

[文章编号] 1007-3949(2011)19-12-0969-04

· 实验研究 ·

## 氧化应激通过抑制胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶介导阿霉素的心肌毒性

郑东诞<sup>1</sup>, 王秀玉<sup>2</sup>, 杨春涛<sup>3</sup>, 莫利求<sup>4</sup>, 兰爱平<sup>2</sup>, 胡芬<sup>2</sup>, 郭润民<sup>2</sup>, 沈宁<sup>2</sup>, 陈培熹<sup>2</sup>, 冯鉴强<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第一医院黄埔院区 CCU 科, 广东省广州市 510700; 2. 中山大学中山医学院生理学教研室, 广东省广州市 510080; 3. 广州医学院生理学教研室, 广东省广州市 510182; 4. 中山大学附属第一医院黄埔院区麻醉科, 广东省广州市 510700)

[关键词] 氧化应激; 活性氧; 胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶; 阿霉素; 心肌毒性

[摘要] 目的 探讨氧化应激是否通过抑制胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶的表达及活性介导阿霉素的心肌毒性。方法 应用阿霉素处理大鼠胚胎 H9c2 心肌细胞以建立阿霉素心肌毒性的细胞模型。在阿霉素处理前 60 min 用活性氧清除剂 N-乙酰半胱氨酸预处理 H9c2 心肌细胞以观察氧化应激在阿霉素心肌细胞损伤中的作用。应用 CCK-8 检测心肌细胞存活率; 双氯荧光素酶染色及荧光显微镜照相术检测细胞内活性氧水平; Western blot 检测胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶的表达; 亚甲基蓝显色法检测胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶活性。结果 5  $\mu$ mol/L 阿霉素处理 H9c2 细胞 24 h 引起明显的心肌毒性, 使细胞存活率降低。阿霉素在促进细胞内活性氧生成的同时, 还抑制胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶的表达及活性。N-乙酰半胱氨酸不仅抑制阿霉素对活性氧生成的促进作用, 还减弱阿霉素的心肌毒性, 并能阻断阿霉素对 H9c2 心肌细胞胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶表达及活性的抑制作用。结论 活性氧可通过抑制心肌细胞胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶的表达及活性介导阿霉素的心肌毒性。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

### Oxidative Stress Mediates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Inhibiting Cystathionine- $\gamma$ -Lyase

ZHENG Dong-Dan<sup>1</sup>, WANG Xiu-Xu<sup>2</sup>, YANG Chun-Tao<sup>3</sup>, MO Li-Qiu<sup>4</sup>, LAN Ai-Ping<sup>2</sup>, HU Fen<sup>2</sup>, GUO Run-Min<sup>2</sup>, SHENG Ning<sup>2</sup>, CHEN Pei-Xi<sup>2</sup>, and FENG Jian-Qiang<sup>2</sup>

(1. Department of CCU in Huangpu Division, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510700, China; 2. Department of Physiology, Zhongshan Medical College, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 3. Department of Physiology, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China; 4. Department of Anesthesia in Huangpu Division, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sun University, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

[KEY WORDS] Oxidative Stress; Reactive Oxygen Species; Cystathionine- $\gamma$ -Lyase; Doxorubicin; Cardiotoxicity

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether oxidative stress mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) expression and activity. **Methods** H9c2 cells treated with doxorubicin were used as the model of doxorubicin cardiotoxicity. H9c2 cells were pretreated with N-acetyl-L-cysteine (NAC) 60 min prior to treatment with DOX so as to examine the role of oxidative stress in DOX-induced injury. Cell viability was measured by cell counter kit-8. The level of reactive oxygen species (ROS) was tested by dichlorofluorescein staining and photofluorography. Expression of CSE was detected by Western blot assay. Activity of CSE was examined by methylene blue test assay. **Results** Exposure of H9c2 cells to 5  $\mu$ mol/L doxorubicin induced significant cardiotoxicity, leading to a decrease in cell viability. Doxorubicin not only enhanced ROS generation, but also inhibited CSE expression and activity in H9c2 cells. Pretreatment with NAC attenuated doxorubicin-induced ROS generation and cardiotoxicity, and also blocked the inhibitory effect of CSE expression and activity by doxorubicin. **Conclusion** ROS may mediate doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting CSE expression and activity.

