

克拉屈滨对人脐静脉内皮细胞的毒性作用及机制

王小华¹, 陈丽璇², 张红³, 韩娜⁴, 段锋祺⁴, 周兆⁵, 吕林林⁵, 肖扬⁶, 刘革修⁵

(1.浙江省临海市第一人民医院普内科, 浙江省临海市 317000; 2.广州中医药大学, 广东省广州市 510405;

3.浙江省台州医院康复科, 浙江省台州市 317000; 4.南方医科大学, 广东省广州市 510515;

5.暨南大学医学院血液研究所, 广东省广州市 510632; 6.广州赛莱拉干细胞研究院, 广东省广州市 510320)

[关键词] 克拉屈滨; 内皮细胞; 细胞毒性; 细胞迁移; 细胞周期

[摘要] **目的** 研究克拉屈滨(2-CdA)对内皮细胞活力、迁移、周期和分泌活性的影响,以评估 2-CdA 在临床应用中,对心血管的影响。**方法** CCK-8 法检测不同浓度 2-CdA 对内皮细胞生长的影响;划痕实验检测细胞迁移;流式细胞术检测细胞周期;吖啶橙/溴化乙锭法检测细胞凋亡;Gries 法测定一氧化氮(NO)含量;ELISA 法检测血管内皮生长因子(VEGF)水平。**结果** 在 0.4~40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围,2-CdA 对内皮细胞有明显抑制作用,IC₅₀ 为 4.126 $\mu\text{mol/L}$ 。随药物浓度升高和作用时间的延长,2-CdA 的抑制作用增强;2-CdA 高浓度长时间作用可导致内皮细胞凋亡。5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 作用内皮细胞后,细胞迁移能力受抑制,细胞周期明显阻滞在 S 期。吖啶橙/溴化乙锭细胞染色结果显示,高浓度 2-CdA 可诱导内皮细胞的凋亡。5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 作用内皮细胞后导致 NO 和 VEGF 含量减少。**结论** 2-CdA 具有内皮细胞毒性作用,引起细胞周期阻滞,并导致细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Toxic effect and mechanism of cladribine on human umbilical vein endothelial cells

WANG Xiao-Hua¹, CHEN Li-Xuan², ZHANG Hong³, HAN Na⁴, DUAN Feng-Qi⁴, ZHOU Zhao⁵, LV Lin-Lin⁵, XIAO Yang⁶, LIU Ge-Xiu⁵

(1. Department of Internal Medicine, First People's Hospital of Linhai, Linhai, Zhejiang 317000, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 3. Department of Rehabilitation, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou, Zhejiang 317000, China; 4. Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 5. Institute of Hematology, School of Basic Medical Sciences, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China; 6. Guangzhou Salai Institute of Stem Cell, Guangzhou, Guangdong 510320, China)

[KEY WORDS] Cladribine; Endothelial cell; Cytotoxicity; Cell migration; Cell cycle

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of cladribine (2-CdA) on the viability, migration, cell cycle and secretion activity of human umbilical vein endothelial cells, and to evaluate the influence of 2-CdA on cardiovascular system in clinical application. **Methods** The effect of different concentrations of 2-CdA on the growth of endothelial cells was detected by CCK-8. The cell migration ability was detected by scratch test. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. The cell apoptosis was detected by acridine orange and ethidium bromide. The content of nitric oxide (NO) was determined by Gries method. ELISA method was used to detect vascular endothelial growth factor (VEGF) level. **Results** In the concentration range of 0.4 to 40 $\mu\text{mol/L}$, 2-CdA had an obvious inhibitory effect on endothelial cells, and IC₅₀ was 4.126 $\mu\text{mol/L}$. With the increase of drug concentration and the prolongation of action time, the inhibitory effect of 2-CdA increased. High concentration of 2-CdA for a long time could induce endothelial cell apoptosis. After 5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA acted on endothelial cells, the migration ability of cells was inhibited, and the cell cycle was significantly blocked in S phase. The staining results of acridine orange and ethidium bromide showed that high concentration of 2-CdA could induce apoptosis of endothelial cells. After the action of 5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA on endothelial cells, NO and VEGF contents were reduced. **Conclusion** 2-CdA has the toxic effect of endothelial cells, resulting in cell cycle arrest and cell apoptosis.

