

张桐,范志民,张洋,等. 曲克芦丁对吡柔比星所致大鼠急性心肌毒性的保护及其机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 72 - 79.
Zhang T, Fan ZM, Zhang Y, et al. Protective effect and mechanism of troxerutin on pirarubicin-induced acute myocardial toxicity in rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 72 - 79.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.012

曲克芦丁对吡柔比星所致大鼠急性心肌毒性的保护及其机制

张桐¹, 范志民², 张洋¹, 侯天一¹, 贾泓瑶², 秦梦¹, 孙波¹, 任立群^{1*}

(1. 吉林大学药学院, 长春, 130021; 2. 吉林大学第一医院, 长春 130021)

【摘要】 目的 探究曲克芦丁对吡柔比星所致大鼠急性心肌毒性的保护作用及机制。**方法** 使用 THP 复制大鼠急性心肌毒性模型, 观察 TRX 对 THP 所致急性心肌毒性大鼠的心脏系数体重、心功能、心电、病理学形态、及血清中各心肌酶指标的变化。同时, 利用 Western blot, 对 AKT、p-AKT、caspase-9、caspase-3、cleaved caspase-3、BCL-2 及 BAX 等蛋白的情况进行测定。**结果** 曲克芦丁可提高吡柔比星所致急性心肌毒性大鼠的心脏系数, 改善其心功能, 降低 LDH、CK-MB、cTn-T 和 BNP 的含量, 同时升高 SOD, 降低 MDA 的水平; TRX 同时激活 AKT 使其磷酸化水平升高, 上调凋亡蛋白 caspase-9、caspase-3、BCL-2, 下调 cleaved caspase-3、BAX 的水平。**结论** 曲克芦丁可能通过激活 AKT, 使相关凋亡蛋白表达下降, 从而改善吡柔比星所致大鼠急性心肌毒性。

【关键词】 曲克芦丁; 吡柔比星; 心肌毒性; AKT; 信号通路; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0072-08

Protective effect and mechanism of troxerutin on pirarubicin-induced acute myocardial toxicity in rats

ZHANG Tong¹, FAN Zhimin², ZHANG Yang¹, HOU Tianyi¹, JIA Hongyao², QIN Meng¹, SUN Bo¹, REN Liqun^{1*}

(1. College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China. 2 First Hospital of Jilin University, Changchun, 130021)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and mechanism of troxerutin (TRX) on acute myocardial toxicity induced by pirarubicin (THP) in rats. **Methods** THP was used to replicate acute myocardial toxicity in rats. Changes in cardiac weight, cardiac function, electrocardiogram, pathological morphology, and serum myocardial enzymes in the rats with acute myocardial toxicity induced by THP were observed. Western blot was used to determine the protein levels of AKT, p-AKT, caspase-9, caspase-3, cleaved caspase-3, BCL-2 and BAX. **Results** TRX increased the cardiac coefficient of rats with acute myocardial toxicity induced by THP, improved their cardiac function, decreased the content of LDH, CK-MB, cTn-T and BNP, increased SOD and decreased the levels of MDA. TRX also activated AKT to generate phosphoric acid. The levels of caspase-9, caspase-3 and BCL-2 were upregulated, and the levels of cleaved caspase-3 and BAX were downregulated. **Conclusions** TRX attenuates acute myocardial toxicity induced by pirarubicin in rats by activating AKT and decreasing the expressions of related apoptotic proteins.

【Keywords】 troxerutin; pirarubicin; myocardial toxicity; Akt; signaling pathway; rat

[基金项目] 吉林大学横向课题(2018 科技字 1603 号)瀚晖制药有限公司(原海正辉瑞制药有限公司)(HPHR17050201)“HT 类药物逆转葱环类药物心脏毒性作用的研究”。

[作者简介] 张桐(1993—),男,硕士研究生,专业:药学。E-mail:16zhangtong@sina.com

[通信作者] 任立群(1963—),女,教授,研究方向:心血管疾病分子药理学。E-mail:renlq@jlu.edu.cn

吡柔比星 (pirarubicin, THP) 是一种临床上常用的蒽环类抗肿瘤药物,广泛地用于治疗血液系统肿瘤和实体肿瘤,如乳腺癌、淋巴瘤、急性白血病等。目前,临床上一线抗肿瘤的标准方案,通常是以 THP 等蒽环类药物为基础的联合治疗,其疗效确切^[1]。但 THP 可引起脱发、骨髓抑制和心脏毒性等毒副反应,其中心脏毒性最为严重^[2]。这些毒副反应极大地限制了 THP 的临床应用。右丙亚胺 (dexrazoxane, DZR) 是目前 FDA 唯一批准的预防蒽环类药物所致心脏毒性的保护剂,但右丙亚胺对使用人群的性别、年龄及用量上有所限制^[3-4],因此,目前急需找到安全、有效药物用于预防 THP 引起的心脏毒性,显得尤为重要。

