

蛋白激酶 C 抑制剂对苏尼替尼所致心脏毒性的保护作用

邱素华¹, 章 华¹, 顾 盼¹, 师晨霞¹, 马景涛², 许彦芳^{1*}

(1.河北医科大学药理教研室,河北省新药药理毒理重点实验室,教育部血管与神经生物重点实验室,河北 石家庄 050017;2.河北医科大学第四医院心内科,河北 石家庄 050011)

[摘要] 目的 在细胞和整体动物水平探讨蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 抑制剂对苏尼替尼 (Sunitinib, SU) 引发心脏毒性的保护作用。方法 新生大鼠心肌细胞 (neonatal rat ventricular myocytes, NRVMs) 在不同浓度的 SU (1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) 中进行孵育, 检测细胞三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放量及线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)。然后观察非选择性 PKC 抑制剂 (bisindolylmaleimide 1, Bis-1)、选择性新型 PKC 抑制剂 (Rotterlin) 或抑制肽对 SU 引发心肌细胞毒性的影响。雄性 C57 小鼠随机分为 4 组, 即正常对照组、SU 组、SU+PKC 抑制剂白屈菜红碱 (chelerythrine, CHE) 低剂量 ($0.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 及 CHE 高剂量 ($0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组。连续灌胃 SU 同时腹腔注射 CHE, 给药 3 周后取心脏组织, 提取线粒体, 检测心肌细胞线粒体呼吸链复合物 IV 和 V 活性; 电镜观察心肌细胞线粒体结构变化; Western blot 检测各组心肌磷酸化 PKC 亚型包括 PKC α 、PKC ϵ 以及 PKC δ 的表达情况。结果 SU 孵育 NRVMs 后呈浓度与时间依赖性减少 ATP 含量、增加 LDH 释放量、降低线粒体膜电位。非选择性 PKC 抑制剂 Bis-1 可预防 SU 引发的上述改变; 选择性新型 PKC 抑制剂 Rotterlin 和新型 PKC ϵ 抑制肽亦可预防 SU 引起的上述各项指标的变化。小鼠给予 SU 后, 心肌细胞线粒体呼吸链复合物 IV 和 V 的活性均显著下降, 电镜显示, 心肌细胞线粒体出现明显肿胀、嵴融合等形态改变; 同时给予不同剂量的 CHE 后, 线粒体呼吸链复合物 IV 和 V 的活性均显著升高, 电镜结果显示, CHE 明显减轻 SU 所致线粒体形态改变。Western 检测显示, SU 组心肌磷酸化 PKC ϵ 表达量显著升高, 而磷酸化 PKC δ 、PKC α 表达量则无明显变化; 高剂量的 CHE 显著抑制了磷酸化 PKC ϵ 的过表达, 使其恢复至对照组水平。结论 PKC 抑制剂对 SU 导致的心脏毒性具有显著保护作用, 此作用可能源于抑制新型 PKC (主要是 PKC ϵ 亚型) 的过度激活。

[关键词] 蛋白激酶 C 抑制剂; 苏尼替尼; 心脏毒性 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.01.002

[中图分类号] R969.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)01-0005-09

Protective effect of protein kinase C inhibitors on sunitinib-induced cardiotoxicity

QIU Su-hua¹, ZHANG Hua¹, GU Pan¹, SHI Chen-xia¹, MA Jing-tao², XU Yan-fang^{1*}

(1. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, the Key Laboratory of New Drug

Pharmacology and Toxicology of Hebei Province, the Key Laboratory of Neural and

Vascular Biology, Ministry of Education, Shijiazhuang 050017, China;

2. Department of Cardiology, the Fourth Hospital of Hebei Medical

University, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of protein kinase C (PKC) inhibitors on the cardiotoxicity induced by sunitinib (SU) at the cellular and whole animal levels.

[收稿日期] 2023-08-31

[基金项目] 河北省自然科学基金精准医学联合基金重点项目

(H2020206554)

[作者简介] 邱素华 (1984-), 女, 河南鹿邑人, 河北医科大学实验师, 理学硕士, 从事心血管药理毒理研究。

* 通信作者。E-mail: yanfangxu@hebm.u.edu.cn

Methods The neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) were cultured and incubated with different concentrations of SU (1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$). The intracellular adenosine triphosphate (ATP) level, lactate dehydrogenase (LDH) release and the mitochondrial membrane potential (MMP) were measured. Then the effects of non-selective PKC inhibitor bisindolylmaleimide 1 (Bis-1), selective novel PKC inhibitor Rotterlin, or inhibitory peptides on SU-induced cardiotoxicity were observed. Male C57 mice were randomly divided into four groups, including control group, SU group, SU combined with PKC inhibitor chelerythrine (CHE) at low dose (i.p. 0.375 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and high dose (i.p. 0.75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) groups. SU was administered continuously by gavage and intraperitoneal injection of CHE was given. At 3 weeks after administration, the heart tissues were harvested and mitochondria from ventricular myocardium were extracted to measure the activity of mitochondrial complexes IV and V. The transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the mitochondria microstructures. Western blot analysis was performed to detect the expression of phosphorylated PKC subtypes, including p-PKC ϵ , p-PKC δ and p-PKC α in each group. **Results** SU significantly reduced ATP level, increased LDH release and decreased MMP in NRVMs in a concentration and time-dependent manner. TEM showed that SU-induced visible changes could be prevented by non-selective PKC inhibitor Bis-1, selective novel PKC inhibitor Rotterlin and selective PKC ϵ inhibitory peptide. Administration of SU significantly reduced the activity of mitochondrial complexes IV and V in mouse myocardium, and TEM showed significant morphological changes such as swelling and cristae fusion in myocardial cell mitochondria. Co-administration of different dose of CHE prevented the decrease of mitochondrial complexes IV and V activities. Meanwhile, TEM showed that CHE significantly alleviated the mitochondrial morphological changes induced by SU. Western blot analysis showed that the expression level of p-PKC ϵ was significantly increased in SU group compared with the control group, but p-PKC δ or p-PKC α had no significant change. High-dose CHE significantly inhibited the overexpression of p-PKC ϵ , restoring it to the control group level. **Conclusion** PKC inhibitors have a significant protective effect against SU-induced cardiotoxicity, which may be due to the inhibition of excessive activation of novel PKC (mainly PKC ϵ subtype).

