

NRF2 减轻阿霉素诱导的心肌 H9C2 细胞氧化应激和溶酶体功能障碍*

陈芳¹, 邹联洪¹, 刘协红¹, 袁李礼², 蒋宇^{1△}

(¹湖南省人民医院急救医学研究所, 急危重症代谢组学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410005;

²湖南省脑科医院心血管内科, 湖南长沙 410007)

[摘要] 目的: 研究核因子 E2 相关因子 2(NRF2)对阿霉素(又称多柔比星, DOX)诱导的心肌 H9C2 细胞氧化应激和溶酶体功能的影响。方法: 用 DOX 处理大鼠心肌 H9C2 细胞, real-time PCR 和 Western blot 测定细胞中 NRF2 表达的变化;慢病毒感染构建 NRF2 稳定过表达的 H9C2 细胞, real-time PCR 和 Western blot 确认过表达效率;给予 DOX 处理, CCK-8 法检测细胞活力, 检测细胞上清中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)的活性及丙二醛(MDA)的含量;通过 FITC-葡聚糖检测溶酶体 pH 的变化;Western blot 检测溶酶体相关膜蛋白 1(LAMP1)和组织蛋白酶 B(cathepsin B)的表达。结果: DOX 处理后 H9C2 细胞中 NRF2 的 mRNA 和蛋白表达明显减少($P < 0.05$)。NRF2 过表达能够明显上调 DOX 处理的 H9C2 细胞中 NRF2 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$)。DOX 处理后 H9C2 细胞的活力降低, 上清中 LDH 的活性增强, SOD、GSH-Px 和 CAT 的活性降低, MDA 的含量增加($P < 0.05$);细胞溶酶体的 pH 值升高, LAMP1 和 cathepsin B 表达降低($P < 0.05$)。NRF2 过表达增强 H9C2 细胞的活力, 降低 LDH 的活性($P < 0.05$), 提高细胞上清中 SOD、GSH-Px 和 CAT 的活性, 减少 MDA 的含量($P < 0.05$);减轻 DOX 所致的 H9C2 细胞溶酶体 pH 值的升高, 升高 LAMP1 和 cathepsin B 的表达($P < 0.05$)。结论: DOX 处理后 H9C2 细胞的 NRF2 呈低表达;过表达 NRF2 可以减轻 DOX 诱导的心肌 H9C2 细胞氧化应激和溶酶体功能障碍。

[关键词] 核因子 E2 相关因子 2; 多柔比星; 心肌细胞; 氧化应激; 溶酶体

[中图分类号] R329.2⁺5; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.08.003

NRF2 attenuates oxidative stress and lysosomal dysfunction in doxorubicin-induced H9C2 cells

CHEN Fang¹, ZOU Lian-hong¹, LIU Xie-hong¹, YUAN Li-li², JIANG Yu¹

(¹Institute of Emergency Medicine, Hunan Provincial People's Hospital, Hunan Provincial Key Laboratory of Emergency and Critical Care Metabonomics, Changsha 410005, China; ²Department of Cardiology, Brain Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China. E-mail: jiangyu@hunnu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) on oxidative stress injury and lysosomal dysfunction in doxorubicin (DOX)-induced rat myocardial H9C2 cells. **METHODS:** The H9C2 cells were treated with DOX. The expression of NRF2 at mRNA and protein levels was determined by real-time PCR and Western blot. The H9C2 cells stably over-expressing NRF2 were established by lentiviral infection. Real-time PCR and Western blot were used to identify the efficiency of over-expression. After DOX treatment, the cell viability was measured by CCK-8 assay, the activity of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT), and the content of malondialdehyde (MDA) in the cell supernatant were detected. FITC-dextran was used to analyze lysosomal pH, and the protein expression of lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) and cathepsin B was determined by Western blot. **RESULTS:** The expression of NRF2 at mRNA and protein levels in DOX-treated H9C2 cells was significantly decreased ($P < 0.05$). Over-expression of NRF2 significantly up-regulated the mRNA and protein expression of NRF2 in DOX-treated H9C2 cells ($P < 0.05$). After DOX treatment, the cell viability was de-

