

环泊酚减轻缺氧/复氧诱导心肌细胞损伤的实验研究

刘 艳,郝 杰,张 迅,王立新



摘要 目的:探究环泊酚对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧(H/R)性损伤的影响及其潜在机制。方法:H9c2 心肌细胞分别用不同浓度环泊酚预处理 48 h,并在缺氧条件下培养 7 h,再复氧培养 6 h。将细胞分为 6 组:对照组、H/R 组、异丙酚组、环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组。使用噻唑蓝(MTT)评估 H9c2 心肌细胞存活;流式细胞术检测细胞凋亡;2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFHDA)评估细胞内活性氧(ROS)水平;试剂盒检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平;蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测相关蛋白的表达。结果:与对照组比较,H/R 组 H9c2 心肌细胞凋亡率增加($P < 0.01$),Caspase-3 蛋白水平升高($P < 0.01$);ROS 浓度和 MDA 含量增加($P < 0.01$),SOD 和 GSH-Px 活性降低($P < 0.01$);炎症细胞因子释放明显增加($P < 0.01$);蛋白激酶 B(AKT)、糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)、血红素加氧酶 1(HO-1)、核因子红细胞相关因子 2(Nrf2)蛋白表达下降($P < 0.01$)。与 H/R 组相比,环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组、环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组心肌细胞凋亡、氧化应激和炎症反应明显减轻($P < 0.01$),AKT/GSK-3 β /Nrf2 通路明显激活($P < 0.01$)。结论:环泊酚在 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤中发挥保护作用,是一种潜在的抗心肌缺血再灌注损伤候选药物。

关键词 环泊酚;H9c2 心肌细胞;缺氧/复氧;细胞凋亡;氧化应激;炎症反应;实验研究

doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2024.23.010

心血管疾病是一种严重威胁人类健康的常见病,具有高致残率和高死亡率,也是病人生活质量下降的主要原因^[1-2]。心肌缺血与多种心脏病的发生发展密切相关,是心肌梗死和恶性心律失常的急性加重因素。心肌缺血是由于缺乏血液流向心肌,导致氧气、葡萄糖和其他可支持线粒体氧化磷酸化的营养物质不足^[3]。恢复缺血性心脏的血供是缺血性心脏病的主要治疗方法,但血液再灌注可引起心肌缺血/再灌注(I/R)损伤,使病人病情恶化,影响病人预后^[4]。I/R 伴有氧化应激、细胞内钙超载和炎症反应,可激活细胞凋亡、坏死和自噬,最终导致心肌的进一步损伤^[5]。由于心肌细胞是终末分化的细胞,不能再生,因此,防止心肌细胞损伤是一种治疗心肌缺血的有效策略。

环泊酚(HSK3486)是一种新型 2,6-烷基二取代苯酚衍生物,其化学结构类似于异丙酚。在前期实验中,环泊酚具有起效快、恢复快、无积累、注射后疼痛小、呼吸抑制小等特点,具有潜在的临床应用价值^[6]。研究表明,环泊酚表现出比异丙酚更高的脂溶性和药代效力^[6]。动物研究表明,异丙酚对心肌 I/R 损伤具有保护作用^[7],环泊酚可以有效保护心脏心肌梗死^[8],但环泊酚对心肌 I/R 损伤是否有保护作用尚不清楚。本研究用缺氧/复氧(H/R)处理 H9c2 细胞以模拟体外 I/R 损伤,旨在确定环泊酚对心肌 I/R 损伤的保护作用和潜在机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

大鼠心肌细胞(H9c2)购自上海生物科学研究所;

环泊酚和异丙酚购自四川海思科制药公司;V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide,PI)细胞凋亡试剂盒购自南京诺唯赞生物公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自武汉云克隆生物公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)诊断试剂盒购自南京建成生物公司;所有抗体均购自美国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养

大鼠心肌 H9c2 细胞孵育在 DMEM 高糖培养基中,补充有 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素(美国 Gibco 公司)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的环境下,细胞保存在含 95% 空气的加湿培养箱中。本研究获得山西省心血管病医院医学伦理委员会批准(2023WJ500)。

1.3 体外 H/R 模型^[9] 及分组

H9c2 心肌细胞分别用 0.5、1、2、4、8、16 和 32 $\mu\text{mol/L}$ 环泊酚预处理 48 h,并在缺氧条件下培养 7 h,再复氧培养 6 h。比较不同浓度环泊酚预处理后的 H9c2 细胞存活率以及缺氧 7 h/复氧 1~6 h 的 H9c2 细胞存活率。将培养的 H9c2 心肌细胞随机分为对照组、H/R 组、异丙酚组、环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组。对照组细胞常规培养,环泊酚各浓度组细胞在缺氧前用不同浓度的环泊酚处理 1 h,异丙酚组细胞在缺氧前用异丙酚处理 1 h,然后在缺氧条件下培养 7 h,再复氧 6 h。用 4 $\mu\text{mol/L}$ 环泊酚和 10 $\mu\text{mol/L}$ PI3K 抑制剂 Ly294002 共同处理 H/R 诱导的 H9c2 细胞,分为对照组、环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组、环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ +10 $\mu\text{mol/L}$ Ly294002 组,检测 3 组蛋白激酶 B(AKT)/糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)/红细胞相关因子 2(Nrf2)信号通路蛋白表达、H9c2 细胞凋亡率、氧化应激指标、炎症因子。

1.4 噻唑蓝(MTT)法

将 H9c2 细胞以 1×10^4 细胞/孔的密度孵育在 96

基金项目 山西省卫健委科研课题项目(No.2019WS0605)
作者单位 山西省心血管病医院(太原 030024),E-mail:13835138359@163.com
引用信息 刘艳,郝杰,张迅,等.环泊酚减轻缺氧/复氧诱导心肌细胞损伤的实验研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2024,22(23):4293-4300.

