

· 论 著 ·

二苯乙烯苷对 H_2O_2 诱导的 MC3T3-E1 凋亡的保护作用及机制研究

张金康¹ 李松林¹ 魏琳岚² 郑子阳¹ 王斌¹ 刘东洲¹ 杜俊杰^{1*}

1. 中国人民解放军空军总医院, 北京 100042

2. 中国人民解放军 61206 部队, 北京 100042

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018)12-1596-05

摘要: 目的 研究二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)对氧化应激导致的成骨前体细胞 MC3T3-E1 凋亡的保护作用,并初步探讨相关机制。方法 不同浓度 TSG 预处理 MC3T3-E1 24 h 后,300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h。实验分组:①空白对照组;②单纯 H_2O_2 处理组;③ H_2O_2 + TSG 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;④ H_2O_2 + TSG 1 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;⑤ H_2O_2 + TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;⑥阳性对照抗氧化剂 NAC 1 mmol/L 处理组,通过 MTT 法、Hoechst33258 染色来评价细胞凋亡情况及 TSG 对氧化损伤的保护作用;利用荧光酶标仪和 MDA 检测试剂盒来检测细胞中 ROS 及 MDA 的水平来评价细胞的氧化应激状态;Western-blot 和 RT-PCR 分别从蛋白水平和基因水平评价 Bcl-2 和 Bax 的表达水平。结果 单纯 H_2O_2 处理可以导致细胞死亡,显微镜下可见许多细胞死亡,脱壁;Hoechst33258 染色可见有较多的细胞出现核固缩、核浓集现象;不同浓度的 TSG 预处理后,细胞凋亡现象得到改善。单独 H_2O_2 作用可以导致成骨前体细胞出现较大程度的凋亡,不同浓度 TSG 预处理后,细胞凋亡率有所降低;单纯 H_2O_2 作用可以导致细胞水平的 ROS 和脂质氧化产物 MDA 产生增加,TSG (1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$) 可以显著降低细胞水平 ROS 和 MDA 水平 ($P < 0.05$),改善细胞的氧化应激状态;Western-blotting 和实时定量 RT-PCR 结果 TSG 预处理可以减少 H_2O_2 处理后,促凋亡蛋白 Bax 的表达,增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。结论 氧化应激可以导致成骨前体细胞 MC3T3-E1 凋亡增加,TSG 可以通过降低氧化应激水平。其机理可能是 TSG 通过促凋亡蛋白 Bax 的表达及增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达起到保护作用。

关键词: 二苯乙烯苷;氧化应激;成骨前体细胞;细胞凋亡

Protective effect of TSG on H_2O_2 induced cytotoxicity in MC3T3-E1 cells and the related mechanism

ZHANG Jinkang¹, LI Songlin¹, WEI Linlan², ZHENG Ziyang¹, WANG Bin¹, LIU Dongzhou¹, DU Junjie^{1*}

