

玉郎伞查尔酮激活 Nrf2/ARE 信号通路减轻缺氧/复氧所致的 H9c2 细胞凋亡及氧化应激损伤

覃斐章^{1*}, 董 敏¹, 秦秋华², 篦霏霏¹, 黄媛恒¹

¹广西医科大学, 南宁 530021; ²南宁市第二人民医院, 南宁 530031

摘要:研究玉郎伞查尔酮(YLSC)对缺氧/复氧所致的H9c2细胞损伤的影响及可能的作用机制。缺氧12 h、复氧24 h建立心肌细胞缺氧/复氧模型,并对细胞凋亡、氧化应激相关指标和Nuclear-Nrf2等蛋白表达进行了检测。结果显示,YLSC可明显增加细胞生存率,提高SOD、GSH-Px水平,降低细胞凋亡率和LDH、ROS、MDA水平。使Nuclear-Nrf2、HO-1、Bcl-2蛋白表达增高而Cleaved caspase 3、Bax蛋白表达减少,联合应用Nrf2抑制剂可抑制YLSC作用效果。结果表明,YLSC可以减轻缺氧/复氧所致的心肌细胞凋亡及氧化应激损伤,其机制可能与激活Nrf2/ARE信号通路有关。

关键词:YLSC; 心肌缺氧/复氧损伤; 氧化应激; 凋亡; Nrf2/ARE 信号通路

中图分类号:R972

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-1038-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.018

17-Methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone activates Nrf2/ARE pathway to protect H9c2 cells against apoptosis and oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation

QIN Fei-zhang^{1*}, DONG Min¹, QIN Qiu-hua², XUAN Fei-fei¹, HUANG Yuan-heng¹

¹Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ²Nanning Second People's Hospital, Nanning 530031, China

Abstract: To explore the effects of 17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone (YLSC) on apoptosis and oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation in H9c2 cells and the possible mechanisms. Cells were cultured under oxygen and glucose deprivation for 12 h and then under recovery conditions for 24 h to stimulate myocardial hypoxia/reoxygenation injury. Apoptosis and oxidative stress related molecules, protein expressions of Nuclear-Nrf2 and HO-1 were tested. Compared with the model group, the cell viability, levels of SOD and GSH-Px were increased significantly in YLSC groups while the apoptotic rate and levels of ROS, LDH and MDA were significantly reduced. Western blot showed that the protein expressions of Nuclear-Nrf2, HO-1 and Bcl-2 in YLSC group were higher, while the expressions of Cleaved caspase 3 and Bax were lower than that in model group. However, combination treatment with Nrf2 inhibitor significantly inhibit the effects of YLSC. YLSC can protect H9c2 cells against apoptosis and oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation, and its mechanism may be associated with the activation of Nrf2/ARE signaling pathway.

Key words: YLSC; hypoxia/reoxygenation; oxidative stress; apoptosis; Nrf2/ARE signaling pathway

缺血心脏在恢复血流灌注后损伤进一步加重的现象,称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI),常见于心脏移植、急性冠脉综合征和冠脉搭桥术后。MIRI时产生的大量自

由基尤其是活性氧(ROS)不仅能直接损伤脂质、蛋白质和核酸,还能与NO、脂肪酸、Fe²⁺反应生成毒性物质,如ONOO⁻、OH⁻等间接损伤细胞。氧化应激水平的升高,还能激活凋亡相关蛋白,使凋亡细胞增多,与心血管重构及心力衰竭早期心肌梗死的发生密切相关^[1]。

Nrf2/ARE(Nuclear factor erythroid derived 2 related factor 2/Antioxidant response element)信号通路

是体内重要的抗氧化通路,在 MIRI 的治疗中发挥着重要的作用。Nrf2 已被证实广泛分布于心脏和血管系统^[2]。有研究表明,活化的 Nrf2 可以促进抗氧化酶的表达,清除过量的 ROS,降低氧化应激诱导的心肌细胞凋亡^[3]。用 Nrf2 siRNA 沉默其表达后,对缺氧/复氧的心肌细胞的保护作用明显减弱甚至消失,说明 Nrf2 的活化对心肌细胞的保护具有十分重要的作用^[4]。增强 Nrf2 活性,还能有效的减轻糖尿病小鼠的心肌损害,延缓缺氧诱导的心肌纤维化的发展^[5]。