曲克芦丁 (troxerutin, TRX), 是芦丁的衍生物,是一种具有多种生物活性的黄酮类化合物^[5]。TRX 具有抑制红细胞和血小板凝聚、防止血栓形成^[6]、改善微循环^[7]、促进新血管生成等作用。此外,TRX 还能对抗 5-羟色胺和缓激肽引起的血管损伤并对内皮细胞起到保护作用,并可以防止由于长距离引起的飞行水肿,还具有抗化学性肝损伤、抗炎症作用^[8-11]。目前,本课题组已发现芦丁可显著改善 THP 所致大鼠急性心肌毒性的心肌组织病理学损伤,心电异常,和心脏功能障碍、心肌酶异常;芦丁可通过显著降低 JNK、cleaved caspase-3 蛋白水平、升高 BCL-2/BAX 比率。从而改善 THP 所致大鼠急性心肌毒性。本实验是通过 THP 所致急性心肌毒性大鼠模型,观察 TRX 对 THP 所致急性心肌毒性大鼠的心脏系数、心电图、心功能、血清心肌酶、SOD 和 MDA、心脏组织病理学形态等指标的影响,探讨 TRX 对 THP 所致大鼠急性心肌毒性的保护机制。旨在为进一步开发应用曲克芦丁提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 2 月龄 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 60 只,体重 170~190 g,购于辽宁长生生物技术有限公司[SCXK(辽) 2015-0001]。饲养于吉林大学药学院中药药理三级实验室[TCM-2009-084],经吉林大学药学院实验动物伦理委员会批准(2017 年,研审第(20170503)),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。室温为 25℃,相对湿度为 50%~70%,饲

喂全价营养颗粒饲料,自由饮水。

1.2 主要试剂与仪器

BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟软件有限公司),台式低温离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司),Nikon ECLIPSE 80i 正置显微镜(日本尼康公司),电泳转移装置(美国 Bio-Rad 公司),纯水仪(成都品成科技有限公司),酶联免疫检测仪(美国 MD 公司),化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

曲克芦丁 (Trolox, TRX, 纯度 $\geq 98\%$) (JZ16120911),购于江苏南京景竹生物科技有限公司;吡柔比星 (pirarubicin, THP) (17019911),购于海正辉瑞有限公司;右丙亚胺 (Dexrazoxane, DZR) (E1611042),购于江苏奥赛康药业有限公司。甲基纤维素钠 (CMC-Na),购于上海金山化学试剂公司,乳酸脱氢酶 (LDH) 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所;肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、心肌钙蛋白 (cTn-T)、脑钠肽 (BNP) 酶联免疫检测试剂盒,购于伊莱瑞特生物科技股份有限公司;RIPA 裂解液、PMSF 购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司;ECL 发光液、BCA 法蛋白定量试剂盒购于上海碧云天生物技术研究;AKT (4691T) 购于 Rabbit mAb Cell Signaling Technology 公司,BAX (ab32503),购于 abcam 公司;Phospho-AKT1/2/3 (AP0274)、Caspase-9 (A10097)、Caspase-3 (A11021)、BCL-2 (A0208) 购于武汉爱博泰克生物科技股份有限公司;山羊抗兔 IgG 单克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将 60 只雄性 Wistar 大鼠 (体重 170~190 g),随机分为 6 组,每组 10 只,即正常组 (CON)、吡柔比星组 (THP)、右丙亚胺+吡柔比星组 (DZR+THP)、曲克芦丁低剂量+吡柔比星组 (TL+THP)、曲克芦丁中剂量+吡柔比星组 (TM+THP)、曲克芦丁高剂量+吡柔比星组 (TH+THP)。

1.3.2 动物给药及血流动力学指标采集

按照体重随机分组,TRX 低、中、高组每天灌胃 TRX 水溶液 1 次 (25、50、100 mg/(kg·d)),其余 3 组每日灌胃等体积三蒸水作为对照,每天灌胃持续 5 d。且实验第 6 天的灌胃后,DZR+THP 组单次尾

静脉注射 180 mg/kg 的 DZR,尾静脉注射 30 min 后,除正常组大鼠注射等体积生理盐水外,其余各组大鼠均单次注射 18 mg/kg 的 THP^[14],TRX 继续灌胃,第 8 天实验结束。

实验结束后,每组大鼠进行心功能测定,麻醉后固定于手术台上,四肢导联。并由胸锁骨胸锁乳突肌内侧分离右颈总动脉,头端结扎,向心端插入连有感受器的静脉留置针。将静脉留置针缓缓插入,使之通过左侧动脉瓣和房室瓣进入左心室^[18],采用 BL-420F 生物机能实验系统,连接到计算机上,待连有感受器的静脉留置针进入左心室后,产生稳定的波形,进行数据保存,采集左心室收缩压 (LVSP, mmHg)、左心室终末舒张压 (LVEDP, mmHg)、左心室内压最大上升速率 (dp/dtmax, mmHg/s)、左心室内压最大下降速率 (-dp/dtmax, mmHg/s) 等血流动力学指标。同时,在检测心功能参数的同时,按标准肢体 II 导联方法,分析大鼠心电图。采集 QRS 波群、Q-T 间期、心率 (HR) 等心肌电生理参数。

1.3.3 指标检测

采集完血流动力学数据后,腹主动脉取血,室温静置 1 h,3000 r/min 离心 10 min,分离血清。检测血清中 MDA、SOD、BNP、CK-MB、cTn-T 及 LDH 的含量。

