

芪参益气滴丸对索拉非尼诱导大鼠心肌损伤的改善作用 及其机制

唐 峥^{1,2}, 刘 薇³, 胡红民³, 赖 琦^{1,2}, 石 妍^{1,2}, 刘盛权³, 杨 军³, 褚 春^{1,2}

(1. 南华大学药学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院附属第二医院药剂科, 湖南 衡阳 421001; 3. 南华大学衡阳医学院附属第一医院心内科, 湖南 衡阳 421001)

[摘 要] **目的:** 探讨芪参益气 (QSYQ) 滴丸对索拉非尼 (SOR) 诱导大鼠心肌损伤的保护作用, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 取 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、SOR 组、SOR+QSYQ 组和 SOR+铁死亡抑制剂 1 (Fer-1) 组, 每组 10 只。SOR 组、SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组大鼠每日腹腔注射 SOR (50 mg·kg⁻¹), 持续 4 周; SOR+QSYQ 组大鼠每日灌胃 QSYQ 滴丸 (300 mg·kg⁻¹); SOR+Fer-1 组大鼠自 SOR 给药前 1 天起每日腹腔注射 Fer-1 (2 mg·kg⁻¹)。干预结束后, 采用试剂盒检测各组大鼠血清中肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 水平, 超声心动图评估各组大鼠心功能左室射血分数 (LVEF) 和左心室短轴缩短率 (LVFS), 记录大鼠心脏质量和体质量并计算心脏指数。采用 HE 染色法观察各组大鼠心肌组织形态表现, 试剂盒测定各组大鼠心肌组织中铁离子、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 和活性氧 (ROS) 水平, Western blotting 法检测各组大鼠心肌组织中酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白表达水平。另取 H9c2 心肌细胞, 分为对照组、SOR 组、SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组。采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法测定各组细胞存活率, Western blotting 法检测各组细胞中 ACSL4 和 GPX4 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, SOR 组大鼠血清中 CK-MB 水平明显升高 ($P<0.05$), LVEF 和 LVFS 明显降低 ($P<0.05$); 与 SOR 组比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组大鼠血清中 CK-MB 水平均明显降低 ($P<0.05$), LVEF 明显升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, SOR 组大鼠心肌纤维排列紊乱, 间隙扩大; 与 SOR 组比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组大鼠心肌细胞损伤程度减轻, 心肌纤维排列较整齐。与对照组比较, SOR 组大鼠心肌组织中铁离子、MDA 和 ROS 水平明显升高 ($P<0.05$), GSH 水平明显降低 ($P<0.05$); 与 SOR 组比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组大鼠心肌组织中铁离子和 ROS 水平明显降低 ($P<0.05$), GSH 水平明显升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, SOR 组大鼠心肌组织中 ACSL4 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 SOR 组比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组大鼠心肌组织中 SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), ACSL4 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SOR 组比较, 加入更高浓度 SOR 后各组 H9c2 细胞存活率均明显降低 ($P<0.05$); 与 SOR 组细胞比较, 不同浓度 QSYQ 组细胞存活率均明显升高 ($P<0.05$), 其中 1 mg·L⁻¹ QSYQ 干预组细胞存活率最高。与对照组比较, SOR 组 H9c2 心肌细胞中 ACSL4 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), GPX4 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 SOR 组比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组细胞中 ACSL4 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), GPX4 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。**结论:** QSYQ

[收稿日期] 2025-03-23 [录用日期] 2025-06-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82074236); 湖南省科技厅自然科学基金青年基金项目 (2022JJ40399); 湖南省卫健委临床重大专项项目 (20201913)

[作者简介] 唐 峥 (2002—), 男, 湖南省永州市人, 在读硕士研究生, 主要从事临床药理学方面的研究。

[通信作者] 褚 春, 主任药师, 硕士研究生导师 (E-mail: 1996020012@usc.edu.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

滴丸可减轻SOR诱导的大鼠心肌损伤, 其机制可能与抑制心肌细胞铁死亡有关。

[关键词] 芪参益气滴丸; 索拉非尼; 铁死亡; 心肌损伤; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A

Improvement effect of Qishen Yiqi dropping pills on myocardium injury in rats induced by sorafenib and its mechanism

TANG Zheng^{1,2}, LIU Wei³, HU Hongmin³, LAI Qi^{1,2}, SHI Yan^{1,2}, LIU Shengquan³,
YANG Jun³, CHU Chun^{1,2}

