

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.09.004

儿茶素经 PI3K-Akt-eNOS 信号通路对冠心病大鼠心肌损伤及抗炎作用分析*

张文强¹ 文亮² 李慧¹ 叶飞林¹ 薛强^{2Δ}

(1 空军第九八六医院心内科 陕西 西安 710054; 2 空军军医大学西京医院心内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨儿茶素经 PI3K-Akt-eNOS 信号通路对冠心病大鼠心肌损伤及抗炎作用分析。**方法:**健康成年 SPF 级 SD 雄性大鼠,经腹腔注射垂体后叶素构建冠心病模型。采用 Western blot 法检测大鼠 PI3K-Akt-eNOS 信号通路相关蛋白的表达情况。采用 ELISA 法检测大鼠炎症因子和氧化应激指标的表达。观察并记录大鼠心肌损伤情况。**结果:**与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的心肌缺血和心肌梗死面积均明显更高($P<0.05$);儿茶素大剂量组心肌缺血和心肌梗死面积明显小于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组($P<0.05$);与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的 PI3K、p-Akt /Akt、p-eNOS /eNOS 均明显更高($P<0.05$);儿茶素大剂量组 PI3K、p-Akt /Akt、p-eNOS /eNOS 明显高于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组($P<0.05$);与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 均明显更高($P<0.05$);儿茶素大剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 明显低于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组($P<0.05$);与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的 ROS、GSH-Px、MDA 均明显更高($P<0.05$);儿茶素大剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 明显低于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组($P<0.05$)。**结论:**儿茶素可通过 PI3K-Akt-eNOS 信号通路靶向改善冠心病大鼠心肌炎症和氧化应激状况,进而发挥心肌保护作用。

关键词:儿茶素;PI3K-Akt-eNOS;冠心病

中图分类号:R-33;R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)09-1619-05

Analysis of Myocardial Injury and Aanti-inflammatory Effect of Catechin in Coronary Heart Disease Rats through PI3K-Akt-eNOS Signaling Pathway*

ZHANG Wen-qiang¹, WEN Liang², LI Hui¹, YE Fei-lin¹, XUE Qiang^{2Δ}

(1 Department of Cardiology, 986 Air Force Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

2 Department of Cardiology, Xijing Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of catechin on myocardial injury and anti-inflammatory effects in rats with coronary heart disease through PI3K-Akt-eNOS signaling pathway. **Methods:** Healthy adult SPF-grade SD male rats were injected with pituitrin intraperitoneally to establish coronary heart disease model. The expression of PI3K-Akt-eNOS signaling pathway was detected by Western blot. The expressions of inflammatory factors and oxidative stress were detected by ELISA. Myocardial injury in rats was observed and recorded. **Results:** Compared with blank group, myocardial ischemia and myocardial infarction area in model group, catechin low-dose group, catechin medium-dose group and catechin high-dose group were higher ($P<0.05$). The area of myocardial ischemia and myocardial infarction in catechin high-dose group was smaller than that in model group, catechin low-dose group and catechin medium-dose group ($P<0.05$). Compared with blank group, PI3K, p-Akt /Akt and P-ENOS /eNOS in model group, catechin low-dose group, catechin medium-dose group and catechin high-dose group were higher ($P<0.05$). PI3K, P-Akt /Akt and P-ENOS /eNOS in catechin high-dose group were higher than those in model group, catechin low-dose group and catechin medium-dose group ($P<0.05$); Compared with blank group, TNF- α , IL-1 β and IL-18 in model group, catechin low-dose group, catechin medium-dose group and catechin high-dose group were higher ($P<0.05$). TNF- α , IL-1 β and IL-18 in catechin high-dose group were lower than those in model group, catechin low-dose group and catechin medium-dose group ($P<0.05$). Compared with blank group, ROS, GSH-Px and MDA in model group, catechin low-dose group, catechin medium-dose group and catechin high-dose group were higher ($P<0.05$). TNF- α , IL-1 β and IL-18 in catechin high-dose group were lower than those in model group, catechin low-dose group and catechin medium-dose group ($P<0.05$). **Conclusions:** Catechin can improve myocardial inflammation and oxidative stress in rats with coronary heart disease by targeting the PI3K-Akt-eNOS signaling pathway, and thus play a myocardial protective role.

