

· 基础研究 ·

葛根芩连汤干预高糖诱导人脐静脉血管
内皮细胞氧化应激实验研究陈俊^{1,2} 林晓³ 葛亚梅³ 钱紫星³ 朱梦杨³ 冉凤³

摘要 目的 探讨葛根芩连汤 (GQD) 对高糖诱导的人脐静脉血管内皮细胞 (HUVECs) 氧化应激的影响。方法 体外培养 HUVECs。配置 GQD 中药复方含药血清, CCK-8 法检测药物毒性、筛选实验最佳浓度及时间后将细胞分为对照组 (细胞正常培养)、模型组 (细胞利用 60 mmol/L 高糖处理 48 h)、含药血清组 (细胞先采用 5% 浓度含药血清预处理 1 h 后, 再利用 60 mmol/L 高糖处理 48 h) 和阳性对照组 [细胞先采用 3 mmol/L N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 预处理 1 h 后, 再利用 60 mmol/L 高糖处理 48 h]。细胞经以上处理后, 采用 CCK-8 比色法检测细胞活力; 流式细胞仪测试细胞凋亡及周期, 同时检测细胞内活性氧 (ROS) 含量; 生化试剂盒检测细胞肌酸激酶 (CK)、谷胱甘肽 (GSH)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 及丙二醛 (MDA) 水平。结果 与对照组比较, 模型组的细胞增殖率显著下降, 细胞凋亡率、G0/G1 期阻滞、ROS、CK、LDH 及 MDA 的水平均显著增加, 而 SOD 和 GSH 的水平显著下降 ($P<0.05$)。与模型组比较, 含药血清组和阳性对照组细胞的增殖率显著上升、凋亡率明显下降, 同时 G0/G1 周期阻滞明显减弱 ($P<0.05$), 含药血清组和阳性对照组的 ROS、CK、LDH 和 MDA 的水平均显著减少, GSH 和 SOD 的水平明显上升 ($P<0.05$)。结论 葛根芩连汤可干预高糖诱导的血管内皮细胞氧化应激的发生, 抑制细胞凋亡, 提高细胞活力。

关键词 葛根芩连汤; 血管内皮细胞; 增殖; 凋亡; 氧化应激; 中药

Experimental Study of Gegen Qinlian Decoction on Oxidative Stress of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by High Glucose

CHEN Jun^{1, 2}, LIN Xiao³, GE Ya-mei³, QIAN Zi-xing³, ZHU Meng-yang³, and RAN Feng³ 1 Department of Endocrinology, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430061); 2 The First Clinical College, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430061); 3 Clinical School of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430061)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Gegen Qinlian Decoction (GQD) on the oxidative stress of human umbilical vein vascular endothelial cells (HUVECs) induced by high glucose. **Methods** HUVECs were cultured *in vitro*. Chinese medicine compound GQD drug-containing serum were configured, CCK-8 method was used to detect drug toxicity, and to screen the optimal concentration and time of the experiment. The cells were divided into control group (normal cell culture), model group (cells treated with 60mmol/L high sugar for 48 h), drug-containing serum group (cells firstly pretreated with 5% concentration drug-containing serum for 1 h, and then handled with 60 mmol/L hyperglycaemic treatment for 48 h) and positive control group [cells were pretreated with 3mmol/L N-acetylcysteine (NAC) for 1 h, and then treated with 60 mmol/L hyperglycemia for 48 h]. After intervention, cell activity was detected by CCK-8 colorimetric method, cell apoptosis and cycle were detected by flow cytometry, and intracellular reactive oxygen (ROS) content was also detected. Biochemical kits

基金项目: 湖北省卫生健康委员会中医药科研项目 (面上项目) (No. ZY2021M016)

作者单位: 1. 湖北省中医院内分泌科 (武汉 430061); 2. 湖北中医药大学第一临床学院 (武汉 430061); 3. 湖北中医药大学中医临床学院 (武汉 430061)

通讯作者: 陈俊, Tel: 027-88920323, E-mail: chenjun1@hbhctcm.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20221210.250

were used to detect cell creatine kinase (CK), glutathione (GSH), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). **Results** Compared with the control group, the cell proliferation rate of the model group decreased, the apoptosis rate, G0/G1 block, ROS, CK, LDH and MDA increased, while SOD and GSH levels decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the proliferation rate of cells in the drug-containing serum group and the positive control group increased, the apoptosis rate decreased, and the G0/G1 cycle block decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the content of ROS, CK, LDH and MDA in the drug-containing serum group and the positive control group decreased, and the levels of GSH and SOD increased ($P < 0.05$). **Conclusion** GQD can interfere with the occurrence of oxidative stress of vascular endothelial cells induced by high glucose, inhibit apoptosis and improve cell vitality.