1. Institute of Orthopaedics, Air Force General Hospital, Beijing 100142

2. The Chinese People's Liberation Army 61206 Troops, Beijing 100142, China

* Corresponding author; DU Junjie, Email: zjk1271984@21cn.com

Abstract: Objective The aim of this study was to explore the protective effect and related mechanism of tetrahydroxystilbene glucoside (TSG) on apoptosis of osteoblast precursor cells (MC3T3-E1) induced by H_2O_2 . **Methods** MC3T3-E1 cells pretreated with different concentrations of TSG were treated with 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h. The experiment consisted of 6 groups, including the control group, H_2O_2 , H_2O_2 + TSG (0.1 $\mu\text{mol/L}$), H_2O_2 + TSG (1 $\mu\text{mol/L}$), H_2O_2 + TSG (10 $\mu\text{mol/L}$) and H_2O_2 + NAC (1 mmol/L) (anti-oxidant positive control group). We evaluated the protective effect of TSG on the apoptosis of MC3T3-E1 cells by MTT assay and Hoechst33258 staining. We tested the production of ROS and MDA by fluorescence microplate reader and MDA assay kit to investigate the oxidative stress status. We tested the production of Bcl-2 and Bax by Western-blotting and the gene expression of Bcl-2 and Bax by RT-PCR. **Results** Cell death induced by H_2O_2 alone was observed under microscope, and Hoechst33258 staining showed more cells with nuclear pyknosis and nuclear enrichment, which was improved after being pretreated with different concentrations of TSG. H_2O_2 alone could lead to a large degree of apoptosis in MC3T3-E1 cells, and the apoptosis rate decreased after pretreatment with different concentrations of TSG. At the same time, TSG (1-10 $\mu\text{mol/L}$) could significantly reduce the level of ROS and MDA ($P < 0.05$) and improve the oxidative stress status in MC3T3-E1 cells. The result of Western-blotting and real-time quantitative RT-PCR demonstrated that pretreatment with TSG could decrease the expression of pro-apoptosis

* 通信作者: 杜俊杰, Email: zjk1271984@21cn.com

protein Bax and increase the expression of anti-apoptosis protein Bcl-2. **Conclusion** The apoptosis of MC3T3-E1 cells increased after induced by H_2O_2 and decreased by pretreatment with TSG. The mechanism of the protective effect could be through decreasing the expression of pro-apoptosis protein Bax and increasing the expression of anti-apoptosis protein Bcl-2.

Key words: tetrahydroxystilbene glucoside; oxidative stress; MC3T3-E1 cells; cell apoptosis

骨质疏松症是一种全身性、退行性、代谢性骨骼疾病,特征为骨量较少、骨组织微结构破坏、生物力学性能减退,导致脆性骨折发生,严重威胁老年人的身心健康。目前研究发现氧化应激在骨质疏松症的发生发展中起着重要作用^[1]。过度氧自由基的形成可诱导成骨细胞凋亡,并降低成骨细胞分化能力,同时,氧自由基可促进破骨细胞形成及活化,进而降低骨组织形成,促进骨组织吸收,导致骨量降低^[2]。二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)是从传统中药何首乌中提取的有效生物活性成分之一,具有良好的水溶性和抗氧化清除自由基的功能,同时还有抗肿瘤作用、肝脏保护作用、神经保护作用、降血脂及抗动脉粥样硬化作用、防治老年痴呆和提高记忆功能作用^[3-4]。本研究采用过氧化氢诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡,通过不同浓度 TSG 预处理后,评估其对氧化应激导致细胞损伤的保护作用,对线粒体凋亡信号通路中的关键信号分子 Bcl-2/Bax 表达的影响,初步探讨 TSG 发挥保护作用的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

TSG(中国药品生物制品检定所);荧光显微镜(NIKON);MTT、Hoechst33258 试剂(sigma 公司);荧光酶标仪;流式细胞仪;MDA 和 ROS 检测试剂盒;NAC;PMSF;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术公司);引物合成(金斯瑞公司代理);RNA 提取试剂盒(OMEGA);反转录及实时定量试剂盒(TaKaRa);Bcl-2 抗体和 Bax 抗体(Cell signaling);实时定量 PCR 仪及 Quantity One 凝胶成像分析成像系统(Bio-Rad 公司);PVDF 膜及 ECL 发光试剂盒(Millipore 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 MC3T3-E1 细胞系的培养及实验分组:用含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基在含 5% CO_2 、37 °C 的孵箱里培养 MC3T3-E1 细胞系。待细胞铺满后,用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化处理,将细胞均匀接种到 6 孔板及 96 孔板中,常规培养基培养。实验分为 6 组:①空白对照组;②单纯 H_2O_2 处理组;③

H_2O_2 + TSG 0.1 μ mol/L 处理组;④ H_2O_2 + TSG 1 μ mol/L 处理组;⑤ H_2O_2 + TSG 10 μ mol/L 处理组;⑥阳性对照抗氧化剂 NAC 1 mmol/L 处理组。

