

# 阿密苘素拮抗多柔比星组织毒性及其机制研究

周文娟, 王玗玥, 赵淼淼, 刘 岩

(四川大学生命科学学院, 成都 610065)

**摘要:** 多柔比星(Doxorubicin, DOX)是临床上使用最广泛的蒽环家族化疗药物. 为了研究阿密苘素(Visnagin, VIS)能否缓解 DOX 诱发的肝、肾毒性及其相关机制, 此研究首先构建 DOX 急性、慢性肝肾损伤小鼠模型, 通过观察小鼠肝肾细胞死亡率、肝肾功能变化评价 VIS 对肝肾损伤的保护作用. 在急性和慢性损伤模型中, 原位末端凋亡实验(TUNEL)结果表明 VIS 可以显著降低肝肾细胞凋亡率; 而慢性模型中, VIS 还能缓解肝肾功能损伤. 此外, 实验结果表明 VIS 可以显著抑制 DOX 诱发的 TOP2-DNA 共价复合物形成, 提示 VIS 可能通过抑制 DOX 下游的 TOP2 通路起保护作用. 研究结果将为后续深入探究降低 DOX 毒副作用的课题提供参考.

**关键词:** 癌症治疗; 多柔比星; 阿密苘素; 毒副作用

**中图分类号:** Q28 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.026004

## Visnagin antagonizes the tissue toxicity of Doxorubicin and its mechanism

ZHOU Wen-Juan, WANG Di-Yue, ZHAO Miao-Miao, LIU Yan

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** Doxorubicin (DOX) is the most widely used anthracycline family chemotherapeutic drug in clinical practice. In order to study whether Visnagin (VIS) could alleviate DOX-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity and its related mechanisms, this study first constructed a DOX-induced mouse model with acute or chronic liver and kidney injury. Then the protective effect of VIS on liver and kidney injury was evaluated by observing the mortality of mouse liver and kidney cells and the changes of liver and kidney function. The TUNEL results showed that VIS can significantly reduced apoptosis of liver and cells in acute and chronic injury models, and VIS can also relieve liver and kidney damage in the chronic model, in which VIS reduced DOX-induced creatine / urea and ALT/AST levels. In addition, VIS significantly inhibit the formation of the TOP2-DNA covalent complex level induced by DOX, suggesting that VIS may have a protective effect by inhibiting the TOP2 pathway downstream of DOX. The results will shed light on the follow-up in-depth exploration of reducing the side effects of DOX.

**Keywords:** Cancer treatment; Doxorubicin; Visnagin; Tissue toxicity

## 1 引言

多柔比星(DOX)是蒽环家族中使用最广泛的

化疗药物,被用于治疗急性白血病(淋巴细胞性和粒细胞性)、胃癌、肝癌等<sup>[1,2]</sup>.

DOX 被大量用于癌症治疗,但其在临床使用

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(81872447)

作者简介: 周文娟(1993-), 女, 四川乐山人, 硕士研究生, 研究方向为细胞生物学. E-mail: 1456136150@qq.com

通讯作者: 刘岩. E-mail: yan.liu@scu.edu.cn

中会导致患者发生不同程度的心脏、肝脏、肾脏、血液损伤<sup>[3,4]</sup>。临床数据表明,病人在 DOX 治疗过程中会出现心脏毒性的症状,例如心率不齐、血压偏低、心电图紊乱等<sup>[5,6]</sup>;另外还有病人会出现肝毒性,例如胆管畸形增生、组织内病灶坏死等<sup>[7,8]</sup>;除此之外,肾损伤现象也不可忽视,比如肾上皮细胞的退化进而引起肾小球恶化,最终导致肾小球硬化(肾病的标志之一),肾小管扩张、间质纤维化和炎症、蛋白尿、局灶性肾小球硬化等<sup>[9-11]</sup>。目前为止,右丙亚胺(Dexrazoxane, DZR)是唯一被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于缓解蒽环化疗药诱发的的心脏毒副作用的药物。但遗憾的是,此药不仅会影响化疗药的抗肿瘤效果,还有诱发二次癌症的风险。因此 DZR 在欧洲被禁止使用,在美国也仅限于特定的癌症治疗<sup>[12]</sup>。基于此种情况,开发一种安全有效的佐剂具有重要意义。