[收稿日期] 2019-05-05 [修回日期] 2019-06-14

* [基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目 (No. 2018JJ3293; No. 2018JJ3285); 湖南省卫生计生委科研计划课题项目 (No. B20180079)

△通讯作者 Tel: 0731-83929129; E-mail: jiangyu@hunnu.edu.cn

creased, and LDH activity was increased. The activity of SOD, GSH-Px and CAT was decreased, and the content of MDA was increased ($P < 0.05$). The lysosomal pH was increased, and the protein expression of LAMP1 and cathepsin B decreased ($P < 0.05$). Over-expression of NRF2 increased the cell viability, decreased LDH activity, increased the activity of SOD, GSH-Px and CAT, and decreased the content of MDA in cell supernatant ($P < 0.05$). Over-expression of NRF2 also decreased the lysosomal pH, and increased the protein expression of LAMP1 and cathepsin B ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** DOX inhibits the expression of NRF2 in the myocardial H9C2 cells. Over-expression of NRF2 attenuates oxidative stress and lysosomal dysfunction in the H9C2 cells induced by DOX.

[KEY WORDS] Nuclear factor-E2-related factor 2; Doxorubicin; Cardiomyocytes; Oxidative stress; Lysosomes

阿霉素(adriamycin; 又称多柔比星, doxorubicin, DOX)作为一种广谱蒽环类抗肿瘤药物,广泛应用于多种实体肿瘤的化疗^[1]。虽然 DOX 的临床疗效确切,但临床应用受限于其剂量依赖性心肌细胞毒性损伤^[2],探讨相关分子机制有利于寻找合适的心肌细胞保护策略。DOX 引发的自由基形成是导致心肌细胞损伤的重要原因,自由基的产生与氧化应激密切相关,氧化应激损伤能够导致心肌细胞结构和功能的改变^[3]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, NRF2)是细胞调节抗氧化应激反应的一种重要转录因子,通过抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)调控抗氧化基因表达,增加细胞对氧化应激的抗性^[4]。研究报道 NRF2 缺乏加重阿霉素所致心肌毒性和损伤^[5]。溶酶体作为细胞中一类细胞器,富含多种水解酶,控制多种内外源性大分子物质的降解^[6],溶酶体功能失调和氧化应激常能互相调控和影响,互为因果。NRF2 拮抗阿霉素心肌细胞损伤是否与调控溶酶体有关尚不明确。本实验拟采用 DOX 处理大鼠心肌 H9C2 细胞损伤模型,探讨 NRF2 对 H9C2 细胞氧化应激和溶酶体功能障碍的影响,为明确阿霉素心肌细胞损伤的分子机制提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 材料和仪器

大鼠心肌 H9C2 细胞购自中科院上海细胞库。胎牛血清、DMEM 培养基、PBS 缓冲液、胰酶、双抗和 DMSO 购自 Gibco; PrimeScript™ RT reagent Kit 和 TB Green® Premix Ex Taq™ 购自大连宝生物有限公司; CCK-8 检测试剂盒购自上海东仁化学科技有限公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过

氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; NRF2 过表达慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司; FITC-dextran 购自 Sigma; 抗 NRF2、溶酶体相关膜蛋白 1(lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1)和组织蛋白酶 B(cathepsin B)抗体购自 Abcam。CO₂ 培养箱(Thermo); 荧光定量 PCR 仪(ABI); 倒置荧光显微镜(Olympus); 酶标仪(BioTek); 蛋白电泳分离、转膜和成像系统(Bio-Rad)。

2 方法

2.1 细胞培养和模型构建 大鼠心肌 H9C2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,培养条件为 37℃、5% CO₂。细胞生长至 80% ~ 90% 融合度时传代,取状态良好的对数生长期细胞进行实验研究。用 DOX 处理 H9C2 细胞构建损伤模型,DOX 终浓度为 5 μmol/L,处理 48 h 后观察各项指标变化^[7]。

2.2 实验分组 大鼠心肌 H9C2 细胞分为对照组(不做任何处理,control 组)、阿霉素组(5 μmol/L 阿霉素处理,DOX 组)、过表达对照 + 阿霉素组(过表达对照病毒感染再用 5 μmol/L 阿霉素处理,DOX + NC 组)和过表达 NRF2 + 阿霉素组(过表达 NRF2 病毒感染再用 5 μmol/L 阿霉素处理,DOX + NRF2 组)。

