

RNA 干扰程序性细胞死亡因子 4 表达对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞凋亡的影响及其机制

邓华 王东梅 何天宇

【摘要】 目的 探讨 RNA 干扰程序性细胞死亡因子 4 (PDCD4) 表达对缺氧/复氧 (H/R) H9C2 心肌细胞凋亡的影响及其机制。方法 将 H9C2 心肌细胞分为对照组、H/R 组、H/R + NC 组和 H/R + siPDCD4 组。采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 分别检测 4 组 H9C2 心肌细胞中 PDCD4 mRNA 和蛋白水平, 流式细胞仪检测其凋亡率, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测其上清液中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, Western blot 检测磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT) 信号通路相关蛋白水平。结果 H/R 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 mRNA 和蛋白、活化的 Caspase-3、Bcl-2 相关 X (Bax) 蛋白、上清液中 LDH、MDA 水平及凋亡率均高于对照组, 而上清液中 SOD 水平、H9C2 心肌细胞 Bcl-2 和 p-AKT 蛋白水平均低于对照组 ($P < 0.05$)。H/R + siPDCD4 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 mRNA 和蛋白、活化的 Caspase-3、Bax 蛋白、上清液中 LDH、MDA 水平及凋亡率均低于 H/R 组, 而上清液中 SOD、H9C2 心肌细胞 Bcl-2 和 p-AKT 蛋白水平均高于 H/R 组 ($P < 0.05$)。结论 RNA 干扰 PDCD4 表达可抑制 H/R 引起的 H9C2 心肌细胞凋亡, 其作用机制可能与激活 PI3K/AKT 信号通路进而降低氧化应激反应有关。

【关键词】 缺氧/复氧; 程序性细胞死亡因子 4; 心肌细胞凋亡; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 氧化应激

Effect of RNA interfering programmed cell death 4 expression on apoptosis of hypoxia/reoxygenation H9C2 cardiomyocytes and its mechanism Deng Hua, Wang Dongmei, He Tianyu. Department of Cardiology, Fulin Hospital in Mianyang of Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of RNA interfering programmed cell death 4 (PDCD4) expression on apoptosis of hypoxia/reoxygenation (H/R) H9C2 cardiomyocytes and its mechanism. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were divided into control group, H/R group, H/R + NC group and H/R + siPDCD4 group. Levels of PDCD4 mRNA and protein of H9C2 cardiomyocytes in 4 groups were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting respectively. Apoptosis rates of them were detected by flow cytometry. Levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH) in supernatant of H9C2 cardiomyocytes were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Levels of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway-related proteins were examined by Western blotting. **Results** Levels of PDCD4 mRNA and protein, activated Caspase-3, Bcl-2 related X (Bax) protein, LDH, MDA and apoptosis rate of H9C2 cardiomyocytes in H/R group were higher than those in control group, while levels of SOD in supernatant and Bcl-2 and p-AKT protein in H9C2 cardiomyocytes were lower than those in control group ($P < 0.05$). Levels of PDCD4 mRNA and protein, activated Caspase-3, Bax protein, LDH, MDA and apoptosis rate of H9C2 cardiomyocytes in H/R + siPDCD4 group were lower than those in H/R group, while levels of SOD in supernatant, Bcl-2 and p-AKT protein in H9C2 cardiomyocytes were higher than those in H/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** RNA interfering PDCD4 expression can inhibit H/R-induced H9C2 cardiomyocyte apoptosis, and its mechanism may be related with the activation of PI3K/AKT signaling pathway to reduce oxidative stress.

【Key words】 Hypoxia reoxygenation; Programmed cell death 4; Cardiomyocyte apoptosis; Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway; Oxidative stress

急性心肌梗死是常见的急危重症,其发病率和死亡率较高。缺血再灌注损伤是导致缺血的心肌在恢复血流时疗效不佳的重要原因。心肌缺血再灌注损伤与能量代谢障碍、氧化应激、炎症反应及细胞凋亡等密切相关^[1-3]。程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)是一种与细胞凋亡密切相关的调控因子,因其具有特殊的 α 螺旋结构,可通过抑制核糖体复合物形成和蛋白质合成等在 DNA 的损伤应答和修复、氧化应激反应、细胞增殖及凋亡等中发挥重要作用^[4]。近年来,有研究显示 PDCD4 与心肌细胞凋亡密切相关^[5]。缺氧/复氧(H/R)心肌细胞模型是模拟体外缺血再灌注损伤的常用研究工具。本研究通过观察 PDCD4 对 H/R H9C2 心肌细胞凋亡的影响,探讨其可能的分子机制,旨在为阐明心肌缺血再灌注损伤的发生机制提供新线索。

