

## 基于Nrf2/HO-1信号通路调控的恰玛古多糖抗多柔比星心肌毒性的机制研究

郭君婷<sup>1,2#</sup>, 赵婷婷<sup>1,2#</sup>, 叶斯木·塔拉甫别克<sup>1,2</sup>, 高瑞娟<sup>3\*</sup>, 刘桂花<sup>1,2,4\*</sup>

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 4. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 本研究主要探讨了恰玛古多糖 (polysaccharides of *Brassica rapa* L., BRPs) 对多柔比星 (doxorubicin, DOX) 心脏毒性的作用及相关机制, 研究选用H9c2细胞作为研究对象, 采用Cell counting kit-8 (CCK-8) 法检测BRPs对DOX致H9c2细胞损伤的影响; 将H9c2细胞分成对照组、模型组和药物组 (0.5~3 mg·mL<sup>-1</sup>), 对照组于正常条件下培养, 其余各组在处理后进行1 μmol·L<sup>-1</sup> DOX诱导24 h。通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡; 分别测定各组细胞乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量; 检测细胞内活性氧 (ROS) 和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP); Western blot检测凋亡及转录因子NF-E2相关因子 (NF-E2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路相关蛋白表达。与对照组相比, DOX致H9c2细胞损伤的细胞活力下降、凋亡率增加, LDH、MDA水平升高, SOD活性降低, ROS水平显著增多, MMP显著下降; B淋巴细胞瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白水平降低, Bcl-2关联X蛋白 (Bcl associated X protein, Bax) 水平显著升高; 且模型组Nrf-2、HO-1、醌氧化还原酶1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1) 蛋白表达水平降低, Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 和磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶蛋白表达水平显著升高。与模型组相比, BRPs各组在0.5~3 mg·mL<sup>-1</sup>对DOX致H9c2细胞损伤具有保护作用, 降低细胞凋亡及LDH、MDA和细胞内ROS水平, 增强SOD活性, 升高MMP; 同时, BRPs可上调凋亡相关Bcl-2, 并下调Bax水平; 而且, BRPs可使Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达水平升高, Keap1和磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶水平降低。本研究认为BRPs能够保护H9c2细胞, 抑制细胞凋亡, 可能与其调节Nrf2/HO-1通路拮抗氧化应激有关。

**关键词:** 恰玛古多糖; 多柔比星; 心肌毒性; 氧化应激; Nrf2/HO-1 信号通路

中图分类号: R928 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-0930-09

## Mechanistic studies on the anti-DOX cardiotoxicity of polysaccharides of *Brassica rapa* L. based on the regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway

GUO Jun-ting<sup>1,2#</sup>, ZHAO Ting-ting<sup>1,2#</sup>, YESEM Talpbek<sup>1,2</sup>, GAO Rui-juan<sup>3\*</sup>, LIU Gui-hua<sup>1,2,4\*</sup>

(1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830000, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Uygur Medical Research, Urumqi 830000, China; 3. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 4. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**Abstract:** To investigate the role of chamagocic polysaccharides (polysaccharides of *Brassica rapa* L., BRPs)

收稿日期: 2023-09-14; 修回日期: 2024-03-08.

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2023D01B45); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目 (KY2021096, KY2022139); 新疆维吾尔自治区重点实验室项目 (2023D04035).

#共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 13269093108, E-mail: gaoruijuan@imb.cams.cn;

Tel: 15099181863, E-mail: lisena-lgh@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1065

against doxorubicin (DOX) cardiotoxicity and related mechanisms, H9c2 cells were selected for the study, and the effects of BRPs on DOX induced damage in H9c2 cells were detected by cell counting kit-8 (CCK-8); H9c2 cells were divided into the control group, the model group, and the drug group ( $0.5-3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); the control group was cultured under normal conditions, and the remaining groups were induced for 24 h by  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DOX after treatment. Apoptosis was detected by flow cytometry; the levels of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured in each group; intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) were detected. Western blot was used to detect the expression of proteins related to the apoptosis and transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) pathway. Compared with the control group, DOX-induced H9c2 cell injury was characterized by decreased cell viability, increased apoptosis, elevated LDH and MDA levels, decreased SOD activity, significantly increased ROS levels, and significantly decreased MMP; the level of B cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein decreased, and the level of Bcl-2 associated X protein (Bax) increased significantly; In the model group, the expression levels of Nrf-2, HO-1, quinone oxidoreductase 1 (NQO1) were reduced, and the expression levels of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase were significantly increased. Moreover, BRPs ( $0.5-3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) increased the protein expression levels of Nrf2, HO-1, and NQO1, and decreased the levels of Keap1 and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase. In summary, the ability of BRPs to protect H9c2 cells and inhibit apoptosis may be related to their regulation of the Nrf2/HO-1 pathway to antagonize oxidative stress.

**Key words:** polysaccharides of *Brassica rapa* L.; doxorubicin; myocardial toxicity; oxidative stress; Nrf2/HO-1 signaling pathway

蒽环类抗生素多柔比星 (doxorubicin, DOX), 对多种血液系统恶性肿瘤和实体肿瘤疗效确切<sup>[1]</sup>, 但是 DOX 会剂量依赖性地引发心律失常、心肌损伤等一系列心脏毒性问题, 大大限制了其在临床上的广泛应用<sup>[2]</sup>。因此, 深入探讨 DOX 诱导心脏毒性的机制及新的临床防治候选药物成为研究的重点和难点。目前, DOX 诱导心脏毒性的病因与一些推测机制有关, 但其确切机制仍有待阐明。氧化应激被认为是 DOX 诱导心脏毒性的关键机制。活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 被认为是导致 DOX 心脏毒性的根源<sup>[3]</sup>, ROS 生成的增加是与 DOX 诱导的心肌细胞氧化应激、线粒体损伤和凋亡相关的主要机制<sup>[4]</sup>。因此, 常有外源抗氧化剂报道对预防 DOX 诱导的心脏毒性有疗效<sup>[5]</sup>。

