

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.02.0157

· 论 著 ·

血清剥夺抑制心肌细胞增殖、促进凋亡及对 P53 和 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

周思维^{1△}, 王宇^{1△}, 左权², 赵峰¹, 王鹏贺¹, 张莎¹, 朱霓¹, 赵仙先¹, 吴弘^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院心血管内科, 上海 200433

2. 上海中冶医院心血管内科, 上海 200941

[摘要] **目的** 研究血清剥夺对心肌细胞增殖和凋亡的影响及其机制。**方法** 将人心肌细胞 AC16 分为血清剥夺组(细胞在无胎牛血清的 DMEM 培养液中培养 48 h)、对照组(细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养 48 h)。采用 CCK-8 法检测心肌细胞活力, EdU 实验法检测细胞 DNA 合成水平, 流式细胞术检测细胞凋亡水平及线粒体膜电位变化, 蛋白质印迹分析检测心肌细胞中 caspase-9、Bcl-2、P53、增殖细胞核抗原(PCNA)、cyclin D1、 β -连环蛋白(β -catenin)、Wnt5a、Axis 抑制蛋白 1(Axin1)、蓬乱蛋白 2(Dvl2)、蓬乱蛋白 3(Dvl3)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 6(LRP6)的表达水平。**结果** CCK-8 实验结果显示对照组的光密度值为 1.93 ± 0.01 , 血清剥夺组的光密度值为 1.08 ± 0.08 , 后者为前者的 55.8%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 细胞 DNA 合成受到抑制, 血清剥夺组细胞 DNA 合成水平下降为对照组的 65.6%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清剥夺诱导了心肌细胞的凋亡, 对照组凋亡率为 $(6.34 \pm 0.47)\%$, 血清剥夺组凋亡率为 $(56.83 \pm 1.90)\%$, 后者为前者的 8.9 倍, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 血清剥夺组心肌细胞线粒体膜电位下降, 但与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白质印迹分析结果显示, 血清剥夺促进了心肌细胞中 caspase-9 蛋白的表达, 同时抑制了心肌细胞中 Bcl-2、P53、PCNA、cyclin D1 蛋白的表达; 血清剥夺抑制了心肌细胞中 β -catenin、Wnt5a、Axin1、Dvl2、Dvl3、LRP6 蛋白的表达。**结论** 血清剥夺可抑制心肌细胞增殖并促进细胞凋亡, 其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

[关键词] 心肌缺血; 心肌细胞; 血清剥夺; 细胞凋亡; Wnt/ β -catenin 信号通路

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)02-0157-05

Serum deprivation inhibits cardiomyocyte proliferation, promotes apoptosis and affects P53 and Wnt/ β -catenin signaling pathways

ZHOU Si-wei^{1△}, WANG Yu^{1△}, ZUO Quan², ZHAO Feng¹, WANG Peng-he¹, ZHANG Sha¹, ZHU Ni¹, ZHAO Xian-xian¹, WU Hong^{1*}

1. Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Cardiovasology, Shanghai Zhongye Hospital, Shanghai 200941, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of serum deprivation on proliferation and apoptosis of cardiomyocytes and its mechanisms. **Methods** Human cardiomyocytes AC16 were randomly divided into serum-deprivation group (the cells were cultured in DMEM medium without fetal bovine serum for 48 h) and control group (the cells were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum for 48 h). CCK-8 assay was performed to test the proliferation ability, and EdU imaging was conducted to detect the DNA synthesis level. Flow cytometry was performed to analyze the apoptosis level and mitochondrial membrane potential. Western blotting was conducted to detect the protein expression levels of caspase-9, Bcl-2, P53, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cyclin D1, β -catenin, Wnt5a, Axis inhibition protein 1 (Axin1), dishevelled 2 (Dvl2), dishevelled 3 (Dvl3) and low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6). **Results** CCK-8 assay showed that the optical density value of the control group was 1.93 ± 0.01 and that of the serum-deprivation group was 1.08 ± 0.08 ,

[收稿日期] 2018-11-05 **[接受日期]** 2019-01-25

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研项目(201540217). Supported by Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201540217).

