

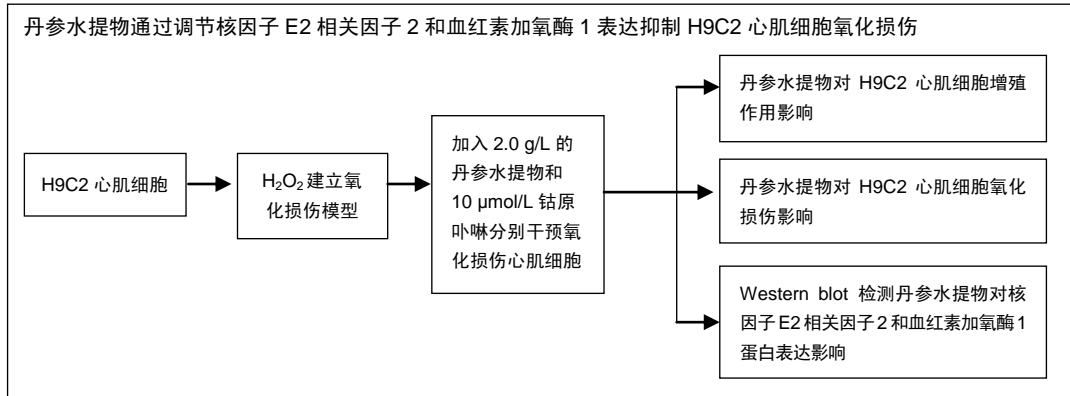
丹参水溶性提取物上调血红素加氧酶1表达对H9C2心肌细胞的保护

于纯淼¹, 赵彬佳惠², 闫宏伟³ (¹哈尔滨市第四医院, 黑龙江省哈尔滨市 150026; ²哈尔滨医科大学解剖教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150010; ³哈尔滨市老年医院, 黑龙江省哈尔滨市 150050)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0823

ORCID: 0000-0003-1428-7439(于纯淼)

文章快速阅读:



于纯淼, 1985 年生, 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 满族, 2015 年哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主要从事病理生理学研究。

通讯作者: 闫宏伟, 主任医师, 哈尔滨市老年医院, 黑龙江省哈尔滨市 150050

中图分类号:R318

文献标识码:B

稿件接受: 2017-12-04



文题释义:

H9C2 细胞: 是一种心肌母细胞。最初是早在 1976 年由 Kimes 与 Brandt 从大鼠胚胎心室组织中提取, 以选择性的继代培养获得的一种同时具有骨骼肌与心肌功能的特异心肌细胞株系。H9C2 细胞具有烟碱酸接受器以及合成肌肉细胞专属特异性功能的肌酸之磷酸激酶之同功酶。

核因子 E2 相关因子 2 的作用: 核因子 E2 相关因子 2 不仅与抗氧化应激有关, 而且与肿瘤的发生发展及转移、抗肿瘤药物性相关, 同时发现除与氧化应激性疾病有关, 还与全身各个系统其他疾病的发生及中毒有关。核因子 E2 相关因子 2 诱导物有可能成为有潜力的基因靶向治疗药物。

摘要

背景: 心肌缺血再灌注损伤的发病与氧化应激损伤有关。既往研究显示丹参具有改善急性梗死心肌细胞凋亡的作用。

目的: 探讨血红素加氧酶 1 介导丹参水溶性提取物对 H9C2 心肌细胞氧化应激损伤的保护作用。

方法: 以 H9C2 心肌细胞为研究对象, 实验分为 4 组, 分别为对照组、模型组、钴原卟啉组和丹参组; 用 300 μmol/L H₂O₂ 处理心肌细胞 24 h 建立心肌细胞氧化损伤模型; 在建立心肌细胞氧化损伤模型后, 用丹参水溶性提取物和钴原卟啉干预氧化损伤的心肌细胞。对照组不做任何处理。

