

• 论著-临床基础研究 •

缺氧/复氧引起 H9C2 细胞 eNOS Ser633 磷酸化水平降低的调控机制*

关慧芳¹ 丁菁¹ 张倩¹ 黄华¹ 姜君财¹ 陆德琴¹

[摘要] 目的:初步探讨缺氧/复氧(H/R)损伤过程心肌细胞株 H9C2 中内皮型一氧化氮合酶(eNOS) Ser633 磷酸化水平的变化及其可能的调控机制。方法:采用缺氧 4 h 培养后恢复常氧条件培养 12、16 或 24 h 造成 H9C2 细胞 H/R 损伤。选取缺氧 4 h/复氧 12 h(H4/R12)进行后续实验。①H/R 后用钙离子泵抑制剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG), 1.0×10^{-6} mol/L 处理细胞 1 h;用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002(5.0×10^{-5} mol/L)预处理 1 h,再进行 H/R 及 TG 处理 1 h。②用 PP2A/PP1 抑制剂冈田酸 Okadaic acid(OA)低剂量(5×10^{-8} mol/L)、高剂量(1×10^{-6} mol/L)预处理细胞 30 min,再进行 H/R。用 Western blot 检测 eNOS 总蛋白及 eNOS Ser633 磷酸化水平,化学比色法检测培养基中一氧化氮(NO)含量。结果:①H/R 损伤后心肌细胞 eNOS Ser633 磷酸化水平降低($P < 0.05$);TG 明显上调 eNOS Ser633 磷酸化水平($P < 0.05$),LY294002 预处理可抑制 TG 的上调作用($P < 0.05$);低剂量 OA、高剂量 OA 预处理均可上调 H/R 损伤后 eNOS Ser633 磷酸化水平($P < 0.05$),且高、低剂量组间无明显差异。②H/R 损伤后培养基中 NO 含量减少($P < 0.05$);TG、低剂量 OA、高剂量 OA 处理均可增加 H/R 损伤后培养基中 NO 含量($P < 0.05$)。结论:H/R 损伤可明显降低 H9C2 细胞中 eNOS Ser633 水平,这可能是由于 H/R 过程中既有 PI3K/Akt 通路被抑制,又有 PP2A 活性增强所致。

[关键词] 心肌细胞;缺氧/复氧;内皮型一氧化氮合酶;PP2A;PI3K/Akt

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2018.04.017

[中图分类号] R363 [文献标志码] A

Regulation mechanism of eNOS Ser633 phosphorylation induced by hypoxia/reoxygenation in H9C2 cell

GUAN Huifang DING Jing ZHANG Qian HUANG Hua JIANG Juncai LU Deqin
(Department of Pathophysiology, Guizhou Medical University, Guiyang, 550025, China)

Corresponding author: LU Deqin, E-mail: dqlu91@hotmail.com

Abstract Objective: To investigate changes of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Ser633 phosphorylation during hypoxia/reoxygenation (H/R) injury in H9C2 cells and its potential regulation mechanism. **Method:** After 4 hours cultivating under hypoxia condition, H/R injury was caused in H9C2 cells by recovering the normoxia conditions for 12, 16 and 24 hours, respectively. Follow-up experiments were proceeded under the condition of hypoxia for 4 hours and reoxygenation for 12 hours (H4/R12). ①Cells were treated by thapsigargin (TG, 1.0×10^{-6} mol/L), a calcium ion pump inhibitor, for 1 hour after H/R. Cells were pretreated by LY294002 (5.0×10^{-5} mol/L), a PI3K/Akt inhibitor, for 1 hour, then cells were treated H/R or TG for 1 hour. ②H9C2 cells were pretreated by Okadaic acid (OA), a PP2A/PP1 inhibitor, respectively with low dose (5×10^{-8} mol/L) and high dose (1×10^{-6} mol/L) for 30 minutes, then were treated H/R. Expression of eNOS and phosphorylation of eNOS Ser633 were detected by Western blot. The content of nitric oxide (NO) in the medium was detected by chemical colorimetry. **Result:** ①Phosphorylation of eNOS Ser633 decreased after H/R ($P < 0.05$), which were significantly up-regulated by TG treatment ($P < 0.05$). LY294002 pretreatment inhibited the up regulation of eNOS Ser633 phosphorylation by TG ($P < 0.05$). Phosphorylation of eNOS Ser633 increased after treated with low dose OA or high dose OA ($P < 0.05$), there was no significant difference in phosphorylation level of eNOS Ser633 between high dose OA and low dose OA. ②The content of NO in the medium reduced after H/R treatment ($P < 0.05$), which could be increased after TG, low dose OA and high dose OA treatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** H/R injury can significantly reduced phosphorylation of eNOS Ser633 in H9C2 cells, which may be due to the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway and enhanced activity of PP2A.

