

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.20.003

脂联素抑制子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖、迁移及侵袭的作用及机制研究 *

程丽宪¹ 杨蝉联¹ 林纳荣¹ 祝姗姗² 刘煌辉¹ 林泓羽¹ 陈晓瑜¹
江佩颖¹ 张 敏¹ 江天琪¹

(1 厦门医学院机能与临床转化福建省高校重点实验室 福建 厦门 361023; 2 厦门医学院药理学系 福建 厦门 361023)

摘要 目的:探讨脂联素(APN)对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用及分子机制。**方法:**分别采用磺酰罗丹明 B(SRB)实验、细胞迁移(Transwell)实验和划痕实验检测子宫内膜癌细胞 HEC-1B 的增殖、迁移和侵袭能力。采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路相关蛋白、AdipoR1、AdipoR2、cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达水平。**结果:**与对照组相比,APN 组 HEC-1B 细胞增殖、迁移及侵袭功能明显下降($P<0.05$)。与对照组相比,APN 组 p-AMPK/AMPK 比值明显提高,而 p-mTOR/mTOR 和 p-4EBP1/4EBP1 比值明显下降($P<0.05$)。与对照组相比,APN 组 cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$)。APN 组和对照组的 AdipoR1、AdipoR2 蛋白表达水平比较无统计学差异($P>0.05$)。**结论:**APN 能够激活 AMPK 信号通路并下调 cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达,进而抑制子宫内膜癌细胞的增殖、迁移和侵袭功能。

关键词:脂联素;子宫内膜癌;增殖;迁移;侵袭;腺苷酸活化蛋白激酶信号通路

中图分类号:R-33;R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)20-3814-04

Study on the Effect and Mechanism of Adiponectin on the Proliferation, Migration and Invasion of HEC-1B Cells in Endometrial Carcinoma*

CHENG Li-xian¹, YANG Chan-lian¹, LIN Na-rong¹, ZHU Shan-shan², LIU Huang-hui¹, LIN Hong-yu¹, CHEN Xiao-yu¹,
JIANG Pei-ying¹, ZHANG Min¹, JIANG Tian-qi¹

(1 Function and Clinical Transformation Key Laboratory of Fujian University, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian, 361023, China;

2 Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian, 361023, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory effect of adiponectin (APN) on the proliferation, migration and invasion of endometrial carcinoma HEC-1B cells and its molecular mechanism. **Methods:** The proliferation, migration and invasion of endometrial cancer cells HEC-1B were detected by sulfonyl rhodamine B (SRB) experiment and the cell migration (Transwell) experiment and scratch tests, respectively. Western blot was used to detect the expression levels of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) signaling pathway related proteins, AdipoR1, AdipoR2, cyclinD1 and cyclinE2. **Results:** Compared with the control group, the proliferation, migration and invasion of HEC-1B cells in APN group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the p-AMPK/AMPK ratio in the APN group was significantly increased, while the p-mTOR/mTOR and p-4EBP1/4EBP1 ratios were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the protein expression levels of cyclinD1 and cyclinE2 in the APN group were significantly decreased ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression of AdipoR1 and AdipoR2 between APN group and control group($P>0.05$). **Conclusion:** APN can activate AMPK signaling pathway and down-regulate the expression of cyclinD1 and cyclinE2 proteins, thereby inhibiting the proliferation, migration and invasion of endometrial cancer cells.

Key words: Adiponectin; Endometrial carcinoma; Proliferation; Migration; Invasion; Adenosine monophosphate activated protein kinase

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)20-3814-04

前言

子宫内膜癌是临床上常见的妇科生殖道恶性肿瘤,在女性生殖道肿瘤中占比 30%左右,其发病率和死亡率逐年增长,对

女性的生命健康造成严重影响^[1]。已有研究报道显示脂联素(Adiponectin, APN)对胰岛素具有一定增敏作用,并且能够抑制子宫内膜癌的发生和发展^[2]。APN 主要由脂肪细胞分泌产生,是一种多肽型激素蛋白,参与细胞内脂质代谢和糖代谢等过

* 基金项目:福建省卫生计生委青年科研项目(2017-2-116);福建省中青年教育科研项目(科技类)(JT180652);2018 年福建省高校杰出青年科研人才培养计划(闽教科(2018)47 号)