结果与结论: 与对照组相比, 模型组细胞上清液中肌酸激酶和乳酸脱氢酶含量升高, 细胞裂解液中丙二醛含量升高, 超氧化物歧化酶含量下降, 细胞中血红素加氧酶 1 和核转录因子 E2 相关因子 2 表达增加; 与模型组相比, 丹参组和钴原卟啉组上清液中肌酸激酶、乳酸脱氢酶、丙二醛的含量降低, 超氧化物歧化酶含量上升, 细胞中血红素加氧酶 1 和核转录因子 E2 相关因子 2 表达明显升高。提示丹参水溶性提取物能够通过激活血红素加氧酶 1 蛋白的表达, 对心肌细胞氧化应激损伤起保护作用。

关键词:

丹参; 血红素加氧酶 1; 核因子 E2 相关因子 2; 中药; 心肌细胞; 氧化应激; 组织工程; 心肌梗死; 心肌缺血再灌注损伤

主题词:

丹参; 血红素加氧酶-1; 肌细胞, 心脏; 组织工程

Salvia miltiorrhiza extract protects H9C2 cardiomyocytes by up-regulation of heme oxygenase-1

Yu Chun-miao¹, Zhao Binjiahui², Yan Hong-wei³ (¹Fourth Hospital of Harbin, Harbin 150026, Heilongjiang Province, China; ²Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China; ³Harbin Geriatric Hospital, Harbin 150050, Heilongjiang Province, China)

Yu Chun-miao, Master, Fourth Hospital of Harbin, Harbin 150026, Heilongjiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: Pathogenesis of myocardial ischemia/reperfusion injury is related to oxidative stress.

Previous studies have shown that Salvia miltiorrhiza can improve the apoptosis of cardiomyocytes post acute myocardial infarction.

OBJECTIVE: To investigate the protective effects of heme oxygenase-1 (HO-1) mediated Salvia miltiorrhiza extract on the oxidative stress-induced cell injury in H9C2 cardiomyocytes.

Corresponding author: Yan Hong-wei, Chief physician, Harbin Geriatric Hospital, Harbin 150050, Heilongjiang Province, China

METHODS: H9C2 cardiomyocytes were divided into four groups: control, model, cobalt protoporphyrin and *Salvia miltiorrhiza* groups. H9C2 cardiomyocytes were treated with 300 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide for 24 hours to establish myocardial cell oxidative damage model.

Afterwards, *Salvia miltiorrhiza* extract or cobalt protoporphyrin was added, while the control group received no treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, in the model group, the content of creatine kinase and lactate dehydrogenase in cell supernatant, the level of malondialdehyde in myocardial cell lysate, and the expression levels of HO-1 and nuclear transcription factor E2 in myocardial cells were increased significantly, while the level of superoxide dismutase in myocardial cell lysate was significantly decreased. Compared with the model group, the cobalt protoporphyrin and *Salvia miltiorrhiza* groups revealed a significant decrease in the content of creatine kinase and lactate dehydrogenase in cell supernatant, the level of malondialdehyde in myocardial cell lysate, and the expression levels of HO-1 and nuclear transcription factor E2 in myocardial cells, and a significant increase in the level of superoxide dismutase in myocardial cell lysate. To conclude, *Salvia miltiorrhiza* extract can protect cardiomyocytes from oxidative stress by HO-1 protein activation.

Subject headings: *Salvia miltiorrhiza*; Heme Oxygenase-1; Myocytes, Cardiac; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

急性心肌梗死严重危害人类的生命健康, 而及时改善血液供应, 是挽救濒死心肌细胞最有效的方法, 但心肌组织缺血后再灌注能够明显加重对心肌细胞的损伤作用, 这种不可逆的损伤称为心肌缺血再灌注损伤^[1-2]。研究发现, 氧化应激诱导的心肌细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤发展的重要病理基础^[3-4], 抑制氧化应激诱导的心肌细胞凋亡能够明显降低心肌缺血再灌注损伤^[5-6]。

