

血塞通调节 miRNA-146 影响内皮细胞凋亡的干预作用

王阶¹, 滕菲^{2*}, 段练^{1,3}, 刘咏梅¹, 陈光^{1,3}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010; 3. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**探讨血塞通(XST)对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)凋亡的影响及作用机制。**方法:**体外培养 HUVEC, H₂O₂ 作为氧化剂作用于 HUVEC 制作氧化应激模型。通过血塞通干预, 观察 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞凋亡的变化, 从表观遗传学微小 RNA (microRNA, miRNA) 角度探讨血塞通对 HUVEC 的保护作用及其作用机制。将体外培养的 HUVEC 分为空白组, H₂O₂ 模型组, H₂O₂ 模型 + XST (30 mg·L⁻¹, 处理 24 h) 组。通过细胞计数试剂盒-8 (CCK8) 法检测细胞活力, Annexin V/碘化丙啶 (PI) 测定细胞凋亡, 实时荧光定量核酸扩增检测系统 (Real-time PCR detecting system, Real-time PCR) 检测 miRNA-146 和 miRNA-199 表达水平。**结果:**HUVEC 经过 100 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理之后, 细胞晚期凋亡和早期凋亡都有明显升高 ($P < 0.05$)。用质量浓度从 1 ~ 100 mg·L⁻¹ XST HUVEC 细胞进行预处理后, 发现用 10 mg·L⁻¹ XST 预处理可以明显地改善细胞增殖情况。Annexin V/PI 双染细胞凋亡检测发现 HUVEC 经过 100 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理之后, 细胞 PI 阳性率 R3 (晚期凋亡) 和 Annexin V 阳性率 R5 (早期凋亡) 都有明显升高 ($P < 0.05$)。H₂O₂ 模型经过 30 mg·L⁻¹ XST 处理之后, 可以明显降低细胞 PI 阳性率 R3 (晚期凋亡) 和 Annexin V 阳性率 R5 (早期凋亡) ($P < 0.05$)。100 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理可以明显升高 hsa-miR-146b-5p 和 hsa-miR-199a-5p 表达 ($P < 0.05$)。与单纯的 H₂O₂ 处理比较, 经过 30 mg·L⁻¹ 的血塞通处理之后, 可以明显降低 hsa-miR-146b-5p 表达 ($P < 0.05$)。**结论:**血塞通可以明显抵抗 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞氧化损伤, 可能是通过抑制 hsa-miR-146b-5p 的升高发挥保护作用。

[关键词] 人脐静脉内皮细胞; 血塞通; 氧化损伤; 细胞凋亡; 微小 RNA

[中图分类号] R287; R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2017) 19-0006-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190006

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1405.048.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 14:05

Intervention Effect of Xuesaitong on Apoptosis of Endothelial Cells by miRNA-146

WANG Jie¹, TENG Fei^{2*}, DUAN Lian^{1,3}, LIU Yong-mei¹, CHEN Guang^{1,3}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;
2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China;
3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Xuesaitong (XST) on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by hydrogen peroxide. **Method:** HUVECs were cultured *in vitro* and H₂O₂ was used as oxidants to establish oxidative stress model in HUVEC. The changes of apoptosis induced by H₂O₂ in HUVEC cells were observed by XST intervention, and the protective effect of XST on HUVEC was discussed from the perspective of epigenetic miRNA. The cultured HUVECs were divided into blank control group, H₂O₂ model group, and H₂O₂ model + XST (30 mg·L⁻¹, 24 h) group. The cell viability was detected by cell counting kit8 (CCK8) method; apoptosis was detected by Annexin V/Propidium iodide (PI); and

[收稿日期] 20170421 (002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81473561, 81173116)

[第一作者] 王阶, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治心血管病研究, Tel: 010-88001817, E-mail: wangjiedoctor2015@163.com

[通讯作者] * 滕菲, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治心血管病研究, Tel: 010-52176630, E-mail: echo-teng@126.com

the expression of miRNA-146 and miRNA-199 was detected by Real-time PCR. **Result:** After 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 treatment, the late apoptosis and early apoptosis of HUVECs were significantly increased ($P < 0.05$). Pretreatment of HUVEC cells with a dose of 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ showed that a significant improvement in cell proliferation was present in 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ preconditioning. Apoptotic detection of Annexin V /PI double staining showed that the PI positive rate R3 (late apoptotic) and Annexin V positive rate R5 (early apoptosis) were significantly increased after HUVEC treatment with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 significantly ($P < 0.05$). While the cell PI positive rate R3 (late apoptosis) and Annexin V positive rate R5 (early apoptosis) were significantly reduced after 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ XST treatment in H_2O_2 models ($P < 0.05$). The expression levels of hsa-miR-146b-5p and hsa-miR-199a-5p were significantly increased by H_2O_2 treatment at 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. As compared with H_2O_2 group, the expression of hsa-miR-146b-5p was significantly decreased after treatment with 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ XST ($P < 0.05$). **Conclusion:** XST can significantly resist H_2O_2 -induced oxidative damage in HUVEC cells, which may play a protective role by inhibiting the increase of hsa-miR-146b-5p.

