



曹丰, 解放军总医院第二医学中心教授、主任医师、博士生导师, 国家老年疾病临床医学研究中心常务副主任, 国家杰出青年科学基金获得者, 全国优秀科技工作者, 心血管病介入专家并享受国务院政府特殊津贴。担任中华医学会心血管分会委员、中国老年医学学会副会长、美国ACC Fellow、European Heart Journal合作编辑、Circulation Research编委等学术职务。长期从事冠心病介入诊治、缺血性心脏病心肌损伤修复及再生的基础探索及临床转化研究。在国际上通过多模态分子影像技术实现了对干细胞在心肌内存活增殖的多模态示踪(Circulation, 2006); 发现了成体干细胞的凋亡直接影响细胞治疗在缺血性心脏病的疗效与转归, 提出了激活微环境VEGF-AKT-mTOR分子通路可改善移植细胞在宿主心肌内的功能性存活以及微环境的适度炎症反应有利于缺血组织的损伤修复(Stem Cells, 2012; Aging Cell, 2012; Basic Res Cardiol, 2013); 率先完成了为期4年的急性心肌梗死自体细胞治疗的临床研究, 提出了自体骨髓细胞修复损伤心肌具有安全性但不能缩小梗死范围, 糖尿病状态可弱化细胞治疗的效果(Eur Heart J, 2009; Diabetes, 2013)。目前的课题方向包括: (1) 基于多模态分子影像技术的心肌再生及冠心病早期预警研究; (2) 基于多能干细胞技术的心血管疾病研究; (3) 基于多模态成像的心肌梗死后微循环代谢稳态失衡的机制研究。

## 基于iPS技术探索肿瘤靶向药物心肌毒性的实验研究

韩东<sup>1#</sup> 苗嘉鑫<sup>1,2,3#</sup> 马焱<sup>1,2</sup> 张阳<sup>1,2</sup> 曹丰<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>解放军总医院第二医学中心&国家老年疾病临床研究中心(解放军总医院), 北京 100853;

<sup>2</sup>解放军医学院, 北京 100853; <sup>3</sup>南开大学医学院, 天津 300071)

**摘要** 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)的心血管副作用越来越得到人们的重视。人诱导多能干细胞(hiPSCs)在体外可分化为各种类型的体细胞, 且来源充足, 为药物早期毒性评价提供了一个较理想的细胞模型。该研究通过TKIs类药物舒尼替尼干预人诱导性多能干细胞来源心肌细胞(human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs), 观察其心肌毒性。体外培养结合化学诱导定向分化得到hiPSC-CMs, 实验分为对照组以及5.6 μmol/L舒尼替尼(IC<sub>50</sub>浓度, CCK8实验结果)干预24 h和48 h组。通过免疫荧光观察HIF-1α的表达、细胞缺氧状态及线粒体膜电位变化; 通过透射电镜观察线粒体结构变化; 通过流式细胞术探索线粒体膜电位变化与细胞凋亡情况; 通过Western blot技术检测各组HIF-1α蛋白的表达。结果显示, 与对照组相比, 观察

收稿日期: 2021-04-06 接受日期: 2021-06-21

国家自然科学基金(批准号: 81820108019、91939303)和中国博士后基金(批准号: BX20200154)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 010-55499449, E-mail: fengcao8828@163.com

Received: April 6, 2021 Accepted: June 21, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81820108019, 91939303) and the National Postdoctoral Program for Innovative Talents (Grant No.BX20200154)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-10-55499449, E-mail: fengcao8828@163.com

到舒尼替尼干预组线粒体结构出现明显损伤,线粒体膜电位受到破坏,出现明显凋亡和坏死现象,且细胞处于缺氧状态,HIF-1 $\alpha$ 被过度激活。总之,舒尼替尼可引起心肌细胞线粒体结构破坏、细胞缺氧及凋亡和坏死,并且可诱导HIF-1 $\alpha$ 过度激活。

**关键词** hiPSC-CMs; TKIs; 心肌毒性; 舒尼替尼

## Experimental Study on Cardiotoxicity of Tumor Targeting Drugs Based on iPSC Technology

HAN Dong<sup>1</sup>, MIAO Jiabin<sup>1,2</sup>, MA Yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Yang<sup>1,2</sup>, CAO Feng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>The Second Medical Center & National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; <sup>2</sup>Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China;

<sup>3</sup>Medical School of Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** Increasing attention has been paid to the cardiovascular side effects of TKIs (tyrosine kinase inhibitors). Human induced pluripotent stem cells can differentiate into various types of somatic cells *in vitro* and have a rich resource, which provides an ideal choice for early drug toxicity evaluation. In this study, the cardiotoxicity of sunitinib was observed in sunitinib-exposed hiPSC-CMs (human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes). Cultured *in vitro* and chemically induced, hiPSC-CMs were divided into control group, 5.6  $\mu\text{mol/L}$  sunitinib (IC<sub>50</sub> concentration, determined by CCK8 method) intervention group for 24 h and 48 h group. The expression of HIF-1 $\alpha$ , the state of hypoxia and the change of mitochondrial membrane potential were evaluated by immunofluorescence; the structural changes of mitochondria were observed by transmission electron microscope; mitochondrial membrane potential and cell apoptosis were examined by flow cytometry. The results showed that sunitinib induced significant mitochondrial structure damage, mitochondrial membrane potential dissipation, apparent hypoxia, and elevated HIF-1 $\alpha$  expression, which was paralleled with overt apoptosis and necrosis. In summary, sunitinib can cause mitochondrial structural damage, hypoxia, apoptosis and necrosis, as well as hyperactivation of HIF-1 $\alpha$  in hiPSC-CMs.

