

Low-dose radiation prevents type 1 diabetes-induced cardiomyopathy via activation of AKT mediated anti-apoptotic and anti-oxidant effects

低線量の放射線は I 型糖尿病誘発性心筋症を抗アポトーシス及び抗酸化作用
に関与する AKT の活性化を介して抑制する

Fangfang Zhang ^{a, b}, Xiufei Lin ^{a, b}, Lechu Yu ^b, Weihua Li ^c, Dingliang Qian ^d,
Peng Cheng ^{a, b}, Luqing He ^{a, b}, Hong Yang ^b, Chi Zhang ^{a, b},

^a Chinese-American Research Institute for Diabetic Complications, Wenzhou Medical University,
Wenzhou, China ^b Ruiyan Center of Chinese-American Research Institute for Diabetic

Complications, Wenzhou Medical University, Wenzhou, China ^c Department of Pathology, the Third
Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, China ^d Department of Inspection, the
Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, China

J. Cell. Mol. Med., 2016; 20 (7), 1352-1366.

翻訳者 東京理科大学名誉教授 小島周二

要旨

私達は低線量放射線 (LDR) が末期糖尿病性心筋症を抑制できるかどうか、又この効果が抗アポトーシス及び抗酸化経路によるものかどうかを検討した。ストレプトゾトシン誘発 C57BL/6J モデルマウスを 2 日間毎に LDR (12.5, 25、又は 50mGy) を全身照射した。糖尿病発症 1~2 週間後に、酸化ストレス及びアポトーシスの増加に伴う心臓機能障害、肥大及び組織病理学的異常を特徴とする心筋症が確認されたが、この病態は LDR 25 又は 50 mGy 照射によって抑制された。この抑制作用が p53 の不活性化、Nrf2 活性の増強、さらに Akt の活性化と関連していることが示唆された。次に、抑制機序を明らかにするため、マウス初代心筋細胞を高グルコース (HG, 33 mmol/L) で 24 時間処理した。なお本処理後半の 15 時間は牛血清アルブミン結合パルミチン酸塩 (Pal, 62.5 mmol/L) を培地に加えて糖尿病性心筋症を作製、又この間 6 時間ごとに細胞を LDR (25 mGy) 照射した。この結果、Akt、MDM2 及び Nrf2 に対する siRNA による Akt/MDM2/P53 又は Akt/Nrf2 経路のブロッキングにより、LDR 誘導抗アポトーシス及び抗酸化作用は LDR 照射により阻害され、また同時に心筋細胞肥大及び HG/Pal 線維症に対する LDR の抑制作用も解除された。

結論として、LDR は Akt/MDM2/P53 媒介抗アポトーシス経路及び Akt/Nrf2 媒介抗酸化経路、同時に関与する心機能及び肥大リモデリングを改善することによって糖尿病性心筋症を抑制した。

キーワード: 糖尿病性心筋症、LDR、肥大リモデリング、酸化ストレス、アポトーシス

序論

糖尿病性心筋症は糖尿病の最も重篤な合併症の一つであり、心臓肥大 (CH) 及び心

臓機能障害に関連した前線維性変化を含む心臓リモデリングによって特徴づけられる[1～3]。糖尿病性心筋症の発症機序は複雑であり、主に糖尿病誘発アポトーシスと酸化ストレスから生じると考えられている。心筋死細胞は細胞外マトリックスに置き換わり、心筋収縮機能を失い、間質性線維症が増大することで、心臓リモデリング及び機能不全に繋がる[4～6]。また、ミトコンドリア由来活性酸素種(ROS)の誘導による酸化ストレスは種々の肥大性シグナルキナーゼや転写因子を活性化し、心筋細胞の機能不全、DNA変異、アポトーシスを促進する不可逆的な細胞障害を誘発する[7]。従って、糖尿病性心筋症を抑制する為の理想的な治療法は酸化ストレス及びアポトーシスを同時に抑制することである。

糖尿病性心筋症に対して今日臨床で使用されている薬物の殆どは代謝され、肝臓や腎臓から排泄される必要があり、身体に過剰の負荷を与える。線量が100 mGy以下の低線エネルギー付与(LET)の低線量放射線(LDR)照射は、遺伝子突然変異の抑制、免疫増強、寿命延長等のホルミシス効果を誘導すると言う証拠が増加しつつある[8, 9]。さらに、以前の研究では、LDRが脂質異常症、炎症及び酸化ストレスを抑制することによって糖尿病性腎症を防護することを示した[10～13]。LDRが糖尿病性動物モデルでの精巣及び海馬ニューロン細胞において抗アポトーシス作用を有することも報告されている。しかし、LDRが糖尿病性心筋症にどのように影響するかは依然として不明である。我々の予備的研究において、LDRが糖尿病の初期段階で炎症を抑制することによって心臓の損傷を防ぐことができることを見出している[14]。しかし、他の研究でも、長期間ではなく寧ろ短期間での糖尿病に於いて有意な炎症がみられることが示されている[15～18]。従って、LDRが長期糖尿病マウスにおいて心筋症抑制作用を誘導することになれば、抗炎症作用では無い他の防護機構の存在が示唆される。

プロテインキナーゼB/Aktはセリン/スレオニンプロテインキナーゼのファミリーである。Aktの活性化(リン酸化)がMDM2/P53及びGSK3b-Fyn-Nrf2経路を介して心筋細胞の抗アポトーシス及び抗酸化作用の両方を同時に媒介することはすでに明らかになっている[19～23]。糖尿病状態では、心臓損傷に関連するAkt活性化とNrf2の発現が低下する[24～26]。私達の以前の研究では、LDR照射が糖尿病誘発性の腎臓Akt活性とNrf2発現の低下を有意に防止することを示した。なお、Akt媒介性MDM2/P53及びGSK3b-Fyn-Nrf2経路のLDR誘発心防護作用に関与しているか否かは依然として不明である。

これらの機序を明らかにするために、私達はまず初めに低用量ストレプトゾトシンの腹腔内投与(STZ, ip)によるI型糖尿病マウスマルクルを作製[27]、その後LDRを全身照射し、心筋症(特に心肥大)、線維症及び心臓機能不全、アポトーシス及び酸化ストレスに対する効果を検討した。

材料及び方法

動物倫理

動物実験はNIHガイドライン(実験動物のケアおよび使用のためのガイド)に準拠して実施した。本実験計画は中国浙江省温州医科大学動物実験倫理委員会の承認を受け

た。マウスに対する全ての処置は、0.2 mL/10g 体重の用量で 1.2% の 2,2,2-トリブロモエタノール (Avertin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) の腹腔内注射による麻酔下で実施され、動物への苦痛を最小にした。

I 型糖尿病マウスモデルの作製

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスは北京大学実験動物センター（北京、中国）から購入した。マウスは腹腔内注射 (ip) により種々の低用量ストレプトゾトシン (STZ, Sigma-Aldrich) を 50 mg/kg/日で 5 日間連続投与し、I 型糖尿病を惹起させた。

マウスへの低線量放射線 (X 線) の全身照射

上記方法により作製した糖尿病モデルマウス及び非糖尿病対照マウスに、12.5, 25, 又は 50 mGy の LDR を 2 日間おきに延べ 12 週間全身照射した。

心筋細胞の単離、培養及び LDR 照射と siRNA によるノックダウン (KO)

