

# 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 过表达 对人脐静脉内皮细胞凋亡和活性氧水平的影响

孙文清<sup>1,2</sup>, 屈顺林<sup>2</sup>, 满永<sup>1</sup>, 王蕾<sup>2</sup>, 王抒<sup>1</sup>, 杨向东<sup>2</sup>, 黎健<sup>1</sup>

(1. 卫生部北京医院老年医学研究所, 北京市 100730; 2. 南华大学医学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶; 人脐静脉内皮细胞; 活性氧; 细胞凋亡

[摘要] 目的 研究尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 表达水平的改变对内皮细胞活性氧生成和凋亡的影响。方法 转染尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 表达质粒或 GFP 质粒到人脐静脉内皮细胞和 ECV304 中, 用逆转录聚合酶链反应检测转染后尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 mRNA 的水平, 用流式细胞仪检测细胞内活性氧水平和细胞凋亡率, 用 Hoechst 染色和 TUNEL 法观察细胞凋亡。结果 转染后的人脐静脉内皮细胞中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 mRNA 水平明显高于 GFP 质粒组和对照组, 不表达尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶的 ECV304 细胞系经转染后亦表达尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 mRNA; 流式细胞仪检测发现, 与 GFP 质粒组(ECV304 和人脐静脉内皮细胞的凋亡率分别为 1.56% ± 0.33% 和 4.56% ± 0.62%) 和对照组(ECV304 和人脐静脉内皮细胞的凋亡率分别为 1.05% ± 0.25% 和 2.28 ± 0.37%) 相比, 转染尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 质粒组内皮细胞的活性氧生成和凋亡率(ECV304 和人脐静脉内皮细胞的凋亡率分别为 9.60% ± 0.92% 和 12.41% ± 1.12%) 明显增加( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ); Hoechst 和 TUNEL 染色发现, 转染尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 质粒后有部分内皮细胞胞核出现凋亡特征性改变。结论 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 表达质粒可有效地转染人脐静脉内皮细胞, 引起尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 mRNA 水平升高; 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 过表达可诱导人脐静脉内皮细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Over-Expression of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4 on Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Level of Reactive Oxygen Species

SUN Wen-Qing<sup>1,2</sup>, QU Shun-Lin<sup>2</sup>, MANG Yong<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, WANG Shu<sup>1</sup>, YANG Xiang-Dong<sup>2</sup>, and LI Jian<sup>1</sup>

(1. Beijing Institute of Geriatrics & Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730; 2. Department of Medical School, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Reactive Oxygen Species; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the change of intracellular reactive oxygen species (ROS) level and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC and ECV304) after transfection with pcDNA3.1-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4) plasmid. **Methods** The level of NOX4 mRNA in hUVEC and ECV304 transfected with pcDNA3.1-NOX4 plasmid or pcDNA3.1-GFP plasmid was measured by RT-PCR. Intracellular ROS level and apoptosis rate were detected with flow cytometry. The apoptosis of hUVEC and ECV304 was observed by Hoechst staining and TUNEL staining. **Results**

NOX4 mRNA expression and ROS level were increased significantly in hUVEC transfected with pcDNA3.1-NOX4 plasmid compared with control group and the group that were transfected with pcDNA3.1-GFP plasmid ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). NOX4 mRNA was also detectable in ECV304 transfected with pcDNA3.1-NOX4 plasmid, but not in control ECV304. The apoptosis rate were elevated significantly in hUVEC and ECV304 transfected with pcDNA3.1-NOX4 plasmid (the apoptosis rate of ECV304 and hUVEC is 9.6% ± 0.9% and 12.4% ± 1.1% respectively) compared with other two groups (the apoptosis rate of ECV304 and hUVEC in control group is 1.05 ± 0.25%, 2.28 ± 0.37% respectively, the apoptosis rate of ECV304 and hUVEC in the group that were transfected with pcDNA3.1-GFP plasmid is 1.56% ± 0.33% and 4.56% ± 0.62% respectively) as detected by flow

