

## · 论著 ·

## 黄芩苷通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻阿霉素诱导的 H9c2 细胞毒性

李登科 张伟 黄从新

(武汉大学人民医院心内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430060)

**【摘要】目的** 探讨黄芩苷对阿霉素(Dox)诱导的 H9c2 细胞毒性的影响及内在机制。**方法** 采用 50  $\mu\text{mol/L}$  黄芩苷预处理 H9c2 细胞 24 h, 然后 1  $\mu\text{mol/L}$  Dox 处理 H9c2 细胞 24 h, 建立体外 Dox 心肌毒性模型。采用 CCK8 法检测细胞活力; 收集细胞上清检测各组心肌损伤标志物乳酸脱氢酶(LDH)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)和肌酸激酶同工酶(CK-MB)的水平以及氧化应激相关指标超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)的水平; 使用 DHE 试剂盒检测各组活性氧(ROS)的含量; 使用 TUNEL 染色检测各组细胞凋亡水平, RT-qPCR 和 Western blot 实验用于检测氧化应激和凋亡相关分子的表达水平。**结果** 与 Dox 组相比, 黄芩苷能提高 H9c2 细胞活力, 降低 LDH、cTnI、CK-MB 水平; DHE 染色显示黄芩苷能减少 ROS 的生成, 增加 SOD、GSH-Px 的活性, 降低 MDA 的含量; TUNEL 染色结果显示黄芩苷能减少阳性细胞数量; RT-qPCR 和 Western blot 检测显示黄芩苷能上调 Nrf2、HO-1、SOD2、Bcl-2 的表达, 降低 Cleaved-caspase 3 和 Bax 的表达。然而, Nrf2 的特异性抑制剂 ML385 可逆转黄芩苷引起的上述变化。**结论** 黄芩苷通过上调 Nrf2/HO-1 信号通路减轻氧化应激和凋亡, 减轻 Dox 诱导的 H9c2 细胞毒性。

**【关键词】** 阿霉素; H9c2 细胞; 黄芩苷; 氧化应激; 凋亡**【DOI】** 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.05.017

## Baicalin Reduces Doxorubicin-Induced H9c2 Cell Toxicity by Regulating Nrf2/HO-1 Signaling Pathway

LI Dengke, ZHANG Wei, HUANG Congxin

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute, Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the effect and underlying mechanism of baicalin on doxorubicin (Dox)-induced H9c2 cell toxicity. **Methods** H9c2 cells were pretreated with 50  $\mu\text{mol/L}$  baicalin for 24 h, followed by treatment with 1  $\mu\text{mol/L}$  Dox for 24 h to establish an invitro model of Dox-induced myocardial toxicity. Cell viability was assessed using the CCK8 assay. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), as well as oxidative stress-related indicators such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and malondialdehyde (MDA) were measured in the cell supernatant of each group. Reactive oxygen species (ROS) content was determined using the DHE assay kit. TUNEL staining was employed to assess cell apoptosis levels in each group. Additionally, RT-qPCR and Western blot experiments were conducted to measure the expression levels of oxidative stress and apoptosis-related molecules. **Results** Baicalin demonstrated the ability to enhance H9c2 cell viability and decrease LDH, cTnI, and CK-MB levels compared to the Dox group. DHE staining indicated that baicalin reduced ROS generation, increased SOD and GSH-Px activity, and decreased MDA content. TUNEL staining results revealed a reduction in the number of positive cells with baicalin treatment. RT-qPCR and Western blot analysis showed that baicalin upregulated the expression of Nrf2, HO-1, SOD2, and Bcl-2, while downregulating the expression of Cleaved-caspase 3 and Bax. However, ML385, a specific inhibitor of Nrf2, reversed the above changes induced by baicalin. **Conclusion** Baicalin alleviates oxidative stress and apoptosis by upregulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway, thereby mitigating Dox-induced H9c2 cell toxicity.

**【Keywords】** Doxorubicin; H9c2 cell; Baicalin; Oxidative stress; Apoptosis

阿霉素(doxorubicin, Dox)是一种应用广泛的化疗药物, 然而因具有严重剂量依赖性的心肌毒性, 使其

在临床应用中受到限制<sup>[1]</sup>。因此有必要寻找一种能减轻 Dox 心肌毒性的药物。Dox 心肌毒性的机制涉及多种,例如氧化应激、内质网应激、钙超载、细胞焦亡、自噬等,其中氧化应激在 Dox 心肌毒性中发挥关键作用<sup>[2]</sup>。核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是一个众所周知的抗氧化转录因子,在调节氧化应激方面起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。越来越多的研究表明 Nrf2/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 信号通路参与调节 Dox 心肌毒性的病理生理过程。研究<sup>[4-5]</sup>表明,在 Dox 引起的急性和慢性心肌毒性模型中, Nrf2 的表达水平降低。而激活 Nrf2/HO-1 信号通路可通过抑制氧化应激和炎症,从而减轻 Dox 诱导的心肌毒性<sup>[6]</sup>。黄芩苷 (Baicalin) 是一种来自黄芩根部的黄酮类物质,已被证明具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等作用<sup>[7]</sup>。近年来,有研究<sup>[8]</sup>表明,黄芩苷能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻炎症和氧化应激,从而改善脂多糖诱导的血脑屏障受损。另有研究<sup>[9]</sup>表明黄芩苷能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻缺氧诱导的 H9c2 细胞凋亡。然而,黄芩苷在 Dox 诱导的 H9c2 心肌细胞毒性中的研究少有报道。因此,本研究的目的是基于 Nrf2/HO-1 信号通路探究黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 心肌细胞毒性的保护作用及内在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 药物与抗体

黄芩苷 (货号:HY-N0197)、Dox (货号:HY-15142) 和 ML385 (货号:HY-100523) 购自 MedChemExpress 公司。抗 Nrf2 抗体 (货号:AF0639) 购自 Affinity 有限公司,抗 HO-1 抗体 (货号:GB12104-100) 购自武汉塞维尔有限公司,抗超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 2 抗体 (货号:A1340)、抗 Bax 抗体 (货号:A11931) 和抗 Bcl-2 抗体 (货号:A11931) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,抗活化型半胱氨酸蛋白酶 3 (Cleaved-caspase 3, C-caspase 3) 抗体 (货号:9664) 购自 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.2 细胞培养