成体マウスの心筋細胞は以前に記載されている方法により単離した [28]。akt1, nrf2 及び p53 に対する特異的 siRNA を処理した心筋細胞を LDR (25mGy) で照射後、高濃度グルコース (HG, 33 mmol/L) を 24 時間処理した。なお、パルミチン酸塩 (Pal, 62.5 μmol/L) は後半 15 時間に曝露させた。

心エコー検査

心機能と血圧 (BP) は、其々心エコー検査とテールカフマノメトリーで測定した [27, 29]。

心筋の形態学的検査

各グループのマウスからの心筋のパラフィン切片を調製した。形態学的变化又はコラーゲン蓄積（線維症）の検出のために、以前報告した方法を用い、ヘマトキシリソ・エオシン、及びシリウス・レッドで染色した (14,27)。

末端デオキシヌクレオチジルトランスクレアーゼ媒介 dUTP ニックエンド標識染色

(TUNEL) 染色のために、各スライドを ApopTag ペルオキシダーゼインサイチューアポトーシス検出キット (Chemicon, Temecula, CA, USA) (データ S1 参照) で染色した [30]。

カスパーゼ-3 活性の検出

カスパーゼ-3 の活性化は以前報告した様に、カスパーゼ-3 活性を検出することによって評価した [31]。

過酸化脂質の定量

過酸化脂質量は以前報告した様に、脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド (MDA) 量をチオバルビツール酸アッセイで測定した。

ROS 产生量の測定

心筋細胞内の ROS は ROS アッセイキットを用いて検討した。

核の分離

以前の方法 [23] と同様に、核内分離キット (NUC-201; Sigma-Aldrich) を用いて、培養及び動物心筋細胞より核を単離した。

ウェスタンプロットティング

ウェスタンプロットは、以前の方法 [10, 11] により行った。

RNA 単離およびリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応

RNA 単離及びリアルタイム定量 PCR は、以前の方法 [10, 11]に従い実施した。

統計解析

1 群あたり 8 匹のマウス、又は 3 回の細胞培養実験からデータを収集し、平均値 ($M \pm$ 標準偏差 (S.D)) で表示した。Origin 7.5 ソフトウェアを用いて、一元配置 ANOVA を使用して有意差検定を、その後グループ間の有意差検定をポストホック Tukey 検定で解析、又グラフを作成した。なお、 $P < 0.05$ を統計的に有意差有りとした。

結果

I 型糖尿病マウスの高血糖に対する LDR の影響

血糖値は STZ 惹起糖尿病誘発前は何れの群でもほぼ同程度であった。STZ 最終投与の 5 日後に、血中グルコースレベルを測定した。高血糖が確認されたマウスを病態対照群、及び同一週齢を非照射群と 2 つの群に分け、両群に 12.5, 25 又は 50mGy の LDR を照射した。図 S1 から明らかな様に、STZ 最終投与 (ip) の 5 日後に有意な血糖値の上昇 (>12mmol/L、約 17mmol/L) がみられ、マウスでの I 型糖尿病惹起が確認された。さらに、本糖尿病モデルマウスでの血糖値は 12 週間後にさらに上昇した(約 25mmol/L)。しかしながら、このモデルマウスでの 25 mGy 照射群と 50 mGy 照射群の血糖値は、12 週間の LDR 曝露後のプラトーレベル (約 16 mmol/L) に維持され、糖尿群 (図 S1) との間に統計的に有意差がみられた。

LDR の照射は I 型糖尿病誘発心臓機能不全を抑制する

エコー検査(表 1)により糖尿病マウスの心機能を検査し、LVDs (左室収縮末期径)、IVSd (心室中隔厚)、LVPWd (左室後壁厚)、及び LVPWs (左室下壁厚拡張期) の漸進的減少; EF (左室駆出率) % 及び FS (左室内径短縮率) % の進行性増加の結果を得た。25 又は 50mGy の照射群では心筋症に対する防御が観察されたが、両群間で統計的有意差はみられなかった。しかし、12.5mGy 照射群では同様の保護効果は見られなかった。

表 1 I 型糖尿病マウスでの心機能に対する LDR の作用

| | Con | 25 mGy | DM | DM/12.5 mGy | DM/25 mGy | DM/50 mGy |
|----------------|--------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|
| LVID;d (mm) | 3.61 ± 0.05 | 3.63 ± 0.1 | 3.98 ± 0.04* | 3.93 ± 0.1 | 3.75 ± 0.04*† | 3.73 ± 0.06*† |
| LVID;s (mm) | 1.69 ± 0.16 | 1.56 ± 0.13 | 2.27 ± 0.15* | 2.19 ± 0.13 | 1.81 ± 0.11*† | 1.75 ± 0.13* |
| IVS;d (mm) | 0.73 ± 0.03 | 0.76 ± 0.01 | 0.81 ± 0.01* | 0.79 ± 0.02 | 0.74 ± 0.02*† | 0.72 ± 0.01* |
| IVS;s (mm) | 1.14 ± 0.02 | 1.11 ± 0.04 | 0.89 ± 0.05 | 0.94 ± 0.02 | 1.01 ± 0.04 | 1.11 ± 0.02 |
| LVPW;d (mm) | 0.82 ± 0.01 | 0.84 ± 0.03 | 1.21 ± 0.03* | 1.14 ± 0.05 | 1.01 ± 0.01*† | 0.94 ± 0.03*† |
| LVPW;s (mm) | 1.82 ± 0.13 | 1.82 ± 0.09 | 1.31 ± 0.1* | 1.4 ± 0.2 | 1.59 ± 0.14*† | 1.74 ± 0.11*† |
| %EF (%) | 89.11 ± 1.32 | 88.35 ± 1.09 | 63.89 ± 2.02* | 68.43 ± 3.59 | 76.35 ± 3.31*† | 80.89 ± 2.02*† |
| %FS (%) | 61.22 ± 1.16 | 60.68 ± 1.21 | 39.48 ± 1.07* | 44.22 ± 5.16 | 52.68 ± 4.21*† | 55.93 ± 1.07*† |
| LV mass (mg) | 92.23 ± 4.12 | 89.68 ± 3.69 | 110.58 ± 6.46* | 107.43 ± 4.97 | 103.44 ± 2.85*† | 98.49 ± 6.32*† |
| LV mass-C (mg) | 73.43 ± 2.11 | 75.37 ± 2.74 | 88.47 ± 3.56* | 82.75 ± 1.13 | 78.69 ± 1.02*† | 76.45 ± 2.22*† |

*P < 0.05 versus the control group.

†P < 0.05 versus the DM group.

Data were presented as means ± S.E.M. n = 8 in each group.

