

[文章编号] 1007-3949(2021)29-05-0395-05

· 实验研究 ·

## 胰高血糖素样肽 1 对 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用及机制研究

张由建<sup>1</sup>, 范卫东<sup>1</sup>, 吴玉国<sup>2</sup>

(1. 河南省胸科医院心内科一病区, 河南省郑州市 450000; 2. 北京怀柔医院心血管内科, 北京市 100000)

[关键词] 胰高血糖素样肽 1; H9c2 心肌细胞; 缺氧复氧损伤; 氧化应激; Nrf2/HO-1 通路

[摘要] 目的 研究胰高血糖素样肽 1(GLP-1)对 H9c2 心肌细胞缺氧复氧(H/R)损伤的保护作用及机制。方法 培养 H9c2 心肌细胞, 随机分为常规处理的对照组、H/R 组及 1、5、10 μmol/L GLP-1 组以验证 GLP-1 的保护作用, 随机分为 si-NC 组、si-NC+H/R 组、si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组、si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1 组以验证核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)在 GLP-1 减轻细胞损伤中的作用。处理 24 h 后检测乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)、丙二醛(MDA)、总抗氧化力(T-AOC)含量及 Nrf2、血红素加氧酶 1(HO-1)表达水平。结果 H/R 组 LDH、CK-MB、MDA 的含量高于对照组, T-AOC 的含量及 Nrf2、HO-1 的表达水平低于对照组; 不同剂量 GLP-1 组 LDH、CK-MB、MDA 的含量低于 H/R 组, T-AOC 的含量及 Nrf2、HO-1 的表达水平高于 H/R 组; 敲低 Nrf2 表达后, si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1 组 LDH、CK-MB、MDA 的含量高于 si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组, T-AOC 的含量及 Nrf2、HO-1 的表达水平低于 si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组。结论 GLP-1 对 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤具有保护作用, 激活 Nrf2/HO-1 通路是可能的分子机制。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

### Protective effect and mechanism of glucagon like peptide-1 on hypoxia/reoxygenation injury of H9c2 cardiomyocytes

ZHANG Youjian<sup>1</sup>, FAN Weidong<sup>1</sup>, WU Yuguo<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Henan Chest Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China; 2. Department of Cardiology, Beijing Huairou Hospital, Beijing 100000, China)

[KEY WORDS] glucagon like peptide-1; H9c2 cardiomyocyte; hypoxia/reoxygenation injury; oxidative stress; Nrf2/HO-1 pathway

[ABSTRACT] Aim To study the protective effect and mechanism of glucagon like peptide-1 (GLP-1) on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury of H9c2 cardiomyocytes. Methods H9c2 cardiomyocytes were cultured and randomly divided into the control group, H/R group, and 1, 5, 10 μmol/L GLP-1 group to verify the protective effect of GLP-1. Also, H9c2 cardiomyocytes were randomly divided into si-NC group, si-NC+H/R group, si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 group, and si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1 group to verify the role of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in GLP-1 alleviating cell injury. The contents of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase-MB (CK-MB), malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (T-AOC) and the expression levels of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) were detected after 24 hours treatment. Results The contents of LDH, CK-MB and MDA in H/R group were higher than those in control group, and the contents of T-AOC and the expression levels of Nrf2 and HO-1 were lower than those in control group. The contents of LDH, CK-MB and MDA in different doses of GLP-1 groups were lower than those in H/R group, the contents of T-AOC and the expression levels of Nrf2 and HO-1 were higher than those in H/R group. After knocking down Nrf2 expression, the contents of LDH, CK-MB and MDA in si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1 group were higher than those in si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 group, the content of T-AOC and the expression levels of Nrf2 and HO-1 were lower than those in si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 group. Conclusion GLP-1 can protect H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury, and activation of Nrf2/HO-1 pathway is a possible molecular mechanism.

