

麦角甾苷通过PI3K/Akt/GSK3 β 通路抑制H₂O₂诱导的小鼠胚胎肝细胞凋亡

赵培¹ 叶婷杰² 闫晓风² 王晓玲^{2*}

(¹上海中医药大学基础医学院公共实验平台, 上海 201203; ²上海中医药大学基础医学院生物教研室, 上海 201203)

摘要 该文建立了H₂O₂诱导小鼠胚胎肝细胞损伤模型, 并探讨了麦角甾苷通过PI3K/Akt/GSK3 β 通路抑制H₂O₂诱导的胚胎肝细胞凋亡作用机制。CCK-8检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot法检测Bcl-xL、Bax、Cyt-c、Akt、p-Akt、GSK3 β 和p-GSK3 β 蛋白质水平。结果显示, 麦角甾苷可通过降低Bax/Bcl-xL比值、抑制线粒体Cyt-c释放、增加Akt和GSK3 β 蛋白质磷酸化水平来提高细胞存活率、减少凋亡细胞数量。该研究结果表明, 麦角甾苷可通过PI3K/Akt/GSK3 β 通路调节H₂O₂诱导的小鼠胚胎肝细胞凋亡。

关键词 麦角甾苷; 过氧化氢; 细胞凋亡

Acteoside Protected Hepatocytes from H₂O₂-Induced Apoptosis by PI3K/Akt/GSK3 β Pathway

Zhao Pei¹, Ye Tingjie², Yan Xiaofeng², Wang Xiaoling^{2*}

(¹The Public Experiment Platform, School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

²Department of Biology, School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract In the present study, we investigated that acteoside inhibited the H₂O₂-induced apoptosis through PI3K/Akt/GSK3 β signal pathway. H₂O₂ was used to induce injury of fetal hepatocyte from mice. Cell viability was determined by CCK-8 assay, and apoptosis was assayed by flow cytometry. Western blot was used to investigate protein levels of Bcl-xL, Bax, Cyt-c, Akt, p-Akt, GSK3 β and p-GSK3 β . Compared with H₂O₂, acteoside can increase the cell viability and decrease the numbers of apoptotic cells. Meanwhile, the ratio of Bax/Bcl-xL down-regulated. The release of Cyt-c from mitochondria into cytoplasm inhibited. The phosphorylation of Akt and GSK3 β enhanced. These results suggested that acteoside protected fetal hepatocytes of mice from H₂O₂-induced apoptosis by PI3K/Akt/GSK3 β signal pathway.

Keywords acteoside; H₂O₂; apoptosis

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是细胞应对机体内、外环境激发的细胞内程序性死亡方式, 也是维持机体内环境稳定的重要细胞学基础。磷脂酰肌

醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, 又称Akt)/糖原合酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)信号通路

收稿日期: 2016-09-21 接受日期: 2016-11-14

国家自然科学基金(批准号: 81503367)和上海市教委预算内项目(批准号: 2012JW01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-51322585, E-mail: wxlzx@sohu.com

Received: September 21, 2016 Accepted: November 14, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81503367) and the Budget Research Project of Shanghai Education Commission (Grant No.2012JW01)

*Corresponding author. Tel: +86-21-51322585, E-mail: wxlzx@sohu.com

网络出版时间: 2016-12-28 16:27:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161228.1627.010.html>

是细胞内重要的信号转导通路,在细胞凋亡、存活以及增殖等活动中发挥重要的生物学功能^[1-2]。该通路对活性氧(reactive oxygen species, ROS)刺激也可作出应答,引发细胞生物学变化^[3]。H₂O₂是强氧化剂可破坏细胞内部氧化-抗氧化平衡系统,形成大量过氧化终产物,继而影响细胞存活,促进细胞凋亡^[4],但H₂O₂对PI3K/Akt/GSK3 β 通路影响的机制仍不清楚。

正常肝实质细胞较少发生细胞凋亡,但在炎症、ROS等病理因素刺激下,过量肝实质细胞发生凋亡。各种原因导致肝实质细胞数量减少,都可造成肝损伤^[5-6]。因此,及时干预肝实质细胞的凋亡是抵抗肝损伤的有效方法之一。

麦角甾苷(acteoside)又名毛蕊花糖苷或毛蕊花苷,是中药材生地黄和熟地黄中稳定的化学成分,可作为两者质量控制的指标^[7],但目前麦角甾苷的生物学功能研究较少,其药理机制不甚明了。本文以H₂O₂诱导肝细胞损伤、凋亡,研究麦角甾苷保护肝细胞、抑制细胞凋亡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

