

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.18.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210802.0937.002.html\(2021-08-02\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210802.0937.002.html(2021-08-02))

柚皮素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用*

王欢,李家富[△],兰卓,徐楠,程晓洪,冯健

(西南医科大学附属医院心内科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究柚皮素预处理对大鼠缺血再灌注(I/R)心肌氧化损伤的作用及其分子机制。**方法** 32只成年雄性SD大鼠分为假手术组(SHAM组)、I/R组、柚皮素组、柚皮素+LY294002组(NL组)。柚皮素组及NL组腹腔注射柚皮素($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续7d后,NL组在结扎冠状动脉前30min腹腔注射磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)通道抑制剂LY294002(0.3 mg/kg),除SHAM组,其余3组大鼠均进行冠状动脉结扎30min再灌注120min,造模成功后处死各组大鼠,苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理变化,TUNEL法检测心肌组织凋亡情况,使用试剂盒检测血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)水平,Western blot测定心肌组织AKT、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)、醌氧化还原酶1(NQO1)、核因子E相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶1(HO-1)的表达水平,逆转录PCR(RT-PCR)测定Nrf2、HO-1转录水平。**结果** 各组AKT表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与SHAM组比较,I/R组LDH、CK、心肌细胞凋亡率、MDA、ROS水平升高,而SOD活性降低($P<0.05$)。与I/R组比较,柚皮素组LDH、CK、心肌细胞凋亡率、MDA、ROS水平降低,而SOD活性、p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1表达水平升高($P<0.05$)。与柚皮素组比较,NL组LDH、CK、心肌细胞凋亡率、MDA、ROS水平升高,而SOD活性、p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1表达水平降低($P<0.05$)。**结论** 柚皮素调节PI3K/AKT/Nrf2通路减轻心肌I/R氧化损伤。

[关键词] 柚皮素;心肌缺血再灌注损伤;氧化应激;PI3K/AKT;Nrf2/HO-1**[中图分类号]** R331.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)18-3066-07

Effect of naringenin on myocardial ischemia reperfusion injury in rats*

WANG Huan, LI Jiafu[△], LAN Zhuo, XU Nan, CHENG Xiaohong, FENG Jian

(Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect and molecular mechanism of naringenin preconditioning on oxidative stress injury of myocardial ischemia reperfusion (I/R) in rats. **Methods** 32 adult male SD rats were randomly divided into the SHAM group, the I/R group, the naringenin group and the naringenin+LY294002 group (the NL group). The naringenin group and the NL group were intraperitoneally injected naringenin ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) for 7 consecutive days, the NL group was intraperitoneally injected phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) channel inhibitor LY294002 (0.3 mg/kg) 30 minutes before coronary artery ligation. Except for the SHAM group, in the other three groups the rats were all subjected to coronary artery ligation for 30 minutes and reperfusion after 120 minutes, the rats of each group were sacrificed after successfully modeling. The pathological changes of the myocardial tissues were observed with HE staining, the apoptosis of myocardial tissues was detected by TUNEL, lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS) contents were detected by kits. Western blot measures the protein levels of AKT, phosphorylated protein kinase B (p-AKT), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), nuclear factor E related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1) in heart tissues. The transcription levels of Nrf2 and HO-1 were measured by reverse transcription PCR (RT-PCR) technology. **Results** There was no significant difference in the expression level of

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31300946);四川省2011项目-四川省心血管疾病防治协同创新中心基金项目(xtcx2019-14);四川省泸州市-川医大联合课题[2015LZCYD-S03(7/7)]。 作者简介:王欢(1994—),在读硕士研究生,主要从事冠心病基础及临床研究。

[△] 通信作者, E-mail:ljf198@126.com。

AKT in each group ($P > 0.05$). Compared with the SHAM group, LDH, CK, myocardial cell apoptosis rate, MDA and ROS levels in the I/R group increased, while SOD activity decreased ($P < 0.05$). Compared with the I/R group, the levels of LDH, CK, cardiomyocyte apoptosis, MDA and ROS in the naringenin group decreased, while SOD activity, p-AKT, Nrf2, HO-1 and NQO1 expression levels increased ($P < 0.05$). Compared with the naringenin group, the levels of LDH, CK, cardiomyocyte apoptosis, MDA and ROS in the NL group increased, while SOD activity, p-AKT, Nrf2, HO-1 and NQO1 expression levels decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Naringenin regulated PI3K/AKT/Nrf2 pathway to alleviate the oxidative of myocardial ischemia-reperfusion injury.

