

丹参酮I基于Akt-Nrf2抗氧化通路减轻多柔比星诱导的心脏毒性

姜茜茜^{1,2,3}, 张敬美^{1,2,3}, 薛思明^{1,2,3}, 田雪^{1,2,3}, 陈旭^{2,3,4}, 刘恬恬^{2,3,4},
江艳艳^{1,2,3}, 孙乾斌^{1,2,3}, 郭冬青^{1,2,3}, 李春^{2,3,5}, 王勇^{2,3,4*}, 王其艳^{1,2,3*}

(1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100029; 2. 证候与方剂基础研究教育部重点实验室(北京中医药大学), 北京 100029; 3. 证候与方剂基础研究北京市重点实验室, 北京 100029; 4. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029; 5. 北京中医药大学中药学院, 现代中药研究中心, 北京 100029)

摘要: 多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是一种蒽环类抗生素, 广泛用于治疗肿瘤, 但其长期使用会产生严重不良反应, 尤其是急性和慢性心脏毒性。本研究探索了丹参酮I (tanshinone I, Tan I) 对DOX诱导的急性心脏毒性的保护作用及其潜在的分子机制。动物福利和实验过程均遵循北京中医药大学实验动物伦理委员会的规定。采用小鼠尾静脉注射DOX (6 mg·kg⁻¹, 每周2次) 和DOX刺激H9C2心肌细胞方法制备在体和离体急性心脏毒性模型。在体实验于尾静脉注射前5天, 灌胃给药Tan I (10 mg·kg⁻¹), 直至实验结束, 检测Tan I对小鼠心功能、心肌组织形态学、血清学指标的影响。离体实验进一步研究Tan I抗氧化应激的具体机制。应用免疫荧光技术检测核因子E2相关因子2 (nuclear erythroid factor 2-related factor 2, Nrf2) 的表达量和入核情况, 并用Western blot方法检测氧化应激相关蛋白蛋白激酶B (protein kinase B, Akt)、Nrf2、血红素加氧酶1 (heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H脱氢酶醌1 [NAD(P)H uinone dehydrogenase 1, NQO1] 水平的变化, 最后进行分子对接验证。结果显示, Tan I能明显改善小鼠的心功能, 同时降低血清中心肌损伤指标肌酸激酶同工酶 (creatinine kinase-MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 的表达水平。免疫荧光结果提示Tan I能增加H9C2细胞中Nrf2的表达水平并促进Nrf2进入细胞核。Western blot结果也提示, 与DOX组相比, DOX+Tan I组氧化应激相关蛋白P-Akt、Nrf2、HO-1、NQO1的水平均显著升高。上述结果证明, Tan I能减轻DOX诱导的急性心脏毒性, 其机制是通过上调Akt-Nrf2通路, 抑制氧化应激, 从而减轻DOX诱导的急性心肌损伤。

关键词: 丹参酮I; 多柔比星; 急性心脏毒性; 氧化应激; 核因子E2相关因子2; 抗氧化剂
中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2022)10-3077-09

Tanshinone I attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity based on the Akt-Nrf2 antioxidant pathway

JIANG Qian-qian^{1,2,3}, ZHANG Jing-mei^{1,2,3}, XUE Si-ming^{1,2,3}, TIAN Xue^{1,2,3}, CHEN Xu^{2,3,4},
LIU Tian-tian^{2,3,4}, JIANG Yan-yan^{1,2,3}, SUN Qian-bin^{1,2,3}, GUO Dong-qing^{1,2,3}, LI Chun^{2,3,5},
WANG Yong^{2,3,4*}, WANG Qi-yan^{1,2,3*}

(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Key Laboratory of TCM Syndrome and Formula (Beijing University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Beijing 100029, China; 3. Beijing Key Laboratory of TCM Syndrome and Formula, Beijing 100029, China; 4. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 5. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Doxorubicin (DOX) is an anthracycline antibiotic widely used in the treatment of certain types of

收稿日期: 2021-12-31; 修回日期: 2022-03-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81822049, 81673712, 82174364, 82174215).

*通讯作者 E-mail: wangqiyanyan2003@126.com; doctor_wangyong@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1866

tumors. However, DOX have some serious side effects in the body after long-term use, especially acute and chronic cardiotoxicity. This study explored the protective effect of tanshinone I (Tan I) on acute cardiotoxicity induced by DOX and its underlying molecular mechanisms. *In vivo* and *in vitro* acute cardiotoxicity models were established by injecting DOX (6 mg·kg⁻¹, twice per week) into the tail vein of C57 mice and stimulating H9C2 cardiomyocytes with DOX. In *in vivo* experiments, Tan I (10 mg·kg⁻¹) was administered daily by oral 5 days before the tail vein injection, till the end of the experiment. The effects of Tan I on mice heart function, myocardial tissue morphology and serological indicators were detected. Animal welfare and experimental procedures followed the regulations of the Animal Ethics Committee of Beijing University of Traditional Chinese Medicine. In *in vitro* experiments, the specific mechanism of Tan I against oxidative stress was further studied. Immunofluorescence was used to detect the expression of Nrf2 and its transcription into the nucleus. In addition, the levels of oxidative stress related proteins, protein kinase B (Akt), nuclear erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), were detected by Western blot. Finally, AutoDock software was used for molecular docking verification. The results showed that Tan I significantly improved cardiac function in mice. Meanwhile, the expression levels of creatine kinase-MB (CK-MB) and lactic dehydrogenase (LDH) in serum were decreased. Immunofluorescence results indicated that Tan I could increase Nrf2 expression level in H9C2 cells and promote Nrf2 entry into the nucleus. Western blot results also indicated that the levels of oxidative stress related proteins, P-Akt, Nrf2, HO-1 and NQO1 in DOX plus Tan I group were significantly increased compared with DOX group. These results suggest that Tan I can alleviate DOX-induced acute cardiotoxicity by inhibiting oxidative stress through up-regulating the Akt-Nrf2 pathway, thereby alleviating DOX-induced acute myocardial injury.

