黄芩素减轻柔红霉素诱导的小鼠心肌损伤*

白小强[1]，王新兰[1]，韩小东[1,2**]，黄勇攀[3,4]

(1. 延安大学医学院，陕西 延安 716000；2. 西安交通大学 第二附属医院，陕西 西安 710049；3. 贵州医科大学 药理学教研室，贵州 贵阳 550004；4. 中南大学湘雅医学院，湖南 长沙 410078)

[摘 要] **目的**：探讨黄芩素(Bai)对柔红霉素(Dox)致小鼠心肌损伤的保护作用，阐明其抗柔红霉素诱导的心肌损伤机制。**方法**：80 只小鼠随机分为 5 组($n = 16$)：对照组、Dox 模型组和 Bai 高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg)，腹腔注射柔红霉素(20 mg/kg)制备小鼠心脏毒性模型，检测心肌 ALT、AST、CK、LDH、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽还原酶(GSH)水平，电镜观察心肌组织超微结构改变。**结果**：心电图显示，Dox 可导致小鼠心律失常；模型组小鼠心肌酶 ALT、AST、CK、LDH 水平显著升高，Bai 高、中、低剂量组呈剂量依赖下降；模型组小鼠心肌 SOD、CAT、GSH 活性显著下降，MDA 含量增多，Bai 高、中、低剂量组呈浓度依赖升高，MDA 含量降低；电镜显示 Dox 组小鼠心肌组织超微结构损伤明显，心肌细胞肿胀，部分肌丝排列紊乱，断裂溶解，线粒体明显肿胀，线粒体嵴断裂消失；Bai 高、中、低剂量组小鼠心肌超微结构呈不同程度改善。**结论**：Bai 对 Dox 致小鼠心肌损伤具有保护作用，其机制可能与其抗氧化活性有关。

[关键词] 黄芩素；柔红霉素；心脏毒性；心肌酶

[中图分类号] R965.1 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)12-1430-05

DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.12.014

Amelioration of Doxorubicin-induced Myocardial Injury in Mice by Baicalein

BAI Xiaoqiang[1], WANG Xinlan[1], HAN Xiaodong[1,2], HUANG Yongpan[3,4]

(*1. Medical College, Yanan University, Yanan 716000, Shaanxi, China; 2. the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China; 3. Department of Pharmacology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the protective effect of Baicalein(Bai) on the myocardial injury induced by Doxorubicin(Dox) in mice, and to elucidate the mechanism of myocardial injury induced by Dox. **Methods**: 80 mice were randomly divided into five groups ($n = 16$): control group, Dox model group, high, medium and low Bai dose group (40,20,10 mg/kg). Intraperitoneal injection of Dox (20 mg/kg) was adopted to establish mouse cardiac toxicity model. Myocardial ALT, AST, CK, LDH, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), glutathione reductase (GSH) level were detected, and electron microscope was used to observe the changes of myocardial tissue ultrastructure. **Results**: ECG showed that DOX could lead to mice arrhythmia. In model group of mice, myocardial enzyme such as ALT, AST, CK, LDH levels were significantly elevated, while in high, medium and low Bai dose group the myocardial enzyme activities showed a dose-dependent decline. In the model group, SOD, CAT, GSH activity was significantly decreased, while MDA content increased. In high, medium and low Bai dose group SOD, CAT, GSH activity showed a concentration-dependent increase, while MDA content decreased. Electron microscope showed that the ul-

*[基金项目]陕西教育厅科学研究项目(12JK0755)；延安市科技惠民项目(2014HM-05)

**通信作者 E-mail：haorenbudazhe@126.com

网络出版时间：2016-12-15 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161215.1534.007.html

trastructure of myocardial tissue in Dox group was obviously damaged, the myocardial cells were swollen, some of the muscle fibers arranged in disorder and were broken to dissolution, the mitochondria was obviously swollen, and the the mitochondrial crest disappeared. In high, medium and low Bai dose group, myocardial tissue ultrastructure improved to different degree. **Conclusion**: Baicalin can play a protective role on myocardial injury induced by Doxorubicin in mice, and the mechanism may be related to its antioxidant activity.