KEYWORDS Gegen Qinlian Decoction; vascular endothelial cells; proliferation; apoptosis; oxidative stress; Chinese herbal medicine

糖尿病是由多种病因导致的以高血糖为特征的代谢紊乱性疾病, 根据 2019 年国际糖尿病联盟 (International Diabetes Federation, IDF) 发布的全球糖尿病地图显示: 中国糖尿病患者已占全球糖尿病患者总数的 1/4, 居全球首位^[1]。我国以 2 型糖尿病患者居多, 心血管并发症是 2 型糖尿病最常见的血管并发症之一, 占糖尿病患者死亡总数的 68%^[2]。在高血糖环境下, 血管内皮细胞功能障碍被认为是心血管并发症发生至关重要的因素^[3]。高糖诱导的血管内皮细胞会产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 氧化应激可抑制血管内皮细胞增殖、加速凋亡, 进而破坏血管内皮细胞的正常功能^[4]。大量研究表明, 在高糖环境下, 血管内皮细胞氧化应激受损是糖尿病血管并发症发生的始动因素^[5-8]。

糖尿病心血管并发症可归属于中医学“消渴病心病”“消渴心络痹”范畴, 基本病机是以“虚”为首, 湿热蕴结致瘀, 痹阻心脉而发病^[9]。葛根芩连汤为仲景经方之一, 具有清热利湿的功效, 现已有研究证实, 此方具有改善高血糖的作用, 被广泛用于糖尿病的临床治疗中^[10-12]。目前为止, 虽有葛根芩连汤对糖尿病心血管并发症防治作用的相关临床研究, 但葛根芩连汤对高糖诱导的血管内皮细胞氧化应激的影响尚未见报道。因此, 为了探讨上述问题, 本研究通过构建高糖诱导人脐静脉血内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 损伤的体外模型, 并给予葛根芩连汤进行干预处理, 观察细胞增殖率、凋亡率及细胞内氧化应激指标, 旨在探讨葛根芩连汤干预高糖诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用及机制, 为葛根芩连汤治疗糖尿病心血管并发症提供确切的实验依据。

材料与方

1 实验动物和细胞 采用 SPF 级 8 周龄雄性

wistar 大鼠 25 只, 平均重量 (281.31 ± 5.54) g, 动物来源于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物质量合格证号: SYXK (鄂) 2018 - 0104。动物实验获得武汉华联科生物技术有限公司动物伦理委员会批准 (No. HLK-20210226-01), 实验过程符合动物伦理相关指导原则。HUVECs 来源中国科学院上海细胞库。

2 药物 葛根芩连汤, 组成为葛根 24 g、黄芩 9 g、黄连 9 g、炙甘草 6 g (批号分别为: 202102006, 202103020, 202101020, 202102010), 药材饮片由湖北天济中药饮片有限公司提供, 并经湖北中医药大学刘合刚教授鉴定为正品。

3 主要试剂及仪器 HUVEC 细胞专用培养基、PBS、0.25% 胰蛋白酶及 CCK-8 试剂盒均购于 Bioswamp 公司 (货号分别为 C1850、C1741、C1812、C1706); 胎牛血清购于 Gibco 公司 (货号为 10270-106); AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒及 PI/Rnase Staining buffer Solution 购于 BD 公司 (货号分别为 556547、550825); 活性氧检测试剂盒购于 Beyotime 公司 (货号为 S0033); 肌酸激酶 (creatin kinase, CK)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒均购于南京建成公司 (货号分别为 a032-1-1、a006-1-1、a020-1-2、a001-1-1、a003-1-1)。超净工作台 (苏州智净净化设备有限公司, 型号: SW-CJ-1D)、生物安全柜 (Spantech 公司, 型号: BSC-1300 II b2)、CO₂ 恒温培养箱 (Thermo 公司, 型号: 311)、移液器 (Thermo 公司, 型号: F3)、酶标仪 (杭州奥盛, 型号: AMR-100)、倒置荧光显微镜 (Leica 公司, 型号: DMIL LED)、流式细胞仪 (艾森, 型号: NovoCyte)。

