

初级纤毛对蛇床子素促进成骨细胞成骨性分化的影响

谢艳芳¹, 石文贵², 王鸣刚^{1*}, 陈克明³ (1.兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050; 2.中国科学院近代物理研究所, 兰州 730050; 3.兰州军区兰州总医院骨科研究所, 兰州 730050)

摘要: 目的 研究初级纤毛对蛇床子素促进成骨细胞成骨性分化的影响。方法 取新生 SD 大鼠颅骨, 多次酶消化法获得成骨细胞, 免疫荧光染色观察成骨细胞表面初级纤毛, RNA 干扰法抑制鞭毛运输系统蛋白(IFT88)的表达, 从而抑制成骨细胞初级纤毛的产生。以浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛇床子素分别作用于 RNA 干扰成骨细胞, 3, 6 d 后检测胞内碱性磷酸酶(ALP)活性; 药物处理 24 h 后, Real-time PCR 检测 1 型胶原(collagen 1, COL-1)、RUNX-2、ALP mRNA 的表达量; Western blot 检测 COL-1、RUNX-2 蛋白表达量。结果 超过 70% 的成骨细胞表面具有长度约为 5 μm 的初级纤毛, RNA 干扰法显著抑制 IFT88 基因和蛋白的表达, 并抑制了初级纤毛的发生。 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛇床子素能够显著地促进胞内 ALP 的活性, 成骨性分化相关的因子 COL-1、RUNX-2 和 ALP 基因的表达也相应增高, 同时 COL-1、RUNX-2 蛋白表达量显著增加。当成骨细胞初级纤毛干扰后, 药物促进 ALP 活性升高的作用消失, COL-1、Runx-2 基因和蛋白的表达量也相应的降低。结论 成骨细胞初级纤毛的去除, 能够显著性地抑制蛇床子素促进成骨细胞成骨性分化的能力。

关键词: 蛇床子素; 初级纤毛; 成骨细胞; RNA 干扰

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)07-0837-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.001

Role of Primary Cilium in the Osthole Induced Differentiation and Mineralization of Osteoblasts

XIE Yanfang¹, SHI Wengui², WANG Minggang^{1*}, CHEN Keming³ (1.School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2.Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730050, China; 3.Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command of CPLA, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the role of primary cilium in the osteogenic differentiation process of rat calvarial osteoblasts induced by osthole. **METHODS** The neonatal SD rat skull was segregated, and enzyme digestion was used to obtain bone cells. Primary cilium of osteoblasts was detected by immunostaining and cilium was abrogated by knockdown of IFT88. Transfected cells were treated with $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ osthole. The alkaline phosphatase (ALP) activity was determined at the 3rd and 6th day. Total RNA was isolated and the gene expression of ALP, collagen-1(COL-1) and RUNX-2 were investigated by real-time PCR. Finally total protein was also isolated and the secretion of COL-1 and RUNX-2 was examined by Western blotting. **RESULTS** The percentage of cells possessing primary cilia was found to be >70%, and the cilium was about 5 μm in length projecting from cell surface. Knockdown of IFT88 caused an reduction of cells with primary cilia. The ALP activity of the group treated with $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ osthole was significantly higher than the control group, and mRNA expression levels of ALP, COL-1 and RUNX-2 after of treatment changed in similar tendency. Similarly, the stimulating effects of osthole on protein expression of COL-1 and RUNX-2. However, osthole-induced promoting effects on ALP activity and other osteogenesis-related markers were suppressed when primary cilia of osteoblasts were abrogated using RNA interference. **CONCLUSION** The abrogation of primary cilium can dramatically blocked the differentiation and mineralization of osteoblasts induced by osthole.

