浙江医学 2021 年第 43 卷第 7 期

三七皂苷 R1 对氧化型低密度脂 蛋白诱导血管内皮细胞凋亡的 保护作用 五体阳 李永领 网络 潘达 陈健 金灿 叶孙志 陈大庆

【摘要】目的 探讨三七皂苷 R1(NGR1)对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导血管内皮细胞凋亡的保护作用及其机制。 方法 将体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)分为对照组、损伤组(ox-LDL组)和4种浓度 NGR1治疗组(ox-LDL+不同浓度 NGR1组);采用 CCK-8 法检测 NGR1 的药物毒性以及各组 HUVECs 的增殖活性,采用 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax 及 Cleaved-caspase-3 凋亡相关蛋白表达情况,免疫荧光染色检测 Cleaved-caspase-3 凋亡情况,钙黄绿素细胞膜标记染色检测细 胞黏附能力,Transwell 迁移试验检测细胞迁移能力。结果 与对照组比较,损伤组 HUVECs 的凋亡率和 Cleaved-caspase-3 表达 水平显著升高,并且 HUVECs 的增殖活性、细胞黏附能力和迁移能力均显著降低(均 P<0.05)。与损伤组比较,NGR1 治疗组 HUVECs 的凋亡率和 Cleaved-caspase-3 表达水平均随着 NGR1 浓度的增加而逐渐下降,HUVECs 的增殖活性、细胞黏附能力和迁移能力均 随着 NGR1 浓度的增加而逐渐升高(均 P<0.05)。结论 NGR1 通过抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖活性降低、 Cleaved-caspase-3 表达上调而引起的细胞凋亡增多、细胞黏附和迁移数量减少,从而发挥其对 ox-LDL 损伤的血管内皮细胞 的保护作用。

【关键词】 三七皂苷 R1 人脐静脉内皮细胞 细胞凋亡 细胞黏附 细胞迁移

Notoginsenoside R1 protects vascular endothelial cells from ox-LDL-induced apoptosis MENG Weiyang, LI Yongling, WEN Hao, PAN Da, CHEN Jian, JIN Can, YE Sunzhi, CHEN Daqing. Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China Corresponding author: CHEN Daqing, E-mail: cdq1965@126.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of notoginsenoside R1(NGR1) on oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) -induced apoptosis of vascular endothelial cells and its mechanism. Methods Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into control group, injury group(ox-LDL stimulation) and NGR1 treatment groups(ox-LDL + NGR1 treatment with various concentrations). CCK-8 was used to detect the toxicity of NGR1 and proliferation of HUVECs, Western blot for expression of Bcl-2, Bax, Cleared-caspase-3 and immunofluorescence staining for expression of Cleared-caspase-3 were used to detected the apoptosis of HUVECs, calcein AM staining of cell membrane was used to detect the adhesion ability of HUVECs to extracellular matrix, Transwell test was used to detect the migration ability of HUVECs. Results Compared with control group, the apoptosis rate of HUVECs and the expression level of Cleaved-caspase-3 protein in the injury group were significantly increased, and the proliferation ability, cell adhesion ability and migration efficiency of HUVECs were significantly re-duced(P<0.05). Compared with the injury group, the apoptosis rate of HUVECs were increase of the NGR1 concentration, and the proliferation ability, cell adhesion ability and migration ability and the proliferation ability, cell adhesion ability and migration ability and the proliferation ability, cell adhesion ability and the expression level of Cleaved-caspase-3 protein in the NGR1 treatment groups decreased with the increase of the NGR1 concentration(P<0.05). Conclusion NGR1 protects vascular endothelial cells from ox-LDL-induced injury through enhancing cell proliferation ability, inhibiting cell apoptosis, and increasing cell adhesion and migration.

