

# CPU0213 对内皮素-NADPH 氧化酶介导 $H_2O_2$ 损伤心肌细胞的改善作用

张国林<sup>1</sup>, 徐明<sup>1</sup>, 戴德哉<sup>1\*</sup>, 奚涛<sup>2\*\*</sup>, 戴茵<sup>1</sup>

(中国药科大学<sup>1</sup>药理学研究室;<sup>2</sup>生命科学与技术学院, 南京 210009)

**摘要** 心肌细胞中 NADPH 氧化酶活性增强和内皮素系统过度激活, 是造成心肌细胞损伤的重要机制。本文旨在探讨内皮素受体拮抗剂 CPU0213 能否通过抑制 ET-NADPH 氧化酶的过表达, 减轻心肌细胞氧化损伤。将 SD 乳大鼠心肌细胞分成 7 组: 对照组、 $H_2O_2$  组、PKA/PKC 阻断剂 H89/Bis 干预组、NADPH 氧化酶阻断剂 APO/DPI 组和 CPU0213 治疗组。结果表明,  $H_2O_2$  组钙调蛋白 FKBP12.6, SERCA2a 和 CASQ2 表达明显下调, pPKC $\epsilon$ /PKC $\epsilon$ , NADPH 氧化酶亚基及 ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R 明显上调, 提示:  $H_2O_2$  激活 NADPH 氧化酶须依赖 PKC 活性, CPU0213 通过抑制 ET-pPKC-NADPH 氧化酶通路逆转 FKBP12.6, SERCA2a 和 CASQ2 的下调。

**关键词** NADPH 氧化酶; 内皮素; FKBP12.6; SERCA2a; 内皮素受体拮抗剂; CPU0213

中图分类号 R965 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)05-0452-06

## Endothelin-NADPH oxidase mediates cardiomyocytes dysfunction caused by $H_2O_2$ and interventions by CPU0213

ZHANG Guo-lin, XU Ming, DAI De-zai\*, XI Tao\*\*, DAI Yin

<sup>1</sup>Research Division of Pharmacology; <sup>2</sup>School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Over-activated NADPH oxidase and endothelin(ET) system are the main mechanism of cardiomyocytes dysfunction. This research mainly focuses on the hypothesis that CPU0213 attenuates cardiomyocytes dysfunction by inhibiting the over-expression of ET-NADPH oxidase. Cardiomyocytes were divided into groups: control,  $H_2O_2$  group, H89/Bis, APO/DPI, CPU0213 group. The expression of FKBP12.6, SERCA2a and CASQ2 were down-regulated and pPKC $\epsilon$ /PKC $\epsilon$ , NADPH oxidase and ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R were up-regulated in  $H_2O_2$  treated group, which implied the involvement of PKC $\epsilon$ . Endothelin receptor antagonist CPU0213 attenuated the abnormal expression of FKBP12.6, SERCA2a and CASQ2 by inhibiting pPKC-NADPH pathway.

**Key words** NADPH oxidase; endothelin; FKBP12.6; SERCA2a; endothelin receptor antagonist; CPU0213

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. B1070145)

氧化应激参与了许多心血管疾病, 如心肌缺血灌注损伤、心肌肥厚和心力衰竭等病理过程<sup>[1]</sup>。NADPH 氧化酶(NOX)是一个黄素蛋白酶, 其产生的超氧阴离子扩大了氧化应激程度, 在室性心动过速、急性心肌梗死和心室肥厚中均起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。内皮素(ET)除了具有强大的缩血管作用外, 还能促进心肌重构, 引起活性氧生成增多, 构成

氧化应激; 组成 ET-ROS 通路, 引起组织损伤。前期研究发现:  $H_2O_2$  下调心肌细胞中钙调蛋白 FKBP12.6 和 SERCA2a 的表达, 可以被 CPU0213 (图 1) 和维生素 E 逆转。在此基础上, 本研究使用 NADPH 选择性阻断剂乙酰香草素(APO)和二亚苯基碘(DPI)做为对照, 以确定 NOX 和过磷酸化 PKC(pPKC)在  $H_2O_2$  损伤心肌细胞中的作用。