玉郎伞系豆科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* (Dunn) Kurz var. *laxior* (Dunn) Z. Wei 的干燥根,是广西壮、瑶族常用中药,具有增强免疫力、疏风止咳、治疗肺热、咽喉肿痛等功效^[6]。玉郎伞查尔酮(17-methoxyl-7-hydroxy-benzfuranalcon, YLSC)是玉郎伞中主要活性成分,具有抗血栓形成^[7]、抗炎、抗凋亡、保护血管内皮细胞,延缓心肌重构^[8]等多种药理作用。我们的前期研究还发现,YLSC 能清除 O₂⁻ 和 ·OH、抑制 O₂⁻ 的生成^[9],对大鼠缺血再灌注损伤有较好的保护作用。然而 YLSC 的心肌保护作用尚不完全清楚。本实验通过观察 YLSC 对缺氧/复氧所致 H9c2 细胞凋亡和氧化应激的影响,探讨 Nrf2/ARE 信号通路在其中的信号转导作用,为进一步研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

H9c2 心肌细胞系购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂与仪器

试剂:YLSC(由广西医科大学药理教研室提供,HPLC 显示其纯度为 98%);ML385 购自美国 AbMole 公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;MTT 和胰酶购自美国 Amresco 公司;ROS 检测试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;细胞核蛋白和细胞浆蛋白抽提试剂盒购自上海碧云天公司;Western blot 一抗 Cleaved caspase 3、Bax、Bcl-2、Nuclear-Nrf2、HO-1、β-actin、lamin B 购自美国 Santa Cruz 公司;Western blot 二抗购自北京中杉金桥公司;考马斯亮蓝蛋白质定量试剂盒、LDH、GSH-Px、MDA、SOD 测试盒购自南京建成生物工程研究所。

仪器:722S 型可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;Multiskan FC 酶标仪,美国 Thermo

Fisher Scientific 公司;FACSCanto II 流式细胞仪,美国 BD 公司;伯乐电泳仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 造模及分组

模型的建立参考文献^[10]。将细胞分正常组、模型组、YLSC 低剂量组、YLSC 中剂量组、YLSC 高剂量组、YLSC 高剂量 + ML385 组。正常组 H9c2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMED 培养液在 37 °C CO₂ 培养箱中培养,不经任何处理。模型组 H9c2 细胞使用无血清的 DMEM 培养液,并置于缺氧盒(94% N₂ + 5% CO₂ + 1% O₂)中培养 12 h,随后更换正常培养液并置于 37 °C CO₂ 培养箱(95% 空气 + 5%)中培养 24 h,复制心肌细胞缺氧/复氧模型。YLSC 低、中、高剂量组细胞分别给予终浓度为 75、150、300 μg/mL 的 YLSC 孵育 24 h,然后进行缺氧/复氧处理。YLSC 高剂量 + ML385 组细胞先给予 3 μg/L ML385 培育 30 min,再加入 300 μg/mL YLSC 孵育 24 h,然后进行缺氧/复氧处理。

1.3.2 细胞存活率测定

将细胞以 6 × 10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔板。MTT 法测定细胞存活率。每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,在 37 °C 培养箱中培育 4 h。弃上清液后,每孔加入 100 μL DMSO 溶解甲脂结晶。用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度(A)值。按以下公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (\text{实验组 A 值}/\text{对照组 A 值}) \times 100\%$$