[Key words] Notoginsenoside R1 Human umbilical vein endothelial Apoptosis Cell adhesion Cell migration

●论

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2021.43.7.2020-2690

作者单位:315027 温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院急诊医学科

通信作者:陈大庆,E-mail:cdq1965@126.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的特征是血管 内皮细胞内脂质斑块堆积^[1]。血管内皮损伤是 AS 的始 发事件和致病因素,主要由氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)引起^[2]。ox-LDL 破坏血管内皮细胞氧化还原平衡,导致内皮损伤,从 而诱导内皮细胞凋亡^[3]。氧化应激通过增加超氧阴离 子促进血管壁的低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)氧化, 而大量的 ox-LDL 进一步损害血管内 皮细胞^[4]。内皮细胞因损伤发生凋亡是 AS 发展过程中 最初但可逆的步骤[5]。因此,预防内皮损伤及细胞凋亡 已成为逆转 AS 的一种治疗策略。研究表明,传统中药 三七对血液和心血管系统具有良好的调节作用[6-7]。三 七皂苷 R1(notoginsenoside R1, NGR1)是三七中起主 要生物学作用的成分,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡作 用[8-9]。然而,目前关于 NGR1 是否可以预防 ox-LDL 诱 导的内皮细胞凋亡以及增强内皮细胞的黏附和迁移 能力尚未明确。本研究通过 ox-LDL 建立 AS 的体外细 胞实验模型,诱导血管内皮细胞凋亡,并且探讨 NGR1 对 ox-LDL 损伤的血管内皮细胞保护作用及其机制, 为 NGR1 防治心血管疾病提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞系(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs, h055)购于南京 BERKE biology 公司。钙黄绿色(Calcein AM, C2012)购于上海 Beyotime 公司。NGR1(HY-N0615)购于美国 MedChem-Express 公司。结晶紫(HT90132)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO, D2650)购于美国 Sigma 公司。CCK-8 (CK04)购于日本 DOJINDO 公司。Transwell 小室(3422) 购于美国康宁公司。兔抗人 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 (Bcl-2,#3498)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax,#14796)多克 隆抗体和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,#4083)购于 美国 CST 公司。兔抗人 Cleaved-caspase-3(ab49822) 多克隆抗体以及 Dylight 594 驴抗兔二抗(ab96921)均 购于美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、处理以及分组 HUVECs使用高糖完 全培养基(含 10% FBS 以及 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)培养,待细胞密度长至 80%~90% 时,用 PBS 将细胞培养液清洗干净后,加入含 0.02% EDTA 的胰 酶消化细胞。待细胞全部脱壁漂浮后,加入 3 倍体积 的完全培养基中和胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液,用完全培养基重悬 HUVECs,将细胞浓度调 整为 1×10⁴ 个/ml 的细胞悬液待用。将 NGR1 粉剂(10 mg) 溶于 DMSO(357.2 μl)中, 配成 30 mmol/L 的母液保存 于-20℃冰箱待用。将体外培养 HUVECs 分为对照组、 损伤组(ox-LDL 组)和4种浓度 NGR1 治疗组(ox-LDL+不同浓度 NGR1 组)。

1.2.2 NGR1 药物毒性及其对 HUVECs 增殖活性影响 检测 将上述细胞悬液接种于 96 孔板中(100 µl/孔)。 将培养板放在 37 ℃、5% CO2 条件下的恒温培养箱中 培养 24 h,待细胞完全贴壁后,分别将不同浓度的 NGR1(7.5、15、30、60 µmol/L)溶液加入对应的 96 孔 板中,再放入细胞培养箱预处理48h。用于药物毒性 测试的细胞,将每孔中的药物洗净后,加入 10 µl CCK-8 溶液;用于增殖活性检测的细胞将每孔中的药 物洗净后,加入 ox-LDL 50 mg/L 刺激 24 h,再加入 10 µl CCK-8 溶液。空白组为 100 µl PBS, 再加入 10 µl CCK-8 溶液。将加入 CCK-8 溶液的培养板移入培养 箱中避光孵育1h,随后取出培养板,用全自动酶标仪 测定每孔的吸光度,测定波长为 450 nm,并计算细胞 增殖活性,细胞增殖活性=[(实验组吸光度-空白组吸 光度》/(对照组吸光度-空白组吸光度)]×100%。每个 样品每次含有3个复孔,实验重复3次。

