

· 基础与实验研究 ·

白藜三醇促进缺氧条件下人脐静脉内皮细胞的血管生成作用*

杨雪, 王志荣, 张卓琦, 张超群, 徐晤, 程明月

摘要

目的: 探讨白藜三醇(Res)对氯化钴(CoCl_2)诱导缺氧的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的血管生成作用的影响及可能机制。

方法: 体外培养 HUVEC 分 5 组: DMEM 高糖(<4500 mg/L)培养基培养细胞组(正常组)、 CoCl_2 +DMEM 高糖培养基(缺氧组)、缺氧+LY294002(阻断剂组)、缺氧+白藜三醇(药物组)、缺氧+白藜三醇+LY294002(药物阻断剂组)。采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况; 采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)的表达; 免疫细胞化学的方法检测 HIF-1 α 的蛋白表达; 采用 transwell chamber(迁移小室)检测内皮细胞的迁移能力; 体外血管形成实验检测内皮细胞的体外血管形成能力。

结果: ① CCK-8: 缺氧组及药物组(0.1、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)与正常组相比 A490 值升高(P 均<0.01); 药物组(1、5 $\mu\text{mol/L}$)与缺氧组比 A490 值升高(P 均<0.01)。尤其药物组 5 $\mu\text{mol/L}$ A490 值明显升高(P <0.01)。② 蛋白免疫印迹: 缺氧组较正常组 HIF-1 α 、VEGF、p-Akt 蛋白表达均增加(P 均<0.05); 药物组(5 $\mu\text{mol/L}$)与缺氧组相比 HIF-1 α 、VEGF、p-Akt 蛋白表达均增加(P 均<0.01); 药物阻断剂组(5 $\mu\text{mol/L}$)较阻断剂组 HIF-1 α 、VEGF、p-Akt 蛋白表达比较差异均无统计学意义(P 均>0.05)。③ 免疫细胞化学: 缺氧组胞内 HIF-1 α 阳性表达, 显色呈黄褐色; 药物组(5 $\mu\text{mol/L}$)胞内 HIF-1 α 强阳性表达, 显色呈深黄褐色。④ transwell chamber: 药物组(5 $\mu\text{mol/L}$)内皮细胞迁移率大于缺氧组(P <0.01)。⑤ 体外血管形成实验: 药物组(5 $\mu\text{mol/L}$)在体外的血管形成数量明显大于缺氧组(P <0.01)。

结论: 白藜三醇可能是激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI-3K)/Akt 通路促进 HIF-1 α 聚集, 从而促进血管的新生。

关键词 白藜三醇; 低氧诱导因子; 血管内皮生长因子; 蛋白激酶 B; 血管生成

Effect of Resveratrol for Improving Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cell at Hypoxia Condition *in vitro*

YANG Xue, WANG Zhi-rong, ZHANG Zhuo-qi, ZHANG Chao-qun, XU Wu, CHENG Ming-yue.

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou (221002), Jiangsu, China

Corresponding Author: WANG Zhi-rong, Email: xzrw@163.com

Abstract

Objective: To study the effect of resveratrol (Res) for improving the angiogenesis in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) at CoCl_2 induced hypoxia condition *in vitro*.

Methods: The HUVEC were cultured in 5 groups, ① Control group, the cells were cultured with high glucose (<4500 mg/L) DMEM, ② Hypoxia group, cells cultured with CoCl_2 , ③ Blocker group, cells cultured with CoCl_2 +LY294002, ④ Medication group, cells cultured with CoCl_2 +Res at different concentrations, ⑤ Hypoxia+medication+blocker group. HUVEC proliferation was detected by CCK8 assay, the protein levels of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), vessel endothelial growth factor (VEGF), protein kinase B (Akt) and p-Akt were examined by Western blot analysis, HIF-1 α expression was measured by immunocytochemistry, cell migration rate was studied by transwell chamber method, and cell angiogenesis was examined by tube formation test.

