

松果菊苷通过下调 *miR-221-3p* 减轻阿霉素诱导的心肌细胞损伤

郑清月, 丁明月, 扈佳

河南省人民医院 重症医学科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 探究松果菊苷对阿霉素 (doxorubicin, DOX) 诱导的心肌细胞损伤的影响及作用机制。方法 不同质量浓度 (5、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 的松果菊苷作用于 DOX 处理的大鼠 H9c2 心肌细胞 48 h, 采用 CCK-8 法测定细胞活性, 通过流式细胞术分析细胞凋亡情况; 采用 Western blotting 检测剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 和 B 细胞淋巴瘤-2 相关的 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 表达; 检测细胞内丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和细胞培养上清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平; 采用 qRT-PCR 检测 *miR-221-3p* 表达。分别转染 *miR-221-3p* 抑制剂 (anti-*miR-221-3p*) 或模拟物 (*miR-221-3p* mimics) 至 H9c2 细胞, 用 DOX 处理 48 h 后, 观察 *miR-221-3p* 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞活性、凋亡、氧化应激和炎症反应的影响。结果 松果菊苷可提高 DOX 处理的 H9c2 细胞活性和 SOD 活性 ($P < 0.05$), 抑制 DOX 诱导的 H9c2 细胞凋亡及 cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达 ($P < 0.05$), 降低 MDA、TNF- α 和 IL-6 水平 ($P < 0.05$)。下调 *miR-221-3p* 后, DOX 处理的 H9c2 细胞活性和 SOD 活性升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达、MDA、TNF- α 和 IL-6 水平均降低 ($P < 0.05$)。松果菊苷降低了 DOX 处理的 H9c2 细胞中 *miR-221-3p* 表达 ($P < 0.05$), 上调 *miR-221-3p* 表达逆转了松果菊苷对 DOX 处理的 H9c2 细胞凋亡、氧化应激和炎症因子水平的作用 ($P < 0.05$)。结论 松果菊苷可显著提高经 DOX 干预的 H9c2 细胞增殖能力, 同时有效抑制细胞凋亡进程、减轻氧化应激损伤及炎症因子释放。其作用机制可能与调控 *miR-221-3p* 的表达有关。

关键词: 松果菊苷; *miR-221-3p*; 阿霉素; 心肌细胞; 凋亡; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)18-6675-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.017

Echinacoside reduces doxorubicin-induced cardiomyocyte damage by down-regulating *miR-221-3p*

ZHENG Qingyue, DING Mingyue, HU Jia

Department of Intensive Care Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of echinacoside on doxorubicin (DOX)-induced cardiomyocyte damage. **Methods** Different concentrations (5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$) of echinacoside were used to act on DOX-treated rat H9c2 cardiomyocytes for 48 h. The cell viability was determined using CCK-8 assay, cell apoptosis was analyzed by flow cytometry; Western blotting was used to detect the expressions of cleaved cysteine aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) and B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax); Level of intracellular malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), as well as levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) in cell culture supernatant were measured; qRT-PCR was used to detect the expression of *miR-221-3p*. *miR-221-3p* inhibitors (anti-*miR-221-3p*) or mimics (*miR-221-3p* mimics) were transfected into H9c2 cells, and after 48 h of DOX treatment, the effects of *miR-221-3p* on viability, apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in DOX-induced H9c2 cells were observed. **Results** Echinacoside could increase the viability and SOD activity of H9c2 cells treated with DOX ($P < 0.05$), inhibit apoptosis of DOX-induced H9c2 cells and expressions of cleaved Caspase-3 and Bax proteins ($P < 0.05$), and reduce the levels of MDA, TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$). After down-regulating *miR-221-3p*, the viability and SOD activity of H9c2 cells treated with DOX were increased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate, expressions of cleaved Caspase-3 and Bax proteins, levels of MDA, TNF- α and IL-6 were decreased ($P < 0.05$). Echinacoside reduced the expression of *miR-221-3p* in H9c2 cells treated with DOX

收稿日期: 2025-05-26

基金项目: 河南省卫生健康委员会科研项目 (LHGJ20210036)

作者简介: 郑清月, 本科, 主管护士, 从事脓毒症多器官功能衰竭研究。E-mail: 15003817990@163.com

($P < 0.05$), while up-regulating *miR-221-3p* expression reversed the effects of echinacoside on apoptosis, oxidative stress and inflammatory factor levels in H9c2 cells treated with DOX ($P < 0.05$). **Conclusion** Echinacoside could significantly enhance the proliferation ability of H9c2 cells intervened by DOX, while effectively inhibiting the process of cell apoptosis, reducing oxidative stress damage and inflammatory cytokine release. Its mechanism may be related to the regulation of *miR-221-3p* expression.