LDR は心臓を糖尿病誘発性肥大リモデリングし、形態学異常及び線維症を抑制する

LDR 非照射の糖尿病マウスでは、心臓の大きさ（図 1A）及び心臓重量・脛骨の長さの比が有意に増加したことから、CH（求心性肥大）の誘発の可能性が示唆された（図 1B）。CH は糖尿病マウスの心室のサイズの増加によってさらに確認された（図 1C）。さらに、糖尿病心に於ける LV（左室側壁）重量（図 1D）及び心筋細胞サイズ（図 1E、図 S2A）の増加もみられた。一貫して、ANP（心房性ナトリウム利尿ペプチド、図 1F）、BNP（脳性ナトリウム利尿ペプチド、図 1G）及び B-MHC（B ミオシン重鎖、図 1H）を含む心肥大マーカーの発現は、糖尿病モデルマウス心に於いて顕著に増加した。しかし、25 又は 50mGy の LDR 照射群ではこれらの増加は抑制された（図 1A-H 及び図 S2A）。さらに、糖尿病心ではヘマトキシリン&エオシン染色（図 S2A）で、中心細胞壊死、心筋組織の無秩序な配列及び筋原線維不連続を含む形態学的異常が観察された。一方、線維症のシリウスレッド染色により、糖尿病心では血管周囲の組織と間質組織に何れも有意なコラーゲン蓄積がみられ（図 S2B、図 2I）。又シリウスレッド染色と一致して、結合組織成長因子（CTGF）（図 2J）とトランスフォーミング増殖因子（TGF）-β（図 2K）を含む分子レベルでの線維化マーカーの発現が糖尿病心で増加した。しかし、25 又は 50mGy の LDR 照射によりこれらの線維症マーカーの増加は顕著に抑制された。

LDR は糖尿病心で抗アポトーシス効果を誘導する

アポトーシスを測定するために心組織について TUNEL アッセイを行った。正常対照群の心と比較して、糖尿病心ではアポトーシスが増加した（図 2A&B）。しかし、この増加は、25 と 50mGy の LDR 照射によって有意に抑制された。さらに、糖尿病誘発心アポトーシスに対する LDR の抑制効果を確認目的でカスパーゼ-3 活性、及び活性化カスパーゼ-3・切断産物を酵素アッセイ及びウェスタンプロットによって解析した。この結果、切断されたカスパーゼ-3 含量とカスパーゼ-3 活性は、何れもが糖尿病心で顕著に増加した（図 2C~E）。これら増加は、25 又は 50mGy の LDR 照射により有意に抑制された（図 2A~E）。一方、ミトコンドリア細胞死経路としての Bax/Bcl-2 比を検討すると、糖尿病心では Bax/Bcl-2 比が相乗的に増加することが明らかになった（図 2F）。さ

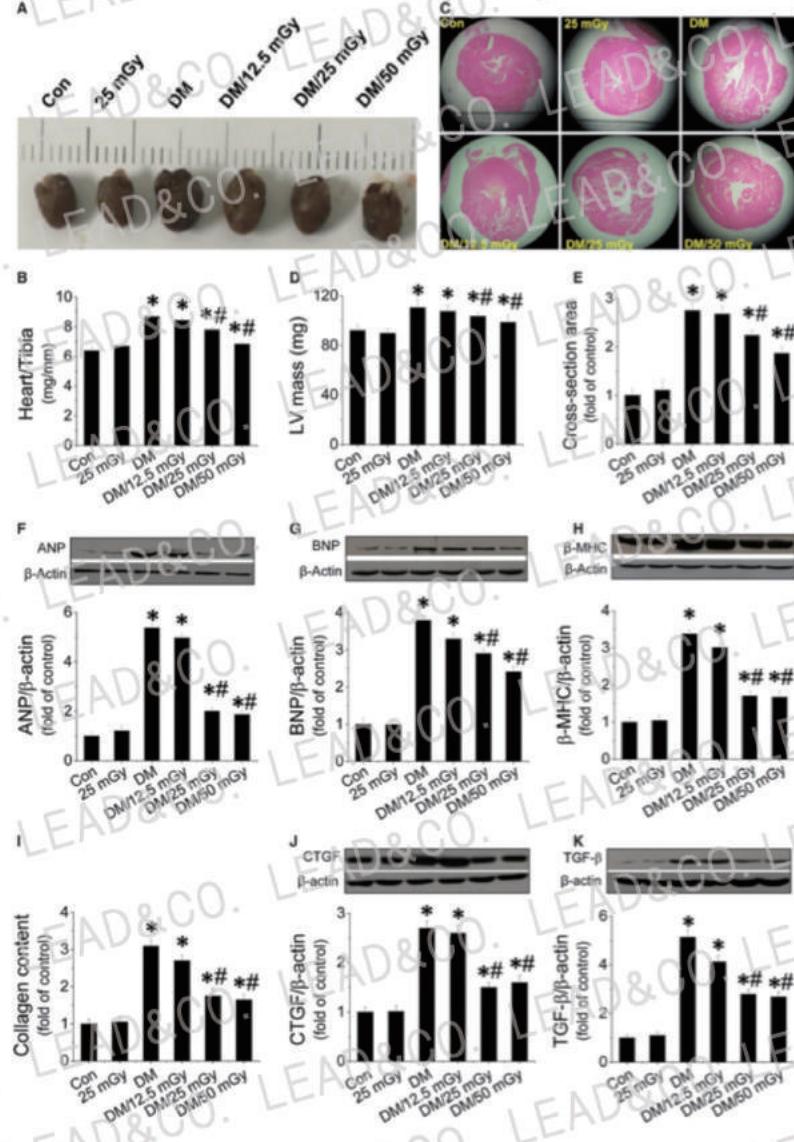


図 1 LDR の糖尿病性心肥大と線維化に対する作用

らに、ミトコンドリア細胞死経路の上流誘導因子である P53 の活性を検討した(図 2G)。この結果、心 P53 活性（リン酸化）は糖尿病心で有意に増強された。この増強は、反対に P53 の負の調節因子である MDM2 発現の有意な低下を伴った(図 2G&H)。しかしながら、心 P53 活性化は 25 又は 50mGy の LDR 照射により顕著に阻害され、又反対に MDM2 の発現は増加した(図 2G&H)。

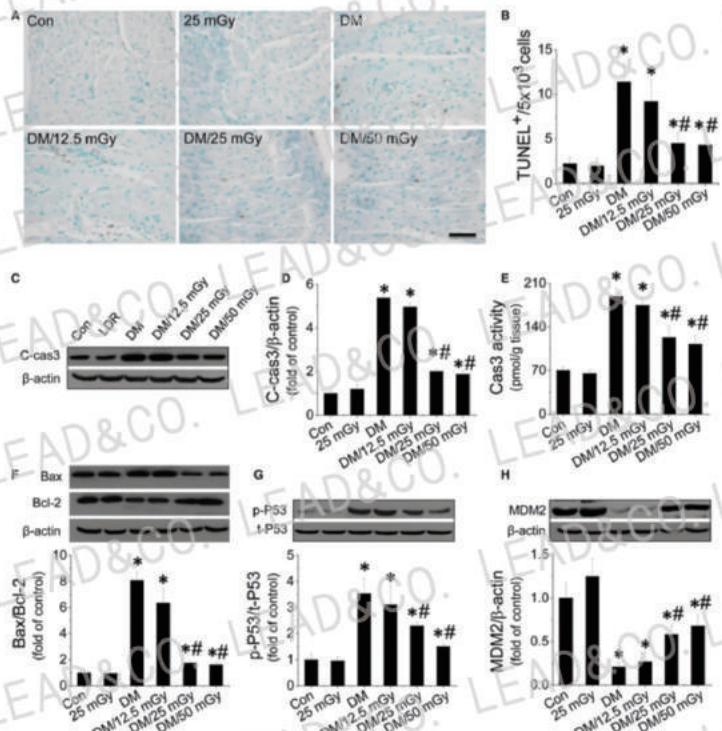


図2 糖尿病心でのミトコンドリア経路介在アポトーシスに対するLDRの作用

LDRは*Nrf2*発現および機能上昇に関連した心に糖尿病誘発性酸化ストレスを抑制した
糖尿病モデルマウス心での酸化ストレスに対するLDR照射の作用をニトロソ化損傷による酸化ストレスの標準的マーカーである3-NT、4-HNE、及びMDAを指標として検討した(図3.A~C)。これらのマーカーは糖尿病心で、何れも有意に増加したが、これらの増加は25又は50mGyのLDR照射により有意に抑制された。さらに、酸化ストレスはROSと抗酸化系との不均衡により生ずることから、心組織でのROS量を測定した。この結果、糖尿心では顕著なROS上昇がみられたが、25又は50mGyのLDR照射により有意に抑制された(図3D)。

