

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.006

线粒体乙醛脱氢酶 2(ALDH2)通过 AMPK/FOXO3a 通路改善高糖导致的心肌细胞凋亡*

郭钰丽 闫浩 张荣庆 李聪叶 张英梅[△] 王海昌[△]

(第四军医大学西京医院心血管内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察乙醛脱氢酶 2(ALDH2)对高糖诱导的 H9C2 心肌细胞存活及凋亡的影响,并探讨腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/FOXO3a 信号通路在高糖导致的心肌细胞凋亡中的调控作用。**方法:**以 30 mmol/L 葡萄糖诱导培养 H9C2 心肌细胞 48 h,经 ALDH2 激动剂 Alda-1 及 AMPK 抑制剂 Compound C 干预后,用 MTT 法检测细胞的存活情况,TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡情况,Western blot 检测 ALDH2、磷酸化 AMPK 和 FOXO3a 蛋白的表达水平。**结果:**与对照组相比,高浓度葡萄糖培养 H9C2 心肌细胞后,细胞的存活率显著降低、凋亡指数明显升高,磷酸化 AMPK 的表达水平明显上调,ALDH2 和磷酸化 FOXO3a 的蛋白表达显著降低($P<0.05$)。ALDH2 的激动剂 Alda-1 处理可显著提高高糖诱导的 H9C2 心肌细胞的存活率、降低其凋亡率,减少磷酸化 AMPK 的蛋白表达,增加 ALDH2 的表达和 FOXO3a 蛋白的磷酸化;而进一步采用 AMPK 的抑制剂 Compound C 处理,可显著抑制 Alda-1 对高糖诱导的 H9C2 心肌细胞的这些影响。**结论:**ALDH2 的激动剂 Alda-1 对高糖诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用,可能与其激活 AMPK,进而抑制心肌细胞 FOXO3a 的活性有关。

关键词:乙醛脱氢酶 2;高糖;心肌细胞;腺苷酸活化蛋白激酶;FOXO3a

中图分类号:R587.1,R542.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2024-05

Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis through AMPK/FOXO3a pathway*

GUO Yu-li, YAN Hao, ZHANG Rong-qing, LI Cong-ye, ZHANG Ying-mei[△], WANG Hai-chang[△]

(Department of Cardiovascular, Xijing Hospital Affiliated to the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the impact of ALDH2 on the cell viability and apoptosis of H9C2 cells, and explore the role of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/FOXO3a pathways in high glucose-induced apoptosis in the cardiomyocytes. **Methods:** H9C2 cells were cultured in DMEM with high doses (30 mM) of glucose for 48 h, in the absence or presence of ALDH2 activator Alda-1 (20 μ M) and AMPK inhibitor Compound C (10 mM). The cell viability was examined by MTT assay, the apoptosis was measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. Western blotting was used to evaluate the expression of ALDH2, phosphorylated AMPK and FOXO3a. **Results:** Compared with the control group, the cell viability, the expression of ALDH2 and p-FOXO3a were significantly decreased, cell apoptosis index and expression of p-AMPK were markedly increased, in high concentration of glucose induced H9C2 cells ($P<0.05$). Alda-1 increased the cell viability, reduced the cell apoptosis, and the expression of p-AMPK, upregulated the ALDH2 expression and phosphorylation of FOXO3a induced by high concentration of glucose, these effect of Alda-1 was obliterated by Compound C. **Conclusions:** ALDH2 activator Alda-1 had a protective effect on high glucose-induced cardiomyocyte injury, which may be mediated by the activation of AMPK and thus the suppression of FOXO3a transcription factor activity.

Key words: ALDH2; high glucose; Myocardial cell; AMPK; FOXO3a

Chinese Library Classification: R587.1, R542.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2024-05

前言

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DC)是指心肌壁内微血管病变、血管周边间质纤维化等原因致使心脏功能异常的一种疾病^[1]。在糖尿病的进展中,大量产生的活性氧损伤心肌细胞,可促进糖尿病心肌病的发生,严重影响患者的生活质量^[2]。如何减轻糖尿病造成的心肌损害,是改善糖尿病患者生存质量的重要途径。

