

• 综 述 •

血管内皮细胞损伤模型及中药保护作用研究进展

马桂鑫, 赵文文, 陈修平*

中药质量研究国家重点实验室 澳门大学中华医药研究院 澳门大学, 澳门特别行政区

摘 要: 血管内皮细胞损伤参与了多种心脑血管疾病发生发展的病理过程。合适的内皮损伤模型是探讨内皮细胞损伤的分子机制、筛选相关保护作用药物的重要工具。引起内皮损伤的因素众多, 机制与病理意义各异。氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)、末端晚期糖基化终末产物(AGEs)、过氧化氢(H₂O₂)、同型半胱氨酸(Hcy)、血管紧张素 II(Ang II)等已被成功应用于建立内皮细胞损伤模型。总结了目前最为常用的内皮细胞损伤模型。同时, 对这些模型具有保护作用的中药进行概述, 以期为目标内皮细胞的药物筛选以及相关中药的研究和开发提供参考。

关键词: 内皮细胞; 损伤模型; 氧化低密度脂蛋白; 末端晚期糖基化终末产物; 过氧化氢; 同型半胱氨酸; 血管紧张素 II; 中药

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)02-0276-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.023

Research progress in injury model of vascular endothelial cells and protective effect of Chinese materia medica

MA Gui-xin, ZHAO Wen-wen, CHEN Xiu-ping

State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao, China

Key words: endothelial cells; injury model; oxidized low density lipoprotein; advanced glycation end products; hydrogen peroxide; homocysteine; angiotensin II; Chinese materia medica

血管内皮细胞是覆盖于血管内膜表面的单层扁平或多角形的细胞, 在维持血管渗透性、传递血管信息和分泌血管活性物质等方面起关键作用。内皮细胞损伤在动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、脑血管疾病等病理过程中起着重要作用。

内皮细胞损伤模型是阐明内皮损伤机制、筛选内皮保护药物的重要工具。目前, 用于损伤模型制备的内皮细胞主要有原代培养的内皮细胞和内皮细胞株两类。前者是来源于实验动物(鼠、牛、猪等)或者人的血管(如主动脉、冠状动脉、脑动脉、肺动脉、脐静脉等), 需原代分离培养, 在体外只能传非常有限的代数。其中, 最为常用的是人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,

HUVECs)。后者类似肿瘤细胞株, 可传至多代, 且有商品化的可供直接使用, 如 HUVEC-12、CRL-1730、EA.hy926 等。ECV304 细胞也曾被认为是内皮细胞, 但最近研究显示, 该细胞为膀胱癌细胞株^[1]。引起内皮细胞损伤的因素有多种, 如氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)、末端晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)、同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)、血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)、细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素等。目前常用的内皮细胞损伤模型正是利用这些损伤因素所建立的。

收稿日期: 2013-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160048); 澳门科学技术发展基金资助项目(021/2012/A1, 077/2011/A3); 澳门大学研究基金资助项目(MRG007/CXP/2013/ICMS)

作者简介: 马桂鑫(1989—), 男, 中药学在读硕士, 主要从事心血管药理学方面基础研究。

*通信作者 陈修平(1977—), 男, 博士, 助理教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管药理学、肿瘤药理学研究。

Tel: (0853)83974873 E-mail: xpchen@umac.mo

1 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤模型

ox-LDL 是血浆中低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 经过氧化修饰的产物。制备 LDL 可通过超速离心机密度梯度离心人血浆。LDL 氧化修饰可通过细胞介导 (生物氧化修饰) 或过渡金属离子、自由基等介导 (化学氧化修饰)。其中利用 Cu^{2+} 等对 LDL 进行化学修饰是体外制备 ox-LDL 的常用方法^[2]。LDL 被氧化成 ox-LDL 后, 其组成成分和生物活性等发生很大变化, 在动脉粥样硬化发病过程中起着重要作用^[3]。

ox-LDL 可以从多条途径直接或间接损伤血管内皮细胞^[4]。一是与其受体结合, 上调相关基因及蛋白表达。与 ox-LDL 结合的受体很多, 但主要表达于内皮细胞的是凝集素样 ox-LDL 受体-1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)。LOX-1 是一种 II 型单链跨膜蛋白, 属 C 型选择素家族, 介导了 ox-LDL 诱导的内皮损伤: 诱导内皮细胞的凋亡、内皮细胞与单核细胞的黏附、巨噬细胞转化为泡沫细胞、诱导产生金属蛋白酶降解胞外基质蛋白等, 在动脉粥样硬化的病理过程中起着重要作用^[5]。

ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤模型, 是最常用的内皮细胞损伤模型之一。在体外损伤模型中, ox-LDL 的质量浓度一般需要 50 $\mu\text{g/mL}$ 以上。由于不同实验室制备的 ox-LDL 存在异质性 (氧化程度的不同), ox-LDL 使用的浓度相差较大。ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤主要有坏死和凋亡 2 种, 高质量浓度 (一般在 150 $\mu\text{g/mL}$ 以上) 的 ox-LDL 可直接诱导内皮细胞坏死。ox-LDL 诱导的内皮损伤主要是氧化损伤, ox-LDL 可通过结合 LOX-1, 调节 NADPH 氧化酶、线粒体电子传递链等活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 源, 诱导细胞内生成大量 ROS。生成的 ROS 一方面可与 NO 结合, 生成过氧亚硝酸阴离子 (ONOO^-), 降低 NO 浓度, 抑制血管舒张; 另一方面, ROS 可作为第 2 信使调节 p38 丝裂素活化蛋白激酶 (p38MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、细胞核因子- κB (NF- κB) 等信号途径引起内皮损伤^[5-7]。最近研究显示, ox-LDL 也可诱导内皮细胞内质网应激和自噬^[8], 后者被认为是区别于凋亡和坏死的另一种细胞死亡方式。值得一提的是, 低浓度的以及低氧化程度的 ox-LDL 不但不引起内皮细胞损伤, 却能促进其增殖、迁移以及血管生成^[9-11], 其主要机制是激活 DNA 结合抑

制子 1 (Id1) 和 p53^[9]、调节 p27Kip1、激活 RohA^[10]、调节 PI3K/Akt/eNOS 通路^[11]等。

研究发现, 一些中药及其活性成分对 ox-LDL 诱导损伤的血管内皮细胞有明显的保护作用, 如银杏叶提取物^[12-13]、桔梗提取物以及桔梗皂苷 D^[14-15]、石榴皮提取物^[16]、厚朴中的和厚朴酚和木兰醇^[17]、芳香植物中的丁香油酚^[18]、大蒜提取物及其主要活性成分 S-烯丙基半胱氨酸^[19]、虎杖中的白藜芦醇^[20-23]、黄连中的小檗碱^[24]、多种中药中的槲皮素和异鼠李素^[25]等。

2 AGEs 诱导的内皮细胞损伤模型

AGEs 是由还原性糖的醛基与蛋白质 N 端游离氨基酸或赖氨酸残基的 ϵ 氨基团, 经非酶促糖基化反应形成的复杂混合物的统称。其生成过程主要是蛋白质的氨基与还原糖的羰基在无酶条件下发生反应, 生成不稳定的薛夫碱 (Schiff bases), 后者重排生成酮胺, 即阿马多里 (amadori), 再经进一步脱水、环化、氧化、重组, 最终生成 AGEs。目前结构较明确的 AGEs 成分有: 戊糖苷素、交联素、N-羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸等^[26-27]。AGEs 是糖尿病、心血管疾病发病的重要病理因子^[28]。

目前认为, AGEs 主要通过与其细胞表面特异受体——晚期糖基化终末产物受体 (receptor of advanced glycation end-products, RAGE) 相互作用产生效应。RAGE 定位于细胞膜, 是 I 型单次跨膜蛋白, 属免疫球蛋白超家族受体。AGEs 与受体结合后激活多条信号转导通路: p44/p42 MAPK、P21ras、P38MAPK、SAPK/JNK MAPKs、NF- κB 、cdc42/rac、PI3K、JAK/Stat、ROS 等^[29-30]。AGEs 作用于不同类型细胞可经由不同的通路诱导不同的生物学效应。

在体外实验中, AGEs 可通过还原糖 (D-葡萄糖、D-果糖、D-核糖、D-脱氧核糖等) 与牛血清白蛋白在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育制备。通过检测 AGEs 的荧光强度 (E_x/E_m , 330 nm/416 nm)、游离氨基酸、游离胺量、羰基量、果糖胺残基等对其进行化学表征^[2]。与 ox-LDL 相比, AGEs 诱导损伤血管内皮细胞的效能较低, 大多在 100 $\mu\text{g/mL}$ 以上方显示出较明显的作用。其中的单体成分毒性相对较大, 但分离、纯化困难, 目前研究较少。AGEs 诱导内皮细胞损伤的机制主要是诱导内质网应激、影响内皮细胞迁移和黏附、自噬、凋亡等。其中可通过 RAGE 依赖性和非依赖性 2 条途径, 诱导内皮 ROS 生成、增加丙二醛 (MDA) 生成, 升高细胞内 Ca^{2+} 浓度, 降低 NO