*Nrf2*は細胞質から核に移行し、酸化ストレスに対する種々の抗酸化物をコードする遺伝子転写を誘導する重要な細胞内防護機構を担う転写因子であることから、次に本転写因子に着目し検討した。この結果、糖尿病心では*Nrf2*の核移行が抑制されるが(図3D&E)、反対に*Nrf2*の負の調節因子であるFynは増加した。これらの因子に対するLDR照射の作用を検討すると、糖尿病心でみられた*Nrf2*の核移行阻害は25又は50mGyのLDR照射により有意に阻害された(図3D~G)。さらに、下流にあるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)をはじめとし、NQO1、CAT、SOD-1の抗酸化物質の発現をmRNA及びタンパク質レベルで解析することにより*Nrf2*の転写能を検討した。この結果、これらの抗酸化物は糖尿病心組織で顕著に発現低下したが、25又は50mGyのLDR照射により有意な回復がみられた(図3H, S3A, 3I, S3B, 3J, S3C, 3K & S3D)。

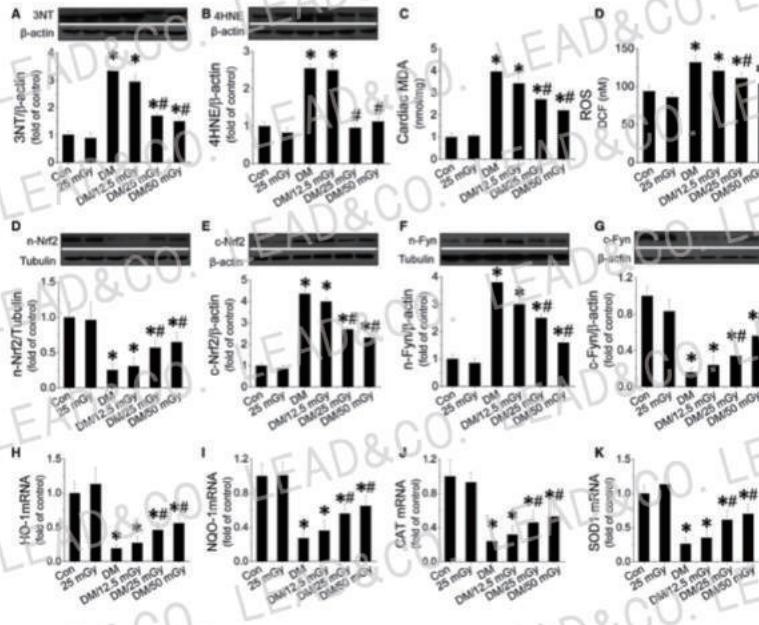


図3 糖尿病心での酸化ストレスに対するLDRの作用

LDRは糖尿病マウス心でのPI3K-AKT-GSK3Bシグナル伝達経路の不活性化を解除する

糖尿病誘発心アポトーシス及び酸化ストレスはPI3K-AKT-GSK-3 β 経路の不活性化に関連すると考えられているが、PI3K(図S4A)、AKTリン酸化(図S4B)、さらにその下流にあるGSK-3 β (図S4C)の顕著な発現の低下に示された様に本研究でこれらの不活性が確認された。次に、これらの発現パターンに対するLDR照射の作用を検討すると、25又は50mGyのLDR照射によりI3K-AKT-GSK-3 β 経路の不活性化は抑制/回復された。

LDRは酸化ストレス及びアポトーシスの抑制と共に初代心筋細胞においてHG/Pal誘発性細胞肥大及び線維化抑制を解除した

マウスを用いた実験結果では、LDRが糖尿病性心筋症に対して抑制的に作用したことを見たが、この機序は明らかでない。そこで、初代培養マウス心筋細胞をHG(高濃度グルコース; 33mmol/L)及びPal(パルミチン酸; 62.5 μmol/L)で処理した。心筋細胞肥大のマーカー、線維症、酸化ストレス及びアポトーシスをウェスタンプロット又はリアルタイムPCRデータを用いて検討した。その結果、HG/PalはANPとBNP発現の上昇により細胞肥大を惹起した(図4A&B)。即ち、CTGFとTGF- β 発現を増強し纖維症を誘導: 3-NT及び4-HNEの増加、反対にHO-1及びNQO-1 mRNA発現を低下させ酸化ストレスを惹起した(図4C~J)。さらに、増加した切断カスパーーゼ3の発現(図4K)及びDNA断片化(図4L)によって心筋細胞アポトーシスが誘導された。一方、これらの異常は25又は50mGyのLDR照射により顕著に抑制された。さらに、

LDR 誘導抗酸化作用が Nrf2 の核転移の増加(図 S5A&B)と Fyn の低下(図 S5C 及び D)に関連していることが確認された。また、HG/Pal-処理初代心筋細胞での LDR 誘導抗アポトーシス効果が p53 の不活性化(図 S5E)及び増加した MDM2 発現(図 S5F)に関連していた。さらに、HG/PAL により心筋細胞での Akt(図 S5G)及び GSK-3B(図 S5H)のリン酸化が顕著に抑制されるが、これらの抑制が 25mGy の LDR 照射により回復することが示された。

HG/Pal 処理初代心筋培養細胞での心筋症に対する Akt 媒介 LDR の抑制作用

私達は培養細胞を用いたインビトロ実験で LDR(25 mGy)誘導心臓保護作用が Akt 活性化に関連することを見出したが、この詳細については明らかでない。そこで、LDR-誘発治療応答における Akt の直接的な役割を siRNA でノックダウン(KO)することにより検討した。この結果、HG/Pal-処理初代心筋細胞での AKT の KO により、Akt のリン酸化(図 5A&B)及び mRNA 発現(図 5A&C)が低下した。引き続き、AKT-KO 細胞での ANP(図 5D)、BNP(図 5E)、CTGF(図 5F)、及び TGF- β 発現(図 5G)の低下により特徴づけられる HG/Pal 起起心細胞肥大と纖維症が 25 mGy の LDR 照射により有意に抑制されることを確認した。同様に、Akt の KO はアポトシスマーカーである切断カスパーゼ-3(図 5H)、酸化ストレスマーカーである 3-NT(図 5I)及び 4-HNE の発現(図 5J)を抑制した。さらに、Akt の KO は、LDR 誘導性 P53(図 5K)の不活性化、Nrf2 の核移行(図 5L&M)とその転写能(図 5N&O)を抑制した。以上の結果より、25mGy の LDR 照射は HG/Pal 起起心筋細胞での糖尿病誘発性心肥大と線維化を抑制し、この作用に Akt 媒介抗アポトーシスと抗酸化経路が寄与することが確認された。