[**Key words**] human umbilical vein endothelial cells; Xuesaitong; oxidative damage; apoptosis; miRNA

冠心病是多因素、多基因、多通路的复杂疾病,其发病机制涵盖多层次生物网络调控过程。血瘀证作为冠心病临床辨证中最常见的证型,其分子机制之一是由于体内相关的微小 RNA (microRNA, miRNA) 与靶基因之间的消长平衡状态被破坏。血管内皮细胞的损伤及凋亡是冠心病的基础,在机体的各种应激状态下,氧化应激成为内皮细胞损伤和凋亡的直接原因^[1]。血塞通的主要成分是三七总皂苷 (Panax notoginseng saponins, PNS)。PNS 是活血化痰经典药物三七的主要有效成分,针对冠心病血瘀证有较好的临床疗效^[2]。实验研究表明,血塞通具有降低血小板黏附和聚集,改善微循环,改善氧化人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的活性的作用。miRNA 是具有 19~23 个核苷酸的非编码 RNA。前期研究发现,miRNA-146, miRNA-199 是冠心病血瘀证的相关 miRNA^[3]。血塞通是否可以通过调节 miRNA 影响内皮细胞的凋亡作用仍然未知。本实验体外培养 HUVEC, H_2O_2 作为氧化剂作用于 HUVEC 制作氧化应激模型。通过血塞通干预,观察 H_2O_2 诱导的 HUVEC 细胞凋亡的变化,首次从表观遗传学 miRNA 角度探讨血塞通对 HUVEC 的保护作用及其作用机制,为冠心病血瘀证的治疗提供新的靶点。

1 材料

1.1 药物及试剂 血塞通冻干粉 200 mg, 购自黑龙江省珍宝岛制药有限公司, 国药准字 Z20026437。人脐静脉内皮细胞由 Sciencell 研究实验室提供; 胎牛血清, 胰蛋白酶, DMEM 培养基 (Invitrogen 公司, 批号分别为 16000044, 25200-056, 12400-024); 细胞增殖检测试剂盒 (CCK8, Dojindo 公司, 批号 CK04);

Annexin V-FITC (BD 公司, 货号 51-65874X); hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-199a-5p, U6 (内参) 引物由上海恒圆生物科技有限公司合成, hsa-miR-146b-5p (153 bp): 上游 5'-ACACTCCAGCTGGGTGAGAACTGAATTCCA-3', 下游 5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3'; hsa-miR-199a-5p (147 bp): 上游 5'-ACACTCCAGCTGGGCCAGTGTTCAGACTAC-3', 下游 5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3'; U6 (133 bp): 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2 仪器 Spectra Max Plus384 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司), 2000C 型核酸浓度测量仪 (美国 Thermo Nano-Drop 公司), 480 型实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche Light Cycler 公司), 3111 型 CO_2 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司), FACSAria 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 HUVEC 培养于含 10% 胎牛血清, 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内培养, 每日换液。所有实验均采用第 3~8 代的细胞。生长至 80% 左右融合度的 HUVEC, 离心后细胞沉淀中加入含 10% DMSO 的 DMEM 培养基 (4 $^\circ\text{C}$ 预冷) 1.5 mL, 吹打混匀后转移至 2 mL 细胞冻存管, 置于 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

HUVEC 细胞分为空白组, H_2O_2 模型组, H_2O_2 模型 + XST (30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 处理 24 h) 组, 共 3 组, 以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理 4 h 为时间零点, 在 72 h, 收集细胞样本。

2.2 CCK8 法检测细胞活力 HUVEC 随机分成 12

批,以 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理 4 h 为时间零点,在 0,24,48,72 h,用 CCK8 法检测细胞活性。空白组用含 5% FBS 的 DMEM 培养基培养; H_2O_2 模型组, $100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 加入 DMEM 培养基作用于 HUVEC 4 h 即可得到氧化损伤细胞模型;XST 预处理组,分别用 1,3,10,30,100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 血塞通预处理 24 h 后加入 $100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 诱导 4 h;XST 后处理组, $100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 加入 DMEM 培养基作用于 HUVEC,4 h 后分别加入 1,3,10,30,100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ XST 进行干预。

