DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20200914.003
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20200914.1816.006.html

缺氧、缺氧/复氧对心肌细胞内ROS、MAPKs活性表达的影响

凌学斌,王 军,綦苗苗,李继科,郭峻莉,李天发✉
(海南医学院第一附属医院心血管内科,心血管病研究所,海南 海口 570102)

[摘要] **目的**:研究缺氧、缺氧/复氧条件对大鼠心肌细胞(H9c2)活性氧(ROS)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)活性及对细胞凋亡的影响。**方法**:使用化学性低氧模型诱导剂氯化钴($CoCl_2$)处理H9c2心肌细胞建立缺氧、缺氧/复氧模型。在不同浓度$CoCl_2$(150、300、450、600、900、1 200、2 400 μmol/L)以及不同时间(4、12、16、24、48 h)下处理H9c2心肌细胞,采用MTT检测其活力;采用双氯荧光素(2′,7′-dichlorofluorescin diacetate,DCFH-DA)、二氢乙啶荧光探针(dihydroethidium,DHE)检测ROS水平;Western blot检测磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPKs)(p-p38、p-ERK1/2和p-JNK)及Caspase-3活性水平。**结果**:使用300~1 200 μmol/L $CoCl_2$处理H9c2心肌细胞后,细胞存活率呈时间及浓度依赖性降低($P<0.01$);与对照组相比,4、16 h后缺氧组ROS表达均升高($P<0.05$),p-JNK、p-p38及Caspase-3蛋白表达升高($P<0.05$),p-ERK表达无明显变化。缺氧/复氧组与缺氧组相比,ROS、p-p38,p-ERK1/2、p-JNK及Caspase-3活性表达更高($P<0.01$)。**结论**:复氧可进一步加重缺氧引起的H9c2心肌细胞氧化应激损伤,活化ROS/MAPKs通路,证实心肌细胞缺血再灌注损伤在心脏缺血发病机制中有着重要的作用。

[关键词] 缺氧/复氧;活性氧;丝裂原活化蛋白激酶;氯化钴;心肌细胞
[中图分类号] R541.6 [文献标识码]A [文章编号] 1007-1237(2021)07-0481-07

Effect of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on the viability expression of ROS and MAPKs in myocardial cells

LING Xue-bin, WANG Jun, QI Miao-miao, LI Ji-ke, GUO Jun-li, LI Tian-fa✉
(*Department of Cardiovasology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou* 570102, *China*)
[*Foundation Project*]:*This work is supported by the Foundation Project of National Natural Science* [*No.* (2018)40]
[*Author*]:*LING Xue-bin,M.M.,Associate Chief Physician,Tel*: 15501786160, *E-mail*: *xuebin*192006@163.*com.*
[*Correspondence to*]:*LI Tian-fa, Ph.D,Chief Physician,Tel*:0898-66528127, *E-mail*: *litf*79997@*aliyun.com.*
Received: 2020-08-24 *Revised*: 2020-09-09 *JHMU*, 2021;27(7):481-487

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To investigate to the effect of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on ROS, MAPKs and cell apoptosis in H9c2 cardiomyocytes. **Methods**: H9c2 cells were treated with cobalt chloride ($CoCl_2$) at different concentrations (150, 300, 450, 600, 900, 1 200, 2 400 μmol/L) for 4-48 h to establish the hypoxia and hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury model. H9c2 cell viability was detected by MTT, and the intracellular ROS level was measured by 2′, 7′-dichlorofluorescin diacetate and dihydroethidium. In addition, the expression level of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (including phosphorylated JNK, ERK and p38) and caspase-3 was determined by Western blotting. **Results**: At 300-12 00 μmol/L, $CoCl_2$ inhibited the cell viability in H9c2 cells in a concentration and time-dependent manner ($P<0.01$). Compared with the control group, the ROS levels under hypoxia condition were significantly increased ($P<0.05$) at 4 and 16 h. Moreover, the expression levels of p-JNK, p-p38 and caspase-3 were increased ($P<0.05$). However, the expression of p-ERK remained unchanged. Furthermore, the expression levels of ROS, p-JNK, p-ERK1/2, p-p38 and caspase-

[基金项目]国家自然科学基金资助项目[国科金计项(2018)40号]
[作者简介]凌学斌,硕士,副主任医师,电话:15501786160,E-mail:xuebin192006@163.com。
[通讯作者]李天发,博士,主任医师,电话:0898-66528127,E-mail:litf79997@aliyun.com。
[收稿日期]2020-08-24 [修回日期]2020-09-09 网络出版时间:2020-09-15 10:43:33

3 in the hypoxia/reoxygenation group were significantly increased compared with the hypoxia group ($P<0.01$). **Conclusions**: Reoxygenation further aggravates hypoxia-induced oxidative stress injury in cardiomyocyte by activating ROS/MAPKs signaling pathway, suggesting the role of myocardial ischemia/reperfusion injury in the pathogenesis of ischemic heart disease.

