

苦豆碱对缺氧/复氧损伤的人脐静脉内皮细胞保护机制研究

马会军*, 朱米娜, 杜燕

西安市第一医院心血管内科, 西安 710002

摘要:苦豆碱(aloperine, ALO)是一种具有抗炎、抗肿瘤及抗感染功效的生物碱,但其对人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤的影响尚不明确。本研究利用人脐静脉内皮细胞建立了体外缺氧/复氧损伤的细胞模型,对细胞进行分组处理:对照组、缺氧/复氧损伤组、苦豆碱(20、50和100 $\mu\text{mol/L}$)预处理组。对细胞活力、细胞内乳酸盐脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,细胞内白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α),以及内质网应激相关蛋白GRP78、XBP-1和凋亡相关蛋白CHOP的表达进行了检测。我们发现与缺氧/复氧损伤组相比,苦豆碱预处理能显著提高细胞活力和SOD活性、降低LDH活性、MDA含量以及IL-1 β 和TNF- α 的水平($P < 0.05$)。另外,苦豆碱预处理还显著下调缺氧/复氧损伤引起的GRP78、XBP-1和CHOP水平的上升($P < 0.05$)。本研究证实苦豆碱能够提高细胞抗脂质过氧化反应的能力、降低炎症因子水平、抑制内质网应激引起的细胞凋亡,改善缺氧/复氧损伤引起的内皮细胞损伤。

关键词:苦豆碱;人脐静脉内皮细胞;缺氧/复氧;炎症;内质网应激

中图分类号:R54;R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)9-1592-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.9.018

Protective mechanism of aloperine on hypoxia/reoxygenation injured human umbilical vein endothelial cells

MA Hui-jun*, ZHU Mi-na, DU Yan

Department of Vasculocardiology, Xi'an No. 1 Hospital, Shaanxi 710002, China

Abstract: Aloperine (ALO) is an alkaloid with anti-inflammatory, anti-tumor and anti-infection activities. However, its protective effects on hypoxia/reoxygenation (H/R) injured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and involved mechanisms are unclear. In this study, hypoxia/reoxygenation injured HUVECs were constructed *in vitro*. The cells were divided into control group, hypoxia/reoxygenation group (H/R group) and different concentrations of aloperine (20, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) pretreated groups. Cell viability, the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD), the content of methane dicarboxylic aldehyde (MDA), the level of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the protein expression of GRP78, XBP-1 and CHOP of different groups were measured. The results showed that compared with hypoxia/reoxygenation group, aloperine pretreatment could increase HUVECs viability and SOD, decreased LDH activity, MDA content, as well as levels of TNF- α and IL-1 β ($P < 0.05$). Aloperine pretreatment also down-regulated hypoxia/reoxygenation induced increase of GRP78, XBP-1 and CHOP ($P < 0.05$). In summary, aloperine could improve the resistant of HUVECs against lipid peroxidation, decrease the levels of inflammatory cytokines and inhibit ERS related cell apoptosis, thus protect the HUVECs from hypoxia/reoxygenation injury.

Key words: aloperine; human umbilical vein endothelial cells; hypoxia/reoxygenation; inflammation; endoplasmic reticulum stress

心血管疾病是一种高发发病率、高死亡率的疾病,缺血/再灌注损伤是各种心血管疾病的重要病理生

理过程,防治缺血/再灌注损伤已成为目前心血管领域的研究热点之一^[1-4]。血管内皮功能障碍是缺血/再灌注损伤的主要病理生理过程之一^[5,6]。作为组织与血液循环之间的关键屏障,血管内皮细胞是组织缺血/再灌注过程中受攻击的第一道靶器官,其改

收稿日期:2020-02-04

接受日期:2020-08-17

基金项目:西安市第一医院心血管内科科室基金(ZDXA2018016)

* 通信作者 E-mail: ma_huijunxa@163.com

变对组织生存至关重要^[7-9]。因此,有效保护血管内皮细胞免于缺血/再灌注损伤是防治多种心血管疾病发生与发展的关键。

研究表明内质网应激(ERS)在缺血/再灌注诱导的细胞损伤中有重要作用。在缺氧或低氧条件下,过量未折叠或错误折叠的蛋白质沉积在内质网,引起ERS并启动未折叠蛋白(UPR)保护机制。当损伤继续时,ERS加重,最终导致内皮细胞损伤及凋亡。

