

花旗松素通过激活 Nrf2/HO-1/HIF1 α /Autophagy 信号通路对 H₂O₂ 所致 H9C2 细胞氧化应激保护作用的研究

苏其利^{1a}, 王晓莉², 谭小华^{1b}, 陆亚朋^{1a}, 旷寿金^{1a}, 蔡 骞^{1a*}, 赵明一^{1a*}

(1. 中南大学 a. 湘雅三医院 儿科; b. 基础医学院 形态学实验室, 中国湖南 长沙 410013; 2. 湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 氧化应激(oxidative stress, OS)是缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)的主要发病机制之一, 抗氧化应激损伤是防治缺血性心肌病的关键。为了探讨花旗松素(taxifolin, tax)对过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)诱导的大鼠心肌细胞 H9C2 氧化应激的影响及其可能的分子机制, 将培养的 H9C2 心肌细胞随机分为对照组(Control)、氧化应激组(H₂O₂)、tax 预处理组(tax+H₂O₂)、tax 单独处理组(tax)。通过观察细胞形态的改变, 检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的生成、自噬体自噬泡的形成, 以及自噬(autophagy)相关蛋白质 LC3 I/II、p62 的表达, 验证 tax 对氧化应激及自噬的影响。同时, 通过检测 Nrf2、HO-1、HIF1 α 的表达, 研究可能存在的分子机制。研究发现 tax 可缓解 H₂O₂ 诱导的 H9C2 细胞氧化应激, 表现为细胞肥大形态缓解、ROS 生成降低、MDA 产生减少, 而且 Nrf2/HO-1/HIF1 α 蛋白的表达升高, 自噬水平升高。实验结果表明: tax 可能通过激活 Nrf2/HO-1/HIF1 α /Autophagy 信号通路促进自噬及抗氧化应激, 从而发挥心肌保护作用。

关键词: 花旗松素(tax); 缺血性心肌病(ICM); H9C2 心肌细胞; 氧化应激(OS); H₂O₂ 氧化损伤; Nrf2/HO-1/HIF1 α /Autophagy 信号通路

中图分类号: Q291, R331.3+1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2017)03-0233-06

Taxifolin Protects H₂O₂-induced Myocardial Oxidative Stress via Activation of Nrf2/HO-1/HIF1 α /Autophagy Pathway in H9C2 Cells

SU Qi-li^{1a}, WANG Xiao-li², TAN Xiao-hua^{1b}, LU Ya-peng^{1a}, KUANG Shou-jin^{1a}, CAI Qian^{1a*}, ZHAO Ming-yi^{1a*}

(1. a. Department of Pediatrics, the Third Xiangya Hospital; b. Morphological Laboratory, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Oxidative stress is one of the main pathogenesis of ischemic cardiomyopathy (ICM), and antioxidant is an important prevention strategy. In order to investigate the effects and mechanisms of taxifolin (tax) on the H₂O₂ induced oxidative stress, H9C2 cells were pretreated with/without tax (100 μ mol/mL) for 6 h, and then exposed to hypoxia in the presence/absence of 200 μ mol/mL H₂O₂ for the next 12 h. Oxidative stress level and autophagy phenomenon were evaluated by planar morphology, intracellular reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) generation, autophagosome and phagophore formation, and autophagy related proteins p62 and LC3 I/II expression levels. In order to reveal the possible molecular mechanisms, the expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2), hemeoxygenase-1 (HO-1), hypoxia-inducible fac-

收稿日期: 2017-01-06; 修回日期: 2017-02-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81500231); 中南大学湘雅三医院“新湘雅人才工程”(JY201524); 湖南省卫生计生委科研计划课题(B2016124)