[作者简介] 周思维, 硕士生. E-mail: siweizhou355@163.com; 王宇, 硕士生. E-mail: 1016793440@qq.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161248, E-mail: doctorwh666@126.com

which was 55.8% of the control group, and there was significant difference between the two groups ($P < 0.01$). DNA synthesis was inhibited by serum deprivation, and the DNA synthesis level of the serum-deprivation group was 65.6% of the control group, with significant difference found between the two groups ($P < 0.05$). Serum deprivation could induce cardiomyocyte apoptosis; the apoptotic rate of control group was $(6.34 \pm 0.47) \%$, and that of serum-deprivation group was $(56.83 \pm 1.90) \%$, which was 8.9 times of the control group, and there was significant difference between the two groups ($P < 0.05$). Serum deprivation could decrease the mitochondrial membrane potential of cardiomyocytes, while there was no significant difference between the serum-deprivation and control groups ($P > 0.05$). Western blotting analysis showed that serum deprivation could upregulate the protein expression of caspase-9 and downregulate the protein expression of Bcl-2, P53, PCNA and cyclin D1. Serum deprivation could inhibit the protein expression of β -catenin, Wnt5a, Axin1, Dvl2, Dvl3 and LRP6 in cardiomyocytes.

Conclusion Serum deprivation can inhibit proliferation and induce apoptosis of cardiomyocytes, which may be mediated by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Key words] myocardial ischemia; cardiomyocytes; serum deprivation; apoptosis; Wnt/ β -catenin signaling pathway

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(2): 157-161]

缺血性心肌病是威胁人类健康的主要原因, 心肌缺血可导致心肌细胞凋亡, 研究显示心肌细胞凋亡参与了心肌梗死后心室重构、心功能不全^[1], 而抑制心肌细胞凋亡可改善心肌梗死后心功能不全^[2]。细胞凋亡受包括 P53 和线粒体信号通路在内的多种信号通路的调控^[3]。既往研究显示 Wnt/ β -catenin 信号通路在心脏疾病中起重要作用, 在血管紧张素 II 诱导的心肌肥厚模型中, *Wnt1*、*Wnt2*、*Wnt2b*、*Wnt3*、*Wnt3a*、*Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt9a*、 β -连环蛋白 (β -catenin) 的 mRNA 表达水平均升高, 提示 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活^[4]。然而, 关于 P53 及 Wnt/ β -catenin 信号通路在心肌缺血环境下的变化尚不完全清楚。本研究应用 CCK-8 法、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 实验检测血清剥夺对心肌细胞增殖的影响, 应用流式细胞术检测血清剥夺对心肌细胞凋亡及线粒体膜电位的影响, 应用蛋白质印迹法检测血清剥夺对心肌细胞中 P53 及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响, 以揭示血清剥夺对心肌细胞增殖和凋亡的影响及可能的机制, 为寻找干预心肌缺血的靶点提供可能的方向。

1 材料和方法

1.1 细胞培养与实验分组 人心肌细胞 AC16 由海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院心血管内科实验室提供, 用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养液在培养箱中贴壁传代培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。待细胞达到 85% 融合后, 用胰酶消化, 将细胞分为血清剥

夺组 (细胞在无 FBS 的 DMEM 培养液中培养)、对照组 (细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养液中培养) 并继续培养 48 h。

1.2 试剂 CCK-8 细胞活性检测试剂盒、EdU 细胞增殖检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒均购自碧云天生物技术公司。 β -Actin、caspase-9、Bcl-2、P53、 β -catenin 抗体均购自碧云天生物技术公司。增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、cyclin D1、Wnt5a、Axis 抑制蛋白 1 (Axis inhibition protein 1, Axin1)、蓬乱蛋白 2 (dishevelled 2, Dvl2)、蓬乱蛋白 3 (dishevelled 3, Dvl3)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 6, LRP6) 抗体均购自美国 Cell Signaling 公司。FBS 购自美国 Gibco 公司。

1.3 CCK-8 法检测细胞生长活力 细胞达到 85% 融合后, 胰酶消化、计数, 以每孔 8×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板并继续培养 24 h。血清剥夺组于无 FBS 的 DMEM 培养液中继续培养 48 h, 对照组于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中继续培养 48 h。处理结束后, 吸除原来培养液, 每孔加入用 DMEM 配制的 CCK-8 溶液 100 μ L 并继续于培养箱中孵育 2 h, 孵育结束后用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度 (*D*) 值。