[Key words] protein kinase C inhibitor; sunitinib; cardiotoxicity

苏尼替尼(Sunitinib, SU)是一种新型小分子、多靶点的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)类药物,选择性抑制过度激活的酪氨酸激酶,主要用于肿瘤治疗^[1]。与传统的细胞毒类抗肿瘤药物相比,TKIs具有靶向性抗肿瘤特征,在临床凸显优势,成为近年新药研发的热点^[2]。然而伴随TKIs的广泛应用,其不良反应也逐渐显露,其中最严重的不良反应就是心脏毒性,表现为从无症状的心电图改变,到左心室射血分数降低,最终发展为充血性心力衰竭,严重威胁着患者的生命健康^[3-5]。因此,探索该类物质心脏毒性的分子机制、寻找特异性毒性防治药物具有重要意义。心肌细胞内有500多种激酶,构成复杂的信号网络调控细胞功能。TKIs可能抑制心肌细胞和肿瘤共有的激酶(on-target)^[2]或抗肿瘤靶点以外的心肌激酶(off-

target)^[6]而改变激酶信号通路产生心脏毒性,干预TKIs扰动的关键信号通路有望防治其引发的心脏毒性^[7]。有研究^[8]显示,产生心脏毒性的TKIs显著增加离体培养新生大鼠心室肌细胞蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)表达水平。PKC是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,至少包括经典型PKC(classical protein kinase C, cPKCs)(α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 γ 等亚型)、新型PKC(novel protein kinase C, nPKCs)(δ 、 ϵ 、 η 和 θ 等亚型)及非典型PKC(atypical protein kinase C, aPKCs)(ξ 、 λ 、 τ 亚型等)^[9-10],在细胞信号传递中发挥重要作用,能够调节细胞代谢、生长、增殖和分化,其活性异常更是参与了多种急慢性心脏疾病的发生发展^[11-12]。为验证PKC的异常激活是否参与SU引发的心脏毒性,本研究利用离体培养的新生大鼠心肌细胞(neonatal rat ventricular

myocytes, NRVMs), 观察 PKC 抑制剂或抑制肽对 SU 导致的心肌细胞毒性作用的影响, 同时在整体动物水平观察选择性 nPKC 亚型抑制剂白屈菜红碱(chelerythrine, CHE)对 SU 导致的心脏毒性的影响, 为探究 TKIs 心脏毒性的分子机制、寻找特异性防治药物提供实验依据。报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 新生 1~2 d 的 SD 大鼠, 成年雄性 C57 小鼠, 体重(20±2)g, 购自河北省实验动物中心, 许可证号: SCXK(冀)2018-003。于室内温度 22~24 °C, 相对湿度控制 50%~60%的条件下饲养。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 取 SD 大鼠 10 只, 酒精消毒取出心脏下 1/3 的心室部分, 放入预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(Gibco, USA)清洗, 将心室组织剪碎成 0.5~1 mm³ 大小组织块, PBS 冲洗 2 次, 加入 0.125% 胰酶-乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(Sigma, USA) 5 mL, 37 °C 磁力搅拌消化 5 min(50 r/min), 收集上清于胎牛血清(PAA, Germany)中, 重复多次直至组织块消化完毕。收集的细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min 弃掉上清, 底层细胞用 DMEM/F-12 培养基(Gibco, USA)重悬, 用 200 目滤网过滤未消化的组织, 置于培养箱(5% CO₂, 37 °C)培养 2 h, 吸出悬液, 再接种于 96 或 24 孔板中, 浓度为 1×10⁵/mL, 仍置于培养箱培养, 72 h 后加入 SU(Meilun Biotech, China)。SU 给药浓度为 1、5、10 μmol/L, 分别于 24、48、72 h 检测细胞内三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)含量, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放量以及线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)变化。为验证非选择性 PKC 抑制剂(bisindolylmaleimide 1, Bis-1)(Alexis, USA)对 SU 的影响, SU 给药浓度仍为 1、5、10 μmol/L, Bis-1 浓度为 100 nmol/L, 孵育 48 h 后检测 ATP 含量, 透射电镜观察细胞器超显微结构变化, 孵育 72 h 后检测 LDH 释放量。为验证选择性 PKC 抑制剂或抑制肽对 SU 毒性的影响, 选用 nPKC 选择性抑制剂 Rotterlin(500 nmol/L)(Sigma, USA), 选择性 PKCε 抑制肽(500 nmol/L)(AngTai Biotech, China)(其乱码肽为对照), 使用 Saponin(TCI, Japan)作打孔剂。

1.2.2 LDH 释放量测定 LDH 催化乳酸脱氢生成丙酮酸, 丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用生成丙酮酸

二硝基苯肼, 后者在碱性溶液中显棕红色, 颜色深浅与丙酮酸浓度成正比。用 LDH 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)和 FLUOstar Omega 全自动多功能酶标仪(BMG LabTech, Germany)可以测定 LDH 释放量。

1.2.3 ATP 含量测定 萤火虫荧光素酶催化荧光素产生荧光时需要 ATP 提供能量, 当萤火虫荧光素酶和荧光素都过量时, 在一定浓度范围内荧光强度和 ATP 浓度成正比。采用 ATP 检测试剂盒(Beyotime, China)和 FLUOstar Omega 全自动多功能酶标仪检测培养基中 ATP 含量。

