

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.006

过氧化氢对内皮祖细胞凋亡相关蛋白表达的影响*

刘芳^{1,2} 桑甜甜² 曹青² 王飞² 郑兴^{1△}

(1 第二军医大学附属长海医院心内科 上海 200433; 2 上海交通大学医学院附属新华医院老年医学科 上海 200092)

摘要 目的:比较不同浓度过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)对人外周血来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)生存能力的改变及其对凋亡相关蛋白表达的影响。**方法:**采用密度梯度离心法和差速贴壁法从人外周静脉血中分离培养内皮祖细胞。选取传代后第3代EPCs作为研究对象,以终浓度分别为50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L和400 μmol/L的过氧化氢处理内皮祖细胞12 h,同时设立正常处理对照组。CCK-8法检测各组内皮祖细胞生存能力的差异;Western blot分析各组内皮祖细胞中凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和p53的蛋白表达情况。**结果:**与对照组相比,在浓度为50 μmol/L、100 μmol/L和150 μmol/L过氧化氢处理组中细胞存活能力逐渐增强,促凋亡蛋白Bax、p53随之下调,抗凋亡蛋白Bcl-2则显著上调;在浓度为200 μmol/L、300 μmol/L和400 μmol/L过氧化氢处理组中细胞生存能力相对于正常对照组逐渐减弱,促凋亡蛋白Bax、p53表达水平逐渐增加,抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平下降。**结论:**过氧化氢对内皮祖细胞存活能力和凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2、p53表达的影响均呈双相性变化。

关键词:内皮祖细胞;过氧化氢;细胞凋亡

中图分类号:Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)07-1222-04

The Effect of Hydrogen Peroxide on Apoptosis-Related Proteins in Endothelial Progenitor Cells*

LIU Fang^{1,2}, SANG Tian-tian², CAO Qing², WANG Fei², ZHENG Xing^{1△}

(1 Department of cardiology, Changhai Hospital, Shanghai Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 Department of Geriatrics, Xinhua Hospital Affiliated With Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of different concentrations of hydrogen peroxide on viability and the level of apoptosis-related proteins in endothelial progenitor cells derived from human peripheral blood. **Methods:** Endothelial progenitor cells were isolated from human peripheral blood by density gradient centrifugation method and differential velocity adherent method. After passage, the third generation EPCs were treated by the final concentrations of 50 μmol/L, 100 μmol/L, 150 μmol/L, 200 μmol/L, 300 μmol/L and 400 μmol/L H₂O₂ for 12 h, respectively; meanwhile, the control group was established. Cell viability was detected by CCK-8 assay. The expression changes of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2 and p53 in endothelial progenitor cells were assessed by Western blot. **Results:** Exposure to low concentrations (≤ 150 μmol/L) of hydrogen peroxide not only promoted EPCs viability, but also caused decrease of proteins Bax, p53 expression and increases of the protein Bcl-2 expression. High concentrations (≥ 200 μmol/L) of hydrogen peroxide resulted in endothelial progenitor cell death; moreover, the level of proteins Bax, p53 expression was up-regulated while the level of protein Bcl-2 expression was down-regulated as concentrations of hydrogen peroxide increased. **Conclusion:** Treated by different concentrations of hydrogen peroxide, endothelial progenitor cell viability and the level of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2 and p53 exhibited biphasic response.

Key words: Endothelial progenitor cells; Hydrogen peroxide; Cell apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): Q813 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1222-04

前言

在正常机体中,内皮细胞在控制血压、凝血以及血管生成等方面发挥着重要作用。一个完整的心血管系统依赖于血管内皮细胞结构上和功能上的完整性。心血管疾病引起的继发性血管功能障碍起始和进展阶段的主要特征是血管内皮完整性和

功能的丧失^[1]。作为内皮细胞的前体细胞,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)于1997年由Asahara等首次人类外周血中作为CD34⁺单个核细胞被分离出来,它作为内皮细胞的前体细胞,具有增殖、迁移、分化成内皮细胞和聚集形成新生血管的作用^[2]。目前,内皮祖细胞可作为评估心血管疾病严重程度的新指标,以它为基础的细胞移植技术已逐渐成为细胞

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270205)