材料与方法

1. 材料:大鼠胚胎心肌细胞株 H9C2 购自中国科学院细胞库,胎牛血清、DMEM 培养基、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、PDCD4 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记二抗、Bcl-2 相关 X(Bax)蛋白、Bcl-2、活化的 Caspase-3 单克隆抗体、放射免疫沉淀法(RIPA)细胞裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度检测试剂盒、ECL 化学发光试剂盒、PVDF 膜、胰蛋白酶、Lipofectamine 2000 转染试剂、膜联蛋白 V(Annexin V)-FITC/碘化丙啶(PI)双染色流式细胞凋亡检测试剂盒、mRNA 提取和逆转录试剂盒及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒,乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒。FACS Calibur 流式细胞仪、CFX96 实时荧光定量 PCR 检测仪、湿电转膜仪、MCO-18AIC CO₂培养箱。

2. 方法

(1)细胞培养和 H/R 细胞模型制备:将储存于液氮罐中的 H9C2 心肌细胞于 37 °C 水浴锅中解冻复苏后,以含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮细胞,然后接种至培养瓶内置于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养。H/R 细胞模型的建立:取长势良好且处于对数生长期的 H9C2 心肌细胞培养至细胞密度为 85% 以上时,更换成无血清的 DMEM 培养基,置于缺氧培养箱(含 95% N₂ 和 5% CO₂)中孵育 4 h 后,更换为含血清的 DMEM 培养基,再置于常规培养箱(37 °C 含 5% CO₂)中孵育 6 h。

(2)实验分组:将 H9C2 心肌细胞随机分为 4 组:①对照组:于 37 °C 含 5% CO₂ 的常规培养箱中培养;②H/R 组:缺氧孵育 4 h 后常规培养 6 h;③H/R + NC 组:缺氧处理前 48 h 参照转染试剂说明书步骤将

20 μ mol/L 的 NC-siRNA 序列转染至 H9C2 心肌细胞中,再缺氧孵育 4 h,常规培养 6 h;④H/R + siPDCD4 组:缺氧处理前 48 h 参照转染试剂说明书步骤将 20 μ mol/L 的 PDCD4-siRNA 序列转染至 H9C2 心肌细胞中,再缺氧孵育 4 h,常规培养 6 h。在转染 NC-siRNA 和 PDCD4-siRNA 序列 48 h 后,分别采用 RT-PCR 和蛋白质印迹法(Western blot)检测 H9C2 心肌细胞中 PDCD4 mRNA 和蛋白的表达情况。PDCD4-siRNA 序列(F:5'-GUUGGCAGUAUCCUUAGTT-3',R:5'-CUAAGGAUACUGCCAACACTT-3')和阴性对照 NC-siRNA 序列(F:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',R:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3')均购自上海吉玛生物公司。

(3)RT-PCR 检测:根据 mRNA 提取试剂盒说明书步骤提取 H9C2 心肌细胞的总 RNA。按照 mRNA 逆转录试剂盒说明书将 RNA 合成单链 cDNA。以 cDNA 为模板,再根据 RT-PCR 试剂盒说明书步骤进行检测,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算 H9C2 心肌细胞中 PDCD4 mRNA 的表达水平。上海生工生物工程有限公司合成的 PCR 引物序列如下,PDCD4 引物序列:F:5'-TCCAAGGCTAAGGACACTGC-3',R:5'-TTTGAGCACGGAGATACGAA-3';内参 GAPDH 引物序列:F:5'-ACCA-CAGTCCATGCCATCAC-3',R:5'-TCCACCACCCTGTT-GCTGTA-3'。PCR 反应条件:预变性阶段 95 °C 30 s,1 个循环;循环阶段:变性 95 °C 10 s,退火 58 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,共 40 个循环。实验重复 3 次取平均值。

(4)Western blot 检测:4 组 H9C2 心肌细胞经 H/R 处理结束后,收集各组细胞加入 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白,采用 BCA 法检测其浓度和纯度,与等体积上样缓冲液混匀后,100 °C 下煮沸 5 min,将 50 μ g 变性蛋白点样至 SDS-PAGE 凝胶孔中进行电泳,转 PVDF 膜后,以 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,于 4 °C 下以特异性一抗孵育过夜后,再于 37 °C 下以辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1.5 h,ECL 发光剂显影后,以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件分析目的条带的灰度值。以目的条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。检测指标包括 PDCD4 蛋白和磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路相关蛋白。实验重复 3 次取平均值。

