

藁本内酯对阿霉素所致心肌损伤的保护作用

孙嘉¹, 刘冰¹, 张陆勇² (1. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东药科大学新药研发中心, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 探讨藁本内酯对阿霉素所致心肌损伤的作用及机制。**方法** 采用 MTT 法检测藁本内酯对阿霉素诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 细胞存活率的影响。通过流式细胞术分析藁本内酯对阿霉素诱导的活性氧(ROS)水平及 H9c2 细胞焦亡的影响。采用免疫印迹法检测 H9c2 细胞 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达情况。通过加入过氧化氢, 探究藁本内酯对阿霉素所致 H9c2 细胞焦亡是否由 ROS 所介导。将小鼠随机分成 4 组, 每组 5 只, 即正常组、藁本内酯组、模型组(阿霉素)、治疗组(阿霉素+藁本内酯)。以阿霉素($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射, 每周 1 次, 共注射 3 周, 累积量为 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。3 周后, 以藁本内酯($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射, 每天 1 次, 连续给药 3 周。记录心脏质量与体质量比值及心脏超声检查, 结合 HE 和 Masson 染色观测心脏病理变化, 探究藁本内酯对阿霉素小鼠心脏功能和心肌损伤的影响。采用免疫印迹法检测藁本内酯对阿霉素小鼠心肌 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达的影响情况。**结果** 与正常组比较, 模型组 H9c2 细胞存活率明显降低($P < 0.05$); 细胞内 ROS 含量、NLRP3 蛋白表达、Caspase-1 水解切割和 Caspase-1/7-AAD 双阳性心肌细胞率明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 治疗组细胞存活率增加($P < 0.05$); 细胞内 ROS 含量、NLRP3 蛋白表达、Caspase-1 水解切割和 Caspase-1/7-AAD 双阳性心肌细胞率减少($P < 0.05$)。而藁本内酯对 Caspase-1/7-AAD 双阳性心肌细胞率的作用可被过氧化氢所拮抗($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组小鼠心肌纤维排列紊乱, 心肌纤维化明显; 左心室收缩末期内径和左心室舒张末期内径明显增大($P < 0.05$), 心脏射血分数和短轴缩短率、心脏质量与体质量比值明显减少($P < 0.05$); 心肌组织 NLRP3 蛋白表达和 Caspase-1 水解切割明显增多($P < 0.05$)。与模型组比较, 治疗组小鼠心功能和心肌损伤检测指标均得到有效改善($P < 0.05$); 心肌组织 NLRP3 蛋白表达、Caspase-1 水解切割明显减少($P < 0.05$)。**结论** 藁本内酯可改善阿霉素所致心肌细胞损伤。

关键词: 藁本内酯; 阿霉素; 心肌损伤; ROS; NLRP3 炎症小体; 细胞焦亡; H9c2 细胞; 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)12-1776-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.007

Protective Effect of Ligustilide on Myocardial Injury Induced by Doxorubicin

SUN Jia¹, LIU Bing¹, ZHANG Luyong² (1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. The Center for Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of ligustilide on myocardial injury induced by doxorubicin. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of different concentrations of ligustilide on the survival rate of H9c2 cells induced by doxorubicin. The effect of ligustilide on doxorubicin-induced reactive oxygen species (ROS) and pyroptosis of H9c2 cells was analyzed by flow cytometry. Western Blot was used to detect the expression of NLRP3 and Caspase-1 protein in H9c2 cells. Our study is to explore whether the effect of ligustilide on doxorubicin-induced pyroptosis in H9c2 cells is mediated by ROS, which was formed by adding hydrogen peroxide.

收稿日期: 2021-05-26

作者简介: 孙嘉, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药理学。Email: 15214400457@163.com。通信作者: 张陆勇, 男, 博士, 教授, 研究方向: 新药筛选、毒理学。Email: lyonzhang@163.com。

基金项目: 广东省普通高校药物早期毒性评价创新团队项目(2018KCXTD016)。

Mice were randomly divided into 4 groups, with five mice in each group: control group, ligustilide group, model group(doxorubicin) and treatment group(doxorubicin+ligustilide). Doxorubicin($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was injected intraperitoneally once a week for 3 weeks, with a cumulative amount of $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. After 3 weeks, ligustilide($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was injected intraperitoneally once a day for 3 weeks. The effects of ligustilide on myocardial injury and cardiac function in doxorubicin mice were investigated by recording the heart weight/body weight (HW/BW) and echocardiogram of mice, and observing pathological changes of heart with HE and Masson staining. Western blot was used to detect the expression of NLRP3 and Caspase-1 protein in myocardium of doxorubicin mice. **Results** Compared with the control group, the survival rate of H9c2 cells in the model group decreased significantly ($P < 0.05$); ROS level, NLRP3 protein expression, the cleaved Caspase-1 and active Caspase-1^{+/7}-AAD⁺ cells in H9c2 cells increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the cell survival rate in the treatment group increased ($P < 0.05$); ROS level, NLRP3 protein expression, the cleaved Caspase-1 and active Caspase-1^{+/7}-AAD⁺ cells decreased ($P < 0.05$). However, the effect of ligustilide on active caspase-1^{+/7}-AAD⁺ cells can be antagonized by hydrogen peroxide ($P < 0.05$). Compared with the control group, the myocardial fibers in the model group were disordered and the myocardial fibrosis was obvious. Left ventricular end-systolic diameter and left ventricular end-diastolic diameter were significantly increased ($P < 0.05$), ejection fraction, fractional shortening, and HW/BW were significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of NLRP3 protein and the cleaved Caspase-1 in myocardium increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the indexes of cardiac function and myocardial injury in the treatment group were effectively improved. In addition, the expression of NLRP3 protein and the cleaved Caspase-1 in myocardial tissue decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Ligustilide can improve doxorubicin-induced myocardial cell injury.

