

辛伐他汀通过氧化应激减轻蒽环类药物心脏毒性的相关性研究

李凤梅 郝长来*

承德医学院附属医院 河北 承德 067000

摘要：目的 研究辛伐他汀通过氧化应激减轻蒽环类药物心脏毒性。方法 将30只雄性Wistar大鼠随机均分为6组，生理盐水组(N)(0.9%NaCl,1ml/kg/隔日灌胃)；辛伐他汀组(T)(3mg/kg/隔日灌胃)；右丙亚胺组(Y)(25mg/kg/周尾静脉注射)；阿霉素组(D)(2.5mg/kg/周尾静脉注射)；阿霉素+辛伐他汀组(DT)(Sim:3mg/kg/隔日灌胃+Dox:2.5mg/kg/周尾静脉注射，另外提前连续7天给予辛伐他汀进行干预)；阿霉素+辛伐他汀组(DY)(Y:25mg/kg/周尾静脉注射半小时后进行Dox:2.5mg/kg/周尾静脉注射)。连续给药2个月，建立阿霉素诱导的心脏毒性(Doxorubicin induce cardiotoxicity,DIC)大鼠损伤模型。观察大鼠的体质量变化；采用HE染色观察各组大鼠心肌情况；采用Western blot法检测各组大鼠心肌组织中SOD-2蛋白表达情况。结果 体重显示阿霉素导致大鼠体重明显降低($P<0.05$)，阿霉素联合辛伐他汀或右丙亚胺中表达增加($P<0.05$)。HE染色显示阿霉素导致大鼠心肌纤维结构扭曲，断裂溶解等。阿霉素联合辛伐他汀或右丙亚胺的大鼠明显减轻心肌细胞异常形态。Western blot结果显示SOD-2蛋白在阿霉素大鼠模型中表达降低($P<0.05$)，在阿霉素联合辛伐他汀或右丙亚胺中表达增加($P<0.05$)。结论 辛伐他汀可保护DIC，其机制可能与抑制氧化应激相关，这为探索DIC的新型保护药和新的诊断性生物标志物提供新见解。

关键词：阿霉素；超氧化物歧化酶SOD-2；辛伐他汀

近年来，随着癌症的发生率和死亡率的增高，以阿霉素为代表的蒽环类药物因其高效广谱的抗癌特性被临床广泛使用，但严重的心脏毒性大大制约其临床应用^[1]。目前DIC的机制尚不完全清楚，包括氧化应激、细胞凋亡、自噬、炎症损伤等^[2]。其中公认氧化应激是蒽环类药物心脏毒性的主要机制^[3]。蒽环类药物可触发铁蓄积在心肌细胞的线粒体中，导致心肌线粒体DNA受损和脂质过氧化，同时刺激活性氧生成。高水平活性氧激活细胞毒信号，导致DNA损伤，线粒体功能障碍，蛋白质合成减弱，和Ca²⁺内流，最终造成心肌细胞不可逆性损伤。

目前蒽环类药物所致心脏毒性尚无安全有效的保护药物，右丙亚胺，是目前FDA唯一批准的DIC保护药；其他研究的药物包括β受体阻滞剂，他汀类药物，中药等。这些药物虽然不是专门针对DOX诱导的心脏毒性开发的保护药，但在临床前模型和临床研究中都显示出一定的疗效。

辛伐他汀(Simvastatin, Sim)是一种3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂，目前主要用于治疗高胆固醇血症。近年来研究显示它也可能是蒽环类药物使用过程中的心脏保护剂，甚至还可以增强DOX使用过程中的抗癌效果，但具体机制尚不十分详细^[4]。本研究以

Wistar大鼠为研究对象，阿霉素为模型化疗药物，探讨Sim对DIC大鼠的影响及其相关机制，以期为临床应用提供更多依据。

1 材料

1.1 实验动物

北京华阜康生物科技股份有限公司购买6周龄SPF级雄性Wistar大鼠(SCXK(京)2019-0008)30只，体质量(250±20)g，饲养于承德医学院附属医院实验动物中心。自由获取水和食物，并在实验前一周适应环境。随机化将大鼠分配到各实验组并收集和数据处理数据。

