

丹参酮 II_A 抗心肌细胞氧化应激作用及抗增殖蛋白功能研究

杨萍^{1*}, 贾钰华²

(1. 南昌市中西医结合医院, 南昌 330002; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

[摘要] **目的:**观察丹参酮 II_A 对过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡的保护作用及其对抗增殖蛋白 (prohibitin, PHB) 表达的影响, 研究 PHB 蛋白在心肌细胞氧化应激中的作用。**方法:**实验组分为正常对照组、氧化应激组、丹参酮 II_A 高、中、低剂量组、siRNA 组、siRNA + 氧化应激组、siRNA 阴性对照组。采用差数贴壁法体外分离培养新生乳鼠心肌细胞, 以 200 μmol·L⁻¹ 过氧化氢作用 2 h 模拟心肌细胞氧化应激损伤, 心肌细胞在氧化应激前给予丹参酮 II_A (1 × 10⁻⁴, 5 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹) 预先干预 24 h。采用 PHB 特异性的 siRNA 干扰心肌细胞 PHB 蛋白表达, 流式细胞仪检测细胞凋亡率、[Ca²⁺]_i 及心肌细胞线粒体膜电位的变化, Western blotting 检测 PHB 蛋白表达水平。**结果:**与正常对照组比较, 氧化应激组心肌细胞经 200 μmol·L⁻¹ 过氧化氢作用 2 h 后, PHB 蛋白表达显著增加, 细胞内游离钙浓度、凋亡率显著增高, 线粒体膜电位显著降低。与氧化应激组比较, 丹参酮 II_A 可呈浓度依赖性显著降低细胞内游离钙浓度及细胞凋亡率, 增加线粒体膜电位, 降低 PHB 蛋白表达水平。与 siRNA 阴性对照组比较, siRNA 组心肌细胞内 PHB 蛋白表达可被显著抑制, 且细胞内游离钙浓度和细胞凋亡率显著增加, 线粒体膜电位显著降低。**结论:**PHB 蛋白在心肌细胞氧化应激中可代偿性增加, 对心肌细胞具有保护作用。丹参酮 II_A 可减少氧化应激损伤心肌细胞内 PHB 蛋白表达, 其机制可能与丹参酮 II_A 减轻心肌细胞氧化应激损伤从而减少心肌细胞自身代偿性作用有关。

[关键词] 丹参酮 II_A; 抗增殖蛋白; 心肌细胞; 凋亡; 氧化应激; 钙超载

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0145-05

Anti-oxidative Effect of Tanshinone II_A and Prohibitin in Cardiomyocytes

YANG Ping^{1*}, JIA Yu-hua²

(1. Nanchang Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Nanchang 330002, China;
X2. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-apoptotic mechanism of tanshinone II_A and the function of prohibitin (PHB) on myocardial cell apoptosis induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). **Method:** there were six groups of myocardial cells in the study: normal control group, oxidative stress group, tanshinone II_A group, siRNA group, siRNA + oxidative stress group, siRNA control group. Primary cultured neonate rat myocardial cells were cultured in medium with 200 μmol·L⁻¹ hydrogen peroxide, and the medium was supplemented with tanshinone II_A (1 × 10⁻⁴, 5 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹) in advance for 24 hours. PHB in myocardial cells was knocked down by small interfering RNA (siRNA) interference, and the expression level of PHB was determined by western blotting analysis. Flow cytometric analysis was used to detect apoptosis rate, [Ca²⁺]_i and mitochondrial membrane potential (MMP). **Result:** H₂O₂-mediated cell apoptosis resulted in activation of PHB, increasing of [Ca²⁺]_i, and decreasing of mitochondrial membrane potential. Tanshinone IIA profoundly prohibited myocardial cells apoptosis induced by hydrogen peroxide, and decreased [Ca²⁺]_i, and increased mitochondrial membrane potential in a dose dependent manner. Specific silence of PHB by siRNA down-regulated the expression level of PHB and increased of

[收稿日期] 20100919(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572435)

[通讯作者] * 杨萍, 医学博士, 医师, 主要从事中西医结合心血管病的基础和临床研究, Tel:15270983318, E-mail: jnyangping@126.com

apoptosis rate and $[Ca^{2+}]_i$, and decreased mitochondrial membrane potential. **Conclusion:** The results demonstrated that the activation of PHB is compensatory increased in myocardial cells against oxidative stress. tanshinone II_A could reduce the expression of PHB by attenuate the injury induced by oxidative stress.

