

· 基础研究 ·

特女贞苷对血管内皮细胞氧化损伤的作用研究

顾 闻 刘 特 陈久林 申定珠 邢三丽 郝志华 陈 川

摘要 目的 研究特女贞苷对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞(EA.hy926)中 p66Shc 及凋亡相关蛋白表达水平的作用。**方法** 采用 H_2O_2 诱导 EA.hy926 形成氧化应激损伤的血管内皮细胞模型,随机分为空白组、模型组(H_2O_2)、特女贞苷组($H_2O_2 + 5, 50, 500 \mu\text{mol/L}$ 特女贞苷)、阴性对照组($H_2O_2 + 5, 50, 500 \mu\text{mol/L}$ DMSO)、抗坏血酸组($H_2O_2 + 5, 50, 500 \mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸)。检测各组细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、 β -gal 活性;采用 Western blot 法测定 p66Shc、caspase-3 活性剪切体、Bax、Bcl-2 蛋白含量;实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测 p66 mRNA 含量。**结果** 与空白组比较,模型组及阴性对照组 SOD 活性、Bcl-2 表达量及 Bcl-2/Bax 比值下降,MDA 含量、 β -gal 活性、p66Shc 蛋白水平及 mRNA 含量、caspase-3 活性剪切体和 Bax 表达水平升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,特女贞苷组及抗坏血酸组 SOD 升高,MDA 含量(除特女贞苷组浓度 $500 \mu\text{mol/L}$ 外)和 β -gal 活性降低($P < 0.01$),抑制 p66Shc 表达及 mRNA 水平($P < 0.01$);特女贞苷组 Bax 和 caspase-3 活性剪切体(除浓度 $500 \mu\text{mol/L}$ 外)表达水平降低,Bcl-2 表达和 Bcl-2/Bax 比值升高(均 $P < 0.01$)。与同浓度的抗坏血酸组比较,特女贞苷组对 Bax、Bcl-2 蛋白水平、Bcl-2/Bax 比率、p66 mRNA 的调节作用较明显($P < 0.05$)。**结论** 特女贞苷可能通过抑制 p66Shc 削弱血管内皮细胞的氧化损伤及降低凋亡相关蛋白的表达。

关键词 p66Shc; 氧化应激; 特女贞苷; 人脐静脉内皮细胞

Effect of Specnuezhenide Reducing the Oxidative Damage of Vascular Endothelial Cells GU Wen, LIU Te, CHEN Jiu-lin, SHEN Ding-zhu, XING San-li, YU Zhi-hua, and CHEN Chuan Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Shanghai (200031)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Specnuezhenide on the expressions of p66Shc and apoptosis-related protein of hydrogen peroxide-induced human umbilical vein endothelial cells (EA.hy926). **Methods** Oxidative damage model of vascular endothelial cells was established H_2O_2 induction on EA.hy926. EA.hy926 cells were divided into the blank group, the model group (H_2O_2), the specnuezhenide group ($H_2O_2 + 5, 50, 500 \mu\text{mol/L}$ of specnuezhenide), the negative control group ($H_2O_2 + 5, 50, 500 \mu\text{mol/L}$ of DMSO), and the ascorbic acid group ($H_2O_2 + 5, 50, 500 \mu\text{mol/L}$ of ascorbic acid). Levels of the superoxide dismutase (SOD) activity, malonic dialdehyde (MDA) content, and β -gal activity of each group were detected. Protein expression of p66Shc, cleaved caspase-3, Bax, Bcl-2 were detected by Western blot. mRNA expressions of p66 were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). **Results** Compared with the blank group, SOD activity, Bal-2/Bax ratio and the expression of Bcl-2 decreased, while MDA content, β -gal activity, the expression levels of p66Shc protein, p66 mRNA, cleaved caspase-3, Bax increased in the model group and the negative control group (all $P < 0.05$). Compared with the model group, SOD activity increased,MDA content (except for the concentration of $500 \mu\text{mol/L}$ in the specnuezhenide group) and β -gal activity decreased, the expression of p66Shc and mRNA were inhibited in the specnuezhenide group and the ascorbic acid group (all $P < 0.01$). The expressions of bax and cleaved capase-3 (except concentration $500 \mu\text{mol/L}$) were decreased, the expressions of Bcl-2 and Bcl-2/Bax ratio were increased (all $P < 0.01$) in the specnuezhenide group. Compared with