4 方法

4.1 中药复方含药血清的配制 将 25 只 SPF 级 8 周龄雄性 Wistar 大鼠适应性喂养 7 天后称量体重,按照生药灌胃 23 g/kg 的标准^[13],计算所得所需中药(葛根芩连汤)生药总量,水煎中药并浓缩至含生药 1.15 g/mL。每只鼠每天灌胃 6 mL(分早晚各 3 mL),连续灌胃 3.5 天。末次灌胃 1 h 后腹主动脉取血,血样静置 3 h 以上,待血块收缩良好后,以 1 500 r/min 离心 15 min;取上清,灭活除菌后于 -80 °C 条件下保存备用。

4.2 HUVECs 培养 复苏冻存的细胞,将完全融化后的细胞悬液吸至离心管中,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清,细胞重新悬浮于 1 mL 培养基中,转移至培养瓶中,加入 4 mL 含 10% 胎牛血清的新鲜培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱内,定期更换培养液,用 PBS 洗去残留的旧培养基,培养瓶中加入 0.25% 胰酶,将消化后的细胞放置培养箱,按 1:3 比例进行传代培养。

4.3 建立高糖诱导的血管内皮细胞损伤模型 高浓度葡萄糖会抑制血管内皮细胞增殖,其原因除了高渗透压的影响外,还与高糖环境下产生的过量 ROS 对细胞的损伤作用有关,并且随着葡萄糖浓度的不断增加及培养时间的延长,细胞活力与之呈明显的负相关^[14]。因此,葡萄糖对血管内皮细胞的损伤呈浓度和时间依赖性。本实验在此理论基础上,参照文献报道^[15],并结合前期对实验结果的预期,筛选出高糖诱导 HUVECs 损伤的最佳造模浓度为 60 mmol/L,由于高糖环境下产生的渗透压对每组细胞的影响一致,因此可以排除渗透压对血管内皮细胞的影响。

4.4 CCK-8 法检测含药血清毒性、筛选实验最佳浓度及时间 收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,分于 96 孔板,5 × 10³ 个细胞/孔,每孔加入 CCK-8 试剂 180 μL,每种细胞每块板接种 3 个同样的孔作为复孔,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜,使细胞贴壁。将贴壁约 80% 的细胞分组为对照处理组(含药血清浓度为 0%,1%,2.5%,5%,7.5%,10%,15%,20% 作用于 HUVEC 细胞 1 h,不加葡萄糖处理)和高糖处理组(对照组基础上加入 60 mmol/L 葡萄糖刺激细胞),作用时间点为 24、48、72 h。取出细胞培养板,向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续放入培养箱中培养 4 h。同时设置对照孔,每组设定 3 复孔,在酶联免疫检测仪 450 nm 处测量各孔的吸光值,观察比较细胞活力,筛选出

的最佳含药血清作用浓度为 5% 及最佳作用时间为 48 h,以此作为后续实验的条件。同时以不加含药血清的正常培养的内皮细胞为对照,判断含药血清对细胞有无毒性作用。

4.5 CCK-8 法检测细胞增殖活力 将细胞悬液按每孔 3 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板,置于培养箱中培养,使细胞贴壁。将细胞分组设置为:对照组(细胞正常培养)、模型组(细胞进行 60 mmol/L 高糖处理 48 h)、含药血清组(细胞先进行 5% 浓度含药血清预处理 1 h 后,再利用 60 mmol/L 高糖处理 48 h)和阳性对照组[细胞先进行 N-乙酰半胱氨酸(3 mmol/L)预处理 1 h 后,再利用 60 mmol/L 高糖处理 48 h],培养 48 h 后取出细胞培养板,向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续培养 4 h。同时设置对照孔,每组设定 3 复孔,在酶联免疫检测仪 450 nm 处测量各孔的吸光值,比较细胞活力,并重复检测 3 次。

