

抗凋亡多肽 Gly14-Humanin 对动脉粥样硬化模型小鼠血小板高敏感性以及脂质斑块形成的作用

胡淑鸿, 杨 飞, 曹宜人, 任丽洁

(苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏省苏州市 215123)

[关键词] 低密度脂蛋白受体; 动脉粥样硬化; 脂质斑块; 血小板

[摘要] **目的** 抗凋亡多肽 Humanin 可以延缓动脉粥样硬化脂质斑块形成, 其机制可能是抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的氧化性应激和内皮细胞凋亡, 但 Humanin 对动脉粥样硬化状态下血小板高敏感性的影响尚无报道。本研究评价了 Humanin 衍生物 (^[Gly14]-Humanin, HNG) 对低密度脂蛋白受体 (LDLR) 敲除小鼠动脉粥样硬化形成以及血小板高敏感性的影响。**方法** 将 8 周龄雄性野生型 (wild type, WT) 和低密度脂蛋白受体敲除小鼠进行实验分组, 包括对照组 (WT 小鼠喂食普通饲料, CD 组)、模型组 (LDLR^{-/-} 小鼠喂食高脂饲料, HFD 组)、实验组 (LDLR^{-/-} 小鼠喂食高脂饲料的同时注射 HNG, HFD + HNG 组)。分别于 4 周、12 周、24 周, 进行下腔静脉取血, 分离洗涤血小板, 进行血小板聚集实验并分离血清进行血脂含量的测量。适时分离主动脉进行苏丹 IV 染色, 观察主动脉内表面粥样脂质斑块形成, 利用 Image-Pro Plus 图像处理软件分析斑块面积大小。**结果** 与对照组相比, 喂食高脂饲料 24 周后, 模型组小鼠主动脉内有大量粥样斑块形成, 并且随着喂食高脂时间的延长, 具有明显的脂蛋白水平的变化。模型组小鼠血小板在二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 诱导下的聚集作用显著增强 ($P < 0.01$), 更重要的是, HFD + HNG 组小鼠的斑块面积明显减小 ($P < 0.01$), 且血小板对 ADP 所诱导的血小板聚集明显低于 HFD 组 ($P < 0.01$)。**结论** HNG 抑制动脉粥样硬化模型小鼠血小板高敏感性, 可能是减缓动脉粥样硬化脂质斑块形成的机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Anti-apoptotic Factor^[Gly14]-Humanin on Platelet Hypersensitivity and Lipid Plaque Formation in the LDLR-deficient Mice

HU Shu-Hong, YANG Fei, CAO Yi-Ren, and REN Li-Jie

(Cyrus Tang Hematology Center, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

[KEY WORDS] Low Density Lipoprotein Receptor; Atherosclerosis; Lipid Plaque; Platelet

[ABSTRACT] **Aim** Anti-apoptotic factor Humanin may have a protective effect on endothelial function and progression of atherosclerosis by modulating oxidative stress and apoptosis in the developing plaque. But there has been no report on whether it has an impact on platelet hypersensitivity in the atherosclerotic mouse models. Here we examined the effect of Humanin analogue (^[Gly14]-Humanin, HNG) on the development of atherosclerosis and platelet hypersensitivity in low-density lipoprotein receptor knock-out mice. **Methods** Mice (8 weeks old) were grouped into wild type mice on normal chow diet (CD) and LDLR^{-/-} mice on high fat diet (HFD) with or without HNG injection. At week 4, 12, 24, blood was obtained from the inferior vena cava and platelets were isolated and measured for aggregation in a Chrono-log lumi-aggregometer and serum lipid level was measured. At the right time, the aorta was stained with Sudan IV and lipid deposition was quantified using Image-Pro Plus. **Results** After 24 weeks on HFD, LDLR^{-/-} mice showed large area of plaques formed in the aorta and an altered lipid profile as compared to WT mice on CD. Platelets of LDLR^{-/-} mice on HFD showed significantly higher reactivity than WT mice on CD in response to ADP ($n = 10$, $P < 0.01$). Most importantly, administration of HNG inhibited the formation of atherosclerotic plaque in the aorta ($n = 10$, $P < 0.01$) and de-

[收稿日期] 2015-02-23

[修回日期] 2015-04-20

[作者简介] 胡淑鸿, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化机制, E-mail 为 hushuhong19901010@126.com。杨飞, 博士研究生, 研究方向为趋化因子在动脉粥样硬化进程中的作用机制, E-mail 为 yangfei0627@126.com。通讯作者任丽洁, 助理研究员, 研究方向为血小板与动脉粥样硬化机制, E-mail 为 renlijie916@126.com。

creased platelet reactivity to ADP ($n=10, P<0.01$) in LDLR^{-/-} mice on HFD. **Conclusion** Our data showed that HNG reduces platelet hypersensitivity in the setting of hyperlipidemia, providing a potential alternative mechanism by which HNG reduces plaque formation.

