

黄芪甲苷改善过氧化氢诱导的人主动脉内皮细胞氧化应激损伤的研究

陈宇琼, 孙东岳, 吴恒芳, 卞智萍, 陈相健*, 杨 笛*

(南京医科大学第一附属医院心脏科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**研究黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs)氧化应激损伤的改善作用。**方法:**体外培养的 HAECs 经饥饿处理后分为对照组、H₂O₂ 损伤组及 AS-IV 治疗组。H₂O₂ 损伤组细胞经 H₂O₂ (400 μmol/L) 持续损伤 36 h, AS-IV 治疗组细胞经 H₂O₂ 损伤 12 h 后加入含 50 μg/mL AS-IV 的培养基继续干预处理 24 h。观察 AS-IV 对 H₂O₂ 诱导的 HAECs 氧化应激损伤及线粒体功能损伤的修复作用。**结果:**H₂O₂ 损伤后 HAECs 丙二醛(MDA)含量、NADPH 氧化酶活性及线粒体活性氧(ROS)水平显著增加,超氧化物歧化酶(SOD)和锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)活性及线粒体膜电位显著降低;H₂O₂ 损伤的 HAECs 经 AS-IV 治疗后,HAECs 的 MDA 含量、NADPH 氧化酶活性及线粒体 ROS 含量明显降低,SOD 和 Mn-SOD 活性及线粒体膜电位显著增高。**结论:**AS-IV 对 H₂O₂ 诱导的 HAECs 氧化应激损伤具有保护作用,提高线粒体的抗氧化功能是其可能的机制之一。

[关键词] 黄芪甲苷;人主动脉内皮细胞;线粒体;过氧化氢

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-949-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20170806

Astragaloside IV attenuates H₂O₂ induced oxidative stress in human aortic endothelial cells

Chen Yuqiong, Sun Dongyue, Wu Hengfang, Bian Zhiping, Chen Xiangjian*, Yang Di*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the beneficial effects of astragaloside IV (AS-IV) on oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured human aortic endothelial cells (HAECs). **Methods:** HAECs were cultured in vitro and randomly divided into Control group, H₂O₂ treated group, and AS-IV treated group. The cells were treated with H₂O₂ (400 μmol/L) for 36 hours as H₂O₂ group. For AS-IV treatment, the cells were first treated with H₂O₂ for 12 hours, then AS-IV (50 μg/mL) were added into culture medium for 24 h. After 36 h, all the cells were examined for oxidative stress injury and mitochondrial antioxidative function. **Results:** Compared with the Control cells, the addition of H₂O₂ significantly increased the MDA content, NADPH oxidase activity, and mitochondrial ROS content of the cells, whereas the SOD activity, Mn-SOD activity and mitochondrial transmembrane potential level were significantly decreased. The administration of AS-IV significantly decreased NADPH oxidase activity, MDA content and mitochondrial ROS content, and increased SOD activity, Mn-SOD activity and mitochondrial transmembrane potential level, compared with those of H₂O₂ treated injured cells. **Conclusion:** In the present study, AS-IV attenuates H₂O₂ induced oxidative stress in HAECs. The enhancement of mitochondrial antioxidant function by AS-IV may be one of the possible pathways of AS-IV to protect HAECs from oxidative stress.

[Key words] astragaloside IV; human aortic endothelial cells; mitochondria; hydrogen peroxide

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):949-954]

[基金项目] 科技部国家重点研发计划(2016YFA0201304);江苏自然科学基金(BK20151587)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: diyang@njmu.edu.cn, chenxiangjian@njmu.edu.cn

血管内皮细胞的氧化应激损伤是多种心血管疾病的早期始动环节和病理生理改变基础,线粒体损伤是氧化应激损伤中的重要环节^[1]。线粒体作为氧化应激损伤的主要靶点之一,在受到活性氧(reactive oxygen species,ROS)损伤后不仅会导致内皮细胞能量生成及利用障碍,还会参与到 ROS 产生与释放的恶性循环,由此导致细胞功能障碍甚至细胞凋亡及死亡^[2-3]。因此寻找有效的治疗药物以改善线粒体抗氧化功能对缓解内皮细胞损伤,从而改善多种心血管疾病的预后具有重要意义。