[**KEY WORDS**] Hypoxia/reoxygenation; Reactive oxygen species; Mitogen-activated protein kinases; Cobalt chloride; Cardiomyocyte

细胞凋亡是引起心力衰竭的重要病理机制，常见诱因包括心肌缺血再灌注（ischemia/reperfusion，I/R）损伤、慢性压力负荷及充血性心力衰竭[1]。I/R损伤常见于溶栓、冠状动脉介入或搭桥、心脏移植术等治疗中，是临床上治疗缺血性心脏病的常用方法，但可诱发心肌顿抑、再灌注恶性心律失常、心肌细胞凋亡及心脏收缩和舒张功能不全[2]。研究发现活性氧（reactive oxygen species，ROS）介导的氧化应激可进一步活化MAPKs通路[3]，是心肌I/R损伤的重要病理过程。ROS包括$O_2^{\cdot -}$、$^{\cdot}OH$、$ONOO^-$、H_2O_2等，目前被认为是细胞内第二信使，影响着细胞增殖、分化、凋亡及坏死等过程[4]。MAPKs为丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，主要包括细胞外信号调节蛋白激酶（ERK）、氨基末端激酶（JNK）及p38，通过磷酸化下游产物调节细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应。目前有关心肌细胞I/R损伤的研究常使用具有成熟心肌细胞特性的H9c2心肌细胞株，通过建立缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）模型来完成。H9c2细胞经H/R处理后可激活ROS/ERK[3]、ROS/JNK[3,5]及ROS/p38[6]通路，进而诱导心肌细胞凋亡。目前尚少有研究关注ROS对ERK、JNK及p38活性水平的表达是否存在差异以及缺氧、H/R对上述通路是否存在影响。本研究通过$CoCl_2$诱导H9c2缺氧，使用完全培养基模拟I/R损伤病理过程，比较常氧、缺氧与H/R条件下ROS水平、MAPKs及Caspase-3活性变化，探讨ROS/MAPKs通路对H9c2心肌细胞氧化应激损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高糖DMEM培养基购自hyclone公司，胎牛血清购自BI公司，青链霉素购自索莱宝公司，$CoCl_2\cdot 6H_2O$、兔抗磷酸化JNK（p-JNK）、兔抗p-ERK1/2购自生工生物工程有限公司，兔抗p-p38、HRP标记山羊抗兔二抗购自Santa Cruze公司，细胞裂解液、兔抗α-Tubulin、兔抗Caspase-3、DHE荧光探针购自碧云天、DCFH-DA荧光探针购自Sigma Aldrich公司。H9c2由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

1.2 细胞培养及H/R模型建立

H9c2心肌细胞株来源于大鼠胚胎期心脏组织，在37℃、5% CO_2条件下培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中。对照组为完全培养基培养16 h，缺氧组给予终浓度600 μmol/L $CoCl_2$的DMEM培养液进行化学模拟缺氧16 h，H/R组细胞在模拟缺氧后，换不含$CoCl_2$ DMEM培养液继续培养4 h。

1.3 细胞存活率检测

H9c2心肌细胞接种于96孔培养板中，当细胞生长到培养孔的80%面积时，根据实验要求进行处理：（1）设置$CoCl_2$浓度梯度（0、150、300、450、600、900、1 200、2 400 μmol/L）培养24 h；（2）设置时间梯度（空白、4、12、16、24、48 h）600 μmol/L $CoCl_2$培养，每组设5个复孔。上述过程完成后，每孔加10% MTT 200 μL，培养箱中培养4 h，加DMSO 150 μL，震荡10 min，最后酶标仪（λ=490 nm）下检测吸光度（OD值）。取6孔OD值的平均数，按公式计算细胞存活率，细胞存活率（%）= OD处理组/OD对照组×100%，重复3次。

