

# 膜雌激素受体介导的 NO 途径对 EPCs 增殖和凋亡的影响

谈智, 崔雨虹, 向秋玲, 林桂平, 王庭槐\*  
(中山大学中山医学院生理学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】观察一氧化氮(NO)信号途径在膜雌激素受体介导的内皮祖细胞(EPCs)增殖和凋亡中的作用。【方法】在培养的EPCs上,分别使用E<sub>2</sub>-BSA、或加雌激素受体阻断剂ICI 182,780、PI3K抑制剂LY294002和NOS抑制剂L-NAME,利用噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖活性(10组,n=9),利用化学比色法测定NO的含量(6组,n=6),Hoechst 33258染色观察EPCs凋亡(8组,n=5)以及免疫印迹法检测EPCs磷酸化eNOS蛋白表达的情况(4组,n=4)。【结果】与对照组相比,E<sub>2</sub>-BSA可以促进EPCs的增殖,ICI 182,780可以抑制其增殖作用,表明膜雌激素受体介导的信号通路参与雌激素对EPCs的增殖作用;NO合成和细胞凋亡结果显示,E<sub>2</sub>-BSA可以促进一氧化氮的合成和抑制血清撤退诱导的凋亡,PI3K抑制剂LY294002、NOS抑制剂L-NAME以及和ICI 182,780可以抑制上述作用;免疫印迹结果显示,E<sub>2</sub>-BSA可以促使eNOS的磷酸化,而LY294002可抑制上述作用。【结论】膜雌激素受体可通过PI3K/Akt/eNOS信号途径抑制EPCs的凋亡从而促进其增殖。

**关键词:** 雌激素; 膜雌激素受体; 内皮祖细胞; 一氧化氮

**中图分类号:** R331.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0064-05

## Role of NO Pathway in Membrane Estrogen Receptor Mediated Proliferation and Apoptosis of Endothelial Progenitor Cells

TAN Zhi, CUI Yu-hong, XIANG Qiu-ling, LIN Gui-ping, WANG Ting-huai\*

(Department of Physiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 The aim of the present study was to investigate the role of membrane estrogen receptor (mER) mediated pathway in the proliferation and apoptosis of endothelial progenitor cells (EPCs). 【Methods】 Bone marrow (BM)-derived EPCs were cultured. The cells were divided into different groups, plus or not plus estrogen receptor blocker (ICI 182,780), PI3K inhibitors (LY294002), and NOS inhibitor (L-NAME) to show the effect of E<sub>2</sub>-BSA on EPCs. The proliferation of EPCs was determined by MTT and nitric oxide (NO) release was measured by chromatometry. Apoptotic cell death was determined using the Hoechst 33258 staining. The expression of phosphorylated eNOS (p-eNOS) were detected by Western blot. 【Results】 E<sub>2</sub>-BSA could increase EPCs proliferation, and this effect was inhibited by estrogen receptor blocker ICI 182,780, thus indicated that mER-initiated membrane signaling pathways were involved in the action of estrogen on EPCs. E<sub>2</sub>-BSA increased nitric oxide production and inhibited apoptosis induced by serum withdrawal, and this effect also inhibited by PI3K inhibitor (LY294002), NOS inhibitor (L-NAME) and estrogen receptor blocker(ICI 182,780), thus indicated that PI3K/Akt/NO pathway was involved the effect of estrogen on EPCs apoptosis. Moreover, E<sub>2</sub>-BSA treatment increased phosphorylation of eNOS (p-eNOS). PI3K inhibitors (LY294002) also blocked these effects. 【Conclusions】 The results of present study suggested that mER mediated EPCs proliferation and apoptosis were related to the PI3K/Akt/eNOS pathway.

