论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1854-05

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

金 鑫,易 龙,陈春烨,糜漫天 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,营养与食品安全重点实验室,重庆市医学营养研究中心,重庆 400038)

摘 要:目的 观察飞燕草素(Delphinidin-3-glucoside,Dp-3-glc)对氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导的血管内皮细胞株EA.hy926的氧化应激损伤、细胞膜电位和线粒体膜电位改变及p38MAPK磷酸化的影响,探讨其抑制内皮细胞氧化应激的分子机制。**方法** 不同浓度(25、50、100、200 μmol/L)的Dp-3-glc预处理内皮细胞2 h后,Ox-LDL(100 μg/ml)继续处理24 h,MTT法检测细胞活力;细胞培养上清液LDH、NO、MDA水平及细胞匀浆SOD酶活性采用试剂盒分别检测;荧光探针DCFH-DA标记细胞内活性氧(ROS)、膜电位敏感的阳离子荧光探针DiSC3(5)和阴离子荧光探针DiBAC4(3)分别标记细胞膜电位,罗丹明-123标记线粒体膜电位,激光共聚焦显微镜分别检测荧光强度;Western blot法检测细胞内p38MAPK的磷酸化水平。**结果** Dp-3-glc能明显抑制Ox-LDL诱导的内皮细胞MDA和LDH生成增加、NO分泌减少及细胞内SOD酶活力降低,并显著减少细胞内活性氧(ROS)生成。实验发现Ox-LDL能明显诱导细胞膜电位升高和线粒体膜电位下降,及增强膜电位相关的p38MAPK的磷酸化水平,而Dp-3-glc预处理能明显减弱Ox-LDL诱导的膜电位改变,并抑制p38MAPK的磷酸化。**结论** Dp-3-glc可能通过影响细胞膜电位、线粒体膜电位及膜电位相关的p38MAPK的磷酸化水平,削弱Ox-LDL诱导的内皮细胞氧化应激损伤。

关键词: 飞燕草素葡萄糖苷;动脉粥样硬化;氧化低密度脂蛋白;血管内皮细胞;膜电位;p38MAPK

中图法分类号: R151.3; R322.12; R329.25 **文献标识码:** A

Delphinidin-3-glucoside inhibits Ox-LDL-induced injury in vascular endothelial cells: roles of membrane potential and MAPK phosphorylation

JIN Xin, YI Long, CHEN Chun-ye, MI Man-tian (Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Medical Nutrition Research Center, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of delphinidin-3-glucoside (Dp-3-glc) on the oxidized injury, alteration of membrane potential and mitochondria potential, and p38MAPK phosphorylation of vascular endothelial cell line EA.hy926 induced by oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) and explore the molecular mechanism of the inhibitory effect of Dp-3-glc on endothelial oxidized injury. **Methods** Endothelial cells were preincubated for 2 h with Dp-3-glc at the concentrations of 25, 50, 100 or 200 μmol/L and then treated for another 24 h with Ox-LDL of 100 μg/ml. MTT assay was used to detect the cell viability. MDA, LDH and NO in the supernatant and intracellular SOD activity were determined by the corresponding detection assay kits. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production marked by DCFH-DA, membrane potential marked by DiSC3(5) and DiBAC4(3) and mitochondria potential marked by rhodamine-123 were respectively measured by laser confocal scanning microscopy. The phosphorylation level of p38MAPK was determined by Western blot assay. **Results** Preincubation with Dp-3-glc significantly inhibited Ox-LDL-induced reduction of cell viability, increase of MDA and LDH production, decrease of NO release and SOD activity, and intracellular ROS production

基金项目: "十一五"国家科技支撑计划(2008BAI58B06);国家自然科学基金重点项目(30730079);重庆市营养与食品安全重点实验室科技创新能力建设资助项目(2006CA1003)

Supported by the National Key Technology R&D Program (2008BAI58B06), the National Natural Science Foundation of China (30730079), and the Innovation Project of Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety (2006CA1003)

作者简介: 金 鑫,女,辽宁省沈阳市人,硕士研究生,医师,主要从事营养与心血管疾病方面的研究。电话:(023)68752291,E-mail:jinxin983@yahoo.cn

通信作者: 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt@sina.com

收稿日期: 2009-07-06;**修回日期:** 2009-07-22

in the endothelial cells. Ox-LDL obviously elevated the membrane potential, declined the mitochondria potential and increased the p38MAPK phosphorylation, while preincubation with Dp-3-glc inhibited the effects of Ox-LDL. **Conclusion** Dp-3-glc attenuates the Ox-LDL-induced stress injury in endothelial cells through decreasing the membrane potential and suppressing p38MAPK phosphorylation.

