

文章编号 1006-8147(2018)02-0101-05

论著

缺氧预适应诱导人脐静脉内皮细胞释放的微囊泡对正常 H9c2 细胞的作用

刘超, 韦苏, 张琨玮, 祝倩, 李焯仪, 荣玉美, 赵俊玉, 李无为, 尚曼, 宋君秋, 吴燕娜, 刘艳霞
(天津医科大学药理学系, 天津 300070)

摘要 目的: 分离提取缺氧预适应(HPC)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)分泌的微囊泡(MVs), 探讨 HPC-EMVs 对正常 H9c2 心肌细胞的作用和其 Caspase 3、Bcl-2 和 Bax 表达的影响。方法: 采用 HPC 方法诱导 HUVECs 释放 MVs, 将其和正常培养的大鼠 H9c2 心肌细胞孵育, 通过 MTT 法检测细胞存活率和比色法测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性; 通过 Hoechst 33258 染色观察细胞核的形态变化; 比色法测定培养液中 Caspase 3 活性以及 Western blot 法检测 H9c2 细胞中 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果: HPC 模型构建过程中, 与缺氧/复氧(H/R)组相比, HPC 组细胞存活率显著升高($P<0.01$), 即成功构建 HUVECs 的 HPC 模型; HPC-EMVs 处理 H9c2 细胞结果发现, 与对照组 H9c2 细胞相比, HPC-EMVs 30、60 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞存活率显著降低($P<0.001$), 且 LDH 活性和 Caspase 3 活性显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 凋亡细胞量增加, Bcl-2/Bax 比值显著降低($P<0.001$)。结论: 成功采用 HPC 的方法诱导 HUVECs 释放 MVs, HPC-EMVs 通过影响正常 H9c2 细胞 Caspase 3、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达发挥凋亡作用。

关键词 微囊泡; 缺氧预适应; 缺氧/复氧; H9c2 细胞; 凋亡

中图分类号 R54

文献标志码 A

Effects of hypoxia preconditioning induced human umbilical vein endothelial cells microvesicles on normal H9c2 cells

LIU Chao, WEI Su, ZHANG Kun-wei, ZHU Qian, LI Ye-yi, RONG Yu-mei, ZHAO Jun-yu, LI Wu-wei, SHANG Man, SONG Jun-qiu, WU Yan-na, LIU Yan-xia

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of microvesicles (MVs) on normal H9c2 cardiomyocytes and the expression of Caspase 3, Bcl-2 and Bax. **Methods:** MVs were generated from HUVECs induced by hypoxia solution pH 6.8/5.8 and pre-hypoxia 10 min/reoxygenation 15 min, which were incubated with normal H9c2 cells. Cell viability was tested by MTT assay. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in cell culture medium was tested by colorimetric method. Morphological changes of H9c2 cells were observed by Hoechst 33258 staining. Caspase 3 activity was determined by colorimetry and the expression of Bcl-2 and Bax in H9c2 cells were detected by Western blot. **Results:** HUVECs HPC model was successfully established. Compared with H/R group, the cells viability of HPC group was significantly increased ($P<0.01$). Compared with normal H9c2 cells, the cells viability of HPC-EMVs 30, 60 $\mu\text{g/mL}$ groups were significantly decreased ($P<0.01$), and the release of LDH increased ($P<0.001$), and the ratio of Bcl-2/Bax significantly decreased ($P<0.001$). **Conclusion:** HUVECs HPC model is successfully established, and MVs are generated from HUVECs induced by the method of HPC, and HPC-EMVs have pro-apoptotic effect on normal H9c2 cells by affecting the expression of Caspase 3, Bcl-2 and Bax.

Key words microvesicles; hypoxia preconditioning; hypoxia/reoxygenation; H9c2 cells; apoptosis

目前临床上治疗心肌梗死的方法有经皮冠状动脉介入治疗、心脏冠状动脉搭桥术、血栓溶解疗法等。缺血的心肌组织在短时间内获得血液再灌注

和氧气供应的同时也加重了心肌损伤即缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤, 其损伤的主要原因是缺血导致的细胞缺氧和细胞酸中毒等^[1]。心肌缺血预适应 (ischemic preconditioning, IPC) 是治疗心肌 I/R 损伤的最具前景的方法^[2]。目前心肌 IPC 作用的分子机制仍有待进一步完善。微囊泡 (microvesicles, MVs) 是由质膜直接脱落的直径在 100~1 000 nm 的微小囊泡。当细胞自身生理发生改变或受到外来刺激, 如组织缺血、氧化损伤、剪切力、

