

## 比索洛尔预处理通过调控 ERK1/2 途径抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和纤维化

吴媛媛, 高元标, 冼笃标, 吴岳畅, 赵映\*

海南医学院第一附属医院 心胸外科, 海南 海口 570102

**摘要:** **目的** 探讨比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和纤维化的影响, 并分析分子机制。 **方法** 构建缺氧/复氧细胞模型, 将 H9c2 细胞分为对照组、模型组、比索洛尔组、细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 通路激活剂 (LM22B-10) 组。采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测细胞中乳酸脱氢酶 (LDH) 和肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 水平, CCK-8 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡水平, 免疫印迹法 (Western blotting) 法检测凋亡蛋白、纤维化蛋白和 ERK1/2 信号通路蛋白表达。 **结果** 与模型组比较, 比索洛尔组 H9c2 细胞中 LDH 和 CK-MB 水平、细胞凋亡率, 切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cleaved Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白 (Bax)、I 型胶原 (Col I)、III 型胶原 (Col III)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白表达以及磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (p-ERK1/2) / (ERK1/2) 比值显著降低; 细胞活力, B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl2)、金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP-1) 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。与比索洛尔组比较, LM22B-10 组 H9c2 细胞中 LDH 和 CK-MB 水平、细胞凋亡率, Cleaved Caspase-3、Bax、Col I、Col III、 $\alpha$ -SMA、MMP-9 蛋白表达以及 (p-ERK1/2) / (ERK1/2) 比值均显著升高, 细胞活力, Bcl-2、TIMP-1 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 比索洛尔预处理通过抑制 ERK1/2 信号通路活化减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和纤维化。

**关键词:** 比索洛尔; 预处理; 缺氧/复氧; 心肌损伤; 细胞凋亡; 纤维化; 细胞外信号调节激酶 1/2

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2022)11 - 2430 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.11.003

## Bisoprolol pretreatment inhibits hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte apoptosis and fibrosis by regulating ERK1/2 pathway

WU Yuan-yuan, GAO Yuan-biao, XIAN Du-biao, WU Yue-chang, ZHAO Ying

Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of bisoprolol pretreatment on cardiomyocyte apoptosis and fibrosis induced by hypoxia reoxygenation, and to analyze the its mechanisms. **Methods** Hypoxia/reoxygenation cell model were constructed, H9c2 cells were divided into control group, model group, bisoprolol group, and LM22B-10 group. LDH and CK-MB levels in cells were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), cell viability was detected by CCK-8 assay, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expressions of apoptotic proteins, fibrotic proteins and ERK1/2 signaling pathway proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, LDH and CK-MB levels and apoptosis rate of H9c2 cells, protein expression of cleaved Caspase-3, Bax, Col I, Col III,  $\alpha$ -SMA, MMP-9, and (p-ERK1/2)/(ERK1/2) ratio were significantly decreased. Cell viability, Bcl-2, and TIMP-1 protein expressions were significantly increased in bisoprolol group ( $P < 0.05$ ). Compared with bisoprolol group, LDH and CK-MB levels, apoptosis rate of H9c2 cells, protein expression of cleaved Caspase-3, Bax, Col I, Col III,  $\alpha$ -SMA, MMP-9, and (p-ERK1/2)/(ERK1/2) ratio were significantly increased, and cell viability, Bcl-2 and TIMP-1 protein expression were significantly decreased in LM22B-10 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Bisoprolol pretreatment attenuated hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte apoptosis and fibrosis by inhibiting the activation of ERK1/2 signaling pathway.

**Key words:** bisoprolol; pretreatment; hypoxia/reoxygenation; myocardial injury; apoptosis; fibrosis; ERK1/2

收稿日期: 2022-07-29

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目 (20A200060)