\* 收稿日期 2011-04-18 通讯作者 \* Tel:025-83271270 E-mail:dezaidai@vip.sina.com

\*\* Tel:025-83271047 E-mail:xitao\_18@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. B1070145)

细胞内钙离子作为一种普遍存在的信使,参与多种生理病理过程。肌浆网钙调控蛋白表达的异常可引起细胞内游离钙水平的增加,促进活性氧产生,导致心肌细胞氧化损伤<sup>[4]</sup>。CPU0213 是一个新型双相的内皮素受体拮抗剂,可有效减少活性氧的产生,改善内皮素系统的异常<sup>[5]</sup>。本研究验证,激活的 ET-NOX 系统是否介导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的心肌细胞钙调蛋白 FKBP12.6, SERCA2a, CASQ2 异常表达;CPU0213 是否通过抑制 pPKC-NAPDH 氧化酶通路,抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导心肌中的钙调蛋白的异常表达。

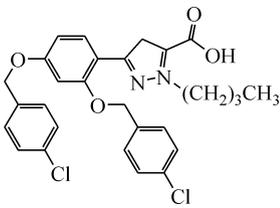


Figure 1 Chemical structure of CPU0213

## 1 材料

### 1.1 试剂

胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);5-溴尿嘧啶, APO, DPI, PKA 抑制剂 H89, PKC 抑制剂双吡啶马来酰亚胺(Bis)(美国 Sigma 公司);CPU0213(纯度大于 98%, 中国药科大学药物化学研究室);莫洛尼氏鼠白血病毒逆转录酶 MMLV(美国 Promega 公司);Taq DNA 聚合酶(北京天根生化科技有限公司);多克隆羊抗 FKBP12.6-IgG, SERCA2a-IgG(美国 Santa Cruz 公司);多克隆兔抗 p47phox-IgG(美国 Upstate 公司);多克隆兔抗 p22phox-IgG(美国 Usnlife 公司);多克隆兔抗 p67phox-IgG(美国

Affinity Bioreagents 公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊 IgG(美国 Daco 公司);多克隆兔抗 ET<sub>A</sub>R-IgG, 多克隆兔抗 ET<sub>B</sub>R-IgG, HRP 标记的羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

图像分析系统(美国 UVP 公司);GDS8000 凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司);Mastercycler PCR 仪,低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

### 1.3 动物

SD 乳大鼠(1~3 d)购于浙江省实验动物中心,合格证号:SCXK(浙)20080033。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

心肌细胞在含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,加入 5-氟尿嘧啶抑制成纤维细胞生长。细胞培养 3 d 达到融合状态后更换无血清培养基,倒置显微镜下观察心肌细胞搏动。分离 4 d 后出现自发收缩的心肌细胞用于实验。细胞分成 7 组,包括:正常对照组, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μmol/L) 处理模型组, PKC 阻断剂 Bis (5 μmol/L) 组, PKA 阻断剂 H89 (10 μmol/L) 组, 两种 NADPH 氧化酶阻断剂 APO (100 μmol/L) 组; DPI (10 μmol/L) 组和 CPU0213 (1 μmol/L) 治疗组。药物干预培养 48 h 后,收获心肌细胞检测蛋白和 mRNA 表达水平。

### 2.2 RT-PCR 检测靶点 mRNA 水平

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 温孵心肌细胞给药培养 18 h 后提取总 RNA 并反转录成 cDNA, PCR 反应体系为 25 μL, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测(溴化乙锭染色)。凝胶成像仪拍照,以核糖体 RNA 亚基 18S DNA 基因作为内参。引物序列及反应条件见表 1。

