

秦皮甲素对 AGEs 致损的 ECV304 细胞增殖及氧化应激的影响

李 甘¹, 夏大静^{2*}¹ 楚雄州人民医院输血科, 楚雄 675000; ² 浙江大学公共卫生学院, 杭州 310058

摘要:为研究秦皮甲素对血管内皮细胞的保护作用,采用 CCK-8 法观察秦皮甲素对体外 AGEs 培养的人脐静脉内皮细胞增殖的影响。检测不同浓度 AGEs 以及秦皮甲素作用后对内皮细胞一氧化氮(NO)、不对称二甲基精氨酸(ADMA)水平的影响以及内皮细胞氧化应激有关指标:活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD);脂肪代谢相关指标:乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、总胆固醇(total cholesterol, CHO)、甘油三酯(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),同时分别检测粘附相关因子:血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)和细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达水平。结果显示 200 mg/L AGEs 对人内皮细胞 ECV304 增殖有显著抑制作用,秦皮甲素可对抗 AGEs 导致的内皮细胞增殖抑制,并呈浓度依赖性。在 25 mg/L 时,保护效应达到最高。秦皮甲素可抵抗 ROS 生成。同时可改善细胞的脂类代谢:胆固醇、LDL 以及 TG 含量在秦皮甲素作用后改善明显。秦皮甲素可显著抑制内皮粘附因子 VCAM-1 的表达。秦皮甲素还可上调 NO 水平,下调 ADMA 水平。总之,秦皮甲素可有效促进人血管内皮细胞增殖并在改善氧化应激,脂代谢,粘附因子和 NO 释放等方面发挥作用。

关键词:秦皮甲素;人脐静脉内皮细胞;糖基化终末产物;增殖作用;氧化应激;粘附因子

中图分类号:R931

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)8-1439-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.8.020

Effects of esculin proliferation and oxidative stress of ECV304 cells damaged by AGEs

LI Gan¹, XIA Da-jing^{2*}¹ Department of Blood Transfusion, Chuxiong People's Hospital, Chuxiong, 675000, China;² School of Public Health, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: To explore the protective effects of esculin on vascular endothelial cell line, the effect of esculin on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells cultured *in vitro* by AGEs was evaluated by CCK-8 assay. The effects of different concentrations of AGEs and esculin on the levels of nitric oxide (NO) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial cells were examined. Endothelial cells oxidative stress related indicators were detected, including superoxide dismutase detection (SOD), reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA). Lactic dehydrogenase (LDH), total cholesterol (CHO), triglyceride (TG) and low density lipoprotein (LDL) were also detected. The levels of adhesion-related factors: vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were also evaluated. The result indicated that 200 mg/L AGEs significantly inhibited the proliferation of human endothelial cell ECV304. The esculin could inhibit the proliferation of endothelial cells induced by AGEs, and it was concentration-dependent. At 25 mg/L, the protective effect was the highest. The oxidative stress index ROS results suggested that esculin could resist AGEs-induced ROS production and improve lipid metabolism; cholesterol, LDL and TG levels were significantly improved after the treatment with esculin. The esculin could significantly inhibit the expression of the endothelial adhesion factor VCAM-1. The expression of NO was increased and the level of ADMA was decreased. Esculin could effectively promote the proliferation of human vascular endothelial cell and had potential effects on endothelial cells in improving ROS, lipid metabolism and adhesion factors

收稿日期: 2019-01-31 接受日期: 2019-07-10

基金项目: 浙江大学公共卫生学院卫健专项

* 通信作者 Tel: 86-571-88208284; E-mail: dxia@zju.edu.cn

and NO releasing.

Key words: esculin; human umbilical vein endothelial cells; glycation end products; proliferation; oxidative stress; adhesion factor

糖基化终末代谢产物(AGEs)是葡萄糖与各种蛋白质、核酸或脂质大分子在非酶的条件下形成的糖基化代谢产物,该反应在体内可缓慢进行,随着年龄的增长而逐渐增加,而在糖尿病或尿毒症患者中该反应速度显著加快,形成量明显增多。AGEs可以通过多种机制对全身许多组织及器官产生损害,在糖尿病中研究较多,被认为是糖尿病血管病变的触发因素^[1]。AGEs通过作用于血管内皮细胞,可以使其结构和功能受到影响。有多种阻止AGEs累积与形成的治疗方法,降糖药如二甲双胍^[2]、氨基胍类化合物、ALT 946 吡哆胺(pyridoxamine)等^[3],它们分别可以通过不同途径阻滞AGEs形成,而AGEs裂解剂可以裂解已经形成的AGEs交联结构。有研究表明^[4],AGEs抑制剂以及AGEs交联结构裂解剂,可以从不同的阶段阻断AGEs的形成,特别是AGEs裂解剂能够逆转或软化由AGEs造成的组织、器官以及血管的硬化,有望成为一类新型治疗药物,尤其针对眼底和肾组织的终末血管变化。

