

文章编号 1006-8147(2023)03-0258-07

论 著

芹菜素对化学法氧糖剥夺/复氧复糖损伤大鼠心肌细胞保护作用研究

禹博¹, 祁琳², 金鑫³, 曹清文⁴, 田晨⁴, 李佳颖⁴, 王越⁴, 周建妹⁵, 陈康寅¹

(1.天津医科大学第二医院心脏科,天津市心血管病离子与分子机能重点实验室,天津心脏病学研究所,天津300211;2.武警特色医学中心药剂科,天津300162;3.武警后勤学院军事药学教研室,天津300309;4.天津中医药大学中西医结合学院,天津301617;5.浙江医院干部保健科,杭州310013)

摘要 目的:研究芹菜素(API)对化学法氧糖剥夺/复氧复糖(OGD/R)大鼠 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用及分子机制。方法:首先给予 H9c2 细胞不同浓度的氯化钴(CoCl_2)或 1% O_2 处理 24 h,通过测定细胞活力和低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达水平,确定模拟 1% O_2 的等效 CoCl_2 浓度;然后给予 H9c2 细胞 CoCl_2 或 1% O_2 处理合并无糖培养 16 h,再正常培养(复氧复糖)4 h,测定细胞活力和 HIF-1 α 的表达水平,确定 OGD/R 模型等效 CoCl_2 浓度。MTT 法测定不同浓度 API 对 OGD/R 大鼠 H9c2 细胞活力的影响;ELISA 法检测细胞 Caspase-3 含量;超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒测定细胞 SOD 和 LDH 含量;采用 Western 印迹方法检测细胞 Bcl-2、Bax、SIRT1、p62 和 LC3 II/I 表达水平。**结果:**筛选 1% O_2 的等效 CoCl_2 浓度结果显示,与对照组相比, CoCl_2 (0.8 mmol/L)组细胞活力明显降低($P<0.05$),HIF-1 α 表达明显上调($P<0.05$)且与 1% O_2 组无显著差异($P>0.05$),因此选取 CoCl_2 (0.8 mmol/L)用于 OGD/R 模型。与对照组相比,OGD/R 组的细胞活力及 SOD 含量明显下降($P<0.05$),LDH 漏出量和 Caspase-3 含量明显提高($P<0.05$),SIRT1、LC3 II/I 及 Bcl-2 表达量均明显下降(均 $P<0.05$),Bax 及 p62 的表达量明显增加($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,API(0.01~10 $\mu\text{mol/L}$)组细胞活力有显著提高($P<0.05$);10 $\mu\text{mol/L}$ API 能显著提高细胞 SOD 含量($P<0.05$),显著降低 LDH 漏出量和 Caspase-3 含量(均 $P<0.05$),明显提高 SIRT1、LC3 II/I 及 Bcl-2 的表达量(均 $P<0.05$),降低 Bax 及 p62 的表达量(均 $P<0.05$)。**结论:**0.8 mmol/L CoCl_2 合并剥糖 16 h 后恢复 4 h 可构建稳定的 H9c2 细胞 OGD/R 损伤模型,API 可通过调节 SIRT1 增强自噬以抵抗 H9c2 细胞 OGD/R 损伤和凋亡。

关键词 芹菜素;氧糖剥夺/复氧复糖;氯化钴;心肌细胞

中图分类号 R541

文献标志码 A

The protective effect of apigenin on cardiomyocytes of rats injured by chemical oxygen-glucose deprivation/restoration

YU Bo¹, QI Lin², JIN Xin³, CAO Qing-wen⁴, TIAN Chen⁴, LI Jia-ying⁴, WANG Yue⁴, ZHOU Jian-mei⁵, CHEN Kang-yin¹

(1. Department of Cardiology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory of Ionic-Molecular Function of Cardiovascular Disease, Tianjin Institute of Cardiology, Tianjin 300211, China; 2. Department of Pharmacy, Characteristic Medical Center of PAP, Tianjin 300162, China; 3. Military Medicine Section, Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China; 4. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 5. Department of Cadre Health Care, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China)

Abstract Objective: To investigate the protective effect and molecular mechanism of apigenin (API) on H9c2 cardiomyocytes of rats injured by chemical glucose-oxygen deprivation/restoration (OGD/R). **Methods:** Firstly, H9c2 cells were treated with different concentrations of cobalt chloride (CoCl_2) or 1% O_2 for 24 h. The cell viability and the expression level of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) were measured to determine the equivalent CoCl_2 concentration to simulate 1% O_2 . Then H9c2 cells were treated with CoCl_2 or 1% O_2 and cultured without glucose for 16 h, and then cultured normally (restoration) for 4 h. Cell viability and HIF-1 α expression level were measured to determine the equivalent CoCl_2 concentration of the OGD/R model. MTT assay was used to determine the effects of different concentrations of API on the viability of H9c2 cells injured by OGD/R. The content of Caspase-3 was detected by ELISA. Superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH) kits were used to determine the contents of SOD and LDH. The expression levels of Bcl-2, Bax, SIRT1, p62 and LC3 II/I were detected by Western blotting. **Results:** The results of screening the equivalent CoCl_2