Key words: echinacoside; *miR-221-3p*; adriamycin; cardiomyocytes; apoptosis; oxidative stress; inflammation

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是目前临床广泛使用且效果较好的蒽环类抗癌药, 但其长期使用会对心肌造成不可逆性损伤^[1]。松果菊苷是一种在管花肉苁蓉、玄参、列当等中药中广泛存在的天然苯乙醇类化合物^[2], 不仅具有显著的抗氧化活性, 能有效清除自由基并增强内源性抗氧化酶系统, 还展现出抗炎、护肝等多重生物效应^[3-4]。研究表明, 松果菊苷可通过激活胶质细胞系来源神经营养因子受体 $\alpha 1$ (glial cell line-derived neurotrophic factor receptor $\alpha 1$, GFR $\alpha 1$) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路抑制 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium ion, MPP⁺) 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞凋亡, 发挥神经保护作用^[5]; 松果菊苷可通过激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2 related factor 2, Nrf2) 通路减轻过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 诱导的心肌细胞损伤^[6]; 松果菊苷可通过抑制肾组织细胞凋亡和炎症反应减轻四氯化碳诱导的大鼠肾损伤^[7]。然而, 松果菊苷对 DOX 诱导的心肌损伤的作用尚不明确。*miR-221-3p* 属于微小 RNA (microRNA, miRNA) 家族成员, *miR-221-3p* 的过表达可增强 DOX 对心脏的毒性, 加快心脏衰老^[8]。本研究采用 DOX 诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞损伤模型, 探究松果菊苷是否通过靶向抑制 *miR-221-3p* 介导相关信号通路实现心肌保护效应, 为开发缓解化疗药物心脏毒性的新型干预策略提供实验数据支撑。

1 材料

1.1 细胞

H9c2 细胞购自通派 (上海) 生物公司。

1.2 药品与试剂

松果菊苷 (批号 82854-37-3, 质量分数 > 98%) 购自成都普思生物科技有限公司; DOX (批号 A183027) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DMEM 高糖培养基 (批号 12491023)、二抗 (批号 ab150077) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 11011-8611) 购自浙江天杭生物科技股份有限公司;

Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (批号 CA1020) 购自北京索莱宝科技有限公司; anti-*miR-221-3p*、anti-*miR-NC*、*miR-221-3p* mimics、*miR-NC* 和 PCR 引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 A003-4-1)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 A001-3-2)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号 A007-1-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 H052-1-2)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 H007-1-2) 购自南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 P0009) 购自上海碧云天生物技术有限公司; miRNA 抽提试剂 (批号 9753A)、基因表达定量试剂盒 (批号 CN830A) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; LipofectamineTM 2000 试剂盒 (批号 11668019) 购自美国 Invitrogen 公司; 剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体 (批号 ab32042)、B 细胞淋巴瘤-2 相关的 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 ab32503) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

RNE90002 型酶标仪 (深圳容金科技有限公司); AttuneTM NxT 流式细胞仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Gel DocTM XR⁺ 凝胶图像分析系统、IQ5 型热循环仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

H9c2 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 细胞分组和处理

2.2.1 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞的作用 取对数生长期的细胞, 以 2.5×10^4 个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2.5 mL, 培养过夜。设置对照组、模型组和松果菊苷 (5、10、20 $\mu\text{g/mL}$)^[9] 组。模型组加入含 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX 的培养液干预 48 h^[10], 松果菊苷组加入含不同质量浓度松果菊苷和 1 $\mu\text{mol/L}$

DOX 的培养液共同干预 48 h, 对照组加入常规培养液干预 48 h。

2.2.2 下调 *miR-221-3p* 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞的作用 参照 Lipofectamine™ 2000 说明书建立优化转染体系, 分别将 anti-*miR-221-3p*、anti-*miR-NC* 通过脂质体介导法导入细胞。转染 12 h 后, 更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养细胞。经 24 h 干预后, 采用 qRT-PCR 检测 *miR-221-3p* 相对表达量以确认转染效率。转染的细胞用含 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX 的培养液处理 48 h, 分别标记为 anti-*miR-221-3p*+DOX 组、anti-*miR-NC*+DOX 组。

