

白皮杉醇苷在大鼠体内外的葡萄糖醛酸结合代谢研究

张靖悦, 刘 卉, 郝盛源, 李方悦, 许 卉*

烟台大学药学院, 烟台 264005

摘要:白皮杉醇苷(PG)是藏边大黄中一种天然抗氧化剂,前期研究发现其极易发生代谢。本文主要研究 PG 在大鼠体内外的葡萄糖醛酸结合代谢特征。SD 大鼠经尾静脉注射给予 PG(20 mg/kg),采集给药后胆汁样品,采用 LC-MS 对主要代谢产物进行结构推测。在此基础上,研究大鼠肝微粒体体外温孵体系中 PG 的葡萄糖醛酸结合代谢,并测定酶促反应动力学参数。实验结果显示 SD 大鼠经尾静脉注射给予 PG,可在胆汁中快速检测到多种 PG 及其衍生物的葡萄糖醛酸结合代谢产物。在大鼠肝微粒体体外温孵体系中,PG 代谢生成两个与体内一致的单葡萄糖醛酸结合代谢物,其葡萄糖醛酸结合代谢的最大反应速率(V_{max})、米氏常数(K_m)和肝内清除率 CL_{int} (V_{max}/K_m)分别为 10.11 nmol/(min·mg)、0.36 mmol/L 和 0.028 mL/(min·mg)。PG 经静脉途径进入大鼠体内可经肝脏被快速地广泛代谢,葡萄糖醛酸结合代谢是其体内消除的主要途径之一。大鼠肝脏的葡萄糖醛酸转移酶对 PG 有较强的亲和力,可催化 PG 发生快速的葡萄糖醛酸结合代谢。

关键词:白皮杉醇苷;葡萄糖醛酸结合;大鼠胆汁;肝微粒体;代谢动力学

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.05.008

In vivo and in vitro Glucuronidation Metabolism of Piceatannol Glucopyranoside in Rat

ZHANG Jing-yue, LIU Hui, HAO Sheng-yuan, LI Fang-yue, XU Hui*

School of Pharmacy, Yantai University, Shandong Yantai 264005, China

Abstract: Piceatannol-4'-O- β -D-glucopyranoside (PG), a natural antioxidant abundant in *Rheum emodi* Wall, was found to be an easily metabolized substrate. The present study was aimed to study glucuronidation of PG in rat *in vivo* and *in vitro*. Rat bile samples were collected after a single intravenous bolus injection of PG at dose of 20 mg/kg. The metabolic profiling was performed using LC-MS, and the principal glucuronide metabolites were deduced. Then *in vitro* glucuronidation was investigated in rat liver microsomes, and the kinetic properties were determined. The results showed that PG can be quickly metabolized to glucuronide metabolites after intravenous administration in rat. In the *in vitro* co-incubation system containing PG and rat liver microsomes, two main mono-glucuronide metabolites of PG were observed, and the metabolic profile was found to be similar to that *in vivo*. The maximum reaction rate (V_{max}) of glucuronidation was 10.11 nmol/(min·mg), Michaelis-Menten constant (K_m) was 0.36 mmol/L, and liver clearance (CL_{int}) was 0.028 mL/(min·mg), respectively. All the findings indicated that UGTs in rat liver have fairly high affinity with PG and were responsible for the rapid glucuronidation of PG, which was one of the main elimination pathways of PG in rat.

Key words: piceatannol-4'-O- β -D-glucopyranoside; glucuronidation; rat bile; liver microsomes; metabolic kinetics

白皮杉醇(反式-3,5,3',4'-四羟基芪,PE)是天然抗氧化剂白藜芦醇的3'-羟基衍生物,在自然界中以苷的形式广泛存在于多种植物中^[1,2]。研究发现,在野生资源丰富的大黄类藏药藏边大黄(*Rheum emodi* Wall.)中,白皮杉醇的4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(白皮杉醇苷,PG)含量高达7.5%以上,是其中含量最高的芪类成分^[3,4],并具有显著的抗氧化活

性^[5,6],为藏边大黄多种以抗氧化为基础药效作用的重要功效成分之一。近年来,针对PG作为天然抗氧化剂候选药物的深入研发备受关注。

ADME特性是影响新药发现和开发成败的关键因素。我们在前期实验研究^[7]中发现,PG在大鼠体内的口服生物利用度不足1%;经静脉注射途径给予大鼠PG,在给药15 min内即可在胆汁中发现多种代谢产物,并在相当长的时间内维持较高水平,但PG原型药物经胆汁和尿排泄的量都很低(<5%)。