基金项目 浙江省医药卫生科技计划项目(2021KY013);天津市医学重点学科(专科)建设资助项目(TJYXZDXK-029A);天津中医药大学研究生创新基金(ZXYCXLX202119);天津中医药大学研究生创新基金(ZXYCXLX202018);武警部队创新研究项目(ZZKY20222419);武警后勤学院基础研究项目(WHJ202007)

作者简介 禹博(1995-),男,硕士在读,研究方向:心血管内科介入治疗;通信作者:陈康寅,E-mail:chenkangyin@vip.126.com;周建妹,E-mail:zhou1306928@163.com。

concentration to simulate 1%O₂ showed that compared with the control group, the cell viability of CoCl₂ (0.8 mmol/L) group was significantly decreased and the HIF-1 α expression was significantly up-regulated ($P<0.05$); and there was no significant difference between 1% O₂ and the above results. Therefore, CoCl₂ (0.8 mmol/L) was selected for OGD/R model. Compared with the control group, the cell viability and SOD content of the OGD/R group were significantly decreased ($P<0.05$); LDH leakage and Caspase-3 content in the OGD/R group were significantly increased ($P<0.05$); the expressions of SIRT1, LC3 II/I and Bcl-2 in OGD/R group were significantly decreased (all $P<0.05$), the expressions of Bax and p62 were significantly increased (both $P<0.05$). Compared with the OGD/R group, the API (0.01–10 μ mol/L) group significantly increased cell viability ($P<0.05$), 10 μ mol/L API could significantly increase the SOD content of cells ($P<0.05$), decrease the LDH leakage and Caspase-3 content ($P<0.05$), increase the expression of SIRT1, LC3 II/I and Bcl-2 (all $P<0.05$) and decrease the expression of Bax and p62 (both $P<0.05$). **Conclusion:** The stable OGD/R injury model of H9c2 cells can be established by 0.8 mmol/L CoCl₂ combined with depriving glucose for 16 h and oxygen-glucose recovery for 4 h. API can protect H9c2 cells from OGD/R injury and apoptosis by regulating SIRT1 to enhance autophagy.

Key words apigenin; oxygen-glucose deprivation/restoration; cobalt chloride; cardiomyocytes

中国心血管疾病患病率处于持续上升阶段,急性心肌梗死的死亡率于2002—2018年总体呈上升趋势^[1]。急性心肌梗死后,通过溶栓或经皮冠状动脉介入治疗及早恢复心肌灌注是减少心肌梗死面积、改善临床预后最有效的方法。但恢复血供又可能造成心肌顿抑、无复流,甚至心肌损伤加重的现象,即心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI),成为再灌注疗法获益的主要障碍。MIRI主要涉及氧化应激、线粒体损伤、凋亡、自噬等机制^[2-5],目前MIRI发生机制尚不完全清楚,缺少疗效确切的预防及治疗药物^[6]。因此,进一步探讨MIRI的机制,寻找安全有效的治疗药物,仍有重要的现实意义。

芹菜素是一种广泛存在于自然界的黄酮类化合物。作为一种脂溶性还原剂,其可在治疗帕金森病、脑缺血再灌注损伤、肿瘤等多种疾病中发挥重要作用^[7-9]。研究表明,芹菜素可通过抑制p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPKs)信号通路减轻大鼠离体心肌缺血再灌注损伤,也可通过上调Janus激酶2(JAK2)-信号传导与转录激活因子3(STAT3)和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路在物理缺氧诱导的氧糖剥夺/复氧复糖(oxygen-glucose deprivation/restoration, OGD/R)损伤中发挥保护作用^[10-12]。但目前尚无关于芹菜素对MIRI中自噬作用的报道。利用化学性缺氧模拟剂氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂)构建OGD/R模型^[13],相比物理缺氧,无需专门低氧培养设备,具有操作更方便,缺氧效果稳定等特点。因此,本研究利用氯化钴建立H9c2细胞的OGD/R模型,初步探讨芹菜素对H9c2细胞OGD/R损伤的影响,并探讨其调节凋亡和自噬相关分子机制,为进一步研究芹菜素抗MIRI提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 大鼠H9c2心肌细胞(购自中国科学院细胞库);胎牛血清、DMEM高糖培养基和0.25%胰蛋白酶(Gibco, Waltham, MA);DMEM无糖培养基、PBS缓冲液、CoCl₂粉剂、MTT、PMSF抑制蛋白降解液和二抗(北京索莱宝科技有限公司);芹菜素(上海源叶生物科技有限公司);RIPA裂解液(康为世纪生物科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司);5 \times 蛋白上样缓冲液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);PVDF膜(密理博科技有限公司);HIF-1 α 抗体、 β -actin抗体及超敏ECL发光液(Affinity Biosciences公司);SIRT-1、p62、LC3A/B、Bax、Bcl-2抗体(ABclonal公司);LDH测定试剂盒、SOD测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);Caspase-3 ELISA检测试剂盒(伊特生命科学研发有限公司)。

