

# 槲皮素保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9C2 心肌细胞氧化损伤的作用机制

霍魁媛, 常宏, 王勇, 李春, 唐炳华\*

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:探讨在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激损伤中槲皮素对 H9C2 心肌细胞存活率、活性氧分子(ROS)、还原型辅酶 II(NADPH)氧化酶、细胞凋亡等关键因子的影响,初步阐明槲皮素对心肌细胞的保护机制。方法:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 H9C2 心肌细胞建立氧化应激损伤模型,分为正常组、模型组、槲皮素组,采用噻唑蓝(MTT)法检测心肌细胞活力,活性氧检测试剂盒检测槲皮素处理后 ROS 变化,流式细胞术检测各组细胞凋亡率,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)与蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测细胞氧化应激反应、细胞凋亡机制相关分子[NADPH 氧化酶-4(NOX-4),NADPH 氧化酶亚单位 p22<sup>phox</sup>,B 淋巴细胞瘤-2 原癌基因(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 基因(Bax),半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)]基因和蛋白表达水平。结果:10 μmol·L<sup>-1</sup>槲皮素具有显著的抗氧化、抗凋亡作用。与模型组比较,槲皮素组细胞存活率明显提高( $P < 0.05$ ),ROS 水平与细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。此外,槲皮素组中 Bcl-2,NOX-4 基因表达上调( $P < 0.05$ );p22<sup>phox</sup>,Bax,Caspase-8 基因表达明显下调( $P < 0.05$ )。同时槲皮素能够抑制 Bax,p22<sup>phox</sup> 蛋白的表达( $P < 0.05$ ),上调磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K),Bcl-2 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。结论:10 μmol·L<sup>-1</sup>槲皮素能有效减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导的心肌细胞氧化损伤,进而抑制心肌细胞凋亡。该机制可能是通过调节 NADPH 氧化酶亚型 NOX-4 与 p22<sup>phox</sup>,减少 ROS 生成,激活 PI3K 表达,升高 Bcl-2 实现。

**[关键词]** 槲皮素; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 氧化应激; 凋亡; 细胞存活率; 活性氧分子; 还原型辅酶 II 氧化酶-4

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0122-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150122

## Protective Mechanism of Quercetin on Oxidative Injury in H9C2 Cardiomyocytes

HUO Kui-yuan, CHANG Hong, WANG Yong, LI Chun, TANG Bing-hua\*

(School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To preliminarily investigate the protective effects of quercetin on the survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury in H9C2 cardiomyocytes, and such key factors as reactive oxygen species (ROS), nicotinamide adenosine denucleotide hydro-phosphoric acid (NADPH) oxidase and apoptosis, in order to clarify the underlying mechanism. **Method:** A model of hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced H9C2 cells oxidative injury was established *in vitro*, and divided into the normal group, the model group and the quercetin group. Cell viability was examined with an methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay to determine the available concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and quercetin. The effects of quercetin on ROS level and apoptosis rate were detected by 2', 7' -Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and flow-cytometry, respectively. We also used Real-time PCR and Western blot to examine the effect of quercetin on oxidative stress and apoptosis mechanism-related molecules (NOX-4, p22<sup>phox</sup>, Bcl-2, Bax and Caspase-8) genes and protein expression level. **Result:** Quercetin of 10 μmol·L<sup>-1</sup> has significant anti-oxidative and anti-apoptotic effect. Cell survival rate increased obviously in quercetin group compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-model group ( $P < 0.05$ ), ROS level and apoptosis rate significantly decreased ( $P <$

**[收稿日期]** 20160217(015)

**[基金项目]** 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAI29B07);国家自然科学基金项目(81202788,81473456,81470191,81302908,81530100);北京市自然科学基金项目(7142099);北京中医药大学优秀青年基金项目(2015-JYB-XYQ001)

