DOI:10.16016/j.1000-5404.202003201

Sestrin2 蛋白通过 Nrf2/HO-1 信号通路保护大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤

刘英存[1],李 飞[2],黄 毅[2],司良毅[1] 401120 重庆,重庆医科大学附属第三医院心血管疾病中心[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院生物医学分析测试中心[2]

[**摘要**] **目的** 探讨 Sestrin2 蛋白在大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤中的作用及其机制。**方法** 体外培养 H9C2 心肌细胞,构建心肌细胞缺氧复氧模型。细胞分为对照组、缺氧 4 h 组、复氧 2 h 组和复氧 4 h 组。采用 CCK-8 法检测细胞存活率;流式细胞术结合 Annexin V/7AAD 荧光染色检测细胞凋亡;微量酶标法检测心肌细胞损伤标记物乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)水平。构建针对 Sestrin2 蛋白沉默的 siRNA 与其阴性对照(si-NC),利用脂质体转染法导入 H9C2 心肌细胞,后将 H9C2 心肌细胞分为对照组、缺氧 4 h+si-NC 组(阴性对照组)、缺氧 4 h+siRNA 组、复氧 4 h+si-NC(阴性对照组)、复氧 4 h+siRNA 组。Western blot 检测 Sestrin2 蛋白的表达;流式细胞术结合 Annexin V/7AAD 荧光染色检测细胞凋亡;Western blot 检测 Sestrin2 蛋白、核转录相关因子 2(nuclear factor erythroid2-related factor 2,Nrf2)及血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)的表达。**结果** 与对照组比较,复氧 4 h 组细胞存活率降低($P<0.01$),细胞凋亡率增加($P<0.05$),LDH 水平明显升高($P<0.01$)。与对照组比较,Sestrin2 蛋白表达在缺氧组和缺氧复氧组均显著增高($P<0.01$),且缺氧复氧组 Sestrin2 蛋白表达量显著高于单纯缺氧组($P<0.01$)。转染 siRNA 特异有效地下调了 Sestrin2 蛋白表达($P<0.05$),同时细胞凋亡率显著增加($P<0.05$),Nrf2 蛋白表达降低($P<0.01$),HO-1 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** Sestrin2 蛋白对缺氧复氧诱导的 H9C2 心肌细胞氧化损伤有保护作用,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 相关信号通路有关。

[**关键词**] Sestrin2 蛋白;心肌缺氧复氧损伤;凋亡

[**中图法分类号**] R322.11; R341; R364.4 [**文献标志码**] A

Sestrin2 protects rat cardiomyocytes from hypoxia-reoxygenation injury through Nrf2/HO-1 signaling pathway

LIU Yingcun[1], LI Fei[2], HUANG Yi[2], SI Liangyi[1] [1]Center for Cardiovascular Diseases, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401120; [2]Biomedical Analysis Center, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and underlying mechanism of Sestrin2 in hypoxia/reoxygenation injury of rat cardiomyocytes. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were cultured *in vitro* and inflicted to establish hypoxia/reoxygenation injury (H/R) model. Thus, the cells were divided into control group, hypoxia 4-hour group (H4h group), and hypoxia 4-hour + reoxygenation 2- and 4-hour groups (H4hR2h and H4hR4h groups). Cell survival rate was measured by cell counting kit-8 (CCK8) assay; Annexin V/7AAD staining with flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Micro-enzymatic method was used to detect the content of myocardial injury marker, lactate dehydrogenase (LDH). Then H9C2 cardiomyocytes were divided into normal control group, hypoxia 4-hour+si-NC group (negative control), hypoxia 4-hour+Sestrin2 siRNA group, hypoxia/reoxygenation 4 hour+si-NC group and hypoxia/reoxygenation 4 h+Sestrin2 siRNA group. Recombinant siRNA for Sestrin2 silencing and negative control (si-NC) were constructed and transfected into H9C2 cardiomyocytes with liposomes. The expression of Sestrin2, Nrf2 and

[**通信作者**] 司良毅,E-mail:siliangyi@163.com

HO-1 proteins was detected by Western blotting. Flow cytometry was used to measure the cell apoptosis. **Results** The cell viability of cardiomyocytes was significantly lower ($P<0.05$), and the apoptosis ($P<0.05$) as well as LDH level ($P<0.01$) was obviously increased in the H4hR4h group than the control group. The expression of Sestrin2 protein was increased in both hypoxia and reoxygenation groups when compared with the control group ($P<0.01$), with the level in the H/R groups higher than that in the H groups ($P<0.01$). Transfected of Sestrin2 siRNA significantly knocked down the protein expression ($P<0.05$), enhanced the cell apoptosis ($P<0.05$), and decreased the expression levels of Nrf2 ($P<0.01$) and HO-1 ($P<0.05$). **Conclusion** Sestrin2 exerts protective effect on oxidative damage in H9C2 cardiomyocytes induced by H/R injury, which might be due to its activating Nrf2/HO-1 related signaling pathway.

