基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001406

Wnt/β-catenin 通路激活促进慢性缺氧 H9c2 细胞中抗凋亡因子 bcl-2 及 survivin 表达

王海霞[1]，张　蕾[1]，刘玲娟[2]，刘晓燕[1]

（1. 重庆医科大学附属儿童医院心血管内科，重庆　400014；2. 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室，重庆　400014）

【摘　要】**目的**：探讨 Wnt/β-catenin 信号转导通路在 H9c2 心肌细胞慢性缺氧适应中的作用及可能机制。**方法**：将 37 ℃、5%O_2、5%CO_2、90%N_2 条件下培养的 H9c2 细胞作为实验组，低氧培养 6、12、24、36、48、72 h 时收集细胞；将 37 ℃、21%O_2、5%CO_2 条件下培养的细胞作为对照组。采用 Western blot 和 real-time PCR 技术检测 β-catenin、抗凋亡因子 bcl-2 和 survivin 在不同培养时间点的表达变化。**结果**：5%O_2 培养的 H9c2 细胞与对照组相比，β-catenin 蛋白在缺氧 6、12、24、36 h 时表达明显增加（P=0.000，P=0.018，P=0.001，P=0.000），bcl-2 及 survivin 表达较对照组明显增加（P=0.000，P=0.000）。**结论**：Wnt/β-catenin 信号通路激活可能是 H9c2 心肌细胞慢性缺氧的适应机制之一，其部分可能通过上调抗凋亡因子 bcl-2 及 survivin 表达起作用。

【关键词】H9c2 细胞；慢性缺氧；Wnt/β-catenin；bcl-2；survivin

【中图分类号】R725.4　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-05-02

Activation of Wnt/β-catenin signaling pathway promotes anti-apoptotic genes bcl-2 and survivin expression in H9c2 cell subject to chronic hypoxia

Wang Haixia[1], *Zhang Lei*[1], *Liu Lingjuan*[2], *Liu Xiaoyan*[1]

(*1. Department of Cardiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; 2. China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics*)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect and mechanism of Wnt/β-catenin signaling pathway in H9c2's cell adaptation to chronic hypoxia. ***Methods***: Embryonic rat-heart-derived H9c2 cells were exposed to 37 ℃, 5%O_2, 5%CO_2, and 90%N_2 as the experimental? group; cells were collected at 6, 12, 24, 36, 48, 72 h. The cells were cultured under 37 ℃, 21%O_2, 5%CO_2 as control group. Expression of β-catenin, bcl-2 and survivin mRNA or protein at different time points were measured by using Western blot and real-time PCR. ***Results***: Protein levels of β-catenin increased at 6, 12, 24, 36 h compared with those of control group (P=0.000, P=0.018, P=0.001, P=0.000). bcl-2 and survivin were significantly increased after β-catenin reaching high level of expression (P=0.000, P=0.000). ***Conclusion***: Activation of Wnt/β-catenin signaling pathway may contribute to H9c2 cell adaptation's to chronic hypoxia, partly through upregulating anti-apoptosis genes expression to promote cell survival.

【Key words】H9c2 cell; chronic hypoxia; Wnt/β-catenin; bcl-2; survivin

先天性心脏病（congenital heart disease，CHD）简称先心病，发病率为 6‰~12‰[1]，每年有 15 万~20 万先心病患儿出生，青紫型是 CHD 的常见类型且预后较差。心肌慢性缺氧是青紫型 CHD 患儿重要的病理生理改变。慢性缺氧一方面可导致心肌损伤、心肌细胞凋亡，损伤心功能；另一方面也可诱导机体产生内源性保护机制适应缺氧，抵御或减轻缺氧造成的心肌损伤[2]。慢性缺氧适应能提高心脏对急性缺氧主要恶性结果如心肌梗死（myocardial infarction，MI）、收缩功能不良的耐受力[3]。青紫型 CHD 患