Key words: delphinidin-3-glucoside; atherosclerosis; oxidized low density lipoprotein; vascular endothelial cells; membrane potential; p38MAPK

WHO 预测到 2010 年动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)将成为世界范围内最主要的疾病之一,AS 在我国的发病率也呈逐年上升趋势[1]。氧化应激引起的血管内皮细胞损伤是 AS 病变的重要特征,血浆氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,Ox-LDL)被认为是最重要的致粥样硬化因子[2-4]。近年来研究发现,广泛存在于各种蔬菜和水果等植物性食物中的花色苷具有明显的抗氧化性,其潜在的抗 AS 作用已成为目前研究的热点[5],但其保护内皮细胞的机制尚不十分清楚。本研究以人血管内皮细胞株 EA.hy926 为研究对象,观察飞燕草素葡萄糖苷(Delphinidin-3-glucoside,Dp-3-glc)[6,7]对 Ox-LDL 诱导的内皮细胞氧化应激损伤的影响,并围绕细胞膜电位和线粒体膜电位的改变,及膜电位相关的细胞内重要信号分子 p38MAPK 的磷酸化水平变化,探讨 Dp-3-glc 保护内皮细胞和抗 AS 作用的可能机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　化学试剂　　Dp-3-glc 纯品购自法国 Extrasynthese 公司,以 DMSO 溶解,分装后 -20 ℃保存。DMEM 液体培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、乳酸脱氢酶(Actate dehydrogenase,LDH)、一氧化氮(Nitric oxide,NO)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒均购自南京建成生物工程公司。Ox-LDL 购于广州中山大学公共卫生学院实验室,经硫代巴比妥酸反应值测定 LDL 氧化修饰程度为 21.8 nmol/mg,Lowry 法测定蛋白浓度1.7 mg/ml。细胞膜电位检测阳离子荧光探针 3,3′-dipropylthiadicarbocyanine iodide[DiSC3(5)]和阴离子荧光探针 bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol[DiBAC4(3)]由本实验室韦娜博士馈赠[8]。活性氧(Reactive oxygen species,ROS)检测荧光探针 2′,7′-二氯荧光素二乙酯(2′,7′-dichlorofluorescein diacetate,DCFH-DA)和细胞核荧光染料 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)均购自美国 Sigma 公司。线粒体膜电位荧光探针罗丹明-123 购自美国 Molecular Probes 公司。兔抗人 p38MAPK 一抗、生物素标记二抗和化学发光试剂盒均购自北京碧云天生物技术有限公司。

1.1.2　细胞株　　人血管内皮细胞株 EA.hy926 由西南医院烧伤研究所梁光萍博士惠赠[9],用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO_2、100% 饱和湿度条件下培养。

1.2　方法

1.2.1　MTT 法检测细胞活力　　取对数生长期的 EA.hy926 细胞,以 1×10^5/ml 接种于 96 孔板,每孔 100 μl。细胞贴壁后,以不同浓度(25、50、100、200 μmol/L)的 Dp-3-glc 预处理 2 h,弃去培养液,再以 100 μg/ml 的 Ox-LDL 继续处理 24 h。以含 0.2% DMSO 的 DMEM 培养基为对照组,每组各 5 个平行。每孔加入 MTT(5 mg/ml)20 μl,继续培养 4 h,小心吸去上清液,每孔加入 150 μl 的 DMSO 溶解结晶颗粒,波长 490 nm 处测定光密度值[D(490)]。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。

1.2.2　试剂盒检测细胞匀浆 SOD 活力及细胞培养上清液 LDH、NO 和 MDA 水平　　细胞以 5×10^5/ml 接种于 24 孔板,以不同浓度(25、50、100、200 μmol/L)的 Dp-3-glc 预处理 2 h 后,弃去培养液,再以 100 μg/ml 的 Ox-LDL 继续处理 24 h,并设 0.2% DMSO 为对照组,每组各 4 个平行。分别按照各试剂盒说明书检测细胞匀浆 SOD 活力及细胞培养上清液 LDH、NO 和 MDA 水平。完全重复实验 3 次,计算各组平均值和标准差。