[Key words] naringenin; myocardial ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; PI3K/AKT; Nrf2/HO-1

冠状动脉粥样硬化性心脏病是心血管疾病引发死亡的主要原因之一^[1],随着再灌注技术应用于临床后,其相关的死亡率明显下降,但缺血心肌恢复灌注时,其组织损伤反而进行性加重,从而产生一种为心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤的现象。即使如此,冠状动脉的尽早开放仍是急性心肌梗死的主要治疗手段,因此改善 I/R 尤为重要。已有大量研究证明氧化应激在 I/R 中扮演着重要的角色^[2],而磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)通路是保护 I/R 分子机制中的经典信号通路,可通过上调核因子 E 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)增加内源性抗氧化作用^[3]。柚皮素又名 4,5,7-三羟基黄酮,属二氢黄酮类化合物,大量存在于柑橘类水果中,既往心血管研究中发现其有减轻糖尿病心肌损伤^[4]、抗动脉粥样硬化^[5]作用。除此之外,国内外研究中均发现柚皮素预处理对 I/R 有明显保护作用,其作用机制与抗氧化应激相关^[6-7],但对其抗氧化应激分子机制的研究较少,本实验通过建立大鼠心脏 I/R 模型,探讨柚皮素对心肌 I/R 损伤的保护作用及是否通过作用于 PI3K/AKT/Nrf2 信号通道达到抗氧化应激作用,为柚皮素的临床应用提供理论及实验依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 32 只,超级清洁级,重量 180~200 g,购自湖北省实验动物中心,动物许可证号:SCXK(鄂)2020-0018。适宜条件下饲养于西南医科大学动物房。

1.1.2 试剂与仪器

柚皮素及 PI3K/AKT 通道抑制剂 LY294002 购自上海阿拉丁试剂有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、肌酸激酶(creatine kinase, CK)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;AKT、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)抗

体购自美国 CST 公司;Nrf2、醌氧化还原酶 1[NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1, NQO1]抗体购自英国 Abcam 公司;血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体购自武汉三鹰公司;电化学发光(ECL)检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自武汉阿斯特生物技术公司。电泳仪(北京市六一仪器厂);扫描仪(日本 Canon 公司);超净工作台(中国苏净安泰公司);酶标仪(中国 Diatek 公司);台式离心机(上海安亭科学仪器厂);冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器);PCR 仪(杭州博日科技公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Life technologies 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

采用随机数字表法将 32 只大鼠分为假手术组(SHAM 组)、I/R 组、柚皮素组、柚皮素+LY294002(NL 组),每组 8 只。柚皮素组及 NL 组腹腔注射 100 mg/kg 柚皮素,每天 1 次,连续 7 d, NL 组在结扎冠状动脉前 30 min 腹腔注射 0.3 mg/kg LY294002, SHAM 组及 I/R 组腹腔注射对应剂量的生理盐水。

1.2.2 模型建立

参照文献[8],将大鼠饥饿处理 12 h 后,予以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,固定并气管插管呼吸机正压通气、连接心电图。在胸骨左缘第 4 肋间打开胸腔并暴露心脏,于左心耳根部下方 2 mm 处结扎左冠状动脉前降支(SHAM 组不结扎),结扎 30 min,再灌注 120 min。结扎冠状动脉后,心肌组织苍白、发绀,心电图显示 ST 段抬高,再灌注后缺血区心肌红润,心电图 ST 段下移 1/2 以上,表示造模成功。

1.2.3 大鼠心肌酶测定

I/R 结束后,收集各组大鼠静脉血,离心后的上清液按照 LDH、CK ELISA 试剂盒说明,采用酶标仪检测 LDH、CK 水平。

1.2.4 心肌组织病理学观察

将各组大鼠的心肌组织用 4%多聚甲醛固定 24 h 后,进行脱水、包埋、切片、脱蜡、苏木素-伊红(HE)染色,然后封片,在显微镜下观察心肌组织病理形态学变化。

1.2.5 TUNEL 荧光染色观察心肌细胞凋亡情况

选各组石蜡切片脱蜡、孵育、破膜、孵育、脱色,取

适量 TUNEL 试剂盒内试剂按说明书中比例覆盖组织,并进行孵育、洗片,最后滴加抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察。

1.2.6 心肌组织 SOD、MDA 水平检测

将各组心脏组织采用酶分解法分离,然后分别采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 水平,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.7 化学荧光法检测心肌组织 ROS 水平