[**Key words**] Sestrin 2; myocardial hypoxia-reoxygenation injury; apoptosis

Corresponding author: SI Liangyi, E-mail: siliangyi@163.com

心肌再灌注损伤(myocardial reperfusion injury, MRI)的机制至今尚未完全阐明,是临床亟待解决的难题之一。既往研究显示,MRI 与氧化应激、自噬、能量代谢障碍及中性粒细胞浸润等都具有密切关系[1-7]。其中,氧化应激在缺血再灌注损伤中占重要地位[4,8]。Sestrin2 蛋白作为一种新发现的蛋白,在减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)聚集、维持能量平衡等方面发挥重要作用。现已证明其与癌症、2 型糖尿病及阿尔茨海默病等的发生、发展有关[9-10]。近来,Sestrin2 蛋白通过诱导自噬、激活 AMPK 信号通路等不同机制在脑缺血再灌注方面发挥了保护作用[11-13],被认为可能是体内一个重要的潜在保护因子。核转录相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)相关信号通路是目前发现的重要的内源性抗氧化应激通路之一。它通过调控抗氧化反应元件(anti-oxidative response element, ARE),激活下游抗氧化因子,如 GST、HO-1、NQO-1、SOD 等发挥抗氧化作用。多项研究表明,Nrf2 及其下游抗氧化基因的激活,可以保护心肌缺血再灌注损伤[14-16]。但是,Sestrin2 蛋白在心肌细胞缺血再灌注中的作用及与 Nrf2-ARE 信号通路的关系目前尚不清楚。鉴于心肌缺氧复氧损伤与心肌缺血再灌注损伤具有相同的病理生理学机制,本研究通过构建心肌细胞缺氧复氧模型来模拟心肌细胞缺血再灌注损伤,并采用小干扰 RNA(siRNA)方法沉默 Sestrin2 蛋白,检测相关蛋白表达及细胞凋亡情况,探讨 Sestrin2 蛋白在心肌缺血再灌注中的作用及其可能的作用途径,为进一步研究和临床预防 MRI 提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

H9C2 大鼠心肌细胞购自上海细胞库;胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基、PBS 缓冲液、青霉素/链霉素双抗及无糖培养基均购自美国 Gibco 公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit 8, CCK-8)购自日本 Dojindo 公司;BCA 蛋白测定试剂盒,凝胶配制试剂盒购自碧云天生物科技公司;ECL 显影试剂盒购自葆光生物;siRNA 转染试剂购自锐博生物科技有限公司;Annexin V-APC(货号:550475)和 7-AAD 染色试剂(货号:559925)购自 BD Biosciences 公司;一抗 Sestrin2 抗体(货号:10795-1-AP,兔抗大鼠多克隆抗体)、Nrf2 抗体(货号:16396-1-AP,兔抗大鼠多克隆抗体)购自 Proteintech 公司;Vinculin 抗体(货号:13901,兔抗大鼠单克隆抗体)购自 Cell Signaling Technology 公司;二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔抗体购自 Cell Signaling Technology;混合气体购自重庆瑞科气体有限公司;LDH 试剂盒(货号 A020-2)购自南京建成生物有限公司;siRNA 序列购自广州锐博生物有限公司,产品编号为 siG150609022533,靶序列为 5′-GCAGAGACCCATTGAACAA-3′。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 H9C2 心肌细胞传代于含 10%FBS、1%双抗混合液的 DMEM 培养基中,置于 5%CO_2,37 ℃培养箱中培养,观察细胞状态,细胞生长至 80%~90%,用 0.25%胰酶消化进行细胞传代。

1.2.2 心肌细胞缺氧复氧模型的建立 2×10^5/孔细胞铺于 6 孔板,置于 5%CO_2,37 ℃培养箱中培养 48 h 后进行实验。采用 Billups-Rothenberg 低氧厌氧培养箱充入混合气体(95%N_2、5%CO_2)构建心肌细胞缺氧复氧模型。细胞分为对照组、缺氧 4 h 组、复氧 2 h 组和复氧 4 h 组。对照组于 5%CO_2,37 ℃细胞培养箱中正常培养。缺氧前先将培养基换成无糖无血清培养基同步化处理 3 h,将缺氧组与复氧组细胞放入厌氧培养

