

小白菊内酯对多柔比星诱导的 H9c2 心肌细胞损伤 保护作用的相关机制研究

郭红豆^{1,2} 蒋凌¹ 罗顺祥¹ 陈甘潇¹ 林佳仪¹ 林奕帆¹ 徐尚华¹

(1. 福建医科大学附属南平第一医院心血管内科, 福建 南平 353000; 2. 武威市人民医院心血管内科, 甘肃 武威 733000)

【摘要】目的 探索小白菊内酯(PTL)对多柔比星(DOX)诱导的心肌细胞损伤的保护作用机制。**方法** 培养 H9c2 大鼠心肌细胞,应用 CCK-8 法确定 DOX 和 PTL 的最佳作用浓度。将 H9c2 大鼠心肌细胞分为对照组、PTL 组、DOX 组及 DOX + PTL 组进行相应处理,DCFH-DA 染色流式细胞仪检测细胞内活性氧水平,Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞仪检测细胞内凋亡比例,蛋白质印迹法检测核转录因子红系 2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 x 蛋白(Bax)和 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白的表达。**结果** 检测 0.5 ~ 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度的 DOX 处理大鼠 H9c2 心肌细胞 24 h 后,细胞活力下降,并且呈现剂量依赖性($P < 0.05$),其中 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 可引起 H9c2 心肌细胞活力降至 $53.0\% \pm 0.4\%$ 。5.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL 预处理 H9c2 心肌细胞 3 h 后可显著增加 DOX 引起的细胞活力($P < 0.05$)。与对照组相比,在 DOX 组的 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 及 Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax 表达显著增加($P < 0.05$),氧化应激水平、细胞凋亡比例增多($P < 0.05$);与 DOX 组相比,PTL 预处理显著增加了 DOX 处理的 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1、Bcl-2 蛋白表达,降低 Bax 表达($P < 0.05$),并降低氧化应激水平、细胞凋亡率($P < 0.05$)。**结论** PTL 缓解 DOX 引起的 H9c2 心肌细胞损伤,可能与激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制 Bcl-2/Bax 通路有关。

【关键词】 小白菊内酯;多柔比星;H9c2 心肌细胞;Nrf2/HO-1 信号通路;细胞凋亡

【DOI】10. 16806/j. cnki. issn. 1004-3934. 2024. 07. 019

Study on the Protective Effects and Mechanisms of Parthenolide Against Doxorubicin-Induced H9c2 Cardiomyocyte Injury

GUO Hongdou^{1,2}, JIANG Ling¹, LUO Shunxiang¹, CHEN Ganxiao¹, LIN Jiayi¹, LIN Yifan¹, XU Shanghua¹

(1. Department of Cardiology, Affiliated Nanping First Hospital, Fujian Medical University, Nanping 353000, Fujian, China; 2. Department of Cardiology, Wuwei People's Hospital, Wuwei 733000, Gansu, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective mechanism of parthenolide (PTL) against doxorubicin (DOX)-induced cardiomyocyte injury. **Methods** Rat H9c2 cardiomyocytes were cultured, and then the optimal concentration of DOX and PTL was determined by CCK-8 assay. Rat H9c2 cardiomyocytes were randomly divided into control group, PTL group, DOX group and DOX + PTL group. Intracellular reactive oxygen species levels were detected with DCFH-DA using a flow cytometer and the apoptotic cells were measured with Annexin V-FITC/PI staining kit by flow cytometer. Western blot was employed to detect the expressions of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), B-cell lymphoma-2-associated X protein (Bax) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2). **Results** The cell viability of H9c2 cardiomyocytes exposed to 0.5 ~ 5.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX for 24 h decreased in a dose-dependent effect ($P < 0.05$), and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX could reduce the viability of H9c2 cardiomyocytes to $53.0\% \pm 0.4\%$. The cell viability of H9c2 cardiomyocytes pretreated with 5.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL for 3 h was significantly increased after exposure to DOX ($P < 0.05$). The protein expression levels of Nrf2, HO-1 and Bcl-2 in DOX group were significantly decreased comparing with the control group, while the proapoptotic protein Bax was significantly increased ($P < 0.05$), and the level of oxidative stress and the proportion of apoptosis were increased ($P < 0.05$). Contrasted with DOX group, pretreatment with PTL could significantly increase the expression levels of Nrf2, HO-1 and Bcl-2 protein, and reduce the expression level of Bax ($P < 0.05$), and decrease the degree of oxidative stress and apoptosis rate of DOX-induced H9c2 cardiomyocytes ($P < 0.05$). **Conclusion** PTL alleviates DOX-induced injury of H9c2 cardiomyocytes which was associated with activation of Nrf2/HO-1 pathway and inhibition of Bcl-2/Bax signaling pathway.