秦皮甲素(Esculin)为木犀科植物苦枥白蜡树(*Fraxinus rhynchophylla* Hance)、白蜡树(*Fraxinus chinensis* Roxb.)、尖叶白蜡树(*Fraxinus szaboana* Lingelsh)或宿柱白蜡树(*Fraxinus stylosa* Lingelsh.)等4种干燥枝皮或干皮提取物。最早见于汉代的药学专著《神农本草经》,中国《本草纲目》对该味药的表述为:“秦皮,治目病,惊癇,取其平木也。”同时也有《淮南子》:“秦皮色青,治目之要药也”。现代药理研究表明^[5],秦皮具有抗炎镇痛、降低尿血酸、抗凝、止咳祛痰平喘以及抗肿瘤作用,主要用于治疗肠炎、痢疾、白带、慢性气管炎、结膜炎,用于治疗痛风效果甚佳。秦皮中主要成分为香豆素类(含秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、宿柱白蜡苷、6,7-二甲氧基香豆素等)^[6],此外还有酚类、皂苷和鞣质等。秦皮甲素可以改善链脲菌素(Streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病小鼠的血脂异常、炎症反应、以及肾损伤^[7]。有文献证明AGEs通过损伤内皮细胞可导致内皮细胞功能紊乱,最终引起糖尿病等血管并发症的发生^[8]。基于糖尿病以及终末肾病中AGEs的大量生成及所产生的生物学效应。本实验应用AGEs作用人脐静脉内皮细胞系(ECV304),模拟糖基终末化产物对内皮细胞的损伤,并用秦皮甲

素干预,观察对ECV304增殖和氧化应激指标的影响。考察秦皮甲素对AGEs损伤后内皮细胞功能的研究,探讨其机制是否与抑制糖基化终末产物(AGEs)的生物学活性有关,将有助于进一步阐明秦皮甲素是否存在潜在的血管保护作用,为进一步的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

秦皮甲素,成都曼思特生物科技有限公司(货号:A0020,纯度:HPLC \geq 98%);无水乙醇,北京化学试剂厂;青霉素,华北制药有限公司;链霉素,华北制药有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4),福州迈新生物技术开发有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(货号:20180326)、活性氧(ROS)测定试剂盒(化学荧光法)(批号:20180326)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20180326)、一氧化氮(NO)测定试剂盒(批号:20180326)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号:20180326)、甘油三酯(TG)测定试剂盒(批号:20180326)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)(批号:20180326)、总胆固醇(CHO)测定试剂盒(批号:20180326)均由南京建成生物工程研究所提供;非对称二甲基精氨酸(ADMA)检测试剂盒为美国CUSBIO公司提供(批号:CSB-E09298h);ECV304细胞为宁波医学科学研究所药理学室赠送,经免疫荧光鉴定,eNOS和vWF均为阳性;DMEM培养基, Trypsin,胎牛血清(FBS)均购自Life technology公司;溴乙锭(EB)、CCK-8为Dojindo产品;二甲亚砜购自国药化学试剂有限公司;Trizol试剂购自Invitrogen公司;逆转录及SYBR Green I Real Time PCR试剂购自大连宝生物公司;引物由GENEWIZ(金唯智)合成;血管内皮细胞粘附因子-1(VCAM-1,货号:ab212937)和细胞间粘附因子1(ICAM-1,货号:ab171123)抗体均为Abcam公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 AGEs的制备

参照文献的方法^[9],用冻干牛血清白蛋白和糖制备无内毒素的糖基化修饰的牛血清白蛋白(AGE-BSA)。

1.2.2 细胞培养

ECV304的培养液为含10% FBS的DMEM培

培养基,用0.25%的胰蛋白酶消化传代后,将 ECV304 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内静置培养,2 天换液 1 次。实验所用细胞为第 6~8 代。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期细胞制成单细胞悬液,以 150 μL/孔接种于 96 孔板,细胞数 2 × 10⁴/孔,培养 24 小时后,加入无血清的 DMEM 培养基,再孵育 24 小时使细胞生长同步进入休止期(同步化)。吸弃上清液,每组设置 6 个重复孔,分别加入不同浓度的 AGEs 达到终浓度(0、25、50、100、150、200、250 mg/L),培养 24 小时,CCK-8 法观察不同浓度 AGEs 对 ECV304 增殖的影响。同一水平 6 孔并列,在加入终浓度为 200 mg/L AGEs 的同时分别给予终浓度为 2.5、5、10、15、20、25 mg/L 的秦皮甲素溶液,并设 AGEs 培养组和 DMEM 对照组。在 37 °C 饱和湿度 5% CO₂ 培养箱内培养 48 小时。取出后,每孔加入 16.7 μL CCK-8 溶液,37 °C 孵箱继续培养 4 小时,用酶标仪检测波长 450 nm 时的光密度值[D(450)值]。