4.6 流式细胞仪测试细胞凋亡及周期 按照实验分组(分组同 4.5)对细胞进行干预,取 1 × 10⁶ 个培养基重悬的细胞,离心弃上清,用 PBS 洗涤 2 次后向收集好的细胞内加入 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,避光孵育 30 min,再次加入 300 μL 的 PBS,随即进行流式检测细胞凋亡。流式细胞仪测试细胞周期的分组同上,取 1 × 10⁷ 个细胞,离心弃上清留沉淀,加入 700 μL 的无水乙醇固定细胞后于 -20 °C 条件下过夜;取出细胞离心弃上清后用预冷 PBS 洗涤 2 次,用 100 μL 浓度为 1 mg/mL 的 RNase A 溶液悬浮使细胞沉淀,在培养箱内消化细胞内的 RNA 30 min;加入 400 μL 浓度为 50 μg/mL 的 PI,4 °C 避光孵育 10 min。用流式细胞仪进行细胞 DNA 含量的测定,确定细胞在各细胞周期所占比例,并用 NovoExpress 软件进行结果分析。

4.7 检测氧化应激水平 将各组细胞收集后悬浮于 1 mL 稀释好的 DCFH-DA 探针中,按照 1 × 10⁶/mL 的细胞浓度将细胞放置培养箱内孵育 20 min;将装载好探针的各组细胞收集起来,用 500 μL 的 PBS 重悬,采用流式细胞仪检测 ROS 的含量并使用 NovoCyte 分析软件进行分析;CK、GSH、LDH、SOD、MDA 水平检测均按照试剂盒说明书进行。

5 统计学方法 本次实验所得数据采用统计学软件 SPSS17.1 进行处理及分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,每个实验重复 3 次,多组间数据比较采用 LSD(最小显著性差异法)检验判定统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 HUVECs 活力结果比较 (表 1、2) 与含药血清浓度为 0% 的细胞比较, 低浓度的 GQD ($\leq 7.5\%$) 干预后增加了正常环境下的细胞活力, 并对细胞无毒性作用 ($P < 0.05$); 同对照处理组中含药血清浓度为 0% 的细胞比较, 高糖处理的细胞活力明显下降, 而高糖环境下的细胞经过低浓度的葛根芩连汤 ($\leq 5\%$) 干预后, 细胞活力显著增加 ($P < 0.05$)。由此发现, 低浓度的葛根芩连汤 ($\leq 5\%$, 特别是在 2.5% 和 5% 时) 干预后能使高糖环境下受损伤的 HUVECs 活性恢复。然而, 高浓度的 GQD ($\geq 7.5\%$) 对高糖诱导的 HUVECs 活性无明显影响。因此, 选择 5% 浓度的葛根芩连汤和 48 h 作为后续实验的条件。

表 1 各组 HUVECs 细胞存活率结果比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
0%	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
1%	3	0.85 ± 0.02*	1.14 ± 0.03*	1.13 ± 0.03*
2.5%	3	0.91 ± 0.01*	1.17 ± 0.04*	1.22 ± 0.04*
5%	3	1.04 ± 0.04	1.16 ± 0.07*	1.26 ± 0.01*
7.5%	3	1.04 ± 0.05	1.18 ± 0.05*	1.27 ± 0.03*
10%	3	0.96 ± 0.01*	0.96 ± 0.02*	1.10 ± 0.01*
15%	3	0.80 ± 0.05*	0.63 ± 0.04*	0.72 ± 0.06*
20%	3	0.74 ± 0.05*	0.73 ± 0.03*	0.72 ± 0.04*

