

促红细胞生成素衍生物螺旋B表面肽对表柔比星诱发大鼠心肌损伤的改善作用及机制研究[△]

于秀燕^{1*}, 李跃荣¹, 徐会圃¹, 赵冬冬¹, 陈薇薇², 郭纪伟², 马宝新^{1#}(1.滨州医学院附属医院心血管内科, 山东滨州 256603; 2.滨州医学院肿瘤研究实验室, 山东滨州 256603)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)19-2608-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.19.04

摘要 目的:研究促红细胞生成素衍生物螺旋B表面肽(HBSP)对表柔比星诱发大鼠心肌损伤的改善作用及机制。方法:将SD大鼠随机分为对照组、模型组、促红细胞生成素(EPO)组和HBSP组,每组10只。除对照组外,其余各组大鼠均腹腔注射表柔比星2.5 mg/kg,每周1次,连续6周复制心肌损伤模型,EPO组和HBSP组大鼠分别腹腔注射重组人促红细胞生成素(rhEPO)5 000 u/kg或HBSP 60 μg/kg,每周3次(分别于表柔比星给药前1天、给药后第1天以及给药后第3天给药),连续6周。以首次给药开始计时,第11周称各组大鼠体质量,超声心动图检测其心功能[左室舒张末期内径(LVIDd)、射血分数(EF)、缩短分数(FS)及心输出量(CO)],酶联免疫吸附法测定其血清中肌钙蛋白I(cTnI)、氨基末端B型利钠肽原(NT-proBNP)的含量,逆转录-聚合酶链式反应检测其心肌组织中磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)和蛋白激酶B(Akt)mRNA的表达,Western blot法检测其心肌组织中p-PI3K和p-Akt蛋白的表达。结果:在研究期内,模型组有2只大鼠死亡,EPO组有1只大鼠死亡,HBSP组无大鼠死亡。与对照组比较,模型组大鼠体质量、EF、FS、CO均显著降低,LVIDd和cTnI、NT-proBNP含量均显著增加,PI3K、Akt mRNA表达水平及p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平均显著降低,以上差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,EPO组及HBSP组大鼠体质量、EF、FS、CO均显著增加,LVIDd和cTnI、NT-proBNP含量显著降低,PI3K、Akt mRNA表达水平及p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平均显著升高,以上差异均有统计学意义($P<0.05$)。与EPO组比较,HBSP组大鼠cTnI、NT-proBNP含量均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:HBSP对大鼠心肌损伤具有与EPO相当的改善作用,且毒性更小,二者改善心肌损伤的作用机制可能与激活PI3K/Akt信号通路有关。

关键词 螺旋B表面肽;表柔比星;心肌损伤;磷脂酰肌醇-3-激酶;蛋白激酶B;大鼠

Improvement Effects of Erythropoietin Derivative Helix B Surface Peptide on Epirubicin-induced Myocardial Injury in Rats and Its Mechanism Study

YU Xiuyan¹, LI Yuerong¹, XU Huipu¹, ZHAO Dongdong¹, CHEN Weiwei², GUO Jiwei², MA Baoxin¹(1.Dept. of Cardiology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Shandong Binzhou 256603, China; 2.Cancer Research Laboratory, Binzhou Medical College, Shandong Binzhou 256603, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects and its mechanism of erythropoietin derivative helix B surface peptide (HBSP) on epirubicin-induced myocardial injury in rats. METHODS: SD rats were randomly divided into control group, model group, erythropoietin (EPO) group and HBSP group, with 10 rats in each group. Except for control group, other groups were given epirubicin 2.5 mg/kg intraperitoneally, once a week, for consecutive 6 weeks to induce myocardial injury model. EPO group and HBSP groups were given rhEPO 5 000 u/kg or HBSP 60 μg/kg intraperitoneally, 3 times a week (one day before medication, first day and third day after medication of epirubicin), for consecutive 6 weeks. At the beginning of the first administration, the rats were weighed at the 11th week. The cardiac function was measured by echocardiography [left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd), ejection fraction (EF), fractional shortening (FS) and cardiac output(CO)]. The serum levels of troponin I (cTnI) and amino-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) were determined by ELISA. mRNA expression of PI3K and Akt in myocardial tissue was detected by RT-PCR. The protein expression of p-PI3K and p-Akt in rat myocardium were detected by Western blot. RESULTS: During research period, two rats died in model group, one in EPO group and none in HBSP group. Compared with control group, body weight, the levels of EF, FS and CO were decreased significantly in model group, while the contents of LVIDd and cTnI, NT-proBNP were increased significantly; mRNA expression of PI3K and Akt as well as protein expression of p-PI3K and p-Akt were decreased significantly, above differences were statistical

