

# 甘松新酮对 H9C2 心肌细胞低氧损伤的作用及其机制

李红艳\*, 赵思涵, 梅显运, 陈政, 李旭光, 孙芳云

(西藏民族大学医学院//西藏高原相关疾病分子遗传机制与干预研究省级重点实验室, 咸阳 712082)

**摘要:**以氯化钴( $\text{CoCl}_2$ )构建 H9C2 心肌细胞低氧损伤模型, 研究 Nar 在其中的作用及机制. CCK-8 试剂盒检测细胞活力, 流式细胞仪测细胞凋亡, 以自噬抑制剂 3-MA 预作用细胞探讨 Nar 对自噬的影响, Western Blot 检测 Beclin-1、LC3II/LC3I、P62、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达, 分光光度计测定乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和肌酸激酶(CK)含量. 结果显示:  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{mol/L}$ ) 可抑制约 50% 细胞生长, 而 Nar (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理显著减轻了  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{mol/L}$ ) 诱导的细胞凋亡; 另外, Nar 通过增加 LC3II/LC3I 和 Beclin-1 表达及促进 P62 降解激活了自噬, 但 3-MA 预作用逆转了该过程; 3-MA 预作用同时逆转了 Nar 对  $\text{CoCl}_2$  造成的 H9C2 细胞凋亡和氧化损伤的保护作用. 研究表明: Nar 在心肌细胞低氧损伤中以诱导自噬抑制凋亡的方式保护心肌细胞, Nar 可能成为治疗低氧性心脏病的潜在药物.

**关键词:**甘松新酮; 自噬; 凋亡; 心肌细胞; 低氧; 氧化损伤

中图分类号: R91

文献标志码: A

文章编号: 1000-5463(2021)02-0051-08

## The Effect of Nardosinone on Hypoxic Injury of H9C2 Cardiomyocytes and Its Mechanism

LI Hongyan\*, ZHAO Sihan, MEI Xianyun, CHEN Zheng, LI Xuguang, SUN Fangyun

(School of Medicine, Xizang Minzu University//Key Laboratory for Basic Life Science Research of

Tibet Autonomous Region, Xianyang 712082, China)

**Abstract:** The model of hypoxic injury of H9C2 cardiomyocytes was established with cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2$ ) to study the role of Nardosinone (Nar) in it and its mechanism. CCK-8 kit was used to detect cell viability and flow cytometry was used to detect apoptosis. Autophagy inhibitor 3-MA was used to pretreat cells to evaluate the effect of Nar on autophagy. The expressions of Beclin-1, LC3II/LC3I, P62, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were detected with Western Blot, and the contents of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and creatine kinase (CK) were measured with spectrophotometer. The results showed that  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{mol/L}$ ) inhibited the growth of H9C2 cells by about 50% while the pretreatment with Nar (50  $\mu\text{mol/L}$ ) significantly alleviated  $\text{CoCl}_2$ -induced cell apoptosis. In addition, Nar promoted P62 degradation and increased the expressions of LC3II/LC3I and Beclin-1, which were reversed with 3-MA pretreatment. At the same time, pretreatment with 3-MA reversed the protective effects of Nar on  $\text{CoCl}_2$ -caused H9C2 cell apoptosis and oxidative damage. The results showed that Nar played a protective role in myocardial hypoxic injury by inducing autophagy and inhibiting apoptosis. It was suggested that Nar may be a potential drug for the treatment of hypoxic heart disease.

**Keywords:** nardosinone; autophagy; apoptosis; cardiomyocytes; hypoxia; oxidative damage

缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)已成为世界上死亡率较高疾病之一, 主要是由冠状

动脉狭窄致心肌缺血引起的<sup>[1]</sup>. 而心肌缺血造成的氧含量降低是 IHD 发病的重要原因之一. 虽有

研究表明急性低氧能提高细胞存活率,促进细胞对低氧环境的适应,但慢性或极端低氧却引起细胞死亡.同时,心肌低氧常常伴有氧自由基增加、钙超载、细胞凋亡和炎症反应等现象.因此,保护心肌细胞免受低氧损伤是降低 IHD 风险的有效策略.

自噬是一个复杂的细胞分解代谢过程<sup>[2]</sup>.通常自噬可以保护细胞免受各种破坏性因素的影响,如低氧或饥饿,以维持细胞内稳态<sup>[3]</sup>.同时,自噬对于维持心脏正常功能至关重要<sup>[4]</sup>.在缺血应激下,自噬被激活以保护心肌细胞免受缺血或缺血/再灌注损伤<sup>[5]</sup>.而严重缺血时,心脏过度自噬会促进细胞死亡并恶化心脏功能<sup>[6]</sup>.