1.4 EdU 实验检测细胞增殖及 DNA 合成 按照 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书进行操作。以每孔 3×10^4 个细胞的密度将细胞接种于 24 孔板并继续培养 24 h, 再经血清剥夺或正常培养 48 h,

然后加入 20 $\mu\text{mol/L}$ EdU 工作液并于室温下继续孵育 2 h, 4% 多聚甲醛室温下固定 15 min, 加入 200 μL Click 反应液室温避光孵育 30 min, 最后用 Hoechst33342 染料进行细胞核染色, 荧光显微镜下拍照。采用 ImageJ 软件计算 EdU 阳性细胞百分比。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 以每孔 2×10^5 个细胞的密度将细胞接种于 6 孔板并继续培养 24 h。细胞经血清剥夺或正常培养 48 h 后, 按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行标记、室温避光孵育 20 min, 然后用流式细胞仪 (CytoFLEX, 美国 Beckman Coulter 公司) 完成细胞凋亡水平的检测。

1.6 流式细胞术检测血清剥夺对线粒体膜电位影响 以每孔 2×10^5 个细胞的密度将细胞接种于 6 孔板并继续培养 24 h。细胞经血清剥夺或正常培养 48 h 后, 吸除培养液, 加入 1 mL JC-1 染色工作液继续于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 20 min, 然后用流式细胞术检测、分析线粒体膜电位水平。

1.7 蛋白质印迹分析 用 RIPA 溶液提取细胞蛋白并行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经转膜、封闭等处理后, 加入一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜孵育, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, 显色并拍照。用 ImageJ 软件量化分析条带灰度, 以目的蛋白与内参蛋白的灰度值的比值代表蛋白相对表达量。

1.8 统计学处理 应用 GraphPad 软件进行统计学分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两样本 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 血清剥夺对人心肌细胞 AC16 增殖及 DNA 合成的影响 人心肌细胞 AC16 经血清剥夺或正常培养 48 h 后, CCK-8 实验结果显示, 对照组 D 值为 1.93 ± 0.01 , 血清剥夺组 D 值为 1.08 ± 0.08 , 后者是前者的 55.8%, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。人心肌细胞 AC16 经血清剥夺或正常培养 48 h 后, EdU 实验检测结果见图 1。经 ImageJ 软件分析, 对照组 EdU 阳性细胞百分比为 $(16.15 \pm 1.52)\%$, 血清剥夺组 EdU 阳性细胞百分比为 $(10.61 \pm 0.21)\%$, 血清剥夺组 DNA 合成水平下降为对照组的 65.6%, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

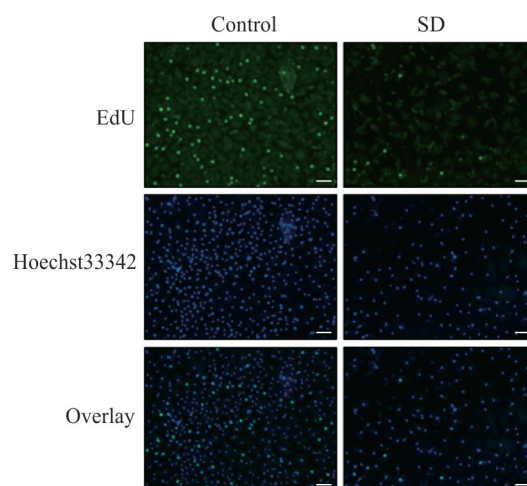


图 1 血清剥夺对人心肌细胞 AC16 DNA 合成的影响

Fig 1 Influence of serum deprivation on DNA synthesis of human cardiomyocytes AC16

SD: Serum-deprivation group. Scale bar=100 μm

2.2 血清剥夺对人心肌细胞 AC16 凋亡的影响 人心肌细胞 AC16 经血清剥夺或正常培养 48 h 后, 流式细胞术分析结果显示血清剥夺组细胞凋亡水平升高, 其中对照组的细胞凋亡率为 $(6.34 \pm 0.47)\%$, 血清剥夺组的细胞凋亡率为 $(56.83 \pm 1.90)\%$, 后者是前者的 8.9 倍, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2。

