

钩藤碱增强自噬改善 TNF- α 介导的血管内皮细胞血栓前状态的研究

李超¹, 蔺琳¹, 张蕾¹, 李运伦^{2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 基于细胞自噬探讨钩藤碱对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 损伤时血栓前状态的影响。**方法** 采用 TNF- α 诱导 HUVECs 制备损伤模型, 透射电镜和免疫荧光技术观察 HUVECs 自噬水平的变化, Western blotting 法检测自噬标记蛋白微管相关蛋白轻链 3II (LC3II) /LC3I、Beclin-1、p62 和凝血相关因子核转录因子- κ B (NF- κ B)、血管假性血友病因子 (vWF) 和纤溶酶原活化物抑制剂-1 (PAI-1) 的蛋白表达水平, ELISA 法检测细胞培养上清中前列环素 (PGI₂) 和内皮素-1 (ET-1) 的量。**结果** TNF- α 上调了 HUVECs 中凝血相关因子 NF- κ B、vWF、PAI-1 蛋白的表达水平, 降低了细胞培养上清液中 ET-1 和 PGI₂ 的量 ($P < 0.05$), 使细胞中出现自噬小体, 上调 LC3II/LC3I、Beclin-1 蛋白表达水平, 下调 p62 蛋白表达水平 ($P < 0.05$); 钩藤碱能够促进 HUVECs 中自噬小体的产生, 并在一定程度上上调 LC3II/LC3I、Beclin-1 蛋白表达水平, 下调 p62 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 下调凝血相关因子 NF- κ B、vWF、PAI-1 蛋白的表达水平, 上调细胞培养上清液中 ET-1 和 PGI₂ 的量 ($P < 0.05$); 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 能够抑制钩藤碱的作用效果 ($P < 0.05$)。**结论** 钩藤碱能够通过增强自噬降低 TNF- α 介导的 HUVECs 细胞凝血相关因子的表达, 抑制血管内皮炎症损伤时血栓前状态的发生。

关键词: 钩藤碱; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞自噬; 人脐静脉内皮细胞; 血栓前状态

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)24-5224-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.026

Study on rhynchophylline reducing vascular endothelial cells prethrombotic state induced by TNF- α through enhancing autophagy

LI Chao¹, LIN Lin¹, ZHANG Lei¹, LI Yun-lun²

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of rhynchophylline on HUVECs prethrombotic state induced by TNF- α through regulating autophagy. **Methods** TNF- α was used to establish the HUVECs damage model. The change of autophagy was detected by transmission electron microscope and immunofluorescence technique. Western blotting was used to detect the LC3II/LC3I ratio and the expression of Beclin-1, p62, NF- κ B, vWF, and PAI-1. The content of ET-1 and PGI₂ in cultural supernatant was detected by ELISA. **Results** TNF- α up-regulated the expression of NF- κ B, vWF, and PAI-1 in HUVECs, and decreased the content of ET-1 and PGI₂ in cell culture supernatant ($P < 0.05$). In addition, more autophagosomes were observed in HUVECs, and the LC3II/LC3I ratio and beclin-1 expression were increased, as well as the expression of p62 was decreased ($P < 0.05$). Rhynchophylline promoted the production of autophagosome, increased the LC3II/LC3I ratio and Beclin-1 expression, and reduced the expression of p62 ($P < 0.05$). Moreover, the results showed that rhynchophylline down-regulated the expression of NF- κ B, vWF, and PAI-1, as well as reduced the content of ET-1 and PGI₂ in cultural supernatant ($P < 0.05$). 3-MA, an inhibitor of autophagy, abolished the effect of rhynchophylline to a certain extent ($P < 0.05$). **Conclusion** Rhynchophylline reduces the expression of coagulative factors induced by TNF- α through enhancing autophagy, and inhibits the prethrombotic state when vascular endothelial cells have inflammatory damage.

