

· 基础研究 ·

麝香酮减轻多柔比星心毒性作用的初步研究

葛嘉诚, 王俊宏, 周宁天, 李殿富*

南京医科大学第一附属医院心脏科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 评估麝香酮(muscone)对多柔比星(doxorubicin, DOX)诱导的心毒性作用的影响, 并探讨其可能机制。方法: 成年雄性C57BL/6小鼠24只, 随机分为4组: 生理盐水组(control组, 4只)、生理盐水+麝香酮组(muscone组, 4只)、多柔比星+生理盐水组(DOX组, 8只)和多柔比星+麝香酮组(DOX+muscone组, 8只), 药物处理后饲养5周, 于药物处理前、药物处理后第2周、第5周心超检测左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF), 第6周处死小鼠分离心脏组织, 通过免疫组织化学染色、实时定量聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测Bax、Bcl-2、cleaved-caspase-3的表达水平。H9C2细胞分4组(control组、muscone组、DOX组、DOX+muscone组), 药物处理24 h, Western blot检测Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3的表达水平。结果: 与control组相比, muscone组心功能、凋亡指标无明显变化, DOX组小鼠心功能下降, 在小鼠心肌细胞及H9C2细胞中, Bax、cleaved-caspase-3表达明显上升($P < 0.05$)、Bcl-2表达明显下降($P < 0.05$)。与DOX组相比, DOX+muscone组小鼠心功能降低不明显, 在小鼠心肌细胞及H9C2细胞中Bax、cleaved-caspase-3表达上升趋势反转($P < 0.05$)、Bcl-2表达增多($P < 0.05$)。结论: 麝香酮在多柔比星诱导的心肌损害中起保护作用, 可以减轻多柔比星诱导的心肌细胞凋亡。

[关键词] 麝香酮; 多柔比星; 凋亡; 心肌细胞

[中图分类号] R54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)05-669-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20200510

Preliminary study on the alleviating effects of muscone on doxorubicin - induced cardiotoxicity

GE Jiacheng, WANG Junhong, ZHOU Ningtian, LI Dianfu*

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to evaluate the effect of muscone on the cardiotoxicity induced by doxorubicin (DOX) and explore its possible mechanism. **Methods:** Total 24 adult male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: normal saline group (control group, $n=4$), normal saline + muscone group (muscone group, $n=4$), doxorubicin + normal saline group (DOX group, $n=8$) and doxorubicin + muscone group (DOX + muscone group, $n=8$), reared for 5 weeks after drug treatment. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was detected by cardiac ultrasonography before drug treatment, 2 weeks after drug treatment and 5 weeks after drug treatment. Mouse was executed 6 weeks after drug treatment, and the isolated heart tissue was collected to detect the expression levels of Bax, Bcl-2, and cleaved-caspase-3 by immunohistochemical staining and quantitative real time polymerase chain reaction. H9C2 cells were divided into 4 groups (control group, muscone group, DOX group, DOX + muscone group) according to drug treatment for 24 hours, and the expression levels of Bax, Bcl-2, caspase-3, and cleaved-caspase-3 were assessed by Western blot. **Results:** Compared with the control group. The muscone group had no significant changes in cardiac function and apoptotic indicators. The cardiac function of the mice in the DOX group decreased. The expressions of Bax, cleaved-caspase-3 increased significantly ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 decreased significantly ($P < 0.05$) in mouse cardiomyocytes and H9C2 cells. Compared with the DOX group, the heart function of the mice in the DOX + muscone group was not significantly reduced, the upward trend of Bax and cleaved-caspase-3 expression was reversed ($P < 0.05$), and Bcl-2 expression was increased ($P < 0.05$) in mouse cardiomyocytes and H9C2 cells. **Conclusion:** Muscone plays a protective role in myocardial damage induced by doxorubicin, and can reduce myocardial cell apoptosis induced by doxorubicin.