1.3.3 细胞上清液 LDH 检测

实验结束后,收集培养液,3 000 rpm 离心 10 min,取上清液备用。按试剂盒说明书测定细胞上清液 LDH 含量。

1.3.4 细胞匀浆 SOD、MDA、GSH-Px 检测

加入适量胰酶消化细胞,1 000 rpm 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL PBS,1 000 rpm 离心 10 min,重复 2~3 次。在细胞沉淀中加入 0.5 mL PBS 溶液,重悬并混匀,在超声条件下破裂细胞,每次 1~2 秒,重复 10 次,取破碎好的匀浆液进行测定。按试剂盒说明书测定细胞匀浆 SOD、MDA、GSH-Px 活性。

1.3.5 心肌细胞凋亡率检测

经药物或缺氧/复氧预处理后,胰酶消化细胞,PBS 清洗两次,2 000 rpm 离心 5 min,收集 1 × 10⁵ 个心肌细胞。加入 100 μL Binding Buffer 重悬细胞,随后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,混匀,室温

避光反应 15 min。1 h 内利用流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率。

1.3.6 心肌细胞 ROS 检测

按照试剂盒说明书测定细胞内 ROS 水平。消化并收集 1×10^5 个细胞, 置于含血清培养基的离心管中, 1 500 rpm 离心 5 min。用预冷的 PBS 清洗两次。加入 0.1 μM 的 Dihydroethidium 染料 500 μL , 吹打均匀, 37 °C 避光孵育 30 min, 过滤收集, 利用流式细胞仪检测细胞 ROS 含量。实验结果以平均荧光强度表示。

1.3.7 Nuclear-Nrf2、HO-1、Cleaved caspase3、Bax、Bcl-2 蛋白表达测定

抽提细胞蛋白, 并用 BCA 法进行蛋白定量。取 30 μg 蛋白上样量, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 恒定电压转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。随后加入相应一抗 (Nuclear-Nrf2 1:1 000; HO-1 1:500; β -actin 1:200; Lamin B 1:400; Cleaved caspase 3 1:500; Bax 1:400; Bcl-2 1:1 000),

表 1 YLSC 对细胞存活率和上清液 LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of YLSC on cell viability and LDH levels in supernatant ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	乳酸脱氢酶 LDH (U/L)	细胞生存率 Cell viability (%)
正常 Normal	867.34 \pm 45.69	100.00 \pm 7.35
模型 Model	1 520.15 \pm 78.44 [#]	40.35 \pm 5.17 ^{##}
YLSC 低剂量 YLSC-L	1 256.75 \pm 60.77 [*]	51.36 \pm 6.23 [*]
YLSC 中剂量 YLSC-M	1 204.94 \pm 77.30 ^{**}	64.79 \pm 6.54 ^{**}
YLSC 高剂量 YLSC-H	985.39 \pm 54.63 ^{**}	80.21 \pm 9.22 ^{**}
YLSC 高剂量 + ML385 YLSC-H + ML385	1 423.19 \pm 89.52 ^{&&}	52.62 \pm 4.34 ^{&&}

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与 YLSC-H 组比较, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$, 下同。

Note: Compared with normal group, [#] $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with YLSC-H group, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$, the same below.

2.2 YLSC 对细胞 ROS 和胞浆 SOD、MDA 及 GSH-Px 含量的影响

与正常组相比, 模型组细胞 ROS 及 MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$), SOD 和 GSH-Px 含量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, YLSC 能明显降低 ROS

4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后, 加入二抗 37 °C 孵育 2 h, ECL 发光, X 线片显影、定影, Image J software 分析其条带灰度值。

1.3.8 统计学处理

应用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多个样本均数间的两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 时被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 YLSC 对细胞存活率和上清液 LDH 含量的影响

与正常组比较, 模型组心肌细胞存活率明显下降, 细胞上清液中 LDH 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 不同剂量 YLSC 预处理后, 心肌细胞存活率明显提高, 上清液 LDH 水平明显降低, 并呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 YLSC-H 组比较, YLSC-H + ML385 组细胞存活率明显下降, 上清液 LDH 水平明显升高 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

