

实验

引用:陈艳,高入春,广可颜,孙 恣,彭光霖,瞿文静,贺有缘,赵思佳,邹晓玲,熊武.黄芪甲苷抗高糖受损内皮祖细胞氧化应激损伤的机制研究[J].中医药导报,2025,31(1):8-12,19.

# 黄芪甲苷抗高糖受损内皮祖细胞氧化应激损伤的机制研究\*

陈 艳<sup>1</sup>,高入春<sup>1</sup>,广可颜<sup>2</sup>,孙 恣<sup>2</sup>,彭光霖<sup>2</sup>,瞿文静<sup>1</sup>,贺有缘<sup>1</sup>,赵思佳<sup>1</sup>,邹晓玲<sup>1</sup>,熊 武<sup>2</sup>

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;

2.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的:研究黄芪甲苷(AS-IV)对高糖诱导的内皮祖细胞(EPCs)氧化应激损伤的保护机制,为AS-IV的临床开发应用奠定基础。方法:取足月新生儿脐带血,采用密度梯度离心法分离出单个核细胞,采用Dil-ac-LDL和FITC-UEA-1双荧光染色法鉴定出EPCs,将鉴定成功的人EPCs分别用30 mmol/L的葡萄糖干预120 h,制成高糖诱导氧化应激损伤细胞模型,实验分为黄芪甲苷+高糖受损EPCs组、黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385(Nrf2抑制剂)组、高糖受损EPCs组和正常EPCs组(5 mmol/L的葡萄糖干预120 h),用流式细胞术检测活性氧(ROS)水平,蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测氧化应激相关蛋白的表达和Nrf2、Keap1及NFE2L2/ARE依赖性信号通路蛋白的表达。结果:与正常EPCs组比较,高糖受损EPCs组细胞内ROS水平显著升高,GSH-Px、CAT、SOD活力均明显降低,LDH活力明显升高,Nox2、Keap1表达显著升高,Nrf2、HMOX1、xCT、GPX4表达降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与高糖受损EPCs组比较,黄芪甲苷+高糖受损EPCs组细胞内ROS水平降低,GSH-Px、CAT、SOD活力升高,LDH活力降低,Nox2、Keap1表达降低,Nrf2、HMOX1、xCT、GPX4表达升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组各项检测指标与高糖受损EPCs组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:高糖能诱导EPCs出现氧化应激损伤,而黄芪甲苷能通过介导NFE2L2(Nrf2)/ARE信号通路发挥抗氧化应激作用,保护高糖诱导氧化应激损伤的内皮祖细胞。

[关键词] 内皮祖细胞;氧化应激;黄芪甲苷;高糖;活性氧

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)01-0008-05

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.01.002

## Study on the Anti-inflammation Effect of Astragalus Membranaceus Fructus on High Glucose-Induced Endothelial Cell Oxidative Stress Damage in Human

CHEN Yan<sup>1</sup>, GAO Ruchun<sup>1</sup>, GUANG Keyan<sup>2</sup>, SUN Min<sup>2</sup>, PENG Guanglin<sup>2</sup>, QU Wenjing<sup>1</sup>, HE Youyuan<sup>1</sup>, ZHAO Sijia<sup>1</sup>, ZOU Xiaoling<sup>1</sup>, XIONG Wu<sup>2</sup>

(1.First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China;

2.School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China)

[Abstract] Objective: To study the protective mechanism of astragaloside IV (AS-IV) against oxidative stress damage of endothelial progenitor cells (EPCs) induced by high glucose, and to lay a foundation for further research on clinical development and application of AS-IV. Methods: Term newborn umbilical cord blood was collected. EPCs were separated by density gradient centrifugation method, and identified by Dil-acLDL + FITC-UEA-1 double fluorescence staining method. The human EPCs successfully identified were treated with 30 mmol/L glucose for 120 h, respectively, to make a cell model of oxidative stress damage induced by high

\*基金项目:国家自然科学基金面上项目(82374276);湖南省科技厅临床医疗技术创新引导项目(2021SK51412);湖南省卫生健康委科研计划项目(202204034510);湖南省自然科学基金科卫联合项目(2021JJ70033)