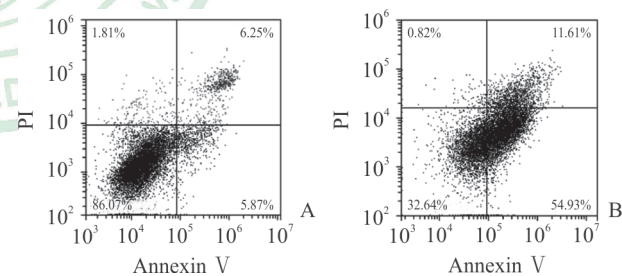


图 2 流式细胞术检测血清剥夺对人心肌细胞 AC16 凋亡的影响

Fig 2 Influence of serum deprivation on apoptosis of human cardiomyocytes AC16 by flow cytometry

A: Control group; B: Serum-deprivation group. PI: Propidium iodide

2.3 血清剥夺对人心肌细胞 AC16 线粒体膜电位的影响 人心肌细胞 AC16 经血清剥夺或正常培养 48 h 后, 对照组中高线粒体膜电位细胞百分比为 $(65.25 \pm 1.45)\%$, 血清剥夺组高线粒体膜电位细胞百分比为 $(54.97 \pm 4.33)\%$, 血清剥夺组心肌细胞线粒体膜电位下降, 但两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。流式细胞术检测结果见图 3。

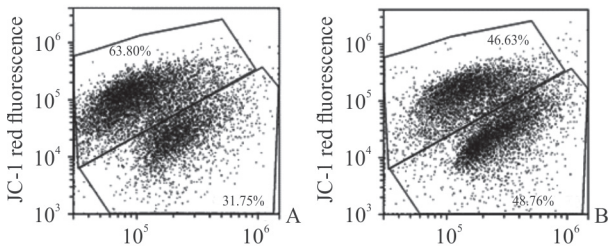


图3 流式细胞术检测血清剥夺对人心肌细胞 AC16 线粒体膜电位的影响

Fig 3 Influence of serum deprivation on mitochondrial membrane potential of human cardiomyocytes AC16 by flow cytometry

A: Control group; B: Serum-deprivation group

2.4 血清剥夺对人心肌细胞 AC16 中 P53 信号通路的影响 人心肌细胞 AC16 经血清剥夺或正常培养 48 h 后,与对照组比较,血清剥夺组 caspase-9 蛋白表达水平升高了 32.4% (0.58 ± 0.01 vs 0.44 ± 0.01 , $P < 0.01$)、Bcl-2 蛋白表达水平降低了 44.4% (0.15 ± 0.01 vs 0.28 ± 0.01 , $P < 0.05$),同时血清剥夺导致 P53 蛋白表达水平降低了 29.7% (0.55 ± 0.02 vs 0.78 ± 0.03 , $P < 0.05$)、PCNA 蛋白表达水平降低了 42.1% (0.39 ± 0.01 vs 0.68 ± 0.01 , $P < 0.01$)、cyclin D1 蛋白表达水平降低了 40.1% (0.44 ± 0.01 vs 0.74 ± 0.01 , $P < 0.01$)。见图 4。结果提示血清剥夺可诱导人心肌细胞 AC16 凋亡并抑制 P53 信号通路。

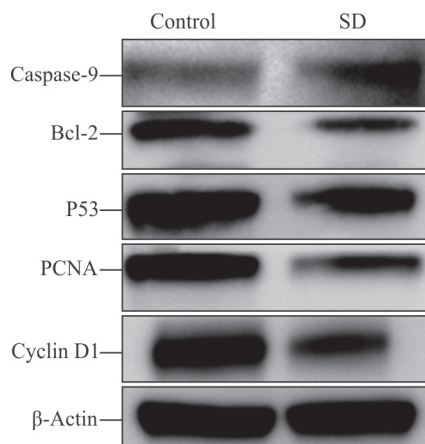


图4 蛋白质印迹分析检测血清剥夺对人心肌细胞 AC16 中 P53 信号通路的影响

Fig 4 Influence of serum deprivation on P53 signaling pathway in human cardiomyocytes AC16 by Western blotting
SD: Serum-deprivation; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