黄芪甲苷(astragaloside IV,AS-IV)是黄芪的有效活性成分之一,具有心血管药理活性,其机制可能与抗炎、抗凋亡、抗纤维化、减轻脂质过氧化、改善能量代谢、减轻钙超载等多种功能相关^[4-5]。本实验室前期实验发现在血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞氧化应激损伤中,AS-IV 能够通过改善线粒体形态及能量代谢保护细胞功能^[6-7],但 AS-IV 在血管内皮细胞损伤中的作用及机制尚待阐明。

本研究将用过氧化氢(hydrogen peroxide,H₂O₂)损伤人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells,HAECs),再用 AS-IV 干预,研究 AS-IV 对内皮细胞氧化应激损伤的作用及其可能机制,以期为研究 AS-IV 的心血管药理作用提供新的实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

HAECs 来自南京医科大学第一附属医院心血管病研究所,该细胞为实验室原代分离并鉴定后培养保存。本实验所采用的细胞均为 3~5 代 HAECs。

DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(Gibco 公司,美国);H₂O₂ 溶液(30%)、二甲基亚砷、内皮细胞生长添加物、非必需氨基酸溶液($\times 100$)、L-谷氨酰胺、青/链霉素溶液、明胶(Sigma 公司,美国);AS-IV(南京春秋生物工程公司);CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒(Biosharp 公司,美国);MitoSOX™ 线粒体内 ROS 指示剂(Invitrogen 公司,美国);丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)和含铜与锌(CuZn)/含锰(Mn)-超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);NADPH 氧化酶活性光度法定量检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司);激光共聚焦显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组和细胞处理

在预实验中,首先以不同浓度梯度的 H₂O₂ 处理 HAECs,通过检测细胞活力确定 H₂O₂ 的工作浓度(400 $\mu\text{mol/L}$),之后以同样方法确定本实验 AS-IV 工作浓度(50 $\mu\text{g/mL}$)。

本实验将 HAECs 分为 3 组。①对照组:用内皮细胞培养基培养 36 h;②H₂O₂ 损伤组:用含 400 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 的内皮培养基培养 36 h;③AS-IV 治疗组:用含 400 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ + 50 $\mu\text{g/mL}$ AS-IV 的培养基培养 24 h。实验结束后同时检测各组的细胞活力,氧化应激损伤及线粒体功能。

1.2.2 细胞活力及细胞形态检测

实验干预结束后应用 CCK-8 法检测各组细胞活力,吸出 96 孔板各孔中的培养基,并于每孔中重新加入 100 μL 内皮细胞培养基 + 10 μL CCK-8 溶液,静置培养箱 4 h 后用酶标仪测定各组细胞在 450 nm 处的吸光度值。以对照组细胞活力为 100% 进行标准化,各实验组细胞活力等于该组吸光度值与对照组吸光度值的百分比。细胞形态检测通过倒置相差显微镜观察、拍照并进行形态对比。

1.2.3 MDA 含量检测

HAECs 细胞经分组处理后消化、离心并收集,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 洗涤后冰浴条件下机械匀浆并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,离心后收集匀浆上清液。按照 MDA 测定试剂盒操作说明书进行检测,所得数值均依据说明书公式进行计算。

1.2.4 NADPH 氧化酶活性检测

HAECs 细胞经分组处理后加入 NADPH 检测试剂盒提供的清理液混匀、离心、收集,随后加入裂解液裂解细胞,冰浴槽孵育后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,取上清液,测定上清蛋白浓度。按照 NADPH 氧化酶活性检测试剂盒操作说明进行检测,在分光光度仪 340 nm 波长处读取初始(0 min)及 5 min 后各组实验的吸光度值,利用所得数值对 NADPH 氧化酶活性进行计算。