[Key words] muscone; doxorubicin; apoptosis; cardiomyocytes

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(05):669-674]

[基金项目] 江苏省科教兴卫工程重点人才项目(K201103)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: doctorldf@163.com

多柔比星是从链霉菌属细菌中提取的一种萜环类抗生素,是一种常用的治疗多种类型癌症的有效药物,包括乳腺癌^[1],然而,在运用多柔比星治疗癌症患者时,其诱导的心脏毒性已被证明是一种重要且严重的不良反应,表现为药物性心肌病和充血性心力衰竭^[2-3]。据报道,在接受单萜环类药物化疗或联合治疗的癌症患者中化疗引起心功能不全的占7.25%~27.00%^[4]。这一证据表明,了解化疗是如何引起心脏毒性,对于制定预防这些不良反应的策略至关重要,如果能采取有效的治疗方法,不仅可以减轻化疗患者的健康负担,还可以减轻化疗患者的经济负担。

近年来,中药活性单体得到了人们的广泛关注,麝香酮是一种高价值的中药活性单体,在临床上被广泛应用于缓解心肌缺血症状。有研究表明,麝香酮可通过减轻心肌巨噬细胞介导的慢性炎症而增强心肌梗死后小鼠的心功能^[5],也有报道称麝香酮可改善心肌梗死后的心室重构,对椎间盘退变等多种慢性疾病有抗炎作用^[6]。然而,关于麝香酮对化疗药物心脏毒性方面影响的相关报道较少。目前,大量证据表明氧化应激、炎症和凋亡均为多柔比星诱导心脏毒性的发病机制之一^[7]。本文从凋亡角度研究了麝香酮对多柔比星诱导的心毒性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

Bax抗体(D2E11)、Bcl-2抗体(D17C4)、cleaved-caspase3抗体(5A1E)、caspase3抗体(D3R6Y)、GAPDH抗体(D4C6R)(Cell Signaling Technology公司,美国),HRP标记亲和纯化山羊抗兔IgG(H+L)和HRP标记亲和纯化山羊抗小鼠IgG(H+L)(Proteintech公司,美国),Doxorubicin(C₂₇H₃₀ClNO₁₁)(上海碧云天生物技术有限公司),麝香酮(南京泽朗生物技术有限公司),亲链霉素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)试剂盒(SA2001)(Boster公司,美国),胎牛血清、DMEM不完全培养基(Gibco公司,美国),CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),TRIzol试剂(15596018)(Invitrogen公司,美国),5×All-In-One RT MasterMix(Applied Biological Materials Inc公司,加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

C57BL/6小鼠(雄性,7~8周龄,北京维通利华实

验动物技术有限公司)。小鼠可自由获取食物和水,在室温23℃、相对湿度45%~70%的12 h/12 h明暗循环的环境饲养。所有动物实验均按照南京医科大学实验动物研究所制定的动物护理指南进行。本研究经南京医科大学动物伦理与福利委员会批准。将小鼠随机分为control组($n=4$)、muscone组($n=4$)、DOX组($n=8$)和DOX+muscone组($n=8$)。每天麝香酮灌胃1次,剂量为2 mg/kg,同时,每周腹腔注射多柔比星3次,剂量2.5 mg/kg,持续2周;其余各组根据设立对照组的要求用等量生理盐水代替相应药物进行处理。所有小鼠均于药物处理结束后第6周经麻醉后颈椎脱臼处死。

1.2.2 细胞培养和处理

H9C2细胞株(目录号CRL1446TM)购自美国模式培养集存库(ATCC)。细胞重悬于含10%胎牛血清、1.5 g/L碳酸氢钠和1%的青-链霉素和两性霉素B的DMEM培养液中,置CO₂培养箱(37℃、5%CO₂饱和湿度)中培养。为了防止细胞分化,每隔2~3 d换液1次,当细胞达到约80%融合后进行传代培养,并在第7代和第20代之间使用。分4组进行如下处理:control组(未药物处理)、muscone组(麝香酮6 μg/mL, 24 h)、DOX组(doxorubicin 2 μmol/L, 24 h)、DOX+muscone组(麝香酮6 μg/mL+doxorubicin 2 μmol/L, 24 h)。采用CCK-8按试剂盒说明检测24、48、72 h细胞活力。