**[第一作者]** 霍魁媛,在读硕士,从事中西医结合基础冠心病病理研究,Tel:010-64286995,E-mail:hky012345@163.com

**[通讯作者]** \*唐炳华,硕士,教授,硕士生导师,从事中西医结合基础冠心病预防研究,Tel:010-64286995,E-mail:tangbinghua@bucm.edu.cn

0.05,  $P < 0.01$ ). Moreover, quercetin had an up-regulation on PI3K, Bcl-2 and NOX4 ( $P < 0.05$ ) and down-regulation of p22<sup>phox</sup>, Bax and Caspase-8 ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, quercetin can inhibit Bax, p22<sup>phox</sup> protein expressions ( $P < 0.05$ ), and up-regulate PI3K, Bcl-2 protein expressions ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Quercetin protects H9C2 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury and inhibit myocardial cell apoptosis by regulating NOX-4 p22<sup>phox</sup>, reducing intracellular ROS level, activating PI3K and increasing Bcl-2.

**[Key words]** quercetin; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; oxidative stress; apoptosis; survival rate; reactive oxygen species; NADPH oxidase-4

心血管疾病已成为人类死亡原因的首位,大量研究显示其病理机制与氧化应激、细胞凋亡密切相关<sup>[1]</sup>。活性氧(ROS)包括超氧阴离子(O<sup>2-</sup>)、过氧化羟基等自由基和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等非自由基<sup>[2]</sup>。过量的 ROS 可通过激活氧化还原信号途径引起心肌细胞氧化损伤、肥大和凋亡<sup>[3]</sup>。在应激反应中,激活还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶-4 (NOX-4) 能促进心肌细胞存活率,促进线粒体三磷酸腺苷(ATP)水平升高,减少 ROS 生成<sup>[4]</sup>。然而,NADPH 氧化酶 p22<sup>phox</sup> 亚基能诱导 ROS 的产生,加速心肌组织氧化损伤的进程<sup>[5]</sup>。对 NOX-4 和 p22<sup>phox</sup> 亚基的调控已成为抗心肌凋亡研究的热点。槲皮素属黄酮类化合物,具有抗病毒、抗氧化、抗炎等功效,并在心血管保护方面具有一定的药理作用<sup>[6-7]</sup>。前期研究发现,槲皮素通过调节线粒体功能紊乱、减少 ROS 产生,发挥保护心肌细胞、抑制细胞凋亡的作用<sup>[8]</sup>。槲皮素对 NADPH 氧化酶亚型介导的心肌细胞氧化损伤与凋亡的影响机制尚不明确。本实验采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 H9C2 心肌细胞,建立氧化应激损伤模型,探讨槲皮素在 NADPH 氧化酶亚型介导的心肌细胞氧化损伤以及促凋亡中的作用靶点与保护机制,为阐明槲皮素保护心肌氧化损伤提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞及试剂** H9C2 细胞购自北京协和医学院细胞资源中心,槲皮素(北京市药品检验所,批号 100081,含量 99.1%),3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (美国 Sigma 公司,批号 STBD8053V),噻唑蓝(MTT,北京金柏沃科技有限公司,批号 bw-m0009),活性氧检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号 PLL-201503),抗兔 B 淋巴细胞瘤-2 原瘤基因(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 基因(Bax),磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab0005, ab32503, ab40755),抗鼠 p22<sup>phox</sup> 一抗(美国 Santa Cruz 公司,批号 F2112),抗鼠  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗,山羊抗兔 IgG 二抗,山羊抗鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 150110, 112586,

112971)。

**1.2 仪器** Thermo 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司),KHB ST-360 型酶标仪(上海旦鼎国际贸易有限公司),Step One Plus 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司),Universal Hood II 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),BD FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司),TH4-200 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

**1.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9C2 细胞损伤模型浓度选择** H9C2 细胞培养在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中。采用 96 孔板接种 H9C2 细胞,调整细胞密度 8 × 10<sup>4</sup> 个/mL,每孔 100  $\mu$ L 培养。24 h 后细胞密度达到 80% 左右,给予 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 25, 50, 100, 200  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>) 作用 1 h,弃原液,每孔加入 0.5 g · L<sup>-1</sup> MTT 稀释液 110  $\mu$ L,孵育 4 h,弃培养液,加入二甲亚砜(DMSO) 150  $\mu$ L,充分震荡,酶标仪检测吸光度 A。实验重复 3 次。

