

三七总皂苷通过激活 Nrf2 信号通路抑制铁死亡 改善阿霉素所致心脏毒性

田冉, 谢昌旭, 李希晨, 袁溢霜, 王舒怡, 陈欢, 薛思明, 杨晓敏, 郭冬青, 王其艳*
(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:本研究旨在探讨三七总皂苷对阿霉素(DOX)诱导的心脏毒性(DIC)的保护作用,并基于核因子E₂相关因子2(Nrf2)信号通路探究其抑制铁死亡的具体机制。方法:将C57BL/6小鼠分成5组(每组10只),分别为空白组、模型组(6 mg·kg⁻¹)、三七总皂苷低剂量组(3 g·kg⁻¹)、三七总皂苷高剂量组(6 g·kg⁻¹)和右雷佐生组(30 mg·kg⁻¹)。在第6天和第9天,除空白组外,其余各组小鼠均接受DOX静脉注射。空白组则在相同时间点注射等体积的生理盐水(0.9%NaCl)。在每次DOX注射前30 min,右雷佐生组小鼠静脉注射右雷佐生进行预处理。三七总皂苷组于DOX处理前5 d开始,每天灌胃溶于超纯水的三七总皂苷,连续给药12 d。空白组与模型组则同期灌胃等体积的蒸馏水。通过心脏超声评价心功能;苏木素-伊红(HE)染色和血清心肌损伤标志物评估心肌损伤程度;采用相应试剂盒检测亚铁离子(Fe²⁺)水平和脂质过氧化程度;原位末端标记法(TUNEL)观察细胞凋亡情况;免疫荧光、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测核受体共激活因子4(NCOA4)、Nrf2核转位及下游蛋白铁转运蛋白(FPN)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、转铁蛋白受体1(TfR1)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠左心室射血分数(LVEF)和左心室缩短分数(LVFS)显著降低($P<0.01$),肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)水平显著升高($P<0.01$),Fe²⁺和丙二醛(MDA)水平显著升高($P<0.01$),谷胱甘肽(GSH)水平显著降低($P<0.01$),Western blot结果显示Nrf2、FPN、GPX4和TfR1的表达水平明显下调($P<0.05$, $P<0.01$),NCOA4表达显著上调($P<0.01$);与模型组比较,三七总皂苷组明显升高小鼠LVFS和LVEF($P<0.05$, $P<0.01$),CK-MB和LDH水平显著下降($P<0.01$),显著降低Fe²⁺和MDA的水平($P<0.01$),明显升高GSH水平($P<0.05$),明显升高Nrf2和GPX4蛋白水平表达($P<0.05$, $P<0.01$),三七总皂苷也可调节FPN、TfR1和NCOA4蛋白的表达水平,但差异无统计学意义。结论:三七总皂苷通过激活Nrf2信号通路抑制铁死亡,从而缓解DOX诱导的心脏毒性。

[关键词] 阿霉素诱导的心脏毒性;铁死亡;三七总皂苷;核因子E₂相关因子2(Nrf2)

[中图分类号] R284;R256;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)16-0152-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260107

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260130.1709.002>

[网络出版日期] 2026-02-02 10:09:36 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Notoginseng Total Saponins Ameliorate Doxorubicin-induced Cardiotoxicity by Inhibiting Ferroptosis via Activation of Nrf2 Signaling Pathway

TIAN Ran, XIE Changxu, LI Xichen, YUAN Yishuang, WANG Shuyi, CHEN Huan, XUE Siming,
YANG Xiaomin, GUO Dongqing, WANG Qiyan*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Notoginseng total saponins (NTS) against doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity (DIC) and to explore the specific mechanism by which NTS inhibits ferroptosis via the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway. **Methods:** C57BL/6 mice were assigned into control, DOX (6 mg·kg⁻¹), low-dose (3 g·kg⁻¹) NTS + DOX (Low NTS+DOX), high-dose (6 g·kg⁻¹) NTS + DOX (High NTS+DOX), and dexrazoxane (30 mg·kg⁻¹) + DOX (DEX+DOX) groups ($n=10$ per group). On days 6 and 9, other groups except the control group

[收稿日期] 2025-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274136);北京中医药大学揭榜挂帅项目(2023-JYB-JBQN-053)