转录因子 NF-E2 相关因子 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/ARE (antioxidant responsive elements, ARE) 是一条重要的内源性抗氧化应激途径, 与其他信号通路如蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)/磷脂酰肌醇三激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等亦关系密切<sup>[6]</sup>。在正常生理条件下, Nrf2 与细胞质中的 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 相结合, 处于抑制状态, 且不会激活下游信号。在 ROS 刺激的氧化应激作用下, Nrf2 细胞核转位被触发, 调控超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶 NADH1 (NADH quinone oxidoreductase 1, NQO1) 等基

因的表达, 从而提高细胞保护能力, 抗氧化能力及抵御氧化损伤的能力<sup>[7]</sup>。因此, 基于 Nrf2/HO-1 信号通路对于解析 DOX 造成的心脏毒性的保护机制具有潜在价值。

恰玛古, 学名芜菁 (*Brassica rapa* L.), 是十字花科芸薹属二年生草本植物, 广泛分布于欧洲、中亚和近东地区, 在我国西藏、新疆 (天山南部、塔里木盆地西北、红色沙漠长寿区) 等地普遍栽培, 肉质根是其食用和药用主要部位, 是一种富含多种人体必需元素和有机的碱性果实, 是传统的药食同源植物<sup>[8]</sup>。近年来, 随着对恰玛古研究的推进, 其增强免疫力、止咳平喘、抗肿瘤、抗辐射、降脂降糖等功用逐步受到关注<sup>[9-12]</sup>。研究表明, 恰玛古含有酚类化合物、多糖、维生素、硫代葡萄糖苷、皂苷等多种药用成分, 其中恰玛古多糖 (polysaccharides of *Brassica rapa* L., BRPs) 是其主要化学成分, 具有很好的抗氧化活性<sup>[13]</sup>。研究表明, 多糖类物质具有上调 Nrf2/HO-1 信号通路的作用<sup>[14,15]</sup>。但 BRPs 抗 DOX 心肌毒性作用是否与其调控 Nrf2/HO-1 信号通路有关尚未见诸报道。本研究以 DOX 为工具药, 以大鼠心肌细胞 H9c2 为研究对象, 构建 DOX 损伤的心肌细胞模型, 然后以 Nrf2/HO-1 通路为切入点, 探究 BRPs 改善 DOX 造成的心脏毒性的保护机制, 为利用 BRPs 新疆特色优势资源奠定基础。

## 材料与方法

**仪器** 光学显微镜 (日本 OLYMPUS, CX21); 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司, HERAccl 150i); 流式细胞

仪 (美国 Beckman 公司, Coulter EPICS XL); 多功能微孔板检测仪 (瑞士 TECAN SPARK 公司, SPARK); 多功能成像系统 (法国 VILBER 公司, FUSION FX6); 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, TGL-16K)。

**药物与试剂** 大鼠心肌细胞 (H9c2) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; BRPs 经新疆维吾尔自治区药物研究所食品安全检测室鉴定<sup>[16]</sup> (含量 52.50%, 批号: 20200506); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 高糖培养基 (批号 10099-141、C11995500BT) 购自美国 Gibco 公司; 0.25% 胰酶-EDTA (批号 FG301-01) 购自北京全式金生物技术股份有限公司; 磷酸盐缓冲液 (批号 SH30256.01) 购自美国 Hyclone 公司; CCK-8 和 Annexin-V FITC/PI 凋亡试剂盒 (批号 AR1199、MK1028) 购自博士德生物工程有限公司; LDH 测定试剂盒、MDA 测定试剂盒、SOD 测定试剂盒 (批号 A020-2、A003-4-1、A001-3) 购自南京建成生物工程研究所; 盐酸多柔比星、MMP 检测试剂盒、ROS 测试试剂盒 (批号 ID0380、M8650、CA1410) 购自北京索莱宝科技有限公司; anti-Nrf2 抗体、anti-GAPDH 抗体 (批号 16396-1-AP、60004-1-Ig) 购自 proteintech 公司; anti-HO-1 抗体、anti-Keap1 抗体、anti-p-p38 MAPK 抗体、anti-p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 抗体、anti-Bax 抗体及 anti-Bcl-2 抗体 (批号 43966、8047、4511、8690、2772、3498) 购自 CST 公司; anti-NQO1 抗体 (批号 Ab80588) 购自美国 Abcam 公司; 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (批号 ZB-2305、ZB-2301) 购自中国中杉金桥公司。

**细胞培养、分组及模型建立** H9c2 细胞用含 10% FBS、青霉素 G (100 u·mL<sup>-1</sup>) 和链霉素 (100 μg·mL<sup>-1</sup>) 的 DMEM 高糖培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, H9c2 细胞生长融合度达到 80%~90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 使用对数生长期细胞进行实验<sup>[17]</sup>。细胞分为对照组、模型组和 BRPs 各质量浓度组 (0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5 mg·mL<sup>-1</sup>)。BRPs 预处理 24 h 后用 1 μmol·L<sup>-1</sup> 的 DOX 诱导 24 h, 模拟 DOX 心脏毒性中心肌细胞损伤的病理变化。

**细胞活力检测** 将 H9c2 细胞 (1×10<sup>4</sup> 个/孔) 接种于 96 孔板中, 每组 6 个复孔, 按“分组及模型建立”方法进行分组和处置, 按照 CCK-8 试剂盒说明书测定细胞活力, 酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (optical density, A) 值, 并根据公式 (1) 计算细胞活力 (cell viability, CV)。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \quad (1)$$

**细胞凋亡检测** 取对数生长期细胞, 按 1.7×10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔培养板中, 细胞长至 70%~80%, 按“分组及

模型建立”方法进行分组和处置, 弃去各组上清液, 加入预冷的 PBS 洗涤 2 遍, 胰酶 (不含 EDTA) 消化后, 加入细胞培养液终止消化, 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细胞。4 °C 预冷 PBS, 洗涤细胞 2 次 (2 000 r·min<sup>-1</sup> × 5 min), 收集细胞。离心弃上清, 加入 500 μL 结合缓冲液, 吹打重悬细胞。加入 5 μL Annexin-V-FITC, 吹打混匀, 加入 5 μL PI 吹打混匀, 室温避光孵育 5~15 min, 流式细胞仪检测。