通信作者:熊武,男,主治医师,研究方向为慢性创面修复/外周血管再生

sugar. The EPCs was divided into Astragaloside + high-glucose impaired EPCs group, Astragaloside + high-glucose impaired EPCs+ML385 group, high-glucose impaired EPCs group and normal EPCs group (5 mmol/L glucose intervention for 120 h). The levels of reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry, and the expression of oxidative stress-related proteins and Nrf2, Keap1 and NFE2L2/ARE-dependent signal pathway protein were detected by Western blotting. Result: Compared with the normal EPCs group, the intracellular ROS level was significantly increased in high-glucose impaired EPCs group. And the activities of GSH-Px, CAT and SOD were significantly decreased in high-glucose impaired EPCs group, while the activities of LDH were significantly increased. The expressions of Nox2 and Keap were significantly increased in high-glucose impaired EPCs group, while the expressions of Nrf2, HMOX1, xCT and GPX4 were significantly decreased, with significant differences ( $P<0.05$ ). Compared with high-glucose impaired EPCs group, the intracellular ROS level decreased in Astragaloside + high-glucose impaired EPCs group. And the GSH-Px, CAT and SOD activity increased in Astragaloside + high-glucose impaired EPCs group, while the LDH activity decreased. The Nox2 and Keap1 expression decreased in Astragaloside + high-glucose impaired EPCs group, while Nrf2, HMOX1, xCT and GPX4 expression increased, with significant differences ( $P<0.05$ ). Conclusion: High-glucose can induce oxidative stress injury of EPCs, and Astragaloside can play an anti-oxidative stress role by mediating NFE2L2 (Nrf2) /ARE signaling pathway, protecting and improving endothelial progenitor cells damaged by high glucose.

[Keywords] endothelial progenitor cells; Astragaloside IV; oxidative stress; high-glucose ; active oxygen

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一种来源于骨髓,能自我更新和分化成内皮细胞的血管干细胞<sup>[1]</sup>,参与出生后损伤血管的修复和新生血管的形成<sup>[2]</sup>。有研究表明<sup>[3]</sup>高糖环境下,体内会产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致组织细胞发生过度氧化应激反应,从而引发EPCs的活性降低和数量减少,导致其增殖、黏附、成管和迁移等生物学功能降低<sup>[4]</sup>。如何有效恢复糖尿病患者体内受损EPCs的活性和增加其数量,成为目前攻克糖尿病血管病变难题的关键。本团队前期研究<sup>[5]</sup>和文献研究<sup>[6]</sup>证实黄芪甲苷(astrogical IV, AS-IV)能增加高糖诱导损伤EPCs数量,改善其增殖、迁移、黏附和体外成管等生物学功能。但AS-IV是如何改善高糖受损EPCs生物学功能而发挥保护作用的,目前尚无相关研究。本研究将在前期研究基础上,进一步探讨AS-IV对高糖诱导损伤EPCs的保护机制,为AS-IV的临床开发应用奠定基础。

## 1 材 料

1.1 药品和试剂 黄芪甲苷(上海源叶生物科技有限公司,批号:11071-201711,纯度98%);DMEM高糖培养基(SIGMA公司,批号:D5796-500ML);胎牛血清(Gibco公司,批号:10099141);ROS试剂盒(碧云天公司,批号:S0033S);BCA蛋白定量试剂盒(Abiowell公司,批号:AWB0104);广谱彩虹预染蛋白Marker(10~180 kD)(Abiowell公司,批号:AWB0236);蛋白上样缓冲液(5×)(还原性)(Abiowell公司,批号:AWB0055);Western转膜缓冲液(10×)(Abiowell公司,批号:AWB0211);丽春红S染色液(10×Ponceau S)(Abiowell公司,批号:AWB0225);RIPA裂解液(强)(Abiowell公司,批号:AWB0136);蛋白酶抑制剂混合液(100×PIC)(Abiowell公司,批号:AWH0645);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京

建成生物工程研究所,批号:A001-3);乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A020-2);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A005-1);过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A007-1-1)。

1.2 主要仪器 低速离心机(上海知信仪器公司,型号:SL02);直热式二氧化碳培养箱(上海三藤仪器公司,型号:DH-160I);倒置显微镜(北京中显恒业公司,型号:DSZ2000X);显微镜(Motic公司,型号:BA210T);台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C);电泳槽(北京六一生物科技有限公司,型号:DYCZ-24DN);转膜仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYCZ-40D);漩涡混合器(江苏其林贝尔仪器制造有限公司,型号:GL-88B);磁力搅拌器(上海仪电科学仪器股份有限公司,型号:JB-13);电子天平(美国双杰公司,型号:JJ224BC);生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司,型号:BioPrep-24);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100)。