基于 LC-MS 的定性分析研究进一步发现,其中多种代谢产物为 PG 或其衍生物的葡萄糖醛酸结合物。这一研究结果提示,与白藜芦醇等天然芪类化合物相似^[8,9],PG 在体内可能经肝脏被快速地广泛代谢,葡萄糖醛酸结合代谢则可能是其体内消除的重要途径之一。本文在课题组前期研究基础上,首次针对 PG 在大鼠体内外的葡萄糖醛酸结合代谢特征进行系统的探索分析,以期深入了解这一活性天然产物的体内代谢过程和后续研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

PG 由本实验室从藏边大黄药材中经分离、纯化制得,HPLC 纯度 >98%,其化学结构经 NMR 测试数据与文献^[10]对照确证;对硝基苯酚(4-NP,批号:20090710,天津市科密欧化学试剂有限公司);对硝基苯酚- β -葡萄糖醛酸苷(4-NPG,批号:035K3796V)、尿苷-二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA,批号:SLBC9398V)购自 Sigma 公司;其他试剂和溶剂均为市售分析纯或色谱纯。

1.2 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括在线脱气机、二元高压泵、自动进样器和 VWD 检测器;Thermo TSQ Quantum Access 三重四级杆串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific Inc.),包括电喷雾离子源,串连四级杆质谱检测器和 Xcalibur 色谱工作站。

1.3 动物

健康 SD 大鼠,雄性,体重(220 \pm 20)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2012-0001。

1.4 方法

1.4.1 大鼠胆汁样品采集与处理

大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后做胆管插管手术,结扎固定,收集一定体积空白胆汁后,经尾静脉注射给予 PG(20 mg/kg),按一定时间间隔收集含药胆汁样品。取胆汁样品 100 μ L,加 10 μ L 5% 甲酸水,涡旋混匀后加 3 mL 乙酸乙酯-正丁醇(5:1, *v/v*)混合溶剂,继续涡旋 5 min,离心(8000 rpm)10 min,取上清,40 $^{\circ}$ C 水浴下氮气吹干,残渣以 100 μ L 流动相复溶,离心(12000 rpm)10 min,取上清,进行 HPLC-UV 及 LC-MS 分析。

1.4.2 大鼠肝微粒体制备与表征

大鼠于实验前禁食 12 h,自由饮水。断头处死后,迅速取出肝脏,称重,剪碎,置冰水浴中,加入适量蔗糖溶液(0.25 mol/L),混匀,4 $^{\circ}$ C 下离心(11500 rpm)20 min 得肝 S9 组分,经进一步的钙沉淀法制备肝细胞液和肝微粒体^[11],于 -80 $^{\circ}$ C 下分装保存,备用。考马斯亮蓝染色法测定所制肝微粒体的蛋白浓度为(12.8 \pm 0.16) mg/mL($n = 6$);肝微粒体 UGTs 酶活力以 HPLC-UV 法测定 4-NP 葡萄糖醛酸结合代谢物 4-NPG 生成速率表征^[12],结果为(9.68 \pm 0.09) nmol/(min(mg)($n = 6$))。

1.4.3 肝微粒体体外温孵代谢^[13,14]

孵育体系含 2 mmol/L MgCl₂、适量 UDPGA 辅因子和大鼠肝微粒体(含微粒体蛋白 1.2 mg/mL),以磷酸盐缓冲液(pH 7.4,0.1 mol/L)调节总体积至 400 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中振荡预孵育 2 min,加入 PG 溶液 10 μ L,继续孵育一定时间后,加 10% 甲酸水溶液 100 μ L 终止反应,按 1.4.1 项下方法进行萃取处理,待测。

1.4.4 色谱与质谱条件

色谱条件:Diamonsil C¹⁸ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m),流动相:乙腈-水(含 0.1% 甲酸)20:80 (*v/v*),流速 1.0 mL/min、柱温 30 $^{\circ}$ C、检测波长 320 nm、进样量 20 μ L;质谱条件:进样方式:分流进样(分流比为 3:1),电喷雾(ESI)离子源,负离子(Negative)方式检测,扫描范围质核比(m/z)100-1000,气动辅助电喷雾离子化,喷雾电压 3.5 kV,毛细管温度 350 $^{\circ}$ C,鞘气压力 30 psi,辅助气压力 5 bar,碰撞气(氦气)、鞘气(氮气)流速 0.75 L/min,辅助气(氮气)流速 0.15 L/min。

