

沉默信息调节因子 1 参与依达拉奉对抗 异丙肾上腺素致心肌细胞损伤

黄涌¹, 董小变^{2,3}, 庄晓东^{2,3}, 龙明², 胡洵², 廖新学^{2,3}

(中山大学附属第一医院 1. 东山区区内科, 2. 心血管内科, 3. 高血压血管病科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 沉默信息调节因子 1; 依达拉奉; β 1-肾上腺素能受体; 心肌保护

[摘要] **目的** 探讨沉默信息调节因子 1(Sirt1)在依达拉奉(EDA)保护心肌细胞对抗异丙肾上腺素(ISO)诱导的损伤中的作用。**方法** 用 ISO 处理培养的大鼠 H9c2 心肌细胞,建立 β 1-肾上腺素能受体(ADRB1)持续兴奋诱导心肌损伤的体外模型。在 ISO 处理前给予 EDA 预处理以观察 EDA 的心肌细胞保护作用。为了明确 Sirt1 的作用,在 ISO 或 EDA 处理前给予其选择性抑制剂 Sirtinol 预处理。检测细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)的释放、胞内脂质过氧化物丙二醛(MDA)的含量以及 Sirt1 和内质网应激蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)的表达。**结果** ISO 处理可降低细胞存活率,诱导细胞损伤使 LDH 释放增加,并抑制 Sirt1 的表达。20 μ mol/L Sirtinol 预处理 30 min 可加重 80 μ mol/L ISO 处理 48 h 诱导的细胞损伤($P < 0.01$)。在 ISO 处理前给予 40 μ mol/L EDA 预处理 1 h,可部分抑制 ISO 诱导的 Sirt1 表达下调($P < 0.01$)。EDA 预处理具有明显的细胞保护作用,提高细胞存活率($P < 0.01$),减少细胞释放 LDH($P < 0.01$),抑制 MDA 的产生($P < 0.01$)以及下调 GRP78 的表达($P < 0.01$)。EDA 的这些保护效应可被 Sirtinol 预处理所削弱。**结论** Sirt1 参与了 EDA 的抗 ISO 心肌损伤作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Silent Information Regulator 1 Was Involved in Edaravone-induced Myocardial Protection Against Isoprenaline-induced Injury in H9c2 Cardiomyocytes

HUANG Yong¹, DONG Xiao-Bian^{2,3}, ZHUANG Xiao-Dong^{2,3}, LONG Ming², HU Xun², and LIAO Xin-Xue^{2,3}

(1. Department of Internal Medicine in Dongshan Division, 2. Department of Cardiology, 3. Department of Hypertension and Vascular Disease, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Silent Information Regulator 1; Edaravone; Beta-1 Adrenergic Receptor; Myocardial Protection

[ABSTRACT] **Aim** To explore the roles of silent information regulator 1 (Sirt1) in edaravone (EDA)-induced myocardial protection in isoprenaline (ISO)-damaged H9c2 cardiomyocytes. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were treated with ISO to establish an in vitro model of myocardial injury induced by persistent beta-1 adrenergic receptor excitement.

Prior to the treatment with ISO, EDA was administered to test its protection. To clarify the roles of Sirt1, a selective inhibitor Sirtinol was used before ISO or EDA. Cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) release, intracellular malondialdehyde (MDA) content, Sirt1 protein and glucose-regulated protein (GRP78) (an endoplasmic reticulum stress protein) expressions were measured. **Results** Treatment with ISO reduced viability and Sirt1 expression, raised LDH release from H9c2 cardiomyocytes. Preconditioning with 20 μ mol/L Sirtinol for 30 min significantly attenuated the cell injury induced by treatment with 80 μ mol/L ISO for 48 h ($P < 0.01$). Preconditioning with 40 μ mol/L EDA partially decreased ISO-induced downregulation of Sirt1 ($P < 0.01$). In addition, pretreatment with EDA exhibited obvious cardiac protection, evidenced by increased viability ($P < 0.01$), suppressed LDH release ($P < 0.01$), MDA generation ($P < 0.01$) and GRP78 expression ($P < 0.01$). These protective effects were markedly impeded by pretreatment with 20 μ mol/L Sirtinol for 30 min. **Conclusion** Sirt1 participates in EDA-induced myocardial protection against ISO-caused injury in H9c2 cardiomyocytes.

