

Pin1 通过氧化应激诱导大鼠心室重塑的研究

吴 限 李 莎 郭芙蓉 黎明江

摘 要 **目的** 讨论肽脯氨酰顺反异构酶 Pin1 (peptidyl - prolyl isomerase Pin1) 与心肌纤维化之间的关系,并验证 Pin1 是否通过氧化应激参与异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导的大鼠心肌纤维化。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 (A 组, 8 只)、ISO 组 (B 组, 13 只) 以及 ISO + 胡桃醌 (Juglone) 组 (C 组, 9 只) 持续用药 4 周后取材,行 Masson 染色观察心肌病理改变和心肌间质胶原纤维增生反应,测定心肌胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF); 应用活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 荧光探针检测心肌组织氧化活性物质的生成,运用免疫组织化学方法对心肌组织 Pin1 进行定性定量分析; 利用反转录酶 - 聚合酶链反应 (reverse transcription - polymerase chain reaction, RT - PCR) 技术检测 Pin1、I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达水平。**结果** 与 A 组比较, B 组心肌间质胶原增生明显, 大量纤维结缔组织将心肌肌束分隔包绕, 心肌细胞排列紊乱; CVF 明显增高 ($P < 0.01$); 此外 B 组 I、III 型胶原蛋白及 Pin1 mRNA 表达水平高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 B 相比, C 组心肌肌束大体规则, 心肌间质及血管旁有少量纤维结缔组织增生; CVF 低于 B 组 ($P < 0.05$); I 型和 III 型胶原蛋白、Pin1 mRNA 表达水平 C 组低于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 上述结果表明在 ISO 诱导的大鼠心肌纤维化模型中, Pin1 与氧化活性物质的产生有关; 加入 Pin1 特异性抑制剂 Juglone 后显著减少了氧化活性物质的产生, 故尚可认为 Pin1 可能通过某种机制诱导氧化应激反应参与 ISO 介导的大鼠心肌纤维化的发生与维持。

关键词 心肌纤维化 氧化应激 肽脯氨酰顺反异构酶 胶原蛋白

中图分类号 R541.9S

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.008

Research of Pin1 in Cardiac Fibrotic Rats Induced by Isoproterenol through Oxidative Stress. Wu Xian, Li Sha, Guo Furong, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To explore the possible relationship between peptidyl - prolyl isomerase Pin1 with cardiac fibrosis, and demonstrate whether Pin1 takes part in the development of cardiac fibrosis in rats induced by isoproterenol through oxidative stress. **Methods** Thirty adults sprague dawley rats were randomly divided into blank control group ($n = 8$, A group), ISO group ($n = 13$, B group), ISO and Juglone group ($n = 9$, C group). The rats were sacrificed 4 weeks later. Masson staining was used to observe rat heart's pathological insults and collagen proliferative reaction in myocardial matrix. CVF was measured by image analysis software. Pin1 in the heart were calculated by immunohistochemistry through the method of combination of qualitative and quantitative analyses. The mRNA levels of Pin1, collagen I and collagen III were measured by RT - PCR. **Results** Compared with A group, B group showed that significant proliferation of myocardial interstitial collagen and fibrous connective tissue, the myocardial cells arranged at random, CVF increased significantly ($P < 0.01$) and the mRNA levels of Pin1, collagen I and collagen III were obviously increased ($P < 0.01$). In C group, myocardium were well - arranged and distributed unevenly and orderly, only few fibrous connective tissue around the blood vessels and CVF decreased obviously ($P < 0.05$). The expression level of Pin1, collagen I and collagen III was lower than in B group ($P < 0.01$). **Conclusion** The results demonstrated that there had a remarkable correlation between Pin1 and oxidative stress, while it was identified that ROS were downregulated after adding Juglone, which is a specific cox inhibitor of Pin1. The present study suggested that Pin1 and oxidative stress may be involved in cardiac fibrosis pathogenesis, with a potential implication as therapeutic targets.