KEY WORDS: osthole; primary cilium; osteoblast; RNA interference

中草药蛇床子是伞形科植物蛇床的果实, 其具有温肾助阳、祛风燥湿、杀虫止痒之功效^[1]。近年来研究报道, 蛇床子的主要有效成分蛇床子素能够显著促进成骨细胞的钙化成熟, 同时抑制破骨细胞的骨吸收, 并诱导其凋亡^[2-3]。笔者前期研

究表明, 10^{-5} , $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛇床子素能够显著促进成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性, 促进成骨性分化因子 COL-1、RUNX-2、BMP-2 的表达, 促进成骨细胞钙化结节的形成。而蛇床子素促进成骨细胞分化的机理目前还不清楚^[4-5]。

基金项目: 国家自然科学基金(81270963, 81471090)

作者简介: 谢艳芳, 女, 硕士 Tel: (0931)8994329

E-mail: xieyanfang@lut.cn

*通信作者: 王鸣刚, 男, 博士, 教授

Tel:

(0931)8994327 E-mail: mgwang@lut.cn

初级纤毛是一种存在于大多数哺乳动物细胞表面的特殊细胞器,在细胞分裂间期和G₀期通过中心粒锚定于细胞表面。近年研究表明,初级纤毛内含有多种信号的受体以及信号分子蛋白,包括PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor α)、Hh(Hedgehog)、Wnt、cAMP-PKA 信号通路,可以作为多种药物的靶点,因此本研究探讨初级纤毛在蛇床子素促进成骨细胞成骨性分化过程中的作用^[6-8]。

1 材料

1.1 动物与细胞系

SPF 级新生 SD 大鼠 10 只,♀,购自甘肃中医药大学 SPF 级动物实验中心,合格证号:SYXK(甘)2010-0012。

1.2 试剂与仪器

蛇床子素对照品(宝鸡晨光,批号:20141020,纯度>98%);二甲基亚砜(AMRESCO,批号:0176B057);DMEM 培养基(GIBCO,批号:1376040);胎牛血清(HyClone,批号:NXM0765);RNAiso Reagent(Takara,批号:A9208-1);反转录试剂盒(Takara,批号:AK4801);Taq DNA 聚合酶(Takara,批号:AK5502);乙酰化 α -微管蛋白(Abcam,批号:GR236918-1);COL-1(Abcam,批号:GR141710-14); β -actin(Bioworld,批号:AA44121);Runx-2(Abcam,批号:GR169432-1);辣根过氧化物酶标记的二抗(Beyotime,批号:A0208);FITC 标记的免疫荧光二抗(KPL 公司,批号:15047);ALP 活性测定试剂盒(南京建成,批号:20150729);脂质体转染试剂(invitrogen,批号:1667501)。

RTG500T CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Revco);1×71 型倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS);WAP Bioware II 型紫外分光光度计(英国 Biochrom);Biotek Epoch 酶标仪(美国 Bio-Rad);Primo R 台式高速冷冻离心机(德国 Heraeus);ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI);4200SF 数码凝胶图像分析仪(美国 Bio-Tanon);Proteom 3 电泳仪电转移仪(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 成骨细胞的分离与培养

将鼠乳处死后,取其颅骨并去除骨膜及结缔组织,PBS 清洗 3 次;将骨片剪碎并用 0.25%胰酶消化 2 次(37℃,每次 10 min),弃上清;0.1%的

1 型胶原酶消化 4 次(37℃,每次 20 min),收集合并上清液,150 目滤网过滤 3 次 1 000 r·min⁻¹离心 10 min;弃上清,加入 α -MEM 培养基(含 10%FBS),细胞悬液以 4×10⁴·mL⁻¹ 接种于培养皿中,37℃5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。

2.2 初级纤毛的观察

将 P₁ 代大鼠成骨细胞爬片培养,24 h 后弃去培养基,PBS 清洗 3 次后依次加入 4%多聚甲醛固定 10 min,0.1%的 TritonX-100 透膜 10 min,免疫荧光封闭液室温封闭 1 h 后,加入乙酰化 α -微管蛋白一抗(1:400)4℃过夜。FITC 标记的荧光二抗(1:200)和 DAPI 染色液(1:10 000)37℃孵育 30 min,封片后置于激光共聚焦显微镜下观察。

2.3 IFT88 的 RNA 干扰

以 IFT88 基因全序列为模板,设计三段特异性抑制 IFT88 的 siRNA 序列(siRNA-1:5'-GGAU AUG GGUCCAAGACA UCC-3',siRNA-2:5'-GGACCUA ACCUACUCCGUUCU-3',siRNA-3:5'-GCAGAGG AAUUAUUCCAAAGC-3')。三段 siRNA 序列与 pENTRTM/U6 载体相连后利用脂质体转入成骨细胞,所用的对照组转入相应的阴性对照载体,转染 24 h 后绿色荧光蛋白检测转染效率,RT-PCR 和 Western blot 检测 IFT88 的表达量,检测 RNA 干扰效率^[9]。

