

郭红,王少玮,谢文静,等. 槲皮素通过 Pink1/Parkin 信号通路减轻阿霉素心肌损伤的作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 1-9.

Guo H, Wang SW, Xie WJ, et al. Protective role of Quercetin on Pink1/Parkin-dependent mitophagy against doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.001

槲皮素通过 Pink1/Parkin 信号通路减轻阿霉素 心肌损伤的作用机制研究

郭红,王少玮,谢文静,周俊,蒋书云,刘金成,杨剑,金屏*

(空军军医大学西京医院心血管外科,西安 710032)

【摘要】 目的 阿霉素(doxorubicin, Dox)的临床应用受到其剂量依赖的心脏毒性的限制,本研究拟探究槲皮素(Quercetin, Que)在 Dox 诱导的细胞毒性中的作用机制。**方法** 将小鼠随机分为 Con 组、Que 处理组、Dox 组、Dox-Que 组,将分离的乳鼠心肌原代细胞(neonatal mouse cardiomyocytes, nmCMs)随机分为 Dox-Vehicle 组、Dox-Que 组、Dox-Que-SB 组、Dox-SB 组及 Dox-3 MA 组。细胞活力以 CCK-8 试剂盒检测、同时检测 ATP 生成及 ROS 生成,此外以 Western blot 方法检测线粒体自噬标志蛋白的表达情况。**结果** 在体研究证实,Que 可通过抑制线粒体自噬并降低心肌纤维化抵抗 Dox 诱导的心肌毒性。体外研究表明,Dox 处理可显著降低 nmCMs 细胞活性,ATP 含量及增加 ROS 生成,同时线粒体自噬被显著激活($P<0.05$),Que 预处理可通过抑制线粒体自噬的激活而缓解 Dox 诱导的心肌细胞损伤,并降低 ROS 生成及增加线粒体 ATP 含量。我们进一步的研究证实 Que 对线粒体自噬的抑制作用是 Pink1/Parkin 分子通路介导的,而 SB 处理可通过激活线粒体自噬而部分抵消 Que 对 Dox 诱导的心肌毒性的保护作用。**结论** Que 通过抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬的激活,促进 ATP 生成及降低 ROS 活性,缓解 Dox 引起的心肌毒性。

【关键词】 槲皮素;线粒体自噬;Pink1;Parkin

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0001-09

Protective role of Quercetin on Pink1/Parkin-dependent mitophagy against doxorubicin-induced cardiotoxicity

GUO Hong, WANG Shaowei, XIE Wenjing, ZHOU Jun, JIANG Shuyun, LIU Jincheng, YANG Jian, JIN Ping*
(Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective The clinical application of doxorubicin (Dox) is limited by its dose-dependent cardiotoxicity. This study was established to elucidate the mechanism by which Quercetin (Que) acts in Dox-induced cytotoxicity. **Methods** Mice were randomly divided into a Con group, Que group, Dox group and Dox-Que group. Neonatal mouse cardiomyocytes were isolated and randomly divided into a Dox-Vehicle group, Dox-Que group, Dox-Que-SB group, Dox-SB group and Dox-3 MA group. Cell viability was detected by CCK-8 kit, while ATP content and ROS production were determined simultaneously. In addition, Western blot was used to determine the expression of mitophagy marker proteins. **Results** *In vivo* studies confirmed that Que can reduce Dox-induced cardiotoxicity by inhibiting

[基金项目] 国家自然科学基金(81870216)。

[作者简介] 郭红(1983—),女,研究方向:心肌保护。E-mail: guo_hongxj@126.com

[通信作者] 金屏(1984—),男,副主任医师,硕士,研究方向:心肌保护。E-mail: bohua001@126.com

mitophagy and reducing myocardial fibrosis. *In vitro* studies showed that Dox treatment significantly reduced the cell activity of neonatal mouse cardiomyocytes and ATP content, increased ROS production, and significantly activated mitophagy ($P < 0.05$). Que pretreatment alleviated Dox-induced cardiomyocyte injury by inhibiting the activation of mitophagy while reducing ROS production and increasing mitochondrial ATP content. Our study further confirmed that the inhibitory effect of Que on mitophagy was mediated by the Pink1/Parkin-dependent signaling pathway, and that SB treatment partially offset the protective effect of Que on Dox-induced cardiotoxicity by activating mitophagy. **Conclusions** Que can inhibit Pink1/Parkin-mediated mitophagy activation, promote ATP production, reduce ROS production and alleviate Dox-induced cardiotoxicity.

【Keywords】 Quercetin; mitophagy; Pink1; Parkin

阿霉素(doxorubicin, Dox)是一种有效的蒽环类抗生素,可用于治疗白血病、淋巴瘤和多种实体肿瘤^[1],但其剂量依赖性的心脏毒副作用限制了 Dox 的临床应用^[2]。Dox 引起的心脏毒性是一种复杂的包括线粒体氧化应激在内的多因素过程,主要表现为线粒体功能被抑制,进而导致心肌细胞损伤^[3]。

线粒体约占心肌细胞体积 30% 以上,以满足心脏持续的能量需求^[4]。线粒体质量控制是调控线粒体大小、形态及生物活性等的重要调控机制^[5-6],当受损的线粒体不能恢复到健康状态时,线粒体自噬(mitophagy)便成为细胞凋亡和坏死之前移除受损的线粒体并维持细胞活力的最后保障^[7]。其中丝氨酸/苏氨酸激酶 1(Pink1)及 E3 连接酶 Parkin 介导的线粒体自噬在 Dox 诱导心肌毒性线粒体功能障碍的消除中起关键作用^[8],然而其机制尚待进一步阐明。