甘松新酮(Nardosinone, Nar)是一种从甘松提取而来的倍半萜类化合物,已将其含量作为衡量甘松品质定性的主要标准.研究发现,Nar 的药理作用主要有镇静、抗癫痫、抗抑郁、促神经生长、改善认知能力、保护心肌细胞、降血压、抑菌与抗疟、抗肿瘤等<sup>[7]</sup>.Nar 可通过激活蛋白激酶 A (Protein Kinase A, PKA) 促进小鼠胚胎神经干细胞的增殖、迁移和选择性分化;通过细胞外信号调节激酶 (Extracellular Signal-Regulated Kinase, ERK) 减少原代培养神经元因缺氧缺葡萄糖诱导的损伤,提高细胞活力;促进神经生长因子诱导的神经生长等<sup>[8]</sup>.Nar 通过抑制核因子- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) 途径治疗相关神经炎症疾病<sup>[9]</sup>.另外,Nar 可抑制 NF- $\kappa$ B 配体诱导的破骨细胞生成,减轻脂多糖诱导牙槽骨吸收等.在心血管研究中发现,Nar 可阻断 SD 大鼠心室肌细胞钠离子通道电流或通过影响 cAMP-PKA 信号通路,抑制心律失常大鼠心肌细胞钙超载,从而发挥抗心律失常作用,以及通过靶向磷脂酰肌醇-3 激酶 (Phosphatidylinositol-3-Kinase, PI3K)/Akt 和 MEK/ERK 信号通路,减轻血管紧张素 II 诱导的 H9C2 细胞肥大等.

尽管 Nar 在神经生长、心律失常和心肌肥大中有着重要作用,但 Nar 在心肌低氧损伤中是否有作用及该过程是否由自噬介导还未见报道.因此,本研究利用氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 模拟 H9C2 心肌细胞低氧,探讨 Nar 干预的作用及机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、药品和仪器

甘松新酮(SN8280,北京索莱宝,纯度 $\geq 98\%$ );氯化钴(Sigma);3-MA(Selleckchem);DMEM 高糖培养基和胰蛋白酶(Gibco);胎牛血清(杭州四季青生物工程研究所);CCK-8 试剂盒(北京同仁);乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(上海贝博生物);RIPA 裂解液(碧云天生物技术研究所);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(西安晶彩生物科技有限公司);一抗 Caspase-3、 $\beta$ -actin、Bax、Bcl-2、LC3B、Beclin-1、P62 和羊抗鼠二抗(ImmunoWay 公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);蛋白电泳与转移仪和凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)等.

### 1.2 细胞培养

H9C2 细胞系购自中国科学院上海细胞库.细胞放置在相对湿度 95%、5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中,以 DMEM 高糖培养基并补加 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素培养.每隔 3 d 进行一次细胞传代,选用对数生长期细胞进行实验.

### 1.3 细胞活性检测

细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种在 96 孔板中,24 h 后,分别以 CoCl<sub>2</sub> (0、50、100、200、500、1 000  $\mu$ mol/L) 孵育 24 h. 根据 CCK-8 试剂盒说明测定细胞活力.后续实验选用 CoCl<sub>2</sub> 半最大效应浓度 (EC<sub>50</sub>) 500  $\mu$ mol/L 进行细胞低氧造模.另外,用 Nar (0、10、50、100、200  $\mu$ mol/L) 预处理细胞 24 h 后,再用 CoCl<sub>2</sub> (EC<sub>50</sub>) 作用 24 h, CCK-8 检测细胞活力.

### 1.4 流式细胞仪测细胞凋亡

细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种在 6 孔板中,24 h 后,分为对照组 (0.1% DMSO 作用 48 h)、CoCl<sub>2</sub> 组 (500  $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub> 作用 24 h)、Nar 组 (50  $\mu$ mol/L Nar 作用 24 h) 和 Nar+CoCl<sub>2</sub> 组 (Nar 预作用 24 h 后,CoCl<sub>2</sub> 再作用 24 h). 根据 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明处理细胞,通过流式细胞仪检测细胞凋亡.

## 1.5 Western Blot

细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种在6孔板中,24 h后,分为对照组(0.1% DMSO)、CoCl<sub>2</sub>组(500  $\mu\text{mol/L}$ )、Nar组(50  $\mu\text{mol/L}$ )、Nar + CoCl<sub>2</sub>组和3-MA + Nar + CoCl<sub>2</sub>组(5 mmol/L 3MA 预处理3 h,随后同Nar + CoCl<sub>2</sub>组).在冰上以RIPA裂解缓冲液裂解细胞,提取总蛋白.用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度.SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白.电泳完成后,以湿转的方式将蛋白转移到PVDF膜上.室温下以5%脱脂奶粉封闭2 h,再一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜.根据抗体说明进行稀释.用到的一抗有:Caspase-3、 $\beta$ -actin、Bax、Bcl-2、LC3B、Beclin-1和P62.TBST洗3次(室温,摇床上缓慢晃动),每次10 min.二抗室温孵育2 h, TBST洗3遍(同上).用Bio-Rad分光成像系统曝光.

## 1.6 氧化应激相关指标检测

细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种在6孔板中,24 h后,细胞分组同“1.5”.利用分光光度计测细胞上清液中MDA浓度及SOD、CK和LDH活性.