1.2.4 MMP 测定 采用 JC-1 染色激光共聚焦显微镜检测 MMP。JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的理想荧光探针, 在线粒体膜电位较高时, JC-1 聚焦在线粒体基质中, 形成聚合物, 产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体基质, 此时 JC-1 为单体, 产生绿色荧光。通过荧光颜色的转变来检测 MMP 的变化, 常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。JC-1 室温溶解, 配制 JC-1 染色工作液(JC-1: 培养基=1:10)。PBS 清洗细胞 2 遍, 向细胞培养孔中加入 1 mL 的 JC-1 染色工作液, 置于细胞培养箱中孵育 15 min。检测 JC-1(Beyotime, China)单聚体时把显微镜激光设置 490 nm, 发射光设置 530 nm, 检测 JC-1 聚合物时, 激光设置 525 nm, 发射光设置为 590 nm。用 Image-pro plus6.0 系统检测各组红色荧光量、绿色荧光量及比例。

1.2.5 透射电镜、组织切片制样观察 细胞用 0.125% 胰酶-EDTA 消化, PBS 冲洗 2 次, 高速离心, 使散在的心肌细胞形成团块状, 置于 2.5% 戊二醛中(心肌组织则直接切块, 3 mm×1 mm×1 mm 大小置于 4% 戊二醛中); 4 °C 放置 2~4 h, PBS 清洗 10~15 min, 3 次; 四氧化钨固定 1~2 h 后用 PBS 清洗 10~15 min, 共 3 次, 然后依次用 50%、70%、80%、90%、100% 的丙酮脱水, 包埋, 切片(样品厚度 50 nm), 醋酸双氧铀染色 10 min, 柠檬酸铅染色 5 min, 透射电镜观察。

1.2.6 整体动物实验设计 小鼠 40 只, 随机分为 ①对照组: 灌胃清水(0.1 mL/10 g)同时腹腔注射生理盐水(0.1 mL/10 g); ②SU 组: 灌胃 SU(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)同时腹腔注射生理盐水(0.1 mL/10 g); ③SU+CHE(L)组: 灌胃 SU 同时腹腔注射 CHE(Cayman, USA)低剂量(0.375 mg·kg⁻¹·d⁻¹); ④SU+CHE(H)组: 灌胃 SU 同时腹腔注射 CHE 高剂量(0.75 mg·kg⁻¹·

d^{-1})。每组 10 只。连续给药 3 周后,取出心脏,将心室组织分成若干块,一部分提取心肌线粒体检测线粒体呼吸链复合物 IV 和 V 的活性;一部分做透射电镜切片观察细胞器超显微结构;一部分心室组织提蛋白做 Western 检测磷酸化 PKC 亚型蛋白表达。

1.2.7 线粒体提取及呼吸链复合物检测 切出 50~100 mg 心室组织用预冷 PBS 清洗,在冰上剪碎,加入 10 倍量 PBS 冷浴 3 min,600 g 离心 10~20 s,弃掉上清。加入两倍体积线粒体分离试剂,600 g 离心 10~20 s,弃掉上清。加入 8 倍体积预冷分离试剂冰上研磨 20~30 min,600 g 离心 5 min ($4^{\circ}C$),弃掉沉淀,上清 11 000 g 离心 10 min ($4^{\circ}C$),得到的沉淀为线粒体,加入 150~200 μL 线粒体裂解液(含有蛋白酶抑制剂)(Beyotime,China)溶解线粒体。分别用线粒体呼吸链复合物 IV、V 检测试剂盒(Genmed Scientifics Inc, USA)和 FLUOstar Omega 全自动多功能酶标仪测定其活性。

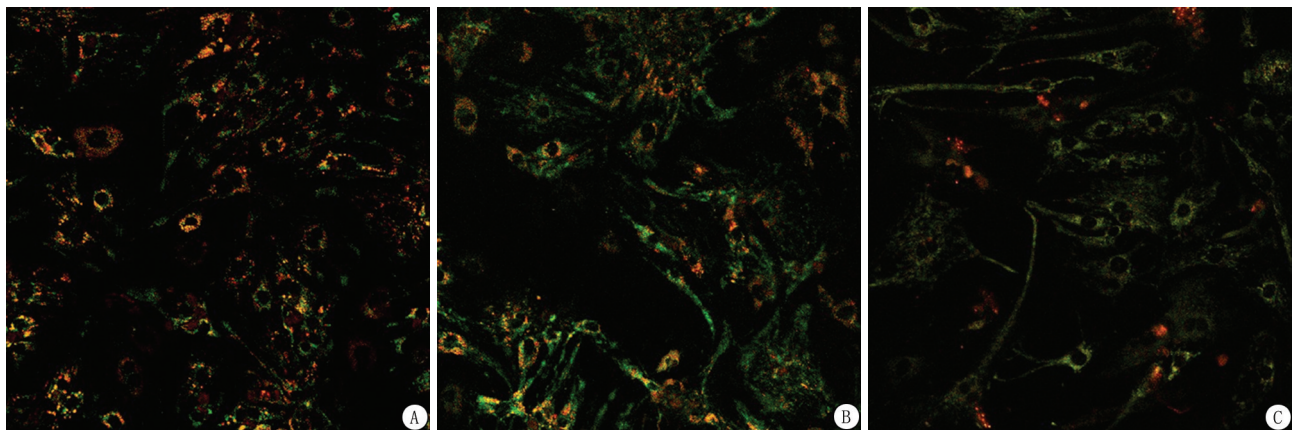
1.2.8 Western blotting 将心肌组织置于冰上匀浆破碎,用加入蛋白酶抑制剂(Solarbio science & technology, China) (1:100)和磷酸酶抑制剂(Roche,Switzerland) (1:10)的 RIPA 高效裂解液(Solarbio science & technology, China)裂解 30 min,然后 $4^{\circ}C$ 12 000 g 离心 30 min,取上清蛋白样品加入 LDS-Sample Buffer(Thermo, USA) (4:1)变性。用 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白(40 μg),然后转至 PVDF 膜(Roche,Switzerland)上,用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 $4^{\circ}C$ 孵育(1:400 稀释)过夜,清洗未结合的抗体,进行二抗(1:5 000, Rockland Immunochemicals, USA)孵育,用