基金项目 天津市高等学校科技发展基金计划项目 (20110106); 天津市高校优秀青年教师资助计划; 高校博士学科专项科研基金 (20101202110005); 天津市自然科学基金 (11JCZDJ18300)

作者简介 刘超 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 心血管药理学; 通信作者: 刘艳霞, E-mail: liu_yanxia126@126.com; 宋君秋, E-mail: song_junqiu@126.com。

细胞蛋白复合物的改变等,导致细胞内钙超载,质膜失去平衡,细胞膜褶皱形成 MVs 释放到细胞外^[3-4]。本实验室前期研究发现,大鼠 IPC 处理后,循环血中总 MVs 的含量明显增加,且 IPC-MVs 通过线粒体和内质网两种途径显著减轻心肌 I/R 损伤,MVs 中内皮来源的 MVs(EMVs)明显增加,但内皮来源的 MVs 在 IPC 对心肌的作用是未知的^[5]。由于动物水平的 IPC 模型受到多种体内体外因素的影响,造成了在体模型的不稳定,不能准确的反映生物活性物质的作用机制。因此本实验体外细胞 HPC 模型模拟体内 IPC,进一步探讨 EMVs 对于心肌细胞的影响,了解 IPC 的作用机制,为临床治疗缺血性损伤提供策略。

1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞(HUVECs,中国科学院细胞库),H9c2 心肌细胞系(ATCC),胎牛血清,DMEM(高糖),青链霉素混合液,MTT(Solarbio),BCA 法蛋白定量检测试剂盒(Solarbio),Hoechst33258 试剂盒,Caspase 3 检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究),LDH 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),Bcl-2 抗体(Santa Cruz),Bax、 β -actin 抗体(Cell Signaling Technology)。

1.2 实验方法

1.2.1 HUVECs 缺氧预适应(HPC)模型的建立 细胞培养与实验分组:HUVECs 细胞以 6×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,于 95% O_2 -5% CO_2 、37 °C 的孵箱中培养 24 h, HUVECs 分为 3 组,对照组、缺氧/复氧组(H/R)和 HPC 组。Control 组弃去上清后加入 200 μ L pH 7.4 的对照液,于 95% O_2 -5% CO_2 、37 °C 孵箱中培养 16 h 25 min。H/R 组和 HPC 组弃去上清后均加入 100 μ L pH 6.8 的缺氧液,H/R 组在于 95% O_2 -5% CO_2 、37 °C 孵箱中培养 25 min,与 H/R 组不同是,HPC 组做短暂缺氧/复氧处理,即预先将细胞置于缺氧装置中以 20 L/min 的流速通 95% N_2 -5% CO_2 混合气 10 min,随后将 HPC 组细胞放置于 95% O_2 -5% CO_2 、37 °C 的孵箱培养 15 min。H/R 组和 HPC 组同时进行长时间的缺氧 12 h/复氧 4 h 处理,即加入 100 μ L pH 5.8 缺氧液,置于缺氧装置中以 20 L/min 的流速通 95% N_2 -5% CO_2 混合气 15 min 达到平衡状态后,于 37 °C 的恒温孵箱中进行长时间缺氧 12 h 的处理,处理完成后取出两组细胞置于 95% O_2 -5% CO_2 、37 °C 孵箱中复氧 4 h。随后采用 MTT 法检测各组细胞存活率。

1.2.2 HPC-EMVs 的分离提取 HUVECs 接种于 6 孔板中,HPC 处理后收集细胞及上清,采用两步离

心法收集 HPC-EMVs:4 °C,1 800 r/min,离心 20 min 去除细胞碎片;收集上清液于 13.2 mL 超速离心管中,4 °C、33 000 r/min,超速离心 150 min,得到的沉淀即为 HPC-EMVs,D-hank's 重选后于 -20 °C 保存备用。

1.2.3 HPC-EMVs 的蛋白定量 采用 BCA 蛋白定量法对 HPC-EMVs 进行蛋白含量的测定。将 HPC-EMVs 样品放置于冰上融化后混匀,取 15 μ L HPC-EMVs 加入 30 μ L 的裂解液,冰上裂解 30 min 后混匀。参照试剂盒说明书对 HPC-EMVs 蛋白含量进行检测。

