

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-07-0666-05

## Diplacone 对同型半胱氨酸致血管内皮细胞损伤的保护作用

陈洪娜<sup>1,2,3,4</sup>, 唐文照<sup>2,3,4</sup>, 闫志晖<sup>2,3,4</sup>, 王英爱<sup>1,2,3</sup>, 李军<sup>2,3,4</sup>, 王福文<sup>2,3,4</sup>

(1. 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东省济南市 250200; 2. 山东省医学科学院药物研究所, 山东省济南市 250062; 3. 国家卫生部生物技术药物重点实验室, 山东省济南市 250062; 4. 山东省罕见病重点实验室, 山东省济南市 250062)

[关键词] 同型半胱氨酸; 人脐静脉内皮细胞; Diplacone

[摘要] **目的** 采用同型半胱氨酸(Hcy) 孵育体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 建立血管内皮细胞炎症损伤模型, 后用 Diplacone 加以干预, 观察 Diplacone 对 HUVEC 的影响, 探讨 Diplacone 对血管内皮细胞可能的保护作用。**方法** 先用不同浓度的 Hcy 预处理 HUVEC, 选出 Hcy 的最适损伤浓度(2 mmol/L) 和时间(12 h), 在 HUVEC 培养基中加入不同浓度 Diplacone 预处理 2 h 后加入 2 mmol/L Hcy 作用 12 h, 通过 MTT 法检测细胞活性变化, Hoechst33342 核染色检测细胞核损伤程度, Western blot 检测与细胞损伤有关的血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 和 P-选择素的表达水平, 以此衡量 Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 损伤的保护作用。**结果** 与对照组相比, 2 mmol/L Hcy 组细胞活性显著降低( $P < 0.01$ ), 10  $\mu\text{mol/L}$  以内 Diplacone 具有明显的剂量依赖性抑制 2 mmol/L Hcy 诱导的 HUVEC 活性损伤并抑制 Hcy 所致的 VCAM-1 和 P-选择素的表达升高( $P < 0.01$ )。**结论** Diplacone 对 Hcy 所致的 HUVEC 内皮损伤具有保护作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Protective effect of Diplacone on vascular endothelial injury induced by homocysteine

CHEN Hong-Na<sup>1,2,3,4</sup>, TANG Wen-Zhao<sup>2,3,4</sup>, YAN Zhi-Hui<sup>2,3,4</sup>, WANG Ying-Ai<sup>1,2,3</sup>, LI Jun<sup>2,3,4</sup>, WANG Fu-Wen<sup>2,3,4</sup>

(1. School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250200, China; 2. Institute of Pharmacy, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062, China; 3. Key Laboratory for Biotech-Drugs, Ministry of Health, Jinan, Shandong 250062, China; 4. Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Jinan, Shandong 250062, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Human umbilical vein endothelial cells; Diplacone

[ABSTRACT] **Aim** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were incubated with high homocysteine (Hcy) in vitro, establishing inflammatory damage model of vascular endothelial cell, after intervening with Diplacone, to observe the effect of Diplacone on HUVEC, and to explore the possible protective effect of Diplacone on vascular endothelial cell. **Methods** HUVEC were pretreated with different concentrations of Hcy, choosing the optimal damage concentration and time of Hcy. HUVEC were treated with different concentration of Diplacone for 2 hours then treated with Hcy for 12 h. The change of cell activity was detected by MTT method; Cell nucleus damage was detected by Hoechst33342 stain; Protein expression levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and P-selectin were detected by Western blot method. The above tests were used to show the protective effect of Diplacone on HUVEC induced by high Hcy.

**Results** Compared with the normal group, the activity of the 2 mmol/L Hcy group was significantly lower ( $P < 0.01$ ), while Diplacone concentration was less than 10  $\mu\text{mol/L}$ , Diplacone showed a concentration dependent on decreasing the damage of Hcy on HUVEC and decreased VCAM-1 and P-selectin protein expression that were increased by Hcy in HUVEC

[收稿日期] 2017-05-03

[修回日期] 2017-05-26

[基金项目] 山东省自主创新及成果转化专项(201402103); 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程; 山东省医学科学院 2015 年计划项目(2015-08)

[作者简介] 陈洪娜, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 1010927603@qq.com。通讯作者李军, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 ykyljun@126.com。通讯作者王福文, 硕士, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 wangfuwww@tom.com。

( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Diplacone has protective effect on endothelial injury induced by high Hcy in HUVEC.