作者简介:程丽宪(1987-),女,博士,讲师,研究方向:生殖系统肿瘤,E-mail: chenglixian22@163.com

(收稿日期:2021-03-11 接受日期:2021-04-08)

程,与恶性肿瘤的发生密切相关^[3,4]。腺苷酸活化蛋白激酶(Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase,AMPK)信号通路是细胞内关键的代谢调节通路,其在蛋白质代谢、线粒体稳态、糖代谢和脂质代谢中均起到重要调节作用^[5,6]。本研究检测 APN 对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖、迁移及侵袭的影响以及 AMPK 信号通路相关蛋白的表达情况,旨在探讨 APN 对子宫内膜癌发生发展的抑制作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

人子宫内膜癌 HEC-1B 细胞购自南京科佰生物科技有限公司培养基采用 DMEM 培养基(美国赛默飞世尔生物技术有限公司,货号:10567014),加入胎牛血清至终浓度 10%。p-AMPK(货号 ab109402)、AMPK(货号 ab32047)、p-mTOR(货号 ab109268)、mTOR(货号 ab134903)、p-4EBP1(货号 ab75767)、4EBP1(货号 ab32024)、AdipoR1(货号 ab126611)、AdipoR2(货号 ab77612)、cyclinD1(货号 ab16663)和 cyclinE2(货号 ab40890)抗体均购自美国 Abcam 生物技术有限公司。二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒(货号 ab102536)购自美国 Abcam 生物技术有限公司。细胞裂解液(Radio Immunoprecipitation Assay,RIPA)(货号 RP05-100)购自上海曼博生物医药科技有限公司。人重组 APN(货号:SRP6257)和 AMPK 抑制剂(货号:171260)购自美国 sigma 生物科技有限公司。

1.2 细胞分组及处理

细胞分为对照组、APN 组、抑制剂组和 APN+ 抑制剂组,其中对照组加入 DMEM 培养基进行培养。APN 组在对照组基础上加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 APN,室温处理 30 min 后更换完全培养基。抑制剂组在对照组基础上加入 10 nmol/L 的 AMPK 抑制剂,室温处理 30 min 后更换完全培养基。APN+ 抑制剂组在对照组基础上加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 APN 和 10 nmol/L 的 AMPK 抑制剂,室温处理 30 min 后更换完全培养基。

1.3 磺酰罗丹明 B(Sulforhodamine B,SRB)实验检测细胞增殖能力

将 5×10^3 个处理后的细胞铺种于 96 孔板中,每组 3 个复孔,于细胞处理后 2d 做如下处理:将培养基吸尽,加入 100 μL 的 10%三氯醋酸并于 37℃ 固定 30 min。弃去 10%三氯醋酸后使用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,等孔内干燥后加入 SRB 溶液孵育 20 min,弃去 SRB,并加入 100 μL 的 1%醋酸溶液冲洗 3 遍。等孔内干燥后加入 200 μL 的 10mM 的 Tris 碱溶液室温溶解 10 min,使用酶标仪于 530 nm 波长处检测每孔的吸光度值,以吸光度值作为纵坐标做图。

1.4 细胞迁移(Transwell)实验检测细胞的迁移能力

细胞计数 5×10^6 个并将细胞铺种于 Transwell 小室中,每组 3 个复孔。于细胞处理后 2d,准备 24 孔板并于孔内加入 1 mL 的 10%结晶紫溶液,将各组的 Transwell 小室上层为侵袭的细胞使用棉签刮去干净后置于结晶紫溶液中反应 30 min,取出 Transwell 小室并用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,室温干燥。每孔中加入 500 μL 的 30%的醋酸,室温溶解 10 min,混合均匀后于 570 nm 波长处检测每孔的吸光度值。

1.5 划痕实验检测 HEC-1B 细胞侵袭能力

将 HEC-1B 细胞铺种于 6 孔板中,等细胞密度达到 100% 融合度,将培养基吸走并加入 PBS 缓冲液冲洗细胞 3 次,每次 1 mL。用 10 μL 枪头于 6 孔板中央划一竖线,用 1 mL 的 PBS 缓冲液冲洗 1 次,吸去 PBS 后加入 2 mL 的 DMEM 培养基继续培养。于 0 h 和 24 h 在倒置显微镜中观察并拍照,细胞侵袭率(%)=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 $\times$ 100%。