LDR は MDM2 の P53 媒介アポトーシスシグナル伝達経路の抑制によって HG/Pal 起起心障害から部分的に回避した

LDR の抑制作用に Akt 媒介 MDM2/P53 情報伝達経路の不活性化が関与するか否かを siRNA により MDM2 発現を KO することにより検討した。まず初めに、siRNA による心筋細胞における MDM2 の発現の KO を確認し(図 6A)、P53 のリン酸化(図 6B)及びその後に作用する切断カスパーゼー3 の発現と DNA 断片化(図 6C&D)に対する LDR の抑制作用の解除を確認した。さらに、MDM2 の KO は、HG/Pal 起起心筋症での ANP、BNP、CTGF、及び TGF- β 発現低下に対する抑制効果を解除させることを示した(図 6E~H)。

Nrf2 媒介抗酸化シグナル伝達経路を活性化することによる HG/Pal 起起心細胞障害に対する LDR の部分的保護作用

LDR の心臓防御作用に Nrf2 が必須か否かを Nrf2 の KO により検討した。この結果、Nrf2 の KO により LDR 誘導 HO-1 及び NQO-1 mRNA 発現上昇が完全に抑制された(図 7A~D)。一方、Nrf2 の KO は LDR 誘導 3-NT と 4-HNE 発現抑制を著しく阻害、また過酸化脂質(MDA)の低下を抑制した(図 7E~H)。本 KO はまた、LDR の示す HG/Pal 起起心筋細胞肥満での肥満マーカーである ANP と BNP 発現を低下させる作用、並びに纖維化マーカーである CTGF 及び TGF- β の発現低下を部分的に抑制した(図 7I~L)。

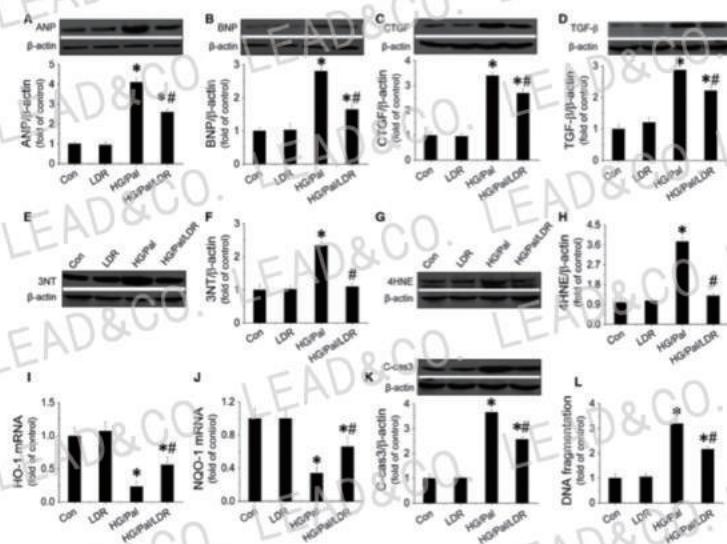


図4 初代培養心筋細胞での HG/Pal 惹起細胞肥大、線維化及びアポトーシスに対する LDR の作用

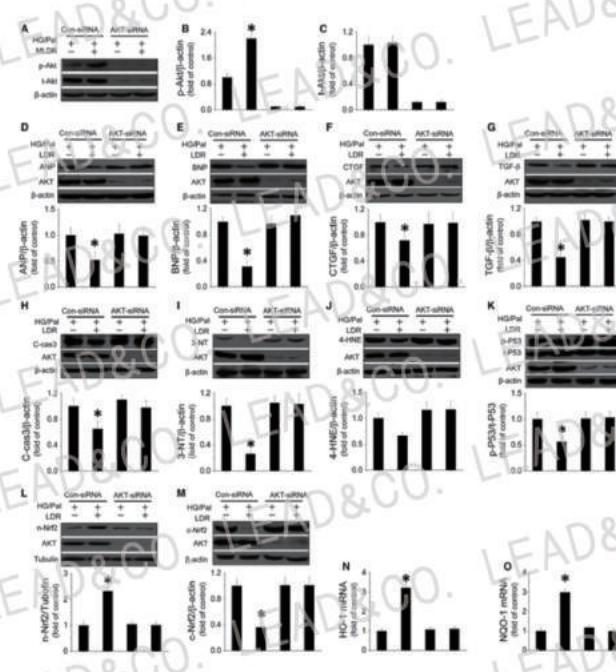


図5 P53 誘導アポトシス抑制と Nrf2 の核移行・転写能改善に関与する HG/Pal に対する LDR 誘導抗肥満と抗線維化抑制を Akt が媒介する

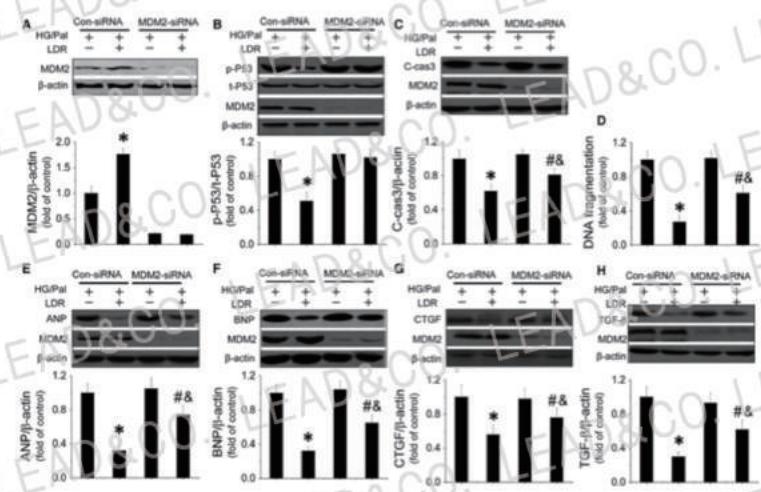


図 6 MDM2/P53 介在抗アポトーシス経路は LDR 誘導心細胞保護に関与する

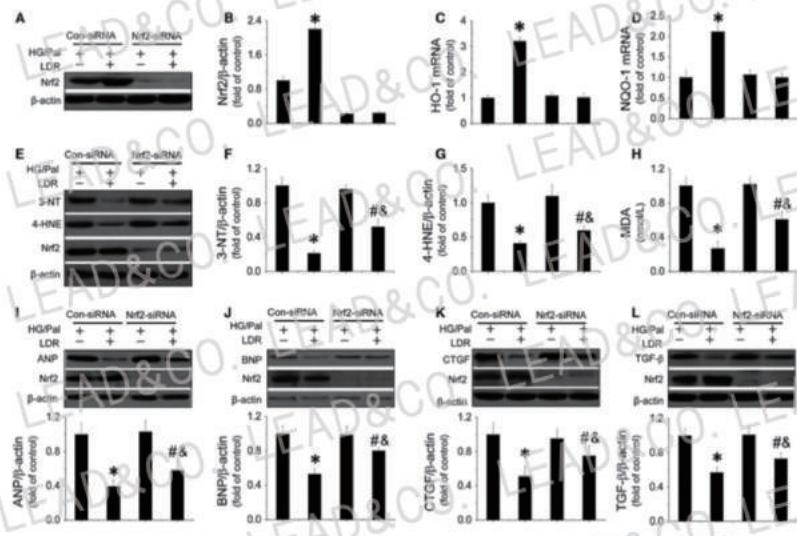


図 7 Nrf2 介在抗アポトーシス経路は LDR 誘導心細胞保護に関与する

血漿中がんマーカー濃度に対する LDR の効果

LDR を臨床で用いる場合、発がん性が主な関心事になる。従って、マウス血漿に於けるがんマーカー濃度を測定した。この結果、健常マウスではがんマーカーの低レベルが維持されており、また同様に、糖尿病又は LDR 照射マウスでもがんマーカーは低いレベルで維持された。これらの結果は、LDR が 12.5, 25 又は 50mGy では腫瘍形成能を