[Key words] tanshinone II_A; prohibitin; myocardial cell; oxidative stress; calcium overload

随着冠状动脉内溶栓、冠脉球囊扩张及冠脉搭桥等内外科治疗缺血性心脏病手段的广泛应用,在恢复缺血心肌的再灌注挽救缺血心肌的同时,缺血/再灌注损伤(Ischemia-reperfusion injury, I/RI)所带来的问题日益明显。许多实验研究已证明,在心肌损伤区有大量自由基产生,自由基产生的氧化损伤是心肌损伤的重要因素,而应用自由基清除剂可以减轻组织细胞的损伤。

抗增殖蛋白(prohibitin, PHB)蛋白定位于线粒体内膜,具有潜在的抑制肿瘤细胞增殖、调节细胞周期、调控细胞凋亡、保护线粒体功能和抗衰老作用^[1]。有研究表明,PHB 对抗胃肠道组织具有抗炎、抗细胞凋亡作用。目前对于 PHB 蛋白在心肌细胞中的功能仍然知之甚少。本课题组的前期蛋白质组学及 Kim^[2]等人的蛋白质组学研究均表明,PHB 蛋白在心肌缺血再灌注过程中表达增高,而对于其在心肌损伤中作用报道较少。

丹参是我国的传统中药,丹参酮 II_A(tanshinone II_A, TSN)是丹参最重要的生物活性部分^[5],广泛用于冠心病的治疗。研究表明,丹参酮 II_A具有抗动脉粥样硬化作用、降低心肌耗氧量、缩小心肌梗塞面积等多种心血管药理活性^[3-4]。我们的前期研究也表明丹参酮具有降低血小板活化集聚的作用,并具有一定的抗炎作用^[5]。

本实验以体外培养的乳鼠心肌细胞为基础,以 H₂O₂ 诱导细胞损伤为模型,旨在研究丹参酮 II_A在氧化应激条件下对心肌细胞的保护作用及其对 PHB 蛋白表达的调控;利用小 RNA 干扰技术研究 PHB 蛋白在心肌细胞中的功能,阐释丹参治疗心肌缺血性疾病的分子机制。

1 材料

1.1 动物 出生 1~3 d 雄性 Wistar 大鼠,SPF 级,购自南方医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2006-0015。

1.2 药品与试剂 胰蛋白酶、DMEM 培养基购于 Gibco 公司;siPORT NeoFX 转染试剂盒购自 Ambion 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程研究所;丹

参酮 II_A 购于中国药品生物制品检定所(批号 110766-200417,纯度达 99.9%);小鼠来源 prohibitin 抗体、羊抗小鼠二抗、prohibitin 特异性 siRNA、转染试剂均购自 Santa cruz 公司;ECL 化学发光试剂盒、蛋白定量试剂盒、Fluo-3 /AM 钙离子荧光探针、Rhodamine 123 均购自碧云天生物技术研究;AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱,美国 FORMA 公司;Milli-Q 超纯水纯化系统,美国 Millipore 公司;倒置荧光显微镜,德国徕卡仪器有限公司;流式细胞仪,美国 BD 公司;Kodak Image Station 2000MM 成像系统,美国 KODAK 公司)。