1.6 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测蛋白质的表达水平

收集 5×10^6 个细胞,5000 g 离心 5 min 后留取沉淀,加入 100 μL 的 RIPA 细胞裂解液,震荡混匀使细胞完全重悬。于冰上裂解 30 min,裂解完全后,12000 $\times$ g 离心 15 min,留取上清液并转移至洁净离心管中。通过蛋白定量检测试剂盒检测蛋白质浓度,每孔蛋白的上样量为 5 μg ,采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)进行检测。100 V 电泳 10 min 后将电压调整为 120V,继续电泳 30 min。将聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)膜置于甲醇中浸泡 1 min 使 PVDF 膜活化,采用湿转法进行蛋白印迹,转膜时间为 30 min。随后使用 5%BSA 封闭 PVDF 膜,室温孵育 30 min。将 5%BSA 回收并置换成 PBS-吐温 20 洗涤剂(PBS-tween20,PBST),PBST 冲洗 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜置于一抗内,4℃ 孵育过夜。次日,将一抗回收并置换成 PBST,PBST 冲洗 3 次,每次 10 min。将 PBSY 弃去并置换成二抗溶液,室温孵育 30 min。孵育结束后弃去二抗溶液并置换成 PBST,PBST 冲洗 3 次,每次 10 min,化学发光检测蛋白表达情况。以 GAPDH 作为内参蛋白,各蛋白相对表达量=目的蛋白表达量/GAPDH 蛋白表达量。

1.7 统计学分析

统计软件使用 SPSS24.0,cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白的相对表达量等计量资料以均值 $\pm$ 标准差的方式表示,两组间显著性分析采用独立样本 t 检验。采用 Graphpad 软件绘制细胞生长曲线以及柱状图, $P<0.05$ 则表示各组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖能力比较

APN 组细胞增殖能力明显低于对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。抑制剂组以及 APN+ 抑制剂组细胞增殖能力与对照组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。

2.2 各组细胞迁移能力比较

APN 组细胞迁移能力明显低于对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。抑制剂组以及 APN+ 抑制剂组细胞迁移能力与对照组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。

2.3 各组细胞侵袭能力比较

APN 组细胞侵袭能力明显低于对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。抑制剂组以及 APN+ 抑制剂组细胞侵袭能力与对照组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

2.4 各组 AMPK 信号通路相关蛋白表达水平比较

APN 组 p-AMPK/AMPK 比值明显高于对照组,而 p-mTOR/mTOR 和 p-4EBP1/4EBP1 比值明显低于对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。抑制剂组以及 APN+ 抑制剂组 p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR 和 p-4EBP1/4EBP1 比值与对

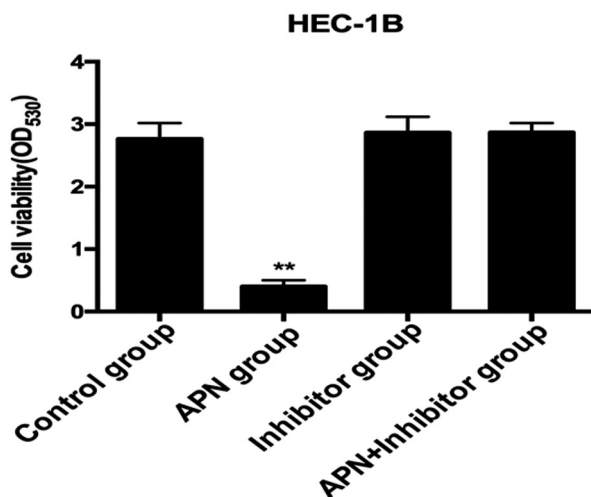


图 1 各组细胞增殖能力比较

Fig.1 Comparison of cell proliferation ability of each group

Note: Compared with control group, ** $P<0.05$.

