

# 前纤维蛋白 1 在糖基化终末产物介导内皮损伤中的作用

李振宇<sup>1</sup>, 谢秀梅<sup>1</sup>, 杨天伦<sup>2</sup>, 陈美芳<sup>1</sup>

(中南大学湘雅医院 1. 老干科, 2. 心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内皮细胞; 糖基化终末产物; 前纤维蛋白 1; 非对称性二甲基精氨酸; 一氧化氮

[摘要] **目的** 通过体外培养的人脐静脉内皮细胞, 探讨糖基化终末产物对内皮细胞的损伤及与前纤维蛋白 1 的关系。**方法** 在体外培养的内皮细胞, 分别用不同浓度(100、200、400 mg/L)糖基化终末产物孵育不同时间(6、12、24、48 h), 采用 Western blot 检测细胞前纤维蛋白 1 的表达, 免疫荧光染色检测前纤维蛋白 1 的表达和 F 肌动蛋白形态及分布, 同时检测细胞上清液非对称性二甲基精氨酸、一氧化氮、细胞间黏附分子水平和细胞内活性氧的水平。**结果** 糖基化终末产物呈时间依赖性上调内皮细胞前纤维蛋白 1 的表达, 以 200 mg/L 糖基化终末产物作用最为明显; 对照组 F 肌动蛋白分布在细胞周边, 分布均匀, 细胞间连接紧密; 200 mg/L 糖基化终末产物处理 24 h 后, 细胞内 F 肌动蛋白形态和分布发生明显改变, 同时伴有胞浆中前纤维蛋白 1 的表达增高; 200 mg/L 糖基化终末产物孵育内皮细胞 24 h 可显著降低一氧化氮水平, 升高非对称性二甲基精氨酸、细胞间黏附分子、活性氧水平, 诱导内皮细胞损伤; 用 siRNA 干扰前纤维蛋白 1 表达可显著抑制糖基化终末产物诱导的内皮损伤, 表现为降低细胞前纤维蛋白 1 的表达, 明显改善 F 肌动蛋白的结构和分布, 增加一氧化氮的生成, 降低非对称性二甲基精氨酸和细胞间黏附分子的水平。**结论** 糖基化终末产物通过上调前纤维蛋白 1 的表达诱导血管内皮细胞损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Role of Profilin-1 in Endothelial Injury Mediated by Advanced Glycation End Products

LI Zhen-Yu<sup>1</sup>, XIE Xiu-Mei<sup>1</sup>, YANG Tian-Lun<sup>2</sup>, and CHEN Mei-Fang<sup>1</sup>

(1. Department of Geriatric Medicine, 2. Department of Cardiovascular Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Endothelial Cell; Advanced Glycation End Product; Profilin-1; Asymmetric Dimethylarginine; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of profilin-1 on the process of endothelial cell damage mediated by advanced glycation end product (AGE) in cultured human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Methods** The endothelial cells were incubated by AGE with different concentrations (100, 200, 400 mg/L) and times (6, 12, 24, 48 h). The protein expression of profilin-1 were determined by Western blot. The morphology and distribution of F-actin was detected by immunofluorescent staining. The levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), nitric oxide (NO) in cultured condition and reactive oxygen species (ROS) were detected by related kits. **Results** Compared with control, profilin-1 protein expression was significantly up-regulated after treatment with 200 mg/L AGE for 24 h, concomitantly with the markedly increased levels of ICAM-1, ADMA and ROS and the significantly decreased levels of NO. Compared with control, the morphology and distribution of F-actin was significantly altered by AGE. Interfering with the profilin-1 gene expression can protect the extent of cell damage induced by AGE by down-regulating the protein expression of profilin-1, improving the distribution of F-actin, decreasing the levels of ICAM-1 and ADMA and increasing the levels of NO. **Conclusion** AGE induced endothelial cell damage by upregulating the expression of profilin-1

[收稿日期] 2014-06-09

[修回日期] 2014-07-25

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(81000140)