Key words: rhynchophylline; tumor necrosis factor alpha; autophagy; human umbilical vein endothelial cells; prethrombotic state

收稿日期: 2017-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473653)

作者简介: 李超 (1990—), 博士研究生。Tel: 15098847977 E-mail: lichao71795@163.com

*通信作者 李运伦, 男, 博士, 教授, 博士生导师。Tel: 13869102760 E-mail: li.yunlun@163.com

血栓前状态 (prethrombotic state, PTS) 是机体血栓形成前的一系列病理变化, 血栓形成是心血管危险事件发生的独立危险因素, 因此血栓前状态对于心血管病的发病及进展尤为重要。研究表明高血压患者心血管疾病的发生与患者体内存在 PTS 密切相关^[1]。高血压时出现的血管内皮受损、血小板聚集以及凝血功能异常是 PTS 发生的主要因素, 而血管内皮受损则是其始动因素^[2]。研究发现血管内皮损伤与炎症、凝血/纤溶系统之间存在密切关系, 炎症反应产生的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是造成内皮细胞损伤、细胞活性物质分泌失调以及促进高凝状态的主要原因^[3]。所以改善 TNF- α 介导的血栓前状态, 对防止高血压患者血栓形成或血栓栓塞性疾病的发生、发展具有重要意义。自噬是指细胞对自身受损细胞器和其他大分子 (如长寿蛋白) 等降解的过程, 是一种高度保守的再循环机制, 对维持细胞内环境的稳态和细胞生存至关重要^[4]。研究发现 TNF- α 能够诱导细胞发生炎症反应, 同时能够诱导细胞发生自噬现象, 而细胞自噬又能够在一定程度上防止细胞发生炎症损伤。

钩藤碱是治疗高血压常用药材钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 的主要有效成分。现代药理学研究表明, 钩藤碱具有降血压、抗氧化、抗炎以及抑制血小板聚集和血栓形成等药理活性^[5-8]。本课题组前期研究证实钩藤碱具有内皮细胞保护及抗炎作用^[9], 然而钩藤碱能否通过调控细胞自噬干预内皮细胞损伤时凝血相关因子的表达, 抑制血管内皮损伤促凝状态的发生尚不明确。因此本研究以 TNF- α 刺激人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 建立血管内皮细胞炎症损伤模型, 观察钩藤碱对 TNF- α 诱导损伤后 HUVECs 自噬水平变化的影响; 检测 HUVECs 中核转录因子- κ B (NF- κ B)、凝血相关因子血管假性血友病因子 (vWF)、纤溶酶原活化物抑制剂-1 (PAI-1) 蛋白的表达情况以及细胞培养上清中前列环素 (PGI₂) 和内皮素-1 (ET-1) 的量, 探讨钩藤碱通过调控自噬对 TNF- α 诱导的 HUVECs 损伤时血栓前状态的作用及相关机制。

1 材料

1.1 细胞

HUVECs 由山东大学齐鲁医院心血管实验室赠送。

1.2 药物与试剂

钩藤碱购于上海诗丹德生物技术有限公司 (批

号 76-66-4, 质量分数 $\geq 98.0\%$); ECM 培养基购于美国 ScienCell 公司; 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 购于美国 Sigma 公司; 雷帕霉素 (Rap) 购于美国 Gene 公司; Beclin-1、人微管相关蛋白轻链 3II (LC3II)/LC3I、NF- κ B 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司; p62、PAI-1、vWF 抗体及 ET-1 ELISA 试剂盒购于美国 Abcam 公司; PGI₂ ELISA 试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司; β -actin 抗体购于南京建成生物科技有限公司。腺病毒转染试剂盒购于汉恒生物科技有限公司。

1.3 仪器

CO₂ 孵箱 (Heraeus 公司); 超净工作台 (广州龙弘自动化设备有限公司); 荧光倒置显微镜 (Zeiss 公司); 电泳仪、半干转电转仪 (美国 Bio-Rad 公司); 全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及给药

HUVECs 用 ECM 培养基 (含有 5% 胎牛血清、1% 内皮细胞生长因子和 1% 青霉素/链霉素) 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。隔天换液 1 次, 镜下观察细胞融合至 80% 时传代培养。参照文献方法^[10], 选用质量浓度为 10 μ g/L 的 TNF- α 与细胞共同孵育 6 h 制备 HUVECs 损伤模型。将细胞随机分为 6 组, 即对照组 (加入完全培养基)、模型组 (TNF- α 10 μ g/L)、DMSO 溶剂对照组 (TNF- α 10 μ g/L + 0.4% DMSO)、Rap 组 (TNF- α 10 μ g/L + Rap 100 nmol/L)、钩藤碱组 (TNF- α 10 μ g/L + 钩藤碱 12 mg/L)^[11]、钩藤碱 + 3-MA 组 (TNF- α 10 μ g/L + 钩藤碱 12 mg/L + 3-MA 5 mmol/L)。模型制备完成后细胞继续培养 24 h 进行指标检测。

