

# 抗氧化肽SS-31抑制高糖诱导的心肌细胞凋亡

李宇<sup>1</sup> 陈智浩<sup>1</sup> 唐丽娟<sup>2\*</sup> 梁子辉<sup>3</sup> 陈娟<sup>4</sup><sup>1</sup>厦门大学附属翔安医院, 厦门 361102; <sup>2</sup>河北省疾病预防控制中心慢性非传染性疾病防治所, 石家庄 050021;<sup>3</sup>河北医科大学临床实践教学部, 石家庄 050000; <sup>4</sup>河北经贸大学经济管理学院校医院, 石家庄 050000)

**摘要** 该文探讨了抗氧化肽SS-31对高糖诱导的大鼠心肌细胞凋亡的影响, 体外培养大鼠心肌细胞(H9C2), 给予高糖(30 mmol/L)进行刺激, 并利用抗氧化肽SS-31进行治疗后, 采用Western blot检测Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、Nox1、Nox4和Txnip的表达; 利用荧光实时定量PCR(Real-time PCR)检测Bax、Bcl-2、Nox1、Nox4和Txnip mRNA的表达; 采用原位缺口末端标记法(TUNEL)观察H9C2细胞凋亡情况; 应用MitoSOX™ Red染色检测H9C2细胞线粒体ROS产生情况。结果显示, 与正常对照组相比, 高糖组H9C2细胞凋亡明显增加, Bax、Cleaved caspase-3、Nox1、Nox4和Txnip蛋白表达明显上调, Bcl-2蛋白表达减少, 线粒体ROS产生增加; SS-31治疗后能够抑制高糖诱导的H9C2细胞的凋亡, 下调Bax、Cleaved caspase-3、Nox1、Nox4、Txnip表达, 上调Bcl-2表达并减少线粒体ROS的产生。以上研究结果提示, 抗氧化肽SS-31抑制高糖诱导的大鼠心肌细胞凋亡的同时抑制Txnip/ROS产生, 表明抗氧化肽SS-31可能对糖尿病心肌病变具有一定的改善作用。

**关键词** 抗氧化肽SS-31; 高糖; H9C2细胞; ROS; 凋亡

## Antioxidant Peptide SS-31 Inhibits High Glucose Induced Cardiomyocyte Apoptosis

LI Yu<sup>1</sup>, CHEN Zhihao<sup>1</sup>, TANG Lijuan<sup>2\*</sup>, LIANG Zihui<sup>3</sup>, CHEN Juan<sup>4</sup><sup>1</sup>Xiang'an Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361102, China; <sup>2</sup>Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Institute of Chronic Non-communicable Diseases, Shijiazhuang 050021, China;<sup>3</sup>Hebei Medical University, Department of Clinical Practice Teaching, Shijiazhuang 050000, China;<sup>4</sup>Hebei University of Economics, Economic Management College Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract** The aim of this article was to investigate the effect of antioxidant peptide SS-31 on HG (high glucose)-induced apoptosis in rat cardiomyocytes. *In vitro* culture of rat cardiomyocytes (H9C2) were stimulated with high glucose (30 mmol/L), and treated with antioxidant peptide SS-31. The protein expressions of Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3, Nox1, Nox4 and Txnip were observed by Western blot. The mRNA expressions of Bax, Bcl-2, Nox1, Nox4 and Txnip were observed by Real-time PCR. The nick end labeling method (TUNEL) was used to observe the apoptotic H9C2 cells situation. MitoSOX™ Red staining was used to detect the production of mitochondrial ROS in H9C2 cells. Compared with the normal control group, the apoptosis of H9C2 cells, was significantly increased. The proteins expression of Bax, Cleaved caspase-3, Nox1, Nox4 and Txnip was up-regulated. The expression of Bcl-2 protein was decreased, and the production of mitochondrial ROS was increased in high glucose

收稿日期: 2019-09-02 接受日期: 2020-02-17

河北省医学科学研究重点课题项目(批准号: 20170444)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0311-86573223, E-mail: bamboo203@sina.com

Received: September 2, 2019 Accepted: February 17, 2020

This work was supported by the Key Research Projects of Medical Science in Hebei Province (Grant No.20170444)

\*Corresponding author. Tel: +86-311-86573223, E-mail: bamboo203@sina.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5223>

stimulated H9C2 cells. Treatment with SS-31 could inhibit the apoptosis of H9C2 cells, down-regulating the expression of Bax, Cleaved caspase-3, Nox1, Nox4 and Txnip, up-regulating the expression of Bcl-2 and reduce the production of mitochondrial ROS in high glucose induced H9C2 cells. Above mentioned results suggest that SS-31 inhibits HG-induced rat cardiomyocytes apoptosis and TXNIP/ROS production, indicating that antioxidant peptide SS-31 may have a certain improvement effect on diabetic cardiomyopathy.