2.3 Real-time PCR 检测 H9C2 细胞 NRF2 的 mRNA 表达 大鼠心肌 H9C2 细胞用 TRIzol 裂解液提取总 RNA,操作按试剂说明书进行,再用 PrimeScript™ RT reagent Kit 将 RNA 逆转成 cDNA,操作按试剂盒说明书进行,用 TB Green® Premix Ex Taq™ 进行检测。反应程序为:95℃ 15 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s,共 40 个循环。引物由上海生工生物公司合成,引物序列见表 1。以 GAPDH 作为内参照,采用 2^{-ΔΔCt} 法对 NRF2 mRNA 表达进行相对定量分析^[8]。

表 1 Real-time PCR 实验的引物序列

Table 1. The primer sequences for real-time PCR

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
NRF2	TGTAGATGACCATGAGTTCGCT	TCCATGTCTCTGCTGATGCTG
GAPDH	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	ATGAAGGGGTCTGTTGATGGC

2.4 Western blot 检测 H9C2 细胞 NRF2、LAMP1 和 cathepsin B 的蛋白表达 大鼠心肌 H9C2 细胞用 PBS 缓冲液清洗 3 次,再用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白定量后煮沸变性。配置 10% 的 SDS-PAGE,每个泳道加入 30 μg 总蛋白电泳分离,湿转至 PVDF 膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 I 抗(1:1 000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,II 抗(1:3 000 稀释)室温孵育 1 h,ECL 化学发光后成像系统采集,用 ImageJ 分析条带灰度值,以 β -actin 作为内参照,分析目的蛋白相对表达水平。

2.5 NRF2 稳定过表达 H9C2 细胞构建及过表达效果的检测 大鼠心肌 H9C2 细胞按每皿 10^6 个细胞接种于 60 mm 细胞培养皿中,培养 24 h 后加入 30 μL 携带 NRF2 慢病毒或携带 NC 序列的慢病毒进行感染,48 h 后更换细胞培养液,用含 2 mg/L 嘌呤霉素的细胞培养液进行筛选,每隔 2~3 d 进行细胞传代,培养 2 周后获得 NRF2 稳定过表达的 H9C2 细胞,采用 real-time PCR 和 Western blot 检测 NRF2 的 mRNA 和蛋白表达情况,明确过表达效果,步骤同上。

2.6 CCK-8 法检测 H9C2 细胞的活力 大鼠心肌 H9C2 细胞按每孔 10^3 个细胞接种于 96 孔板,依照不同分组进行实验操作,48 h 后每孔中加入 10 μL 的 CCK8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后测定波长 450 nm 的吸光度(A)值,以对照组为参照,计算其它各组 H9C2 细胞相对活力。

2.7 H9C2 细胞上清 LDH、SOD、GSH-Px 和 CAT 活性及 MDA 含量的检测 大鼠心肌 H9C2 细胞按每孔 10^3 个细胞接种于 96 孔板,依照不同分组进行实验操作,48 h 后收集细胞培养液上清,采用比色法检测 LDH 活性,羟胺法检测 SOD 活性,比色法检测 GSH-Px 活性,可见光法检测 CAT 活性,TBA 法检测 MDA

含量,所有操作均按试剂盒说明书进行。

2.8 FITC-葡聚糖检测 H9C2 细胞溶酶体 pH 值^[9]

大鼠心肌 H9C2 细胞按每皿 10^6 个细胞接种于 60 mm 细胞培养皿中,依照不同分组进行实验操作,48 h 后各皿加入终浓度为 0.2 g/L 的 FITC-葡聚糖,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h,利用 PBS 缓冲液清洗细胞 3 遍,去除细胞外过量的葡聚糖。荧光显微镜下采集波长为 490 nm 激发光下的荧光图片,随机选择 10 个视野,分析荧光强度,并参照标准曲线换算 pH 值。

3 统计学分析

GraphPad Prism 5 软件进行图形绘制和统计学分析。数据采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 Bonferroni 校正的 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 DOX 处理抑制心肌 H9C2 细胞 NRF2 的表达