1.3.4 心组织心脏系数的测定及其病理学检查

称取大鼠体重,处死后,迅速取出心脏组织,用生理盐水清洗,称取心脏重量,公式如下:

$$CWI = \frac{\text{大鼠心脏重量}}{\text{大鼠体重}} \times 100\% \text{ [12]}。$$

切取心脏心尖冻存,其余部分 10% 甲醛 (pH 7.4) 中固定,常规石蜡包埋,切片,苏木素-伊红 (HE) 染色,镜检。

1.3.5 Western blot 检测大鼠心脏组织中 AKT、p-AKT 及 caspase 蛋白的表达

冰冻组织按总蛋白提取试剂盒说明书提取各组心肌组织总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,调整每条泳道的上样量,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法转膜至 PVDF 膜上,封闭液封闭 1 h 后,Western blot 一抗稀释液稀释,各一抗稀释浓度 AKT (1:1000)、P-AKT (1:1000)、caspase-9 (1:2000)、caspase-3 (1:2000)、cleaved-caspase3 (1:2000)、BAX (1:2000)、BCL-2 (1:200)。4℃ 孵育过夜,次日用 Western blot

二抗稀释液稀释二抗,室温孵育摇床 1 h,滴加 Ecl 发光工作液,化学发光成像系统拍照,采用 Image J 软件进行灰度分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据。实验结果以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料经正态分布和方差齐性检验后,多组均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两之间比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

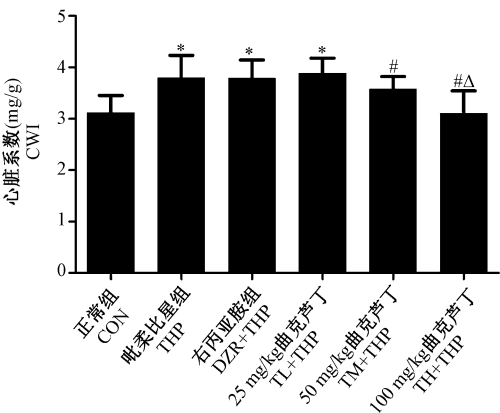
2 结果

2.1 TRX 对 THP 诱导大鼠急性心肌毒性心脏系数的影响

实验结束后,取各组大鼠心脏并称重,计算其心脏系数。图 1 显示,THP、DZR 及 TL 组大鼠的心脏系数显著高于 CON 组 ($P < 0.05$);TM、TH 组大鼠的心脏系数显著低于 THP 组,且 TH 组效果最为明显 ($P < 0.05$)。

2.2 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠心功能的影响

大鼠心功能结果显示,THP 组大鼠的 LVSP、± dp/dtmax 明显低于 CON 组,LVEDP 显著高于 CON 组 ($P < 0.05$)。与 THP 组相比,TM、TH 及 DZR 组大鼠 LVEDP 降低,LVSP、± dp/dtmax 明显升高 ($P < 0.05$),且 TH 组大鼠改善效果最好。见表 1。



注:与 CON 组比较, * $P < 0.05$; 与 THP 组比较, # $P < 0.05$; 与 DZR + THP 组比较, Δ $P < 0.05$ 。

图 1 TRX 对 THP 诱导大鼠急性心肌毒性 CWI 的影响
Note. Compared with the CON group, * $P < 0.05$. Compared with the THP group, # $P < 0.05$. Compared with the DZR + THP group, Δ $P < 0.05$.

Figure 1 CWI after application of troxerutin on THP-induced acute myocardial toxicity in rats

表 1 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠心功能的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Effect of TRX on cardiac function in the THP-induced acute myocardial toxicity rat model

组别 Groups	左心室收缩压 (mmHg) LVSP	左心室终末舒张压 (mmHg) LVEDP	左心室内压最大上升速率 (mmHg/s) dp/dtmax	左心室内压最大下降速率 (mmHg/s) -dp/dtmax
正常组 CON	90.8±1.6	8.2±0.1	5298.3±93.9	4983.3±77.8
吡柔比星组 THP	66.7±2.3 [*]	23.1±2.0 [*]	3214.0±55.8 [*]	3320.8±44.1 [*]
右丙亚胺+吡柔比星组 DZR+THP	70.4±3.1 ^{*#}	20.7±2.3 ^{*#}	3999.4±108.4 ^{*#}	3899.9±87.3 ^{*#}
25 mg/kg 曲库芦丁+ 吡柔比星组 TL+THP	64.1±2.3 [*]	19.8±1.0 ^{*#}	3598.7±127.3 [*]	3692.9±86.1 [*]
50 mg/kg 曲库芦丁+ 吡柔比星组 TM+THP	74.1±1.0 ^{*#}	17.9±1.9 ^{*#Δ}	3997.4±121.7 ^{*#}	3825.8±101.1 ^{*#}
100 mg/kg 曲库芦丁+ 吡柔比星组 TH+THP	78.3±1.3 ^{*#Δ}	17.4±1.6 ^{*#Δ}	4442.0±118.9 ^{*#Δ}	4136.2±114.6 ^{*#Δ}

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与吡柔比星组比较,[#] $P<0.05$;与右丙亚胺+吡柔比星组比较,^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with the CON group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the THP group, [#] $P<0.05$. Compared with the DZR+THP group, ^Δ $P<0.05$.