表 2 YLSC 对细胞 ROS 和胞浆 SOD、MDA、GSH-Px 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of YLSC on intracellular ROS and SOD, MDA, GSH-Px levels in cytoplasm ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	活性氧 ROS 平均荧光强度	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD (U/ μg prot)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (U/ μg prot)
正常 Normal	45.89 \pm 3.75	5.66 \pm 0.42	0.135 \pm 0.019	0.973 \pm 0.080
模型 Model	114.60 \pm 11.83 [#]	11.27 \pm 1.38 [#]	0.097 \pm 0.016 [#]	0.590 \pm 0.047 [#]
YLSC 低剂量 YLSC-L	96.87 \pm 12.26 [*]	10.35 \pm 0.89	0.138 \pm 0.022 ^{**}	0.703 \pm 0.066 ^{**}

及 MDA 含量, 升高 SOD、GSH-Px 水平, 呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 YLSC-H 组比较, YLSC-H + ML385 组细胞 ROS 和 MDA 含量明显升高, SOD 和 GSH-Px 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见表 2。

表 2 YLSC 对细胞 ROS 和胞浆 SOD、MDA、GSH-Px 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of YLSC on intracellular ROS and SOD, MDA, GSH-Px levels in cytoplasm ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	活性氧 ROS 平均荧光强度	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD (U/ μg prot)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (U/ μg prot)
正常 Normal	45.89 \pm 3.75	5.66 \pm 0.42	0.135 \pm 0.019	0.973 \pm 0.080
模型 Model	114.60 \pm 11.83 [#]	11.27 \pm 1.38 [#]	0.097 \pm 0.016 [#]	0.590 \pm 0.047 [#]
YLSC 低剂量 YLSC-L	96.87 \pm 12.26 [*]	10.35 \pm 0.89	0.138 \pm 0.022 ^{**}	0.703 \pm 0.066 ^{**}

续表2(Continued Tab. 2)

组别 Group	活性氧 ROS 平均荧光强度	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD (U/μg prot)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (U/μg prot)
YLSC 中剂量 YLSC-M	88.53 ± 6.67 **	9.86 ± 0.80 *	0.141 ± 0.011 **	0.710 ± 0.050 **
YLSC 高剂量 YLSC-H	72.46 ± 5.18 **	9.35 ± 0.73 *	0.146 ± 0.028 **	0.715 ± 0.081 **
YLSC 高剂量 + ML385 YLSC-H + ML385	93.25 ± 10.72 &&	10.50 ± 1.19 &	0.126 ± 0.014 &	0.611 ± 0.058 &