随着社会老龄化的加快,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)已成为当今时代最为严重的心血管疾病之一。目前认为它是一种慢性炎症反应<sup>[1]</sup>,且研究发现其始动步骤是血管内皮损伤<sup>[2-3]</sup>。黏附分子是一类重要的炎症因子,临床发现<sup>[4]</sup>,它几乎参与 As 发生的整个过程,其中与血管内皮损伤有关的黏附分子主要有属免疫球蛋白超家族的血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)及属选择素家族的 P-选择素等。研究表明<sup>[5-6]</sup>同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)可直接或间接通过氧化应激等作用来诱导这些黏附分子的大量表达,造成内皮损伤以及 As 的发生和发展。Diplacone (Dip) 化学名称为(2S)-6-香叶基-3',4',5,7-四羟基二氢黄酮<sup>[7]</sup>,具有较强的抗炎活性<sup>[8]</sup>,能抵抗炎症因子在巨噬细胞中的表达,且具有较强的抗氧化能力<sup>[9]</sup>。目前,关于 Dip 对 Hcy 所致内皮细胞损伤是否具有保护作用尚且不明。本实验主要研究 Dip 对 Hcy 诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)损伤的干预作用,观察 HUVEC 的活性、细胞核形态的变化以及 VCAM-1 和 P-选择素的表达,初步探讨 Dip 对 Hcy 所致内皮细胞损伤的保护作用及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

HUVEC 株由山东省医学科学院药物研究所药理室提供;Dip 由山东省医学科学院药物研究所天然药物研究室分离,纯度 $>95\%$ ;Hcy、MTT 和 DMSO 购自 Sigma 公司;DMEM 细胞培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自 Gibco 公司;Hoechst 33342 细胞核凋亡试剂盒、细胞清洗液 D-Hank's 购自 Solarbio 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; $\beta$ -actin 购自 Cell Signaling Technology;VCAM-1 一抗 CD106、P-选择素一抗 CD62P 购自 Novus Biologicals 公司,二抗购自中杉金桥公司。

### 1.2 细胞培养及实验分组

HUVEC 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温恒湿培养箱中培养。细胞汇合至 80%~90%,用含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化,常规传代。条件培养液为最适损伤浓度 2 mmol/L 的 Hcy 及不同浓度的 Dip,选择生长状态良好的 HUVEC 接种于底面积为 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中

培养,在细胞汇合至 80% 状态时,参照相关文献<sup>[10]</sup>,将其分为 6 个组给药,对照组、2 mmol/L Hcy 模型组及给药组,给药组又分为 0.1  $\mu$ mol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组、1  $\mu$ mol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组、10  $\mu$ mol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组以及 100  $\mu$ mol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组。

### 1.3 血管内皮细胞炎症损伤模型的建立及细胞活力的检测

取对数生长期 HUVEC,胰酶消化后计数,稀释为  $5 \times 10^7$  个/L,以每孔 100  $\mu$ L 悬液,即每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔。待细胞汇合至 50%,吸出培养液用 D-Hank's 洗 3 遍,用无血清培养基培养 24 h,即使细胞饥饿 24 h,同步化于 G<sub>0</sub> 期。24 h 后吸出培养基,用 D-Hank's 清洗 3 遍。

(1) 细胞损伤模型建立:使用不同浓度 Hcy 刺激孵育培养 HUVEC,分为对照组(不加 Hcy)和模型组(Hcy 的浓度梯度为 0.25 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L 和 6 mmol/L),24 h 后通过 MTT 检测法,筛出一个明显抑制细胞增殖的适宜浓度为 2 mmol/L。后在此基础上分别在 36 h、24 h、12 h、6 h、2 h、0 h 后加入 2 mmol/L 的 Hcy,通过 MTT 检测 OD 值筛选出最适损伤时间为 12 h。

(2) 细胞活力检测:根据实验分组,先将给药组分别加入 0.1  $\mu$ mol/L Dip、1  $\mu$ mol/L Dip、10  $\mu$ mol/L Dip 及 100  $\mu$ mol/L Dip 提前孵育 2 h,加入 2 mmol/L Hcy 继续孵育 12 h 后加入 MTT 检测。MTT 检测具体方法:每孔加入 10  $\mu$ L MTT (5 g/L),37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 4 h 后吸出培养基,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,置于摇床上震荡 10 min,使甲臞晶体充分溶解,用酶标仪检测 OD 值(检测用 490 nm 的波长)。细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)  $\times 100\%$ 。空白组为不加细胞的调零组。