血小板除了众所周知的参与止血与维持单层内皮细胞完整性功能以外^[1],在病理条件下还能够参与动脉粥样硬化与血栓的形成^[2],同时促进动脉粥样硬化的发展^[3],尤其是在高脂状态下,血小板对于激动剂的敏感性增高^[4],并且高敏感性血小板能够与血管内皮相互作用,诱导血管内皮细胞分泌黏附分子^[5],还能够释放趋化因子和细胞因子,趋化单核/巨噬细胞、中性粒细胞等炎症相关细胞向附近血管壁部位黏附,最终通过黏附、迁移和浸润作用进入血管内膜下,促进炎症反应及动脉粥样硬化的发展^[3, 6-7]。

抗凋亡多肽 Humanin 是由编码线粒体 16S rRNA 的 DNA 序列转录翻译所合成,它是由 24 个氨基酸所组成的多肽。首次发现它,是从阿尔茨海默病患者脑中提取出来的^[8],是一种内源性抗细胞凋亡的多肽。最初发现 Humanin 能够对抗由淀粉样蛋白和许多家族性突变所诱导的神经细胞凋亡^[9]。近期发现该多肽在其他许多组织中有表达,且在各自组织中也发挥抗凋亡^[10-11]及更广泛的作用^[12]。心肌缺血和脑缺血再灌注损伤中起到一定的保护作用^[13-14]。最近有文章报道 Humanin 在糖尿病中也发挥着重要作用并因性别不同在血浆中的水平也有一定的差异^[15]。已知 Humanin 在血管内皮细胞中表达,能够通过抑制氧化型低密度脂蛋白所诱导的活性氧产生以及内皮细胞凋亡,从而缓解动脉粥样硬化发展^[16-17],但 Humanin 能否通过其他途径,如在高脂血症状态下抑制血小板的高敏感性缓解动脉粥样硬化发展,并没有报道。

本文旨在探讨抗凋亡多肽 Humanin 是否能够影响高脂血症下血小板的高反应性,以及是否能够影响高脂血症下明显增高的血脂含量和体内动脉粥样硬化脂质斑块形成大小,最终影响动脉粥样硬化的发展。在实验过程中,我们使用了 Humanin 的衍生物 HNG,HNG 多肽是 Humanin 在 14 位氨基酸由丝氨酸突变为甘氨酸,其抗凋亡活性比 Humanin 高 1000 多倍,更具有临床应用价值,而且 HNG 在其他病理研究中也广泛采用,如心肌缺血和脑缺血再灌注小鼠模型中^[18]。因此,我们应用 LDLR^{-/-}小鼠建立了动脉粥样硬化模型,并模仿临床治疗中,长期持续进行 HNG 多肽的注射来研究该多肽在动脉粥样硬化生理机制中的所起的效应。力图发现新的诊断和干预靶

点,为血管性疾病的病理性血栓及其并发症的预防和诊疗提供理论基础和应用依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

C57BL/6 背景 LDLR^{-/-}小鼠从 Jackson Lab (Brass 实验室引进)引进,运抵苏州大学实验动物中心,进入 SPF 级环境饲养。体式显微镜及 CCD 显微成像系统购自上海精密仪器仪表有限公司。血小板聚集仪购自 Chrono-log 公司。

1.2 动物分组

LDLR^{-/-}小鼠与野生型 WT 小鼠交配得到 LDLR^{+/-}杂合子后代,后用 LDLR^{+/-}杂合小鼠雌雄相互交配,经基因鉴定得到 LDLR^{+/+}(即 WT)与 LDLR^{-/-}小鼠,挑选同窝 8 周龄雄鼠,LDLR^{+/+}小鼠喂食普通饲料作为对照组(CD 组),实验组 LDLR^{-/-}小鼠喂食高脂饲料,再分为两亚组,一是模型组(HFD 组),喂食高脂饲料同时每天每只小鼠腹腔注射生理盐水 200 μ L,另一组为 HNG 组(HFD + HNG 组),在喂食高脂饲料的同时,每天每只小鼠腹腔注射 1 μ g HNG(日本 PEPTIDE 公司购买),HNG 溶于 200 μ L 生理盐水中。