**Key words:** estrogen; membrane estrogen receptor; endothelial progenitor cells; nitric oxide

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(1):64-68]

内皮功能障碍在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)等心血管疾病的发生发展中起着重要作用,其本质是内皮损伤和修复之间动态平衡的破坏<sup>[1]</sup>。

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是存在于骨髓和外周血中,能分化增殖为成熟内皮细胞的一群祖细胞,对内皮损伤后的修复起着重要

收稿日期: 2009-04-17

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(05300602)

作者简介: 谈智, 博士, 讲师, E-mail: tanzhi@mail.sysu.edu.cn; \* 通信作者, 王庭槐, 教授, E-mail: wangth@mail.sysu.edu.cn

作用<sup>[2]</sup>。目前,EPCs 介导的治疗性血管再生及损伤血管修复已经成为心血管疾病治疗的研究热点之一<sup>[3]</sup>。EPCs 可以作为评价内皮功能及心血管疾病危险性的一个指标。研究表明,雌激素的心血管保护作用与一氧化氮(nitric oxide, NO)有关。我们以往的研究表明雌激素可通过膜雌激素受体促进血管内皮细胞增殖及 eNOS mRNA 表达,促进 NO 释放<sup>[4]</sup>。最新研究表明,雌激素可以通过 eNOS 动员 EPCs,加速受损血管内皮再生<sup>[5]</sup>。因而我们设想雌激素可通过调控 EPCs 而发挥其心血管保护作用。本研究主要探讨雌激素对 EPCs 增殖和凋亡的影响及其机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

SD 大鼠由中山大学实验动物中心提供,雌二醇-牛血清白蛋白复合物(E<sub>2</sub>-BSA),二苯基四氮唑溴盐(MTT)、胰蛋白酶、*l*-硝基-精氨酸甲酯(*l*-nitroarginine methylester, *l*-NAME)、LY294002、ICI 182,780、Hoechst 33258、Tris 均为 Sigma 公司产品;DMEM 培养液购自 Hyclone 公司,Ficoll 淋巴细胞分离液购自 Amersham Bioscience 公司;人纤维连接蛋白(human fibronectin, HFN)、购自 Chemicon 公司,CD34、VEGFR-2 单抗、p-eNOS3 (Ser 1177)、羊抗兔-FITC 二抗购自 Santa Crus 公司;GAPDH 单抗购自上海康成;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;其余均为国产分析纯。

### 1.2 EPCs 的分离、培养及鉴定

取 SD 大鼠的股骨和胫骨,0.01 mol/L PBS 冲洗骨髓,密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞(MNC),将单个核细胞接种( $1 \times 10^5$ )在包被有人纤维连接蛋白的培养板。DMEM 培养基(含 200 mL/L 胎牛血清)每 2 d 换液,PBS 清洗去除非贴壁细胞。用免疫荧光法检测培养 7 d 前后贴壁细胞 CD34、VEGFR-2 抗体的表达。细胞经甲醇固定、100 mL/L BSA 封闭后,分别加入兔抗鼠 CD34、羊抗鼠 VEGFR-2 抗体,37 °C 孵育 60 min, PBS 洗涤,加入抗兔 Rhodamine 标记及抗羊 FITC 标记的二抗,37 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤、干燥、封片,荧光显微镜下检测双阳性细胞。

### 1.3 MTT(噻唑蓝)比色实验

实验分 10 组,每组 9 个样品。内皮祖细胞的

分离和培养同前,取培养第 7 天  $3 \times 10^4$  个细胞密度接种于纤维连接蛋白(1 ng/ $\mu$ L)包被的 96 孔板中,每孔加 100  $\mu$ L 培养液,在培养液中加入不同浓度 17 $\beta$ -雌二醇( $10^{-9} \sim 10^{-7}$  mol/L)置于体积分数 5%的 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20  $\mu$ L,混匀后 37 °C,体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 条件下继续孵育 4 h,终止培养。吸弃孔内培养液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,震荡 5 ~ 10 min。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸光值  $D(490 \text{ nm})$ 。在一些实验中,预先加入 PI3K 抑制剂 LY294002(10  $\mu$ mol/L)、*l*-NAME (100  $\mu$ mol/L) 作用和 ICI 182,780(100  $\mu$ mol/L) 1 h,再加入  $10^{-8}$  mol/L 17 $\beta$ -雌二醇作用 24 h。

