doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.29.009

Trx 通过 Sirt3-P53 通路促进自噬并改善高糖诱发的 CMECs 损伤

赵志林 1 白 锋 1位 任旭爱 2 丁邵祥 2 伏晓琳 3 尹志勇 4

(1兰州大学第二附属医院心内科 甘肃 兰州 730030;2 陕西省咸阳市第一人民医院心内 1 科 陕西 咸阳 712000; 3 陕西省咸阳市中心医院重症医学科 陕西 咸阳 712000;4 陕西省西安市西京医院心内科 陕西 西安 710000)

摘要 目的:明确硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)通过自噬调节对大鼠心脏微血管内皮细胞损伤的保护作用及相关机制。方法:分离 成年大鼠心脏微血管内皮细胞并分为:0 正常对照组;0 高糖组;0 高糖 + Trx 组;0 高糖 + Trx+ Ad-shSirt3 组;0 高糖 + Trx+ Ad-shP53 组;0 高糖 + DMSO 空载组。通过 In Vitro Vascular Permeability Assay Kit 检测单层心脏微血管内皮细胞通透性, TUNEL 染色检测细胞凋亡, Western blot 法检测 Sirt3、P53、Atg5、LC3BI/II 等相关自噬相关信号通路关键蛋白的表达水平。结果: 与正常对照组相比,高糖引起单层心脏微血管内皮细胞通透功能损伤,增加细胞凋亡,抑制自噬,且 Sirt3、Atg5、LC3BI/II 表达下 降而 P53 表达上升;给予 Trx 可以上调 Sirt3、Atg5、LC3BI/II 蛋白表达水平,抑制 P53 表达,并显著减轻上述高糖引起的细胞损 伤;但是,分别干扰 Sirt3 和 P53 表达后, Trx 的作用明显减弱。结论: Trx 通过 Sirt3-P53 信号通路促进心脏微血管内皮细胞自噬, 降低细胞凋亡,改善高糖诱发的大鼠心脏微血管内皮细胞损伤。

关键词:硫氧还蛋白;自噬;心脏微血管内皮细胞;糖尿病

中图分类号:R-33;R587.2;R54 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)29-5642-04

Thioredoxin Increase the Autophagy to Alleviate Cardiac Microvascular Endothelial Cells Injury Induced by High Glucose via Sirt3-P53 Pathway

ZHAO Zhi-lin¹, BAI Feng¹, REN Xu-a², DING Shao-xiang², FU Xiao-lin³, YIN Zhi-yong⁴

(1 Department of Cardiology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730030, China; 2 Department of Cardiology,

First Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi, 712000, China; 3 Department of Cardiology, Center Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi, 712000, China; 4 Xi-Jing Hospital of the city's Fourth Military Medical University's, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective role and Sirt3-P53 related mechanism of Thioredoxin in rat cardiac microvascular endothelial cells injury induced by high glucose. **Methods:** Adult rat cardiac microvascular endothelial cells (CMECs) were cultured and divided to six groups including: 0 Control Group; 0 High-Glucose Group; 0 HG+Trx Group; 0 HG+Trx+ Ad-shSirt3 Group; 0 HG+Trx+ Ad-shP53 Group; 0 HG+Vehicle Group. Permeability of monolayer CMECs was tested by In Vitro Vascular Permeability Assay Kit; Cellular apoptosis was detected by TUNEL staining; And Western Blot was used to analyze the protein expression including Sirt3, P53, Atg5 and LC3BI/II. **Results:** Compared with Control Group, the Permeability of monolayer CMECs and cellular apoptosis were increased by high glucose, which also reduced autophagy. The expression of Sirt3, Atg5 and LC3BI/II were on the decline and the P53 on rise. Trx could alleviate CMECs permeability injury as well as apoptosis and promoted cellular autophagy. At meaning while, Sirt3, Atg5 and LC3BI/II expression were increased and P53 expression were decreased by Trx. In addition, while Sirt3 or P53 were knockdown by siRNA, the protective role of Trx was interfered obviously. **Conclusions:** Trx can enhance CMECs autophagy and attenuate apoptosis through Sirt3-P53 pathway, which is helpful to alleviate injury induced by high glucose.