作者介绍：王海霞，Email：whaiia09@163.com，研究方向：心肌慢性缺氧适应。

通信作者：刘晓燕，Email：lxylxy65@163.com。

基金项目："十二五"国家科技支撑计划资助项目（编号：2012BAI03B03）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTC2010BB5373）。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170919.1615.016.html（2017-09-19）

儿心脏长期被低氧血液灌注，但在一定时期内仍能存活并维持其心脏功能。心肌慢性缺氧适应的机制目前并不清楚，对此机制的深入研究将有助于探索心肌缺氧保护新的干预手段。

近年来，有关 Wnt/β-catenin 信号通路与心脏疾病关系的研究日益增多，其中该通路的心肌保护作用成为研究热点，但国内外类似研究多集中在心肌急性缺血/缺氧动物模型[4-5]，而对该通路在慢性缺氧适应中的作用尚不清楚。β-catenin 是 Wnt/β-catenin 信号转导通路的核心分子，起信号调节开关的作用。多数肿瘤具有缺氧的微环境，肿瘤形成的关键步骤就是对缺氧的适应。β-catenin 水平升高可激活下游靶基因，促进血管生成和细胞存活[6]，抑制细胞凋亡[7]，可能与肿瘤细胞适应缺氧有关。本研究以低氧条件下培养 H9c2 心肌细胞为慢性缺氧模型，并通过检测 H9c2 心肌细胞中 β-catenin、bcl-2、survivin 在不同时间点的表达水平，探讨 Wnt/β-catenin 信号通路在 H9c2 心肌细胞慢性缺氧适应中的作用及可能机制。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 H9c2 心肌细胞 心肌细胞株购自重庆市卓诺生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 全蛋白提取试剂盒、胞浆胞核蛋白提取试剂盒购自凯基公司，RNA 提取试剂盒 SuperReal PreMix(SYBR Green)购自天根公司，逆转录试剂盒购自 Takara 公司，RT-PCR 引物由上海生工合成，兔来源多克隆抗体 β-catenin 购自英国 Abcam，兔来源多克隆抗体 bcl-2 及 survivin 购自美国 CST，兔来源多克隆抗体 α-tubulin 购自杭州华安；电泳仪、电转仪、凝胶图像分析仪(Bio-Rad，美国)，荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad，CFX96，美国)，三气培养箱(New Brunswick，英国)，荧光倒置显微镜(Nikon，日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 H9c2 心肌细胞培养 大鼠 H9c2 心肌细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，放于 37 ℃、21%O_2、5%CO_2 培养箱中培养，当细胞长至 80%左右时按 1:2~1:3 分瓶传代，平均 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 实验分组 H9c2 细胞传至第 3 代时，将细胞置于 37 ℃、5%O_2、5%CO_2、90%N_2 培养箱中培养，作为实验组，低氧培养 6、12、24、36、48、72 h 时收集细胞；将 37 ℃、21%O_2、5%CO_2 条件下与实验组培养相同时间细胞作为对照组。

1.2.3 Real-time PCR 检测 β-catenin、bcl-2 和 survivin mRNA 表达水平 采用 RNA 提取试剂盒提取 5%O_2 下培养 H9c2 心肌细胞各时间点细胞总 RNA，Takara 逆转录试剂盒进行逆转录，使 cDNA 量为 800 ng。逆转录条件为：42 ℃、30 min，85 ℃、5 min；产物-20 ℃ 保存备用。按 SuperReal PreMix (SYBR Green)试剂盒说明书进行 qPCR 实验。取 cDNA 1 μL，2×SYBR Green 10 μL，特异性引物正义链和反义链各 0.6 μL，加去 RNA 酶水至终体积 20 μL 并混匀，扩增条件为：95 ℃、30 s，95 ℃、5 s，68 ℃、30 s，40 个循环。特异性引物序列见表1。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对 mRNA 含量，$\Delta\Delta Ct=\Delta Ct$(实验组)$-\Delta Ct$(对照组)，$2^{-\Delta Ct}$ 表示实验组目的基因 mRNA 的含量相对于对照组所改变的倍数。