2.4 ALP 活性的测定

将转染 24 h 后的相应成骨细胞接种于 6 孔板中,分别设对照组(对照转染)、蛇床子素组(对照转染+1×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 蛇床子素)和 siRNA 组(siRNA 转染+1×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的蛇床子素),培养 3,6 d 后,ALP 活性测定试剂盒检测胞内 ALP 活性,每孔的蛋白浓度用 BCA 法进行测定,ALP 活性根据每 1 mg 蛋白催化生成酚的量来换算成单位为 nmol·(15 min)⁻¹·mg⁻¹ 蛋白。

2.5 Real Time RT-PCR 分析

分别设对照组、蛇床子素组和蛇床子素+siRNA 组,药物处理 48 h 后,加入 Trizol 裂解液,一步法提取总 RNA,总 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 RT-PCR 扩增,逆转录 PCR 扩增体系及反应条件均参照说明书设定。RT-PCR 数据分析采用 $\Delta\Delta C_t$ 法,数据结果采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 表示,所用引物由 TaKaRa 公司设计并合成,引物序列如下:IFT88, 5'-TCAGGCTATTGAGTGGCT-3', 和 5'-TCTCG CAGAACTGGGTAT-3';COL-1, 5'-TGGC AAGGC

CGGTGAAGATA-3'和 5'-TGACCAGGA AGCCTC GGACT-3'; RUNX-2, 5'-GCACCCAGCCATAA TAGA-3'和 5'-TTGGAGCAAGGAGAACCC-3'; ALP, 5'-CACGTTGACTGTGGTTACTGCTGA-3'和 5'-CCTTGTAACCAGGCCCGTTG-3'; GAPDH, 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', 5'-ATGG TGGTGAAGACGCCAGTA-3'。

2.6 Western blot 分析

分别设对照组、蛇床子素组和 siRNA 组, 药物处理 48 h 后, 加入细胞裂解, 4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 提取总蛋白, BCA 法进行蛋白浓度的测定。各组取含 20 μg 蛋白质样品, 经 SDS-PAGE 分离后, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 然后分别加入 β-actin、COL-1、RUNX-2 一抗(均为 1:1 000 稀释), 4℃过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000 稀释)37℃孵育 2 h 后, 用增强化学发光法检测目的蛋白, 灰度值使用 Image-Pro plus 6.0 软件扫描测定。

2.7 统计方法

所有实验数据的处理和计算采用 SPSS 16.0 软件完成, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每组 3 个平行重复($n=3$), 每种实验重复 3 次, 各组间是否存在差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两组间的差异比较用 LSD 检验法(方差齐)来判断是否有显著性差异, $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。

3 结果

3.1 初级纤毛的观察结果

初级纤毛经乙酰化的 α-tubulin 免疫荧光染色, 并用激光共聚焦显微镜观察显示, 成骨细胞表明存在一根长约 5 μm 的初级纤毛, 具有初级纤毛的细胞数目占总细胞数目 70%以上。结果见图 1。

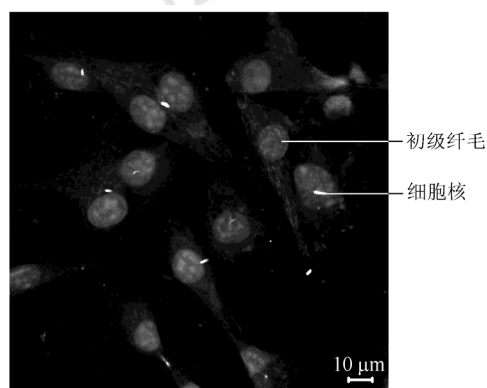


图 1 大鼠成骨细胞初级纤毛免疫荧光染色结果
Fig. 1 Immunostaining for primary cilia

3.2 IFT88 的 RNA 干扰结果

转染成功的细胞显绿色荧光, 细胞转染成功率>80%。RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 3 种 siRNA 均使 IFT88 的表达量有所下降, 其中 siRNA-3 干扰的效率最高, 与对照组相比, siRNA-3 组 IFT88 基因与蛋白表达显著降低($P<0.01$), 因而选取 siRNA-3 为后续干扰序列, 结果见图 2。