**Keywords** hiPSC-CMs; TKIs; cardiotoxicity; sunitinib

随着抗肿瘤方法及抗肿瘤药物的不断发展,肿瘤患者预后得到改善,长期生存率明显增加,但放疗、化疗靶向治疗及免疫治疗等抗肿瘤治疗相关的心血管并发症也日益增多,可引起一系列广泛的短期及长期心血管毒性事件<sup>[1-2]</sup>。酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 近年来成为癌症治疗的新一线靶向药,能够选择性地作用于靶向肿瘤细胞,对慢性粒细胞白血病、乳腺癌、胃肠道间质瘤等恶性肿瘤有明显的治疗作用,但随着TKIs在临床上使用的增加,其心脏毒性逐渐成为临床关注的重要问题<sup>[3]</sup>。其中,舒尼替尼(sunitinib)为TKIs临床上严重心脏不良事件相关的药物之一。舒尼替尼的心脏毒性作用既来自其所致高血压的继发改变,既往研究也证实其具有直接的心肌毒性<sup>[4-6]</sup>。

人类诱导性多功能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 可以通过小分子化合物化学诱导定向分化为心肌细胞 (human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)。hiPSC-CMs在分子生物学、电生理和力学特性等方面更接近生理状态下的原代心肌细胞,其能够在细胞水平上呈现某种疾病表型和发展变化过程,且在心血管病模型构建和药物筛选方面的研究已经取得了重要进展<sup>[1,7-9]</sup>。

在本实验中,我们通过人工诱导iPSC获得人源诱导来源心肌细胞 (hiPSC-CMs), 构建舒尼替尼干预hiPSC-CMs模型,从线粒体结构、线粒体膜电位变化、细胞凋亡、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达、细胞缺氧情况等多个方面观察舒尼替尼的心肌毒性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人诱导性多能干细胞株PGP1购自北京赛贝生物技术有限公司, 并在本实验室长期冻存保种。

1.1.2 主要试剂 Matrigel基质胶购自美国Corning公司; 人胚胎干细胞/多能干细胞培养基mTeSR1购自美国Stem Cell公司; Y27632ROCK1抑制剂、GSK3受体抑制剂CHIR99021、Wnt抑制剂Endo-IWR1购自英国Tocris Bioscience公司; Knockout™ DMEM培养基、无糖DMEM培养基、RPMI1640培养基、B-27补充剂(50×)、B-27补充剂(50×)无胰岛素购自美国Life Technology公司; 线粒体膜电位检测试剂盒JC-1与TMRM购自美国Abcam公司; 舒尼替尼购自克林公司; CCK8试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 hiPSC-CMs分化及培养 从液氮罐中取出有人多能性干细胞系(hiPSC)的1.5 mL冻存管, 置于37 °C水浴中融化, 1 000 r/min离心5 min, 去除上清液。用mTeSR1+5 μmol/L Y27632培养基重悬细胞, 并以 $2 \times 10^5$ 细胞/10cm<sup>2</sup>的细胞密度种植于Matrigel包被的细胞培养板中, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。24 h后换成mTeSR1, 并且每天换液, 用显微镜观察细胞长势。

采用0.5 mmol/L EDTA消化并传代得到的hiPSCs(P20)以1:15~1:12的比例种植于Matrigel包被过的6孔板中, 24 h内使用mTeSR1+5 μmol/L Y27632培养基培养, 每孔添加2 mL培养基, 24 h后, 换成mTeSR1培养基, 每天换液。细胞培养生长3~4天, 显微镜观察细胞密度达到约85%后, 进行心肌分化诱导。通过倒置相差显微镜实时观察并记录hiPSC-CMs形态和搏动情况:

(1) 第0天, 弃原mTeSR1培养基, 1× PBS冲洗细胞2次; 添加RPMI1640+B27无胰岛素+5 μmol/L肝酯合成激酶-3β抑制剂(glycogen synthase kinase-3β inhibitor) CHIR99021, 培养24 h;

(2) 第1天, 弃原培养基, 添加RPMI1640+B27无胰岛素培养基;

(3) 第3天, 弃原培养基, 添加RPMI1640+B27无胰岛素+5 μmol/L的Wnt抑制剂endo-IWR1;

(4) 第5天, 弃原培养基, 添加RPMI1640+B27无胰

岛素培养基; 第7~13天, 培养基换成RPMI1640+B27补充剂培养基, 每3天换1次培养基;

(5) 第14~19天, 培养基换成无葡萄糖的DMEM+4 mmol/L乳酸钠培养基, 每3天换1次培养基;

(6) 第19~30天, 培养基换成RPMI1640+B27补充剂培养基, 每3天换1次培养基。

1.2.2 心肌毒性及IC<sub>50</sub>测定(CCK8法) 96孔板中配制100 μL的细胞悬液(6组×4复孔)。将培养板在37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱内预培养24 h; 向培养板的药物组每孔加入10 μL的1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L、1 000 μmol/L舒尼替尼溶液, 在培养箱中继续培养48 h。换用新鲜培养基(除去旧的培养基, 并用新鲜培养基洗涤细胞2次, 然后加入新的培养基), 向每孔加入10 μL CCK8溶液, 避免气泡产生。将加入CCK8的培养板在37 °C培养箱内孵育2 h, 用酶标仪测定波长在450 nm处的吸光度值。利用CCK8法计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)时, 采用如下设置。阴性对照组Control: 溶媒(0.1% DMSO), 实验中以该组细胞活力为100%; 空白组Blank: 无细胞的孔, 用于吸光度值的调零(减去本底吸光度值); 细胞活力(cell viability)(%)= $(D_{\text{drug}} - D_{\text{blank}}) / (D_{\text{Control}} - D_{\text{blank}}) \times 100\%$ , 将舒尼替尼诱导hiPSC-CMs细胞活力降到50%时的浓度称为IC<sub>50</sub>, 用于后续实验。

1.2.3 透射电子显微镜下观察线粒体 将分组干预后的心肌细胞从培养箱中取出, 弃去培养基, 加入预冷的电镜固定液至没过细胞, 固定10 min后刮下细胞, 转移至离心管中, 800 r/min离心5 min, 去除大部分上清液, 将离心管里的细胞转入1.5 mL EP管中, 加入适量预冷戊二醇, 置于4 °C冰箱中固定。梯度乙醇脱水后包埋。37 °C烘箱内过夜, 45 °C烘箱内处理12 h, 60 °C烘箱内固化48 h。随后, 用超薄切片机(莱卡EMUC7)切片, 厚度为70 nm。最后, 铀铅双染色(2%醋酸铀饱和乙醇溶液、枸橼酸铅, 各染色15 min, 在HITACHI HT7800透射电子显微镜下观察细胞亚显微结构, 采集图像并分析。

1.2.4 检测线粒体膜电位 配制JC-1染色工作液: 将JC-1配制成1 mmol/L, 再用缓冲液稀释为1 μmol/L。用PBS溶液冲洗细胞3次, 然后加入JC-1染色工作液和缺氧探针pimonidazole, 37 °C孵育10 min; 在激光共聚焦显微镜下观察细胞膜电位变化、绿色荧光和红色荧光强度。在检测细胞膜电位时, 按照产品说