2.2.3 上调 *miR-221-3p* 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞的作用 将 *miR-221-3p* mimics、*miR-NC* 转染细胞, 采用 qRT-PCR 检测 *miR-221-3p* 相对表达量以确认转染效率。转染的细胞用含 20 $\mu\text{g/mL}$ 松果菊苷和 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX 的培养液共同处理 48 h, 分别标记为 *miR-221-3p*+DOX+松果菊苷组、*miR-NC*+DOX+松果菊苷组。

2.3 CCK-8 法检测细胞活性

按“2.2”项下方法进行分组和处理后, 使用多通道移液器向各孔精准加入 10 μL CCK-8 试剂, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 120 min。采用酶标仪测定吸光度 (A) 值, 并计算细胞活性。

$$\text{细胞活性} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

按“2.2”项下方法进行分组和处理后, 收集细胞, 用 Annexin V 结合液重悬, 加入 Annexin V-FITC 和 PI 溶液, 室温避光孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 Western blotting 检测 cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达

按“2.2”项下方法进行分组和处理后, 于冰上提取蛋白。弃去培养基, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 15 min, 吸取上清液, 加入上样缓冲液, 混合均匀, 煮沸 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h。分别加入 cleaved Caspase-3 (1:1 000)、Bax (1:500) 和 β -actin (1:1 500) 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 孵育 1 h, 洗涤后, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 使用 Gel Doc™ XR+凝胶成像系统可视化条带, 并使用 Image J 软件分析条带的灰度值。

2.6 氧化应激和炎症因子水平的检测

按“2.2”项下方法进行分组和处理后, 收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书测定细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平。收集细胞, 用预冷的 PBS (pH 7.4) 轻柔漂洗细胞 2 次, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行充分裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 500 $\times g$ 离心 5 min, 收集上清液, 按照试剂盒说明书测定 MDA 水平及 SOD、CAT 活性。

2.7 qRT-PCR 检测细胞中 *miR-221-3p* 表达

按“2.2”项下方法进行分组和处理后, 按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA, 采用 TB Green Premix ExTaq™ 试剂盒进行 qRT-PCR 分析。引物序列: *miR-221-3p* 上游引物 5'-GTACGATGCTAGGCCTAG-3', 下游引物 5'-CGATAGGCATTCTCGATG-3'; *U6* 上游引物 5'-CGATCGGCTAGGCTAGTCG-3', 下游引物 5'-CGTAGGCTGACTGGAGCG-3'。将 *U6* 作为 *miR-221-3p* 内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *miR-221-3p* 的基因相对表达量。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件分析实验数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用独立样本 t 检验; 多组间比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验。

3 结果

3.1 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞活性和凋亡的影响

如图 1 和表 1 所示, 与对照组比较, 模型组细胞活性显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 和促凋亡蛋白 Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 松果菊苷各给药组细胞活性显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

3.2 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞氧化应激和炎症因子水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组 MDA、TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD、CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 松果菊苷各给药组 MDA、TNF- α 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$), SOD、CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