Real-time PCR 和 Western blot 检测结果显示,经 5 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理后,心肌 H9C2 细胞 NRF2 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低($P < 0.05$),见图 1。这提示 DOX 能够抑制心肌 H9C2 细胞中 NRF2 的表达。

2 过表达 NRF2 能有效促进 DOX 处理的心肌 H9C2 细胞 NRF2 的表达

Real-time PCR 和 Western blot 检测结果显示,心肌 H9C2 细胞感染 NRF2 过表达慢病毒后再经 5 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理,细胞中 NRF2 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.05$),见图 2。这提示 NRF2 过表达能有效促进 DOX 处理的心肌 H9C2 细胞 NRF2 的表达水平。

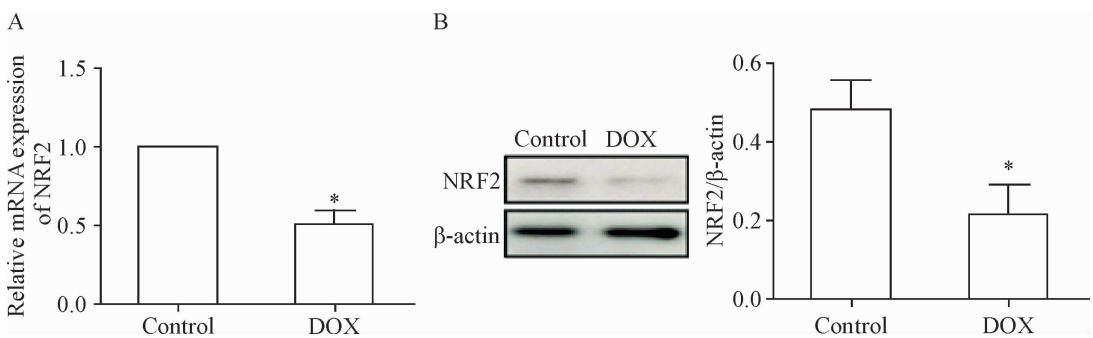


Figure 1. The change of NRF2 expression in H9C2 cells after DOX treatment. A: the results of real-time PCR for detecting NRF2 mRNA expression level; B: the results of Western blot for detecting the NRF2 protein expression level. Mean \pm SD. $n = 6$.

* $P < 0.05$ vs control group.

图 1 DOX 处理后心肌 H9C2 细胞 NRF2 表达水平的变化

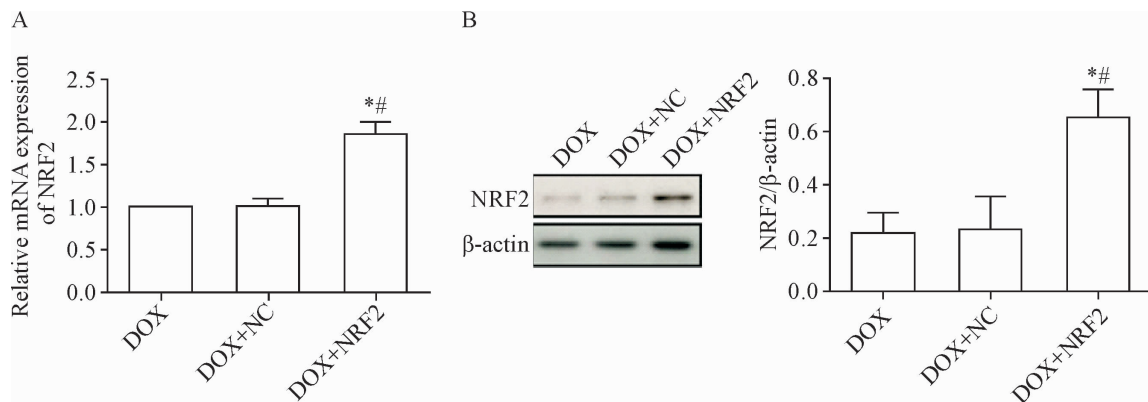


Figure 2. The effect of lentivirus infection on the expression of NRF2 in the H9C2 cells treated with DOX. A: the results of real-time PCR for detecting the effect of NRF2 lentivirus infection on NRF2 mRNA expression level; B: the results of Western blot for detecting the effect of NRF2 lentivirus infection on NRF2 protein expression level. Mean ± SD. n = 6. * P < 0.05 vs DOX group; # P < 0.05 vs DOX + NC group.