1.4.5 数据处理

以底物消除法测定酶促代谢反应速率,分别绘制 Michaelis - Menten 曲线和 Lineweaver - Buck 双倒数曲线,据此进一步计算得 PG 在大鼠肝微粒体中葡萄糖醛酸结合代谢的动力学参数,包括最大反应速度 V_{\max} (方程截距的倒数)、米氏常数 K_m (方程斜率与截距的比值)和肝内消除率 $CL_{\text{int}}(V_{\max}/K_m)$ 。

2 实验结果

2.1 PG 在大鼠体内外葡萄糖醛酸结合代谢及其一致性分析

2.1.1 大鼠胆汁中 PG 葡萄糖醛酸结合代谢产物分析

在 PG 的最大 UV 吸收波长(320 nm)下分别对

大鼠空白胆汁、加标的空白胆汁以及给药后的胆汁样品进行 HPLC-UV 测定,结果如图 1(A、B、C)所示。在分析条件下,大鼠胆汁中内源性物质几乎不出峰(图 1-A),不干扰对 PG 的检测(图 1-B),但在 i. v. 给药 15 min 后的大鼠胆汁样品色谱图(图 1-C)中明显可见 PG 和多个峰面积显著高于 PG 的非内源性物质色谱峰。进一步的 LC-MS 分析结果(图 2)显示,色谱保留时间分别为 4.53 min 和 5.48 min 的 M1、M2 m/z ($[M-H]^-$) 均为 581 Da,较原形药物 PG 的 m/z ($[M-H]^-$) 405 Da 增加了 176 Da,推测为 PG 分子结构中不同位置上羟基的单葡萄糖醛酸结合物;M3 为 8.65 min 处的色谱峰,其 m/z ($[M-H]^-$) 为 433 Da,较 PG 苷元 PE 的 m/z ($[M-H]^-$) 243 Da 增加了 190 Da (14 + 176 Da),推测 M3 可能为 PG 在体内水解为苷元 PE 后,其分子结构中两个羟基分别结合一个甲基和一个葡萄糖醛酸的代谢产物。

2.1.2 PG 在大鼠肝微粒体中的葡萄糖醛酸结合代谢

对比不同肝微粒体体外温孵体系的 HPLC-UV 分析结果(图 1-D、E、F),发现 PG 与不含 UDPGA 辅因子的大鼠肝微粒体共孵育时基本没有发生改变,在孵育体系中未出现除 PG 外的非内源性物质色谱峰,表明 PG 在大鼠肝微粒体孵育体系中具有良好的非代谢稳定性。在 PG 与大鼠肝微粒体共孵育 8

min 的体系中,在 PG 色谱峰前增加了两个明显的非内源性物质色谱峰(图 1F),且其色谱峰面积在一定时间内随温孵时间延长逐渐增大,而 PG 的色谱峰面积相应减小。上述研究结果表明,PG 在大鼠肝微粒体体外温孵体系中发生了经 UGTs 介导的代谢转化。进一步针对相同分析条件下的体内外代谢样品 HPLC-UV 谱图(图 1-C、1-F)进行对比分析,发现 PG 在大鼠肝微粒体孵育体系中生成的两个主要代谢产物峰与给药胆汁样品中的单葡萄糖醛酸结合代谢物 M1、M2 色谱保留时间基本一致(t_R 分别为 4.53 min、5.48 min),且 M1 的丰度均高于 M2,表明 PG 在大鼠体内外的葡萄糖醛酸结合代谢具有良好的一致性。

2.2 HPLC-UV 测定大鼠肝微粒体孵育体系中 PG 含量方法的建立与考察

2.2.1 专属性与线性

如图 1 所示,在所建立的 HPLC 分析条件下,大鼠肝微粒体中 PG 的色谱峰型良好,且与其代谢产物及内源性物质均有足够的分离度,表明大鼠肝微粒体中内源性物质不干扰 PG 的测定,所建立 HPLC-UV 方法专属性良好。PG 的色谱峰面积(Y)与肝微粒体中 PG 浓度(X , mmol/L)间线性回归的典型方程为: $Y = 90.05X + 0.014$ ($r = 0.9992$),在 0.05 ~ 0.70 mmol/L 范围内线性关系良好。

