

### 【基础研究】

作者简介:刘永强(1982-),男,河南卫辉人,硕士,主治医师,研究方向:心肌损伤防治的基础与临床。

improve DOX-induced cardiomyocyte toxicity in rats, and its mechanism may be related to the up-regulation of the cMLCK expression and the down-regulation of the NCX-1 expression.

**Key words:** neuregulin-1; doxorubicin; cardiac myosin light chain kinase;  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchanger

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是一种有效的抗肿瘤药物<sup>[1]</sup>, 能够成功诱导多种肿瘤达到临床缓解, 然而, 其严重的心脏毒性是限制其大剂量和 (或) 长期临床应用的重要因素之一。DOX 的心脏毒性主要表现为用药早期诱发的各种心律失常, 以及晚期出现剂量依赖性和充血性心力衰竭, 而且, 一旦出现充血性心力衰竭, 其病死率高达 50%<sup>[2]</sup>。因此, 研究和寻找既能减轻 DOX 的心脏毒性, 又能保持其抗肿瘤活性的药物具有十分重要的意义。迄今为止, DOX 引起心脏毒性的机制尚未完全阐明, 一般认为与活性氧自由基、细胞凋亡及细胞能量代谢障碍有关, BHATT 等<sup>[3]</sup>认为, 氧自由基和氧化应激在 DOX 所致心脏毒性中起主要作用。XU 等<sup>[4]</sup>研究发现, 神经调节蛋白-1 (neuregulin-1, NRG-1) 可以减轻新生大鼠心肌细胞的氧化应激和内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激, 是一种潜在的心肌保护剂。本研究通过克隆大鼠 NRG-1 基因并原核表达该蛋白, 观察其对不同浓度 DOX 所致原代心肌细胞毒性的保护作用, 并探讨其可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、试剂与仪器** 新生 72 h 内 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 10 只及妊娠大鼠 2 只由新乡医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: SYXK (豫) 2009-0002; pET28a (+) 载体和 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株均由新乡医学院实验室保存; Ni-氨基三乙酸 (Ni-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA) 试剂盒购自安诺伦 (北京) 生物科技有限公司, DOX 购自浙江海门制药厂 (批号: 971174), 胎牛血清和达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自美国 Gibco 公司,  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  交换体 ( $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchanger, NCX-1) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、心肌球蛋白轻链激酶 (cardiac myosin light chain kinase, cMLCK) 抗体以及对应的二抗购自美国 Santa Cruz 公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司, DNA 胶回收试剂盒购自美国 Promega 公司, Taq 酶、荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 引物由南京金思瑞生物科技有限公司合成; 大容量低温离心机及核酸蛋

白检测仪购自美国 Beckman 公司, 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司, 电泳仪、垂直板蛋白电泳装置、凝胶图像分析仪购自美国 Biorad Gel Doc 公司。

### 1.2 NRG-1 蛋白表达与纯化

**1.2.1 NRG-1 基因获得及原核表达载体构建** 取 SD 妊娠大鼠 2 只, 麻醉后以体积分数 75% 乙醇浸泡消毒, 开腹取出胎鼠, 将胎鼠开胸摘取心尖部心室组织, 以预冷 D-Hank's 液洗涤心室组织 3 遍并将其剪碎。TRIzol 法提取胎鼠心室肌细胞总 RNA, 反转录后应用 NRG-1 引物扩增, 所有操作严格按照试剂盒说明书进行, 以 GAPDH 作为内参照。NRG-1 上游引物序列为 5'-GCGGAATTCATGTCTGAGCG-CAAAG-3', 下游引物序列为 5'-CGCGTCGACTTAT-ACAGCAATAGG-3'; GAPDH 上游引物序列为 5'-CT-GGAAGATGCTGATGGGATT-3', 下游引物序列为 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'。将 PCR 产物及 pET28a (+) 载体进行 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶剪切 4 h, 对目的片段和 pET28a (+) 载体片段进行琼脂糖凝胶电泳及回收。回收后的目的片段连接并转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 表达菌株中, 挑取克隆鉴定后备用。