取各组大鼠心肌组织,称取重量,加入一定量的磷酸盐缓冲液(PBS),冰浴条件下匀浆,然后离心,收取上清液,留部分上清液进行蛋白定量检测,部分加入配置好的 DCFH-DA 和 PBS 混合液,然后使用酶标仪进行检测。

1.2.8 Western blot 检测心肌组织 AKT、p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1 水平

取各组大鼠心脏组织依次经过提取总蛋白溶液、测定样品蛋白浓度、分离和浓缩制胶、上样、电泳转膜处理后,加入按比例稀释好的一抗 AKT、p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1、GAPDH 4 °C 过夜,用 TBST 洗 3 次,加入稀释液稀释好的二抗,室温孵育、摇床,加入新鲜配制的 ECL 混合溶液,暗室中曝光。将胶片进行扫描存档,AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的吸光度值。

1.2.9 逆转录 PCR(RT-PCR)技术检测 Nrf2、HO-1 基因的转录水平

取心脏组织,充分研磨,匀浆液中加入三氯甲烷,充分混匀,冰上静置 5 min,混合液离心,吸取上清液加入等体积 4 °C 预冷的异丙醇,颠倒混匀,-20 °C 静置 15 min,再次离心,留置沉淀,加入 4 °C 预冷的 75% 乙醇混匀,清洗 RNA 沉淀,再次离心,倒掉液体,乙醇充分挥发后加入 RNase-Free 水,充分溶解 RNA。在冰上配置逆转录反应液,GAPDH 上游引物序列 5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3',下游引物序列 5'-GTG GAT GCA GGG ATG ATG TTC-3'; Nrf2 上游引物序列 5'-CAA CTG GAT GAA GAG ACC GGA G-3',下游引物序列 5'-TAT GCT GCT TAA ATC AGT CAT GGC-3'; HO-1 上游引物序列 5'-GTG ACA GAA GAG GCT AAG ACC G-3',下游引物序列 5'-GGC CAA CAC TGC ATT TAC ATG G-3',合成第一链 cDNA,并在 PCR 仪上进行 RT-

PCR。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠血清中 LDH、CK 的水平

与 SHAM 组比较,I/R 组及 NL 组血清中 LDH、CK 活性水平明显升高($P < 0.05$);与 I/R 组比较,柚皮素组及 NL 组 LDH、CK 活性水平明显降低($P < 0.05$);与柚皮素组比较,NL 组 LDH、CK 活性水平明显升高($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 LDH、CK 的水平($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	LDH(U/L)	CK(U/mL)
SHAM 组	37.63 ± 6.05	1.31 ± 0.29
I/R 组	214.32 ± 31.07 ^a	2.94 ± 0.11 ^a
柚皮素组	81.80 ± 18.74 ^{ab}	1.85 ± 0.22 ^{ab}
NL 组	169.33 ± 9.58 ^{abc}	2.36 ± 0.31 ^{abc}
<i>F</i>	53.801	24.643
<i>P</i>	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$,与 SHAM 组比较;^b: $P < 0.05$,与 I/R 组比较;^c: $P < 0.05$,与柚皮素组比较。

2.2 各组大鼠心肌组织病理结果

心肌组织 HE 染色显示,SHAM 组心肌纤维分布均匀,细胞核结构清楚,无炎性细胞。与 SHAM 组比较,I/R 组心肌纤维排列紊乱,心肌细胞肿胀、破裂、溶解,大量炎性细胞浸润。与 I/R 组比较,柚皮素组心肌纤维排列稍整齐,心肌细胞破坏明显减少,炎性细胞明显减少。与柚皮素组比较,NL 组心肌组织肌纤维排列紊乱较明显,心肌细胞破坏增加,炎症细胞浸润更明显,见图 1。

2.3 各组大鼠心肌组织凋亡情况

正常心肌细胞核染色为蓝色,凋亡细胞核染色为绿色荧光,与 SHAM 组比较,I/R 组凋亡细胞明显增加,凋亡率明显升高($P < 0.05$)。与 I/R 组比较,柚皮素组凋亡细胞明显减少,凋亡率明显降低($P < 0.05$)。与柚皮素组比较,NL 组凋亡细胞明显增加,凋亡率明显升高($P < 0.05$),见图 2、3。

