

葛根素对表柔比星致H9c2心肌细胞凋亡的影响

李 聪^{1*},周 捷²,黄海潮³,巫 玮⁴,李 园^{1#}(1.广东省人民医院/广东省医学科学院药学部,广州 510080;2.中山大学肿瘤防治中心药学部,广州 510060;3.广东食品药品职业学院实验实训中心,广州 510520;4.广东省食品药品职业技术学校药学系,广州 510663)

中图分类号 R361⁺.3;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4807-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.17

摘要 目的:研究葛根素对表柔比星致H9c2心肌细胞凋亡的影响。方法:取H9c2心肌细胞分为空白对照组、模型组、阳性对照组(10 μmol/L 右丙亚胺)和葛根素低、中、高浓度组(10、50、100 μmol/L),每组5个复孔。除空白对照组不作任何处理外,其他各组细胞加入表柔比星(1.0 μmol/L)及相应药物,作用24 h后,采用CCK-8法检测细胞存活率,Hoechst 33258染色观察细胞的凋亡形态,流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blot法检测凋亡相关信号蛋白Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3的表达,比色法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)的含量。结果:与空白对照组比较,模型组细胞核出现明显的凋亡小体,细胞存活率、Bcl-2表达、SOD活性均降低,凋亡率、Bax和Cleaved-caspase-3表达、Bax/Bcl-2比例、MDA含量均增加;与模型组比较,阳性对照组和葛根素中、高浓度组细胞核形态完整,细胞存活率、Bcl-2表达、SOD活性均增加,凋亡率、Bax和Cleaved-caspase-3表达、Bax/Bcl-2比例、MDA含量均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其余指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:葛根素可能通过抑制细胞凋亡信号通路和减轻氧化损伤作用来降低表柔比星的心肌毒性。

关键词 葛根素;表柔比星;H9c2心肌细胞;心肌毒性

Effects of Puerarin on the Apoptosis of H9c2 Myocardial Cell Induced by Epirubicin

LI Cong¹, ZHOU Jie², HUANG Haichao³, WU Wei¹, LI Yuan¹(1. Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Dept. of Pharmacy, Tumor Prevention and Treatment Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 3. Experimental Training Center, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 4. Dept. of Pharmacy, Guangdong Food and Drug Vocational-technical School, Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of puerarin (Pue) on the apoptosis of H9c2 myocardial cell induced by epirubicin (Epi). METHODS: The H9c2 myocardial cells were divided into blank control group, model group, positive control group (10 μmol/L dexrazoxane) and Pue low-dose, medium-dose and high-dose groups (10, 50, 100 μmol/L), with 5 wells in each group. Except blank control group didn't received any treatment, other groups were treated with Epi (1.0 μmol/L) and relevant medicine. 24 h later, survival rate of myocardial cell was measured by CCK-8 kit; apoptotic morphology was observed by Hoechst 33258 fluorescent staining; apoptotic rate of myocardial cell was determined by flow cytometry; the protein expression of Bax, Bcl-2 and Cleaved-caspase-3 were assayed by Western blot; SOD activity and MDA content were assayed by colorimetric kit. RESULTS: Compared with blank control group, apoptotic body was obviously found in cell nucleus of model group; survival rate, the expression of Bcl-2 and SOD activity were decreased; while the apoptotic rate, the expression of Bax and Cleaved-caspase-3, Bax/Bcl-2 ratio and MDA content were increased. Compared with model group, the morphology of cell nucleus was complete in positive control group and Pue medium-dose and high-dose groups; survival rate, the expression of Bcl-2 and SOD activity were increased; while apoptotic rate, the expression of Bax and Cleaved-caspase-3, Bax/Bcl-2 ratio and MDA content were decreased, with statistical significance ($P < 0.05$). There was no statistical significance in other indexes ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Pue could mitigate cardiac toxicity of Epi via inhibiting apoptotic signaling pathway and depressing oxidative damage.

