

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.24.002

糖尿病诱导 serpinE1 分泌增多对心肌细胞 NF- κ B 核易位及凋亡的影响*

赵娜 黄璐 沈惺忆 葛清 朱苏文 任晓敏 胡作英^Δ

(南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)心内科 江苏南京 210006)

摘要 目的:探讨糖尿病诱导 serpinE1 分泌增多是否引起心肌细胞 NF- κ B 核易位及凋亡。**方法:**8 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和糖尿病组,糖尿病模型应用链脲佐菌素腹腔注射诱导。体外试验中,应用低糖(5.5 mmol/L)及高糖(25 mmol/L)浓度培养基分别处理大鼠心肌 H9C2 细胞。ELISA 法分别检测小鼠血清及细胞培养上清中的 serpinE1 水平,Western Blot 分别检测心脏组织及细胞中 caspase-3、cleaved caspase-3 以及细胞浆、细胞核中 NF- κ B 蛋白表达。此外,H9C2 细胞分为三组:对照组、serpinE1 重组蛋白处理组、JSH-23 与 serpinE1 重组蛋白共同处理组,Western Blot 检测上述相同指标。**结果:**糖尿病小鼠血清及高糖处理的细胞培养上清中 serpinE1 水平较对照组显著增加($P<0.05$)。同对照组相比,细胞核/细胞浆 NF- κ B、cleaved caspase-3/caspase-3 在糖尿病小鼠心肌组织及 H9C2 细胞高糖处理组中显著上升 ($P<0.05$)。此外,serpinE1 重组蛋白处理后细胞核/细胞浆 NF- κ B 以及 cleaved caspase-3/caspase-3 同对照组相比,均显著增加($P<0.05$),而 JSH-23 则减弱了 serpinE1 的这些效应。**结论:**糖尿病诱导 serpinE1 分泌增多促进心肌细胞 NF- κ B 核易位及凋亡。

关键词:serpinE1;NF- κ B;心肌凋亡

中图分类号:R-33;R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)24-4606-06

Effects of Diabetes-induced Increase in SerpinE1 Secretion on Nuclear Translocation of NF- κ B and Apoptosis in Cardiomyocytes*

ZHAO Na, HUANG Lu, SHEN Xing-yi, GE Qing, ZHU Su-wen, REN Xiao-min, HU Zuo-ying^Δ

(Department of Cardiology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210006, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether the increased secretion of serpinE1 induced by diabetes can cause nuclear translocation and apoptosis of NF- κ B in cardiomyocytes. **Methods:** 8-week-old C57BL/6J mice were randomly divided into control and diabetic group. The diabetes model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. *In vitro*, rat myocardial H9C2 cells were treated with low-glucose (5.5 mmol/L) and high-glucose (25 mmol/L) concentration media, respectively. SerpinE1 levels in mouse serum and cell culture supernatant were detected by ELISA, as well as caspase-3 and cleaved caspase-3, in line with NF- κ B protein expressions in cytoplasm and nucleus in heart tissue and cells were detected by Western Blot, respectively. In addition, H9C2 cells were divided into three groups: control, serpinE1 recombinant protein, and JSH-23 combined with serpinE1 recombinant protein. Western Blot were used to detect the same indicators above. **Results:** SerpinE1 levels in serum of diabetic mice and cell culture supernatants treated with high glucose were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). Compared with the control group, nuclear/cytoplasmic NF- κ B, cleaved caspase-3/caspase-3 were significantly increased in the myocardial tissue of diabetic mice and H9C2 cells treated with high glucose ($P<0.05$). Moreover, the nuclear/cytoplasmic NF- κ B and cleaved caspase-3/caspase-3 were significantly increased after serpinE1 recombinant protein treatment compared with the control group ($P<0.05$), while JSH-23 treatment attenuated these effects of serpinE1. **Conclusion:** Diabetes-induced increase in serpinE1 secretion promotes NF- κ B nuclear translocation and apoptosis in cardiomyocytes.

Key words: SerpinE1; NF- κ B; Myocardial apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)24-4606-06

前言

糖尿病心肌病(DCM)是糖尿病的常见并发症,基于人群的流行病学研究报道,几乎一半的糖尿病(DM)患者存在 DCM,其主要特征性表现为心肌肥厚、心脏纤维化及心力衰

竭,危害严重^[1,2]。长期高血糖状态是引起糖尿病患者心肌损伤的重要原因,但是多项大规模临床研究显示,单纯降糖治疗未能得到预期的心血管保护作用^[3]。因此,探讨触发 DCM 的发病机制,寻找早期有效的防控靶点,具有非常重要的意义。DM 早期诱导心肌细胞凋亡,引起心肌肥厚及心脏纤维化,最终导致

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82170363)

