

# 黑芥子苷通过 p38/JNK MAPK 信号通路对阿霉素心脏毒性的保护作用

吕瑾 杨胜祥 华晓芳 刘长召

**【摘要】** 目的:探讨黑芥子苷对阿霉素诱导的心脏毒性的作用及机制。 方法:10 周龄雄性 C57/BL6 小鼠随机分为对照组、黑芥子苷组、阿霉素组和黑芥子苷 + 阿霉素组。阿霉素组和黑芥子苷 + 阿霉素组给予单次腹腔注射阿霉素(15 mg/kg),对照组和黑芥子苷组给予单次腹腔注射生理盐水(15 mg/kg),黑芥子苷组和黑芥子苷 + 阿霉素组小鼠同时用黑芥子苷 5 mg/kg 灌胃,每 2 天 1 次,共 3 次。7 d 后超声心动图检测心脏功能,Western blot 检测心肌中凋亡相关蛋白和 MAPK 信号通路相关蛋白的表达水平。结果:黑芥子苷组与对照组小鼠超声心动图各指标、凋亡相关蛋白表达水平和 MAPK 相关蛋白表达水平的差异无统计学意义。与对照组相比,阿霉素组小鼠 LVEDD、LVESD 均明显增大,LVEF 和 LVFS 均明显减小,Bax 表达水平、p38 和 JNK 的磷酸化水平明显升高,Bcl-2 表达水平明显降低( $P$  均  $< 0.05$ )。与阿霉素组相比,黑芥子苷 + 阿霉素组小鼠 LVEDD、LVESD 均明显减小,LVEF 和 LVFS 均明显增大,Bax 表达水平、p38 和 JNK 的磷酸化水平均明显降低,Bcl-2 表达水平明显升高( $P$  均  $< 0.05$ )。 结论:黑芥子苷通过 p38/JNK MAPK 信号通路减少心肌细胞凋亡,减轻阿霉素诱导的心脏毒性。

**【关键词】** 阿霉素;心脏毒性;黑芥子苷;凋亡;信号通路

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.01.012

**Sinigrin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity via the p38/JNK MAPK pathway** LÜ Jin, YANG Shengxiang, HUA Xiaofang, LIU Changzhao Department of Cardiology, The Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Hubei 445000, China

**【Abstract】** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of sinigrin on doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Methods:** Male C57/BL mice aged 10 weeks were randomly divided into control group, sinigrin group, doxorubicin group and sinigrin + doxorubicin group. A single intraperitoneal injection of doxorubicin (15 mg/kg) was given to mice in the doxorubicin group and the sinigrin + doxorubicin group. While in the control group and the mycosidin group, a single intraperitoneal injection of saline (15 mg/kg) was given. At the same time mice in the sinigrin group and the sinigrin + doxorubicin group were intragastrically administered with sinigrin 5 mg/kg once every 2 days, 3 times in total. After 7 days, cardiac function was evaluated by echocardiography, and the expression levels of apoptosis-related proteins and MAPK signaling pathway-related proteins in myocardium were detected by western blot. **Results:** There were no significant statistical differences in the echocardiographic indicators, expression of apoptosis-related proteins and MAPK-related proteins between the sinigrin group and the control group. Compared with the control group, LVEDD and LVESD were significantly larger, LVEF and LVFS were significantly smaller; Bax expression level, phosphorylation levels of P38 and JNK were significantly higher, and Bcl-2 expression level was significantly lower, in the doxorubicin group ( $P$  all  $< 0.05$ ). Compared with the doxorubicin group, LVEDD and LVESD were significantly smaller in the

sirolimus + doxorubicin group, and LVEF and LVFS were significantly larger; Bax expression level, phosphorylation levels of P38 and JNK were significantly lower, while Bcl-2 expression levels were significantly higher ( $P$  all  $< 0.05$ ). **Conclusions:** Sinigrin reduces the cardiomyocyte apoptosis through P38/JNK MAPK signaling pathway and protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity.