箱充入混合气体进行缺氧处理,缺氧 4 h 后将 6 孔板取出,复氧组更换为有糖培养基于 5%CO_2,37 ℃细胞培养箱中复氧处理 2、4 h。

1.2.3 采用 CCK-8 检测细胞存活率 将 8×10^3/孔细胞接种于 96 孔板,过夜贴壁后,对照组置于 5%CO_2 细胞培养箱中正常培养,实验组按上述方法进行缺氧复氧处理。缺氧及缺氧复氧结束后,各组细胞按 CCK-8 试剂盒说明书,加入 CCK-8 反应液,于 37 ℃敷箱中孵育 1 h,酶标仪 450 nm 波长检测光密度值。

1.2.4 采用微量酶标法进行心肌细胞 LDH 含量测定 将 8×10^3/孔细胞接种于 96 孔板,过夜贴壁,建立缺氧复氧模型后,取上清按照 LDH 试剂盒指示操作。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 建立细胞缺氧复氧模型,胰酶消化细胞后 PBS 清洗 3 次,按试剂盒说明加 Annexin V 和 7-AAD 染料,避光处理 15 min 用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6 siRNA 转染 2×10^5/孔细胞铺于 6 孔板,过夜贴壁。用 120 μL 1×riboFECT™ CP Buffer(v2)稀释 10 μL 20 μmol/L siRNA 储备液,轻轻混匀后,加入 12 μL riboFECT™ CP Reagent(v4),轻轻吹打混匀,室温孵育 0~15 min,制备成转染复合物,加入到 1 858 μL 不含双抗的 DMEM 培养基中进行 siRNA 转染。将 H9C2 心肌细胞分为对照组、缺氧 4 h+si-NC 组(阴性对照组)、缺氧 4 h+siRNA 组、复氧 4 h+si-NC(阴性对照组)、复氧 4 h+siRNA 组。构建针对 Sestrin2 蛋白沉默的 siRNA 与其阴性对照(si-NC),利用脂质体转染法导入 H9C2 心肌细胞。

1.2.7 Western blot 检测 Sestrin2、Nrf2/HO-1 蛋白含量变化 建立缺氧复氧模型,胰酶消化细胞后用 PBS 洗 3 遍,加 RIPA(加蛋白酶抑制剂)裂解液裂解细胞,BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取 20 μg 蛋白样本加入 5×蛋白上样缓冲液于 100 ℃变性 10 min。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,完毕后将蛋白印迹转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后剪膜,分别加 Vinculin 抗体(1∶2 000 稀释)、Sestrin2 抗体(1∶2 000 稀释)、Nrf2 抗体(1∶2 000 稀释)、HO-1 抗体(1∶2 000 稀释)孵育,4 ℃过夜。TBST 洗膜 3 遍,孵育二抗 2 h,再用 TBST 洗 3 遍后,加 ECL 显影液曝光。上述步骤重复至少 3 次。

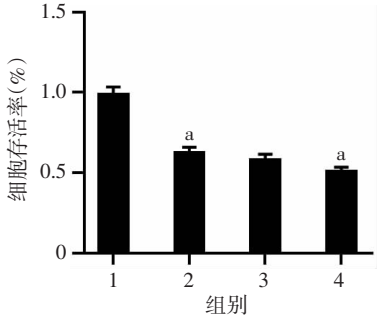
1.3 统计学分析

利用 GraphPad Prism 8.0 和 FlowJo10.0 进行数据处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组样本之间采用独立样本 t 检验,多组样本两两比较采用多因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

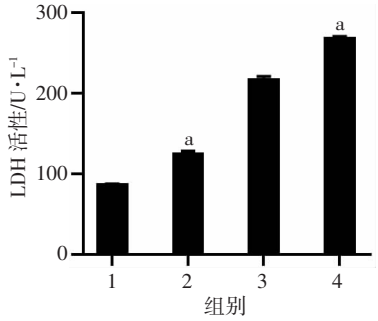
2.1 心肌细胞缺氧复氧模型的建立

CCK-8 结果显示,细胞存活率随复氧时间呈下降趋势,与对照组比较,复氧 4 h 组细胞存活率显著降低($P<0.01$,图 1);LDH 结果表明,随复氧时间增加,细胞损伤加重。与对照组比较,复氧 4 h 组 LDH 活性显著增加($P<0.01$,图 2)。流式细胞检测结果显示,与对照组比较,缺氧 4 h 组细胞凋亡率明显增高($P<0.01$,图 3A),随复氧时间增加,细胞凋亡率呈上升趋势,具有时间依赖性($P<0.05$,图 3B)。缺氧 4 h 复氧 4 h 为心肌细胞缺氧复氧模型建立的时间点,可作为后续研究时间。