[收稿日期] 2006-02-27 [修回日期] 2006-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金(30440065、30572082、30200103); 北京市自然科学基金(7052059)

[作者简介] 孙文清, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制和动物模型的复制, 联系电话 0734-8281409, Email 为 bs81409@yahoo.com.cn。屈顺林, 硕士, 从事动脉粥样硬化的分子发病机制研究, 联系电话 0734-8281409, Email 为 qushunlin78@126.com.cn。通讯作者黎健, 研究员, 博士研究生导师, 卫生部北京老年医学研究所所长, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机理和干细胞的分化机理, 联系电话 010-65237929, E-mail 为 lijli@hotmail.com。

cytometry ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). The results of Hoechst staining and TUNEL staining indicated that apoptotic cells present in hUVEC and ECV304 transfected with pcDNA3.1-NOX4 plasmid, but not in other two groups. **Conclusion** The transfection of plasmid pcDNA3.1-NOX4 results in over-expression of NOX4 in hUVEC and ECV304, inducing apoptosis of hUVEC and ECV304.

活性氧是调节血管功能状态的重要信号分子,体内有多种酶参与了活性氧的生成,如尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NADPH 氧化酶)、黄嘌呤氧化酶、线粒体呼吸链酶复合体和一氧化氮合酶等<sup>[1]</sup>,但入血管系统中的活性氧主要源于 NADPH 氧化酶(NOX)。2002 年 Soresch 等<sup>[2]</sup>应用定量 PCR 检测了内皮细胞中各种 NOX 组分的 mRNA 表达,发现 NADPH 氧化酶 4(NOX4)表达比 NADPH 氧化酶 2(NOX2)高 20 多倍。Ago 等<sup>[3]</sup>发现在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)中主要表达 NOX4 mRNA,用反义核酸技术抑制 NOX4 的表达能显著地降低内皮细胞中活性氧的生成,从而推测 NOX4 可能参与了内皮细胞内活性氧的生成。为此,我们将 NOX4 表达质粒转染到 hUVEC 中使细胞内 NOX4 高表达,然后检测细胞凋亡和活性氧含量的变化。通过对 NOX4 在内皮细胞氧化损伤过程中的作用机制研究,为探寻内皮细胞保护和动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)防治提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人脐静脉内皮细胞系 ECV304 由武汉大学中国典型物贮存中心提供,Ⅲ型胶原酶、明胶、RNase A 和碘化丙啶购自 Sigma, GFP 表达质粒(GFP-pcDNA3.1)和 NOX4 表达质粒(NOX4-pcDNA3.1)由瑞士日内瓦大学 Karl Heinz Krause 教授惠赠,转染试剂盒购自 Qiagen, Trizol 试剂盒购自 Gibco, 荧光探针 DCFH-DA 购自江苏碧云天公司,逆转录试剂盒、Hoechst33342 和 TUNEL 染色试剂盒购自 Promega。

### 1.2 细胞获取及培养

取约 20 cm 长新鲜脐带,用生理盐水冲洗去除残留血液,用 0.1% Ⅲ型胶原酶灌注 15 min,收集灌注液,800 r/min 离心 7 min,收集内皮细胞到 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中加入 5 mL 含 20% 胎牛血清的 M199 混合培养基在 37℃ 含 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养<sup>[4]</sup>,12 h 后更换新鲜培养基,以后每隔 2 天换培养基 1 次。待第 2~3 代细胞长至亚融合状态时用于实验。细胞系 ECV304 在 37℃ 含 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中用含 10% 胎牛血清的 M199 混合培养基培养。

