DOI: 10.16016/j.1000-5404.201602006

异氟烷预处理激活 Nrf2-ARE 通路保护 H9c2 心肌细胞缺氧-复氧损伤

梁 冰,方 洁 (450000 郑州,河南中医药大学第一附属医院麻醉科)

[摘要] **目的** 研究异氟烷预处理对大鼠胚胎心肌细胞(H9c2)缺氧-复氧损伤及 Nrf2-ARE 信号通路的影响。**方法** 用大鼠 H9c2 细胞低氧模拟缺血性损伤,并将细胞分为空白对照组、缺氧-复氧组、异氟烷预处理组、转染 Nrf2 siRNA 组、转染非特异性 siRNA 组(Scramble 组)、异氟烷预处理的 Scramble 组和异氟烷预处理的 siRNA 组。采用 MTT 法检测 H9c2 细胞存活率,TUNEL 染色检测细胞凋亡,分别使用硫代巴比妥酸法(TBA)和分光光度法测定 MDA 和 GSH 水平,qRT-PCR 及 Western blot 检测 Nrf2、HO-1 和 NQO1 基因的表达。**结果** 与空白对照组比较,缺氧-复氧组细胞活力降低,凋亡细胞数上升,MDA 水平升高,GSH 水平降低,同时 H9c2 细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的 mRNA 和蛋白表达降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与缺氧-复氧组比较,异氟烷可提高 H9c2 细胞活力,降低凋亡细胞数,并降低 MDA 水平,升高 GSH 水平,上调 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的表达($P<0.05$)。siRNA 转染组 Nrf2 的 mRNA 和蛋白表达与缺氧-复氧组和 Scramble 组相比均降低($P<0.05$),2% 异氟烷对 siRNA 转染组 Nrf2 mRNA 和蛋白表达均无影响($P>0.05$);经 2% 异氟烷处理的 siRNA 转染组 H9c2 细胞存活率与空白对照组、2% 异氟烷处理组和 2% 异氟烷处理的 Scramble 组相比降低,凋亡细胞数增多,MDA 水平升高,GSH 水平降低($P<0.05$)。**结论** 异氟烷预处理对 H9c2 细胞缺氧-复氧损伤具有保护作用,这种保护作用与激活 Nrf2-ARE 信号通路有关。

[关键词] 异氟烷;缺氧-复氧;Nrf2-ARE 信号通路;H9c2 细胞
[中图法分类号] R322.11;R364.4;R971.2 [文献标志码] A

Protective effect of isoflurane on H9c2 cells from hypoxia-reoxygenation injury *via* Nrf2-ARE signaling pathway

Liang Bing, Fang Jie (Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan province, 450000, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the protective effect of isoflurane on H9c2 cell injury induced by hypoxia-reoxygenation *via* Nrf2-ARE signaling pathway. Methods H9c2 cells were cultured and divided into control group, hypoxia-reoxygenation group, isoflurane pre-treatment group, Nrf2 siRNA transfection group, nonspecific transfection group (scramble group), nonspecific transfection with isoflurane pretreatment group, and Nrf2 siRNA transfection with isoflurane pretreatment group. Cell viability and apoptosis were evaluated by MTT assay and TUNEL assay, respectively. The levels of MDA and GSH were tested with TBA method and spectrophotometric method. qRT-PCR and Western blotting were performed to detect the expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 at mRNA and protein levels. Results Compared with the control group, the decreased cell viability, increased cell apoptosis, raised MDA level, and descended GSH level were observed in the hypoxia-reoxygenation group. Meanwhile, both of the mRNA and protein levels of Nrf2, HO-1 and NQO1 were remarkably down-regulated in the hypoxia-reoxygenation group compared with the control group ($P<0.05$). Isoflurane pre-treatment significantly improved H9c2 cell viability, reduced the number of apoptotic cells, decreased MDA level and increased GSH level compared with the hypoxia-

