·临床研究·

大黄素通过抑制线粒体呼吸链途径介导心脏毒性的机制研究

应娜，李兆顺，蔡云祥，林鑫建

【摘要】目的　探讨大黄素诱导的氧化应激和细胞凋亡对心脏的毒性作用。**方法**　选取 SPF 级 Balb/c 小鼠 32 只，腹腔注射不同浓度大黄素，另选取心肌细胞系 H9c2 细胞株直接暴露于大黄素。观察给予大黄素后，心脏功能与组织病理的改变。采用 MTT 法检测心肌细胞细胞存活率，DCFH-DA 探针检测细胞活性氧水平，JC-1 探针检测线粒体膜电位水平，Hoechst 33342 探针检测细胞凋亡率，Western blot 法检测相关蛋白水平。**结果**　大黄素显著上调心脏组织肌酸激酶（CK）、肌酸激酶同工酶（CK-MB）及乳酸脱氢酶（LDH）水平，降低超氧化物歧化酶（SOD）谷胱甘肽（GSH）水平（均 $P < 0.05$）。经大黄素处理后，H9c2 细胞活力降低，SOD、GSH 表达降低，活性氧产生增加，线粒体膜电位去极化（ΔΨm）。大黄素上调细胞凋亡调节因子（Bax）表达，促进细胞凋亡诱导因子（AIF）与细胞色素 C（Cyt-C）释放到细胞浆内，并提高半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 3（Caspase-3）的酶活性。**结论**　大黄素通过线粒体凋亡途径，激活 Caspase-3 通路，诱发心肌细胞凋亡。

【关键词】　大黄素；心脏毒性；线粒体凋亡；氧化应激
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.07.007
【中图分类号】　R965　**【文献标志码】**　A　**【文章编号】**　1671-0800(2025)07-0687-04

大黄素主要来源于蓼科植物掌叶大黄的根茎，具有多种生物活性和药用价值。近年来，研究人员发现大黄素具有多种药理作用，包括抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用等[1-3]。目前，虽然含有大黄素成分的药物在抗癌、抗纤维化等慢性疾病展现出显著的治疗效果，但是血流量灌流较大的脏器如心脏等，可能会受到大剂量的大黄素冲击，而造成一定的损伤或者产生不同程度的毒副作用[4-5]。越来越多的研究表明，大黄素可能是通过触发氧化应激、线粒体功能障碍等机制，促使细胞凋亡，最终导致器官衰竭[6-8]。机制通路涉及 Notch1/Nrf2 途径、Bax/caspase 凋亡途径、HIF-1/GSK-3β途径、GRP78/CHOP 途径等。因此，本研究拟通过 Balb/c 小鼠动物实验、心肌细胞系 H9c2 体外实验，探讨大黄素对心脏的毒性作用，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　细胞与试剂　心肌细胞系 H9c2 细胞株，购于瑞维优科生物。线粒体膜电位检测试剂盒（M8650）、大黄素（E8390）、活性氧检测试剂盒（CA1410）、噻唑蓝 MTT（M8180）、Hoechst 33342（C0031）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）检测试剂盒（BC5165）、GSH 检测试剂盒（BC1175）、LDH 检测试剂盒（BC0685）及 Caspase-3 活性测试剂盒（BC3830）等购于中国北京索莱宝科技有限公司。胰蛋白酶（1∶250）（BS130）、DMEM 培养基（BL304A）、胎牛血清（BL205A）、青霉素-链霉素（BL505A）均购于白鲨科技有限公司。Bax（CY5059）、凋亡诱导因子（apoptosis inducing factor，AIF）（CY5024）、细胞色素 C（cytochrome C，Cyt-C）（CY5734）抗体、GAPDH 抗体（AB0038）、羊抗兔二抗（AB0171）及羊抗鼠二抗（AB0172）均购自 Abways 公司。

1.2　动物实验　选取健康 Balb/c 小鼠 32 只，体质量 17 ～ 23 g，雄性，SPF 级，购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：（湘）2024-0009。先喂养 3 d 以适应 SPF 级实验房的环境，随后分为 4 组：空白对照组（0.9%氯化钠注射液，8 只）、低/中/高剂量大黄素组（0.2、0.4、0.8 g/kg，每组 8 只）。按组别单次腹腔注射给药后，进行一般观察并记录，如 Balb/c 小鼠的行为活动、精神状态、毛色是否异常等。3 d 后麻醉动物，称重后于小鼠眼周静脉丛处取血液，小鼠在麻醉状态下脱臼处死。随后将小鼠解剖，取心脏组