H9c2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中,使用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的高糖 DMEM 培养基培养 H9c2 细胞。黄芩苷溶于磷酸盐缓冲溶液中,Dox 溶于双蒸水中,ML385 溶于 DMSO 中制成浓度分别为 50、1 和 10 mmol/L 的母液置于 -80 °C 冰箱中储存。基于文献报道及 CCK8 法结果采用 50 μmol/L 黄芩苷、1 μmol/L Dox 和 5 μmol/L ML385 进行实验。第一部分的实验分为 3 组:(1) 对照组 (Control 组):正常培

养心肌细胞;(2) 模型组 (Dox 组):用 1 μmol/L Dox 处理 24 h;(3) 治疗组 (Baicalin 组):50 μmol/L 黄芩苷预处理 24 h 后,更换培养基用 1 μmol/L Dox 和 50 μmol/L 黄芩苷共处理 24 h。第二部分的实验分为 4 组:(1) 对照组 (Control 组);(2) 模型组 (Dox 组);(3) 治疗组 (Baicalin 组);(4) 添加抑制剂组 (ML385 组):50 μmol/L 黄芩苷预处理 24 h 后,更换培养基用 1 μmol/L Dox、50 μmol/L 黄芩苷、5 μmol/L ML385 共处理 24 h。其中 Control 组、Dox 组、Baicalin 组使用含有 0.5 μL DMSO/mL 培养基作为对照。

### 1.3 CCK8 法检测细胞活力

将 100 μL 处于对数生长期的 H9c2 细胞悬浮液接种于 96 孔板中,待药物干预完成后向每孔加入 10 μL CCK8 试剂,37 °C 孵育 1.5 h,放置于酶标仪中,读取 450 nm 波长下的吸光度值,并计算出各组的细胞活力。

### 1.4 细胞相关指标的检测

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒购自南京建成有限公司,乳酸脱氢酶 (dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒购自雷杜公司,肌酸激酶同工酶 (creatine kinase isoenzyme, CK-MB) 检测试剂盒购自长春汇力公司,心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTNI) ELISA 试剂盒购自优尔生公司。收集各组细胞上清,根据说明书中的步骤进行操作。

### 1.5 DHE 染色检测细胞内活性氧水平

将 H9c2 种于细胞玻片上,待细胞密度达到 80% 左右时加药处理,根据 DHE 试剂盒说明书进行检测,在荧光显微镜下采集图像并使用 ImageJ 软件进行分析。

### 1.6 流式细胞学检测

使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡情况。简单来说,用不含 EDTA 的胰酶消化各组细胞,收集细胞沉淀,经磷酸盐缓冲溶液清洗后用含有 Annexin V-FITC 和碘化丙锭的混合体系室温避光孵育 20 min 左右,然后使用流式细胞仪上机检测。

### 1.7 TUNEL 染色检测细胞凋亡水平

将爬片浸于破膜液中孵育 5 min,磷酸盐缓冲溶液洗 3 次后向组化笔圈的范围滴加 buffer,室温孵育 10 min 后加入适量末端脱氧核苷酸转移酶和脱氧尿嘧啶核苷三磷酸,37 °C 孵育 1 h。随后用 DAPI 染液避光孵育 10 min,洗涤封片后置于荧光显微镜下采集图像并使用 ImageJ 软件分析荧光强度。

## 1.8 RT-qPCR 检测相关基因的表达水平

使用 Trizol 裂解各组细胞,将裂解液收集于 1.5 mL 离心管中,待静置 3 min 后向其中加入氯仿,适当涡旋振荡后于室温静置 5 min,然后离心取上清液置于新的离心管中,向其中加入异丙醇,使之充分混匀并静置 10 min,12 000 g/min 4 ℃ 离心 10 min 后用 75% 的无水乙醇洗涤离心得到的沉淀,待沉淀晾干后溶于 20~80  $\mu$ L 双蒸水中并测量 RNA 浓度。根据逆转录试剂盒的步骤将 RNA 逆转录为互补 DNA,将含有互补 DNA、前引物、后引物的混合体系置于聚合酶链反应扩增仪中进行扩增,使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算各目的基因的表达量。目的基因引物序列为:Nrf2 的上游引物 5'-GCCTTCCTCTGCTGCCATTAGTC-3'、Nrf2 的下游引物 5'-TGCCTTCAGTGTGCTTCTGCTTG-3';HO-1 的上游引物 5'-TGCACATCCGTGCAGAGAAT-3'、HO-1 的下游引物 5'-CTGGTTCTGCTTGTTCGC-3';SOD2 的上游引物 5'-TCCCTGACCTGCCTTACGACTATG-3';SOD2 的下游引物 5'-TCGTGTTACTTCTCCTCGGTGAC-3';Bax 的上游引物 5'-AGACACCTGAGCTGACCTTGGAG-3'、Bax 的下游引物 5'-TTCATCGCCAATTCGCCTGAGAC-3';GAPDH 的上游引物 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3'、GAPDH 的下游引物 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'。

## 1.9 Western blot 检测相关蛋白的表达水平

Western blot 检测 Nrf2、HO-1、SOD2、Bax、Bcl-2、C-caspase 3 的表达水平。将 H9c2 细胞用加有 1% 的磷酸酶抑制剂和 PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,然后进行 12 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,收集上清液。取适量蛋白原液用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,其余蛋白液加入 5X 上样缓冲液置于 100 ℃ 金属浴中变性 10 min。取 20~30  $\mu$ g 变性后的蛋白经 8%

或 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,随后转移至 NC 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 1.5 h 后转移至一抗中 4 ℃ 摇床上过夜。随后用 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。最后,将被超敏显影液浸泡过的条带在 ChemiDoc™ XRS + system 仪器下进行可视化,并使用 ImageJ 软件进行半定量分析。所有蛋白用  $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin)的表达水平进行标准化。

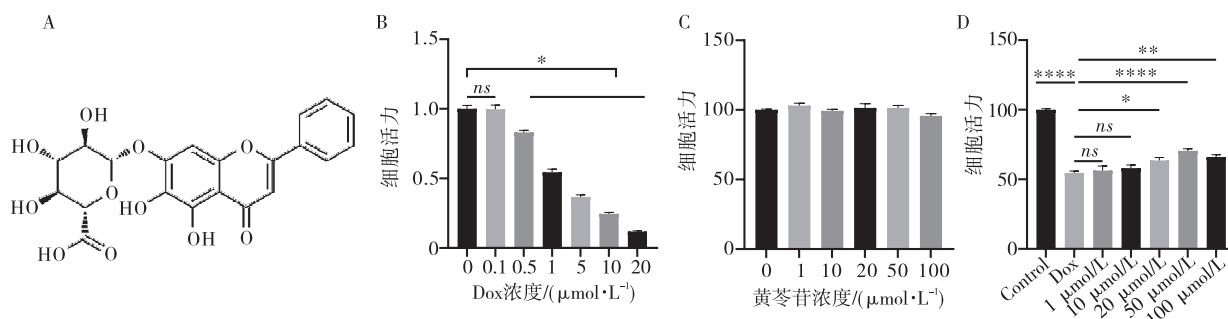
## 1.10 统计学处理

所有数据使用 GraphPad Prism 9.0.2 进行分析。定量数据表示为均数  $\pm$  标准差。多组之间的比较采用了非配对单因素方差分析, $P < 0.05$  被认为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 黄芩苷最佳浓度的确定