【Keywords】 Parthenolide; Doxorubicin; H9c2 cardiomyocytes; Nrf2/HO-1 pathway; Apoptosis

基金项目:福建省自然科学基金(2019J01610);福建省科技创新联合基金项目(2021Y9035)

通信作者:徐尚华, E-mail:13365998866@163.com

多柔比星 (doxorubicin, DOX) 作为一种常用的蒽环类化疗药物,被广泛用于临床治疗多种恶性肿瘤,包括乳腺癌、白血病、软组织肉瘤和淋巴瘤等。然而,DOX 的应用受到剂量依赖性心肌毒性的限制^[1]。最近的研究表明,氧化应激在 DOX 引起的心肌细胞损伤中扮演了关键角色。此外,DOX 导致过多的活性氧累积还会促使心肌细胞凋亡,最终演变成进行性心肌病和心力衰竭^[2]。小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 是从中药艾菊中提取的倍半萜烯内酯类自然产物。PTL 具有多种药理作用,包括抗炎、抗氧化、促使细胞凋亡及抑制肿瘤生长等^[3]。研究^[4]已证实,PTL 通过减轻心血管损伤,延缓动脉粥样硬化的进展,对心肌缺血具有治疗作用。然而,尚未有相关研究证明 PTL 是否具备减轻 DOX 引起的心肌细胞损伤的潜力。此外,研究^[5]表明,PTL 可通过激活核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、醌氧化还原酶 1、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达,对抗庆大霉素引起的大鼠肾毒性。因此,本研究旨在使用 DOX 诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞模型进行体外实验,以研究 PTL 对 DOX 引起的 H9c2 心肌细胞损伤的影响,并探索其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

H9c2 大鼠心肌细胞系于中国科学院细胞库购得。

1.2 主要试剂

主要试剂有 DOX、PTL (MCE, 美国), 抗 Nrf2、抗 HO-1、抗 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2-associated X protein, Bax)、抗 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (Proteintech, 中国), 抗 β -actin 抗体 (Cell Signaling, 美国), CCK-8 细胞活力检测试剂盒 (Dojindo, 日本), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、DCFH-DA 活性氧检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 中国), DMEM 高糖培养基、5% 胰蛋白酶 (Gibco, 美国), 胎牛血清 (PAN Seratech, 美国), 以及青霉素和链霉素双抗溶液 (Thermo ScientificTM, 美国)。

1.3 主要仪器

主要仪器有 Synergy HT 型多功能酶标仪 (BioTek, 美国)、PowerPac Basic 基础电泳仪 (BioRad, 美国) 和 FACSCantoTM II 型流式细胞仪 (BD, 美国)。

1.4 主要方法

1.4.1 H9c2 心肌细胞的培养

使用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素双抗溶液的高糖 DMEM 培养基培养 H9c2 大鼠心肌细胞, 在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下常规培养。当细胞密度为 80% 左右时, 可进行细胞的传代处理。传代按 1 : 3

的比例进行, 也可根据实验的具体需求将细胞以适当的密度接种到不同培养皿或培养板中。

1.4.2 DOX 造模浓度的筛选

将处于对数生长期的 H9c2 心肌细胞接种到 96 孔板中, 每孔约有 7 000 个细胞。细胞在培养 24 h 后贴壁完全, 分别予以 0、0.5、1.0、2.0 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理 24 h。随后, 每孔加入 100 μL CCK-8 工作液 (包括 90 μL DMEM 培养基 + 10 μL CCK-8 母液)。同时设置空白组, 即只加入培养基而不加入细胞。所有操作需在避光条件下进行, 孵育 2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 的波长下测定每孔溶液的吸光度 (A), 并计算细胞活力值。DOX 的用药浓度将选取细胞活力值接近 50% 的浓度用于后续实验中 DOX 损伤模型的制备。细胞活力 (%) = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.4.3 PTL 浓度的筛选

将处于对数生长期的 H9c2 心肌细胞接种到 96 孔板中, 每孔约有 7 000 个细胞。细胞在培养 24 h 后贴壁完全, 分别予以含有 0、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 的培养基处理 H9c2 心肌细胞 24 h。使用 CCK-8 法检测细胞活力, 以确定 PTL 干预 H9c2 心肌细胞的上限浓度。

1.4.4 PTL 对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞的作用

将处于对数生长期的 H9c2 心肌细胞接种到 96 孔板中, 每孔约有 7 000 个细胞。细胞在培养 24 h 后贴壁完全, 分别予以 1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL 预处理 H9c2 心肌细胞 3 h。同时设立空白组和模型组, 其中空白组只添加培养基, 模型组加入培养基 + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX。使用 CCK-8 法检测细胞活力确定最佳 PTL 给药浓度。