[收稿日期] 2020-05-12

[修回日期] 2020-06-11

[作者简介] 张由建,硕士,副主任医师,研究方向为心血管内科、冠心病,E-mail 为 zhuxuzhen05003@163.com。

心肌缺血再灌注损伤是临幊上常见的心肌损伤类型,主要发生于急性心肌梗死的再灌注治疗,可进一步引起恶性心律失常、心源性休克等严重并发症并危及患者生命,因此需要积极防治<sup>[1-2]</sup>。胰高血糖素样肽1(glucagon like peptide-1, GLP-1)是由小肠上皮L细胞分泌的一类小分子多肽,除了具有促进胰岛素分泌、降低血糖的作用外,新近的多项研究还证实GLP-1能够在多种组织的缺血再灌注过程中发挥保护作用<sup>[3-5]</sup>,但GLP-1减轻心肌缺血再灌注损伤的作用及机制仍有待证实。

核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)通路是体内重要的抗氧化信号通路,多项研究证实,缺血再灌注的心肌中Nrf2、HO-1的表达均减少<sup>[6-7]</sup>;国内王东娟的研究证实,GLP-1能够激活Nrf2通路并减轻糖尿病大鼠心肌微血管损伤<sup>[8]</sup>,提示激活Nrf2/HO-1通路是GLP-1发挥保护作用的可能分子机制。为了阐明GLP-1在心肌缺血再灌注过程中的保护作用及机制,本实验以H9c2心肌细胞为对象,分析了GLP-1激活Nrf2/HO-1通路减轻细胞缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤的作用及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

(1) 细胞:H9c2心肌细胞购自上海继和生物科技公司。(2) 试剂:GLP-1购自美国Sigma公司,Nrf2 siRNA及阴性对照(negative control, NC) siRNA购自南京金斯瑞生物科技公司,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、磷酸肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)的检测试剂盒购自合肥莱尔生物科技公司,RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购自上海生工公司,Nrf2、HO-1一抗及二抗购自GeneTex公司。(3) 仪器:细胞培养箱购自杭州赫贝科技公司,蛋白电泳仪购自北京六一生物科技有限公司,凝胶成像仪购自上海金鹏分析仪器公司。

### 1.2 细胞培养

H9c2心肌细胞复苏后在含有10%胎牛血清的完全培养基中贴壁培养,每2天更换1次完全培养基并观察细胞生长情况,待细胞铺满培养瓶底面80%~90%后用0.25%胰蛋白酶进行消化,按照1:3的比例继续传代培养。传代后的细胞接种在

培养板内,待细胞密度达到60%~70%后进行分组干预。

### 1.3 实验分组

为验证GLP-1的心肌保护效应,传代后的H9c2心肌细胞分为对照组、H/R组及1、5、10 μmol/L GLP-1组。对照组在常氧培养箱(5% CO<sub>2</sub>、95%空气)内培养24 h;H/R组在缺氧培养箱(5% CO<sub>2</sub>、95% N<sub>2</sub>)内培养4 h,而后移入常氧培养箱内继续培养16 h;1、5、10 μmol/L GLP-1组在缺氧前在培养基中加入GLP-1使其终浓度分别达到1、5、10 μmol/L,而后参照H/R组的方法进行缺氧复氧操作。

为验证Nrf2在GLP-1心肌保护效应中的作用,传代后的H9c2心肌细胞分为si-NC组、si-NC+H/R组、si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1组、si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1组。si-NC组转染NC siRNA;si-NC+H/R组转染NC siRNA后进行缺氧复氧操作;si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1组转染NC siRNA,加入GLP-1使其终浓度达到10 μmol/L后进行缺氧复氧操作;si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1组转染Nrf2 siRNA,加入GLP-1使其终浓度达到10 μmol/L后进行缺氧复氧操作。

### 1.4 培养基中LDH、CK-MB含量的检测

细胞分组处理24 h后,取培养基并采用试剂盒检测LDH、CK-MB含量;用RIPA裂解液提取细胞中的蛋白并采用BCA试剂盒检测蛋白含量。计算每毫克细胞总蛋白对应的培养基中LDH、CK-MB含量。

### 1.5 细胞中MDA、T-AOC含量的检测

细胞分组处理24 h后,用RIPA裂解液提取细胞中的蛋白并采用BCA试剂盒检测蛋白含量,采用试剂盒检测MDA、T-AOC含量。计算每毫克细胞总蛋白对应的细胞中MDA、T-AOC含量。