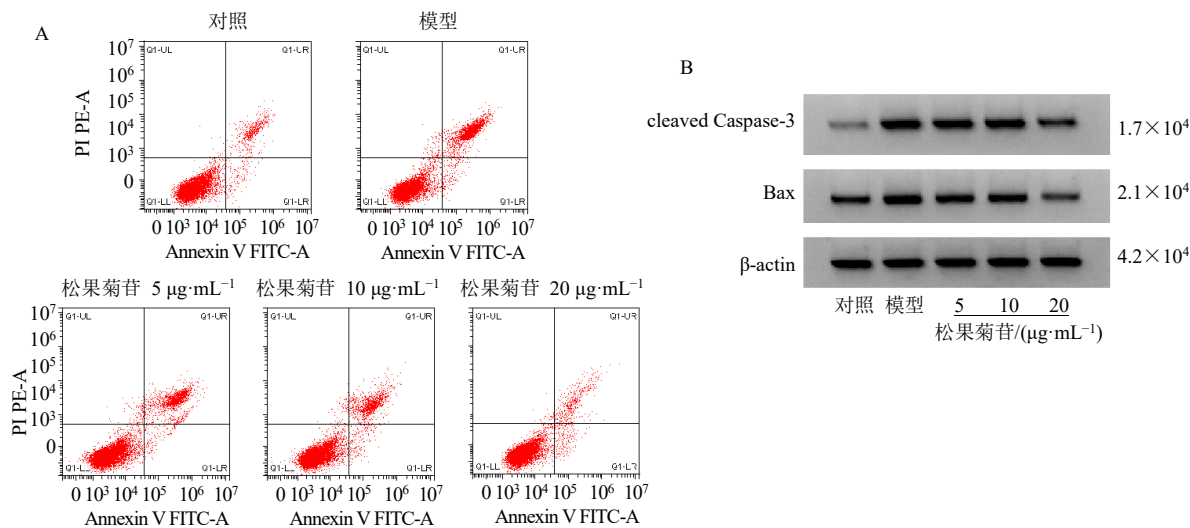


图 1 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞凋亡 (A) 及凋亡相关蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Fig. 1 Effect of echinacoside on apoptosis (A) and apoptosis related protein expressions (B) in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

表 1 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞活性、凋亡率及凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 1 Effect of echinacoside on activity, apoptosis rate and expressions of apoptosis related proteins in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞活性/%	细胞凋亡率/%	cleaved Caspase-3/ β -actin	Bax/ β -actin
对照	—	100.00 $\pm$ 8.75	7.16 $\pm$ 0.61	0.37 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.03
模型	—	47.37 $\pm$ 3.50*	24.01 $\pm$ 1.96*	0.85 $\pm$ 0.07*	0.80 $\pm$ 0.06*
松果菊苷	5	60.68 $\pm$ 5.25 [#]	19.35 $\pm$ 1.05 [#]	0.74 $\pm$ 0.06 [#]	0.69 $\pm$ 0.05 [#]
	10	78.02 $\pm$ 6.13 [#]	14.05 $\pm$ 0.91 [#]	0.60 $\pm$ 0.06 [#]	0.53 $\pm$ 0.05 [#]
	20	86.08 $\pm$ 7.88 [#]	8.93 $\pm$ 0.64 [#]	0.47 $\pm$ 0.03 [#]	0.40 $\pm$ 0.03 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group.

表 2 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞氧化应激和炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 2 Effect of echinacoside on levels of oxidative stress and inflammatory factors in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SOD/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CAT/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	18.52 $\pm$ 1.43	17.82 $\pm$ 1.51	11.05 $\pm$ 0.83	55.02 $\pm$ 4.68	65.31 $\pm$ 5.41
模型	—	36.04 $\pm$ 2.74*	6.43 $\pm$ 0.51*	4.62 $\pm$ 0.31*	151.97 $\pm$ 11.35*	227.61 $\pm$ 18.94*
松果菊苷	5	30.24 $\pm$ 1.83 [#]	7.83 $\pm$ 0.61 [#]	6.35 $\pm$ 0.51 [#]	121.54 $\pm$ 10.39 [#]	184.53 $\pm$ 12.04 [#]
	10	24.53 $\pm$ 1.67 [#]	11.23 $\pm$ 1.05 [#]	8.86 $\pm$ 0.72 [#]	82.04 $\pm$ 7.05 [#]	124.91 $\pm$ 9.03 [#]
	20	19.67 $\pm$ 1.25 [#]	16.38 $\pm$ 1.36 [#]	9.98 $\pm$ 0.73 [#]	67.94 $\pm$ 4.67 [#]	83.47 $\pm$ 6.39 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ 。

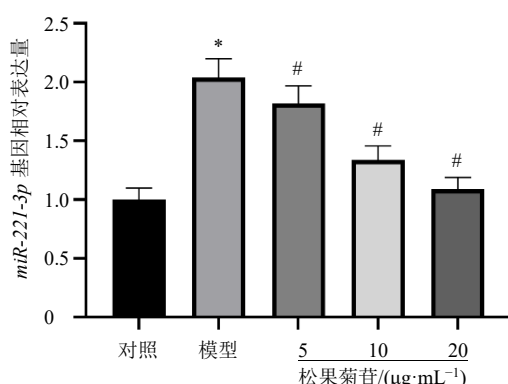
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group.