Keywords: Ligustilide; doxorubicin; myocardial injury; ROS; NLRP3 inflammasome; pyroptosis; H9c2 cells; mice

阿霉素是临床上蒽环类抗肿瘤药物^[1], 具有广谱的抗肿瘤活性^[2]。然而, 其临床应用受到心脏功能障碍甚至心力衰竭等急性或慢性毒副作用的限制^[3]。右雷佐生是美国食品药品监督管理局(FDA)唯一批准的用于预防阿霉素所致心肌损伤的药物, 但其具有增加继发性恶性肿瘤的潜在风险^[4]。因此, 亟待寻找新的有效治疗阿霉素心脏毒性的药物。

随着我国中药现代化建设步伐的加快, 传统中药及其有效成分在新药研发领域中的作用日益凸显^[5]。藁本内酯是我国传统中药伞形科植物当归的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抑制癌细胞增殖等药理作用^[6-8]。研究^[9]报道, 藁本内酯可保护兔免受脂多糖诱导的内毒素休克并改善其心功能。此外, 有研究^[10]表明, 藁本内酯对缺血性心肌病具有保护作用。然而, 尚无详实研究探讨藁本内酯对阿霉素所致心肌损伤的作用。

因此, 本实验拟在体内、外实验中探究藁本内酯是否对阿霉素所导致的心肌病具有保护作用并探讨其机制, 以期防治阿霉素的毒性研究提供

一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物 大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞, 来源于中国科学院上海细胞库。SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 18~22 g, 来源于广东省医学实验动物中心, 生产许可证号: SCXK(粤)2018-0002, 动物质量合格证号: 44005800012375。饲养于广东药科大学 SPF 级实验动物中心, 12 h 昼夜交替, 温度 22~26 ℃, 湿度 50%~70%, 使用许可证号: SYXK(粤)2017-0125。动物实验得到广东药科大学实验动物管理与使用委员会批准, 批准号: gdpulacspf2017335。

1.2 药物及试剂 藁本内酯(纯度≥98%, CAS 号: 4431-01-0), 上海麦克林生化科技有限公司; 阿霉素(CAS 号: 25316-40-9), 美国 MCE 公司; 南美胎牛血清(批号: 2243863)、DMEM 培养基(批号: 8120373)、胰酶(批号: 25200072), 美国 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS, 批号: PM291317160), 北

京酷来搏科技有限公司; ECL 发光液(批号: BL523A), 北京兰杰柯科技有限公司; Caspase-1 检测试剂盒(批号: FAM600-1), 美国 Cell Technology 公司; NLRP3(批号: A6345)、Caspase-1(批号: A0964)抗体, 武汉泰克生物科技有限公司; β -actin(批号: GTX109639)、二抗山羊抗兔 IgG(批号: GTX213110-01), 美国 Gene Tex 公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号: SK258367), 美国 Thermo Scientific 公司; 噻唑蓝四唑溴化铵(MTT, CAS 号: 298-93-1)、2, 7 二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA, 批号: 118M4012V)、过氧化氢(批号: BCCF3861), 美国 Sigma 公司; 二甲基亚砜(DMSO, 批号: Q5733), 西基(上海)生物科技有限公司; 聚山梨酯-80(批号: J0506A), 大连美仑生物技术有限公司。

1.3 仪器 SW-CJ-1FD 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; HF151UV 型 CO₂ 培养箱, 力康生物医疗科技控股有限公司; AFC2 型流式细胞仪、1510 型全波长酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Microfugu20R 型高速冷冻离心机、Allegra X-12R 型大型离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; 3300 Mini 型化学发光成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; 2100 型超声检测仪, 加拿大 VIVO 公司; Apotome 3 型荧光显微镜, 德国 ZEISS 公司; ME204E 型电子天平, 美国 METTLER TOLEDO 公司。

1.4 细胞培养与分组 H9c2 细胞培养于质量分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 标准加湿培养箱中培养。藁本内酯溶于 DMSO 中配制成浓度为 50 mmol·L⁻¹ 的母液, 临用前以 DMEM 培养基配制成相应的浓度。过氧化氢的浓度为 100 μ mol·L⁻¹。细胞实验分组: 正常组、藁本内酯组(50 μ mol·L⁻¹ 藁本内酯)、模型组(5 μ mol·L⁻¹ 阿霉素)、治疗组(阿霉素+藁本内酯)。

1.5 MTT 法检测细胞存活率 将 H9c2 细胞消化并计数, 以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 细胞贴壁后, 用不同浓度药物处理细胞 48 h。药物干预结束后, 每孔中加入 180 μ L 无血清培养基和 20 μ L MTT 溶液, 在 37 ℃ 下避光孵育 4 h。除去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 轻轻摇晃, 最后使用酶标仪在 570 nm 下测量吸光度(A)值。细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.6 DCFH-DA 标记法检测细胞内活性氧(ROS)的水平 将 H9c2 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后

给予药物干预 24 h, 用终浓度为 10 μ mol·L⁻¹ 的 DCFH-DA 在 37 ℃ 条件下避光孵育 30 min, PBS 重悬 3 次, 流式细胞仪以 488 nm 的激发波长和 525 nm 的发射波长进行分析。