### 1.6 细胞中Nrf2、HO-1表达的检测

细胞分组处理24 h后,用RIPA裂解液提取细胞中的蛋白并采用BCA试剂盒检测蛋白含量,取含有30 μg蛋白的样本与上样缓冲液混合,煮沸变性后加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,电泳分离蛋白质后电转至二氟化树脂(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1 h,Nrf2、HO-1、β-actin一抗孵育PVDF膜过夜,而后二抗孵育PVDF膜1 h,最后加入ECL显影液并在凝胶成像仪中曝光得到蛋白条带,计算Nrf2、HO-1与β-actin蛋白条带灰度值的比值作为蛋白表达水平。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件录入数据, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 4 组及 5 组间的比较均采用方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 不同剂量 GLP-1 对 H/R 心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 含量的影响

与对照组比较, H/R 组 H9c2 心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 的含量明显增加 ( $P < 0.05$ ); 与 H/R 组比较, 1、5、10  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组 H9c2 心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 的含量明显降低 ( $P < 0.05$ ), 且 GLP-1 剂量越高, LDH、CK-MB 的含量越低(表 1)。

**表 1. 5 组 H9c2 心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 含量的比较**

**Table 1. Comparison of LDH and CK-MB contents in culture medium of H9c2 cells among 5 groups**

分组	n	LDH/(U/mg)	CK-MB/(U/mg)
对照组	5	18.48 ± 5.82	1.03 ± 0.32
H/R 组	5	56.48 ± 9.39 <sup>a</sup>	6.41 ± 1.03 <sup>b</sup>
1 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	39.47 ± 5.68 <sup>b</sup>	4.24 ± 0.76 <sup>b</sup>
5 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	30.51 ± 4.62 <sup>bc</sup>	3.09 ± 0.63 <sup>bc</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	24.12 ± 3.48 <sup>bed</sup>	1.93 ± 0.32 <sup>bed</sup>

注:a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ , 与 H/R 组比较;c 为  $P < 0.05$ , 与 1  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组比较;d 为  $P < 0.05$ , 与 5  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组比较。

### 2.2 不同剂量 GLP-1 对 H/R 心肌细胞中 MDA、T-AOC 含量的影响

与对照组比较, H/R 组 H9c2 心肌细胞中 MDA 的含量明显增加, T-AOC 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 H/R 组比较, 1、5、10  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组 H9c2 心肌细胞中 MDA 的含量明显降低, T-AOC 含量明显增加 ( $P < 0.05$ ), 且 GLP-1 剂量越高, MDA 的含量越低, T-AOC 的含量越高(表 2)。

### 2.3 不同剂量 GLP-1 对 H/R 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 表达的影响

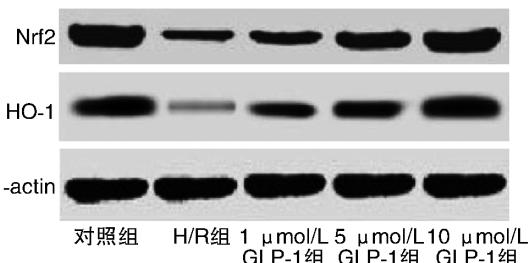
与对照组比较, H/R 组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 H/R 组比较, 1、5、10  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的表达水平明显增高 ( $P < 0.05$ ), 且 GLP-1 剂量越高, Nrf2、HO-1 的表达水平越高(图 1、表 3)。

**表 2. 5 组 H9c2 心肌细胞中 MDA、T-AOC 含量的比较**

**Table 2. Comparison of MDA and T-AOC contents in H9c2 cells among 5 groups**

分组	n	MDA/(mmol/g)	T-AOC/(U/mg)
对照组	5	0.84 ± 0.15	19.39 ± 3.24
H/R 组	5	3.29 ± 0.72 <sup>a</sup>	8.59 ± 1.34 <sup>a</sup>
1 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	2.47 ± 0.52 <sup>b</sup>	12.12 ± 1.42 <sup>b</sup>
5 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	1.84 ± 0.24 <sup>bc</sup>	14.73 ± 1.95 <sup>bc</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	1.31 ± 0.16 <sup>bed</sup>	17.89 ± 2.27 <sup>bed</sup>

注:a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ , 与 H/R 组比较;c 为  $P < 0.05$ , 与 1  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组比较;d 为  $P < 0.05$ , 与 5  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组比较。



