

圣草次苷激活 Nrf2 信号通路保护 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤作用研究

陈荣昌, 王梦晨, 杨龙坡, 孙晓波*

中国医学科学院, 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 建立大鼠 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧 (H/R) 损伤模型, 考察圣草次苷改善心肌缺血再灌注损伤的作用机制。方法 利用无糖无血清培养基结合厌氧(94% N₂、5% CO₂、1% O₂)处理 H9c2 心肌细胞 4 h 后, 更换新鲜完全培养基再放入正常孵箱复氧 24 h, 制备 H/R 损伤模型。在造模前 12 h 给予圣草次苷(5、10、20 μg·mL⁻¹), 细胞活力及乳酸脱氢酶(LDH)检测实验中 选择灯盏乙素(20 μg·mL⁻¹)作为阳性药, 对照组及模型组给予等体积 DMSO。MTT 法测定细胞存活率; 试剂盒检测细胞培养上清液中 LDH 水平; 试剂盒检测细胞内丙二醛(MDA)水平和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力; TUNEL 染色检测细胞凋亡; DCFH-DA 和 JC-1 探针分别检测细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位改变; Western blotting 检测核蛋白中 转录因子(NF)-E2 相关因子 2(Nrf2) 和总蛋白中 血红素氧合酶 1(HO-1)、γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)水平。结果 与对照组比较, H/R 损伤诱导的模型组细胞存活率明显下降, 凋亡明显增加, LDH 水平明显升高, 细胞内 MDA 水平明显升高, SOD、CAT、GSH-Px 活力明显降低, ROS 释放明显增多, 线粒体膜电位明显降低, 差异均有统计学意义(P<0.01); 与模型组比较, 圣草次苷可剂量相关性地改善上述变化, 其中 10、20 μg·mL⁻¹ 组均差异显著(P<0.01)。Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞 Nrf2 核转位以及 HO-1、GCL 表达水平无显著变化; 与模型组比较, 圣草次苷 10、20 μg·mL⁻¹ 显著增加 Nrf2 核转位及 HO-1、GCL 表达水平(P<0.01)。结论 圣草次苷能够保护 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤, 其可能通过激活 Nrf2 抗氧化信号通路, 增加细胞内源性抗氧化能力, 抑制氧化应激损伤, 保护线粒体功能以阻止细胞凋亡的发生。

关键词: 圣草次苷; 心肌缺血再灌注损伤; 缺氧/复氧; 氧化应激; Nrf2 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2443-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.006

Eriocitrin protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia reoxygenation injury by activating Nrf2 signaling pathway

CHEN Rongchang, WANG Mengchen, YANG Longpo, SUN Xiaobo

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective The hypoxia/reoxygenation (H/R) injury model of rat H9c2 cardiomyocytes was established to investigate the mechanism of Eriocitrin (ERI) in improving myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were treated with sugar-free serum-free medium combined with anaerobic (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂) for 4 h, and then replaced with fresh complete medium and reoxygenated in normal incubator for 24 h to prepare H/R injury model. ERI (5, 10, and 20 μg·mL⁻¹) treatment from 12 h before modeling. Breviscapine (20 μg·mL⁻¹) was selected as the positive drug for cell viability and lactate dehydrogenase (LDH) detection. The control group and model group were treated with equal volume DMSO. Cell viability was measured by MTT assay. The levels of LDH, malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by the kit. Cell apoptosis were detected by TUNEL staining. DCFH-DA and JC-1 probes were used to detect the changes of intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP). The expression of nuclear protein NF-E2-related factor 2 (Nrf2) and expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and glutamate cysteine ligase (GCL) expression in total protein was detected by western blotting. **Results** Compared with control group, H/R decreased cell viability and increased apoptosis rate and LDH level significantly (P < 0.01). Besides, H/R decreased MMP and

收稿日期: 2022-05-23

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-031)