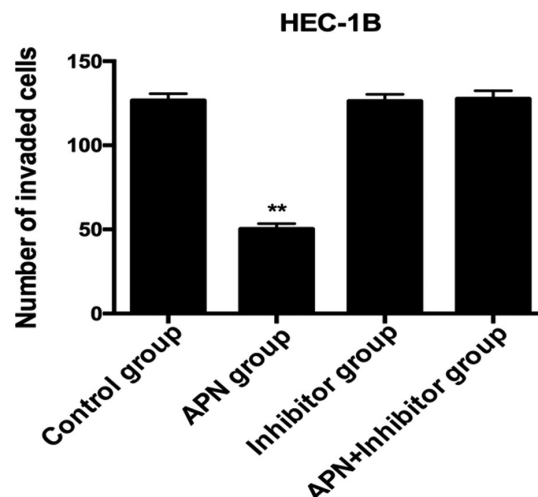


图 2 各组细胞迁移能力比较

Fig.2 Comparison of cell migration ability of each group

Note: Compared with control group, ** $P<0.05$.

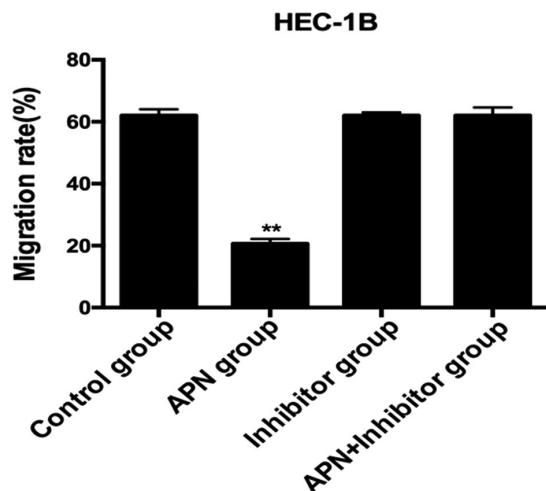


图 3 各组细胞侵袭能力比较

Fig.3 Comparison of invasion ability of cells in each group

Note: Compared with control group, ** $P<0.05$.

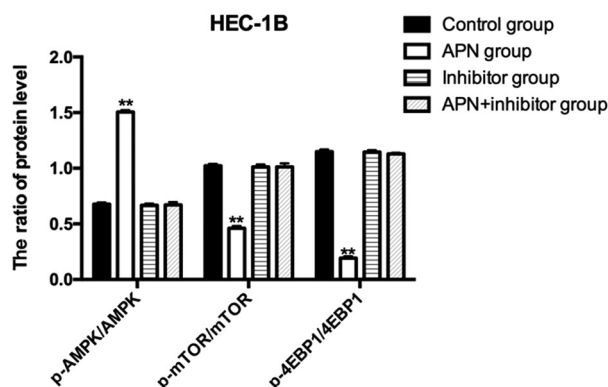


图 4 各组 AMPK 信号通路相关蛋白表达水平比较

Fig.4 Comparison of AMPK signaling pathway related protein expression levels in each group

Note: Compared with control group, ** $P<0.05$.

照组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 4。

2.5 各组 AdipoR1、AdipoR2、cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达水平比较

APN 组 cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达水平明显低于对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。APN 组和对照组的 AdipoR1、AdipoR2 蛋白表达水平比较,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。抑制剂组以及 APN+ 抑制剂组 AdipoR1、AdipoR2、cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达水平与对照组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 5。

3 讨论

APN 是一种脂肪因子且在脂肪组织中特异性表达,其通过与细胞膜上的 APN 受体蛋白结合发挥调节作用^[7,8]。近年来的研究发现 APN 是一种肿瘤抑制因子,APN 参与多种恶性肿瘤的发生和发展,比如子宫内膜癌^[9,10]、结直肠癌^[11,12]和乳腺癌^[13,14]等。子宫内膜癌的发病率在中国女性生殖道恶性肿瘤中排名第二,对子宫内膜癌诊断、治疗以及发病因素的研究是目

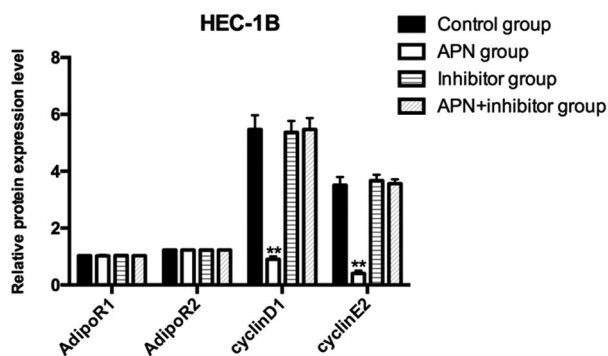


图 5 各组 AdipoR1、AdipoR2、cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达水平比较

Fig.5 Comparison of expression levels of AdipoR1, AdipoR2, cyclinD1 and cyclinE2 proteins in each group

Note: Compared with control group, ** $P<0.05$.