BNL.CL.2小鼠胚胎肝细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,DMEM基础培养液(Gibco公司)+10%胎牛血清FBS(Gibco公司)培养。麦角甾苷自上海纯优生物有限公司。LY294002购自Abcam公司。30%过氧化氢溶液购自国药集团化学试剂有限公司。CCK-8细胞活力检测试剂盒购自日本同仁化学。TBARS检测试剂盒购自Cayman公司。Annexin V细胞凋亡检测试剂盒购自BD公司。线粒体抽提试剂盒购自上海索莱宝科技有限公司。BCA蛋白含量检测试剂盒、细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司。Akt、p-Akt、GSK3 β 、p-GSK3 β 、Bcl-xL(B-cell lymphoma-2)、Bax、细胞色素-c(cytochrome-c, Cyt-c)、CoxIV和 β -actin抗体购自Cell Signaling Technology公司。HRP标记羊抗兔二抗购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK8测定细胞存活率 细胞接种于96孔板(4 000/孔),24 h后用不同浓度麦角甾苷(以0.1% DMSO溶解,2% FBS-DMEM培养液稀释至终浓度)预处理20 h,添加400 μ mol/L H₂O₂共同处理4 h。每孔加

入10 μ L CCK8溶液,于37 $^{\circ}$ C孵箱内孵育2 h后,再用酶标仪测吸光度(D_{450})。细胞存活率=(处理组吸光度-空白对照组吸光度)/(正常对照组吸光度-空白对照组吸光度) \times 100%。每组设4个复孔,实验重复3次。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞接种在60 mm培养皿中,24 h后用麦角甾苷预处理20 h,添加400 μ mol/L H₂O₂共同作用4 h。收集细胞,预冷的PBS洗3次,每次5 min,0.25%胰酶消化细胞,4 $^{\circ}$ C下3 000 \times g离心10 min。将细胞重悬在1 \times Annexin V结合缓冲液中(确保细胞浓度1 \times 10⁶/mL),加入5 μ L Annexin V和5 μ L PI,室温避光孵育15 min,置冰上,轻轻混匀,1 h内上流式细胞仪检测。实验重复3次。

1.2.3 线粒体蛋白质抽提 收集细胞,加入200 μ L预冷的Mito-Cyto缓冲液重悬细胞,将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内,0 $^{\circ}$ C冰上研磨50次。4 $^{\circ}$ C下1 000 \times g离心5 min。取上清转移至新的离心管中,4 $^{\circ}$ C下1 000 \times g再次离心5 min。取上清转移至新的离心管中,4 $^{\circ}$ C下12 000 \times g离心10 min,离心后的上清转移至新离心管中含胞质成分,沉淀为线粒体。加入100 μ L Mito-Cyto缓冲液重悬线粒体沉淀,4 $^{\circ}$ C下12 000 \times g离心10 min,弃上清。加入20 μ L Mito-Cyto缓冲液重悬线粒体沉淀。

1.2.4 Western blot检测蛋白质水平 细胞接种在60 mm培养皿中,选择麦角甾苷(终浓度分别为10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ mol/L)预处理20 h,添加400 μ mol/L H₂O₂共同处理4 h。根据实验结果选择10⁻⁶ mol/L麦角甾苷分别处理12、24、48 h,收获细胞之前4 h加入400 μ mol/L H₂O₂共同处理。用预冷的PBS洗涤细胞2次,加入细胞裂解液(RIPA,含1% PMSF)裂解细胞,BCA法测定蛋白质浓度。SDS-PAGE电泳,湿法转膜转印蛋白质至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入相应一抗(Bax为1:1 000, Bcl-xL为1:1 000, Akt为1:1 000, p-Akt为1:1 000, GSK3 β 为1:1 000, p-GSK3 β 为1:1 000, Cyt-c为1:1 000, CoxIV为1:1 000和 β -actin为1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗3次,每次10 min。加入HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育2 h, TBST洗3次, ECL化学发光,成像系统中曝光拍摄。用Image J图像分析软件对条带进行灰度分析,目的蛋白质与内参蛋白质的灰度比值来代表各自的蛋白质含量。实验重复3次。

1.2.5 TBARS法检测细胞内丙二醛含量 细胞接种在60 mm培养皿中,10⁻⁶ mol/L终浓度麦角甾苷预

处理22 h, 添加400 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂继续作用2 h。收集细胞($1 \times 10^6/\text{mL}$), 冰浴超声破碎细胞3次, 40 V/10 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $1\ 600 \times g$ 离心10 min, 收集上清液。根据TBARS试剂盒说明添加各试剂后, 激发光波长530 nm/吸收光波长550 nm, 酶标仪检测荧光值, MDA含量(%)=各组荧光值/正常对照组荧光值 $\times 100\%$ 。

1.3 统计方法

所得实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 15.0软件进行分析, Graph Prism 5.0生物医学软件作图。两组之间比较采用 t 检验, 多组间两两比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 麦角甾苷对H₂O₂损伤肝细胞存活率的影响

分别以5个不同浓度的麦角甾苷(0、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L)处理肝细胞24 h。结果显示, 从 10^{-7} ~ 10^{-4} mol/L浓度的麦角甾苷对细胞存活率均无显著影响, 表明麦角甾苷无明显的细胞毒性(图1)。H₂O₂作用后细胞存活率显著下降($P < 0.01$), 而麦角甾苷在 10^{-6} ~ 10^{-4} mol/L浓度范围内均可显著增加细胞存活率($P < 0.01$, 图1)。

2.2 麦角甾苷对H₂O₂诱导肝细胞内氧化损伤的影响

蛋白质的羰基化水平(protein carbonyl content, PCC)是评价蛋白质总体氧化水平的重要指标, 正常肝细胞内有一定的蛋白质羰基化水平。但H₂O₂作