作者简介:赵娜(1997-),女,硕士研究生,研究方向:糖尿病心肌病,E-mail: zhaona_1997@163.com

^Δ 通讯作者:胡作英,女,博士,主任医师,研究方向:心律失常与心力衰竭,E-mail: Zuoying_Hu@163.com

(收稿日期:2022-05-24 接受日期:2022-06-21)

心力衰竭及 DCM^[1,4]。Hamid T 等报道了心力衰竭小鼠模型中,核因子- κ B (NF- κ B) 持续激活促进心肌细胞凋亡及心脏纤维化,加剧心脏重塑^[5]。Zuo 等进一步发现糖尿病小鼠心肌组织 NF- κ B 核易位增加,引起 NF- κ B 激活及心肌凋亡^[6]。此外,众多文献阐明了抑制 NF- κ B 核易位可有效改善 DCM^[7-9]。这些研究均表明 NF- κ B 可能是治疗 DCM 的重要分子靶点。丝氨酸蛋白酶抑制剂进化枝 E 成员 1 (serpinE1),也被称为纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1),为分泌型蛋白,与 NF- κ B 相互作用,参与高糖诱导的人皮肤成纤维细胞损伤^[10]。糖尿病患者血清中 serpinE1 水平明显升高^[11,12],是否促发心肌细胞 NF- κ B 核易位及凋亡,从而导致心脏重塑及 DCM,目前尚不明确。本研究设计研究糖尿病诱导 serpinE1 分泌增多对心肌细胞 NF- κ B 核易位及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 30 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购于常州卡文斯实验动物有限公司,所有动物均在实验室适应性喂养一周,然后随机被分为对照组、糖尿病模型组,每组 15 只。C57BL/6J 小鼠以 55 mg / (kg·d) 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (美国 Sigma-Aldrich 公司) 进行腹腔注射,连续 5 d,1 周后断尾取血,血糖仪检测血糖,以血糖浓度大于 16.7 mmol / L 作为 1 型糖尿病小鼠。4 周后,对照组、糖尿病模型组小鼠分别摘眼球取血,离心获取血清,-80℃ 保存备用,同时分离心脏组织,提取组织总蛋白进行 Western-blot 实验^[6,13]。所有实验程序均经动物实验伦理委员会预审,并遵循南京医科大学小鼠实验指南(编号: IACUC-1802007)。

1.1.2 主要试剂 大鼠及小鼠 serpinE1 ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);大鼠 serpinE1 重组蛋白(武汉华美生物工程有限公司);caspase-3、cleaved caspase-3、NF- κ B p65、Histone H3 及 β -actin 抗体 (Cell Signaling Technology 公司);JSH-23 (NF- κ B p65 核易位抑制剂)(美国 MedChemExpress 公司);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 大鼠心肌 H9C2 细胞(上海中乔新舟生物科技有限公司)分别培养在含有 10 % 胎牛血清 (美国 Gibco 公司) 和 1 % 青霉素、链霉素的低糖 (LG, 5.5 mmol/L) 及高糖 (HG,

25 mmol/L) DMEM 培养基 (武汉赛维尔生物科技有限公司) 中,于 37℃、5 % CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,每 2-3 天传代,并取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.2 ELISA 法检测 SerpinE1 的含量 将 H9C2 细胞以每孔 5×10^5 个细胞种植于 12 孔板中,对照组的孔中加入 1 mL 的低糖 DMEM 培养基,高糖组的孔中加入 1 mL 的高糖 DMEM 培养基,每组设 6 个复孔。采用大鼠 serpinE1 ELISA 试剂盒检测两组细胞培养上清中 serpinE1 的含量,检测方法按照试剂盒说明书进行操作。-80℃ 保存备用的小鼠血清在检测 ELISA 前,事先放在 4℃ 冰箱过夜,然后离心并按照试剂盒说明书进行后续操作。酶标仪型号为 Thermo Scientific Multiskan FC (美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2.3 大鼠 SerpinE1 重组蛋白与 JSH-23 处理 大鼠 serpinE1 重组蛋白用 PBS 溶解配置成 100 μ g/mL 母液,然后分别应用 10 ng/mL、20 ng/mL serpinE1 干预 H9C2 细胞。JSH-23 (NF- κ B p65 核易位抑制剂)用 DMSO 溶解配置成 10 mmol/L 母液,然后分别应用 10 μ mol/L (μ M) 和 30 μ mol/L (μ M) 浓度的 JSH-23 预处理 H9C2 细胞 1 h,最后再分别与 serpinE1 重组蛋白共同处理细胞。未经 serpinE1 及 JSH-23 干预的 H9C2 细胞作对照组。

