

本文引用:谭 彩,曹 蛟,张杼惠,刘建和. 柴胡三参胶囊通过调控 PI3K/Akt 和 p38MAPK 通路抑制阿霉素诱导的心脏毒性[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(9): 1434-1441.

柴胡三参胶囊通过调控 PI3K/Akt 和 p38MAPK 通路抑制阿霉素诱导的心脏毒性

谭 彩^{1,2}, 曹 蛟², 张杼惠², 刘建和^{1*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 研究柴胡三参胶囊对新生大鼠心肌细胞损伤和小鼠心力衰竭模型中磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide3-kinase, PI3K)/Akt 和丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路相关蛋白表达的影响,探讨其拮抗阿霉素诱导的心脏毒性的作用机制。**方法** 用阿霉素诱导生成新生大鼠心肌细胞(neonatal rat ventricular myocyte, NRVM)损伤模型和小鼠心力衰竭模型,随机分为对照(no treatment, NT)组、模型(Model)组、柴胡三参胶囊预处理(CHSSC)组。末次给药后次日处死小鼠,处死前进行超声心动图检测,采用 CCK-8 法检测细胞活力, TUNEL 法检测细胞凋亡,试剂盒检测血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)含量, Western blot 法检测裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(c-Caspase 3)和磷酸化丝裂原激活的蛋白激酶(p-p38MAPK)、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶(p-Akt)蛋白表达情况。**结果** 与 NT 组比较, Model 组以阿霉素剂量依赖性方式降低 NRVM 细胞活力, 诱发细胞凋亡($P<0.01$); 氧化应激指标 CK、LDH、MDA 明显增加($P<0.01$); 左室 EF 值下降($P<0.01$), LVIDs、LVIDd、LVESV、LVEDV 水平增加($P<0.05$); p-p38MAPK、c-Caspase 3 和 p-PI3K 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。与 Model 组比较, CHSSC 组增加细胞活力、减轻细胞凋亡, 差异有明显统计学意义($P<0.01$); 氧化应激指标 CK、LDH、MDA 降低($P<0.01$); EF 增加($P<0.05$), LVIDs、LVIDd、LVESV、LVEDV 下降($P<0.05$); p-p38MAPK、c-Caspase 3 和 p-PI3K 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。**结论** 柴胡三参胶囊可改善阿霉素诱导的心脏毒性, 可能与其通过调控 PI3K/Akt 和 p38MAPK 通路抑制氧化应激和细胞凋亡相关。

[关键词] 柴胡三参胶囊; PI3K/Akt; p38MAPK; 阿霉素; 心脏毒性; 氧化应激; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.09.004

Chaihu Sanshen Capsule suppressed adriamycin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3K/Akt and p38MAPK pathways

TAN Cai^{1,2}, CAO Jiao², ZHANG Zhuhui², LIU Jianhe^{1*}

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Chaihu Sanshen Capsule on the expression of proteins related to phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt kinase and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in neonatal rat cardiomyocyte injury model and mouse heart failure model, and to explore the mechanism in antagonizing adriamycin-induced cardiotoxicity. **Methods** A neonatal rat ventricular myocyte (NRVM) injury model and a mouse heart failure model were induced by adriamycin, which were divided into no treatment (NT) group, model group, and Chaihu Sanshen Capsule pretreatment (CHSSC) group. Mice were sacrificed the

[收稿日期] 2021-12-31

[基金项目] 湖南省中医药管理局项目(2021011); 湖南省省级财政中医药项目(rsk-010-05006-01); 湖南省科学技术厅临床医疗技术创新引导项目(2020SK51405)。

[第一作者] 谭 彩,女,博士研究生,研究方向:肿瘤及心血管疾病的中医药防治。

[通信作者] * 刘建和,男,博士研究生导师,主任医师, E-mail: ljhtcm1@163.com。

next day after the last administration, and echocardiography was detected before sacrifice. CCK-8 method was used to detect cell viability; TUNEL was used to detect cell apoptosis; the kit was used to detect serum creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), and malondialdehyde (MDA) levels. The protein expression of cleaved c-Caspase 3 (c-Caspase 3), phosphorylated mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK), p-PI3K and phosphorylated protein kinase (p-Akt) were evaluated by Western blot. **Results** Compared with the NT group, the NRVM cell viability reduced and apoptosis was induced in the model group due to the adriamycin dose-dependent manner ($P<0.01$); the levels of oxidative stress indexes CK, LDH and MDA increased significantly ($P<0.01$); the left ventricular EF decreased ($P<0.01$), while LVIDS, LVIDd, LVESV and LVEDV increased ($P<0.05$); the expression levels of p-p38MAPK, c-Caspase 3 and p-PI3K were significantly higher ($P<0.01$). Compared with the model group, cell viability increased and the apoptosis reduced in CHSSC group ($P<0.01$); the levels of oxidative stress indexes CK, LDH and MDA decreased significantly ($P<0.01$); EF increased ($P<0.05$); LVIDS, LVIDd, LVESV and LVEDV decreased ($P<0.01$); the expression levels of p-p38MAPK, c-Caspase 3 and p-PI3K were significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Chaihu Sanshen Capsule can ameliorate adriamycin-induced cardiotoxicity, and the mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress and apoptosis by regulating the PI3K/Akt and p38MAPK pathways.