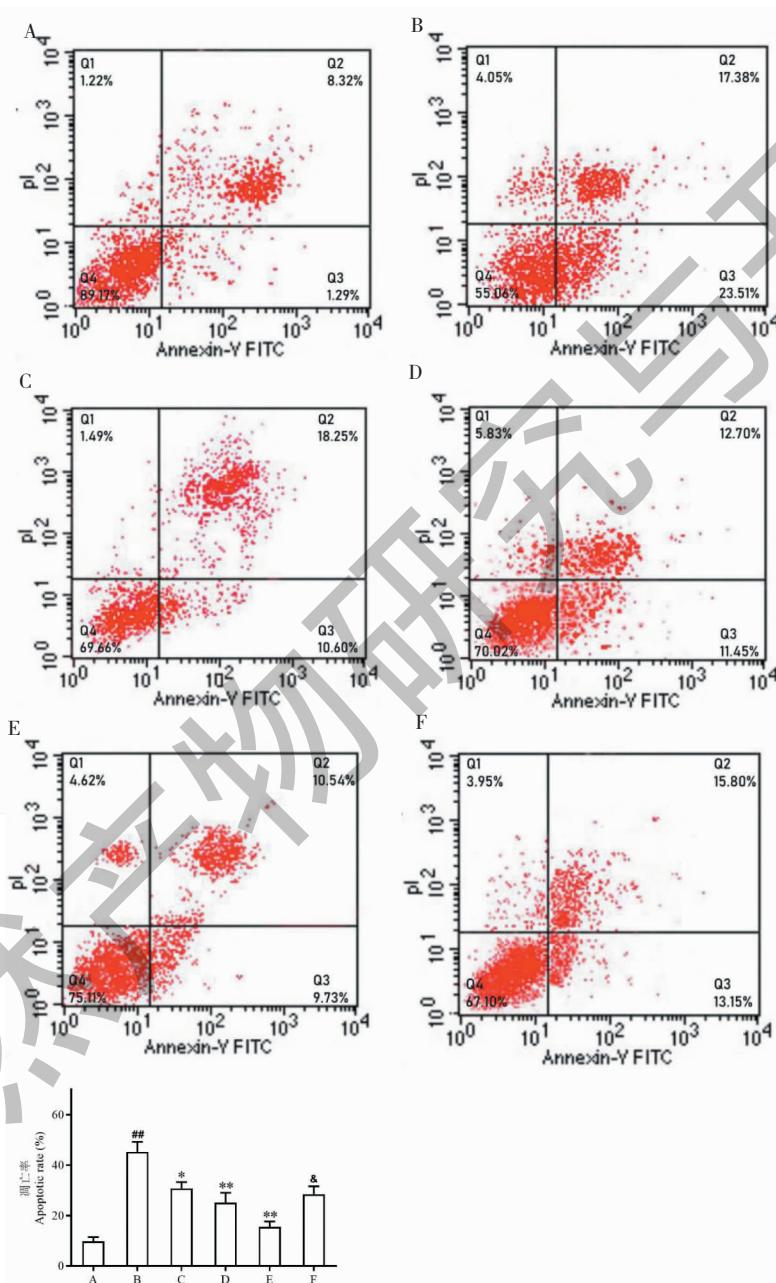


图 1 YLSC 对 H9c2 细胞凋亡率的影响

Fig. 1 Effects of YLSC on apoptotic rate in H9c2 cells by flow cytometry assay

注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 YLSC 低剂量组;D 为 YLSC 中剂量组;E 为 YLSC 高剂量组;F 为 YLSC 高剂量 + ML385 组。与正常组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 YLSC-H 组比较, $^{\&}P < 0.05$, $^{&&}P < 0.01$ 。下同. Note: A: Normal group; B: Model group; C: YLSC-L group; D: YLSC-M group; E: YLSC-H group; F: YLSC-H + ML385 group, the same below. Compared with normal group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; Compared with model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; Compared with YLSC-H group, $^{\&}P < 0.05$, $^{&&}P < 0.01$. The same below.

2.3 YLSC 对细胞凋亡率的影响

与正常组比较,模型组能明显增加细胞凋亡率($P < 0.01$)。与模型组比较,75、150、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的YLSC预处理可使细胞凋亡率逐渐下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与YLSC-H组比较,YLSC-H+ML385组细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$),结果见图1。

2.4 YLSC 对心肌细胞缺氧/复氧 Cleaved caspase 3、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达量的影响

与正常组比较,模型组细胞 Bcl-2 表达明显下

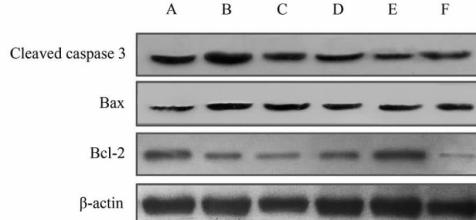


图2 YLSC 对 H9c2 细胞 Cleaved caspase 3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of YLSC on protein expressions of Cleaved caspase 3, Bax and Bcl-2 in H9c2 cells

2.5 YLSC 对心肌细胞缺氧/复氧 Nuclear-Nrf2 HO-1 蛋白表达的影响

与正常组比较,缺氧/复氧增加了细胞 Nrf2 核转移和 HO-1 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,YLSC 处理后使得 Nrf2 核转移和 HO-1 的