*基金项目: 江苏省卫生厅医学重点人才基金(RC2007089)

作者单位: 221002 江苏省徐州市, 徐州医学院附属医院 心内科

作者简介: 杨雪 住院医师 硕士 主要从事冠心病的防治研究 Email: 18795421661@163.com 通讯作者: 王志荣 Email: xzrw@163.com

中图分类号: R541 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614(2013)08-0622-05 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2013.08.017

Results: ① By CCK8 assay, for HUVEC proliferation, Hypoxia group and Medication (0.1, 1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) group had increased A490 level than that in Control group, and A490 level in Medication (1, 5 $\mu\text{mol/L}$) group was higher than that in Hypoxia group, all $P < 0.01$. ② By Western blot analysis, HIF-1 α , VEGF, p-Akt protein expression significantly increased in Hypoxia group than that in Control group, all $P < 0.01$. HIF-1 α , VEGF and p-Akt protein expression increased in Medication (5 $\mu\text{mol/L}$) group than that in Hypoxia group, all $P < 0.05$. HIF-1 α , VEGF, p-Akt protein expression were similar in Blocker group, all $P > 0.05$. ③ By immunohistochemistry, HIF-1 α was positive in Hypoxia group, and strongly positive in Medication (5 $\mu\text{mol/L}$) group. ④ By transwell chamber method, cell migration rate in Medication (5 $\mu\text{mol/L}$) group was higher than that in Hypoxia group, $P < 0.01$. ⑤ By tube formation test, the angiogenesis in Medication (5 $\mu\text{mol/L}$) group was more than that in Hypoxia group, $P < 0.01$.

Conclusion: Res may activate Akt pathway, aggregate HIF-1 α and therefore, improve the angiogenesis in HUVEC *in vitro*.

Key words Resveratrol; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Vessel endothelial growth factor; Protein kinase B; Angiogenesis
(Chinese Circulation Journal, 2013,28:622.)

在临床上, 心肌缺血是心脏缺氧最常见的原因。缺氧心肌及周围心肌的血管生成在一定程度上可以缓解心肌缺血, 近十几年来介入性血管新生具有广泛的前景^[1], 而且现在临床研究证明, 靠机体启动再生新的血管以适应缺血变化的过程非常缓慢, 因此, 人为地增加心肌局部生长因子的浓度, 对缓解以致解除心肌缺血有潜在的可行性。研究发现某些药物可以增加病变部位血管生长因子的浓度, 促进局部血管的再生, 增加有功能的冠状血管分支和侧支循环。白藜三醇(resveratrol, Res)是一种非黄酮类多酚化合物, 对心血管系统有很多的保护作用, 我们前期的在体实验研究发现, 白藜三醇可以促进急性心肌梗死后新生血管和侧支循环的形成^[2], 其促进血管新生的机理尚不清楚, 本实验拟在细胞水平上验证白藜三醇促进血管新生的可能机制, 进一步为药物治疗心肌缺血提供广阔前景。

1 材料与方法

药品及试剂 白藜三醇、氯化钴(CoCl_2)购于美国 Sigma 公司, DMEM 高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国 Gibco 公司, 鼠抗 β -actin、即用型 SABC 免疫细胞化学染色试剂盒、二氨基联苯胺显色剂(DAB)、碱性磷酸酶标记的马抗小鼠和山羊抗兔 IgG 均购于北京中杉金桥科技有限公司, transwell chamber、Matrigel(GFR)购于美国 BD biosciences, 结晶紫染液购于碧云天生物技术研究所在体实验研究所, 鼠抗人低氧诱导因子(HIF-1 α)单克隆抗体和鼠抗人血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体均购于美国 Abcam 公司, 兔抗人蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)多克隆抗体、LY294002(PI3K 阻断剂)购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

细胞来源 人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购于美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

方法 细胞培养: 取人脐静脉内皮细胞株, 复苏后采用胰蛋白酶(0.25%)消化法, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 5% 二氧化碳(CO_2)培养箱中进行细胞培养, 待细胞长满融合后按 1:3 分瓶传代。