作者简介:刘芳(1975-),女,副主任医师,主要研究方向:心血管疾病

△通讯作者:郑兴, E-mail: zhengxing57530@163.com

(收稿日期:2014-09-22 接受日期:2014-10-18)

治疗的新策略^[34]。本实验利用活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS)--过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)以不同浓度处理人外周血来源的内皮祖细胞,探讨不同浓度过氧化氢对内皮祖细胞存活能力的改变及其对凋亡相关蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

取正常健康成年男子外周静脉血 50 mL, 加入肝素抗凝, 取自新华医院体检中心, 术前签订知情同意书并由医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

人纤维连接蛋白 Fibronectin(Fn, Gibco 公司); 肝素 Heparin(上海百特药业公司); 全培养液 EGM-2MV BulletKit(Lonza 公司); 胎牛血清 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco 公司); 0.25%胰蛋白酶 Trypsin (Gibco 公司); 3%过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂); 淋巴细胞分离液 Histopaque 1077、FITC-UEA-I (Sigma 公司); Dil-AcLDL (Molecular Probes 公司); CCK-8 试剂盒 (Dojindo 公司); 预染蛋白质分子量标准 (Fermentas 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、鼠抗人 Tubulin 抗体(江苏 Beyotime 碧云天生物技术研究); 鼠抗人 p53 单克隆抗体(sigma 公司); 兔抗人 Bax 单克隆抗体、Bcl-2 单克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司); ECL 底物化学发光试剂盒(Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore); 化学发光成像仪 ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Canada)。

1.3 人外周血来源 EPCs 的分离和培养

用 10 μg/mL 人纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)500 μL 铺满预冷的 6 孔细胞培养板板底, 在 5% CO₂ 饱和湿度 37℃ 恒温培养箱中放置 2 h 以上备用。外周静脉血血样取自经本人知情同意的正常健康成年男子并通过伦理委员会的批准。无菌采集外周血 50 mL, 肝素抗凝和磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)按比例稀释后, 加入淋巴细胞分离液 Histopaque 1077 进行密度梯度离心, 吸取中间厚约 1~2 mm 的白膜层, 收集单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)。经 PBS 洗涤后, 将细胞重悬至 EGM-2MV BulletKit 全培养液, 种植于预先包被有纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)的无菌 6 孔培养板中, 置于 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养。接种 3 天后, 进行首次半量换液; 此后每 3 天全量换液一次, 并观察细胞形态及生长状况。当细胞培养板中贴壁细胞生长约达 80% 左右时进行传代, 选择第 3 代细胞用于后续实验。

1.4 实验分组及药物处理

分组前, 将 3% H₂O₂ 用 PBS 配制浓度为 20 mmol/L 的工作液存放于 4℃ 备用。选取生长状态好、处于对数增长期的细胞, 将含有约 3×10⁵ 个内皮祖细胞的 4 mL EGM-2MV 全培养液充分混匀后接种于 5 个 6 孔细胞培养板中。培养至第 16 天时, 贴壁细胞占培养板每孔底面积 80% (约 5×10⁵ 个细胞) 后进行药物处理。随机将细胞随机分成如下组别, 每组 6 孔。正常对照组(组 1); EGM-2MV BulletKit 全培养液常规培养, 不加处理因素; H₂O₂ 处理组(组 2~6); 往 EGM-2MV BulletKit 全培养液加入一定体积的过氧化氢, 使其终浓度分别为 50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L 和 400

μmol/L, 继续培养 12 h。培养 12 h 后, 置于普通倒置显微镜下观察细胞形态。

1.5 CCK-8 法检测 H₂O₂ 对内皮祖细胞存活能力的影响

选取生长状态好、处于对数增长期的细胞作为研究对象, 将含有 5×10³ 个内皮祖细胞的 100 μL EGM-2MV 全培养液充分混匀后接种于 96 孔细胞培养板的每孔中。待细胞贴壁后, 正常对照组中更换新鲜 EGM-2MV 全培养液 100 μL, H₂O₂ 处理组中分别更换含有终浓度为 50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L 和 400 μmol/L H₂O₂ 的新鲜 EGM-2MV 全培养液 100 μL, 每组设 6 个复孔, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中继续培养。12 h 后, 将培养液全部吸出。每孔加入含有 10 μL CCK-8 工作液和 100 μL 新鲜 EGM-2MV BulletKit 全培养液的混合液, 另外给予 6 个空白孔加入同样混合液; 置于 37℃ 孵育 3 h。显微镜下观察, 使用酶标仪测定, 以空白对照组调零, 测定各孔在波长为 450 nm 下的吸光度值(A), 记录结果。细胞增殖抑制率表达式如下:

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \left| \frac{\text{对照组平均吸光度值} - \text{处理组平均吸光度值}}{\text{对照组平均吸光度值}} \right| \times 100\%$$

1.6 蛋白质印迹实验(western blot)方法测定凋亡相关蛋白的表达

弃除 H₂O₂ 处理后的各组培养基, 每组中加入含有 1% PMSF 的细胞裂解液 100 μL, 并于 4℃, 14000 g/min 离心 10 min, 取上清液。依据碧云天生物技术研究所提供的操作方法进行 BCA 法细胞蛋白浓度的测定。随后使蛋白质充分变性, 每组取含 1× 上样缓冲液的 50 μg 蛋白上样并 SDS-PAGE 电泳。利用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜后, 将 PVDF 膜置于封闭液(由含 5% 脱脂奶粉的 1× TBST 缓冲液制成)中室温封闭 1 h。TBST 洗膜后分别加入兔抗人 Bax 抗体、Bcl-2 抗体、鼠抗人 p53 抗体以及 Tubulin 抗体(1:1000 稀释)4℃ 孵育过夜。次日洗膜后, 用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗(1:1000 稀释)分别室温孵育含有兔抗人 Bax 抗体、Bcl-2 抗体的 PVDF 膜 1 h; 用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠二抗(1:1000 稀释)分别室温孵育含有鼠抗人 p53 抗体以及 Tubulin 抗体的 PVDF 膜 1 h。TBST 洗膜 3 次, 使用 ECL 底物化学发光试剂盒(Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore)显色, 通过化学发光成像仪 ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Canada)成像, 利用目的蛋白相对含量/内参蛋白相对含量比值分析 Bax、Bcl-2 和 p53 蛋白的表达水平。

1.7 统计学处理

所有实验操作均独立重复 3 次。采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。所有计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间统计学差异采用单因素方差分析(one way ANOVA)来评估。若统计结果中 P 值<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察人外周血来源 EPCs 细胞形态及鉴定

倒置普通光学显微镜下观察发现, 从外周血中分离得到的单个核细胞于接种至细胞培养板 1 天后, 开始贴壁, 细胞折光

性增强;培养至第 8 天,细胞出现集落样生长,梭形细胞、椭圆形细胞数目增多;在接种的第 16 天,细胞集落明显扩大,排列密集,保持快速增殖,呈现短梭形铺路石样形态,此时细胞贴壁数目已达培养板底面积的 80%左右,进行第一次传代。本实验组已就此内皮祖细胞进行鉴定^[5]。

2.2 CCK-8 法检测不同浓度过氧化氢处理后 EPCs 的细胞存活情况

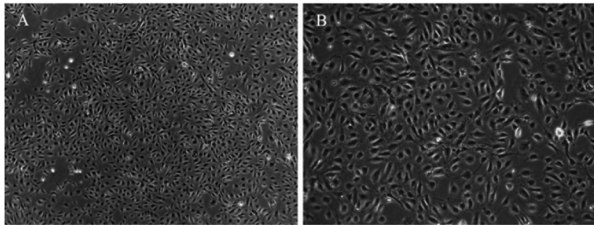


图 1 原代培养第 16d 倒置显微镜下 EPCs 呈典型铺路石样形态(A× 50, B× 100)

Fig.1 A cobble-stone morphology of endothelial progenitor cells (EPCs) cultured in 16th day under an inverted microscope (A: × 50, B: × 100)

本实验用 CCK-8 法来分析不同浓度 H_2O_2 对内皮祖细胞生存能力的影响。结果显示,不同浓度的 H_2O_2 对内皮祖细胞生存能力的影响呈双相性改变(图 2)。

过氧化氢浓度在 150 $\mu\text{mol/L}$ 范围以内时,随着浓度增加,内皮祖细胞集落生长速度加快,细胞间排列紧密,增殖能力逐渐增加;相对于对照组,在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢处理组中细胞的平均增殖率分别为 3.98%、7.01%和 12.22%($P < 0.05$)。