### 1.4 NO 释放的测定

实验分 6 组,每组 6 个样品。给药方法同前。用 Nitrit/Nitrat Farbstest 试剂盒,比色法测定培养液和细胞内的硝酸盐总量。以每培养瓶  $10^5$  个细胞的密度接种细胞,分别收集细胞培养液和细胞裂解液(80 °C 恒温水浴裂解 10 min,12 000 r/min,离心半径  $r = 12 \text{ cm}$ ,离心 10 min,取上清液)进行测定。500  $\mu$ L 样品中加入 250  $\mu$ L NADPH 和 200  $\mu$ L 硝酸还原酶,室温下孵育 30 min,加入对氨基苯磺酰胺和萘乙二胺显色 15 min,以紫外分光光度计 546 nm 波长测定吸光度  $D(546 \text{ nm})$ ,再根据标准曲线换算成硝酸盐浓度。细胞培养液和细胞裂解液中硝酸盐浓度之和即为 EPCs 释放出的硝酸盐总量。

### 1.5 细胞凋亡检测

实验分 8 组,每组 5 个样品。给药方法同前。Hoechst 33258 荧光素核染色细胞经不同的处理后,用预冷 PBS 洗 3 次。40 g/L 预冷多聚甲醛室温固定 30 min 后,再用预冷的 PBS 液冲洗 2 次。加入终浓度为 5  $\mu$ mol/L 的 DNA 染料 Hoechst 33258 室温避光染色 10 min, PBS 洗 3 次后于荧光显微镜下观察。随机观察每个高倍视野( $\times 400$ )内的细胞凋亡数,计算凋亡阳性细胞的百分比。

### 1.6 免疫印迹法检测蛋白表达

培养细胞在 6 孔培养板中经过不同药物处理后,加入 0.2 mL 蛋白提取液,提取液成分同前。收集细胞,匀浆后 4 °C 离心,13 000 r/min (离心半径  $r = 12 \text{ cm}$ ),10 min,取上清液,按 Bradford 法测量蛋白浓度,调蛋白质浓度至 200 mg/L,进行 SDS-PAGE 电泳,上样量为 25  $\mu$ L,电印迹转移法

将凝胶内的蛋白质转至硝酸纤维素膜上,用体积分数 5% 的小牛血清白蛋白(BSA)的 TBST 溶液室温封闭 1 h,与一抗:eNOS、GAPDH 单克隆抗体(稀释度为 1:4 000)、4 °C 孵育过夜,TBST 溶液洗脱 3 次,再与二抗:HRP 标记的 IgG 抗体(稀释度均为 1:2 000)室温孵育 1 h,TBST 溶液洗脱 3 次后与 ECL 试剂反应 1 min,X 线胶片压片曝光 10 s,以 IBAS 图像处理系统对胶片进行扫描测定感光区带的感光密度,并进行积分处理,以对照组为 100% 进行统计分析作图。

### 1.7 统计学处理

数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,检验行 *t* 检验(两组间)和单因素方差分析(各组间),以  $P < 0.05$  作为差异有显著性意义界限。

## 2 结果

### 2.1 雌激素对 EPCs 增殖的影响

与对照组相比,不同浓度的  $E_2$ -BSA<sub>2</sub> ( $10^{-9} \sim 10^{-7}$  mol/L) 作用于 EPCs 24 h,可以增加吸光度值,以  $10^{-8}$  mol/L 的  $E_2$  作用最强 ( $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ,图 1A),ICI 182,780( $10 \mu\text{mol/L}$ )作用 1 h 可以抑制  $E_2$ -BSA 的作用( $n = 6$ , $P < 0.05$ ,图 1A)。与对照组相比, $E_2$ -BSA( $17.5 \text{ ng/ml}$ ,相当于游离的  $E_2$  浓度为  $10^{-8}$  mol/L) 可以增加吸光度 ( $n = 6$ , $P < 0.05$ ,图 1B)。预先使用 LY294002( $10 \mu\text{mol/L}$ )、*l*-NAME( $100 \mu\text{mol/L}$ ) 和 ICI 182,780( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 作用 1 h,可明显抑制  $E_2$ -BSA 作用 ( $n = 9$ , $P < 0.05$ ,图 1B)。单独使用 LY294002、*l*-NAME 和 ICI 182,780 对 EPCs 增殖无影响。