注: 与 0% 含药血清干预比较, * $P < 0.05$

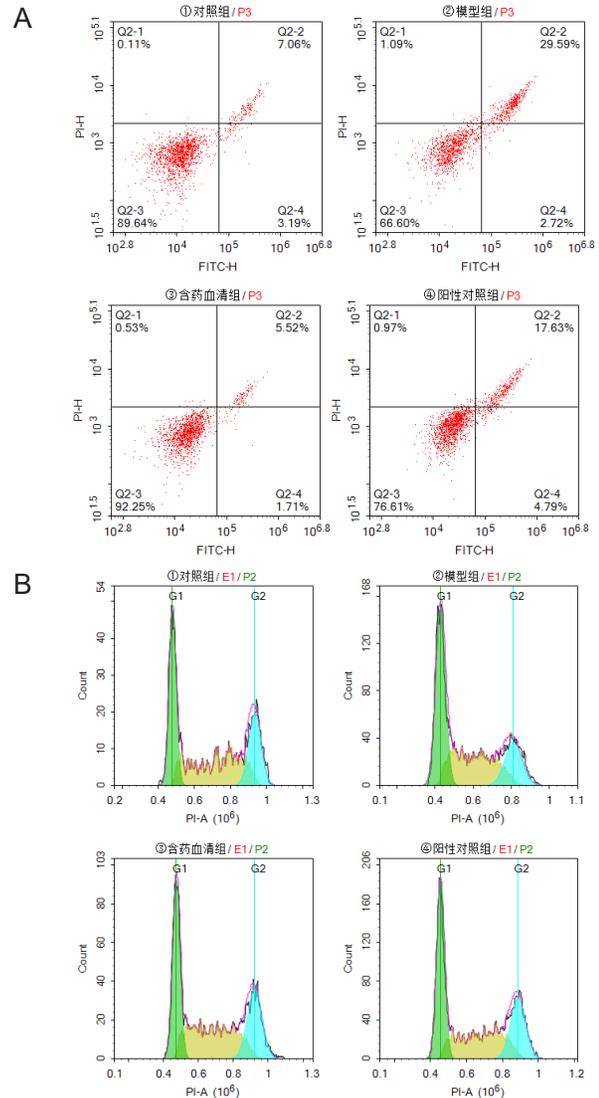
表 2 各组高糖处理的 HUVECs 细胞存活率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
高糖对照	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
0%	3	0.76 ± 0.04*	0.75 ± 0.01*	0.71 ± 0.04
1%	3	0.80 ± 0.06	0.83 ± 0.05 [△]	1.23 ± 0.03 [△]
2.5%	3	0.96 ± 0.07 [△]	1.36 ± 0.07 [△]	1.45 ± 0.04 [△]
5%	3	1.01 ± 0.05 [△]	1.29 ± 0.08 [△]	1.50 ± 0.04 [△]
7.5%	3	0.67 ± 0.04	0.67 ± 0.03	0.76 ± 0.04
10%	3	0.69 ± 0.04	0.71 ± 0.08	0.89 ± 0.04 [△]
15%	3	0.67 ± 0.01	0.81 ± 0.06	0.89 ± 0.01 [△]
20%	3	0.73 ± 0.01	0.79 ± 0.05	0.89 ± 0.04 [△]

注: 与高糖对照组比较, * $P < 0.05$; 与 0% 含药血清干预比较, [△] $P < 0.05$ 。

2 各组 HUVECs 增殖、凋亡及周期结果比较 (图 1, 表 3、4) 与对照组比较, 模型组的细胞增殖率下降, 细胞凋亡率增加, 及 S 期比例降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 含药血清组和阳性对照组的细胞增殖率均有不同程度的提高, 细胞的凋亡率明显下降, 细胞 S 期比例增加 ($P < 0.05$), 含药血清组与阳性对照组比, 细胞增殖活力更高, 凋亡率更

低 ($P < 0.05$), 两组 S 期比例比较差异无统计学意义 ($P = 0.982$)。



注: A 为流式细胞术检测 HUVECs 凋亡; B 为流式细胞术检测 HUVECs 周期性进展

图 1 葛根芩连汤对高糖诱导的 HUVECs 增殖、凋亡及周期的影响

表 3 各组 HUVECs 增殖、凋亡比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖率 (%)	凋亡率 (%)
对照	3	1.00 ± 0.00	10.24 ± 0.11
模型	3	0.76 ± 0.03*	33.22 ± 0.34*
含药血清	3	1.16 ± 0.03 ^{△▲}	7.43 ± 0.42 ^{△▲}
阳性对照	3	0.87 ± 0.01 [△]	24.29 ± 1.28 [△]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, [▲] $P < 0.05$

3 各组 ROS 生成、CK、LDH、MDA 水平、SOD、GSH 活性结果比较 (图 2, 表 5) 与对照组比较, 模型组 ROS 生成明显增多, 细胞内 CK、LDH 和 MDA 的水平亦明显上升, 细胞内 SOD 和

表 4 各组 HUVECs 周期比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	G2 (%)	S (%)	G0 (%)
对照	3	34.55 ± 0.47	40.43 ± 0.33	25.00 ± 0.47
模型	3	43.27 ± 0.90	38.07 ± 0.46*	18.67 ± 0.55
含药血清	3	33.29 ± 0.51	41.03 ± 0.57 [△]	25.65 ± 0.73
阳性对照	3	38.89 ± 0.56	35.61 ± 0.50 [△]	25.50 ± 0.16