用含有 0、0.1、0.5、1、5、10、20  $\mu$ mol/L Dox 的培养基培养 H9c2 细胞 24 h,结果发现 0.1  $\mu$ mol/L Dox 对 H9c2 细胞的活力无显著影响,而 0.5、1、5、10、20  $\mu$ mol/L Dox 均能显著降低 H9c2 细胞的活力,基于文献报道及 CCK8 法结果,选择使用 1  $\mu$ mol/L Dox 作为诱导 H9c2 细胞毒性的造模浓度。将 H9c2 细胞置于含有 0、1、10、20、50、100  $\mu$ mol/L 黄芩苷的培养基中培养 24 h,结果发现,不同浓度的黄芩苷对 H9c2 细胞活力的影响无显著性差异。先用 0、1、10、20、50、100  $\mu$ mol/L 黄芩苷预处理 24 h,后与 1  $\mu$ mol/L Dox 共处理 24 h,结果发现,1 和 10  $\mu$ mol/L 组细胞活力与 Dox 组无统计学差异,而 20、50 和 100  $\mu$ mol/L 组细胞活力高于 Dox 组,其中 50  $\mu$ mol/L 组细胞活力最高。因此,在后续实验中,选择 50  $\mu$ mol/L 黄芩苷处理 H9c2 细胞。见图 1。



注:A,黄芩苷的化学结构式;B,不同浓度Dox对H9c2细胞活力的影响;C,不同浓度黄芩苷对H9c2细胞活力的影响;D,不同浓度黄芩苷对Dox处理的H9c2细胞活力的影响。与Dox组相比,\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ ,\*\*\*\*表示 $P < 0.0001$ ,ns表示无统计学差异。

图1 黄芩苷的化学结构式及不同浓度的黄芩苷和Dox对H9c2细胞活力的影响

## 2.2 黄芩苷对Dox诱导的H9c2心肌细胞损伤的影响

检测 Control 组、Dox 组、Baicalin 组细胞上清中

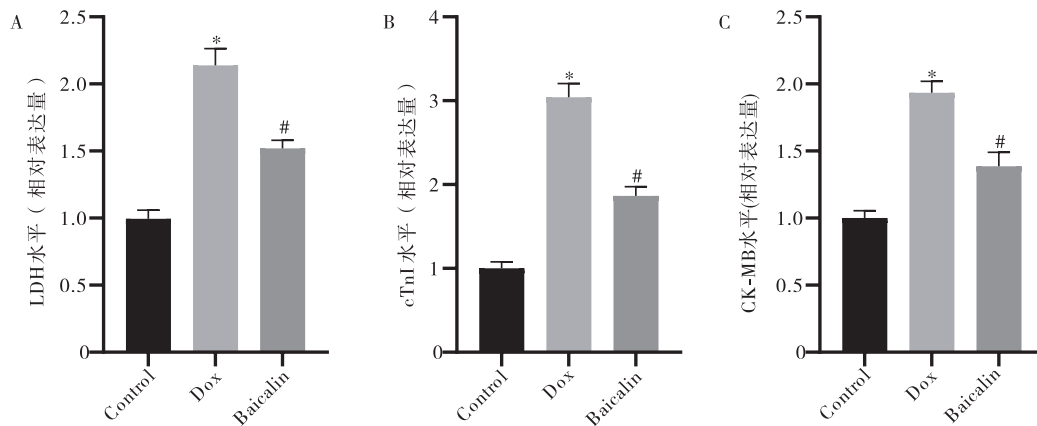
LDH、cTnI、CK-MB 的水平,结果发现,与 Control 组相比,Dox 组的 LDH、cTnI、CK-MB 水平升高( $P < 0.05$ ),而 Baicalin 组 LDH、cTnI、CK-MB 水平降低,差异有统

计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞氧化应激的影响

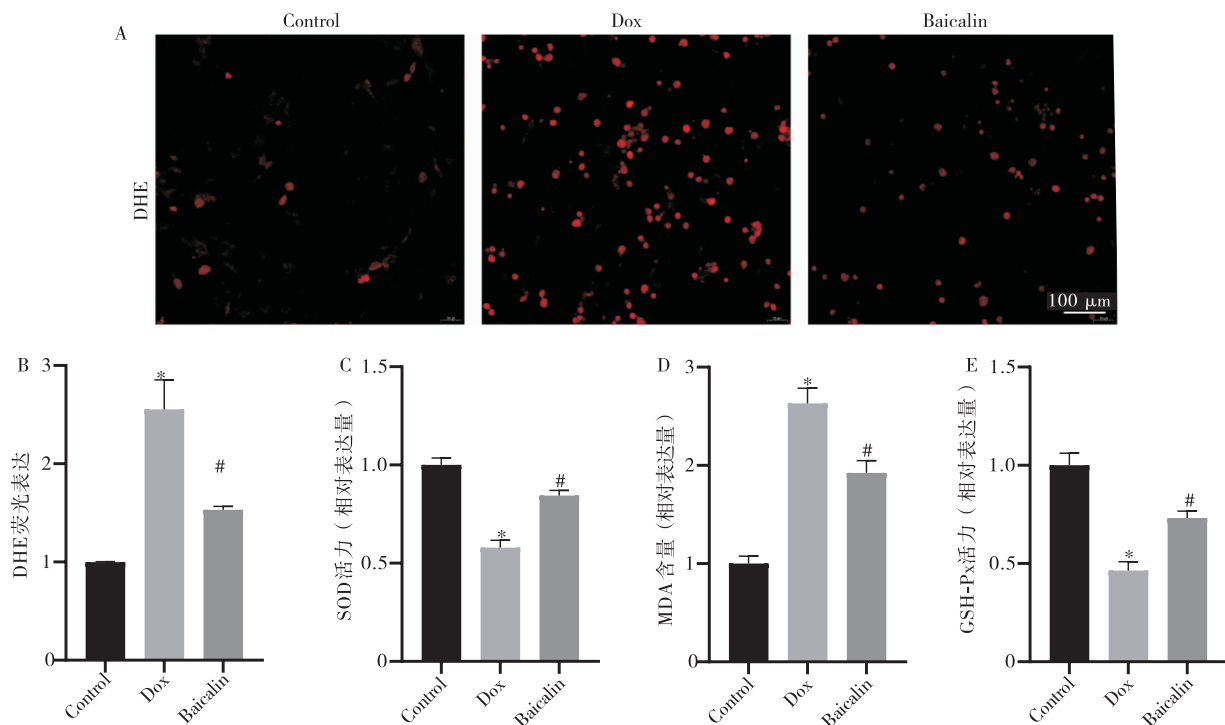
DHE 染色结果显示,Control 组有较少的活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生;而 Dox 处理 H9c2 细胞 24 h 后 ROS 水平显著升高( $P < 0.05$ );与 Dox 组