### 2.2 雌激素对 EPCs NO 生产的影响

与对照组相比, $10^{-8}$  mol/L  $E_2$ -BSA 作用于 24 h 可增加 NO 的产生( $n = 6$ , $P < 0.05$ );预先使用 LY294002 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 和 ICI 182,780 ( $10 \mu\text{mol/L}$ )作用 1 h,可明显抑制  $E_2$ -BSA 对 NO 生成的促进作用( $n = 6$ , $P < 0.05$ );单独使用 LY294002 和 ICI 182,780 对 NO 生成无影响(图 2)。

### 2.3 雌激素对 EPCs 凋亡的影响

Hoechst 33258 是特异性荧光染料,以非嵌入式结合在 DNA 的碱基区。凋亡细胞可见染为高亮蓝色的典型凋亡小体,其细胞核明显固缩、凝聚和断裂。与对照组相比, $E_2$ -BSA( $10^{-8}$  mol/L)可以抑制基础状态下 EPCs 凋亡;而事先加入 LY294002

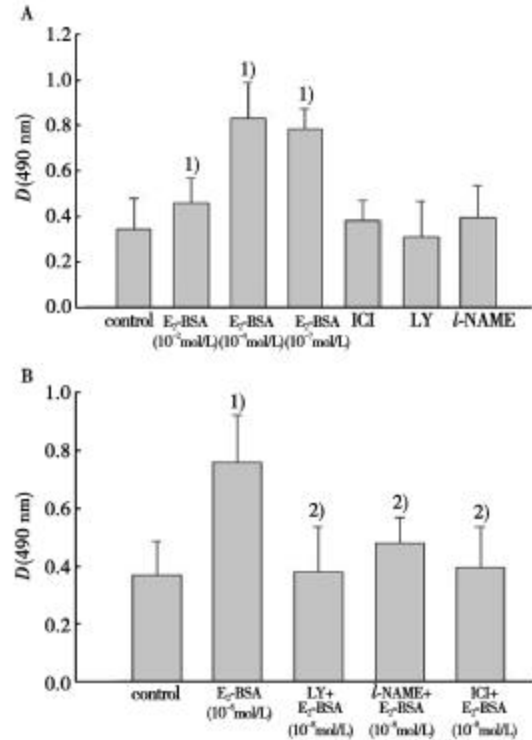


图 1 雌激素对内皮祖细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of estrogen on the proliferation of EPCs

A: The effect of different concentration of estrogen ( $10^{-9}$  mol/L  $\sim 10^{-7}$  mol/L) on the proliferation of EPCs; B: The role of LY294002 ( $10^{-5}$  mol/L), *l*-NAME ( $10^{-4}$  mol/L) and ICI 182,780 ( $10^{-4}$  mol/L) on the proliferation of EPCs induced by  $10^{-8}$  mol/L estrogen.  $n = 9$ . 1)  $P < 0.05$  vs. control, 2)  $P < 0.05$  vs.  $10^{-8}$  mol/L  $E_2$ -BSA

