

文章编号:1000-5404(2013)16-1671-05

论著

SIRT1/UCP2 通路在白藜芦醇抑制血管内皮细胞氧化应激损伤中的作用

周曦, 易龙, 金鑫, 陈明亮, 陈春烨, 王丽, 高燕翔, 施琳颖, 糜漫天 (400038 重庆, 第三军医大学军事预防医学院营养与食品安全研究中心, 重庆市营养与食品安全重点实验室, 重庆市医学营养研究中心)

[摘要] **目的** 观察白藜芦醇对血管内皮细胞氧化应激损伤的抑制作用,并围绕 SIRT1/UCP2 信号通路探讨其作用机制。**方法** 原代培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),用叔丁基过氧化氢(t-BHP)建立 HUVECs 氧化应激损伤模型。CCK-8 法检测细胞增殖,确定半抑制浓度(IC₅₀)。荧光分光光度计检测细胞内活性氧(ROS)生成。CCK-8 法检测白藜芦醇对 t-BHP 诱导的 HUVECs 活力的影响;qRT-PCR 法检测白藜芦醇对 SIRT1 和 UCP2 mRNA 表达的影响;Western blot 法检测白藜芦醇对 SIRT1、UCP2 和 Caspase-3 在细胞内蛋白表达的影响。**结果** t-BHP 明显抑制细胞活力,IC₅₀ 为 80 μmol/L。白藜芦醇(0.1、1、10 μmol/L)预处理 2 h 能显著抑制 t-BHP 诱导的细胞活力下降($P < 0.05$),并抑制 t-BHP 诱导的细胞内 ROS 增加($P < 0.05$)。同时,白藜芦醇能明显抑制 t-BHP 诱导的 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达下降、UCP2 的 mRNA 和蛋白表达升高及 Caspase-3 表达增加($P < 0.05$),而 Sirt1 抑制剂尼克酰胺能削弱白藜芦醇的抑制作用。**结论** 白藜芦醇可能通过活化 SIRT1 抑制 UCP2 表达,削弱 t-BHP 诱导的细胞内 ROS 生成,从而抑制血管内皮细胞氧化应激损伤。

[关键词] 动脉粥样硬化;白藜芦醇;人脐静脉内皮细胞;氧化应激;SIRT1;UCP2

[中图分类号] R151.3;R329.26;R543

[文献标志码] A

Role of SIRT1/UCP2 signaling pathway in resveratrol-induced inhibition of oxidative injury in vascular endothelial cells

Zhou Xi, Yi Long, Jin Xin, Chen Mingliang, Chen Chunye, Wang Li, Gao Yanxiang, Shi Linying, Mi Mantian (Center for Nutrition and Food Safety Research, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Center of Medical Nutrition Research, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To assess the role of silent mating type information regulation 2 homolog 1/uncoupling protein 2 (SIRT1/UCP2) signaling pathway in the inhibition of oxidative damage in vascular endothelial cells by resveratrol. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated and primarily cultured. The obtained cells were treated by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) at the concentrations of 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 μmol/L respectively for 24 h, and CCK-8 assay was used for cell viability to determine the IC₅₀ value. The intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was observed by fluorospectrophotometry. The expression of SIRT1 and UCP2 at mRNA level was determined by qRT-PCR assay. The protein expression of SIRT1, UCP2 and Caspase-3 were determined by Western blot assay. **Results** Cell viability was significantly inhibited by t-BHP treatment ($P < 0.05$) and the IC₅₀ value was identified as 80 μmol/L. Pretreatment with resveratrol at the doses of 0.1, 1, and 10 μmol/L significantly inhibited the decrease of cell viability ($P < 0.05$) and the increase of intracellular ROS level induced by t-BHP. Furthermore, the mRNA and protein expression of SIRT1 were up-regulated by resveratrol pretreatment, and that of UCP2 was down-regulated, yet which was abolished by niacinamide pretreatment. **Conclusion** Resveratrol may suppress the expression of UCP2 by activating SIRT1, and attenuate the increase of intracellular ROS level induced by t-BHP, and thus, inhibit t-BHP-induced endothelial injury.

