

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1339-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240518

姜黄素通过调控SIRT3/SOD2信号通路对阿霉素引起心肌细胞毒性的减轻作用

熊凤梅¹, 蔡玉香², 刘卓¹, 孙娜³, 李洋¹

(1. 陕西省西安市儿童医院药剂科, 陕西 西安 710003; 2. 陕西省西安市儿童医院急诊科, 陕西 西安 710003; 3. 西安医学院基础部基础医学研究所, 陕西 西安 710021)

[摘要] **目的:** 探讨姜黄素改善阿霉素(DOX)诱导的心肌H9c2细胞毒性的作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 采用DOX处理H9c2细胞建立心肌细胞毒性模型。将H9c2细胞分为正常组、DOX组、DOX+姜黄素组和DOX+姜黄素+沉默信息调节蛋白3(SIRT3)抑制剂3-TYP+DOX组(DOX+姜黄素+3-TYP组)。24 h后观察各组细胞形态表现, CCK-8法检测各组细胞活性, TUNEL染色检测各组细胞凋亡率, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组细胞中过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)水平, 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)染色检测各组细胞中活性氧(ROS)水平, Western blotting法检测各组细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶2(NOX2)、NADPH氧化酶4(NOX4)、SIRT3、乙酰化超氧化物歧化酶2(Ac-SOD2)和超氧化物歧化酶2(SOD2)蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, DOX组H9c2细胞肿胀, 细胞活性降低($P<0.05$), 细胞中CAT和SOD活性降低($P<0.05$), MDA和ROS水平升高($P<0.05$), NOX2和NOX4蛋白表达水平升高($P<0.05$), Bcl-2/Bax比值和SIRT3蛋白表达水平降低($P<0.05$), SOD和Ac-SOD2蛋白表达水平升高($P<0.05$); 与DOX组比较, DOX+姜黄素组H9c2细胞形态改善, 细胞活性升高($P<0.05$), 细胞中CAT和SOD活性升高($P<0.05$), MDA和ROS水平降低($P<0.05$), NOX2和NOX4蛋白表达水平降低($P<0.05$), Bcl-2/Bax比值和SIRT3蛋白表达水平升高($P<0.05$), SOD2和Ac-SOD2蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与DOX+姜黄素组比较, DOX+姜黄素+3-TYP组细胞肿胀, 细胞密度和细胞活性明显降低($P<0.05$), 细胞凋亡率明显升高($P<0.05$), 细胞中CAT和SOD活性降低($P<0.05$), MDA水平和ROS水平明显升高($P<0.05$), NOX2和NOX4蛋白表达水平升高($P<0.05$), Bcl-2/Bax比值和SIRT3蛋白表达水平降低($P<0.05$), SOD2和Ac-SOD2蛋白表达水平升高($P<0.05$)。**结论:** 姜黄素通过激活SIRT3/SOD2信号抑制氧化应激和细胞凋亡, 改善细胞活性, 减轻DOX引起的心肌H9c2细胞毒性。

[关键词] 姜黄素; 阿霉素; 沉默信息调节蛋白; 氧化应激; 心肌毒性

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

Alleviatory effect of curcumin on cardiomyocyte toxicity induced by doxorubicin by regulating SIRT3/SOD2 signaling pathway

XIONG Fengmei¹, CAI Yuxiang², LIU Zhuo¹, SUN Na³, LI Yang¹

(1. Department of Pharmacy, Children's Hospital, Xi'an City, Shaanxi Province, Xi'an 710003, China;

2. Department of Emergency, Children's Hospital, Xi'an City, Shaanxi Province, Xi'an 710003, China;

[收稿日期] 2023-09-19

[基金项目] 陕西省科技厅重点研发计划项目(2023-YBSF-530); 陕西省西安市儿童医院院级课题资助项目(2020C01)

[作者简介] 熊凤梅(1979-), 女, 河北省沧州市人, 医学硕士, 主要从事药品不良反应方面的研究。

[通信作者] 蔡玉香, 副主任医师(E-mail: 53177288@qq.com)