苦豆碱(aloperine, ALO)是从中药苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中提取的一种生物碱,具有抗炎、抗肿瘤及抗感染的功效^[10,11]。苦豆碱能够保护肾缺血再灌注损伤,保护心肌细胞缺血再灌注引起的损伤和炎症应答^[11,12]。此外,苦豆碱对氧糖剥夺再灌注损伤的海马神经元具有保护作用。然而,苦豆碱是否能抑制ERS,从而减少缺氧/复氧对血管内皮细胞的损伤尚不清楚。本研究旨在探讨苦豆碱对人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

苦豆碱(宁夏紫荆花药业股份有限公司,纯度为99%),人脐静脉内皮细胞株 HUVEC(中国科学院上海细胞生物研究所),DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 美国 Gibco 公司),MTT 试剂盒(南京凯基生物有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),兔多克隆抗体 XBP-1(ab37152)、GRP78(ab227865)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Abcam 公司),鼠单克隆抗体 CHOP(2895S, Cell Signaling Technology 公司),ECL 化学发光试剂(美国 Millipore 公司),Annexin V-EGFP/PI 细胞凋亡检测试剂盒(40303ES20, 上海翊圣生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养

取 HUVEC 细胞,复苏后,于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中进行培养,隔 2 天更换 1 次培养液,至细胞融合度达 80%~90%时,使用 0.25% 胰酶消化后传代培养,取第 3 代细胞进行实验。

1.3 缺氧/复氧模型建立

缺氧/复氧模型的制备参照文献^[13]中方法描述,生长良好的 HUVEC 细胞消化传代后铺于 6 孔/96 孔板,继续培养 12 h,待细胞贴壁后,将完全培养基更换为不含糖和血清的培养基,继续于 37 °C、5% CO₂、94% N₂ 密闭缺氧培养 2 h,然后在正常培养箱中复氧培养 4 h。

1.4 细胞分组及处理

取生长良好的对数期 HUVEC 细胞,消化成单细胞悬液,以 1.2×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板,继续培养 12 h 至贴壁。细胞分为对照组、缺氧/复氧模型组、苦豆碱预处理组。对照组细胞正常培养;缺氧/复氧模型组细胞按照“1.3”描述进行缺氧/复氧处理;苦豆碱预处理组在细胞贴壁后分别加入不同浓度的苦豆碱(20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 预培养 24 h,然后进行缺氧/复氧处理。

1.5 MTT

取生长良好的对数期 HUVEC 细胞,消化成单细胞悬液,以 5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板,于 37 °C、5% CO₂ 培养 12 h 至贴壁后,如上进行分组处理。分组处理完成后,每孔加入 20 μL MTT(5 g/L),孵育 4 h,弃培养基,每孔加 150 μL 的 DMSO 溶液,摇床振荡。酶标仪上检测 490 nm 吸光度。

1.6 LDH 活性及 MDA 水平的测定

收集各组的细胞培养液,3 500 rpm 离心 15 min,收集上清。按照试剂盒说明书测定 LDH 活性和 MDA 水平。

1.7 SOD 活性测定

分组处理的 HUVEC 细胞用 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液,离心弃上清,加入 PBS 重悬细胞制备悬液,超声破碎,按照 SOD 试剂盒说明书检测细胞内 SOD 活性。

1.8 ELISA

收集各组细胞上清,依据 ELISA 试剂盒说明书分别检测细胞上清中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平。

1.9 Western blot

收集各组细胞,用细胞裂解液 RIPA 于 4 °C 下裂解细胞,获取总蛋白,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度;各取 30 μg 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,电转印法进行转膜,脱脂奶粉封闭,加入 GRP78(1:1 000),XBP-1(1:1 500)以及 CHOP(1:800)一抗,4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/鼠 HRP 二抗(1:8 000),继续室温

孵育 2 h, ECL 显色并拍照。用 Image J 分析条带灰度值, 以目的条带灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值反映目的蛋白的表达。

1.10 统计学分析

每次实验至少重复 3 次, 数据均采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行表示。实验结果使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 各组数据采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦豆碱提高缺氧/复氧 HUVEC 细胞活性, 降低 LDH 活性