基金项目：　温岭市社会发展科技项目（2024S00095）
作者单位：　317502 浙江省台州，台州市肿瘤医院
通信作者：　应娜，Email：41186704@qq.com

织，一半制成组织匀浆待检测；另一半固定于 4%多聚甲醛固定液，行 HE 染色来观察心脏病理改变。本研究获得德瑞康生物技术（浙江）有限公司实验动物伦理委员会批准（20240430021）。

1.3 心肌细胞培养 H9c2 细胞使用含 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养液，将其置于 37℃、5%CO_2 的无菌培养箱中培养 4 ～ 6 h。细胞培养过夜，2 ～ 3 d 传代。当细胞生长培养至将铺满培养皿时，加入 1 ml 0.25%胰蛋白酶消化细胞直至细胞边缘发亮变圆，加入适量 DMEM 培养液中并使用移液器吹吸均匀使 H9c2 细胞脱壁成为悬液，继续进行传代培养。取对数生长期的 H9c2 细胞，接种到 96 孔培养板中（每孔细胞数约 1×10^5 个），放入细胞培养箱中培养至细胞贴壁后（约 24 h），吸去溶液，予不同浓度的大黄素（0、20、40、80 及 160 μmol/L）处理 H9c2 细胞 24 h 后，按照试剂盒说明书采用 MTT 法检测细胞存活率，采用 LDH 法检测细胞损伤程度。

1.4 观察指标 不同浓度的大黄素处理 H9c2 细胞 24 h 后，采用 DCFH-DA 荧光探针检测活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平，采用 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位水平（线粒体膜电位较高时 JC-1 以聚合体形式存在，呈红色荧光；当线粒体膜电势下降时，JC-1 无法聚集而分解成单体模式，此时 JC-1 单体呈绿色荧光），采用 Hoechst 33342 荧光探针检测细胞凋亡情况。取各组小鼠心脏组织匀浆及不同浓度的大黄素（0、20、40、80 及 160 μmol/L）处理 24 h 后的 H9c2 细胞，按照试剂盒说明书检测样品中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）及 Caspase-3 酶活性。Western bolt 法检测各组小鼠心脏组织匀浆及不同浓度的大黄素处理 24 h 后 H9c2 细胞的蛋白表达。

1.5 统计方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差表示，多组对比采用单因素方差分析（One-way ANOVA），组内比较采用 Tukey’s 检验；两组之间的比较采用 Student’ s t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对小鼠心脏损伤的影响 与空白对照组相比，各剂量大黄素组小鼠均出现不同程度的体质量下降、体毛粘连、肢体活动能力受限等现象，甚至出现精神萎靡。各剂量大黄素组出现心肌间质出血、心肌纤维断裂及心肌肥厚等病理变化，见图 1。各剂量大黄素组肌酸激酶同工酶（creatine kinase-MB，CK-MB）、肌酸激酶（creatine kinase，CK）及乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）水平均高于空白对照组（均 $P<0.05$），见表 1。

2.2 大黄素对心肌细胞的影响 H9c2 细胞暴露于 0、20、40、80 及 160 μmol/L 大黄素 24 h 后，各组细胞存活率分别为（103.32±2.11）%、（80.51±1.68）%、（72.33±2.08）%、（51.57±3.05）%、（38.58±1.92）%。大黄素诱导 LDH 呈剂量依赖性方式释放，显著降低 SOD、GSH 的水平，增加心脏组织中活性氧的水平，并使细胞内线粒体膜电位下降（均 $P<0.05$），见表 2、图 2。

2.3 大黄素对小鼠心脏组织中抗氧化酶、促凋亡蛋白活性的影响 随着大黄素浓度的增加，小鼠心脏组织 GSH、SOD 蛋白表达减少，Caspase-3 活性增强（均 $P<0.05$），见表 3。

2.4 大黄素引起的 H9c2 心肌毒性与凋亡相关 不同浓度大黄素处理后，心肌细胞凋亡率、Caspase-3 活性差异均有统计学意义（均 $P<0.05$），见表 4、图 3。