[作者简介] 李振宇, 在读博士研究生, 研究方向为心血管介入治疗, E-mail 为 liyu1552@hotmail.com。谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为老年心血管疾病的防治, E-mail 为 xyxiexm@sina.com。通讯作者陈美芳, 博士, 主治医师, 研究方向为血管病变的机制研究, E-mail 为 chenmeifang16@hotmail.com。

糖尿病(diabetes mellitus, DM)血管病变引发的并发症是糖尿病致残、致死的主要原因之一。对于那些长期高血糖的患者,包括严格控制血糖及强效降脂等在内的综合治疗手段并不能有效防止糖尿病大血管并发症的发生,这种现象被称为“代谢记忆”。大量研究显示糖基化终末产物(advanced glycation end product, AGE)生成增快、增多是“代谢记忆”产生的主要原因<sup>[1]</sup>。大量研究证实前纤维蛋白1(profilin-1)介导的F肌动蛋白(F-actin)的重组和再分布是内皮细胞收缩、血管通透性升高的主要病理基础。近期研究发现前纤维蛋白1在糖尿病和脂质氧化诱导的内皮损伤中触发的通路令人惊讶的相似<sup>[2,3]</sup>,提示前纤维蛋白1可能是内皮细胞损伤的共同通路。但前纤维蛋白1是否参与AGE介导的血管内皮损伤过程迄今未见报道。基于此,本研究拟探讨前纤维蛋白1在AGE介导的血管内皮损伤中的可能作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要药品和试剂

人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自武汉博士德生物工程有限公司,来源于美国ATCC(American Type Culture Collection)细胞库;AGE购自Merk公司(编号:121800);非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)标准品购自美国Sigma公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自杭州四季青公司;DMEM培养基购自Invitrogen公司;兔抗人前纤维蛋白1抗体和 $\beta$ -actin购自Abcam公司;二抗购自Millipore公司;BCA试剂盒、PIPA裂解液、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒购自Promega公司;细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;pLNCX2-Profilin-1干扰质粒由Clotech公司合成;Lip2000转染试剂和鬼笔毒素(phallotoxins)购自Invitrogen公司。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞的培养和分组

取HUVEC细胞株,解冻复苏后加入含10%特级胎牛血清的培养基制成细胞悬液,接种于培养瓶中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养。每隔2~3天换1次培养液,待细胞70%融合时用0.25%胰蛋白酶消化传代。将细胞浓度调整后以每

孔 $1.0 \times 10^5$ 个细胞接种于6孔培养板中,待细胞80%融合时换用含1%胎牛血清的培养基继续培养24 h,使细胞同步化。对照组:用含1%小牛血清的培养液继续孵育24 h;AGE组:用含不同浓度(100、200、400 mg/L)AGE和BSA的培养液培养HUVEC 6、12、24、48 h;AGE + Profilin-1干扰组:用200 mg/L AGE和4  $\mu$ g pLNCX2-Profilin-1干扰质粒共同孵育内皮细胞4 h,4 h后换液培养,继续用200 mg/L AGE孵育20 h。

### 1.3 siRNA 干扰实验

Profilin-1 siRNA干扰实验在本实验前期试验<sup>[4]</sup>的基础上加以改进,由Clotech公司设计合成pLNCX2-Profilin-1 siRNA质粒,经测序证实克隆的RNAi打靶序列100%正确,浓度为0.5~5.0 g/L,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)用于检测转染的效率。转染前24 h,用胰蛋白酶消化细胞,将细胞浓度调整后以每孔 $5.0 \times 10^5$ 个细胞接种于6孔培养板中,使其转染密度为80%~90%。按照每1  $\mu$ g质粒加入30 pmol的siRNA,然后按1:1的比例用Lip2000转染试剂稀释质粒和siRNA,室温孵育5 min后,按每孔4  $\mu$ g质粒转入细胞。

