

木犀草素预处理对 H₂O₂ 诱导大鼠心肌 H9c2 细胞损伤的保护机制研究

肖童¹, 钟焯², 孙雅涵¹, 韩学超¹, 徐森¹, 何玛莉¹, 徐菁蔓^{1,3,4}, 田炜^{1,3,4*}¹华北理工大学医学实验研究中心; ²华北理工大学附属医院;³国家科技部老年医学国际科技合作基地; ⁴唐山市老年医学重点实验室,唐山 063000

摘要:为了探讨木犀草素能否通过再灌注损伤挽救激酶(Reperfusion injury salvage kinase, RISK)细胞信号通路发挥抗心肌氧化应激损伤保护作用,本实验分别用 1、50、100、150 μmol/L 的木犀草素预处理大鼠心肌来源的 H9c2 细胞,再使用 650 μmol/L 的 H₂O₂ 制作氧化应激损伤模型。利用 MTT 法(四甲基偶氮唑盐比色法)检测细胞存活率,然后用最适浓度的木犀草素预处理 H9c2 细胞并利用激光共聚焦显微镜技术检测线粒体膜电位,Western blot 检测 P-ERK1/2、P-Akt、P-GSK-3β 以及凋亡相关蛋白细胞色素 C。最后我们发现不同浓度的木犀草素预处理均能提高细胞存活率,其中在 100 μmol/L 时达到最佳效应。与 H₂O₂ 组相比,100 μmol/L 的木犀草素预处理可以使 TMRE(四甲基罗丹明乙酯)强度降低程度明显减轻,对抗 H₂O₂ 引起的细胞氧化损伤。同时木犀草素预处理可以降低细胞色素 C 表达,使 P-GSK-3β、P-Akt、P-ERK1/2 表达升高,渥曼青霉素(PI3K 抑制剂)和 PD98059(ERK1/2 抑制剂)可以阻断这种作用。因此我们认为木犀草素预处理可以减轻 H₂O₂ 引起的氧化应激损伤,这一作用可能是通过 RISK 信号通路增加 P-GSK-3β 表达,抑制 mPTP 开放实现的。

关键词:木犀草素;氧化应激损伤;RISK 信号通路

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.004

Luteolin Prevents H₂O₂-Induced Injury in H9c2 Cells through Modulating RISK Signaling Pathway

XIAO Tong¹, ZHONG Ye², SUN Ya-han¹, HAN Xue-chao¹, XU Sen¹, HE Ma-li¹, XU Jing-man^{1,3,4}, TIAN Wei^{1,3,4*}¹Medical Research Center, North China University of Science and Technology;²Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology;³International Scientific and Technology Cooperation Base of Geriatric Medicine;⁴Tangshan Key Laboratory of Geriatric Medicine, Tangshan 063000, China

Abstract: In order to investigate whether luteolin can protect heart against myocardial oxidative stress injury via reperfusion injury salvage kinase (RISK) signaling pathway we use myocardial H9c2 cells were pretreated with luteolin at 1, 50, 100 and 150 μmol / L respectively, while cell oxidative stress injury was induced by adding 650 μmol / L H₂O₂. Cell viability was detected by MTT assay (MTT assay). Then, H9c2 cells were pretreated with luteolin at the optimal concentration and mitochondrial membrane potential was detected by laser confocal microscopy. Western blot was used to detect the level of P-ERK1 / 2, P-Akt, P-GSK-3β and apoptosis-related protein Cytochrome c. Finally we found that compared with the control group, cells pretreated with different concentrations of luteolin showed an increase in cell survival rate, which reached the peak at 100 μmol / L. Compared with H₂O₂ group, pretreatment with 100 μmol / L luteolin could significantly reduce the intensity of TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester) and prevent oxidative damage of cells induced by H₂O₂. At the same time, luteolin pretreatment could decrease the expression of Cytochrome C, but increase the expression of P-GSK-3β, P-Akt and P-ERK1 / 2, which were inhibited by wortmannin (PI3K inhibitor) and PD98059 (ERK1 / 2 inhibitor). So we think that Luteolin preconditioning reduces oxidative stress injury by decreasing

收稿日期:2018-02-28 接受日期:2018-07-02

基金项目:国家自然科学基金(81700324);华北理工大学大学生创新项目(X2017365)

*通信作者 Tel:86-013513451200;E-mail:twzhm@aliyun.com

GSK-3 β activity via RISK signaling pathway and then inhibiting mPTP opening.

