



黄豆苷元对 H_2O_2 诱导 H9c2 细胞衰老的保护作用

王 萱¹, 刘亚辉², 李 勇³, 金 明¹

(1. 延边大学 医学院, 吉林 延吉 136200; 2. 锦州医科大学 附属第三医院, 辽宁 锦州 121000; 3. 延边大学附属医院, 吉林 延吉 136200)

摘 要:为探究黄豆苷元(Daidzein, DAI)对 H_2O_2 诱导的大鼠心肌细胞衰老的保护作用及其机制, 将 H9c2 细胞随机分成对照组、模型组($400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$)与 DAI 低、中、高剂量组($20, 40, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DAI), 采用 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色法观察 H9c2 细胞衰老程度, 采用比色法检测细胞总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量, 采用 DCFH-DA 荧光染色法检测细胞中活性氧(ROS)水平, 采用 Rh123 荧光染色法检测线粒体膜电位变化, 采用 western blotting 法检测 H9c2 细胞 p53、p21、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap1)、核因子 E2 相关因子(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白表达水平。结果显示:DAI 降低了 H_2O_2 诱导的衰老 H9c2 细胞 SA- β -gal 阳性率以及 p53、p21 蛋白表达水平, 提高了衰老 H9c2 细胞 T-AOC 水平和 SOD 的活性, 降低了细胞中 MDA 的含量及 ROS 的水平, 维持了线粒体膜电位的稳定, 抑制了细胞中 Keap1 蛋白表达并促进了 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达。研究表明 DAI 可延缓细胞衰老, 增强细胞抗氧化能力, 抑制细胞氧化应激, 此作用可能与 DAI 调节 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

关键词:黄豆苷元; 氧化应激; 细胞衰老; 抗氧化; H_2O_2 ; H9c2 细胞

Protective Effect of Daidzein on Senescence of H9c2 Cells Induced by Hydrogen Peroxide

WANG Xuan¹, LIU Ya-hui², LI Yong³, JIN Ming¹

(1. Medical College, Yanbian University, Yanji 136200, China; 2. The Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 3. Yanbian University Hospital, Yanji 136200, China)

Abstract: In order to investigate the protective effect of Daidzein (DAI) on H_2O_2 -induced senescence of rat cardiomyocytes and its mechanism, we randomly divided the H9c2 cells into the control group, model group ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of H_2O_2), and low, medium and high-dose DAI groups ($20, 40$ and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of DAI, respectively). And we observed the cell senescence by senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining. The total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were detected by the colorimetric assay. The ROS level was detected by DCFH-DA fluorescence staining. The mitochondrial membrane potential was detected by the Rh123 fluorescence staining. The expressions of p53, p21, kelch-like epichlorohydrin-associated protein-1 (Keap1), nuclear factor E2-associated factor (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) proteins in H9c2 cells were detected with the western blotting method. The results showed that DAI decreased the positive staining of SA- β -gal, down-regulated the expression of p53 and p21 proteins, increased the T-AOC level and SOD activity, decreased the MDA and ROS levels, and maintained the stability of mitochondrial membrane potential in aging H9c2 cells induced by H_2O_2 . DAI inhibited the expression of Keap1 protein, up-regulated Nrf2 and HO-1 protein expression. It is suggested that DAI could delay cellular senescence, enhance cellular antioxidant capacity and inhibit cellular oxidative stress. The mechanism may be related to regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathways.

Keywords: daidzein; oxidative stress; cell senescence; antioxidant; H_2O_2 ; H9c2 cells

随着社会经济的不断发展,老龄化的趋势愈加明显,患心血管疾病的人数逐年升高,心血管疾病已成为主要的致死疾病之一^[1]。衰老心肌细胞的累积可导致心功能障碍和心脏衰老^[2]。因此,为研发抗衰老药物及防治心血管疾病,了解心肌细胞衰老的机制至关重要。

黄豆苷元(Daidzein, DAI)是大豆异黄酮中的主要成分之一,约占其总量的 30% ~ 35%^[3]。研究发现,DAI 的药理功能较多,包括抗糖尿病、抗癌和抗氧化等,并且在预防骨质疏松症和绝经后综合征中

也发挥重要作用^[3-4]。DAI 的抗氧化作用表现在提高大鼠皮肤的抗氧化防御体系、增加海马神经元细胞的 S 期百分比以及抑制肝细胞氧化应激等方面。研究表明,DAI 还可通过上调更年期大鼠中抗衰老蛋白、增强大鼠老化皮肤中的抗氧化酶等发挥其抗衰老作用^[5-8],但其对衰老心肌细胞的保护作用研究较少。

氧化应激与包括心肌细胞在内的各种细胞衰老及凋亡密切相关。梁璐等^[9]研究表明,甘木通活性化合物可通过改善 H9c2 细胞内氧化应激,激活

收稿日期:2022-02-14

基金项目:国家自然科学基金(82060537)。

第一作者:王萱(1997—),男,硕士研究生,主要从事天然成分的活性研究。E-mail:1148963428@qq.com。

通讯作者:金明(1972—),女,博士,副教授,硕导,主要从事天然成分的活性研究。E-mail:jinning@ybu.edu.cn。

抗氧化酶来提高 H9c2 细胞活性并抑制其凋亡。多种物质可在体外诱导细胞衰老,如 β -半乳糖、阿霉素、LPS、 H_2O_2 等。其中 H_2O_2 可通过持续性刺激引起细胞氧化应激,诱导细胞发生衰老,甚至可导致细胞死亡^[10]。因 H_2O_2 具有易于获得且价格低廉等特点,所以在构建体外衰老模型中有广泛应用^[11]。因此本研究采用 H_2O_2 作为诱导剂,构建衰老 H9c2 细胞模型,探究 DAI 的抗衰老作用并阐述其在 Nrf2/HO-1 信号通路中的作用,探讨 DAI 的抗衰老及防治心血管疾病作用,旨在为临床进一步开发延缓心脏衰老药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠心肌 H9c2 细胞株(博士德生物工程有限公司); β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色试剂盒(杰美基因医药科技有限公司);DAI、 H_2O_2 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司);DMEM 培养液(美国 Gibco 公司);高效 RIPA 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PMSF(北京索莱宝科技有限公司);线粒体膜电位、总抗氧化能力(T-AOC)、SOD、MDA、ROS 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP(纳川科技有限公司); β -actin、p53、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap1)、核因子 E2 相关因子(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)、组蛋白(Histone H3)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);p21(美国 Abcam 公司)。