Key words: Thioredoxin; Autophagy; Cardiac microvascular endothelial cell; Diabetes

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2; R54 Document code: A Article ID: 1673-6273(2017)29-5642-04

前言

近年来我国糖尿病发病率不断上升,据统计中国目前确诊 糖尿病患者已超过 9000 万,而且我国尚有至少 1.5 亿人群可 能处于糖尿病前期阶段^[1],而心血管疾病被公认为糖尿病患者 的"头号杀手"。心脏是全身血管密度最大的重要器官,既往研究结果表明,在心脏遭受缺血损伤的过程中,心肌细胞凋亡现象的发生发展明显晚于心肌微血管内皮细胞(Cardiac microvascular endothelial cells, CMECs),且范围和程度与其与心 肌微血管距离呈反比^[2],进一步提示心肌微血管内皮细胞损伤 可能是糖尿病心脏病的重要原因^[34]。

自噬是细胞自身清除衰老或受损细胞器及蛋白的重要方式,对维持细胞内稳态至关重要^[5]。目前已有相关研究提示自噬 是衰老、糖尿病等慢性疾病的发生发展过程中的重要因素,但

作者简介:赵志林(1984-),硕士,主要从事心血管疾病研究与治疗,E-mail:zhaozhilin04@126.com

[△] 通讯作者:白锋,主任医师,主要从事冠心病基础和临床研究,

E-mail:baifeng@medmail.com.cn

⁽收稿日期:2016-12-30 接受日期:2017-01-26)

其机制因其包含大量分子的复杂交互作用而仍旧扑朔迷离^[67]。因此,更加全面理解自噬相关分子机制并寻找合适的干预方式 是目前相关研究面临的主要挑战。

硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx),作为普遍存在于哺乳动物 各种细胞内的 12 kD 小分子蛋白,也被称为孕因子或成人 T 细 胞白血病衍化因子,其共同特点是具有氧化还原活性的保守序 列位点:即 Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys24^[89]。因此,Trx 具有显著 的抗氧化及清除活性氧自由基的作用,并帮助细胞降低氧化应 激损伤,是调节机体细胞增殖、凋亡的关键因子^[9]。已有研究证 明,心肌缺血损伤中 Trx 活性降低,给予外源性 Trx 明显减轻 心肌细胞和心肌微血管内皮细胞凋亡和心肌梗死面积^[10]。但 是,Trx 是否可以通过调节自噬进而影响糖尿病心肌微血管内 皮细胞损伤的作用及机制仍不清楚。

因此,我们以 CMECs 为本实验的研究对象,以细胞自噬 为切入点,进一步完善 Trx 在糖尿病心肌微血管内皮细胞损伤 与保护中的作用与相关机制,为防治糖尿病心脏病损伤提供新 的理论基础与治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

成年 Spragure-Dawley 大鼠(雄性,8-10周,220克左右, SPF级,由第四军医大学动物房提供),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),二甲基亚砜(DM-SO)(美国 Sigma 公司),BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公 司),硫氧还蛋白(美国 Sigma 公司),4',6-二脒基 -2-苯基吲哚 (DAPI)(德国 Roche 公司),TUNEL 检测试剂盒(美国 Promega 公司),兔抗 Sirt3 抗体(美国 Cell Signaling 公司),兔抗 P53 抗 体(美国 Abcam 公司),兔抗 atg5 抗体(美国 Abcam 公司),兔 抗 GAPDH 抗体(中国中杉金桥公司),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜 (美国 Millipore 公司)。荧光显微镜(日本 Olympus 株式会社), In Vitro Vascular Permeability Assay Kit (美国 Chemicon 公司), Western-Blot 系统(美国 Bio-Rad 公司),细胞培养孵箱(美国 Thermo 公司)。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 CMECs 分离 无菌条件下迅速分离大鼠左心室,剥离 心肌表面内外膜,去除冠脉组织,并将所得左心室组织均匀剪 切为 1-2 mm³ 组织块;37℃水浴箱中,用 0.25% II 型胶原酶消 化 5-7 min,再以 0.2% 胰蛋白酶消化 5-7 min,用 100 目滤网过 滤后,小心接种于提前用鼠尾胶包被完毕的培养皿中;给予差 速贴壁 6 h,将悬浮细胞用吸管弃去,保留贴壁细胞。最后将其 培养于 DMEM 培养基 (提前添加 1% 内皮细胞生长因、1% 成 纤维细胞生长抑制剂及 50 mg/L 肝素)¹³⁴。