在过氧化氢浓度大于 150 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组中,内皮祖细胞出现脱壁现象,生长速度减慢,生存能力随 H_2O_2 浓度增加而逐渐受到抑制;相对于对照组,在浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢处理组中细胞的平均抑制率分别为 8.65%、14.26%和 25.69%($P < 0.05$)。

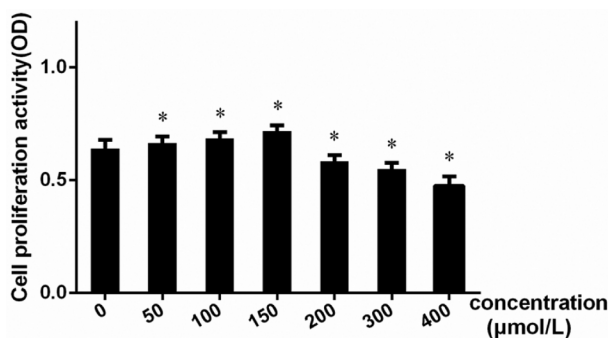


图 2 CCK-8 法检测不同浓度 H_2O_2 对 EPCs 存活的影响 (n=6; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$)

Fig.2 Effects of the different concentrations of hydrogen peroxide on the proliferation of EPCs via CCK-8 assay (n=6; * $P < 0.05$)

2.3 不同浓度过氧化氢对 EPCs 凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 检测不同浓度过氧化氢处理 12 h 后 EPCs 中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 p53 的表达水平,结果如图 3 显示,当过氧化氢浓度在 150 $\mu\text{mol/L}$ 范围以内时,Bax、p53 的蛋白表达水平随过氧化氢浓度增加而降低,Bcl-2 蛋白水平则随着其浓度增加而上调;在大于浓度 150 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组中,

Bax、p53 的表达水平随过氧化氢浓度增加而增加,而 Bcl-2 蛋白与 Bax、p53 结果相反。

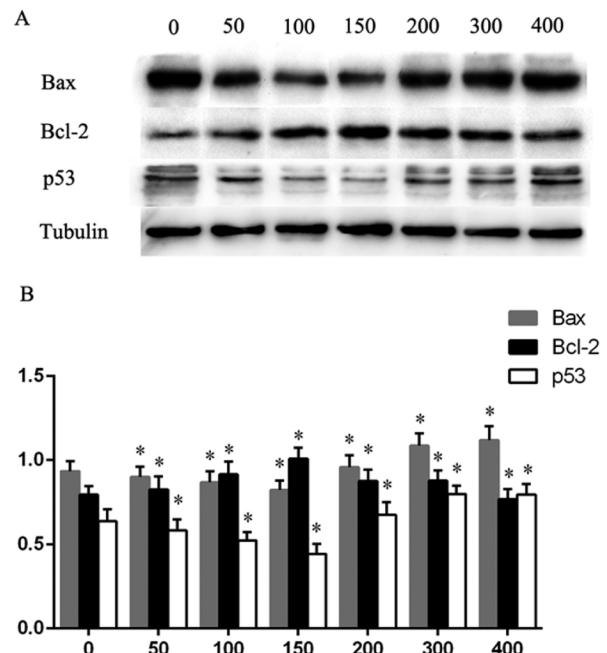


图 3 不同浓度过氧化氢处理内皮祖细胞后 Bax、Bcl-2 和 p53 的蛋白表达水平

图 3A 为 western blot 经化学发光成像仪检测所得;

图 3B 为经软件统计分析目的蛋白相对含量/内参蛋白相对含量比值所得(n=3; * 表示与对照组相比, $P < 0.05$)

Fig.3 The level of the proteins Bax, Bcl-2 and p53 expression in EPCs treated by different concentrations of hydrogen peroxide

Fig.3A. The protein bands were detected by chemiluminescence imaging;

Fig.3B. Bar graph was obtained from quantification and statistical analysis. (n=3; * $P < 0.05$)

