TNF- α 유발 심근비대세포의 AICAR 및 SIRT1 activator 처치 후 Traf2와 SIRT1 발현 변화*

김기진**1) · 안나영¹⁾ · 김상현²⁾

1) 계명대학교 2) 전북대학교

ABSTRACT

Kijin Kim · Nayoung Ahn · Sanghyun Kim. Changes of Traf2 and SIRT1 Expression by AICAR and SIRT1 Activator in TNF- α -induced Cardiac Hypertrophy. *The Journal of Kinesiology*, 2017, 19(3): 71-81. **[PURPOSE]** The study was aimed to identify the effects of Traf2 and SIRT1 on Akt acetylation and autophagy in cardiac hypertrophy. **[METHODS]** We analyzed the effects of diet and exercise intervention on cardiac hypertrophy and the underlying mechanisms of TNF- α /Traf2/SIRT1 through Akt-FOXO pathway. **[RESULTS]** A significant up-regulation of Traf2 expression and down-regulation of SIRT1 were observed as the increase of TNF- α in cardiomyocytes. By the significant deacetylation of FOXO1 in 50 μ M resveratrol treated group, we can suppose that FOXO1 is activated by SIRT1 in cardiomyocytes. Positive effects of exercise intervention remarkably inhibited the up-regulation of Traf2 expression and Akt acetylation in cardiac hypertrophy. However we could not confirm either a higher depression in Akt acetylation or the activation of FOXO1 by the SIRT1 activation. **[CONCLUSION]** The present study demonstrated that Traf2 served as an important mediator that enhanced cardiac hypertrophy by activating AKT pathway, and the positive effects of exercise training on the inhibition of Traf2 in cardiac hypertrophy.

Key words : obesity, cardiac hypertrophy, Traf2, SIRT1, akt pathway

주요어 : 비만, 심근비대, Traf2, SIRT1, akt 회로

서론

비만은 심장의 지방산 산화 변화(Feuvray & Darmellah, 2008), 심장세포의 산소소비량 증가(Boudina & Abel, 2006), 산화스트레스 유발(Dong et al., 2007), 심장세포의 Ca²⁺ 조절이상(Lima-Leopoldo et al., 2008), 인슐린저항성(Ouwens et al., 2005) 및 염증성 사이토카인 분비 증가(Thaik et al., 1995; Yokoyama et al., 1997; Smeets et al., 2008) 등에 의한 심장비대 및 심장기능의 부정적인 영향을 초래한다(Levy et al., 1990; Eckel et al., 2002; Sowers, 2003; Li et al., 2006). 이러한 심장의 구조 및 기능 이상은 단백질 합성의 중추적인 역할을 담당하는 Akt 기전과 관련되어 있으나 상, 하위 정확한 기전은 여전히 불분명하다. 심장의 병적비대와 관련된 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 수용체와 상호작용하는 tumor

necrosis factor receptor-associated factor 2(Traf2)(Jono et al., 2004; Ermolaeva et al., 2008; Shih et al., 2011)는 심장의 병적비대에 핵심적인 역할을 하는 Akt signaling을 활성화시키는 중요한 매개체인 것으로 보고되었다(Huang et al., 2014).

Silent information regulator-1(SIRT1)은 세포생존, 세포사멸(apoptosis) 및 자식작용(autophagy)을 조절하며(Li et al., 1997), FOXO를 탈아세틸화(deacetylation)하여 활성화를 증가시킨다(Zhao et al., 2007; Mammucari et al., 2007; Sengupta et al., 2009). 고지방식이 섭취에 의한 SIRT1의 활성화 감소는 Akt의 활성화를 감소시키기 때문에 심장비대를 방지할 수 있는 것으로 간주될 수 있으나 고지방식이섭취는 심장의 병적비대를 유도하며(Fang et al., 2008; Turdi et al., 2011), 심장비대가 진행되는 동안 SIRT1은 Akt의 활성화를 오히려 증가시키는 것으로 알려져 있다

* 이 논문은 2015년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2015S1A5A2A01012213)

** 교신저자: kjk744@kmu.ac.kr

(Sundaresan et al., 2011). 뿐만 아니라 감소된 SIRT1의 활성화는 FOXO 전이효소의 활성화를 감소시킬 수 있기 때문에 자식작용을 통한 심장의 정상적인 발달에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 이와 같이 고지방식이 섭취에 의한 심장비대에 SIRT1이 어떤 기전을 통해서 역할을 수행하는지는 여전히 정확하게 밝혀지지 않고 있다(Figure 1). 이러한 관점에서 비만에 의한 심장의 부정적인 영향을 방지하기 위해서 널리 이용되고 있는 운동과 식이요법이 어떤 기전을 통해 효과를 나타내는가를 정확히 분석할 필요성이 있다.