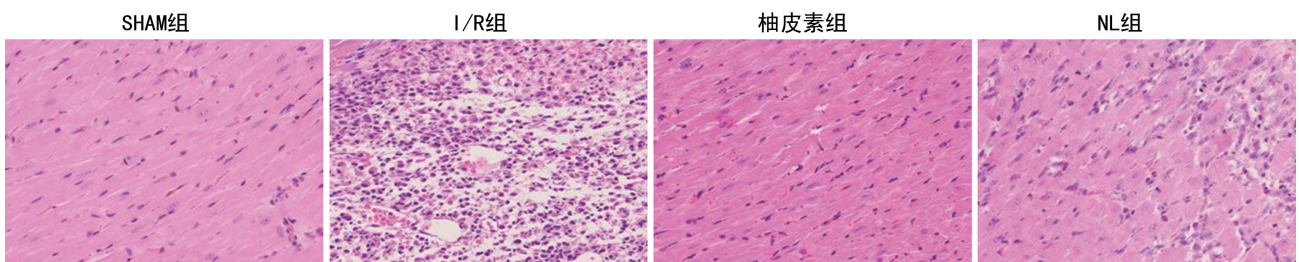


图 1 各组大鼠心肌组织病理结果(HE 染色,×400)

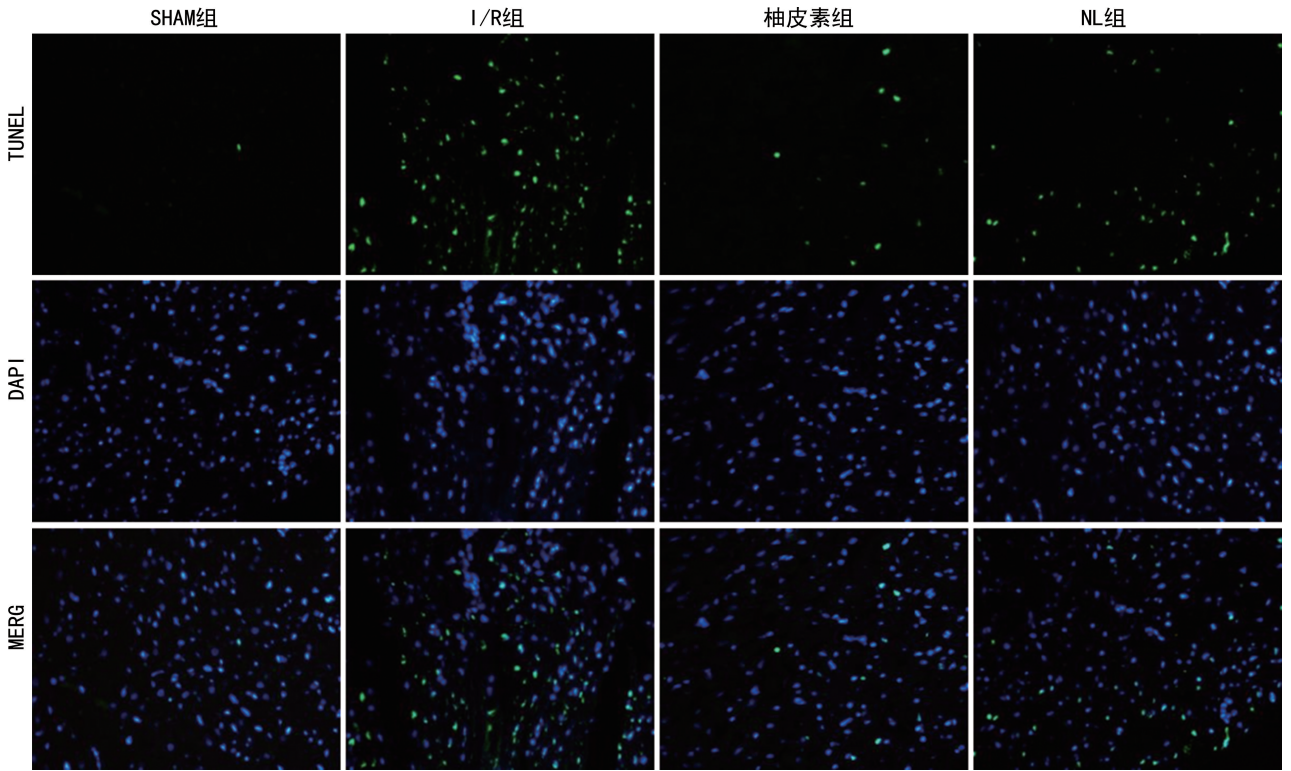
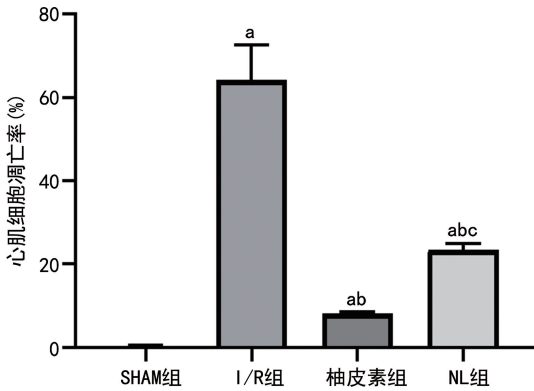