**1.2.2 NRG-1 蛋白表达与纯化** 选取鉴定正确的克隆菌株, 使用  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 进行小量诱导, 并应用十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 比较 0、1、2、3、4 h 时蛋白条带的变化, 鉴别目的蛋白条带并观察其表达。NRG-1 蛋白条带大小为 73 700。IPTG 诱导 1 L 目的菌, 超声破菌后  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液和沉淀, 分别进行 SDS-PAGE 电泳, 发现蛋白大部分在沉淀中, 说明是包涵体表达。严格参照 Ni-NTA 试剂盒说明书, 应用多聚组氨酸标签 (His-Tag) 纯化目的蛋白, 通过紫外分光光度仪测定目的蛋白 NRG-1 的浓度和纯度, 纯化产物行蛋白定量后, 鉴定蛋白活性。

**1.3 大鼠心肌原代细胞分离与培养** 取新生 72 h 内 SD 大鼠 10 只, 处死后以体积分数 75% 乙醇浸泡消毒并获取心室组织, 应用预冷 DMEM 培养基冲洗后将心室组织置于小塑料皿中剪碎。加入 6 mL 胰蛋白酶, 使用吸管将含心尖碎块的胰蛋白酶移入  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶中,  $37^\circ\text{C}$  水浴轻摇,  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  消化 15 min; 吸弃上清液后再加入 4 mL 消化液 (消化液含

3.2 mL 磷酸缓冲盐溶液、0.4 mL 胶原酶、0.4 mL 胰蛋白酶),37 ℃ 轻摇,100 r · min<sup>-1</sup> 消化 10 min;将上清液转移至新的离心管中并加入牛血清 5 mL,混合后室温放置;重复以上实验步骤直至组织块完全消化,收集上清液于同一离心管内,1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃上清液;DMEM 完全培养液重悬沉淀;将细胞悬液转移到未包被的培养皿中,37 ℃ 静置 45 min;轻轻摇匀细胞悬液,转移到新的培养皿中,重复上步操作步骤 2 次;收集细胞悬液,计数,按所需接种密度将细胞转移到培养皿中培养,细胞贴附后进行后续实验。

**1.4 DOX 浓度的确定** 取对数生长期细胞,将细胞密度调整为 1 × 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>,接种于 12 孔细胞培养板;调整 DOX 终浓度为 0.0、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 μmol · L<sup>-1</sup>。每孔加入相应浓度的 DOX,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,每隔 24 h 换液 1 次,连续培养 72 h,观察细胞生长情况,选取心肌细胞毒性相对显著的 DOX 浓度进行后续实验。

**1.5 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8,CCK-8) 测定细胞活力** 取对数生长期细胞,按每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔培养板,将细胞分为 5.0、10.0、20.0 μmol · L<sup>-1</sup> DOX 组,NRG-1 浓度分别为 0.00、0.14、0.41、1.22、3.67、11.00、33.00 和 99.00 nmol · L<sup>-1</sup>。每组心肌细胞给予该组固定浓度的 DOX 处理的同时,同组的 8 孔细胞每孔加入固定浓度的 NRG-1,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h,换液,干预 7 d 后测定细胞活力。用无血清 DMEM 配制体积分数 10% 的 CCK-8 溶液 15 mL,去除培养孔中的培养基,每孔加入 CCK-8 溶液 100 μL,37 ℃ 孵育 2 ~ 4 h,测定 450 nm 波长处的吸光度值,细胞活力 (%) = (加药细胞吸光度值 - 空白孔吸光度值) / (对照细胞吸光度值 - 空白孔吸光度值) × 100%。根据实验结果,选取心肌细胞活力升高相对显著的 DOX 和 NRG-1 浓度进行后续实验。