1.2.5 细胞总 SOD 及线粒体 Mn-SOD 活性检测

HAECs 分组处理后,消化并收集细胞沉淀,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 洗涤后冰浴条件下机械匀浆,随后将匀浆液 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,取上清液,测定蛋白浓度。按照细胞总 SOD 及线粒体 Mn-SOD 活性检测试剂盒操作说明进行检测,在酶标仪 450 nm 测定各样品吸光度。

所得数值依据说明书计算并根据蛋白浓度进行校正。

1.2.6 线粒体 ROS 检测

HAECs 分组处理后, 各组细胞与红色 MitoSOX™ 线粒体 ROS 探针在 37 °C 条件下共孵育 10 min, 再用 PBS 洗涤细胞 3 次。激光共聚焦显微镜 400 倍放大视野下观察并拍照。Image J 软件测定各组细胞的平均光密度。

1.2.7 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)检测

HAECs 分组处理后, 加入试剂盒中的 JC-1 线粒体染色工作液在 37 °C 条件下孵育 20 min 标记细胞, 之后用 JC-1 染色缓冲液轻柔洗涤 3 次, 于激光共聚焦显微镜 400 倍视野下观察、拍照并测定细胞红光和绿光的荧光强度(IOD)。线粒体受损后, 线粒体膜电位去极化, 经试剂盒染色后发出绿光, 而正常线粒体发出红光。线粒体膜电位与绿光 IOD/红光 IOD 的比值成负相关, 即线粒体损伤越重, 绿光 IOD/红光 IOD 的比值越高, 线粒体膜电位水平越低。

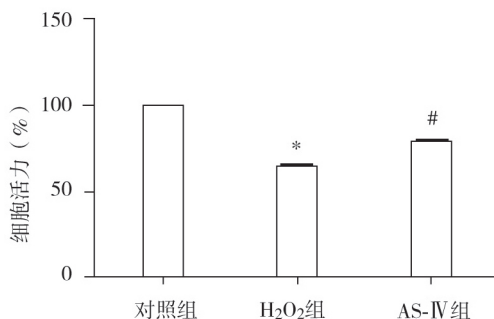
1.3 统计学方法

所有实验均重复 4~6 次, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 用 SPSS18.0 软件对 3 组数据进行单因素方差分析, 多重对比采用 LSD 分析, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS-IV 对细胞活力及细胞形态的作用

相比于对照组细胞, H_2O_2 损伤后细胞活力明显降低, 约为正常组细胞活力的 65%。AS-IV 治疗后细胞活力明显增高, 较损伤组提高约 22%(图 1)。



与对照组比较, * $P<0.05$; 与 H_2O_2 组比较, # $P<0.05$ ($n=6$)。

图 1 AS-IV 提高 H_2O_2 损伤后的细胞活力

Figure 1 AS-IV improves cell viability after H_2O_2 injury

对照组细胞贴壁牢固, 细胞间连接紧密, 细胞呈多角型或短梭形, 边界清楚, 大小均匀, 呈鹅卵石铺路样排列。 H_2O_2 损伤后细胞贴壁面积减少, 胞体变

圆变小, 细胞间隙增宽, 部分包膜不完整, 有较多细胞脱落, 并形成大片脱失区。 AS-IV 组形态介于对照组与 H_2O_2 组之间, 细胞形态良好, 细胞间隙较 H_2O_2 组缩小, 细胞脱落较少。

2.2 AS-IV 对细胞氧化应激损伤的作用

与对照组相比, 损伤组细胞 MDA 含量显著上升, 约为对照组的 5 倍; AS-IV 组 MDA 含量较损伤组明显降低, 约为损伤组的 1/2(图 2A)。损伤组细胞 NADPH 氧化酶活性也显著上升, 约为对照组的 3 倍; AS-IV 治疗后, NADPH 氧化酶活性较损伤组明显下降(图 2B)。相比于对照组, 损伤组细胞总 SOD 活性明显降低, 约为对照组细胞的 44%; 经 AS-IV 治疗后细胞总 SOD 活性明显提高, 较损伤组提高约 23%(图 2C)。

