

Endotelin tip-A reseptör antagonist tedavisinin diyabetik sıçan aortunda hücresel bağlantıların ve hücre adezyon moleküllerinin gen ekspresyonlarına etkileri

Effects of endothelin type-A receptor antagonist therapy on gene expressions of cell junctions and cell adhesion molecules in diabetic rat aorta

Çetintaş V B¹ Oltulu F² Kosova B¹ Yavaşoğlu A² Oytun E³ Aktuğ H²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Bu çalışmada, tedavi amaçlı uygulanan endotelin reseptör antagonist-A'nın (ERA-A) streptozotocin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik sıçanların aortlarındaki hücresel bağlantı ve hücre adezyon moleküllerinin gen ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Toplamda 80 sıçan 4 eşit gruba bölünerek incelenmiştir: Grup1: Kontrol, Grup2: ERA-A uygulanan, Grup3: Diyabet ve Grup4: Diyabet sonrası ERA-A uygulanan grup. Kırk sıçanda tek doz STZ enjeksiyonu ile diyabet indüklenmiştir ve hayvanlar 2 ay takip edilmiştir. Ayrıca, 20 diyabetik ve 20 sağlıklı sıçana 7. ve 15. günlerde ERA-A uygulanmıştır. Sıçan aort doku örneklerindeki hücreler arası bağlantı birimlerinin bileşenlerini ve hücre adezyon moleküllerini kodlayan genlerin ekspresyonları kantitatif gerçek-zamanlı ters transkripsiyon-polimer zincir reaksiyonu ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Konneksin-30 (Cx30), Cx33, Cx37, Cx40 ve Cx45 ekspresyonları diyabet grubunda azalmıştır. ERA-A uygulanan diyabetik sıçanlarda ise Cx33 ve Cx36 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Diyabet grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında α -1-katenin ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı, ve β -1-katenin ekspresyonunun da anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

Sonuç: Çalışmamızda, endotel hücrelerin hücreler arası iletişimini sağlayan oluklu bağlantılarında diyabet ile indüklenen hasar saptanmıştır. ERA-A uygulaması bazı konneksin alt tiplerinin ekspresyonlarını arttırdığı için, bu durumun sağaltımı için gelecekteki rutin kullanımı düşünülebilir.

Anahtar Sözcükler: Diyabet, hücrelerarası bağlantılar, konneksin, hücre adezyon molekülü, katenin, aort.

Summary

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of endothelin receptor type-A antagonist (ERA-A), that has been applied for therapeutic reasons, on the gene expressions of cell junctions and cell adhesion molecules in the aorta of streptozotocin (STZ) induced diabetic rats.

Materials and Methods: A total of 80 rats were analyzed in 4 equally distributed groups: Group 1: Control, Group 2: ERA-A administered, Group 3: Diabetic, and Group 4: Diabetic ERA-A treated. Diabetes was induced in 40 rats by a single injection of STZ and the animals were followed for 2 months. Twenty diabetic and 20 healthy rats were also treated with ERA-A at days 7 and 15. The expressions of genes coding for cell junctions and cell adhesion molecules in rat aortic tissue samples were analyzed by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction.

Results: The expressions of connexin-30 (Cx30), Cx33, Cx37, Cx40, and Cx45 were decreased in the diabetic group. A statistically significant increase in the expressions of Cx33 and Cx36 was determined in diabetic rats treated with ERA-A. When the diabetic group was compared to the control group a significant increase in the expression of α -1-catenin, and a significant decrease in the expression of β -1-catenin was found.

Yazışma Adresi: Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 14.12.2012 Kabul Tarihi: 26.02.2013

Conclusion: In our study, diabetes induced damages in the intercellular communication of endothelial cells provided by gap junctions. Since administration of ERA-A has led to an increase in the expression of some connexin subtypes, its routine use in the treatment of this condition could be considered in the future.

Key Words: Diabetes, intercellular junctions, connexin, cell adhesion molecule, catenin, aorta.

Giriş

Kardiyovasküler komplikasyonlar *diabetes mellitus* olgularında en önemli morbidite ve mortalite nedeni olarak kabul edilmektedir. Diyabetik olgularda meydana gelen endotel disfonksiyonu ve hızlanmış aterosklerozun, kardiyovasküler komplikasyonların oluşumunda anahtar rol oynadığı bildirilmektedir (1). Diyabetik aterosklerozun oluşumuna neden olan patolojik mekanizmalar hücre-hücre iletişimini sağlayan bağlantı birimlerini de etkilemektedir (2,3).