作者简介: 吴媛媛, 女, 主治医师, 本科, 主要研究方向为内科。E-mail: huiming897@163.com

\*通信作者: 赵映, 男, 副主任医师, 硕士, 主要研究方向为胸心外科。

缺血性心脏病是全球范围内一个主要的公共卫生问题,具有高致残率和死亡率。缺血区快速再灌注被认为是临床治疗缺血性心脏病最有效的方法<sup>[1]</sup>。虽然恢复血流可以改善心肌坏死,降低死亡率,但再灌注会诱发一系列复杂的不良反应,导致组织继发性损伤,称为缺血/再灌注损伤<sup>[2-3]</sup>。比索洛尔是一种选择性的  $\beta_1$  受体阻滞剂,具有改善冠状动脉血流量、降低血压、减少心肌耗氧量等作用,临床上用于治疗高血压和充血性心力衰竭等疾病。研究发现在急性心肌梗死发生后早期使用比索洛尔可降低室性心律失常的发生率和死亡率<sup>[4]</sup>。Wang 等<sup>[5]</sup>报道,比索洛尔预处理可通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶  $3\beta$  (PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ ) 途径减少缺血/复氧引起的活性氧 (ROS) 产生而保护心肌细胞免受缺血/再灌注损伤。因此,本研究旨在分析比索洛尔预处理对缺血/复氧诱导的心肌细胞凋亡和心肌纤维化的影响,并探究其相关分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;比索洛尔(规格 10 mg,批号 20210637)购自广州佳途科技股份有限公司;胎牛血清(批号 BS-1101-1)、DMEM 培养基(批号 GUXMD-50029)购自上海源培生物科技股份有限公司;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(批号 JL58179)、细胞计数试剂盒(CCK-8)(批号 JL41527)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;人膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(AnnexinV-FITC/PI)凋亡检测试剂盒(批号 MA0220)购自大连美仑生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(LDH,批号 SP15135)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)检测试剂盒(批号 SP15205)购自武汉赛培生物科技股份有限公司;B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl2,批号 A01935-40)、B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白(Bax,批号 A01985-43)、切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cleaved Caspase-3,批号 A01955-100)、I 型胶原(Col I,批号 A01958-40)、III 型胶原(Col III,批号 A01957-40)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA,批号 A01952-41)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9,批号 A01951-40)、金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP-1,批号 A01936-40)、细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2,批号 A01937-38)、磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2,批号 A01937-35)、 $\beta$ -

肌动蛋白( $\beta$ -actin,批号 A01951-43)对应一级抗体均购自南京金斯瑞生物科技有限公司;辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 二级抗体(批号 ab10031)购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** H9c2 细胞在高糖 DMEM 培养基中培养,培养基中加入 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素溶液,置于 37 °C、95%空气、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育,当细胞达到约 80%的融合率时进行传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

**1.2.2 缺氧/复氧细胞模型构建** 参照文献方法<sup>[6]</sup>用无糖、无血清的 DMEM 培养基培养 H9c2 细胞,在 37 °C、含有 95%N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的缺氧室中缺氧培养 8 h,然后将细胞替换至正常的 DMEM 培养基中,在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub> 的常氧培养箱中进行复氧培养 8 h。

**1.2.3 细胞分组与处理** 将正常培养的对数生长期 H9c2 细胞分为对照组、模型组、比索洛尔组、ERK1/2 通路激活剂(LM22B-10)组。参照文献方法<sup>[7-8]</sup>并结合前期预实验确定各组细胞药物干预浓度。对照组在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 和 95% O<sub>2</sub> 的常氧培养箱中正常培养;缺氧/复氧组按照 1.2.2 项下操作构建细胞缺氧/复氧模型;比索洛尔组在缺氧培养前 30 min 加入终浓度为 2  $\mu$ mol/L 的比索洛尔预处理 H9c2 细胞,随后进行细胞缺氧/复氧处理;LM22B-10 组:缺氧培养前 1 h 加入终浓度为 100  $\mu$ mol/L 的 LM22B-10 处理 H9c2 细胞,缺氧培养前 30 min 加入终浓度为 2  $\mu$ mol/L 的比索洛尔预处理 H9c2 细胞,随后进行细胞缺氧/复氧处理。

**1.2.4 ELISA 法检测细胞中 LDH 和 CK-MB 水平** 收集处理后的细胞悬液,分别采用试剂盒测定细胞上清液中 LDH 和 CK-MB 水平,实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

**1.2.5 CCK-8 法检测细胞活力** 将收集的各组细胞以  $3 \times 10^3$  个细胞接种至 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,设置 5 个复孔,培养细胞融合至约 80%后,每孔分别加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液培养 4 h,经酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集处理后的细胞,用预冷的 PBS 缓冲液清洗 3 次,加入 500  $\mu$ L 结合缓冲液重新悬浮细胞,将细胞浓度调节至  $1 \times 10^6$ /mL。将 100  $\mu$ L 细胞悬浮液转移至 5 mL EP 管