[通信作者] 方 洁,E-mail: huiqingguohn@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160412.1338.004.html(2016-04-12)

reoxygenation group ($P<0.05$). Furthermore, the mRNA and protein levels of Nrf2, HO-1 and NQO1 in H9c2 cells were also up-regulated after isoflurane treatment ($P<0.05$). Compared with the hypoxia-reoxygenation group and the scramble group, the expression of Nrf2 in the siRNA transfection group was significantly decreased ($P<0.05$), and 2% isoflurane had no significant effect on the expression of Nrf2. The cell viability was significantly decreased, and apoptotic cells were notably increased in the Nrf2 siRNA transfection with isoflurane pretreatment group compared with the control group, isoflurane pretreatment group and nonspecific transfection with isoflurane pretreatment group ($P<0.05$). Meanwhile, the MDA level was notably up-regulated, and the GSH level was remarkably down-regulated in the Nrf2 siRNA transfection with isoflurane pretreatment group. **Conclusion** The protective effect of isoflurane on hypoxia-reoxygenation-injured H9c2 cells is confirmed, and it is possibly related with the activation of Nrf2-ARE signaling pathway.

[**Key words**] isoflurane; hypoxia-reoxygenation injury; Nrf2-ARE signaling pathway; H9c2 cells

Corresponding author: Fang Jie, E-mail: huiqingguohn@163.com

缺血性心脏病严重危害人类健康,及时、有效地恢复心脏的血液供应是治疗缺血性心脏病最为有效的方法。通过再灌注来恢复心脏血流的过程中,心肌功能并未得到有效的恢复,并且由于活性氧自由基的大量积累,甚至会造成更为严重的损伤,产生缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤[1]。心肌 I/R 损伤是一个复杂的病理过程,涉及氧化应激、炎症反应和细胞凋亡等多种机制[2]。因此,探讨心肌 I/R 损伤相关信号传导通路,寻找新的治疗靶点,对于阻止和预防心肌 I/R 损伤有着非常重要的临床意义。

目前,吸入麻醉药预处理在心肌 I/R 损伤方面的研究已受到关注[3]。异氟烷是临床常用的一种吸入性全身性麻醉药,其预处理对心肌的保护作用已被报道[4-5]。Nrf2 被认为是细胞氧化应激反应中的关键调控因子,可有效保护心肌组织[6]。然而,异氟烷能否通过 Nrf2-ARE 通路来保护与氧化应激密切相关的心肌免受 I/R 损伤,尚鲜见报道。本实验通过 H9c2 细胞缺氧-复氧模拟制作心肌 I/R 损伤模型,以 Nrf2 为靶点,探讨 Nrf2-ARE 信号通路在异氟烷保护 H9c2 细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

大鼠胚胎 H9c2 心肌细胞系购自中国科学院上海细胞库;DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清 FBS 购于美国 Gibco 公司;细胞凋亡检测试剂盒、MDA 水平测定试剂盒、GSH 水平测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;兔抗大鼠 Nrf2 抗体(货号:sc-722)、兔抗大鼠 HO-1 抗体(货号:sc-7696)、兔抗大鼠 NQO1 抗体(货号:sc-16464)、兔抗大鼠 GAPDH 抗体(货号:sc-20357),以及 HRP 标记的山羊抗兔二抗(货号:sc-2028)均购自 Santa Cruz 生物科技公司;TRIzol 试剂盒、转染试剂 Lipofetamine™ 2000 转染试剂与逆转录试剂盒均为美国 Invitrogen 公司提供;Nrf2 siRNA(货号:sc-37049)和非特异性 siRNA(货号:sc-37007)均由 Santa Cruz 生物科技公司提供。

1.2 分组

将细胞分为空白对照组、缺氧-复氧组、异氟烷预处理组、转染 Nrf2 siRNA 组、转染非特异性 siRNA 组(Scramble 组)、异氟烷预处理的 Scramble 组和异氟烷预处理的 siRNA 组。空白对照组细胞在含 5% CO_2 和 95% 空气的培养箱中,于 37 ℃培养;缺氧-复氧组细胞在 100% N_2 培养 8 h 后,恢复正常的氧气浓度培养 24 h;异氟烷处理组细胞分别用 1%、1.5%、2% 的异氟烷(溶解在 DMEM 培养液中)预处理 3 h,随后进行上述缺氧-复氧实验;Nrf2 siRNA 组转染 Nrf2 siRNA 进行缺氧-复氧实验,不经异氟烷预处理;Scramble 组转染非特异性 siRNA 进行缺氧-复氧实验,不经异氟烷预处理;异氟烷预处理的 Scramble 组用 2% 异氟烷预处理 3 h 后将转染非特异性 siRNA 的细胞进行细胞缺氧-复氧处理;异氟烷预处理的 siRNA 组用 2% 异氟烷预处理 3 h 后将转染 Nrf2 siRNA 的细胞进行细胞缺氧-复氧处理。