(5)流式细胞仪检测:收集 H/R 处理后的 4 组 H9C2 心肌细胞,制成浓度为 5 \times 10⁵ 个/ml 的细胞悬液。取细胞悬液 1 ml,加入 200 μ l 结合缓冲液悬液细胞后,以 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI 避光条件下染色 15 min。补加结合缓冲液 300 μ l 后,于 1 h 内上流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。实验重复 3 次取平均值。

(6)ELISA 检测 MDA、SOD 和 LDH 水平:经 H/R 处理结束后,收集 4 组 H9C2 心肌细胞的上清液,参照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测 MDA、SOD 及 LDH 水平。实验重复 3 次取平均值。

3. 统计学处理:应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.4 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 mRNA 和蛋白水平比较:H/R 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 mRNA 和蛋白水平均高于对照组 ($P < 0.05$);H/R + siPDCD4 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 mRNA 和蛋白水平均低于 H/R 组 ($P < 0.05$);而 H/R + NC 组和 H/R 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 mRNA 和蛋白水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1 和表 1。



注:1:对照组;2:H/R 组;3:H/R + NC 组;4:H/R + siPDCD4 组
图 1 Western blot 检测 4 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 蛋白的表达

表 1 4 组 H9C2 心肌细胞 PDCD4 mRNA 和蛋白水平比较 ($n = 9, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | PDCD4 mRNA | PDCD4 蛋白 |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 1.00 ± 0.07 | 0.28 ± 0.02 |
| H/R 组 | 2.52 ± 0.16 ^a | 0.42 ± 0.03 ^a |
| H/R + NC 组 | 2.64 ± 0.12 | 0.39 ± 0.03 |
| H/R + siPDCD4 组 | 0.28 ± 0.03 ^b | 0.09 ± 0.01 ^b |
| <i>F</i> 值 | 351.97 | 116.35 |
| <i>P</i> 值 | <0.01 | <0.01 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 H/R 组比较,^b $P < 0.05$

2.4 组 H9C2 心肌细胞凋亡率比较:流式细胞仪检测结果显示,对照组、H/R 组、H/R + NC 组及 H/R + siPDCD4 组 H9C2 心肌细胞的凋亡率分别为 (3.25 ± 0.13)%、(17.42 ± 1.15)%、(16.28 ± 2.06)%、(9.56 ± 0.32)% ,其中 H/R 组 H9C2 心肌细胞的凋亡率高于对照组 ($P < 0.05$);H/R + siPDCD4 组 H9C2 心肌细胞的凋亡率低于 H/R 组 ($P < 0.05$);而 H/R + NC 组和 H/R 组 H9C2 心肌细胞的凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.4 组 H9C2 心肌细胞上清液中 LDH、SOD 及 MDA 水平比较:ELISA 法检测结果显示,H/R 组 H9C2 心肌细胞上清液中 LDH 和 MDA 水平均高于对照组,而 SOD 水平低于对照组 ($P < 0.05$);H/R + siPDCD4

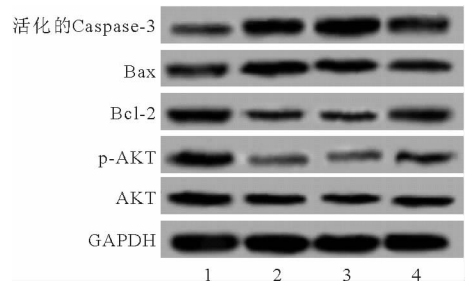
组 H9C2 心肌细胞上清液中 LDH 和 MDA 水平均低于 H/R 组,SOD 水平高于 H/R 组 ($P < 0.05$);而 H/R + NC 组和 H/R 组 H9C2 心肌细胞上清液中 LDH、SOD 及 MDA 水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 4 组 H9C2 心肌细胞上清液中 LDH、SOD 及 MDA 水平比较 ($n = 9, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | LDH (U/L) | SOD (U/ml) | MDA (nmol/L) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 4.23 ± 0.11 | 138.56 ± 3.05 | 5.52 ± 0.28 |
| H/R 组 | 13.12 ± 1.25 ^a | 66.48 ± 2.12 ^a | 11.48 ± 1.03 ^a |
| H/R + NC 组 | 12.86 ± 1.32 | 64.75 ± 2.24 | 11.15 ± 1.12 |
| H/R + siPDCD4 组 | 7.68 ± 0.15 ^b | 82.83 ± 2.45 ^b | 6.82 ± 0.36 ^b |
| <i>F</i> 值 | 66.45 | 578.09 | 43.39 |
| <i>P</i> 值 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 H/R 组比较,^b $P < 0.05$