**图 1. 5 组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的蛋白条带**

**Figure 1. Protein bands of Nrf2 and HO-1 in H9c2 cells of 5 groups**

**表 3. 5 组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 表达水平的比较**

**Table 3. Comparison of Nrf2 and HO-1 expressions in H9c2 cells among 5 groups**

分组	n	Nrf2	HO-1
对照组	5	0.98 ± 0.15	0.87 ± 0.16
H/R 组	5	0.34 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.07 <sup>a</sup>
1 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	0.51 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.08 <sup>b</sup>
5 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	0.78 ± 0.11 <sup>bc</sup>	0.63 ± 0.10 <sup>bc</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 组	5	0.93 ± 0.12 <sup>bed</sup>	0.83 ± 0.14 <sup>bed</sup>

注:a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ , 与 H/R 组比较;c 为  $P < 0.05$ , 与 1  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组比较;d 为  $P < 0.05$ , 与 5  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组比较。

### 2.4 转染 Nrf2-siRNA 敲低 Nrf2 表达的效果

与 si-NC 组比较, si-NC+H/R 组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 si-NC+H/R 组比较, si-NC+H/R+10  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的表达水平明显增加 ( $P < 0.05$ ); 与 si-NC+H/R+10  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组比较, si-Nrf2+H/R+10  $\mu\text{mol/L}$  GLP-1 组心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的表达水平明显降低 ( $P <$

0.05)(图2、表4)。

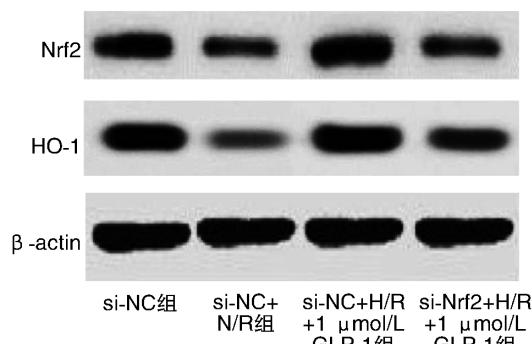


图2. 4组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的蛋白条带

Figure 2. Protein bands of Nrf2 and HO-1 in H9c2 cells of 4 groups

### 2.5 敲低 Nrf2 对 10 μmol/L GLP-1 减轻心肌细胞损伤作用的影响

与 si-NC 组比较, si-NC+H/R 组 H9c2 心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 及细胞中 MDA 的含量均明显增加, 细胞中 T-AOC 的含量明显降低( $P<0.05$ );

与 si-NC+H/R 组比较, si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组 H9c2 心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 及细胞中 MDA 的含量均明显降低, 细胞中 T-AOC 的含量明显增加( $P<0.05$ ); 与 si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组比较, si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1 组心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 及细胞中 MDA 的含量均明显增加, 细胞中 T-AOC 的含量明显降低( $P<0.05$ )(表5)。

表4. 4组 H9c2 心肌细胞中 Nrf2、HO-1 表达水平的比较

Table 4. Comparison of Nrf2 and HO-1 expressions in H9c2 cells among 4 groups

分组	n	Nrf2	HO-1
si-NC 组	5	0.89±0.14	0.86±0.15
si-NC+H/R 组	5	0.34±0.09 <sup>a</sup>	0.29±0.06 <sup>a</sup>
si-NC + H/R + 10 μmol/L GLP-1 组	5	0.94±0.17 <sup>b</sup>	0.93±0.17 <sup>b</sup>
si-Nrf2 + H/R + 10 μmol/L GLP-1 组	5	0.40±0.08 <sup>c</sup>	0.48±0.08 <sup>c</sup>

注:a 为  $P<0.05$ , 与 si-NC 组比较;b 为  $P<0.05$ , 与 si-NC+H/R 组比较;c 为  $P<0.05$ , 与 si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组比较。

表5. 4组 H9c2 心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 含量及细胞中 MDA、T-AOC 含量的比较

Table 5. Comparison of LDH, CK-MB contents in culture medium of H9c2 cells and MDA, T-AOC contents in cells among 4 groups

分组	n	LDH/(U/mg)	CK-MB/(U/mg)	MDA/(mmol/g)	T-AOC/(U/mg)
si-NC 组	5	20.11±5.77	0.97±0.28	0.95±0.14	20.15±3.72
si-NC+H/R 组	5	54.77±8.91 <sup>a</sup>	5.93±0.94 <sup>a</sup>	3.33±0.83 <sup>a</sup>	8.84±1.51 <sup>a</sup>
si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组	5	28.82±6.68 <sup>b</sup>	2.04±0.54 <sup>b</sup>	1.42±0.39 <sup>b</sup>	17.03±4.12 <sup>b</sup>
si-Nrf2+H/R+10 μmol/L GLP-1 组	5	45.51±9.02 <sup>c</sup>	5.14±0.86 <sup>c</sup>	2.87±0.62 <sup>c</sup>	10.32±2.48 <sup>c</sup>