2 方法

2.1 分组、模型制备与给药

将30只Wistar大鼠随机分为6组(n=5)，生理盐水组(N)(3mg/kg/隔日灌胃)，辛伐他汀组(T)(3mg/kg/隔日灌胃)，右丙亚胺组(Y)(25mg/kg/周尾静脉注射)阿霉素组(D)(2.5mg/kg/周尾静脉注射)，阿霉素+辛伐他汀组(D+T)(Sim:3mg/kg/隔日灌胃+Dox:2.5mg/kg/周尾静脉注射，另外辛伐他汀提前连续7天给予辛伐他汀进行干预)，阿霉素+辛伐他汀组(D+Y)(Y:25mg/kg/周尾静脉注射半小时后进行Dox:2.5mg/kg/周尾静脉注射)，建立阿霉素心脏毒性



模型。DOX 给药 8 周后，在异氟烷麻醉下对所有大鼠进行安乐死（2%），从主动脉根部游离出心脏，并迅速切除心脏，修建并清洗，最后甲醛固定和液氮速冻。

2.2 HE 染色

将组织固定 48h 后取出脱水，石蜡包埋、5um 切片、烤片、脱蜡、脱二甲苯后进行 HE 染色，最后透明封片，显微镜下观察心肌纤维病理改变。

2.3 Western blot

取心肌组织先用剪刀剪碎，经含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液匀浆后裂解后，冰上静置 30min，4℃，12000r/min 离心 30min 后取上清液，BCA 法进行蛋白定量。上样缓冲液与适当蛋白匀浆混匀后，置于 95℃ 金属浴中加热 10min，冰上渐冷，放于 -20 度保存。总共使用 30ug 的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转膜，1*TBST 洗膜 5min*6 次，5% 脱脂奶粉 37 度 1 小时。1*TBST 洗膜 5 分钟，加入稀释的相应一抗：SOD-2(ET1701-54, 1:1000)GAPDH (ab181602, 1 : 5000)，过夜，第二天 1*TBST 洗膜 5min*6 次。加入二抗 (S1002-100, 1 : 10000) 室温摇床 1h，1*TBST 洗膜 5min*6 次，结束后 DAB 显色，用 Image J 软件分析条带灰度值，并以目标条带与内参条带灰度的比值反映目标蛋白的表达情况。

2.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 软件 (GraphPad Software Inc., CA, USA) 进行统计分析和作图。使用单因素方差分析进行多组间比较。数据表示为平均值 ± 标准差 (SD)。统计学显著性标准设定为 P<0.05。

3 结果

研究共纳入 30 只大鼠，分析了各组大鼠体重情况，心脏组织 HE 染色情况和 SOD-2 蛋白表达情况。第 8 周末大鼠体重情况显示，与 N 组、T 组、和 Y 组相比，D 组大鼠体重明显减轻 (P<0.05)，与 D 组相比，DT 组和 DY 组大鼠体重明显增加 (P<0.05) (图 1)。HE 染色显示 N 组、T 组、和 Y 组大鼠心肌细胞完好，心肌纤维排列整齐，无水肿等。D 组大鼠的心脏组织中心肌细胞排列疏松，心肌纤维结构扭曲，断裂溶解等。与 D 组相比，DT 组和 DY 组大鼠明显减轻心肌细胞异常形态 (图 2)。以上情况初步证明辛伐他汀可以改善 DIC。Western blot 分析显示，与 N 组、T 组、和 Y 组相比，D 组大鼠心脏组织中 SOD-2 蛋白表达明显减少 (P<0.05)；与 D 组相比，DT 组和 DY 组大鼠心脏组织中 SOD-2 蛋白表达明显增加 (P<0.05) (图 3)。以上结果表明，

辛伐他汀改善 DIC 可能与氧化应激相关。

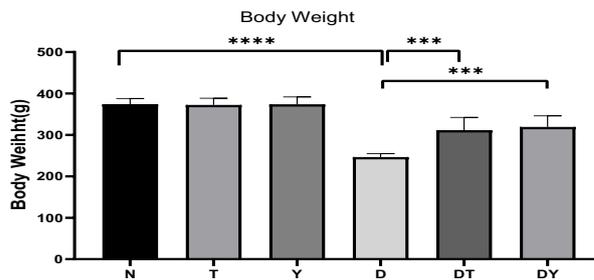


图 1 各组大鼠第 8 周末体重情况 ($\bar{X} \pm S$, n=5)