前的研究重点^[15,16]。

APN 作为抑癌因子,能够抑制肿瘤进展,已有研究报道显示在肿瘤分期较高的子宫内膜癌当中 APN 受体的表达水平明显下降^[17]。本研究发现 APN 能够明显抑制子宫内膜癌细胞的增殖、迁移和侵袭功能,而 APN 和 AMPK 抑制剂同时处理子

宫内膜癌细胞后肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭功能恢复至正常水平,实验结果表明 APN 能够抑制子宫内癌细胞的增殖、迁移和侵袭功能,并且其功能依赖于 AMPK 信号通路的活化。进一步通过 Western blot 检测 AMPK 信号通路相关蛋白的表达也证实 ANP 能够激活 AMPK 信号通路。目前对于 ANP 激活 AMPK 信号通路的分子机制仍然缺乏了解,已有研究报道显示 ANP 能够诱导 LKB1 蛋白表达,LKB1 作为 AMPK 信号通路的上游分子,其表达水平上调能够激活 AMPK 信号通路^[18]。APN 对子宫内癌细胞增殖、迁移和侵袭功能的抑制一方面可能是由于 APN 能够激活 AMPK 信号通路,进而抑制子宫内癌细胞的进展,另一方面可能是由于 APN 刺激下能够抑制子宫内癌细胞内多种信号通路的活化,进而导致子宫内癌细胞的生长和转移抑制^[19,20],例如在胰腺癌中的研究发现 APN 能够抑制 β -catenin 信号通路,进而抑制胰腺癌细胞生长^[21]。AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白作为 APN 受体,是 APN 的直接作用靶点^[22,23]。进一步实验结果显示 APN 不影响 AdipoR1、AdipoR2 蛋白表达,说明 APN 对子宫内癌细胞的调节作用并不是通过上调 AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白表达实现的,APN 更多是通过与 AdipoR1 和 AdipoR2 两种受体蛋白结合,进而活化胞内信号通路,从而影响子宫内癌细胞的增殖和迁移等过程。卵巢癌中的研究结果显示 APN 与 AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白结合,进而抑制卵巢癌细胞增殖以及 IGF-1 信号通路的活化^[24]。cyclinD1 和 cyclinE2 是细胞周期调节蛋白,是 G1/S 细胞周期检查点的重要调节蛋白^[25,26]。本研究发现 APN 处理后子宫内癌细胞中 cyclinD1 和 cyclinE2 表达水平明显下调,实验结果表明 APN 能够诱导子宫内癌细胞发生细胞周期阻滞,导致细胞分裂障碍,分析其原因可能是由于 ANP 能够激活 AMPK 信号通路,进而抑制 cyclinD1 和 cyclinE2 表达。黑色素瘤中的研究显示 AMPK 信号通路的活化能够引起黑色素瘤细胞发生细胞周期阻滞^[27]。其次,ANP 也可能通过抑制其它细胞周期相关信号通路的活化来抑制 cyclinD1 和 cyclinE2 表达,如卵巢癌中的研究显示抑制 STAT3 信号通路会抑制卵巢癌细胞的细胞周期进程并诱导肿瘤细胞发生凋亡^[28]。

综上所述,APN 能够激活 AMPK 信号通路并下调 cyclinD1 和 cyclinE2 蛋白表达,进而抑制子宫内癌细胞的增殖、迁移和侵袭功能。

参考文献(References)