1.7 流式细胞术分析细胞焦亡 将 H9c2 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后给予药物干预 24 h, 收集细胞上清, 并用 PBS 洗 1 次, 胰酶消化细胞, 转移至离心管, 以离心半径 8 cm、1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。弃上清, 用 200 μ L DMEM 培养基重悬细胞。根据 Caspase-1 检测试剂盒说明书进行标记, 然后通过流式细胞术检测 H9c2 细胞的焦亡情况, 并进行统计分析。

1.8 蛋白免疫印迹法分析蛋白表达量 将 H9c2 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后给予药物处理; 给药结束后, 加入细胞裂解液(RIPA:PMSF = 100:1)获得全细胞提取物。动物实验则将各组小鼠心脏组织经匀浆离心后收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度, 制备样品进行电泳, 电转及 5% 脱脂奶粉封闭的过程后, 分别在 4 ℃ 下孵育一抗过夜, 第 2 天室温孵育二抗 1 h, 最后在凝胶成像仪下进行显影, 使用 ImageJ 分析软件对蛋白条带的灰度值进行分析。

1.9 小鼠模型复制与分组 将 20 只 C57BL/6 雄性小鼠, 随机分成 4 组, 每组 5 只, 即正常组、藁本内酯组、模型组(阿霉素)、治疗组(阿霉素+藁本内酯)。模型组和治疗组小鼠腹腔注射阿霉素 5 mg·kg⁻¹, 按体质量调整给药量, 正常组及藁本内酯组腹腔给予等体积 PBS 缓冲液, 每周 1 次, 共注射 3 周, 累积量为 15 mg·kg⁻¹[11]。3 周后, 藁本内酯溶于 3%(W/V) 的聚山梨酯-80 中, 治疗组腹腔注射 20 mg·kg⁻¹ 藁本内酯[12], 按体质量调整给药量; 同时藁本内酯组给予相同剂量的藁本内酯。每天 1 次, 连续给药 3 周。

1.10 超声检测仪检测小鼠心功能 初次给予阿霉素后第 6 周, 称取各组小鼠质量, 然后对每组小鼠进行心脏超声检查。腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠 10~20 mL·kg⁻¹, 待小鼠处于麻醉状态后, 固定在恒温板上, 胸部脱毛。应用心脏超声检测仪, 对每组小鼠进行心脏超声心动图检查, 观察小鼠心功能变化。所有超声心动检查均连续检测 3 个心动周期, 取各组检测值的平均值。

1.11 小鼠心脏取材与心脏质量与体质量比值记录(HW/BW) 完成“1.10”项下小鼠心功能检测后, 按顺序解剖组织进入胸腔, 心尖微向左旁开 3~4 mm

处插入磨钝的一次性静脉注射器，注入少量冷的 PBS 充盈心脏后剪开右心耳，匀速推入 PBS 进行灌注。待肝肾组织由深红色变为浅红色后，随后小心地分离和称量心脏质量，记录各组小鼠心脏质量与体质量比值。心脏从最大横切面分离成两部分，一部分放入冻存管并置于 -80°C 保存，用于“1.8”项下蛋白检测；另一部分放入 4% 的多聚甲醛中固定组织样品 24 h。

1.12 HE 染色观察 将固定于 4% 多聚甲醛的心脏组织取出，脱水，石蜡包埋，切片，脱蜡，使用苏木素和伊红对组织进行染色，用中性树胶对切片封片，在光镜下以不同的视野在相同的设置下观察心脏组织的病理学改变。

1.13 Masson 染色观察 将固定于 4% 多聚甲醛的心脏组织取出，常规脱水，石蜡包埋，切片，按照 Masson 复合染液说明书进行染色。以 95% 乙醇与无水乙醇展开脱水处理后，以二甲苯予以透明，待其干透前滴加中性树胶，确保切片充分浸泡。使用中性树胶封片，待风干后镜下观察。

1.14 统计学处理方法 采用 GraphPad Prism 7.01 统计软件，计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 藁本内酯可抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞存活率降低 藁本内酯相对分子质量为 190.24，分子结构见图 1。如图 2-A 所示，阿霉素可呈剂量依赖性抑制 H9c2 细胞存活率，其 IC_{50} 值为 $(5.78 \pm 0.70) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，故后续实验选择 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿霉素建立 H9c2 心肌细胞损伤模型。另外，如图 2-B 所示，使用不同浓度

(0~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 藁本内酯刺激 H9c2 细胞，结果显示，当藁本内酯浓度 $\leq 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，细胞存活率 $> 90\%$ ，藁本内酯对 H9c2 细胞的存活率无明显影响 ($P > 0.05$)，差异无统计学意义。图 2-C 显示，25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的藁本内酯均可抑制阿霉素引起的细胞存活率降低 ($P < 0.05$)，其中 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的藁本内酯作用较为明显，因此，选用 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度用于后续实验。

2.2 藁本内酯可下调阿霉素诱导的 H9c2 细胞 ROS 水平增加 见图 3，在 H9c2 细胞中，与正常组比较，模型组 ROS 的含量明显升高 ($P < 0.05$)，藁本内酯组 ROS 含量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与模型组比较，治疗组 ROS 的含量明显降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明，藁本内酯可明显抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞内 ROS 含量升高。

2.3 藁本内酯可抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡 如图 4 所示，在 H9c2 细胞中，与正常组比较，模型组 Caspase-1/7-AAD 双阳性心肌细胞率明显升高 ($P < 0.05$)，藁本内酯组双阳性心肌细胞率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与模型组比较，治疗组 Caspase-1/7-AAD 双阳性心肌细胞率明显降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