1.2.2 MTT 法评价细胞活性:取对数生长期的细胞,按分组要求给予不同的处理因素,不同浓度 TSG 预处理 24 h 后,300 μ mol/L H_2O_2 处理 24 h,每孔加入 20 μ L MTT 溶液,孵育 4 h 后,加入 150 μ L DMSO,待紫色结晶完全溶解后,用酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度值,评价 TSG 对 H_2O_2 造成的细胞凋亡的保护作用。

1.2.3 Hoechst33258 染色:取对数生长期细胞,接种到 24 孔板内的无菌盖玻片上,按实验分组给予不同处理后,4% 多聚甲醛于 4 °C 固定过夜,PBS 清洗 3 遍,每孔加 5 mg/L Hoechst33258 染液,避光染色 10 min,甘油封片,荧光显微镜下观察细胞凋亡状态。

1.2.4 ROS 检测方法:将细胞均匀接种到 6 孔板,按实验分组给予不同处理后,用无血清的培养基稀释 DCFH-DA,使其终浓度为 10 μ mol/L,用来装载探针,将细胞消化、收集,用 DCFH-DA 培养基重悬细胞,根据 ROS 检测试剂盒说明书流程,用荧光酶标仪检测荧光强弱,评价 ROS 的水平。

1.2.5 MDA 检测方法:将细胞均匀接种到 6 孔板,按实验分组给予不同处理后,用 IP 细胞裂解液裂解细胞,1600 g,4 °C 离心 10 min,取少量上清检测蛋白含量,依照 MDA 检测试剂盒说明书流程检测 MDA 含量。

1.2.6 Western-blot 检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达:收集各组细胞,用细胞裂解液裂解细胞后提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白质含量,每组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,进行电转至 PVDF 膜,封闭缓冲液 37 °C 封闭 2 h,一抗孵育,4 °C 过夜,TBST 洗膜 5 $\times$ 3 min,加入二抗孵育,37 °C,孵育 2 h。化学发光法显色,应用 BIO-RAD 凝胶成像系统采集图像。

1.2.7 RT-PCR (real-time quantitative PCR) 检测 Bcl-2、Bax 基因的表达:收集各组细胞,利用 Total RNA Kit I 试剂盒提取细胞总 RNA,利用 PrimeScript RT reagent kit 反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录为 cDNA,反转录反应条件:37 °C 15 min;85 °C 5 s,

使用 SYBRGreen RT-qPCR 试剂盒建立 PCR 体系,按照程序 95 ℃ 30 s、95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s、40 个循环进行 PCR。读板,根据公式计算目的基因的相对表达量。qPCR 的引物序列见表 1。

表 1 Bcl-2 和 Bax 的 RT-PCR 引物序列

Table 1 Real-time PCR primer sequences for Bcl-2 and Bax

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Bcl-2	acttctctctgctgctaccgt	tccctgaagagttctctcac
Bax	aclaaagtgcccgagctgat	alggctcactgtctgcatgt
β -actin	ctggcaccacacattctaca	ggtacgaccagagccataca

1.3 统计学分析

所有测量的结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,利用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,组间数据采用 Tukey-q 检验进行多重比较,以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义。

2 结果

2.1 TSG 对氧化应激导致 MC3T3-E1 细胞凋亡的保护作用

2.1.1 MTT 检测结果:不同浓度 TSG 预处理细胞 24 h 后,加入 H_2O_2 作用 24 h,显微镜下观察到细胞数量减少,细胞坏死和皱缩增多。MTT 检测结果提示: H_2O_2 可以导致细胞数量减少 ($P < 0.05$),不同浓度 TSG 预处理后,细胞数量增加,其中 TSG (1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$) 作用后,明显改善细胞数量 ($P < 0.05$)。表明 TSG 预处理对氧化应激导致的细胞数量减少有保护作用(图 1)。