1.2.4 透射电镜观察 HPC-EMVs 的形态 将 HPC-EMVs 样本置于冰上自然融化,待其完全融化后混匀,取 40 μ L HPC-EMVs 悬液滴在铜网上,室温静置 2 min,将多余的液体用滤纸从侧面吸去。滴入等量的 2% 磷钨酸染色液到未完全干的载网,室温放置 2 min,将多余的液体用滤纸从侧面吸去。白炽灯照射使其干燥,并在透射电镜下观察,选择合适的视野和放大倍数进行拍照。

1.2.5 HPC-EMVs 和正常 H9c2 细胞共孵育 将 H9c2 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度分别接种于培养板中,于 95% O_2 -5% CO_2 、37 °C 孵箱中培养 24 h。弃去培养液,对照组换用无 FBS 高糖 DMEM 培养基,HPC-EMVs 各组换用预先用 DMEM 培养基配制的浓度为 10、30、60 μ g/mL 的 HPC-EMVs 悬液,于 95% O_2 -5% CO_2 、37 °C 孵箱中孵育 4 h。

1.2.6 MTT 法检测细胞存活率 取各组处理完成的细胞,每孔加入 0.5% MTT 溶液 10 μ L,放入 37 °C 培养箱中继续培养 4 h 后取出,吸净孔中液体,每孔加入 150 μ L DMSO,将培养板置于酶标仪中,调节波长为 490 nm,震荡 10 min,检测各孔吸光度。按照 OD 检测组/OD 对照组 $\times 100\%$ 的公式计算细胞存活率。

1.2.7 比色法测定培养液中 LDH 活性 分别取各组 H9c2 细胞培养液,参照试剂盒说明书采用比色法对培养液中 LDH 活力进行检测,LDH 活性 (U/L) = (测定孔吸光度-对照孔吸光度)/(标准孔吸光度-空白孔吸光度) \times 标准品浓度(0.2 mmol/L) $\times 1\ 000$ 。

1.2.8 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡 D-Hank's 洗涤各组 H9c2 细胞 2 次,每孔加入 Hoechst 33258 染色液 1 mL,室温染色 30 min,D-Hank's 洗 2~3 次以去除染液,设置显微镜激发波长为 340 nm,选择合适的视野观察细胞形态并拍照。

1.2.9 比色法测定 Caspase 3 活性 吸取各组细胞培养液,备用。收集细胞于离心管中。在 4 °C 的条件下,400 r/min,离心 5 min,小心吸去上清,用 D-

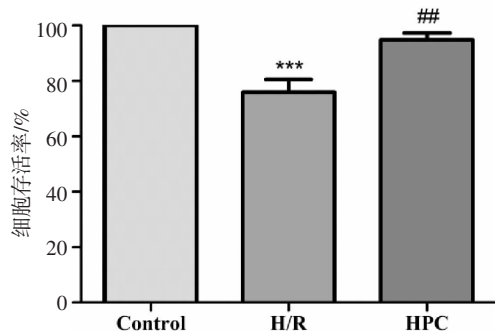
Hank's 洗涤 1 次后再次离心。吸尽上清后,6 孔板每孔加入含 1 mmol PMSF 的裂解液 100 μ L,混匀后,冰上裂解 30 min。 4°C ,8 000 r/min,离心 15 min 提取蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度,参照试剂盒说明书使用微量酶标仪读取 405 nm 处吸光度,绘制标准曲线,计算样品中 Caspase 3 活性。