Key words Cardiac fibrosis; Oxidative stress; Peptidyl - prolyl isomerase Pin1; Collagen

心肌纤维化是多种心血管疾病发展至终末期的

病理结局,随着正常心肌组织减少,纤维结缔组织增多,长期发展可引起心室壁增厚、顺应性降低、僵硬增加,从而导致心室收缩及舒张功能障碍甚至心力衰竭的发生^[1]。Pin1 是目前已知的人体内唯一能够识别磷酸化丝/苏 - 脯氨酸 (pSer/Thr - Pro) 氨基酸序列的高度保守的功能蛋白,作用于氨基酸酰胺键使其

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81170085)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科、武汉大学心血管病研究所、心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:黎明江,硕士生导师、主任医师,电子信箱:mingjiangli@yahoo.com.cn

发生顺反异构作用,从而影响相应蛋白的生物功能,改变多条信号转导通路的生物活性^[2]。近年来大量研究表明 Pin1 与多种疾病的发生、发展密切相关,然而关于 Pin1 与心肌纤维化之间的关系、Pin1 是否通过氧化应激反应参与心肌纤维化等问题尚无确切报道。故本实验从上述角度出发,通过腹腔注射 ISO 建立心肌纤维化大鼠模型,加入 Pin1 特异性抑制剂 Juglone,观察不同组别间心肌纤维化水平的差异,随后测量不同实验组心肌组织中氧化物质的含量及 Pin1 的表达,从病理染色及分子生物学等方面着手探讨 Pin1、氧化应激及心肌纤维化三者之间的关系。

材料与方法

1. 实验分组:30 只 Sprague - Dawley (SD) 雄性 SPF 级大鼠、180 ~ 200g,购自湖北省疾病预防控制中心实验动物部门;每日 12h 光照维持、昼夜循环、饲养温度控制在 15 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 70%;动物分组饲养、给予大鼠标准饲料、自由进食水。30 只 SD 大鼠随机分为空白对照组(A 组,8 只)、ISO 组(B 组,13 只)、ISO 和胡桃醌组(C 组,9 只),其中 B 组腹腔注射 ISO 5mg/(kg · d)、C 组腹腔注射 ISO 5mg/(kg · d)和胡桃醌 3mg/(kg · d)、A 组注射等体积生理盐水。饲养 4 周后腹腔注射 10% 水合氯醛 3mg/kg 麻醉,开胸取出心脏并用生理盐水洗净,修剪周围组织和血管,取左心室部分组织置于 - 80℃ 冰箱保存备用,另取心脏组织用甲醛固定制做石蜡切片行病理染色分析。

2. Masson 染色:石蜡切片脱蜡置水,置于重铬酸盐 - 醋酸液处理 40min,水洗后染苏木精 10min,自来水冲洗;2% 的盐酸乙醇分化,继续用水冲洗;1% 的丽春红酸性品红液中染 15min,蒸馏水冲洗;1% 磷钼酸水溶液处理 5min,接着用 2% 的亮绿液染色 8min;1% 的醋酸液分色 2 ~ 3 次,脱水、透明、中性树胶封片。高倍视野下每张切片随机选取 6 个视野,将图片用软件 Image - Pro - Plus(6.0)图像分析软件进行分析,计算每个视野面积内的胶原纤维面积,视野胶原纤维面积数与视野心肌组织面积的比值即 CVF,取平均值比较其差异性。

3. ROS 荧光探针:将 PBS 溶液和 DAPI 染液(由武汉阿斯本生物技术有限公司提供)按 1:10000 比例稀释,避光保存备用;将取出的心脏组织用 PBS 洗净,于 - 80℃ 冰箱冷藏后置于冷冻切片机(CM1900 Lecia)内切片,再将稀释好的探针溶液滴加至切片上,37℃ 孵育 30min;洗去多余液体,用抗荧光淬灭剂

封片,置于显微镜下观察并拍照。

4. 免疫组织化学:心脏组织石蜡切片置于 65℃ 烘箱中烘片 2h 脱蜡至水、用 PBS 洗 3 次,每次 5min。切片置于 EDTA 缓冲液中微波修复,中火至沸后断电,间隔 10min 低火至沸。自然冷却后 PBS 洗 3 次,每次 5min。切片置于 3% 过氧化氢溶液中,室温下避光孵育 10min。PBS 洗 3 次,每次 5min,甩干后 5% BSA 封闭 20min。去除 BSA 液,每张切片加入约 50μl 稀释的一抗 Pin1 (abs100362 爱必信)覆盖组织,PBS 洗 3 次,每次 5min。去除 PBS 液,每张切片加 50 ~ 100μl 相应种属的二抗,37℃ 孵育 50min。PBS 洗 3 次,每次 5min。去除 PBS 液,每张切片加 50 ~ 100μl DAPI 染液,室温避光孵育 5min。染色后将切片放入 PBS 中洗 3 次,每次 5min。滴加适量的抗荧光淬灭剂于组织上,中性树胶封片,置于显微镜观察并拍照。