Table 1 Sequence and amplification conditions used in RT-PCR

Gene	Primer sequence	Condition
FKBP12.6	Sense: 5'-GTGAAGGCAGGAAGGAA-3'	94 °C, 40 s; 53 °C, 40 s; 72 °C, 60 s; 30 cycles
	Antisense: 5'-GCAGCCAACAGAAGATAAG-3'	
SERCA2a	Sense: 5'-CCGTATCCGATGACAATG-3'	94 °C, 40 s; 59 °C, 40 s; 72 °C, 60 s; 28 cycles
	Antisense: 5'-CCAGGCTCCAGGTAGTTT-3'	
CASQ2	Sense: 5'-AGCAGCGTCTCCAAGAACC-3'	94 °C, 40 s; 54 °C, 40 s; 72 °C, 60 s; 28 cycles
	Antisense: 5'-CGTGGTAGTAGAGACAGAGCAAA-3'	
p22phox	Sense: 5'-GCTCATCTGTCTGCTGGAGTA-3'	94 °C, 60 s; 60 °C, 40 s; 72 °C, 60 s; 30 cycles
	Antisense: 5'-ACGACCTCATCTGTAAGTGA-3'	
p47phox	Sense: 5'-TCACCGAGATCTACGAGTTC-3'	94 °C, 60 s; 60 °C, 40 s; 72 °C, 60 s; 30 cycles
	Antisense: 5'-ATCCCATGAGGCTGTGAAGT-3'	
p67phox	Sense: 5'-GAAAGCATGAAGATGCCCTGG-3'	94 °C, 60 s; 58 °C, 50 s; 72 °C, 60 s; 30 cycles
	Antisense: 5'-ATAGACCAAGATCACATCTCC-3'	
ppET1	Sense: 5'-AGCAATAGCATCAAGGCATC-3'	94 °C, 40 s; 63 °C, 40 s; 72 °C, 40 s; 30 cycles
	Antisense: 5'-TCAGACACGAACACTCCCTA-3'	

### 2.3 Western blotting 检测靶点蛋白表达水平

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 温孵心肌细胞给药培养 18 h 后提取蛋白并测定浓度, -20 °C 保存。蛋白提取物与上样缓冲液混匀, 98 °C 加热 10 min 后进行 SDS-PAGE。电泳完毕转膜后用 5% 脱脂牛奶封闭。与一抗 (1:200) 温孵过夜。PBS 漂洗 3 次后与 HRP 标记二抗室温反应 1 h。PBS 漂洗后显色。用凝胶成像及分析系统拍照并进行量化分析, 以  $\beta$ -actin 作为参照, 进行蛋白表达的定量分析。

### 2.4 数据处理及统计分析

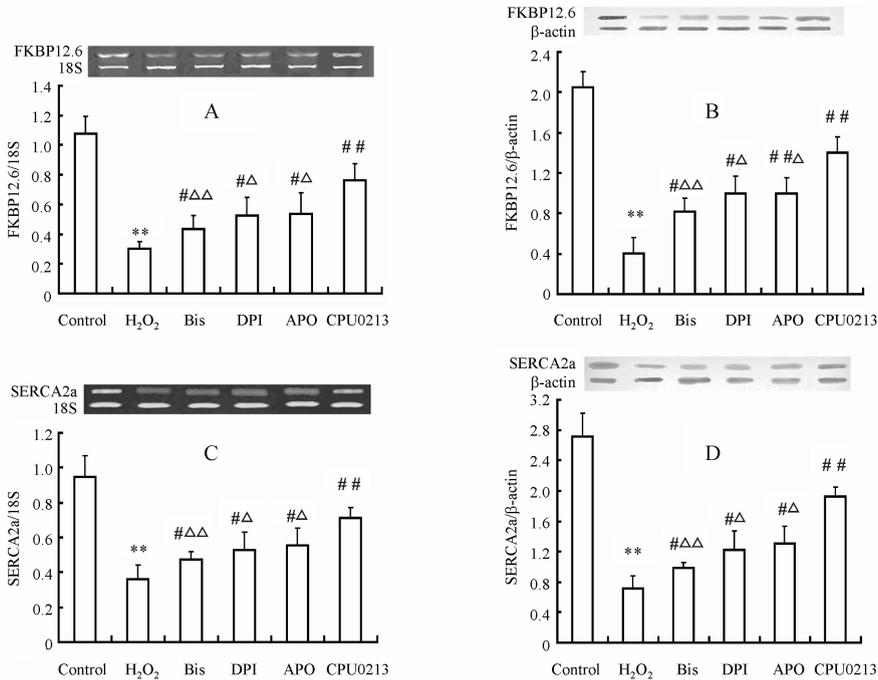
数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行单因素方差分析 (One way-ANOVA), 事后检验根据方差齐性采用 Student-