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81373706, No. 81202731, No. 81202811)

作者单位:上海市中医老年医学研究所(上海 200031)

通讯作者:陈 川, Tel: 021-64720010, E-mail: ch9453@126.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20180619. 058

the same concentration of the ascorbic acid group, the specnuezhenide group had a significant effect on the regulation of Bax, Bcl-2 protein levels, Bcl-2/Bax ratio, and p66 mRNA ($P < 0.05$). Conclusion Specnuezhenide could reduce the oxidative damage and the expression of apoptosis-related proteins of vascular endothelial cells by inhibiting p66Shc.

KEYWORDS p66Shc; oxidative stress; specnuezhenide; human umbilical vein endothelial cells (EA.hy926)

血管内皮细胞作为血管壁的最内层,能选择性的调节血液中的小分子至超大分子通过血管壁,参与血管运动的调节,并维持血管壁的完整性^[1]。其功能障碍是动脉粥样硬化等心血管疾病进展的首要因素之一^[2],而氧化应激是血管内皮细胞功能障碍的重要病理基础。体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生过多或清除下降引起蛋白质、脂质、脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)发生氧化,导致血管内皮细胞老化、凋亡、坏死^[3]。Liu L 等^[4]通过研究发现胃膜下小动脉内皮细胞的老化和功能障碍与过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)、丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)升高有关。p66Shc 作为 ShcA 基因编码的蛋白质,与线粒体的氧化酶、血管内皮细胞的氧化损伤、凋亡密切相关^[5]。1999 年 Migliaccio E 等^[6]最先发现 p66Shc 可以负性调节寿命。p66Shc^{-/-}的小鼠比野生型小鼠延长了近 30% 的寿命,其氧化损伤也明显减少。进一步研究发现 p66Shc^{-/-}小鼠能通过减少 ROS 产生,增加 NO 释放从而保护血管内皮细胞功能障碍^[5]。然而目前对于药物调节 p66Shc 水平从而减轻内皮细胞氧化损伤的报道较少。

特女贞苷是(specnuezhenide)从女贞子果实中用 60% 甲醇提取的活性物质^[7],女贞子具有抗炎、调节免疫、抗衰老的作用^[8]。研究发现特女贞苷在自由基引起的红细胞溶血中有较强的抗氧化作用,并能保护 6-羟多巴胺诱导的神经毒性作用^[9,10]。为进一步研究特女贞苷对内皮细胞的保护作用,本实验通过特女贞苷对 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞 EA.hy926 氧化损伤后 p66Shc 及凋亡相关蛋白 caspase-3、Bax、Bcl-2 表达水平的调节作用,探讨特女贞苷的作用机制。

材料与方法

1 细胞 EA.hy926 购自中国科学院细胞库,批号:GNHu39。

2 试剂及仪器 主要试剂: H_2O_2 (批号: 20120917) 购自国药集团化学试剂有限公司; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养基,胎牛血清均购自 Gibco 公司;特女贞苷(批号:111926-