[第一作者] 田冉,在读硕士,从事中医药防治心血管疾病的药理机制研究,E-mail:t1186011971@163.com

[通信作者] *王其艳,博士,副教授,从事中医药防治心血管疾病的药理机制研究,E-mail:wangqy@bucm.edu.cn

received intravenous injections of DOX. The control group was injected with an equal volume of normal saline (0.9%NaCl) at the same time points. Thirty minutes before each DOX injection, the DEX+DOX group was intravenously administered DEX. The NTS-treated groups received daily oral gavage of NTS dissolved in ultrapure water for 12 days, starting 5 days before DOX administration. The control and DOX groups were administered an equal volume of distilled water by gavage during the same period. Cardiac function was assessed by echocardiography. The myocardial injury was evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining and serum cardiac injury markers. The iron(II) ion (Fe^{2+}) level and lipid peroxidation were measured via commercial kits. Apoptosis was observed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining. Nrf2 nuclear translocation and the expression of downstream proteins including nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4), ferroportin (FPN), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and transferrin receptor 1 (TfR1) were examined by immunofluorescence and Western blot. **Results:** Compared with the control group, the DOX group showed decreased left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) ($P<0.01$), elevated levels of creatine kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) ($P<0.01$), increased Fe^{2+} and malondialdehyde (MDA) ($P<0.01$), and reduced glutathione (GSH) ($P<0.01$). Western blot analysis revealed downregulated expression of Nrf2, FPN, GPX4, and TfR1 ($P<0.05$, $P<0.01$), and upregulated expression of NCOA4 ($P<0.01$). Compared with the DOX group, NTS improved LVFS and LVEF ($P<0.05$, $P<0.01$), decreased CK-MB and LDH levels ($P<0.01$), lowered Fe^{2+} and MDA levels ($P<0.01$), and increased the GSH level ($P<0.05$). At the protein level, NTS enhanced the expression of Nrf2 and GPX4 ($P<0.05$, $P<0.01$) and showed a regulatory trend on the expression of FPN, TfR1, and NCOA4, although these changes were not statistically significant. **Conclusion:** NTS can alleviate DOX-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis through activation of the Nrf2 signaling pathway.

[Keywords] doxorubicin-induced cardiotoxicity; ferroptosis; Notoginseng total saponins; nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)

阿霉素是一种重要的广谱抗肿瘤药物,在治疗包括乳腺癌、淋巴瘤和肉瘤在内的多种恶性肿瘤中发挥着关键作用。然而,其临床应用伴随着心脏毒性的风险,包括心律失常、心肌炎和心力衰竭等^[1-2]。这些不良心脏效应显著限制了阿霉素的临床应用,促使研究人员探索新的治疗策略以减轻其有害影响。

阿霉素诱导的心脏毒性(DIC)的潜在机制已被研究数十年。铁死亡是一种新近发现的程序性细胞死亡方式,已被揭示在DIC的发生发展中起主要作用。研究表明,阿霉素能严重损害并破坏细胞内的铁代谢调节过程,特别是通过促进细胞内亚铁离子(Fe^{2+})的异常蓄积。这种过量的 Fe^{2+} 通过芬顿反应产生脂质过氧化物,最终引发铁死亡^[3]。核因子 E_2 相关因子2(Nrf2)以其在保护细胞免受氧化损伤中的作用而闻名,已被发现对DIC具有潜在的保护效应^[4-6]。阿霉素诱导的氧化应激破坏了细胞内的氧化还原稳态。激活Nrf2可上调谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的表达,该酶是一种抗氧化酶,能中和活性氧(ROS)并减轻氧化损伤^[7-9]。此外,Nrf2还与细胞对铁死亡的易感性有关。一些研究表明,激活Nrf2可能通过调控参与铁稳态的基因如线粒体铁蛋白(FTMT)、铁蛋白重链1(FTH1)和铁转运蛋白(FPN1)等来抑制铁死亡^[10]。因此,Nrf2通过多种途径减轻阿霉素诱导的DIC中的铁死亡。

三七总皂苷是从三七(*Panax notoginseng*)根部提取的活性化合物,其主要成分为人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_1 和三七皂苷 R_1 。这些成分被认为具有多

种药理作用^[11-12]。研究表明,三七总皂苷可能对心血管疾病具有治疗潜力^[13-14]。然而,三七总皂苷在缓解DIC中的作用尚不清楚。本研究旨在探讨三七总皂苷在减轻DIC方面的益处,并深入探究其潜在作用机制。

1 材料

1.1 动物 50只雄性C57BL/6小鼠,体质量(20 ± 2)g,购自北京斯贝福生物技术有限公司(中国北京),合格证号SCXK(京)2019-0010。实验小鼠饲养于北京中医药大学动物实验中心,饲养条件为温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度50%~60%,遵循每日12h的光明与黑暗交替周期。

1.2 伦理 所有动物实验程序均根据北京中医药大学伦理委员会批准的方案进行(批准号BUCM-2024121003-4214)。

1.3 试剂 三七总皂苷从北京中医药大学获得,早期的研究详述了其质量标准^[13]。阿霉素(上海源叶生物科技有限公司,批号B20564);右雷佐生(DEX,美国GLPbio公司,批号GC10655);肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(北京北检新创源生物技术有限公司,批号分别为SEKM-0152、SEKM-0409);丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为BC0025、BC1170);苏木素-伊红(HE)、原位末端标记法(TUNEL)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1076-500ML、G1501-50T);核受体共激活因子4(NCOA4)抗体(武汉爱博泰克生

物科技有限公司,批号 A25307);Nrf2、GPX4 抗体(英国 Cohesion 公司,批号分别为 CPA1797、CQA1094);FPN 抗体(美国 NOVUS 公司,批号 NBP1-21502SS);转铁蛋白受体 1(TfR1)抗体(美国 ABclona 公司,批号 A25900); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(上海泊湾生物科技有限公司,批号 AB2001);辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗抗体、HRP-山羊抗鼠 IgG 二抗抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab6721、ab205719);铁试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 A039-2-1)。

1.4 仪器 PowerPac™ 型基础电泳、电转设备及 ChemiDoc 型凝胶成像设备(美国 Bio-Rad 公司);Vevo2100 型小动物超声影像系统(加拿大 Visual Sonics 公司);SpectraMax ABS 型全波长酶标仪(北京普思百得科技发展有限公司);9003240 型组织破碎仪(德国 Qiagen 公司);MDF-382E(N)型-80℃超低温冰箱(日本 Sanyo 公司);Pannoramic MIDI 型全景扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司)。