细胞缺氧模型制备及分组: 体外培养人脐静脉内皮细胞株分 5 组: DMEM 高糖培养基培养(正常组)、 CoCl_2 +DMEM 高糖培养基(缺氧组)、缺氧+LY294002(阻断剂组)、缺氧+白藜三醇(药物组)、缺氧+白藜三醇+LY294002(药物阻断剂组)。根据文献[3]的方法, 采用氯化钴造成缺氧, 种板培养 24 h 后, 各孔弃去培养基, 用无菌 PBS 缓冲液清洗 2 次, 去血清同步化 24 h 后, 阻断剂组加入 LY294002 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 1 h; 药物组加入白藜三醇终浓度分别为 0.1、1、5、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 2 h; 缺氧组、阻断剂组、药物组、药物阻断剂组加入氯化钴终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

CCK-8 法检测细胞增殖^[4]: 取对数生长期的细胞, 以 2×10^4 孔接种于 96 孔板中, 分组处理细胞, 各组均加入 CCK-8, 每个浓度及正常组均设 6 个平行孔。孵育 24 h 后加入 CCK-8, 重新放回培养箱 2 h 后, 用酶标仪于 490 nm 检测每孔光密度(A490)值, 细胞增殖率 = $(D_{\text{处理组}} - D_{\text{缺氧组}}) / D_{\text{缺氧组}} \times 100\%$ 。

蛋白免疫印迹(Western blot)法检测低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1 α)、VEGF、Akt、p-Akt 蛋白表达: 处理后的细胞用 PBS 缓冲液清洗干净, 用含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液在冰上裂解 30 min, 14 000 $\times g$ 离心 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度^[5]。蛋白高温变性, 加样, 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶进行跑胶, 转膜,

含 5% 脱脂牛奶的缓冲液 (含有 Tris-HCl、NaCl、Tween-20, pH=7.4) 封闭 2 h, 一抗室温孵育 2 h 后, 4℃ 孵育过夜。缓冲液洗 3 遍, 每次 5 min, 二抗室温孵育 3 h, 缓冲液洗净, 显色, 扫描。

免疫细胞化学检测缺氧状态下各组 HIF-1 α 的表达: 将细胞接种于放有盖玻片的 24 孔板中, 按照 5 个分组处理完后, 取出各组盖玻片, 室温下多聚甲醛固定。0.1% Triton-X-100 破膜。0.3% 过氧化氢 (H₂O₂) 室温浸泡盖玻片以灭活内源性过氧化物酶。5% 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭。滴加一抗 (鼠抗人 HIF-1 α 单克隆抗体, 稀释度 1:250) 4℃ 过夜。滴加生物素化的马抗小鼠 IgG, 室温 2 h, 滴加辣根过氧化物酶工作液 15 min (以上各步骤间均用 PBS 缓冲液漂洗 3 遍, 每遍 5 min)。DAB 显色, 蒸馏水洗涤, 苏木素伊红复染。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

内皮细胞体外迁移实验: 按照文献 [6] 24 孔板每孔加入 500 μ l 含有 20% 血清的培养基, 上室加入 100 μ l 无血清的细胞混悬液 (3 \times 10⁴/孔), 按照 5 个分组处理细胞, 加入白藜三醇或 LY294002 或氯化钴, 每组均设 3 个复孔, 于 37℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养 12 h 后, 用多聚甲醛固定 30 min 后, 进行结晶紫染色 15 min, 用棉签轻轻将上室滤膜的上层细胞擦净, 将滤膜在玻片上固定, 滤膜下表面朝上。显微镜下计数滤膜下表面的细胞数, 随机选取 5 个视野。

内皮细胞的体外小管形成实验: 用预冷的枪头将基质胶在冰上以每孔 50 μ l 铺于 96 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置 1 h, 之后每孔加入 100 μ l 的细胞悬液 (2 \times 10⁴/孔)。按照 5 个分组处理细胞 6 h 后, 观察各组细胞管状排列状况及管状结构数量、完整程度, 并随机选取 5 个视野, 应用 Image J 软件分析显微镜下每个视野小管数量, 结果以与正常组相比的百分数表示。