KEYWORDS Puerarin; Epirubicin; H9c2 myocardial cell; Cardiac toxicity

表柔比星(Epirubicin)属于蒽环类抗肿瘤药物,广泛应用于治疗白血病、恶性淋巴瘤、乳腺癌等多种肿瘤疾病。尽管表

* 药师。研究方向:药剂学。电话:020-83827812。E-mail: 583578431@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:药剂学。电话:020-83827812。E-mail:389103928@qq.com

柔比星具有显著的抗肿瘤作用,但其心脏毒性的危害程度甚高,主要表现为心律失常、心功能紊乱、充血性心力衰竭,甚至导致患者死亡^[1]。有研究表明,其心脏毒性主要是因为体内的表柔比星在细胞色素P₄₅₀等酶的作用下转可变为半醌表柔比星,半醌结构所带的孤对电子可传递给分子氧形成超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$),产生的 $\cdot\text{O}_2^-$ 又可进一步转化为羟自由基、过

氧化氢等多种自由基,从而使细胞膜及细胞器膜磷脂中的不饱和脂肪酸发生过氧化反应,破坏膜结构完整性并改变膜上蛋白的功能,从而严重影响心肌细胞的正常功能^[2]。

葛根素(Puerarin)是从豆科植物野葛根中提取的黄酮苷,具有清除自由基、抗脂质过氧化和改善心肌能量代谢等作用,由此推测,葛根素可能用于降低表柔比星的心肌毒性^[3]。本文利用H9c2心肌细胞株探讨葛根素对表柔比星心肌毒性的抑制作用及机制,并以目前广泛使用的预防蒽环类药物心肌毒性的保护剂右丙亚胺作为对照,比较两者对心肌的保护效果。

1 材料

1.1 仪器

HERA Cell 150i CO₂细胞培养箱、Sorvall ST 40 台式离心机(美国 Thermo Scientific 公司);DMI3000B 荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司);Elx-808 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);BD FACSVerse 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)。

1.2 药品与试剂

葛根素(批号:031M1302V,纯度:>99.0%)、表柔比星(批号:038K1349,纯度:98%)、Hoechst 33258 染色试剂(批号:3491-45-4)均购自美国 Sigma Aldrich 公司;右丙亚胺注射液(江苏奥赛康药业有限公司,批号:E1511042,规格:每支 250 mg);CCK-8 试剂盒(日本 Dojindo Lab 公司);胎牛血清(FBS)、高糖 DMEM 干粉培养基(美国 Gibco 公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒和 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究);凋亡相关信号蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 和 β -肌动蛋白(β -actin)、兔抗鼠抗体以及羊抗兔二抗(美国 Cell Signaling Technology Inc 公司)。

1.3 细胞株

鼠源性 H9c2 心肌细胞株由中山大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 H9c2 细胞培养

用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下培养细胞。细胞生长至满皿的 80% 时进行传代,弃培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次后,加入 0.25% 胰酶消化 2~3 min,再加含血清培养液终止消化。用滴管轻轻吹打至细胞从皿底完全脱落,按试验需求接种于培养板或培养瓶内待用。

2.2 MTT 法检测细胞存活率

将 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,调细胞密度为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ 个/ml,分为空白对照组、模型组、阳性对照组(10 μ mol/L 右丙亚胺)和葛根素低、中、高浓度组(10、50、100 μ mol/L,按预试验设计),每组 5 个复孔。除空白对照组不作任何处理外,其他各组细胞加入表柔比星(1.0 mmol/L)^[4],同时,加药组细胞加入相应药物,作用 24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8,37 °C 孵育 2 h。用酶标仪测定各孔细胞 450 nm 波长处的光密度(OD),计算细胞存活率,细胞存活率(%) = 给药组 OD/空白对照组 OD \times 100%。

2.3 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡形态

将 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,按“2.2”项下方法分组、给药处理后,弃培养液,以 PBS 洗涤 2 次,加入 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 2 次。加入 5 mg/L 的 Hoechst 33258 试剂,室温轻摇 30 min,经 PBS 洗涤后,用荧光显微镜在 346 nm 激发波长处观察染色情况,并拍照。