2.3 AS-IV 对线粒体 ROS 水平的作用

在激光共聚焦显微镜下发现, 与对照组相比, 经 H_2O_2 损伤后细胞内线粒体 ROS 含量明显增多, 而 AS-IV 干预后, 细胞内线粒体 ROS 水平较 H_2O_2 组明显下降(图 3)。

2.4 AS-IV 对线粒体膜电位的影响

与对照组相比, H_2O_2 损伤组绿光 IOD/红光 IOD 比值明显提高, 表明损伤后线粒体膜电位水平降低。 AS-IV 治疗后, 该比值明显降低, 表明去极化的线粒体比值减少, 线粒体膜电位水平提高(图 4)。

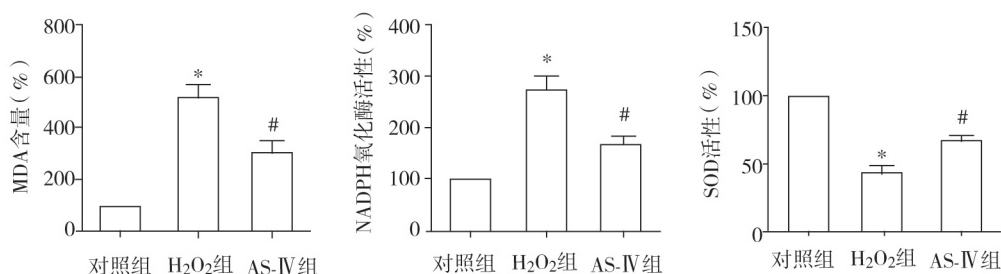
2.5 AS-IV 对线粒体 Mn-SOD 的影响

与对照组相比, H_2O_2 组 Mn-SOD 活性显著下降, 约为正常对照组的 54%。相比于损伤组, AS-IV 组 Mn-SOD 活性明显增加, 较损伤组提高约 23%(图 5)。

3 讨论

AS-IV 是黄芪中提取的有效活性物质, 是一种抗氧化剂^[8], 可以降低细胞和组织的氧化应激水平, 改善细胞活性和组织器官功能状态^[5]。 本实验结果发现, H_2O_2 可以明显降低 HAECs 细胞活力, 造成细胞氧化应激损伤, 损害线粒体抗氧化功能, AS-IV 干预可以明显提高细胞活性, 改善细胞氧化应激损伤, 提高线粒体的抗氧化作用。

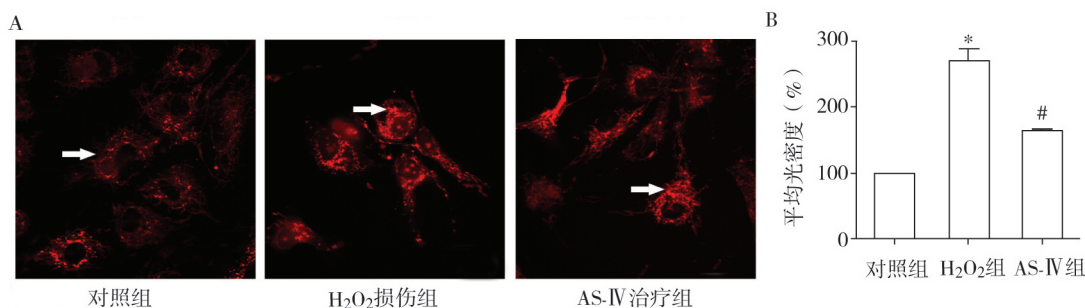
H_2O_2 是引起血管损伤的物质之一, 能够促进羟自由基的产生, 进而氧化生物大分子诱发血管内皮细胞损伤^[9]。 本实验采取的 H_2O_2 损伤浓度区间为 100~ 800 $\mu\text{mol/L}$, 在 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 进行损伤时细胞活力降低并且处于可逆转范围, 结合相关实验, 本实验最终采用 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作为损伤工作浓度^[10]。 预实验中发现 AS-IV 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度内对