生成, 调节 NF- κ B、PI3K/Akt、p38MAPK 通路, 促进糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β) 磷酸化等^[31-37]。

研究发现, 许多中药的有效成分对 AGEs 诱导的内皮损伤有抑制作用, 如葛根中的毛蕊异黄酮-7-O-吡喃葡萄糖苷通过逆转 AGEs 诱导的 ERK1/2 激活和 NF- κ B 磷酸化, 抑制氧化应激、上调 Bcl-2 表达和下调 Bax、Bad 水平等抑制 AGEs 诱导的 HUVEC 凋亡^[38]; 葡萄籽原花青素提取物以及葡萄籽原花青素 B2 通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor gamma, PPAR γ) 抑制血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 表达、调节 Bax 与 Bcl-2 的比值、促进 GSK3 β 磷酸化等保护 AGEs 诱导的内皮细胞损伤^[37,39-41]。此外, 藏红花中提取的西红花酸^[42]、虎杖中的白藜芦醇^[39]等对 AGEs 诱导的内皮细胞损伤也有保护作用。

3 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤模型

内皮细胞对氧化应激的损伤非常敏感, 过量 ROS 的产生可导致细胞膜、蛋白质和核酸的氧化损伤。H₂O₂ 是内皮细胞产生的主要 ROS 之一。低浓度的 H₂O₂ 是维持内皮细胞生长和增殖的必要条件, 但是短时间内大量地生成 H₂O₂ 则会引起内皮细胞功能损伤。H₂O₂ 很容易透过细胞膜, 过量的 H₂O₂ 可诱导内皮炎症、促进内皮细胞凋亡、促进单核细胞的黏附、抑制 NO 的产生等^[43-44]。

H₂O₂ 对内皮细胞毒性较大, 且由于来源方便、价格低廉、损伤效果明显等优点, 成为目前广泛应用的研究氧化损伤的工具药物。内皮细胞对 H₂O₂ 敏感, 在微摩尔级浓度即可损伤内皮细胞。然而在诱导内皮细胞损伤模型中, H₂O₂ 浓度差别巨大, 从数十至数百甚至可达毫摩尔级别^[45-47]。其原因部分是由于实验条件尤其是孵育时间的不同 (从数分钟到 24 h 甚至更长)。不同的内皮细胞对其损伤的敏感性差异较大也是可能的原因之一。此外, 还可能由于 H₂O₂ 稳定性差, 易于分解。故近年来也有采用较稳定的叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, TBHP) 代替 H₂O₂ 制备该模型。TBHP 损伤的机制基本与 H₂O₂ 相同, 也主要是氧化损伤。不少研究应用该模型时利用二氯二氢荧光素-乙酯乙酸酯 (DCFH₂-DA) 及其类似物作为 ROS 荧光探针测定细胞内 ROS 的生成, 这时需要注意 H₂O₂ 本身就能强烈氧化 DCFH₂-DA 成 DCF, 产生强烈的荧光^[48], 可引起假阳性结果。

利用该模型评价中药保护作用的研究较多, 余甘果提取物在 EA.hy926 细胞中预孵育可明显降低 H₂O₂ 诱导的细胞死亡, 增加 ROS 生成、激活 PI3K/Akt 通路, 但不影响 NF- κ B 水平^[47]。在人冠状动脉内皮细胞, 白藜芦醇抑制 H₂O₂ 诱导的细胞损伤同时增加谷氨酸半胱氨酸连接酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶的蛋白表达以及谷胱甘肽的量^[49]。连翘中的金丝桃苷通过激活细胞外调节蛋白激酶 (ERK)、诱导 Bcl-2 表达、降低 Bax 水平、抑制 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 凋亡^[50]。在大鼠脑微血管内皮细胞, 丹酚酸 B 通过 PI3K/Akt/Raf/MEK/ERK 途径保护 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡^[51]。此外, 川芎-当归提取物^[52]、丹参酮 II_A^[53]、紫葳总黄酮^[54]、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)^[55]、槲皮素^[55-57]、水飞蓟宾^[58]、淫羊藿苷^[59]等在该模型中也显示出较明显的保护作用。