**1.6 Western blot 法检测心肌细胞中 cMLCK 和 NCX-1 蛋白表达** 取对数生长期细胞,将细胞分为正常对照组、DOX (5.0 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、DOX (5.0 μmol · L<sup>-1</sup>) + NRG-1 组 (11.0 nmol · L<sup>-1</sup>)、NRG-1 组 (11.0 nmol · L<sup>-1</sup>)。正常对照组不加用任何药物,其他组根据分组加入相应药物处理,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养,每隔 24 h 换液 1 次,7 d 后收取细胞。提取细胞全蛋白,以 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,具体操作步骤参照说明书进行。蛋白置于水锅中煮沸 5 min,根据测定结果,每组分别取含 5 μg 蛋白的样品液进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜,脱脂奶粉室

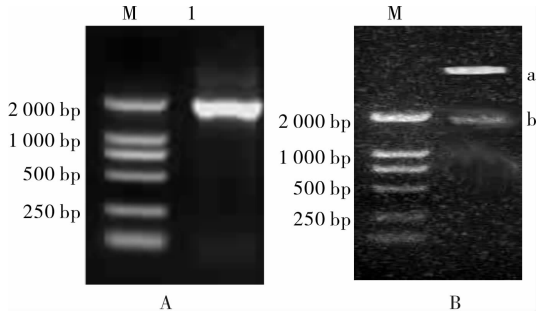
温封闭 2 h,依据目的蛋白相对分子质量截取蛋白条带置于小盒中,加入相应一抗 (cMLCK、NCX-1 及 GAPDH,1 : 1 000 比例稀释),4 ℃ 孵育过夜,加入二抗 (1 : 5 000),室温孵育 1 ~ 2 h,采用增强化学发光显色,以 Tanon 软件拍摄图像并分析心肌细胞中 cMLCK、NCX-1 蛋白的表达。

**1.7 荧光定量 PCR 检测心肌细胞中 cMLCK、NCX-1 mRNA 表达** 取“1.6 项”中各组样本,用磷酸盐缓冲溶液清洗 3 次,分别加入 1 mL TRIzol 试剂,于冰上反应 10 min,提取样本总 RNA。以 GAPDH 为内参进行荧光定量 PCR。NCX-1 上游引物序列为 5'-GGAAGATGATGACGACGAT-3',下游引物序列为 5'-CAGCCATTCCAGTATTCAGT-3';cMLCK 上游引物序列为 5'-CACTGAGGCAGGGAGTTGA-3',下游引物序列为 5'-GGCTTGCTGGATGAGGTT-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-CTGGAAGATGCTGATGGGATT-3',下游引物序列为 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 cMLCK、NCX-1 mRNA 的表达水平。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 20.0 软件进行数据统计与分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Tukey 法,组间变化趋势采用方差分析线性趋势检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 NRG-1 表达载体的琼脂糖凝胶电泳结果** NRG-1 PCR 基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果显示,产物大小在 2 000 bp 附近,符合 1 929 bp 的预期 (图 1A);pET28a(+) -NRG-1 酶切 4 h 后琼脂糖凝胶电泳结果显示,得到了 2 000 bp 和 5 000 bp 左右的 2 个片段,前者为 NRG-1 片段 (1 929 bp),后者为载体 pET28a(+) 片段 (5 369 bp) (图 1B)。表明成功构建了 pET28a(+) -NRG-1 原核表达载体。