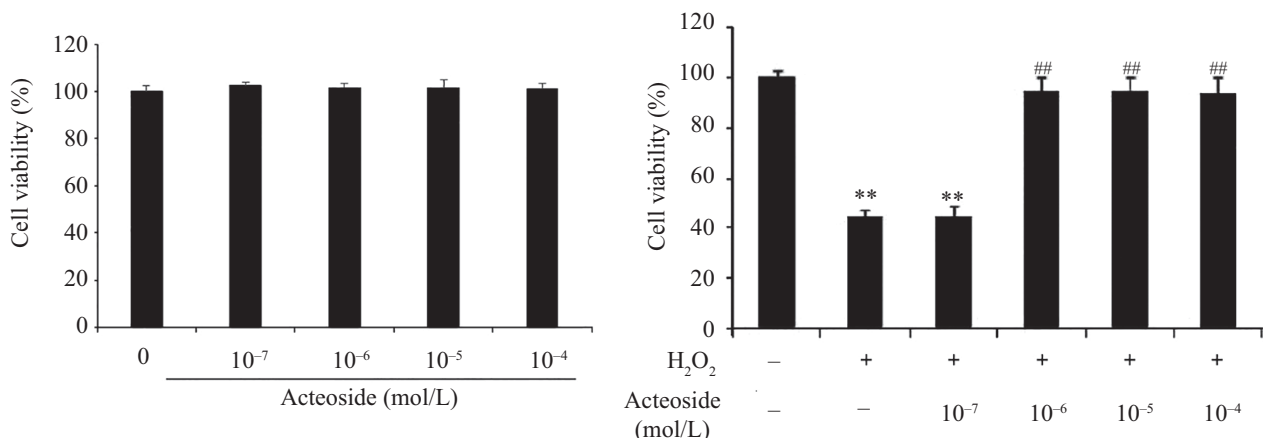
用后, 细胞内蛋白质羰基化水平明显增加, 麦角甾苷可抑制H₂O₂引起的细胞内蛋白质羰基化水平增加(图2)。丙二醛(malondialdehyde, MDA)是脂质过氧化的最终产物, H₂O₂处理后肝细胞MDA含量升高, 达到正常对照组的 $127.74\% \pm 2.45\%$; 而麦角甾苷组MDA含量下降到正常对照组的 $105.26\% \pm 0.60\%$, 有显著的统计学差异($P < 0.01$, 图2)。

2.3 麦角甾苷对H₂O₂诱导细胞凋亡的影响

细胞经Annexin V-FITC/PI染色后, 经流式细胞术检测细胞凋亡率。结果发现, H₂O₂处理细胞后, 细胞凋亡率增加到 $15.33\% \pm 2.61\%$, 而对照组细胞凋亡率仅为 $7.11\% \pm 1.17\%$, 麦角甾苷组细胞凋亡率减少为 $12.25\% \pm 2.52\%$ ($P < 0.05$)(图3), 显示麦角甾苷可以保护肝细胞, 减少H₂O₂诱导的凋亡细胞数。

2.4 麦角甾苷对H₂O₂处理细胞凋亡相关蛋白质的影响

通过Western blot方法检测凋亡相关蛋白表达水平。结果显示, H₂O₂处理肝细胞后, 促凋亡蛋白质Bax的水平显著升高, 抗凋亡蛋白质Bcl-xL的水平明显降低, Bax/Bcl-xL比值较正常对照组显著升高($P < 0.001$)。不同浓度(10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L)麦角甾苷分别预处理细胞20 h后, 加入H₂O₂继续作用4 h, 各浓度组Bax/Bcl-xL比值均显著降低($P < 0.001$, 图4)。随后, 选择 10^{-6} mol/L麦角甾苷分别预处理细胞12、24、48 h, 结果显示, Bax/Bcl-xL的比值随着作用时间延长逐渐降低($P < 0.001$, 图4)。这些结果显示, 麦角甾苷抑制凋亡相关蛋白质水平呈剂量和时间依