[**Key words**] baicalein; doxorubicin; cardiotoxicity; myocardial enzymes

柔红霉素(doxorubicin,Dox)是临床上最为常用的蒽环类化疗药物之一,其抗肿瘤活性广泛,但由于该药物的心脏毒性限制了其在临床上的应用[1-3],Dox 心脏毒性自由基损伤被大多数研究者所接受。Dox 能引起心肌细胞在代谢过程中产生活性氧(reaetive oxygen species,ROS),过量的 ROS 攻击心肌细胞,增加心肌细胞内 ROS 的产生和降低心肌细胞内抗氧化物酶的活性,使心肌细胞处于氧化应激状态,从而引起心肌病和充血性心力衰竭。黄芩素(baicalein,Bai)是从中药黄芩中提取的黄酮类化合物,具有较强的抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化及清除氧自由基等广泛药理作用[4-5],本研究通过建立 Dox 致小鼠心肌损伤模型,探讨 Bai 对心肌损害的保护作用及机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　昆明种小鼠 80 只,SPF 级,雌雄各半,体重(20 ± 2)g,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 2004A062。

1.1.2　药物与试剂　柔红霉素购自延安大学附属医院药剂科,黄芩素(纯度 98%)购自 Sigma 公司。临用前配制成 40 mg/L 的溶液。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶 MB 同工酶(CK-MB)、SOD、MDA、CAT 测试剂盒购自南京建成生物工程有限公司。

1.1.3　主要仪器　酶标仪购自 Thermo 公司,电动匀浆仪购自德国,H-7650 型透射电镜购自日本日立公司。

1.2　方法

1.2.1　小鼠心脏毒性模型制备　小鼠适应性喂养 1 周后,检测心电图。随机将心电图正常小鼠随机分为如下 5 组:正常对照组(control 组)、模型组(Dox 组)、黄芩素高剂量组(Dox + Bai 40 mg/L)、黄芩素中剂量组(Dox + Bai 20 mg/L)及黄芩素低剂量组(Dox + Bai 10 mg/L),连续给药两周。除正常对照组腹腔注射等体积生理盐水外,其余各给药组小鼠均每 3 d 通过腹腔注射给予 Dox(累积剂量 20 mg/kg),制备 Dox 心脏毒性模型,模型成功与否采用心电图来检测。各给药组动物于次日开始给予不同剂量黄芩素。

1.2.2　心电图观察　Dox 组,黄芩素高剂量组(40 mg/L),黄芩素中剂量组(20 mg/L),黄芩素低剂量组(10 mg/L)注射柔红霉素,对照组腹腔注射同体积的生理盐水 12 h 后,小鼠用 3% 水合氯醛腹腔注射麻醉,仰卧固定,采用标准肢体Ⅱ导联描记心电图,观察心律失常的发生率。以出现各种类型的期前收缩、房室传导阻滞、窦性心动过速、窦性心动过缓中的任何一项都视为心律失常。

1.2.3　标本收集　给药两周后,采用颈椎脱臼处死动物,取出心脏用预冷生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重冰浴中取部分心室,用生理盐水制成 10% 心肌组织匀浆,4 ℃,3 000 转/min,离心 10 min,取上清检测心肌 ALT、AST、CK-MB、LDH、SOD、MDA、CAT 等指标,前述检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2.4　病理组织学检查　采用水合氯醛(5%,1 mL/kg)深度麻醉小鼠后,剪开胸腔,暴露心脏,经左心室插入灌注针头,穿入主动脉内,同时剪开右心耳,快速灌注生理盐水约 20 mL,然后接换 4 ℃ 4% 多聚甲醛 30 mL 继续灌注,直至小鼠四肢强直、发白。此时固定完毕,开颅取脑,4% 多聚甲醛固定 24 h,制作石蜡切片,然后苏木精 - 伊红染色。