Newman-Keuls 或 Dunnett's 检验。P < 0.05 认为存在显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 FKBP12.6 和 SERCA2a 的表达

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 温孵心肌细胞后, FKBP12.6 和 SERCA2a 表达明显下调 (P < 0.01)。内皮素受体拮抗剂 CPU0213 和 NADPH 氧化酶阻断剂 APO、DPI 明显上调 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 FKBP12.6 和 SERCA2a 的异常表达, 且 CPU0213 的作用明显强于 APO (P < 0.05)、DPI (P < 0.05) 和 Bis (P < 0.01) (图 2)。



**Figure 2** Down-regulated mRNA and protein expressions of FKBP12.6 (A, B) and SERCA2a (C, D) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-incubated cardiomyocytes reversed by APO, DPI and CPU0213 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Bis; bisindolylmaleimide; APO; apocynin; DPI; diphenylene iodonium. \*\* P < 0.01 vs control group; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01 vs CPU0213 group

### 3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 温孵心肌细胞致 CASQ2 表达下调

心肌细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 主要通过与其与储钙蛋白 CASQ2 (calsequestrin 2) 结合的方式储存。储钙蛋白功能的完整性, 直接影响心脏-收缩耦联过程中胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度的平衡。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 温孵心肌细胞后, CASQ2 表达明显下调 (P < 0.01)。内皮素拮抗剂 CPU0213 和 NADPH 氧化酶阻断剂 APO、DPI 明显上调 CASQ2 的表达 (P < 0.01) (图 3)。

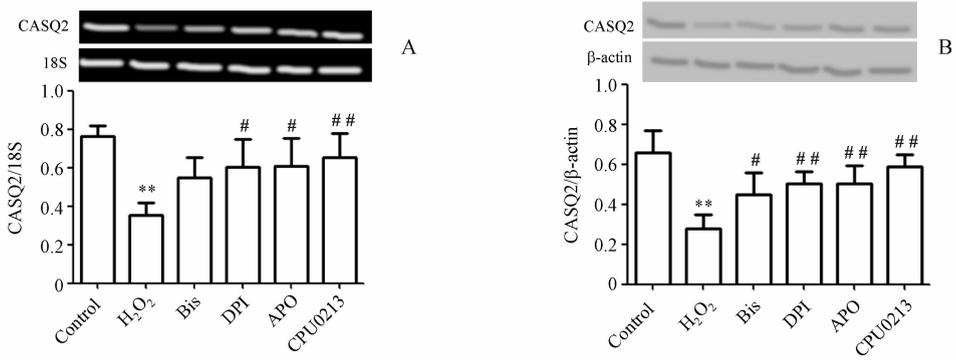
### 3.3 PKC $\epsilon$ 和 pPKC $\epsilon$ 的表达

为了证实 PKC 的过磷酸化 (pPKC) 参与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 温孵对肌中钙调控蛋白下调, 进行了 PKC 和 pPKC 研究。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显著上调心肌细胞中 PKC $\epsilon$  和 pPKC $\epsilon$

的表达 (P < 0.01) (图 3), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理心肌细胞中 pPKC $\epsilon$ /PKC $\epsilon$  比率明显增加, 表明 PKC $\epsilon$  过磷酸化参与钙调控蛋白的病理改变。CPU0213 和 Bis 明显抑制了 PKC $\epsilon$  和 pPKC $\epsilon$  的表达水平 (图 4)。