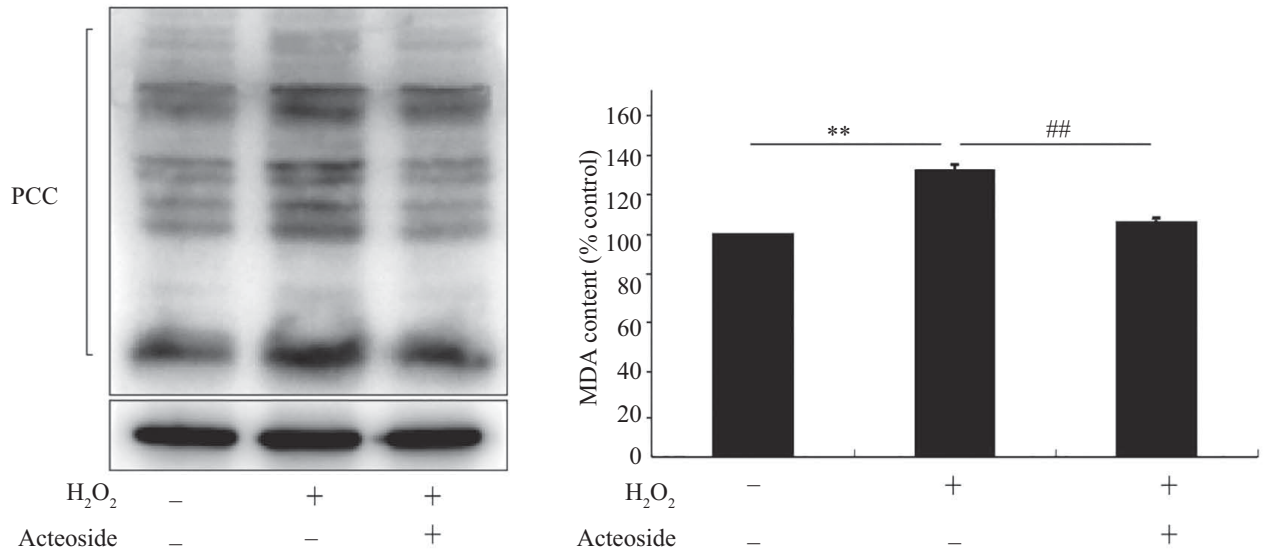


** $P < 0.01$, 与对照组比较; ## $P < 0.01$, 与H₂O₂组比较。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs H₂O₂ group.

图1 麦角甾苷对H₂O₂诱导细胞存活率的影响

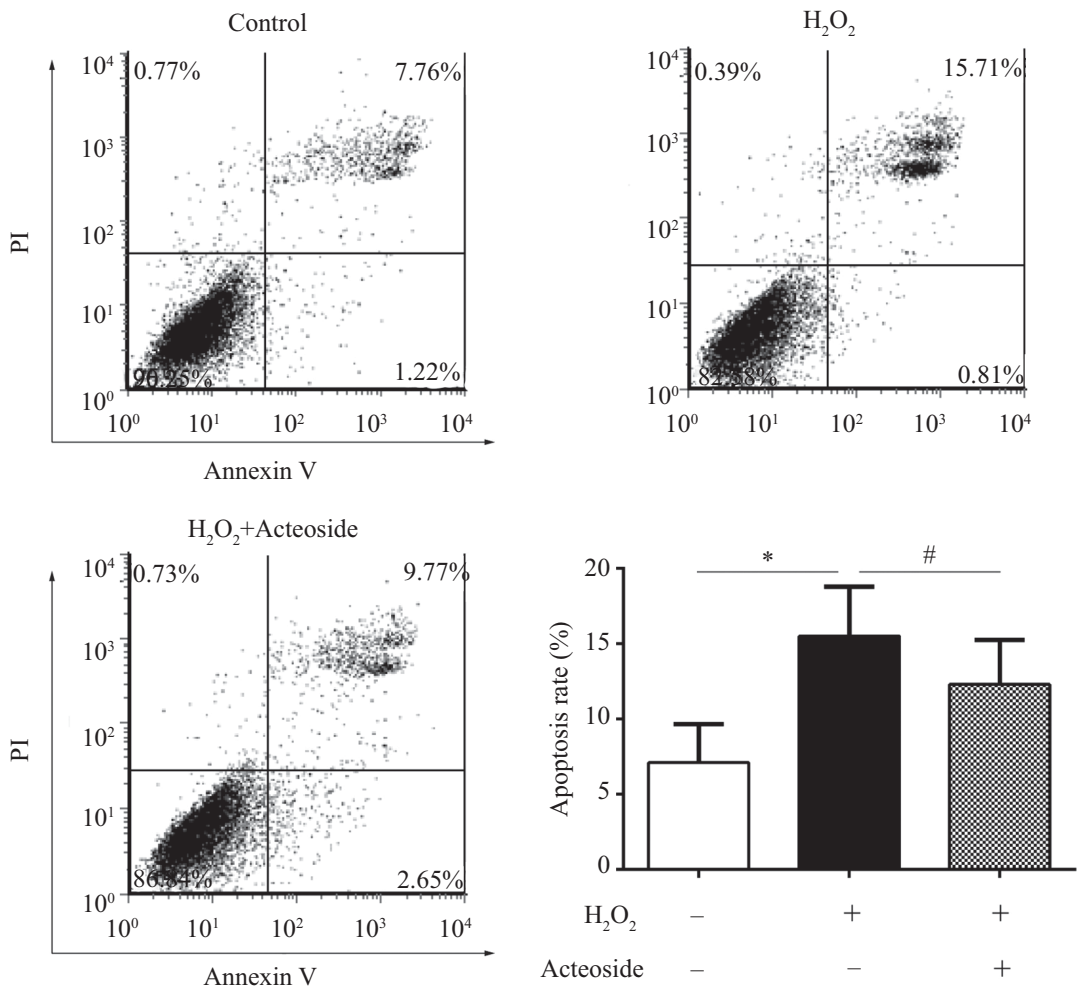
Fig.1 The effect of acteoside on viability of H₂O₂-induced cells