1.2 细胞培养及分组 处理大鼠H9c2心肌细胞在含有10%FBS、100 U/mL青霉素/100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养,实验使用的细胞均处于对数生长期。实验分3部分:(1)模拟1%低氧等效CoCl₂浓度确定实验:分为①对照组;②1%O₂组;③CoCl₂(0.1~1.2 mmol/L)组。1%O₂组是将细胞在三气培养箱(1% O₂、5% CO₂、94% N₂)中用含1%FBS的DMEM高糖培养基培养24 h,CoCl₂组是用不同浓度CoCl₂处理并在含1%FBS的DMEM高糖培养基培养24 h。(2)模拟1%O₂ OGD/R模型等效CoCl₂浓度确定实验:分为①对照组;②1%O₂组;③CoCl₂(0.6和0.8 mmol/L)组。根据第一部分实验结果确定的CoCl₂浓度处理细胞,1%O₂组是将细胞置于三气培养箱中用含1%FBS的DMEM无糖培养基培养16 h后,置于正常条件(复氧复糖)培养4 h;CoCl₂组将细胞用0.6和

0.8 mmol/L CoCl_2 处理并在含 1%FBS 的 DMEM 无糖培养基培养 16 h 后,置于正常条件培养 4 h。(3) 芹菜素对 H9c2 细胞 OGD/R 作用的影响:①对照组;②OGD/R 组(CoCl_2 浓度为 0.8 mmol/L);③OGD/R+芹菜素组。不同浓度芹菜素预处理 24 h。

1.3 细胞活力测定 将 H9c2 细胞根据实验分组以 8×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板,培养 24 h 后用含 1%FBS 的 DMEM 高糖培养基同步化 24 h,然后根据实验分组处理细胞。结束培养前 4 h,弃去上清,避光加入 100 μL /孔 MTT(0.5 mg/mL,PBS 配制),作用 4 h 后弃上清,加入 100 μL /孔 DMSO,充分震荡,492 nm 处测定每孔吸光度值。细胞活力计算公式:细胞活力(%)=(实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。每组设 5 个复孔。

1.4 蛋白提取和 Western 印迹 按照实验分组,将 H9c2 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 后用含 1%FBS 的 DMEM 高糖培养基同步化 24 h,然后根据实验分组处理细胞。弃去培养液,用 PBS 清洗细胞 2 遍,每孔加入适量含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液提取蛋白并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后,以每泳道 20 μg 的蛋白上样量用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳、转膜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,使用 5%脱脂牛奶阻断非特异性蛋白结合,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育一抗(1:500 稀释)过夜。次日,吸出一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,HRP 结合二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后,ECL 化学发光试剂盒显色,采用 Image J 软件对蛋白条带的光密度值进行分析。

1.5 细胞 caspase-3 含量测定 将 H9c2 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,依据实验分组处理细胞并收集细胞,在细胞沉淀中加入约 0.4 mL 的 PBS,混匀,在冰水浴中进行超声破碎细胞,使细胞内蛋白充分释放,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心 10 min 得到样品,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。设置空白孔、标准品孔及样本孔,根据 ELISA 试剂盒操作说明加入试剂及待检样本,覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h;洗涤,加入底物,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min;加入终止液,在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值,绘制标准曲线,并计算细胞的 caspase-3 浓度。

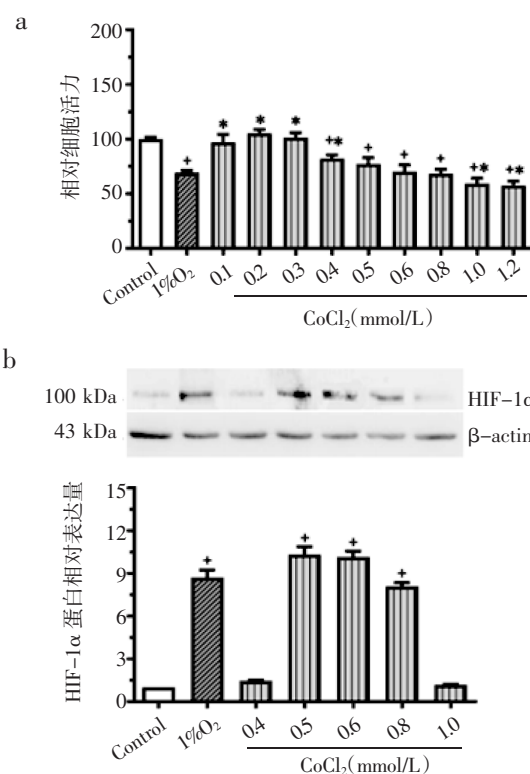
1.6 细胞 SOD 含量测定 细胞分组和处理同 1.5,设置对照孔、对照空白孔、样品孔及样品空白孔,根据 SOD 试剂盒操作说明书加入相关试剂,混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值,根据说明书计算 SOD 含量。

1.7 细胞外液 LDH 水平测定 将 H9c2 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,依据实验分组处理细胞后收集各自的培养液上清。设置空白孔、标准孔、测定孔及对照孔,根据 LDH 试剂盒说明书加入相关试剂并依次 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育后加入终止液后,在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值,根据说明书计算 LDH 漏出量。

1.8 统计学处理 应用 Graph Pad Prism 9.0 软件进行数据处理及作图,计量资料中符合正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组内两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模拟 1% O_2 的等效 CoCl_2 浓度 结果图 1a 所示,与对照组相比,1% O_2 及 CoCl_2 (0.4~1.2 mmol/L)组细胞活力均明显降低($P < 0.05$);与 1% O_2 组相比, CoCl_2 (0.5~0.8 mmol/L)组细胞活力降低程度无统计学差异($P > 0.05$)。图 1b 所示,与对照组相比,1% O_2 及 CoCl_2 (0.5~0.8 mmol/L)组 HIF-1 α 表达均明显上调($P < 0.05$),且与 1% O_2 组相比无显著差异($P > 0.05$)。因此选取 0.6 mmol/L 和 0.8 mmol/L CoCl_2 用于 OGD/R 模型构建筛选。