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424
- [2] Ciortea R, Şuşman S, Măluţan AM, et al. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and Ishikawa cells co-culture highlight the role of adiponectin in endometrial cancer pathogenesis [J]. Rom J Morphol Embryol, 2018, 59(4): 1165-1172
- [3] Di Zazzo E, Polito R, Bartollino S, et al. Adiponectin as Link Factor between Adipose Tissue and Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): 839
- [4] Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, et al. Adipose Tissue, Obesity and Adiponectin: Role in Endocrine Cancer Risk [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2863
- [5] Lin SC, Hardie DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status[J]. Cell Metab, 2018, 27(2): 299-313
- [6] Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(2): 121-135
- [7] 张丽志, 朱元喜, 薛凤霞. 脂联素与乳腺癌和子宫内癌关系的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2008, 35(2): 117-121
- [8] Tuna BG, Cleary M, Dogan S. Roles of Adiponectin Signaling Related Proteins in Mammary Tumor Development [J]. South Clin Istanbul Eurasia, 2019, 30(4): 290-295
- [9] Busch EL, Crous-Bou M, Prescott J, et al. Adiponectin, Leptin, and Insulin-Pathway Receptors as Endometrial Cancer Subtyping Markers [J]. Horm Cancer, 2018, 9(1): 33-39
- [10] 王巍巍, 崔玉兰, 孙海艳. 脂联素及其受体与子宫内癌关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(9): 1503-1505
- [11] Otani K, Ishihara S, Yamaguchi H, et al. Adiponectin and colorectal cancer[J]. Surg Today, 2017, 47(2): 151-158
- [12] 解寒冰, 夏云展, 薛建锋, 等. 脂联素在结直肠癌患者中的表达及其对结直肠癌细胞增殖和 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(19): 47-51
- [13] Güven HE, Doğan L, Gülçelik MA, et al. Adiponectin: A Predictor for Breast Cancer Survival[J]. Eur J Breast Health, 2018, 15(1): 13-17
- [14] 刘爱蕊, 李秀楠, 王钢乐, 等. 脂联素及其受体在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的相关性分析[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(17): 3285-3290
- [15] 玉婷婷, 王纯雁, 曾庆东, 等. 子宫内癌组织 KIF23、LAPTM4B、Snail 表达与患者临床病理参数及预后的关系[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(16): 3069-3073, 3086
- [16] 王秀琪, 孙智晶, 郎景和. 子宫内癌的筛查 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(11): 93-97
- [17] 侯英, 张蒙, 耿宇宁. 血清 CA125、CA199 联合脂联素对子宫内癌的的诊断价值[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(11): 1760-1763
- [18] 程媛. 脂联素通过 LKB1 途径激活骨骼肌腺苷酸活化蛋白激酶 [D]. 安徽: 安徽医科大学, 2010
- [19] Jian M, Kwan JS, Bunting M, et al. Adiponectin suppresses amyloid- β oligomer (A β O)-induced inflammatory response of microglia via AdipoR1-AMPK-NF- κ B signaling pathway[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 110
- [20] Luo L, Zheng W, Lian G, et al. Combination treatment of adipose-derived stem cells and adiponectin attenuates pulmonary arterial hypertension in rats by inhibiting pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and regulating the AMPK/BMP/Smad pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(1): 51-60
- [21] Jiang J, Fan Y, Zhang W, et al. Adiponectin Suppresses Human Pancreatic Cancer Growth through Attenuating the β -Catenin Signaling Pathway[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(2): 253-264
- [22] Alzahrani B, Iseli T, Ramezani-Moghadam M, et al. The role of AdipoR1 and AdipoR2 in liver fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(3): 700-708
- [23] Ruiz M, Ståhlman M, Borén J, et al. AdipoR1 and AdipoR2 maintain membrane fluidity in most human cell types and independently of adiponectin[J]. J Lipid Res, 2019, 60(5): 995-1004
- [24] Hoffmann M, Gogola J, Ptak A. Adiponectin Reverses the Proliferative Effects of Estradiol and IGF-1 in Human Epithelial Ovarian Cancer Cells by Downregulating the Expression of Their Receptors[J]. Horm Cancer, 2018, 9(3): 166-174

