

木香烃内酯通过抑制线粒体凋亡和自噬来减轻阿霉素诱导的心肌细胞损伤

吴玉^{1*} 罗智¹ 胡春华²

(¹绵阳市人民医院心血管内科, 绵阳 621000; ²绵阳市人民医院产科, 绵阳 621000)

摘要 该研究探讨木香烃内酯(costunolide, Cos)对阿霉素(doxorubicin, DOX)诱导心肌细胞损伤的保护作用及机制。在细胞实验中, 将H9C2心肌细胞分为正常组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和Rapamycin组, 以DOX建立损伤模型。EDU检测细胞增殖活力、流式细胞术检测细胞凋亡率、免疫荧光染色检测LC3表达情况。在动物实验中, 以SD大鼠为对象, 将其随机分成5组: Ctrl组、Model组、L-Cos组、M-Cos组和H-Cos组, 每组10只。彩色多普勒超声检测大鼠心脏功能。HE和Masson染色检测心肌组织病理变化。蛋白免疫印迹检测并分析与凋亡、自噬过程密切相关的蛋白表达水平, 以揭示所研究生物体系中的潜在分子机制。电镜下观察心肌细胞线粒体内自噬体数目。(1) 在细胞实验中, 与正常组相比, 模型组H9C2细胞的EDU阳性率显著降低($P<0.05$); 细胞凋亡率、LC3荧光强度显著增加($P<0.05$)。与模型组相比, 低剂量组、中剂量组和高剂量组H9C2细胞的EDU阳性率显著增加($P<0.05$); 细胞凋亡率、LC3荧光强度显著降低, 呈剂量依赖性($P<0.05$)。(2) 在动物实验中, 与Ctrl组相比, Model组大鼠的LVESD、LVEDD、p53、Bax和Bnip3蛋白表达水平, LC3-II/LC3-I值, 心肌细胞线粒体自噬体数目显著增加($P<0.05$); LVFS、LVEF、Bcl-2、P62蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与Model组相比, L-Cos组、M-Cos组和H-Cos组大鼠的LVESD、LVEDD、p53、Bax和Bnip3蛋白表达水平, LC3-II/LC3-I值, 心肌细胞线粒体自噬体数目显著降低($P<0.05$); LVFS和LVEF, Bcl-2、P62蛋白表达水平显著增加, 呈剂量依赖性($P<0.05$)。Cos能够阻断细胞凋亡信号通路、减缓心肌细胞线粒体过度自噬进程、增强细胞代谢活力以及减轻心肌纤维化病变程度, 最终改善心脏功能, 有效减轻DOX引发的心肌毒性损伤。

关键词 木香烃内酯; 阿霉素; 心肌细胞损伤; 凋亡; 自噬

Costunolide Reduces Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Injury by Inhibiting Mitochondrial Apoptosis and Autophagy

WU Yu^{1*}, LUO Zhi¹, HU Chunhua²

(¹Department of Cardiovascular Medicine, Mianyang People's Hospital, Mianyang 621000, China;

²Department of Obstetrics, Mianyang People's Hospital, Mianyang 621000, China)

Abstract This study was to investigate the protective effect and mechanism of Cos (costunolide) on DOX (doxorubicin)-induced cardiomyocyte injury. In cell experiments, H9C2 cardiomyocytes were divided into normal group, model group, low-dose group, medium-dose group and high-dose group, and DOX was used to establish injury model. EDU was used to detect cell proliferation activity; flow cytometry was employed to precisely measure the apoptosis rate of the cells, while immunofluorescence staining was utilized to accurately detect the expression

收稿日期: 2025-06-17

接受日期: 2025-08-05

*通信作者。Tel: 13547130313, E-mail: dxnd20407@163.com

Received: June 17, 2025

Accepted: August 5, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13547130313, E-mail: dxnd20407@163.com

of LC3 protein, providing valuable insights into the cellular physiological state. In the animal experiment, a total of SD rats were randomly allocated into five distinct groups: Ctrl group, Model group, L-Cos group, M-Cos group, and H-Cos group, with ten rats in each group. The cardiac function parameters of these rats were measured. Additionally, HE staining and Masson's trichrome staining were employed to examine the pathological alterations in the myocardial tissue. Western blot was meticulously employed to detect and analyze the expression levels of proteins that were closely associated with apoptosis and autophagy processes, aiming to uncover the underlying molecular mechanisms in the studied biological system. The number of autophagosomes in mitochondria of cardiomyocytes was observed under electron microscope. (1) In the cellular experiment, the proportion of EDU-positive H9C2 cells in the model group was notably decreased compared with that in the normal group ($P<0.05$). The rates of apoptosis and the fluorescence intensity of LC3 experienced a significant elevation ($P<0.05$). Compared with the model group, the EDU positive rate of H9C2 cells in the low-dose group, middle-dose group and high-dose group was significantly increased ($P<0.05$). The apoptosis rate and LC3 fluorescence intensity were significantly decreased in a dose-dependent manner ($P<0.05$). (2) In animal experiments, compared with the Ctrl group, LVESD, LVEDD, p53, Bax, and Bnip3 protein expression, LC3-II/LC3-I ratio, and the count of mitochondrial autophagosomes within cardiomyocytes were notably higher in the Model group ($P<0.05$). LVFS and LVEF, along with the protein expression levels of Bcl-2 and P62, were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the Model group, LVESD, LVEDD, p53, Bax, and Bnip3 protein expression, LC3-II/LC3-I ratio, and the number of mitochondrial autophagosomes in cardiomyocytes were significantly decreased in the L-Cos group, M-Cos group, and H-Cos group ($P<0.05$). LVFS and LVEF, Bcl-2 and P62 protein expression levels were significantly increased in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Cos can inhibit the process of excessive mitophagy in cardiomyocytes, block the apoptotic signaling pathway, enhance the metabolic activity of cells and reduce the degree of myocardial fibrosis, and ultimately improve cardiac function and effectively resist DOX-induced myocardial toxic injury.

Keywords costunolide; doxorubicin; myocardial cell injury; apoptosis; autophagy

化疗是治疗恶性肿瘤的重要手段,可延长患者生存期。然而,化疗也会引发诸多不良反应,例如骨髓抑制、免疫抑制、贫血、胃肠道紊乱以及疲劳等。其中,心肌病是化疗的严重并发症之一^[1]。阿霉素(doxorubicin, DOX)属于蒽环类抗生素化疗药物,具有显著的抗肿瘤活性,被广泛应用于多种癌症的治疗,是目前最有效的抗癌化疗药物之一^[2]。但在临床使用过程中,该药物会引发一系列副作用,其中,累积性和剂量依赖性心脏毒性尤为突出,易诱发急性或慢性阿霉素心肌病,大幅增加癌症患者的死亡风险,进而对其临床应用的广度和深度形成制约^[3]。由此可见,探寻能够有效防治DOX心脏毒性的辅助治疗策略,对临床治疗具有至关重要的意义。已证实多种病理生理过程参与DOX诱导心脏毒性的发病进程,例如自噬功能失衡、细胞内钙离子平衡失调、活性氧过度蓄积以及心肌细胞凋亡等机制^[4]。木香烃内酯(costunolide, Cos)是从多种菊科植物中分离出的天然倍半萜内酯,具有抗炎、抗氧化、神经保护、