孔板(美国 Croning 公司)中,环泊酚处理完成后,用磷酸缓冲液溶液(PBS)清洗每组 H9c2 细胞 2 次,并向每孔中加入 100 μL 正常培养基,20 μL 的 MTT 溶液,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h。去除上清液后,向每孔中加入 150 μL 二甲亚砜,并在振荡器上振荡 10 min,并通过微孔板读数器在 490 nm 处测量吸光度(OD)值。

1.5 流式细胞术

环泊酚预处理和 H/R 损伤后,收集培养基中的悬浮细胞和贴壁细胞。用胰蛋白酶(北京碧云天生物技术有限公司)消化 H9c2 细胞。根据制造商的说明,用冰 PBS 洗涤细胞 2 次,并将其重悬在 1 $\times$ 结合缓冲液(300 μL)中。室温条件下,用异 Annexin V-FITC(5 μL)和 PI(5 μL)在黑暗中对细胞染色 15 min。最后,使用流式细胞仪(美国 Thermo Fisher 公司)分析伴随光散射的荧光信号。

1.6 活性氧(ROS)水平检测

环泊酚预处理和 H/R 损伤的 H9c2 细胞达到 70%~80% 的融合度时,取出上层培养基,并用 PBS 洗涤 2 次。用 ROS 测定试剂盒(美国 Abcam 公司)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下对细胞进行 30 min 的染色。用适合于异硫氰酸荧光素(FITC)的过滤器组对活细胞进行成像。在荧光显微镜下观察结果并拍照。

1.7 MDA、SOD 和 GSH-Px 活性测定

环泊酚预处理和 H/R 损伤后,用指定的商业试剂盒采集细胞,测量 H9c2 细胞中 MDA、SOD 水平和 GSH-Px 活性。

1.8 促炎细胞因子水平测定

环泊酚预处理和 H/R 损伤后,离心 H9c2 细胞并收集上清液。根据制造商的说明,通过 ELISA 试剂盒检测白介素(IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平。

1.9 蛋白免疫印迹法(Western Blot)

在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 RIPA 裂解缓冲液提取 H9c2 蛋白,使用二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(北京碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,并转膜到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下用稀释的抗 Caspase-3(1:1 000)、抗蛋白激酶 B(AKT)(1:1 000)、抗糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β)(1:1 000)、抗核因子红细胞相关因子 2(Nrf2)和抗血红素加氧酶 1(HO-1)孵育过夜。用与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,并用增强化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)化学发光检测系统检测。用 Image J 分析图像灰度值。以 β -actin 作为内参。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。符合正态分布的定量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 环泊酚对 H/R 损伤性 H9c2 细胞存活率的影响

与对照组相比, H9c2 细胞存活率随着复氧时间的增加而降低($P < 0.01$)。在缺氧 7 h 和复氧 6 h 条件下,细胞存活率为 $(55.23 \pm 3.41)\%$ 。详见图 1。与对照组相比,环泊酚 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组、环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组 H9c2 细胞存活率差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明在 0.5~4 $\mu\text{mol/L}$ 剂量下环泊酚对 H9c2 细胞没有毒性。与对照组相比,环泊酚浓度高于 8 $\mu\text{mol/L}$ 时, H9c2 细胞存活率明显降低($P < 0.01$),表明高于 8 $\mu\text{mol/L}$ 的剂量对细胞有毒性。详见图 2。与对照组相比, H/R 组细胞存活率下降至 $(56.87 \pm 1.95)\%$ ($P < 0.01$);与 H/R 组相比,不同浓度环泊酚组细胞存活率明显增加($P < 0.01$)。详见图 3。

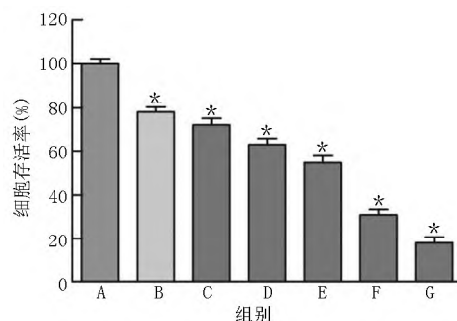


图1 MTT检测H/R处理后的H9c2细胞存活率

(A 为对照组; B 为缺氧 7 h 组; C 为缺氧 7 h/复氧 1 h 组; D 为缺氧 7 h/复氧 3 h 组; E 为缺氧 7 h/复氧 6 h 组; F 为缺氧 7 h/复氧 9 h 组; G 为缺氧 7 h/复氧 12 h 组。与对照组比较, * $P < 0.01$)