[**Keywords**] Chaihu Sanshen Capsule; PI3K/Akt; p38MAPK; adriamycin; cardiotoxicity; oxidative stress; apoptosis

近年来,随着抗肿瘤治疗新型化疗药、靶向药、免疫药物^[1]等治疗方法的不断改进,肿瘤患者生存期延长,带瘤生存者越来越多,但抗肿瘤治疗导致急性或长期的心血管毒性成为影响患者生存的一个主要因素^[2],加上近些年来人口老龄化趋势越来越明显,因此抗肿瘤治疗导致的心血管毒性问题越发凸显,其中以蒽环类化疗药物引起的心脏毒性为甚。研究表明,阿霉素诱导DNA损伤,抑制DNA和蛋白质合成,促进肌纤维变性,抑制特定基因的转录,并通过Caspase 3依赖性机制导致心肌细胞凋亡^[3]。心力衰竭时心肌细胞主要以凋亡细胞死亡的形式丢失,导致心脏收缩功能恶化和左心室重构。Akt的激活可能通过抑制细胞凋亡^[4]从而保护心功能,而p38丝裂原激活的蛋白激酶(p38MAPK)的抑制可以减弱细胞的炎症反应。柴胡三参胶囊是我院针对心律失常疗效显著的经验方,由小柴胡汤化裁而来,前期研究证实其可缓解症状、减少急性发作次数,对心肌急性损伤具有保护作用^[5-6]。此外,其含药血清在一定条件下能激活p38MAPK信号通路^[7]。然而柴胡三参胶囊能否改善化疗引起的心脏毒性尚不清楚。故本实验通过建立阿霉素诱导的新生大鼠心肌细胞损伤模型和小鼠心力衰竭模型,从磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/Akt和p38MAPK通路入手,探讨柴胡三参胶囊对阿霉素诱导的心脏毒性保护作用及可能的机制。

1 材料

1.1 实验动物

1~3日龄的SD大鼠10只,雌性3只,雄性7只,体质量6~10 g;SPF级健康C57BL/6小鼠,60只,6~8周龄,雄性,体质量20~25 g,采购自上海

斯莱克实验动物有限责任公司;动物合格证批号:20170005050155。饲养在(20±5)℃的无病原体环境中,自由进食和饮水,喂养1周。本研究取得湖南中医药大学伦理委员会批准,编号ZYFY20210506。

1.2 药物

阿霉素由索莱宝公司提供,批号D8740。柴胡三参胶囊由湖南中医药大学第一附属医院制剂中心提供,药物组成:北柴胡、黄连、法半夏、丹参、苦参、青蒿、党参、甘草,药物剂量比例为15:6:10:10:10:10:15:6,各药物购自湖南中医药大学第一附属医院,由湖南中医药大学第一附属医院刘绍贵教授鉴定均为正品,符合2015年版《中华人民共和国药典》规范。制剂符合胶囊剂项下有关的各项规定(《中华人民共和国药典》2015年版四部通则0103)。

1.3 试剂

30%聚丙烯酰胺(上海生工生物工程有限公司,批号: CAS.9003-05-8);二氧化碳细胞培养箱(赛默飞世尔科技公司,批号:BB150-2TCS);DMEM-High glucose基础培养基(批号:JXS0101);0.25%胰酶消化液(含EDTA)(批号:JXS0101);青链霉素混合液(批号:JXS0201)均购自苏州君欣生物科技有限公司;HE染色液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:G1005);水合氯醛(批号:30037517-250 g);二甲苯(批号:10023418)国药集团化学试剂有限公司;caspase 3、cleaved Caspase 3、p-p38MAPK、p-Akt、PI3K抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab184787、ab214430、ab178867、ab8805、ab32089);Akt蛋白(ABways,批号:CY5561);TUNEL凋亡检测试剂盒(上海罗氏制药有限公司,批号:43260100);DHE染色活性氧检测

试剂盒(北京索莱宝科技公司,批号:C01201);血清肌酸激酶(creatine kinase, CK)检测试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(北京索莱宝科技公司,批号分别为 BC1140、BC0680、BC0025);CCK-8 细胞活力检测试剂盒(上海东寰生物科技有限公司,批号:C00901)。

1.4 仪器

荧光定量 PCR 仪(上海力康生物医疗科技有限公司,型号:CG-05);荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:CKX53);酶标仪(芬兰 THERMO 公司,型号:117123001);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);超声心动图(加拿大:Fujifilm VisualSonics,型号:VEVO LAZR-X);离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司,型号:SF-TGL-20R);正置光学显微镜及成像系统(日本尼康公司,型号:Nikon Eclipse E100);电子天平(深圳市无限量衡器有限公司,型号:FA1004)。

2 方法

2.1 大鼠心肌细胞的分离培养

用胰蛋白酶和Ⅱ型胶原酶联合消化法从 10 只 1~3 日龄 SD 大鼠分离出新生大鼠心室肌细胞(NRVM)^[8]。无菌条件下取 SD 大鼠心尖部组织,使用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次,将心肌组织剪成约 1 mm³ 大小后移入离心管中,加入 0.08%胰蛋白酶液进行反复吹打,动作轻柔,然后置于 37 ℃水浴消化 10 min,弃去上清液,再加入 0.08%胰蛋白酶液和 0.05%胶原酶,反复吹打后置于 37 ℃水浴消化 8 min,取上清液移入新离心管中,加入等体积含 10%新生牛血清的 DMEM 培养液终止消化,将混合液以 1500 r/min 离心 10 min 后弃去上清液,加入培养液混悬细胞沉淀,放置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中进行细胞培养。

