

水飞蓟宾对异丙肾上腺素引起的大鼠乳鼠心肌细胞损伤的保护作用及其机制

周蓓¹, 吴立军², 田代真一³, 小野寺敏³, 内海文彰⁴, 池岛乔^{1*}

(沈阳药科大学 1. 中日医药研究所, 2. 天然药物研究室, 辽宁 沈阳 110016; 3. 昭和药科大学 病态科学研究室, 东京 194-8543, 日本; 4. 东京理科大学 药学部 遗传子制御学教研室, 野田 278-0021, 日本)

摘要: 水飞蓟宾 (silibinin) 为从菊科植物水飞蓟 (*Silybum marianum*) 的种子和果实中提取得到的黄酮类单体成分。本研究观察水飞蓟宾对 β -肾上腺素受体激动剂异丙肾上腺素对培养乳鼠心肌细胞损伤的影响, 并对其机制进行研究。采用 MTT 法测定细胞存活率, 酶联法测定细胞丙二醛 (maleic dialdehyde, MDA) 和细胞培养液中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的含量以及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性, 流式细胞仪测定线粒体膜电位 ($\Delta\Psi$), 以及 Western blotting 检测与线粒体相关蛋白的表达。与模型组相比, 水飞蓟宾使细胞受损伤的程度降低, 并且增加 SOD 的活性, 抑制了细胞膜电位的降低, 并且改善 Bcl-2 家族蛋白中 Bax/Bcl-2 的表达比率, 上调 Bax 上游去乙酰化酶 SIRT1 蛋白的表达。水飞蓟宾通过上调线粒体上游 Bax/Bcl-2 的表达比率与 SIRT1 蛋白的表达, 改善了线粒体的功能, 从而对由异丙肾上腺素引起的培养乳鼠心肌细胞损伤有明显的保护作用。

关键词: 水飞蓟宾; 心肌细胞; 损伤; 线粒体膜电位; Bcl-2 家族蛋白; SIRT1

中图分类号: R282.71; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)03 - 0263 - 06

Protective effect of silibinin against isoproterenol-induced injury to cardiac myocytes and its mechanism

ZHOU Bei¹, WU Li-jun², TASHIRO Shin-ichi³, ONODERA Satoshi³,
UCHIUMI Fumiaki⁴, IKEJIMA Takashi^{1*}

(1. China-Japan Research Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Department of Phytochemistry, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
3. Department of Clinical and Biomedical Sciences, Showa Pharmaceutical University, Tokyo 194-8543, Japan;
4. Department of Gene Regulation, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Chiba 278-0021, Japan)

Abstract: Silibinin is a polyphenolic flavanoid derived from fruits and seeds of milk thistle (*Silybum marianum*). To investigate the effect and mechanism of silibinin on β -isoproterenol-induced rat neonatal cardiac myocytes injury, the viability, the activation of lactate dehydrogenase (LDH) and the content of maleic dialdehyde (MDA) were chosen for measuring the degree of cardiac myocytes injury. Superoxide dismutase (SOD) activity, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) detected by flow cytometric analysis, and Western blotting analysis were applied to determine the related proteins. Silibinin protected isoproterenol-treated rat cardiac myocytes from death and significantly decreased LDH release and MDA production. Silibinin increased superoxide dismutase (SOD) activity, and increased mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$). Furthermore, the release of pro-apoptotic cytochrome c from mitochondria was reduced by silibinin. Silibinin increased the expression of anti-apoptotic Bcl-2 family protein Bcl-2, and up-regulation of SIRT1 inhibited the translocation of Bax from cytoplasm to mitochondria, which caused mitochondrial dysfunction and cell injury. Silibinin protects cardiac myocytes against isoproterenol-induced injury through resuming mitochondrial function and regulating the expression of SIRT1 and Bcl-2 family

收稿日期: 2006-07-07.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 24 - 23844463, E-mail: ikejimat@vip.sina.com

members.