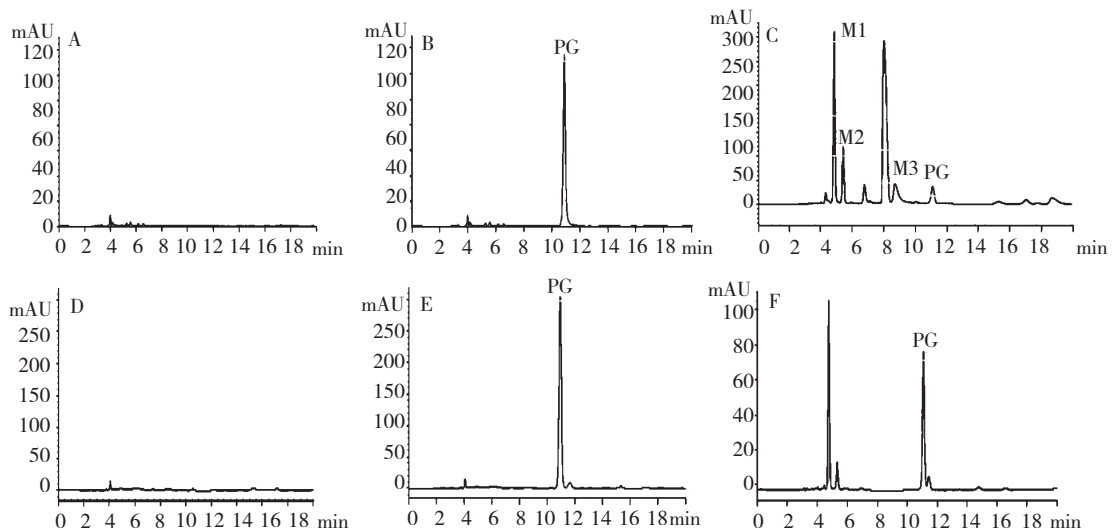


图 1 PG 及其在大鼠体内外代谢产物的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV chromatograms of PG and its metabolites in rat *in vivo* and *in vitro*

注:A. 空白大鼠胆汁;B. 空白大鼠胆汁中加入 PG 标准溶液;C. 给药 15 min 后的大鼠胆汁样品;D. 不加 PG 的大鼠肝微粒体孵育体系空白;E. PG 与不含 UDPGA 辅因子的大鼠肝微粒体共孵育体系;F. PG 与大鼠肝微粒体共孵育 8 min

Note: A: Blank bile; B: Blank bile of rat spiked with PG; C: Bile sample of rat after administration 15 min; D: Blank incubation system of rat liver microsomes without PG; E: PG and rat liver microsomes co-incubation system without UDPGA; F: PG and rat liver microsomes co-incubation system after incubation for 8 min