**LDH、MDA 和 SOD 检测** 将 H9c2 细胞 (1×10<sup>4</sup> 个/孔) 接种于 96 孔板中, 每组 6 个复孔, 按“分组及模型建立”方法进行分组和处置, 按照试剂盒说明书测定各组细胞培养液中 LDH 及细胞内 MDA、SOD 水平。

**细胞内 ROS 检测** 取对数生长期的 H9c2 细胞, 按“分组及模型建立”方法进行分组和处置, 弃去上清, 每孔加入 1 mL 用无血清培养基稀释的 10 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA, 37 °C 培养箱内孵育 30 min。弃培养液, PBS 洗涤 2 遍, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 胰酶 (不含 EDTA) 消化, 加含血清培养液终止消化, 将细胞悬液全部收集。离心弃上清, 收集细胞。计数细胞个数, 将细胞数调整为一致, 加入 96 孔中, 每孔 100 μL, 2 个复孔。使用荧光酶标仪检测细胞内 DCF 水平 (Ex = 485 nm, Em = 535 nm)。

**MMP 检测** 取对数生长期的 H9c2 细胞, 按“分组及模型建立”方法进行分组和处置, 按试剂盒说明书配制 JC-1 (1×) 染色工作液, 每孔分别加入 1 mL 细胞培养液和 1 mL JC-1 染色工作液 (1×), 充分混匀, 在 37 °C 细胞培养箱中孵育 20 min。用 JC-1 (1×) 染色工作液洗涤 2 次, 加入细胞培养液, 荧光显微镜下观察并拍照。

**Western blot 检测** 取对数生长期的 H9c2 细胞, 按“分组及模型建立”方法进行分组和处置, 收集 H9c2 细胞, 裂解液按比例加蛋白酶和磷酸酶抑制剂。蛋白样品经 BCA 法测定浓度, 按比例加入蛋白上样缓冲液稀释, 金属浴 95 °C 煮 5 min 变性。蛋白样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 以防止非特异性抗体结合。分别加一抗 Nrf2、HO-1、Keap1、NQO1、p38MAKP、p-p38MAKP、Bax、Bcl-2 (稀释比例均为 1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 弃去一抗洗膜, 并与相应的二抗 (稀释比例均为 1:10 000) 孵育 1~2 h, 再次洗膜后使用灵敏型发光液试剂盒在化学发光成像系统中采图, 并采用 Image J 软件分析条带灰度。

**Nrf2 抑制剂 (ML385) 检测** 取对数生长期的 H9c2 细胞, 按“分组及模型建立”方法进行分组和处置, 待细胞长至 80% 以上时, 提前 2 h 加入 ML385 (4 μmol·L<sup>-1</sup>) 抑制剂刺激细胞, 分组为对照组、模型组、

ML385+模型组、DOX+BRPs组和ML385+模型+BRPs组, BRPs预处理24 h后用 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DOX诱导24 h。检测ML385加入后对细胞活力、ROS及凋亡的影响。

**数据处理** 所有实验均进行3次独立平行实验, 采用GraphPad Prism 9.0进行数据分析和作图, 结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)进行多组间比较,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 BRPs减轻DOX诱导的H9c2细胞损伤

CCK-8结果显示, 不同质量浓度(0.1、0.2、0.5、1、2、3、4和 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的BRPs分别作用于H9c2细胞24 h, 不会明显抑制其细胞活力(图1A), 其中 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DOX作用24 h效果最好(后续实验选取 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DOX质量浓度处理24 h)(图1B)。结果显示: 与对照组相比, DOX模型组H9c2细胞活力明显下降( $P < 0.0001$ ); 与DOX模型组比,  $0.5\sim 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  BRPs可使DOX损伤的H9c2细胞活力得到不同程度的提高, 且BRPs在 $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 保护作用最明显(图1B)。

### 2 BRPs降低了DOX致H9c2细胞凋亡

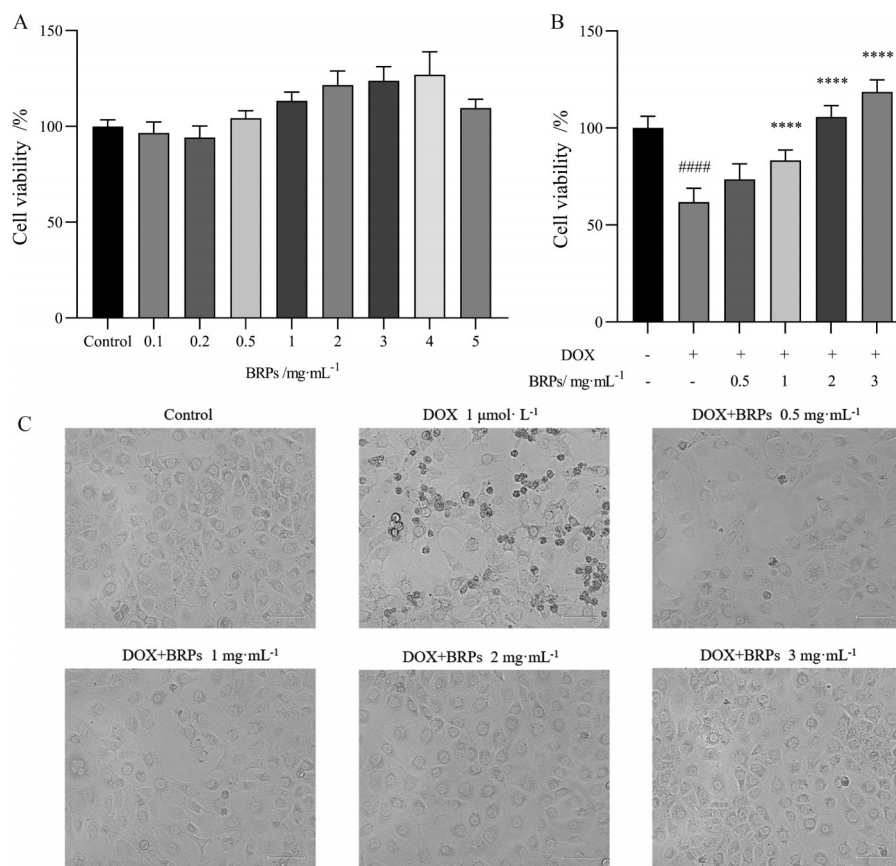
采用Annexin-V FITC/PI双染凋亡试剂盒进行染色, 并通过流式细胞仪进行检测。结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率显著升高(图2,  $P < 0.0001$ )。与模型组比较, BRPs在 $0.5\sim 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内可呈剂量依赖性抑制H9c2细胞凋亡( $P < 0.001$ )。