3. Institute of Basic Medicine, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of curcumin on ameliorating doxorubicin (DOX)-induced cytotoxicity in the H9c2 cardiomyocytes, and to clarify its mechanism. **Methods:** The H9c2 cardiomyocytes were treated with DOX to establish the cardiotoxicity model. The H9c2 cells were divided into normal group, DOX group, DOX+curcumin group, and DOX+curcumin+silent information regulator 3 (SIRT3) inhibitor-3 (3-TYP) group. After 24 h, the morphology of the cells in various groups were observed; CCK-8 method was used to detect the viabilities of the cells in various groups; TUNEL staining was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and the levels of malondialdehyde (MDA) in the cells in various groups; 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) staining was used to detect the levels of reactive oxygen species (ROS) in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2 (NOX2), NADPH oxidase 4 (NOX4), SIRT3, acetylated superoxide dismutase 2 (Ac-SOD2), and superoxide dismutase 2 (SOD2) proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with normal group, the H9c2 cells in DOX group exhibited swelling, the activity of the cells was decreased ($P < 0.05$), the CAT and SOD activities were decreased ($P < 0.05$), the MDA and ROS levels were increased ($P < 0.05$), the expression levels of NOX2, and NOX4 proteins were increased ($P < 0.05$), the ratio of Bcl-2/Bax and the expression level of SIRT3 protein were decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of SOD2 and Ac-SOD2 proteins were increased ($P < 0.05$). Compared with DOX group, the H9c2 cells in DOX+curcumin group showed improved morphology, the activity of the cells was increased ($P < 0.05$), the CAT and SOD activities were increased ($P < 0.05$), the MDA and ROS levels were decreased ($P < 0.05$), the expression levels of NOX2, and NOX4 proteins were decreased ($P < 0.05$), the ratio of Bcl-2/Bax and the expression level of SIRT3 protein were increased ($P < 0.05$), and the expression levels of SOD2 and Ac-SOD2 proteins were decreased ($P < 0.05$). Compared with DOX+curcumin group, the cells in DOX+curcumin+3-TYP group exhibited swelling, the activity of the cells was decreased ($P < 0.05$), the apoptotic rate of the cells was significantly increased ($P < 0.05$), the CAT and SOD activities were decreased ($P < 0.05$), the MDA and ROS levels were significantly increased ($P < 0.05$), the expression levels of NOX2 and NOX4 proteins were increased ($P < 0.05$), the ratio of Bcl-2/Bax and the expression level of SIRT3 protein were decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of SOD2 and Ac-SOD2 proteins were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Curcumin suppresses the oxidative stress and apoptosis by activating the SIRT3/SOD2 signaling pathway, improving the cell activity and alleviating the DOX-induced cytotoxicity in the H9c2 cells.

KEYWORDS Curcumin; Doxorubicin; Silent information regulator 3; Oxidative stress; Cardiotoxicity

作为一种蒽环类抗生素药,阿霉素(doxorubicin, DOX)是有效的临床一线广谱抗癌药物,常用于治疗血液系统和实体恶性肿瘤,如白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金瘤、乳腺癌和骨肉瘤等^[1-2]。尽管DOX能有效抑制肿瘤的进展,但其时间和剂量依赖的不良反应特别是严重的心脏毒性,会导致扩张型心肌病和心力衰竭^[3-4]。DNA拓扑异构酶损伤、活性氧(reactive oxygen species,

ROS)堆积、氧化应激、线粒体功能损伤和细胞凋亡等因素是DOX引起心脏毒性的重要病理机制^[5-7]。然而,DOX引起心脏毒性的临床防治手段却十分有限,除右雷佐生外,缺乏其他潜在的有效药物^[8]。因此探讨新的临床防治DOX引起心脏毒性的靶向药物成为研究的热点。

姜黄素是从姜科植物根茎中提取的一种重要的生物活性成分,在一些国家已经作为临床上广泛应

用的一类传统中药, 用于防治多种疾病^[9-10]。研究^[11-12]显示: 姜黄素在调节细胞生长、增殖和存活中发挥重要作用, 具有抗炎症和氧化应激等多种药理学作用。姜黄素通过核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 抑制 ROS 的产生, 抑制 DOX 诱导的心肌细胞凋亡^[13]; 姜黄素能够通过增强抗氧化酶的活性, 进而降低炎症反应和细胞凋亡^[14-15]。然而, 姜黄素能否通过调控沉默信息调节蛋白 3/超氧化物歧化酶 2 (silent information regulator 3/superoxide dismutase 2, SIRT3/SOD2) 信号通路改善 DOX 心脏毒性尚未见报道。本研究采用心肌 H9c2 细胞探讨姜黄素能否通过调控 SIRT3/SOD2 信号引起的炎症反应和细胞凋亡减轻 DOX 诱导的心肌毒性。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 H9c2 心肌细胞系购于美国 ScienCell 公司。DOX、二甲基亚砜和姜黄素购于美国 Sigma 公司, 二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 蛋白定量试剂盒、细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 细胞活力检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (2, 7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 和放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液购于广州碧云天生物技术有限公司, SIRT3 抑制剂 3-TYP 购于美国 Selleck 公司, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 染色试剂盒购于美国 Roche 公司, 抗 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2)、NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4)、SIRT3、乙酰化超氧化物歧化酶 2 (acetylated superoxide dismutase 2, Ac-SOD2) 和超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2) 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购于武汉三鹰生物技术有限公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 二抗购买于北京中杉金桥生物技术有限

公司。细胞超净台、细胞培养箱和酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 光学显微镜购自日本 Nikon 公司, Bio-Rad 化学显像发光仪购自美国 Bio-Rad 公司, 激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 细胞培养和实验分组 在 37 °C 恒温 CO₂ 培养箱中, 采用含 10% 胎牛血清的杜氏改良 Eagle (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 培养基培养心肌 H9c2 细胞, 当细胞密度达到约 90% 时, 将细胞分为 4 组: 正常组, 采用正常培养基培养细胞 24 h; DOX 组, 采用含 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 的培养基处理细胞 24 h, 建立心肌细胞毒性模型; DOX+姜黄素组, 采用含 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素和 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 的培养基共同处理细胞 24 h; DOX+姜黄素+3-TYP 组, 采用含 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-TYP 和 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 的培养基共同处理细胞 24 h。采用二甲基亚砜将姜黄素溶解并配置成 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 再采用培养基稀释至 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据文献 [16-18] 确定 DOX、姜黄素和 3-TYP 的实验浓度。