1.2.3　激光共聚焦显微镜检测细胞内 ROS 生成　　实验分为对照组、100 μg/ml Ox-LDL 处理 24 h 组、Dp-3-glc(100 μmol/L)预处理 2 h 后 Ox-LDL 处理 24 h 组。各组细胞分别加入终浓度为 50 μmol/L 的 DCFH-DA,37 ℃孵育 50 min 后,PBS 轻洗 3 次。细胞核荧光染料 DAPI(10 μg/ml)染色 3 min 后 PBS 轻洗 2 次。激光共聚焦显微镜检测荧光强度,DCFH-DA 的激发波长和发射波长分别为 488 nm 和 510 nm,DAPI 的激发波长和发射波长分别为 340 nm 和 488 nm。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,并在激发光下发出蓝色荧光,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。随机选择 10 个视野,Image J 软件分析各组荧光强度。设定对照组平均荧光强度为 100%,各组相对荧光强度等于各组平均荧光强度与对照组平均荧光强度比值的百分数。

1.2.4　细胞膜电位测定　　将处于生长期的 EA.hy926 细胞接种于 24 孔板,制备细胞爬片,实验分组同 1.2.3。各组细胞贴壁后,分别加入终浓度为 1 mmol/L 的膜电位敏感的阳离子荧光探针 DiSC3(5)和阴离子荧光探针 DiBAC4(3)于 37 ℃避光孵育 30 min,激光共聚焦显微镜测定荧光强度。DiSC3(5)的激发波长和发射波长分别为 651 nm 和 675 nm,DiBAC4(3)的激发波长和发射波长分别为 493 nm 和 516 nm。随机选择 10 个视野,Image J 软件分析荧光强度,以与对照组平均荧光强度比值的百分数作为各组相对荧光强度。

1.2.5　线粒体膜电位测定　　将处于生长期的 EA.hy926 细胞接种于 24 孔板,制备细胞爬片,分组同 1.2.3。各组细胞贴

壁后,加入终浓度为 1 μg/ml 的罗丹明-123,避光孵育 20 min,用 PBS 洗涤 3 次,用激光共聚焦显微镜测定荧光强度,激发波长和发射波长分别为 507 nm 和 529 nm。选择 10 个视野,Image J 软件分析荧光强度,以与对照组平均荧光强度比值的百分数作为各组相对荧光强度。

1.2.6 Western blot 法检测细胞内 p38MAPK 磷酸化水平

实验分组同 1.2.3。收集各组细胞,用蛋白裂解液冰上裂解 30 min 后,4 ℃,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,用 Bradford 法进行蛋白定量,分装后 -20 ℃保存备用。各组分别取 80 μg 蛋白,加入 5×SDS 上样缓冲液,95 ℃煮沸 5 min 使蛋白变性,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 0.22 μm 的 PVDF 膜上。5% 的 BSA 封闭 2 h,用 1∶1 000 稀释的 p38MAPK 一抗 37 ℃孵育 1 h 后 4 ℃孵育过夜,生物素标记二抗孵育后,化学发光法显示目的条带,扫描图像后用软件 Quantity One 对条带进行灰度值分析,以目的蛋白与内参照 β-tubulin 灰度比值代表目的蛋白表达水平。

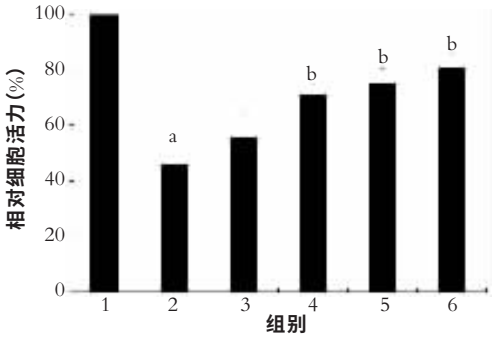
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较通过 Tukey-Kramer 法分析。

2 结果

2.1 Dp-3-glc 对细胞活力的影响

与对照组比较,100 μg/ml 的 Ox-LDL 能明显抑制内皮细胞活力($P<0.05$);不同浓度的 Dp-3-glc 预处理 EA.hy926 细胞 2 h 后,与 Ox-LDL 处理组相比,细胞活力随 Dp-3-glc 处理浓度增大而明显增加($P<0.05$),见图 1。结果表明,Ox-LDL 能显著削弱 Ox-LDL 对内皮细胞活力的抑制作用。