1.2 主要仪器

荧光倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);低温高速离心机(美国科俊电器公司); CO_2 细胞培养箱(美国 Bio-Tek 公司);UVP 凝胶成像分析仪(美国 UVP 公司);迷你转运电泳仪(北京六一生物科技有限公司);RT-2100 型酶标仪。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂配制 将 DAI 粉末溶于 DMSO 中配置成 DAI 原液,DAI 浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,避免反复冻融。配置含有 1% 双抗及 10% FBS 的 DMEM 培养液(完全培养液),使用 DMSO 进行稀释,DMSO 的终体积分数为 0.1%。

1.3.2 细胞培养 使用 DMEM + 10% FBS 作为大鼠心肌细胞的常规培养液,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱,显微镜观察细胞生长状况,每隔 2~3 d 换液。细胞融合度为 80%~90% 时可进行传代。

1.3.3 H9c2 细胞增殖情况分析 采用 MTT 法检测 DAI 对 H9c2 细胞增殖的影响^[12]。胰酶消化对数生长的 H9c2 细胞,将其随机分为空白组、对照

组、DAI 10 、 20 、 40 、 80 、 $160\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,接种至 96 孔板,每组设 4 个复孔,每孔 5×10^3 个细胞。DAI 分别作用 6、12、24 和 48 h,使用酶标仪检测 492 nm 处 OD 值,计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $\frac{\text{给药组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100$ 。

1.3.4 衰老 H9c2 细胞增殖情况分析 采用 MTT 法检测 DAI 浓度在 $0\sim 160\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内对经 H_2O_2 处理的衰老 H9c2 细胞增殖的影响^[13]。以 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导 H9c2 细胞衰老^[14]。随机取对数生长期 H9c2 细胞,分为空白组、对照组、模型组、DAI 10 、 20 、 40 、 80 、 $160\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。24 h 后将给药组更换为含不同浓度 DAI 的培养液,其余各组更换为含 0.1% DMSO 的完全培养液,培养 24 h 后弃去培养液,将模型组和给药组更换为含 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 的无血清培养液,将对照组与空白组更换为无血清培养液,2 h 后将各组更换为完全培养液继续培养 24 h,检测 H9c2 细胞的存活率并分析最佳 DAI 作用浓度和时间。

1.3.5 H9c2 细胞衰老程度观察 采用 β -半乳糖苷酶 SA- β -gal 染色法观察 H9c2 细胞衰老程度^[15]。将 H9c2 细胞分为 5 组:对照组、模型组、DAI $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、DAI $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 DAI $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,接种于细胞密度为 1×10^5 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$ 的 6 孔板中,培养 24 h,细胞处理同 1.3.4。使用 SA- β -gal 染色试剂盒进行衰老细胞染色,显微镜下蓝染细胞为阳性细胞,重复 3 次,计算阳性率,阳性率(%) = $\frac{\text{蓝染细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100$ 。

1.3.6 衰老 H9c2 细胞生化指标检测 采用比色法检测细胞总抗氧化能力、超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量^[16]。随机取对数生长期 H9c2 细胞,细胞处理同 1.3.4。使用试剂盒检测细胞内 T-AOC、SOD、MDA 水平或含量。

1.3.7 衰老 H9c2 细胞内 ROS 水平及线粒体膜电位变化分析 采用 DCFH-DA 荧光染色法检测细胞中 ROS 水平^[17],采用 Rh123 荧光染色法检测线粒体膜电位变化^[18]。细胞接种及处理同 1.3.4,使用 Rhodamine 123 试剂盒检测 ROS 和线粒体膜电位,荧光显微镜下观察细胞,每组随机选出 3 个视野,拍照记录,重复 3 次。

1.3.8 衰老 H9c2 细胞蛋白表达水平分析 采用 western blotting 法^[19] 检测 H9c2 细胞的 p53、p21、Keap1、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平。同上方法进行细胞接种及处理,加入裂解液(高效 RIPA 组织/细胞裂解液:PMSF = 100:1),冰上裂解 10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 20 min, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心后的上清液即为细胞

全蛋白。使用试剂盒检测蛋白浓度,按每孔 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 后,电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,随后 4 ℃ 孵育一抗过夜,次日于室温孵育二抗 1 h,使用 ECL 显色液显色,使用 UVP 凝胶成像分析仪成像。

1.4 数据分析

试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 8.0 分析软件。组间的差异对比采用单因素方差分析,SNK 方法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 判断差异是否具有统计学意义。使用 Image J 进行图片分析。

2 结果与分析

2.1 DAI 对 H9c2 细胞增殖的影响

如图 1 所示,当 DAI 作用时间为 24 h,浓度为 0 ~ 160 μmol · L⁻¹ 时,对细胞增殖无显著影响,因此后续试验选取 24 h 作为药物处理时间。