槲皮素(Quercetin, Que)属于一种黄酮类化合物,存在于多种蔬菜食品包括苹果、红茶、绿茶、洋葱、红酒、红葡萄、柑橘类水果、樱桃、不同浆果如覆盆子、越橘和蔓越莓、花椰菜和其他多叶绿色蔬菜^[9]。在植物中由苯丙氨酸经苯丙烷途径产生,具有抗癌、抗糖尿病、抗炎和抗氧化(清除自由基)等多种生物学功能^[10-11]。有研究证实,Que 可通过酸水解法及酶转化法等方法进行分离提纯,并通过绘制标准溶液曲线,以紫外分光光度计法进行浓度测定^[12]。此外,Que 对于心血管疾病具有重要的预防和治疗效果^[13],如 Que 对 Dox 诱导的心脏毒性的保护作用^[14],然而其对心肌细胞的保护作用是否通过 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬未见报道。

本研究拟建立 Dox 诱导的小鼠及 nmCMs 细胞毒性模型^[15],验证 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬在 Que 缓解 Dox 心肌毒性中的具体作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

所有的实验方案均经第四(空军)军医大学实验动物中心福利与伦理委员会的批准(20200445),并按照美国国立卫生研究院实验动物使用指南实施。本研究中使用 SPF 级,8 周龄,体重为 20~22 g 的雄性 C57BL/6J 小鼠,共计 40 只;1~3 d(1.5~2 g)大小的 C57BL/6J 乳鼠(SPF 级),共计 50 只。均由空军军医大学动物实验中心饲养并提供[SCXK(陕)2019-001][SYXK(陕)2019-001],在研究中均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Que 标准品(货号:SQ8030)及 Que(货号:Q8010)均购买自 Solarbio 公司(中国);CCK-8 细胞毒性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(货号:G021-1);DOX 购自 Tocris 公司(Bristol,英国,货号:2252);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(货号:ZB2301)、山羊抗鼠(货号:ZB-2305)二抗购自北京中山金桥生物技术有限公司;胎牛血清(货号:16010159)、双抗(货号:15140163)、DMEM 培养基(货号:11965092)(美国)、GAPDH 抗体(货号:51332)、Pink1(货号:46421)、Parkin(货号:4211)、P62(货号:23214)、LC3(货号:4108)及 Beclin1(货号:3495)购自 CST 公司(美国);线粒体自噬激动剂 SB-203580(货号:HY-10256)及线粒体自噬抑制剂 3-Methyladenine(3 MA)(货号:HY-19312)购自 MedChemExpress(MCE,美国);Pierce 原代心肌细胞分离试剂盒(thermo fisher scientific,美国);线粒体分离试剂盒(abcam,美国);蛋白酶抑制剂(南京建成,中国);Bradford 试剂盒(Pierce Biotechnology,美国)。Olympus 荧光显微镜(Olympus,日本);Image Lab(Bio-Rad 公司,美国);SpectraMax M5 分光光度计(美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠在体实验与原代心肌模型建立及实验分组

将 Dox 以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 溶解后制成 10 mmol/L 储备液。实验动物随机分为如下 4 组: (1) 对照组 (Con): 实验小鼠以正常饮食喂养。(2) 槲皮素处理组 (Que): 小鼠以 50 mg/kg Que 灌胃处理 1 周^[16]。(3) 阿霉素组 (Dox): 小鼠隔天以 3 mg/kg 剂量腹腔注射 Dox, 持续 2 周。(4) 阿霉素-槲皮素组 (Dox-Que): 小鼠以 50 mg/kg Que 灌胃处理 1 周, 随后隔天以 3 mg/kg 剂量腹腔注射 Dox, 持续 2 周。所有药物处理结束后饲养 4 周。离体实验将分离的乳鼠心肌原代细胞 (nmCMs) 细胞以随机数字表法随机组, 药物处理情况如下: (1) 对照组 (Vehicle): nmCMs 细胞未作任何处理。(2) 槲皮素组 (Que): nmCMs 细胞分别以 10 μ mol/L 或 20 μ mol/L Que 预处理 22 h。(3) 阿霉素组 (Dox): nmCMs 细胞以 10 μ mol/L Dox 及 DMSO 稀释液共同处理 24 h^[17]。(4) 阿霉素-槲皮素组 (Dox-Que): nmCMs 细胞以 20 μ mol/L Que 预处理 22 h^[18], 再以 10 μ mol/L Dox 及 DMSO 稀释液共同处理 24 h。(5) 阿霉素-槲皮素-线粒体自噬激动剂组 (Dox-Que-SB): nmCMs 细胞以 20 μ mol/L Que 预处理 22 h, 再以 10 μ mol/L Dox 及 10 μ mol/L SB 共同处理 24 h。(6) 阿霉素-线粒体自噬激动剂组 (Dox-SB): nmCMs 细胞以 10 μ mol/L Dox 及 10 μ mol/L SB 共同处理 24 h。(7) 阿霉素+3-甲基腺嘌呤组 (Dox-3 MA), nmCMs 细胞以 10 μ mol/L Dox 处理 16 h 随后以 5 mmol/L 3 MA 共同处理 8 h^[19]。(8) 线粒体自噬激动剂组 (SB): nmCMs 细胞以 10 μ mol/L SB 处理 24 h。

