

# 氨氯地平拮抗 ox-LDL 损伤大鼠骨髓源性 内皮祖细胞血管样结构形成及机制

童海<sup>1</sup>, 雷建军<sup>2</sup>, 王仁<sup>2</sup>, 孟军<sup>1</sup>, 张凯<sup>2</sup>, 冯祺论<sup>2</sup>, 吴灿<sup>2</sup>, 王佐<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属第一医院; 2. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内皮祖细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 氨氯地平; 血管样生成

[摘要] **目的** 探索氨氯地平拮抗氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤大鼠骨髓源性内皮祖细胞(EPC)血管样结构形成及其作用机制。**方法** 实验分为对照组、ox-LDL 组(50 mg/L ox-LDL)和氨氯地平组(50 mg/L ox-LDL + 0.5  $\mu$ mol/L 氨氯地平)。差异贴壁法培养分离 EPC, ac-LDL 摄取和结合 UEA-1 鉴定 EPC, Transwell 测定细胞迁移, Matrigel 法测血管生成, Western blot 和 RT-PCR 分别检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的蛋白水平和 mRNA 表达情况, DCFH-DA 法检测活性氧(ROS)水平, Griess 法测定一氧化氮(NO)含量。**结果** EPC 经 50 mg/L 的 ox-LDL 处理后, 细胞的迁移能力下降近 3 倍, 血管样结构形成能力明显下降, 用 0.5  $\mu$ mol/L 氨氯地平干预可部分恢复 EPC 的迁移能力, 并显著恢复 EPC 的血管样结构形成能力( $P < 0.05$ )。机制研究发现, ox-LDL 下调 EPC eNOS mRNA 和蛋白表达水平, 显著减少 NO 的含量( $P < 0.01$ ), 氨氯地平显著拮抗 ox-LDL 的上述作用; EPC 经 50 mg/L 的 ox-LDL 处理后, 细胞内 ROS 含量显著增加( $P < 0.01$ ), 氨氯地平显著减少胞内 ROS 的水平( $P < 0.05$ )。**结论** 氨氯地平对 ox-LDL 损伤 EPC 血管样结构的形成有显著拮抗作用, 其作用与上调 eNOS 表达和降低细胞内 ROS 水平有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Antagonistic Effect of Amlodipine on Vascular Tube-like Information of Oxidized Low Density Lipoprotein Injured Rat Bone Marrow Derived Endothelial Progenitor Cells

TONG Hai<sup>1</sup>, LEI Jian-Jun<sup>2</sup>, WANG Ren<sup>2</sup>, MENG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Kai<sup>2</sup>, FENG Qi-Lun<sup>2</sup>, WU Can<sup>2</sup>, and WANG Zuo<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital, University of South China; 2. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Oxidized Low Density Lipoprotein; Amlodipine; Vascular Tube-Like Information

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the antagonistic effect of amlodipine on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced rat marrow endothelial progenitor cells (EPC) vascular tube-like information injury and related mechanisms.

**Methods** EPC was isolated from rat marrow, and was divided into three groups, control (200  $\mu$ mol/L EDTA), ox-LDL group (50 mg/L ox-LDL) and amlodipine group (50 mg/L ox-LDL + 0.5  $\mu$ mol/L amlodipine). Differential adhesion rate was used to isolate EPC, endocytosis ac-LDL and binding UEA-1 were used to identify EPC, and transwell for migration, matrigel for tube information, Western blot and RT-PCR were used to measure the protein and mRNA level of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and DCFH-DA dyeing for reactive oxygen species (ROS), Griess Reagent for nitric oxide (NO), respectively.

**Results** The migration capacity of EPC was reduced almost 3 times by 50 mg/L ox-LDL, and this inhibitory effect can be recovered by 0.5  $\mu$ mol/L amlodipine; The tube-like information was reduced by 50 mg/L ox-LDL remarkably ( $P < 0.01$ ), and it was partly recovered by administrating 0.5  $\mu$ mol/L amlodipine. Both mRNA and protein of eNOS were reduced by 50 mg/L ox-LDL, also the NO level was reduced ( $11.44 \pm 1.15 \mu$ mol/L vs  $24.35 \pm$

[收稿日期] 2015-01-07

[修回日期] 2015-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81070221); 江苏省博士后科研资助基金(1302095B); 湖南省卫生厅课题(B2013-034, B2011-054)资助