1.2.3 细胞凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3)表达检测 采用 Western blot 法。各组 HUVECs 用 RIPA 裂解液裂解后,使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度 并配平每组蛋白的上样量。配制蛋白样品时保证 20 µl 样品中含 30 µg 蛋白;12%SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜 后,用 5%脱脂牛奶常温封闭 2 h。随后将 PVDF 膜放入 相应的抗体孵育盒中(Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 抗 体按 1:1 000 的比例稀释),在4℃摇床上孵育过夜;一 抗孵育结束之后,将 PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次,5 min/次, 再将 PVDF 膜转入 HRP 结合的二抗孵育盒,放于摇床 上,室温孵育 2 h 后再用 TBST 漂洗 3 次,5 min/次;二 抗孵育结束之后,将 ECL 显色液均匀敷在膜上,在凝 胶成像仪上曝光成像,并用 Image J 软件分析计算各组 蛋白条带的灰度值。

1.2.4 细胞凋亡检测 采用免疫荧光法。将上述细胞 悬液接种于 24 孔板中(500 µl/孔)。待细胞完全贴壁 后,向各孔中分别加入 15、30 µmol/L NGR1 预处理 48 h,然后再用 ox-LDL 50mg/L 刺激 24 h。随后用 4% 多聚甲醛固定 HUVECs 15 min,0.1% Triton 通透 15 min, 5%山羊血清封闭 2 h,最后将 Cleaved-caspase-3 一抗 (1:200)稀释,加入到各个孔中,4 ℃冰箱孵育过夜。第 2 天取出 24 孔板,37 ℃复温 1 h 后,吸净一抗,并用

PBS 清洗 3 次,5 min/次,随后加入驴抗兔 Dylight 594 二抗(1:300 稀释),37 ℃孵育 1 h 后,吸净二抗,并用 PBS 清洗 3 次,5 min/次,最后加入 DAPI 染核 5 min, 应用抗荧光淬灭剂封固。在荧光显微镜下观察染色的 细胞(即凋亡细胞),通过 Image J 软件分析并计算各组 不同视野下的 Cleaved-caspase-3 的平均荧光强度。

1.2.5 细胞黏附能力检测 采用钙黄绿素细胞膜标记 染色。将 HUVECs 经15、30 µmol/L NGR1 预处理48 h及 ox-LDL 50mg/L 刺激 24 h 后,用胰酶消化并用完培 重悬每组细胞。随后每组细胞悬液中加入钙黄绿素染 色工作液,37 ℃孵育 30 min。孵育结束后,1 000 r/min 离心 5 min,吸除上清液,缓慢加入 37 ℃预热的培养 基重悬细胞。再次以 1 000 r/min 离心 5min,以充分去 除残留的染色液。最后将钙黄绿素标记的 HUVECs 接种于预包被人纤维连接蛋白 1 µg/ml 的培养板中, 37 ℃孵育 30 min,然后用 PBS 清洗 3 次,5 min/次,将 未贴壁的 HUVECs 洗净。在倒置荧光显微镜下观察并 计数 5 个随机视野。

1.2.6 细胞迁移能力检测 采用 Transwell 迁移试验。将 HUVECs 经 15、30 μmol/L NGR1 预处理 48 h及 ox-LDL 50mg/L 刺激 24 h后,用胰酶消化并用无血清的高糖 DMEM 培养基重悬每组细胞,将 200 μl的细胞悬液置 于孔径为 8 μm 的 Transwell 小室上部。最后将高糖 DMEM 培养基(700 μl,含 2% FBS)加入小室的下部。将 Transwell 板在 37 ℃下培养 48 h。弃去培养基,用湿棉签 擦拭每个 Transwell 小室膜的上层部分以除去未迁移细 胞。迁移细胞用 4%多聚甲醛固定,并用 0.2%结晶紫染 色。从 6 个随机选择的显微镜视野计数平均迁移细胞数。 1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 5.0 统计软 件。计量资料用 x̄±s表示,多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 NGR1 作用后 HUVECs 增殖活性的比较 与对照组相比,NGR1 治疗组 HUVECs 的增殖活性逐渐提高,差异有统计学意义(P<0.05);HUVECs 的增殖活性随着 NGR1 浓度的增加而增加,在 30 μmol/L 时达到高峰,随后增加 NGR1 浓度至 60 μmol/L 时,HUVECs 的增殖活性反而出现少许下降,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