[收稿日期] 2013-11-20

[基金项目] 广东省科技计划项目(2011B080701051)

[作者简介] 黄涌, 硕士, 副主任医师, 研究方向为心血管病的防治, E-mail 为 huangyong1971@yeah.net。通讯作者廖新学, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的临床与基础, E-mail 为 liaoxinx@mail.sysu.edu.cn。

β 1-肾上腺素能受体(beta-1 adrenergic receptor, ADRB1)在正常情况下调节着心脏的自律性、传导性和收缩性,起着正性变时、变力和变传导的作用。然而,在心肌肥大和心力衰竭等病理状态下,ADRB1存在持续的异常兴奋并对心肌细胞造成损伤。深入研究ADRB1持续兴奋诱导心肌损伤的分子机制对于心肌肥大和心力衰竭等疾病的治疗具有重要的现实意义和临床价值。已有研究显示^[1,2],氧化应激和内质网应激是ADRB1持续兴奋诱导心肌损伤的重要分子机制。沉默信息调节因子1(silent information regulator1, Sirt1)是Sirtuins家族的重要成员,通过使蛋白去乙酰化调节细胞的存活、氧化应激、内质网应激及心肌肥大和心力衰竭^[3,4]。白藜芦醇和姜黄素可通过上调Sirt1的表达而对缺血再灌注引起的心肌损伤^[5,6]。本课题组的近期研究发现,依达拉奉(edaravone, EDA)可保护心肌细胞对抗ADRB1激动剂异丙肾肾上腺素(isoprenaline, ISO)诱导的损伤作用^[7]。然而,在EDA诱导的心肌保护中Sirt1起着何种作用,至今尚未见报道。为此,本研究拟采用ISO处理H9c2心肌细胞,探讨Sirt1在EDA心肌保护中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

ISO由禾丰制药有限公司提供(中国,上海),EDA由先声东元制药有限公司提供(中国,南京),Sirt1和葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)兔抗大鼠多克隆抗体购自Bioworld生物技术公司(Louis Park, US),Sirt1抑制剂Sirtinol购自Sigma-Aldrich公司,细胞计数试剂盒8(cell counting kit 8, CCK-8)购自东仁化学科技有限公司(中国,上海),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所(中国,海门),DMEM高糖培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibico公司(Ground Island, NY, USA)。

1.2 细胞培养及处理

H9c2心肌细胞株由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(中国,上海)提供。该心肌细胞株来源于大鼠胚胎期心脏组织,在37℃、5% CO₂的条件下培养于含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,每隔2~3天传代一次。ISO处理:处理前先将H9c2心肌细胞培养于含低浓度血清(1% FBS)的培养基中72 h,然后给予ISO处理,以建立ADRB1

持续兴奋诱导心肌损伤的体外模型;EDA预处理:在ISO处理前给予EDA预处理1 h,以明确EDA是否具有减轻ISO致心肌细胞损伤的作用;Sirtinol预处理:为明确Sirt1的作用,在ISO或EDA处理前给予Sirt1选择性抑制剂Sirtinol预处理30 min,观察其对ISO的心肌细胞损伤作用以及EDA的心肌保护效应是否有影响。

1.3 细胞存活率和乳酸脱氢酶释放的检测

将H9c2心肌细胞接种于96孔培养板中,当细胞生长至培养孔底部约70%面积时,进行低血清处理72 h,然后给予不同条件培养基处理48 h。处理结束后,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,轻摇,放入培养箱继续孵育2 h。用酶标仪(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)记录450 nm波长处的吸光度,每组4个复孔,取其平均值,按如下公式计算细胞存活率,细胞存活率(%) = (OD_{处理组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组}) × 100%,重复4次;细胞受损时还表现为细胞膜通透性增加,LDH释放增多,因而检测LDH的释放也可反应细胞的受损程度。收集各培养孔内的培养基,并向每孔加入100 μ L的裂解液裂解细胞,按照试剂盒说明书分别检测培养基中和细胞内LDH的含量。LDH的释放率按照如下公式计算,LDH释放率(%) = 培养基中LDH / (培养基中LDH + 细胞内LDH) × 100%,重复4次。