抗过敏、抗凋亡、促进成骨、抗菌、抗肿瘤以及降血糖等多重生物活性^[5]。研究表明, Cos凭借其抗凋亡特性对双氧水诱导的心肌细胞氧化损伤展现出一定保护作用^[6]。然而,截至目前,关于Cos在DOX诱导心肌细胞损伤模型中作用的研究尚属空白。本研究从体内、体外两个维度展开探索,旨在初步探究Cos对DOX所致心肌细胞损伤的保护效应,同时剖析其对线粒体凋亡进程及细胞自噬活动产生的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

H9C2细胞购自武汉尚恩生物技术有限公司; 50只SPF级SD大鼠(8周龄, 270~290 g)购自山西隆克尔生物制药有限公司, 许可证号: SYXK(晋)2020-0004。实验大鼠饲养于符合标准的清洁级环境内。环境温度恒定在(21±2) °C, 相对湿度保持在(60±5)%, 同时设置12 h明暗交替的光照制度。在此条件下, 动物可自由摄取食物和饮水。本研究所有涉及实验动物的

操作均已获得绵阳市人民医院伦理委员会的批准(批准号为: XYLL20240512), 确保实验设计的合理性和必要性, 以及实验过程中对动物福利的最大化保护。

1.2 主要试剂与仪器

阿霉素(货号: HY-15142)、木香炔内酯(货号: HY-N0036)和自噬诱导剂雷帕霉素(Rapamycin, 货号: HY-10219)购自美国 Med Chem Express 公司; 高糖 DMEM 培养基(货号: 11965126)购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; EDU 法细胞增殖检测试剂盒(货号: KFS329)购自北京百奥莱博科技有限公司; HE(货号: ST2067)和 Masson(货号: C0189S)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; LC3 抗体(货号: RM293)、p53 抗体(货号: POE316A)、Bax 抗体(货号: 5B7)、Bnip3 抗体(货号: EPR4034)、P62 抗体(货号: EPR20451)和 GAPDH 抗体(货号: EPR16891)购自美国 Abcam 公司; Bcl-2(货号: AB_2923635)购自武汉三鹰生物技术有限公司; SM2010R 切片机购自德国 Lecia 公司; HT7800120kV 购自日本 Hitachi 公司。

1.3 细胞分组及处理

先把处于冻存的 H9C2 心肌细胞放置在 37 °C 的水浴环境里进行解冻, 迅速完成复苏步骤。复苏后的细胞与含 10%(V/V)胎牛血清、1%(V/V)青/链霉素双抗的高糖 DMEM 完全培养基混合, 常温下经 1 000 r/min 离心 5 min 后, 取适量悬液转至培养瓶, 37 °C、5% CO₂ 培养, 融合度达 80% 时转接至 6 孔板或共聚焦皿。等细胞再次融合到约 80% 的时候, 将其分为正常组(normal group)、模型组(model group)、低剂量组(low dose group)、中剂量组(middle dose group)、高剂量组(high dose group)和 Rapamycin 组(Rapamycin group), 每组设置三个复孔。其中, 正常组使用高糖培养基培养 24 h; 模型组则用 5 μmol/L 的 DOX 处理 24 h; 低剂量组、中剂量组和高剂量组分别采用 1 μmol/L、2.5 μmol/L 和 5 μmol/L 的 Cos 与 5 μmol/L 的 DOX 共同处理 24 h, Rapamycin 组采用 5 μmol/L 的 Cos、5 μmol/L 的 DOX 和 0.1 μmol/L 的 Rapamycin^[7]共同处理 24 h。Cos 剂量参考既往研究^[6,8]及预实验确定: 在本研究前期, 我们进行了预实验, 使 MTT/CCK-8 法检测了不同浓度 Cos(0.1 μmol/L 至 10 μmol/L)对 H9C2 心肌细胞活力的影响。结果显示, 1 μmol/L、2.5 μmol/L 和 5 μmol/L 的 Cos 剂量对细胞活力无显著抑制作用(细胞活力 > 90%), 而 10 μmol/L 的 Cos 开始表现出轻微的细胞毒性(细胞活力

约 85%)。因此, 选择了 1 μmol/L、2.5 μmol/L 和 5 μmol/L 作为实验剂量, 以确保在发挥保护作用的同时避免细胞毒性。

1.4 EDU 检测细胞活力

将 H9C2 细胞按 5×10^3 /孔接种于 96 孔板各孔中, 接着往孔中加入 50 μL 的 EDU 工作液, 37 °C 孵育 2 h。孵育结束后, 吸除含有 EDU 的工作液, 每孔加入 100 μL 的 4% 多聚甲醛溶液于常温下固定 15 min, 再用 PBS 洗涤。接着进行渗透处理, 并加入 EDU 染色缓冲液室温避光孵育 30 min 以标记 DNA 复制细胞。最终, 将细胞放在荧光显微镜下进行观察, 统计 EDU 阳性细胞数量并计算其占总细胞的百分比。

1.5 流式细胞术

将 H9C2 细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于培养孔板中。接种操作完成后, 收集细胞并进行重悬处理, 随后向细胞悬液中加入 Annexin V-FITC/PI 染色试剂, 染色作用时长设定为 20 min, 染色温度控制在 4 °C。染色过程结束后, 将细胞置于室温且避光的环境中孵育 15 min。最后, 采用流式细胞仪对处理后的细胞样本进行检测分析。

1.6 mCherry-EGFP-LC3 腺病毒转染实验

将 H9C2 细胞悬液以 5×10^4 /孔的密度接种至玻底培养皿, 待细胞完成贴壁后, 向细胞培养基中加入浓度调整为 10^9 PFU/mL 的自噬双标腺病毒 HBAD-mcherry-EGFP-LC3, 设定感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 50 作为腺病毒加入浓度, 进行 16 h 的转染处理。随后, 更换为不含腺病毒的培养基, 并根据实验设计对细胞进行分组处理。利用激光共聚焦显微镜, 观察由绿色与红色荧光蛋白共同标记的自噬体, 以及仅由红色荧光蛋白标记的自噬溶酶体的形成状况。通过统计不同颜色荧光斑点的数量, 量化评估自噬流的大小。

1.7 大鼠的分组与造模

将 50 只 SD 大鼠随机分成 5 组: Ctrl 组、Model 组、L-Cos 组、M-Cos 组和 H-Cos 组, 每组 10 只。参考既往研究方法^[9], 除 Ctrl 组外, 其余大鼠在第 1 天, 通过一次性腹腔注射的方式, 以 10 mg/kg 的剂量给予盐酸阿霉素, 构建急性心力衰竭大鼠模型。Cos 剂量参考既往研究^[10-11], 并依据前期预实验: 对 SD 大鼠行 Cos 急性毒性实验, 发现 10~50 mg/kg 剂量连续 7 天灌胃无显著毒性, 100 mg/kg 以上出现轻微肝肾功能障碍, 故选定 10、20、50 mg/kg 为实验剂量, 以确保无