作者简介: 苏其利(1990-), 女, 湖南娄底人, 硕士研究生, E-mail: suqili@foxmail.com; * 通讯作者: 赵明一(1983-), 女, 河北霸州人, 博士, 助理研究员, 主要从事心血管病研究, Tel: 0731-86188205, E-mail: 36163773@qq.com; 蔡骞(1979-), 女, 湖南南县人, 硕士, 主管护师, 主要从事临床护理研究, Tel: 0731-88618805, E-mail: 23909648@qq.com。

tor 1 α (HIF1 α) were analyzed. The results showed that H₂O₂-induced H9C2 myocardial hypertrophy was inhibited by tax. At the same time, ROS and MDA productions were attenuated, Nrf2, HO-1 and HIF1 α expressions were upregulated, and autophagy was promoted. In conclusion, the data suggests tax protects H9C2 cells from H₂O₂ induced oxidative stress via activation of Nrf2/HO-1/HIF1 α /Autophagy pathway.

Key words: taxifolin (tax); ischemic cardiomyopathy (ICM); H9C2 cells; oxidative stress (OS); H₂O₂-induced oxidative stress; Nrf2/HO-1/HIF1 α /Autophagy pathway

(*Life Science Research*, 2017, 21(3): 233~238)

1970 年, Burch 等^[1]首次将由冠心病心肌缺血引起的心肌功能失常命名为缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)。ICM 是西方国家最为常见的严重疾病,在我国亦日益增多,约 11%~45%的 ICM 最终发展为明显的心力衰竭^[2]。目前有研究表明,氧化应激(oxidative stress, OS)及自噬(autophagy)与 ICM 的发生发展密切相关^[3,4],但其具体发病机制未完全明确。

在生命活动的氧化代谢过程中,有机体会不断地产生各种氧自由基(oxygen free radical, OFR)。生理情况下,机体产生的自由基在抗炎和抑制肿瘤等方面有重要意义。但是,在病理性心肌缺血缺氧条件下,体内 OFR 的产生过度或清除减少,将造成体内活性氧类生成与抗氧化防御之间的平衡紊乱,即氧化应激。氧化应激可致脂质过氧化,破坏细胞膜,损伤细胞结构;同时可氧化蛋白质,使酶的功能受损;而且亦可使核酸发生碱基修饰及链的断裂,造成染色体破坏,引起细胞功能障碍,继而导致 ICM 的发生和发展^[5]。自噬是细胞受到刺激后,通过溶酶体途径降解细胞内物质的统称,是近年来逐渐被认识的细胞除坏死和凋亡外的第 3 种死亡方式。通常情况下,自噬在多数细胞内都处于一个相当低的水平。但是当细胞受到外界因素刺激(如营养物质或氧缺乏、高温、毒物或药物损害),或遇到自身代谢性问题及退行性病变时,则会增强自噬。适当的自噬可以通过营养物质再利用促进细胞生存,而过度的自噬则会引起自噬性细胞死亡^[4]。

花旗松素(taxifolin, tax)是从黄杉属绿枞中提取的一种二氢槲皮素,属于黄酮类中草药。相关研究表明, tax 有抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤、抑制细胞凋亡等作用^[6-8]。在糖尿病心肌病心肌细胞中, tax 可通过下调胱天蛋白酶 3/9 (caspase 3/9),上调 Bcl-2/Bcl-xl, 恢复线粒体跨膜电位及渗透性,抑制氧化应激所致线粒体凋亡途径;同时可通过调节 JAK2 的表达抑制 NADPH 氧化酶的激活,

减少 ROS 的生成,从而抗氧化应激,发挥心肌保护作用^[9]。但其在 ICM 中的作用及机制并不明确。基于此,本实验使用过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)处理 H9C2 心肌细胞建立氧化应激模型,探讨 tax 对氧化应激心肌细胞的作用及其可能的分子机制,以期为临床诊治提供新的策略。

1 材料与方 法

1.1 实验对象

大鼠心肌细胞 H9C2 由湖南师范大学生命科学学院心脏发育研究中心馈赠。

1.2 实验仪器与主要试剂

细胞培养箱(德国百瑞公司),光学显微镜、Olympus BH-2 倒置显微镜、生物光学显微镜照相机(日本 Olympus 公司),多功能酶标仪(美国 MD 公司),蛋白质电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),转膜仪(美国 BD 公司),凝胶扫描成像系统(美国 Eastman Kodak 公司)。