2.2 不同浓度 NGR1 作用后 ox-LDL 诱导 HUVECs 增 殖活性的比较 与对照组相比,损伤组的细胞增殖活 性显著降低,差异有统计学意义(P<0.05)。与损伤组相

表 1 不同浓度 NGR1 作用后 HUVECs 增殖活性的比较

组别	细胞增殖活性
7.5 μmol/L NGR1 治疗组	$113.32 \pm 4.59^*$
15 μmol/L NGR1 治疗组	123.80 ± 4.30
30 μmol/L NGR1 治疗组	$137.85 \pm 4.77^{\vartriangle}$
60 μmol/L NGR1 治疗组	126.74 ± 2.96▲
对照组	99.67 ± 0.31

注:NGR1 为三七皂苷 R1;HUVECs 为人脐静脉内皮细胞系;与 对照组比:*P<0.05;与 15 μmol/L NGR1 治疗组比较,^ΔP<0.05;与 30 μmol/L NGR1 治疗组比较,[▲]P<0.05

比,NGR1 治疗组细胞增殖活性显著增加,在 NGR1 治 疗浓度为 30 μmol/L 时,其抗 ox-LDL 所诱导的凋亡效 果达到峰值,差异有统计学意义(P<0.05);随后继续增 加浓度至 60 μmol/L 时,NGR1 治疗组 HUVECs 细胞的 增殖活性反而有所下降,说明高浓度 NGR1 存在一定 的细胞毒性。NGR1 发挥抗凋亡活性以 30 μmol/L 为最 适宜浓度,所以选取 15 和 30 μmol/L NGR1 的治疗浓 度用于后续实验,见表 2。

表 2	不同浓度 NGR1 作用后 ox-LDL 诱导 HUVECs
$\boldsymbol{\Sigma}$	增殖活性的比较

组别	细胞增殖活性
损伤组	$29.40 \pm 3.59^*$
ox-LDL+7.5 μmol/L NGR1 治疗组	$44.25 \pm 1.97^{\vartriangle}$
ox-LDL+15 µmol/L NGR1 治疗组	53.63 ± 1.26
ox-LDL+30 µmol/L NGR1 治疗组	80.31 ± 5.20▲
ox-LDL+60 µmol/L NGR1 治疗组	69.78 ± 2.27
对照组	99.67 ± 0.31

注:NGR1 为三七皂苷 R1;HUVECs 为人脐静脉内皮细胞系; ox-LDL 为氧化型低密度脂蛋白;与对照组比较,*P<0.05;与损伤组 比较,^ΔP<0.05;与 ox-LDL+15 μmol/L NGR1 治疗组比较,**Δ**P<0.05

2.3 各组细胞凋亡相关蛋白表达的比较 与对照组比较,损伤组凋亡相关蛋白Bax、Cleaved-caspase-3的表达明显上升(P<0.05),而Bcl-2蛋白表达明显下降(均P<0.05);而与损伤组比较,NGR1治疗组中Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达显著下降(均P<0.05),而Bcl-2蛋白表达明显上升(P<0.05),且凋亡相关蛋白皆呈浓度依赖性,见图1和表3。

2.4 各组细胞凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase-3 表达的比较 与对照组比较,损伤组 HUVECs 内凋亡相关 蛋白 Cleaved-caspase-3 表达增强,而在 NGR1 治疗组中,这种情况得到明显改善,凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase-3 表达显著减弱,见图 2(插页)和表 4。