1.3 心肌细胞模拟 I/R 损伤模型的建立

模型制备参照文献[7]中所描述的方法进行。细胞在模拟缺血环境的培养液中培养。培养液(mmol/L)含 HEPES 5, 2-deoxy-D-glucose 10, NaCl 139, KCl 12, $MgCl_2$ 0.5, $CaCl_2$ 1.3, 乳酸 20, pH = 6.2, 37 ℃下通入 100% N_2(O_2 <1%),培养 8 h。随后更换为含 10% FBS 的 DMEM/M199 培养液在正常含氧量下培养,模拟再灌注状态。

1.4 siRNA 转染

于 6 孔板中培养的 H9c2 细胞长满约 80% 时,更换无血清培养基,按照转染试剂的操作要求,采用

Lipofetamine™ 2000 分别将 Nrf2 siRNA 或非特异性 siRNA(Scramble)转染细胞。

1.5 MTT 检测细胞存活率

取对数期生长的 H9c2 细胞接种于 96 孔板,每孔 200 μL,含 2×10^4 个细胞。细胞贴壁后,用无血清培养液代替旧培养基培养 24 h。取出培养板,每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μL,于培养箱继续培养 4 h 后弃去上清,加入 DMSO 150 μL,低速振荡 10 min 充分溶解结晶物。用酶联免疫吸附仪检测 490 nm 下的光密度值。细胞存活率 = 各组 D(490)值/空白对照组 D(490)值×100%。

1.6 TUNEL 染色检测细胞凋亡

按照细胞凋亡检测试剂盒操作,具体参考 Liu 等[8]实验方法。用4%多聚甲醛于室温下固定各组细胞 15 min,用 PBS 洗去多余的多聚甲醛,然后加新配制的破膜液处理 5 min,每个样本加入混合好的 TUNEL 反应液,封闭液封闭,在 37 ℃避光孵育 1 h。显微镜下观察并统计凋亡细胞数量。

1.7 细胞氧化应激指标测定

收集细胞培养液,按照 MDA 试剂盒操作要求测定 MDA 水平。按比例将试剂一、试剂二、试剂三、细胞培养液及 MDA 标准品涡旋混匀,在 95 ℃下水浴 40 min,取出冷却后 4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,在 532 nm 处测定光密度值,根据 D(532)值计算 MDA 浓度。

GSH 水平参照 GSH 试剂盒说明书进行。将试剂一、试剂二、试剂三、细胞培养液及 GSH 标准品混匀,室温静止 5 min 后在 412 nm 处测定光密度值,并计算 GSH 浓度。

1.8 qRT-PCR 检测 Nrf2、HO-1 和 NQO1 基因的 mRNA 表达

用 TRIzol 提取试剂盒提取 H9c2 细胞总 RNA 后,进行 RNA 浓度和纯度检测,接着逆转录合成 cDNA。大鼠 Nrf2 上游引物序列:5′-GACCTAAAGCACAGCCAACACAT-3′,下游引物序列:5′-CTCAATCGGCTTGAATGTTTGTC-3′,产物大小:181 bp;HO-1 上游引物序列:5′-AAGAG-GCCAAGACTGCGTTC-3′,下游引物序列:5′-GGTG-TCATGGGTCAGCAGC-3′,产物大小:435 bp;NQO1 上游引物序列:5′-GGATTGGACCGAGCTGGAA-3′,下游引物序列:5′-AATTGCAGTGAAGATGAAGGCAAC-3′,产物大小:1 495 bp;GAPDH 为内参,上游引物序列:5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,下游引物序列:5′-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3′,产物大小:138 bp。Real-Time PCR 反应体系20 μL(SYBR Premix *Ex Taq*™ 10 μL;上、下游引物各 0.5 μL;2 μL cDNA;ddH_2O 7 μL)。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析数据。

1.9 Western blot 检测 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的蛋白表达

抽提细胞总蛋白,并用 BCA 法定量。取 20 μg 上样进行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳后转膜,用封闭液(含 5% 脱脂奶粉、2% BSA、0.2% Tween-20 的 PBS 液)于室温下封闭 2 h,加入一抗 4 ℃孵育过夜,包括兔抗大鼠 Nrf2(1∶500),兔抗大鼠 HO-1(1∶1 000)和兔抗大鼠 NQO1(1∶500),洗膜后加入二抗(1∶4 000)孵育 1 h,用 ECL 系统进行发光和观察。