Key words: Catechin; PI3K Akt - eNOS; Coronary heart disease

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81600356)

作者简介:张文强(1986-),男,硕士研究生,主治医师,研究方向:冠心病的临床及基础研究, E-mail:zwqq986@163.com

Δ 通讯作者:薛强(1981-),男,博士研究生,副主任医师,研究方向:冠心病中西医结合基础及临床研究, E-mail:zwqq986@163.com

(收稿日期:2022-12-12 接受日期:2023-01-09)

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 Document code: A

Article ID:1673-6273(2023)09-1619-05

前言

冠状动脉粥样硬化性心脏病(Coronary atherosclerotic heart disease, CHD)是临床常见疾病,动脉血管发生粥样硬化致使冠状动脉出现不同程度的狭窄或阻塞是CHD病情发生、发展的核心病理机制^[1]。流行病学研究显示^[2],近年来我国CHD发病率逐年递增已严重威胁老年群体的生命健康安全,且CHD的发病有年轻化趋势。近来针对CHD的综合疗法已逐步规范,即调整饮食、抗血栓的药物治疗和支架植入等手术介入的综合方案的开展使得CHD患者的病情控制和疾病转归得到了较好的改善,但其疗效仍未达预期^[3]。CHD起病后心肌组织炎症被过度激活,高炎症环境可继发导致心肌组织出现严重损伤进而导致CHD患者预后恶化,故有效改善CHD患者心肌损伤成为临床探讨的热点话题^[4]。胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)-蛋白激酶(Akt)-内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路被广泛证实存在于心肌损伤中被激活表达^[5]。儿茶素是一种多种酚类天然非酶抗氧化剂,近来被发现在抑制炎症、改善氧化应激状态和改善血管内皮功能方面具有显著效果^[6]。然而,儿茶素能否通过PI3K-Akt-eNOS信号通路抑制心肌氧化应激反应和炎症,进而缓解心肌损伤仍未见系统报道。基于此背景,本次课题拟通过构建冠心病大鼠模型,并采用儿茶素进行干预治疗,旨在明确其作用价值,进而为后续临床CHD的治疗开展提供更佳方案选择。

1 材料与方法

1.1 研究对象

健康成年SPF级SD大鼠雄性40只,体重 227 ± 20 g,8周龄。所有大鼠购置回后均进行适应性喂养,室内湿度70%,保持室温25℃。按照给药方案不同进行分组,主要为,空白对照组(不做任何处理,采用生理盐水进行灌胃,8只),模型组(构建冠心病模型,采用生理盐水进行灌胃,8只),儿茶素小剂量组(构建冠心病模型,采用20 mg/kg儿茶素灌胃,8只)、儿茶素高剂量组(构建冠心病模型,采用40 mg/kg儿茶素灌胃,8只)、儿茶素高剂量组(构建冠心病模型,采用60 mg/kg儿茶素灌胃,8只)。模型构建方法:所有大鼠完成适应性喂养后,采用高脂方案进行喂养(高甲硫氨酸、高脂饲料,饲料配方为:87.3%基础饲料,3%甲硫氨酸,10%猪油,2%胆固醇,0.5%胆酸钠,0.2%丙硫氧嘧啶。),进行6周的喂养后,经腹腔注射垂体后叶素30 μg/kg,1次/d,连续注射3 d^[7]。并在末次注射后对大鼠进行心电图检查,若出现心律不齐、ST段抬高超过0.1 mV、T波高耸则可认定为造模成功。

1.2 PI3K-Akt-eNOS 信号通路

PI3K、Akt、p-Akt、eNOS、p-eNOS蛋白的检测采用Western blot法。首先提取心肌组织中的总蛋白,随后采用BCA法进行蛋白定量,并进行浓缩胶和分离胶的配置,配置操作完成后进行凝胶电泳(每孔滴入40 μg蛋白),电泳操作完成后湿转到PVDF膜上,并进行封闭2 h(环境为:5%脱脂奶粉),随后置于

4℃冰箱孵育过夜。次日采用5%脱脂奶粉对一抗与二抗原液进行稀释(V-一抗原液:VTBST溶液=1:1000)。取出样本后进行1 h复温,并采用TBST进行洗涤,每次10 min,共洗3次。再次在室温下进行1 h孵育,并再次进行洗涤,15 min每次,共3次。随后采用ECL化学发光法显色,并分析条带灰度值(软件为:Image J),计算PI3K、Akt、p-Akt、eNOS、p-eNOS蛋白的相对表达水平。