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31801085);山东省医药卫生科技计划项目(No.2016WS0049)

* 硕士研究生。研究方向:继发性心肌损伤。E-mail: 1776738263@qq.com

通信作者:副主任医师,博士。研究方向:继发性心肌损伤。E-mail:343324710@qq.com

significant ($P < 0.05$). Compared with model group, body weight, the levels of EF, FS and CO were increased significantly in EPO group and HBSP group, while the contents of LVIDd and cTnI, NT-proBNP were decreased significantly; mRNA expression of PI3K and Akt as well as protein expression of p-PI3K and p-Akt were increased significantly, above differences were statistical significant ($P < 0.05$). Compared with EPO group, the contents of cTnI and NT-proBNP were decreased significantly in HBSP group, with statistical significance ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: HBSP can improve myocardial injury in rats as much as EPO, and has less toxicity. Their mechanism may be related to the activation of PI3K/Akt signaling pathway.

KEYWORDS Helix B surface peptide; Epirubicin; Myocardial injury; PI3K; Akt; Rat

表柔比星,又名表阿霉素,是蒽环类药物新的衍生物,在临床上已成为多柔比星有效、实用的替代物。在过去30年,蒽环类抗肿瘤药物的使用明显提高了肿瘤患者的生存率及预后^[1]。然而,其心血管副作用限制了在临床实践中的应用。长期使用蒽环类药物会使心肌纤维化和重塑,导致心功能障碍^[2]。促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)对心、肾、肝、脑及视网膜等受损组织可发挥重要的保护作用^[3]。然而,EPO的红细胞生成作用可导致血栓形成、中风和高血压等副作用,明显限制了EPO的临床应用^[4]。螺旋B表面肽(Helix B surface peptide, HBSP)是衍生自EPO的螺旋B结构域的小肽,具有与EPO相同的药理学特性,发挥相似的组织保护作用,但其对骨髓造血系统无明显影响,无促红细胞生成活性,避免了EPO可引起的相关副作用,但其心肌保护的具体作用机制仍不明确^[5]。本实验通过建立表柔比星致心肌损伤模型大鼠,并给予表柔比星致心肌损伤模型大鼠EPO及HBSP进行治疗,进一步验证EPO及HBSP对表柔比星诱发的心肌损伤的保护作用,并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

-80 °C低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SW-CJ-2FD型超净工作台(南京贝登医疗股份有限公司);VividE9型彩色多普勒超声诊断仪(北京市瑞强兴达医疗设备公司);5417R型超速离心机(德国 Eppendorf 公司);T-100型聚合酶链反应(PCR)仪和Jel-doc2000型凝胶影像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 药品与试剂

注射用盐酸表柔比星(以下简称表柔比星,海正辉瑞制药有限公司,批号:20180810,规格:10 mg);注射用重组人促红细胞生成素(rhEPO,昂德生物药业有限公司,批号:20180802,规格:5 000 u);HBSP(上海科肽生物科技有限公司,批号:20180804,纯度:>98%);大鼠心肌肌钙蛋白I(cTnI)、血清氨基末端B型利钠肽原(NT-proBNP)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ML1003202、ML1003039);总RNA提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司,批号:20180617);逆转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号:RR047A);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAP-

DH)兔单克隆抗体(上海生工生物工程有限公司,批号:20180907);磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(Phosphorylation-phosphatidylinositol-3-kinase, p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(Phosphorylation-protein kinase B, p-Akt)兔单克隆抗体(美国 Cell signaling 公司,批号:4292、9611S);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(美国 Bioworld 公司);增强化学发光(ECL)液试剂盒(美国 Sigma 公司);其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 动物

SPF级Wistar大鼠40只,♂,6~8周龄,体质量(280±20)g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)20140007。本实验方案已通过滨州医学院动物实验伦理审查。