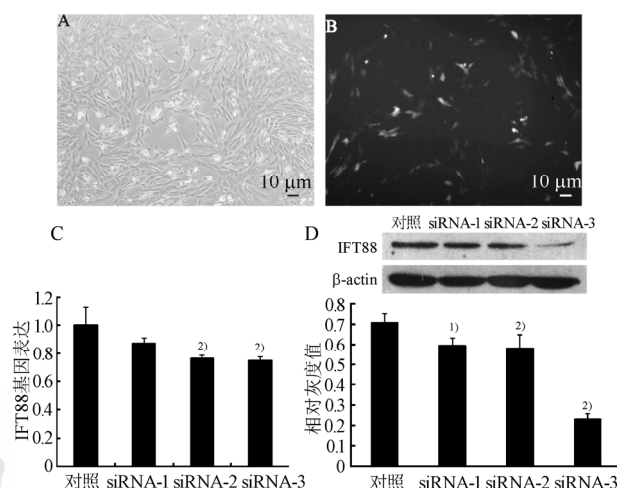


图 2 siRNA 干扰法抑制 IFT88 的表达($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-siRNA 转染后细胞形态; B-转染成功细胞带绿色荧光; C-转染后 IFT88 基因表达; D-转染后 IFT88 蛋白表达; 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Expression of IFT88 was inhibited by siRNA transfection($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-osteoblasts transfected by siRNA; B-transfected osteoblasts indicated by GFP; C-IFT88 mRNA levels as measured by real-time RT-PCR; D-protein expression as determined by Western blot; compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.3 ALP 活性分析

1×10^{-6} mol·L⁻¹ 的蛇床子素处理成骨细胞后, ALP 活性持续增加, 与对照组相比, 蛇床子素组呈极显著性差异($P<0.01$); 当 RNA 干扰去除初级纤毛后, 蛇床子素+siRNA 组 ALP 活性显著下降, 与蛇床子素组相比呈显著性差异($P<0.01$)。结果见图 3。

3.4 Real-time RT-PCR 检测结果

1×10^{-6} mol·L⁻¹ 的蛇床子素处理成骨细胞后, 成骨性基因 ALP、COL-1 和 Runx-2 表达量持续增加, 药物作用 24 h 后, 蛇床子素组与对照组相比具有极显著性差异($P<0.01$); 而蛇床子素+siRNA 组 ALP、COL-1 和 RUNX-2 表达量均低于蛇床子素组, 具有显著性差异($P<0.01$)。结果见图 4。

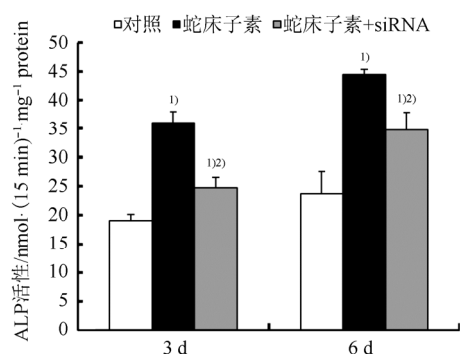


图 3 蛇床子素对转染后成骨细胞 ALP 活性的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与蛇床子素组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of osthole on ALP activity in transfected osteoblasts ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with osthole group, ²⁾ $P<0.01$.

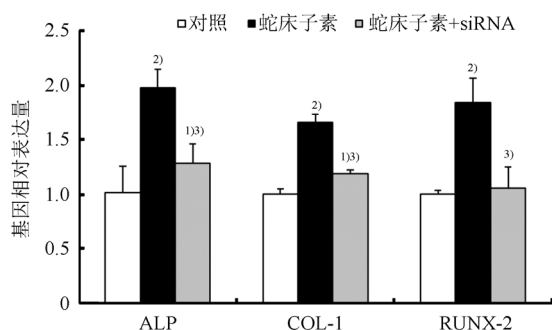


图 4 蛇床子素对转染后成骨细胞基因表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与蛇床子素组相比, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of osthole on mRNA expression of transfected osteogenic factors ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with osthole group, ³⁾ $P<0.01$.