1.4.5 实验分组

基于 CCK-8 细胞活力的测定结果, 笔者将实验分为以下组别: 对照组、PTL 处理组 (5 $\mu\text{mol/L}$)、DOX 处理组 (1.0 $\mu\text{mol/L}$)、DOX + PTL 共处理组 (1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX + 5.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL)。其中共处理组在 PTL 预处理 3 h 后, 加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX, 共同干预 H9c2 心肌细胞 24 h; 空白对照组只加入完全培养基; 其余两组按药物浓度分别加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX、5.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL 干预 H9c2 心肌细胞 24 h。每组实验重复 3 次。

1.4.6 细胞凋亡率的测定

使用 Annexin V-FITC 和 PI 染色来检测 H9c2 心肌细胞的早期和晚期凋亡。不同组别的 H9c2 心肌细胞用 0.25% 无 EDTA 胰酶进行消化, 然后将细胞收集于微量离心管中, 用 PBS 冲洗 2 次后重悬细胞。按照说明书的操作方法: 每组取 10 万重悬细胞, 进行离心 (1 000 g, 5 min), 弃去上清液后加入 195 μL Annexin

V-FITC 结合液重悬细胞。接着分别添加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI, 轻轻混匀, 并转移至流式管中。在避光条件下室温孵育 10 min 后(孵育过程中通过重悬细胞 3 次以提高染色效果), 立即用流式细胞仪进行检测。

1.4.7 活性氧生成的检测

笔者使用 DCFH-DA 探针来检测细胞内活性氧的生成。不同组别的 H9c2 心肌细胞在 1 mL 稀释后的 DCFH-DA 中重悬, 使细胞浓度为 100 万/mL, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱内孵育 20 min, 孵育过程中每 5 min 轻轻颠倒混匀, 以确保探针和细胞充分接触。然后, 用不含血清的细胞培养液, 对细胞进行 3 次洗涤, 以确保充分清除未进入细胞内的 DCFH-DA, 使用流式细胞仪检测活性氧的生成。

1.4.8 蛋白质印迹法检测相关蛋白的表达水平

各组细胞用 PBS 漂洗 2 次, 加入含有 RIPA 裂解液在冰上进行裂解 30 min, 然后进行总蛋白提取, 并使用 BCA 法完成蛋白浓度测定, 加入 5 \times loading buffer 制样。每孔上 30 μg 的蛋白, 依据不同目的蛋白的大小, 分别配置 8% 或 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离。用 PVDF 转印膜将蛋白进行转移, 并在室温下封闭 1 h, 将 PVDF 膜用洗膜液清洗后, 分别加入 Nrf2、HO-1、Bax、Bcl-2、 β -actin 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。隔日用洗膜液清洗孵育抗体的 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min, 加入相应的二抗(稀释比例为 1:2 000), 室温孵育 1 h, 然后使用 ECL 化学发光液在多功能成像系统下曝光显影, 应用 Image J 软件分析条带的灰度。

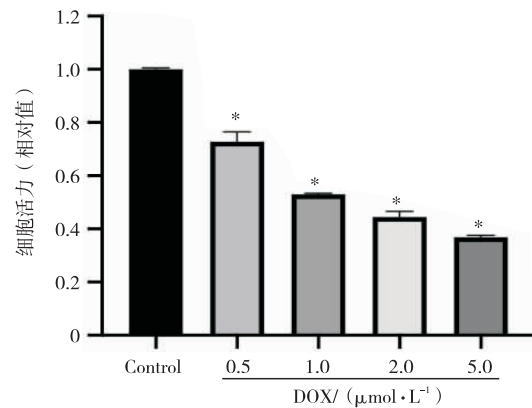
1.5 统计处理方法

使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析, 以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示计量资料。应用单因素方差分析对多组之间的差异显著性进行检验, 不同两组之间的比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DOX 造模浓度的确定

与对照组相比, 加入不同浓度梯度的 DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用于大鼠 H9c2 心肌细胞, 培养 24 h 后, DOX 均可降低 H9c2 心肌细胞的活力, 而且这种效应呈现出剂量依赖性 ($P < 0.05$), 见图 1。因此, 本研究后续的体外实验中, 选择可使 H9c2 心肌细胞活力降至接近 50% 时所对应的 DOX 的浓度, 即应用 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 对细胞进行干预, 干预时间为 24 h, 以建立 DOX 引起的心肌细胞损伤模型。