Key words cardiomyocyte; hypoxia/reoxygenation; endothelial nitric oxide synthase; PP2A; PI3K/Akt

* 基金项目:贵州省社会发展攻关项目(No:黔科合 SY 字(2013)3019 号);国家自然科学基金(No:31460267)

¹ 贵州医科大学病理生理学教研室(贵阳, 550025)

通信作者:陆德琴, E-mail: dqlu91@hotmail.com

心肌缺血后及时恢复血液供应是治疗缺血性心脏病的主要方法,但再灌注有可能会加重心肌功能障碍和结构损伤,这种现象即为缺血再灌注损伤。存在于心血管系统的内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[1]。研究报道,在小鼠心肌细胞内特异性过表达 eNOS 可以减小心肌梗死面积,减轻心肌功能损伤^[2]。eNOS 可催化产生一氧化氮(nitric oxide, NO)。心肌细胞产生的 NO 能够激活肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶,减轻心肌细胞钙超载,抑制促凋亡蛋白表达和线粒体膜通透性转换孔开放,减少细胞凋亡^[3-5]。eNOS 活性调控的重要机制之一是翻译后水平磷酸化调控。目前已明确其调控位点中的 Ser633/635(人/牛)、Ser1177/1179(人/牛)的磷酸化可使 eNOS 活性增强^[6]。eNOS Ser1177 磷酸化的分子调控机制目前比较清楚,而对 eNOS Ser633 的磷酸化调控机制了解相对较少,尤其是在一些病理生理过程中,对该位点的去磷酸化调控尚不清楚。因此,本研究选用心肌细胞株 H9C2,建立缺氧/复氧(H/R)损伤模型模拟心肌缺血再灌注损伤,探讨 H/R 损伤过程中 eNOS Ser633 磷酸化的变化及其可能的分子调控机制,为临床防治心肌缺血再灌注损伤提供新的思路 and 实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);钙离子泵抑制剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)、PI3K/Akt 抑制剂 LY294002(美国 Sigma 公司)、特异性蛋白磷酸酶 PP2A/PP1 抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA, 碧云天生物技术公司);鼠抗人 eNOS 抗体(美国 BD 公司)、兔抗鼠 eNOS Ser633 和 eNOS Ser1177 抗体(美国 Millipore 公司)、兔抗鼠 β -tubulin 抗体及羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司)、兔抗鼠 α -横纹肌肌动蛋白(α -actin)抗体(北京博奥森生物公司);免疫组织化学 SABC 法检测试剂盒(北京中杉金桥公司)、NO 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);ECL 化学发光试剂盒、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);BX41 普通光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 H9C2 细胞培养

H9C2 细胞(购于上海细胞库,货号:GNR 5)接种于 25 cm^2 的培养瓶中,用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养,每 48 h 更换 1 次培养基。细胞密度达 80% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化液消化细胞。实验用 12 代以内的细胞。