1.3 光学显微镜观察各组细胞形态表现和 CCK-8 法检测各组 H9c2 细胞活性 先将 H9c2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 当细胞密度达约 90% 时, 按照“1.2”中实验分组方法给予各组细胞相应处理后, 采用光学显微镜观察各组细胞形态表现, 再向各处理孔中分别加入 10 μL CCK-8 反应液, 并在空白孔加入培养基和反应液作为空白组, 细胞培养箱中避光孵育 2 h, 将酶标仪波长设置为 450 nm, 检测各组吸光度 (A) 值, 并按照说明书计算各组细胞活性。细胞活性 = (处理组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) \times 100%。

1.4 TUNEL 染色检测各组细胞凋亡率 按照“1.2”中实验分组给予各组细胞相应处理后, 弃用培养基并采用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 漂洗。采用 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 1 h, 采用 0.1% Triton X-100 打孔 30 min, PBS 缓冲液漂洗, 将 TUNEL 染色试剂与各组细胞置于 37 °C 避光孵育 30 min, PBS 缓冲液漂洗, 再采用 4, 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4, 6-diamidin-2-phenylindole, DAPI) 染液与各组细胞 37 °C 避光孵育 10 min, PBS 缓冲液漂洗。在避光环境中采用激光共聚焦显微镜随机拍照, 保存图像, 并计算各组细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 绿色荧光细胞数 / 总

细胞数 $\times 100\%$ 。

1.5 试剂盒检测各组细胞中过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平 按照“1.2”中分组处理后,弃用培养基并采用PBS缓冲液漂洗。收集各组细胞并采用超声破碎。4℃、2 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心10 min,取上清-80℃冻存备用。严格按照各试剂盒的要求检测各组上清中CAT和SOD活性及MDA水平。

1.6 DCFH-DA 荧光探针检测各组细胞中 ROS 水平 按照“1.2”中分组处理后,将培养基替换为含10 μ mol \cdot L $^{-1}$ DCFH-DA的培养基,并在培养箱中避光孵育20 min,然后在暗室中采用激光共聚焦显微镜随机拍照,保存图像,采用Image J软件分析各组细胞中平均荧光强度,以平均荧光强度表示细胞中ROS水平。

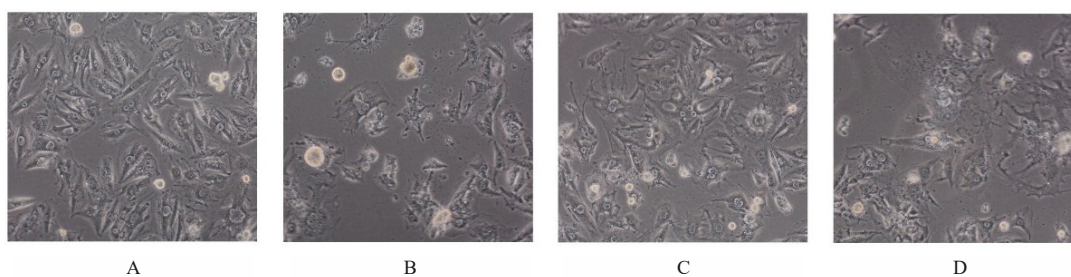
1.7 Western blotting 法检测各组细胞中目的蛋白表达水平 各组细胞进行处理后,弃用培养基并采用PBS缓冲液漂洗,再采用RIPA裂解液提取细胞蛋白,BCA法进行蛋白定量,采用10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白样品,采用恒压湿转法进行转膜。采用含有5%脱脂奶粉的含吐温-20三乙醇胺缓冲液(tris buffered saline with Tween 20, TBST)室温封闭2 h,将相应目的条带切下并置入抗Bcl-2、Bax、NOX2、NOX4、SIRT3、Ac-SOD2、

SOD2和抗GAPDH抗体中4℃过夜。TBST洗膜3次,室温下用含辣根过氧化物酶的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗孵育2 h。再采用TBST洗膜3次,增强化学发光法曝光条带,采用Image Lab软件检测各组细胞中目的蛋白条带和相应GAPDH条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值。

1.8 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.3.0统计软件进行统计学分析和绘图。各组细胞活性、细胞凋亡率、细胞中ROS水平、CAT和SOD活性、MDA水平及Bcl-2、Bax、NOX2、NOX4、SIRT3、Ac-SOD2和SOD2蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数采用单因素方差比较分析,组间样本均数两两比较采用Tukey检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞形态表现和细胞活性 与对照组比较,DOX组细胞肿胀明显,密度明显降低,细胞活性明显降低($P<0.05$);与DOX组比较,DOX+姜黄素组细胞肿胀减轻,细胞密度和细胞活性明显升高($P<0.05$);与DOX+姜黄素组比较,DOX+姜黄素+3-TYP组细胞肿胀,细胞密度降低,细胞活性明显降低($P<0.05$)。见图1和2。



A: Control group; B: DOX group; C: DOX+curcumin group; D: DOX+curcumin+3-TYP group.