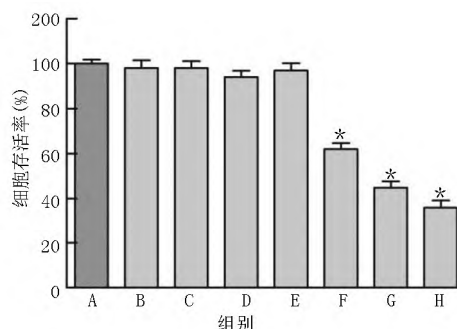


图2 MTT检测环泊酚预处理的H9c2细胞存活率

(A 为对照组; B 为环泊酚 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; C 为环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; D 为环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组; E 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组; F 为环泊酚 8 $\mu\text{mol/L}$ 组; G 为环泊酚 16 $\mu\text{mol/L}$ 组; H 为环泊酚 32 $\mu\text{mol/L}$ 组。与对照组比较, * $P < 0.01$)

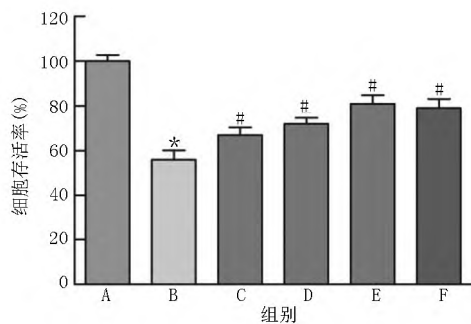


图3 MTT 检测环泊酚处理的 H/R 模型 H9c2 细胞存活率

(A 为对照组;B 为 H/R 组;C 为异丙酚组;
D 为环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组;E 为环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组;
F 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组。与对照组比较, * $P < 0.01$;
与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

2.2 环泊酚对 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

与对照组相比,H/R 诱导了 HCC827 和 PC-9 细胞凋亡,裂解的 Caspase-3 表达上调($P < 0.01$)。与 H/R 组相比,环泊酚明显抑制 H/R 诱导的细胞凋亡,裂解的 Caspase-3 表达下调($P < 0.05$),表明环泊酚抑制 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡。详见图 4~图 7。

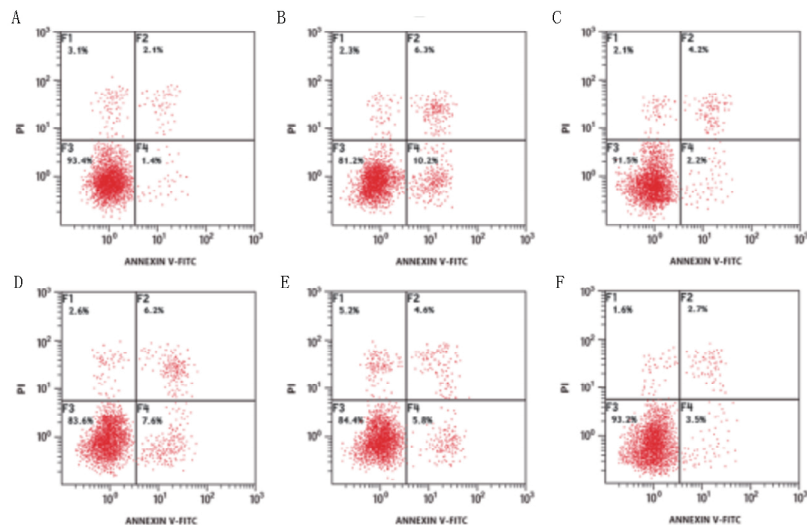


图4 流式细胞术检测 H9c2 细胞凋亡率

(A 为对照组;B 为 H/R 组;C 为异丙酚组;D 为环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组;
E 为环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组;F 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组)

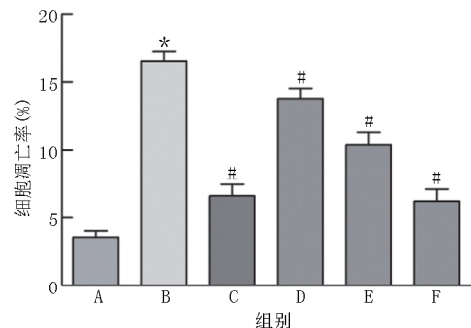


图5 各组 H9c2 细胞凋亡率柱状图

(A 为对照组;B 为 H/R 组;C 为异丙酚组;
D 为环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组;E 为环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组;
F 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组。与对照组比较, * $P < 0.01$;
与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

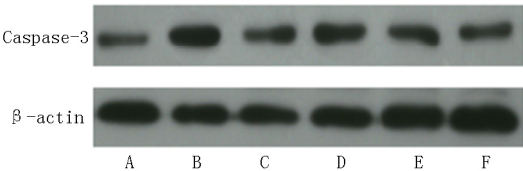


图6 各组 Caspase-3 蛋白表达条带图

(A 为对照组;B 为 H/R 组;C 为异丙酚组;
D 为环泊酚 1 $\mu\text{mol/L}$ 组;E 为环泊酚 2 $\mu\text{mol/L}$ 组;
F 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组)

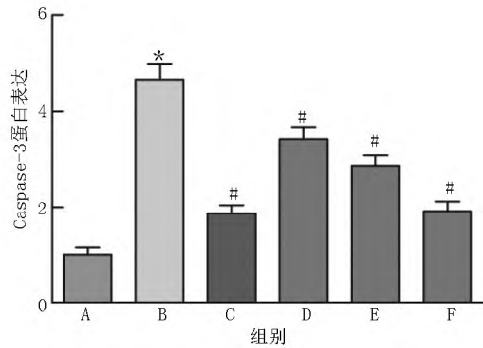


图7 各组 Caspase-3 蛋白表达柱状图

(A 为对照组;B 为 H/R 组;C 为异丙酚组;