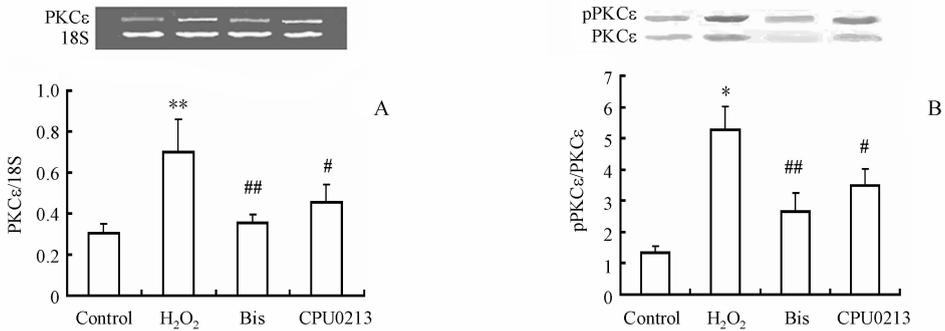
### 3.4 NOX 亚基的表达

NOX 位于线粒体中, 是心肌细胞活性氧的一个重要来源, 它的亚基过表达是激活和形成氧化应激的必备条件。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 明显促进 NOX 亚基 p22phox, p47phox 和 p67phox mRNA 和蛋白表达的上调 (P < 0.01)。CPU0213 可以有效抑制 NOX 亚基的表达 (图 5)。PKC 而非 PKA 可有效逆转该过程, 即 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤心肌由 PKC 所介导, 而与 PKA 无关。



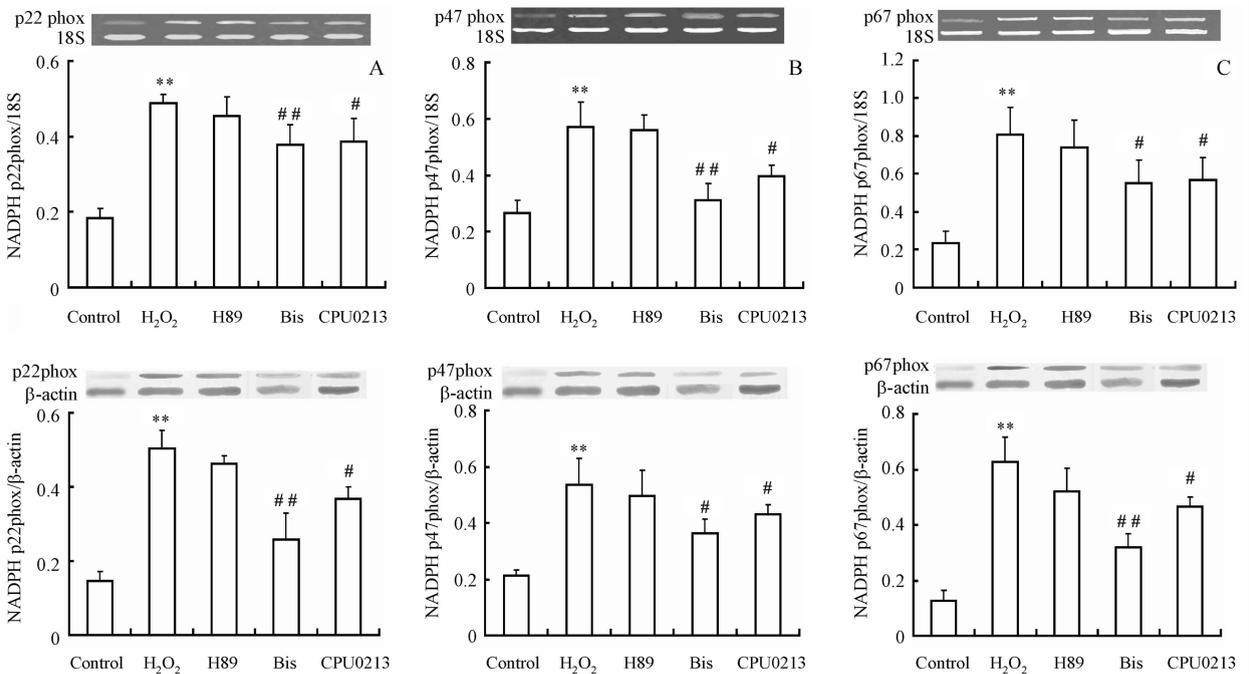
**Figure 3** Down-regulated mRNA (A) and protein expressions (B) of CASQ2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-incubated cardiomyocytes were reversed by APO, DPI and CPU0213 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