1.2.4 Western Blot 法检测蛋白表达 提取心肌组织及细胞中总蛋白、细胞浆及细胞核蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,根据样品浓度确定上样量,保证上样量均为 20 μ g,电泳和湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜后,5 % BSA 封闭 2 h 后,加入相应一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,孵育辣根过氧化物酶标记的二抗,室温摇床 1 h, TBST 洗 3 次, ECL 发光液显色、曝光。成像设备型号 GeneGnome XRQ (英国 Syngene 公司),使用 Image J 软件进行条带的灰度值分析。

1.3 统计学分析

应用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较均采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠血清中 serpinE1 含量

15 只小鼠,STZ 成功诱导糖尿病小鼠 14 只,4 周后对照组及糖尿病小鼠均未出现死亡。同对照组小鼠相比,糖尿病小鼠血清中 serpinE1 含量显著增多 ($P=0.017$)。(表 1)。

表 1 两组小鼠血清中 serpinE1 含量 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Table 1 Comparison of serpinE1 levels in serum between the two mice groups ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Index	Control(n=15)	Diabetic mice(n=14)	P-value
serpinE1	2.88 $\pm$ 0.76	5.32 $\pm$ 0.91	0.017

2.2 两组细胞培养上清中 serpinE1 含量

低糖 (LG) 与高糖 (HG) 培养基分别培养 H9C2 细胞 48 h 后, ELISA 检测两组培养上清中 serpinE1 含量。同低糖培养的 H9C2 细胞上清相比,高糖培养的细胞上清中 serpinE1 含量显著增多 ($P=0.022$)。(表 2)。

2.3 糖尿病促进心肌 NF- κ B 核易位及凋亡

STZ 诱导糖尿病小鼠 4 周后,分离对照组及糖尿病小鼠心肌组织,Western Blot 检测心肌 NF- κ B 核易位及凋亡。同对照组小鼠相比,糖尿病小鼠心肌组织中细胞核 NF- κ B 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$) 及 cleaved caspase-3/caspase-3 比值增加 ($P < 0.05$),而细胞浆 NF- κ B 蛋白表达则明显降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

表 2 两组细胞培养上清中 serpinE1 含量($\bar{x} \pm s$, pg/mL)Table 2 Comparison of serpinE1 levels in cell culture supernatants between the two groups ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Index	LG(n=6)	HG(n=6)	P-value
serpinE1	45.12 $\pm$ 8.53	87.71 $\pm$ 10.36	0.022

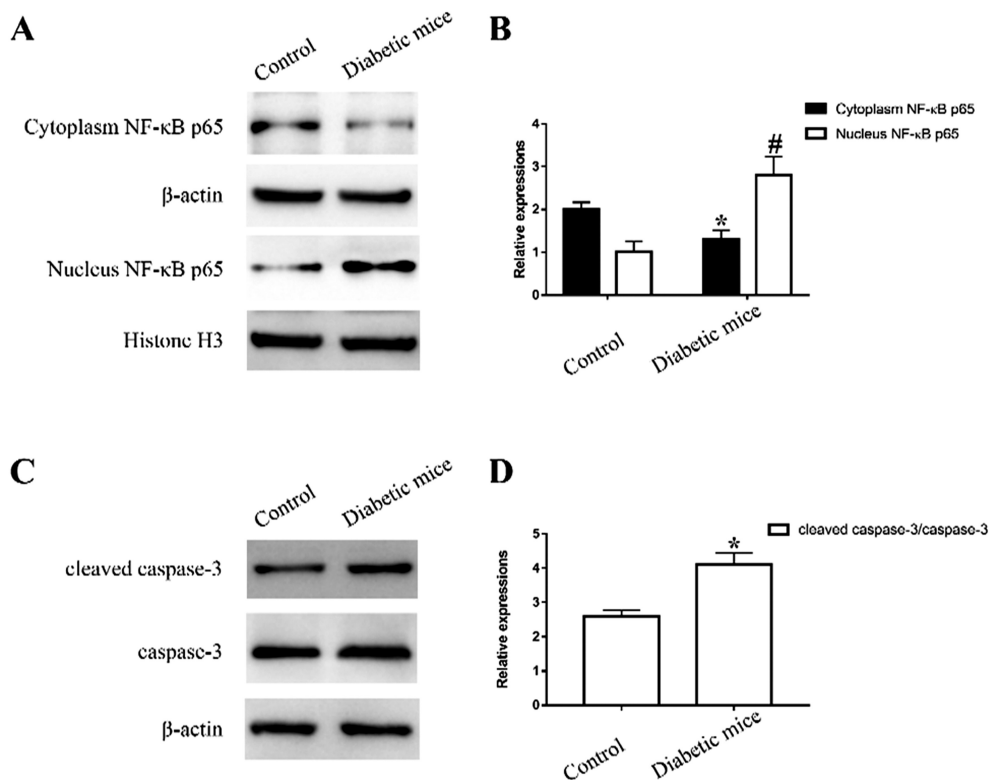


图 1 两组小鼠心脏组织中 NF-κB p65 核易位及凋亡的变化

Fig.1 Changes of NF-κB p65 nuclear translocation and apoptosis in heart tissue of two groups of mice

注:与 Control 小鼠比 * $P<0.05$, # $P<0.01$ 。Note: compared with Control, * $P<0.05$, # $P<0.01$.