4.4 组 H9C2 心肌细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白水平比较:Western blot 检测结果显示,H/R 组 H9C2 心肌细胞活化的 Caspase-3 和 Bax 蛋白水平均高于对照组,Bcl-2 和 p-AKT 蛋白水平均低于对照组 ($P < 0.05$);H/R + siPDCD4 组 H9C2 心肌细胞活化的 Caspase-3 和 Bax 蛋白水平均低于 H/R 组,Bcl-2 和 p-AKT 蛋白水平均高于 H/R 组 ($P < 0.05$);而 H/R + NC 组和 H/R 组 H9C2 心肌细胞活化的 Caspase-3、Bax、Bcl-2 及 p-AKT 蛋白水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);4 组 H9C2 心肌细胞 AKT 蛋白水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2 和表 3。



注:1:对照组;2:H/R 组;3:H/R + NC 组;4:H/R + siPDCD4 组
图 2 Western blot 检测 4 组 H9C2 心肌细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达结果

讨 论

既往研究结果显示,PDCD4 具有抑制癌细胞增殖和促凋亡作用,是治疗恶性肿瘤的潜在靶点^[6]。随着研究深入,PDCD4 在心肌组织损伤和心肌细胞凋亡中的作用逐渐引起关注。PDCD4 在大鼠严重烫伤早期心肌组织中的表达水平升高,可被微小 RNA (miR)-21 负向调控,参与烫伤早期心肌损伤^[7]。脂多糖 (LPS) 刺激新生大鼠心肌细胞后,PDCD4 表达水平升高,进一步上调其表达后,可通过 Bcl-2 途径增强 LPS 诱导

表 3 4 组 H9C2 心肌细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白水平比较 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 活化的 Caspase-3 | Bax 蛋白 | Bcl-2 蛋白 | p-AKT 蛋白 | AKT 蛋白 |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| 对照组 | 0.26 ± 0.02 | 0.32 ± 0.03 | 0.53 ± 0.03 | 0.56 ± 0.04 | 0.61 ± 0.05 |
| H/R 组 | 0.75 ± 0.05 ^a | 0.65 ± 0.05 ^a | 0.34 ± 0.02 ^a | 0.28 ± 0.03 ^a | 0.57 ± 0.04 |
| H/R + NC 组 | 0.78 ± 0.06 | 0.61 ± 0.04 | 0.31 ± 0.02 | 0.25 ± 0.02 | 0.56 ± 0.05 |
| H/R + siPDCD4 组 | 0.42 ± 0.03 ^b | 0.49 ± 0.03 ^b | 0.44 ± 0.03 ^b | 0.40 ± 0.03 ^b | 0.58 ± 0.04 |
| F 值 | 104.80 | 44.66 | 46.31 | 62.61 | 0.68 |
| P 值 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 0.59 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 H/R 组比较,^b $P < 0.05$

的心肌细胞凋亡^[8]。PDCD4 是 miR-21 的靶基因,上调 miR-21 表达可抑制心肌细胞在氧化应激损伤下的凋亡^[9]。表明 PDCD4 在心肌细胞损伤中发挥重要作用。

心肌细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤中的重要机制,而细胞凋亡过程又是一个多基因参与的复杂过程。PI3K/AKT 信号通路是参与细胞生命活动的重要信号转导通路之一,AKT 位于该通路的下游,也是该通路的关键调节因子,活化的 AKT 可通过磷酸化作用影响下游凋亡相关蛋白如 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达进而调控细胞凋亡^[10]。Caspase-3 是公认的凋亡执行因子,其活化生成活化的 Caspase-3 标志细胞凋亡进入不可逆阶段;Bcl-2 和 Bax 分别发挥抑制凋亡和促凋亡作用。既往研究结果显示,PDCD4 的 Ser67 和 Ser457 可被 AKT 磷酸化,激活 AKT 可引起 PDCD4 功能降低^[11]。本研究结果显示,H/R 处理后 H9C2 心肌细胞的凋亡率及 PDCD4、活化的 Caspase-3、Bax 蛋白水平均明显升高,而 Bcl-2、p-AKT 蛋白水平均明显降低;在转染 PDCD4-siRNA 成功下调 PDCD4 表达后,H/R 引起的上述变化均明显得到部分逆转,表明 RNA 干扰 PDCD4 表达可通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡,提示 PDCD4 调控的细胞凋亡可能是 H/R 引起心肌细胞凋亡的重要机制。