5. RT - PCR:参照 TRIzol 试剂法提取心室肌组织总 mRNA (SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒由 Life Technologies 公司提供);PCR 程序设置为预热 95℃ 1min,变性 95℃ 15s,退火 58℃ 20s,延伸 72℃ 45s,共循环 40 次;溶解曲线 60℃ → 95℃,每 20s 升温 1℃;反应体系包括 2 × qPCR Mix 5.0μl,引物工作液 (2.5μmol/L) 1.0μl,Template 1.0μl,ddH₂O 2.8μl,Rox 0.2μl。以 GAPDH 作为内参,通过 2^{-(ΔΔCT)} 法比较目的基因的表达差异,引物序列见表 1 (引物均由 Invitrogen Biotechnology Co. LTD 中国公司合成)。

表 1 引物序列

靶向基因	引物序列(5'→3')
Pin1	上游引物:CTGGTGAAGCACAGCCAATCT
	下游引物:GATGCCTGAATCCGTGAACAC
collagen I	上游引物:CCGTGACCTCAAGATGTGCC
	下游引物:GAACCTTCGCTTCCATACTCG
collagen III	上游引物:TGTCCACAGCCTTCTACACCT
	下游引物:TAGCCACCCATTCTCCG
GAPDH	上游引物:CGCTAACATCAAATGGGGTG
	下游引物:TTGCTGACAATCTTGAGGGAG

6. 统计学方法:应用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据统计分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及多组间比较采用单因素方差分析,同时间组间比较采用 *LSD* 或 *SNK* 法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 造模结果:雄性 SD 大鼠 30 只,其中 B 组 13 只,饲养过程中因药物不良反应死亡 1 只,因急性心

力衰竭死亡 3 只,因穿刺不当被咬伤致死 1 只;C 组死亡 1 只,最终符合实验标准 A、B、C 组各 8 只。

2. Masson 染色:空白对照组心肌组织排列整齐,心肌肌束大小规则,未见炎性细胞浸润和纤维结缔组织增生(图 1A);ISO 组可见心肌间质胶原增生明显,

大量蓝染纤维结缔组织呈网格状将心肌肌束分隔包绕,正常心肌组织显著减少,心肌细胞排列紊乱,炎性细胞大量浸润(图 1B);ISO + Juglone 组可见心肌肌束大体上排列规则,心肌间质及血管旁有少量纤维结缔组织增生(图 1C),其纤维化程度显著低于 ISO 组。

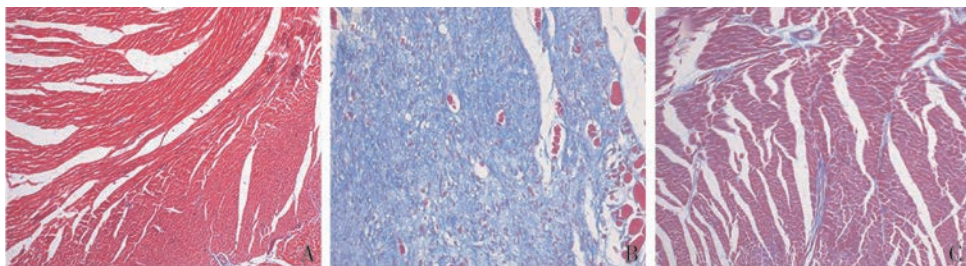


图 1 各组心肌组织 Masson 染色(×40)

A. 空白对照组;B. ISO 组;C. ISO + Juglone 组

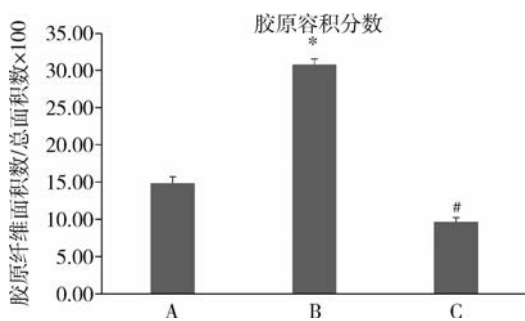


图 2 胶原容积分数比较

A. 空白对照组;B. ISO 组;C. ISO + Juglone 组;与空白对照组比较, * $P < 0.01$;与 ISO 组比较, # $P < 0.05$

3. ROS 荧光探针:二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)可自由透过活细胞膜进入细胞内,当心肌组织及细胞内有大量 ROS 生成时,DHE 可被氧化形成氧化乙啶并渗入染色体 DNA 中产生红色荧光。B 组可见心肌组织中大量 ROS 生成(图 3 中 C、D),提示大鼠心肌组织存在氧化应激反应,导致氧化产物增加;而正常情况下心肌组织内氧化活性物质较少,表达较弱(图 3 中 A、B);给予 Pin1 特异性抑制剂 Juglone 的 C 组心肌组织中未见明显 ROS 的产生(图 3 中 E、F)。