与对照组比较,* $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较,# $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 2 AS-IV降低细胞氧化应激损伤的作用

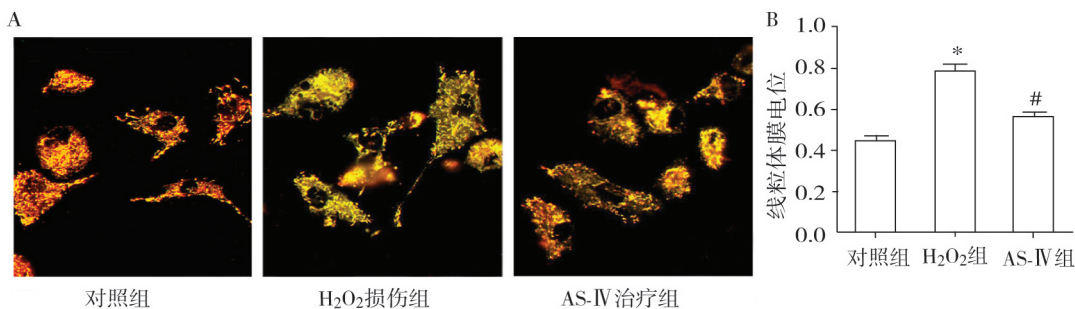
Figure 2 AS-IV attenuates oxidative stress injury



A:各组细胞线粒体 ROS 荧光图($\times 400$);B:各组细胞线粒体 ROS 定量对比图。与对照组比较,* $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较,# $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 3 AS-IV减少线粒体 ROS 含量

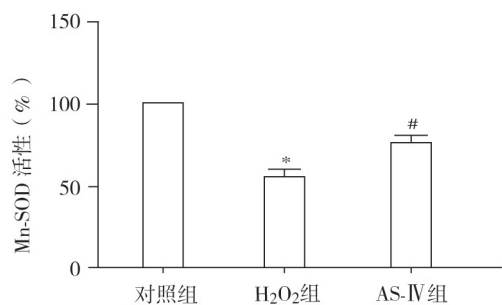
Figure 3 AS-IV decreases mitochondrial ROS content



A:各组线粒体膜电位荧光图($\times 400$);B:各组线粒体膜电位定量对比图。与对照组比较,* $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较,# $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 4 AS-IV提高线粒体膜电位水平

Figure 4 AS-IV improves mitochondrial transmembrane potential level



与对照组比较,* $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较,# $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 5 AS-IV 增强线粒体 Mn-SOD 活性

Figure 5 AS-IV enhances Mn-SOD activity

HAECs 具有保护作用并与其浓度呈线性相关,本实验采取 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AS-IV 用于后续实验。

ROS 过度蓄积介导的内皮细胞氧化应激损伤与多种心血管疾病的发病机制密切相关,如心肌缺血再灌注损伤、动脉粥样硬化、高血压、心衰等^[11-12]。在氧化应激损伤中线粒体功能损害是导致细胞结构和功能紊乱的重要机制之一^[13]。有效地抑制线粒体 ROS 的产生或者清除线粒体 ROS,是改善线粒体功能及保护血管内皮细胞的重要方法^[14]。AS-IV 作为一种有效的抗氧化剂能从多个方面改善心血管功能损伤,如抗氧化应激、调节细胞能量代谢、减轻钙超载、