### 1.4 细胞凋亡形态学检测

取对数生长期的 HUVEC,以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞的密度接种于 96 孔板,24 h 完全贴壁后,进行饥饿培养 24 h,按实验分组给药 12 h 后,吸出培养基,用 D-Hank's 清洗 3 遍,每孔加入 100  $\mu$ L Hoechst 33342 染色液,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 30 min,最后将染色液吸出,用 D-Hank's 清洗 3 遍,荧光显微镜下观察、拍照,并进行凋亡率计算。凋亡率 = 凋亡细胞 / 正常细胞  $\times 100\%$

### 1.5 Western blot 检测黏附分子的表达

取对数生长期状态良好的 HUVEC 接种于 25 cm<sup>2</sup>

细胞培养瓶, 每组重复 3 次, 待细胞长至 80%, 进行饥饿培养 24 h, 后用 D-Hank's 清洗 3 次, 按实验分组先给药 Dip 提前孵育 2 h 后加入 2 mmol/L Hcy 培养 12 h, 然后 0.25% 胰酶消化, 离心, 倒掉上清, 加入裂解液 (含 PMSF) 4℃ 裂解 2 h, 后 4℃ 离心, 取上清 -20℃ 保存。BCA 测蛋白浓度。配胶, 取 80 μg 蛋白量与上样缓冲液混合, 100℃ 加热 5 min 使蛋白变性, SDS-PAGE 电泳浓缩胶 (60 V, 50 min), 分离胶 (120 V, 100 min)。PVDF 膜裁剪, 300 mA, 240 V, 2 h 冰浴电转, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。5% BSA 封闭液室温摇床封闭 1 h, P-选择素单克隆抗体 (1:500) 与 VCAM-1 单克隆抗体 (1:1000) 分别 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min。二抗 (1:5000) 孵育摇床上震荡 3 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min。ECL 发光液孵育 1 min, 利用显影仪进行显影, 后采用 Quantity One 分析软件对灰度值进行半定量分析。

## 1.6 统计学分析

应用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异比较采用方差分析及 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hcy 对 HUVEC 活性的影响及模型建立依据

Hcy 对 HUVEC 有损伤作用, 并在浓度和时间上成依赖性增长。与对照组相比, 0.25、1、2、4、6 mmol/L Hcy 组 HUVEC 存活率呈递减趋势, 且在 2 mmol/L Hcy 处递减最快, 之后递减趋势缓慢降低, 因此选取 2 mmol/L Hcy 为抑制 HUVEC 增殖最适浓度。用 2 mmol/L Hcy 做时间依赖性实验, 结果显示 12 h 时差异有显著性 ( $P < 0.01$ ; 图 1)。

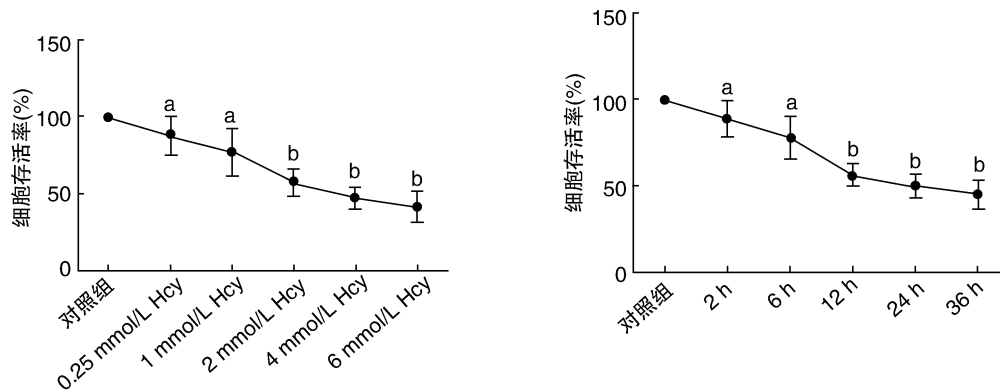


图 1. Hcy 对 HUVEC 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ) a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

Figure 1. Effect of Hcy on the viability of HUVEC ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 2.2 Dip 对 Hcy 抑制 HUVEC 活性的影响