2 方法

2.1 分组、给药与处理 将小鼠随机分成 5 组,每组 10 只,分别为空白组、模型组、三七总皂苷低剂量组($3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、三七总皂苷高剂量组($6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和右雷佐生组($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。在第 6 天和第 9 天,除空白组外,其余各组小鼠均接受 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 阿霉素静脉注射。空白组则在相同时间点注射等体积的生理盐水($0.9\%\text{NaCl}$)。在每次阿霉素注射前 30 min,右雷佐生组小鼠尾静脉注射右雷佐生进行预处理。三七总皂苷组于阿霉素处理前 5 d 开始,每天灌胃溶于超纯水的三七总皂苷,连续给药 12 d。空白组与模型组则同期灌胃等体积的蒸馏水。三七总皂苷和右雷佐生的剂量依据早期研究的结果确定^[15]。第 13 天时进行超声心动图检测以评估心功能,若模型组小鼠左室射血分数及短轴缩短率较空白组显著降低,则判定造模成功。随后将各实验组小鼠经 0.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,行眼球眶后静脉丛取血至 1.5 mL 离心管中,血液样本室温静置 2 h 待析出,随后以 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min(离心半径 10 cm,下同),分离上层血清分装并置于-80℃超低温冰箱保存。取血完毕后,将小鼠安乐死,迅速打开小鼠胸腔摘取心脏,提取的心肌组织,除指定用于切片的部分外,被立即储存在-80℃冰箱中供未来研究使用。

2.2 心脏功能的超声心动图评估 使用 Vevo 2100 型超声设备获得超声心动图,评估小鼠心脏功能。

通过分析 3 个连续的心动周期确定左心室射血分数(LVEF)和左心室缩短分数(LVFS)。计算公式: $\text{LVFS} = (\text{LVEDD} - \text{LVESD}) / \text{LVEDD} \times 100\%$, $\text{LVEF} = (\text{LVEDV} - \text{LVESV}) / \text{LVEDV} \times 100\%$ ^[16]。

2.3 试剂盒检测血清中 CK-MB 和 LDH 的水平 在小鼠心脏功能被评估后,进行眼球取血。血液在室温下放置 2 h 并以 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,储存在-80℃冰箱中。按照说明书要求进行血清中 CK-MB 和 LDH 的水平测定。

2.4 HE 染色观察心脏组织病理学变化 小鼠眼球取血后,迅速摘取心脏,并用生理盐水冲洗残留血液。心脏组织样本经 4% 多聚甲醛固定后,进行石蜡包埋。将包埋组织连续切片(厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$),进行 HE 染色。最后,在光学显微镜下(700 倍放大)观察切片并采集图像^[17]。

2.5 试剂盒检测心肌组织铁、MDA 和 GSH 的水平 严格按试剂盒说明书操作,测定心肌组织中铁、MDA 及 GSH 水平。

2.6 TUNEL 染色观察小鼠心肌组织细胞凋亡的情况 心脏石蜡切片脱蜡后浸入蒸馏水,干燥后滴加通透工作液 $50\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。弃去通透液, PBS 洗涤 3 次(每次 5 min),加入 TUNEL 检测液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。弃检测液后添加 TUNEL 反应液 $50\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 1 h。最终用抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI)封片。切片经全景扫描仪采集图像并分析。

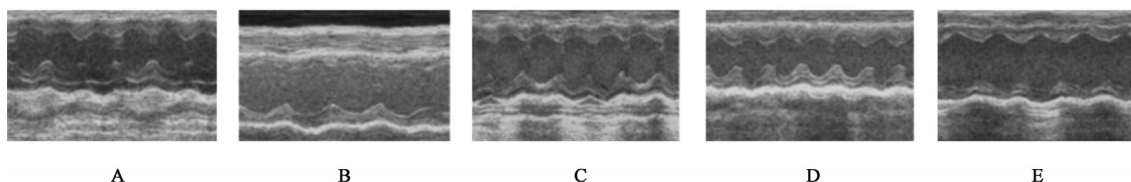
2.7 免疫荧光观察小鼠心肌组织 Nrf2 核转位的表达 采用抗 Nrf2 抗体通过免疫荧光观察 Nrf2 核转位, DAPI 标记细胞核后,于荧光显微镜下采集图像,具体实验方案详见已发表文献[4]。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠心脏组织 NCOA4、Nrf2、GPX4、FPN、TfR1 蛋白的表达 小鼠心脏组织置于含磷酸酶/蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解 30 min。匀浆后转入预冷离心机, $12\,000\times g$ 离心 10 min,取上清提取总蛋白,蛋白质经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,按标准流程进行 Western blot,蛋白一抗和二抗稀释比如下:NCOA4(1:800)、Nrf2(1:800)、GPX4(1:1 000)、FPN(1:1 000)、TfR1(1:2 000)、 β -actin(1:1 000);二抗(1:10 000)。得到免疫印迹条带后置于化学发光成像系统中进行显影,自动曝光保存图像,采用 Image Lab 软件分析蛋白灰度值。

2.9 分子对接模拟三七总皂苷主要成分与 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)的相互作用 从 PubChem