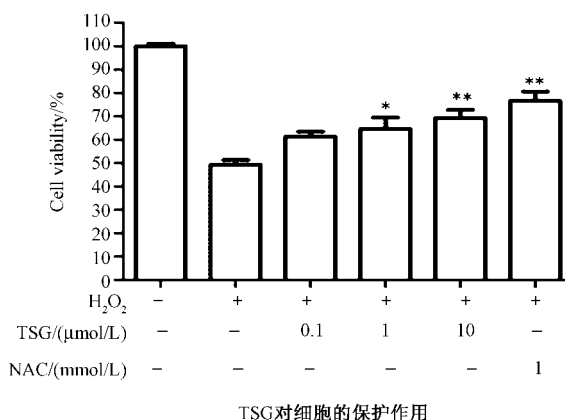


图 1 MTT 检测 TSG 对细胞凋亡的保护作用 (* $P < 0.05$ 与 ** $P < 0.01$ 为同单纯 H_2O_2 作用组相比)

Fig. 1 Protective effect of TSG on the apoptosis of MC3T3-E1 cells by MTT assay (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the group treated with H_2O_2 alone)

2.1.2 Hoechst33258 染色结果:单纯 H_2O_2 作用后,在荧光显微镜下可以看到核固缩,核浓集,核碎裂,较多的细胞出现凋亡,不同浓度 TSG 预处理后,凋亡细胞数量减少,表明 TSG 预处理可以改善 H_2O_2 导致的细胞凋亡现象(图 2)。

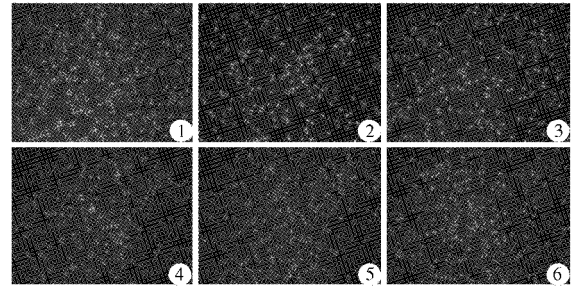


图 2 Hoechst33258 染色评价细胞的凋亡状况 ($\times 100$) [①为空白对照组;②为单纯 H_2O_2 作用组;③④⑤为 H_2O_2 同不同浓度的 TSG (0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$) 共同作用组;⑥为阳性对照 NAC 作用组 (1 mmol/L)]

Fig. 2 Protective effect of TSG on the apoptosis of MC3T3-E1 cells by Hoechst33258 staining ($\times 100$) [① Control group; ② H_2O_2 ; ③ H_2O_2 + TSG (0.1 $\mu\text{mol/L}$); ④ H_2O_2 + TSG (1 $\mu\text{mol/L}$); ⑤ H_2O_2 + TSG (10 $\mu\text{mol/L}$); ⑥ H_2O_2 + NAC (1 mmol/L)]

2.2 氧化应激水平检测结果

单纯 H_2O_2 处理后,细胞内氧化应激水平升高,ROS 及脂质氧化终产物 MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$),不同浓度 TSG 预处理后,氧化应激水平下降,其中 TSG (1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$) 明显降低 ROS 及 MDA 的表达 ($P < 0.05$)。检测结果提示: H_2O_2 作用可以提高细胞内的氧化应激水平,TSG 预处理可以降低细胞的氧化应激水平(图 3)。

2.3 Western-blot 检测结果

Western-blot 结果显示: H_2O_2 诱导细胞内 Bcl-2 表达下降,Bax 表达上升,不同浓度 TSG (0.1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后,细胞内 Bcl-2 表达上升,Bax 表达下降,表明 TSG 能够提高凋亡保护蛋白 Bcl-2 的表达及降低促凋亡蛋白 Bax 的表达,来起到对氧化应激导致细胞凋亡的保护作用(图 4)。