以上分组小鼠再按照实验要求,持续喂养和注射 HNG 到 4 周、12 周和 24 周三个不同时间点,取血脂、血小板或剥离冠状及胸主动脉等处理。

1.3 LDLR 基因敲除小鼠鉴定方法

由 LDLR^{+/-}小鼠相互交配得到的小鼠出生 1 个月后标记上耳号后,按照 Brass 实验室提供的引物和条件进行鉴定^[3]。首先剪取小鼠尾巴,通过基因组 DNA 提取试剂盒的说明提取出基因组 DNA 模板。引物为 LDLR-F、LDLR-R、LDLR-Common(表 1),其中每只小鼠用 2 个管进行鉴定,一管中的引物为 LDLR-F 与 LDLR-Common(有 LDLR⁺基因则能合成出 380 bp 片段,没有 LDLR⁺基因跑不出 DNA 片段),另一管中为 LDLR-R 与 LDLR-Common(有 LDLR⁻基因则能合成出 550 bp 片段,没有 LDLR⁻基因跑不出 DNA 片段),然后通过 PCR 技术及凝胶成像系统鉴别出小鼠基因型。

PCR 程序为 90 $^{\circ}$ C 变性 1 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,

4℃ 保冷,共 35 个循环。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

基 因	引物序列
	正向 (forward) 5' AAG ACG TGC TCC CAG GAT G 3'
LDLR	反向 (reverse) 5' CGT GCT CCT CAT CTG ACT TGT 3'
	通用 (common) 5' ATC GCC TTC TTG ACG AGT TC 3'

1.4 剥离小鼠胸主动脉及斑块染色实验

分离小鼠主动脉弓到胸主动脉一段主动脉, PBS 洗涤多次后,用 4% 多聚甲醛固定,剔除血管周围脂肪组织,纵向剖开,进行苏丹Ⅳ染色,小针固定于黑石蜡底盘,拍照,利用 Image-Pro Plus 6.0 软件依据着色情况进行区域划分并定量分析。

1.5 血脂含量测定实验

小鼠眼眶后静脉丛取血方法:可事先用低剂量麻醉剂麻醉,右手抓鼠尾,置于笼盖上向后拉,在其向前爬时,用左手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤,左手小指钩起鼠尾,中指和无名指抵住背部皮肤,取血时压迫颈部,使眼球突出充血,然后用右手拿住毛细管(3 cm 长即可)沿靠近耳侧的眼角插入眼底静脉丛,血可自然从毛细管中流出,用 1.5 mL EP 管接住即可。此法可多次采血,室内放置 2 h 后取上清的血清。血脂测定:准备好待测样本,每个样本准备 100 μL,并按照总胆固醇(TC,购自北京利德曼生化股份有限公司)和低密度脂蛋白胆固醇(LDLc,购自北京利德曼生化股份有限公司)测定试剂盒的说明操作,最后通过酶标仪检测吸光值,换算出各样本的血脂含量。

1.6 血小板分离及聚集实验

1% 戊巴比妥按照 100 mg/kg 体重麻醉小鼠(腹腔注射),肝素钠抗凝(15 U 抗凝 1 mL 血比例),下

腔静脉取血 1 mL 后,加入等体积的 Tyrode's buffer (137 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 5.6 mmol/L glucose, 1 mg/mL BSA, 1 mmol/L MgCl₂, 2.7 mmol/L KCl, 3.3 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.4),缓慢混匀,150 g 离心 7 min,吸出上清富含血小板血浆(platelet rich plasma, PRP),再 340 g 离心 12 min 后,弃去上清液,血小板沉淀用 500 μL Tyrode's buffer 重悬,血小板计数后用 Tyrode's buffer 调整血小板数量至 2 × 10⁸ 即可,制备出洗涤血小板悬液。吸取 250 μL 洗涤血小板悬液,37℃ 孵育 10 min,通过血小板聚集仪设定条件 37℃ 900 r/min。(5 ~ 10) μmol/L ADP 刺激血小板聚集,聚集 5 min,测定最大聚集率以反应血小板的功能活性。