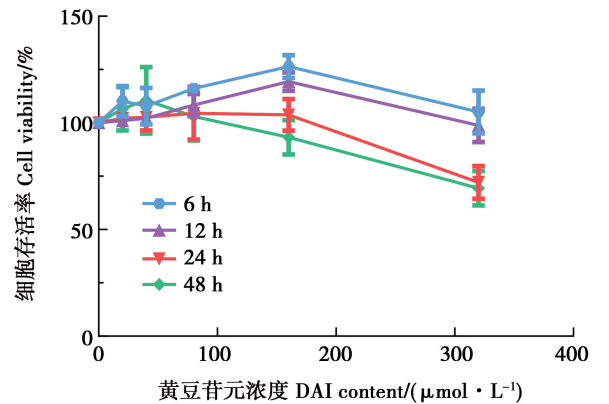
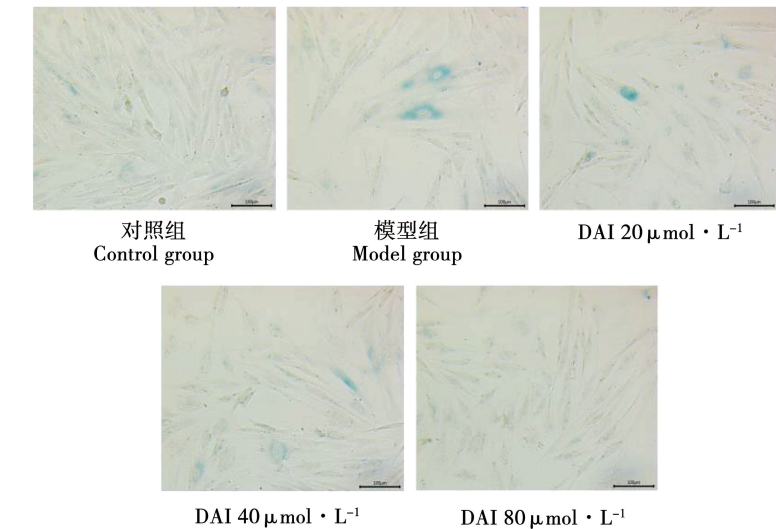


图 1 DAI 浓度对 H9c2 细胞增殖的影响
Fig. 1 Effect of DAI content on H9c2 cell proliferation

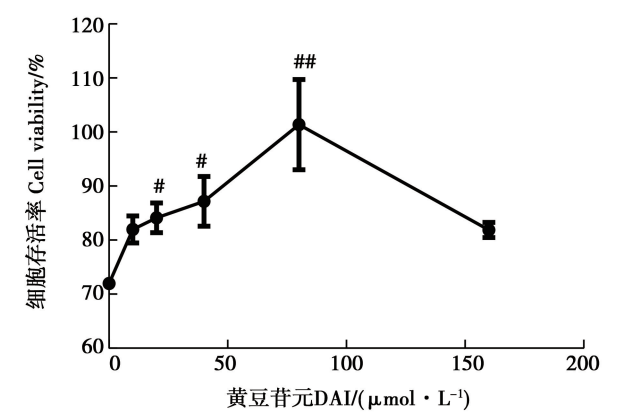


注: * 和 ** 分别表示与对照组相比在 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 水平差异显著; # 和 ## 分别表示与模型组相比在 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 水平差异显著。下同。
Note: * and ** indicate there is significant difference at the levels of $P < 0.05$ or $P < 0.01$ compared with control group respectively; # and ## indicate there is significant difference at the levels of $P < 0.05$ and $P < 0.01$ compared with the model group respectively. The same below.

图 3 DAI 对衰老 H9c2 细胞 SA-β-gal 阳性率的影响 (200 ×)
Fig. 3 Effect of DAI on the positive staining of SA-β-gal in aging H9c2 cells (200 ×)

2.2 DAI 对衰老 H9c2 细胞增殖的影响

如图 2 所示,与未加 DAI 相比,DAI 浓度为 20, 40 和 80 μmol · L⁻¹ 时可显著提高衰老 H9c2 细胞存活率。因此后续试验选择 DAI 浓度为 20, 40 和 80 μmol · L⁻¹ 作为干预剂量。

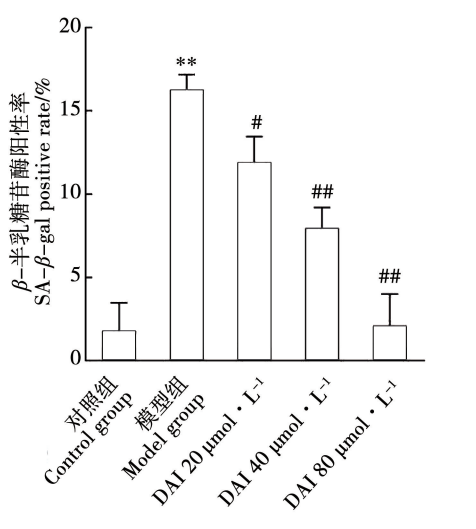


注: # 和 ## 分别表示与对照细胞相比,在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平差异显著。
Note: # and ## indicate there is significant difference at the levels of $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively compared with control cell.

图 2 DAI 对衰老 H9c2 细胞增殖的影响
Fig. 2 Effect of DAI on proliferation in aging H9c2 cells

2.3 DAI 对衰老 H9c2 细胞 SA-β-gal 阳性率的影响

如图 3 所示,与对照组相比,模型组细胞 SA-β-gal 阳性率升高 789.1% ($P < 0.01$),细胞数量减少、颗粒增多;与模型组相比,DAI 20, 40, 80 μmol · L⁻¹ 组阳性率分别降低 26.79%、51.12% 和 86.91%,存在 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 水平差异。结果表明 DAI 可延缓 H9c2 细胞衰老。



2.4 DAI 对衰老 H9c2 细胞 p53、p21 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组相比,模型组 p53、p21 蛋白表达水平分别升高 49. 29% 和 88. 58% ($P < 0. 01$);与模型组相比,DAI 20,40,80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

H9c2 细胞 p53 和 p21 蛋白表达水平分别降低 28. 10%、53. 67%、53. 45% 和 16. 89%、16. 68%、53. 39%,存在 $P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$ 水平差异。结果表明 DAI 可通过降低 p53、p21 蛋白表达水平,延缓 H9c2 细胞衰老。

