

当归红芪超滤物含药血清对放射性 H9C2 心肌细胞铜死亡的干预效应*

汪鸣¹, 赵信科^{2,△}, 刘生发¹, 钱燕¹, 张滋龙¹, 安彩莲¹, 张永茂¹

(1. 河西学院附属张掖人民医院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的: 观察当归红芪超滤物 (RAS-RH) 含药血清对放射性 H9C2 心肌细胞铜死亡的干预效应。方法: SPF 级 Wistar 雄性大鼠予 RAS-RH ($100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 灌胃给药制备含药血清。将 H9C2 细胞随机分为对照组 (正常血清干预)、模型组 (6Gy X 线照射+正常血清干预) 及观察组 (6Gy X 线照射+含药血清干预)。采用 CCK-8 比色法检测各组 H9C2 心肌细胞增殖情况; Seahorse 细胞能量代谢分析技术检测各组细胞线粒体糖酵解及氧化磷酸化水平; ELISA 法检测各组细胞线粒体三磷酸腺苷 (ATP)、谷胱甘肽 (GSH) 及丙酮酸脱氢酶 (PDH) 表达情况; ICP-MS 法测定各组细胞铜元素含量; RT-PCR 技术检测各组细胞铜死亡关键因子铁硫蛋白 1 (FDX1)、二氢硫辛酸转乙酰基酶 (DLAT) 及硫辛酸合成酶 (LIAS) mRNA 的表达情况。结果: 与对照组比较, 模型组培养 48h 及 72h 后细胞增殖情况、基础耗氧率、ATP 合成量、最大耗氧率、氧储备能力、ATP、GSH 及 PDH 表达均明显降低 ($P<0.05$), 细胞铜元素含量及铜死亡关键因子 FDX1、DLAT、LIAS mRNA 表达均显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 观察组培养 48h 及 72h 后细胞增殖情况、基础耗氧率、ATP 合成量、最大耗氧率、氧储备能力、ATP、GSH 及 PDH 表达均明显增加 ($P<0.05$), 铜元素含量及铜死亡关键因子 FDX1、DLAT 及 LIAS mRNA 表达均明显降低 ($P<0.05$)。结论: 铜死亡可能是辐射诱导心肌细胞损伤的重要机制, 当归红芪超滤物通过改善放射性心肌细胞线粒体功能, 抑制细胞铜死亡, 起到保护放射性心肌损伤的作用。

关键词: 当归红芪超滤物; 放射性心脏病; 铜死亡; 线粒体

中图分类号: R 285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2025) 03-0138-06

Intervention effect of Radix Angelicae Sinensis and Radix Hedysari serum on cuproptosis of radioactive H9C2cardiomyocytes/WANG Ming¹, ZHAO Xinke², LIU Shengfa¹, et al// (1. Zhangye People's Hospital Affiliated to Hexi University, Zhangye 734000, China; 2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of Radix Angelicae Sinensis and Radix Hedysari (RAS-RH) serum on cuproptosis of H9C2cardiomyocytes. Methods: SPF-grade Wistar male rats were administrated intragastric with RAS-RH ($100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) to prepare drug-containing serum. H9C2cells were randomly divided into control group (normal serum intervention), model group (6Gy X-ray irradiation + normal serum intervention) and observation group (6Gy X-ray irradiation + drug-containing serum intervention). The proliferation of H9C2cardiomyocytes in each group was detected by CCK-8colorimetry. The levels of mitochondrial glycolysis and oxidative phosphorylation were measured by Seahorse cell energy metabolism analysis. The expression of Adenosine triphosphate (ATP), Glutathione (GSH) and Pyruvate Dehydrogenase (PDH) in mitochondria of each group was detected by ELISA. The content of copper element in each cell was determined by ICP-MS. The mRNA expressions of Ferredoxin 1 (FDX1), Dihydropyridyl Transacetylase (DLAT) and Lipoic Acid Synthetase (LIAS), a key factor of cuproptosis, were detected by RT-PCR. Results: Compared with the control group, cell proliferation, basal oxygen consumption rate, ATP synthesis amount, maximum oxygen consumption rate, oxygen reserve capacity, ATP, GSH and PDH expression were significantly decreased in the model group after 48h and 72h culture ($P<0.05$). The content of copper and the mRNA expressions of the key factors of cuproptosis FDX1, DLAT and LIAS were significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, cell proliferation, basal oxygen consumption rate, ATP synthesis amount, maximum oxygen consumption rate, oxygen reserve capacity, ATP, GSH and PDH expression were significantly increased in observation group after 48h and 72h culture ($P<0.05$). The cop-