4 Hcy 诱导的内皮细胞损伤模型

Hcy 是蛋氨酸代谢过程中的中间产物, 是近年来特别受重视的血管损伤因素之一。Hcy 血症是血管内皮细胞损伤的独立危险因素。内皮细胞对 Hcy 损伤较为敏感, Hcy 内皮细胞损伤模型早在 20 世纪 80 年代初即有报道^[60]。Hcy 抑制内皮细胞的生长以及诱导其死亡等损伤机制复杂, 可能涉及抑制 cyclin A 的转录以及通过抑制 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 而抑制 DNA 甲基化^[61], 通过促进类花生酸的代谢及黄嘌呤氧化酶系统增加自由基生成^[62]、上调 Noxa 表达^[63]、降低 NO 的生物有效性^[64]、通过 IRE1/TRAF2 通路激活 c-jun 氨基末端激酶 (JNK) 和转录抑制子 ATF3/LRF1^[65]等。最新研究显示, Hcy 可通过低甲基化 p66shc 启动子的特异 CpG 二核苷酸上调 p66shv 的表达 (位点特异性表观调节) 诱导内皮功能障碍^[66]; Hcy 可激活酸性鞘磷脂酰胺通路^[67]、诱导二甲基精氨酸甲基精氨酸二甲胺 2 (dimethylarginine dimethylaminohydrolyase 2, DDAH2) 启动子低甲基化诱导内皮细胞凋亡^[68]。此外, 反应元件结合蛋白 (CREB) 通路介导的果蝇同源蛋白 3 (tribbles related protein 3, TRB3) 被认为是 Hcy 阻滞细胞周期的关键分子^[69]。

富含 S-烯丙基半胱氨酸的老年大蒜提取物 (aged garlic extract, AGE) 可抑制高 Hcy 诱导的 NO 降低^[70]; 淫羊藿苷通过激活 PI3K/AKT-eNOS 信号通路延缓 Hcy 诱导内皮细胞衰老^[71]; 槲皮素通过降低 MDA 的量、促进内皮素的释放、提高超氧

化物歧化酶(SOD)活性和NO量以及调节NF- κ B水平等抗氧化、抗炎作用,抑制Hcy诱导的内皮细胞损伤^[72]。此外,丹参素^[73]、大豆提取物^[74]、银杏内酯A^[75]、黄芪及其主要成分黄芪皂苷^[76-77]、红景天苷^[78]等对Hcy诱导的内皮细胞损伤均有保护作用。

5 Ang II诱导的内皮细胞损伤模型

Ang II是强烈的缩血管物质,在血管平滑肌细胞,Ang II通过其受体AT1介导,激活各种细胞内的蛋白激酶,如受体或非受体酪氨酸激酶,包括表皮生长因子受体(EGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、c-Src、PYK2、FAK、JAK2;激活丝氨酸/苏氨酸激酶,如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族、P70S6激酶Akt蛋白/蛋白激酶B和各种蛋白激酶C亚型等^[79]。在内皮细胞,Ang II可通过AT1和AT2诱导内皮细胞凋亡^[80]。其损伤血管内皮细胞的机制包括增加血管内皮细胞或其内膜的通透性以促进脂质的沉积和有害物质的侵入;激活NF- κ B,加重炎症反应^[81];激活细胞膜表面的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶,以及NADPH氧化酶,促进ROS生成,诱导氧化应激^[82-83];激活蛋白激酶C途径,促进内皮素1和依前列醇释放^[84]以及降低NO的量^[80]等。

内皮细胞对Ang II敏感,纳摩尔级别Ang II即可引起内皮细胞显著损伤。Ang II(1~100 nmol/L)通过激活p38 MAPK/HSP27通路,时间和剂量依赖性诱导HUVEC应力纤维的形成和通透性增加,这可被EGCG所抑制^[85]。绿茶多酚(GTP)和黑茶多酚(BTP)通过下调NADPH氧化酶亚基p22phox和p67phox的表达,降低细胞内ROS的生成,改善Ang II诱导的牛颈动脉内皮细胞通透性^[86]。在猪主动脉内皮细胞,丹参酮II_A抑制Ang II诱导的NO生成减少和内皮型NO合酶(eNOS)表达降低^[87]。