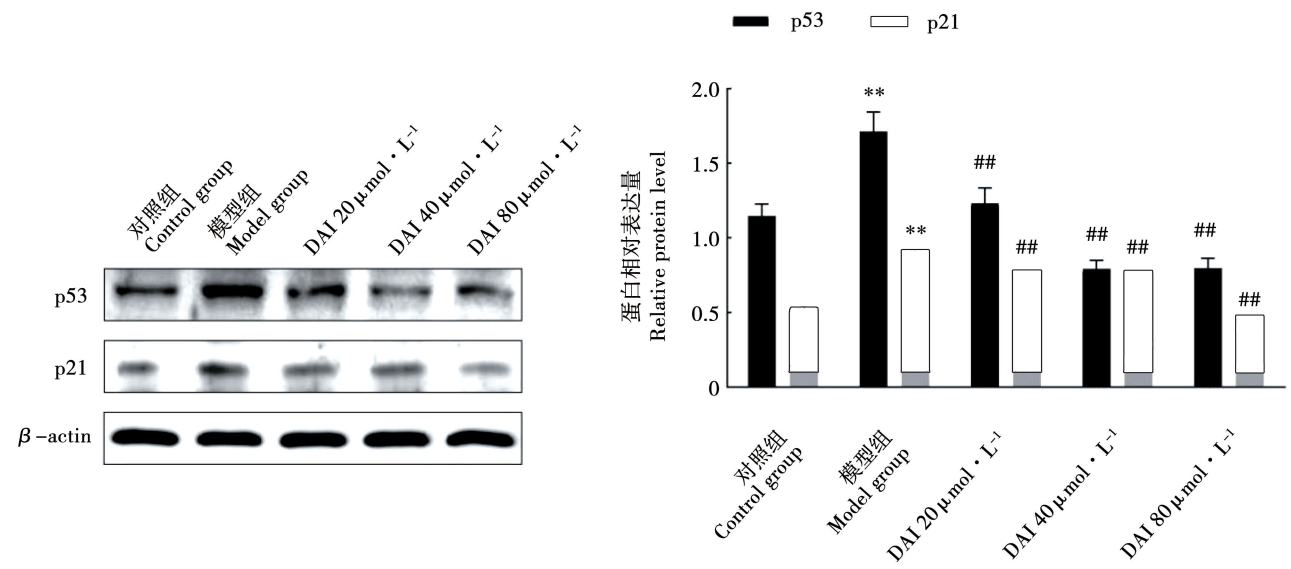


图 4 DAI 对衰老 H9c2 细胞 p53、p21 蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of DAI on expression of p53 and p21 proteins in aging H9c2 cells

2.5 DAI 对衰老 H9c2 细胞抗氧化能力的影响

2.5.1 DAI 对衰老 H9c2 细胞内 T-AOC、SOD 和 MDA 的影响 如表 1 所示,与对照组相比,模型组 T-AOC 水平和 SOD 活性分别下降 32. 15% 和 69. 48%,MDA 含量上升 117. 77% ($P < 0. 01$);与模型组相比,DAI 20,40,80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 T-AOC 水平

分别升高 11. 90%、21. 97% 和 31. 48%,SOD 活性分别升高 80. 07%、152. 07% 和 213. 85%,MDA 含量分别降低 20. 05%、29. 60% 和 43. 24% ($P < 0. 01$)。结果表明 DAI 可显著提升衰老 H9c2 细胞的抗氧化能力。

表 1 DAI 对衰老 H9c2 细胞内 T-AOC、SOD 和 MDA 的影响
Table 1 Effect of DAI on T-AOC,SOD and MDA in aging H9c2 cells

组别 Group	总抗氧化能力 T-AOC/(mmol·g ⁻¹)	超氧化物歧化酶 SOD/(U·mg ⁻¹)	丙二醛 MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照组 Control group	20. 93 ± 0. 64	44. 24 ± 3. 91	37. 14 ± 3. 63
模型组 Model group	14. 20 ± 0. 15**	13. 50 ± 2. 55**	80. 88 ± 6. 99**
DAI 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	15. 89 ± 0. 20##	24. 31 ± 1. 74##	64. 66 ± 3. 81##
DAI 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	17. 32 ± 0. 27##	34. 03 ± 2. 39##	56. 94 ± 2. 07##
DAI 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	18. 67 ± 0. 44##	42. 37 ± 3. 11##	45. 91 ± 4. 84##

2.5.2 DAI 对衰老 H9c2 细胞中 ROS 水平的影响

如图 5 所示,与对照组相比,模型组中 H9c2 细胞荧光强度升高 357. 42% ($P < 0. 01$);与模型组相比,DAI 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组荧光强度分别降低

24. 94%、61. 48% 和 69. 57%,分别存在 $P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$ 水平差异。结果表明 DAI 可显著降低衰老 H9c2 细胞中 ROS 的水平。

