

# 秦皮乙素抑制多柔比星毒性的分子机制研究

李潇 徐繁 房亮 张圣林 姜海军 赵博

**【摘要】 目的** 探讨秦皮乙素(Esc)对多柔比星(DOX)诱导的 H9C2 细胞损伤的保护作用及机制。**方法** 培养 H9C2 心肌细胞并分为空白组、DOX 组、Esc + DOX 组,透射电镜观察各组细胞超微结构,蛋白免疫印迹法检测各组 Bmi-1 的表达情况。将细胞重新分为 3 组:DOX 组,空白 siRNA 转染组(Esc + DOX + NC siRNA)和 Bmi-1 siRNA 转染组(Esc + DOX + Bmi-1 siRNA),蛋白免疫印迹法检测各组 Bmi-1 的表达情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况和细胞内活性氧(ROS)的含量。**结果** DOX 组细胞肿胀、线粒体嵴断裂,Bmi-1 表达低于 Esc + DOX 组( $P < 0.01$ );Bmi-1 siRNA 转染组 H9C2 细胞凋亡数量、ROS 含量高于空白 siRNA 组( $P$  均  $< 0.01$ ),Bmi-1 表达低于空白 siRNA 转染组( $P < 0.01$ )。**结论** 秦皮乙素可减轻多柔比星诱导 H9C2 细胞的凋亡,其作用机制可能与抑制 Bmi-1 表达,从而调节线粒体功能及减少 ROS 的产生有关。

**【关键词】** 多柔比星;秦皮乙素;线粒体;Bmi-1

**Molecular mechanism of the effect of esculetin on relieving doxorubicin toxicity** Li Xiao, Xu Fan, Fang Liang, Zhang Shenglin, Jiang Haijun, Zhao Bo. Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Corresponding author, Xu Fan, E-mail: 28574060@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effect and mechanism of esculetin (Esc) on doxorubicin (DOX) -induced injury in H9C2 cells. **Methods** H9C2 myocardial cells were cultured and divided into the control, DOX and Esc + DOX groups. The ultrastructure of the cells in each group was observed by transmission electron microscope. The expression of Bmi-1 in each group was detected by western blot. The cells were then divided into three groups: DOX, Esc + DOX + NC siRNA and Esc + DOX + Bmi-1 siRNA groups. Western blot was used to detect the expression of Bmi-1 in each group. The cellular apoptosis and the content of intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. **Results** In the DOX group, cell swelling and mitochondrial cristae breakage were observed and the expression of Bmi-1 was significantly lower than that in the Esc + DOX group ( $P < 0.01$ ). In the Esc + DOX + Bmi-1 siRNA group, the quantity of apoptotic cells and the content of ROS were significantly higher than that in the Esc + DOX + NC siRNA group (both  $P < 0.01$ ), and the expression of Bmi-1 was significantly lower than that in the Esc + DOX + NC siRNA group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Esc can mitigate the DOX-induced injury in the H9C2 cells. The underlying mechanism is probably correlated with the down-regulated expression level of Bmi-1, thereby modulating the mitochondrial function and reducing the production of ROS.

**【Key words】** Doxorubicin; Esculetin; Mitochondria; Bmi-1

多柔比星为蒽环类抗生素,具有广谱抗肿瘤作用,但其对正常细胞(心脏、肝脏、肾脏等细胞)具有毒性作用,严重制约多柔比星的临床应用<sup>[1]</sup>。有研究表明,当多柔比星的累积总量大于 600 mg/m<sup>2</sup>时,心力衰竭的发生率达 36%<sup>[2]</sup>。多柔比星诱导心脏毒性的机制比较复杂,包括刺激自由基形成增

加、线粒体损伤、细胞凋亡等,其对正常细胞的毒性主要为线粒体功能破坏、线粒体损伤<sup>[3]</sup>。秦皮乙素是中药秦皮的主要活性成分,可清除氧自由基、保护细胞免受过氧化物造成的损伤,之前已有研究证实 Bmi-1 基因在 DNA 损伤应答、维持线粒体功能和活性氧(ROS)平衡过程中发挥重要的作