DMEM 培养基(16000-044, 美国 Gibco 公司); 10%的胎牛血清(0510, 美国 ScienCell 公司); tax (YM-zm10725, 上海远慕生物科技有限公司); ROS 荧光染色试剂盒(C1048, 上海碧云天生物技术有限公司); MDA 试剂盒(A003-4, 南京建成生物工程研究所); 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液、BCA 蛋白定量试剂盒、显影液和定影液(武汉博士德生物工程有限公司); 抗体 Nrf2 (16842-1-AP)、HO-1 (10701-1-AP)、LC3 I/II (14600-1-AP)、p62 (18420-1-AP)、HIF1 α (20960-1-AP)以及 HRP 标记山羊抗兔二抗(60008-1-Ig)均购自美国 Proteintech 公司; 逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)。qRT-PCR 引物设计与合成委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 H9C2 细胞培养与处理

H9C2 细胞用 DMEM 完全培养基(含 10%的 FBS)培养,培养条件为 37 °C、5% CO₂。随机分为

正常对照组(Control, 培养基中加入 0.1% DMSO); 氧化应激组(H₂O₂, 培养基中加入 200 μ mol/mL H₂O₂ 处理 12 h); tax 预处理组(tax+H₂O₂, 先加入 100 μ mol/mL tax 处理 6 h, 换液后 200 μ mol/mL H₂O₂ 处理 12 h); tax 单独处理组(tax, 培养基中加入 100 μ mol/mL tax 处理 6 h)。Tax 溶于 DMSO, 配制成浓度为 100 μ mol/mL 的储备液, 于 4 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

1.3.2 光学显微镜观察

取对数生长的 H9C2 心肌细胞接种于 6 孔板培养 24 h, 药物处理后, 置于光学显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 ROS 荧光染色

取对数生长的 H9C2 心肌细胞接种于 6 孔板培养 24 h, 药物处理后, 加入 ROS 荧光染色试剂, 避光孵育 15 min 后荧光显微镜下观察拍照。

1.3.4 分光光度计检测

取 Control 组、H₂O₂ 组、tax 预处理组细胞的培养基, 按照 MDA 试剂盒说明进行加样, 用混匀器充分混匀, 沸水浴 40 min, 取出冷却, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于 1 cm 光径比色杯中, 于波长 532 nm 处, 蒸馏调零, 测各管 OD 值。

1.3.5 电镜观察

将培养的 Control 组和 tax 单独处理组 H9C2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化后, 离心收集; 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定细胞 2 h; 1% 锇酸固定 15 min 后丙酮梯度脱水; Epon812 包埋。切成半薄切片, 甲苯氨蓝染色后观察。选取所需要的部位, 用醋酸钠、柠檬酸铅双重染色, 透射电镜下观察拍照。

1.3.6 Western-blot 检测

将培养的 Control 组和 tax 单独处理组 H9C2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化后, 离心收集, RIPA 裂解蛋白质, BCA 法定量。以每个样品总蛋白质为 50~100 μ g 计算各个样品所需取样量, 并与 5 \times loading buffer 混匀, 沸水煮 5 min, 放入冰盒中速冷。根据蛋白质定量的结果, 第一孔加入 marker, 其他每孔上样 20 μ L 已变性蛋白质, 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳, 样品在积层胶的参数为恒压 80 V、30 min, 在分离胶的参数为恒压 120 V、1.5 h。切取含有目标蛋白的胶转膜 15 min, 5% 脱脂牛奶封闭 30 min, 加适量一抗 Nrf2 (1 : 500)、HO-1 (1 : 500)、LC3 I/II (1 : 500)、p62 (1 : 500)、HIF1 α (1 : 500), 4 $^{\circ}$ C 震荡过夜, 孵育结束后 1 \times TB-

