

# 虾青素对氧化应激诱导内皮祖细胞凋亡的保护作用

李培<sup>1</sup>, 张琼宇<sup>1</sup>, 曾乐平<sup>2△</sup>, 龚志刚<sup>3,4</sup>

(1. 湖南永州职业技术学院医学院, 湖南永州 425006; 2. 中南大学基础医学院人体解剖与神经生物学系, 长沙 410013; 3. 南方医科大学研究生院, 广州 510515; 4. 广州军区武汉总医院心内科, 武汉 430070)

**摘要:**目的 探讨虾青素对体外氧化应激诱导的人外周血内皮祖细胞凋亡的影响及机制。方法 体外培养人外周血单核细胞源的内皮祖细胞, 分为对照组、模型组(叔丁基过氧化氢 100  $\mu\text{mol/L}$ )、虾青素+叔丁基过氧化氢组[虾青素 0.10、1.00、10.00 nmol/L 预处理 24 h 后, 分别使用叔丁基过氧化氢溶液(100  $\mu\text{mol/L}$ )连续培养 6 h]。细胞存活率采用 MTT 法检测; 细胞凋亡率采用 DAPI 染细胞检测; DCFH-DA 法检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; JC-1 法测定线粒体膜电位。结果 与对照组比较, 叔丁基过氧化氢(100  $\mu\text{mol/L}$ )能明显的造成内皮祖细胞的凋亡( $P < 0.05$ )。虾青素可降低叔丁基过氧化氢引起的内皮祖细胞凋亡, 表现为细胞凋亡率减少( $P < 0.05$ ), 线粒体膜电位增加。结论 虾青素对叔丁基过氧化氢诱导的内皮祖细胞凋亡具有保护作用, 其机制可能与保护线粒体功能有关。

**关键词:**氧化性应激; 内皮祖细胞; 虾青素; 细胞凋亡; 膜电位; 线粒体

中图分类号: R543.7

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)26-3464-04

## Protective effect of astaxanthin on endothelial progenitor cell apoptosis induced by oxidative stress

Li Pei<sup>1</sup>, Zhang Qiongyu<sup>1</sup>, Zeng Leping<sup>2△</sup>, Gong Zhigang<sup>3,4</sup>

(1. Medical College, Youzhou Vocational Technical College, Yongzhou, Hunan 425006, China;

2. Department of Anatomy and Neurobiology, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha,

Hunan 410013, China; 3. Graduate School of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China;

4. Department of Cardiology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effect of astaxanthin on the peripheral blood endothelial progenitor cells (EPCs) apoptosis induced by oxidative stress in vitro and to explore its underlying mechanism. **Methods** Human peripheral blood EPCs were in vitro cultured and divided into the control group, model group with 100  $\mu\text{mol/L}$  tert-butyl hydroperoxide (tBHP) and the astaxanthin plus tBHP group (with 0.10, 1.00, 10.00 nmol/L astaxanthin pretreatment for 24 h, then adding the final concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$  tBHP for 6 h continuous culture). The cell viability was measured by the MTT method. The level of reactive oxygen species (ROS) was determined by the DCFH-DA method. The changes of mitochondrial membrane potential (MMP) and the apoptosis ratio were detected by the JC-1 method and the DAPI method, respectively. **Results** Compared with control group, 100  $\mu\text{mol/L}$  tBHP could obviously caused the apoptosis of EPCs ( $P < 0.05$ ), while astaxanthin could decrease tBHP induced apoptosis, which manifested by the decrease of the apoptosis ratio ( $P < 0.05$ ) and MMP increase. **Conclusion** Astaxanthin has the protective effect on the apoptosis of EPCs, its mechanism may be related with the protection of the mitochondrial function.