### 1.3 质粒转染

GFP 表达质粒(GFP-pcDNA3.1)和 NOX4 表达质

粒(NOX4-pcDNA3.1)的转染按试剂盒说明书推荐的方法进行:将 2.4 μg DNA(GFP 质粒或 NOX4 质粒)加入到 600 μL 的内皮细胞缓冲液中,并加 19.2 μL 增强剂(Enhancer),涡旋混匀 1 s,在常温下放置 2~5 min,加入转染试剂 60 μL,涡旋混匀 10 s,在常温下放置 5~10 min,将含血清的新鲜培养基 3.6 mL 加到转染试剂中,并混匀,将上述混合液以每孔 713 μL 加入到已接种好 hUVEC 或 ECV304 细胞的 6 孔板中,混匀,12 h 后更换新鲜培养基并继续培养 24 h。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应检测

按 Trizol 试剂盒的说明提取各种细胞总 RNA,按照试剂盒推荐的实验程序完成逆转录反应。以 β-actin 和 NOX4 的引物进行 PCR 扩增,检测三组细胞中 NOX4 的表达变化。β-actin 的引物序列为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' 和 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3', 扩增片段长 539 bp, PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min 后,94℃ 变性 1 min → 68℃ 退火 1 min → 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环,72℃ 继续延伸 7 min; NOX4 的引物序列为 5'-CAG GAG GGC TGC TGA AGT ATC AA-3' 和 5'-TGA CTG GCT TAT TGC TCC GGA TA-3', 扩增片段长 303 bp, PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min 后,94℃ 变性 1 min → 68℃ 退火 1 min → 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环,72℃ 继续延伸 7 min。

### 1.5 流式细胞仪检测细胞内活性氧水平

以 DCFH-DA 作为荧光探针对细胞内活性氧进行荧光标记,用流式细胞仪检测每组细胞内的荧光强度。未加 DCFH-DA 的阴性对照组的自发荧光值定为 1,而其它各组的荧光值均为相对阴性对照值的相对值(各组的荧光强度/阴性对照的荧光强度)。转染 hUVEC 或 ECV304 细胞 12 h,换液继续培养 24 h 后收集细胞,用无血清培养基冲洗细胞 2 次,加 5 mL 无血清培养基和 7 μL DCFH-DA 到 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中,在 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 45 min, PBS 洗 3 次,用胰酶消化,加血清终止反应,用无血清培养基洗 2 次,用 3 mL 无血清培养基重悬细胞;其中阳性对照组加入阳性药物 Rosup(试剂盒提供)5 μL,常温下孵育 1 h; PBS 冲洗 2 次后用流式细胞仪检测细胞内活性氧。

### 1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

在转染 hUVEC 或 ECV304 细胞 12 h 后换液,继续培养 24 h 后收集细胞, PBS 洗涤细胞 1 次,用 70%

乙醇 5 mL 固定细胞过夜, 800 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入含 RNase A 的 PBS 500  $\mu$ L (终浓度 50 mg/L), 37  $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 min, 再加入碘化丙啶, 使其终浓度为 50 mg/L, 4  $^{\circ}$ C 避光 30 min, 300 目尼龙网过滤, 上流式细胞仪检测, 计数 10 000 个细胞, 测定凋亡的细胞数, 计算凋亡率。

### 1.7 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡

在转染 hUVEC 或 ECV304 细胞 12 h 后换新鲜培养基并继续培养 24 h 后收集细胞, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 Hoechst33342 浓缩液, 使其终浓度为 10 mg/L, 常温下孵育 15 min, 离心去上清, 滴片, 于荧光显微镜下观察。

### 1.8 TUNEL 法观察细胞凋亡

在 hUVEC 或 ECV304 细胞转染质粒 12 h 后换新鲜培养基并继续培养 24 h 收集细胞, 然后按 TUNEL 染色试剂盒推荐的程序检测细胞凋亡。

### 1.9 实验分组及数据统计

将已灭菌的圆形盖玻片放置在 6 孔板中, 每孔加入 0.5% 的明胶 1 mL, 常温下放置 45 min。用 0.1% 的胰酶消化第 1 代或第 2 代 hUVEC, 以每孔 0.8