1.3 细胞鉴定

使用 6 孔板进行细胞爬片,待细胞密度约为 50% 时,用含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养液静止培养 12 h 后, PBS 洗涤 3 次,经 4% 多聚甲醛固定,兔抗鼠 α -actin 抗体作为 I 抗,用 PBS 按 1:80 稀释后孵育,阴性对照滴加 PBS 孵育, SABC 法进行免疫细胞化学染色。普通光学显微镜下观察胞质内出现大量棕黄色颗粒的为阳性细胞,200 倍镜下随机取 5 个视野观察计数阳性细胞,计算阳性细胞率(%) = 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.4 细胞 H/R 损伤模型制备

根据文献[7]将高纯氮气(体积分数为 99.99%)经过滤后通入无血清低糖 DMEM 培养液内,气体流速为 4~6 L/min,通气 3 min 后,将该培养基迅速加入培养瓶内,再向培养瓶内通氮气 5 min。通气完成后,拧紧瓶盖,封口胶密封瓶口,放入 37°C 孵箱中缺氧培养 4 h。缺氧结束后,细胞更换含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基,继续在常氧条件(37°C , 5% CO_2)下复氧培养 12、16 和 24 h。

1.5 体外培养 H9C2 细胞处理

单纯 H/R 处理:待细胞生长融合至 70% 左右时,用含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养液静止培养 12 h 后,进行 H/R 处理。细胞随机分为对照组、H4/R12 组、H4/R16 组、H4/R24 组。根据 H/R 实验结果,选取 H4/R12 进行后续实验。

TG 处理:H/R 后,使用钙离子泵抑制剂 TG ($1.0 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$)处理 1 h,细胞随机分为对照组、H4/R12 组、TG 组、H4/R12+TG 组。

LY294002 处理:在 H/R 前使用特异性 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 ($5.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$)处理细胞 1 h, H/R 后使用 TG 处理 1 h。细胞随机分为对照组、H4/R12 组、H4/R12+TG 组、LY294002+H4/R12+TG 组。

OA 处理:使用 PP2A/PP1 特异性抑制剂 OA 低浓度($5 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$)、高浓度($1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$)于 H/R 前分别处理 30 min。细胞随机分为对照组、H4/R12 组、低剂量 OA+H4/R12 组、高剂量 OA+H4/R12 组。

1.6 Western Blot 检测蛋白水平

提取各组细胞总蛋白,按 BCA 试剂盒操作步骤测定蛋白浓度。其余蛋白变性后用 7% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h, TBST 洗膜 10 min $\times 3$ 次, I 抗按相应比例稀释(eNOS 1:2 000, Ser1177 1:2 000, Ser633 1:500, β -tubulin 1:4 000), 4°C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜后,常温孵育 II 抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG)1 h, ECL 显影,凝胶成像系统采集图像。Image Lab 软件分析灰度值,以 β -tubulin

作为内参,结果以目的条带与其相应的 β -tubulin 积分光密度值的比值表示,以对照组蛋白条带的积分光密度值为 100%。以上结果至少重复 3 批独立实验,每批重复检测 3 次。

1.7 培养基中 NO 含量检测

实验分组为对照组、H4/R12 组、H4/R12 + TG 组、低剂量 OA 组、高剂量 OA 组,细胞处理结束后,收集各组培养基,按试剂盒说明操作,检测各组培养基中 NO 含量。

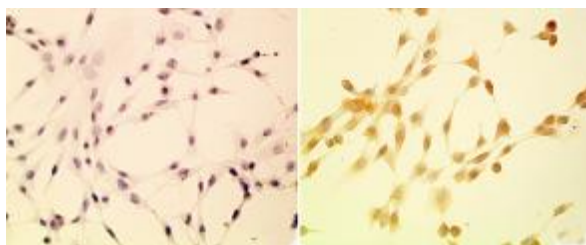
1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两两比较采用 SNK-q 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定结果