乙醛脱氢酶 2(aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)存在于线粒体内,是一种关键的醛类氧化酶,也是一种内源性的心肌保护因子,能对抗乙醛及其代谢产物 4-羟壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)对细胞的损伤作用^[3]。最近研究发现,ALDH2 不仅通过催化醛类分解对酒精产生的心肌损伤具有保护作用,而且对缺血再灌注、内质网应激等多种因素导致的心肌损伤也有保护作用。其作用机制主要包括:①通过代谢 4-HNE 等毒性醛类在心肌梗死过程中起抗心肌细胞凋亡并改善心室重构的作用^[4];

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81370195)

作者简介:郭钰丽(1985-),女,硕士研究生,电话:18392135100, E-mail: guoyuli67@163.com

[△] 通讯作者:王海昌, E-mail: Wanghc@fmmu.edu.cn; 张英梅, E-mail: Zhangym@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-27 接受日期:2013-12-24)

② ALDH2 通过 PI3K/Akt 信号通路保护内质网应激导致的活性氧(ROS)聚积^[5-7]等。

腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)是真核生物细胞中一种重要的蛋白激酶,通过 AMPK 对能量的调节使得心肌细胞能够保持正常的 ATP 水平,有助于维持心肌细胞的正常功能^[8]。AMPK 可调节整个机体和细胞内能量的利用,被认为是能量的调控器^[9]。FOXO3a 是 AMPK 重要的下游分子,参与多种细胞生物学过程的信号转导及调控,具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用^[10]。研究证实,ALDH2 可通过调节 AMPK 信号通路,对心肌缺血-再灌注损伤发挥保护作用^[11,12]。最近的一项研究表明,ALDH2 及其激动剂 Alda-1 能够通过调控 AMPK 信号通路,有效缓解酒精引起的心肌损害,为心脏提供保护作用^[13,14]。然而,AMPK 在调控心肌细胞凋亡中的作用及其具体机制目前尚不清楚。本研究旨在观察 ALDH2 对高糖诱导的 H9C2 心肌细胞存活及凋亡的影响,并探讨腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/FOXO3a 信号通路在其中的调控作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

H9C2 细胞购买于标准细胞库;二甲亚砜(DMSO)、葡萄糖、MTT、BCA 蛋白定量试剂盒均为碧云天公司产品;DMEM 培养基(Hyclone)、胎牛血清(Hyclone);药品 Alda-1 和 Compound C 购自 cell signaling 公司;细胞凋亡原位检测试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit, POD)购自 Roche 公司;ECL 发光试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。Model 680 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad)。激光扫描共焦显微镜:日本, Olympus FV1000。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 用 10%血清的低糖培养基培养 H9C2 细胞,当细胞增殖至培养瓶底 80 %时传代。将细胞“同步化”后再分组。设置分为五组:(1)对照组(NG):低糖(5.5 mmol/L)+DMSO 培养 48 h;(2)High glucose 组(HG):高糖(30 mmol/L)+DMSO 培养 48 h;(3)NG+Alda-1 组:H9C2 细胞经 Alda-1 (20 μ mol/L)预处理后,在低糖条件下培养 48 h;(4)HG+Alda-1 组:H9C2 细胞经 Alda-1 (20 μ mol/L)处理后,在高糖条件下培养 48 h;(5)HG+Alda-1+Compound C (HG+Alda-1+CC):H9C2 细胞经 Alda-1(20 μ mol/L)和 Compound C(10 mmol/L)处理后,在高糖条件下培养 48 h。

1.2.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)检测细胞活力 调整细胞悬液浓度为 5×10^4 /ml,每孔接种 200 μ l 于 96 孔培养板上,每组设 3 个平行孔,用含 10 %胎牛血清的低糖培养液培养 24 h,待细胞生长至 80 %~90 %融合后可开始干预。各组分别加入含不同浓度葡萄糖的培养基 200 μ l,加药干预后置于 37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 培养箱中培养 48 h。然后每孔中加入 20 μ l 的 MTT 溶液(5 g/L),37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,弃去上清,加入 150 μ l 的 DMSO,震荡 10 min 使结晶充分溶解。用酶联免疫仪检测 490 nm 波长处 OD 值,用公式计算细胞存活率 = (OD 实验组 / OD 对照组) $\times$ 100%。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 应用脱氧核糖核苷酸末端转