ST 洗涤 3 次, 每次 15 min。孵育二抗(1 : 2 000) 2 h, 孵育结束后 1 \times TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min。采用 ECL 化学发光液发光, 在凝胶成像系统中观察、拍照, 并用 Quantity One 专业灰度分析软件进行分析。

1.3.7 qRT-PCR 分析

采用 Trizol 法提取各组细胞的 mRNA, 用反转录试剂盒将其反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法检测各组中 Nrf2、HO-1 mRNA 的表达情况, 引物设计如表 1。反应结束后, 根据熔解曲线确定反应是否为特异性扩增, 并通过 Roto-Gene 6.0 软件以 β -actin 为内参进行分析。实验均至少重复 3 次。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR analysis

Primer	Sequence
Nrf2	F: 5'-TCCTCTGCTGCCATTAGTCA-3' R: 5'-GTGCCTTCAGTGTGCTTCT-3'
HO-1	F: 5'-TCTGGAATGGAAGGAGATGC-3' R: 5'-AGTTCTGGGGCTCTGTTGC-3'
β -actin	F: 5'-CATCCTGCCGTCTGGACCTGG-3' R: 5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3'

1.3.8 统计分析

实验每组重复 3 次, 所有结果均采用 Graph-Pad Prism 5.0 软件进行分析, 统计结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间均数的比较运用方差分析, 两组间均数比较运用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 Tax 对细胞形态的影响

细胞肥大是心肌缺血氧化应激的早期表现^[10]。在本实验中, 各试剂处理后, 光镜观察结果显示: 相比于正常对照组细胞, H₂O₂ 处理后细胞形态由梭形变为圆形或不规则形, 且细胞肥大, 而 tax 预处理后可缓解细胞的形态改变, 这表明 H₂O₂ 处理后 H9C2 细胞呈现出氧化应激表型, 而 tax 的预处理可改善 H₂O₂ 所致氧化应激产生的心肌形态改变(图 1A)。

2.2 Tax 对细胞内氧化应激的影响

氧化应激过程中线粒体内 ROS 的生成增多, 这是缺氧所致心肌损害的主要机制之一^[3], 为进一步验证 tax 是否通过抑制线粒体内 ROS 的产生从而发挥抗氧化作用, 通过免疫荧光染色检测线粒体中 ROS 的水平。Mito-Tracker Green 是一种绿

色荧光标记的 Mito-Tracker, 可作为线粒体内检测 ROS 水平的特异性荧光探针, 相对分子质量为 671.88。和 rhodamine 123 或 JC-1 相比, Mito-Tracker Green 对于线粒体的染色不依赖于线粒体膜电位的改变, 因此适用性更广。染色后荧光显微镜下的观察结果显示: 正常对照组中仅可见极少量绿色荧光且亮度较弱; 相比于正常对照组, H_2O_2 处理组中绿色荧光明显增多且荧光亮度增强; 而 tax 预处理后绿色荧光数目有所减少且荧光亮度减弱(图 1B), 说明 tax 预处理后细胞内 ROS 生成减少。

MDA 是氧化应激过程中脂质过氧化产物, 是细胞内氧化应激水平的标志物之一, 实验结果显示: 与 Control 组相比, H_2O_2 组 H9C2 心肌细胞 MDA 水平显著升高 (167.1 ± 15.44 nmol/mL & 310.5 ± 33.6 nmol/mL, $P < 0.01$); 而与 H_2O_2 组相比, tax 预处理组 MDA 水平则显著降低 (310.5 ± 33.6 nmol/mL & 112.2 ± 74.30 nmol/mL, $P < 0.05$) (图 2)。上述结果均提示 tax 可降低细胞内氧化应激水平。