2.2 指标检测

2.2.1 透射电镜观察自噬小体 药物作用结束后, 去除培养基并加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 2 次, 然后用细胞刮刀轻轻刮下, 并吹打使其形成单细胞悬液, 加入离心管中以 1 000 r/min 离心 10 min, 小心去除上清液, 向底部细胞团块中缓缓加入 1.5 mL 3% 戊二醛固定液进行固定, 后送至济南微亚生物科技有限公司进行双固定、脱水等后续工作。

2.2.2 免疫荧光技术观察绿色荧光蛋白-人微管相关蛋白轻链 3 (GFP-LC3) 表达 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 24 孔板中每孔加入 500 μ L 细胞悬液, 37 °C 培养过夜, 待细胞密度 40%~60% 时进行病毒

转染。将腺病毒取出并在冰上缓慢融化,按照说明书采用 1/2 体积感染法。吸去原有培养基,加入 1/2 体积新鲜培养基,加入终质量浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 的聚凝胺,选定 $\text{MOI}=100$ 计算病毒总量,换算病毒原液体积。温箱孵育转染 6 h 后换用完全培养基培养 24 h,然后进行药物干预(步骤同“2.1”项下)。干预结束后用 4%多聚甲醛室温固定 10 min,加入抗荧光淬灭剂封片,于激光共聚焦显微镜下拍照并采集图像。

2.2.3 Western blotting 检测 LC3II/LC3I、Beclin-1、p62、NF- κB 、vWF、PAI-1 蛋白的表达 取“2.1”项下药物作用后的细胞,冰上操作,加入 200 μL RIPA 裂解液(含 20% PMSF)并用无菌细胞刮刀轻轻刮取细胞,冰浴 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。以 1:4 将 5 $\times$ SDS 与蛋白质样品振荡混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 min 变性,冰浴冷却,制得样品。按照预先测定的蛋白浓度计算上样量,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜,将膜放入 5%的脱脂奶粉中室温摇床封闭 1 h 后加入一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,加入二抗室温摇床孵育 1 h,配置 ECL 显色液并进行显色曝光,以 β -actin 为内参进行灰度值分析。

2.2.4 细胞培养上清液中 ET-1、PGI₂ 量的检测 按“2.2.3”项下方法取细胞上清液,1 000 r/min 离心 5 min, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存以备检测。采用 ELISA 试剂盒进行检测,依据说明书要求配制相关试剂并进行操作,

用酶标仪在 450 nm 的波长下测定各孔吸光度(A)值。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,在满足正态性检验和方差齐性的前提下,进行单因素方差分析,采用 LSD- t 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 透射电镜观察各组 HUVECs 自噬小体产生情况

与对照组 HUVECs 比较,模型组细胞内出现了含有胞浆成分的液泡状双层膜或新月状双层膜结构(图 1)。DMSO 组与模型组细胞没有明显的差异,Rap 组和钩藤碱组细胞内的双层膜结构明显增多,而 3-MA 能够显著削弱钩藤碱的作用效果。

3.2 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 中 GFP-LC3 表达的影响

图 2 结果表明,与对照组比较,TNF- α 干预后,HUVECs 中绿色荧光点明显增多,Rap 和钩藤碱能够显著增加细胞内 GFP-LC3 的表达水平,而 3-MA 能够显著抑制钩藤碱上调 GFP-LC3 表达水平的作用。提示 TNF- α 干预 6 h 后能够诱导细胞发生自噬现象,而钩藤碱进一步促进了自噬以达到保护细胞的作用。

3.3 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 中自噬标记蛋白 LC3II/LC3I、Beclin-1、p62 蛋白表达的影响

由图 3 结果可知,与对照组比较,TNF- α 能够上调 HUVECs 中 LC3II/LC3I 和 Beclin-1 蛋白的表达水平,降低 p62 蛋白的表达水平($P<0.05$)。与模型组比较,自噬激活剂 Rap 和钩藤碱均能够明显