Key words: luteolin; oxidative stress injury; RISK signaling pathway

缺血引起的组织损伤是很多疾病致死的原因,相关疾病有心肌梗死、脑梗死等。人们认为缺血组织在恢复血供后可以缓解由缺血引起的损伤,但研究发现,恢复供血后缺血组织或器官不仅没有恢复其原有功能,反而使损伤加重,这种现象称之为缺血再灌注损伤^[1]。心肌缺血再灌注损伤(Myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)是指在心肌供血中断后,迅速恢复其血供引起的较之前更为严重的损伤。

RISK 信号通路由 PI3K/Akt 信号通路和 ERK1/2 信号通路组成,PI3K/Akt 信号通路参与细胞生长、分化、凋亡^[2]。ERK1/2 是丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路的组成部分,参与细胞增殖、分化、凋亡等^[3,4]。GSK-3 β 是线粒体通透性转换孔(mPTP)的调节因子,同时也是 RISK 信号通路下游靶点,参与调节细胞代谢、生长、凋亡、能量代谢等过程^[5]。

木犀草素(Luteolin, Lu)是一种黄酮类化合物,为黄色,多以糖苷形式存在,可在胡萝卜、茶等植物中找到^[6]。研究表明,木犀草素在 MIRI 中可以起到心肌保护作用,主要是通过减少炎症因子、减少梗死面积、减少 ROS 含量等来发挥作用^[7-10]。但是其具体保护机制尚不明确,因此,本研究利用浓度为 650 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 处理大鼠心肌来源的 H9c2 细胞来制作氧化应激损伤模型,并探讨木犀草素心肌保护作用是否通过 RISK 信号通路以及线粒体保护机制发挥作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

大鼠胚胎心脏组织来源的 H9c2 细胞株购自美国 ATCC 公司。

1.2 试剂与仪器

木犀草素(北京百威灵科技有限公司,纯度 > 99%)用 DMSO 配置,培养基中 DMSO 终浓度为 0.1%, H₂O₂ (Sigma, 美国;批号 STBB6350), 荧光染料四甲基罗丹明乙酯(Tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE) (Invitrogen, 美国), 渥曼青霉素(Wortmannin, Wort) (北京索莱宝公司), 兔源单克隆抗体 P-Akt (Ser473)、P-GSK-3 β (Ser9)、P-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, 美国), 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 二

抗、鼠源肌动蛋白 β -Actin (上海碧云天生物技术研究), DMEM 培养基、噻唑蓝(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究), 超敏 ECL 化学发光检测试剂盒(北京索莱宝公司), 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱(Thermo Forma, 美国), FV1000 激光扫描共聚焦显微镜(Olympus, 日本), 5804R 高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国), JY200C 电泳仪和湿转装置(北京君意东方电泳设备有限公司), 酶标仪(Bio-Rad, 美国), AI600 化学发光成像仪(GE, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

生长状态良好的贴壁 90% 以上的 H9c2 心肌细胞用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基培养,选择贴壁 90% 以上生长良好的心肌细胞进行实验。

1.3.2 实验分组

实验分为两部分。第一部分为木犀草素最适作用浓度测定,分组为:①空白对照组(Control):浓度为 0.1% DMSO 处理的正常心肌细胞;②H₂O₂ 组:650 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 处理 20 min;③不同浓度木犀草素 + H₂O₂ 组:不同浓度木犀草素(1、10、50、100、150 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 20 min,再用 650 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 处理 20 min。

第二部分为木犀草素抗氧化应激损伤机制研究,分组为:①空白对照组(Control);②H₂O₂ 处理组;③木犀草素 + H₂O₂ 处理组:100 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素孵育 20 min,再用 650 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 处理 20 min;④木犀草素组:100 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素孵育 20 min;⑤H₂O₂ + PD + 木犀草素组:先用 100 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素孵育 20 min,再用 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 处理 10 min,最后用 650 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 处理 20 min;⑥PD 组:30 $\mu\text{mol/L}$ PD9859 孵育 10 min;⑦H₂O₂ + 渥曼青霉素 + 木犀草素组:先用 100 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素孵育 20 min,再用 100 nmol/L 的渥曼青霉素处理 10 min,最后用 650 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 处理 20 min;⑧渥曼青霉素组:用 100 nmol/L 渥曼青霉素孵育 10 min。

1.3.3 MTT 法检测细胞存活率

选择状态良好处于对数生长期的细胞经计数

后,稀释为 1×10^5 个/mL,接种到 96 孔板上,每孔 100 μL 约 10 000 个细胞培养 24 h,按要求每孔加入不同浓度的木犀草素和 H_2O_2 处理相应时间,然后将液体吸出,PBS 冲洗后每孔加入 100 μL 新培养基培养 12 h,每孔加入 MTT 溶液 10 μL 在细胞培养箱中孵育 4 h,每孔加入 150 μL DMSO 处理 15 min,用酶标仪在 570 nm 波长下测定每孔 OD 值,计算细胞存活率。

1.3.4 激光共聚焦检测线粒体膜电位

将生长状态良好,贴壁 90% 以上的各组细胞传入共聚焦专用小皿中,每个小皿 2 mL,培养 24 ~ 48 h,用 PBS 冲洗 3 次后加入含 100 nmol/L 线粒特异荧光染料 TMRE 的培养基于细胞培养箱中孵育 20 min,PBS 冲洗 3 遍,加入 2 mL 新培养基,采用 543 nm 波长的激发光在共聚焦显微镜下,观察并采集加入 H_2O_2 前及 20 min 后的荧光变化,利用软件对荧光强度进行分析。