## 2 方 法

2.1 内皮祖细胞的分离和培养 取足月脐带血,采用梯度离心法分离得到单个核细胞。将单个核细胞接种于10%FBS的DMEM高糖培养基,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h后,收集未贴壁细胞,换用EGM-2培养基接种于FN包被的培养皿中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养3 d;每3 d换1次液,培养7 d;取贴壁细胞,用胰酶消化细胞按1:3进行传代<sup>[7]</sup>。

2.2 内皮祖细胞的鉴定 将“2.1”收集的细胞接种至预先放置爬片的24孔板中,培养过夜。弃去培养基,PBS洗涤3次,避光加入含DiI-ac-LDL(10 μg/mL)的培养液250 mL,37℃、5%

CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4 h。孵育完毕后,吸弃培养基,PBS洗涤3次,加入4%多聚甲醛固定30 min。吸弃多聚甲醛,PBS洗涤3次,避光加入FITC-UEA-1(10 μg/mL)250 μL,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养1 h。PBS洗涤3次,加入250 μL DAPI工作液(1 μg/mL),37℃避光孵育10 min,弃染液,PBS洗涤3次,用荧光显微镜电镜采集图像。

**2.3 细胞造模与分组** EPCs细胞培养于含10%FBS+1%双抗的专用培养基中,37℃,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度培养箱中培养。取对数生长的细胞进行如下分组的处理。(1)黄芪甲苷+高糖受损EPCs组<sup>①</sup>:EPCs细胞用30 mmol/L高糖受损120 h后加入100 mg/L的黄芪甲苷培养48 h;(2)黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组(NFE2L2抑制剂):EPCs细胞用30 mmol/L高糖受损120 h后同时加入100 mg/L的黄芪甲苷和19 μmol/L的ML385培养48 h;(3)高糖受损EPCs组:EPCs细胞用30 mmol/L高糖受损120 h;(4)正常EPCs组:EPCs细胞正常培养。

**2.4 ROS检测** 按照1:1 000用无血清培养液稀释DCFH-DA(母液浓度10 mmol/L),使终浓度为10 μmol/L。处理完成的细胞去除细胞培养液,加入适当体积稀释好的DCFH-DA,充分盖住细胞。37℃细胞培养箱内孵育20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。用胰酶消化收集。流式细胞仪检测。

**2.5 检测氧化应激相关蛋白(SOD、LDH、GSH-Px、CAT)的表达情况** 收集细胞后制成细胞悬液,3 000 r/min离心10 min(离心半径为15 cm),移去上清,PBS清洗后用含EDTA和TritonX-100的PBS缓冲液进行裂解,3 000 r/min离心15 min,收集上清液,按照SOD、LDH、GSH-Px、CAT试剂盒说明书进行测定<sup>②</sup>。

**2.6 检测Nrf2、Keap1及NFE2L2/ARE依赖性信号通路蛋白(包括Nox2、HMOX1和NQO1)的表达** 用冷PBS洗涤细胞,加入200 μL RIPA裂解液后,刮取细胞超声破碎;4℃,12 000 r/min离心15 min(离心半径为15 cm)。将上清液配制10%分离胶,加入TEMED摇匀灌胶,用异丙醇封胶。凝胶后,去除异丙醇,用滤纸吸干。配制4.8%的浓缩胶,加TEMED摇匀灌胶。进行电泳并转膜,电泳恒定电压75 V,130 min;300 mA恒定电流转膜,转膜完毕后,1×PBST漂洗1次,5 min,检测蛋白转膜效率。用1×PBST配制5%脱脂奶粉,浸入室温放置90 min。用1×PBST稀释一抗,孵育,4℃过夜,次日室温放置30 min。孵育结束后,1×PBST洗3次,10 min/次。用1×PBST稀释HRP标记的二抗,将稀释后的二抗与膜共同室温孵育90 min后,1×PBST洗3次,每次15 min。使用ECL法检测,凝胶成像系统成像分析。