1.2.2 CMECs 培养及分组 在原代 CMECs 接近 80% 融合 时,按 1:2 的比例传代给予传代,选取生长状态良好的第三代 CMECs 并适度消化,以 1× 10⁶ 浓度仔细接种于 In Vitro Vascular Permeability Assay Kit 的上层培养小室。并根据实验设计给 予以下处理并分组:A. 正常对照组 (Control Group):低糖 DMEM 培养基 (葡萄糖浓度 5.5 mmol/L);B. 高糖培养组 (High-Glucose Group):DMEM 培养基含葡萄糖 25 mmol/L;C. 高糖 +Trx 组(HG+Trx Group)高糖组加入 10 μmol/LTrx;D.高 糖 (葡萄糖浓度 25 mmol/L)+ Trx (10 μmol/L)+ Ad-shSirt3 组 (HG+Trx+ Ad-shSirt3 Group);E.高糖(葡萄糖浓度 25 mmol/L)
+ Trx(10 μmol/L)+ Ad-shP53 组(HG+Trx+ Ad-shP53 Group);
F.高糖(葡萄糖浓度 25 mmol/L)+ DMSO 空载组(HG+Vehicle Group)。

1.2.3 单层 CMECs 通透性检测 各组细胞在培养48h后,充 分融合并形成单层 CMECs 网,将试剂盒中 FITC-Dextran 以1 mg/mL 浓度加入 InVitro Vascular Permeability Assay Kit 上室, 室温放置 10 min 后, 取等量 In Vitro Vascular Permeability Assay Kit 下室培养液,置于荧光分光光度仪下,检测各组细胞培 养液中荧光强度并分析其所代表的细胞通透功能并重复5次。 1.2.4 TUNEL 检测 CMECs 凋亡 各组给予细胞爬片处理后 PBS 洗 3 次, 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, TUNEL 试剂 37℃避 光孵育1h, DAPI 室温孵育 3-5 min, 充分脱水后并给予甘油小 心封片。根据不同荧光颜色进行统计,具体方法如下:凋亡 CMECs 显示为绿色荧光, DAPI 核染总细胞数显示为蓝色荧 光。每个实验细胞组随机选取4张细胞爬片,每张细胞爬片随 机选取5个视野,在荧光显微镜下观察并记录CMECs总数和 凋亡阳性细胞数,取平均值后按照以下公式计算:内皮细胞凋 亡指数(Apoptosis Index)=TUNEL 阳性细胞数(绿色)/ 总细胞 数(蓝色)× 100%。并重复5次。