2 方法

2.1 大鼠分组及处理

将大鼠按照随机数字表法分为对照组、模型组、EPO组和HBSP组,每组10只。除对照组外,其余各组大鼠均腹腔注射表柔比星2.5 mg/kg,每周1次,连续6周复制心肌损伤模型^[6]。EPO组和HBSP组大鼠分别腹腔注射rhEPO 5 000 u/kg或HBSP 60 μg/kg,每周3次,给药时间分别为表柔比星给药前1天、给药后第1天以及给药后第3天,连续6周;对照组和模型组大鼠均以等量生理盐水腹腔注射6周。rhEPO和HBSP的给药剂量依据文献[7-8]以及预实验结果确定。

2.2 一般情况

观察记录各组大鼠存活情况、体质量变化、饮水量、毛色及活动情况,于第11周处死大鼠。

2.3 超声心动图检测心功能

在大鼠处死前,腹腔注射水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠,仰卧位固定于固定台上,使用动物剃毛器剔除大鼠胸毛,充分暴露胸部。采用VividE 9型彩色多普勒超声诊断仪,高频探头(12 MHz),设置深度2 cm,取大鼠胸骨旁左室短轴切面测量左室舒张末期内径(LVIDd)、射血分数(EF)、缩短分数(FS)及心输出量(CO)。

2.4 酶联免疫吸附法测定血清中cTnI、NT-proBNP含量

在大鼠处死前,内眦静脉采血2 mL,静置30 min,3 000 r/min(离心半径为3 cm)离心5 min,采用酶联免疫吸附法测定各组大鼠血清中cTnI、NT-proBNP含量,具体检测方法严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测心肌组织中PI3K和Akt mRNA表达

大鼠处死后,分离心肌组织,称取60 mg左右的心肌组织加入1 mL Trizol,严格按照总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒提取心肌总RNA,逆转录合成cDNA,再以cDNA为模板进行PCR扩增。以GAPDH为内参,分别对PI3K和Akt基因进行扩增。反应条件:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 15 s, 35个循环; 72 ℃ 7 min。PCR产物在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,使用凝胶成像系统Image Lab进行条带图像采集,使用Image J软件分析条带吸光度。引物序列与产物长度见表1。

表1 引物序列与产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length

基因	引物序列(5'-3')	长度, bp
PI3K	上游:GCAGGCAGCCTGTCTCCATG	81
	下游:TTCGGGTGTCTTGCTGATGCG	
Akt	上游:GGCAGGAGGAGACGATGG	109
	下游:TTCATGGTCACACGGTGTCTGG	
GAPDH	上游:CTCCTCTGTTCGACAGTCAGC	102
	下游:CCCAATACGACCAATCCGTT	

2.6 Western blot法检测心肌组织中p-PI3K和p-Akt蛋白表达

称取60 mg左右大鼠心肌组织,充分剪碎研磨,加入100 μL的细胞裂解液,以12 000 r/min(离心半径为8 cm)离心20 min,取上清液即为蛋白样本。按5×上样缓冲液的比例加入蛋白样品及缓冲液充分混匀,99 ℃加热变性10 min,再以10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白后,将蛋白电转移至PVDF膜上。经5%脱脂奶粉封闭后,滴加抗磷酸化p-PI3K单克隆抗体和p-Akt单克隆抗体(稀释比例均为1:1 000),4 ℃孵育过夜,再滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(稀释比例为1:20 000),常温孵育1 h,经ECL发光试剂曝光后观察结果。采用Image J软件分析条带的光密度值,以GAPDH为内参,以目的蛋白与内参的光密度比值表示相应蛋白的表达水平。

2.7 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠的一般情况

与对照组比较,模型组大鼠饮水和鼠粮摄入量减少,并且出现精神差、活动减少、毛发脏乱、脱毛、消瘦等表现,部分大鼠后期处于濒死状态,于实验第9周死亡2只,解剖后发现大鼠出现胸腔、腹腔积液,心脏肥大,肝肾暗红肿胀。EPO组和HBSP组大鼠一般情况较模型组好转,其中EPO组大鼠于实验第10周死亡1只,其解剖