**Keywords** antioxidant peptide SS-31; high glucose; H9C2 cells; ROS; apoptosis

SS-31(*D*-Arg-2',6'-dimethyltyrosine-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>)是一种新型的线粒体靶向抗氧化肽,其分子结构中含有二甲基酪氨酸残基,具有清除线粒体ROS并且抑制亚油酸和低密度脂蛋白氧化的功能<sup>[1]</sup>。SS-31可以与线粒体内膜上心磷脂相结合,调节心磷脂在维持线粒体嵴和呼吸链超氧复合物结构中的作用,从而增加ATP的产生<sup>[2]</sup>。此外,SS-31还可以调控心磷脂与细胞色素C的相互作用,从而防止线粒体通透性改变引起的线粒体肿胀,并且抑制细胞色素C释放诱导的细胞凋亡<sup>[3]</sup>。SS-31可以预防脂质氢过氧化物诱导的神经细胞凋亡<sup>[4]</sup>,而且还可以减少缺血再灌注引起的动物模型中心肌梗死面积<sup>[5]</sup>。另外,SS-31还可以减轻高脂饮食诱导的肾损伤。SS-31的这些保护作用均与其可以清除线粒体ROS有关。ROS是体内细胞氧化还原平衡失调产生的病理产物,细胞中的ROS主要由线粒体产生,过多的ROS可以损伤线粒体膜而进入细胞质,通过激活caspase级联反应最终导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)系统调控细胞内氧化还原状态。硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)是TRX的一种内源性抑制蛋白, TXNIP能与TRX活性位点结合而抑制TRX的抗氧化应激活性,导致线粒体ROS产生增加<sup>[7]</sup>。目前有研究表明,SS-31可以抑制高糖环境下肾小管上皮细胞凋亡和TXNIP蛋白表达。但是,关于SS-31对高糖诱导的心肌细胞凋亡及相关机制的研究还少见报道。本实验旨在观察SS-31干预对高糖诱导的大鼠心肌细胞凋亡以及TXNIP/ROS产生的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

H9C2细胞由中国医学科学院基础医学研究所惠赠。D-葡萄糖、SS-31和MitoSOX<sup>TM</sup>试剂购自美国Sigma公司。兔抗Nox1和Nox4购自美国Proteintech公司。兔抗Bax、Txnip、Bcl-2多克隆抗体和ECL增

强化学发光试剂盒购自英国Abcam公司。Cleaved caspase-3购自美国Cell signaling公司。TUNEL试剂盒、反转录试剂盒和Real-time PCR试剂盒购自美国Promega公司。辣根酶标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术公司。聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)购自美国Milipore公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和分组刺激实验** H9C2细胞在低糖型DMEM完全培养基(含体积分数0.1胎牛血清、105 U/L青霉素、100 mg/L链霉素)中常规培养。将H9C2细胞分为5组:正常糖对照组(5.5 mmol/L glucose, NG)、高渗对照组(5.5 mmol/L glucose、24.5 mmol/L mannitol, M)、高糖组(30 mmol/L glucose, HG)、高糖组+溶剂对照组(30 mmol/L glucose+DMSO, HG+DMSO)高糖+SS-31组(30 mmol/L glucose+10 mmol/L SS-31, HG+SS-31)。于刺激48 h后收集细胞,进行以下观察。

**1.2.2 末端脱氧核苷酸转移酶介导dUTP缺口标记法(TUNEL)检测** 细胞接种于6孔板中,并进行分组刺激。具体实验步骤按试剂盒的使用说明书进行。细胞核呈绿色者为阳性细胞,每孔至少计300个细胞,计算阳性细胞百分比。

**1.2.3 荧光实时定量PCR(Real-time PCR)检测mRNA表达变化** Trizol法提取总RNA,进行反转录。荧光实时定量PCR采用20 μL反应体系为10 μL SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II(2×)、0.4 μL ROX Reference Dye(50×)、2 μL反转录产物、6 μL ddH<sub>2</sub>O及上下游引物(使用浓度为1 ng/mL)各0.8 μL。反应条件为:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,共40个循环。根据比较法计算基因表达相对量,采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达的相对倍数变化。引物由上海生物工程股份有限公司合成,序列见表1。

