

H2 型松弛素促进人血管平滑肌细胞迁移的作用及机制

马晓娟,王 侠,丁肖华,付毓平

(新乡医学院三全学院检验与影像学院,河南新乡 453003)

[摘要] **目的** 探讨 H2 型松弛素(Relaxin-2)对血管平滑肌细胞(VSMCs)迁移的作用及分子机制。**方法** 采用划痕实验和 Transwell 实验检测 Relaxin-2 对 VSMCs 的迁移作用;采用蛋白质印迹法检测其对细胞信号蛋白丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)、细胞外信号调节激酶(ERK)、核因子- κ B(NF- κ B) p65 的影响。**结果** Relaxin-2 可剂量依赖性促进 VSMCs 的迁移,应用 NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082 可阻断 Relaxin-2 诱导的基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达,磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)抑制剂 LY294002 和 ERK 抑制剂 U0126 预处理可以降低 Relaxin-2 引起的 NF- κ B p65 的激活。**结论** Relaxin-2 可能通过活化 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路激活 NF- κ B p65,进而促进 MMP-9 和 MMP-2 的表达,从而诱导 VSMCs 迁移效应。

[关键词] H2 型松弛素;血管平滑肌细胞;迁移

[中图分类号] R329.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)30-4207-04

Role of Relaxin-2 in the migration of human vascular smooth muscle cells and its underlying mechanisms

Ma Xiaojuan, Wang Xia, Ding Xiaohua, Fu Yuping

(Department of Inspection and Image, Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and the associated mechanism of Relaxin-2 in the migration of human vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** The migration of VSMCs in responding to Relaxin-2 was evaluated by using wound healing assay and transwell assay, and the cell signaling proteins, including Akt, ERK and NF- κ B p65, in responding to Relaxin-2 were measured by using Western blotting assay. **Results** Relaxin-2 can promote the migration of VSMCs in a dose-dependent manner, NF- κ B inhibitor BAY11-7082 can block the expression of MMP-9 and MMP-2 induced by Relaxin-2, pretreatment with PI3K inhibitor LY294002 and ERK inhibitor U0126 can reduce the activation of NF- κ B p65 induced by Relaxin-2. **Conclusion** NF- κ B p65 could be activated by the activation of PI3K/Akt and ERK signaling pathway induced by Relaxin-2, thereby promoting the expression of MMP-9 and MMP-2, and inducing VSMCs migration effect.

[Key words] Relaxin-2; vascular smooth muscle cells; migration

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)在维持血管稳态中发挥重要作用。当血管受到损伤或外界刺激时可引起 VSMCs 的增殖和迁移, VSMCs 迁移至内膜引起的内膜增生是血管外科搭桥术、经皮血管成形术、血管移植术等手术后血管再狭窄发生的重要因素^[1]。外界因素主要包括细胞因子、趋化因子、生长因子及基质金属蛋白酶(matrix Metalloproteinases, MMPs)等,均可引起 VSMCs 的迁移。正常的 VSMCs 位于血管中膜层,周围由细胞外基质包裹,阻止 VSMCs 的迁移^[2]。MMPs 表达异常时可引起细胞外基质的降解,从而使 VSMCs 失去控制,获得迁移能力, MMPs 表达异常引起的 VSMCs 迁移在动脉粥样发病中起重要作用。其中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)是 MMPs 家族中的两个重要成员,在 VSMCs 迁移中起关键作用^[3]。核因子- κ B(NF- κ B)是参与炎症的重要转录因子, NF- κ B 也是参与 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的重要调控因子^[4]。研究发现,磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)和细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路在 NF- κ B 激活中发挥重要作用^[5]。松弛素一直作为一种孕激素为人们所了解, H2 型松弛素(Relaxin-2)是其中一种亚型,是机体循环中最主要的成分之一。过去研究表明,松弛素具有抗纤维化、治疗心衰、改善心肌缺血再灌注损伤、降低血压等心血管保护作用^[6]。但近年来发现,松弛素具有促进细胞迁移的效应,且有研究发现人骨肉瘤组织和骨肉瘤患者血清中的 Relaxin-2 水平呈不同