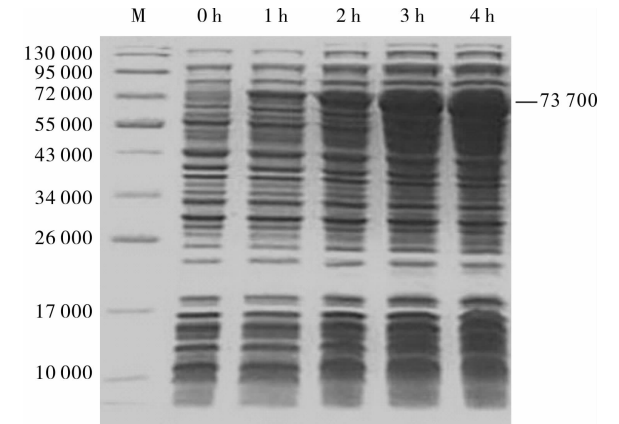
A: NRG-1 PCR 基因扩增结果;M: DL2000;1: NRG-1。B: pET28a(+) -NRG-1 双酶切结果;M: DL2000;a: pET28a(+);b: NRG-1。

图 1 心肌组织中 NRG-1 基因及 ET28a(+) -NRG-1 酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis results of myocardium NRG-1 gene and enzyme products of pET28a(+) -NRG-1

2.2 NRG-1 蛋白的 SDS-PAGE 电泳和纯化结果

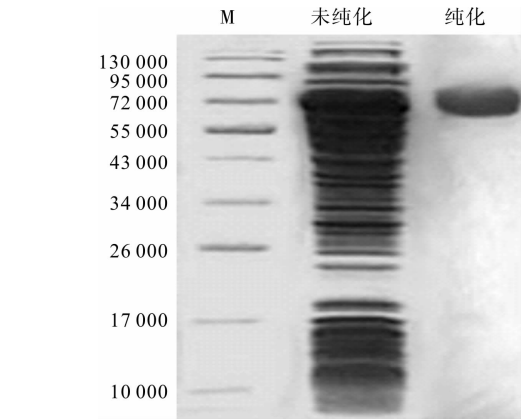
与 0 h 比较,IPTG 诱导 1、2、3、4 h 时在相对分子质量72 000左右的位置出现了 1 个条带,且随着时间的延长,条带越粗,其他条带无明显变化,表明细菌高表达目的蛋白(图 2)。诱导后经过 Ni-NTA 纯化的 SDS-PAGE 电泳结果显示,在相对分子质量 72 000处出现单一条带,且与未纯化时随时间延长而增粗的条带相对应,提示成功纯化目的蛋白(图 3)。NRG-1 纯化后通过紫外分光光度仪测定蛋白浓度和纯度, $A_{260}/A_{280}=0.998$ 。



M: Marker。

图 2 NRG-1 蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2 SDS-PAGE results of NRG-1 proteins



M: Marker;未纯化:IPTG 诱导 3 h 的 NRG-1 蛋白未纯化结果;纯化:IPTG 诱导 3 h 的 NRG-1 蛋白纯化结果。

图 3 NRG-1 未纯化蛋白和纯化蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 3 SDS-PAGE results of NRG-1 unpurified proteins and purified proteins

表 1 3 组大鼠心肌细胞活力比较

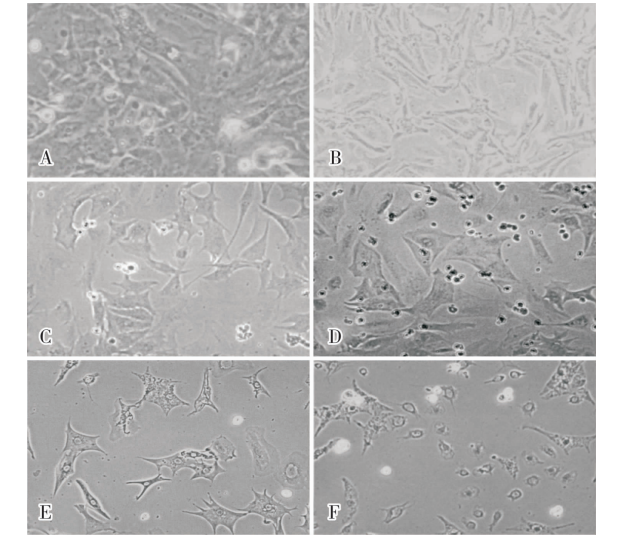
Tab. 1 Comparison of rat myocardial cell activity among the three groups