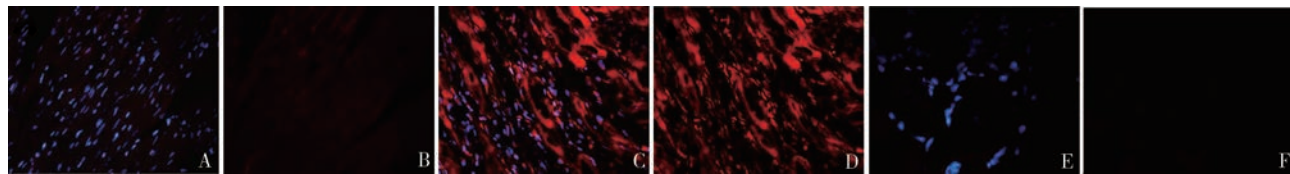


图 3 各组心肌组织免疫荧光探针 - DHE(×40)

A、B. 空白对照组;C、D. ISO 组;E、F. ISO + Juglone 组

4. 免疫组织化学:结果显示 B 组 Pin1 数量较多,且均匀分布(图 4 中 C、D);A 组 Pin1 分布较少,荧光数量较弱(图 4 中 A、B);C 组仅见少量 Pin1 表达且荧光微弱(图 4 中 E、F)。从免疫荧光探针 - DHE 及

Pin1 免疫组织化学结果可知,Pin1 的表达量与氧化活性物质的生成趋势基本一致,且两者均与 ISO 的活性有关。

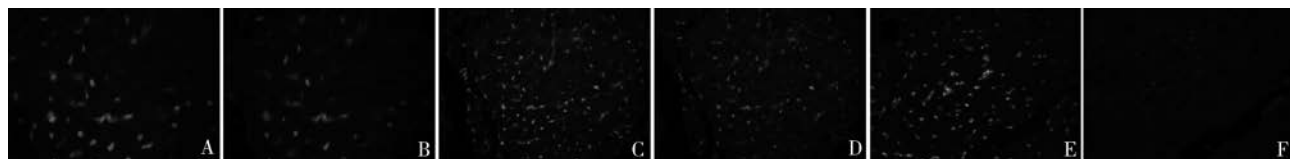


图 4 Pin1 在心肌组织中定性定量分析(免疫组织化学,×40)

A、B. 空白对照组;C、D. ISO 组;E、F. ISO + Juglone 组

5. RT-PCR: 通过 RT-PCR 检测 A、B、C 3 组心室肌中 Pin1、I 型及Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 表达情况, 笔者发现 B 组 Pin1 的表达水平较 A 组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 A 组相比, B 组 I 型胶原蛋白表达量显著高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Ⅲ型胶原蛋白同样高于 A 组 ($P < 0.01$), 此外还发现 B 组中Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 表达水平低于 I 型胶原蛋白 mRNA 表达水平。与 B 组相比, 加入 Pin1 特异性阻断剂 Juglone 后 I 型、Ⅲ型胶原蛋白及 Pin1 均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 5)。