(1. School of Pharmaceutical Science, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China; 3. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the protective effect of Qishen Yiqi (QSYQ) dropping pill against sorafenib (SOR)-induced myocardium injury in the rats, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** Forty SD rats were randomly divided into control group, SOR group, SOR+QSYQ group, and SOR+ferroptosis inhibitor 1 (Fer-1) group, with 10 rats in each group. The rats in SOR group, SOR+QSYQ group, and SOR+Fer-1 group were intraperitoneally injected with SOR ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) daily for 4 weeks; the rats in SOR+QSYQ group were intragastrically administered with QSYQ dropping pill ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) daily; the rats in SOR+Fer-1 group were intraperitoneally injected with Fer-1 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) daily starting from 1 d before SOR administration. After the intervention, kits were used to detect the levels of creatine kinase isoenzyme-MB (CK-MB) in serum of the rats in various groups; echocardiography was used to evaluate the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) of the rats in various groups; the heart mass and body mass of the rats were recorded, and the cardiac index was calculated. HE staining was used to observe the morphology of myocardium tissue of the rats in various groups; kits were used to detect the levels of iron ion, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and reactive oxygen species (ROS) in the myocardium tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) proteins in the myocardium tissue of the rats in various groups. Additionally, H9c2 cardiomyocytes were divided into control group, SOR group, SOR+QSYQ group, and SOR+Fer-1 group. CCK-8 method was used to detect the survival rates of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of ACSL4 and GPX4 proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with control group, the level of CK-MB in serum of the rats in SOR group was significantly increased ($P < 0.05$), while the LVEF and LVFS were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with SOR group, the levels of CK-MB in the serum of the rats in SOR+QSYQ group and SOR+Fer-1 group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the LVEFs were significantly increased ($P < 0.05$). The HE staining results showed that compared with control group, the myocardial fibers of the rats in SOR group were disorderly arranged with enlarged intercellular spaces; compared with SOR group, the degrees of myocardial cell injury in SOR+QSYQ group and SOR+Fer-1 group were alleviated, and the myocardial fibers were arranged more neatly. The kit detection results showed that compared with control group, the levels of iron ion, MDA, and ROS in the myocardium tissue of the rats in SOR group were significantly

increased ($P<0.05$), while the level of GSH was significantly decreased ($P<0.05$); compared with SOR group, the levels of iron ion and ROS in the myocardium tissue of the rats in SOR+QSYQ group and SOR+Fer-1 group were significantly decreased ($P<0.05$), while the levels of GSH were significantly increased ($P<0.05$). The Western blotting method results showed that compared with control group, the expression level of ACSL4 protein in the myocardium tissue of the rats in SOR group was significantly increased ($P<0.05$), while the expression levels of SLC7A11 and GPX4 proteins were significantly decreased ($P<0.05$); compared with SOR group, the expression levels of SLC7A11 and GPX4 proteins in the myocardium tissue of the rats in SOR+QSYQ group and SOR+Fer-1 group were significantly increased ($P<0.05$), while the expression level of ACSL4 protein was significantly decreased ($P<0.05$). The CCK-8 assay results showed that compared with $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SOR group, the survival rates of H9c2 cells treated with higher doses of SOR were significantly decreased ($P<0.05$); compared with SOR group, the survival rates of the cells treated with different concentrations of QSYQ were significantly increased ($P<0.05$), and the survival rate of the cells in $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ QSYQ intervention group was the highest. The Western blotting method results showed that compared with control group, the expression level of ACSL4 protein in the H9c2 cardiomyocytes in SOR group was significantly increased ($P<0.05$), while the expression level of GPX4 protein was significantly decreased ($P<0.05$); compared with SOR group, the expression levels of ACSL4 protein in the cells in SOR+QSYQ group and SOR+Fer-1 group were significantly decreased ($P<0.05$), while the expression levels of GPX4 protein were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** QSYQ dropping pill can alleviate SOR-induced myocardial injury in the rats, and its mechanism may be related to the inhibition of ferroptosis in cardiomyocytes.

KEYWORDS Qishen Yiqi dropping pill; Sorafenib; Ferroptosis; Myocardium injury; Oxidative stress

目前,抗肿瘤药物已被广泛应用于临床,但其引起的心脏毒性,如心力衰竭、心肌病及心肌梗死等,严重影响患者预后,甚至危及生命^[1]。索拉非尼(sorafenib, SOR)作为一种关键的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI),在晚期肝细胞癌等肿瘤治疗中具有明确疗效^[2],然而其也可引发多种心血管并发症,包括心力衰竭、心肌梗死和高血压等^[3-4]。临床研究^[5]显示:约18%接受SOR治疗的患者出现心脏不良事件。另一项回顾性观察研究^[6]发现:与未接受SOR治疗的患者比较,接受SOR治疗的患者心血管事件发生率更高。SOR所致的心脏损害是临床中普遍存在但常被低估的问题,其具体毒性机制仍未完全阐明。

铁死亡是一种由铁依赖的脂质过氧化驱动的新型程序性细胞死亡形式,其特征是铁积累、活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量生成和过度脂质氧化^[7]。研究^[8]显示:在SOR治疗的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞中,可观察到谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭、亚铁离子(Fe^{2+})和ROS生成增加等铁死亡事件,提示铁死亡可能参与其诱导的细胞损伤。因此,寻找有效的防治策略以减轻SOR的心脏毒性,对提高