1.3 心肌梗死面积测定

末次给药并完成治疗后,采用脊柱脱臼法处死大鼠,并再次结扎冠状动脉,并将1.5 mL的伊文氏蓝注入右颈动脉,并取出心脏后置入冰箱冷冻1 h。随后对获取的心脏组织进行切片(切片范围从心尖到心基底部),每片切片约1 mm厚。完成切片后将所有切片置入0.5%氯化三苯基四氮唑红中。随后进行30 min的孵育(条件为:37℃水浴避光)。并再次置入10%甲醛液中固定10 min。最终参考显色进行判定,结果为:非缺血区(蓝色)、缺血区(砖红色)、左心室梗死区(苍白色)。并参考下述公式进行心肌缺血范围计算:心肌缺血范围=缺血区面积(AAR)/左室面积(LV)×100%。心肌梗死范围=梗死区面积(IS)/AAR×100%。

1.4 大鼠心肌炎症指标的检查

取心肌组织100 mg,并滴入裂解液对采集组织进行裂解操作,待匀浆内无法观察到肉眼可见的固体时停止。获取匀浆样本后进行离心,1000 r/min,离心共5 min,离心维持温度为4℃。待离心完成后静置并吸取上清液置入-20℃冰箱内保存。并在ELISA法检测TNF-α、IL-1β、IL-18的表达水平,操作严格按照试剂盒说明进行。

1.5 大鼠心肌水平氧化应激的检查

取心肌组织100 mg,预冷后采取同上述的方法进行冲洗,并吸干,且采用相同的离心方法制备血样。并采用Elisa试剂盒说明书在酶标仪上测定吸光度值,并使用Excel绘制标准曲线,并计算ROS、GSH-Px、MDA的表达水平。

1.6 统计学方法

本研究所得数据结果采用SPSS22.0进行处理和分析,计量资料以(均数±标准差)表示,多组间比较采用单因素方差分析进行检验,两组间比较采用t检验,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌梗死结果比较

与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的心肌缺血和心肌梗死面积均更高($P<0.05$);儿茶素大剂量组心肌缺血和心肌梗死面积小于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组($P<0.05$),详情见表1。

2.2 各组大鼠PI3K-Akt-eNOS 信号通路蛋白表达结果比较

与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的PI3K、p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS均更高($P<0.05$);儿茶素大剂量组PI3K、p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS高于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组($P<0.05$),详

情见表 2。

表 1 各组大鼠心肌梗死结果比较(均数±标准差)

Table 1 Comparison of myocardial infarction results in all rats (mean± standard deviation)

Groups	n	Ischemia myocardial (%)	Myocardial infarction (%)
Blank control group	8	-	-
Model group	8	46.54±5.12	41.54±4.65
Catechin low dose group	8	39.57±6.42 ^a	38.54±5.12 ^a
Catechin medium dose group	8	25.35±3.54 ^{ab}	26.45±5.28 ^{ab}
Catechins high dose group	8	16.54±5.12 ^{abc}	17.54±5.26 ^{abc}
F/P	-	162.45/<0.001	157.65/<0.001

Note: compared with OP model group, ^a*P*<0.05; compared with Catechin low dose group, ^b*P*<0.05; compared with Catechin medium dose group, ^c*P*<0.05, the same below.

表 2 各组大鼠 PI3K-Akt-eNOS 信号通路蛋白表达结果比较(均数±标准差)

Table 2 Comparison of protein expression results of PI3K-Akt-eNOS signal pathway in all group of rats (mean±standard deviation)

Groups	n	PI3K	p-Akt /Akt	p-eNOS /eNOS
Blank control group	8	1.01±0.11	0.98±0.12	1.03±0.09
Model group	8	1.23±0.09	1.37±0.10	1.21±0.41
Catechin low dose group	8	1.45±0.11 ^a	1.76±0.13 ^a	1.65±0.12 ^a
Catechin medium dose group	8	2.32±0.12 ^{ab}	2.28±0.10 ^{ab}	2.31±0.11 ^{ab}
Catechins high dose group	8	3.01±0.11 ^{abc}	3.13±0.11 ^{abc}	3.10±0.12 ^{abc}
F/P	-	293.45/<0.001	235.54/<0.001	167.546/<0.001