用<sup>[4]</sup>。在本研究中我们首次探究了秦皮乙素对 H9C2 细胞内 Bmi-1 表达的调节作用,以探讨秦皮乙素保护多柔比星致心肌细胞损伤的可能机制。

## 材料与方法

### 一、材 料

大鼠胚胎心肌细胞 H9C2,来源于中国科学院细胞库。RPMI-1640 培养基(货号:SH30809.01B)和胎牛血清(FBS 货号:SV30087.03),购于 HyClone Laboratories 公司(美国);GAPDH 的一抗(兔多抗,货号:10494-1-AP)、二抗(羊抗兔 IgG HRP 抗体,货号:10494-1-AP)购于 Proteintech 公司(中国武汉);Bmi-1 siRNA(货号:6442S)和 NC siRNA(货号:abx918119)均来自生兴生物公司(中国南京);DCFH-DA(货号:D6470)购于 Invitrogen 公司(美国);多柔比星(货号:ASD-807)、秦皮乙素(货号:YM-WS1229)购于阿拉丁生物化学技术有限公司(中国上海)。

### 二、细胞培养及分组

H9C2 细胞用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,当细胞覆盖培养瓶底部的 80% 时,使用胰蛋白酶消化以制备单细胞悬液。然后将 H9C2 细胞接种到 96 孔板,调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/ml,细胞分为 3 组:空白组(Control)、多柔比星(DOX)组、秦皮乙素(Esc + DOX)组。空白组细胞只加培养基,秦皮乙素组细胞加入 10 μmol/L 秦皮乙素培养 2 h<sup>[5]</sup>;然后在 Dox 和 Esc + Dox 组细胞加入 8 μmol/L 多柔比星继续培养 48 h,收集细胞待用。

### 三、透射电子显微镜观察线粒体结构

收集各组细胞,加入 2.5% 戊二醛在 4℃ 的冰箱中固定 48 h;再用 1% 四氧化锇在 4℃ 固定 30 min;用系列丙酮在室温下脱水;然后用包埋剂包埋,用超薄切片机切片并染色,透射电子显微镜检测线粒体结构改变。

### 四、Bmi-1 在 H9C2 细胞中的表达及其对细胞损伤的影响

#### 1. 通过胰蛋白酶消化收集各组细胞

使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度,通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶将细胞抗原按分子量大小分离,湿式转膜将蛋白转印至硝酸纤维素膜上,分别加入 Bmi-1、GAPDH 一抗(用一抗稀释液将一抗按照 1:1 000 稀释)4℃ 孵育过夜,再分别加入二抗(用二抗稀释液将二抗按照 1:2 000 稀

释)室温下 2 h,在暗室中将 ECL 发光液覆盖于膜表面,用化学发光荧光影像分析仪进行曝光,检测各组 Bmi-1 的表达。

### 2. 实验细胞分组

将细胞重新分为 3 组:DOX 组、空白 siRNA 转染组(Esc + DOX + NC siRNA)和 Bmi-1 siRNA 转染组(Esc + DOX + Bmi-1 siRNA)。将 300 pmol Bmi-1 siRNA 和 300 pmol 空白 siRNA 加入到 2 ml 无血清 Opti-MEM 1 培养基中,将 Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX 加入(20 μl)至 2 种溶液中,然后充分混合并加入细胞中。孵育 48 h 后,通过蛋白免疫印迹法检测每组 Bmi-1 的表达;然后用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况;在每组细胞中加入 10 μmol/L DCFH-DA 染色溶液,37℃ 避光孵育 20 min,采用流式细胞仪检测各组细胞 ROS 的水平。