Konneksinler (Cx) hücreler arası bağlantı birimlerinden olan oluklu bağlantı (*gap junctions*) kanallarının oluşturulmasından sorumlu olup kalsiyum bağımlı olarak işlev görürler (4). Bu bağlantılar hücreler arasında iyonların, ikincil mesajcıların ve küçük sinyal moleküllerinin doğrudan değişiminde, doku homeostazında, büyüme, farklılaşma ve gelişmenin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (5). Tanımlanmış olan 14 farklı konneksin geninin ekspresyonları dokular arasında farklılık gösterebilmektedir. Endotel hücrelerinde ise yoğunlukla Cx37, Cx40 ve Cx43'ün eksprese edildiği bildirilmektedir (6). ApoE-eksik diyabetik fare modelinde endotelial Cx37 ve Cx40 ekspresyonlarının baskılandığı bildirilmektedir (7). Buna ilave olarak, diyabetik sıçan düz kas hücrelerinde Cx43 ekspresyonu belirgin olarak baskılanmış ve simvastatin ve losartan tedavilerinin diyabetin Cx43 ekspresyonu üzerine olan yan etkileri tersine döndürebildiği gösterilmiştir (8).

Hücreden-hücreye veya hücreden-hücre dışı matrikse hücre iskeleti bileşenlerinin bağlanmasını sağlayarak hücre içi iskeletin oluşturulmasında önemli rol oynayan çıpalayan kavşak bağlantı birimleri kadherin ve integrin proteinlerinden oluşmaktadır. Hücreler arası ağ yapısının oluşmasında kateninler de hücre içi çıpa proteini olarak rol almaktadırlar. Bazı çalışmalar büyüme faktörlerinin vasküler düz kas hücrelerinde β -katenin yolağını aktive ettiğini bildirmektedir (9,10). Ayrıca, okside LDL (Düşük yoğunluklu lipoprotein) E-kadherinin azalmasına, β -katenin/E-kadherin kompleksinin ayrılmasına ve düz kas hücrelerinin sitozolüne aktif β -katenin salınmasına neden olmaktadır (11).

Endotelin sistemindeki bozukluklar birçok kardiyovasküler hastalığın patogenezinde yer almaktadır. Endotelin (ET-1) güçlü bir vazoaaktif peptid olup uzun ömürlü vazokonstriksiyonu indüklemekte ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyarmaktadır (12). Hipertansiyon, vasküler şekillenme, kardiyak hipertrofi ve koroner arter hastalıklarında önemli rol oynayan ET-1, G

proteinine bağlı iki reseptör üzerinden etki etmektedir; endotelin tip-A (ET-A) ve -B (ET-B) (13). ET-A reseptörleri vasküler düz kas hücrelerinde lokalize olup vazokonstriksiyonu sağlamakta, ET-B vasküler endotelial hücrelerinde lokalize olup vazodilatasyonu sağlamaktadır (14).

Düz kas hücreleri arasındaki bağlantı birimlerinde bulunan genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin, aterosklerozun erken aşamaları sırasında vasküler hasara yanıt olarak bu kas hücrelerinin fenotipik dönüşümünü sağladığı öne sürülmektedir (2). Bununla birlikte diyabetin aorttaki bağlantı birimlerinin oluşmasını sağlayan genlerin ekspresyonlarını nasıl etkilediği henüz tam anlaşılammıştır. ET-A ve ET-B reseptörleri, artmış ET-1 düzeyleri ile ilişkili bozukluklar için ilgi çekici bir terapötik hedefdir. Bu çalışmada diyabetin hücreler arası bağlantı birimleri ve hücre adezyon moleküllerinin ekspresyon düzeylerine olan etkileri ve endotelin reseptör antagonist tip-A (ERA-A) tedavisinin bu etkileri düzeltere bilirliliği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney Tasarımı