Key words: silibinin; cardiac myocyte; injury; mitochondrial membrane potential; Bcl-2 family proteins; SIRT1

随着人口老龄化问题的日益突出,心脑血管疾病成为人类健康的第一杀手。近几年的研究已证实细胞凋亡与损伤现象普遍存在于心血管系统的许多生理及病理变化中^[1],心肌细胞完全分化,失去增殖与再生能力。因此,研究介导心肌细胞存活与死亡的信号传导途径对于心脏疾病的发生与治疗尤为重要^[2]。进一步研究表明,在心衰患者体内可以检测到高水平的异丙肾上腺素,体外实验同样证实,培养乳鼠心肌细胞通过 β 肾上腺素能途径引起细胞损伤^[3,4],提示 β 肾上腺素受体激动剂可能为心脏疾病中引起心肌细胞损伤的因素之一。因此,通过加入高浓度 β 肾上腺素受体激动剂异丙肾上腺素(isoproterenol)可以建立体外培养乳鼠心肌细胞损伤模型。水飞蓟宾(silibinin)为从菊科植物水飞蓟(*Silybum marianum*)的种子和果实中提取得到的黄酮类单体成分,临床用于肝炎的治疗,效果显著,成为在临床上广泛使用的药物之一^[5]。近三十年的临床经验证明,水飞蓟宾具有很强的抗氧化活性,能够抑制阿霉素对心肌细胞的毒性作用^[6]。另外,用麻醉大鼠冠状动脉前降支结扎造成心肌梗死及再灌注损伤模型,观察水飞蓟宾对心肌梗死范围及再灌注心律失常的作用,结果表明水飞蓟宾能显著降低结扎4h后的心肌梗死范围并可预防再灌注心律失常的发生^[7,8]。因此,本研究考察水飞蓟宾对异丙肾上腺素引起的大鼠乳鼠心肌细胞损伤的影响,以期探明其作用机制。

材料与方法

动物 新生24~72h的Sprague-Dawley(SD)大鼠乳鼠由沈阳药科大学实验动物中心提供。

药品与试剂 水飞蓟宾(silibinin)购自中国药品生物制品检定所,HPLC检测纯度大于99%,溶解于二甲基亚砜(DMSO,终浓度<0.001%)。异丙肾上腺素(isoproterenol)和5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2'-deoxy-uridine)均购自Sigma公司(St. Louis, MO, USA),DMEM培养基购自Hyclon公司(Logan, UT, USA),胎牛血清(北京元亨圣马生物试剂公司)。MDA,LDH及SOD试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。溴化乙啶(EB)、RNA酶A、蛋白酶K与噻唑蓝(MTT)均为Sigma公司产品。Bax,Bcl-2与

SIRT1多克隆兔抗体,Bcl-X_L与细胞色素c单克隆鼠抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗均购于Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)。

细胞培养 取1~3d龄的SD大鼠,分离心肌细胞,用含10%FBS的高糖DMEM培养液制成细胞悬液,于培养皿中置37℃,5%CO₂培养箱内,根据心肌细胞和成纤维细胞贴壁时间的不同,采用差速贴壁1h。用吸管轻轻吸取未贴壁细胞悬液,调整细胞密度,以细胞数 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于96孔板、6孔板或培养皿中,37℃,5%CO₂培养箱内静置培养,在心肌细胞培养液中加入BrdU($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),以抑制成纤维细胞的增殖。在倒置相差显微镜下动态观察细胞生长情况,根据情况2~3d换液。加药测试前24h换成含5%FBS的DMEM培养液进行细胞培养。培养板或培养皿在使用前用 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚赖氨酸涂层过夜,用无菌水洗净后吹干,使分离出的心肌细胞更易贴壁、存活^[9]。

心肌细胞损伤模型的制备 取培养2~3d的心肌细胞,分为:(1)对照组,用含5%胎牛血清的DMEM培养基;(2)模型组,即异丙肾上腺素诱导组,加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异丙肾上腺素于培养液中,继续培养48h;(3)给药组,用含5%胎牛血清的DMEM培养液配制水飞蓟宾至所需终浓度(50,100,300,500和 $700 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),预给药1h,再加入异丙肾上腺素(终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养48h后,观察各项指标的变化。

细胞生长存活率实验 将分离的心肌细胞接种于96孔培养板中(细胞数 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$),每孔100 μL ,培养48h后,加入异丙肾上腺素(终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),同时设平行孔3个。对照组加入含0.001% DMSO的培养液(不含药物),给药组加入异丙肾上腺素(终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与不同浓度的水飞蓟宾于37℃,5%CO₂条件下继续培养48h,用MTT法^[10]测定吸收度(A)值,绘制时效反应曲线。