1.3.5 Western blot 检测 P-GSK-3 β 、P-ERK1/2、P-Akt 以及细胞色素 C 蛋白表达

将生长状态良好的细胞消化后加入新培养基重悬传入到培养皿中,培养 24 ~ 48 h,细胞贴壁 90% 时根据分组进行相应处理。PBS 冲洗两遍后,加入 50 μL 裂解液冰上裂解 30 min,用细胞刮将细胞刮下来收集到 Ep 管中,超声破碎 15 s,4 $^\circ\text{C}$ 12 000 rpm 离心 15 min,取上清放入新的 Ep 管中。用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,酶标仪 595 nm 波长检测数值,将定量好的蛋白和蛋白上样缓冲液混合好后 100 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min,按每孔 30 μg 上样。电泳转膜后 10% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h,分别用 P-Akt、P-GSK-3 β 、P-ERK1/2、 β -Actin、细胞色素 C 一抗 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗三遍,每次 10 min,相应二抗室温孵育 2 h,TBST 洗三遍,每次 10 min,用超敏 ECL 试剂盒进行显色,化学发光成像仪采集图像,用 Image J 软件处理条带并分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS17.0 软件进行统计分析,结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较用完全随机设计单因素方差分析,两两比较用 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 木犀草素抗心肌氧化应激损伤保护作用

2.1.1 木犀草素对心肌细胞存活率影响

MTT 结果显示(图 1),和空白对照组相比,加入

650 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 后细胞存活率明显降低($0.544 \pm 0.202, P < 0.05, n = 4$),而用不同浓度木犀草素(1、50、100、150 $\mu\text{mol/L}$)预处理后,与 H_2O_2 组相比,细胞存活率均有明显增加(均 $P < 0.05, n = 4$),而以木犀草素浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时作用最为显著($1.045 \pm 0.086, P < 0.05, n = 4$),因此后续实验中均采用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的木犀草素处理。

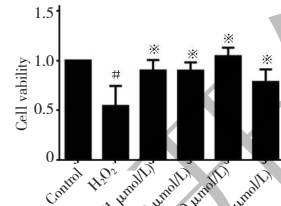


图 1 不同浓度木犀草素对心肌细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of luteolin at different density on cardiomyocyte survival rate

注:与 Control 组比较, # $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with Control, # $P < 0.05$; Compare with H_2O_2 , * $P < 0.05$ 。

2.1.2 木犀草素对线粒体膜电位的影响

共聚焦结果显示(图 2),与空白组相比 H_2O_2 组 TMRE 荧光强度明显下降($0.505 \pm 0.088, P < 0.05, n = 10$),说明 H_2O_2 使 mPTP 开放线粒体膜电位降低,引起线粒体损伤。与 H_2O_2 组相比,木犀草素预处理组,荧光强度明显升高($0.831 \pm 0.104, P < 0.05, n = 10$),说明木犀草素预处理可能通过抑制 mPTP 开放,减轻 H_2O_2 造成的线粒体损伤,发挥心肌细胞保护作用。

2.1.3 木犀草素对 P-Akt 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示(图 3),与空白组相比,加入 H_2O_2 后, P-Akt 蛋白表达水平显著降低($0.644 \pm 0.136, P < 0.05, n = 4$)。与 H_2O_2 组相比,木犀草素预处理组 P-Akt 蛋白表达水平显著增加($0.965 \pm 0.049, P < 0.05, n = 4$),提示木犀草素可以阻断 H_2O_2 降低 Akt 活性的作用,木犀草素的心肌保护作用可能与 RISK 信号通路中的 Akt 通路密切相关。

2.1.4 木犀草素对 P-ERK1/2 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示(图 4),与空白组相比,加入 H_2O_2 后, P-ERK1/2 蛋白表达水平显著降低($0.320 \pm 0.142, P < 0.05, n = 4$)。与 H_2O_2 组相比,木犀草素预处理组 P-ERK1/2 蛋白表达水平显著增加($0.995 \pm 0.227, P < 0.05, n = 4$),提示木犀草素可以阻断 H_2O_2 降低 ERK1/2 活性的作用, RISK 信