[基金项目] 国家自然科学基金(81172670);重庆市重点实验室资助项目(2006CA1003);第三军医大学青年基金(2012XJQ06)

[通信作者] 糜漫天,电话:(023)68752292

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1104.013.html>(2013-03-21)

[**Key words**] atherosclerosis; resveratrol; human umbilical vein endothelial cells; oxidative stress; silent mating type information regulation 2 homolog 1; uncoupling protein 2

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81172670), the Fund for Chongqing Key Laboratory (2006CA1003) and the Innovative Foundation for Young Talents of Third Military Medical University (2012XJQ06). Corresponding author: Mi Mantian, Tel: 86-23-68752292

心血管疾病是导致人类死亡的主要原因之一,在我国的发病率呈逐年上升趋势,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是其主要病理基础。大量研究表明,血管内皮细胞氧化应激损伤是AS发生的始动因素和早期病理改变,并已成为AS防治的重要靶点。氧化应激主要与细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增加和清除能力下降密切相关,而线粒体电子传递链是细胞内ROS的主要来源^[1]。沉默信息调节子(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1)是真核生物细胞内普遍表达的去乙酰化蛋白,在调节内皮细胞代谢稳态和抑制氧化应激损伤中发挥关键作用。白藜芦醇(resveratrol)是一种重要的多酚类植物化学物^[2],广泛存在于葡萄、花生、藜芦等多种天然植物中,流行病学调查发现具有潜在的抗AS作用,但其作用机制尚不完全清楚。白藜芦醇作为SIRT1已知的天然激活物,是否可通过SIRT1调节线粒体解偶联蛋白(uncoupling protein 2, UCP2)表达,进而降低血管内皮细胞ROS水平及抑制氧化应激损伤,相关研究少见报道。本研究以原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为研究对象,在体外建立内皮细胞氧化应激损伤模型,探讨SIRT1/UCP2信号通路在白藜芦醇抑制内皮细胞氧化应激损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 化学试剂 原代细胞培养基购自上海奥塞尔(all cells)公司。标准胎牛血清购自美国HyClone公司。CCK-8 (cell counting kit-8)试剂盒购自日本Dojindo公司。叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)、DMSO、白藜芦醇购自美国Sigma公司。2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)荧光探针及SIRT1特异性抑制剂尼克酰胺(Nicotinamide)购自碧云天生物公司。PCR引物由上海Invitrogen公司合成。兔抗人SIRT1和UCP2一抗购自美国Sigma公司。Caspase-3和兔抗人 β -tubulin多克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品。

1.1.2 HUVECs的分离和培养

1.1.2.1 HUVECs的分离及原代培养 无菌条件下取健康产妇剖宫产的新生儿脐带,用含青、链霉素的磷酸盐缓冲液(PBS)于4℃保存,4h内处理。脐带每根长度应大于10cm,

在超净台上剪去有钳痕、凝血块阻塞的部分,将无菌静脉输液针头插入脐静脉,血管钳固定针头,用无菌注射器吸取PBS注射至脐静脉,反复冲洗直至将脐静脉内的残血洗净,然后用血管钳闭锁脐带另一端,注入临用现配的0.1%的I型胶原酶进行消化(加入的胶原酶的量根据血管长度确定,以管腔完全充盈为宜);将加入胶原酶的脐静脉连同血管钳置于CO₂培养箱于37℃,孵育12min;取出后用手轻按脐带使HUVECs脱落,收集脐静脉内的消化液,1200r/min离心5min,弃上清液,用含20%胎牛血清的培养基重悬细胞,将悬液接种于50mL的一次性培养瓶中,标记为P0代,置于37℃,5%CO₂培养箱中培养,24h后用含10%胎牛血清的培养基换液,以去除残余红细胞和其他未贴壁细胞。