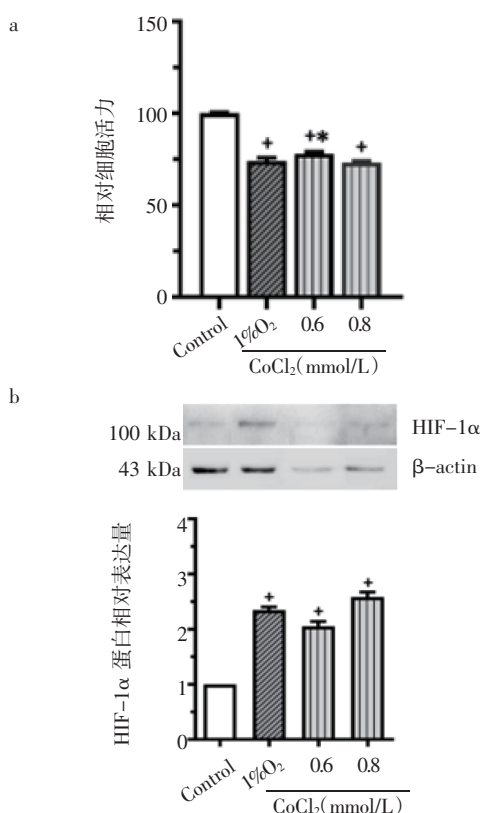


注:Control:对照组;与对照组相比,* $P < 0.05$;与 1% O_2 组相比,** $P < 0.05$

图1 不同浓度 CoCl_2 对 H9c2 细胞活力和 HIF-1 α 表达的影响

Fig 1 The effects of 1% O_2 and CoCl_2 of different concentrations on the viability and expression of HIF-1 α in H9c2 cells

2.2 模拟 1%O₂ OGD/R 模型等效 CoCl₂ 浓度 结果图 2a 所示,与对照组相比,1%O₂ 及 CoCl₂(0.6、0.8 mmol/L)组细胞活力明显降低($P<0.05$)。与 1%O₂ 组相比,0.8 mmol/L CoCl₂ 组细胞活力降低没有统计学意义($P>0.05$)。图 2b 所示,与对照组相比,1%O₂ 及 CoCl₂(0.6、0.8 mmol/L)组 HIF-1 α 表达均明显上调($P<0.05$),且与 1%O₂ 组相比无显著差异($P>0.05$)。因此选取 CoCl₂(0.8 mmol/L)用于后续 OGD/R 模型及检测实验。

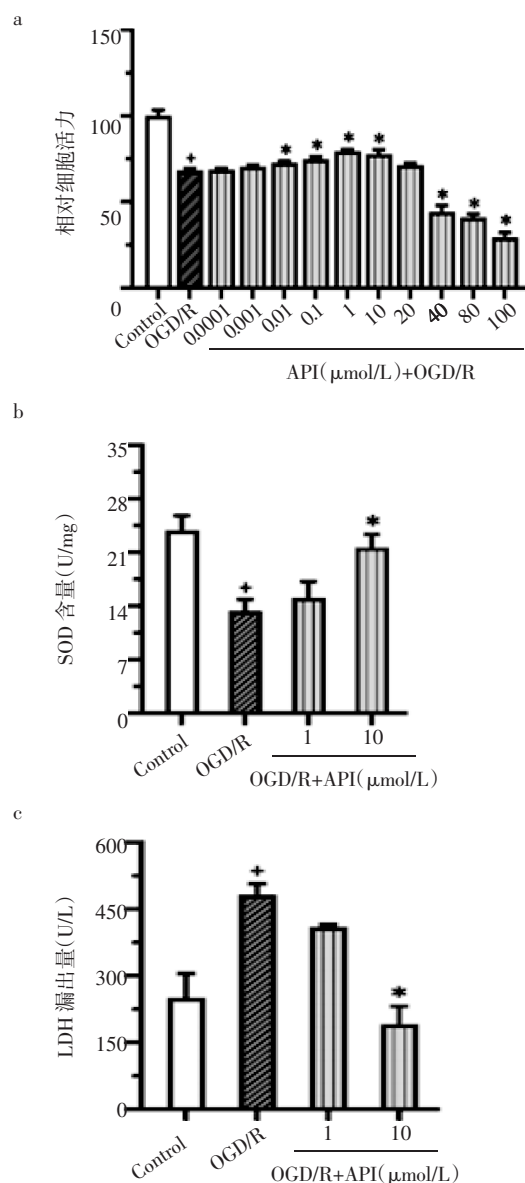


注: Control: 对照组; 与对照组相比, * $P<0.05$; 与 1%O₂ 组相比, * $P<0.05$

图2 OGD/R 条件下不同浓度 CoCl₂ 对 H9c2 细胞活力及 HIF-1 α 表达的影响

Fig 2 The effect of 1% O₂ and CoCl₂ of different concentrations on the viability and expression of HIF-1 α of H9c2 cells under the condition of OGD/R