获取人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁的SDF结构并转为PDB格式。从RCSB PDB下载Keap1晶体结构(PDB ID: 7C5E)。使用AutoDockTools预处理蛋白,采用AutoDock Vina进行半柔性对接。按结合能选取最佳构象,PyMOL分析氢键与疏水作用。

2.10 统计学分析 所有数据经GraphPad Prism 9.0处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。



注:A.空白组;B.模型组;C.三七总皂苷低剂量组;D.三七总皂苷高剂量组;E.右雷佐生组(图2同)

图1 三七总皂苷对阿霉素诱导的DIC小鼠心脏损伤的影响

Fig. 1 Effect of Notoginseng total saponins (NTS) on cardiac damage in mice induced by doxorubicin

表1 三七总皂苷对DIC小鼠的LVEF和LVFS的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of NTS on LVEF and LVFS in DIC mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LVEF	LVFS
空白组		83.94±6.51	53.44±14.20
模型组		46.62±2.04 ²⁾	20.30±0.98 ²⁾
三七总皂苷低剂量组	3	64.37±9.23 ³⁾	39.79±7.40 ⁴⁾
三七总皂苷高剂量组	6	71.49±7.18 ⁴⁾	42.75±6.45 ⁴⁾
右雷佐生组	0.03	63.97±8.92 ³⁾	41.02±6.24 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表6同)

3 结果

3.1 三七总皂苷对阿霉素诱导的DIC小鼠心功能的影响 采用超声心动图评估了小鼠的心脏功能,与空白组比较,模型组小鼠心脏LVFS和LVEF显著降低($P<0.01$),提示左心室收缩功能明显受损;与模型组比较,三七总皂苷各剂量组明显升高小鼠的LVFS和LVEF($P<0.05$, $P<0.01$);右雷佐生组的LVFS和LVEF明显提高($P<0.05$, $P<0.01$)。见图1、表1。

3.2 三七总皂苷对阿霉素诱导的DIC小鼠心肌损伤的影响 空白组心肌细胞排列紧密整齐;模型组心肌细胞出现核固缩或变形、肌原纤维排列紊乱、及空泡变性等病理改变;三七总皂苷低、高剂量组心肌细胞排列紊乱和心肌纤维断裂均被改善,并且减轻了心肌结构损伤;右雷佐生组心肌结构损伤也有较大改善。见图2。与空白组比较,模型组小鼠血清心肌损伤标志物CK-MB和LDH水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,三七总皂苷高剂量组CK-MB和LDH水平显著下降($P<0.01$)。见表2。

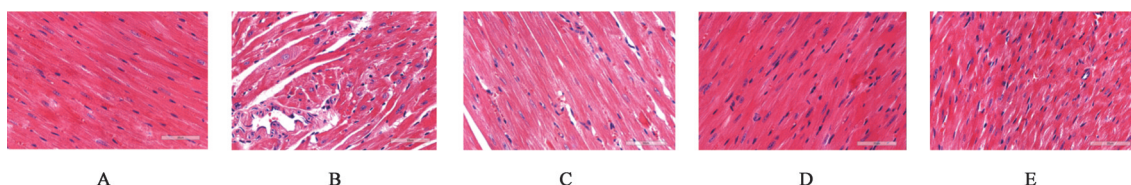


图2 三七总皂苷对DIC小鼠心肌组织病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of NTS on pathological changes of myocardial tissue in DIC mice (HE, ×400)

3.3 三七总皂苷对阿霉素诱导的DIC小鼠心肌组织中氧化应激和Fe²⁺含量的影响 与空白组比较,模型组小鼠心肌组织中的Fe²⁺含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,三七总皂苷组显著降低心肌组织中的Fe²⁺含量($P<0.01$)。与空白组比较,模型组显著升高MDA水平($P<0.01$),显著降低GSH水平($P<0.01$);与模型组比较,三七总皂苷组显著降低MDA水平($P<0.01$),明显升高GSH水平($P<0.05$)。见表3。TUNEL染色结果显示,与空白组比较,模

型组细胞凋亡特征且荧光强度增强($P<0.01$),而三七总皂苷治疗后细胞凋亡显著减少,荧光强度显著降低($P<0.01$),右雷佐生组细胞凋亡同样显著减少($P<0.01$)。见表4及增强出版附加材料。

3.4 三七总皂苷对阿霉素诱导的DIC小鼠心肌组织促进Nrf2的蓄积与核转位的影响 结果显示,空白组中Nrf2存在核内蓄积情况,而在阿霉素处理后,Nrf2表达下调,核内蓄积显著减少($P<0.01$),且其主要定位于细胞质中;给药后三七总皂苷促进

表2 三七总皂苷对DIC小鼠血清中CK-MB和LDH水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of NTS on levels of CK-MB and LDH in serum of DIC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$) U·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CK-MB	LDH
空白组		300.02±48.83	643.85±82.90
模型组		605.06±57.78 ²⁾	1 336.16±217.33 ²⁾
三七总皂苷低剂量组	3	561.28±96.84	1 108.14±87.45
三七总皂苷高剂量组	6	191.44±75.44 ⁴⁾	998.46±89.47 ⁴⁾
右雷佐生组	0.03	407.83±58.72 ⁴⁾	1 047.54±172.15 ³⁾