* 基金项目: 甘肃省高校教师创新基金项目 (编号: 2023B-165); 甘肃省青年科技基金项目 (编号: 23JRRG0042); 河西学院校长基金青年科研项目 (编号: QN2022018)。第一作者: 汪鸣, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合; E-mail: 420975410@qq.com。△ 通讯作者: 赵信科, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合心血管临床及基础研究, E-mail: zskd412@163.com。

per content and the mRNA expressions of the key factors of cuproptosis FDX1, DLAT and LIAS were significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion: Cuproptosis may be an important mechanism of radiation-induced cardiomyocyte injury. Radix Angelicae Sinensis and Radix Hedysari can improve the mitochondrial function of radioactive cardiomyocytes, inhibit the cell cuproptosis, and play a role in protecting the radioactive myocardial injury.

Keywords: Radix Angelicae Sinensis and Radix Hedysari; Radiation-Induced Heart Disease; Cuproptosis; Mitochondria

电离辐射广泛应用于恶性肿瘤的治疗,在放射诱导胸部恶性肿瘤细胞死亡的同时,常使心脏组织受到损伤,导致放射性心脏病(Radiation-induced heart disease, RIHD)^[1]。过去 10 年全球肺癌、乳腺癌、食道癌等胸部恶性肿瘤的发病率呈现持续上升趋势,随着癌症幸存者生存时间的延长,RIHD 的发病风险亦明显增加^[2]。研究发现^[3],当心脏受到辐射的刺激,可导致线粒体的呼吸链断裂,并引起水分子分解,活性氧(Reactive oxygen species, ROS)过量产生,三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)合成减少,导致心肌细胞损伤。辐射可诱导铜离子在细胞内大量蓄积^[4],过量的铜离子可通过直接与线粒体三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle, TCA)中脂酰化部分相结合,诱导脂酰化蛋白的聚集和铁硫簇蛋白(iron-sulfur clusters, Fe-S)的不稳定,导致蛋白毒性应激,从而诱发细胞铜死亡^[5]。RIHD 的发生是否与辐射诱导心肌细胞发生铜死亡有关,目前尚不清楚。针对 RIHD 的治疗,目前临床尚无确切有效的治疗方法和防治措施。课题组前期研究发现,当归红芪超滤物(Radix angelicae sinensis and radix hedysari, RAS-RH)能够调节辐射诱导线粒体呼吸相关因子 ROS、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的表达,从而起到防治放射性心肌损伤的作用^[6],这是否与 RAS-RH 抑制放射性心肌细胞铜死亡有关,尚不完全清楚。因此,本研究希望通过观察 RAS-RH 对放射性 H9C2 心肌细胞铜死亡的干预效应,探讨中医药防治 RIHD 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及 H9C2 细胞 选用 3~4 月龄 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 20 只,体重(200 ± 20) g,繁殖培育于甘肃中医药大学实验动物中心,环境温度(24 ± 2)℃,相对湿度 45%~55%,正常光照,自由饮食。动物许可证号:SYXK(甘)2021~0004。研究经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号:SY2023~083)。H9C2 细胞购于美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection),编号:CRL-1446。

1.2 主要试剂 CCK-8 检测试剂盒(货号:E-CK-

A362),购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;ATP、GSH 及丙酮酸脱氢酶(Pyruvate dehydrogenase, PDH) ELISA 试剂盒(货号:KMERa011319, KMERa011056, KMERa010296),购自温州科森生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒(货号:9767, RR047Q, RR014A),购自宝日医生物技术(北京)有限公司;细胞线粒体糖酵解检测试剂盒、压力检测试剂盒及 Seahorse XF Base Medium(货号:103346-100, 103010-100, 103193-100),购自安徽徽特医疗科技发展有限公司。