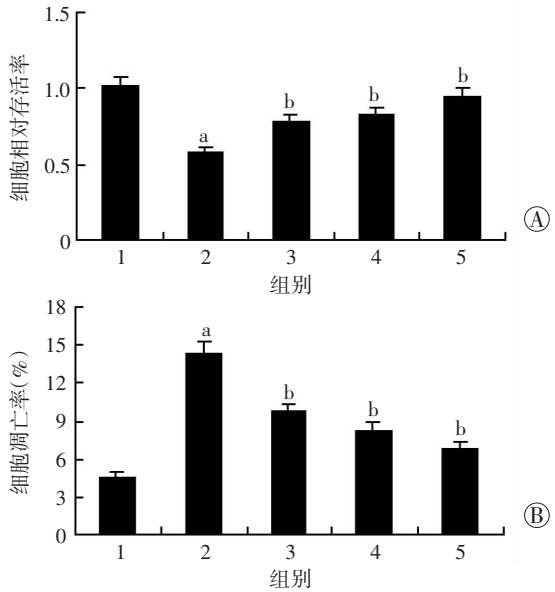
1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者采用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett's T3 检验,结果表示为 $\bar{x}\pm s$。

2 结果

2.1 异氟烷能够逆转缺氧-复氧处理对 H9c2 细胞存活率和凋亡的影响

缺氧-复氧处理后,H9c2 细胞存活率显著低于空白对照组($P<0.01$),与缺氧-复氧组比较,1%、1.5%、2% 异氟烷处理可使 H9c2 细胞的存活率逐渐升高($P<0.05$,图 1A)。



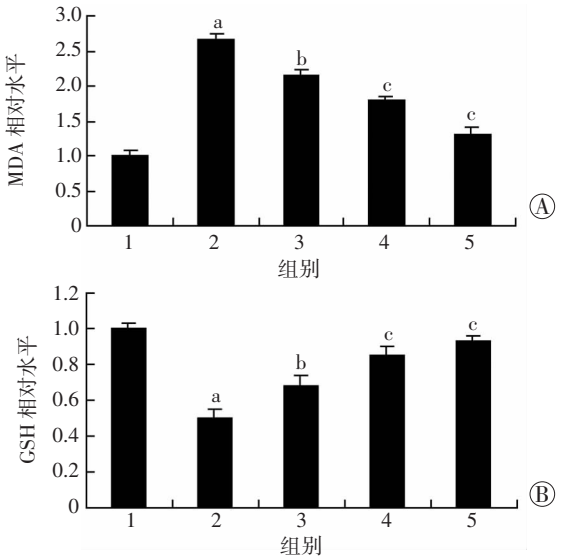
1:空白对照组;2:缺氧-复氧组;3:1% 异氟烷预处理组;4:1.5% 异氟烷预处理组;5:2% 异氟烷预处理组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与缺氧-复氧组比较

图 1 MTT 法和 TUNNEL 染色分别检测不同浓度异氟烷对缺氧-复氧损伤 H9c2 细胞相对存活率(A)和凋亡率(B)的影响

与空白对照组比较,缺氧-复氧损伤可显著增加细胞凋亡($P<0.01$),与缺氧-复氧组比较,1%、1.5%、2%的异氟烷预处理可使细胞凋亡率逐渐下降($P<0.05$,图1B)。

2.2 异氟烷能够减弱缺氧-复氧引起的氧化损伤

缺氧-复氧组MDA水平与空白对照组比较显著升高($P<0.01$),然而,与缺氧-复氧组比较,1%、1.5%和2%的异氟烷处理可显著降低MDA水平($P<0.05$,图2A)。此外,缺氧-复氧组GSH水平和空白对照组比较显著降低($P<0.01$),GSH水平的增加也呈现出对于异氟烷的浓度依赖性($P<0.05$,图2B)。



1:空白对照组;2:缺氧-复氧组;3:1%异氟烷预处理组;4:1.5%异氟烷预处理组;5:2%异氟烷预处理组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与缺氧-复氧组比较