2.3 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠心电图的影响

给药后 72 h,测标准肢体Ⅱ导联心电图 15 min,利用 BL-420F 生物信号系统监测各组心率(HR)、QT 间期及 QRS 波群电压变化情况。与 CON 组相比,THP 组大鼠 QT 间期延长及 QRS 波群电压显著降低($P<0.05$),心率减弱($P<0.05$);与 THP 组相比,DZR 组、TRX 各组大鼠心率显著增加,其中,TM 和 TH 组的 QRS 波群电压增加显著,Q-T 间期缩短($P<0.05$),尤以 TH 组改善效果为明显。见表 2。

2.4 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠心肌酶活性的影响

实验结束后,分离血清并按照试剂盒说明书方法检测血清中 LDH、CK-MB、cTn-T 和 BNP 水平,结果显示,THP 组大鼠血清中 LDH、CK-MB、cTn-T 和 BNP 水平显著高于 CON 组($P<0.05$)。与 THP 组

相比,DZR 组、TM 和 TH 可显著降低 LDH、CK-MB、cTn-T、BNP 水平($P<0.05$);TL 可显著降低 cTn-T、BNP 的水平($P<0.05$);与 DZR 组相比,TH 可显著降低 cTn-T 和 CK-MB 水平($P<0.05$);TL 组和 TM 组均显著降低 cTn-T($P<0.05$)。TM 和 TH 组改善心肌酶含量的效果最佳。见表 3。

2.5 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠的 SOD、MDA 含量影响

大鼠取血后,分离血清并按照试剂盒说明书方法检测血清中 SOD 和 MDA 的含量,结果显示,与 CON 组相比,THP 组大鼠血清中 SOD 的活性出现显著降低($P<0.05$),MDA 的含量出现显著升高($P<0.05$)。与 THP 组相比,DZR 组、TRX 各剂量组均可显著升高 SOD 水平($P<0.05$),降低 MDA 水平($P<0.05$)。其中,TM 和 TH 组改善 SOD、MDA 的水平效果最佳。见表 4。

表 2 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠心电图的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 2 Effect of troxerutin on electrocardiogram of the rats with THP-induced acute myocardial toxicity

组别 Groups	QRS 波群电压和 (mV) QRS	Q-T 间期 (ms) Q-T	心率 (次/分) HR
正常组 CON	0.38±0.13	63.50±5.56	465.6±16.4
吡柔比星组 THP	0.07±0.06 ^{**}	81.56±7.78 ^{**}	361.0±13.4 ^{**}
右丙亚胺+吡柔比星组 DZR+THP	0.13±0.09 ^{**##}	77.86±6.36 ^{**}	407.6±10.0 ^{**##}
25 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TL+THP	0.18±0.07 ^{**##}	77.60±5.68 ^{**}	372.0±14.7 ^{**#Δ}
50 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TM+THP	0.28±0.09 ^{**##}	72.91±4.67 ^{**##}	413.0±15.8 ^{**##}
100 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TH+THP	0.26±0.11 ^{##Δ}	65.40±5.46 ^{##Δ}	425.0±21.0 ^{**##Δ}

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与吡柔比星组比较,[#] $P<0.05$;与右丙亚胺+吡柔比星组比较,^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with the CON group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the THP group, [#] $P<0.05$. Compared with the DZR+THP group, ^Δ $P<0.05$.

表 3 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠心肌酶活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effects of troxerutin on the levels of LDH, CK-MB, cTn-T and BNP in the THP-induced acute myocardial toxicity rat model

组别 Groups	乳酸脱氢酶 (U/mL) LDH	肌酸激酶同工酶 (ng/mL) CK-MB	心肌肌钙蛋白 T (pg/mL) cTn-T	脑钠肽 (pg/mL) BNP
正常组 CON	10531±3737.0	17.13±1.98	364.99±22.59	280.80±23.44
吡柔比星组 THP	19882±5375.9 [*]	34.05±3.00 [*]	593.95±14.93 [*]	355.41±30.80 [*]
右丙亚胺+吡柔比星 DZR+THP	8119±2228.1 [#]	26.26±1.06 ^{*#}	517.11±21.30 ^{*#}	298.21±29.46 [#]
25 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TL+THP	14489±796.7	28.66±2.55	463.97±18.07 ^{*#Δ}	292.93±17.47 [#]
50 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TM+THP	11083±4099.1 [#]	25.92±2.09 ^{*#}	431.40±19.04 ^{*#Δ}	261.06±27.10 ^{#Δ}
100 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TH+THP	10793±4266.6 [#]	22.41±1.83 ^{*#Δ}	401.41±38.14 ^{*#Δ}	252.85±21.03 ^{#Δ}

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与吡柔比星组比较,[#] $P<0.05$;与右丙亚胺+吡柔比星组比较,^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with the CON group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the THP group, [#] $P<0.05$. Compared with the DZR+THP group, ^Δ $P<0.05$.