有しなかいことを示唆する。

表2 I型糖尿病マウスでの血中がんマーカーに対するLDRの影響

| | Con | 25 mGy | DM | DM/12.5 mGy | DM/25 mGy | DM/50 mGy |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AFP (U/l) | 8.00 ± 0.67 | 8.02 ± 0.78 | 8.10 ± 0.54 | 8.10 ± 0.83 | 8.03 ± 0.64 | 8.06 ± 0.58 |
| CEA (ng/ml) | 0.58 ± 0.16 | 0.57 ± 0.11 | 0.60 ± 0.15 | 0.60 ± 0.13 | 0.58 ± 0.15 | 0.60 ± 0.13 |
| CA-125 (U/ml) | 3.22 ± 0.56 | 3.12 ± 0.65 | 3.30 ± 0.35 | 3.14 ± 0.68 | 3.20 ± 0.52 | 3.16 ± 0.41 |
| CA-153 (U/ml) | 2.54 ± 0.22 | 2.46 ± 0.24 | 2.60 ± 0.25 | 2.56 ± 0.22 | 2.48 ± 0.24 | 2.49 ± 0.22 |
| CA-199 (U/ml) | 8.56 ± 2.11 | 8.32 ± 1.86 | 8.48 ± 1.95 | 8.44 ± 1.57 | 8.33 ± 1.28 | 8.46 ± 1.60 |
| CA-724 (U/ml) | 1.00 ± 0.13 | 1.04 ± 0.09 | 0.97 ± 0.11 | 1.02 ± 0.12 | 0.95 ± 0.14 | 1.06 ± 0.11 |
| NSE (ng/ml) | 41.65 ± 5.33 | 40.12 ± 4.38 | 43.00 ± 6.28 | 41.99 ± 5.54 | 42.64 ± 6.38 | 41.53 ± 4.68 |
| PSA (ng/ml) | 6.65 ± 1.13 | 6.42 ± 1.21 | 6.5 ± 1.07 | 6.32 ± 5.16 | 6.36 ± 4.21 | 6.35 ± 1.07 |
| SCCA (μg/l) | 0.32 ± 0.08 | 0.35 ± 0.04 | 0.34 ± 0.05 | 0.34 ± 0.03 | 0.36 ± 0.05 | 0.33 ± 0.03 |
| Ferritin (ng/ml) | 45.56 ± 5.55 | 46.35 ± 4.73 | 43.43 ± 5.54 | 47.26 ± 6.47 | 46.53 ± 6.30 | 45.05 ± 3.34 |

Data were presented as means ± S.E.M. n = 8 in each group.

AFP: Alpha foetal protein; CEA: Cancer embryo antigen; CA-125: Cancer antigen-125; CA-153: Cancer antigen-153; CA-724: Cancer antigen-724; NSE: neuron-specific enolase; PSA: Prostate-specific antigen; SCCA: Squamous cell carcinoma antigen.

考察

糖尿病性心筋症は冠動脈疾患や高血圧の発生とは異なり、心肥大、線維症、及び心室機能障害として定義されている [35]。酸化ストレスとアポトーシスは糖尿病性心筋症の主な特徴とされている [29,36,37]。従って、糖尿病性心筋症を抑制するための理想的な薬物は酸化ストレスとアポトーシスを同時に抑制する必要があるのかもしれない。

LDR の効果は中線量と高線量で異なり、細胞増殖、代謝活性、抗炎症作用、更に抗酸化作用等の有益な効果を刺激する [38~42]。私達の過去の研究では、繰り返しの LDR 照射 (25mGy/日) は糖尿病の初期ステージでの心筋症で抗炎症作用を誘導する [14]。しかしながら、LDR が糖尿病の後期ステージの心筋症に対しても有益な作用が誘導されるか否かは現在不明である。従って、LDR が糖尿病性心筋症での炎症とは別のアポトーシスや酸化ストレスをはじめとする他の病態に対して抑制作用を誘導するか否かを詳細に検討する必要がある。

LDR が糖尿病性心筋症に対し抑制作用を有することを確認するために、I型糖尿病マウスマルクを 12 週間、12.5、25、あるいは 50mGy の放射線を照射した。この結果、糖尿病マウスでは形態学的異常を伴った心肥大 (CH) や線維症を含む重大な心機能不全と心臓リモデリングがみられ、糖尿病性心筋症モデルマウスが作製されたものと確認された。興味深いことに、心筋での糖尿病性心筋症の症状は試みた線量で最も低い線量では抑制作用はみられなかつたが、中線量と高線量の LDR 照射により顕著に抑制された。なお、視覚的には 50mGy での繰り返し照射の方がより強い心臓保護効果があるようと思われたものの、中線量と高線量の LDR の抑制効果には有意差はみられなかつた。

それでは、糖尿病性心疾患に対する LDR の抑制効果にはどのようなメカニズムが存在するのか？ご存知の様に、炎症、アポトーシス及び酸化ストレスは糖尿病性心筋症の主因である。以前の研究で、25mGy の LDR 照射が糖尿病性心疾患に対して抗炎症作用示すことを明らかにした [14]。しかし、炎症は短期間の I 型糖尿病ではなく、寧ろ長期

的な I 型糖尿病で観察されたことを明らかにした [15~18]。この結果は、炎症が増強される事で後期ステージでの糖尿病性心筋症が惹起されにくいことを示唆する。LDR が糖尿病性心筋症に対する抑制作用を誘導することができた場合には、抗炎症作用より寧ろ他の防御メカニズムが有るに違いない。そこで本研究では、心筋症を炎症以外の他の病因、主としてアポトーシスと酸化的ストレスに着目し LDR の作用を検討した。心細胞のアポトーシスを TUNEL 染色とカスパー-3 の活性から検討すると、糖尿病性心筋症でアポトーシスが顕著に誘導された。しかしながら、LDR 照射はアポトーシス陽性細胞カスパー-3 活性の低下から明らかな様に、用量依存的に糖尿病誘発アポトーシスを抑制した。カスパー-3 はミトコンドリア、粗面小包体、あるいはデス受容体経路によって活性化されるエンドポイント・アポトーシスマーカーである。本研究では、Bax/Bcl 比の増加は LDR が糖尿性心筋細胞アポトーシスを部分的に抑制した事を示唆している。その理由は、ミトコンドリア経路のみが抑制された為である。しかしながら、他の二つのアポトーシス経路も LDR によって抑制されるか否かは不明である。12.5mGy ではなく、25 又は 50mGy の LDR 照射が糖尿病性心筋症での酸化ストレスを有意に抑制することを HO-1、NQO-1、CAT 及び SOD-1 を含む抗酸化物と関連している 3-NT、4-HNE 及び MDA と ROS 産生の低下から示した。これらのエビデンスに基づき、LDR の抗アポトーシスと抗酸化ストレス特性が糖尿病での LDR の心筋症抑制に関与していたことを明らかにした。