1.1.2.2 HUVECs传代培养 细胞生长融合成单层细胞后即可传代。首先弃去培养瓶中的培养液,然后加入含0.25%胰蛋白酶和0.01%EDTA的混合消化液2mL,轻摇培养瓶,使消化液覆盖所有细胞表面,在倒置显微镜下观察,发现细胞回缩变圆、细胞间隙增大后,加入含10%胎牛血清的M199培养基2mL中止消化,用弯头吸管轻轻吹打瓶壁细胞,最后将细胞悬液离心(1200r/min,5min),去除上清液后将细胞重悬,按1:2比例接种传代。

1.2 方法

1.2.1 细胞模型建立 取对数生长期的HUVECs,以 2.5×10^4 /mL接种于96孔板,每孔100 μ L。细胞贴壁后,吸弃孔内液体,按每孔100 μ L加入不同浓度(20、30、40、50、60、70、80、90、100 μ mol/L)的t-BHP,空白对照组只加入培养基,每组6个平行。处理24h后,避光加入CCK-8 10 μ L/孔,孵箱中放置2h,用酶标仪在450nm测定各孔光密度值D(450),设定对照组细胞活力为100%,其余各组相对细胞活力等于各组D(490)与对照组D(490)比值的百分数,确定半抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.2 CCK-8法检测细胞活力 细胞培养和接种方法同1.2.1。实验分组为:①对照组;②80 μ mol/L t-BHP处理4h组;③不同浓度白藜芦醇(0.1、1、5、10 μ mol/L)预处理2h后,弃去上清液,再加入80 μ mol/L t-BHP处理4h组。用CCK-8法测定各孔光密度值[D(490)值],设定对照组细胞活力为100%,其余各组相对细胞活力等于各组D(490)与对照组D(490)比值的百分数。

1.2.3 荧光分光光度计检测ROS生成 DCFH-DA荧光染料用无血清培养基稀释到10 μ mol/L,按照每孔100 μ L加入各组细胞中,37℃避光孵育30min后,用无血清培养基100 μ L轻洗3次,再用荧光分光光度计检测荧光强度。DCFH-DA的激发波长和发射波长分别为488nm和525nm。DCFH-DA以二乙酯的形式自由扩散快速进入细胞,可被胞内酯酶催化并在

ROS的作用下转变为2',7'-DCF,并在激发光下发出绿色荧光,荧光强度与细胞内ROS水平呈正相关,由此反映细胞内ROS水平。IPP5.0软件分析各组平均荧光强度。

1.2.4 qRT-PCR法检测SIRT1和UCP2的mRNA表达水平

以GAPDH作为内参照,Primer Premier 5.0软件设计引物如表1所示,在GenBank上进行产物特异性分析。用Trizol总RNA提取试剂提取各组细胞总RNA,核酸蛋白分析仪测定D(260)/D(280)及总RNA浓度。各组分别取2μg总RNA,按照常规方法进行逆转录反应后,cDNA产物置于-20℃保存。qPCR反应体系包括:cDNA 4μL、2×SYBR Master Mix 12.5μL、引物各1μL、Taq酶0.15μL、三蒸水6.35μL。以MIQ单色实时荧光定量PCR仪进行qPCR反应,每组各2个平行。绘制目的基因和内参照基因的溶解曲线和标准曲线,检测各基因qPCR反应的特异性和扩增效率。以IQ 5.0软件对实验结果进行分析,以各组目的基因表达水平与内参照基因表达水平几何平均的比值为该基因校正表达水平。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	引物序列
GAPDH	正义链: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
	反义链: 5'-GATGCAGGGATGATGTTG-3'
SIRT1	正义链: 5'-CGTCTTATCCTCTAGTCTTGTCG-3'
	反义链: 5'-ATCTCCATCAGTCCCAATCC-3'
UCP2	正义链: 5'-CCGGTTACAGATCCAAGGAGAA-3'
	反义链: 5'-TCAGAATGGTGCCCATCACA-3'

1.2.5 总蛋白抽提 胰蛋白酶消化收集各组细胞,用蛋白裂解液冰上裂解15min后,4℃,12000 r/min离心15min,吸取上清,用Bradford法进行蛋白定量,根据蛋白浓度,每组取80μg蛋白,加入5×SDS上样缓冲液,95℃煮沸10min使蛋白变性,于-80℃保存备用。