表 4 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠的 SOD、MDA 含量影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effects of troxerutin on the levels of SOD and MDA in the THP-induced acute myocardial toxicity rat model

组别 Groups	超氧化物歧化酶 (U/mL) SOD	丙二醛 (nmol/mL) MDA
正常组 CON	92.27±1.23	4.55±1.63
吡柔比星组 THP	83.19±3.91 [*]	8.33±1.30 [*]
右丙亚胺+吡柔比星组 DZR+THP	94.43±5.05 [#]	7.21±1.50 [*]
25 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TL+THP	89.56±4.89 [#]	6.94±1.25 [#]
50 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TM+THP	90.29±4.03 [#]	5.10±1.49 ^{#Δ}
100 mg/kg 曲克芦丁+吡柔比星组 TH+THP	90.92±1.59 ^{*#}	4.43±0.93 ^{#Δ}

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与吡柔比星组比较,[#] $P<0.05$;与右丙亚胺+吡柔比星组比较,^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with the CON group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the THP group, [#] $P<0.05$. Compared with the DZR+THP group, ^Δ $P<0.05$.

2.6 TRX 对 THP 诱导的急性心肌毒性大鼠的心肌组织病理学改变

CON 组心肌纤维排列整齐,心肌细胞无萎缩或肥大;THP 组大鼠出现不同程度的心肌细胞肥大、坏死,间质胶原结缔组织增生,心肌纤维扭曲、断裂、横纹模糊。DZR 组心肌纤维排列较为整齐;间质内偶见少量胶原纤维增生胞浆,心肌纤维排列较为整齐。TM 和 TH 组排列较为整齐,质内偶见少量胶原纤维增生胞浆,部分心肌细胞出现萎缩,心肌纤维扭曲程度,断裂程度较小。见图 2。

2.7 TRX 对 THP 诱导大鼠急性心肌毒性心肌组织相关蛋白水平表达的影响

通过对上述实验结果分析,曲克芦丁中、高剂量组改善 THP 所致的心肌毒性程度最佳,因此,选择 CON、THP、DZR+THP、TM+THP、TH+THP 等 5 组进行蛋白免疫印迹(Western blot)。

结果分析表明,THP 激活 AKT 磷酸化水平较低,同时,caspase-9、caspase-3、BCL-2 的表达水平降低,并上调 cleaved caspase-3、BAX 蛋白的表达。加入 TRX 作用后,AKT 磷酸化水平升高,caspase-9、

caspase-3、BCL-2 的含量升高,下调 cleaved caspase-3、BAX 等蛋白表达量。见图 3。

3 讨论

吡柔比星所致的急性大鼠心肌毒性通常表现为:(1)血流动力学异常:LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 偏低,LVEDP 偏高;(2)心肌出现不同程度的心肌细胞肥大、坏死,间质胶原结缔组织增生,心肌纤维扭曲、断裂、横纹模糊;(3)血清中 LDH、CK-MB、cTn-T、BNP 心肌酶含量升高。芦丁对 THP 所致大鼠的血流动力学指标、心电、心肌组织病理学形态异常指标有所改善,本实验室以往研究发现芦丁逆转 THP 所致的急性大鼠心肌毒性^[13]。同时,已有相关文献说明 TRX 具有相似的保护作用。Shu 等^[14]用 150 mg/kg TRX 预处理,大鼠心肌缺血/再灌注模型。与模型组相比,TRX 预处理使大鼠的 LVEDP 显著降低,LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 显著升高。TRX 预处理显著降低心肌梗塞面积,改善心脏功能,并降低肌酸激酶(CK),天冬氨酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)的水平。本研究观察 TRX 高剂量对 THP