1.2.5　电镜观察　取实验动物心肌组织,1 mm × 1 mm × 1 mm,戊二醛(2.5%)和锇酸(1%)双重固定,丙酮脱水,树脂包埋,超薄切片,醋酸双氧铀(1%)及枸橼酸铅双重染色,透射电镜下观察。

1.3　统计学处理

实验数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用

SPSS 17.0 软件(SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606, USA)分析,两样本均数比较采用 t 检验,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般指标

对照组小鼠在实验期间饮水、进食、运动正常,体重稳定增加。给予 Dox 后,从实验第 2、3 天开始,实验动物活动少及进食减少、体重不增等;实验第 5 天开始出现腹水;随着实验时间的延长,上述现象更明显;第 10 天,Dox 组有 3 只死于充血性心衰(CHF),尸检发现胸腹腔积液、肝肿大、心腔扩大、心室壁明显变薄等表现。各给药组动物也出现饮食差、活动少等表现;但给药后各给药组动物体重均有不同程度的增长,胸腹腔积液减轻,未见明显肝肿大、心腔扩大等表现。各给药组心律失常的发生率均降低,有统计学差异($P<0.05$),见表 1。

表 1　Bai 对 Dox 诱导小鼠心电图的影响

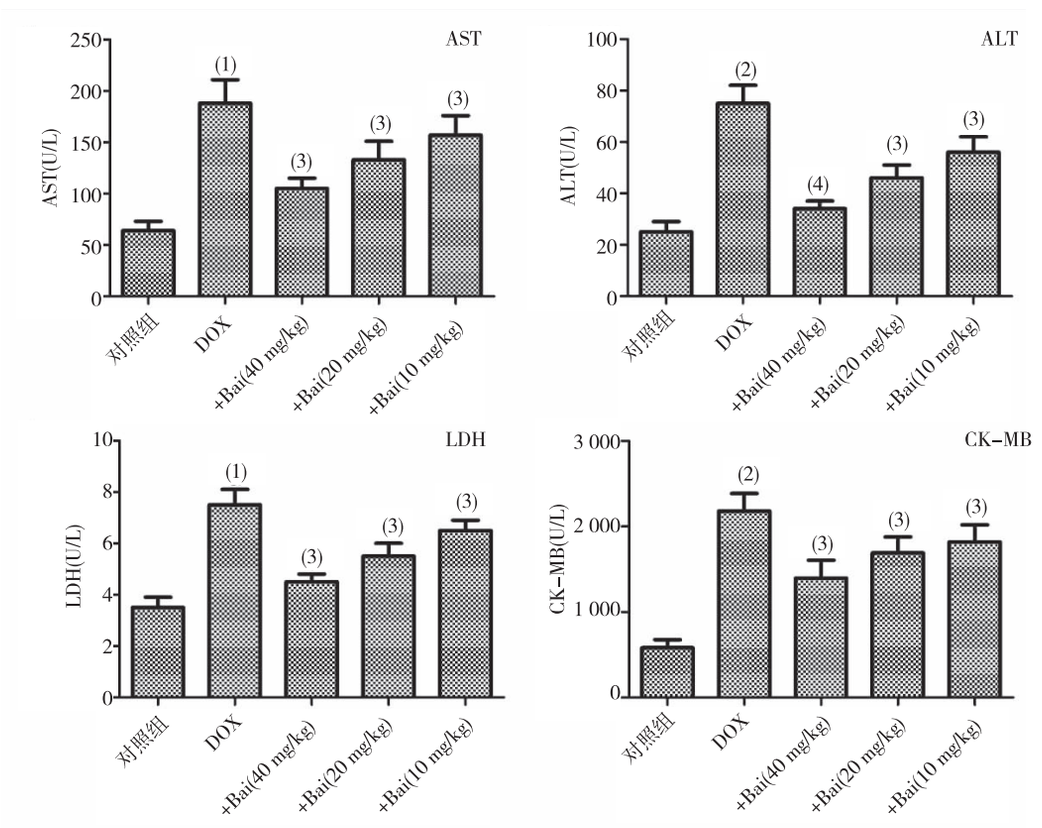
Tab. 1　Effects of Bai on electrocardiogram in Dox-induced cardiotoxic mice