### 3 BRPs降低了DOX致H9c2细胞氧化应激

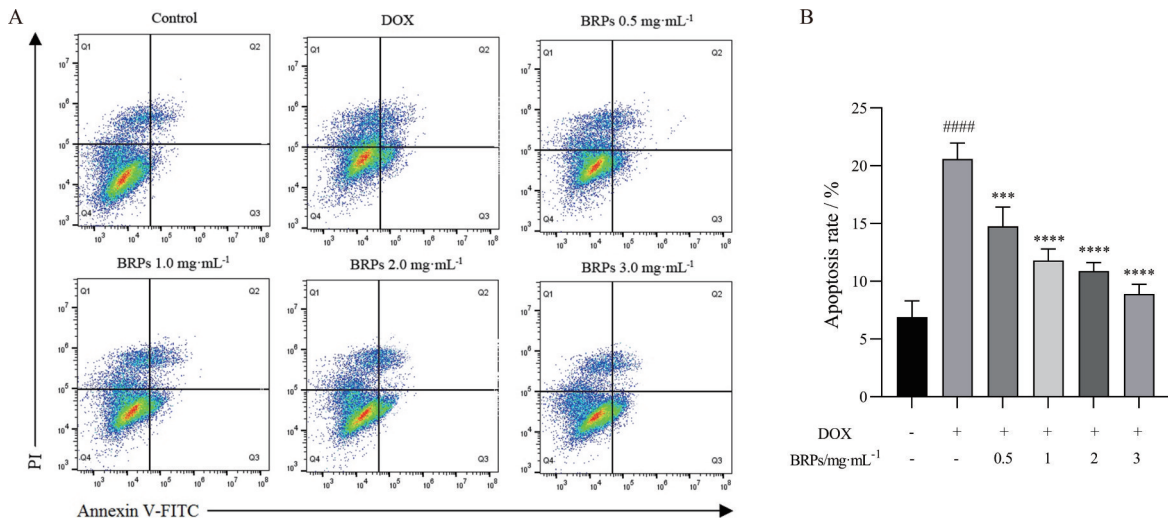
与对照组相比, 模型组细胞的LDH、MDA水平显著升高, SOD活性显著降低( $P < 0.0001$ ); 而与模型组相比, BRPs可上调DOX损伤H9c2细胞内SOD活性( $P < 0.01$ ), 并剂量依赖性显著降低LDH和MDA水平( $P < 0.01$ ), 该结果表明, BRPs可减轻DOX损伤的H9c2细胞氧化应激(图3)。

### 4 BRPs减轻DOX致H9c2细胞内ROS生成

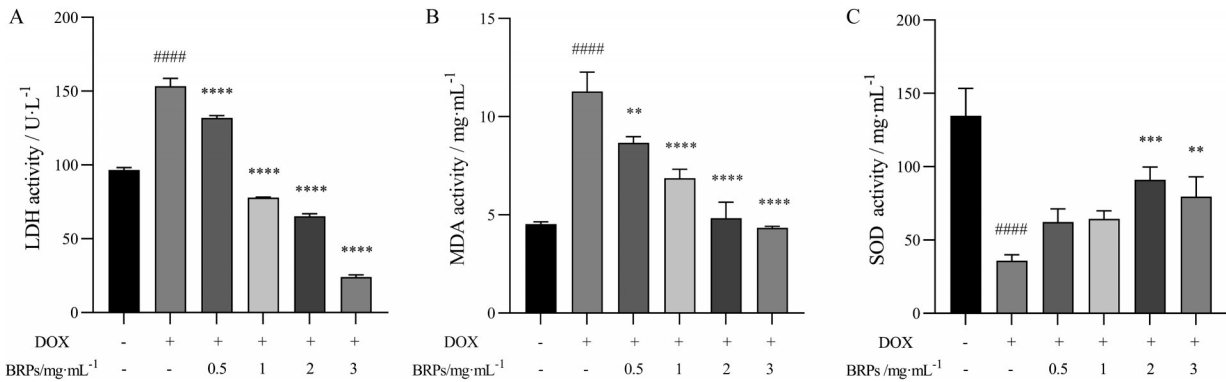
使用DCFH-DA探针检测DOX损伤的H9c2细胞内ROS水平。结果发现(图4), 与对照组比较, DOX诱导的模型组产生氧化应激, 细胞内ROS水平显著高于对照组( $P < 0.0001$ ); 与模型组相比, BRPs可剂量依赖性减少细胞内的ROS( $P < 0.0001$ )。该结果提示, BRPs可能通过减轻DOX诱导的线粒体ROS生成, 保



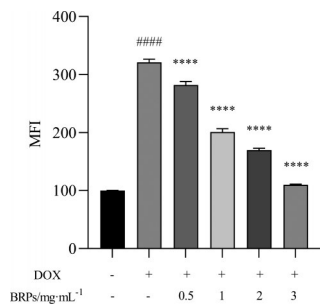
**Figure 1** BRPs attenuate DOX-induced damage in H9c2 cells. A, B: Cell viability was first determined by CCK-8 assay; C: Morphological changes after BRPs pre-treatment followed by DOX were observed and captured by the inverted microscope in H9c2 cells. BRPs: Polysaccharides of *Brassica rapa* L.; DOX: Doxorubicin.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group



**Figure 2** Effect of BRPs on apoptosis in DOX-induced H9c2 cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group



**Figure 3** Effects of BRPs on LDH activity (A), MDA activity (B) and SOD activity (C) in DOX-induced H9c2 cells. LDH: Lactate dehydrogenase; MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group



**Figure 4** Effect of BRPs on ROS release in DOX-induced H9c2 cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group. MFI: Mean fluorescence intensity; ROS: Reactive oxygen species