说明书37 °C孵育TMRM荧光探针, 上机检测细胞膜电位。

**1.2.5 免疫荧光观察 HIF-1 $\alpha$  的表达及缺氧情况** 将生长状况良好的hiPSC-CMs接种于细胞爬片, 密度为 $6 \times 10^5$ /片, 用PBS溶液冲洗3次, 分组培养, 缺氧探针37 °C孵育2 h。4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS溶液冲洗3次。细胞破膜: 0.1% Triton X-100透膜30 min, PBS溶液冲洗3次。二抗孵育及封片: 提前配制好1:1 000稀释荧光标记的二抗, 37 °C孵育1 h, PBS溶液冲洗3次。用Mounting Medium(含DAPI)封片, 避光保存。激光共聚焦显微镜下观察细胞HIF-1 $\alpha$ 的表达情况及细胞缺氧情况。

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 将各组的细胞用心肌细胞消化液消化后转移入离心管, 800 r/min离心5 min, 移除上清; 弃上清, PBS溶液洗涤2次,  $1 \times$ 缓冲液重悬细胞, 制备成单细胞悬液; 10  $\mu$ L Annexin V-FITC+10  $\mu$ L PI染色液, 充分混匀, 放置15 min(4 °C严格避光); 最后, 加入Annexin V结合液500  $\mu$ L。流式细胞检测结果显示, 绿色荧光代表Annexin V-FITC, 红色荧光代表PI(整个过程控制在30 min); 每管中加入300  $\mu$ L  $1 \times$ 结合缓冲液并混匀后避光条件下将细胞悬液转移到5 mL流式管中, 1 h内于流式细胞仪上机检测。

**1.2.7 统计学分析** 各实验均独立重复3次, 使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。定量资料、结果数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 符合正态分布的两组间数据比较采用 $t$ 检验, 多组间数据采用方差分析,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hiPSC-CMs的定向分化及鉴定

按1.2.1部分描述的方法对iPSCs进行复苏及培养, hiPSCs克隆界限清楚, 形态扁平, 当汇合度达到80%~90%后, 开始定向分化, 细胞克隆形状不断变化, 细胞同时向周围延伸, 在分化第8天左右开始出现跳动的心肌细胞(图1A和图1B)。分化成功的心肌细胞可表达心肌细胞特异性标志物Troponin-T和 $\alpha$ -actinin, 免疫荧光法检测结果显示, 定向分化后细胞能够表达这两种蛋白, 表明心肌细胞定向分化成功(图1C)。

### 2.2 舒尼替尼心肌毒性IC<sub>50</sub>测定(CCK8法)

采用浓度梯度0、0.1、1、10、100  $\mu$ mol/L的舒

尼替尼处理hiPSC-CMs, 持续48 h, CCK8法测定细胞活力, 将数据用Prism软件作图并计算分析(图2); CCK8法发现, 1、10、100  $\mu$ mol/L的舒尼替尼处理48 h可浓度依赖性地抑制hiPSC-CMs的细胞活力(图2A), IC<sub>50</sub>计算结果: 舒尼替尼干预心肌细胞24 h细胞存活率为50%时的舒尼替尼浓度为(5.6 $\pm$ 0.4)  $\mu$ mol/L(图2B,  $n=3$ ,  $P < 0.001$ )。

### 2.3 舒尼替尼干预后心肌细胞线粒体超微结构观察

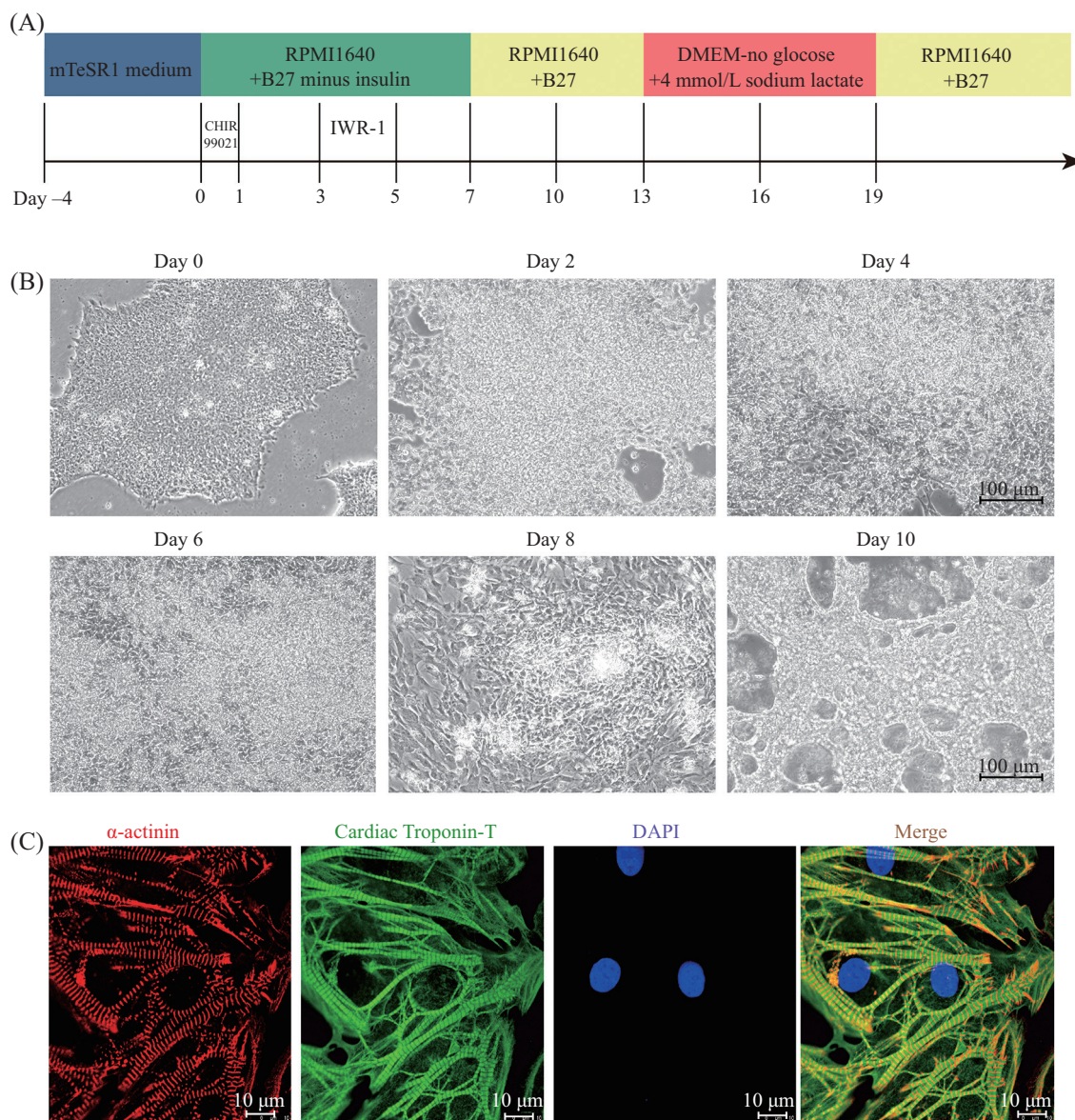
电镜下观察心肌细胞线粒体超微结构。对照组hiPSC-CMs在透射电镜下可见正常心肌细胞的胞质内线粒体(白色箭头所示)十分丰富, 且形态清晰正常。5.6  $\mu$ mol/L舒尼替尼干预24 h后观察到的hiPSC-CMs线粒体超微结构显示, 线粒体结构出现损伤, 包括线粒体肿胀、变圆及线粒体嵴断裂等。5.6  $\mu$ mol/L舒尼替尼干预48 h后观察到的hiPSC-CMs线粒体超微结构显示, 线粒体结构严重损伤, 线粒体形态不清晰空泡化, 结构混乱, 胞质内出现自噬体(图3)。