1:对照组;2:缺氧 4 h 组;3:复氧 2 h 组;4:复氧 4 h 组;a:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 CCK-8 测定缺氧及复氧后各组细胞存活率

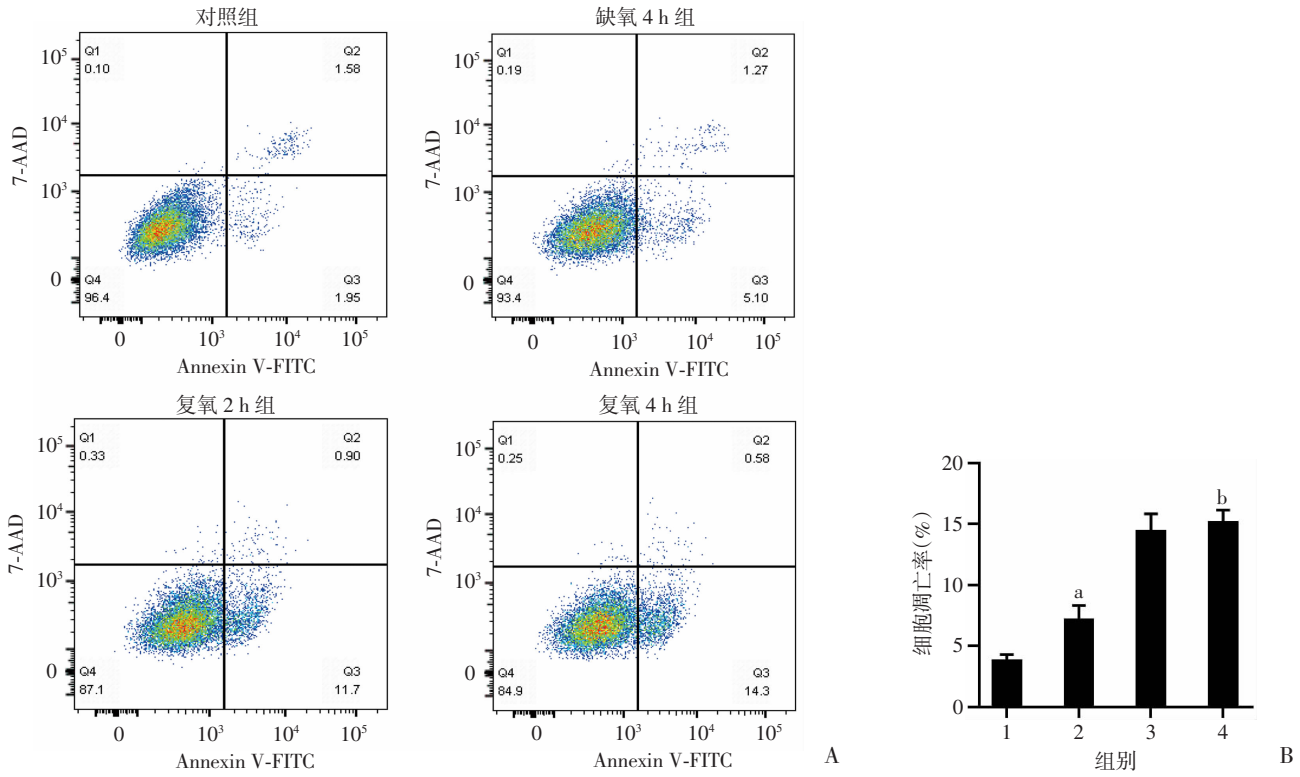


1:对照组;2:缺氧 4 h 组;3:复氧 2 h 组;4:复氧 4 h 组;a:$P<0.01$,与对照组比较

图 2 LDH 测定缺氧及复氧后各组心肌细胞损伤

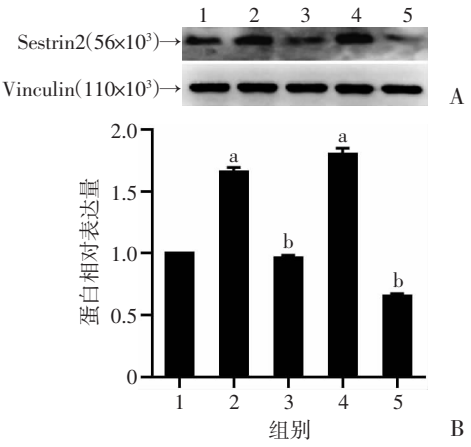
2.2 缺氧复氧对 Sestrin2 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与对照组比较,缺氧 4 h(si-NC)组和复氧 4 h(si-NC)组 Sestrin2 蛋白表达量均增加($P<0.01$,图 4)。复氧 4 h 组蛋白表达比单纯缺氧 4 h 组更高($P<0.01$)。说明 Sestrin2 蛋白参与了心肌缺氧及缺氧复氧损伤过程。



