

同型半胱氨酸对内皮祖细胞生成 eNOS、p-eNOS 和 NO 的影响及黄酒的改善作用

蒋承建^{1,2}, 郭航远^{1,2}, 唐伟良¹, 池菊芳¹, 翟小亚¹, 孟立平¹, 郭艳¹

(1. 绍兴市人民医院心内科 浙江大学绍兴医院心内科, 浙江省绍兴市 312000; 2. 浙江中医药大学, 浙江省杭州市 310053)

[关键词] 黄酒; 动脉粥样硬化; 内皮祖细胞; 同型半胱氨酸

[摘要] **目的** 观察黄酒是否能改善同型半胱氨酸(Hcy)诱导的内皮祖细胞(EPC)功能。**方法** 抽取大鼠骨髓,用密度梯度离心法从骨髓细胞悬液中获取单个核细胞,将其接种在人纤维连接蛋白包被的培养板,诱导单个核细胞向内皮祖细胞分化,收集贴壁细胞用于实验。激光共聚焦显微镜鉴定 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 双染色阳性细胞被认定是正在分化的 EPC,流式细胞计数进一步鉴定。通过 MTT 法检测细胞活性以及考虑人体病理生理浓度选取 Hcy 最佳干预浓度和时间。每种酒(0%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%)与 300 μmol/L Hcy 共同孵育 EPC 24 h, MTT 法检测酒类对细胞活性的影响,确定最佳干预浓度后分为对照组、Hcy 组、Hcy + 黄酒组、Hcy + 红酒组和 Hcy + 酒精组,培养 24 h 后收集样品,采用 Western blot、NO 试剂盒分别观察 EPC 的 eNOS、p-eNOS 功能和 NO 水平。**结果** Hcy 组 eNOS、p-eNOS 的生成量较对照组降低($P < 0.01$),Hcy + 黄酒组和 Hcy + 红酒组较 Hcy 组能明显改善 eNOS、p-eNOS 的生成量($P < 0.01$),Hcy + 酒精组较 Hcy 组没有明显的变化($P > 0.05$)。Hcy 组 NO 水平较对照组降低($P < 0.001$),Hcy + 黄酒组和 Hcy + 红酒组较 Hcy 组能明显改善 NO 的生成量($P < 0.001$),Hcy + 黄酒组优于 Hcy + 红酒组($P < 0.001$),并且两者还明显优于 Hcy + 酒精组($P < 0.001$),Hcy + 酒精组较 Hcy 组没有明显的变化($P > 0.05$)。**结论** Hcy 能显著减弱 EPC 的 eNOS、p-eNOS 和 NO 生成量,小剂量的黄酒和红酒均能改善 EPC 的上述功能。

[中图分类号] Q46

[文献标识码] A

Homocysteine on Endothelial Progenitor Cells to Produce eNOS, p-eNOS and NO Levels and the Improvement Effect of Yellow Wine

JIANG Cheng-Jian^{1,2}, GUO Hang-Yuan^{1,2}, TANG Wei-Liang¹, CHI Ju-Fang¹, ZHAI Xiao-Ya¹, MENG Li-Ping¹, and GUO Yan¹

(1. Department of Cardiovascular Disease, Shaoxing People's Hospital & Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China; 2. Zhejiang University of Chinese Medical, Hangzhou, Zhejiang 310053, China)

[KEY WORDS] Chinese Yellow Wine; Atherosclerosis; Endothelial Progenitor Cell; Homocysteine

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether Chinese yellow wine has influences on activity of homocysteine-induced in rat endothelial progenitor cells. **Methods** Rat bone marrow was extracted to harvest mononuclear cells (MNC) by density gradient centrifugation, and then the cells were plated on fibronectin-coated culture dishes, which were induced into endothelial progenitor cells by EGM-2 complete medium supplemented with cell growth factor. After 7 days, the adhered cells were collected to be used in all studies. Endothelial progenitor cells were characterized as adherent cells double positive for Di-LDL uptake and lectin binding by direct fluorescent staining under a laser scanning confocal microscope. Endothelial progenitor cells were incubated with one kind of wine (at the concentrations of 0%, 0.2%, 0.4%, 0.8% and 1.6%) and 300 μmol/L Hcy for 24 h. The optimal concentration of the wine was selected. In another experiment, the