组别	n	NRG-1/(nmol · L <sup>-1</sup> )								F	P
		0.00	0.14	0.41	1.22	3.67	11.0	33.0	99.0		
5.0 μmol · L <sup>-1</sup> DOX 组	5	55.10 ± 1.28 <sup>a</sup>	73.00 ± 2.30 <sup>a</sup>	83.80 ± 2.59 <sup>a</sup>	86.40 ± 1.31 <sup>a</sup>	93.20 ± 1.15 <sup>a</sup>	102.16 ± 2.08 <sup>a</sup>	112.10 ± 1.85 <sup>a</sup>	111.80 ± 1.92 <sup>a</sup>	3 606.28	0.00
10.0 μmol · L <sup>-1</sup> DOX 组	5	46.40 ± 1.64	52.20 ± 1.74	56.10 ± 1.96	61.60 ± 1.65	68.00 ± 1.06	71.50 ± 1.38	79.30 ± 1.09	75.00 ± 1.10	2 010.60	0.00
20.0 μmol · L <sup>-1</sup> DOX 组	5	41.10 ± 0.94	44.20 ± 0.96	48.10 ± 0.98	49.60 ± 1.46	50.00 ± 1.16	51.50 ± 1.52	51.30 ± 1.27	49.00 ± 1.05	215.41	0.00

注:与 10.0 μmol · L<sup>-1</sup> DOX 组、20.0 μmol · L<sup>-1</sup> DOX 组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05。

2.3 不同浓度 DOX 干预下大鼠心肌细胞的分离培养

DOX 浓度为 0.0 μmol · L<sup>-1</sup>时,大鼠心肌细胞呈贴壁生长,细胞凸起明显,伴有伪足(图 4A);随着 DOX 浓度的增加,细胞形态逐渐萎缩,伪足减少(图 4B、4C);当 DOX 浓度增加至 5.0 μmol · L<sup>-1</sup>时,心肌细胞开始出现死亡(图 4D);DOX 浓度增加至 10.0、20.0 μmol · L<sup>-1</sup>时,死亡心肌细胞明显增加,细胞密度明显降低(图 4E、4F)。故后续实验选择 5.0、10.0、20.0 μmol · L<sup>-1</sup>作为 DOX 的实验浓度。



A:0.0 μmol · L<sup>-1</sup>DOX; B:1.0 μmol · L<sup>-1</sup>DOX;C:2.5 μmol · L<sup>-1</sup>DOX; D:5.0 μmol · L<sup>-1</sup>DOX;E:10.0 μmol · L<sup>-1</sup>DOX;F:20.0 μmol · L<sup>-1</sup>DOX。

图 4 不同浓度 DOX 干预下大鼠心肌细胞原代培养 (×100)

Fig. 4 Primary culture of rat myocardial cell under the intervention with different DOX concentrations

2.4 不同干预条件下大鼠心肌细胞活力比较

结果见表 1。随着 NRG-1 浓度增高,5.0、10.0、20.0 μmol · L<sup>-1</sup> DOX 组心肌细胞活力均有逐渐升高趋势( $F=3\ 606.28、2\ 010.60、215.41$ , $P<0.05$ ),其中 5.0 μmol · L<sup>-1</sup> DOX 组升高最明显( $P<0.05$ );当 NRG-1 浓度增加至 33.0 nmol · L<sup>-1</sup>后,5.0、10.0、20.0 μmol · L<sup>-1</sup> DOX 组心肌细胞活力反而下降。故后续实验选择 5.0 μmol · L<sup>-1</sup>作为 DOX 的实验浓度,11.0 nmol · L<sup>-1</sup>作为 NRG-1 的实验浓度。