Bu çalışmada ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen seksen *Rattus albinus* dört eşit gruba ayrıldı: 1. grup; kontrol grubu; 2. grup; ERA-A uygulanan grup (ERA-A); 3. grup; diyabet grubu (DM); 4. grup; Diyabet sonrası ERA-A uygulanan grup (ERA-A+DM). Diyabet oluşturulması amacıyla deney hayvanlarına 55 mg/kg, tek doz, intra-peritonel streptozotocin (STZ, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA) enjeksiyonu yapıldı (15). STZ 0.1 mol/L sodyum sitrat solüsyonunda (pH 4.7) çözülerek hazırlandı. STZ enjeksiyonundan sonra 24 ve 48. saatlerde hayvanların kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinde glukoz ölçümü yapıldı. Kan glukoz düzeyi 250 mg/dL'nin üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edildi ve ikinci ayın sonunda tekrar glukoz ölçümleri yapıldı (Tablo-1).

Tablo-1. Diyabetik ratlarda (Grup 3 ve 4) STZ uygulamasından önce ve sonra ölçülen kan glukoz değerleri.

Kan Glukoz Düzeyleri (mg/dl)* n=40		
0. Gün 1. (STZ öncesi)	2. Gün 3. (STZ sonrası)	60. Gün
129.5±26.35	407.7±59.47**	358.9±51.91***

*Ortalama \pm Standart sapma, ** $p < 0.0001$ (0.gün vs 2. gün), *** $p < 0.0001$ (0.gün vs 60. gün)

İkinci ve dördüncü gruptaki hayvanlara 7. ve 15. günlerde 1 µg/ml selektif ERA-A antagonisti BQ-123 (Sigma-Aldrich, Shanghai, China) sodyum sitrat solüsyonunda (pH 4.7) hazırlandı ve intravenöz yolla uygulandı. Çalışma protokolü Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylandı.

mRNA Ekspresyon Analizi

Dondurulmuş aort dokularından RNA pürifikasyonu TriPure reaktifi (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) kullanılarak yapıldı. Elde edilen 10 µg RNA örneğinden High Fidelity Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) kullanılarak tamamlayıcı DNA elde edildi. Konneksin-26, -30, -31, -32, -33, -36, -37, -40, -43, -45, -57, kadherin-1, -6 ve -13, α-1 ve β-katenin genlerinin ekspresyon düzeyleri Taqman problemleri (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon polimer zincir

reaksiyonu (Q-PCR) yöntemi ile analiz edildi (16). Ekspresyon düzeyleri LightCycler-480 cihazının kendi yazılım programında H6pdh (Hexose-6-phosphate dehydrogenase) yapısal geni referans gen olarak kullanılarak relatif kantitasyon yöntemine göre hesaplandı (17).

İstatistiksel Analizler

Gen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel analizleri CLC Main Workbench programı kullanılarak yapıldı. Ekspresyon düzeyleri yapısal gen ekspresyonuna (H6pdh) normalize edildikten sonra *log2* transformasyonu yapıldı ve p değerleri hesaplandı.

Bulgular

Çalışmamızdaki deney gruplarının aort dokularından elde edilen ekspresyon bulguları Tablo-2'de gösterilmektedir.

Tablo-2. Deney grupları arasında gen ekspresyon düzeyleri (ortalama ± standart sapma).

Gen	Grup 1 Kontrol	Grup 2 ERA-A	Grup 3 DM	Grup 4 ERA-A+DM
Cx26 (GJB2)	-	-	0.002±0.003	0.490±0.400
Cx30 (GJB4)	1.938±1.342	3.326±0.594	0.562±0.418	2.902±1.570
Cx31 (GJB5)	0.523±0.426	1.025±0.769	0.656±0.244	0.890±0.526
Cx33 (GJA6)	0.621±0.315	1.320±0.781	0.297±0.205[†]	5.440±0.064*
Cx36 (GJD2)	0.518±0.423	0.340±0.418	0.596±0.226^{††}	4.702±3.573**
Cx37 (GJA4)	0.869±0.224	1.214±3.214	0.436±0.376	1.325±0.406
Cx40 (GJA5)	0.988±0.281	0.115±0.157	0.573±0.118^{†††}	2.451±1.325
Cx43 (GJA1)	0.010±0.010	0.226±0.173	0.325±0.454	0.082±0.047
Cx45 (GJA7)	0.917±0.044	0.311±0.305	0.338±0.418	0.278±0.156
Cx57 (GJA10)	0.848±0.059	1.567±3.131	0.771±0.216	2.935±1.605
ITGA2 (Integrin-α-2)	-	0.004±0.006	0.001±0.000	0.320±0.261
Kadherin-1	-	-	-	0.009±0.007
Kadherin-13	-	0.002±0.002	-	-
Kadherin-6	-	-	-	0.019±0.015
α-1-katenin	0.001±0.000	0.014±0.010	0.259±0.349[†]	0.137±0.091
β-1-katenin	3.793±2.896	0.141±0.102	0.075±0.008^{††}	0.749±0.591
Protokadherin-12	-	-	0.003±0.002	-