2.5 血清剥夺对人心肌细胞 AC16 中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 人心肌细胞 AC16 经血清剥夺或正常培养 48 h 后,与对照组比较,血清剥夺组心肌细胞中 β -catenin 蛋白表达水平降低了 48.6% (0.49 ± 0.01 vs 0.96 ± 0.02 , $P < 0.01$)、Wnt5a 蛋白表达水平降低了 21.8% (0.43 ± 0.02 vs 0.55 ± 0.01 , $P < 0.05$)、Axin1 蛋白表达水平降低了 52.9% (0.39 ± 0.02 vs 0.83 ± 0.04 , $P < 0.05$)、Dvl2 蛋白表达水平降低了 54.3% (0.38 ± 0.01 vs 0.84 ± 0.01 , $P < 0.01$)、Dvl3 蛋白表达水平降低了 52.9% (0.40 ± 0.02 vs 0.86 ± 0.01 , $P < 0.01$)、LRP6 蛋白表达水平降低了 32.9% (0.68 ± 0.03 vs 1.01 ± 0.01 , $P < 0.05$)。见图 5。结果提示血清剥夺可抑制人心肌细胞 AC16 中 Wnt/ β -catenin 信号通路。

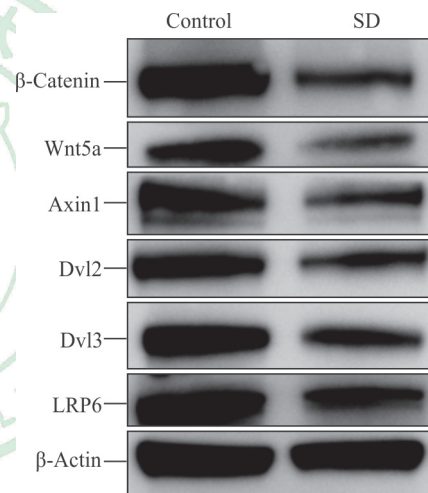


图5 蛋白质印迹分析检测血清剥夺对人心肌细胞 AC16 中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

Fig 5 Influence of serum deprivation on Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cardiomyocytes AC16 by Western blotting

SD: Serum-deprivation; Axin1: Axis inhibition protein 1; Dvl2: Dishevelled 2; Dvl3: Dishevelled 3; LRP6: Low-density lipoprotein receptor-related protein 6

3 讨论

既往研究显示心肌细胞凋亡在多种心脏疾病中起重要作用,包括心肌梗死、心功能不全等^[1,5]。Caspase 家族蛋白在细胞凋亡过程中发挥重要作用,caspase 家族蛋白主要以酶原的形式存在,激活后的 caspase 家族蛋白如激活后的 caspase-9 可引起 caspase 级联反应,进而水解蛋白底物,引起细

胞凋亡^[6]。Bcl-2 蛋白可抑制细胞凋亡,当其表达降低时促进细胞凋亡。本研究应用血清剥夺模拟心肌缺血,经流式细胞术检测证实血清剥夺 48 h 后诱导了心肌细胞的凋亡。蛋白质印迹分析显示,血清剥夺促进了 caspase-9 蛋白的表达,同时降低了 Bcl-2 蛋白的表达,进一步证实血清剥夺诱导了心肌细胞的凋亡。

细胞凋亡受多种信号通路的调控,线粒体介导的凋亡、死亡受体介导的凋亡、内质网介导的凋亡均在凋亡调控中起重要作用^[1]。本研究中,血清剥夺降低了心肌细胞的线粒体膜电位,表明血清剥夺可能导致心肌细胞线粒体功能紊乱。Bonavita 等^[7]研究显示,缺氧、营养因子缺乏可导致心肌细胞线粒体膜电位降低、线粒体功能紊乱,与本研究结果一致。P53 信号通路在细胞凋亡中同样起重要调控作用,多种损伤因素可促进 P53 的表达,并进一步促进 Bcl-2 家族中促凋亡蛋白的表达,最终促进 caspase-9 等蛋白的表达并启动凋亡^[7]。本研究中,蛋白质印迹分析发现血清剥夺导致 P53 蛋白表达的降低,表明血清剥夺抑制了心肌细胞中 P53 信号通路,提示血清剥夺诱导的凋亡可能通过 P53 以外的信号通路进行调控,血清剥夺诱导心肌细胞凋亡的确切机制需进一步探究。

