doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.16.005

# 葛根素延缓动脉粥样硬化进展的机制研究\*

王翅遥」高严格2 张晓东3 康晓军4 陈蕊蕊1△

(1 空军军医大学唐都医院心内科 陕西 西安 710032;2 长庆油田职工医院心内科 陕西 西安 710200; 3 西安国际医学中心 陕西 西安 710100;4 西安医学院第二附属医院心内科 陕西 西安 710038)

摘要目的:明确葛根素(Pur)对小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性的治疗作用及其潜在机制。方法:用高脂饮食喂养成年小鼠诱导动 脉粥样硬化模型,将小鼠分为 Con 组, ApoE<sup>+</sup>组, ApoE<sup>+</sup>+ Pur 组。采用 HE 染色分别检测各组小鼠中动脉粥样硬化斑块面积,免疫 荧光染色检测斑块中 MMP2 的阳性区域面积。用 50 µg/mL ox-LDL 干预巨噬细胞诱导动脉粥样硬化细胞模型,并用 Ad-sh-Sirt3 干扰 Sirt3 表达,将细胞分为 Con 组、ox-LDL 组、ox-LDL+Pur 组、ox-LDL+Pur+Ad-sh-Sirt3 组。Western-blot 检测 Sirt3 表达含量, TUNEL 法检测巨噬细胞凋亡。结果:动物水平,与 Con 组相比, ApoE<sup>+</sup> 组小鼠出现了显著的动脉粥样硬化斑块, ApoE<sup>+</sup> 组小鼠 MMP2 阳性区域面积显著高于 Con 组(P<0.05);Pur 处理后, ApoE<sup>+</sup>+ Pur 组动脉粥样硬化斑块面积明显低于 ApoE<sup>+</sup> 组(P<0.05), MMP2 的阳性区域面积显著低于 ApoE<sup>+</sup> 组(P<0.05)。细胞水平,Western 结果显示,与对照组相比, ox-LDL 组 Sirt3 表达量显著降 低(P<0.05), ox-LDL+Pur 组 Sirt3 表达水平显著高于 ox-LDL 组(P<0.05)。相比于 Con 组, ox-LDL 组巨噬细胞凋亡水平显著升高 (P<0.05);给予 Pur 处理后,相比于单纯 ox-LDL 组, ox-LDL+Pur 组巨噬细胞的凋亡水平显著降低(P<0.05)。Ad-sh-Sirt3 处理消除 了 葛根素对于巨噬细胞凋亡的抑制作用(P<0.05)。结论:外源性 Pur 可能通过激活 Sirt3 表达,进一步降低巨噬细胞凋亡水平,减 少巨噬细胞的浸润,增加动脉粥样硬化斑块稳定性。

关键词: 葛根素; 动脉粥样硬化; Sirt3; 凋亡; 巨噬细胞 中图分类号: R-33; R543.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2020) 16-3022-06

# Study on the Mechanism of Puerarin in Preventing the Progression of Atherosclerosis\*

WANG Chi-yao<sup>1</sup>, GAO Yan-ge<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-dong<sup>3</sup>, KANG Xiao-jun<sup>4</sup>, CHEN Rui-rui<sup>1/2</sup>

(1 Department of Cardiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Cardiology, Changqing Oilfield Staff Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710200, China;