### 1.4 细胞上清液中一氧化氮水平测定

生物系统中NO释放后很快转变成代谢产物NO<sub>2</sub><sup>-</sup>和NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,用镉粉将NO<sub>3</sub><sup>-</sup>变成NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,NO<sub>2</sub><sup>-</sup>通过Griess重氮化反应生成有色化合物,用722分光光度计于540 nm处测定,然后根据公式计算得出NO<sub>2</sub><sup>-</sup>水平,以此反映细胞上清液中NO浓度。

### 1.5 细胞上清液中ADMA水平测定

取细胞培养上清液100  $\mu$ L,加入5-磺基水杨酸沉淀蛋白,离心10 min后取上清液,用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定上清液的ADMA含量(HPLC系统:LC210Advp;色谱柱:Nova-Pak C18)。取10  $\mu$ L上清液或标准品加入100  $\mu$ L衍生试剂(邻苯二甲醛与硼酸缓冲液及 $\beta$ -巯基乙醇的混合物),混匀,室温下反应3 min后进样,然后用线性梯度洗脱的方式将样品从色谱柱中洗脱[流动相A:0.05 mol/L乙酸钠(pH 6.8)-甲醇-四氢呋喃(82:17:1);流动相B:0.05 mol/L乙酸钠-甲醇-四氢呋喃(22:77:1);流速为1 mL/min],经预柱处理后,用RF-10Ax1型荧光检测器对其及内标ADMA进行检测(激发波长: $\lambda$ 338 nm;吸收波长: $\lambda$ 425 nm)。

### 1.6 细胞内活性氧水平检测

双氯荧光素(2',7'-dichlorfluorescein-diacetate,

DCFH-DA) 本身没有荧光,但进入细胞内后,可被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以反映细胞内 ROS 的水平。将 HUVEC 接种于 6 孔板进行处理后,去除原培养液,按 1:500 用无血清培养基稀释 DCFH-DA,37℃ 避光孵育 30 min,用无血清的培养液洗涤 3 次,激发波长为 488 nm,用激光共聚焦扫描显微镜直接观察。

### 1.7 细胞前纤维蛋白 1 检测

经过处理的各组细胞,提取细胞总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,样品置 -70℃ 保存待用。取总蛋白 40 μg,沸水使蛋白变性 5 min,15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行电泳分离蛋白,然后将蛋白转印到二氟化树脂(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。转膜后用 1% 封闭牛奶 37℃ 封闭 1 h,加入前纤维蛋白 1 一抗(稀释度为 1:2 000),4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,常温下辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗孵育 1 h(1:5 000),TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,然后化学发光底物显影 X 线曝光。

### 1.8 免疫荧光染色检测 F 肌动蛋白分布和前纤维蛋白 1 表达

将细胞爬片培养加药处理 24 h 后用多聚甲醛固定,用 0.1% Triton-100 常温处理 10 min,然后再用 3% BSA 封闭细胞 2 h,再加前纤维蛋白 1 (1:50) 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min,然后常温下加抗兔二抗(1:1 000)1 h, PBS 洗 3 次,每次 5 min。用鬼笔毒素(1:200)染 F 肌动蛋白,常温 30 min, PBS 洗 2 次,每次 5 min,然后用 DAPI 染核, PBS 洗 2 次,每次 5 min,封片,激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000)下观察。

### 1.9 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理。多组间比较采用 ANOVA 方差分析进行检验。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AGE 对内皮细胞前纤维蛋白 1 表达的影响

不同浓度(100、200、400 mg/L) AGE 孵育内皮细胞 24 h 均可使前纤维蛋白 1 表达上调( $P < 0.05$ ;图 1),但以 200 mg/L AGE 最明显( $P < 0.01$ ;图 1)。200

mg/L AGE 呈时间依赖性上调内皮细胞前纤维蛋白 1 的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ;图 2),后续实验均选用 200 mg/L AGE 作用内皮细胞 24 h。使用 siRNA 技术干扰前纤维蛋白 1 基因可明显下调 AGE 诱导的内皮细胞前纤维蛋白 1 表达( $P < 0.01$ ;图 3)。