免疫细胞化学染色结果显示,在培养的 H9C2 细胞质内出现大量棕黄色颗粒,提示 α -actin 表达阳性,阴性对照未见胞质内出现棕黄色颗粒,见图 1。计算阳性细胞率为 100%。



左:阴性对照;右:H9C2 细胞中 α -actin 阳性表达。

图 1 α -actin 在 H9C2 细胞中的表达 ($\times 200$)

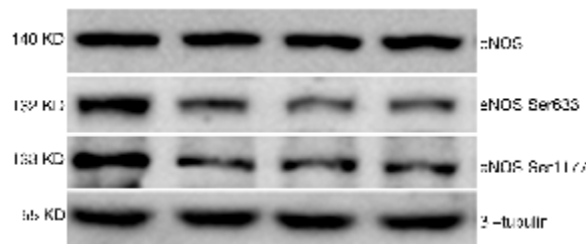
Figure 1 The expression of α -actin in H9C2 cells ($\times 200$)

2.2 H9C2 细胞 H/R 损伤过程中 eNOS Ser633 磷酸化水平降低

本研究在观察 eNOS Ser633 变化时,以目前磷酸化调控机制已较明确的 eNOS Ser1177 作为对比同时观察。与对照组比较,H/R 损伤 3 个时间点组 eNOS 总蛋白差异无统计学意义,但 H/R 各组 eNOS Ser633 磷酸化水平平均降低 ($P < 0.05$),eNOS Ser633 与 Ser1177 变化一致。见图 2、3。

2.3 TG 上调 H9C2 细胞 H/R 损伤过程中 eNOS Ser633 磷酸化水平

与对照组比较,H4R12 组 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化水平均降低 (均 $P < 0.05$),TG 组 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化均增加 ($P < 0.05$);与 H4/R12 组比较,H4/R12 + TG 组 eNOS Ser633 磷酸化水平增加 ($P < 0.05$),eNOS Ser1177 磷酸化水平也增加 ($P < 0.05$);各组 eNOS 总蛋白差异无统计学意义。见图 4、5。



各条带从左至右依次为对照组、H4/R12 组、H4/R16 组和 H4/R24 组。

图 2 eNOS、Ser633 及 Ser1177 磷酸化的 Western Blot 检测结果

Figure 2 Western Blot results of eNOS, Ser633 and Ser1177 in H9C2

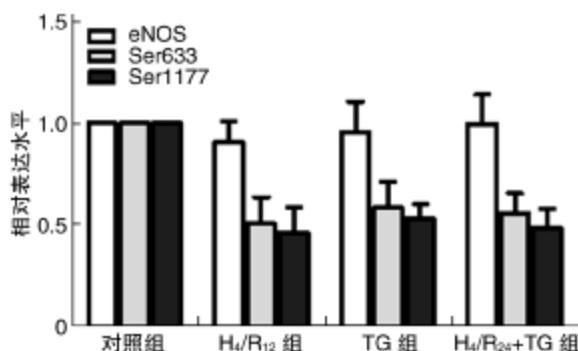
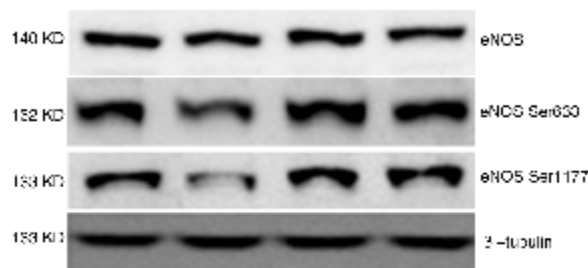