肝肾毒性。L-Cos组、M-Cos组和H-Cos组同时分别灌胃给药10、20、50 mg/kg的木香桉内酯,1次/天,连续7天。

1.8 大鼠心脏功能检测

实验结束后的次日,对各组大鼠采用含0.015体积分数的异氟烷实施麻醉处理。随后,采用彩色多普勒超声显像仪检测大鼠的左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)以及左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.9 组织学染色

完成心脏超声检查后,对各组大鼠进行麻醉操作,小心提取大鼠心脏组织,并将其置于4℃预冷的40 g/L多聚甲醛溶液中,进行24 h的固定处理。待固定完成后,对心脏组织石蜡切片进行脱蜡处理,并严格按照Masson染色试剂的使用说明开展染色工作。依次采用苏木精染液以及Masson进行染色,之后经过浸洗、脱水、封固等步骤。最后,将处理好的切片置于Olympus荧光倒置显微镜下进行拍照观察。

1.10 蛋白免疫印迹

取大鼠心肌组织按1:9质量比加1×PBS匀浆,加细胞裂解液冰浴20 min。混合液经4℃预冷离心机12 000 r/min离心10 min,取上清液测定蛋白总量。蛋白样品沸水浴变性1 min后,取40 μg进行SDS-PAGE电泳,湿转法转至NC膜。室温封闭2 h,加不同稀释比例的一抗(p53 1:1 000, Bax 1:1 000, Bcl-2 1:2 000, LC3-II 1:3 000, LC3-I 1:1 000, Bnip3 1:500, P62 1:300)4℃孵育过夜。次日,加入稀释的二抗(1:4 000),室温孵育2 h,转移至暗室中进行曝光显影。利用ImageJ软件对扫描所得条带的灰度值进行分析处理。将GAPDH作为内参蛋白,通过相关计算得出待测蛋白的相对表达量。

1.11 心肌细胞线粒体中自噬体形成观察

各组大鼠心肌切片经3%醋酸铀-枸橼酸铅进行双重染色处理。随后,将染色后的切片置于透射电子显微镜下,对心肌细胞线粒体中的自噬体形成状况展开细致观察。在观察过程中,针对每张切片随机选取10个视野进行计数统计,最终取其均值。

1.12 统计学分析

每次实验重复进行3次。运用SPSS 23.0软件

进行数据分析。针对符合正态分布的定量数据,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两差异比较采用Tukey's多重比较检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 木香桉内酯对阿霉素诱导的H9C2细胞增殖的影响

将正常组与其他组进行对比,模型组中H9C2细胞的EDU阳性率与正常组相比有显著下降($P < 0.05$)。进一步比较模型组与不同剂量组,相较于模型组,低剂量组、中剂量组以及高剂量组的H9C2细胞EDU阳性率均显著上升,且呈现出明显的剂量依赖关系($P < 0.05$);与高剂量组相比,Rapamycin组H9C2细胞EDU阳性率显著下降($P < 0.05$)。见表1、图1。

2.2 木香桉内酯对阿霉素诱导的H9C2细胞凋亡的影响

与正常组相比,模型组的H9C2细胞凋亡率呈现出显著上升的趋势($P < 0.05$);而与模型组相比较,低剂量组、中剂量组以及高剂量组的H9C2细胞凋亡率均显著下降,且下降程度表现出明显的剂量依赖关系($P < 0.05$)。见表2、图2。

2.3 木香桉内酯对阿霉素诱导的H9C2细胞自噬流的影响

相较于正常组,模型组的H9C2细胞中自噬小体数量和自噬溶酶体数量显著增加($P < 0.05$);而与模型组对比,低剂量组、中剂量组以及高剂量组的H9C2细胞自噬小体数量和自噬溶酶体数量显著减少,呈现出明显的剂量依赖特征($P < 0.05$);与高剂量组相比,Rapamycin组的H9C2细胞中自噬小体数量和自噬溶酶体数量显著增加($P < 0.05$)。见表3、图3。

2.4 木香桉内酯对阿霉素损伤大鼠心脏功能的影响

与Ctrl组相比,Model组大鼠的LVESD和LVEDD显著增加,LVFS和LVEF显著降低($P < 0.05$);与Model组相比,L-Cos组、M-Cos组和H-Cos组大鼠的LVESD和LVEDD显著降低,LVFS和LVEF显著增加,呈剂量依赖性($P < 0.05$)。见表4、图4。

2.5 木香桉内酯对阿霉素损伤大鼠心肌病理变化的影响

Ctrl组大鼠心肌间质未见异常,心肌细胞结构

表1 各组H9C2细胞增殖活性的比较

Table 1 Comparison of proliferation activity of H9C2 cells in each group

组别	EDU阳性率/%
Group	EDU positive rate /%
Normal group	49.95±5.06
Model group	15.73±2.41*
Low dose group	26.21±2.26*#
Middle dose group	34.82±3.93*#△
High dose group	41.58±2.10*#△▲
Rapamycin group	28.01±2.16*#▽
<i>F</i>	44.326
<i>P</i>	<0.001

n=3, $\bar{x}\pm s$ 。**P*<0.05, 与正常组比较; #*P*<0.05, 与模型组比较; △*P*<0.05, 与低剂量组比较; ▲*P*<0.05, 与中剂量组比较; ▽*P*<0.05, 与高剂量组比较。
n=3, $\bar{x}\pm s$. **P*<0.05 compared with the normal group; #*P*<0.05 compared with the model group; △*P*<0.05 compared with the low dose group; ▲*P*<0.05 compared with the middle dose group; ▽*P*<0.05 compared with the high dose group.