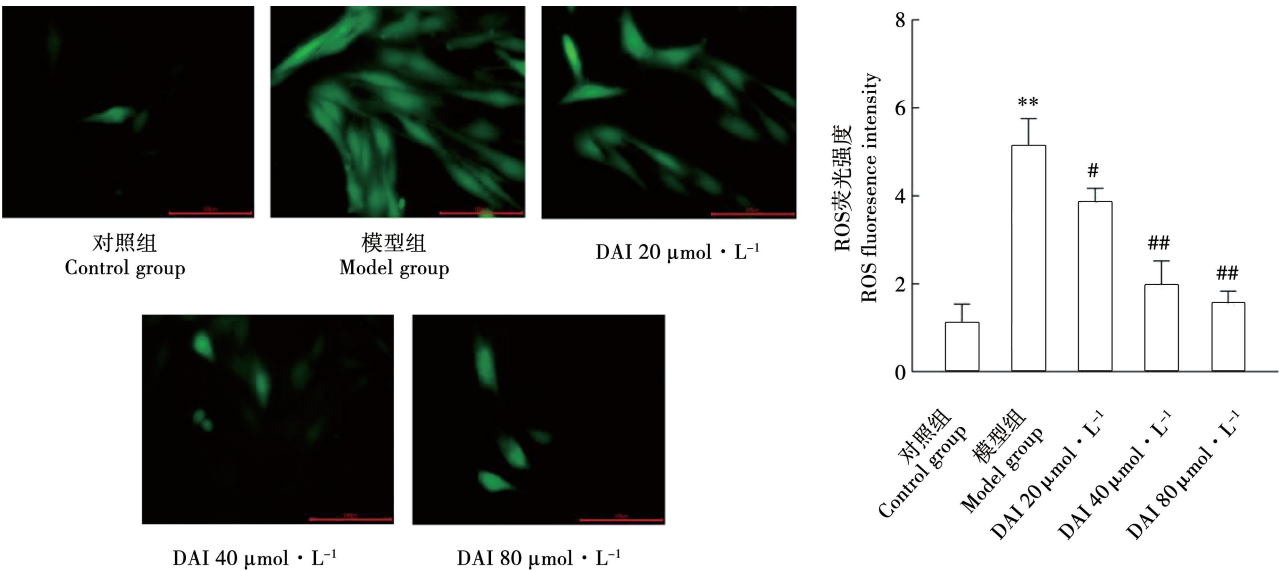


图5 DAI对衰老H9c2细胞ROS水平的影响(400 ×)

Fig.5 Effect of DAI on ROS level in aging H9c2 cells (400 ×)

2.5.3 DAI对衰老H9c2细胞中线粒体膜电位的影响 如图6所示,与对照组相比,模型组Rh123荧光强度升高3 647.57% ($P < 0.01$);与模型组相比,

DAI 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组荧光强度分别降低43.34%、68.94%、85.61% ($P < 0.01$)。结果表明DAI可维持衰老H9c2细胞线粒体膜电位的稳定。

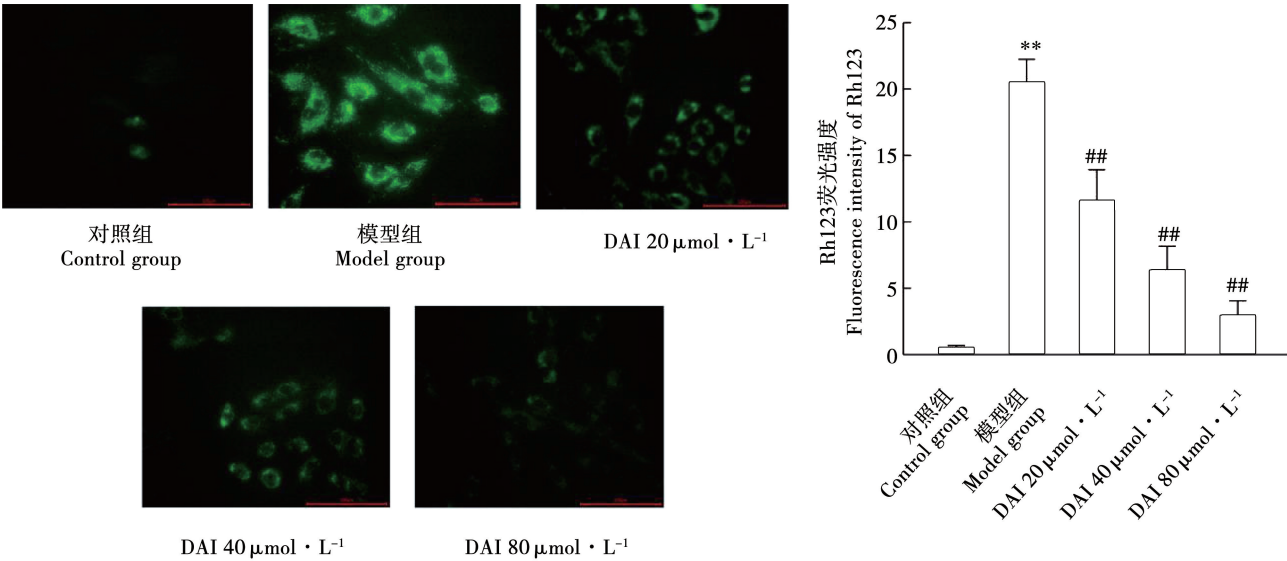


图6 DAI对衰老H9c2细胞线粒体膜电位的影响(400 ×)

Fig.6 Effect of DAI on mitochondrial membrane potential in aging H9c2 cells (400 ×)

2.6 DAI对衰老H9c2细胞内Nrf2/HO-1信号通路的影响

如图7所示,与对照组相比,模型组细胞中Keap1蛋白表达水平升高71.59%,Nrf2及HO-1蛋白表达水平降低27.63%和40.50% ($P < 0.01$);与

模型组相比,DAI 20,40,80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组中H9c2细胞Keap1蛋白表达水平分别降低8.21%、21.29%和27.75%,Nrf2及HO-1蛋白表达水平分别升高6.70%、18.35%、57.81%和11.84%、63.40%、103.47% ($P < 0.01$)。