中, 分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染色, 在室温下避光培养 15 min, 通过流式细胞术分析细胞凋亡率。

**1.2.7 Western blotting 法检测凋亡蛋白、纤维化蛋白和 ERK1/2 信号通路蛋白表达** 使用放射性免疫沉淀测定裂解缓冲液从 H9c2 细胞中提取总蛋白质, 并使用 BCA 试剂盒定量蛋白质浓度。将浓缩 SDS 样品缓冲液与等量蛋白质样品混匀, 在 100 °C 水中煮沸 5 min。以 10% SDS-PAGE 分离定量蛋白质, 并将分离的蛋白转移到 PVDF 膜, 在室温下用 5 % 脱脂牛奶阻断膜 2 h, 洗膜, 在 4 °C 条件下, 将膜与 Bcl-2 (1 : 800)、Bax (1 : 800)、cleaved Caspase-3 (1 : 800)、Col I (1 : 1000)、Col III (1 : 1000)、α-SMA (1 : 1000)、MMP-9 (1 : 1000)、TIMP-1 (1 : 1000)、ERK1/2 (1 : 1000)、p-ERK1/2 (1 : 1000) 和 β-actin (1 : 1000) 抗体一起孵育过夜, 冲洗膜, 在 37 °C 下将膜与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 二抗孵育 2 h, 滴加增强化学发光试剂显影, 在凝胶成像系统中成像, 以 β-actin 为内参蛋白, 采用 Image J 软件进行图像量化。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。

**2 结果**

**2.1 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞中 LDH 和 CK-MB 活性的影响**

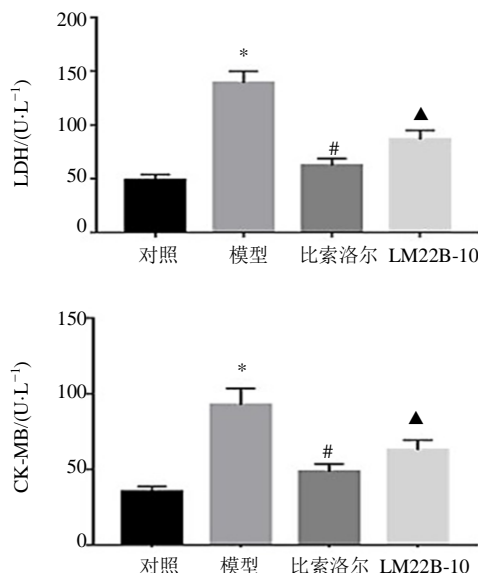
与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞中 LDH 和 CK-MB 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 比索洛尔组 LDH 和 CK-MB 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与比索洛尔组比较, LM22B-10 组中 LDH 和 CK-MB 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

**2.2 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞活力的影响**

与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 比索洛尔组 H9c2 细胞活力显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与比索洛尔组比较, LM22B-10 组 H9c2 细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

**2.3 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡及相关蛋白的影响**

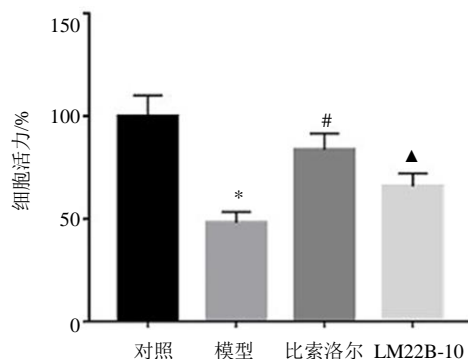
与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞凋亡率、cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达显著升高, Bcl-2



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与比索洛尔组比较: ▲ $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; ▲ $P < 0.05$  vs bisoprolol group

**图 1 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞中 LDH 和 CK-MB 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

**Fig. 1 Effects of bisoprolol pretreatment on LDH and CK-MB levels in hypoxic/reoxygenation-induced cardiomyocytes ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与比索洛尔组比较: ▲ $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; ▲ $P < 0.05$  vs bisoprolol group

**图 2 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )**

**Fig. 2 Effect of bisoprolol pretreatment on the viability of cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )**

蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 比索洛尔组的 H9c2 细胞凋亡率、cleaved Caspase-3、

Bax 蛋白表达均显著降低, Bcl-2 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与比索洛尔组比较, LM22B-10 组细胞

凋亡率、cleaved Caspase-3、Bax 表达均显著升高, 而 Bcl-2 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3A、B。