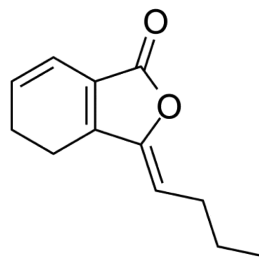
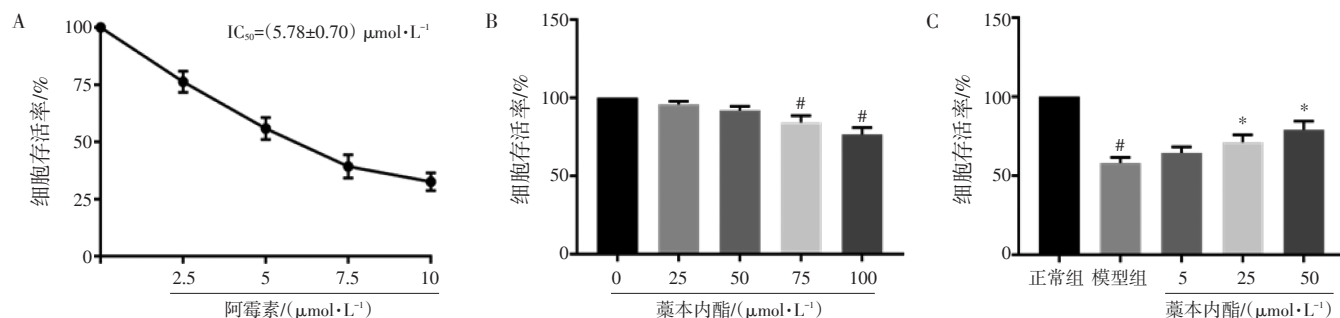


图 1 藁本内酯的分子结构

Figure 1 The molecular structure of ligustilide

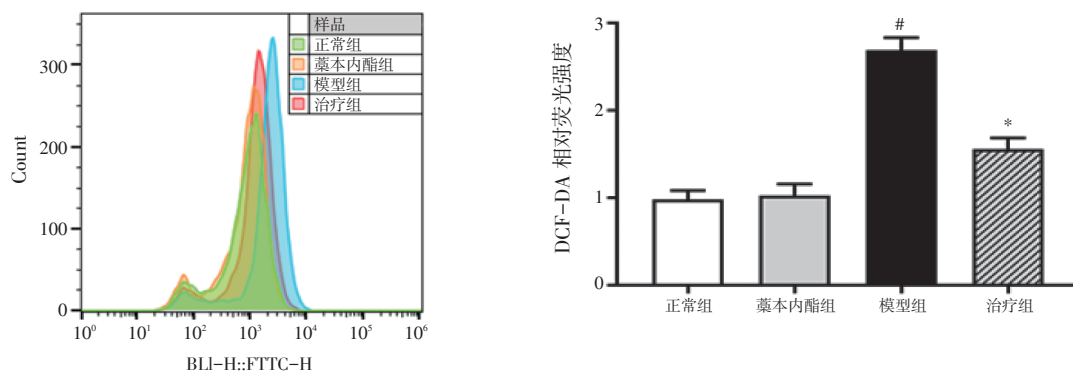


注：A. 阿霉素对 H9c2 细胞存活率的影响；B. 藁本内酯对 H9c2 细胞存活率的影响；C. 藁本内酯对阿霉素诱导的 H9c2 细胞存活率的影响。

与正常组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较， $^{\#}P < 0.05$ ；与模型组比较， $^{*}P < 0.05$

图 2 藁本内酯对阿霉素诱导的 H9c2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

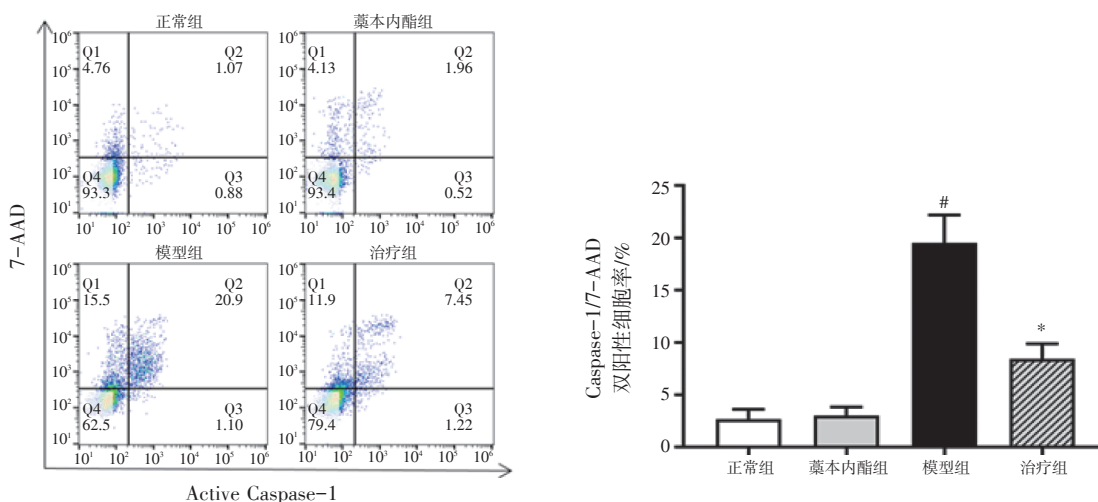
Figure 2 The effect of ligustilide on doxorubicin-induced cell viability in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

图3 藜本内酯对阿霉素诱导的 H9c2 细胞 ROS 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 3 The effect of ligustilide on doxorubicin-induced ROS levels in H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