2.2 CCK-8 法测定最佳含药浓度

将制备好的细胞悬液(10 000 个细胞/孔)接种到 96 孔板中,每孔约 100 μL 细胞悬液,分别加入含药血浆 5、10、20 μL,使终浓度分别为 5%、10%、20%,每一浓度同时设 3 个复孔;空白血浆对照组按上述操作加入无药血浆。随后将培养板置于 5% CO₂,37 ℃环境中孵育 48 h。然后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,培养板在培养箱内孵育 2 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(OD 值)。以细胞数量为横坐标(即 X 轴),以吸光度为纵坐标(即 Y 轴)制

作曲线,并据此标准曲线测定细胞数量。采用心肌细胞生存率最高的血浆浓度作为干预度,心肌细胞存活率=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)]×100%。由 CCK-8 法检测细胞活力,初步实验结果显示阿霉素(1 μmol/L)及 5%含药血浆浓度更适于后续实验。

2.3 实验分组、造模及给药

细胞实验:用不同浓度的阿霉素(0、0.1、0.5、1、3、5、10、20 和 30 μmol/L)培养 NRVM 24 h 后备用。柴胡三参胶囊溶解在 PBS 中至 10 mg/mL,然后用含有 10%不同浓度 FBS 的 DMEM 培养基稀释。以相同体积的磷酸缓冲盐溶液无胎牛血清 DMEM 作为对照。再进一步将细胞分为对照(NT)组、阿霉素处理(Model)组、柴胡三参胶囊预处理后再用阿霉素处理(CHSSC)组。

动物实验:将 60 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠按随机数字表分为正常对照(NT)组、模型(Model)组、柴胡三参胶囊预处理(CHSSC)组,每组 20 只。Model:单次腹腔注射溶解于生理盐水的阿霉素(15 mg/kg)^[9],并口服等剂量生理盐水。CHSSC 组:给予柴胡三参胶囊(0.728 g/kg),给药剂量参考徐叔云教授主编的《药理实验方法学》(第三版)^[10]人鼠等剂量换算,以成人体质量 60 kg 为标准获得,灌胃体积为 0.3 mL,灌胃 3 d 后,腹腔注射与模型组相同剂量的阿霉素后再予以柴胡三参胶囊 3 d。NT 组:等剂量生理盐水灌胃。造模时间 1 周。

2.4 标本采集

末次给药后次日,小鼠在氧气中用 10%水合氯醛轻度麻醉,直到心率稳定到 400~500 次/min,超声心动图测量 EF、LVIDS、LVIDd、ESV、EDV。超声心动图测量完成后,收集血清,颈椎脱位安乐死小鼠,摘取心脏,快速于冰台上取心脏。一部分心脏组织置于 4%多聚甲醛固定 24 h,脱水、石蜡包埋;另一部分组织置于冻存管中,过液氮,-80 ℃冰箱保存备用。

2.5 指标检测

2.5.1 CCK-8 法检测细胞活力 在制备好的 NRVM 细胞悬液 96 孔板每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,将培养板在培养箱内孵育 2 h,用酶标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度值。

2.5.2 超声心动仪检测小鼠心功能 用小动物超声心动仪在小鼠乳头肌水平进行二维定向 M 型示踪,测量和计算 EF、LVIDS、LVIDd、LVESV、LVEDV,所有小鼠由一位专业超声人员进行检测,每项测量平均连续 3 次心动周期。

2.5.3 试剂盒检测氧化应激指标 各组心肌细胞经过相应处理后,6-磷酸葡萄糖脱氢酶法检测 CK 含量,硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量,2,4-二硝基苯肼显色法检测 LDH 含量,均严格按照试剂盒说明书进行操作,并通过分光光度计比色法进行检测。

2.5.4 TUNEL 细胞凋亡检测 将吸附细胞的载玻片在 4%多聚甲醛中固定 25 min;PBS 浸洗 2 次,每次 5 min;制备 TUNEL 反应混合液;加入 50 μ L TUNEL 反应混合液,暗湿盒中反应 37 $^{\circ}$ C $\times$ 1 h;PBS 漂洗 3 次;加入 50 μ L converter-POD,暗湿盒中反应 37 $^{\circ}$ C $\times$ 30 min;PBS 漂洗 3 次;加入 50~100 μ L DAB 底物,反应(15~25) $^{\circ}$ C $\times$ 10 min;PBS 漂洗 3 次;加 1 滴 PBS 在视野下,用光学显微镜观察凋亡细胞并拍照。

2.5.5 Western blot 法检测 c-Caspase 3、p-p38MAPK、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达 称取心肌组织 50 mg,加入 RIPA 裂解液,在冰上研磨离心,电泳、转膜、3%BSA 摇床 1 h 封闭、一抗孵育(β -actin、1:1000 稀释)4 $^{\circ}$ C 摇床过夜,二抗孵育(兔抗、1:8000 稀释)室温 2 h、洗膜,进行蛋白免疫印迹分析,用 ECL 化学发光试剂盒显像,凝胶图像系统分析各蛋白条带灰度值,以目的蛋白/ β -actin 表示目的蛋白的相对表达量。