组别	n	心律失常发生率(%)
对照组	15	6
Dox	8	50(1)
Dox + Bai(40mg/kg)	13	15(2)
Dox + Bai(20mg/kg)	13	21(2)
Dox + Bai(10mg/kg)	11	31(2)

(1) 与对照组比较,$P<0.05$;(2) 与 Dox 组比较,$P<0.05$

2.2 Bai 对小鼠心肌酶 AST、ALT、LDH 和 CK-MB 含量的影响

AST、ALT、LDH 和 CK 水平升高提示心肌损伤,可作为临床诊断心肌组织损伤的评价指标。与正常对照组比较,Dox 组小鼠心肌 AST、ALT、LDH 和 CK-MB 水平均显著升高($P<0.05$),具有统计学差异。与 Dox 组比较,各给药组小鼠 AST、ALT、LDH 和 CK-MB 水平含量降低,呈剂量依赖,具有统计学意义($P<0.05$),见图 1A、B、C、D。



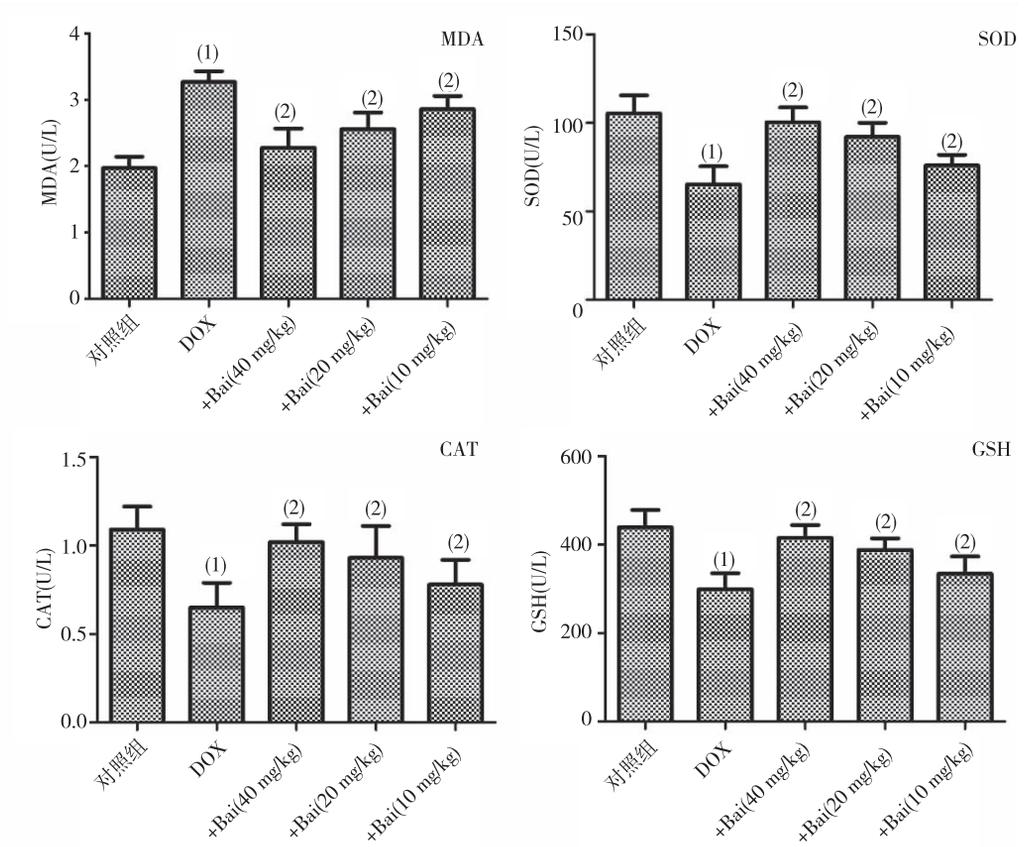
与对照组比较,(1) $P<0.05$,(2) $P<0.01$;与 Dox 组比较,(3) $P<0.05$,(4) $P<0.01$