1.3.2 乳鼠心肌原代细胞分离培养

采用 Pierce 原代心肌细胞分离试剂盒分离 1~3 d 大小的 C57BL/6J 小鼠心肌原代细胞^[20]。新生小鼠心脏解剖后, 立即与心肌细胞分离酶 1 和酶 2 在 37℃ 孵育 30~35 min, Hanks 平衡盐溶液洗涤两次, 然后转移至 DMEM 高糖培养基中。将分离的乳鼠心肌细胞置于培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 孵育, 剩余的组织以相同的方法处理, 直到没有残留。混合细胞悬液, 收集非贴壁细胞并计数, 随后将细胞转移至 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 μ g/mL) 的 DMEM 中。以进行下一步实验。

1.3.3 成鼠心肌组织及 nmCMs 细胞线粒体分离

使用线粒体分离试剂盒分离成年小鼠心肌组织及 nmCMs 线粒体。所有程序都按照操作说明进行。剪碎心肌组织, nmCMs 用预冷的 PBS 缓冲液清洗。在 3000 r/min 的转速下, 将上清液转移到新管中。在 12377 r/min 的转速下再次离心, 收集含有胞浆蛋白的上清液。然后将含有线粒体的颗粒在添加蛋白酶抑制剂混合物的分离缓冲液中清洗, 并在 12377 r/min 的转速下收集以供进一步使用。

1.3.4 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 检测

利用阳离子荧光染料 JC-1 对线粒体膜电位进行检测。用药物处理后, 将细胞与 JC-1 工作液在 37℃, 避光孵育 30 min, 随后以 PBS 清洗 3 次, 再以 SpectraMax M5 (美国) 分光光度计读取数值。数据以药物处理组与对照组的比值表示。

1.3.5 Western blot 检测

使用预冷的 RIPA 裂解缓冲液处理 nmCMs 细胞。采用 Bradford assay 试剂盒测定蛋白质含量。将处理后的细胞分别收集提取细胞总蛋白, 以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样本, 随后转移至 PVDF 膜, 之后以 5 g/100 mL 脱脂牛奶在室温下孵育 2 h, 再加入相应的一抗抗体于 4℃ 孵育过夜。TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 与兔二抗孵育 2 h。再次清洗后用化学发光系统进行检测, 蛋白定量分析使用 Image Lab 软件 (Bio-Rad)。

1.3.6 ATP 水平检测

按照操作说明分离 nmCMs 细胞线粒体后, 随后以 ATP 检测试剂盒检测线粒体内 ATP 含量。

1.3.7 细胞活力检测

将分离的 nmCMs 接种于 96 孔板, 接种浓度为 5×10^3 个/孔, 以前述方法分别进行处理后, 避光向各孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 37℃ 孵育 90 min 后在 450 nm 波长下测量 OD 值。细胞活力以药物组细胞 OD 与 Con 组细胞 OD 分别减去空白 OD 值后的比值表示。

1.3.8 组织病理学分析

小鼠麻醉后, 去除心脏并以 PBS 冲洗, 随后将心脏组织于 4% 多聚甲醛中固定 3 d, 再以石蜡包埋后切成 3 μ mol/L 切片, 苏木精伊红染色 (hematoxylin and eosin, HE), 并以 Masson's 三色染色法评估心肌纤维化程度。染色结果以 Image J 软件定量后分析。

1.4 统计学方法

所有值均以平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x}\pm s\bar{x}$)表示。实验组之间的差异是通过单向或双向 ANOVA 分析确定, 然后进行 Tukey post hoc 检验。 t 检验用于组间单因素比较。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Que 对 Dox 处理后心肌形态学改变及对 ROS 生成、MMP 及线粒体 ATP 含量的影响

心脏组织的组织病理学检查显示, Con 组和 Que 治疗组小鼠的心肌形态和肌原纤维正常(图 1A、1B)。在 Dox 处理的心脏切片中观察到肌原纤维变性和破坏。Que 处理显著改善了 Dox 诱导的这些损伤。Masson's 三色染色的进一步研究显示, 与正常对照组相比, Dox 处理显著诱导心肌纤维化, 而用 Que 治疗的心肌纤维化在 Dox 处理的心脏组织中被显著抑制(图 1A~1C)。心肌纤维化定量分析显示 Que 能显著降低 Dox 诱导的心肌纤维化($P<0.05$)。如图 1D, 相对于 Con 组, Dox 可显著增加心肌组织的 ROS 生成, Que 预处理可降低 ROS 生成量

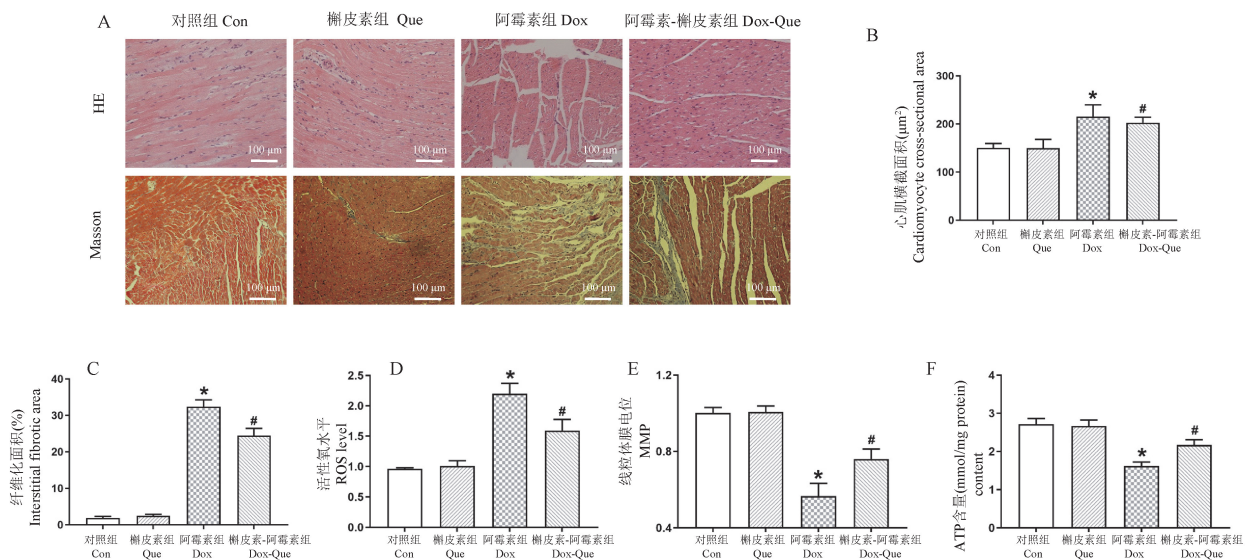
($P<0.05$), 而 Que 单独处理未见对 ROS 生成有显著改变。对不同处理条件的小鼠心肌组织检测发现, Dox 处理相对于 Con 组, 可显著降低 MMP 含量及线粒体 ATP 生成量($P<0.05$), 这种降低的趋势可被 Que 预处理逆转($P<0.05$)(图 1E~1F)。

