

氰酸盐诱导人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤

樊春华¹ 田宽^{1,2} 何菲¹ 胡玲^{1,2} 郭珮^{1,2} 陈益^{1,2} 熊伟^{1,2}
周宏宇¹ 李静^{1,2} 李晋芳³ 冉建华^{1*}

(¹重庆医科大学解剖教研室神经科学研究中心, 重庆 400016; ²重庆医科大学组胚教研室
组织细胞工程与干细胞研究室, 重庆 400016; ³重庆医科大学第二附属医院神经内科, 重庆 400016)

摘要 该研究探讨尿素水解产物氰酸盐(cyanate)对体外培养的血管内皮细胞氧化应激和功能障碍的作用。培养人脐静脉内皮细胞系(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 通过CCK8法检测氰酸盐对内皮细胞活力的影响; 采用DCFH-DA法检测ROS水平; 用比色法测定NO水平; 分别用细胞免疫荧光和Western blot检测ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)、eNOS(endothelial nitric oxide synthase)表达。氰酸盐呈浓度依赖性影响内皮细胞活力, 与对照组相比, 当氰酸盐浓度为1.00 mmol/L时, 细胞活力受到明显抑制($P<0.05$); 与正常组和阴性对照组(甘露醇组)相比, 氰酸盐诱导内皮细胞内ROS水平明显升高; NO水平明显减少($P<0.05$)。免疫荧光结果显示, 氰酸盐作用内皮细胞24 h后, ICAM-1荧光明显增强, eNOS明显减弱($P<0.05$)。Western blot结果显示, 内皮细胞内ICAM-1水平随氰酸盐浓度升高和负荷时间延长上调, 而eNOS水平下调($P<0.05$)。氰酸盐诱导血管内皮细胞氧化应激产生和功能障碍。

关键词 氰酸盐; HUVECs; 氧化应激; ROS; NO

Cyanate Induces Oxidative Stress Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Fan Chunhua¹, Tian Kuan^{1,2}, He Fei¹, Hu Ling^{1,2}, Guo Pei^{1,2}, Chen Yi^{1,2}, Xiong Wei^{1,2},
Zhou Hongyu¹, Li Jing^{1,2}, Li Jinfang³, Ran Jianhua^{1*}

(¹Center of Neuroscience Research, Department of Anatomy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
²Department of Histology and Stem Cell Research, Department of Histology and Embryology,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ³Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital
of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The study was to explore the mechanism of oxidative stress and dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with cyanate *in vitro*. The vitality of the cells treated with cyanate of different concentrations were measured by the CCK8 method. ROS level was detected by DCFH-DA assay. The NO level was detected by a commercial NO assay kit. The levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) proteins were observed by immunofluorescence. Western blot analysis was used to assess the protein levels of ICAM-1 and eNOS. The activities of HUVECs in culture was inhibited by

收稿日期: 2017-08-25 接受日期: 2017-10-19

国家自然科学基金(批准号: 81770738)、重庆市科技计划项目(批准号: cstc2015jcyjA10036)、重庆市卫生局课题(批准号: 2012-1-038)和重庆医科大学大学生科学研究与创新实验项目(批准号: 201609)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15086814824, E-mail: 1315038024@qq.com

Received: August 25, 2017 Accepted: October 19, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81770738), the Project of Science and Technology of Chongqing (Grant No.cstc2015jcyjA10036), the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (Grant No.2012-1-038) and the Project of College Students in Chongqing Medical University (Grant No.201609)

*Corresponding author. Tel: +86-15086814824, E-mail: 1315038024@qq.com

网络出版时间: 2017-12-04 12:22:47 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1222.024.html>

cyanate in a dose dependent manner ($P<0.05$). Compared with the normal group and the control (mannitol) group, ROS levels were greatly increased after cyanate loading 24 h ($P<0.05$). NO level was decreased significantly at 24 h after cyanate treatment ($P<0.05$). Immunofluorescence showed high positive immunostaining of ICAM-1 after 1.00 mmol/L cyanate treatment 24 h ($P<0.05$). However, the immunostaining of eNOS was lowered ($P<0.05$). The level of ICAM-1 was remarkably increased, and eNOS was clearly reduced. Cyanate can induce in HUVECs oxidative stress and dysfunction.