2.6 统计学分析 应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。满足正态分布者,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐者用 Dunnett's T3 法检验;不符合正态分布者用秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般状况

喂养期间,NT 组小鼠活动正常,皮毛光滑柔顺,

进食及二便正常,无死亡。Model 组及 CHSSC 组第 4 天开始小鼠活动减少,毛发不光泽或干枯,进食减少,各组皆无死亡。

3.2 细胞活力结果

Model 组用不同浓度的阿霉素(0、0.1、0.5、1、3、5、10、20 和 30 μ mol/L)培养 NRVM 24 h 后,用 CCK-8 法测定细胞活力,显示阿霉素以剂量依赖性方式降低 NRVM 细胞活力,而用柴胡三参胶囊预处理的 NRVM 组提高了阿霉素诱导的细胞活力($P<0.01$)。详见表 1 和图 1。

3.3 细胞凋亡结果

用不同浓度的阿霉素培养 NRVM 24 h 后以 TUNEL 法检测细胞凋亡,显示 Model 组以阿霉素剂量依赖性方式触发细胞凋亡,差异有明显统计学意义($P<0.01$),而用柴胡三参胶囊预处理后凋亡细胞数明显减少($P<0.01$)。详见图 2。在心肌组织检测中同样显示与 NT 组比较,Model 组细胞凋亡明显增加($P<0.01$);与 Model 组比较,CHSSC 组细胞凋亡减轻($P<0.01$)。详见图 3。

3.4 心肌细胞氧化应激指标结果

与 NT 组相比,Model 组中 CK、LDH、MDA 含量明显增加($P<0.01$),与 Model 组比较,CHSSC 组 CK($P<0.05$)、LDH、MDA 含量降低($P<0.01$)。详见图 4。

3.5 超声心动图检测结果

与 NT 组比较,Model 组中左室 EF 值明显下降,差异有统计意义($P<0.01$),LVIDs、LVIDd、LVESV、LVEDV 值增加,差异有统计意义($P<0.01$);与 Model 组比较,CHSSC 组小鼠心脏彩色超声情况都有不同程度的改善,其中 EF 升高明显($P<0.05$),LVESV 降低($P<0.05$),LVIDs、LVIDd、LVEDV 皆明显下降($P<0.01$)。详见图 5。

表 1 各组心肌细胞 OD 值及心肌细胞生存率

测定指标	正常细胞组	5%含药组	10%含药组	20%含药组	5%无药组	10%无药组	20%无药组
OD 均值	0.2834	0.3614	0.331	0.323	0.328	0.315	0.316
细胞生存率/%	—	97.98	83.41	29.37	—	—	—

注:心肌细胞生存率=(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔) $\times$ 100%。