### 2.4 舒尼替尼干预后心肌细胞线粒体膜电位检测

图4为5.6  $\mu$ mol/L舒尼替尼分别干预24 h、48 h后且经JC-1染色观察到的线粒体膜电位变化。正常对照组可见JC-1红色荧光较强而绿色荧光较弱; 5.6  $\mu$ mol/L舒尼替尼干预24 h后的JC-1染色结果显示, 与对照组相比红色荧光减弱, 绿色荧光增强; 而5.6  $\mu$ mol/L舒尼替尼干预48 h后的JC-1染色结果显示, 相对于干预24 h红色荧光进一步减弱。基于TMRM荧光探针的线粒体膜电位流式细胞术检测结果进一步证实, 舒尼替尼干预后心肌细胞膜电位下降。

### 2.5 舒尼替尼干预后细胞处于缺氧状态, HIF-1 $\alpha$ 的表达增加

图5A所示为免疫荧光染色检测心肌细胞HIF-1 $\alpha$ 的表达及细胞缺氧情况, 其中绿色荧光为HIF-1 $\alpha$ , 红色荧光为细胞经缺氧探针试剂孵育后观察到的结果, 缺氧细胞中的缺氧探针可被还原并活化, 活化后的产物可与巯基基团结合成为稳定的化合物, 经激发后可发出红色荧光。定量结果显示, 舒尼替尼可以时间依赖性地引起HIF-1 $\alpha$ 的上调和细胞缺氧状况的加剧(图5B和图5C)。图5B所示为5.6  $\mu$ mol/L舒尼替尼干预后通过Western blot方法检测心肌细胞HIF-1 $\alpha$ 的表达情况。结果显示与对照组相比, 舒尼替尼干预后心肌细胞HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达增加, 且舒尼替尼干预48 h较舒尼替尼干预24 h时HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达量



A: hiPSC-CMs的定向分化及鉴定的流程示意图; B: hiPSC-CMs的定向分化的第0天、第2天、第4天、第6天、第8天、第10天的光镜下照片; C: 第30天纯化后的心肌细胞心肌细胞特异性标志物Troponin-T和 $\alpha$ -actinin的免疫荧光鉴定。

A: the schematic diagram of the process of hiPSC-CMs differentiation; B: the photos of hiPSC-CMs on the 0<sup>th</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day of induced differentiation under bright-field microscopy; C: immunofluorescence identification of purified cardiomyocytes of Day 30 with specific cardiac markers Troponin-T and  $\alpha$ -actinin.

图1 hiPSC-CMs的定向分化及鉴定

Fig.1 Induced differentiation and identification of hiPSC-CMs

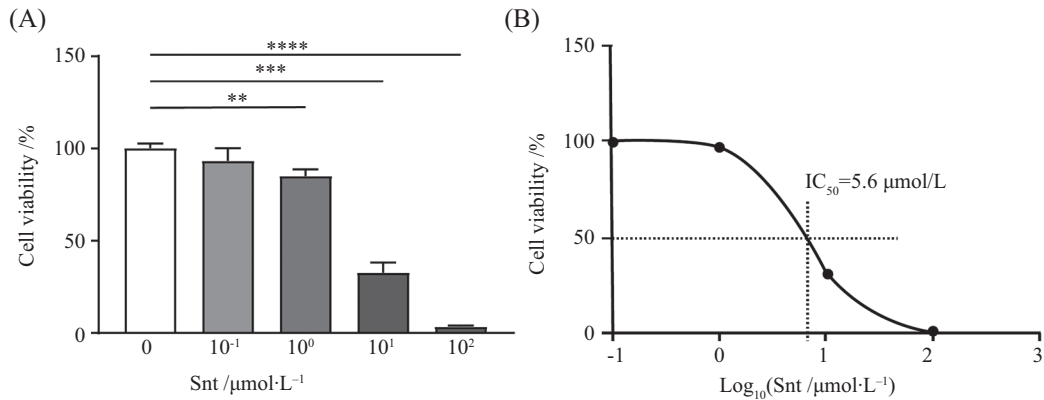
显著增多(图5D)。

## 2.6 舒尼替尼干预后心肌细胞凋亡与坏死情况

Annexin V-FITC与PI双染流式细胞术检测舒尼替尼干预后心肌细胞凋亡与坏死情况(图6A)。与对照组相比,舒尼替尼干预后的健康细胞比例显著降低,且48 h组降低更明显(图6B)。比较Annexin V单阳性的凋亡情况显示,凋亡细胞比例在舒尼替尼干预后显著增加,但48 h处理后细胞凋亡比例较24 h组

有一定降低(图6C)。比较PI单阳性的坏死情况显示,坏死细胞比例在舒尼替尼干预后显著增加,且48 h处理后细胞坏死比例较24 h组有明显增加(图6D)。另外,我们使用心肌结构蛋白CTnT染色显示心肌特异性的肌节结构,结果如图6E所示。我们发现,舒尼替尼处理24 h可造成心肌细胞肌节结构的严重破坏,处理48 h可进一步加重心肌肌节结构的破坏和紊乱(图6E)。