1.2.3 超声心动图

药物处理前和处理后第2周、第5周,经由Vevo 2100超声系统(Visual Sonic,加拿大)评估小鼠心功能,计算各组小鼠左室射血分数(LVEF)。

1.2.4 免疫组织化学染色

石蜡切片经脱蜡、酒精水化、自来水冲洗。在10 mmol/L柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)中,用微波炉加热20 min,修复抗原。封闭后,切片在4℃条件下与Bax、Bcl-2、cleaved-caspase3一抗孵育过夜,冲洗后,用二抗孵育1 h,用SABC-POD试剂盒冲洗处理(SA2001, Boster, 武汉)。切片用苏木精复染,脱水后用中性树胶封片。

1.2.5 蛋白免疫印迹实验(Western blot)

用蛋白酶抑制剂RIPA reagent裂解处理后的H9C2细胞,提取蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度,并进行校正。然后,在每个孔中加入等量的蛋白质,用10% SDS PAGE分离,转移到NC膜上。用5%脱脂奶粉封闭细胞膜1 h,并与GAPDH、Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase3一抗在4℃孵育过夜。

随后,在室温下,清洗膜并用二抗[HRP标记亲和纯化山羊抗兔IgG(H+L)和HRP标记亲和纯化山羊抗小鼠IgG(H+L)]孵育1 h。最终,加入增强的化学发光辣根过氧化物酶底物曝光处理,免疫反应性定量使用Image J软件(版本1.44)。

1.2.6 RNA制备和实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

总RNA使用TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国)提取自左心室心肌组织。使用5×All-In-One RT MasterMix参照制造商说明进行逆转录。qRT-PCR在StepOne-Plus Real-Time PCR系统(Applied Biosystems,美国)上使用Hieff[™]qPCR SYBR[®]Green Master Mix(Yeasen,上海)按照说明书的实验流程进行。相关基因以GAPDH作为mRNA的内参通过2^{-ΔΔCT}方法表示。相关引物GAPDH(5'-AATGGATTTGGACGCATTGGT-3', 5'-TTTGCACCTGGTACGTGTTGAT-3')、Bax(5'-AGACAGGGGCCTTTTGTCTAC-3', 5'-AATTCGCCGGAGACACTCG-3')、Bcl-2(5'-GAGCC-TGTGAGAGACGTGG-3', 5'-CGAGTCTGTGTATAG-CAATCCCA-3')(上海生工生物有限公司)。

1.3 统计学方法

计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用t检验,多组比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)后应用Dunnett t检

验(Dunnett's post hoc test,所有组与对照组比较)和Bonferroni检验(Bonferroni post hoc test,所有成对的组比较)。所有实验至少重复3次,实验数据采用SPSS16.0软件(Armonk,美国)和GraphPad Prism 5.0进行处理(GraphPad software,美国)。