[作者简介] 童海, 硕士, 研究方向为心血管病学, E-mail 为 nb12111@126.com。通讯作者王佐, 博士, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 smt121101@163.com。

4. 62  $\mu\text{mol/L}$ ), and it can be restored by administrating 0.5  $\mu\text{mol/L}$  amlodipine significantly ( $P < 0.05$ ); The ROS level was increased by 50 mg/L ox-LDL in EPC ( $1.00 \pm 0.25$  vs  $2.53 \pm 0.32$ ), and it was decreased by administrating 0.5  $\mu\text{mol/L}$  amlodipine significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Injury effect of ox-LDL on tube-like information of EPC can be antagonized by amlodipine, and it was related to up-regulating expression of eNOS and reducing ROS generation.

氨氯地平(amlodipine)属于第三代新型长效1,4-二氢吡啶类钙通道阻滞剂。有研究报道,氨氯地平在不影响血浆脂质和血压的情况下,却表现出抑制早期动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块形成的作用<sup>[1,2]</sup>,深入进行的机制研究发现氨氯地平抗As作用与抗炎抗氧化应激<sup>[3]</sup>有关。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)可直接分化为血管内皮细胞,是血管内皮细胞的前体细胞, EPC参与损伤血管的重新内皮化(reendothelialization),参与局部缺血损伤的重新血管化和治疗性血管新生,因此, EPC已成为心血管疾病新的治疗靶点<sup>[4]</sup>。但大多数As危险因素都对EPC有负面影响<sup>[5,6]</sup>。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是As的重要危险因素,能损伤EPC,抑制EPC的迁移、黏附及掺入到血管结构中,降低EPC修复血管能力。研究发现,氧化应激损伤是ox-LDL损伤EPC的重要方式,氧化应激能减少EPC数目,并损伤其生物学功能<sup>[7]</sup>,抗氧化药物则对EPC生物学功能产生正面作用。既然氨氯地平具有抗氧化应激的作用,故氨氯地平存在抑制ox-LDL损伤EPC作用分子基础,我们已经证实氨氯地平可拮抗ox-LDL对EPC增殖的抑制作用,并显著上调内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)蛋白表达<sup>[8]</sup>,因ox-LDL损伤EPC治疗性血管新生<sup>[9]</sup>,且PI3K/Akt/eNOS通路在EPC的功能中起重要调控作用,故氨氯地平同样存在拮抗ox-LDL损伤EPC血管新生的潜力,本研究拟进行验证性实验,为氨氯地平对EPC在治疗性血管新生中的保护作用提供证据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

4周龄雄性SD大鼠购于南华大学实验动物部, UEA-1购自Sigma公司, Dil-ac-LDL购自广州奔源生物, Matrigel胶购自B&D公司, 封闭用羊血清购于武汉博士德生物工程有限公司, 胎牛血清购自元亨圣马生物技术研究, DMEM培养基、TRIZOL试剂购自美国Gibco公司, 一氧化氮(NO)检测试剂盒购自碧云天, Western blot 荧光检测试剂盒购自HyClone-Pierce公司, MMLV第一链cDNA合成试剂

盒、2 × PCR MasterMix 和 DNA 分子量 Marker 购自北京天根生化, DCFH-DA 染料购于江苏碧云天生物技术研究所, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 骨髓 EPC 的提取及实验分组

断头致死SD大鼠, 于75%酒精浸泡0.5 h后, 在无菌操作台上取股骨、胫骨。冲洗骨髓所得骨髓冲洗液200 r/min离心4 min以去除组织成份, 1012个/L接种培养瓶, 在DMEM培养基[5%~10%胎牛血清, 青霉素100 kU/L, 链霉素100 kU/L, 10 mg/L血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)]中于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞孵箱中孵育。当细胞出现单个细胞集落单位时在显微镜下摄像记录。当细胞达到80%密度时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 重悬呈单细胞悬液后, 接种于96孔板。取对数生长期细胞进行分组: 对照组加等量含200  $\mu\text{mol/L}$  EDTA的全培养液; 根据参考文献, ox-LDL组加50 mg/L ox-LDL<sup>[7]</sup>; 根据预实验结果, 氨氯地平组加50 mg/L ox-LDL和0.5  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平。