血红素加氧酶系统是一种微粒体酶系统。血红素加氧酶分为血红素加氧酶1、血红素加氧酶2和血红素加氧酶3三种亚型, 其中血红素加氧酶1具有广泛的生理作用, 且这些作用存在可诱导性^[7]。研究认为血红素加氧酶1是一种重要的心肌内源性保护因子, 在氧化应激相关的心血管疾病中增加血红素加氧酶1的表达能够抑制心肌细胞的凋亡^[8-9]。钴原卟啉是至今为止发现的最有效的血红素加氧酶1诱导剂, 在细胞内不会分解代谢生成活性氧族, 不会增加氧化应激^[10]。研究发现血红素加氧酶1诱导剂钴原卟啉作用于缺氧/复氧的H9C2心肌细胞, 刺激血红素加氧酶1表达, 心肌细胞上清液中乳酸脱氢酶和肌酸激酶的含量明显降低, 说明刺激血红素加氧酶1表达具有保护缺氧/复氧损伤作用^[11]。

丹参为中医活血化瘀类常用药物之一, 主要用于治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病、心绞痛、心肌梗死等心血管疾病^[12-13]。研究发现给予急性心肌梗死模型大鼠5 mg/kg的丹参能够明显抑制心肌细胞的凋亡, 抑制心肌组织凋亡基因Bax的表达, 表明丹参具有改善急性梗死心肌细胞凋亡的作用^[14]。同时研究发现心肌细胞损伤或凋亡与氧化应激损伤具有一定的相关性, 抑制氧化应激损伤能够明显改善心肌细胞。核转录因子E2相关因子2是细胞内一种重要的转录因子^[15], 能与核内抗氧化反应元件结合, 进而调控一系列抗氧化酶及蛋白的表达, 研究发现核转录因子E2相关因子2-抗氧化反应元件是调节细胞内抗氧化防御体系的重要信号通路, 在细胞抵抗氧化应激损伤方面发挥着重要的作用^[16-17]。

因此, 实验以H9C2心肌细胞氧化应激损伤模型为研究对象, 从核转录因子E2相关因子2/血红素加氧酶1通路角度探讨丹参水溶液对H9C2心肌细胞氧化损伤影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年10月至2017年2月在哈尔滨医科大学实验室完成。

1.3 材料 H9C2大鼠心肌细胞株购自武汉博士德生物工程有限公司。丹参产地为河北省, 购于哈尔滨市世一堂大药房。

实验用主要试剂及仪器: DMEM高糖培养基、胎牛血清和胰酶购自美国Hyclone公司; CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司; 钴原卟啉购自Sigma公司; 乳酸脱氢酶、肌酸激酶、丙二醛和超氧化物歧化酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2抗体购自CST公司; GAPDH抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司; ECL化学发光检测试剂盒购自Pierce Biotechnology公司; 光学显微镜购自日本Olympus公司; 酶标仪购自瑞士TECAN公司; Direct Detect™ Spectrometer-Sample Measuring红外微量分析仪购自德国Merck Millipore公司; 凝胶成像系统购自美国Bio-rad公司。

1.4 方法

1.4.1 丹参水溶性提取物的制备 参考文献[18], 将丹参于40 °C烘干, 粉碎成干粉, 然后加入10倍水于80 °C提取2次, 每次提取30 min。过滤, 弃去滤渣, 合并滤液, 过滤, 将溶液定容至100 mL, 2 000 r/min离心10 min, 取上清液。

1.4.2 H9C2心肌细胞培养 取H9C2细胞用PBS清洗两三次, 加入胰酶消化, 光学显微镜下观察细胞变圆, 轻轻拍打培养瓶直到细胞脱落, 加入培养液终止消化, 离心后重悬细胞, 接种到培养瓶中培养, 采用含体积分数10%胎牛血清的高糖DMEM进行培养, 细胞融合至80%~90%进行传代, 第2代细胞后续实验。