统计学处理 计量数据均以均数 \pm 标准差表示, 采用 Graphpad Prism 5 软件进行统计学分析, 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较各组之间的差别, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜三醇对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

缺氧组和药物组 (0.1、1、5、10 μ mol/L) 比正常组 A490 值升高 (P 均 < 0.01), 药物组 (50 μ mol/L) 比正常组 A490 值降低 ($P < 0.01$), 差异均有统计学

意义。药物组 (1、5 μ mol/L) 比缺氧组 A490 值升高 (P 均 < 0.01), 差异均有统计学意义。药物组 (0.1、1、10、50 μ mol/L) 比药物组 (5 μ mol/L) A490 值低 (P 均 < 0.01), 差异均有统计学意义。表 1

表 1 CCK-8 法检测白藜三醇对人脐静脉内皮细胞增值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	A490
正常组	0.936 \pm 0.032
缺氧组	1.089 \pm 0.032 [†]
药物组	
0.1 μ mol/L	1.164 \pm 0.106 ^{†Δ}
1 μ mol/L	1.242 \pm 0.034 ^{†Δ}
5 μ mol/L	1.366 \pm 0.024 ^{†Δ}
10 μ mol/L	1.162 \pm 0.062 ^{†Δ}
50 μ mol/L	0.550 \pm 0.036 ^{†Δ}

注: 与正常组比 [†] $P < 0.01$; 与缺氧组比 ^{Δ} $P < 0.01$; 与药物组 5 μ mol/L 比 ^{Δ} $P < 0.01$

2.2 白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞内 HIF-1 α 、VEGF、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响

缺氧组较正常组 HIF-1 α 、VEGF、p-Akt 蛋白表达均增加 (P 均 < 0.05); 阻断剂组与缺氧组比较 HIF-1 α 、VEGF、p-Akt 蛋白表达均减低 (P 均 < 0.05); 药物组 (选取白藜三醇为 5 μ mol/L) 与缺氧组相比 HIF-1 α 、VEGF、p-Akt 蛋白表达均增加 (P 均 < 0.01); 差异均有统计学意义。药物阻断剂组 (选取白藜三醇为 5 μ mol/L) 较阻断剂组 HIF-1 α 、VEGF、p-Akt 蛋白表达比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。图 1、表 2

2.3 白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞内 HIF-1 α 表达的影响

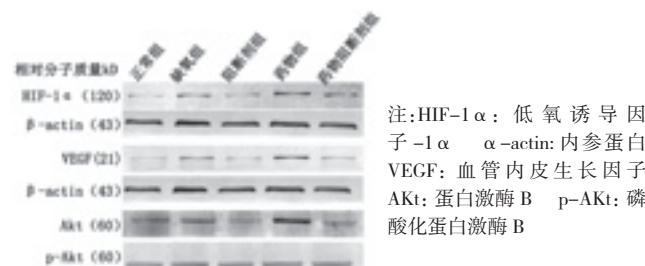


图 1 蛋白免疫印迹分析白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞内 HIF-1 α 、VEGF、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响 (各组蛋白条带 $n=3$)

缺氧组: 胞质及胞核内 HIF-1 α 阳性表达, 显色呈黄褐色; 阻断剂组: 胞质及胞核内 HIF-1 α 表达减弱, 显色呈浅黄棕色; 药物组 (选取白藜三醇为 5 μ mol/L): 胞质及胞核内 HIF-1 α 强阳性表达, 显色呈深黄褐色; 药物阻断剂组: 胞质及胞核内 HIF-1 α 表达较药物组减弱, 呈浅黄褐色。图 2

表 2 各组低氧诱导因子 -1 α 、血管内皮生长因子、磷酸化蛋白激酶 B 蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