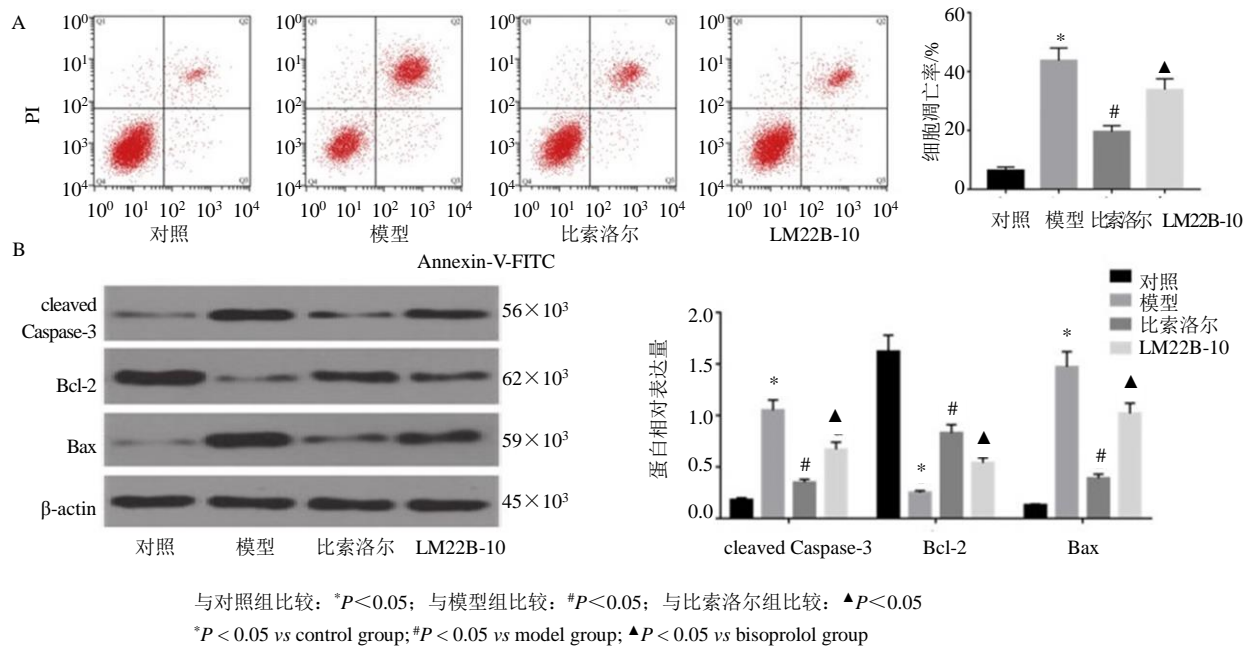


图 3 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡 (A) 及相关蛋白表达 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effects of bisoprolol pretreatment on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes (A) and related protein expression (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 2.4 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞纤维化的影响

与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞中 Col I、Col III、 $\alpha$ -SMA、MMP-9 蛋白表达均显著升高, TIMP-1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 比索洛尔组 H9c2 细胞中 Col I、Col III、 $\alpha$ -SMA、MMP-9 蛋白表达均显著降低, TIMP-1 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与比索洛尔组比较, LM22B-10 组 H9c2

细胞中 Col I、Col III、 $\alpha$ -SMA、MMP-9 蛋白表达均显著升高, TIMP-1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

#### 2.5 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞中 ERK1/2 信号通路的影响

与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞中 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 比索洛尔组 H9c2 细胞中 p-ERK1/2 与 ERK1/2