图1 各组细胞形态表现($\times 200$)

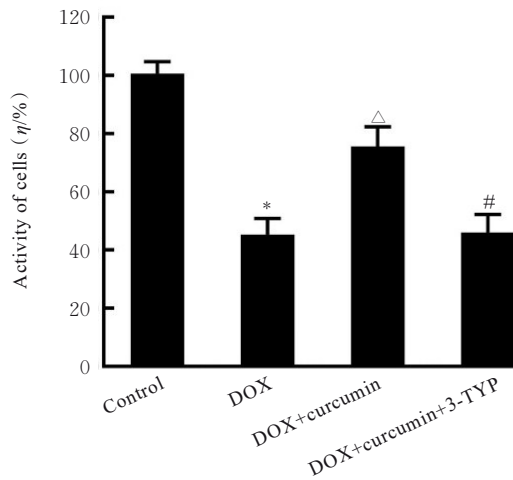
Fig. 1 Morphology of cells in various groups($\times 200$)

2.2 各组细胞凋亡率 与对照组比较,DOX组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);与DOX组比较,DOX+姜黄素组细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);与DOX+姜黄素组比较,DOX+姜黄素+3-TYP组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$)。见图3和4。

2.3 各组细胞中CAT和SOD活性及MDA水平 与对照组比较,DOX组细胞中CAT和SOD活

性降低($P<0.05$),MDA水平升高($P<0.05$);与DOX组比较,DOX+姜黄素组细胞中CAT和SOD活性升高($P<0.05$),MDA水平降低($P<0.05$);与DOX+姜黄素组比较,DOX+姜黄素+3-TYP组细胞中CAT和SOD活性降低($P<0.05$),MDA水平升高($P<0.05$)。见图5。

2.4 各组细胞中ROS水平 与对照组(11.37 \pm



* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs DOX group; # $P < 0.05$ vs DOX+curcumin group.

图2 各组细胞活性

Fig. 2 Activities of cells in various groups

1.24) 比较, DOX 组细胞中 ROS 水平 (48.56 ± 4.38) 明显升高 ($P < 0.05$); 与 DOX 组比较,

DOX+姜黄素组细胞中 ROS 水平 (17.16 ± 2.46) 明显降低 ($P < 0.05$); 与 DOX+姜黄素组比较, DOX+姜黄素+3-TYP 组细胞中 ROS 水平 (46.81 ± 5.69) 明显升高 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.5 各组细胞中 Bcl-2/Bax 比值 与对照组比较, DOX 组细胞中 Bcl-2/Bax 比值明显降低 ($P < 0.05$); 与 DOX 组比较, DOX+姜黄素组细胞中 Bcl-2/Bax 比值明显升高 ($P < 0.05$); 与 DOX+姜黄素组比较, DOX+姜黄素+3-TYP 组细胞中 Bcl-2/Bax 比值明显降低 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.6 各组细胞中 NOX2 和 NOX4 蛋白表达水平

与对照组比较, DOX 组细胞中 NOX2 和 NOX4 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 DOX 组比较, DOX+姜黄素组细胞中 NOX2 和 NOX4 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 DOX+姜黄素组比较, DOX+姜黄素+3-TYP 组细胞中 NOX2 和 NOX4 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 8。

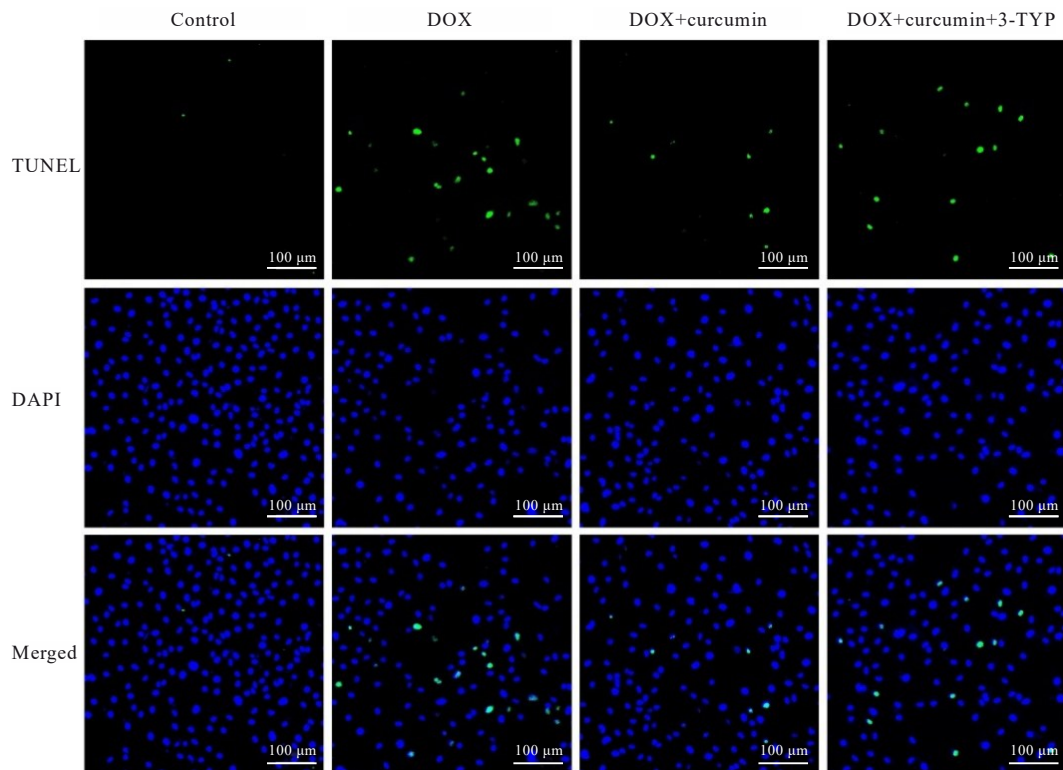
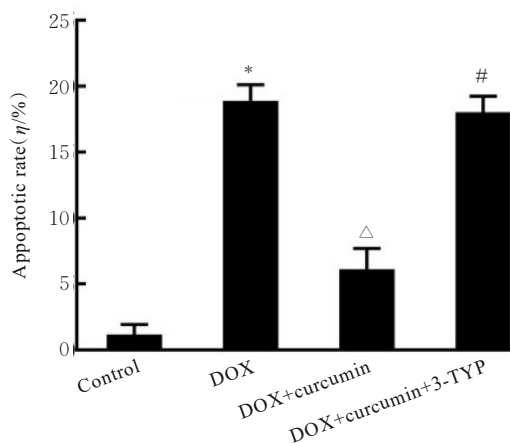