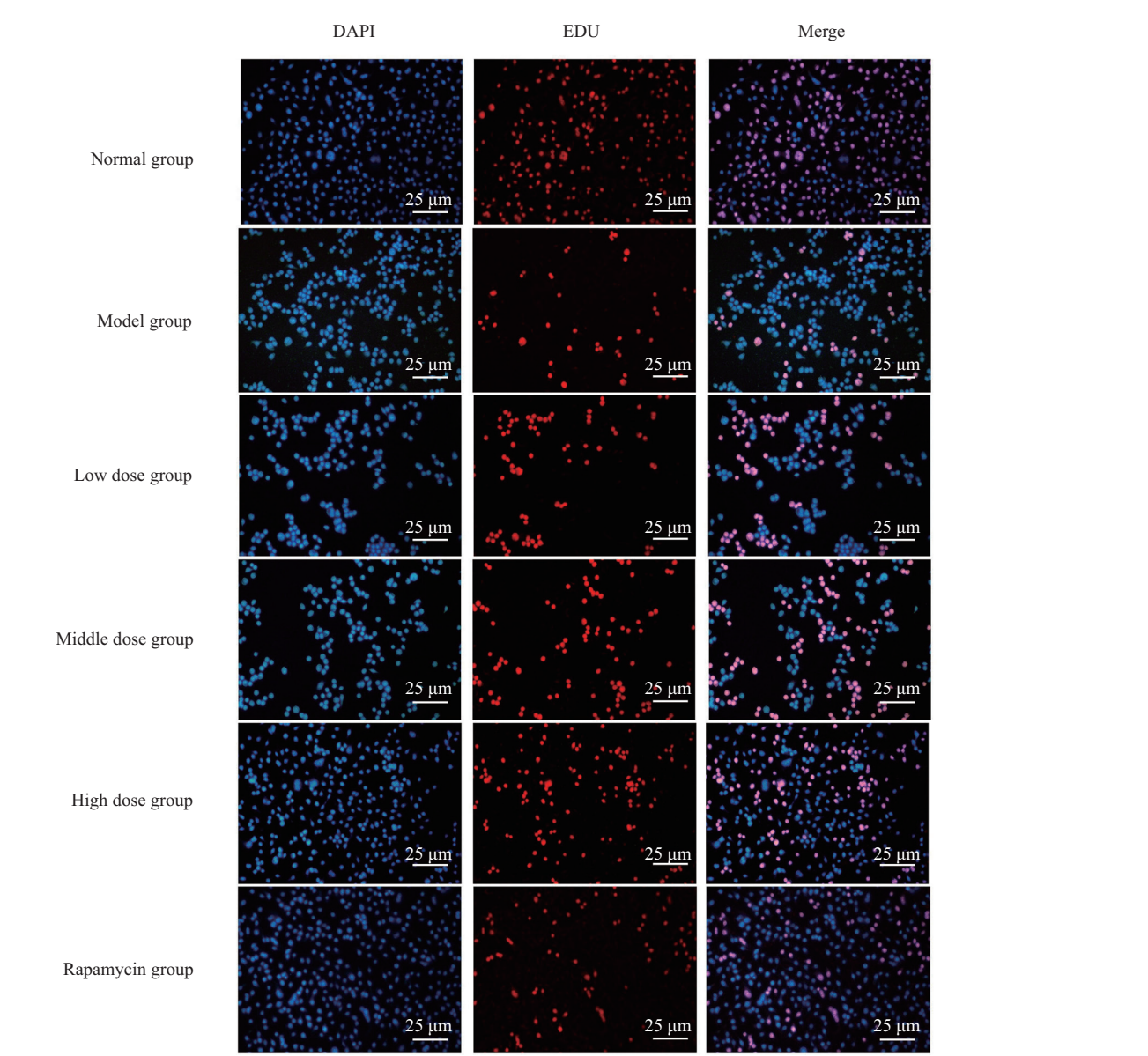


图1 各组H9C2细胞增殖活性的比较

Fig.1 Comparison of proliferation activity of H9C2 cells in each group

表2 各组H9C2细胞凋亡率的比较

Table 2 Comparison of apoptosis rate of H9C2 cells in each group

组别	细胞凋亡率/%
Group	Apoptosis rate /%
Normal group	3.35±0.27
Model group	19.17±0.39*
Low dose group	15.99±0.28*
Middle dose group	12.12±0.63* [#] △
High dose group	5.64±0.30* [#] △▲
Rapamycin group	11.13±0.22* [#] △▽
<i>F</i>	482.352
<i>P</i>	<0.001

n=3, $\bar{x}\pm s$. **P*<0.05, 与正常组比较; [#]*P*<0.05, 与模型组比较; △*P*<0.05, 与低剂量组比较; ▲*P*<0.05, 与中剂量组比较; ▽*P*<0.05, 与高剂量组比较。
n=3, $\bar{x}\pm s$. **P*<0.05 compared with the normal group; [#]*P*<0.05 compared with the model group; △*P*<0.05 compared with the low dose group; ▲*P*<0.05 compared with the middle dose group; ▽*P*<0.05 compared with the high dose group.

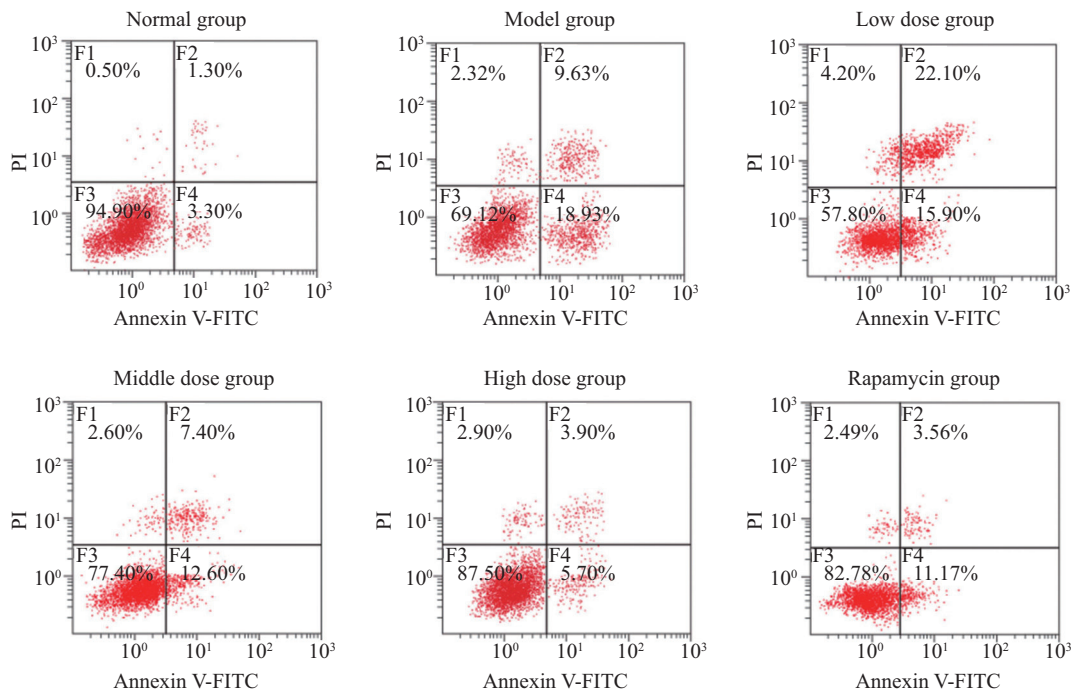


图2 各组H9C2细胞凋亡率的比较

Fig.2 Comparison of apoptosis rate of H9C2 cells in each group

正常, 心肌纤维排列规整, 横纹清晰。而Model组大鼠心肌排列紊乱, 存在明显炎性细胞浸润, 心肌间隙增宽, 间质可见血管扩张与充血, 胶原纤维显著增生, 大量蓝色纤维交错分布于心肌间。相较于Model组, L-Cos组、M-Cos组及H-Cos组炎性细胞浸润程度逐渐减轻, 血管扩张与充血状况逐步改善, 胶原纤维含量亦逐渐减少。见图5。

2.6 木香烃内酯对阿霉素损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响

与Ctrl组相比, Model组大鼠的p53和Bax蛋白

表达水平显著增加, Bcl-2蛋白表达水平显著降低(*P*<0.05)。与Model组相比, L-Cos组、M-Cos组和H-Cos组大鼠的p53和Bax蛋白表达水平显著降低, Bcl-2蛋白表达水平显著增加, 且呈剂量依赖性(*P*<0.05)。见表5、图6。