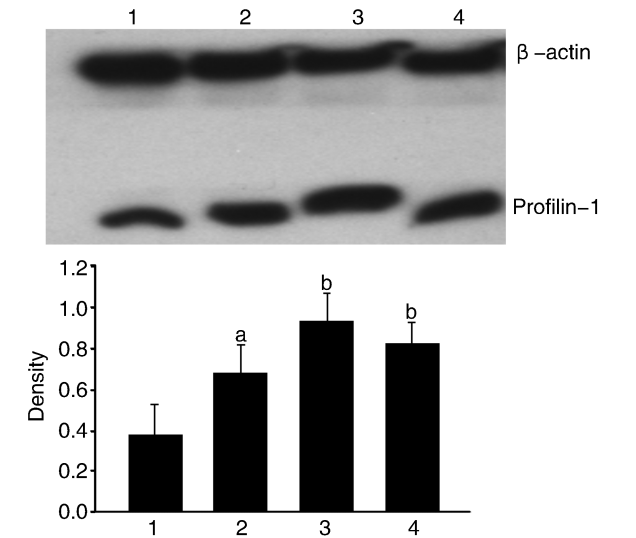


图 1. 不同浓度 AGE 作用内皮细胞 24 h 对前纤维蛋白 1 表达的影响( $n = 3$ ) 1 为对照组,2 为 100 mg/L AGE 组,3 为 200 mg/L AGE 组,4 为 400 mg/L AGE 组。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

Figure 1. The effect of AGE with different concentrations on the protein expression of profilin-1 in endothelial cells ( $n = 3$ )

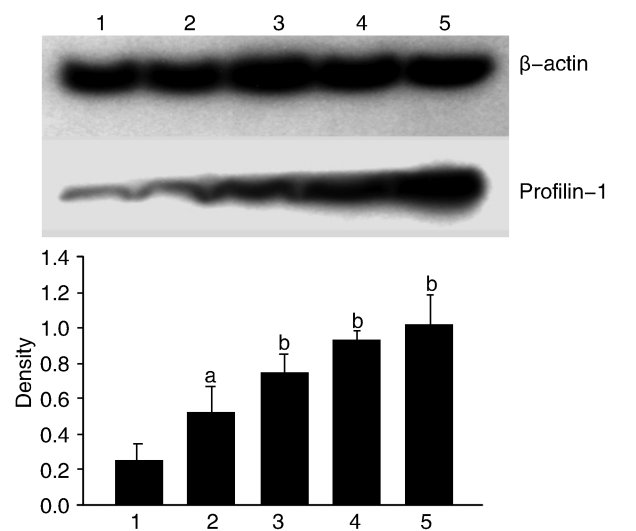


图 2. 200 mg/L AGE 作用内皮细胞不同时间对前纤维蛋白 1 表达的影响( $n = 3$ ) 1 为对照组,2 为 6 h 组,3 为 12 h 组,4 为 24 h 组,5 为 48 h 组。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

Figure 2. The effect of 200 mg/L AGE for different time on the protein expression of profilin-1 in endothelial cells ( $n = 3$ )