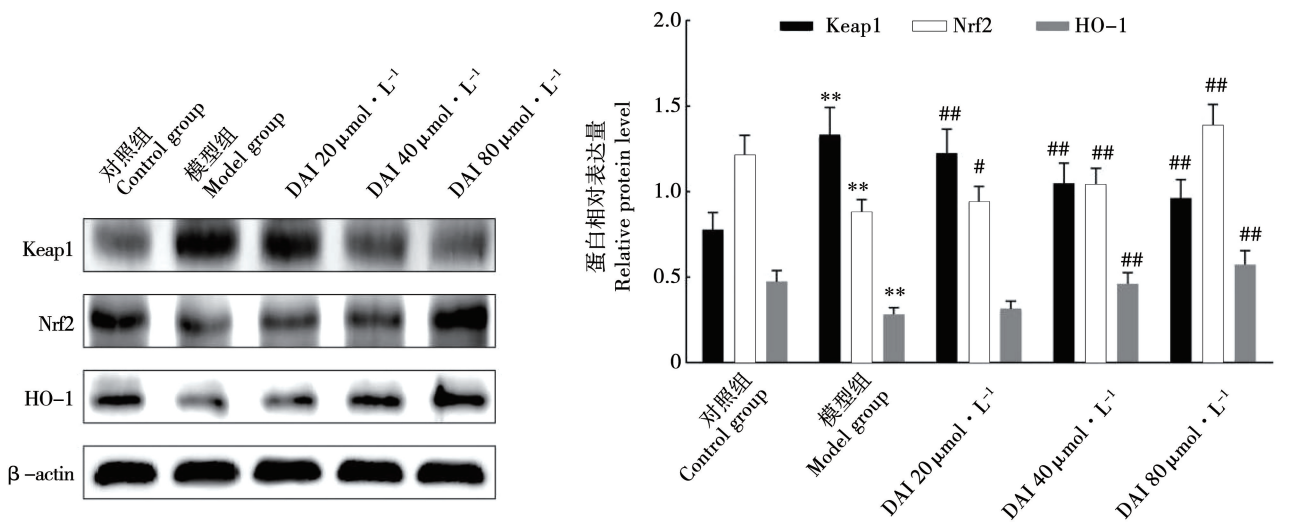


图 7 DAI 对衰老 H9c2 细胞内 Keap1、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响
Fig.7 Effect of DAI on protein expressions of Keap1,Nrf2 and HO-1 in aging H9c2 cells

如图 8 所示,与对照组相比,模型组细胞核内 Nrf2 蛋白表达水平下降 36.18% ($P<0.01$);与模型组相比,DAI 20,40,80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞核内 Nrf2 蛋

白表达水平分别上升 77.03%、97.24% 和 216.80% ($P<0.01$)。上述结果表明,DAI 可激活衰老 H9c2 细胞内 Nrf2/HO-1 信号通路。

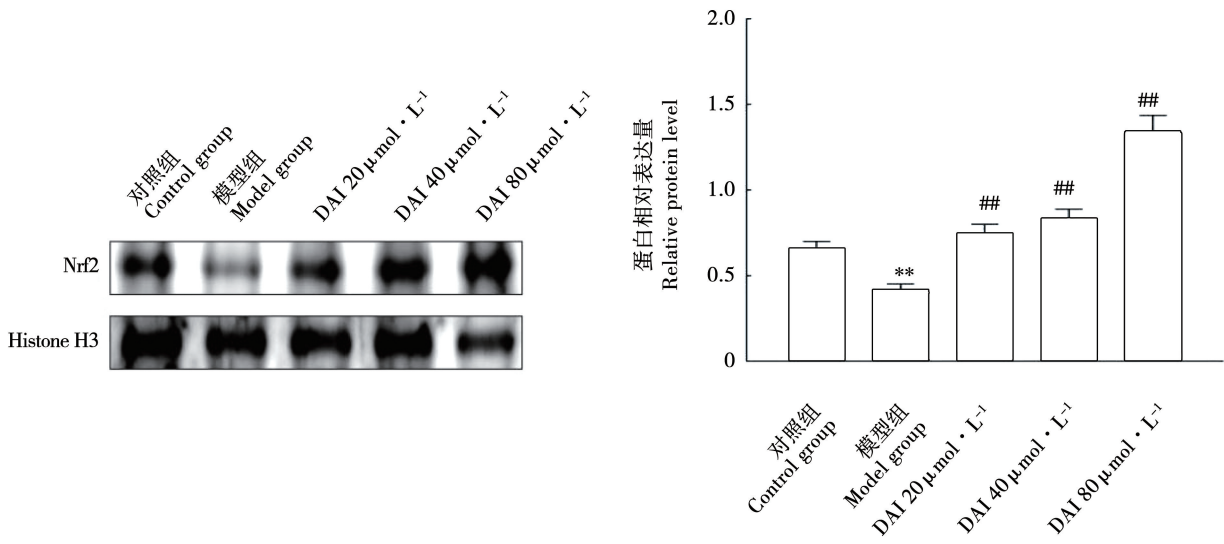


图 8 DAI 对衰老 H9c2 细胞核内 Nrf2 蛋白表达的影响
Fig.8 Effect of DAI on Nrf2 protein expression in aging H9c2 cell nucleus

3 讨论

细胞衰老是指细胞在执行生命活动过程中,随着时间的推移细胞增殖与分化能力和生理功能逐渐发生衰退的变化过程。细胞衰老的主要特征表现为周期的永久停滞,SA- β -gal 活性的改变、细胞体积变大、颗粒或空泡增多等^[20]。SA- β -gal 存在于细胞的溶酶体中,在细胞衰老时,由于溶酶体体积变

大、含量增加,致使 SA- β -gal 活性增高。最常用的细胞衰老标志之一为 SA- β -gal 活性的改变,其可区分静止及终末分化期细胞与衰老细胞,所以,观测 SA- β -gal 活性可判断细胞是否发生衰老^[21]。有研究显示,细胞在衰老过程,可通过下调 p53 蛋白的表达来发挥其抗衰老作用^[22]。p21 是首批确定的 p53 下游靶标之一,也是一种细胞周期蛋白抑制剂^[23]。下调 p21 后在 DNA 损伤的小鼠成纤维细胞中无法进

行 G1 期阻滞,且缺乏 p21 可以延缓衰老^[24-25]。为验证 DAI 对衰老 H9c2 细胞的保护作用,本研究采用 SA-β-gal 染色法观察细胞衰老程度,用 western blotting 法检测衰老相关蛋白 p53、p21 的表达水平。结果显示,H₂O₂ 刺激可导致 H9c2 细胞 SA-β-gal 染色阳性率及 p53、p21 蛋白表达水平升高,而加入 DAI 后 H9c2 细胞 SA-β-gal 阳性率及 p53、p21 蛋白表达水平下降显著,表明 DAI 可延缓 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞衰老。