程度的增加,其中,晚期骨肉瘤患者和血行转移癌患者血清 Relaxin-2 水平更高,体外实验表明下调 Relaxin-2 可以抑制 MG-63 骨肉瘤细胞的迁移和血管生成等生物学效应^[7]。此外, Relaxin-2 具有促进 MMP-2 和 MMP-9 表达的效应^[8],提示 Relaxin-2 可能在 VSMCs 的迁移中发挥作用,松弛素可以激活 NF- κ B p65 信号通路减弱内皮素诱导的血管收缩,还有研究发现 Relaxin-2 通过激活 PI3K/Akt 和 ERK 参与纤维软骨细胞 MMP-9 的产生,但目前并没有松弛素对 VSMCs 迁移效应的报道。本研究旨在探讨松弛素对 VSMCs 迁移的效应,以及确定松弛素是否可以通过 PI3K/Akt、ERK 和 NF- κ B 上调 MMP-2 和 MMP-9 进而引起 VSMCs 的迁移效应,为治疗血管再狭窄和动脉粥样硬化等疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 人的 VSMCs 系购自美国 ATCC 公司, Relaxin 2 (Human)购自美国 Phoenix Biotech 公司, Dulbecco 氏改良 Eagle 培养基/F-12(DMEM/F-12)培养基、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司,青霉素、链霉素和二甲基亚砷(DMSO)均购自美国 Sigma 公司, Akt 兔多克隆抗体及其磷酸化抗体、ERK1/2 兔多克隆抗体及其磷酸化抗体和内参三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)兔多克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, NF- κ B p65 兔多克隆抗体、MMP-9 兔多克隆抗体和 MMP-2 兔多克隆抗体均购自美国 Proteintech 公司。放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓

度测定试剂盒、5×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(5×SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液、彩色预染蛋白质相对分子质量标准、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、BeyoECL Plus 超敏电化学发光(ECL)试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法。

1.2.1 VSMCs 培养 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基培养人 VSMCs, 37 °C 5% 二氧化碳(CO₂) 培养, 每 2 天换 1 次液, 待细胞生长至密度为 70%~80% 时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:3 或 1:4 进行传代, 取对数生长期细胞用于实验。以未用 Relaxin-2 处理的 VSMCs 作为对照。

1.2.2 细胞划痕实验 通过划痕实验来检测 Relaxin-2 对人 VSMCs 的迁移能力, 胰酶消化对数生长期 VSMCs, 以每孔 1×10⁴ 个细胞接种于 24 孔板内, 待细胞生长到单层融合状态时, 用 200 μL 移液器枪头在培养板底部进行划痕, 划痕呈“一”字, 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻洗去悬浮的细胞, 加入无血清的培养基, 在 5% CO₂ 和 37 °C 恒温条件下孵箱继续培养 24 h, 在相同位置和相同放大倍数下观察并照相, 测量细胞的相对迁移距离。

1.2.3 Transwell 实验 通过 Transwell 实验来检测 Relaxin-2 对人 VSMCs 的迁移能力, 取对数生长期的 VSMCs, 将浓度每孔 1×10⁴ 个细胞的无血清细胞悬液接种到 Transwell 小室上室, 向 Transwell 小室下室加入含不同浓度 Relaxin-2(10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L) 的无血清培养基在 5% CO₂ 37 °C 恒温孵箱中继续培养 24 h, 使细胞迁移至基底膜下, 取出小室, 用棉签拭去上室表面未迁移过去的细胞, 用甲醇固定 20 min, 风干, 1% 结晶紫染色 5 min, 将培养小室倒置, 在光学显微镜下观察、照相, 并每组随机选取 5 个视野, 计数每低倍视野滤膜底面的平均细胞数。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western blotting)检测蛋白的表达 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 冰上裂解 30 min, 4 °C 低温离心机 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, BCA 法测定细胞蛋白浓度, 加入适量的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 100 °C 水浴加热 5 min 使蛋白充分变性保存备用, 用微量加样器将等量的蛋白加入到上样孔中, 经 SDS-PAGE 分离蛋白后, 将蛋白电转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, 1×TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入合适浓度的一抗, 4 °C 缓慢摇动过夜, 第 2 天取出 PVDF 膜, 1×TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的合适二抗, 室温孵育 1 h, 1×TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入超敏 ECL 发光液, 发光仪检测抗体结合条带。