图2 不同浓度异氟烷对缺氧-复氧损伤H9c2细胞MDA(A)和GSH(B)相对水平的影响

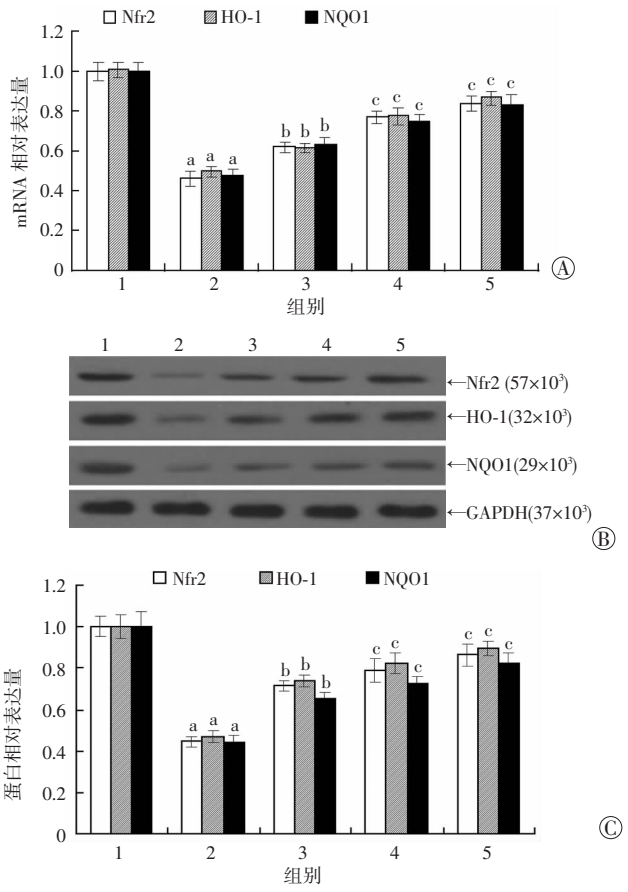
2.3 异氟烷可激活Nrf2-ARE通路

为探讨异氟烷预处理对Nrf2-ARE通路的影响,检测了不同浓度异氟烷的作用下Nrf2及Nrf2-ARE通路下游的抗氧化蛋白和Ⅱ相解毒酶HO-1及NQO1的表达。qRT-PCR检测结果(图3A)和Western blot结果(图3B、C)示:缺氧-复氧组中Nrf2、HO-1和NQO1的mRNA和蛋白表达水平均显著低于空白对照组($P<0.01$),而与缺氧-复氧组比较,异氟烷预处理可上调缺氧-复氧损伤H9c2细胞中Nrf2、HO-1和NQO1的表达($P<0.05$)。

2.4 Nrf2 siRNA转染成功地降低了H9c2细胞中Nrf2的表达

上述实验结果表明:H9c2细胞对于异氟烷的反应呈现浓度依赖性。因此,在后续的实验中选取2%浓度的异氟烷进行预处理。

转染Nrf2 siRNA后Nrf2的表达如图4所示,siRNA转染组Nrf2的mRNA和蛋白表达水平与缺氧-复氧组和Scramble组比较均显著降低($P<0.01$),表明Nrf2 siRNA成功地敲除了H9c2细胞中Nrf2的表达。

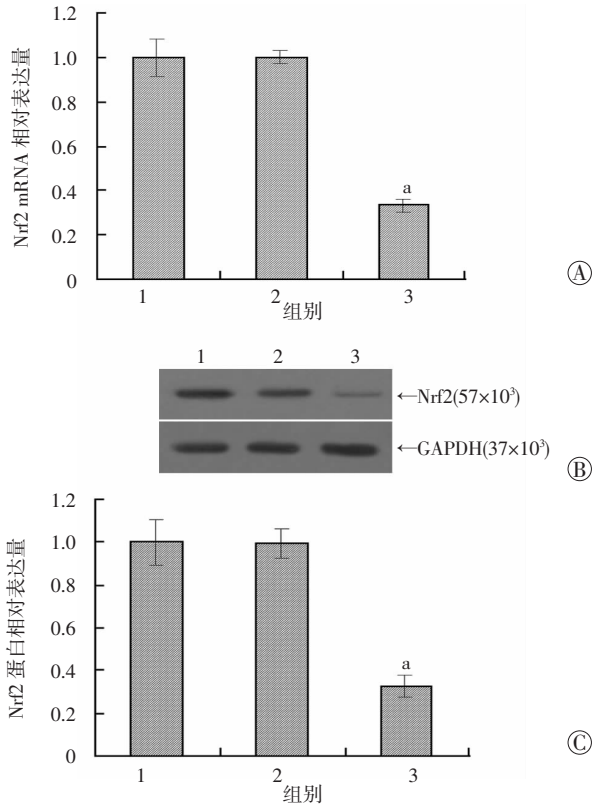


1:空白对照组;2:缺氧-复氧组;3:1%异氟烷预处理组;4:1.5%异氟烷预处理组;5:2%异氟烷预处理组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与缺氧-复氧组比较