1.3 EPC 鉴定

细胞爬片, 待细胞生长至50%密度时加入10 mg/L Dil-ac-LDL至培养孔内, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>下孵育4 h, 1%多聚甲醛1 mL固定10 min, 荧光显微镜下观察。以10 mg/L的浓度加入UEA-1-FITC, 覆盖细胞爬片, 4℃下置于湿盒内孵育2 h。最后进行DAPI复染核, 并在荧光显微镜下观察。

1.4 细胞迁移力分析

在Transwell的下室加入2.6 mL培养液, 将1.5 mL  $1 \times 10^8$  个/L细胞悬浮液注入上室, 在下室加入不同浓度(0、1、10、100  $\mu\text{g/L}$ )基质细胞衍生因子1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )。培养24 h后取上室, 用酒精棉球擦去上室膜上未迁移过去的细胞, 再以95%酒精固定10 min, 苏木素染色5 min, 显微镜下随机选择3个连续视野计数迁移到上室膜下的细胞, 取均值。

1.5 EPC 在 Matrigel 胶上形成血管样结构分析

无菌条件下24孔板每孔加入100  $\mu\text{L}$  Matrigel胶, 37℃培养箱40 min后, 每孔加入约 $2 \times 10^4$  Dil-ac-LDL标记的正常EPC, 继续培养3~7天; 显微镜随机选取20个视野观察EPC血管腔样结构形成情况。Photoshop软件测量血管样结构总长度(mm), 取平均数。

## 1.6 RT-PCR

TRIZOL 试剂提取细胞总 RNA 并凝胶电泳鉴定纯度。取总 RNA 2  $\mu\text{g}$ , cDNA 合成用 Promega 公司逆转录试剂盒, 取逆转录产物 1.0  $\mu\text{L}$  做 PCR 循环。eNOS (417 bp) 的引物序列为 5'-AAGACCGATTA-CACGACA-3' 和 5'-GCAATGTGAGTCCGAAAA-3'; 内参  $\beta$ -actin (207 bp) 引物序列为 5'-CCAACTGG-GACGATATGGAG-3' 和 5'-CAGAGGCATACA GGA-CAAC-3'。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 59 $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 30 个循环, 末次循环 72 $^{\circ}\text{C}$ , 延伸 10 min。反应完成后, 取产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色。UVP 型凝胶图像分析系统测定灰度值, 以各组目的基因与  $\beta$ -actin 的吸光度值减去背景值的比值来计算待测基因的 mRNA 水平。

## 1.7 Western blot

三去污剂裂解缓冲液进行细胞裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$  下离心 10 min, BCA 法蛋白质定量。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白质于 5 $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液中, 100 $^{\circ}\text{C}$  下加热使蛋白质变性 10 min。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离后, 转至 PDVF 膜, 丽春红染色观察效果, 同时确定蛋白质分子质量标准位置。封闭试剂封闭 2 h, 按 1:200 比例分别加入羊多克隆抗体 eNOS 和小鼠多克隆抗体  $\beta$ -actin, 4 $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜, TBST 洗 3 次, 以 1:2000 稀释倍数加辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗和羊抗小鼠二抗, 室温下孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 显示于 X 光片。Labwork 凝胶图像分析系统进行分析, 得到目的蛋白及  $\beta$ -actin 灰度值, 以比值代表 eN-

OS 蛋白表达。

## 1.8 DCFH-DA 染色法检测细胞内活性氧的量

$2 \times 10^5$  细胞密度接种于 6 孔培养板。贴壁后换用新鲜无血清培养基, 用 50 mg/L ox-LDL 孵育细胞 24 h 后, 弃培养基, 用 PBS 洗三次, 每孔以 1 mL 培养基中加 0.5  $\mu\text{L}$  DCFH-DA 孵育细胞 20 min 后, 弃培养基, 无血清培养基洗 3 次, 加无血清培养基 1 mL, 荧光显微镜下观察, 蓝光激发光下细胞中呈现强荧光者为活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 阳性细胞。

## 1.9 一氧化氮的检测

首先制作一氧化氮 (nitric oxide, NO) 标准曲线, 用 Griess 法测定 NO 的浓度, 在单光 540 nm 波长下检测上述样品的吸光度, 按照 NO 标准曲线公式, 计算样品中 NO 浓度值。

## 1.10 统计学分析

实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS 12.0 进行统计学处理, 组间比较采用方差分析及  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  判定差异有显著性。