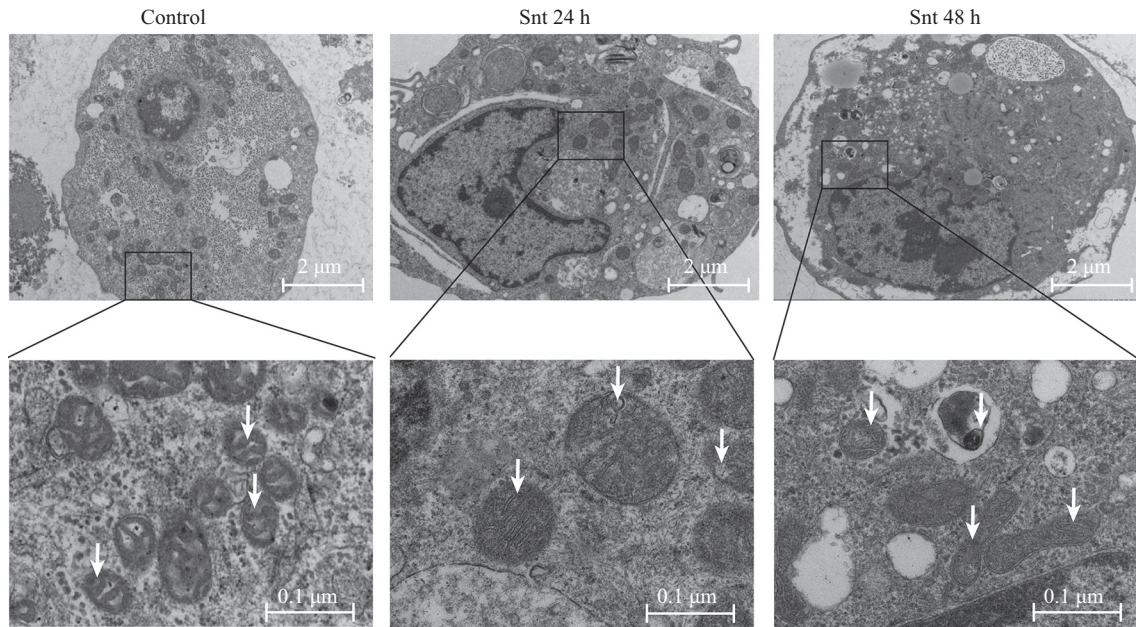


A: 不同浓度0、0.1、1、10、100 μmol/L的舒尼替尼处理hiPSC-CMs,持续48 h, CCK8法测定的细胞活力值; B: 舒尼替尼心肌毒性IC<sub>50</sub>曲线及计算。Snt代表舒尼替尼; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: hiPSC-CMs was treated with different concentrations of 0, 0.1, 1, 10, 100 μmol/L sunitinib for 48 hours, and the cell viability was measured by CCK8. B: the IC<sub>50</sub> curve of cardiotoxicity of sunitinib and its calculation. Snt indicates sunitinib; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

图2 舒尼替尼心肌毒性IC<sub>50</sub>测定

Fig.2 IC<sub>50</sub> determination of cardiotoxicity of sunitinib



Snt代表舒尼替尼。箭头指向线粒体。

Snt represents sunitinib. Arrows indicate mitochondrions.

图3 舒尼替尼干预后心肌细胞线粒体超微结构观察

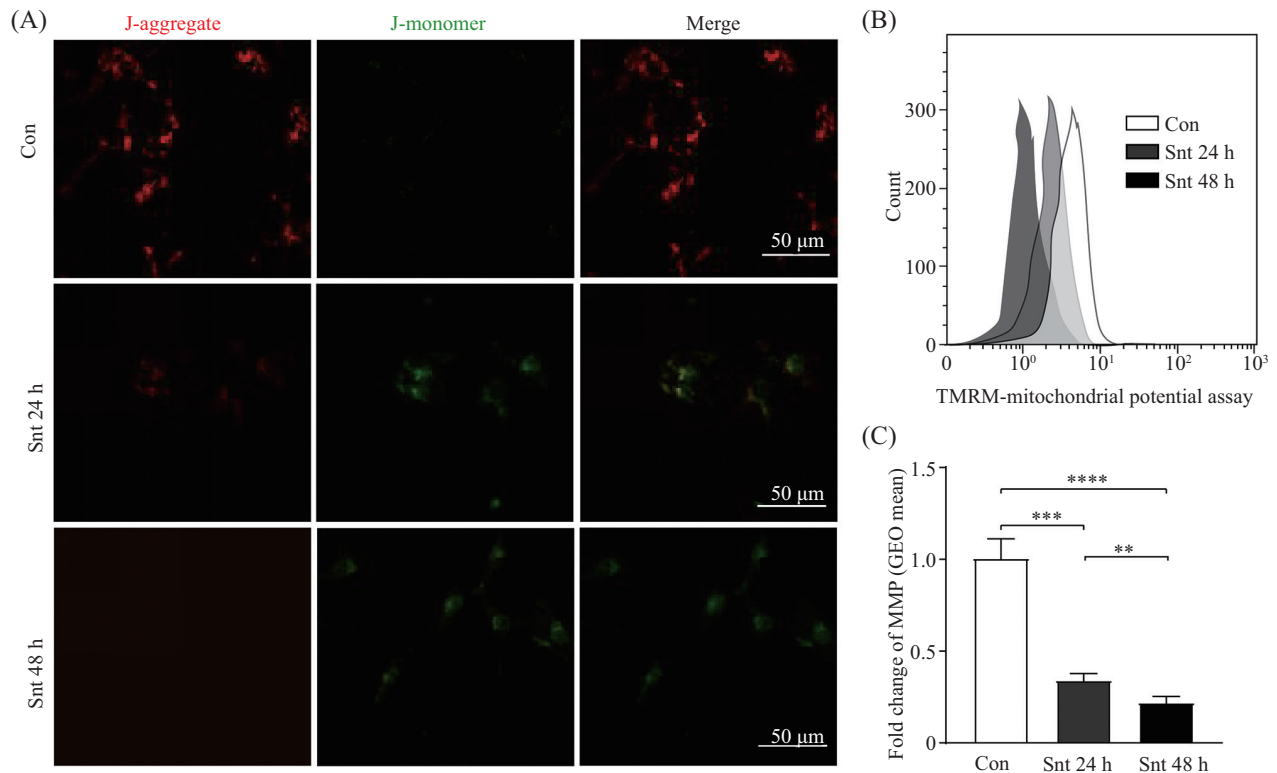
Fig.3 Mitochondrial ultrastructure of cardiomyocytes post sunitinib treatment

### 3 讨论

尽管TKIs靶向治疗等新型抗肿瘤药物在一定程度上改善了多种癌症的治疗和预后,给肿瘤患者带来收益,使肿瘤患者生存期延长,但是在这类药物的临床应用过程中有部分患者出现严重的心血管毒性<sup>[10]</sup>。因此,我们需要积极关注这类患者,对高风险患者进行及时的识别及治疗,而这需要心脏科及肿瘤科等多科室联合诊治,使肿瘤患者在抗肿瘤治疗