Grup1 – Grup3 arasında: α-1-katenin için [†]p=0.003, β-1-katenin için ^{††}p=0.004

Grup1 – Grup4 arasında: Cx33 için *p= 0.002, Cx36 için **p=0.02

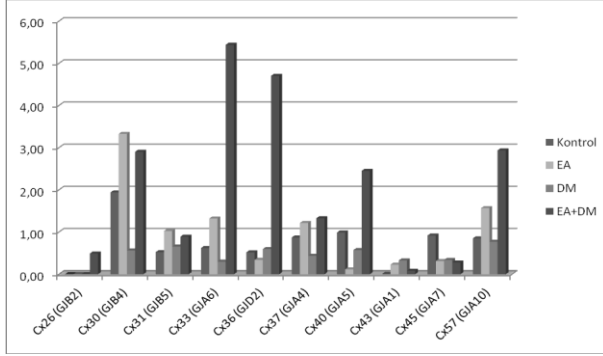
Grup3 – Grup4 arasında: Cx33 için [†]p=0.02, Cx36 için ^{††}p=0.02, Cx40 için ^{†††}p= 0.04

Yalnızca ERA-A uygulanmasının gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Cx30, Cx33, Cx37, Cx40 ve Cx45 ekspresyonları diyabet grubunda azalmaktadır (Şekil-1). Ancak konneksin ekspresyonlarındaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubu

ile ERA-A uygulanan diyabet grubu (grup 4) karşılaştırıldığında ise Cx33 ve Cx36 ekspresyonlarında anlamlı bir artış gözlenmektedir (Cx33: 0.621 vs. 5.440, p= 0.002; Cx36: 0.518 vs. 4.702, p=0.02).

Diyabetik gruplar (grup 3-4) kendi arasında karşılaştırıldığında ERA-A uygulamasından sonra Cx30, Cx31, Cx33, Cx36, Cx37, Cx40, Cx45 ve Cx57 ekspresyon-

larının arttığı belirlenmiştir. Ancak bu gruptan sadece Cx33, Cx36 ve Cx40'ın artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (Cx33: 0.297 vs. 5.440, p=0.02; Cx36: 0.596 vs. 4.702, p= 0.02; Cx40: 0.573 vs. 2.451, p= 0.04).



Şekil-1. Konneksin ekspresyon düzeylerinin deney grupları arasındaki değişimi.

α -1-katenin ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet grubunda anlamlı olarak artmış (0.001 vs. 0.259, p=0.003), ERA-A uygulandıktan sonra ise ekspresyon düzeyinde düşüş meydana gelmiştir. Ayrıca β -1-katenin ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet grubunda anlamlı olarak azaldığı (3.793 vs. 0.075, p=0.004) belirlenmiştir. β -1-katenin düzeyinin ERA-A uygulanmasından sonra arttığı gözlenmiş ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır.

Tartışma

Kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik olgularda ölümlerin %80'inden sorumludur ve bunların büyük bir kısmını koroner arter hastalıkları oluşturmaktadır. Diyabet koroner ateroskleroz, yoğun plak yükü, azalmış damar referans çapı, zayıf kollateral dolaşım ile ilişkilidir (18). Ateroskleroz patofizyolojisinde, kronik inflamasyon, lipidlerin birikimi ve arter duvarında vasküler hücrelerde değişiklikler gibi çok yönlü mekanizmalar rol oynamaktadır (11). Lezyonların gelişimi endotel fonksiyonlarının bozulması ile başlar, plak oluşuma neden olur ve sonuç olarak tromboza giden bir süreç başlar. Endotel hücreleri arasında oluklu bağlantılar ile sağlanan hücreler arası iletişim, vazomotor tepkilerin koordinasyonu ve vasküler tonüs ve arteriyal kan basıncının kontrolü için esastır. Vasküler endotelial ve düz kas hücrelerinde konneksin ailesinden Cx37, Cx40, Cx43 ve Cx45'in ekspresyon edildiği bildirilmektedir (19). Konneksin ailesinin oluşturduğu oluklu bağlantıların büyüklükleri ve sayıları vasküler yapının bölgesine göre farklılık göstermekte ve ateroskleroz ve hipertansiyon gibi hastalıklarda da değişmektedir (20).