次に、糖尿病性心筋症での LDR 誘導抑制作用の背後にいるメカニズムを検討した。PI3K の作用因子である酸化 Akt はセリン/トレオニンプロテインキナーゼであり、異なる組織でも様々な細胞機能を制御する [43~45]。PI3K/Akt 情報伝達経路は心筋細胞の成長の改善や心血管新生・糖代謝を含む心筋細胞での有益な生理活性を媒介することが知られている。メカニズムに関する研究により、Akt 介在性心臓の防護作用が主としてアポトーシス及び酸化的損傷の抑制に起因することを明らかにされた [24, 46~48]。Matsui らの研究グループは Akt 活性増強が有意なインビトロでの低酸素応答アポトーシスから心筋細胞を保護することを報告した [49]。さらに、虚血/再灌流障害後の Akt 活性の改善は顕著に梗塞サイズを制限し、ドキソルビシン誘発性心機能障害をアポトーシスを阻害することで改善した [50,51]。また、ニンニクは糖尿病ラットの PI3K/AKT/Nrf2 経路の活性化を介して、心の酸化ストレスを低下させるが報告されている [24]。さらに、ヘミンは PI3K/AKT シグナリングを介して全身性高血圧のラットモデルにおける心臓酸化ストレスを減少させる [52]。私達は LDR により誘導される PI3K/AKT/GSK3B 情報伝達経路の活性化が線量依存的であることに注目し、Akt の活性化そのものが LDR 誘導心防御作用の要因であるか否かを培養細胞でのインビトロ実験で検討した。即ち、インビトロで初代心筋細胞を HG/Pal 処理し、I 型糖尿病ミニクを作製、次いで Akt-KO 細胞を作製、その後 LDR 照射した。25 及び 50mGy の LDR 照射は、何れも糖尿病性心筋症に対しほぼ同等の抑制作用を誘導したことから、最小有効線量として 25mGy を選択した。しかしながら、臨床ではより安全な線量が望ましい。本研では、Akt-KO は HG/PAL 処理した心筋細胞で LDR の抗アポトーシス及び抗酸化能誘導の抑制を介した心筋肥満と線維症抑制を阻害した。従って、私達は Akt 媒介抗アポトーシス及び抗酸化能の活性化が糖尿病に対する LDR 誘発心防御作用に寄与することを初めて実証した。

Akt が媒介する LDR の心臓防御作用は解明されていなかった為、次に Akt/MDM2/P53 情報伝達経路の活性化は抗アポトーシス作用に、また Akt/Nrf2 情報伝達経路の活性化は抗酸化作用に繋がることを念頭におき、次の研究に着手した [19, 53]。私達の動物を用いたインビボ研究では、中線量又は高線量の LDR の照射が心での P53 ネガティブ制御因子 MDM2 の発現を上昇することにより、上流に位置するアポトーシス誘引因子 p53 の活性化を顕著に抑制することを示した。一方、LDR 照射した糖尿病心 Nrf2 の核移行の増加が種々の抗酸化物質の上昇と共にみられた。これらの情報伝達経路が LDR 誘導心保護作用を媒介するのか否かについても、それぞれ MDM2 と Nrf2 の KO 心筋細胞を用いて検討した。その結果、HG/Pal 処理心筋細胞での MDM2 の KO が LDR 誘導心筋細胞肥満・線維症抑制作用を阻害する p53 活性とその後のアポトーシスを顕著に高めた。同様に、Nrf2 の KO も LDR 誘導抗酸化作用と心臓保護作用を阻害した。以上の結果より、LDR が Akt/MDM2/p53 の活性化を介したアポトーシスと AKT/Nrf2 シグナル伝達経路を介した酸化ストレスの阻害により LDR が糖尿病性心筋症を防ぐのであろうと結論した。さらに、我々は 25 及び 50mGy の LDR 照射が糖尿病マウス血糖値を顕著に低下させたことを確認した。LDR の低血糖効果が間接的に LDR 誘導糖尿病性心筋症の抑制に寄与するか否かについては、今後検討する必要がある。

高線量の電離放射線は DNA 損傷、細胞毒性及腫瘍形成 [11, 54~56] に至ることから有害であると考えられている。特に糖尿病においては、LDR 照射が種々の有益な作用を誘導することが示唆されているにも拘らず [10, 12~14]、この線量に関連する潜在的な死に至る有害リスクが盛んに議論されており、現在なお結論に至っていない。疫学的調査によれば、100mGy 以下の放射線に暴露された個体は固形がん発症の増加は無いとされている； 白血病の増加なし、心血管疾患の増加無し、そしておそらく寿命は伸びるであろう。臨床現場で使用される線量も当然無毒であると思われる。本研究では、各実験群間でマウスの血漿中の一連のがんマーカーのレベルを検討した。その結果、LDR 照射マウスの全てのこれら血漿マーカー値は健康又は糖尿病マウスと同等であり、本実験で選択した線量は安全線量であることが示唆された。しかしながら、この線量を臨床の現場で用いる際には、又 LDR の糖尿病治療での重要性を理解する為にも線量を詳細に検討する必要がある。

要約すると、糖尿病性心筋症はしばしば、心臓線維症、心筋肥大及び重篤な心不全に繋がる心機能障害を有する糖尿病患者にとって致命的な合併症である。糖尿病誘導アポトーシスと酸化ストレスはこの病理のメディエーターであると考えられており、同時にこれらのイベントを抑制する戦略は糖尿病心筋症の治療の理想的な方法かも知れない。私達のこれまでの研究では、LDR が糖尿病の初期段階での心臓損傷を防止し、この機序として炎症の阻害に起因していたことを明らかにした。また本研究で、LDR が糖尿病の後期段階で糖尿病性心筋症を防止し、この機序として、Akt 媒介 MDM2/P53 経路と Nrf2/keap1 経路を介した糖尿病誘発アポトーシスと酸化ストレスの抑制であることを示唆した。