肿瘤患者生存质量具有重要意义。

芪参益气(Qishen Yiqi, QSYQ)滴丸是由黄芪、丹参和三七为君药并配伍降香油等活性成分的中药复方制剂,具有益气扶正、活血化瘀和通络护脉的作用,在改善微循环障碍和血管内皮功能方面展现出独特治疗优势。现代药理学研究^[9-10]表明:QSYQ滴丸在治疗心力衰竭和心肌缺血、改善心脏功能及抑制炎症等方面具有良好效果。研究^[11-12]显示:QSYQ滴丸可通过改善线粒体动力学稳态来抑制心肌细胞铁死亡,并通过调控心肌细胞损伤后的钙稳态抑制炎症反应。然而,目前关于QSYQ滴丸是否通过干预铁死亡途径拮抗SOR心脏毒性的研究尚未见报道。因此,本研究探讨QSYQ滴丸对SOR诱导大鼠心肌损伤的保护作用及其与铁死亡通路的关系,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 40只6~8周龄的SPF级SD大鼠,体质量(body weight, BW) (200 ± 20) g,购自湖南省长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可号:SCXK(湘)2022-0011。大鼠饲养于南华大学动物研究中心。本研究实验过程按照南华大学有关规范和实验动物

规章进行, 经南华大学动物伦理评审委员会审核批准(伦理批准号: USC202212DS75)。大鼠心肌H9c2细胞购自中国科学院细胞库。QSYQ滴丸购自天津天士力制药集团股份有限公司, SOR购自大连美伦生物科技有限公司, 铁死亡抑制剂1(ferrostatin-1, Fer-1)购自美国MedChemExpress公司, 肌酸激酶同工酶(creatine kinase-myocardial band, CK-MB)试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司, ROS试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、GSH试剂盒和铁离子试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体、溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)抗体和酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒购自美国APEX-BIO公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胰酶细胞消化液 Trypsin-EDTA Solution和杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基购自美国Gibco公司。多功能酶标检测仪(型号: Varioskan ALF)购自美国Thermo Fisher Scientific公司, 小型电泳仪和转膜仪均购自美国Bio-Rad公司, 化学发光成像仪(型号: SCG-W3000)购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.2 大鼠心肌损伤模型制备、分组和处理 适应性喂养1周后, 将40只SD大鼠随机分为对照组(不干预)、SOR组(SOR干预)、SOR+QSYQ组(SOR和QSYQ滴丸干预)和SOR+Fer-1组(SOR和Fer-1干预), 每组10只。SOR组、SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组大鼠每日腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SOR, 持续4周, 对照组大鼠则注射相同剂量生理盐水。SOR+QSYQ组大鼠SOR+QSYQ组大鼠每日给予 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ QSYQ滴丸灌胃干预, 其余各组大鼠给予等体积生理盐水灌胃。自SOR给药前1天起, SOR+Fer-1组大鼠每日额外接受 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Fer-1腹腔注射, 持续4周。

1.3 试剂盒检测各组大鼠血清中CK-MB水平 干预结束后, 各组存活大鼠于1%异氟烷轻度麻

醉下, 经尾静脉采集血液样本, 于 4°C 静置过夜。于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下 $1\,000 \text{ g}$ 离心20 min。取上清, 加入样本稀释液稀释至2倍, 严格按照试剂盒说明书操作, 检测各组大鼠血清中CK-MB水平。

1.4 超声心动图检测各组大鼠心脏功能 干预4周后, 称量各组存活大鼠BW。经1%异氟烷麻醉后, 采用超声心动图检测并记录各组大鼠左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening rate, LVFS)。超声测量完毕后, 取出各组大鼠心脏, 充分洗净并吸干水分后, 使用精密电子天平称量各组大鼠心脏质量(heart weight, HW), 并计算心脏指数。心脏指数=HW/BW。

1.5 HE染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现 取各组大鼠新鲜心脏组织, 于4%多聚甲醛中固定, 石蜡包裹后进行切片处理。切片经脱蜡、水化后, 经苏木素染色4 min, 蒸馏水冲洗, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)返蓝, 再经伊红染色1 min, 蒸馏水冲洗。经梯度乙醇(95%~100%)脱水, 每次5 min, 二甲苯透明, 中性树胶封片。于显微镜下观察各组大鼠心肌组织病理形态表现并采集图像。

1.6 试剂盒检测各组大鼠心肌组织中铁离子、MDA和GSH水平 取各组大鼠心肌组织(每只0.1 g), 按质量体积比1:9加入预冷生理盐水, 于冰上充分研磨至匀浆状态。严格按照检测试剂盒说明书操作, 将反应液与待测样品混合后, 使用酶标仪测定各组样品吸光度(A)值, 根据试剂盒说明书计算各组大鼠心肌组织中铁离子、MDA和GSH水平。

1.7 DCFH-DA荧光探针法检测各组大鼠心肌组织中ROS水平 取各组大鼠适量心肌组织, 迅速置于预先冷却的PBS缓冲液中。采用酶消化技术制备单细胞悬液, 调整细胞密度至 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。取等量细胞悬液, 分别设置样本管、阴性对照管(仅加PBS缓冲液)和阳性对照管(加入活性氧诱导剂)。各管加入等体积稀释后的 $2', 7'$ -二氯二氢荧光素二乙酯($2', 7'$ -dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针工作液, 于 37°C 避光孵育20 min。 $1\,000 \text{ g}$ 离心10 min, PBS缓冲液洗涤2次后, 再次离心以收集细胞沉淀, 加入PBS缓冲液重悬。采用化学发光成像仪于488 nm波长处检测各组荧光强度, 以荧光强度表示各组大鼠心肌组织中ROS水平。