1.4 细胞内丙二醛含量的检测

将H9c2心肌细胞接种于90 mm培养皿内,生长至70%融合时参照1.3进行血清剥夺,而后给予不同的处理因素作用48 h,每组4个培养皿。处理结束后,收集细胞,加入细胞裂解液,用BCA法进行蛋白定量。而后按照试剂盒说明书检测细胞内MDA的含量,根据标准曲线测出MDA的浓度,并用蛋白浓度进行标准化处理。

1.5 免疫印迹技术检测蛋白的表达

将H9c2心肌细胞接种于60 mm培养皿内,待细胞生长至70%融合时进行血清剥夺(1% FBS)72 h,随后给予各条件培养基。待处理因素结束后,用预冷的磷酸盐缓冲溶液洗2次,加入65 μ L细胞裂解液(PMSF临用时加入),4℃静置30 min。12 000 r/min离心10 min,取上清,用BCA法进行蛋白定量。总蛋白经SDS-PAGE电泳分离后,转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉室温封闭2 h。随后加入1:2 000稀释的兔抗大鼠的Sirt1或GRP78抗体,4℃轻摇过夜,用TBST漂洗3次,加入相应的二抗,室温孵育1 h,漂洗3次。ECL显色后,用ImageJ 1.47软件对蛋白条带进行半定量分析。实验重复4次。

1.6 统计学方法

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-t 检验进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sirt1 表达下调介导了 ISO 损伤 H9c2 心肌细胞

H9c2 心肌细胞经不同浓度的 ISO 处理 48 h 后, CCK-8 法检测细胞存活率显示, 对照组、40 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理组、80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理组细胞存活率分别为 100%、80.1% \pm 8.4%、50.3% \pm 5.6%, 与对照组比较, ISO 处理组细胞存活率显著下降 (P 均 < 0.01)。在相同的处理条件下, H9c2 心肌细胞内 Sirt1 蛋白表达的检测显示, 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理组较对照组细胞内 Sirt1 蛋白表达水平明显降低 (图 1)。为进一步查明, Sirt1 在 ISO 致心肌细胞损伤中的作用, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理前, 用 20 $\mu\text{mol/L}$ Sirtinol (Sirt1 抑制剂) 预处理 30 min, 细胞存活率从 50.3% \pm 5.6% 被降至 30.1% \pm 3.5%, 与单独 ISO 处理组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。这些结果提示, Sirt1 表达不足介导了 ISO 诱导的心肌细胞损伤。

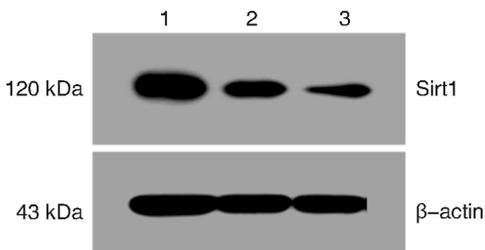


图 1. 不同浓度的 ISO 对 H9c2 心肌细胞内 Sirt1 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 40 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 48 h, 3 为 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 48 h。

Figure 1. Effects of different concentrations of isoprenaline on the expression of silent information regulator 1 in H9c2 cardiomyocytes

2.2 EDA 拮抗 ISO 诱导的 H9c2 心肌细胞内 Sirt1 表达下调

在用 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 H9c2 心肌细胞前, 用 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 预处理 1 h, 结果显示, EDA 预处理本身不改变胞内 Sirt1 蛋白的表达, 但可明显逆转 ISO 处理诱导的 Sirt1 表达下调 (图 2 和表 1)。