**2.5 各组大鼠心肌细胞中 cMLCK 和 NCX-1 蛋白表达水平比较** 结果见图 5 和表 2。4 组心肌细胞中 NCX-1 和 cMLCK 蛋白表达比较差异均有统计学意义 ( $F=9.316,31.955, P<0.05$ )。与正常对照组比较,DOX 组心肌细胞中 NCX-1 蛋白表达显著升高,cMLCK 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );与 DOX 组比较,DOX + NRG-1 组细胞中 NCX-1 蛋白表达显著降低,cMLCK 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );DOX + NRG-1 组心肌细胞中 cMLCK 蛋白表达高于 NRG-1 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),2 组心肌细胞中 NCX-1 蛋白表达比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

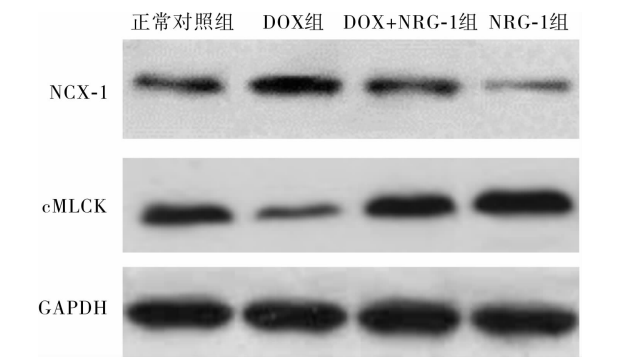


图5 4组大鼠心肌细胞中 cMLCK 和 NCX-1 蛋白表达 (Western blot)

Fig.5 Expression of cMLCK and NCX-1 protein in the myocardial cell of rats in the four groups( Western blot)

表2 4组大鼠心肌细胞中 cMLCK 和 NCX-1 蛋白表达比较  
Tab.2 Comparison of the expression of cMLCK and NCX-1 protein in the myocardial cell of rats among the four groups

组别	<i>n</i>	NCX-1 蛋白	cMLCK 蛋白
正常对照组	5	0.942 ± 0.598	1.166 ± 0.478
DOX 组	5	2.672 ± 0.871 <sup>a</sup>	0.414 ± 0.214 <sup>a</sup>
DOX + NRG-1 组	5	1.172 ± 0.470 <sup>b</sup>	1.778 ± 0.349 <sup>b</sup>
NRG-1 组	5	0.908 ± 0.421	2.570 ± 0.356 <sup>c</sup>
<i>F</i>		9.316	31.955
<i>P</i>		0.001	0.000

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 DOX 组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 DOX + NRG-1 组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

**2.6 各组大鼠心肌细胞中 cMLCK、NCX-1 mRNA 表达水平比较** 结果见表 3。4 组心肌细胞中 NCX-1、cMLCK mRNA 的表达比较差异均有统计学意义 ( $F=160.958,98.877, P<0.05$ )。与正常对照组比较,DOX 组心肌细胞中 NCX-1 mRNA 表达显著升高,cMLCK mRNA 表达显著降低,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );与 DOX 组比较,DOX + NRG-1 组心肌细胞中 NCX-1 mRNA 表达显著降低,cMLCK

mRNA 表达显著升高,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );DOX + NRG-1 组心肌细胞中 cMLCK mRNA 表达高于 NRG-1 组 ( $P<0.05$ ),但 2 组心肌细胞中 NCX-1 mRNA 表达比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表3 4组大鼠心肌细胞中 cMLCK、NCX-1 mRNA 表达比较  
Tab.3 Comparison of the expression of NCX-1 and cMLCK mRNA in the myocardial cell of rats among the four groups

组别	<i>n</i>	NCX-1 mRNA	cMLCK mRNA
正常对照组	5	0.946 ± 0.505	1.110 ± 0.164
DOX 组	5	5.762 ± 0.517 <sup>a</sup>	0.378 ± 0.205 <sup>a</sup>
DOX + NRG-1 组	5	1.800 ± 0.209 <sup>b</sup>	2.414 ± 0.376 <sup>b</sup>
NRG-1 组	5	1.080 ± 0.274	3.252 ± 0.353 <sup>c</sup>
<i>F</i>		160.958	98.877
<i>P</i>		0.000	0.000