本实验室前期利用 DOX 诱导产生心脏毒性的斑马鱼模型,筛选出以阿密苊素(VIS)为代表的化学小分子,发现 VIS 在小鼠和斑马鱼模型中均可减弱 DOX 诱发的心脏毒性,并且不会影响其抗肿瘤效果<sup>[13]</sup>。VIS 是一种从 *Ammivisnaga* 植物中提取的具有生物活性的化学小分子,属于  $\gamma$ -吡喃酮类化合物。在一些亚洲国家的古代药典中, VIS 被用于肾结石、心绞痛等疾病的治疗,同时现代医学研究发现 VIS 具有舒缓平滑肌、降低血压、消炎的作用<sup>[14]</sup>。

已有报道表明, DOX 可通过稳定 TOP2-DNA 共价复合物致使细胞死亡: TOP2 是细胞内高度保守的酶,在 DNA 复制、转录时负责切断并且重连 DNA, 释放超螺旋引起的张力<sup>[15]</sup>。DOX 存在时会稳定 TOP2-DNA 共价复合物结构,当细胞清除该复合物时会暴露出自由 DNA 末端,从而造成双链 DNA 断裂(double-strand DNA break; DSB)甚至细胞死亡<sup>[16]</sup>。这一发现将为 DOX 佐剂的机制研究提供线索。

为了探究 VIS 是否可以保护其他组织器官及其保护机制,本课题通过构建 DOX 诱导产生肝、肾毒性的小鼠急/慢性模型,证实 VIS 对小鼠肝、肾损伤具有缓解作用;拟通过机制研究实验结果揭示 VIS 是否通过抑制 TOP2-DNA 共价复合物的形成发挥保护作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

2.1.1 实验动物 Balb/c 小鼠购于达硕公司(成都,四川),均为 6~8 周龄,雄性,体重  $20 \pm 2$  g,严

格按照 SPF 级饲养标准饲养。

2.1.2 主要试剂 环糊精、DOX、VIS、阿佛丁均购于 Innochem。

### 2.2 实验方法

2.2.1 小鼠实验 本实验所有小鼠饲养条件严格按照 SPF 级饲养标准,购回适应 24 h 以上再开展实验。

急性模型:适应环境后的小鼠随机分为 Cont(对照)组、DOX(阿柔比星)组、DV(阿柔比星/VIS 共处理)组,每组 5 只。对照组尾静脉注入 20 mg/kg 生理盐水及 25 mg/kg 环糊精溶液; DOX 组尾静脉注入 20 mg/kg DOX 溶液及 25 mg/kg 环糊精溶液; DV 组尾静脉注射 20 mg/kg 的 DOX 溶液以及 25 mg/kg VIS 溶液。给药 24 h 后麻醉小鼠收取肝组织及肾组织,并及时将组织置于 4% 甲醛中过夜固定。

慢性模型: 15 只小鼠随机分为 Cont、DOX、DV 组,每组 5 只。对照组尾静脉注入 5 mg/kg 生理盐水及 25 mg/kg 环糊精溶液, 1 w 2 次,连续注射 2 w。DOX 组尾静脉注入 5 mg/kg DOX 溶液及 25 mg/kg 环糊精溶液, 1 w 2 次,连续注射 2 w。DV 组尾静脉注入 5 mg/kg DOX 溶液及 25 mg/kg VIS 溶液, 1 w 2 次,连续注射 2 w。给药结束后麻醉小鼠,眼球采取 300  $\mu$ L 全血用于检测肝肾功能,肝肾组织用 4% 甲醛固定。

VIS 安全性检测实验:随机将 10 只小鼠分为 Cont 组和 VIS 组,每组 5 只。对照组尾静脉注入 25 mg/kg 的 40% 环糊精溶液, VIS 组尾静脉注入 25 mg/kg VIS 溶液。1 w 注射 2 次,持续 2 w,注射安排及小鼠取样同上述慢性小鼠模型一致。

2.2.2 生化指标测定 小鼠血液送至成都华西海圻医药科技有限公司(成都,四川),做血液生化指标测定。

2.2.3 组织凋亡细胞检测 固定好的肝肾组织脱水包埋后进行 TUNEL 染色。在莱卡 DM6B 荧光显微镜下拍取照片, Image J 软件计数 TUNEL 阳性细胞数及总细胞数, TUNEL/总细胞数比值为组织细胞凋亡比例。