引用文献

1. Feng B, Chen S, George B, et al. miR133a regulates cardiomyocyte hypertrophy in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010; 26: 40–49.
2. Chang SH, Liu CJ, Kuo CH, et al. Garlic oil alleviates MAPKs- and IL-6-mediated diabetes-related cardiac hypertrophy in STZ-induced DM rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 950150.
3. Cox EJ, Marsh SA. A systematic review of fetal genes as biomarkers of cardiac hypertrophy in rodent models of diabetes. *PLoS ONE.* 2014; 9: e92903.
4. Adeghate E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol Cell Biochem.* 2004; 261: 187–91.
5. van Empel VP, De Windt LJ. Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 487–99.
6. Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev.* 2002; 7: 317–25.
7. Maulik SK, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicol Mech Methods.* 2012; 22: 359–66.
8. Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 175–97.
9. Cuttler JM, Pollicove M. Nuclear energy and health: and the benefits of low-dose radiation hormesis. *Dose Response.* 2009; 7: 52–89.
10. Shao M, Yu L, Zhang F, et al. Additive protection by LDR and FGF21 treatment against diabetic nephropathy in type 2 diabetes model. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015; 309: E45–54.
11. Shao M, Lu X, Cong W, et al. Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress. *PLoS ONE.* 2014; 9: e92574.
12. Xing X, Zhang C, Shao M, et al. Low-dose radiation activates Akt and Nrf2 in the kidney of diabetic mice: a potential mechanism to prevent diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 291087.
13. Zhang C, Tan Y, Guo W, et al. Attenuation of diabetes-induced renal dysfunction by multiple exposures to low-dose radiation is associated with the suppression of systemic and renal inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297: E1366–77.
14. Zhang C, Jin S, Guo W, et al. Attenuation of diabetes-induced cardiac inflammation and pathological remodeling by low-dose radiation. *Radiat Res.* 2011; 175: 307–21.
15. Ares-Carrasco S, Picatoste B, Benito-Martín A, et al. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H2109–19.
16. Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2007; 102: 500–7.
17. Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, et al. Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in

- experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2007; 56: 1834–41.
- 18. Westermann D, Rutschow S, Jager S, et al. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes*. 2007; 56: 641–6.
 - 19. Shu X, Yang Z, Li ZH, et al. *Helicobacter pylori* infection activates the Akt-Mdm2-p53 signaling pathway in gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci*. 2015; 60: 876–86.
 - 20. Dung TD, Day CH, Binh TV, et al. PP2A mediates diosmin p53 activation to block HA22T cell proliferation and tumor growth in xenografted nude mice through PI3K-Akt-MDM2 signaling suppression. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50: 1802–10.
 - 21. Fenouille N, Puissant A, Tichet M, et al. SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. *Oncogene*. 2011; 30: 4887–900.
 - 22. Li B, Cui W, Tan Y, et al. Zinc is essential for the transcription function of Nrf2 in human renal tubule cells *in vitro* and mouse kidney *in vivo* under the diabetic condition. *J Cell Mol Med*. 2014; 18: 895–906.
 - 23. Zhang C, Lu X, Tan Y, et al. Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model. *PLoS ONE*. 2012; 7: e49257.
 - 24. Padiya R, Chowdhury D, Borkar R, et al. Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. *PLoS ONE*. 2014; 9: e94228.
 - 25. Cui W, Bai Y, Luo P, et al. Preventive and therapeutic effects of MG132 by activating Nrf2-ARE signaling pathway on oxidative stress-induced cardiovascular and renal injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 306073.
 - 26. Bai Y, Cui W, Xin Y, et al. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 57: 82–95.
 - 27. Zhang C, Huang Z, Gu J, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway. *Diabetologia*. 2015; 58: 1937–48.
 - 28. Luo J, Hill BG, Gu Y, et al. Mechanisms of acrolein-induced myocardial dysfunction: implications for environmental and endogenous aldehyde exposure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H3673–84.
 - 29. Tan Y, Li X, Prabhu SD, et al. Angiotensin II plays a critical role in alcohol-induced cardiac nitrative damage, cell death, remodeling, and cardiomyopathy in a protein kinase C/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent manner. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59: 1477–86.
 - 30. Cai L, Wang Y, Zhou G, et al. Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 1688–97.
 - 31. Cai L, Li W, Wang G, et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes*. 2002; 51: 1938–48.
 - 32. Cai L, Wang J, Li Y, et al. Inhibition of superoxide generation and associated nitrosative damage is involved in metallothionein prevention of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2005; 54: 1829–37.

33. Zhang Y, Wei L, Sun D, et al. Tanshinone IIA pretreatment protects myocardium against ischaemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in diabetic rats. *Diabetes Obes Metab.* 2010; 12: 316–22.
34. Whittington HJ, Harding I, Stephenson CI, et al. Cardioprotection in the aging, diabetic heart: the loss of protective Akt signalling. *Cardiovasc Res.* 2013; 99: 694–704.
35. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972; 30: 595–602.
36. Wang Y, Sun W, Du B, et al. Therapeutic effect of MG-132 on diabetic cardiomyopathy is associated with its suppression of proteasomal activities: roles of Nrf2 and NF-kappaB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 304: H567–78.
37. Guan SJ, Ma ZH, Wu YL, et al. Long-term administration of fasudil improves cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50: 1874–82.
38. Cai L. Research of the adaptive response induced by low-dose radiation: where have we been and where should we go? *Hum Exp Toxicol.* 1999; 18: 419–25.
39. Cai L, Liu SZ. Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells *in vivo* and *in vitro* by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1990; 58: 187–94.
40. Liu G, Gong P, Bernstein LR, et al. Apoptotic cell death induced by low-dose radiation in male germ cells: hormesis and adaptation. *Crit Rev Toxicol.* 2007; 37: 587–605.
41. Jiang H, Li W, Li X, et al. Low-dose radiation induces adaptive response in normal cells, but not in tumor cells: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Radiat Res.* 2008; 49: 219–30.
42. Jiang H, Xu Y, Li W, et al. Low-dose radiation does not induce proliferation in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Radiat Res.* 2008; 170: 477–87.
43. Chaanine AH, Hajjar RJ. AKT signalling in the failing heart. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13: 825–9.
44. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res.* 2002; 90: 1243–50.
45. Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* 2006; 20: 3347–65.
46. Zhou S, Yin X, Zheng Y, et al. Metallothionein prevents intermittent hypoxia-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death likely via activation of Akt signaling pathway in mice. *Toxicol Lett.* 2014; 227: 113–23.
47. Tan Y, Li Y, Xiao J, et al. A novel CXCR4 antagonist derived from human SDF-1beta enhances angiogenesis in ischaemic mice. *Cardiovasc Res.* 2009; 82: 513–21.
48. Wang M, Sun GB, Zhang JY, et al. Elatoside C protects the heart from ischaemia/reperfusion injury through the modulation of oxidative stress and intracellular Ca(2)(+) homeostasis. *Int J Cardiol.* 2015; 185: 167–76.
49. Matsui T, Li L, del Monte F, et al. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes *in vitro*. *Circulation.* 1999; 100: 2373–9.
50. Matsui T, Tao J, del Monte F, et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia *in vivo*. *Circulation.* 2001; 104: 330–5.

51. Taniyama Y, Walsh K. Elevated myocardial Akt signaling ameliorates doxorubicin-induced congestive heart failure and promotes heart growth. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 1241–7.
52. Worou ME, Belmokhtar K, Bonnet P, et al. Hemin decreases cardiac oxidative stress and fibrosis in a rat model of systemic hypertension via PI3K/Akt signalling. *Cardiovasc Res.* 2011; 91: 320–9.
53. Han CT, Schoene NW, Lei KY. Influence of zinc deficiency on Akt-Mdm2-p53 and Akt-p21 signaling axes in normal and malignant human prostate cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297: C1188–99.
54. Pinar B, Lara PC, Lloret M, et al. Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. *Radiat Res.* 2007; 168: 415–22.
55. Hellman B, Brodin D, Andersson M, et al. Radiation-induced DNA-damage and gene expression profiles in human lung cancer cells with different radiosensitivity. *Exp Oncol.* 2005; 27: 102–7.
55. Popanda O, Ebbeler R, Twardella D, et al. Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003; 55: 1216–25.