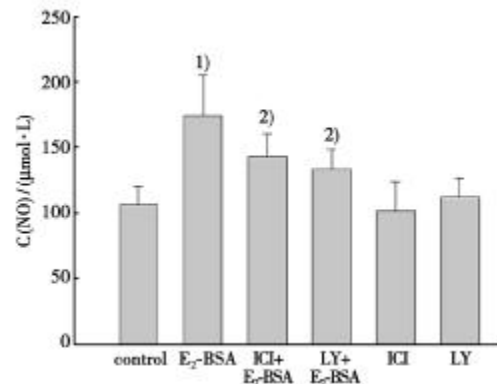


图 2 雌激素对内皮祖细胞 NO 生成的影响

Fig.2 Effect of estrogen on the EPCs NO production

Compared to control,  $10^{-8}$  mol/L estrogen significantly increased NO production. This effect was inhibited by  $10^{-5}$  mol/L LY294002 and  $10^{-4}$  mol/L ICI 182,780. Whereas, both  $10^{-5}$  mol/L LY294002 and  $10^{-4}$  mol/L ICI 182,780 alone had no effect on the production of NO.  $n = 6$ . 1)  $P < 0.05$  vs. control, 2)  $P < 0.05$  vs.  $10^{-8}$  mol/L  $E_2$ -BSA

( $10 \mu\text{mol/L}$ )、ICI 182,780 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 和 *l*-NAME ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) 可以抑制雌激素的抑制凋亡效应

( $n = 5, P < 0.05$ , 图 3)。单独使用 LY294002、L-NAME 和 ICI 182,780 对 EPCs 凋亡无明显影响。

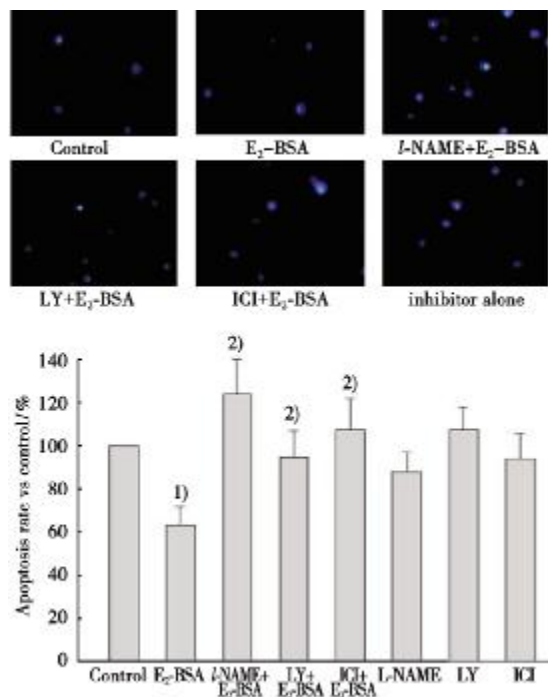


图 3 雌激素对内皮祖细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of estrogen on apoptosis of EPCs

Compared to control,  $10^{-8}$  mol/L estrogen significantly decreased apoptotic EPCs rate. This effect was inhibited by  $10^{-5}$  mol/L LY294002,  $10^{-4}$  mol/L L-NAME and  $10^{-4}$  mol/L ICI 182,780.  $n = 5$ . 1)  $P < 0.05$  vs. control, 2)  $P < 0.05$  vs.  $10^{-8}$  mol/L E<sub>2</sub>-BSA

## 2.4 雌激素对磷酸化 eNOS 蛋白表达的影响

用磷酸化蛋白的表达量来表示蛋白活性的变化。与对照组相比, E<sub>2</sub>-BSA ( $10^{-8}$  mol/L) 作用于 EPCs 24 h 后, 明显使磷酸化 eNOS 蛋白表达增加, 预先使用 LY294002 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 作用 1 h, 可以抑制 E<sub>2</sub>-BSA 的作用 ( $n = 4, P < 0.05$ , 图 4)。

## 3 讨 论

在冠状动脉粥样硬化、糖尿病等血管内皮结构功能受损的患者外周血中 EPCs 的数量和功能均明显减低<sup>[6]</sup>, 因此是否能通过药物干预使 EPCs 数量功能改善而起到对冠心病的保护作用都具有十分重要的临床价值。