护H9c2细胞免受DOX诱导的细胞凋亡。

### 5 BRPs减轻DOX致H9c2细胞线粒体膜电位的影响

为了监测线粒体功能,使用JC-1染料对DOX处理过的H9c2细胞进行染色与分析。与对照组比较,

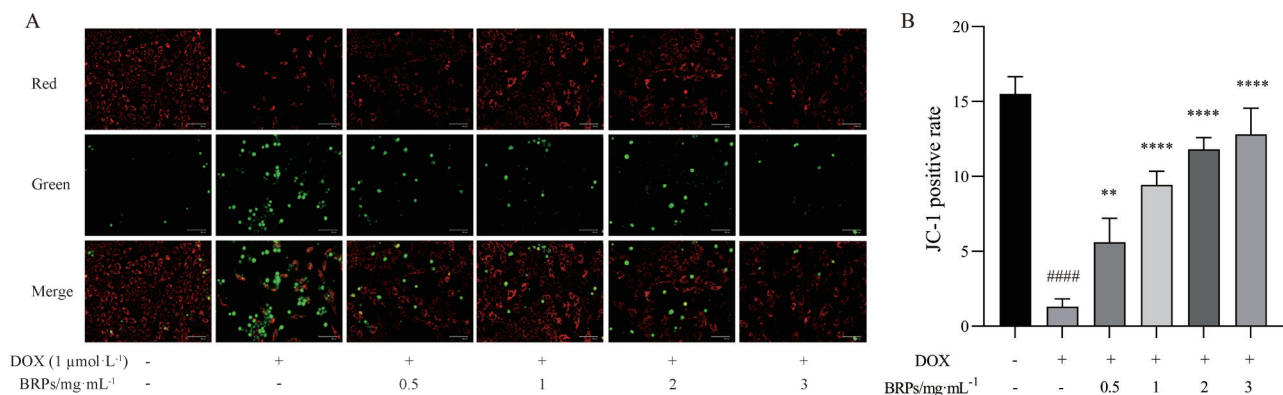
DOX诱导的模型组细胞红色荧光向绿色荧光转移,即线粒体膜电位降低 ( $P < 0.0001$ );与模型组比较, BRPs预保护可减弱红色荧光向绿色荧光转移(图5),提示线粒体膜电位升高 ( $P < 0.01$ )。

### 6 BRPs减轻DOX致H9c2细胞Bax和Bcl-2表达的影响

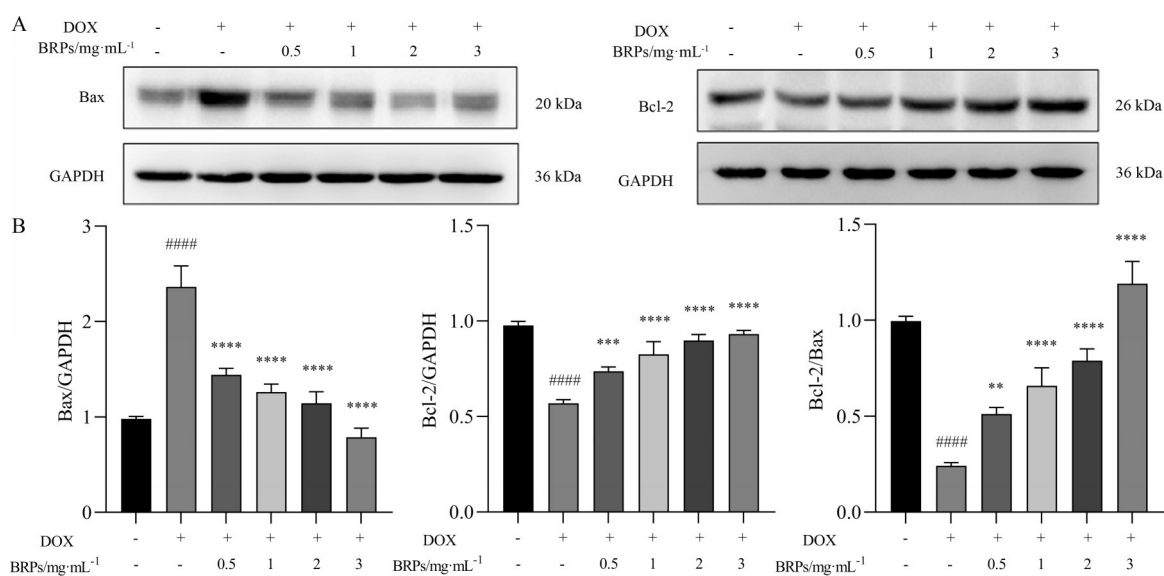
图6结果显示,与对照组比较,DOX损伤上调线粒体介导的凋亡蛋白Bax的表达水平,可下调H9c2细胞中Bcl-2的表达水平 ( $P < 0.0001$ );与模型组比较, BRPs预处理降低了DOX损伤后H9c2细胞Bax蛋白的表达,增加了Bcl-2蛋白的表达及Bcl-2/Bax比值 ( $P < 0.01$ )。由此可见, BRPs可以调节细胞凋亡相关蛋白并减轻DOX致H9c2细胞凋亡。

### 7 BRPs对DOX损伤的H9c2细胞Keap1/Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达的影响

图7结果显示,与对照组相比,DOX损伤可下调H9c2细胞中Nrf2及下游相关蛋白HO-1、NQO1的蛋



**Figure 5** Effect of BRPs on membrane potential in DOX-induced H9c2 cells. A: Cell images stained by the lipophilic cationic probe JC-1. Red signal indicates JC-1 in mitochondria, and green signal indicates cytosolic JC-1. Scale bar: 125  $\mu\text{m}$ ; B: Quantitative analysis of mitochondrial membrane potential (MMP) based on the cell images stained by JC-1.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group



**Figure 6** Effect of BRPs on DOX-induced expression of apoptosis-related protein in H9c2 cells. A: Western blot of Bax and Bcl-2; B: Bax, Bcl-2 protein expression and Bcl-2/Bax ratio.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group

白水平,上调Keap1蛋白水平和p38MAPK蛋白的磷酸化水平。相反, BRPs的干预导致Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达水平升高, Keap1和p-P38MAPK蛋白表达水平降低。