\*\*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group



**Figure 4** PKCε mRNA (A) and pPKCε protein (B) were markedly up-regulated in the cardiomyocytes incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Both CPU0213 and Bis effectively suppressed hyperphosphorylation of PKC ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group

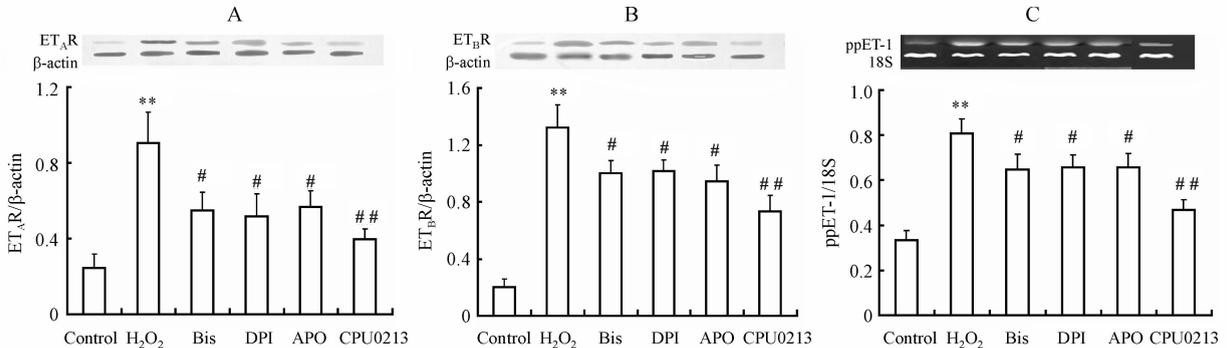


**Figure 5** Up-regulated mRNA and protein levels of p22phox (A), p47phox (B) and p67phox (C) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubated cardiomyocytes were reversed by Bis and CPU0213 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

H89: *N*-[2-(*p*-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide · 2HCl hydrate; \*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group

### 3.5 ET 系统表达

为探讨激活的 ET 系统在  $H_2O_2$  损伤心肌细胞过程中的作用,本研究比较 NADPH 氧化酶抑制剂和 CPU0213,对 ET 系统相关分子的干预作用。



**Figure 6** Endothelin system was activated in  $H_2O_2$  treated cardiomyocytes, manifesting the increased protein levels of ET<sub>A</sub>R (A) and ET<sub>B</sub>R (B) and mRNA abundance of ppET-1 (C). These were suppressed by Bis, APO, DPI and CPU0213 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

\*\*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs  $H_2O_2$  group

## 4 讨论

细胞内活性氧和  $\beta$ -受体激动剂 ISO 均可造成心肌细胞损伤,介导许多心血管疾病的发生发展<sup>[6]</sup>,在心力衰竭和心律失常的发生过程中,激活的 ET-ROS 系统发挥着重要作用。因此研究其信号通路是心血管领域的重要课题。