1.2.5 细胞核蛋白和细胞质蛋白的分离 根据生产厂家提供的提取步骤, 在低渗透压条件下, 使细胞充分膨胀, 然后破坏细胞膜, 释放出细胞质蛋白, 然后通过离心得到细胞核沉淀。最

后通过高盐的细胞核蛋白抽提试剂抽提得到细胞核蛋白和细胞质蛋白。细胞质蛋白以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参, 细胞核蛋白以 Lamine 为内参。

1.2.6 细胞免疫荧光 将对数生长期的细胞分别给予无菌 PBS 和 10⁻⁵ mol/L 的 Relaxin-2 刺激 24 h 后, PBS 清洗 1 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 滴加 0.1% Triton X-100 室温孵育 10 min, 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加即用型正常山羊血清, 置于湿盒中 37 °C 孵育 1 h, 弃去血清, 勿洗, 加入合适浓度的 NF-κB p65 抗体(1:200), 4 °C 冰箱过夜。弃去一抗, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 加入合适浓度的异硫氰酸荧光素标记的猴抗羊抗体 IgG(FITC-conjugated monkey anti-goat IgG, 1:200), 置入暗盒中 30 min, 4', 6-二脒基-2-苯基喹啉(DAPI)染色 5 min, 滴加防荧光猝灭剂, 封片, 暗盒内风干荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用完全随机资料的方差分析, 两组间进行 SNK 法分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Relaxin-2 促进 VSMCs 的迁移 细胞划痕实验和 Transwell 实验证明 Relaxin-2 可剂量依赖性(10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L) 促进 VSMCs 的迁移, 与对照组相比, Relaxin-2 明显增加 VSMCs 的迁移距离和穿透数目($P < 0.05$), 见图 1、表 1。因此本研究选择 10⁻⁵ mol/L 的 Relaxin-2 做下一步研究。

2.2 Relaxin-2 促进 MMP-9 和 MMP-2 的表达 Western blotting 实验结果表明 Relaxin-2 可促进 MMP-9 和 MMP-2 的表达, Relaxin-2 处理 VSMCs 12 h 即可引起 MMP-9 和 MMP-2 的表达增加, 24 h 效果更加明显($P < 0.05$), 见图 2。