3 讨论

近年来,人们越来越关注影响内皮祖细胞生存能力和功能状态的多种因素和机制以优化血管再生和器官修复的细胞疗法。已有研究发现,多种因素均可导致内皮祖细胞的(endothelial progenitor cells, EPCs)功能失调与凋亡。冠心病患者可出现血循环或骨髓中 EPCs 数量减少以及功能障碍^[6];衰老可降低缺血时内皮祖细胞的动员,抑制其功能活性^[7];高糖状态可通过 SIRT1 表达减少、酶活性的降低和乙酰化 FOXO1 升高而引起 EPCs 数目的减少^[8];高同型半胱氨酸可显著降低端粒酶活性以及 Akt 磷酸化而加速 EPCs 衰老,降低其增殖活性^[9]。

各种原因引起细胞损伤和细胞凋亡的一个共同途径就是氧化应激,它最终产生了一种活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS)如氧自由基、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)等,这类物质生成过多而细胞内抗氧化物质产生不足的不平衡状态。为研究氧化应激对内皮祖细胞存活能力的影响,本实验使用不同浓度过氧化氢处理外周血来源的内皮祖细胞,检测细胞存活能力发现,EPCs 在较低浓度过氧化氢条件下存活能力增强,而在较高浓度条件下细胞凋亡。

过多的 ROS 可与细胞膜和线粒体膜上脂质相互作用,增加膜通透性,破坏其完整性,导致细胞损伤^[10],除此之外,还可引起蛋白质的氧化损伤以及 DNA 突变等影响^[11]。过氧化氢可通过 cAMP/PKA/CREB 信号通路引起人脐静脉血内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)内血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)表达增多,生存能力下降,从而使细胞凋亡^[12]。此外,体育锻炼促进循环中 EPCs 的增多,而内源性过氧化氢增多可显著降低循环 EPCs 的水平^[13]。

目前,关于不同浓度 H_2O_2 对人外周血来源的内皮祖细胞存活能力的影响研究较少,其作用机制也不十分明确。为探究高浓度 H_2O_2 对 EPCs 凋亡的机制,本实验在高浓度过氧化氢($\geq 200 \mu\text{mol/L}$)处理后,经 western blot 分析显示,促凋亡蛋白 p53/Bax 随着 H_2O_2 浓度增加而表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降。实验结果表明,氧化应激可通过 p53-Bax 途径引起 EPCs 的凋亡。其机制可能是 H_2O_2 通过 p53 激活促凋亡因子 Bax,使其构象改变并迁移至线粒体,释放细胞色素 c 触发细胞凋亡反应^[14]。Bcl-2 蛋白多数定位于哺乳动物细胞线粒体外膜,与 Bax 同属于 Bcl-2 家族,且二者具有较高的同源性,均以线粒体为靶细胞器,但发挥与 Bax 相反的作用。Bcl-2 与 Bax 结合形成复合物,难以形成跨膜通道,阻断细胞色素 c 从线粒体的释放,抑制细胞凋亡^[15-17]。

尽管过量的 ROS 可导致细胞功能障碍,引起凋亡,而生理水平下的 ROS 对转录因子激活、调节细胞功能、增殖和分化等方面具有重要意义^[18,19]。研究发现,葡萄糖氧化酶可持续性产生低剂量 H_2O_2 ,促进内皮细胞增殖,相反这种作用可被过氧化氢酶抑制^[20]。Dernbach 等^[21]研究了人外周血来源 EPCs 的抗氧化防御体系及其对氧化剂的敏感性后发现,与 HUVECs 或者 CD14⁺ 单核细胞相比,EPCs 内具有的基础 ROS 表达水平较低,对氧化应激具有更高的抵抗能力,EPCs 对 H_2O_2 诱导的细胞凋亡表现得相对不敏感,并且 EPCs 的各种细胞内抗氧化酶表达水平均显著高于 HUVECs 和 人微血管内皮细胞。基于这些发现,我们可以推测,内皮祖细胞中存在比内皮细胞更强的抗氧化防御体系,这使得 EPCs 在 ROS 较多的环境中仍能持续增殖和血管再生。反之,当细胞抗氧化体系受损时,EPCs 就会对氧化应激的敏感性增强,引起细胞凋亡以及端粒酶失活^[22]。为阐明较低浓度 H_2O_2 对 EPCs 增殖作用的机制,本实验通过 western blot 检测凋亡相关蛋白表达发现,在一定范围($\leq 150 \mu\text{mol/L}$)内,促凋亡蛋白 p53/Bax 表达水平随 H_2O_2 浓度增加而逐渐减少,抗凋亡蛋白 Bcl-2 则表达上调。这表明在较低浓度 H_2O_2 环境下,EPCs 存活能力增强可能与 p53-Bax 信号通路活性的下降有关。