**Key words:** oxidative stress; endothelial progenitor cell; astaxanthin; cell apoptosis; membrane potential; mitochondria

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPCs)是一组促进内皮修复, 实现再内皮化, 形成血管内皮, 维持血管内皮完整的祖细胞<sup>[1]</sup>。研究表明 EPCs 对氧化应激损伤敏感<sup>[2]</sup>, 增强 EPCs 抗氧化应激能力, 降低凋亡的发生有可能成为血管损伤后再内皮化治疗的新靶点<sup>[3]</sup>。虾青素(astaxanthin, ASX)是雨生红球藻应对不良环境胁迫, 在细胞内形成的一类应激分子, 参与抑制氧化应激引起的人神经干细胞<sup>[4]</sup>、视网膜细胞<sup>[5]</sup>、脐静脉内皮细胞<sup>[6]</sup>、肾小球系膜细胞<sup>[7]</sup>等多种细胞凋亡的发生。但目前鲜见 ASX 保护 EPCs 对抗氧化应激损伤所引起凋亡的相关报道。本研究内皮祖细胞源自体外培养的人外周血单核细胞, 使用叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, tBHP)引发 EPCs 凋亡构建氧化应激损伤模型, 对 ASX 抑制 tBHP 诱导 EPCs 凋亡进行观察, 探索 ASX 抑制 EPCs 凋亡作用与相关机制, 从实验角度研究 ASX 对机体心血管的保护作用。

## 1 材料与与方法

### 1.1 实验药物与试剂

美国 Amersham Biosciences 公司生产

的淋巴细胞分离液(Histopaque1077); 美国 Gibco 公司生产的 M199 细胞培养板、胎牛血清、培养基; 上海博光生物技术公司生产的胰酶; 美国 Sigma 公司生产的硫氨酸荧光标记荆豆凝集素 I(FITC-UEA-I)、ASX、甲基噻唑蓝(MTT)、人纤维连接蛋白、叔丁基过氧化氢(tBHP); 美国 Molecular Probe 公司生产的 DiI-Ac-LDL 乙酰化低密度脂蛋白; 英国 Pepro Tech 公司生产的 rh-b-FGF 重组人碱性成纤维细胞生长因子、rh-VEGF165 重组人血管内皮生长因子; 德国 Miltenyi Biotec 公司生产的 PE 标记鼠抗人 CD133 单克隆抗体; 美国 SBA 公司生产的 FITC 标记鼠抗人 CD34 单克隆抗体; 美国 R&D System 公司生产的 VEGF-R2 单克隆抗体、PE 标记鼠抗人 Caspases 活性检测试剂盒; 碧云天生物技术研究所 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)检测试剂。

### 1.2 人 EPCs 的分离、培养和鉴定

外周静脉血来自健康志愿者, 用 PBS 缓冲液(1:2)进行稀释, 将稀释液缓慢移至 His-

topaque1077 上方,按照 1 500 r/min,在室温下离心 30 min,分离出单个核细胞层。用含有 10% PBS、20% 胎牛血清、10 ng/mL rh-b-FGF、10 ng/mL rh-VEGF 的 M199 培养液将单核细胞稀释成  $5 \times 10^6$ /mL 溶液,在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 4 d 后,用 PBS 液洗除非贴壁细胞,在更换培养液后继续培养到第 7 天时,在 37 °C 下将细胞加入 10 mg/L FITC-UEA-I 和 2.4 mg/L DiI-Ac-LDL 孵育 1 h 后,通过荧光显微镜检测双染色阳性细胞百分比。同时,取用培养到第 7 天的细胞,使用 0.25% 胰蛋白酶消化,分别加入 PE 标记的 10 mg/L CD133 单克隆抗体、10 mg/L PE 标记的 VEGF-R2 单克隆抗体、10 mg/L FITC 标记的 CD34 抗体,在 4 °C 下孵育 30 min 后,细胞表面标志物表达率使用流式细胞仪进行检测。细胞培育第 7 天,细胞液中加入无血清的培养液同步孵化细胞 24 h,继续后续实验。