**1.4 细胞存活率检测** 培养条件同 1.3 项,培养 24 h 后,给予槲皮素(5, 10, 20  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>) 作用 4 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 1 h,弃原液,每孔加入 0.5 g · L<sup>-1</sup> MTT 稀释液 110  $\mu$ L,孵育 4 h,弃培养液,加入 DMSO 150  $\mu$ L,充分震荡,酶标仪检测 A。实验重复 3 次。

**1.5 检测 ROS 浓度** 采用 6 孔板接种 H9C2 细胞,细胞密度约 8 × 10<sup>4</sup> 个/mL,每孔 2 mL 培养 24 h 后,分为正常组、模型组、槲皮素组。去除上清液,正常组、模型组采用高糖 DMEM 培养基培养;槲皮素组加入 10  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> 槲皮素处理。分别加入终浓度 10  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> 无血清培养基稀释的 2',7'-二氯荧光黄二乙酸酯(DCFH-DA) 500  $\mu$ L,避光 30 min,洗涤,培养 4 h 后,模型组与槲皮素组分别加入 50  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 15 min,洗涤,倒置荧光显微镜下观察各组细胞内 ROS 生成情况,Image J 1.47v 软件分析荧光相对光密度。

**1.6 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI) 双染检测细胞凋亡** 细胞处理同 1.5 项,槲皮素组加入 10  $\mu$ mol ·

L<sup>-1</sup> 槲皮素。培养 4 h 后,模型组和槲皮素组分别加入 50 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 1 h。洗涤,胰酶消化细胞,离心,弃上清;洗涤后,加入 1 × binding buffer 100 μL, Annexin V-FITC 5 μL, PI 5 μL, 采用流式细胞仪检测。

**1.7 Real-time PCR 检测 Bcl-2, NOX-4, p22<sup>phox</sup>, Bax 和 Caspase-8 mRNA 表达** 细胞处理同 1.5 项,加入 Trizol 提取总 RNA, Nanodrop 软件测定 RNA 浓度; Oligo<sup>dt</sup> 反转录成 cDNA; 以 cDNA 为模板链,在 PCR 仪器上进行扩增反应。反应条件:95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 40 个循环。实验重复 3 次。Stepone plus 软件测定 C<sub>t</sub> 值,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 值表示 mRNA 相对表达量。相关引物序列见表 1。

表 1 引物序列及序列长度

Table 1 Primer sequences and lengths

引物	序列	长度/bp
β-actin	上游 5'-GCACCACACCTTCTACAA-3'	18
	下游 5'-TACGACCAGAGGCATACA-3'	18
Nox-4	上游 5'-GCAAGATACCAGAATGAGGA-3'	20
	下游 5'-GGAACAATACCACCACCAT-3'	19
p22 <sup>phox</sup>	上游 5'-CATCAAGCAGCCACCTAC-3'	18
	下游 5'-ACCTCATCTGTCACTGGAA-3'	19
Caspase-8	上游 5'-GGAACCAACTATGATGAAGAG-3'	21
	下游 5'-CAGCAGATGAAGCAGTCT-3'	18
Bcl-2	上游 5'-GGATACTGGAGATGAAGACT-3'	20
	下游 5'-AGGCTGGAAGGAGAAGAT-3'	18
Bax	上游 5'-GATGATTGCTGATGTGGATAC-3'	21
	下游 5'-AGTTGAAAGTTGCCGTCTG-3'	18