2.4 高糖促进 H9C2 细胞 NF-κB 核易位及凋亡

低糖(LG)与高糖(HG)培养基分别培养 H9C2 细胞 48 h 后, Western Blot 检测细胞 NF-κB 核易位及凋亡。同 LG 组相比, HG 组细胞核 NF-κB 蛋白表达显著上调($P<0.01$)及 cleaved caspase-3/caspase-3 比值增加($P<0.05$),而细胞浆 NF-κB 蛋白表达则明显降低($P<0.05$)。见图 2。

2.5 serpinE1 重组蛋白促进 H9C2 细胞 NF-κB 核易位及凋亡

不同浓度大鼠 serpinE1 重组蛋白(10 ng/mL 和 20 ng/mL)处理 H9C2 细胞 48 h 后, Western Blot 检测细胞 NF-κB 核易位及凋亡。同对照组相比,不同浓度 serpinE1 处理组细胞核 NF-κB 蛋白均表达上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$),cleaved caspase-3/caspase-3 比值均增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),细胞浆 NF-κB 蛋白表达则均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。此外,同 10 ng/mL serpinE1 处理组相比,20 ng/mL serpinE1 处理组细胞核 NF-κB 蛋白表达进一步增加($P<0.05$),细胞浆 NF-κB 蛋白表达则进一步降低($P<0.05$)。见图 3。

2.6 JSH-23 抑制 serpinE1 重组蛋白致 NF-κB 核易位及促凋亡效应

不同浓度 JSH-23(10 μ M 和 30 μ M)预处理 1 h,再分别与大鼠 serpinE1 重组蛋白(20 ng/mL)共同处理 H9C2 细胞 48 h 后, Western Blot 检测细胞 NF-κB 核易位及凋亡。同单纯 serpinE1

处理组相比,不同浓度 JSH-23 与 serpinE1 共同处理后引起的细胞核 NF-κB 蛋白表达及 cleaved caspase-3/caspase-3 比值均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),细胞浆 NF-κB 蛋白表达则均增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。此外,同 10 μ M JSH-23 相比,30 μ M JSH-23 与 serpinE1 共同处理后,进一步引起细胞核 NF-κB 蛋白表达降低($P<0.05$),而增加细胞浆 NF-κB 蛋白表达($P<0.05$)。见图 4。

3 讨论

1972 年 Rubler 等^[14]对 27 例糖尿病肾小球硬化症的患者进行尸检,发现 4 例有明显的心肌肥厚、心肌纤维化和充血性心力衰竭现象,这 4 例患者都有至少 3 年的糖尿病病史,但并无其他引起心力衰竭的病因,进而提出 DCM 的概念。众多文献综述了前期的研究,发现无论在糖尿病动物模型中,还是在高糖刺激心肌细胞后,均存在心肌肥大、心肌纤维化以及糖尿病动物出现舒张/收缩功能障碍,抑制心肌肥厚及心肌纤维化可改善 DCM^[14-16]。在 DCM 早期,尽管心肌肥厚、心肌纤维化导致患者心脏舒张功能受损,但患者并无临床症状,然而随着病程进展,患者心脏收缩功能明显下降进而出现心力衰竭^[14]。因此,寻找早期触发心肌肥厚及心肌纤维化的分子靶点,并进行干预对治疗 DCM 具有里程碑的意义。