**1.3 建立 tBHP 诱发人 EPCs 损伤模型** 使用 0.25% 胰酶消化同步化后的 EPCs,按  $1 \times 10^3$ /孔将细胞液接种于 96 孔板,分别加入 30、60、120、240  $\mu$ mol/L 的 tBHP 并干预 6 h 后,加入 5 g/L 的 MTT 10  $\mu$ L,在 37 °C 下持续孵育 4 h 后将上清液除去,加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砷,振荡 10 min 使结晶溶解,通过酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值。通过观察实验细胞存活水平,选择相应浓度的 tBHP 进行后续干预实验。细胞存活率计算值=实验组 A 值/对照组 A 值 $\times$ 100%。

**1.4 ASX 对正常及受损 EPCs 存活率的影响** 当培育细胞铺满 70%~80% 板底时,分别加入 0.10、1.00、10.00 nmol/L 的 ASX 溶液在 37 °C 下孵育 24 h 后,更换为无血清 MEM,并加入浓度为 100  $\mu$ mol/L 的 tBHP 溶液继续培养 6 h 后,细胞存活率检测采用 MTT 法。tBHP+/ASX-组:使用 100  $\mu$ mol/L tBHP 处理 EPCs 细胞 6 h。tBHP+/ASX+组:使用 10 nmol/L ASX 孵育 EPCs 细胞 24 h 后,用 100  $\mu$ mol/L tBHP 处理 6 h。细胞均使用 2',7'-二氯化荧光素乙二酯(H2DCFDA)检测并通过荧光显微镜测量。

**1.5 EPCs 凋亡率测定** 除去细胞培养基后用 PBS 液冲洗 2 次,用 binding buffer 缓冲液重悬并调整细胞数达  $1 \times 10^6$ /mL 后,用 4% 的多聚甲醛固定 15 min,用 2.5  $\mu$ g/mL DAPI 染核 20 min,在荧光显微镜下拍摄细胞图像并对细胞核形态进行观察。活细胞核经染色后在荧光显微镜下呈现弥散均匀荧光,当细胞发生凋亡时,浓染致密的颗粒块状荧光可出现在细胞核或细胞质内,出现不同程度的细胞核固缩,DNA 荧光碎片(凋亡小体)显现。分别选取镜下 5 个视野,计数细胞 100 个并计算细胞凋亡小体形成率(凋亡小体细胞数/总的细胞数 $\times$ 100%),取 5 次实验结果的平均值评价细胞凋亡率。

**1.6 细胞内活性氧(ROS)水平测定** 采用 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平。接种于 96 孔板,经药物处理后的各组 EPCs,用 10  $\mu$ mol/L DCFH-DA 荧光探针的培养液于 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min,用无血清细胞培养液洗 3 次以去除探针,酶标仪检测 DCF,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm。DCF 相对荧光强度(%)=实验组的荧光值/对照组的荧光值 $\times$ 100%。

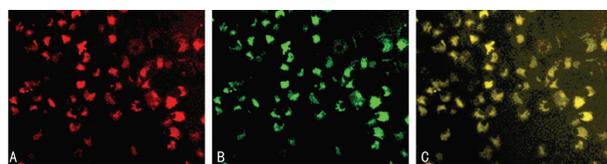
**1.7 测定线粒体膜电位** 细胞线粒体膜电位采用 JC-1 法测定。96 孔板接种细胞液,经药物处理后各组 EPCs 液吸除培养基,使用 PBS 液冲洗 2 遍,并滴加 100  $\mu$ L 阳离子脂质荧光染料 JC-1 工作液,在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 20 min 后,使用  $1 \times$  Incubation Buffer 孵育液清洗 2 遍,使用荧光显微镜观察。JC-1 因浓度不同以不同形态存在,低浓度时为单体,高浓度时为多聚体,其发射光谱各异,线粒体膜电位的变化检测基础为:JC-1 透过正常细胞膜以单体状态存在于细胞内,正常细胞线粒体膜电位( $\Delta\Psi$ )具有极性,依赖于膜电位的极性 JC-1 被迅速

摄入细胞线粒体内,并因浓度不断增高而在线粒体内形成多聚体,并呈现红色荧光;在线粒体膜通透性发生改变时,由于线粒体膜电位去极化,线粒体内释放 JC-1,多聚体分解,红光强度减弱,胞质内 JC-1 逐渐以单体形式存在并呈绿色荧光。