2 方法

2.1 实验分组 原代乳鼠心肌细胞经分离、纯化后进行实验分组,分为以下几组①正常对照组:正常培养的心肌细胞;②氧化应激组:心肌细胞培养液中添加 200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 作用 2 h;③丹参酮 II_A 高、中、低剂量组:心肌细胞分别用高、中、低 3 种剂量浓度的丹参酮 II_A (1 × 10⁻⁴, 5 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹) 培养 24 h 后添加 200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 继续作用 2 h;④siRNA 组:正常培养的心肌细胞转染 PHB 特异性 siRNA 序列;⑤siRNA + 氧化应激组:转染 PHB 特异性 siRNA 序列的心肌细胞再经 200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 作用 2 h;⑥siRNA 阴性对照组:正常培养的心肌细胞转染阴性对照 siRNA 序列。

2.2 新生大鼠心肌细胞培养 参照 Goldenberg 等^[6]方法略加改进。取出生 1~3 d Wistar 乳鼠,在 75% 乙醇中浸泡 8 s 后取出,固定四肢。用无菌眼科剪剪开胸部,无菌眼科弯镊取出心脏。迅速将心脏放入装有冷 D-Hanks 液的培养皿中,去除心房及心外膜的结缔组织,将心室剪开,洗净残血,反复洗 3 次。将心室肌在无菌培养皿侧壁剪碎成 1~2 mm³ 的小组织块。将小组织块移入 50 mL 塑料离心管中,加入 0.1% 胰蛋白酶 5 mL,37 ℃ 消化 6 min。自然沉淀后去除第一次上清,再加入 5 mL 胰蛋白酶于 37 ℃ 消化 6 min 后,轻轻吹打,自然沉淀后,取上清

移入 15 mL 离心管中,加含 5% 血清培养基终止消化,1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,洗 2 次。剩余沉淀继续加胰蛋白酶消化,如此反复消化 7~10 次直至组织块完全消化。将离心所得沉淀用含 15% 胎牛血清的培养基制成细胞悬液,在二氧化碳培养箱中差速贴壁 1 h,去除非心肌细胞(主要是成纤维细胞和内皮细胞)。1 h 后轻轻吸出细胞悬液,调整细胞密度,将心肌细胞悬液均匀接种于 6 孔板内,置于二氧化碳培养箱中培养。前 48 h 加入终密度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-溴脱氧尿苷,每 24 h 换液 1 次。经 α -横纹肌肌动蛋白免疫组化鉴定,心肌细胞纯度达 95% 以上。

2.3 RNA 干扰 细胞生长接近 80% 融合时进行 siRNA 干扰。消化贴壁的细胞,调整细胞密度为 1×10^5 /孔。分别取 2~8 μL 转染试剂 A 和 B 以不含血清和抗生素的 siRNA 转染培养基稀释至 100 μL ,将 solution A 与 solution B 混合并轻轻混匀,室温孵育 15~45 min。siRNA 转染培养基洗涤细胞 1 次。Solution A 与 solution B 混合液中添加 0.8 mL siRNA 转染培养基,轻轻混匀,添加到培养板中。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5~7 h。加 1 mL 正常培养基(含 2 倍浓度血清)至培养板,继续培养 18~24 h。弃去培养基,更换新鲜培养基。培养 24~72 h 后检测蛋白表达水平。Western blot 检测 PHB 蛋白表达以来评价 PHB siRNA 的沉默效率。

2.4 心肌细胞凋亡 吸出培养液,D-Hanks 洗细胞 3 次,每次 5 min。向培养瓶中加入 2~3 mL 0.125% 胰蛋白酶(使用前应预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右),镜下观察细胞,待其变圆,细胞间分离但尚未脱落时倒去胰酶,加入原培养液终止消化,吹打瓶壁,使细胞脱落。将细胞悬液转移至离心管,1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 5 min 离心,加 PBS 重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,取 0.5 mL 上述细胞悬液,1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 4 min 离心,弃上清,加 0.5 mL Binding Buffer 重悬细胞,加入 1 μL 荧光标记的 Annexin V 试剂,混匀后避光室温下孵育 20 min。加入 5 μL PI 混匀后避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min,孵育后加入 500 μL Binding Buffer,立即上流式细胞仪分析,激发波长 $\text{Ex} = 488 \text{ nm}$; 发射波长 $\text{Em} = 530 \text{ nm}$ 。