本研究首先检测了苦豆碱单独作用对 HUVEC

细胞活力的影响。与对照组相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ 苦豆碱处理对 HUVEC 细胞活力没有显著影响, 细胞形态没有明显变化。但 50 $\mu\text{mol/L}$ 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 的苦豆碱处理能显著降低 HUVEC 细胞活力 ($P < 0.05$, 图 1A), 且 100 $\mu\text{mol/L}$ 苦豆碱处理, 细胞出现死亡。缺氧/复氧处理后, HUVEC 细胞活性和对照组相比明显降低 ($P < 0.05$, 图 1B 和 1C), LDH 活性较对照组相比显著升高 ($P < 0.05$, 图 1D)。与缺氧/复氧组相比, 用不同浓度苦豆碱预处理后, 缺氧/复氧 HUVEC 细胞的活性明显增加, LDH 活性呈剂量依赖性显著降低 ($P < 0.05$)。为避免细胞死亡对结果的影响, 后续实验以 50 $\mu\text{mol/L}$ 苦豆碱单独处理组为对照。

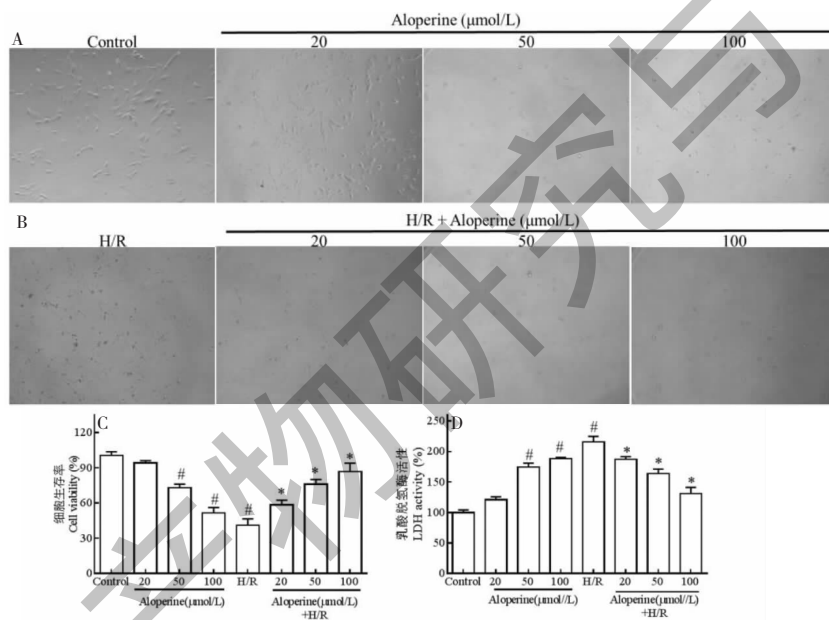


图 1 苦豆碱对正常及缺氧/复氧损伤的 HUVECs 的影响

Fig. 1 The effect of aloperine on normal and H/R injured HUVECs

注: (A) 苦豆碱单独处理 HUVECs; (B) 苦豆碱预处理对缺氧/复氧损伤的 HUVECs 细胞形态的影响; (C) 苦豆碱预处理对缺氧/复氧损伤的 HUVECs 细胞活性; (D) LDH 活性的影响。与对照组及 50 $\mu\text{mol/L}$ 苦豆碱组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与 H/R 组比较, $^*P < 0.05$ 。Note: (A) The morphological change of HUVECs upon aloperine alone treatment; (B) aloperine pretreated HUVECs upon H/R injure; (C) The cell viability; (D) LDH activity of normal or H/R injured HUVECs with or without aloperine pretreatment. Compared with control group and 50 $\mu\text{mol/L}$ aloperine pretreated group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with H/R group, $^*P < 0.05$.

2.2 苦豆碱预处理能减少缺氧/复氧诱导的 HUVECs 凋亡

本研究进一步对不同处理组 HUVEC 细胞凋亡进行了分析。不同浓度苦豆碱预处理, 可显著降低缺氧/复氧诱导的 HUVEC 细胞凋亡 (图 2)。

2.3 苦豆碱对缺氧/复氧损伤的 HUVECs MDA、SOD 的影响

与对照组及 50 $\mu\text{mol/L}$ 苦豆碱单独处理组相

比, 缺氧/复氧组细胞 MDA 含量明显增多、SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$), 与缺氧/复氧组比较, 苦豆碱预处理显著降低缺氧/复氧损伤 HUVECs 的 MDA 含量 ($P < 0.05$; 图 3A)、升高培养基中 SOD 活性 ($P < 0.05$; 图 3B)。