获得较长生存期的同时获得较好的生存质量<sup>[11]</sup>。

在本实验中,我们建立了hiPSC-CMs舒尼替尼干预模型,通过透射电镜观察了心肌细胞的线粒体超微结构,并通过JC-1染色法在激光共聚焦下观察了心肌细胞线粒体膜电位的变化情况。线粒体是细胞的主要能量代谢场所,由线粒体外膜、线粒体间隙、线粒体内膜和线粒体基质四个部分组成,线粒体结构的完整性是线粒体进行正常能量代谢的基



A: JC-1染色荧光显微镜代表性图片; B: 基于TMRM荧光探针的线粒体膜电位流式细胞术检测结果; C: B图的定量结果。Snt代表舒尼替尼; GEO代表几何平均数; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: representative JC-1 staining images; B: flow cytometry based detection of mitochondrial membrane potential based on TMRM fluorescent probe. C: quantitative results of panel B. Snt indicates sunitinib; GEO stands for geometric mean; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

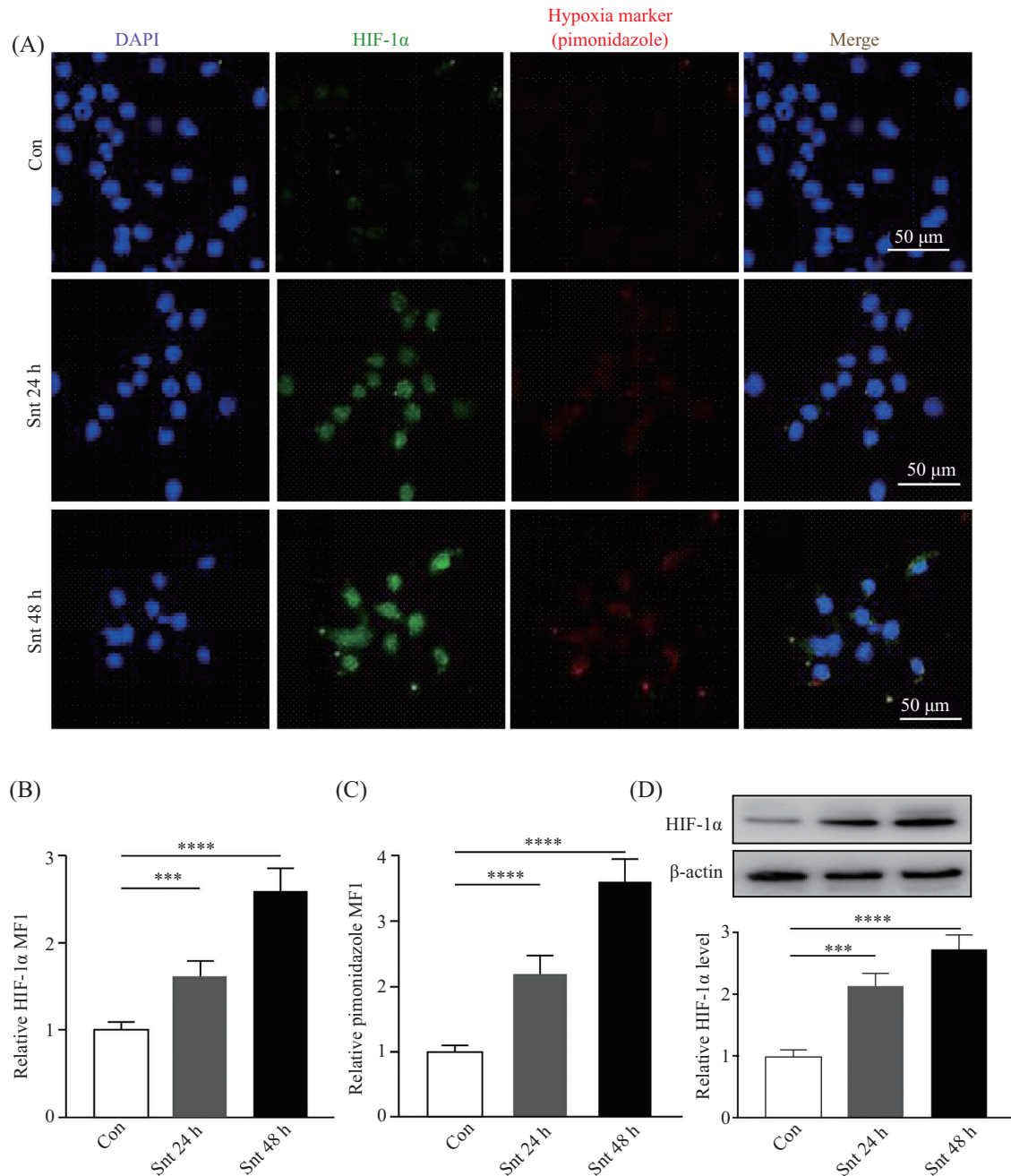
图4 舒尼替尼干预后心肌细胞线粒体膜电位检测

#### Fig.4 Mitochondrial membrane potential of cardiomyocytes post sunitinib treatment

础。由于心脏的高能量需求, 心肌细胞线粒体体积占心肌细胞体积30%以上, 因此, 线粒体损伤引起细胞能量代谢异常可导致心肌病、心力衰竭等一系列心血管疾病<sup>[12]</sup>。线粒体膜电位的下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 一旦线粒体膜电位崩溃, 则会发生不可逆转的细胞凋亡<sup>[13]</sup>。在本实验中, 我们观察到与对照组相比, 舒尼替尼干预后心肌细胞线粒体结构出现严重损伤, 包括线粒体肿胀变圆, 严重者出现线粒体的内膜嵴断裂, 舒尼替尼干预48 h时线粒体结构的损伤较干预24 h更为严重, 在舒尼替尼干预48 h组中可观察到自噬体, 说明舒尼替尼可引起心肌细胞线粒体结构的严重破坏从而导致心肌毒性的发生。同时, 在舒尼替尼干预组中还可观察到线粒体膜电位下降。细胞凋亡检测的结果显示, 与对照组相比, 舒尼替尼干预组的部分心肌细胞处于凋亡状态, 舒尼替尼干预48 h时的心肌细胞较舒尼替尼干预24 h坏死细胞增多, 健康细胞更少。此结果提示: 舒尼替尼干预后早期心肌细胞