2.4 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡率

将 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,按“2.2”项下方法分组、给药处理后,弃培养液,以 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 0.25% 胰蛋白酶(不含乙二胺四乙酸),于 37 °C 消化 2~3 min 后,每孔加入含血清的培养液终止消化。细胞悬浮液以 1 000 r/min(离心半径为 17.8 cm)离心 10 min,弃上清,收集细胞后按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作进行染色。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,细胞凋亡率(%) = 晚期细胞凋亡率 + 早期细胞凋亡率。

2.5 Western blot 法检测凋亡相关蛋白表达

将 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,按“2.2”项下方法分组、给药处理后,弃培养液,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液,4 °C 静置 30 min,12 000 r/min(离心半径为 9.8 cm)离心 15 min。取上清液,采用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量。总蛋白经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离后,转移到 PVDF 膜上,用 5% 牛血清白蛋白室温下封闭 90 min,加入一抗[Bax(1:5 000)、Bcl-2(1:1 000)、Cleaved-caspase-3(1:1 000)],4 °C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 3 次后,加 1:5 000 稀释的二抗,室温孵育 1 h 后,再次洗膜,加入增强化学发光(ECL)液,曝光、显影、定影。采用凝胶成像系统自带软件分析各组细胞凋亡相关蛋白条带的灰度值,以其与内参 β -actin 灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。

2.6 比色法检测 MDA 含量和 SOD 活性

将 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,按“2.2”项下方法分组、给药处理后,弃培养液,用 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 0.05 mmol/ml 的乙二胺四乙酸和 1 ml 0.1 mol/L 的 PBS,再加入 50 μ l 1% 的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton-X 100),振荡 1 min。加入 25% 的 H₃PO₄ 100 μ l,4 °C 下 12 000 r/min(离心半径为 9.8 cm)离心 1 h。取上清液,按检测试剂盒说明书操作测定各组细胞 MDA 含量和 SOD 活性。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率

空白对照组、模型组、阳性对照组和葛根素低、中、高浓度组细胞存活率分别为 100%、(58.3 \pm 0.11)%、(78.6 \pm 0.06)%、(61.2 \pm 0.08)%、(70.5 \pm 0.09)%、(76.4 \pm 0.12)% ($n=5$)。与空白对照组比较,模型组细胞存活率降低($P < 0.05$)。与模型组比较,葛根素中、高浓度组和阳性对照组细胞存活率均增加($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,葛根素低、中浓度组细胞存活率均降低($P < 0.05$),葛根素高浓度组细胞存活率差异无统计

学意义($P>0.05$)。

3.2 细胞凋亡情况

模型组和葛根素低浓度组细胞出现较多亮蓝色的凋亡小体;相比之下,葛根素中、高浓度组细胞的细胞核形态完整,荧光较暗,着色均匀,与阳性对照组细胞的染色状况相近。各组细胞核的形态学观察结果见图1。

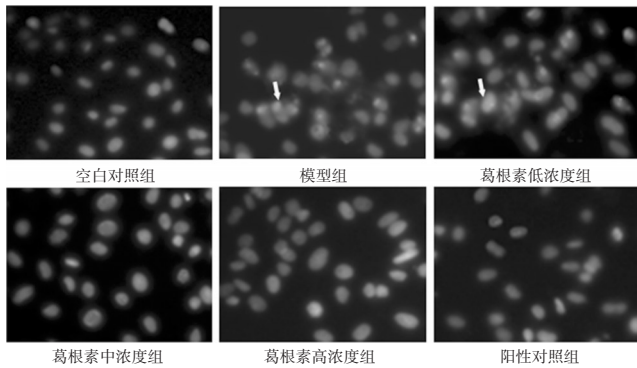


图1 各组细胞核的形态学观察结果($\times 200$)