2.5 线粒体膜电位 用 0.125% 胰蛋白酶消化贴壁的心肌细胞,调整细胞数为 1×10^6 个/mL,用 PBS 洗 2 次。取储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 溶于 DMSO 的 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Rh123,用不含牛血清的 DMEM 稀释至 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,重悬上述细胞,避光于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min 后进行流式细胞仪测定(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm),测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。以阳性细胞的平均荧光强度表示心肌细胞膜电位的相对水平。

2.6 细胞内钙浓度测定 0.125% 胰蛋白酶消化贴壁的心肌细胞,调整细胞数为 1×10^6 个/mL,用 PBS 洗两次。于室温避光条件下用 Fluo-3/AM 负载细胞约 30 min,终浓度 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞静置贴壁后再用 PBS 洗 2~3 次,洗去多余的荧光染料,即可上机检测,60 min 内检测完毕。发射波长 527 nm,激发波长 506 nm。Fluo-3/AM 检测的 $[\text{Ca}_2^+]_i$ 计算公式为: $[\text{Ca}_2^+]_i = \text{Kd} \cdot [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$ 其中, Kd 为 Fluo-3 的解离常数,为 400 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; F 为对样品检测得到的荧光强度值, $F_{\max}$, $F_{\min}$ 分别为加 0.1% Triton X-100 及 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA 时测得的荧光强度值。

2.7 Western blotting 蛋白样品采用 BCA 法蛋白定量后,按照标准上样。应用 SDS-PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜。含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h 后,加一抗 PHB 单克隆抗体(1:800 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 漂洗 3 次,加二抗 HRP 标记羊抗小鼠 IgG(1:1 000 稀释),室温 1 h, TBST 漂洗 3 次, ECL 化学发光法显色,凝胶图像分析系统扫描图像。将各样品条带积分吸光度扫描,将各实验点的灰度值与内参 β -actin 灰度值比较,对各组灰度值比值进行统计学分析。

2.8 统计分析 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。多组数据间比较采用单因素方差分析处理,组间两两比较采用 LSD 法。检验显著性水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 丹参酮Ⅱ_A 及 siRNA PHB 对心肌细胞凋亡率、细胞内钙浓度、线粒体膜电位的影响 心肌细胞经 H_2O_2 处理 2 h 后,细胞凋亡率和细胞内钙离子浓度较正常对照组显著增加,而线粒体膜电位较正常对照组显著降低;心肌细胞经丹参酮Ⅱ_A 预先处理后,细胞凋亡率和细胞内钙离子浓度较模型组呈浓度依赖性显著降低,而线粒体膜电位则呈浓度依赖性的显著增加。siRNA 可显著增加心肌细胞凋亡率、细胞内钙离子浓度,降低线粒体膜电位,且 siRNA + 氧

化应激组凋亡率、细胞内钙离子浓度较氧化应激组 显著增高,线粒体膜电位则显著降低。结果见表 1。

表 1 丹参酮Ⅱ_A对细胞凋亡率、细胞内钙浓度和线粒体膜电位的影响

组别	终浓度/mol·L ⁻¹	凋亡率/%	[Ca ²⁺] _i /nmol·L ⁻¹	荧光强度
正常	—	2.530±0.183	94.560±4.511	83.650±1.793
氧化应激	—	44.820±2.430 ¹⁾	277.273±7.818 ¹⁾	47.543±1.341 ¹⁾
TSN	1×10 ⁻⁴	17.477±1.196 ^{1,2)}	133.350±8.635 ^{1,2)}	76.530±1.206 ^{1,2)}
	5×10 ⁻⁵	37.533±0.742 ^{1,2)}	162.723±4.453 ^{1,2)}	61.023±1.366 ^{1,2)}
	1×10 ⁻⁵	38.657±2.576 ^{1,2)}	249.800±4.923 ^{1,2)}	51.390±0.969 ^{1,2)}
siRNA	—	13.560±1.032 ^{1,2)}	133.593±10.903 ^{1,2)}	79.3200±0.805 ^{1,2)}
siRNA+氧化应激	—	58.273±1.225 ^{1,2)}	336.648±7.852 ^{1,2)}	40.987±2.182 ^{1,2)}
siRNA 阴性对照	—	2.657±0.125 ²⁾	92.217±5.249 ²⁾	83.7033±0.981 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾*P*<0.05;与模型组比较²⁾*P*<0.05(表 2 同)。