	蛋白表达量			
	正常组	缺氧组	阻断剂组	药物组(白藜三醇为 5 $\mu\text{mol/L}$) 药物阻断剂组(白藜三醇为 5 $\mu\text{mol/L}$)
低氧诱导因子 -1 α	1.000 \pm 0.000	1.298 \pm 0.013 [*]	0.979 \pm 0.050 ^Δ	2.079 \pm 0.077 ^{ΔΔ} 1.067 \pm 0.044
血管内皮生长因子	1.000 \pm 0.000	1.380 \pm 0.025 [*]	0.929 \pm 0.044 ^Δ	2.564 \pm 0.102 ^{ΔΔ} 1.151 \pm 0.081
磷酸化蛋白激酶 B	1.000 \pm 0.000	1.227 \pm 0.035 [*]	0.884 \pm 0.076 ^Δ	1.978 \pm 0.076 ^{ΔΔ} 1.024 \pm 0.025

注:与正常组比^{*} $P<0.05$;与缺氧组比^Δ $P<0.05$ ^{ΔΔ} $P<0.01$

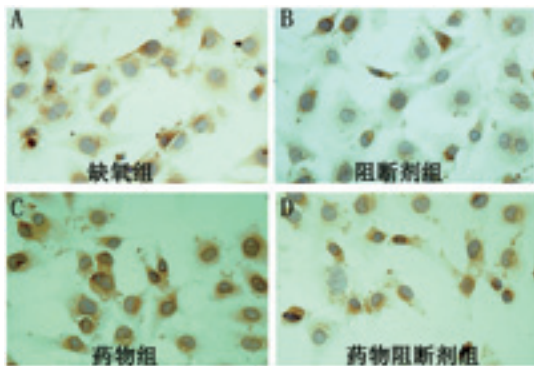
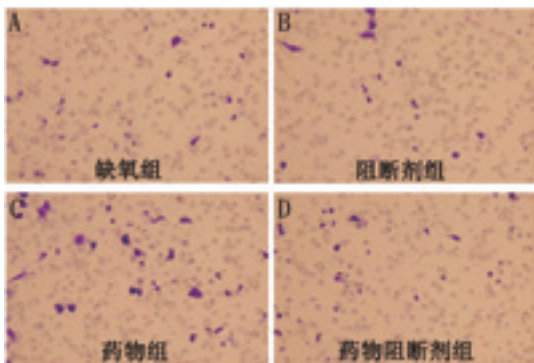


图 2 免疫细胞化学检测白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞内 HIF-1 α 表达的影响($\times 200$)

2.4 白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞迁移的影响

阻断剂组内皮细胞迁移率(49.882 \pm 1.533) % 明显小于缺氧组(100.000 \pm 0.000) % ($P<0.01$), 药物组(选取白藜三醇为 5 $\mu\text{mol/L}$) 内皮细胞迁移率(159.864 \pm 3.294) % 大于缺氧组($P<0.01$), 差异均有统计学意义。阻断剂组内皮细胞迁移率和药物阻断剂组(57.233 \pm 1.499) % 相比差异无统计学意义($P>0.05$)。图 3

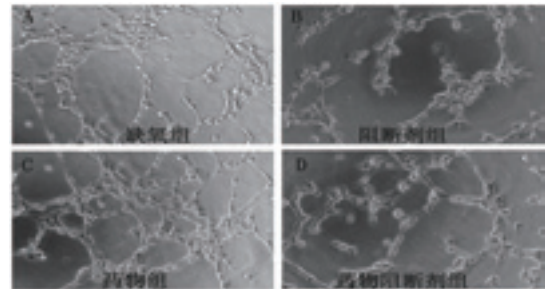


注:图中紫色为被结晶紫染成紫色的迁移细胞(4组取视野 $n=5$)
图 3 白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞迁移的影响($\times 200$)

2.5 白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞体外血管形成的影响

阻断剂组体外血管形成数量(54.627 \pm 1.727) 明显小于缺氧组(100.000 \pm 0.000) ($P<0.01$), 药物组(选取白藜三醇为 5 $\mu\text{mol/L}$) 体外血管形成数量

(171.397 \pm 5.904) 大于缺氧组($P<0.01$), 差异均有统计学意义。阻断剂组和药物阻断剂组(68.005 \pm 1.867) 相比差异无统计学意义($P>0.05$)。图 4