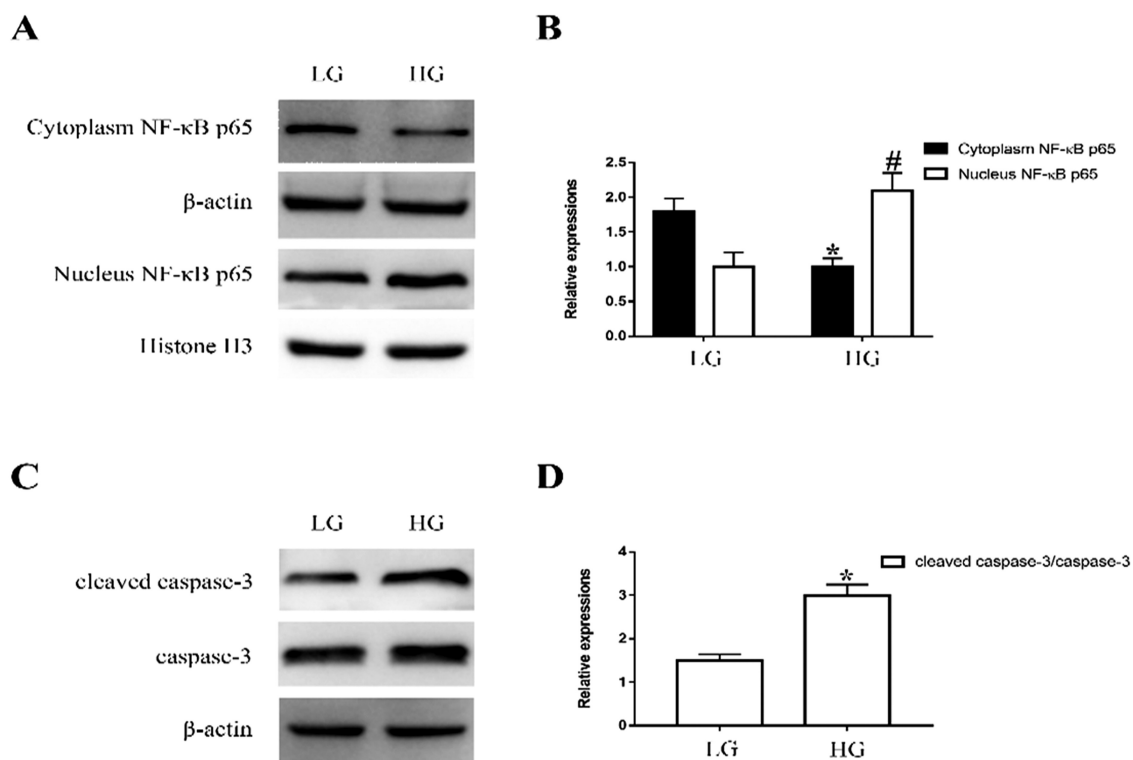


图2 两种糖浓度培养基培养 H9C2 细胞后 NF-κB p65 核易位及凋亡的变化

Fig.2 Changes of NF-κB p65 nuclear translocation and apoptosis in H9C2 cells cultured with two glucose concentrations

注:LG-低糖,HG-高糖,与 LG 比 * $P<0.05$, # $P<0.01$ 。

Note: LG-Low glucose, HG-high glucose; Compared with LG, * $P<0.05$, # $P<0.01$.