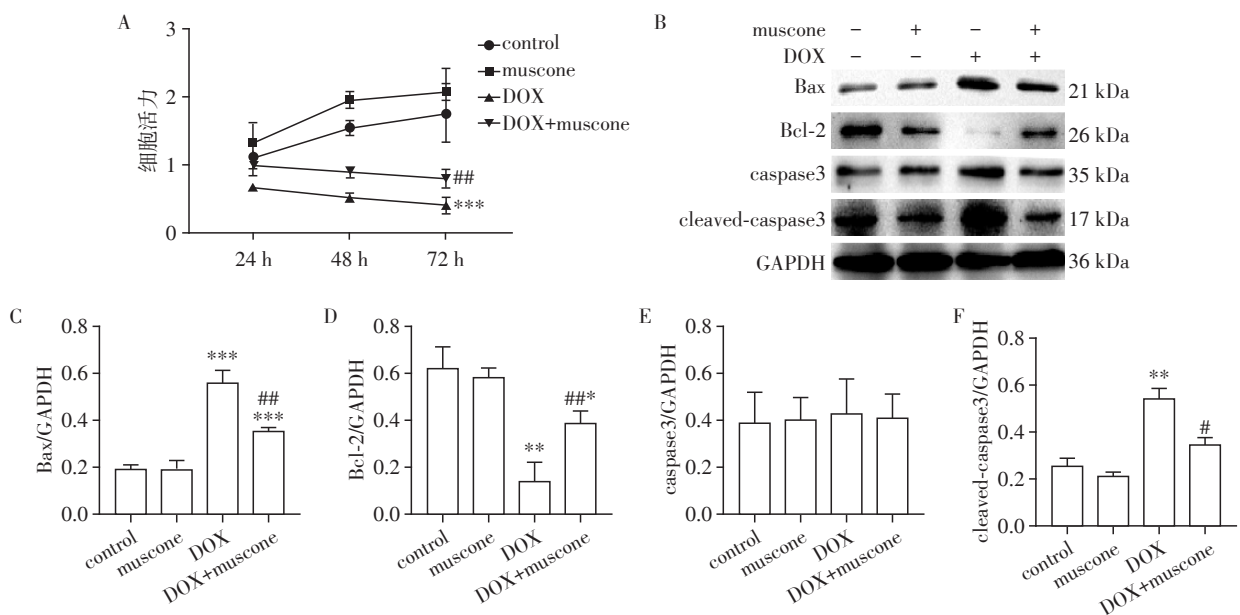
2 结果

2.1 麝香酮可以降低多柔比星诱导H9C2细胞的毒性和凋亡

细胞活力测定证实,多柔比星对心肌细胞有明显损伤作用,麝香酮可明显减轻其毒性(图1A)。Western blot结果进一步证实多柔比星处理显著增加促凋亡蛋白Bax、cleaved-caspase3在H9C2细胞中的表达,加入麝香酮可以缓解这一情况(图1B、C、F)。抗凋亡蛋白Bcl-2的情况则相反,在DOX组中下降趋势明显,麝香酮处理后下降趋势被反转(图1B、D)。各组的caspase3蛋白相对表达量的差异无统计学意义(图1B、E)。

2.2 麝香酮可以减轻多柔比星诱导的心肌损害

为了进一步探究体内条件下麝香酮对多柔比星诱导心肌损害的影响。用C57BL/6小鼠构建多柔比星心肌损害模型,对小鼠心功能进行相应评估。如图2,各组药物处理前LVEF无明显差异(图2A、B)。药物处理后第2周,各组LVEF差异也无统计



A: CCK-8测细胞活力(n=4); B: Western blot检测Bax、Bcl-2、caspase3、cleaved-caspase3的表达; C: Bax蛋白相对表达水平; D: Bcl-2蛋白相对表达水平; E: caspase3蛋白相对表达水平; F: cleaved-caspase3蛋白相对表达水平。与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,与DOX组比较,#P<0.05,##P<0.01。

图1 麝香酮对多柔比星诱导的H9C2细胞活力及凋亡的影响

Figure 1 Effect of muscone on viability and apoptosis of H9C2 cells induced by doxorubicin

学意义(图2A、C)。药物处理后第5周,与control组比较,DOX组LVEF明显下降而DOX+muscone组LVEF变化无统计学意义;DOX+muscone组的LVEF较DOX组明显改善(图2A、D)。这些结果表明麝香酮可改善多柔比星处理后第5周小鼠的心功能。