3 讨论

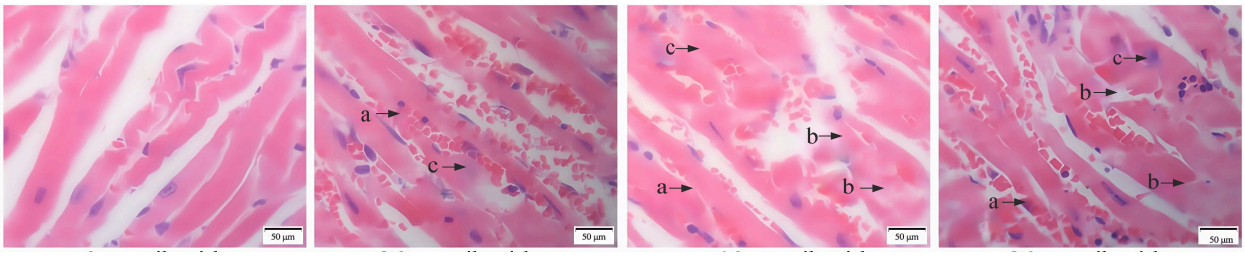
大黄素作为一种药物成分，其心脏毒性一直备受关注[10-12]。为了揭示大黄素对心脏的毒性作用及其机制，本研究对大黄素的心脏毒性作用及其分子机制进行了深入研究。结果显示，大黄素可通过多种途径影响心脏细胞的正常功能，包括细胞凋亡、氧化应激和线粒体功能异常等。

氧化应激指在生物体内，由于氧化剂和抗氧化剂之间的平衡被破坏，导致过量活性氧（ROS）和自由基产生。这种失衡状态可能引起细胞结构和功能的损伤，是许多疾病的发病机制之一，包括癌症、心血管疾病、神经退行性疾病等。当因各种内外环境

表 1 大黄素对小鼠心脏功能相关指标的影响 U/L

组别	CK	CK-MB	LDH
空白对照组	387.29±12.37	171.83±11.91	80.93±9.10
低剂量大黄素组	557.87±20.13	288.84±18.56	93.03±12.01
中剂量大黄素组	598.59±17.06	325.14±20.92	182.77±23.64
高剂量大黄素组	658.36±21.69	466.08±17.02	202.81±17.60