[收稿日期] 2014-11-18

[修回日期] 2015-01-08

[基金项目] 卫生部科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技计划项目(Wkj2011-2-018);浙江省自然科学基金项目(LY14H020002);浙江省公益技术研究社会发展项目(2012C33040)

[作者简介] 蒋承建,硕士研究生,主要从事冠心病发病机制的基础研究,E-mail 为 xql_1030@163.com。通讯作者郭航远,博士,主任医师,博士研究生导师,主要从事心肌病、冠心病和高血压的基础和临床研究,E-mail 为 ghanyuan@hotmail.com。唐伟良,硕士,主治医师,主要从事冠心病、高血压病的基础和临床研究。

cells were divided into 5 groups: control group, Hcy group, Hcy + yellow wine group, Hcy + red wine group and Hcy + ethanol group, and were given the corresponding treatment for 24 h. The amount of eNOS and p-eNOS generated were determined by Western blot. The level of NO were determined by NO kit. **Results** Compared with control group, the amount of eNOS and p-eNOS generated in Hcy group were significantly decreased ($P < 0.01$), but significantly improved in Hcy + yellow wine group and Hcy + red wine group compared with Hcy group ($P < 0.01$), and there was no significant difference between Hcy + ethanol group and Hcy group ($P > 0.05$). Compared with control group, the level of NO in Hcy group were significantly decreased ($P < 0.001$), but significantly improved in Hcy + yellow wine group and Hcy + red wine group compared with Hcy group ($P < 0.001$), Hcy + yellow wine group was markedly better than Hcy + red wine group ($P < 0.001$), the level of NO decreased markedly in Hcy group compared to Hcy + yellow wine group and Hcy + red wine group ($P < 0.001$), there was no statistical difference between Hcy + ethanol group and Hcy group ($P > 0.05$). **Conclusions** Hcy may result in decreasing the amount of eNOS, p-eNOS generated and level of NO in endothelial progenitor cells, and treatment with yellow wine or red wine improves Hcy-induced endothelial progenitor cells functional activity.

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是体内三种含硫氨基酸之一,由于遗传、环境以及饮食造成 Hcy 代谢中重要的辅酶维生素 B6、B12 或叶酸的缺乏及肝肾功能不全等均可引起血浆中 Hcy 浓度升高。正常空腹血浆中总 Hcy 水平是 5 ~ 15 $\mu\text{mol/L}$,上述各种原因均可导致血浆 Hcy 浓度 $> 15 \mu\text{mol/L}$ 时称为高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteine, HHcy), HHcy 是目前公认与冠状动脉、脑动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)相关的一个重要的独立危险因素^[1],是一个强的冠心病预测因子。As 是冠心病病变血管的主要病理改变,而血管内皮功能障碍是 As 的重要始动因素之一,并在其发展过程发挥了关键作用^[2]。血管内皮功能发生障碍,主要表现为屏障功能和内分泌一氧化氮(nitric oxide, NO)功能受损以及细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的异常表达,进而引发血管壁炎症反应、血管异常收缩等一系列病理变化,最终导致粥样斑块形成^[3]。因而,维护正常的内皮功能对于延缓甚至抑制 As 的发生至关重要。目前认为,内皮功能障碍的本质是内皮损伤与修复的失衡^[4],而循环内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)数量和功能的下降加剧了这一失衡。我们前期通过低密度脂蛋白受体基因缺陷(low density lipoprotein receptor knockout, LDLR^{-/-})小鼠在体实验发现,黄酒能降低小鼠血浆 Hcy、抑制血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达和活性而明显抑制动脉粥样斑块的形成^[5-6],后续体外实验表明黄酒能抑制 Hcy 诱导的大鼠血管平滑肌细胞 MMP-2 的表达和活性^[6]。由此我们提出:黄酒是否也能改善 Hcy 诱导的 EPC 功能障碍进而抑制动脉粥样斑块的进展?为探索这一问题课题组展开了下列研究。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