2 mmol/L 的 Hcy 孵育 HUVEC 12 h, 与对照组相比存活率显著降低 ( $P < 0.05$ )。不同浓度的 Dip 处理 HUVEC 2 h 后, 再加入 Hcy 孵育 12 h, Dip 可明显抑制 Hcy 的损伤作用。与 2 mmol/L Hcy 组相比, 10 μmol/L 以下 Dip 可呈浓度依赖性抑制 Hcy 对 HUVEC 的损伤, 而 100 μmol/L Dip 抑制 Hcy 损伤 HUVEC 活性的作用明显下降, 并与 Hcy 组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 图 2), 因此 10 μmol/L Dip 为抑制 Hcy 损伤 HUVEC 活性的最适浓度。

### 2.3 Dip 对 Hcy 所致 HUVEC 细胞核形态学的影响

已知正常的 HUVEC 细胞核呈均匀的蓝色荧光, 细胞核形状规则。2 mmol/L Hcy 孵育 HUVEC 12 h, 加入 Hoechst33342 染色液孵育 30 min, 荧光显微镜下可见细胞核呈凋亡状态, 细胞核具有凋亡

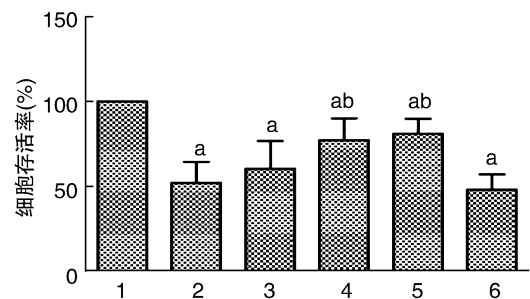


图 2. Dip 对 Hcy 诱导的 HUVEC 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

1 为对照组, 2 为 2 mmol/L Hcy 组, 3 为 0.1 μmol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组, 4 为 1 μmol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组, 5 为 10 μmol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组, 6 为 100 μmol/L Dip + 2 mmol/L Hcy 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 2 mmol/L Hcy 组比较。

Figure 2. Effects of Dip pretreatment on the viability of HUVEC induced by Hcy ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )



形态特点,即胞核中染色体凝集、边聚化、胞核呈亮蓝色荧光的细胞比例增多(图3)。

与2 mmol/L Hcy 组相比,Dip 给药组细胞核的形态损伤程度明显降低了,且凋亡率明显降低( $P<0.01$ ;图3),表现为细胞核中染色体凝集、边聚化的亮蓝色荧光细胞比例减少,细胞核形态正常的均匀蓝色荧光细

胞增多。10  $\mu\text{mol/L}$  以下 Dip 可呈浓度依赖性抑制 Hcy 对 HUVEC 细胞核的形态损伤,且凋亡率逐渐降低。而 100  $\mu\text{mol/L}$  Dip 抑制核形态损伤程度有所降低,且其凋亡率与 2 mmol/L Hcy 组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ ;图3)。显然 10  $\mu\text{mol/L}$  Dip 降低 Hcy 所致 HUVEC 的损伤作用最好。