1.2.4 氧化应激指标及其相关指标检测

按照试剂盒说明书收集细胞和培养基上清检测相应指标:ROS、MDA、LDH、LDL、CHO、TG。对细胞裂解物中的 SOD 进行检测。

1.2.5 血管粘附分子检测

免疫印迹检测 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达水

平,过程如下:细胞在 AGEs 和秦皮甲素共同孵育 24 小时,使用 RIPA 法裂解,收集细胞裂解液。裂解后,取 3 μL 裂解液用于二喹啉甲酸法(BCA)定量。蛋白样品 95 °C 孵育 10 分钟变性处理,变性后的蛋白-20 °C 保存备用。制备 10% 的 SDS-page 胶,进行电泳分离。蛋白分离后经 200 mA 恒流 1.5 小时电转移到 PVDF 膜后,使用含 5% 脱脂牛奶的封闭液封闭 1 小时,与一抗 4 °C 孵育过夜,次日加入内参抗体 β-actin 室温孵育 1 小时,洗膜后加入含二抗室温作用 1 小时后,TBST 洗膜 3 次,取出膜后加入 ECL 发光液,暗室中压片显影。使用 Image J 软件对条带灰度值进行量化分析,ELISA 法确定样本基本浓度。

1.2.6 RT-qPCR 检测相关基因的表达

收集细胞,参照 Trizol 试剂说明裂解细胞后提取 RNA。引物序列见表 1。实时定量 PCR 25 μL 反应体系由以下成份组成:12.5 μL 2 × Power SYBR Green PCR Master Mix,1.0 μmol/L 上、下游引物,1 μL 逆转录产物,超纯水构成。反应程序为:95 °C 10 分钟;循环反应为 95 °C 8 s,60 °C 40 s,40 个循环,在各循环的 60 °C 40 s 步骤进行荧光检测;最后为融解曲线步骤。每个样品目的基因的表达域值与其内参基因表达域值的差 ΔCt 为其相对表达量。以 2^{-ΔCt} 表示为目的基因在药物处理组的表达量与在正常组表达量的比值。

表 1 实时定量 PCR 检测基因的引物序列

Table 1 Real-time quantitative PCR primer sequences

	引物 Primer	片段位置 Location of gene	登录号 Accession code
ICAM-1 (196 bp)	5'-CTCTCGCTCTGTCACC-3'	3018-3033	NM_000201.2
	5'-GGAAGTCTGGCAATGT-3'	3213-3197	NM_000201.2
VCAM-1 (127 bp)	5'-AAGCAAAGGGAGCACTGGGTTG-3'	2591-2612	NM_080682.1
	5'-TCTGATGAACAACTTCGTGAAAC-3'	2717-2694	NM_080682.1
GAPDH (254 bp)	5'-AACGAATTTGGCTACAGC-3'	1048-1066	NM_002046.3
	5'-AGGGTACTTTATGATGATACAT-3'	1301-1278	NM_002046.3

1.2.7 NO 以及相关指标检测

应用 Griess 法对细胞上清液中 NO 水平进行检测。采用酶联免疫吸附试验对 ADMA 进行检测,操作严格遵循说明书实施。

1.2.8 统计学处理

本研究中实验重复 3 次以上,计量数据以平均值及标准差(mean ± SD)表示,数据结果采用 Prism6.0 统计软件进行处理。组间具有方差齐性时,组间比较使用 t 检验,多组比较采用单因素

ANOVA 分析,方差不齐者采用非参数检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 秦皮甲素对内皮细胞增殖的影响

AGEs 作用 ECV304 细胞 24 小时后,如图 1A 所示,与空白对照组相比,当 AGEs 浓度高于 50 mg/L 时,其存活率显著降低(*P* < 0.05)。由图 1B 可知,不同浓度(2.5、5、10、15、20、25 mg/L)秦皮甲素作用于 AGEs 致 ECV304 损伤的细胞,当秦皮甲素的浓