8 周龄 SD 大鼠购自浙江省实验动物中心;酒精度 12% 的黄酒、酒精购自绍兴黄酒集团;酒精度 12% 的红葡萄酒购自法国 Languedoc-Roussillon;人纤维连接蛋白(human fibronectin, HFN)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和体外血管形成试剂盒购自 Chemicon 公司;血管内皮生长培养基(EGM-2)购自美国 Cambrex 公司;0.25% 胰蛋白酶-EDTA 和胎牛血清购自 Gibco 公司;大鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;标记荆豆凝集素(FITC-UEA-I)购自 Sigma 公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL)购自 Molecular Probe 公司;抗鼠 vWF-FITC 抗体购自 Abcam 公司;抗鼠 CD31-APC 抗体购自 eBioscience 公司;兔抗鼠 CD133 抗体购自 Proteintech 公司;MTT 购自华美生物工程公司(进口分装);5 μm 孔径 Transwell 小室购自 Corning 公司;其余试剂为国产分析纯。

1.2 EPC 的分离与培养

颈椎脱臼处死 SD 大鼠,无菌条件下剥离双侧股骨和胫骨,放入含有 D-hanks 液培养皿中,剪去股骨和胫骨两端的骨髓,暴露骨髓腔,用 5 mL 注射器吸取 D-hanks 液(含 10% 胎牛血清)冲洗骨髓腔,1000 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀,加入 D-hanks 液轻轻吹打,5 mL D-hanks 液充分混匀细胞。取 15 mL 离心管,按 1:1 等量缓慢叠加于等量的淋巴细胞分离液上层,2000 r/min 离心 20 min。收集白膜层的单个核细胞,用 D-hanks 液洗涤 2 次(1000 r/min 离心 5 min),弃上清,加 EGM-2 完全培养液(含体积分数为 10% 的胎牛血清、血管内皮生长因子 10 $\mu\text{g/L}$)重悬细胞,按 1×10^9 Cells/L 密度接种于包被

有人纤维连接蛋白的培养板,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵箱中培养 24 h,转移未贴壁细胞至新包被孔中,补加完全培养液,继续培养诱导 7 天,贴壁细胞供实验用。

1.3 细胞染色和鉴定

将细胞和 Dil-ac-LDL(2.4 mg/L)于 37℃ 孵育 10 h,4% 多聚甲醛固定 10 min,D-hanks 液冲洗后,将 FITC-UEA-I(10 mg/L)加于上述样品,37℃ 继续孵育 1 h,采用多波长激光共聚焦显微镜观察。

1.4 流式细胞仪检测细胞表面抗原

晚期 EPC 的主要表面抗原原有 CD31、vWF 和 CD133,用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞并计数,将 5×10^5 个贴壁细胞依次与 CD31、vWF 和 CD133 抗体结合,在 4℃ 水浴箱孵育 30 min,用 D-hanks 液冲洗 2 次,最后用 300 μL D-hanks 液将其制成细胞悬浮液放在流式细胞仪上检测。