1.8 CCK-8法检测不同浓度SOR和QSYQ滴丸处理后各组细胞存活率 H9c2心肌细胞使用含10%FBS和1%青-链霉素的DMEM高糖培养基,于37℃、5% CO₂条件下培养。取对数生长期且状态良好的H9c2心肌细胞,接种于96孔细胞培养板上。加入不同浓度(0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5和15.0 μmol·L⁻¹) SOR诱导大鼠H9c2心肌细胞,建立心肌损伤模型。随后在经合适浓度SOR处理后的细胞中加入不同浓度(0、0.25、0.50、1.00和2.00 mg·L⁻¹) QSYQ滴丸进行干预作为不同浓度QSYQ组。处理结束后,每孔加入CCK-8溶液,继续孵育2 h。采用酶标仪于450 nm波长处检测各组细胞A值,以仅加入培养基的孔为空白孔,未加药物处理的细胞孔为对照孔,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值)×100%。根据CCK-8法检测结果筛选后续实验的药物浓度。

1.9 H9c2心肌细胞分组和处理 取对数生长期且状态良好的H9c2心肌细胞,将细胞分为对照组、SOR组、SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组。SOR+QSYQ组细胞加入溶于PBS缓冲液且经0.22 μm孔径滤器过滤除菌的QSYQ滴丸(1 mg·L⁻¹)预处理1 h, SOR+Fer-1组细胞加入铁死亡抑制剂Fer-1(10 μmol·L⁻¹)预处理1 h。预处理后, SOR组、SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组细胞中加入含10 μmol·L⁻¹ SOR的培养基继续培养24 h,对照组则正常培养。

1.10 Western blotting法检测各组大鼠心肌组织和细胞中ACSL4、SLC7A11和GPX4蛋白表达水平 收集各组大鼠心肌组织匀浆或H9c2心肌细胞,加入含有蛋白酶抑制剂的放射性免疫沉淀分析缓冲液(radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)裂解液裂解。离心后取上清,使用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法进行蛋白质定量分析。取等量蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),随后转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。用5%脱脂牛奶封闭后,分别加入特异性一抗,于4℃孵育过夜。洗膜后,加入相应二抗室温孵育1 h,显影。采用Image J软件检测目的蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条

带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。各组大鼠血清中CK-MB水平、LVEF、LVFS和心脏指数,心肌组织中铁离子、MDA、GSH和ROS水平及铁死亡相关蛋白表达水平以及各组H9c2细胞存活率均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠存活情况和血清中CK-MB水平 本研究中,共有6只大鼠死亡,其中SOR组3只大鼠死亡, SOR+QSYQ组2只大鼠死亡, SOR+Fer-1组1只大鼠死亡。与对照组比较, SOR组大鼠血清中CK-MB水平明显升高($P<0.05$)。与SOR组比较, SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组大鼠血清中CK-MB水平均明显降低($P<0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠存活数量和CK-MB水平
Tab.1 Survival numbers and CK-MB levels of rats in various groups [$\bar{x}\pm s$, ρ_B/(ng·L⁻¹)]

Group	<i>n</i>	CK-MB
Control	10	505.28±119.20
SOR	7	1 930.00±467.90*
SOR+QSYQ	8	1 072.72±272.60 ^Δ
SOR+Fer-1	9	789.97±184.50 ^Δ

* $P<0.05$ compared with control group; ^Δ $P<0.05$ compared with SOR group.

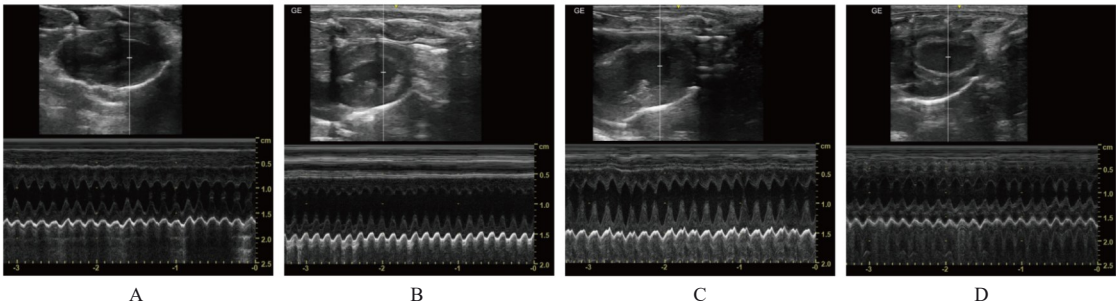
2.2 各组大鼠心脏功能和心脏指数 与对照组比较, SOR模型组大鼠LVEF和LVFS均明显降低($P<0.05$),心脏指数呈上升趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);与SOR组比较, SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组大鼠LVEF明显升高($P<0.05$),LVFS略有升高,心脏指数呈下降趋势,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表2和图1。

2.3 各组大鼠心肌组织病理形态表现 与对照组比较, SOR组大鼠心肌组织发生病理改变,主要表现为心肌纤维排列紊乱,间隙扩大,心肌断裂和少量炎症细胞浸润,提示心肌损害加重;与SOR组比较, SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组大鼠心肌组织损伤程度减轻,心肌纤维排列尚整齐,炎症细