图3 qRT-PCR和Western blot检测不同浓度异氟烷对缺氧-复氧损伤H9c2细胞Nrf2、HO-1和NQO1的mRNA(A)和蛋白(B、C)表达的影响

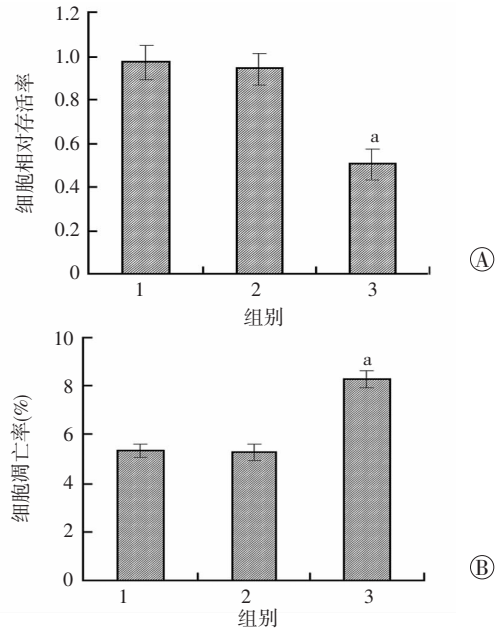
2.5 Nrf2 siRNA转染后剥夺了异氟烷对H9c2细胞缺氧-复氧损伤的保护作用

敲除Nrf2的表达后对细胞存活率和凋亡的影响如图5所示:2%异氟烷预处理组和2%异氟烷预处理的Scramble组H9c2细胞存活率和凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$),而异氟烷预处理的siRNA组细胞存活率显著低于2%异氟烷预处理组和2%异氟烷预处理的Scramble组($P<0.05$),细胞凋亡率更是显著高于其他2组($P<0.05$)。



1:缺氧-复氧组;2:Scramble 组;3:Nrf2 siRNA 组;a:$P<0.01$ 与缺氧-复氧组比较

图 4 qRT-PCR 和 Western blot 检测 siRNA 转染后缺氧-复氧损伤 H9c2 细胞中 Nrf2 mRNA(A)和蛋白(B、C)的表达

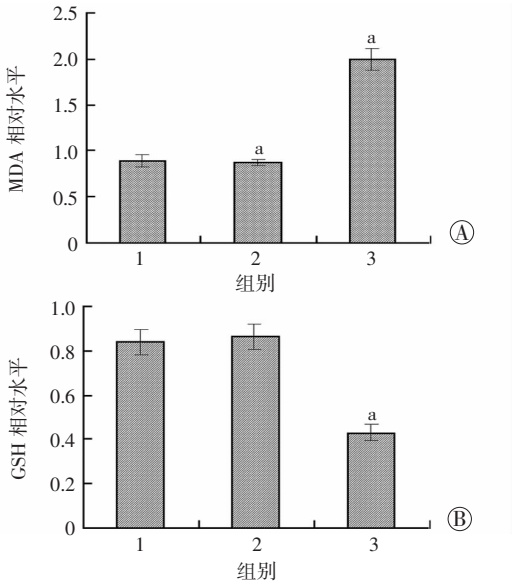


1:2% 异氟烷预处理组;2:2% 异氟烷预处理的 Scramble 组;3:2% 异氟烷预处理的 siRNA 组;a:$P<0.05$,与 2% 异氟烷预处理组比较

图 5 异氟烷对 Nrf2 siRNA 转染后缺氧-复氧 H9c2 细胞存活率(A)和凋亡率(B)的影响

2.6 Nrf2 siRNA 转染后降低了异氟烷对 H9c2 细胞氧化损伤的抑制作用

转染 Nrf2 siRNA 后,MDA 和 GSH 的水平见图 6,2% 异氟烷预处理组和 2% 异氟烷预处理的 Scramble 组 MDA 和 GSH 水平差异无统计学意义($P>0.05$),而 2% 异氟烷预处理的 siRNA 组 MDA 水平显著高于其他 2 组($P<0.05$),GSH 水平显著低于其他 2 组($P<0.05$)。