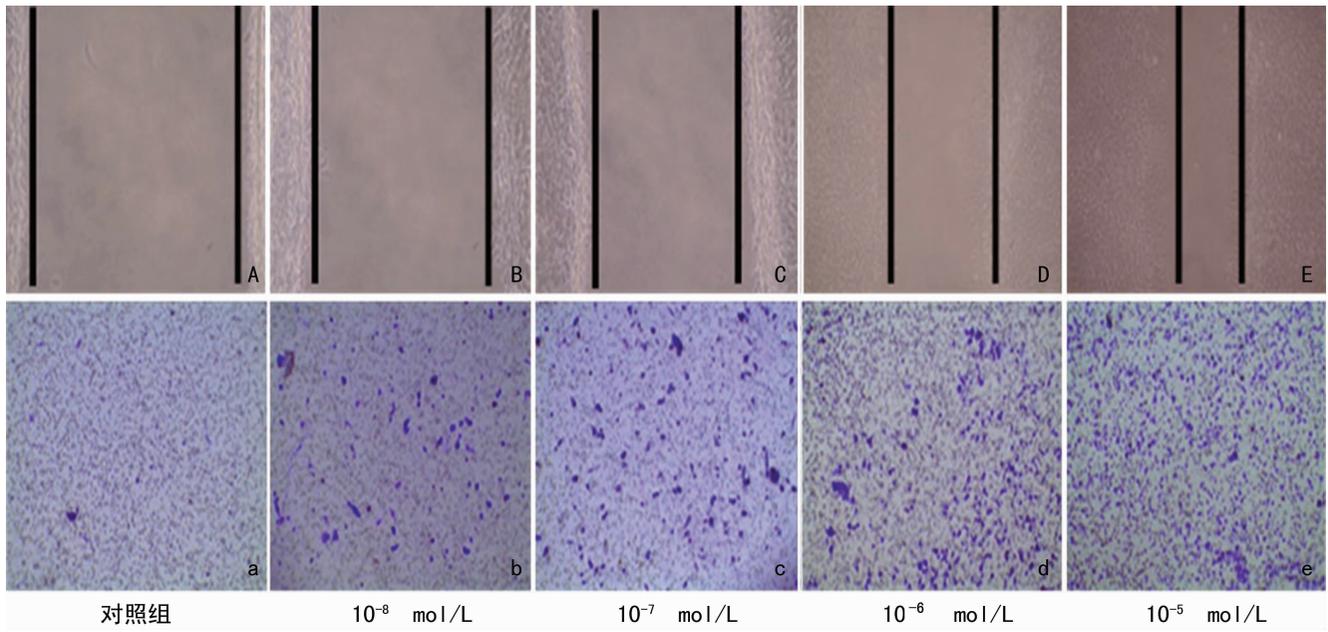
2.3 NF-κB p65 参与 Relaxin-2 诱导的 MMP-9 和 MMP-2 的表达 为了研究 Relaxin-2 可促进 MMP-9 和 MMP-2 表达的机制, 进一步研究发现 Relaxin-2 可引起 NF-κB p65 的核移位, 表现为细胞质的 NF-κB p65 水平下降($P < 0.05$, 图 3B), 但细胞核内的 NF-κB p65 水平明显升高($P < 0.05$, 图 3A), 提示 Relaxin-2 可引起 NF-κB p65 的激活, 细胞免疫荧光进一步证实 Relaxin-2 促进 NF-κB p65 的核移位(图 4)。应用 NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082 可阻断 Relaxin-2 诱导的 MMP-9 和 MMP-2 的表达(图 5)。

2.4 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路 Relaxin-2 的 NF-κB p65 激活 为了研究 Relaxin-2 可促进 NF-κB p65 激活的机制, 进一步研究发现 Relaxin-2 可促进 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化($P < 0.05$, 图 6), 应用 PI3K 抑制剂 LY294002 和 ERK 抑制剂 U0126 预处理可以降低 Relaxin-2 引起的 NF-κB p65 核移位, 提示 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路参与了 Relaxin-2 诱导的 NF-κB p65 激活(图 7)。

表 1 不同水平 Relaxin-2 处理人 VSMCs 系 24 h 后细胞迁移情况($\bar{x} \pm s$)

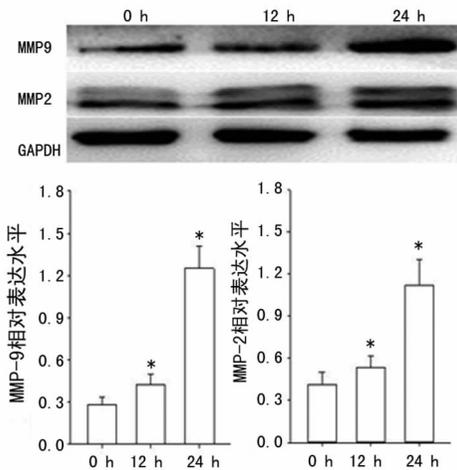
项目	对照组	Relaxin-2 水平(mol/L)			
		10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
迁移距离(μm)	3.4±1.1	6.7±2.3*	8.4±2.7*	12.3±3.8*	16.2±5.2*
迁移细胞数(个)	5.7±2.6	25.6±7.9*	45.7±11.7*	92.4±18.3*	214.3±34.4*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。