2.2 Que 对线粒体自噬关键蛋白表达的调节作用

对不同处理组线粒体自噬标志蛋白的检测发现, 如图 2 所示, Dox 处理相对于 Con 组, 可显著增加 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬及标志蛋白 Beclin1 及 LC3II 的表达而降低 P62 蛋白表达量($P<0.05$), 以促进线粒体自噬的激活, Que 可通过抑制 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬的激活 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬($P<0.05$), 保护小鼠心肌组织抵抗 Dox 引起的细胞毒性。

2.3 Que/SB 对 nmCMs 细胞活力及 LDH 活性的影响

如图 3A 所示, 10 $\mu\text{mol/L}$ Dox 处理 6 h 可见细胞活力较未加入 Dox 或 Que 组显著降低, 加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 预处理后, 可显著增加细胞活力以逆转 Dox 引起的细胞毒性损伤($P<0.05$), 而 Que 单独处理未见对 nmCMs 细胞有显著影响。通过对不同处理组

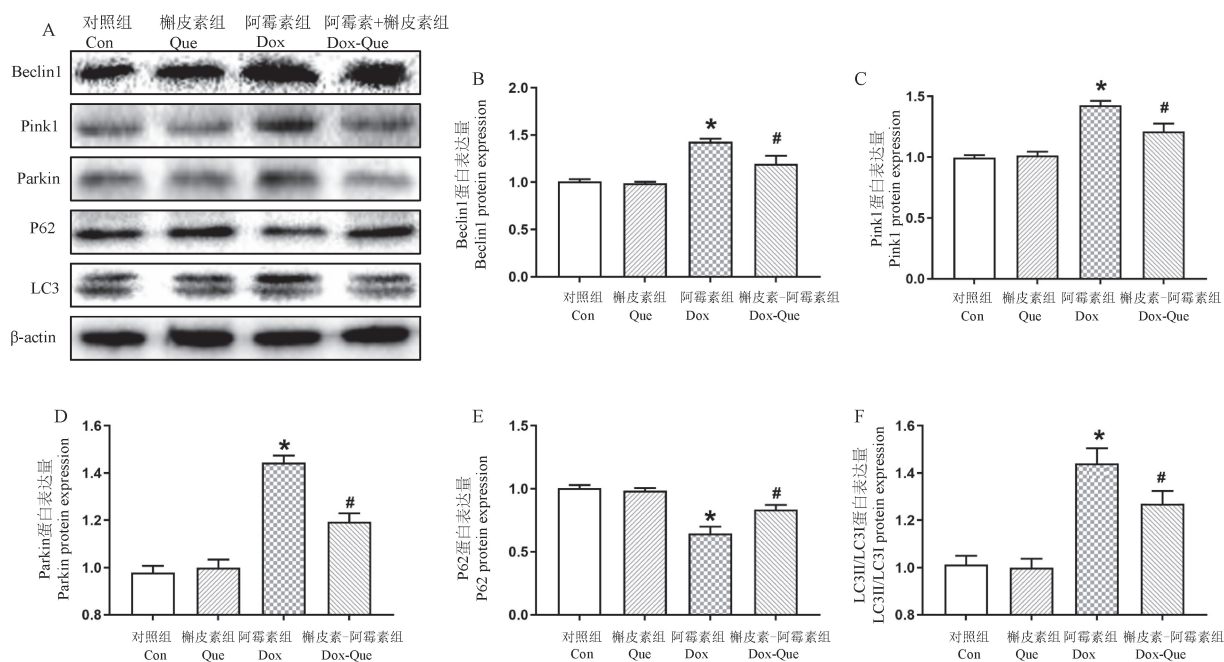


注: A: Que 对 Dox 诱导的心肌组织形态及纤维化的影响。上侧表示 HE 染色, 下侧表示 Masson 染色; B: 心肌细胞横截面积; C: 心脏纤维化区域; D: ROS 水平; E: 线粒体膜电位; F: ATP 含量。与对照组相比, * $P<0.05$; 与 Dox 组相比, # $P<0.05$ 。

图 1 Que 可显著减轻 Dox 引起的心肌纤维化, 降低 ROS 生成与上调 MMP、ATP 含量 ($n=5$)

Note. A, Effects of Que on cardiac morphology and fibrosis in Dox-induced cardiomyopathy. The upper panel represents images with HE staining, the lower panel indicates cardiac fibrosis with Masson's trichrome staining. B, Cardiomyocyte cross-sectional area. C, Cardiac fibrosis area. D, ROS level. E, MMP production. F, ATP content. Compared with Con group, * $P<0.05$. Compared with Dox group, # $P<0.05$.