图 3 eNOS、Ser633 及 Ser1177 磷酸化水平

Figure 3 Changes of eNOS, Ser633 and Ser1177



各条带从左至右依次为对照组、H4/R12 组、TG 组和 H4/R12+TG 组。

图 4 TG 对 eNOS、Ser633 及 Ser1177 磷酸化水平的影响

Figure 4 Effects of TG on levels of eNOS, Ser633 and Ser1177

2.4 LY294002 预处理抑制 TG 对 eNOS Ser633 磷酸化的上调作用

与对照组比较,H4/R12 组 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化水平均降低 ($P < 0.05$);与 H4/R12 组比较,H4/R12 + TG 组 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化水平均增加 ($P < 0.05$);与 H4/R12 + TG 组比较,LY294002 + H4/R12 + TG 组 eNOS Ser633 磷酸化水平降低 ($P < 0.05$),接近 H4/R12 组水平,而 Ser1177 磷酸化水平也降低 ($P < 0.05$),但仍高于 H4/R12 组。见图 6、7。

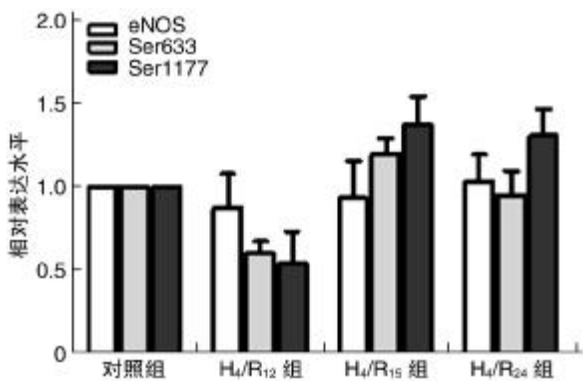
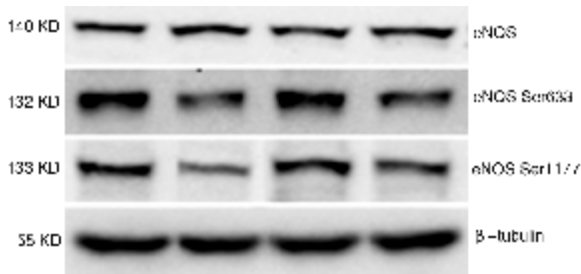


图 5 TG 对 eNOS、Ser633 及 Ser1177 磷酸化水平的影响
Figure 5 Effects of TG on levels of eNOS, Ser633 and Ser1177



各条带从左至右依次为对照组、H4/R12 组、H4/R12+TG 组和 LY294002+H4/R12+TG 组。
图 6 LY294002 对 eNOS、Ser633 及 Ser1177 磷酸化水平的影响
Figure 6 Effects of LY294002 on eNOS, Ser633 and Ser1177

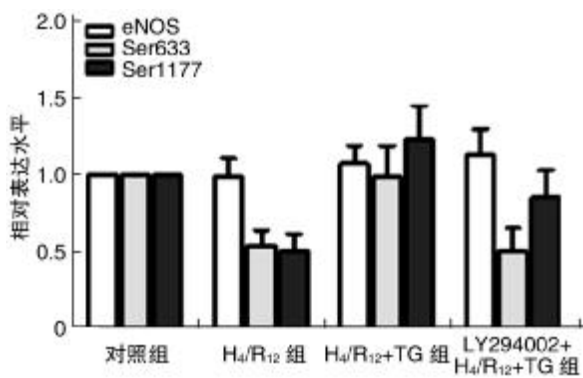
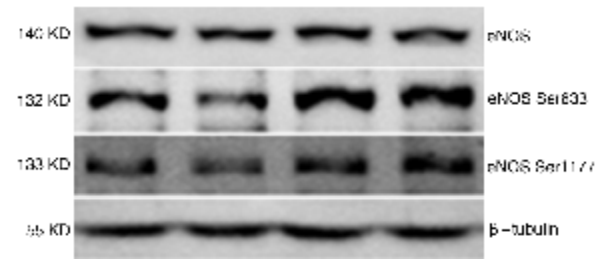