3 Xi'an International Medical Center, Xi'an, Shaanxi, 710100, China;

4 Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

**ABSTRACT Objective:** To clarify the therapeutic effect of Puerarin (Pur) on stability of atherosclerotic plaques and its underlying mechanism. **Methods:** High-fat-diet was used to induce atherosclerosis model, the mice were divided into Con group, ApoE<sup>4</sup> group and ApoE<sup>4</sup>+Pur group. The plaque area was measured by HE staining, the positive area of MMP2 in plaques were detected by immunofluorescence staining. In vitro, 50  $\mu$ g/mL ox-LDL was used to simulate atherosclerosis and Ad-sh-Sirt3 was used to inhibit Sirt3 expression. Cells were divided into Con group, ox-LDL group, ox-LDL + Pur group, ox-LDL + Pur + Ad-sh-Sirt3 group. Western-blot was used to detect the expression of Sirt3. The level of apoptosis in macrophages was detected by TUNEL assay. **Results:** Compared with the Con group, the mice in the ApoE<sup>4</sup> group showed significant atherosclerotic plaques, the positive area of MMP2 in ApoE<sup>4</sup> mice were significantly higher than Con group (*P*<0.05). The plaque area and the positive area of MMP2 in ApoE<sup>4</sup> mice were significantly higher than ApoE<sup>4</sup>+Pur group (*P*<0.05). In cell level, western blot showed that compared with Con group, the expression of Sirt3 in ox-LDL group was significantly reduced (*P*<0.05). Treatment with Pur significantly increased the expression of Sirt3 compared with ox-LDL group (*P*<0.05), and Pur administration significantly reduced the apoptosis levels of cells compared with ox-LDL group (*P*<0.05). **Conclusions:** Pur effectively reduced the level of macrophage apoptosis and the infiltration of macrophages, increased the stability of atherosclerotic plaques by activating Sirt3 expression.

Key words: Puerarin; Atherosclerosis; Sirt3; Apoptosis; Macrophages

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R543.5 Document code: A Article ID: 1673-6273(2020)16-3022-06

<sup>\*</sup>基金项目:国家自然科学基金青年项目(81800346);陕西省自然科学基础研究计划 - 一般项目(2019JQ-422,808081369018)

作者简介:王翅遥(1985-),男,硕士,医师,主要从事心血管基础及临床研究,E-mail:408943506@qq.com

<sup>△</sup> 通讯作者:陈蕊蕊(1987-),女,博士,主治医师,主要从事心血管基础及临床研究,E-mail:ruirui317@163.com

<sup>(</sup>收稿日期:2020-03-03 接受日期:2020-03-28)

# 前言

动脉粥样硬化在发展中国家是导致死亡和致残的主要原因<sup>[1]</sup>。随着肥胖和2型糖尿病患病人数不断增多,动脉粥样硬化的发病率也在不断上升<sup>[2]</sup>。动脉粥样硬化引起的临床疾病最常见的是冠心病,例如不稳定心绞痛、急性心肌梗死、缺血性脑卒中和急性心源性猝死<sup>[23]</sup>。探讨动脉粥样硬化的发病机制,提出针对性的干预策略,对冠心病的治疗具有重要意义。

葛根素(puerarin,Pur)为传统中药葛根及粉葛的主要药效 成分之一,具有典型的雌激素样生物学活性,具有抗心肌纤维 化损伤、舒张血管、抗动脉钙化及粥样硬化、促血管新生、改善 微血流、抗血小板凝集、降脂、抗糖尿病等作用<sup>i4</sup>,但是葛根素是 否可以增加动脉粥样硬化斑块稳定性,以及是否通过减少巨噬 细胞浸润进而增加动脉粥样硬化斑块稳定性及其具体机制尚 不得而知。本研究通过建立动脉粥样硬化动物和细胞模型,观 察葛根素对于动脉粥样硬化斑块稳定性的影响,并探寻其具体 机制。

# 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级野生型 C57BL 小鼠 10 只, 鼠龄 6-8 周龄,
体重 20-25 g, 购自常州卡文斯模式动物中心, 雄性 ApoE<sup>+</sup> 小鼠
20 只, 鼠龄 6-8 周龄, 体重 20-25 g, 购自北京维通利华有限公司。高脂饲料购自北京维通利华有限公司,主要成分包括 15 %
脂肪, 1.25 %胆固醇, 0.2 %胆酸盐。