# 2 结 果

## 2.1 大鼠骨髓源 EPC 的鉴定

EPC 吞噬 ac-LDL 后, 在 543 nm 激光激发下, 发出红色荧光, 488 nm 激光同时激发可见绿色荧光分布于整个细胞表面, 2 种荧光叠加后结果显示, 90% 以上的细胞均为红绿双染阳性、融合成橙色, 该细胞符合 EPC 的特征 (图 1)。

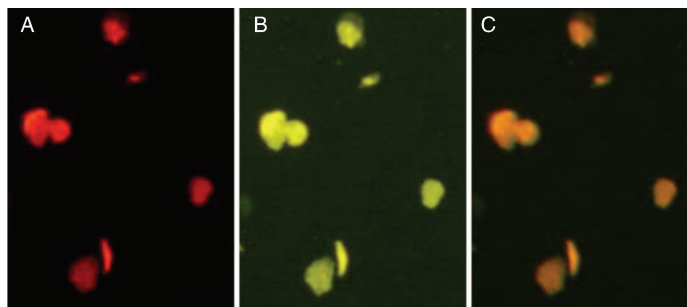


图 1. 大鼠骨髓 EPC 鉴定 (10 $\times$ ) A 为 EPC 吞噬 ac-LDL (红色荧光), B 为 EPC 结合 UEA-1 (绿色荧光), C 为叠加图 (橙色)。

Figure 1. Identification of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells (10 $\times$ )

## 2.2 氨氯地平拮抗 ox-LDL 损伤大鼠骨髓 EPC 的血管形成

显微镜下可见 EPC 在基质胶中形成血管样结构, 经 ox-LDL 处理, 血管样结构形成明显受到了抑制 (图 2)。对照组、ox-LDL 组、氨氯地平组血管样结构长度分别为:  $15.13 \pm 2.41$  mm/视野、 $5.32 \pm$

$1.27$  mm/视野、 $9.84 \pm 2.16$  mm/视野。ox-LDL 可明显抑制血管样结构的形成, 经 0.5  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平处理后, 其血管样结构形成明显得到改善, 与 ox-LDL 组比较, 差异有显著性 ( $P < 0.01, n = 5$ )。但氨氯地平只是部分恢复 EPC 的血管形成能力。



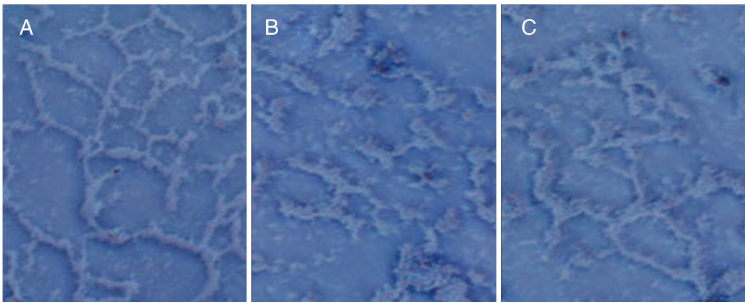


图 2. 氨氯地平拮抗 ox-LDL 损伤大鼠骨髓 EPC 的血管样结构形成能力(20 ×) A 为对照组,B 为 ox-LDL 组,C 为氨氯地平组。  
Figure 2. Antagonistic effect of amlodipine on vascular tube-like information of oxidized low density lipoprotein injured rat bone marrow derived endothelial progenitor cells(20 ×)

2.3 氨氯地平拮抗 ox-LDL 损伤大鼠骨髓 EPC 的迁移  
由于受到 Transwell 迁移小室下槽 VEGF 的作用,促使 EPC 从上槽向下槽迁移,但 50 mg/L 的 ox-

LDL 显著抑制 EPC 的这种迁移( $P < 0.01$ ),而 0.5  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平可部分恢复 EPC 的迁移能力( $P < 0.05$ ;图 3)。