阿霉素是临床上常用的一种广谱抗癌药<sup>[1]</sup>, 由于它可引起剂量依赖性的心肌毒性, 限制了它在临

[收稿日期] 2011-09-20

[基金项目] 广东省科技计划基金项目(2010B080701035; 2008B080703053)

[作者简介] 郑东诞, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病的基础与临床, E-mail 为 yunsenzheng@live.cn. 王秀玉, 硕士, 研究方向为细胞损伤与保护机制, E-mail 为 wangxiuyu1985@163.com. 杨春涛, 博士, 讲师, 研究方向为细胞损伤与保护机制。

床上的应用<sup>[2]</sup>。阿霉素引起心肌毒性的机制之一可能与氧化应激有关。有研究指出,阿霉素能促进活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)生成<sup>[3,4]</sup>,也能使超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶的活性降低<sup>[4]</sup>,从而导致氧化应激损伤。近年有研究报道,内源性硫化氢(H<sub>2</sub>S)生成减少可能与大鼠阿霉素心肌病的发生有关<sup>[5,6]</sup>。H<sub>2</sub>S的供体硫氢化钠(NAC)能抑制阿霉素引起的大鼠心肌氧化应激

性及CSE表达中的作用。实验分组:正常培养的H9c2细胞;5 μmol/L阿霉素处理2 h的H9c2细胞;1000 μmol/L NAC预处理60 min后再用5 μmol/L阿霉素处理2 h的H9c2细胞;1000 μmol/L NAC预处理60 min后再继续培养2 h的H9c2细胞。

1.3 细胞存活率检测

将H9c2心肌细胞接种于96孔培养板中,经不同处理因素作用后,每孔加入10 μl CCK-8溶液,按

H<sub>2</sub>S在阿霉素心肌毒性的发生及发展过程中可能存在一定的关联。为此,本研究应用阿霉素处理H9c2心肌细胞建立阿霉素心肌毒性的体外模型,旨在探讨阿霉素对H9c2细胞内CSE表达及活性的影响,从而推断阿霉素对内源性H<sub>2</sub>S生成的影响;应用ROS清除剂能否阻断阿霉素对CSE表达及活性的抑制作用;应用ROS清除剂能否对抗阿霉素的心肌毒性作用,以便为深入阐明阿霉素的心肌毒性机制提供新颖的实验资料。

1 材料和方法

1.1 材料

用ImageJ 1.41o软件进行分析。

1.5 Western blot 检测 CSE 蛋白的表达

H9c2心肌细胞接种于35 mm<sup>2</sup>培养皿内,在各处理因素作用后,用预冷的PBS洗2次,加入细胞裂解液,4℃静置30 min,12000 r/min离心10 min,取上清,采用BCA法进行蛋白定量。总蛋白经SDS-PAGE分离后,转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉封闭1.5 h。随后加入CSE抗体(1:1000),室温孵育2 h,用TBST洗3次,加入相应的二抗,孵育1 h,漂洗3次。经ECL显色后,用ImageJ 1.41o软件分析蛋白的相对表达。

1.6 亚甲基蓝显色法检测 CSE 活性

H9c2心肌细胞接种于35 mm<sup>2</sup>培养皿中,在各

min。反应结束后用酶标仪检测 670 nm 波长处的吸光度。检测出的 H<sub>2</sub>S 含量根据每组的蛋白浓度进行标准化处理,重复 3 次。

1.7 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿霉素诱导心肌细胞氧化应激反应

在正常的 H9c2 细胞内,ROS 水平较低。当用 5  $\mu\text{mol/L}$  阿霉素处理 2 h 后,H9c2 细胞内 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ),提示阿霉素可引起心肌细胞氧化应激反应。在阿霉素处理细胞前,用 NAC 1000  $\mu\text{mol/L}$  预处理 H9c2 细胞 60 min 能明显阻断阿霉素引起的 ROS 生成增多 ( $P < 0.05$ ),而 1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 本身对 H9c2 细胞内 ROS 生成无明显影响(图 1 和表 1)。

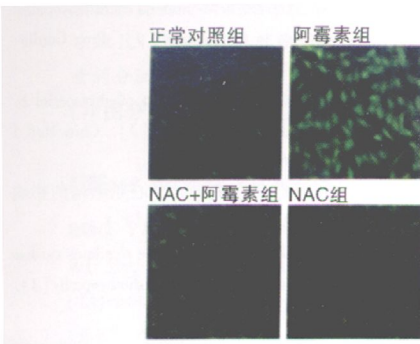


图 1. NAC 对阿霉素诱导的 ROS 产生的影响 ( $\times 200$ )