1.2.10 Western blot 检测 Bcl-2/Bax 蛋白的表达 收集 H9c2 细胞后加入 Western 及 IP 裂解液 100 μ L,混匀后于冰上裂解 30 min。 4°C ,8 000 r/min,离心 15 min 收集蛋白,蛋白定量后取适量蛋白电泳并转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,并在其中加入 Bcl-2(1:1 000)、Bax 抗兔一抗(1:1 000)和 β -actin(1:1 000)抗兔一抗, 4°C 孵育过夜,一抗孵育结束后用 TBST 于摇床上洗膜,每次 10 min,共 3 次。将 PVDF 膜封于新的杂交袋中,并加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 IgG(1:1 000),室温摇动孵育 2 h,孵育结束再次洗膜。加入 Bcl-2 和 Bax 抗兔一抗(1:1 000),化学发光成像仪拍摄蛋白条带,图像利用 Image J 软件计算 Bcl-2、Bax 灰度值,并计算两者比值。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件对测定结果进行分析,组间比较使用单因素方差分析检验,对于单因素方差分析,方差齐时,采用多组间比较 LSD 法;方差不齐时,采用 Tamhane's T^2 法。检验以 $P<0.05$ 为有统计学意义。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 成功建立 HUVECs HPC 模型 与对照组相比,H/R 组细胞存活率在 70%左右,说明 H/R 造成细胞损伤且损伤程度适中,与 H/R 组相比,HPC 组细胞存活率较 H/R 组显著升高($94.83\%\pm 2.55\%$ vs $75.98\%\pm 4.54\%$, $P<0.01$)(图 1),说明 HPC 发挥了抗 H/R 损伤的作用,实验结果稳定且重复性好,故成功建立 HUVECs 的 HPC 模型。



*** $P<0.001$ vs Control; ## $P<0.01$ vs H/R.

图 1 H/R 和 HPC 模型中 HUVECs 存活率 ($n=6, \bar{x}\pm s$)

Fig 1 The cells viability of HUVECs in H/R and HPC model ($n=6, \bar{x}\pm s$)

2.2 HPC-EMVs 的蛋白含量和形态 HPC-EMVs 的蛋白定量:通过 BCA 法标准曲线的公式计算出 HPC-EMVs 的蛋白含量为 $(0.298\pm 0.045) \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。HPC-EMVs 的形态:负染法处理 MVs 后,在透射电镜下,选定放大倍数为 6 000 倍,结果发现 HPC-EMVs 直径在 100~1 000 nm,形状为圆或椭圆形,且具有和细胞相似的膜结构,有完整的包膜,未见明显细胞器结构(图 2)。

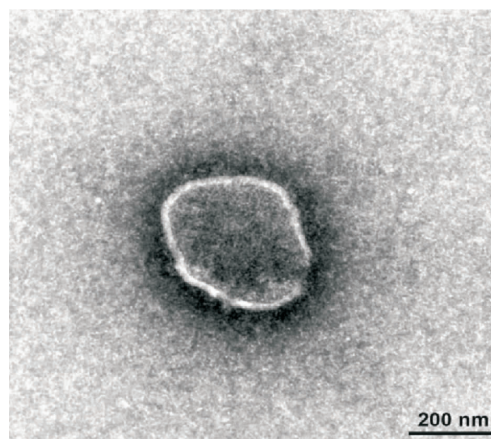


图 2 透射电镜下 HPC-EMVs 的结构(负染法, $\times 6.0 \text{ K}$)

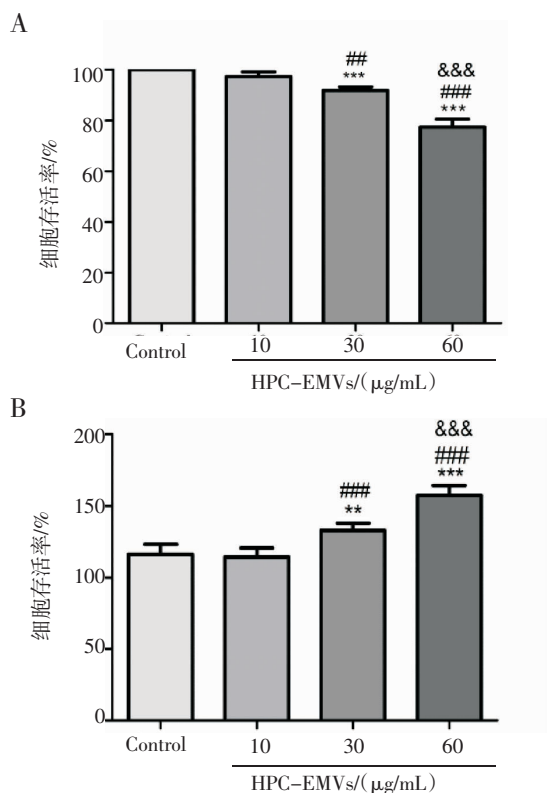
Fig 2 The structure of HPC-EMVs under transmission electron microscopy (negative dyeing method, $\times 6.0 \text{ K}$)