常规培养的 HUVEC 消化后,在 96 孔板中配置细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 h。至第 2 天,96 孔板内细胞生长至约 30% ~ 50% 融合,根据预先设定的 4 个时间点(0,24,48,72 h)继续进行培养,最后一次性向每孔加入 CCK8 溶液 10 μL 。将培养板放置在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱内孵育 1 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度 A 。

2.3 Annexin V/碘化丙啶(PI)测定细胞凋亡 培养分选的 HUVEC,细胞分组同 2.1 项,感染转染 Lenti-Vector Control 和 Lenti-Bmi1-shRNA 的慢病毒载体后 48 h,加凋亡诱导化疗药物 Cisplatin,处理 24 h,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。计数 1×10^5 个细胞加入 Binding Buffer 100 μL ,放入 1.5 mL 离心管中。Annexin V 5 μL 孵育,再加入 PI 3 μL 孵育。加入 Binding buffer 400 μL ,流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-146 和 miRNA-199 表达水平 细胞分组同 2.1 项,收集处理 72 h 后的细胞,trizol 法提取总 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 PCR。PCR 反应体系:cDNA(已稀释 10 倍)4 μL ,SYBR Green 5 μL ,Primer 0.2 μL + 前后引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),各 0.2 μL ,水 0.6 μL ,总计 10 μL 。PCR 条件:95 $^\circ\text{C}$ 5 min;95 $^\circ\text{C}$ 10 s,60 $^\circ\text{C}$ 20 s,共 50 个循环;5 $^\circ\text{C}$ 10 s,60 $^\circ\text{C}$ 10 s,40 $^\circ\text{C}$ 30 s。采用荧光定量分析仪自动采集给出目的基因和对照基因的 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算和统计 mRNA 相对表达量。

2.5 统计学处理 数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 ANOVA 比较不同条件下的组间差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 HUVEC 细胞培养及特征 显微镜下观察可见 HUVEC 细胞呈单层生长,互不重叠。形态呈椭圆

形、长梭形,长满时呈典型鹅卵石样镶嵌排列,并呈现旋涡状排列特征。单个 HUVEC 细胞边界清楚,胞浆丰富,胞核呈圆形或椭圆形。见图 1。在本研究中均选用第 3 ~ 8 代细胞。

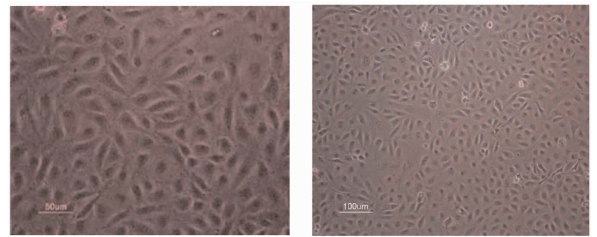


图 1 HUVEC 细胞形态(倒置显微镜)

Fig. 1 Cellular morphology of HUVEC(inverted microscope)

3.2 XST 对细胞活力的影响 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理可以明显抑制 HUVEC 细胞的增殖。从 1 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ XST 对 HUVEC 细胞进行预处理后,发现用 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ XST 预处理可以明显的改善细胞增殖情况,而更低或者更高浓度的 XST 处理,并无明显作用;且 1 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ XST 干预氧化损伤的 HUVEC 细胞时发现,随着质量浓度的增加,当 XST 达到 10 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,能显著对抗细胞氧化损伤,在药物质量浓度为 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的时候,细胞增殖改善达到顶峰。见图 2。

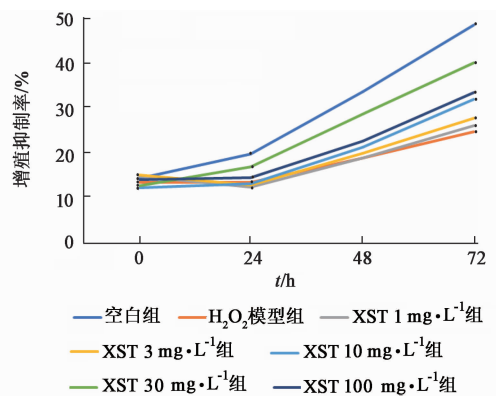


图 2 血塞通对细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of XST on cell viability($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.3 XST 对细胞凋亡的影响 HUVEC 经过 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理后,细胞 PI 阳性率 R3(晚期凋亡)和 Annexin V 阳性率 R5(早期凋亡)都有显著升高($P < 0.01$)。 H_2O_2 模型经过 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ XST 处理之后,可以显著降低细胞的 PI 阳性率 R3(晚期凋亡)和 AnnexinV 阳性率 R5(早期凋亡)($P < 0.01$)。见图 3。

