\bar{x}\pm s,n=16$)
Tab 2 Determination results of serum biochemical indexes of mice in each group($\bar{x}\pm s,n=16$)

| 组别 | ALT,U/L | AST,U/L | CK,U/L | CK-MB,U/L | LDH,U/L | TC,mmol/L |
|------------|-------------|----------------|-----------------|--------------|----------------|-------------|
| Con组 | 52.74±11.07 | 158.00±27.51 | 843.33±92.39 | 316.67±92.39 | 846.00±112.61 | 1.73±0.46 |
| DOX组 | 59.74±14.91 | 201.14±21.85** | 976.11±178.02 | 340.44±63.03 | 941.56±147.31 | 2.10±0.34 |
| DOX+HS醇提物组 | 55.89±13.79 | 199.16±49.57 | 765.33±129.80** | 328.60±48.36 | 801.40±95.74** | 1.71±0.17** |

注:与Con组比较,** $P<0.01$;与DOX组比较,** $P<0.01$
Note: vs. Con group, ** $P<0.01$; vs. DOX group, ** $P<0.01$

3.4 HS醇提物对DOX致慢性心肌损伤小鼠心脏系数的影响

与Con组[(0.004 40±0.000 99) g/g]比较,DOX组小鼠的心脏系数[(0.005 60±0.000 66) g/g]明显升高($P<0.05$);与DOX组比较,DOX+HS醇提物组小鼠的心脏系数[(0.004 80±0.000 47) g/g]明显降低($P<0.05$)。

4 讨论

由于DOX可引起剂量依赖性的心脏毒性,而限制了其临床应用^[6],其毒性主要表现为器质性的病变^[9]。目前,主要是应用DOX控释剂和联合使用心脏保护剂(如右丙亚胺)来降低DOX的心脏毒性^[7-9]。但化学药品往往通过一种机制来降低DOX的心脏毒性,而中药则可能通过多靶点进行拮抗^[9]。HS所含化学成分较多,主要有萜类、苷类、生物碱等。研究证明,HS提取物具有舒张血管、降压、抗癌、镇痛、抗菌消炎、抗氧化、抑制免疫功能等活性。日本科学家证实,HS的甲醇提取物有较强的抗氧化性,其活性高于2,3-丁基-4-羟基茴香醚^[10]。

本研究采用连续8周重复对小鼠注射DOX致累积中毒剂量的方法,观察HS醇提物是否可拮抗其产生的慢性心肌损伤。笔者前期研究已证明,HS醇提物对DOX所致的急性心肌损伤和肝、肾损伤均有保护作用,以高剂量组作用最为明显^[2-3],故在本研究设计时没有设定不同给药剂量组,只选定高剂量为本次实验剂量。

在本研究中,从小鼠的一般状况来看,与Con组比较,DOX组小鼠均出现竖毛、肢冷、活动力差等现象;与DOX组比较,DOX+HS组上述症状均有所改善。因DOX的半衰期为48~96 h,故本研究的各项指标在DOX注射48 h后进行检测。从小鼠体质量变化来看,Con组小鼠体质量在8周后明显增加,而DOX组小鼠体质量却明显减少,DOX+HS醇提物组小鼠体质量稍增加,但差异无统计学意义。而DOX组小鼠的心脏系数却明显高于Con组,这说明DOX对心脏的损伤可引起实验小鼠的体质量下降,但心脏质量却增加,而心脏质量增加可能是心肌细胞的肿胀和间质水肿所致。与DOX组比较,

DOX+HS醇提物组小鼠的心脏系数却降低,这提示HS醇提物对DOX所造成的心脏损伤有一定的对抗作用。DOX组小鼠心电图的心率减慢、R波增高、PR间期和QT间期延长,提示DOX长期累积注射可造成小鼠慢性心肌损伤,而HS醇提物可缓解DOX所致的心电图异常。