**1.8 免疫印迹法 (Western blot) 检测 Bcl-2, p22<sup>phox</sup>, PI3K, Bax 蛋白表达** 采用 60 mm 培养皿培养心肌细胞,细胞处理同 1.6 项。洗涤,刮下并收集细胞,离心,弃上清;加入裂解液 200 μL 裂解,低温离心,取上清;采用 BCA 法测定总蛋白量,蛋白变性,上样,转膜,封闭,加入一抗 p22<sup>phox</sup> (1:100), PI3K (1:2 000), Bcl-2 (1:1 000), Bax (1:1 000), β-actin (1:5 000) 摇床上低温孵育过夜,洗膜,加入山羊抗鼠 (1:5 000), 山羊抗兔 (1:5 000) 二抗孵育 2 h,洗膜,显影成像,凝胶成像仪采集图片, Image Lab5.2.1 软件分析图像灰度值,以目的蛋白/β-actin 表示蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

**1.9 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,两组比较采用 LSD 法,

$P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 H9C2 细胞存活率的影响** 与正常组比较,不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 H9C2 细胞 1 h 后,细胞存活率逐渐下降 ( $P < 0.01$ )。其中 50 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激时细胞存活率为 59.41%。文献报道适当浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理细胞,细胞主要通过氧化应激途径进行生物学改变<sup>[9-10]</sup>,故选择 50 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为后续研究氧化损伤心肌细胞模型的剂量。见表 2。

表 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对心肌细胞存活率影响 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 2 Effect on myocardial cell viability ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量/μmol·L <sup>-1</sup>	存活率/%
正常	-	100.000 ± 0.000
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25	91.549 ± 4.153 <sup>1)</sup>
	50	59.410 ± 11.047 <sup>1)</sup>
	100	33.980 ± 3.328 <sup>1)</sup>
	200	26.352 ± 2.615 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**2.2 槲皮素对氧化应激损伤下 H9C2 细胞存活率的影响** 与模型组比较,10,20 μmol·L<sup>-1</sup> 槲皮素组细胞存活率显著升高 ( $P < 0.01$ ),10,20 μmol·L<sup>-1</sup> 槲皮素之间无显著性差异。见 表 3。故选取 10 μmol·L<sup>-1</sup> 为槲皮素的干预剂量。

表 3 槲皮素对氧化应激损伤下 H9C2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

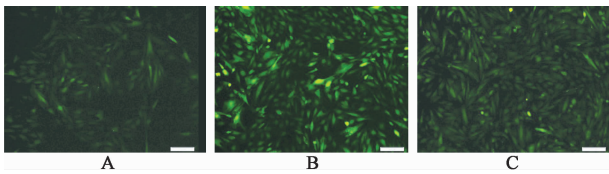
Table 3 Effect on H9C2 cell viability in different concentrations of quercetin ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/μmol·L <sup>-1</sup>	存活率/%
正常	-	100.000 ± 0.000 <sup>1)</sup>
模型	-	49.390 ± 4.896
槲皮素	20	88.341 ± 5.434 <sup>1)</sup>
	10	85.330 ± 8.238 <sup>1)</sup>
	5	55.213 ± 2.681

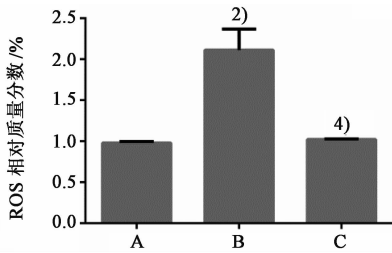
注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**2.3 槲皮素对 H9C2 细胞内 ROS 相对含量的影响** 与模型组比较,10 μmol·L<sup>-1</sup> 槲皮素组荧光强度减弱。槲皮素组细胞内 ROS 相对含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 1,2。

**2.4 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9C2 细胞凋亡的影响** 模型组凋亡率较正常组显著升高 ( $P < 0.01$ ),10 μmol·L<sup>-1</sup> 槲皮素组凋亡率较模型组显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. 槲皮素 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组 (图 2~7 同)  
图 1 槲皮素对细胞内 ROS 相对含量的影响 (荧光显微镜,  $\times 100$ )  
Fig. 1 Effect of quercetin on content of ROS in H9C2 cells (fluorescence microscope,  $\times 100$ )



与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (图 3~7 同)

图 2 槲皮素对细胞内 ROS 相对质量分数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 2 Effect of quercetin on content of ROS in H9C2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