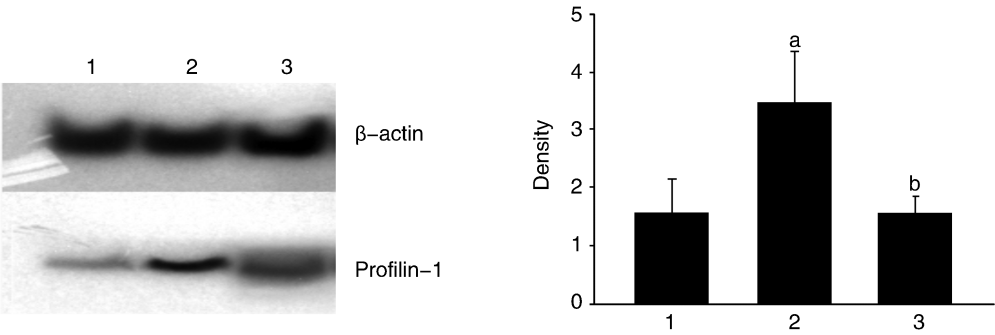


图 3. Profilin-1 siRNA 干扰对 AGE 诱导前纤维蛋白 1 表达的影响( $n=3$ ) 1 为对照组,2 为 AGE 组(200 mg/L AGE 孵育内皮细胞 24 h),3 为 AGE + Profilin-1 干扰组(用 200 mg/L AGE 和 4  $\mu$ g pLNCX2-Profilin-1 干扰质粒共同孵育内皮细胞 4 h 后继续用 200 mg/L AGE 孵育 20 h)。a 为  $P<0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 AGE 组比较。

Figure 3. The effect of profilin-1 siRNA on the protein expression of profilin-1 induced by AGE in endothelial cells ( $n=3$ )

2.2 AGE 对内皮细胞 F 肌动蛋白分布和前纤维蛋白 1 表达的影响

对照组 F 肌动蛋白纤维主要分布在细胞膜的周边,分布均匀,细胞间连接紧密,而 200 mg/L AGE 处理 24 h 后细胞内的 F 肌动蛋白纤维形态和分布发生明显改变,细胞周边的 F 肌动蛋白明显减少,胞浆中

出现较多的应力纤维,变粗变短,紊乱,可见伪足。与对照组相比,AGE 组内皮细胞胞浆中前纤维蛋白 1 的表达有所增加,表现为绿色荧光增加。siRNA 干扰前纤维蛋白 1 表达后明显改善了 AGE 诱导的 F 肌动蛋白的重组和再分布,F 肌动蛋白重新分布在细胞膜的周边,胞浆中的应力纤维减少(图 4)。