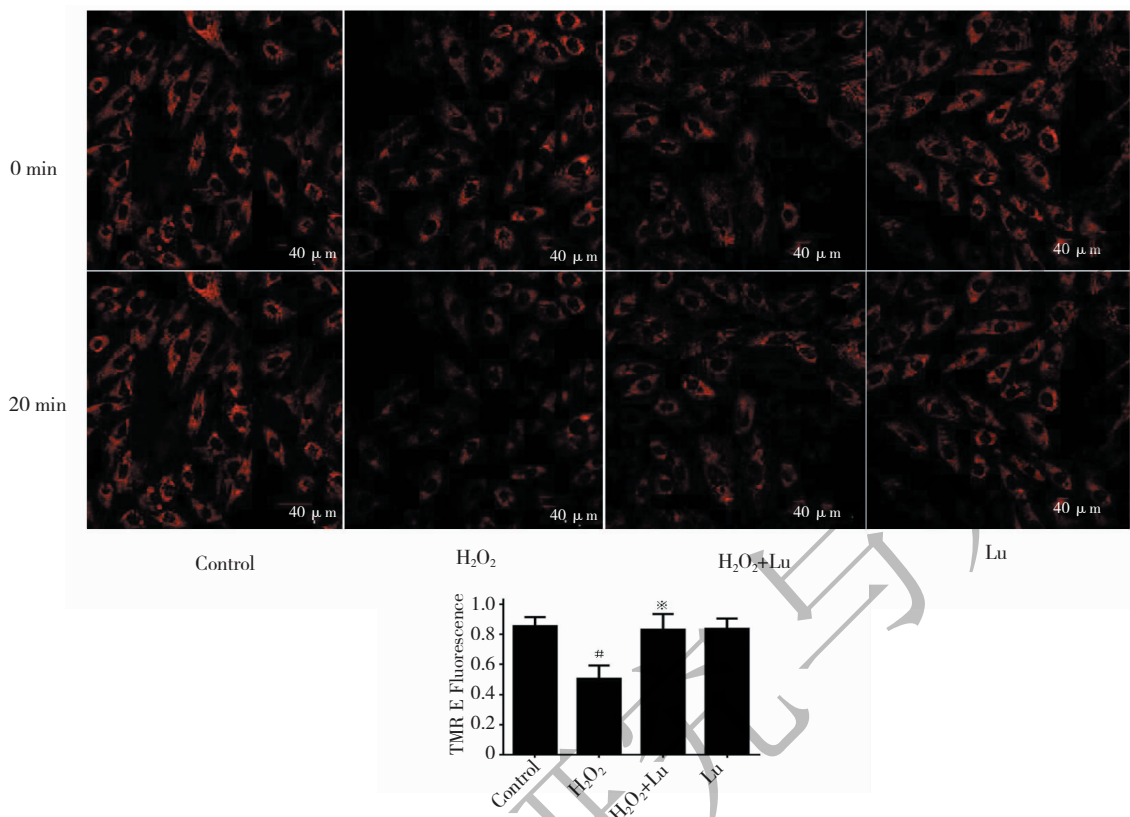


图 2 激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位

Fig. 2 Detection of mitochondrial membrane potential by laser scanning confocal microscopy

注:与对照组比较,[#]*P* < 0.05;与 H₂O₂ 组比较,^{*}*P* < 0.05。

Note: Compare with control, [#]*P* < 0.05; Compare with H₂O₂, ^{*}*P* < 0.05.

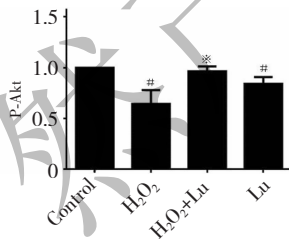
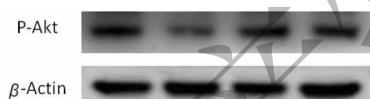


图 3 Western blot 检测 P-Akt 蛋白的表达

Fig. 3 Western blot analysis of expression levels of P-Akt conversion

注:与对照组比较,[#]*P* < 0.05;与 H₂O₂ 组比较,^{*}*P* < 0.05。

Note: Compare with control, [#]*P* < 0.05; compare with H₂O₂, ^{*}*P* < 0.05.

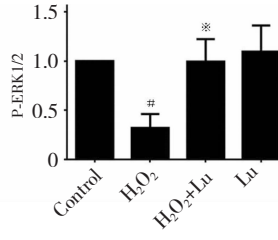
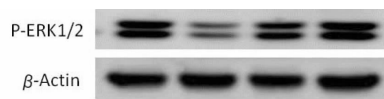


图 4 Western blot 检测 P-ERK1/2 蛋白的表达

Fig. 4 Western blot analysis of expression levels of P-ERK1/2 conversion

注:与对照组比较,[#]*P* < 0.05;与 H₂O₂ 组比较,^{*}*P* < 0.05。

Note: Compare with control, [#]*P* < 0.05; compare with H₂O₂, ^{*}*P* < 0.05.