以凋亡为主, 随着时间推移, 心肌细胞由凋亡向坏死转变。

我们还通过缺氧探针的孵育在激光共聚焦下观察到舒尼替尼干预后的心肌细胞处于缺氧状态, 伴随HIF-1 $\alpha$ 表达增加。HIF是动物细胞对氧气进行感知和反应的一个重要因子, HIF-1是由氧分压依赖HIF-1 $\alpha$ 和非氧分压依赖的HIF-1 $\beta$ 构成的异源二聚体, 在细胞、组织和生物体中的对氧可利用性变化的转录反应中起着关键作用<sup>[14]</sup>。常氧条件下, 胞质内的HIF-1 $\alpha$ 蛋白通过氧依赖性的过程发生羟基化, 并通过泛素-蛋白酶系统快速被降解, 几乎不存在累积现象<sup>[15]</sup>。缺氧条件下, 泛素-蛋白酶体系受到抑制, HIF-1 $\alpha$ 蛋白稳定存在, 并转入细胞核内, 与核内的HIF-1 $\beta$ 形成异源二聚体复合物后, 通过靶向序列(RCGTG)与缺氧反应元件(hypoxia response elements, HRE)结合, 激活缺氧诱导基因的转录, 调控下游基因的表达, 参与调控能量供给、凋亡、自噬、血管生成以及其他缺氧适应性反应, 对器官组织结构、



A: 荧光显微镜检测HIF-1α表达、缺氧探针pimonidazole代表性图片; B、C: HIF-1α、缺氧探针pimonidazole的荧光强度定量; D: Western blot检测HIF-1α的表达。Snt代表舒尼替尼; MF1代表平均荧光强度; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: the expression of HIF-1α was detected by fluorescence microscope, the representative image of hypoxia marker pimonidazole; B,C: the fluorescence intensity quantification of HIF-1α and hypoxia marker pimonidazole. D: the expression of HIF-1α was detected by Western blot. Snt indicates sunitinib; MF1 stands for mean fluorescence intensity; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

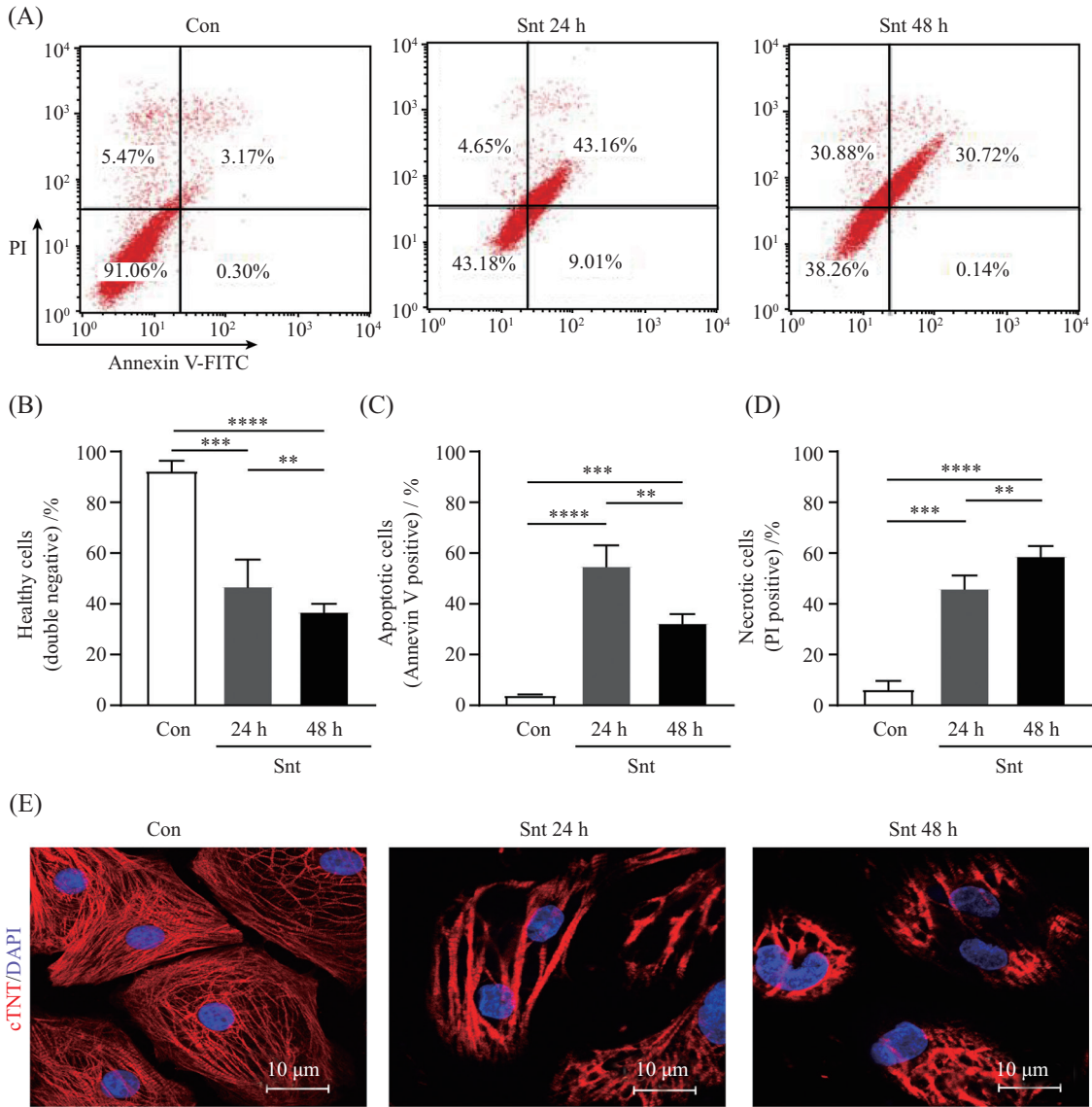
图5 舒尼替尼干预后心肌细胞缺氧状态及HIF-1α表达检测

Fig.5 Detection of hypoxia and expression of HIF-1α in cardiomyocytes post sunitinib treatment

功能和代谢产生短期和长期影响<sup>[15-17]</sup>。HIF是参与低氧转录反应调控的主要转录因子。在缺氧过程中, HIF-1α水平积累, 并引发糖酵解、细胞存活和抗氧化等过程中的相关基因表达增加。通过这些转录调节活动, HIF的激活在生理性缺氧条件下的细胞生

存中起着至关重要的作用<sup>[18]</sup>。然而, 严重缺氧能够诱导HIF异常持久激活, 并转录激活BNIP3。BNIP3的过表达导致线粒体损伤及功能障碍(膜电位降低)、Caspase非依赖性凋亡以及威胁细胞生存的线粒体自噬增加, 并使细胞对氰化物诱导的毒性损伤敏感<sup>[19]</sup>。