图 7 LY294002 对 eNOS Ser633 及 Ser1177 磷酸化水平的影响
Figure 7 Effects of LY294002 on eNOS, Ser633 and Ser1177

2.5 低、高剂量 OA 预处理均上调 eNOS Ser633 磷酸化水平

与对照组比较, H4/R12 组 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化水平均降低($P<0.05$); 与 H4/R12 组比较, 低剂量 OA 组和高剂量 OA 组 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化水平均增加($P<0.05$), 并且二位点变化有所不同。高剂量 OA 组与低剂量

OA 组间 eNOS Ser633 磷酸化水平无明显差异, 而高剂量 OA 组 eNOS Ser1177 磷酸化水平高于低剂量 OA 组($P<0.05$)。见图 8、9。



各条带从左至右依次为对照组、H4/R12 组、低剂量 OA 组和高剂量 OA 组。
图 8 OA 对 eNOS、Ser633 及 Ser1177 磷酸化水平的影响
Figure 8 Effects of OA on eNOS, Ser633 and Ser1177

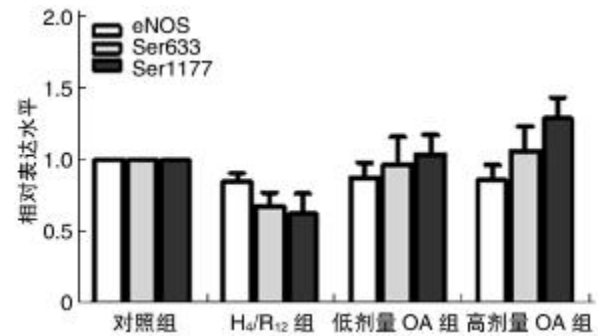


图 9 OA 对 eNOS、Ser633 及 Ser1177 磷酸化水平的影响
Figure 9 Effects of OA on eNOS, Ser633 and Ser1177

2.6 培养基中 NO 含量检测

与对照组比较, H4/R12 组培养基中 NO 含量降低($P<0.05$); 与 H4/R12 组比较, TG、低剂量 OA、高剂量 OA 处理后均增加了 NO 含量($P<0.05$); 与低剂量 OA 组比较, 高剂量 OA 组 NO 含量增加($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组培养基中 NO 含量比较	
Table 1 The concentration of NO in culture medium in each group	$\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$
组别	NO 浓度
对照组	1.52 ± 0.14
H4/R12 组	$0.72 \pm 0.14^{1)}$
H4/R12+TG 组	$1.16 \pm 0.15^{1) 2)}$
低剂量 OA 组	$0.92 \pm 0.16^{1) 2)}$
高剂量 OA 组	$1.48 \pm 0.14^{2) 3)}$

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 H4/R12 组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与低剂量 OA 组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

磷酸化和去磷酸化是 eNOS 翻译后水平活性调控的重要机制之一。Ser633 位于 eNOS 自抑制

环区,目前研究已发现 eNOS Ser1177 与 Ser633 磷酸化调控有异同。有文献报道阿托伐他汀、脂联素通过激活 AMPK 使 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化,且发现 Ser633 磷酸化持续时间较长,表明 Ser633 磷酸化对维持 eNOS 活性有重要作用^[8]。