1.5 实验分组

为了观察 Hcy 对 EPC 活性的影响,按 Hcy 浓度梯度分为 0、100、200、300 及 400 μmol/L 组,与 EPC 共同孵育 24 h 及 300 μmol/L Hcy 与 EPC 共同培养 12、24 及 48 h,通过 MTT 法检测细胞活性确定最佳浓度。黄酒和红酒对 EPC 功能的影响,实验分为对照组、Hcy 组(Hcy 300 μmol/L)、Hcy + 黄酒组(Hcy 300 μmol/L,酒精度 0.4%)、Hcy + 红酒组(Hcy 300 μmol/L,酒精度 0.4%)和 Hcy + 酒精组(Hcy 300 μmol/L,酒精度 0.4%)。培养 24 h 后收集样品,采用 Western blot、NO 试剂盒分别检测 eNOS、p-eNOS 和 NO 的生成。结合前期的预实验结果,每种酒(0%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%)与 300 μmol/L Hcy 共同孵育 EPC 24 h,MTT 法检测酒类对细胞活性的影响,确定最佳干预浓度。

1.6 eNOS 和 p-eNOS 生成量测定

收集各组细胞,每组加 100 μL 含 PMSF(1 mmol/L)的裂解液,于 4℃ 裂解 30 min,为使细胞充分裂解离心管要经常来回摇动。裂解完后,4℃、11000 r/min 离心 5 min。将离心后的上清分装转移

到 1.5 mL 的离心管中,于 -80℃ 保存。用 BCA 法测定蛋白浓度。预先配置 1 L 转移缓冲液并冷却至 4℃。先将 PVDF 膜在甲醇中浸泡约 30 s,再在转移缓冲液浸泡 10 min,后与滤纸、凝胶一起放入电转移缓冲液中。200 mA 稳流电转移,根据所转蛋白分子量,约 1 min/kd。将 PVDF 膜浸入含 5% 脱脂奶粉或牛血清白蛋白的封闭液中,置摇床上缓慢摇动,室温封闭过夜。取出已封闭的 PVDF 膜,浸于 $1 \times$ TBST 缓冲液中,于摇床上缓慢洗涤 5 min。然后移入含有一抗的小袋中,室温孵育 2 h。PVDF 膜转移到含二抗的玻璃皿中,于室温摇床上孵育 1 h,将 PVDF 膜浸于 $1 \times$ TBST 缓冲液中,于摇床上缓慢洗涤 3 次,每次 15 min。取适量 ECL 试剂盒中等体积的 A 液和 B 液混合,混匀后加在膜的表面,移入凝胶成像分析仪中,化学光敏模式曝光显影,在 Image J 软件下分析各条带光密度。

1.7 NO 水平测定

将培养至 15 天的 EPC 用 0.25% 的胰酶消化收集,细胞计数,以 1×10^8 Cells/L 细胞量,每孔 2 mL 接种 6 孔板,37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h;收集细胞培养上清,-80℃ 保存备用;取出上清和 NO 测试盒室温平衡 30 min,依照试剂盒说明配制各项试剂和操作检测。

1.8 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPC 的鉴定

将培养至 12 天的 EPC 接种到爬片中,用 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 对细胞进行染色,荧光显微镜下观察。绿光(555 nm)激发 Dil-ac-LDL 显红色荧光,蓝光(488 nm)激发 FITC-UEA-I 显绿色荧光,双荧光阳性是正在分化的 EPC(图 1)。

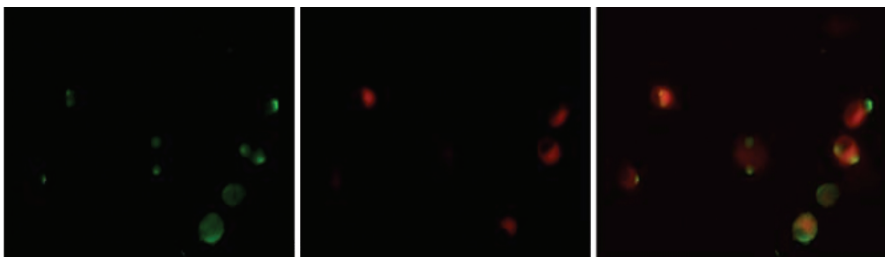


图 1. 激光共聚焦显微镜鉴定 EPC($\times 400$)