第一作者: 陈荣昌, 研究方向为药理毒理。E-mail: chenrongchang456@126.com

*通信作者: 孙晓波 Tel: (010)57833113 E-mail: sunxiaoboys@163.com

increased ROS production and the level of MDA ($P < 0.01$). The activities of SOD, CAT and GSH-Px decreased significantly ($P < 0.01$). ERI could improve these changes in a dose-dependent manner compared with model group, and there were significant differences in 10 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ groups ($P < 0.01$). Western blotting results showed that compared with control group, the nuclear translocation of Nrf2 and the expression levels of HO-1 and GCL in the model group had no significant changes. Compared with model group, ERI 10 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ significantly increased Nrf2 nuclear translocation and the expression levels of HO-1 and GCL ($P < 0.01$). **Conclusions** ERI protected against H/R induced H9c2 injury and apoptosis by increasing the endogenous antioxidant capacity of cells, inhibiting oxidative stress damage, and protecting mitochondrial function, which may be mediated by Nrf2 signaling pathway.

Key words: eriocitrin; myocardial ischemia-reperfusion injury; hypoxia/reoxygenation; oxidative stress; Nrf2 signaling pathway

缺血性心脏病是全球范围内具有高发病率和致死率的一种疾病,及时恢复血供能够减少心肌缺血带来的损伤,但同时也会造成继发性的再灌注损伤,有可能导致病情的进一步恶化^[1]。心肌缺血后因再灌注造成的损伤称为心肌缺血再灌注损伤(MIRI)^[2],其对心肌的结构和功能可能产生不可逆的伤害。氧化应激是MIRI的主要病理机制,如何减轻MIRI一直是近年来心血管系统疾病治疗的研究热点^[3]。圣草次苷是一种存在于柠檬或酸橙柑桔中的黄酮类,具有抗氧化、抗炎、抗癌和抗过敏等多种生物活性^[4]。有研究发现圣草次苷抗氧化及抗炎活性显著,对小鼠慢性帕金森疾病有治疗作用^[5];并能有效阻止 H_2O_2 所致人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤^[6]。最近研究发现圣草次苷可通过抑制心肌缺血再灌注大鼠心肌组织促炎细胞因子的生成发挥心肌保护作用,但其机制仍值得进一步研究^[7]。本研究主要从抗氧化方面,研究圣草次苷对缺氧复氧(H/R)诱导大鼠心肌细胞H9c2损伤的保护作用,以期圣草次苷的开发利用提供依据。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

圣草次苷、灯盏乙素(质量分数 $>98\%$)购自上海融禾医药科技发展有限公司;DMEM低糖培养基、0.25%胰酶-EDTA,HyClone公司;胎牛血清(FBS)、无糖DMEM,Gibco公司;活性氧(ROS)检测试剂盒、线粒体膜电位(JC-1)检测试剂盒、RIPA(强)裂解液和苯甲基黄酰氟(PMSF)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶快速配制试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒,碧云天生物技术有限公司;四唑盐(MTT)粉末,美国Sigma公司;乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;转录因子(NF)-E2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶1(HO-1)、 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)抗

体,Abcam公司;Lamin A、 β -actin抗体、辣根酶标记的山羊抗小鼠IgG和辣根酶标记的山羊抗兔IgG,中国中杉金桥公司。

1.2 主要仪器

细胞培养箱(美国Thermo Fisher公司);SpectraMax M5酶标仪(美国Molecular Devices公司);电泳仪和电泳槽(美国Bio-Rad公司);流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司);厌氧操作台(美国Coy Laboratory公司)。

1.3 细胞株及细胞培养

大鼠H9c2心肌细胞购自中国科学院上海细胞库,培养于含10%FBS的DMEM低糖培养基中。当细胞生长至融合度达80%~90%时,用0.25%胰酶-EDTA溶液消化细胞,并将其置于5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中进行传代培养。

2 方法

2.1 细胞分组给药及H/R损伤模型建立

正常培养细胞,当细胞生长到60%~70%的密度时,更换新鲜的无糖无血清培养基,再将培养皿放入厌氧操作台(94% N_2 、5% CO_2 、1% O_2)中,缺氧4h后将细胞取出,更换新鲜完全培养基后再放入正常孵箱复氧24h^[8]。对照组不造模。