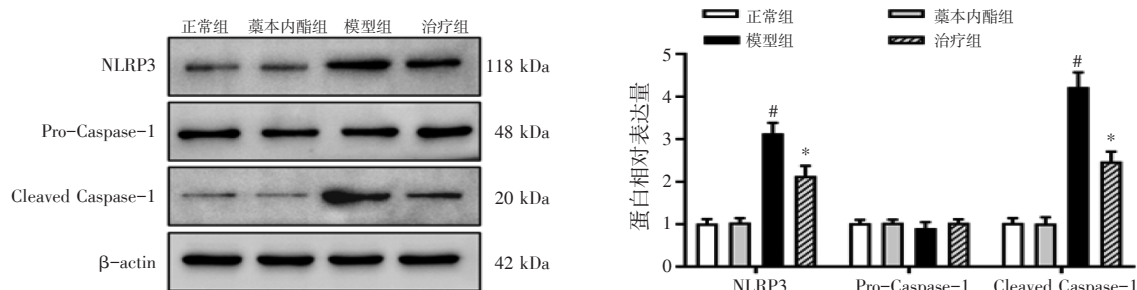
注: 与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

图4 藜本内酯对阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 The effect of ligustilide on doxorubicin-induced pyroptosis in H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 藜本内酯可抑制阿霉素诱导的 NLRP3 炎症小体的激活 如图 5 所示, 与正常组比较, 模型组 H9c2 细胞中 NLRP3 蛋白表达及 Caspase-1 水解切割 (Cleaved Caspase-1) 均明显升高 ($P < 0.05$), 藜本内酯组 NLRP3 蛋白表达及 Caspase-1 水解切割的差异

均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 治疗组 H9c2 细胞中 NLRP3 蛋白表达及 Caspase-1 水解切割均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结合“2.3”项, 说明藜本内酯可以抑制阿霉素诱导的 NLRP3 炎症小体介导的 H9c2 细胞焦亡。



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

图5 藜本内酯对阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 The expression of associated proteins of doxorubicin-induced pyroptosis in H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.5 藁本内酯可通过下调 ROS 水平抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡 如图 6-A 所示, 与模型组比较, 治疗组藁本内酯可降低阿霉素诱导的 H9c2 细胞 ROS 含量($P < 0.05$); 与治疗组比较, 加入过氧化氢后, 藁本内酯降低阿霉素诱导的 H9c2 细胞 ROS 含量作用被拮抗($P < 0.05$)。如图 6-B 所示, 与模型组比较, 治疗组藁本内酯可降低阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡($P < 0.05$); 与治疗组比较, 加入过氧化氢后, 藁本内酯降低阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡作用被拮抗($P < 0.05$)。综上所述, 藁本内酯可通过下调 ROS 水平抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡。

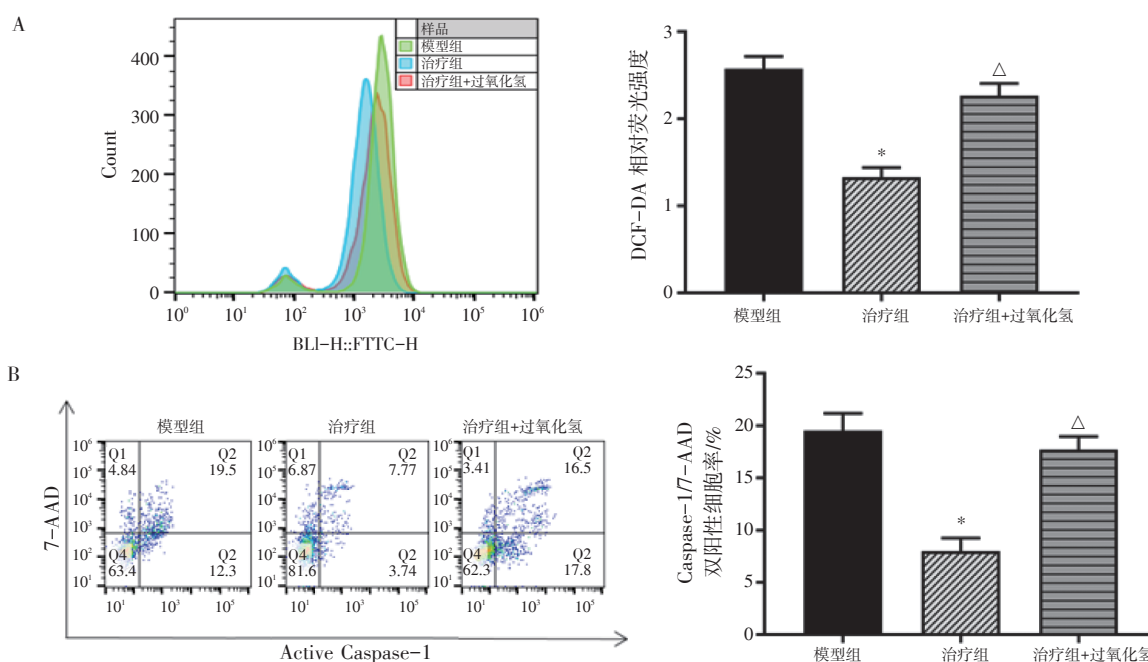
2.6 藁本内酯可改善阿霉素小鼠心功能 如图 7 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠左心室收缩末期内径(LVESD)和左心室舒张末期内径(LVEDD)明显增大, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 并伴随收缩功能参数心脏射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)、心脏质量与体质量比值明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果表明, 阿霉素腹腔注射诱导小鼠心肌损伤模型复制成功。与模型组比较, 治疗组小鼠左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径、心脏射血分数、短轴缩短率和心脏质量与体质量比值等反映心脏功能指标均明显改善, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 藁本内酯可减轻阿霉素所致的小鼠心肌损伤 如图 8 所示, 正常组和藁本内酯组小鼠心肌结构正常, 纤维排列规则整齐, 细胞核居中, 胞浆纹理清晰, 未见心肌纤维化表现; 模型组小鼠心肌纤维排列紊乱、肌丝断裂, Masson 染色可见大量蓝色胶原纤维, 心肌纤维化明显。与模型组比较, 治疗组小鼠心肌病变较轻, 心肌纤维密度较高, 可见纤维排列稍微紊乱、细胞形态大体完整, 蓝色胶原纤维也较模型组少。结果表明, 藁本内酯可减轻阿霉素小鼠心肌病变。