## 1.7 统计学分析

每个实验组至少进行3个独立实验.数据采用

Spss19.0统计软件进行分析,所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差的形式呈现.采用 $t$ 检验对2组间进行比较,多组间的比较采用单因素方差分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 Nar对CoCl<sub>2</sub>诱导的H9C2细胞损伤的影响

不同浓度的CoCl<sub>2</sub>作用H9C2细胞24 h后(图1A),细胞活力以剂量依赖方式显著降低,500  $\mu\text{mol/L}$ 的CoCl<sub>2</sub>可抑制约50% H9C2细胞生长,故选此浓度造H9C2低氧模型.不同浓度的Nar预作用H9C2细胞24 h,再以500  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub>孵育24 h.结果显示:与CoCl<sub>2</sub>组比,50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  Nar预作用均可提高细胞活力,而50  $\mu\text{mol/L}$  Nar作用最显著( $P < 0.01$ )(图1B),因此后续实验以50  $\mu\text{mol/L}$  Nar进行分析.同时,与对照组(细胞不做任何处理组)相比,CoCl<sub>2</sub>(500  $\mu\text{mol/L}$ )可显著减少细胞数.而50  $\mu\text{mol/L}$  Nar预干预24 h,可明显减轻CoCl<sub>2</sub>造成的细胞生长抑制现象(图1C).

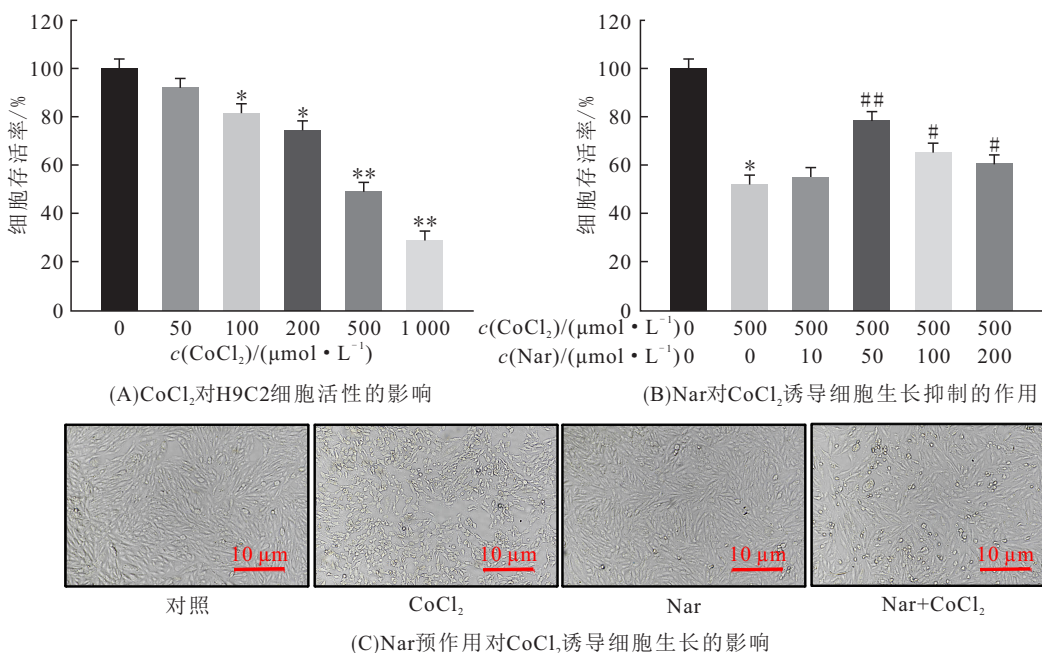


图1 Nar对CoCl<sub>2</sub>诱导H9C2细胞损伤的影响

Figure 1 The effect of Nar on CoCl<sub>2</sub>-induced cell injury in H9C2 cells

注:与0  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub>组比较,\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ ;与500  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub>组比较,#表示 $P < 0.05$ ,##表示 $P < 0.01$ .

### 2.2 Nar对CoCl<sub>2</sub>诱导H9C2细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡发现:CoCl<sub>2</sub>可引起

H9C2细胞凋亡,而Nar明显减轻CoCl<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡(图2A、B).与对照组比较,CoCl<sub>2</sub>组Caspase-3

蛋白表达升高, Bcl-2/Bax 相对比率降低. 而 Nar 预作用后, 与 CoCl<sub>2</sub>组相比, Caspase-3 蛋白表达降低,

Bcl-2/Bax 相对比率升高 ( $P < 0.01$ ) (图 2C~E). 表明 Nar 对 CoCl<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡有抑制作用.

