

甘氨酸对华法林诱导的瓣膜间质细胞钙化的保护作用

邱 铭, 陆 艳, 孙 伟, 孔祥清, 王 芳*

南京医科大学第一附属医院心血管内科, 江苏 南京 210029

[摘要]目的:探究甘氨酸对华法林诱导的瓣膜间质细胞(aortic valve interstitial cells, AVICs)钙化是否有保护作用。方法:提取猪 AVICs,通过钙浓度测定、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定、茜素红染色等方法检测不同浓度甘氨酸对钙化的作用;real-time PCR 探究甘氨酸对成骨分化的作用;Western blot、流式细胞学及 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)染色研究甘氨酸对华法林引起的 AVICs 凋亡的作用。结果:甘氨酸抑制华法林引起的 AVICs 钙化,抑制 mRNA 水平成骨分化标志物的表达,抑制 Smad1、5/RUNX2 通路,并且抑制华法林引起的 AVICs 凋亡。结论:甘氨酸可能抑制 Smad1、5/RUNX2 通路,并且抑制钙化早期凋亡,因此对华法林引起的 AVICs 钙化具有保护作用。

[关键词] 甘氨酸;瓣膜钙化;瓣膜间质细胞;华法林

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1022-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180802

Glycine attenuates warfarin induced valve interstitial cells calcification

Qiu Ming, Lu Yan, Sun Wei, Kong Xiangqing, Wang Fang*

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate if glycine has the protection effect on warfarin induced aortic valve interstitial cells (AVICs) calcification. **Methods:** Porcine AVICs were isolated, calcium quantification, alkaline phosphatase activation and Alizarin red staining were performed to determine the effect of different concentrations of glycine on calcification, and the mRNA expression of osteogenic markers were determined by RT-PCR. Western blot, Flow cytometry and TUNEL assay were performed to investigate the anti-apoptosis effect on warfarin induced AVICs calcification. **Results:** Glycine attenuated warfarin induced AVICs calcification, reduced the mRNA expression of osteogenic markers, inhibited the Smad1, 5/RUNX2 pathway and decreased the apoptosis of warfarin induced calcification. **Conclusion:** Glycine inhibits Smad1, 5/RUNX2 pathway and decreases the early stage of apoptosis to attenuate warfarin induced AVICs calcification.

[Key words] glycine; valve calcification; valve interstitial cells; warfarin

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1022-1027]

心脏瓣膜疾病是我国的多发疾病,心脏瓣膜钙化不仅会引起瓣膜功能的异常,还能导致血栓栓塞、心力衰竭,甚至猝死。在瓣膜钙化的原因中有一类特殊的由药物华法林引起的钙化,近年来才逐渐被人们发现和认识。临床研究发现长期服用华法林会导致心血管钙化^[1],而华法林应用的时长与

主动脉瓣钙化程度密切相关。华法林是一种维生素 K 的抑制剂,不仅可以抑制凝血因子的功能进而达到抗凝的作用,同时也可以抑制维生素 K 依赖蛋白基质 Gla 蛋白(matrix Gla protein, MGP)的合成和功能^[2],而 MGP 却是组织钙化的重要抑制因子。目前对于华法林引起的钙化仍没有有效的预防和治疗方法,其他药物尚不能完全替代华法林,因此探索可以抑制华法林引起钙化的干预方法对于临床更科学地认识、应用和改良抗凝药物具有重要意义。

甘氨酸(glycine, Gly)是一种最简单的氨基酸,广泛参与机体的各种代谢,并且也是中枢神经系统

[基金项目] 国家自然科学基金(81671610,81471611);江苏省自然科学基金(BK20141024)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangfangheart@njmu.edu.cn

中一种重要的抑制性神经递质。甘氨酸对ATP耗竭细胞具有保护作用^[3],并已被证实其凋亡抑制作用,对多种脏器缺血再灌注损伤具有保护作用^[4],目前研究发现甘氨酸除了具有抗凋亡作用外,还具有抗炎作用,参与免疫调节,改善糖尿病,抑制心肌肥大以及抑制肿瘤生长的作用^[5]。