Key words: tanshinone I; doxorubicin; acute cardiotoxicity; oxidative stress; nuclear erythroid factor 2-related factor 2; antioxidant

多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是目前临床最常用的广谱抗肿瘤药物之一,但其心脏毒性不良反应限制了临床应用^[1]。DOX 心脏毒性还可发展至不可逆的心肌病及心力衰竭^[2]。右雷佐生是目前唯一被批准用于预防蒽环类药物引起的心脏毒性的治疗方法,但由于继发性恶性肿瘤和骨髓增生异常综合征等不良反应的出现,其临床使用受到限制。DOX 心脏毒性的具体机制尚未阐明,但现有研究证明氧化应激是其重要致病因素^[3]。丹参是临床上广泛用于治疗心血管疾病的中草药^[4],其主要药理活性成分是丹参酮。丹参酮在心血管方面的保护作用一直是研究重点,研究表明其具有保护心血管、抗炎、抗纤维化和抗肿瘤等多种药理活性^[5]。丹参酮由4种主要成分组成:丹参酮I (tanshinone I, Tan I)、丹参酮IIA、隐丹参酮和二氢丹参酮I。最新研究证实丹参酮主要成分对人类癌细胞有一定的抑制活性。隐丹参酮通过影响细胞周期显著抑制体外肝癌和乳腺癌细胞的生长^[6,7]。丹参酮IIA通过诱导细胞凋亡抑制体外乳腺癌、胶质瘤、白血病和肝癌细胞的生长^[8]。Tan I是中药丹参根的乙醚提取物中的成分,具有高效抗氧化作用,对心血管疾病有很好的保护作用^[9]且具有较好的抗肿瘤活性^[10],但其在DOX诱导的急性心脏毒性中的作用尚不明确,有关Tan I在DOX心脏毒性模型中的保护作用还未见报道。核因子E2

相关因子2 (nuclear erythroid factor 2-related factor 2, Nrf2) 是细胞氧化还原稳态的主要调节器,在心脏组织中发挥关键的抗氧化作用。本研究建立了小鼠DOX心脏毒性模型,探讨Tan I对DOX诱导的心脏毒性的保护效果,并探究Tan I是否能通过激活Nrf2通路发挥抗氧化作用,以期为DOX诱导心脏毒性的防治研究提供一定的实验依据,为临床DOX心脏毒性的治疗提供潜在的靶点。

材料与方法

实验动物 C57BL/6小鼠购自北京斯贝福实验动物技术有限公司,雄性,体重18±2g,许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物福利和实验过程均遵循北京中医药大学实验动物伦理委员会的规定,动物研究方案获得北京中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号:BUCEM-4-2018001201-1014。

试剂 DOX (25316-40-9-1.0g, 华奉联博公司); Tan I (T101150-20mg, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 右丙亚胺 (dexrazoxane, S26619-100mg, 上海源叶生物科技有限公司); 肌酸激酶同工酶 (creatin kinase-MB, CK-MB) 测定试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司); 蛋白激酶B (protein kinase B, Akt) 抗体、P-Akt抗

体、Nrf2抗体、血红素加氧酶1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体、 β -actin 抗体、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗 (Abways 公司); NAD(P)H 脱氢酶醌1 [NAD(P)H uinone dehydrogenase 1, NQO1] 抗体 (博士德生物公司); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (南京建成公司); RIPA 裂解液、封闭专用脱脂奶粉、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); DMEM 高糖培养基 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (Thermo Fisher 公司); 活性氧检测试剂盒 (DCFH-DA 荧光探针)、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、普通山羊血清 (上海碧云天生物技术有限公司)。

仪器 小动物超声影像系统 (Vevo2100, Visual-Sonics 公司); 组织超声破碎仪 (HildenTissueLyser II, Qiagen 公司); 电泳及电转系统 (041BR182017)、凝胶成像仪及图像分析系统 (Molecular Imagery Chemi-DocTM XRST) (Bio-Rad 公司); Multiskan 全自动酶标仪 (MK3, Thermo 公司); 倒置光学显微镜 (卡尔蔡司公司); 倒置荧光显微镜 (Leica 公司); 激光共聚焦显微镜 (奥林巴斯公司)。

DOX 诱导的小鼠急性心脏毒性模型制备及给药 C57BL/6 小鼠采用计算机生成随机数字法随机分为对照组、模型组、Tan I 组, 每组 6 只。模型组和 Tan I 组小鼠尾静脉注射 DOX ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 生理盐水溶解), 于第 1、4 天分别注射 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共累计 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 第 7 天进行超声取材, 对照组同时腹腔注射等容积生理盐水。根据前期实验研究^[11-14], 从注射 DOX 前 5 天进行 Tan I ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 0.5% CMC 钠溶解; 储液浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组灌胃给药, 每天 1 次, 共计 12 天; 对照组和模型组给予等量 0.5% CMC 钠溶液灌胃。模型建立过程中无动物死亡现象。