号通路中的 ERK 通路可能在木犀草素的心肌保护作用中也发挥着重要作用。

2.1.5 木犀草素对 P-GSK-3β 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示(图 5),与空白组相比,

加入 H₂O₂ 后,P-GSK-3β 蛋白表达水平显著降低(0.299 ± 0.109, *P* < 0.05, *n* = 4)。与 H₂O₂ 组相比,木犀草素预处理组 P-GSK-3β 蛋白表达水平显著增加(0.646 ± 0.068, *P* < 0.05, *n* = 4),提示木犀草素

可能是通过增加 P-GSK-3 β 蛋白表达,阻止 mPTP 开放,发挥抗心肌氧化应激损伤保护作用的。

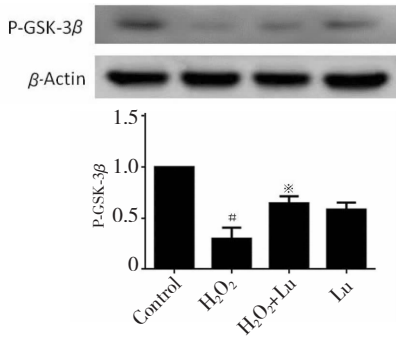


图5 Western blot 检测 P-GSK-3 β 蛋白的表达

Fig.5 Western blot analysis of expression levels of P-GSK-3 β conversion

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with Control,[#] $P < 0.05$; Compare with H₂O₂,^{*} $P < 0.05$ 。

2.1.6 木犀草素对 Cytochrome C 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示(图6),与空白组相比,加入 H₂O₂ 后,细胞色素 C 蛋白表达水平显著升高($2.919 \pm 1.256, P < 0.05, n = 4$)。与 H₂O₂ 组相比,木犀草素预处理组细胞色素 C 蛋白表达水平显著降低($1.801 \pm 0.446, P < 0.05, n = 4$),提示木犀草素可能是通过减少细胞色素 C 释放,减轻细胞凋亡发挥抗心肌氧化应激损伤保护作用的。

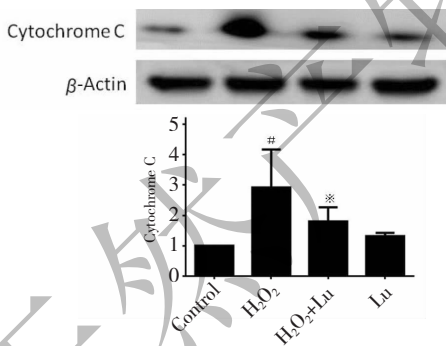


图6 Western blot 检测 Cytochrome C 蛋白的表达

Fig.6 Western blot analysis of expression levels of Cytochrome C conversion

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with Control,[#] $P < 0.05$; Compare with H₂O₂,^{*} $P < 0.05$ 。

2.2 木犀草素通过 RISK 信号通路发挥线粒体保护作用

2.2.1 木犀草素通过 RISK 信号通路影响线粒体通透性转移孔开放

共聚焦结果显示(图7),与 H₂O₂ 组相比,木犀

草素预处理可以使 TMRE 荧光值升高($n = 10$),而加入 PI3K/Akt 抑制剂渥曼青霉素和 ERK1/2 抑制剂 PD98059 后,荧光值再度降低($n = 10$),木犀草素的保护作用受到抑制,说明木犀草素可能是通过 RISK 信号通路发挥抗心肌氧化应激损伤保护作用。

2.2.2 木犀草素通过 RISK 信号通路发挥心肌保护作用

Western blot 结果显示(图8、9),与 H₂O₂ 组相比,加入木犀草素后, P-GSK-3 β 、P-Akt、P-ERK1/2 蛋白表达水平均显著增加($P < 0.05, n = 4$),细胞色素 C 表达减少($P < 0.05, n = 5$),而加入 PI3K 抑制剂渥曼青霉素和 ERK1/2 抑制剂 PD98059 后,木犀草素升高 P-GSK-3 β 、P-Akt、P-ERK1/2 及降低细胞色素 C 的作用被阻断,提示木犀草素可能是通过 RISK 信号通路调节 GSK-3 β 活性,减轻线粒体损伤从而发挥抗心肌氧化应激损伤保护作用。

3 讨论

木犀草素作为一种天然中草药提取物具有多种药理活性,在金银花、紫苏、茶等植物中含量较高,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种作用^[7-10]。研究发现,木犀草素在脑、肾、肝脏等器官缺血再灌注损伤时可以发挥抗炎、抗凋亡、抗氧化等作用^[11-14]。同时,动物实验研究发现,木犀草素可以减轻心肌缺血再灌注损伤^[8]。