度高于 15 mg/L 时对 AGEs 致损的 ECV304 细胞有显著的保护作用($P < 0.05$),同时呈现剂量依赖性。

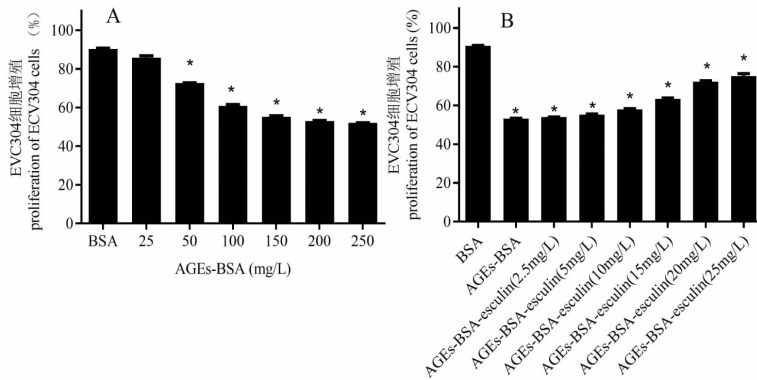


图1 秦皮甲素削弱 AGEs 对 ECV304 细胞抑制效应

Fig. 1 Esculin diminished the inhibitory effect of AGEs on ECV304 cells

注:A:AGEs 对 ECV304 细胞增殖的影响;B:甲素对 AGEs 致 ECV304 损伤影响。* 代表与 BSA 组比较, $P < 0.05$ 。Note:A:the effect of AGEs on the proliferation of ECV304 cells. B:the effect of esculin on AGEs-treated ECV304 cells. * Compared with the control group, $P < 0.05$.

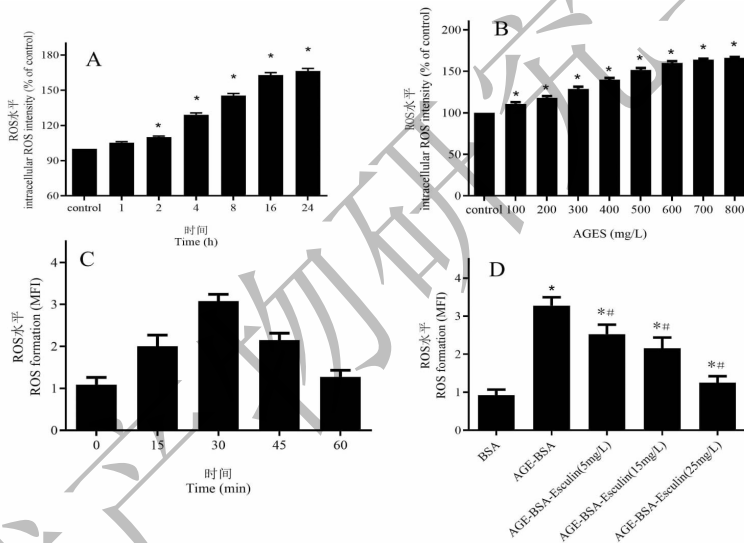


图2 秦皮甲素对 AGEs 诱导 ROS 形成的影响

Fig. 2 Effect of esculin on ROS formation induced by AGEs

注:A:200 mg/L AGEs 作用不同时间细胞内 ROS 的水平;B:不同浓度 AGEs 对细胞内 ROS 的生成的影响;C:秦皮甲素作用不同时间后对 ECV304 细胞内 ROS 生成的影响;D:秦皮甲素对 AGEs 作用后 ECV304 细胞内 ROS 水平的影响。* 代表与 control 组比较, $P < 0.05$ # 代表与 control 组比较, $P < 0.05$ 。Note:A:The level of intracellular ROS at different time after treatment with 200 mg/L AGEs. B:The effect of different concentrations of AGEs on the production of ROS in cells. C:The effect of esculin on ROS production in ECV304 cells at different time. D:The effect of esculin on ROS levels in ECV304 cells after AGEs treatment. * Compared with the control group, $P < 0.05$. # Compared with the AGEs model group, $P < 0.05$.

2.2 秦皮甲素对 AGEs 诱导的活性氧以及相关酶的影响

测定秦皮甲素对 AGEs 致损的 ECV304 细胞中 ROS、SOD、MDA、LDH 等相关指标的影响。在 AGEs 作用下,随着 AGEs 作用时间的增加,细胞内 ROS 的

浓度随之增加,呈现剂量与时间依赖性(如图 2A 和 2B)。细胞中的 ROS 水平在秦皮甲素作用 30 分钟后出现下调趋势(图 2C)。随着秦皮甲素作用浓度增加,ROS 的水平呈现降低的趋势(图 2D),相关酶的表达情况如图 3 所示,可以得出经 AGEs 处理过

的细胞,其 MDA, LDH, CHO, LDL, TG 含量增加, SOD 酶活性降低,与空白对照组比较有显著差异($P < 0.01$);而加入秦皮甲素后可提高 SOD 酶活力,降

低 MDA、LDH、CHO、LDL、TG 含量,与 AGEs 模型组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