$\times 10^5$  个细胞接种于已包被好明胶的 6 孔板中, 24 h 后待细胞长到 60% 时分别转染 GFP 质粒和 NOX4 质粒。ECV304 细胞的消化和接种同 hUVEC, 但不需用明胶包被。每种细胞均分为 3 组: (1) 未转染质粒的对照组; (2) 转染 GFP 质粒组 (GFP 组); (3) 转染 NOX4 质粒组 (NOX4 组)。实验重复三次。结果均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS10.0 进行统计处理, 统计学采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  判定差异的显著性。

## 2 结果

### 2.1 内皮细胞表达尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 mRNA 水平

转染 NOX4 质粒的 hUVEC 中 NOX4 mRNA 水平高于对照组和 GFP 组, 差异有显著性统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 同样转染 NOX4 质粒的 ECV304 也表达 NOX4 mRNA, 而对照组和 GFP 组未见 NOX4 mRNA 表达 (图 1)。这些结果表明, NOX4 质粒经转染后可在内皮细胞中有效表达。

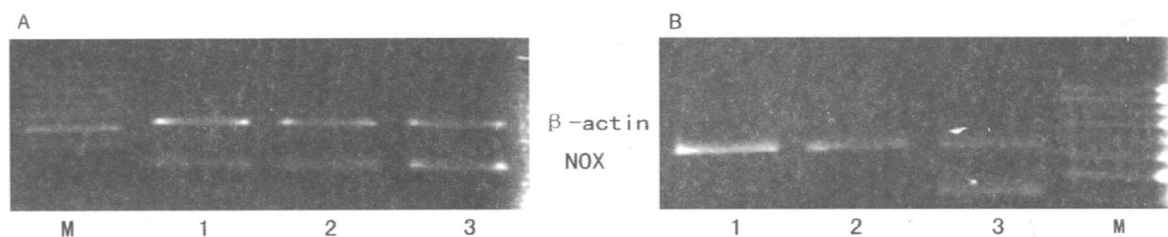


图 1. 内皮细胞中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 mRNA 的表达 A 为转染 NOX4 质粒后 hUVEC 中 NOX4 mRNA 的表达。B 为转染 NOX4 质粒后 ECV304 中 NOX4 mRNA 的表达。其中 M 为 DNA 标志物, 1 为对照组, 2 为 GFP 组, 3 为 NOX4 组。

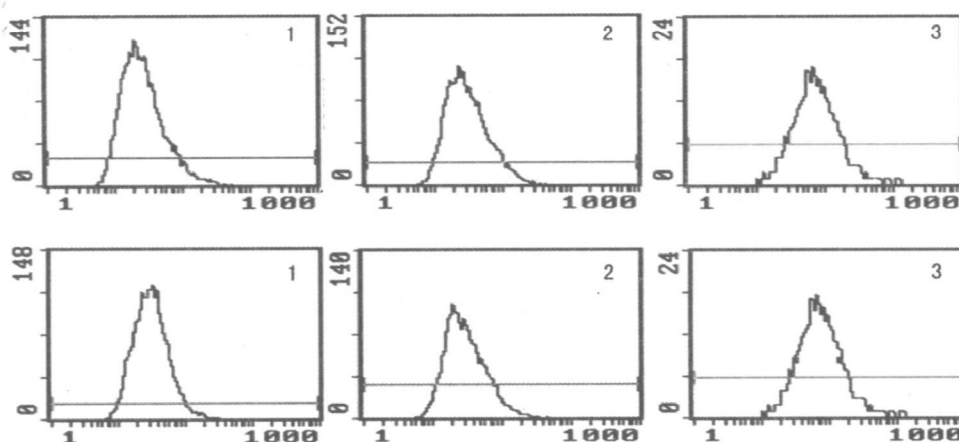


图 2. 流式细胞仪检测内皮细胞内的活性氧水平 图中, 纵坐标为细胞数, 横坐标为荧光强度。上图为转染 NOX4 质粒后 hUVEC 内 ROS 水平, 下图为转染 NOX4 质粒后 ECV304 内 ROS 水平。1 为对照组, 2 为 GFP 组, 3 为 NOX4 组。