2.3 OGD/R 条件下芹菜素对 H9c2 细胞活力、SOD 及 LDH 的影响 图 3a 所示,与对照组相比,OGD/R 组的细胞活力均受到明显抑制($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,芹菜素(0.01~10 μ mol/L)组细胞活力有显著差异($P<0.05$);图 3b 所示,与对照组相比,OGD/R 组的 SOD 含量明显下降($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,10 μ mol/L 芹菜素组 SOD 含量显著提高($P<0.05$);图 3c 所示,与对照组相比,OGD/R 组的 LDH 漏出量明显提高($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,10 μ mol/L 芹菜素组 LDH 漏出量显著下降($P<0.05$)。



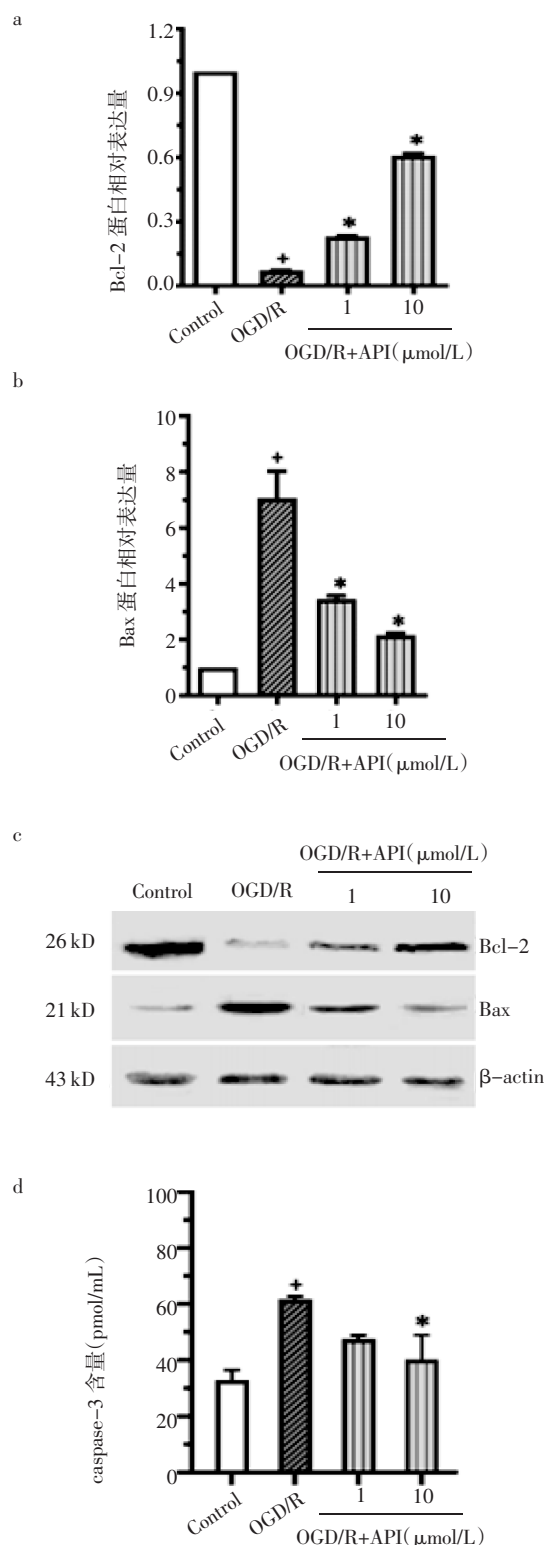
注: Control: 对照组; 与对照组相比, * $P<0.05$; 与 1%O₂ 组相比, * $P<0.05$

图3 OGD/R 条件下芹菜素对 H9c2 细胞活力、SOD 及 LDH 的影响

Fig 3 The effects of API on the viability, SOD and LDH of H9c2 cells under the condition of OGD/R

2.4 芹菜素对 OGD/R H9c2 细胞凋亡相关指标的影响 图 4a、b、c 所示,与对照组相比,OGD/R 组 Bcl-2 表达量明显下降($P<0.05$),Bax 的表达量明显增加($P<0.05$);10 μ mol/L 芹菜素可显著提高 Bcl-2 的表达量($P<0.05$),降低 Bax 的表达量($P<0.05$);图 4d 所示,与对照组相比,OGD/R 组的 caspase-3 含量明显增加($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,10 μ mol/L 芹菜素组的 caspase-3 含量明显下降($P<0.05$)。

2.5 芹菜素对 H9c2 细胞 OGD/R 损伤 SIRT1 及自噬相关蛋白表达的影响 图 5 所示,与对照组相比,OGD/R 组 SIRT1 及 LC3 II/I 表达量明显下降($P<0.05$),p62 的表达量明显增加($P<0.05$);10 μ mol/L 芹菜素