3.2 丹参酮Ⅱ_A及 siRNA PHB 对心肌细胞 PHB 蛋白表达的影响 以正常组 PHB 蛋白与β-actin 灰度值比值为 1,其他各组 PHB 蛋白表达量见与内参β-actin 比值见表 2。结果显示,心肌细胞在氧化应激状态下,PHB 蛋白表达较正常组显著增高(*P*<0.05),经各剂量浓度丹参酮Ⅱ_A干预后,心肌细胞内 PHB 蛋白表达较氧化应激组显著降低,但仍显著高于正常组(*P*<0.05)。siRNA PHB 干预后,与正常组比较,心肌细胞内 PHB 蛋白表达被显著抑制(*P*<0.05),说明基因沉默效果显著。与正常组比较,siRNA 阴性对照不影响 PHB 蛋白表达(*P*>0.05)。各组 PHB 蛋白表达见表 2。

表 2 丹参酮Ⅱ_A及 siRNA PHB 对心肌细胞 PHB 蛋白表达的影响

组别	终浓度/mol·L ⁻¹	相对灰度值
正常		1
氧化应激	—	1.691±0.041 ¹⁾
TSN	1×10 ⁻⁴	1.261±0.058 ^{1,2)}
	5×10 ⁻⁵	1.301±0.042 ^{1,2)}
	1×10 ⁻⁵	1.385±0.056 ^{1,2)}
siRNA	—	0.553±0.020 ^{1,2)}
siRNA+氧化应激	—	0.576±0.019 ^{1,2)}
siRNA 阴性对照	—	0.992±0.033 ²⁾

4 讨论

冠状动脉搭桥术、溶栓疗法、冠状动脉介入治疗和体外循环方法的建立,均使心脏经历了缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/RI)的过程。目前对这种反常现象的内在机制尚不完全清楚,但

再灌时产生大量氧自由基(活性氧)导致的细胞结构损伤和功能代谢障碍已为许多实验结果所肯定。许多实验研究已证明心肌缺血-再灌注损伤不仅引起细胞坏死,而且也诱导细胞凋亡。心肌细胞的过度凋亡会导致心肌细胞数量的减少以及心肌结构破坏和功能障碍。研究表明,细胞内钙浓度升高被认为是凋亡的始动因素,抑制钙浓度升高则可阻止诱导的细胞发生凋亡。线粒体膜电位下降为细胞凋亡的早期表现,其显著下降说明线粒体膜结构已破坏,细胞进入凋亡阶段。本研究结果显示,外源性 H₂O₂ 200 μmol·L⁻¹可以导致心肌细胞凋亡率、细胞内钙离子浓度显著增高,线粒体膜电位显著降低,而加入各剂量丹参酮Ⅱ_A预处理后,细胞凋亡率、细胞内钙离子浓度呈浓度依赖性显著降低,线粒体膜电位呈浓度依赖性显著升高,说明丹参酮Ⅱ_A对氧化应激诱导的心肌细胞凋亡具有显著的保护作用。

PHB 基因是作为一种可能的抑癌基因被发现的,因其具有明显的抗细胞增殖、抗肿瘤作用而又称为抗增殖蛋白^[7]。目前对于 PHB 蛋白与疾病的关系在许多器官组织的蛋白质组学研究中出现^[8]。本课题组的前期蛋白质组学及 Kim^[4]等人的蛋白质组学研究均表明,PHB 蛋白在心肌缺血再灌注过程中表达增高,而对于其在心肌损伤中作用报道较少。为探讨 PHB 蛋白的功能,本研究采用了 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术诱导内源靶基因 mRNA 降解,以达到阻止基因表达的目的。结果表明,PHB 蛋白特异性的 siRNA 干扰后,siRNA 组 PHB 条带较正常组组明显变细变淡,表明蛋白表达被显著抑制。siRNA 干扰 PHB 蛋白表达后,心肌细胞凋