图 1 各组细胞凋亡相关蛋白的电泳图(NGR1 为三七皂苷 R1; ox-LDL 为氧化型低密度脂蛋白;Bcl-2 为兔抗人 B 淋巴细胞瘤 -2 蛋白;Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白)

表3 各组细胞凋亡相关蛋白表达的比较

组别	Bel-2	Bax	Cleaved-caspase-3
损伤组	$0.06\pm0.06^*$	$9.62 \pm 0.16^{*}$	$4.96 \pm 0.61^{*}$
ox-LDL+15 μ mol/L NGR1	$0.37\pm0.04^{\scriptscriptstyle \bigtriangleup}$	$7.65 \pm 0.27^{\vartriangle}$	$2.65\pm0.27^{\vartriangle}$
治疗组			
ox–LDL+30 μ mol/L NGR1	0.65 ± 0.11▲	$2.93\pm0.14^\blacktriangle$	1.53 ± 0.42▲
治疗组			
对照组	1.03 ± 0.09	1.03 ± 0.09	1.03 ± 0.09

注:NGR1 为三七皂苷 R1;ox-LDL 为氧化型低密度脂蛋白; Bcl-2 为兔抗人 B 淋巴细胞瘤 -2 蛋白;Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白; 与对照组比较, P < 0.05; 与损伤组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 ox-LDL+15 μ mol/L NGR1 治疗组比较, $^{A}P < 0.05$

表 4 各组细胞调亡蛋白 Cleaved-caspase-3 表达情况的比较

		Y
组别	XXX	荧光强度
损伤组		$5.62\pm0.16^*$
ox-LDL+15 µmol/LNGR1 治	疗组	$3.31 \pm 0.34^{\vartriangle}$
ox-LDL+30 µmol/LNGR1 治	疗组	1.62 ± 0.44▲
对照组		1.03 ± 0.09

注:NGR1 为三七皂苷 R1; ox-LDL 为氧化型低密度脂蛋白; 与对照组比较, P < 0.05; 与损伤组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 ox-LDL+15 μ mol/L NGR1 治疗组比较, $^{A}P < 0.05$

2.5 各组细胞黏附能力的比较 与对照组比较,损伤 组 HUVECs 的细胞黏附能力显著降低,差异有统计学 意义(P<0.05);与损伤组比较,NGR1 治疗组 HUVECs 的细胞黏附能力显著提高,差异有统计学意义(P<0.05); 黏附细胞个数随着 NGR1 浓度的增加而增大,差异有统 计学意义(P<0.05),见图 3(插页)和表 5。

2.6 各组细胞迁移能力的比较 与对照组比较,损伤 组 HUVECs 的细胞迁移能力显著降低,差异有统计学 意义(P<0.05);与损伤组比较,NGR1 治疗组 HUVECs

表 5 各组细胞黏附细胞数的比较

组别	黏附细胞数(个/视野)
损伤组	$46.33 \pm 5.86^*$
ox-LDL+15 μmol/LNGR1 治疗组	$105.67\pm3.06^{\vartriangle}$
ox-LDL+30 μmol/LNGR1 治疗组	202.67 ± 36.94▲
对照组	302.33 ± 21.01

注:NGR1 为三七皂苷 R1; ox-LDL 为氧化型低密度脂蛋白; 与对照组比较, P < 0.05; 与损伤组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 ox-LDL+15 μ mol/L NGR1 治疗组比较, $^{\Phi}P < 0.05$

的细胞迁移能力显著提高,差异有统计学意义(P<0.05);迁移细胞数随着 NGR1 浓度的增加而增大,差异 有统计学意义(P<0.05),见图 4(插页)和表 6。

表 6 各组细胞迁移细胞数的比较

•	
组别	迁移细胞数(个/视野)
损伤组	$69.00 \pm 7.00^*$
ox-LDL+15 µmol/L NGR1 治疗组	$104.33 \pm 7.77^{\triangle}$
ox-LDL+30 µmol/L NGR1 治疗组	152.67 ± 13.01▲
对照组	227.33 ± 18.56