Odyssey 红外成像系统(LICOR 9120, Li-COR, USA)检测荧光信号。各蛋白条带以 GAPDH 为内参标化。以下一抗被用于实验:p-PKC ϵ 抗体(Anbo Biotech, USA), p-PKC δ 抗体(Anbo Biotech, USA), p-PKC α 抗体(Anbo Biotech USA),GAPDH 抗体(ProteinTech,China)。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件分析数据。Adobe Illustrator CS5 软件处理图像。计量资料比较采用独立样本 t 检验、单因素方差分析、SNK- q 检验和重复测量的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SU 对 NRVMs 的毒性作用 不同浓度的 SU (1、5、10 $\mu mol/L$)与 NRVMs 孵育 48 h 细胞内 ATP 含量呈浓度依赖性减少,与对照组相比,5、10 $\mu mol/L$ SU 显著减少 ATP 含量($P < 0.05$)。72 h 检测到的 LDH 释放量随着 SU 浓度增加而明显增多,与对照组相比,10 $\mu mol/L$ SU 显著增加 LDH 释放量($P < 0.05$),见表 1。孵育 10 $\mu mol/L$ SU,于 24、48 及 72 h 3 个时间点检测细胞内 ATP 的含量,LDH 释放量以及 MMP 变化。结果显示,SU 组 ATP 含量呈明显降低趋势,低于对照组,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2;SU 组 LDH 释放量呈明显升高趋势,高于对照组,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。SU 组 MMP 呈明显降低趋势,低于对照组,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1,表 4。



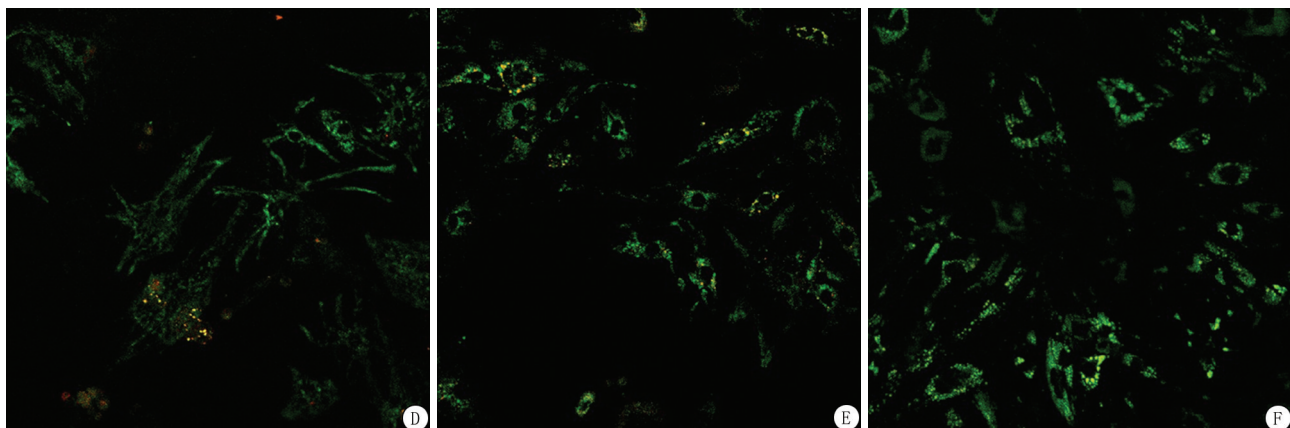


图1 SU 孵育不同时间对新生大鼠心室肌细胞 MMP 的影响(×20)

A,对照组 24 h;B,对照组 48 h;C,对照组 72 h;D,SU 组 24 h;E,SU 组 48 h;F,SU 组 72 h

Figure 1 Effects of sunitinib treatment on the MMP in cultured NRVMs at various time points(×20)

表1 不同浓度 SU 对新生大鼠心室肌细胞 ATP 和 LDH 的影响

Table 1 Effects of various concentrations of sunitinib treatment on ATP level and LDH activity in the culture medium of NRVMs

组别	ATP		LDH	
	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	1.00±0.04	1.00±0.09	1.00±0.09	1.00±0.09
SU 1 mol/L	1.01±0.03	0.92±0.01	0.92±0.01	0.92±0.01
SU 5 μmol/L	0.68±0.08*	1.49±0.07	1.49±0.07	1.49±0.07
SU 10 μmol/L	0.30±0.07*	2.52±0.20*	2.52±0.20*	2.52±0.20*
F 值	101.856	17.096	17.096	17.096
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与对照组比较(SNK-q 检验)

表2 SU 孵育不同时间对新生大鼠心室肌细胞 ATP 的影响

Table 2 Effects of sunitinib treatment on ATP level in cultured NRVMs at various time points

组别	ATP		
	24 h	48 h	72 h
对照组	1.00±0.08	1.00±0.04	1.00±0.08
SU 10 μmol/L	0.90±0.07	0.30±0.07	0.15±0.03
组间	F 值=327.996	P 值<0.001	P 值<0.001
时点间	F 值=55.974	P 值<0.001	P 值<0.001
组间·时点间	F 值=55.974	P 值<0.001	P 值<0.001

表3 SU 孵育不同时间对新生大鼠心室肌细胞 LDH 的影响

Table 3 Effects of sunitinib treatment on LDH activity in cultured NRVMs at various time points