3.3 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞 miR-221-3p 表达的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组 miR-221-3p 表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,松果菊苷各给药组 miR-221-3p 表达水平显著降低 ($P < 0.05$),且呈剂量相关性。

3.4 下调 miR-221-3p 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞活性和凋亡的影响

转染 anti-miR-NC、anti-miR-221-3p 的 H9c2 细胞中 miR-221-3p 基因相对表达量分别为 1.00 ± 0.09 、 0.18 ± 0.03 ,两者比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),表明 anti-miR-221-3p 能显著降低 H9c2 细胞



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 2 松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞 *miR-221-3p* 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Effect of echinacoside on *miR-221-3p* expression in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

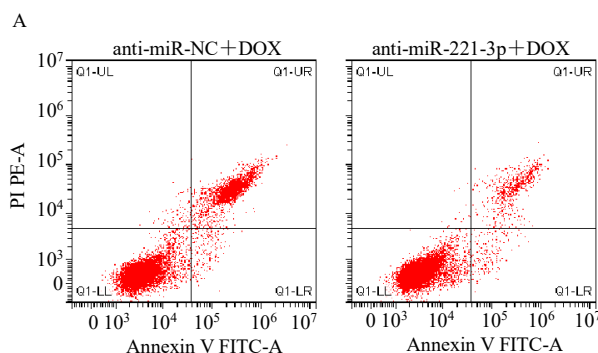


图 3 下调 *miR-221-3p* 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞凋亡 (A) 及凋亡相关蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 3 Effect of down-regulating *miR-221-3p* on apoptosis (A) and apoptosis related protein expressions (B) in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

表 3 下调 *miR-221-3p* 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞活性、凋亡率及凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Effect of down-regulating *miR-221-3p* on activity, apoptosis rate and expressions of apoptosis related proteins in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	细胞活性/%	细胞凋亡率/%	cleaved Caspase-3/β-actin	Bax/β-actin
anti-miR-NC+DOX	100.00 ± 7.31	24.10 ± 1.83	0.84 ± 0.07	0.79 ± 0.07
anti-miR-221-3p+DOX	189.03 ± 12.80*	8.16 ± 0.73*	0.39 ± 0.03*	0.34 ± 0.02*

与 anti-miR-NC+DOX 组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs anti-miR-NC + DOX group.

表 4 下调 *miR-221-3p* 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞氧化应激及炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 4 Effect of down-regulating *miR-221-3p* on levels of oxidative stress and inflammatory factors in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	MDA/(μmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	CAT/(U·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
anti-miR-NC+DOX	36.10 ± 2.61	6.39 ± 0.47	4.65 ± 0.29	149.03 ± 9.83	230.51 ± 16.10
anti-miR-221-3p+DOX	13.25 ± 1.12*	15.31 ± 1.11*	10.31 ± 0.73*	49.35 ± 3.61*	60.52 ± 5.14*

与 anti-miR-NC+DOX 组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs anti-miR-NC + DOX group.

中 *miR-221-3p* 的表达。如图 3 和表 3 所示, 与 anti-miR-NC+DOX 组比较, anti-miR-221-3p+DOX 组细胞活性显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

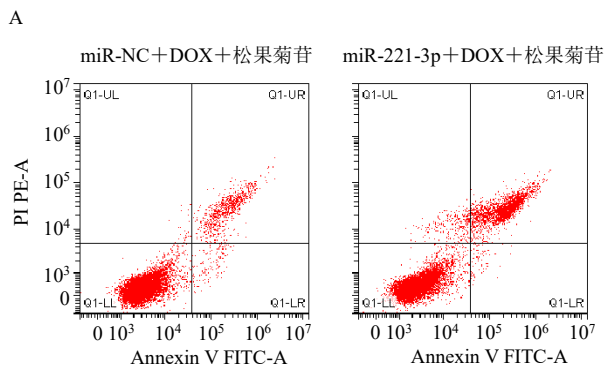
3.5 下调 *miR-221-3p* 对 DOX 诱导的 H9c2 细胞氧化应激和炎症因子水平的影响

如表 4 所示, 与 anti-miR-NC+DOX 组比较, anti-miR-221-3p+DOX 组 MDA、TNF-α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$), SOD、CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$)。

3.6 上调 *miR-221-3p* 逆转松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞活性和凋亡的作用

转染 miR-NC、*miR-221-3p* mimics 的 H9c2 细胞中 *miR-221-3p* 基因相对表达量分别为 1.00 ± 0.11、2.56 ± 0.13, 两者比较差异具有统计学意义 ($P <$