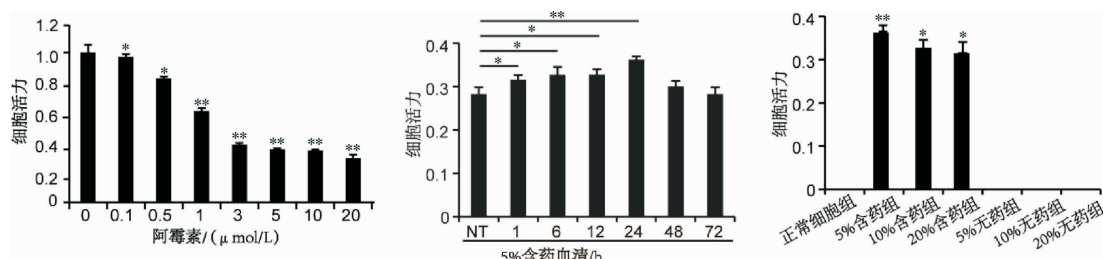


图 1 柴胡三参胶囊对 NRVM 细胞活力影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

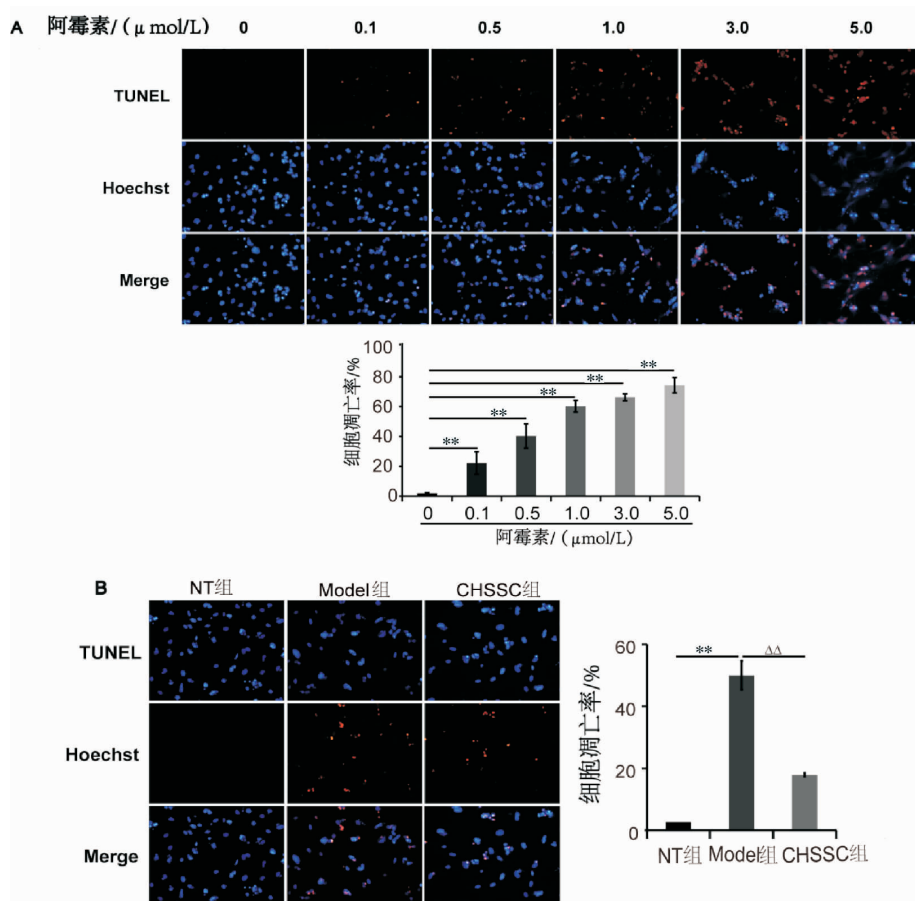


图2 不同浓度阿霉素(A)及柴胡三参胶囊(B)对NRVM细胞凋亡影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

注:与NT组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与Model组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

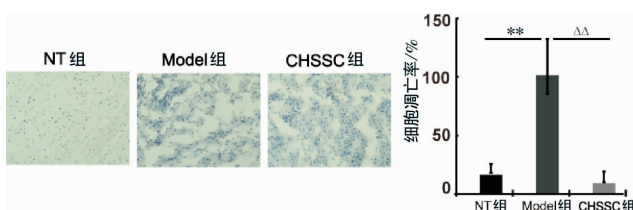


图3 柴胡三参胶囊对心肌组织细胞凋亡($\bar{x} \pm s, n=9$)

注:与NT组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与Model组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

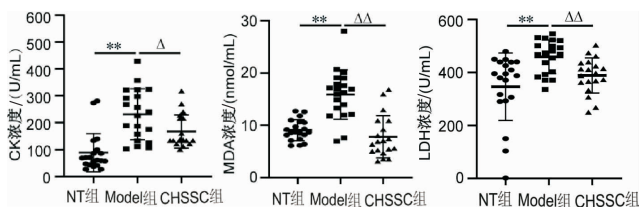


图4 柴胡三参胶囊对心肌细胞氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

注:与NT组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与Model组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3.6 NRVM及心肌组织中c-Caspase 3、p-p38MAPK、p-PI3K、p-Akt蛋白表达结果

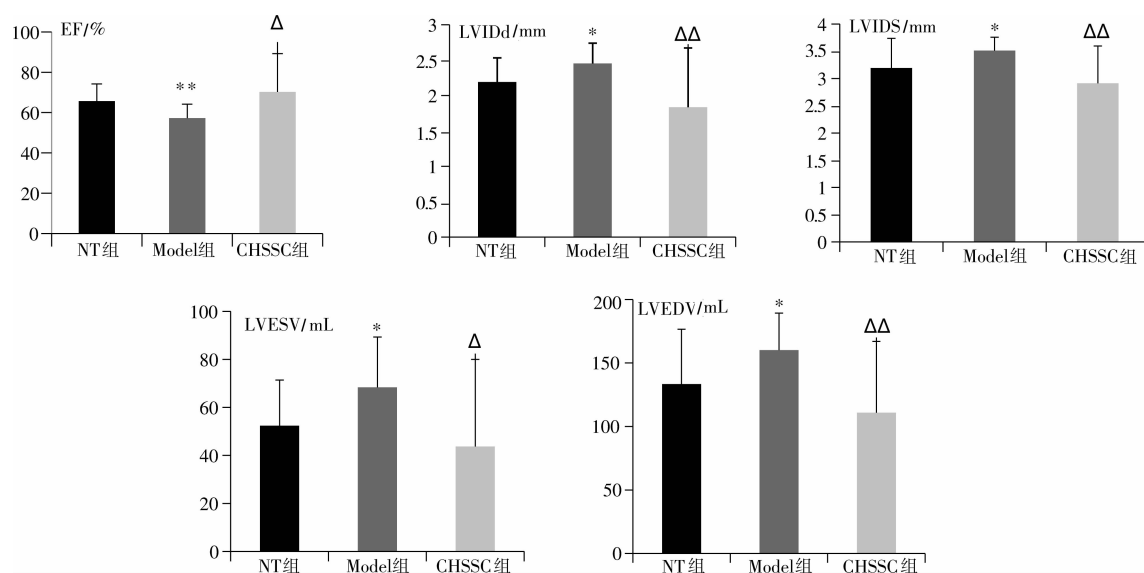
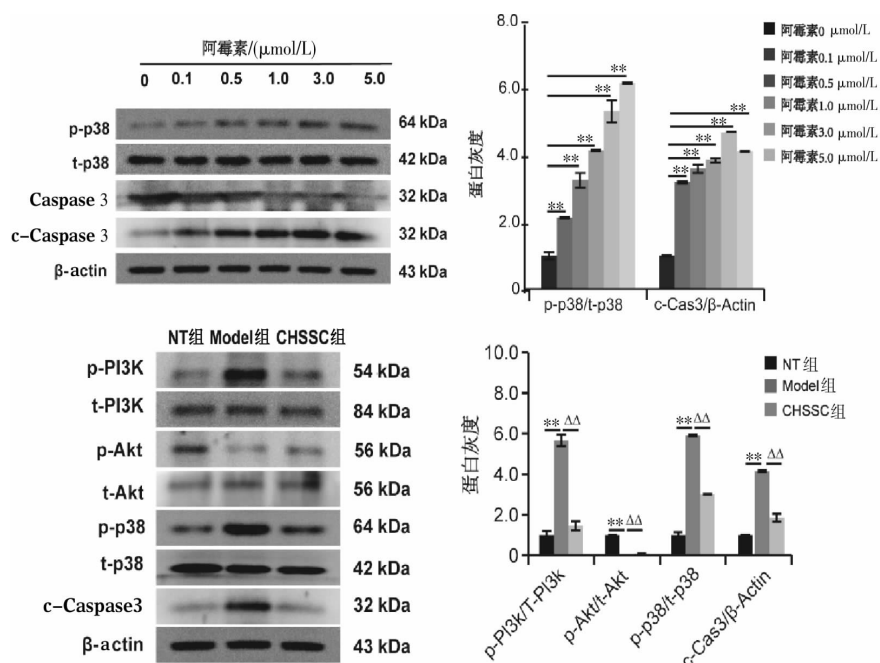
在NRVM中与NT组比较,Model组中p-p38MAPK、p-PI3K和c-Caspase 3蛋白表达水平升高,且以阿霉素浓度剂量依赖性方式增加($P<0.01$),与Model组