其他引起内皮细胞损伤的常见因子还有TNF- α 、LPS、线粒体电子传递链抑制剂鱼藤酮、谷氨酸等。缺血、缺氧等也可被用来制备内皮细胞损伤模型,其中Z-藁本内酯^[88]、灯盏花素^[89]对TNF- α 和谷氨酸诱导的内皮细胞损伤有保护作用。

6 结语与展望

内皮细胞不再被认为是一层单单的细胞屏障,而是参与了多种疾病的发生、发展的病理过程。内皮细胞激活、功能失调和损伤可能是多种心脑血管疾病尤其是动脉粥样硬化的重要始动环节之一。因此,抑制内皮细胞损伤对防治心脑血管疾病具有重

要意义。多种因子诱导的内皮细胞损伤模型已广泛应用于内皮细胞损伤机制的探讨和内皮细胞保护药物的筛选。本文总结了目前常用的血管内皮细胞损伤模型,制备这些模型的损伤因素均被证实与心血管疾病的发生、发展具有密切联系,可较好地模拟在体过程。体外实验中采用的损伤因子如ox-LDL、AGEs、H₂O₂、Hcy等的浓度比临床病人血液中检测到的浓度高很多。同时,这些模型具有相同的血管内皮细胞损伤机制,如诱导ROS生成、抑制eNOS表达、降低NO产生,但也具有各自不同的特点和优势。因此,可以根据不同的实验需求选取不同的模型,以期达到较为理想的效果。同所有体外模型类似,以上模型仅仅以内皮细胞为研究对象,均不能全面地反映整个病变过程,故需要在体动物实验的支持。中药是替代医学和补充疗法的杰出代表,是药物发现的潜在源泉。诸多内皮细胞损伤模型为评价中药的心血管药理学活性和寻找相关保护药物提供了简便的方法。目前的研究显示很多的中药成分,尤其是一些黄酮类化合物在这些模型中具有显著地保护内皮细胞的作用。对这些有效成分的深入研究将有助于阐释中药的传统功效,有助于阐明中药的药效物质基础。

参考文献

- [1] Brown J, Reading S J, Jones S, *et al*. Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: A comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line t24/83 [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(1): 37-45.
- [2] Chen X, Zhang T, Du G. Advanced glycation end products serve as ligands for lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): biochemical and binding characterizations assay [J]. *Cell Biochem Funct*, 2008, 26(7): 760-770.
- [3] Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2009, 37(1): 4-11.
- [4] 徐娟萍, 张晓峰. 氧化低密度脂蛋白致血管内皮损伤机制及中药复方防治的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(3): 195-198.
- [5] Chen X P, Zhang T T, Du G H. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, a new promising target for the therapy of atherosclerosis? [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2007, 25(2): 146-161.
- [6] Chen X P, Xun K L, Wu Q, *et al*. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density

- lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species [J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47(1): 1-9.
- [7] Cominacini L, Pasini A F, Garbin U, *et al.* Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappa B through an increased production of intracellular reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12633-12638.
- [8] Muller C, Salvayre R, Negre-Salvayre A, *et al.* Oxidized LDLs trigger endoplasmic reticulum stress and autophagy: prevention by HDLs [J]. *Autophagy*, 2011, 7(5): 541-543.
- [9] Qiu J, Wang G, Zheng Y, *et al.* Coordination of Id1 and p53 activation by oxidized LDL regulates endothelial cell proliferation and migration [J]. *Ann Biomed Eng*, 2011, 39(12): 2869-2878.
- [10] Seibold S, Schurle D, Heinloth A, *et al.* Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(12): 3026-3034.
- [11] Yu S, Wong S L, Lau C W, *et al.* Oxidized LDL at low concentration promotes *in vitro* angiogenesis and activates nitric oxide synthase through PI3K/Akt/eNOS pathway in human coronary artery endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(1): 44-48.
- [12] Pierre S V, Lesnik P, Moreau M, *et al.* The standardized *Ginkgo biloba* extract Egb-761 protects vascular endothelium exposed to oxidized low density lipoproteins [J]. *Cell Mol Biol*, 2008, 54(Suppl): 1032-1042.
- [13] Ou H C, Lee W J, Lee I T, *et al.* *Ginkgo biloba* extract attenuates oxLDL-induced oxidative functional damages in endothelial cells [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 106(5): 1674-1685.
- [14] Wu J, Yang G, Zhu W, *et al.* Anti-atherosclerotic activity of platycodin D derived from roots of *Platycodon grandiflorum* in human endothelial cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(8): 1216-1221.
- [15] Chung M J, Kim S H, Park J W, *et al.* *Platycodon grandiflorum* root attenuates vascular endothelial cell injury by oxidized low-density lipoprotein and prevents high-fat diet-induced dyslipidemia in mice by up-regulating antioxidant proteins [J]. *Nutr Res*, 2012, 32(5): 365-373.
- [16] Sestili P, Martinelli C, Ricci D, *et al.* Cytoprotective effect of preparations from various parts of *Punica granatum* L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 56(1): 18-26.
- [17] Zhang X, Chen S, Wang Y. Honokiol up-regulates prostacyclin synthase protein expression and inhibits endothelial cell apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 554(1): 1-7.
- [18] Ou H C, Chou F P, Lin T M, *et al.* Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(9): 1485-1495.
- [19] Ide N, Lau B H. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1997, 49(9): 908-911.
- [20] Ou H C, Chou F P, Sheen H M, *et al.* Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1/2): 196-204.
- [21] Chow S E, Hshu Y C, Wang J S, *et al.* Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(4): 1520-1527.
- [22] Lin Y L, Chang H C, Chen T L, *et al.* Resveratrol protects against oxidized LDL-induced breakage of the blood-brain barrier by lessening disruption of tight junctions and apoptotic insults to mouse cerebrovascular endothelial cells [J]. *J Nutr*, 2010, 140(12): 2187-2192.
- [23] Guo H, Chen Y, Liao L, *et al.* Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2013, 27(3): 189-198.
- [24] Hsieh Y S, Kuo W H, Lin T W, *et al.* Protective effects of berberine against low-density lipoprotein (LDL) oxidation and oxidized LDL-induced cytotoxicity on endothelial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(25): 10437-10445.
- [25] Bao M, Lou Y. Flavonoids from seabuckthorn protect endothelial cells (EA.hy926) from oxidized low-density lipoprotein induced injuries via regulation of LOX-1 and eNOS expression [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48(1): 834-841.
- [26] Thomas M C. Advanced glycation end products [J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 170: 66-74.
- [27] Cho S J, Roman G, Yeboah F, *et al.* The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(15): 1653-1671.
- [28] Prasad A, Bekker P, Tsimikas S. Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease [J]. *Cardiol*