1:对照组;2:100 μg/ml Ox-LDL 组;3~6:25、50、100、200 μmol/L Dp-3-glc + 100 μg/ml Ox-LDL 组

a:$P<0.05$,与第 1 组比较;b:$P<0.05$,与第 2 组比较

图 1 Dp-3-glc 对 EA.hy926 细胞活力的影响

2.2 Dp-3-glc 对细胞匀浆 SOD 活力及培养上清液 LDH、NO 和 MDA 水平的影响

如表 1 所示,与对照组相比,100 μg/ml 的 Ox-LDL 能明显降低细胞内 SOD 酶活力和细胞培养液 NO 水平,并明显增加细胞培养液 LDH 和 MDA 水平($P<0.05$);而不同浓度的Dp-3-glc 预处理细胞 2 h,与 100 μg/ml Ox-LDL 处理组相比,细胞内 SOD 酶活力和细胞培养上清液 NO 水平显著增加($P<0.05$),细胞培养液 LDH 和 MDA 水平均显著下降($P<0.05$)。结果表明,Dp-3-glc 能显著减弱 Ox-LDL 对内皮细胞的氧化损伤。

2.3 激光共聚焦显微镜检测 Dp-3-glc 对 EA.hy926 细胞 ROS 生成的影响

绿色荧光显示细胞内 ROS 生成,蓝色荧光显示细胞核。与对照组(图 2A1)比较,100 μg/ml Ox-LDL(图 2A2)能显著增加细胞内 ROS 水平($P<0.05$);100 μmol/L 的 Dp-3-glc(图 2A3)预处理细胞 2 h 后,与 Ox-LDL 处理组相比,细胞内 ROS 产生显著降低($P<0.05$)。表明 Dp-3-glc 能显著抑制 Ox-LDL 诱导的细胞内 ROS 生成及氧化应激损伤。

2.4 激光共聚焦显微镜检测 Dp-3-glc 对 EA.hy926 细胞膜电位的影响

红色荧光(图 2B)显示阳离子荧光探针 DiSC3(5),绿色荧光(图 2C)显示阴离子荧光探针 DiBAC4(3)。分别与对照组比较(图 2B1、2C1),100 μg/ml Ox-LDL 处理后(图 2B2、2C2),荧光强度均明显增强($P<0.05$);而 100 μmol/L 的 Dp-3-glc(图 2B3、2C3)预处理细胞 2 h 后,荧光强度较 100 μg/ml Ox-LDL 处理组均明显降低。表明 Dp-3-glc 能明显降低 Ox-LDL 引起的细胞膜电位升高。

2.5 激光共聚焦显微镜检测 Dp-3-glc 对 EA.hy926 线粒体膜电位的影响

与对照组比较(图 2D1),Ox-LDL 处理组(图 2D2)的荧光强度明显减弱($P<0.05$),而 100 μmol/L 的 Dp-3-glc 预处理(图 2D3)后,与 Ox-LDL 处理组比较,荧光强度明显增强($P<0.05$)。结果表明,Dp-3-glc 能明显增加 Ox-LDL 诱导的线粒体膜电位降低。

