

# 瘦素-p38MAPK 通路介导高糖对 H9c2 心肌细胞的损伤

徐文明<sup>1</sup>, 陈景福<sup>2</sup>, 田丽红<sup>2</sup>, 郭润民<sup>2</sup>, 冯鉴强<sup>3</sup>, 陈培熹<sup>3</sup>, 郭瑞鲜<sup>3</sup>, 吴铿<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第一医院黄埔院区内科, 广东省广州市 510700; 2. 广东医学院附属医院心内科, 广东省湛江市 524001; 3. 中山大学中山医学院生理学教研室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 瘦素; p38 丝裂原激活蛋白激酶; 高糖; 细胞凋亡; 心肌细胞

[摘要] **目的** 探讨瘦素-p38 丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)通路在高糖损伤 H9c2 心肌细胞中的作用。**方法** 应用 35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞以建立高糖损伤细胞模型。应用细胞计数试剂盒检测细胞存活率; 双氯荧光素染色荧光显微镜照相测定胞内活性氧水平; Hoechst 33258 核染色检测凋亡细胞形态与数量的改变; 罗丹明 123 染色荧光显微镜照相测定线粒体膜电位; Western blot 检测瘦素和 p38MAPK 蛋白的表达水平。**结果** 35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞明显促进瘦素的表达。在高糖处理 H9c2 心肌细胞前, 应用 50 μg/L 瘦素拮抗剂预处理 24 h 明显抑制高糖对磷酸化 p38MAPK 表达的上调作用。瘦素拮抗剂预处理 24 h 或 p38MAPK 抑制剂(SB203580)预处理 60 min 均能抑制高糖对 H9c2 心肌细胞的损伤作用, 使细胞存活率升高, 凋亡细胞数量减少, 活性氧生成及线粒体膜电位丢失减小。**结论** 瘦素-p38MAPK 通路参与高糖对心肌细胞的损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Leptin-p38MAPK Pathway Mediates High Glucose-induced Injury in H9c2 Cardiac Cells

XU Wen-Ming<sup>1</sup>, CHEN Jing-Fu<sup>2</sup>, TIAN Li-Hong<sup>2</sup>, GUO Run-Min<sup>2</sup>, FENG Jian-Qiang<sup>3</sup>, CHEN Pei-Xi<sup>3</sup>, GUO Rui-Xian<sup>3</sup>, and WU Keng<sup>2</sup>

(1. Department of Internal Medicine in Huangpu Division, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510700, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China; 3. Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Leptin; p38 Mitogen-activated Protein Kinase; High Glucose; Apoptosis; Cardiomyocyte

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of leptin-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in high glucose (HG)-induced injury in H9c2 cardiac cells. **Methods** H9c2 cardiac cells were treated with HG to establish a model of cellular injury induced by HG. Cell viability was tested by cell counter kit 8 (CCK-8). The intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was measured by dichlorofluorescein staining and photofluorography. The changes in morphology and amount of apoptotic cells were tested by Hoechst 33258 nuclear staining. Mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by rhodamine 123 (Rh123) staining followed by photofluorography. The expression levels of leptin and p38MAPK protein were measured by Western blot assay. **Results** Exposure of H9c2 cardiac cells to 35 mmol/L glucose (HG) markedly enhanced the expression of leptin. Pretreatment of cells with 50 μg/L leptin antagonist (LA) for 24 h before exposure to HG significantly inhibited HG-induced upregulation of phosphorylated p-p38MAPK expression. Pretreatment of H9c2 cardiac cells with either LA for 24 h or SB203580 (an inhibitor of p38MAPK) for 60 min prior to exposure to HG reduced HG-induced injuries, as evidenced by an increase in cell viability, decreases in apoptotic cells, ROS production and dissipation of MMP. **Conclusion** The leptin-p38MAPK pathway is involved in HG-induced cardiomyocyte injury.