Keywords cyanate; HUVECs; oxidative stress; ROS; NO

终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)持续发展进入肾脏功能失代偿的终末阶段。心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)是终末期肾病患者最常见的并发症和死亡原因^[1],且ESRD患者死于CVD并发症的风险是一般人群的10~20倍^[2]。近年来的研究发现,引起ESRD患者CVD高发的原因除了高龄、吸烟、糖尿病、高血压等传统因素外,还有慢性炎症、氧化应激和内皮细胞功能损伤等危险因素^[3]。

氧化应激通过产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)、降低一氧化氮(nitric oxide, NO)利用率和抗氧化系统能力,导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、心力衰竭、高血压等多种CVD疾病^[4]。在ESRD患者体内,随着肾功能的下降,体内经肾排泄的代谢产物在血液或组织中堆积,这些产物如尿素、补体、细胞因子等的积聚诱发了血管内皮的损伤^[5]。近年来,尿素对血管内皮的损伤越来越受到研究者的关注^[6]。生理水平的尿素对机体本身是无害的,但ESRD患者因肾脏功能损伤造成体内尿素升高可以引起内皮损伤,其机制尚不清楚^[7]。Sun等^[8]研究发现,ESRD患者体内约0.8%的尿素通过非酶促反应水解产生氰酸盐(cyanate),氰酸盐浓度随着尿素的显著增加而升高,甚至能够达到1.00 mmol/L。心血管系统是运输尿素的主要途径,而血管内皮是尿素接触的重要部位,也是氰酸盐产生和发挥作用的场所。研究证实,血管内皮功能紊乱是AS发生发展的起始和关键环节^[9]。本课题组前期研究证实,高浓度尿素能够诱导ROS大量产生,导致氧化应激的发生,进一步造成人脐静脉内皮细胞系(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)功能紊乱和结构损伤^[10]。那么,ESRD患者体内高尿素是否通过水解产物氰酸盐诱导血管内皮细胞产生ROS并造成内皮功能失常?为了验证此猜想,本研究采用氰酸盐作用HUVECs,检测细胞活力的变化、ROS的产生情

况及内皮细胞功能变化,为阐明ESRD患者易并发CVD的病理机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞系(HUVECs)由重庆医科大学神经科学研究中心实验室提供。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Excell公司;RPMI-1640培养基购自Gibco公司;氰酸盐、甘露醇购自Sigma公司;胰蛋白酶消化液、青-链霉素溶液、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜、ECL化学发光试剂盒购自Miliopore公司;细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和 β -actin抗体购自武汉博士德公司;内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)抗体购自Abcam公司;辣根过氧化物酶二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;CCK8试剂盒购自Dojindo公司;ROS测定试剂盒购自上海贝博生物有限公司;NO测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HUVECs常规复苏后,用含10% FBS和1%青/链霉素的RPMI-1640培养液,于37 °C、含5% CO₂的培养箱内培养。6 h后首次换液,此后2~3 d换液1次。待细胞汇合到80%左右时,用0.25%胰蛋白酶于37 °C消化2 min;显微镜下观察细胞皱缩变圆后加入新培养液终止消化,以800 r/min离心5 min,弃去上清液,加入新培养液混匀,进行常规传代处理后按上述条件继续孵育,以备用于后续实验。

1.2.2 CCK8法检测细胞活力 取对数期的HUVECs接种于96孔板中,在细胞培养箱中孵育24 h,根据Dalia等^[11]的研究结果,将氰酸盐实验组浓度分别设置为0、0.25、0.50、1.00和2.00 mmol/L,在对照组加入等体积的培养基,每组设置5个复孔。孵育

箱中培养24 h, 各孔加入10 μL CCK8试剂, 于培养箱中孵育2 h, 酶标仪测定450 nm处的吸光度(D)值, 根据公式计算细胞活力。

1.2.3 DCFH-DA法检测HUVECs内ROS的水平 以1.00 mmol/L的氰酸盐负荷HUVECs 24 h, 按照ROS检测试剂盒说明书操作, 弃去旧培养液, 加入适当体积的工作浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA的培养基, 于6孔板中每孔加入稀释后的DCFH-DA 1 mL即可。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, 每3~5 min摇晃孔板1次, 之后用PBS液洗3次, 洗净孔板里未进入细胞内的DCFH-DA。最后于荧光显微镜下观察DCFH的荧光强度。