本实验中,CCK-8 及 EdU 实验发现血清剥夺抑制了心肌细胞的活力及 DNA 合成,蛋白质印迹分析发现血清剥夺导致细胞中 PCNA 蛋白表达下降,提示血清剥夺抑制了心肌细胞增殖。哺乳动物 Wnt 信号通路由 19 种 Wnt 蛋白配体、10 种 Fzd 受体和两种 LRP 受体组成,既往研究显示 Wnt 信号通路在细胞分化、增殖、凋亡过程中具有重要作用^[8-9]。已有研究显示,激活小鼠胚胎心肌中 Wnt/ β -catenin 信号通路可通过激活下游信号分子 cyclin D2 促进小鼠胚胎心肌细胞增殖,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路则可抑制小鼠胚胎心肌细胞增殖^[10]。不同的刺激因素对心肌细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响不同。本实验发现,经血清剥夺处理 48 h 后,心肌细胞 β -catenin 蛋白的表达降低,同时 Wnt/ β -catenin 信号通路下游的靶分子 cyclin D1 蛋白的表达受到抑制,血清剥夺也抑制了 β -catenin 上游 Wnt5a 细胞膜配体蛋白及 LRP6 细胞膜受体蛋白的表达,此外 Dvl2、Dvl3、Axin1 蛋白表达也受到了抑制,表明血清剥夺抑制

了心肌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路,提示血清剥夺抑制心肌细胞增殖可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

综上所述,在血清剥夺模拟心肌细胞缺血模型中,血清剥夺抑制了心肌细胞增殖并诱导细胞凋亡,同时血清剥夺抑制了心肌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路,血清剥夺对心肌细胞增殖的抑制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,提示 Wnt/ β -catenin 信号通路可作为干预心肌缺血的潜在靶点。但血清剥夺诱导心肌细胞凋亡的确切调控机制仍不清楚,需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] TERINGOVA E, TOUSEK P. Apoptosis in ischemic heart disease[J/OL]. *J Transl Med*, 2017, 15: 87. doi: 10.1186/s12967-017-1191-y.
- [2] LUO K, LONG H B, XU B C. Reduced apoptosis after acute myocardial infarction by simvastatin[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71: 735-740.
- [3] ULUKAYA E, ACILAN C, YILMAZ Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology?[J]. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29: 468-480.
- [4] ZHAO Y, WANG C, WANG C, HONG X, MIAO J, LIAO Y, et al. An essential role for Wnt/ β -catenin signaling in mediating hypertensive heart disease[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 8996-9010.
- [5] ANDREKA P, NADHAZI Z, MUZES G, SZANTHO G, VANDOR L, KONYA L, et al. Possible therapeutic targets in cardiac myocyte apoptosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10: 2445-2461.
- [6] 易铁男,周云峰,伍钢. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展[J]. *国外医学:肿瘤学分册*, 2001, 28: 39-42.
- [7] BONAVITA F, STEFANELLI C, GIORDANO E, COLUMBARO M, FACCHINI A, BONAFÈ F, et al. H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA[J]. *FEBS Lett*, 2003, 536: 85-91.
- [8] COHEN E D, TIAN Y, MORRISEY E E. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal[J]. *Development*, 2008, 135: 789-798.
- [9] YE X, LIN J, LIN Z, XUE A, LI L, ZHAO Z, et al. Axin1 up-regulated 1 accelerates stress-induced cardiomyocytes apoptosis through activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359: 441-448.
- [10] YE B, HOU N, XIAO L, XU Y, BOYER J, XU H, et al. APC controls asymmetric Wnt/ β -catenin signaling and cardiomyocyte proliferation gradient in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt B): 287-296.

[本文编辑] 尹 茶