注:a 为  $P<0.05$ , 与 si-NC 组比较;b 为  $P<0.05$ , 与 si-NC+H/R 组比较;c 为  $P<0.05$ , 与 si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组比较。

### 3 讨 论

心肌缺血再灌注损伤的防治是心血管领域的研究热点, 心肌细胞缺氧复氧模型是研究心肌缺血再灌注损伤的常用细胞模型。本实验以离体培养的 H9c2 心肌细胞为对象, 通过缺氧复氧处理模拟心肌缺血再灌注的过程, 缺氧复氧处理后细胞培养基中两种心肌酶 LDH、CK-MB 的含量均明显增加, 表明心肌细胞发生了缺氧复氧损伤, 后续将在心肌细胞缺氧复氧损伤模型中进行心肌缺血再灌注损伤防治的研究。

GLP-1 是近年来新发现的具有组织和脏器保护作用的内分泌激素, 来源于小肠上皮 L 细胞, 对缺血再灌注或缺氧复氧引起的心肌、内皮、脑、肾脏等均具有保护作用<sup>[4-5,9-10]</sup>。本实验在心肌细胞缺氧复

氧的过程中加用不同浓度 GLP-1 干预, 结果发现心肌细胞培养基中 LDH、CK-MB 的含量均明显降低, 且 GLP-1 剂量越高, LDH 及 CK-MB 的降低越明显, 表明 GLP-1 能够以剂量依赖性的方式减轻心肌细胞缺氧复氧损伤, 与既往其他研究发现的 GLP-1 减轻心肌细胞损伤的结果吻合。

缺血再灌注过程中自由基大量生成、激活氧化应激反应是造成组织损伤的重要病理因素, 而 GLP-1 在多种组织中能够介导抗氧化作用<sup>[11-13]</sup>。MDA 是组织发生氧化应激损伤过程中脂质过氧化反应的产物, 在自由基大量生成的过程中 MDA 明显增多<sup>[14-15]</sup>; T-AOC 是各种酶类抗氧化物和非酶类抗氧化物形成的总抗氧化能力, 在自由基大量生成并消耗抗氧化物的过程中, T-AOC 明显减少<sup>[16]</sup>。本实验在缺氧复氧的心肌细胞中发现 MDA 含量增加, T-

AOC 含量减少,表明心肌细胞在缺氧复氧过程中氧化应激反应显著激活;在心肌细胞缺氧复氧的过程中加用不同浓度 GLP-1 干预后,MDA 含量减少,T-AOC 含量增加,表明 GLP-1 能够以剂量依赖性的方式减轻心肌缺氧复氧过程中的氧化应激反应,这也可能是 GLP-1 减轻心肌细胞缺氧复氧损伤的机制。

Nrf2/HO-1 通路是与缺血再灌注及缺氧复氧过程中氧化应激反应激活密切相关的抗氧化信号通路,Nrf2 激活后进入细胞核,与相应的反应元件结合后启动 HO-1 的表达,进而通过 HO-1 的抗氧化作用来减轻氧化应激反应。多项缺血再灌注的研究均证实 Nrf2、HO-1 的表达在缺血再灌注的心肌、脑、肾脏组织中明显降低<sup>[6,17-18]</sup>,Nrf2/HO-1 通路的抗氧化作用减弱,进而造成氧化应激反应的激活。本实验发现缺氧复氧心肌细胞中 Nrf2、HO-1 的表达减少,而在加用 GLP-1 干预后 Nrf2、HO-1 的表达明显增加,表明缺氧复氧能够抑制心肌细胞中的抗氧化通路 Nrf2/HO-1,与既往其他研究的报道一致;GLP-1 能够在心肌缺氧复氧过程中激活 Nrf2/HO-1 通路,这可能是 GLP-1 减轻心肌细胞缺氧复氧损伤、抑制氧化应激反应的分子机制。