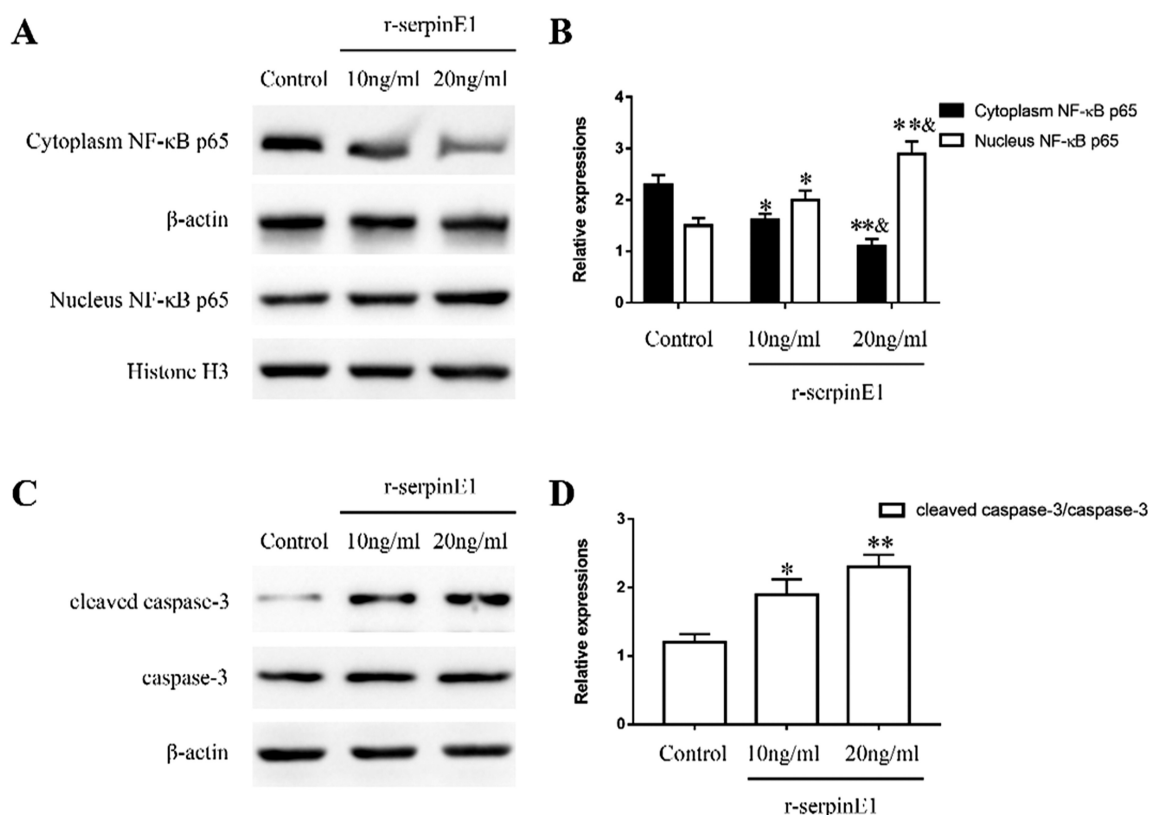


图3 不同浓度 serpinE1 重组蛋白刺激 H9C2 细胞后 NF-κB p65 核易位及凋亡的变化

Fig.3 Changes of NF-κB p65 nuclear translocation and apoptosis in H9C2 cells stimulated with different concentrations of serpinE1 recombinant protein

注:r-serpinE1-serpinE1 重组蛋白,与 Control 比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 10 ng/mL serpinE1 重组蛋白比 & $P<0.05$ 。

Note: r-serpinE1-serpinE1 recombinant protein; Compared with Control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with 10 ng/mL r-serpinE1, & $P<0.05$.

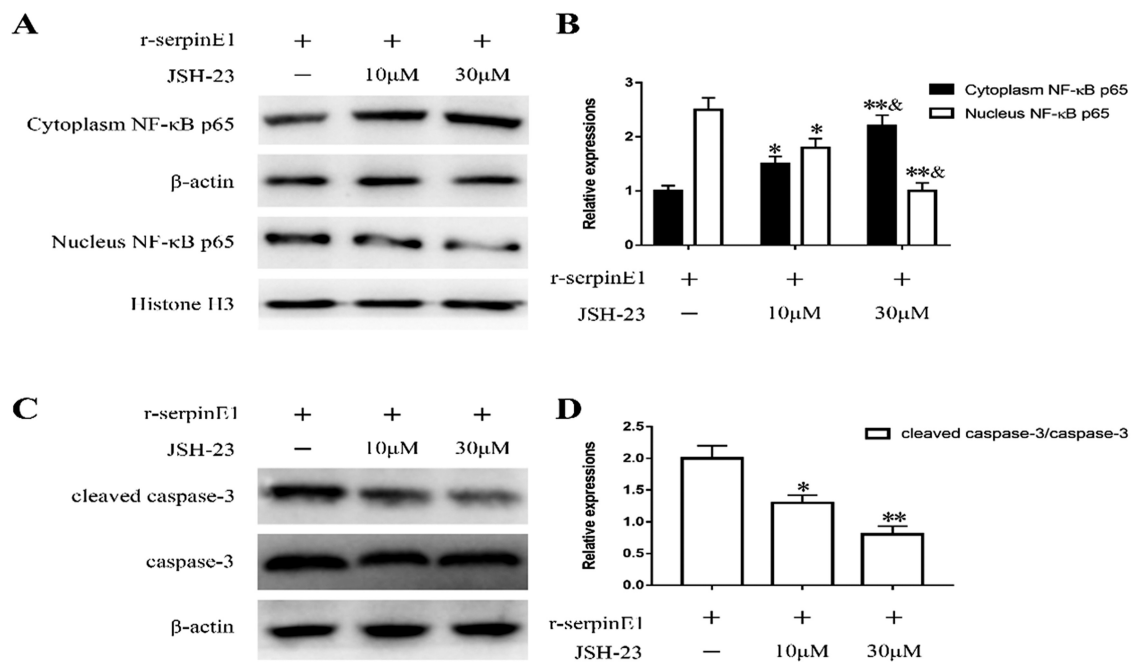


图4 不同浓度 JSH-23 对 serpinE1 重组蛋白(20 ng/mL)刺激 H9C2 细胞后 NF-κB p65 核易位及凋亡的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of JSH-23 on NF-κB p65 nuclear translocation and apoptosis in H9C2 cells stimulated with serpinE1 recombinant protein(20 ng/mL)

注:与 r-serpinE1 比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 r-serpinE1+JSH-23 10 μM 比 * $P<0.05$ 。

Note: compared with r-serpinE1, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with r-serpinE1 pretreated with 10 μM JSH-23, * $P<0.05$.