1.3 主要实验仪器 X 射线辐射仪(NORTH BRANFORD;型号:XCELL 50);-80℃冰箱:(Thermo Electron Corporation;型号:8930086V);低速离心机(中佳科技有限公司;型号:SC3614);酶标仪(Thermo;型号:multiscan MK3);光学显微镜(Olympus CKX41;型号:U-CTR30-2);细胞恒温培养箱(Thermo scientific;型号:HERACELL150i);倒置显微镜(Leica;型号:DMI6000B);PCR 扩增仪(美国 PE 公司;型号:PE2400);电感耦合等元素体质谱仪(PerkinElmer;型号:ICP-MS2000)。

1.4 实验方法

1.4.1 模型 依据本课题组前期研究结果^[7],采用 6Gy 辐射剂量 X 线照射建立 RIHD 细胞模型。

1.4.2 含药血清制备 当归红芪超滤物(RAS-RH),本课题组前期分离所得^[8],产品批号:20200902。将 20 只 SPF 级 Wistar 雄性大鼠随机分为正常组及药物组,每组 10 只。参照前期研究结果^[8],药物组大鼠按 RAS-RH $100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量,分早、晚两次灌胃给药,连续 1 周;正常组予等体积生理盐水灌胃,剂量、次数和时间与药物组一致;干预期间所有大鼠均给予正常饲养。末次给药 90min 后,两组大鼠均予 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,采用腹主动脉取血,静置半小时, $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10min,收集血清,并标记为正常血清及含药血清,56℃灭活 30min,置于-80℃冰箱,保存备用。

1.4.3 分组及干预 根据课题组前期研究结论,发现采用 RAS-RH $100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 制备的含药血清对

放射性 H9C2 细胞的保护作用最明显^[8]。在前期研究基础上将 H9C2 细胞随机分为对照组（正常血清干预）、模型组（6Gy X 线照射+正常血清干预）及观察组（6Gy X 线照射+含药血清干预）。所有组均为单次给予含药血清或正常血清，给药体积为 0.25mL，以细胞增殖结果，确定最佳检测时间为培养后 48h。

1.4.4 CCK-8 比色法检测 H9C2 心肌细胞增殖情况

将处理后的各组 H9C2 心肌细胞按每孔约 5×10^3 个细胞悬液接种于 96 孔板中，每个样本设置 3 个复孔，同时设空白孔（不加细胞，但是加入同体积的培养基）。待细胞同步化 12h 后，对照组及模型组加入正常血清，观察组加入含 RAS-RH 的含药血清，37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24h、48h 及 72h。每孔加入 10μL 的 CCK-8 溶液，37℃ 培养箱中继续孵育 3h。分别于培养前、24h、48h 及 72h 时用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（A）。细胞存活率（%）=（A 实验组 - A 空白组）/（A 对照组 - A 空白组）× 100%。

1.4.5 Seahorse 技术检测 H9C2 心肌细胞线粒体能量代谢 第 1 天：将各组 H9C2 心肌细胞接种到 Seahorse XF 96 孔板中，予 DMEM 完全培养基孵育 24h；同时无 CO₂ 培养箱中 37℃ 水化探针板。第 2 天：配制 Seahorse XF Base Medium 检测液，细胞洗涤 2 次，在无 CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 1h。进行线粒体有氧呼吸压力测试，将试剂盒中寡霉素（Oligomycin）、解偶联剂（FCCP）、鱼藤酮/抗霉素 A（Rotenone/ anti-mycin A，R/A）按比例稀释，依次加到探针板的孔中，放入仪器中校准，进行线粒体耗氧率（Oxygen Consumption Rate，OCR）检测，检测结束后应用 WAVE 软件进行数据分析。