图2 慢病毒感染对DOX处理后心肌H9C2细胞NRF2的过表达效果

3 过表达 NRF2 减轻 DOX 诱导的 H9C2 细胞损伤

CCK-8 实验和 LDH 检测结果显示, DOX 处理后心肌 H9C2 细胞的活力降低, LDH 产生和释放增多 (P < 0.05); NRF2 过表达提高细胞活力, 减少 LDH 产生和释放 (P < 0.05), 见表 2, 提示过表达 NRF2 能减轻 DOX 诱导的 H9C2 细胞损伤。

4 过表达 NRF2 减轻 DOX 诱导的 H9C2 细胞氧化应激

DOX 处理后心肌 H9C2 细胞上清中 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性降低, MDA 含量增加 (P < 0.05); NRF2 过表达提高细胞上清中 SOD、GSH-Px 和 CAT

活性, 减少 MDA 含量 (P < 0.05), 见表 3, 提示过表达 NRF2 能减轻 DOX 诱导的 H9C2 细胞氧化应激。

表 2 各组心肌 H9C2 细胞损伤指标的比较

Table 2. The cell viability and the activity of LDH in the H9C2 cells of each group (Mean ± SD. n = 6)

Group	Relative cell viability	LDH (U/L)
Control	1.00	111.8 ± 11.6
DOX	0.55 ± 0.10 [*]	273.8 ± 14.7 [*]
DOX + NC	0.53 ± 0.09	270.3 ± 14.6
DOX + NRF2	0.75 ± 0.08 [#]	174.7 ± 15.0 [#]

* P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs DOX + NC group.

表 3 各组心肌 H9C2 细胞氧化应激指标的比较

Table 3. The activity of SOD, GSH-Px and CAT and the content of MDA in the H9C2 cells of each group (Mean ± SD. n = 6)

Group	SOD (U/L)	GSH-Px (U/L)	CAT (U/L)	MDA (μmol/L)
Control	179.5 ± 14.9	217.0 ± 14.6	135.3 ± 10.4	6.6 ± 0.9
DOX	76.7 ± 10.6 [*]	115.5 ± 14.5 [*]	78.2 ± 9.8 [*]	12.8 ± 1.2 [*]
DOX + NC	79.5 ± 11.2	113.2 ± 11.9	76.2 ± 11.0	13.2 ± 1.1
DOX + NRF2	134.5 ± 13.7 [#]	175.0 ± 14.3 [#]	106.5 ± 11.9 [#]	8.9 ± 1.2 [#]

* P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs DOX + NC group.

5 过表达 NRF2 减轻 DOX 诱导的 H9C2 细胞溶酶体功能障碍

DOX 处理后心肌 H9C2 细胞溶酶体 pH 值升高, LAMP1 和 cathepsin B 蛋白表达降低 (P < 0.05); NRF2 过表达降低细胞溶酶体 pH 值, 升高 LAMP1 和 cathepsin B 蛋白表达 (P < 0.05), 见图 3, 提示过表达 NRF2 能减轻 DOX 诱导的 H9C2 细胞溶酶体功能障碍。

讨 论

肿瘤相关死亡是全球人口死亡的主要原因^[10],

肿瘤筛查策略和各种新型抗肿瘤药物的发展延长了肿瘤患者的生存期, 但抗肿瘤药物也有着严重的副作用, DOX 作为一种衍生于链霉素的蒽环类抗肿瘤药物, 常用于白血病及多种实体瘤的化疗^[11]。然而, DOX 对于心肌细胞的剂量依赖性毒性作用是化疗期间备受关注的问题。氧化应激是 DOX 诱导心肌细胞损伤的主要病理生理机制之一, 活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 和抗氧化物质的失衡导致氧化应激^[12]。有研究报道 DOX 的累积剂量超过 500 mg/m², 会引起氧化应激的增强。本实验表明, DOX 处理后的 H9C2 细胞活力降低, LDH 生成和释放增多;