移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)检测心肌细胞凋亡,按照 TUNEL 试剂盒说明书操作。将心肌细胞以 4×10^4 个/ml 细胞铺片,用含不同浓度葡萄糖的培养基加药干预 48 h。吸弃培养液,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,4 %中性甲醛固定 10 min。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用 0.1 %Triton 透膜,置于 4 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min。PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min;新鲜配制 3 %H₂O₂,室温处理 10 min,阻断内源性过氧化物酶活性,通过 TdT 酶的作用,使 dUTP 掺入到凋亡细胞双链或单链 DNA 的 3'-OH 末端,与 dATP 形成异多聚体,与过氧化物酶的 DNA 断点连接。PBS 液漂洗 3 次,以 1:10000 浓度的 DAPI 孵育 1 min,PBS 液漂洗 3 次,脱水、甘油封片。在光学显微镜下观察并记录结果。细胞核呈绿色荧光即为凋亡细胞。每个切片随机选取 5 个高倍视野(400 $\times$)观察计数,根据公式细胞凋亡指数(AI)=(凋亡心肌细胞数 / 心肌细胞总数) $\times$ 100 %计算,取其平均凋亡指数。

1.2.4 Western blotting 法检测蛋白的表达 六孔板中充满的细胞按设定分组加药干预处理,然后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,提蛋白、BCA 定量,根据定量结果将蛋白上样量调整为一致。加入等量的 5 $\times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min。以每孔 50 μ g 蛋白上样后进行 SDS-PAGE 电泳,电泳分离蛋白后转膜,用含 5 %牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)Tween-20 的封闭液孵化 1 h,分别加兔抗鼠的特异性一抗,对各反应组分别用 p-AMPK 和 p-Foxo3a--p-FOXO3a 的磷酸化抗体标记,以 AMPK 和 Foxo3a--FOXO3a 非磷酸化相应抗体作内参。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,以 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,加入相应的二抗(羊抗兔 IgG-HRP)室温孵育 1 h,以 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,用电化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显色检测目的条带。膜经凝胶成像仪(Bio-rad)记录相应的表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件包进行统计学分析,计量资料数据用均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间的比较采用 One-way ANOVA 分析,两两比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心肌细胞存活率的比较

H9C2 心肌细胞经高糖处理 48 h 后,存活率显著低于对照组($P < 0.05$),而 HG+Alda-1 组细胞的存活率较 HG 组显著升高($P < 0.05$),HG+Alda-1+CC 组细胞的存活率则明显低于 HG+Alda-1 组($P < 0.05$),见图 1。

2.2 各组心肌细胞凋亡情况的比较

采用 TUNEL 染色法检测心肌细胞的凋亡程度。结果显示,与对照组相比,高糖刺激可引起心肌细胞凋亡显著增加($P < 0.05$);而加入 Alda-1 干预后显著减轻高糖刺激引起的细胞凋亡($P < 0.05$);与 HG+Alda-1 组相比,Compound C 可部分抵消 Alda-1 的抗凋亡作用($P < 0.05$),见图 2。

2.3 各组心肌细胞中 ALDH2、p-AMPK 及 p-FOXO3a 蛋白表达的比较

高糖诱导的 H9C2 心肌细胞中 ALDH2 和 p-FOXO3a 蛋白表达水平较对照组明显降低,而 p-AMPK 的表达水平显著升高

($P<0.05$); 与 HG 组比较, HG+Alda-1 组 ALDH2 和 p-FOXO3a 蛋白表达显著增加, p-AMPK 蛋白表达量却显著降低($P<0.05$); 与 HG+Alda-1 组比较, HG+Alda-1+CC 组 p-FOXO3a 的蛋

白表达显著增强, p-AMPK 蛋白表达明显降低($P<0.05$), ALDH2 的蛋白表达无显著改变; Alda-1 组与对照组 p-AMPK 及 p-FOXO3a 的蛋白表达比较无明显差异, 见图 3。

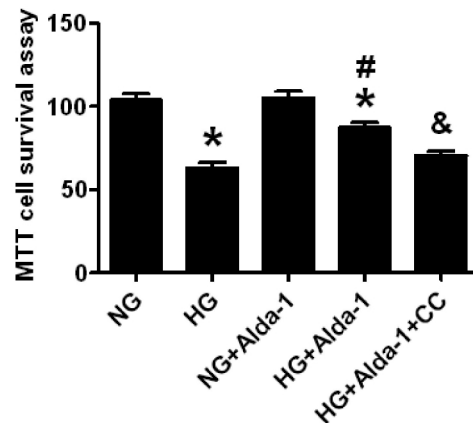


图1 Alda-1 对高糖诱导的 H9C2 心肌细胞存活率的影响

注: 均数 $\pm$ SEM, $n=5$, * $P<0.05$ vs 对照组, # $P<0.05$ vs 高糖 --- 高糖组, & $P<0.05$ vs 高糖 +Alda-1 组。