超声心动图测定 在实验末次给药后, 对各组小鼠进行经胸心脏彩色超声多普勒检查。超声经胸骨左心长轴切面测量左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短分数 (left ventricular fractional shortening, LVFS)、左室舒张末期内径 (left ventricular internal dimension-diastole, LVIDd)、左室收缩末期内径 (left ventricular internal dimension-systole, LVIDs)。

病理学检测 在冰上分离小鼠左心, 用 4% 多聚甲醛固定。经乙醇脱水、组织透明、石蜡包埋、连续切片和苏木素-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色等操作, 制作病理切片, 于光镜下观察心肌组织形态学改变并拍摄图片。

血清学检测 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 腹

主动脉取血, 常温静置 2 h, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后分离血清, 按照试剂盒说明书检测血清中心肌损伤指标 (LDH、CK-MB) 和氧化应激指标 (GSH-Px、SOD、MDA)。

DCFH-DA 染色 通过体外 DCFH-DA 染色方法评估细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生。将 H9C2 细胞接种于 24 孔板中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行培养。用无血清培养液以 1:1 000 稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入细胞孔, 在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下避光染色 30 min, 用倒置荧光显微镜进行拍摄并用 Image J 软件分析。

免疫荧光 H9C2 细胞以 8×10^3 个接种于 14 mm 的激光共聚焦培养皿 (Cellvis 公司) 中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行培养。4% 多聚甲醛固定 15 min, 透化 20 min, 普通山羊血清封闭 1 h。随后, 将细胞与 Nrf2 抗体在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后与二抗孵育 1 h。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次后, 用 DAPI ($5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 复染细胞 20 min。用激光共聚焦显微镜拍摄图像, Image J 软件进行分析。

蛋白印迹 (Western blot) 测定 使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液对来自细胞和心脏组织的总蛋白样品进行匀浆, 用 BCA 蛋白测定试剂盒测定样品的蛋白浓度。含量测定后, 用 SDS-PAGE (8%~12%) 分离蛋白质, 转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 与一抗在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 然后将膜用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。接着室温下加入抗兔或抗小鼠二抗 1 h 后, 用电化学发光 (ECL) 试剂在黑暗中反应 1 min。用 Image-Lab 软件进行分析, 对 P-Akt 与 Akt 的灰度值进行标准化, Nrf2、HO-1、NQO1 的灰度值分别与内参 β -actin 的灰度值进行标准化。

分子对接 分子对接以受体理论为基础, 通过计算机虚拟模拟, 评价药物活性成分与关键靶点的结合能力。本研究采用 AutoDock 软件进行分子对接验证, 并采用 PyMOL 软件去除氢原子及配体, 并将对接结果可视化, 以此评价 Tan I 与靶蛋白 Nrf2 之间的结合活性。

统计学分析 数据均表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行统计分析。进行单向方差分析 (ANOVA), 然后进行 Tukey 事后检验, 以比较多组的平均值。通过 Student's *t* 检验分析两组之间差异。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。实验重复 3 次。

结果

1 Tan I 明显改善 DOX 损伤的小鼠心脏功能

超声心动图检测是评价心脏功能的常用方法。本

研究中, DOX 于第 6 天和第 9 天尾静脉注射后未出现小鼠死亡的情况。超声心动图结果显示 (图 1), 与对照组比较, DOX 组小鼠 LVEF、LVFS 显著降低, LVIDs 显著升高。与 DOX 组比较, DOX+Tan I 组 LVEF、LVFS 显著升高, LVIDs 显著降低, 差异具有统计学意义。上述结果提示 Tan I 能改善 DOX 诱导的心脏毒性小鼠的心功能。

2 Tan I 对心肌损伤小鼠血清生化指标的影响

在 DOX 诱导的心脏毒性模型中, CK-MB、LDH 可作为评估心肌损伤的关键指标。结果显示 (图 2), 与对照组比较, 模型组小鼠血清 CK-MB、LDH 显著升高。与模型组比较, Tan I 组小鼠 CK-MB、LDH 显著降低。上述结果说明 Tan I 能降低 DOX 诱导的心肌损伤。

3 Tan I 对 DOX 诱导的心肌损伤小鼠心肌组织形态的影响

如图 3 所示, 对照组心肌细胞排列均匀, 形态正常, 未见异常形态细胞。模型组出现心肌细胞水肿, 空泡变性, 排列紊乱, 细胞增生, 甚至出现间质纤维化。Tan I 组与模型组比较, 心肌细胞排列较均匀, 水肿减

轻, 空泡变性减少, 细胞增生不明显。结果说明 Tan I 改善了小鼠因 DOX 导致的心肌形态变化, 减轻了心肌细胞的纤维化程度。

4 Tan I 对 DOX 心脏毒性小鼠模型氧化应激指标的影响

氧化损伤被认为是 DOX 引起心脏毒性的关键原因^[15]。因此, 检测了血清中 SOD、GSH-Px 和 MDA 的水平。如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 SOD 活性和 GSH-Px 水平均显著降低, MDA 水平显著升高; 与模型组比较, Tan I 组 SOD 活性和 GSH-Px 水平均显著升高, MDA 水平显著降低, 提示 Tan I 能提高小鼠的抗氧化水平, 并减轻氧化损伤。