Figure 1 Que treatment significantly attenuates Dox-induced cardiotoxicity, reducing ROS level and increasing MMP and ATP content

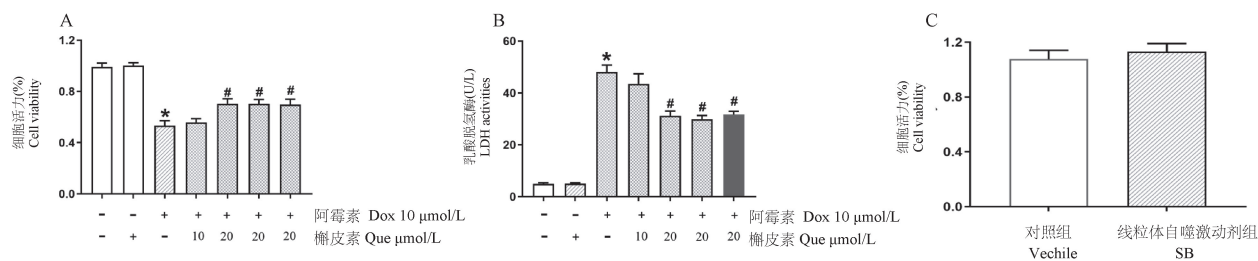


注:A:用 Western blot 对不同组的代表性蛋白图像进行分析;B~F:Beclin1、Pink1、Parkin、P62 和 LC3 的表达。与对照组相比, * $P < 0.05$;与槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 Que 对心肌组织中线粒体自噬标志蛋白表达的影响 ($n = 3 \sim 5$)

Note. A, Representative protein images by Western blot from different groups. B~F, Expression of Beclin1, Pink1, Parkin, P62 and LC3. Compared with Con group, * $P < 0.05$. Compared with Dox group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Que alleviates mitophagy marker protein expression in myocardial



注:A:Dox 和 Que 对细胞活力的影响;B:Dox 和 Que 对 LDH 活性的影响;C:SB(SB-203580)对细胞活力的影响。与对照组相比, * $P < 0.05$;与槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 Dox、Que 及 SB 对细胞活力与 LDH 的影响 ($n = 3 \sim 5$)

Note. A, The effective of Dox and Que on cell viability. B, The effective of Dox and Que on LDH activity. C, The effective of SB on cell viability. Compared with Vechile group, * $P < 0.05$. Compared with Dox group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of Que, Dox and SB on cell viability and LDH activity

细胞培养上清液的检测发现(图 3B),Dox 可引起 LDH 浓度的显著增加,加入 20 $\mu\text{mol/L}$ Que 后 LDH 浓度较单独加入 Dox 后显著降低($P < 0.05$),但这种降低趋势并未随 Que 浓度增加而改变。此外,SB 单独处理并未改变 nmCMs 细胞活力(图 3C)。

2.4 Que/SB 对 Dox 诱导下 nmCMs 细胞 ROS 生成、MMP 及线粒体 ATP 生成量的影响

如图 4A 所示,相对于 Dox 组,Que 预处理可显著降低 LDH 含量($P < 0.05$),而 SB 加入则部分抵消

了 Que 对 LDH 活性的抑制作用($P < 0.05$)。如图 4B 所示,与 Dox 组相比较,Que 预处理可显著降低线粒体 ROS 生成,而 SB 则降低了 Que 对 ROS 生成的抑制作用($P < 0.05$),单独加入 SB 未见对 Dox 处理细胞线粒体 ROS 生成有显著改变。

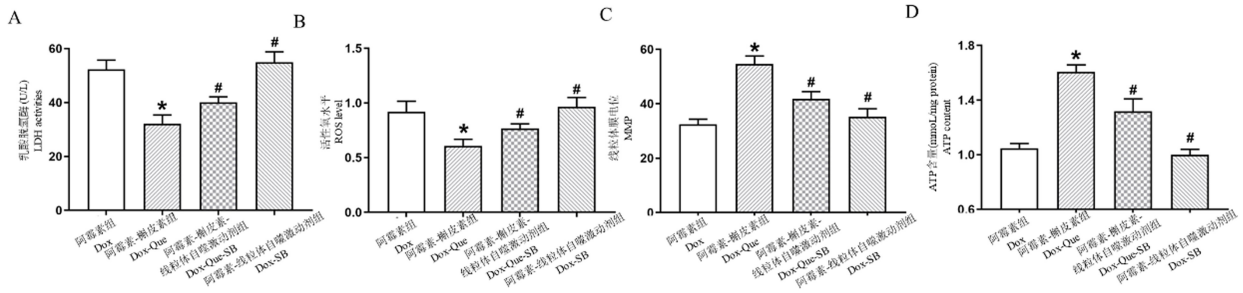
此外(图 4C、4D),对不同条件下细胞 MMP 及 ATP 含量的检测发现,Que 预处理可显著增加 nmCMs 细胞 MMP 及 ATP 生成($P < 0.05$),而 SB 可部分抵消 Que 对 MMP 及 ATP 生成的促进作用($P <$

0.05)。SB 对 Dox 处理的 nmCMs 细胞 MMP 及 ATP 生成则未见改变。

2.5 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬对 Dox 引起的心肌细胞毒性具有重要的调节作用