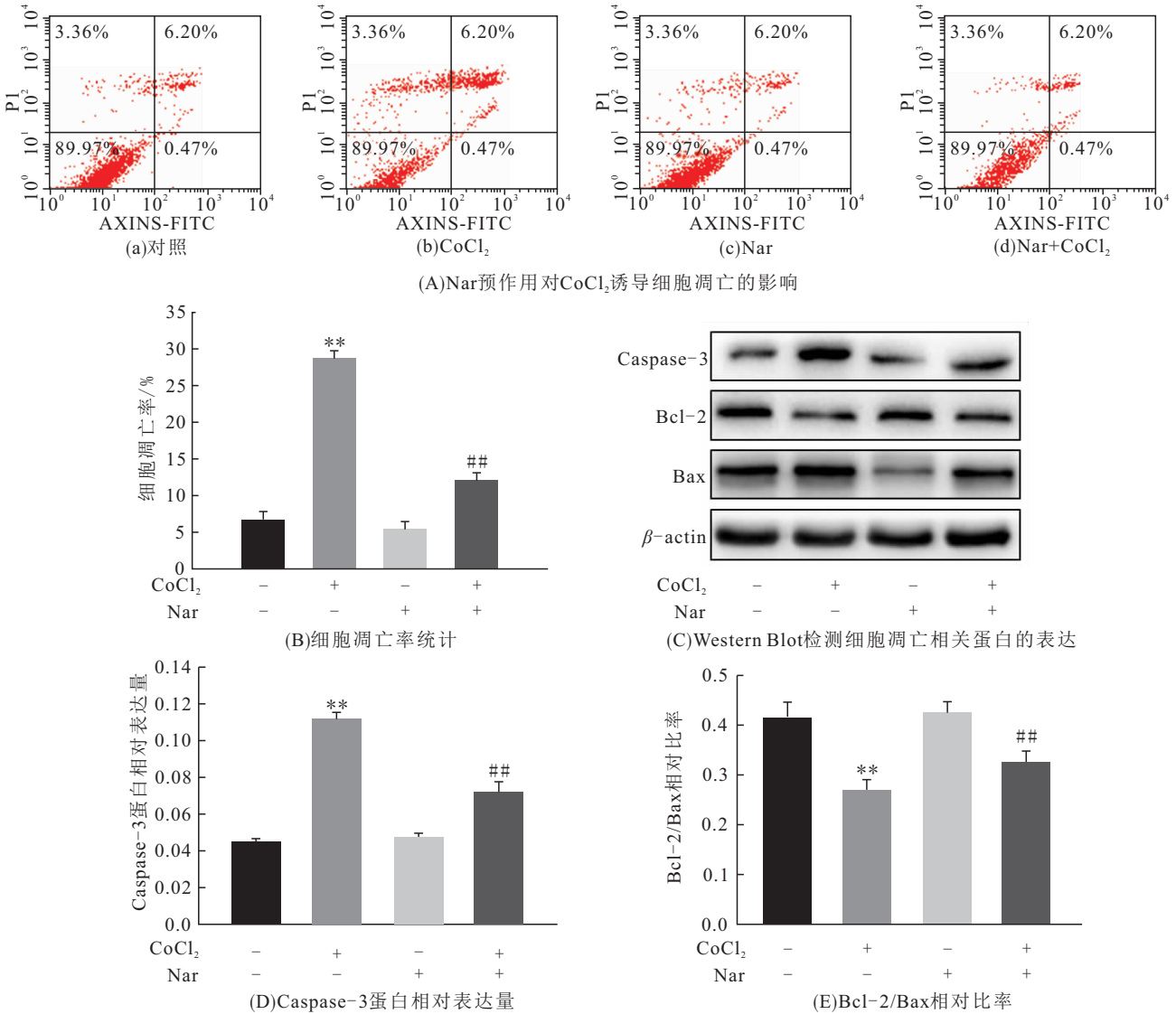


图 2 Nar 对 CoCl<sub>2</sub> 诱导细胞凋亡的影响

Figure 2 The effect of Nar on CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis

注: 与对照组比较, \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ ; 与 CoCl<sub>2</sub> 组比较, # 表示  $P < 0.05$ , ## 表示  $P < 0.01$ .

### 2.3 Nar 对 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9C2 细胞损伤与自噬的关系

为了确定自噬是否介导了 Nar 对 H9C2 细胞低氧损伤的保护过程, Western Blot 检测自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3II/LC3I 和 P62 的表达. 与对照组相比 (图 3A), CoCl<sub>2</sub> 组 LC3II/LC3I、P62 和 Beclin-1 蛋白表达均增加, 这与先前研究结果一致<sup>[10]</sup>. 而 Nar 组 LC3II/LC3I 和 Beclin-1 蛋白表达显著升高, P62 下降. 与 CoCl<sub>2</sub> 组相比, Nar+CoCl<sub>2</sub> 组的 LC3II/LC3I、Beclin-1 和 P62 表达均降低. 而 3-MA 预处理可逆转

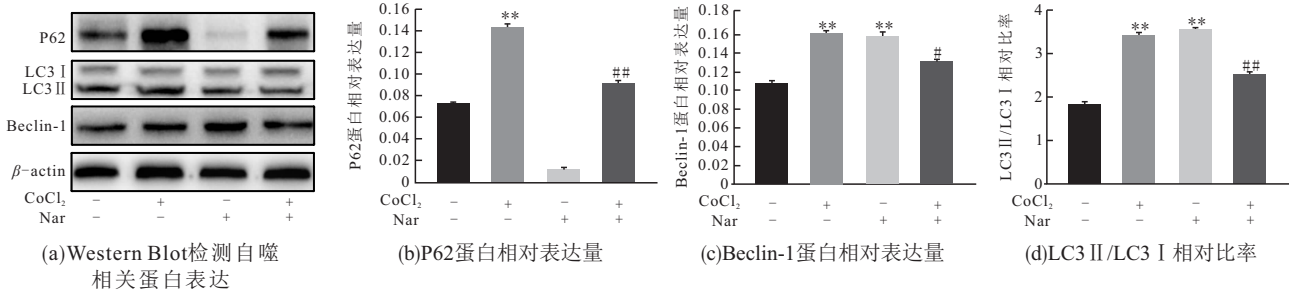
Nar 诱导的 LC3II/LC3I 和 Beclin-1 蛋白表达增加及 P62 蛋白表达降低 (图 3B). 这些结果表明: Nar 通过激活自噬减轻了 CoCl<sub>2</sub> 诱导的细胞损伤. CoCl<sub>2</sub> 也激活了自噬, 但其对 H9C2 细胞的作用与 Nar 明显不同, 具体机制有待进一步研究.