2.3 各组大鼠心肌组织炎症因子水平结果比较

与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的 TNF-α、IL-1β、IL-18 均更高(*P*<0.05);

儿茶素大剂量组 TNF-α、IL-1β、IL-18 低于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组(*P*<0.05),详情见表 3。

表 3 各组大鼠心肌组织炎症因子水平结果比较(均数±标准差)

Table 3 Comparison of inflammatory factor levels in rats (mean±standard deviation)

Groups	n	TNF-α(ng/L)	IL-1β/(pg/mL)	IL-18/(pg/mL)
Blank control group	8	135.45±11.35	23.45±2.54	83.54±8.54
Model group	8	223.54±19.54	128.54±9.54	275.54±17.45
Catechin low dose group	8	165.45±10.54 ^a	87.54±5.24 ^a	147.54±9.21 ^a
Catechin medium dose group	8	164.56±10.23 ^{ab}	76.55±6.31 ^{ab}	110.54±8.45 ^{ab}
Catechins high dose group	8	112.34±9.54 ^{abc}	48.45±5.41 ^{abc}	98.54±8.45 ^{abc}
F/P	-	36.546/<0.001	155.54/<0.001	67.57/<0.001

2.4 各组大鼠心肌组织氧化应激水平结果比较

与空白组相比,模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组、儿茶素大剂量组的 ROS、GSH-Px、MDA 均明显更高(*P*<0.05); 儿茶素大剂量组 TNF-α、IL-1β、IL-18 明显低于模型组、儿茶素小剂量组、儿茶素中剂量组(*P*<0.05),详情见表 4。

3 讨论

本研究构建了冠心病大鼠模型,心电图结果显示大鼠均出现了心律不齐、ST 段抬高超过 0.1 mV、T 波高耸的表现提示造模成功。本次研究结果显示,CHD 大鼠采用儿茶素进行干预后

期心肌梗死面积和心肌缺血面积均得到改善,且采用大剂量的儿茶素进行干预后 CHD 大鼠的心肌梗死和心肌缺血改善更加明显。证实儿茶素可作为改善 CHD 大鼠心肌损伤的潜在药物。

TNF-α 是机体中重要的促炎因子,在 CHD 病后表达上调,且参与心肌炎症的过度激活^[8,9]。Li 等^[10]研究显示,TNF-α 在老年冠心病患者中表达上调,且与动脉病变程度密切相关。Pereira-da-Silva T 等^[11]研究证实,TNF-α 的表达上调可促进动脉粥样硬化病情的发展。IL-1β 和 IL-18 是参与诸多免疫炎症疾病的重要促炎因子,在心血管疾病相关的心肌炎症激活中发挥着重要作用。Libby P 等^[12]报道显示,IL-1β 作为炎症反应途

表 4 各组大鼠心肌组织氧化应激水平结果比较(均数±标准差)

Table 4 Comparison of oxidative stress levels in all rats (mean ± standard deviation)

Groups	n	ROS(U/mL)	GSH-Px(U/mL)	MDA(μmol/L)
Blank control group	8	136.87±6.57	145.56±5.71	12.54±11.65
Model group	8	227.56±5.87	203.54±4.41	18.54±2.15
Catechin low dose group	8	196.87±6.75 ^a	169.57±9.57 ^a	15.65±2.65 ^a
Catechin medium dose group	8	163.65±5.28 ^{ab}	155.54±9.57 ^{ab}	14.56±2.65 ^{ab}
Catechins high dose group	8	135.45±6.57 ^{abc}	143.54±5.28 ^{abc}	13.57±4.21 ^{abc}
F/P	-	437.87/<0.001	168.45/<0.001	198.54/<0.001