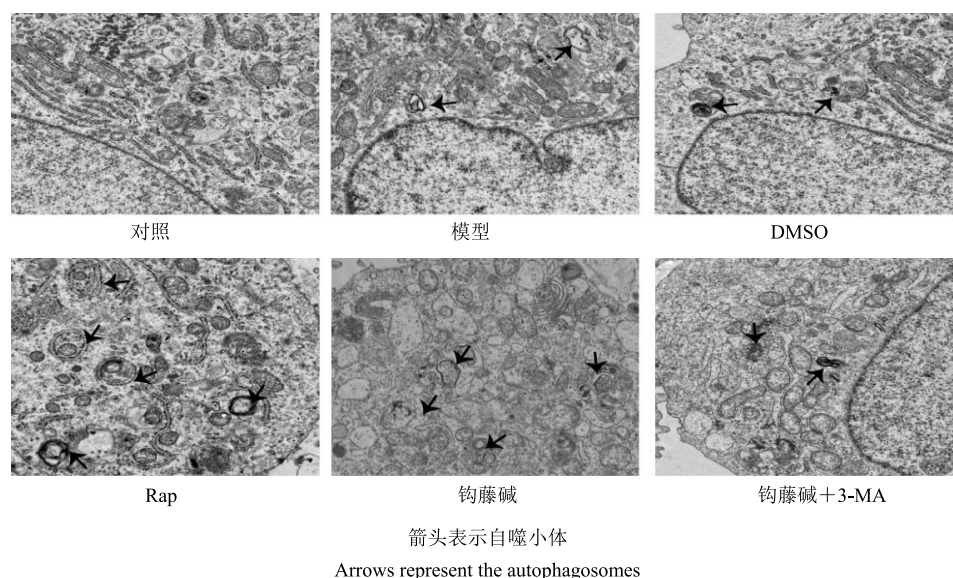


图 1 透射电镜观察各组细胞自噬小体 ($\times 10\ 000$)

Fig. 1 Autophagosomes of each group observed by transmission electron microscope ($\times 10\ 000$)

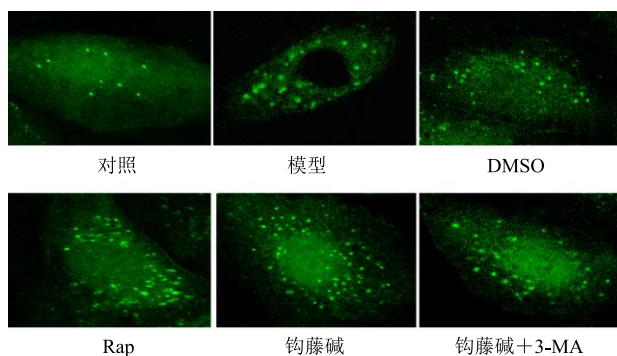
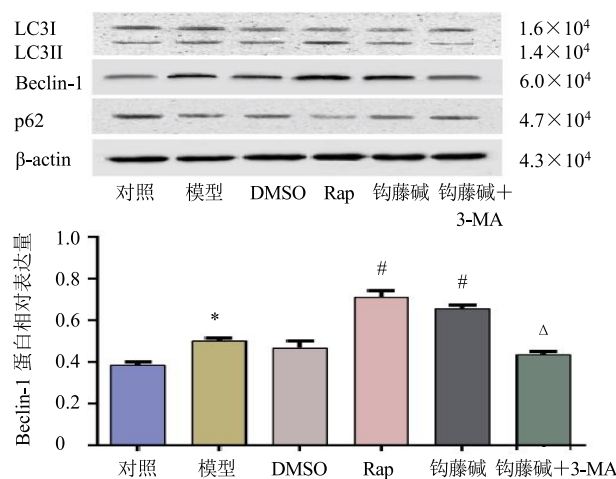


图 2 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 细胞中 GFP-LC3 表达的影响 ($\times 1000$)

Fig. 2 Effect of rhynchophylline on expression of GFP-LC3 in HUVECs induced by TNF- α ($\times 1000$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TNF- α 组比较: # $P < 0.05$; 与钩藤碱组比较: $\Delta P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs TNF- α group; $\Delta P < 0.05$ vs rhynchophylline group, same as below