细胞衰老的程度可以客观地反映细胞抗氧化能力及氧化应激水平^[26]。T-AOC 作为脂质过氧化的敏感指标可反映机体中的总抗氧化能力^[27]。SOD 可与体内的其他抗氧化酶共同清除生命活动过程中所产生的自由基,消除其毒性,在机体的抗衰老中起到重要的作用^[28-29]。MDA 作为脂质过氧化反应的产物,可以反映细胞损伤情况及脂质过氧化程度^[30]。在细胞衰老过程中,线粒体结构受到破坏,导致其功能障碍、膜电位崩溃,使细胞产生过量的 ROS,而 ROS 的增多又会使细胞衰老加剧,最终走向死亡。为了解 DAI 对衰老 H9c2 细胞抗氧化能力的影响,本研究通过比色法测定细胞中 T-AOC、SOD 和 MDA 水平,采用荧光染色法检测 DAI 对衰老 H9c2 细胞中 ROS 及线粒体膜电位的影响。研究表明,DAI 可提高衰老细胞的总抗氧化能力、抗氧化酶活性,降低脂质过氧化反应,并且可通过减少细胞 ROS 的产生,维持线粒体膜电位的稳定,进而延缓 H₂O₂ 所致的 H9c2 细胞衰老。

Nrf2/HO-1 信号通路是调节氧化应激的重要信号途径之一^[31]。Nrf2 受 Keap1 负调节,是氧化应激期间释放的关键转录因子,也是细胞氧化应激的传感器之一,且 Nrf2 以二聚体形式连接 Keap1。Keap1 通过氧化还原敏感的半胱氨酸残基的结合来检测氧化应激,并释放 Nrf2 转向细胞核,加强 HO-1、SOD 等抗氧化基因的转录^[32]。为探究 DAI 延缓 H9c2 细胞衰老的具体机制,本研究通过 western blotting 检测 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白的表达。本研究结果显示,DAI 干预可下调衰老 H9c2 细胞 Keap1 水平并促进 Nrf2 的核转移,上调 HO-1 蛋白水平,从而抑制细胞氧化应激水平。

4 结论

DAI 可延缓细胞衰老,增强细胞抗氧化能力,抑制细胞氧化应激,此作用可能与 DAI 激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。研究结果为揭示 DAI 的抗衰老作用机制、防治心血管疾病及进一步开发延缓心脏衰老的临床药物提供了理论依据。

参考文献

[1] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告 2020[J]. 心肺血管病杂志, 2021, 40(9): 885-889. (National Center for Cardiovascular Disease. China cardiovascular health and disease report 2020 [J]. Journal of Cardiopulmonary and Vascular Diseases, 2021, 40(9): 885-889.)

[2] BAKER D J, WIJSHAKE T, TCHKONIA T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders[J]. Nature, 2011, 479(7372): 232-236.

[3] 李丹. 大豆查尔酮还原酶 1 (CHR1) 基因的克隆及在大豆中的转化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014. (LI D. Cloning of Chalcone Reductase 1 (CHR1) gene of soybean and its transformation into soybean [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.)

[4] RAWAT S, PATHAK S, GUPTA G, et al. Recent updates on daidzein against oxidative stress and cancer[J]. EXCLI Journal, 2019, 18: 950-954.

[5] DUCHNIK E, KRUK J, BARANOWSKA-BOSIACKA I, et al. Effects of the soy isoflavones, genistein and daidzein, on male rats' skin[J]. Postepy Dermatologii i Alergologii, 2019, 36(6): 760-766.

[6] ŽIVANOVIĆ J, JARIĆ I, AJDŽANOVIĆ V, et al. Daidzein upregulates anti-aging protein Klotho and NaPi 2a cotransporter in a rat model of the andropause [J]. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, 2019, 221: 27-37.

[7] PAN M, HAN H, ZHONG C, et al. Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in H19-7 neural cell line[J]. Journal of Nutrition Health & Aging, 2012, 16(4): 389-394.

[8] YU Z, YANG L, DENG S, et al. Daidzein ameliorates LPS-induced hepatocyte injury by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 885: 173399.

[9] 梁璐, 蔡晓彤, 岑慧裕, 等. 甘木通活性化合物的抗氧化活性及对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(11): 1530-1535. (LIANG L, CAI X T, CEN H Y, et al. Antioxidant activities of 10 active compounds from *Clematis filamentosa* Dunn. and their protective effects on H₂O₂-induced oxidative stress injury in H9c2 cardiomyocytes[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 201, 37(11): 1530-1535.)

[10] 黄紫霞, 吴明月, 许峰, 等. 柴胡皂苷 A 通过抑制氧化应激和铁死亡减轻过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(1): 43-48. (HUANG Z X, WU M Y, XU F, et al. Saikosaponin A inhibits oxidative stress and ferroptosis and reduces the injury of human umbilical vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide [J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2022, 30(1): 43-48.)

[11] ZHU W, WU Y, MENG Y F, et al. Effect of curcumin on aging retinal pigment epithelial cells[J]. Drug Design Development & Therapy, 2015, 9(DEFAULT): 5337-5344.

[12] 凌佳, 蔡振荣, 庄晓华, 等. 沉默 C-SKI 对大鼠心肌细胞 H9C2 细胞增殖与侵袭能力的影响研究[J]. 贵州医药, 2018, 42(1): 6-8, 129. (LING J, CAI Z R, ZHUANG X H, et al.

Down regulation of C-SKI enhances invasion of H9C2 cardiac muscle cells[J]. *Guizhou Pharmaceutical*, 2018, 42 (1): 6-8, 129.)

[13] 杨群辉, 杨硕, 冯颖, 等. siRNA 表达载体对大鼠心肌 H9c2 细胞牛磺酸合成限速酶-CSD 基因表达的抑制作用[J]. *营养学报*, 2012, 34(4): 317-321. (YANG Q H, YANG S, FENG Y, et al. The inhibitory effects of siRNA expression vector on the biosynthetic rate- limiting enzyme-CSD gene of rat H9c2 cardiac myoblasts[J]. *Journal of Nutrition*, 2012, 34(4): 317-321.)