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, [▲] $P < 0.05$

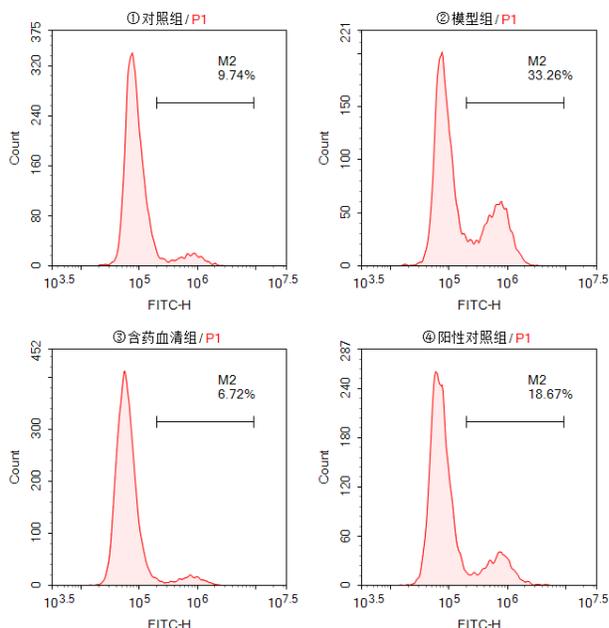


图 2 流式细胞术检测 HUVECs 中 ROS 的产生

GSH 的活性显著下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 含药血清组和阳性对照组 ROS 生成减少及 CK、LDH 和 MDA 水平降低, GSH 和 SOD 水平升高 ($P < 0.05$)。含药血清组 ROS、SOD 水平较阳性对照组降低, CK、LDH、MDA 水平较阳性对照组升高 ($P < 0.05$), 两组 GSH 水平差异无统计学意义 ($P = 0.096$)。

讨 论

糖尿病患者日久伴随多种慢性并发症的发生, 其中心血管并发症是糖尿病最常见的并发症之一, 其发病机制十分复杂。高血糖所致的氧化应激被认为是该病发生的主要驱动因素, 氧化应激导致血管内皮细胞的直接损伤, 引发或加重动脉粥样硬化^[16]。因此,

氧化应激是糖尿病心血管并发症发生的起始因子, 而血管内皮细胞功能障碍是该病发生的主要病理因素^[17]。在生理状态下, 机体不断产生活性氧自由基, 同时被氧自由基清除剂降解以维持平衡。然而在高糖环境下, 这种平衡被打破, 出现氧化应激的代谢状态, 导致细胞内生成过量 ROS, 同时产生大量 MDA, 细胞内抗氧化酶 (SOD、GSH 等) 的活性降低, 进而损伤血管内皮细胞的功能稳态^[18]。因此, 高血糖会造成氧化应激损伤, 从而抑制血管内皮细胞的增殖并加速其凋亡。本实验研究结果显示, 高糖环境会显著降低 HUVECs 增殖率、增加 HUVECs 凋亡率, 并产生氧化应激状态, 这验证了高糖会引起 HUVECs 功能障碍, 成为糖尿病心血管并发症发生的重要病理基础。

近年来, 中医药正在广泛介入糖尿病心血管并发症的治疗中, 关于单味中药或中药提取物对改善血管内皮细胞功能障碍或损伤的相关研究层出不穷。廖占林等^[19]研究发现红景天对高糖损伤的血管内皮细胞具有保护作用; Zhang W 等^[20]报道称银杏叶可显著减轻间歇性高血糖造成的血管内皮细胞氧化损伤。葛根苓连汤出自医圣张仲景之《伤寒杂病论》, 该方以葛根、黄芩、黄连、炙甘草组成, 组方精简, 可解表清里、生津润燥。目前关于葛根苓连汤治疗 2 型糖尿病及其并发症的研究多是以改善胰岛素抵抗、调节肠道菌群紊乱、抑制炎症因子等方向为主^[21-23], 而对血管内皮细胞相关性的研究较少。葛根的主要活性成分是葛根素, 具有抗氧化应激、抑制细胞增殖并诱导其凋亡、抗动脉粥样硬化等作用^[24]。黄芩素是从黄芩根中提取的黄酮类化合物, Wan CX 等^[25]研究发现黄芩素能够抑制 HUVECs 炎症和凋亡, 对 HUVECs 损伤具有保护作用。小檗碱是黄连中的有效活性成分, 现代药理学研究证实小檗碱有降糖、抗氧化应激、抗炎等作用^[26]。甘草作为方剂中配伍最多的药物, 其具有调和百药、解毒缓急等功用。近来研究表明甘草在抗氧化、降低毒性、抗炎等方面起到治疗作用^[27]。因此, 葛根苓连汤对防治糖尿病心血管并发症的临床应用具有指导意义。