1.2.4 NO水平测定 选取1.00 mmol/L的氰酸盐作用内皮细胞24 h, 收集细胞培养液, 按NO检测试剂盒说明书操作, 设置空白、标准孔, 每组设置3个复孔, 酶标仪检测波长为550 nm处的吸光度(D)值, 根据公式计算NO水平。

1.2.5 细胞免疫荧光技术检测ICAM-1和eNOS的荧光强度 细胞经1.00 mmol/L氰酸盐负荷24 h后, PBS清洗盖玻片上的细胞3次, 每次5 min; 4%多聚甲醛室温固定15 min; PBS洗3次, 每次5 min; 之后室温下封闭30 min(封闭缓冲液: 4%山羊血清、0.2% Triton X-100的PBS液); 随后, 以稀释的一抗(对照组用PBS代替)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日PBS洗涤3次, 每次5 min; 滴加荧光二抗(1:150), 于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1 h, PBS洗涤, DAPI染核5 min, PBS充分洗涤后, 用防淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 Western blot检测ICAM-1和eNOS蛋白质水平 培养的HUVECs加入1.00 mmol/L氰酸盐作用24 h或48 h后收集细胞。加入适量细胞裂解液冰上裂解30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心15 min, 上清液即为细胞总蛋白, BCA法检测蛋白质浓度。通过10% SDS-PAGE进行蛋白质分离, 电泳结束后将蛋白质电转至PVDF膜上, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% BSA封闭2 h, 一抗(均为1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12~24 h。次日TBST洗膜3次, 每次10 min, 加入二抗(均为1:10 000)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, TBST常温洗膜3次, 每次15 min。ECL显色液显色, Image Lab Tool仪器曝光。Image Lab Tool分析软件对目的条带进行灰度值分析。

1.2.7 统计学分析 采用SPSS 20.0软件系统进行统计分析处理相应的实验数据。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两样本均数的比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$, 表示统计具有显著性差异; $P<0.01$,

则表示具有极显著差异。

2 结果

2.1 不同浓度氰酸盐对HUVECs活力的影响

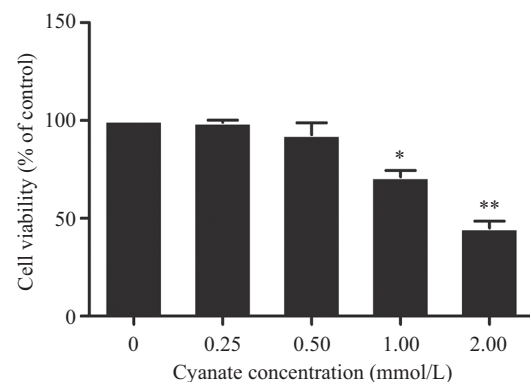
为了明确氰酸盐对细胞活力的影响, 采用CCK8法检测不同浓度氰酸盐负荷内皮细胞24 h后的活力。结果显示, 随着氰酸盐浓度的不断升高, 细胞活力呈逐渐下降的趋势, 当氰酸盐的浓度达到1.00 mmol/L时, 细胞活力受到抑制($P<0.05$), 并随浓度增加到2.00 mmol/L而受到显著抑制($P<0.01$)(图1)。

2.2 氰酸盐诱导HUVECs内ROS的产生

利用荧光探针DCFH-DA对细胞内ROS进行检测。为了排除渗透压对细胞造成的影响, 选用同等浓度的甘露醇作为阴性对照, 与氰酸盐作用内皮细胞相同时间(24 h)后, 荧光结果显示, 正常组和对照组中仅可见微弱的绿色荧光, 无显著差别; 氰酸盐组的绿色荧光明显强于正常组和对照组($P<0.05$)。此结果提示, 氰酸盐诱导HUVECs ROS产生, 排除了渗透压的影响(图2)。

2.3 氰酸盐对HUVECs内NO水平影响

实验组用0、0.5、1.00和2.00 mmol/L氰酸盐作用内皮细胞24 h, 对照组换新培养液正常孵育, 待到时间后, 收集细胞培养液, 检测两组HUVECs产生的NO水平的变化。结果显示, 与对照组相比, 1.00 mmol/L氰酸盐作用内皮细胞后NO水平较对照组明显降低($P<0.05$)(图3)。