细胞凋亡是细胞死亡的一种形式,研究证实细胞凋亡参与瓣膜异位钙沉积的病理发生过程。有研究表明,细胞凋亡伴随凋亡小体的清除障碍可能是活体心脏瓣膜钙化发生的基础机制^[6]。瓣膜间质细胞(aortic valve interstitial cells, AVICs)是心脏瓣膜中的主要细胞成分,不仅起着支架作用,在瓣膜的正常生理及病理应答过程中发挥着重要作用。因此干预AVICs凋亡发生将对抑制瓣膜钙化的形成发挥重要调控作用。本研究采用体外华法林诱导猪主动脉瓣间质细胞钙化,观察甘氨酸对猪AVICs钙化的作用并阐明其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

猪主动脉瓣膜来自句容市杨海生猪养殖专业合作社,配置华法林钙化培养基:DMEM(含HEPES)高糖培养基,含1%FBS、1%青/链霉素、1.6 mmol/L磷酸盐(Pi)、10 μmol/L华法林^[7](Sigma-Aldrich公司,美国)。甘氨酸粉末(G7126, Sigma-Aldrich公司,美国)。使用的一抗:GAPDH抗体(#5174),RUNX2抗体(#12556)、pSmad1/5抗体(#9516)、Smad1/5抗体(#8685)、Cleaved-Caspase3抗体(#2876)和Bcl2抗体(#5174)(Cell Signaling Technology公司,美国),HRP标记的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(Cell Signaling Technology公司,美国)。显影液(SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo公司,美国),ChemiDoc XRS成像系统(Bio-Rad公司,美国)。流式细胞仪(FACSscan flow cytometer, BD Biosciences公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

钙浓度测定和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定分为6组,包括空白对照组(Ctrl)、华法林处理组(War)、10 mmol/L甘氨酸处理组(10 mmol/L Glycine)、1 mmol/L甘氨酸处理组+华法林处理组(1 mmol/L Glycine+War)、5 mmol/L甘氨酸处理组+华法林处理组(5 mmol/L Glycine+War)、10 mmol/L甘氨酸处理组+华法林处理组(10 mmol/L

Glycine+War)。茜素红染色、Western blot、PCR、流式检测细胞凋亡及TUNEL染色实验分为4组,包括空白对照组(Ctrl)、华法林处理组(War)、10 mmol/L甘氨酸处理组(10 mmol/L Glycine)、5 mmol/L甘氨酸处理组+华法林处理组(5 mmol/L Glycine+War)。

1.2.2 猪主动脉瓣膜间质细胞(pig aortic valve interstitial cells, pAVICs)的提取

将20 kg雄性家猪(共5头)麻醉后,将少部分主动脉与心脏一起取出。沿主动脉—前室间沟剪开左心室,在主动脉根部将主动脉三叶瓣膜从根部剪出,放入预冷无菌PBS中暂存。配置1 200 U/mL胶原酶消化液,抗生素梯度清洗瓣膜后,转入放有胶原酶消化液中37℃消化15 min。用细胞刮轻轻刮去瓣膜上皮细胞,将瓣膜充分剪碎后转入加了胶原酶的消化液中,放入摇床(37℃,转速200 r/min)消化3 h。3 h后离心,弃上清,加新鲜完全培养基(DMEM高糖培养基,含20% FBS、1%青/链霉素、2 mmol/L L型谷氨酰胺),用100 μm滤网过滤后转入25 cm²培养瓶中于37℃,5%CO₂培养箱中培养。48 h观察贴壁后换培养基。细胞进行传代培养,后续实验将选取第3代至第5代的细胞进行。