5 Tan I 通过 Akt-Nrf2 通路减轻小鼠氧化应激损伤

Nrf2 在心脏组织中起关键抗氧化作用, Akt 是 Nrf2 的上游调控因子, HO-1 和 NQO1 是 Nrf2 的下游靶标, 是具有抗氧化功能的酶。本研究通过 Western blot 技术检测这些蛋白的表达水平。如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 P-Akt、Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达水平均降低。与模型组比较, Tan I 组 P-Akt、Nrf2、HO-1、

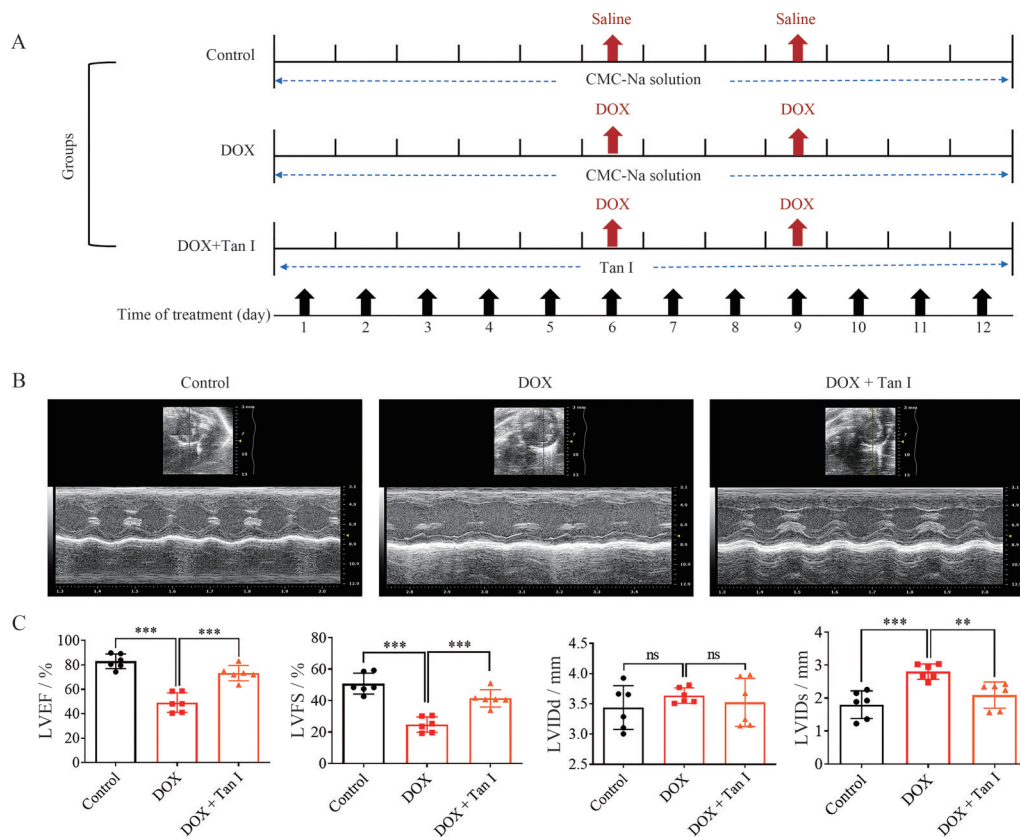


Figure 1 Tanshinone I (Tan I) improved cardiac function in mice with acute myocardial injury induced by doxorubicin (DOX). A: Schematic diagram of animal experiment process (DOX: 5 mg·kg⁻¹; Tan I: 10 mg·kg⁻¹); B: Representative M-mode echocardiography was used to evaluate the cardiac function of each group; C: Echocardiography data showed that Tan I increased left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS) and decreased left ventricular internal dimension-systole (LVIDs). *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. ns: Not significant

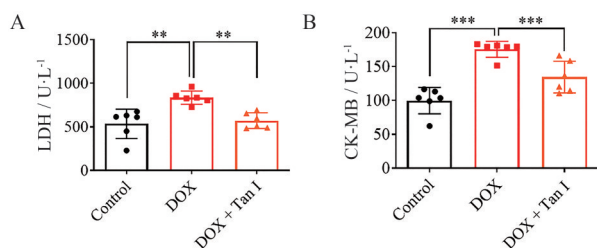


Figure 2 Tan I reduced myocardial damage markers in mice suffering from DOX cardiotoxicity. A: The expression level of lactic dehydrogenase (LDH) in serum; B: The level of serum creatine kinase-MB (CK-MB). DOX: 5 mg·kg⁻¹; Tan I: 10 mg·kg⁻¹. *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

NQO1 蛋白表达水平显著升高。结果说明 Tan I 可能通过激活 Akt-Nrf2 通路, 提高下游抗氧化酶 HO-1、NQO1 的表达, 从而对 DOX 诱导的心脏毒性起保护作用。

6 Tan I 对 DOX 诱导的 H9C2 心肌损伤模型中 ROS 水平的影响

为了进一步证明 Tan I 的抗氧化作用, 在离体实验中采用 DCFH-DA 试剂盒评估 DOX 诱导的 H9C2 心肌细胞中 ROS 的产生。如图 6 所示, DCFH-DA 探针装载后, 与对照组相比, 模型组绿色荧光明显增强, 表明 H9C2 细胞中的 ROS 水平显著升高, 不同浓度的 Tan I 处理以剂量依赖的方式降低了 DOX 刺激的 H9C2 细