1.4.3 CCK-8检测细胞活性 取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于96孔培养板, 于37 °C、体积分数5% CO₂培养箱中培养24 h后, 加入0.5~3.0 g/L丹参水溶性提取物干预24 h, 每孔加入10 μL 的CCK8继续孵育3 h, 酶标仪检测490 nm处吸光度值。

1.4.4 细胞分组及心肌细胞氧化损伤模型的建立 取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于96孔培

养板, 于37 °C、体积分数5% CO₂培养箱中培养24 h后, 将细胞分为4组: 对照组、模型组、丹参组和钴原卟啉组。其中后3组加入300 μmol/L H₂O₂培养24 h, 建立氧化损伤模型^[19]。在心肌细胞氧化损伤模型建立24 h后, 弃上清液, 向丹参组加入2 g/L丹参水溶性提取物; 钴原卟啉组加入10 μmol/L钴原卟啉, 对照组和模型组加入相应的培养液继续培养24 h。

1.4.5 培养液中肌酸激酶、乳酸脱氢酶及心肌细胞中丙二醛、超氧化物歧化酶含量的测量 用微量移液器吸取培养24 h的各组心肌细胞培养液用于肌酸激酶和乳酸脱氢酶含量的测定, 各组心肌细胞用PBS冲洗3次后加入一定量的胰酶进行消化收集各组心肌细胞, 收集的心肌细胞用PBS重悬, 超声进行细胞破碎, 释放出细胞中的丙二醛和超氧化物歧化酶, 应用红外微量分析仪直接检测蛋白浓度, 按照试剂盒说明书测定培养液中肌酸激酶、乳酸脱氢酶及心肌细胞中丙二醛、超氧化物歧化酶含量。

1.4.6 Western blot测定血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2蛋白表述 各组心肌细胞在H₂O₂处理24 h后加入相应的药物组再进行干预24 h, 弃上清液, 加入0.5 mL的PBS清洗3次, 再加入0.5 mL的Western及IP裂解液取提取各组细胞总蛋白, 进行蛋白定量, 经SDS-PAGE电泳分离, 转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温孵育2 h后, 加入血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2一抗工作液, 稀释倍数均为1:1 000稀释, 4 °C过夜, TBS-T缓冲液洗膜5次, 10 min/次, 加入二抗工作液, 室温孵育1 h, TBS-T洗膜5次, 10 min/次, 采用ECL法显色。凝胶成像系统观察结果。

1.5 主要观察指标 ①CCK-8法测定心肌细胞增殖情况; ②心肌细胞上清液中肌酸激酶、乳酸脱氢酶和心肌细胞中丙二醛、超氧化物歧化酶含量测定; ③Western blot分析心肌细胞血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2蛋白表述。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0(美国IBM公司)进行统计学分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用 t 检验, 组间比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞增殖的影响 质量浓度为0.5, 1.0, 1.5, 2.0和3.0 g/L的丹参水溶性提取物处理H9C2心肌细胞24 h, CCK-8法检测其对心肌细胞增殖的影响。结果显示, 与对照组相比, 0.5, 1.0, 1.5和2.0 g/L丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞增殖无明显影响($P > 0.05$); 丹参水溶性提取物质量浓度达到3.0 g/L时, 才对H9C2心肌细胞增殖具有促进作用($P < 0.05$; 图1)。实验为排除高浓度丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞的增殖作用, 故选用2.0 g/L丹参水溶性提取物进行后续研究。

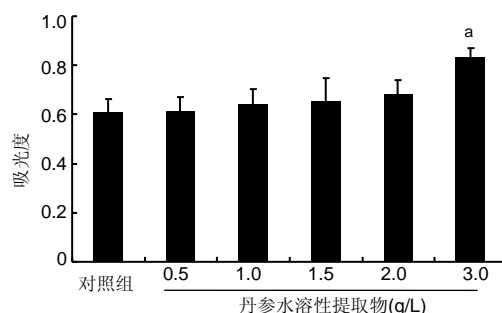


图1 不同质量浓度的丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞增殖影响
Figure 1 Effect of Salvia miltiorrhiza extracts at different concentrations on the proliferation of H9C2 cardiomyocytes
图注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