MDA含量测定 按照MDA试剂盒使用说明书测定心肌培养细胞的MDA含量。即收集细胞,加入20%TCA孵育20min后,加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl与0.67%TBA95℃水浴1h,4℃,250 \times g离心10min,紫外可见分光光度计于532nm测定吸收度值。

LDH含量测定 采用酶联法,按照 LDH 试剂盒使用说明书测定心肌细胞培养液中释放的 LDH 的含量。收集细胞培养液,加入 LDH 反应缓冲液,反应 5 min 后于 490 nm 测定吸收度值。

SOD活性测定 采用黄嘌呤氧化酶法,按照 SOD 试剂盒使用说明书测定心肌培养细胞的 SOD 活性。每个细胞样品中加入 WST 工作液与酶工作液,37 ℃ 孵育 20 min,在 540 nm 测定吸收度值。

线粒体膜电位观察^[11] 采用若丹明 123 (rhodamine 123, Rh123, 10 mg · L⁻¹, Molecular Probes, 溶于 PBS) 对细胞进行线粒体染色,运用流式细胞仪进行线粒体膜电位定量分析。

免疫印记法检测细胞色素 c, Bax, Bcl2 与 Bcl-X_L, SIRT1 蛋白的表达 收集细胞 (1 × 10⁶ 个),冰上裂解 1 h,提取细胞内蛋白,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),转印到硝酸纤维素膜上,利用特异性的抗体 (兔多克隆抗体 Bax, Bcl-2, SIRT1, 鼠单克隆抗体 Bcl-X_L, 细胞色素 c) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗检测,用 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 作为 HRP 底物显色^[12]。

细胞胞浆及线粒体提取物的制备 收集细胞,加入匀浆缓冲液 100 μL 匀浆,4 ℃ 离心 (150 × g) 30 min,上清液为胞浆提取物。沉淀部分为线粒体,加入裂解液 100 μL 冰上裂解 1 h,16 000 × g 离心 30 min,上清液为线粒体提取物^[13]。

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间显著性检验采用方差分析及 Student's *t* 检验。

结果

1 水飞蓟宾对由异丙肾上腺素引起的心肌细胞损伤的影响

1.1 水飞蓟宾抑制异丙肾上腺素引起的心肌细胞存活率降低 水飞蓟宾 (0 ~ 700 μmol · L⁻¹) 作用于细胞 1 h,加入异丙肾上腺素 (终浓度 10 μmol · L⁻¹) 继续培养 48 h 后,用 MTT 法测定细胞的存活率 (图 1)。水飞蓟宾对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞存活率的降低具有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性。心肌细胞的存活率由单独使用异丙肾上腺素的 (41.2 ± 1.6)% 上升到同时加入水飞蓟宾 (500 μmol · L⁻¹) 的 (91.8 ± 3.3)%。单独使用水飞蓟宾的细胞存活率未见变化,表明水飞蓟宾在所用浓度范围内没有细胞毒作用。

1.2 水飞蓟宾降低异丙肾上腺素引起的心肌细胞

MDA含量增加 对照组中检测到的 MDA 含量为 (1.45 ± 0.28) nmol · mL⁻¹。与对照组相比,模型组的 MDA 含量显著增加,为 (3.05 ± 0.35) nmol · mL⁻¹。加入水飞蓟宾,可明显减少 MDA 含量,且呈剂量依赖性 (表 1)。

1.3 水飞蓟宾减少异丙肾上腺素引起的心肌细胞 LDH 释放增加 异丙肾上腺素可引起 LDH 大量释放到培养液中,而水飞蓟宾可明显减少培养液中的 LDH 含量 (表 1)。结果表明,水飞蓟宾对心肌细胞的损伤有明显的保护作用。

2 水飞蓟宾对心肌细胞 SOD 活性的影响

与对照组相比,模型组的 SOD 活性显著降低,加入水飞蓟宾可显著增强 SOD 活性 (表 2)。结果显示,水飞蓟宾可以增强机体清除氧自由基的能力,保护细胞免受损伤。