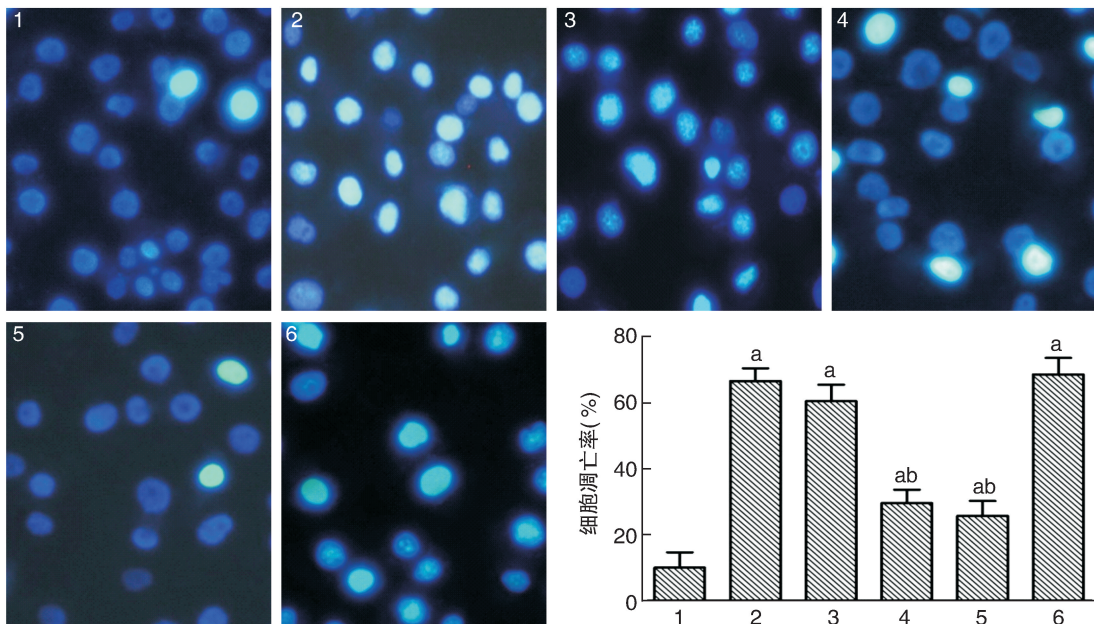


图3. Dip 对 Hcy 所致 HUVEC 细胞凋亡的影响 1 为对照组,2 为 2 mmol/L Hcy 组,3 为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组,4 为 1  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组,5 为 10  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组,6 为 100  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组。a 为  $P<0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 2 mmol/L Hcy 组比较。

Figure 3. Effect of Dip on HUVEC apoptosis induced by Hcy

#### 2.4 Dip 对 Hcy 诱导的 HUVEC 黏附分子 VCAM-1 和 P-选择素表达的影响

HUVEC 经不同浓度 Dip 预处理 2 h 后,加入 2 mmol/L Hcy 继续孵育 12 h,Dip 可有效抑制 Hcy 诱导的细胞黏附分子 VCAM-1 和 P-选择素的表达,10  $\mu\text{mol/L}$  以下 Dip 呈剂量依赖性抑制其表达( $P<0.01$ ;图4)。100  $\mu\text{mol/L}$  浓度时,黏附分子蛋白表达量明显升高,与 2 mmol/L Hcy 组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ ;图4)。

### 3 讨论

近年来大量研究已证实 Hcy 是动脉粥样硬化性心血管疾病的独立危险因素<sup>[11]</sup>,并表明它参与炎症、血管内皮损伤、血栓形成以及血管平滑肌增生等多个病理生理过程<sup>[12]</sup>,它可以通过增强血管内皮细胞的氧化应激<sup>[13]</sup>作用,使体内产生一系列活性氧(ROS),过多的 ROS 会将低密度脂蛋白氧化成具有

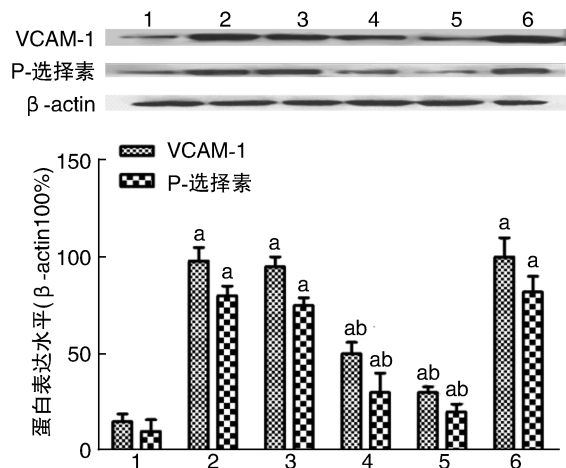


图4. Dip 对 Hcy 诱导的 HUVEC 中 VCAM-1 和 P-选择素蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) 1 为对照组,2 为 2 mmol/L Hcy 组,3 为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组,4 为 1  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组,5 为 10  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组,6 为 100  $\mu\text{mol/L}$  Dip+2 mmol/L Hcy 组。a 为  $P<0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 2 mmol/L Hcy 组比较。

Figure 4. Effect of Dip pretreatment on VCAM-1 and P-selectin protein expression induced by Hcy in HUVEC( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

细胞毒性的氧化型低密度脂蛋白,可导致纤维形肌动蛋白微丝破坏,使其分布紊乱,进而导致内皮细胞通透性增加<sup>[5]</sup>,使得 VCAM-1 和 P-选择素等黏附分子大量表达,单核巨噬细胞更加容易通过黏附分子进入内皮细胞,加重细胞损伤,并进一步促进 As 的发生发展。本实验也通过 Hcy 造成细胞活性的损伤,促进细胞凋亡,并使得 VCAM-1 和 P-选择素等黏附分子表达上调等验证了其损伤作用,并发现 Hcy 对内皮细胞的损伤呈剂量依赖性。