### 8 BRPs上调Nrf2抑制氧化应激减轻DOX致心脏毒性

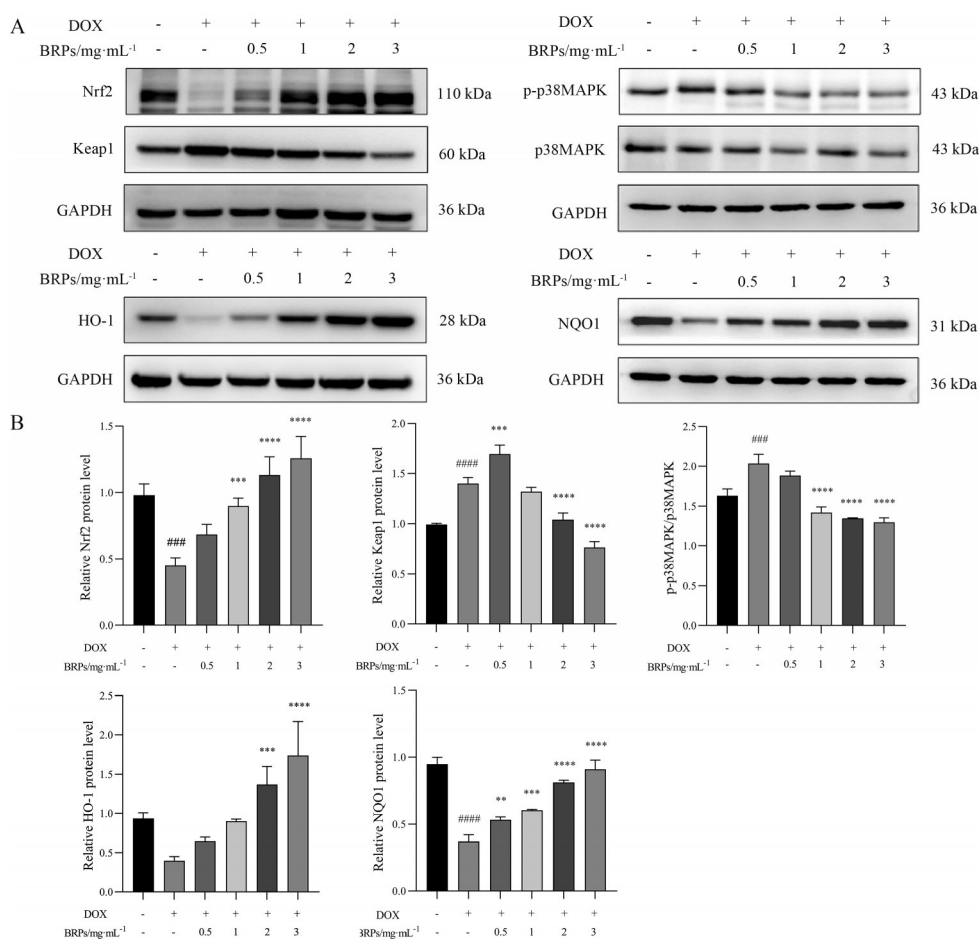
ROS生成的增加是与DOX诱导的H9c2细胞氧化应激相关, ML385是特异性的Nrf2抑制剂, 因此采用Nrf2抑制剂ML385预先处理2 h, 与模型组相比, DOX+ML385处理时降低了细胞活力, 引起细胞内ROS水平显著升高。而联合BRPs处理后, 与药物组相比则降低了细胞活力, 显著升高细胞内ROS水平(图8), 提示BRPs可能通过拮抗氧化应激治疗DOX诱导的心脏毒性。

### 9 BRPs上调Nrf2抑制细胞凋亡减轻DOX致心脏毒性

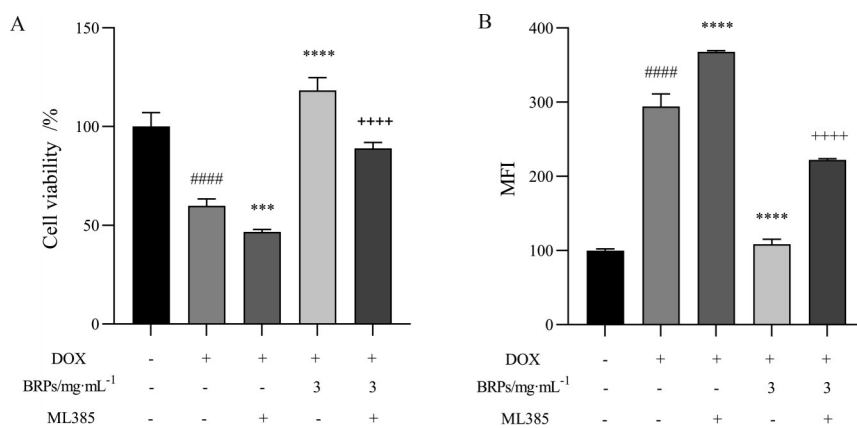
与模型组相比, DOX+ML385处理时引起凋亡率显著升高。而联合BRPs处理后, 与药物组相比, 也显著升高凋亡率, 提示BRPs可能通过抑制细胞凋亡治疗DOX诱导的心脏毒性(图9)。

### 讨论

恰玛古在新疆各地均有栽培, 以肉质根为食用和药用主要部位, 是新疆维吾尔族喜食的一种药食同源植物, 被视为饱口腹、解疾患的长寿圣果, 并有“沙漠小人参”之美誉<sup>[18]</sup>, BRPs是采用水提醇沉法从新疆柯坪县的恰玛古中提取获得的, 具有民族药特色。而且, BRPs制备工艺成熟, 可大量制备, 现已获得专利保护<sup>[16]</sup>。课