A:流式细胞术结果;B:各组细胞凋亡率比较;1:对照组;2:缺氧4 h组;3:复氧2 h组;4:复氧4 h组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与缺氧4 h组比较

图3 流式细胞术测定缺氧及复氧后各组心肌细胞凋亡率



A: Western blot检测结果;B:蛋白半定量分析;1:对照组;2:缺氧4 h+si-NC组;3:缺氧4 h+siRNA组;4:复氧4 h+si-NC组;5:复氧4 h+siRNA组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,分别与其相应阴性对照组比较

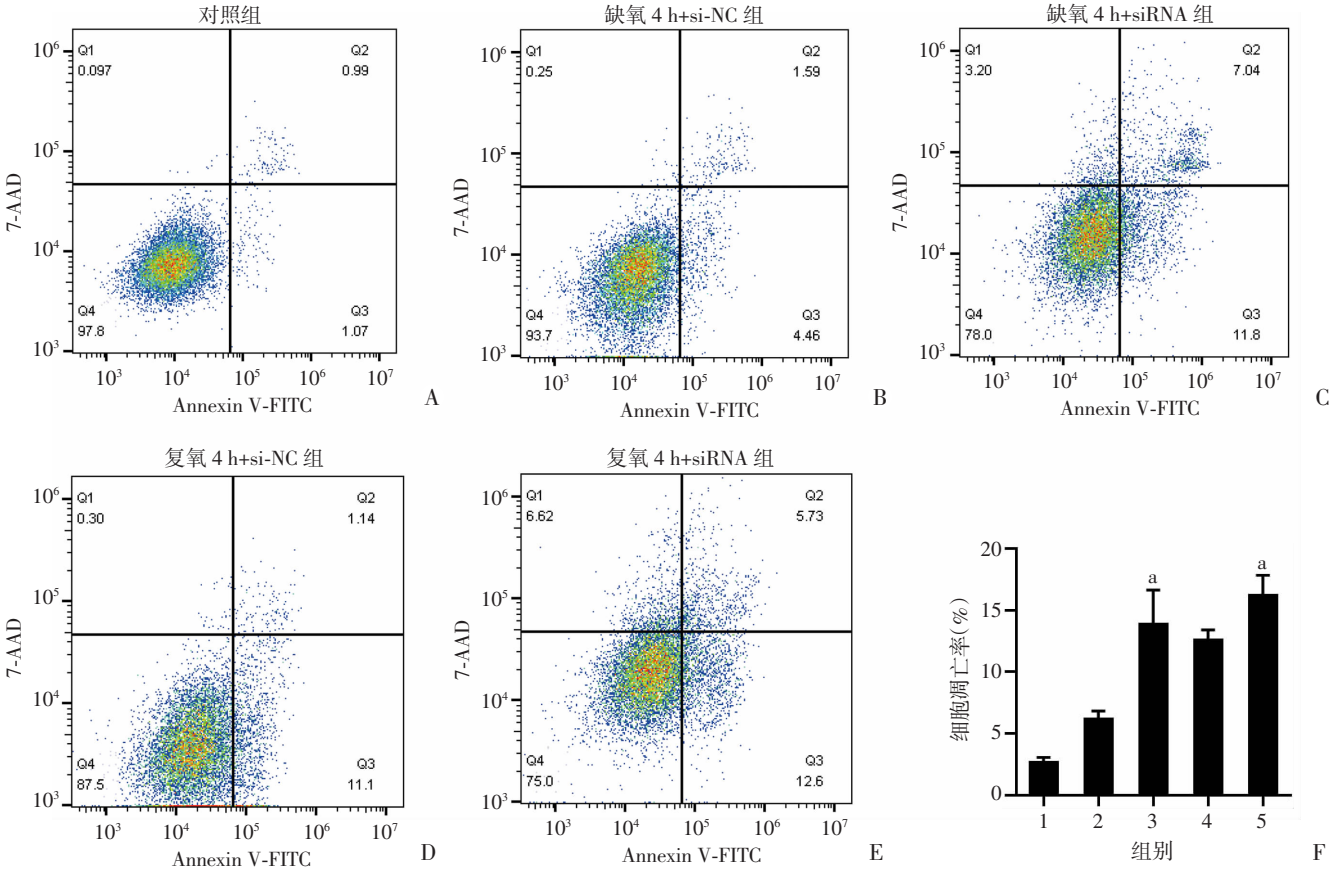
图4 Western blot检测缺氧、复氧及siRNA干扰后Sestrin2蛋白含量变化