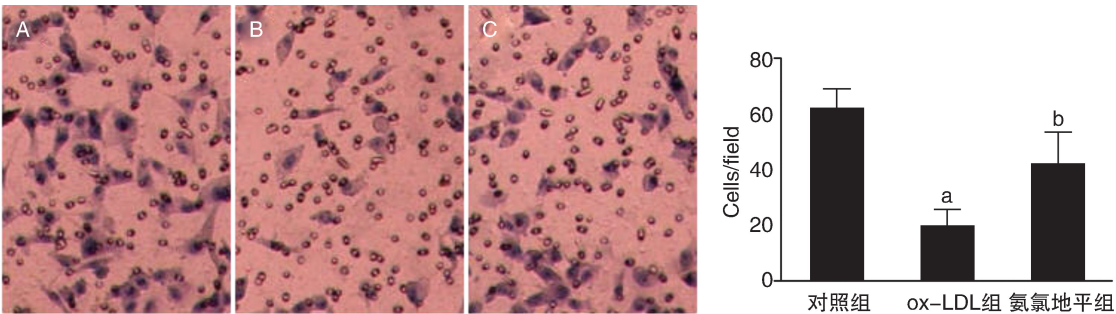


图 3. 氨氯地平对 ox-LDL 损害大鼠骨髓 EPC 迁移的拮抗作用(10 ×, n = 3) A 为对照组,B 为 ox-LDL 组,C 为氨氯地平组。a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 ox-LDL 组比较。

Figure 3. Antagonistic effect of amlodipine on migration of oxidized low density lipoprotein injured rat bone marrow derived endothelial progenitor cells(10 ×, n = 3)

2.4 氨氯地平促进大鼠骨髓 EPC 的 eNOS 表达及 NO 的释放

EPC 经过 50 mg/L ox-LDL 处理后,eNOS mRNA 及蛋白水平均显著下调( $P < 0.01$ ),而 ox-LDL 的这种作用可被 0.5  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平显著改善,相对于 ox-LDL 组,eNOS mRNA 水平显著上调( $P < 0.05$ ),但 eNOS mRNA 水平仍然未恢复到对照组水平(图 4)。

经 50 mg/L ox-LDL 处理后,EPC 上清 NO 含量显著减少 ( $11.44 \pm 1.15 \mu\text{mol/L}$  比  $24.35 \pm 4.62 \mu\text{mol/L}$ , $P < 0.01$ ),而经 0.5  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平干预后,NO 含量有所回升 ( $17.35 \pm 1.94 \mu\text{mol/L}$ ),与 ox-LDL 组比较,差异有显著性( $P < 0.05$ ),即氨氯地平能拮抗 ox-LDL 损伤大鼠骨髓 EPC 的 NO 释放。

2.5 氨氯地平降低 ox-LDL 损伤大鼠骨髓 EPC 的活性氧水平

在荧光显微镜下呈蓝荧光者为活性氧阳性细胞。可见在镜下对照组几乎无荧光出现,经 50

mg/L 的 ox-LDL 处理后视野下出现大量的绿色荧光,表明 ox-LDL 能刺激 EPC 产生大量活性氧,而氨氯地平组视野中荧光强度显著减弱 ( $1.56 \pm 0.18$  比  $2.53 \pm 0.32$ , $P < 0.05$ ),即氨氯地平可显著拮抗 ox-LDL 引起的胞内活性氧水平的升高(图 5)。

### 3 讨论

研究发现,PI3K/Akt/eNOS 通路对 EPC 生长、分化、归巢等生物学功能均起重要的调控作用<sup>[10,11]</sup>,ox-LDL 对 EPC 有较强的损伤作用,这种损伤作用与 PI3K/Akt/eNOS 信号通路活性下降密切相关<sup>[12]</sup>。ox-LDL 能导致 PI3K 的 p85 亚基硝基化,致 p85 和 p110 亚基解离,向 EPC 转染 Akt 则显著拮抗 ox-LDL 损伤 EPC 的作用。因此拮抗 ox-LDL 对 EPC 损伤十分重要,已经有一些 ox-LDL 对 EPC 损伤干预方面的研究,并已经取得一些进展。如阿托伐他汀<sup>[13]</sup>、丹参素<sup>[14]</sup>、17 $\beta$ -雌二醇<sup>[15]</sup>等,且其作