1.4 细胞内ROS水平的测定

将赖氨酸包被的盖玻片置于6孔培养板内，H9c2心肌细胞被均匀的接种在盖玻片上。当细胞生长到培养孔约80%面积时，根据实验需要给予相应的处理：（1）缺氧组600 μmol/L $CoCl_2$分别处理8、16 h；（2）H/R组：600 μmol/L $CoCl_2$分别处理8、16 h后，换用不含$CoCl_2$ DMEM培养4 h。每组包括3个复孔，处理完后，用PBS漂洗2次，分别对H9c2心肌细用10 μmol/L绿色荧光探针DCFH-DA检测缺氧8 h/复氧4 h、5 μmol/L红色荧光探针DHE检测缺氧16 h/复氧4 h，37℃孵育30 min。在荧光显微镜下随机选取5个不重复区摄片，用Image J1.42q软件进行平均荧光强度（mean flourscence indensity，MFI）分析。

1.5 Western blot法检测p-p38、p-ERK1/2、p-JNK、Caspase-3表达

H9c2心肌细胞接种于35 mm培养皿内，培养至80%满时，分别按上述处理条件处理对照组、缺氧组及H/R组细胞，处理各组细胞后用预冷的PBS洗2次，加入细胞裂解液，裂解数分钟后，12 000 r/min离心10 min，取上清，采用考马斯亮蓝G-250测定蛋白含量。总蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，转移到PVDF膜上。用2%胎牛血清蛋白封闭2 h，TBS洗3次，随后加入一抗p-JNK(1∶500)、p-ERK1/2(1∶500)、p-p38(1∶1 000)、Caspase-3(1∶1 000)、α-Tubulin(1∶1 000)4 ℃过夜，TBST洗3次后用HRP标记山羊抗兔(1∶5 000)37 ℃孵育1 h，TBST洗PVDF膜3次，用发光试剂ECL显色，暗室曝光到X光片上，凝胶成像系统扫描分析结果。

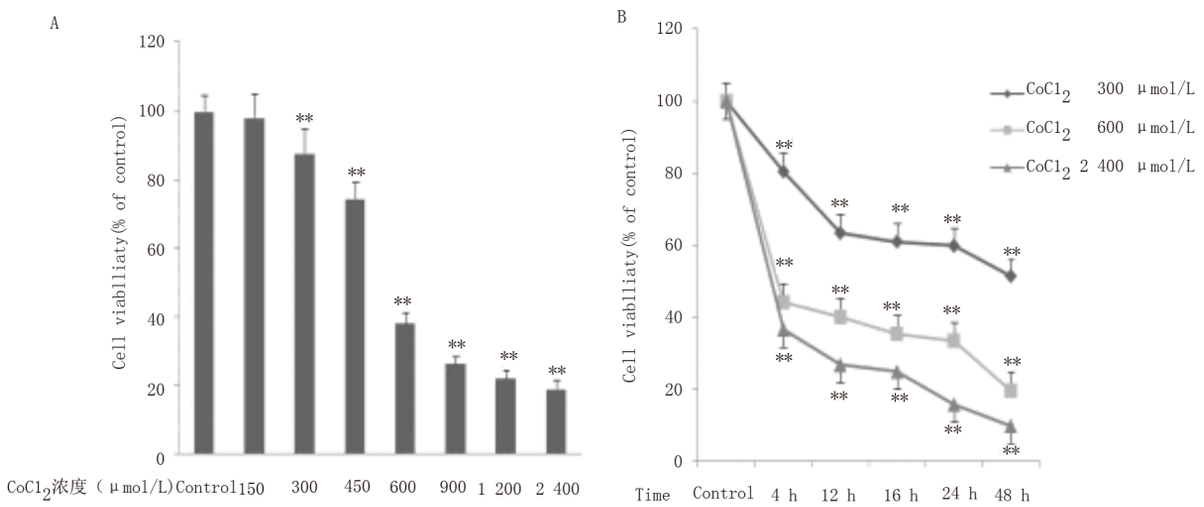
1.6 统计学处理

全部实验数据经SPSS 19软件进行统计学分析，所有结果以($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验，用LSD进行均数之间的比较，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $CoCl_2$呈浓度依赖性及时间依赖性抑制H9c2心肌细胞成活率