2.7 木香烃内酯对阿霉素损伤大鼠心肌细胞线粒体自噬的影响

与Ctrl组相比, Model组大鼠的LC3-II/LC3-I值和Bnip3蛋白表达水平以及心肌细胞线粒体自噬体数目显著增加, P62蛋白表达水平显著降低(*P*<0.05);

表3 各组H9C2细胞自噬小体数量和自噬溶酶体数量的比较

Table 3 Comparison of the number of autophagosomes and autolysosomes in H9C2 cells of each group		
组别 Group	自噬小体数量 Number of autophagosomes	自噬溶酶体数量 Number of autophagic lysosomes
Normal group	1.89±0.10	1.75±0.09
Model group	7.15±0.12*	8.32±0.21*
Low dose group	6.46±0.23*#	7.73±0.22*#
Middle dose group	4.62±0.27*#△	4.82±0.23*#△
High dose group	3.81±0.23*#△▲	3.70±0.19*#△▲
Rapamycin group	4.39±0.21*#▽	4.55±0.25*#△▽
F	260.511	440.347
P	<0.001	<0.001

$n=3, \bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$, 与正常组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较; △ $P<0.05$, 与低剂量组比较; ▲ $P<0.05$, 与中剂量组比较; ▽ $P<0.05$, 与高剂量组比较。
 $n=3, \bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$ compared with the normal group; # $P<0.05$ compared with the model group; △ $P<0.05$ compared with the low dose group; ▲ $P<0.05$ compared with the middle dose group; ▽ $P<0.05$ compared with the high dose group.

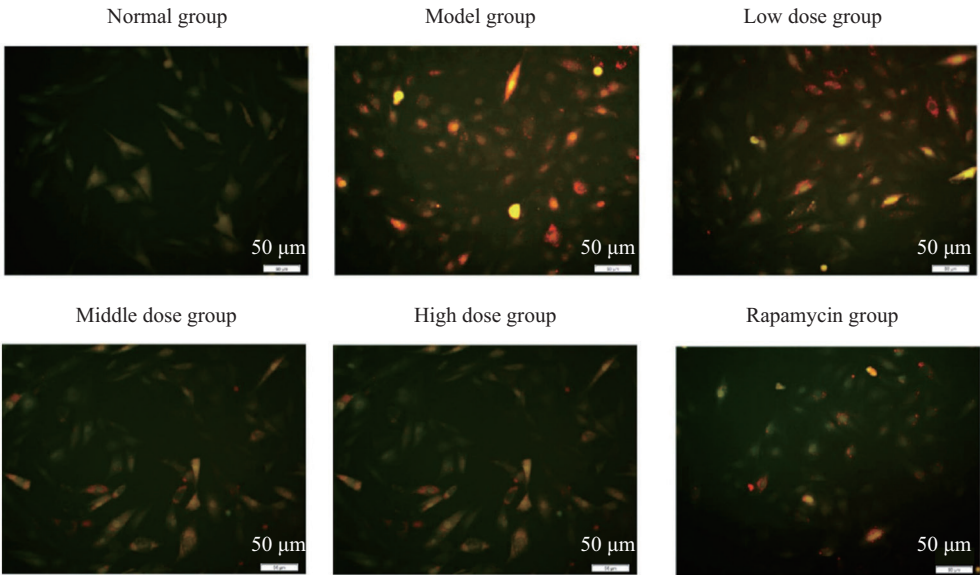


图3 木香烃内酯对阿霉素诱导的H9C2细胞自噬流的影响

Fig.3 Effect of costunolide on adriamycin-induced autophagic flux in H9C2 cells

表4 各组大鼠心脏功能指标的比较

Table 4 Comparison of cardiac function indexes of rats in each group				
组别 Group	LVESD /cm	LVEDD /cm	LVFS /%	LVEF /%
Ctrl group	0.27±0.01	0.49±0.05	40.03±1.64	82.61±4.02
Model group	0.78±0.05*	0.97±0.07*	17.96±0.81*	39.97±2.49*
L-Cos group	0.65±0.03*#	0.81±0.06*#	22.15±0.99*#	48.93±3.16*#
M-Cos group	0.49±0.04*#△	0.64±0.05*#△	27.59±1.37*#△	61.46±3.52*#△
H-Cos group	0.31±0.02*#△▲	0.53±0.03*#△▲	37.11±1.86*#△▲	75.34±4.12*#△▲
F	431.818	139.653	463.425	254.938
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$n=10, \bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$, 与Ctrl组比较; # $P<0.05$, 与Model组相比; △ $P<0.05$, 与L-Cos组比较; ▲ $P<0.05$, 与M-Cos相比。
 $n=10, \bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$ compared with Ctrl group; # $P<0.05$ compared with the Model group; △ $P<0.05$ compared with the L-Cos group; ▲ $P<0.05$ compared with the M-Cos group.

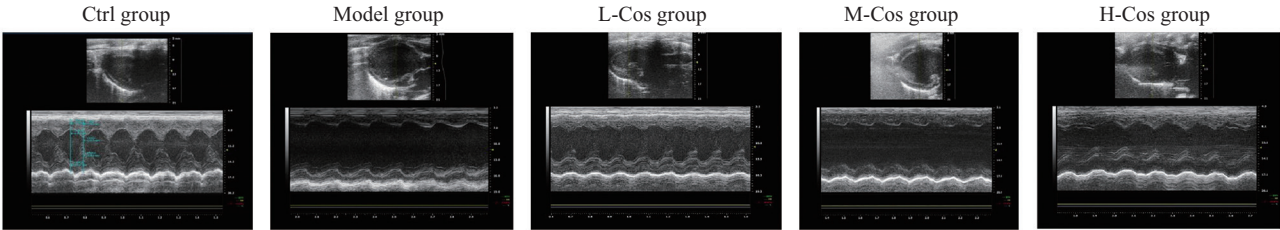


图4 木香烃内酯对阿霉素损伤大鼠心脏功能的影响

Fig.4 Effects of costunolide on cardiac function in adriamycin-injured rats

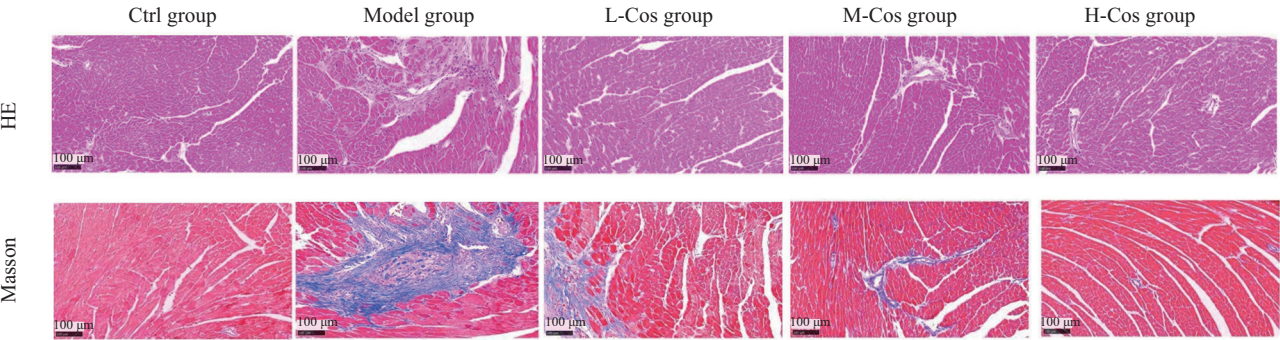


图5 木香烃内酯对阿霉素损伤大鼠心肌病理变化的影响

Fig.5 Effects of costunolide on myocardial pathological changes in adriamycin-injured rats