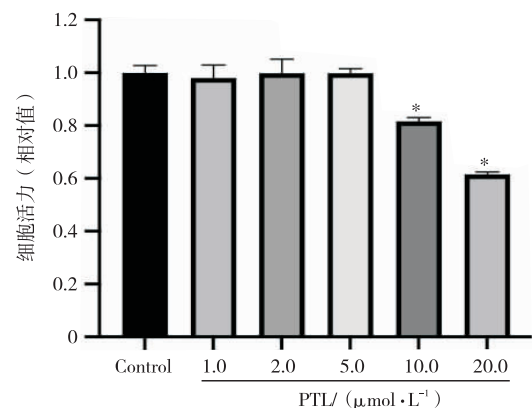


注: Control 表示对照组; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度 DOX 对 H9c2 心肌细胞活力的影响

2.2 PTL 浓度的确定

与对照组相比, 不同浓度的 PTL (1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理对细胞活力均没有显著影响 ($P > 0.05$), 见图 2。然而, 当 PTL 浓度增加至 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 明显降低了 H9c2 心肌细胞的活力 ($P < 0.05$)。因此, 在后续实验中选择 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 PTL 浓度, 确定为 PTL 的干预浓度上限。



注: Control 表示对照组; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$ 。

图 2 不同浓度 PTL 对 H9c2 心肌细胞活力的影响

2.3 PTL 对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的作用

经过 DOX 处理 24 h 后, 细胞活力明显降低 ($P < 0.05$), 而经过 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL 预处理后, 细胞活力均得到显著提高 ($P < 0.05$)。在这 4 个剂量组中, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL 表现出最显著的保护效果, 见图 3。因此, 选择 5.0 $\mu\text{mol/L}$ PTL 进行预处理, 为期 3 h, 然后加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 共同干预 H9c2 心肌细胞, 持续培养 24 h。

2.4 PTL 对 Nrf2/HO-1 信号通路蛋白表达及活性氧生成的影响

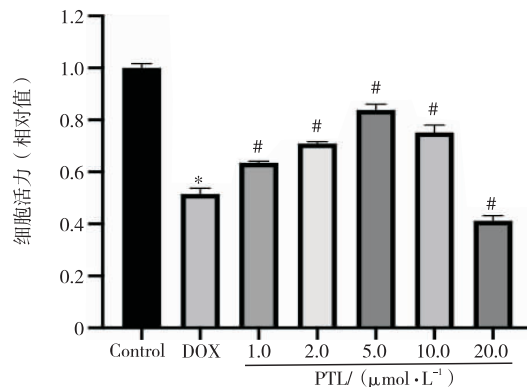
根据 DCFH-DA 染色的流式细胞仪检测结果显示, 经过 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 干预的 H9c2 心肌细胞, 与对照组相比, 细胞内活性氧水平显著增高 ($P < 0.05$)。然

而,与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理组相比,DOX + PTL 共处理组的细胞活性氧水平显著下调($P < 0.05$)。见图 4。

蛋白质印迹法实验结果提示,经过 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 刺激后,H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。然而,经过 PTL 预处理后,Nrf2、HO-1 的蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。见图 5。

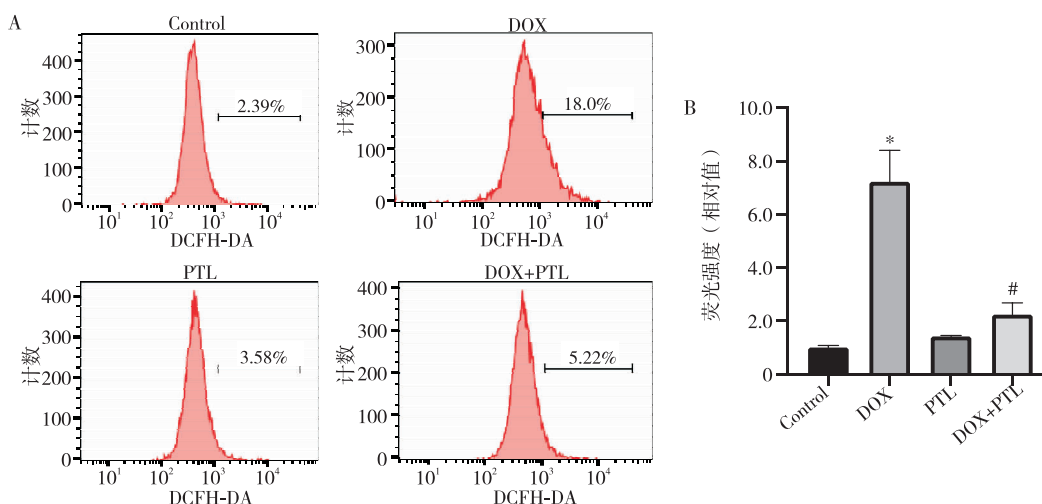
2.5 PTL 对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