**1.2.4 Western blot检测** 细胞用冰冷生理盐水洗3遍,加入细胞裂解液,冰上裂解40 min,4 °C、14 000 r/min离心20 min,Lowry法测定上清液蛋白

表1 实时定量PCR引物列表

Table 1 Primer sequences used for Real-time PCR analysis

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Genes	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
18s RNA	ACA CGG ACA GGA TTG ACA GA	GGA CAT CTA AGG GCA TCA CAG
<i>Bax</i>	CCA GGA TGC GTC CAC CAA	AAG TAG AAG AGG GCA ACC AC
<i>Bcl-2</i>	GCT ACC GTC GTG ACT TCG C	TCC CAG CCT CCG TTA TCC
<i>Nox1</i>	TCA CTA ACG TGT GGG TCA GC	GCT CTC ATG TTG CCA AAG CC
<i>Nox4</i>	CCT CTG TCT GCT TGT TTG GC	TCC TAG GCC CAA CAT CTG GT
<i>Txnip</i>	CCG TTA GGA TCC TGG CTT GC	GGC GCC TTG TAC TCA TAT TTG TTT C

浓度。取细胞裂解蛋白 50  $\mu\text{g}$ , 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳后电转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h, 分别加入 Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、Nox1、Nox4 及 Txnip 抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠或兔抗体 (1:10 000 稀释), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h; 洗膜后加 ECL 试剂, 用 ODYSSEY 远红外双色荧光成像系统 (LI.COR Gene Company, USA) 显影。用 ImageJ 1.48 分析系统软件 (NIH, USA) 对 Western blot 条带进行半定量分析。以目的条带和  $\beta$ -actin 条带积分光密度值比值作为最终结果。

**1.2.5 MitoSOX<sup>TM</sup> Red 染色** 细胞接种于 6 孔板中, 并进行分组刺激。具体实验步骤按使用说明书进行。用 Leica<sup>TM</sup> TCS SP8 共聚焦显微镜采集图像, 用 ImageJ 1.48 分析系统软件 (NIH, USA) 对图像进行半定量分析。以治疗组与正常糖对照组平均光密度值比值作为最终结果。

**1.2.6 统计学处理** 实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SS-31对HG诱导H9C2细胞凋亡的影响

与 NG 组和 M 组相比, 高糖刺激 48 h 后, HG 组和 HG+DMSO 组凋亡细胞明显增多, HG 组和 HG+DMSO 组 H9C2 细胞凋亡百分比无明显差异。与 HG+DMSO 组相比, SS-31 治疗组细胞凋亡百分比明显下降 (图 1)。

### 2.2 SS-31对HG诱导H9C2细胞凋亡相关mRNA及蛋白表达的影响

与 NG 组和 M 组相比, 高糖刺激 48 h 后, HG 组和 HG+DMSO 组 Bax mRNA 和蛋白表达增加, Bcl-2

mRNA 和蛋白表达减少, Cleaved caspase-3 蛋白表达明显增高, HG 组和 HG+DMSO 组之间表达无显著差异。与 HG+DMSO 组相比, SS-31 治疗组细胞中 Bax mRNA 和蛋白表达减少, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达增加, Cleaved caspase-3 蛋白表达明显减低 (图 2)。

### 2.3 SS-31对HG诱导H9C2细胞线粒体ROS的影响

与 NG 组和 M 组相比, 高糖刺激 48 h 后, HG 组和 HG+DMSO 组 H9C2 细胞线粒体 ROS 产生增加, HG 组和 HG+DMSO 组细胞线粒体 ROS 水平无明显差异。与 HG+DMSO 组相比, SS-31 治疗组细胞线粒体 ROS 产生减少 (图 3)。

### 2.4 SS-31对HG诱导H9C2细胞Nox1和Nox4表达的影响

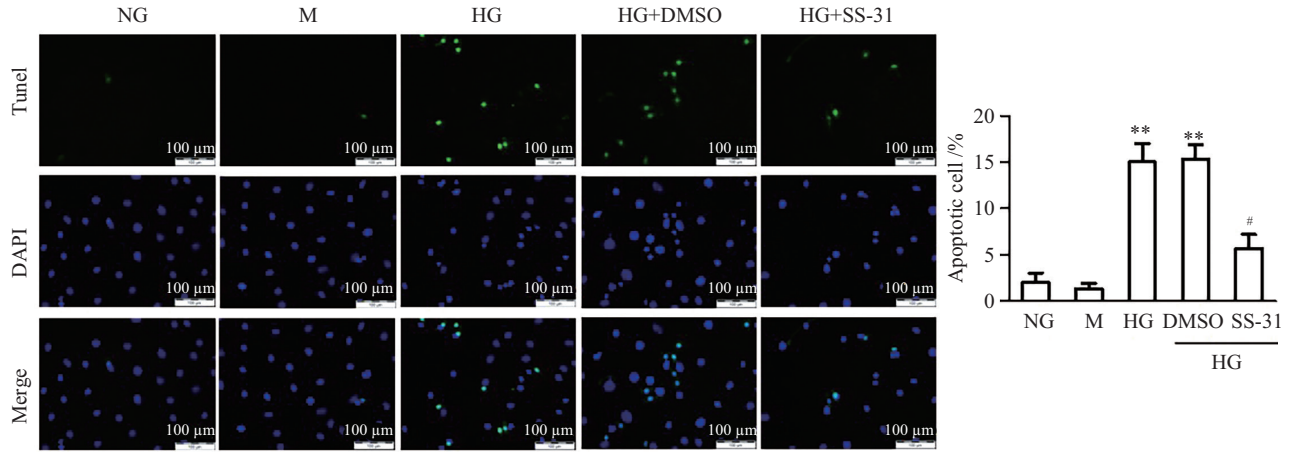
与 NG 组和 M 组相比, 高糖刺激 48 h 后, HG 组和 HG+DMSO 组 Nox1 和 Nox4 的 mRNA 和蛋白表达均增加, HG 组和 HG+DMSO 组之间表达无显著差异。与 HG+DMSO 组相比, SS-31 治疗组细胞中 Nox1 和 Nox4 的 mRNA 和蛋白表达均减少 (图 4)。