表1 丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞培养液中肌酸激酶和乳酸脱氢酶含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Salvia miltiorrhiza extract on the content of creatine kinase and lactate dehydrogenase in the cell supernatant of H9C2 cardiomyocytes

组别	乳酸脱氢酶(U/L)	肌酸激酶($\times 10^3$ U/L)
对照组	105 \pm 10	0.81 \pm 0.064
模型组	309 \pm 24 ^a	1.86 \pm 0.155 ^a
丹参组	191 \pm 15 ^b	1.06 \pm 0.095 ^b
钴原卟啉组	234 \pm 19 ^b	1.19 \pm 0.12 ^b

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

表2 丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞中丙二醛和超氧化物歧化酶含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Salvia miltiorrhiza extract on the content of malondialdehyde and superoxide dismutase in the cell supernatant of H9C2 cardiomyocytes

组别	丙二醛(μ mol/g)	超氧化物歧化酶($\times 10^3$ U/g)
对照组	0.75 \pm 0.035	94.88 \pm 8.49
模型组	1.98 \pm 0.154 ^a	35.46 \pm 3.11 ^a
丹参组	0.95 \pm 0.081 ^b	75.69 \pm 5.52 ^b
钴原卟啉组	1.09 \pm 0.062 ^b	70.53 \pm 7.16 ^b

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞培养液中肌酸激酶和乳酸脱氢酶含量的影响 如表1所示, 与对照组相比, 模型组心肌细胞培养液中肌酸激酶和乳酸脱氢酶的含量均显著升高($P < 0.05$); 而丹参组和钴原卟啉组心肌细胞培养液中肌酸激酶和乳酸脱氢酶的含量比模型组显著降低($P < 0.05$), 表明丹参和钴原卟啉均能够明显降低H₂O₂引起的H9C2心肌细胞的损伤。

2.3 丹参水溶性提取物对H9C2心肌细胞中丙二醛和超氧化物歧化酶含量的影响 如表2所示, 与对照组相比, 模型组心肌细胞培养液中丙二醛和超氧化物歧化酶的含量均显著升高($P < 0.05$); 而丹参组和钴原卟啉组心肌细胞培养液中丙二醛和超氧化物歧化酶的含量比模型组显著降低($P < 0.05$), 表明丹参和钴原卟啉均能够明显降低H₂O₂引起的H9C2心肌细胞的脂质过氧化损伤。