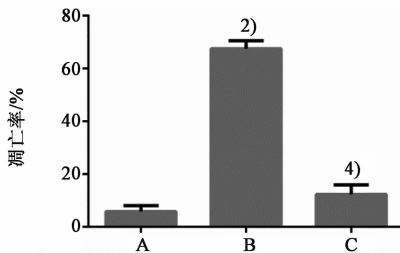


图 3 槲皮素对 H9C2 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 3 Effect of quercetin on apoptosis rate in H9C2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**2.5 槲皮素对 H9C2 细胞中氧化应激损伤相关分子的影响** 与正常组比较, 模型组 NOX-4 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), p22<sup>phox</sup> mRNA 和蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与模型组比较,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  槲皮素组 NOX-4 mRNA 表达显著升高, p22<sup>phox</sup> mRNA 和蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 4, 5。

**2.6 槲皮素对 H9C2 细胞中凋亡相关分子的影响** 与空白组比较, 模型组 Bax mRNA 和蛋白, Caspase-8 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); Bcl-2 mRNA 和蛋白表达, PI3K 蛋白表达, Bcl-2/Bax 明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与模型组比较,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  槲皮素组 Bax mRNA 和蛋白, Caspase-8 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); Bcl-2 mRNA 和蛋白表达, PI3K 蛋白表达, Bcl-2/Bax 明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 6, 7。

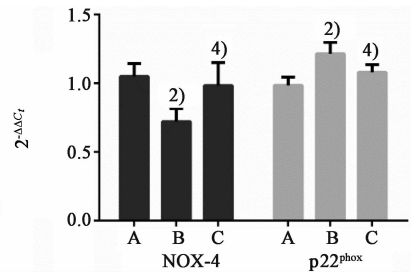


图 4 槲皮素对 H9C2 细胞 NOX-4 与 p22<sup>phox</sup> mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 4 Effect of quercetin on expression of NOX-4 and p22<sup>phox</sup> mRNA in all groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

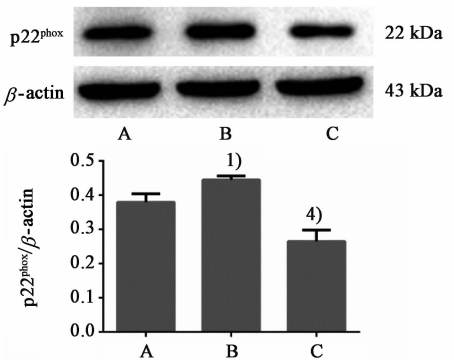


图 5 槲皮素对 H9C2 细胞 p22<sup>phox</sup> 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 5 Effect of quercetin on expression of p22<sup>phox</sup> protein in all groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

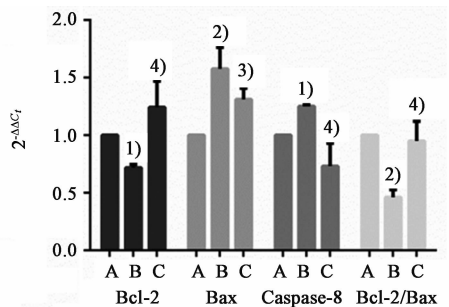


图 6 槲皮素对 H9C2 细胞 Bcl-2, Bax, Caspase-8 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 6 Effect of quercetin on expression of Bcl-2, Bax and Caspase-8 mRNA in all groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论

研究表明, 在心血管疾病中氧化应激可诱导线粒体呼吸链功能异常, 促进心肌细胞凋亡, 导致心肌肥厚, 心脏纤维化, 加速心力衰竭, 最终影响其预后和转归<sup>[11-13]</sup>。ROS 是生物系统中普遍存在的信号分子, 过量的 ROS 诱发心肌细胞氧化损伤进而诱导其凋亡<sup>[14]</sup>。NADPH 氧化酶是心血管疾病氧化应激中的主要酶, 在 ROS 生成及氧化还原通路中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。NADPH 氧化酶活化后可催化 NADPH 电子转移, 诱导活性氧 ROS 的生成, 有文献报道,