**1.8 统计学处理** 用 SPSS13.0 进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,使用单因素方差分析及 *t* 检验进行统计, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 EPCs 的形态与鉴定** 体外培养 48 h 后,EPCs 集落出现,4 d 后多数集落均已形成,第 7 天后加入 FITC-UEA-I 和 DiI-Ac-LDL 染色,荧光显微镜下观察 90% 细胞吞噬 DiI-Ac-LDL 并呈现红色,吞噬 FITC-UEA-I 并呈现绿色,染色显示阳性(图 1)。采用 FITC 标记的鼠抗人 CD34、PE 标记的鼠抗人 CD133 以及 PE 标记的鼠抗人 VEGF-R2 抗体标记细胞表面并使用流式细胞仪检测,结果显示:CD34、D133 及 VEGF-R2 阳性率分别为(66.3 $\pm$ 6.3)%、(89.5 $\pm$ 5.3)%和(93.1 $\pm$ 8.3)%,证实分离培养的细胞为 EPCs。



A:DiI-Ac-LDL;B:FITC-UEA-I;C:二者融合。

图 1 EPCs 荧光染色( $\times$ 100)

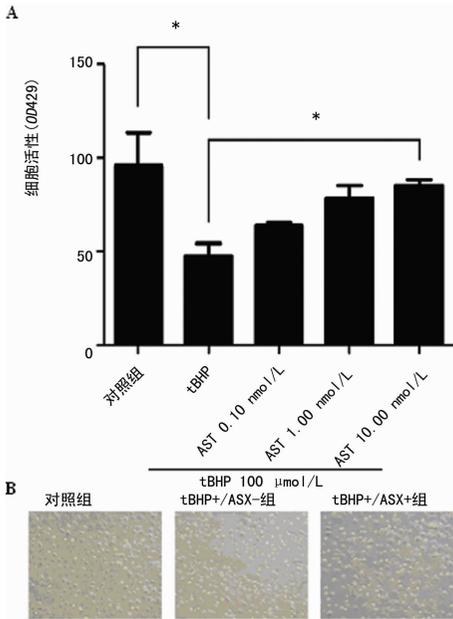
**2.2 tBHP 损伤 EPCs 模型的建立** MTT 检测结果显示:经不同浓度 tBHP 诱导 EPCs 凋亡 6 h 后,细胞存活率与 tBHP 浓度呈现负相关关系。当 tBHP 浓度达 30  $\mu$ mol/L 时,EPCs 细胞存活率达(83.61 $\pm$ 10.12)%,tBHP 浓度达 60  $\mu$ mol/L 时,存活率达(65.11 $\pm$ 8.86)%,120  $\mu$ mol/L 时,存活率达(34.72 $\pm$ 13.22)%,至最大浓度 240  $\mu$ mol/L 时,细胞大部分死亡,细胞存活率下降至(6.34 $\pm$ 4.66)%,与对照组(100%)相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。当 100  $\mu$ mol/L tBHP 下,细胞存活率维持在 50% 左右,后续实验选择在该条件下建立的 tBHP 诱导 EPCs 氧化损伤模型。

**2.3 ASX 对 tBHP 诱导 EPCs 凋亡细胞存活率下降的影响** 使用不同浓度(0.10、1.00、10.00 nmol/L)的 ASX 预处理培养的内皮祖细胞 24 h,随后用 100  $\mu$ mol/L 的 tBHP 处理 6 h。图 2A:在不同条件下,所有的细胞活力检测均采用 3 个复孔,每个实验至少重复 3 次。图 2B 显微照片清晰显示 10 nmol/L 的 ASX 能有效抑制 tBHP 介导的细胞凋亡。MTT 检测结果显示,预实验中 0.10、1.00、10.00 nmol/L 的 ASX 不影响 EPCs 的存活率。与损伤模型组相比,细胞存活率与 ASX 浓度呈剂量依赖性,当 ASX 的浓度达到 10 nmol/L 时,细胞存活率从 47.6% 上升至 85.3%,显著提高 EPCs 存活率( $P < 0.05$ )。