表5 各组大鼠细胞凋亡相关蛋白表达水平的比较

Table 5 Comparison of expression levels of apoptosis-related proteins in rats of each group

组别 Group	p53	Bax	Bcl-2
Ctrl group	0.33±0.03	0.22±0.03	1.41±0.12
Model group	1.28±0.10*	1.25±0.09*	0.21±0.01*
L-Cos group	0.95±0.08*#	0.99±0.07*#	0.38±0.04*#
M-Cos group	0.68±0.05*#△	0.70±0.06*#△	0.67±0.04*#△
H-Cos group	0.40±0.03*#△▲	0.40±0.04*#△▲	1.10±0.11*#△▲
F	375.773	462.225	416.493
P	<0.001	<0.001	<0.001

$n=10$, $\bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$, 与Ctrl组比较; # $P<0.05$, 与Model组相比; △ $P<0.05$, 与L-Cos组比较; ▲ $P<0.05$, 与M-Cos相比。
 $n=10$, $\bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$ compared with Ctrl group; # $P<0.05$ compared with the Model group; △ $P<0.05$ compared with the L-Cos group; ▲ $P<0.05$ compared with the M-Cos group.

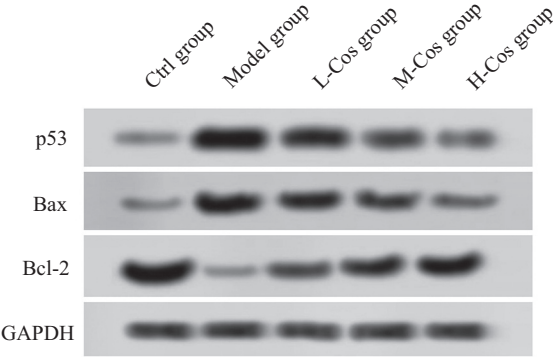


图6 各组大鼠细胞凋亡相关蛋白表达水平的比较

Fig 6 Comparison of the expression levels of apoptosis-related proteins in each group of rats

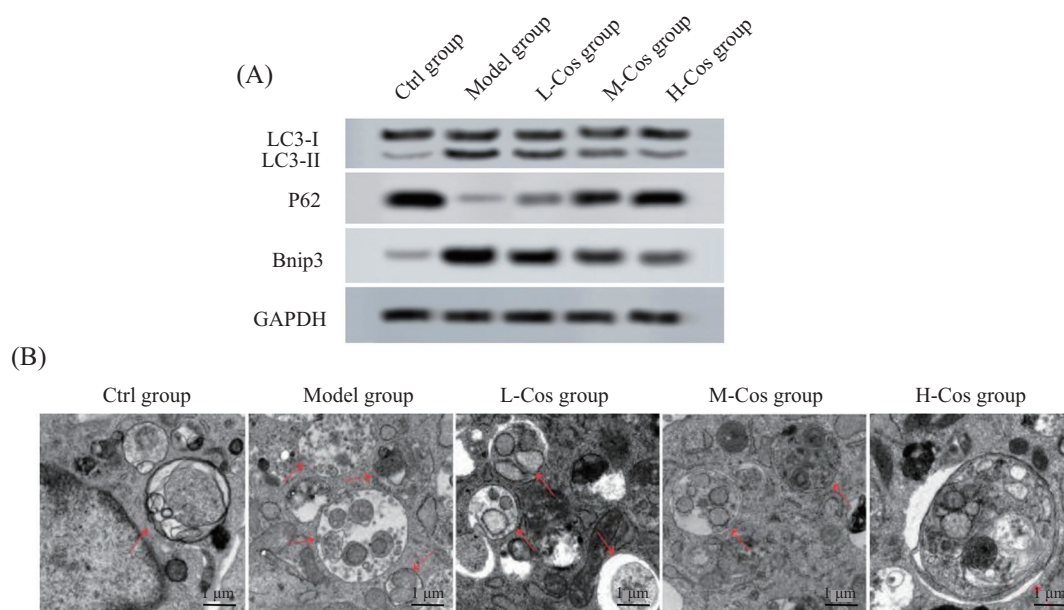
表6 各组大鼠心肌细胞线粒体自噬相关蛋白表达水平和自噬体数目的比较

Table 6 Comparison of the expression levels of mitochondrial autophagy-related proteins and the number of autophagosomes in myocardial cells of rats in each group

组别 Group	LC3-II/LC3-I	P62	Bnip3	自噬体数目 Number of autophagosomes
Ctrl group	0.23±0.02	1.59±0.13	0.19±0.02	0.49±0.06
Model group	1.19±0.08*	0.20±0.01*	1.43±0.12*	3.19±0.21*
L-Cos group	0.96±0.07* [#]	0.37±0.02* [#]	1.08±0.09* [#]	2.63±0.23* [#]
M-Cos group	0.60±0.05* ^{#△}	0.65±0.06* ^{#△}	0.82±0.06* ^{#△}	2.01±0.24* ^{#△}
H-Cos group	0.30±0.03* ^{#△▲}	1.10±0.09* ^{#△▲}	0.41±0.04* ^{#△▲}	0.85±0.09* ^{#△▲}
<i>F</i>	570.298	549.777	444.359	396.717
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$n=10$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, 与Ctrl组比较; [#] $P<0.05$, 与Model组相比; [△] $P<0.05$, 与L-Cos组比较; [▲] $P<0.05$, 与M-Cos相比。

$n=10$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$ compared with Ctrl group; [#] $P<0.05$ compared with the Model group; [△] $P<0.05$ compared with the L-Cos group; [▲] $P<0.05$ compared with the M-Cos group.



A: 各组大鼠心肌细胞线粒体自噬相关蛋白表达水平的比较; B: 各组大鼠心肌细胞线粒体自噬体形成的比较。红色箭头指向自噬体。

A: comparison of the expression levels of mitophagy-related proteins in cardiomyocytes of rats in each group; B: comparison of the formation of mitophagosomes in cardiomyocytes of rats in each group. Red arrow points to autophagosomes.