2.8 藁本内酯可减少阿霉素小鼠心肌 NLRP3 炎症小体的激活 如图 9 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠心肌 NLRP3 蛋白表达和 Caspase-1 水解切割明显增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 治疗组小鼠心肌 NLRP3 蛋白表达和 Caspase-1 水解切割明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明, 藁本内酯可以减少阿霉素诱导的小鼠心肌 NLRP3 炎症小体的激活。

3 讨论

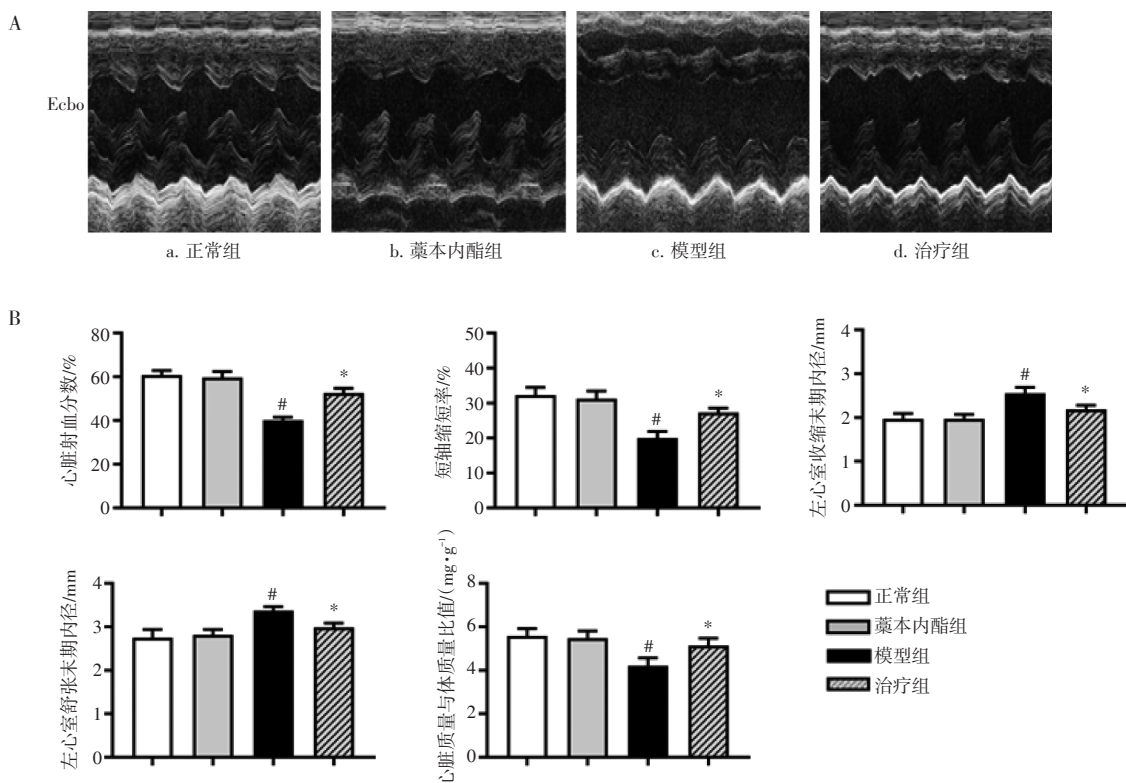
阿霉素是一种广谱蒽环类化疗药物, 因其心脏毒性导致其在临床的使用受到限制, 且阿霉素造成的心肌损伤是不可逆的^[3]。目前现有药物对阿霉素诱导



注: A. 加入过氧化氢后, 藁本内酯对阿霉素诱导的 ROS 水平的影响; B. 加入过氧化氢后, 藁本内酯对阿霉素诱导的 Caspase-1/7-AAD 双阳性心肌细胞率的影响。与模型组比较, $*P < 0.05$; 与治疗组比较, $\Delta P < 0.05$

图 6 藁本内酯通过下调 ROS 水平抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 Ligustilide inhibited doxorubicin-induced pyroptosis by down-regulating ROS levels in H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: A. 各组小鼠的心脏超声图; B. 各组小鼠的心功能比较。与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

图7 藜本内酯对阿霉素诱导的小鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 7 The effect of ligustilide on heart function induced by doxorubicin in mice($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