3 水飞蓟宾对心肌细胞膜电位的影响

用 Rh123 对心肌细胞线粒体进行染色,用流式

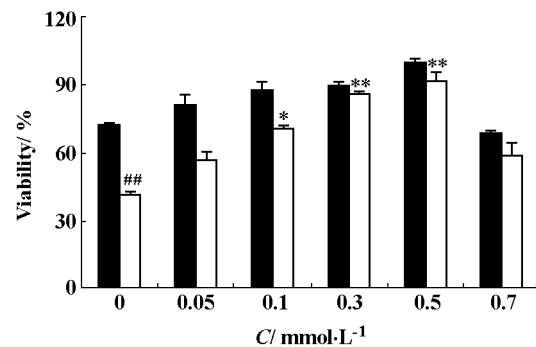


Figure 1 Protective effect of silibinin on isoproterenol-induced myocardial cell viability. The cells were incubated with silibinin and with (□) or without (■) isoproterenol (10 μmol · L⁻¹) for 48 h. The viability was evaluated by MTT method. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. ## *P* < 0.01 vs control group; * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs isoproterenol group

Table 1 Effect of silibinin on the activity of MDA and the content of LDH in isoproterenol-injured cardiomyocytes

Group	Dose / μmol · L ⁻¹	MDA / nmol · mL ⁻¹	LDH / U · dl ⁻¹
Control	-	1.45 ± 0.28	27.15 ± 1.68
Silibinin	0	3.05 ± 0.35 ^{##}	50.16 ± 3.77 ^{##}
(+10 μmol · L ⁻¹ isoproterenol)	0.05	2.98 ± 0.27	47.89 ± 2.41
	0.1	2.27 ± 0.34	36.88 ± 3.32*
	0.3	2.10 ± 0.17*	29.43 ± 2.17**
	0.5	1.44 ± 0.26**	25.41 ± 1.85**
	0.7	2.27 ± 0.24	30.44 ± 2.89**

n = 3, $\bar{x} \pm s$. ## *P* < 0.01 vs control group; * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs isoproterenol group

Table 2 Effect of silibinin on the activity of SOD in isoproterenol-injured cardiomyocytes

Group	Dose /mmol·L ⁻¹	SOD/nU·mL ⁻¹
Control	-	34.20 ± 1.96
Silibinin (+10 μmol·L ⁻¹ isoproterenol)	0	11.97 ± 1.87 ^{##}
	0.05	19.66 ± 1.65
	0.1	27.79 ± 2.13 [*]
	0.3	35.05 ± 2.01 ^{**}
	0.5	43.88 ± 2.34 ^{**}
	0.7	10.70 ± 1.33

n = 3, $\bar{x} \pm s$. ^{##} P < 0.01 vs control group; ^{**} P < 0.01 vs isoproterenol group

细胞仪进行线粒体膜电位定量分析。实验结果表明,水飞蓟宾能逆转由异丙肾上腺素引起的线粒体膜电位的降低,使表征峰形的裂分与前移减少,保护了线粒体的功能(图 2)。

4 水飞蓟宾对细胞色素 c, Bax, Bcl-2 与 Bcl-X_L 蛋白表达的影响

Bcl-2 家族是线粒体途径的中心,此家族中主要包括两类蛋白:促凋亡蛋白(Bax, Bik 等)及抗凋亡蛋白(Bcl-2, Bcl-X_L 等)。图 3A 显示加入异丙肾上腺素

腺素使抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达量明显减少,而水飞蓟宾可剂量依赖性地增加其表达,整个细胞裂解液中的 Bax 与 Bcl-X_L 蛋白表达量在药物作用下均无变化。加入异丙肾上腺素使细胞色素 c 由线粒体释放到胞浆,而水飞蓟宾可抑制其释放(图 3B)。

5 水飞蓟宾对 SIRT1 蛋白表达的影响

SIRT1 为一种去乙酰化酶,可调节 Bax 蛋白在线粒体与胞浆的分布,从而抑制由 Bax 蛋白引起的线粒体功能的改变。异丙肾上腺素的作用是使 SIRT1 蛋白的表达量降低,而水飞蓟宾可上调其表达(图 4A),并且可抑制 Bax 蛋白由胞浆转位到线粒体(图 4B)。

讨论

作者选择测定心肌细胞的存活率、乳酸脱氢酶(LDH)与丙二醛(MDA)的含量来衡量心肌细胞受损伤的程度,结果显示水飞蓟宾可减少由异丙肾上腺素引起的 LDH 和 MDA 含量的增加,逆转异丙肾上腺素的细胞毒作用,保护细胞免受异丙肾上腺素的损伤。超氧化物歧化酶(SOD)可清除氧自由基,