- Rev, 2012, 20(4): 177-183.
- [29] Zhou Z M, Wang K, Penn M S, *et al.* Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury [J]. *Circulation*, 2003, 107(17): 2238-2243.
- [30] Rojas A, Delgado-Lopez F, Gonzalez I, *et al.* The receptor for advanced glycation end-products: a complex signaling scenario for a promiscuous receptor [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(3): 609-614.
- [31] Li H, Zhang X, Guan X, *et al.* Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11: 46-55.
- [32] Wang S S, Xu Y H, Feng L, *et al.* A PKC-beta inhibitor prompts the HUVECs apoptosis-induced by advanced glycation end products [J]. *Pharmazie*, 2011, 66(11): 881-887.
- [33] Zhan Y, Sun H L, Chen H, *et al.* Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects vascular endothelial cells against advanced glycation end products (AGEs)-induced apoptosis [J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(7): 286-291.
- [34] Adamopoulos C, Farmaki E, Spilioti E, *et al.* Advanced glycation end-products induce endoplasmic reticulum stress in human aortic endothelial cells [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52(1): 151-160.
- [35] Xie Y, You S J, Zhang Y L, *et al.* Protective role of autophagy in AGE-induced early injury of human vascular endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(3): 459-464.
- [36] Min C, Kang E, Yu S H, *et al.* Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1999, 46(3): 197-202.
- [37] Li B Y, Li X L, Gao H Q, *et al.* Grape seed procyanidin B2 inhibits advanced glycation end product-induced endothelial cell apoptosis through regulating GSK3beta phosphorylation [J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(7): 663-669.
- [38] Xu Y, Feng L, Wang S, *et al.* Phytoestrogen calycosin-7-O-beta-D-glucopyranoside ameliorates advanced glycation end products-induced HUVEC damage [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10): 2953-2965.
- [39] Yang J C, Lu M C, Lee C L, *et al.* Selective targeting of breast cancer cells through ROS-mediated mechanisms potentiates the lethality of paclitaxel by a novel diterpene, gelomulide K [J]. *Free Radical Bio Med*, 2011, 51(3): 641-657.
- [40] Ma L, Gao H Q, Li B Y, *et al.* Grape seed proanthocyanidin extracts inhibit vascular cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products through activation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 49(5): 293-298.
- [41] Hou Y Y, Yang Y, Yao Y, *et al.* Neuroprotection of Glycyrrhizin against ischemic vascular dementia *in vivo* and glutamate-induced damage *in vitro* [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 125-131.
- [42] Xiang M, Yang M, Zhou C, *et al.* Crocetin prevents AGEs-induced vascular endothelial cell apoptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2006, 54(4): 268-274.
- [43] Tang X Y, Yang X D, Peng Y F, *et al.* Protective effects of lycopene against H₂O₂-induced oxidative injury and apoptosis in human endothelial cells [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, 23(6): 439-448.
- [44] Wang Y K, Hong Y J, Wei M, *et al.* Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 233-239.
- [45] Jolliet P, Polla B, Donath A, *et al.* Early hydrogen peroxide-induced pulmonary endothelial cell dysfunction: detection and prevention [J]. *Crit Care Med*, 1994, 22(1): 157-162.
- [46] Valen G, Sonden A, Vaage J, *et al.* Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(11/12): 1480-1488.
- [47] Wongpradabchai S, Chularojmontri L, Phornchirasilp S, *et al.* Protective effect of *Phyllanthus emblica* fruit extract against hydrogen peroxide-induced endothelial cell death [J]. *J Med Assoc Thai*, 2013, 96(Suppl 1): 40-48.
- [48] Chen X, Zhong Z, Xu Z, *et al.* 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(6): 587-604.
- [49] Sayin O, Arslan N, Guner G. The protective effects of resveratrol on human coronary artery endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide *in vitro* [J]. *Acta Clin Croat*, 2012, 51(2): 227-235.
- [50] Li Z L, Liu J C, Hu J, *et al.* Protective effects of hyperoside against human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 388-394.
- [51] Liu C L, Xie L X, Li M, *et al.* Salvianolic acid B inhibits hydrogen peroxide-induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/Akt signaling [J]. *PLoS One*, 2007, 2(12): e1321.
- [52] Hou Y Z, Zhao G R, Yang J, *et al.* Protective effect of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on

- endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide [J]. *Life Sci*, 2004, 75(14): 1775-1786.
- [53] Lin R, Wang W R, Liu J T, *et al*. Protective effect of tanshinone IIA on human umbilical vein endothelial cell injured by hydrogen peroxide and its mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(2): 217-222.
- [54] Wang B, Peng L, Zhu L, *et al*. Protective effect of total flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid on human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 60(1): 36-40.
- [55] Choi Y J, Kang J S, Park J H, *et al*. Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells [J]. *J Nutr*, 2003, 133(4): 985-991.
- [56] Kaindl U, Eyberg I, Rohr-Udilova N, *et al*. The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(4): 1320-1326.
- [57] Chuenkitiyanon S, Pengsuparp T, Jianmongkol S. Protective effect of quercetin on hydrogen peroxide-induced tight junction disruption [J]. *Int J Toxicol*, 2010, 29(4): 418-424.
- [58] Wang Y K, Hong Y J, Huang Z Q. Protective effects of silybin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H_2O_2 *in vitro* [J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, 43(4): 198-206.
- [59] Wang Y K, Huang Z Q. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H_2O_2 *in vitro* [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(2): 174-182.
- [60] Wall R T, Harlan J M, Harker L A, *et al*. Homocysteine-induced endothelial cell injury *in vitro*: a model for the study of vascular injury [J]. *Thromb Res*, 1980, 18(1/2): 113-121.
- [61] Jamaluddin M D, Chen I, Yang F, *et al*. Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene [J]. *Blood*, 2007, 110(10): 3648-3655.
- [62] Blundell G, Jones B G, Rose F A, *et al*. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration [J]. *Atherosclerosis*, 1996, 122(2): 163-172.
- [63] Lee S J, Kim K M, Namkoong S, *et al*. Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5781-5788.
- [64] Welch G N, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis [J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(15): 1042-1050.
- [65] Zhang C, Kawauchi J, Adachi M T, *et al*. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(3): 718-724.
- [66] Kim C S, Kim Y R, Naqvi A, *et al*. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(3): 466-475.
- [67] Lee J T, Peng G S, Chen S Y, *et al*. Homocysteine induces cerebral endothelial cell death by activating the acid sphingomyelinase ceramide pathway [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 45: 21-27.
- [68] Jia S J, Lai Y Q, Zhao M, *et al*. Homocysteine-induced hypermethylation of DDAH2 promoter contributes to apoptosis of endothelial cells [J]. *Pharmazie*, 2013, 68(4): 282-286.
- [69] Zou T, Liu W J, Li S D, *et al*. TRB3 mediates homocysteine-induced inhibition of endothelial cell proliferation [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(11): 2782-2789.
- [70] Weiss N, Papatheodorou L, Morihara N, *et al*. Aged garlic extract restores nitric oxide bioavailability in cultured human endothelial cells even under conditions of homocysteine elevation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 162-167.
- [71] Duan X H, Xu C Q, Huang J H, *et al*. Icariin delays homocysteine-induced endothelial cellular senescence involving activation of the PI3K/AKT-eNOS signaling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(4): 433-440.
- [72] Lin R, Liu J, Gan W, *et al*. Protective effect of quercetin on the homocysteine-injured human umbilical vein vascular endothelial cell line (ECV304) [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 101(3): 197-202.
- [73] Chan K, Chui S H, Wong D Y, *et al*. Protective effects of Danshensu from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against homocysteine-induced endothelial dysfunction [J]. *Life Sci*, 2004, 75(26): 3157-3171.
- [74] Fuchs D, Dirscherl B, Schroot J H, *et al*. Soy extract has different effects compared with the isolated isoflavones on the proteome of homocysteine-stressed endothelial cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(1): 58-69.
- [75] Zhou W, Chai H, Courson A, *et al*. Ginkgolide A attenuates homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries [J]. *J Vasc Surg*, 2006, 44(4): 853-862.