为了进一步验证 Nrf2/HO-1 通路在 GLP-1 减轻心肌细胞缺氧复氧损伤、抑制氧化应激反应中的作用,本实验设计了 Nrf2 siRNA,在 GLP-1 处理的同时通过转染 siRNA 的方式敲低 Nrf2 的表达,结果发现:与 si-NC+H/R+10 μmol/L GLP-1 组比较,si-Nrf2 +H/R + 10 μmol/L GLP-1 组 心 肌 细 胞 培 养 基 中 LDH、CK-MB 及细胞中 MDA 的含量均明显增加,T-AOC 的含量明显降低,表明敲低 Nrf2 的表达能够使 GLP-1 减轻心肌缺氧复氧损伤、抑制氧化应激反应的作用发生逆转,进而提示 Nrf2/HO-1 通路在 GLP-1 减轻心肌细胞缺氧复氧损伤、抑制氧化应激反应中起重要作用,激活 Nrf2/HO-1 通路是 GLP-1 在心肌细胞缺氧复氧过程中发挥保护作用的分子机制。

综上所述,GLP-1 对 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤具有保护作用,激活 Nrf2/HO-1 通路、减轻氧化应激反应是 GLP-1 发挥保护作用可能的分子机制,今后 GLP-1 有望成为防治心肌缺血再灌注损伤的药物之一。

#### [参考文献]

- [1] Tibaut M, Mekis D, Petrovic D. Pathophysiology of myocardial infarction and acute management strategies [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2017, 14(3): 150-159.
- [2] Hausenloy DJ, Chilian W, Crea F, et al. The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1143-1155.
- [3] Liu C, Liu Y, He J, et al. Liraglutide increases VEGF expression via CNPY2-PERK pathway induced by hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 24(10): 789.
- [4] Zykova VA, Tuchina TP, Lebedev DA, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 analogs in combination with insulin on myocardial infarct size in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *World J Diabetes*, 2018, 9(9): 149-156.
- [5] Abdel-Latif RG, Heeba GH, Taye A, et al. Lixisenatide, a novel GLP-1 analog, protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic rats [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2018, 391(7): 705-717.
- [6] Shen Y, Liu X, Shi J, et al. Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 496-502.
- [7] Zhou XL, Wu X, Zhu RR, et al. Notch1-Nrf2 signaling crosstalk provides myocardial protection by reducing ROS formation [J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(2): 106-111.
- [8] 王东娟,李恒栋,谢小玲,等.胰高血糖素样肽 1 通过 Keap1-Nrf2 信号通路减轻糖尿病大鼠心肌微血管损伤 [J].中国病理生理杂志,2019,35(12): 2143-2149.
- [9] Moellmann J, Klinkhammer BM, Onstein J, et al. Glucagon-like peptide 1 and its cleavage products are renoprotective in murine diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2018, 67(11): 2410-2419.
- [10] Verouhis D, Saleh N, Settergren M, et al. Remote ischemic conditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury via a glucagon-like peptide-1 receptor-mediated mechanism in humans [J]. *Int J Cardiol*, 2019, 274: 40-44.
- [11] Ren X, Sun L, Wei L, et al. Liraglutide up-regulation thioredoxin attenuated Müller cells apoptosis in high glucose by regulating oxidative stress and endoplasmic reticulum stress [J]. *Curr Eye Res*, 2020, 17: 1-9.
- [12] Siraj MA, Mundil D, Beca S, et al. Cardioprotective GLP-1 metabolite prevents ischemic cardiac injury by inhibiting mitochondrial trifunctional protein-α [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(3): 1392-1404.
- [13] Cui R, Tian L, Lu D, et al. Exendin-4 protects human retinal pigment epithelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage via activation of NRF2 signaling [J]. *Ophthalmic Res*, 2020, 63(4): 404-412.
- [14] Cadena S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89.
- [15] Groehler A, Kren S, Li Q, et al. Oxidative cross-linking of proteins to DNA following ischemia-reperfusion injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 120: 89-101.
- [16] Zhou T, Prather ER, Garrison DE, et al. Interplay between ROS and antioxidants during ischemia-reperfusion injuries in cardiac and skeletal muscle [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): E417.
- [17] Tong F, Zhou X. The Nrf2/HO-1 pathway mediates the antagonist effect of L-arginine on renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2017, 42(3): 519-529.
- [18] Fan J, Lv H, Li J, et al. Roles of Nrf2/HO-1 and HIF-1α/VEGF in lung tissue injury and repair following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 7695-7707.

(此文编辑 曾学清)