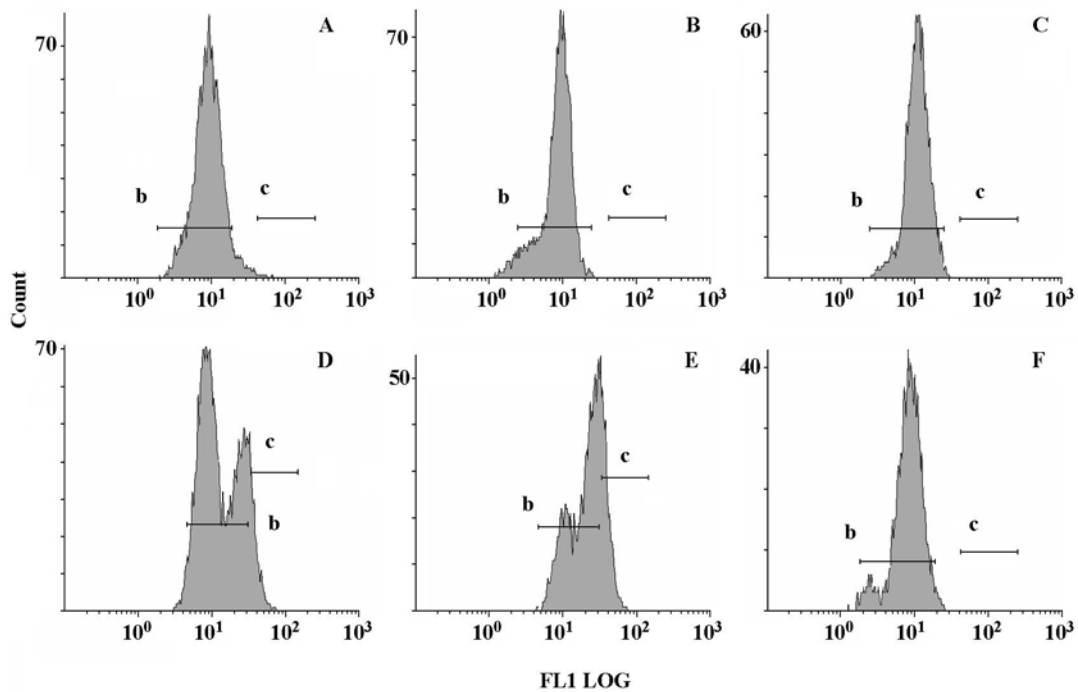


Figure 2 The recovery of the lost mitochondrial $\Delta\Psi$ in isoproterenol-injured cardiomyocytes by silibinin. The cells were incubated in medium alone and detected at 48 h (A); The cells were incubated with 0.2 mmol·L⁻¹ (B) and 0.5 mmol·L⁻¹ (C) silibinin for 48 h, then harvested and stained with 5 μmol·L⁻¹ Rh123, then detected using a flowcytometry; The cells were incubated in 10 μmol·L⁻¹ isoproterenol alone and detected at 48 h (D); The cells were incubated with 0.2 mmol·L⁻¹ (E) and 0.5 mmol·L⁻¹ (F) silibinin for 1 h prior to the treatment with isoproterenol (10 μmol·L⁻¹), then continued to be incubated for 48 h. The results were applied of three individual experiments