图 1　Bai 对 Dox 诱导小鼠心肌组织 AST、ALT、LDH 和 CK-MB 含量的影响

Fig. 1　Effects of Baicalin on the contents of CK-MB, ALT, LDH and AST in myocardial tissue of mice

2.3　Bai 对小鼠心肌组织 MDA、SOD、GSH 和 CAT 的影响

与对照组比较，Dox 组小鼠心肌组织 MDA 含量明显升高，SOD、CAT 和 GSH 活性显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与 Dox 组比较，各给药组小鼠 MDA 含量呈剂量依赖地降低，SOD、CAT 和 GSH 活性增高，见图 2A、B、C、D。



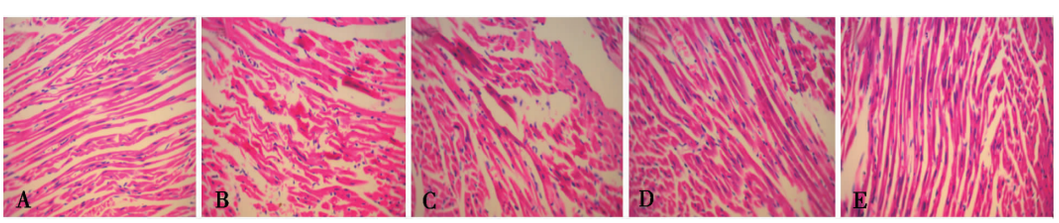
与对照组比较，$^{(1)}P<0.05$；与 Dox 组比较，$^{(2)}P<0.05$

图 2　Bai 对 Dox 诱导小鼠心肌组织 MDA、SOD、CAT 和 GSH 的影响

Fig. 2　Effects of Bai on content of MDA and activities of SOD, CAT, GSH in myocardial tissue in Dox-induced cardiotoxic mice

2.4　Bai 对小鼠心肌细胞形态学的影响

对照组小鼠心肌组织 HE 染色显示，心肌细胞排列整齐，纤维无破坏，细胞间隙正常，未见水肿。与对照组比较，Dox 组小鼠心肌细胞多灶性变性和坏死，表现为心肌纤维丢失，肌浆溶解，间质和心肌细胞内空泡形成；坏死灶内可见单核、淋巴细胞浸润。各给药组：较模型组心肌损伤明显减轻，部分组织与正常大鼠心脏组织学无明显差异（图 3）。



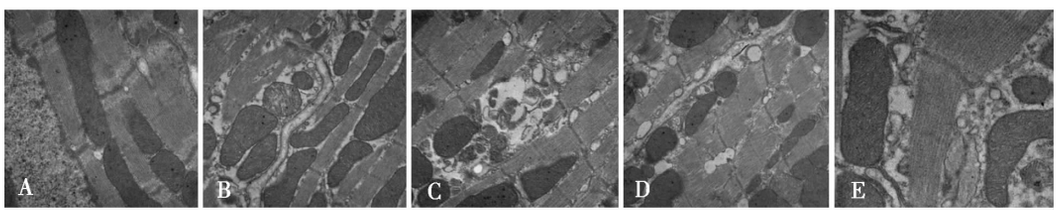
注：A 为对照组，B 为模型组，C 为 Bai 高剂量组，D 为 Bai 中剂量组，E 为 Bai 低剂量组

图 3　Bai 对 Dox 诱导小鼠心肌细胞形态学的影响（×200）

Fig. 3　Effects of Bai on myocardial tissue ultrastructure in DOX-induced cardiotoxic mice

2.5 Bai 对小鼠心肌超微结构的影响

Dox 引起心肌组织氧自由基损伤，其主要是心肌细胞器线粒体肿胀及空泡变性。Dox 组心肌组织超微结构损伤明显，心肌细胞肿胀，部分肌丝排列紊乱，断裂溶解，线粒体明显肿胀，线粒体嵴断裂消失。而 Bai 高、中、低剂量组心肌组织超微结构损伤明显改善，线粒体水肿减轻，空泡样变性减少，少数心肌组织肌丝断裂，损伤较 Dox 组明显减轻，而且 Bai 高剂量组改善最为明显，心肌纤维结构基本趋于正常（图 4）。