Fig.1 Effect of Alda-1 on the cell viability of H9C2 myoblasts induced by high glucose

Note: Mean $\pm$ SEM, $n=5$, * $P<0.05$ vs NG group, # $P<0.05$ vs HG group, & $P<0.05$ vs HG+Alda-1 group.

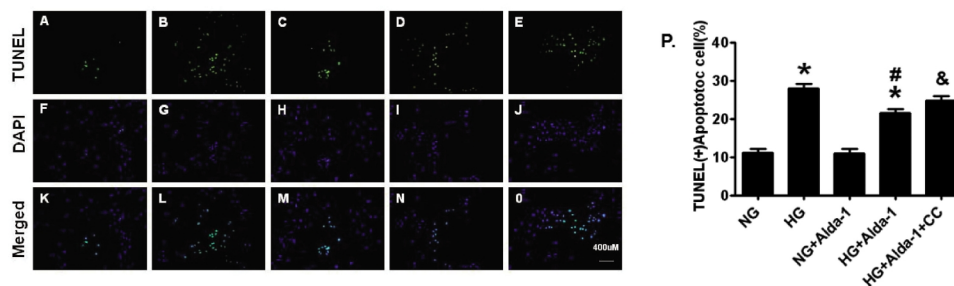


图2 Alda-1 对高糖诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡的影响

注: 均数 $\pm$ SEM, $n=5$, * $P<0.05$ vs 对照组, # $P<0.05$ vs 高糖 --- 高糖组, & $P<0.05$ vs 高糖 +Alda-1 组。

Fig.2 Effect of Alda-1 on the high glucose-induced H9C2 cell apoptosis

Note: Mean $\pm$ SEM, $n=5$, * $P<0.05$ vs NG group, # $P<0.05$ vs HG group, & $P<0.05$ vs HG+Alda-1 group.

TUNEL 染色使阳性细胞呈绿色荧光: (A)NG, (B)HG, (C)NG+Alda-1, (D)HG+Alda-1, (E)HG+Alda-1+CC。DAPI 使细胞核呈蓝色荧光: (F)NG, (G)HG, (H)NG+Alda-1, (I)HG+Alda-1, (J)HG+Alda-1+CC。绿色和蓝色荧光叠加后的图片: (K)NG, (L)HG, (M)NG+Alda-1, (N)HG+Alda-1, (O)HG+Alda-1+CC。(P)数据分析。

TUNEL-positive nuclei were visualized with fluorescein (green) in panels: (A)NG, (B)HG, (C)NG+Alda-1, (D)HG+Alda-1, (E)HG+Alda-1+CC. All nuclei were stained with DAPI shown in blue in panels: (F)NG, (G)HG, (H)NG+Alda-1, (I)HG+Alda-1, (J)HG+Alda-1+CC. The merged images in each group: (K)NG, (L)HG, (M)NG+Alda-1, (N)HG+Alda-1, (O)HG+Alda-1+CC. (P)Quantified data.

3 讨论

糖尿病心肌病以氧化应激和细胞凋亡为心肌损伤的特点^[15],是造成糖尿病病人死亡的重要原因之一^[16]。糖尿病心肌病的发生、发展机制非常复杂,高血糖与心血管并发症的发生密切相关。大量研究证实,持续高糖刺激使心肌细胞处于过度氧化应激状态,同时可激活许多促凋亡信号^[17,18]。H9C2 细胞来源于大鼠,是同时具有骨骼肌与心肌功能的特异性心肌细胞株,常用于研究心脏相关疾病^[19]。本研究采用高浓度葡萄糖诱导 H9C2 细胞,结果显示高糖培养 48 h 后,细胞的凋亡数量明显增多,这与以往的实验结果一致^[20]。