**2.4 ASX 对 tBHP 诱导 EPCs 凋亡的影响** 使用不同浓度(0.10、1.00 及 10.00 nmol/L)的 ASX 预处理培养的内皮祖细胞 24 h,随后用 100  $\mu$ mol/L 的 tBHP 处理 6 h,细胞使用 DAPI 荧光染色 20 min,固定并经荧光显微镜成像。图 3A:未处理的细胞呈现均匀染色的细胞核;经 tBHP 处理过得细胞变得更小,出现核碎裂与核固缩。经 tBHP 与 10 nmol/L ASX 处理过得细胞核变化更少。图 3B:随着 ASX 剂量的增加细胞凋亡率呈现下降趋势。

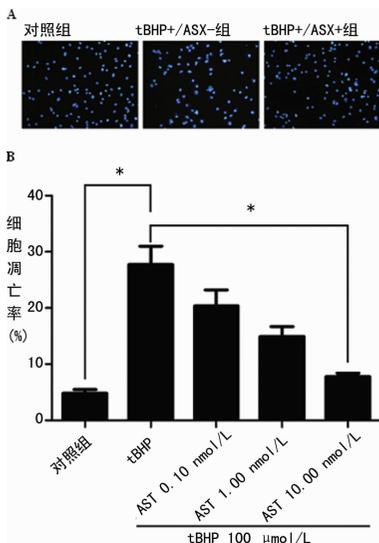
通过检测 DAPI 染色细胞分析 ASX 对 tBHP 引起 EPCs 凋亡的影响作用。用 100  $\mu$ mol/L tBHP 液对 EPCs 处理 6 h

后,EPCs 细胞核出现典型的凋亡形态学改变,与对照组相比,细胞染色质浓缩,核固缩显现,凋亡小体显著增多,经 ASX 预处理 EPCs 24h 后,细胞凋亡状况显著改善,随着 ASX 浓度的不断增加,抑制凋亡现象逐步增强,当 ASX 达 10.00 nmol/L 时,抑制效果最为显著。对凋亡小体进行统计分析,100  $\mu$ mol/L tBHP 损伤 6 h 组 EPCs 凋亡小体形成率为(27.8 $\pm$ 3.2)%,较对照组(4.8 $\pm$ 0.7)%显著增多,差异有统计学意义( $P<0.05, n=6$ ),EPCs 经 0.10、1.00、10.00 nmol/L ASX 预处理 24 h 后,再用 100  $\mu$ mol/L tBHP 液处理 EPCs 6 h 后,细胞凋亡小体形成率分别为(20.4 $\pm$ 2.9)%、(14.9 $\pm$ 1.7)%、(7.8 $\pm$ 0.7)% ( $P<0.05, n=6$ ),提示 ASX 能有效抑制 tBHP 诱导的 EPCs 细胞凋亡,见图 3。