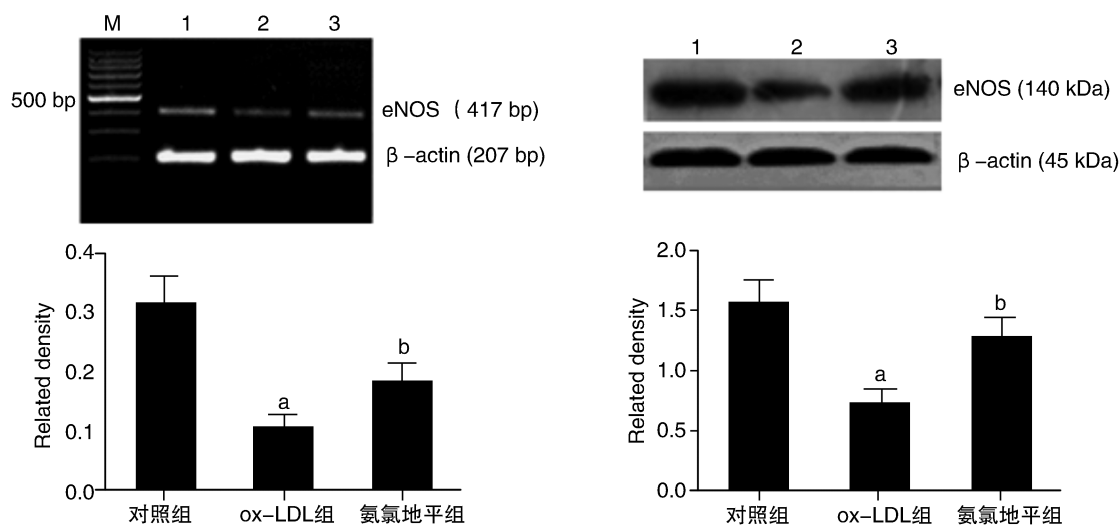


图 4. 氨氯地平促进 ox-LDL 损伤的大鼠骨髓 EPC 的 eNOS mRNA (左图) 和蛋白 (右图) 表达 ( $n = 3$ ) M 为 DNA Marker, 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为氨氯地平组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. Amlodipine improves eNOS expression both in protein and mRNA level of oxidized low density lipoprotein injured rat bone marrow derived endothelial progenitor cells ( $n = 3$ )

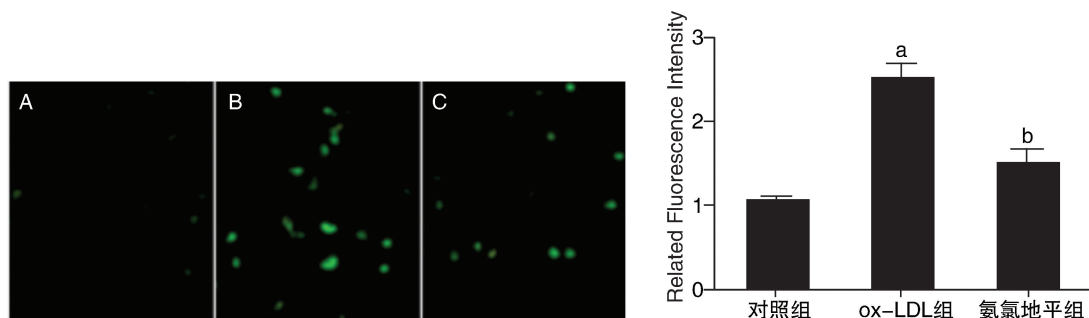


图 5. 氨氯地平降低 ox-LDL 损伤大鼠骨髓 EPC 的活性氧水平 ( $n = 3$ ) A 为对照组, B 为 ox-LDL 组, C 为氨氯地平组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较。

Figure 5. Amlodipine decreases the reactive oxygen species level of ox-LDL injured rat bone marrow derived endothelial progenitor cells ( $n = 3$ )

用机制均与上调 Akt/eNOS 信号通路的活性有关。

钙通道阻滞剂通过非降血压途径对心血管系统的保护作用近来受到重视。如硝苯地平可以保护血管内皮功能并阻止 As 进程<sup>[16]</sup>, 这种作用与降血压效果无关, 却与加强血管内皮 NO 的释放和抑制血管及其周围组织活性氧的产生有关。服用硝苯地平患者循环 EPC 数目显著增多, 硝苯地平在体外就能促进 EPC 的血管生成和分化, 并阻止  $H_2O_2$  诱导的对 EPC 的氧化应激损伤, 促进 EPC 迁移<sup>[17]</sup>。研究发现硝苯地平能促进 EPC 产生 NO, 上调 Mn-SOD 酶的活性, 增加 VEGF 生成<sup>[18]</sup>。我们采用第三代新型长效 1, 4 - 二氢吡啶类钙通道阻滞剂氨氯地平来干预 ox-LDL 对 EPC 的损伤作用, 结果也证实了其对 ox-LDL 损伤 EPC 的血管样结构形成的拮抗