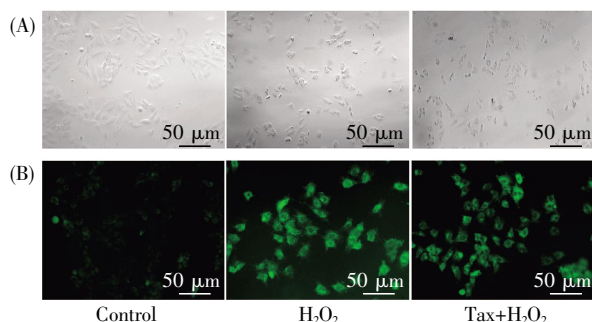


图 1 Tax 可改善 H_2O_2 所致心肌细胞形态改变及氧化应激 (A) 光镜观察细胞形态改变; (B) ROS 染色的检测结果。

Fig.1 Tax ameliorates H_2O_2 -induced OS

(A) Cell morphology change observed by optical microscope; (B) Intracellular generation of ROS detected by ROS staining.

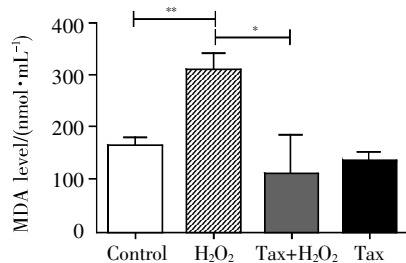


图 2 Tax 对 MDA 生成的影响

Fig.2 Effects of tax on the generation of MDA

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.3 Tax 对自噬的影响

心肌细胞自噬对维持心脏功能具有重要作用。近年来研究证实, 各种心血管应激(心肌缺血、

缺血再灌注、缺血预适应等)和心脏疾病(心肌病、心肌梗死、心力衰竭等)均伴有细胞自噬的改变并影响着疾病的发生发展^[11-13]。自噬小体和自噬小泡是自噬过程中的膜性成分, 其形成是自噬过程的重要体现。为验证 tax 是否可通过影响自噬发挥心肌保护作用, 电镜下观察各组细胞中自噬小体及自噬泡的形成, 结果显示 tax 处理后细胞内自噬小体增多, 部分自噬小泡融合(图 3A)。进一步用 Western-blot 检测自噬相关蛋白质 p62、LC3 I/II 的表达水平, 结果显示 tax 处理组 p62 表达水平降低, LC3 I 向 LC3 II 转化增多(图 3B), 这些结果提示 tax 可促进自噬。

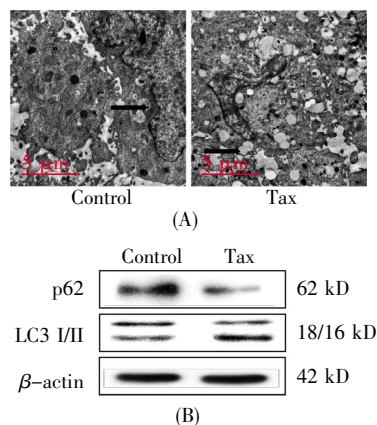


图 3 Tax 对自噬的影响

(A) 电镜观察自噬小体(箭头所指)、自噬泡; (B) Tax 对 p62、LC3 I/II 蛋白表达的影响。

Fig.3 Effects of tax on autophagy

(A) Electron microscope detection of autophagosome (showed by arrows) and phagophore; (B) Effects of tax on expressions of p62 and LC3 I/II.

2.4 Tax 对 Nrf2/HO-1 的影响

HO-1 是细胞内的抗氧化酶, 具有抗氧化应激、促自噬、抗炎等作用^[14], 其表达受上游转录因子 Nrf2 的调节。为验证 tax 是否通过影响 Nrf2/HO-1 信号通路的表达发挥其心肌保护作用, 通过 qRT-PCR 检测 H_2O_2 处理及 tax 预处理后心肌细胞 *Nrf2*、*HO-1* mRNA 的表达水平。实验结果显示: H_2O_2 处理对 *Nrf2*/*HO-1* mRNA 的表达无明显影响, 而 tax 预处理后 *Nrf2*/*HO-1* mRNA 表达明显升高(图 4A、B)。进一步用 Western-blot 法检测 Control 组和 tax 处理组中 Nrf2、HO-1 蛋白的表达量, 结果与 mRNA 检测结果类似, tax 处理后 Nrf2、HO-1 的表达均明显升高(图 4C)。上述检测结果说明 tax 可促进 Nrf2/HO-1 的表达, 从而发挥抗氧化应激作用。