Fig 1 Morphological results of cells in each group($\times 200$)

3.3 细胞凋亡率

空白对照组、模型组、阳性对照组和葛根素低、中、高浓度组细胞凋亡率分别为 $(7.4 \pm 0.03)\%$ 、 $(43.2 \pm 0.07)\%$ 、 $(31.3 \pm 0.06)\%$ 、 $(41.8 \pm 0.06)\%$ 、 $(38.5 \pm 0.05)\%$ 、 $(32.7 \pm 0.04)\%$ ($n=5$)。与空白对照组比较,模型组细胞凋亡率增加($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和葛根素中、高浓度组细胞凋亡率均降低($P<0.05$)。与阳性对照组比较,葛根素低、中浓度组细胞凋亡率均增加($P<0.05$)。各组细胞凋亡的流式细胞图见图2。

3.4 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达

与空白对照组比较,模型组细胞Bcl-2蛋白表达减弱,Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达增强,Bax/Bcl-2增加($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和葛根素中、高浓度组细胞Bcl-2蛋白表达增强,Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达减弱,Bax/Bcl-2减小($P<0.05$)。各组细胞Bax、Bcl-2和Cleaved-caspase-3蛋白表达的电泳图见图3,检测结果见表1。

3.5 MDA含量和SOD活性

与空白对照组比较,模型组细胞MDA含量降低,SOD活性增强($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和葛根素中、高浓度组细胞MDA含量增加,SOD活性降低($P<0.05$)。各组细胞MDA含量和SOD活性的检测结果见表2。

4 讨论

CCK-8检测细胞存活率和流式细胞术检测细胞凋亡率的实验结果表明,葛根素的浓度在 $50\sim 100\ \mu\text{mol/L}$ 时,在体外能有效抑制表柔比星引起的心肌细胞凋亡,提高细胞的存活率。Western blot结果显示,葛根素抑制细胞凋亡的机制是增加Bcl-2的表达量从而减少Bax二聚体的形成,降低Bax/Bcl-2的比例^[5]。Caspase-3是执行细胞凋亡的效应蛋白,当其裂解成活化片段(Cleaved-caspase-3)后,能够连续传递和放大凋亡信号,从而导致细胞发生大量而快速的凋亡反应。实验表明,在