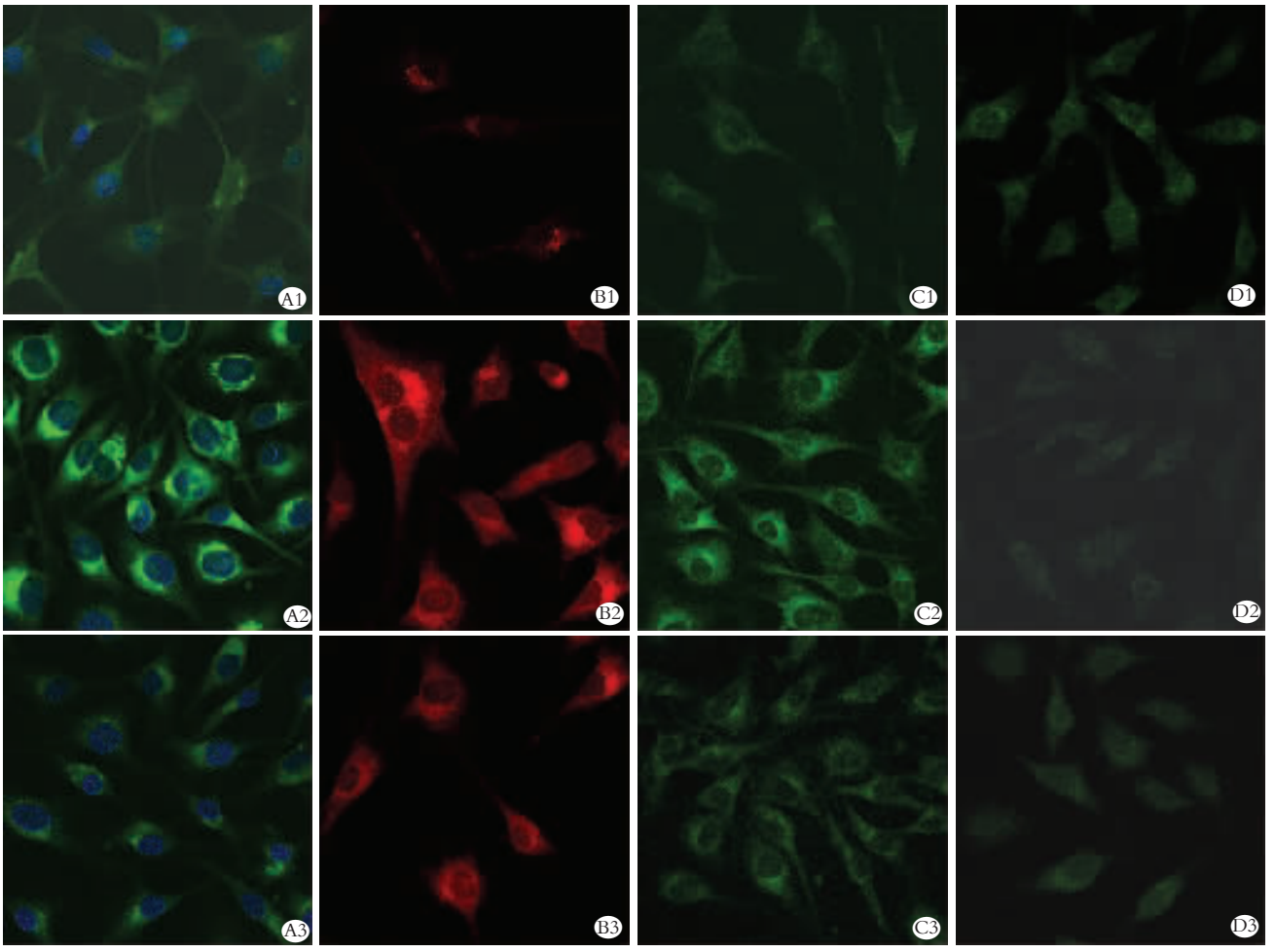
2.6 Western blot 法检测细胞内 p38MAPK 磷酸化水平

100 μg/ml Ox-LDL 处理内皮细胞 24 h 后,p38MAPK 磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。不同浓度(50、100、200 μmol/L)的 Dp-3-glc 预处理 2 h 后,与 Ox-LDL 处理组比较,p38MAPK 磷酸化水平显著降低($P<0.05$,图 3)。表明 Dp-3-glc 能明显抑制内皮细胞 p38MAPK 磷酸化水平。

表 1 Dp-3-glc 对 EA.hy926 细胞匀浆 SOD 活力及培养上清液 LDH、NO 和 MDA 水平的影响

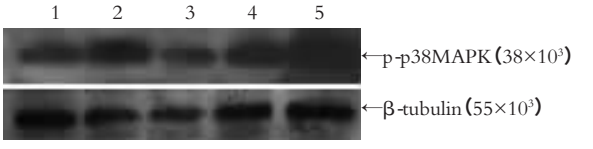
组别	SOD 活力(U/mg)	MDA 水平(nmol/ml)	LDH 水平(U/L)	NO 水平(μmol/L)
对照组	57.07±4.61	4.27±2.58	173.36±24.53	90.03±1.51
Ox-LDL (100 μg/ml)	20.83±2.21[a]	40.91±4.81[a]	689.70±71.16[a]	41.22±6.38[a]
Dp-3-glc(25 μmol/L)+Ox-LDL (100 μg/ml)	28.77±1.40	33.53±3.46	602.4±21.32	48.65±4.86
Dp-3-glc(50 μmol/L)+Ox-LDL (100 μg/ml)	39.47±0.87[b]	24.30±3.81[b]	502.75±39.83[b]	56.67±4.51
Dp-3-glc(100 μmol/L)+Ox-LDL (100 μg/ml)	44.47±3.84[b]	13.67±1.30[b]	396.52±24.74[b]	81.81±6.60[b]
Dp-3-glc(200 μmol/L)+Ox-LDL (100 μg/ml)	45.9±3.36[b]	10.42±1.36[b]	344.23±22.69[b]	80.50±5.75[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 Ox-LDL(100 μg/ml)组比较