### 2.4 Nar 抑制 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9C2 细胞凋亡与自噬的关系

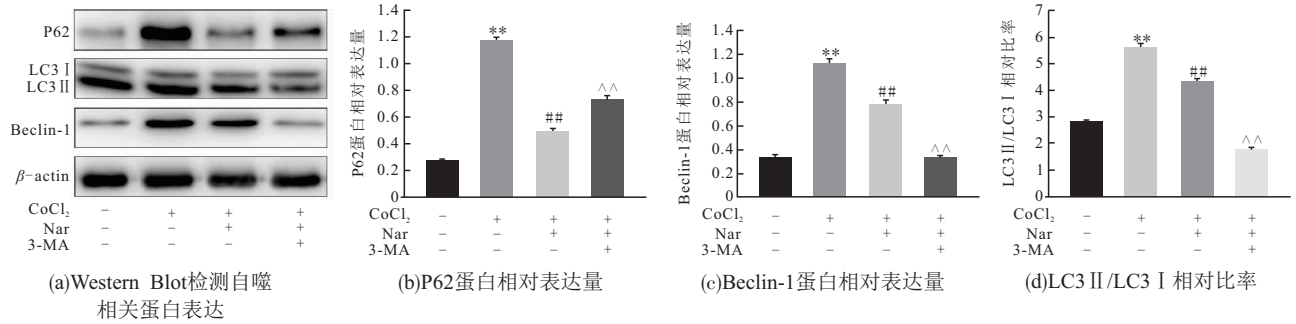
为进一步探讨 Nar 激活自噬与 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9C2 细胞凋亡的关系, 以 3-MA 预作用 3 h, Western Blot 检测凋亡相关蛋白表达. 结果表明: 3-MA 预作用组

与 Nar+CoCl<sub>2</sub> 组相比, Caspase-3 蛋白表达升高而 Bcl-2/Bax 降低, 表明 3-MA 逆转了 Nar 的抗凋亡

作用(图 4A~C). 说明 Nar 以激活自噬方式对抗 CoCl<sub>2</sub> 诱导的凋亡.



(A) Nar 对 CoCl<sub>2</sub> 诱导自噬相关蛋白表达的影响



(B) 自噬抑制剂预作用后, Nar 对 CoCl<sub>2</sub> 诱导的自噬相关蛋白的影响

图 3 Nar 对 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9C2 细胞损伤与自噬的关系

Figure 3 The function of Nar in CoCl<sub>2</sub> inducing H9C2 cell injury and its relationship with autophagy

注:与对照组比较,\*表示 P<0.05,\*\*表示 P<0.01;与 CoCl<sub>2</sub> 组比较,#表示 P<0.05,##表示 P<0.01;与 Nar+CoCl<sub>2</sub> 组比较,^^表示 P<0.01.

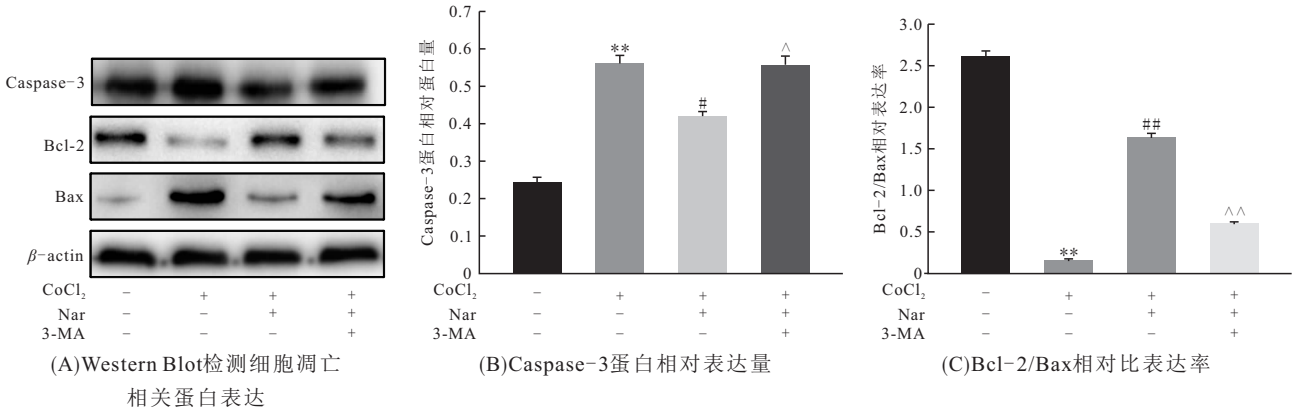


图 4 Nar 抑制 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9C2 细胞凋亡与自噬的关系

Figure 4 The relationship between Nar inhibiting CoCl<sub>2</sub>-induced H9C2 cell apoptosis and autophagy

注:与对照组比较,\*表示 P<0.05,\*\*表示 P<0.01;与 CoCl<sub>2</sub> 组比较,#表示 P<0.05,##表示 P<0.01;与 Nar+CoCl<sub>2</sub> 组比较,^^表示 P<0.05,^^表示 P<0.01. 图 5 同.