图3 各组细胞凋亡形态表现

Fig. 3 Apoptotic morphology of cells in various groups

2.7 各组细胞中 SIRT3、Ac-SOD2 和 SOD2 蛋白表达水平 各组细胞中 SOD2 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与对照组比较,

DOX 组细胞中 SIRT3 蛋白表达水平降低 ($P > 0.05$), Ac-SOD2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 DOX 组比较, DOX+姜黄素组细胞中 SIRT3 蛋白表达水



* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs DOX group; # $P < 0.05$ vs DOX+curcumin group.

图4 各组细胞凋亡率

Fig. 4 Apoptotic rates of cells in various groups

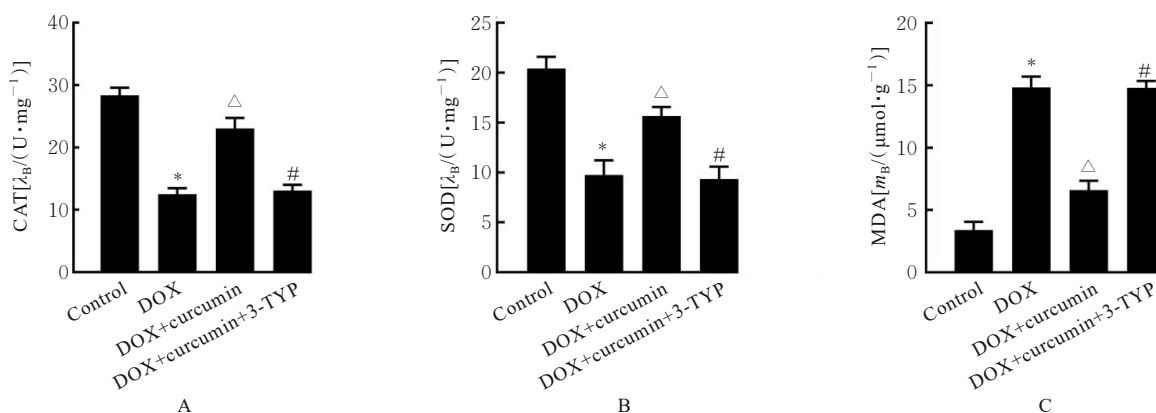
平升高 ($P < 0.05$), Ac-SOD2蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与DOX+姜黄素组比较, DOX+姜黄素+3-TYP组细胞中SIRT3蛋白表达水平降低

($P < 0.05$), Ac-SOD2蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图9。

3 讨论

随着癌症患者的增多, DOX已经被广泛用于治疗各类肿瘤, 但DOX的严重不良反应限制了其临床应用, 尤其是时间和剂量依赖的心脏毒性, 对心脏结构和功能造成严重损伤, 甚至会导致心力衰竭^[3, 19]。DOX导致心脏毒性的具体机制尚未完全阐明, 也缺乏有效的临床防治药物。因此, 进一步探讨DOX导致心脏毒性的病理机制和潜在的靶向治疗药物是目前研究的重点。本研究结果显示: 多酚类化合物姜黄素通过抑制细胞凋亡和氧化应激减轻DOX导致的心肌毒性; 同时, 应用SIRT3抑制剂3-TYP可阻断姜黄素的保护作用, 说明姜黄素可通过SIRT3信号通路改善DOX导致的心脏毒性。