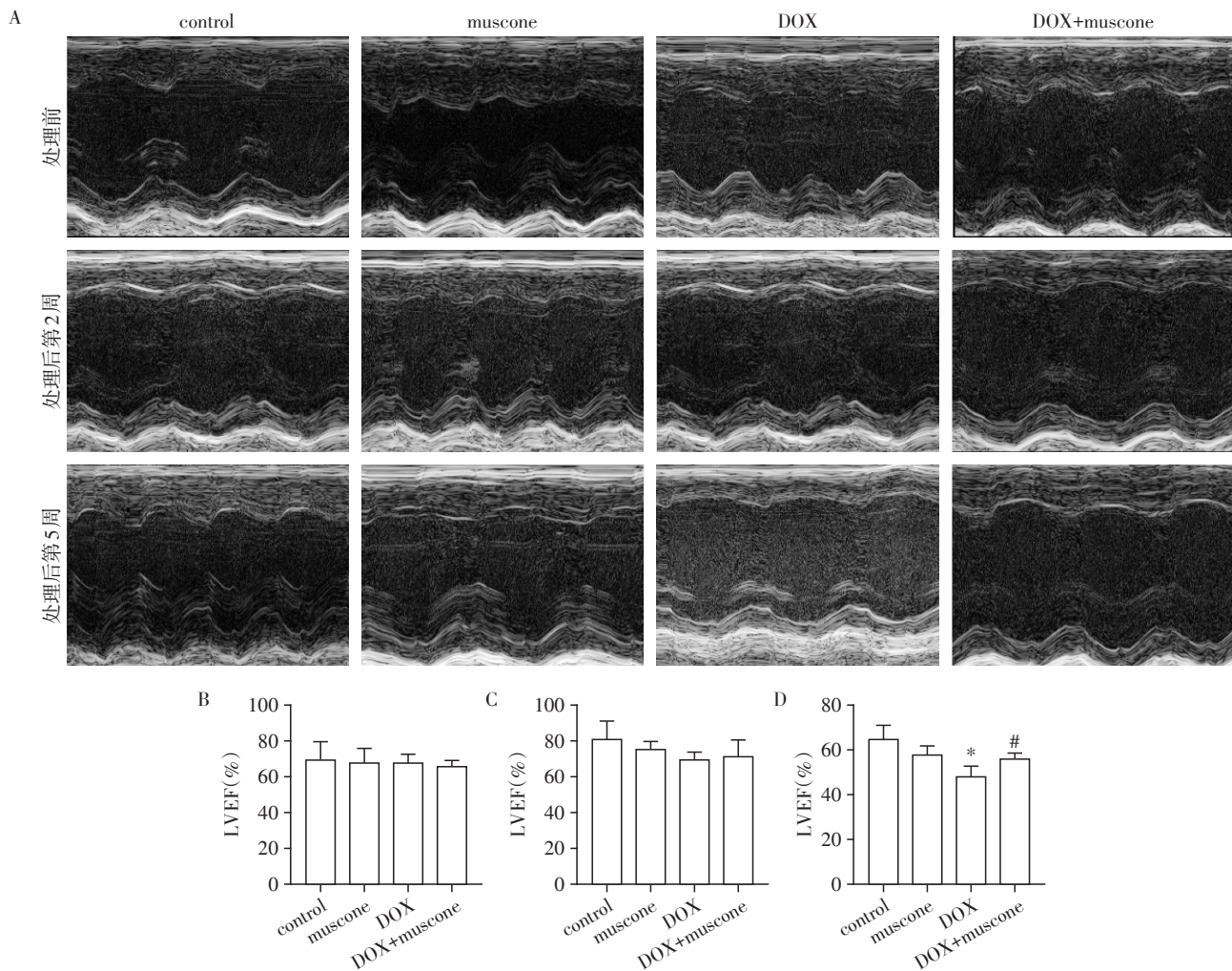
2.3 麝香酮可以抑制多柔比星诱导小鼠心肌细胞的凋亡

凋亡是多柔比星诱导心肌受损的重要机制之一。免疫组织化学染色结果显示促凋亡蛋白Bax、cleaved-caspase3在心肌细胞胞浆表达增多,而麝香酮的治疗可以减少其阳性表达;对凋亡有抑制效果的Bcl-2表达情况与凋亡蛋白表达情况相反(图3A、B、C、D)。qRT-PCR结果显示,凋亡相关因子Bax在DOX组表达明显高于DOX+muscone组,更高于control组、muscone组,而Bcl-2在control组、muscone组