0.05),表明 miR-221-3p mimics 能显著升高 H9c2 细胞中 miR-221-3p 的表达。如图 4 和表 5 所示,与 miR-NC+DOX+松果菊苷组比较,miR-221-3p+DOX+松果菊苷组细胞活性显著降低 ($P<0.05$),细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$),cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。



3.7 上调 miR-221-3p 逆转松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞氧化应激和炎症因子水平的作用

如表 6 所示,与 miR-NC+DOX+松果菊苷组比较,miR-221-3p+DOX+松果菊苷组 MDA、TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P<0.05$),SOD、CAT 活性显著降低 ($P<0.05$)。

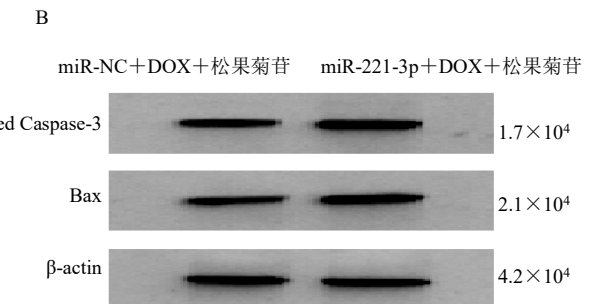


图 4 上调 miR-221-3p 逆转松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞凋亡 (A) 及凋亡相关蛋白表达 (B) 的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Fig. 4 Up-regulation of miR-221-3p reverses effect of echinacoside on apoptosis (A) and apoptosis related protein expressions (B) in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

表 5 上调 miR-221-3p 逆转松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞活性、凋亡率及凋亡相关蛋白表达的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 5 Up-regulation of miR-221-3p reverses effect of echinacoside on activity, apoptosis rate and expressions of apoptosis related proteins in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞活性/%	细胞凋亡率/%	cleaved Caspase-3/ β -actin	Bax/ β -actin
miR-NC+DOX+松果菊苷	20	100.00 $\pm$ 8.10	9.05 $\pm$ 0.71	0.46 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.02
miR-221-3p+DOX+松果菊苷	20	52.02 $\pm$ 5.06*	25.43 $\pm$ 1.87*	0.83 $\pm$ 0.07*	0.78 $\pm$ 0.06*

与 miR-NC+DOX+松果菊苷组比较: * $P<0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs miR-NC + DOX + echinacoside group.

表 6 上调 miR-221-3p 逆转松果菊苷对 DOX 诱导的 H9c2 细胞氧化应激和炎症因子水平的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 6 Up-regulation of miR-221-3p reverses effect of echinacoside on levels of oxidative stress and inflammatory factors in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CAT/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
miR-NC+DOX+松果菊苷	20	19.57 $\pm$ 1.61	16.43 $\pm$ 1.21	9.91 $\pm$ 0.64	66.37 $\pm$ 5.14	83.34 $\pm$ 7.10
miR-221-3p+DOX+松果菊苷	20	35.71 $\pm$ 2.34*	6.17 $\pm$ 0.43*	4.18 $\pm$ 0.31*	135.24 $\pm$ 9.12*	227.15 $\pm$ 15.19*

与 miR-NC+DOX+松果菊苷组比较: * $P<0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs miR-NC + DOX + echinacoside group.

4 讨论

DOX 是治疗肿瘤的常用药物,但其长期使用可引起心肌损伤。DOX 可在体内形成多种氧自由基,引起细胞氧化反应^[11]。在生理系统中,MDA 作为脂质过氧化反应的标志物,其水平可作为评估氧化应激程度的敏感指标。SOD 与 CAT 构成生物体内重要的抗氧化防御系统,能有效中和过量活性氧

物质,从而降低氧化应激引发的细胞结构损伤。此外,心肌局部炎症反应也参与了 DOX 引起的心肌损伤^[12]。当机体受损时,活化的巨噬细胞可分泌并释放 TNF- α ,TNF- α 可进一步刺激 IL-6 等炎症因子的产生介导炎症反应,加剧细胞损伤。过度的氧化应激还可破坏心肌细胞膜结构,引起细胞内钙离子超载,进一步诱导心肌细胞凋亡^[13]。本研究结果表