2.4 苦豆碱降低 ERS 相关蛋白 GRP78 的表达水平为进一步检测苦豆碱对缺氧/复氧损伤的 HUVECs 的保护机制, 对缺氧/复氧损伤的 HUVECs 中

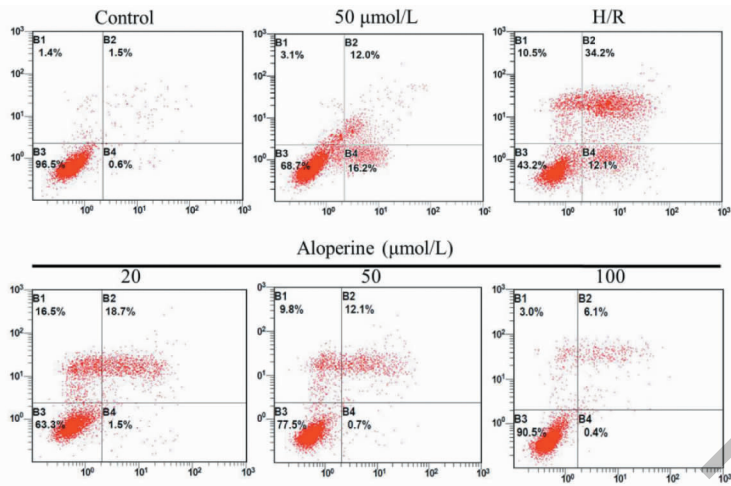


图2 苦豆碱预处理减少缺氧/复氧损伤诱导的HUVECs凋亡

Fig. 2 H/R induced HUVECs apoptosis was reduced by pretreatment of aloperine

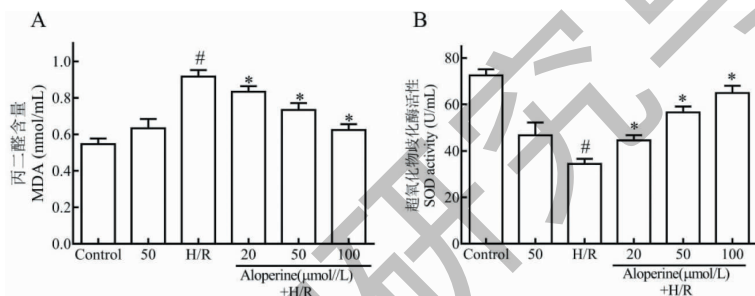


图3 苦豆碱对缺氧/复氧损伤的HUVECs MDA含量和SOD活性的影响

Fig. 3 The MDA content and SOD activity of H/R injured HUVECs with or without aloperine pretreatment

注:(A)MDA含量;(B)SOD活性。与对照组及50 μmol/L苦豆碱单独处理组比较,[#] $P < 0.05$;与H/R组比较,^{*} $P < 0.05$ 。Note:(A) The MDA content;(B) SOD activity. Compared with control group and 50 μmol/L aloperine pretreated group,[#] $P < 0.05$;Compared with H/R group,^{*} $P < 0.05$.

ERS相关蛋白的表达进行了检测,发现缺氧/复氧损伤能显著增加HUVECs中GRP78蛋白水平。与单独缺氧/复氧组相比,苦豆碱预处理后能显著抑制缺氧/复氧诱导的HUVECs中GRP78的上调,且这种抑制作用呈剂量依赖性,说明苦豆碱能降低缺氧/复氧诱导的ERS($P < 0.05$,图4)。

2.5 苦豆碱对缺氧/复氧损伤的HUVECs凋亡及XBP-1及CHOP表达的影响

XBP-1是ERS下游未折叠蛋白(UPR)保护机制的相关蛋白,其表达水平在缺氧/复氧损伤的HUVECs中显著升高(图5)。与单纯缺氧/复氧损伤组相比,苦豆碱预处理组细胞XBP-1的表达显著降低,且高浓度苦豆碱(100 μmol/L)的作用更显著。为研究苦豆碱在ERS诱导的细胞凋亡中的作用,进一步对CHOP的表达水平进行了检测。与XBP-1

表达水平一致,缺氧/复氧损伤导致HUVECs中CHOP表达显著升高。而苦豆碱预处理能显著降低缺氧/复氧诱导的CHOP表达。这些结果表明苦豆碱能通过减缓缺氧/复氧诱导的ERS,降低缺氧/复氧引发的HUVECs凋亡($P < 0.05$;图5)。