图1A及表1显示，与对照组相比，不同浓度的$CoCl_2$处理H9c2心肌细胞16 h后，150 μmol/L $CoCl_2$对H9c2心肌细胞活力无影响，从300 μmol/L开始呈剂量依赖性抑制心肌细胞活力($P<0.01$)。与前一梯度浓度相比，在600 μmol/L处下降最为明显($P<0.001$)，随后1 200 μmol/L与900 μmol/L、2 400 μmol/L与1 200 μmol/L细胞活力差别无统计学意义，可能与细胞处于生长对数期抵制$CoCl_2$毒性作用有关。图1B及表2显示不同时间段(0～48 h)下，与对照组相比，300、600及2 400 μmol/L的$CoCl_2$均呈时间依赖性抑制H9c2心肌细胞活力($P<0.01$)，其中300、600 μmol/L在12～24 h内细胞活力差别无统计学意义，24 h后显著下降($P<0.001$)，而2 400 μmol/L的$CoCl_2$除12～16 h外细胞活力差别均存在显著差异($P<0.001$)。综上，为有效抑制细胞活力并减少细胞过多的凋亡，选择600 μmol/L的$CoCl_2$培养16 h。



注：A：不同浓度的$CoCl_2$处理16 h对H9c2心肌细胞存活率的影响；B：300、600及2 400 μmol/L $CoCl_2$时在不同时间段对H9c2心肌细胞存活率的影响。与对照组比较，**$P<0.01$。

图1 $CoCl_2$对H9c2心肌细胞存活率的影响

Fig 1 Effect of $CoCl_2$ on H9c2 viability

表1 不同浓度$CoCl_2$处理16 h对H9c2心肌细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of different concentrations of $CoCl_2$ for 16 h on survival rate of H9c2($\bar{x}\pm s$)

OD值	$CoCl_2$(μmol/L)							
	0	150	300	450	600	900	1 200	2 400
OD	100.0±4.5	98.1±6.8	87.8±6.9	74.5±4.8	38.2±3.1	26.3±2.2	22.2±2.5	19.0± 2.5
t	—	1.47	12.92	90.68	771.76	1 309.00	1 380.00	1 491.00
P	—	0.265	0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

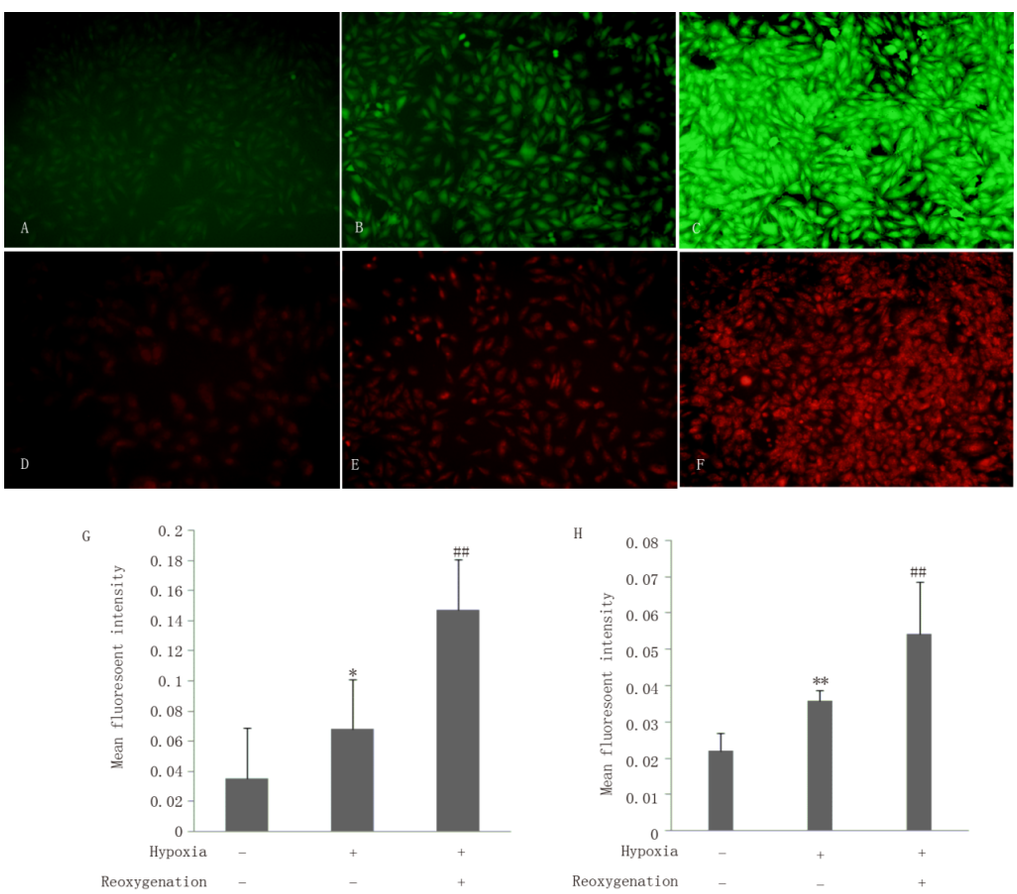
表2　300、600及2 400 μmol/L $CoCl_2$时在不同时间段对H9c2心肌细胞存活率的影响(%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of $CoCl_2$ at 300, 600 and 2 400 μmol/L on survival rate of H9c2 cardiomyocytes at different times (%,$\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	4 h	12 h	16 h	24 h	48 h	F	P
300 μmol/L $CoCl_2$组	99±2.2	80.5±6.7	63.4±0.3	60.9±0.9	59.8±2.7	51.3±0.8	20.17	<0.001
600 μmol/L $CoCl_2$组	100±4.5	44.2±8.2	40.1±2.5	35.3±1.7	33.5±9.6	19.6±0.9	632.00	<0.001
2 400 μmol/L $CoCl_2$组	100±3.3	36.6±4.8	26.7±3.3	24.9±3.3	15.8±1.1	9.8±0.8	286.00	<0.001