胞中的 ROS 水平。

7 Tan I 对 Akt-Nrf2 通路的影响及对 Nrf2 核转运的影响

为了探讨 Akt-Nrf2 通路是否介导 Tan I 对 DOX 诱导的心脏毒性的保护作用, 采用 Western blot 检测 H9C2 细胞中 Nrf2 及其上下游指标的总蛋白水平, 证明了 Tan I 对 Nrf2 激活的影响, 并采用细胞免疫荧光技术分析了 Nrf2 的核定位 (图 7)。结果表明, 与正常组相比, DOX 组细胞中 Nrf2、P-Akt、HO-1、NQO1 的水平显著降低, 1、5 和 10 μmol·L⁻¹ 的 Tan I 干预使 Nrf2、P-Akt、HO-1、NQO1 水平呈剂量依赖性升高 (图 7A)。此外, 1、5 和 10 μmol·L⁻¹ 的 Tan I 处理增加了 Nrf2 的总量并促进 Nrf2 进入细胞核 (图 7B)。这些数据表明 Tan I 促进了 DOX 诱导的 H9C2 心肌损伤细胞中 Nrf2 的激活和核转运。

8 分子对接验证 Tan I 与靶蛋白 Nrf2 之间的结合活性

为进一步确定 Tan I 与核心靶蛋白 Nrf2 之间的相互作用, 采用 AutoDock 软件进行分子对接验证。评价分子对接结果的一般标准是亲和力和配体与受体结合的稳定性^[16]。结合力越低表明亲和力越强, 氢键数目越多表明结合越稳定。分子对接结合能 < -5.0 被认为具有结合意义^[17]。本研究分子对接结果如图 8 所示,

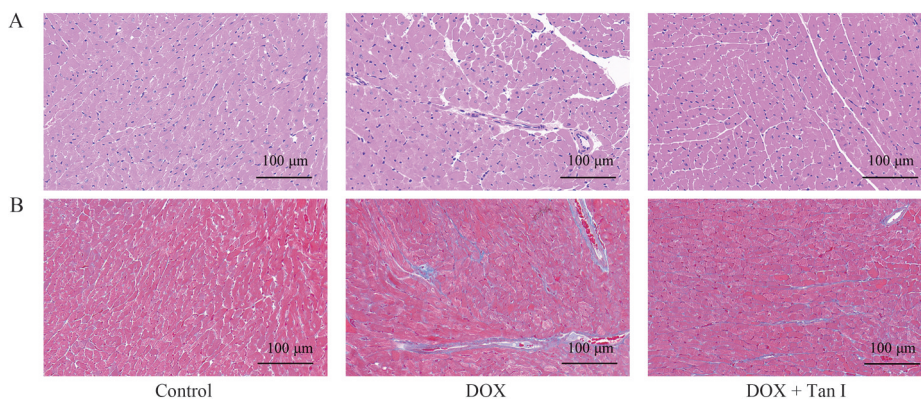


Figure 3 Effects of Tan I on myocardial morphology in mice with DOX-induced myocardial injury. A: Hematoxylin and eosin staining for paraffin section showed that Tan I (10 mg·kg⁻¹) protected against the structural damage caused by DOX (5 mg·kg⁻¹); B: Masson's trichrome staining for fibrosis. Scale bar: 100 μm

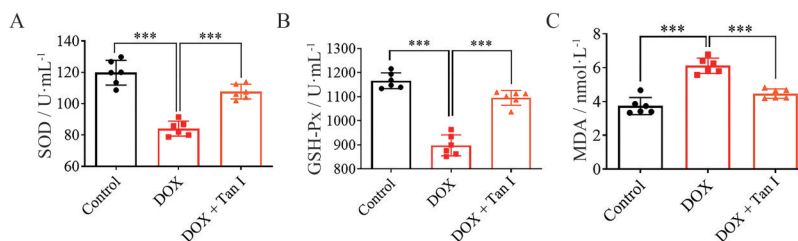


Figure 4 Tan I attenuated DOX-induced oxidative stress. A-C: The levels of superoxide dismutase (SOD, A), glutathione peroxidase (GSH-Px, B) and malondialdehyde (MDA, C) in mice sera. DOX: 5 mg·kg⁻¹; Tan I: 10 mg·kg⁻¹. *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. ****P* < 0.001

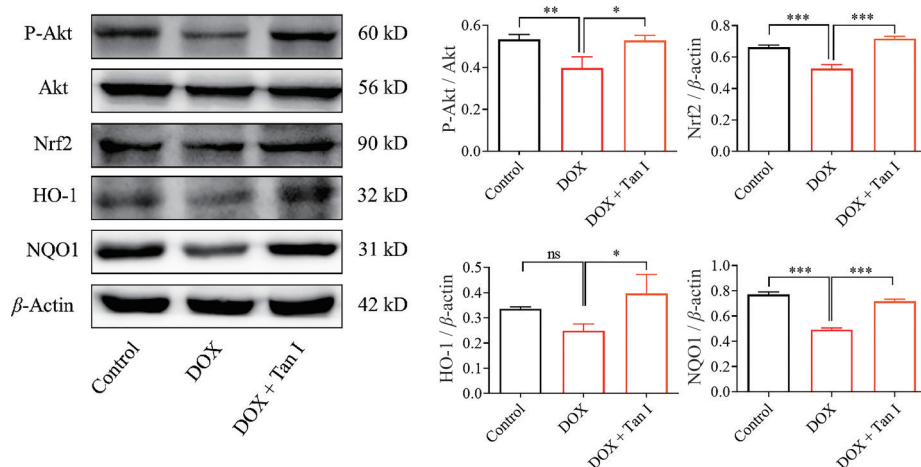


Figure 5 Tan I activated protein kinase B (Akt)-nuclear erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2) signaling in DOX-induced mice. The expression levels of P-Akt, Akt, Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H uinone dehydrogenase 1 (NQO1) were analyzed by Western blot. DOX: 5 mg·kg⁻¹; Tan I: 10 mg·kg⁻¹. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