### 2.5 Nar 减轻 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9C2 细胞凋亡与氧化应激的关系

氧自由基的升高是低氧诱发心肌损伤的重要原因之一. 过量的氧自由基会攻击生物膜诱发脂质过氧化,致使心肌中 MDA 含量增加,影响脂质的生物学功能. 同时心肌损伤后会引引起细胞膜结合酶的泄露,如血清中 CK 和 LDH 水平的升高,最终引起细胞凋亡.

与 CoCl<sub>2</sub> 组相比(图 5A~D), Nar 预处理显著提高 H9C2 细胞 SOD 水平,降低 CK、MDA 和 LDH 水平. 而 3-MA 预作用降低 SOD 水平,提高 CK、MDA 和 LDH 水平,从而逆转了 Nar 对 CoCl<sub>2</sub> 诱导细胞损伤的抗氧化作用. 结果表明: Nar 激活自噬减轻了 CoCl<sub>2</sub> 对 H9C2 细胞的氧化损伤.

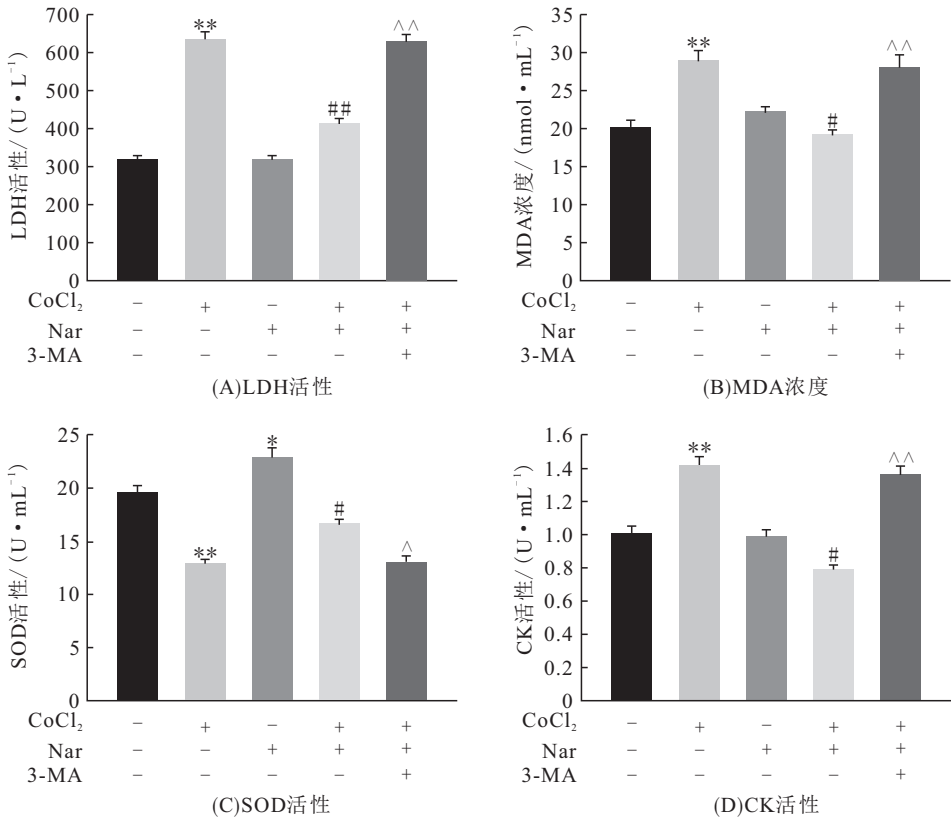


图 5 Nar 减轻  $\text{CoCl}_2$  诱导 H9C2 细胞凋亡与氧化应激的关系

Figure 5 The relationship between Nar alleviating  $\text{CoCl}_2$ -induced H9C2 cell apoptosis and oxidative stress

### 3 讨论

$\text{CoCl}_2$  因其二价钴离子可以取代脯氨酰羟化酶辅因子(二价铁离子), 已广泛用于包括 H9C2 细胞在内的各种细胞系模拟低氧条件. 本研究中  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 H9C2 细胞生长有明显抑制作用, 而 Nar (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预作用可减轻  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{mol/L}$ ) 引起的细胞生长抑制现象. LI 等<sup>[8]</sup> 也报道 Nar (50 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 能保护因低氧和缺糖引起的神经元损伤, 并提高细胞活力. LI 等<sup>[11]</sup> 发现 Nar 有促神经干细胞增殖、增加细胞迁移和分化的作用. 这些结果提示: Nar 可促进 H9C2 细胞低氧损伤条件下的生长.