注:NGR1 为三七皂苷 R1;ox-LDL 为氧化型低密度脂蛋白; 与 对 照 组 比 较, P < 0.05; 与 损 伤 组 比 较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 $_{ox-LDL+15 \mu mol/L NGR1 治疗组比较, <math>^{A}P < 0.05$

3 讨论

AS 的发展是一个相对较复杂的过程^[5],目前,AS 确切的发病机制仍不清楚。许多研究表明,ox-LDL 通 过激活活性氧自由基(ROS)和丙二醛(MDA)诱导氧化 应激,通过释放炎性细胞因子刺激炎症,进而导致内皮 细胞损伤,最终引起内皮细胞的凋亡[10-11]。研究显示, Bcl-2家族和 caspase 家族在细胞凋亡转导通路尤其是 线粒体途径中发挥了极为重要的调控作用。Bcl-2、Bax 蛋白位于线粒体上游,是线粒体膜的通透性改变的重 要调控因素,其过度表达能控制其下游 caspase-3 蛋白 酶的活化,介导细胞的存活或死亡[12]。因此 caspase-3被 认为是细胞凋亡发病机制中的关键酶。当全长 caspase-3(32kD)被激活时,它被切割形成两个成熟亚基:p17 (17kD)和 p12(12kD);进而 Cleaved-caspase-3 水平代 表活化的 caspase-3 水平[13-14]。所以,检测内皮细胞的凋 亡水平是衡量 ox-LDL 对细胞影响的有效方法。本研究 发现 ox-LDL 可以显著诱导 HUVECs 凋亡, 而 NGR1 的 干预可以明显缓解其凋亡的发生,并且可以改善内皮 细胞的黏附和迁移能力。

三七是五加科植物的一员,作为传统中药已有数

千年的历史,特别是根茎常被临床用来维持人体微环 境稳态,并用于治疗心血管系统、神经系统以及代谢相 关疾病^[15-17]。其中 NGR1 是三七中发挥最主要药理学效 益的生物活性物质^[16]。近年来,越来越多的证据表明, NGR1 具有多种生物活性,包括心血管保护^[8]、神经保 护^[18]和抗肿瘤^[19]。本研究选取人正常内皮细胞 HUVECs 为实验材料,通过 ox-LDL 诱导建立内皮细胞凋亡模 型,通过 CCK-8 检测初步探讨 NGR1 是否具有拮抗由 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞凋亡的功能。本研究结果 表明,NGR1 可以发挥抗凋亡的作用,保护内皮细胞,增 加其细胞增殖活性,减少 caspase-3 的激活。为了探索 存活下的内皮细胞功能是否完整,本研究进行了细胞 迁移和细胞黏附实验,结果显示 HUVECs 用 NGR1 治 疗后,显著改善了由 ox-LDL 造成的内皮细胞功能的减 退,提高了 HUVECs 的黏附和迁移能力。

本研究采用 ox-LDL 诱导的 HUVECs 内皮细胞凋亡 模型来观察 NGR1 的抗凋亡作用。结果表明,NGR1 通过 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 增殖活性降低、细胞凋亡 增多、caspase-3 蛋白的表达上调,细胞迁移和黏附减少, 从而发挥其对 ox-LDL 损伤的血管内皮细胞的保护作用。 因缺乏体内实验的验证,本研究的结果具有一定的局限 性,但为 NGR1 的进一步开发提供了一定的理论基础。