Nrf2的核转位和核内蓄积($P<0.05$),右雷佐生组表现出显著促进作用($P<0.01$)。见图3、表5。

3.5 三七总皂苷对阿霉素诱导的DIC小鼠心肌组织Nrf2通路相关关键蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组Nrf2、FPN、GPX4和TfR1蛋白表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$),NCOA4蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,三七总皂苷组明显升高Nrf2和GPX4蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$)。

表3 三七总皂苷对DIC小鼠心肌组织铁、MDA和GSH含量的影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of NTS on myocardial Fe²⁺, MDA, GSH content in DIC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

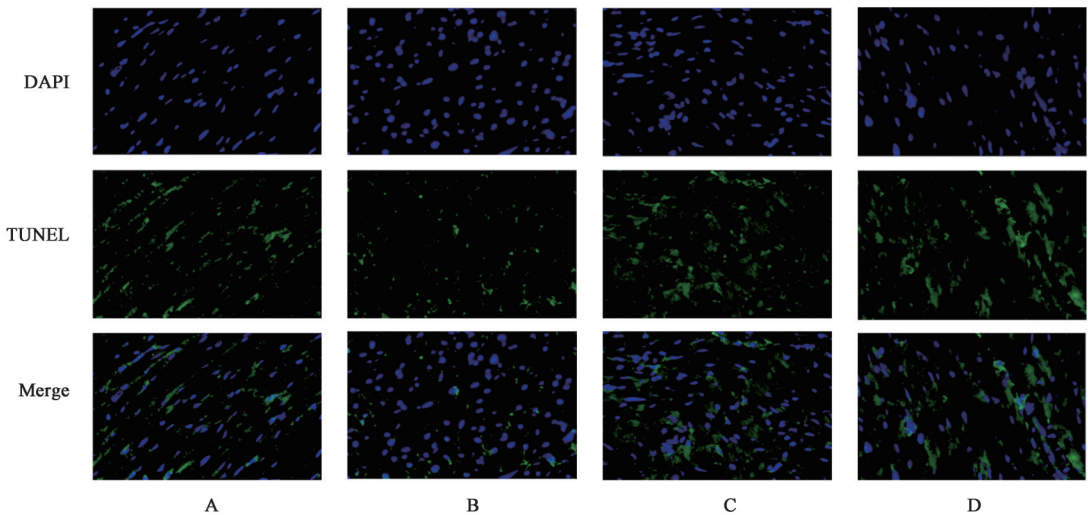
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Fe ²⁺ /mg·g ⁻¹	MDA /nmol·g ⁻¹	GSH /μg·g ⁻¹
空白组		14.02±1.68	31.18±15.83	225.78±64.32
模型组		36.45±4.67 ²⁾	89.77±5.53 ²⁾	30.77±2.16 ²⁾
三七总皂苷组	6	15.69±4.22 ⁴⁾	26.89±18.52 ⁴⁾	141.55±6.96 ³⁾
右雷佐生组	0.03	16.95±4.72 ⁴⁾	43.04±18.15 ³⁾	135.04±6.12 ³⁾

表4 三七总皂苷对DIC小鼠心肌组织细胞凋亡的影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of NTS on apoptosis of myocardial tissue cells in DIC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	细胞阳性面积/%
空白组		3.99±0.43
模型组		41.28±3.01 ²⁾
三七总皂苷组	6	4.11±0.81 ⁴⁾
右雷佐生组	0.03	4.92±0.29 ⁴⁾

三七总皂苷也可调节FPN、TfR1和NCOA4的表达水平,但差异无统计学意义。见图4和表6。



注:A.空白组;B.模型组;C.三七总皂苷组;D.右雷佐生组(图4同)

图3 三七总皂苷对DIC小鼠心肌组织Nrf2的蓄积与核转位的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of NTS on accumulation and nuclear translocation of Nrf2 in myocardial tissue of DIC mice (IF, ×400)

3.6 三七总皂苷主要成分与Keap1/Nrf2的相互作用 分子对接结果显示,人参皂苷Rg₁可与Keap1(氨基酸残基位点分别为465、516、367、606、559)形成氢键,其分子对接的结合能为-9.6 kcal·mol⁻¹(1 kcal≈4.184 kJ,下同)。人参皂苷Rb₁可与Keap1(氨基酸残基位点分别为326、322、606、367、420、467、564)形成氢键,其分子对接的结合能为-8.8 kcal·mol⁻¹。三七总皂苷可能通过与Keap1

结合并干扰Nrf2与Keap1的相互作用,从而实现其作用机制。见增强出版附加材料。

4 讨论

临床研究表明,许多癌症患者在服用抗肿瘤药物阿霉素后出现DIC,严重者可表现为心力衰竭甚至死亡^[1-2]。右雷佐生是目前唯一获美国食品药品监督管理局批准用于预防DIC的心脏保护药物,其通过整合细胞内Fe²⁺阻止超氧自由基形成,从而抑

表 5 三七总皂苷对 DIC 小鼠心肌组织 Nrf2 的蓄积与核转位的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of NTS on accumulation and nuclear translocation of Nrf2 in myocardial tissue of DIC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	蛋白入核阳性面积/%
空白组		15.13±0.72
模型组		7.17±0.41 ²⁾
三七总皂苷组	6	12.50±2.48 ³⁾
右雷佐生组	0.03	15.60±1.50 ⁴⁾