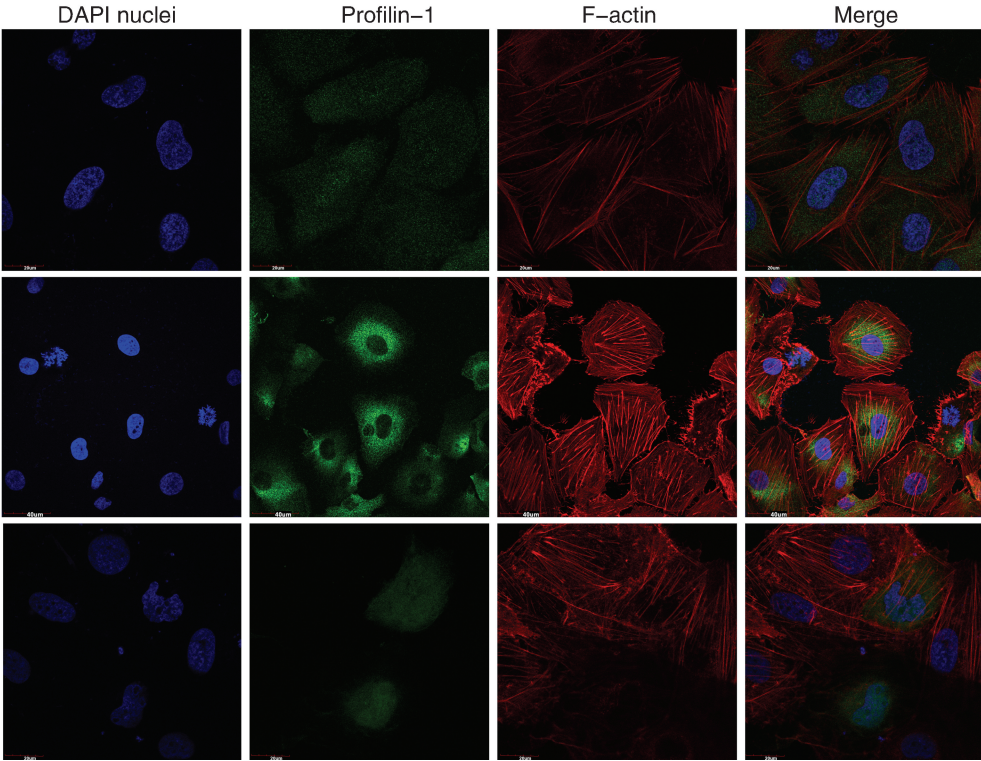


图 4. Profilin-1 siRNA 对 AGE 介导的前纤维蛋白 1 表达和 F 肌动蛋白分布的影响 第 1 行为对照组,第 2 行为 AGE 组,第 3 行为 AGE + Profilin-1 干扰组。

Figure 4. The effect of profilin-1 siRNA on the expression of profilin-1 and the distribution of F-actin induced by AGE

2.3 AGE 对细胞上清液中 ADMA、ICAM-1、NO 水平的影响

200 mg/L AGE 处理内皮细胞 24 h 可显著升高

细胞培养上清液中 ADMA、ICAM-1 水平,降低 NO 水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ;图 5)。同时给予 4  $\mu$ g pLNCX2-Profilin-1 干扰质粒孵育内皮细胞可明显减



少 AGE 所致的 ADMA、ICAM-1 水平的升高,增加 NO 的生成( $P < 0.05, P < 0.01$ ;图 5)。

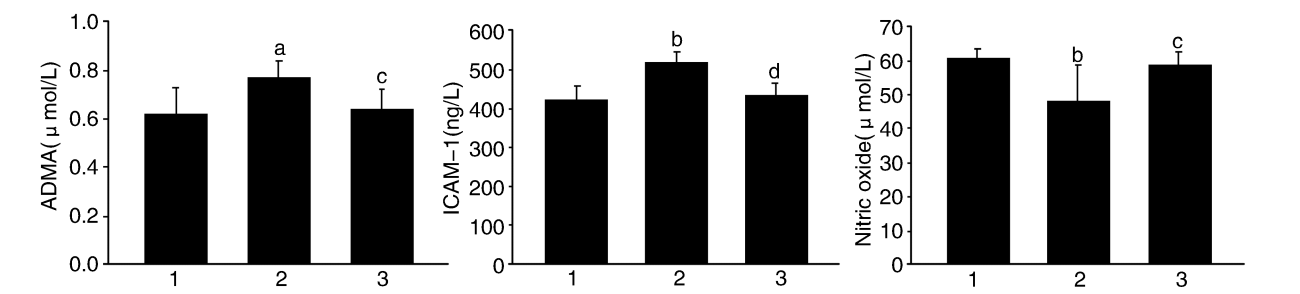


图 5. Profilin-1 siRNA 干扰对 AGE 介导的 ADMA、ICAM-1、NO 水平的影响( $n = 6$ ) 1 为对照组,2 为 AGE 组,3 为 AGE + Profilin-1 干扰组。a 为  $P < 0.05$ ,b 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;c 为  $P < 0.05$ ,d 为  $P < 0.01$ ,与 AGE 组比较。

Figure 5. The effect of profilin-1 siRNA on the levels of ADMA, ICAM-1 and NO mediated by AGE ( $n = 6$ )

### 2.4 AGE 对内皮细胞活性氧的影响

200 mg/L AGE 处理内皮细胞 24 h 后细胞形态变得很不规则,绿色荧光明显增加,提示 AGE 明显增加细胞内 ROS 水平(图 6)。因为 pLNCX2-Profilin-1 质粒带有 GFP 干扰实验结果,故未行干扰后细胞的 ROS 水平检测。