2.3 HPC-EMVs 对 H9c2 细胞的损伤作用 MTT 检测发现,与对照组($100\%\pm 0\%$)相比,HPC-EMVs 30 组($90.43\%\pm 1.21\%$)和 HPC-EMVs 60 组($73.19\%\pm 2.11\%$)细胞存活率明显下降($P<0.001$),但 HPC-EMVs 10 组的细胞存活率($96.31\%\pm 1.84\%$)并无统计学差异;与 HPC-EMVs 10 组相比,HPC-EMVs 30 和 60 组细胞存活率显著下降 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$);与 HPC-EMVs 30 组相比,HPC-EMVs 60 组细胞存活率亦显著下降 ($P<0.001$)。由此可见,随 HPC-EMVs 浓度增大,H9c2 细胞存活率逐渐下降,且差异具有统计学意义,见图 3A。

LDH 检测显示,与对照组($116.23 \text{ U/L}\pm 6.88 \text{ U/L}$)相比,HPC-EMVs 30 组($132.97 \text{ U/L}\pm 4.92 \text{ U/L}$)、60 组($157.38 \text{ U/L}\pm 6.94 \text{ U/L}$)LDH 活性显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$),但 HPC-EMVs 10 组的 LDH 水平($114.25 \text{ U/L}\pm 6.31 \text{ U/L}$)略有降低并无统计学差异;与 HPC-EMVs 10 组相比,HPC-EMVs 30 和 60 组 LDH 活性显著增加 ($P<0.001$);与 HPC-EMVs 30 组相比,HPC-EMVs 60 组 LDH 活性亦显著增加($P<0.001$)。LDH 活性随 HPC-EMVs 浓度的增加呈剂量依赖性显著性增加,见图 3B。

2.4 HPC-EMVs 对 H9c2 细胞的促凋亡作用及相关机制 Hoechst33258 染色结果显示,对照组细胞形态规则完整,细胞核染色均匀一致。HPC-EMVs 处理后,HPC-EMVs 10 组 H9c2 细胞可见个别细胞核出现固缩凝聚,呈致密浓染;HPC-EMVs 30 组凝聚的细胞核稍增多;HPC-EMVs 60 组细胞核固缩浓染明显增多,细胞核分裂成碎片,胞核致密浓染,即凋亡细胞数目增加,见图 4A。

Caspase 3 活性检测结果显示,与对照组 ($140.04 \text{ U}/\mu\text{g} \pm 10.37 \text{ U}/\mu\text{g}$) 比较,HPC-EMVs 60 组 Caspase 3 活性显著升高 ($307.29 \text{ U}/\mu\text{g} \pm 9.25 \text{ U}/\mu\text{g}$, $P < 0.001$);与 HPC-EMVs 10 ($142.51 \text{ U}/\mu\text{g} \pm 10.55 \text{ U}/\mu\text{g}$) 和 HPC-EMVs 30 组 ($182.78 \text{ U}/\mu\text{g} \pm 6.58 \text{ U}/\mu\text{g}$) 比,HPC-EMVs 60 组 Caspase3 活性也有显著增高 ($P < 0.001$),见图 4B;Western blot 检测显示,与对照比,HPC-EMVs 各组随 MVs 浓度增大,Bcl-2 的条带逐渐变浅,HPC-EMVs 60 组条带几乎消失,Bax 的条带逐渐加深,Bcl-2/Bax 比值降低,见图 4C。

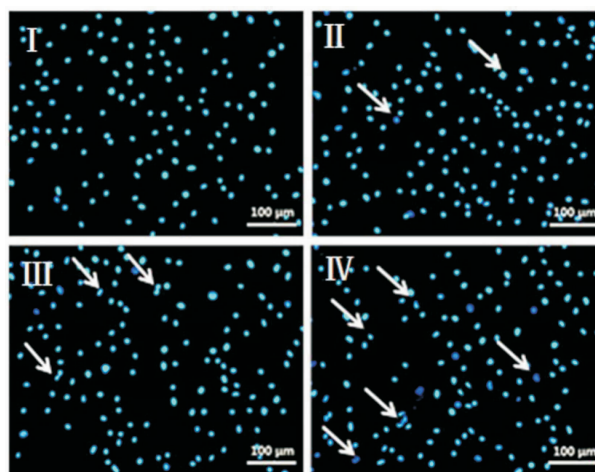


** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HPC-EMVs 10; &&& $P < 0.001$ vs HPC-EMVs 30

图3 A. HPC-EMVs 对正常 H9c2 细胞存活率的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)
B. HPC-EMVs 对正常 H9c2 细胞培养上清液 LDH 活性的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