**【Key words】** Doxorubicin; Cardiotoxicity; Sinigrin; Apoptosis; Signaling pathway

阿霉素属于蒽环类抗生素,广泛应于白血病、淋巴瘤以及实体瘤等的治疗<sup>[1-2]</sup>。然而,阿霉素的心脏毒性限制了其临床应用。应用阿霉素后的心脏功能障碍在治疗期间或治疗停止后数周至数年内出现,其心脏毒性可表现为心包炎、心律失常、充血性心力衰竭以及治疗后即会出现的可逆性低血压,长期应用阿霉素治疗死亡率超过 50%<sup>[3-4]</sup>。阿霉素诱导的心脏毒性可能涉及多种途径,其中阿霉素诱导的线粒体功能障碍是其诱导心脏毒性的关键<sup>[5]</sup>。阿霉素对心磷脂具有高亲和力,与心磷脂结合后可进入线粒体,抑制呼吸链功能,最终引起心肌细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。

黑芥子苷是十字花科植物如西兰花中天然存在的葡萄糖苷类营养成分,具有抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤和抗炎作用<sup>[8-10]</sup>。研究发现,黑芥子苷还可在抗动脉粥样硬化中发挥重要作用<sup>[11]</sup>,但其是否能预防阿霉素引起的心脏毒性尚不清楚。本研究探讨黑芥子苷对阿霉素所致心脏毒性的作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

32 只 10 周龄 C57/BL6 成年雄性小鼠购于中国医学科学院实验动物研究所,体质量 23.5 ~ 27.5 g,SPF 级。黑芥子苷购于上海融禾公司,批号 64550-88-5,纯度  $> 98\%$ ; 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 抗体、p38 丝裂原激活蛋白激酶 (T-p38) 抗体、磷酸化的 p38 丝裂原激活蛋白激酶 (P-p38) 抗体、c-Jun 氨基末端激酶 (T-JNK) 抗体、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (P-JNK) 抗体、Bax 抗体和 Bcl-2 抗体等一抗均购于美国 CST 公司; 荧光标记羊抗兔二抗购于美国 LI-COR 公司; 化学发光蛋白检测显影液购于美国 Borad 公司。

### 1.2 实验分组

实验小鼠购回后,适应环境 1 周,随机分为对照组、黑芥子苷组、阿霉素组和黑芥子苷+阿霉素组,每组各 8 只。阿霉素组和黑芥子苷+阿霉素组小鼠给予单次腹腔注射阿霉素 (15 mg/kg),对照组和黑芥子苷组给予单次腹腔注射生理盐水 (15 mg/kg),黑芥子苷组和黑芥子苷+阿霉素组小鼠同时用黑

芥子苷 5 mg/kg 灌胃,每 2 天 1 次,共 3 次。本实验经动物护理和使用委员会批准。

### 1.3 超声心动图检测

腹腔注射后第 7 天,采用多普勒心脏超声检测 4 组小鼠左室舒张末期内径 (LVEDD)、左室收缩末期内径 (LVESD)、左室射血分数 (LVEF) 以及左室短轴缩短率 (LVFS)。

### 1.4 Western blot 检测

小鼠称重并记录后处死,沿胸骨中线剪开皮肤,充分暴露心脏后取出心脏,将心脏内血液轻轻挤出,称量心脏质量。将各组心脏组织溶解于裂解缓冲液中,采用 BCA 法测量蛋白浓度,蛋白经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离,转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗 37 °C 孵育 40 min, ECL 显影。使用 ImageJ 软件对蛋白表达水平进行定量, GAPDH 为内参蛋白。

### 1.5 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用两独立样本的  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黑芥子苷对阿霉素所致心脏毒性的保护作用

黑芥子苷组与对照组小鼠超声心动图各指标的差异无统计学意义。与对照组相比,阿霉素组小鼠 LVEDD、LVESD 均明显增大,而 LVEF 和 LVFS 均明显减小 ( $P$  均  $< 0.05$ )。与阿霉素组相比,黑芥子苷+阿霉素组小鼠 LVEDD、LVESD 均明显减小, LVEF 和 LVFS 均明显增大 ( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 黑芥子苷减轻阿霉素所致心肌细胞凋亡

Western blot 结果显示,黑芥子苷组与对照组小鼠凋亡相关蛋白表达水平的差异无统计学意义。与对照组小鼠相比,阿霉素组小鼠心肌 Bax 表达水平明显升高, Bcl-2 表达水平明显降低 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 与阿霉素组相比,黑芥子苷+阿霉素组 Bax 表达水平明显降低, Bcl-2 表达水平明显升高, ( $P$  均  $< 0.05$ ),见图 1、表 2。