黏附分子是一类介导细胞间或细胞与细胞外基质间相互接触和结合的一类分子,主要表达在内皮细胞、白细胞、血小板以及脂质纤维斑块的平滑肌细胞上<sup>[4]</sup>,当血管内皮损伤时,多种黏附分子大量表达,并加剧 As 的发生和发展。VCAM-1 是一种重要的血管细胞黏附分子,广泛表达在活化内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞等表面,其生物学作用十分广泛,VCAM-1 的高表达可诱导白细胞和炎症因子的黏附,进而促进血管内皮炎症。P-选择素在血小板、内皮细胞、巨噬细胞、再生内皮细胞表面均有表达,特别是在 As 后期形成不稳定斑块<sup>[14]</sup>时,能活化血小板和白细胞并介导血小板和细胞外的脂质黏附,促使血栓形成,从而造成该血管支配部位缺血、梗死,导致 As 的发生。本实验中为进一步验证 Dip 对 Hcy 损伤内皮细胞的保护作用,检测了 VCAM-1、P-选择素两种黏附分子的表达量,结果发现与对照组相比,Hcy 模型组 VCAM-1、P-选择素的表达量明显升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );同时发现低于 10  $\mu\text{mol/L}$  Dip 组中 VCAM-1、P-选择素呈剂量依赖性表达降低,且与 Hcy 模型组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

本实验发现用 Dip 预孵育可以有效降低 Hcy 对 HUVEC 造成的活性损伤、细胞核形态损伤以及所诱导的黏附分子的表达。这些结果也初步说明了 Dip 对 Hcy 所致内皮细胞的损伤具有一定的保护作用,但是其保护机制尚不清楚。由于 Dip 有很强的抗氧化作用,初步猜测可能与氧化应激有关,但尚没有直接的证据证明,还需要进一步查证。

#### [参考文献]

- [1] Graham A, Allen AM. Mitochondrial function and regulation of macrophage sterol metabolism and inflammatory responses [J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(5): 277-286.
- [2] Yamauchi H, Higashi T, Kagawa S, et al. Impaired perfusion modifies the relationship between blood pressure and stroke risk in major cerebral artery disease [J]. *J Neurol*

*Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(11): 1 226-232.

- [3] Tsao CW, Seshadri S, Beiser AS, et al. Relations of arterial stiffness and endothelial function to brain aging in the community [J]. *Neurology*, 2013, 81(11): 984-991.
- [4] Braach N, Buschmann KP, Flaum J, et al. Anti-inflammatory functions of protein C require RAGE and ICAM-1 in a stimulus dependent manner [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014(9): 69-77.
- [5] Peng HY, Man CF, Xu J, et al. Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies [J]. *Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(1): 78-86.
- [6] Ying J, Wang H, Bao B, et al. Molecular variation and horizontal gene transfer of the homocysteine methyltransferase gene *mmuM* and its distribution in clinical pathogens [J]. *Int J Bio Sci*, 2015, 11(1): 11-21.
- [7] 李传厚, 王晓静, 唐文照, 等. 毛泡桐果化学成分研究 [J]. *食品与药品*, 2014, 16(1): 12-14.
- [8] Hosek J, Zavalova V, Smejkal K, et al. Effect of diplacone on LPS-induced inflammatory gene expression in macrophages [J]. *Folia Biol (Praha)*, 2010, 56(3): 124-130.
- [9] Chen CN, Wu CL, Lin JK. Propolis C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(3): 53-66.
- [10] 朱琳, 王彦军, 俞天虹, 等. 红景天苷通过抑制内质网应激减少高同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(1): 5-10.
- [11] Bonciani D, Antiga E, Bonciolini V, et al. Homocysteine serum levels are increased and correlate with disease severity in patients with lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, 34(1): 76-81.
- [12] Cabo R, Hernes S, Slettan A, et al. Effects of polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and folate metabolizing genes on the concentration of serum nitrate, folate, and plasma total homocysteine after folic acid supplementation: A double-blind crossover study [J]. *Nutrition*, 2014, 31(2): 337-344.
- [13] Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, et al. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2015, 11(default): 173-183.
- [14] Qiao Y, Zhang PJ, Lu XT, et al. Panax notoginseng saponins inhibits atherosclerotic plaque angiogenesis by down-regulating vascular endothelial growth factor and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit 4 expression [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 21(4): 259-265.

(此文编辑 许雪梅)