本研究结果显示,H9C2 细胞经 H/R 处理后,不仅 eNOS Ser1177 位点磷酸化水平降低,而且 Ser633 位点的磷酸化水平也降低,培养基中 NO 含量减少。这可能是由于 H/R 过程中发生了一些蛋白激酶被抑制或蛋白磷酸酶被激活,或二者均存在所致。已明确 PI3K/Akt 是使 eNOS Ser1177 磷酸化的重要信号通路,大量研究表明缺血再灌注损伤过程中 PI3K/Akt 被抑制而使 Ser1177 磷酸化降低^[9-10]。亦有研究发现 H9C2 细胞 H/R 过程中 Akt 活性下降,eNOS Ser1177 磷酸化水平降低^[11]。因而推测,本实验中 H/R 处理引起的 eNOS Ser1177 位点磷酸化水平降低可能是由于 PI3K/Akt 被抑制所致。根据文献报道,TG 可以激活 PI3K/Akt^[12]。本实验使用 TG 处理 H9C2 细胞,结果显示 TG 可以上调 H/R 引起的 eNOS Ser1177 磷酸化水平降低,提示 H/R 引起的 eNOS Ser1177 水平降低很可能是由 PI3K/Akt 被抑制导致的。继续加用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 后,eNOS Ser1177 水平降低,进一步提示 H/R 过程抑制了 PI3K/Akt 通路,最终导致 eNOS Ser1177 磷酸化过程减少而水平降低。与此同时,eNOS Ser633 磷酸化发生了几乎一致的变化。本研究表明,H/R 过程中 eNOS Ser633 磷酸化减少也是由于 PI3K/Akt 被抑制而引起的。eNOS Ser633 磷酸化可受 PI3K/Akt 通路调控,这一结论与已有文献报道一致。文献报道,在其他生理或病理因素刺激下,如松弛素与糖皮质激素可以通过激活或抑制 PI3K/Akt 信号通路,增加或降低 eNOS Ser633 磷酸化水平^[13-14]。本研究中,PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 使 eNOS Ser1177 和 Ser633 均降低,但稍有区别的是,eNOS Ser633 水平降低至接近 H/R 组水平,而 eNOS Ser1177 水平呈部分降低,提示除 PI3K/Akt 通路外,eNOS Ser1177 还受其他信号通路调控^[15]。

蛋白磷酸酶 1(protein phosphatase 1,PP1)和蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatase 2A,PP2A)在 eNOS 的去磷酸化和酶活性调控中发挥重要作用,PP2A 可以使 eNOS Ser1177 发生去磷酸化^[16]。然而,何种蛋白磷酸酶可使 eNOS Ser633 发生去磷酸化,至今尚未明了。研究表明在心肌缺血/再灌注或 H/R 过程中,PP2A 被激活,使 eNOS Ser1177 发生去磷酸化,加重心肌损伤^[17]。根据文献报道,低剂量的 PP2A/PP1 特异性抑制剂 OA(50 nmol/L)可以抑制 PP2A 活性,而高剂量 OA(1 μ mol/L)

可以抑制 PP2A/PP1 活性^[18]。本文应用低剂量 OA(50 nmol/L)和高剂量 OA(1 μ mol/L)分别预处理 H9C2 细胞,结果发现低、高剂量 OA 预处理均上调了 H/R 损伤过程中 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化水平,且有所区别,eNOS Ser1177 磷酸化水平高剂量 OA 组高于低剂量 OA 组($P<0.05$),而 eNOS Ser633 磷酸化水平在低、高剂量 OA 组间无明显差异。提示在 H9C2 细胞 H/R 损伤中,eNOS Ser1177 和 Ser633 均存在去磷酸化过程增强,eNOS Ser1177 的去磷酸化既有 PP2A 的作用又有 PP1 的作用,而 eNOS Ser633 去磷酸化主要由 PP2A 激活所致。

本研究还检测了培养基中 NO 含量,H/R 组 NO 含量明显降低,TG 处理组和低、高剂量 OA 处理组明显增加,高剂量 OA 组 NO 含量高于低剂量 OA 组,NO 含量变化趋势与 eNOS Ser633、Ser1177 磷酸化变化趋势保持一致,表明 eNOS Ser633 与 Ser1177 磷酸化均是正调控 eNOS 活性的磷酸化位点。

综上所述,H9C2 细胞在 H/R 损伤过程中 eNOS Ser633 磷酸化降低,可能是由于 H/R 损伤导致 PI3K/Akt 信号通路被抑制,同时 PP2A 活性增强的结果。eNOS Ser633 和 Ser1177 磷酸化水平改变均可影响 eNOS 酶活性,从而影响 NO 产量,对心血管系统功能稳态有重要调节作用,可成为临床心血管疾病治疗的靶点。