H9c2细胞分为对照组、模型组及圣草次苷(5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,药物剂量根据前期预试验确定;圣草次苷先用DMSO溶解,再用正常含血清培养基稀释到相应浓度,在缺氧复氧前12h给药;在细胞活力及LDH检测实验中,选择灯盏乙素(20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作为阳性对照药,给药方法同圣草次苷;对照组及模型组加入等量的DMSO。

2.2 细胞活力及LDH检测

将H9c2细胞按每孔 1×10^5 接种于96孔板,每孔100 μL ,细胞贴壁24h。按照“2.1”项方法圣草次苷、灯盏乙素处理及缺氧复氧完成后,吸取上清液-80 $^\circ\text{C}$ 保存,按照试剂盒说明书检测LDH的水平。每孔加100 μL 的DMEM培养液和20 μL 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

MTT,再次置于培养箱中作用4 h,弃上清液,加入150 μL DMSO,振荡10 min,在570 nm酶标仪下检测各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 细胞膜电位检测

取适量JC-1(200 \times),按照每50 μL 加入8 mL无菌DMEM的比例稀释,剧烈震荡充分溶解并混匀,然后再加入2 mL JC-1染色缓冲液(5 \times),混匀后即为JC-1染色工作液。将无菌圆形盖玻片置于24孔板内,将H9c2细胞按每孔 1×10^5 接种于24孔板,每孔500 μL ,细胞贴壁24 h。按照“2.1”项方法圣草次昔处理及缺氧复氧完成后,弃去上清液,加入500 μL JC-1染色工作液,避光孵育15 min,然后用PBS洗涤2次,将盖玻片取出,倒扣于载玻片上,使用荧光显微镜观察,使用Image J软件进行统计分析。

2.4 TUNEL细胞凋亡检测

将无菌圆形盖玻片置于24孔板内,将H9c2细胞按每孔 1×10^5 接种于24孔板,每孔500 μL ,细胞贴壁24 h。按照“2.1”项方法圣草次昔处理及缺氧复氧完成后,取出盖玻片,PBS洗涤2次,在样品上加50 μL TUNEL检测液,放入湿盒,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育60 min,PBS洗涤3次,用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。

2.5 ROS流式检测

将H9c2细胞按每孔 1×10^5 接种于24孔板,每孔500 μL ,细胞贴壁24 h。按照“2.1”项方法圣草次昔处理及缺氧复氧完成后,无血清培养基洗细胞2次,收集细胞,加入100 μL 无血清培养基稀释至 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DCFH-DA,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育30 min。 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清,每孔加入100 μL PBS重悬,流式细胞仪检测。

2.6 细胞内MDA、SOD、CAT、GSH-Px检测

H9c2细胞按每孔 1×10^5 接种于6孔板,每孔1 mL,细胞贴壁24 h。按照“2.1”项方法圣草次昔处理及缺氧复氧完成后,弃去上清,收集细胞加入PBS,用细胞破碎仪冰上破碎, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低温离心10 min,取上清根据试剂盒说明书检测细胞内MDA、SOD、CAT、GSH-Px水平。

2.7 Western blotting检测心肌细胞蛋白表达

H9c2细胞按每孔 1×10^5 接种于6孔板,每孔1 mL,细胞贴壁24 h。按照“2.1”项方法圣草次昔处理及缺氧复氧完成后,弃细胞上清,预冷PBS洗涤2次,加入RIPA(强)裂解液(含1% PMSF和1%蛋白酶抑制剂)冰上裂解30 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心

15 min,收集上清液即为总蛋白,细胞核蛋白提取按核蛋白抽提试剂盒操作说明进行。BCA法测定蛋白浓度,每组取20 g总蛋白,12% SDS-PAGE分离蛋白,用电转移法将蛋白质转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭3 h,分别加入Nrf2、HO-1、GCL、 β -actin、Lamin A一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST溶液洗涤3次(每次5 min),加入辣根素过氧化物酶标记的二抗,室温孵育4 h,TBST溶液洗膜3次(每次5 min),化学发光法显影。