注:图中内皮细胞在基质胶上连成网格状结构(各组取视野 $n=5$)
图 4 白藜三醇对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞体外血管形成的影响($\times 100$)

3 讨论

本实验发现,白藜三醇诱导血管发生与多种血管生长因子表达增多相关,白藜三醇是上调 HIF-1 α 、VEGF 和血管再生的一种重要调节因素。实验中,白藜三醇在缺氧条件下,可以促进人脐静脉内皮细胞的增值和血管的再生,白藜三醇上调 HIF-1 α 和促进血管再生的机制可能是依赖于磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI-3K)/Akt 通路的激活。

缺氧广泛的发生于缺血、肿瘤等事件中,本实验就是在一个模拟的缺氧环境里进行的。一些血管生长因子就是在缺氧的环境里由细胞分泌的。HIF-1 是维持氧自稳平衡的核心调控因子,调控一系列缺氧相关基因的表达,而且在感受氧,传递缺氧信号的过程中发挥着重要的作用。HIF-1 由 α 亚基和 β 亚基组成。 α 亚基是活性亚基,依赖于环境中氧浓度的变化,在正常氧饱和度下细胞中检测不到亚基的表达,而在缺氧状态下,亚基的降解被抑制; β 亚基在胞浆内稳定表达。 α 亚基和 β 亚基形成具有活性的 HIF-1, 转移到核内调节多种基因转录。HIF-1 被缺氧信号激活后,与 VEGF5' 端增强子相互作用,调节 VEGF 表达升高。VEGF 是一种促血管形成和分化的重要调节因子,VEGF 与受体作用后,促进内皮细胞分裂、增殖,导致血管新

生。既往研究表明在缺氧条件下 HIF-1 α 可促进血管的再生^[7], 而 HIF-1 α 也可以作为调节因子促进下游 VEGF 的表达^[8]。本研究中我们探讨了白藜三醇是否可以通过上调 HIF-1 α 从而促进 VEGF 的表达。实验结果表明, 在缺氧条件下 HIF-1 α 表达增加, 白藜三醇可以促进这一变化。基于 HIF-1 α 对 VEGF 有重要的调节作用, 我们推测白藜三醇通过上调 HIF-1 α , 从而最终促进了 VEGF 的表达。

近十几年来研究发现白藜三醇有明确的心血管系统的保护作用^[9], 如抗氧化^[10]; 抑制血小板聚集; 调节血脂, 防止动脉粥样硬化; 促进冠状动脉舒张, 增加机体耐缺氧储备的作用^[11]; 减少缺血再灌注损伤及缩小梗死面积等。此外, 白藜三醇对血管生成还有明显的作用, 血管生成是指从已存在的微血管床上芽生出新的以毛细血管为主的血管系统的过程, 此过程与血管生成诱导因子和内源性血管生成抑制因子间的“平衡和失衡”相关。研究显示白藜三醇对肿瘤血管生长具有抑制的作用^[12], 另有研究表明白藜三醇可以促进急性心肌梗死后新生血管和侧支循环的形成及缩小梗死面积。推测如此矛盾的结果可能与白藜三醇的给药剂量、方式、器官组织对药物的反应性及机体血管生成的微环境不同(白藜三醇抑制血管生成的实验多为肿瘤组织, 而促血管生成的实验多在心肌梗死或脑组织缺血梗死条件下进行)等因素有关^[13]。

在缺血和血管生成时 PI-3K/Akt 通路被激活^[14], PI-3K/Akt 通路可以促进 HIF-1 α 蛋白的合成^[15]。而且在细胞存活和细胞凋亡过程中 PI-3K/Akt 通路起很重要的作用。为检测内皮细胞 p-Akt 信号蛋白的表达, 明确其与 PI-3K/Akt 的关系, 本实验增加了 LY294002 阻断剂组。LY294002 是特异性的 PI-3K/Akt 抑制剂, 本实验所选用的浓度既能很好阻断 PI-3K/Akt 通路, 又不会对细胞功能产生影响。Akt 对 HIF-1 α 的表达和转录激活通过以下两个下游靶目标: E3 泛素连接酶人类双微粒体基因 2 (HDM2) 和 p70S6K1 (核糖体蛋白 S6 激酶 1)^[16], HDM2 的磷酸化位点丝氨酸 166 和 186, 通过 Akt 的激活, 这两个位点的磷酸化使得 HDM2 从胞浆到胞核易位^[17]。我们的研究, 发现缺氧可以激活 PI-3K/Akt 通路的激活, 促进 HIF-1 α 和 VEGF 的表达, 从而促进血管的再生, 而白藜三醇促进了这一变化。