注：CK 为肌酸激酶，CK-MB 为肌酸激酶同工酶，LDH 为乳酸脱氢酶



空白对照组　低剂量大黄素组　中剂量大黄素组　高剂量大黄素组

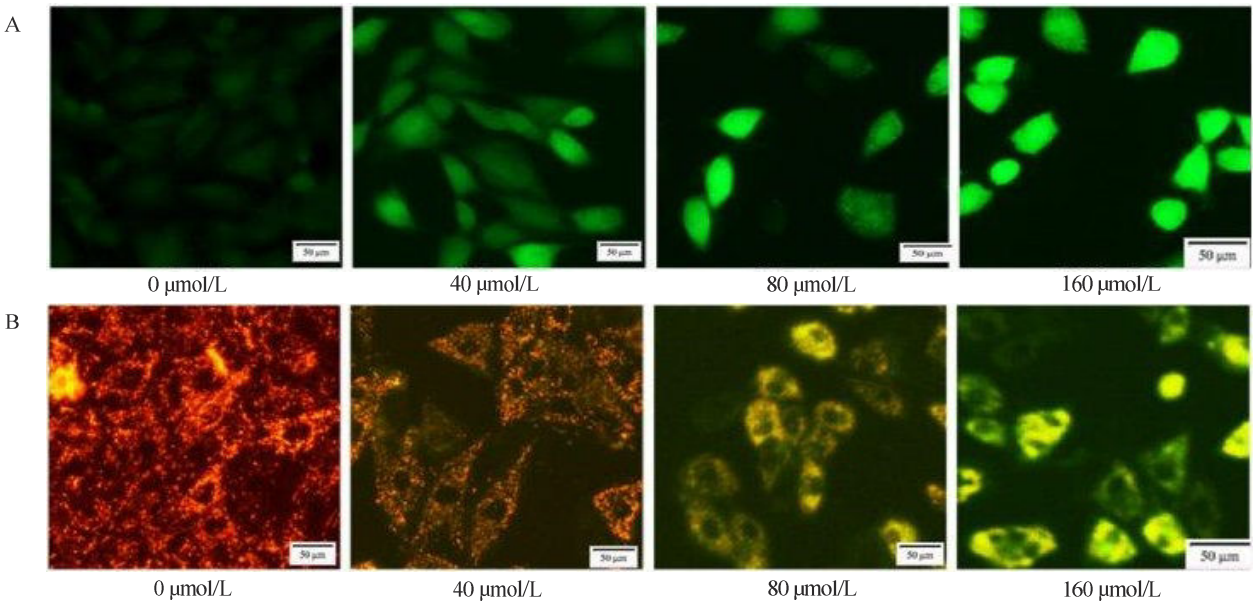
注：a 为心肌间质出血，b 为心肌纤维断裂，c 为心肌细胞肥大

图 1　大黄素损伤小鼠心脏功能（HE 染色）

表 2　大黄素对 H9c2 细胞毒性指标的影响

组别	LDH（U/L）	SOD（%）	GSH（%）	ROS（%）	线粒体膜电位（mV）
0 μmol/L	1.09±0.07	101.85±2.79	100.33±4.16	6.08±0.53	1.18±0.03
20 μmol/L	2.07±0.35	92.45±4.12	89.27±5.32	18.75±4.08	2.08±0.09
40 μmol/L	3.06±0.63	88.16±8.01	83.38±2.84	34.36±2.77	3.35±0.15
80 μmol/L	5.29±0.54	55.71±3.69	52.01±3.79	67.98±5.71	5.98±0.46
160 μmol/L	8.26±0.61	36.81±1.84	31.85±2.66	85.92±3.63	8.19±0.16

注：LDH 为乳酸脱氢酶，SOD 为超氧化物歧化酶，GSH 为谷胱甘肽，ROS 为活性氧



0 μmol/L　40 μmol/L　80 μmol/L　160 μmol/L

0 μmol/L　40 μmol/L　80 μmol/L　160 μmol/L

注：A 为 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内活性氧水平荧光图；B 为 JC-1 荧光探针法检测细胞内线粒体膜电位水平荧光图

图 2　大黄素抑制心肌细胞存活率并诱导氧化应激

表 3　大黄素对小鼠心脏组织中抗氧化酶、促凋亡蛋白活性的影响

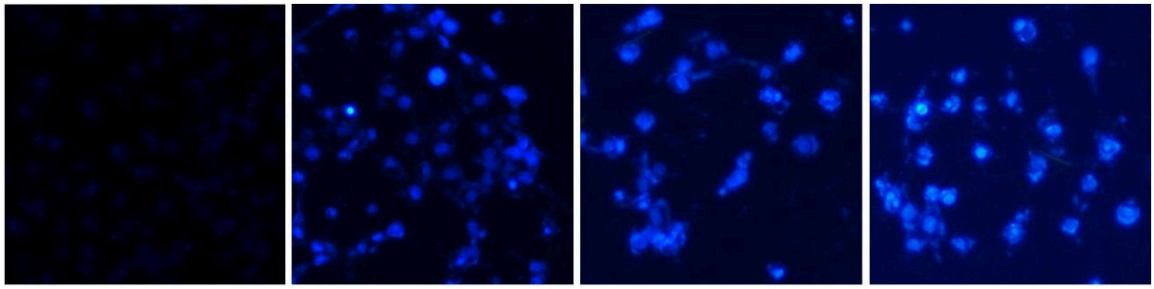
组别	GSH（mg/mg）	SOD（U/mg）	Caspase-3 活性（U）
空白对照组	38.23±2.67	8.46±1.02	1.03±0.06
低剂量大黄素组	26.67±3.11	5.77±0.61	3.88±0.24
中剂量大黄素组	15.09±2.72	4.28±0.15	5.56±0.38
高剂量大黄素组	8.66±1.20	3.85±0.29	6.55±0.62

注：GSH 为谷胱甘肽，SOD 为超氧化物歧化酶

表 4　大黄素对 H9c2 细胞凋亡的影响

组别	凋亡率（%）	Caspase-3 活性（U）
0 μmol/L	3.29±0.26	1.05±0.05
40 μmol/L	19.16±2.33	3.56±0.32
80 μmol/L	45.72±4.01	4.03±0.19
160 μmol/L	78.23±2.18	5.16±0.35

原因导致 ROS 产生过多，并超过机体的清除能力时，氧化作用与抗氧化作用间失去平衡，由此产生一系列复杂效应，最终导致氧化应激的发生[13-14]。线粒体是细胞内的能源工厂，负责生成 ATP 为细胞提供能量，同时还参与调控细胞信号传导、细胞死亡等过程。氧化应激可以增加线粒体膜的通透性，导致细胞凋亡。氧化损伤能使线粒体释放 Cyt-C 等凋亡促进因子，损伤线粒体内膜，影响其正常功能。同时它还对线粒体 DNA 造成损伤，这种损伤可以影响线粒体的功能，并可能导致其功能障碍。其次它还通过