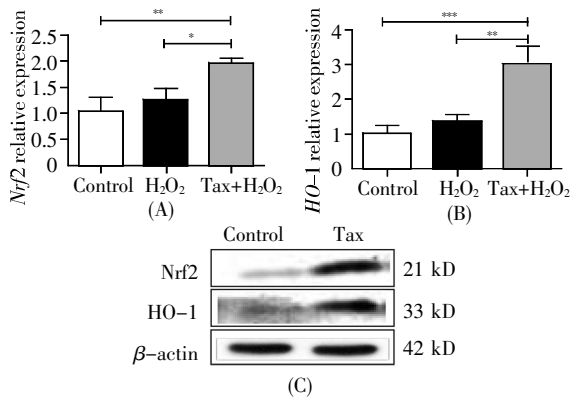


图 4 Tax 对 Nrf2、HO-1 表达的影响
(A) Tax 对 Nrf2 mRNA 表达的影响; (B) Tax 对 HO-1 mRNA 表达的影响; (C) Tax 对 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.005$ 。

Fig.4 Effects of tax on the expression of Nrf2 and HO-1
(A) Effects of tax on the expression of Nrf2 mRNA; (B) Effects of tax on the expression of HO-1 mRNA; (C) Effects of tax on the expressions of Nrf2 and HO-1 proteins. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.005$ 。

2.5 Tax 对 HIF1 α 蛋白表达的影响

在缺氧情况下, HIF1 α 的表达稳定, 分解减少, 通过电子传递链的抑制, 减少活性氧的表达, 同时可通过 HIF1 α 依赖的机制诱发自噬^[15]。为验证 tax 是否可通过 Nrf2/HO-1 通路的激活促进 HIF1 α 的表达, 从而促进自噬, 本文采用 Western-blot 实验检测 HIF1 α 蛋白的表达变化情况。结果发现 tax 处理后 HIF1 α 蛋白的表达水平升高(图 5), 说明 tax 可促进 HIF1 α 的表达。

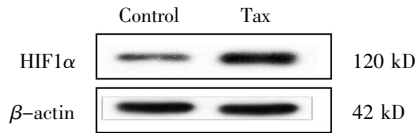


图 5 Tax 对 HIF1 α 蛋白表达的影响
Fig.5 Effects of tax on the expression of HIF1 α protein

3 讨论

ICM 是缺血条件下心肌形态和功能的改变所致的心功能降低, 研究表明氧化应激和自噬在 ICM 的发生和发展中有重要作用^[3, 4], 因此抗氧化应激及促自噬成为防治 ICM 的关键。现有研究发现, 许多中药成分均可通过抗氧化及促自噬发挥其生物活性^[16, 17], 提示 tax 亦可能通过抗氧化应激及促自噬发挥心肌保护作用。

殷照初等^[18]的研究表明细胞的形态改变是 ICM 的早期变化, 缺氧可致心肌细胞肥大。我们的实验结果显示, H₂O₂ 可引起细胞形态学改变,

包括细胞肥大、正常梭形形态变为圆形或不规则形, 同时引起细胞内 ROS 及 MDA 产生增多等氧化应激损害表现。而 tax 预处理可缓解 H₂O₂ 诱导氧化应激所致的心肌损害, 表现为缓解心肌细胞形态学改变、降低线粒体中 ROS 的生成、减少脂质过氧化, 同时 tax 可促进自噬小体及自噬泡的形成, 诱导自噬相关蛋白质表达量的改变。本文的研究结果提示, tax 的心肌保护作用可能与其抗氧化应激及促进自噬相关。