高表达,在DOX+muscone组稍有降低,在DOX组明显下降(图3E)。以上实验结果表明,麝香酮抑制多柔比星心毒性主要是通过抑制多柔比星诱导的心肌细胞凋亡来实现的。

3 讨论

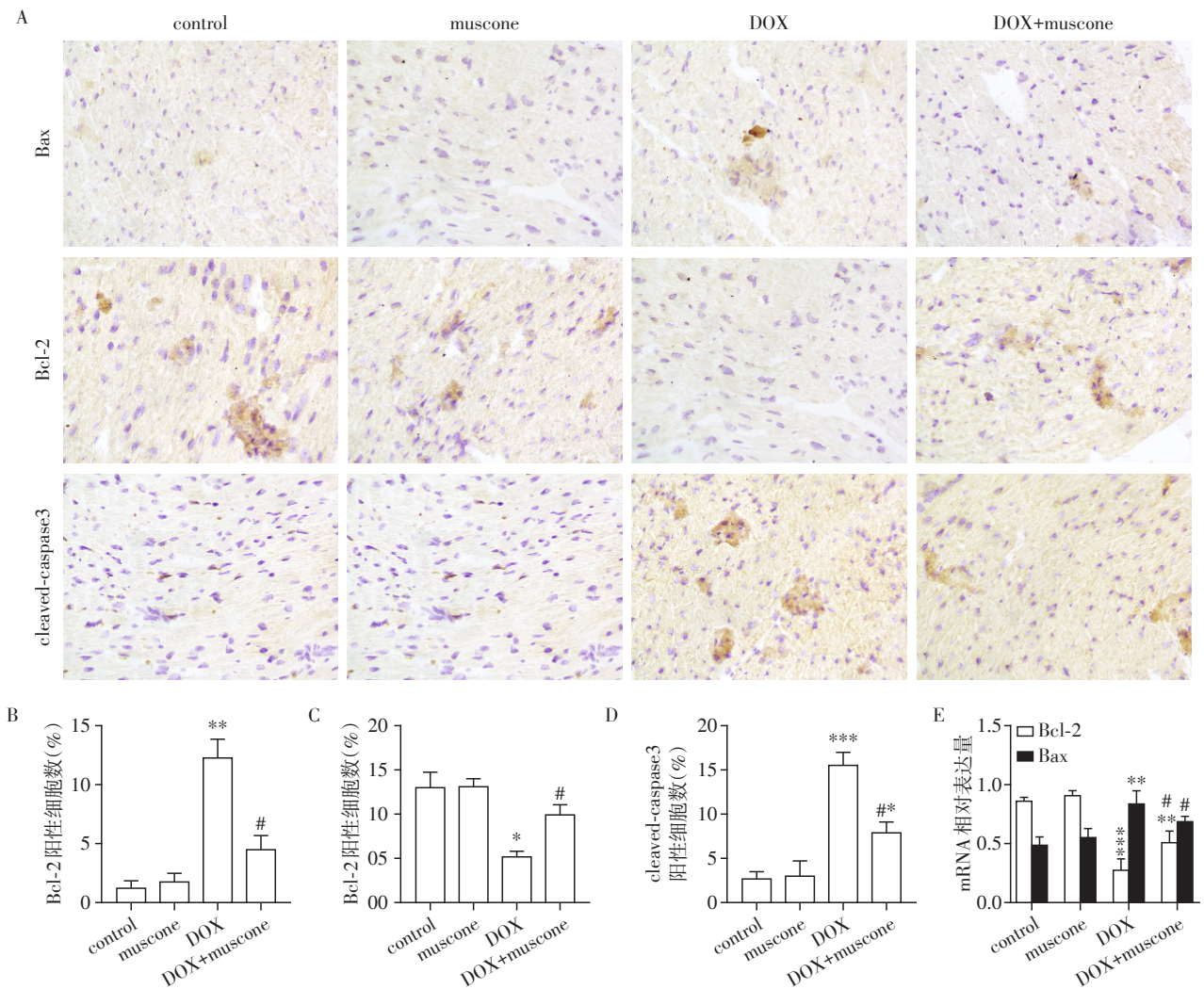
多柔比星是临床常见化疗药物,对部分肿瘤极为有效,包括乳腺癌等,但其心毒性限制了其在临床的应用。许多分子(主要是调节多柔比星代谢、氧化应激、细胞凋亡、自噬和坏死相关分子)导致其心毒性^[8]。凋亡作为主要机制之一历来是多柔比星心毒性治疗方面的研究热点。在本研究中,分析实验数据发现麝香酮可以抑制多柔比星诱导的小鼠心肌损害。进一步研究表明麝香酮可以通过抑制多柔比星诱导的心肌细胞凋亡从而改善小鼠心功