图 2 各组大鼠心肌细胞 TUNEL 染色(×400)



^a: $P < 0.05$, 与 SHAM 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与柚皮素组比较。

图 3 各组大鼠心肌细胞凋亡率比较

2.4 各组大鼠心肌组织 SOD 活性水平、MDA 及 ROS 水平比较

与 SHAM 组比较, I/R 组及 NL 组 SOD 活性降低, MDA、ROS 水平升高 ($P < 0.05$)。与 I/R 组比较, 柚皮素组及 NL 组 SOD 活性升高, MDA、ROS 水平降低 ($P < 0.05$)。与柚皮素组比较, NL 组 SOD 活性降低, MDA、ROS 水平升高 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠心肌组织 SOD 活性水平、MDA 及 ROS 水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/L)	ROS (AU/mgprot)
SHAM 组	61.13 ± 6.82	1.30 ± 0.12	60.49 ± 1.62
I/R 组	12.82 ± 1.92 ^a	6.41 ± 0.60 ^a	153.25 ± 15.07 ^a
柚皮素组	46.05 ± 4.43 ^{ab}	3.46 ± 0.24 ^{ab}	80.27 ± 11.03 ^{ab}

续表 2 各组大鼠心肌组织 SOD 活性水平、MDA 及 ROS 水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/L)	ROS (AU/mgprot)
NL 组	26.05 ± 2.38 ^{abc}	5.02 ± 0.67 ^{abc}	116.21 ± 8.99 ^{abc}
F	72.448	66.105	46.493
P	<0.001	<0.001	<0.001

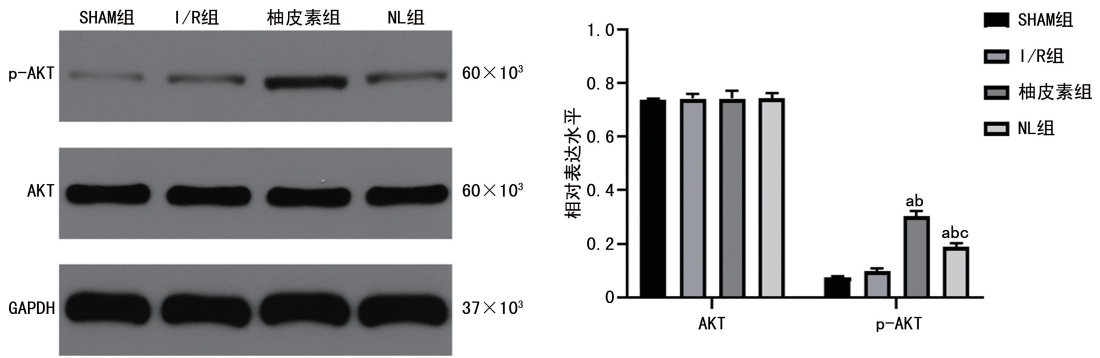
^a: $P < 0.05$, 与 SHAM 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与柚皮素组比较。

2.5 各组大鼠心肌组织 AKT、p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1 表达水平比较

各组 AKT 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 SHAM 组比较, I/R 组心肌组织 p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1 水平升高, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 I/R 组比较, 柚皮素组及 NL 组 p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与柚皮素组比较, NL 组 p-AKT、Nrf2、HO-1、NQO1 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 4、5。