根据 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡的流式细胞仪结果分析,与对照组相比,经过 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理 24 h 后,H9c2 心肌细胞的凋亡比例显著增加($P < 0.05$)。然而,与 DOX 处理组相比,DOX + PTL 共处理组的细胞凋亡水平显著降低($P < 0.05$)。见图 6。



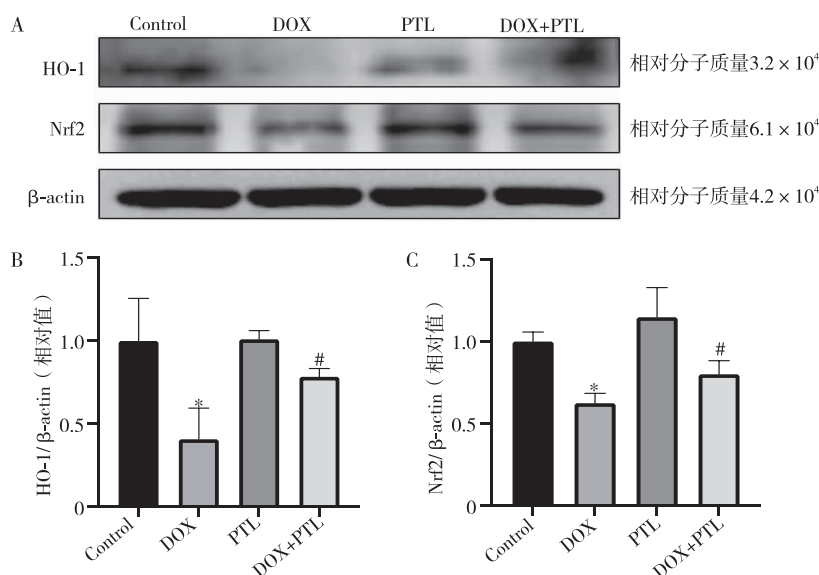
注:Control 表示对照组; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; # 表示与 DOX 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 不同浓度 PTL 对 DOX 诱导 H9c2 心肌细胞活力的影响



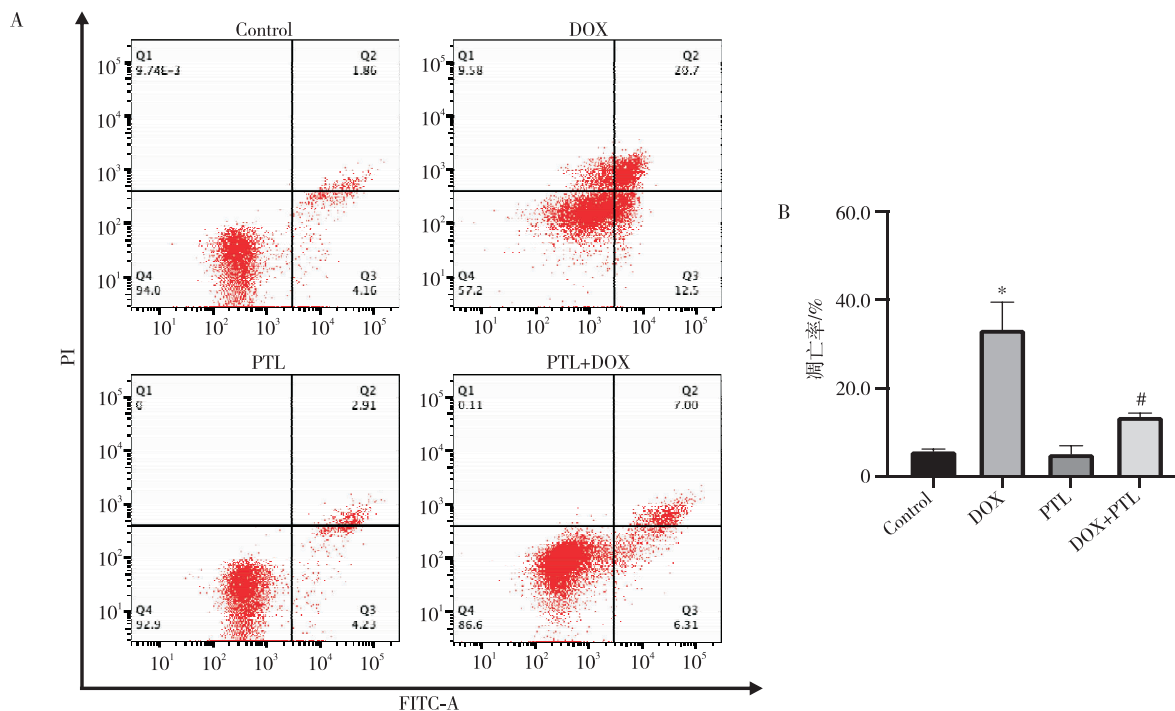
注:图 A 为不同分组活性氧流式细胞图,图 B 为不同分组活性氧水平;Control 表示对照组; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; # 表示与 DOX 组相比, $P < 0.05$ 。