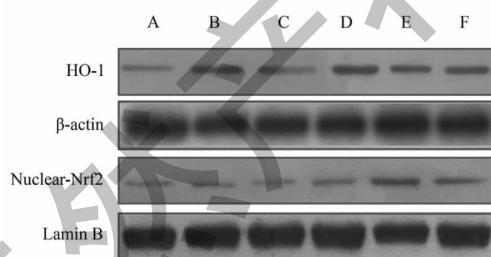


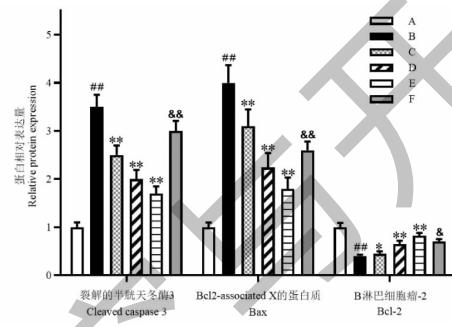
图3 YLSC 对 H9c2 细胞 Nuclear-Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of YLSC on protein expressions of Nuclear-Nrf2 and HO-1 in H9c2 cells

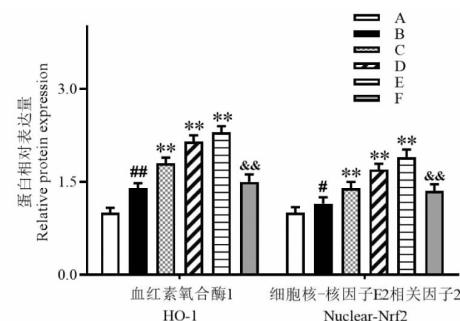
3 讨论

MIRI 是心脏手术和心肌梗死后常见的致死原因。研究发现,ROS 作为 MIRI 的主要启动因子,在缺血发生的急性及慢性病理变化中发挥着关键作用,可影响细胞凋亡、内质网应激和细胞的迁移与增殖等过程。缺血诱发的氧化应激反应可能与内源性抗氧化物质减少,抗氧化酶活性下降,氧化与抗氧化

上调($P < 0.01$),Cleaved caspase 3 和 Bax 表达明显上调($P < 0.01$);与模型组比较,YLSC 组 Bcl-2 表达水平升高,而 Cleaved caspase 3 和 Bax 表达水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),呈剂量依赖关系。与YLSC-H 组比较,YLSC-H+ML385 组细胞 Bcl-2 表达明显下调,Cleaved caspase 3 和 Bax 表达明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见图2。



表达进一步增加,并呈剂量依赖关系($P < 0.01$)。与YLSC-H 组比较,YLSC-H+ML385 组 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$),结果见图3。



防御系统失衡有关。SOD 能清除 O_2^- ,使之生成 H_2O_2 。GSH-Px 催化脂质过氧化过程中产生的 LOOH 转化为相应的醇 LOH,阻断脂质过氧化的侧链循环反应。我们的研究发现,与正常组比较,模型组 ROS、MDA 水平升高,SOD 和 GSH-Px 水平降低。经 YLSC 预处理的心肌细胞内 ROS、MDA 水平显著下降,SOD 和 GSH-Px 水平升高。结果提示,YLSC

可能具有清除自由基,提高抗氧化酶活性,减轻 MI-RI 时氧化应激损伤的作用。

缺血再灌注使细胞活性降低,数量减少,凋亡细胞增多,最终导致心功能障碍。线粒体在调控细胞凋亡上起着重要的作用。线粒体功能下降是细胞凋亡的早期表现,伴随着线粒体膜电位的下降^[11]。Bcl-2 能维持线粒体的完整性,而 Bax 则能增加线粒体转换孔的通透性,使 AIF 和 Cyt c 从线粒体释放增加。Caspase 3 是 Caspase 家族的下游蛋白,可导致细胞内 DNA 断裂,最终引起细胞凋亡。本实验用流式细胞仪检测 H9c2 细胞的凋亡率,发现 YLSC 能减少缺氧心肌细胞的凋亡率,使 Bcl-2 的表达升高,而 Bax 和 Cleaved caspase 3 的表达明显降低。提示 YLSC 具有减轻心肌细胞凋亡的作用。