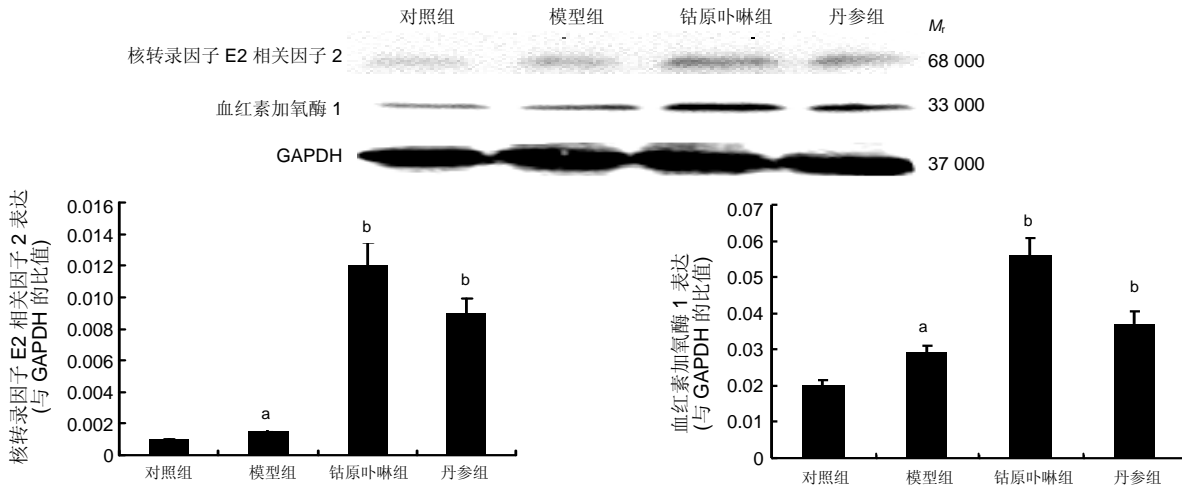


图 2 丹参水溶性提取物对 H9c2 心肌细胞中核转录因子 E2 相关因子 2 和血红素加氧酶 1 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of *Salvia miltiorrhiza* extract on the expression levels of heme oxygenase-1 and nuclear transcription factor E2 in H9C2 cardiomyocytes

图注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.01$ 。

2.4 丹参水溶性提取物对H9c2心肌细胞中血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2蛋白表达的影响 如图2所示,与对照组相比,模型组H9C2心肌细胞中血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2的蛋白表达均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,丹参组和钴原卟啉组心肌细胞中血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2蛋白表达明显升高($P < 0.01$),表明丹参能够诱导心肌细胞血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2的蛋白的表达。

3 讨论 Discussion

生物体内抗氧化能力失衡是许多疾病的病理生理基础,最新发现的机体内源性抗氧化信号通路:Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1-核因子E2相关因子2/抗氧化反应元件信号通路具有抵抗内外界氧化和化学物质刺激所产生的氧化应激损伤,使生物体抵抗各种外来损伤中起着非常重要的作用,是生物体内最重要的内源性抗氧化信号通路,成为近年来抗氧化研究领域的热点^[20]。

氧化应激的发生是机体内的氧化与抗氧化系统功能失衡的结果,可能是由于以活性氧自由基为代表的氧化分子产生增多,也可能由于组织内抗氧化系统特别是抗氧化酶类的合成减少所致^[21]。氧化应激损伤主要由活性氧所致,有害的活性氧自由基可通过脂质过氧化诱导细胞损伤。超氧化物歧化酶含量变化间接反映机体清除氧自由基的能力,丙二醛是脂质过氧化的产物,丙二醛含量可以表明脂质过氧化水平,作者发现与模型组比较,丹参组和钴原卟啉组心肌细胞中超氧化物歧化酶含量明显升高,丙二醛的含量明显降低,表明丹参组能够明显降低心肌细胞氧化损伤。乳酸脱氢酶和肌酸激酶是心肌细胞胞质中的特异性酶。氧化应激损伤造成心肌细胞膜通透性增加,心肌细胞内的重要酶外漏,因此测定胞外的乳酸脱氢酶和肌酸激酶可以

间接反映出心肌细胞损伤程度。研究发现与模型组比较,丹参组和钴原卟啉组心肌细胞上清液中乳酸脱氢酶和肌酸激酶含量明显降低,表明丹参水提取物能够明显降低心肌细胞胞质酶乳酸脱氢酶和肌酸激酶的外漏。

当机体受到氧化应激刺激时,发生构象变化的蛋白释放核转录因子E2相关因子2,或者调节蛋白激酶C、丝裂原活化蛋白激酶和磷脂酰肌醇3-激酶信号通路激活核转录因子E2相关因子2,启动抗氧化应激蛋白基因的转录进而保护机体免受氧化应激损伤^[22-23]。研究发现核转录因子E2相关因子2诱导激活血红素加氧酶1表达被认为是抗氧化应激最重要机制之一^[24]。实验结果发现,与模型组比较,丹参组和钴原卟啉组心肌细胞中血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2蛋白表达明显升高,表明丹参能够诱导心肌细胞血红素加氧酶1和核转录因子E2相关因子2的蛋白的表达。作者实验结果与朱晓洁等^[11]的研究结果相似,刺激血红素加氧酶1的表达能够明显改善氧化应激损伤作用。