Figure 1. Hypothesis of cardiac hypertrophy through Traf2/SIRT1-Akt mechanism by high fat diet-induced inflammation(IRS: insulin receptor substrate, TNF- α : tumor necrosis factor- α , mTOR: mammalian target of rapamycin, FOXO: Forkhead Box O, Traf2: TNF receptor associated factor 2, SIRT1: sirtuin1)

이에 본 연구는 심장비대과정에서 핵심적인 역할을 담당하는 것으로 보고된 Traf2와 SIRT1이 Akt를 통한 단백질 합성과 자식작용에 영향을 미치는 세부적인 기전을 규명하기 위하여 심근세포를 이용한 in vitro 실험을 통해서 TNF- α /Traf2/SIRT1에 의한 단백질 합성(Akt pathway)과 자식작용(FOXO pathway)에 따른 심장비대 기전을 명확하게 확인하고, 심장비대를 개선하기 위한 식이조절과 운동의 효과를 확인하였다.

연구방법

심근세포(HL-1 cell)를 이용한 in vitro 실험을 통해서 TNF- α /Traf2/SIRT1에 의한 단백질 합성(Akt

pathway)과 자식작용(FOXO pathway)에 따른 심장비대 기전을 확인하고, 심장비대를 개선하기 위한 식이조절과 운동의 효과를 확인하였다.

세포배양

생쥐 심장근 세포인 HL-1(Invitrogen, USA)을 Claycomb medium(87% Claycomb medium, 10% FBS, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.1mM norepinephrine, 2mM L-glutamine)으로 37 $^{\circ}$ C와 5% CO $_2$ 가 공급되는 cell incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교환하였으며, 약 70%정도 confluence되었을 때 실험목적에 따라 6-well plate 등으로 분할하였다. TNF- α 가 Traf2와 SIRT1과 상호작용 하는가를 분석하기 위해서 TNF- α (Sigma, #T7539, USA)를 6 well plate에 배양된 HL-1 세포에 각각 Con, 10, 20, 40ng/ml 등으로 처리한 후 24시간 후 PBS로 2회 세척하고 cell lysis buffer를 이용하여 수확 후 TNF- α 의 농도에 따른 Traf2와 SIRT1의 발현정도의 차이를 분석하였다.

SIRT1 construct 및 세포내 과발현

SIRT1 과 발현(SIRT1 WT)과 활성억제(SIRT1 G261A)를 위한 construct는 현재 보유중인 것을 사용하였다. SIRT1 construct 제작을 위해서 pAd-Track Flag-SIRT1과 pCruzHA SIRT1 G261A를 구입하였으며(Addgene, USA), 구입한 E.coli는 kanamycin이 포함된 aga-plate에 골고루 펴 바른 후 37 $^{\circ}$ C incubator에서 밤새도록 배양하며, 배양된 aga-plate에서 하나의 colony를 골라 4ml의 LB broth와 100 μ g/ml의 kanamycin을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 배양하였다. 배양 후 plasmid mini-prep kit(Qiagen, USA)으로 plasmid DNA를 정제하며, 정제된 HEK293A 세포에 이입(transfection) 한 후 Flag과 HA 단백질의 발현이 확인된 plasmid는 plasmid maxi-prep kit(Qiagen, USA)을 이용하여 plasmid DNA를 충분히 확보된 SIRT1-WT과 SIRT1-G261A는 SIRT1이 Akt와 FOXO1의 활성을 조절하는가를 확인하기 위해서 lipofectamine(Invitrogen, USA)을 이용하여 배양된 HL-1 세포에 이입하였다.