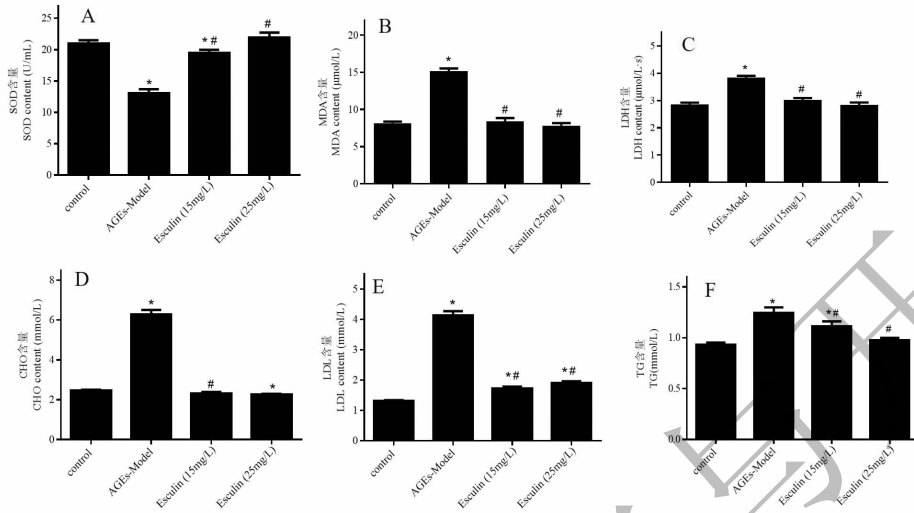


图3 秦皮甲素对氧化应激相关指标的影响

Fig. 3 Effect of esculin on oxidative stress related indicators

注:A:对 SOD 酶活性的影响;B:对 MDA 浓度的影响;C:对 LDH 浓度的影响;D:对 CHO 浓度的影响;E:对 LDL 浓度的影响;F:对 TG 浓度的影响。* 代表与 control 组比较, $P < 0.05$,# 与 AGEs 模型组比较, $P < 0.05$ 。Note:A:Effect of esculin on SOD enzyme activity. B:Effect of esculin on MDA concentration. C:Effect of esculin on LDH concentration. D:Effect of esculin on CHO concentration. E:Effect of esculin on LDL concentration. F:Effect of esculin on TG concentration.* Compared with the control group, $P < 0.05$. # Compared with the AGEs model group, $P < 0.05$.

2.3 AGEs 对血管粘附因子表达的影响

在 AGEs 作用下 VCAM-1 和 ICAM-1 明显增高,只加入秦皮甲素不会导致 VCAM-1 和 ICAM-1 的上升。在添加 AGEs 的培养基中加入秦皮甲素可以发现,VCAM-1 和 ICAM-1 的含量下降,且 VCAM-1 随秦皮甲素浓度增加下调趋势明显,而 ICAM-1 随秦皮甲素加入降低效果不明显,在 15 mg/L 秦皮甲素处理时 ICAM-1 含量高于 AGEs 组。表明秦皮甲素选择性抑制内皮粘附因子的表达。RT-qPCR 检测 VCAM-1 mRNA 和 ICAM-1 mRNA 的表达结果发现,在 AGEs 作用下 VCAM-1 mRNA 和 ICAM-1 mRNA 的表达显著上调,表达量分别是对照组的 5.9 ± 0.2 和 4.4 ± 0.7 倍,在添加 AGEs 的培养基中加入秦皮甲素后可以发现,VCAM-1 mRNA 的表达显著下调,25 mg/L 秦皮甲素处理组的 VCAM-1 mRNA 表达量仅为对照组的 1.4 ± 0.03 倍,ICAM-1 mRNA 随秦皮甲素浓度增加降低效果不明显。

2.4 秦皮甲素对细胞上清液中 NO 和 ADMA 的影响

AGEs(200 mg/L) 处理内皮细胞可显著升高细

胞培养上清液中 ADMA 水平,同时下调 NO 水平。与 AGEs(200 mg/L) 处理组相比较,可以得到秦皮甲素(25 mg/L) 处理组内皮细胞的 ADMA 水平呈现明显的下调,有显著性统计意义($P < 0.05$);而秦皮甲素(25 mg/L) 处理组内皮细胞 NO 水平与 AGEs(200 mg/L) 处理组相比较则明显的升高($P < 0.05$)。

3 结论

研究表明,在糖尿病并发症以及心血管疾病的发生发展中,AGEs 通过与其配体结合,通过多种细胞途径,对内皮细胞造成损伤。在糖尿病并发症过程中具有重要意义^[10]。有不少研究显示,天然植物中存在可抑制 AGEs 形成的活性物质,如 VB6^[11], 梗稻的提取物^[12] 都可一定程度上削弱 AGEs 对血管、肾等器官的损伤,探索抑制 AGEs 的活性物质在糖尿病并发症的防治中有着重要的意义。