2.4 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 结果提示:单纯 H_2O_2 作用可诱导细胞内 Bcl-2 基因表达水平明显下降 ($P < 0.05$),Bax 表达水平明显上升 ($P < 0.05$),不同浓度 TSG (0.1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后,Bcl-2 表达明显上升 ($P < 0.05$),Bax 表达水平明显下降 ($P < 0.05$),表明 TSG 可以在

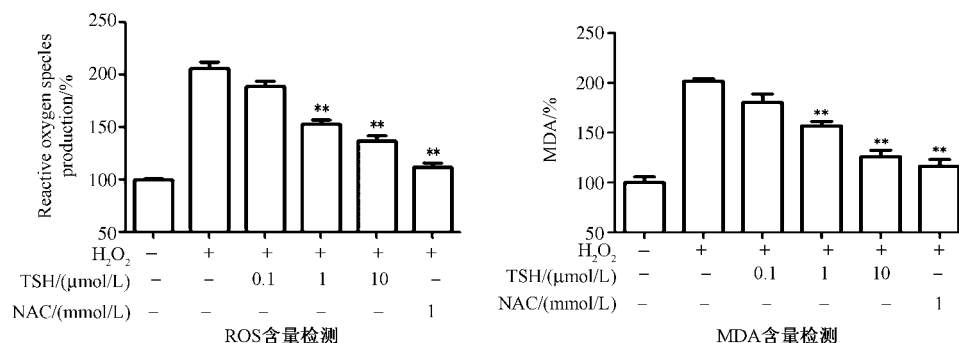


图3 氧化应激指标 ROS 及 MDA 检测 (* $P < 0.05$ 与 ** $P < 0.01$ 为同单纯 H₂O₂ 作用组相比较)

Fig.3 Inhibition effect of TSG on ROS and MDA generation induced by H₂O₂ in MC3T3-E1 cells (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the group treated with H₂O₂ alone)

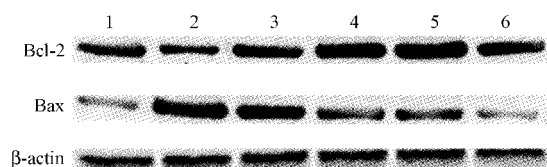


图4 Western-blot 检测 Bcl-2 和 Bax 的表达水平。[①为空白对照组;②为单纯 H₂O₂ 作用组;③④⑤为 H₂O₂ 同不同浓度的 TSG (0.1、1、10 μmol/L) 共同作用组;⑥为阳性对照 NAC 作用组 (1 mmol/L)]

Fig.4 Production of Bcl-2 and Bax tested by Western-blotting [① the control group; ② H₂O₂; ③ H₂O₂ + TSG (0.1 μmol/L); ④ H₂O₂ + TSG (1 μmol/L); ⑤ H₂O₂ + TSG (10 μmol/L); ⑥ H₂O₂ + NAC (1 mmol/L)]