***P*<0.01, ##*P*<0.01.

图2 麦角甾苷对H₂O₂诱导细胞内过氧化水平的影响

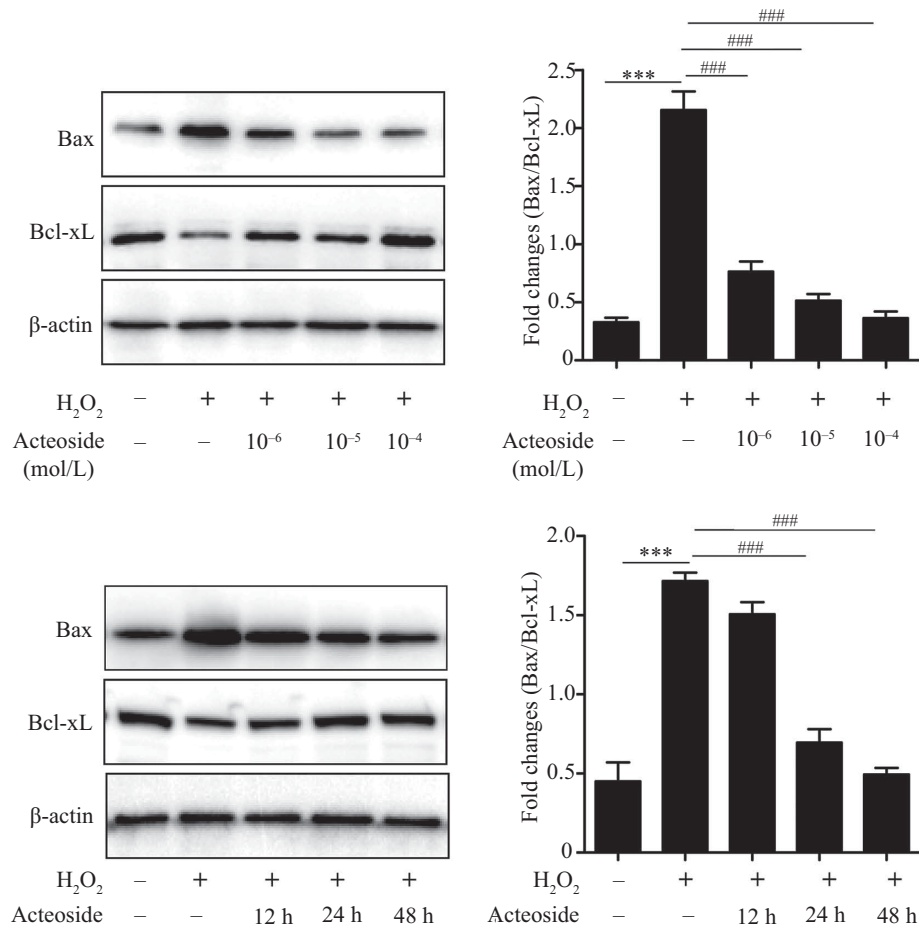
Fig.2 The effect of acteoside on peroxide content in H₂O₂-induced cells



**P*<0.05, #*P*<0.05.

图3 麦角甾苷对肝细胞凋亡的影响

Fig.3 The effect of acteoside on the apoptosis of hepatocytes



*** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$.

图4 麦角甾苷对肝细胞凋亡相关蛋白质水平的影响

Fig.4 The effect of acteoside on the levels of apoptosis related proteins in hepatocytes