抗凋亡等^[15-16]。然而 AS-IV 是否能够通过改善线粒体功能以缓解内皮细胞氧化应激损伤尚未见报道。

MDA 是 ROS 攻击细胞膜多不饱和脂肪酸形成的脂质过氧化物,是评价 ROS 生成量和组织氧化损伤程度的重要标志物,其含量增高可以直接反映组织细胞氧化应激损伤加重^[17-18]。本实验结果显示 HAECs 经 H₂O₂ 损伤后细胞内 MDA 含量明显增加,而 AS-IV 可以有效降低细胞 MDA 含量,提示 H₂O₂ 损伤后 HAECs 细胞内脂质过氧化物明显增加,细胞受到氧化应激损伤。而 AS-IV 使受 H₂O₂ 损伤的 HAECs 细胞 MDA 生成量明显降低,提示 AS-IV 具有较强的对抗氧化应激的作用,与文献报道一致。NADPH 氧化酶是机体促 ROS 生成的主要酶类^[19],细胞内集聚的 ROS 会导致线粒体呼吸链解偶联,继而生成更多的线粒体 ROS,这一过程也会进一步激活 NADPH 氧化酶,导致 ROS 不断产生并蓄积的恶性循环^[19-20]。细胞体内 SOD 是细胞防御氧自由基损伤的关键酶类,是机体清除 ROS 的主要酶类之一^[21]。内皮细胞内 SOD 包括 Cu/Zn-SOD 及 Mn-SOD,Cu/Zn-SOD 主要存在于细胞胞浆内,Mn-SOD 主要存在于细胞线粒体内,二者均在维护 ROS 产生与清除的平衡中发挥着至关重要的作用^[22]。本实验发现 H₂O₂ 显著增加了细胞内 NADPH 氧化酶的活性,同时明显降低了细胞内 SOD 的活性。AS-IV 明显降低 NADPH 氧化酶的活性,并显著增加 SOD 活性。提示 AS-IV 可以通过降低 NADPH 氧化酶活性并提高 SOD 活性以逆转 H₂O₂ 导致的氧化应激损伤。

线粒体是细胞合成 ATP 的主要场所,为细胞活动提供能量^[23]。同时在细胞损伤中线粒体也是 ROS 的主要来源之一,细胞损伤会诱发线粒体肿胀,氧化呼吸链解偶联,继而通过氧化呼吸链生成大量的 ROS。提高线粒体的抗氧化功能,清除线粒体 ROS 是减轻细胞损伤以恢复细胞功能的主要途径之一^[24]。线粒体膜电位是线粒体发挥功能的必要前提,也是评价线粒体抗氧化功能损伤的标志物^[25-26],线粒体 ROS 蓄积诱发的线粒体膜电位去极化将导致细胞能量生成障碍,使细胞正常生理功能受限。Mn-SOD 具有清除氧自由基、平衡线粒体 ROS 产生与清除的作用,是线粒体内主要的抗氧化酶类^[27]。本实验结果显示 H₂O₂ 损伤后线粒体 ROS 含量明显增加,线粒体膜电位水平显著降低,Mn-SOD 活性明显降低,表明线粒体氧化应激损害加剧,线粒体膜电位严重去极化,线粒体抗氧化功能受损。而 AS-IV 治疗提高了 Mn-SOD 活性,降低了线粒体 ROS 含量,维护了

线粒体膜电位水平。据此推测,AS-IV 可以通过提升 Mn-SOD 活性,清除线粒体 ROS 并维护线粒体膜电位稳定,以提升线粒体的整体抗氧化功能。

本实验结果提示黄芪甲苷能够通过改善细胞氧化应激损伤以提高 H₂O₂ 损伤后的 HAECs 活性,通过增强 Mn-SOD 活性、降低线粒体 ROS 以改善线粒体抗氧化功能可能是其机制之一。

[参考文献]