1.2.4 Western blot 检测 β-catenin 蛋白表达水平 采用凯基全蛋白及胞浆胞核蛋白提取试剂盒提取 H9c2 细胞全蛋白及胞浆胞核蛋白，BCA 法测蛋白浓度，操作均按试剂盒说明书进行。获得全蛋白变性后进行 SDS-PAGE，电泳结束后经湿转将蛋白条带转到 PVDF 膜，5%脱脂奶粉、TBST 室温封闭 1 h，加一抗 anti-β-catenin(1:3 000)、anti-bcl-2(1:1 000)、anti-survivin(1:1 000)、anti-α-tubulin(1:2 000)，4 ℃冰箱过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加二抗 Goat anti rabbit IgG HRP(1:3 000)室温 1.5 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，用 ECL 化学发光试剂盒显影，α-tubulin 作为内参，用灰度值 β-catenin/α-tubulin、bcl-2/α-tubulin、survivin/α-tubulin 反映蛋白相对表达量，采用 Quantity One 图像处理系统分析蛋白条带灰度再进行统计学分析。

1.2.5 免疫荧光检测 β-catenin 在 H9c2 心肌细胞内定位 细胞爬片后，待细胞融合 80%左右时取出盖玻片，4%多聚甲醛固定 30 min，PBS 冲洗 2 次，每次 5 min，0.5%Triton-X100 通透 20 min，PBS 冲洗 2 次，每次 5 min。滴加一抗(anti-β-catenin)(1:500)，超过组织边缘 3 mm，置于湿盒内 4 ℃过夜。取湿盒于 37 ℃复温 30 min，滴加二抗(红/绿色荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体)(1:200)，37 ℃孵育 1 h(避光操作存放)，PBS 冲洗 3 次，每次 2 min。滴加 DAPI 液(5 μg/mL)，室温避

表 1 用于 RT-PCR 分析的各引物序列

Tab.1 Sequences of RT-PCR primers

指标	正向引物	反向引物
β-catenin	5'-CTAGTGCAGCTTCTGGGTT-3'	5'-ATGGCAGGCTCGGTAATG-3'
bcl-2	5'-GGCATCTTCTCCTTCCAG-3'	5'-GAGTTCCTCCACCACCGT-3'
survivin	5'-TTCATCCACTGCCCTACC-3'	5'-CTTGGCTCTTTGTTTGTCC-3'
β-actin	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'

光显色 15 min。荧光倒置显微镜下观察拍照。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析，实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析、LSD-t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 5%O_2 条件下培养 H9c2 心肌细胞不同时间细胞形态变化

对照组及 5%O_2 条件下培养 H9c2 细胞各时间点细胞形态如图 1 所示。镜下见细胞呈长梭形，核清晰明显呈圆形，低氧培养不同时间点细胞形态与对照组相比未观察到明显形态改变。

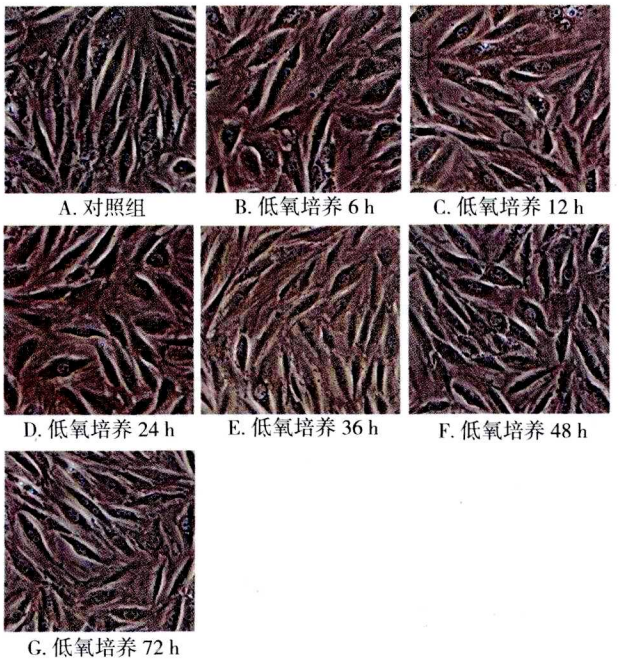


图 1 正常氧浓度及 5%O_2 条件下各时间点培养的 H9c2 细胞（100×）

Fig.1 H9c2 cell morphology under normal and hypoxia condition (100×)