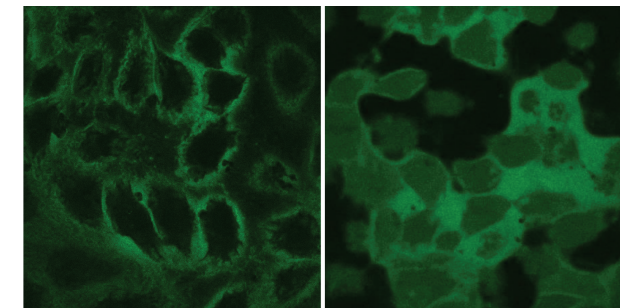


图 6. 200 mg/L AGE 处理内皮细胞后对活性氧的影响 左为对照组,右为 AGE 组。

Figure 6. The change of ROS after treated by 200 mg/L AGE in endothelial cells

## 3 讨论

糖尿病是冠心病的独立危险因素,糖尿病血管病变引发的并发症是糖尿病致残、致死的主要原因之一。早期国内研究证实,糖尿病大鼠随着病程的延长,组织中 AGE 沉积越多,进而影响组织的正常功能<sup>[5]</sup>,心血管保护药物坎地沙坦可下调糖尿病大鼠组织中 AGE 受体的表达,减少 AGE 的生成,发挥靶器官的保护作用<sup>[6]</sup>。大量研究显示,长期的高血糖使线粒体功能下降,产生过量的超氧化物,细胞蛋白、核酸被糖化导致大量的 AGE 生成,AGE 本身可直接修饰线粒体蛋白,抑制其修复,生成更多的超氧离子。这种损害随着高血糖时间延长而积累,

此时即使纠正高血糖,AGE 的损害仍持续存在,其介导的“代谢记忆”可继续加速血管病变的进展<sup>[1]</sup>。

内皮细胞结构和功能受损是糖尿病血管病变发生的始动环节。内皮细胞产生的缩血管因子和舒血管因子之间的平衡是内皮细胞功能正常的标志,一旦失去这种平衡即认为内皮细胞功能障碍。NO 是由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)转化而来。L-Arg 的类似物如 ADMA,它与 L-Arg 竞争性地抑制 NOS 活性,减少 NO 生成,对调节 NO 的生成起着重要作用。近年来大量的研究证实 ADMA 不仅是内皮功能不全的标志因子,也是心血管疾病的危险因子<sup>[3]</sup>。近期研究显示,在体外培养的内皮细胞,AGE 可诱导内皮损伤,减少 NO 的生成和内皮型一氧化氮合酶(endothelial NOS, eNOS)的蛋白表达,增加 ICAM-1 的水平<sup>[7,8]</sup>,而给予新的 AGE 抑制剂交叉连接破裂药(alagebrium chloride),可抑制 AGE 对内皮细胞的损伤<sup>[7]</sup>。与此研究结果类似,本研究再次证实 AGE 体外可诱导内皮细胞的损伤,表现为内皮损伤因子 ADMA、ICAM-1 水平的升高,内皮保护因子 NO 的生成减少,ROS 生成增加。

前纤维蛋白是 1977 年首次在牛脾内发现的一类大小约 12 ~ 15 kDa 的小分子蛋白质,存在于除骨骼肌之外几乎所有类型的细胞和组织中,具有高度保守序列,对于有机体的存活是必需的。它目前已分离定性的有 4 种亚型,其中前纤维蛋白 1 在整个胚胎时期均表达,通过其配体肌动蛋白或多聚脯氨酸介导内皮细胞收缩,增加血管通透性。体外实验证实,许多内皮损伤因子如同型半胱氨酸、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)、氧化胆固醇、血管紧张素 II 均可上调内皮细胞前纤维蛋白 1 表达,导致