201203,纯度 98%) 购自上海东方药品科技实业有限公司;抗坏血酸(批号:111926-201203,含量 98%) 购自上海展云化工有限公司。特女贞苷及抗坏血酸用 100% 的 DMSO (Sigma Aldrich 公司,批号:055K0103) 配成 50 mol/L 储藏在 -20°C ,实验时用 DMEM 稀释到所需浓度; p66Shc 抗体(批号: ab87663) 购自 Abcam 公司; Bcl-2 抗体(批号: 50E3), Bax 抗体(批号: D2E11), caspase-3 活性剪切体(批号: 8G10)、GAPDH 抗体(批号: 14C10) 购自 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(批号: A0208) 购自上海碧云天生物技术有限公司;MDA 试剂盒(批号: 20140523),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号: 20140724), β -gal Elisa 试剂盒(批号: 1404262) 均购自南京建成生物工程研究所;Rever Tra Ace qPCR RT 试剂盒(批号: FSQ-101), SYBR Green Real-time PCR MasterMix 购自 ToYoBo 公司,批号: 411900。

主要仪器: 定量 PCR 仪(Eppendorf 公司,型号: REALPLEX2); 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司,型号 5417R); 酶联免疫检测仪(BioTek 公司,型号: Powerave XS); 超净工作台(上海上净净化设备有限公司,型号: CA-920-3); 垂直电泳仪(BioRad 公司,型号: Powerave Pac); 红外成像系统(Odyssey 公司,型号: LI-COR); 超声波细胞粉碎机(Sonics 公司,型号: VCX130)。

3 方法

3.1 细胞培养 用含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基,同时加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 链霉素和 100 $\mu\text{mol/L}$ 青霉素,细胞接种于无菌培养瓶中,在 37°C 、5% CO_2 、95% 饱和湿度条件下培养 EA.hy926。细胞消化采用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶,选取状态良好的对数期细胞进行试验。细胞密度达到 50% ~ 60% 后行后续实验。

3.2 MTT 法检测细胞毒性 特女贞苷对于 EA.hy926 的细胞存活率采用 MTT 法测定。根据文献[11],取生长旺盛的 EA.hy926 细胞接种于 96 孔板。常规培养 24 h 后,加入特女贞苷(终浓度为 0.5、5、

10、50、100、500 $\mu\text{mol/L}$) 培养 24 h。各孔加入 MTT (5 mg/mL) 100 μL , 避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 h。吸取上清, 每孔加 DMSO 150 μL , 轻摇 10 min, 在酶标仪上读取 490 nm 吸光值。细胞相对存活率的计算公式如下: (检测孔的平均吸光值/空白对照孔的平均吸光值) $\times 100\%$ 。

3.3 细胞分组及干预方法 将 EA.hy926 细胞随机分为空白组常规培养细胞 48 h; 模型组根据预试验结果^[12], 选取 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 刺激细胞 24 h 后制备模型, 继续常规培养 24 h; 特女贞苷组 (H_2O_2 + 5、50、500 $\mu\text{mol/L}$ 的特女贞苷培养 24 h); 阴性对照组 (H_2O_2 + 5、50、500 $\mu\text{mol/L}$ DMSO 培养 24 h); 抗坏血酸组 (作为阳性对照组, H_2O_2 + 5、50、500 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸培养 24 h)。

3.4 生化法检测 SOD 活性及 MDA 含量 EA.hy926 用冰预冷的 PBS 漂洗 2 遍后用细胞刮刀在冰上将细胞刮下。用 0.1% 的 PBS (pH 7.2 ~ 7.4) 制成细胞悬液, 超声波细胞粉碎机将细胞震碎。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度并定量。按试剂盒所述方法测定细胞内的 SOD 活性及 MDA 含量。每个样本至少重复 3 次。用酶联免疫检测仪测定吸光度, 并按下述公式计算其 SOD 活性及 MDA 含量。SOD 活性 = (对照管 A - 测定管 A) / 对照管 A $\times$ 反应液总体积 / 取样量; MDA 含量 = (测定管 A - 测定空白管 A) / (标准管 A - 标准空白管 A) $\times$ 对照品浓度 $\times$ 样本测试前稀释倍数。