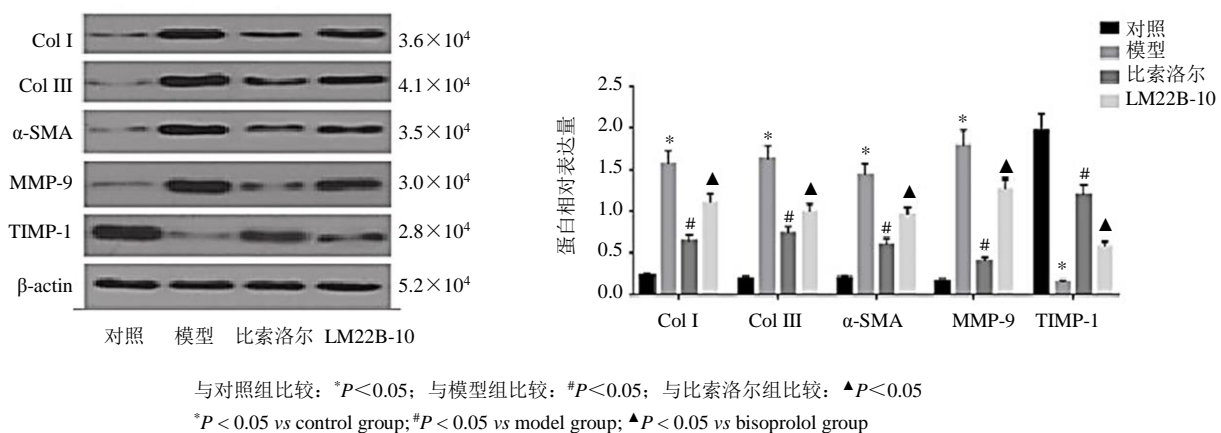
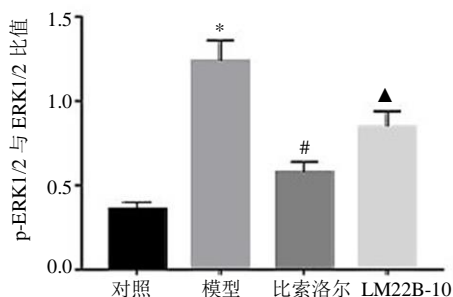
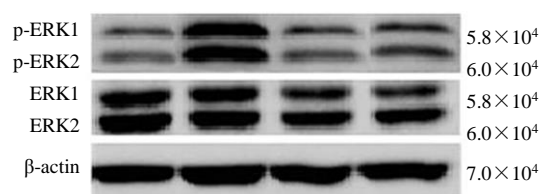


图 4 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞纤维化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of bisoprolol pretreatment on hypoxia/reoxygenation-induced myocyte fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

比值显著降低 ( $P < 0.05$ )；与比索洛尔组比较，LM22B-10 组 H9c2 细胞中 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值显著升高 ( $P < 0.05$ )，见图 5。



与对照组比较：\* $P < 0.05$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ；与比索洛尔组比较：▲ $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; ▲ $P < 0.05$  vs bisoprolol group

图 5 比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导的心肌细胞中 ERK1/2 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of bisoprolol pretreatment on ERK1/2 signaling pathway in cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论

随着人口老龄化的发生，缺血性心脏病的发病率和死亡率在世界范围内逐渐增加，相应的缺氧/复氧损伤亦成为临床常见的病理损伤。大量研究证实，在心肌缺氧/复氧损伤过程中神经-交感系统处于过度激活状态，导致体内儿茶酚胺水平大幅度升高，而过高的儿茶酚胺会加重心肌损伤，引起心肌凋亡及坏死<sup>[9-11]</sup>。 $\beta_1$ 受体阻滞剂作为治疗心血管疾病的常用药物，主要通过抑制过度激活的神经-交感活性、调节儿茶酚胺的分泌发挥作用<sup>[12]</sup>。相关研究报道，比索洛尔能够通过抑制线粒体中未折叠蛋白质改善心肌损伤，还可显著降低炎症反应<sup>[13]</sup>。比索洛尔能够恢复心脏对 $\beta$ -受体刺激的敏感性，改善心肌顺应性并改善心肌重构，具有全面保护心脏的作用。本研究建立缺氧/复氧诱导的心肌 H9c2 细胞损伤模型，检测 H9c2 细胞中 LDH 和 CK-MB 水平以及心肌细胞活力，发现缺氧/复氧诱导的 H9c2 细胞中 LDH 和 CK-MB 水平显著升高，细胞活力降低，给予比索洛尔预处理干预后，H9c2 细胞中 LDH

和 CK-MB 水平明显降低，细胞活力明显升高。证实比索洛尔预处理可改善缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤。