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 DOX 组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 DOX + NRG-1 组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

3 讨论

NRG-1 是神经调节素家族成员之一,具有广泛的心血管保护作用<sup>[5]</sup>。同时,NRG-1 在心脏发育过程中也发挥重要作用,NRG-1 基因缺失的胎鼠心脏会出现发育缺陷<sup>[6]</sup>,由此推测 NRG-1 可能对 DOX 引起的心脏毒性有一定抑制或逆转作用。本研究采用 TRIzol 法提取 SD 胎鼠的心室肌细胞总 RNA,将 SD 胎鼠的 NRG-1 基因克隆测序,利用原核表达系统提高 NRG-1 基因表达,目的基因片段被转化到 *coli*. BL21 (DE3) 表达菌株中,经 IPTG 诱导、Ni-NTA 纯化,最终成功获得了 SD 大鼠的 NRG-1 蛋白,为该蛋白的生物学活性研究提供了基础。

ASENSIO-LÓPEZ 等<sup>[7]</sup> 研究认为,DOX 作为化学治疗药物,其心脏毒性作用主要归因于活性氧的产生。有关 DOX 诱导的心脏毒性,已知的机制主要涉及氧化应激、线粒体功能障碍和自噬失调等<sup>[8]</sup>。目前,DOX 所致心脏毒性已被学界重视,但其作用机制仍需进一步研究。本研究中,在 DOX 的干预下,大鼠原代心肌细胞生长活性随 DOX 浓度的增高而降低,细胞生长受到不同程度的抑制,尤其当 DOX 浓度为 5.0、10.0、20.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,心肌细胞可发生不可逆性变化,从而导致心肌细胞损伤和死亡。如果能抑制 DOX 引起的心肌细胞氧化应激等因素,心肌细胞损伤或凋亡就有可能被逆转,心肌细胞就能得到有效保护。GAO 等<sup>[9]</sup> 研究表明,NRG-1 能够改善心力衰竭患者心肌结构,增加射血分数。也有研究表明,NRG-1 的功能是多样性的<sup>[10]</sup>;体外研究表明,NRG-1 有调节心肌细胞氧化

的能力<sup>[11]</sup>。如果 NRG-1 能够对 DOX 毒性心肌细胞起保护作用,那么,当 DOX 干预的心肌细胞在一定浓度 NRG-1 作用下,心肌细胞活性会得到不同程度的恢复。本研究结果显示,NRG-1 对由  $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DOX 引起的心肌细胞活力下降具有明显的恢复作用,对由  $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DOX 引起的心肌细胞活力下降具有一定的恢复作用;当 DOX 浓度过高时,NRG-1 对心肌细胞的保护有限甚至无保护作用,可能是由于心肌细胞发生了不可逆性损伤或死亡。

肌球蛋白轻链激酶是平滑肌细胞收缩的关键调节蛋白,MLCK 结构组成包括 N 末端肌动蛋白结合区、中心激酶区、钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合区及 C 端的肌球蛋白结合区。MASSENGILL 等<sup>[12]</sup>研究表明,cMLCK 是心肌特异性肌球蛋白轻链激酶,在心肌细胞收缩中起关键作用,cMLCK 缺失可导致成年小鼠急性心力衰竭伴心肌细胞萎缩。TSUKAMOTO 等<sup>[13]</sup>提出,cMLCK 对心脏应激具有保护作用。本研究发现,在受到 DOX 的持续作用后,cMLCK mRNA 和蛋白表达水平均明显下降,在与不同浓度 NRG-1 共同作用后,cMLCK mRNA 和蛋白表达水平升高,甚至达到正常水平之上,同时细胞生长得到改善。NCX-1 是可兴奋细胞膜上一种重要的双向离子转运蛋白,其主要功能是排出细胞兴奋过程中进入细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$ ,使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  恢复到静息状态水平。在每排出 1 个  $\text{Ca}^{2+}$  的同时,转入细胞内 3 个  $\text{Na}^{+}$ ,因此有一个净电荷的跨膜移动,产生跨膜电流<sup>[14]</sup>。NCX-1 表达的变化特别是异常升高可能引起细胞膜损伤,进而导致膜电位异常,膜通透性改变,使大量  $\text{Na}^{+}$  进入细胞,此时  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  逆向交换被激活,引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载,从而加重细胞损伤和死亡。本研究结果显示,DOX 可以导致大鼠心肌细胞中 NCX-1 mRNA 和蛋白表达水平升高,但在不同浓度 NRG-1 的共同作用下,这种升高作用受到很大程度的抑制。