组别	LDH		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.07±0.02	0.07±0.01	0.14±0.03
SU 10 μmol/L	0.17±0.01	0.31±0.02	0.41±0.00
组间	F 值=127.257	P 值<0.001	P 值<0.001
时点间	F 值=24.291	P 值<0.001	P 值<0.001
组间·时点间	F 值=8.068	P 值=0.006	P 值=0.006

表4 SU 孵育不同时间对新生大鼠心室肌细胞 MMP 的影响

Table 4 Effects of sunitinib treatment on MMP in cultured NRVMs at various time points

组别	MMP		
	24 h	48 h	72 h
对照组	1.00±0.14	0.86±0.13	0.90±0.32
SU10 μmol/L	0.41±0.09	0.29±0.05	0.24±0.06
组间	F 值=81.097	P 值<0.001	P 值<0.001
时点间	F 值=1.470	P 值=0.254	P 值=0.254
组间·时点间	F 值=0.166	P 值=0.848	P 值=0.848

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

2.2 非选择性 PKC 抑制剂 Bis-1 对 SU 毒性的影响 在 NRVMs 中, Bis-1 (100 nmol/L) 和 SU (1, 5, 10 μmol/L), 孵育 48 h 检测 ATP 含量, 孵育 72 h 检测 LDH 释放量。单独孵育 Bis-1 ATP 含量和 LDH 释放量与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而加入 Bis-1 使 3 个浓度下 SU 组的 ATP 含量和 LDH 释放量均恢复到对照组水平 ($P < 0.05$), 见表 5; 单独孵育 Bis-1 对 MMP 无明显影响 ($P > 0.05$), Bis-1 与 SU 共孵育可显著逆转 SU 导致的 MMP 值下降 ($P < 0.05$), 见表 6。透射电镜扫描结果显示, SU 引发线粒体形态发生显著变化, 多数线粒体产生空泡、肿胀或髓样化改变。而共同孵育 Bis-1 的 SU 组细胞中线粒体恢复正常形态(图 2)。

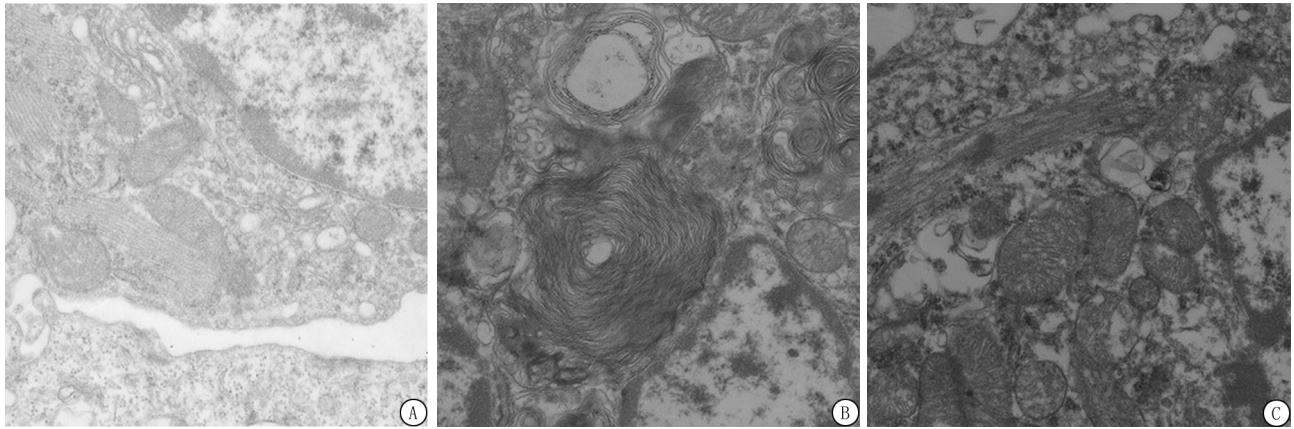


图2 PKC抑制剂改善SU诱导的心室肌细胞线粒体形态改变(×12 000)

A.对照组;B.SU组;C.SU+Bis-1组

Figure 2 PKC inhibitor in improving mitochondrial morphological changes induced by sunitinib in ventricular myocytes (×12 000)

表5 PKC抑制剂对SU诱导的心室肌细胞毒性的拮抗作用

Table 5 The antagonistic effect of PKC inhibitors on SU-induced cytotoxicity in ventricular myocytes

(n=5, x̄±s)

组别	ATP	t 值	P 值	LDH	t 值	P 值
对照组	1.00±0.04			1.00±0.09		
Bis-1 100 nmol/L 组	1.02±0.13	0.240	0.822	0.94±0.09	1.316	0.213
SU 1 μmol/L 组	1.01±0.03			0.92±0.01		
SU 1 μmol/L+Bis-1 100 nmol/L 组	1.17±0.07	1.964	0.100	0.79±0.01	0.664	0.700
SU 5 μmol/L 组	0.68±0.08			1.49±0.06		
SU 5 μmol/L+Bis-1 100 nmol/L 组	1.33±0.21	4.966	0.008	1.01±0.15	8.688	0.001
SU 10 μmol/L 组	0.30±0.07			2.51±0.20		
SU 10 μmol/L+Bis-1 100 nmol/L 组	0.95±0.07	11.379	<0.001	1.60±0.11	9.676	<0.001