既往的研究表明,ALDH2 在酒精代谢中发挥重要作用,还

能对抗氧化应激造成的线粒体损伤。肝脏内 ALDH2 在对酒精代谢产物乙醛的解毒和清除中发挥重要作用;提高 ALDH2 活性可缓解和治疗酒精中毒症状和乙醇造成的肝脏损伤,对酒精相关性疾病及癌症的治疗有重要价值。ALDH2 还可以降低氧化应激造成的心肌细胞凋亡、减轻心肌的氧化损伤,从而产生保护心肌的作用^[21]。新近研究表明,激活 ALDH2 可以对心肌发挥保护作用,ALDH2 表达的高低与糖尿病大鼠心肌功能损伤程度密切相关^[22]。Chen 等^[23]采用小鼠复制心肌梗死模型,在缺血前用 Alda-1 干预,发现其可以增加 ALDH2 的活性,同时减少心肌梗死面积,这提示了 Alda-1 在治疗缺血 - 再灌注损伤中的价值。Alda-1 是 ALDH2 的激活剂,对心肌也具有保护作用,这一重要发现为研究心肌保护机制开辟了新的途径^[24]。心肌细

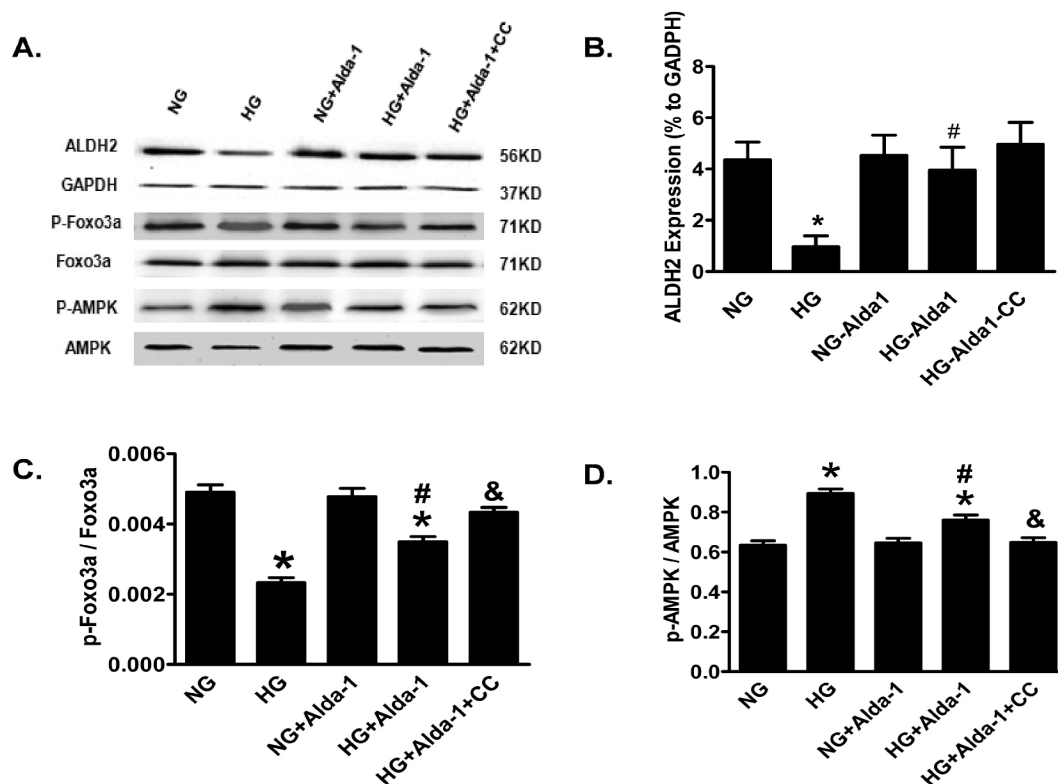


图3 Alda-1对高糖诱导的H9C2细胞中ALDH2、AMPK和FOXO3a总蛋白及磷酸化蛋白表达的影响

注:均数 $\pm$ 标准误, $n=5$, * $P<0.05$ vs 对照组, # $P<0.05$ vs 高糖组, & $P<0.05$ vs 高糖+Alda-1组。

Fig.3 Effect of Alda-1 on the high glucose-induced ALDH2, the total and phosphorylated AMPK and FOXO3a expression

Note: Mean $\pm$ SEM, $n=5$, * $P<0.05$ vs NG group, # $P<0.05$ vs HG group, & $P<0.05$ vs HG+Alda-1 group.