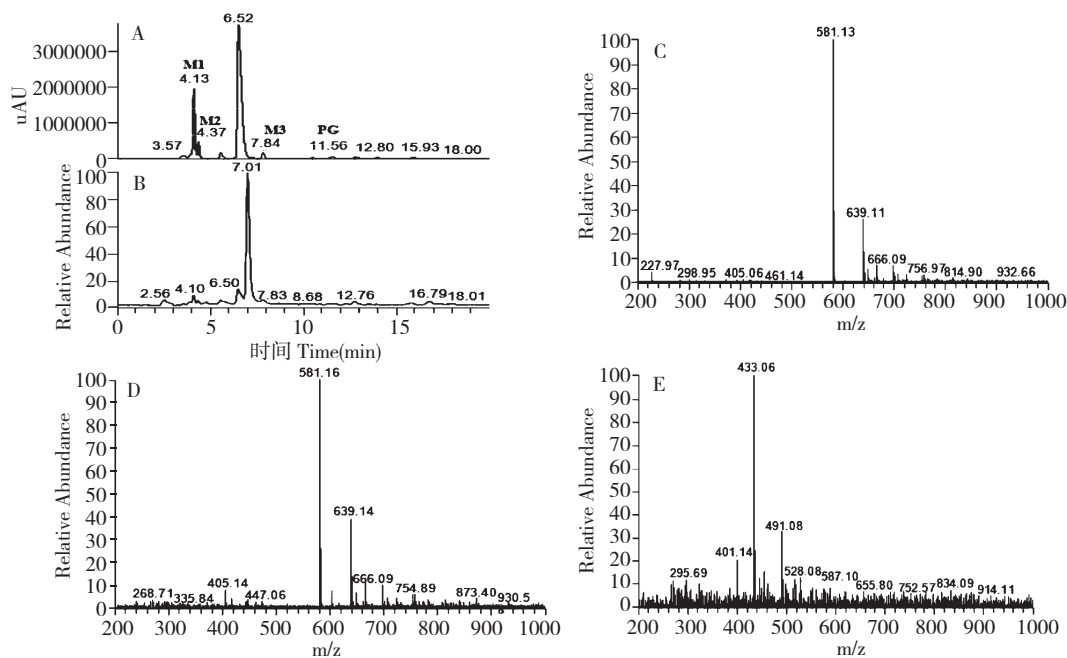


图2 给药 15 min 后大鼠胆汁样品的 HPLC-UV 色谱图(A)、TIC 图(B)及葡萄糖醛酸结合代谢物 M1 (C)、M2 (D)、M3 (E) 的一级质谱图

Fig. 2 HPLC-UV (A) and total ion (B) chromatograms of bile sample of rat after administration 15 min and HPLC-MS spectrum of glucuronide metabolites M1 (C), M2 (D) and M3 (E)

2.2.2 精密度

以灭活大鼠肝微粒体为基质,分别配制含 PG 0.1、0.3、0.6 mmol/L 的低、中、高浓度 QC 样品,按 1.4.3 项下处理后进行 HPLC-UV 分析。分别按照测定方法在 1 d 内每个浓度平行测定 6 个样品,并在 6 d 内重复测定 6 次。根据测定结果,计算得低、中、高三个浓度下肝微粒体中 PG 含量测定的日内精密度 (RSD, $n = 6$) 分别为 3.01%、2.86% 和 3.43%; 日间精密度 (RSD, $n = 6$) 分别为 4.16%、3.37%、3.52%。精密度符合生物样品测定要求。

2.2.3 回收率与准确度

以灭活大鼠肝微粒体为基质,分别配制含 PG 0.1、0.3、0.6 mmol/L 的低、中、高浓度 QC 样品,按 1.4.3 项下处理。同时以空白缓冲液代替肝微粒体基质制备各浓度 QC 样品的对照溶液。根据对各样品的 HPLC-UV 测定结果,计算得低、中、高浓度下 PG 测定的回收率 ($n = 6$) 均在 80% 以上,分别为 (80.5 ± 3.0)%、(89.3 ± 2.1)%、(91.6 ± 1.4)%; 准确度 (相对回收率, $n = 6$) 分别为 (101.5 ± 3.4)%、(100.2 ± 2.5)%、(98.9 ± 2.7)% , 均在 85% ~ 115% 范围内。研究表明,本文所建立的 HPLC-UV 方法符合生物样品测定的准确度要求,适

用于肝微粒体中 PG 含量的测定。

2.3 大鼠肝微粒体中 PG 葡萄糖醛酸结合代谢的酶促反应动力学

2.3.1 时间的影响

设置温孵体系中 PG 的初始浓度为 0.16 mmol/L,肝微粒体蛋白浓度为 1.2 mg/mL,在 37 °C 水浴中振荡温孵,分别于 1、3、5、8、10、15、20 min 取样,按 1.4.3 项下方法处理后测定 PG 浓度。如图 3-A 所示,在温孵 1 ~ 8 min 内 PG 基本呈线性消除 ($r = 0.9986$),此后代谢消除迅速减缓,至 20 min 达到最大反应速度。

2.3.2 UDPGA 供体浓度的影响

设置温孵体系中 PG 的初始浓度为 0.16 mmol/L,肝微粒体蛋白浓度为 1.2 mg/mL,UDPGA 的浓度分别为 0.6、1.25、1.5、2、2.5、3 mmol/L,温孵 8 min 后取样,按 1.4.3 项下方法处理后测定 PG 浓度。如图 3-B 所示,在 UDPGA 供体浓度在 0.25 ~ 2.5 mmol/L 范围时 PG 基本呈线性消除 ($r = 0.9912$),此后代谢消除逐渐减缓,至 3 mmol/L 达到最大反应速度。