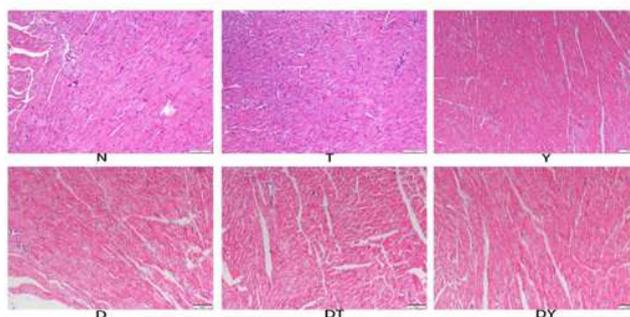


图 2 各组大鼠心脏组织 HE 染色情况 (X400)

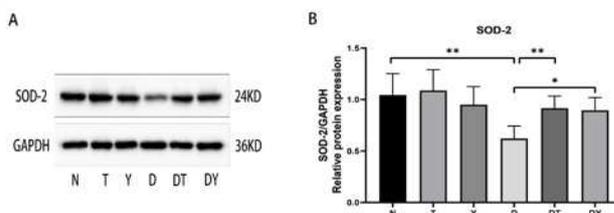


图 3 A. 各组大鼠心脏组织 SOD-2 蛋白表达 ;B. 各组大鼠心脏组织 SOD-2 蛋白相对表达量 ($\bar{X} \pm S$, n=5)

4 讨论

阿霉素属于恶性肿瘤化疗的蒽环类药物家族之一，然而因各种类型的心律失常和症状性心力衰竭等心脏毒性，严重限制了临床应用。^[5,6]。目前公认氧化应激是 DIC 的主要机制，超氧化物歧化酶 -2 (SOD-2) 是抗氧化应激的关键因子，因此本研究着重于此^[7]。右丙亚胺是目前唯一批准的 DIC 保护药，但因价格昂贵、骨髓抑制等副作用仍需探索更安全可靠药物来防治心脏毒性。近年来研究发现辛伐他汀具有减轻心肌纤维化、抗癌和增加阿霉素抗癌效果等特性^[8,9]；此外，研究表明，Sim 和 Dox 的脂质体共封装可以进一步降低 DIC 事件的风险，同时保留甚至增强 Dox 的抗癌作用^[10]。但辛伐他汀与蒽环类药物联用时对 DIC 的具体影响及相关调控机制尚不清楚。因此，本研究旨在初步探讨大鼠体内联合应用辛伐他汀与蒽环类药物时对 DIC 的影响及 SOD-2 的表达情况，并与右丙亚胺形成阳性对照。发现

与阿霉素单独应用时相比，两者联合应用能更显著的增加SOD-2蛋白的表达情况，且改善大鼠的DIC情况。综上所述，辛伐他汀可保护DIC，其机制可能与抑制氧化应激相关，这为探索DIC新的保护药及可能的机制提供了新见解。当然有关辛伐他汀具体如何发挥保护DIC作用仍需进一步研究。我们相信，随着对辛伐他汀的深入研究，其有望成为DIC的保护药。

参考文献：

[1] Sheibani M, Azizi Y, Shayan M, et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(4):292-310.

[2] Christidi E, Brunham L R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):339.

[3] Kong C Y, Guo Z, Song P, et al. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(2):760-770.

[4] Chotenimitkhun R, D'agostino R, Jr., Lawrence J A, et al. Chronic statin administration may attenuate early anthracycline-associated declines in left ventricular ejection function[J]. *Can J Cardiol*, 2015, 31(3):302-7.

[5] Sawicki K T, Sala V, Prever L, et al. Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61: 309-332.

[6] Wei M F, Cheng C H, Wen S Y, et al. Atorvastatin

Attenuates Radiotherapy-Induced Intestinal Damage through Activation of Autophagy and Antioxidant Effects[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:7957255.

[7] Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, et al. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:1521020.

[8] Patel R, Nagueh S F, Tsybouleva N, et al. Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2001, 104(3):317-24.

[9] Kim M J, Bible K L, Regnier M, et al. Simvastatin provides long-term improvement of left ventricular function and prevents cardiac fibrosis in muscular dystrophy[J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(6): e14018.

[10] Bjørnstad R, Reiten I N, Knudsen K S, et al. A liposomal formulation of simvastatin and doxorubicin for improved cardioprotective and anti-cancer effect[J]. *Int J Pharm*, 2022, 629:122379.

作者简介：

李凤梅（1997.02- ），女，河北衡水，汉族，硕士，主要从事萘环类药物心脏毒性方面的研究。

通信作者：郝长来（1964.10- ），男，河北廊坊，汉族，博士，主任医师，主要从事萘环类药物心脏毒性方面的研究。