- [76] Zhang B Q, Hu S J, Qiu L H, *et al.* Effects of Astragalus membranaceus and its main components on the acute phase endothelial dysfunction induced by homocysteine [J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 46(4): 278-285.
- [77] Qiu L H, Xie X J, Zhang B Q. Astragaloside IV improves homocysteine-induced acute phase endothelial dysfunction via antioxidation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(4): 641-646.
- [78] Leung S B, Zhang H, Lau C W, *et al.* Salidroside improves homocysteine-induced endothelial dysfunction by reducing oxidative stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 679635.
- [79] Nakashima H, Suzuki H, Ohtsu H, *et al.* Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006, 4(1): 67-78.
- [80] Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, *et al.* Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide [J]. *Circ Res*, 1997, 81(6): 970-976.
- [81] Yang L X, Guo R W, Liu B, *et al.* Role of TRPC1 and NF-kappa B in mediating angiotensin II-induced Ca^{2+} entry and endothelial hyperpermeability [J]. *Peptides*, 2009, 30(7): 1368-1373.
- [82] Zhang H, Schmeisser A, Garlich C D, *et al.* Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 44(1): 215-222.
- [83] Lee D Y, Wauquier F, Eid A A, *et al.* Nox4 NADPH oxidase mediates peroxynitrite-dependent uncoupling of endothelial nitric oxide synthase and fibronectin expression in response to angiotensin II. Role of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(40): 28668-28686.
- [84] Oriji G K. Angiotensin II-induced ET and PGI (2) release in rat aortic endothelial cells is mediated by PKC [J]. *Prostag Leukotr Ess*, 1999, 61(2): 113-117.
- [85] Yang D, Liu J, Tian C, *et al.* Epigallocatechin gallate inhibits angiotensin II-induced endothelial barrier dysfunction via inhibition of the p38 MAPK/HSP27 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(10): 1401-1406.
- [86] Ying C J, Xu J W, Ikeda K, *et al.* Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells [J]. *Hypertens Res*, 2003, 26(10): 823-828.
- [87] 李永胜, 梁黔生, 王进. 丹参酮 II_A 对猪主动脉内皮细胞受血管紧张素 II 作用时产生 NO 及 eNOS 基因表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(7): 637-639.
- [88] 王迎超, 黄怡, 王毅, 等. Z-槲本内酯对人脐静脉内皮细胞保护作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1157-1161.
- [89] 叶立, 李建宇, 李月鹏, 等. 灯盏花素对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 955-957.