研究发现,线粒体在心肌缺血再灌注损伤时发挥重要作用^[15-17]。线粒体是细胞内重要的细胞器,为细胞提供能量,线粒体通透性转移孔(mPTP)是线粒体上的孔性结构,可以维持线粒体基质和胞质之间渗透压,线粒体 PH 改变、氧自由基增多均可使 mPTP 开放。激光共聚焦结果显示,木犀草素可以减轻 H₂O₂ 使 mPTP 的开放的作用发挥线粒体保护作用,而渥曼青霉素和 PD98059 可以抑制这种作用。说明木犀草素可能通过 RISK 信号通路调节 mPTP 开放来减轻线粒体损伤,起到心肌保护作用。缺血再灌注损伤诱导 mPTP 开放会释放细胞色素 C 入细胞,导致细胞凋亡和坏死^[18]。细胞色素 C 是位于线粒体间隙的水溶性蛋白也是线粒体呼吸链中的组成成分,起传递电子的作用。正常情况下,细胞色素 C 缺少时,电子传递中断,ATP 生成减少,活性氧增多^[19,20]。同时,研究发现,一方面细胞色素 C 释放后进入细胞基质导致 caspase 级联反应,进而导致细胞凋亡;另一方面细胞色素 C 的释放受到线粒体

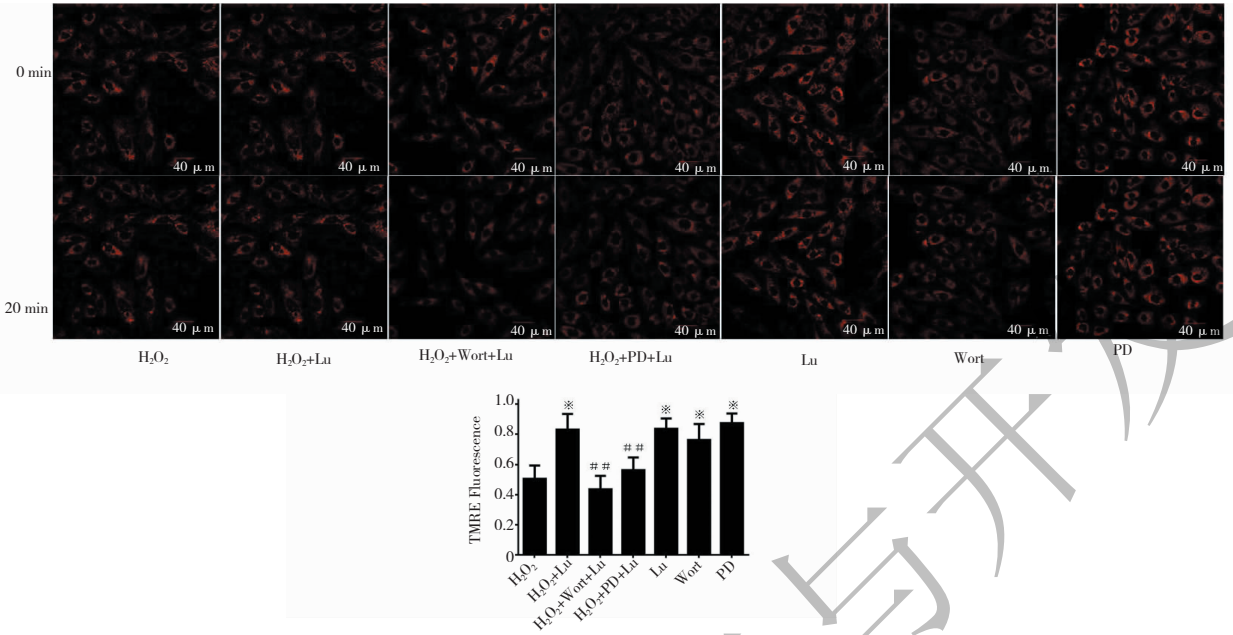


图 7 激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位

Fig. 7 Detection of mitochondrial membrane potential by laser scanning confocal microscopy

注:与 H₂O₂ 组比较, * P < 0.05; 与 H₂O₂ + Lu 组比较, ## P < 0.05.

Note: Compare with H₂O₂, * P < 0.05; Compare with H₂O₂ + Lu, ## P < 0.05.