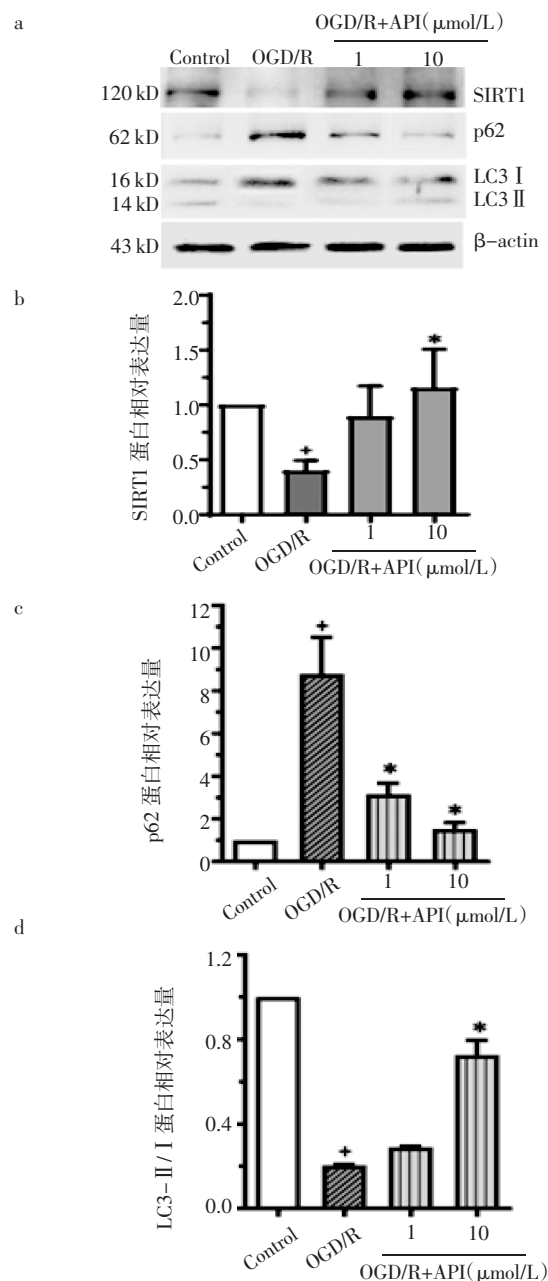


注:Control:对照组;与对照组相比,* $P<0.05$;与 1% O_2 组相比,* $P<0.05$ 。

图 4 OGD/R 条件下芹菜素对 H9c2 细胞凋亡相关指标的影响

Fig 4 The effects of API on the apoptosis-related indexes of H9c2 cells under the condition of OGD/R

可显著提高 SIRT1 及 LC3 II/I 的表达量($P<0.05$),降低 p62 的表达量($P<0.05$)。



注:Control:对照组;与对照组相比,* $P<0.05$;与 1% O_2 组相比,* $P<0.05$

图 5 OGD/R 条件下芹菜素对 H9c2 细胞 SIRT1 及自噬相关指标的影响

Fig 5 The effects of API on the SIRT1 and autophagy-related indexes of H9c2 cells under the condition of OGD/R

3 讨论

MIRI 是由多种细胞因子和信号通路参与的复杂病理过程,对心血管病患者的治疗和预后造成了严重影响。因此,MIRI 机制的研究一直是心血管领域的热点。如何减轻 MIRI 对改善心肌梗死患者预后具有重要意义。OGD/R 诱导的 H9c2 细胞损伤是经典的体外心肌细胞损伤模型,常用于心肌梗死和 MIRI 的药物筛选和机制研究。根据缺氧方式不同,可分为物理缺氧和化学缺氧。物理缺氧存在设备复杂昂贵,模型稳定性差,缺氧程度难以控制的缺点,而化学缺氧则可

以有效避免上述缺点且操作简便易行。 CoCl_2 通过钴离子代替HIF的脯氨酰羟化酶活性位点中的 Fe^{2+} ,能在体外诱导细胞产生缺氧损伤^[14-15],因此 CoCl_2 常用于化学缺氧损伤模型。HIF-1 α 是由缺氧刺激产生的重要转录因子,在缺氧诱导的哺乳动物细胞中广泛表达,为缺氧应答的全局性调控因子,与氧化应激密切相关^[16]。故本研究以H9c2细胞为实验对象,采用细胞活力和HIF-1 α 相结合作为评价指标,比较1% O_2 和 CoCl_2 建立的缺氧和OGD/R损伤效果,构建简便易行且稳定的H9c2细胞化学OGD/R模型。结果显示,0.8 mmol/L CoCl_2 联合剥糖作用16 h,复氧复糖4 h的方案与此条件下1% O_2 造成的损伤相近,可作为H9c2细胞稳定的OGD/R损伤模型。

本研究通过MTT实验阐明了芹菜素对OGD/R H9c2细胞活力的影响。结果显示,低浓度的芹菜素(0.000 1、0.001 $\mu\text{mol/L}$)对OGD/R H9c2细胞没有作用;中等浓度的芹菜素(0.01~10 $\mu\text{mol/L}$)对OGD/R H9c2细胞有保护作用;而高浓度的芹菜素(40~100 $\mu\text{mol/L}$)对OGD/R H9c2细胞有明显毒性作用,故接下来的研究选用1、10 $\mu\text{mol/L}$ 的芹菜素进行实验。OGD/R会造成心肌细胞氧化应激损伤,SOD和LDH是氧化应激损伤的重要标志物^[17]。SOD与氧自由基的清除能力密切相关,检测SOD水平可反映氧自由基攻击引起的细胞脂膜损伤的严重程度。LDH作为一种催化酶,主要参与丙酮酸和乳酸的转化,当细胞膜损伤时其可释放到细胞外基质,检测LDH水平可反映细胞膜完整性及细胞损伤程度。本研究显示芹菜素可提高OGD/R所致的细胞SOD降低,可减少OGD/R所致的LDH漏出,提示芹菜素可以保护OGD/R导致的细胞氧化应激损伤。