相比,Baicalin 组的 ROS 水平降低,差异有显著性( $P < 0.05$ )。与 Control 组相比,Dox 组的 SOD 活性、GSH-Px 活性降低,MDA 含量升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而黄芩苷处理后 SOD 活性、GSH-Px 活性较 Dox 组升高,MDA 含量较 Dox 组降低( $P < 0.05$ )。见图 3。



注: \* 表示与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; # 表示与 Dox 组相比,  $P < 0.05$ 。

图2 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞损伤的影响



注:A,各组的 DHE 染色代表图;B,各组 DHE 染色荧光强度的定量分析;C,各组 SOD 活力的统计分析;D,各组 MDA 含量的统计分析;E,各组 GSH-Px 活力的统计分析。\* 表示与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; # 表示与 Dox 组相比,  $P < 0.05$ 。

图3 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞氧化应激的影响

### 2.4 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞的抗氧化酶 mRNA 和蛋白表达水平的影响

RT-qPCR 结果显示,与 Control 组相比,Dox 组的 Nrf2、HO-1、SOD2 的表达降低( $P < 0.05$ ),而黄芩苷可改善 Dox 引起的这种改变。与 RT-qPCR 结果一致,Western blot 结果也显示 Dox 组的 Nrf2、HO-1、SOD2 的

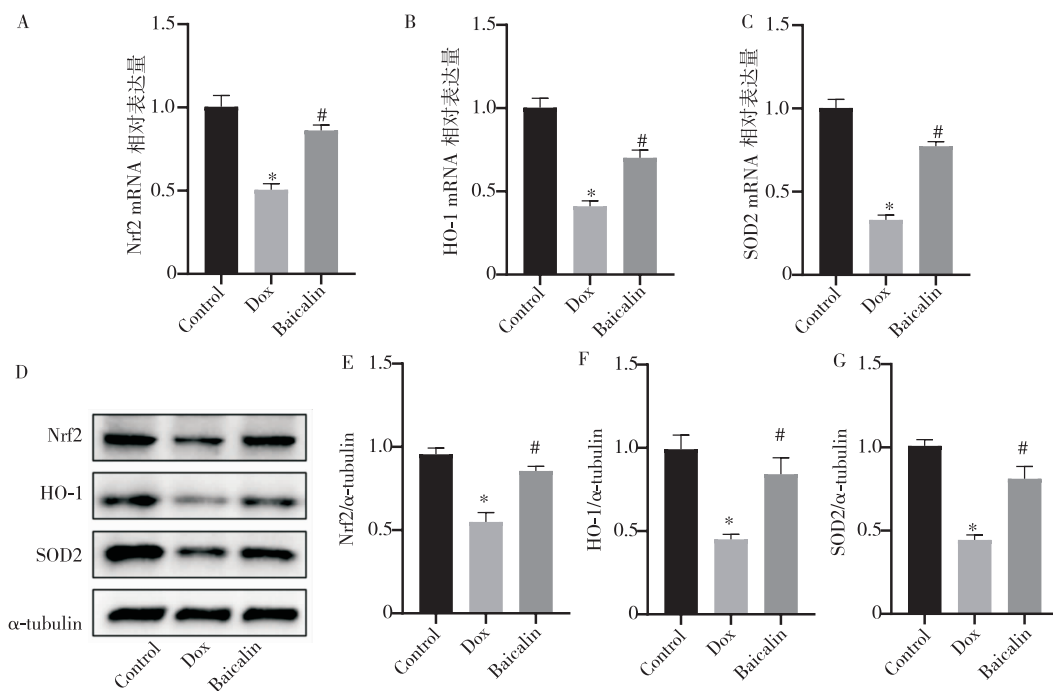
蛋白表达降低,而 Baicalin 组 Nrf2、HO-1、SOD2 的蛋白表达较 Dox 组有所升高( $P < 0.05$ )。见图 4。

### 2.5 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示,Control 组有极少的阳性细胞,Dox 组有较多阳性细胞,与 Control 组比较,这种差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。经黄芩苷治疗后

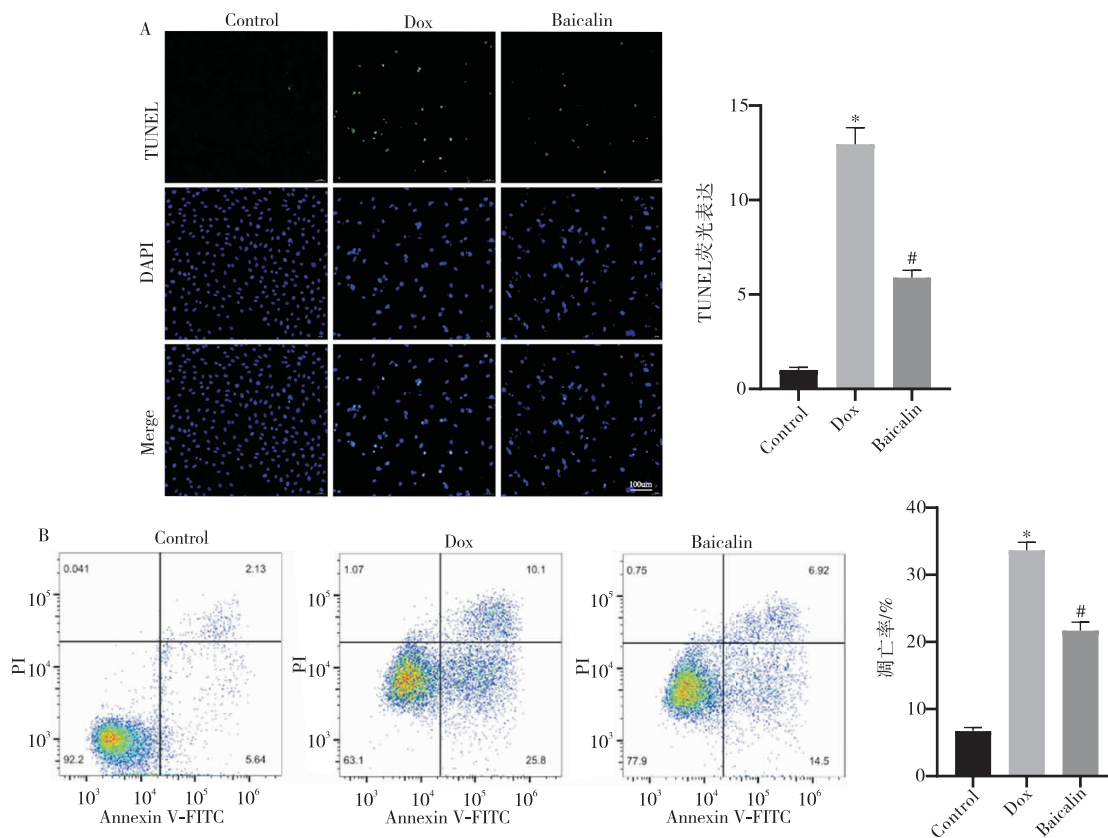
TUNEL 阳性细胞显著减少 ( $P < 0.05$ )。流式细胞学检测也显示, Control 组有较少的凋亡细胞, 而 Dox 处