如图 5 所示, nmCMs 细胞分别以 Dox、Que 或 SB 处理后, 对线粒体自噬相关蛋白的检测发现, Dox 可通过激活 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬, 诱导细胞损伤, 以 Que 预处理则可部分抵消 Dox 诱导的

细胞毒性, 这种保护作用是通过抑制线粒体自噬的激活而实现的。而 SB 则通过促进 Pink1/Parkin 的激活, 进而显著逆转 Que 对 Dox 诱导的细胞毒性的保护作用。此外, 通过线粒体自噬抑制剂 3 MA 处理 nmCMs 细胞后发现, Que 及 3 MA 均可显著抑制 Dox 诱导的线粒体自噬, 降低心肌细胞损伤 (图 6)。提示 Que 抵抗 Dox 诱导的细胞毒性是通过 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬实现的。

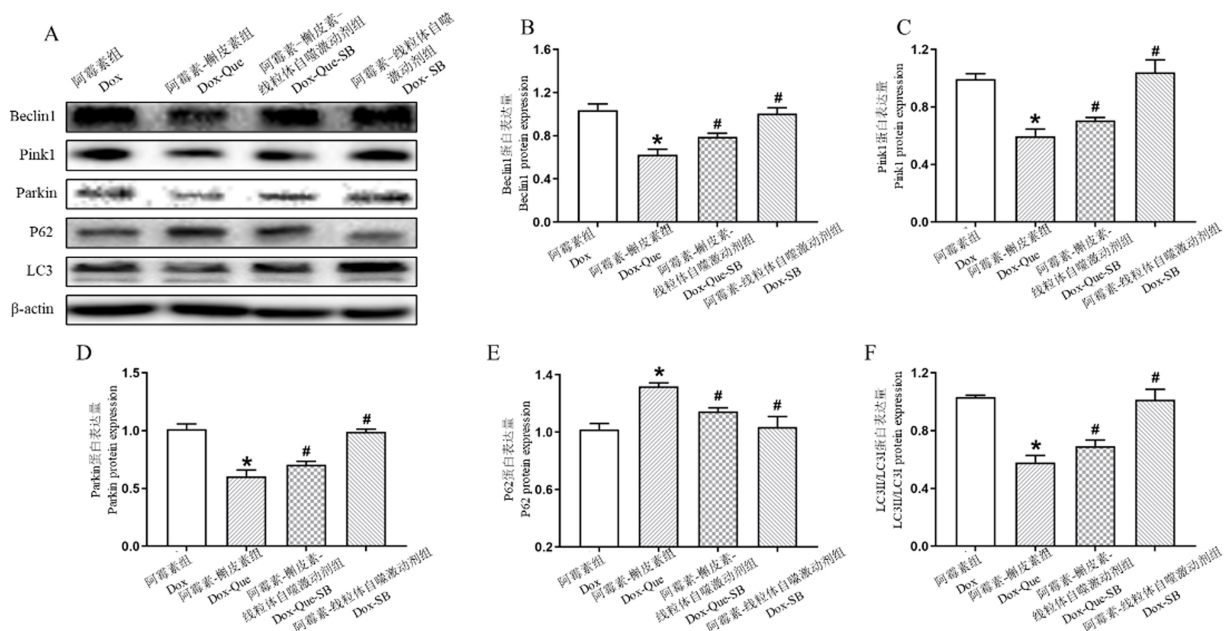


注: A: 乳酸脱氢酶活性; B: ROS 水平; C: 线粒体膜电位产生; D: ATP 含量。与阿霉素组相比, * $P < 0.05$; 与阿霉素-槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 Que 通过调节 LDH、ROS、MMP 及 ATP 含量抵抗 Dox 诱导的心肌细胞损伤 ($n=3\sim5$)

Note. A, LDH activities. B, ROS level. C, MMP production. D, ATP content. Compared with Dox group, * $P < 0.05$. Compared with Dox-Que group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Que protected nmCMs against Dox-induced cardiomyocytes injury via regulating LDH level, ROS level, MMP and ATP content