1.1.2 试剂 巨噬细胞 RAW264.7 购自美国 ATCC 公司; Puerarin (批号:P0043,纯度≥ 97%)购自上海纯优生物科技有 限公司;ox-LDL 购自广州益源生物科技有限公司; Sirt3 抗体、 GAPDH 抗体均购自美国 CST 公司;二抗购自西安壮志生物公 司;TUNEL 试剂盒购自美国罗氏公司;小鼠麻醉所用异氟烷购 自中国河北一品公司;Bio-Rad 成像系统购自美国伯乐公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 小鼠动脉粥样硬化模型的建立 SPF 级野生型 C57BL 小鼠 10 只, 鼠龄 8 周龄, 体重 20-25g, 购自常州卡文斯模式动 物中心。将 20 只 8 周龄 ApoE<sup>4</sup>小鼠随机分配为 2 组, 即动脉 粥样硬化组(ApoE<sup>4</sup>)和动脉粥样硬化 +Pur 组(ApoE<sup>4</sup>+Pur), 每 组 10 只。参考相关文献, 在以上各组小鼠 8 周龄时, 进行高脂 饮食喂养 16 周以构建动脉粥样硬化模型<sup>[5]</sup>。其中, ApoE<sup>4</sup>+Pur 组给予 300 mg/kg·d Pur 灌胃, 连续给药 4 周<sup>[6]</sup>。继续高脂喂养 12 周以诱导动脉粥样硬化。所有小鼠均自由进食饮水。持续监 测小鼠血脂水平, 12 周后分离小鼠主动脉, 通过 HE 染色观察 动脉内膜面是否形成斑块进行模型验证。

1.2.2 巨噬细胞的培养和诱导泡沫细胞形成 巨噬细胞 RAW264.7 给予含 50 g/mL 的 ox-LDL 干预 +10% FBS 的培养 基培养 24 h 诱导巨噬细胞变成泡沫细胞; 对于治疗 (ox-LDL+Pur)组,先给与 100 g/mLPur 作用 1h 后,加入 50 g/mL ox-LDL 干预 24 h<sup>[7]</sup>。

1.2.3 HE 染色检测 ApoE<sup>4</sup> 小鼠中动脉粥样硬化斑块面积 将石蜡切片脱蜡至水,按照说明书操作步骤,苏木素染细胞核, 放入伊红染液中染色 3 min 对细胞质进行染色,依次脱水后封 片,显微镜下拍照观察,细胞核蓝色,细胞质红色。利用 ImageJ 软件分析斑块面积与血管壁总横截面积,计算二者之比即动脉 粥样硬化斑块面积百分比<sup>[5]</sup>。

1.2.4 蛋白的提取及 Western-Blot 检测 Sirt3 的表达 将各组 细胞用 PBS 洗涤 3 次,充分消化,全程 4℃低温操作。加入裂解 液 RIPA 提取蛋白,根据蛋白定量结果调整上样体积。按照操 作流程进行 SDSPAGE 蛋白电泳,并转膜至 PVDF 膜上。配置 5%脱脂奶粉封闭孵育 1 h,TBST 液洗 3 次,过夜孵育一抗,TBST 液洗 3 次,滴加山羊抗兔 IgG 抗体孵育 1h,TBST 液洗 3 次。用化学发光法检测目的蛋白条带,并用 Bio-rad 成像系统记录并分析,以 GAPDH 为内参标化各蛋白表达的水平。

1.2.5 巨噬细胞凋亡检测 使用末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)测定试剂盒(美国罗氏公司)检测 ox-LDL干预的巨噬细胞的凋亡水平,重复3次,所有操作均按 照试剂盒说明书严格执行,染色封片后在激光共聚焦显微镜下 观察并拍照。共聚焦显微镜下观察巨噬细胞凋亡,绿色荧光为 凋亡细胞,蓝色荧光为细胞核。

1.2.6 Ad-sh-Sirt3 干扰 Sirt3 表达 巨噬细胞 RAW264.7,转染 腺病毒 Ad-sh-Sirt3,干扰 Sirt3 的表达,然后给与 50 g/mL ox-LDL 干预 24 h 进行细胞实验。Ad-sh-Sirt3 购自上海汉恒生物科技有 限公司,选取生长状态良好的巨噬细胞,用高糖的 DMEM 稀释 腺病毒原液,干预巨噬细胞,感染复数即 MOI 值是 100:1。培养 箱(37℃、5% CO<sub>2</sub>)孵育 4-6 h 后更换正常培养基。在病毒感染 巨噬细胞 12 h 后开始对细胞进行 ox-LDL 干预。