2.3 选择性PKC抑制剂或抑制肽对SU毒性的影响 Rotterlin是nPKCs选择性抑制剂,单独孵育Rotterlin(500 nmol/L)组ATP含量、LDH的释放量和MMP值与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05),SU组ATP含量和MMP值低于对照组,LDH的释放量高于对照组,SU+Rotterlin组可完全对抗SU引起的上述各项指标的变化(P<0.05),见表7。在膜打孔剂Saponin(200 nmol/L)存在下,选择性PKCε抑制肽(500 nmol/L)组ATP含量、LDH的释放量和MMP值与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05),SU组ATP含量和MMP值低于对照组,LDH的释放量高于对照组,SU+PKCε+组可显著对抗SU导致的各项指标的变化(P<0.05),而其乱码肽对SU的作用无明显影响(P>0.05),见表8。

表6 PKC抑制剂减弱SU对心室肌细胞MMP的抑制

Table 6 PKC inhibitor in alleviating sunitinib's inhibition of MMP in ventricular myocytes

(n=5, x̄±s)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	1.00±0.12	0.86±0.13	0.90±0.32
Bis-1 组	0.91±0.12	0.69±0.19	0.80±0.17
组间	F 值=48.875		P 值<0.001
时点间	F 值=1.245		P 值=0.298
组间·时点间	F 值=1.748		P 值=0.134
SU 组	0.29±0.05	0.29±0.05	0.24±0.06
SU+Bis-1 组	0.77±0.02	0.94±0.10	0.71±0.07
组间	F 值=383.168		P 值<0.001
时点间	F 值=11.138		P 值=0.001
组间·时点间	F 值=5.311		P 值=0.014

表7 选择性 PKC 抑制剂 Rotterlin 对 SU 毒性的拮抗作用

Table 7 Antagonistic effect of selective PKC inhibitor Rotterlin on SU-induced toxicity

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	ATP	LDH	MMP
对照组	1.00±0.08	0.99±0.08	1.00±0.12
Rotterlin 组	0.91±0.07	1.19±0.33	0.92±0.01
SU 组	0.29±0.03*	2.51±0.20*	0.29±0.05*
SU+ Rotterlin 组	0.74±0.02 [#]	1.22±0.12 [#]	0.81±0.01 [#]
F 值	92.064	69.193	62.315
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与对照组比较 # P 值<0.05 与 SU 组比较(SNK-q 检验)

表8 PKCε 抑制肽对 SU 导致的心室肌细胞毒性的拮抗作用

Table 8 Antagonistic effect of PKCε inhibitory peptide on SU-induced toxicity in ventricular myocytes

(n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	ATP	LDH	MMP
对照组	1.00±0.05	1.01±0.03	0.98±0.09
PKCε+	1.00±0.08	0.98±0.06	0.95±0.10
PKCε-	0.95±0.04	0.94±0.06	0.87±0.02
SU	0.38±0.02*	2.21±0.07*	0.35±0.06*
SU+PKCε+	0.93±0.04 [#]	1.20±0.02 [#]	0.85±0.07 [#]
SU+PKCε-	0.44±0.05	2.35±0.11	0.52±0.07
F 值	104.925	311.253	36.281
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与对照组比较 # P 值<0.05 与 SU 组比较(SNK-q 检验)

2.4 不同剂量 CHE 对 SU 在线粒体心脏毒性的影响 给予 SU 后,小鼠心肌细胞线粒体呼吸链复合物 IV 和 V 的活性显著低于对照组,在同时给予不同剂量 CHE 后,复合物 IV 和 V 的活性均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 9。透射电镜结果

显示,在给予 SU 后,小鼠心肌细胞线粒体出现明显的脊和膜的融合,胞质轻度水肿,在同时给予不同剂量 CHE 后,各组线粒体均有不同程度恢复,其中 SU+CHE(H)组恢复最明显,嵴和膜清晰可见(图 3)。

表9 CHE 对 SU 导致小鼠心肌线粒体毒性的预防作用

Table 9 The preventive effect of CHE on myocardial mitochondrial toxicity induced by sunitinib in mice

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	线粒体复合物 IV	线粒体复合物 V
对照组	1.00±0.17	1.00±0.20
SU 组	0.59±0.05*	0.31±0.07*
SU+CHE(L)组	1.65±0.13 [#]	2.38±0.47 [#]
SU+CHE(H)组	1.76±0.09 [#]	1.65±0.05 [#]
F 值	64.350	35.200
P 值	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与对照组比较 # P 值<0.05 与 SU 组比较(SNK-q 检验)

2.5 PKC 亚型表达改变 磷酸化 PKC 代表激活的 PKC,采用 Western 检测心肌磷酸化 PKC 亚型含量。结果显示:给予 SU 后,磷酸化 PKCε 表达量显著增加($P < 0.05$),同时给予低剂量 CHE 组并未明显抑制磷酸化 PKCε 的过表达量($P > 0.05$);而同时给予高剂量的 CHE 组则明显抑制了磷酸化 PKCε 的过表达,使其恢复至对照组水平($P < 0.05$);而对于磷酸化 PKCδ、PKCα, SU、CHE 均未明显改变它们的表达量($P > 0.05$)。见表 10,图 4。以上结果显示,主要是 PKCε 亚型的明显激活参与 SU 的心脏毒性,而选择性 PKCε 抑制剂能明显预防这种心脏毒性。

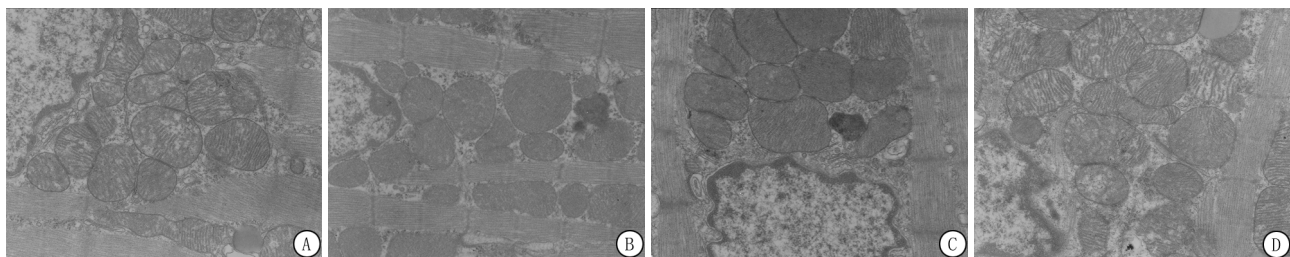


图3 CHE 改善 SU 诱导的小鼠心室肌细胞线粒体形态改变(×5 000)