比较,CHSSC中p-p38MAPK、p-PI3K和c-Caspase 3表达降低($P<0.01$)。详见图6。

在心肌组织中,与NT组比较,Model组中p-PI3K、p-p38MAPK蛋白($P<0.01$)和c-Caspase 3($P<0.05$)蛋白表达水平升高,与Model组相比,CHSSC组中p-PI3K、p-p38MAPK蛋白($P<0.01$)和c-Caspase 3($P<0.05$)蛋白表达降低。详见图7。

4 讨论

蒽环类化疗药物是临床常用的一类抗肿瘤药物,但其通过累积和剂量依赖方式引起的心脏毒性使其临床应用受到限制^[11]。现代医学对抗肿瘤治疗相关心血管毒性并无特殊有效方法,主要依靠右丙亚胺、 β 受体阻滞剂或他汀类等心血管药物来减轻不良反应。但由于右丙亚胺可能干扰蒽环类抗生素的抗癌活性,并增强阿霉素的骨髓抑制作用,而且价格相对昂贵,临床应用受到限制^[12]。柴胡三参胶囊是本院针对心律失常疗效显著的经验方。方中柴胡为君,达肝经入少阳,疏泄肝郁,升发肝气,调畅气机,和解少阳之邪;臣以法半夏化痰燥湿、消痰下气;丹参活血通经、凉血消肿、清心除烦;苦参清火燥湿,兼

图5 各组小鼠心脏超声结果比较($\bar{x} \pm s, n=20$)注:与 NT 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 Model 比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。图6 柴胡三参胶囊对 NRVMc-Caspase3、p-p38MAPK、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平的影响($n=3$)注:与 NT 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 Model 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

通利小便;黄连大苦大寒,燥湿清热;青蒿辛开苦泄,宣可去壅,善开痰结,并能定悸;党参补气健脾,益气以扶其正;甘草补脾益气、滋咳润肺、缓急解毒、调和百药为佐使。在前期研究中发现,柴胡三参胶囊能明显减少缺血性心律失常大鼠心肌中 PKA、PKC 的表达及血清 CRP 水平,对心肌急性损伤具有保护作用,此外,其含药血清在一定条件下能激活 p38MAPK 信号通路和 PI3K/Akt 通路^[13]。但该药是否通过 PI3K/Akt 及 p38MAPK 通路的活化而发挥心肌保护作用尚不明确,因此,很有必要从蛋白分子水平上进一步深入探讨其保护心肌的作用机制,为蒺苘类药物所致

心脏毒性的中医药防治提供科学可靠的理论依据。

阿霉素被认为会诱导心脏毒性,因其自由基会引起线粒体损伤^[1]。鉴于一系列研究报告活性氧清除剂未能有效预防心脏毒性,这一假设不足以解释阿霉素的心脏毒性^[14]。研究表明,阿霉素可通过 Caspase 3 依赖性机制诱导 DNA 损伤,抑制 DNA 和蛋白质合成,促进肌纤维变性,抑制特定基因的转录,导致心肌细胞凋亡^[3]。而在心力衰竭过程中,心肌细胞主要以细胞凋亡和自噬形式导致细胞损失,从而引起心脏收缩功能恶化和左室重构。在此过程中,多种凋亡因子共同发挥作用,而 PI3K/Akt 信号通