3.5 Western blot 检测结果

$1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛇床子素处理成骨细胞后, 蛇床子素组 COL-1 和 Runx-2 蛋白表达量明显高于对照组, 呈极显著性差异($P<0.01$); 当 RNA 干扰去除初级纤毛后, 蛇床子素+siRNA 组 COL-1 和 RUNX-2 蛋白表达量明显低于蛇床子素组, 呈显著性差异($P<0.05$)。结果见图 5。

4 讨论

蛇床子素的抗骨质疏松活性已为动物实验和临床试验所证实^[10-11]。本课题组和国内外其他研究人员发现, 蛇床子素能够促进成骨细胞的钙化成熟, 同时抑制破骨细胞的骨吸收活性。尽管已有大量细胞水平的研究报道显示, 蛇床子素可以激活 BMP-2、Runx-2、OPG/RANKL 等信号途径,

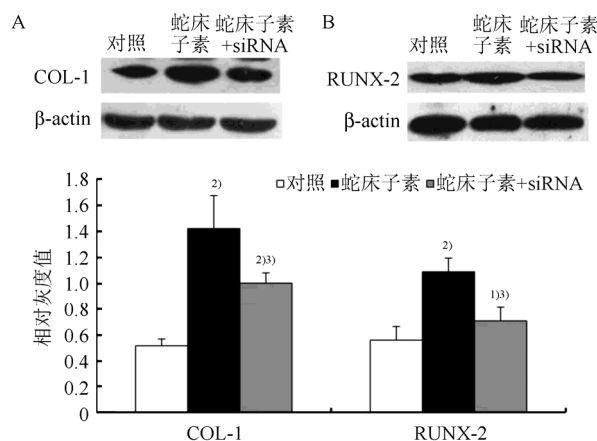


图 5 蛇床子素对转染后成骨细胞蛋白表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-COL-1 蛋白表达; B-RUNX-2 蛋白表达; 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与蛇床子素组相比, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Effect of osthole on protein expression in transfected osteogenic factors ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-protein expression of COL-1; B-protein expression of RUNX-2. compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with osthole group, ³⁾ $P<0.01$.

然而, 这些途径只是整个信号级联反应的一部分, ICA 促进骨形成的作用机理至今不明^[12-13]。

本研究证明, 初级纤毛在蛇床子素促进成骨细胞成骨性分化过程中扮演着重要的角色, 这与成骨细胞在骨组织中的特殊位置密切相关。成骨细胞贴壁分布于骨小梁表面, 其感受外界信号的能力被限制, 而初级纤毛作为突出于成骨细胞表面的信号感受器, 可提高成骨细胞接受外界信号的能力^[7,12,14]。此外, 初级纤毛的基部为中心粒, 中心粒为中心体的组成部分, 因而参与初级纤毛的形成就必定使中心体不能参与纺锤体的发生, 因而初级纤毛在一定程度上可以调节成骨细胞的增殖, 这也是初级纤毛在成骨细胞增殖与分化过程中意义重大的原因之一^[8-9]。初级纤毛内含有多种信号通路, 而蛇床子素激活了初级纤毛当中的哪条信号途径, 进而促进成骨细胞的成骨性分化还需进一步研究。

REFERENCES

- [1] SHENG Y, CHEN Y, ZHANG W T. Determination of matrine, imperatorin and osthole in fubishu vaginal effervescent tablets [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(1): 82-85.
- [2] ZHOU Z W, SHENG X. Pharmacological activities of osthole [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2006, 15(20): 1726-1730.
- [3] MING L G, GE B F, CHEN K M, et al. Effect of osthole on the proliferation and differentiate of osteoblasts *in vitro* [J]. J Chin

