注射用益气复脉(冻干)对阿霉素诱导 H9c2(2-1)心肌细胞毒性的保护作用

曾永君^{1,3}, 赵新超¹, 万梅绪^{1,2}, 李德坤^{1,2}, 李 智^{1,2}, 宋美珍^{1,2}, 鞠爱春^{1,2*}

- 1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410
- 2. 天津市中药注射剂安全评价企业重点实验室,天津 300410
- 3. 中国药科大学 药学院, 江苏 南京 211198

摘 要:目的 探讨注射用益气复脉(冻干,YQFM)对阿霉素(doxorubicin,DOX)诱导 H9c2(2-1)心肌细胞毒性的保护作用。方法 H9c2(2-1)心肌细胞随机分为对照组,模型组(终浓度为 $0.3~\mu$ mol/L 的 DOX 处理细胞 48~h),YQFM 低、中、高剂量(125、625、3 125 μ g/mL)组(提前 2~h 加入药物预处理,然后加入终浓度为 $0.3~\mu$ mol/L 的 DOX 处理 48~h),采用 CCK-8 法检测细胞活力;使用乳酸脱氢酶(LDH)和 ATP 试剂盒检测细胞 LDH 和 ATP 水平;应用 Hoechst 33258 染色法检测细胞调亡;JC-1 法检测细胞线粒体膜电位;Western blotting 法检测 caspase-3 蛋白的表达水平。结果 与模型组比较,YQFM 中、高剂量组显著增加细胞存活率(P<0.05、0.01),低、高剂量组明显改善细胞凋亡;低、中、高剂量组 LDH 活性显著降低(P<0.05、0.01),ATP 含量显著增加(P<0.05、0.01),线粒体膜电位明显恢复。结论 YQFM 抑制 DOX诱导 H9c2(2-1)的细胞毒性,其作用机制可能与抑制线粒体凋亡信号通路的激活有关。

关键词: 阿霉素; 心脏毒性; 注射用益气复脉(冻干); 凋亡; H9c2 细胞; 线粒体膜电位

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 03-0380 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.005

Protective effect of Yiqi Fumai Lyophilized Injection against Doxorubicin - induced cardiotoxicity in H9c2 (2-1) cell

ZENG Yongjun^{1,3}, ZHAO Xinchao¹, WAN Meixu^{1,2}, LI Dekun^{1,2}, LI Zhi^{1,2}, SONG Meizhen^{1,2}, JU Aichun^{1,2}

- 1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Ltd., Tianjin 300410, China
- 2. Tianjin TCMI Safety Evaluation Enterprise Laboratory, Tianjin 300410, China
- 3. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) against Doxorubicin (Dox)-induced cardiotoxicity in H9c2 (2-1). **Methods** H9c2 (2-1) myocardial cells were randomly divided into control group, model group (cells treated with DOX at the final concentration of 0.3 μmol/L for 48 h), YQFM low, medium and high dose (125, 625, and 3 125 g/mL) group (pretreatment with YQFM for 2 h, and then adding DOX of a final concentration of 0.3 μmol/L). Cell viability was detected with CCK-8 assay. Cells LDH and ATP levels were examined using LDH and ATP kits. Cell death was measured by Hoechst 33258 stain assay. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1. Caspase-3 protein expression was evaluated by Western blotting. **Results** Compared with model group, YQFM medium and high dose group significantly increased the cell survival rate (P < 0.05 and 0.01), low and high dose group significantly improved cell apoptosis; LDH activity of low, medium and high dose group was significantly decreased (P < 0.05 and 0.01), ATP content increased significantly (P < 0.05 and 0.01), and the mitochondrial membrane potential was restored. **Conclusion** YQFM inhibited DOX-induced cardiotoxicity in H9c2 (2-1), the possible mechanisms may be related to the inhibition of activation of mitochondrial apoptotic signaling pathway.

Key words: Doxorubicin; cardiotoxicity; Yiqi Fumai Lyophilized Injection; apoptosis; H9c2 (2-1) cells; mitochondrial membrane potential

收稿日期: 2018-01-15

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设基金(17PTSYJC00090)

^{*}通信作者: 鞠爱春(1973-), 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及生产管理研究, Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

阿霉素(doxorubicin,DOX)属于蒽环类抗生素,是一种有效的化疗药,临床常用于各种实体瘤和恶性肿瘤的治疗,如肉瘤、乳腺癌、淋巴瘤和白血病^[1-2]等。DOX 有很多副作用,其中最严重的是剂量相关性的心脏毒性,可导致不可逆性心肌炎和充血性心力衰竭,可能会在停止化疗后的 10~15年发生^[3-5],因此急需开发一种安全有效的药物减轻DOX 心脏毒性。