1.7 统计学分析

实验数据通过 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量数据描述以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 Student t 检验;三组间数据比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HNG 减小动脉粥样硬化脂质斑块的面积

小鼠分别喂食普通饲料、高脂饲料并注射 HNG 维持 24 周后处死,取剥离冠状动脉及胸主动脉并进行苏丹Ⅳ染色(图 1)。HFD 组小鼠喂食 6 个月后可以发现其冠状动脉及胸主动脉中有明显的脂质斑块产生,HFD 组注射 HNG 后可以有效的减小其斑块的面积大小,计算出脂质斑块面积大小占整个冠状动脉及胸主动脉的比例,定量表示冠状动脉及胸主动脉内的脂质斑块面积,并做统计分析($n = 10$)。

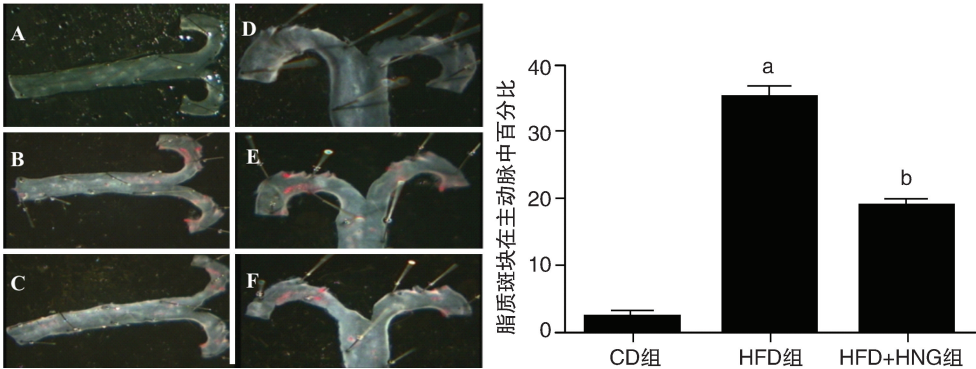


图 1. 注射 HNG 24 周可以有效的减小 LDLR^{-/-} 小鼠斑块的面积大小($\bar{x} \pm s, n = 10$) A、D 为 CD 组,B、E 为 HFD 组,C、F 为 HFD + HNG 组。a 为 $P < 0.01$,与 CD 组对比;b 为 $P < 0.01$,与 HFD 组对比。

Figure 1. Administration of HNG for 24 weeks reduced the size of atherosclerotic plaques in LDLR^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.2 HNG 降低高脂血症小鼠的血脂含量

饲料喂食 4 周,较 CD 组,HFD 组血浆中总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)含量稍有上升,而 HFD + HNG 组其血脂含量与 HFD 组相比明显降低($P < 0.05$),说明 HNG 可以有效抑制血清中血脂含量的升高(表 2)。饲料喂食 12 周,HFD 组较

CD 组 TC 和 LDLC 含量明显升高,而 HFD + HNG 组较 HFD 组有明显抑制作用($P < 0.05$),且对 TC 抑制作用更显著($P < 0.01$;表 2)。饲料喂食 24 周,HFD 组 TC 和 LDLC 含量维持高水平,而 HFD + HNG 组较 HFD 组有持续明显抑制作用($P < 0.05$;表 2)。

表 2. 血脂含量测定($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2. Measurement and analysis of plasma lipid levels ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时 间	TC (mmol/L)			LDLC (mmol/L)		
	CD 组	HFD 组	HFD + HNG 组	CD 组	HFD 组	HFD + HNG 组
4 周	3.96 ± 0.13	5.12 ± 0.06	4.74 ± 0.02 ^a	2.21 ± 0.07	2.91 ± 0.05	2.59 ± 0.01 ^a
12 周	4.85 ± 0.39	21.49 ± 0.93	16.79 ± 0.48 ^b	2.45 ± 0.44	14.79 ± 0.68	12.45 ± 0.42 ^a
24 周	4.57 ± 0.26	20.71 ± 1.08	17.47 ± 0.58 ^a	2.09 ± 0.19	14.21 ± 0.84	12.21 ± 0.24 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$,与 HFD 组比较。

2.3 HNG 降低高脂血症状态下血小板的高敏感性

2.3.1 三组小鼠维持 4 周 HNG 注射血小板聚集率比较 三组小鼠分别维持 4 周后处死,取血分离血小板,ADP(10 $\mu\text{mol/L}$)刺激进行血小板聚集实验