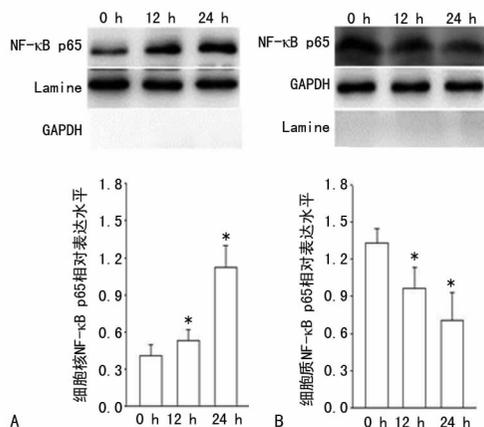
A~E: 划痕实验, 不同水平 Relaxin-2 (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 处理人 VSMCs 系 24 h 后细胞迁移情况; a~e: Transwell 实验, 不同水平 Relaxin-2 (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 处理人 VSMCs 系 24 h 后细胞迁移情况。

图 1 Relaxin-2 促进 VSMCs 的迁移 ($\times 100$)



*: $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

图 2 Relaxin-2 促进 MMP-9 和 MMP-2 的表达



A: 细胞核; B: 细胞质; *: $P < 0.05$, 与 0 h 组比较; Lamine: 细胞核蛋白内参; GAPDH: 细胞质蛋白内参。

图 3 Relaxin-2 对 NFκB-p65 的影响

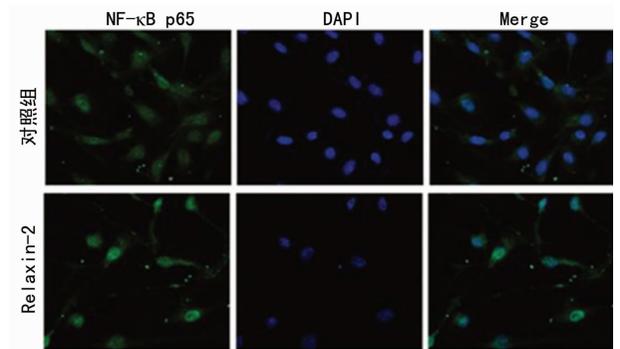
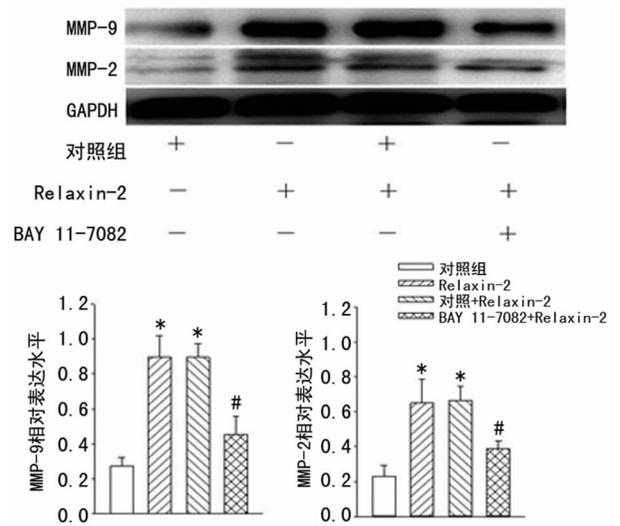
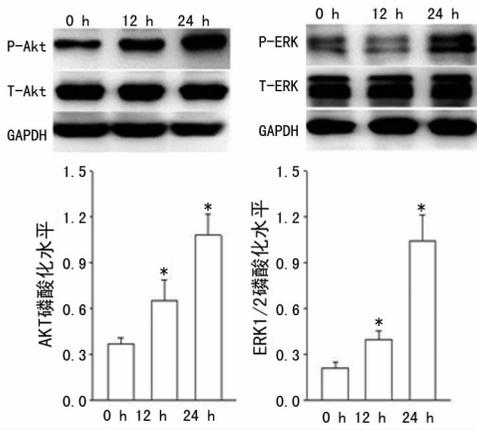


图 4 细胞免疫荧光显示 Relaxin-2 促进 NFκB-p65 的核移位 ($\times 400$)