明 DOX 诱导心肌细胞产生了氧化应激和炎性损伤,并加剧了心肌细胞凋亡,表明 DOX 诱导的心肌细胞损伤模型建立成功。研究显示,松果菊苷具有多种药理活性^[14]。松果菊苷可缓解 DOX 诱导的急性心脏毒性,其作用机制与抑制心肌组织氧化应激损伤和心肌细胞凋亡有关^[15];松果菊苷可通过调控 p53/p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /Caspase 信号通路的传导抑制糖尿病心肌病小鼠心肌细胞凋亡,减轻心肌损伤^[16]。然而,松果菊苷对 DOX 诱导的心肌细胞损伤的影响和作用机制未见报道。本研究结果表明松果菊苷可减轻 DOX 诱导的心肌细胞氧化应激和炎性损伤。

细胞凋亡是一个复杂的过程,受到多种基因分子和信号通路的调控。其中, Bax 蛋白的表达在凋亡过程中起着关键作用。当 Bax 表达增加时,它能够形成同源二聚体,这种二聚体的形成会改变细胞膜的通透性,从而导致细胞色素 C 的释放量增加。细胞色素 C 的释放是激活 Caspase 凋亡途径的重要步骤^[17]。Caspase-3 作为 Caspase 凋亡途径的核心分子,在受到凋亡信号的刺激后会被活化,生成 cleaved Caspase-3。活化的 Caspase-3 能够剪切各种细胞底物,最终诱导细胞发生凋亡^[18]。本研究结果表明松果菊苷可抑制 DOX 诱导的心肌细胞凋亡。

miRNA 在疾病的发生发展中起着重要的调控作用^[19-20]。有报道称,敲减 *miR-221-3p* 可能通过 c-Fos/Beclin-1 改善冠状动脉微栓塞大鼠心脏功能^[21];上调 *miR-221-3p* 可诱导大鼠心肌细胞凋亡^[22]。本研究发现 DOX 诱导的 H9c2 细胞中,下调 *miR-221-3p* 可增强细胞活性,并可抑制细胞凋亡、氧化应激及炎症反应,提示 *miR-221-3p* 促进 DOX 引起的心肌损伤,其有可能成为治疗 DOX 引起的心肌损伤的分子靶点。本研究提示松果菊苷可能通过抑制 *miR-221-3p* 的表达来减轻 DOX 引起的心肌细胞损伤。现有的证据已表明在 H₂O₂ 处理的 H9c2 细胞和心肌缺血再灌注大鼠模型中, *miR-221-3p* 通过靶向 p57 参与心肌细胞损伤^[23]。因此,松果菊苷可能通过调控 *miR-221-3p*/p57 轴抑制 DOX 引起的心肌细胞氧化应激和炎症反应,并减少心肌细胞凋亡。

综上,松果菊苷能够有效抑制 DOX 诱导的心肌细胞氧化应激和炎症反应,并减少细胞凋亡,从而发挥对 DOX 所致心肌损伤的保护作用。其潜在的作用机制可能涉及松果菊苷对 *miR-221-3p* 表达

的调控。松果菊苷的抗氧化、抗炎、抗凋亡特性在本研究中扮演了关键角色,它们不仅直接减轻了 DOX 引起的氧化应激、炎症损伤和细胞凋亡,还可能通过影响下游 miRNA 表达,共同构成了其心肌保护作用的综合机制。这一发现不仅验证了松果菊苷对 DOX 心脏毒性的潜在治疗价值,也揭示了 *miR-221-3p* 在心肌损伤中的作用,并提出了松果菊苷可能通过调控该 miRNA 来发挥保护作用的全新视角,为理解 DOX 心脏毒性的分子机制提供了新的线索。另外,本研究为临床上寻找安全有效的心肌损伤治疗策略提供了新的天然候选药物和潜在分子靶点。然而本研究仅通过体外细胞实验进行了探究,尚需通过动物实验在体内进一步验证松果菊苷保护 DOX 引起的心肌损伤的作用,且 *miR-221-3p* 靶基因和信号通路对 DOX 引起的心肌损伤的影响也还需进一步探究。在后续研究中会利用心肌缺血再灌注鼠模型验证本结论,而且也将进一步探究松果菊苷是否通过调控 *miR-221-3p*/p57 细胞轴来抑制 DOX 引起的心肌细胞氧化应激和炎症反应,并减少心肌细胞凋亡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mei S B, Hong L, Cai X Y, *et al.* Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 307: 41-48.
- [2] Wang W, Jiang S J, Zhao Y, *et al.* Echinacoside: A promising active natural products and pharmacological agents [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 197: 106951.
- [3] Pan Y B, Liu Y J. Echinacoside alleviates airway remodeling and inflammation in an ovalbumin-induced neonatal mouse model of asthma by modulating the SIRT1-NF- κ B pathway [J]. *Allergol Immunopathol*, 2023, 51(4): 71-77.
- [4] Yang Y J, Liu J. Echinacoside alleviates carbon tetrachloride-induced chronic liver injury by modulating the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2024, 104(3): e14616.
- [5] 赵卿, 张鹏, 白宇, 等. 松果菊苷通过调控 GFR α 1/AKT 信号通路抑制 MPP⁺诱导的多巴胺能细胞 SH-SY5Y 凋亡 [J]. *中成药*, 2016, 38(6): 1225-1231.
- [6] 杨芳, 吴泽幼, 包思, 等. 松果菊苷通过调节 Nrf2 表达减轻 H₂O₂ 致心肌细胞损伤的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2017, 26(12): 2078-2082.
- [7] 姜瑞凤, 衣少娜, 王媛媛, 等. 松果菊苷对四氯化碳诱导大鼠急性肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中国*