心肌细胞凋亡引起心肌收缩单位的损失和修复性纤维化发生,是引起心肌肥厚、心脏纤维化及导致心力衰竭的一个重要因素^[6,17,18]。在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠模型中,在 STZ 诱导后的 4 周即可观察到心肌细胞的凋亡显著增加^[19]。在本研究中,我们应用 STZ 对小鼠进行腹腔注射,4 周后检测到心肌组织 Cleaved caspase-3 蛋白表达及 Cleaved caspase-3/caspase-3 比值明显增加,提示心肌凋亡,这与既往报道相一致。NF-κB p65 持续激活促进心肌细胞凋亡及心脏纤维化,加剧心脏重塑^[5]。在体外实验中,我们前期研究发现高糖诱导 H9C2 细胞 NF-κB p65 核易位及凋亡增加,而 JSH-23(NF-κB p65 核易位抑制剂)处理后则显著缓解高糖效应^[20]。此外,大量研究发现,在糖尿病动物模型中,高糖诱导 NF-κB p65 磷酸化,促进 NF-κB p65 入核,从而导致肾脏足细胞^[21-23]、肾小管上皮细胞^[24]、视网膜上皮细胞及周细胞^[25,26]、血管内皮细胞凋亡^[27-29],提示 NF-κB p65 介导高糖诱导的多种细胞凋亡及参与多种糖尿病并发症,如糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变及糖尿病血管病变。如前所述,既往文献报道了 STZ 诱导的糖尿病小鼠 4 周后即可出现心肌凋亡,我们动物实验结果进一步证实了这一结论,并发现 4 周糖尿病小鼠心肌组织 NF-κB p65 核易位较对照组明显增加。鉴于我们体外及动物实验结果,以及既往研究报道的 NF-κB p65 介导高糖诱导的多种细胞凋亡。据此,我们推测,在糖尿病早期,NF-κB p65 核易位可能介导了高糖诱导的心肌细胞凋亡,靶向抑制 NF-κB p65 则可能显著改善包括 DCM 在内的一系列糖尿病并发症的进展。因此,寻找早期触发 NF-κB p65 激活的分子靶点,对防治 DCM 具有重要意义。

丝氨酸蛋白酶抑制剂进化枝 E 成员 1 (serpinE1),即纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI-1),其作为分泌型蛋白,已被报道诱

导细胞凋亡,参与多种疾病的病理生理过程^[30-32]。Pang 等研究发现 serpinE1 与 NF-κB 相互作用,参与高糖诱导的人皮肤成纤维细胞损伤^[10]。鉴于 50%DM 患者存在 DCM^[1,2],而 DM 患者血清中 serpinE1 水平明显升高^[11,12,33],参与心血管疾病的病理生理过程。此外,Lothar A 等通过对 STZ 诱导的糖尿病小鼠心肌组织进行单细胞测序,进一步发现 serpinE1 在心肌细胞中表达上调^[34]。因此,我们推测 serpinE1 分泌增多可能促进心肌细胞 NF-κB 核易位及凋亡,参与心肌重塑,最终导致 DCM。尽管既往研究报道了 serpinE1 参与血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡及修复性心肌纤维化,加剧心脏重塑^[35],但 serpinE1 是否促进高糖诱导心肌细胞凋亡以及相关机制,目前尚不清楚。本研究体外及在体实验中,均显示 DM/高糖诱导心肌细胞 serpinE1 分泌增多,促进 NF-κB 核易位及其介导的心肌凋亡,提示 serpinE1 可能是触发 DCM 的独立致病因子,靶向抑制 serpinE1 分泌可能对防治 DCM 具有重要的意义。

总之,本研究阐明了 DM 诱导 serpinE1 分泌增多促进心肌细胞 NF-κB 核易位及凋亡,可能参与心肌重塑,最终导致 DCM,但 serpinE1 对心肌细胞具体的生物学效应,以及其对 NF-κB 作用的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Tan Y, Zhang Z, Zheng C, et al. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence [J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(9): 585-607
- [2] Marwick TH, Ritchie R, Shaw JE, et al. Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(3): 339-351
- [3] Pofi R, Giannetta E, Galea N, et al. Diabetic cardiomyopathy progression is triggered by miR122-5p and involves extracellular