2.3 siRNA干扰Sestrin2蛋白表达对心肌细胞凋亡的影响

Western blot结果显示,与阴性对照组相比,缺氧4 h组与复氧4 h组siRNA沉默Sestrin2蛋白表达效果明显($P<0.01$,图4B)。流式细胞术结果显示,siRNA沉默Sestrin2蛋白表达后,细胞凋亡率升高($P<0.01$,图5),证明Sestrin2蛋白的激活与心肌细胞凋亡显著性相关,可能起到保护性作用。

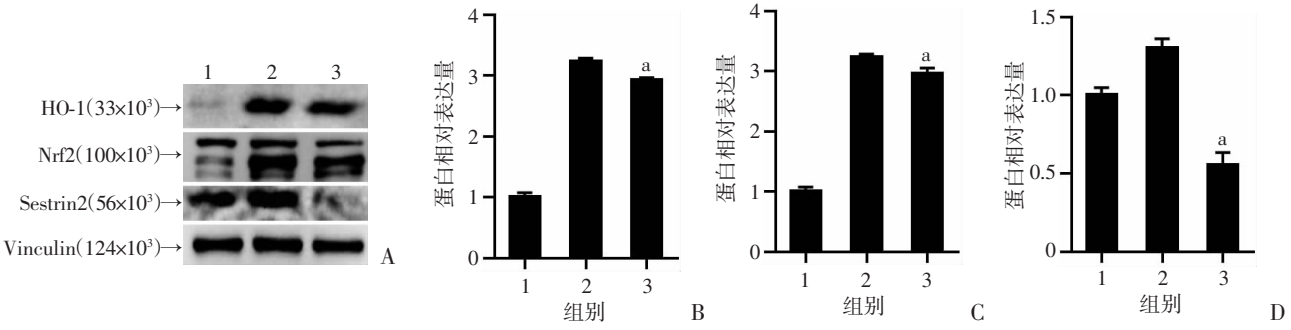
2.4 siRNA干扰Sestrin2蛋白表达对Nrf2及HO-1蛋白表达的影响

Western blot结果显示,在缺氧复氧损伤过程中Sestrin2蛋白表达增加,Nrf2及HO-1表达也增加,说明Sestrin2与Nrf2相关蛋白可能具有相关关系。同时,siRNA沉默Sestrin2蛋白表达后,Nrf2及HO-1蛋白表达也降低($P<0.01$,图6)。



A~E:流式细胞术检测各组细胞凋亡情况;F:各组细胞凋亡率分析;1:对照组;2:缺氧 4 h+si-NC 组;3:缺氧 4 h+siRNA 组;4:复氧 4 h+si-NC 组;5:复氧 4 h+siRNA 组;a:$P<0.01$,分别与缺氧 4 h+si-NC 组和复氧 4 h+si-NC 组比较

图 5 流式细胞术检测 siRNA 沉默 Sestrin2 蛋白表达后的细胞凋亡率变化



A:Western blot 检测结果;B~D:HO-1、Nrf2、Sestrin2 蛋白的相对表达量;1:对照组;2:复氧 4 h+si-NC 组;3:复氧 4 h+siRNA 组;a:$P<0.01$,与复氧 4 h+si-NC 组比较

图 6 Western blot 检测复氧 4 h Sestrin2 蛋白沉默后 Nrf2 及 HO-1 蛋白含量的变化

3 讨论

目前,急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)的发病率和病死率呈逐渐上升趋势。尽快进行经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention,PCI)术是减少 AMI 后心肌梗死面积和改善患者临床预后的关键治疗措施。然而伴随血管再通后诱发的心肌再灌注损伤,会导致心律失常等一系列恶性心血管