图 4 PTL 对 DOX 诱导 H9c2 心肌细胞氧化应激水平的影响



注:图 A 为不同分组中 HO-1、Nrf2 蛋白表达,图 B 为不同分组中 HO-1 蛋白的相对表达量,图 C 为不同分组中 Nrf2 蛋白的相对表达量;Control 表示对照组; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; # 表示与 DOX 组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 PTL 对 DOX 诱导 H9c2 心肌细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

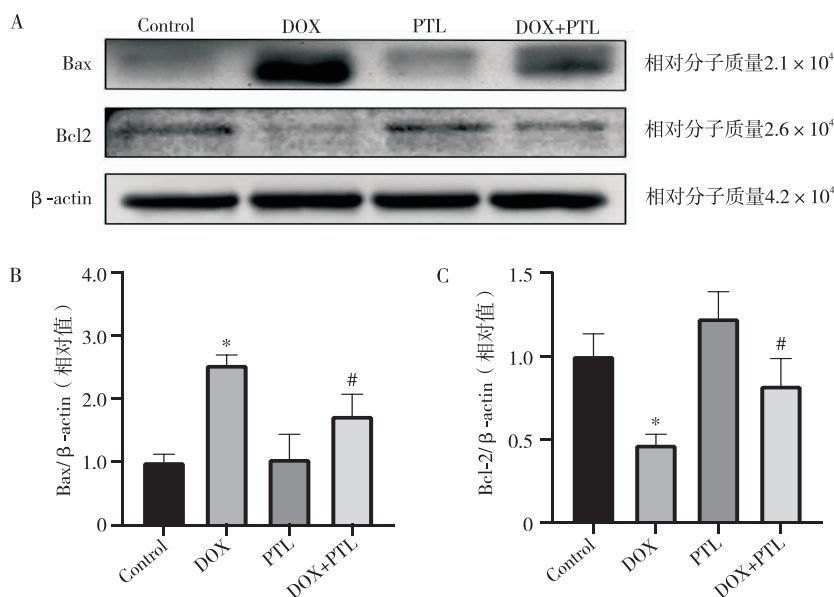


注:图 A 为不同 H9c2 心肌细胞凋亡的流式细胞图,图 B 为不同分组 H9c2 心肌细胞的凋亡率;Control 表示对照组; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; # 表示与 DOX 组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 PTL 对 DOX 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡率的影响

蛋白质印迹法实验结果提示,应用 $1 \mu\text{mol/L}$ DOX 处理 H9c2 心肌细胞,经过 24 h 后,促凋亡相关蛋白 Bax 的表达显著增加,同时抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表

达显著降低 ($P < 0.05$)。然而,与 DOX 处理组相比,DOX + PTL 共处理组的 Bax 表达显著降低,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达显著增加 ($P < 0.05$)。见图 7。



注:图 A 为不同分组中 Bax、Bcl-2 蛋白表达,图 B 为不同分组中 Bax 的相对表达量,图 C 为不同分组中 Bcl-2 蛋白的相对表达量;Control 表示对照组; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; # 表示与 DOX 组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 PTL 对 DOX 诱导 H9c2 心肌细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

3 讨论

尽管学术界对 DOX 引发心肌细胞损伤的机制已研究了数十年,但迄今为止,尚缺乏能有效预防和治

疗 DOX 心脏毒性反应的特效药物^[6]。目前,右丙亚胺是美国食品药品监督管理局批准用于改善 DOX 相关的心肌细胞损伤的唯一药物,它通过抗心肌细胞过度

氧化应激的机制来减轻 DOX 心肌细胞损伤,并已在临床上得到应用^[7]。然而,右丙亚胺的临床效果存在限制,而且已有研究^[8]表明它可能会增加儿童继发性恶性肿瘤的发生风险。因此,进一步探索用于减轻 DOX 心脏毒性损伤的药物,并深入了解其相关缓解作用机制,具有极其重要的临床意义。