后脏器情况较模型组严重程度减轻;HBSP组大鼠未出现死亡情况。比较各组大鼠解剖前体质量发现,与对照组比较,模型组大鼠体质量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,EPO组和HBSP组大鼠体质量显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);EPO组与HBSP组大鼠间体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠解剖前的体质量结果见表2。

表2 各组大鼠解剖前的体质量结果($\bar{x} \pm s, g$)

Fig 2 Body weight results of rats before anatomy in each group($\bar{x} \pm s, g$)

组别	<i>n</i>	体质量
对照组	10	474.66 ± 17.89
模型组	8	334.25 ± 15.38*
EPO组	9	378.99 ± 15.26 [#]
HBSP组	10	384.50 ± 8.98 [#]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$; vs. model group,[#] $P < 0.05$

3.2 大鼠的心功能指标变化

与对照组比较,模型组大鼠的LVIDd显著延长,EF、FS及CO显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,EPO组和HBSP组大鼠的LVIDd显著缩短,EF、FS及CO显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。EPO组与HBSP组大鼠间心功能指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠的心功能指标结果见表3。

表3 各组大鼠心功能指标结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Cardiac function results of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LVIDd, cm	EF, %	FS, %	CO, L/min
对照组	10	0.593 ± 0.027	86.15 ± 7.708	48.68 ± 2.035	4.761 ± 1.238
模型组	8	0.765 ± 0.048*	67.14 ± 3.092*	34.72 ± 1.314*	2.564 ± 0.765*
EPO组	9	0.621 ± 0.035 [#]	80.18 ± 4.283 [#]	40.48 ± 1.097 [#]	3.976 ± 1.092 [#]
HBSP组	10	0.641 ± 0.019 [#]	83.29 ± 6.276 [#]	42.96 ± 1.260 [#]	4.123 ± 1.207 [#]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$; vs. model group,[#] $P < 0.05$

3.3 大鼠血清中cTnI、NT-proBNP含量变化

与对照组比较,模型组大鼠血清中cTnI和NT-proBNP含量均显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,EPO和HBSP组大鼠血清中cTnI和NT-proBNP含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与EPO组比较,HBSP组大鼠血清中cTnI和NT-proBNP含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠血清中cTnI、NT-proBNP含量测定结果见表4。

3.4 大鼠心肌组织中PI3K、Akt mRNA表达变化

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中PI3K及Akt mRNA表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,EPO组和HBSP组大鼠心肌组织

表4 各组大鼠血清中cTnI、NT-proBNP含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Tab 4 Determination results of content determination of cTnI and BNP in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	cTnI	NT-proBNP
对照组	10	659.57 ± 28.28	210.92 ± 18.36
模型组	8	1 263.22 ± 20.70*	742.97 ± 28.31*
EPO组	9	884.83 ± 23.65**	343.61 ± 24.20**
HBSP组	10	755.55 ± 20.67** ^Δ	253.12 ± 16.79** ^Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与EPO组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$; vs. model group,# $P < 0.05$; vs. EPO group,^Δ $P < 0.05$

中PI3K、Akt mRNA表达水平显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。EPO组与HBSP组大鼠间PI3K、Akt mRNA表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠心肌组织中PI3K、Akt mRNA表达的电泳图见图1,表达水平测定结果见图2。

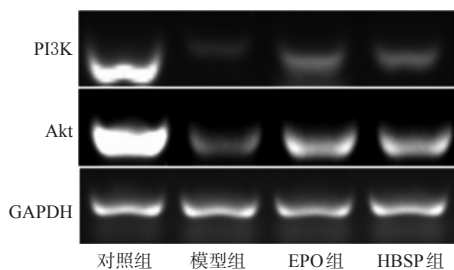


图1 各组大鼠心肌组织中PI3K、Akt mRNA表达的电泳图

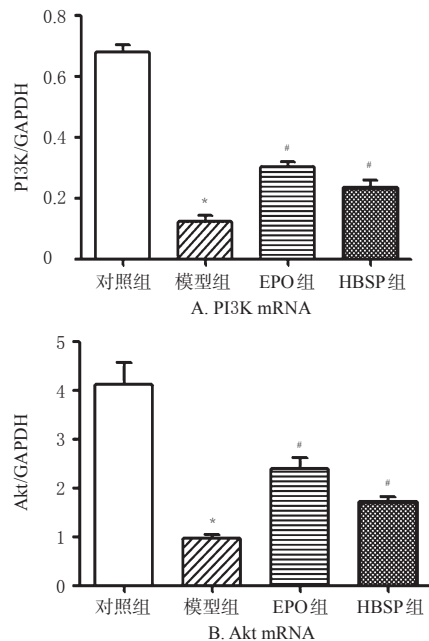
Fig 1 Electrophoresis of PI3K and Akt mRNA expression in myocardium of rats in each group