事件,其具体机制尚不明确,临床也尚无有效的预防和治疗措施。既往研究显示缺血再灌注损伤与氧化应激、免疫炎症反应、中性粒细胞浸润等有密切关系[5-7],其中氧化应激占重要地位。目前,抗氧化治疗被认为是预防氧化应激损害的关键,但是实验和临床研究均显示外源性抗氧化剂进入细胞后的效果不佳。故而,寻找特异性内源性抗氧化治疗方式获得广泛关注[17-18]。Sestrin2 蛋白在癌症[19-20]、年龄相关疾病[21-22]等方面,被证明可通过内源性抗氧化应激等方式阻碍或延缓相关疾病的发生、发展。新近,ISHIHARA 等[23]发现在肾脏缺血再灌注损伤过程中,Sestrin2 蛋白可以通过调节自噬,发挥肾脏保护作用。

因心肌细胞缺氧复氧与缺血再灌注损伤具有相似的病理生理过程,本研究利用 Billups-rothenberg 低氧厌氧培养箱充入混合气体的物理性缺氧复氧方式模拟心肌缺血再灌注过程。结果发现缺氧时细胞凋亡率升高,存活率降低,心肌细胞出现损伤,复氧后细胞损伤进一步加重,凋亡呈升高趋势,说明本实验缺氧 4 h 后再复氧 4 h 可以达到缺氧复氧损伤状态。同时发现在缺氧复氧损伤过程中,心肌细胞的 Sestrin2 蛋白表达量增加,证明 Sestrin2 蛋白参与了心肌细胞缺氧复氧损伤过程。本研究用 siRNA 沉默 Sestrin2 蛋白的表达后,流式细胞术检测细胞凋亡,发现细胞凋亡显著性加重,进一步说明 Sestrin2 蛋白参与心肌缺氧复氧过程,并可以作为减轻心肌细胞损伤的潜在性作用靶点。Nrf2 相关信号通路是已知细胞内抗氧化应激的重要通路之一。在基础状态下,其与 keap1 结合成复合体并被降解。而受到氧化刺激后,Nrf2 进入细胞核与氧化应答元件结合,激活下游 HO-1、TrxR1 等抗氧化基因的表达,发挥抗氧化作用[24]。BAE 等[25]研究显示,Sestrin2 通过 P62 依赖性自噬降解 keap1,激活 Nrf2 相关信号通路下游抗氧化基因 Rbx1,在脂质诱导的肝脏氧化损伤方面发挥保护作用。本研究进一步发现,用 siRNA 沉默 Sestrin2 蛋白表达后,Nrf2 蛋白表达降低,其下游抗氧化蛋白 HO-1 表达也同时降低。所以,我们初步认为 Sestrin2 蛋白参与心肌缺氧复氧损伤的作用可能与 Nrf2/HO-1 相关信号通路激活相关。其深层机制还需进一步研究。综上所述,本研究发现 Sestrin2 蛋白作为一种重要的内源性抗氧化应激蛋白存在于心肌细胞中,且参与心肌缺氧复氧损伤的过程。因其具有内源性,且可以调控抵抗多种疾病的氧化损伤,可能通过激活刺激该蛋白或者其相关靶点等方法预防或治疗心肌再灌注损伤。

参考文献:

[1] SZUMMER K, JERNBERG T, WALLENTIN L. From early pharmacology to recent pharmacology interventions in acute coronary syndromes: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(12): 1618-1636. DOI:10.1016/j.jacc.2019.03.531.

[2] FORTUNI F, CRIMI G, ANGELINI F, *et al*. Early complete revascularization in hemodynamically stable patients with ST-segment elevation myocardial infarction and multivessel disease[J]. Can J Cardiol, 2019, 35(8): 1047-1057. DOI:10.1016/j.cjca.2019.03.006.

[3] KWON O, PARK D W, PARK S J. Completeness of revascularization as a determinant of outcome: a contemporary review and clinical perspectives[J]. Can J Cardiol, 2019, 35(8): 948-958. DOI:10.1016/j.cjca.2018.12.038.

[4] DHALLA N S, ELMOSELHI A B, HATA T, *et al*. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury[J]. Cardiovasc Res, 2000, 47(3): 446-456. DOI:10.1016/s0008-6363(00)00078-x.

[5] KHUANJING T, PALEE S, CHATTIPAKORN S C, *et al*. The effects of acetylcholinesterase inhibitors on the heart in acute myocardial infarction and heart failure: From cells to patient reports[J]. Acta Physiol (Oxf), 2020, 228(2): e13396. DOI:10.1111/apha.13396.

[6] FAN Q, TAO R, ZHANG H, *et al*. Dectin-1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration[J]. Circulation, 2019, 139(5): 663-678. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036044.