径的关键靶点,在介导心血管病变中发挥着尤为重要的作用。Jia 等^[13]研究显示,IL-1 β 和 IL-18 在川崎病患者中表达上调,且其表达上调与川崎病患者的冠状动脉内皮损伤密切相关。ROS、GSH-Px、MDA 是反应机体氧化应激水平的关键血清因子,临床可通过监测 ROS、GSH-Px、MDA 的表达情况反应心肌组织的氧化应激水平^[14,15]。Liu 等^[16]研究证实,靶向改善冠心病大鼠的氧化应激水平可有效改善其心肌组织损伤。Shi 等^[17]研究证实,冠心病心肌组织氧化应激水平的抑制有助于促进病情转归。本次研究结果显示,儿茶素干预后 CHD 大鼠心肌氧化应激及炎症反应水平被明显抑制,且采用大剂量干预后氧化应激及炎症反应抑制更加显著,提示儿茶素可有效改善 CHD 大鼠心肌炎症及氧化应激反应。Jurga 等^[18]报道显示,儿茶素具有较好的氧化应激抑制作用,可有效清除 ROS。Jane 等^[19]研究证实,儿茶素干预后可有效抑制氧化应激损伤。Monira 等^[20]研究证实,儿茶素可抑制慢性炎症的激活从而缓解高炎症反应继发引起的相关疾病。故本次研究结果与上述研究基本一致,即儿茶素可有效抑制氧化应激和炎症反应。PI3K 信号通路是广泛分布于机体各细胞中,并与细胞的增殖、分化、凋亡和炎症反应激活密切相关。Akt 是与蛋白激酶 B(PKB)高度同源的由 480 个氨基酸残基组成的蛋白激酶,其家族主要由 3 个成员构成,即 Akt1/PKB α 、Akt2/PKB β 和 Akt3/PKB γ ^[21,22]。Akt 激活后的产物可调控局部区域内下游信号因子的磷酸化水平,进而发挥心血管保护作用^[23]。当 Akt 的磷酸化水平升高后,高表达的 Akt 可有效磷酸化 eNOS 并使 eNOS 的表达被激活。eNOS 主要由心肌细胞合成,过表达的 eNOS 可减少炎性细胞的浸润、抑制血管痉挛和调控血流等目的作用^[24]。Hong 等^[25]研究显示,eNOS 可作为 AS 防治的重要靶点,其机制可能与 eNOS 可通过参与调节 AS 相关的炎症反应有关。Susanne 等^[26]报道显示,eNOS 在心血管疾病中扮演着炎症反应和氧化还原开关的重要角色。Li 等^[27]研究显示,eNOS 在缓解冠状动脉炎症反应中发挥着尤为重要的作用。本次实验结果显示,CHD 大鼠采用儿茶素干预后可激活 PI3K-Akt-eNOS 信号通路的表达,提示儿茶素可通过激活 PI3K-Akt-eNOS 信号通路的表达进而发挥心肌保护作用。Nan 等^[28]研究证实,儿茶素可通过调控 PI3K / AKT / eNOS 信号通路的表达进而发挥神经保护作用。Liu 等^[29]研究证实,儿茶素可通过调控 PI3K / AKT / eNOS 信号通路进而缓解血管内皮损伤。故这项研究表明 CHD 大鼠中儿茶素可调节 PI3K / AKT / eNOS 信号通路的表达,这亦预示着儿茶素干预 CHD 后可通过靶向调节 PI3K / AKT / eNOS 信号通路的表达进而使心肌组

织的氧化应激反应和炎症反应得到抑制,从而发挥心肌保护作用并减轻心肌梗死面积。表明临床可进一步对儿茶素的应用做出研究进一步促进儿茶素在临床应用的转化进而为后续临床进一步改善 CHD 患者的治疗效果提供新思路^[30]。

综上所述,PI3K-Akt-eNOS 信号通路在 CHD 大鼠中被过度激活,且与大鼠心肌损伤有关,采用儿茶素干预可有效抑制 PI3K-Akt-eNOS 信号通路相关蛋白的表达进而缓解心肌组织炎症及氧化应激反应,从而改善 CHD 大鼠心肌损伤。

参考文献(References)