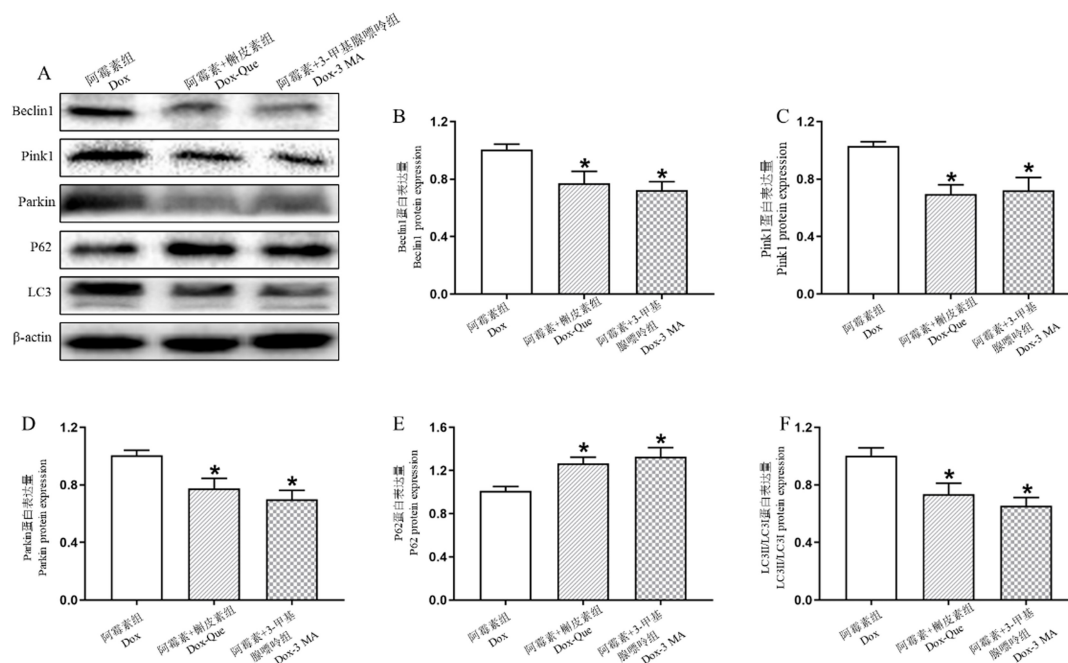


注: A: 用 Western blot 对不同组的代表性蛋白图像进行分析; B~F: Beclin1、Pink1、Parkin、P62 和 LC3 的表达。与阿霉素组相比, * $P < 0.05$; 与阿霉素-槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 Que 通过抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬, 缓解 Dox 诱导的心肌细胞损伤 ($n=3\sim5$)

Note. A, Representative protein images by Western blot from different groups. B~F, Expression of Beclin1, Pink1, Parkin, P62 and LC3. Compared with Dox group, * $P < 0.05$. Compared with Dox-Que group, # $P < 0.05$.

Figure 5 Que protects mitochondrial hemostasis by inhibiting Pink1/Parkin-dependent mitophagy against Dox-induced cardiotoxicity



注:A:用 Western blot 对不同组的代表性蛋白图像进行分析;B~F:Beclin1、Pink1、Parkin、P62 和 LC3 的表达。与阿霉素组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 Que 及 3 MA 均可显著抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬,缓解 Dox 诱导的心肌细胞损伤($n = 3 \sim 5$)

Note. A, Representative protein images by Western blot from different groups. B ~ F, Expression of Beclin1, Pink1, Parkin, P62 and LC3. Compared with Dox group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Que and 3 MA significantly inhibited Pink1/Parkin-dependent mitophagy against Dox-induced cardiotoxicity

3 讨论

本研究通过对小鼠及分离的 nmCMs 细胞建立 Dox 损伤模型后发现,Que 可保护小鼠心肌组织 nmCMs 细胞并降低 Dox 对细胞的毒性作用,降低纤维化,其作用机制主要是通过抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬与降低线粒体 ROS 产生,及促进 ATP 合成量的增加来实现的。我们的研究结果证实,Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬有助于 Que 保护小鼠心脏功能并抵抗 Dox 诱导的心肌毒性,从而为临床用药提供部分理论参考。

Dox 诱导的心肌毒性主要机制之一便与线粒体功能障碍有关,导致细胞内 ROS 增加和氧化应激。线粒体是细胞暴露于 Dox 后受损最严重的细胞内细胞器,其内膜中 Dox 积累的重要因素之一是与心磷脂的高亲和力结合有关,后者已知可维持线粒体的结构、功能、能量代谢和细胞存活^[21]。我们的研究证实,Dox 诱导可显著降低心肌组织/细胞 ATP 含量及增加线粒体 ROS 生成,而 Que 预处理可通过增加线粒体 ATP 生成及降低 ROS 生成抵抗 Dox 诱导的细胞毒性,降低心肌纤维化程度。

线粒体自噬是一个进化上保守的细胞进程,能去除功能失调或多余的线粒体,以维持线粒体功能稳态^[22]。Pink1 是 2001 年发现的一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在其 N 端含有一个线粒体靶向序列 (mitochondrial targeting sequence, MTS),在跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD) 旁边还存在一个外部线粒体定位信号 (outer mitochondrial localization signal, OMS)。Parkin 是 1998 年发现的一种 E3 泛素化连接酶,细胞功能正常时,由于线粒体内吞、蛋白酶切割和蛋白酶体降解,Pink1 持续维持在低水平,在细胞损伤时 Pink1 则积累于线粒体外膜并从胞浆中招募 Parkin 于线粒体,从而激活线粒体自噬^[23]。Pink1 依赖的线粒体自噬在细胞重编程过程中防止线粒体蓄积起关键作用^[24]。且线粒体质量控制对于心脏功能调节及防止疾病损伤和发展至关重要。如在心肌梗死后,Parkin 介导的线粒体自噬对心脏具有保护作用,缺乏 Parkin 的小鼠对心肌梗死更敏感,并且心脏中线粒体功能异常。另一项研究表明,Pink1/Parkin 途径的激活可调节线粒体自噬,抵抗脓毒症导致的心功能损伤^[24]。此外,Pink/Parkin 介导的线粒体自噬异常与 Dox 诱导

的心肌细胞毒性显著相关^[8]。因此,线粒体自噬的调节对心脏功能的维持具有重要作用。我们的研究证实,Dox 诱导可显著激活线粒体自噬,即上调线粒体自噬标志蛋白 Pink1、Parkin、及 LC3II 的表达而抑制 P62 蛋白活性,Que 预处理则显著降低 Pink1、Parkin、及 LC3II 的表达与增加 P62 的蛋白表达量,提示 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬在 Que 抵抗 Dox 诱导的线粒体损伤中有非常重要的作用。