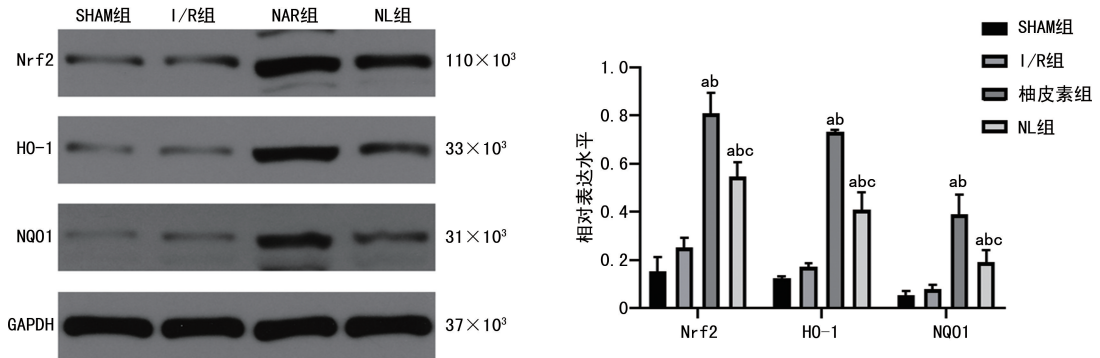
2.6 各组大鼠心肌组织 Nrf2、HO-1 mRNA 水平比较

与 SHAM 组比较, I/R 组心肌组织 Nrf2、HO-1 mRNA 水平升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 I/R 组比较, 柚皮素组及 NL 组 Nrf2、HO-1 mRNA 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与柚皮素组比较, NL 组 Nrf2、HO-1 mRNA 水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 6。



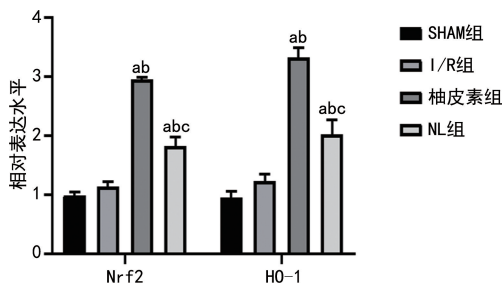
^a: $P < 0.05$, 与 SHAM 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与柚皮素组比较。

图 4 各组大鼠心肌组织 AKT、p-AKT 表达水平



^a: $P < 0.05$, 与 SHAM 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与柚皮素组比较。

图 5 各组大鼠心肌组织 Nrf2、HO-1、NQO1 表达水平



^a: $P < 0.05$, 与 SHAM 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与柚皮素组比较。

图 6 各组大鼠心肌组织 Nrf2、HO-1 mRNA 水平

3 讨论

尽管从基础和临床进行了广泛研究,心肌 I/R 损伤的机制仍然不完全清楚。目前主要有氧化应激损伤、钙离子超载、心肌能量代谢障碍、内皮细胞功能障碍、中性粒细胞浸润、细胞凋亡和线粒体损伤等几种学说。氧化应激损伤作为大部分疾病的主要病理变化过程,亦在 I/R 中发挥着重要作用。近年来以饮食或药用植物为基础的天然化合物在疾病中的应用已成为医学研究中的趋势。柚皮素作为一种新型天然化合物,在肝癌^[9]、二氧化钛引起的关节炎^[10]、预防脂肪肝^[11]、糖尿病心肌病^[4]等研究中均表现出明显抗氧化作用。

LDH、CK 为反映心肌损伤的常见指标,ROS、MDA 为氧化应激反应时的重要产物,而 SOD 则为对抗氧化损伤的活性物质,本实验通过建立大鼠心肌

I/R 模型,检测上述指标,观察柚皮素对心肌 I/R 的抗氧化保护效应。结果显示 I/R 后心肌损伤明显加重,氧化物质水平增加,抗氧化物质活性水平降低,而柚皮素预处理后明显减轻了上述变化。提示心肌 I/R 时存在氧化应激损伤,而柚皮素在一定程度上可减轻这种损伤。

在柚皮素保护心肌 I/R 损伤抗氧化分子机制研究中,YU 等^[7]发现柚皮素可通过环鸟苷酸/蛋白激酶 $GI\alpha$ (cyclic unanosine monophosphate /protein kinase $GI\alpha$,cGMP/PKG $GI\alpha$)信号传导减少氧化应激和内质网(endoplasmic reticulum,ER)应激,从而预防 I/R 损伤。MENG 等^[6]发现柚皮素具有抗 I/R 损伤的心脏保护作用,可以通过激活细胞和线粒体膜中的三磷酸腺苷敏感钾通道增强心肌的抗氧化能力来实现。但调节氧化应激的经典通路 PI3K/AKT 尚无报道。PI3K/AKT 曾在不同组织表现出明显的抗氧化作用。而有趣的是,ZHAO 等^[12]发现柚皮素在脂多糖诱导的急性肺损伤中通过抑制 PI3K/AKT 通道发挥氧化还原调节作用。ZHANG 等^[13]研究显示柚皮素可通过激活 PI3K/AKT 通路对半乳糖诱导的小鼠衰老发挥抗氧化作用。PI3K/AKT 通道在氧化还原稳态中有着独特的作用,既可以激活 ROS 的产生,又能促进抗氧化物质的释放^[14]。不同组织器官氧化还原平衡点及启动内源性抗氧化能力不同,可能导致 PI3K/AKT 通道在氧化与抗氧化平衡中作用方向不同。