D 为环泊酚 1 μmol/L 组;E 为环泊酚 2 μmol/L 组;

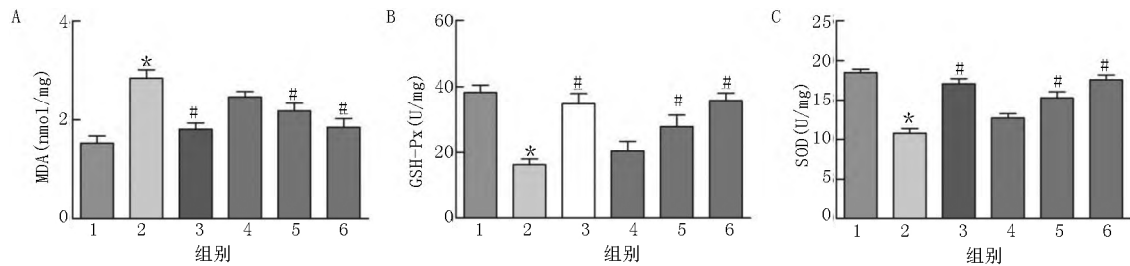
F 为环泊酚 4 μmol/L 组。与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

图8 各组氧化应激指标比较

(A 为 MDA 含量比较;B 为 GSH-Px 活性比较;C 为 SOD 活性比较。

1 为对照组;2 为 H/R 组;3 为异丙酚组;4 为环泊酚 1 μmol/L 组;5 为环泊酚 2 μmol/L 组;

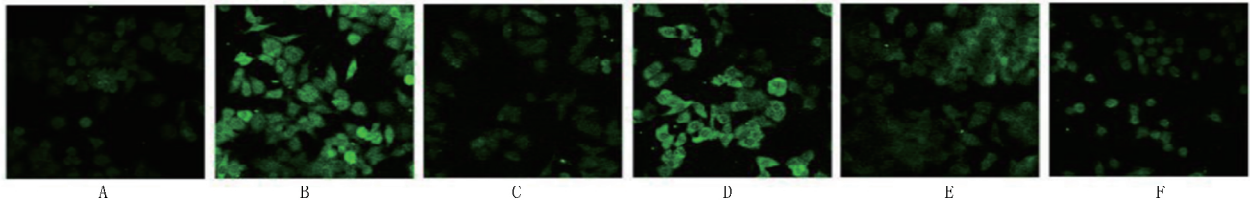
6 为环泊酚 4 μmol/L 组。与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

图9 2,7-氯荧光素二乙酸酯(DCFDA)染色图

(A 为对照组;B 为 H/R 组;C 为异丙酚组;D 为环泊酚 1 μmol/L 组;E 为环泊酚 2 μmol/L 组;F 为环泊酚 4 μmol/L 组)

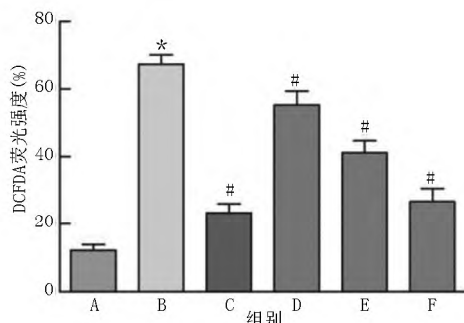


图10 各组 DCFDA 荧光强度比较

(A 为对照组;B 为 H/R 组;

C 为异丙酚组;D 为环泊酚 1 μmol/L 组;

E 为环泊酚 2 μmol/L 组;F 为环泊酚 4 μmol/L 组。

与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

2.3 环泊酚对 H/R 诱导的 H9c2 细胞氧化应激的影响

与对照组相比, H/R 组 MDA 含量明显增加, GSH-Px 和 SOD 活性明显降低, ROS 水平明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 H/R 组相比, 环泊酚 2、4 μmol/L 处理明显减弱了 H9c2 细胞氧化应激 ($P < 0.01$), 表明环泊酚处理可减少 H/R 诱导心肌损伤中的氧化应激。详见图 8~图 10。

2.4 环泊酚对 H/R 诱导的 H9c2 细胞炎症反应的影响

与对照组相比, H/R 诱导的 H9c2 细胞中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与 H/R 组相比, 环泊酚 2 μmol/L 组、环泊酚 4 μmol/L 组 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平明显降低 ($P < 0.01$), 表明环泊酚处理减弱了 H9c2 细胞炎症反应。详见图 11。