1.2.7 免疫荧光染色检测 MMP2 的阳性区域面积 制备石蜡 切片,脱蜡至水,用 EDTA 抗原修复缓冲液对切片进行抗原修 复,山羊血清封闭 1 h 后加一抗 MMP2(1:100;Ab215986;Abcam),放在 4℃冰箱中孵育过夜。滴加相应的荧光二抗(兔抗 鼠,用 PBS 按 1:100 稀释;Abcam)均匀覆盖组织,避光环境下 在室温中孵育 60 min。加抗荧光淬灭剂封片后激光共聚焦显微 镜下观察并采集图像。

1.2.8 统计学分析 计量资料数据 x± s 用表示。用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析和绘图,两组之间的比较采用 One-way ANOVA 分析, *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

# 2 结果

#### 2.1 葛根素对 ApoE<sup>--</sup> 小鼠中动脉粥样硬化斑块进展的影响

HE 染色中,相比于 WT 组,ApoE<sup>--</sup> 组和 ApoE<sup>-+</sup>+Pur 组管 腔中有明显的斑块,表明动脉粥样硬化模型造模成功。HE 染色 结果表明,ApoE<sup>-+</sup>+Pur 组动脉粥样硬化斑块面积显著低于 ApoE<sup>--</sup> 组(54.90± 3.21 vs. 21.49± 1.22, P<0.05),见图 1A。

#### 2.2 葛根素对 ApoE<sup>--</sup> 小鼠中 MMP2 表达量的影响

免疫荧光染色结果表明,相比于 ApoE<sup>+</sup>组,Pur 处理显著 降低了 ApoE<sup>+</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块中 MMP2 的表达(*P*<0.05), 一定程度上增加了动脉粥样硬化斑块的稳定性,见图 2A-B。 2.3 葛根素对 ox-LDL 干预巨噬细胞中 Sirt3 表达量的影响

Western-blot 结果显示,相比于 Con 组,ox-LDL 组巨噬细胞的 Sirt3 表达量出现了显著的下降(P<0.05),给予 Pur 干预后 Sirt3 表达量显著增加 (P<0.05)。可见外源性 Pur 显著上调了 ox-LDL 组巨噬细胞中 Sirt3 的表达,表明 Pur 改善动脉粥样硬

化的作用很可能是通过上调 Sirt3 表达量实现的,见图 3A-B。



图 1 HE 染色检测动脉粥样硬化斑块面积(n=4-6;a,与 Con 组相比, P<0.05;b,与 ApoE<sup>4</sup> 组相比, P<0.05) Fig.1 Plaque area was detected by HE staining (n=4-6; a, vs. Con, P<0.05; b, vs. ApoE<sup>4</sup>, P<0.05)



图 2 Western-blot 检测 Sirt3 表达量(n=4-6;a,与 Con 组相比,P<0.05;b,与 ox-LDL 组相比,P<0.05);免疫荧光染色检测小鼠斑块中 MMP2 的表达(n=4-6;a,与 ApoE<sup>--</sup> 组相比,P<0.05)

Fig.2 Positive area of MMP2 was detected by Immunofluorescence staining (n=4-6; a, vs ApoE<sup>2,</sup>, P<0.05)



图 3 Western-blot 检测 Sirt3 表达量,(n=4-6;a,与 Con 组相比,P<0.05;b,与 ox-LDL 组相比,P<0.05) Fig.3 Expression of Sirt3 in macrophages was detected by Western-blot (n=4-6; a, vs. Con, P<0.05; b, vs. ox-LDL, P<0.05)

# 2.4 干扰 Sirt3 对葛根素改善巨噬细胞凋亡作用的影响

TUNEL 检测结果显示,相比于 Con 组, ox-LDL 组巨噬细胞凋亡水平显著升高(P<0.05),给予 Pur 处理后,相比于单纯

ox-LDL 组, ox-LDL+Pur 组巨噬细胞的凋亡水平显著降低 (*P*<0.05)。Ad-sh-Sirt3 处理消除了葛根素对于巨噬细胞凋亡的 抑制作用(*P*<0.05), 见图 4A-B。



