·基础研究·

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶在脂多糖诱导的小鼠急性心肌损伤组织中的表达及意义

段明霞,唐其柱*
(武汉大学人民医院心内科,武汉大学心血管病研究所,心血管病湖北省重点实验室, 武汉 430060)

【摘 要】 **目的** 探讨还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶的非吞噬细胞氧化酶(Nox)家族在脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性心肌损伤组织中的表达及意义。**方法** 选取8~10周龄无特定病原体C57/BL6雄性小鼠30只,随机分为对照组和LPS组,每组15只。LPS组小鼠通过腹腔注射大剂量LPS(10 mg/kg)诱导急性心肌损伤模型,对照组腹腔注射等量生理盐水,观察6 h后取材,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测Nox、B细胞淋巴瘤/白血病蛋白-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶3(Caspase 3)基因表达,Western blotting检测Nox 2、Nox 4、Bax、Bcl-2和Caspase 3蛋白表达,免疫组织化学法检测4羟基壬烯醛(4-HNE)表达,末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)介导的脱氧尿苷三磷酸(dUTP)切口末端标记技术(TUNEL)法检测心肌组织细胞凋亡,比较两组结果差异。使用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析,两组比较采用t检验。**结果** 相比对照组,LPS组小鼠心肌Nox 2、Nox 4、Bax基因和蛋白以及Caspase 3蛋白表达水平明显升高,*Bcl-2*基因和蛋白表达水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。免疫组织化学检测结果表明相比对照组,LPS组心肌组织4-HNE表达明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。TUNEL检测结果表明相比对照组,LPS组心肌组织心肌凋亡细胞明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** NADPH氧化酶通过调控氧化应激和细胞凋亡参与急性心肌损伤的发生发展。

【关键词】 脂多糖类;细胞凋亡;氧化性应激;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸;心肌损伤
【中图分类号】 R541 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.02.029

Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in acute myocardial injury mice induced by lipopolysaccharide and its significance

DUAN Ming-Xia, TANG Qi-Zhu*
(Department of Cardiology, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei Provincial Key Laboratory of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the expression of non-phagocytic cell oxidase (Nox), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, in mice of lipopolysaccharide (LPS)-induced acute myocardial injury and its significance. **Methods** SPF male C57/BL6 mice (8-10 weeks old) were randomly assigned into control group (normal saline, $n=15$) and LPS group ($n=15$). LPS group was injected with large dose of LPS (10 mg/kg) to induce acute myocardial injury model, and the control group was only injected with saline equivalent. The mice were sacrificed in 6 h later, and the heart tissues were harvested. The mRNA and protein levels of Nox 2, Nox 4, Bcl-2-associated X protein (Bax), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and cysteine aspastic acid-specific protease 3 (Caspase 3) were detected by RT-PCR and Western blotting respectively. The expression of lipid peroxidation products (4-HNE) in the myocardium was measured by immunohistochemistry. TUNEL was used to detect myocardial apoptosis. SPSS statistics 13.0 was used to perform the statistical analysis, and student's t test was employed for comparison between groups. **Results** Compared with the control group, the mRNA and protein levels of Nox 2, Nox 4 and Bax were significantly increased, while those of Bcl-2 were decreased, and the protein expression of Caspase 3 was elevated in the LPS group ($P<0.05$). Immunohistochemical assay showed that the expression of 4-HNE was significantly higher in the mice of the LPS group ($P<0.05$). TUNEL assay indicated that there were more apoptotic cells in the LPS group ($P<0.05$). **Conclusion** NADPH oxidase takes part in the occurrence and development of acute myocardial injury through regulating oxidative stress and cell apoptosis.