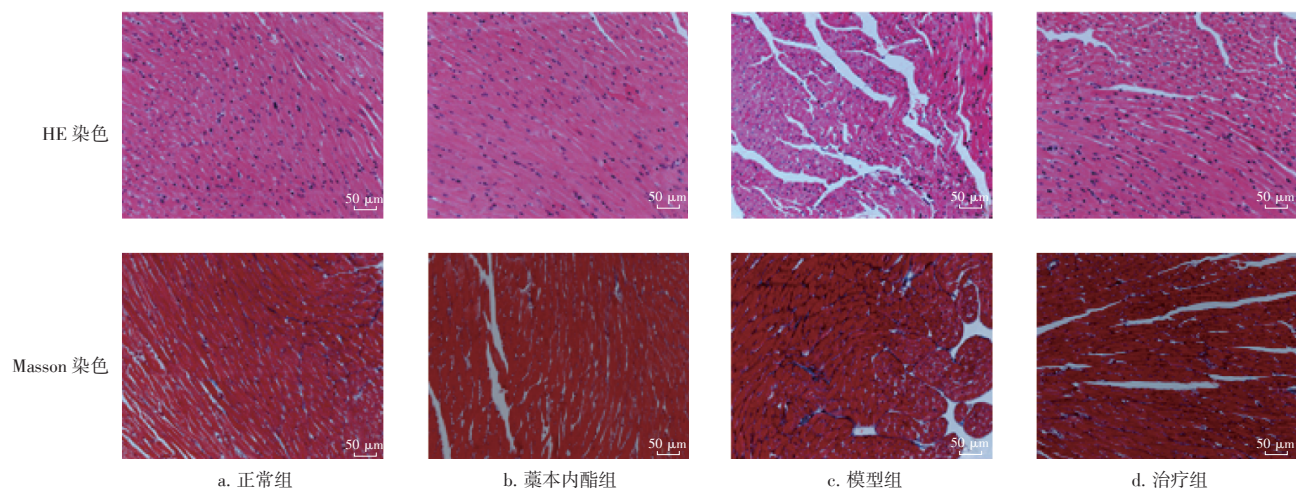


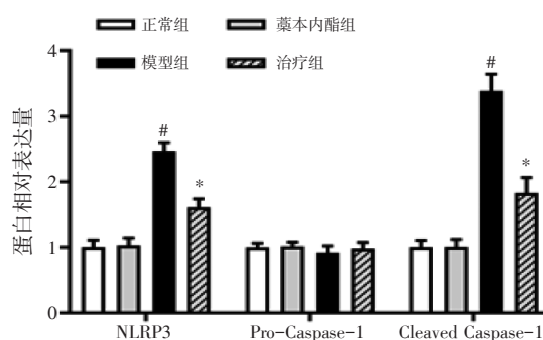
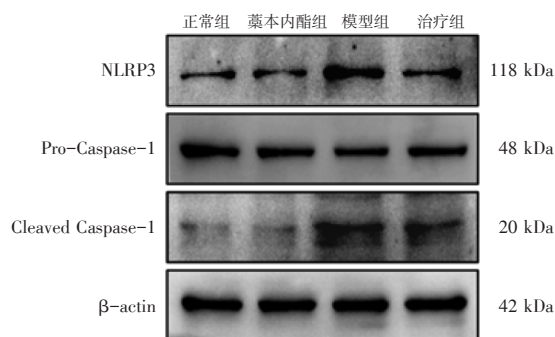
图8 藜本内酯对阿霉素诱导的小鼠心肌损伤的影响(HE染色和Masson染色, $\times 400$)

Figure 8 The effects of ligustilide on myocardial injury induced by doxorubicin in mice(HE staining and Masson staining, $\times 400$)

的心肌病的治疗效果不佳且预后较差,故亟需寻找新的治疗药物^[4]。藜本内酯是当归的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化等多种药理作用^[12]。在本研究中,通过MTT实验,发现藜本内酯可以抵抗由阿霉素引起的H9c2细胞毒性,并且进一步的动物实验也发现,藜本内酯可减轻阿霉素所致心肌损伤及心功能障碍。这些结果表明,藜本内酯对阿霉素导致的心

肌毒性具有保护作用。

NLRP3炎症小体由NLRP3、ASC适配器蛋白和Caspase-1组成^[13]。NLRP3炎症小体的激活可诱导Caspase-1自我水解激活,进一步促进促炎性白细胞介素(如IL-1 β)的成熟与释放。此外,激活的Caspase-1可水解切割焦亡执行蛋白,导致细胞膜通透性增加,水分内流、细胞膨胀并破裂,引起细胞



注：与正常组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$

图 9 藁本内酯对阿霉素小鼠心肌组织中 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 9 The effect of ligustilide on the expression of NLRP3 inflammasome-related proteins in heart tissue of doxorubicin-induced mice($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

焦亡^[14-15]。

研究^[13]发现，NLRP3 炎症小体介导的心肌细胞焦亡在多种心血管疾病的发生发展中起重要作用。NLRP3 炎症小体介导的心肌细胞焦亡是介导阿霉素所致心肌病的关键因素，抑制 NLRP3 炎症小体或细胞焦亡已成为开发治疗阿霉素心肌毒性药物的重要途径^[16]。本研究通过细胞和动物实验均观察到，藁本内酯可以明显减少阿霉素诱导的 NLRP3 蛋白表达、Caspase-1 的水解切割增多；并进一步通过流式细胞术验证，藁本内酯可以减少阿霉素诱导的 H9c2 细胞焦亡，证明藁本内酯可抑制阿霉素诱导的 NLRP3 炎症小体及心肌细胞焦亡。此外，Hu Jia 等^[17]发现，藁本内酯可通过抑制 NLRP3 炎症小体激活和小胶质细胞焦亡来减轻缺血性脑损伤。结合我们实验提示，藁本内酯可能在多种细胞中均能抑制 NLRP3 炎症小体及细胞焦亡。考虑到 NLRP3 炎症小体及细胞焦亡参与多种疾病的发生发展，提示藁本内酯可为炎症小体相关类疾病的药物研发提供潜在候选药物。