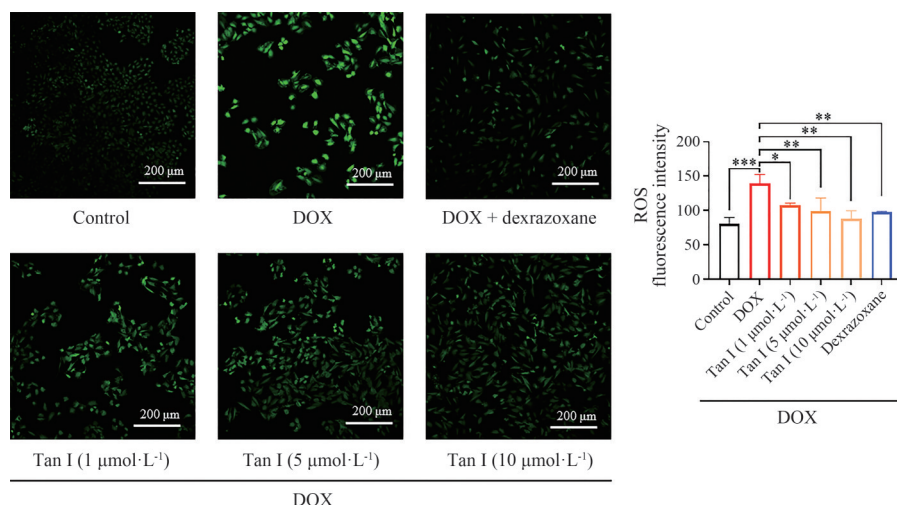


Figure 6 Reactive oxygen species (ROS) levels in DOX-induced H9C2 myocardial injury model. DOX: 1 μmol·L⁻¹; Dexrazoxane: 20 μmol·L⁻¹; Tan I: 1, 5, 10 μmol·L⁻¹. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Scale bar: 200 μm

Tan I 与 Nrf2 的分子对接结合能为 -6.29 kcal·mol⁻¹, 即 < -5.0, 且在此结合能下, 二者之间形成氢键, 表明 Tan I 与 Nrf2 有良好的亲和力和稳定性。

讨论

DOX 诱导心脏毒性的机制非常复杂, 包括氧化应激、细胞凋亡、线粒体功能障碍、铁死亡、炎症、自噬等, 这些机制往往相互重叠^[18-20]。在现有的机制研究中, 氧化应激占主导地位。ROS 的产生与抗氧化防御系统之间的不平衡是 DOX 诱导心脏毒性的主要机制之一^[21]。在本研究中, 根据心功能、形态学、血清生化指标、免疫荧光、Western blot 等结果, 证实 Tan I 可通过 Nrf2 信号通路减轻氧化应激, 对 DOX 诱导的急性心脏毒性起保护作用。

Tan I 是一种具有心血管保护作用的天然化合物^[22], 可直接靶向 Nrf2 并作为潜在的 Nrf2 激动剂, 在体内过氧化氢模型和体外 ISO 诱导的心脏肥大模型中调节 Nrf2/MAPK 信号来抑制氧化应激, 从而减轻心脏损伤^[23]。在心肌缺血再灌注模型中通过 Akt-Nrf2 信号通路抑制坏死性凋亡从而发挥心血管保护作用^[9]。此外, Tan I 显示出针对不同类型癌症的抗肿瘤活性, 如在体外抑制卵巢癌细胞的增殖^[10], 抑制斑马鱼白血病模型中恶性造血和白血病细胞的生长等^[24]。Tan I 能否通过调控 Nrf2 通路对 DOX 诱导的急性心脏毒性起保护作用尚不清楚。

DOX 诱导的自由基和随之而来的脂质过氧化是心肌细胞损伤的重要原因。当心肌组织的 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶的活性降低时, ROS 的产生超过清除能力,