总之,本实验证实,过氧化氢对内皮祖细胞存活能力和凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、p53 表达的影响均呈双相性变化。较低浓度($\leq 150 \mu\text{mol/L}$) H_2O_2 可增强人外周血来源内皮祖细胞的存活能力,较高浓度($\geq 200 \mu\text{mol/L}$) H_2O_2 则促进 EPCs 的凋亡。这一作用与 p53-Bax 信号通路的调节相关。阐明影响 EPCs 存活的因素可以为以后更深入地研究 EPCs 血管新生提供理论基础。

参考文献(References)

- [1] Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction[J]. Basic Res Cardiol, 2008, 103(5): 398-406
- [2] Zhang M, Malik AB, Rehman J. Endothelial progenitor cells and vascular repair[J]. Curr Opin Hematol, 2014, 21(3): 224-228
- [3] Hung HS, Shyu WC, Tsai CH, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells as therapeutics for cardiovascular diseases [J]. Cell Transplant, 2009, 18(9): 1003-1012
- [4] Mansour S, Roy DC, Bouchard V, et al. One-Year Safety Analysis of the COMPARE-AMI Trial: Comparison of Intracoronary Injection of CD133 Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction [J]. Bone Marrow Res, 2011, 2011: 385124
- [5] 黄黎亚, 王飞, 曹青, 等. FOXO3a 沉默或过表达对内皮祖细胞增殖的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(1): 30-35
Huang Li-ya, Wang Fei, Cao Qing, et al. Effects of FOXO3a silencing or over-expression on the proliferation of Endothelial Progenitor Cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2013, 35(1): 30-35
- [6] Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, et al. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice[J]. Circulation, 2000, 102(24): 2919-2922
- [7] Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ, et al. Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia [J]. Circulation, 2007, 116(24): 2818-2829
- [8] Balestrieri ML, Rienzo M, Felice F, et al. High glucose downregulates endothelial progenitor cell number via SIRT1 [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784(6): 936-945
- [9] Zhu JH, Chen JZ, Wang XX, et al. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(5): 648-652
- [10] Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites[J]. Am J Surg, 1991, 161(4): 488-503
- [11] Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system[J]. Circ Res, 2012, 110(10): 1364-1390
- [12] Mu X, He K, Sun H, et al. Hydrogen peroxide induces overexpression of angiotensin-converting enzyme in human umbilical vein endothelial cells[J]. Free Radic Res, 2013, 47(2): 116-122
- [13] Suvorova T, Kumpf S, Rauch BH, et al. Hydrogen peroxide inhibits exercise-induced increase of circulating stem cells with endothelial progenitor capacity[J]. Free Radic Res, 2010, 44(2): 199-207
- [14] Cheng J, Cui R, Chen CH, et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates p53-dependent activation of proapoptotic Bax leading to apoptosis of differentiated endothelial progenitor cells[J]. Endocrinology, 2007, 148(5): 2085-2094
- [15] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC[J]. Nature, 1999, 399(6735): 483-487
- [16] Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis[J]. Science, 1997, 275(5303): 1132-1136(下转第 1296 页)