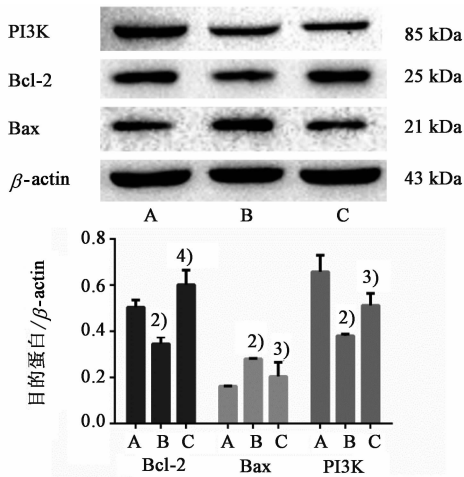


图 7 槲皮素对 H9C2 细胞 Bcl-2, Bax, PI3K 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 7 Effect of quercetion on expression of Bcl-2, Bax and PI3K protein in all groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

p22<sup>phox</sup> 亚基能诱导 ROS 的产生,加速心肌组织氧化损伤的进程<sup>[16]</sup>。研究发现,在应激反应中,激活内质网中 NOX-4 能促进心肌细胞存活,可能是通过上调 NADPH/NADP<sup>+</sup>,增加去乙酰化酶 3(SIRT3)表达量,使心肌细胞存活率、线粒体 ATP 水平升高,ROS 生成量减少,从而发挥保护心肌的作用<sup>[17-18]</sup>。在心衰动物模型中 NADPH 氧化酶亚型 NOX-4 通过增加心肌血管生成,提高心肌对压力负荷的适应性而发挥保护心肌细胞的作用<sup>[19]</sup>。NADPH 氧化酶 p22<sup>phox</sup> 是重要的跨膜活性亚单位,在维持氧化酶尤其是 NOX-4 的正常功能及 ROS 的产生中扮演着重要的角色<sup>[20]</sup>。PI3K 蛋白通路参与心肌细胞的增殖与凋亡,主要通过降低缺血心肌细胞中的 Caspases 活性、钙超载,及上调 Bcl-2 基因表达,下调 Bax 基因表达,从而达到保护心肌细胞的作用<sup>[21]</sup>。

本实验结果显示,槲皮素组细胞活力呈浓度依赖性升高,心肌细胞内 ROS 含量下降,细胞存活率明显升高,表明槲皮素可能通过减少 ROS 的生成,从而保护细胞免于氧化损伤。进一步研究发现,与模型组比较,槲皮素组中 NADPH 氧化酶 p22<sup>phox</sup> 在基因、蛋白表达方面均明显降低,NOX-4 在基因表达方面明显升高,表明槲皮素可能通过调节 NADPH 氧化酶的表达,从而保护氧化损伤的心肌细胞。在凋亡通路中,槲皮素通过上调 PI3K 与 Bcl-2 表达,抑制 Bax 与 Caspase-8 表达,进而发挥抑制心肌细胞凋亡的作用。

综上所述,槲皮素能有效减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导的 H9C2 细胞氧化损伤,抑制细胞凋亡,其作用机制可

能是通过调控 NADPH 氧化酶,促使 NOX-4 表达,抑制 p22<sup>phox</sup> 表达,减少 ROS 生成,从而达到减轻心肌细胞氧化应激损伤的目的,同时激活 PI3K,提高 Bcl-2 蛋白表达,抑制 Bax 与 Caspase-8 促凋亡表达,从而发挥抗氧化、抗凋亡、保护心肌细胞的作用。

[参考文献]

[ 1 ] Sitical H N, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease ( a review ) [ J ]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 71 : 40-46.

[ 2 ] Sinha N, Dabla P K. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-A current review [ J ]. *Curr Hypertens Rev*, 2015, 11 ( 2 ) : 132-142.

[ 3 ] Kuo C Y, Chiu Y C, Lee A Y, et al. Mitochondrial Lon protease controls ROS-dependent apoptosis in cardiomyocyte under hypoxia [ J ]. *Mitochondrion*, 2015, 23 : 7-16.