2.2 5%O_2 条件下培养 H9c2 心肌细胞不同时间点 β-catenin 在细胞内的表达部位

细胞免疫荧光结果段未显示，β-catenin 弥散分布于整个细胞内，β-catenin 在细胞质及细胞核均可见，经低氧处理后其表达明显增强，且主要位于细胞核。见图 2。

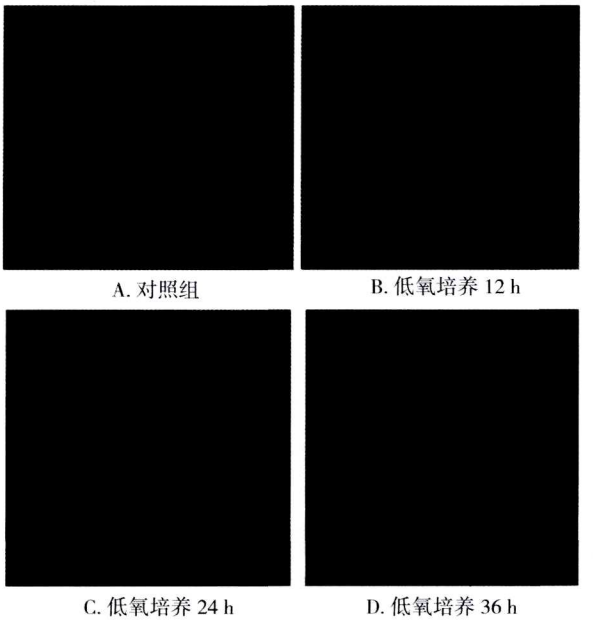


图 2 免疫荧光检测 β-catenin 在 H9c2 心肌细胞中的定位

Fig.2 Cellular localization of β-catenin in H9c2 cells

2.3 5%O_2 条件下培养 H9c2 心肌细胞不同时间 β-catenin 的表达变化

结果显示，随着缺氧时间延长，β-catenin mRNA 表达呈先增后降的趋势，缺氧 12、24、36 h 时 β-catenin mRNA 表达较对照组明显增加（P=0.049，P=0.001，P=0.020），而 48、72 h 时表达下降，与 12、24 及 36 h 表达量相比，差异均具有统计学意义（P=0.000）。见表 2。

Western bolt 结果显示，5%O_2 条件下培养H9c2 细胞时 β-catenin 表达明显增加，全细胞 β-catenin 水平与细胞质、细胞核内 β-catenin 变化趋势一致。在培养 6、12、24、36 h 时细胞质及细胞核内 β-catenin 表达明显增加，均在 36 h 时表达最高。与对照组相比，差异均具有统计学意义（P=0.000，P=0.000，P=0.003，P=0.000）。48、72 h 表达较 36 h 明显下降（P=0.000，P=0.000），且基本降至对照组水平（表 2，图 3）。

2.4 5%O_2 条件下培养 H9c2 心肌细胞不同时间抗凋亡因子 bcl-2 及 survivin 表达变化

实验结果段尾显示，低氧处理 H9c2 心肌细胞后抗凋亡

表 2 5%O_2 条件下培养 H9c2 细胞不同时间 β-catenin 的表达变化

Tab.2 Expression of β-catenin in H9c2 cells at different time points subjected to 5%O_2