1.2.6 Western blot检测SIRT1、UCP2和Caspase-3的蛋白表达水平 各组分别取60μg蛋白,进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后电转移至0.22μm的PVDF膜上。5%的BSA封闭2h,用1:1000稀释的SIRT1、UCP2和Caspase-3一抗4℃孵育过夜,用TBST振摇洗膜10min×3次,以1:5000稀释的羊抗兔生物素标记二抗,室温孵育2h后,再次用TBST振摇洗膜10min×3次。ECL底物化学发光显色后机器扫描存盘,以Image lab软件进行条带分析。

1.3 统计学分析

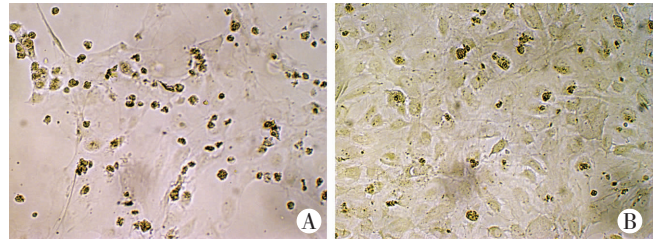
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 HUVECs形态学观察

正常原代脐静脉HUVECs贴壁生长,在接种初期为圆形,单个或聚集成团,当细胞生长融合成单层细胞时,绝大部分形态呈短梭形,鹅卵石样镶嵌排列,细胞膜折光性明显,增殖状态

良好。1~2d可连接成片,3~4d可铺满瓶底。原代细胞传至第3代时性状稳定,第7代时开始老化,因此,实验中严格使用3~6代HUVECs。倒置显微镜下观察,t-BHP处理后的HUVECs出现明显形态学改变,细胞极化不明显,大部分呈不规则的圆形、椭圆形或肾形,并出现部分死亡或凋亡细胞,细胞膜折光性减弱,细胞之内可见黑色颗粒(图1)。

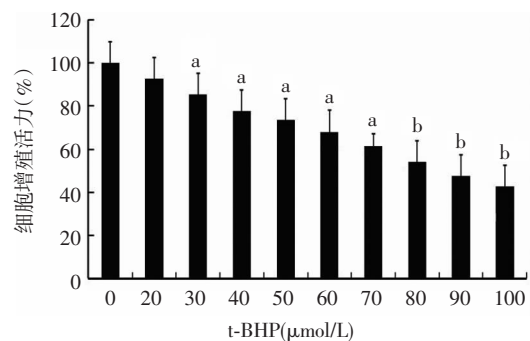


A: 对照组; B: 80 μmol/L t-BHP处理组

图1 倒置显微镜观察各组HUVECs细胞形态变化(×100)

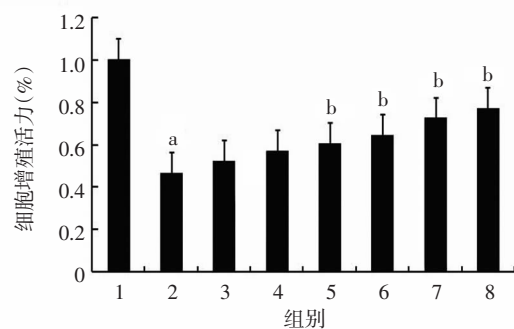
2.2 细胞增殖活力检测

如图2所示,不同浓度(20~100μmol/L)的t-BHP处理HUVECs 24h后,细胞增殖活力随处理浓度增加而下降。结果表明:t-BHP能明显抑制HUVECs增殖活力,半抑制浓度(IC₅₀)约为80μmol/L。白藜芦醇预处理后再以t-BHP处理后发现,不同浓度(0.1~10μmol/L)白藜芦醇预处理HUVECs细胞2h,与80μmol/L的t-BHP处理组相比,细胞活力明显增加。结果表明:白藜芦醇能显著抑制t-BHP诱导的HUVECs活力下降(图3)。