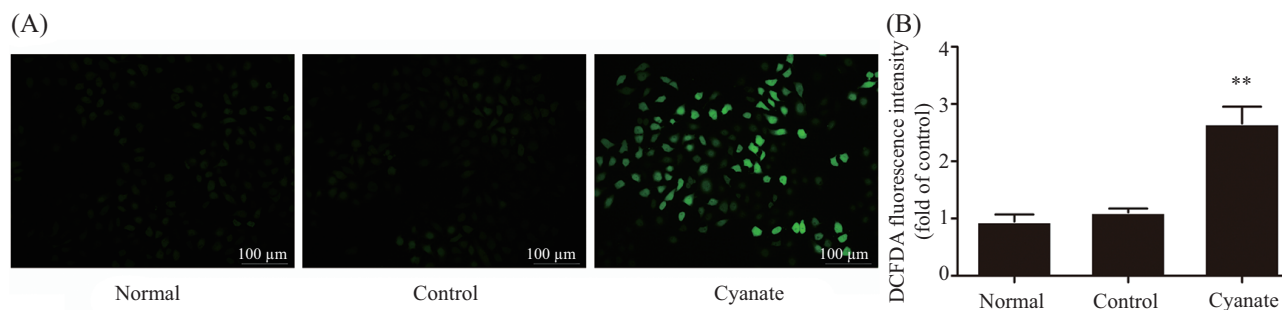


不同剂量氰酸盐作用24 h后HUVECs的活力, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 分别与对照组相比较。

Cell viability after cyanate treatment for 24 h, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图1 氰酸盐对HUVECs细胞活力的影响

Fig.1 Effects of cyanate on HUVECs cell viability

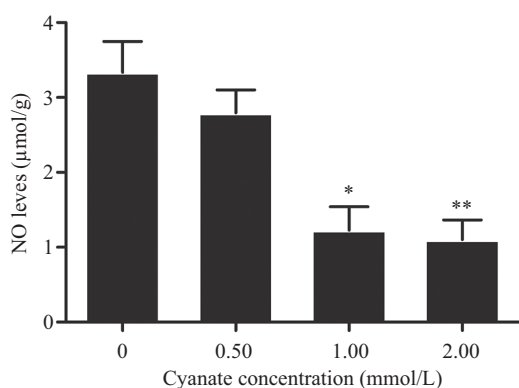


A: HUVECs细胞的DCFDA染色的荧光表现; B: DCFDA染色的定量分析。 ** $P < 0.01$, 与对照组相比较。

A: HUVEC cell with DCFDA staining; B: quantity analysis of intensity of the DCFDA staining. ** $P < 0.01$ compared with control group.

图2 氰酸盐诱导HUVECs ROS产生

Fig.2 ROS production in HUVECs induced by cyanate



不同剂量氰酸盐作用24 h后HUVECs内NO水平, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比较。

NO levels after cyanate treatment for 24 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图3 氰酸盐对HUVECs中NO水平的影响

Fig.3 Effects of cyanate on NO content in HUVECs

2.4 氰酸盐对HUVECs中ICAM-1及eNOS蛋白质水平的影响

待HUVECs生长至80%汇合时,以0.25%胰蛋白酶消化细胞,加入铺有10 mm×10 mm盖玻片的24孔板,培养24 h后,以1.00 mmol/L的氰酸盐作用内皮细胞24 h,检测ICAM-1和eNOS的荧光强度。结果显示,ICAM-1和eNOS在细胞内的表达呈特异性的绿色荧光,而胞核被DAPI染成蓝色荧光。正常组细胞中ICAM-1的绿色荧光微弱,氰酸盐组细胞中ICAM-1的绿色荧光明显强于正常组;而eNOS的水平正相反,氰酸盐组细胞中eNOS的绿色荧光较正常组弱。这提示,氰酸盐能诱导HUVECs炎症因子产生和内皮舒缩功能障碍($P < 0.05$)(图4)。

2.5 氰酸盐负荷HUVECs后ICAM-1和eNOS蛋白质水平

根据CCK8实验,以0、0.50、1.00和2.00 mmol/L

的氰酸盐负荷内皮细胞24 h后收集细胞。同时,时间梯度组以1.00 mmol/L氰酸盐负荷细胞0、24和48 h后收集细胞。Western blot结果显示,随着氰酸盐浓度的升高和负荷时间的延长,ICAM-1蛋白质水平上调,而eNOS蛋白质水平下调($P < 0.05$)(图5)。