# 3 讨论

动脉粥样硬化是一种由脂蛋白驱动的慢性进展性疾病<sup>18</sup>, 取决于遗传、性别以及一些独立的危险因素,例如高胆固醇血 症、糖尿病、高血压、肥胖症和吸烟。其中在高血压、血脂异常、 糖尿病和吸烟中的炎症和免疫反应被认为与动脉粥样硬化的 进展有密切联系<sup>[9]</sup>。易损斑块的特点通常有:较大的坏死核心, 较薄的纤维帽(厚度通常 <65 µm),大量的巨噬细胞浸润以及 较少的平滑肌细胞,斑块内新生血管形成,斑块内出血,斑块钙 化。斑块破裂发生在纤维帽最薄且泡沫细胞(巨噬细胞)浸润最 多的地方<sup>[10]</sup>。动脉粥样硬化形成的病理过程是复杂的,多种细 胞参与其中,包括内皮细胞、单核细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞、 B细胞、T细胞及树突状细胞等<sup>[2]</sup>。储留在内皮下的脂蛋白经过 聚集和氧化修饰,被单核细胞分化成的巨噬细胞吞噬,变成负 载胆固醇的泡沫细胞,泡沫细胞的形成可以进一步促进脂蛋白 的修饰和储留,促进炎症反应。随着动脉粥样硬化病理过程的 进展,平滑肌细胞从中膜迁移至内膜,转变为分泌型平滑肌细 胞,分泌胶原促进纤维帽形成。巨噬细胞衍生的泡沫细胞能分 泌蛋白水解酶,例如纤溶酶原激活物,组织蛋白酶和基质金属 蛋白酶。MMPs 过度表达参与促进斑块不稳定性,如降解纤维 帽基质。MMP的活性与斑块中的薄纤维帽和大量的坏死核心相 关, 这表明 MMP 的活性可能是导致不稳定斑块的主要原因[11,12]。 在动脉粥样硬化的小鼠模型中的巨噬细胞中过表达基质金属 蛋白酶9,可促进斑块的破裂[13,14]。

在哺乳动物中,Sirtuin 家族具有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依 赖的去乙酰化酶活性,包括从 Sirt1 到 Sirt7 的 7 个成员,定位 于细胞的不同部位<sup>[15,16]</sup>。Sirt3 主要位于肝脏,脂肪和心脏的线粒 体中<sup>[17,18]</sup>,在维持能量稳态、心脏重构、心力衰竭和保护心脏免 受氧化应激损伤中起着重要作用<sup>[19,20]</sup>。既往研究结果表明,在小 鼠动脉粥样硬化模型中,Sirt3 mRNA 和蛋白水平均明显下降, 提示 Sirt3 的下调与动脉粥样硬化中的内皮细胞凋亡密切相 关<sup>[21]</sup>。本研究也表明,在小鼠动脉粥样硬化模型中,Sirt3 表达量 显著降低。既往研究证实,Sirt3 与血管内皮细胞脂质的代谢和 氧化应激关系密切<sup>[22]</sup>。因此,Sirt3 表达水平降低可能通过影响 脂质代谢和氧化应激进一步影响动脉粥样硬化斑块的形成和 稳定性。

葛根素(puerarin, Pur)为传统中药葛根及粉葛的主要药效 成分<sup>[23]</sup>。近年来研究表明, Pur 具有扩张血管、保护神经、降血 压、降血糖、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用, 在心血管领域已 有广泛的临床应用<sup>[424]</sup>。动物模型研究证实, Pur 干预可维持内 皮细胞正常功能, 减少动脉粥样硬化斑块发生钙化, 抑制动脉 粥样硬化进展<sup>[526]</sup>。本研究也证实 Pur 显著减少动脉粥样硬化 面积, 改善动脉粥样硬化斑块的稳定性。巨噬细胞在动脉粥样 硬化斑块的形成和进展中发挥重要作用, 本研究进一步证实 Pur 的斑块保护作用很可能是通过提高巨噬细胞中 Sirt3 的表 达发挥的: Pur 能够提高巨噬细胞中 Sirt3 的表达, 降低巨噬细 胞的凋 亡水平, 减少巨噬细胞在斑块中的浸润。使用 Ad-sh-Sirt3 抑制 Sirt3 的表达后, Pur 对抑制巨噬细胞调亡的作 用被减弱。