CK广泛存在于各种组织中,与三磷酸腺苷的再生有关,此酶的功能是在生理水平上维持细胞内的三磷酸腺苷浓度。CK由M和B两个亚单位组成,组合成CK-BB、CK-MM、CK-MB 3种同工酶,其中CK-MB则主要存在于心肌,血清中CK和CK-MB是DOX诱发心肌损害致细胞完整性缺失的定量指示剂^[11]。LDH是糖酵解过程中的重要酶,在心肌细胞中的含量远高于其他组织,血清中LDH含量的高低与心肌损伤的程度呈正相关^[12]。AST的分布以心肌最高,当心肌细胞受到损伤时,大量释放入血,使其血清含量增加。本研究结果显示,DOX组血清中CK、CK-MB、LDH、TC、ALT、AST水平均升高,而DOX+HS醇提物组小鼠血清中以上各种酶的水平均有所降低,这提示HS醇提物对DOX慢性中毒所致的心肌损伤有一定的保护作用。

综上所述,HS醇提物可改善DOX致小鼠慢性心肌损伤,但究竟是何种成分在起作用还有待进一步研究。

参考文献

[1] Fu J, Yamamoto K, Guan ZW, et al. Human neuronal nitric oxide synthase can catalyze one electron reduction of adriamycin: role of flavin domain[J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 427(2): 180-187.
[2] 于静,王婧,苏素文,等. 豨莶草提取物对抗多柔比星致大鼠急性心肌损伤的作用[J]. 医药导报, 2013, 32(7): 843-847.
[3] 于静,王建欣,苏素文,等. 豨莶草提取物对抗多柔比星致大鼠急性肝损伤的作用及其机制[J]. 医药导报, 2014, 33(4): 422-425.
[4] 吴运香,张野,谢春林,等. SD大鼠阿霉素慢性心力衰竭模型的建立与评价[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(8): 1170-1173.
[5] 张明岩,安晶红,柴森,等. 阿霉素在临床应用中心脏毒性的研究进展[J]. 哈尔滨医药, 2008, 28(5): 55-56.
[6] Keefe DL. Anthracycline-induced cardiomyopathy[J]. Semin Oncol, 2001, 28(4 Suppl 12): 2-7.
[7] Cvetkovic RS, Scott LJ. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy [J]. Drugs, 2005, 65(7): 1005-1024.
[8] 余炜,郭增清,谢瑞祥,等. 右丙亚胺联合参麦注射液用于蒽环类药物致乳腺癌患者心脏毒性的临床观察[J]. 中国药房, 2015, 26(32): 4562-4564.
[9] 于静,杨继章,苏素文,等. 多柔比星心脏毒性及其中药防治研究进展[J]. 医药导报, 2013, 32(2): 174-177.
[10] 许云龙,熊江,金歧端,等. 常用中药豨莶研究进展[J]. 天

葡萄籽原花青素对胆汁酸盐在结肠腺细胞 Caco-2 中转运的影响[△]

来丽华^{1*},葛 建^{2#}(1.杭州市中医院广兴堂国医馆中药房,杭州 310007;2.中国计量大学药理学系,杭州 310018)

中图分类号 R361[†].3;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1323-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.07

摘要 目的:研究葡萄籽原花青素(GSP)对甘氨酸胆酸钠(GA)和牛磺胆酸钠(TA)在结肠腺细胞 Caco-2 中跨膜转运的影响。方法:利用 Caco-2 细胞模型,采用反相-高效液相色谱法测定细胞培养液中 GA 和 TA 的含量。试验分为 GSP 组、GA 组、TA 组、GSP+GA 组和 GSP+TA 组,分别检测 0、2、4、8 h 从 Transwell 小室顶端(AP)侧透过 Caco-2 细胞向基底端(BL)侧转运 GA 和 TA 的透过量。结果:GA 和 TA 检测浓度的线性范围均为 0.05~1.2 mmol/L($R^2=0.999\ 9$)。随着时间的延长,GA 组和 TA 组 BL 侧 GA 和 TA 的透过量急剧增加;而加入 GSP 后,BL 侧 GA 和 TA 的透过量明显较少,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:GSP 对 GA 和 TA 在 Caco-2 细胞中的跨膜转运具有抑制作用。
关键词 葡萄籽原花青素;结肠腺细胞 Caco-2;牛磺胆酸钠;甘氨酸胆酸钠;跨膜转运