### 五、统计学处理

使用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

一、秦皮乙素可减轻多柔比星诱导的 H9C2 细胞毒性线粒体功能紊乱

电镜结果显示,DOX 组出现 H9C2 细胞肿胀,线粒体嵴发生破裂。在 Esc + DOX 组中,H9C2 细胞保持正常完整的线粒体(图 1)。

二、秦皮乙素对多柔比星诱导的 H9C2 细胞 Bmi-1 表达和细胞损伤的影响

蛋白免疫印迹分析表明,与 DOX 组相比,Esc + DOX 组内 Bmi-1 表达增加(图 2A)。在敲除 Bmi-1 后,与空白 siRNA 组相比,Bmi-1 siRNA 组中的 Bmi-1 蛋白表达降低(图 2B),细胞凋亡率升高(图 2C),ROS 水平升高(图 2D)。因此,秦皮乙素对多柔比星诱导的心肌细胞损伤的作用机制是上调 Bmi-1 的表达。

## 讨 论

多柔比星是抗肿瘤谱广、活性强、在国内外被广泛使用的抗肿瘤药物。但长期使用时,由于剂量累积作用,存在严重的毒副反应,尤其是骨髓与心脏的毒性,大大限制了多柔比星的应用。多柔比星产生心脏毒性的机制很多,包括线粒体功能紊乱、ROS 水平增高等<sup>[6]</sup>。本研究结果表明多柔比星会使线粒体的形态发生改变,增加了 H9C2 细胞内

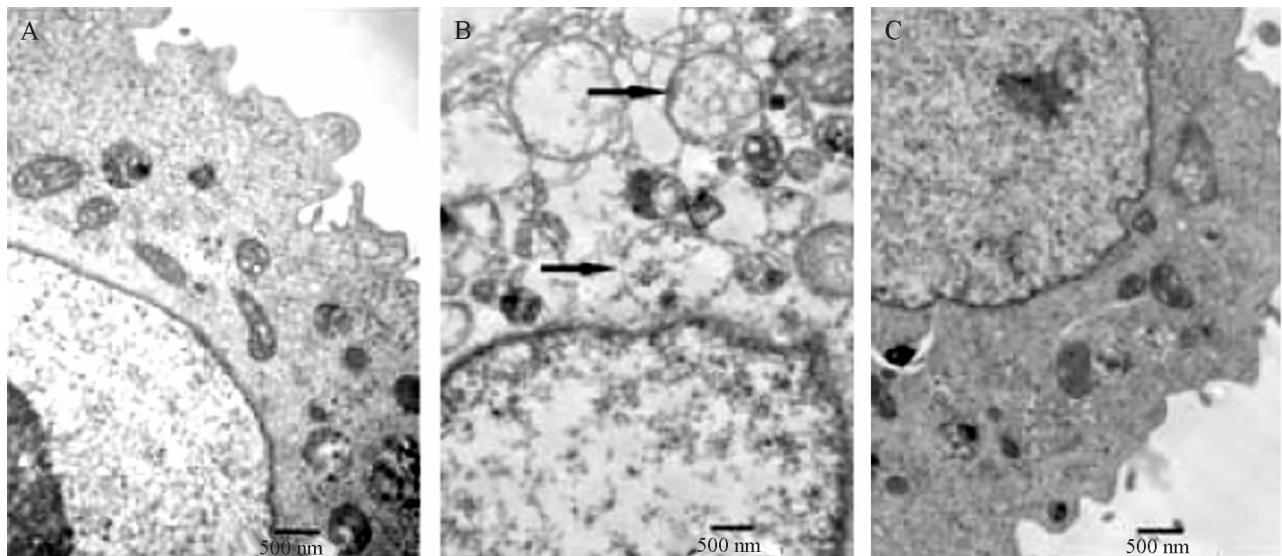


图 1 Esc 对 DOX 诱导的 H9C2 细胞线粒体功能的影响 (×10 000)