3.5 ELISA 法检测人 β -半乳糖苷酶 (β -gal) EA.hy926 用冰预冷的 PBS 漂洗 2 遍, 加入 RAPI 蛋白裂解液, 按上法离心后取上清即为细胞总蛋白。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度并定量。按试剂盒所述方法测定细胞内的 β -gal 活性。每个样本至少重复 3 次。用酶联免疫检测仪测定细胞内吸光度。

3.6 Western blot 法检测 p66Shc、Bcl-2、Bax、capase-3 活性剪切体含量 EA.hy926 用冰预冷的 PBS 漂洗 2 遍, 加入含 cocktail 蛋白酶抑制剂的 RAPI 蛋白裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清即为细胞总蛋白。用 BCA 法测定总蛋白浓度后, 按每孔 50 μg 进行 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 电转移至 PVDF 膜后, 以 5% BSA 室温封闭 2 h; 加入下述稀释后的一抗: p66Shc (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、Bcl-2 (1:2 000)、capase-3 活性剪切体 (1:1 000) 和 GAPDH (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 洗涤后加 HRP 标记的二抗 (1:4 000) 室温孵育 1 h, 再次 PBST 洗涤。用凝胶图像分析系统测光密度值, 荧光强度用 Quantity One 4.6 软件分析。

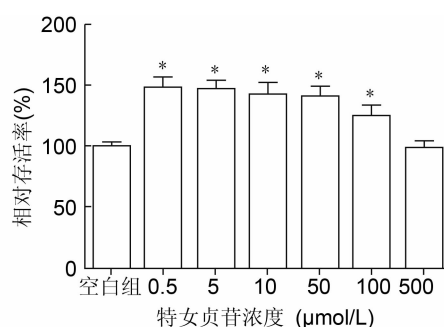
不同的蛋白含量以 GAPDH 条带作为内参。

3.7 RNA 提取和 qPCR 法检测 p66 mRNA 收集各组细胞, 提取细胞总 RNA, 鉴定 RNA 完整性及纯度。用 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒逆转录合成 cDNA 第 1 条链。采用 SYBR Green Real-time PCR MasterMix 在定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。p66Shc 上游引物 5'-GTATGTGCTCACTGGCTTGC-3', 下游引物 5'-CTGACACTTTCAAAGCGGTG-3'; 18s rRNA 上游引物 5'-CAGCCACCCGAGATTGAGCA-3', 下游引物 5'-TAGTAGCGACGGGCGGTGTG-3'。反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 40 个循环。通过计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 比较不同样品之间特定基因的表达差异。为了减少系统误差和样品误差, 每个样品均设定 3 个平行复孔, 实验至少重复 3 次。p66 mRNA 的水平以 18s rRNA 作为内参。

3.8 统计学方法 应用 SPSS 18.0 软件对数据进行分析。计量资料的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析, 两组之间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度的特女贞苷作用 EA.hy926 24 h 后细胞存活率比较 (图 1) 与空白组比较, 500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下的特女贞苷对 EA.hy926 无细胞毒性 ($P < 0.05$)。