1.4.6 ELISA 法检测线粒体 ATP、GSH 及 PDH 表达情况 严格按照 ATP、GSH 及 PDH ELISA 试剂盒说明书在 96 孔酶标板内进行操作，主要步骤包括：分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入 100μL 比稀释的标准品，空白孔加入 100μL 样本稀释液，其余孔加入 100μL 待测样本，酶标板覆膜，37℃ 孵育 90min。甩尽孔内液体，每个孔中加入酶标抗体 100μL，37℃ 孵育 1h。甩尽孔内液体，每孔加洗涤液 350μL，吸干酶标板内的液体。每孔先加显色液 A 100μL，37℃ 孵育 30min，洗板 5 次。每孔加底物溶液（TMB）90μL，37℃ 避光孵育 15min。每孔加终止液 50μL，终止反应。立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度（OD 值），计算标准曲线的回归方程式，求得样品浓度。

1.4.7 ICP-MS 法测定 H9C2 心肌细胞铜元素含量 各组 H9C2 心肌细胞移至试管内，用离心机 1.5×10^4 r·min⁻¹ 离心 10min，去除上清液，细胞沉淀中加入 3mL 浓硝酸进行消解，按说明书进行微波消解。消解结束后，130℃ 金属浴加热去酸 30min，冷却后稀释 20 倍，通过 ICP-MS 仪器检测铜元素的含量。

1.4.8 RT-PCR 技术检测细胞铜死亡关键因子 FDX1、DLAT 及 LIAS 的表达情况 根据 RNA 试剂盒说明书提取各组 H9C2 心肌细胞中总 mRNA，通过反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA，反应体系：20μL，反转录程序：25℃、5min，42℃、30min，70℃、10min；并以此为模板于荧光定量 PCR 仪进行扩增。以 GAPDH 作为内参，按^{△△}Ct 法计算目的基因相对表达量。各基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	扩增片段(bp)
FDX1	F:5'-CAAGGGGAAAATTGGCGACTC-3'	231
	R:5'-TTGGTCAGACAAACTTGGCAG-3'	
DLAT	F:5'-TAGTCTCTTTCGGAAGAAGTTGG-3'	224
	R:5'-TCACTCGACGAATGTTGCTGA-3'	
LIAS	F:5'-ACATTGCGGAATTTAAGTCTCCA-3'	139
	R:5'-TGCAACCTCTTGTGCATGTGT-3'	
GAPDH	F:5'-TGGCCTTCCGTGTCCTAC-3'	178
	R:5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'	

1.5 统计分析 实验数据应用 SPSS 26.0 软件统计分析，计量资料符合正态分布以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用两独立样本 t 检验；以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞增殖比较 采用 CCK-8 检测结果显示（图 1A）。与对照组比较，模型组细胞培养 48h 及 72h 后增殖均显著减少（P<0.01）；与模型组比较，观察组细胞培养 48h 及 72h 后增殖均明显增多（P<0.05）。各组细胞培养 48h 后增殖达到峰值，此后增殖强度降低（图 1B），因此选择培养 48h 的 H9C2 细胞用于后续实验检测。

2.2 各组细胞线粒体能量代谢比较 采用 Seahorse 技术检测 H9C2 心肌细胞线粒体能量代谢结果显示（图 2，表 2）。与对照组比较，模型组基础耗氧率、ATP 合成量、最大耗氧率及氧储备能力明显降低（P<0.05）；与模型组比较，观察组基础耗氧率、ATP 合成量、最大耗氧率及氧储备能力明显增加（P<0.05）。