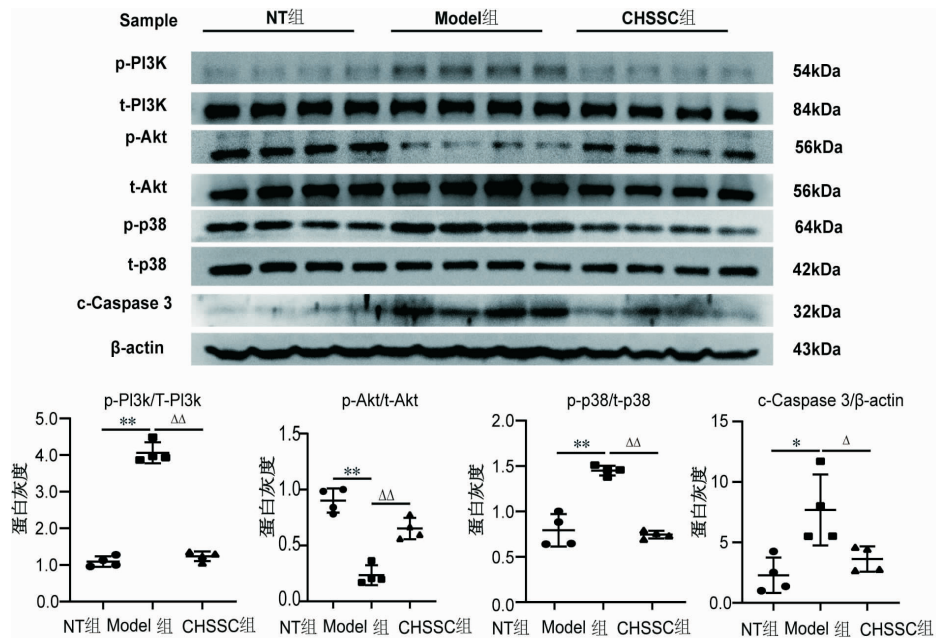


图7 柴胡三参胶囊对心肌组织中 c-Caspase 3、p-P38MAPK、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平的影响 (n=8)

注:与 NT 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 Model 比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

路可以通过直接或间接的方法抑制凋亡因子发挥效应^[15]。PI3K/Akt 信号通路是一条广泛存在的信号通路,已被认为参与多种细胞生物学过程^[16]。这一信号通路在各种病理或应激刺激下被激活,如炎症、缺血、缺氧和氧化应激等^[17]。Akt 是 PI3K 的关键下游调节因子之一,活化的 PI3K 将膜结合的磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP2)转化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP3),PIP3 作为重要的第二信使招募磷酸肌醇依赖激酶 1(PDK1)在苏氨酸 308(Thr308)处磷酸化 Akt。因此,Akt 的激活形式可以进一步与多种凋亡和生存相关的调控因子相互作用,从而促进细胞存活,抑制细胞凋亡^[18]。MAPK 已被报道为最重要的信号通路蛋白激酶,作为 MAPK 家族的一员,p38MAPK 可以被化学和物理应激激活,促进生长,导致氧化应激、凋亡和血管收缩^[19]。众所周知,氧化应激通过调节炎症信号通路和促凋亡信号通路来诱导细胞凋亡,从而导致人类和心力衰竭动物模型的心室扩张^[20-21]。氧化应激被认为可引起 p38MAPK 的激活,p38MAPK 是氧化应激所致心脏损伤的主要靶点,在氧化应激或缺血再灌注等应激状态下,p38MAPK 的激活促进心肌细胞凋亡,从而导致心肌收缩功能和左心室的恶化。相关研究证明,p38MAPK 已被证明在 DOX 诱导的心脏毒性中起重要作用^[22-23]。

本研究显示,阿霉素在体外和体内触发心脏毒性,柴胡三参胶囊可保护心肌细胞免受阿霉素诱导的氧化应激和细胞凋亡。研究表明,PI3K/Akt 信号通

路提供了心肌细胞中必不可少的细胞存活信号^[24]。在本研究中,发现柴胡三参胶囊可以激活 PI3K/Akt 信号通路并减少阿霉素诱导的心肌细胞凋亡。阿霉素诱导 Akt 磷酸化增加,这与 SWAIN 等人的发现相似^[25-26],并被认为是一种补偿性保护性上调。然而,本实验表明,经过柴胡三参胶囊预处理后,磷酸化的 Akt 降低,这可能与阿霉素诱导的 Akt 磷酸化的时间过程相关,阿霉素治疗可以在短时间内诱导补偿性 Akt 磷酸化增加,但随着时间推移,磷酸化量逐渐较少^[27],因本研究暂时未做时间梯度的对比,在进一步实验中可以完善这部分验证。柴胡三参胶囊预处理后,促凋亡蛋白,如活化的 Caspase 3 和 p-p38MAPK 在体外和体内均减少,表明柴胡三参胶囊可以通过激活 Akt 通路抑制细胞凋亡。既往研究显示,阿霉素可诱导 p38MAPK 的激活,导致炎症反应和细胞损伤^[28]。本研究中,发现阿霉素导致 p38MAPK 激活增加,而柴胡三参胶囊治疗后大大降低了蛋白激活,鉴于氧化应激可以激活 p38MAPK 信号通路,柴胡三参胶囊可以有效地降低 p38MAPK 磷酸化并减轻细胞炎症,从而抑制心肌细胞凋亡和损伤。

综上所述,柴胡三参胶囊可保护心脏免受阿霉素诱导的氧化应激和细胞凋亡损伤,其机制可能与调节 PI3K/Akt 和 p38MAPK 通路有关,但是否与剂量存在密切关系需进一步探索。