A: 药物处理前、药物处理后第2周、第5周小鼠典型M型超声心动图;B: 超声心动图测定药物处理前LVEF;C: 超声心动图测定药物处理后第2周LVEF;D: 超声心动图测定药物处理后第5周LVEF。与control组比较,* $P < 0.05$;与DOX组比较,# $P < 0.05$ 。

图2 麝香酮对多柔比星诱导的小鼠心功能的影响

Figure 2 Effect of muscone on cardiac function in mice affected by doxorubicin



A: control、muscone、DOX、DOX muscone 免疫组织化学染色($\times 400$); B: Bax 免疫组化染色阳性细胞数百分比; C: Bcl-2 免疫组化染色阳性细胞数百分比; D: cleaved-caspase3 免疫组化染色阳性细胞数百分比; E: Bax、Bcl-2 的 mRNA 的表达水平与 GAPDH 的比率, 代表 2 个独立实验。与 control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 DOX 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 麝香酮对多柔比星诱导的小鼠心肌细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of muscone on myocardial cell apoptosis induced by doxorubicin

能。同时, 体外研究表明麝香酮可以抑制多柔比星诱导 H9C2 细胞凋亡相关蛋白表达。

凋亡主要有 3 条经典信号通路: 外源途径、内源(线粒体)途径、内质网途径^[9], 而 Bcl 家族主要参与线粒体途径调控。多柔比星化疗导致氧化应激增加、细胞凋亡和线粒体功能障碍^[10], 从而激活腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK), 对多种下游靶点如 c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、P53、mTORC1 的调节, 从而促进其下游机制的进行, 引起心肌细胞凋亡^[11-12]。本研究发现, 麝香酮抑制了多柔比星诱导的 Bcl-2 减少, 及 Bax、cleaved-caspase3 的升高。而 Bcl-2 家族(包括抗凋亡因子 Bcl-2、Bcl-

XL、Bcl-W、mcl1 和促凋亡因子 Bax、Bak1 等)在 P53 影响下调节线粒体外膜通透, 使线粒体膜间隙中的可溶性蛋白(如细胞色素 c)弥散到细胞胞浆中。细胞色素 c 导致凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptotic protease activating factor-1, APAF1)寡聚形成 caspase 活化复合物(凋亡小体)。这结合促进了启动子 caspase-9 的激活, 进而激活了 caspase-3 和 caspase-7, 这些 caspase-3 和 caspase-7 可裂解多种底物, 从而诱发凋亡表型^[13]。此外, 当 P53 表达被抑制时, 可使心脏组织 Bax 和 caspase-3 表达下调^[14]。麝香酮有可能是通过 P53、AMPK 相关通路对多柔比星诱导的 Bcl-2、Bax 表达产生影响, 其机制还需进一步论证。已有文献报道, Bcl-2、Bcl-XL 参与了与 Beclin-1 的相互作