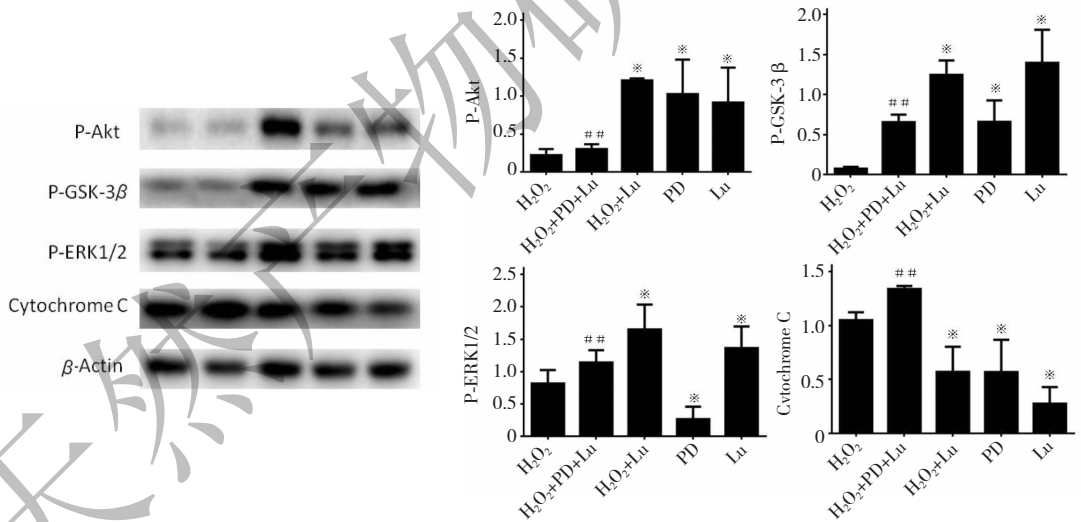


图 8 Western blot 检测 P-Akt、P-GSK-3β、P-ERK1/2、细胞色素 C 蛋白的表达

Fig. 8 Western blot analysis of expression levels of P-Akt, P-GSK-3β, P-ERK1/2 and cytochrome C conversion

注:与 H₂O₂ 组比较, * P < 0.05; 与 H₂O₂ + Lu 组比较, ## P < 0.05.

Note: Compare with H₂O₂, * P < 0.05; Compare with H₂O₂ + Lu, ## P < 0.05.

膜上的 Bcl-2 蛋白的调控,说明细胞色素 C 在线粒体凋亡中起到重要作用。本研究发现,木犀草素可以使细胞色素 C 表达减少,减轻 H₂O₂ 造成的氧化损伤。而 PI3K 通路抑制剂渥曼青霉素和 ERK 通路

抑制剂 PD98059 可以阻断木犀草素使细胞色素 C 表达减少的作用,抑制木犀草素对线粒体的保护,说明木犀草素可以通过 RISK 通路调节细胞色素 C 表达,减轻线粒体凋亡,发挥心肌保护作用。

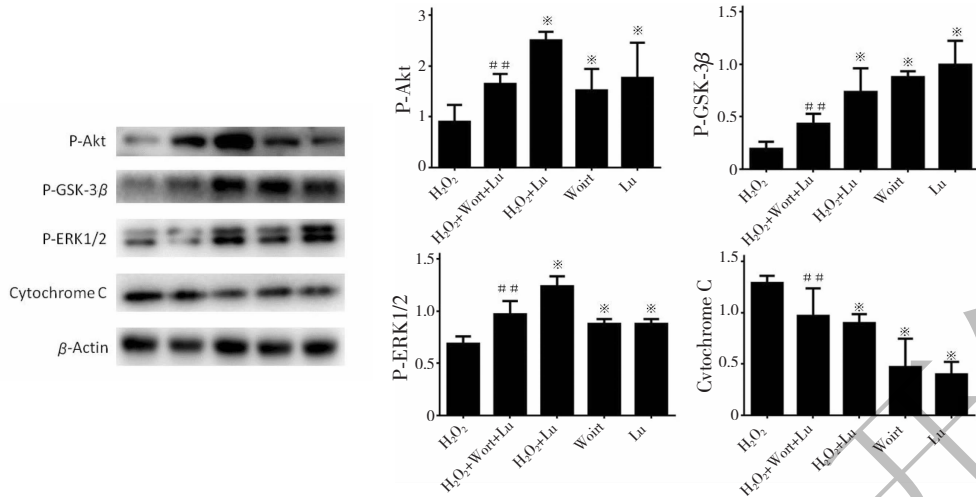


图9 Western blot 检测 P-Akt、P-GSK-3 β 、P-ERK1/2、细胞色素 C 蛋白的表达

Fig. 9 Western blot analysis of expression levels of P-Akt, P-GSK-3 β , P-ERK1/2 and cytochrome C conversion

注:与 H₂O₂ 组比较, * $P < 0.05$; 与 H₂O₂ + Lu 组比较, ## $P < 0.05$ 。

Note: Compare with H₂O₂, * $P < 0.05$; compare with H₂O₂ + Lu, ## $P < 0.05$.

GSK-3 β 是 mPTP 的调节因子,也是 RISK 信号通路的下游靶点^[5]。RISK 信号通路由 PI3K/Akt 信号通路和 ERK1/2 信号通路组成,PI3K/Akt 信号通路参与细胞生长、分化、凋亡^[2]。Akt 是 PI3K 的下游靶点,起着非常重要的作用,Akt 的活化即磷酸化可以将上游信息传递到下游各靶点。ERK1/2 由 ERK1 和 ERK2 组成,是丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路的组成部分,参与细胞增殖、分化、凋亡等^[3,4]。本研究发现,木犀草素可以使 P-GSK-3 β 、P-Akt、P-ERK1/2 表达升高,减少细胞色素 C 的产生,而加入 PI3K 通路抑制剂渥曼青霉素和 ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 均可阻断木犀草素使 P-GSK-3 β 、P-Akt、P-ERK1/2 及细胞色素 C 的这一作用。

综上所述,木犀草素可以减轻 H₂O₂ 引起的心肌氧化应激损伤发挥心肌保护作用,而这种作用可能是通过调控 RISK 信号通路降低 GSK-3 β 活性抑制 mPTP 开放实现的。

参考文献

- 1 Hang P, Zhao J, Su Z, *et al.* Choline inhibits ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte autophagy in rat myocardium by activating Akt/mTOR signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45: 2136-2144.
- 2 Wang Y, Li X, Wang X, *et al.* Ginsenoside Rd attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via Akt/GSK-3 β signaling and inhibition of the mitochondria-dependent apoptotic pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8: 70956.