A: Control 组; B: DOX 组; C: Esc + DOX 组

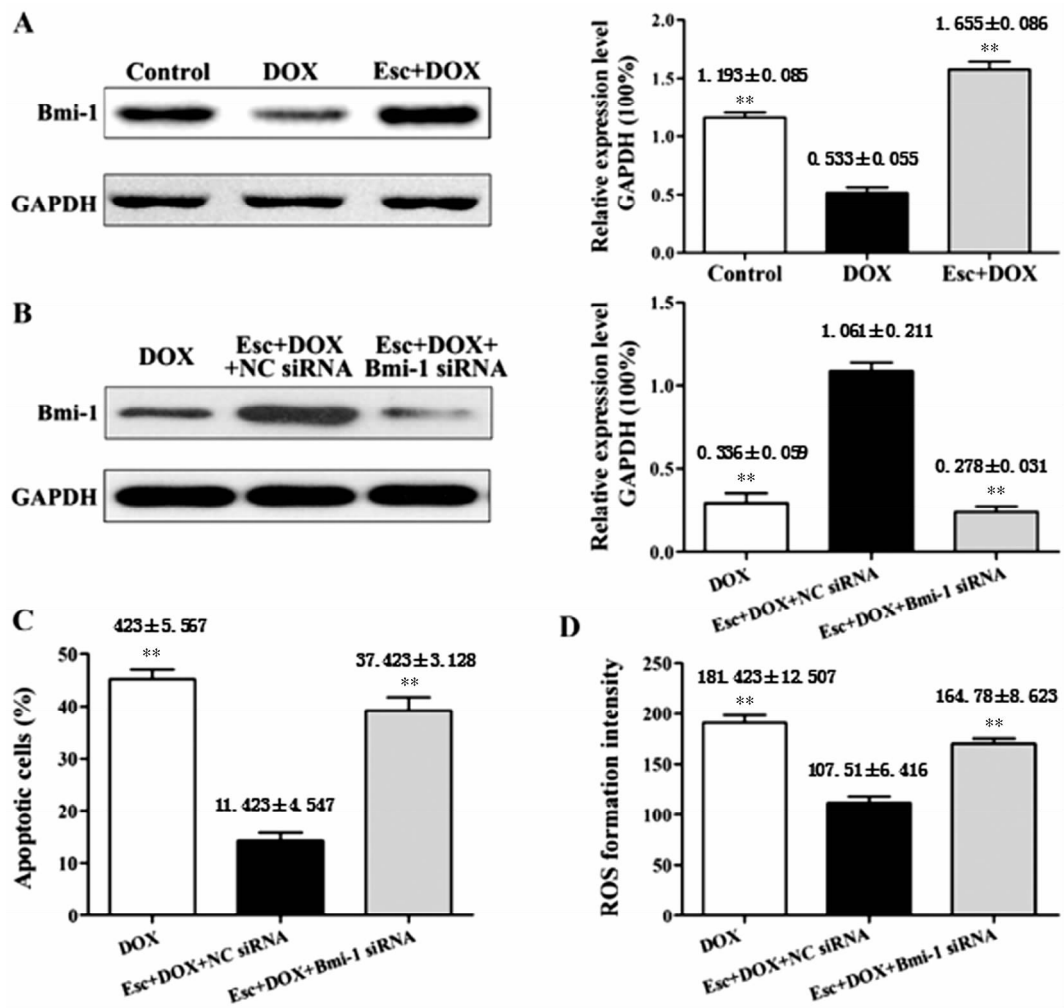


图 2 H9C2 细胞 Bmi-1 表达和细胞损伤情况

A: 与 DOX 组比较, Control 组及 Esc + DOX 组 Bmi-1 表达增加 ( $F = 539.098, P < 0.001$ ),  $** P < 0.01$ ; B: 与空白 siRNA 组相比, Bmi-1 siRNA 组中的 Bmi-1 蛋白表达降低 ( $F = 116.527, P < 0.001$ ),  $** P < 0.01$ ; C: 与空白 siRNA 组相比, Bmi-1 siRNA 组细胞凋亡率升高 ( $F = 134.612, P < 0.001$ ),  $** P < 0.01$ ; D: 与空白 siRNA 组相比, Bmi-1 siRNA 组 ROS 水平升高 ( $F = 165.837, P < 0.001$ ),  $** P < 0.01$