图 3 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 中 LC3II/LC3I、Beclin-1、p62 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of rhynchophylline on protein expression of LC3II/LC3I, Beclin-1, and p62 in HUVECs induced by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

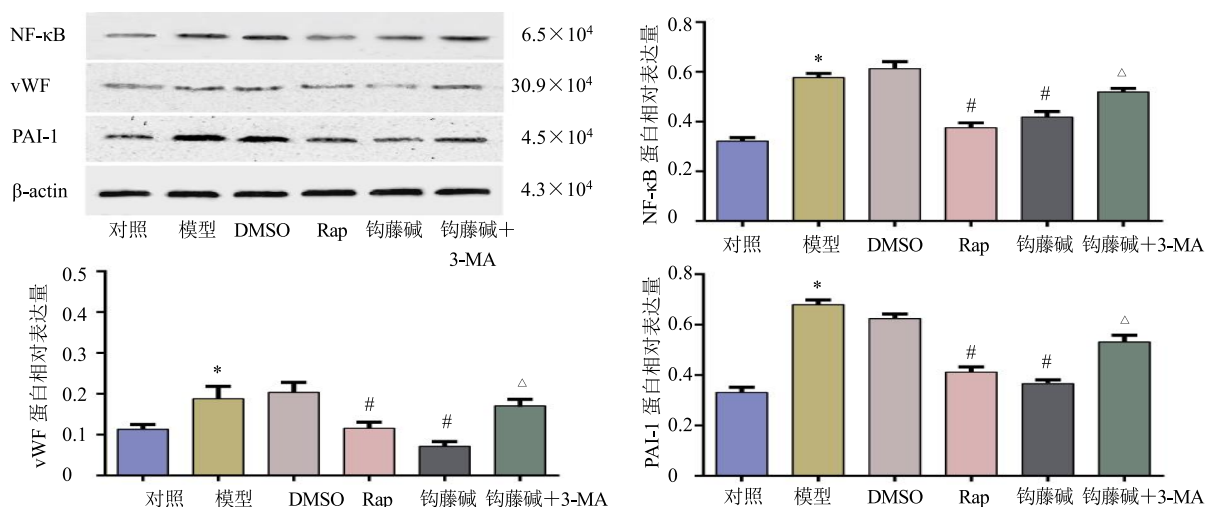


图 4 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 细胞中 NF- κ B、vWF、PAI-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of rhynchophylline on protein expression of NF- κ B, vWF, and PAI-1 in HUVECs induced by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

增强这一效应, 并且自噬抑制剂 3-MA 能够显著抑制钩藤碱的作用效果 ($P < 0.05$)。DMSO 组与模型组比较各蛋白表达水平无明显差异。

3.4 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 中凝血相关因子 NF- κ B、vWF、PAI-1 蛋白表达的影响

由图 4 结果可知, 与对照组比较, TNF- α 能够明显上调 HUVECs 中 NF- κ B、vWF、PAI-1 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$), 与模型组比较, Rap 和钩藤碱均能够不同程度地下调 HUVECs 中 NF- κ B、vWF、PAI-1 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$)。3-MA 能够显著抑制钩藤碱的作用效果 ($P < 0.05$)。DMSO 组与模型组比较各蛋白表达水平无明显差异。

3.5 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 中 ET-1 和 PGI2 量的影响

与对照组比较,模型组细胞上清液中 ET-1 和 PGI2 的量显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,Rap 和钩藤碱能够明显促进细胞分泌释放 ET-1 和 PGI2, ($P<0.05$)。3-MA 能够抑制钩藤碱的作用效果 ($P<0.05$)。DMSO 组与模型组 ET-1 和 PGI2 比较无明显差异。结果见表 1。

表 1 钩藤碱对 TNF- α 诱导的 HUVECs 细胞中 ET-1 和 PGI2 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects of rhynchophylline on levels ET-1 and PGI2 in supernatant of cell culture ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	PGI2/(pg·mL ⁻¹)
对照	14.79 $\pm$ 2.31	36.85 $\pm$ 6.33
模型	8.77 $\pm$ 3.13 [*]	14.21 $\pm$ 4.99 [*]
DMSO	8.43 $\pm$ 3.69	15.88 $\pm$ 7.44
Rap	11.73 $\pm$ 2.95 [#]	28.19 $\pm$ 8.53 [#]
钩藤碱	13.77 $\pm$ 3.02 [#]	31.61 $\pm$ 7.74 [#]
钩藤碱+3-MA	9.82 $\pm$ 2.43 [^]	22.84 $\pm$ 8.45 [^]