作用, 这种拮抗作用与氨氯地平促进 EPC 的迁移, 减少 ROS 水平及上调 Akt/eNOS 信号通路活性有关, 这一点与大多数拮抗 ox-LDL 损伤 EPC 的试剂和药物的作用机制相同, 至于减少 ROS 的生成, 可能与钙离子拮抗剂上调 MnSOD 酶的活性有关。另外与硝苯地平研究不同的是, 硝苯地平采用的处理因素是直接使用  $H_2O_2$ , 而我们使用的是 ox-LDL, 因 ox-LDL 的 EPC 损伤作用干预手段和措施目前研究较少, 故本研究为干预 ox-LDL 致 EPC 损伤提供新的途径。但本研究尚没有就氨氯地平影响调控 EPC 的其它信号途径进行研究, 如 Notch 信号通路、血管生成、MAPK 信号传导通路与细胞增殖, 故这些将成为今后氨氯地平保护 EPC 的研究方向。

## [参考文献]

- [1] Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P, et al. Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2004, 292(18): 2 217-225.
- [2] Pitt B, Byington RP, Furberg CD, et al. PREVENT investigators: effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events [J]. *Circulation*, 2000, 102(13): 1 503-510.
- [3] Chou TC, Yang SP, Pei D. Amlodipine inhibits pro-inflammatory cytokines and free radical production and inducible nitric oxidesynthase expression in lipopolysaccharide/interferon-gamma-stimu-lated cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 89 (2): 157-163.
- [4] Takashi U, Yukihito H. Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108(1): 1-6.
- [5] Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(3): 741-752.
- [6] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(4): 999-1 007.
- [7] Lee SH, Kim JY, Yoo SY, et al. Cytoprotective effect of dieckol on human endothelial progenitor cells (hEPCs) from oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(6-7): 526-534.
- [8] 刘慧婷, 杨简, 童海, 等. 氨氯地平对 ox-LDL 致大鼠骨髓 EPCs 损伤的保护作用与上调一氧化氮合酶表达有关 [J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(2): 139-143.
- [9] Wu Y, Wang Q, Cheng L, et al. Effect of oxidized low-density lipoprotein on survival and function of endothelial progenitor cell mediated by p38 signal pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 53(2): 151-156.
- [10] Gensch C, Clever YP, Werner C, et al. The PPAR2gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 192 (1): 67-74.
- [11] Lai P, Liu Y. Echinocystic acid, isolated from *Gleditsia sinensis* fruit, protects endothelial progenitor cells from damage caused by oxLDL via the Akt/eNOS pathway [J]. *Life Sci*, 2014, 114(2): 62-69.
- [12] Ma FX, Zhou B, Chen Z, et al. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(6): 1 227-237.
- [13] Ma FX, Chen F, Ren Q, et al. Lovastatin restores the function of endothelial progenitor cells damaged by oxLDL [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(5): 545-552.
- [14] Ji KT, Chai JD, Xing C, et al. Danshen protects endothelial progenitor cells from oxidized low-density lipoprotein induced impairment [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(8): 618-626.
- [15] 应才, 胡国勇, 王艳, 等. oxLDL 诱导人外周血内皮祖细胞凋亡及 17 $\beta$ -雌二醇的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(14): 2 132-138.
- [16] NCORE Investigators. Effect of nifedipine and cerivastatin on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease: the ENCORE I Study (Evaluation of Nifedipine and Cerivastatin on Recovery of Coronary Endothelial Function) [J]. *Circulation*, 2003, 107: 422-428.
- [17] Tomonori Sugiura, Takahisa Kondo, Yasuko Kureishi-Bando, et al. Nifedipine improves endothelial function: role of endothelial progenitor cells [J]. *Hypertension*, 2008, 52(3): 491-498.
- [18] Gabriella Passacuale, Giovambattista Desideri, Giuseppe Croce, et al. Nifedipine improves the migratory ability of circulating endothelial progenitor cells depending on manganese superoxide dismutase upregulation [J]. *J Hypert*, 2008, 26(4): 737-746.

(此文编辑 许雪梅)