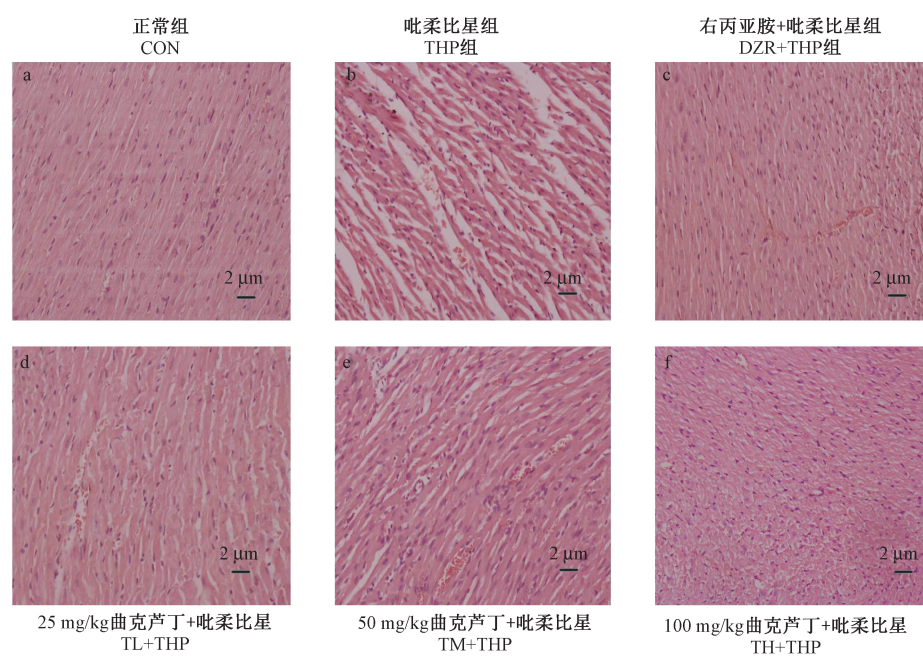
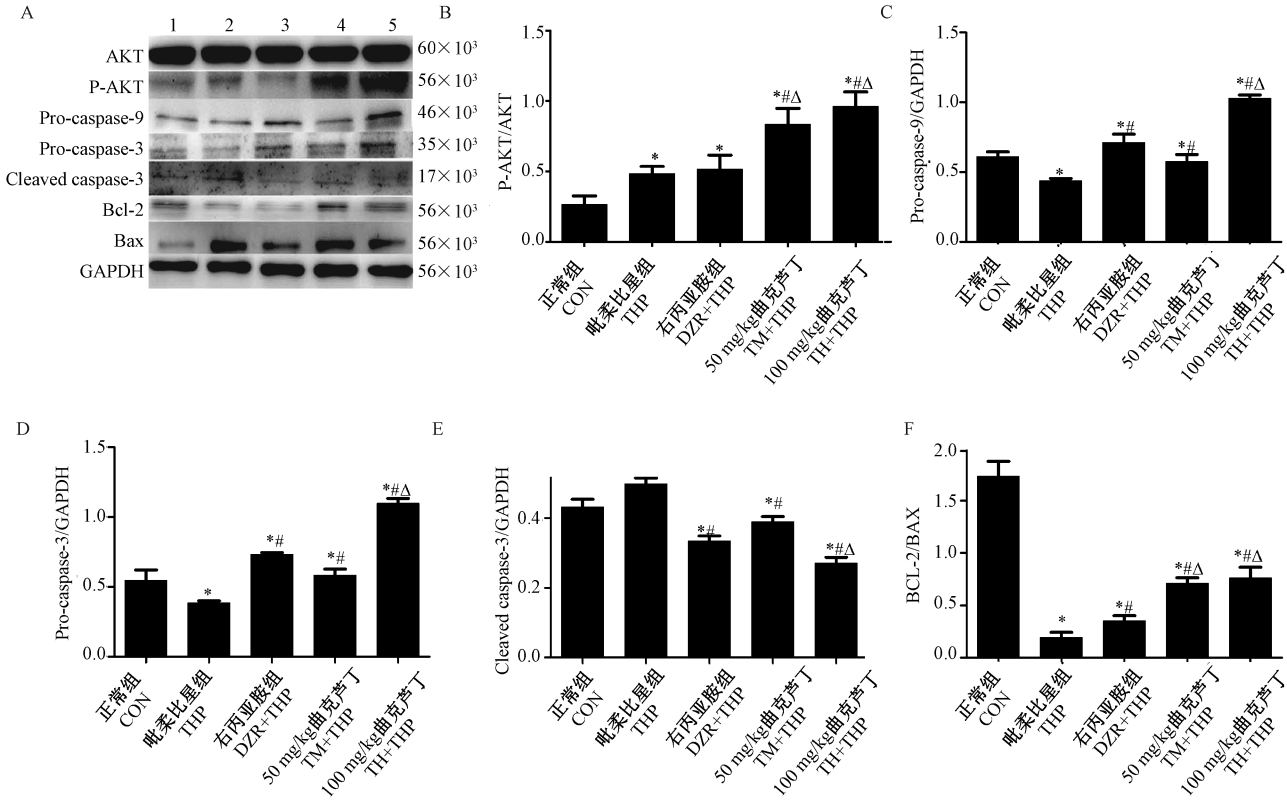


图 2 TRX 对 THP 诱导心肌毒性大鼠的心肌组织的作用(HE 染色,×200)

Figure 2 Effect of trolox on the THP-induced acute myocardial toxicity in the rats



注:图中的 A 代表各个蛋白的条带,B,C,D,E 和 F 代表分别 P-AKT/AKT,Caspase-9,Caspase-3,Cleaved Caspase-3 和 BCL-2/BAX 等蛋白相对灰度值。与正常组比较,* $P<0.05$;与吡柔比星组比较,# $P<0.05$;与右丙亚胺组比较,Δ $P<0.05$ 。

图 3 TRX 对 THP 诱导大鼠急性心肌毒性各个蛋白的表达水平的影响($n=3$)

Note. A in the figure represents a band of each protein, and B, C, D, E and F represent proteins P-AKT/AKT, Caspase-9, Caspase-3, Cleaved Caspase-3 and BCL-2/BAX, respectively. Relative gray value. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the pirarubicin group, # $P<0.05$. Compared with the dexamethasone group, Δ $P<0.05$.

Figure 3 Effect of TRX on the expression of various proteins in the myocardial tissues of rats with acute myocardial toxicity induced by THP

所致大鼠的心脏系数、LVEDP、LVSP、 $\pm dp/dtmax$ 、心电、心肌组织病理学形态等指标有所改善;另外,TRX 降低 THP 所致大鼠血清中的 cTn-T、CK-MB、BNP、LDH 等相关心肌酶含量。提示 TRX 可改善 THP 所致的急性大鼠心肌毒性程度。

SOD 具有清除体内自由基的作用,降低机体的脂质过氧化反应,对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要作用^[15]。MDA 为氧自由基氧化细胞膜上磷脂形成的脂质过氧化物的稳定存在形式,其含量变化可反映机体内脂质过氧化程度^[16]。SOD 和 MDA 含量异常,也是 THP 所致的急性大鼠心肌毒性重要指标^[13]。Yu 等^[17]发现 TRX 可减少代谢综合征小鼠模型(MS)体内 ROS 的产生,增强抗氧化能力。本研究结果显示,TRX 能明显降低 THP 所致大鼠血清中 MDA 含量、提高 SOD 活力。提示,TRX 对 THP 所致的急性大鼠心肌毒性,可能与降低脂质过氧化物水平,提高机体抗氧化能力有关。