在本研究中,通过构建 AGEs 培养的人脐静脉内皮细胞显示,高浓度的 AGEs 可对 ECV304 细胞造成显著的损伤。在 50 mg/L 浓度时,即可对细胞增殖造成影响。有研究显示高浓度的 AGEs 可诱导

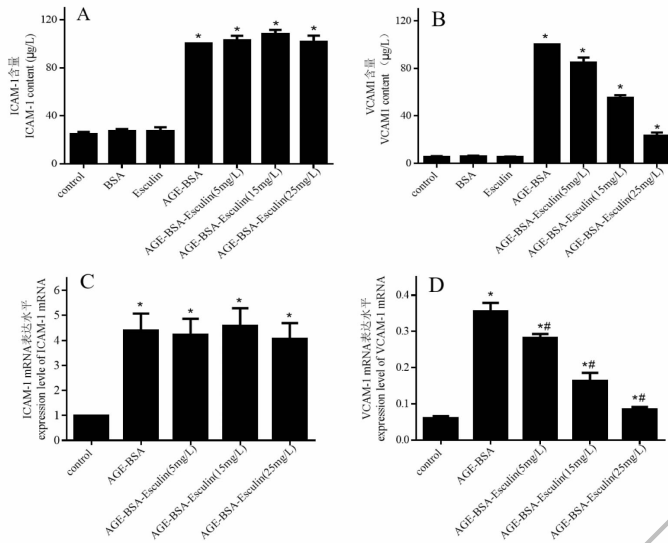


图4 秦皮甲素对血管粘附有关分子表达的影响

Fig. 4 Effect of esculin on expression of vascular adhesion related molecules

注:A:不同处理组 ICAM-1 蛋白的表达水平;B:不同处理组 VCAM-1 蛋白的表达水平;C:不同处理组 ICAM-1 mRNA 的表达水平;D:不同处理组 VCAM-1 mRNA 的表达水平。*代表与 control 组比较, $P < 0.05$,#代表与 AGE-BSA 组比较, $P < 0.05$ 。Note:A:Expression levels of ICAM-1 protein in different treatment groups. B:Expression levels of VCAM-1 protein in different treatment groups. C:Expression levels of ICAM-1 mRNA in different treatment groups. D:Expression levels of VCAM-1 mRNA in different treatment groups. * Compared with the control group, $P < 0.05$. # Compared with the AGE-BSA group, $P < 0.05$.

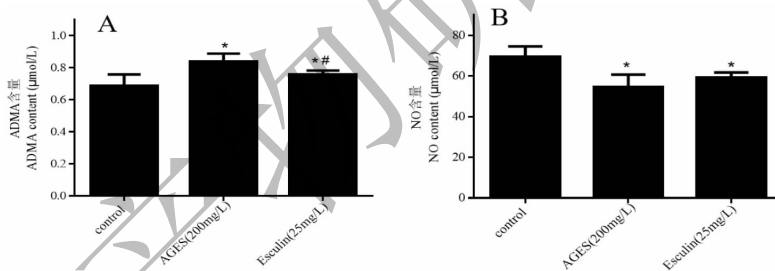


图5 秦皮甲素对 NO 相关通路的影响

Fig. 5 Effect of esculin on NO related pathway

注:A:不同处理组 ADMA 的量;B:不同处理组一氧化氮的量。*代表与 control 组比较, $P < 0.05$,#与 AGEs 模型组比较, $P < 0.05$ 。Note:A:content of ADMA in different treatment groups. B:content of nitric oxide in different treatment groups. * Compared with the control group, $P < 0.05$. # Compared with the AGEs model group, $P < 0.05$.

ECV304 细胞凋亡,并与处理时间和浓度相关^[8]。加入 AGEs 后,脐静脉内皮细胞 ROS 含量,MDA 以及 LDH 含量随即增加,提示在细胞水平存在损伤,与文献相符^[13]。在加入 AGEs 同时,给予不同浓度的秦皮甲素溶液处理,在一定浓度区间内(15 ~ 25 mg/L),细胞增殖率有显著差别,同时,前几项指标出现显著下降。降低了由 AGEs 引起的 LDH,MDA 增加,提示秦皮甲素对细胞的保护作用,且具有剂量依赖性。有研究显示,秦皮甲素对 DPPH 等自由基有较强的清除能力^[14],可较好拮抗 AGEs 带来的负

面效应。本研究进一步证实,秦皮甲素可以抵抗由 AGEs 诱导的细胞内 ROS 生成,并与浓度有关。

AGEs 作用内皮细胞后还可以增加 LDL 和 HDL 的糖基化,影响脂质代谢^[15],在本次实验中,检测脂质代谢相关指标 CHO,LDL 和 TG 显示,加入秦皮甲素后显著改善 LDL 和 TG 水平,但不同浓度间未见有统计学显著。可见,秦皮甲素在一定程度上可以改善由 AGEs 引起的脂质代谢紊乱。