[收稿日期] 2013-07-29

[基金项目] 国家自然科学基金(H0208); 广东省科技计划项目(2012B031800358)

[作者简介] 徐文明, 硕士, 主治医师, 研究方向为糖尿病及其并发症的临床与基础, E-mail 为 xwm920018@163.com。陈景福, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病的损伤与保护机制, E-mail 为 chenjf\_gdmc@163.com。通讯作者吴铿, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的损伤与保护机制, E-mail 为 wukeng1245@hotmail.com。

瘦素是一种由脂肪细胞<sup>[1]</sup>和其他组织细胞,如心肌细胞<sup>[2]</sup>和血管平滑肌细胞<sup>[3]</sup>分泌的 16 kDa 多肽。早期,瘦素被认为主要参与调控肥胖或体重。然而,近年的研究证实,瘦素还参与多种病理生理过程,例如,炎症的调节、血压内稳态和心血管疾病等。在心力衰竭患者,血浆瘦素水平明显升高<sup>[4]</sup>。瘦素能减弱大鼠心室肌的收缩力<sup>[5]</sup>,并引起心肌肥厚<sup>[6]</sup>。在多种细胞模型,瘦素可通过激活 p38 丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)而发挥作用<sup>[3]</sup>。p38MAPK 是细胞内 MAPK 家族中的一个重要成员,可被多种物理或化学应激,例如细胞因子、缺血缺氧、氧化应激和紫外线所激活<sup>[7]</sup>。在大鼠血管平滑肌细胞,瘦素可通过激活 p38MAPK 而引起平滑肌肥大<sup>[3]</sup>。最近,我们证实,高糖可激活 p38MAPK 通路而引起心肌细胞凋亡<sup>[8]</sup>。但是,瘦素-p38MAPK 通路是否参与高糖引起的心肌细胞损伤,迄今,国内外未见报道。高血糖是诱发多种糖尿病性心血管疾病并发症的一个危险因素。但是,高血糖引起心肌损伤的机制尚未完全明了。为此,本研究探讨瘦素是否通过调控 p38MAPK 通路介导高糖引起的心肌细胞损伤,为阐明高糖的心肌损伤机制提供新的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

双氯荧光素(2',7'-dichlorfluorescein-diacetate, DCFH-DA)、Hoechst 33258、罗丹明(rhodamine, Rh) 123 购自 Sigma-Aldrich 公司,瘦素拮抗剂(leptin antagonist, LA)购自 ProSpec 公司。细胞计数试剂盒 8 (cell counter kit-8, CCK-8) 购自 Dojindo Lab 公司。DMEM-F12 培养基购于 Hyclone 公司,特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco BRL 公司。抗瘦素抗体、抗 p38MAPK 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。H9c2 心肌细胞由中山大学实验动物中心提供。

### 1.2 细胞培养与处理

H9c2 心肌细胞来源于大鼠胚胎期心脏组织,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基,置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的温箱条件下。实验分为 6 组:①正常对照组;②高糖损伤组:35 mmol/L 葡萄糖作用 H9c2 心肌细胞 24 h;③瘦素拮抗剂预处理+高糖损伤组:50 μg/L LA 作用 H9c2 心肌细胞 24 h,撤去,用 PBS 洗 2 次,接着 35 mmol/L 葡萄糖作用 24 h;④ SB203580(p38MAPK 抑制剂)预处理+高糖损伤

组:3 μmol/L SB203580 作用 H9c2 心肌细胞 60 min,撤去,用 PBS 洗 2 次,接着 35 mmol/L 葡萄糖作用 24 h;⑤瘦素拮抗剂处理组:50 μg/L LA 作用 H9c2 心肌细胞 24 h;⑥SB203580 处理组:3 μmol/L SB203580 作用 H9c2 心肌细胞 60 min。

### 1.3 细胞存活率检测

H9c2 心肌细胞接种于 96 孔培养板中,心肌细胞生长到培养孔面积 80% 时,上述各实验组的不同处理因素完成后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,轻摇,37℃ 孵育 2 h,用酶标仪(λ = 450 nm)记录各孔的吸光度(absorbance, A)。取 4 孔 A 值的平均数,按下列公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = 处理组 A 值/对照组 A 值 × 100%,重复 6 次。

### 1.4 细胞凋亡检测

H9c2 心肌细胞接种于 24 孔培养板中,当细胞生长到培养孔面积约 80% 时,上述各实验组的不同处理因素完成后,弃去培养基,PBS 冲洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗 2 次,加入 5 mg/L Hoechst 33258 试剂,温箱孵育 30 min, PBS 冲洗 2 次。在荧光显微镜(TE-2000, Nikon, Japan)下摄片,染色质均匀分布、核被染成均匀蓝色的细胞被认为是正常细胞,核呈浓缩、碎裂的明亮蓝色细胞认为是凋亡细胞,随机选取视野在荧光显微镜下摄片。