【**Key words**】 lipopolysaccharides; apoptosis; oxidative stress; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; myocardial damage
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81470516, 81530012).
Corresponding author: *TANG Qi-Zhu*, *E-mail*: *qztang@whu.edu.cn*

收稿日期: 2017-09-27; **修回日期**: 2017-11-06
基金项目: 国家自然科学基金(81470516,81530012)
通信作者: 唐其柱, E-mail: qztang@whu.edu.cn

内毒素血症是由革兰氏阴性菌释放大量内毒素而引起的一种全身炎症反应,可发展为中毒性休克和多器官功能衰竭等。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是内毒素的主要成分,属于革兰氏阴性菌外膜成分,具有剂量依赖性细胞毒作用,可引起严重的急性心肌损伤和心力衰竭。研究表明,LPS 诱导心脏损伤而引起的病死率可达 50% ~60%,是重症监护室患者的首要死因[1,2]。因此,寻找和阻断内毒素血症发生时心肌损伤的靶点,对诊治和改善患者预后具有重要的临床意义。

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶的非吞噬细胞氧化酶(non-phagocytic cell oxidase, Nox)家族是一类广泛分布的跨膜蛋白,最先发现于中性粒细胞和巨噬细胞,是体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源之一[3]。研究表明,Nox 依赖的 ROS 参与调节多种心血管疾病,如缺血性心肌病、心力衰竭、高血压和心肌炎等[4,5]。Shah 等[6]通过研究证实,心脏特异性高表达 Nox 4 可加重血管紧张素Ⅱ诱导的心肌重构,而 Nox 4 抑制剂可显著改善心功能,提示 Nox 在调控心肌重构的过程中发挥重要作用。研究表明,LPS 可诱导心肌组织凋亡和心肌组织氧化损伤,表现为 B 细胞淋巴瘤/白血病蛋白 -2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)水平降低,Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶 3(cysteine aspastic acid-specific protease 3, Caspase 3)、4 羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)水平升高[7]。Bax 为促凋亡因子,在细胞中发挥促凋亡作用[8]。Caspase 3 是凋亡途径的下游效应部分,活化后的 Caspase 3 (cleaved Caspase 3, c-Caspase 3)通过其酶解切割作用影响 DNA 的复制和转录,发挥促凋亡作用[9]。4-HNE 是 ROS 与生物大分子物质发生脂质过氧化反应而形成的脂质过氧化物,可反映心肌组织是否氧化损伤[10]。然而,Nox 在 LPS 诱导的急性心肌损伤组织中的具体机制尚不明确。本研究探讨了 Nox 在 LPS 诱导的急性心肌损伤组织中的表达及意义,以期为临床治疗内毒素血症所致的心肌损伤提供理论依据和干预靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

LPS 购买于美国 Sigma 公司,纯度 >95%。抗 Nox 2、Nox 4、Bax、Bcl-2、c-Caspase 3 和 4-HNE 的一抗购买于英国 Abcam 公司,3 - 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)购买于美国 Santa cruz 公司;免疫印迹荧光标记羊抗兔二抗 IRdye@800 CWIgG 购买于 LI-COR 公司,免疫组织化学辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购买于艾吉泰康公司。TRIZOL 和反转录试剂盒购自瑞士 Roche 公司。主要的实验仪器有超声裂解仪、研磨仪、超高速离心机、分光光度计、酶标仪、水浴锅、蛋白/核酸电泳仪、转膜槽、摇床、封膜机、脱水机、包埋机、病理切片机、组织摊片机、烤箱、倒置显微镜、双色红外荧光成像系统、实时荧光定量 PCR 检测仪。

1.2 实验动物和内毒素血症模型构建

所有针对动物的操作都经武汉大学人民医院动物伦理委员会批准。本实验采用 8 ~ 10 周龄无特定病原体 C57/BL6J 雄性小鼠(n = 30),购于北京华富康生物科技有限公司。实验动物购回后,适应实验环境至少 1 周,随后被随机分为对照组和 LPS 组,每组 15 只。其中,LPS 组一次性注射 10 mg/kg 的 LPS,对照组注射等量生理盐水。两组小鼠均于注射后第 6 h 处死,取出小鼠心脏置于 10% 氯化钾液,称重后转移至 - 80℃ 冰箱保存备用;拟组织学方法检测的心肌标本置于 4% 多聚甲醛中固定,脱水后石蜡包埋待切片。

1.3 逆转录 - 聚合酶链反应检测基因表达

取约 20 mg 心肌组织加入 EP 管中并加入 1 ml TRIZOL,研磨后加入 200 μl 三氯甲烷,12 000 转/min 离心 15 min 后吸取上清液,加入等体积异丙醇,12 000 转/min离心 15 min 后,将沉淀的核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)溶于焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水中,分光光度计测定 RNA 浓度。当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~2.0,A_{230}/A_{260} 比值 >2.0 即表明可用,计算 RNA 提取量。