本次实验还检测了细胞粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 水平。AGEs 与 RAGE 结合后,可通过核因

子 kB(NF- κ B)引起 ICAM-1 和 VCAM-1 表达水平的增高^[16],诱导平滑肌细胞的增殖。加入秦皮甲素后可显著抵抗由 AGEs 诱导的 VCAM-1 水平增加,而对 ICAM-1 改变并不明显。在某种程度上抑制平滑肌增生。

内皮细胞产生的缩血管因子和舒血管因子之间的平衡是内皮细胞功能正常的标志。NO 起舒张血管平滑肌,保持血管正常功能。ADMA 做为 L-精氨酸类似物,与精氨酸竞争性地抑制活性,达到减少 NO 生成,调节 NO 的生成起着重要作用^[17],ADMA 浓度增加时,NO 的生成减少。近年来大量的研究证实 ADMA 也可作为是内皮功能不全的主要标志之一^[18],也是心血管疾病以及糖尿病血管损伤的危险因子。研究显示^[19],体外培养的内皮细胞中加入 AGEs 后,NO 生成减少和 eNOS 蛋白表达下调,而 ICAM-1 的水平增加,本研究中发现,秦皮甲素加入后一定程度上抵抗由 AGEs 诱导的 NO 下调,同时可以减少 ADMA 的上调。

综上,在本研究中,我们发现秦皮甲素可以从抑制氧化应激,脂质糖基化,抑制血管平滑肌增生,维持血管正常功能等方面保护血管内皮细胞免受 AGEs 的损伤,通过降低 ROS 水平,增加抗氧化应激酶 SOD 含量,NO 的水平等抵抗由于 AGE 对血管带来的负面影响。可以考虑将秦皮甲素作为糖尿病并发症防治的候选化合物进行深入研究,从而达到控制 AGEs 的效应,减少糖尿病患者血管的损伤的效果。

参考文献

- 1 Wilkinson-Berka JL, Kelly DJ, Koerner SM, et al. ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic(mREN-2)27 rat[J]. Diabetes, 2002, 51: 3283-3289.
- 2 Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, et al. Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced renal tubular cell injury by suppressing reactive oxygen species generation via reducing receptor for AGEs (RAGE) expression [J]. Horm Metab Res, 2012, 44: 891-895.
- 3 Pereira A, Fernandes R, Crisóstomo J, et al. The Sulforaphane and pyridoxamine supplementation normalize endothelial dysfunction associated with type 2 diabetes [J]. Sci Rep, 2017, 7: 14357.
- 4 Jud P, Sourij H. Therapeutic options to reduce advanced glycation end products in patients with diabetes mellitus: A review [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 148: 54-63.
- 5 Zhang HF, Chen YC, Wang DS, et al. Safety pharmacology of esculin, a cracking agent of advanced glycation end products [J]. Chin J New Drug (中国新药杂志), 2016, 25: 1587-1594.
- 6 Nie AZ, Lin ZJ, Zhang B. Advance in studies on chemical constituents of *Fraxini Cortex* and their pharmacological effects [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 3332-3341.
- 7 Kang KS, Lee W, Jung Y, et al. Protective effect of esculin on streptozotocin-induced diabetic renal damage in mice [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62: 2069-2076.
- 8 Zhuang XY, Chen YG, Cao JJ, et al. Effects of saponins from *Tribulus terrestris* L. on nonenzymatic glycation and endothelial cell dysfunction [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 736-740.
- 9 Bhatwadekar AD, Ghole VS. Rapid method for the preparation of an AGE-BSA standard calibrator using thermal glycation [J]. J Clin Lab Anal, 2005, 19: 11-15.
- 10 Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2007, 27: 130-143.
- 11 Elseweidy MM, Elswefy SE, Younis NN, et al. Pyridoxamine, an inhibitor of protein glycation, in relation to microalbuminuria and proinflammatory cytokines in experimental diabetic nephropathy [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013, 238: 881-888.
- 12 Sohn E, Kim J, Kim CS, et al. The extract of *Litsea japonica* reduced the development of diabetic nephropathy via the inhibition of advanced glycation end products accumulation in db/db mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 769416.
- 13 Luo T, Zhong X, Li J, et al. Protective effect of tanshinone IIA on normal and oxidative injured endothelial cells [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1182-1185.
- 14 Liang M. Research on isolation and activity of antioxidant components from Qinpi [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2006, 27: 64-66.
- 15 Bucala R, Makita Z, Vega G, et al. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 9441-9445.
- 16 Basta G, Lazzerini G, Massaro M, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses [J]. Circulation, 2002, 105: 816-822.
- 17 Osorio-Yáñez C, Chin-Chan M, Sánchez-Peña LC, et al. The