2.3.3 底物浓度对代谢速率的影响

设置温孵体系中肝微粒体蛋白浓度为 1.2 mg/

mL, UDPGA 供体浓度为 2.5 mmol/L, 在 0.1 ~ 0.6 mmol/L 范围内改变底物 PG 的初始浓度, 温孵时间 8 min 后取样, 按 1.4.3 项下方法处理后测定 PG 浓度。如图 4-A 所示, 在 0.1 ~ 0.6 mmol/L 底物浓度范围内, PG 的代谢反应速率随底物浓度增加而增加, 此后, 不再随底物浓度增大继续增加, 表明孵育体系中代谢酶与底物的结合已趋饱和状态。

根据孵育体系中的肝微粒体蛋白浓度以及反应

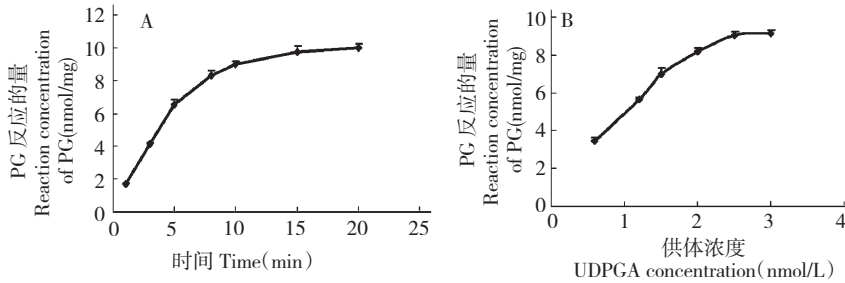


图 3 在大鼠肝微粒体孵育体系中, 孵育时间 (A) 和 UDPGA 浓度 (B) 对 PG 代谢的影响

Fig. 3 Effect of incubation time (A) and concentration of UDPGA (B) on metabolism of PG in the incubation system of rat liver microsomes

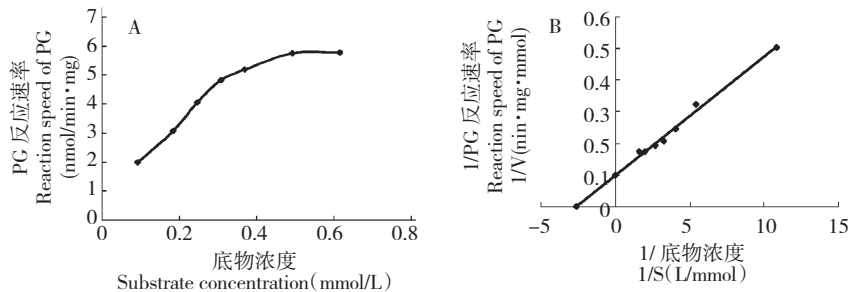


图 4 大鼠肝微粒体孵育体系中 PG 葡萄糖醛酸结合代谢的米氏动力学曲线 (A) 和双倒数曲线 (B)

Fig. 4 Michaelis-Menten kinetic curve (A) and Lineweaver-Buck double reciprocal curve (B) of glucuronidation of PG in the incubation system of rat liver microsomes

3 讨论

PG 是藏边大黄中含量最高的芪类成分, 具有显著的抗氧化活性, 近年来作为天然抗氧化剂候选药物被广泛关注。本文在前期研究基础上, 首次通过 HPLC-UV 和 LC-MS 分析研究了 PG 在大鼠体内外的葡萄糖醛酸结合代谢。结果发现, 经静脉注射途径进入大鼠体内的 PG 会经肝脏快速代谢生成多种葡萄糖醛酸结合物, 其中以羟基的单葡萄糖醛酸结合产物为主; 在大鼠肝微粒体体外温孵体系中, PG 经 UGTs 介导发生快速的葡萄糖醛酸结合代谢, 主要生成两个在结构和丰度上均与体内一致的单葡萄糖醛酸代谢物, 表明 PG 的葡萄糖醛酸结合代谢具

时间, 计算酶促反应速率, 分别绘制 Michaelis - Menten 曲线和 Lineweaver - Buck 双倒数曲线如图 4-A、B 所示。进一步计算得 PG 在大鼠肝微粒体中葡萄糖醛酸结合代谢反应的最大反应速率 V_{max} 、米氏常数 K_m 和肝内清除率 $CL_{int} (V_{max}/K_m)$ 分别为 10.11 nmol/(min · mg)、0.36 mmol/L、0.028 mL/(min · mg)。