Figure 1. Effect of NAC on ROS generation induced by doxorubicin in H9c2 cells

表 1. NAC 对阿霉素诱导 ROS 产生的影响

Table 1. Effect of NAC on ROS generation induced by doxorubicin in H9c2 cells

分 组	平均荧光强度
正常对照组	10.5 $\pm$ 3.9
阿霉素组	38.2 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
NAC + 阿霉素组	27.6 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
NAC 组	12.3 $\pm$ 2.9

a 为  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与阿霉素组比较。

2.2 氧化应激介导阿霉素的心肌细胞毒性作用

用 5  $\mu\text{mol/L}$  阿霉素处理 H9c2 细胞 24 h 可使细胞存活率明显降低 ( $P < 0.05$ ),提示阿霉素能诱

导心肌细胞毒性。在阿霉素处理细胞前应用 1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 预处理 H9c2 细胞 60 min 能明显地阻断阿霉素的心肌细胞毒性作用,使心肌细胞存活率明显升高 ( $P < 0.05$ ),提示氧化应激介导阿霉素的心肌细胞毒性。1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 本身不影响 H9c2 细胞存活率(表 2)。

表 2. NAC 对阿霉素诱导细胞存活率的影响

Table 2. Influence of NAC on cell viability induced by doxorubicin in H9c2 cells

分 组	细胞存活率
正常对照组	100%
阿霉素组	59.2% $\pm$ 6.7% <sup>a</sup>
NAC + 阿霉素组	78.3% $\pm$ 8.2% <sup>b</sup>
NAC 组	101.5% $\pm$ 4.6%

a 为  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与阿霉素组比较。

2.3 氧化应激介导阿霉素对心肌细胞 CSE 表达的抑制作用

用 5  $\mu\text{mol/L}$  阿霉素处理 H9c2 心肌细胞 24 h CSE 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 本身不影响 CSE 的基础表达,但是 NAC 预处理心肌细胞 60 min 能明显地阻断阿霉素对 CSE 表达的抑制作用 ( $P < 0.05$ ),提示氧化应激介导阿霉素对 H9c2 心肌细胞 CSE 表达的抑制作用(图 2 和表 3)。

2.4 氧化应激介导阿霉素对心肌细胞 CSE 活性的抑制作用

用 5  $\mu\text{mol/L}$  阿霉素处理 H9c2 心肌细胞 24 h 对 CSE 活性有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 本身不影响 CSE 活性,但是 NAC 预处理心肌细胞 60 min 能明显地拮抗阿霉素对 CSE 活性的抑制作用,提示氧化应激介导阿霉素对 CSE 活性的抑制作用(表 3)。

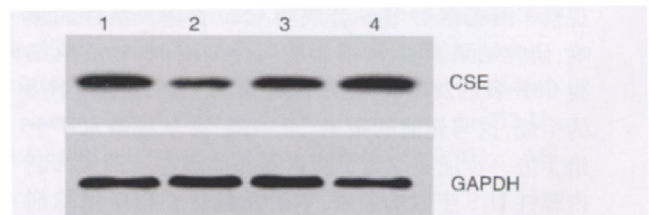


图 2. NAC 对阿霉素诱导的 CSE 表达的影响 1 为正常对照组,2 为阿霉素组,3 为 NAC + 阿霉素组,4 为 NAC 组。

Figure 2. Effect of NAC on CSE expression induced by doxorubicin in H9c2 cells

表3. NAC对阿霉素诱导CSE表达及活性的影响

**Table 3. Effect of NAC on CSE expression and activity induced by doxorubicin in H9c2 cells**

分组	CSE/GAPDH	CSE活性
正常对照组	1.1 ± 0.2	100% ± 4.1%
阿霉素组	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	72.8% ± 8.6% <sup>a</sup>
NAC + 阿霉素组	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	87.5% ± 5.1% <sup>b</sup>
NAC组	1.1 ± 0.1	98.2% ± 4.3%

a 为  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与阿霉素组比较。

### 3 讨论

近年,应用心肌细胞株,特别是大鼠胚胎心肌细胞(H9c2细胞)探讨阿霉素引起心肌细胞损伤机制及对抗机制受到关注<sup>[10]</sup>。本研究观察到,5  $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素处理H9c2心肌细胞24 h可产生明显的心肌毒性,表现为细胞存活率明显降低。同时,阿霉素能增加心肌细胞内ROS生成。进一步的研究证实,ROS清除剂NAC在阻断阿霉素促进ROS生成的同时,能保护H9c2心肌细胞对抗阿霉素的心肌毒性,提示氧化应激与阿霉素的心肌毒性密切相关。上述研究结果与Takemura等<sup>[3,4,11]</sup>的研究报道一致。ROS是阿霉素代谢的副产物。ROS能损伤膜脂质及其他细胞成份,最终导致心肌细胞凋亡或坏死<sup>[12]</sup>。因此,不少研究支持这样一种观点,即ROS生成增多导致氧化应激及抗氧化物减少是阿霉素引起心肌病的重要机制之一<sup>[11]</sup>。