AKT 具有调控细胞存活、生长、增殖等多种生物学进程作用,是多种细胞信号转导的核心因子^[18-19]。Caspase 家族是细胞凋亡重要的调控因子^[20]。已有研究发现 AKT 与 caspase 家族之间存在着密切关系。Shu 等^[14]用 150 mg/kg TRX 预处理激活 Akt 磷酸化,降低 BAX、caspase-3(激活型)蛋白的表达,从而改善心肌缺血/再灌注的心肌损伤程度。Yu 等^[21]发现心脏休克波治疗(CSWT)激活 AKT 磷酸化,抑制细胞凋亡因子,从而改善慢性心肌缺血的猪模型中的心肌灌注、心脏功能、严重冠状动脉疾病(CAD)患者的心肌缺血,又可逆转缺血/缺氧(I/H)诱导的心肌细胞凋亡。醛脱氢酶是

一类以多种醛类为底物的酶类,醛脱氢酶除了具有催化作用之外还具有很多其它重要的生理功能,Yu 等^[22]发现醛脱氢酶 2(ALDH2)蛋白的表达水平升高时,可激活 AKT 的磷酸化,上调 BCL-2 蛋白表达量,下调 cleaved caspase-3、BAX 蛋白表达量,参与远程缺血后处理(RIPostC)过程,改善心肌缺血/再灌注后的心肌损伤程度;Luo 等^[23]发现 10 g/kg 播娘蒿可依赖的上调 AKT 磷酸化、BCL-2 蛋白表达量,下调 BAX、cleaved caspase-3 蛋白表达,从而改善肾上腹主动脉缩窄手术后大鼠心肌纤维化和损伤程度;Huang 等^[24]观察到丹参和川芎嗪注射液,依赖于激活 AKT 磷酸化、上调一氧化氮合酶 eNOS 蛋白表达量及 BCL-2/BAX 比例,下调 cleaved caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平,实现其改善心肌缺血/再灌注的心肌受损程度。Wang 等^[25]通过体内外实验,发现人参皂苷 Rg3(GSRg3)可上调 pAKT、eNOS 蛋白表达量及 BCL-2/BAX、pro-caspase-3、pro-caspase-9 比例,下调 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白表达,从而改善心肌损伤程度。Xu^[26]采用计算机药物设计,已确定 TRX 和 AKT 之间具有极好的相关性。TRX 通过抑制 PTEN 的激活以激活 AKT 磷酸化,从而阻止 JNK 的活化以保护细胞。

本研究结果显示,TRX 通过激活 AKT 磷酸化,上调凋亡蛋白 caspase-9、caspase-3、BCL-2,下调 cleaved caspase-3、BAX 等蛋白的表达。TRX 对 THP 所致心肌毒性的保护作用可能是通过激活 AKT,并抑制 Caspase 的表达完成。

本研究采用吡柔比星复制大鼠急性心肌毒性

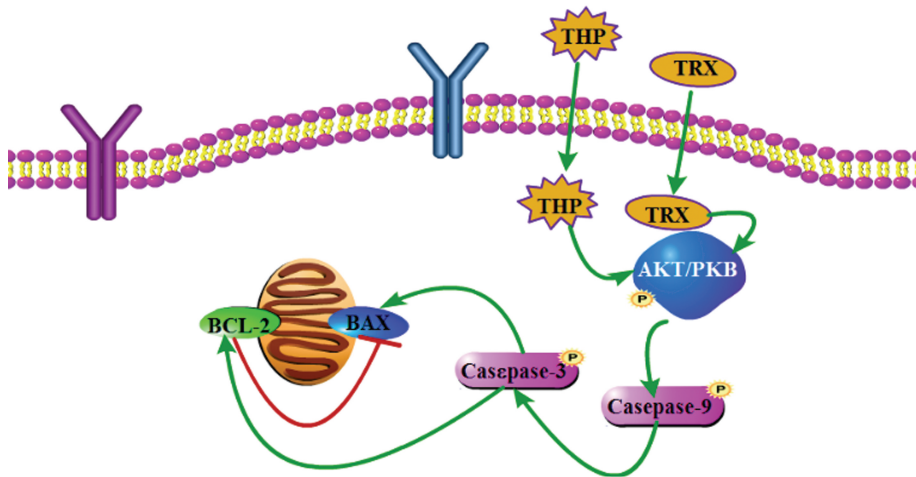


图 4 曲克芦丁对吡柔比星所致大鼠急性心肌毒性的保护作用机制示意图

Figure 4 Schematic diagram of the protective mechanism of troxerutin against acute myocardial toxicity induced by pirarubicin in rats