4 参考文献

- [1] Watanabe T, Sato K, Itoh F, et al. Emerging roles for vasoactive peptides in diagnostic and therapeutic strategies against atherosclerotic cardiovascular diseases[J]. Current protein & peptide science, 2013, 14(6):472–480. DOI:10.2174/138920371131 49990064.
- [2] Mannarino E, Pirro M. Endothelial injury and repair: a novel theory for atherosclerosis[J]. Angiology, 2008, 59:69S–72S. DOI:10.1177/ 0003319708320761.
- [3] Lubrano V, Balzan S.LOX=1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage[J]. Free Radic Res, 2014, 48(8): 841–848. DOI:10.3109/10715762.2014.929122.
- [4] Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis[J]. Current atherosclerosis reports, 2017, 19(11): 42. DOI:10.1007/s11883-017-0678-6.
- [5] Tabas I, García–Cardeña G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis[J]. The Journal of cell biology, 2015, 209(1):13–22. DOI:10.1083/jcb.201412052.
- [6] Li W, Li X, Du Q, et al. Effect of tongluojiunao injection made from sanqi (Radix Notoginseng) and zhizi (Fructus Gardeniae) on brain microvascular endothelial cells and astrocytes in an in vitro ischemic model[J]. Journal of traditional Chinese Medicine, 2014, 34 (6):725–732. DOI:10.1016/s0254–6272(15)30088–1.
- [7] Shang Q, Xu H, Liu Z, et al. Oral Panax notoginseng Preparation

for Coronary Heart Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials[J]. Evidence–based complementary and alter– native medicine: eCAM, 2013, 2013: 940125. DOI:10.1155/2013/ 940125.

- [8] Yang X, Xiong X, Wang H, et al. Protective effects of panax notoginseng saponins on cardiovascular diseases: a comprehensive overview of experimental studies[J]. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2014, 2014:204840. DOI: 10.1155/2014/204840.
- [9] Chen WX, Wang F, Liu YY, et al. Effect of notoginsenoside R1 on hepatic microcirculation disturbance induced by gut ischemia and reperfusion[J]. World J Gastroenterol. 2008, 14(1): 29–37. DOI:10.3748/wjg.14.29.
- [10] Peluso I, Morabito G, Urban L, et al. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst
 [J]. Endocrine Metabolie & Immune Disordes–Drug Targets, 2012, 12(4):351–360. DOI:10.2174/187153012803832602.
- [11] Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX–1, OxLDL, and atheros– clerosis[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013:152786. DOI: 10.1155/ 2013/152786.
- [12] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5381):1309. DOI:10.1126/science.281.5381.1309.
- [13] Nagy A, Eder K, Selak MA, et al. Mitochondrial energy metabolism and apoptosis regulation in glioblastoma[J]. Brain Res, 2015, 1595:127–142. DOI:10.1016/j.brainres.2014.10.062.
- [14] Yu X, Zhou X, Fu C, et al. Celastrol induces apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 34(3):1129–1136. DOI:10.3892/or.2015.4124.
- [15] Zhang S, Chen C, Lu W, et al. Phytochemistry, pharmacology, and clinical use of Panax notoginseng flowers buds[J]. Phy– totherapy research:PTR, 2018, 32(11):2155–2163. DOI:10.1002/ ptr.6167.
- [16] Xie W, Meng X, Zhai Y, et al. Panax Notoginseng Saponins: A Review of Its Mechanisms of Antidepressant or Anxiolytic Effects and Network Analysis on Phytochemistry and Pharmacology[J]. Molecules(Basel, Switzerland), 2018, 23(4):940. DOI:10.3390/ molecules23040940.
- [17] Ju Z, Li J, Han H, et al. Analysis of bioactive components and multi–component pharmacokinetics of saponins from the leaves of Panax notoginseng in rat plasma after oral administration by LC–MS/MS[J]. Journal of separation science, 2018, 41(7):1512– 1523. DOI:10.1002/jssc.201701042.
- [18] Zou S, Zhang M, Feng L, et al. Protective effects of notoginsenoside R1 on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6):6012–6016. DOI:10.3892/etm.2017.5268.
- [19] Lee CY, Hsieh SL, Hsieh S, et al. Inhibition of human colorectal cancer metastasis by notoginsenoside R1, an important compound from Panax notoginseng[J]. Oncol Rep, 2017, 37(1):399– 407. DOI: 10.3892/or.2016.5222.

(收稿日期:2020-07-06) (本文编辑:严玮雯)