本研究也存在着一定的局限性。首先,动脉粥样硬化的发

病机制极其复杂,Pur 是否通过改善内皮细胞通透性、抑制血小板聚集、减少巨噬细胞与平滑肌细胞的联系,从而抑制平滑肌细胞的迁移和增殖,这些还有待进一步研究;其次,Pur 通过何种方式激活 Sirt3 表达及其具体调控机制尚不明确。

本研究在动物和细胞两个水平证实:外源性 Pur 可能通过 激活 Sirt3 表达,进一步减小动脉粥样硬化斑块面积,抑制动脉 粥样硬化进展,减少巨噬细胞浸润,抑制泡沫细胞形成,增加动 脉粥样硬化斑块稳定性。本研究为临床应用 Pur 治疗动脉粥样 硬化患者提供了实验依据,为冠心病的治疗提供了新的中医药 治疗方案。

#### 参考文献(References)

- MURRAY C J, LOPEZ A D. Measuring the global burden of disease
   N Engl J Med, 2013, 369(5): 448-57
- [2] TABAS I, GARCIA-CARDENA G, OWENS G K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis [J]. The Journal of cell biology, 2015, 209(1): 13-22
- [3] MECHANICK J I, FARKOUH M E, NEWMAN J D, et al. Cardiometabolic-Based Chronic Disease, Addressing Knowledge and Clinical Practice Gaps: JACC State-of-the-Art Review [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(5): 539-555
- [4] WEI S Y, CHEN Y, XU X Y. Progress on the pharmacological research of puerarin: a review [J]. Chinese journal of natural medicines, 2014, 12(6): 407-414
- [5] WANG T, SUN C, HU L, et al. Sirt6 stabilizes atherosclerosis plaques by promoting macrophage autophagy and reducing contact with endothelial cells [J]. Biochemistry and cell biology, 2020, 98(2): 120-129
- [6] YAN L P, CHAN S W, CHAN A S, et al. Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats [J]. Life sciences, 2006, 79(4): 324-330
- [7] ZHANG H, ZHAI Z, ZHOU H, et al. Puerarin Inhibits oxLDL-Induced Macrophage Activation and Foam Cell Formation in Human THP1 Macrophage[J]. BioMed research international, 2015, 2015: 403616
- [8] KASIKARA C, DORAN A C, CAI B, et al. The role of non-resolving inflammation in atherosclerosis [J]. The Journal of clinical investigation, 2018, 128(7): 2713-2723
- [9] LIBBY P, LOSCALZO J, RIDKER P M, et al. Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis: JACC Review Topic of the Week [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2018, 72 (17): 2071-2081
- [10] FALK E, SHAH P K, FUSTER V. Coronary plaque disruption [J]. Circulation, 1995, 92(3): 657-671
- [11] HEO S H, CHO C H, KIM H O, et al. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. Journal of clinical neurology, 2011, 7(2): 69-76
- [12] SHALHOUB J, VIIRI L E, CROSS A J, et al. Multi-analyte profiling in human carotid atherosclerosis uncovers pro-inflammatory macrophage programming in plaques [J]. Thrombosis and haemostasis, 2016, 115(5): 1064-1072
- [13] GOUGH P J, GOMEZ I G, WILLE P T, et al. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice [J]. J Clin Invest, 2006, 116(1): 59-69

- [14] CHEN Y, WAQAR A B, NISHIJIMA K, et al. Macrophage-derived MMP-9 enhances the progression of atherosclerotic lesions and vascular calcification in transgenic rabbits [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2020[Epub ahead of print]
- [15] GIBLIN W, SKINNER M E, LOMBARD D B. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan [J]. Trends in genetics: TIG, 2014, 30(7): 271-286
- [16] D'ONOFRIO N, VITIELLO M, CASALE R, et al. Sirtuins in vascular diseases: Emerging roles and therapeutic potential [J]. Biochimica et biophysica acta, 2015, 1852(7): 1311-22
- [17] NOGUEIRAS R, HABEGGER K M, CHAUDHARY N, et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism [J]. Physiological reviews, 2012, 92(3): 1479-1514
- [18] WU J, ZENG Z, ZHANG W, et al. Emerging role of SIRT3 in mitochondrial dysfunction and cardiovascular diseases [J]. Free radical research, 2019, 53(2): 139-149
- [19] HE X, ZENG H, CHEN J X. Emerging role of SIRT3 in endothelial metabolism, angiogenesis, and cardiovascular disease [J]. Journal of cellular physiology, 2019, 234(3): 2252-2265
- [20] PALOMER X, ROMAN-AZCONA M S, PIZARRO-DELGADO J, et al. SIRT3-mediated inhibition of FOS through histone H3 deacetylation prevents cardiac fibrosis and inflammation [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2020, 5: 14