表 2 各组大鼠 LVEF、LVFS 和心脏指数
Tab. 2 LVEF, LVFS and cardiac indexes of rats in various groups (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	LVEF($\eta/\%$)	LVFS($\eta/\%$)	Cardiac index [$w_B/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$]
Control	85.40 $\pm$ 3.58	49.80 $\pm$ 4.66	2.65 $\pm$ 0.18
SOR	74.00 $\pm$ 4.85*	38.00 $\pm$ 4.30*	3.04 $\pm$ 0.50
SOR+QSYQ	82.80 $\pm$ 5.93 Δ	46.80 $\pm$ 7.29	2.90 $\pm$ 0.14
SOR+Fer-1	84.40 $\pm$ 4.51 Δ	47.00 $\pm$ 6.36	2.86 $\pm$ 0.60

*P<0.05 compared with control group; Δ P<0.05 compared with SOR group.



A: Control group; B: SOR group; C: SOR+QSYQ group; D: SOR+Fer-1 group.

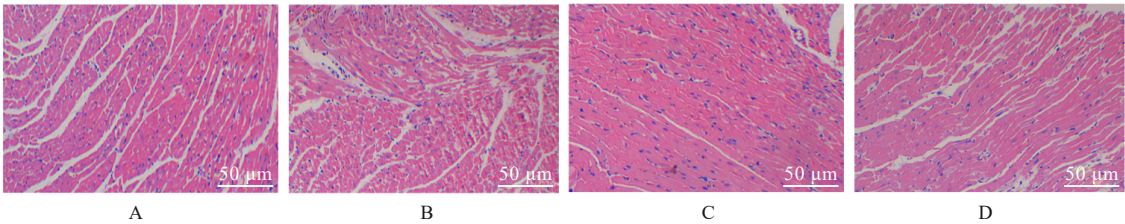
图 1 各组大鼠超声心动图

Fig. 1 Echocardiography of rats in various groups

胞浸润较少。见图 2。

2.4 各组大鼠心肌组织中铁离子、MDA、GSH 和 ROS 水平 与对照组比较, SOR 组大鼠心肌组织中铁离子、MDA 和 ROS 水平均明显升高 ($P<0.05$), GSH 水平明显降低 ($P<0.05$)。与 SOR 组

比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组大鼠心肌组织中铁离子水平明显降低 ($P<0.05$); MDA 水平有所降低, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); GSH 水平明显升高 ($P<0.05$); ROS 水平均明显降低 ($P<0.05$)。见表 3。



A: Control group; B: SOR group; C: SOR+QSYQ group; D: SOR+Fer-1 group.

图 2 各组大鼠心肌组织病理形态表现(HE, ×400)

Fig. 2 Pathomorphology of myocardium tissue of rats in various groups (HE, ×400)

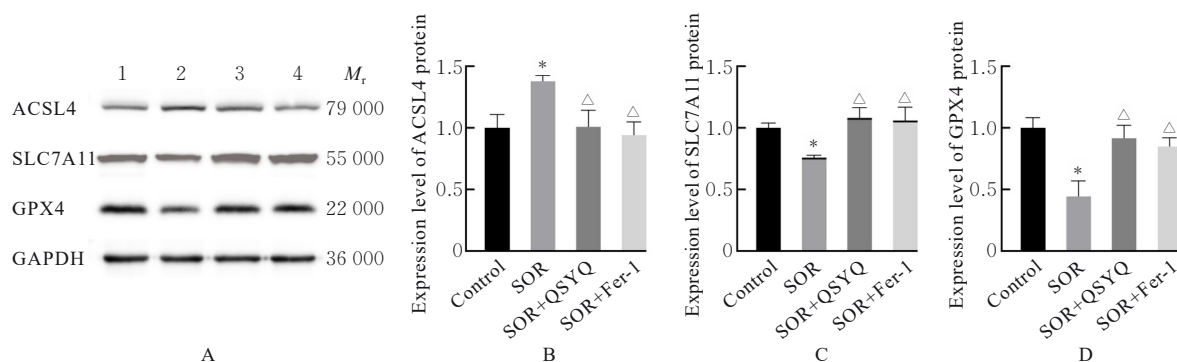
表 3 各组大鼠心肌组织中铁离子、MDA、GSH 和 ROS 水平
Tab. 3 Levels of Fe²⁺, MDA, GSH and ROS in myocardium tissue of rats in various groups (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	Fe ²⁺ [$m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$]	MDA [$m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$]	GSH [$m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$]	ROS
Control	16.38 $\pm$ 8.05	3.40 $\pm$ 1.05	13.31 $\pm$ 4.24	30.26 $\pm$ 2.32
SOR	33.51 $\pm$ 4.67*	6.76 $\pm$ 1.80*	3.00 $\pm$ 2.55*	53.07 $\pm$ 8.14*
SOR+QSYQ	17.09 $\pm$ 6.40 Δ	5.24 $\pm$ 1.16	11.53 $\pm$ 5.00 Δ	34.05 $\pm$ 4.45 Δ
SOR+Fer-1	23.11 $\pm$ 4.61 Δ	5.16 $\pm$ 1.41	11.34 $\pm$ 3.88 Δ	43.63 $\pm$ 7.05 Δ

*P<0.05 compared with control group; Δ P<0.05 compared with SOR group.