内皮细胞骨架结构的重塑<sup>[2,9,10]</sup>;前纤维蛋白 1 过表达可上调 ICAM-1 表达,增加内皮细胞通透性,诱导内皮细胞凋亡,促进内皮细胞迁移、黏附和灶性接触形成;基因沉默前纤维蛋白 1 则作用相反<sup>[11]</sup>。这些研究提示前纤维蛋白 1 可能通过诱导血管内皮损伤参与血管病变的发生。新近研究显示 AGE 和糖化代谢产物乙二醛均可引起内皮细胞骨架肌动蛋白的重组和再分布,导致内皮细胞通透性增加<sup>[12-14]</sup>,而前纤维蛋白 1 调控的细胞骨架蛋白 F 肌动蛋白的重组和再分布是导致血管通透性升高的主要病理基础。基于此,我们直接观察了 AGE 对内皮细胞前纤维蛋白 1 表达的影响,结果显示,在培养的内皮细胞,不同浓度的 AGE 处理后均可显著上调前纤维蛋白 1 的表达,且呈时间依赖性,免疫荧光染色亦显示 AGE 处理后可明显增加细胞浆前纤维蛋白 1 的表达,F 肌动蛋白发生重组和再分布,细胞通透性增加,导致内皮细胞损伤。为进一步验证前纤维蛋白 1 在这一过程中的确切作用,我们采用 siRNA 干扰技术,干扰前纤维蛋白 1 的表达后可明显抑制 AGE 诱导的内皮损伤,改善 F 肌动蛋白的重组和再分布,显著增加内皮细胞 NO 的生成,减少 ADMA、ICAM-1 的水平,提示前纤维蛋白 1 在 AGE 介导的内皮损伤过程中起到关键的作用,值得进一步深入探讨。

#### [参考文献]

- [1] Ceriello A. The emerging challenge in diabetes; the “metabolic memory”[J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 57(5-6): 133-138.
- [2] Romeo GR, Kazlauskas A. Oxysterol and diabetes activate STAT3, and control endothelial expression of profilin-1 via OSBP1[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9 595-605.
- [3] Bouras G, Detsis S, Tousoulis D, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(2): 180-200.
- [4] Cheng JF, Ni GH, Chen MF, et al. Involvement of profilin-1 in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2011, 55(1-3): 34-41.
- [5] 赵伟, 张廷威, 王瑞琳, 等. 实验性糖尿病大鼠肺组织晚期糖基化终末产物、肺表面活性物质蛋白质 A 免疫组织化学分析[J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(6): 732-735.
- [6] 范秋灵, 肇晓明, 蒲实, 等. 坎地沙坦不同治疗时机对 2 型糖尿病 KK/Ta 小鼠肾脏晚期糖基化终末产物形成及其受体表达的影响 [J]. *中国医师杂志*, 2012, 14(2): 140-145.
- [7] Soro-Paavonen A, Zhang WZ, Venardos K, et al. Advanced glycation end-products induce vascular dysfunction via resistance to nitric oxide and suppression of endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(4): 780-788.
- [8] Feng L, Zhu MM, Zhang MH, et al. N-epsilon-(carboxymethyl) lysine is unable to induce endothelial dysfunction but is able to attenuate ages-induced endothelium damage in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Pharmacol*, 2013, 68(4): 251-256.
- [9] Romeo GR, Moulton KS, Kazlauskas A. Attenuated expression of profilin-1 confers protection from atherosclerosis in the LDL receptor null mouse [J]. *Circ Res*, 2007, 101(4): 357-367.
- [10] Jin HY, Song B, Oudit GY, et al. ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38 502.
- [11] Ding Z, Lambrechts A, Parepally M, et al. Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(19): 4 127-137.
- [12] Wang J, Liu H, Chen B, et al. RhoA/ROCK-dependent moesin phosphorylation regulates AGE-induced endothelial cellular response [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11(1): 7.
- [13] 王吉萍, 陈波, 李强, 等. 晚期糖基化终产物引起的 RhoA 和 ROCK 在人皮肤微血管内皮细胞的分布变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(5): 341-343.
- [14] Sliman SM, Eubank TD, Kotha SR, et al. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells; aminoguanidine protection [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 333(1-2): 9-26.

(此文编辑 曾学清)