A:ASX 对 tBHP 诱导的内皮祖细胞凋亡的保护;B:各组 EPCs 存活率观察; \* : $P<0.05$ 。

图 2 虾青素对叔丁基过氧化氢诱导内皮祖细胞凋亡的保护作用

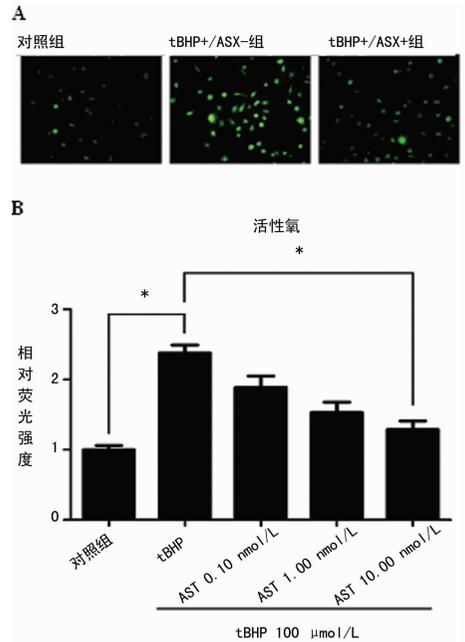


A:各组 EPCs 凋亡检测;B:细胞凋亡情况; \* : $P<0.05$ 。

图 3 ASX 对 tBHP 诱导 EPCs 凋亡的影响

2.5 ASX 对细胞内 ROS 的影响 tBHP 渗透进入细胞,迅速转化为叔丁氧基,并进而促进细胞内 ROS 的形成。DCHF-DA

是检测细胞内 ROS 的分子探针,其本身无荧光,当它进入细胞与细胞内 ROS 结合时,产生一种荧光物质 DCF,DCF 的荧光强度反映了细胞内 ROS 水平。本实验检测结果显示,100  $\mu$ mol/L tBHP 损伤组,EPC 细胞内 ROS 水平显著增加;而经 ASX 预处理组,EPCs 细胞内 ROS 水平呈剂量依赖性降低,在 10.00 nmol/L ASX 浓度时,降低 ROS 水平最为显著,荧光强度较损伤模型组明显减弱,见图 4。图 4A:DCF 的荧光强度反映细胞内活性氧的增加。图 4B:ASX 降低 tBHP 诱导 EPCs 细胞中活性氧产生的剂量依赖效果。



A:各组细胞活性氧荧光检测;B:各组细胞活性氧荧光强度检测; \* : $P<0.05$ 。

图 4 ASX 抑制 tBHP 诱导增加细胞内活性氧

2.6 EPCs 线粒体膜电位检测 对照组呈现黄绿色,经 100  $\mu$ mol/L tBHP 处理 6 h(tBHP+/ASX-组)后,因细胞线粒体膜电位丢失,绿色荧光强度明显增强,而 tBHP+/ASX+组的 EPCs 经 10 nmol/L ASX 预处理 24 h 后,细胞线粒体膜电位丢失得到有效抑制,黄绿色荧光强度增加,但较对照组稍偏绿,提示 ASX 能抑制 tBHP 引起的 EPCs 线粒体膜电位去极化,从而提高线粒体膜电位水平,进而对线粒体膜电位丢失促发的 EPCs 凋亡具有一定的保护作用,见图 5。tBHP+/ASX-组:使用 100  $\mu$ mol/L tBHP 处理 EPCs 细胞 6 h。tBHP+/ASX+组:使用 10 nmol/L ASX 孵育 EPCs 细胞 24 h 后,用 100  $\mu$ mol/L tBHP 处理 6 h。

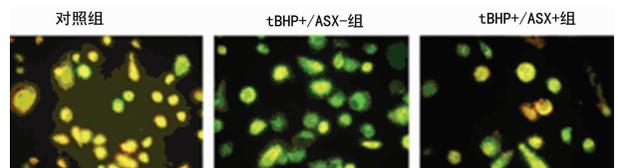


图 5 ASX 对 EPCs 线粒体膜电位的作用

3 讨 论

ROS 是细胞凋亡的第二信使<sup>[8]</sup>,近年来的研究证实了氧化应激发生时,氧化还原失衡引发的 ROS 过度升高,使内皮祖细胞凋亡和损伤进一步加重,内皮祖细胞数量和功能下降,严重影响血管内皮修复作用,容易引发再内皮化不全或延迟,使不良心血管事件发生概率增加。

ASX 是一种酮式类胡萝卜素,  $C_{40}H_{52}O_4$  为其分子式, 相对分子质量达 596.86, 最早在雨生红球藻类细胞在较长时间环境胁迫影响下, 应急产生的一种多种生物活性物质, 抗氧化活性极高, 对细胞内氧化应激造成的损伤具有抑制作用<sup>[9]</sup>, tBHP 作为构建细胞氧化损伤模型的常用试剂, 化学性质与过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 相似, 但 tBHP 性能更为稳定, 不易降解, 能有效模拟氧化应激损伤, 对细胞膜结构直接破坏, 最终达到破坏细胞或线粒体膜的作用<sup>[10]</sup>。