## 2.2 内皮细胞活性氧水平

以 DCFH-DA 作为荧光探针用流式细胞仪检测细胞内活性氧, 观察转染 NOX4 质粒后活性氧水平。结果发现, 与对照组和 GFP 组相比, NOX4 组的 hUVEC 和 ECV304 中荧光值高峰均明显右移, 这说明细胞转染 NOX4 后, 产生高水平活性氧的细胞明显增多(图 2)。

## 2.3 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶 4 过高表达与细胞凋亡

为了确定转染 NOX4 质粒是否促进内皮细胞发生凋亡, 我们首先用流式细胞仪检测细胞凋亡, 结果发现, 对照组和 GFP 组的 hUVEC 在 G1 峰前未见亚 G1 峰(即凋亡峰), 凋亡率分别为 2.28%  $\pm$  0.37% 和 4.56%  $\pm$  0.62%, 而 NOX4 组的 hUVEC 可见一小的亚 G1 峰, 凋亡率为 12.41%  $\pm$  1.12%, 与其它两组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )(图 3 上)。同样, 对照组和 GFP 组的 ECV304 在 G1 峰前未见亚 G1 峰, 凋亡率分别为 1.05%  $\pm$  0.25% 和 1.56%  $\pm$  0.33%, 而 NOX4 组的 ECV304 可见一小的亚 G1 峰, 凋亡率 9.60%  $\pm$  0.92%, 较其它两组显著增高( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )(图 3 下)。

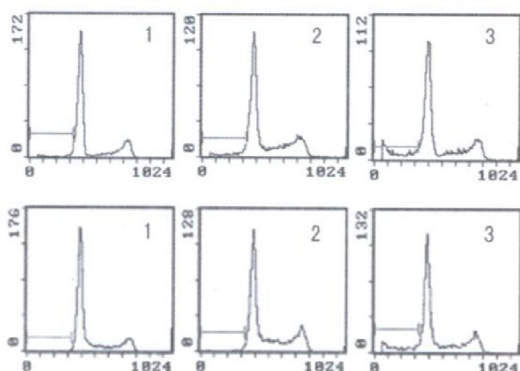


图 3. 流式细胞仪检测内皮细胞凋亡 图中, 纵坐标为细胞数, 横坐标为 DNA 含量。上图为转染 NOX4 质粒后 hUVEC 凋亡; 下图为转染 NOX4 质粒后 ECV304 凋亡。1 为对照组, 2 为 GFP 组, 3 为 NOX4 组。

进一步用 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡, 荧光显微镜下可见, 对照组和 GFP 组的 hUVEC 和 ECV304 细胞核形态正常, 而 NOX4 组的 hUVEC 和 ECV304 有部分细胞核出现染色质浓缩、边缘化等凋亡特征性改变(图 4)。

最后用 TUNEL 法观察细胞凋亡, NOX4 组的 hUVEC 和 ECV304 均可见 TUNEL 染色阳性细胞即细胞核被染成棕褐色, 而对照组和 GFP 组的 hUVEC 和 ECV304 未见异常(图 5)。以上结果表明, NOX4 在

内皮细胞中过表达可以导致细胞凋亡。

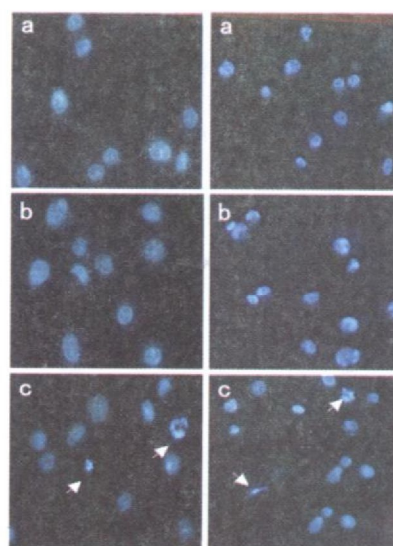


图 4. Hoechst 染色观察内皮细胞的胞核形态(10  $\times$  20) 左图为 hUVEC 的胞核形态, 右图为 ECV304 的胞核形态。a 为对照组; b 为 GFP 组; c 为 NOX4 组, 部分胞核出现染色质浓缩和边缘化(箭头所指处)。