1.2.3 体外华法林诱导pAVICs钙化模型的构建

用DMEM培养基溶解后加入华法林钙化培养基中,使其终浓度分别为1、5、10 mmol/L。用华法林钙化培养基处理主动脉瓣间质细胞4~7 d。

1.2.4 细胞钙浓度测定

将12孔板中培养的细胞用PBS清洗3次,每孔加入500 μL 0.6 mol/L HCL,4℃摇床24 h。使用试剂盒:QuantiChrom™ Calcium Assay Kit (DICA-500, QuantiChrom公司,美国)。每个样品取5 μL加入96孔板,加入200 μL工作液,室温振荡3 min后使用Synergy™ 2 microplate reader (BioTek公司,美国)读取612 nm处吸光度。将12孔板中液体吸净,预冷PBS冲洗3次;加入0.1 mol/L NaOH/0.1% SDS,将每孔细胞刮下,4℃13 000 g离心20 min,取上清使用BCA法测蛋白浓度(BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific Pierce公司,美国)。钙浓度值计算:标准化钙浓度(μg/mg protein)=绝对钙浓度/蛋白浓度。

1.2.5 ALP活性测定

将12孔板中培养的细胞用PBS清洗3次;各孔添加250 μL 0.05%的曲拉通X-100,进行冻融操作,共3次。收集每孔中液体,4℃15 000 r/min离心15 min处理,将上清液移到新的EP管中,并以此作为样品。使用ALP试剂盒(WAKO公司,日本)。做

标准曲线,向96孔板内添加100 μL 底物缓冲液和20 μL 样品,在微孔板震荡器上充分振荡1 min后,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min;添加80 μL 反应终止液,在微孔板震荡器上充分振荡1 min后,用Synergy™ 2 microplate reader(BioTek公司,美国)测量405 nm处的吸光值(OD值)。同样方法进行空白(蒸馏水)对照和标准品的检测。BCA法检测样品的总蛋白浓度,然后根据ALP活性的计算公式计算ALP活性。ALP活性的计算公式如下:活性($\text{U}/\mu\text{L}/\mu\text{g}$)= $C \times a / (t \times M)$

C:由标准曲线得到的OD值(A实验值减去A空白值的差值),计算p-硝基酚浓度($\text{mmol/L}=\text{nmol}/\mu\text{L}$);t:反应时间(min);M:样品的总蛋白浓度;A:样品的稀释倍数。

1.2.6 茜素红染色

将12孔板培养基吸干净,PBS漂洗3次;4%甲醛溶液固定室温10 min,PBS漂洗3次;95%乙醇室温固定细胞20~30 min后,去离子水漂洗3遍;2%茜素红S染色1 min,镜下观察有无橘红色结节出现,若有终止染色,若无继续染色,最迟5 min;2%茜素红S的配制:茜素红S 2 g加入蒸馏水100 mL,溶于蒸馏水后,用10%氢氧化铵调整其pH至4.2;去离子水漂洗数次,以洗净非特异性染色为止,后使用扫描仪扫描图像。

1.2.7 实时荧光定量PCR

使用RNeasy RNA isolation kit(Qiagen公司,美国)提取pAVIC的总RNA,使用PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa公司,日本)进行逆转录。实时荧光定量PCR使用Prism 7900(ABI公司,美国)系统。用于实时反应检测BMP2(#23 cat.no.04686977001)、Runx2(#66 cat.no.04688651001)和SOX9(#133 cat.no.04694171001)Taqman的探针(Roche公司,瑞士)。所有荧光定量PCR反应均重复3次,目标基因标准化于管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。按照对照组将CT值进行标准化,计算各处理组CT值的变化。

1.2.8 Western blot

蛋白使用Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo公司,美国)按照试剂盒说明书提取。细胞裂解产物使用10%~15%的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到PVDF膜(Roche公司,瑞士)上,5%BSA溶液封闭后,目标蛋白孵育一抗,后孵育相对应HRP耦联二抗(1:5 000稀释)。使用的一抗如下:GAPDH抗体(#5174)、RUNX2抗体(#12556)、pSmad1/5抗体(#9516)、Smad1/5抗体(#8685)、Cleaved-Caspase3抗