a: P < 0.05, b: P < 0.01, 与对照组(0 μmol/L)比较

图2 不同浓度t-BHP对HUVECs活力的影响

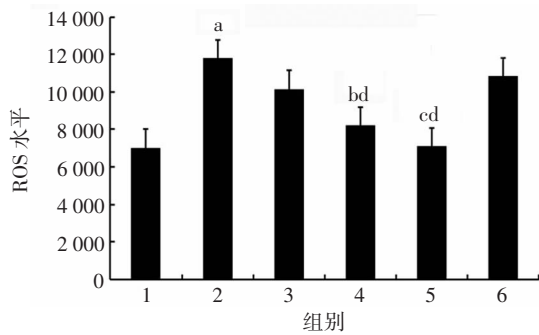


1: 对照组; 2: 80 μmol/L t-BHP处理组; 3~8: 0.1、0.3、1、3、5、10 μmol/L白藜芦醇预处理加t-BHP 80 μmol/L处理组; a: P < 0.05, 与对照组比较; b: P < 0.05, 与t-BHP组比较

图3 白藜芦醇对t-BHP诱导的HUVECs活力的影响

2.3 细胞 ROS 水平检测

与对照组比较,80 μmol/L 的 t-BHP 处理后细胞内 ROS 水平显著升高。而白藜芦醇预处理后再以 t-BHP 处理,细胞内 ROS 水平显著降低($P < 0.05$)。白藜芦醇抑制剂尼克酰胺预处理后,细胞内 ROS 与未加入尼克酰胺比较,细胞内 ROS 增加明显(图4)。实验结果表明,白藜芦醇能显著抑制 t-BHP 诱导的细胞内 ROS 生成及氧化应激损伤。

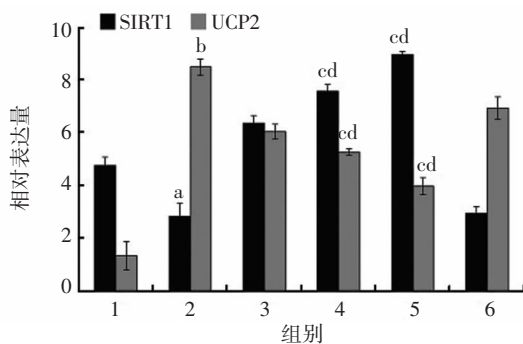


1: 对照组;2: 80 μmol/L t-BHP 处理组;3~5:0.1、1、10 μmol/L 白藜芦醇预处理加 t-BHP 80 μmol/L 处理组;6: SIRT1 抑制剂尼克酰胺组
a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与 80 μmol/L t-BHP 处理组比较; d: $P < 0.05$, 与 SIRT1 抑制剂尼克酰胺组比较

图4 荧光分光光度计检测各组细胞内 ROS 水平

2.4 qRT-PCR 法检测白藜芦醇对 SIRT1 及 UCP2 mRNA 表达水平的影响

与对照组相比,t-BHP 对 SIRT1 及 UCP2 的 mRNA 表达有明显抑制作用($P < 0.05$),而经不同浓度梯度的白藜芦醇预处理后,SIRT1 及 UCP2 的 mRNA 表达随处理浓度增加而增加,存在一定浓度依赖关系。尼克酰胺处理组 mRNA 表达有所降低,但仍高于 t-BHP 处理组($P < 0.05$)。见图5。