心肌细胞凋亡是MIRI的主要致病机制之一,心肌细胞是永久细胞,凋亡会导致心肌收缩功能障碍,阻断凋亡过程可防止心肌细胞的丢失,减少心脏损伤。Bcl-2家族是重要的细胞凋亡调控蛋白,而其中的Bcl-2(抑制凋亡蛋白)和Bax(促进凋亡蛋白)发挥着关键作用,两者可以结合,形成二聚结合体,调节线粒体的稳定状态,进而调控细胞凋亡^[18]。Caspase-3是细胞凋亡的主要执行者,可引起DNA降解、细胞核碎裂,最终导致细胞凋亡的发生^[19]。本研究发现,芹菜素可提高OGD/R所致的Bcl-2降低,减少OGD/R所致的细胞Bax和Caspase-3增加,提示芹菜素可以减少OGD/R导致的细胞凋亡。

自噬是一种复杂保守的自我降解过程,对维持细胞内稳态至关重要。自噬在心脏疾病中的作用取决于特定的病理情况和发病阶段,适度的自噬有助

于保持心脏健康,而自噬不足或过度则对心脏造成损伤^[20-21]。LC3是自噬的标志物,其中存在LC3-I、LC3-II两种形式,泛素样作用下的LC3-I与膜结构上的磷脂共价结合,形成LC3-II存在于自噬体的内外膜上,所以LC3-II/I的比值可反映自噬水平^[22]。p62是选择性自噬接头蛋白,是连接LC3与待降解泛素化底物的重要桥梁。作为自噬待降解的产物,自噬流受阻时大量泛素化蛋白会堆积到细胞内,此时p62表达水平会升高;而在自噬流活化状态下,p62被降解,表达水平降低^[23]。因此,LC3-II/LC3-I及p62表达水平能可评价细胞自噬流水平。Liu等^[24]通过动物实验证实,盐诱导蛋白2可能通过mTOR/ULK1信号通路促进自噬,抑制该蛋白可通过减少异常自噬减轻心肌MIRI。而Li等^[25]通过动物和细胞实验证实促进自噬通量可抑制MIRI诱导的细胞凋亡。这说明自噬在MIRI中的两面性。SIRT1是sirtuins蛋白家族的一员,主要位于常染色体区域,可在细胞核和细胞质中穿梭调节,其通过催化组蛋白和转录因子的赖氨酸去乙酰化修饰,从而影响细胞增殖、衰老与代谢等生理活动^[26]。SIRT1通过其脱乙酰酶活性参与自噬从起始到降解的不同步骤的调节。当然,SIRT1的水平和功能也受自噬过程的调节^[27]。Zhang等^[28]发现去甲肾上腺素抑制剂可在心肌缺血再灌注损伤小鼠中发挥保护作用,其机制与SIRT1对自噬小体的清除密切相关。Zhong等^[29]研究表明SIRT1可通过减少炎症和诱导自噬发挥抗心肌缺血损伤的作用。Wang等^[30]利用H9c2细胞证实,SIRT1可通过促进自噬抑制心肌肥厚。本研究显示,OGD/R条件下,SIRT1和LC3-II/I明显降低,p62蛋白表达明显上调,提示自噬水平降低。芹菜素可一定程度逆转上述自噬通量的变化,表明芹菜素增强了OGD/R H9c2的自噬水平,该过程可能与SIRT1的作用有关。

综上所述,自噬、氧化应激和凋亡之间存在复杂的相互作用关系。氧化应激可以激活自噬,也可促进凋亡^[31-32]。自噬可以通过清除受损的线粒体,降低活性氧,减轻细胞氧化应激损伤,进而减少细胞的凋亡^[33]。本研究结果显示,芹菜素能提高H9c2细胞OGD/R模型的细胞活力,减少细胞凋亡,具有明显抑制氧化应激损伤的作用,可能与其通过调控SIRT1促进细胞自噬有关,但它们之间的相互关系及深入机制,仍需要进一步实验加以验证。

参考文献:

- [1] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告2021》要点解读[J].中国全科医学,2022,25(27):3331-3346.