赖性。

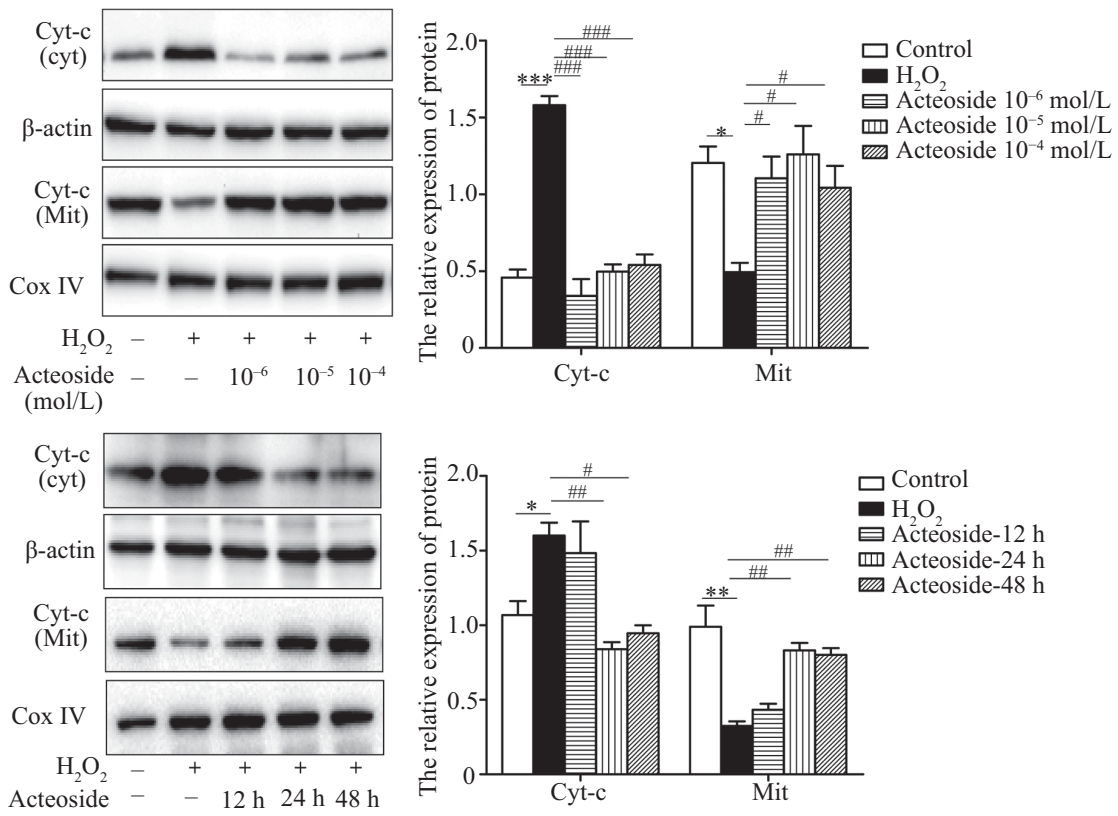
2.5 麦角甾苷对H₂O₂诱导线粒体Cyt-c释放的影响

正常细胞中Cyt-c主要存在于线粒体,细胞发生凋亡时Cyt-c从线粒体释放到胞质中。H₂O₂处理肝细胞后,线粒体中Cyt-c含量明显降低($P < 0.05$),同时胞质中Cyt-c含量显著增高($P < 0.001$),提示Cyt-c从线粒体释放到了胞质中。以不同浓度(10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ mol/L)麦角甾苷分别预处理细胞20 h后,再加入H₂O₂共同作用4 h,发现各浓度组线粒体Cyt-c含量均增高($P < 0.05$),而同时胞质中Cyt-c含量均降低($P < 0.001$,图5)。随后,选择10⁻⁶ mol/L麦角甾苷分别预处理细胞12、24、48 h,结果发现,随着时间的延长Cyt-c含量在线粒体中逐渐增加而胞质中逐渐减少($P < 0.05$, $P < 0.01$,图5)。这些结果显示,麦角甾苷可抑制Cyt-c从线粒体释放,而且这种作用呈剂量和时间依赖性。

2.6 麦角甾苷对PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路的影响

LY294002是PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路中第一

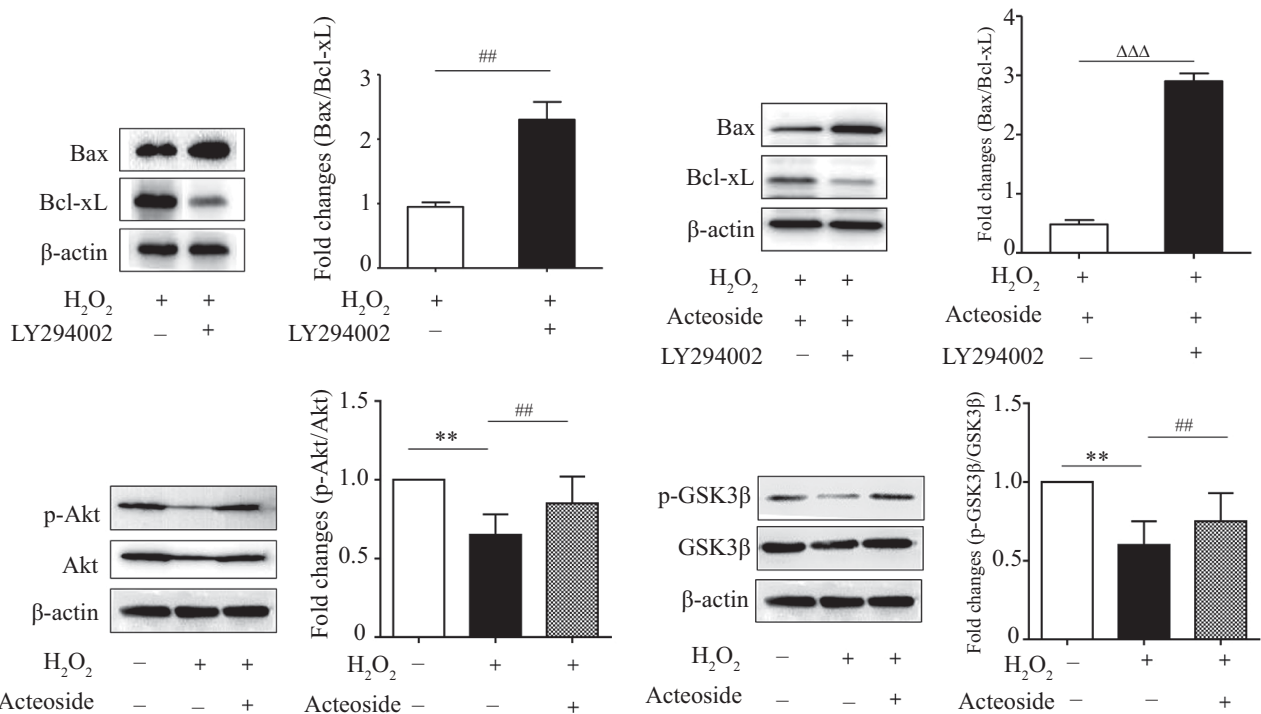
个蛋白质PI3K的特异抑制剂,其主要作用是使Akt失活,从而诱导细胞凋亡增加、增值减少^[8]。实验结果显示,LY294002可显著增加促凋亡蛋白质Bax的水平,抑制抗凋亡蛋白质Bcl-xL水平,Bax/Bcl-xL比值也显著增加(图6),与H₂O₂的作用效果相似(图4A和图4B)。这表明,抑制该信号通路可促进肝细胞凋亡,H₂O₂也是通过抑制该通路从而触发了细胞凋亡。将麦角甾苷与H₂O₂联合应用作为对照,观察LY294002对麦角甾苷作用效果的影响,结果显示,10⁻⁶ mol/L麦角甾苷+H₂O₂+LY294002组较10⁻⁶ mol/L麦角甾苷+H₂O₂组抗凋亡蛋白质Bcl-xL水平降低,促凋亡蛋白质Bax水平升高,Bax/Bcl-xL的比值也显著升高($P < 0.001$),表明阻断PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路后,麦角甾苷抗凋亡作用减弱(图6)。以上结果提示,PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路参与了麦角甾苷抑制H₂O₂诱导的肝细胞凋亡。进一步检测Akt和GSK3 β 蛋白质的磷酸化发现,H₂O₂均抑制了p-Akt和