### 2.5 SS-31对HG诱导H9C2细胞Txnip表达的影响

与 NG 组和 M 组相比, 高糖刺激 48 h 后, HG 组和 HG+DMSO 组 Txnip mRNA 和蛋白表达增加, HG 组和 HG+DMSO 组之间 Txnip mRNA 和蛋白表达无显著差异。与 HG+DMSO 组相比, SS-31 治疗组细胞中 Txnip mRNA 和蛋白表达减少 (图 5)。

## 3 讨论

糖尿病心肌病变是指糖尿病患者伴发的心肌疾病, 它不能用高血压、冠状动脉粥样硬化或其他心脏病变来解释。糖尿病心肌病变是在患者代谢紊乱及微血管病变的基础上出现的心肌广泛灶性坏死, 进而引发一系列心功能异常临床表现。有研究表明, 一种细胞程序性死亡方式“凋亡”参与了心肌

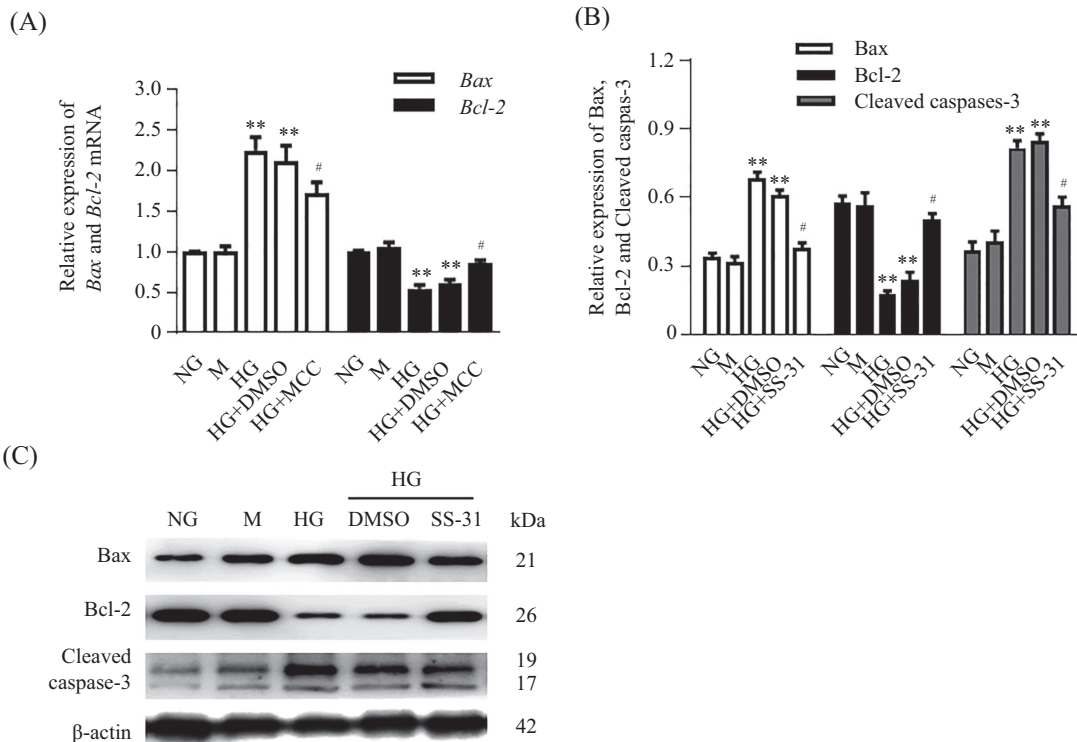


A: TUNEL染色检测各组H9C2细胞凋亡情况; B: 半定量分析各组H9C2细胞凋亡表达情况。 \*\* $P < 0.01$  vs NG; # $P < 0.05$  vs HG+DMSO。

A: TUNEL staining was used to detect the apoptosis of H9C2 cells in each group; B: semi-quantitative analysis of the expression of H9C2 cells in each group. \*\* $P < 0.01$  vs NG; # $P < 0.05$  vs HG+DMSO.