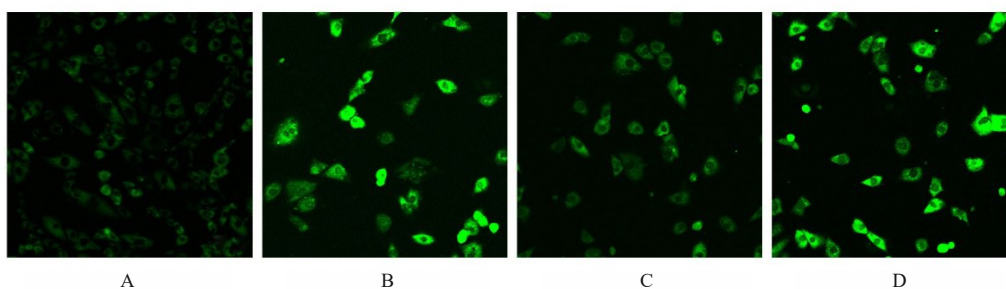
DOX能引起心肌细胞损伤甚至细胞死亡, 而心肌细胞作为一种几乎无分裂能力的终末分化细



* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs DOX group; # $P < 0.05$ vs DOX+curcumin group.

图5 各组细胞中CAT(A)和SOD(B)活性及MDA(C)水平

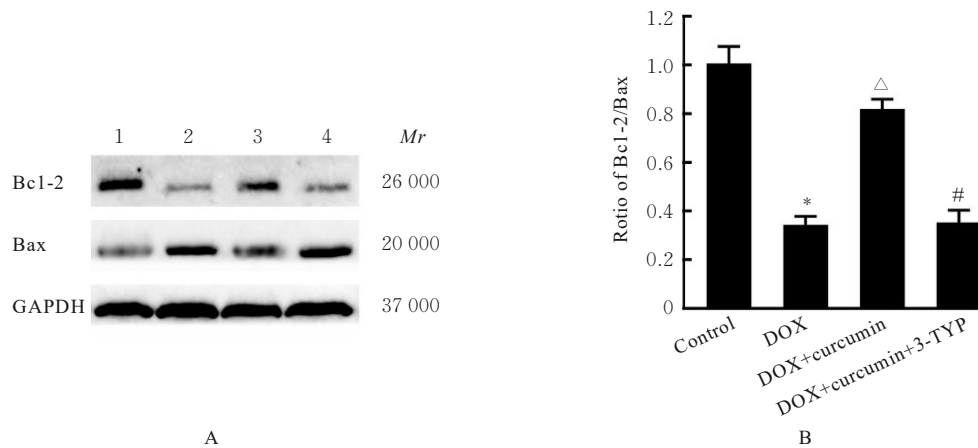
Fig. 5 Activities of CAT(A) and SOD(B), and levels of MDA(C) in cells in various groups



A: Control group; B: DOX group; C: DOX+curcumin group; D: DOX+curcumin+3-TYP group.

图6 DCFH-DA荧光探针染色检测各组细胞中ROS水平($\times 100$)

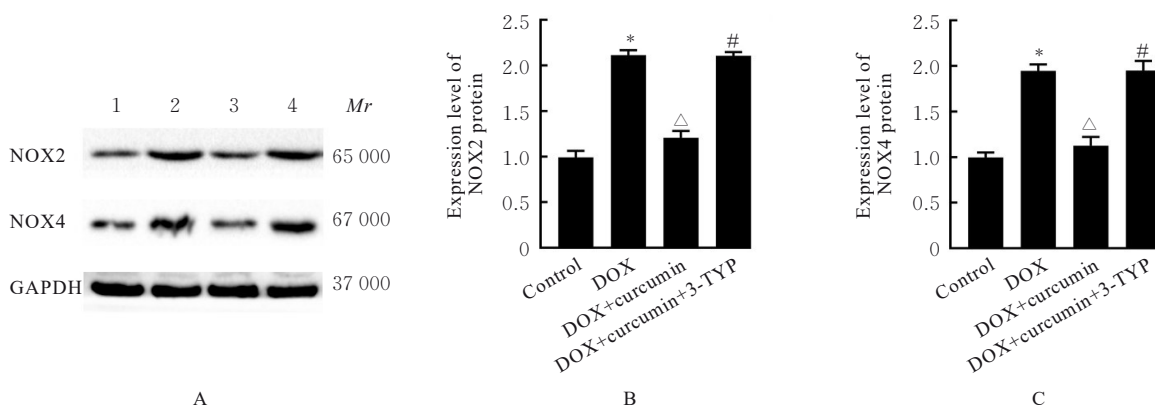
Fig. 6 Levels of ROS in cells in various groups detected by DCFH-DA fluorescence probe staining ($\times 100$)



Lane 1: Control group; Lane 2: DOX group; Lane 3: DOX+curcumin group; Lane 4: DOX+curcumin+3-TYP group. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs DOX group; # $P < 0.05$ vs DOX+curcumin group.

图7 各组细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达电泳图(A)和 Bcl-2/Bax 比值直条图(B)

Fig. 7 Electrophoregram (A) of expressions of Bcl-2 and Bax proteins and histogram (B) of ratios of Bcl-2/Bax in cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: DOX group; Lane 3: DOX+curcumin group; Lane 4: DOX+curcumin+3-TYP group. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs DOX group; # $P < 0.05$ vs DOX+curcumin group.