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为高剂量组，D 为中剂量组，E 为低剂量组

图 4　Bai 对 Dox 诱导小鼠心肌超微结构的影响（×50 000）

Fig. 4　Effects of Bai on myocardial ultrastructure in DOX-induced cardiotoxic mice

3　讨论

Dox 作为一种重要的蒽环类抗癌药物，在高效抗肿瘤的同时，对正常细胞也有损伤作用，尤其体现在对心肌组织的毒性[6]。大量文献认为，Dox 引发心肌毒性的机制有多种学说，其中氧自由基损伤机制为多数学者所支持。Dox 与心肌细胞具有独特的亲和力，极易在心脏中蓄积，当 Dox 进入心肌细胞后，导致线粒体内呼吸链功能异常，大量的 ROS 产生，ROS 进而攻击心肌细胞，引起心肌细胞氧化损伤。心肌细胞膜受损后，细胞膜通透性增大，造成胞内多种酶外漏，如 ALT、AST、LDH 等，严重影响心肌纤维的舒缩功能。因此，心肌细胞损伤的心肌酶谱生化指标 ALT、AST、LDH、CK、CK-MB 可以用来评价 Dox 致心肌损伤的严重程度。

本研究通过腹腔注射 Dox 致小鼠心肌损伤模型，分 4 次给完，Dox 累计剂量为 20 mg/kg，发现模型组小鼠体重减轻明显，心律失常发生率高达 70%，心肌组织匀浆心肌酶 ALT、AST、LDH、CK 水平显著升高。不同浓度 Bai 降低 ALT、AST、LDH、CK 水平，呈剂量依赖，从而减轻心肌损伤。

MDA 是细胞膜脂质过氧化产物，常用来反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。正常情况下 SOD、CAT 和 GSH 在构成了细胞内在的抗氧化防御系统，其活性高低反映机体清除氧自由基的能力。Dox 抑制心肌细胞 SOD 和 CAT 等抗氧化酶的活性[7-8]。本研究显示 Dox 致小鼠心肌组织 MDA 含量升高，SOD、CAT 和 GSH 活性降低，心肌超微结构改变明显，如线粒体肿胀明显及空泡变性、肌丝断裂、线粒体嵴断裂。Bai 明显降低心肌组织 MDA 含量，提高 SOD、CAT 和 GSH 活性。电镜下观察，可见心肌组织超微结构损伤明显改善，线粒体水肿程度减轻，空泡样变性减少。Bai 作为一种天然黄酮类化合物，其具有清除自由基及较强的抗氧化能力，通常用于心脑血管疾病的防治[9]。本研究显示 Bai 对 Dox 致小鼠心肌损伤后氧化与抗氧化系统的保护作用，其机制可能与提高心肌抗氧化酶活性和清除自由基有关。

研究表明，Dox 引起心肌组织损伤其机制为氧化应激所致氧自由基大量产生，影响了细胞膜结构的完整性，导致心肌细胞亚细胞结构变化，包括心肌细胞支架结构完整性的丧失，线粒体肿胀等[10]。本研究发现，Bai 可以改善心肌超微结构损伤。综上所述，Bai 能减轻 Dox 致心肌氧自由基损伤，从而降低其心脏毒性。

4　参考文献

[1] Konishi M, Haraguchi G, Ohigashin H, et al. Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation [J]. Cardiovasc Res, 2011 (2): 309 - 319.

[2] Kumar D, Kirshenbaum LA, Li T, et al. Apoptosis in Adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol [J]. Antioxid Redox Signal, 2001 (1): 135 - 145.

[3] Rabelo E, De Angelis K, Bock P, et al. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in Adriamycin induced heart failure [J]. Hypertension, 2001 (10): 576 - 580.