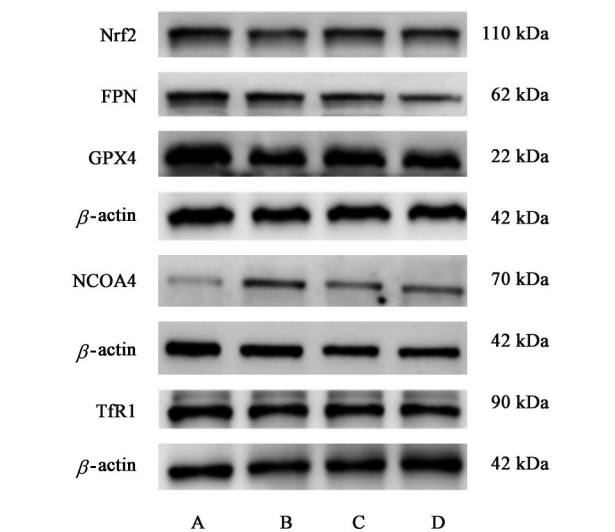


图 4 各组小鼠心肌组织中 Nrf2 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of expression of Nrf2 signaling pathway-related proteins in myocardial tissues of each group of mice

制细胞死亡。然而,由于其血液毒性和肾毒性等不良反应,其临床应用存在局限性^[18-19]。目前,缺乏不良反应少且有效防治 DIC 的药物。因此,亟需探索 DIC 的新型治疗策略。众多研究探讨 DIC 的发病机制,认为铁死亡是其主要诱因之一。铁死亡的主要特征包括脂质过氧化和铁过载^[20]。因此,调控铁代谢和拮抗氧化应激可能是治疗 DIC 的关键环节。本研究中,发现三七总皂苷可通过调控游离铁含量和脂质过氧化水平抑制铁死亡,从而保护心脏免受 DIC 损伤。此外,三七总皂苷的抗铁死亡作用可能通过激活 Nrf2 信号通路实现。

表 6 三七总皂苷对阿霉素诱导的 DIC 小鼠模型中 Nrf2 通路相关蛋白表达水平的分析 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of NTS on expression of Nrf2 pathway-related proteins in a DIC mice model ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nrf2/ β -actin	FPN/ β -actin	GPX4/ β -actin	NCOA4/ β -actin	TfR1/ β -actin
空白组		1.42±0.31	1.42±0.10	1.09±0.23	0.65±0.12	1.25±0.26
模型组		0.82±0.10 ²⁾	0.92±0.09 ²⁾	0.75±0.08 ¹⁾	1.18±0.14 ²⁾	0.89±0.11 ¹⁾
三七总皂苷组	6	1.15±0.22 ¹⁾	1.01±0.19	1.20±0.20 ⁴⁾	1.05±0.16	1.16±0.13
右雷佐生组	0.03	0.84±0.20	0.85±0.12	1.13±0.33 ³⁾	1.24±0.15	0.71±0.36

三七总皂苷是中药三七的主要活性成分,数十年来一直用于治疗心肌缺血、心绞痛和冠心病等心血管疾病^[21-23]。三七总皂苷中含量最丰富的两种化合物人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁, 可通过调节氧化应激、细胞凋亡、线粒体能量代谢等过程发挥心血管保护作用^[24-26]。此外,研究已证实人参皂苷 Rg₁ 可通过铁死亡抑制蛋白 1/辅酶 Q₁₀/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)[FSP1/CoQ₁₀/NAD(P)H]信号通路抑制 HK-2 细胞铁死亡^[27]。本研究揭示了三七总皂苷对阿霉素诱导的 DIC 的保护作用,并首次探讨了三七总皂苷如何通过调控 Nrf2 信号通路来抑制铁死亡。

铁死亡是 DIC 的核心病理机制之一,其特征为游离铁过载和脂质过氧化。阿霉素通过多种途径破坏细胞内铁稳态,增加 Fe²⁺ 含量。Fe²⁺ 与细胞内过氧化氢反应进一步生成脂质过氧化物,导致细胞膜通透性增加。此外,阿霉素能够降解细胞内抗氧化系统,降低 GPX4 的水平,降低脂质过氧化物的清除能力。过去的研究表明,三七总皂苷可以通过抑制铁死亡来改善脑缺血再灌注损伤、口腔黏膜纤维化和脓毒症肾损伤^[28-30]。在本研究中,发现与模型组比较,三七总皂苷的治疗显著降低了心脏组织 Fe²⁺ 和脂质过氧化标志物 MDA 的水平,并上调了 GSH 水平,表明三七总皂苷能够减轻 DIC 小鼠的氧化应激和铁含量。研究首次提出三七总皂苷可通过抑制铁死亡从而改善阿霉素诱导的 DIC,丰富药物在 DIC 方面的治疗策略。

Nrf2 是一种抗氧化转录因子,通过诱导多个下游抗氧化目标基因[包括 GPX4 和硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)]来维持氧化还原平衡^[8]。重要的是,已有研究发现,在肝细胞癌细胞中,Nrf2 通过激活涉及脂质过氧化物生产和铁代谢的多种基因,成为铁死亡的重要负调控因子^[31]。此外,另一项研究表明,Nrf2 的激活通过增强线粒体功能和恢复氧化还原平衡来保护弗里德赖希共济失调症患者免受铁死亡的影响^[32]。部分研究表明,上调 Nrf2 表达可