心肌细胞肌浆网钙离子调控异常,是心力衰竭及心律失常重要机制。肌浆网内钙离子释放受雷诺定受体 2 (RyR2) 及其分子上附属蛋白 FKBP12.6 等的调控。FKBP12.6 可以作为药物治疗心力衰竭的分子标记,也是心律失常的记号<sup>[7]</sup>,在心动周期过程中,RyR2 是主要的钙离子释放通道,FKBP12.6 通过稳定 RyR2 抑制钙离子通道的过度激活。CASQ2 为肌浆网上的辅助蛋白,在调节 RyR2 和 SERCA2a 的活动及功能,维持肌浆网内钙平衡中起调控作用。儿茶酚胺性多形性室性心动过速 (CPVT) 患者伴有 RyR2 和 CASQ2 基因的突变,CASQ2 缺乏,使在运动时易于出现严重的 CPVT。FKBP12.6 和 RyR2 的结合状态对氧化还原敏感,活性氧可通过钙调蛋白的氧化修饰,使 FKBP12.6 与 RyR2 解离,从而在舒张期内出现钙泄漏,导致钙超载<sup>[8-9]</sup>,以往研究已证明: $H_2O_2$  可以导致 RyR2-FKBP12.6 解离或下调<sup>[10]</sup>。在心肌收缩功能障碍的 ob/ob 糖尿病小鼠模型中,SERCA2a 被明显修饰<sup>[11]</sup>,加重活性氧诱导的小鼠心肌

$H_2O_2$  明显上调 ET<sub>A</sub>R 和 ET<sub>B</sub>R 蛋白以及 ppET-1 的 mRNA 水平,且 NADPH 氧化酶抑制剂 APO、DPI 及 ET 阻断剂 CPU0213 可显著抑制 ET<sub>A</sub>R、ET<sub>B</sub>R 和 ppET-1 表达量的增加(图 6)。

功能障碍,且能被 SERCA2a 表达增加而改善<sup>[12]</sup>。前期研究表明 CPU0213 和维生素 E 可以通过抑制 PCK $\epsilon$  改善  $H_2O_2$  和异丙肾上腺素引起的心肌细胞 FKBP12.6 和 SERCA2a 的异常表达<sup>[13]</sup>。本实验中肌浆网钙调蛋白 FKBP12.6, SERCA2a 和 CASQ2 表达减少,也参与了  $H_2O_2$  造成的钙异常循环。FKBP12.6, SERCA2a 和 CASQ2 的下调,导致舒张期钙泄漏增多,钙摄取减少,导致更多的钙留在胞浆,参与了  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞内的钙过载,是构成心力衰竭和出现严重心律失常的病理基础。

NADPH 氧化酶激活在血管内皮细胞、血管平滑肌细胞损伤和心肌肥厚中起到重要的作用,它是细胞内活性氧的主要来源,在组织损伤和胰岛素抵抗方面发挥重要作用<sup>[14-18]</sup>。 $H_2O_2$  可刺激心肌细胞产生过度的 NADPH 氧化酶,激活内皮素通路,形成 ET-ROS 恶性循环,加重心血管系统的氧化应激,二者协同介导了众多心血管疾病的发生,如肺动脉高压、心肌肥厚、心力衰竭、糖尿病心肌病等。CPU0213 抑制 ET-NADPH 氧化酶系统的激活,改善糖尿病肾病及异丙肾上腺素引起的心肌成纤维细胞异常<sup>[19-20]</sup>,正常及心力衰竭的心脏中,内皮素诱导激活 ROS 恶性循环过程中,ET<sub>A</sub> 和 ET<sub>B</sub> 受体是共同存在的。在异丙肾上腺素造成的心肌成纤维细胞损伤过程中,ET<sub>A</sub> 起主要作用,ET<sub>B</sub> 起协同作用。应用 NADPH 氧化酶阻断剂 APO 和 DPI 和内皮素受体拮抗剂 CPU0213 可以逆转内皮素系统

的上调,减轻氧自由基产生,抑制过度激活的 ET-ROS 系统,缓解组织损伤。

总之,通过直接检测 NADPH 氧化酶亚基的表达及利用其特异性阻断剂 APO 和 DPI 发现,PKC $\epsilon$  参与 ET-ROS 介导的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导心肌钙调控系统的异常。CPU0213 通过抑制过度激活的 ET-PKC $\epsilon$ -NADPH 氧化酶通路上调了 FKBP12.6, SERCA2a 及 CASQ2 的异常表达,对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的心肌细胞损伤起到恢复作用。