4 讨论

高血压患者的血管内皮存在显著的炎性损伤,而炎性损伤能够在不同程度上削弱血管内皮细胞调节凝血、抗凝以及纤溶系统等能力,使血液呈现高凝状态,促进机体血栓前状态的形成和进展,触发病理性血栓的形成。TNF- α 是炎性损伤的主要效应分子,是由激活的巨噬细胞分泌的一类具有多种生物学效应的炎性促进因子,对血管内皮细胞具有直接损伤作用。越来越多的研究揭示了 TNF- α 通过介导炎性损伤诱导血栓前状态的内在机制, TNF- α 与内皮细胞膜上的 TNF- α 受体相结合,通过上调 ET-1 的量、抑制内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的表达、抑制精氨酸活性等途径诱导内皮细胞的炎性反应和内皮功能紊乱,进而改变内皮细胞的凝血/纤溶功能,导致炎性-凝血的发生^[12-14]。因此,有效地减轻炎性反应诱导的血栓前状态,降低相关蛋白因子的表达,对预防高血压血栓形成和心脑血管等不良事件的发生具有重要意义。

血栓前状态的特异性标志物一直是国内外学者的研究焦点,vWF 是反映内皮细胞损伤的重要标记分子,不仅能够促进血小板趋向血管损伤部位并黏附,还对机体维持凝血与抗凝的动态平衡具有重要的作用。近年来研究证实,vWF 是预测 H 型高血压

患者血栓前状态较为敏感的指标^[15]; PAI-1 是反映机体纤溶功能的关键物质,人体内大部分的 PAI-1 由内皮细胞产生,并抑制血浆组织纤溶酶原激活物 (t-PA) 的活力,削弱机体的纤溶功能,促进凝血功能亢进和血栓的形成^[16]; ET-1 主要由内皮细胞分泌,通过促进血管收缩,维持内皮舒张功能和血流稳定,进而达到预防血栓形成的作用; PGI2 具有显著的舒张血管的作用,此外,研究发现, PGI2 具有明显的抑制二磷酸腺苷 (ADP) 诱导的血小板聚集、增强 P2Y₁₂ 受体阻断以及抗血栓形成的作用^[17-18]。本研究结果表明, TNF- α 明显促进了 HUVECs 凝血相关因子 NF- κ B、vWF、PAI-1 的蛋白表达水平,降低了 ET-1 和 PGI2 分泌释放的量,与文献报道^[12-14] TNF- α 上调 ET-1 的结果存在差异,可能是因为离体细胞实验和动物实验存在不同的影响因素。

细胞自噬是细胞应对外环境改变的一种自体保护机制,能够形成双层膜结构包裹受损的细胞器等胞内大分子物质,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,对膜内物质进行降解和回收利用,饥饿、缺氧、氧化应激和炎性反应等均能够诱导自噬的产生以减轻细胞损伤^[19]。研究证实,自噬在细胞炎性损伤的自体保护机制中具有着重要的作用^[20]。自噬通过消除胞内损伤的有机体,下调炎性细胞因子的产生和释放,抑制炎性信号的传导^[21],此外,自噬还能够降低胞内受损的细胞器,例如受损的线粒体,以减少受损线粒体产生活性氧进一步损伤细胞^[22]。本课题组前期研究证实,钩藤碱具有降低炎性细胞因子分泌和抗炎的作用^[6,9],进一步研究发现,钩藤碱还能够通过增强自噬降低氧化低密度脂蛋白介导的内皮细胞炎性损伤。推测钩藤碱能够通过调控自噬抑制 TNF- α 介导的血管内皮细胞血栓前状态。本研究结果表明, TNF- α 在促进 HUVECs 释放凝血相关因子的同时诱导其发生细胞自噬现象,而 Rap 上调自噬水平能够明显降低凝血相关因子 NF- κ B、vWF、PAI-1 的蛋白表达水平,促进 ET-1 和 PGI2 的分泌,钩藤碱与 Rap 具有相似的效应,并且自噬抑制剂 3-MA 能够显著抑制钩藤碱的作用效果。