通过反转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA,GAPDH 作为内参照,罗氏 LightCycler480 Real-time PCR 仪进行扩增并对 PCR 结果进行定量分析。扩增条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 15 s、60℃ 退火 8 s、72℃ 延伸 25 s,共 40 个循环。目的基因以 GAPDH 为内参照对其表达量进行校正。利用 Primer-BLAST 在线设计引物序列,由上海生物工程有限公司合成(表 1)。

1.4 Western blotting

从 - 80℃ 冰箱取出心脏标本,取 30 ~ 40 mg 心肌组织放入离心管中,加入裂解液,放入研磨仪中研磨,研磨完全后再使用超声裂解仪裂解标本,使细胞蛋白充分释放。采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid

表1 *Nox 2*、*Nox 4*、*Bax* 和 *Bcl-2* 基因引物序列

Table 1 Primer sequence of *Nox 2*, *Nox 4*, *Bax and Bcl-2* gene

Gene	Amplified direction	Primer sequence
Nox 2	Sense	5'-GACCATTGCAAGTGAACACCC-3'
	Anti-sense	5'-AAATGAAGTGGACTCCACGCG-3'
Nox 4	Sense	5'-TTCCATCCCCAAATGCAAAG-3'
	Anti-sense	5'-TCAGATGCCCTAAAACCGGAG-3'
Bax	Sense	5'-GCCTTTTTGCTACAGGGTTTCAT-3'
	Anti-sense	5'-TATTGCTGTCCAGTTCATCTCCA-3'
Bcl-2	Sense	5'-TGACTTCTCTCGTCGCTACCGT-3'
	Anti-sense	5'-CCTGAAGAGTTCCTCCACCACC-3'
GAPDH	Sense	5'-AGGAGCGAGACCCCACTAACA-3'
	Anti-sense	5'-AGGGGGGCTAAGCAGTTGGT-3'

Nox: non-phagocytic cell oxidase; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B cell lymphoma/leukemia-2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

disodium,BCA)法测定蛋白浓度,加入相应上样缓冲液和水,使蛋白样本浓度均一化,72℃水浴10 min使蛋白变性。取适量蛋白样本放入10%基质钠十二烷基硫酸聚丙烯胺凝胶电泳(substrate-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)胶进行电泳分离,90 V恒压电泳2 h。电泳结束后,使用转膜仪将目的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上,清洗3次后使用5%脱脂牛奶封闭1.5 h。封闭完成后4℃孵育一抗过夜。TBST缓冲液清洗膜3遍后,加入IRdye@800 CW标记的羊抗兔IgG二抗37℃孵育1 h,清洗3遍后使用双色红外成像系统进行扫膜分析。以GAPDH为内参照分析和计算Nox 2、Nox 4、Bax、Bcl-2和Caspase 3蛋白表达水平。

1.5 免疫组织化学方法

60℃烤片30 min,二甲苯3次脱蜡,每次5 min,无水乙醇、95%乙醇和70%乙醇各3遍脱水。采用3%甲醇双氧水来抑制内生过氧化物酶的活性,并用8%羊血清封闭60 min,排除非特异性抗原。抗4-HNE的一抗使用1∶100磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)稀释,4℃过夜。随后用PBS清洗5遍,加入辣根过氧化物酶标记二抗,继续清洗,随后加入二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)。每组随机选取10个样本,每个样本随机选取1个视野,采用Image-Pro Plus 6.0(IPP)软件计算4-HNE分布面积取平均值。对照组心脏组织呈灰白色,无4-HNE分泌,LPS组心脏组织可见着色的4-HNE。