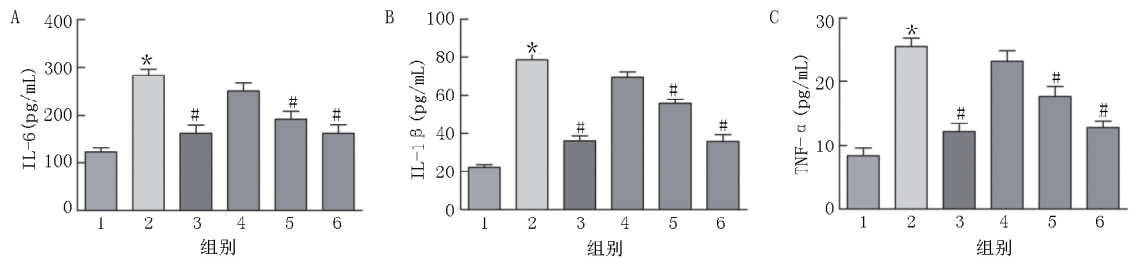


图 11 各组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平比较

(A 为 IL-6 水平比较;B 为 IL-1 β 水平比较;C 为 TNF- α 水平比较。1 为对照组;2 为 H/R 组;
3 为异丙酚组;4 为环泊酚 1 μ mol/L 组;5 为环泊酚 2 μ mol/L 组;6 为环泊酚 4 μ mol/L 组。
与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

2.5 环泊酚对 AKT/GSK-3 β /Nrf2 通路的影响

与对照组相比,环泊酚可下调 p-AKT、p-GSK-3 β 、Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达($P < 0.01$)。与 H/R 组相比,

环泊酚 2、4 μ mol/L 处理明显增加 p-AKT、p-GSK-3 β 、Nrf2 和 HO-1 表达($P < 0.01$),表明环泊酚激活了 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路。详见图 12、图 13。

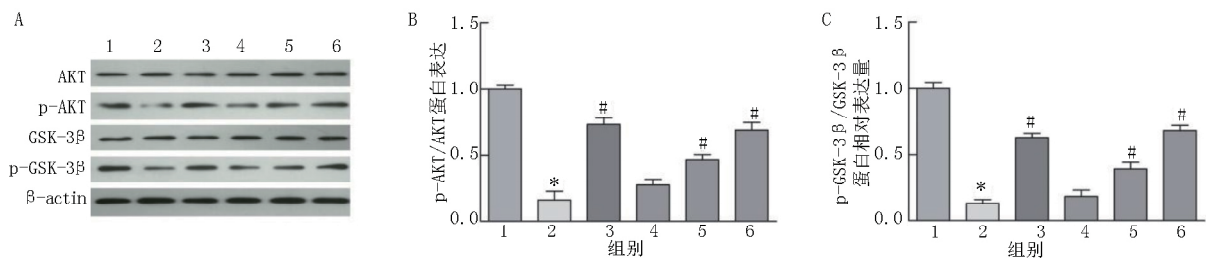


图 12 各组 H9c2 细胞中 AKT、p-AKT、GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 蛋白表达

(A 为各组 AKT/GSK-3 β 通路蛋白表达条带图;B 为各组 p-AKT/AKT 比较;C 为各组 p-GSK-3 β /GSK-3 β 比较。
1 为对照组;2 为 H/R 组;3 为异丙酚组;4 为环泊酚 1 μ mol/L 组;5 为环泊酚 2 μ mol/L 组;6 为环泊酚 4 μ mol/L 组。
与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

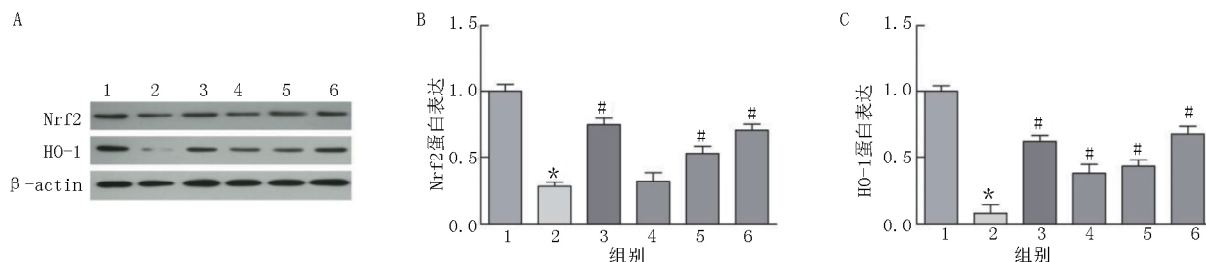


图 13 H9c2 细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

(A 为 H9c2 细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达条带图;B 为各组 Nrf2 蛋白表达比较;C 为各组 HO-1 蛋白表达比较。
1 为对照组;2 为 H/R 组;3 为异丙酚组;4 为环泊酚 1 μ mol/L 组;5 为环泊酚 2 μ mol/L 组;6 为环泊酚 4 μ mol/L 组。
与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

2.6 环泊酚通过 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路保护心脏损伤

用 4 μ mol/L 环泊酚和 10 μ mol/L 的磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)抑制剂 Ly294002 共同处理 H/R 诱导的 H9c2 细胞。与环泊酚组相比,LY294002 在 H/R 诱

导的 H9c2 细胞中明显逆转了环泊酚的抗凋亡、抗氧化应激和抗炎反应作用($P < 0.05$),表明环泊酚通过抑制 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路保护心肌 I/R 损伤。详见图 14~图 21。