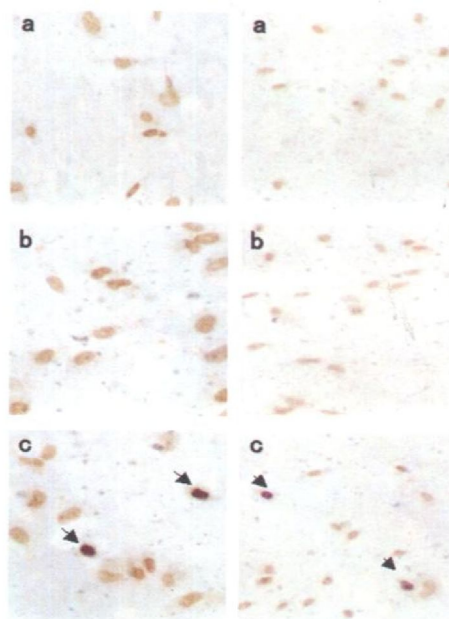


图 5. TUNEL 法检测内皮细胞凋亡( $\times 200$ ) 左图为转染 NOX4 质粒后 hUVEC 凋亡, 右图为转染 NOX4 质粒后 ECV304 凋亡。a 为对照组; b 为 GFP 组; c 为 NOX4 组, 部分细胞核被染成棕褐色(箭头所指处)。

## 3 讨论

虽然动脉粥样硬化是以细胞增殖为主的血管性疾病, 但近年来研究发现在动脉粥样斑块中, 细胞凋亡现象亦很常见, 其中包括内皮细胞的凋亡。血管



内皮细胞不仅是血液和组织之间的屏障,还具有多种重要生理功能。当血管内皮细胞受到损伤即可引起其功能变化,如内膜通透性增加,凝血纤溶系统失去平衡等,这已被认为是动脉粥样硬化的始动步骤。血管内皮细胞损伤能导致细胞自身凋亡,而内皮细胞凋亡又可增加血管壁对动脉粥样硬化形成的易感性,内皮完整性的丢失能够使血脂、单核细胞和平滑肌细胞更容易迁移、沉积进入血管内膜,损害血管系统,促进斑块发展,渗透到内膜的白细胞还能通过分泌细胞因子影响平滑肌细胞的增殖。因此,内皮细胞凋亡在动脉粥样硬化发生、发展过程中起着重要作用。许多因素都可以通过激活不同的信号途径而致细胞凋亡,内皮细胞凋亡的信号传递通路主要有:(1) Fas-FasL-caspase 死亡途径;(2) TNF- $\alpha$  介导的内皮细胞凋亡;(3) 细胞色素 C 途径。

目前,国内外对低密度脂蛋白、血管紧张素 $\text{Ang II}$ 、低氧血症等诱导的血管内皮细胞凋亡已进行了广泛、深入的研究<sup>[5-9]</sup>。活性氧在内皮细胞凋亡过程中起重要作用。活性氧对细胞的生长调控具有双重性,其作用与浓度有关:低浓度的活性氧可以促进细胞生长,而浓度过高则可诱导细胞凋亡<sup>[10-13]</sup>。我们最新的研究发现,人脐静脉内皮细胞中活性氧的产生主要源于 NOX4,在高葡萄糖、高 LDL、高血管紧张素 II 和无血清培养条件下,内皮细胞中 NOX4 mRNA 水平升高,同时细胞内活性氧生成和凋亡增加(结果在另文发表)。因此,我们推测 NOX4 可能通过产生活性氧而促进内皮细胞凋亡。实验结果表明,在转染 NOX4 质粒后的 hUVEC 中 NOX4 mRNA 的表达明显高于其它两组( $P < 0.05$ ),RT-PCR 的结果显示,ECV304 细胞中未检测到 NOX4 表达,但在转染 NOX4 表达质粒后的 ECV304 细胞中可检测到 NOX4 mRNA 表达,这表明转染 NOX4 质粒能使内皮细胞(hUVEC 和 ECV304)有效地表达 NOX4。以 DCFH-DA 为荧光探针用流式细胞仪检测细胞内活性氧水平,结果发现转染 NOX4 质粒组的 hUVEC 和 ECV304 中荧光值高峰均明显右移,这说明细胞转染 NOX4 后产生高水平活性氧的细胞明显增多,转染 NOX4 质粒后能促进内皮细胞内活性氧生成。流式细胞仪检测发现转染 NOX4 质粒组的 hUVEC 和 ECV304 细胞凋亡率均较其它两组(未转染质粒的对照组和转染 GFP 质粒组)明显增加( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )。Hoechst33342 染色也发现转染 NOX4 质粒组的部分 hUVEC 和 ECV304 细胞的胞核呈现凋亡特征