表 5 各组 ROS 生成、CK、LDH、MDA 水平、SOD 及 GSH 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CK (U/mgprot)	GSH ($\mu\text{mol/gprot}$)	LDH (U/gprot)	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	ROS (%)
对照	3	52.87 ± 2.51	81.47 ± 1.33	79.13 ± 2.08	132.57 ± 2.44	27.27 ± 1.67	9.43 ± 0.29
模型	3	95.07 ± 2.08*	25.37 ± 2.33*	254.60 ± 0.79*	44.77 ± 3.51*	77.63 ± 2.46*	33.25 ± 0.06*
含药血清	3	72.60 ± 4.05 ^{▲▲}	45.67 ± 1.88 [△]	189.47 ± 0.90 ^{▲▲}	68.83 ± 2.19 ^{▲▲}	53.33 ± 1.96 ^{▲▲}	7.07 ± 0.57 ^{▲▲}
阳性对照	3	64.40 ± 0.89 [△]	50.87 ± 3.30 [△]	135.13 ± 2.30 [△]	84.87 ± 2.57 [△]	45.10 ± 2.45 [△]	19.00 ± 0.33 [△]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, [▲] $P < 0.05$

本实验研究发现葛根芩连汤能够明显增加高糖诱导的 HUVECs 增殖率, 并抑制其凋亡和氧化应激。这表明葛根芩连汤对高糖诱导的 HUVECs 氧化应激损伤具有良好的保护作用, 可以保护血管内皮、延缓糖尿病心血管并发症的发生及进展。

利益冲突: 本研究不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 15 (7): 107843.
- [2] Bhupathiraju SN, Frank BH. Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications[J]. *Circ Res*, 2016, 118 (11): 1723-1735.
- [3] Shalini P, Azam A, Rajesh K. Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus-a comprehensive review[J]. *J Diabetes Complications*, 2020, 34 (8): 1056-8727.
- [4] Pan D, Li W, Hanchi M, et al. LW-214, a newly synthesized flavonoid, induces intrinsic apoptosis pathway by down-regulating Trx-1 in MCF-7 human breast cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87 (4): 598-610.
- [5] Vedantham S, Radha A, Ann MS, et al. Aldose reductase, oxidative stress and diabetic cardiovascular complications[J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2012, 10 (3): 234-240.
- [6] Patel H, Chen J, Das KC, et al. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 142.
- [7] Wang W, Wang WH, Azadzi KM, et al. Alu RNA accumulation in hyperglycemia augments oxidative stress and impairs eNOS and SOD2 expression in endothelial cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 426: 91-100.
- [8] 蒋诗敏, 张珂嘉, 周泰, 等. 丹参酮 II a 抑制氧化应激减轻人脐静脉内皮细胞损伤[J]. *徐州医科大学学报*, 2021, 41 (4): 235-240.
- [9] 尤良震, 潘海娥, 代倩倩, 等. 糖尿病心脏病中医病机述要[J]. *中医杂志*, 2021, 62 (12): 1013-1019.
- [10] 杨霞, 朱向东, 王志刚, 等. 葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病的研究进展[J]. *慢性病学杂志*, 2022, 23 (5): 717-720.
- [11] 张小清, 许文华, 肖鑫, 等. 葛根芩连汤促进糖尿病大鼠棕色脂肪分化改善糖脂紊乱的分子机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (17): 4462-4470.
- [12] 陈俊, 钱紫星, 朱梦杨, 等. 基于 GPR119/caMP/ GLP-1 通路探讨葛根芩连汤的降糖机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (3): 25-30.
- [13] 刘文科. 从 G 蛋白偶联受体 119 表达探讨清热降浊方调控 GLP-1 分泌的分子机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [14] 柴伟栋, 陈家伟, 崔毓桂, 等. 葡萄糖对血管内皮细胞生长的影响[J]. *江苏医药*, 1999, 25 (3): 186-187.
- [15] 宋卫东, 邱太彬, 王光耀, 等. 高糖培养对雪旺细胞增殖及血管内皮细胞生长因子分泌的影响[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27 (13): 2325-2326.
- [16] Charlton A, Jessica G, Jay JC, et al. Oxidative stress and inflammation in renal and cardiovascular complications of diabetes[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 10 (1): 18.
- [17] Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2005, 109 (2): 143-159.
- [18] 祝双华, 刘晓群, 姜怀德, 等. 蛇床子素对高糖诱导人脐静脉血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中成药*, 2015, 37 (5): 929-934.
- [19] 廖占林, 刘鹏程, 张蕾, 等. 红景天苷对高糖损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用研究[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17 (5): 494-497, 502.
- [20] Zhang W, Xing SS, Gao L, et al. *Ginkgo biloba* attenuates oxidative DNA damage of human umbilical vein endothelial cells induced by intermittent high glucose[J]. *Pharmazie*, 2014, 69 (3): 203-207.
- [21] Xu X, Gao Z, Yang F, et al. Antidiabetic effects of Gegen Qinlian Decoction via the gut microbiota