3.4 XST 对氧化损伤 HUVEC 细胞 miRNA-146, miRNA-199 表达的影响 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理可以明显升高 hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-199a-5p

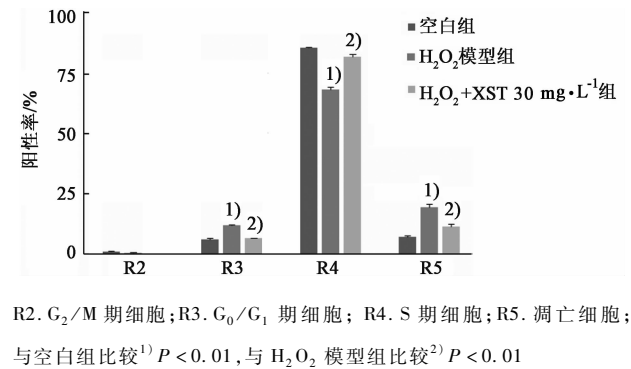


图 3 血塞通对 HUVEC H₂O₂ 氧化损伤模型细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of XST on apoptosis of HUVEC H₂O₂ oxidative damage model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

相对表达量 ($P < 0.05$); 其中 hsa-miR-146b-5p 大约升高 2.3 倍, hsa-miR-199a-5p 的表达大约能升高 4 倍。hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-199a-5p 在空白组中有一定差异表达, 在 H₂O₂ 模型中表达差异进一步增大。见表 1。

表 1 氧化损伤对 HUVEC 细胞的 hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-199a-5p 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of oxidative damage on hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-199a-5p expression in HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-199a-5p
空白	0	0.752 ± 0.236	1.036 ± 0.063
H ₂ O ₂ 模型	100	2.241 ± 0.393 ¹⁾	4.117 ± 0.234 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 XST 对 HUVEC 细胞氧化损伤模型 miRNA-146, miRNA-199 表达的影响 与单纯的 H₂O₂ 处理相比, 经过 30 mg·L⁻¹ XST 处理之后, 可以明显地降低 hsa-miR-146b-5p 相对表达 ($P < 0.05$)。XST 对 hsa-miR-199a-5p 的影响有一定下降趋势, 但结果并无统计学差异。见表 2。

表 2 血塞通对 hsa-miR-146b-5p 和 hsa-miR-199a-5p 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Xuesaitong treatment on expression of hsa-miR-146b-5p and hsa-miR-199a-5p ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-199a-5p
H ₂ O ₂ 模型	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2.241 ± 0.393	4.117 ± 0.234
H ₂ O ₂ 模型 + XST	30 mg·L ⁻¹	1.291 ± 0.455 ¹⁾	3.750 ± 0.821

注: 与 H₂O₂ 模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

XST 的主要构成成分是三七总皂苷, 三七总皂苷是三七的主要活性成分。三七可以活血化瘀, 消肿止痛, 并具有止血不留瘀, 化瘀不伤正的特点。在过去 20 年中, 大量研究观察了 XST 的临床疗效, 发现 XST 治疗冠心病可以降低心血管不良事件的发生, 改善患者症状^[4-5]。在细胞和分子水平上的药理作用。研究表明三七总皂苷具有降低血小板黏附和聚集, 血液黏度、抗血小板聚集、扩张血管和改善微循环的作用^[6]。

内皮细胞是构成血管壁的基本细胞, 许多因素都可导致内皮细胞的损伤和凋亡, 最终导致内皮细胞的功能障碍, 而激活的氧自由基是重要的影响因素之一。本实验采用 H₂O₂ 诱导复制氧化损伤的 HUVEC, 是研究损伤内皮细胞的重要模型。针对氧化 HUVEC 的研究发现, 三七总皂苷可以改善氧化 HUVEC 的活性, 提高单核细胞黏附率, 增加细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)^[7], 还可以通过调节 HUVEC 中血管内皮生长因子 (VEGF)-其血管内皮生长因子受体 (VEGF-KDR/Flk-1) 和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/内皮型一氧化氮合酶 (PI3K/Akt/eNOS) 信号通路促进血管发生^[8]。其作用机制已经从多个角度开展研究, 但还未就 miRNA 角度进行探索。