体(#2876)和Bcl2抗体(#5174),HRP标记的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗。使用显影液反应1 min后,在ChemiDoc XRS成像系统下曝光。Image Lab™ 软件用于条带灰度分析。

1.2.9 流式检测细胞凋亡

用无血清培养基饥饿处理7 d以诱导凋亡。胰酶消化,4 $^{\circ}\text{C}$ 450 g离心5 min,收集细胞;PBS清洗2遍后,重悬于100 μL Annexin V binding buffer中,细胞在5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI(BD)室温避光染色孵育15 min后,加入400 μL Annexin V binding buffer。立即用流式细胞仪(FACScan flow cytometer, BD Biosciences公司,美国)检测细胞凋亡。早期凋亡细胞(Annexin-FITC阳性,PI阴性)位于右下象限,晚期凋亡细胞(Annexin-FITC阳性,PI阳性)位于右上象限;正常细胞位于(Annexin-FITC阴性,PI阴性)位于左下象限。结果以阳性染色细胞占所有细胞的百分比形式呈现。

1.2.10 TUNEL染色

使用TUNEL染色试剂盒(Promega公司,美国)与DAPI对比染色。将pAVIC种植于Lab-Tek II腔室玻片(Thermo公司,美国),并给与5 mmol/L甘氨酸与华法林钙化诱导处理4 d。将腔室取下,玻片用PBS洗2次,使用4%的多聚甲醛固定,孵育一抗,细胞核与DAPI复染色。TUNEL阳性细胞其细胞核固缩并被绿色荧光染色,表明细胞凋亡。图像使用正置荧光显微镜(Zeiss公司,德国)拍摄。

1.3 统计学方法

所有测量数据都表示为平均值 \pm 标准平均误差(Standard Error of Mean, SEM)。使用GraphPad Prism 5.0软件比较处理组与对照组数值。两组比较采用t检验比较统计学差异,4组数据采用单向方差分析(One-Way ANOVA)中的Bonferroni多重比较检验; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘氨酸对华法林引起pAVICs钙化的保护作用

细胞内钙含量测定结果显示,华法林处理显著诱导了pAVICs的钙化,1 mmol/L甘氨酸处理组与华法林处理组相比,对细胞内钙含量没有影响($P > 0.05$)。5 mmol/L甘氨酸处理组与华法林处理组相比,降低了细胞内钙含量($P < 0.01$),10 mmol/L甘氨酸处理组与华法林处理组相比,细胞内钙含量得到显著抑制($P < 0.001$,图1A)。ALP活性结果显示华法林处理显著增加了pAVICs ALP的活性,1 mmol/L

甘氨酸处理组与华法林处理组相比,对细胞内 ALP 活性没有影响($P > 0.05$)。5 mmol/L 甘氨酸处理组与华法林处理组相比,降低了细胞内 ALP 活性($P < 0.01$),10 mmol/L 甘氨酸处理组与华法林处理组相比,细胞内 ALP 活性得到显著抑制($P < 0.001$,图 1B)。茜素红染色结果显示华法林处理组茜素红染色呈阳性,可见钙结节。10 mmol/L 甘氨酸可以显著