2.2　ROS水平与H9c2心肌细胞缺氧、H/R关系

图2显示了ROS荧光探针检测600 μmol/L的$CoCl_2$不同时间处理下H9c2心肌细胞缺氧、缺氧/复ROS水平变化。与对照组相比，缺氧4 h后采用DCFH-DA活性氧探针MFI为其1.9倍(P<0.05)，缺氧4 h/复氧4 h后MFI为其4.2倍(P<0.001)；缺氧16 h后采用DHE超氧化物阴离子荧光探针MFI为其1.6倍(P<0.01)，缺氧16 h/复氧4 h MFI为其2.5倍(P<0.001)；缺氧4 h或16 h后复氧均可使ROS水平产生进一步增多(P<0.01)，见表3。DCFH-DA和DHE探针法检测结果表明$CoCl_2$诱导的化学性缺氧剂可导致H9c2心肌细胞内ROS水平升高，去除$CoCl_2$后模拟缺氧复氧环境仍可促进ROS表达。



注：A、B、C为H9c2处理4 h时DCFH-DA荧光检测ROS水平(放大倍数100×)，A为对照组，B为缺氧组，C为H/R组；D、E、F为H9c2处理16 h时DHE检测ROS水平(放大倍数100×)，D为对照组，E为缺氧组，F为H/R组；G为处理4 h后平均荧光强度；F为处理16 h后平均荧光强度。与对照组比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01；与缺氧组比较，$^{\#\#}P$<0.01。

图2　缺氧、H/R对H9c2细胞内ROS水平的影响

Fig 2　Effect of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on ROS in H9c2

2.3　缺氧、H/R下H9c2心肌细胞内p-JNK、p-ERK1/2和p-p38蛋白表达影响

结果显示H9c2心肌细胞在600 μmol/L的$CoCl_2$诱导缺氧16 h，复氧4 h时p-MAPKs活性变化。蛋白印迹检测显示，与对照组比较，p-JNK和p-p38表达升高(P<0.05)，而p-ERK变化无统计学意义，提示600 μmol/L的$CoCl_2$诱导缺氧16 h后可引起p-JNK和p-p38明显升高，而p-ERK无

表3 缺氧、H/R对H9c2细胞内ROS水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on ROS in H9c2($\bar{x}\pm s$)