2.5 各组大鼠心肌组织中 ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平 与对照组比较, SOR 组大鼠心肌组织中 ACSL4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平明显降低

($P < 0.05$); 与 SOR 组比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组大鼠心肌组织中 ACSL4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3。



Lane 1: Control group; Lane 2: SOR group; Lane 3: SOR+QSYQ group; Lane 4: SOR+Fer-1 group. * $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with SOR group.

图3 各组大鼠心肌组织中 ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

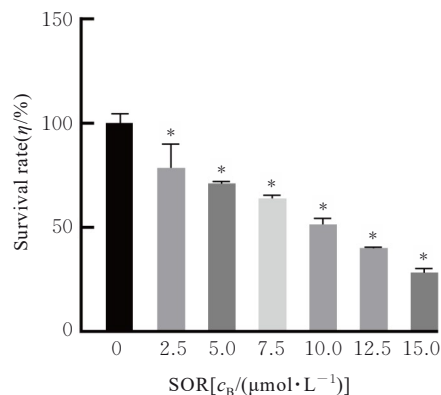
Fig. 3 Electrophoregram (A) and histograms (B—D) of expressions of ACSL4, SLC7A11 and GPX4 proteins in myocardium tissue of rats in various groups

2.6 不同浓度 SOR 和 QSYQ 滴丸处理后各组 H9c2 细胞存活率 与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SOR 组比较, 加入更高浓度 SOR 的各组 H9c2 细胞存活率均明显降低 ($P < 0.05$), 说明 SOR 可抑制大鼠 H9c2 细胞存活率且存在剂量依赖性, 后续实验选择 $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SOR 作为诱导剂量以构建心肌细胞损伤模型。见图 4。QSYQ 滴丸干预心肌细胞损伤模型结果显示: 与 SOR 组比较, QSYQ 干预后各组细胞存活率均明显升高 ($P < 0.05$), 且随着 QSYQ 滴丸浓度升高, 细胞存活率逐步升高; $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ QSYQ 滴丸组细胞存活率最高。因此后续细胞实验选择 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ QSYQ 滴丸进行干预。见图 5。

2.7 各组 H9c2 心肌细胞中 ACSL4 和 GPX4 蛋白表达水平 与对照组比较, SOR 组 H9c2 心肌细胞中 ACSL4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), GPX4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。与 SOR 组比较, SOR+QSYQ 组和 SOR+Fer-1 组细胞中 ACSL4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), GPX4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

提高癌症患者生存率是现代医学的重要目标。然而, 抗肿瘤治疗常伴随心血管损伤, 严重威胁患者生命安全^[13]。SOR 是目前被推荐用于治疗中晚

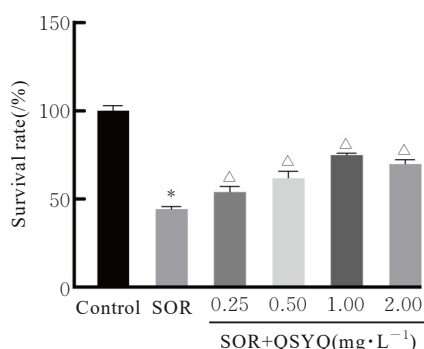


* $P < 0.05$ compared with $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SOR group.

图4 SOR 诱导后各组 H9c2 细胞存活率

Fig. 4 Survival rates of H9c2 cells in various groups after induced with SOR

期肝癌的一线分子靶向药物, 可通过抑制血管生成并诱导细胞凋亡来抑制肿瘤细胞增殖^[14], 但其临床应用可导致心肌损伤、心力衰竭和心绞痛等心脏毒性^[5]。探讨防治 SOR 所致心肌损害的药物已成为研究热点。中药提取物来源广泛, 安全有效, 对 SOR 引起的心肌损伤具有一定保护作用, 为中西医结合防治心脏毒性提供了方向。QSYQ 滴丸是一种传统的中药制剂, 在抗炎和抗氧化应激等方面均表现出良好的药理作用, 是一种潜在的功能制剂^[15-16]。研究^[17-18]显示: QSYQ 滴丸可通过抑制



* $P < 0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with SOR group.

图5 QSYQ滴丸处理后各组H9c2细胞存活率

Fig. 5 Survival rates of H9c2 cells in various groups after treated with QSYQ dripping pills