3 讨论

氰酸盐是尿素在体内的水解产物,正常人体内尿素水平低,产生的氰酸盐含量微乎其微,由其产生的氨甲酰化作用可忽略不计;但ESRD患者血浆尿素水平明显升高,氰酸盐浓度显著增加,产生大量氨基甲酰化产物积聚体内,促进AS的发展^[12]。研究表明,氨基甲酰化白蛋白、氨基甲酰化低密度脂蛋白可通过诱导泡沫细胞形成、血管平滑肌增殖等促进血管炎性反应的发生,从而介导AS的发展^[13-14]。然而,最近也有研究发现,氰酸盐可在早期直接抑制人冠状动脉内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白质的表达,是诱导内皮功能障碍的主要因素,但机制尚未阐明^[11]。

众所周知,eNOS表达下调所致的内皮功能障碍与AS的发生、发展密切相关^[11]。eNOS是一种同二聚体,由还原酶区、氧化酶区及钙调蛋白结合序列共同构成,表达于血管内皮细胞,催化精氨酸合成NO,维持血管的生理功能^[15-16]。同时,eNOS还是内皮功能完整的标志之一,其合成的NO能够起到保持内皮细胞表面完整、抗血管增殖、白细胞黏附及防止血栓形成等作用^[16]。尽管Dalia等^[11]证实了氰酸盐对血管内皮细胞的直接作用,但其未检测NO的浓度及引起eNOS蛋白质表达下调的原因。本研究采用氰酸盐作用于HUVECs,不仅检测到eNOS水平下调,并且也观察到NO水平明显降低,证实了氰酸盐对内

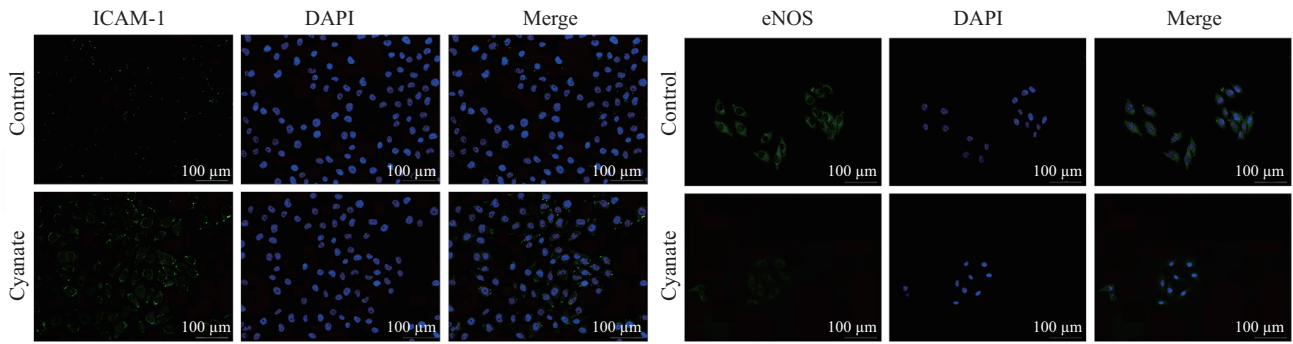
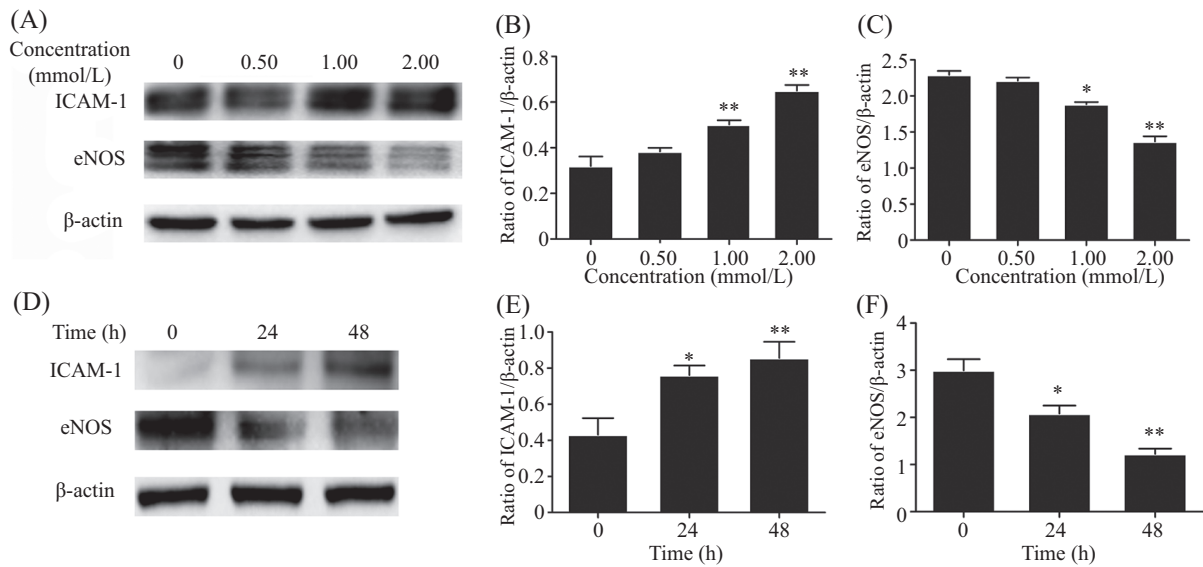