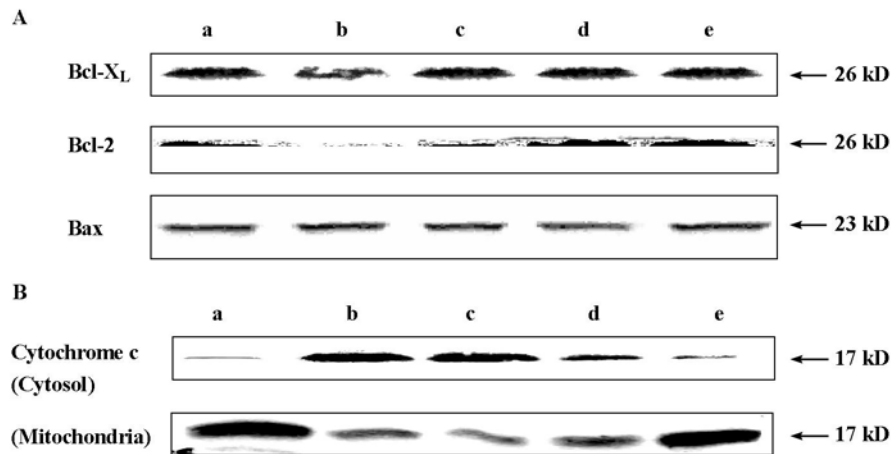


Figure 3 Effect of silibinin on the expression in Bcl-2 family proteins and cytochrome c in isoproterenol-treated cardiomyocytes. The cells were incubated with silibinin for 1 h prior to the treatment with isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), then continued to be incubated for 48 h. Cell lysates were separated by 12% SDS-PAGE, and the expressions of Bcl-2, Bcl-X_L and Bax were detected by Western blotting analysis (A). Cytochrome c proteins both in the cytosol and in the mitochondria were detected by 15% SDS-PAGE (B). The results were applied of three individual experiments. a: Control; b: Isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); c: Silibinin ($0.05 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); d: Silibinin ($0.3 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); e: Silibinin ($0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

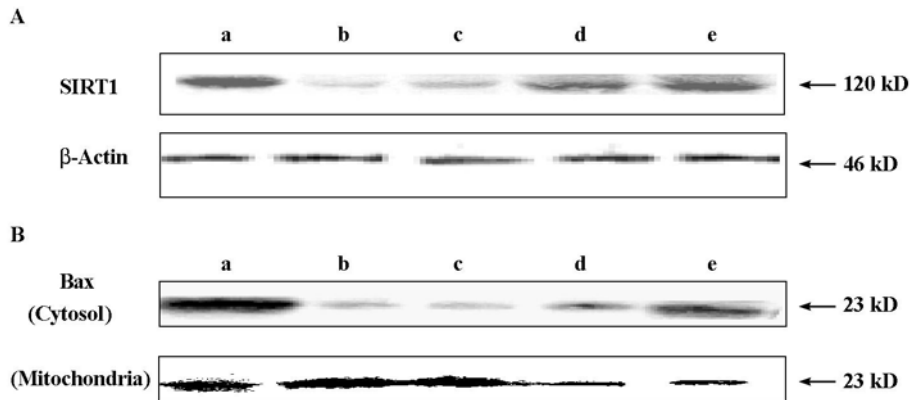


Figure 4 Involvement of SIRT1 in silibinin-protected cardiomyocyte injury. The cells were incubated with various concentrations of silibinin for 1 h prior to the treatment with isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), then continued to be incubated for 48 h. The changes of SIRT1 expression (A) and Bax proteins both in the cytosol and in the mitochondria (B) were analyzed. The results were applied of three individual experiments. a: Control; b: Isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); c: Silibinin ($0.05 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); d: Silibinin ($0.3 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); e: Silibinin ($0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + isoproterenol ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

减少脂质过氧化物的产生,研究中发现水飞蓟宾可显著增强 SOD 的活性,与 MDA 含量的减少相符。因此可以推断水飞蓟宾是通过清除细胞内过量的自由基来保护细胞免受损伤的。

本研究还观察到,单独使用异丙肾上腺素在前期使心肌细胞的搏动明显加快,随着时间的延长,细胞的搏动停止,而同时加入水飞蓟宾可恢复心肌细

胞规律的搏动。搏动节律可影响氧的消耗,进一步引起细胞损伤^[14]。因此推测前期异丙肾上腺素使心肌细胞搏动节律增加,引起脂质过氧化物如 MDA 聚集,后期过量的脂质过氧化物引起细胞损伤,细胞搏动消失。这与作者测得的 MDA 含量与 SOD 活性相符。水飞蓟宾恢复了心肌细胞的搏动,同时使 MDA 含量与 SOD 活性达到与对照组相同的水平。

这些结果表明,水飞蓟宾恢复心肌细胞的搏动是通过减少由异丙肾上腺素产生的氧化压力来实现的。

线粒体通过氧化磷酸化合成 ATP,而心脏是一个需要很多能量的器官,因此,线粒体功能的破坏是造成细胞损伤的一个重要因素,并且已有报道过量的异丙肾上腺素作用于细胞可引起细胞线粒体功能的丧失^[15]。线粒体膜电位分析结果显示,水飞蓟宾能够逆转由异丙肾上腺素引起的线粒体膜电位的降低,从而保护线粒体的功能。