### 1.5 胞内活性氧含量测定

H9c2 心肌细胞接种于 24 孔培养板中,当细胞生长到培养孔面积约 80% 时,上述各实验组的不同处理因素完成后, PBS 冲洗 2 次,用 10 μmol/L DCFH-DA 染液于 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 2 次。在荧光显微镜下随机选取 5 个不重复区摄片,用 ImageJ 1.41 软件分析 5 个视野绿色荧光强度的平均值,再对每组的各样本进行统计分析。

### 1.6 线粒体膜电位测定

H9c2 心肌细胞接种于 24 孔培养板中,当细胞生长到培养孔面积约 80% 时,上述各实验组的不同处理因素完成后, PBS 冲洗 2 次,用含 10 μg/L Rh123 的无血清培养基 37℃ 孵育 45 min, PBS 冲洗 2 次。在荧光显微镜下随机选取 5 个不重复区摄片,细胞核周围绿色的亮点为摄取了 Rh123 的线粒体。用 ImageJ 1.41 软件分析 5 个视野绿色荧光强度的平均值,再对每组的各样本进行统计分析。

### 1.7 Western blot 检测蛋白表达

H9c2 心肌细胞接种于 35 mm 培养皿中,培养至 80% 满时,各实验组给予不同的处理因素,然后用预冷的 PBS 洗 2 次,加入裂解液,4℃ 静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,采用 BCA 法进行

蛋白定量。总蛋白经 SDS-PAGE 分离后,转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 60 min,随后分别加入抗瘦素抗体(1:1 000)、抗 p38MAPK 抗体(1:1 000),4℃ 过夜,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜用发光试剂 ECL 显色,暗室曝光到 X 线片上,凝胶成像系统扫描分析结果。

1.8 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较用 LSD-t 检验,检验水准  $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 高糖上调 H9c2 心肌细胞瘦素的表达

正常 H9c2 心肌细胞能表达一定水平的瘦素。当 35 mmol/L 葡萄糖作用心肌细胞 6 h,瘦素的表达明显增加( $P < 0.05$ )。随着高糖作用时间延长,瘦素表达水平逐渐升高,其中作用 9 h,瘦素表达水平达到高峰,为正常对照组的  $3.30 \pm 0.01$  倍( $P < 0.01$ ;图 1)。

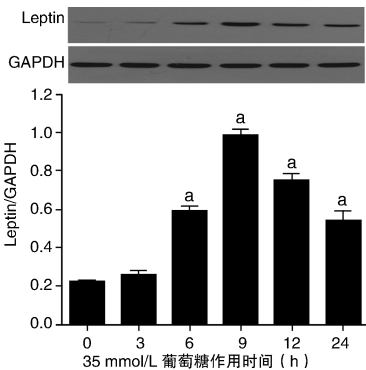


图 1. 高糖促进 H9c2 心肌细胞瘦素的表达 ( $n = 3$ ) a 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组(0 h 组)比较。

Figure 1. High glucose enhances the expression level of leptin in H9c2 cardiac cells ( $n = 3$ )

2.2 瘦素拮抗剂抑制高糖对心肌细胞磷酸化 p38MAPK 表达的上调作用

35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 9 h 可显著增加磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 的表达水平,为正常对照组的  $1.90 \pm 0.27$  倍( $P < 0.01$ )。但是,在高糖作用 H9c2 心肌细胞前,应用 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂预处理 24 h 可明显抑制高糖对 p-p38MAPK 表达的上调作用( $P < 0.01$ )。单独 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂预处理对正常 H9c2 心肌细胞瘦素的表达水平没有明显影响(图 2)。

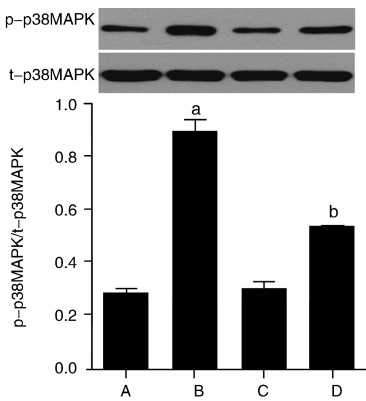


图 2. 瘦素拮抗剂抑制高糖对 H9c2 心肌细胞磷酸化 p38MAPK 表达的上调作用 ( $n = 3$ ) t-p38MAPK 为总 p38MAPK。A 为正常对照组,B 为高糖损伤组,C 为瘦素拮抗剂处理组,D 为瘦素拮抗剂预处理 + 高糖损伤组。a 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与高糖损伤组比较。