2.8 统计学分析

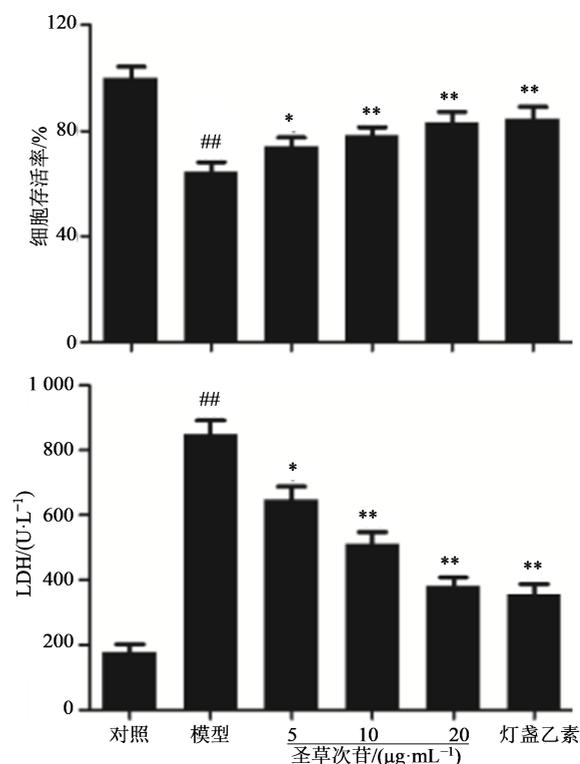
采用SPSS18.0软件对数据进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用单因素方差分析法。

3 结果

3.1 圣草次昔改善H/R诱导的H9C2心肌细胞损伤

如图1所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 圣草次昔及20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 灯盏乙素显著提高细胞存活率($P < 0.05$ 、 0.01)。

与对照组比较,模型组细胞上清中LDH水



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图1 圣草次昔对H/R诱导H9c2细胞损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Fig. 1 Protective effect of ERI on H9c2 cells injury induced by H/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 圣草次苷及 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 灯盏乙素显著降低 LDH 水平($P < 0.05, 0.01$)。结果说明,圣草次苷可降低 H/R 诱导的 H9c2 细胞损伤,增强细胞活力。20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 圣草次苷与灯盏乙素比较,细胞存活率及 LDH 水平无显著差异。

3.2 圣草次苷降低 H/R 诱导的 H9c2 细胞凋亡

如图 2 所示,对照组细胞无明显凋亡发生,与对照组比较,H/R 模型组 H9c2 细胞凋亡数明显增多($P < 0.01$);与模型组比较,圣草次苷 10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可剂量相关性地减少 H9c2 细胞凋亡($P < 0.01$)。

3.3 圣草次苷改善 H/R 损伤的 H9c2 细胞线粒体膜电位降低

线粒体是与细胞能量代谢调控相关的关键细胞器,线粒体膜电位降低引起膜去极化并诱发线粒体路径的凋亡发生。如图 3 所示,对照组 H9c2 细胞中的线粒体在 JC-1 染色后发出红色荧光,与对照组

比较,H/R 显著增加绿色荧光的强度,表明线粒体膜电位显著去极化($P < 0.01$);与模型组比较,圣草次苷 5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 预处理显著增加线粒体膜电位($P < 0.05, 0.01$)。

3.4 圣草次苷降低 H/R 损伤的 H9c2 细胞 ROS 水平

为了评估圣草次苷抗氧化能力,本研究以 DCFH-DA 为探针对 H/R 损伤 H9c2 细胞内 ROS 释放量进行了检测。如图 4 所示,与对照组比较,模型组细胞内 ROS 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 圣草次苷组细胞内 ROS 水平显著降低($P < 0.01$)。结果提示,圣草次苷可通过抑制 ROS 释放抵抗 H/R 诱导的细胞氧化应激损伤。

3.5 圣草次苷提高 H/R 损伤的 H9c2 细胞 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力,降低 MDA 水平

如图 5 所示,与对照组比较,模型组的 MDA 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,圣草次苷