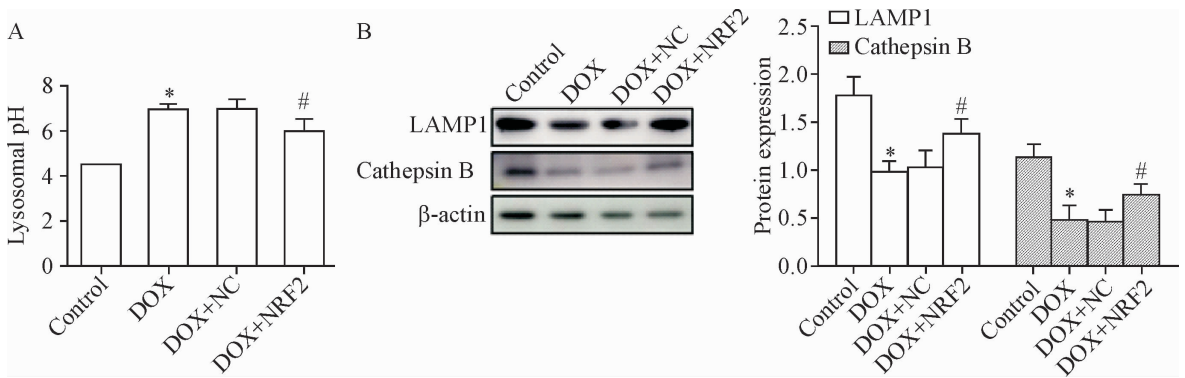


Figure 3. The change of lysosomal pH and the protein expression of LAMP1 and cathepsin B in the H9C2 cells of each group. A: the result of lysosomal pH calculated by FITC-dextran; B: the results of Western blot for detecting the protein expression level of LAMP1 and cathepsin B. Mean \pm SD. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs DOX + NC group.

图3 各组心肌H9C2细胞溶酶体pH值和溶酶体相关蛋白表达变化

细胞氧化应激增加,表现为SOD、GSH-Px和CAT的活性降低,以及MDA含量增加,说明DOX诱导的心肌细胞损伤和氧化应激模型构建成功。

NRF2是由NFE2L2基因编码的转录因子,是一种碱性亮氨酸拉链蛋白,其能够调节抗氧化蛋白的表达以抵抗氧化损伤^[13]。在基础条件下,NRF2通过与细胞质结合蛋白Keap1相结合形成复合物,减少NRF2入核及下游抗氧化酶的基因转录,包括NADPH:醌氧化还原酶1、血红素加氧酶1和谷胱甘肽S-转移酶等^[14]。本实验表明,DOX处理后的心肌H9C2细胞中的NRF2表达降低,NRF2过表达的H9C2细胞活力增加,LDH生成和释放减少;细胞氧化应激减少,表现为SOD、GSH-Px和CAT活性的增加,以及MDA含量减少,说明NRF2具有抗DOX诱导的心肌H9C2细胞损伤和氧化应激的作用。

溶酶体是一种膜包裹的囊状细胞器,富含大量水解酶,在酸性条件下活性较高。一些刺激因素作用下,溶酶体膜完整性和功能遭到破坏,不能清除细胞内有害物质,并释放一些水解酶而导致细胞损伤。LAMP1是位于溶酶体膜上的一类特异的蛋白质,作为一种溶酶体标志物,其蛋白表达水平能反映溶酶体功能情况^[15]。而溶酶体功能也与其pH值密切相关,正常pH范围为3.5~5.5,酸性环境被认为有利于溶酶体水解酶发挥作用^[16],cathepsin B则是溶酶体水解酶其中的一种半胱氨酸蛋白酶类。这些指标均常用于溶酶体功能的检测,有研究报道酸性pH能诱导LAMP1蛋白结合能力^[17],此外酸性环境也能够诱导cathepsin B在细胞内的重新分布和分泌^[18]。本研究结果显示,DOX处理后溶酶体pH升高,降低LAMP1和cathepsin B蛋白的表达,说明DOX所致的H9C2细胞损伤模型中存在溶酶体功能障碍。有关NRF2调控溶酶体的报道很少,有研究表明,NRF2能