用,影响细胞的自噬与凋亡^[15]。Beclin-1具有Bcl-2同源性(Bcl-2 homology, BH)3结构域,其BH3结构域可与BH3受体结合,抑制抗凋亡的Bcl-2蛋白,如Bcl-2和Bcl-XL,或激活促凋亡的Bcl-2家族成员,如Bax和Bak。另一方面,Beclin-1作为Ⅲ类磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)复合物的组成部分,在自噬小体形成中起关键作用^[16],Bcl-2与Beclin-1的结合会降低Beclin-1激活自噬的能力^[17]。麝香酮与多柔比星诱导的细胞自噬、自噬与凋亡的相关作用及其机制也有待进一步研究。

综上所述,本研究发现,麝香酮可以改善多柔比星诱导心肌损害小鼠的心功能,抑制多柔比星诱导的心肌细胞凋亡。此外,麝香酮对多柔比星毒性的改善可能与麝香酮对心肌细胞过度自噬的抑制有关。本研究结果证实麝香酮是对多柔比星心肌损害有保护作用中药活性单体,为多柔比星毒性的治疗提供了新的视角。

[参考文献]

- [1] GEISBERG C A, SAWYER D B. Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2010, 12(6):404-410
- [2] MCGOWAN J V, CHUNG R, MAULIK A, et al. Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2017, 31(1):63-75
- [3] PUGAZHENDHI A, EDISON T, VELMURUGAN B K, et al. Toxicity of doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems[J]. *Life Sci*, 2018, 200:26-30
- [4] MOHAN N, JIANG J, DOKMANOVIC M, et al. Trastuzumab - mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers[J]. *Antib Ther*, 2018, 1(1):13-17
- [5] DU Y, GU X, MENG H, et al. Muscone improves cardiac function in mice after myocardial infarction by alleviating cardiac macrophage - mediated chronic inflammation through inhibition of NF-kappaB and NLRP3 inflammasome[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12):4235-4246
- [6] WANG X, MENG H, CHEN P, et al. Beneficial effects of muscone on cardiac remodeling in a mouse model of myocardial infarction[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(1):103-111
- [7] GRANADOS-PRINCIPAL S, EL-AZEM N, PAMPLONA R, et al. Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(1):25-33
- [8] CHEN Y, HUANG T, SHI W, et al. Potential targets for intervention against doxorubicin - induced cardiotoxicity based on genetic studies: a systematic review of the literature[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 138:88-98
- [9] SHIRJANG S, MANSOORI B, ASGHARI S, et al. MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 139:1-15
- [10] LIU D, MA Z, DI S, et al. AMPK/PGC1alpha activation by melatonin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity via alleviating mitochondrial oxidative damage and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129:59-72
- [11] KAVIYARASI R, ABILASH V G, TIRUPATHI PICHIAH P B, et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818:241-253
- [12] 高 婷, 陈 忠. 二甲双胍对脂多糖诱导的大鼠心肌细胞H9C2损伤的保护机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(9):1298-1303
- [13] DONG Y, CHEN H, GAO J, et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 136:27-41
- [14] YANG B, XU B, ZHAO H, et al. Dioscin protects against coronary heart disease by reducing oxidative stress and inflammation via Sirt1/Nrf2 and p38 MAPK pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1):973-980
- [15] COOPER K F. Till do us de part ath: The marriage of autophagy and apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:4701275
- [16] HURLEY J H, YOUNG L N. Mechanisms of autophagy initiation [J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86:225-244
- [17] LI M, GAO P, ZHANG J. Crosstalk between autophagy and apoptosis: potential and emerging therapeutic targets for cardiac diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17:1-19

[收稿日期] 2019-12-17