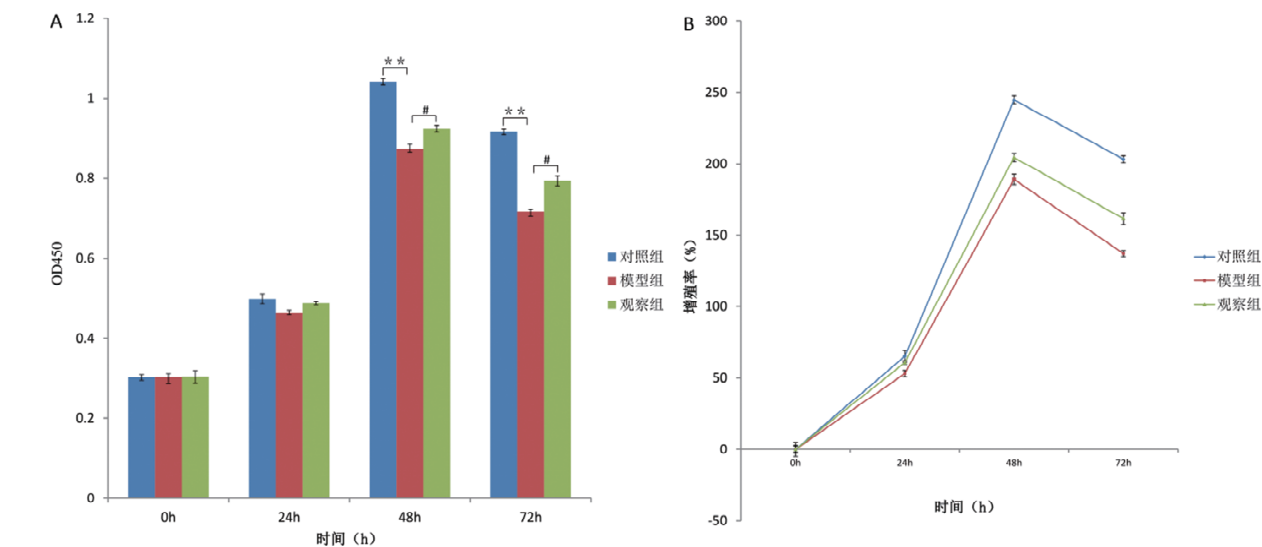


图 1 各组 H9C2 心肌细胞增殖结果 (n=3)

注: A: 各组 H9C2 心肌细胞增殖情况; 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。B: 各组 H9C2 心肌细胞生长曲线。

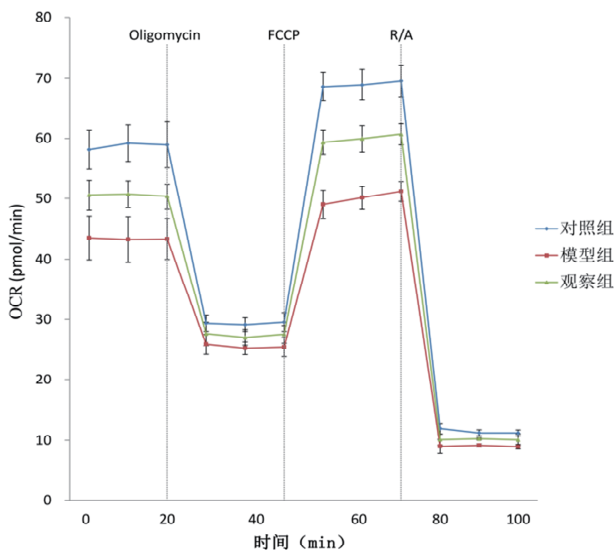


图 2 各组 H9C2 细胞线粒体耗氧率 (OCR) 变化曲线

表 2 各组细胞线粒体能量代谢分析 ($\bar{x}\pm s$, pmol/min)

组别	n	基础耗氧率	ATP 合成量	最大耗氧率	储备能力
对照组	3	47.36±0.93	29.45±0.62	57.64±0.83	10.27±0.48
模型组	3	34.33±0.21**	17.81±0.21**	41.10±1.12**	6.77±1.19*
观察组	3	40.43±0.12##	23.18±0.48##	49.85±0.69##	9.43±0.79#

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

2.3 各组细胞线粒体 ATP、GSH 及 PDH 表达比较
采用 ELISA 法检测各组细胞线粒体 ATP、GSH 及 PDH 表达情况 (表 3)。与对照组比较, 模型组 ATP、GSH 及 PDH 表达显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 观察组 ATP、GSH 及 PDH 表达显著增加 ($P<0.01$)。

表 3 各组细胞线粒体 ATP、GSH 及 PDH 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

组别	n	ATP	GSH	PDH
对照组	3	145.09±15.63	109.95±15.37	119.34±10.98
模型组	3	107.91±9.77**	85.78±7.68**	91.36±9.23**
观察组	3	131.48±13.55**	100.61±12.94**	114.69±9.36**