2.6 苦豆碱降低缺氧/复氧损伤HUVECs炎症因子水平

鉴于苦豆碱的抗炎功效,本研究对缺氧/复氧处理对细胞内炎症因子水平的影响进行了检测。发现缺氧/复氧处理显著增加HUVECs TNF-α和IL-1β的水平($P < 0.05$),而苦豆碱预处理后缺氧/复氧处理的HUVECs中TNF-α和IL-1β的水平呈现不同程度降低($P < 0.05$,图6)。

3 讨论

心血管疾病是致残和致死的主要原因,而血管

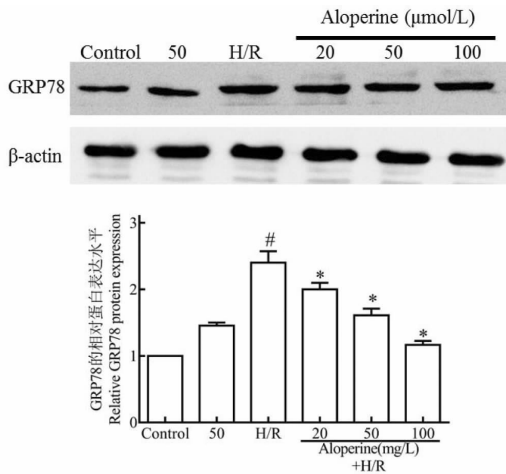


图4 苦豆碱预处理呈剂量依赖性抑制缺氧/复氧诱导的HUVECs中GRP78的表达上调

Fig. 4 Aloperine pretreatment inhibit H/R induced upregulation of GRP78 in HUVECs in a dose dependent manner

注:与对照组及50 μmol/L苦豆碱单独处理组比较, # $P < 0.05$;与H/R组比较, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with control and 50 μmol/L aloperine pretreated group, # $P < 0.05$ 。 Compared with H/R group, * $P < 0.05$ 。

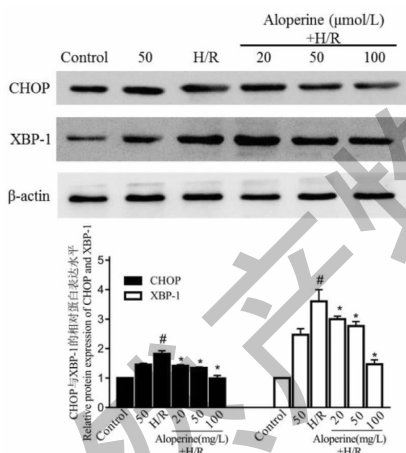


图5 苦豆碱预处理呈剂量依赖性抑制缺氧/复氧诱导的HUVECs中XBP-1及CHOP蛋白表达

Fig. 5 Aloperine pretreatment inhibit H/R induced upregulation of XBP-1 and CHOP in HUVECs in a dose dependent manner

注:与对照组及50 μmol/L苦豆碱单独处理组比较, # $P < 0.05$;与H/R组比较, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with control and 50 μmol/L aloperine pretreated group, # $P < 0.05$ 。 Compared with H/R group, * $P < 0.05$ 。

内皮功能障碍是多种心血管疾病的共同病理生理基础。内皮细胞位于血管的最内层,是血管的重要组成部分,因此损伤内皮细胞通常被认为是缺血/再灌

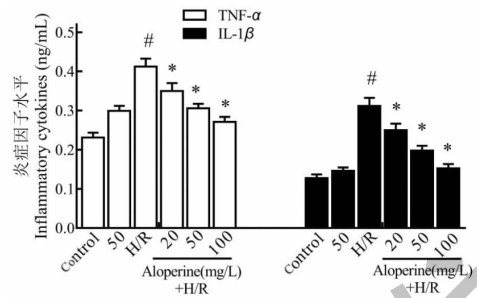


图6 苦豆碱对缺氧/复氧HUVECs炎症因子水平的影响

Fig. 6 The level of inflammatory factors in H/R injured HUVECs with or without aloperine pretreatment were detected by ELISA

注:与对照组及50 μmol/L苦豆碱单独处理组比较, # $P < 0.05$;与H/R组比较, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with control and 50 μmol/L aloperine pretreated group, # $P < 0.05$; Compared with H/R group, * $P < 0.05$ 。