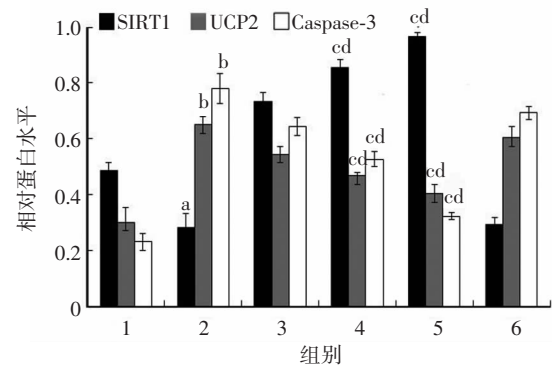
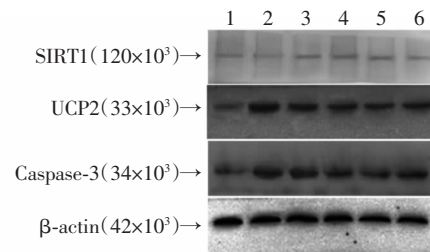
1: 对照组;2: 80 μmol/L t-BHP 处理组;3~5:0.1、1、10 μmol/L 白藜芦醇预处理加 t-BHP 80 μmol/L 处理组;6: SIRT1 抑制剂尼克酰胺组
a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与 80 μmol/L t-BHP 处理组比较; d: $P < 0.05$, 与 SIRT1 抑制剂尼克酰胺组比较

图5 qRT-PCR 法检测白藜芦醇对 SIRT1 及 UCP2 mRNA 表达的影响

2.5 Western blot 法检测白藜芦醇对 SIRT1、UCP2 和 Caspase-3 蛋白表达水平的影响

与对照组相比,t-BHP 对 SIRT1 的蛋白表达有明显抑制作

用($P < 0.05$),而经不同浓度梯度的白藜芦醇预处理后,SIRT1 的蛋白表达随处理浓度增加而增加,存在一定浓度依赖关系。与白藜芦醇处理组比较,尼克酰胺抑制剂处理组蛋白表达有所降低,但仍明显高于 t-BHP 处理组($P < 0.01$)。t-BHP 处理组 Caspase-3 和 UCP2 的蛋白表达显著增加($P < 0.01$),经白藜芦醇预处理后,Caspase-3 和 UCP2 的蛋白表达随处理浓度增加而降低,存在一定浓度依赖关系。与白藜芦醇处理组比较,尼克酰胺抑制剂组的蛋白表达显著增加。见图6。



1: 对照组;2: 80 μmol/L t-BHP 处理组;3~5:0.1、1、10 μmol/L 白藜芦醇预处理加 t-BHP 80 μmol/L 处理组;6: SIRT1 抑制剂尼克酰胺组
a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与 80 μmol/L t-BHP 处理组比较; d: $P < 0.05$, 与 SIRT1 抑制剂尼克酰胺组比较

图6 Western blot 法检测白藜芦醇对 SIRT1、UCP2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

3 讨论

根据 Ross^[3]提出的“损伤应答学说”,氧化应激(oxidative stress)是导致内皮细胞损伤的主要原因。内皮细胞氧化应激损伤与 ROS 等自由基大量产生密切相关。体内 ROS 的大量产生超过了清除能力,将直接导致与血液中与各种损伤因素直接接触的血管内皮细胞结构损伤和功能障碍,表现为细胞活力下降、细胞凋亡等,并进一步促进脂质沉积于内皮细胞和粥样斑块形成。因此,血管内皮细胞氧化应激损伤已经成为 AS 干预的重要生物靶点^[4-6]。

白藜芦醇的抗 AS 和心血管保护作用已由许多流行病学调查所揭示,但作用机制尚不完全明确。细胞内重要的沉默信息调节子(silent information regulator,

sir)家族成员与模式生物酵母、线虫、果蝇的能量代谢密切相关,并介导寿命延长^[7-9]。Sir在哺乳动物的同源基因被称作“sirtuins”家族,由SIRT1~SIRT7共7个成员组成。SIRT1是第一个在哺乳动物中发现的sirtuins家族成员,具有去乙酰化酶活性,通过对组蛋白、多种转录因子、转录共调控因子的翻译后修饰(去乙酰化),可调节与氧化应激、凋亡、炎症反应相关蛋白活性。研究表明,AMPK是能量代谢的重要“感受器”,白藜芦醇可通过AMPK激活PGC1- α ,继而调节SIRT1的转录水平^[10-12]。SIRT1主要存在于细胞核内,能够作为转录因子抑制UCP2转录活性,从而抑制ROS生成和内皮细胞氧化应激损伤。