注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

2.4 各组细胞铜元素含量比较 采用 ICP-MS 法测定各组 H9C2 心肌细胞铜元素含量显示 (图 3)。与对照组比较, 模型组铜元素含量显著增高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 观察组铜元素含量显著减少 ($P<0.01$)。

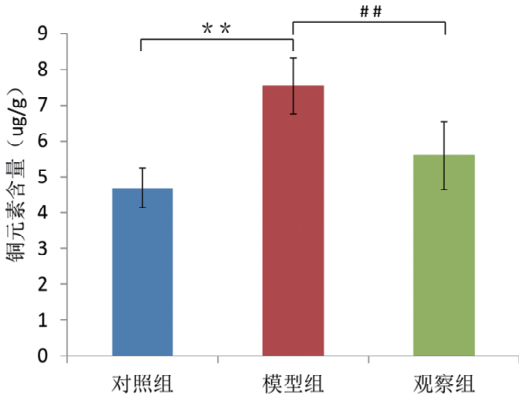


图 3 各组 H9C2 细胞铜元素含量比较 (n=3)

注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

2.5 各组细胞铜死亡关键因子 FDX1、DLAT 及 LIAS mRNA 表达比较 采用 RT-PCR 技术检测细胞铜死亡关键因子 FDX1、DLAT 及 LIAS mRNA 的表达情况 (表 4)。与对照组比较, 模型组 FDX1、DLAT 及 LI-

AS mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，观察组 FDX1、DLAT 及 LIAS mRNA 表达明显降低 ($P<0.05$)。

表 4 各组细胞铜死亡关键因子 FDX1、DLAT 及 LIAS mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FDX1	DLAT	LIAS
对照组	3	1.18±0.20	0.95±0.24	1.41±0.26
模型组	3	1.80±0.35 ^{**}	1.57±0.43 [*]	2.22±0.55 ^{**}
观察组	3	1.47±0.31 [#]	1.25±0.29 [#]	1.75±0.41 [#]

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$

3 讨 论

放疗在癌症等疾病治疗中具有重要作用，放射性心肌损伤是放射治疗胸部恶性肿瘤过程中出现的一种严重并发症，其对心脏功能的影响不容忽视。当前的研究发现，放射性心肌损伤可能与氧化应激、DNA 损伤反应、端粒侵蚀、线粒体功能障碍、表观遗传调控、循环因子、蛋白质翻译后修饰和代谢物变化等多种因素相关，但其发病机制仍不完全清楚^[9]。研究表明^[4,10]，辐射可诱导铜离子在细胞内大量蓄积，引起铜稳态蛋白失衡，过量的铜还可导致线粒体发生氧化应激反应，ROS 产生增加，引发 DNA 双链断裂，从而破坏细胞增殖和代谢，导致细胞损伤。因此，我们推测辐射导致的 RIHD，可能与辐射诱导心肌细胞铜离子蓄积，诱导心肌细胞线粒体功能障碍有关。课题组首先通过检测各组细胞增殖情况，选择后续最佳实验时间（48h），以保证结果的准确性；随后利用 Seahorse 技术及 ELISA 法检测各组细胞线粒体能量代谢情况，以评估线粒体功能。研究发现，各组细胞培养 48h 后增殖达到峰值；相较于对照组，模型组细胞培养 48h 及 72h 后增殖情况、基础耗氧率、ATP 合成量、最大耗氧率、氧储备能力、ATP、GSH 及 PDH 表达均明显降低 ($P<0.05$)，说明辐射可导致心肌细胞线粒体功能障碍，使线粒体能量代谢降低。

铜死亡作为近年来新发现的一种细胞程序性死亡方式，与已知的细胞死亡机制（如凋亡、铁死亡、坏死和焦亡等）不同，其特点是细胞内铜离子的积累，导致硫辛酰化蛋白异常聚集，干扰线粒体呼吸相关的铁硫簇蛋白（Fe-S），引起蛋白质毒性应激反应，最终导致细胞死亡^[5]。在铜死亡的机制中，铁硫蛋白 1（FDX1）起到关键性作用，FDX1 的主要功能是介导蛋白质的脂酰化修饰，铜离子与 FDX1 结合，