1993 年, miRNA 被首次检测后^[9], 经过大量研究发现 miRNA 在人类的生理病理中发挥着重要作用。在冠心病血瘀证的研究中发现, miR-146b-5p 的上调可能导致促进炎症的 CALR 的下调, 而上调 miR-199a-5p 诱导 TP53 的下调^[3,10]。miR-146 抑制剂可以显著降低急性冠脉综合征中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), 核转录因子- κ B (NF- κ B) p65 表达的关键炎性细胞因子^[11]。对 miR-199 的研究发现, 缺氧可导致心肌细胞中的 miR-199a 快速下调。如果在缺氧时给心肌细胞补充 miR-199a, 可以通过抑制靶基因 Hif-1 α 和 Sirt1 以减少凋亡^[12]。已有研究发现, 损伤 HUVEC 中, miRNA-146 显著上升^[13]。本实验在 H₂O₂ 损伤 HUVEC 中, 观察到不仅 miRNA-146 有所上升, miRNA-199 也显著上升, 进一步探索了损伤 HUVEC 模型中 miRNA 的表达变化。

本研究通过 CCK8 法检测细胞活力, 发现随着浓度的增加, 当 XST 达到 10 ~ 100 mg·L⁻¹ 时, 能显著对抗细胞氧化损伤, 在 XST 为 30 mg·L⁻¹ 时, 细胞增殖改善达到顶峰, 选用此浓度为干预浓度。

Annexin V/PI 测定细胞凋亡,发现 H₂O₂ 处理可以明显地促进 HUVEC 凋亡, XST 可以明显抑制 H₂O₂ 损伤的 HUVEC 凋亡。为了探索 XST 保护 H₂O₂ 损伤的 HUVEC 作用机制,在前期相关 miRNA 研究的基础上,选择了 miRNA-146 和 miRNA-199 进行检测。发现在 H₂O₂ 损伤的 HUVEC 中, miRNA-146 和 miRNA-199 都显著上升,而 XST 处理可以明显降低 H₂O₂ 损伤的 HUVEC 中 hsa-miR-146b-5p 的表达。研究结果提示, XST 可以明显抵抗 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞氧化损伤,可能是通过抑制 hsa-miR-146b-5p 的升高发挥保护作用。

[参考文献]

[1] Harrington L S, Sainson R C, Williams C K, et al. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Microvasc Res*, 2008, 75(2):144-154.

[2] YANG X, XIONG X, WANG H, et al. Xuesaitong soft capsule (chinese patent medicine) for the treatment of unstable angina pectoris: a Meta-analysis and systematic review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: org/10.1155/2013/948319.

[3] WANG J, YU G. A Systems biology approach to characterize biomarkers for blood stasis syndrome of unstable angina patients by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/510208.

[4] 刘晔,李霁,杨戈,等. 活血药有效组分配伍对不稳定型心绞痛血瘀证患者炎性水平的影响[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(24):2950-2953.

[5] 冯素莲,冯素花,刘俊峰. 三七总皂苷与阿托伐他汀对冠心病患者血脂、颈总动脉厚度及斑块积分的影

响[J]. *中国民康医学*, 2016(11):51-53.

[6] 许军,王阶,温林军. 三七总皂苷干预血栓形成研究概况[J]. *云南中医中药杂志*, 2003, 24(5):46-47.

[7] LIU G, WANG B, ZHANG J, et al. Total panax notoginsenosides prevent atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: role of downregulation of CD40 and MMP-9 expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(2):350-354.

[8] HONG S J, WAN J B, ZHANG Y, et al. Angiogenic effect of saponin extract from *Panax notoginseng* on HUVECs *in vitro* and zebrafish *in vivo* [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(5):677-686.

[9] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5):843-854.

[10] 王阶,姚魁武,刘咏梅,等. 冠心病血瘀证转录组学研究——病证结合生物标志物研究思路与方法[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(19):1-5.

[11] GUO M, MAO X B, JI Q W, et al. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome [J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88(5):555-564.

[12] Rane S, HE M, Sayed D, et al. Downregulation of MiR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 α and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 2009, 104(7):879-886.

[13] Echavarria R, Mayaki D, Neel J C, et al. Angiopoietin-1 inhibits toll-like receptor 4 signalling in cultured endothelial cells: role of miR-146b-5p [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(3):465-477.

[责任编辑 张丰丰]