性改变即染色质浓缩边缘化,而未转染质粒的对照组和转染 GFP 质粒组未见胞核有凋亡改变。TUNEL 法染色结果显示转染 NOX4 质粒组的 hUVEC 和 ECV304 中部分细胞的胞核被染成棕褐色,而未转染质粒的对照组和转染 GFP 质粒组的 hUVEC 和 ECV304 未见被染成棕褐色的胞核。这说明高水平表达的 NOX4 可以促进细胞内活性氧生成和细胞凋亡,NOX4 可能通过调节细胞内活性氧的生成而参与细胞凋亡。但 Vaquero 等<sup>[14]</sup>用反义核酸技术抑制人类胰腺癌细胞系 MIA PaCa-2 中 NOX4 表达后能显著降低细胞内活性氧的生成并促进细胞凋亡,这可能是由于 NOX4 在不同的细胞类型中可能发挥不同的功能。细胞内活性氧可通过损伤线粒体和细胞膜而促进细胞凋亡,但它也可通过激活核因子 $\kappa\text{B}$ 、HSP70 和 HSP27 等抗凋亡通路而抑制凋亡。因此,对 NOX4 参与细胞凋亡的机理仍有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 屈顺林,唐蔚青,黎健. NADPH 氧化酶与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (2): 228-232
- [2] Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RZ, Szocs K, Sorescu GP, et al. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, 105: 1 429-435
- [3] Tetsuro A, Takanari K, Hiroaki O, Teruaki I, Youn HH, Junichi T, et al. NOX4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase [J]. *Circulation*, 2004, 109: 227-233
- [4] 刘江红,黎健,许贤豪,张华,国红,王红,等. 细胞培养的应用[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2002, 9 (4): 194-195
- [5] Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1999, 142 (1): 1-28
- [6] Li D, Yang B, Philips MI. Proapoptotic effects of Ang $\text{Ang II}$  in human coronary artery endothelial cells: Role of AT1 receptor and PKC activation [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: H786-792
- [7] Theilmeier G, Verhamme P, Dymarkowski S. Hypercholesterolemia in minipigs impairs left ventricular response to stress: association with decreased coronary flow reserve and reduced capillary density [J]. *Circulation*, 2002, 106 (9): 1 140-146
- [8] Dader DJ, Dugi KA. The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2000, 26 (5): 521-528
- [9] Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (31): 23 807-813
- [10] Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival [J]. *Circ Res*, 2000, 87: 179-183
- [11] Heinloth A, Heemeler K, Raff U, Wanner C, and Galle J. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 11: 1 819-825
- [12] Heinloth A, Heemeler K, Raff U, Wanner C, and Galle J. Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress [J]. *Kidney Internat*, 2001, 59 (78): S120-123
- [13] Griendling KK, Harrison DG. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth [J]. *Circ Res*, 1999, 85: 562-563
- [14] Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandolfi SJ, Gukovskiy I. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (33): 34 643-654

(此文编辑 胡必利)