心肌缺血再灌注损伤不仅与心肌细胞过度凋亡有关,还与氧化应激反应密切相关^[12]。MDA 水平高低间接反映细胞受自由基攻击的严重程度,SOD 是一种重要的氧自由基清除剂,在维持细胞氧化与抗氧化平衡过程中发挥重要作用;LDH 是一种稳定的胞浆酶,其水平高低间接反映细胞膜的损伤程度。本研究中 H/R 处理后的 H9C2 心肌细胞上清液中 LDH 和 MDA 水平明显升高,SOD 水平明显降低,而下调 PDCD4 可明显抑制 H/R 引起的上述变化,提示 RNA 干扰 PDCD4 表达可降低 H9C2 心肌细胞的氧化应激损伤,在 H/R 引起的 H9C2 心肌细胞氧化损伤过程中 PDCD4 发挥重要作用,但该过程并不完全受 PDCD4 基因调控,可能还存在其他基因或信号通路的调控。有研究证实,PI3K/AKT 信号通路的激活可降低氧化应激反应诱导的心肌细胞凋亡^[13],提示下调 PDCD4 表达可能通过

激活 PI3K/AKT 信号通路降低氧化应激诱导的心肌细胞凋亡,进而减轻心肌缺血再灌注损伤。

综上所述,RNA 干扰 PDCD4 表达可抑制 H/R 引起的 H9C2 心肌细胞凋亡,其作用机制可能与激活 PI3K/AKT 信号通路降低氧化应激反应有关。该结果为 PDCD4 有望成为治疗心肌缺血再灌注损伤的新靶点提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Wang L, Ma H, Xue Y, et al. Berberine inhibits the ischemia-reperfusion injury induced inflammatory response and apoptosis of myocardial cells through the phosphoinositide 3-kinase/RAC- α serine/threonine-protein kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2):1225-1232.
- [2] Kong LH, Chen YL, Sun N, et al. Inhibition of CaMK II alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing mitochondrial oxidative stress in isolated perfused rat heart [J]. *J South Med Univ*, 2018, 38(2):181.
- [3] 代冰冰,何学明.急性心肌梗死患者院内死亡危险因素分析[J].*临床内科杂志*,2017,34(4):247-250.
- [4] Ye Y, Yang S, Han Y, et al. Linc00472 suppresses proliferation and promotes apoptosis through elevating PDCD4 expression by sponging miR-196a in colorectal cancer [J]. *Aging*, 2018, 10(6):1523-1533.
- [5] Xiao J, Pan Y, Li XH, et al. Cardiac progenitor cell-derived exosomes prevent cardiomyocytes apoptosis through exosomal miR-21 by targeting PDCD4 [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6):e2277.
- [6] Zhen Y, Li D, Li W, et al. Reduced PDCD4 Expression Promotes Cell Growth Through PI3K/Akt Signaling in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Oncol Res*, 2016, 23(1):61-68.
- [7] 谢琼慧,赵超莉,叶子青,等.微小 RNA-21 在大鼠严重烧伤早期心肌组织中的表达变化及作用机制 [J]. *中华烧伤杂志*, 2014, 30(4):315-319.
- [8] Jia Z, Wang J, Shi Q, et al. SOX6 and PDCD4 enhance cardiomyocyte apoptosis through LPS-induced miR-499 inhibition [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(2):174-183.
- [9] Wei C, Li L, Kim IK, et al. NF- κ B mediated miR-21 regulation in cardiomyocytes apoptosis under oxidative stress [J]. *Free Radic Res*, 2014, 48(3):282-291.
- [10] Liu Y, Geng L, Zhang J, et al. Oligo-Porphyrin Ameliorates Neurobehavioral Deficits in Parkinsonian Mice by Regulating the PI3K/Akt/Bcl-2 Pathway [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(3):82.
- [11] Lankat-Buttgereit B, Müller S, Schmidt H, et al. Knockdown of Pdc4 results in induction of proprotein convertase 1/3 and potent secretion of chromogranin A and secretogranin II in a neuroendocrine cell line [J]. *Biol Cell*, 2008, 100(12):703-715.
- [12] Zhai M, Li B, Duan W, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis [J]. *J Cardiol Res*, 2017, 63(2):e12419.
- [13] Xu F, Yu H, Liu J, et al. α B-crystallin regulates oxidative stress-induced apoptosis in cardiac H9c2 cells via the PI3K/AKT pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(3):2517-2526.

(收稿日期:2018-12-17)

(本文编辑:周三凤)