Effects of Grape Seed Proanthocyanidin on the Transport of Bile Salts in Colon Glandular Cell Caco-2
LAI Lihua¹, GE Jian² (1.Dept. of TCM, Guangxingtang Traditional Chinese Medicine, Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310007, China;2.Dept. of Pharmacy, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of grape seed proanthocyanidin (GSP) on the transmembrane transport of sodium glycocholate (GA) and sodium taurocholate (TA) in colon glandular cell Caco-2. METHODS: Caco-2 model was used, and RP-HPLC was conducted to determine the contents of GA and TA in cell culture medium. The test was divided into GSP group, GA group, TA group, GSP+GA group and GSP+TA group, the transport volumes of transporting GA and TA from Transwell apical (AP) side to basolateral (BL) side by Caco-2 cell at 0, 2, 4, 8 h were detected, respectively. RESULTS: The linear ranges of GA and TA were 0.05-1.2 mmol/L ($R^2=0.999\ 9$). With the time passing, transport volumes of GA and TA in BL site in GA group and TA group were sharply increased; while the transport volumes were obviously decreased after adding GSP, with statistical significance ($P<0.01$). CONCLUSIONS: GSP has inhibitory effect on the transmembrane transport of GA and TA in Caco-2 cell.
KEYWORDS Grape seed proanthocyanidin; Colon glandular cell caco-2; Sodium glycocholate; Sodium taurocholate; Transmembrane transportation

原花色素是广泛存在于多种植物中,具有 C6-C3-C6 基本构架的一类多酚化合物的总称,其中原花青素报道最多,分布最为广泛。国内外研究表明,原花青素具有抗氧化、清除自由基、抗菌、抗癌以及保护肝和心脑血管系统等作用^[1-3]。近年来,关于葡萄籽原花青素(GSP)在调控心脑血管系统功能方面的报道较多,尤其是 GSP 对机体脂质代谢过程改善方面的报道最多^[4]。然而,关于 GSP 调控脂质代谢的分子机制研究报道较少。
胆汁酸是在肝中由胆固醇合成的物质,与甘氨酸或

牛磺酸结合生成甘氨酸胆酸钠(GA)或牛磺胆酸钠(TA)分泌入十二指肠,胆汁酸盐可在盲肠末端被重吸收进入肠肝循环,以保持胆汁酸盐的动态平衡^[5]。有研究表明,部分水果、蔬菜或茶叶中某些组分可结合胆汁酸盐,使其排出体外,阻止胆汁酸盐的重吸收,可促进血浆及肝中胆固醇转化为胆汁酸,从而降低胆固醇的含量,起到降血脂的效果^[6-7]。
笔者前期研究表明,儿茶素类天然多酚化合物能显著吸附胆汁酸盐,从而抑制肠道脂质吸收,起到调控血

然产物研究与开发,2001,13(5):84-85.
[11] Li J, Liu H, Ramachandran S, et al. Grape seed proantho-
△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31100499)
* 中药师。研究方向:中草药活性。电话:0571-87881603。E-mail: xskathy@163.com
通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:天然药物。电话:0571-86835702。E-mail: gejian16888@163.com

cyanidins ameliorate doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(3): 569-584.
[12] 赵文英,陈冬云,邢文,等.磷酸肌酸钠对小鼠阿霉素心肌损伤的保护机制初探[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(3): 259-262.
(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-12)
(编辑:林 静)