NLRP3 炎症小体可被多种机制激活，其中 ROS 被认为是 NLRP3 炎症小体激活的重要机制^[18-19]。有研究^[20-22]表明，过量的 ROS 产生是阿霉素诱发心脏毒性的主要原因之一。此外，Hu Shanshan 等^[14]发现，ROS/NLRP3 炎症小体/细胞焦亡信号参与促进阿霉素诱导的心肌毒性，而抑制此信号可有效改善阿霉素引起的心肌损伤。在本研究中，我们通过 DCFH-DA 标记法检测 H9c2 细胞内 ROS 的含量，发现藁本内酯能下调阿霉素诱导的 H9c2 细胞内 ROS 水平增多；进一步实验观察到，藁本内酯抑制阿霉素引起的细胞焦亡作用可被过氧化氢所拮抗，表明 ROS/NLRP3 炎症小体/细胞焦亡信号可能是治疗阿霉素所

致心肌病的有效靶点，提示我们通过下调 ROS 水平从而抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡可能是藁本内酯发挥对阿霉素所致心肌损伤的保护作用机制之一。

综上所述，本研究发现，藁本内酯可通过下调 ROS 水平，抑制 NLRP3 炎症小体和细胞焦亡，从而减轻阿霉素所致心肌损伤。然而，藁本内酯诱导 ROS 下调的关键信号通路有待进一步探索。

参考文献：

- [1] PILLAI V B, KANWAL A, FANG Y H, et al. Honokiol, an activator of Sirtuin-3(SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 34082-34098.
- [2] SAYED-AHMED M M, SALMAN T M, GABALLAH H E, et al. Propionyl-L-carnitine as protector against adriamycin-induced cardiomyopathy[J]. *Pharmacol Res*, 2001, 43(6): 513-520.
- [3] LIN J M, FANG L J, LI H, et al. Astragaloside IV alleviates doxorubicin induced cardiomyopathy by inhibiting NADPH oxidase derived oxidative stress[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859 (23): 172490-172497.
- [4] WU W Y, CUI Y K, HONG Y X, et al. Doxorubicin cardiomyopathy is ameliorated by acacetin via Sirt1-mediated activation of AMPK/Nrf2 signal molecules[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20): 12141-12153.
- [5] 萧伟, 陈凤龙, 章晨峰, 等. 国内外天然药物研究的发展现状和趋势[J]. *中草药*, 2009, 40(11): 1681-1687.
- [6] 左爱华, 王莉, 肖红斌. 藁本内酯药理学和药代动力学研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(22): 3350-3353.
- [7] WU Q, MAO Z G, LIU J, et al. Ligustilide attenuates ischemia reperfusion-induced hippocampal neuronal apoptosis via activating the PI3K/Akt pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11(6): 979-989.
- [8] ZHU Y, ZHANG Y J, HUANG X, et al. Z-Ligustilide protects vascular endothelial cells from oxidative stress and rescues high fat

- diet-induced atherosclerosis by activating multiple NRF2 downstream genes[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 284(2): 110–120.
- [9] SHAO M, QU K, LIU K, et al. Effects of ligustilide on lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in rabbits[J]. *Planta Med*, 2011, 77(8): 809–816.
- [10] LIU X, LI X Z, JI S G, et al. Screening of bioactive ingredients in *Ligusticum Chuanxiong* Hort for protection against myocardial ischemia[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3–4): 770–780.
- [11] ZHANG X, HU C, KONG C Y, et al. FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(2): 540–555.
- [12] GUO S J, WANG G F, YANG Z X. Ligustilide alleviates the insulin resistance, lipid accumulation, and pathological injury with elevated phosphorylated AMPK level in rats with diabetes mellitus [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(1): 85–92.
- [13] ZENG C, WANG R Q, TAN H M. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(7): 1345–1357.
- [14] WEI S S, MA W J, LI X H, et al. Involvement of ROS/NLRP3 inflammasome signaling pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(5): 507–519.
- [15] MEZZAROMA E, ABBATE A, TOLDO S. NLRP3 inflammasome inhibitors in cardiovascular diseases[J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 976–995.
- [16] ZENG C, DUAN F Q, HU J, et al. NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy[J]. *Redox Biol*, 2020, 34(7): 101523–101536.
- [17] HU J, ZENG C, WEI J, et al. The combination of *Panax ginseng* and *Angelica sinensis* alleviates ischemia brain injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation and microglial pyroptosis[J]. *Phytomedicine*, 2020, 76(5): 153251–153263.
- [18] AN N, GAO Y H, SI Z Y, et al. Regulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasome, a novel immune-inflammatory marker in cardiovascular diseases[J]. *Front Immunol*, 2019, 10(7): 1592–1603.
- [19] LIU Y X, LI M N, DU X Y, et al. Sestrin 2, a potential star of antioxidant stress in cardiovascular diseases[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 163(24): 56–68.
- [20] MUKHOPADHYAY P, RAJESH M, BATKAI S, et al. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(4): 773–784.
- [21] FARIDVAND Y, HADDADI P, VAHEDIAN V, et al. Human amnion membrane proteins prevent doxorubicin-induced oxidative stress injury and apoptosis in rat H9c2 cardiomyocytes[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(4): 370–379.
- [22] TANG Q, XIONG W, KE X X, et al. Mitochondria-associated protein LRPPRC exerts cardioprotective effects against doxorubicin-induced toxicity, potentially via inhibition of ROS accumulation[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 3837–3845.

(编辑: 修春)