[收稿日期] 2017-12-12

[修回日期] 2018-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81270568)

[作者简介] 王小华, 硕士, 副主任医师, 研究方向为肿瘤放疗化疗, E-mail 为 wxh26822@sina.com。通讯作者刘革修, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为干细胞基础与应用, E-mail 为 tliugx@jnu.edu.cn。

克拉屈滨 (cladribine, 2-CdA) 是目前最具发展前景的抗 DNA 核苷类似物, 主要用于治疗毛细胞白血病 (hairy cell leukemia, HCL)、B 细胞淋巴瘤、多发性硬化症、多发性骨髓瘤、急性粒细胞白血病等。2013 年美国国家综合癌症网络指南 (NCCN 指南) 将 2-CdA 作为 HCL 的标准一线治疗药物^[1]。2-CdA 治疗 HCL 的缓解率高达 80%。2-CdA 主要作用机制与脱氧胞苷激酶和脱氧核苷酸激酶活性有关; 2-CdA 被动转运到细胞内, 被脱氧胞苷激酶磷酸化, 转化为克拉屈滨三磷酸, 掺合到 DNA 分子中, 阻碍 DNA 的修复, 影响 DNA 的合成^[2]。虽然 2-CdA 治疗 HCL 等血液病有很好的疗效, 但也会产生一定的副作用, 主要不良反应为骨髓抑制、免疫抑制、感染及心血管反应等。所以, 2-CdA 在合并心脏疾病的血液病患者中应用的安全性须引起重视。本实验就 2-CdA 对内皮细胞生物学特性的影响进行研究, 探讨 2-CdA 对血管内皮细胞的毒性作用, 为临床防治 2-CdA 引起心血管不良反应提供实验依据, 提高 2-CdA 的临床用药安全性。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

克拉屈滨为广州军区广州总医院血液科惠赠。DMEM/高糖培养基 (HyClone 公司); 胎牛血清、0.25% 胰酶、青霉素、链霉素、PBS 缓冲液 (Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (Dojindo 公司); 细胞周期试剂盒 (Sigma 公司); 吖啶橙 (acridine orange, AO) 和溴化乙啶 (ethidium bromide, EB) (MYM Biological Technology 公司); 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 酶联免疫吸附试剂盒 (武汉华美公司); 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (南京建成公司)。96 孔板、25 cm² 细胞培养瓶 (Beaver 公司)。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞 EA.hy926 (human umbilical vein endothelial cell EA.hy926) 购买于中国科学院细胞生物学研究所北京细胞库。于 37℃、5%CO₂ 培养箱中用 DMEM/高糖培养液 (含 10% 胎牛血清、1% 双抗) 培养 EA.hy926, 每 24~48 h 传代 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

1.3 药物准备

克拉屈滨 (规格: 10 mL, 2-CdA 10 mg 与氯化钠 90 mg; 分子量 285.69 Da), 根据 2-CdA 分子量得知母液浓度 3.5 mmol/L, 用 PBS 缓冲液稀释至不同浓

度, 4℃ 储存备用。

1.4 CCK-8 法检测细胞活力

制备 EA.hy926 细胞悬液, 将细胞接种于 96 孔板, 5×10^3 个/孔, 在含 10% 血清的 DMEM/高糖培养基中过夜后加入 2-CdA (最终浓度为 0、0.4、0.8、1、5、10、20、40 μmol/L)。于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 加入 CCK-8 试剂, 每孔 10 μL, 混匀后继续孵育 3 h。在酶标仪上测定 450 nm 波长处各孔吸光度 (absorbance, A) 值。按照同样方法检测 5 μmol/L 2-CdA 处理细胞 24、48、72 h 的 A 值。然后根据 A 值计算细胞活力。