图4 氰酸盐诱导HUVECs中ICAM-1、eNOS蛋白质水平的影响

Fig.4 Effects of cyanate on levels of ICAM-1, eNOS proteins in HUVECs



A: 不同浓度氰酸盐作用HUVECs 24 h后ICAM-1、eNOS水平; B: 不同浓度作用后ICAM-1条带的半定量分析; C: 不同浓度作用后eNOS条带的半定量分析; D: 1.00 mmol/L氰酸盐作用HUVECs 0、24、48 h后ICAM-1、eNOS水平; E: 作用不同时间后ICAM-1条带的半定量分析; F: 作用不同时间后eNOS条带的半定量分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 分别与对照组进行比较。

A: HUVECs were treated with increasing concentrations of cyanate for 24h, and levels of ICAM-1, eNOS; B: semi-quantitative analysis of ICAM-1 at different concentrations; C: semi-quantitative analysis of eNOS at different concentrations; D: HUVECs were treated with 1.00 mmol/L cyanate for 0, 24, 48 h, and the levels of ICAM-1, eNOS; E: semi-quantitative analysis of ICAM-1 at different times; F: semi-quantitative analysis of eNOS at different times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图5 氰酸盐对人脐静脉内皮细胞中ICAM-1、eNOS蛋白质水平的影响

Fig.5 Effects of cyanate on ICAM-1 and eNOS protein levels in HUVECs

皮细胞功能的影响。

细胞间黏附分子-1(ICAM-1)是一种位于内皮细胞表面的跨膜单链糖蛋白,能够与LFA-1、Mac-1等结合,介导多种炎症细胞黏附于内皮细胞表面,促进炎症细胞转移至炎症部位参与炎症反应。AS发展的一个关键环节是白细胞与血管内皮的黏附,这一过程由多种细胞黏附因子例如ICAM-1、血管细胞黏附分子-1和E-选凝蛋白(E-selectin)表达在活化的血管内皮细胞表面来完成^[17-18]。研究显示,在ESRD患者体内血清中的高ICAM-1水平与AS的发生有着

直接关系^[19]。既然氰酸盐可直接作用于血管内皮细胞影响eNOS蛋白质水平,那么其是否可以诱导ICAM-1蛋白质的产生是值得探讨的问题。本研究检测到,氰酸盐可直接诱导血管内皮细胞中ICAM-1蛋白质水平上调,进一步证实了氰酸盐对内皮细胞炎症发生的影响。

众所周知,氧化应激是吸烟、饮酒、炎症等引起AS发生、发展的共同病理基础;那么氰酸盐对血管内皮功能及炎症因子产生的影响是否与氧化应激相关,是目前研究需要阐明的问题。本实验采用荧