1:2% 异氟烷预处理组;2:2% 异氟烷预处理的 Scramble 组;3:2% 异氟烷预处理的 siRNA 组;a:$P<0.05$,与 2% 异氟烷预处理组比较

图 6 异氟烷对 Nrf2 siRNA 转染后缺氧-复氧 H9c2 细胞 MDA(A)和 GSH(B)相对水平的影响

3 讨论

心肌 I/R 损伤是心肌梗塞等缺血性心脏病手术后的主要病理变化,严重损伤机体健康,采取有效措施降低心肌 I/R 损伤具有十分重要的意义。

缺氧-复氧过程中会产生大量的活性氧自由基,造成细胞损伤,同时氧自由基引起脂质过氧化反应。具有较强的细胞毒性的 MDA 是脂质过氧化反应的终产物,因此其含量可反映机体脂质过氧化程度,以及机体受自由基损伤程度[9]。而正常情况下,体内 GSH 等物质可有效清除自由基,GSH 还可通过维持还原态维生素 E 的含量来防止脂质过氧化损伤[10],故而 GSH 可反映机体抗氧化能力。本试验用缺氧-复氧对细胞进行处理模拟器官 I/R 损伤,通过对 H9c2 细胞进行异氟烷预处理,检测异氟烷对 H9c2 细胞的保护作用,发

现异氟烷可显著抑制缺氧-复氧导致的 H9c2 细胞 GSH 下降及 MDA 水平升高,暗示异氟烷的预处理可显著减轻活性氧自由基对细胞造成的损害。

Nrf2-ARE 信号通路是被公认的最重要的一条内源性抗氧化应激通路[11],其激活可诱导机体产生抗氧化酶和Ⅱ相药物代谢酶[12],对于维持细胞内氧化还原状态,降低氧化损伤,保护细胞功能等均发挥着重要作用[13]。研究发现,Nrf2-ARE 信号通路与改善心肌 I/R 损伤密切相关[14]。Nrf2 是细胞降低活性氧的重要转录因子。正常情况下,无活性的 Nrf2 与胞浆中 Keapl 紧密结合;在氧自由基等信号攻击下,Nrf2 被泛素化降解[15],与 Keapl 迅速解离,转入细胞核,再与核内 Maf 等物质结合成异二聚体,进而识别抗氧化反应元件 ARE 并促进其介导的Ⅱ相解毒酶下游基因 NQO1 和 HO-1 等的表达[16-17]。HO-1 和 NQO1 均为抗氧化保护基因,研究发现:HO-1 和 NQO1 的表达上调可抵抗氧化应激,从而减轻自由基损伤,维持内环境稳定[18-19]。HO-1 被认为是治疗 I/R 损伤的新靶点[20]。为研究异氟烷对心肌细胞的保护作用是否与 Nrf2-ARE 信号通路有关,我们检测了缺氧-复氧损伤后 H9c2 细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的表达。结果发现异氟烷预处理能够逆转缺氧-复氧损伤后 Nrf2、HO-1 和 NQO1 表达的下调,表明异氟烷对 H9c2 细胞的保护作用与激活 Nrf2-ARE 信号通路有关。为进一步确定 Nrf2 在异氟烷保护缺氧-复氧心肌细胞中的作用,我们用 Nrf2 siRNA 沉默其表达,发现在 Nrf2 被抑制后,异氟烷对缺氧-复氧损伤心肌细胞的保护作用显著减弱甚至消失,表明 Nrf2 的活化在异氟烷对心肌细胞保护中具有十分重要的作用。

综上所述,本实验结果表明:异氟烷预处理可抑制缺氧-复氧损伤导致的细胞活力下降、细胞凋亡率增加、MDA 含量升高和 GSH 含量的降低,减轻缺氧-复氧对心肌细胞的损伤,同时上调 Nrf2、HO-1、SOD1 和 NQO1 的表达,提示 Nrf2-ARE 信号通路在异氟烷对 H9c2 细胞缺氧-复氧损伤的保护中发挥着非常重要的作用。然而本研究仅以缺氧-复氧心肌细胞作为 I/R 损伤心肌的体外模型,异氟烷对心肌细胞缺氧复氧损伤和 Nrf2-ARE 信号通路的影响的具体机制以及体内相关作用还有待深入研究。