基因水平改变线粒体凋亡信号通路的关键分子 Bcl-2 及 Bax 的表达来发挥保护作用(图 5)。

3 讨论

氧化应激在骨质疏松症的发生过程中起到重要的作用,通过骨形成及骨吸收平衡的作用维持骨量,

过量氧自由基的产生可导致成骨细胞凋亡及分化能力下降,活化破骨细胞,导致骨形成降低,骨吸收增加,引起骨质疏松的发生^[1, 5]。

H₂O₂ 是最常见的活性氧自由基。它的半衰期较长,可以很容易穿透细胞膜,导致细胞的脂质氧化及 DNA 损伤,并可以破坏机体的抗氧化防御体系,导致细胞的死亡和凋亡^[6]。Lean 等^[7] 研究证实, H₂O₂ 在绝经后骨质疏松的发生及发展过程中起到关键作用。Fatokun 等^[8] 报道,将成骨前体细胞系 MC3T3-E1 细胞暴露于浓度至少为 0.2 mmol/L 的 H₂O₂ 作用 1 h,可以导致细胞明显的凋亡。本次研究也得出相同的结论,给予 H₂O₂ 处理,通过细胞活性检测及凋亡染色证实 H₂O₂ 可以导致细胞凋亡。当给予 TSG 预处理后, H₂O₂ 导致的细胞凋亡被不同程度逆转。TSG 为中药何首乌提取成分之一,具有多酚类结构,同白藜芦醇较相似,许多研究已经证实 TSG 具有较强的抗氧化性能,本次实验表明 TSG 可以预防 H₂O₂ 导致的 MC3T3-E1 细胞的凋亡。

在机体内,氧化反应和抗氧化反应处于平衡状

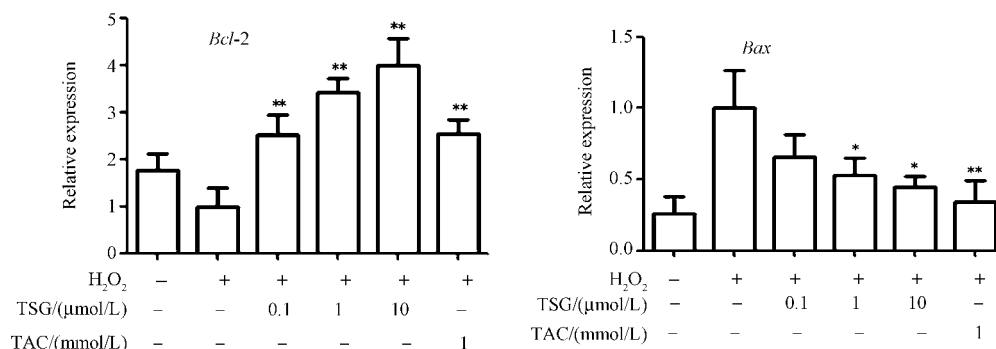


图5 RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax 的基因表达水平

Fig.5 Gene expression of Bcl-2 and Bax tested by RT-PCR

态。细胞代谢过程中,在线粒体内产生能量的过程中就会产生大量的 ROS。但是,机体内也存在大量的抗氧化酶,可以将多余的 ROS 清除。如果这种平衡状态被破坏,过量的 ROS 就会在体内聚集,引起蛋白质、脂质等物质发生氧化反应,DNA 完整性被破坏,引发炎症反应,进而导致细胞死亡。MDA 为脂质氧化的终产物,其可以导致细胞膜通透性增强,引起细胞死亡。在本次实验中,给予外源性的 H_2O_2 处理后,细胞内的 ROS 和 MDA 水平明显增加($P < 0.05$),氧化应激水平升高。给予不同浓度 TSG 预处理后,ROS 和 MDA 的升高都有不同程度的下降。因此,TSG 可以降低细胞的氧化应激水平,对细胞起到保护作用。