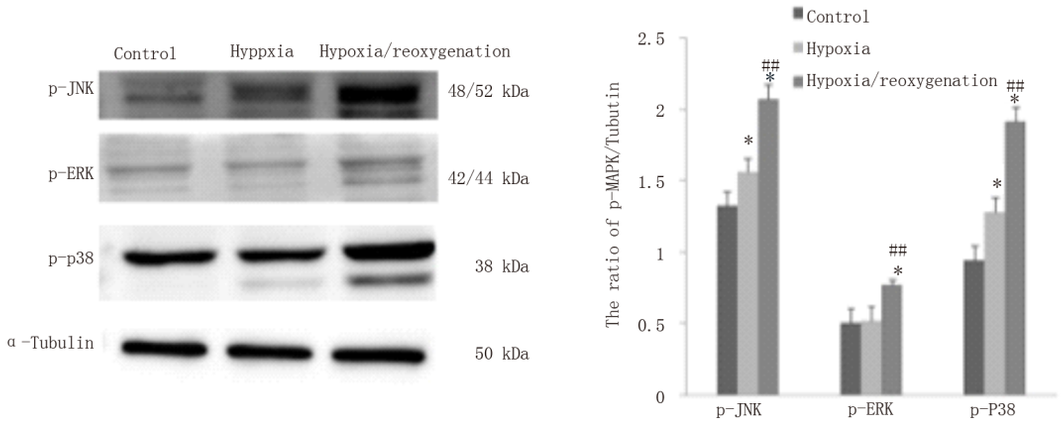
组别	DCFH-DA(4 h)	*P*	DHE(16 h)	*P*
对照组	0.035±0.006	—	0.022±0.005	—
缺氧组	0.068±0.015	0.038*	0.036±0.003	0.001*
H/R组	0.147±0.034	<0.001##	0.054±0.006	<0.001##

注:与对照组比较,*$P<0.05$;与缺氧组比较,##$P<0.01$。

明显变化,当细胞发生H/R后,与缺氧组比较,三者均明显升高($P<0.01$),提示细胞H/R加重细胞氧化应激损伤,进一步活化p-MAPKs,见图3,表4。

2.4 H9c2心肌细胞缺氧、H/R时对Cleaved Caspase-3活性的影响

图4为H9c2细胞在600 μmol/L的$CoCl_2$诱导缺氧16 h,复氧4 h下细胞凋亡情况。图中无活性Caspase-3在缺氧、H/R逐渐减少,转化为有活性的Cleaved Caspase-3并逐渐增多。从结果中可看出细胞缺氧下可激活Caspase-3介导的凋亡通路,H/R后可使该通路进一步活化,见表5。



注:与对照组比较,*$P<0.05$;与缺氧组比较,##$P<0.01$。

图3 缺氧、H/R下H9c2细胞内p-JNK、p-ERK及p-p38表达变化

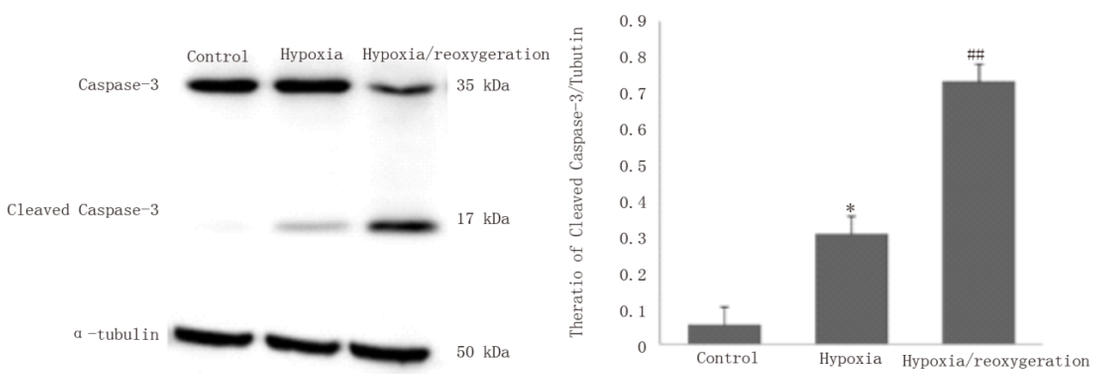
Fig 3 Effect of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on p-JNK, p-ERK and p-p38 in H9c2

表4 缺氧、H/R下H9c2细胞内p-JNK、p-ERK及p-p38表达变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effects of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on p-JNK, p-ERK and p-p38 in H9c2($\bar{x}\pm s$)

组别	P-JNK	*P*	P-ERK	*P*	P-P38	*P*
对照组	1.323±0.041	—	0.507±0.069	—	0.946±0.024	—
缺氧组	1.559±0.075	0.026*	0.524±0.067	0.793*	1.282±0.167	0.014*
H/R组	2.068±0.070	<0.001##	0.771±0.066	0.005##	1.914±0.076	<0.001##

注:与对照组比较,*$P<0.05$;与缺氧组比较,##$P<0.01$。



注:与对照组比较,*$P<0.05$;与缺氧组比较,##$P<0.01$。

图4 缺氧、H/R下对H9c2细胞内Caspase-3活性裂解片段表达的影响

Fig 4 Effects of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on the expression of cleaved Caspase-3 in H9c2