图8 各组细胞中 NOX2 和 NOX4 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B, C)

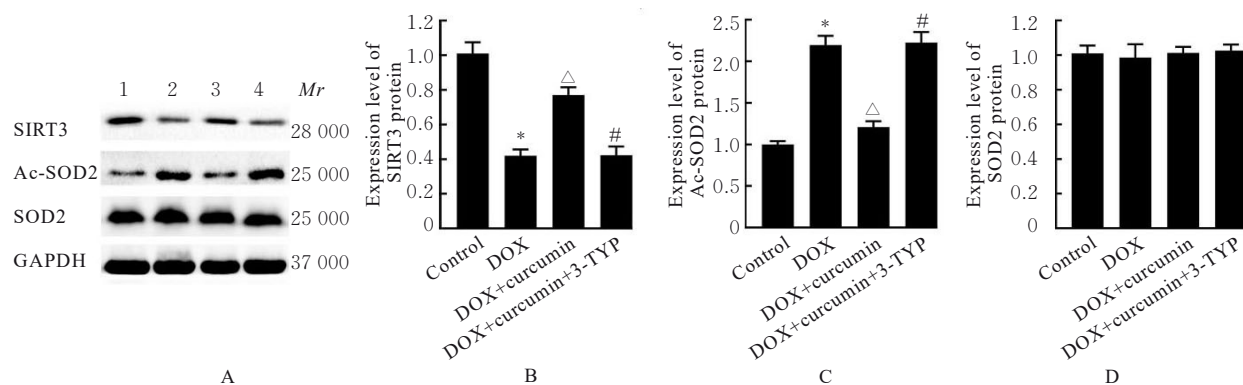
Fig. 8 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of NOX2 and NOX4 proteins in cells in various groups.

胞, 细胞死亡特别是细胞凋亡导致的心肌细胞数量减少是一个不可逆过程^[20], 也是 DOX 诱发心脏毒性的重要原因之一。本研究结果显示: DOX 组 H9c2 细胞活性降低, 细胞形态明显肿胀; 细胞中 Bax 蛋白表达水平和细胞凋亡率升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低; 同时, 姜黄素能改善细胞活力和形态, 降低 Bax 蛋白表达水平和细胞凋亡率, 上调 Bcl-2 蛋白表达水平, 说明姜黄素能抑制 DOX 引起的细胞凋亡; 然而, SIRT3 抑制剂 3-TYP 可逆转姜黄素对 H9c2 细胞损伤和凋亡的改善作用, 说明姜黄素抑制 DOX 诱发细胞损伤和凋亡的作用依赖于 SIRT3 信号。

氧化应激是 DOX 诱导心脏毒性的重要病理机

制之一。氧化应激时氧化剂如 ROS 和活性氮生成增多, 抗氧化剂如 CAT 和 SOD 活性抑制之间的平衡失调是导致氧化应激的主要原因^[21]。NOX2 和 NOX4 是 NOXs 家族在心脏中表达最丰富的 2 个亚型, 且在 DOX 引起的 ROS 累积中发挥作用^[6]。本研究结果显示: DOX 抑制 H9c2 细胞中 CAT 和 SOD 活性, 升高 MDA 水平、NOX2 和 NOX4 蛋白表达水平以及 ROS 水平; 姜黄素能上调 CAT 和 SOD 活性, 降低 MDA 水平、NOX2 和 NOX4 蛋白表达水平以及 ROS 水平; 而 3-TYP 可逆转姜黄素的保护作用, 说明 SIRT3 信号在姜黄素抑制 DOX 引起的氧化应激损伤中发挥重要作用。

SIRT3 是一种分布于线粒体中的去乙酰化酶,



Lane 1: Control group; Lane 2: DOX group; Lane 3: DOX+curcumin group; Lane 4: DOX+curcumin+3-TYP group. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs DOX group; # $P < 0.05$ vs DOX+curcumin group.

图9 各组细胞中SIRT3、Ac-SOD2和SOD2蛋白表达电泳图(A)和直条图(B~D)

Fig. 9 Electrophoregram (A) and histograms (B~D) of expressions of SIRT3, AC-SOD2, and SOD2 proteins in cells in various groups

与细胞中多种生理病理过程有关,如衰老、能量代谢、细胞凋亡、应激和炎症反应等,并在维持线粒体功能中发挥作用,是调控线粒体内蛋白质乙酰化的关键去乙酰化酶^[22]。此外,SIRT3在防止心肌细胞应激、抑制心肌肥大、保护心肌细胞免受衰老和氧化应激的影响中发挥重要作用^[23]。SOD2是一类重要的抗氧化酶,可清除线粒体中产生的自由基,将这些自由基转化为过氧化氢,并在CAT或谷胱甘肽过氧化物酶的作用下转化为水,然而SOD2发生乙酰化会导致活性降低继而抑制其发挥抗氧化应激的作用^[24-25]。本研究结果显示:DOX导致SIRT3表达降低,其底物Ac-SOD2表达水平升高;姜黄素上调SIRT3表达水平,降低Ac-SOD2表达水平;而3-TYP可逆转姜黄素对SIRT3和Ac-SOD2的调控作用,说明SIRT3信号在姜黄素改善DOX引起的心肌毒性中发挥重要作用。