注: 与空白组比较, * $P < 0.05$

图 1 不同浓度的特女贞苷作用 EA.hy926 24 h 后细胞存活率比较

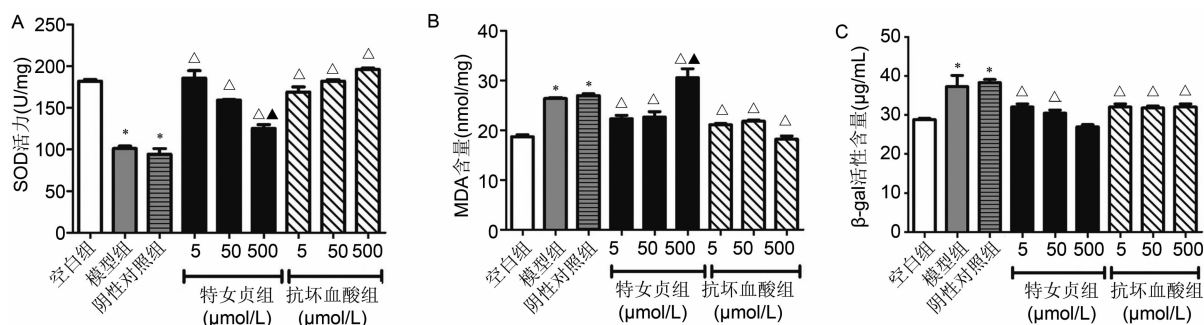
2 各组细胞氧化应激损伤后 SOD、MDA 和 β -gal 比较 (图 2) 与空白组比较, 模型组及阴性对照组 SOD 活性下降, MDA 含量和 β -gal 活性升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 特女贞苷组及抗坏血酸组 SOD 升高 ($P < 0.01$), MDA 含量 (除浓度 500 $\mu\text{mol/L}$ 特女贞苷组, $P < 0.01$) 和 β -gal 活性均降低 ($P < 0.01$)。

与同浓度的抗坏血酸组比较,特女贞苷组浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 SOD、MDA、 $\beta\text{-gal}$ 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),其他浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 各组细胞氧化应激损伤后 p66Shc、capase-3 活性剪切体、Bax 和 Bcl-2 表达比较(图 3) 与空白组比较,模型组及阴性对照组 p66Shc、capase-3 活性剪切体和 Bax 表达量升高,Bcl-2 表达量 Bcl-2/Bax 降低(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,特女贞苷组各浓度 p66Shc、Bax 和 capase-3(除浓度 500 $\mu\text{mol/L}$ 外)表达水平降低,Bcl-2 表达和 Bcl-2/Bax 比值升高($P < 0.01$);抗坏血酸组各浓度 p66Shc、capase-3 活性剪切体水平降低,除浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 外的 Bax 表达和 Bcl-2/Bax 比率值亦降低,浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸

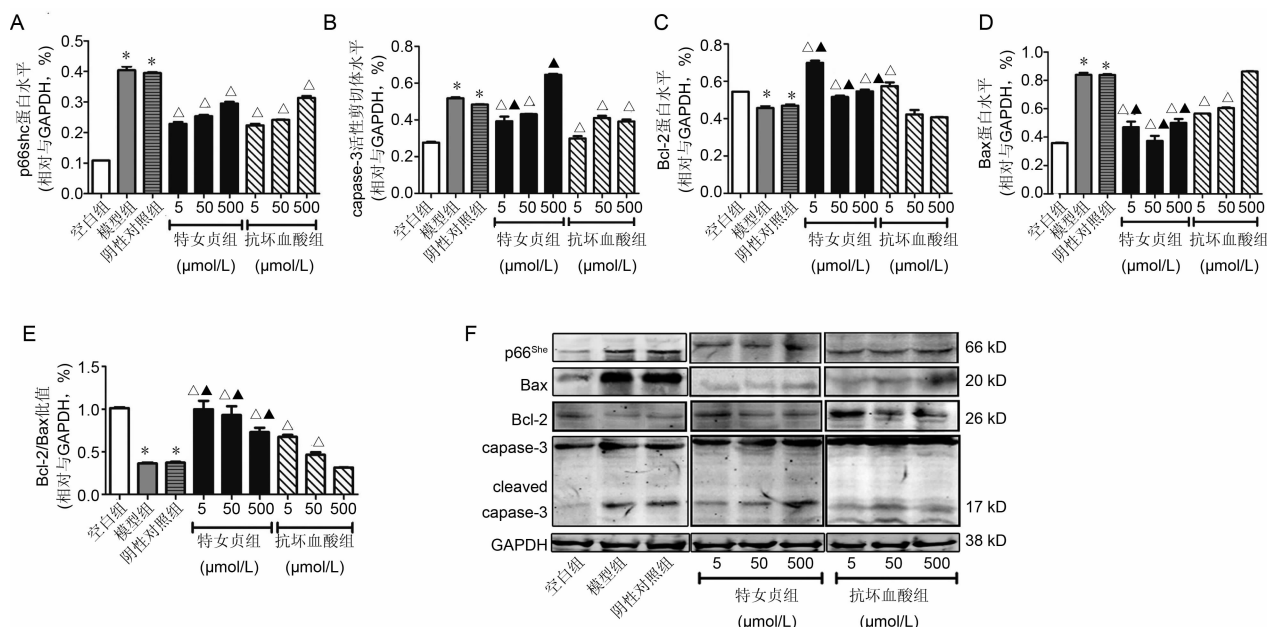
组 Bcl-2 表达升高(均 $P < 0.01$)。与同浓度抗坏血酸组比较,特女贞苷组浓度 5、500 $\mu\text{mol/L}$ 的 capase-3 活性剪切体活性表达增多($P < 0.05$),Bax、Bcl-2 蛋白水平和 Bcl-2/Bax 比率的调节作用优于抗坏血酸($P < 0.05$)。