1.6 TUNEL法检测心肌细胞凋亡

60℃烤片30 min,二甲苯脱蜡2次,每次5 min,梯度乙醇脱水;蛋白酶K工作液37℃处理组织玻片20 min后,PBS漂洗2次,每次5 min;LPS组玻片加50 μl末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxyribonucleotidyl transferase,TdT)+450 μl荧光素标记的脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphate, dUTP)液;对照组仅加50 μl荧光素标记的dUTP液;玻片干后加50 μl TdT介导的dUTP切口末端标记技术(TdT-mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)反应混合液于标本上,加盖玻片在37℃中反应1 h;PBS漂洗3次,每次5 min;玻片干后加50 μl辣根过氧化物酶标记的荧光抗体于标本上,于37℃中反应30 min;PBS漂洗3次,每次5 min;随后滴加100 μl DAB底物,室温反应10 min;PBS漂洗3次,每次5 min;观察后用苏木素复染3 s,流水冲洗;梯度乙醇脱水,二甲苯使切片透明,中性树胶封片,然后200倍镜头下拍照。每组随机选取10个样本,每个样本随机选取1个视野,采用Image-Pro Plus 6.0(IPP)软件计算心肌凋亡细胞数取平均值。正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡细胞胞核呈致密浓染。

1.7 统计学处理

使用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较使用独立样本t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组心肌组织 *Nox 2*、*Nox 4*、*Bax* 和 *Bcl-2* 基因表达水平比较

相比对照组,LPS组小鼠心肌*Nox 2*、*Nox 4*、*Bax*基因表达水平明显升高,*Bcl-2*基因表达水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$;图1)。

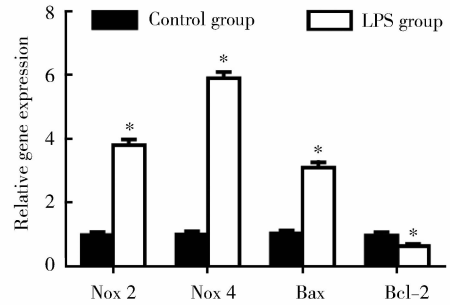


图1 *Nox 2*、*Nox 4*、*Bax*、*Bcl-2* 基因在对照组和LPS组中的表达

Figure 1 Expression of *Nox 2*, *Nox 4*, *Bax and Bcl-2* gene between control and LPS group

Nox: non-phagocytic cell oxidase; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B cell lymphoma/leukemia-2; LPS: lipopolysaccharides. Compared with control group, * $P<0.05$

2.2 两组心肌组织 Nox 2、Nox 4、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较

相比对照组，LPS 组心肌组织 Nox 2、Nox 4、Bax 蛋白表达水平明显增加，Bcl-2 蛋白表达水平降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$；图 2）。

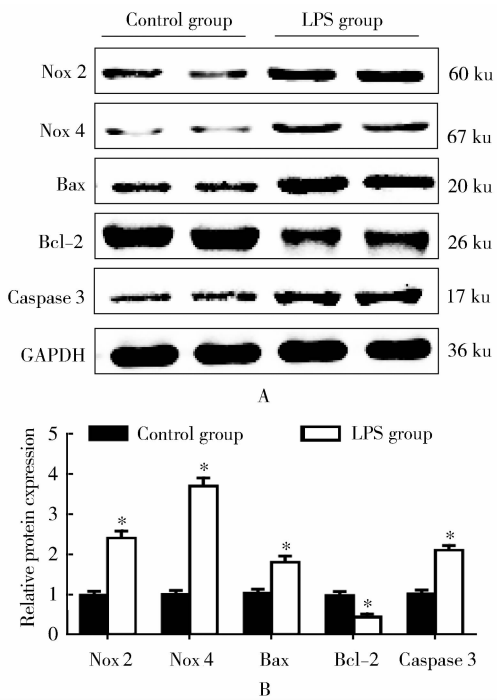


图 2 Nox 2、Nox 4、Bax、Bcl-2 和 caspase 3 蛋白在对照组和 LPS 组中的表达

Figure 2 Expression of Nox 2, Nox 4, Bax and Caspase 3 protein in control and LPS groups

A: Western blotting results; B: quantitative analysis results. Nox: non-phagocytic cell oxidase; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B cell lymphoma/leukemia-2; LPS: lipopolysaccharides. Compared with control group, $^{*}P<0.05$