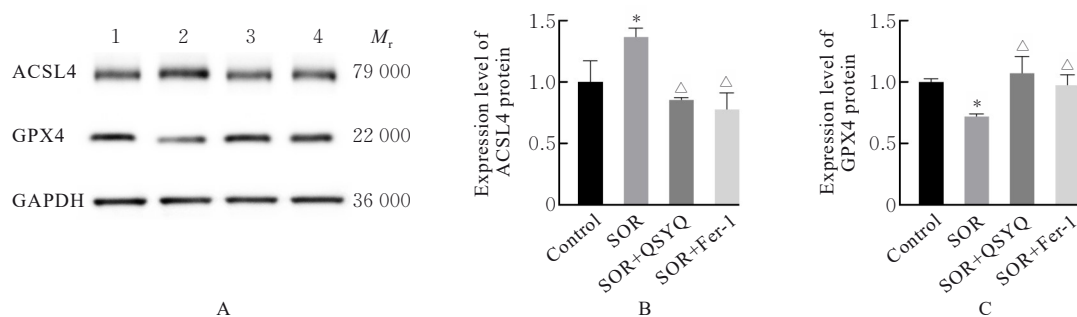
氧化应激来保护细胞,既能通过抑制细胞焦亡来减轻心肌缺血再灌注导致的心肌损伤,也可改善线粒体功能和减少凋亡来抵御高糖诱导的心肌损伤。但QSYQ滴丸能否抑制铁死亡从而改善SOR引起的心肌损伤目前尚不明确。

当心肌受到损伤时,细胞内的CK-MB会释放入血液,其活性变化可作为心肌损伤的标准^[19]。心肌结构破坏会导致心功能下降,具体表现为心肌组织的病理变化和LVEF及LVFS降低^[20]。本研究结果显示:与对照组比较,SOR组大鼠血清中CK-MB水平明显升高,表明成功构建大鼠心肌损伤模型;SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组大鼠血清中CK-MB水平较SOR组明显降低,提示QSYQ滴丸在一定程度上可改善SOR诱导的心肌损伤。与对照组比较,SOR组大鼠心肌纤维排列紊乱,间隙扩大,少量炎症细胞浸润;SOR+QSYQ组

较心肌组织损伤程度减轻,心肌纤维排列较为整齐。与对照组比较,SOR组大鼠心功能指标明显降低;与SOR组比较,SOR+QSYQ组大鼠心功能指标明显升高。上述结果均表明QSYQ滴丸对SOR所致心肌损伤具有保护作用,可改善心功能并改善心肌组织病理形态表现。

研究^[21]表明:铁死亡的发生涉及3个关键环节——铁代谢异常、GSH耗竭和脂质过氧化。细胞内铁代谢主要包括铁的吸收、输出、利用和储存,这些过程之间的不平衡可能影响细胞对铁死亡的敏感性^[22]。MDA是脂质过氧化的产物,而GSH作为GPX4的辅助因子,参与催化脂质过氧化物的还原^[23]。研究^[24]显示:ROS诱导的脂质过氧化在SOR引起的心肌损伤中发挥重要作用。SOR作为铁死亡诱导剂,可消耗GSH并破坏GSH依赖的抗氧化系统,导致有毒脂质ROS积累,进而引发铁死亡。研究^[25-26]显示:SOR可通过诱导铁死亡来杀死宫颈癌细胞,且可诱导心肌细胞铁死亡并引起心脏毒性。本研究结果显示:与对照组比较,SOR组大鼠心肌组织中铁离子、MDA和ROS水平升高,GSH水平降低,提示SOR可能通过氧化应激和脂质过氧化损伤心肌;与SOR组比较,SOR+QSYQ组和SOR+Fer-1组大鼠心肌组织中铁离子及ROS水平降低,GSH水平升高,提示QSYQ滴丸可能通过抑制氧化应激和清除过氧化物,改善SOR所致的心肌损伤。

心肌细胞损伤是心脏疾病发生发展中的核心病理环节,而铁死亡作为程序性细胞死亡的一种形式,在动脉粥样硬化、心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤和其他非缺血性心脏疾病中发挥重要调控作



Lane 1: Control group; Lane 2: SOR group; Lane 3: SOR+QSYQ group; Lane 4: SOR+Fer-1 group. * $P < 0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with SOR group.

图6 各组H9c2细胞中ACSL4和GPX4蛋白表达电泳图(A)及直条图(B,C)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of ACSL4 and GPX4 proteins in H9c2 cells in various groups

用^[27]。SLC7A11是负责谷氨酸和半胱氨酸转运的蛋白,参与GSH合成。GPX4是机体内最关键的抗氧化酶,其沉默或抑制可促进铁死亡,而过表达则可减少ROS,抑制铁死亡^[28]。多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)在机体内蓄积和过氧化清除能力下降可诱发铁死亡,且激活后的PUFA与膜脂结合形成脂质过氧化物,可导致细胞中的铁死亡。ACSL4作为PUFA活化关键酶,被视为促铁死亡蛋白^[29]。研究^[26]显示:铁死亡在SOR诱导的心脏损伤中起重要作用,抑制铁死亡可有效减轻SOR引起的心脏损伤。本研究结果显示:与对照组比较,SOR组大鼠心肌组织中和SOR组心肌细胞中ACSL4蛋白表达水平均明显升高,GPX4和SLC7A11蛋白表达水平则明显降低;经QSYQ滴丸与Fer-1治疗后,ACSL4蛋白表达水平明显降低,SLC7A11和GPX4蛋白表达水平升高,提示QSYQ滴丸可能通过与Fer-1类似的机制抑制SOR诱导的铁死亡,从而发挥心肌保护作用。