指标	对照组	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	F 值	P 值
β-catenin mRNA	0.88 ± 0.13	0.79 ± 0.04	1.00 ± 0.00^{ab}	1.11 ± 0.04^{ab}	1.02 ± 0.06^{ab}	0.75 ± 0.06^{acde}	0.71 ± 0.05^{acde}	16.030	0.000
Cytosolic β-catenin	0.71 ± 0.14	1.53 ± 0.10^{a}	1.24 ± 0.11^{ab}	1.55 ± 0.26^{ac}	1.87 ± 0.12^{abcd}	0.89 ± 0.14^{bcde}	0.72 ± 0.10^{bcde}	28.542	0.000
nuclear β-catenin	0.67 ± 0.11	1.28 ± 0.15^{a}	1.39 ± 0.16^{a}	1.10 ± 0.04^{ac}	1.78 ± 0.23^{abcd}	0.47 ± 0.06^{abcde}	0.52 ± 0.03^{bcde}	44.129	0.000
β-catenin 蛋白	0.90 ± 0.04	1.78 ± 0.29^{a}	1.25 ± 0.19^{ab}	1.56 ± 0.25^{a}	1.96 ± 0.13^{acd}	0.92 ± 0.16^{bde}	0.76 ± 0.06^{bcde}	20.111	0.000

注：a，与对照组比较，P<0.05；b：与缺氧 6 h 比较，P<0.05；c：与缺氧 12 h 比较，P<0.05；d：与缺氧 24 h 比较，P<0.05；e：与缺氧 36 h 比较，P<0.05

表 3 5%O_2 条件下培养 H9c2 细胞不同时间 bcl-2 表达变化

Tab.3 Level of bcl-2 in H9c2 cells subjected to 5%O_2

组别	对照组	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	F 值	P 值
bcl-2 mRNA	0.66 ± 0.05	1.00 ± 0.00[a]	0.98 ± 0.05[a]	0.39 ± 0.02[abc]	0.36 ± 0.01[abc]	0.57 ± 0.03[abcd]	0.55 ± 0.03[abcd]	188.059	0.000
bcl-2 蛋白	0.59 ± 0.08	1.88 ± 0.09[a]	1.35 ± 0.25[ab]	1.33 ± 0.17[ab]	0.70 ± 0.07[bcd]	0.61 ± 0.06[bcd]	0.40 ± 0.08[bcd]	51.580	0.000

注：a，与对照组比较，P<0.05；b：与缺氧 6 h 比较，P<0.05；c：与缺氧 12 h 比较，P<0.05；d：与缺氧 24 h 比较，P<0.05

表 4 5%O_2 条件下培养 H9c2 细胞不同时间 survivin 表达变化

Tab.4 Level of survivin in H9c2 cells subjected to 5%O_2

组别	对照组	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	F 值	P 值
survivin mRNA	0.93 ± 0.08	0.63 ± 0.03[a]	0.84 ± 0.17[b]	1.25 ± 0.01[abc]	0.70 ± 0.02[acd]	0.23 ± 0.01[abcd]	0.57 ± 0.05[abcd]	54.078	0.000
survivin 蛋白	0.71 ± 0.03	0.81 ± 0.03	1.05 ± 0.10[ab]	1.71 ± 0.18[abc]	1.10 ± 0.11[abd]	0.75 ± 0.09[cd]	0.57 ± 0.13[bcd]	36.634	0.000

注：a，与对照组比较，P<0.05；b：与缺氧 6 h 比较，P<0.05；c：与缺氧 12 h 比较，P<0.05；d：与缺氧 24 h 比较，P<0.05

因子 bcl-2 表达较对照组明显增加，其中 bcl-2 mRNA 在缺氧 6、12 h 表达较对照组明显增加（P=0.000，P=0.000），36 h 时表达降至最低水平。bcl-2 蛋白在培养 6、12、24 h 时表达明显增加（P=0.000，P=0.000，P=0.000）。见表 3。

随培养时间延长，survivin 表达先增后降。与对照组相比，survivin mRNA 表达水平于培养 24 h 明显增加（P=0.000）。同样，survivin 蛋白在培养 12、24 h 时表达明显增加，24 h 时表达最高（P=0.000，P=0.000）。见表 4。