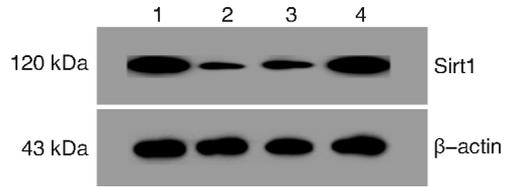


图 2. EDA 预处理对 ISO 下调 H9c2 心肌细胞内 Sirt1 表达的影响 1 为对照组, 2 为 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 48 h, 3 为在 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 48 h 前用 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 预处理 1 h, 4 为单纯 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 处理 1 h 后继续培养 48 h。

Figure 2. Effects of pretreatment with edaravone on ISO-induced downregulation of Sirt1 in H9c2 cardiomyocytes

表 1. EDA 预处理对 ISO 下调 H9c2 心肌细胞内 Sirt1 表达的影响

Table 1. Effect of pretreatment with edaravone on ISO-induced downregulation of Sirt1 in H9c2 cardiomyocytes

分 组	Sirt1/ β -actin
对照组	1.021 \pm 0.173
ISO 处理组	0.325 \pm 0.091 ^a
EDA + ISO 组	0.582 \pm 0.116 ^b
EDA 组	1.083 \pm 0.192

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 ISO 处理组比较。

2.3 抑制 Sirt1 减弱 EDA 诱导的心肌保护作用

在 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 H9c2 心肌细胞 48 h 前, 用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的选择性 Sirt1 抑制剂 Sirtinol 预处理 30 min, 而后再用 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 处理 1 h, 结果发现, Sirtinol 预处理可明显减弱 EDA 对细胞存活率的改善作用 ($P < 0.01$), Sirtinol 本身对细胞的存活率无明显影响 ($P > 0.05$)。另外, 检测 LDH 的释放率也显示, ISO 处理可明显提高 H9c2 心肌细胞释放 LDH, 给予 EDA 预处理可抑制 ISO 诱导的 LDH 释放, 而 EDA 的抑制效应被 Sirtinol 处理削弱 (P 均 < 0.01 ; 表 2)。

2.4 Sirt1 抑制剂削弱 EDA 的抗氧化作用

80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 H9c2 心肌细胞 48 h 可使胞内 MDA 的含量增加, 与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在 ISO 处理前给予 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 处理 1 h 可以明显减弱 ISO 诱导的 MDA 含量增加 ($P < 0.01$), 而 EDA 的这种效应可被 20 $\mu\text{mol/L}$ Sirtinol 预处理 30 min 所抑制 ($P < 0.01$; 表 2)。

2.5 抑制 Sirt1 拮抗 EDA 的内质网保护作用

在 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 处理细胞前给予 20 $\mu\text{mol/L}$ Sirtinol 预处理 30 min, 再用 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 H9c2 心肌细胞 48 h, 结果显示, EDA 抑制内质网应激蛋白 GRP78 上调的作用被明显削弱 ($P < 0.01$)。

此结果提示 Sirt1 可能部分介导了 EDA 的内质网保护作用(图 3 和表 2)。

表 2. 不同处理因素对 H9c2 心肌细胞存活率、胞内 MDA 含量和 GRP78 表达的影响

Table 2. Effects of indicated treatments on viability, intracellular malondialdehyde content and glucose-regulated protein 78 expression in H9c2 cardiomyocytes

分 组	细胞存活率	LDH 释放	MDA 含量 ($\mu\text{mol/g}$)	GRP78/ β -actin
对照组	100%	5.6% \pm 1.4%	1.032 \pm 0.203	0.628 \pm 0.106
ISO 处理组	50.3% \pm 5.6% ^a	19.3% \pm 5.8% ^a	2.143 \pm 0.190 ^a	1.098 \pm 0.125 ^a
EDA + ISO 组	74.1% \pm 9.2% ^b	11.4% \pm 4.6% ^b	1.460 \pm 0.152 ^b	0.449 \pm 0.102 ^b
Sirtinol + EDA + ISO 组	57.3% \pm 6.9% ^c	18.2% \pm 3.7% ^c	2.017 \pm 0.161 ^c	0.738 \pm 0.091 ^c
EDA 组	104.2% \pm 10.5%	5.4% \pm 2.6%	0.987 \pm 0.186	0.632 \pm 0.117
Sirtinol 组	101.3% \pm 7.7%	5.7% \pm 1.9%	1.125 \pm 0.197	0.729 \pm 0.138