PTL 是从天然药用植物艾菊中分离到的倍半萜烯内酯类化合物,其亲脂性有助于其在血脑屏障中的良好通透性^[9]。现有研究^[3]已证实 PTL 的药理作用领域较广泛,主要涉及到抑制血管平滑肌细胞增殖、抗炎、抗氧化、免疫抑制、抑制破骨细胞活性,以及抗肿瘤等。本项研究观察到,DOX 可导致 H9c2 心肌细胞的活力下降,然而在 PTL 预处理后可提高细胞活力,表明 PTL 对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤具有一定程度的抑制作用。此外,研究还表明 PTL 可通过抑制 STAT3 和 NF- κ B 信号通路,抑制不同肿瘤细胞的增殖,包含乳腺癌、急性髓性白血病等^[10-11]。这些研究结果表明,PTL 不仅可改善 DOX 引发的心肌细胞损伤,还可抑制肿瘤细胞的生长。在不减弱 DOX 的抗肿瘤效果的前提下,PTL 可能有望改善肿瘤患者的预后,因此,深入研究其心肌保护的具体机制具有重要意义。

已有研究^[12]明确指出,细胞凋亡被认为是参与 DOX 心肌细胞损伤重要病理过程之一,因此降低心肌细胞凋亡率可缓解 DOX 诱导的心肌细胞损伤。在本实验中,笔者应用 Annexin V-FITC/PI 染色和蛋白质印迹法来观察 H9c2 心肌细胞的凋亡程度。结果显示,经过 DOX 处理的 H9c2 心肌细胞中,促凋亡相关蛋白 Bax 的表达增加,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达降低,同时细胞凋亡比例显著增加,与相关研究^[13]结果一致。与 DOX 处理组相比,经过 PTL 预处理后,促凋亡相关蛋白 Bax 的表达降低,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达增加,同时显著减少了 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡比例。这些研究结果表明,PTL 减轻 DOX 引发的 H9c2 心肌细胞损伤可能与抑制凋亡蛋白的表达有关。

另外,氧化应激也在萜环类药物引发心脏功能障碍的机制中扮演着重要的角色。DOX 在其代谢过程中会生成半醌自由基,这些自由基通过一系列反应最终形成活性氧,导致心肌细胞损伤^[14]。Nrf2 是一种对氧化应激敏感的转录因子,它在细胞内调节氧化应激反应,能上调抗氧化基因 HO-1 的表达,而有活性的 HO-1 蛋白能减轻细胞内炎症、细胞凋亡和氧化应激等反应。此外,应用 DOX 会导致心脏中核蛋白 Nrf2 的表达降低^[15-16]。有研究^[17]已证实,染料木黄酮,一种异黄酮类植物雌激素,能增加 DOX 诱导的心肌细胞损

伤动物模型中 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平。这一过程可能与染料木黄酮激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关,发挥潜在的抗氧化作用,从而保护心脏免受损伤。在本实验中,笔者观察到 PTL 预处理显著减少了 DOX 引起的 H9c2 心肌细胞内活性氧的生成,增加了 Nrf2、HO-1 蛋白的表达水平,从而降低了促凋亡相关蛋白 Bax 的表达,抑制了心肌细胞凋亡的发生,最终缓解了 DOX 对 H9c2 心肌细胞引发的损伤。

DOX 造成心脏毒性的机制较为复杂,其通过提升氧化应激水平直接或通过促凋亡间接导致心肌细胞损伤^[18]。Nrf2/HO-1 是在细胞氧化应激中发挥作用的关键通路之一,研究发现染料木黄酮激活此通路,抑制氧化应激诱导的心肌细胞损伤,继而抑制凋亡水平^[17]。表明在 DOX 引起的心肌细胞损伤中,以上两条通路可能存在相互影响,但需进一步研究论证。在本研究中,笔者发现 PTL 可调节这两条通路并改善 DOX 引起的心肌细胞损伤。但关于通路间是否存在相互促进关系,仍需进一步研究。

综上所述,本研究揭示 PTL 可能与激活 Nrf2/HO-1 通路,增加 Nrf2、HO-1 抗氧化蛋白的水平,降低心肌细胞内活性氧的生成有关,从而缓解氧化应激对心肌细胞的损害,进而减轻 DOX 引发的心肌细胞凋亡。此研究结果表明 PTL 对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤具有明显的抵抗作用。本研究通过细胞体外实验,为临床上治疗和预防 DOX 引起的相关心脏病提供了参考,后续将进一步完善动物体内实验。