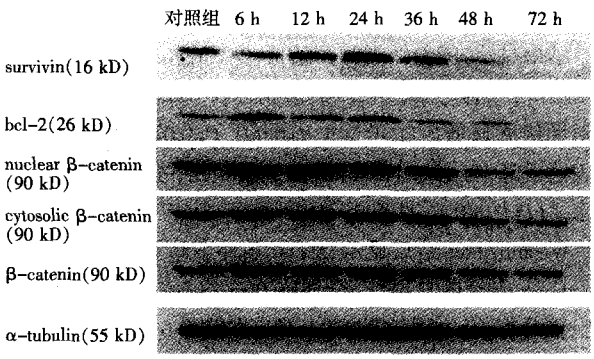


图 3 Western blot 检测 5%O_2 条件下培养 H9c2 细胞不同时间 β-catenin、bcl-2 及 survivin 蛋白表达

Fig.3 Expression of β-catenin, bcl-2, and survivin in H9c2 cells subjected to 5%O_2

3 讨 论

慢性缺氧时心肌会产生多种适应方式，如通过增加线粒体数量增加有限 O_2 的利用率；调节血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）的表达，增加微血管数量，增加供血量；通过增强抗凋亡因子表达，增强心肌细胞耐受应激能力等。这种适应方式形式多样，但高度统一，最终实现心肌细胞慢性缺氧适应（myocardial adaptation to chronic hypoxia）[8-9]。心肌慢性缺氧适应有助于青紫型 CHD 患儿在一定时期内存活并维持其心脏功能，并对外科手术所致的心肌缺血缺氧有较好耐受性。然而心肌慢性缺氧适应的机制目前仍不清楚，国内外相关研究较少，有研究显示 PKC、p38 MAPK、JUN 激酶[10]及 Akt 信号通路[11]可能是心肌慢性缺氧适应的信号通路之一，但其机制仍不完全明确。

心肌急性缺血/缺氧损伤时可激活 Wnt/β-catenin 信号通路[4-5]，且激活的此通路具有一定心脏保护作用[12]。通过对短暂性结扎左冠状动脉前降支形成的大鼠缺血预处理（ischemic preconditioning，IP）模型的研究发现（缺血 4 min，再灌注 4 min，一共 4 个周期），IP 可使心肌细胞细胞质及细胞核内 β-catenin 明显增加，且增加的 β-catenin 具有一定抗凋亡及促血管生成作用[13]，下调 β-catenin 表达时观察到 VEGF、bcl-2 及 survivin 表达下降，一定程度上消除了 IP 介导的心脏保护作用[14]。然而，心肌慢性缺氧时 Wnt/β-catenin 信号通路的变化目前尚未见报道。本研究结果表明，5%O_2 条件下培养 H9c2 心肌细胞 6~72 h，培养不同时间时 H9c2 心肌细胞形态与对照组相比均未观察到明显改变，提示 H9c2 细胞对 5%O_2 慢性低氧培养条件具有一定耐受性。Wnt/β-catenin 信号通路没有激活时，细胞质中 β-catenin 被降解复合体降解，而激活后，降解复合体活性被抑制，β-catenin 才能在细胞质中聚集并进入细胞核，与 T 细胞因子/淋巴增强子（TCF/LEF）相互作用，激活 Wnt 靶基因转录。本研究结果显示，低氧培 6~36 h，H9c2 心肌细胞的细胞质及细胞核中 Wnt/β-catenin 通路核心分子 β-catenin 表达均较对照组明显增加，提示细胞质中 β-catenin 聚集并向

核内转移，说明 H9c2 心肌细胞慢性缺氧时可激活细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路。本研究同时发现，随培养时间延长，β-catenin mRNA 及蛋白表达呈先增后降趋势，于 48 h 和 72 h 时蛋白表达降至对照组水平，提示此时激活的信号通路活性存在一定时限。本研究也显示，低氧条件下培养心肌细胞时，抗凋亡因子 bcl-2 及 survivin 表达增加，在培养过程中两者表达水平均先升后降，bcl-2 于培养 6、12 h 时表达最高，survivin 于 24 h 时达最高，而在此时间段内，β-catenin 表达均维持在较高水平，提示慢性缺氧时 β-catenin 表达增加可能上调 bcl-2、survivin 表达，因此慢性缺氧时激活的 Wnt/β-catenin 信号通路可能通过上调抗凋亡因子 bcl-2 及 survivin 表达，从而减少慢性缺氧时心肌细胞凋亡，促进细胞在低氧环境中存活。