表5　缺氧、H/R下对H9c2细胞内Caspase-3活性裂解片段表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Effects of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on the expression of cleaved Caspase-3 in H9c2($\bar{x}\pm s$)

组别	Caspase-3活性裂解片段	P
对照组	0.056±0.018	—
缺氧组	0.307±0.109	0.041*
H/R组	0.731±0.173	<0.001##

注：与对照组比较，*P<0.05；与缺氧组比较，##P<0.01。

3　讨论

H9c2细胞株来源于大鼠胚胎心脏组织，具有成熟心肌细胞特性，广泛用于细胞形态、电生理及毒理研究[5]。细胞体外H/R模型可通过物理性及化学性诱导。物理性缺氧常在充有氮气缺氧装置及常氧装置中完成[6]，因需要严格检测氧浓度，技术性要求高所以其运用受到限制。化学性缺氧则操作方便，$CoCl_2$为常用的是化学性低氧模拟剂。钴可替代亚铁螯合于血红蛋白中，使细胞摄氧障碍而引起氧化应激损伤，去除$CoCl_2$溶液换用新鲜培养基可恢复血红蛋白摄氧，引起细胞H/R损伤[7]，进而模拟细胞I/R损伤。本实验再次证实，$CoCl_2$呈浓度依赖性及时间依赖性抑制H9c2心肌细胞成活率，与Gallo等[8]报道的相一致。本研究显示心肌细胞缺氧后可导致ROS大量产生，而H/R后ROS进一步增多，进而证实心肌I/R损伤与ROS诱导的氧化应激损伤密切相关。细胞经I/R处理后产生的ROS可作为第二信使从细胞膜转运到胞浆，并作为第三信使转进入细胞核中，通过与DNA结合及改变下游基因表达水平引起细胞I/R损伤，因而目前常用的抗氧化剂如谷胱甘肽、超氧化物歧化酶、辅酶Ⅱ和血红素加氧酶-1，可减少细胞内ROS水平达到抗氧化应激损伤作用[9]。

H9c2在H/R诱导下通过ROS/JNK/Egr-1通路引发细胞发生氧化应激损伤[10]，而腺苷酸活化蛋白激酶的激活可通过JNK介导的NF-κB途径抑制缺氧/复氧时的炎症反应[11]。H9c2细胞凋亡与ROS激活JNK/p38通路有关，Jantira等[12]证实使用P38抑制剂可阻断P38通路进而对糖尿病缺血性心肌病患者起到积极的心脏保护作用。P38通路在细胞缺血缺氧时可被活化，但并不是出现在所有缺血缺氧模型中，这与细胞何时被激活以及缺血持续时间密切相关[13]。本研究发现，H9c2在缺氧及H/R不同处理后JNK和p38磷酸化水平均明显升高，而p-ERK在缺氧处理后升高不明显，但经H/R后表达水平明显升高，这与Mizukanmi等[14]在对大鼠心脏I/R体内实验结果相一致，该研究发现缺血不足以激活ERK上游分子MEK（MAP kinase/extracellular signal-regulatedkinase kinase）-2，只有经I/R处理后可使得MEK-2磷酸化进而激活ERK。此外，是否需ROS大量蓄积后才能激活ERK通路尚需要进一步证实。总之，MAPKs通路的活化随着ROS不同诱导条件而存在差异，提示三条通路不是独立存在，而是相互作用、相互影响。

在缺氧或H/R条件下产生的ROS可诱导心肌细胞氧化应激损伤，主要表现在线粒体、内质网应激、溶酶体等亚细胞结构损伤，可分别通过JNK/ERK/p38通路介导下诱导细胞凋亡[15-17]，本课题组既往研究对此有详细阐释[18]。本研究进一步证实H9c2经I/R损伤后可引发更多的心肌细胞发生凋亡。目前ERK信号通路在细胞凋亡中的作用存在争论，该通路活化既可导致细胞发生凋亡[19]，也可抑制肿瘤细胞凋亡使其存活的作用[20]。庞伟[21]同样证实在缺锌致海马神经细胞氧化应激损伤中发现ERK活性表达下降，引发细胞凋亡，而适量补锌可通过活化MEK/ERK信号通路，减缓海马神经细胞损伤。JNK、ERK及p38在细胞凋亡中的作用机制尚需要进一步研究。综上所述，$CoCl_2$诱导缺氧、H/R损伤模型，可模拟心肌细胞缺血、I/R损伤病理过程，为后续抗氧化应激损伤机制研究提供理论基础和实验依据。

参考文献

1　Cristine JR, Faisal JA, Tarak NK, et al. SR9009 administered for one day after myocardial ischemia-reperfusion prevents heart failure in mice by targeting the cardiac inflammasome[J]. Commun Biol, 2019, 2:353.