Figure 2. Traf2 & SIRT1 responses with TNF- α dose concentrations(A) and treatment time(B)

Western blot

Lysis buffer(#89900, Thermo Scientific)를 이용하여 수확된 세포를 10분간 원심분리(1500g, 4°C)한 후 상층액 획득한 후 단백질을 Lowry et al.(1951)의 방법에 의해 정량분석 하였다. 정량분석 후 시료를 전기영동과 membrane 전이 후 항체 처리하여 단백질 발현량 분석을 위한 band 시각화(SigmaGel 이용)를 실시하였다. Immunoblotting에서 이용한 일차항체는 Traf2(Santa Cruz), SIRT1(Millipore), p-Akt, acetylated Akt, Akt, p-mTOR, mTOR, p-FOXO1, acetylated FOXO1, FOXO1(Cell Signaling) 등을 이용하여 분석하였다.

자료처리

본 연구의 자료는 각 측정항목에 대한 결과는 SPSS 18.0 통계프로그램을 이용하여 처치항목별로 처치농도와 시간경과 등에 따른 차이를 검증하기 위해서 one-way ANOVA를 실시하고, 사후검정은 Tukey법을 이용하였으며, 통계적 유의수준은 $\alpha=0.05$ 로 하였다.

결과

TNF- α /Traf2/SIRT1을 통한 심장비대

TNF- α 가 최근 심장비대에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Traf2와 SIRT1과 상호작용 하는가를 분석하기 위해서 Traf2와 SIRT1의 발현정도가 TNF- α 의 농도에 의존하여 차이를 나타내는가를 분석한 결과는 <Figure 2A>와 같다. 심근세포에서 TNF- α 농도의 증가에 따라서 tumor necrosis factor receptor-associated factor 2(Traf 2)가 현저하게 증가함으로써 활성화 시키는 상호작용을 확인할 수 있었다. 또한 TNF- α 농도의 증가에 따라서 SIRT1의 농도가 낮게 나타남으로서 억제되는 상호작용을 나타냈다. 심근세포에서 TNF- α 의 특정 농도인 20 ng/ml로 처리하여 SIRT1의 농도를 분석한 결과 배양시간 경과에 따라서 그 농도가 둔화됨으로서 역시 억제시키는 작용을 확인할 수 있었다 <Figure 2B>.

Figure 3. Validity of RSV effects instead of SIRT construct(A: FOXO1 response to resveratrol & nicotinamide, B: Comparison of Akt and FOXO1 between control and resveratrol)

Akt와 FOXO1에 대한 SIRT1의 역할

TNF- α 와 상관없이 SIRT1 자체가 심장비대에는 어떤 영향을 미치는가를 확인할 필요가 있다. 이에 resveratrol(SIRT1 activator)과 nicotinamide(NAA; SIRT1 inhibitor)가 SIRT1의 활성 조절하는 가를 알아보기 위해 SIRT1의 target protein인 FOXO1의 acetylation 정도를 분석하였다(Figure 3A). 또한 Control그룹과 Resveratrol 처리그룹으로 구분하여 Akt 인산화와 FOXO1 인산화를 분석한 결과는 <Figure 3B>와 같다. Control 그룹 및 10 mM nicotinamide 처리그룹과 비교한 결과 50 μ M Resveratrol 처리그룹이 현저하게 FOXO1을 deacetylation 시키는 것으로 나타남으로서 심근세포에서 SIRT1이 FOXO1을 활성화시키는 것으로 간주되었다. 또한 Control 그룹과 비교한 결과 50 μ M Resveratrol 처리그룹이 현저하게 Akt 인산화를 둔화시키며, FOXO1의 인산화를 증가시키는 것으로 간주되었다.