通过LAMP2A调控溶酶体介导的自噬^[18]。本研究结果显示,过表达NRF2能够降低DOX所致的细胞溶酶体pH值升高,增加LAMP1和cathepsin B蛋白的表达,表明过表达NRF2能减轻DOX诱导H9C2细胞溶酶体功能障碍。氧化应激过程中产生的ROS能造成溶酶体膜稳定性下降,使得溶酶体内部水解酶释放,造成细胞损伤^[19],其次ROS能与蛋白质发生反应,破坏蛋白质的空间结构,构象异常的蛋白质通过溶酶体降解^[20]。另有研究报道溶酶体稳定性和功能破坏后释放出的水解酶能够作用于线粒体,破坏线粒体膜稳定性,从而促进氧化物的生成^[21]。

综上所述,阿霉素可导致NRF2表达减少,是DOX导致心肌损伤的机制之一,过表达NRF2可能通过减轻氧化应激和溶酶体功能障碍发挥抗DOX损伤作用,这对于研究阿霉素心肌细胞损伤的病理生理机制具有重要意义。但本实验存在一定的局限性,仅在H9C2细胞系中进行研究,并没有在整体动物模型或原代心肌细胞中进行探讨,还需要在后续实验中进行验证。

[参 考 文 献]

- [1] Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, et al. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside [J]. Drug Discov Today, 2017, 22(2):270-281.
- [2] Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, et al. Toxicity of doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. Life Sci, 2018, 200:26-30.
- [3] Mei SB, Hong L, Cai XY, et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Toxicol Lett, 2019, 307(1):41-48.
- [4] Zhang H, Davies KJ, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(Pt B):314-336.

- [5] Tomlinson L, Lu ZQ, Bentley RA, et al. Attenuation of doxorubicin-induced cardiotoxicity in a human *in vitro* cardiac model by the induction of the NRF-2 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112:108637.
- [6] Lawrence RE, Zoncu R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(2):133-142.
- [7] 王朝华, 徐勤, 肖慧琼, 等. 丹参酮 II A 通过 AMPK 介导的自噬减轻阿霉素所致 H9c2 心肌细胞损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(3):406-410.
- [8] Adnan M, Morton G, Hadi S. Analysis of *rpoS* and *bola* gene expression under various stress-induced environments in planktonic and biofilm phase using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(1-2):275-282.
- [9] Canton J, Grinstein S. Measuring phagosomal pH by fluorescence microscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1519:185-199.
- [10] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7-30.
- [11] Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, et al. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(9):2063-2076.
- [12] Donato C, Antonella DA, Luigi S, et al. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:1521020.
- [13] 林晓萍, 李雯, 沈华浩. 抗氧化应激转录因子-Nrf2 的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(6):1234-1239.
- [14] Schmidlin CJ, Dodson MB, Madhavan L, et al. Redox regulation by NRF2 in aging and disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 134:702-707.
- [15] 熊静薇, 毛雨, 李荣荣, 等. 布比卡因增强小鼠成肌细胞溶酶体的活性 [J]. *实用老年医学*, 2015(6):461-463.
- [16] Lassen K, McKenzie C, Mari M, et al. Genetic coding variant in GPR65 alters lysosomal pH and links lysosomal dysfunction with colitis risk [J]. *Immunity*, 2016, 44(6):1392-1405.
- [17] Li S, Sun Z, Pryce R, et al. Acidic pH-Induced Conformations and LAMP1 Binding of the Lassa Virus Glycoprotein Spike [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(2):e1005418.
- [18] Ruzza P, Quintieri L, Osler A, et al. Fluorescent, internally quenched, peptides for exploring the pH-dependent substrate specificity of cathepsin B [J]. *J Pept Sci*, 2006, 12(7):455-461.
- [19] Marta P, Rojo AI, Esperanza A, et al. Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A [J]. *Autophagy*, 2018, 14(8):1310-1322.
- [20] Cai X, Liu Y, Hu Y, et al. ROS-mediated lysosomal membrane permeabilization is involved in bupivacaine-induced death of rabbit intervertebral disc cells [J]. *Redox Biol*, 2018, 18:65-76.
- [21] Rodacka, Aleksandra. The effect of radiation-induced reactive oxygen species (ROS) on the structural and functional properties of yeast alcohol dehydrogenase (YADH) [J]. *Int J Radiat Biol*, 2016, 92(1):11-23.

(责任编辑: 陈妙玲, 罗森)