### 3.1 膜雌激素受体对 EPCs 增殖的影响

研究发现雌激素能够促进 EPCs 增殖, 其机制尚不清楚。在培养的细胞模型上, 我们证实了雌激素可以促进 EPCs 的增殖, 这与 Strehlow 等<sup>[7]</sup>在整

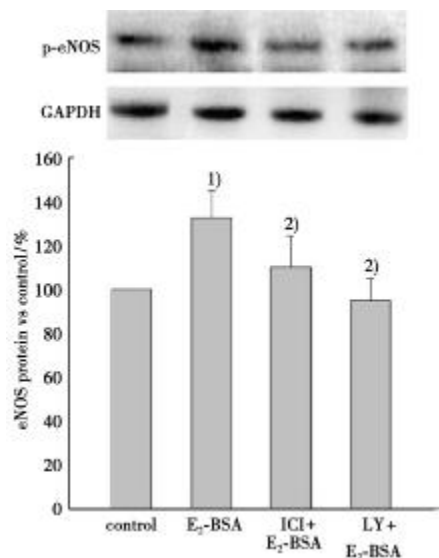


图 4 雌激素对磷酸化 eNOS 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of estrogen on phosphorylation of eNOS protein expression in EPCs

Compared to control,  $10^{-8}$  mol/L estrogen significantly increased phosphorylated eNOS protein expression. This effect was inhibited by  $10^{-4}$  mol/L ICI 182,780 and  $10^{-5}$  mol/L LY294002.  $n = 4$ . 1)  $P < 0.05$  vs. control, 2)  $P < 0.05$  vs.  $10^{-8}$  mol/L E<sub>2</sub>-BSA

体动物实验中得到的结果相一致。说明雌激素无论在离体还是整体上都能促进 EPCs 的增殖。雌激素主要是通过其受体发挥其生物学效应。目前已证实了雌激素受体分为两型: ER $\alpha$  和 ER $\beta$ , 是雌激素发挥作用的物质基础。其作用机制传统上用“基因表达学说”来阐述, 我们实验中使用雌激素受体阻断剂 ICI 182,780 可以抑制雌激素作用, 说明雌激素促 EPC 增殖作用是由其受体介导的。Hamada 等<sup>[8]</sup>的最新研究结果显示, ER $\alpha$  和 ER $\beta$  都参与了雌激素对 EPC 的作用。然而越来越多的研究表明, 除传统核受体外, 细胞膜上有雌激素的结合位点, 雌激素可通过其发挥其快速非基因效应。但膜受体介导的信号通路是否只是短期效应? Stirone 等<sup>[9]</sup>在脑血管上证实了膜雌激素受体激活具有长期效应。由于雌激素-牛血清白蛋白大分子复合物 (E<sub>2</sub>-BSA) 不能通透细胞膜, 广泛应用于雌激素膜受体的研究, 因此本实验中, 我们使用 E<sub>2</sub>-BSA 作用 EPCs 来观察其长期效应。实验结果显示, E<sub>2</sub>-BSA 作用 24 h 能促进 EPCs 增殖, 这一作用能被 ICI 182,780 所阻断, 说明膜雌激素受体激活能产生长期效应, 促进 EPCs 增殖。

### 3.2 NO 信号通路在膜雌激素受体对 EPCs 增殖中的影响

研究表明 Akt 是磷脂酰肌醇三磷酸激酶 (PI3K)