综上所述,以H9C2心肌细胞为研究对象,利用H₂O₂建立氧化应激损伤模型,给予丹参水溶性提取物观察H9C2心肌细胞氧化应激损伤程度,通过测定细胞上清液乳酸脱氢酶、肌酸激酶和裂解液中丙二醛、超氧化物歧化酶间接评估心肌细胞受伤和脂质过氧化程度以及核转录因子E2相关因子2和血红素加氧酶1表达;结果表明丹参水溶性提取物能够明显减低细胞上清液中乳酸脱氢酶、肌酸激酶和细胞中丙二醛含量,增加细胞中超氧化物歧化酶的含量,增加核转录因子E2相关因子2和血红素加氧酶1表达,说明丹参水溶性提取物通过激活血红素加氧酶1的表达,对心肌细胞氧化应激损伤具有保护作用。

作者贡献:于纯淼进行实验设计,实验实施和实验评估,并对文章修改或者审校,赵彬佳惠进行实验操作、数据解析、文章起草,闫宏伟负责实验试剂的提供和课题设计

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章中的干预手段应用了丹参, 但是所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。

伦理问题: 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298: 229-317.
- [2] 李俊平, 郭丽丽, 陈中, 等. 丹参片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, 2017, 23(1):95-100.
- [3] 汤世民, 吴咏梅, 周雨亭, 等. 丹参酮 II A 对心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激的保护作用[J]. 中国医药导报, 2017, 14(4):8-11.
- [4] Windecker S, Bax JJ, Myat A, et al. Future treatment strategies in ST-segment elevation myocardial infarction. *Lancet.* 2013;382(9892):644-657.
- [5] 王挺, 杨怡, 田玥, 等. 视神经萎缩症蛋白 1 通过抑制氧化应激减少高糖高脂诱导的心肌细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(2):151-156.
- [6] Xu H, Yao Y, Su Z, et al. Endogenous HMGB1 contributes to ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis by potentiating the effect of TNF- α /JNK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(3):H913-921.
- [7] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(17):3221-3247.
- [8] Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation.* 2008;117(2):231-241.
- [9] Lakkisto P, Siren JM, Kytö V, et al. Heme oxygenase-1 induction protects the heart and modulates cellular and extracellular remodelling after myocardial infarction in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011;236(12):1437-1448.
- [10] Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, et al. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* 2006;20(14):2651-2653.
- [11] 朱晓洁, 梁飞, 王秀宏, 等. 钴原卟啉对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(3):352-356.
- [12] 姜雪, 史磊. 丹参活性成分及药理作用研究进展[J]. 药学研究, 2016, 36(3):166-168.
- [13] 巴翠晶, 李得鑫, 段雪磊, 等. 丹参的药理研究进展[J]. 中兽医学杂志, 2016(1):65-67.
- [14] 张代富, 阮长武, 刘中民, 等. 丹参对大鼠急性心肌缺血再灌注时心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响[J]. 上海医学, 2003, 26(9):669-670.
- [15] 胡流芳, 王迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1): 146-152.
- [16] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:Keap1 signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(9):1304-1309.
- [17] Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13291-13295.
- [18] 王德明. 丹参素提取工艺研究[J]. 生物化工, 2017, 3(1):10-12, 16.
- [19] Jun HO, Kim DH, Lee SW, et al. Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Exp Mol Med.* 2011;43(1): 53-61.
- [20] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011;16(2):123-140.
- [21] 谷仕艳, 陈虹宇, 张遵真. 微小 RNA 与氧化应激相互调控在疾病发生发展中的研究进展[J]. 现代预防医学, 2017, 44(2): 306-308, 374.
- [22] 赵然尊, 秦继超, 龙仙萍, 等. 核因子相关因子 2 参与间充质干细胞调节大鼠梗死心肌氧化应激作用[J]. 上海医学, 2013, 36(10): 876-880.
- [23] Keum YS, Yu S, Chang PP, et al. Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.* 2006;66(17):8804-8813.
- [24] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol.* 2008; 591(1-3):66-72.