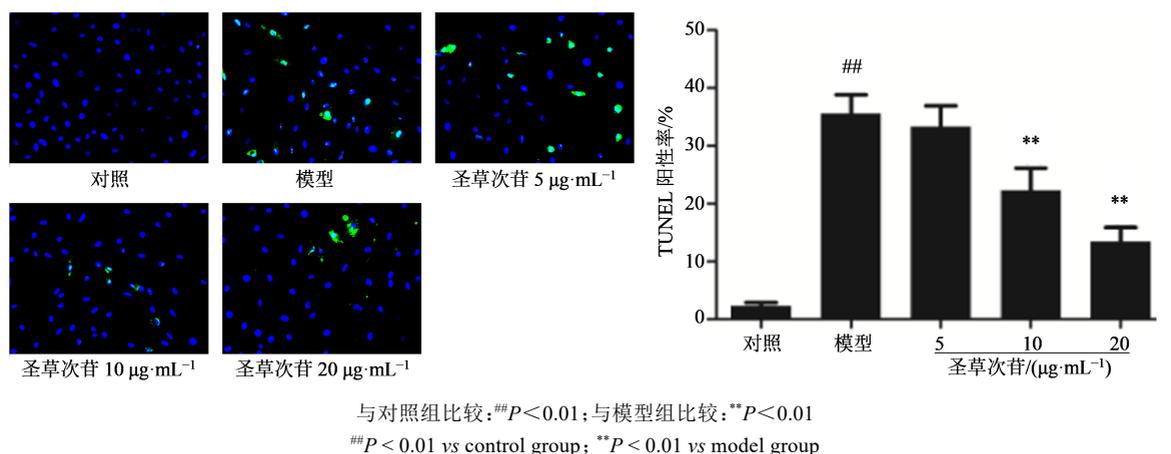


图 2 圣草次苷对 H/R 诱导 H9c2 细胞凋亡保护作用($\times 200$, TUNEL 染色, $\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Protective effect of ERI on H9c2 cells apoptosis induced by H/R ($\times 200$, TUNEL staining, $\bar{x} \pm s, n=3$)

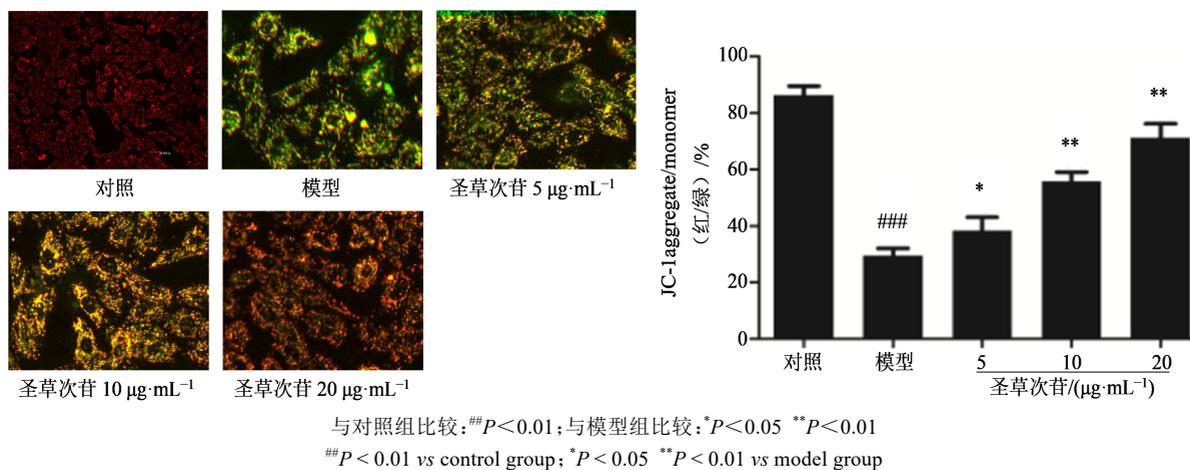


图 3 圣草次苷对 H/R 诱导 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响($\times 200$, JC-1 染色, $\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of ERI on mitochondrial membrane potential in H9c2 cells injured by H/R ($\times 200$, JC-1 staining $\bar{x} \pm s, n=3$)