Bcl-2 家族是凋亡过程的主要调节因子, 包括促凋亡蛋白如 Bax 和抗凋亡蛋白如 Bcl-2<sup>[12-13]</sup>. Bcl-2/Bax 决定了细胞是增殖还是凋亡<sup>[14]</sup>. 此外, Caspase-3 是凋亡过程的关键执行者<sup>[15]</sup>. 本研究发现, Nar 可降低  $\text{CoCl}_2$  诱导的 H9C2 细胞凋亡, 并减少 Caspase-3 蛋白表达, 使 Bcl/Bax 比降升高, 表明 Nar

通过抑制细胞凋亡减轻了  $\text{CoCl}_2$  诱导的 H9C2 细胞损伤.

心肌细胞在缺血状态下因缺乏足够的葡萄糖、氨基酸和能量等而导致自噬被激活<sup>[16]</sup>. 正常生理活动中, 自噬通过调节细胞代谢以适应营养供应和清除受损细胞器, 从而起到维持细胞内稳态的作用<sup>[17]</sup>. 但在极端条件下, 如慢性或极度低氧, 激活自噬会引发细胞凋亡<sup>[18]</sup>. 在各种自噬相关基因中, Beclin-1 和 LC3B 在协调自噬的细胞保护功能中有着重要作用, 二者同时可对抗凋亡<sup>[19]</sup>. LC3B 由 LC3I 和 LC3II 组成, 自噬激活后 LC3I 转化为 LC3II. 因此 LC3II/LC3I 反应了自噬体的形成程度<sup>[20]</sup>. Beclin-1 表达在自噬体形成的初始阶段<sup>[21]</sup>. P62 有向自噬体传递泛素结合蛋白复合物, 并以自噬体溶酶体融合机制促进降解的作用, 故自噬激活后, 细胞内 P62 水平降低<sup>[17]</sup>. 本研究 Western Blot 结果显示: Nar 和  $\text{CoCl}_2$  均可激活自噬, 但作用机制不同.  $\text{CoCl}_2$  诱导细胞凋亡可能增加了自噬体形成通量, 而不是降低清除率. Nar 激活自噬可能增加了损伤细胞器的清除, 从而对  $\text{CoCl}_2$  诱导的 H9C2 细胞低氧损伤起保护作用. 另有研究发现, 缺血预处理以激活自噬的形式

对心脏起保护作用<sup>[22-23]</sup>,且缺血预处理后,LC3II/LC3I和Beclin-1表达增加<sup>[24]</sup>,与本研究Nar作用一致.因此,Nar可能具有保护H9C2细胞免受CoCl<sub>2</sub>诱导凋亡的低氧预处理作用,具体机制需要进一步验证.另外,3-MA预作用明显增加了Nar+CoCl<sub>2</sub>组细胞凋亡的发生,表明Nar诱导的自噬对CoCl<sub>2</sub>造成的低氧损伤有抗凋亡作用.

SOD是细胞内抗氧化剂,有清除自由基的作用<sup>[25]</sup>.MDA是脂质过氧化的一个关键指标,可间接反应细胞的损伤程度<sup>[26-27]</sup>.另外,CK和LDH是心肌损伤的标志物.通常细胞上清中LDH活性增加与细胞死亡的程度相关<sup>[28]</sup>,而CK可直接反应心肌受损程度<sup>[29-31]</sup>.本研究中,CoCl<sub>2</sub>作用后引起的SOD下调,MDA、LDH和CK的上调被Nar预作用所逆转,表明Nar能改善CoCl<sub>2</sub>诱导的H9C2细胞氧化损伤,但当3-MA预作用时,SOD、MDA、LDH和CK水平接近CoCl<sub>2</sub>组水平,表明Nar以激活自噬起到抗氧化损伤的作用.

综上所述,CoCl<sub>2</sub>对H9C2细胞可造成凋亡和氧化损伤,Nar通过激活自噬对CoCl<sub>2</sub>造成的H9C2细胞损伤有促生长、抗凋亡和抗氧化作用.

#### 参考文献:

[1] MOHAMMAD H F, ASHKAN A, LILY T A, et al. GBD risk factors collaborators global regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational and metabolic risks or clusters of risks, 1990 - 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1659-1724.

[2] CATANA C S, ATANASOV A G, BERINDAN-NEAGOE I. Natural products with anti-aging potential: affected targets and molecular mechanisms[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(6): 1649-1656.

[3] DONG Z, CHU G, SIMA Y, et al. Djhs90s are crucial regulators during planarian regeneration and tissue homeostasis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 498(4): 723-728.

[4] ZHANG Q Y, JIN H F, CHEN S, et al. Hydrogen sulfide regulating myocardial structure and function by targeting cardiomyocyte autophagy[J]. *Chinese Medical Journal*, 2018, 131(7): 839-844.

[5] WANG L, LI Y, NING N, et al. Decreased autophagy induced by  $\beta$ 1-adrenoceptor autoantibodies contributes to

cardiomyocyte apoptosis[J]. *Cell Death Discovery*, 2018, 9(3): 1-13.