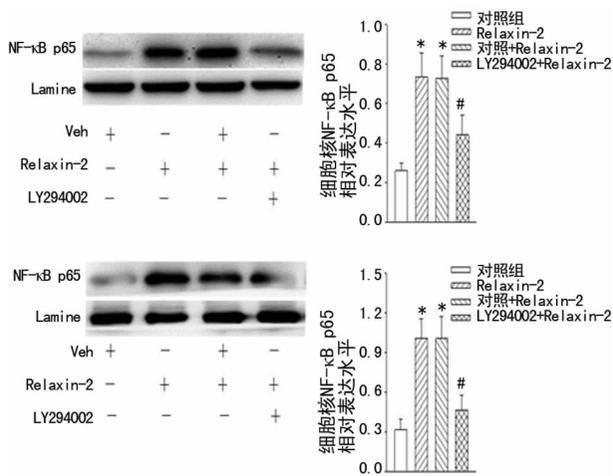
*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与对照+Relaxin-2 组比较; BAY 11-7082: NF-κB 抑制剂。

图 5 NF-κB p65 参与 Relaxin-2 诱导的 MMP-9 和 MMP-2 的表达



*: $P < 0.05$, 与 0 h 比较。

图 6 Relaxin-2 对 Akt 和 ERK1/2 磷酸化水平的影响



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与对照 + Relaxin-2 组比较。

图 7 Akt 和 ERK 信号通路对 Relaxin-2 诱导的 NF-κB p65 核移位的影响

3 讨论

当受到外界刺激或疾病状态下,静止的 VSMCs 获得迁移能力,VSMCs 的迁移是动脉粥样硬化斑块形成和血管成形术后再狭窄等心血管疾病的共同病理特征。抑制 VSMCs 过度迁移的关键靶点成为治疗血管再狭窄和动脉粥样硬化等疾病的重要策略之一。本研究发现,Relaxin-2 可通过激活 PI3K/Akt 和 ERK 等关键细胞通路促进 NF-κB p65 转录因子的核移位,上调 MMP-9 和 MMP-2 的表达,促进细胞外基质的降解,引起 VSMCs 迁移效应。

研究发现,松弛素还可促进乳腺癌细胞的侵袭能力,这些结果表明松弛素可能具有促进细胞迁移的能力^[8]。正常机体情况下,VSMCs 处于分化状态,不具有迁移能力,但当血管受损或在机械刺激等因素作用下,VSMCs 即可获得迁移能力,VSMCs 的迁移参与了动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等心血管疾病的发生、发展。但目前并没有相关研究证实松弛素对 VSMCs 迁移是否有影响,本研究通过细胞划痕实验和 Transwell 实验初步证实 Relaxin-2 具有促进 VSMCs 迁移的作用。

MMPs 是一类锌蛋白酶,在动脉粥样硬化和血管损伤时可促进细胞外基质的降解,正常情况下,VSMCs 被细胞外基质

包裹,起到阻止 VSMCs 迁移的作用。在血管损伤等情况下,MMPs 表达会发生异常增加,通过降解细胞外基质来促进 VSMCs 的迁移。MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族的重要成员,研究表明,其表达增加参与了血小板衍生生长因子-BB (PDGF-BB)和葡萄糖诱导的 VSMCs 的迁移^[8],在球囊损伤引起的血管内膜增生模型中,二者表达均出现上调现象^[9],且松弛素可引起心肌细胞产生 MMP-2 和 MMP-9,从而参与心肌细胞外基质的重构^[7]。研究还发现,用 Relaxin-2 处理人皮肤成纤维细胞,也可促进 MMP-2 和 MMP-9 的表达,进而抑制胶原沉积和肌成纤维细胞的异常分化^[6]。本研究发现,Relaxin-2 可促进 MMP-9 和 MMP-2 的表达,Relaxin-2 处理 VSMCs 可引起 MMP-9 和 MMP-2 的表达增加,结果表明,MMP-9 和 MMP-2 表达上调可能参与了 Relaxin-2 引起的 VSMCs 的迁移。