- Journal of Clinical, 2005, 21(6):513
- [3] Pawlik TM, Vauthey JN. Surgical margins in hepatic surgery for colorectal liver metastases: complete resection not necessarily defines outcome[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(3):677-679
- [4] 秦复康,何凤生,刘统俊.急性有机磷农药中毒"中间期肌无力综合征"的诊断及分级诊断[J].中华劳动卫生职业病杂志,2000,18(3):146-150
- Qin Fu-kang, He Feng-sheng, Liu Tong-jun. Diagnosis and classification diagnosis of acute organophosphorus Pesticide Poisoning "intermediate myasthenia syndrome"[J]. Chinese Journal of Labor Occupational Health, 2000,18(3):146-150
- [5] GBZ 8-2002.职业性急性有机磷杀虫剂中毒诊断标准[S].北京:中华人民共和国卫生部,2002
- GBZ 8-2002. Occupational acute organophosphorus Pesticide Poisoning diagnostic criteria [S]. Beijing: People's Republic of China Ministry of Health, 2002
- [6] World Health Organization. The Impact of Pesticides on Health: Preventing Intentional and Unintentional Deaths from Pesticide Poisoning [EB/OL]. Available at: http://www.who.int/mental_health/Prevention/suicide/en/PesticidesHealth2.Pdf [Date accessed: January 21, 2011]
- [7] Senanayake N, Karalliedde L. Neurotoxic effects of organophorus insecticides. An intermediate syndrome [J]. N Engl J Med, 1987, 316(13): 761-763
- [8] Dandapani M, Zachariah A, Kavitha MR, et al. Oxidative damage in intermediate syndrome of acute organophosphorus Poisoning[J]. Ind J Med Res, 2003, 117(3):253-259
- [9] Khan S, Hemalatha R, Jeyaseelan L, et al. NeuroParalysis and oxime efficacy in organophosphate Poisoning: a study of butyrylcholinesterase[J]. Hum Exp Toxicol, 2001, 20(4):169-174
- [10] 王继敏. 盐酸戊乙奎醚治疗有机磷中毒中间综合征效果评价[J]. 药物与临床, 2007, 4(24):47-48
- Wang ji-min. Penehyclidine hydrochloride treatment of organophosphate Poisoning intermediate syndrome Evaluation [J]. Drugs and clinical, 2007, 4(24):47-48
- [11] Shadnia S, Darabi D, Pajoum A, et al. A simplified acute Physiology score in the Prediction of acute organophosphate Poisoning outcome in an intensive care unit[J]. Hum Exp Toxicol, 2007, 26(8): 623-627
- [12] Rafai MA, Boulaajaj FZ, Bourezguim, et al. Clinical and electrophysiological aspects of acute organophosphate intoxication[J]. Neuromuscul Clin, 2007, 37(1):35-39
- [13] Shailesh KK, Vengamm B. Clinical and electrophysiological study of immediate syndrome in Patients with organophosphorus Poisoning[J]. J Assoc Physicians India, 1994, 42(2):451
- [14] Pereira EF, Aracava Y, Alkondon M, et al. Molecular and cellular actions of galantamine: clinical implications for treatment of organophosphorus Poisoning[J]. J Mol Neurosci, 2010, 40(1-2):196-203
- [15] Moffatt A, Mohammed F, Eddleston M, et al. Hypothermia and fever after organophosphorus Poisoning in humans-A Prospective case series[J]. J Med Toxicol, 2010, 6(4):379-385
- [16] Zhang Y, Leng YF, Xue X, et al. Effects of Penehyclidine hydrochloride in small intestinal damage caused by limb ischemia-reperfusion [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(2):254-259
- [17] Zhan J, Zhang ZZ, Chen C, et al. Penehyclidine hydrochloride attenuates LPS-induced iNOS Production by inhibiting P38 MAPK activation in endothelial cells[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2):1261-1265
- [18] Guven M, Sungur M, Eser B, et al. The effects of fresh frozen Plasma on cholinesterase levels and outcomes in Patients with organophosphate Poisoning[J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2004, 42(5):617-623
- [19] Thiermann H, Zilker T, Eyer F, et al. Monitoring of neuromuscular transmission in organophosphate Pesticide-Poisoned Patients [J]. Toxicol Lett, 2009, 191(2-3):297-304
- [20] Paudyal BP. Organophosphorus Poisoning [J]. J Nepal Med Assoc, 2008, 47(172):251-258
- [21] Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, et al. Management of acute organophosphorus Pesticide Poisoning [J]. Lancet, 2008, 371(9612): 597-607
- (上接第 1225 页)
- [17] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 887-896
- [18] De Bono DP, Yang WD. Exposure to low concentrations of hydrogen peroxide causes delayed endothelial cell death and inhibits proliferation of surviving cells[J]. Atherosclerosis, 1995, 114(2): 235-245
- [19] Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses[J]. Endothelium, 2002, 9(4): 231-238
- [20] Ruiz-Gines JA, Lopez-Ongil S, Gonzalez-Rubio M, et al. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 35(1): 109-113
- [21] Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, et al. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress[J]. Blood, 2004, 104(12): 3591-3597
- [22] Fujii H, Li SH, Sznitko PE, et al. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(11): 2476-2482