1.5 划痕法检测细胞迁移

将 EA.hy926 细胞接种于 6 孔板中, 5×10^4 个/孔, 待细胞在含 10% 血清的 DMEM/高糖培养基中贴壁并长至融合时, 使用无菌的 200 μL 枪头在 6 孔板中均匀地划 4 条相互垂直的直线并用 PBS 洗去脱落的细胞, 然后加入 2-CdA 使其最终浓度为 0 μmol/L 和 5 μmol/L, 分别在加药后 0、8、12、24 h 时在带有拍照系统的倒置显微镜 (Leica 公司) 下观察拍照, 然后使用 Image J 软件分析图片, 统计每个时间点细胞整体迁移的距离。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

将细胞接种于 25 cm² 的培养瓶中, 待细胞长至 70% 融合时, 加入 2-CdA, 使终浓度为 5 μmol/L, 并设置对照组 (0 μmol/L 2-CdA)。继续培养 48 h 后, 离心收集细胞, 按照试剂盒说明操作, 于流式细胞仪 (ACEA 公司) 上检测分析。

1.7 吖啶橙/溴化乙啶染色检测细胞凋亡

将细胞接种于 25 cm² 的培养瓶中, 待细胞长至 70% 融合时, 加入 2-CdA, 使终浓度为 5 μmol/L, 并设置对照组 (0 μmol/L 2-CdA)。继续培养 48 h 后, 离心收集细胞, 用 PBS 重悬混匀, 并吸取 50 μL 的细胞悬液于载玻片上进行涂片, 然后滴加 50 μL 的 AO/EB 混合液并盖上盖玻片, 随即在正立荧光显微镜下拍照观察。

1.8 Western blot 检测目的蛋白的表达水平

收集 2-CdA 处理 48 h 后的细胞, 按照蛋白抽提试剂盒上的说明提取细胞总蛋白; BCA 法测定蛋白浓度后, 取 40 μg 变性后蛋白样品上样, 12% SDS-PAGE 电泳, 待溴酚蓝达到凝胶底部时, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上; 5% 脱脂奶粉液室温封闭 1 h 后, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 一抗 4℃ 孵育过夜; TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 二抗室温摇床孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 5 min; ECL 发光, 凝胶成像仪中

显影,采用 Gel-Pro analyzer 6.0 进行蛋白条带灰度分析。

1.9 检测上清 NO 和 VEGF 水平

收集 0 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 干预 48 h 后的细胞培养上清液。按照 Gries 试剂盒和 ELISA 试剂盒说明操作,分别检测上清液中 NO 和 VEGF 的水平。

1.10 统计学处理

采用 Stata 13.0 统计软件进行数据分析。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用 Bonferroni 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 克拉屈滨抑制内皮细胞的细胞活力

克拉屈滨 (0.4 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$) 作用后,随着药物

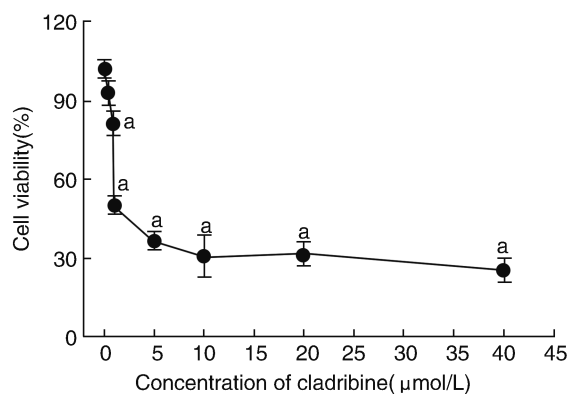


图 1. 2-CdA 呈浓度依赖性抑制 EA.hy926 细胞的细胞活力 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$,与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ 组) 比较。

Figure 1. 2-CdA inhibited the viability of EA.hy926 cells in a dose-dependent manner ($n=3$)

浓度增加,内皮细胞活性逐渐降低,其半数抑制率 IC_{50} 为 4.126 $\mu\text{mol/L}$,各组与对照组相比有明显抑制作用 ($P < 0.05$;图 1)。当 2-CdA 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对内皮细胞已经有明显的抑制作用 ($P < 0.01$),细胞存活率为 50.2%。当药物浓度达 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,2-CdA 对细胞有严重抑制作用 ($P < 0.01$),细胞存活率为 36.7%,与 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度相比,细胞活性没有明显差异。因此,选择 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进行后续实验。随着 5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 作用时间延长,细胞活性下降 ($P < 0.01$;图 2)。由此可见 2-CdA 具有细胞毒性。