图1 SS-31对HG诱导的H9C2细胞凋亡的影响

Fig.1 Effects of SS-31 on HG-induced apoptosis of H9C2 cells



A: Real-time PCR检测各组H9C2细胞中Bax和Bcl-2 mRNA的表达; B: 半定量分析各组H9C2细胞中Bax、Bcl-2和Cleaved caspase-3的表达情况; C: Western blot检测各组H9C2细胞中Bax、Bcl-2和Cleaved caspase-3蛋白的表达情况。 \*\* $P < 0.01$  vs NG; # $P < 0.05$  vs HG+DMSO。

A: Real-time PCR detection of Bax and Bcl-2 mRNA expression in H9C2 cells of each group; B: semi-quantitative analysis of the expression of Bax, Bcl-2 and Cleaved caspase-3 in H9C2 cells of each group; C: Western blot detection of Bax, Bcl-2 and Cleaved caspase-3 protein expression in H9C2 cells of each group. \*\* $P < 0.01$  vs NG; # $P < 0.05$  vs HG+DMSO.

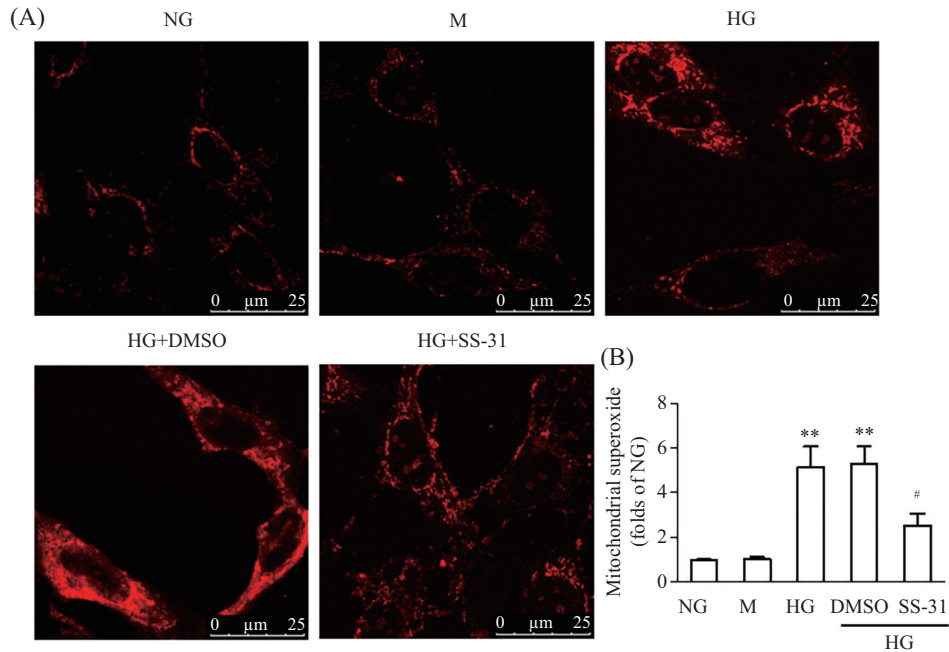
图2 SS-31对高糖诱导的H9C2细胞中Bax、Bcl-2和Cleaved caspase-3表达的影响

Fig.2 Effects of SS-31 on expression of Bax, Bcl-2 and Cleaved caspase-3 in HG-induced H9C2 cells