从而将 Cu^{2+} 转化为有毒的 Cu^{+} ，导致铁硫簇蛋白的稳定性降低，使蛋白质功能丧失，最终细胞线粒体无法维持正常的代谢和能量平衡而死亡。此外，FDX1 可促进丙酮酸脱氢酶（PDH）的脂酰化，铜离子能够与三羧酸循环（TCA）中的蛋白质脂酰化修饰蛋白质（如 DLAT）结合，导致这些蛋白质发生寡聚化，寡聚化的 DLAT 能够干扰 TCA 循环的正常功能，导致三羧酸循环中间产物的积累和能量产生的抑制^[5]。研究发现^[11]，硫辛酸合成酶（LIAS）也参与了蛋白质脂酰化代谢过程，LIAS 的缺失可降低铜毒性，说明 LIAS 也可诱导细胞发生铜死亡。因此，为进一步明确辐射导致的线粒体功能障碍是否与铜死亡相关，我们采用 ICP-MS 法测定各组细胞铜元素含量，采用 RT-PCR 技术检测细胞铜死亡关键因子 FDX1、DLAT 及 LIAS mRNA 的表达情况。研究发现，相较于对照组，模型组细胞铜元素含量及铜死亡关键因子 DX1、DLAT、LIAS mRNA 表达均显著升高 ($P<0.05$)，说明铜死亡可能是辐射诱导心肌细胞损伤的关键机制之一。

从临床症状来看，RIHD 当属中医学“胸痹”“心悸”等范畴，病位在心，其主要致病因素为电离辐射，中医理论认为电离辐射属热毒之邪，其具有火热之性，从外侵袭人体，直中脏腑，易损伤气血，心失所养，发为胸痹、心悸；其发病机制为“热盛伤阴、津枯血燥、气虚血瘀、脏腑失养”^[12-13]。因此，RIHD 的治疗当以益气养心，补血活血为主。近年来研究发现，补益气血类药物当归、红芪及其有效成分具有抗氧化、抑制细胞损伤，提高线粒体功能等作用^[14-15]；亦有减轻辐射致细胞损伤的作用^[16-18]。在中医气血理论的指导下，以金元时代名医李东垣所创益气补血名方“当归补血汤”为基础，选用甘肃地道药材当归、红芪按 1：5 比例制备当归红芪超滤物（RAS-RH）。有学者研究发现，RAS-RH 可通过抑制胶原沉积来降低心肌纤维化以及抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路来降低炎症反应，从而达到减轻辐射致心肌细胞损伤的作用^[7,19]。但中药成分复杂，RAS-RH 在防治 RIHD 的机制中可能同时涉及多个靶点。本课题从细胞铜死亡的角度研究发现，相较于模型组，观察组细胞培养 48h 及 72h 后增殖情况、基础耗氧率、ATP 合成量、最大耗氧率、氧储备能力、ATP、GSH 及 PDH 表达均明显增加 ($P<0.05$)，说明 RAS-RH 能够促进 ATP、GSH 及 PDH 的表达，减轻辐射导致的心肌细胞线粒体功能障碍。进一步对心肌细胞铜离子及铜死亡关键因子表达的

研究发现,相较于模型组,观察组铜元素含量及铜死亡关键因子 DX1、DLAT 及 LIAS mRNA 表达均明显降低 ($P<0.05$),说明 RAS-RH 防治 RIHD 的作用机制可能与减轻辐射诱导的心肌细胞铜死亡有关。

综上所述,铜死亡可能是辐射诱导心肌细胞损伤的重要机制,RAS-RH 通过提高线粒体功能,抑制放射性心肌细胞铜死亡,起到保护放射性心肌损伤的作用。本研究从铜死亡的角度初步探讨辐射诱导的心肌细胞损伤的发生机制,并基于此研究 RAS-RH 对 RIHD 的防治效应。然而,本研究尚未对铜死亡程序中三羧酸循环脂酰化蛋白途径的调控机制进行深入研究,后续研究将通过抑制三羧酸循环脂酰化蛋白途径,以进一步明确 RAS-RH 治疗 RIHD 的具体作用靶点。本研究可为临床研发抗辐射损伤药物奠定理论基础,也对减轻患者病痛、推动中医药的社会效应有一定的价值。