抑制铁死亡并改善阿霉素诱导的DIC^[6,33]。尽管如此,亦有研究显示过度的Nrf2表达可能促进铁死亡,这可能是由于血红素加氧酶-1(HO-1)激活后细胞内游离铁浓度升高所致^[34]。因此,Nrf2在DIC中的作用仍需更多研究证实。本研究中,发现阿霉素可降低Nrf2水平并限制其核转位。而三七总皂苷处理则促进了Nrf2的表达及其向细胞核的转位。三七总皂苷对Nrf2的激活作用在其他心血管疾病中亦有报道^[21,24]。本研究发现,与模型组比较,三七总皂苷治疗显著提高小鼠的LVFS和LVEF,并且其通过改善心肌细胞排列紊乱和心肌纤维断裂,减轻心肌结构损伤,减少了心肌损伤生物标志物,证实了三七总皂苷减轻DIC的功效。这可能与Nrf2信号通路的激活防止氧化应激引起的心脏损伤有关。三七总皂苷上调下游抗氧化酶GPX4的表达。细胞清除脂质过氧化物主要依赖GPX4的作用,其可利用GSH作为底物,将脂质过氧化物还原为正常磷脂。阿霉素还破坏FPN的表达。FPN是已知的唯一细胞铁外排蛋白。FPN表达下降导致细胞内游离铁离子增加,引发铁死亡。NCOA4是一种新发现的自噬货物受体,通过直接识别并结合FTMT将NCOA4-铁蛋白复合物转运至溶酶体,介导铁蛋白降解并释放游离铁^[35]。本实验中,阿霉素上调NCOA4的表达。尽管差异无统计学意义,三七总皂苷可上调FPN并下调NCOA4表达。这些结果表明,三七总皂苷主要通过激活Nrf2/GPX4通路发挥抗铁死亡作用。

Keap1可以调控Nrf2活性。内源性Nrf2抑制剂称为Keap1^[36]。通常情况下,Keap1与Nrf2相互作用并引导其发生蛋白酶体降解。当Keap1和Nrf2受到氧化应激刺激时,二者结合解离,Nrf2脱离Keap1,转位入核并启动下游蛋白的表达^[37]。因此,干扰Keap1与Nrf2的结合是激活Nrf2的有效策略之一。人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁是三七总皂苷的主要活性成分。分子对接数据显示,人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁与Keap1具有较高的结合能,这可能阻碍Keap1与Nrf2的结合。因此,三七总皂苷可能通过竞争性结合Keap1的氨基酸位点,促进Keap1与Nrf2解离。三七总皂苷与Keap1的结合作用仍需进一步研究。本研究采用了三七总皂苷低、高2个剂量初步揭示了三七总皂苷的效应与机制,后续研究需要包含更细化的剂量梯度与临床前药代动力学与毒理学数据,以精确确定其量效关系,为临床转化提供直接依据。

综上所述,本研究证实三七总皂苷对阿霉素诱导的DIC具有保护作用。三七总皂苷通过激活Nrf2/GPX4信号通路,至少部分地抑制了铁死亡的发生。作为一种有效的中药提取物,三七总皂苷有望成为癌症化疗的辅助治疗手段。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] VAN DALEN E C, MICHIELS E M, CARON H N, et al. Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, 2010(5):Cd005006.
- [2] KOCARNIK J M, COMPTON K, DEAN F E, et al. Cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8(3):420-444.
- [3] FANG X, ARDEHALI H, MIN J, et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(1):7-23.
- [4] JIANG Q, CHEN X, TIAN X, et al. Tanshinone I inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating Nrf2 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 106:154439.
- [5] FANG Y, YE J, ZHAO B, et al. Formononetin ameliorates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via the KEAP1-NRF2-GSTP1 axis[J]. *Redox Biol*, 2020, 36:101677.
- [6] ANANDHAN A, DODSON M, SHAKYA A, et al. NRF2 controls iron homeostasis and ferroptosis through HERC2 and VAMP8[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(5):eade9585.
- [7] QI W, BOLIANG W, XIAOXI T, et al. Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122:109547.
- [8] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D D. Nrf2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019, 23:101107.
- [9] WANG Y, YAN S, LIU X, et al. PRMT4 promotes ferroptosis to aggravate doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibition of the Nrf2/GPX4 pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(10):1982-1995.
- [10] TADOKORO T, IKEDA M, IDE T, et al. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(9):e132747.
- [11] CHEN H, YIN J, DENG Y, et al. The protective effects of ginsenoside Rg₁ against hypertension target-organ damage in spontaneously hypertensive rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12:53.
- [12] CHEN X, WANG Q, SHAO M, et al. Ginsenoside Rb₃ regulates energy metabolism and apoptosis in cardiomyocytes via activating PPAR α pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120:109487.