本研究发现柚皮素预处理明显增强了 I/R 后 AKT 的磷酸化,使用 PI3K/AKT 通道抑制剂 LY294002 后,心肌组织 AKT 的磷酸化被明显抑制,柚皮素介导的心肌组织保护作用 and 抗氧化作用也被明显抑制,说明柚皮素可能通过上调 PI3K/AKT 信号途径减轻大鼠心肌氧化应激损伤。

众所周知,PI3K/AKT 下游有多条信号传导通路,其中 Nrf2/HO-1 通路在机体抗氧化机制中有至关重要的作用^[15],曾有研究发现通过沉默 Nrf2、HO-1 基因能明显地抑制 ROS 的清除、增加细胞的损伤^[16]。YANG 等^[17]发现黄芪甲苷 IV 通过调节 PI3K/AKT 途径上调 Nrf2/HO-1 通路抑制缺氧-复氧诱导的 H9c2 心肌损伤。此外,SONG 等^[18]发现使用 PI3K 抑制剂 LY294002 及 AKT 抑制剂曲西立滨能明显降低 Nrf2、HO-1 蛋白的表达并发挥抗氧化和心肌保护作用。Nrf2 是调节细胞氧化还原稳态的主要转录因子^[19]。在生理情况下,Nrf2 被 kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (recombinant kelch like ECH associated protein 1,Keap1) 结合并定位在细胞质中,当机体处于氧化应激状态时,大量 ROS 产生,使 Keap1 磷酸化发生构象变化释放 Nrf2,Nrf2 进入细胞核调控 SOD、HO-1、NQO1 等抗氧化基因表达^[20]。HO-1 是一种重要的抗氧化应激和组织保护酶,可分解血红素产生具有抗氧化作用的一氧化碳和胆绿素,还可诱导多种抗氧化信号通路,从而明显减少细胞损伤并保护器官功能^[21]。作为一种多功能酶,NQO1 可以还原辅酶 Q10 和 α -生育酚,使其发挥抗氧化作用,还能直接还原超氧化物,在抗氧化机制中有一定作用^[22]。本实验提示柚皮素预处理促进了 Nrf2 的表达,从而促进下游 HO-1、NQO1 等抗氧化物质表达,而这种作用在使用 LY294002 后被明显逆转,提示柚皮素可能通过调控 PI3K/AKT 信号途径而激活下游 Nrf2/HO-1/NQO1 通路。

综上所述,柚皮素在一定程度上减轻了 I/R 引起的氧化损伤来发挥心肌保护作用,可能与调控 PI3K/AKT/Nrf2 信号转导途径有关。本研究初步探讨了柚皮素在大鼠心肌 I/R 损伤中抗氧化应激作用的分子机制,由于 PI3K/AKT 通路在调控凋亡、炎症中亦有明显作用,在本实验中还显示,在柚皮素作用下,心肌凋亡率明显下降及病理组织炎症细胞明显减少,但这是否与柚皮素抗炎、抗凋亡有关,仍待进一步探讨。

参考文献

[1] CHARLES E J, TIAN Y K, ZHANG A, et al. Pulsed ultrasound attenuates the hyperglycemic exacerbation of myocardial ischemia-reperfusion

injury[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 161(4):297-306.