- [6] LI J, ZHANG D, WIERSMA M, et al. Role of autophagy in proteostasis: friend and foe in cardiac diseases[J]. *Cells*, 2018, 7(12): 1-19.
- [7] LI P, MATSUNAGA K, YAMAKUNI T, et al. Nardosinone, the first enhancer of neurite outgrowth-promoting activity of staurosporine and dibutyryl cyclic AMP in PC12D cells[J]. *Developmental Brain Research*, 2003, 145(2): 177-183.
- [8] 李玮, 石晋丽, 李琴, 等. 甘松新酮对缺糖缺氧损伤原代培养神经元的保护作用[J]. *药学报*, 2013, 48(9): 1422-1429.
- LI W, SHI J L, LI Q, et al. Nardosinone reduces neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation in primary cortical cultures[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(9): 1422-1429.
- [9] KO W, PARK J S, KIM K W, et al. Nardosinone-type sesquiterpenes from the hexane fraction of nardostachys jatamansi attenuate NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells[J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1215-1228.
- [10] 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 Discovery*, 2014, 5(4): 1-12.
- [11] LI Z H, LI W, SHI J L, et al. Nardosinone improves the proliferation, migration and selective differentiation of mouse embryonic neural stem cells[J]. *PloS One*, 2014, 9(3): 1-7.
- [12] CHEN H C, KANAI M, INOUE-YAMAUCHI A, et al. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(10): 1270-1281.
- [13] 朵兴红, 姜萧韩, 周若琦, 等. 靶向多肽功能化阳离子聚合物携带ZNF580质粒对内皮细胞增殖的影响[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 52(3): 62-69.
- DUO X H, JIANG X H, ZHOU R Q, et al. The effect of targeted polypeptide functionalized cationic polymer loaded with ZNF580 plasmid on proliferation of endothelial cells[J]. *Journal of South China Normal University(Natural Science Edition)*, 2020, 52(3): 62-69.
- [14] HE S, LIU P, JIAN Z, et al. miR-138 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis via MLK3/JNK/cjun pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications, 2013, 441(4): 763-769.
- [15] BOLAND K, FLANAGAN L, PREHN J H. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3[J]. Cell Death Disease, 2013, 4(7): 1-6.
- [16] GUSTAFSSON A B, GOTTLIEB R A. Autophagy in ischemic heart disease [J]. Circulation Research, 2009, 104(2): 150-158.
- [17] HU J, CUI W, DING W, et al. Globular adiponectin attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in rat chondrocytes by inducing autophagy through the AMPK/mTOR pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 43(1): 367-382.
- [18] MARIN-GARCIA J, AKHMEDOV A T. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure[J]. Heart Failure Reviews, 2016, 21(2): 123-136.
- [19] KANG R, ZEH H J, LOTZE M T, et al. The beclin-1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. Cell Death and Differentiation, 2011, 18(4): 571-580.
- [20] MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, MATSUI M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker [J]. Molecular Biology of the Cell, 2004, 15(3): 1101-1111.
- [21] LIN H H, CHEN J H, HUANG C C, et al. Apoptotic effect of 3, 4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation [J]. International Journal of Cancer, 2007, 120(11): 2306-2316.
- [22] KANAMORI H, TAKEMURA G, GOTO K, et al. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion [J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011, 300(6): H2261-H2271.
- [23] HUANG C Q, YITZHAKI S, PERRY C N, et al. Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection [J]. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2010, 3(4): 365-373.
- [24] GURUSAMY N, LEKLI I, GORBUNOV N V, et al. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009, 13(2): 373-387.
- [25] LIU J, HOU J, XIA Z Y, et al. Recombinant PTD-Cu/Zn SOD attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes [J]. Free Radical Research, 2013, 47(5): 386-393.
- [26] CAO J, MIAO Q, MIAO S, et al. Tetramethylpyrazine (TMP) exerts antitumor effects by inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma [J]. International Immunopharmacology, 2015, 26(1): 212-220.
- [27] SUN Z W, ZHANG L, ZHU S J, et al. Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage [J]. Neuroscience Bulletin, 2010, 26(1): 8-16.
- [28] WEBER N C, RIEDEMANN I, SMIT K F, et al. Plasma from human volunteers subjected to remote ischemic preconditioning protects human endothelial cells from hypoxia-induced cell damage [J]. Basic Research in Cardiology, 2015, 110(2): 1-17.
- [29] AMANI M, JEDDI S, AHMADIASL N, et al. Effect of HEMADO on level of CK-MB and LDH enzymes after ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart [J]. Bioimpacts, 2013, 3(2): 101-104.
- [30] ZHANG X D, LIANG X M, LIN X, et al. Mechanism of the protective effect of Yulangsang flavonoid on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2014, 34(4): 1050-1062.
- [31] 蔡轶, 魏沁, 蔡跃鹏, 等. 表儿茶素没食子酸酯对人鼻咽癌 C666-1 细胞凋亡的影响 [J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2015, 47(4): 103-107.
- CAI Y, WEI Q, CAI Y P, et al. Effect of epicatechin gallate on the apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma Cell Line C666-1 [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2015, 47(4): 103-107.

【责任编辑:成文 责任校对:成文 英文审校:程杰】