2.3 免疫组织化学结果比较

相比对照组，LPS 组心肌组织 4-HNE 表达明显增加，差异具有统计学意义（$P<0.05$；图 3）。

2.5 TUNEL 结果比较

相比对照组，LPS 组心肌组织心肌凋亡细胞明显增加，差异具有统计学意义（$P<0.05$；图 4）。

3 讨 论

LPS 由类脂 A、核心多糖和 O - 特异性多糖侧链等组成，其中类脂 A 是 LPS 最主要的生物活性成分。研究表明，少量 LPS 刺激机体时，可通过诱导干扰素产生而增强机体的固有免疫功能，而大量 LPS 释放入血，可激活单核 - 巨噬细胞，诱发全身炎症反应综合征，严重时可引起弥漫性血管内凝血和多器官功能衰竭[11]。大量研究证实，多种因素参与内毒素血症诱导的心功能障碍，包括氧化应激、炎症、心肌能量代谢和微血管功能障碍等。其中，氧化应激被认为是诱导心功能障碍的主要原因[12]。已有临床研究表明，内毒素血症患者氧化应激水平与预后密切相关，且氧化应激水平越高，预后越差[13]。内毒素血症发生时，机体内超氧阴离子、羟自由基和过氧化氢等 ROS 成分大量蓄积，破坏细胞膜结构的完整性和功能，进而引起细胞凋亡，导致组织损伤和器官功能障碍。据研究，ROS 和其产生的氧化应激在细胞凋亡中发挥着关键作用，大量 ROS 可通过启动凋亡信号来促进心肌细胞凋亡。抗氧化剂如 N - 乙酰半胱氨酸可抑制或延迟细胞凋亡[14]。4-HNE是一种脂质过氧化物，通过与线粒体蛋白形成加合物对心肌发挥破坏性影响[15]。本研究结果表明一次性注射大剂量 LPS 诱导的急性心肌组织损伤模型中，心肌组织氧化损伤标志物 4-HNE 表达增加，表明 LPS 可加重心肌组织脂质过氧化，导致氧化应激损伤。

循环系统主要表达 4 种 Nox 亚型，而心肌细胞主要表达 Nox 2 和 Nox 4。Nox 2 主要位于内皮细胞、心肌细胞和成纤维细胞中，生理条件下，Nox 2 处

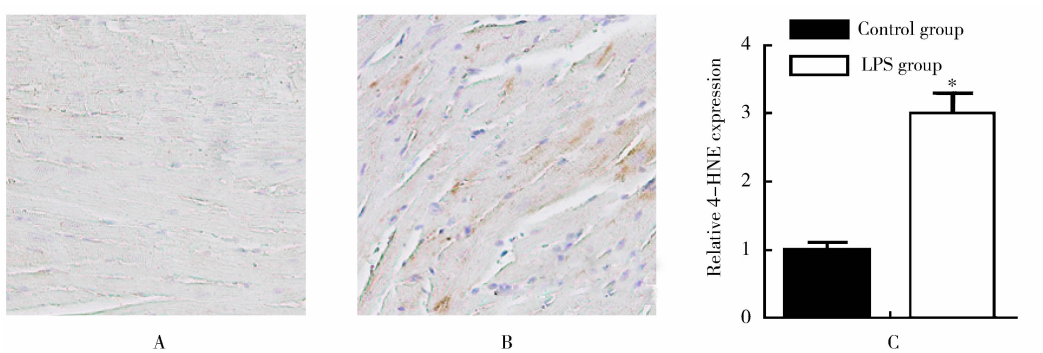


图 3 免疫组织化学法检测两组心肌组织 4-HNE 表达

Figure 3 Detection of 4-HNE expression in myocardium by immunohistochemistry (PAP ×200)

HNE: 4-hydroxynonenal. A: control group; B: LPS group; C: quantitative analysis results. Compared with control group, $^{*}P<0.05$

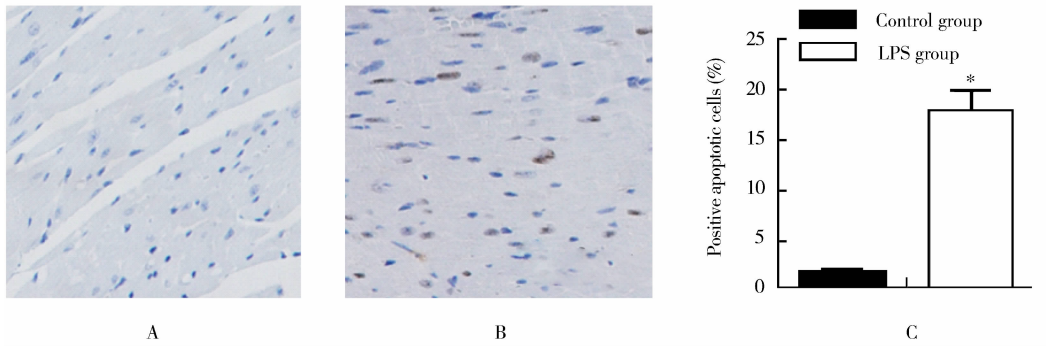


图4 TUNEL法检测心肌组织凋亡细胞

Figure 4 Detection of myocardial apoptotic cells by TUNEL (×200)