Nrf2/HO-1 信号通路是细胞内经典的抗氧化应激通路, 其激活可降低氧化应激损害, 起到保护细胞的作用^[19, 20]。激活后的 Nrf2 通过与 Keap1 解离后进入胞核与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)相互作用, 启动下游编码抗氧化蛋白和 II 相解毒酶的基因表达, 发挥细胞保护作用, HO-1 是其下游基因之一。课题组前期的研究证明, 在 RAW 细胞系中 tax 可通过激活 MAPK/Nrf2/HO-1 信号途径缓解刀豆素 ConA 诱导的细胞损伤^[21]。为探讨 tax 在 H9C2 心肌细胞中抗氧化应激可能的分子机制, 我们研究了氧化应激相关通路 Nrf2/HO-1 的表达水平。通过检测 Nrf2 和 HO-1 的 mRNA 及蛋白质表达水平发现, tax 处理后可促进 Nrf2/HO-1 mRNA 及蛋白质的表达, 表明 tax 可通过上调 Nrf2/HO-1 通路的表达发挥其抗氧化应激作用。

目前研究表明自噬与氧化应激密切相关^[22]。抗氧化酶 HO-1 可调节自噬, 相关研究报道, 在肝细胞中 HO-1 可通过调节自噬抑制肝细胞损害^[23, 24]; Suroli 等^[25]指出在肺内皮细胞中 HO-1 可通过调节自噬抑制其死亡及肺气肿的发展。本文的实验结果显示 tax 可上调 HO-1, 同时可促进自噬, 提示 tax 在心肌细胞中可通过 HO-1 调节自噬, 但其可能的分子机制有待进一步探索。

HIF1 α 存在于线粒体中, 既可以抑制电子生物传递链中 ROS 的产生, 又可以通过 BNIP3/Bcl-2 途径促进细胞线粒体自噬。Gui 等^[15]的研究表明 HIF1 在缺氧心肌细胞中具有调节自噬的作用, 被缺氧诱导的自噬可通过增加 HIF1 的表达而增强, 而敲除 HIF1 后自噬被抑制, 同时 HIF1 可通过调节自噬缓解缺氧诱导的细胞死亡。我们的实验结果显示 tax 处理后 HIF1 α 表达增加, 提示 tax 可能通过 Nrf2/HO-1 通路促进 HIF1 α 的表达, 从而促进自噬。

总之, 本研究提示在 H9C2 细胞中, tax 可能

通过 Nrf2/HO-1/HIF1 α 信号通路增强自噬, 从而发挥抗氧化应激心肌保护作用, 有望为 ICM 的诊治提供新思路。

参考文献(References):