图7 木香烃内酯对阿霉素损伤大鼠心肌细胞线粒体自噬的影响

Fig.7 Effect of costunolide on mitophagy in adriamycin-injured rat cardiomyocytes

与Model组相比, L-Cos组、M-Cos组和H-Cos组的LC3-II/LC3-I值和Bnip3蛋白表达水平以及心肌细胞线粒体自噬体数目显著降低, P62蛋白表达水平显著增加, 呈剂量依赖性($P<0.05$)。见表6、图7。

3 讨论

DOX作为一种应用广泛的化疗药物, 抗肿瘤谱广且疗效显著, 但其毒副作用显著, 除常见的血小板减少和白细胞减少等不良反应外^[12], 其对心肌组织

亲和力高, 易在心脏蓄积产生毒性。该毒性通过抑制核酸与蛋白质合成、干扰能量代谢, 最终引发心脏不可逆损伤^[13]。因此, 探寻治疗DOX诱导心脏毒性的药物十分关键。近年来, 天然产物因高效、低毒、易获取等优势, 为疾病治疗药物开发提供了新方向。Cos是从菊科植物中分离的天然倍半萜内酯, 已知具有抗炎、抗氧化活性, 在急性肝损伤、溃疡性结肠炎、糖尿病性心脏病等疾病中已展现出潜在治疗价值^[14]。有研究显示, Cos可通过调节氧化应激、炎

症和细胞凋亡,保护大鼠免受阿霉素诱导的毒性^[11]。这一结果为本研究提供了重要的前期线索,促使我们进一步探究Cos对DOX诱导心肌损伤的保护作用及其机制。本研究构建DOX诱导的大鼠心肌细胞H9C2损伤模型及大鼠损伤模型,发现DOX可显著降低H9C2细胞增殖活性,动物实验中模型组大鼠心功能下降、心肌组织损伤加重且心肌间胶原纤维增生明显。鉴于Cos的抗氧化、抗炎活性,推测其可能对DOX诱导的心肌损伤有保护作用。经不同剂量Cos干预后,DOX诱导的细胞增殖活性损伤显著减轻,模型大鼠心功能增强、心肌组织损伤减轻,且呈剂量依赖性。这表明,Cos可减轻DOX诱导的心肌损伤。

心肌细胞凋亡是DOX诱导心肌损伤的核心机制^[15]。DOX能与心磷脂形成近乎不可逆复合物,锚定于线粒体内膜,干扰电子传递链,引发线粒体功能障碍及细胞凋亡^[16]。本研究采用流式细胞术检测心肌细胞的凋亡情况。细胞实验结果表明,模型组H9C2细胞的凋亡率显著升高,而在不同浓度Cos干预后,凋亡率显著降低。这表明,Cos可通过抑制DOX诱导的心肌细胞凋亡,发挥保护心肌细胞的作用。进一步检测DOX模型大鼠心肌组织中凋亡相关蛋白的表达水平。p53在DNA双链断裂激活后,会启动细胞凋亡程序;Bcl-2是经典的抗凋亡蛋白,Bax则是促凋亡蛋白,p53能够下调Bcl-2的表达,并与Bcl-2形成抑制复合物,从而推动细胞凋亡^[17-19]。既往研究显示,Cos可通过抑制p53信号通路引起的心肌细胞凋亡,减轻心肌细胞氧化损伤^[6];也可通过调控抗氧化活性通路,抑制炎症信号通路,进而抑制肝细胞凋亡,减轻脂多糖和D-半乳糖胺诱导的急性肝损伤^[20]。本研究结果显示,Cos可显著降低p53和Bax蛋白表达水平,增加Bcl-2蛋白表达水平,且呈剂量依赖性。这提示Cos或许能够借助对p53/Bcl-2/Bax凋亡信号转导通路的调节,抑制心肌细胞的凋亡,进而展现出其在心肌保护方面的积极作用。

线粒体自噬是高度保守的细胞生理过程,能选择性清除功能紊乱或多余的线粒体,维持线粒体内环境稳定^[21]。自噬对心脏功能维持至关重要,适度自噬可保护细胞,过度自噬则干扰细胞代谢平衡,引发凋亡或坏死^[22]。心力衰竭时,多种应激源协同诱导过度自噬,导致心肌细胞死亡及心功能障碍^[23]。已有研究证实,DOX可通过触发线粒体自噬失调,

诱发心肌细胞过度死亡^[24]。自噬过程依赖溶酶体降解受损细胞器和大分子,其调控受自噬相关基因严格介导。自噬激活时,自噬相关蛋白LC3-I会转化为LC3-II形式,此过程中LC3-I的蛋白含量逐渐减少,LC3-II的蛋白含量相应增加^[25]。监测LC3-II与LC3-I比值可评估细胞自噬动态。此外,P62蛋白可与LC3相互作用并作为底物被自噬-溶酶体途径分解代谢,P62含量升高常提示自噬流受阻^[26]。有报道称,提高LC3-II/LC3-I值并下调P62蛋白表达,可显著减轻DOX所致的心肌细胞自噬损伤^[8,21]。Bnip3是自噬相关分子,能与LC3相互作用介导线粒体隔离形成自噬体,调节线粒体更新和细胞凋亡路径^[27]。在DOX处理的心肌细胞中,Bnip3表达水平上升,引发线粒体过度自噬和坏死,而敲低Bnip3可抑制线粒体分裂和DOX诱导的细胞死亡^[28]。另有报道称,Cos能通过抑制自噬体的形成或自噬流的完成,抑制肝癌细胞的自噬^[29]。本研究发现,DOX可显著增加H9C2细胞自噬小体和自噬溶酶体数量,提示自噬活性升高;大鼠心肌组织中LC3-II/LC3-I值和Bnip3蛋白表达量显著增加,P62蛋白表达显著下调。而不同剂量Cos干预后,上述情况显著逆转。透射电镜下观察发现,Cos可明显减少心肌细胞线粒体内自噬体数目。这表明,Cos能通过抑制Bnip3/LC3/p62轴介导的心肌细胞线粒体过度自噬,发挥对阿霉素诱导的心肌细胞损伤的保护作用。凋亡与自噬存在潜在串扰。一方面,自噬可通过清除受损细胞器和蛋白质,为细胞提供能量和物质,从而抑制凋亡的发生;另一方面,过度自噬可能导致细胞内重要物质过度降解,破坏细胞稳态,进而触发凋亡^[30]。在本研究中,DOX同时诱导了心肌细胞的凋亡和过度自噬,而Cos既能抑制凋亡又能抑制过度自噬,提示Cos可能通过协调凋亡与自噬的平衡,共同发挥对心肌细胞的保护作用。

综上所述,Cos具备阻断细胞凋亡信号转导通路的能力,可抑制心肌细胞线粒体的过度自噬现象,提升细胞的代谢活性,同时减轻心肌纤维化的病变程度,最终改善大鼠心脏功能,有效减轻DOX引发的心肌毒性损伤。本研究为Cos防治DOX诱导的心脏毒性提供了实验依据。目前的研究虽取得了一定成果,但仍存在以下局限性。首先,本研究采用单次腹腔DOX注射构建急性心衰模型,但该模型与临床中抗肿瘤药物所致心肌损伤的慢性、持续性特征存