- [2] FRYDRYCHOWSKI P, MICHAŁEK M, BIL-LULA I, et al. Cardio-protective effect of acetylsalicylic acid in the myocardial ischemia-reperfusion model on oxidative stress markers levels in heart muscle and serum[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(8): 1432.
- [3] MILJKOVIC J L, BURGER N, GAWEL J M, et al. Rapid and selective generation of H₂S within mitochondria protects against cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. *Redox Biol*, 2022, 55: 102429.
- [4] LIU C, LI Y. Propofol relieves inflammation in MIRI rats by inhibiting Rho/Rock signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2): 976-984.
- [5] YU Y W, LIU S, ZHOU Y Y, et al. Shexiang Baixin Pill attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by activating autophagy via modulating the ceRNA-Map3k8 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154336.
- [6] WANG K, LI Y, QIANG T, et al. Role of epigenetic regulation in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105743.
- [7] PATEL M, SINGH S. Apigenin attenuates functional and structural alterations via targeting NF- κ B/Nrf2 signaling pathway in LPS-induced parkinsonism in experimental rats; apigenin attenuates LPS-induced parkinsonism in experimental rats[J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(4): 941-960.
- [8] LING C, LEI C, ZOU M, et al. Neuroprotective effect of apigenin against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(9): 300060520945859.
- [9] CHEN Y H, WU J X, YANG S F, et al. Anticancer effects and molecular mechanisms of apigenin in cervical cancer cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1824.
- [10] HU J, LI Z, XU L T, et al. Protective effect of apigenin on ischemia/reperfusion injury of the isolated rat heart[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2015, 15(3): 241-249.
- [11] WANG P, SUN J, LV S, et al. Apigenin alleviates myocardial reperfusion injury in rats by downregulating miR-15b[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2764-2776.
- [12] ZHOU Z, ZHANG Y, LIN L, et al. Apigenin suppresses the apoptosis of H9C2 rat cardiomyocytes subjected to myocardial ischemia-reperfusion injury via upregulation of the PI3K/Akt pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 8(2): 1560-1570.
- [13] LIU X, BAI H, WU X, et al. Recombinant adiponectin inhibits the expression of inflammation-associated proteins from mouse astrocytes via AMPK-independent PKC pathway[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2020, 36(7): 596-602.
- [14] KNYAZEVA E N, PAUL S Y, TONEVITSKY A G. Chemical induction of trophoblast hypoxia by cobalt chloride leads to increased expression of DDIT3[J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2021, 499(1): 251-256.
- [15] LI S, JIANG J, FANG J, et al. Naringin protects H9C2 cardiomyocytes from chemical hypoxia-induced injury by promoting the autophagic flux via the activation of the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(6): 102.
- [16] HOU T, MA H, WANG H, et al. Sevoflurane preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation injury of H9c2 cardiomyocytes by activation of the HIF-1/PDK-1 pathway[J]. *Peer J*, 2020, 8: e10603.
- [17] YANG Y, ZHAO F, YUAN Z, et al. Inhibition of miR-218-5p reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in a Sprague-Dawley rat model by reducing oxidative stress and inflammation through MEF2C/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 108299.
- [18] FLORES-ROMERO H, HOHORST L, JOHN M, et al. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis[J]. *EMBO J*, 2022, 41(2): e108690.
- [19] UNNISA A, GREIG N H, KAMAL M A. Inhibition of caspase 3 and caspase 9 mediated apoptosis: a multimodal therapeutic target in traumatic brain injury[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(4): 1001-1012.
- [20] ZHONG Z, LUO X Y, XIANG P, et al. MRTF-A alleviates myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting the inflammatory response and inducing autophagy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(2): 343-359.
- [21] HUANG G, LU X, ZHOU H, et al. PCSK9 inhibition protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via suppressing autophagy[J]. *Microvasc Res*, 2022, 142: 104371.
- [22] KLIONSKY D J, CUERVO A M, SEGLEN P O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human[J]. *Autophagy*, 2007, 3(3): 181-206.
- [23] 吕晓希, 胡卓伟. 自噬流的检测方法[J]. *药学报*, 2016, 51(1): 45-51.
- [24] LIU X, XU L, WU J, et al. Down-regulation of SIK2 expression alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting autophagy through the mTOR-ULK1 signaling pathway[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2022, 42(7): 1082-1088.
- [25] LI L, LIN L, LEI S, et al. Maslinic acid inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury-induced apoptosis and necroptosis via promoting autophagic flux[J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(5): 487-497.
- [26] HATTORI Y, IHARA M. SIRT1 [J]. *Nihon Rinsho*, 2016, 74(4): 589-594.
- [27] KIM J Y, MONDACA-RUFF D, SINGH S, et al. SIRT1 and autophagy: implications in endocrine disorders [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 930919.
- [28] ZHANG J, CUI J, ZHAO F, et al. Cardioprotective effect of MLN4924 on ameliorating autophagic flux impairment in myocardial ischemia-reperfusion injury by Sirt1 [J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102114.
- [29] ZHONG Z, LUO X Y, XIANG P, et al. MRTF-A alleviates myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting the inflammatory response and inducing autophagy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(2): 343-359.
- [30] WANG W, WANG L, YANG M, et al. Circ-SIRT1 inhibits cardiac hypertrophy via activating SIRT1 to promote autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1069.
- [31] WANG Y T, CHEN G C. Regulation of oxidative stress-induced autophagy by ATG9A ubiquitination[J]. *Autophagy*, 2022, 18(8): 2008-2010.
- [32] MENG M, JIA R, WEI M, et al. Oxidative stress activates Ryr2-Ca²⁺ and apoptosis to promote PM_{2.5}-induced heart injury of hyperlipidemia mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 232: 113228.
- [33] LI T T, GUO Y J, REN J, et al. Danggui buxue decoction improves heart function of chronic intermittent hypoxia mice by promoting mitochondrial autophagy and inhibiting cardiomyocyte apoptosis [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2022, 47(11): 3066-3072.