A:DCFH-DA 检测 ROS 生成;B:阳离子荧光探针 DiSC3(5)检测细胞膜电位;C:阴离子荧光探针 DiBAC4(3)检测细胞膜电位;D:罗丹明-123 检测线粒体膜电位　　1:对照组;2:100 μg/ml Ox-LDL 处理组;3:100 μmol/L Dp-3-glc + 100 μg/ml Ox-LDL 组

图 2　激光共聚焦显微镜观察 Dp-3-glc 对 EA. hy926 细胞 ROS 生成、细胞膜电位和线粒体膜电位的影响　(×1 000)



1:对照组;2:100 μg/ml Ox-LDL 组;3 ~ 5:分别为 200、100、50 μmol/L Dp-3-glc + 100 μg/ml Ox-LDL 组

图 3　Dp-3-glc 对 EA. hy926 细胞 p38MAPK 磷酸化水平的影响

3　讨论

大量流行病学调查发现,富含花色苷类食物的摄入水平与 AS 发生呈负相关[10,11]。近年来国内外研究显示花色苷能明显影响内皮细胞活力、凋亡发生和分泌功能,但对内皮细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制尚不清楚[12,13]。花色苷种类繁多,约有 500 余种,Dp-3-glc 是目前研究较多的花色苷之一。本实验以 Ox-LDL 诱导损伤的血管内皮细胞 EA. hy926 为模型[14],发现 Dp-3-glc 预处理能明显增强细胞活力,抑制 Ox-LDL 诱导的 LDH 和 MDA 产生,促进内皮细胞 NO 分泌,增加细胞内抗氧化酶 SOD 水平,并能明显减少 Ox-LDL 诱导的细胞内 ROS 生成,结果表明,Dp-3-glc 能明显抑制 Ox-LDL 诱导的内皮细胞氧化应激损伤。

细胞膜电位与线粒体膜电位与维持内皮细胞正常功能密切相关,细胞膜电位改变可能导致与膜相关受体活性改变,影响下游信号转导通路,诱导与氧化应激相关基因如 eNOS、ET-1、ICAM-1 等表达,并可通过激活细胞膜 NADPH 氧化酶促进 ROS 生成增加;而线粒体膜电位改变与细胞凋亡发生直接相关,并可加重氧化应激损伤。本研究发现 Ox-LDL 能明显升高细胞膜电位和降低线粒体膜电位,而 Dp-3-glc 预处理能明显减弱 Ox-LDL 引起膜电位改变,提示 Dp-3-glc 预处理后影响的膜电位改变可能是其抑制内皮细胞氧化应激损伤的重要机制之一。最近的研究表明,花色苷能够通过细胞膜被内皮细胞摄取,并可与细胞浆内一些蛋白相互作用并影响其功能[15],表明花色苷作为小分子物质可能直接或间接影响大分子物质的功能。本实验分别以阳离子荧光探针 DiSC3(5)和阴离子荧光探针

DiBAC4(3)标记细胞膜电位,观察 Dp-3-glc 对细胞膜电位的影响。阳离子荧光探针 DiSC3(5)具有亲脂性,细胞超极化时易淬灭,去极化时荧光强度增强[16,17]。研究发现,Ox-LDL 处理后细胞内荧光强度明显增强,表明细胞发生去极化,而 Dp-3-glc 可明显使细胞部分恢复至极化状态。阴离子荧光探针 DiBAC4(3)于细胞去极化时易进入细胞,荧光强度增强,反之亦然[18]。本实验研究结果表明 Ox-LDL 处理后细胞内荧光强度显著增强,细胞发生去极化,而 Dp-3-glc 可明显使细胞部分恢复至极化状态。Ox-LDL 诱导的细胞去极化可能与内皮细胞氧化损伤密切相关;而花色苷预处理内皮细胞可能使细胞趋于超极化状态,从而部分抵消后续 Ox-LDL 诱导的细胞膜去极化。线粒体膜电位改变与细胞氧化损伤和凋亡发生密切相关,可影响线粒体电子传递和 ATP 生成,并可导致 caspase 释放,引起凋亡发生[19]。本研究发现,Dp-3-glc 预处理能明显抑制 Ox-LDL 诱导的线粒体膜电位改变,揭示线粒体膜电位可能在 Dp-3-glc 抑制内皮细胞氧化应激损伤中起重要作用。