A.对照组;B.SU 组;C.SU+CHE(L)组;D.SU+CHE(H)组

Figure 3 CHE in alleviating sunitinib-induced mitochondrial morphological changes in mouse ventricular myocytes(×5 000)

表 10 CHE 拮抗 SU 诱导的小鼠心肌细胞磷酸化蛋白表达的上调

Table 10 Antagonistic effect of CHE on sunitinib-induced up-regulation of phosphorylated protein expression in mouse ventricular myocytes

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-PKC ϵ	p-PKC δ	p-PKC α
对照组	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.10
SU 组	2.41 \pm 0.85 *	0.82 \pm 0.18	0.76 \pm 0.12
SU+CHE(L)组	1.92 \pm 0.13	1.03 \pm 0.27	1.10 \pm 0.17
SU+CHE(H)组	1.13 \pm 0.15 #	1.04 \pm 0.27	0.92 \pm 0.33
F 值	6.863	0.655	1.497
P 值	0.013	0.602	0.288

* P 值 < 0.05 与对照组比较 # P 值 < 0.05 与 SU 组比较 (SNK-q 检验)

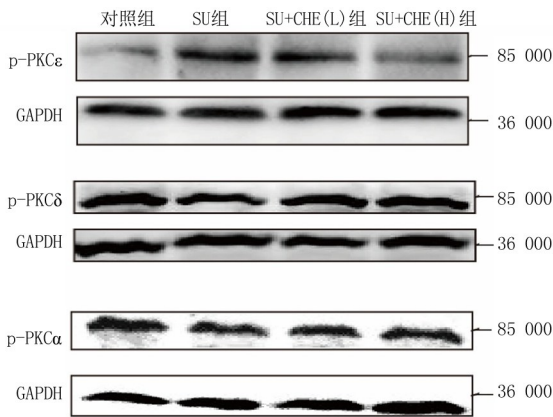


图 4 CHE 拮抗 SU 诱导的小鼠心肌细胞磷酸化蛋白表达的上调

Figure 4 Antagonistic effect of CHE on sunitinib-induced up-regulation of phosphorylated protein expression in mouse ventricular myocytes

3 讨 论

TKIs 类药物在临床中应用效果显著,使得这类药物的研发逐渐成为抗肿瘤药物研究中的热点。伊马替尼(imatinib, IM)是第一个通过 FDA 审批用于肿瘤治疗的 TKIs 类药物,其在临床前研究中并未发现心脏毒性,但在随后的临床治疗当中发现部分患者发生了心力衰竭^[13-14]。而与 IM 不同, SU 在临床前和临床研究都显示具有明确的心脏毒性^[15],因此 TKIs 类心脏毒性研究中常用 SU,本研究亦选择 SU 为研究对象。

有实验表明,在新生大鼠心肌细胞, SU、IM 使 LDH 释放增加,并具有剂量依赖性和时间依赖性;无论在高糖还是低糖水平, SU 和 IM 均会使 H9C2 细胞的 ATP 含量下降^[16]。本研究在 NRVMs 上,发现 SU 可引起 ATP 含量的下降、LDH 释放增加、MMP 下降,表明 SU 在体外细胞培养模型上产生明

显心肌细胞毒性,这些毒性作用具有浓度依赖性和时间依赖性。从 3 个指标的变化时间上看, MMP 的下降出现于 24 h,而此时, ATP 含量和 LDH 释放量并未发生明显变化,表明 MMP 的变化是最敏感,最先出现的变化,提示 SU 心肌细胞毒性的最初表现发生在线粒体。

目前引起上述线粒体损伤的分子机制尚不清楚,在早期的一项实验中, IM 可使小鼠心肌细胞 PKC δ 的含量明显升高,提示了 PKC 信号通路参与细胞毒性的可能,然而, PKC δ 的抑制肽,或者是两种非选择性抑制剂 GF 109203X 和 Go 6983^[17-18], 都未能阻止细胞色素 C 的释放和维持细胞膜完整性,提示 PKC 信号通路似乎并未参与早期的毒性事件。本研究结果表明,非选择性 PKC 抑制剂能够显著对抗 SU 导致的心肌细胞毒性, ATP 含量、LDH 释放量、MMP 均能恢复接近对照组,共同孵育 Bis-1 的 SU 组细胞中线粒体均能恢复正常形态。进一步对各亚型选择性 PKC 抑制剂或抑制肽的作用观察发现, nPKCs 的抑制剂或抑制肽可显著预防 SU 的心肌细胞毒性。很显然,本研究结果不同于以往的实验报道。实验结果不同的原因尚不清楚,除实验系统和动物种属的差别外,所用药物及抑制剂浓度的不同亦可能是造成差别的原因。