- [1] Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases [J]. *Circ J*, 2009, 73(3): 411-418
- [2] Speijer D. How the mitochondrion was shaped by radical differences in substrates: what carnitine shuttles and uncoupling tell us about mitochondrial evolution in response to ROS [J]. *Bioessays*, 2014, 36(7): 634-643
- [3] Emiliano P, Massimo M. ROS signaling and redox biology in endothelial cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(17): 3281-3303
- [4] Sinclair S. Chinese Herbs: A clinical review of astragalus, ligusticum, and schizandrae [J]. *Altern Med Rev*, 1998, 3(5): 338-344
- [5] Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(3): 413-416
- [6] Lu Y, Li S, Wu H, et al. Beneficial effects of astragaloside IV against angiotensin II-induced mitochondrial dysfunction in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(5): 1223-1232
- [7] 路遥,徐晋妣,卞智萍,等.黄芪甲苷逆转血管紧张素 II 引起的主动脉平滑肌细胞线粒体功能障碍 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(7): 975-980
- [8] Zhao J, Yang P, Li F, et al. Therapeutic effects of astragaloside IV on myocardial injuries: multi-target identification and network analysis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44938
- [9] 陈海明,叶攀.丹参酮 II A 对血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. *中药材*, 2008, 31(4): 569-572
- [10] Hou X, Tong Q, Wang W, et al. Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways [J]. *Life Sci*, 2015, 130(6): 38-46
- [11] Ahwach SM, Thomas M, Onstead-Haas L, et al. The glutathione mimic ebselen inhibits oxidative stress but not endoplasmic reticulum stress in endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2015, 134(1): 9-15
- [12] Wu X L, Zheng B, Jin L S, et al. Chinese medicine

- Tongxinluo reduces atherosclerotic lesion by attenuating oxidative stress and inflammation in microvascular endothelial cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(6): 6323-6333
- [13] Sinha K, Das J, Pal PB, et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis [J]. *Arch Toxicol*,2013,87 (7): 1157-1180
- [14] Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants [J]. *FASEB J*,2015,29(12): 4766-4771
- [15] 刘天一, 何观虹, 姚 丽. 黄芪甲苷治疗心血管疾病研究进展 [J]. *中医药信息*,2013,30(2): 117-120
- [16] 张大伟, 徐晋妣, 卞智萍, 等. 黄芪皂苷 IV 通过 PKA 途径减轻缺氧/复氧心肌损伤的机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2012,32(1): 30-34
- [17] Bo L, Jiang S, Xie Y, et al. Effect of vitamin E and omega-3 fatty acids on protecting ambient PM2.5-induced inflammatory response and oxidative stress in vascular endothelial cells [J]. *PLoS One*,2016,11(3): e0152216
- [18] Yang B, Xu Y, Hu Y, et al. Madecassic Acid protects against hypoxia-induced oxidative stress in retinal microvascular endothelial cells via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Biomed Pharmacother*,2016,84(12):845-852
- [19] Kadowaki D, Anraku M, Sakaya M, et al. Olmesartan protects endothelial cells against oxidative stress-mediated cellular injury[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2015, 19 (6): 1007-1014
- [20] Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences [J]. *Antioxid Redox Signal*,2008,10 (2): 179-206
- [21] 张笑天, 郑晓瑛. 氧化自由基清除剂超氧化物歧化酶与疾病 [J]. *中国公共卫生*,2014,30(10): 1349-1352
- [22] 张少君, 吴恒芳, 陈相健, 等. 黄芪甲苷对肾血管性高血压大鼠主动脉内皮细胞线粒体损伤的保护作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2014,34(7): 889-893
- [23] Dikalov S I, Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2013,305(10): H1417-H1427
- [24] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling [J]. *Cardiovasc Res*,2009,81(3): 449-456
- [25] Wu H, Jiang C, Gan D, et al. Different effects of low- and high-dose insulin on ROS production and VEGF expression in bovine retinal microvascular endothelial cells in the presence of high glucose[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*,2011,249(9): 1303-1310
- [26] Wu SY, Xu GX, Peng YR, et al. Experimental study on the photodynamic treatment of choroidal neovascularization with nanophthalocyanine photosensitizer[J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(6): 575-581
- [27] Lu X, Wang C, Liu B. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix* [J]. *Fish Shellfish Immunol*,2015,42(1): 58-65

[收稿日期] 2017-01-07

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%,(2~6)×10³ 或 2×10³~6×10³,30~40 km。