细胞凋亡是细胞的一种主动性死亡方式，受细胞外环境和细胞内基因的影响和调控。细胞凋亡通常伴随着抗凋亡因子 Bcl-2 的减少和促凋亡因子 Bax 的增加。此外，细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质，导致半胱氨酸蛋白酶家族中的 Caspase-3 被剪切激活，从而启动细胞凋亡途径<sup>[14]</sup>。研究发现，在心血管疾病发生、发展过程中细胞凋亡途径被异常激活<sup>[15]</sup>。细胞凋亡是缺氧/复氧损伤的主要致病机制之一，阻断细胞凋亡可有效减轻缺氧/复氧诱导的心肌损伤，减缓甚至预防心力衰竭的发生<sup>[16-17]</sup>。有研究报道，比索洛尔可能通过调控 Bcl-2 和 Bax 的表达，抑制心肌细胞凋亡，从而发挥对心脏的保护作用<sup>[18]</sup>。本研究结果显示，比索洛尔预处理显著降低 H9c2 细胞凋亡率、下调 Cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达，上调 Bcl-2 蛋白表达。表明比索洛尔预处理有效缓解了缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡。

纤维化是细胞外基质 (ECM) 病理重塑过程，受多种因素调控。心肌纤维化是许多心血管疾病的病理标志，其发生与多余的纤维化组织的区域性或弥漫性积聚有关，会导致心肌收缩期和舒张期功能下降或恶性心律失常易感性增加<sup>[19]</sup>。Col I、Col III、 $\alpha$ -SMA 被认为是纤维化的生物标志物，在心肌纤维化患者体内显著增加<sup>[20]</sup>。研究认为基质金属蛋白酶 (MMPs) 是降解 ECM 成分的主要酶，其活性受 TIMP 的特异性抑制。MMPs 和 TIMP 之间的动态平衡对于维持 ECM 的动态平衡至关重要，而在心肌纤维化期间，ECM 中 MMPs 和 TIMP 之间的动态平衡被破坏<sup>[21]</sup>。MMP-9 是纤维化早期引起 ECM 分解的主要蛋白酶，其水平升高可导致 ECM 变性，心肌排列和收缩功能异常紊乱，而 MMP-9 活性在体内受到 TIMP-1 的抑制<sup>[22]</sup>。王东隶等<sup>[23]</sup>报道，比索洛尔可抑制慢性心力衰竭大鼠心肌组织纤维化，延缓心肌间质重构。本研究检测发现，比索洛尔预处理干预后，H9c2 细胞中 Col I、Col III、 $\alpha$ -SMA、MMP-9 蛋白表达明显降低，TIMP-1 蛋白表达明显升高。提示索洛尔预处理能够通过调控纤维化相关蛋白表达改善缺氧/复氧诱导的心肌纤维化。

ERK1/2 信号通路是来自丝裂原活化蛋白激酶家族的重要信号转导途径之一，ERK1/2 是将信号分子从细胞表面受体传导至细胞核最重要的效应

分子,常与其他信号通路相互影响,调节细胞增殖、分化、黏附等生物学效应。研究发现,在缺血/再灌注损伤中,ERK1/2 蛋白磷酸化的程度显著升高,ERK1/2 信号通路已被确定为心肌缺血/再灌注损伤的潜在作用靶点<sup>[24-25]</sup>。亦有研究表明,缺氧/复氧引起的心肌细胞凋亡与 ERK1/2 磷酸化增强有关<sup>[26]</sup>。本研究中,缺氧/复氧诱导的 H9c2 细胞中 ERK1/2 蛋白磷酸化水平显著升高,比索洛尔预处理后缺氧/复氧诱导的 H9c2 细胞中 ERK1/2 蛋白磷酸化水平明显降低。说明比索洛尔通过抑制 ERK1/2 信号通路的活化发挥作用。为进一步验证比索洛尔是否通过调节 ERK1/2 信号通路发挥心脏保护作用,本实验使用 ERK1/2 激活剂 LM22B-10 和比索洛尔共同预处理 H/R 诱导的 H9c2 细胞,结果显示,LM22B-10 能够逆转比索洛尔预处理对缺氧/复氧诱导 H9c2 细胞中 LDH 和 CK-MB 水平、细胞活力、细胞凋亡以及纤维化的改善作用,并升高比索洛尔预处理后缺氧/复氧诱导 H9c2 细胞中 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平。该结果提示,比索洛尔预处理可能通过阻断 ERK1/2 信号转导途径在缺氧/复氧诱导的 H9c2 细胞损伤中发挥保护作用。