TNF- α 에 의해 유도된 심장비대 개선을 위한 식이조절과 운동의 효과검증

고지방식은 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인을 증가시킴(Yang et al., 2012)에 근거한 TNF- α 처리, 운동과 식이요법의 효과를 분석하기 위해서 세포로 유입된 후 AMP analog인 ZMP로 전이되고 AMPK를 자극하여 운동효과 유발항목(Börgeson, et al., 2017; Manio et al., 2016)으로 널리 알려진 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside(AICAR) 처리 및 SIRT1 차단 조건 등을 부과하여 Traf2, SIRT1, Akt pathway(hypertrophy), FOXO pathway(autophagy) 등을 분석하였다. 그룹 구분은 <Figure 4>에 나타난 바와 같이, Group1은 Normal-Normal diet(Control), Group2는 High fat-High fat diet(사전-사후 TNF- α ; 심근비대), Group3은 High fat-Normal diet(사전-TNF- α ; 심근비대 완화), Group4는 High fat-High fat+Exercise(사전-사후 TNF- α ; 심근비대+AICAR), Group5는 High fat-Normal+Exercise(사전-TNF- α ; 심근비대 완화+AICAR), Group6은 High fat-High

Figure 4. Experimental condition for validity test of diet and exercise intervention in TNF- α induced cardiac hypertrophy (TNF- α , tumor necrosis factor- α ; AICAR, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside; NAA, nicotinamide)

fat+Exercise without SIRT1(사전-사후 TNF- α ; 심근비대+AICAR+NAA), Group7은 High fat-Normal+

Exercise without SIRT1(사전-TNF- α ; 심근비대 완화+AICAR+NAA) 등으로 각각 구분하여 실험조건을 구

A

B-1

B-2

B-3

Figure 5. Effects of diet and exercise intervention on positive improvement in TNF- α induced cardiac hypertrophy(NN: Normal-Normal diet, HH: High fat-High fat diet, HN: High fat-Normal diet, HHE: High fat-High fat+Exercise, HNE: High fat-Normal+Exercise, HHEG: High fat-High fat+Exercise without SIRT-1, HNEG: High fat-Normal+Exercise without SIRT-1)

성한 후 비교한 결과, <Figure 5>에서 나타난 바와 같이 Traf 2는 심근비대 세포에서 현저하게 활성화되며, 운동수행(AICAR처리) 그룹은 완화되는 것으로 나타났다. SIRT1은 TNF- α 처리에 의한 심근비대 세포에서 현저하게 둔화되며, 운동수행(AICAR처리) 그룹은 다소 완화되지만 유의한 차이는 없었다. Akt 인산화는 예상과 다르게 TNF- α 처리에 의한 심근비대 세포에서 현저하게 둔화되며, 운동수행(AICAR처리) 그룹은 완화되는 것으로 나타났으며, SIRT1의 영향은 현저하게 확인할 수 없었다. FOXO1 인산화는 TNF- α 처리, 운동수행(AICAR처리) 및 SIRT1 등의 영향을 현저하게 확인할 수 없었다.

논의

비만으로 증가된 염증성 사이토카인인 TNF- α 가 심장비대를 유도하는가를 확인하기 위해서 심장비대에 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 Akt signaling 활성화의 중요한 매개체인 Traf2를 실제로 증가시키는가를 분석한 결과, TNF- α 의 농도에 의존하여 Traf2가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 심근세포의 비대과정에서 중요한 중심축으로 작용하는 AKT 신호체계(Chen et al., 2013; Maillet et al., 2013)에 대한 Traf2의 작용을 분석한 선행연구에서 Huang et al.(2014)은 Traf2 과변이를 유도한 심근 비대세포에서 AKT인산화가 유의하게 활성화되는 것으로 보고하였으며, 이 과정에서 AKT는 CSK3 β (a negative regulator of calcineurin/nuclear factor of activated T cell signaling and hypertrophy)에 대한 작용을 통해서 영향을 미치는 것으로 주장한 결과에 의해 뒷받침됨으로서 Traf2는 심장비대과정에서 중요한 역할을 담당한다는 것으로 확인할 수 있었다. Traf2가 AKT 신호체계를 활성화시키는 기전은 여전히 불분명하지만 심근의 정상적인 기능수행과 보상적 비대과정에서 중요한 역할을 담당하는 NF κ B 신호체계(Santos et al., 2010; Leychenko et al., 2011)를 통해서 AKT 작용을 조절하는 것으로 유추해볼 수 있는데(Huang et al., 2014), 이러한 NF κ B pathway에서의 역할은 심장세포

의 리모델링 과정에서 중요한 역할을 담당한다(Donners et al., 2008; Divakaran et al., 2013).