1.2.5 Western blot 检测 4℃PBS 洗涤细胞 3 次后加入细胞 裂解液,BCA 法测定并调整蛋白上样,每孔上样 20 μ g, SDS-PAGE 法分离蛋白并转膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h 后 TBST 液洗 5 次(10 min/次),滴加兔抗 Sirt3 抗体(Cell Signaling,1:1 000 稀释)、兔抗 P53 抗体(Abcam,1:1 000 稀释)、兔抗 atg5 抗体(Abcam,1:1 000 稀释)和兔抗 atg12 抗体(Abcam,1:1 000 稀释),4℃摇床孵育过夜并 TBST 液摇洗 5 次 (10 min/ 次),滴加 HRP 山羊抗兔 IgG 抗体(中杉金桥,1:5 000 稀释)孵 育 1 h,TBST 液洗 5 次(10 min/次)。用 Bio-image(Bio-Rad)系 统检测、记录并分析目的条带。所有 Western blot 检测均重复 5 次,且以 GAPDH 为内参标化各蛋白表达的水平。

1.3 统计学处理方法

本研究涉及所有计量数据均以均数±标准差(mean±SD) 进行记录,利用 SPSS19.0 软件对实验记录数据给予 one-way ANOVA 统计分析,GraphPad Prism 5.0 进行绘图,P<0.05 时认 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 不同分组单层 CMECs 通透功能变化

图1柱状图结果提示,与正常对照组相比较,高糖致单层 CMECs 通透功能受损,通透性显著增高(420.15±32.47 vs. 232.36±25.25;n=5,P<0.05);而 Trx 可以缓解这一病理现象 (321.56±25.782 vs. 420.15±32.47;n=5,P<0.05);当 Sirt3 与 P53 被抑制后,Trx 对心肌微血管内皮细胞通透性的保护作用 均有不同程度下降(Ad-shSirt3:388.25±30.47 vs. 321.56± 25.782;Ad-shP53:380.39±24.59 vs. 321.56±25.782;n=5,P<0. 05);高糖 + DMSO 空载组(HG+Vehice)通透性与高糖组无明 显差别(426.15±29.33 vs420.15±32.47;n=5,P>0.05)。



图 1 不同分组单层 CMECs 通透功能变化

Fig.1 Permeability change of monolayer CMECs in different groups * 与对照组相比,P<0.05;# 与高糖组相比,P<0.05;& 与高糖 +Trx 组相 比.P<0.05₀

* Compared with Control Group, P<0.05; #Compared with High Glucose Group, P<0.05; & Compared with HG+Trx Group, P<0.05.

2.2 不同分组 CMECs 凋亡结果

如图2显示,与正常组相比,高糖组细胞凋亡指数明显上 升 (35.00%± 5.20%vs. 3.13%± 0.90%;n=5, P<0.05), 而 Trx 可以显著下调高糖环境中 CMECs 凋亡指数(17.00% ± 1.60%

vs. 35.00%± 5.20%;n=5, P<0.05), Trx 对 CMECs 凋亡的抑制 作用均有不同程度下降(Ad-shSirt3: 27.00% ± 2.10% vs. 17.00% ± 1.60%; Ad-shP53: 26.60% ± 3.30% vs. 17.00% ± 1.60%; n=5, P<0.05);高糖 + DMSO 空载组(HG+Vehicle)与高糖组细 胞凋亡指数无统计学差异。

2.3 Trx 对不同分组 CMECs 自噬相关信号通路及关键蛋白的 影响

图 3 的 Western blot 结果显示,和正常组相比,高糖组 Sirt3 表达明显降低, 而 P53 显著升高, 代表心肌微血管内皮细 胞自噬标志物的 Atg5 和 LC3BI/II 亦明显下降(n=5, P<0.05), 提示高糖环境抑制心肌微血管内皮细胞自噬活动; 而在给予 Trx 干预后,高糖导致的上述分子变化均受到不同程度的抑制, 提示 Trx 对于高糖致心肌微血管内皮自噬相关信号通路紊乱 有明显的纠正作用。但是,当信号通路中的 Sirt3 和 P53 受到抑 制后,Trx的自噬调节作用受到明显抑制。此外,在给予 Sirt3 抑 制时,可以看到 P53 的表达也受到较大影响;但给予 P53 抑制, Sirt3 的表达不但未明显降低,反而表达上调,提示 Sirt3 是 P53 的上游调控分子, 而 P53 对 Sirt3 有负反馈调节作用。