大量研究表明,Nrf2 是调节细胞内氧化还原反应的关键转录因子。它可使抗氧化酶和Ⅱ相解毒酶(如 NQO1、谷胱甘肽、GSH-Px、SOD 等)表达上调,以减轻氧化应激反应^[12]。Nrf2 信号通路亦可调节线粒体的生物合成和 NADPH 氧化酶影响细胞内 ROS 的生成^[13]。正常情况下,Nrf2 与 Kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1)相连,并被 Keap1 阻止活性。当细胞受到氧化应激源作用或其它刺激时,Keap1 半胱氨酸残基被修饰,构象发生改变,Nrf2-Keap1 复合物解离,Nrf2 快速由细胞质转入细胞核。入核的 Nrf2 与 ARE 结合,促进下游的目标基因如 γ -glutamylcysteine synthetase、hemeoxygenase 1(HO-1)等的表达^[14]。Xu 等^[15]研究发现,Nrf2 基因敲除小鼠心肌梗死面积增加,心脏保护作用减弱。Triptolide 减少缺血再灌注引起的炎症反应和氧化应激,机制与上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达有关^[16]。Nrf2 还参与了凋亡的调节。Das^[17]等报道,Nrf2/ARE 信号通路通过影响 p53、Bax、Bcl-2、Bad、Caspase 3 等线粒体依赖的凋亡蛋白影响细胞的生存。介导 Nrf2 活性的蛋白 Keap1,可以与 Bcl-2 相互作用,调控细胞的凋亡^[18]。本实验发现,缺氧/复氧能使心肌细胞 HO-1 表达增加,Nrf2 在细胞核表达增多。YLSC 预处理 24 h 后,HO-1 和细胞核内 Nrf2 表达进一步增加,同时细胞凋亡率和凋亡相关蛋白表达减少,抗氧化酶表达增加。同时给予 Nrf2 抑制剂 ML385 后,可见细胞的凋亡率增加,抗氧化水平降低,Nrf2 和 HO-1 的上调受到抑制,提示 YLSC 的抗氧化应激和细胞凋亡的作用可能与 Nrf2/ARE 信号通路有关。有研究发现,PI3K/Akt/

GSK3 β 信号通路作为 Nrf2 的上游通路也参与了 Nrf2 的调控^[19]。GSK3 β 能直接磷酸化 Nrf2,通过 Fyn 激酶促进 Nrf2 核转录,并使 Nrf2 在细胞核中失活^[20]。我们前期的研究发现,YLSC 能激活 PI3K/Akt 信号通路,减轻缺血再灌注诱导的心肌细胞自噬和凋亡^[21]。PI3K/Akt 信号通路是否参与了 YLSC 介导的 Nrf2 调节,在抗氧化反应和阻止缺血诱导的细胞凋亡方面发挥作用,有待于进一步研究。

综上所述,YLSC 预处理对 H9c2 细胞缺氧/复氧损伤有保护作用,能够显著降低 LDH 水平和细胞凋亡率,增加 SOD、GSH-Px 含量,降低 MDA、ROS 水平。增加 Nuclear-Nrf2、HO-1、Bcl-2 蛋白表达,减少 Bax 和 Cleaved caspase 3 蛋白表达,其机制可能与激活 Nrf2/ARE 信号通路有关。