p38MAPK 作为细胞内重要的信号分子,参与细胞增殖、分化及凋亡的调控,在内皮细胞氧化应激损伤中也起重要作用,细胞膜电位改变可能影响膜相关 p38MAPK 的磷酸化水平。p38MAPK 与细胞膜多个受体活化状态密切相关,并介导下游多个氧化应激相关基因表达。本研究发现,p38MAPK 磷酸化水平在 Ox-LDL 处理后明显增强,可能介导下游与细胞凋亡、炎症因子释放、氧化损伤等相关基因的表达,而 Dp-3-glc 能明显抑制 Ox-LDL 导致的 p38MAPK 磷酸化水平增加,揭示 Dp-3-glc 可能通过影响细胞膜电位改变而抑制 p38MAPK 磷酸化导致的相关基因表达。

综上所述,本研究发现,Dp-3-glc 对内皮细胞氧化应激损伤具有抑制作用,并可能通过影响细胞膜电位和线粒体膜电位的改变及细胞内重要信号分子 p38MAPK 的磷酸化水平,影响与氧化应激相关的基因表达,保护内皮细胞。本研究为深入揭示花色苷的内皮保护作用和探索其抗 AS 作用的分子机制提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] Lusis A J. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233 – 241.

[2] Sima A V, Stancu C S, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis[J]. Cell Tissue Res, 2009, 335(1): 191 – 203.

[3] Vannini N, Pfeffer U, Lorusso G, *et al*. Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E-selectin expression and modulation as a model[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(3): 221 – 225.

[4] Ueno T, Fukuda N, Tsunemi A, *et al*. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function[J]. J Hypertens, 2009, 27(3): 508 – 516.

[5] Liu L K, Lee H J, Shih Y W, *et al*. Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL[J]. J Food Sci, 2008, 73(6): H113 – H121.

[6] Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, *et al*. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis[J]. Br J Pharmacol, 2003, 139(6): 1095 – 1102.

[7] Martin S, Favot L, Matz R, *et al*. Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(4): 669 – 675.

[8] 韦 娜,糜漫天,杨志强,等. 洛伐他丁对乳腺癌细胞膜电位、MAPK 活性的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(8): 1490 – 1491.

[9] Liang G P, Su Y Y, Chen J, *et al*. Analysis of the early adaptive response of endothelial cells to hypoxia via a long serial analysis of gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384(4): 415 – 419.

[10] Neto C C. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases[J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(6): 652 – 664.

[11] Miyazaki K, Makino K, Iwadate E, *et al*. Anthocyanins from purple sweet potato Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki suppress the development of atherosclerotic lesions and both enhancements of oxidative stress and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(23): 11485 – 11492.

[12] Lazze M C, Pizzala R, Perucca P, *et al*. Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2006, 50(1): 44 – 51.

[13] Serraino I, Dugo L, Dugo P, *et al*. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure[J]. Life Sci, 2003, 73(9): 1097 – 1114.

[14] 陈春烨,张乾勇,易 龙,等. bcl-2 在氧化低密度脂蛋白诱导人血管内皮细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(8):663 – 667.

[15] Youdim K A, Martin A, Joseph J A. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29(1): 51 – 60.

[16] Plasek J, Hrouda V. Assessment of membrane potential changes using the carbocyanine dye, diS-C3-(5): synchronous excitation spectroscopy studies[J]. Eur Biophys J, 1991, 19(4): 183 – 188.

[17] Toyomizu M, Okamoto K, Akiba Y, *et al*. Anacardic acid-mediated changes in membrane potential and pH gradient across liposomal membranes[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1558(1): 54 – 62.

[18] Baxter D F, Kirk M, Garcia A F, *et al*. A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels [J]. J Biomol Screen, 2002, 7(1): 79 – 85.

[19] Hsieh Y S, Kuo W H, Lin T W, *et al*. Protective effects of berberine against low-density lipoprotein (LDL) oxidation and oxidized LDL-induced cytotoxicity on endothelial cells[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(25): 10437 – 10445.

(编辑 汪勤俭)