表 1 各组小鼠心功能比较

组别	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%	LVFS/%
对照组 (n=8)	3.62±0.26	2.44±0.18	78.2±3.2	41.9±2.64
黑芥子苷组 (n=8)	3.66±0.32	2.48±0.45	76.8±4.12	39.6±5.32
阿霉素组 (n=8)	4.02±0.22 <sup>(1)</sup>	3.04±0.28 <sup>(1)</sup>	56.4±3.41 <sup>(1)</sup>	26.6±2.62 <sup>(1)</sup>
黑芥子苷+阿霉素组 (n=8)	3.78±0.42 <sup>(2)</sup>	2.74±0.52 <sup>(2)</sup>	67.4±2.52 <sup>(2)</sup>	34.2±1.44 <sup>(2)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与阿霉素组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$

图 2 各组 MAPK 信号通路相关蛋白表达情况

表 3 各组小鼠 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平比较

组别	P-JNK/T-JNK	P-p38/T-p38
对照组 (n=8)	1.00±0.05	1.00±0.07
黑芥子苷组 (n=8)	1.02±0.09	0.98±0.06
阿霉素组 (n=8)	2.23±0.21 <sup>(1)</sup>	2.41±0.12 <sup>(1)</sup>
黑芥子苷+阿霉素组 (n=8)	1.56±0.09 <sup>(2)</sup>	1.78±0.32 <sup>(2)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与阿霉素组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$

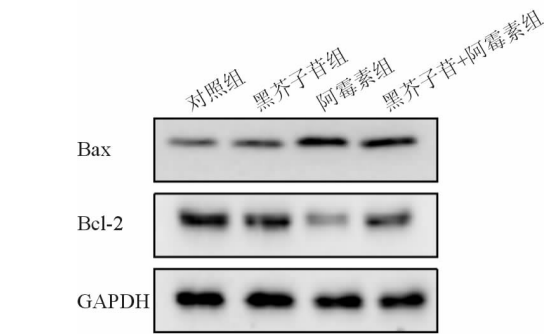


图 1 各组凋亡相关蛋白表达情况

表 2 各组小鼠凋亡相关蛋白表达水平比较

组别	Bax	Bcl-2
对照组 (n=8)	1.00±0.08	1.00±0.07
黑芥子苷组 (n=8)	0.99±0.06	1.01±0.05
阿霉素组 (n=8)	2.45±0.15 <sup>(1)</sup>	0.43±0.08 <sup>(1)</sup>
黑芥子苷+阿霉素组 (n=8)	1.88±0.18 <sup>(2)</sup>	0.76±0.03 <sup>(2)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与阿霉素组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$

2.3 黑芥子苷通过 p38/JNK MAPK 减轻阿霉素的 心脏毒性

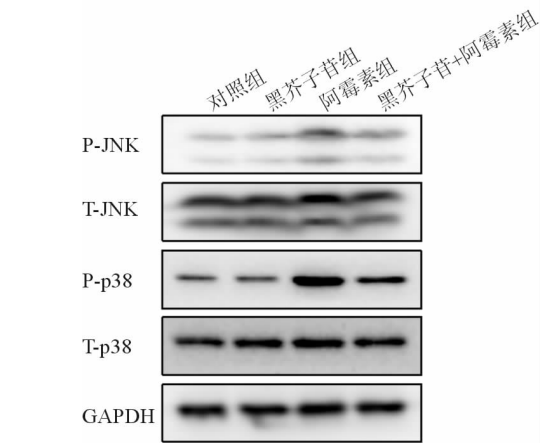
Western blot 结果显示,黑芥子苷组与对照组小鼠 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平的差异无统计学意义。与对照组相比,阿霉素组小鼠心肌中磷酸化的 p38 和 JNK 的表达水平明显升高( $P$  均 $<0.05$ );与阿霉素组相比,黑芥子苷+阿霉素组磷酸化的 p38 和 JNK 的表达水平明显降低( $P$  均 $<0.05$ )。见图 2。

3 讨论

本研究探讨黑芥子苷对阿霉素诱导的心脏毒性的潜在保护作用,并阐明这种保护作用的可能机制。LVEF 和 LVFS 的下降是阿霉素诱导的心脏功能降低的表现<sup>[12]</sup>。我们的研究发现阿霉素诱导心脏功能恶化,表现为 LVEF 和 LVFS 的降低,而使用黑芥子苷干预后,小鼠心功能明显改善。

体外和体内研究表明,阿霉素诱导的心脏毒性与心肌细胞凋亡和坏死有关<sup>[13-15]</sup>。线粒体是阿霉素诱导心肌细胞自由基毒性的靶点<sup>[16]</sup>。阿霉素可引起线粒体通透性转换孔(mPTP)开放,允许小分子通过线粒体膜,导致线粒体三功能蛋白(MTP)崩溃,进而引起线粒体肿胀和破裂,促细胞凋亡分子释放到胞质中<sup>[17]</sup>。线粒体在阿霉素诱导的心肌病的发病机制中起重要作用,预防线粒体功能障碍可影响心肌改变,使心脏出现好的转归<sup>[18]</sup>。在本研究中,我们观察到阿霉素使促凋亡蛋白 Bax 表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,但黑芥子苷干预可减弱阿霉素介导的促凋亡现象。