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick-end labeling. A: control group; B: LPS group; C: quantitative results. Compared with control group, $^{*}P<0.05$

于未激活状态,不具有生物功能。炎症、中毒等刺激可激活 Nox 2,通过 NADPH 将氧分子转变为游离氧。研究表明,*Nox 2* 基因在人心肌梗死区域表达增加,而敲除 *Nox 2* 基因可明显改善心肌梗死小鼠的左心室功能[16,17]。而 Nox 4 主要通过其和游离氧的歧化作用产生过氧化氢,从而调节 ROS 的生成[18]。Matsushima等[19]发现特异性敲除心脏 *Nox4* 基因可减轻压力超负荷诱导的线粒体和心功能障碍。此外,Sun 等[20]通过研究发现高级氧化蛋白产物(advanced oxidative protein products, AOPPs)可诱导细胞凋亡,Nox 4、Bax 蛋白表达增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降。上述研究提示 Nox 依赖 ROS 的产生可促进心肌细胞凋亡。本研究表明相比对照组,LPS 组心肌组织促凋亡因子 *Nox 2*、*Nox 4*、*Bax* 基因和蛋白表达增加,抗凋亡因子 *Bcl-2* 基因和蛋白表达降低,TUNEL 染色结果提示 LPS 组小鼠心肌组织凋亡细胞数增加,我们推测 Nox 依赖 ROS 的增加,激活相关通路,从而引起心肌细胞凋亡,而干预 Nox 通路有可能是治疗内毒素血症患者的有效靶点。

本研究也存在一定的局限性:Nox 是否直接通过氧化应激来发挥作用尚需进一步探讨;Nox 是否通过其他途径影响 LPS 诱导的心肌细胞凋亡尚不清楚;Nox 通过何种具体机制影响 LPS 诱导的急性心肌损伤也需后期研究探讨。

【参考文献】

[1] Zhang J, Zhao P, Quan N, *et al*. The endotoxemia cardiac dysfunction is attenuated by AMPK/mTOR signaling pathway regulating autophagy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 492(3): 520-527. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.034.

[2] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, *et al*. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016[J]. Crit Care Med, 2017, 45(3): 486-552. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255.

[3] Spencer N, Engelhardt JF. The basic biology of redoxosomes in cytokine-mediated signal transduction and implications for disease-specific therapies[J]. Biochemistry, 2014, 53(10): 1551-1564. DOI: 10.1021/bi401719r.

[4] Zhang M, Perino A, Ghigo A, *et al*. NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers? [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18(9): 1024-1041. DOI: 10.1089/ars.2012.4550.

[5] 池小钜, 吕卓, 岑娈. NADPH 氧化酶 p22phox 亚基基因多态性与高血压左心室肥厚的相关性[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2013, 12(6): 438-441. DOI: 10.3724/SP.J.1264.2013.00109.
Chi XJ, Lyu Z, Cen L. Correlation of p22phox gene polymorphism of NADPH oxidase with left ventricular hypertrophy in hypertensive patients[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2013, 12(6): 438-441. DOI: 10.3724/SP.J.1264.2013.00109.

[6] Shah AM. Parsing the role of NADPH oxidase enzymes and reactive oxygen species in heart failure[J]. Circulation, 2015, 131(7): 602-604. DOI: 10.1161/CIRC ULATIONA HA.115.014906.

[7] Um HD. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 5193-5203. DOI: 10.18632/oncotarget.6405.

[8] Maes ME, Schlamp CL, Nickells RW. BAX to basics: how the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells[J]. Prog Retin Eye Res, 2017, 57: 1-25. DOI:10.1016/j.preteyeres.2017.01.002.