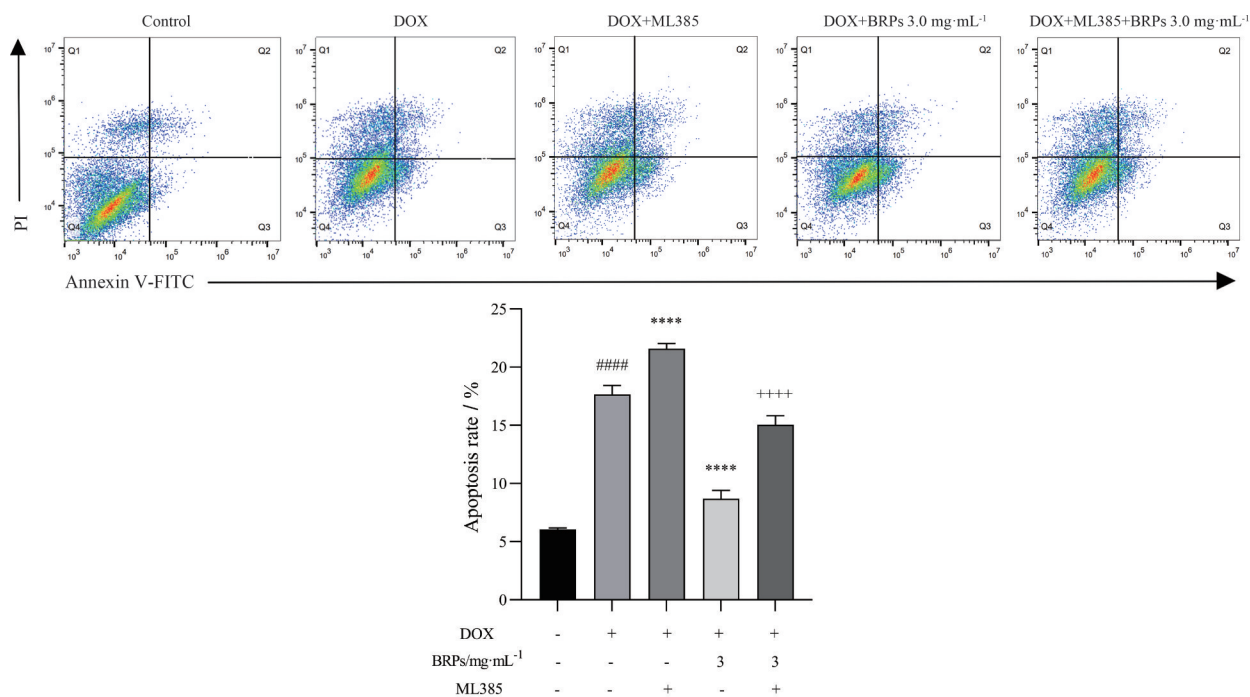
**Figure 7** Effect of BRPs on protein expression of the Nrf2/HO-1 pathway, in DOX-induced H9c2 cells. A: Western blot of Nrf2, Keap1, p-p38MAPK, p38MAPK, HO-1 and NQO1; B: Expression of Nrf2, Keap1 and other proteins.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group. Nrf2: Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1; HO-1: Heme oxygenase-1; NQO1: NADH quinone oxidoreductase 1



**Figure 8** A: Effect of Nrf2 inhibitor ML385 on the viability of H9c2 cells; B: Effect of Nrf2 inhibitor ML385 on ROS release in H9c2 cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs BRPs group

课题组前期证实, 恰玛古或BRPs具有润肺止咳<sup>[8]</sup>、抗肿瘤<sup>[19]</sup>、抗辐射<sup>[12]</sup>、免疫调节<sup>[20]</sup>、抗氧化活性, 可清除DPPH自由基<sup>[13]</sup>等作用。本研究通过DOX损伤的H9c2细胞模型模拟心脏毒性的病理变化, BRPs预给

药处理发现, BRPs在0.5~3 mg·mL<sup>-1</sup>质量浓度H9c2细胞免受DOX损伤, 因此后续研究选取0.5~3 mg·mL<sup>-1</sup>作为本实验的药物浓度组。以药食同源恰玛古治疗化疗药物引发的DOX心肌毒性将会给肿瘤患者带来很



**Figure 9** Effect of Nrf2 inhibitor ML385 on apoptosis in H9c2 cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ####  $P < 0.0001$  vs control group; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs model group; +++++  $P < 0.0001$  vs BRPs group

多利好因素,这亦是某些其他外源抗氧化剂无法比拟的一个重要方面。

目前,关于DOX的心脏毒性机制问题,国内外已开展大量研究并取得明显进展。DOX可诱导高水平ROS产生,促进心肌细胞氧化应激和线粒体介导的细胞凋亡,进而导致心力衰竭;抗氧化剂可防止DOX诱导的心肌细胞损伤<sup>[21]</sup>;DOX损伤H9c2细胞与其诱导ROS产生和破坏线粒体功能有关<sup>[22]</sup>。由于BRPs具有ROS清除能力<sup>[14]</sup>,而且对DOX心肌损伤具有一定保护作用,BRPs可通过减轻细胞毒性、清除氧自由基和降低机体过氧化化的程度来减少细胞损伤。根据实验结果作者推测,BRPs可通过减少DOX诱导的线粒体ROS生成、稳定细胞环境来改善线粒体功能障碍及抑制细胞凋亡,从而对心肌细胞产生保护作用。ML385作为Nrf2信号通路特异性抑制剂,通过影响Nrf2-maf蛋白复合物的DNA结合活性抑制Nrf2通路的激活。目前国内关于ML385的报道主要是将其作为Nrf2抑制剂应用,用于研究药物是否是通过调控Nrf2通路发挥作用<sup>[23-25]</sup>。结果表明,BRPs可以在DOX诱导的H9c2细胞中通过调控Nrf2/HO-1通路,降低了DOX诱导的心脏毒性,发挥其抗氧化的药理作用。Nrf2是氧化应激和内源性抗氧化酶激活的重要转录因子<sup>[26,27]</sup>。有研究表明,HO-1的高表达可减少DOX诱导的心肌损伤<sup>[28]</sup>。在应对氧化应激时,活化的Nrf2可导致HO-1的抗氧化酶的转录激活<sup>[29]</sup>。在氧化应激状态下,p38MAPK的

激活会促进心肌细胞凋亡,从而导致心力衰竭时心脏收缩功能恶化。有证据表明,抑制p38MAPK可减轻细胞炎症反应并保护细胞免于凋亡<sup>[30]</sup>。本研究证明了BRPs具有升调节Nrf2/HO-1信号通路的作用,而BRPs对DOX损伤心肌细胞的保护作用也与Nrf2/HO-1激活所诱导的抗氧化活性增强有关。