综上所述,比索洛尔预处理能有效改善缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和心肌纤维化,进而减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤,其作用机制可能与抑制 ERK1/2 信号通路活化有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Severino P, D'Amato A, Pucci M, et al. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: From plaque activation to microvascular dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8118.
- [2] Xiang M, Lu Y, Xin L, et al. Role of oxidative stress in reperfusion following myocardial ischemia and its treatments [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6614009.
- [3] Ou W, Liang Y, Qin Y, et al. Hypoxic acclimation improves cardiac redox homeostasis and protects heart against ischemia-reperfusion injury through upregulation of O-GlcNAcylation [J]. *Redox Biol*, 2021, 43: 101994.
- [4] Kim H K, Lim K S, Kim S S, et al. Impact of bisoprolol on ventricular arrhythmias in experimental myocardial infarction [J]. *Chonnam Med J*, 2021, 57(2): 132-138.
- [5] Wang J, Liu J, Xie L, et al. Bisoprolol,  $\alpha_1$  antagonist, protects myocardial cells from ischemia-reperfusion injury via PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  pathway [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2020, 34(6): 708-720.
- [6] 徐佩尔, 颜雪芸, 周乐, 等. 血塞通(三七皂苷)对缺氧/复氧诱导的 H9c2 心肌细胞氧化损伤的抑制作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(2): 113-117.
- [7] 蔡树鸿, 范智文, 秦晓平, 等. 比索洛尔对小鼠心肌微血管内皮细胞缺氧复氧损伤的保护作用 [J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(1): 38-43.
- [8] 解小萌, 崔丽杰, 刘海涛. 阿托伐他汀通过抑制 ERK/MAPK 信号通路改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的血管内皮细胞损伤的机制研究 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2022, 14(1): 53-57.
- [9] Wang K, Qi Y, Gu R, et al. Renal denervation attenuates adverse remodeling and intramyocardial inflammation in acute myocardial infarction with ischemia-reperfusion injury [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 832014.
- [10] Oyama Y, Blaskowsky J, Eckle T. Dose-dependent effects of esmolol-epinephrine combination therapy in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(19): 2199-2206.
- [11] Sun X, Wei Z, Li Y, et al. Renal denervation restrains the inflammatory response in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115(2): 15.
- [12] Joseph P, Swedberg K, Leong D P, et al. The evolution of  $\beta$ -blockers in coronary artery disease and heart failure (Part 1/5) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(5):672-682.
- [13] Zhang C, He S, Li Y, et al. Bisoprolol protects myocardium cells against ischemia/reperfusion injury by attenuating unfolded protein response in rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11859.
- [14] Deng X, Yang P, Gao T, et al. Allicin attenuates myocardial apoptosis, inflammation and mitochondrial injury during hypoxia-reoxygenation: An *in vitro* study [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 200.
- [15] Del Re D P, Amgalan D, Linkermann A, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1765-1817.
- [16] He F, Wu Q, Xu B, et al. Suppression of Stim1 reduced intracellular calcium concentration and attenuated hypoxia/reoxygenation induced apoptosis in H9C2 cells [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(6): BSR20171249.
- [17] 冯帅, 沙爽, 常庆, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对缺血性心脏病中细胞凋亡与自噬的调控机制研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4670-4677.
- [18] 马旭莲, 朱芳一, 祝存奎. 比索洛尔对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(10): 1240-1243.

- [19] Yu P, Ma S, Dai X, *et al.* Elabela alleviates myocardial ischemia reperfusion-induced apoptosis, fibrosis and mitochondrial dysfunction through PI3K/AKT signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4467-4477.
- [20] Yu C, Wang W, Jin X. Hirudin protects Ang II-induced myocardial fibroblasts fibrosis by inhibiting the extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 6264-6272.
- [21] Kremastiotis G, Handa I, Jackson C, *et al.* Disparate effects of MMP and TIMP modulation on coronary atherosclerosis and associated myocardial fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23081.
- [22] Xue Y, Zhang M, Liu M, *et al.* 8-Gingerol ameliorates myocardial fibrosis by attenuating reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 711701.
- [23] 王东隶, 杨传华. 比索洛尔对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化及 ERK 信号通路的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(34): 9-12.
- [24] Wang L, Niu H, Zhang J. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in myocardial ischemia/reperfusion injury through stimulating ROS production and the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 938-944.
- [25] 李玉红, 李妍妍, 樊官伟, 等. 益气养阴活血中药减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤作用研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(2): 281-289.
- [26] Wang M, Ma Y, Zhang T, *et al.* Proteinase-activated receptor 2 deficiency is a protective factor against cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3764-3772.

[责任编辑 高源]