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ISO 处理组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 EDA + ISO 组比较。

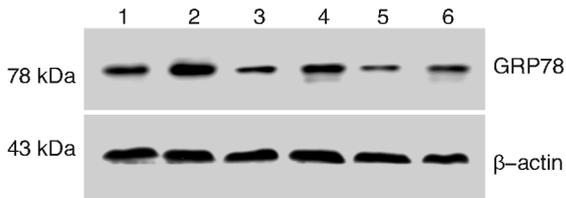


图 3. 不同处理对 H9c2 心肌细胞内葡萄糖调节蛋白 78 表达的影响

1 为对照组, 2 为 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 48 h, 3 为在 80 $\mu\text{mol/L}$ ISO 处理 48 h 前用 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 预处理 1 h, 4 为在 EDA 和 ISO 处理前给予 20 $\mu\text{mol/L}$ Sirtinol 预处理 30 min, 5 为 40 $\mu\text{mol/L}$ EDA 预处理 1 h 继续培养 48 h, 6 为 20 $\mu\text{mol/L}$ Sirtinol 预处理 30 min 继续培养 48 h。

Figure 3. Effects of indicated treatments on the expression of glucose-regulated protein 78 in H9c2 cardiomyocytes

3 讨 论

本文在前期研究工作^[7]的基础上, 观察了去乙酰化酶 Sirt1 在临床常用药 EDA 对抗 ADRB1 过度兴奋诱导心肌细胞毒性中的作用及机制。研究发现, 在 ISO 诱导 H9c2 心肌细胞损伤的过程中 Sirt1 的表达明显降低, EDA 预处理可以部分逆转 ISO 诱导的 Sirt1 表达下调。Sirt1 的抑制剂 Sirtinol 显著减弱 EDA 诱导的心肌细胞保护、抗氧化效应以及内质网改善作用。

Sirtuins 是一种从细菌到人类广泛存在并且高度保守的去乙酰化酶, Sirt1 是 Sirtuins 家族中被广泛研究的重要成员^[6]。有报道显示, Sirt1 可以调节细胞的存活、氧化应激、内质网应激、心肌肥大和心力衰竭等^[8]。本研究首先用 ISO 处理 H9c2 心肌细胞并检测胞内 Sirt1 蛋白的表达, 结果显示, ISO 的处理可明显下调 H9c2 心肌细胞内 Sirt1 的表达, 此发现与 Zhou 等^[9]在乳鼠原代心肌细胞的报道类似。

本文接着探讨了 Sirt1 在 ISO 损伤心肌细胞中的作用, 研究发现, 选择性 Sirt1 抑制剂 Sirtinol 可明显加重 ISO 诱导的心肌存活率下降, 提示 Sirt1 的表达下调可能是 ISO 损伤心肌细胞的重要机制。

由于本课题组前期工作主要是观察临床常用药物 EDA 的心肌保护, 因而, 本研究继续探讨在 EDA 保护心肌细胞对抗 ISO 诱导的损伤过程中 Sirt1 水平的变化。研究发现, EDA 预处理可以明显恢复 ISO 诱导的 Sirt1 的表达下调, 这与另一临床常用抗氧化剂水飞蓟素 (Silibinin, 又名益肝灵) 的作用类似^[9]。最近, Suo 等^[10]也报道, 内源性气体分子硫化氢可以通过上调 Sirt1 而对抗氧化应激诱导的人脐静脉内皮细胞损伤。本文的研究和上述报道均支持, 抗氧化剂在生物体内的作用可能并不是单纯通过清除自由基或上调内源性抗氧化系统而实现, 其中还可能涉及到很多复杂的信号通路。