2.2.4 RADAR 实验 称取 10 mg 小鼠新鲜组织,使用 2 mL M 裂解液充分研磨。通过乙醇沉淀法去除 DNA 中的杂质,取相同量的 DNA 吸附于硝酸纤维膜上,孵育 TOP2 抗体检测 TOP2-DNA 共价复合物的形成情况。

2.2.5 统计分析 结果使用 Prism 软件进行 t 检

验分析. 每次独立实验的数据均以平均值±标准误差表示; \* \* \*,  $P<0.001$ ; \* \*,  $P<0.01$ ; \*,  $P<0.1$ .

3 结果与分析

3.1 VIS 减少急性小鼠模型中肝细胞和肾细胞死亡

小鼠被随机分为对照组 (Cont)、DOX 组、DV (DOX/VIS 共处理) 组. 给药 24 h 后, 收取小鼠的肝肾组织制作成石蜡切片进行 TUNEL 染色, 计数 TUNEL 阳性 (凋亡细胞) 占总细胞比例. 结果如图 1 所示: 和对照组小鼠相比, DOX 处理会导致小鼠肝组织和肾组织细胞凋亡率显著上升, 同时 VIS 将 DOX 升高的细胞凋亡率降低到对照组水平, 这说明 VIS 对 DOX 诱发的肝细胞和肾细胞凋亡具有显著保护作用.

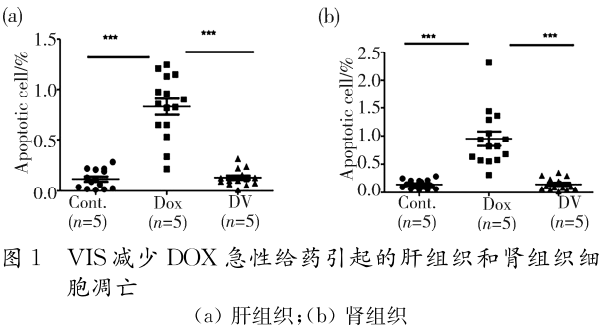


图 1 VIS 减少 DOX 急性给药引起的肝组织和肾组织细胞凋亡  
(a) 肝组织; (b) 肾组织  
Fig. 1 Visnagin reduces doxorubicin-induced cell death in liver and kidney in acute mode  
(a) Liver statistics; (b) kidney statistics

3.2 VIS 减少慢性小鼠模型中肝细胞和肾细胞的凋亡

我们构建了为期 14 d 的 DOX 慢性小鼠模型 (图 2a), 给药结束后, 收取肝、肾组织制作切片, TUNEL 染色并计算细胞凋亡率. 统计每组 5 只小鼠的数据, 结果如图 2b, 2c 所示: 在 DOX 组小鼠中, 凋亡细胞比例明显上调, 而 VIS 可以将细胞凋亡率降低到对照组水平, 显著减少细胞凋亡. 这表明同急性小鼠结果一致, VIS 可以有效缓解 DOX 慢性给药造成的肝、肾细胞毒性.

3.3 VIS 缓解 DOX 诱发的肝功能和肾功能损伤

在图 2a 实验的终点, 我们收集了小鼠血液进行生化指标检测. 实验结果如图 3 所示: 与对照组相比, 注射 DOX 的小鼠血浆中肝功能指标 (AST、ALT)、肾功能指标 (BUN、CREA) 水平均显著上升, 意味着 DOX 损害了小鼠肝、肾功能, 而 VIS 共处理则有效地将 AST、ALT、BUN、CREA 水平均降低到对照组水平, 揭示 VIS 可以显著改善 DOX

诱发的肝、肾功能损伤. 由此进一步验证 VIS 除了可以拮抗 DOX 诱导的肝、肾细胞凋亡外, 还可以维持肝、肾的正常功能.