有较好的体内外一致性。后续可通过体外重组酶实验进一步进行代谢表型的深入研究。

本文研究建立了大鼠肝微粒体中 PG 含量的 HPLC-UV 方法, 经专属性、线性、精密度、回收率与准确度验证项目考察, 表明该方法具有灵敏、准确、快速的特点, 适用于底物消除法研究 PG 在大鼠肝微粒体温孵代谢的反应动力学。在肝微粒体蛋白浓度为 1.2 mg/mL、供体浓度为 2.5 mmol/L 温孵代谢反应 8 min 的大鼠肝微粒体体外温孵体系中, PG 的葡萄糖醛酸结合代谢呈现饱和动力学特征, 其代谢消除符合米氏方程。酶促代谢反应的主要动力学参数 V_{max} 、 K_m 、 $CL_{int} (V_{max}/K_m)$ 分别为 10.11 nmol/(min · mg)、0.36 mmol/L、0.028 mL/(min · mg), 与白

藜芦醇的 K_m 值^[15] 基本一致,表明大鼠肝脏中 UGTs 酶对 PG 具有较强的亲和力,可催化其发生快速的葡萄糖醛酸结合代谢。

参考文献

- Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol; leaving the shadow of resveratrol. *Mutat Res*, 2012, 750: 60-82.
- Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer*, 2002, 86: 774-778.
- Lu JG (卢敬光), Wang S (王曙), Yan XL (严晓梁), et al. Content determination of piceatannol-4'-O- β -D- glucopyranoside in *Rheum emodi* Wall. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2008, 23: 704-705.
- Liu B (刘兵). The quality standard and evaluation study of Rhubarb from *Rheum emodi* Wall. Chengdu: Sichuan University (四川大学), PhD. 2007.
- Rajkumar V, Guha G, Ashok KR. Antioxidant and anti-cancer potentials of *Rheum emodi* rhizome extracts. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011: 697986.
- Chai YY, Wang F, Li YL, et al. Antioxidant activities of stilbenoids from *Rheum emodi* Wall. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 603678.
- Chai YY (柴媛媛). Study on antioxidant activity and pharmacokinetics of piceatannol and its glucoside. Yantai: Yantai University (烟台大学), MSD. 2012.
- Yu C, Shin YG, Chow A, et al. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res*, 2002, 19: 1907-1914.
- Niles RM, Cook CP, Meadows GG, et al. Resveratrol is rapidly metabolized in athymic (nu/nu) mice and does not inhibit human melanoma xenograft tumor growth. *J Nutri*, 2006, 136: 1542-1546.
- Liu B (刘兵), Yang J (杨静), Wang S (王曙). The chemical constituents in rhubarb rhizomes and roots derived from *Rheum emodi* Wall. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2007, 22: 35-37.
- Pekka T, Seppo K. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev*, 1999, 51: 593-628.
- Li YL (李艳丽), Tian HC (田红翠), Zhai WT (翟文婷), et al. Effect of salvianolic acid A on rat hepatic uridine diphosphate glucolactone transferases activity. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm* (中药新药与临床药理), 2013, 24: 558-562.
- Jin XL (金学利), Fang ZZ (房中则), Qu YQ (曲衍清), et al. Study on the glucuronidation of alpinetin in human liver microsomes. *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志), 2011, 27: 847-850.
- Deng QT (邓婧婷), Zhuang XM (庄笑梅), Li H (李桦). *In vitro* comparison of thienorphine metabolism in liver microsomes of human, Beagle dog and rat. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2010, 45: 98-103.
- Tan AP (谭爱萍), Wang LY (王丽岩), Zhao S (赵姗). Metabolic kinetics of trans-resveratrol in human liver microsomal enzyme. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2012, 23: 1449-1451.
- Zhang PX (张鹏霞), Li HM (李鸿梅), Chen D (陈东), et al. Effects of oleanolic acid on apoptosis and cell cycle of HL-60 cells *in vitro*. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2008, 24: 1908-1911.
- Li HY (李宏杨), Liu GM (刘国民), Liu F (刘飞), et al. Research of ursolic acid and similar pentacyclic triterpenoid. *J Hunan Univ Tech* (湖南工业大学学报), 2009, 23: 18-22.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001, 108: 391-397.
- Katusic ZS, Austin SA. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J*, 2013, eht544.

(上接第 792 页)