4 特女贞苷对氧化应激损伤后 p66 mRNA 表达水平的作用(图 4) 与空白组比较,模型组及阴性对照组 p66 mRNA 含量升高($P < 0.05$)。与模型组比较,各浓度特女贞苷组 p66 mRNA 含量降低,分别下调了 8.3、7.3、4.2 倍($P < 0.01$);抗坏血酸组 p66 mRNA 含量亦降低($P < 0.01$)。与同浓度抗坏血酸组比较,50、500 $\mu\text{mol/L}$ 特女贞苷组 p66 mRNA 的调节作用优于抗坏血酸组($P < 0.05$)。



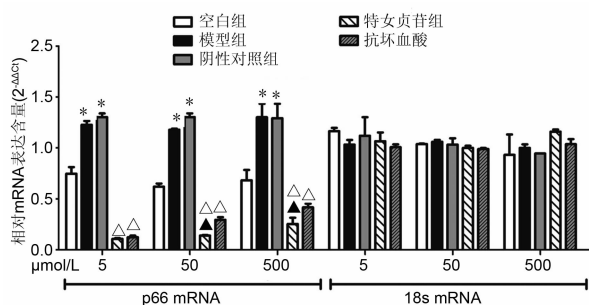
注:A 为各组 SOD 活力比较; B 为各组 MDA 含量比较; C 为 $\beta\text{-gal}$ 活性比较; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与同浓度的抗坏血酸组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图 2 各组细胞氧化应激损伤后 SOD、MDA 和 $\beta\text{-gal}$ 比较



注:A、B、C、D、E 分别为各组 p66Shc、capase-3、Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax 比值图; F 为各组 p66Shc、capase-3、Bcl-2、Bax 表达的电泳图; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与同浓度抗坏血酸组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图 3 各组细胞氧化应激损伤后 p66Shc、capase-3 活性剪切体、Bax 和 Bcl-2 表达比较



注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;
与同浓度抗坏血酸组比较, $\Delta P < 0.05$

图4 特女贞苷对氧化损伤内皮细胞内
p66 mRNA 水平的调节作用

讨 论

氧化应激与动脉粥样硬化、血管老化等多种心血管疾病密切相关^[13],其对血管内皮细胞的损伤主要包括两方面:(1)改变内皮细胞代谢。氧化应激损伤能引起血管内皮细胞中 NO 生物活性降低,前列腺环素 (prostacyclin, PGI₂) 的释放减少,从而抑制血管舒张^[14]。(2)加速内皮细胞凋亡。氧化应激中过多的 ROS 堆积能改变血流切应力、增加线粒体通透性,从而引起线粒体凋亡途径^[15]。