- [2] SHEN Y M, LIU X J, SHI J H, et al. Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125:496-502.
- [3] FÃO L G, MOTA S I, REGO A C, et al. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 54:100942-100942.
- [4] 李燕,冯健,谢发江,等.柚皮素通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路减轻糖尿病小鼠心肌损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(1):38-46.
- [5] BURKE A C, SUTHERLAND B C, TELFORD D E, et al. Naringenin enhances the regression of atherosclerosis induced by a chow diet in Ldlr mice[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 286:60-70.
- [6] MENG L M, MA H J, GUO H, et al. The cardioprotective effect of naringenin against ischemia-reperfusion injury through activation of ATP-sensitive potassium channel in rat[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(9):973-978.
- [7] YU M L, DONG X, ZHANG J, et al. Naringenin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via cGMP-PKGI alpha signaling and in vivo and in vitro studies[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:7670854.
- [8] 申静,刘冲,陈文.芳香新塔花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14):115-121.
- [9] AHMED O M, AHMED A A, FAHIM I H, et al. Molecular physiology division quercetin and naringenin abate diethylnitrosamine/acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats; the roles of oxidative stress, inflammation and cell apoptosis[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2019, 2019:1-12.
- [10] MANCHOPE M F, ARTERO N A, FATTORI V, et al. Naringenin mitigates titanium dioxide (TiO₂)-induced chronic arthritis in mice; role of oxidative stress, cytokines, and NF kappa B[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(11):997-1012.
- [11] ZOBEIRI M, BELWAL T, PARVIZI F, et al. Naringenin and its nano-formulations for fatty liver; cellular modes of action and clinical perspective[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19(3):196-205.

- [12] ZHAO M H, LI C, SHEN F J, et al. Naringenin ameliorates LPS-induced acute lung injury through its anti-oxidative and anti-inflammatory activity and by inhibition of the PI3K/AKT pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2228-2234.
- [13] ZHANG Y, LIU B, CHEN X, et al. Naringenin ameliorates behavioral dysfunction and neurological deficits in a d-galactose-induced aging mouse model through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. *Rejuvenation Res*, 2017, 20(6): 462-472.
- [14] KOUNDOUROUROS N, POULOGIANNIS G. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 160.
- [15] ALCARAZ M J, FERRÁNDIZ M L. Relevance of Nrf2 and heme oxygenase-1 in articular diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 157: 83-93.
- [16] XIAO Q F, PIAO R L, WANG H Y, et al. Orientin-mediated Nrf2/HO-1 signal alleviates H₂O₂-induced oxidative damage via induction of JNK and PI3K/AKT activation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118: 747-755.
- [17] YANG P, ZHOU Y P, XIA Q, et al. Astragaloside IV regulates the PI3K/Akt/HO-1 signaling pathway and inhibits H9c2 cardiomyocyte injury induced by hypoxia-reoxygenation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(5): 721-727.
- [18] SONG Y X, WANG X F, FAN Z X, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates myocardium ischemia-reperfusion injury through upregulation of heme oxygenase1 expression: PI3K/Akt/Nrf2 pathway involved[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2015, 20(4): 428-438.
- [19] CADENAS S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89.
- [20] LI B, NASSER M I, MASOOD M, et al. Efficiency of traditional Chinese medicine targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110074.
- [21] EL-MIHI K A, KENAWY H I, EL-KAREF A, et al. Naringin attenuates thioacetamide-induced liverfibrosis in rats through modulation of the PI3K/Akt pathway[J]. *Life Sci*, 2017, 187: 50-57.
- [22] HE J, ZHOU D, YAN B. Eriocitrin alleviates oxidative stress and inflammatory response in cerebral ischemia reperfusion rats by regulating phosphorylation levels of Nrf2/NQO-1/HO-1/NF- κ B p65 proteins [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(12): 757.

(收稿日期: 2020-12-18 修回日期: 2021-05-11)

(上接第 3065 页)

- [13] 李景东, 甘婷. I_f 电流抑制剂伊伐布雷定在心血管病中的临床应用进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2020, 36(3): 212-214.
- [14] 伊伐布雷定临床应用中国专家共识[J]. *中华心力衰竭和心肌病杂志*, 2020, 4(2): 84-91.
- [15] SIMKO F, BAKA T. Ivabradine and blood pressure reduction: underlying pleiotropic mechanisms and clinical implications [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 607998.
- [16] DALLAPELLEGRINA L, SCIATTI E, VIZZARDI E. Ivabradine and endothelium: an update[J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2020, 14: 1753944720934937.
- [17] XIE M, HUANG H L, ZHANG W H, et al. Increased sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a activity underlies the mechanism of the positive inotropic effect of ivabradine[J]. *Exp Physiol*, 2020, 105(3): 477-488.
- [18] RAMIREZ-CARRACEDO R, TESORO L, HERNANDEZ I, et al. Ivabradine-stimulated microvesicle release induces cardiac protection against acute myocardial infarction[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6566.

(收稿日期: 2020-12-28 修回日期: 2021-05-08)