Que 是一种天然的多酚化合物,在饮食中含量丰富。Que 已被证明对人体具有许多有益的作用,包括在心血管系统如心脏的缺血再灌注(ischemic reperfusion, I/R)损伤中具有重要的保护作用^[16,25]。Que 对蒽环类药物诱导的心脏毒性或其他类型的心脏疾病的保护作用主要通过其抗氧化、抗炎作用实现的^[26]。且已被众多的研究证实,在对啮齿动物的研究中发现,在给与 Dox 前 5~7 d 口服 Que,可显著缓解前者引起的心肌毒性进而预防心功能损伤^[9]。在对 SD 大鼠接受为期 2 周的 Dox 治疗中发现,在化疗前 15 d 并在化疗期间同时每日给予高剂量 Que,可显著降低血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)水平以,以改善 Dox 引起的心功能损伤^[14]。我们的研究表明,Que 预处理可以降低 Dox 诱导的 ROS 生成增加及促进线粒体 ATP 生成。此外,Que 的心肌保护作用被证实与缓解线粒体功能损伤具有重要相关性^[18]。我们在研究中发现,Dox 可诱导心肌组织/细胞线粒体自噬相关蛋白 Pink1、Parkin 及 LC3 的激活与 P62 活性降低,Que 预处理后可部分缓解 Dox 损伤状态下,Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬的激活,保护线粒体功能免受 Dox 诱导的细胞毒性损伤,而这种保护作用可被线粒体自噬激活剂 SB 而抵消。

我们的研究结果证实,Que 对 Dox 诱导的心肌毒性具有保护作用。其潜在的保护作用机制是通过抑制 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬实现的。SB 处理可部分抵消 Que 的保护作用。且 3 MA 与 Que 处理均可显著降低心肌细胞线粒体自噬。因此,Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬可能为 Dox 诱导的心肌毒性的潜在治疗靶点。此外,由于 Que 来源广泛且易于获得,对 Que 的心肌保护作用进行深入研究,有望成为减轻抗癌药物 Dox 引起的心肌毒性的重要治疗策略。

参考文献:

- [1] Wallace KB, Sardao VA, Oliveira PJ. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2020, 126(7): 926-941.
- [2] Renu K, VG A, PB T, et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy-An update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 241-253.
- [3] Studneva I, Palkeeva M, Veselova O, et al. Protective effects of a novel agonist of galanin receptors against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2019, 19(2): 136-146.
- [4] Yang M, Linn BS, Zhang Y, et al. Mitophagy and mitochondrial integrity in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(9): 2293-2302.
- [5] Zhang Y, Whaley-Connell AT, Sowers JR, et al. Autophagy as an emerging target in cardiorenal metabolic disease: From pathophysiology to management [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 191: 1-22.
- [6] 张颖颖, 段然, 陈永学, 等. 布比卡因致心肌 21 细胞线粒体损伤大鼠模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 13-18.
- [7] Yoo SM, Jung YK. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics [J]. *Mol Cells*, 2018, 41(1): 18-26.
- [8] Yin J, Guo J, Zhang Q, et al. Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 51: 1-10.
- [9] Navarro-Hortal MD, Varela-Lopez A, Romero-Marquez JM, et al. Role of flavonoids against adriamycin toxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 146: 111820.
- [10] Andres S, Pevny S, Ziegenhagen R, et al. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(1): 1700447.
- [11] Colunga Biancatelli RML, Berrill M, Catravas JD, et al. Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19) [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1451.
- [12] Jeszka-Skowron M, Krawczyk M, Zgoła-Grzeskowiak A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals [J]. *J Food Compost Anal*, 2015, 40: 70-77.
- [13] Guo X, Chen M, Zeng H, et al. Quercetin attenuates ethanol-induced iron uptake and myocardial injury by regulating the angiotensin II-L-type calcium channel [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(5): 1700772.
- [14] Zakaria N, Khalil SR, Awad A, et al. Quercetin reverses altered energy metabolism in the heart of rats receiving adriamycin chemotherapy [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18(2): 109

- 119.
- [15] Wu S, Lu Q, Ding Y, et al. Hyperglycemia-driven inhibition of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ induces diabetic cardiomyopathy by promoting mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes *in vivo* [J]. Circulation, 2019, 139 (16): 1913-1936.
- [16] Tang J, Lu L, Liu Y, et al. Quercetin improve ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo* study via SIRT1/PGC-1 α signaling [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 9747-9757.
- [17] du Pre BC, Dierickx P, Crnko S, et al. Neonatal rat cardiomyocytes as an *in vitro* model for circadian rhythms in the heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 112: 58-63.
- [18] Chen X, Peng X, Luo Y, et al. Quercetin protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress and improving mitochondrial function via 14-3-3 γ [J]. Toxicol Mech Methods, 2019, 29(5): 344-354.
- [19] Liang H, Su X, Wu Q, et al. LncRNA 2810403D21Rik/Mirf promotes ischemic myocardial injury by regulating autophagy through targeting miR26a [J]. Autophagy, 2020, 16(6): 1077-1091.
- [20] Mu J, Zhang D, Tian Y, et al. BRD4 inhibition by JQ1 prevents high-fat diet-induced diabetic cardiomyopathy by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy *in vivo* [J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 149: 1-14.
- [21] Wenningmann N, Knapp M, Ande A, et al. Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring [J]. Mol Pharmacol, 2019, 96(2): 219-232.
- [22] Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(9): 1013-1022.
- [23] Wang L, Lu G, Shen HM. The long and the short of PTEN in the regulation of mitophagy [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 299.
- [24] Naik PP, Birbrair A, Bhutia SK. Mitophagy-driven metabolic switch reprograms stem cell fate [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(1): 27-43.
- [25] Wang L, Tan A, An X, et al. Quercetin dihydrate inhibition of cardiac fibrosis induced by angiotensin II *in vivo* and *in vitro* [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127: 110205.
- [26] Ferenczyova K, Kalocayova B, Bartekova M. Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1585.

[收稿日期]2021-03-14