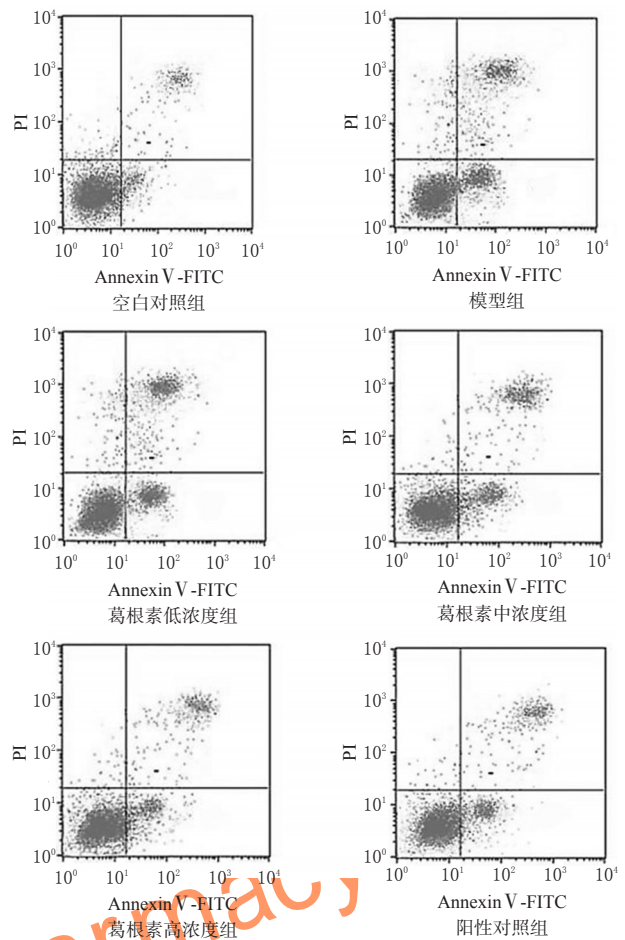


图2 各组细胞凋亡的流式细胞图

Fig 2 Flow cytometry of cells apoptosis in each group

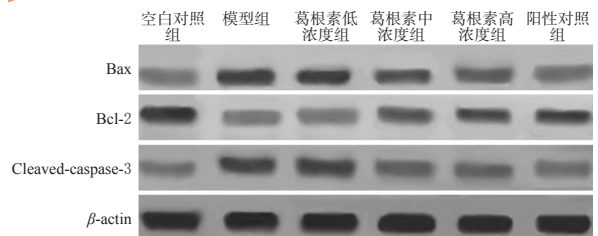


图3 各组细胞Bax、Bcl-2和Cleaved-caspase-3蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretograms of protein expression of Bax, Bcl-2 and Cleaved-caspase-3 of cells in each group

表1 各组细胞Bax、Bcl-2和Cleaved-caspase-3蛋白表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 The protein expression of Bax, Bcl-2 and Cleaved-caspase-3 of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Cleaved-caspase-3/ β -actin	Bax/Bcl-2
空白对照组	38.4 ± 3.1	90.7 ± 8.1	24.1 ± 2.2	0.42 ± 0.08
模型组	$105.3 \pm 7.4^*$	$42.0 \pm 3.7^*$	$47.9 \pm 5.8^*$	$2.51 \pm 0.22^*$
葛根素低浓度组	103.2 ± 7.0	43.1 ± 4.0	44.7 ± 6.5	2.39 ± 0.24
葛根素中浓度组	$62.2 \pm 5.2^{\#}$	$57.4 \pm 5.3^{\#}$	$36.2 \pm 5.5^{\#}$	$1.08 \pm 0.17^{\#}$
葛根素高浓度组	$46.8 \pm 4.0^{\#}$	$63.4 \pm 4.7^{\#}$	$30.4 \pm 3.6^{\#}$	$0.74 \pm 0.14^{\#}$
阳性对照组	$45.8 \pm 4.9^{\#}$	$64.7 \pm 4.8^{\#}$	$29.2 \pm 3.5^{\#}$	$0.71 \pm 0.11^{\#}$

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, $^{\#}P<0.05$

表2 各组细胞MDA含量和SOD活性的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 MDA content and SOD activity of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	MDA, $\mu\text{mol/g pro}$	SOD, U/mg pro
空白对照组	32.34 \pm 5.62	50.11 \pm 5.27
模型组	64.08 \pm 7.05*	29.85 \pm 3.43*
葛根素低浓度组	58.75 \pm 3.37	32.42 \pm 2.69
葛根素中浓度组	44.51 \pm 6.62 [#]	35.66 \pm 3.08 [#]
葛根素高浓度组	36.87 \pm 5.22 [#]	40.56 \pm 1.95 [#]
阳性对照组	40.47 \pm 5.08 [#]	41.28 \pm 2.67 [#]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. blank control group,* $P < 0.05$;vs. model group,[#] $P < 0.05$

葛根素的干预下,Caspase-3裂解活化的程度减小,导致Cleaved-caspase-3的数量下降,从而抑制细胞的凋亡进程^[6]。研究表明,Bax形成二聚体后能够增加线粒体外膜通透性,导致细胞色素C释放,最终可诱导Caspase-3被裂解活化而启动凋亡进程,因此推断葛根素能够抑制线粒体介导的细胞凋亡途径^[7]。通过检测SOD和脂质氧化反应产物MDA的水平,可以确定葛根素能够降低过氧自由基的含量,有效抑制氧化应激对细胞的损伤,从而提高细胞的存活率^[8]。