- [1] Stewart RAH, Held C, Hadziosmanovic N, et al. STABILITY Investigators. Physical Activity and Mortality in Patients With Stable Coronary Heart Disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70 (14): 1689-1700
- [2] Cybulska B, Kłosiewicz-Latoszek L. Landmark studies in coronary heart disease epidemiology. The Framingham Heart Study after 70 years and the Seven Countries Study after 60 years [J]. Kardiol Pol, 2019, 77(2): 173-180
- [3] Muscella A, Stefano E, Marsigliante S. The effects of exercise training on lipid metabolism and coronary heart disease [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 319(1): H76-H88
- [4] Khamis RY, Ammari T, Mikhail GW. Gender differences in coronary heart disease[J]. Heart, 2016, 102(14): 1142-9
- [5] Saahene RO, Agbo E, Barnes P, et al. A Review: Mechanism of Phyllanthus urinaria in Cancers-NF- κ B, PI3K/AKT, and MAPKs Signaling Activation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 18(2): 4514342
- [6] Bansal S, Vyas S, Bhattacharya S, et al. Catechin prodrugs and analogs: a new array of chemical entities with improved pharmacological and pharmacokinetic properties [J]. Nat Prod Rep, 2013, 30(11): 1438-54
- [7] 朱晓晴, 吴琼, 李甜, 等. 不同方式注射垂体后叶素对大鼠心肌缺血模型影响的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(7): 1087-1090
- [8] Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship (s)[J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(3): 184-95
- [9] Ma K, Zhang H, Baloch Z. Pathogenetic and Therapeutic Applications of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in Major Depressive Disorder: A Systematic Review[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5): 733
- [10] Li X, Zhang F, Zhou H, et al. Interplay of TNF- α , soluble TNF receptors and oxidative stress in coronary chronic total occlusion of the oldest patients with coronary heart disease[J]. Cytokine, 2020, 125

- (5): 154836
- [11] Pereira-da-Silva T, Napoleão P, Costa MC, et al. Association between miR-146a and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Stable Coronary Artery Disease[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(6): 575
- [12] Libby P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(18): 2278-2289
- [13] Jia C, Zhang J, Chen H, et al. Endothelial cell pyroptosis plays an important role in Kawasaki disease via HMGB1/RAGE/cathepsin B signaling pathway and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 778
- [14] Nie X, Dai Y, Zheng Y, et al. Establishment of a Mouse Model of Premature Ovarian Failure Using Consecutive Superovulation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(5): 2341-2358
- [15] Zhang YY, Yi M, Huang YP. Oxymatrine Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 626-635
- [16] Liu JW, Liu HT, Chen L. The Therapeutic Role of Slit2 in Anti-fibrosis, Anti-inflammation and Anti-oxidative Stress in Rats with Coronary Heart Disease[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2021, 21(12): 973-983
- [17] Shi L, Zhang Y, Zhang J, et al. MiR-339 is a potential biomarker of coronary heart disease to aggravate oxidative stress through Nrf2/FOXO3 targeting Sirt2[J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(3): 2596-2609
- [18] Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 965
- [19] Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, 43(1): 89-143
- [20] Pervin M, Unno K, Ohishi T, et al. Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases[J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1297
- [21] Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function[J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74(5): 38-48
- [22] Xu Y. TET2 expedites coronary heart disease by promoting microRNA-126 expression and inhibiting the E2F3-PI3K-AKT axis [J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(6): 698-708
- [23] Wang M, Yang D, Hu Z, et al. Extracorporeal Cardiac Shock Waves Therapy Improves the Function of Endothelial Progenitor Cells After Hypoxia Injury via Activating PI3K/Akt/eNOS Signal Pathway [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8(1): 747497
- [24] Yang P, Wu P, Liu X, et al. Interaction between eNOS gene polymorphism and current smoking on susceptibility to coronary heart disease in Chinese people[J]. *Coron Artery Dis*, 2020, 31(1): 87-91
- [25] Hong FF, Liang XY, Liu W, et al. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment[J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(6): 429-441
- [26] Karbach S, Wenzel P, Waisman A, et al. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(22): 3579-94
- [27] Li JB, Wang HY, Yao Y, et al. Overexpression of microRNA-138 alleviates human coronary artery endothelial cell injury and inflammatory response by inhibiting the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(8): 1482-1491
- [28] Nan W, Zhonghang X, Keyan C, et al. Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Neuronal Apoptosis in Rats after Middle Cerebral Artery Occlusion Injury via PI3K/AKT/eNOS Signaling Pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 11(1): 6473580
- [29] Liu S, Sun Z, Chu P, et al. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(5): 672-680
- [30] Lin XP, Cui HJ, Yang AL, et al. Astragaloside IV Improves Vasodilatation Function by Regulating the PI3K/Akt/eNOS Signaling Pathway in Rat Aorta Endothelial Cells [J]. *J Vasc Res*, 2018, 55(3): 169-176