细胞坏死过程,它是心功能损伤的重要环节,与心脏疾病的发生及心功能恢复密切相关<sup>[8]</sup>。因此,寻求糖尿病心肌病中抑制心肌细胞凋亡的方法将在一定

程度上延缓心脏疾病的发展。

SS-31是一种可渗透性抗氧化剂,线粒体中SS-31积聚增加可以保护心磷脂和其他线粒体蛋白

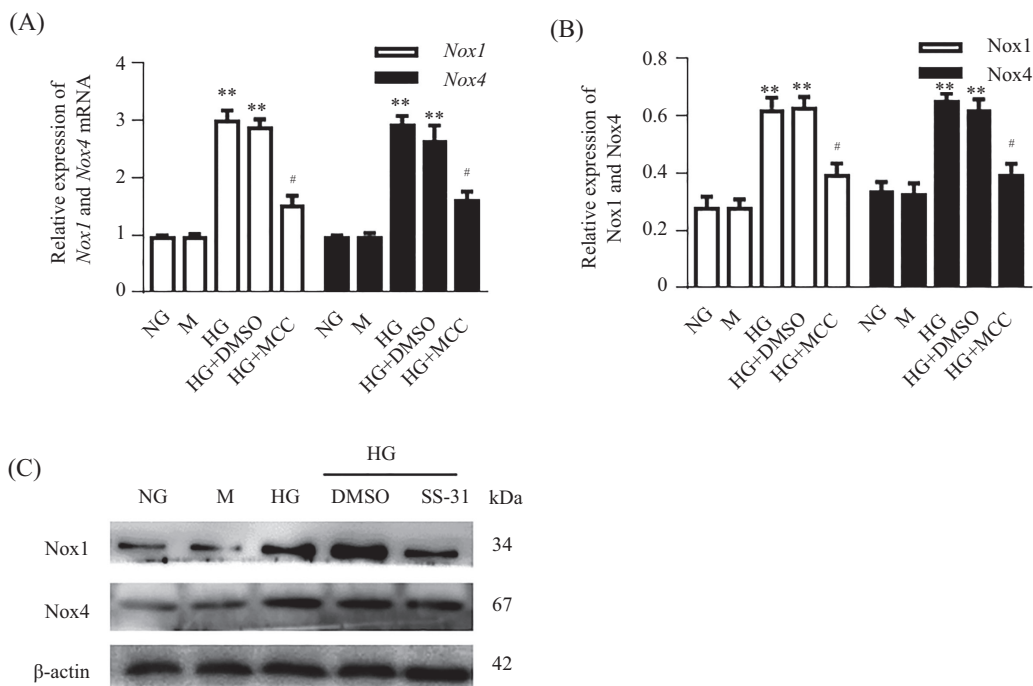


A: MitoSOX™ Red染色法检测各组H9C2细胞ROS产生情况; B:半定量分析各组H9C2细胞ROS产生情况。 \*\* $P<0.01$  vs NG; # $P<0.05$  vs HG+DMSO。

A: MitoSOX™ Red staining method was used to detect the ROS production of H9C2 cells in each group; B: semi-quantitative analysis of ROS production of H9C2 cells in each group. \*\* $P<0.01$  vs NG; # $P<0.05$  vs HG+DMSO.

图3 SS-31对HG诱导的H9C2细胞线粒体中ROS产生的影响

Fig.3 Effects of SS-31 on mitochondria ROS production in HG-induced H9C2 cells

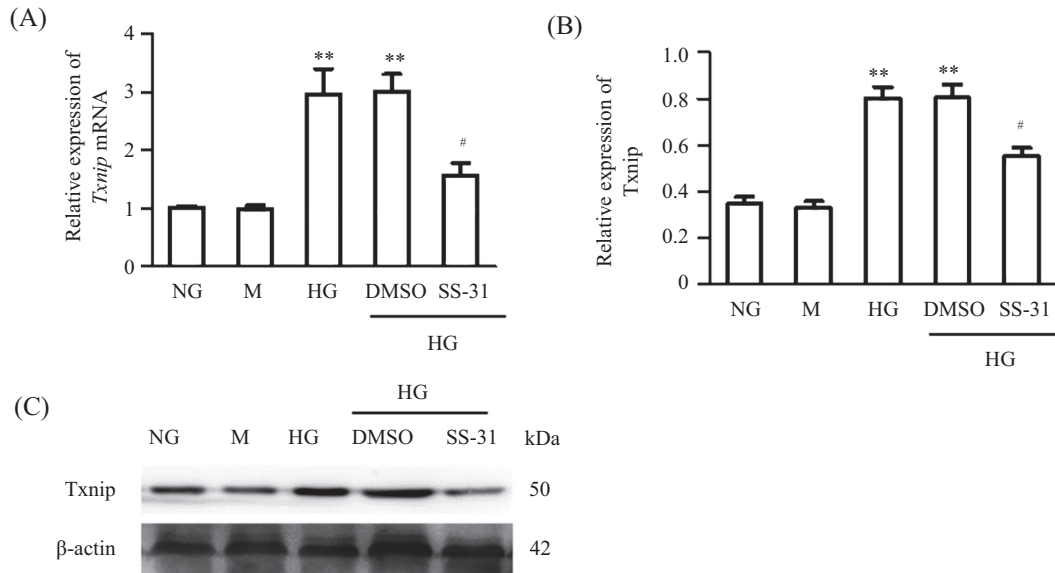


A: Real-time PCR检测各组H9C2细胞中Nox1和Nox4 mRNA的表达; B: 半定量分析各组H9C2细胞中Nox1和Nox4的表达情况; C: Western blot检测各组H9C2细胞中Nox1和Nox4蛋白的表达情况。 \*\* $P<0.01$  vs NG; # $P<0.05$  vs HG+DMSO。

A: Real-time PCR detection of Nox1 and Nox4 mRNA expression in H9C2 cells of each group; B: semi-quantitative analysis of Nox1 and Nox4 expression in H9C2 cells of each group; C: Western blot detection of Nox1 and Nox4 protein expression in H9C2 cells of each group. \*\* $P<0.01$  vs NG; # $P<0.05$  vs HG+DMSO.