参考文献

- [1] ARE C, BEMAN R S, WYLD L, et al. Global curriculum in surgical oncology[J]. *European Journal of Surgical Oncology*, 2016, 23(6):1792-1795.
- [2] DENT S, LIU P, BREZDEN-MASLEY C, et al. Cancer and cardiovascular disease: The complex labyrinth[J]. *Journal of Oncology*, 2015, 2015: 516450.
- [3] ZHOU S, STARKOV A, FROBERG M K, et al. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(2): 771-777.
- [4] CHAANINE A H, HAJJAR R J. AKT signalling in the failing heart[J]. *European Journal of Heart Failure*, 2011, 13 (8): 825-829.
- [5] 刘建和,胡熙苒,何少平,等.柴胡三参胶囊对实验性心律失常保护作用的研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2010,8(9):1073-1075.
- [6] 刘建和,吴亦之,刘锦霞,等.柴胡三参胶囊对缺血性心律失常大鼠模型心肌PKA与PKC表达水平影响的研究[J].*中医导报*, 2016,22(16):22-25.
- [7] 刘建和,赵吉锐,雷娄芳,等.柴胡三参胶囊对p38MAPK通路介导BMSCs向心肌细胞分化的干预研究[J].*中国中医急症*,2018,27(7): 1163-1166,1170.
- [8] SHEN T, ANEAS I, SAKABE N, et al. Tbx20 regulates a genetic program essential to adult mouse cardiomyocyte function[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(12): 4640-4654.
- [9] HULLIN R, McTRICH M, SARRE A, et al. Diverging effects of enalapril or eplerenone in primary prevention against doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cardiovascular Research*, 2017, 114(2): 272-281.
- [10] 徐叔云.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002.
- [11] MADONNA R, CADEDDU C, DEIDDA M, et al. Improving the preclinical models for the study of chemotherapy-induced cardiotoxicity: A position paper of the Italian working group on drug cardiotoxicity and cardioprotection[J]. *Heart Failure Reviews*, 2015, 20(5): 621-631.
- [12] WANG S D, WANG Y G, ZHANG Z G, et al. Cardioprotective effects of fibroblast growth factor 21 against doxorubicin-induced toxicity via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(8): e3018.
- [13] 刘建和,赵吉锐,雷娄芳,等.柴胡三参胶囊含药血清对骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞过程中PI3K/Akt信号通路干预[J].*辽宁中医药大学学报*,2018,20(8):15-18.
- [14] ASHOUR A E, SAYED-AHMED M M, ABD-ALLAH A R, et al. Metformin rescues the myocardium from doxorubicin-induced energy starvation and mitochondrial damage in rats[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 2012: 434195.
- [15] 范亮亮,马立宁,彭元亮,等.PI3K/AKT信号通路于心力衰竭[J].*生命科学研究*,2015,19(1):85-90.
- [16] GUO J P, DAI X P, LAURENT B, et al. AKT methylation by SET-DB1 promotes AKT kinase activity and oncogenic functions[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(2): 226-237.
- [17] LI X F, HU X R, WANG J C, et al. Short-term hesperidin pretreatment attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein expression via the PI3K/Akt pathway[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 39(5): 1850-1862.
- [18] ZHANG L,ZHANG X Z. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat[C]//中国脑血管病大会 2014 论文汇编,2014:390-391.
- [19] LI J, ZHAO Z, LIU J, et al. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF- β 1/Smads pathway[J]. *Cell Proliferation*, 2010, 43(4): 333-343.
- [20] NABEEBACCUS A, ZHANG M, SHAH A M. NADPH oxidases and cardiac remodelling[J]. *Heart Failure Reviews*, 2011, 16(1): 5-12.
- [21] NAKAMURA K, KUSANO K F, MATSUBARA H, et al. Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Journal of Cardiac Failure*, 2005, 11(2): 117-123.
- [22] LI M F, YE J J, ZHAO G J, et al. Gas6 attenuates lipopolysaccharide induced TNF α expression and apoptosis in H9C2 cells through NF κ B and MAPK inhibition via the Axl/PI3K/Akt pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 44(3): 982-994.
- [23] HUBBARD B P, SINCLAIR D A. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014, 35(3): 146-154.
- [24] LOTRIONTE M, BIONDI-ZOCCAI G, ABBATE A, et al. Review and Meta-analysis of incidence and clinical predictors of anthracycline cardiotoxicity[J]. *The American Journal of Cardiology*, 2013, 112(12): 1980-1984.
- [25] SWAIN S M, WHALEY F S, EWER M S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials[J]. *Cancer*, 2003, 97(11): 2869-2879.
- [26] ZHOU Z, ZHANG Y, LIN L, et al. Apigenin suppresses the apoptosis of H9C2 rat cardiomyocytes subjected to myocardial ischemia[⊖]reperfusion injury via upregulation of the PI3K/Akt pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 18(2): 1560-1570.
- [27] CAO Y, RUAN Y, SHEN T, et al. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 2014: 674219.
- [28] HENRIKSEN P A. Anthracycline cardiotoxicity: An update on mechanisms, monitoring and prevention[J]. *Heart*, 2018, 104(12): 971-977.

(本文编辑 苏 维)