注射用益气复脉(冻干, Yiqi Fumai Lyophilized Injection, YQFM)来源于著名古方生脉散,生脉散是中国药典收录且长期应用于治疗心衰的药物^[6-8]。YQFM 由红参、麦冬和五味子 3 味中药组成,研究显示,它能减轻冠状动脉结扎所致的心衰、氧化应激、结构损伤和心室重构^[8-9]。在慢性间歇性缺氧小鼠模型中,YQFM 能逆转心脏内皮细胞肿大和空泡形成;通过增强心肌收缩力增加射血分数和每搏输出量;抑制肌酸激酶和乳酸脱氢酶(LDH)活性^[10]。通过传统工艺制备的 YQFM 能治疗各种心衰,但它是否能减轻 DOX 诱导的心脏毒性目前还不清楚。本研究使用阿霉素诱导的大鼠心肌细胞 H9c2(2-1)模型,探讨 YQFM 对 DOX 诱导心脏毒性的保护作用,并研究其作用机制。

1 材料

1.1 药品和试剂

注射用益气复脉(冻干), 批号 20160409, 天津天士力之骄药业有限公司; DMEM 培养基和小牛血清(FBS), Gibco公司; 细胞增殖/毒性检测试剂(CCK-8)与 LDH 测定试剂盒, 日本同仁化学研究所; 阿霉素, 上海 TCI公司; BCA 蛋白测定试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; ATP 测定试剂盒、细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)和 NP-40 裂解液, 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞

大鼠心肌细胞 H9c2 (2-1), 购自 ATCC 公司。

1.3 仪器

细胞培养箱,美国 Thermo 公司;多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司;倒置荧光显微镜,德国 Leica 公司;凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;电子分析天平,瑞士 Mettler 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

H9c2 (2-1)细胞用含 10% FBS、1% 100 U/mL

青霉素和 0.1 g/L 链霉素的 DMEM 培养基,在 $37 \text{ °C} \times 5 \text{ °C} \times CO_2$ 的饱和湿度培养箱中培养,实验时 取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 CCK-8 法测定细胞存活率

将细胞浓度为 8×10^4 /mL 的 H9c2(2-1)细胞接种于 96 孔板中,100 μ L/孔,将 96 孔板置于 37 \mathbb{C} 、5% CO_2 培养箱培养 24 h,待细胞贴壁后,根据实验需要进行不同处理,分为对照组,模型组(终浓度为 0.3 μ mol/L 的 DOX 处理细胞 48 h),YQFM 低、中、高剂量(125、625、3 125 μ g/mL)组(提前 2 h加入药物预处理,然后加入终浓度为 0.3 μ mol/L 的 DOX 处理 48 h),每组 6 个复孔。终止培养后,向每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,将 96 孔板置于培养箱中孵育 2 h 后,用多功能酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值。

2.3 培养液 LDH 含量的测定

细胞接种、分组、给药、造模操作均同"2.1"项下方法,离心收集细胞上清液,按照试剂盒说明 书检测 LDH 含量。

2.4 细胞内 ATP 水平的测定

将浓度为 8×10^5 /mL 的 H9c2 (2-1) 细胞接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,培养 24 h,细胞分组、给药、造模操作均同"2.1"项下方法,离心弃去细胞上清,向细胞中加入裂解液,裂解细胞,4 \mathbb{C} 、12 $000\times g$ 离心 5 min,收集上清,用 ATP 试剂盒进行检测,BCA 蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度。

2.5 Hoechst 法检测细胞凋亡

按"2.3"项方法接种和处理细胞,48 h 后弃去培养基,PBS 清洗 2 遍,各孔加入 0.5 mL 的固定液,37 ℃温孵 10 min 固定细胞,用磷酸缓冲液(PBS)清洗 2 遍细胞后,加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液,37 ℃避光孵育 30 min。弃去染色液,避光条件下清洗细胞 3 遍;封片液封片,荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 线粒体膜电位的检测

按"2.3"的方法接种和处理细胞,48 h 后弃去培养基,PBS 洗 1 遍,离心,弃去上清,向每个孔中加入 1 mL DMEM 完全培养液和 1 mL JC-1 染色工作液,混匀,37 ℃避光孵育 20 min,用 JC-1 染色缓冲液洗 2 遍,加入 2 mL DMEM 完全培养液,用荧光显微镜分析检测。