光探针DCFH-DA检测细胞内的ROS水平,观察到氰酸盐作用HUVECs 24 h后,细胞内ROS大量产生,证实氰酸盐可以诱导血管内皮细胞氧化应激发生。研究发现,导致内皮功能紊乱的根本原因是氧化应激和eNOS脱偶联,氧化应激产生的ROS通过与NO、eNOS组成成分反应导致其结构变化从而影响eNOS构像,导致eNOS不能生成NO,转而产生O₂⁻,造成NO的生物利用度下降和增加氧化应激的发生,进一步加重内皮功能障碍^[20-21]。本研究观察到,氧化应激发生后24 h甚至48 h后eNOS蛋白质水平受到抑制,与国外文献报道一致^[11]。有文献报道,氧化应激通过促进各种炎症相关转录因子如核因子κB、活化蛋白-1、p53等的转录,从而产生各种炎性介质诱导细胞炎症发生^[22]。本研究也观察到,氧化应激发生后24 h甚至48 h后ICAM-1水平呈持续上升趋势,提示氰酸盐诱导内皮细胞氧化应激与炎症因子产生密切相关。由此可见,氰酸盐可通过氧化应激诱导血管内皮细胞的功能障碍和炎症发生,二者相互作用,进一步促进了AS的发生、发展,但氰酸盐诱导氧化应激的具体机制有待进一步阐明。

参考文献 (References)

- 1 Hee YK, Tae-Hyun Y, Yuri H, Ga HL, Bonah K, Jiyeon Jang, *et al.* Indoxyl sulfate (IS)-mediated immune dysfunction provokes endothelial damage in patients with end-stage renal disease (ESRD). *Sci Rep* 2017; 7(1): 3057.
- 2 Fellstrom BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, *et al.* Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2009; 360(14): 1395-407.
- 3 Lau WL, Vaziri ND. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. *Clin Sci* 2017; 131(1): 3-12.
- 4 Bassenge E, Schneider HT, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular diseases. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130(50): 2904-9.
- 5 El-Gamal D, Rao SP, Holzer M, Hallström S, Haybaeck J, Gauster M, *et al.* The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2014; 86(5): 923-31.
- 6 Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(12): 2747-52.
- 7 Koeth RA, Kalantar-Zadeh K, Wang Z, Fu X, Tang WH, Hazen SL. Protein carbamylation predicts mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(5): 853-61.
- 8 Sun JT, Yang K, Mao JY, Shen WF, Lu L, Wu QH, *et al.* Cyanate-impaired angiogenesis: association with poor coronary collateral growth in patients with stable angina and chronic total occlusion. *J Am Heart Assoc* 2016; 5(12): e004700.
- 9 Bassenge E, Schneider HT, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular diseases. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130(50): 2904-9.
- 10 何菲, 樊春华, 郭珮, 王宏凯, 周宏宇, 陈益, 等. PKCβ/p66Shc介导高尿素引起的人脐静脉内皮细胞ROS的产生. *中国组织化学与细胞化学杂志*(He Fei, Fan Chunhua, Guo Pei, Wang Hongkai, Zhou Hongyu, Chen Yi, *et al.* PKCβ/p66Shc pathway mediates the production of ROS induced by high concentration urea in human umbilical vein endothelial cells. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*) 2016; 25(5): 385-91.
- 11 Dalia EG, Shailaja PR, Michael H, Seth H, Johannes H, Martin G, *et al.* The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2014; 86(5): 923-31.
- 12 Fellstrom BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, *et al.* Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2009; 360(14): 1395-407.
- 13 Gross ML, Piecha G, Bierhaus A, Hanke W, Henle T, Schirmer P, *et al.* Glycated and carbamylated albumin is more "nephrotoxic" than unmodified albumin in the amphibian kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(3): 476-85.
- 14 Apostolov EO, Shah SV, Ray D, Basnakian AG. Scavenger receptors of endothelial cells mediate the uptake and cellular proatherogenic effects of carbamylated LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(10): 1622-30.
- 15 Masano T, Kawashima S, Toh R, Satomi-Kobayashi S, Shinohara M, Takaya T, *et al.* Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats: the possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Circ J* 2008; 72(9): 1512-9.
- 16 Monti M, Solito R, Puccetti L, Pasotti L, Roggeri R, Monzani E, *et al.* Protective effects of novel metal-nonoates on the cellular components of the vascular system. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 351(3): 500-9.
- 17 Hadad N, Tuval L, Elgazar-Carmom V, Levy R, Levy R. Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A2α via both NF-κB and CREB transcription factors. *J Immunol* 2011; 186(3): 1816-27.
- 18 Apostolov EO, Shah SV, Ok E, Basnakian AG. Carbamylated low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial cells through intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(4): 826-32.
- 19 Suliman ME, Qureshi AR, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P. Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: a predictor of outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(6): 1603-10.
- 20 Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 2003; 37(2): 121-7.
- 21 Zou MH, Shi CM, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 2002; 109(6): 817-26.
- 22 Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121(11): 2373-80.