参考文献

- [1] Quintero-Martinez JA, Cordova-Madera SN, Villarraga HR. Radiation-induced heart disease [J]. J Clin Med, 2021, 11 (1): 146-146.
- [2] Bergom C, Rayan D, Brown SA. Predicting radiation-induced heart disease and survival-is location the key? [J]. JAMA Oncol, 2020, 7 (2): 193-195.
- [3] Yi J, Yue L, Zhang Y, et al. PTPMT1 protects cardiomyocytes from necroptosis induced by γ -ray irradiation through alleviating mitochondria injury [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 324 (6): 1320-1331.
- [4] Masaldan S, Clatworthy SAS, Gamell C, et al. Copper accumulation in senescent cells: interplay between copper transporters and impaired autophagy [J]. Redox Biol, 2018, 16: 322-331.
- [5] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. Science, 2022, 375 (6586): 1254-1261.
- [6] 蒋虎刚,冯明霞,刘凯,等. 基于 Rho/Rock 通路当归红芪多糖对 H9C2 细胞放射性心肌损伤的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26 (05): 54-58.
- [7] 孔姗姗,汪鸣,蒋虎刚,等. 当归红芪超滤物对放射性 H9C2 细胞损伤 TNF- α /CTRP9 信号通路相关因子表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28 (05): 50-54.
- [8] 韩金晏,蒋虎刚,王新强,等. 当归红芪超滤物通过调控 P53 表达对 H9C2 细胞凋亡的干预效应研究 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38 (04): 1543-1548.
- [9] Wang KX, Ye C, Yang X, et al. New insights into the understanding of mechanisms of radiation-induced heart disease [J]. Curr Treat Options Oncol, 2023, 24 (1): 12-29.
- [10] Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, et al. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease [J]. Arch Toxicol, 2016, 90 (1): 1-37.
- [11] Guo HR, Wang YQ, Cui HM, et al. Copper induces spleen damage through modulation of oxidative stress, apoptosis, DNA damage, and inflammation [J]. Biol Trace Elem Res, 2022, 200 (2): 669-677.
- [12] 廖泽彬,邵帅,柏志杰,等. 放射损伤的中医药防治及机制 [J]. 中国科学基金, 2024, 38 (03): 419-425.
- [13] 赵哲,胡蓉,靳玉秋,等. 重离子辐射旁效应与中医的“传舍”理论 [J]. 实用中医内科杂志, 2023, 37 (06): 108-110.
- [14] Song YR, Jang B, Lee SM, et al. Angelica gigas NAKAI and its active compound, decursin, inhibit cellular injury as an antioxidant by the regulation of AMP-activated protein kinase and YAP signaling [J]. Molecules, 2022; 27 (6): 1858.
- [15] Chang X, Li Y, Liu J, et al. β -tubulin contributes to Tongyang Huoxue decoction-induced protection against hypoxia/reoxygenation-induced injury of sinoatrial node cells through SIRT1-mediated regulation of mitochondrial quality surveillance [J]. Phytomedicine, 2023, 108: 154502-154502.
- [16] Tang Z, Huang G. Extraction, structure, and activity of polysaccharide from radix astragali [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 113015-113015.
- [17] Shen J, Qin H, Li K, et al. The angelica polysaccharide: a review of phytochemistry, pharmacology and beneficial effects on systemic diseases [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 133: 112025-112025.
- [18] Huang Y, Cheng M, Wang X, et al. Dang Gui Bu Xue Tang, a conventional Chinese herb decoction, ameliorates radiation-induced heart disease via Nrf2/HMGB1 pathway [J]. Front Pharmacol, 2023, 13 (04): 1086206-1086206.
- [19] Ren C, Wang L, Li X, et al. Elucidating the mechanism of action of Radix Angelica sinensis (Oliv.) Diels and Radix Astragalus mongolicus Bunge ultrafiltration extract on radiation-induced myocardial fibrosis based on network pharmacology and experimental research [J]. Eur J Pharm Sci, 2024, 199 (01): 106794-106794.

(收稿日期 2024-11-17)