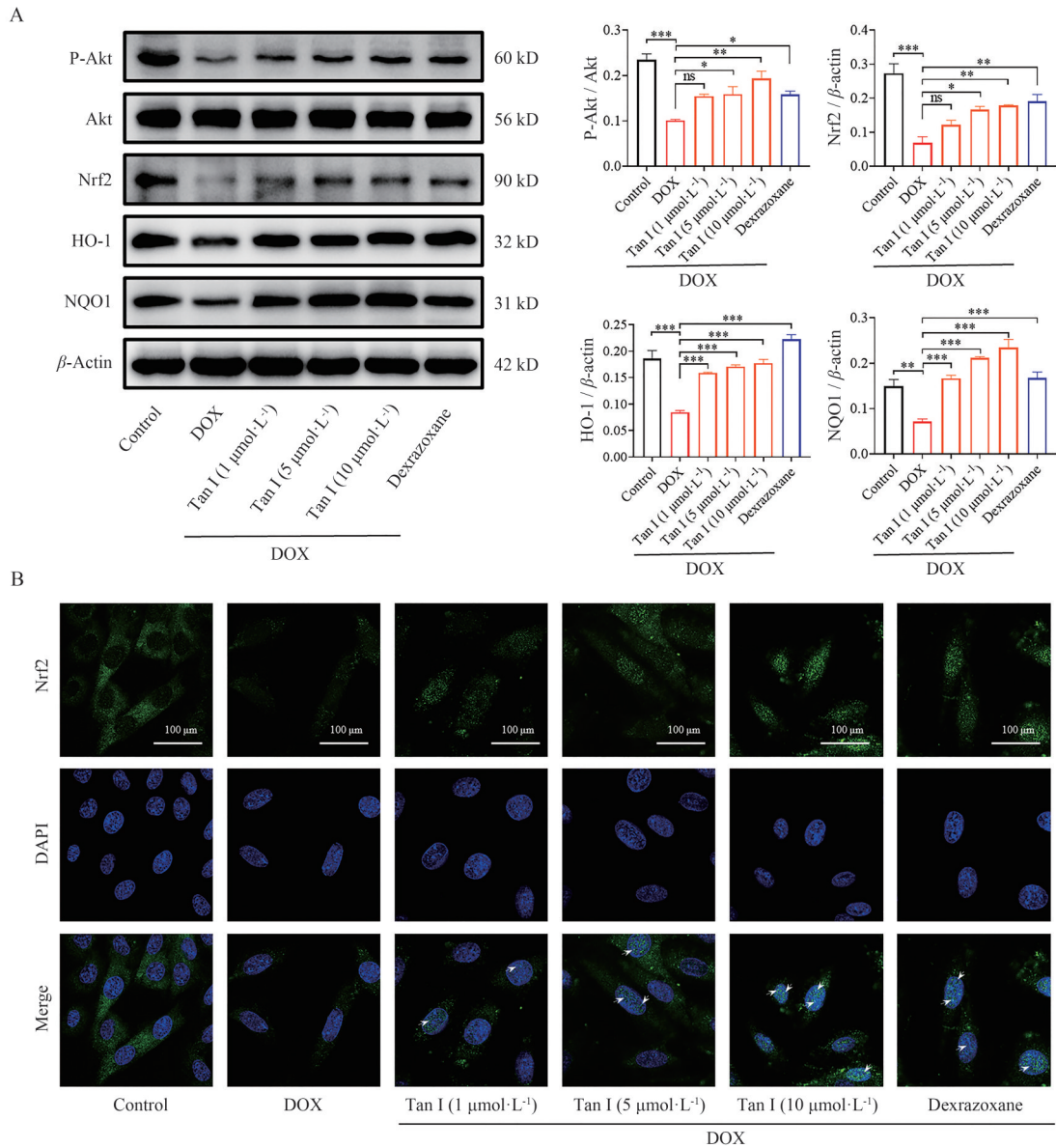


Figure 7 Tan I activated Akt-Nrf2 signaling in DOX-induced H9C2 cells. A: Western blot analysis showed P-Akt, Nrf2, HO-1 and NQO1 levels, as shown in histograms. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; B: Immunofluorescence representative image of nuclear colocalization of Nrf2. DOX: $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Dextrazoxane: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Tan I: 1, 5, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Scale bar: $100 \mu\text{m}$

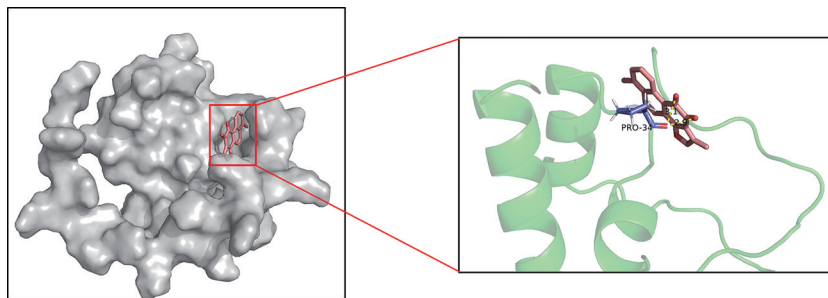


Figure 8 Molecular docking results of Tan I with core target protein Nrf2 (PDB: 2LZ1). Left: The structures of Nrf2 protein surface and small molecule Tan I are shown in gray and red, respectively; Right: Partial magnification of the fine structure of Nrf2 protein and structural portion of the small molecule Tan I are shown in green and red, respectively. The small molecule Tan I forms 2 hydrogen bonding (yellow) interactions with amino acid residue PRO-34 (blue) at distances of 3.1 \AA and 2.9 \AA , respectively

就会引发氧化应激,使心肌更易受到DOX的损伤^[25]。Nrf2是碱性亮氨酸拉链转录因子CNC (cap'n'collar)家族的重要成员,在机体的多种组织(如心、肝、肾、脾等)的细胞内均有表达。Nrf2是细胞氧化还原稳态的主要调节器,是防御ROS的基础^[15]。Nrf2被激活后从细胞质易位到细胞核,启动抗氧化酶的表达,其中包括HO-1和NQO1等,使其含量升高,以对抗DOX诱导的氧化应激进而发挥细胞保护作用^[26]。Akt是Nrf2的上游调控因子。本研究数据表明,经Tan I处理后,Akt发生活化(磷酸化),从而激活Nrf2并使其向细胞核内转移,核中Nrf2蛋白水平增加后提高了HO-1、NQO1等抗氧化酶的活性从而发挥抗氧化作用。这在一定程度上说明了Tan I减轻DOX诱导的心脏毒性与氧化应激有关。最后本研究采用AutoDock软件进行分子对接验证,其结果也很好证明了Tan I与Nrf2有良好的亲和力和稳定性。