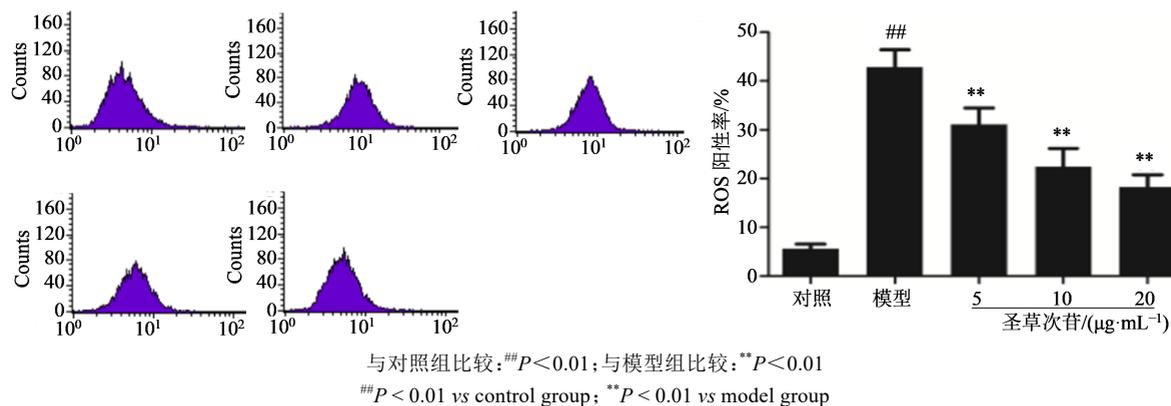


图4 圣草次苷对H/R诱导H9c2细胞ROS水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of ERI on ROS production in H9c2 cells injured by H/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

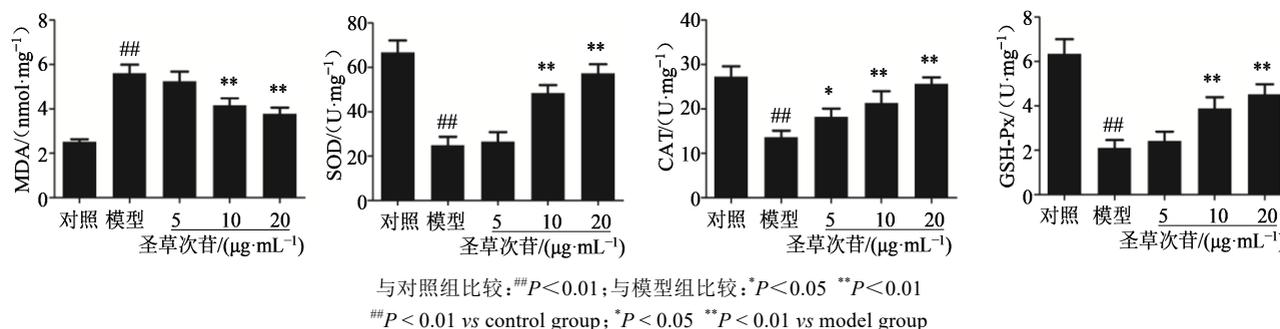


图5 圣草次苷对H/R诱导H9c2细胞抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活力及MDA水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of ERI on anti-oxidant enzyme (SOD, CAT, and GSH-Px) activity and MDA level in H9c2 cells injured by H/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可剂量相关性降低MDA水平($P < 0.01$)。与对照组比较,模型组的抗氧化酶SOD、CAT与GSH-Px活力都显著下降($P < 0.01$);圣草次苷组的抗氧化酶水平较模型组显著增加($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。提示圣草次苷可以增加H/R损伤的H9c2细胞内源性抗氧化能力,减轻氧化应激损伤。

3.6 圣草次苷对H/R损伤的H9c2细胞Nrf2信号通路的影响

Nrf2及其下游的HO-1和GCL蛋白是重要的抗

氧化信号通路,推测圣草次苷的抗氧化作用可能与该通路相关,根据Western blotting结果(图6)可知,与对照组比较,模型组细胞核Nrf2、HO-1和GCL水平有所增加,但没有统计学意义;与模型组比较,圣草次苷10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可以显著增加Nrf2的核转位以及HO-1和GCL表达水平($P < 0.01$),从而使细胞内源性抗氧化作用显著增强。提示圣草次苷抗氧化作用有可能是通过激活Nrf2信号通路来实现的。