**2.7 统计学方法** 采用SPSS 26.0统计分析软件进行统计学处理,服从正态分布的计量资料以“均数±标准差”(x±s)表示。

满足方差齐性的多组间计量资料比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 内皮祖细胞的培养与鉴定** 第7天观察到培养皿中细胞呈现典型集落形态,中央细胞呈圆形,周边细胞呈梭形。第10天,细胞形态以扁平的“铺路石”样为主(见图1)。荧光显微镜鉴定内皮祖细胞,细胞结合FITC-UEA-1呈绿色,细胞摄取Dil-ac-LDL呈红色,细胞核染呈蓝色,同时,Dil-ac-LDL+FITC-UEA-1二者双染呈橙黄色改变的细胞即为正常分化的EPCs。(见图2)

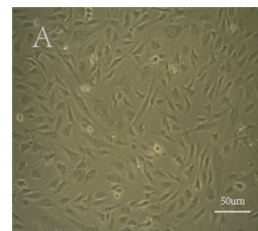
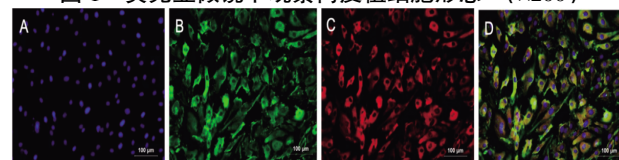


图1 荧光显微镜下观察内皮祖细胞形态 (×200)



注:A.细胞核染呈蓝色;B.UEA-1结合呈绿色;C.摄取Dil-ac-LDL呈红色;D.Dil-ac-LDL+UEA-1双染呈橙黄色改变。

图2 内皮祖细胞鉴定 (×400)

**3.2 ROS的检测结果** 与正常EPCs组比较,高糖受损EPCs组荧光强度显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与高糖受损EPCs组比较,黄芪甲苷+高糖受损EPCs组荧光强度显著降低( $P<0.05$ );与黄芪甲苷+高糖受损EPCs组比较,黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组荧光强度升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(见表1、图3)

表1 各组 ROS 水平荧光强度比较 (x±s)

组别	n	荧光强度
正常EPCs组	3	1 231.57±168.72
高糖受损EPCs组	3	8 559.80±326.81 <sup>a</sup>
黄芪甲苷+高糖受损EPCs组	3	2 471.07±339.58 <sup>b</sup>
黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组	3	6 473.30±379.72

注:与正常EPCs组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与高糖受损EPCs组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

**3.3 氧化应激相关蛋白(SOD、LDH、GSH-Px、CAT)的表达结果** 与正常EPCs组比较,高糖受损EPCs组内GSH-Px、CAT、SOD活力均明显降低,LDH活力明显升高,差异均有统

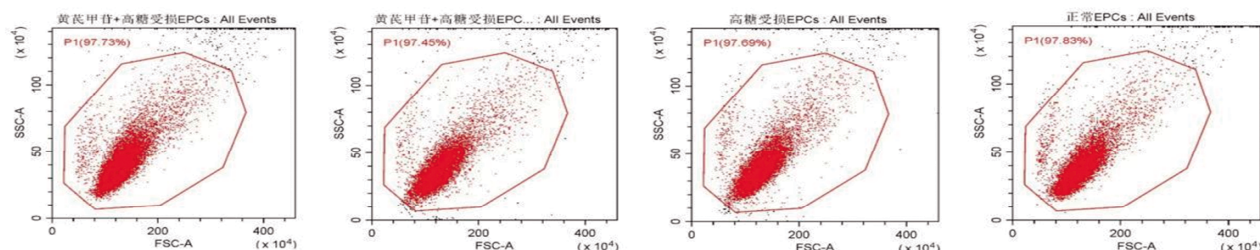


图3 ROS水平检测流式图

计学意义( $P<0.05$ )。与高糖受损EPCs组比较,黄芪甲苷+高糖受损EPCs组GSH-Px、CAT、SOD活力均明显升高,LDH活力明显降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与黄芪甲苷+高糖受损EPCs组比较,黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组GSH-Px、CAT、SOD活力降低,LDH活力升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。(见表2)

表2 各组抗氧化应激蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	GSH-Px( $\mu\text{mol/L}$ )	CAT(U/mL)	SOD(U/mL)	LDH(U/L)
正常EPCs组	3	175.14 $\pm$ 5.05	27.43 $\pm$ 0.84	20.36 $\pm$ 0.54	94.00 $\pm$ 4.96
高糖受损EPCs组	3	82.14 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup>	12.92 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	8.66 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	156.40 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>
黄芪甲苷+高糖受损EPCs组	3	158.01 $\pm$ 4.36 <sup>b</sup>	21.95 $\pm$ 2.03 <sup>b</sup>	17.13 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>	109.19 $\pm$ 2.32 <sup>b</sup>
黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组	3	113.81 $\pm$ 6.071	15.88 $\pm$ 0.84	11.55 $\pm$ 0.90	140.05 $\pm$ 3.26