[ 4 ] Zhang M, Brewer A C, Schröder K, et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 ( 42 ) : 18121-18126.

[ 5 ] Yang C M, Lee I T, Hsu R C, et al. NADPH oxidase/ROS-dependent PYK2 activation is involved in TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat heart-derived H9c2 cells [ J ]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272 ( 2 ) : 431-442.

[ 6 ] Arumugam S, Thandavarayan R A, Arozal W, et al. Quercetin offers cardio-protection against progression of experimental autoimmune myocarditis by suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress via endothelin-1 /MAPK signaling [ J ]. *Free Radic Res*, 2012, 46 ( 2 ) : 154-163.

[ 7 ] Nabavi S F, Nabavi S M, Mirzaei M, et al. Protective effect of quercetin against sodium fluoride induced oxidative stress in rat's heart [ J ]. *Food Funct*, 2012, 3 ( 4 ) : 437-441.

[ 8 ] Dong Q, Chen L, Lu Q, et al. Quercetin attenuates doxorubicin cardiotoxicity by modulating Bmi-1 expression [ J ]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171 ( 19 ) : 4440-4454.

[ 9 ] 韩苗苗, 王文飞, 刘铭瑶, 等. FGF-21 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠心肌细胞 H9C2 氧化应激损伤的保护作用 [ J ]. *药学学报*, 2014, 49 ( 4 ) : 470-475.

[ 10 ] Fu W, Sui D, Yu X, et al. Protective effects of ginsenoside Rg<sub>2</sub> against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury and apoptosis in H9C2 cells [ J ]. *Int J Clin Exp Med*, 2015,

- 8(11):19938-19947.
- [11] Ralph B D, Michael J P, Joseph M M, et al. Cardiovascular disease risk assessment: insights from Framingham [J]. *Glob Heart*, 2013, 8(1):11-23.
- [12] Brown D I, Griendling K K. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2015, 116(3):531-549.
- [13] Kuroda J, Sadoshima J. NADPH oxidase and cardiac failure [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(4):314-320.
- [14] Madamanchi N R, Runge M S. Redox signaling in cardiovascular health and disease [J]. *Free Rasic Biol Med*, 2013, 61(8):473-501.
- [15] Rodinojaneiro B K, Paradeladobarro B, Castineiras-landeira M I, et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology [J]. *Vasc Health Risk Manaq*, 2013, 9(1):401-428.
- [16] Liu Y, Lei S, Gao X, et al. PKC $\beta$  inhibition with ruboxistaurin reduces oxidative stress and attenuates left ventricular hypertrophy and dysfunction in rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Clin Sci*, 2012, 122(4):161-173.
- [17] 何薇,曾超,邹倩,等. 下调 NADPH 氧化酶 4 加重缺氧/复氧心肌细胞损伤:线粒体 SIRT3 信号的关键作用[J]. *心脏杂志*, 2014, 26(3):259-264.
- [18] Sudaresan N R, Gupta M, Kim G, et al. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(9):2758-2771.
- [19] Szczurek W, Szygula-Jurkiewicz B. Oxidative stress and inflammatory markers the future of heart failure diagnostics [J]. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*, 2015, 12(2):145-149.
- [20] Hahn N E, Meischl C, Wijnker P J, et al. NOX2, p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> are targeted to the nuclear pore complex in ischemic cardiomyocytes colocalizing with local reactive oxygen species [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 27(5):471-478.
- [21] Wang Y, Zhang Z Z, Wu Y, et al. Quercetin post conditioning attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(10):861-867.

[责任编辑 张丰丰]

## 欢迎订阅《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为 CSCD 来源期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊,16 开本,234 页,标准刊号 ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号 2-417;国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行,代号 SM4655,欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购,地址:北京市东城区东直门内南小街 16 号,收件人:《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编 100700, Tel:(010)84076882, E-mail:syfjx\_2010@188.com, 网址:www.syfjzxx.com。