2.2 克拉屈滨抑制内皮细胞迁移

在观察的 24 h 内,对照组的细胞逐渐迁移至划痕中,划痕空间逐渐变小。而实验组细胞在观察的时间内,细胞迁移数量很少,在第 24 h,与对照组比较划痕空间很大 ($P < 0.05$;图 3)。说明 2-CdA 对内皮细胞的迁移有抑制作用。

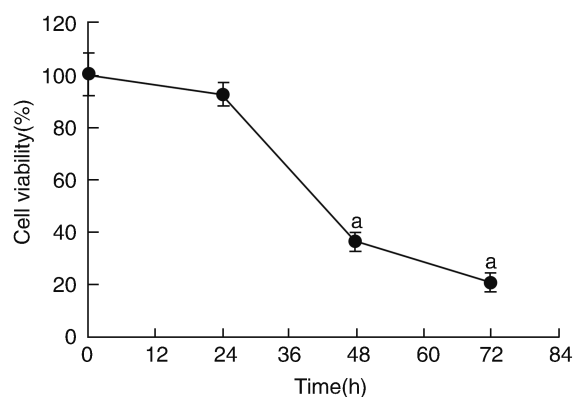


图 2. 2-CdA 呈时间依赖性抑制 EA.hy926 细胞的细胞活力 ($n=3$) a 为 $P < 0.01$,与对照组 (0 h 组) 比较。

Figure 2. 2-CdA inhibited the viability of EA.hy926 cells in a time-dependent manner ($n=3$)

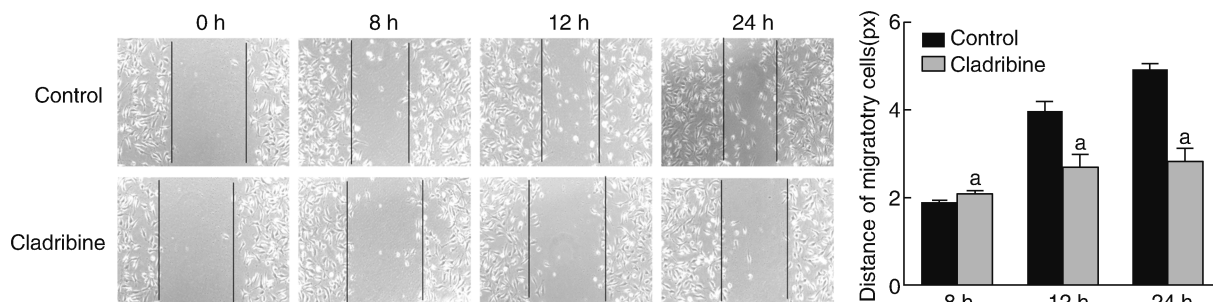


图 3. 2-CdA 抑制 EA.hy926 细胞的迁移 ($n=3$) 左图为各时间点细胞迁移图 (100 \times);右图为与 0 时划痕距离相比较的细胞迁移距离统计分析。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较。

Figure 3. 2-CdA inhibited the migration ability of EA.hy926 cells ($n=3$)

2.3 克拉屈滨阻滞内皮细胞的细胞周期
5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 作用 48 h 后,更多的细胞处