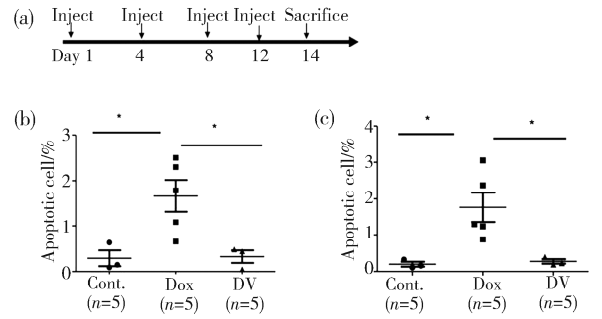


图 2 VIS 减少 DOX 慢性给药引起的肝组织和肾组织细胞凋亡  
(a) 慢性给药示意图; (b) 肝组织; (c) 肾组织  
Fig. 2 Visnagin reduces doxorubicin-induced cell death of liver in chronic model  
(a) workflow of chronic model; (b) liver statistics; (c) kidney statistics

3.4 VIS 拮抗 DOX 引起的小鼠体重减轻

在实验过程中我们还发现 VIS 对小鼠的生存状态具有显著的改善作用. 在上述 14 d 小鼠慢性模型中, 我们选取第 1、5、8、12、14 d 称取小鼠体重, 统计结果如图 4 所示: 对照组小鼠的平均体重 14 d 内稳步上升, DOX 组小鼠的体重则显著减轻, 毛色暗淡, 运动迟缓, 而注射 VIS 则可以有效提升小鼠的体重及其生存状态.

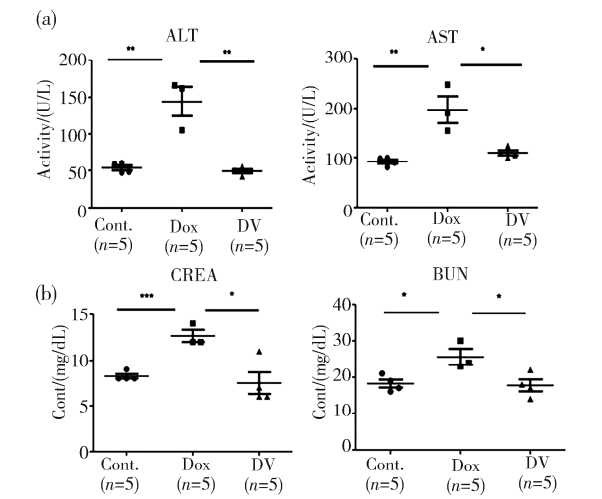


图 3 VIS 缓解 DOX 引起的肝肾功能损伤  
(a) 肝组织; (b) 肾组织  
Fig. 3 VIS alleviates liver and kidney dysfunction caused by DOX  
(a) Liver statistics; (b) kidney statistics

3.5 VIS 无肝毒性和肾毒性

采用上述慢性给药方式处理小鼠, 设置对照组和 VIS 组, 其中对照组注射 40% 环糊精溶液, VIS 组小鼠只注射 VIS 溶液 (VIS 溶解于 40% 环糊精

中). 待给药完成后,抽取血液测肝、肾功能指标,统计结果如 5 所示:和对照组相比,VIS 组小鼠的肝功能指标 AST、ALT 和肾功能指标 BUN、CREA 均无显著的变化,由此可说明 VIS 对小鼠肝、肾组织均无毒性,是一种潜在的安全用药.

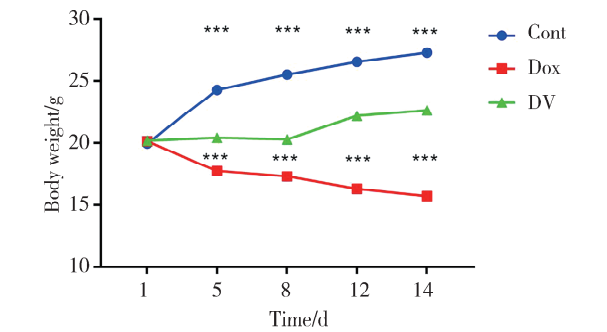


图 4 VIS 缓解 DOX 引起的小鼠体重减轻  
Fig. 4 VIS alleviates weight loss in mice caused by DOX