(图 2)。与 CD 组相比,HFD 组小鼠血小板敏感性增强,血小板聚集率显著高于对照组($P < 0.05$),而 HFD + HNG 组的小血小板聚集较 HFD 组有抑制作用($P < 0.05$)。

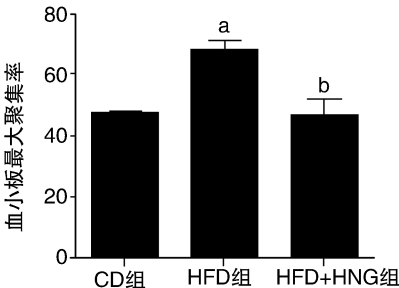
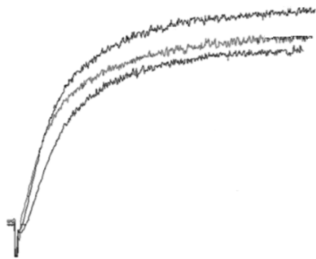


图 2. 维持 4 周 HNG 注射对血小板聚集有一定的抑制($\bar{x} \pm s, n = 10$) a 为 $P < 0.05$,与 CD 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 HFD 组比较。

Figure 2. Administration of HNG for 4 weeks reduced the platelets aggregation($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.3.2 三组小鼠维持 12 周 HNG 注射血小板聚集率比较 三组小鼠分别维持 12 周后分离血小板,ADP(5 $\mu\text{mol/L}$)刺激进行血小板聚集实验(图 3)。HFD 组较 CD 组的小血小板聚集率显著增强($P < 0.01$),而 HFD + HNG 组能够有效的抑制高脂血症

下血小板的高敏感性($P < 0.01$)。此时 ADP 降低到 5 $\mu\text{mol/L}$ 是由于此时高脂饲料喂食时间长,血小板敏感性上调,即选择能刺激血小板聚集的最低浓度。避免由于刺激剂剂量过大影响 HNG 抑制效果。

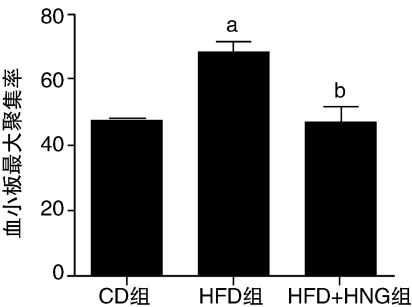
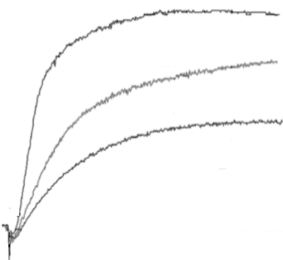


图 3. 维持 12 周 HNG 注射对血小板聚集有明显的抑制趋势($\bar{x} \pm s, n = 10$) a 为 $P < 0.01$,与 CD 组比较;b 为 $P < 0.01$,与 HFD 组比较。

Figure 3. Administration of HNG for 12 weeks greatly reduced the platelets aggregation($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.3.3 三组小鼠维持 24 周 HNG 注射血小板聚集率比较 三组小鼠分别维持 24 周后分离血小板,进行血小板聚集实验(图 4)。HFD + HNG 组能够持续显著抑制动脉粥样硬化状态下血小板的高敏感性(P

<0.01)。高脂血症小鼠(HFD 组)的血小板在 ADP ($5\text{ }\mu\text{mol/L}$) 刺激下聚集率较正常小鼠(CD 组)明显升高,说明其血小板处于高敏感性,而同时注射 HNG 会对高敏感性的血小板有明显的抑制作用。

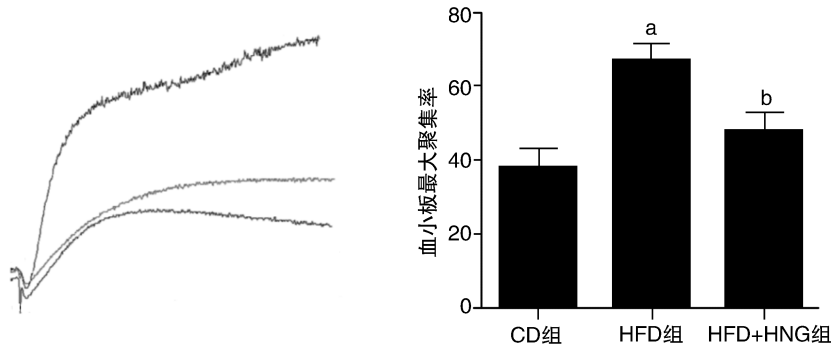


图 4. 维持 24 周 HNG 注射对血小板聚集也有明显的抑制趋势($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) a 为 $P < 0.01$, 与 CD 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 HFD 组比较。