于 S 期,与对照组相比有显著差异($P<0.05$;图 4、表 1)。说明 2-CdA 阻滞细胞周期于 S 期。

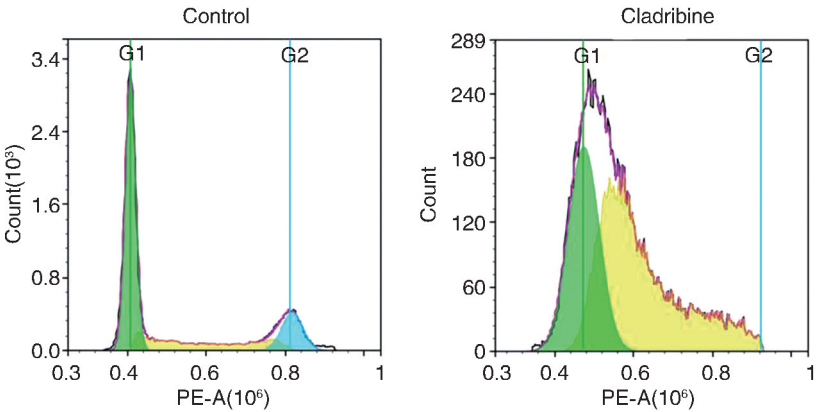


图 4. 2-CdA 阻滞 EA.hy926 细胞的细胞周期
Figure 4. 2-CdA block the cell cycle of EA.hy926 cells

表 1. 两组细胞在细胞周期中的分布率($n=3$)
Table 1. The distribution rate of cells of two groups in the cell cycle ($n=3$)

分 组	G1 期(%)	S 期(%)	G2 期(%)
对照组	59.50 \pm 0.89	23.09 \pm 2.01	16.93 \pm 1.19
5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 组	37.31 \pm 1.86 ^a	62.33 \pm 2.10 ^a	0.36 \pm 0.41 ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

2.4 克拉屈滨诱导内皮细胞凋亡
克拉屈滨处理 48 h 后,进行 AO/EB 染色,对照组的细胞拥有正常的圆形和绿色的细胞核,5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 组的细胞显示出许多橙色,核内染色体发生了聚缩(在图中表现为局部的亮橙色;图 5)。说

明高浓度的 2-CdA 可诱导内皮细胞的凋亡。
2.5 克拉屈滨对内皮细胞蛋白表达水平的影响
5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 作用 48 h 后,Cleaved caspase-3 的蛋白量明显上升,Bcl-2 蛋白表达减弱,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$;图 6)。说明 2-CdA 促进 Cleaved caspase-3 蛋白的表达,抑制 Bcl-2 蛋白的表达。

2.6 克拉屈滨抑制内皮细胞分泌 NO 和 VEGF
5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 作用 48 h 后,细胞上清液中 NO 与 VEGF 的含量减少,与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$;表 2)。提示 2-CdA 抑制 NO 与 VEGF 的分泌。

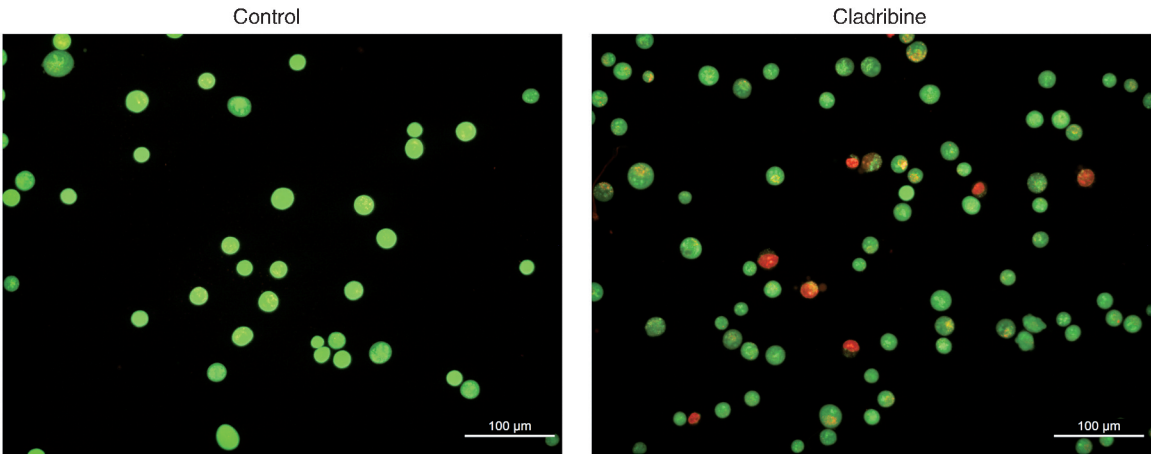


图 5. 2-CdA 对 EA.hy926 细胞凋亡的影响
Figure 5. Effect of 2-CdA on the apoptosis of EA.hy926 cells