항염증 및 세포성장과 같은 다양한 과정에 관여(Howitz et al., 2003; Ford et al. 2005; Kojima et al., 2008) 하는 등 심장을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려진 SIRT1과의 관련성을 분석한 결과 TNF- α 의 농도가 증가할수록 SIRT1의 발현은 감소되었다. 그러나 40ng/ml의 TNF- α 처치에 의해서 심근세포의 크기를 직접 측정하지는 않았으나 세포위축현상이 많이 발생하는 것으로 나타남으로서 TNF- α 처치가 심근비대에 중요한 역할을 할 것으로 간주된다. 이러한 결과를 토대로 비만에 따른 TNF- α 에 의한 심근비대와 관련된 실험을 위한 조건은 <Figure 2A와 B>를 기준으로 농도는 20ng/ml로 하였으며, 처치시간은 36시간으로 하여 모든 실험을 실시하였다.

최근에는 SIRT1 activator인 resveratrol 처치가 TNF- α 에 의해 야기된 염증을 억제하고(Zhu et al., 2011) 심장에 긍정적인 영향(Lin et al., 2015)을 미치는 것으로 보고되었다. 따라서 SIRT1 자체가 심근비대에 어떤 영향을 미치는가를 확인해 볼 필요가 있다는 관점에서 SIRT1의 활성화 및 억제조건에서의 변화를 분석하기 위하여 resveratrol(SIRT1 activator)과 nicotinamide(SIRT1 inhibitor)의 효과를 검증하였다. 그 결과 <Figure 3A>에 나타난 바와 같이 SIRT1의 target protein인 FOXO1의 탈아세틸화(deacetylation)가 50 μ M resveratrol에 의해서는 증가되었으며, nicotinamide에 의해서는 감소되었다. 이에 50 μ M의 resveratrol을 처치하여 SIRT1 활성을 증가시킨 결과 <Figure 3B>에 나타난 바와 같이 Akt의 인산화는 감소되었으며, FOXO1의 인산화는 증가되었다. 이러한 결과는 비만하지 않은 상황과 같이 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인이 증가되지 않은 상황에서는 SIRT1이 Akt와 FOXO1의 활성을 조절하여 심장의 비대를 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

TNF- α 에 의해 유도된 심장비대 개선을 위한 식이조절과 운동의 효과검증을 위해서 운동효과를 나타내는 것으로 알려진 AICAR 처리와 TNF- α 및 SIRT1 차단 조건을 부과하여 Traf2, SIRT1, Akt 및 FOXO pathway 등을 분석한 결과, 심근비대에 대한 운동 및 식이에 의한 영향은 Traf2의 영향을 현저하게 둔화시키며, 아울러 그

Figure 6. We can confirm the inhibit effects of research topics' arrow markers in experimental hypothesis of effects of exercise training and diet treatment on diet-induced obese cardiac hypertrophy(gray arrow : confirmation in this study, dot arrow : supposition, black arrow : previous suggestion)

에 따라 Akt 인산화에 다소의 영향을 미침으로서 운동 수행은 Traf2 저하과정을 통한 심근비대 처치에 도움을 줄 수 있는 근거가 마련되었다. 이와 같은 작용과정들을 요약 정리하면 <Figure 6>과 같다. 그러나 이 과정에서 SIRT1 활성화에 의한 Akt인산화에 대한 둔화작용은 현저하게 확인할 수 없었으며, FOXO1 활성화에도 현저한 영향을 미치는지 그 여부를 확인할 수 없었다. 심근비대 개선을 위한 운동프로그램의 효과는 다양한 선행연구를 통해서 제시된 바 있는데, Santos et al.(2016)은 심근경색 증상 후 재활과정에서 운동트레이닝은 PPAR-α 활성화를 통한 좌심실 기능의 긍정적인 효과를 나타낼 가능성이 높는데, 이 과정에서 NF-κB, TNF-α 및 PPAR-α 상호작용에 의한 염증반응과 세포사멸의 억제효과를 보고하였다. 또한 산소공급 저하를 비롯한 심근경색의 경우 미토콘드리아 활성산소에 의한 과산화지질화현상이 유발되며 이 과정에서는 NF-κB, TNF-α 및 IL-1 등의 활성화가 동반되는데, 규칙적인 운동트레이닝을 비롯한 긍정적인 자극은 IL-10 및 IL-13과 같은 항염증 매개체의 활성화를 통해서 NF-κB, TNF-α 및 IL-1 등의 활성화를 억제할 수 있다(Garavelo et al., 2015). 한편 운동의 구체적인 방법과 관련해서는 유산소성 운동을 비롯한 심장