SU 是一种多靶点的 TKI 类药物^[19], 可被其抑制的靶点至少有 50 种,不仅包括激酶,还有其他也在细胞内信号转导中发挥重要作用的物质。研究这些作用的分子机制,期望阻断心肌中这些信号通路既能不影响其抗肿瘤活性又能抑制其心脏毒性^[20]。在各类已知的激酶中,除了酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TK)以外, PKC 是另一大类具有重要功能的激酶^[21]。PKC 作为细胞内重要的信号分子,参与了多种体内生物学信号转导的生理过程和多种疾病的发生发展^[22]。对于心脏来说,更是介导了多种心脏疾病,在心肌肥厚型心力衰竭发展过程中发现有 PKC 异常激活^[23]。有报道^[24]显示, IM 能导致 nPKC 中 PKC δ 蛋白表达的显著上调。那么 TKIs 类药物有可能由于抑制了 TK 而导致 PKC 异常激活,并由此介导了心脏毒性。本研究也显示了 nPKCs 抑制剂可有效预防 SU 导致的心脏毒性。为进一步说明此保护作用是否是通过 PKC 来完成,本研究检测了磷酸化的 PKC α 、PKC δ 和 PKC ϵ 蛋白的表达情况,结果显示, SU 只引起了磷酸化的 PKC ϵ 蛋白的异常增多,提示 SU 心脏毒性只与 nPKCs 亚型当中的 PKC ϵ 异常激活有关。而 PKC δ 磷酸化水平并未明显改变,可能与种属差异和心脏

发育的阶段有关^[25]。

综上所述,PKC 的过度激活可能参与了 SU 导致的线粒体损伤,而 nPKC 亚型抑制剂对 SU 导致的心肌细胞毒性有抑制作用,深入研究 PKC 信号通路在此类药物引发心肌细胞毒性中的作用及分子机制,对将来的药物开发应用、避免心脏毒性,具有重要意义。

[参考文献]

[1] Cohen P, Cross D, Jänne PA. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(7): 551-569.

[2] Bolzacchini E, Pinotti G, Bertù L, et al. On-target toxicities predictive of survival in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) treated with sunitinib: a multicenter retrospective study [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2020, 18(2): e145-e156.

[3] Gündoğan C, Erol Ö, Beyhan E, et al. Findings of congestive heart failure associated with sunitinib cardiotoxicity in 18F-FDG PET/CT [J]. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol (Engl Ed)*, 2022, 41(3): 197-198.

[4] Ghafary I, Kim C-K, Roth E, et al. The association of QTc prolongation with cardiovascular events in cancer patients taking tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [J]. *Cardio Oncology*, 2023, 9(1): 25.

[5] Liu Y, Chen C, Rong C, et al. Anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitor-associated cardiotoxicity: a recent five-year pharmacovigilance study [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 858279.

[6] O'farrell AC, Miller IS, Evans R, et al. Implementing reverse phase protein array profiling as a sensitive method for the early pre-clinical detection of off-target toxicities associated with sunitinib malate [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2019, 13(4): 1800159.

[7] Scott SS, Greenlee AN, Matzko A, et al. Intracellular signaling pathways mediating tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity [J]. *Heart Fail Clin*, 2022, 18(3): 425-442.

[8] Force T, Krause DS, Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(5): 332-344.

[9] Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, et al. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 952-960.

[10] Kikkawa U. The story of PKC: A discovery marked by unexpected twists and turns [J]. *IUBMB Life*, 2018, 71(6): 697-705.

[11] Chen L, Shi D, Guo M. The roles of PKC- δ and PKC- ϵ in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Pharmacolo Res*, 2021, 170: 105716.

[12] Black JD, Affandi T, Black AR, et al. PKC α and PKC δ : friends and rivals [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(8): 102194.

[13] Chiba K, Kambayashi R, Onozato M, et al. Imatinib induces

diastolic dysfunction and ventricular early-repolarization delay in the halothane-anesthetized dogs: Class effects of tyrosine kinase inhibitors [J]. *J Pharmacol Sci*, 2022, 150(3): 154-162.

[14] Nunes RaB, Neves PDMDM, Da Costa LMA, et al. Five-year cardiovascular outcomes in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, dasatinib, or nilotinib: A cohort study using data from a large multinational collaborative network [J]. *Fron Cardiovasc Med*, 2023, 10: 888366.

[15] McMullen CJ, Chalmers S, Wood R, et al. Sunitinib and imatinib display differential cardiotoxicity in adult rat cardiac fibroblasts that involves a role for calcium/calmodulin dependent protein kinase II [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 7: 630480.

[16] Will Y, Dykens JA, Nadanaciva S, et al. Effect of the multitargeted tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, sunitinib, and sorafenib on mitochondrial function in isolated rat heart mitochondria and H9c2 cells [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 106(1): 153-161.

[17] Radaszkiewicz KA, Beckerová D, Woloszczuková L, et al. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate increases cardiomyogenesis through PKC/ERK signaling [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15922.

[18] Gram A, Kowalewski MP. Molecular mechanisms of lipopolysaccharide (LPS) induced inflammation in an immortalized ovine luteal endothelial cell line (OLENDO) [J]. *Vet Sci*, 2022, 9(3): 99.

[19] Ferrari SM, Centanni M, Virili C, et al. Sunitinib in the treatment of thyroid cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(6): 963-972.

[20] Grabowska ME, Chun B, Moya R, et al. Computational model of cardiomyocyte apoptosis identifies mechanisms of tyrosine kinase inhibitor-induced cardiotoxicity [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 155: 66-77.

[21] Silnitsky S, Rubin SJS, Zerihun M, et al. An update on protein kinases as therapeutic targets-part i: protein kinase c activation and its role in cancer and cardiovascular diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17600.

[22] Antal Corina E, Newton Alexandra C. Tuning the signalling output of protein kinase C [J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(6): 1477-1483.

[23] Gada KD, Logothetis DE. PKC regulation of ion channels: The involvement of PIP2 [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(6): 102035.

[24] Kurosu T, Tsuji K, Kida A, et al. Rottlerin synergistically enhances imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells through its mitochondrial uncoupling effect independent of protein kinase C- δ [J]. *Oncogene*, 2006, 26(21): 2975-2987.

[25] Goldberg M, Steinberg SF. Tissue-specific developmental regulation of protein kinase C isoforms [J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, 51(8): 1089-1093.