A: Annexin V-FITC与PI双染流式细胞术代表性图片; B: 双阴性健康细胞定量比较; C: Annexin V单阳性的凋亡细胞定量; D: PI单阳性的坏死细胞定量; E: 心肌结构蛋白cTnT免疫荧光检测显示心肌细胞肌节结构的破坏情况。Snt代表舒尼替尼; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。A: representative images of AnnexinV-FITC and PI double staining flow cytometry; B: double negative healthy cells quantification; C: Annexin V single positive apoptotic cells quantification; D: PI single positive necrotic cells were quantified; E: immunofluorescence detection of myocardial structural protein cTnT shows the destruction of sarcomere structure in cardiomyocytes. Snt indicates sunitinib; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图6 舒尼替尼干预后心肌细胞凋亡与坏死情况

Fig.6 Cardiomyocytes apoptosis and necrosis post sunitinib treatment

此外, 最新的一项研究表明, HIF-1 $\alpha$ 在炎症巨噬细胞中被过度激活, 导致线粒体功能障碍和能量耗竭并诱发巨噬细胞坏死, 从而加速动脉粥样硬化坏死核心的形成<sup>[20]</sup>。类似地, 在缺血性脑卒中模型中, HIF-1 $\alpha$ 过度激活导致了神经元发生NLRP3依赖性的细胞凋亡和焦亡, 而抑制HIF-1 $\alpha$ 激活可以显著减少神经元的死亡<sup>[21]</sup>。在本实验中, 与对照组相比, 舒尼替尼干预后的心肌细胞处于明显缺氧状态, 并引发明显的线粒体功能障碍, 根据以往的文献, 我们推测

舒尼替尼可能通过激活HIF-1 $\alpha$ /BNIP3信号通路导致线粒体损伤和线粒体过度自噬, 最终导致细胞死亡, 但这些推测未来需要更多的实验加以验证。

综上所述, 在本实验中我们观察到舒尼替尼可导致心肌细胞线粒体结构破坏、膜电位下降及凋亡增加, 同时观察到细胞处于缺氧状态, HIF-1 $\alpha$ 表达增多, 但舒尼替尼对心脏毒性的具体机制较为复杂, 本实验未能研究其具体机制及相关通路。本实验有助于后续科研人员基于hiPSC定向分化获得的心肌细

胞模型, 在用其他各种肿瘤药物干预后从多个方面观察其心肌毒性并进行相关机制及通路研究, 根据相关通路研发针对性的药物来减少或预防其心肌细胞毒性作用。对于本实验中所用到的抗肿瘤药物舒尼替尼, 我们通过使用保护线粒体功能、改善膜电位的相关药物, 减少线粒体损伤及凋亡, 这可能有助于减弱其心肌毒性。

### 参考文献 (References)

- [1] MIAO J X, GAO S, FAN L, et al. Progress in prevention and treatment of myocardial injury induced by cancer therapy [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(22): 2724-8.
- [2] HERRMANN J. Adverse cardiac effects of cancer therapies: cardiotoxicity and arrhythmia [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(8): 474-502.
- [3] ORPHANOS G S, IOANNIDIS G N, ARDAVANIS A G. Cardiotoxicity induced by tyrosine kinase inhibitors [J]. *Acta Oncol*, 2009, 48(7): 964-70.
- [4] CHU T F, RUPNICK M A, KERKELA R, et al. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib [J]. *Lancet*, 2007, 370(9604): 2011-9.
- [5] YANG Y, LI N, CHEN T, et al. Sirt3 promotes sensitivity to sunitinib-induced cardiotoxicity via inhibition of GTSP1/JNK/autophagy pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(11): 3249-60.
- [6] SOURDON J, FACCHIN C, CERTAIN A, et al. Sunitinib-induced cardiac hypertrophy and the endothelin axis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(8): 3830-8.
- [7] YOSHIDA Y, YAMANAKA S. Induced pluripotent stem cells 10 years later: for cardiac applications [J]. *Circ Res*, 2017, 120(12): 1958-68.
- [8] GINTANT G, BURRIDGE P, GEPSTEIN L, et al. Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in preclinical cancer drug cardiotoxicity testing: a scientific statement from the American heart association [J]. *Circ Res*, 2019, 125(10): e75-92.
- [9] HAN D, WANG Y, WANG Y, et al. The tumor-suppressive human circular RNA CircITCH sponges mir-330-5p to ameliorate doxorubicin-induced cardiotoxicity through upregulating SIRT6, survivin, and SERCA2a [J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): e108-25.
- [10] GUHA A, ARMANIOUS M, FRADLEY M G. Update on cardiology: novel cancer therapeutics and associated cardiotoxicities [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2019, 29(1): 29-39.
- [11] 赵岚, 杨烽华, 张少衡. 肿瘤心脏病学及抗肿瘤药物的心脏毒性[J]. *生理科学进展*(ZHAO L, YANG F H, ZHANG S H. *Cardiology and cardiotoxicity of antitumor drugs* [J]. *Progress in Physiological Sciences*), 2017, 48(3): 197-202.
- [12] WALLACE K B, SARDÃO V A, OLIVEIRA P J. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2020, 126(7): 926-41.
- [13] GIACOMELLO M, PYAKURELA, GLYTOSOU C, et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 204-24.
- [14] ZHANG Z, YAO L, YANG J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4): 3547-54.
- [15] LIU M, GALLI G, WANG Y, et al. Novel therapeutic targets for hypoxia-related cardiovascular diseases: the role of HIF-1 [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 774.
- [16] CERYCHOVA R, PAVLINKOVA G. HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 460.
- [17] KOYASU S, KOBAYASHI M, GOTO Y, et al. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: two decades of knowledge [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(3): 560-71.
- [18] LOOR G, SCHUMACKER P T. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemiareperfusion [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4): 686.
- [19] ZHANG L, LI L, LIU H, et al. HIF-1 $\alpha$  activation by a redox-sensitive pathway mediates cyanide-induced BNIP3 upregulation and mitochondrial-dependent cell death [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(1): 117.
- [20] KARSHOVSKA E, WEI Y, SUBRAMANIAN P, et al. HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) promotes macrophage necroptosis by regulating miR-210 and miR-383 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 583.
- [21] JIANG Q, GENG X, WARREN J, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) mediates NLRP3 inflammasome-dependent-pyrototic and apoptotic cell death following ischemic stroke [J]. *Neuroscience*, 2020, 448: 126.