注损伤过程的第一步^[14,15]。保护血管内皮细胞免于缺血/再灌注损伤对于防治多种心血管疾病的发生至关重要。

苦豆碱存在于天然豆科植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 的种子和地上部分。苦豆碱具有抗炎、抗菌和抗肿瘤等广泛药理活性,其对小鼠的急性毒性实验研究为苦豆碱药理研究提供了进一步的实验基础^[16,17]。但苦豆碱对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)缺氧/复氧损伤的影响尚不明确。HUVECs是一种常见的研究心血管疾病发病机制的细胞模型,在血管生理学和病理学具有重要意义^[18]。基于缺血/再灌注与缺氧/复氧相似,本实验建立HUVECs缺氧/复氧模型,探究苦豆碱对缺氧/复氧损伤的内皮细胞的保护作用及机制。苦豆碱预处理能有效提高缺氧/复氧损伤的HUVECs活性,抑制细胞凋亡,降低LDH活性,表明苦豆碱能够增强细胞的呼吸能力,保护细胞膜完整性,从而降低细胞损伤。缺氧/复氧可促使HUVECs产生大量氧自由基,使细胞膜发生脂质过氧化反应,严重损伤生物膜,加重细胞损伤。脂质代谢产物MDA含量间接反映细胞损伤程度,抗氧化防御物SOD的活性反映机体清除氧自由基的能力。本实验发现,不同浓度苦豆碱预处理均能显著提高缺氧/复氧损伤的HUVECs内SOD活性,降低MDA含量,增强抗脂质过氧化反应能力,从而减轻细胞膜脂质过氧化损伤。

炎症反应在血管内皮的损伤过程中发挥重要作用,内皮细胞在缺氧/复氧条件刺激下,诱导产生多

种炎症因子,促进炎症反应^[19]。研究显示,缺氧/复氧处理后,心肌细胞 IL-1 β 和 TNF- α 的表达明显升高^[20,21]。本研究显示缺氧/复氧处理显著上调了 HUVECs 中 TNF- α 和 IL-1 β 的产生。Li 等^[22] 研究发现苦豆碱明显降低哮喘小鼠血清及肺组织 TNF- α 及 IL-1 β 水平。与以上结果一致,本研究发现不同浓度的苦豆碱预处理能够不同程度的降低缺氧/复氧损伤的 HUVECs 中炎症介质 TNF- α 和 IL-1 β 的产生,揭示苦豆碱能够保护 HUVECs 抵抗缺氧/复氧诱导的炎症损伤。

内质网(ER)是细胞内分泌型及跨膜蛋白合成的场所。除转录后修饰以及蛋白正确折叠等功能外,ER 在维持细胞内钙稳态及脂类生物合成中也有重要作用。在缺血/缺氧等病理条件下,错误折叠与未折叠蛋白聚集在内质网,导致蛋白从内质网向高尔基体转运受阻,最终导致内质网应激(ERS)。细胞启动一些列信号转导,引发未折叠蛋白(UPR)保护机制,维持细胞稳态。当损伤持续时,细胞最终进入凋亡。热休克蛋白家族成员 GRP78,是 ERS 的标志分子之一。细胞处于缺氧状态时,ER 微环境不稳定导致 GRP78 活化,进而激活 UPR^[23]。本研究中,我们发现 ERS 参与缺氧/复氧诱导的 HUVECs 损伤。苦豆碱预处理后,缺氧导致的 GRP 表达升高受到抑制。另外,作为 UPR 成分之一的转录因子 XBP-1 以及 ERS 诱导的下游凋亡信号通路关键转录因子 CHOP 的表达也受到影响。这些结果提示苦豆碱预处理能减少缺氧/复氧处理引发的 ERS 相关细胞凋亡。