P*<0.05, *P*<0.01, ****P*<0.001, #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.001.

图5 麦角甾苷对肝细胞Cyt-c释放的影响

Fig.5 Effects of acteoside on the release of Cyt-c in hepatocytes



***P*<0.01, #*P*<0.01, ΔΔΔ*P*<0.001.

图6 麦角甾苷对肝细胞PI3K/Akt/GSK3β信号通路的影响

Fig.6 The effect of acteoside on PI3K/Akt/GSK3β signal pathways

p-GSK3 β 的水平, 而麦角甾苷均逆转了H₂O₂对p-Akt, p-GSK3 β 蛋白质水平的抑制($P < 0.01$, 图6)。这些结果提示, 麦角甾苷可拮抗H₂O₂对PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路的抑制作用。

3 讨论

细胞内ROS是诱导细胞凋亡的关键因素之一。H₂O₂是强氧化剂, 极易通过细胞膜进入细胞发生Fenton反应, 破坏细胞内部的氧化-抗氧化平衡系统, 产生大量自由基, 继而影响细胞存活促进细胞凋亡^[9-10]。因此在体外研究中, H₂O₂常被应用于诱导过氧化损伤的模型。本研究结果发现, H₂O₂作用细胞后, 细胞内MDA含量增加、羰基化蛋白质水平增加, 表明H₂O₂使细胞内的氧化应激水平增加并最终导致细胞凋亡。而麦角甾苷明显降低细胞内MDA含量和羰基化蛋白质水平, 降低H₂O₂引发的肝细胞凋亡, 显示了麦角甾苷可通过清除H₂O₂造成的肝细胞内过氧化, 降低细胞凋亡从而保护肝细胞。

Bcl-xL和Bax是细胞凋亡发生、发展中的重要信号分子, Bax和Bcl-xL的比例是决定细胞发生凋亡与否的重要调控因素, 该比值降低则促进凋亡, 升高则抑制内源性损伤因子的释放, 发挥抗凋亡的作用。活化的促凋亡Bax可通过移位、构象改变和寡聚化, 插入线粒体膜, 改变线粒体膜的通透性, 使位于线粒体中的Cyt-c释放入胞质中并与凋亡激活因子形成复合物, 导致细胞凋亡的发生^[11-12]。本研究结果显示, H₂O₂作用后, 促凋亡蛋白质Bax水平显著升高, 抗凋亡蛋白质Bcl-xL水平降低, Bax/Bcl-xL比值增加, 促使Cyt-c从线粒体释放到胞质中, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡增强。而麦角甾苷明显降低Bax/Bcl-xL比值, 抑制Cyt-c从线粒体释放到胞质中, 提高细胞存活率, 降低细胞凋亡。以上结果表明, 麦角甾苷可通过清除H₂O₂造成的肝细胞内过氧化, 降低细胞凋亡。

PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路长期以来都是细胞凋亡信号领域的研究热点^[13-14]。Akt是PI3K下游的直接靶蛋白, PI3K可磷酸化Akt的第308位酪氨酸从而激活Akt, 是该蛋白质活性调节的关键位点。GSK3 β 是体内第一个被发现的Akt底物, Akt可使GSK3 β 第9位丝氨酸磷酸化, 磷酸化的GSK3 β 蛋白质水平降低可诱导细胞凋亡^[15], 这一过程与抑制抗凋亡蛋白质Bcl-xL水平有关^[16]。为了明确麦角甾