are attributable to its key ingredient berberine[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2020, 18 (6): 721-736.

[22] Tu J, Zhu S, Li B, et al. Gegen Qinlian Decoction coordinately regulates PPAR γ and PPAR α to Improve glucose and lipid homeostasis in diabetic rats and insulin resistance 3T3-L1 adipocytes[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 811.

[23] 王焯, 朱向东. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠 CRP, TNF- α , IL-6 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (21): 130-134.

[24] Deng Y, Lei T, Li H, et al. ERK5/KLF2 activation is involved in the reducing effects of puerarin on monocyte adhesion to endothelial cells and atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864 (8): 2590-2599.

[25] Wan CX, Xu M, Huang SH, et al. Baicalein protects against endothelial cell injury by inhibiting the TLR4/NF-kb signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (2): 3085-3091.

[26] Ma X, Chen Z, Wang L, et al. The pathogenesis of diabetes mellitus by oxidative stress and inflammation: its inhibition by berberine[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 782.

[27] Cao LJ, Hou ZY, Li HD, et al. The ethanol extract of Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) protects against triptolide-induced oxidative stress through activation of Nrf2[J]. Evid-Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 2752389.

(收稿: 2021-09-27 在线: 2023-01-30)
责任编辑: 汤 静

《中国中西医结合杂志》第九届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 雷 燕

顾 问 王永炎 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 唐由之 黄璐琦
曹洪欣 屠呦呦 韩济生

编辑委员

于德泉	王一涛	王卫霞	王 伟	王 阶	王拥军 (上海)	王拥军 (北京)	王 舒	毛 威		
卞兆祥	方邦江	方敬爱	邓跃毅	叶文才	田金洲	史戟祥	白彦萍	吕志平	朱立国	朱 兵
朱明军	危北海	刘瓦利	刘龙涛	刘 平	刘 良	刘建平	刘建勋	刘保延	刘鲁明	齐清会
安冬青	阮新民	孙汉董	孙 燕	阳 晓	花宝金	苏 励	李大金	李军祥	李国栋	李国勤
李 恩	李焕荣	杨任民	杨宇飞	连 方	吴大嵘	吴万垠	吴正治	吴泰相	吴根诚	吴 烈
张大钊	张卫东	张允岭	张永贤	张永祥	张荣华	张俊华	张亭栋	张敏州	张敏建	陆付耳
陈士林	陈士奎	陈小野	陈立典	林志彬	林 谦	林瑞超	郁仁存	果德安	季 光	郑国庆
赵一鸣	赵伟康	赵芳芳	胡义扬	胡晓梅	胡镜清	段金廛	侯凡凡	饶向荣	洪传岳	夏城东
栗原博 (日本)	徐凤芹	徐 浩	凌昌全	高瑞兰	郭 军	郭 姣	郭 艳	郭赛珊	唐旭东	
黄光英	梅之南	崔 红	麻 柔	梁 春	梁挺雄	梁晓春	梁繁荣	董竞成	董福慧	谢竹藩
谢明村	谢 恬	蔡定芳	蔡 晶	裴正学	廖福龙	衡先培	魏 玮	Ye-meng CHEN (意大利)		
Yung-chi CHENG (美国)	Jia-lang HE (美国)	Yong-ming LI (美国)	Sheng-xing MA (美国)							
Qun-hao ZHANG (美国)	Joseph ZHOU (美国)	Mian-sheng ZHU (法国)								

(以上名单按姓氏笔画为序, 编委工作单位信息在本刊网站首页“下载专区”公布, 网址: <http://www.cjim.cn/zxyjhcn/zxyjhcn/ch/index.aspx>)