Figure 1. Identification of endothelial progenitor cells($\times 400$)

2.2 EPC 细胞表面抗原的表达

培养第 10 天, EPC 表面抗原 vWF 高表达, CD133 低表达, CD31 不表达。培养第 10 天 EPC 是处于早期和晚期之间, 因此 CD31 不表达, 可以排除内皮细胞的干扰, CD133 或 vWF 阳性皆为 EPC (图 2)。

2.3 eNOS 和 p-eNOS 的生成量

Hcy 组 eNOS 和 p-eNOS 的生成量较对照组降低 ($P < 0.01$), 黄酒和红酒能明显改善 eNOS 和 p-eNOS 的生成量 ($P < 0.01$), Hcy + 酒精组较 Hcy 组

没有明显的变化 ($P > 0.05$; 图 3)。

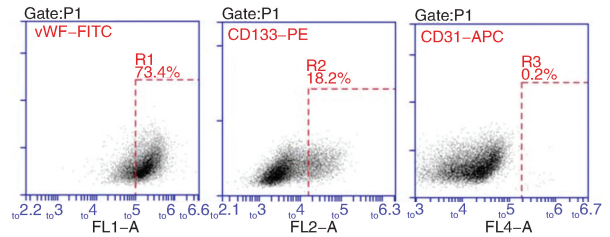


图 2. 流式细胞仪鉴定内皮祖细胞

Figure 2. Identification of endothelial progenitor cells by flow cytometry

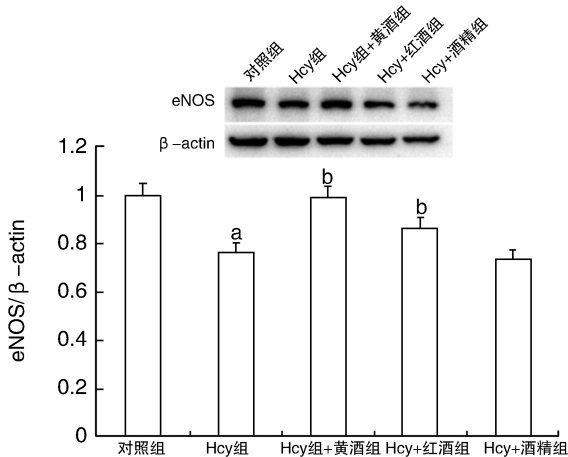
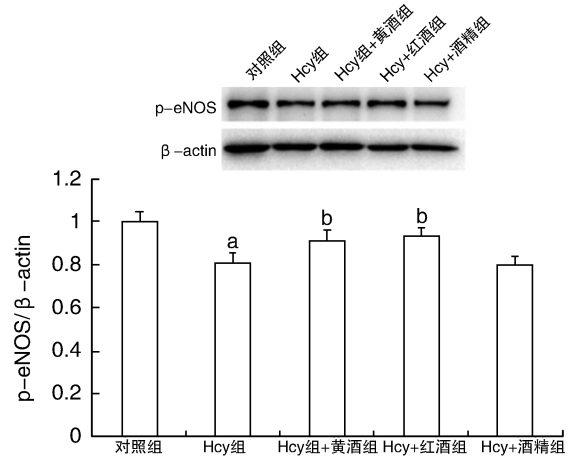


图 3. 各组 eNOS 和 p-eNOS 的生成量 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 Hcy 组比较。

Figure 3. The amount of eNOS and p-eNOS generated in each group



2.4 NO 的生成量

Hcy 组 NO 的生成量较对照组降低 ($P < 0.001$), 黄酒和红酒能明显改善 NO 的生成量 ($P < 0.001$), 黄酒的作用优于红酒 ($P < 0.001$), 且两者的作用还明显优于酒精 ($P < 0.001$)。Hcy + 酒精组较 Hcy 组没有明显的变化 ($P > 0.05$; 图 4)。