- 免疫学杂志, 2019, 35(17): 2053-2058.
- [8] Zhuang L, Xia W Z, Chen D D, *et al.* Exosomal LncRNA-NEAT1 derived from MIF-treated mesenchymal stem cells protected against doxorubicin-induced cardiac senescence through sponging miR-221-3p [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 157.
- [9] 蔡华, 张领, 李满生, 等. 松果菊苷通过上调 miR-34a 减轻心肌细胞缺血再灌注损伤 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(6): 739-742.
- [10] 刘欢, 雷欢, 梁瑞华, 等. 柚皮素对阿霉素致心肌细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 788-793.
- [11] Sun M L, Dong J M, Liu C, *et al.* Metformin-mediated protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 180: 117535.
- [12] Wang S L, Zhang X, Hou Y H, *et al.* SIRT6 activates PPAR α to improve doxorubicin-induced myocardial cell aging and damage [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 392: 110920.
- [13] Hu C, Zhang X, Zhang N, *et al.* Osteocrin attenuates inflammation, oxidative stress, apoptosis, and cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(3): e124.
- [14] 冯茜, 董波, 杨旭红. 松果菊苷治疗神经系统疾病作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1654-1662.
- [15] 马超, 郭万刚, 马文帅. 松果菊苷对多柔比星心脏毒性保护作用及机制研究 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(8): 1450-1454.
- [16] 张祥, 杨洛, 徐雄峰, 等. 松果菊苷通过 p53/p38 MAPK/Caspase 信号转导途径改善 db/db 小鼠心肌细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国当代医药, 2019, 26(13): 13-18.
- [17] Glover H L, Schreiner A, Dewson G, *et al.* Mitochondria and cell death [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(9): 1434-1446.
- [18] Dou H, Yu P Y, Liu Y Q, *et al.* Recent advances in Caspase-3, breast cancer, and traditional Chinese medicine: A review [J]. *J Chemother*, 2024, 36(5): 370-388.
- [19] Ramprosand S, Govinden-Soulange J, Ranghoo-Sanmukhiya V M, *et al.* miRNA, phytometabolites and disease: Connecting the dots [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(9): 4570-4591.
- [20] Giammona A, Galuzzi B G, Imperia E, *et al.* Chronic gastrointestinal disorders and miRNA-associated disease: An up-to-date [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(1): 413.
- [21] 吴文豪, 李浪, 郑静, 等. miR-221-3p 调控 c-Fos/Beclin-1 对大鼠冠状动脉微栓塞后心肌细胞自噬的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(4): 559-568.
- [22] 李雨弥, 章培, 唐勇, 等. lncRNA TINCR 靶向调控 miR-221 抑制大鼠心肌细胞凋亡的实验研究 [J]. 河北医学, 2021, 27(2): 195-201.
- [23] Meng Q F, Liu Y, Huo X Y, *et al.* microRNA-221-3p contributes to cardiomyocyte injury in H₂O₂-treated H9c2 cells and a rat model of myocardial ischemia-reperfusion by targeting p57 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 589-596.

[责任编辑 李亚楠]