（下转第 1443 页）

作用。该实验从临床和实验两个方面证实了消疕汤对银屑病的确切疗效，为消疕汤的临床应用提供了临床及基础实验支持。

4　参考文献

[1] 郭志丽，郭峰，顾军. IL-10 与 IL-12 在银屑病患者系统血液快速固有免疫反应中的表达[J]. 中国麻风皮肤病杂志，2011(5)：301－303.

[2] 陈旭娥，谭志建，岳青，等. 寻常性银屑病皮损及非皮损中 IL-23(p19 /p40)和 IL-12(p35/p40)mRNA 的表达[J]. 中国皮肤性病学杂志，2008(1)：14－16.

[3] 张学军. 皮肤性病学[M]. 北京：人民卫生出版社，2008：141－144.

[4] 国家中医药管理局. 中医皮肤病证诊断疗效标准·白疕[S]. 2000. 157.

[5] Marks R，Borton SP，Shuttleworth D，et al. Assessment of-disease progress in psoriasis[J]. Arch Dermatol，1989(2)：235－240.

[6] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京：江苏科学技术出版社，2009：1008－1009.

[7] Di Cesare A. The IL-23/TH17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis[J]. Invest Dermatol，2009(129)：1339－1350.

[8] Nakajima K. Critical role of the interleukin-23/T-helper 17 Cell axis in the pathogenesis of psoriasis.[J]. Dermatol，2012(3)：291－294.

[9] 倪安红，李家文. IL-23/Th17 轴在银屑病发病机制中的相关研究[D]. 华中科技大学，2013.

[10] 王雨娟，武三卯，骆志成. 寻常型银屑病患者外周血中 IL-2/IFN-r、IL-12 和 TNF-a 的测定及其临床意义[J]. 中国麻风皮肤病杂志，2002(4)：327－329.

[11] 周雅，赵广琼，袁伟，等. 银屑病患者血液流变学指标的观察[J]. 贵阳医学院学报，1996(1)：15－16.

[12] 贺爱娟，贾敏，吴然，等. 消疕汤对寻常型银屑病患者血清 sICAM-1 的影响[J]. 中国保健营养，2016(2)：282－283.

[13] 贺爱娟，贾敏，吴然，等. 消疕汤对寻常型银屑病患者血清 TNF-α 的影响[J]. 家庭医药，2016(1)：116－117.

[14] 文昌晖，贾敏，张硕，等. 贾敏教授经验方消疕汤治疗寻常型银屑病临床研究[J]. 中国当代医药，2016(9)：28－31.

(2016-09-13 收稿，2016-11-27 修回)
中文编辑：刘　平；英文编辑：刘　华

(上接第 1434 页)

[4] 辛文好，宋俊科，何国荣，等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志，2013(6)：647－659.

[5] 高燕，顾振纶，蒋小岗，等. 黄芩素药理学研究新进展[J]. 时珍国医国药，2010(7)：1765－1767.

[6] Dal Ben D，Palumbo M，Zagotto G，et al. DNA topoisomerase Ⅱ structures and anthracyline activity：insight into ternary complex formation[J]. Curr Pharm Des，2007(27)：2766－2780.

[7] Fisher PW，Salloum F，Das A，et al. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity[J]. Circulation，2005(13)：1601－1610.

[8] Li L，Tang YX，Ou BN，et al. Effects of(－)-epigallocatechin-3-gallate peracetylated derivative on daunorubicin-induced cardiotoxicity in mice[J]. Chin Pharmacol Bull，2014(3)：345－348.

[9] Li CR，Lin G，Zuo Z. Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of Radix Scutellariae and its bioactive flavones[J]. Biopharm. Drug Dispos，2011(32)：427－445.

[10] Peng J，Xu WJ，He BX，et al. Effects of Baicalein on Rat Myocardial Ischemia and Neonatal Cardiomyocyte Injury[J]. Chinese Journal of Natural Medicines，2011(2)：0132－0140.

(2016-09-15 收稿，2016-11-26 修回)
中文编辑：刘　平；英文编辑：刘　华