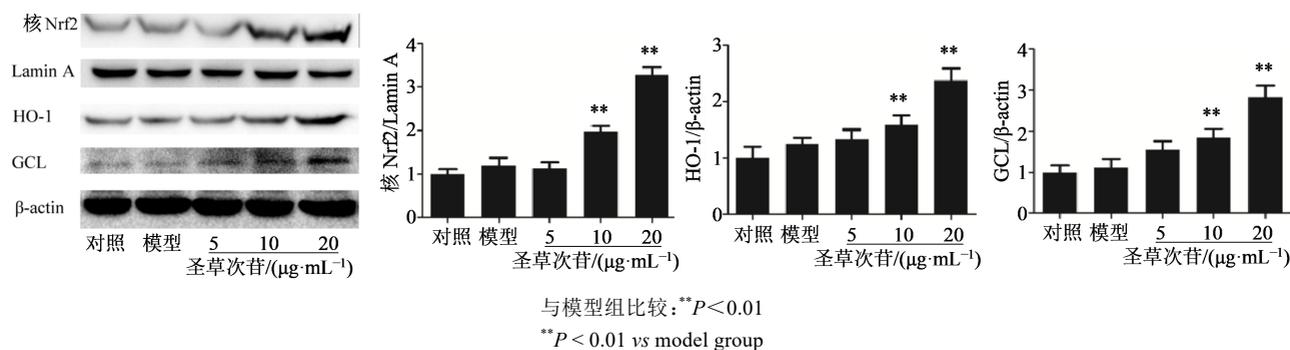


图6 圣草次苷对H9c2细胞Nrf2、HO-1、GCL蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of ERI on expression levels of Nrf2, HO-1, and GCL in H9c2 cells injured by H/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

目前,由 I/R 损伤引起的心肌损伤仍然是医学界急需解决的难题之一^[8]。如何有效地预防 MIRI 依然是当前研究的热点问题。本研究在证明圣草次昔对 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞损伤的基础上,首次从抗氧化角度对其作用机制进行了研究,证明圣草次昔可通过激活 Nrf2 信号通路,增加心肌细胞内源性抗氧化能力,降低细胞氧化应激损伤,发挥心肌保护作用。本研究中,首先通过 MTT 细胞活力检测及细胞培养液上清 LDH 活力检测,证明圣草次昔可以减轻 H/R 诱导的 H9c2 细胞损伤。进一步通过 JC-1 染色及 TUNEL 染色,证明圣草次昔可以显著提高细胞线粒体膜电位,降低细胞凋亡发生。

氧化应激是 MIRI 的主要机制之一,在心肌缺氧及再灌注过程中,会有大量氧自由基生成,ROS 可以通过一系列级联反应诱导心肌细胞的损伤、凋亡^[9]。通过流式细胞术检测,发现模型组细胞内 ROS 水平显著升高,圣草次昔可剂量相关性降低细胞内 ROS 水平,其心肌保护作用可能与抗氧化作用有关。SOD、CAT、GSH-Px 是细胞内源性抗氧化酶,其活性高低可间接反映细胞清除氧自由基的能力^[10]。MDA 是氧自由基攻击细胞膜不饱和脂肪酸的过氧化产物,其水平可间接反映心肌细胞氧化应激损伤程度^[11]。本研究发现心肌细胞 H/R 损伤后,SOD、CAT、GSH-Px 活力明显降低,MDA 的水平显著升高,加入圣草次昔处理后,SOD、CAT、GSH-Px 活力明显上升,MDA 的水平明显下降,进一步证明圣草次昔可以增加心肌细胞内源性抗氧化酶水平,增加细胞抗氧化能力,降低氧化应激损伤。