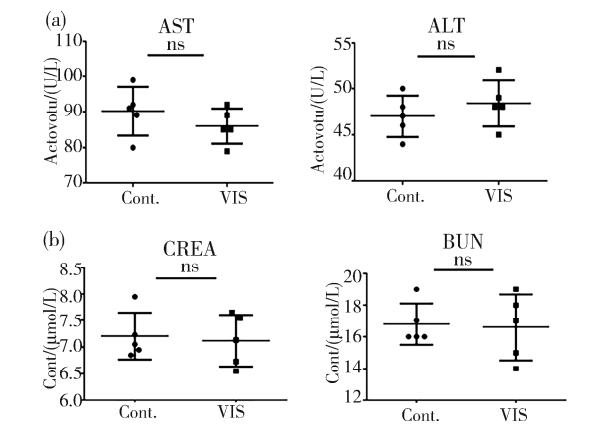


图 5 VIS 无肝毒性和肾毒性  
(a) 肝组织; (b) 肾组织  
Fig. 5 VIS is free of liver and kidney toxicity  
(a) Liver statistics; (b) kidney statistics

### 3.6 VIS 抑制小鼠肝肾组织中 DOX 诱发的 TOP2-DNA 共价复合物形成

使用急性模型小鼠的肝、肾组织样品进行 DNA 复合物快速检测 (RADAR) 实验. RADAR 实验原理主要是通过强裂解液去除掉 DNA 上非共价结合的 TOP2 蛋白,仅留下共价结合的 TOP2 蛋白,量取等量 DNA 吸附于硝酸纤维膜并孵育 TOP2 抗体,由此便可以通过 TOP2 信号强弱反映 TOP2-DNA 共价复合物的浓度. 结果如图 6a, 6c 所示:DOX 组小鼠肝、肾组织内 TOP2-DNA 共价复合物水平显著升高,而 DV 处理组小鼠肝、肾内 TOP2-DNA 复合物水平则明显降低. 三次独立实验结果统计如图 6b, 6d: VIS 阻碍了 DOX 诱发的肝肾组织内 TOP2-DNA 共价复合物形成. 已有报道表明,DOX 可通过稳定 TOP2-DNA 共价复合物

致使细胞死亡<sup>[14]</sup>. 以上数据支持 VIS 在 小鼠体内通过抑制 TOP2-DNA 共价复合物形成发挥保护作用.

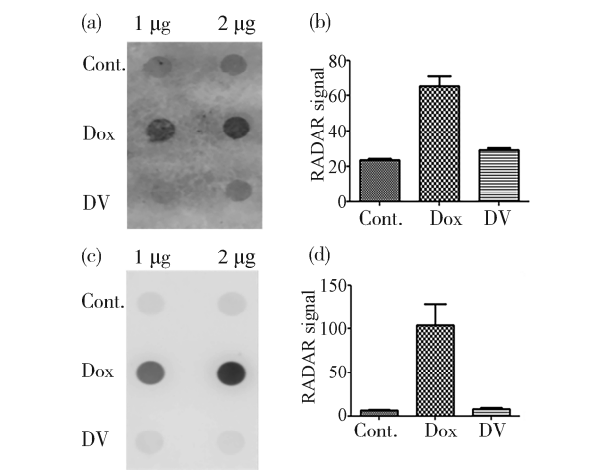


图 6 VIS 抑制小鼠组织内 TOP2-DNA 共价复合物形成  
(a) 肝组织; (b) 肝组织定量结果; (c) 肾组织; (d) 肾组织定量结果  
Fig. 6 Visnagin reduces the formation of the TOP2-DNA complex in mice  
(a) Liver; (b) the quantitative results of liver; (c) kidney; (d) the quantitative results of kidney

## 4 讨 论

DOX 是临床上应用最广的化疗药之一,但其组织器官毒性极大限制了治疗效果<sup>[1]</sup>. 其中 DOX 诱发的剂量依赖性心脏毒性尤为严重,除此之外肝肾毒性也不可小觑<sup>[6,7]</sup>. 本实验室前期采用 DOX 诱导产生心脏毒性的斑马鱼模型,筛选出以 VIS 为代表的化学小分子,发现 VIS 在 小鼠和斑马鱼模型中均可以减弱 DOX 诱发的心脏毒性,并且不会干扰 DOX 治疗癌症的效果. 但 VIS 是否可以保护肝肾组织尚不知晓. 为了模拟临床上 DOX 的给药方式,明确 VIS 对 DOX 诱发的肝肾毒性是否具有缓解作用,我们使用急性和慢性小鼠肝肾损伤模型,通过比较 VIS 处理后的各项指标变化评价其肝肾损伤程度. 结果表明 VIS 可以有效减少 DOX 引起的肝肾组织细胞凋亡,并且缓解 DOX 造成的肝肾功能损伤.