综上所述,姜黄素可通过抑制细胞凋亡和氧化应激减轻DOX引起的心肌毒性,姜黄素的心肌保护作用与激活SIRT3/SOD2信号有关。本研究为阐明姜黄素减轻抗肿瘤药物DOX引起的心脏毒性提供了实验依据,并为姜黄素作为临床中抗肿瘤药物的研究提供了依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

熊凤梅、孙娜和李洋参与研究的整体设计、数据的获取和论文撰写,蔡玉香和刘卓参与数据分析、论文修改和论文审校。

[参考文献]

- [1] CURIGLIANO G, CARDINALE D, DENT S, et al. Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 309-325.
- [2] HUANG J Q, WU R D, CHEN L Y, et al. Understanding anthracycline cardiotoxicity from mitochondrial aspect [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 811406.
- [3] ZHANG S, LIU X B, BAWA-KHALFE T, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Nat Med, 2012, 18(11): 1639-1642.
- [4] CHEN S, CHEN J W, DU W T, et al. PDE10A inactivation prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity and tumor growth [J]. Circ Res, 2023, 133(2): 138-157.
- [5] RAWAT P S, JAISWAL A, KHURANA A, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management [J]. Biomedecine Pharmacother, 2021, 139: 111708.
- [6] KONG C Y, GUO Z, SONG P, et al. Underlying the mechanisms of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity: oxidative stress and cell death [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2): 760-770.
- [7] SANGWENI N F, GABUZA K, HUISAMEN B, et al. Molecular insights into the pathophysiology of doxorubicin-induced cardiotoxicity: a graphical representation [J]. Arch Toxicol, 2022, 96(6): 1541-1550.
- [8] DING M G, SHI R, FU F, et al. Paeonol protects

- against doxorubicin-induced cardiotoxicity by promoting Mfn2-mediated mitochondrial fusion through activating the PKC ϵ -Stat3 pathway [J]. *J Adv Res*, 2023, 47: 151-162.
- [9] HEIDARI H, BAGHERNIYA M, MAJEED M, et al. Curcumin-piperine co-supplementation and human health: a comprehensive review of preclinical and clinical studies [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(4): 1462-1487.
- [10] PANKNIN T M, HOWE C L, HAUER M, et al. Curcumin supplementation and human disease: a scoping review of clinical trials [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4476.
- [11] ASHRAFIZADEH M, AHMADI Z, MOHAMMADINEJAD R, et al. Curcumin activates the Nrf2 pathway and induces cellular protection against oxidative injury [J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20(2): 116-133.
- [12] PENG Y, AO M Y, DONG B H, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in the inflammatory diseases: status, limitations and countermeasures [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4503-4525.
- [13] IBRAHIM FOUAD G, AHMED K A. Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity via suppressing oxidative stress and modulating iNOS, NF- κ B, and TNF- α in rats [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(2): 152-166.
- [14] BENZER F, KANDEMIR F M, KUCUKLER S, et al. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2018, 124(5): 448-457.
- [15] HU P, LI K Q, PENG X X, et al. Curcumin derived from medicinal homologous foods: its main signals in immunoregulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1233652.
- [16] ZHANG T, ZHANG Y, CUI M Y, et al. CaMK II is a RIP3 substrate mediating ischemia-and oxidative stress-induced myocardial necroptosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2): 175-182.
- [17] YU W, QIN X, ZHANG Y C, et al. Curcumin suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via a PI3K/Akt/mTOR-dependent manner [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(4): 752-769.
- [18] WU J J, YANG Y L, GAO Y F, et al. Melatonin attenuates anoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive mitophagy through the MT2/SIRT3/FoxO3a signaling pathway in H9c2 cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 2047-2060.
- [19] KUNO A, HOSODA R, TSUKAMOTO M, et al. SIRT1 in the cardiomyocyte counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating histone H2AX [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 118(17): 3360-3373.
- [20] 吕云玲, 卢娜, 张明明, 等. 下腔静脉变异率联合脉搏指示连续心排量在心肌梗死后心源性休克容量管理中应用研究 [J]. *中国实用内科杂志*, 2024, 44(3): 223-227.
- [21] Songbo M, Lang H, Xinyong C, et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 307: 41-48.
- [22] Zhang J, Xiang H, Liu J, et al. Mitochondrial Sirtuin 3: new emerging biological function and therapeutic target [J]. *Theranostics*, 2020, 10(18): 8315-8342.
- [23] Cao M, Zhao Q, Sun X, et al. Sirtuin 3: Emerging therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180: 63-74.
- [24] Zhang J, Li W, Xue S, et al. Qishen granule attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by protecting mitochondrial function and reducing oxidative stress through regulation of Sirtuin3 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 319(Pt 1): 117134.
- [25] Barcena ML, Tonini G, Haritonow N, et al. Sex and age differences in AMPK phosphorylation, mitochondrial homeostasis, and inflammation in hearts from inflammatory cardiomyopathy patients [J]. *Aging Cell*, 2023, 22(8): e13894.