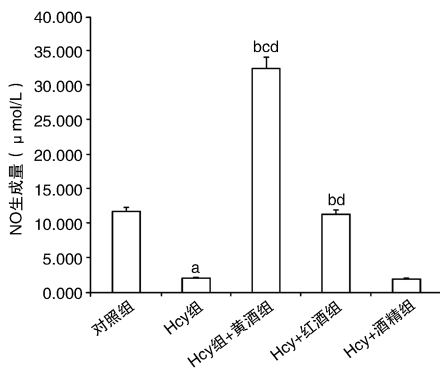


图 4. 各组 NO 的生成量 a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.001$, 与 Hcy 组比较; c 为 $P < 0.001$, 与 Hcy + 红酒组比较; d 为 $P < 0.001$, 与 Hcy + 酒精组比较。

Figure 4. The amount of NO generated in each group

3 讨论

近年国内外大量的研究阐明, 除了传统的如高血压、糖尿病、血脂异常、肥胖等危险因素外, HHcy 也是 As 发病重要的独立危险因素, 并且其通过众多机制参与到 As 的发生发展, 而引起内皮细胞的功能障碍是其关键环节^[7]。王兴祥等^[8]研究发现 Hcy 主要影响 EPC 的数量和功能。

NO 是体内的最重要信使分子, 它是以 L-精氨酸为底物, 由 eNOS 和 p-eNOS 催化而成。作为内皮依赖性血管舒张因子, NO 不仅是调节血管舒张功能的重要介质, 而且还抑制血小板和单核细胞向内皮粘附、聚集和抑制血管平滑肌细胞增殖^[9]。在 As 病变发展过程中, 由于内皮功能的损伤, eNOS 和 p-eNOS 的表达或活性下降, 导致内源性 NO 生成减少, 加速了 As 的病变进程。目前认为, 内皮功能障碍的本质是内皮损伤与修复的失衡^[4], 而循环 EPC 数量和功能的下降加剧了这一失衡。EPC 是一类能增殖并分化为血管内皮的前体细胞, 广泛参与内皮受损后的修复, 对于改善内皮功能障碍意义

重大。研究表明,As 患者外周血循环 EPC 数量和功能低下^[10-11],且这一改变在粥样病变尚未形成之前便已出现^[12-13],严重影响了受损内皮的修复,而输注功能良好的 EPC 则能明显改善内皮功能并抑制粥样斑块的进展^[14-15]。

过量饮酒有害身体健康,但适量饮酒却能减少冠心病事件的发生,其中以红葡萄酒的研究证据最多^[16]。研究发现红酒中的多酚具有抑制炎症因子、减少血小板凝集、提高循环 EPC 的数量和功能以及保护血管内皮等作用,能延缓甚至抑制粥样斑块的进展,最终可以有效减少心肌梗死等严重心血管事件的发生,而上述作用与酒精则无明显相关性^[17-20]。作为我国特有民族产品的绍兴黄酒富含与红酒相似的多酚,并含有丰富的低聚糖、低肽和 γ -氨基丁酸等营养成分^[21]。本研究发现,Hcy 组较对照组 NO 生成量、eNOS 和 p-eNOS 的表达都有明显的下降。Hcy + 黄酒组和 Hcy + 红酒组较 Hcy 组 NO 生成量、eNOS 和 p-eNOS 的表达都得到极大改善,并且在酒精终浓度为 0.4% 达到峰值。表明少量的黄酒能通过改善 Hcy 诱导的 EPC 功能来抑制 As 的形成,从而减少心血管事件的发生。但是具体机制尚不明确,可能与以下因素有关:①本课题的前期实验已经证实少量黄酒能减低血浆 Hcy 水平^[7-8],从而减少 Hcy 对 EPC 功能和数量的影响。②黄酒可能也是通过一种与红酒极其相似的机制即黄酒中黄酒多酚成分来发挥其改善 EPC 功能和增加数量。

少量的黄酒能改善 Hcy 诱导的 EPC 功能,表现于 NO 生成量增加、eNOS 和 p-eNOS 的表达改善,从而预防 As 的形成及减少心血管事件的发生,针对其具体机制的研究将在本系列实验中进一步展开。

【参考文献】

[1] 徐志红, 陆国平, 吴春芳. 高同型半胱氨酸血症对内皮细胞炎症反应的促发作用及其干预性研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (5): 353-357.