参考文献

- Ligia AK, Rudá PA, Che HC, et al. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: challenges and opportunities[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 129:155-168.
- Meng Z, Teng S, Wang XY, et al. Asiatic acid inhibits cardiac fibrosis via activating Nrf2-mediated anti-oxidant signaling pathway in spontaneous hypertensive rats[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2018, 34:1073-1078.
- Ma ZG, Yuan YP, Zhang X, et al. Protective effects of geniposide on oxidative stress induced injury in H9C2 cells[J]. Chin J Diffic Compl Cas(疑难病杂志), 2017, 16:1189-1192.
- Liang B, Fang J. Protective effect of isoflurane on H9c2 cells from hypoxia-reoxygenation injury via Nrf2-ARE signaling pathway[J]. J Third Mil Med Univ(第三军医大学学报), 2016, 38:1615-1621.
- Li Y, Feng J, Xie JF. Naringenin attenuates myocardial injury by regulating AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway in diabetic mice[J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2020, 36(1):38-46.
- Department of Health of Guangxi Zhuang Autonomous Region. Standard of Guangxi traditional Chinese medicine(广西中药材标准)[M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Publishing House, 1992:31-32.
- Qin FZ, Jian J, Lin X, et al. Effect of 17-methoxy-7-hydroxybenzofuran chalcone on blood coagulation and platelet aggregation[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(13):242-245.
- Ye FX, He JH, Wu XM, et al. The regulatory mechanisms of Yulangsan MHBFC reversing cardiac remodeling in rats

- based on eNOS-NO signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: UNSP 109141.
- 9 Jian J, Li YW, Jiang WZ, et al. Effects of flavone monomer from Yulangsan on free radicals scavenging [J]. *Chin J Geront*(中国老年学杂志), 2009, 29: 2353-2354.
- 10 Wang S, Zhu YF, Qiu RX, et al. Shikonin protects H9c2 cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury through activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 712-717.
- 11 Xu XY, Yu MY, Jiang N, et al. Protective effects of swertisin on oxidative damage of PC12 cells induced by H₂O₂ [J]. *Nat Prod Res*(天然产物研究与开发), 2018, 30: 97-101.
- 12 Shen YM, Liu XJ, Shi JH, et al. Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 496-502.
- 13 Kovac S, Angelova PR, Holmstrom KM, et al. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850: 794-801.
- 14 Buendia I, Michalska P, Navarro E, et al. Nrf2-ARE pathway: an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 157: 84-104.
- 15 Xu B, Zhang J, Strom J, et al. Myocardial ischemic reperfusion induces de novo Nrf2 protein translation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842: 1638-1647.
- 16 Yu HJ, Shi LY, Zhao SJ, et al. Triptolide attenuates myocardial ischemia/reperfusion injuries in rats by inducing the activation of Nrf2/HO-1 defense pathway [J]. *Cardiovascu Toxicol*, 2016, 16: 325-335.
- 17 Das A, Gopalakrishnaan B, Voss OH, et al. Inhibition of ROS-induced apoptosis in endothelial cells by nitrone spin traps via induction of phase II enzymes and suppression of mitochondria dependent proapoptotic signaling [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84: 486-497.
- 18 Niture SK, Jaiswal AK. INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18: 439-451.
- 19 Tahir A, Taehyun K, Shafiq UR, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/ Nrf2/HO-1 Pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 6076-6093.
- 20 Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 16502-16510.
- 21 Xuan FF, Huang JC, Tang JZ, et al. 17-Methoxyl-7-hydroxylbenzofuran chalcone alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt signal pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2015, 31: 1735-1740.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵 WANG Hongbing	戈惠明 GE Huiming	尹文兵 YIN Wenbing	尹胜 YIN Sheng	吕兆林 LV Zhaolin	刘相国 LIU Xiangguo
孙昊鹏 SUN Haopeng	孙桂波 SUN Guibo	李良成 LI Liangcheng	李国友 LI Guoyou	邱莉 QIU Li	汪海波 WANG Haibo
沐万孟 MU Wanmeng	张炳火 ZHANG Binghuo	陈益华 CHEN Yihua	林昌俊 LIN Changjun	欧阳杰 OU Yangjie	易华西 YI Huaxi
罗应刚 LUO Yinggang	周文 ZHOU Wen	胡友财 HU Youcai	袁涛 YUAN Tao	夏永刚 XIA Yonggang	高慧敏 GAO Huimin
唐金山 TANG Jinshan	黄胜雄 HUANG Shengxiong	韩秀珍 HAN Xiuzhen	韩淑燕 HAN Shuyan	曾克武 ZENG Kewu	蓝蔚青 LAN Weiqing
廖晨钟 LIAO Chenzhong	薛永波 XUE Yongbo				