MAPK 在细胞增殖、分化和死亡中起重要作用。MAPK 家族由 3 个成员组成:细胞外信号调节激酶(ERK),JNK 和 p38。MAPK 信号通路是通过氧化应激触发细胞凋亡的主要中间体。JNK 和 p38 参与阿霉素诱导的氧化应激反应<sup>[7,19]</sup>。因此,我们研究了黑芥子苷对 p38/JNK MAPK 信号通路的影响。在本研究中,经阿霉素作用后,心脏组织 p38 和 JNK 的磷酸化水平升高,而黑芥子苷抑制了阿霉素诱导的 JNK 和 p38 的磷酸化。



在本研究中,我们使用黑芥子苷干预阿霉素诱导的心脏毒性,结果表明黑芥子苷通过 p38/JNK MAPK 信号通路发挥心脏保护作用,这为黑芥子苷减轻阿霉素诱导的心脏毒性提供了理论依据。

### 参 考 文 献

[1] Abdel-Raheem IT, Omran GA, Katary MA. Irbesartan, an angiotensin II receptor antagonist, with selective PPAR- $\gamma$ -modulating activity improves function and structure of chemotherapy-damaged ovaries in rats[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2015, 29(3):286-298.

[2] Akolkar G, Bhullar N, Bews H, et al. The role of renin angiotensin system antagonists in the prevention of doxorubicin and trastuzumab induced cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Ultrasound*, 2015, 13:18.

[3] Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy[J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(1): 106-135.

[4] Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, et al. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone[J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(9):2063-2076.

[5] Bahadır A, Kurucu N, Kadioğlu M, et al. The role of nitric oxide in Doxorubicin-induced cardiotoxicity: experimental study[J]. *Turk J Haematol*, 2014, 31(1):68-74.

[6] Zhao L, Tao X, Qi Y, et al. Protective effect of dioscin against doxorubicin-induced cardiotoxicity via adjusting microRNA-140-5p-mediated myocardial oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2018, 16:189-198.

[7] Chen CT, Wang ZH, Hsu CC, et al. In vivo protective effects of diosgenin against Doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Nutrients*, 2015, 7(6):4938-4954.

[8] Lee HW, Lee CG, Rhee DK, et al. Sinigrin inhibits production of inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B/MAPK pathways or NLRP3 inflammasome activation in macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 45: 163-173.

[9] Lozano-Baena MD, Tasset I, Obregón-Cano S, et al. Antigenotoxicity and tumor growing inhibition by leafy

brassica carinata and sinigrin[J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 15748-15765.

[10] Mazumder A, Dwivedi A, Du Plessis J. Sinigrin and its therapeutic benefits[J]. *Molecules*, 2016, 21(4):416.

[11] Jang YJ, Park B, Lee HW, et al. Sinigrin attenuates the progression of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed a high-cholesterol diet potentially by inhibiting VCAM-1 expression [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 272:28-36.

[12] Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: phenotype and molecular mechanisms[J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2016, 10:17-24.

[13] Wang Y, Lei T, Yuan J, et al. GCN2 deficiency ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by decreasing cardiomyocyte apoptosis and myocardial oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2018, 17:25-34.

[14] Sun J, Sun G, Meng X, et al. Isorhamnetin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e64526.

[15] Lee BS, Kim SH, Jin T, et al. Protective effect of survivin in doxorubicin-induced cell death in h9c2 cardiac myocytes[J]. *Korean Circ J*, 2013, 43(6):400-407.

[16] Abdel-Raheem IT, Taye A, Abouzied MM. Cardioprotective effects of nicorandil, a mitochondrial potassium channel opener against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 113(3):158-166.

[17] Gharanei M, Hussain A, Jannah O, et al. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 268(2):149-156.

[18] Ahmed LA, El-Maraghy SA. Nicorandil ameliorates mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced heart failure in rats: possible mechanism of cardioprotection[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(9):1301-1310.

[19] Das J, Ghosh J, Manna P, et al. Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(7):891-909.

(收稿:2019-04-23 修回:2019-10-17)

(本文编辑:胡晓静)