亡率、细胞内钙浓度较正常组显著增高,线粒体膜电位则显著降低,且 siRNA + 氧化应激组细胞凋亡率、细胞内钙浓度较氧化应激组显著增高,线粒体膜电位则显著降低。本研究的结果表明,PHB 蛋白对氧化应激状态下的心肌细胞具有保护作用。

在本研究中,丹参酮Ⅱ_A对氧化应激状态下的心肌细胞具有显著的保护作用,却可显著降低保护性作用蛋白 PHB 蛋白的表达水平,结果看似矛盾,其实不然。导致这一结果有两方面的机制。一方面,据 Kim^[2]等人的报道均显示,PHB 蛋白在心肌缺血损伤中表达增高,其增高的机制可能为氧化应激可诱导 PHB 高表达,是心肌细胞抗氧化损伤的代偿性反应。由于丹参酮Ⅱ_A作为一个天然的抗氧化剂,能有效抑制细胞脂质过氧化,通过抗氧化机制减轻心肌细胞的氧化损伤,从而减少心肌细胞自身代偿性的 PHB 蛋白表达。另一方面,关于 PHB 蛋白的表达调控,目前已有研究证实 IL-6 可刺激 PHB 蛋白表达^[9]。在心肌缺血再灌注过程中,大量炎症介质参与了心肌细胞的损伤机制,其中就包括 IL-6。在心肌细胞氧化应激中,IL-6 也参与了细胞损伤。目前已有大量的研究表明,在丹参酮Ⅱ_A具有显著的抗炎作用,可下调 IL-6, TNF- α 等炎症因子表达^[10]。因此,丹参酮Ⅱ_A下调心肌缺血再灌注及氧化应激损伤中 PHB 蛋白表达的另一种机制可能是通过下调 IL-6 表达介导的。至于丹参酮Ⅱ_A对 PHB 蛋白表达调控具体的信号转导机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Mishra S, Murphy L C, Nyomba B L, et al. Prohibitin: a potential target for new therapeutics [J]. Trends Mol Med,2005,11(4):192.

[2] Kim N, Lee Y, Kim H, et al. Potential biomarkers for

ischemic heart damage identified in mitochondrial proteins by comparative proteomics [J]. Proteomics, 2006,6(4):1237.

[3] 陈晓龙,杨建中,熊慧生,等. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠治疗冠心病不稳定型心绞痛的临床研究[J]. 重庆医学, 2008(2): 168.

[4] 王蓉,曾晓荣,王贞,等. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠对家兔缺血预处理心肌保护作用的影响[J]. 中国微循环, 2004(5):335.

[5] 孙学刚,贾钰华,陈育尧. 定心方及丹参酮对血小板膜粘附分子表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2001,25(1):61.

[6] Goldenberg I, Shainberg A, Jacobson K A, et al. Adenosine protects against angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiocyte cultures [J]. Mol Cell Biochem, 2003,252(1):133.

[7] Galang N, Sasaki H, Maulik N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy [J]. Toxicology, 2000, 148 (2/3):111.

[8] Ferrer I, Perez E, Dalfó E, et al. Abnormal levels of prohibitin and ATP synthase in the substantia nigra and frontal cortex in Parkinson's disease[J]. Neurosci Lett, 2007,415(3):205.

[9] Theiss A L, Obertone T S, Merlin D, et al. Interleukin-6 transcriptionally regulates prohibitin expression in intestinal epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2007,282(17):12804.

[10] Jang S I, Jeong S I, Kim K J, et al. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* inhibits inducible nitric oxide synthase expression and production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in activated RAW 264.7 cells[J]. Planta Med, 2003,69(11):1057.

[责任编辑 聂淑琴]