134

- [7] Kivela R, Hemanthakumar KA, Vaparanta K, et al. Endothelial Cells Regulate Physiological Cardiomyocyte Growth via VEGFR2-Mediated Paracrine Signaling[J]. *Circulation*, 2019, 139(22): 2570-2584
- [8] Wang H, Zhang S, Wang N, et al. Genetic variants of VEGFR-1 gene promoter in acute myocardial infarction[J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1): 56
- [9] 谢林润,李骊华.血管内皮生长因子在心血管疾病中的作用[J]. *国际心血管病杂志*, 2019, 46(4): 219-222
- [10] Schwabl P, Payer BA, Grahovac J, et al. Pioglitazone decreases portosystemic shunting by modulating inflammation and angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertensive rats [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1135-1142
- [11] 刘忠强,屈玲玲,邹琴,等.吡格列酮调控 β -连环蛋白表达延缓糖尿病大鼠肾脏纤维化的组织和细胞实验研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2020, 28(7): 529-536
- [12] 徐晓东,徐浩,王姗姗,等.吡格列酮联合利拉鲁肽对老年 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝患者血浆脂联素、转化生长因子- β 1 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(1): 43-46
- [13] Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2005, 366(9493): 1279-1289
- [14] Tan A, Cao Y, Xia N, et al. The addition of pioglitazone in type 2 diabetics poorly controlled on insulin therapy: a meta-analysis[J]. *Eur J Intern Med*, 2010, 21(5): 398-403
- [15] 贺滢.CaMK II 对 20-HETE 诱导的心肌细胞凋亡和肥大的作用及机制研究[D].贵州:遵义医学院, 2018: 1-72
- [16] Vázquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2016, 594(3): 509-525
- [17] Behringer A, Trappiel M, Berghausen EM, et al. Pioglitazone alleviates cardiac and vascular remodelling and improves survival in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2016, 389(4): 369-379
- [18] Sakamoto A, Hongo M, Furuta K, et al. Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model of angiotensin I-I-induced hypertension[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(2): 409-415
- [19] Chang CS, Tsai PJ, Sung JM, et al. Diuretics prevent thiazolidine-dione-induced cardiac hypertrophy without compromising insulin-sensitizing effects in mice[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(2): 442-453
- [20] Elshama SS, El-Kenawy Ael-M, Osman HE. Toxicological evaluation of subchronic use of pioglitazone in mice [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(7): 712-719
- [21] 车瑞芹,崔秀洁,马常满.吡格列酮通过 PI3K/AKT 通路改善多柔比星诱导的心脏毒性 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2021, 42(3): 402-406
- [22] 何晓乐.吡格列酮对老年 2 型糖尿病伴高血压患者血糖、血压及血管内皮功能的影响[D].中国人民解放军空军军医大学;第四军医大学, 2016: 1-43
- [23] 万邦贝,刘波,王兆兴,等.Meis1 与 VEGFR-2 在早期肾癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2020, 45(9): 1061-1067
- [24] Sarabipour S, Ballmer-Hofer K, Hristova K. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding[J]. *Elife*, 2016, 5: e13876
- [25] Zheng L, Han P, Liu J, et al. Role of copper in regression of cardiac hypertrophy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 66-84
- [26] 王秀珍,邹伟,李冀,等.基于 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路探讨稳心丹对 MIRI 大鼠心肌保护作用的机制研究[J]. *中医药学报*, 2020, 48(10): 6-11
- [27] 郑建滨,黄娟珍,吴加富,等.星状神经节阻滞对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(6): 9-13
- [28] 高伟年,赵曙光,郭娜,等.HERC2 通过激活 PI3K-AKT 信号促进心肌细胞肥大[J]. *河北医科大学学报*, 2020, 41(6): 632-636
- [29] 徐彬,杨秀书,刘旋,等.尿液环境中肠上皮细胞及其凋亡因子半胱氨酸蛋白酶 3、Bax 和 Bcl-2 表达的变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(20): 3173-3177
- [30] 刘中,产进中,黄俊,等.缺血预处理诱导的外泌体对心肌细胞低氧/复氧损伤及 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(2): 197-202

(上接第 3817 页)

- [25] Ru Y, Chen XJ, Zhao ZW, et al. CyclinD1 and p57kip2 as biomarkers in differentiation, metastasis and prognosis of gastric cardia adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 73860-73870
- [26] Xu X, Tian J, Li QY. Downregulation of HOTTIP regulates insulin secretion and cell cycle in islet β cells via inhibiting MEK/ERK pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(15): 4962-4968
- [27] Song M, Lee J, Kim YJ, et al. Jeju Magma-Seawater Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis via CaMKK β -AMPK Signaling Pathways in B16F10 Melanoma Cells [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(9): 473
- [28] Wen W, Lowe G, Roberts CM, et al. Pterostilbene Suppresses Ovarian Cancer Growth via Induction of Apoptosis and Blockade of Cell Cycle Progression Involving Inhibition of the STAT3 Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1983