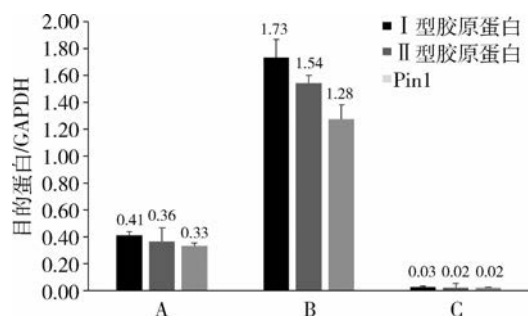


图 5 RT-PCR

A. 空白对照组; B. ISO 组; C. ISO + Juglone 组

讨 论

广义上说, 心室重塑是由于长期的负荷(容量负荷和压力负荷)及损伤(缺血、炎症)引起心肌细胞、非心肌细胞以及细胞外基质等结构与功能改变, 如心肌细胞肥大凋亡坏死、成纤维细胞增生分化、纤维结缔组织增殖, 从而使心脏的结构、功能及代谢途径经历一个模式改建过程^[3]。狭义上心室重塑主要指心肌肥厚和心肌纤维化。心肌纤维化是多种心脏疾病发展至终末期不可逆性改变的原因及结局, 一方面在心血管疾病的早期阶段若未行有效干预, 心肌纤维化可加速疾病恶化, 促使心血管事件从可逆性阶段发展为不可逆性改变; 另一方面大面积的心肌纤维化使正常心肌组织成分丧失, 影响心肌正常泵血及有效做功, 使原本衰弱的心脏受到持续打击, 严重影响心功能及全身血流动力学稳定。在临床上相应的疾病进展早期表现为心室舒张功能障碍, 随即出现收缩功能受损, 继而发展为充血性心力衰竭^[4]。心肌纤维化在心力衰竭、心律失常及恶性心脏疾病的发生、发展中均起着重要作用, 全球心血管内科乃至其他所有科室的医护人员均应予以足够的重视及关注, 为寻求心肌纤维化的治疗贡献一份力量。

心肌纤维化改变涉及多种病理生理机制的参与, 例如肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone, RAAS)、各种生物活性因子、炎性介质、氧化应激反应及多种细胞信号转导通路等。ISO 属于儿茶酚胺类物质, 通过激活 RAAS 系统, 促进 Ang II 的合成与释放参与心肌纤维化进程。Ang II 与其受体结合后一方面诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化、激活细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated kinase, ERK)促进转录因子的表达; 另一方面刺激转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 的产生^[5]。众所周知 TGF- β 除了是强致纤维化因子外, 还可通过 Smads 信号通路发挥促纤维化作用。因此本实验通过腹腔注射 ISO 建立心肌纤维化大鼠模型的方法是可行的、效果持久稳定。另外根据 Masson 染色和各组 CVF 测定结果显示 B 组心肌组织中出现大量蓝染的纤维结缔组织且 CVF 显著高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 B 组相比较, C 组纤维化减弱、CVF 降低 ($P < 0.05$), 进一步证实了上述结论的正确性。

心肌间质纤维化特征性病理表现为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构及功能的改变, 尤其是胶原蛋白含量及成分的变化。正常心肌组织主要由 I、Ⅲ型胶原蛋白组成, 分别约占心肌胶原蛋白总数的 80%、11%。当胶原过度沉积、降解受抑制可引起胶原异常聚集, 导致心肌纤维化的发生^[6]。因此在病理染色的基础上通过 RT-PCR 测定各组 I、Ⅲ型胶原蛋白的含量, 比较各组胶原成分的变化差异。发现 B 组 I、Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 的表达较 A 组明显升高, 分别约为 A 组的 4.21 倍、4.27 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 加入 ISO 及 Juglone 的 C 组 I、Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 的表达显著低于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 上述结果不仅验证了心肌纤维化模型方法建立的成功, 揭露了 Pin1 与心肌纤维化的正性相关关系, 还发现通过抑制 Pin1 的表达能有效减轻心肌组织胶原蛋白的沉积和纤维化程度。

氧自由基介导的氧化应激反应是体内氧化作用与抗氧化作用失衡的表现, 被认为与衰老及多种疾病有关^[7]。氧化应激反应也是心肌纤维化进程中不可或缺的重要因素, 心肌纤维化与大量氧自由基的生成和脂质过氧化反应密切相关^[8]。大量的研究证明氧化应激是心室重塑和心功能损伤的重要发病机制^[9]。当体内 ROS 生成速度超过其清除速率时, 会导致 ROS 过度积聚, 此时 ROS 通过影响细胞内环境

稳定并激活多条信号转导通路的下游信号分子,参与心肌细胞凋亡、成纤维细胞增殖分化、炎性细胞的浸润以及蛋白酶的分解^[10,11]。有研究指出在加入血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 的心肌细胞及成纤维细胞培养皿中,予以铁螯合剂和自由基清除剂干预后,发现 TGF- β 和单核细胞趋化因子 (monocyte chemotactic factors-1, MCP-1) 表达减弱,说明抑制氧化活性物质的产生可减弱致纤维化生物因子的表达,从而有效干预纤维化过程。因此笔者检测心肌组织中氧化物质含量即 DHE 染色,希望观测不同组别间氧化应激水平差异,结果表明 B 组氧化活性物质生成最为明显,侧面证实了模型组出现了强烈且持续的氧化应激反应。