- matrix: a 5-year prospective study [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2021, 14(6): 1130-1142
- [4] Ritchie RH, Abel ED. Basic mechanisms of diabetic heart disease [J]. *Circ Res*, 2020, 126(11): 1501-1525
- [5] Hamid T, Guo SZ, Kingery JR, et al. Cardiomyocyte NF- κ B p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(1): 129-138
- [6] Zuo GF, Ren XM, Ge Q, et al. Activation of the PP2A catalytic subunit by ivabradine attenuates the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 130: 170-183
- [7] Shi H, Wang L, Fang ZH, et al. Experimental study on effect and mechanism of danzhi jiangtang capsules on diabetic myocardial injury[J]. *Zhong guo Zhong Yao Za Zhi*, 2019, 44(23): 5159-5165
- [8] Cheng G, Li L. High-glucose-induced apoptosis, ROS production and pro-inflammatory response in cardiomyocytes is attenuated by metformin treatment via PP2A activation[J]. *J Biosci*, 2020, 45: 126
- [9] Liu L, Luo H, Liang Y, et al. Dapagliflozin ameliorates STZ-induced cardiac hypertrophy in type 2 diabetic rats by inhibiting the calpain-1 expression and nuclear transfer of NF- κ B [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 3293054
- [10] Pang LX, Wang YP, Zheng MQ, et al. Transcriptomic study of high glucose effects on human skin fibroblast cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2627-2634
- [11] Yener S, Comlekci A, Akinci B, et al. Soluble CD40 ligand, plasminogen activator inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-1-antigen in normotensive type 2 diabetic subjects without diabetic complications [J]. *Med Princ Pract*, 2009, 18 (4): 266-271
- [12] Mossberg KE, Pournaras DJ, Welbourn R, et al. Differential response of plasma plasminogen activator inhibitor 1 after weight loss surgery in patients with or without type 2 diabetes [J]. *Surg Obes Relat Dis*, 2017, 13(1): 53-57
- [13] Zuo G, Ren X, Qian X, et al. Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1925-1936
- [14] Murtaza G, Virk HUH, Khalid M, et al. Diabetic cardiomyopathy-a comprehensive updated review [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2019, 62(4): 315-326
- [15] Dillmann WH. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124(8): 1160-1162
- [16] Cherney DZ, Odotayo A, Aronson R, et al. Sodium glucose cotransporter-2 inhibition and cardiorenal protection: JACC review topic of the week[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(20): 2511-2524
- [17] Thabassum Akhtar Iqbal S, Tirupathi Pichiah PB, Raja S, et al. Paeonol reverses adriamycin induced cardiac pathological remodeling through notch1 signaling reactivation in H9c2 cells and adult zebrafish heart[J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(2): 312-323
- [18] Ni J, Li Y, Xu Y, et al. Salidroside protects against cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling by AKT/HO-1 signaling pathways in a diabetic cardiomyopathy mouse model [J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153406
- [19] Zhang X, Qu L, Chen L, et al. Improvement of cardiomyocyte function by in vivo hexarelin treatment in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Physiol Rep*, 2018, 6(4): e13612
- [20] Ren X, Zuo G, Wu W, et al. Atorvastatin alleviates experimental diabetic cardiomyopathy by regulating the GSK-3 β -PP2Ac-NF- κ B signaling axis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166740
- [21] Zhu L, Han J, Yuan R, et al. Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 9
- [22] Li F, Chen Y, Li Y, et al. Geniposide alleviates diabetic nephropathy of mice through AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 886: 173449
- [23] Yang PY, Li PC, Feng B. Protective effects of gliclazide on high glucose and AGEs-induced damage of glomerular mesangial cells and renal tubular epithelial cells via inhibiting RAGE-p22phox-NF- κ B pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(20): 9099-9107
- [24] Zhang R, Qin L, Shi J. MicroRNA 199a 3p suppresses high glucose induced apoptosis and inflammation by regulating the IKK β /NF- κ B signaling pathway in renal tubular epithelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(6): 2161-2171
- [25] Yang Q, Li S, Zhou Z, et al. HDAC6 inhibitor Cay10603 inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in retinal pigment epithelial cells via regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39 (2): 169-177
- [26] Yun JH. Interleukin-1 β induces pericyte apoptosis via the NF- κ B pathway in diabetic retinopathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 546: 46-53
- [27] Zhang W, Liu D, Ren J, et al. Overexpression of Sirtuin2 prevents high glucose-induced vascular endothelial cell injury by regulating the p53 and NF- κ B signaling pathways [J]. *Biotechnol Lett*, 2018, 40 (2): 271-278
- [28] Li H, Wu R, Xi Y, et al. Dopamine 1 receptors inhibit apoptosis via activating CSE/H2 S pathway in high glucose-induced vascular endothelial cells[J]. *Cell Biol Int*, 2022[Epub ahead of print]
- [29] Zhao W, Deng C, Han Q, et al. Carvacrol may alleviate vascular inflammation in diabetic db/db mice [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(3): 977-988
- [30] Wang T, Lu H, Li D, et al. TGF- β 1-mediated activation of SERPINE1 is involved in hemin-induced apoptotic and inflammatory injury in HT22 cells[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021, 11, 17: 423-433
- [31] Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis[J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(6): 1029-1036
- [32] Sillen M, Declerck PJ. A narrative review on plasminogen activator inhibitor-1 and its (patho)physiological role: to target or not to target? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2721
- [33] Bayomy O, Rao AD, Garg R, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and pericardial fat in individuals with type 2 diabetes mellitus [J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2017, 15(6): 269-275
- [34] Lothar A, Bondareva O, Saadatmand AR, et al. Diabetes changes gene expression but not DNA methylation in cardiac cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 151: 74-87
- [35] Flevaris P, Khan SS, Eren M, et al. Plasminogen activator inhibitor type I controls cardiomyocyte transforming growth factor- β and cardiac fibrosis[J]. *Circulation*, 2017, 136(7): 664-679