NF-κB 是参与炎症的重要转录因子,NF-κB 激活参与了 VSMCs 的迁移效应和血管损伤引起的内膜损伤,此外研究还表明 NF-κB 是 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的重要调控因子。另有研究表明,松弛素可以激活 NF-κB 信号通路促使人单核细胞系 THP-1 分泌 MMP-9^[10]。阻断 NF-κB 信号通路可抑制 Relaxin-2 引起的前列腺癌细胞株的过度增殖^[9]。松弛素可以激活 NF-κB p65 信号通路减弱内皮素诱导的血管收缩。本研究发现,Relaxin-2 可引起 NF-κB p65 的核移位,表现为细胞质的 NF-κB p65 水平下降,但细胞核内的 NF-κB p65 水平明显升高,提示 Relaxin-2 可引起 NF-κB p65 的激活,应用 NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082 可阻断 Relaxin-2 诱导的 MMP-9 和 MMP-2 的表达。结果表明,Relaxin-2 可通过 NF-κB p65 信号通路参与 MMP-9 和 MMP-2 的表达,进而促进 VSMCs 的迁移。PI3K/Akt 和 ERK 等信号通路参与了 VSMCs 的迁移效应,且 PI3K/Akt 和 ERK 等信号通路的激活是促进 NF-κB p65 活化的重要因素^[11]。研究发现,Relaxin-2 可通过激活 Akt/糖原合成酶激酶 3β(GSK3β)信号通路促进人类绒毛外滋养细胞的增殖,还可通过激活 Akt/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、MMP-9 的表达参与人骨肉瘤细胞的生物学效应^[12-13]。还有研究发现,Relaxin-2 通过激活 PI3K/Akt 和 ERK 参与纤维软骨细胞 MMP-9 的产生^[14]。本研究发现,Relaxin-2 可促进 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化,应用 PI3K 抑制剂 LY294002 和 ERK 抑制剂 U0126 预处理可以降低 RLN-2 引起的 NF-κB p65 的激活,提示 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路参与了 Relaxin-2 诱导的 NF-κB p65 的激活。

参考文献

- [1] Nair VB, Samuel CS, Separovic F, et al. Human relaxin-2: historical perspectives and role in cancer biology[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(3): 1131-1140.
- [2] Dschietzig TB. Recombinant human relaxin-2: (how) can a pregnancy hormone save lives in acute heart failure? [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2014, 14(5): 343-355.
- [3] Ma J, Niu M, Yang W, et al. Role of relaxin-2 in human primary osteosarcoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2013(13): 59.
- [4] Ji BC, Hsiao YP, Tsai CH, et al. Cantharidin impairs cell migration and invasion of A375, S2 human melanoma cells by suppressing MMP-2 and -9 through PI3K/NF-κB signaling pathways[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(2): 729-738.

(下转第 4213 页)

可抑制 SNMC 的作用,促进小鼠急性肝损伤的发生。因此,以上研究提示,SNMC 可通过调节 NF- κ B 信号通路降低急性肝损伤的严重程度。本研究通过检测不同肝功指标,观察加入 proDTC 前后 SNMC 对小鼠急性肝损伤的影响。然而,由于 SNMC 对肝细胞的影响是多方面的,不仅仅可降低肝损伤程度,同时与肝纤维化、细胞凋亡坏死、脂肪肝及水样变性等密切相关^[4,15]。提示一方面 NF- κ B 信号通路不仅参与了 SNMC 的抗损伤作用;同时 NF- κ B 通路可能只是 SNMC 抗肝损伤机制的一小部分,很可能还存在其他的机制。本研究以 SNMC 抗肝损伤为媒介,深入探讨急性肝损伤的发生、发展机制,从而更好地控制急性肝损伤,为临床用药提供更多的理论指导。

参考文献

- [1] Taylor SA, Whittington PF. Neonatal acute liver failure [J]. *Liver Transpl*, 2016, 22(5): 677-685.
- [2] Licata A. Adverse drug reactions and organ damage: the liver[J]. *Eur J Intern Med*, 2016(28): 9-16.
- [3] Agrawal S, Dhiman RK, Limdi JK. Evaluation of abnormal liver function tests[J]. *Postgrad Medical J*, 2016, 92(1086): 223-234.
- [4] Matsuzaki Y, Ikegami T, Saito Y. Alternative therapies for hepatitis C: UDCA and SNMC[J]. *Nihon Rinsho*, 2011, 69(Suppl 4): 256-261.
- [5] 陈立艳, 杨宝山, 马英骥, 等. 复方甘草酸苷对小鼠暴发性肝功能衰竭的保护作用[J]. *中华肝病杂志*, 2005, 13(3): 209-212.
- [6] 何水清, 卢瑞廷. 舒肝宁联合复方甘草酸苷治疗急性肝损伤 120 例[J]. *中国实用医药*, 2014, 9(20): 182-183.
- [7] Bak J, Je Nam K, Chung HY, et al. Oligonol ameliorates CCl₄-induced liver injury in rats via the NF-Kappa B and