3.5 大鼠心肌组织中p-PI3K、p-Akt蛋白表达变化

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,EPO组和HBSP组大鼠心肌组织中p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。EPO组与HBSP组大鼠之间的p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠心肌组织中p-PI3K、p-Akt蛋白表达的电泳图见图3,表达水平测定结果见图4。

4 讨论

EPO是一种主要由成人肾脏产生的内源性蛋白质,临床上主要用于治疗各种原因引起的贫血。近年来,多项研究发现EPO对心、肾、肝、脑等具有保护作用^[3,9]。EPO的组织保护作用是通过与由EPO受体(EPOR)和 β 共同受体(β CR)亚基组成的异二聚体受体复合物结合来实现的^[10]。有研究表明,对于表柔比星所致的心肌损伤,EPO干预后可降低心脏特异性转录因子GATA结合因



注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$; vs. model group,# $P < 0.05$

图2 各组大鼠心肌组织中PI3K、Akt mRNA表达水平测定结果

Fig 2 Determination results of mRNA expression of PI3K and Akt in myocardium of rats in each group

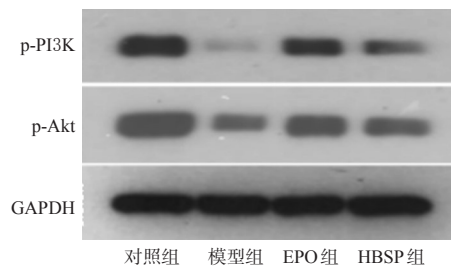
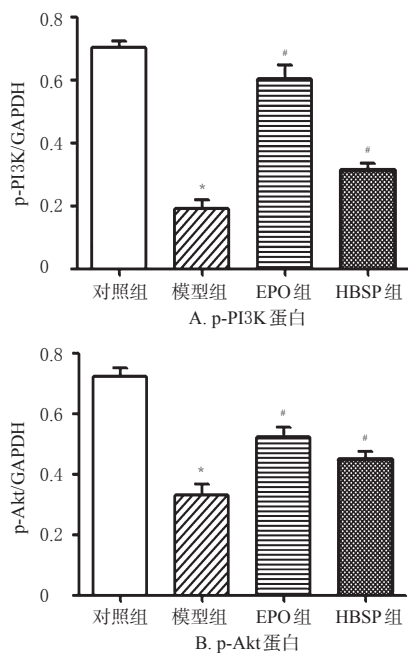


图3 各组大鼠心肌组织中p-PI3K、p-Akt蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoresis of p-PI3K and p-Akt protein expression in myocardium of rats in each group

子4(GATA-4)和主要组织相容性复合体(MHC)、肌钙蛋白I和结合蛋白的表达水平,激活组蛋白去乙酰化酶(SIRT1)以增强线粒体功能,保护心脏免受蒺环类药物诱导的心肌细胞萎缩和变性、心肌纤维化、炎性细胞浸润,从而降低心肌损伤,改善心功能^[11-12]。然而,EPO的组织保护作用需要高剂量来实现,而这种高剂量会导致红细胞比容升高、血管内血栓形成增加、血压升高等一系列不良反应。更重要的是,EPO作为一种增殖剂,可刺激现有肿瘤的生长,甚至导致新发肿瘤的发生^[4,13]。

2008年,Brines M等^[14]首次合成了一种EPO的衍生物HBSP,HBSP对骨髓造血系统无明显影响,无促红细胞生成活性,避免了红细胞增多、血栓形成增加、血压升



注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$

图4 各组大鼠心肌组织中p-PI3K、p-Akt蛋白的相对表达量测定结果

Fig 4 Determination results of protein expression of p-PI3K and p-Akt in myocardium of rats in each group