细胞实验结果表明,达到相同的细胞保护作用,VIS 所需浓度远远小于 DZR;DOX 处理细胞死亡率高 达 30%,而 25 μmol/L 的 VIS 溶液和 100 μmol/L 的 DZR 均可将细胞死亡率降低至 5%,这也许暗示了 VIS 和 DZR 的作用机制及作用效力不同<sup>[17]</sup>.

近年来越来越多的研究支持 DOX 可通过

TOP2 通路诱发组织毒性,特别是在心肌细胞中特异性敲除 TOP2b 后,小鼠心脏表现出了对 DOX 极大的抗性. TOP2 负责释放 DNA 转录和复制时产生的超螺旋张力,DOX 可以通过稳定 TOP2 催化过程中的中间产物 TOP2-DNA 共价复合物,从而引起 DNA 损伤及细胞死亡<sup>[14,15]</sup>. 我们的研究支持 VIS 通过抑制 TOP2-DNA 共价复合物形成拮抗 DOX 诱导的组织器官毒性.

综上,本研究结果揭示了 VIS 是一种可以有效拮抗 DOX 毒副作用的潜在安全佐剂,通过作用于 TOP2 蛋白发挥保护作用,但其具体作用机制还有待进一步的研究.

### 参考文献:

- [1] Carvalho C, Santos R X, Cardoso S J, *et al.* Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 3267.
- [2] Mancilla T R, Iskra B, Aune G J. Doxorubicin-Induced cardiomyopathy in children [J]. *Compr Physiol*, 2019, 93: 905.
- [3] Shabalala S, Muller C J F, Louw J, *et al.* Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Life Sci*, 2017, 180: 160.
- [4] Prathumsap N, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn S C, *et al.* Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 866: 172818.
- [5] Swain S M, Whaley F S, Ewer M S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials [J]. *Cancer*, 2010, 97: 2869.
- [6] Bartlett J J, Trivedi P C, Pulinilkunnil T. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 104: 1.
- [7] Mohajeri M, Sahebkar A. Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: a review [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 122: 30.
- [8] Varela-López A, Battino M, Navarro-Hortal M D. An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 134: 110834.
- [9] Mei S, Hong L, Cai X, *et al.* Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 307: 41.
- [10] Timm K N, Tyler D J. The role of AMPK activation for cardioprotection in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34: 255.
- [11] Chang V Y, Wang J J. Pharmacogenetics of chemotherapy-induced cardiotoxicity [J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20: 52.
- [12] Testore D F, Milanese S, Ceste M. Cardioprotective effect of dexrazoxane in patients with breast cancer treated with anthracyclines in adjuvant setting: a 10-year single institution experience [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2008, 8: 257.
- [13] Liu Y, Asnani A, Zou L, *et al.* Visnagin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy through modulation of mitochondrial malate dehydrogenase [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 266.
- [14] Lee J K, Jung J S, Park S H, *et al.* Anti-inflammatory effect of visnagin in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33: 1843.
- [15] Pommier Y, Leo E, Zhang H L, *et al.* DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs [J]. *Chem Biol*, 2010, 17: 421.
- [16] Renu K, Abilash V G, Pichiah P T, *et al.* Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy—an update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 241.
- [17] Asnani A, Zheng B, Yan L, *et al.* Highly potent visnagin derivatives inhibit *Cyp1* and prevent doxorubicin cardiotoxicity [J]. *JCI Insight*, 2018, 3: e96753.

### 引用本文格式:

中文: 周文娟, 王均玥, 赵淼淼, 等. 阿密苄素拮抗多柔比星组织毒性及其机制研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 026004.

英文: Zhou W J, Wang D Y, Zhao M M, *et al.* Visnagin antagonizes the tissue toxicity of Doxorubicin and its mechanism [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2022, 59: 026004.