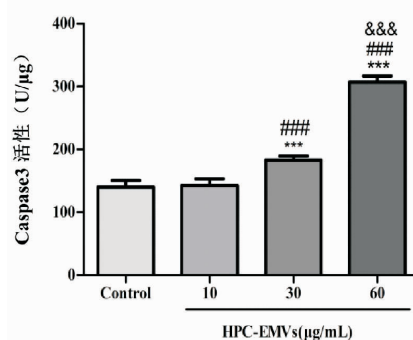
Fig 3 A. Effects of HPC-EMVs on normal H9c2 cell viability ($n=6, \bar{x} \pm s$) B. Effects of HPC-EMVs on LDH activity in supernatant of normal H9c2 cells ($n=6, \bar{x} \pm s$)

A

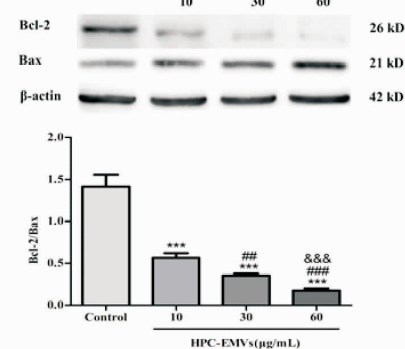


I: Control; II: HPC-EMVs 10; III: HPC-EMVs 30; IV: HPC-EMVs 60

B



C



*** $P < 0.001$ vs Control; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HPC-EMVs 10; &&& $P < 0.001$ vs HPC-EMVs 30

图4 A. HPC-EMVs 对正常 H9c2 细胞 Hoechst 染色的影响 ($\times 200$); B. HPC-EMVs 对正常 H9c2 细胞 Caspase 3 活性的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$); C. HPC-EMVs 对正常 H9c2 细胞 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig 4 A. Effects of HPC-EMVs on Hoechst staining in normal H9c2 cells ($\times 200$); B. Effects of HPC-EMVs on the activity of Caspase 3 in normal H9c2 cells ($n=6, \bar{x} \pm s$); C. Effects of HPC-EMVs on the protein of Bcl-2/Bax in normal H9c2 cells ($n=6, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

血管内皮功能紊乱作为心肌缺血损伤的起始环节,其与 IHD 的发生发展密切相关。IPC 指的是短暂的剥夺特定器官或组织的血液供应后,给予短

时间的再灌注的处理,进而对后续的长时间的缺血/再灌注损伤发挥保护作用^[6]。心肌缺血/再灌注损伤常伴发严重的心肌损伤,心肌细胞出现不可逆性的凋亡和坏死。实验室前期发现,来自 H/R 处理的人脐静脉内皮细胞的微泡促进 H9c2 心肌细胞的凋亡和氧化应激^[7]。本研究证实 HPC-EMVs 对正常 H9c2 心肌细胞有损伤作用,并发现其通过降低 H9c2 细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的比值,增加 Caspase 3 活性发挥作用。

将细胞进行缺氧处理,是最接近在体缺血过程及机制的细胞模型^[8-9]。本实验室前期在细胞水平选用酸性的缺氧液模拟 I/R 损伤时的细胞酸中毒以及通入 N₂-CO₂ 混合气模拟细胞缺氧时的无氧环境建立了 I/R 损伤模型并达到了良好的损伤程度和重复性,为内皮细胞的 HPC 模型提供了前提^[7]。因此本实验采用体外的细胞缺氧预适应模型,探索内皮细胞来源的 MVs 在 HPC 过程中的作用机制。