在哺乳动物组织中,内源性H<sub>2</sub>S由4种酶催化合成,包括胱硫醚- $\beta$ -合成酶(CBS)、CSE、3-巯基丙酮酸转硫酶(3-MST)和半胱胺酸裂解酶(CL)。这些酶在组织中分布具有特异性,例如,CSE主要分布于心脏和血管平滑肌,是心肌组织产生H<sub>2</sub>S的关键酶。最近,有学者证实,内源性H<sub>2</sub>S生成减少可能与大鼠阿霉素心肌病发生有关<sup>[5,6]</sup>。但是,氧化应激在阿霉素抑制内源性H<sub>2</sub>S生成中的作用如何尚未明了。为了探讨这一有意义的问题,本研究首先观察了阿霉素对H<sub>2</sub>S合成酶CSE表达及活性的影响,研究表明,阿霉素能明显抑制H9c2心肌细胞CSE表达及活性,提示阿霉素能抑制内源性H<sub>2</sub>S的生成,这与先前的报道<sup>[5,6]</sup>一致,并从细胞水平上给予进一步证实。为了探讨氧化应激与阿霉素抑制内源性H<sub>2</sub>S生成的关系,本研究观察了ROS清除剂NAC对阿霉素抑制CSE表达及活性的影响。研究显示,NAC能明显地阻断阿霉素对H9c2心肌细胞CSE表达及活性的抑制作用,提示ROS可能介导阿霉素对内源性H<sub>2</sub>S生成的抑制作用。由于内源性H<sub>2</sub>S或外源性H<sub>2</sub>S已被证实具有心脏保护作用及抗

氧化作用<sup>[6-8]</sup>,抑制内源性H<sub>2</sub>S生成能减弱缺血预处理产生的心脏保护作用<sup>[13]</sup>,应用外源性H<sub>2</sub>S能保护心脏对抗阿霉素引起的心肌损伤<sup>[6]</sup>,因此,结合上述研究结果,我们推测阿霉素可能通过增加ROS生成,引起氧化应激反应,并抑制H9c2心肌细胞CSE的生成和活性,从而使内源性H<sub>2</sub>S生成减少及细胞内的抗氧化能力降低,最后与其他损伤机制一道导致心肌细胞损伤,包括心肌毒性。

综上所述,本研究从细胞水平证实阿霉素能抑制CSE表达及活性,并揭示氧化应激在阿霉素抑制内源性H<sub>2</sub>S生成中的作用及其与阿霉素心肌毒性的关联,将有助于进一步阐明阿霉素心肌毒性的发病机制,并为防治阿霉素心肌毒性开拓了新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1991, 11 (1): 43-64.
- [2] Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis [J]. Cancer Res, 2000, 60 (7): 1789-792.
- [3] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2007, 49 (5): 330-352.
- [4] Liu Z, Song XD, Xin Y, et al. Protective effect of chrysoeriol against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122 (21): 2652-656.
- [5] 苏钰雯. 内源性硫化氢对阿霉素心肌病大鼠心肌结构的影响 [J]. 临床儿科杂志, 2007, 25: 4.
- [6] Su YW, Liang C, Jin HF, et al. Hydrogen sulfide regulates cardiac function and structure in adriamycin-induced cardiomyopathy [J]. Circ J, 2009, 73 (4): 741-749.
- [7] Geng B, Chang L, Pan C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318 (3): 756-763.
- [8] Chen SL, Yang CT, Yang ZL, et al. Hydrogen sulphide protects H9c2 cells against chemical hypoxia-induced injury [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37 (3): 316-321.
- [9] 李建平, 杨战利, 杨春涛, 等. 热休克蛋白90在硫化氢对抗化学性缺氧引起的心肌细胞损伤中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (4): 265-268.
- [10] 杨涛, 屈顺林, 伍赶球, 等. Kruppel样因子4对阿霉素诱导大鼠心肌细胞H9c2凋亡的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (3): 181-183.
- [11] Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy [J]. Pharmacol Toxicol, 2003, 93 (3): 105-115.
- [12] Menna P, Minotti G, Salvatorelli E. In vitro modeling of the structure-activity determinants of anthracycline cardiotoxicity [J]. Cell Biol Toxicol, 2007, 23 (1): 49-62.
- [13] Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316 (2): 670-678.

(此文编辑 王玉珊)