### 参考文献

- [1] Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signaling in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Hear*, 2007, **93** (8):903-907.
- [2] Cheng YS, Dai DZ, Dai Y. Isoproterenol disperses distribution of NADPH oxidase, MMP-9, and pPKCepsilon in the heart, which are mitigated by endothelin receptor antagonist CPU0213 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, **30**(8):1 099-1 106.
- [3] Sirker A, Zhang M, Murdoch C, et al. Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodeling and heart failure [J]. *Am J Nephrol*, 2007, **27**(6):649-660.
- [4] Przygodzki T, Sokal A, Bryszewska M. Calcium ionophore A 23187 action on cardiomyocytes is accompanied by enhanced production of reactive oxygen species [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1 740**(3):481-488.
- [5] Guan L, Feng Y, Ji M, et al. Pharmacokinetics of CPU0213, a novel endothelin receptor antagonist, after intravenous administration in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, **27**(3):367-371.
- [6] Aggeli IK, Gaitanaki C, Beis I. Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells [J]. *Cell Signal*, 2006, **18** (10):1 801-1 812.
- [7] Zhang GL, Dai DZ, Xi T et al. Isoproterenol-induced FKBP12.6/12 downregulation is modulated by ETA and ETB receptors and reversed by argirhein, a derivative of rhein [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, **32**(2):223-229.
- [8] Ihara Y, Kageyama K, Kondo T. Overexpression of calreticulin sensitizes SERCA2a to oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **329**(4):1 343-1 349.
- [9] Kang SM, Lim S, Song H, et al. Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca<sup>2+</sup> overload in ischemia-reperused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, **535**(1/3):212-219.
- [10] Zissimopoulos S, Doerat N, Lai FA. Redox sensitivity of the ryanodine receptor interaction with FK506-binding protein [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(10):6 976-6 983.
- [11] Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, et al. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch [J]. *Diabetologia*, 2006, **49**(6):1 434-1 446.
- [12] Bupha-Intr T, Janssen PM. SERCA overexpression reduces hydroxy radical injury in murine myocardium [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **291**(6):H3 130-3 135.
- [13] Li N, Jia N, Dai DZ, et al. Endothelin receptor antagonist CPU0213 and vitamin E reverse downregulation of FKBP12.6 and SERCA2a: a role of hyperphosphorylation of PKCepsilon [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, **591**(1/3):211-218.
- [14] Xu J, Li N, Dai DZ, et al. The endothelin receptor antagonist CPU0213 is more effective than aminoguanidine to attenuate isoproterenol-induced vascular abnormality by suppressing overexpression of NADPH oxidase [correction of oxidas], ETA, ETB, and MMP9 in the vasculature [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, **52**(1):42-48.
- [15] Hingtgen SD, Tian X, Yang J, et al. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Physiol Genomics*, 2006, **26**(3):180-191.
- [16] Grieve DJ, Byrne JA, Siva A, et al. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, **47**(4):817-826.
- [17] Zhang F, Jin S, Yi F, et al. Local production of O<sub>2</sub>-by NAD(P)H oxidase in the sarcoplasmic reticulum of coronary arterial myocytes; cADPR-mediated Ca<sup>2+</sup> regulation [J]. *Cell Signal*, 2008, **20**(4):637-644.
- [18] Yi XY, Li VX, Zhang F, et al. Characteristics and actions of NAD(P)H oxidase on the sarcoplasmic reticulum of coronary artery smooth muscle [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290** (3):1 136-1 144.
- [19] Peng HJ, Dai DZ, Ji H, et al. The separate roles of endothelin receptors participate in remodeling of matrix metalloproteinase and connexin 43 of cardiac fibroblasts in maladaptive response to isoproterenol [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, **634** (1/3):101-106.
- [20] Xu M, Dai DZ, Dai Y. Normalizing NADPH oxidase contributes to attenuating diabetic nephropathy by the dual endothelin receptor antagonist CPU0213 in rats [J]. *Am J Nephrol*, 2009, **29** (3):252-256.