Nrf2 信号通路是细胞内抗氧化应激和维持氧化还原平衡的重要通路之一^[12]。正常情况下,Nrf2 位于胞浆中与 Keap1 结合,当细胞受到外界刺激,如氧自由基及抗氧化剂等,改变了 Keap1 蛋白半胱氨酸的巯基残基结构,这种半胱氨酸残基结构改变导致 Nrf2 从 Keap1 解离,从而增加 Nrf2 稳定性并进一步促进 Nrf2 易位到细胞核,继而 Nrf2 结合到 DNA 上的抗氧化反应元件,启动细胞保护基因的转录,生成相关抗氧化蛋白,如 HO-1、NADPH 醌氧化还原酶 1 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶等^[13-14]。本研究发现,心肌细胞 H/R 损伤后,Nrf2 核转位及 HO-1、GCL 的蛋白表达水平有所增加,但没有统计学意义,这并不足以清除过多的 ROS,而圣草次昔 ($10, 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理后显著增加 Nrf2 核转位及 HO-1、GCL 的蛋白表达水平。

本研究首次从抗氧化角度研究了圣草次昔对 H/R 诱导的心肌细胞损伤保护作用,其作用机制可能与激活 Nrf2 信号通路,增加细胞内源性抗氧化能力,降低氧化应激损伤有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] García-Niño W R, Correa F, Rodríguez-Barrena J I, et al. Cardioprotective kinase signaling to subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria is mediated by caveolar structures [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112(2): 15.
- [2] 谢静文, 苏天德, 魏雨亭, 等. 抗氧化药物在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展 [J]. *药理学学报*, 2021(7): 1845-1855.
- [3] Xie J W, Su T D, Wei Y T, et al. Research progress of antioxidant drugs in myocardial ischemiareperfusion injury [J]. *Acta Pharm*, 2021, 56(7): 1845-1855.
- [4] Kura B, Szeiffova Bacova B, Kalocayova B, et al. Oxidative stress-responsive microRNAs in heart injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 358.
- [5] Kwon E Y, Choi M S. Eriocitrin improves adiposity and related metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice [J]. *J Med Food*, 2020, 23(3): 233-241.
- [6] 张晓愉, 张昆鹏, 王建民, 等. 圣草次昔调控 MPTP 诱导的慢性小鼠帕金森疾病和机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(3): 369-374.
- [7] Zhang X Y, Zhang K P, Wang J M, et al. Study on eriocitrin alleviating MPTP-induced chronic Parkinson's disease in rats and its mechanism [J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36: 369-374.
- [8] 梁曾恩妮, 汪秋安, 张菊华, 等. 圣草次昔的合成及其对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *食品科学*, 2021, 42(15): 159-166.
- [9] Liang Z E N, Wang Q A, Zhang J H, et al. Synthesis and protective effect on oxidative damage of eriocitrin in hydrogen peroxide-induced HUVEC cells [J]. *Food Sci*, 2021, 42(15): 159-166.
- [10] 李丽丽, 杨桂枝, 田志斌, 等. 圣草次昔对大鼠缺血再灌注心肌损伤的保护作用 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(9): 1505-1512.
- [11] Li L L, Yang G Z, Tian Z B. Protective effect of eriocitrin from myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(9): 1506-1512.
- [12] Chen R C, Sun G B, Wang J, et al. Naringin protects against Anoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells via the Nrf2 signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2015, 6(4): 1331-1344.
- [13] Szabo D, Sarszegi Z, Polgar B, et al. PACAP-38 in acute

- ST-segment elevation myocardial infarction in humans and pigs: A translational study [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (6): 2883.
- [10] Marzilli M, Merz C N, Boden W E, et al. Obstructive coronary atherosclerosis and ischemic heart disease: An elusive link! [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(11): 951-956.
- [11] Zhao Y X, Zhang X, Luan J, et al. Shenxian-Shengmai oral liquid reduces myocardial oxidative stress and protects myocardium from ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48 (6): 2503-2516.
- [12] Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89.
- [13] Stępkowski T M, Kruszewski M K. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(9): 1186-1195.
- [14] Peng S J, Zhang B X, Meng X K, et al. Synthesis of piperlongumine analogues and discovery of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activators as potential neuroprotective agents [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(13): 5242-5255.

[责任编辑 兰新新]