Figure 2. Leptin antagonist attenuates the high glucose-induced upregulation of expression of p-p38MAPK in H9c2 cardiac cells ( $n = 3$ )

2.3 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂减轻高糖引起的心肌细胞毒性

35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 24 h 可产生明显的细胞毒性,使细胞存活率降低至  $52.30\% \pm 0.27\%$  ( $P < 0.01$ )。在高糖处理心肌细胞前,分别应用 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂预处理 24 h 或 3  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 预处理 60 min 均可显著抑制高糖引起的心肌毒性,使细胞存活率分别升高  $79.30\% \pm 0.35\%$  和  $82.70\% \pm 0.56\%$  ( $P < 0.01$ )。单独 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂或 3  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 预处理对细胞存活率无明显影响(图 3)。

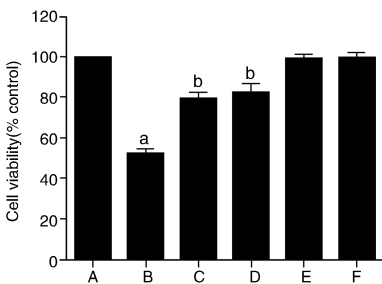


图 3. 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞毒性 ( $n = 6$ ) A 为正常对照组,B 为高糖损伤组,C 为 SB203580 预处理 + 高糖损伤组,D 为瘦素拮抗剂预处理 + 高糖损伤组,E 为 SB203580 处理组,F 为瘦素拮抗剂处理组。a 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与高糖损伤组比较。

Figure 3. Both leptin antagonist and the inhibitor of p38MAPK prevent high glucose-induced cytotoxicity in H9c2 cardiac cells ( $n = 6$ )



2.4 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞凋亡

35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 24 h 可明显增加凋亡细胞数量 ( $P < 0.01$ )。在高糖处理心肌细胞前, 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂预处理 24 h 或 3  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 预处理 60 min 可分别对抗高糖的致细胞凋亡作用, 使凋亡细胞数量明显减小 ( $P < 0.01$ )。单独 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂或 3  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 预处理不引起凋亡细胞数量改变 (图 4)。

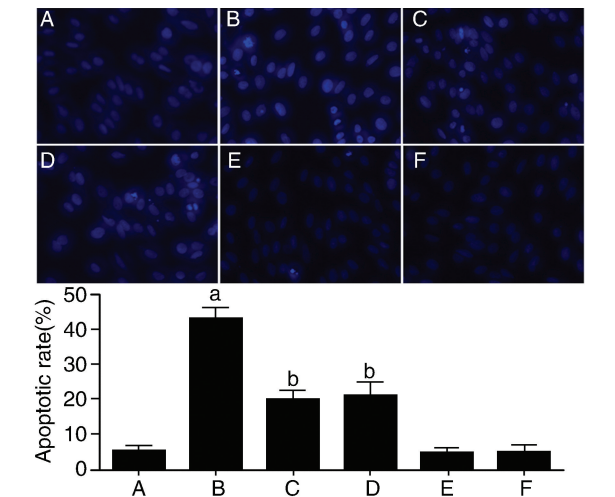


图 4. 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂抑制高糖引起的心肌细胞凋亡 ( $n = 5$ ) A 为正常对照组, B 为高糖损伤组, C 为 SB203580 预处理 + 高糖损伤组, D 为瘦素拮抗剂预处理 + 高糖损伤组, E 为 SB203580 处理组, F 为瘦素拮抗剂处理组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高糖损伤组比较。

Figure 4. Leptin antagonist and the inhibitor of p-p38MAPK depress the high glucose-induced apoptosis in H9c2 cardiac cells ( $n = 5$ )

2.5 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂减轻高糖诱发的心肌细胞氧化应激反应

35 mmol/L 高糖处理 H9c2 心肌细胞 24 h 可明显增加胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成 ( $P < 0.01$ )。在高糖处理心肌细胞前, 应用 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂预处理 24 h 或 3  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 预处理 60 min 均可减少胞内 ROS 生成 ( $P < 0.01$ )。单独瘦素拮抗剂或 SB203580 预处理对心肌细胞内 ROS 生成无明显影响 (图 5)。