高等不良反应的发生,但具有与EPO相同的药动学特性和相当的组织保护作用。近年来,有研究通过建立心肌梗死、糖尿病心肌病及心肌缺血再灌注损伤模型证实了HBSP具有抗心肌细胞凋亡、缩小心肌梗死面积、减少氧化应激等作用,且治疗效果与EPO相当^[15-16],但至今尚无研究报道HBSP在蒽环类化疗药物引起心肌损伤中的影响。本研究通过建立表柔比星致心肌损伤大鼠模型,心脏超声心动图显示,模型组大鼠LVIdd显著延长,EF、FS、CO显著降低,提示应用表柔比星后大鼠心功能下降,心肌损伤模型复制成功。给予EPO及HBSP后,LVIdd显著缩短,EF、FS、CO显著增加,表明EPO及HBSP具有明显改善心功能的作用。cTnI是反映心肌损伤程度高敏感、高特异的“金标准”,而NT-proBNP具有良好的敏感性及特异性,在临床上被广泛应用于心衰的诊断和预后评估^[17]。模型组大鼠血清中cTnI和NT-proBNP含量显著增加,提示应用表柔比星后大鼠存在明显的持续性心肌损伤。给予EPO及HBSP干预后,cTnI和NT-proBNP含量显著降低,表明EPO及HBSP可减少表柔比星所致的心肌损伤,对心肌具有保护作用。

PI3K/Akt信号通路是参与细胞增殖、存活、分化和凋亡的重要途径之一^[18]。近年来研究表明,EPO及其衍生物可通过增加PI3K/Akt信号传导以抑制炎症介质的产生和释放,保护心肌免受心肌损伤并减少心肌细胞凋

亡^[16]。本研究应用EPO及HBSP干预表柔比星所致心肌损伤模型大鼠,结果发现,模型组大鼠心肌组织中PI3K、Akt mRNA表达水平及p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平显著低于对照组,而EPO及HBSP的干预能显著上调心肌组织中PI3K、Akt mRNA及p-PI3K、p-Akt蛋白的表达,表明表柔比星可能是通过抑制PI3K及Akt的磷酸化水平而引起心肌损伤,而EPO和HBSP可上调被表柔比星抑制的PI3K及Akt的磷酸化水平,这可能是EPO和HBSP阻断心肌细胞凋亡及改善心功能的一个重要环节。笔者下一步研究将使用PI3K/Akt特异性抑制剂预处理,以深入明确PI3K/Akt信号通路在HBSP减轻大鼠表柔比星所致心肌损伤的保护作用中的具体作用机制。

综上所述,EPO衍生物HBSP可改善表柔比星所致心肌损伤模型大鼠的心功能、减轻心肌损伤,其作用机制可能是通过PI3K/Akt信号通路来实现的,然而是否还通过其他机制发挥心肌保护作用仍需进一步探究。本研究为HBSP应用于临床提供了可靠的实验依据,同时为HBSP治疗化疗药物导致的心肌损伤提供了可能的策略。

参考文献

- [1] CARVALHO FS, BURGEIRO A, GARCIA R, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy[J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(1):106-135.
- [2] ARMENIAN S, BHATIA S. Predicting and preventing anthracycline-related cardiotoxicity[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2018. DOI:10.1200/EDBK_100015.
- [3] 侯兰, 吕娟, 陈莉娜. 促红细胞生成素的多器官保护作用研究进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(17):1626-1628.
- [4] HACHE G, GARRIGUE P, BENNIS Y, et al. ARA290, a specific agonist of erythropoietin/CD131 heteroreceptor, improves circulating endothelial progenitors' angiogenic potential and homing ability[J]. *Shock*, 2016, 46(4):390-397.
- [5] 游伟, 刘映峰, 缪绯, 等. 促红细胞生成素衍生肽的组织保护作用研究进展[J]. *中国循环杂志*, 2015. DOI:10.3969/j.issn.1000-3614.2015.11.021.
- [6] YI X, BEKEREDJIAN R, DEFILIPPIS NJ, et al. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(3):H1098-H1102.
- [7] RAMOND A, SARTORIUS E, MOUSSEAU M, et al. Erythropoietin pretreatment protects against acute chemotherapy toxicity in isolated rat hearts[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, 233(1):76-83.
- [8] 蒋娜, 叶瑾, 党晶艺, 等. 促红细胞生成素衍生肽抑制缺血/再灌注损伤诱导的大鼠心肌细胞凋亡[J]. *心脏杂志*,