재활트레이닝 프로그램이 심장기능 회복에 긍정적인 영향을 미치며 그 지침이 널리 제시되어 왔으며(Oldridge et al., 2012; Achttie et al., 2013), 그 이전도 일정부분 제시되어 왔다. 그러나 그 이전에 대한 세부적인 분석결과는 여전히 미흡하며, 운동트레이닝의 세부적인 내용에 따른 특이적 효과분석결과는 여전히 미흡하다. 이와 관련하여 Lu et al.(2015)은 고강도 인터벌 트레이닝과 중강도의 지속적 운동효과를 분석하는 과정에서 심근조직의 재활과 관련된 핵심적인 지표로 제시되어 온 세포사멸(Frank et al., 2003), 산화성 스트레스(Blanc et al., 2003), 탄수화물 및 지방대사기전(Bijland et al., 2013)을 분석한 결과 심근조직의 항산화효소 활성화, 세포사멸의 억제, PI3K/Akt-p38mapk-AMPK pathway의 활성화, 탄수화물-지방대사의 활성화 등을 보고한 바 있다.

이상에서 심근비대과정에서 Traf2의 활성화와 Akt 인산화 억제가 중요한 요인임을 확인하였으며, 심근비대에 대한 운동수행의 긍정적인 효과기전 중 Traf2의 억제효과가 분명하게 나타날 수 있다는 것을 확인함으로써 in vivo 실험의 필요성에 대한 근거를 마련하였다고 생각된다. 그러나 FOXO 활성화에 대한 명확한 결과를 얻기 위하여 실제 운동처치와 함께 LC-3,

Atg12 등을 포함한 자식작용관련 변인을 분석하는 등 약간의 추가실험이 필요하다고 생각된다.

결론

심장비대기전과 이를 개선하기 위한 식이조절과 운동 효과를 확인한 결과, 심근비대과정에서 Traf2의 활성화와 Akt 인산화 억제가 중요한 요인임을 확인하였으며, 심근비대에 대한 운동수행의 긍정적인 효과기전 중 Traf2의 억제효과가 분명하게 나타날 수 있다는 것을 확인하였다.

참고문헌

- Achtien, R. J., Staal, J. B., van der Voort, S., Kemps, H. M. C., Koers, H., Jongert, M. W. A., Hendriks, E. J. M., & on behalf of the Practice Recommendations Development Group (2013). Exercise-based cardiac rehabilitation in patients with coronary heart disease: a practice guideline. *Netherlands Heart Journal*, 21: 429-438.
- Bijland, S., Mancini, S. J., & Salt, I. P. (2013). Role of AMP activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clinical Science (Lond)*, 124: 491-507.
- Blanc, A., Pandey, N. R., & Srivastava, A. K. (2003). Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: Potential involvement in vascular disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 11: 229-234.
- Börgeon, E., Wallenius, V., Syed, G. H., Darshi, D., Rodriguez, J. L., Börserud, C., Ek, M. R., Björklund, P., Quiding-Järbrink, M., Fändriks, L., Godson, C., & Sharma, K. (2017). AICAR ameliorates high-fat diet-associated pathophysiology in mouse and ex vivo models, independent of adiponectin. *Diabetologia*, 60: 729-739.
- Boudina, S., & Abel, E. D. (2006). Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology (Bethesda)*, 21: 250-258.
- Chen, K., Gao, L., Liu, Y., Zhang, Y., Jiang, D., Wei, X., Zhu, H., Zhang, R., Chen, Y., Yang, Q., Kioka, N., Zhang, X.-D., & Li, H. (2013). Vinexin-beta protects against cardiac hypertrophy by blocking the Akt-dependent signalling pathway. *Basic Research in Cardiology*, 108: 338. doi:10.1007/s00395-013-0338-0.
- Divakaran, V. G., Evans, S., V. K., Diwan, A. Burchfield, J. Gao, F., Dong, J., Tzeng, H.P., Sivasubramanian, N., Barger, P. M., & Mann, D. L. (2013). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 signaling provokes adverse cardiac remodeling in the adult mammalian heart. *Circulation: Heart Failure*, 6: 535-543.
- Dong, F. 1., Li, Q., Sreejayan, N., Nunn, J. M., & Ren, J. (2007). Metallothionein prevents high-fat diet induced cardiac contractile dysfunction: role of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha and mitochondrial biogenesis. *Diabetes*, 56(9): 2201-2212.
- Donners, M. M. P. S., Beckers, L., Lievens, D., Munnix, I., Heemskerk, J., Janssen, B. J., Wijnands, E., Cleutjens, J., Zernecke, A., Weber, C., Ahonen, C. L., Benbow, U., Newby, A. C., Noelle, R. J., M. J. A. P. Daemen, M.J.A.P., & Lutgens, E. (2008). The CD40-TRAF6 axis is the key regulator of the CD40/CD40L system in neointima formation and arterial remodeling. *Blood*, 111: 4596-4604.
- Eckel, R. H., Barouch, W. W., & Ershow, A. G. (2002). Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation*, 105(24):