注：Hoechst 33342 荧光探针法检测细胞凋亡水平荧光图

图 3　大黄素诱导心肌细胞凋亡

参与电子传递链和氧化磷酸化过程，减少 ATP 的产生，从而影响细胞的能量代谢。最终对核糖聚合酶（poly ADP-ribose polymerase，PARP）、胞质骨架蛋白等底物产生影响，致使细胞程序性死亡。

本研究结果显示，大黄素可以增加心脏细胞内 ROS 的产生，促进氧化应激反应的增加。这些氧化应激反应包括蛋白质氧化、DNA 氧化和脂质过氧化等，进而导致心脏细胞的结构和功能异常。过量的 ROS 还能引起线粒体功能障碍，最终导致组织、器官受损。大黄素通过多靶点、多通路发挥心脏保护作用，其机制随剂量调整从抑制急性损伤转向对抗慢性氧化应激，为个体化用药提供理论依据。同时，本研究发现，大黄素可以使线粒体膜电势降低，开放线粒体膜孔通道，导致线粒体功能异常。而从线粒体中释放的 AIF 与 Cyt-C 随即启动细胞凋亡。这提示在未来对大黄素减毒策略的研究中，可以将抗氧化剂如维生素 C、谷胱甘肽等纳入其中。

综上所述，大黄素对心脏细胞的作用机制是多方面的。大黄素可引起心脏细胞的损伤，导致心功能异常。进一步的机制研究表明，大黄素通过引起氧化应激、抑制细胞的线粒体功能及激活细胞凋亡通路等途径，导致心脏毒性，为大黄素的毒理学特性提供了重要的研究数据。然而，大黄素的心脏毒性机制还需进一步研究，如引入激动剂、抑制剂或者基因过表达及敲除等手段，以便更好地理解大黄素的心脏毒性、更全面地评估其安全性，从而推动大黄素在医学领域的应用和发展。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　应娜、林鑫建：实验操作、论文撰写；李兆顺、蔡云祥：数据整理、统计学分析；应娜：研究指导、论文修改、经费支持

参　考　文　献

[1] XING M, MA X Y, WANG X, et al. Emodin disrupts the Notch1/Nrf2/GPX4 antioxidant system and promotes renal cell ferroptosis[J]. J Appl Toxicol, 2023, 43(11): 1702-1718.

[2] 谢蓉,张民权,李莹,等.大黄素药理作用及新剂型研究进展[J].中华中医药学刊,2023,41(12):120-125.

[3] 吴丛宇,周悦,上官璐茜,等. 大黄素的药理作用机制研究进展[J]. 中国药科大学学报,2023,54(5):634-643.

[4] 文航华,周雪英,董勇. 大黄萃取液对兔心肺复苏后脑组织炎症因子表达水平的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2023,30(4):431-435.

[5] 高鑫,方方.大黄酸的结构修饰及其生物活性研究进展[J].中国新药杂志,2023,32(1):35-45.

[6] 徐良,王晓东,李金旭,等.大黄素通过MEK/ERK信号通路对主动脉瘤小鼠模型的保护作用[J].医药论坛杂志,2022,43(19):10-14,18.

[7] 汤海霞,班涛.大黄素与心血管疾病的研究[J].医学信息,2022,35(11):19-21,32.

[8] 汪祺,杨建波,王莹,等.大黄素甲醚大鼠体内毒代动力学研究[J].中国药学杂志,2022,57(19):1666-1672.

[9] 唐碧,高琦,周彤,等.大黄酚激活 SIRT1/PGC-1α抑制心脏成纤维细胞的增殖、侵袭和迁移及向肌成纤维细胞转化[J].华中科技大学学报(医学版),2022,51(4):449-455.

[10] 邢志华,徐志远,申光焕,等.大黄素结构修饰及其生物活性研究进展[J].中国药学杂志,2022,57(16):1316-1322.

[11] 戴胜云,詹书怡,欧阳晓婕,等. 基于不确定度轮廓的大黄 HPLC 定量分析方法验证研究[J]. 药物分析杂志,2021,41(12):2202-2210.

[12] 马开,辛玉凤,田萍,等.大黄素纳米结构脂质载体在大鼠体内的药动学及组织分布[J].中成药,2021,43(10):2605-2611.

[13] 张昊悦,赵蓓,王业皇,等. 大黄素通过调节Nrf2/HO-和MAPKs抑制炎症和氧化应激机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(9):1063-1068.

[14] CHEN M Y, LIANG X L, LIANG Z Q, et al. Study on the effect and mechanism of NFKBIA on cervical cancer progress in vitro and in vivo[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2021, 47(11): 3931-3942.

收稿日期：2025-02-19

（本文编辑：吴迪汉）