下游直接的靶蛋白, Akt 可直接磷酸化 eNOS 1179 位丝氨酸, 导致 eNOS 激活, 在细胞存活、增殖、代谢、凋亡中发挥关键作用<sup>[10]</sup>。使用 *l*-NAME 能抑制 E<sub>2</sub>-BSA 的作用, 说明 NO 在 E<sub>2</sub>-BSA 促 EPCs 增殖中起重要作用。实验中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 可以抑制 E<sub>2</sub>-BSA 作用促 EPCs 增殖的作用; LY294002 可抑制 E<sub>2</sub>-BSA 促 EPCs NO 的生成, 表明 Akt 的激活在这过程中起作用; 使用 ICI 182, 780 可以抑制 E<sub>2</sub>-BSA 促 NO 的生成, 进一步证实了 PI3K/Akt/NO 途径在膜雌激素受体促 EPCs 增殖中起着重要作用。Imanishi 等<sup>[12]</sup>也证明了雌激素可通过 PI3K/Akt 促进 EPCs 的增殖。但 Imanishi 等使用的是能直接通过细胞膜的雌激素, 而本实验使用的是不能通过细胞膜的 E<sub>2</sub>-BSA。膜雌激素受体和胞内雌激素受体介导的 PI3K/Akt/NO 途径的激活到底有何不同还有待进一步的研究。

### 3.3 eNOS 对膜雌激素受体介导的抗 EPCs 凋亡中的作用

Strehlow 等<sup>[7]</sup>实验结果显示雌激素可通过抑制 EPCs 的凋亡率来增进 EPCs 的数量从而促进血管的修复, 同时 Iwakura 等<sup>[5]</sup>证明了 eNOS 是雌激素抑制血管损伤反应不可缺少的, 这说明雌激素可以通过 eNOS 来抑制凋亡从而发挥其抗血管损伤作用。在 eNOS 基因敲除的鼠中, 雌激素促进骨髓源性的内皮祖细胞增殖和迁移作用也就消失了, 表明雌激素促进内皮祖细胞的增殖, 依赖于 eNOS 的表达。因此本实验观察了 PI3K/Akt/NO 途径在 E<sub>2</sub>-BSA 对 EPCs 凋亡中的作用。Hoechst 染色显示 E<sub>2</sub>-BSA 可以抑制 EPCs 的凋亡, LY294002、L-NAME 可以抑制 E<sub>2</sub>-BSA 的作用; 与此相对应, 免疫印记实验结果显示, E<sub>2</sub>-BSA 可以促进 EPCs 磷酸化 eNOS 蛋白的表达, 而 LY294002 可以抑制 E<sub>2</sub>-BSA 的作用; 说明了 PI3K/Akt/NO 在雌激素抑制 EPCs 凋亡中起着重要作用。

综上所述, 本实验证实了膜雌激素受体可以通过激活 PI3K/Akt/eNOS 来发挥其抑制凋亡和促增殖的作用。以往多集中研究膜雌激素受体介导的快速效应, 本研究结果表明, 膜雌激素受体的激活同样可以产生长期效应。因此本实验能增进我们对雌激素动员 EPCs 的了解, 有助于进一步对雌激素心血管保护作用机制的阐明。

### 参考文献:

- [1] 马焕云, 魏 芳. 血管内皮功能影响因素与动脉粥样硬化 [J]. 新医学, 2005, 36(06): 362-364.
- [2] Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis [J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(2): 318-332.
- [3] 徐明国, 陶 军, 王洁梅, 等. 内皮祖细胞移植修复大鼠颈总动脉内皮损伤 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(4): 365-368.
- [4] 王庭槐, 付晓东, 杨 丹, 等. 膜雌激素受体介导一氧化氮合酶活性增高的快速非基因效应 [J]. 生理学报, 2003, 55(2): 213-218.
- [5] Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury [J]. Circulation, 2003, 108(25): 3115-3121.
- [6] Zhou B, Cao XC, Fang ZH, et al. Prevention of diabetic microangiopathy by prophylactic transplant of mobilized peripheral blood mononuclear cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(1): 89-97.
- [7] Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation [J]. Circulation, 2003, 107(24): 3059-3065.
- [8] Hamada H, Kim MK, Iwakura A, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction [J]. Circulation, 2006, 114(21): 2261-2270.
- [9] Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP, et al. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects [J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(1): 105-113.
- [10] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt [J]. Nature, 1999, 399(6736): 597-601.
- [11] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [12] Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity [J]. J Hypertens, 2005, 23(9): 1699-1706.

(编辑 徐 杰)