苷是否通过PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路参与抗凋亡作用, 我们选用PI3K的特异抑制剂LY294002预处理细胞, 结果显示, LY294002可增加促凋亡蛋白质Bax水平, 抑制抗凋亡蛋白质Bcl-xL水平。我们的结果表明, 抑制该通路可促进细胞凋亡, 且这种作用与H₂O₂作用的结果一致, 说明H₂O₂促细胞凋亡至少有一部分是通过该信号通路实现的。进一步研究发现, LY294002抑制了麦角甾苷逆转的H₂O₂诱导的Bax和Bcl-xL表达变化。综合这些研究结果可知, 麦角甾苷通过影响PI3K通路抑制了H₂O₂诱导的肝细胞凋亡。本研究中, H₂O₂作用后细胞内p-Akt和p-GSK3 β 水平均降低, 并导致抗凋亡蛋白Bcl-xL表达下降, 与文献报道一致^[17]。麦角甾苷预处理细胞可逆转H₂O₂造成的p-Akt和p-GSK3 β 蛋白质水平降低, 提示麦角甾苷通过激活PI3K/Akt/GSK3 β 信号途径保护肝细胞。

总之, H₂O₂通过抑制PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路促进小鼠胚胎肝细胞凋亡, 而麦角甾苷通过激活该信号通路调控Bcl-xL及Bax蛋白质水平、降低线粒体损伤, 从而抑制H₂O₂诱导的细胞凋亡。

参考文献 (References)

- 1 Han JW, Zhan XR, Li XY, Xia B, Wang YY, Zhang J, *et al.* Impaired PI3K/Akt signal pathway and hepatocellular injury in high-fat fed rats. *World J Gastroenterol* 2010; 16(48): 6111-8.
- 2 Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. Roles for PI3K/AKT/PTEN pathway in cell signaling of nonalcoholic fatty liver disease. *ISRN Endocrinol* 2013; doi: 10.1155/2013/472432.
- 3 Kim HJ, Joe Y, Kong JS, Jeong SO, Cho GJ, Ryter SW, *et al.* Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via ROS-dependent Akt signaling and inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Oxid Med Cell Longev* 2013; doi: 10.1155/2013/306421.
- 4 Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Fasshauer M, Muller M. H₂O₂-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflugers Arch* 2009; 458(5): 937-52.
- 5 Xie RF, Li ZC, Chen PP, Zhou X. Bufotionine induced the mitochondria-mediated apoptosis in H22 liver tumor and acute liver injury. *Chin Med* 2015; doi:10.1186/s13020-015-0033-1.
- 6 Yao L, Du Q, Yao H, Chen X, Zhang Z, Xu S. Roles of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in selenium deficiency-induced apoptosis in chicken liver. *Biometals* 2015; 28(2): 255-65.
- 7 李惠, 俞桂新, 王峥涛, 胡之璧. HPLC测定地黄中麦角甾苷的含量. *中国中药杂志*(Li Hui, Chou Guixin, Wang Zhengtao, Hu Zhibi. HPLC determination of acteoside in *Radix rehmanniae*. *China Journal of Chinese Materia Medica*) 2006; 31(10): 822-4.
- 8 Hohmann N, Xia N, Steinkamp-Fenske K, Förstermann U, Li H. Estrogen receptor signaling and the PI3K/Akt pathway are

- involved in betulinic acid-induced eNOS activation. *Molecules* 2016; doi: 10.3390/molecules21080973.
- 9 Celi P, Gabai G. Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. *Front Vet Sci* 2015; 2(1): 48.
- 10 Poljsak B, Suput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013; doi:10.1155/2013/956792.
- 11 Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z, Lin J, *et al.* Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J* 2006; 25(11): 2287-96.
- 12 Peng J, Ding J, Tan C, Baggenstoss B, Zhang Z, Lapolla SM, *et al.* Oligomerization of membrane-bound Bcl-2 is involved in its pore formation induced by tBid. *Apoptosis* 2009; 14(10): 1145-53.
- 13 Shin JA, Ryu MH, Kwon KH, Choi B, Cho SD. Down-regulation of Akt by methanol extracts of *impatiens balsamina* L. promotes apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *J Oral Pathol Med* 2014; 44(6): 420-8.
- 14 Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, Williams DC Jr, Ferreira-Gonzalez A, Grant S. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer Res* 2013; 73(4): 1340-51.
- 15 Zhang L, Tu Y, He W, Peng Y, Qiu Z. A novel mechanism of hepatocellular carcinoma cell apoptosis induced by lupeol via brain-derived neurotrophic factor inhibition and glycogen synthase kinase 3 beta reactivation. *Eur J Pharmacol* 2015; 762(21): 55-62.
- 16 Mamaghani S, Simpson CD, Cao PM, Cheung M, Chow S, Bandarchi B, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *PLoS One* 2012; 7(7): e41102.
- 17 Li H, Wang Y, Wei C, Bai S, Zhao Y, Li H, *et al.* Mediation of exogenous hydrogen sulfide in recovery of ischemic post-conditioning-induced cardioprotection via down-regulating oxidative stress and up-regulating PI3K/Akt/GSK3 β pathway in isolated aging rat hearts. *Cell Biosci* 2015; doi: 10.1186/s13578-015-0003-4.