- [13] CHEN X, MA L, SHAO M, et al. Exploring the protective effects of PNS on acute myocardial ischaemia-induced heart failure by transcriptome analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271:113823.
- [14] DUAN L, XIONG X, HU J, et al. Efficacy and safety of oral *Panax notoginseng* saponins for unstable angina patients: A meta-analysis and systematic review [J]. Phytomedicine, 2018, 47:23-33.
- [15] WANG X, LI C, WANG Q, et al. Tanshinone II_A restores dynamic balance of autophagosome/autolysosome in doxorubicin-induced cardiotoxicity via targeting beclin1/LAMP1[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(7):910.
- [16] ZHANG J, LI W, XUE S, et al. Qishen granule attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by protecting mitochondrial function and reducing oxidative stress through regulation of Sirtuin3 [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319 (Pt 1):117134.
- [17] XIA K, WANG Q, LI C, et al. Effect of QSKL on MAPK and RhoA pathways in a rat model of heart failure[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017:3903898.
- [18] HASINOFF B B, SCHNABL K L, MARUSAK R A, et al. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria [J]. Cardiovasc Toxicol, 2003, 3(2):89-99.
- [19] CHEN Y, SHI S, DAI Y. Research progress of therapeutic drugs for doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156:113903.
- [20] DOS SANTOS A F, FAZELI G, XAVIER DA SILVA T N, et al. Ferroptosis: Mechanisms and implications for cancer development and therapy response [J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(12):1062-1076.
- [21] HU S, LIU T, WU Y, et al. *Panax notoginseng* saponins suppress lipopolysaccharide-induced barrier disruption and monocyte adhesion on bEnd. 3 cells via the opposite modulation of Nrf2 antioxidant and NF- κ B inflammatory pathways[J]. Phytother Res, 2019, 33(12):3163-3176.
- [22] KANG Z, XIAO Q, WANG L, et al. The combination of astragaloside IV and *Panax notoginseng* saponins attenuates cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats through ferroptosis and inflammation inhibition via activating Nrf2 [J]. J Pharm Pharmacol, 2023, 75(5):666-676.
- [23] FENG Z, ZHOU C, DONG S, et al. Catalpol and *Panax notoginseng* saponins synergistically alleviate triptolide-induced hepatotoxicity through Nrf2/ARE pathway [J]. Toxicol In Vitro, 2019, 56:141-149.
- [24] FAN J, LIU D, HE C, et al. Inhibiting adhesion events by *Panax notoginseng* saponins and ginsenoside Rb₁ protecting arteries via activation of Nrf2 and suppression of p38 - VCAM-1 signal pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 192:423-430.
- [25] ZHANG M, LIN W, TAO X, et al. Ginsenoside Rb₁ inhibits ferroptosis to ameliorate hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121:110503.
- [26] LU M, ZHAO F, RAN C, et al. Ginsenoside Rg₁ attenuates diabetic vascular endothelial dysfunction by inhibiting the calpain-1/ROS/PKC- β axis[J]. Life Sci, 2023, 329:121972.
- [27] GUO J, CHEN L, MA M. Ginsenoside Rg₁ suppresses ferroptosis of renal tubular epithelial cells in sepsis-induced acute kidney injury via the FSP1-CoQ₁₀-NAD(P)H pathway [J]. Curr Med Chem, 2024, 31(15):2119-2132.
- [28] 邹春云, 黄琼燕, 韦松里, 等. 三七总皂苷调控 NRF2-GPX4 通路减轻脓毒症肾损伤的机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(11):2003-2011.
- ZOU C Y, HUANG Q Y, WEI S L, et al. Mechanism of *Panax notoginseng* saponins in alleviating sepsis-associated acute kidney injury by regulating the NRF2-GPX4 pathway [J]. Nat Prod Res Dev, 2025, 37(11):2003-2011.
- [29] WANG L L, KANG M L, LIU C W, et al. *Panax notoginseng* saponins activate nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to inhibit ferroptosis and attenuate inflammatory injury in cerebral ischemia-reperfusion [J]. Am J Chin Med, 2024, 52 (3):821-839.
- [30] 邹红, 孙宇婕, 赵晨曦, 等. 三七总皂苷通过抑制槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞铁死亡减轻口腔黏膜下纤维化[J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(9):1563-1569.
- ZOU H, SUN Y J, ZHAO C X, et al. *Panax notoginseng* saponins attenuate oral submucous fibrosis by pre-venting arecaline-induced ferroptosis of HaCaT cells [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(9):1563-1569.
- [31] SUN X, OU Z, CHEN R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. Hepatology, 2016, 63(1):173-184.
- [32] LA ROSA P, PETRILLO S, TURCHI R, et al. The Nrf2 induction prevents ferroptosis in Friedreich's ataxia[J]. Redox Biol, 2021, 38:101791.
- [33] YAN R, LIN B, JIN W, et al. NRF2, a superstar of ferroptosis [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(9):1739.
- [34] JUUL-NIELSEN C, SHEN J, STENVINKEL P, et al. Systematic review of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) system in human chronic kidney disease: Alterations, interventions and relation to morbidity [J]. Nephrol Dial Transplant, 2022, 37(5):904-916.
- [35] HE J, LI Z, XIA P, et al. Ferroptosis and ferritinophagy in diabetes complications[J]. Mol Metab, 2022, 60:101470.
- [36] WU C T, DENG J S, HUANG W C, et al. Salvianolic acid C against acetaminophen-induced acute liver injury by attenuating inflammation, oxidative stress, and apoptosis through inhibition of the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:9056845.
- [37] SHAH S Z A, ZHAO D, HUSSAIN T, et al. p62-Keap1-NRF2-ARE pathway: A contentious player for selective targeting of autophagy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in prion diseases[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11:310.

[责任编辑 周冰冰]