[9] Odonkor CA, Achilefu S. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy[J]. Cancer Invest, 2009, 27(4): 417-429.

[10] Zhang J, Zhu D, Wang Y, *et al*. Andrographolide attenuates LPS-induced cardiac malfunctions through inhibition of $I_{\kappa}B$ phosphorylation and apoptosis in mice[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(4): 1619-1628. DOI:10.1159/000438528.

[11] Anwar MA, Choi S. Gram-negative marine bacteria: structural features of lipopolysaccharides and their relevance for economically important diseases[J]. Mar Drugs, 2014, 12(5): 2485-2514. DOI: 10.3390/md12052485.

[12] Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, *et al*. Inflammation in myocardial diseases[J]. Circ Res, 2012, 110(1): 126-144. DOI: 10.

1161/CIRCRESAHA. 111. 243170.

[13] Paoli G, Valente S, Ardissino D, *et al*. Myocardial dysfunction during sepsis: epidemiology, prognosis and treatment[J]. G Ital Cardiol (Rome), 2011, 12(12): 804 – 814. DOI: 10. 1714/996. 10825.

[14] 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. DOI: 10. 1007/s00204-013-1034-4.

[15] Deshpande M, Mali VR, Pan G, *et al*. Increased 4-hydroxy-2-nonenal-induced proteasome dysfunction is correlated with cardiac damage in streptozotocin-injected rats with isoproterenol infusion[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(5): 334 – 342. DOI:10. 1002/cbf. 3195.

[16] Yang J, Brown ME, Zhang H, *et al*. High-throughput screening identifies microRNAs that target Nox 2 and improve function after acute myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 312(5): H1002 – H1012. DOI: 10. 1152/ajpheart. 00685. 2016.

[17] Cangemi R, Calvieri C, Bucci T, *et al*. Is Nox 2 upregulation implicated in myocardial injury in patients with pneumonia? [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(18): 2949 – 2954. DOI:10. 1089/ ars. 2013. 5766.

[18] Siu KL, Lotz C, Ping P, *et al*. Netrin-1 abrogates ischemia/reperfusion-induced cardiac mitochondrial dysfunction *via* nitric oxide-dependent attenuation of Nox 4 activation and recoupling of Nos[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 78: 174 – 185. DOI: 10. 1016/j. yjmcc. 2014. 07. 005.

[19] Matsushima S, Kuroda J, Ago T, *et al*. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox 4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2013, 112(4): 651 – 663. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 112. 279760.

[20] Sun B, Ding R, Yu W, *et al*. Advanced oxidative protein products induced human keratinocyte apoptosis through the NOX-MAPK pathway[J]. Apoptosis, 2016, 21(7): 825 – 835. DOI:10. 1007/s 10495-016-1245-2.

(编辑：王彩霞)

·消 息·

《中华老年多器官疾病杂志》调整文末参考文献著录格式

自2017年1月起，我刊调整录用稿件的文末参考文献著录格式：(1)中文参考文献采用中英文双语著录，中文在前，英文在后；(2)参考文献如有“数字对象唯一标识符(DOI)”编码，应著录，列于末尾。

示例：

[1] Williamson JD, Supiano MA, Applegate WB, *et al*. Intensive *vs* standard blood pressure control and cardiovascular disease outcomes in adults aged ≥75 years: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2016, 315(24): 2673 – 2682. DOI: 10. 1001/jama. 2016. 7050.

[2] 李葳，邓雅丽，卓琳，等. 阿司匹林对于心血管疾病一级预防的效果及安全性的系统综述及meta分析[J]. 中华老年多器官疾病杂志，2016，15(12)：896 – 901. DOI：10. 11915/j. issn. 1671-5403. 2016. 12. 215.

Li W, Deng YL, Zhuo L, *et al*. Effect and safety of aspirin for primary prevention of cardiovascular diseases: a systematic review and meta analysis[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2016, 15(12): 896 – 901. DOI: 10. 11915/j. issn. 1671-5403. 2016. 12. 215.

地址：100853 北京市复兴路28号，《中华老年多器官疾病杂志》编辑部

电话：010 – 66936756

网址：www. mode301. cn

E-mail：zhlndqg@ mode301. cn