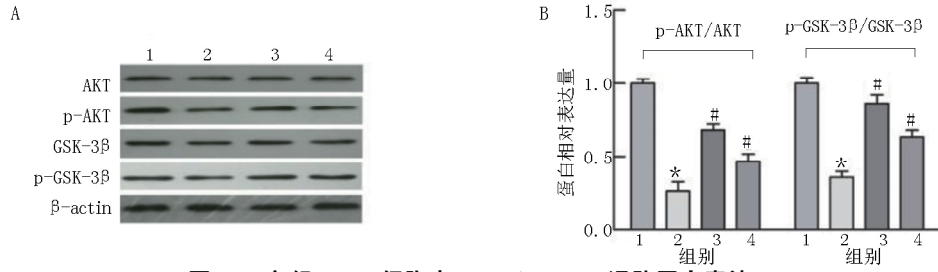


图 14 各组 H9c2 细胞中 AKT/GSK-3β 通路蛋白表达

(A 为 H9c2 细胞中 AKT/GSK-3β 通路蛋白表达条带图;B 为 AKT/GSK-3β 通路蛋白表达比较。

1 为对照组;2 为 H/R 组;3 为环泊酚 4 μmol/L 组;4 为环泊酚 4 μmol/L+10 μmol/L LY294002 组。

与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

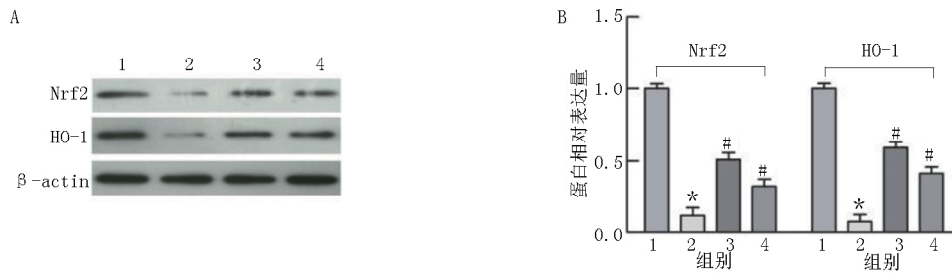


图 15 各组 H9c2 细胞中 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达

(A 为 H9c2 细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达条带图;B 为 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达比较。

1 为对照组;2 为 H/R 组;3 为环泊酚 4 μmol/L 组;4 为环泊酚 4 μmol/L+10 μmol/L LY294002 组。

与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

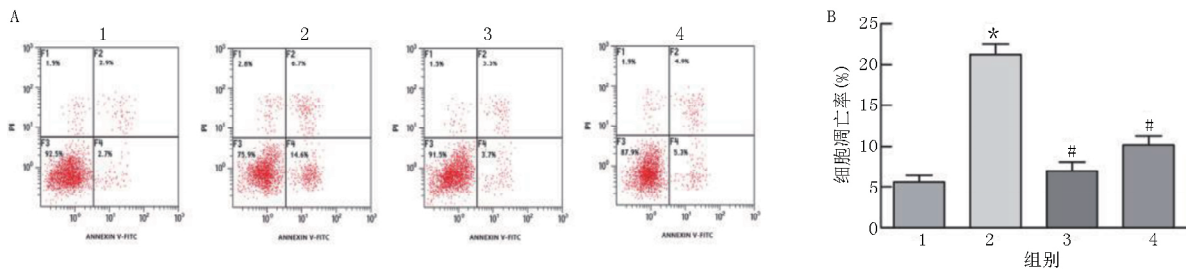


图 16 流式细胞术检测 H9c2 细胞凋亡率

(A 为流式细胞图;B 为各组细胞凋亡率比较。1 为对照组;2 为 H/R 组;3 为环泊酚 4 μmol/L 组;

4 为环泊酚 4 μmol/L+10 μmol/L LY294002 组。与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

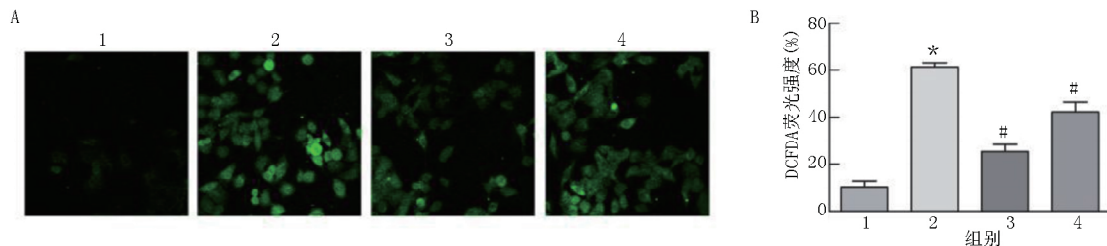


图 17 DCFDA 染色检测 ROS 水平

[A 为 DCFDA 染色($\times 200$);B 为各组荧光强度比较。1 为对照组;2 为 H/R 组;3 为环泊酚 4 μmol/L 组;

4 为环泊酚 4 μmol/L+10 μmol/L LY294002 组。与对照组比较, * $P < 0.01$;与 H/R 组比较, # $P < 0.01$]

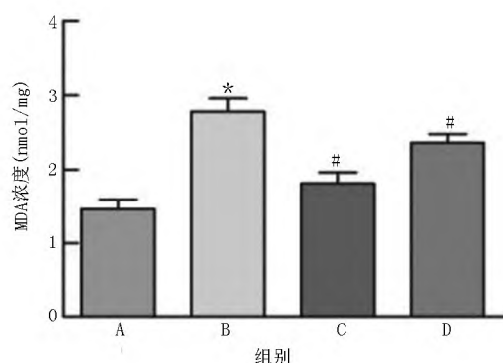


图 18 各组 MDA 水平比较

(A 为对照组; B 为 H/R 组; C 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组;
D 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ + 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 组。
与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