HPLC法测定苯唑嗪胶囊中主成分及有关物质的含量^Δ

张英华^{1*},高佳²,陈人萍²,刘卫²,王清²,张炜煜^{1#}(1.长春中医药大学药学院,长春 130117;2.吉林省中医药科学院中医药基础所,长春 130012)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)19-2613-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.19.05

摘要 目的:建立测定苯唑嗪胶囊中主成分及有关物质含量的方法。方法:采用高效液相色谱法测定主成分含量,采用主成分自身对照法计算有关物质(已知杂质1、已知杂质2、总杂质)的含量。色谱柱为Inertsil ODS-2 C₁₈,流动相为乙腈-水(55:45,V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为223 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。结果:苯唑嗪主成分与杂质分离度良好,苯唑嗪检测质量浓度线性范围为20.04~60.12 μg/mL($r=1.000\ 0$);精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均≤0.5%($n=6$);平均回收率为97.50%(RSD=0.36%, $n=3$);苯唑嗪的检测限和定量限分别为0.91、3.04 ng。在3批样品中,苯唑嗪、已知杂质1、已知杂质2、总杂质含量的平均值分别为106.68%、0.002 1%、0.044 0%、0.046 2%。结论:建立的苯唑嗪胶囊中主成分及有关物质的含量测定方法简便、专属性强、灵敏度高,结果准确,适用于苯唑嗪胶囊的质量控制。

关键词 苯唑嗪胶囊;高效液相色谱法;含量测定;有关物质

Determination of Main Components and Related Substances in Phenzolazine Capsules by HPLC

ZHANG Yinghua¹, GAO Jia², CHEN Renping², LIU Wei², WANG Qing², ZHANG Weiyu¹ (1.School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2.Basic Institute of TCM, Jilin Provincial Academy of TCM, Changchun 130012, China)

- 2013,25(3):327-332.
- [9] TERAMO KA, KLEMETTI MM, WIDNESS JA. Robust increases in erythropoietin production by the hypoxic fetus is a response to protect the brain and other vital organs [J]. *Pediatr Res*, 2018, 84(6):807-812.
- [10] BRINES M, GRASSO G, FIORDALISO F, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(41):14907-14912.
- [11] AMMAR HI, SABA S, AMMAR RI, et al. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(6):H2413-H2421.
- [12] CUI L, GUO J, ZHANG Q, et al. Erythropoietin activates SIRT1 to protect human cardiomyocytes against doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction and toxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2017. DOI:10.1200/EDBK_100015.
- [13] MAIESE K. Erythropoietin and diabetes mellitus[J]. *World J Diabetes*, 2015, 6(14):1259-1273.
- [14] BRINES M, PATEL NS, VILLA P, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(31):10925-10930.
- [15] 刘超权,司瑞,宁明安,等.促红细胞生成素衍生肽抑制细胞自噬减轻小鼠心肌缺血/再灌注损伤[J]. *心脏杂志*, 2016, 28(4):390-395.
- [16] LIN C, ZHANG M, ZHANG Y, et al. Helix B surface peptide attenuates diabetic cardiomyopathy via AMPK-dependent autophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4):665-671.
- [17] 姚贵俊.高敏C反应蛋白、心肌肌钙蛋白I、B型钠尿肽水平对急性心血管病的诊断价值[J]. *心血管康复医学杂志*, 2018, 27(2):132-135.
- [18] JIA Y, MO SJ, FENG QQ, et al. EPO-dependent activation of PI3K/Akt/FoxO3a signalling mediates neuroprotection in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(1):117-124.

Δ 基金项目:国家科技重大专项重大新药创制项目(No.2011-ZX09102-003-03);吉林省科技发展计划项目(No.20170201003YY)

* 助理研究员。研究方向:新药开发。E-mail:549669053@qq.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:制剂新技术及新药开发。E-mail:weiyuzhang2003@126.com

(收稿日期:2019-06-26 修回日期:2019-08-12)

(编辑:邹丽娟)