抑制 pAVICs 的钙化程度(图 1C)。

2.2 甘氨酸抑制 pAVICs 的成骨分化

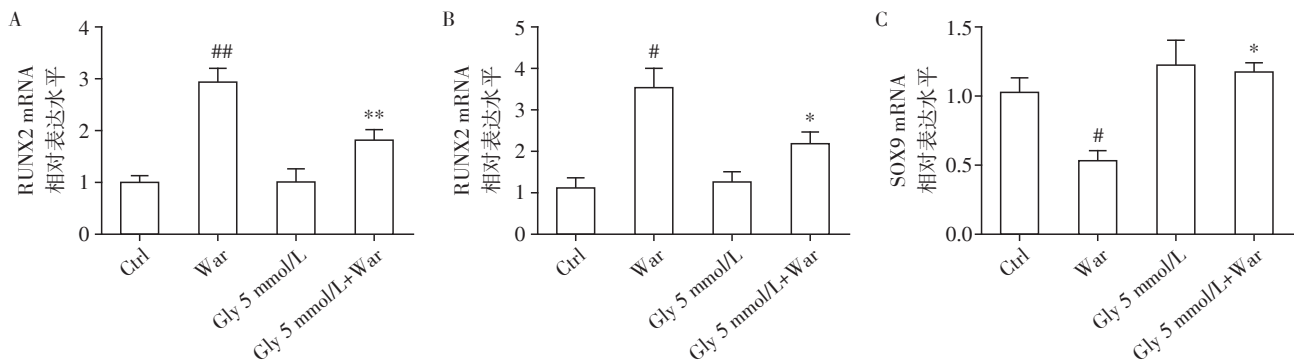
Real-time PCR 结果显示,华法林显著诱导了 pAVICs 成骨分化指标 RUNX2 和 BMP2 的表达,降低了 SOX9 的表达水平。甘氨酸最低有效浓度 5 mmol/L 处理抑制了 RUNX2 和 BMP2 的激活,逆转了 SOX9 的降低,从而发挥了其抗钙化的保护作用(图 2)。



A: 细胞内钙含量的测定;B: 细胞内 ALP 活性的测定;C: 茜素红染色结果。与 Ctrl 比较,### $P < 0.001$;与 War 比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n > 12$)。

图 1 不同浓度梯度甘氨酸的抗钙化作用

Figure 1 The protective effect of different concentration of glycine on calcification



A: RUNX2 的 mRNA 表达水平;B: BMP2 的 mRNA 表达水平;C: SOX9 的 mRNA 表达水平。与 Ctrl 比较,# $P < 0.01$,## $P < 0.001$;与 War 比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ ($n > 6$)。