- Med Mater(中药材), 2010, 34(3): 404-408.
- [4] LEI G, WANG M G, CHEN K M, et al. Effect of osthon on apoptosis and bone resorption of osteoclasts cultured *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2012, 47(2): 174-179.
- [5] MING L G, Ge B F, CHEN K M, et al. Effect of osthon on the proliferation and differentiate of osteoblasts *in vitro* [J]. China J Orthop Trauma(中国骨伤), 2010, 23(9): 688-691.
- [6] SATIR P, PEDERSEN L B, CHRISTENSEN S T. The primary cilium at a glance [J]. Cell Sci, 2010, 123(4): 499-503.
- [7] IZAWA I, GOTO H, KASAHARA K, et al. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle [J]. Cilia, 2015, 4(1): 1-13.
- [8] FUJII K. Primary cilia and hedgehog signaling [J]. No to Hattatsu, 2015, 47(4): 259-265.
- [9] PRAETORIUS H A. The primary cilium as sensor of fluid flow: new building blocks to the model. A review in the theme: cell signaling: proteins, pathways and mechanisms [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 308(3): 198-208.
- [10] MING L G, Ge B F, CHEN K M, et al. Effects of osthon on bone marrow stromal stem cell differentiation and proliferation *in vitro* [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2010, 26(8): 1098-1103.
- [11] CIVITELLI R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage [J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2): 188-192.
- [12] YUAN X, SERRA R A, YANG S. Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2015, 31: 78-99.
- [13] CHEN K M, GE B F, MA H P, et al. Icariin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells [J]. Pharmazie, 2005, 60(12): 939-942.
- [14] CHEN K M, GE B F, MA H P, et al. The serum of rats administered flavonoid extract from *Epimedium sagittatum* but not the extract itself enhances the development of rat calvarial osteoblast-like cells *in vitro* [J]. Pharmazie, 2004, 59(1): 61-64.

收稿日期: 2016-01-28

葛根素对高血压大鼠内皮功能障碍的影响

李晓洁^{a,b}, 林宇涵^a, 刘彦彬^a, 黄蕾^a, 周明生^{a*} (锦州医科大学, a.生理教研室; b.附属第一医院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 目的 研究葛根素对血管紧张素(angiotensin, Ang) II 诱导的高血压大鼠的影响, 并探讨其改善内皮功能的机制。

方法 SD 大鼠随机分为对照组、Ang II 组和葛根素组。Ang II 组连续 5 d 泵入 Ang II (0.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 葛根素组在泵入 Ang II 前 10 d 采用葛根素注射液腹腔注射(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)进行干预。采用尾动脉法测量收缩压, 用血管张力测量灌流系统测量内皮依赖性舒张功能(endothelium-dependent relaxation, EDR)。Western blot 测量血管内相关蛋白的表达。

结果 葛根素能明显降低 Ang II 诱导的大鼠高血压水平($P<0.05$), 减轻 Ang II 引起的动脉内膜增厚和心肌细胞的肥大。和对照组相比, Ang II 组能削弱动脉血管的 EDR, 同时降低 p-eNOS(Ser 1177)的表达, 增强 gp91 phox(85%), p22 phox(113%)的表达, 而葛根素能改善 EDR, 并逆转 Ang II 引起的蛋白量的变化。

结论 在 Ang II 诱导的高血压大鼠中, 葛根素能降低血压, 保护内皮功能及靶器官免受损伤。葛根素具有心血管保护作用, 机制可能和自身抗氧化及上调 p-eNOS 的作用有关。

关键词: 血管紧张素 II; 葛根素; 内皮功能; 高血压; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)07-0841-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.002

Influence of Puerarin on Endothelial Dysfunction in Hypertensive Rats

LI Xiaojie^{a,b}, LIN Yuhan^a, LIU Yanbin^a, HUANG Lei^a, ZHOU Mingsheng^{a*} (Liaoning Medical University, a. Department of Physiology; b. The First Affiliated Hospital, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of puerarin on endothelial function in angiotensin (Ang) II-induced hypertensive rats as well as the underlying mechanism of improving endothelial function. **METHODS** SD rats were randomly divided into control, Ang II and puerarin groups. The rats of Ang II groups were infused with Ang II (0.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹ implanted by mini-pump) for 5 d while the rats of puerarin group were treated with puerarin (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 10 d followed by Ang II and puerarin for 5 d. The systolic blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff method. Endothelium-dependent

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470532)

作者简介: 李晓洁, 女, 硕士生 Tel: 18841608985 E-mail: qianxun326@126.com *通信作者: 周明生, 男, 博士, 教授 Tel: 18104068992 E-mail: zhousm1963@163.com