综上所述,本实验结果表明,苦豆碱预处理能够提高细胞抗氧化应激能力,抑制炎症因子产生,抑制 ERS 相关蛋白的表达,有效抑制缺氧/复氧引起的细胞损伤。

参考文献

- Kalogeris T, Baines CP, Krena M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 298:229-317.
- Bi X Y, He X, Zhao M, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase and vagal activity in the endothelial protection of atorvastatin in ischemia/reperfusion injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 6:391-400.
- Gao X, Bi Y, Chi K, et al. Glycine-nitronyl nitroxide conjugate protects human umbilical vein endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury via multiple mechanisms and ameliorates hind limb ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488:239-246.
- Shi W, Wei X, Wang Z, et al. HDAC9 exacerbates endothelial injury in cerebral ischaemia/reperfusion injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20:1139-1149.
- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury [J]. *J Pathol*, 2000, 190:255-266.
- Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury [J]. *Ann Vasc Surg*, 2005, 19:572-584.
- Sturtzel C. Endothelial Cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1003:71-91.
- Li Q, Cui HH, Yang YJ, et al. Quantitative proteomics analysis of ischemia/reperfusion injury-modulated proteins in cardiac microvascular endothelial cells and the protective role of tongxinluo [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41:1503-1518.
- Xie XL, Zhu TB, Chen LL, et al. MCP1-induced autophagy mediates ischemia reperfusion injury in endothelial cells via HMGB1 and CaSR [J]. *Sci Rep*, 2018, 8:1735.
- Jin SJ, Jin DX, Wang WB, et al. Advances in anti-tumor of osthole and derivatives [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2015:214-217.
- Chen S, Jin Z, Dai L, et al. Aloperine induces apoptosis and inhibits invasion in MG-63 and U2OS human osteosarcoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97:45-52.
- Zhang HC, Xu L, Rui HH, et al. Role of aloperine on ischemia-reperfusion-induced injury and inflammatory response in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)*, 2018, 34:281-286.
- Feng Y, Hu L, Xu Q, et al. Cytoprotective role of alpha-1 antitrypsin in vascular endothelial cell under hypoxia/reoxygenation condition [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66:96-107.
- Xie P, Duan Y, Guo X, et al. SalA attenuates hypoxia-induced endothelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis via down-regulation of VLDL receptor expression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35:17-28.
- Wang J, Chen S, Ma X, et al. Effects of endothelial progenitor cell-derived microvesicles on hypoxia/reoxygenation-induced endothelial dysfunction and apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013:572729.
- Sun P, Yan QX, Du TT, et al. A general research on aloperine [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药)*, 2017, 26:49-53.
- Lu ZB, Fan CL, Zhou HL, et al. Acute toxicity of aloperine on mice [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29:821-825.
- Zhu TB, Yao Q, Hu XN, et al. The role of MCP1 in ische-

- mia/reperfusion injury-induced HUVEC migration and apoptosis[J]. *Cell Physiol Biochem*,2015,37:577-591.
- 19 Yang HH, Chen Y, Gao CY, et al. Protective effects of microRNA-126 on human cardiac microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury and inflammatory response by activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*,2017,42:506-518.
- 20 Zhang C, Lin G, Wan W, et al. Resveratrol, a polyphenol phytoalexin, protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury via the TLR4/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*,2012,29:557-563.
- 21 Ren T, Huang ZD, Tian XF, et al. Effect of preconditioning with serum containing Xintongshu on the newborn rat's myocardial cells with hypoxia and reoxygenation injury and the expression of TNF- α and IL-1 β [J]. *J Hunan Univ Chin Med*(湖南中医药大学学报),2012,32(11):11-15.
- 22 Li HL, Luo QB, He JJ, et al. Effects of aloperine on pulmonary function, NF- κ B, TNF- α and IL-1 β in experimental asthmatic mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床),2016,32(3):69-72.
- 23 Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*,2010,48:1105-1110.
-
- (上接第 1561 页)
- 9 Du WF, Wang SB, Cong XD, et al. Rapid determination of ingredients in *Gastrodia elata* by infrared reflectance and spectroscopy partial least square[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2012,34:1820-1822.
- 10 Zhan H, Wu HW, Zhang D, et al. Determination of calycosin-7-glucoside and astragaloside in *Astragali Radix* with near infrared spectroscopy[J]. *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析),2017,37:1391-1396.
- 11 Liu GH, Zhang ZH. Analysis on application prospect of Raman, NIR and IR on screening chemical substances adulterated in drugs[J]. *Qilu Pharm A*(齐鲁药事),2012,31:634-635.
- 12 Xin B, Ma SJ, Xie J, et al. Influence of different growing years on accumulation of flavonoids and saponins in *Astragali Radix*[J]. *J Chin Med Mater*(中药材),2015,38:1366-1369.
- 13 Tang SW. The Emendation of *Daguan Bencao* Proofread by SHANG Zhi-jun(尚志钧点校的《大观本草》)[M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press,2002:229.
- 14 Guo YZ, Pang WJ, Sun SQ, et al. Rapid analysis of astragalus and its extracts by infrared spectroscopy [J]. *Int J Tradit Chin Med*(国际中医中药杂志),2015,37:431-434.