* Compared with Control Group, P<0.05; #Compared with High Glucose Group, P<0.05; &Compared with HG+Trx Group, P<0.05

3 讨论

随着全球人口的老龄化的不断发展,糖尿病患病率呈现不 断上升的趋势,糖尿病已经被确证为世界范围内继癌症与心血 管病后的 "第三大威胁人类健康的非传染性疾病 "[1,11]。美国心

脏病学会(AHA)早在1999年就提出"糖尿病是心血管病", 标志着糖尿病和心脏病互为等危因素关系的确立[12]。近年来, 大量基础实验与回顾性临床研究均证实,CMECs功能及结构 异常与糖尿病患者心血管病的发生发展密切相关[13]。尤其是在 糖尿病发病的早期阶段,高血糖可以通过多种途径及信号通路



* Compared with Control Group, P<0.05; #Compared with High Glucose Group, P<0.05; &Compared with HG+Trx Group, P<0.05

影响 CMECs 结构以及通透功能,这一点也能够与本研究所得 出的部分现象性实验结果相互印证。但是,糖尿病性心肌微血 管在病理性通透性下调和血管发生障碍的变化及其机制至今 仍未明确^[14,15],并且也缺乏有效的干预手段,这就为糖尿病性心 血管病预防及治疗的进一步发展带来巨大困难。

本研究通过体外细胞实验的设计及实施模拟临床中糖尿病性心血管病患者 CMECs 通透功能失调的过程及基本特点--因为高血糖持久刺激导致的通透功能变化正是糖尿病心肌微血管并发症的特征性病变之一^[4,16],这种细胞功能失调促使现存及新生血管出现病理性渗漏,最终影响心脏供血、营养输送及代谢效率。而 TRx 是包括人体在内的哺乳动物体内广泛存在的 12 kD 小分子量蛋白,拥有:Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys24 这一保守氧化还原活性位点序列,已经被证明具有广泛的抗氧化以及活性氧自由基清除作用¹⁷⁷。此外,Trx 的非氧化还原功能在生物体内同样起着不可缺少的作用,尤其是 Trx 作为调节细胞增殖、凋亡的关键因子受到大量关注^[18]。

Sirt3 作为 Sirtuin 蛋白家族的重要亚型,被公认为是依赖 NAD+的组蛋白去乙酰基转化酶,可以减少氧化应激损伤,在 凋亡、衰老、自噬等反应中扮演着不可或缺的角色^[19]。P53 是目 前研究所公认的功能最为强大、影响最为广泛的抑癌基因,P53 蛋白在正常细胞周期的维持和凋亡发生发展过程中也起着不 可替代的关键作用。而在自噬活动中,P53 也具有著名的双刃 剑作用,即P53 一方面可以抑制自噬负调节子 -- 哺乳动物雷 帕霉素靶点(Mammalian Target of Rapamycin, mTOR),促进自 噬,诱导受损细胞器及无用蛋白的回收和降解,维持细胞内稳 态;另一方面在肿瘤、衰老等多种慢性应激状态下,P53 会抑制 正常细胞的基础自噬能力,进一步恶化慢性疾病的发展^[2021]。

在本研究中,高糖正是作为一种典型的慢性应激因素,抑制 Sirt3 的表达,上调并激活 P53,而作为自噬标志物的 Atg5 和 LC3BI/II 表达明显下调,即提示高糖环境下 CMECs 的自噬能力下降显著,并会进一步损伤细胞的通透功能。而 Trx 通过上调 Sirt3 表达,抑制 p53 蛋白,能够部分恢复心肌微血管内皮细胞自噬能力、减少细胞凋亡并回复细胞的通透功能。此外,我们在细胞水平通过分别干扰 Sirt3 和 P53 的表达,进一步验证 Sirt3 和 P53 是 Trx 发挥促自噬和抗凋亡作用的关键分子,而且 Sirt3 作为 P53 的上游调控分子能够抑制 P53 的表达并提高心肌微血管内皮细胞自噬活动。而在干扰 P53 时,Sirt3 的表达不降反升,提示 P53 对其上游的 Sirt3 有负反馈调节作用。