在差异;其次,尚未明确Cos调控上游信号通路影响细胞凋亡与自噬的具体机制;最后,当前研究仍处于基础实验阶段,距临床转化应用尚有较大距离。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG L, WU P, ZHANG L, et al. Ameliorative effect of rosiglitazone, a peroxisome proliferator gamma agonist on adriamycin-induced cardio toxicity via suppressing oxidative stress and apoptosis [J]. IUBMB Life, 2020, 72(4): 607-15.
- [2] LI X, LUO W, TANG Y, et al. Semaglutide attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by ameliorating BNIP3-Mediated mitochondrial dysfunction [J]. Redox Biol, 2024, 72: 103129.
- [3] 沈盛晖, 叶建华, 吴相忠, 等. miR-494在阿霉素诱导大鼠心肌细胞损伤中的作用及机制研究[J]. 心电与循环(SHEN S H, YE J H, WU X Z, et al. Effect and mechanism of miR-494 in doxorubicin-induced cardiomyocyte injury in rats [J]. Journal of Electrocardiology and Circulation), 2024, 43(4): 316-22.
- [4] ZHANG X, HU C, KONG C Y, et al. FND5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(2): 540-55.
- [5] LI Q, WANG Z, XIE Y, et al. Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109955.
- [6] 薛伟栋, 翟昌林, 钱钢. 基于p53信号通路探讨木香炔内酯对H9C2心肌细胞过氧化损伤的保护作用[J]. 中国中医药科技(XUE W D, ZHAI C L, QIAN G. Research on protective effect of costunolide on H9C2 cardiomyocytes oxidative damage through p53 signaling pathway [J]. Chin J Tradit Chin Med Sci Technol), 2023, 30(2): 225-8.
- [7] 饶春梅, 成细华, 任婷, 等. 加味丹参饮含药血清预处理对缺氧/复氧H9C2心肌细胞自噬相关基因Atg5和Beclin1 mRNA表达的影响[J]. 中国老年学杂志(RAO C M, CHENG X H, REN T, et al. Influence of preconditioning with Jiawei Danshen decoction on expression level of autophagy related gene Atg5 and Beclin1 in H9C2 cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation injur [J]. Chin J Gerontol), 2017, 37(8): 1821-4
- [8] 高远真, 原阳, 叶婷, 等. 壬二酸对阿霉素诱导的心肌细胞损伤的保护作用及其机制[J]. 精准医学杂志(GAO Y Z, YUAN Y, YE T, et al. Protective effect of azelaic acid against doxorubicin-induced cardiomyocyte injury and its mechanism [J]. J Precis Med), 2022, 37(4): 288-93,299.
- [9] 任欣伟, 张卫国, 聂玉真. 黄芪甲苷通过CaMkk β /AMPK通路对急性心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体自噬的作用机制研究[J]. 医药论坛杂志(REN X W, ZHANG W G, NIE Y Z. Mechanism of Astragaloside IV on myocardial mitophagy in rats with acute heart failure through CaMkk β /AMPK pathway [J]. J Med Forum), 2023, 44(9): 41-6.
- [10] 宋冬林, 王玉良. 木香炔内酯对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 武警医学(SONG D L, WANG Y L. Protective effect of costunolide on kidneys in diabetic rats [J]. Med J Chin People's Armed Police Forces), 2022, 33(4): 281-6.
- [11] XING W, WEN C, WANG D, et al. Cardiorenal protective effect of costunolide against doxorubicin-induced toxicity in rats by modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. Molecules, 2022, 27(7): 2122.
- [12] MILANO G, BIEMMI V, LAZZARINI E, et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(2): 383-92.
- [13] YU X, RUAN Y, HUANG X, et al. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting both apoptosis and necroptosis in cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(1): 140-6.
- [14] J IN B, CHEN Y, WANG J, et al. Costunolide alleviates hyperglycaemia-induced diabetic cardiomyopathy via inhibiting inflammatory responses and oxidative stress [J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(6): 831-45.
- [15] TASKIN E, GUVEN C, TUNC KAYA S, et al. Silencing HMGB1 expression inhibits adriamycin's heart toxicity via TLR4 dependent manner through MAPK signal transduction [J]. J buon, 2020, 25(1): 554-65.
- [16] HU C, ZHANG X, SONG P, et al. Meteorin-like protein attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating cAMP/PKA/SIRT1 pathway [J]. Redox Biol, 2020, 37: 101747.
- [17] CHRISTIDI E, BRUNHAM L R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 339.
- [18] WANG Q, JIANG Y, XIE S, et al. Exploring the efficacy enhancement mechanism of qixue shuangbu prescription after TCM processing for treating chronic heart failure by regulating ERK/Bcl-2/Bax/Caspases-3 signaling pathway [J]. Heliyon, 2024, 10(9): e30476.
- [19] MORADIPOUR A, DARIUSHNEJAD H, AHMADIZADEH C, et al. Dietary flavonoid carvacrol triggers the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via the p53/Bax/Bcl-2 axis [J]. Med Oncol, 2022, 40(1): 46.
- [20] MAO J, YI M, WANG R, et al. Protective effects of costunolide against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1469.
- [21] 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(GUO H, WANG S W, XIE W J, 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.
- [22] AJOOLABADY A, CHIONG M, LAVANDERO S, et al. Mitophagy in cardiovascular diseases: molecular mechanisms, pathogenesis, and treatment [J]. Trends Mol Med, 2022, 28(10): 836-49.
- [23] SILVA K A S, LEARY E V, OLIVER T D, et al. Tissue-specific small heat shock protein 20 activation is not associated with traditional autophagy markers in Ossabaw swine with cardiometabolic heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 319(5): H1036-43.
- [24] QU Y, GAO R, WEI X, et al. Gasdermin D mediates endoplasmic reticulum stress via FAM134B to regulate cardiomyocyte autophagy and apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(10): 901.
- [25] XU S, HUANG P, YANG J, et al. Calycosin alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by repressing autophagy via STAT3/FOXO3a

- signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 115: 154845.
- [26] OU W, LIU H, CHEN C, et al. Spexin inhibits excessive autophagy-induced ferroptosis to alleviate doxorubicin-induced cardiotoxicity by upregulating Beclin 1 [J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(21): 4195-213.
- [27] 周云, 王玲娥, 余薇, 等. 线粒体自噬在阿霉素心脏毒性中的研究进展[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*(ZHOU Y, WANG L E, YU W, et al. Research progress of mitophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Journal of Hubei University of Science and Technology, Medical Edition*), 2021, 35(4): 356-60.
- [28] ZHENG X, ZHONG T, MA Y, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via caspase-3/GSDME [J]. *Life Sci*, 2020, 242: 117186.
- [29] OKUBO S, OHTA T, FUJITA H, et al. Costunolide and dehydrocostuslactone from *Saussurea lappa* root inhibit autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Nat Med*, 2021, 75(1): 240-5.
- [30] GAO G, CHEN W, YAN M, et al. Rapamycin regulates the balance between cardiomyocyte apoptosis and autophagy in chronic heart failure by inhibiting mTOR signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(1): 195-209.