Figure 4. Administration of HNG for 24 weeks obviously reduced the platelets aggregation($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3 讨论

高脂血症和动脉粥样硬化是影响人类健康最严重、最常见的心血管疾病之一^[19],是人类当前死亡的一个主要病因,因此对其病因、发病机理和防治的研究是一个相当活跃的领域^[20-21]。本课题采用 LDLR^{-/-} 敲除小鼠,喂食 HFD,经血浆血脂分析,和剥离主动脉显微镜形态学观察,结果显示其血脂水平明显升高,主动脉、冠状动脉均有明显斑块形成。通过实验性动脉粥样硬化纯系小鼠整体动物模型来研究 HNG 对动脉粥样硬化的影响,是切实可行的体内实验。

在前期的研究中,我们知道动脉粥样硬化的发生与高脂血症状态下小鼠血小板的活性有着密切关系^[3],这就使我们联系到 HNG 是否能够通过抑制高脂血症状态下的血小板的高敏感性,进而影响动脉粥样硬化的发生发展,我们通过进一步实验得到证实。最近研究报道过 Humanin 能够缓解 ox-LDL 诱导的内皮细胞功能紊乱,进而减缓 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的进程^[22],内皮功能的紊乱也是动脉粥样硬化发病的一个重要因素,内皮功能紊乱后会造成血管内皮细胞功能障碍,内皮正常的生理机能发生变化^[23],上调单核细胞趋化因子 1、白细胞介素 8 等对单核细胞、白细胞、血小板粘附性增强,导致 ROS 的产生,同时内皮细胞对脂蛋白和其他血浆成分的通透性增强,使各类脂蛋白进入内皮下。内皮损伤也使内皮细胞由抗凝向促凝性质转变,出现分泌障碍,抑制了抗炎症因子的表达和分

泌^[24],转为分泌各种血管活化因子、细胞因子和生长因子,启动炎症反应^[25]。

通过上述研究表明内皮细胞功能障碍对于动脉粥样硬化发展起重要作用,而 Humanin 能够影响动脉粥样硬化相关性的细胞,包括内皮细胞和血小板等,影响内皮细胞 ROS 的产生从而降低 ROS 对于内皮细胞和平滑肌细胞的损害^[22],Humanin 也影响高脂状态下血小板的活性,证明 Humanin 可以通过多条途径缓解动脉粥样硬化的发生和发展^[26]。

血脂受膳食、年龄、职业以及代谢的影响,并且与动脉粥样硬化的发生发展密切相关^[27]。在人类和实验动物,由于遗传和环境因素的影响,血浆脂蛋白的结构和代谢发生异常时,血液中某种或几种直至成分就会升高或者代谢发生紊乱,造成高脂血症,从而促进动脉粥样硬化的发展,因此降低血脂含量对于治疗动脉粥样硬化至关重要^[28]。之前也报道证实,Humanin 可以抑制载脂蛋白 E 敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化的形成但对于高脂血症状态下血脂水平没有明显的影响^[22]。而我们在实验中发现 HNG 能够抑制 LDLR^{-/-} 小鼠高脂血症状态下的血脂含量,我们推测是因为两组小鼠的敲除背景不同导致了高脂血症状态下血脂水平的差异,其具体机制还有待进一步的研究,但它的降脂作用却十分重要,这样就证明 HNG 能够从降低血小板高敏感性与降脂以及保护内皮细胞等许多环节共同抑制动脉粥样硬化的形成。

综上所述, HNG 能够抑制 LDLR 敲除小鼠动脉粥样硬化的形成过程,可以在一定程度上降低高脂

血症病理条件下的高血脂含量,尤其是总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇含量。与此同时,HNG也作用于高脂状态下血小板的活性,这样就证明HNG能够从降低血小板高敏感性与降脂以及保护内皮细胞等许多环节降低致动脉粥样硬化的危险因素,通过对不同途径的抑制作用就能够共同抑制动脉粥样硬化的发展。

[参考文献]