众所周知,线粒体电子传递链的氧化反应与ADP生成ATP的磷酸化作用是偶联的,而UCPs可以使得“氧化”和“磷酸化”两者解偶联。UCPs包括UCP1~UCP5等多种形式,其中,UCP2是血管内皮细胞内UCPs主要的形式。UCP2本是线粒体上的质子通道,能够影响线粒体跨膜电位。当它被激活的时候,可以引起质子渗漏,降低线粒体在呼吸时形成的质子梯度,使氧化磷酸化解耦联,导致细胞代谢中的能量以钠泵的途径消耗和以热能的形式释放出来,ADP磷酸化合成ATP效率下降,从而也降低了ROS的生成^[13-15]。近年来的实验进一步证实^[16-17],UCP2可以通过减少线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)和增加电子的传递比率来降低ROS的产生。而且,局部的解偶联可以降低线粒体内NADH/NAD比率,为脱氢酶提供更多的NAD,加快底物氧化,使底物氧化还原反应过程中产生的ROS减少。因此,本实验结果提示,白藜芦醇可能通过SIRT1抑制UCP2表达,降低细胞内ROS水平,减少ROS引起的血管内皮细胞损伤,并且白藜芦醇对凋亡蛋白Caspase-3也有显著的调节作用,而SIRT1的抑制剂尼克酰胺预处理后,SIRT1/UCP2通路介导的ROS生成被显著抑制,提示SIRT1/UCP2通路可能在介导白藜芦醇抑制t-BHP诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤中起重要作用。综上,本研究为深入揭示白藜芦醇的内皮保护作用 and 探索其抗AS作用的分子机制提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] 陈春焯,易龙,金鑫,等. Delphinidin抑制血管内皮细胞凋亡发生的机制研究[C]. 重庆市营养学会学术会议论文汇编,2010: 2.
[2] 易龙,糜漫天. 植物化学物抗氧化应激损伤结构与功效关系的研究[C]. 重庆市营养学会学术会议论文汇编,2010: 8.

[3] Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115 – 126.
[4] Dolinsky V W, Dyck J R. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(11): 1477 – 1489.
[5] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure[J]. Pharmacol Ther, 2010, 127(6): 295 – 314.
[6] Foqarty S, Hardie D G. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer[J]. Biochem Biophys Acta, 2010, 1804(3): 581 – 591.
[7] Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos R M, et al. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort[J]. Br J Nutr, 2008, 100(1): 188 – 196.
[8] Pervaiz S, Holme A L. Resveratrol: its biologic targets and functional activity[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(11): 2851 – 2897.
[9] Rajapakse A G, Yepuri G, Carvas J M, et al. Hyperactive S6K1 mediates oxidative stress and endothelial dysfunction in aging: inhibition by resveratrol[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19237.
[10] 陈明亮,易龙,金鑫,等. 白藜芦醇对TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎性反应的影响及机制研究([J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(13): 1255 – 1258.
[11] Salminen A, Hyttinen J M, Kaamiranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on health-span and lifespan[J]. Mol Med, 2011, 89(7): 667 – 676.
[12] Tang Y, Xu J, Qu W, et al. Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms[J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(11): 1410 – 1416.
[13] Chung S, Yao H, Caito S, et al. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 501(1): 79 – 90.
[14] Frombaum M, Le-Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, et al. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases[J]. Biochimie, 2012, 94(2): 269 – 276.
[15] Sprague A H, Khalil R A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(6): 539 – 552.
[16] 易龙,陈春焯,金鑫,等. 花色苷类植物化学物抑制血管内皮细胞氧化应激损伤作用的结构-效应关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2046 – 2049.
[17] 金鑫,易龙,陈春焯,等. 膜电位及MAPK磷酸化在飞燕草素抑制Ox-LDL诱导的血管内皮细胞氧化损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(19): 1854 – 1858.

(收稿:2013-01-31;修回:2013-03-11)

(编辑 汪勤俭)