图4 SS-31对高糖诱导的H9C2细胞中Nox1和Nox4表达的影响

Fig.4 Effects of SS-31 on expression of Nox1 and Nox4 in HG-induced H9C2 cells



A: Real-time PCR检测各组H9C2细胞中Txnip mRNA的表达; B: 半定量分析各组H9C2细胞中Txnip的表达情况; C: Western blot检测各组H9C2细胞中Txnip蛋白的表达情况。 \*\* $P < 0.01$  vs NG; # $P < 0.05$  vs HG+DMSO。

A: Real-time PCR detection of Txnip mRNA expression in H9C2 cells of each group; B: semi-quantitative analysis of Txnip expression in H9C2 cells of each group; C: Western blot to detect the expression of Txnip protein in H9C2 cells in each group. \*\* $P < 0.01$  vs NG; # $P < 0.05$  vs HG+DMSO。

图5 SS-31对高糖诱导的H9C2细胞中Txnip表达的影响

Fig.5 Effects of SS-31 on expression of Txnip in HG-induced H9C2 cells

免受氧化损坏, 这些保护作用可能与SS-31抑制线粒体ROS产生有关, 另外SS-31可以逆转各种损伤引起的线粒体蛋白质组学重塑<sup>[2]</sup>。SS-31不仅可以维持线粒体结构完整, 而且在细胞内质网应激、脂质沉积、自噬、细胞凋亡等过程中也发挥重要作用<sup>[9]</sup>。目前关于SS-31治疗心肌病变的研究也有报道。SS-31治疗心肌缺血再灌注大鼠, 可以有效减少梗死面积, 降低心律不齐的严重程度。但是SS-31治疗糖尿病心肌病的作用仍不清楚。我们的实验结果显示, HG能够诱导大鼠心肌细胞凋亡, 上调心肌细胞中Bax和Cleaved caspase-3蛋白的表达, 同时下调Bcl-2蛋白的表达, SS-31治疗后可以逆转高糖引起的这些变化。这提示, SS-31可能通过减少心肌细胞凋亡而改善糖尿病心肌病变。我们的实验结果与之前的研究结果一致, SS-31可以通过保护线粒体功能, 预防肥胖小鼠肾小球内皮细胞凋亡<sup>[10]</sup>; 减少胰岛细胞凋亡从而改善胰岛移植后功能<sup>[11]</sup>; 减少缺血再灌注引起的神经胶质细胞凋亡<sup>[4]</sup>; 抑制糖尿病小鼠肾小管上皮细胞凋亡<sup>[7]</sup>。这些结果均说明, SS-31在抑制细胞凋亡过程中发挥着重要的功能, 但具体的作用机制仍需进一步研究。

ROS水平增加会产生明显的细胞毒性, 能够导致细胞凋亡和坏死<sup>[12]</sup>。ROS在线粒体氧化呼吸链

上产生, 需要NADH进行电子传递, 并被NADPH酶消除。除线粒体外, 心肌细胞中ROS还可以来源于NADPH氧化酶、一氧化氮合酶、单胺氧化酶A和黄嘌呤氧化酶等作用产物<sup>[13]</sup>。目前研究表明, Nox1和Nox4是心肌细胞中主要表达NADPH氧化酶, 在调节心肌细胞氧化应激方面发挥重要作用, 也是目前常用的估算心肌细胞氧化应激水平的指标<sup>[14]</sup>。SS-31可以清除细胞线粒体中产生的ROS, 从而改善氧化应激引起的各种细胞损伤。我们的结果显示, 抗氧化肽SS-31能够减少高糖诱导的心肌细胞中Nox1和Nox4表达, 并减少线粒体ROS产生。表明抗氧化肽SS-31可以调节高糖诱导的心肌细胞氧化应激状态。线粒体ROS产生增加可以增加线粒体膜Ca<sup>2+</sup>通道的开放性, 使得细胞膜通透性增加, 细胞色素C释放而引起细胞凋亡<sup>[15]</sup>。据此, 我们推断, SS-31保护糖尿病心肌细胞凋亡可能通过减少线粒体ROS实现。但两者之间是否存在明确关系, 仍需进一步的实验验证。

Txnip是一种硫氧还蛋白相互作用蛋白, Txnip从TRX解离后响应氧化应激而影响多种细胞生物学行为, 如凋亡、转分化<sup>[16]</sup>和自噬<sup>[17]</sup>。有研究表明, 在Txnip小干扰RNA转染的心肌细胞中, 细胞活力得到改善, ROS产生减少, 并伴随着过氧化氢酶和