综上所述,NRG-1 能够对 DOX 引起的大鼠心肌细胞毒性产生一定的保护作用,其机制可能与 cMLCK 表达上调、NCX-1 表达下调有关。但本研究仅对 cMLCK、NCX-1 等部分因素进行了初步研究,NRG-1 改善 DOX 心肌细胞毒性作用的具体机制仍有待进一步探究。

## 参考文献:

- [1] JAIN A, RANI V. Mode of treatment governs curcumin response on doxorubicin-induced toxicity in cardiomyoblasts [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 442(1/2): 81-96.
- [2] MOHAMED E A, KASSEM H H. Protective effect of nebivolol on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats [J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(6): 1450-1458.
- [3] BHATT L, JOSHI V. Mangifera indica L. leaf extract alleviates doxorubicin induced cardiac stress [J]. *J Intercult Ethnopharmacol*, 2017, 6(3): 284-289.
- [4] XU M, WU X S, JIE B Z, et al. Neuregulin-1 protects myocardial cells against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced apoptosis by regulating endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(5): 464-469.
- [5] 周芹, 王龙, 王晞, 等. 神经调节蛋白-1 对脓毒症大鼠心脏功能及炎性介质的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30(2): 140-144.
- [6] 罗明雄, 陈小丹, 魏玲. 神经调节蛋白 1 对高糖损伤的心肌细胞的保护作用及其机制 [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(9): 902-907.
- [7] ASENSIO-LÓPEZ M C, SOLER F, PASCUAL-FIGAL D, et al. Doxorubicin-induced oxidative stress; the protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172803.
- [8] ZILINYI R, CZOMPA A, CZEGLÉDI A, et al. The Cardioprotective effect of metformin in doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of autophagy [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1184.
- [9] GAO R L, ZHANG J, CHENG L Q, et al. A phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(18): 1907-1914.
- [10] HAO J J, GALINDO C L, TRAN T L, et al. Neuregulin-1 $\beta$  induces embryonic stem cell cardiomyogenesis via ErbB3/ErbB2 receptors [J]. *Biochem J*, 2014, 458(2): 335-341.
- [11] ENNEQUIN G, CAPEL F, CAILLAUD K, et al. Neuregulin 1 improves complex 2-mediated mitochondrial respiration in skeletal muscle of healthy and diabetic mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1742.
- [12] MASSENGILL M T, ASHRAF H M, CHOWDHURY R R, et al. Acute heart failure with cardiomyocyte atrophy induced in adult mice by ablation of cardiac myosin light chain kinase [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 111(1): 34-43.
- [13] TSUKAMOTO O, KITAKAZE M. Biochemical and physiological regulation of cardiac myocyte contraction by cardiac-specific myosin light chain kinase [J]. *Circ J*, 2013, 77(9): 2218-2225.
- [14] MORA M T, FERRERO J M, ROMERO L, et al. Sensitivity analysis revealing the effect of modulating ionic mechanisms on calcium dynamics in simulated human heart failure [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187739.

(本文编辑:杨 博)