MAPK signaling pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016(2016): 3935841.

- [8] Luedde T, Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver[J]. *Liver Int*, 2006, 26(10): 1163-1174.
- [9] Wu J, Zern MA. NF-kappa B, liposomes and pathogenesis of hepatic injury and fibrosis[J]. *Front Biosci*, 1999(4): D520-527.
- [10] Jacob KA, Hjortnaes J, Kranenburg G, et al. Mortality after cardiac surgery in patients with liver cirrhosis classified by the Child-Pugh score[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2015, 20(4): 520-530.
- [11] Chughlay MF, Kramer N, Spearman CW, et al. N-acetylcysteine for non-paracetamol drug-induced liver injury: a systematic review[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 81(6): 1021-1029.
- [12] Juan J, Feld JJ. Hepatitis B virus and hepatitis C virus treatment and management in patients receiving immunomodifying agents[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2014, 26(4): 395-403.
- [13] Arii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2003, 10(3): 189-194.
- [14] Shin T, Kuboki S, Lentsch AB. Roles of nuclear factor-kappaB in postischemic liver[J]. *Hepatol Res*, 2008, 38(5): 429-440.
- [15] 王岩, 马英骥, 杨宝山, 等. 复方甘草酸苷减轻 HepG2 细胞凋亡的机制[J]. *中华肝病杂志*, 2005, 13(2): 132-135.

(收稿日期: 2016-03-23 修回日期: 2016-07-11)

(上接第 4210 页)

- [5] Askvig JM, Watt JA. The MAPK and PI3K pathways mediate CNTF-induced neuronal survival and process outgrowth in hypothalamic organotypic cultures [J]. *J Cell Commun Signal*, 2015, 9(3): 217-231.
- [6] Feng S, Agoulnik IU, Li Z, et al. Relaxin/RXFP1 signaling in prostate cancer progression[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009(1160): 379-380.
- [7] Cao WH, Liu HM, Liu X, et al. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by upregulation of S100A4/MMPs signaling [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(5): 609-617.
- [8] Figueiredo KA, Rossi G, Cox ME. Relaxin promotes clustering, migration, and activation states of mononuclear myelocytic cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009(1160): 353-360.
- [9] Pan HZ, Dong AB, Wang L, et al. Significance of relaxin-2 expression in hepatocellular carcinoma: relation with clinicopathological parameters [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(8): 1095-1101.
- [10] Frati A, Ricci B, Pierucci F, et al. Role of sphingosine kinase/S1P axis in ECM remodeling of cardiac cells elicited

by relaxin[J]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29(1): 53-67.

- [11] Vinnall RL, Mahaffey CM, Davis RR, et al. Dual blockade of PKA and NF- κ B inhibits H2 relaxin-mediated castrate-resistant growth of prostate cancer sublines and induces apoptosis[J]. *Horm Cancer*, 2011, 2(4): 224-238.
- [12] Dschietzig T, Bartsch C, Richter C, et al. Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist; attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor- κ B [J]. *Circ Res*, 2003, 92(1): 32-40.
- [13] Lee CY, Yang JJ, Lee SS, et al. Protective effect of Ginkgo biloba leaves extract, EGB761, on endotoxin-induced acute lung injury via a JNK- and Akt-dependent NF κ B pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(27): 6337-6344.
- [14] Mishra S, Tripathi A, Chaudhari BP, et al. Deoxyvalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 279(2): 186-197.

(收稿日期: 2016-04-11 修回日期: 2016-07-09)