[14] 刘亚辉. 黄豆苷元对过氧化氢诱导大鼠 H9c2 细胞衰老的延缓作用[D]. 延吉: 延边大学, 2021. (LIU Y H. Effect of daidzein on senescence induced by hydrogen peroxide in rat H9c2 cells[D]. Yanji: Yanbian University, 2021.)

[15] 刘思彤. 金雀异黄酮对叔丁基过氧化氢诱导的 H9c2 细胞衰老的抑制作用及其机制[D]. 延吉: 延边大学, 2020. (LIU S T. Effect of isoflavone on senescence of H9c2 cells induced by tert-butyl hydrogen peroxide and its mechanism [D]. Yanji: Yanbian University, 2020.)

[16] 刘亚辉, 刘思彤, 王萱, 等. 金雀异黄酮对叔丁基过氧化氢诱导的衰老 H9c2 细胞的保护作用[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(18): 113-118. (LIU Y H, LIU S T, WANG X, et al. Protective effects of genistein on senescent H9c2 cells induced by tert-butyl hydrogen peroxide[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021, 47(18): 113-118.)

[17] 冷彦, 王静, 吴文斗, 等. 高压脉冲电场预处理普洱熟茶对 SD 大鼠体内活性氧(ROS)水平的影响[J]. *西南农业学报*, 2021, 34(6): 1208-1214. (LENG Y, WANG J, WU W D, et al. Effect of pre-treatment of Pu'er Tea by high voltage pulse electric field on reactive oxygen (ROS) levels in SD mice[J]. *Southwest Agricultural Journal*, 2021(6): 1208-1214.)

[18] 孙蓓, 张丽, 刘晓东, 等. 光动力疗法联合拉帕替尼抑制人表皮生长因子受体-2 阳性乳腺癌细胞的基础研究[J]. *中国全科医学*, 2019, 22(21): 2551-2556, 2563. (SUN B, ZHANG L, ZHANG X D, et al. EFFECT OF 5-ALA mediated photodynamic therapy combined with lapatinib on breast cancer cell: A potential strategy to improve her2-positive breast cancer therapeutic efficacy[J]. *Chinese Journal of General Medicine*, 2019, 22(21): 2551-2556, 2563.)

[19] 刘思彤, 刘亚辉, 尹学哲, 等. 大豆异黄酮和维生素 E 提高衰老小鼠肝脏抗氧化能力比较[J]. *大豆科学*, 2020, 39(5): 797-803. (LIU S T, LIU Y H, YIN X Z, et al. Comparison on the effects of soy isoflavones and vitamin E on hepatic antioxidant capacity of aging mice[J]. *Soybean Science*, 2020, 39(5): 797-803.)

[20] KIM E C, KIM J R. Senotherapeutics: Emerging strategy for healthy aging and age-related disease[J]. *BMB Reports*, 2019, 52(1): 47-55.

[21] DIMIRI G P, LEE X, BASILE G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(20): 9363-9367.

[22] 向玥, 陈粼波, 姚辉, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对 D-半乳糖所致衰老小鼠海马的保护机制[J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3789-3795. (XIANG Y, CHEN L B, YAO H, et al. Protective mechanism of ginsenoside Rg₁ on hippocampus of aging mice induced by D-galactose[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2017, 13(18): 3789-3795.)

[23] JIANG C L, SUN M J, LI S T, et al. Long non-coding RNA DICER1-ASI-low expression in arsenic-treated A549 cells inhibits cell proliferation by regulating the cell cycle pathway [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2021, 84: 103617.

[24] BRUGAROLAS J, CHANDRASEKARAN C, GORDON J I, et al. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency [J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 552-557.

[25] PAPISMADOV N, GAL H, KRIZHANOVSKY V. The anti-aging promise of p21[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(21): 1997-1998.

[26] 李旭, 张雪燕, 杨世培, 等. 中药多糖抗衰老作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(4): 271-282. (LI X, ZHANG X Y, YANG S P, et al. Anti-aging mechanism of Chinese medicinal polysaccharides: A Review [J]. *Chinese Journal of Experimental Formulas of Chinese Medicine*, 2022, 28(4): 271-282.)

[27] 温奇龙, 银喆, 罗育, 等. 扶芳藤总三萜对衰老小鼠血清及组织 T-AOC, CAT, GSH-PX 表达的影响及意义[J]. *海南医学*, 2020, 31(4): 413-417. (WEN Q L, YIN Z, LUO Y, et al. Effect and significance of total triterpenes of *Euonymus fortunei* (Turcz.) hand-mazz on the expression of T-AOC, CAT, and GSH-PX in serum and tissues of mice with D-galactose induced senescence[J]. *Hainan Medical*, 2020, 31(4): 413-417.)

[28] LI C, TAN F, YANG J J, et al. Antioxidant effects of *Apocynum venetum* tea extracts on d-galactose-induced aging model in mice [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(9): 381.

[29] WANG Y, WANG X F, ZHANG L C, et al. Alleviation of acute lung injury in rats with sepsis by resveratrol *via* the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Nuclear Factor-Erythroid 2 related factor 2/Heme Oxygenase-1 (PI3K/Nrf2/HO-1) pathway [J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2018, 24: 3604-3611.

[30] TEMNEANU R O, MOTOC A, ZUGUN F E, et al. The relevance of circadian rhythms disruption on pulmonary SOD expression in rat [J]. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2012, 53(3 Suppl): 789-793.

[31] WANG Y, WANG H L, XING G D, et al. S-allyl cysteine ameliorates heat stress-induced oxidative stress by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway in BMECs[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2021(416): 115469.

[32] GU Y H, ZHAO Z. Significance of the changes occurring in the levels of interleukins, SOD and MDA in rat pulmonary tissue following exposure to different altitudes and exposure times[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 10(3): 915-920.