本研究以炎性介导的血栓前状态为切入点,从细胞自噬的角度揭示抗高血压中药有效成分钩藤碱的血管保护效应。研究发现,钩藤碱通过上调自噬降低 TNF- α 介导的血管内皮细胞凝血相关因子 NF- κ B、vWF、PAI-1 蛋白的表达,促进了 ET-1 和 PGI2 的分泌释放,抑制 TNF- α 介导的血栓前状态。

本研究仅通过体外细胞实验揭示钩藤碱对TNF- α 介导的血管内皮细胞血栓前状态的作用及机制,在接下来的研究中,将进一步通过动物实验从整体深入验证。

参考文献

- [1] Catena C, Colussi G, Brosolo G, *et al.* A prothrombotic state is associated with early arterial damage in hypertensive patients [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19(5): 471-478.
- [2] Xu Y, Gong B, Yang Y, *et al.* Adenovirus-mediated overexpression of glutathione transferase mitigates transplant arteriosclerosis in rabbit carotid allografts [J]. *Transplantation*, 2010, 89(4): 409-416.
- [3] Moreira D M, da Silva R L, Vieira J L, *et al.* Role of vascular inflammation in coronary artery disease: potential of anti-inflammatory drugs in the prevention of atherothrombosis. Inflammation and anti-inflammatory drugs in coronary artery disease [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2015, 15(1): 1-11.
- [4] 程 勇, 徐振平, 孙爱军. 自噬的分子医学研究进展 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2011, 11(2): 121-123.
- [5] Shin S C, Lee D U. Ameliorating effect of new constituents from the hooks of *Uncaria rhynchophylla* on scopolamine-induced memory impairment [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(4): 391-395.
- [6] 姜月华, 李运伦, 赵 婧, 等. 钩藤碱对D-半乳糖诱导的内皮细胞衰老的干预 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(6): 474-478.
- [7] 孙敬昌, 齐冬梅, 周洪雷, 等. 钩藤生物碱对自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞凋亡和增殖的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(7): 925-929.
- [8] 田丽娜, 高华武, 龙子江, 等. 钩藤碱对自发性高血压大鼠的降压作用及其对血管的调节机制探讨 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2210-2213.
- [9] 杨金果, 李运伦, 周洪雷. 钩藤和莱菔子生物碱抗高血压血管内皮细胞损伤效应 [J]. 中成药, 2013, 35(5): 15-19.
- [10] 陈明亮, 易 龙, 金 鑫, 等. 白藜芦醇对TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症反应的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(13): 1255-1258.
- [11] 李运伦. 钩藤碱和异钩藤碱抑制血管紧张素II诱导血管平滑肌细胞增殖及相关机制 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 53-58.
- [12] Sharon D K, Edward W V, Maro R P, *et al.* Effects of 17-hydroxyprogesterone on tumor necrosis factor- α -induced hypertension during pregnancy [J]. *Am J Hypertens*, 2009, 22(10): 1120-1125.
- [13] Goodwin B L, Pendleton L C, Levy M M, *et al.* Tumor necrosis factor- α reduced argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(2): 1115-1121.
- [14] Gao X, Belmadani S, Picchi A, *et al.* Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in leprdb mice [J]. *Circulation*, 2007, 115(2): 245-254.
- [15] 陈孝红, 王 卓, 马 婷, 等. vWF预测H型高血压患者血栓前状态的意义 [J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(5): 74-77.
- [16] Nicholl S M, Roztocil E, Davies M G. Plasminogen activator system and vascular disease [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006, 4(2): 101-116.
- [17] Ruan C H, Dixon R A, Willerson J T, *et al.* Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension [J]. *Tex Heart Inst J*, 2010, 37(4): 391-399.
- [18] Chan M V, Knowles R B, Lundberg M H, *et al.* P2Y₁₂ receptor blockade synergizes strongly with nitric oxide and prostacyclin to inhibit platelet activation [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 81(4): 621-633.
- [19] De Meyer G R, Martinet W. Autophagy in the cardiovascular system [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(9): 1485-1495.
- [20] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation [J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 323-335.
- [21] Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 722-737.
- [22] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.