细胞凋亡是多基因、多种分子参与的复杂生命过程<sup>[11]</sup>。本研究使用 DAPI 检测发现 tBHP 能明显引发内皮祖细胞的凋亡, 单纯 ASX 对内皮祖细胞不产生损伤作用, ASX 能有效抑制 tBHP 诱导的内皮祖细胞凋亡。

线粒体是最重要的细胞凋亡调控靶点, 同时, 线粒体还是 ROS 的主要来源, 并易受氧化应激损伤。研究表明, 胞浆内 ROS 可作为信号诱导线粒体通透转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的开放、钙离子内流和线粒体电子传递链解偶联, 同时促进自身线粒体及其他线粒体产生 ROS, ROS 升高又进一步诱导 MPTP 开放, 两者互为因果, 形成恶性循环<sup>[12]</sup>。线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 下降是 MPTP 开放的表征, MMP 下降, 氧化磷酸化解偶联, 线粒体基质肿胀, 外膜破裂, 导致各种凋亡因子包括最重要的细胞色素 C 释放于胞质中, 细胞线粒体途径凋亡级联反应被启动, 使细胞凋亡速度加快。本实验结果显示, 与空白对照组相比, 经 tBHP 损伤的组细胞体内 ROS 显著增加, 线粒体膜电位明显下降, 而 ASX 预处理的组内皮细胞内 ROS 水平较损伤组显著降低, 线粒体膜电位明显增高, 提示 tBHP 增加细胞内 ROS, 降低 EPCs 线粒体膜电位, 诱导线粒体途径细胞凋亡的发生, 而 ASX 能显著减少细胞体内 ROS 的生成, 促使 EPCs 线粒体膜电位升高, 发挥对 tBHP 诱导线粒体途径细胞凋亡的抑制作用。

综上所述, 本研究显示: 通过提高线粒体膜电位, ASX 有效抑制线粒体氧化应激损伤, 从而减少细胞内 ROS 生成, 最终抑制了 EPCs 凋亡的发生。本研究在实验层面证实了 ASX 具有抗氧化应激损伤, 改善 EPCs 数量, 提高细胞功能, 促进损伤血管再内皮化的作用。

#### 参考文献:

- [1] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10): 999-1007.
  - [2] Ingram DA, Krier TR, Mead LE, et al. Clonogenic endo-
- (上接第 3463 页)
- 诱导大鼠肝移植免疫耐受的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(10): 1670-1673.
- [9] Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, et al. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells including suppressors of alloreactivity [J]. *Immunol Rev*, 2006, 212: 314-329.
  - [10] Lechler RI, Garden OA, Turka LA. The complementary

thelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 297-304.

- [3] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 999-1007.
- [4] Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2008, 4(4): 275-286.
- [5] Manabe E, Handa O, Naito Y, et al. Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(6): 1925-1937.
- [6] Kim JH, Choi W, Lee JH, et al. Astaxanthin inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated apoptotic cell death in mouse neural progenitor cells via modulation of P38 and MEK signaling pathways [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(11): 1355-1363.
- [7] Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Zhan L, et al. Cardioprotective efficacy of a novel antioxidant mix VitaePro against ex vivo myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2): 281-286.
- [8] Dong LY, Jin J, Lu G, et al. Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(3): 960-974.
- [9] Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, et al. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress [J]. *Blood*, 2004, 104(12): 3591-3597.
- [10] Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease [J]. *J Cardiol*, 2008, 101(10 Suppl): S58-68.
- [11] Haidara K, Morel I, Abalea V, et al. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1542(1/3): 173-185.
- [12] Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(11): 1895-1907.

(收稿日期: 2014-04-08 修回日期: 2014-07-25)

roles of deletion and regulation in transplantation tolerance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2): 147-158.

- [11] Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance [J]. *Transpl Immunol*, 2002, 10(2/3): 101-108.

(收稿日期: 2014-03-21 修回日期: 2014-06-24)