Caspase 家族主要在凋亡的执行阶段起主要作用,凋亡的发生是一系列 Caspase 家族成员共同参与完成的。其中,Caspase 3 被认为是各种凋亡刺激因子激活的 Caspase 家族中的关键蛋白酶。Caspase 3 可被该家族其他成员活化,引起 DNA 损伤修复酶降解,同时激活核酸内切酶,从而使细胞凋亡^[10]。Bcl-2 家族是细胞凋亡基因之一,其中 Bcl-2 是原癌基因,Bcl-2 可抑制细胞凋亡,而 Bax 的作用正好相反,Bax 的表达或过表达,可促使细胞凋亡,Bcl-2/Bax 的比值将决定细胞是否发生凋亡^[11]。本实验室前期研究发现 IPC-MVs 对 I/R 大鼠心肌具有保护作用,并证明其机制为上调 I/R 心肌组织中 Bcl-2 的蛋白表达,下调 Bax 的蛋白表达,降低 Caspase 3 活力^[12];本研究进一步证实 HPC-EMVs 同样通过下调 H9c2 心肌细胞中 Bcl-2 的蛋白表达,上调 Bax 的蛋白表达,下调 Bcl-2/Bax 的比值,升高 Caspase 3 活力发挥促凋亡作用。

本研究发现 HPC-EMVs 对正常培养的 H9c2 有促进凋亡的作用,原因有如下几点:首先,在 MV 的提取时间方面,本研究对 HUVECs 进行短暂缺氧/复氧后又进行了长时间的缺氧/复氧处理,最终提取的 MVs,不排除在长时间的缺氧/复氧中,产生了损害性的 MVs 的可能。其次,在 MVs 的作用效果方面,本实验前期发现 IPC-MVs 对于正常的 H9c2 细胞

有促进凋亡的作用,但对于 H/R 损伤的心肌细胞有保护作用,即 MVs 发挥了双向的作用。总之,血管内皮功能障碍是与缺血性心脏病密切相关的决定因素。然而内皮 MVs 对心肌损伤的潜在贡献尚不清楚,探索 MVs 的作用机制成为目前的重点。

参考文献:

- [1] Fröhlich G M, Meier P, White S K, et al. Myocardial reperfusion injury : looking beyond primary PCI[J]. Eur Heart J, 2013, 34(23): 1714
- [2] Robertson F P, Fuller B J, Davidson B R. An evaluation of ischaemic preconditioning as a method of reducing ischaemia reperfusion injury in liver surgery and transplantation[J]. J Clin Med, 2017,6(7): pii: E69
- [3] Curtis A M, Edelberg J, Jonas R, et al. Endothelial microparticles Sophisticated vesicles modulating vascular function[J]. Vasc Med, 2013, 18(4): 204
- [4] Mao S S, Sun Q Q, Xiao H H, et al. Secreted miR-34a in astrocytic shedding vesicles enhanced the vulnerability of dopaminergic neurons to neurotoxins by targeting Bcl-2[J]. Protein Cell, 2015, 6(7): 529
- [5] Liu M, Wang Y L, Shang M, et al. Flow cytometric analysis of circulating microvesicles derived from myocardial Ischemic preconditioning and cardioprotection of Ischemiareperfusion[J]. Chin J Appl Physiol, 2015, 31(6): 524
- [6] Bystrom P, Foley N, Toledo-Pereyra, et al. Ischemic preconditioning modulates ROS to confer protection in liver ischemia and reperfusion[J]. EXCLI J, 2017,6:483
- [7] Zhang Q, Shang M, Zhang M X, et al. Microvesicles derived from hypoxia/reoxygenation-treated human umbilical vein endothelial cells promote apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes[J]. BMC Cell Biol, 2016,17(1):25
- [8] Tian Y, Daoud A, Shang J. Effects of bpV (pic) and bpV (phen) on H9c2 cardiomyoblasts during both hypoxia/reoxygenation and H₂O₂-induced injuries[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(3): 852
- [9] Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Rho-Rho kinase pathway is involved in the protective effect of early ischemic preconditioning in the rat heart[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(1): 156
- [10] Bodiga V L, Thokala S, Vemuri P K, et al. Zinc pyrithione inhibits caspase-3 activity, promotes ErbB1-ErbB2 heterodimerization and suppresses ErbB2 downregulation in cardiomyocytes subjected to ischemia/reperfusion[J]. J Inorg Biochem, 2015,153:49
- [11] Tian X, Shi Y, Liu N, et al. Upregulation of DAPK contributes to homocysteine-induced endothelial apoptosis via the modulation of Bcl2/Bax and activation of caspase 3[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4173
- [12] 王艺璐,刘森,尚曼,等. 心肌缺血预适应循环血中微囊泡对大鼠心肌 I/R 损伤的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2016,32(2):97

(2017-10-26 收稿)