Pin1 是一种具有高度保守性的肽脯氨酰顺反异构酶,通过特异性识别并结合 pSer/Thr-Pro 氨基酸序列,催化顺反异构酶的酰胺键,改变蛋白质生物活性和磷酸化水平。大量研究表明 Pin1 与肿瘤、阿尔兹海默症、神经系统退行性疾病的发生、发展密切相关。然而目前关于 Pin1 与心肌纤维化之间的关系、Pin1 是否通过氧化应激反应参与 ISO 诱导的大鼠心肌纤维化等问题尚无确切报道。笔者从以上角度出发,利用 RT-PCR 技术测定各组 Pin1 的表达水平,运用免疫荧光技术对心肌组织中的 Pin1 进行定性定量分析,发现 Pin1 的表达与心肌纤维化的程度呈正相关。此外笔者还通过给予 Pin1 特异性抑制剂 Juglone, Juglone 又名 5-羟基-1,4-萘醌,是从胡桃楸中分离提取的羟基萘醌类化合物,也是通过高通量筛选方法发现的第 1 个 Pin1 的特异性抑制剂,期望反向论证 Pin1 与心肌纤维化及氧化应激的关系^[12]。结果显示抑制 Pin1 的表达不仅能够减轻心肌纤维化的程度,还能够减弱氧化应激水平,减少氧化活性物质的生成。综上所述可初步得知 Pin1 参与氧化活性物质的激活,并通过介导氧化活性物质的产生介导心肌纤维化进程。

随着新兴研究领域的不断开拓以及对心肌纤维化研究的深入进展,心肌纤维化作用机制及治疗方法正发生着日新月异的变化。到目前为止有多种潜在的作用靶点逐渐被挖掘,其中存在许多值得被深究的地方。Pin1 是目前已知的人体内唯一能够识别 pSer/Thr-Pro 酰胺键的肽脯氨酰顺反异构酶,参与多种细胞信号转导通路的调节,在细胞的生命过程中发挥着关键作用。本实验结果表明 ISO 诱导的心肌纤维化大鼠心室组织中 Pin1 表达增高,可能通过氧化应激

参与纤维化的发生与维持;此外本实验首次论证了 Pin1、氧化应激及心肌纤维化的关系,对于心肌纤维化机制研究具有重要意义。由此笔者认为 Pin1 可能是防治心肌纤维化的潜在作用靶点,但具体 Pin1 通过何种途径参与氧化活性物质的产生,如何通过氧化应激参与心肌纤维化的进展还需要进一步深入研究,这正是笔者后续研究的方向。在此期望有关科研人员加快对 Pin1 相关疾病及抑制剂的研究,为未来心肌纤维化的临床预防及治疗进展开辟新的途径。

参考文献

- 1 Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(2):265-272
- 2 王淑祥,李坤,闻家辰,等. Pin1 及其小分子抑制剂的研究进展[J]. *中国医药化学杂志*, 2015, 25(2):135-142
- 3 Liu R, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity MAPK phosphatases (DUSPs)[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 101:44-49
- 4 Fischer M, Baessler A, Hense HW, et al. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample[J]. *Eur Heart J*, 2003, 24(4):320-328
- 5 李萌,吕仕超,吴美芳,等. 不同原因诱导的心肌纤维化动物模型的建立[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(3):330-334
- 6 Saito K, Ishizaka N, Aizawa T, et al. Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced upregulation of TGF- β 1 in the heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(4):H1836-H1843
- 7 王禹川,丁燕生,刘梅林. 不同因子致心肌纤维化分子学机制[J]. *医学综述*, 2012, 18(17):2736-2740
- 8 Mazereeuw G, Herrmann N, Andreazza AC, et al. Oxidative stress predicts depressive symptom changes with omega-3 fatty acid treatment in coronary artery disease patients[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 60:136-141
- 9 Rosa CM, Gimenes R, Campos DH, et al. Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus[J]. *Cardiovasc Diabetol* [J], 2016, 15(1):126
- 10 Tanaka R, Shimizu M. The relationship between reactive oxygen species and cardiac fibrosis in the Dahl salt-sensitive rat under ACEI administration[J]. *Vet Med Int*, 2012, 2012:105316
- 11 Purnomo Y, Piccart Y, Coenen T, et al. Oxidative stress and transforming growth factor- β 1-induced cardiac fibrosis[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2013, 13(2):165-172
- 12 Costantino S, Paneni F, Luscher TF, et al. Pin1 inhibitor Juglone prevents diabetic vascular dysfunction. [J] *Int J Cardiol*. 2016, 203:702-707

(收稿日期:2017-01-08)

(修回日期:2017-01-08)