凋亡过程的调节涉及到多种信号通路的参与。Bcl-2 家族在细胞凋亡调控中有重要的作用^[9]。Bcl-2 是一个多基因家族,在哺乳动物中发现其家族成员至少有 15 个,它们所形成的同源或异源二聚体通过调控蛋白酶及核酸酶的活性而双向调节细胞凋亡。Bcl-2、Bax 是该家族中最具代表性的抑制和促进细胞凋亡的基因^[10],分别以同源二聚体的形式存在,也可形成异源二聚体,当活性氧等作用破坏膜结构时,Bax 过度表达,可形成大量的 Bax-Bax 同源二聚体,使细胞凋亡增多;而 Bcl-2 过度表达时,大量的 Bax-Bax 同源二聚体被分开,与 Bcl-2 形成 Bax-Bcl-2 异源二聚体,同时 Bcl-2 可结合在线粒体膜上,抑制线粒体通透性的改变,抑制凋亡诱导因子的释放,同时稳定内质网膜,阻断 Ca^{2+} 释放等而发挥抗凋亡作用^[9, 11-12]。龙石银等^[13]研究发现,TSG 能抑制 H_2O_2 诱导的内皮细胞凋亡,该作用与上调 Bcl-2 表达有关。李军等^[14]研究发现,TSG 可提高同型半胱氨酸损伤状态下内皮细胞的凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达,同时降低促凋亡基因 Bax 和 Caspase-3 mRNA 的表达。本研究发现 H_2O_2 诱导成骨前体细胞 MC3T3-E1 凋亡时,Bcl-2 表达下调,Bax 表达上调,给予不同浓度 TSG 预处理后,Bcl-2 表达较前上调,Bax 表达下调,细胞凋亡得到不同程度的改善,表明 H_2O_2 处理后,细胞内的活性氧自由基增多,使抗凋亡基因 Bcl-2 的表达下降,促凋亡基因 Bax 表达上升,导致细胞凋亡,而 TSG 可以改善线粒体凋亡途径中 Bcl-2 和 Bax 的表达,说明 TSG 可以通过线粒体凋亡途径 Bcl-2/Bax 信号通路来对 H_2O_2 导致的成骨前体细胞的凋亡起到保护作用。

综上所述,本研究发现,氧化应激可以导致成骨前体细胞 MC3T3-E1 发生凋亡,给予 TSG 预处理后,

细胞凋亡得到改善,同时,TSG 可以降低细胞内的 ROS 及 MDA 含量,降低细胞内的氧化应激水平。其机理可能是 TSG 通过促凋亡蛋白 Bax 的表达及增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达起到保护作用。本研究为 TSG 可能用于骨质疏松的治疗提供了实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] Wilson C. Bone: Oxidative stress and osteoporosis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10 (1): 3.
- [2] 孙振双,耿元卿,张丽君,等. 氧化应激介导绝经后骨质疏松发病机制的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22 (8): 1063-1067.
- [3] 吴晓玲,张贵锋,刘其礼,等. 二苯乙烯苷对慢性氟中毒致脑损伤大鼠学习记忆能力、氧化应激的影响[J]. 中国医学创新, 2017, 14(2): 21-24.
- [4] 陈冰冰,姜爱玲,张岩. 何首乌有效成分二苯乙烯苷的药理活性研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21 (6): 710-715.
- [5] Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E, et al. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 569563.
- [6] Denisova NA, Cantuticastelvetri I, WN Hassan, et al. Role of membrane lipids in regulation of vulnerability to oxidative stress in PC12 cells: implication for aging[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2001, 30 (6): 671-678.
- [7] Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, et al. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation [J]. Endocrinology, 2005, 146 (2): 728-735.
- [8] Fatokun AA, TW Stone, RA Smith. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells: The effects of glutamate and protection by purines[J]. Bone, 2006, 39 (3): 542-551.
- [9] Levine B, SC Sinha, G Kroemer. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy[J]. Autophagy, 2008, 4 (5): 600-606.
- [10] Lindsten T, Ross AJ, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues[J]. Mol Cell, 2000, 6 (6): 1389-1399.
- [11] Shimizu S, Konishi A, Kodama T, et al. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (7): 3100-3105.
- [12] Shroff EH, C Snyder, NS Chandel. Role of Bcl-2 family members in anoxia induced cell death[J]. Cell Cycle, 2007, 6 (7): 807-809.
- [13] 龙石银,黄良珠,乔新惠,等. 二苯乙烯苷对血管内皮细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (7): 557-560.
- [14] 李军,王国荣,张秀芹,等. 二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导血管内皮细胞凋亡及 bcl-2、bax、caspase-3 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29 (4): 743-747.

(收稿日期: 2017-07-11;修回日期: 2017-09-04)