Bcl-2家族蛋白位于线粒体上游,控制线粒体膜的通透性,从而控制细胞色素 c 的释放和下游 caspase 蛋白酶的活化,介导细胞的存活或死亡^[16]。水飞蓟宾使 Bax/Bcl-2 的表达比率下调,从而抑制了线粒体膜的通透性,并且抑制了细胞色素 c 由线粒体释放到胞浆中,这也可能是水飞蓟宾稳定线粒体膜电位的原因之一。对下游 caspase 蛋白酶的影响将是作者下一步实验中考察的目标。

通常情况下 Bax 在胞浆中与 DNA 修复因子 Ku70 结合而处于失活状态,在细胞处于应激或损伤状态时, Ku70 被乙酰化而与 Bax 分离,使 Bax 转位到线粒体中引起细胞的死亡。SIRT1 是细胞处于应激状态时促进防御和存活的一种关键酶,一些推迟或避免与老化有关的疾病(如癌症、动脉硬化、糖尿病等)的机制与 SIRT1 去乙酰化酶的活性有关。SIRT1 能有效地使 Ku70 去乙酰化,抑制 Bax 转位到线粒体,从而抑制凋亡的发生。此外, SIRT1 还可以通过去乙酰化抑制 p53 的转录活性^[17,18]。在本研究中发现,总 Bax 蛋白的表达不变,但异丙肾上腺素使其在线粒体中的表达量增加,而水飞蓟宾抑制了 Bax 蛋白表达量的变化,同时水飞蓟宾上调了 SIRT1 的表达,抑制了 Bax 定位于线粒体,可能因此而保护了线粒体的功能,保护了心肌细胞免受损伤。

References

- [1] Zeng GY, Xu XW, Liu HX. Experimental models of heart failure [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2002, 37: 579 - 585.
- [2] Araki M, Hasegawa K, Iwai-Kanai E. Endothelin-1 as a protective factor against beta-adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiac myocytes [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36: 1411 - 1418.
- [3] Communal C, Singh K, Pimentel DR, et al. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the β -adrenergic pathway [J]. Circulation, 1998, 98: 1329 - 1334.
- [4] Gao SJ, Zeng GY. Cardiotoxic and toxic effects of peruvoside and nerifolim [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1983, 18: 572 - 578.
- [5] Wang HM, Lian HX, Xu JJ, et al. The preventive effects of silibinin on the cardiac toxicity caused by doxorubicin [J]. Adverse Drug React J (药物不良反应杂志), 2003, 5: 371 - 374.
- [6] Chen H, Su DF, Zhang TH. Effects of silybinin on acute myocardial infarction and reperfusion injury in anesthetized rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 1992, 13: 69 - 71.
- [7] Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, et al. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver [J]. J Hepatol, 1989, 9: 105 - 113.
- [8] Barth E, Stammer G, Speiser B, et al. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man [J]. J Mol Cell Cardiol, 1992, 24: 669 - 681.
- [9] Kaburagi S, Hasegawa K, Morimoto T. The role of endothelin converting enzyme-1 in the development of α_1 -adrenergic-stimulated hypertrophy in cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. Circulation, 1999, 99: 292 - 298.
- [10] Lasek W, Wankowicz A, Kuc K, et al. Augmentation of antitumor efficacy by the combination of actinomycin D with tumor necrosis factor- α and interferon- γ on melanoma model in mice [J]. Cancer Immunol Immunother, 1995, 40: 315 - 321.
- [11] Sayen MR, Gustafsson AB, Sussman MA, et al. Calcineurin transgenic mice have mitochondrial dysfunction and elevated superoxide production [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284: 562 - 570.
- [12] Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, et al. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1 β [J]. J Immunol, 2001, 167: 5940 - 5947.
- [13] Torras J, Seron D, Herrero I, et al. Renal protective effect of liposomal superoxide dismutase in an experimental warm ischemia model [J]. Transpl Int, 1994, 7: S472 - 475.
- [14] Anand K, Brar R, Wang P, et al. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility [J]. Am Physiol Soc, 1999, 276: 265 - 277.
- [15] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281: 1309 - 1312.
- [16] Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304: 437 - 444.
- [17] Wang C, Wang MW, Tashiro SI, et al. Effect of protein kinase C on human melanoma A375-S2 cell death induced by evodiamine [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2005, 40: 1033 - 1036.
- [18] Giannakou ME, Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14: 408 - 412.