- [1] Burch G E, Giles T D, Colcolough H L. Ischemic cardiomyopathy[J]. American Heart Journal, 1970, 79(3): 291-292.
- [2] 李庚山. 缺血性心肌病的诊断及治疗策略[C]//中华医学会, 中国生物医学工程学会. 2006 全国心血管病进展心律失常主题研讨会论文集(Li Geng-shan. The diagnosis and treatment of ischemic cardiomyopathy[C]//Chinese Medical Association, Chinese Society of Biomedical Engineering. Proceedings of the National Cardiovascular Disease Progress Topic of Arrhythmia Seminar at 2006), 2006: 65-67.
- [3] Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, *et al.* Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction[J]. Current Vascular Pharmacology, 2015, 13(1): 26-36.
- [4] Li B, Chi R F, Qin F Z, *et al.* Distinct changes of myocyte autophagy during myocardial hypertrophy and heart failure: association with oxidative stress[J]. Experimental Physiology, 2016, 101(8): 1050-1063.
- [5] Stocker R. Role of oxidative modifications in atherosclerosis[J]. Physiological Reviews, 2004, 84(4): 1381-1478.
- [6] Chobot V, Hadacek F, Bachmann G, *et al.* Pro- and antioxidant activity of three selected flavan type flavonoids: catechin, eriodictyol and taxifolin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(12): 1986.
- [7] Topal F, Nar M, Gocer H, *et al.* Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016, 31(4): 674-683.
- [8] Guo H, Zhang X, Cui Y, *et al.* Taxifolin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2015, 287(2): 168-177.
- [9] Sun X, Chen R C, Yang Z H, *et al.* Taxifolin prevents diabetic cardiomyopathy in vivo and in vitro by inhibition of oxidative stress and cell apoptosis[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 63: 221-232.
- [10] 罗红, 石元刚, 田怀军, 等. 茶多酚对大鼠慢性缺氧损伤保护的实验研究[J]. 生命科学研究(Luo Hong, Shi Yuan-gang, Tian Huai-jun, *et al.* Inhibition effects of tea polyphenols to the injury induced by chronic hypoxia in rats[J]. Life Science Research), 2007, 11(3): 268-272.
- [11] Song H, Yan C, Tian X, *et al.* CREG protects from myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating myocardial autophagy and apoptosis[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2016, 15(11): 4-9.
- [12] Sung H K, Chan Y K, Han M, *et al.* Lipocalin-2 (NGAL) attenuates autophagy to exacerbate cardiac apoptosis induced by myocardial ischemia[J]. Journal of Cellular Physiology, 2017, 232(8): 2125-2134.
- [13] Duan Q, Yang W, Jiang D, *et al.* Spermine ameliorates ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes via regulation of autophagy[J]. American Journal of Translational Research, 2016, 8(9): 3976-3985.
- [14] Chen D, Jin Z, Zhang J, *et al.* HO-1 protects against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunction in H9C2 cardiomyocytes[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e153587.
- [15] Gui L, Liu B, Lü G. Hypoxia induces autophagy in cardiomyocytes via a hypoxia-inducible factor 1-dependent mechanism[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016, 11(6): 2233-2239.
- [16] Song Y, Huang L, Yu J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling[J]. Journal of Neuroimmunology, 2016, 301: 1-6.
- [17] Jaroonwichawan T, Chaicharoenaudomrung N, Namkaew J, *et al.* Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy[J]. Neuroscience Letters, 2016, 636: 40-47.
- [18] 殷照初, 李永青, 吴秀山. 基质金属蛋白酶与心肌重塑[J]. 生命科学研究(Yin Zhao-chu, Li Yong-qing, Wu Xiu-shan. Matrix metalloproteinase and cardiac remodeling[J]. Life Science Research), 2004(suppl. 1): 43-48.
- [19] Li H, Song F, Duan L R, *et al.* Paeonol and danshensu combination attenuates apoptosis in myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress: roles of Nrf2/HO-1 and PI3K/Akt pathway[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23693.
- [20] Choi Y H. The cytoprotective effect of isorhamnetin against oxidative stress is mediated by the upregulation of the Nrf2-dependent HO-1 expression in C2C12 myoblasts through scavenging reactive oxygen species and ERK inactivation[J]. General Physiology and Biophysics, 2016, 35(2): 145-154.
- [21] Zhao M, Chen J, Zhu P, *et al.* Dihydroquercetin (DHQ) ameliorated concanavalin A-induced mouse experimental fulminant hepatitis and enhanced HO-1 expression through MAPK/Nrf2 antioxidant pathway in RAW cells[J]. International Immunopharmacology, 2015, 28(2): 938-944.
- [22] Ikeda Y, Sciarretta S, Nagarajan N, *et al.* New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014, 2014: 210934.
- [23] Harada S, Nakagawa T, Yokoe S, *et al.* Autophagy deficiency diminishes indomethacin-induced intestinal epithelial cell damage through activation of the ERK/Nrf2/HO-1 pathway[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2015, 355(3): 353-361.
- [24] Chen K, Li J, Li S, *et al.* 15d-PGJ2 alleviates ConA-induced acute liver injury in mice by up-regulating HO-1 and reducing hepatic cell autophagy[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 80(6): 183-192.
- [25] Suroliya R, Karki S, Kim H, *et al.* Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against pulmonary endothelial cell death and development of emphysema in cadmium-treated mice[J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2015, 309(3): L280-L292.