参考文献:

[1] Wang J, Yang L, Rezaie A R, *et al*. Activated protein C protects against myocardial ischemic/reperfusion injury through AMP-activated protein kinase signaling[J]. J Thromb Haemost, 2011, 9(7): 1308 - 1317. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04331.x

[2] Silambarasan T, Manivannan J, Priya M K, *et al*. Sinapic acid protects heart against ischemia/reperfusion injury and H9c2 cardiomyoblast cells against oxidative stress[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(4): 853 - 859. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.12.022

[3] Pratt P F Jr, Wang C, Weihrauch D, *et al*. Cardioprotection by volatile anesthetics: new applications for old drugs? [J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2006, 19(4): 397 - 403. DOI: 10.1097/01.aco.0000236139.31099.b5

[4] Wu W, Zhou X, Liu P, *et al*. Isoflurane reduces hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and mitochondrial permeability transition in rat primary cultured cardiocytes[J]. BMC Anesthesiol, 2014, 14:17. DOI:10.1186/1471-2253-14-17

[5] Liu X, Guo Q L, Zhang Z, *et al*. Effect of emulsified isoflurane on apoptosis of anoxia-reoxygenation neonatal rat cardiomyocytes[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(12): 977 - 981. DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60175-3

[6] Wang Y, Li C, Cheng K, *et al*. Activation of liver X receptor improves viability of adipose-derived mesenchymal stem cells to attenuate myocardial ischemia injury through TLR4/NF-κB and Keap-1/Nrf-2 signaling pathways[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(18): 2543 - 2557. DOI: 10.1089/ars.2013.5683

[7] Diaz A, Humeres C, Gonzalez V, *et al*. Insulin/NFκB protects against ischemia-induced necrotic cardiomyocyte death [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(2): 451 - 457. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.171

[8] Liu D, Zhang H, Gu W, *et al*. Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on high glucose-induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79399. DOI: 10.1371/journal.pone.0079399

[9] Malinska D, Kulawiak B, Kudin A P, *et al*. Complex Ⅲ-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1797(6/7):1163 - 1170. DOI: 10.1016/j.bbabio.2010.03.001

[10] Kong Q, Lin C L. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(11): 1817 - 1829. DOI:10.1007/s00018-010-0277-y

[11] Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(1): 162 - 171. DOI: 10.1128/MCB.25.1.162-171.2005

[12] Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, *et al*. Role of Nrf2 signaling

in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury[J]. FEBS Lett, 2005, 579(14): 3029-3036. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.04.058

[13] Vomhof-Dekrey E E, Picklo M J Sr. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism[J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(10): 1201-1206. DOI:10.1016/j.jnutbio.2012.03.005

[14] Cheng L, Jin Z, Zhao R, *et al*. Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia-reperfusion injury: role of Nrf2/ARE pathway[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 10420-10428.

[15] Maruyama A, Nishikawa K, Kawatani Y, *et al*. The novel Nrf2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the Nrf2-mediated cytoprotective response[J]. Biochem J, 2011, 436(2): 387-397. DOI: 10.1042/BJ20101748

[16] Xia B, Liu H, Xie J, *et al*. Akt enhances nerve growth factor-induced axon growth *via* activating the Nrf2/ARE pathway[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(5): 1426-1432. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2329

[17] Zhang H, Liu H, Davies K J, *et al*. Nrf2-regulated phase Ⅱ enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(9): 2038-2046. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.042

[18] Hwa J S, Jin Y C, Lee Y S, *et al*. 2-methoxycinnamaldehyde from Cinnamomum cassia reduces rat myocardial ischemia and reperfusion injury *in vivo* due to HO-1 induction[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(2): 605-615. DOI: 10.1016/j.jep.2011.12.001

[19] Piao C S, Gao S, Lee G H, *et al*. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels[J]. Pharmacol Res, 2010, 61(4): 342-348. DOI:10.1016/j.phrs.2009.11.009

[20] Juhasz B, Varga B, Czompa A, *et al*. Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(9): 1973-1982. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01153.x

(收稿:2015-10-30;修回:2016-01-06)

(编辑 吴培红)