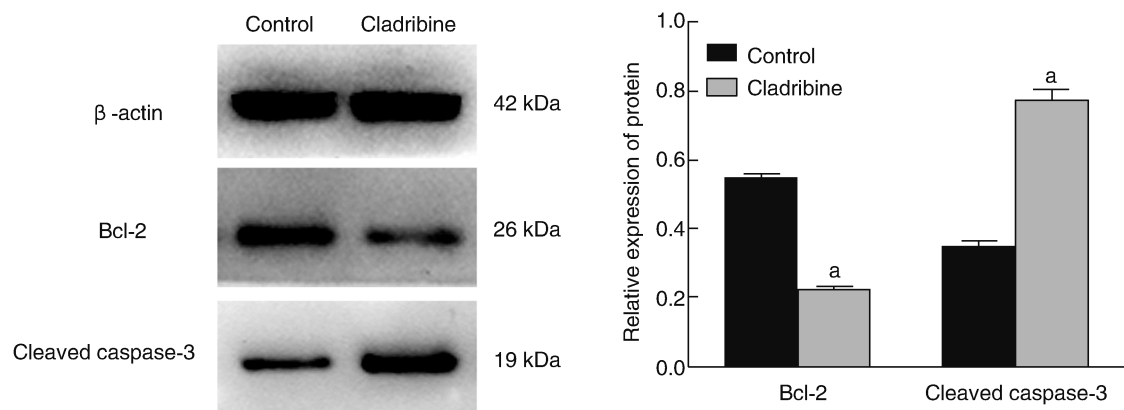


图 6. 2-CdA 对 EA.hy926 细胞蛋白表达水平的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较。

Figure 6. Effect of 2-CdA on the expression of protein in the EA.hy926 cells ($n=3$)

表 2. 2-CdA 对 EA.hy926 细胞 NO 与 VEGF 水平的影响 ($n=3$)

Table 2. Effect of 2-CdA on the levels of NO and VEGF in EA.hy926 cells ($n=3$)

分 组	NO($\mu\text{mol/L}$)	VEGF(ng/L)
对照组	3.59 \pm 0.41	845.33 \pm 9.71
5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 组	1.07 \pm 0.16 ^a	396.67 \pm 10.02 ^a

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

目前,2-CdA 在血液病肿瘤中的应用有着明显的优势。采用持续 2-CdA 静脉滴注 7 天治疗 HCL, 总有效率达 95%^[3]。对于复发 HCL 患者,再次应用总缓解率达 90%^[4]。除了治疗 HCL,2-CdA 还被用于治疗慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤^[5]。此外,2-CdA 还用于治疗朗格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤和多发性硬化症。2-CdA 治疗效果明显,但其引发的骨髓抑制、感染等不良反应也令人担忧。来自国外 196 位 HCL 患者的安全性数据,发现治疗开始 2 周内出现心动过速者约 6%^[6-8]。虽然国内尚无关于 2-CdA 引起心血管不良反应的临床报道,但是 2-CdA 在合并心脏疾病的血液病患者中应用的安全性有待进一步研究探讨。血管内皮细胞具有维持血管内皮光滑,防止血小板黏附和有害物质侵入血管壁的重要作用。内皮细胞功能紊乱在高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病中有重要意义^[9]。

本研究中,我们观察了 2-CdA 在体外对人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 活性的影响,发现药物浓度越高,细胞存活率越低,IC₅₀ 为 4.126 $\mu\text{mol/L}$ 。迁移实验发现 2-CdA 能抑制细胞的迁移能力。通过