ROS 的水平；而秦皮乙素预处理后，ROS 的产生显著减少。

Bmi-1 基因是多梳基因家族 PcG 的重要成员之一，由多种转录抑制因子组成，以多蛋白复合体的形式调控靶基因的表达，在细胞的增殖能力、细胞周期及细胞凋亡等生命现象中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。近来研究显示，Bmi-1 也在多种恶性肿瘤异常表达，包括乳腺癌、宫颈癌和肺癌等，与肿瘤的生物特性及患者的预后转归密切相关，被认为是一种新的肿瘤标志物和潜在的治疗靶点<sup>[8]</sup>。Bmi-1 通过调节与线粒体功能和 ROS 产生相关的基因表达来调节线粒体功能。研究显示 Bmi-1 基因缺失的细胞线粒体功能遭到了破坏，ROS 水平升高，说明 Bmi-1 可以直接调节细胞内氧化压力<sup>[9]</sup>。

本研究表明，秦皮乙素可以抑制多柔比星导致的 Bmi-1 表达减少，从而调节线粒体功能及减少 ROS 的产生，减轻多柔比星对心肌细胞的毒性。有研究表明，Bmi-1 是 miRNA-132 的下游靶基因，过表达 miRNA-132 之后，可抑制 Bmi-1 的表达<sup>[10]</sup>。秦皮乙素减轻多柔比星致心脏毒性的其他机制尚需深入探讨，但本研究可为相关临床研究提供实验依据。

# 参 考 文 献

[1] Barry E, Alvarez JA, Scully RE, Miller TL, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert Opin Pharmacother*, 2007, 8 (8): 1039-1058.

[2] Chen ZC, Chen LJ, Cheng JT. Doxorubicin-induced cardiac toxicity is mediated by lowering of peroxisome proliferator-acti-

ted receptor delta expression in rats. *PPAR Res*, 2013; 456042.

[3] Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation*, 2000, 102 (5): 572-578.

[4] Ismail IH, Andrin C, McDonald D, Hendzel MJ. BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *J Cell Biol*, 2010, 191 (1): 45-60.

[5] 李潇, 徐繁, 房亮, 曹向宇, 姜海军, 肖旭. 秦皮乙素减低多柔比星诱导心脏毒性的研究. *承德医学院学报*, 2018, 36 (1): 11-14.

[6] Yoshida M, Shiojima I, Ikeda H, Komuro I. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47 (5): 698-705.

[7] Wu CY, Kang HY, Yang WL, Wu J, Jeong YS, Wang J, Chan CH, Lee SW, Zhang X, Lamothe B, Campos AD, Darnay BG, Lin HK. Critical role of monoubiquitination of histone H2AX protein in histone H2AX phosphorylation and DNA damage response. *J Biol Chem*, 2011, 286 (35): 30806-30815.

[8] Dong Q, Sharma S, Liu H, Chen L, Gu B, Sun X, Wang G. HDAC inhibitors reverse acquired radio resistance of KYSE-150R esophageal carcinoma cells by modulating Bmi-1 expression. *Toxicol Lett*, 2014, 224 (1): 121-129.

[9] Liu J, Liu C, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature*, 2009, 459 (7245): 387-392.

[10] 谭洁媚, 李明毅, 梁颖. miRNA-132 通过靶向调控 Bmi-1 表达影响鼻咽癌细胞对放射治疗敏感性. *新医学*, 2015, 46 (7): 428-432.

(收稿日期: 2017-12-06)

(本文编辑: 杨江瑜)