综上所述,SOR可能通过诱发心肌细胞铁死亡来诱导心肌损伤,而铁死亡抑制剂Fer-1的干预可减轻该损伤。QSYQ滴丸可抑制心肌细胞氧化应激,减少脂质过氧化物,并有效减轻SOR诱导的心肌损伤,其机制可能与抑制心肌细胞铁死亡有关。本研究结果为防治SOR诱导心脏毒性的临床实践提供了新思路,值得进一步深入探索。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

唐峥参与实验设计和论文撰写,刘薇、胡红民和赖琦参与数据分析及研究设计,石妍和刘盛权参与文献查阅,杨军和褚春参与论文审阅及修改。

[参考文献]

- [1] VIRANI S A, DENT S, BREZDEN-MASLEY C, et al. Canadian cardiovascular society guidelines for evaluation and management of cardiovascular complications of cancer therapy [J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(7): 831-841.
- [2] KONG F H, YE Q F, MIAO X Y, et al. Current status of sorafenib nanoparticle delivery systems in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2021, 11(11): 5464-5490.
- [3] BRIELER J, BREEDEN M A, TUCKER J. Cardiomyopathy: An overview[J]. *Am Fam Physician*, 2017, 96(10): 640-646.
- [4] CHAAR M, KAMTA J, AIT-LOUDHIA S. Mechanisms, monitoring, and management of tyrosine kinase inhibitors-associated cardiovascular toxicities [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6227-6237.
- [5] SCHLITT A, JORDAN K, VORDERMARK D, et al. Cardiotoxicity and oncological treatments [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2014, 111(10): 161-168.
- [6] ABDEL-RAHMAN O, FOUAD M. Risk of cardiovascular toxicities in patients with solid tumors treated with sorafenib: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *Future Oncol*, 2014, 10(12): 1981-1992.
- [7] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [8] GUO L L, HU C T, YAO M W, et al. Mechanism of sorafenib resistance associated with ferroptosis in HCC[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1207496.
- [9] 刘洋,贾孟晓,赵婷,等.基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS和网络药理学的芪参益气滴丸治疗心肌缺血的配伍机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(14): 3769-3783.
- [10] CHEN J R, WEI J, WANG L Y, et al. Cardioprotection against ischemia/reperfusion injury by QiShenYiQi Pill® via ameliorate of multiple mitochondrial dysfunctions [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3051-3066.
- [11] WU L L, FAN Z Y, GU L F, et al. QiShenYiQi dripping pill alleviates myocardial ischemia-induced ferroptosis via improving mitochondrial dynamical homeostasis and biogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116282.
- [12] 詹玲君,秦伟彬,何贵新,等.基于mitoKATP/PI3K/mTOR探讨芪参益气滴丸影响H9C2心肌细胞损伤后钙稳态及炎性环境的机制[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(9): 2087-2090.
- [13] BALACHANDRAN L, HAW T J, LEONG A J W, et al. Cancer therapies and cardiomyocyte viability: Which drugs are directly cardiotoxic? [J]. *Heart Lung Circ*, 2024, 33(5): 747-752.
- [14] TANG W W, CHEN Z Y, ZHANG W L, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 87.
- [15] LI Z X, YU Y J, BU Y, et al. QiShenYiQi pills preserve endothelial barrier integrity to mitigate sepsis-

- induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322: 117610.
- [16] HUANG Y T, ZHANG K, LIU M, et al. An herbal preparation ameliorates heart failure with preserved ejection fraction by alleviating microvascular endothelial inflammation and activating NO-cGMP-PKG pathway[J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153633.
- [17] 胡 越, 阮益莉, 龚子莹, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨芪参益气滴丸预防心肌缺血再灌注损伤的机制[J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(4): 61-67.
- [18] ZHANG S Y, WANG H, LI L X, et al. Qishen Yiqi Drop Pill, a novel compound Chinese traditional medicine protects against high glucose-induced injury in cardiomyocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6393-6402.
- [19] 刘耀武. 四逆汤联合溶栓治疗急性心肌梗死缺血再灌注损伤及对患者动态心电图和SOD、CK-MB、LDH的影响[J]. *陕西中医*, 2019, 40(7): 858-860.
- [20] 刘满义. 心脏彩超联合血清心肌损伤标志物诊断急性心肌梗死的价值分析[J]. *临床研究*, 2020, 28(10): 146-148.
- [21] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [22] WU X G, LI Y, ZHANG S C, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3052-3059.
- [23] WANG B Q, WANG Y, ZHANG J, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(6): 1439-1451.
- [24] MA W Z, LIU M, LIANG F F, et al. Cardiotoxicity of sorafenib is mediated through elevation of ROS level and CaMKII activity and dysregulation of calcium homeostasis[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2020, 126(2): 166-180.
- [25] WANG C, ZENG J, LI L J, et al. Cdc25A inhibits autophagy-mediated ferroptosis by upregulating ErbB2 through PKM2 dephosphorylation in cervical cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1055.
- [26] JIANG H, WANG C, ZHANG A, et al. ATF4 protects against sorafenib-induced cardiotoxicity by suppressing ferroptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113280.
- [27] 王新羽, 张霖柯, 符艾青, 等. 铁死亡在心血管疾病中的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(17): 61-66.
- [28] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [29] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.