特女贞苷的主要来源女贞子,常用于治疗氧化损伤、衰老相关的心血管疾病。1997 年 Kikuchi M 等首次从植物女贞中提取出特女贞苷^[16],它是一类裂环烯醚萜 (secoiridoid) 化合物,具有环烯醚萜苷 (iridoid) 骨架。本实验数据表明 0.5 ~ 500 μmol/L 的特女贞苷对内皮细胞无细胞毒性。H₂O₂ 刺激内皮细胞能降低细胞内 SOD 活性,提高 MDA 含量,诱导氧化应激损伤。而特女贞苷干预后能明显调控 SOD 水平及 MDA 含量,与具有明确抗氧化作用的抗坏血酸比较,差异无统计学意义。提示特女贞苷能提高氧化损伤细胞中抗氧化酶活性,减少脂质氧化物。血管内皮细胞老化与氧化应激增多、抗氧化能力下降有关,β-gal 是目前较为公认的细胞衰老标志物^[17]。H₂O₂ 刺激后 β-gal 活性升高,特女贞苷能抑制 β-gal 的活性,提示特女贞苷对氧化应激引起的血管老化具有潜在治疗作用。

Shc 家族中包含 ShcA、ShcB 及 ShcC,目前研究表明 ShcB 和 ShcC 局限于神经细胞内,ShcA 可以结合表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 激活 Ras-MAPK 通路^[18]。p66Shc 属于 ShcA 家族,由于其末端含有独特的 110 个氨基酸的 CH2 (collagen homologous region 2) 结构域,故 p66Shc 与家族另两个剪切体 p52Shc、

p46Shc 不同,能介导氧化应激反应^[19,20]。p66Shc 作为氧化应激感受器及氧化酶,一旦有氧化信号刺激,p66Shc 的 CH2 中 S36 位点发生磷酸化,并与 Hsp70 解离,氧化细胞色素 c,从而激活 caspase-3 引起细胞凋亡^[21,22]。为了更好地观察药物对 p66Shc 的调节,通过预实验选取对 p66Shc 最为敏感 H₂O₂ 浓度作为模型浓度。各组特女贞苷都能降低 p66 mRNA 水平及蛋白含量,调节趋势随浓度升高而降低,与抗坏血酸组比较,差异无统计学意义。特女贞苷对 p66Shc 的调节与对 MDA 含量的调节变化趋势一致,提示特女贞苷削弱氧化损伤的机制可能与抑制 p66Shc 表达相关。

目前 p66Shc 与凋亡相关分子之间关系的报道较少,Haga S 等^[23]人发现 p66Shc 敲除的小鼠肝细胞 (AML12 cells) 抗凋亡蛋白 Bcl-xL 升高。Bcl-2 家族可调节线粒体稳定性,其中 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白能拮抗地调节线粒体外膜的通透性及调控电压依赖性阴离子通道从而引起 cyt c 的释放及 caspase-3 的活化使细胞凋亡^[24]。本实验发现,特女贞苷能提高 Bcl-2/Bax 比率,降低 caspase-3 剪切体表达水平。特女贞苷对 Bcl-2/Bax 比率及 caspase-3 剪切体的作用效应随浓度升高而减弱,与其对 p66Shc 的变化趋势一致。

本研究结果表明,特女贞苷可以通过抑制 p66Shc 的表达从而提高抗氧化酶活性,降低氧化产物,降低 β-gal 活性,并且提高 Bcl-2/Bax 比率、降低 caspase-3 剪切体表达水平。提示特女贞苷具有治疗内皮细胞氧化损伤、老化相关疾病潜力。

利益冲突声明:所有作者声明不存在利益冲突关系。

参 考 文 献

- [1] Shi Y, Camici GG, Lüscher TF. Cardiovascular determinants of life span[J]. Pflugers Arch-Eur J Physiol, 2010, 459(2): 315–324.
- [2] Ayoub KF, Pothineni NVK, Rutland J, et al. Immunity, inflammation, and oxidative stress in heart failure: emerging molecular targets [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2017, 31(5–6): 593–608.
- [3] Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61(8): 473–501.
- [4] Liu L, Liu Y, Cui J, et al. Oxidative stress induces gastric submucosal arteriolar dysfunction in the elderly[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(48): 9439–9446.