理后凋亡细胞显著增加, 但黄芩苷可部分减少 Dox 引起的凋亡。见图 5。



注: \* 表示与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; # 表示与 Dox 组相比,  $P < 0.05$ 。

图 4 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞的抗氧化酶 mRNA 和蛋白表达水平的影响



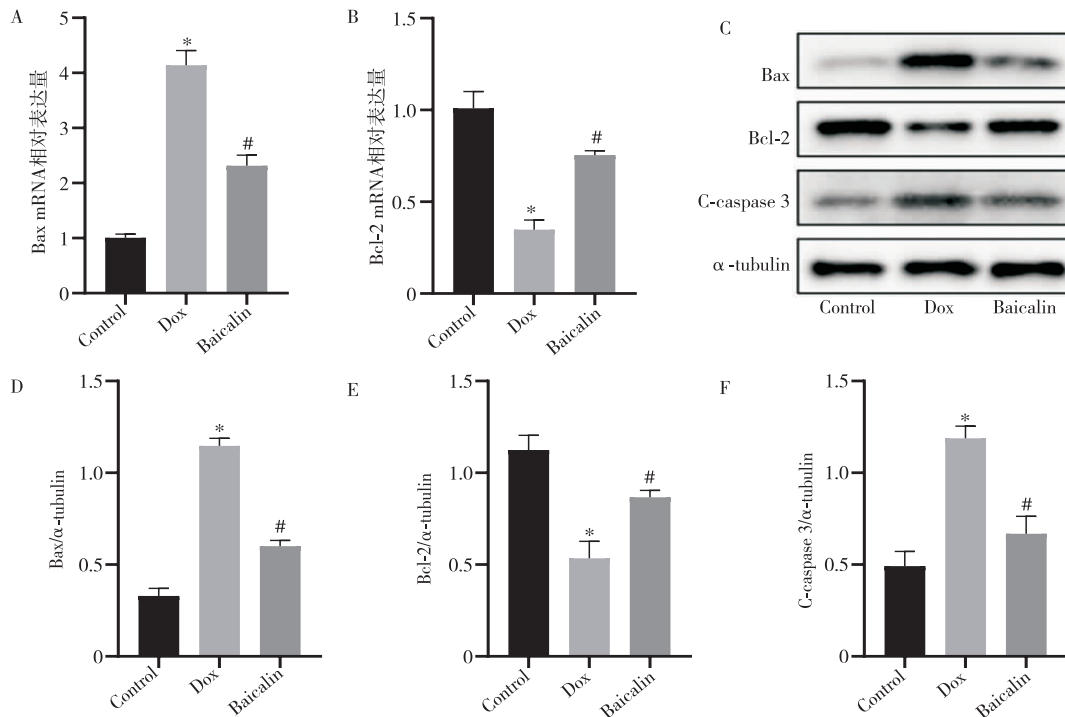
注: A, TUNEL 染色检测的各组细胞凋亡情况; B, 流式细胞术检测的各组细胞凋亡情况。\* 表示与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; # 表示与 Dox 组相比,  $P < 0.05$ ; Merge, 合并。

图 5 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响

## 2.6 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞凋亡相关 mRNA 和蛋白表达水平的影响

RT-qPCR 结果显示,与 Control 组相比,Dox 组的 Bax 的表达水平升高,Bcl-2 的表达水平降低( $P < 0.05$ ),而黄芩苷可逆转 Dox 引起的这种改变。与

RT-qPCR 结果一致,Western blot 结果也显示 Dox 组的 Bax、C-caspase 3 的表达较 Control 组升高,Bcl-2 的表达较 Control 组降低( $P < 0.05$ ),而与 Dox 组相比,Baicalin 组 Bax、C-caspase 3 的蛋白表达有所降低,Bcl-2 的表达显著升高( $P < 0.05$ )。见图 6。



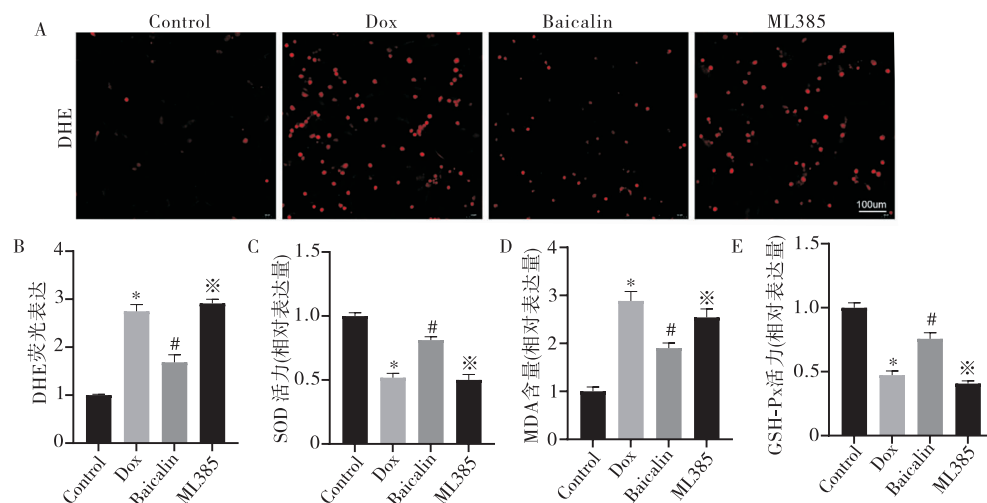
注: \*表示与 Control 组相比, $P < 0.05$ ; #表示与 Dox 组相比, $P < 0.05$ 。