- [1] Akkerman, JW. From low-density lipoprotein to platelet activation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(11): 2 374-378.
- [2] Schick, BP, Serglycin proteoglycan deletion in mouse platelets: physiological effects and their implications for platelet contributions to thrombosis, inflammation, atherosclerosis, and metastasis[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010, 93: 235-287.
- [3] Zhu L, Stalker TJ, Fong KP, et al. Disruption of SEMA4D ameliorates platelet hypersensitivity in dyslipidemia and confers protection against the development of atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(7): 1 039-045.
- [4] Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(2): 360-366.
- [5] Liu Y, Davidson BP, Yue Q, et al. Molecular imaging of inflammation and platelet adhesion in advanced atherosclerosis effects of antioxidant therapy with NADPH oxidase inhibition[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2013, 6(1): 74-82.
- [6] Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, et al. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130 [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(12): 2 864-873.
- [7] Huo Y and Ley KF, Role of platelets in the development of atherosclerosis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, 14(1): 18-22.
- [8] Kariya S, Hirano M, Furiya Y, et al. Effect of humanin on decreased ATP levels of human lymphocytes harboring A3243G mutant mitochondrial DNA[J]. *Neuropeptides*, 2005, 39(2): 97-101.
- [9] Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation[J]. *J Exp Med*, 2002, 196(7): 887-896.
- [10] Gottardo MF, Jaita G, Magri ML, et al. Correction: Antiapoptotic Factor Humanin Is Expressed in Normal and Tumoral Pituitary Cells and Protects Them from TNF-alpha-Induced Apoptosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0 124 589.
- [11] Xie Y, Liu ZH, Li XY, et al. Protection effect of [Gly14]-Humanin from apoptosis induced by high glucose in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 106(3): 560-566.
- [12] Jia Y, Ohanyan A, Lue YH, et al. The effects of humanin and its analogues on male cell apoptosis induced by chemotherapeutic drugs[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(4): 551-561.
- [13] Wang T, Zhang L, Zhang M, et al. [Gly14]-Humanin reduces histopathology and improves functional outcome after traumatic brain injury in mice[J]. *Neuroscience*, 2013, 231: 70-81.
- [14] Zhao ST, Huang XT, Zhang C, et al. Humanin protects cortical neurons from ischemia and reperfusion injury by the increased activity of superoxide dismutase [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(1): 153-160.
- [15] Lytvyn Y, Wan J, Lai V, et al. The effect of sex on humanin levels in healthy adults and patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(4): 239-243.
- [16] Theilmeier G, Michiels C, Spaepen E, et al. Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia [J]. *Blood*, 2002, 99(12): 4 486-493.
- [17] Xu X, Chua CC, Gao J, et al. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke[J]. *Stroke*, 2006, 37(10): 2 613-619.
- [18] Chen J, Sun M, Zhang X, et al. Increased oligodendrogenesis by humanin promotes axonal remyelination and neurological recovery in hypoxic/ischemic brains[J]. *Hippocampus*, 2015, 25(1): 62-71.
- [19] Alie N, Eldib M, Fayad ZA, et al. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease: PET/CT for the Evaluation of Atherosclerosis and Inflammation[J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2014, 8(Suppl 3): 13-21.
- [20] Tearney, GJ. OCT imaging of macrophages: a bright spot in the study of inflammation in human atherosclerosis[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2015, 8(1): 73-75.
- [21] Mendel I, Yacov N, Harats D, et al. Therapies targeting innate immunity for fighting inflammation in atherosclerosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(9): 1 185-195.
- [22] Oh YK, Bachar AR, Zacharias DG, et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1): 65-73.
- [23] Saing L, Wei YC, and Tseng CJ. Ergothioneine represses inflammation and dysfunction in human endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015. [Epub ahead of print].
- [24] Viles-Gonzalez JF, Fuster V, and Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences[J]. *Eur Heart J*, 2004, 25(14): 1 197-207.
- [25] Oates JC. Endothelial dysfunction in injury and inflammation[J]. *Am J Med Sci*, 2015, 349(1): 2.
- [26] Widmer RJ, Flammer AJ, Herrmann J, et al. Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(3): H393-397.
- [27] Wong JM, Kendall CW, Marchie A, et al. Equol status and blood lipid profile in hyperlipidemia after consumption of diets containing soy foods[J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 95(3): 564-571.
- [28] Steinberg D and Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2 311-316.