综上所述,BRPs发挥其有益作用的主要机制可能归因于它们的抗氧化特性,并通过调控Nrf2/HO-1氧化应激通路及其下游抗氧化蛋白的表达抑制细胞凋亡,拮抗DOX损伤心肌细胞内ROS的产生,改善DOX造成的心脏毒性的保护机制。为新疆食药同源BRPs用于防治DOX诱导的心脏/心肌毒性提供实验依据。

**作者贡献:** 郭君婷负责实验操作和文章撰写;赵婷婷和叶斯木·塔拉甫别克参与了部分实验操作与论文修改;刘桂花、高瑞娟负责实验总体设计及稿件修改。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52: 1213-1225.
- [2] Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: phenotype and molecular mechanisms [J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2016, 10: 17-24.
- [3] Xi L, Zhu SG, Das A, et al. Dietary inorganic nitrate alleviates

- doxorubicin cardiotoxicity: mechanisms and implications [J]. Nitric Oxide, 2012, 26: 274-284.
- [4] Shi Y, Fan DF, Hou BL, et al. Research progress on the mechanism of action of DOX cardiotoxicity and its prevention and treatment by traditional Chinese medicine [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med (新疆中医药), 2019, 37: 113-116.
- [5] Najafi M, Hooshangi Shayesteh MR, Mortezaee K, et al. The role of melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity: a systematic review [J]. Life Sci, 2020, 241: 117173.
- [6] Wang XY, Chen LL, Wang T, et al. Ginsenoside Rg3 antagonizes adriamycin-induced cardiotoxicity by improving endothelial dysfunction from oxidative stress via upregulating the Nrf2-ARE pathway through the activation of Akt [J]. Phytomedicine, 2015, 22: 875-884.
- [7] Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, et al. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders [J]. Mol Neurobiol, 2011, 44: 192-201.
- [8] Gu ZY. Modern Research and Application of Uyghur Medicine: Vol 1 (维吾尔药现代研究与应用: 第一卷) [M]. Urumqi: Xinjiang People's Publishing House, Xinjiang Science and Technology Press, 2015: 302-320.
- [9] Sun Y, An XQ, Ma Y, et al. Effects of chamagra honey ointment on immune function in mice [J]. China Med Herald (中国医药导报), 2010, 7: 20-22.
- [10] Xiao CX, Zhang HL. Clinical observation of chamagra cream affecting chemotherapy-related indexes in middle and advanced colorectal cancer [J]. Asia-pac Tradit Med (亚太传统医药), 2010, 6: 30-31.
- [11] Qian XW. Effects of turnip juice on normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines [J]. Acta Nutrimenta Sin (营养学报), 2003, 25: 222-224.
- [12] An XQ, Ma Y, Zhang T, et al. Comparison of vitamin chamagop powder and honey paste for radiation injury protection [J]. Sci Technol Rev (科技导报), 2010, 28: 28-31.
- [13] Zhang QX, An XQ, Bai LP, et al. Antioxidant function of chamagogues polysaccharides and their preparation process of tablets [J]. J Food Saf Qual (食品安全质量检测学报), 2017, 8: 2079-2085.
- [14] Zhang T, Shi L, Li Y, et al. Polysaccharides extracted from *Rheum tanguticum* ameliorate radiation-induced enteritis via activation of Nrf2/HO-1 [J]. J Radiat Res, 2021, 62: 46-57.
- [15] Chen W, Lu Y, Hu DW, et al. Black mulberry (*Morus nigra* L.) polysaccharide ameliorates palmitate-induced lipotoxicity in hepatocytes by activating Nrf2 signaling pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 172: 394-407.
- [16] An XQ, Zhang T, Zhao TT, et al. Chama ancient polysaccharide extract and its preparation method: CN, ZL 201410266707.7 [P]. 2014-10-26.
- [17] Sirangelo I, Sapio L, Ragone A, et al. Vanillin prevents doxorubicin-induced apoptosis and oxidative stress in rat H9c2 cardiomyocytes [J]. Nutrients, 2020, 12: 2317.
- [18] Liu Y. Uyghur Pharmacognosy: Vol 2 (维吾尔药志: 下) [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Health Press, 1999: 334-335.
- [19] Guo WW, Liu XJ, Guo JT, et al. Polysaccharides of *Brassica rapa* L. attenuate tumor growth via shifting macrophages to M1-like phenotype [J]. Phytother Res, 2022, 36: 3957-3968.
- [20] Guo WW, Zhang QX, Du Y, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* by activating Akt/NF- $\kappa$ B signaling [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 14: 90-96.
- [21] Chen RC, Xu XD, Liu XZ, et al. Total flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 472565.
- [22] Dou YW, Zheng RF, Ceng C, et al. Protective effect and mechanism of total flavonoids of *Dracocephalum moldevica* on doxorubicin myocardial toxicity [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 6045-6051.
- [23] Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism [J]. Trends Mol, 2004, 10: 549-557.
- [24] Gañán-Gómez I, Wei Y, Yang H, et al. Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2 [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65: 750-764.
- [25] Wang LF, Su SW, Wang L, et al. Tert-butylhydroquinone ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating Nrf2 and inducing the expression of its target genes [J]. Am J Transl Res, 2015, 7: 1724-1735.
- [26] Wang X, Mo JJ, Zhou P, et al. Progress of research on anti-cardiovascular disease effects of traditional Chinese medicine and its active ingredients based on Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med From (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 227-234.
- [27] Zhang B, Zhang XL, Zhang CY, et al. Study on the role of Guanxin Danshen formula in regulating Nrf2 signaling pathway for the treatment of diabetic nephropathy [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 2595-2600.
- [28] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47: 89-116.
- [29] Zhao N, Guo FF, Xie KQ, et al. Targeting Nrf-2 is a promising intervention approach for the prevention of ethanol-induced liver disease [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75: 3143-3157.
- [30] Cao Y, Ruan Y, Shen T, et al. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014: 674219.