参考文献

- [1] 鲁雪丽. 基于 PI3K-AKT 信号通路研究参附注射液对糖尿病合并冠心病 ZDF 大鼠模型的保护机制[J]. 临床心血管病杂志,2017,33(5):479-482.
- [2] Lee JU, Bae EH, Ma SK, et al. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases [J]. Chonnam Med J, 2016, 52(2): 81-90.
- [3] Omar MA, Wang L, Clanachan AS. Cardioprotection by GSK-3 inhibition: role of enhanced glycogen synthesis and attenuation of calcium overload[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(3): 478-486.
- [4] Wang J, Ji SY, Liu SZ, et al. Cardioprotective effect of breviscapine: inhibition of apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via the PI3K/Akt/eNOS pathway following simulated ischemia/reperfusion injury[J]. Pharmazie, 2015, 70(9): 593-597.
- [5] Tourki B, Matéo P, Morand J, et al. Lebetin 2, a snake venom-derived natriuretic peptide, attenuates acute myocardial ischemic injury through the modulation of mitochondrial permeability transition pore at the time of reperfusion[J]. Plos One, 2016, 11(9): e0162632.
- [6] Michel T, Vanhoute PM. Cellular signaling and NO production[J]. Pflugers Arch. 2010, 459(6): 807-816.
- [7] 黄华, 丁菁, 栗凤, 等. 葛根素预处理上调内皮型一氧

- 化氮合酶的表达减轻人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(5): 857—862.
- [8] Chen Z, Peng IC, Sun W, et al. AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633[J]. Circ Res, 2009, 104(4): 496—505.
- [9] Lv L, Jiang SS, Xu J, et al. Protective effect of ligustrazine against myocardial ischaemia reperfusion in rats; the role of endothelial nitric oxide synthase[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(1): 20—27.
- [10] 马一铭, 李丽, 郭涛, 等. 体外心脏震波治疗通过 PI3K/AKT 信号传导通路对人脐静脉内皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(1): 79—82.
- [11] He F, Xu B L, Chen C, et al. Methylophiopogonanone A suppresses ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis in mice via activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6): 763—771.
- [12] Huber M, Hughes MR, Krystal G. Thapsigargin-induced degranulation of mast cells is dependent on transient activation of phosphatidylinositol-3 kinase[J]. J Immunol July, 2000, 165(1): 124—133.
- [13] Brecht A, Alexiou K, Bartsch C, et al. Abstract 12951: Relaxin improves experimentally induced endothelial dysfunction via phosphatidylinositol 3-kinase signaling and glucocorticoid receptor-mediated effects[J]. Circulation, 2011, 21: A12951.
- [14] 郭珈宜, 崔宏勋, 郭马珑, 等. 糖皮质激素对骨髓微血管内皮细胞一氧化氮合酶磷酸化的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(7): 1538—1540.
- [15] Schneider JC, El KD, Chéreau C, et al. Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(6): H2311—2319.
- [16] Chen W, Xiao H, Rizzo A N, et al. Endothelial nitric oxide synthase dimerization is regulated by heat shock protein 90 rather than by phosphorylation[J]. PLoS One, 2014, 25, 9(8): e105479.
- [17] Penna C, Tullio F, Perrelli M G, et al. Ischemia/reperfusion injury is increased and cardioprotection by a postconditioning protocol is lost as cardiac hypertrophy develops in nandrolone treated rats. [J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(3): 409—420.
- [18] Amsailale R, Beyaert M, Smal C, et al. Protein phosphatase 2A regulates deoxycytidine kinase activity via Ser-74 dephosphorylation[J]. Febs Letters, 2014, 588(5): 727—732.

(收稿日期: 2017-10-08)