AO/EB 染色,发现部分细胞变橙色,细胞形态发生改变,细胞核内染色体聚缩。AO/EB 染色检测细胞凋亡的方法由 Ribble 等^[10]的方法改进而来。根据该方法的原理可知活细胞拥有正常的绿色核;早期凋亡的细胞核内有聚缩的染色体片段,拥有更亮的绿色的核;晚期凋亡的细胞展现出聚缩的片段化的橙色染色体;坏死的细胞则显示出正常的橙色核^[11]。实验结果显示,5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 能够诱导内皮细胞凋亡,对内皮细胞有毒性作用。细胞凋亡是在特定基因调控下发生的一种程序性死亡,包括线粒体途径(内源性)和死亡受体途径(外源性)2 种途径^[12]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键蛋白酶,参与细胞凋亡的内源性和外源性途径。抑制 Caspase-3 的活化可以阻断细胞凋亡的反应。活化后的 Caspase-3(Cleaved caspase-3)才是发挥诱导细胞凋亡的重要分子^[13-14]。Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要蛋白,通过阻断线粒体释放细胞色素 C 起到保护细胞的作用^[15]。本研究通过 Western blot 检测发现,经 2-CdA 作用后,Cleaved Caspase-3 表达增加,而 Bcl-2 表达减弱,与细胞凋亡实验相一致。

许多研究发现氧化应激是导致内皮细胞损伤的主要原因,氧化应激使内皮细胞减少 NO 的分泌,增加活性氧的产生,引起内皮细胞损伤和凋亡^[16]。NO 分泌减少时,使环磷酸鸟苷生成减少,并影响血管平滑肌舒张功能和内皮依赖性血管舒张反应,导致内皮功能障碍^[17]。在本研究中,5 $\mu\text{mol/L}$ 2-CdA 显著抑制内皮细胞的细胞活力,并且使 NO 分泌减少,细胞核形态发生变化;说明 2-CdA 可通过氧化应激的方式造成血管内皮细胞功能损伤。内皮细胞产生的 NO 能够保持血管内皮细胞的完整性,具有维持血管舒张和血压稳定的重要作用。NO 生成减少,血管收缩,管腔狭窄,引起血压升高、心动过速。临床观察也发现高血压病人血清 NO 比正常人

低^[18-19]。NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸(L-Arg)产生。当血管内皮损伤时, NOS-L-Arg-NO 途径障碍;内皮细胞损伤, NO 分泌减少,导致血管平滑肌细胞增生,血管痉挛,血小板黏附增强,容易引起血管阻塞和血栓形成。经临床观察,冠状动脉粥样硬化性心脏病患者 NO 水平降低, NOS 合成受限^[20]。

克拉屈滨对内皮细胞生物学的影响,不仅与 NO 有关,还与 2-CdA 减少 VEGF 的分泌有关。VEGF 是一种内皮细胞特异性丝裂原元素,能够维持内皮细胞的正常功能,可促进内皮细胞分泌 NO。VEGF 保护内皮细胞的途径之一是通过刺激 NO 的分泌,发挥 NO 抑制血小板聚集、黏附和抗血栓的作用,从而保持内皮细胞的完整性^[21-22]。当 VEGF 减少时, NO 的分泌会减少,内皮细胞的正常功能也受影响。另一方面, VEGF 会促进内皮细胞的增殖和迁移^[23-25]。本研究发现 2-CdA 作用后, VEGF 和 NO 的分泌减少,并且细胞活性下降和细胞迁移受抑制,实验结果具有一致性。

综上,本研究发现 2-CdA 具有促进内皮细胞凋亡、抑制内皮细胞迁移等毒性作用,其机制可能与抑制 NO 和 VEGF 的生成有关。而临床上合理使用 2-CdA,减少其带来的不良反应,是临床医师和患者关注的问题。我们希望, 2-CdA 作用于内皮细胞的量效曲线、抑制 NO 和 VEGF 分泌等实验数据能为临床安全用药、防治血管内皮损伤提供参考,为探索 2-CdA 靶向治疗肿瘤细胞的作用机制提供新思路。但是,由于本研究主要涉及的是 2-CdA 对内皮细胞毒性作用的体外实验,至于 2-CdA 在体内对内皮细胞的影响,以及采取何钟相关措施预防 2-CdA 对内皮细胞的毒性作用,还需要进一步的研究探索。

[参考文献]