- ADMA/DDAH/NO pathway in human vein endothelial cells exposed to arsenite[J]. *Toxicol In Vitro*,2017,42:281-286.
- 18 Sibal L, Agarwal SC, Home PD, et al. The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease[J]. *Curr Cardiol Rev*,2010,6:82-90.
 - 19 Ren X, Ren L, Wei Q, et al. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells[J]. *Cardiovasc Diabetol*,2017,16:52.
- (上接第 1338 页)
- 2 Liu S, Yang XJ. Separation and purification of polymethoxylated flavones from orange peel using macroporous resin[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2014,26:1562-1567.
 - 3 Zhong ZH, Kang ZF. Effect of jinshao extract on p38 MAPK inflammatory signaling pathway in kidney tissue of diabetic nephropathy rats [J]. *Med Inno Chin*(中国医学创新),2018,15(8):32-36.
 - 4 He W, Hu AX, Cheng X. et al. Regulation of hesperidin on Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic nephropathy rats[J]. *J Hubei Univ Chin Med*(湖北中医药大学学报),2018,12(1):28-33.
 - 5 Zhou X, Feng Y, Zhan Z, et al. Hydrogen sulfide alleviates diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. *J Biol Chem*,2014,289:28827-28834.
 - 6 Kong FL, Zhu XA, Chen T. et al. Nobiletin on fat reduction and weight reduction in rats induced by high-fat diet and prevention of fatty liver formation [J]. *Food Sci*(食品科学),2018,39:213-220.
 - 7 Wang MJ, Hou JX. Epidemiology of diabetic nephropathy and early diagnosis of diabetic nephropathy by urinary protein [J]. *Inner Mongolia Med J*(内蒙古医学杂志),2016,48:1077-1080.
 - 8 Zhu YL, Qian QY, Zhang XY. Research progress of diabetic nephropathy in traditional chinese and western medicine[J]. *J Shandong Tradit Chin Med*(山东中医杂志),2017,36(1):82-84.
 - 9 Li Q, An Y, Sui CH. et al. The role of antioxidants in the progression and treatment of diabetic nephropathy [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intensive Nephrol*(中国中西医结合肾病杂志),2016,17:275-276.
 - 10 Dugbartey GJ. Diabetic nephropathy: a potential savior with 'rotten-egg' smell[J]. *Pharmacol Rep*,2017,69:331-339.
 - 11 Duan JF, Wang YN, Jin FZ. et al. Analysis of the relationship between diabetic nephropathy and blood sugar control and related risk factors[J]. *J Clin Med Pract*(中华老年多器官疾病杂志),2018,65(1):34-38.
 - 12 Cao X, Yang DP. Effect of blood sugar fluctuation on urinary microalbumin and inflammatory factors in early diabetic nephropathy[J]. *J Hainan Med Coll*(海南医学院学报),2016,22:2390-2392.
 - 13 Xia XH, Li W, Zhou DM, et al. Protective effect of liraglutide on renal tissue of diabetic rats and its related mechanism [J]. *Chin J Nephrol*(中华肾脏病杂志),2016,32:200-205.
 - 14 Li YL, Liao YG, Li XW, et al. Risk factors of diabetic nephropathy [J]. *Pract Prevent Med*(实用预防医学),2017,24:133-136.
 - 15 Gan ZQ. Analysis of the correlation between type 2 diabetic nephropathy and blood lipid [J]. *J Pract Diab*(实用糖尿病杂志),2004,12(2):27-28.
 - 16 Jin H, Piao SG, Jin JZ, et al. Synergistic effects of leflunomide and benazepril in streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. *Nephron Exp Nephrol*,2014,126:148-148.
 - 17 Xue L, Feng X, Wang C, et al. Benazepril hydrochloride improves diabetic nephropathy and decreases proteinuria by decreasing ANGPTL4 expression [J]. *Bmc Nephrol*,2017,18:307.
 - 18 Jing D, Bai H, Yin S. Renoprotective effects of emodin against diabetic nephropathy in rat models are mediated via PI3K/Akt/GSK-3 β and Bax/caspase-3 signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*,2017,14:5163-5169.
 - 19 Tunçdemir M, Öztürk M. Regulation of the Ku70 and apoptosis-related proteins in experimental diabetic nephropathy [J]. *Metabolism*,2016,65:1466-1477.
 - 20 Dong YJ, Gao WJ. The role and relationship of bcl-2, Bax and caspase-3 in apoptosis [J]. *Chin J Gerontol*(中国老年学),2012,32:4828-4830.
 - 21 Yuan H, Zhang X, Zheng W, et al. Minocycline attenuates kidney injury in a rat model of streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. *Biol Pharm Bull*,2016,39:1231-1237.