Çalışmamızda diyabetik sıçanların aort dokularında Cx30, Cx33, Cx37, Cx40 ve Cx45 ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Diyabetik sıçan aortunda yapılan

bazı çalışmalarda aterosklerozun erken evrelerinde Cx43 ekspresyonunun arttığı öne sürülmektedir (2,3). Hiperlipidemik farelerin endotel dokularında oluklu bağlantıların azaldığı bildirilmektedir (21). Bu bulguyu destekleyen *in vitro* bir çalışmada yüksek glukozlu ortamda çoğaltılan mikrovasküler endotel hücrelerinde hücre bağlantılarının azaldığı gösterilmiştir (22). Diyabetin Cx43 ekspresyonunu inhibe ettiği ve simvastatin+losartan tedavisinin Cx43 ekspresyonunu yeniden kazandırdığı bildirilmiştir (8). Bizim çalışmamızda Cx43 mRNA ekspresyonu deney grupları arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu çalışmalarda elde edilen farklı sonuçlar diyabetin farklı dönemlerinde Cx43 ekspresyonunun değişmesinden kaynaklanabilir. Örneğin, Yeh ve Blackburn diyabetin erken dönemlerindeki Cx43 ekspresyonunu araştırmışlardır (2,21). Sheu ve arkadaşları ise kan glukoz düzeyleri 250mg/dl'nin üzerinde, diyabetin daha ileri evrelerinde hayvan modelinde çalışmışlardır (8).

Çalışmamızda diyabetik ratların aort dokularında α -1-katenin ekspresyonunun arttığı, β -1-katenin ekspresyonunun ise azaldığı belirlenmiştir. β -katenin, E-kadherin ve α -katenin arasında bir köprü işlevi görerek aktin filamentlerini bağlar. Diyabette azaldığı saptanan β -katenin ekspresyonu E-kadherin ve α -katenin arasındaki bağlantıyı bozarak, aktin filamentlerine tutulumu da olumsuz yönde etkileyebilir. Ancak, ERA-A uygulaması β -katenin ekspresyonunu arttırmadığından bu durumu düzeltmede etkin bulunmamıştır. Ayrıca β -katenin, embriyogenez ve kanser gelişiminde hücre çoğalması ve farklılaşmasında Wnt sinyal yolağının düzenleyicisi olarak rol almaktadır (11). Son çalışmalarda, vasküler düz kas hücrelerinde büyüme faktörleri ile β -katenin yolağının aktive edildiği ve bu yolağın aterosklerotik plak oluşumunda rol oynayabileceği öne sürülmüştür (23). Kalp kasında β -katenin ve plakoglobin gen ekspresyonlarının kaybının gap junctionların yeniden şekillenmesine ve aritmogeneze yol açtığı bildirilmektedir (24).

Sonuç

Bu çalışmada deneysel diyabetik sıçan modelinde uygulanan ERA-A tedavisinin aort dokusunda hücre bağlantıları ve hücre adezyon moleküllerinin gen ekspresyon düzeylerine olan etkileri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre diyabetik sıçanların aortlarında ERA-A uygulamasından sonra Cx33, Cx36 ve Cx40 ekspresyonları anlamlı olarak artmıştır. Apo-E geni olmayan diyabetik farelerde endotelial oluklu bağlantılar ve bunların bileşenleri olan Cx37 ve Cx40 ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir (7). Ayrıca Cx37 ve Cx40'ın fare aortunda endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunu ve fonksiyonunu kontrol ettiği öne sürülmüştür (25). Azalmış Cx40 protein ekspresyonu diyabetik farelerde vasküler koroner fonksiyonlarda bozulma ile de ilişkilendirilmiştir (26).