- (A)ALDH2蛋白条带, AMPK和FOXO3a的总蛋白和磷酸化蛋白条带; (B)定量分析ALDH2的蛋白水平; (C)定量分析FOXO3a的蛋白水平; (D)定量分析AMPK的蛋白水平。
- (A)Representative gel blots of ALDH2, the total and phosphorylated AMPK and FOXO3a; (B)ALDH2; (C)pFOXO3a-to-FOXO3a ratio; (D)pAMPK-to-AMPK ratio.

胞中的活性氧主要来自于线粒体,作为细胞的“能量工厂”对疾病的发展具有重大影响^[25]。本研究的结果表明,高糖刺激后细胞的凋亡率明显升高;加入Alda-1干预后,相对于高糖组凋亡的细胞数量显著减少,提示ALDH2的激活对高糖导致的心肌细胞凋亡有保护作用。

AMPK在大多数哺乳动物组织中表达,在调控细胞生长、增殖和能量代谢中发挥重要作用^[26]。在运动、缺血、缺氧等情况下,细胞内AMP/ATP比值明显升高,AMPK α 亚基Thr172磷酸化后被激活。研究发现,AMPK不仅是“细胞能量调节器”,同时AMPK的激活还有助于减轻心肌缺血和细胞凋亡对机体造成的损伤,减缓动脉粥样硬化的进程^[27]。FOXO蛋白家族是一类重要的转录因子,参与细胞生长周期、DNA损伤后修复、凋亡等多种细胞生物学过程的信号转导和调控^[28]。FOXO3a转录因子活性受到多种调节,包括基因表达水平、翻译后修饰、蛋白质稳定性等多个层次,其中磷酸化和去磷酸化修饰在调节FOXO3a蛋白的亚细胞定位及转录活性中具有重要作用^[29]。FoxO3a---FOXO3a是一种转录蛋白,可调节细胞凋亡分子和抗细胞增殖分子的表达,具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用^[30]。FOXO3a激活后可调控靶基因的转录,使细胞停止在G0/G1期,也可通过诱导促凋亡因子的表达,引起多种细胞凋亡^[31]。研究表明FOXO3a通过调节下游靶基因诱导肿瘤细胞凋

亡^[32]。FOXO3a还可以通过诱导MAFbx蛋白降解引起肌肉萎缩^[33],是调控体内蛋白合成和降解的重要转录因子^[34,35]。本研究的结果显示,高糖刺激能促进心肌细胞中AMPK的磷酸化,明显抑制FOXO3a磷酸化;Alda-1干预可抑制高糖诱导的AMPK和FOXO3a的磷酸化;而AMPK的抑制剂Compound C可部分恢复Alda-1对高糖诱导的这种抑制作用。因此ALDH2可能通过抑制AMPK/FOXO3a通路改善高糖诱导的心肌细胞凋亡。

综上所述,本研究表明,ALDH2通过抑制高糖诱导的AMPK激活、上调FOXO3a磷酸化,减少心肌细胞凋亡,这为研究ALDH2在糖尿病心肌病中的保护机制提供了重要的理论依据。我们推测,外源性ALDH2的激活可以减轻糖尿病对心肌造成的损伤,这种保护作用可能是通过下调p-AMPK增加FOXO3a转录因子磷酸化,降低高糖刺激对细胞造成的损伤从而减少心肌细胞凋亡来实现的,但具体机制还有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Murarka S, Movahed M R. Diabetic cardiomyopathy [J]. J Card Fail, 2010,16(12):971-979
- [2] Seferovic P M, Milinkovic I, Ristic A D, et al. Diabetic cardiomyopathy: ongoing controversies in 2012 [J]. Herz, 2012,37(8): 880-886