[7] LIU C Y, ZHANG Y H, LI R B, *et al*. LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardin transcription[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 29. DOI:10.1038/s41467-017-02280-y.

[8] CASIN K M, FALLICA J, MACKOWSKI N, *et al*. S-nitrosoglutathione reductase is essential for protecting the female heart from ischemia-reperfusion injury[J]. Circ Res, 2018, 123(11): 1232-1243. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.118.313956.

[9] CHEN S D, YANG J L, LIN T K, *et al*. Emerging roles of sestrins in neurodegenerative diseases: counteracting oxidative stress and beyond[J]. J Clin Med, 2019, 8(7): E1001. DOI:10.3390/jcm8071001.

[10] LEE J H, BUDANOV A V, TALUKDAR S, *et al*. Maintenance of metabolic homeostasis by Sestrin2 and Sestrin3[J]. Cell Metab, 2012, 16(3): 311-321. DOI:10.1016/j.cmet.2012.08.004.

[11] KIM K M, YANG J H, SHIN S M, *et al*. Sestrin2: a promising therapeutic target for liver diseases[J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(7): 966-970. DOI:10.1248/bpb.b15-00228.

[12] QUAN N H, SUN W Q, WANG L, *et al*. Sestrin2 prevents age-related intolerance to ischemia and reperfusion injury by modulating substrate metabolism[J]. FASEB J, 2017, 31(9): 4153-4167. DOI:10.1096/fj.201700063R.

[13] MORRISON A, CHEN L, WANG J, *et al*. Sestrin2 promotes LKB1-mediated AMPK activation in the ischemic heart[J]. FASEB J, 2015, 29(2):408-417. DOI: 10.1096/fj.14-258814.

[14] ZHAO Y, LIU X H, FU X J, *et al*. Protective effects of epigallocatechin gallate against ischemia reperfusion injury in rat skeletal muscle via activating Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Life Sci, 2019, 239: 117014. DOI:10.1016/j.lfs.2019.117014.

[15] ZHANG J L, ZHANG Q Q, LIU G, *et al*. Therapeutic potentials and mechanisms of the Chinese traditional medicine Danshensu[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 864: 172710. DOI:10.1016/j.ejphar.2019.172710.

[16] GU M H, HE P K, LYU C F, *et al*. Spinosin and 6‴-Feruloylspinosin protect the heart against acute myocardial ischemia and reperfusion in rats[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(5): 4253-4261. DOI:10.3892/mmr.2019.10686.

[17] HAUSENLOY D J, YELLON D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target[J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 92-100. DOI:10.1172/JCI62874.

[18] JAKOBS P, SERBULEA V, LEITINGER N, *et al*. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 and thioredoxin-1 in atherosclerosis and ischemia/reperfusion injury in the heart[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 26(12): 630-644. DOI:10.1089/ars.2016.6795.

[19] DAI J M, HUANG Q C, NIU K W, *et al*. Sestrin 2 confers primary resistance to sorafenib by simultaneously activating AKT and AMPK in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Med, 2018, 7(11): 5691-5703. DOI:10.1002/cam4.1826.

[20] LOAYZA-PUCH F, DROST J, ROOIJERS K, *et al*. P53 induces transcriptional and translational programs to suppress cell proliferation and growth[J]. Genome Biol, 2013, 14(4): R32. DOI:10.1186/gb-2013-14-4-r32.

[21] QUAN N H, WANG L, CHEN X, *et al*. Sestrin2 prevents age-related intolerance to post myocardial infarction *via* AMPK/PGC-1α pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 115: 170-178. DOI:10.1016/j.yjmcc.2018.01.005.

[22] CHUNG H S, HWANG H J, HWANG S Y, *et al*. Association of serum Sestrin2 level with metabolic risk factors in newly diagnosed drug-naïve type 2 diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 144: 34-41. DOI:10.1016/j.diabres.2018.07.024.

[23] ISHIHARA M, URUSHIDO M, HAMADA K, *et al*. Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(4): F495-F509. DOI:10.1152/ajprenal.00642.2012.

[24] CALVERT J W, JHA S, GUNDEWAR S, *et al*. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling[J]. Circ Res, 2009, 105(4): 365-374. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.109.199919.

[25] BAE S H, SUNG S H, OH S Y, *et al*. Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage[J]. Cell Metab, 2013, 17(1): 73-84. DOI:10.1016/j.cmet.2012.12.002.

(收稿:2020-03-16;修回:2020-05-09)

(编辑 汪勤俭)