氧化应激是 ISO 损伤心肌细胞的重要机制。在体内 ADRB1 的持续兴奋常导致心肌的耗氧量增加, 因相对缺氧而使氧化-磷酸化失衡, 造成氧自由基的大量产生, 损伤脂质、核酸和蛋白质等生物大分子^[11]。前文的研究已显示, EDA 预处理可以减轻 ISO 诱导的氧化应激损伤^[7], 本研究从脂质过氧化方面进一步评价了 EDA 的抗氧化效果, 发现 EDA 预处理可以改善 ISO 诱导的脂质过氧化损伤, 表现为 MDA 水平降低。更重要的是, 在 EDA 处理前给予 Sirt1 的选择性抑制剂, EDA 的抗氧化效果被明显削弱, 提示上调 Sirt1 的表达和/或活性可以发挥重要的抗氧化功能^[12]。另外, 硫化氢和白藜芦醇也可通过上调 Sirt1 而保护细胞^[5, 10]。氧化应激损伤与内质网功能障碍有着密切的关系。有证据显示^[13], 在内质网蛋白质错误折叠的过程中可以产生大量

的氧自由基并诱导细胞死亡,抑制 ADRB1 可以改善内质网应激,延缓心肌肥大和心力衰竭的发展^[2]。为此,本研究最后观察了 Sirt1 在 EDA 诱导的内质网保护中的作用。GRP78 是内质网应激的标志蛋白之一,EDA 可通过抑制 GRP78 的表达而拮抗 ISO 诱导的内质网应激损伤^[7]。本研究发现,在 EDA 处理细胞前,给予 Sirt1 的抑制剂可以部分取消 EDA 对 GRP78 的下调作用,提示 EDA 的内质网保护功能可能部分与 Sirt1 有关。

总之,本研究证实 Sirt1 在 EDA 保护心肌细胞对抗 ISO 诱导的损伤中起着重要的作用。此研究结果扩展了 EDA 的细胞保护机制,为 EDA 在心血管疾病中的应用提供了基础资料。

[参考文献]

[1] Neri M, Cerretani D, Fiaschi AI, et al. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11 (1): 156-170.

[2] Ni L, Zhou C, Duan Q, et al. Beta-AR blockers suppress ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *PLoS One*, 2011, 6 (11): e27294.

[3] Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 2010, 122 (21): 2 170-182.

[4] 林琴琴, 林蓉, 张继业, 等. 非诺贝特通过 Sirt1-NF- κ B 途径调控肿瘤坏死因子 α 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞炎症反应[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (3): 238.

[5] Chen CJ, Yu W, Fu YC, et al. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the

SIRT1-FoxO1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378 (3): 389-393.

- [6] Yang Y, Duan W, Lin Y, et al. SIRT1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65C: 667-679.
- [7] 黄涌, 阮经文, 杨春涛, 等. 依达拉奉保护 H9c2 心肌细胞对抗异丙肾上腺素诱导的氧化应激及内质网应激反应[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27 (3): 410-415.
- [8] Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase [J]. *Science*, 2004, 305 (5682): 390-392.
- [9] Zhou B, Wu LJ, Li LH, et al. Silibinin protects against isoproterenol-induced rat cardiac myocyte injury through mitochondrial pathway after up-regulation of SIRT1 [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 102 (4): 387-395.
- [10] Suo R, Zhao ZZ, Tang ZH, et al. Hydrogen sulfide prevents H₂O₂-induced senescence in human umbilical vein endothelial cells through SIRT1 activation[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7 (6): 1 865-870.
- [11] Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65 (1): 230-238.
- [12] Alcendor RR, Gao S, Zhai P, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart [J]. *Circ Res*, 2007, 100 (10): 1 512-521.
- [13] Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death[J]. *Mol Cell*, 2004, 15 (5): 767-776.

(此文编辑 许雪梅)