图 6 黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞凋亡相关 mRNA 和蛋白表达水平的影响

## 2.7 ML385 消除了黄芩苷的抗氧化应激作用

为进一步验证黄芩苷是否是通过上调 Nrf2/HO-1 信号通路发挥保护作用,使用了 Nrf2 的特异性阻断剂 ML385 来进行下一步实验,结果发现,ML385 的加入使得

黄芩苷减少 ROS 生成的作用丧失,与 Baicalin 组相比,ML385 组 ROS 水平增加( $P < 0.05$ )。此外,与 Baicalin 组相比,ML385 组的 SOD 活性、GSH-Px 活性降低,MDA 含量升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 7。



注:A,各组的 DHE 染色代表图;B,各组 DHE 染色荧光强度的定量分析;C,各组 SOD 活力的统计分析;D,各组 MDA 含量的统计分析;E,各组 GSH-Px 活力的统计分析。\*表示与 Control 组相比, $P < 0.05$ ;#表示与 Dox 组相比, $P < 0.05$ ;\*\*表示与 Baicalin 组相比, $P < 0.05$ 。

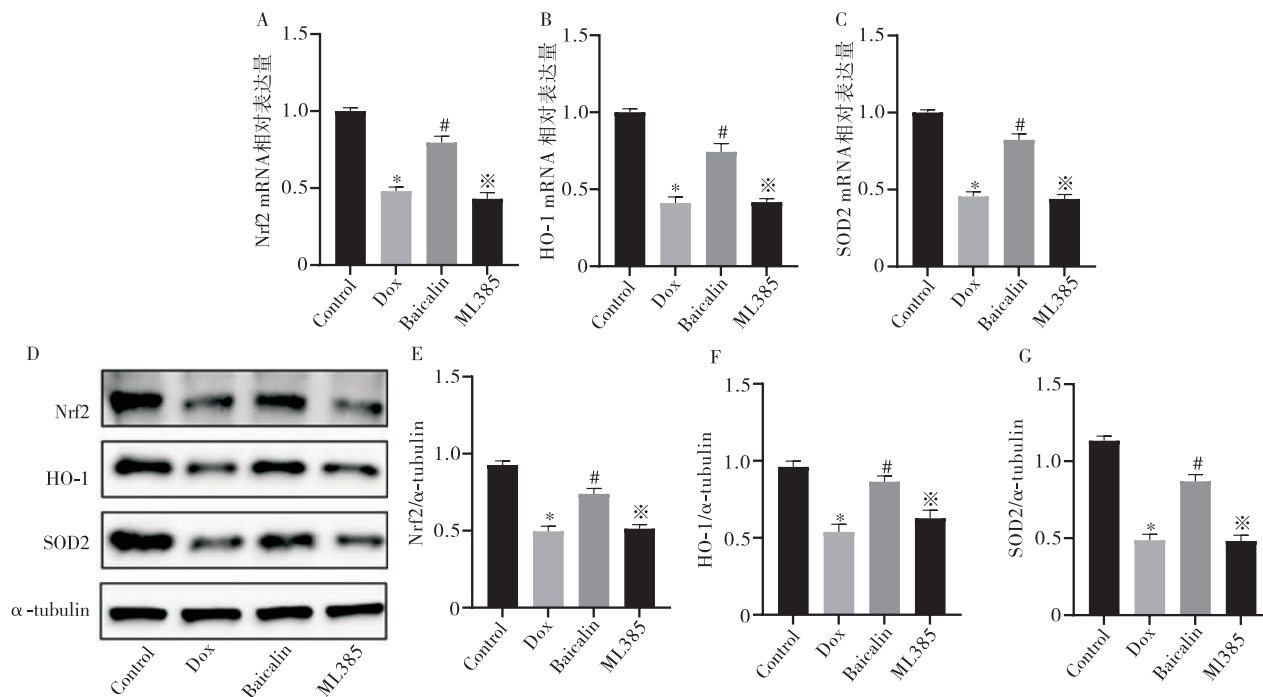
图 7 ML385 消除了黄芩苷的抗氧化应激作用



## 2.8 ML385 消除了黄芩苷上调 Nrf2/HO-1 信号通路的作用

RT-qPCR 结果显示,ML385 可逆转黄芩苷诱导的 Nrf2、HO-1、SOD2 基因的表达( $P < 0.05$ )。Western blot

结果也进一步证实,与 Baicalin 组相比,ML385 组 Nrf2、HO-1、SOD2 表达降低,提示黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞的抗氧化作用是通过上调 Nrf2/HO-1 信号通路来实现的( $P < 0.05$ )。见图 8。



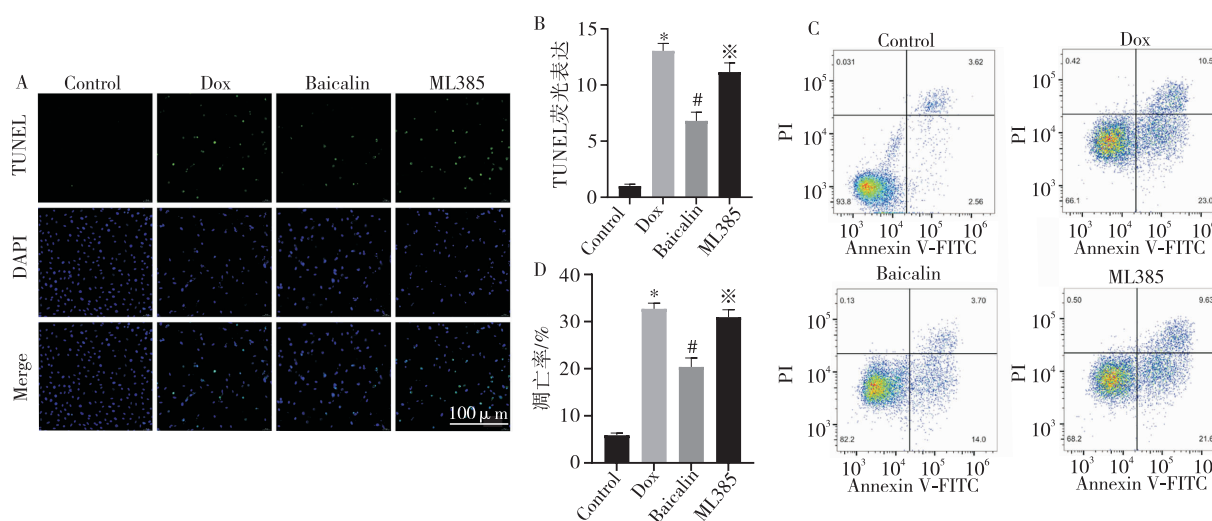
注: \*表示与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; #表示与 Dox 组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*表示与 Baicalin 组相比,  $P < 0.05$ 。