综上所述,本研究证实 Trx 可以通过促进 Sirt3 表达,抑制 P53 蛋白及其负向调节自噬能力,从而促进细胞自身对于因高 糖受损细胞器的回收和清除能力,同时降低细胞凋亡,改善心 肌微血管内皮细胞通透功能,为 Trx 在糖尿病心脏病中的潜在 治疗应用提供了更多的基础证据。

参考文献(References)

- Lehrke M, Leiter LA, Hehnke U, et al. Safety and efficacy of linagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: Analysis of pooled events from 19 clinical trials [J]. J Diabetes Complications, 2016 [Epub ahead of print]
- [2] Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, et al. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury
 [J]. Circulation, 2001, 104(3): 253-256
- [3] Wei L, Yin Z, Yuan Y, et al. A PKC-beta inhibitor treatment reverses cardiac microvascular barrier dysfunction in diabetic rats [J]. Microvasc Res, 2010, 80(1): 158-165
- [4] Yin Z, Fan L, Wei L, et al. FTY720 protects cardiac microvessels of diabetes: a critical role of S1P1/3 in diabetic heart disease [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42900
- [5] Mei Y, Thompson M D, Cohen R A. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852 (2): 243-251
- [6] Wende AR, Young ME, Chatham J, et al. Redox biology and the interface between bioenergetics, autophagy and circadian control of metabolism[J]. Free Radic Biol Med, 2016 [Epub ahead of print]
- [7] Gui L, Liu B, Lv G. Hypoxia induces autophagy in cardiomyocytes via a hypoxia-inducible factor 1-dependent mechanism [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(6): 2233-2239
- [8] Whayne TF Jr, Parinandi N, Maulik N. Thioredoxins in cardiovascular disease[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(11): 903-911
- [9] Bi QR, Hou JJ, Qi P, et al. TXNIP/TRX/NF-κB and MAPK/NF-κB pathways involved in the cardiotoxicity induced by Venenum Bufonis in rats[J]. Sci Rep, 2016, 6: 22759
- [10] D'Annunzio V, Perez V, Boveris A, et al. Role of thioredoxin-1 in ischemic preconditioning, postconditioning and aged ischemic hearts [J]. Pharmacol Res, 2016, 109: 24-31
- [11] Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, et al. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies [J]. Nat Rev Endocrinol, 2016 [Epub ahead of print]

[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2016, 36(12): 2837-2840

- [19] Liu C, Vojnovic D, Kochevar I E, et al. UV-A Irradiation Activates Nrf2-Regulated Antioxidant Defense and Induces p53/Caspase3-Dependent Apoptosis in Corneal Endothelial CellsUV-A Activates Nrf2 and Induces p53 in Corneal Endothelial Cells [J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2016, 57(4): 2319-2327
- [20] Yan J, Zheng M, Zhang D. Chrysophanol Liposomes Protects Brain Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Reducing Expression of Caspase3 in Mice [J]. latin american journal of pharmacy, 2014, 33(6): 973-981
- [21] Liu S, Zhang J, Zhang X Z, et al. Triptolide induces cell apoptosis in human stomach cancer cell via caspase 3-dependent cascade pathway
 [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 15 (9): 1853-1858
- [22] Sikdar S, Mukherjee A, Ghosh S, et al. Condurango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell-proliferation in lung cancer, in vitro and in vivo[J]. Environmental toxicology and pharmacology, 2014, 37(1): 300-314
- [23] Tai Y T, Landesman Y, Acharya C, et al. CRM1 inhibition induces tumor cell cytotoxicity and impairs osteoclastogenesis in multiple myeloma: molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. Leukemia, 2014, 28(1): 155-165
- [24] Ye S, Zhang D, Cheng F, et al. Wnt/β-catenin and LIF-Stat3 signaling pathways converge on Sp5 to promote mouse embryonic stem cell self-renewal[J]. J Cell Sci, 2016, 129(2): 269-276
- [25] Lian X, Zhang J, Azarin S M, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating

(上接第 5645 页)

- [12] Pimpin L, Wu JH, Haskelberg H, et al. Is Butter Back? A Systematic Review and Meta-Analysis of Butter Consumption and Risk of Cardiovascular Disease, Diabetes, and Total Mortality [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0158118
- [13] Bae JC. Diabetes Drugs and Cardiovascular Safety [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2016, 31(2): 239-244
- [14] Beckman JA, Creager MA.Vascular Complications of Diabetes [J]. Circ Res, 2016, 118(11): 1771-1785
- [15] Bonapace S, Rossi A, Lipari P, et al. Relationship between increased left atrial volume and microvascular complications in patients with type 2 diabetes[J]. J Diabetes Complications, 2015, 29(6): 822-828
- [16] Joshi MS, Williams D, Horlock D, et al. Role of mitochondrial dysfunction in hyperglycaemia-induced coronary microvascular dysfunction: Protective role of resveratrol[J]. Diab Vasc Dis Res, 2015, 12(3): 208-216

 Wnt/β -catenin signaling under fully defined conditions [J]. Nature protocols, 2013, 8(1): 162-175

- [26] Yong X, Tang B, Xiao Y F, et al. Helicobacter pylori upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/β-catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer [J]. Cancer letters, 2016, 374(2): 292-303
- [27] Li L, Wang Q F, Zou M L, et al. Overexpressed lncRNA ZEB1-AS1 promotes cell invasion and angiogenesis through Wnt/β-catenin signaling in non-small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(3): 3990-3997
- [28] Xu R, Hu J, Zhang T, et al. TRIM29 overexpression is associated with poor prognosis and promotes tumor progression by activating Wnt/β-catenin pathway in cervical cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7 (19): 28579-28591
- [29] Cheung E C, Lee P, Ceteci F, et al. Opposing effects of TIGAR-and RAC1-derived ROS on Wnt-driven proliferation in the mouse intestine[J]. Genes & development, 2016, 30(1): 52-63
- [30] Qiang Y W, Ye S, Edmondson R D, et al. Identification of Biomarkers Associated with MAF-Mediated Resistance to Proteasome Inhibitors in t (14; 16) Multiple Myeloma[J]. Blood, 2015, 126(23): 3020-3020
- [31] Delgado-Calle J, Anderson J, Cregor M D, et al. Bidirectional Notch signaling and osteocyte-derived factors in the bone marrow microenvironment promote tumor cell proliferation and bone destruction in multiple myeloma[J]. Cancer research, 2016, 76(5): 1089-1100
- [32] Narayanan N K, Duan B, Butcher J T, et al. Characterization of multiple myeloma clonal cell expansion and stromal Wnt/β-catenin signaling in hyaluronic acid-based 3D hydrogel[J]. In Vivo, 2014, 28(1): 67-73
- [17] Bhatt NM, Aon MA, Tocchetti CG, et al. Restoring redox balance enhances contractility in heart trabeculae from type 2 diabetic rats exposed to high glucose[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 308 (4): H291-302
- [18] Zhao X, Zhang Y, Li X, et al. Variations of thioredoxin system contributes to increased susceptibility to apoptosis in cardiomyocytes of type 2 diabetic rats[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(4): 318-329
- [19] Matsushima S, Sadoshima J. The role of sirtuins in cardiac disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(9): H1375-1389
- [20] Sudhagar S, Sathya S, Gokulapriya G, et al. AKT-p53 axis protect cancer cells from autophagic cell death during nutrition deprivation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471(4): 396-401
- [21] White E.Autophagy and p53 [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016, 6(4): a026120