HIF-1 为一种缺氧诱导产生的、可激活缺氧反应基因转录的 DNA 结合蛋白，是机体氧感受和缺氧反应信号转导的共同通路。有研究显示，HIF-1 与 β-catenin 存在一定相互作用，HIF-1 可促进缺氧条件下 β-catenin 向细胞核内转移[15]，β-catenin 能够增强 HIF-1 介导的转录，从而促进细胞存活，适应缺氧[16]。这进一步提示 Wnt/β-catenin 信号通路可能直接或间接参与了细胞在低氧环境中存活。

综上所述，本研究探讨了低氧培养条件下 H9c2 心肌细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路的变化，研究结果提示，低氧可激活 H9c2 心肌细胞中 Wnt/β-catenin 通路，且激活后的信号通路可能在一定时期内通过上调抗凋亡因子表达来减少慢性缺氧状态下 H9c2 心肌细胞的凋亡，促进细胞存活。深入研究 Wnt/β-catenin 信号通路在心肌慢性缺氧状态中作用，可对临床某些慢性缺氧性心脏疾病心肌保护提供新的治疗思路和方法。

参 考 文 献

[1] 苏肇伉. 先天性心脏病外科进展[J]. 上海第二军医大学学报，2004，24(3)：153-158.

[2] Silverman HS，Wei S，Haigney MC，et al. Myocyte adaptation to chronic hypoxia and development of tolerance to subsequent acute severe hypoxia[J]. Circ Res，1997，80(5)：699-707.

[3] Kolar F，Ostadal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia[J]. Physiol Res，2004，53(s1)：3-13.

[4] Barandon L，Dufourcq P，Costet P，et al. Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/frizzled pathway in ischemic preconditioning[J]. Circ Res，2005，96(12)：1299-1306.

[5] Aisagbonhi O，Rai M，Ryzhov S，et al. Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition[J]. Dis Model Mech，2011，4(4)：469-483.

[6] Huang CL，Liu D，Ishikawa S，et al. Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer[J]. Eur J Cancer，2008，44(17)：2680-2688.

[7] Leal LF，Bueno AC，Gomes DC，et al. Inhibition of the Tcf/beta-catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis[J]. Oncotarget，2015，6(40)：43016-43032.

[8] 肖颖彬，蹇 朝. 心肌慢性缺氧适应的研究进展[J]. 西部医学，2015，27(3)：321-322.

[9] Palmer BF，Clegg DJ. Oxygen sensing and metabolic homeostasis[J]. Mol Cell Endocrinol，2014，397(1-2)：51-58.

[10] Rafiee P，Shi Y，Kong X，et al. Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts：role in cardioprotection[J]. Circulation，2002，106(2)：239-245.

[11] 谢婧雯，刘晓燕. Akt 信号通路在紫绀型先天性心脏病患儿心肌慢性缺氧适应中的作用[J]. 临床心血管病杂志，2012，28(5)：373-376.

[12] Hahn JY，Cho HJ，Bae JW，et al. Beta-catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts[J]. J Biol Chem，2006，281(41)：30979-30989.

[13] Kaga S，Zhan L，Altaf E，et al. Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF，Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol，2006，40(1)：138-147.

[14] Thirunavukkarasu M，Han Z，Zhan L，et al. Adeno-sh-beta-catenin abolishes ischemic preconditioning-mediated cardioprotection by downregulation of its target genes VEGF，Bcl-2，and survivin in ischemic rat myocardium[J]. Antioxid Redox Signal，2008，10(8)：1475-1484.

[15] Mitani T，Harada N，Nakano Y，et al. Coordinated action of hypoxia-inducible factor-1alpha and beta-catenin in androgen receptor signaling[J]. J Biol Chem，2012，287(40)：33594-33606.

[16] Kaidi A，Williams AC，Paraskeva C. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia[J]. Nat Cell Biol，2007，9(2)：210-217.

（责任编辑：方 济）