- 3 Chen M, Sat PY, Chuprun JK, *et al.* Pro-death signaling of GRK2 in cardiac myocytes after ischemic stress occurs via ERK-dependent, hsp90-mediated mitochondrial targeting [J]. *Circ Res*, 2013, 112: 1121-1134.
- 4 Xu T, Wu X, Chen Q, *et al.* The anti-apoptotic and cardioprotective effects of salvianolic acid A on rat cardiomyocytes following ischemia/reperfusion by DUSP-mediated regulation of the ERK1/2/JNK pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9: 102292.
- 5 Jin DL, Qian D, Huan HT, *et al.* Wnt/Glycogen synthase kinase3 β / β -catenin signaling activation mediated sevoflurane preconditioning-induced cardioprotection [J]. *Chin Med J*, 2015, 128: 2346-2353.
- 6 Wang JS (王继双), He Y (何焱), Zhang WJ (张文静). Advances in studies on pharmacological effects of luteolin [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences (生命科学)*, 2013, 25: 560-565.
- 7 Chang H, Li C, Huo K, *et al.* Luteolin prevents H₂O₂-induced apoptosis in H9C2 cells through modulating Akt-P53/Mdm2 signaling pathway [J]. *Bio Med Res Int*, 2016, 25: 560-565.
- 8 Fan WN (樊维娜), Sun JW (孙经武). Effects of luteolin pretreatment on inflammatory reaction and apoptosis of myocardium of ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Shaanxi J Trad Chin Med (陕西中医)*, 2015, 36: 1558-1560.
- 9 Caltagirone C, Cisari C, Schievano C, *et al.* Co-ultramicro-oxidized palmitoylethanolamide/ luteolin in the treatment of cerebral ischemia: from rodent to man [J]. *Trans Stroke Res*, 2016, 7(1): 54-69.
- 10 Zhang XQ (张相强), Zhang P (张鹏), Huang MK (黄茂葵), *et al.* Inhibitory effects of luteolin against proliferation of gastric cancer cell line MGC803 and related mechanisms

- [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2016, 37:302-308.
- 11 Gao CY (高春艳), Nie ZG (聂珍贵), Wang JY (王俊亚), *et al.* Inhibitory effect of luteolin on aminopeptidase N in glioma cells and its mechanism[J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2015, 31:334-337.
- 12 Wang GG (王国光), Lu XH (陆晓华), Ding M (丁敏), *et al.* Protective effects of luteolin preconditioning on rat liver under ischemia/reperfusion[J]. *Acta Physiologica Sinica* (生理学报), 2011, 63:177-183.
- 13 Xiao TT (肖婷婷), PALIDA Kelimu, Yu D (余丹). Luteolin protects brain injury and improves endogenous neural stem cells proliferation on cerebral ischemia-reperfusion injury in rat[J]. *China J Biochem Pharmacol* (中国生化药物杂志), 2017, 37(3):37-40.
- 14 Su QG (苏庆国), Cai HJ (蔡虹静), Zhang B (张冰), *et al.* Protective effects of luteolin pretreatment on renal ischemia reperfusion injury in rat[J]. *BMU Journal* (滨州医学院学报), 2016, 39:254-257.
- 15 Lim TS, Dávila A, Wallace DC, *et al.* Assessment of mitochondrial membrane potential using an on-chip microelectrode in a microfluidic device. *Lab on A Chip*, 2010, 10:1683-1688.
- 16 Pery SW, Norman JP, Barbieri J, *et al.* Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide[J]. *Biotechniques*, 2011, 50(2):98.
- 17 Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM, *et al.* Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes[J]. *Transl Res*, 2010, 156(1):15-25.
- 18 Philippe P, Elizabeth PJ, Philip HA. Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(1):005645.
- 19 Marenzi G, Cosentino N, Boeddinghaus J, *et al.* Diagnostic and prognostic utility of circulating cytochrome c in acute myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2016, 119:1339-1346.
- 20 Huang X (黄仙), Pang XZ (庞玺倬), Yu Z (喻卓), *et al.* Protection effect and correlation of PKG and RISK signal pathway on myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Clin Med* (临床医学), 2016, 36:126-128.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

昆明医科大学药学院