[2] Eren E, Yilmaz N, Aydin O. Functionally defective high-density lipoprotein and paraoxonase: a couple for endothelial dysfunction in atherosclerosis[J]. Cholesterol, 2013, 10 (2): 168-175.

[3] Choi BJ, Matsuo Y, Aoki T, et al. Coronary endothelial dysfunction is associated with inflammation and vasa vasorum proliferation in patients with early atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34 (11): 2 473-477.

[4] Zhang L, Xu Q. Stem/progenitor cells in vascular regeneration[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34 (6): 1 114-119.

[5] Guo H, Liu L, Shi Y, et al. Chinese yellow wine and red wine inhibit matrix metalloproteinase-2 and improve atherosclerotic plaque in LDL receptor knockout mice[J]. Cardiovasc Ther, 2010, 28 (3): 161-168.

[6] Guo H, Wang P, You B, et al. Chinese yellow wine inhibits production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smoothmuscle cells[J]. Clin Nutr, 2007, 26 (3): 348-354.

[7] He L, Zeng H, Li F, et al. Homocysteine impairs coronary artery endothelial function by inhibiting tetrahydrobiopterin in patients with hyperhomocysteinemia[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 299 (6): 1 061-065.

[8] 王兴祥, 尚云鹏, 朱军慧, 等. 同型半胱氨酸对外周血内皮祖细胞数量和功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (7): 1 274-278.

[9] 李鑫, 李大勇, 马贤德, 等. 血管内皮细胞损伤和血清内源性代谢物的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (6): 541-546.

[10] Liu P, Zhou B, Gu D, et al. Endothelial progenitor cell therapy in atherosclerosis: a double-edged sword [J]? Ageing Res Rev, 2009, 8 (2): 83-93.

[11] Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis [J]. Circulation, 2003, 108 (4): 457-463.

[12] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. N Engl J Med, 2005, 353 (10): 999-1 007.

[13] Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair[J]. Circulation, 2005, 111 (22): 2 981-987.

[14] Lee SH, Lee KB, Lee JH, et al. Selective interference targeting of Ink in umbilical cord-derived late endothelial progenitor cells improves vascular repair, following hindlimb ischemic injury, via regulation of JAK2/STAT3 signaling [J]. Stem Cells, 2014, 117 (9): 1 002-005.

[15] Foteinis G, Hu Y, Xiao Q, et al. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 2008, 117 (14): 1 856-863.

[16] Das DK, Mukherjee S, Ray D. Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity[J]. Heart Fail Rev, 2010, 15 (5): 467-477.

[17] Rosenbloom JI, Mukamal KJ, Frost LE, et al. Alcohol consumption patterns, beverage type, and long-term mortality among women survivors of acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2012, 109 (2): 147-152.

[18] Kloner RA, Rezkalla SH. To Drink or Not to Drink? That is the Question[J]. Circulation, 2007, 116 (11): 1 306-317.

[19] Huang PH, Chen YH, Tsai HY, et al. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30 (4): 869-877.

[20] Hamed S, Alshiek J, Aharon A, et al. Red wine consumption improves in vitro migration of endothelial progenitor cells in young, healthy individuals[J]. Am J Clin Nutr, 2010, 92 (1): 161-169.

[21] 谢广发. 黄酒的功能性成份与保健功能[J]. 中国酒, 2008, 35 (5): 76-77.