- [1] 杜雅慧, 王文, 纪春岩, 等. 克拉屈滨的临床应用[J]. 中国处方药, 2013, 11(3): 33-35.
- [2] Sigal DS, Miller HJ, Schram ED, et al. Beyond hairy cell: the activity of cladribine in other hematologic malignancies[J]. Blood, 2010, 116(16): 2 884-896.
- [3] Robak T, Jamrozik K, Gora-Tybor J, et al. Cladribine in a weekly versus daily schedule for untreated active hairy cell leukemia: final report from the Polish Adult Leukemia Group (PALG) of a prospective, randomized, multicenter trial[J]. Blood, 2007, 109(9): 3 672-675.
- [4] Goodman GR, Burian C, Koziol JA, et al. Extended follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with cladribine[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(5): 891-896.
- [5] Byrd JC, Peterson B, Piro L, et al. A phase II study of cladribine treatment for fludarabine refractory B cell chronic lymphocytic leukemia: results from CALGB Study 9211[J]. Leukemia, 2003, 17(2): 323-327.
- [6] 胡涛, 刘嵘, 李君惠, 等. 克拉屈滨治疗儿童难治性高危朗格汉斯细胞组织细胞增生症:13 例报告并文献复习[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(11): 985-989.
- [7] 陈海丝, 杨欣, 黄锦海, 等. 多发性硬化症新型药物克拉屈滨的研究进展[J]. 医学综述, 2014(23): 4 343-346.
- [8] 蔡博. 多发性骨髓瘤治疗的新型药物和联合用药策略研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2013; 1-60.
- [9] 李润生, 李大勇, 陈文娜, 等. 桃红四物汤调节血管内皮细胞功能及治疗动脉硬化闭塞症的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(2): 191-196.
- [10] Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates[J]. BMC Biotechnol, 2005, 5(12): 1-7.
- [11] 王茜, 周兆, 张雷, 等. 达沙替尼对人骨髓间充质干细胞生物学特性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(6): 993-999.
- [12] Gonzalez D, Espino J, Bejarano I, et al. Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 333(1): 151-157.
- [13] Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30(1): 87-89.
- [14] Fan TJ, Han LH, Cong RS, et al. Caspase family proteases and apoptosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2005, 37(11): 719-727.
- [15] Adams JM, Cory S. The BCL-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. Science, 1998, 281(5381): 1 322-326.
- [16] Hou X, Tong Q, Wang W, et al. Dihydropyridine protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways[J]. Life Sci, 2015, 1(130): 38-46.
- [17] Dong JY, Zhang YH, Qin LQ. Erectile dysfunction and risk of cardiovascular disease: meta-analysis of prospective cohort studies[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(13): 1 378-385.
- [18] 岳伟, 崔秋子, 田雪, 等. 老年糖尿病合并高血压患者血清内脂素与一氧化氮、一氧化氮合酶的关系[J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(5): 26-28.
- [19] 张勇. H 型高血压患者血管内皮功能变化及与血浆同型半胱氨酸水平的关系[J]. 河北医药, 2017, 39(17): 2 593-596.
- [20] 王元, 向定成. 一氧化氮合酶基因多态性与冠状动脉痉挛的相关性[J]. 岭南心血管病杂志, 2015, 21(1): 123-125.
- [21] 马跃东, 李德华. VEGF 在心血管疾病治疗中作用的研究进展[J]. 中国老年学, 2011, 31(9): 1 703-705.
- [22] Liu F, Wang J, Chang AK, et al. Fucoidan extract derived from Undaria pinnatifida inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells[J]. Phytomedicine, 2012, 19(8): 793-797.
- [23] Schultz A, Lavie L, Hochberg I, et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation[J]. Circulation, 1999, 100(5): 547-552.
- [24] 刘岩, 涂明利, 孙晓东, 等. 小檗碱经 JAK/STAT3 通路抑制 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞增殖和迁移[J]. 华南国防医学杂志, 2015, 29(8): 575-578.
- [25] 马骥, 赵庆丽, 任晖, 等. RhoA 在缺氧诱导的乳腺癌细胞 VEGF 分泌和血管内皮细胞增殖、迁移及管腔形成中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(6): 784-788.

(此文编辑 曾学清)