右丙亚胺为乙二胺四乙酸的亲脂性衍生物,能够透过生物膜进入细胞并水解成类似EDTA的结构,通过络合螯环-铁螯合物中的铁离子,干扰铁离子介导生成自由基,从而减轻氧化反应对心机的损害^[9]。检测心肌细胞存活率和凋亡率的结果显示,100 $\mu\text{mol/L}$ 葛根素与10 $\mu\text{mol/L}$ 右丙亚胺在体外对心肌细胞的保护效果相近。Western blot的结果反映出右丙亚胺调控凋亡相关蛋白的能力优于葛根素,能更好地干预细胞信号通道抑制凋亡。而在检测氧化应激指标方面,所得数据则显示葛根素抑制细胞膜脂质氧化的能力强于右丙亚胺,这很可能归功于葛根素4位和7位的2个酚羟基具有良好的还原性^[10-11]。综合而言,两者保护细胞的机制相似而各有侧重,在保护细胞的环节上存在互补的作用。

在临床应用方面,尽管右丙亚胺已获美国FDA批准录入《美国肿瘤化疗及放疗保护剂临床操作指南》,可见其疗效广受认可^[12],但副作用仍不可忽视,主要包括肾毒性和骨髓毒性,当用于儿童患者身上表现更为显著^[13]。葛根素不仅能够抑制氧化应激对心机的损伤,而且还具有保护血管内皮、扩张冠状动脉、改善心肌血液循环等右丙亚胺所不具备的作用^[14]。因此,在使用螯环类药物时,联合应用葛根素与右丙亚胺可更有效地降低药物的心肌毒性^[15]。

参考文献

[1] Florescu M, Magda LS, Enescu OA, *et al.* Early detection of epirubicin-induced cardiotoxicity in patients with breast cancer[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2014, 27(1): 83.
 [2] Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, *et al.* Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection[J]. *Anti-*

oxid Redox Signal, 2013, 18(8): 899.

[3] 胥甜甜.葛根素抗心肌细胞缺氧复氧损伤保护作用机制研究[D].南昌:南昌大学,2014.
 [4] 何华.甘草提取物及其活性成分抗阿霉素心脏毒性作用及其机制研究[D].杭州:浙江大学,2010.
 [5] Renault TT, Teijido O, Antonsson B, *et al.* Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x (L): keep your friends close but your enemies closer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(1): 64.
 [6] Damarla M, Parniani AR, Johnston L, *et al.* Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 mediates apoptosis during lung vascular permeability by regulating movement of cleaved caspase 3[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(5): 932.
 [7] 周波林.中药有效成分调控Bcl-2基因抗器官缺血再灌注损伤的研究进展[J].中国药房,2014,25(15):1 433.
 [8] 鄢良春,王林,吕秋军,等.葛根素衍生物抗心肌缺血再灌注损伤的活性筛选[J].中国药房,2008,19(3):172.
 [9] Spagnuolo RD, Recalcati S, Tacchini L, *et al.* Role of hypoxia-inducible factors in the dexrazoxane-mediated protection of cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 163(2): 299.
 [10] Han RM, Tian YX, Liu Y, *et al.* Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(9): 3 780.
 [11] 李佳,余薇,吴基良.葛根素对大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J].武汉大学学报:医学版,2010,31(6): 763.
 [12] Limat S, Daguindau E, Cahn JY, *et al.* Incidence and risk-factors of CHOP/R-CHOP-related cardiotoxicity in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2014, 39(2): 168.
 [13] Seif AE, Walker DM, Li Y, *et al.* Dexrazoxane exposure and risk of secondary acute myeloid leukemia in pediatric oncology patients[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2015, 62(4): 704.
 [14] 巩红岩,秦元旭,王更富,等.葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165.
 [15] 徐庆国,谈金强,宋希林,等.葛花总黄酮对阿霉素所致中毒性心肌炎的保护作用研究[J].中国生化药物杂志,2014,34(7):27.

(收稿日期:2016-02-02 修回日期:2016-04-17)

(编辑:邹丽娟)