Endotelin sistemdeki düzensizlikler birçok kardiyovasküler hastalığın patolojisinde önemli olduğundan ET-A ve ET-B reseptörleri artmış ET-1 düzeyleri ile ilişkili bozuklukların düzeltilebilmesi için aday terapötik hedeflerdir. Endotelin reseptörlerinin hücre içi sinyal mekanizmalarının anlaşılması kardiyovasküler hastalıklar için

Yeni ilaçlar geliştirilmesinde yeni stratejiler sağlayabilecektir. Çalışmamız, endotel hücrelerinin hücreler arası iletişimini sağlayan oluklu bağlantılarında diyabet ile indüklenen hasarın sağaltımında ERA-A tedavisinin kullanılabilirliğini göstermektedir.

Kaynaklar

1. Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: Lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(7):1423-30.
2. Blackburn JP, Peters NS, Yeh HI, Rothery S, Green CR, Severs NJ. Upregulation of connexin43 gap junctions during early stages of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(8):1219-28.
3. Yeh HI, Lupu F, Dupont E, Severs NJ. Upregulation of connexin43 gap junctions between smooth muscle cells after balloon catheter injury in the rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3174-84.
4. Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 1981;61(4):829-913.
5. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996;84(3):381-8.
6. Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, et al. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ Res* 1997;81(3):423-37.
7. Hou CJ, Tsai CH, Su CH, et al. Diabetes reduces aortic endothelial gap junctions in ApoE-deficient mice: Simvastatin exacerbates the reduction. *J Histochem Cytochem* 2008;56(8):745-52.
8. Sheu JJ, Tsai TH, Chang LT, et al. Diabetes mellitus downregulates expression of connexin43 in rat aortic medial smooth muscle cells and can be reversed by simvastatin and losartan therapy. *Chang Gung Med J* 2008;31(2):136-44.
9. Couffignal T, Dufourcq P, Duplaa C. Beta-catenin nuclear activation: Common pathway between Wnt and growth factor signaling in vascular smooth muscle cell proliferation? *Circ Res* 2006;99(12):1287-9.
10. Quasnichka H, Slater SC, Beeching CA, Boehm M, Sala-Newby GB, George SJ. Regulation of smooth muscle cell proliferation by beta-catenin/T-cell factor signaling involves modulation of cyclin D1 and p21 expression. *Circ Res* 2006;99(12):1329-37.
11. Bedel A, Negre-Salvayre A, Heeneman S, et al. E-cadherin/beta-catenin/T-cell factor pathway is involved in smooth muscle cell proliferation elicited by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res* 2008;103(7):694-701.
12. Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA. Endothelin-1: The yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem* 2006;13(14):1655-65.
13. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:731-59.
14. Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(4):219-24.
15. Kosova B, Cetintas VB, Yavasoglu A, Altay B, Aktug H. From a molecular biological viewpoint, does endothelin type A receptor antagonist therapy reduce diabetes-induced testicular damage in rats? *Urology* 2011;77(1):250.e7-13.
16. Steckel M, Boutros M. Rapid development of Real-Time RT-PCR assays using universal probe library. : Applications for dissecting signalling pathways by RNA interference. <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>
17. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15(3):155-66.
18. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002;287(19):2570-81.
19. Brisset AC, Isakson BE, Kwak BR. Connexins in vascular physiology and pathology. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(2):267-82.
20. Severs NJ, Rothery S, Dupont E, et al. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc Res Tech* 2001;52(3):301-22.
21. Yeh HI, Lu CS, Wu YJ, et al. Reduced expression of endothelial connexin37 and connexin40 in hyperlipidemic mice: Recovery of connexin37 after 7-day simvastatin treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(8):1391-7.
22. Sato T, Haimovici R, Kao R, Li AF, Roy S. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes* 2002;51(5):1565-71.
23. Taurin S, Sandbo N, Yau DM, Sethakorn N, Dulin NO. Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294(5):C1169-74.
24. Swope D, Cheng L, Gao E, Li J, Radice GL. Loss of cadherin-binding proteins beta-catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis. *Mol Cell Biol* 2012;32(6):1056-67.
25. Alonso F, Boittin FX, Beny JL, Haefliger JA. Loss of connexin40 is associated with decreased endothelium-dependent relaxations and eNOS levels in the mouse aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299(5):H1365-73.
26. Makino A, Platoshyn O, Suarez J, Yuan JX, Dillmann WH. Downregulation of connexin40 is associated with coronary endothelial cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295(1):C221-30.