参 考 文 献

- [1] Christidi E, Brunham LR. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):339.
- [2] Li D, Yang Y, Wang S, et al. Role of acetylation in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Redox Biol*, 2021, 46:102089.
- [3] Freund RRA, Gobrecht P, Fischer D, et al. Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide[J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37(4):541-565.
- [4] Skoumal R, Tóth M, Serpi R, et al. Parthenolide inhibits STAT3 signaling and attenuates angiotensin II-induced left ventricular hypertrophy via modulation of fibroblast activity[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(4):634-641.
- [5] Albalawi RS, Binmahfouz LS, Hareeri RH, et al. Parthenolide phytosomes attenuated gentamicin-induced nephrotoxicity in rats via activation of Sirt-1, Nrf2, OH-1, and NQO1 axis[J]. *Molecules*, 2023, 28(6):2741.
- [6] Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(6):1213-1225.
- [7] Russo M, Della Sala A, Tocchetti CG, et al. Metabolic aspects of anthracycline cardiotoxicity[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2021, 22(2):18.
- [8] de Baat EC, Mulder RL, Armenian S, et al. Dexrazoxane for preventing or reducing cardiotoxicity in adults and children with cancer receiving anthracyclines[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2022, 9(9):CD014638.
- [9] Végh K, Riethmüller E, Hosszú L, et al. Three newly identified lipophilic flavonoids in *Tanacetum parthenium* supercritical fluid extract penetrating the

- Blood-Brain Barrier[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 149:488-493.
- [10] Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells[J]. *Blood*, 2005, 105(11):4163-4169.
- [11] Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, et al. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer; modern target but ancient solution[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1091:151-169.
- [12] Qu Y, Gao R, Wei X, et al. Gasdermin D mediates endoplasmic reticulum stress via FAM134B to regulate cardiomyocyte autophagy and apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10):901.
- [13] Liu D, Ma Z, Di S, et al. AMPK/PGC1 α activation by melatonin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity via alleviating mitochondrial oxidative damage and apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129:59-72.
- [14] Mukhopadhyay P, Rajesh M, B  tkai S, et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(5):H1466-H1483.
- [15] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases; an evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17):3221-3247.
- [16] Jiang Q, Chen X, Tian X, et al. Tanshinone I inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating Nrf2 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 106:154439.
- [17] Chen M, Samuel VP, Wu Y, et al. Nrf2/HO-1 mediated protective activity of genistein against doxorubicin-induced cardiac toxicity[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2019, 38(2):143-152.
- [18] Kanwar MK, Sunku R, Alruwaili F, et al. Beneficial effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with asthma; a literature review[J]. *Cureus*, 2022, 14(10):e30812.

收稿日期:2023-12-24

《心血管病学进展》对投稿中表格制作的要求

表格可用全线表、省线表(包括三线表)和无线表。表格应是完整的、可独立存在的形象化语言,表格的内容应简洁直观,以数字表达为主,避免与文字表述过于重复,同时表格应具有自明性。

1. 表格的组成。(1)表序和表题:表序即表格的序号,一篇论文中如只有一个表格则表序编为表1,有两个及以上的表格,应按先后标出表的序号。序号用阿拉伯数字表示,置于表的上方。表题应准确得体、简洁精练,中间不用标点,末尾不加句号。(2)表头:对表格各行和各列单元格内容进行概括和提示的栏目,反映了表身中该栏信息的特征或属性。(3)表身:表头之外的单元格总体,是表格的主体,表身中单元格内的数值不宜带单位;表身中如果一个单元格里包含两个数据,其中一个数据应用括号,同时需要在表头或标注中说明;表身中单元格内可使用空白或一字线“—”填充,如果需要区别数据“不适用”和“无法获得”,前者可采用空白单元格,后者可采用一字线,并在正文或标注中说明这种区别。(4)表注:必要时,应将表中的符号、标记、代码,以及需要说明的事项,以最简练的文字,横排于表身下。

2. 表格制作的要求。(1)主谓清楚:表的横表头为主语,指表中所要说明的对象;纵表头为谓语,表示对主语的说明,读表的顺序为:主语→谓语→数据。特殊情况时,主、谓语可以换位,但换位后的主谓语的性质不变。作者在设计表格时,应力求科学、准确、一目了然。一个好的表格应具有语言学上的逻辑性,即主谓清楚、层次分明、标目合理。(2)数字准确:表格内的数字应准确无误,一律用阿拉伯数字,上下个位数对齐,数字中如有“ \pm ”或“ \sim ”号,则以其为中心对齐。表内不宜用“同上”“同左”“同类”词,须填入具体的数字或文字。(3)表格内的单位:表头中量和单位的标注形式应为“量的名称或符号/单位符号”;表格中涉及的单位全部相同时,宜在表的右上方统一标注。(4)表格中的统计学符号:论文中的显著性检验,只在表下注释 P 值是不够的,应将检验方法、计算结果及 P 值均列出,以便读者进一步了解实际差异的大小。

本刊编辑部