- [5] Boengler K, Bencsik P, Palóczy J, et al. Lack of contribution of p66shc and its mitochondrial translocation to ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic preconditioning[J]. Front Physiol, 2017, 8: 733.
- [6] Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals[J]. Nature, 1999, 402(6759): 309–313.
- [7] Guo N, Yu Y, Ablajan K, et al. Seasonal variations in metabolite profiling of the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011, 25(12): 1701–1714.
- [8] Lin HM, Yen FL, Ng LT, et al. Protective effects of *Ligustrum lucidum* fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111(1): 129–136.
- [9] Wu JM, Ke X, Fu W, et al. Inhibition of Hypoxia-induced retinal angiogenesis by specnuezhenide, an effective constituent of *Ligustrum lucidum* Ait., through suppression of the HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. Molecules, 2016, 21(12): E1756.
- [10] He ZD, But PPH, Chan TW, et al. Antioxidative glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2001, 49(6): 780–784.
- [11] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill[J]. J Immunol Methods, 1989, 119(2): 203–210.
- [12] 孙申维, 顾闻, 陈川, 等. 补肾中药单体对氧化损伤内皮细胞中 p66 mRNA 的调控作用[J]. 四川中医, 2017, 35(3): 40–43.
- [13] Egea J, Fabregat I, Frapart YM, et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS)[J]. Redox Biol, 2018, 14: 694–696.
- [14] Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(4): 653–661.
- [15] Scheitlin CG, Nair DM, Crestanello JA, et al. Fluid mechanical forces and endothelial mitochondria: A bioengineering perspective[J]. Cell Mol Bioeng, 2014, 7(4): 483–496.
- [16] Kikuchi M, Kakuda R. Studies on the constituents of *Ligustrum* species. XIX. Structures of iridoid glucosides from the leaves of *Ligustrum lucidum* Ait [J]. Yakugaku Zasshi, 1999, 119(6): 444–450.
- [17] Sun R, Zhu B, Xiong K, et al. Senescence as a novel mechanism involved in β -adrenergic receptor mediated cardiac hypertrophy[J]. PloS One, 2017, 12(8): e0182668.
- [18] Ponti G, Conti L, Cataudella T, et al. Comparative expression profiles of ShcB and ShcC phosphotyrosine adapter molecules in the adult brain[J]. Neuroscience, 2005, 133(1): 105–115.
- [19] Pellegrini M, Pacini S, Baldari CT. p66SHC: the apoptotic side of Shc proteins[J]. Apoptosis, 2005, 10(1): 13–18.
- [20] Patrussi L, Capitani N, Cattaneo F, et al. p66Shc deficiency enhances CXCR4 and CCR7 recycling in CLL B cells by facilitating their dephosphorylation-dependent release from β -arrestin at early endosomes[J]. Oncogene, 2018, 37(11): 1534–1550.
- [21] Shan W, Gao L, Zeng W, et al. Activation of the SIRT1/p66shc antiapoptosis pathway via carnosic acid-induced inhibition of miR-34a protects rats against nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(7): e1833.
- [22] Gertz M, Steegborn C. The Lifespan-regulator p66Shc in mitochondria: redox enzyme or redox sensor? [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 13(9): 1417–1428.
- [23] Haga S, Terui K, Fukai M, et al. Preventing hypoxia/reoxygenation damage to hepatocytes by p66 (shc) ablation: up-regulation of anti-oxidant and anti-apoptotic proteins[J]. J Hepatol, 2008, 48(3): 422–432.
- [24] Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis[J]. FEBS J, 2017, 285(3): 416–431.

(收稿: 2016–06–24 在线: 2018–07–12)

责任编辑: 白霞