模型^[13],实验结果表明,TRX 对 THP 所致大鼠的心脏系数、LVEDP、LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、心电、心肌组织病理学形态等指标均有所改善;TRX 降低 THP 所致大鼠血清中的 cTn-T、CK-MB、BNP、LDH 等心肌酶含量;TRX 可升高 THP 所致大鼠血清中 SOD 水平以及降低其 MDA 水平,降低脂质过氧化物水平,提高机体抗氧化能力;TRX 可能通过激活 AKT 磷酸化,上调 caspase-9、caspase-3、BCL-2,下调 cleaved caspase-3、BAX 等蛋白的表达。根据上述,实验可绘制 TRX 的保护 THP 所致心肌毒性分子机制(如图 4)。因此,TRX 逆转 THP 所致心肌毒性作用可能通过激活 AKT,抑制 Caspase 的表达完成。

参考文献:

- [1] 臧梦芳,张咏梅,智英辉,等. 乳腺癌对吡柔比星和表柔比星的药物敏感性及其有效性的对比观察[J]. 中华医学杂志, 2011,91(20):1388-1392.
- [2] Albini A, Pennesi G, Donatelli F, et al. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention[J]. J Natl Cancer Inst., 2010,102(1): 14-25.
- [3] Cvetkovic RS, Scott LJ. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy[J]. Drugs, 2005,65(7):1005-1024.
- [4] Anonymous. Dexrazoxane restricted in adults/contraindicated in children[J]. Reactions Weekly, 2011,1358(1):3.
- [5] Subastri A, Suyavaran A, Pb E, et al. Troxerutin with copper generates oxidative stress in cancer cells; its possible chemotherapeutic mechanism against hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Physio, 2017,233(3):1775-1790.
- [6] Giannini I, Amato A, Basso L, et al. Flavonoids mixture (diosmin, troxerutin, hesperidin) in the treatment of acute hemorrhoidal disease: a prospective, randomized, triple-blind, controlled trial[J]. Tech Coloproctol, 2015,19(6):339-365.
- [7] Shishlo VK, Malinin AA, Diufzhanov AA. Mechanisms of antioedemic effect of bioflavonoids in experiment[J]. Angiol Sosud Khir, 2013,19(2):25-30.
- [8] Hannaert P, Alvarez-Guerra M, Hider H. Vascular permeabilization by intravenous arachidonate in the rat peritoneal cavity: antagonism by ethamsylate[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 466(1-2):207-212.
- [9] Dobbins DE, Soika CY, Dabney JM. O-(beta-hydroxyethyl)-rutoside (Venoruton) fails to block histamine or bradykinin-induced edema formation in the canine forelimb perfused at constant arterial inflow[J]. Microcirc Endothelium Lymphatics, 1984,1(5):509-523.
- [10] 周昌奎,吴晓华.曲克芦丁临床研究新进展[J]. 中国生化药物志,2005,26(05):64-66.
- [11] Hannaert P, Alvarez-Guerra M, Hider H, et al. Vascular permeabilization by intravenous arachidonate in the rat peritoneal cavity: antagonism by ethamsylate[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 466(1-2):207-212.
- [12] 马君,程阳阳,谭鹏,等.附子炮制品对阿霉素致急性心力衰竭的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2017,28(9):2136-2138.
- [13] Wang YD, Zhang Y, Sun B, et al. Cardioprotective effects of rutin in rats exposed to pirarubicin toxicity[J]. J Asian Nat Prod Res, 2018,20(4):361-373.
- [14] Shu L, Zhang W, Huang C, et al. Troxerutin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway in rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2017,44(5):1939-1948.
- [15] 范慧敏,刘泳,张涛,等.腺苷预处理对大鼠心脏移植缺血再灌注损伤心肌的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(07):24-27.
- [16] 吴永涛,罗毅,顾云,等.参附注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2007,17(1):26-29.
- [17] Yu Y, Zheng G. Troxerutin protects against diabetic cardiomyopathy through NFκB/AKT/IRS1 in a rat model of type 2 diabetes[J]. Mol Med Rep, 2017,15(6):3473-3478.
- [18] 符丽珍,黄茂芹,劳之勇,等. miR-221 在 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌细胞损伤中的作用及机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017,27(5):83-88.
- [19] 刘志辉. 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 凋亡及 PI3K/AKT/eNOS 信号通路的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2016,26(03):58-63.
- [20] 高威,钟锋. miR-126 对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7):57-63.
- [21] Yu W, Shen T, Liu B, et al. Cardiac shock wave therapy attenuates H9c2 myoblast apoptosis by activating the AKT signal pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(5):1293-1303.
- [22] Yu Y, Jia XJ, Zong QF, et al. Remote ischemic postconditioning protects the heart by upregulating ALDH2 expression levels through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2014,10(1):536-542.
- [23] Luo Y, Sun Z, Hu P, et al. Effect of aqueous extract from *descurainia sophia* (L.) webb ex prantl on ventricular remodeling in chronic heart failure rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018(8):1904081.
- [24] Huang W, Yang Y, Zhi Z, et al. Effect of *Salvia miltiorrhiza* and ligustrazine injection on myocardial ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation injury[J]. Mol Med Rep, 2016,14(5): 4537-4544.
- [25] Wang Y, Hu Z, Sun B, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling and the B-cell lymphoma/B-cell lymphoma-associated X protein pathway[J]. Mol Med Rep, 2015,11(6):4518-4524.
- [26] Xu P, Zhang WB, Cai XH, et al. Activating AKT to inhibit JNK by troxerutin antagonizes radiation-induced PTEN activation[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 759:66-74.