2.7 Western blotting 检测 Caspase-3 蛋白表达

按"2.3"项下方法接种和处理细胞,48h后弃

去培养基, PBS 洗 2 遍, 每孔加入 NP-40 裂解液 150 μL,置于冰上用枪吹打数下,充分裂解后,4 $^{\circ}$ C、12 000×g 离心 5 min,取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度并配平至浓度一致的样品。12%的 SDS-PAGE 电泳后转膜至 0.45 μm 的 PVDF 膜上。封闭液封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C孵育过夜,一抗浓度分别为 Caspase-3(1:1 000)、β-actin(1:1 000)。用 TBST 洗膜 3 遍,室温下与二抗(1:1 000),解育 2 h,TBST 洗膜后,加入 ECL 发光液,放入凝胶成像仪进行检测。

2.8 数据分析

所有实验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,两组均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

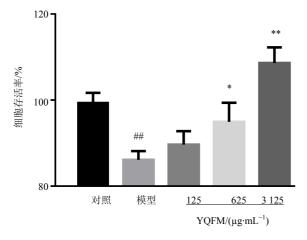
3 结果

3.1 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 细胞存活率的影响

如图 1 所示,与对照组比较,DOX 显著降低 H9c2 (2-1) 细胞存活率 (P<0.01);与模型组比较,中、高剂量的 YQFM 显著增加细胞存活率 (P<0.05、0.01)。

3.2 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 心肌细胞 LDH 水平 的影响

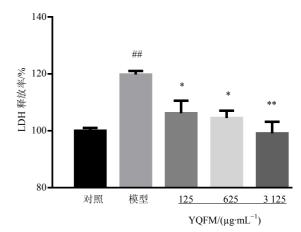
细胞外 LDH 的释放是细胞膜损伤和细胞坏死的标志。图 2 结果显示,模型组的 LDH 活性与对



与对照组比较: $^{#*}P$ <0.01; 与模型组比较: *P <0.05 $^{**}P$ <0.01 $^{#*}P$ <0.01 vs control group; *P <0.05 $^{**}P$ <0.01 vs model group

图 1 YQFM 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 心肌细胞存活率的 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of YQFM on DOX-induced cytotoxicity in cell viability of H9c2 (2-1) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: $^{**}P$ <0.01;与模型组比较: $^{*}P$ <0.05 $^{**}P$ <0.01 $^{**}P$ <0.01 $^{**}P$ <0.01 $^{**}P$ <0.01 $^{**}P$ <0.01 $^{**}P$ <0.05 $^{**}P$ <0.01 $^{**}P$

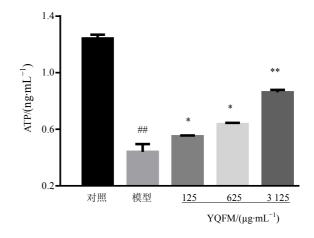
图 2 YQFM 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 心肌细胞 LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of YQFM on LDH enzyme content induced by DOX in H9c2 (2-1) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

照组比较显著增强(P<0.01),与模型组比较, YQFM 低、中和高剂量 LDH 活性呈剂量相关性地 降低,差异显著(P<0.05、0.01)。

3.3 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 细胞 ATP 的影响

与对照组比较,DOX 显著降低细胞 ATP 的含量 (P<0.01); 而 YQFM 低、中和高剂量组与模型组比较,ATP 含量显著增加(P<0.05、0.01),结果见图 3。



与对照组比较: **P<0.01;与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01 **P<0.01 vs control group; *P<0.05 **P<0.01 vs model group

图 3 YQFM 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 心肌细胞 ATP 的影响 ($\overline{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of YQFM on intracellular ATP levels induced by DOX in H9c2 (2-1) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 细胞凋亡的影响

Hoechst 染色是一种经典、简单和快速的从正常细胞中检测出凋亡细胞的方法。如图 4 所示,对照组细胞状态良好,几乎没有凋亡核的出现;而模型组出现了典型的凋亡特征,且细胞数量明显减少。与模型组比较,YQFM 低、高剂量组降低了 DOX诱导 H9c2(2-1)细胞的凋亡,细胞数量显著增加,但中剂量组没有观察到明显的抗凋亡作用。

3.5 对 **DOX** 诱导 **H9c2** (2-1) 细胞线粒体膜电位 的影响

对照组细胞显示出红色荧光,而 DOX 诱导H9c2 (2-1)细胞出现绿色荧光,表明细胞线粒体膜电位出现极化,导致膜电位偏移。YQFM 各给药组与模型组比较,H9c2 (2-1)细胞显示出显著的红色荧光,说明 YQFM 对 DOX 诱导细胞具有稳定线粒体膜电位的作用,结果见图 5。