总的来说, 白藜三醇有很多心血管的保护作用, 前期动物实验发现白藜三醇促进急性心肌梗死后侧支循环的形成, 本研究在细胞水平上模拟内皮细胞

缺血环境, 进一步研究白藜三醇促进血管再生机制, 白藜三醇诱导血管发生与多种血管生长因子表达增多相关, 本实验发现白藜三醇可能是激活 PI-3K/Akt 通路上调 HIF-1 α 水平, 促进 VEGF 表达, 从而调节血管的再生。

4 参考文献

- [1] 肖帅真, 于岱成, 郭静萱. 介入性血管新生—冠心病介入治疗的新方法. 中国循环杂志, 2001, 16: 315-317.
- [2] 马洁, 周召峰, 徐晤, 等. 白藜芦醇对兔心肌梗死后血管新生的诱导作用. 中国循环杂志, 2011, 26: 141-144.
- [3] Hang XY, Li PY, Li ZF, et al. Transcription and splicing regulation in human umbilical vein endothelial cells under hypoxic stress conditions by exon array. BMC Genomics, 2009, 10: 126.
- [4] Bai J, Mei PJ, Liu H. BRG1 expression is increased in human glioma and controls glioma cell proliferation, migration and invasion in vitro. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138: 991-998.
- [5] Xiong W, Luo Y, Zhang C. Expression, purification of recombinant human mitochondrial transcription termination factor 3 (hMTERF3) and preparation of polyclonal antibody against hMTERF3. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 167: 2318-2329.
- [6] Liu SJ, Wu P, Ye DY, et al. Effects of lipoxin A4 on CoCl₂-induced angiogenesis and its possible mechanisms in human umbilical vein endothelial cells. Pharmacology, 2009, 84: 17-23.
- [7] 李玉珍, 蔡丽蓉, 孙胜, 等. 低氧诱导因子-1 α 参与低氧预处理诱导的心肌血管形成. 中国病理生理杂志, 2005, 21: 2301-2304.
- [8] 江从庆, 樊利芳, 刁路明, 等. 低氧及一氧化氮 SW480 细胞缺氧诱导因子-1 α 、VEGF 及 iNOS 表达的初步研究. 中国病理生理杂志, 2005, 21: 722-726.
- [9] Petrovski G, Gurusamy N, Das DK. Resveratrol in cardiovascular health and disease. Ann NY Acad Sci, 2011, 1215: 22-33.
- [10] Kao CL, Chen LK, Chang YL, et al. Resveratrol protects human endothelium from H₂O₂-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation. J Atheroscler Thromb, 2010, 17: 970-979.
- [11] Hattori R, Otani H, Maulik N, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. Am J Physiol, 2002, 282: H1988-H1995.
- [12] Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, et al. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. Angiogenesis, 2010, 13: 305-315.
- [13] Chen Y, Tseng SH. Pro- and anti-angiogenesis effects of resveratrol. In Vivo, 2007, 21: 365-370.
- [14] Yang XM, Wang YS, Zhang J, et al. Role of PI3K/AKT and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1 α and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50: 1873-1879.
- [15] Choi YK, Kim CK, Lee H, et al. Carbon monoxide promotes VEGF expression by increasing HIF-1 α protein level via two distinct mechanisms: translational activation and stabilization of HIF-1 α protein. J Biol Chem, 2010, 285: 32116-32125.
- [16] Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, et al. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. J Biol Chem, 2004, 279: 45643-45651.
- [17] Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 11598-11603.

(收稿日期: 2013-04-01)

(编辑: 漆利萍)