- [3] Ding X, Beier J I, Baldauf K J, et al. Acute ethanol preexposure promotes liver regeneration after partial hepatectomy in mice by activating ALDH2[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013
- [4] Guo J M, Liu A J, Zang P, et al. ALDH2 protects against stroke by clearing 4-HNE[J]. *Cell Res*, 2013, 23(7):915-930
- [5] Teng X, Song J, Zhang G, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by intermedin(1-53) protects against myocardial injury through a PI3 kinase-Akt signaling pathway [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(12):1195-1205
- [6] Malhotra J D, Kaufman R J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(12):2277-2293
- [7] Zhang Y, Xia Z, La Cour K H, et al. Activation of Akt rescues endoplasmic reticulum stress-impaired murine cardiac contractile function via glycogen synthase kinase-3 β -mediated suppression of mitochondrial permeation pore opening [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(9):2407-2424
- [8] Xie Z, He C, Zou M H. AMP-activated protein kinase modulates cardiac autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. *Autophagy*, 2011, 7(10):1254-1255
- [9] Iwabuchi S, Kawahara K. Extracellular ATP-prinoceptor signaling and AMP-activated protein kinase regulate astrocytic glucose transporter 3 in an in vitro ischemia[J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(4):259-268
- [10] Peng K, Li Y, Long L, et al. Knockdown of FoxO3a induces increased neuronal apoptosis during embryonic development in zebrafish[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 484(2):98-103
- [11] Ma H, Guo R, Yu L, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(8):1025-1038
- [12] Zhang Y, Ren J. Autophagy in ALDH2-elicited cardioprotection against ischemic heart disease: slayer or savior?[J]. *Autophagy*, 2010, 6(8):1212-1213
- [13] Guo R, Scott G I, Ren J. Involvement of AMPK in alcohol dehydrogenase accentuated myocardial dysfunction following acute ethanol challenge in mice[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6):e11268
- [14] Ge W, Guo R, Ren J. AMP-dependent kinase and autophagic flux are involved in aldehyde dehydrogenase-2-induced protection against cardiac toxicity of ethanol [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(9):1736-1748
- [15] Dei C A, Spigoni V, Ridolfi V, et al. Diabetes and chronic heart failure: from diabetic cardiomyopathy to therapeutic approach [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2013, 13(1):38-50
- [16] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9):1058-1070
- [17] Zhang Y, Babcock S A, Hu N, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: role of GSK3 β and mitochondrial function[J]. *BMC Med*, 2012, 10:40
- [18] Huynh K, Kiriazis H, Du X J, et al. Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60:307-317
- [19] Comelli M, Domenis R, Bisetto E, et al. Cardiac differentiation promotes mitochondria development and ameliorates oxidative capacity in H9c2 cardiomyoblasts[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(2):315-326
- [20] Lv W, Zhang Y, Guan G, et al. Mycophenolate mofetil and valsartan inhibit podocyte apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Pharmacology*, 2013, 92(3-4):227-234
- [21] Li S Y, Gilbert S A, Li Q, et al. Aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) ameliorates chronic alcohol ingestion-induced myocardial insulin resistance and endoplasmic reticulum stress [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(2):247-255
- [22] Wang H J, Kang P F, Ye H W, et al. Effect of ALDH2 ctivation against myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rat [J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2012, 28(2):133-137
- [23] Fu S H, Zhang H F, Yang Z B, et al. Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2014, 387(1):87-94
- [24] Budas G R, Disatnik M H, Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: a new therapeutic target? [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2009, 19(5):158-164
- [25] Dobrin J S, Lebeche D. Diabetic cardiomyopathy: signaling defects and therapeutic approaches [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8(3):373-391
- [26] Appuhamy J A, Nayananjali W A, England E M, et al. Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(1):419-429
- [27] Wang L T, Chen B L, Wu C T, et al. Protective Role of AMP-Activated Protein Kinase-Evoked Autophagy on an In Vitro Model of Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Tubular Cell Injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e79814
- [28] Sanchez A M, Candau R B, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 190(4):1603-1613
- [29] Reagan-Shaw S, Ahmad N. The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224(3):360-368
- [30] Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J I, Takai K, et al. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering its Localization[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(1):188-200
- [31] Wang J G, Zheng X X, Zeng G Y, et al. Purified vitexin compound 1 induces apoptosis through activation of FOXO3a in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(1):488-496
- [32] Dey P, Strom A, Gustafsson J A. Estrogen receptor beta upregulates FOXO3a and causes induction of apoptosis through PUMA in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 5(5):1605-1610
- [33] Wang H, Liang B, Peng C, et al. Effect of Ligustrazine on expressions of FoXO3a, MAFbx, and MuRF1 in denervated skeletal muscle atrophy rats [J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2012, 26(5):597-600
- [34] Skurc K, Izumiya Y, Maatz H, et al. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21):20814-20823
- [35] Li D Y, Qu Y, Li J H, et al. Role of the FOXO3a transcription factor in neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2013, 15(11):1023-1027