图 2 甘氨酸对成骨分化的抑制作用

Figure 2 The inhibition of glycine on osteogenic differentiation

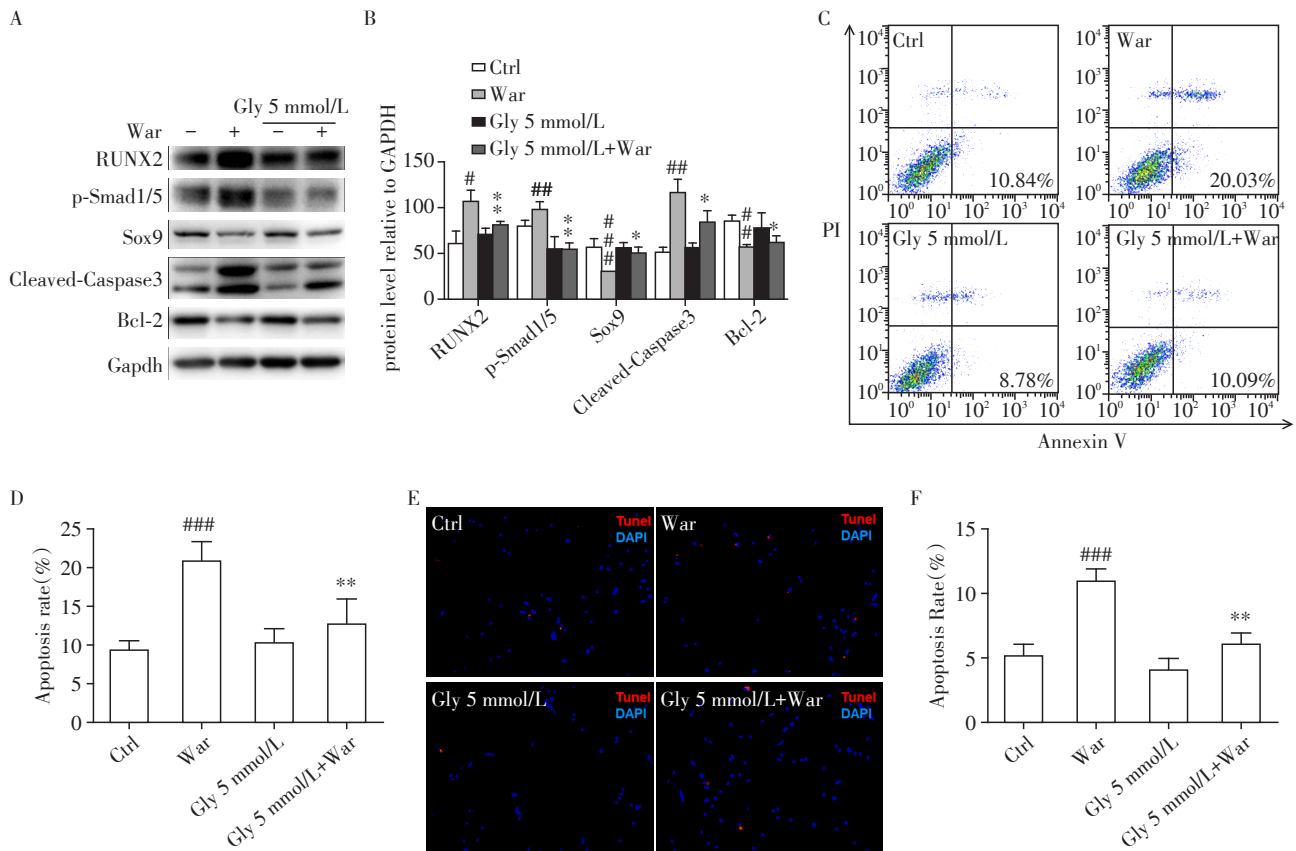
2.3 甘氨酸对瓣膜间质细胞凋亡的抑制作用

Western blot 结果显示,华法林处理显著激活了 RUNX2、p-SMAD1/5、Cleaved-Caspase3 的表达,下调了 SOX9 与 Bcl-2 的水平。甘氨酸处理后抑制了 RUNX2、p-SMAD1/5、Cleaved-Caspase3 的激活,上调了 SOX9 与 Bcl-2 的表达,发挥了显著的抗凋亡作用(图 3A、B)。流式细胞术检测结果显示,华法林处理明显激活了 pAVICs 凋亡的发生,甘氨酸给药显著逆转了 pAVIC 凋亡的程度(图 3C、D)。TUNEL 染色结

果显示,华法林处理明显使 TUNEL 染色阳性细胞比例增多,而甘氨酸给药可以减低华法林处理后 pAVICs 的凋亡程度,发挥了抗钙化作用(图 3E、F)。

3 讨论

心脏瓣膜钙化是瓣膜结缔组织发生退行性变及纤维化,以瓣叶增厚、基质重塑及钙盐沉积为主要病理特征,最终导致瓣膜狭窄和(或)关闭不全,严重影响瓣膜的正常功能。研究表明,人体瓣膜间



A: Western blot 检测成骨分化与凋亡水平; B: Western blot 统计分析结果; C: 流式细胞术检测凋亡水平; D: 流式细胞统计结果; E: TUNEL 染色检测 pAVIC 凋亡水平($\times 200$); F: TUNEL 染色统计结果。与 Ctrl 比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.01$; 与 War 比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ ($n > 3$)。