2.6 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂阻断高糖引起的心肌细胞线粒体膜电位丢失

35 mmol/L 高糖处理 H9c2 心肌细胞 24 h 可明显损伤线粒体, 使线粒体内 Rh123 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 减弱 ( $P < 0.01$ )。在高糖处理心肌细胞前, 应用 50  $\mu\text{g/L}$  瘦素拮抗剂预处理 24 h 或

3  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 预处理 60 min 均可保护线粒体, 使线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 丢失减小 ( $P < 0.01$ )。单独瘦素拮抗剂或 SB203580 预处理对 MMP 无明显作用 (图 6)。

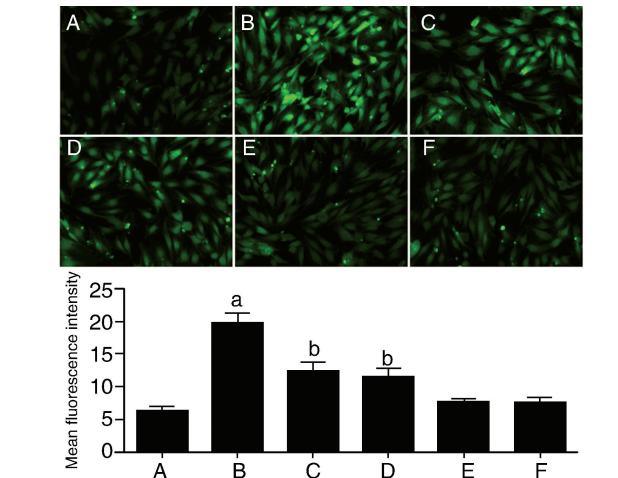


图 5. 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞氧化应激反应 ( $n = 5$ ) A 为正常对照组, B 为高糖损伤组, C 为 SB203580 预处理 + 高糖损伤组, D 为瘦素拮抗剂预处理 + 高糖损伤组, E 为 SB203580 处理组, F 为瘦素拮抗剂处理组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高糖损伤组比较。

Figure 5. Leptin antagonist and the inhibitor of p-p38MAPK ameliorate high glucose-induced oxidative stress in H9c2 cardiac cells ( $n = 5$ )

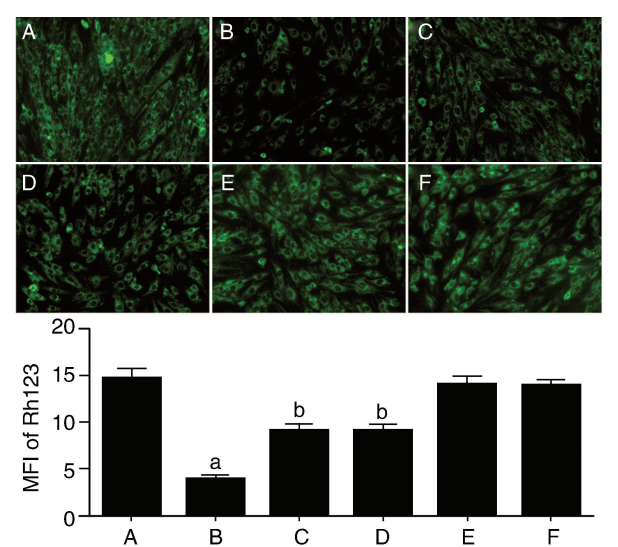


图 6. 瘦素拮抗剂与 p38MAPK 抑制剂减轻高糖引起的心肌细胞线粒体膜电位丢失 ( $n = 5$ ) A 为正常对照组, B 为高糖损伤组, C 为 SB203580 预处理 + 高糖损伤组, D 为瘦素拮抗剂预处理 + 高糖损伤组, E 为 SB203580 处理组, F 为瘦素拮抗剂处理组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高糖损伤组比较。

Figure 6. Leptin antagonist and the inhibitor of p-p38MAPK alleviate the high glucose-induced dissipation of mitochondrial membrane potential in H9c2 cardiac cells ( $n = 5$ )