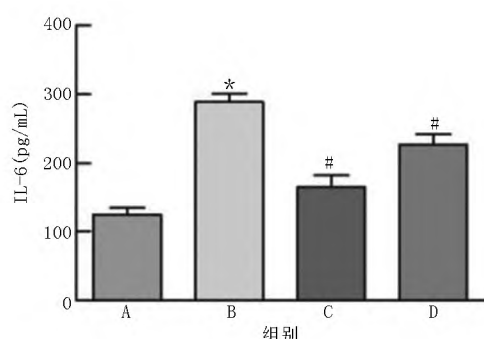


图 19 各组 IL-6 水平比较

(A 为对照组; B 为 H/R 组; C 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组;
D 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ + 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 组。
与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

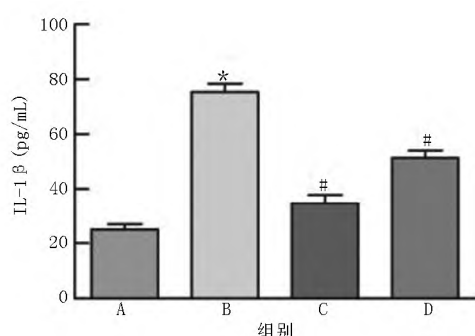


图 20 各组 IL-1 β 水平比较

(A 为对照组; B 为 H/R 组; C 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组;
D 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ + 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 组。
与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

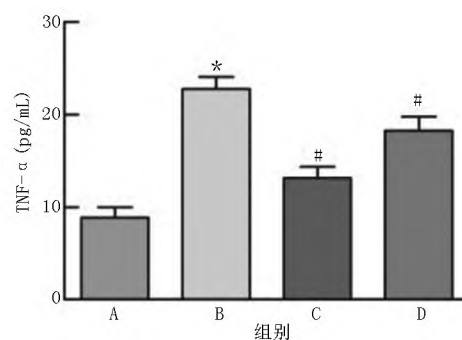


图 21 各组 TNF- α 水平比较

(A 为对照组; B 为 H/R 组; C 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ 组;
D 为环泊酚 4 $\mu\text{mol/L}$ + 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 组。
与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, # $P < 0.01$)

3 讨论

本研究阐明了环泊酚在调节 H/R 诱导的 H9c2 细胞心肌损伤中的保护作用。结果表明,环泊酚减轻了 H9c2 心肌细胞中 H/R 诱导的细胞凋亡、ROS 产生和炎性因子的释放。PI3K 抑制剂 LY294002 下调 Nrf2 的激活,并部分逆转了环泊酚的保护作用。此外,环泊酚通过激活 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号在心肌 I/R 损伤中发挥重要作用。炎症反应是心肌损伤的一个关键特征,表现为释放出大量的促炎细胞,包括 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α ^[10],加剧心脏损害和心肌细胞凋亡。此外,炎症反应与氧化应激密切相关,互相调节,引发恶性循环最终导致心肌细胞死亡和凋亡^[11]。本研究中,I/R 诱导明显升高 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 表达水平,而环泊酚给药明显降低炎性因子的释放。在心肌 I/R 损伤条件下,细胞凋亡通路被异常激活,并发生过度凋亡^[12]。一些实验研究表明,可通过抑制细胞凋亡改善心肌 I/R 损伤^[13]。本研究还发现,环泊酚处理明显抑制 H/R 诱导的细胞凋亡率,并抑制 Caspase-3 的裂解。这些结果表明,环泊酚可作为一种抗 H/R 诱导的心脏炎症和心肌细胞凋亡的保护剂。

ROS 是心肌 I/R 损伤的主要致病因素之一^[14],内源性抗氧化剂 SOD 水平间接影响细胞清除氧自由基的能力。心肌细胞更容易受到自由基损伤,因为其含有较少的抗氧化剂和抗氧化酶,如 GSH、SOD 和过氧化氢酶。当心肌细胞发生 H/R 损伤时,心肌损伤标

志物乳酸脱氢酶(LDH)和MDA会增加^[15]。MDA是一种脂质过氧化物质,可以迁移到细胞内外,从而加剧了氧化应激引起的损伤范围。本研究发现,H/R处理后MDA和ROS水平明显增加,活细胞数量明显减少,并明显降低了抗氧化酶GSH-Px和SOD的活性。这些结果表明,环泊酚可以通过增加GSH-Px和SOD活性来减少ROS和MDA的产生,从而防止心肌H/R损伤。

活性AKT可促进体外心肌细胞的存活,并对心肌H/R损伤具有保护作用。GSK-3 β 是PI3K/AKT信号通路的关键下游分子,通常通过PI3K/AKT介导的磷酸化调节细胞凋亡^[16]。缺血预处理或后处理可以通过激活PI3K-AKT-GSK-3 β 通路抑制线粒体通透性转换孔道(mPTP)开放来预防心肌H/R损伤^[17]。本研究中,环泊酚增强了AKT和GSK-3 β 的磷酸化水平,同时环泊酚对心肌H/R损伤的保护作用被PI3K抑制剂逆转。Nrf2是氧化还原敏感转录因子之一,被认为是抑制细胞内ROS产生的重要抗氧化传感器^[18]。增强Nrf2转录活性可以减弱H/R诱导的氧化应激和心肌损伤^[19]。Nrf2上调易位到细胞核以增加氧化应激反应基因的转录[如HO-1、醌氧化还原酶-1(NQO-1)],而HO-1的上调可以促进细胞对H/R诱导损伤的抗性^[19]。研究表明,Nrf2的核转位需要PI3K/AKT途径的激活^[20]。在本研究中,环泊酚处理增加了AKT和GSK-3 β 的磷酸化。此外,环泊酚可明显上调Nrf2蛋白及其下游基因HO-1,以抑制H/R诱导的细胞凋亡,炎症反应和氧化应激损伤。这些结果表明,环泊酚通过激活H9c2细胞中的AKT/GSK3 β /Nrf2信号轴发挥抗心肌损伤作用。