2　Huang RZ, Shu J, Dai XQ, et al. The protective effect of polyphyllin I on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(10): 644.

3　Sun L, Fan H, Yang L, et al. Tyrosol prevents ischemia/reperfusion-induced cardiac injury in H9c2 cells: involvement of ROS, Hsp70, JNK and ERK, and apoptosis[J]. Molecules, 2015, 20(3): 3758-3775.

4　Vaishali A, Hardeep ST, Ayşegül V. Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements[J]. Biomolecules, 2019, 9(11): 735.

5　Chu Q, Zhang Y, Zhong S, et al. N-n-Butyl haloperidol iodide ameliorates oxidative stress in mitochondria induced

by hpoxia/reoxygenation through the mitochondrial c-Jun N-terminal Kinase/Sab/Src/Reactive oxygen species pathway in H9c2 cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019, 7417561.

6 Liu Y, Zhang S, Su D, et al. Inhibiting (pro)renin receptor-mediated p38 MAPK signaling decreases hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 403(1-2): 267-276.

7 Jing SQ, Wang SS, Zhong RM, et al. Neuroprotection of *Cyperus esculentus L*. orientin against cerebral ischemia/reperfusion induced brain injury[J]. Neural Regen Res, 2020,15(3): 548-556.

8 Gallo S, Gatti S, Sala V, et al. Agonist antibodies activating the Met receptor protect cardiomyoblasts from cobalt chloride-induced apoptosis and autophagy[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1185.

9 Berenice FR, Gustavo IVC, José PC, et al. Lipoteichoic acid reduces antioxidant enzymes in H9c2 cells[J]. Toxicol Rep, 2019, 7: 101-108.

10 Zhang YM, Liao H, Zhong SP, et al. Effect of N-n-butyl haloperidol iodide on ROS/JNK/Egr-1 signaling in H9c2 cells after hypoxia/reoxygenation[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11809.

11 Chen X, Li X, Zhang WY, et al. Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF-κB pathway [J]. Metabolism, 2018, 83: 256-270.

12 Jantira S, Eakkapote P, Punyanuch A, et al. Combination of metformin and p38 MAPK inhibitor, SB203580, reduced myocardial ischemia/reperfusion injury in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats[J]. Exp Ther Med, 2019, 18 (3): 1701-1714.

13 Steenbergen C. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in myocardial ischemia/reperfusion injury; relationship to ischemic preconditioning[J]. Basic Res Cardiol, 2002, 97(4): 276-285.

14 Mizukami YK, Yoshida KI. Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion[J]. Biochem J, 1997, 323 (Pt 3): 785-790.

15 Deng TM, Wang YH, Wang CH, et al. FABP4 silencing ameliorates hypoxia reoxygenation injury through the attenuation of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating PI3K/Akt pathway[J]. Life Sci, 2019, 224: 149-156.

16 Chu Q, Zhang Y, Zhong S, et al. N-n-butyl haloperidol iodide ameliorates oxidative stress in mitochondria induced by hypoxia/reoxygenation through the mitochondrial c-Jun N-terminal Kinase/Sab/Src/reactive oxygen species pathway in H9c2 cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7417561.

17 Ma X, Liu H, Murphy JT, et al. Regulation of the transcription factor EB-PGC1α axis by beclin-1 controls mitochondrial quality and cardiomyocyte death under stress[J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(6): 956-976.

18 Ling XB, Wei HW, Wang J, et al. Mammalian metallothionein-2A and oxidative stress[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1483.

19 Wen SY, Tsai CY, Pai PY, et al. Diallyl trisulfide suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting MAPK/NF-kappa B signaling through attenuation of ROS generation[J]. Environ Toxicol, 2018, 33(1): 93-103.

20 Shehzad A, Islam SU, Ahn EM, et al. Decursinol angelate inhibits PGE2-induced survival of the human leukemia HL-60 cell line via regulation of the EP2 receptor and NFkappa B pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(9): 985-993.

21 庞伟. MEK/ERK信号通路在缺锌致海马神经细胞损伤中的作用及其机制研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.

[本文编辑] 姚 强 谭贝加