### 3 讨论

在糖尿病患者,高血糖被认为是引起糖尿病心肌病的一个重要因素。最近,我们证实,高糖可引起 H9c2 心肌细胞凋亡及线粒体功能受损,此作用可能与高糖激活 p38MAPK 通路有关<sup>[8]</sup>。另有报道指出,高血糖可使心肌 ROS 生成增多<sup>[9-11]</sup>。本研究证实,高糖对 H9c2 心肌细胞具有明显损伤作用,表现为细胞存活率降低、凋亡细胞数量增多、ROS 生成增多及 MMP 丢失,与多份报道<sup>[8-11]</sup>相一致。另一方面,本研究也证实,p38MAPK 通路参与高糖对心肌细胞的损伤作用。

本研究发现高糖能促进 H9c2 心肌细胞瘦素的表达,并提示心肌细胞具有合成与表达瘦素的功能。Lin 等<sup>[2]</sup>也发现心肌细胞可能是生成瘦素的另一个细胞来源,支持本研究结果。本研究的一个重要发现是证实瘦素介导高糖引起的心肌细胞损伤。我们观察到,瘦素拮抗剂能对抗高糖对心肌细胞的损伤作用,使细胞存活率升高,凋亡细胞数量、ROS 生成及 MMP 丢失减少,提示上调瘦素表达可能是高糖损伤心肌细胞的一个重要机制。有报道指出,瘦素对心肌具有损伤作用,可引起心肌肥大<sup>[6]</sup>和收缩力减弱<sup>[5]</sup>,与本研究的结果相似。然而,也有学者认为瘦素具有心肌保护作用,能抑制氧化应激引起的心肌细胞凋亡<sup>[12]</sup>。导致瘦素对心肌细胞具有不同作用(即损伤作用或保护作用)的原因是复杂的,可能与实验模型不同或损伤因素不同等因素有关。另一方面,临床研究证实,心力衰竭患者的血浆瘦素水平明显升高<sup>[4]</sup>,这值得重视。

由于有研究指出,瘦素位于 p38MAPK 的上游,可通过激活 p38MAPK 通路诱发血管平滑肌细胞肥大<sup>[3]</sup>。因此,本研究观察了瘦素拮抗剂对高糖上调 H9c2 心肌细胞 p-p38MAPK 表达的影响。研究结果表明,瘦素拮抗剂明显抑制高糖对 p-p38MAPK 表达的上调,提示瘦素参与高糖对 p38MAPK 通路的激活。本研究证实,瘦素-p38MAPK 通路介导高糖引起的心肌细胞损伤,包括降低细胞存活率和 MMP,增加凋亡细胞数量和 ROS 生成。

综上所述,本研究为阐明瘦素-p38MAPK 通路在高糖损伤心肌细胞中的作用提供了新颖的实验资料。

### [参考文献]

- [1] Scherer T, Buettner C. Yin and Yang of hypothalamic insulin and leptin signaling in regulating white adipose tissue metabolism[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011, 12(3): 235-243.
- [2] Lin J, Barb CR, Matteri RL, et al. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2000, 19(1): 53-61.
- [3] Shin HJ, Oh J, Kang SM, et al. Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(1):18-24.
- [4] Schulze PC, Kratzsch J, Linke A, et al. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure [J]. *Eur J Heart Fail*, 2003, 5(1): 33-40.
- [5] Nickola MW, Wold LE, Colligan PB, et al. Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes: Role of NO[J]. *Hypertension*, 2000, 36(4): 501-505.
- [6] Pladevall M, Williams K, Guyer H, et al. The association between leptin and left ventricular hypertrophy: a population-based cross-sectional study [J]. *J Hypertens*, 2003, 21(8): 1 467-473.
- [7] Correia ML, Haynes WG. Leptin, obesity and cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004, 13(2): 215-223.
- [8] Huang H, Wu K, You Q, et al. Naringin inhibits high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction and modulating the activation of the p38 signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(3): 396-402.
- [9] Peake BF, Nicholson CK, Lambert JP, et al. Hydrogen sulfide preconditions the db/db diabetic mouse heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2 signaling in an Erk-dependent manner[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(9): H1 215-224.
- [10] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd, et al. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003, 17(1): 24-38.
- [11] 程飞, 陈景福, 郭润民, 等. 活性氧与丝裂原激活蛋白激酶通路的相互作用介导高糖引起的心肌细胞损伤 [J]. *解剖学研究*, 2013, 35(3): 210-215.
- [12] Eguchi M, Liu Y, Shin EJ, et al. Leptin protects H9c2 rat cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis [J]. *FEBS J*, 2008, 275(12): 3 136-144.

(此文编辑 曾学清)