综上所述,Tan I对DOX诱导的急性心脏毒性有保护作用,主要表现在减轻心肌细胞氧化损伤、保护心功能等方面,其作用机制可能与激活Akt-Nrf2信号通路、减轻氧化应激损伤有关。

作者贡献:姜茜茜负责研究设计、结果分析及文章撰写;张敬美、薛思明和田雪参与实验操作与数据采集;陈旭和刘恬恬参与实验设计和实验技术的提供;江艳艳和孙乾斌负责文献检索和数据分析;郭冬青和李春参与实验设计、结果分析、论文修改;王勇和王其艳负责实验监督及论文审阅。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lin H, Zhang J, Ni T, et al. Yellow wine polyphenolic compounds prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through activation of the Nrf2 signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 6034-6047.
- [2] Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2020, 126: 926-941.
- [3] Zhao L, Qi Y, Xu L, et al. MicroRNA-140-5p aggravates doxorubicin-induced cardiotoxicity by promoting myocardial oxidative stress via targeting Nrf2 and Sirt2 [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 284-296.
- [4] Wang L, Ma R, Liu C, et al. *Salvia miltiorrhiza*: a potential red light to the development of cardiovascular diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23: 1077-1097.
- [5] Li Z, Zou J, Cao D, et al. Pharmacological basis of tanshinone and new insights into tanshinone as a multitarget natural product for multifaceted diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110599.
- [6] Ni W, Fan H, Zheng X, et al. Cryptotanshinone inhibits ER α -dependent and -independent BCRP oligomer formation to reverse multidrug resistance in breast cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 624811.
- [7] Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Orouei S, et al. Recent advances and future directions in anti-tumor activity of cryptotanshinone: a mechanistic review [J]. *Phytother Res*, 2021, 35: 155-179.
- [8] Fang ZY, Zhang M, Liu JN, et al. Tanshinone IIA: a review of its anticancer effects [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 611087.
- [9] Zhuo Y, Yuan R, Chen X, et al. Tanshinone I exerts cardiovascular protective effects *in vivo* and *in vitro* through inhibiting necroptosis via Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. *Chin Med*, 2021, 16: 48.
- [10] Zhou J, Jiang YY, Chen H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12739.
- [11] Bin Jordan YA, Ansari MA, Raish M, et al. Sinapic acid ameliorates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity via the NF- κ B-mediated pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 3921796.
- [12] Ahmed AZ, Satyam SM, Shetty P, et al. Methyl gallate attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by suppressing oxidative stress [J]. *Scientifica (Cairo)*, 2021, 2021: 6694340.
- [13] Zhang WB, Zheng YF, Wu YG. Protective effects of oroxylin A against doxorubicin-induced cardiotoxicity via the activation of Sirt1 in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6610543.
- [14] Ahmed AZ, Mumbrekar KD, Satyam SM, et al. Chia seed oil ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in female Wistar rats: an electrocardiographic, biochemical and histopathological approach [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2021, 21: 533-542.
- [15] Mirzaei S, Zarrabi A, Hashemi F, et al. Nrf2 signaling pathway in chemoprotection and doxorubicin resistance: potential application in drug discovery [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10: 349.
- [16] Wu H, Wang JQ, Yang YW, et al. Preliminary exploration of the mechanism of Qingfei Paidu decoction against novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 374-383.
- [17] Mu YF, Chen WL, Zhou B, et al. Investigating the mechanism of Chuanzhitongluo capsule for interfering with microcirculatory disorders based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2021, 52: 11.
- [18] He H, Wang L, Qiao Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate pretreatment alleviates doxorubicin-induced ferroptosis and cardiotoxicity by upregulating AMPK α 2 and activating adaptive autophagy [J]. *Redox Biol*, 2021, 48: 102185.
- [19] Ye J, Wang Y, Xu Y, et al. Interleukin-22 deficiency alleviates doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac injury via the p38 MAPK/macrophage/Fizz3 axis in mice [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101636.

- [20] Zhang X, Hu C, Kong CY, et al. FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity *via* activating AKT [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 540-555.
- [21] Arunachalam S, Nagoor Meeran MF, Azimullah S, et al. Nerolidol attenuates oxidative stress, inflammation, and apoptosis by modulating Nrf2/MAPK signaling pathways in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10: 984.
- [22] Li GH, Li YR, Jiao P, et al. Therapeutic potential of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* against human diseases based on activation of Nrf2-mediated antioxidant defense system: bioactive constituents and mechanism of action [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7309073.
- [23] Wu YT, Xie LP, Hua Y, et al. Tanshinone I inhibits oxidative stress-induced cardiomyocyte injury by modulating Nrf2 signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 644116.
- [24] Huang Y, Yu SH, Zhen WX, et al. Tanshinone I, a new EZH2 inhibitor restricts normal and malignant hematopoiesis through upregulation of MMP9 and ABCG2 [J]. *Theranostics*, 2021, 11: 6891-6904.
- [25] Hu C, Zhang X, Song P, et al. Meteorin-like protein attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity *via* activating cAMP/PKA/SIRT1 pathway [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101747.
- [26] Alzahrani AM, Rajendran P, Veeraraghavan VP, et al. Cardiac protective effect of kireinol against doxorubicin-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cells through Nrf2 signaling *via* PI3K/AKT pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 3269.