图3 甘氨酸对华法林诱导的瓣膜间质细胞凋亡的抑制作用

Figure 3 Glycine decreased the apoptosis of warfarin induced AVIC calcification

质细胞钙化是瓣膜钙化的基础^[8]。研究体外培养瓣膜间质细胞的钙化过程有利于揭开瓣膜钙化的机制。经研究证实瓣膜间质细胞的凋亡参与了瓣膜钙化的病理发生过程并有着重要作用^[9]。心脏瓣膜钙化的分子机制与血管钙化相似,是一个异位钙化的过程,细胞凋亡、基质小泡、碱性磷酸酶、脂质以及炎症等机制均参与了此过程。有研究结果表明在血管平滑肌钙化的早期即发生了凋亡,培养7 d即出现了凋亡细胞,但钙化结晶直到培养的第28天才出现^[10],说明凋亡早于钙化结晶沉积。细胞钙化是一个可以调控的过程,目前对钙化性主动脉瓣疾病的治疗主要是通过外科手术即瓣膜置换术治疗,通过改变凋亡是否可以抑制瓣膜钙化的发生从而减少钙化性瓣膜疾病的发生也是重要的研究方向。

华法林是一种维生素K的抑制剂,通过抑制肝脏中的凝血因子从而发挥抗凝作用,是目前临床上最主要的口服抗凝剂。然而华法林也可以影响维生素K依赖蛋白MGP的功能,而MGP是钙化发生发展

过程中一种极为重要的抗钙化分子。目前研究认为华法林主要是通过影响了MGP对主要成骨分化信号BMP2通路的抑制作用而实现的^[1]。BMP2/SMAD1,5通路的激活促进瓣膜间质细胞的成骨分化,启动钙化的发生发展。然而华法林引起钙化的机制十分复杂,目前对华法林引起的瓣膜钙化的机制尚不十分清楚。本课题组前期研究发现,华法林处理后的pAVICs TUNEL染色结果中存在着大量凋亡细胞,提示细胞凋亡机制在华法林诱导的瓣膜间质细胞钙化过程中发挥着重要作用。

甘氨酸是一种最简单的天然氨基酸,又名氨基乙酸,是人体非必需的一种氨基酸,并且唯一不具有旋光活性。同时甘氨酸也是中枢神经系统的一种重要的抑制性神经递质,甘氨酸通过与其受体相结合进而引起大量氯离子内流,使细胞膜发生超极化从而抑制突触后神经元。目前研究结果显示预防或是治疗性给予甘氨酸可以对一些疾病状态下的器官或是组织发挥保护作用。比如甘氨酸可以对分离出的近端小管遭受甲萘醌损伤时发挥保

护作用,并且可以对肾脏在环孢素 A 损伤时起到保护作用以及对肾脏近端小管缺血再灌注损伤起到保护作用。在消化系统可以保护小肠缺血再灌注损伤,甘氨酸对胃溃疡也具有保护作用,并且可以缓解乙醇所诱导的胃黏膜损伤。对肝细胞缺氧性损伤具有保护作用,对缺血性休克所造成的肝损伤具有保护作用,提高肝脏移植手术后的存活率。在神经系统可以改善脑缺血再灌注损伤^[11]。在循环系统,已证实甘氨酸可以改善心肌缺血再灌注损伤后的心功能,抑制凋亡,并且认为甘氨酸抗凋亡的作用是通过与甘氨酸受体结合后引起氯离子的大量内流,从而引起细胞膜发生超极化,细胞膜超极化势必会使得大量电压门控钙通道发生失活,从而缓解细胞内钙离子浓度的过高状态,进而对其下游的通路产生抑制作用^[12]。上述研究结果表明,甘氨酸具有普遍的抗凋亡作用,是一种强效的细胞保护剂。那么在华法林诱导的瓣膜间质细胞钙化系统中,假设甘氨酸也可以发挥作用从而缓解细胞钙化的发生过程,减少钙结节沉积。从本结果中可以看出甘氨酸显著降低了华法林诱导的瓣膜间质细胞内的钙含量,抑制了 ALP 活性的增高,减少了钙结节的形成。Real-time PCR 结果显示甘氨酸处理组抑制了成骨分化的程度,降低了 RUNX2 以及 BMP2 的表达,缓解了钙化保护因子 SOX9 的降低,延缓了华法林诱导的瓣膜间质细胞钙化的进展过程。并且通过 Western blot 实验证实华法林处理确实激活了 SMAD1、5/RUNX2 通路,甘氨酸可以抑制 SMAD1、5/RUNX2 信号通路,推测其机制可能是甘氨酸减少了 BMP2 的表达,从而使 BMP I 型受体(BMPR-I)和 BMP II 型受体(BMPR-II)激活减少,减少了 Smad1/5/8 的磷酸化,从而进一步抑制了 RUNX2 的表达。同时,甘氨酸显著抑制了 Cleaved-Caspase3 的激活,恢复了 Bcl-2 的水平,发挥了抗凋亡作用。同时流式细胞术也证实了甘氨酸对华法林诱导的瓣膜间质细胞凋亡的保护作用。TUNEL 染色结果也支持了上述结论,即甘氨酸通过抑制瓣膜间质细胞凋亡的发生,从而缓解了钙化的发生发展过程,发挥了保护作用。