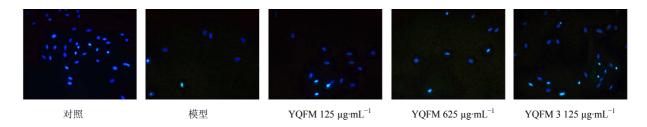


图 4 YQFM 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 心肌细胞凋亡的影响(×200, Hoechst 染色)

Fig. 4 Effect of YQFM on apoptosis of H9c2 (2-1) cells induced by DOX (× 200, Hoechst straining)

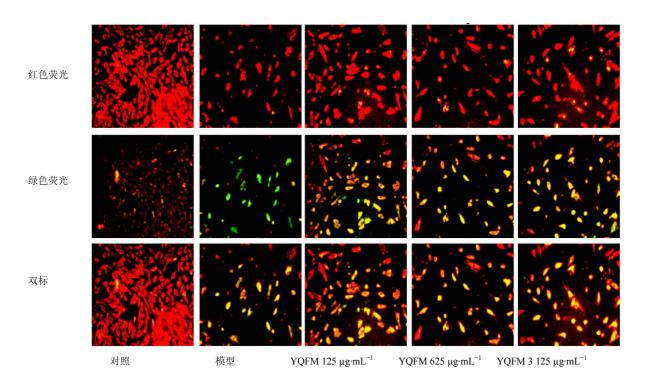


图 5 YQFM 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 细胞线粒体膜电位的影响 (×200)

Fig. 5 YQFM protect cells against DOX-induced H9c2 (2-1) cells changes in mitochondrial membrane potential (× 200)

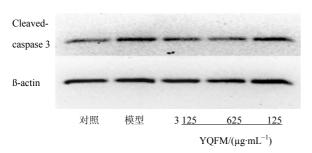
3.6 对 **DOX** 诱导 **H9c2**(**2-1**)细胞 **Caspase-3** 蛋 白表达的影响

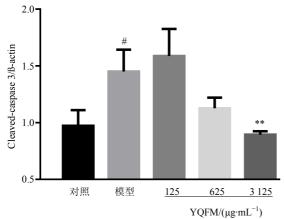
Caspase-3 蛋白在细胞凋亡的过程中扮演着关键角色。如图 6 所示,模型组与对照组比较,Caspase-3 蛋白表达显著增加(P<0.05),而YQFM

高剂量组与模型组比较,显著降低了 Caspase-3 蛋白表达 (P<0.01)。

4 讨论

研究显示,YQFM 在临床上用于治疗各种心脏疾病,可能通过多靶点和整体协同作用发挥治疗效





与对照组比较: *P <0.05; 与模型组比较: $^{**}P$ <0.01 *P <0.05 vs control group; $^{**}P$ <0.01 vs model group

图 6 YQFM 对 DOX 诱导 H9c2 (2-1) 细胞 caspase-3 蛋白 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of YQFM on caspase-3 protein expression in DOX-induced H9c2 (2-1) cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

果^[8-9, 11]。本研究首次证明 YQFM 能够抑制 DOX 诱导 H9c2(2-1)心肌细胞的凋亡,抑制 caspase-3 的表达,增加胞内 ATP 含量和稳定线粒体膜电位。以上结果表明,YQFM 对 DOX 诱导的细胞毒性的保护作用可能是通过抑制线粒体凋亡信号通路的激活发挥的。

DOX 是临床常用的化疗药,但其副作用会导致不可逆的心脏毒性,引起心衰,阻碍临床使用^[3-4]。研究显示,DOX 引起心脏毒性的分子机制与心肌细胞的凋亡和坏死有关^[2,12],但这种病理机制没有被完全阐明。其他机制还包括氧化应激产生的自由基、胞内钙紊乱、自噬相关蛋白的增加,能量代谢紊乱和凋亡信号通路的激活等^[5,13-15]。

本研究显示,DOX 显著降低细胞活力,增加H9c2(2-1)细胞的凋亡,增加细胞上清 LDH 的释放。在给予 YQFM 后,细胞活力增加,并恢复细胞上清中 LDH 的水平; 用 Hoechst 染色法进一步检测了 YQFM 的抗凋亡作用,结果显示,YQFM 能抑制 DOX 诱导的心肌细胞凋亡。