图 8 ML385 消除了黄芩苷诱导的 Nrf2/HO-1 信号通路上调

## 2.9 ML385 消除了黄芩苷对 Dox 诱导的凋亡的保护作用

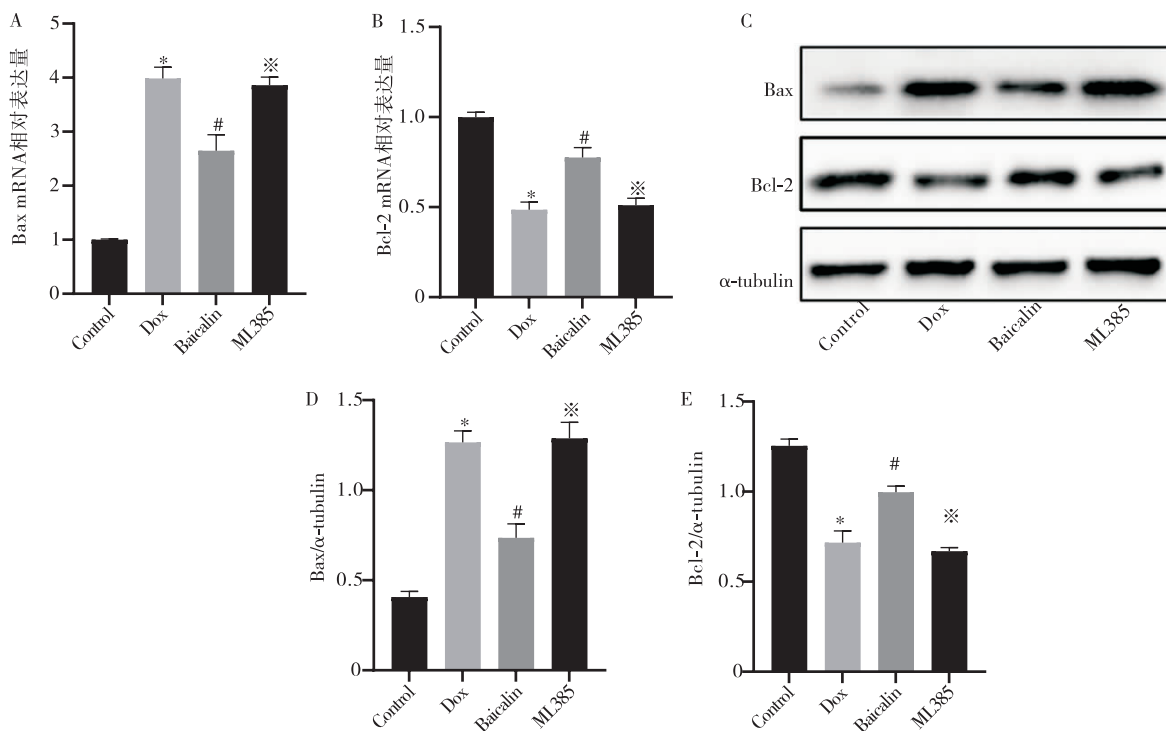
TUNEL 染色和流式细胞学检测显示,加入 ML385 后黄芩苷对 Dox 诱导凋亡的保护作用丧失。RT-qPCR

和 Western blot 结果也提示,ML385 通过上调 Bax、下调 Bcl-2 的表达,减弱黄芩苷对 Dox 诱导的凋亡保护作用。见图 9 和图 10。



注: A 和 B, TUNEL 染色检测的各细胞凋亡情况; C 和 D, 流式细胞术检测的各细胞凋亡情况。\*表示与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; #表示与 Dox 组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*表示与 Baicalin 组相比,  $P < 0.05$ ; Merge, 合并。

图 9 ML385 消除了黄芩苷对 Dox 诱导凋亡的保护作用



注: \* 表示与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; # 表示与 Dox 组相比,  $P < 0.05$ ; ※ 表示与 Baicalin 组相比,  $P < 0.05$ 。

图 10 ML385 消除了黄芩苷的抗凋亡作用

### 3 讨论

本研究采用 Dox 处理 H9c2 细胞以模拟 Dox 心肌毒性,结果显示,Dox 作用 24 h 后 H9c2 细胞活力明显下降,心肌细胞损伤标志物 LDH、CK-MB、cTnI 水平升高,氧化应激和凋亡水平升高,而黄芩苷可改善 Dox 导致的细胞活力下降及心肌损伤标志物的升高,并降低氧化应激水平和凋亡水平,具体表现为黄芩苷通过上调 Nrf2/HO-1 信号通路,增加下游抗氧化酶 SOD、GSH-Px 的表达,减少 ROS 的产生,并通过减少 C-caspase 3、Bax 的表达,上调 Bcl-2 的表达,减少凋亡的发生,最终保护 H9c2 细胞免受 Dox 的损伤。

随着癌症诊疗水平的提升,癌症患者的生存率已大幅提升,然而作为最经典的抗癌化疗药物,Dox 引起的心脏毒性已严重影响癌症患者的预后<sup>[10]</sup>。先前研究<sup>[11]</sup>显示,Dox 对线粒体内膜的心磷脂有较高的亲和力,因此在治疗癌症的同时更容易在富含线粒体的心肌细胞中蓄积。Dox 属于蒽环类药物,能被 NADH 脱氢酶还原,并形成半醌自由基,而这种半醌自由基与游离氧反应,产生大量超氧自由基,使得细胞内氧化系统和抗氧化系统失衡<sup>[12]</sup>。此外,由于心肌细胞高强度的新陈代谢反应和相对较差的抗氧化防御能力,使得心脏相对于其他脏器更容易受到 Dox 产生的自由基的损伤。Nrf2 是体内调节抗氧化系统的关键分子,发生氧化应激反应时,Nrf2 从细胞质转移至细胞核,与抗氧化反应元件结合,激活下游 HO-1、醌氧化还原酶