综上所述,甘氨酸可以显著抑制华法林诱导的瓣膜间质细胞钙化,这一作用主要是通过抑制钙化早期凋亡的发生而实现的,并且进一步抑制了 SMAD1、5/RUNX2 通路的激活,缓解了瓣膜间质细胞成骨分化过程,减少了钙结节沉积。这一研究发现也将为临床开辟治疗瓣膜钙化新手段提供新思路。

[参考文献]

- [1] Palaniswamy C, Sekhri A, Aronow WS, et al. Association of warfarin use with valvular and vascular calcification: A review[J]. Clin Cardiol, 2011, 34(2): 74-81
- [2] Kapustin AN, Schoppet M, Schurgers LJ, et al. Prothrombin loading of vascular smooth muscle cell-derived exosomes regulates coagulation and calcification[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(3): e22-e32
- [3] Jiang L, Qin X, Zhong X, et al. Glycine-induced cytoprotection is mediated by erk1/2 and akt in renal cells with atp depletion[J]. Eur J Cell Biol, 2011, 90(4): 333-341
- [4] Gao X, Bi Y, Chi K, et al. Glycine-nitronyl nitroxide conjugate protects human umbilical vein endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury via multiple mechanisms and ameliorates hind limb ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 488(1): 239-246
- [5] Lu Y, Zhu X, Li J, et al. Glycine prevents pressure overload induced cardiac hypertrophy mediated by glycine receptor[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 123(1): 40-51
- [6] Cirka HA, Kural MH, Billiar KL. Mechanoregulation of aortic valvular interstitial cell life and death[J]. J Long Term Eff Med Implants, 2015, 25(1-2): 3-16
- [7] Beazley KE, Eghtesad S, Nurminskaya MV. Quercetin attenuates warfarin-induced vascular calcification in vitro independently from matrix gla protein[J]. J Biol Chem, 2013, 288(4): 2632-2640
- [8] Yip CY, Chen JH, Zhao R, et al. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(6): 936-942
- [9] Gao L, Ji Y, Lu Y, et al. Low-level overexpression of p53 promotes warfarin-induced calcification of porcine aortic valve interstitial cells by activating slug gene transcription[J]. J Biol Chem, 2018, 293(10): 3780-3792
- [10] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Apoptosis regulates human vascular calcification *in vitro*: Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies[J]. Circ Res, 2000, 87(11): 1055-1062
- [11] Lu Y, Zhang J, Ma B, et al. Glycine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice[J]. Neurochem Int, 2012, 61(5): 649-658
- [12] Zhong X, Li X, Qian L, et al. Glycine attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis in rats[J]. J Biomed Res, 2012, 26(5): 346-354

[收稿日期] 2017-12-17