综上所述,本研究阐明了环泊酚通过激活AKT/GSK-3 β /Nrf2信号保护H9c2细胞免受H/R诱导的细胞凋亡、氧化应激和炎症的影响。环泊酚可能在心肌I/R损伤的进展中发挥重要作用,并提示环泊酚/AKT/GSK-3 β /Nrf2信号传导是调节心肌I/R损伤的一种新机制。本研究为环泊酚在临床麻醉中,特别是在心脏病病人中的应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] ZHAO J V, SCHOOLING C M. Genetically predicted sex hormone binding globulin and ischemic heart disease in men and women: a univariable and multivariable Mendelian randomization study[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23172.
- [2] TYROVOLA D, SOULAIPOPOULOS S, TSIOUFIS C, et al. The role of nutrition in cardiovascular disease: current concepts and trends[J]. *Nutrients*, 2023, 15(5): 1064.
- [3] HAO J, DU H, LIU F, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor 1 (APE1) alleviates myocardial hypoxia-reoxygenation injury by inhibiting oxidative stress and ameliorating mitochondrial dysfunction[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3): 2143-2151.
- [4] FERDINANDY P, ANDREADOU I, BAXTER G F, et al. Interaction of cardiovascular nonmodifiable risk factors, comorbidities and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by pharmacological treatments and ischemic conditioning[J]. *Pharmacol Rev*, 2023, 75(1): 159-216.
- [5] WANG S, HU S, LUO X, et al. Prevalence and prognostic significance of DNMT3A- and TET2- clonal haematopoiesis-driver mutations in patients presenting with ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *EBioMedicine*, 2022, 78: 103964.
- [6] QIN L, REN L, WAN S, et al. Design, synthesis, and evaluation of n2, 6-disubstituted phenol derivatives as general anesthetics[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(9): 3606-3617.
- [7] LI S Q, LEI Z, YANG X M, et al. Propofol protects myocardium from ischemia/reperfusion injury by inhibiting ferroptosis through the AKT/p53 signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 841410.
- [8] YANG Y Z, XIA Z Y, XU C, et al. Ciprofol attenuates the isoproterenol-induced oxidative damage, inflammatory response and cardiomyocyte apoptosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 1037151.
- [9] XIE D, DENG H F, FENG H. Sevoflurane exerts improved protective effects than propofol on hypoxia-reoxygenation injury by regulating the microRNA-221-5p/ADAM8 axis in cardiomyocytes[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2021, 22(2): 893.
- [10] LIU C, LI Y. Propofol relieves inflammation in MIRI rats by inhibiting Rho/Rock signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2021, 25(2): 976-984.
- [11] JOFFRE J, HELLMAN J. Oxidative stress and endothelial dysfunction in sepsis and acute inflammation[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2021, 35(15): 1291-1307.
- [12] CHEN Z H, WU J P, LI S J, et al. Inhibition of myocardial cell apoptosis is important mechanism for ginsenoside in the limitation of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 806216.
- [13] FERNANDEZ RICO C, KONATE K, JOSSE E, et al. Therapeutic peptides to treat myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 792885.
- [14] ZHAO L, CHENG L T, WU Y Q. Ambra1 alleviates hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cells by regulating autophagy and reactive oxygen species[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 3062689.
- [15] FENG J, KONG R R, XIE L Y, et al. Clemaichinenoside protects renal tubular epithelial cells from hypoxia/reoxygenation injury in vitro through activating the Nrf2/HO-1 signalling pathway[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 2020, 47(3): 495-502.
- [16] WEI D J, XU H J, GAI X D, et al. Astragaloside IV alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through regulating PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathways[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2019, 34(7): e201900708.
- [17] SHI X J, TAO G Z, JI L L, et al. Sappanone A alleviates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes injury through inhibition of mitochondrial apoptosis and activation of PI3K-Akt-Gsk-3 β pathway[J]. *Bioscience Reports*, 2020, 40(2): BSR20192442.
- [18] YU C, XIAO J H. The Keap1-Nrf2 system: a mediator between oxidative stress and aging[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 6635460.
- [19] ZHANG Q, DANG Y Y, LUO X, et al. Kazinol B protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced cardiac injury by modulating the AKT/AMPK/Nrf2 signalling pathway[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2023, 61(1): 362-371.
- [20] LEE N, YOUN K, YOON J H, et al. The role of fucoxanthin as a potent Nrf2 activator via Akt/GSK-3 β /fyn axis against amyloid- β peptide-induced oxidative damage[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(3): 629.

(收稿日期: 2023-04-11)
(本文编辑 郭怀印)