1、GSH-Px 等抗氧化酶系统的表达,从而提高机体对氧化应激的防御能力<sup>[13]</sup>。Jiang 等<sup>[14]</sup>表明,Dox 诱导的小鼠心肌毒性模型中,Nrf2 的表达下调,体内 ROS 的产生增加。与此一致的是,在实验中也观察到 Dox 处理后,ROS 含量增加,SOD、GSH-Px 的水平降低,RT-qPCR 实验和 Western blot 实验也证实了 Nrf2 在转录水平和蛋白水平的下调,这表明 Dox 诱导了显著的氧化应激。而黄芩苷干预后,Nrf2 的 mRNA 及蛋白水平得到显著的恢复,并且 DHE 染色结果及 SOD、GSH-Px、MDA 的变化也提示氧化应激水平较 Dox 组明显降低。这提示了黄芩苷减轻 Dox 诱导的 H9c2 细胞损伤的机制部分与其抑制氧化应激的作用有关。为进一步验证黄芩苷对 Dox 诱导的 H9c2 细胞损伤的保护作用是否是通过上调 Nrf2/HO-1 信号通路实现,使用了 Nrf2 的特异性抑制剂 ML385 来进行下一步实验,结果发现,ML385 可增加 ROS 的产生,降低 Nrf2、HO-1、SOD2 的表达,抑制黄芩苷的抗氧化应激作用。

研究<sup>[15]</sup>显示,凋亡也参与 Dox 诱导的心肌细胞毒性的病理生理过程。Dox 发挥抗癌作用的重要机制之一是 Dox 可与拓扑异构酶 II (topoisomerase II, Top II) 结合,Top II 有两种形式:Top II  $\alpha$  和 Top II  $\beta$ ,其中 Top II  $\alpha$  在肿瘤细胞中高表达,而 Top II  $\beta$  在心肌细胞中高表达。Dox 能与心肌细胞中的 Top II  $\beta$  及 DNA 形成复合物,这种三元复合物可诱导心肌细胞 DNA 双链发生断裂,导致细胞凋亡<sup>[16]</sup>。另一方面,Dox 产生的大量



ROS 引起线粒体功能障碍、线粒体膜电位转换孔渗透性改变,进而导致细胞色素 C 的释放。细胞色素 C 能激活半胱天冬酶的级联反应,导致细胞凋亡。有研究<sup>[17]</sup>报道,黄芩苷能通过抑制 C-caspase 3 的表达减少地塞米松诱导的骨髓间充质干细胞凋亡。更重要的是,黄芩苷对过氧化氢或缺氧诱导的 H9c2 细胞凋亡也有一定程度的保护作用<sup>[9,18]</sup>。在本研究中,观察到 Dox 组的凋亡细胞数量增加,C-caspase 3 和 Bax 表达上调,而 Bcl-2 的表达下降,这验证了 Dox 的致凋亡作用。而黄芩苷的加入能显著减少凋亡的发生,部分阻止了 Dox 引起的 C-caspase 3 和 Bax 的表达上调以及 Bcl-2 的表达下调。但 ML385 的存在使得黄芩苷的抗凋亡作用被抑制。总之,本研究表明黄芩苷可通过抑制促凋亡蛋白的表达以及增加抗凋亡蛋白的表达,减轻 Dox 诱导的 H9c2 细胞的凋亡。

综上所述,本研究结果提示,黄芩苷通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,抑制 Dox 引起的氧化应激和凋亡,从而降低 Dox 对 H9c2 细胞的损伤作用。本研究为蒽环类药物心脏毒性的治疗提供了一种潜在的治疗措施。然而研究结果仅在体外水平得到证实,接下来仍需进行进一步的体内实验。

#### 参 考 文 献

- [1] Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, et al. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity[J]. *Cancer*, 1973, 32(2):302-314.
- [2] Christidi E, Brunham LR. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):339.
- [3] Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53:401-426.
- [4] Yuan Hsieh DJ, Islam MN, Kuo WW, et al. A combination of isoliquiritigenin with *Artemisia argyi* and *Ohwia caudata* water extracts attenuates oxidative stress, inflammation, and apoptosis by modulating Nrf2/Ho-1 signaling pathways in SD rats with doxorubicin-induced acute cardiotoxicity[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(12):3026-3042.
- [5] Hu S, Liu B, Yang M, et al. Carnosic acid protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity through enhancing the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Food Funct*, 2023, 14(8):3849-3862.
- [6] Fang G, Li X, Yang F, et al. Galangin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase 1 signaling pathway to suppress oxidative stress and inflammation[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(12):5854-5870.
- [7] Wen Y, Wang Y, Zhao C, et al. The pharmacological efficacy of baicalin in inflammatory diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11):9317.
- [8] Wang X, Yu JY, Sun Y, et al. Baicalin protects LPS-induced blood-brain barrier damage and activates Nrf2-mediated antioxidant stress pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96:107725.
- [9] Yu H, Chen B, Ren Q. Baicalin relieves hypoxia-aroused H9c2 cell apoptosis by activating Nrf2/HO-1-mediated HIF1 $\alpha$ /BNIP3 pathway[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1):3657-3663.
- [10] Curigliano G, Cardinale D, Dent S, et al. Cardiotoxicity of anticancer treatments: epidemiology, detection, and management[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4):309-325.
- [11] Aryal B, Rao VA. Deficiency in cardiolipin reduces doxorubicin-induced oxidative stress and mitochondrial damage in human B-lymphocytes[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0158376.
- [12] Borišev I, Mrđanović J, Petrović D, et al. Nanoformulations of doxorubicin: how far have we come and where do we go from here? [J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(33):332002.
- [13] Liu C, Xu X, He X, et al. Activation of the Nrf2/HO-1 signalling axis can alleviate metabolic syndrome in cardiovascular disease[J]. *Ann Med*, 2023, 55(2):2284890.
- [14] Jiang Q, Chen X, Tian X, et al. Tanshinone I inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating Nrf2 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106:154439.
- [15] Kitakata H, Endo J, Ikura H, et al. Therapeutic targets for DOX-induced cardiomyopathy: role of apoptosis vs. ferroptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1414.
- [16] Vejpongsa P, Yeh ET. Topoisomerase 2 $\beta$ : a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 95(1):45-52.
- [17] Jia B, Jiang Y, Yao Y, et al. Baicalin attenuates dexamethasone-induced apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells by activating the hedgehog signaling pathway[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2023, 136(15):1839-1847.
- [18] Qiu L, Chen J, Lin J, et al. Baicalin alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury of H9c2 cardiomyocytes through suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):9251-9255.

收稿日期:2023-12-14