- [21] KARNEWAR S, VASAMSETTI S B, GOPOJU R, et al. Mitochondria-targeted esculetin alleviates mitochondrial dysfunction by AMPK-mediated nitric oxide and SIRT3 regulation in endothelial cells: potential implications in atherosclerosis [J]. Scientific reports, 2016, 6: 24108
- [22] HIRSCHEY M D, SHIMAZU T, GOETZMAN E, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation [J]. Nature, 2010, 464(7285): 121-125
- [23] WU M, ZHANG Q, YI D, et al. Quantitative Proteomic Analysis Reveals Antiviral and Anti-inflammatory Effects of Puerarin in Piglets Infected With Porcine Epidemic Diarrhea Virus [J]. Frontiers in immunology, 2020, 11: 169
- [24] WANG Q, WU T, CHEN X, et al. Puerarin injection for unstable angina pectoris [J]. The Cochrane database of systematic reviews, 2006, 3: CD004196
- [25] BAO L, ZHANG Y, WEI G, et al. The anti-atherosclerotic effects of puerarin on induced-atherosclerosis in rabbits [J]. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 2015, 159(1): 53-59
- [26] LU Q, XIANG D X, YUAN H Y, et al. Puerarin attenuates calcification of vascular smooth muscle cells [J]. The American journal of Chinese medicine, 2014, 42(2): 337-347

### (上接第 3010 页)

- [13] 王中领,唐纳,王悍,等.制备 anti-EGFR-PEG-SPIO 靶向纳米分子探 针对肺腺癌细胞行体外靶向 MR 成像 [J]. 中国医学影像技术, 2017, 33(12): 1797-1801
- [14] Hu Y, Mignani S, Majoral JP, et al. Construction of iron oxide nanoparticle-based hybrid platforms for tumor imaging and therapy [J]. Chem Soc Rev, 2018, 47(5): 1874-1900
- [15] Duan M, Xia F, Li T, et al. Matrix metalloproteinase-2-targeted superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG-G5-MMP2@Ce6 nanoprobes for dual-mode imaging and photodynamic therapy [J]. Nanoscale, 2019, 11 (39): 18426-18435
- [16] Khandhar AP, Keselman P, Kemp SJ, et al. Evaluation of PEG-coated iron oxide nanoparticles as blood pool tracers for preclinical magnetic particle imaging[J]. Nanoscale, 2017, 9(3): 1299-1306
- [17] Taouk G, Hussein O, Zekak M, et al. CD56 expression in breast cancer induces sensitivity to natural killer-mediated cytotoxicity by en-

hancing the formation of cytotoxic immunological synapse [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8756

- [18] Griffin JD, Hercend T, Beveridge R, et al. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells[J]. J Immunol, 1983, 130 (6): 2947-2951
- [19] Liu JF, Herold C, Gray KP, et al. Assessment of Combined Nivolumab and Bevacizumab in Relapsed Ovarian Cancer: A Phase 2 Clinical Trial[J]. JAMA Oncol, 2019, 5(12): 1731-1738
- [20] Grepin R, Guyot M, Dumond A, et al. The combination of bevacizumab/Avastin and erlotinib/Tarceva is relevant for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: the role of a synonymous mutation of the EGFR receptor[J]. Theranostics, 2020, 10(3): 1107-1121
- [21] Karn T, Meissner T, Weber K, et al. A small hypoxia signature predicted pCR response to bevacizumab in the neoadjuvant GeparQuinto breast cancer trial[J]. Clin Cancer Res, 2020[Epub ahead of print]