MnSOD的表达增加。此外, Txnip小干扰RNA转染可以抑制脂多糖诱导的心肌细胞凋亡<sup>[18]</sup>, 在败血症诱发的心肌功能障碍中发挥重要作用。另有研究表明, 高糖刺激可以减少细胞中TRX和Txnip之间的相互作用, 但增加了NLRP3和Txnip之间的相互作用, 这些改变可被抗氧化剂MitoQ治疗逆转<sup>[19]</sup>。基于这些观察结果, 我们猜测, 暴露于高糖环境下的H9C2细胞中也可能发生类似事件。为支持这一假设, 我们进行了下一步实验, 结果发现, 高糖刺激增加ROS产生的同时Txnip表达也明显增加, 而且抗氧化剂SS-31治疗后减少高糖诱导的心肌细胞中Txnip表达。目前研究表明, Txnip在高糖诱导的多种细胞凋亡中都发挥重要作用, 如胰岛β细胞、视网膜内皮细胞、肾小管上皮细胞等<sup>[20]</sup>。这些研究提示, Txnip在调节糖尿病心肌细胞凋亡中可能也具有重要作用, 但具体作用仍需进一步研究。

综上所述, 抗氧化肽SS-31抑制高糖诱导的大鼠心肌细胞凋亡。同时, 抗氧化肽SS-31抑制高糖诱导的大鼠心肌细胞Txnip/ROS产生。我们的研究结果提示, 抗氧化肽SS-31对糖尿病心肌病变具有一定的保护作用, 对临床糖尿病心肌病变的治疗具有一定的意义。

### 参考文献 (References)

- [1] CALKINS M J, MANCZAK M, MAO P, et al. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(23): 4515-29.
- [2] BIRK A V, LIU S, SOONG Y, et al. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(8): 1250-61.
- [3] ZHAO K, ZHAO G M, WU D, et al. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33): 34682-90.
- [4] ZHU Y, WANG H, FANG J, et al. SS-31 provides neuroprotection by reversing mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 4783602.
- [5] CHO J, WON K, WU D, et al. Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats [J]. *Coron Artery Dis*, 2007, 18(3): 215-20.
- [6] MUNZEL T, CAMICI G G, MAACK C, et al. Impact of oxidative stress on the heart and vasculature: part 2 of a 3-part series [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(2): 212-29.
- [7] HOU Y, LI S, WU M, et al. Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 310(6): F547-59.
- [8] CHEN C Y, CHOONG O K, LIU L W, et al. MicroRNA let-7- TGFBR3 signalling regulates cardiomyocyte apoptosis after infarction [J]. *EBioMedicine*, 2019, 46: 236-47.
- [9] ESCRIBANO-LOPEZ I, DE MARANON A M, IANNANTUONI F, et al. The mitochondrial antioxidant SS-31 modulates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy in type 2 diabetes [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(9): 1322.
- [10] SZETO H H, LIU S, SOONG Y, et al. Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(5): 997-1011.
- [11] THOMAS D A, STAUFFER C, ZHAO K, et al. Mitochondrial targeting with antioxidant peptide SS-31 prevents mitochondrial depolarization, reduces islet cell apoptosis, increases islet cell yield, and improves posttransplantation function [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(1): 213-22.
- [12] WANG X, LU X, ZHU R, et al. Betulinic acid induces apoptosis in differentiated PC12 cells via ROS-mediated mitochondrial pathway [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(4): 1130-40.
- [13] AJITH T A, JAYAKUMAR T G. Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases [J]. *World J Cardiol*, 2014, 6(10): 1091-99.
- [14] YOUSEFIAN M, SHAKOUR N, HOSSEINZADEH H, et al. The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension [J]. *Phytomedicine*, 2019, 55: 200-13.
- [15] KALPAGE H A, BAZYLIANSKA V, RECANATI M A, et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis [J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1540-53.
- [16] JI L, WANG Q, HUANG F, et al. FOXO1 overexpression attenuates tubulointerstitial fibrosis and apoptosis in diabetic kidneys by ameliorating oxidative injury via TXNIP-TRX [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3286928.
- [17] GAO C, WANG R, LI B, et al. TXNIP/Redd1 signaling and excessive autophagy: a novel mechanism of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(3): 645-57.
- [18] YANG C, XIA W, LIU X, et al. Role of TXNIP/NLRP3 in sepsis-induced myocardial dysfunction [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2): 417-26.
- [19] ZHOU R, TARDIVEL A, THORENS B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 136-40.
- [20] ALHAWITI N M, AL MAHRI S, AZIZ M A, et al. TXNIP in metabolic regulation: Physiological role and therapeutic outlook [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(9): 1095-103.