- 2923-2928.
- Ermolaeva, M. A., Michallet, M. C., Papadopoulou, N., Utermöhlen, O., Kranidioti, K., Kollias, G., Tschopp, J., & Pasparakis, M. (2008). Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nature Immunology*, 9: 1037-1046.
- Fang, C. X., Dong, F., Thomas, D. P., Ma, H., He, L., & Ren, J. (2008). Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *American Journal of Physiology: Heart Circulatory Physiology*, 295(3): H1206-H1215.
- Feuvray, D., & Darmellah, A. (2008). Diabetes-related metabolic perturbations in cardiac myocyte. *Diabetes Metabolism*, 34(Suppl. 1): S3-9.
- Ford, J., Jiang, M., & Milner, J. (2005). Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Research*, 65(22): 10457-10463.
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., & Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22: 8983-8998.
- Garavelo, S. M., Pereira, J. J., Wadt, N. S. Y., Reis, M. M., Ikegami, R. N., Kawakami, J. T., Agouni, A., Palomino, S. A. P., Abdalla, D., & Higuchi, M. L. (2015). Oral PTCTS (Particulated transialidase) removes serum microparticles and decrease inflammation in atherosclerotic plaques of rabbits. *Advances in Nanoparticles*, 4: 107-115, <http://dx.doi.org/10.4236/anp.2015.44012>.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954): 191-196.
- Huang, Y., Wu, D., Zhang, X., Jiang, M., Hu, C., Lin, J., Tang, J., & Wu, L. (2014). Cardiac-specific Traf2 overexpression enhances cardiac hypertrophy through activating AKT/GSK3 β signaling. *Gene*, 536(2): 225-231.
- Jono, H., Lim, J. H., Chen, L. F., Xu, H., Trompouki, E., Pan, Z. K., Mosialos, G., & Li, J. D. (2004). NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 36171-36174.
- Kojima, K., Ohhashi, R., Fujita, Y., Hamada, N., Akao, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T., & Ito, M. (2008). A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(3): 423-428.
- Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B., & Castelli, W. P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *New England Journal of Medicine*, 322(22): 1561-1566.
- Leychenko, A., Konorev, E., Jijiwa, M., & Matter, M. L. (2011). Stretch-induced hypertrophy activates NFkB-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes. *PLoS One*, 6, e29055.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., & Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275(5308): 1943-1947.
- Li, S. Y., Yang, X., Ceylan-Isik, A. F., Du, M., Sreejayan, N., & Ren, J. (2006). Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic

- reticulum Ca^{2+} -ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia*, 49(6): 1434-1446.
- Lima-Leopoldo, A. P., Sugizaki, M. M., Leopoldo, A. S., Carvalho, R. F., & Nogueira, C. R. Nascimento, A. F., Martinez, P. F., Luvizotto, R. A., Padovani, C. R., & Cicogna, A. C. (2008). Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca^{2+} handling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(7): 615-620.
- Lin, C. H., Lin, C. C., Ting, W. J., Pai, P. Y., Kuo, C. H., Ho, T. J., Kuo, W. W., Chang, C. H., Huang, C. Y., & Lin, W. T. (2014). Resveratrol enhanced FOXO3 phosphorylation via synergetic activation of SIRT1 and PI3K/Akt signaling to improve the effects of exercise in elderly rat hearts. *Age*, 36(5): 9705.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin ohenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Lu, K., Wang, L., Wang, C., Yang, Y., Hu, D., & Ding, R. (2015). Effects of high-intensity interval versus continuous moderate\intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Molecular Medicine Report*, 12: 2374-2382.
- Maillet, M., van Berlo, J. H., & Molkentin, J. D., (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14: 38-48.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S. J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A. L., Schiaffino, S., & Sandri, M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism*, 6(6): 458-471.
- Manio, M. C., Inoue, K., Fujitani, M., Matsumura, S., Fushiki, T. (2016). Combined pharmacological activation of AMPK and PPAR δ potentiates the effects of exercise in trained mice. *Physiological Reports*, Mar; 4(5). pii: e12625. doi: 10.14814/phy2.12625.
- Nishida, K., Kyo, S., Yamaguchi, O., Sadoshima, J., & Otsu, K. (2009). The role of autophagy in the heart. *Cell Death and Differentiation*, 16(1): 31-38.
- Oldridge, N. (2012). Exercise-based cardiac rehabilitation in patients with coronary heart disease: meta-analysis outcomes revisited. *Future Cardiology*, 8: 729-751.
- Ouwens, D. M., Boer, C., Fodor, M., de Galan P., Heine, R. J., Maassen, J. A., & Diamant, M. (2005). Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*, 48(6): 1229-1237.
- Santos, M. H., Higuchi, M. L., Tucci, P. J., Garavelo, S. M., Reis, M. M., Antonio, E. L., Serra, A. J., & Maranhao, R. C. (2016). Previous exercise training increases levels of PPAR- α in long-term post-myocardial infarction in rats, which is correlated with better inflammatory response. *Clinics*, 71(3): 163-168.
- Santos, D. G., Resende, M. F., Mill, J. G., Mansur, A. J., Krieger, J. E., & Pereira, A. C. (2010). Nuclear factor (NF) kappaB polymorphism is associated with heart function in patients with heart failure. *BMC Medical Genetics*, 11: 89.
- Sengupta, A., Molkentin, J. D., & Yutzey, K. E. (2009). FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(41): 28319-28331.
- Shih, V. F., Tsui, R., Caldwell, A., & Hoffmann, A. (2011). A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Research*, 21: 86-102.

- Smeets, P. J., Teunissen, B. E., Planavila, A., de Vogel-van den Bosch, H., Willemsen, P. H., van der Vusse, G. J., & van Bilsen, M. (2008). Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPARalpha and PPARdelta. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43): 29109-29118.
- Sowers, J. R. (2003). Obesity as a cardiovascular risk factor. *American Journal of Medicine*, 115(Suppl 8A): 37S-41S
- Sundaresan, N. R., Pillai, V. B., Wolfgeher, D., Samant, S., Vasudevan, P., Parekh, V., Raqhuraman, H., Cunningham, J. M., Gupta, M., & Gupta, M. P. (2011). The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Scientific Signaling*, 4(182): ra46.
- Thaik, C. M., Calderone, A., Takahashi, N., & Colucci, W. S. (1995). Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 96(2): 1093-1099.
- Turdi, S., Kandadi, M. R., Zhao, J., Huff, A. F., Du, M., & Ren, J. (2010). Deficiency in AMP-activated protein kinase exaggerates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*, 50(4): 712-722.
- Yang, Z., Wang, X., He, Y., Qi, L., Yu, L., Xue, B., & Shi, H. (2012). The Full Capacity of AICAR to Reduce Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance Requires Myeloid SIRT1. *Plos One*, 7(11): e49935.
- Yokoyama, T., Nakano, M., Bednarczyk, J. L., McIntyre, B. W., Entman, M., & Mann, D. L. (1997). Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*, 95(5): 1247-1252.
- Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism*, 6(6): 472-483.
- Zhu, X., Liu, Q., Wang, M., Liang, M., Yang, X., Xu, X., Zou, H., & Qiu, J. (2011). Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One*, 6(11): e27081.