线粒体通路和死亡受体通路都会激活细胞的凋亡^[16]。有研究显示,DOX 直接激活线粒体凋亡通路,使线粒体膜电位发生改变;线粒体膜电位的改变会导致如细胞色素 c 等促凋亡分子的释放,而细胞色素 c 是由 caspase-9 形成的凋亡体,它会促进caspase-3 的活化^[17-19]。Caspase 属于天冬半胱氨酸蛋白家族,在调节细胞凋亡方面具有关键作用,caspase-3 是其中最重要的蛋白^[20-23]。研究显示,YQFM 预处理能抑制 DOX 诱导的线粒体紊乱,增加线粒体膜电位和 ATP 的水平,降低 caspase-3 的表达。这些结果表明,YQFM 可能是通过调节能量代谢和线粒体凋亡通路发挥对 H9c2(2-1)心肌细胞的保护作用。

综上所述,YQFM 对 DOX 诱导的 H9c2(2-1)心肌细胞毒性具有保护作用。YQFM 可通过稳定线粒体膜电位、调节线粒体的能量代谢和抑制caspase-3 表达发挥作用,推测这种保护作用可能与抑制线粒体凋亡信号通路的激活有关。

参考文献

- [1] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity [J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(2): 185-229.
- [2] Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015(11): 1-13.
- [3] Rahman A M, Yusuf S W, Ewer M S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation [J]. Int J Nanomed, 2007, 2(4): 567-584.
- [4] 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.
- [5] Octavia Y, Tocchetti C G, Gabrielson K L, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(6): 1213-1225.
- [6] Chen J, Wu G, Li S, et al. Shengmai (a traditional Chinese herbal medicine) for heart failure [J]. Cochrane Db Syst Rev, 2012, 11(4): CD005052.
- [7] 褚延斌, 苏小琴, 李德坤, 等. 基于一测多评法对注射 用益气复脉(冻干)中 9 种成分的质量控制研究 [J]. 中 草药, 2017, 48(17): 3537-3544.

- [8] Pang L Z, Ju A C, Zheng X J, et al. YiQiFuMai Powder Injection attenuates coronary artery ligation-induced myocardial remodeling and heart failure through modulating MAPKs signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 202, 67-77.
- [9] Xing L, Jiang M, Dong L, et al. Cardioprotective effects of the YiQiFuMai injection and isolated compounds on attenuating chronic heart failure via NF-κB inactivation and cytokine suppression [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(1): 239-245.
- [10] Feng Y Q, Ju A C, Liu C H, et al. Protective effect of the extract of Yi-Qi-Fu-Mai preparation on hypoxia-induced heart injury in mice [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(6): 401-406.
- [11] Song D, Hu M, Han T, et al. Efficacy of Yiqi Fumai (Freeze-Dried Powder) on ischemic diastolic heart failure [J]. Chin Med, 2014, 5(2): 75-86.
- [12] Alharthi S E, Alarabi O M, Ramadan W S, et al. Amelioration of doxorubicin induced cardiotoxicity by resveratrol [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3): 1455-1460.
- [13] Li B, Kim D S, Yadav R K, et al. Sulforaphane prevents doxorubicin-induced oxidative stress and cell death in rat H9c2 cells [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(1): 53-64.
- [14] Zhang Y, Chen Y, Zhang M, et al. Doxorubicin induces sarcoplasmic reticulum calcium regulation dysfunction via the decrease of SERCA2 and phospholamban expressions in rats [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(3): 1791-1798.
- [15] Yang Y, Zhang H, Li X, et al. Effects of PPARα/PGC-1α

- on the myocardial energy metabolism during heart failure in the doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in mice [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2435-2442.
- [16] Sun X, Sun G B, Wang M, et al. Protective effects of cynaroside against H₂O₂ - induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(8): 2019-2029.
- [17] Shan P, Pu J, Yuan A, et al. RXR agonists inhibit oxidative stress-induced apoptosis in H9c2 rat ventricular cells [J]. Biochem Bioph Res Co, 2008, 375(4): 528-533.
- [18] Sussman M A. Mitochondrial integrity: preservation through Akt/Pim-1 kinase signaling in the cardiomyocyte [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2009, 7(8): 929-938.
- [19] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6): 749-762.
- [20] Porter A G, Janicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99-104.
- [21] Riedl S J, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis [J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2004, 5(11): 897-907.
- [22] Lee C H, Kim J H. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases [J]. J Ginseng Res, 2014, 38(3): 161-166.
- [23] Wang Y Q, Liu C H, Zhang J Q, et al. Protective effects and active ingredients of yi-qi-fu-mai sterile powder against myocardial oxidative damage in mice [J]. J Pharmacol Sci, 2013, 122(1): 17-27.