注:与正常EPCs组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与高糖受损EPCs组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

3.4 Nrf2、Keap1及NFE2L2/ARE依赖性信号通路蛋白(包括Nox2、HMOX1和NQO1)表达结果 与正常EPCs组比较,高糖受损EPCs组内Nox2、Keap1表达显著升高,Nrf2、HMOX1、NQO1、xCT、GPX4表达降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。与高糖受损EPCs组比较,黄芪甲苷+高糖受损EPCs组内Nox2、Keap1表达降低,Nrf2、HMOX1、NQO1、xCT、GPX4表达升高( $P<0.05$ );与黄芪甲苷+高糖受损EPCs组比较,黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组内Nox2、Keap1表达升高,Nrf2、HMOX1、NQO1、xCT、GPX4表达降低( $P<0.05$ )。(见表3)

#### 4 讨 论

糖尿病是一类以血糖浓度升高为主要临床特征的慢性代谢疾病<sup>[9]</sup>。糖尿病足为高糖环境导致的血管病变的典型代表,修复难度大,致残率高<sup>[10]</sup>。皮肤溃疡是糖尿病血管病变常见并发症,也是导致糖尿病足患者截肢的首要原因<sup>[11]</sup>。因此研究糖尿病皮肤溃疡的发病原因,修复糖尿病损伤血管和促进新血管形成是解决上述问题的关键。目前有研究<sup>[12]</sup>表明,持续的高糖状态可以诱导细胞产生大量的ROS,而大量的ROS会诱导细胞出现氧化应激反应,从而引发血管EPCs损伤和功能障碍<sup>[13]</sup>。秦臻等<sup>[14]</sup>研究发现,在体外培养中,ROS的增加也会加速EPCs的衰老,从而损伤EPCs的功能。而本团队前期研究<sup>[7]</sup>表明EPCs在血管损伤修复和血管再生中扮演了重要的角色,高糖会导致EPCs增殖、成管和分泌功能障碍,在糖尿病患者体内则表现为EPCs活性下降和数量减少,增加心血管突发事件的风险,并延缓溃疡创口的愈合<sup>[15]</sup>。

HO J C Y等<sup>[16]</sup>研究发现,糖尿病患者来源的EPCs培养基中的VEGF、SDF-1 $\alpha$ 、PIGF等促血管新生因子的表达显著下调。这导致了EPCs的成管能力明显减弱,进而成为血管修复和新血管形成障碍的重要原因。FADINI G P等<sup>[17]</sup>研究显示,

糖耐量受损会导致外周血中CD34<sup>+</sup>降低,这反映了EPCs数量的下降。同时此研究还发现EPCs的减少也是糖尿病患者心血管疾病并发症发生的重要原因。MARROTTE E J等<sup>[18]</sup>发现高糖状态下EPCs内抗氧化酶含量降低,锰超氧化物歧化酶表达活性减弱,导致锰超氧化物含量减少。这进一步证明了EPCs的数量和功能在伤口愈合过程中的再生能力上发挥着重要作用。BALESTRIERI M L等<sup>[19]</sup>研究表明高糖可通过抑制细胞增殖、NO的产生、MMP-9的活性和迁移来提高氧化应激,降低EPCs的存活率。也有研究<sup>[20]</sup>表明,糖尿病患者外周血中SDF-1水平下降则外周血中EPCs数量下降,血管修复能力受损。可见恢复糖尿病患者体内EPCs的活性、数量和成管功能是解决糖尿病血管病变及糖尿病皮肤溃疡的关键。

黄芪甲苷作为中药黄芪的主要活性物质,被誉为细胞的“动力剂”,因其显著的抗炎、抗氧化、神经保护、组织器官保护作用而备受关注<sup>[21-25]</sup>。本课题组前期的研究已经证实,黄芪甲苷可以促进EPCs的增殖<sup>[26]</sup>,并刺激其分泌大量的EPCs外泌体。这些外泌体有助于修复高糖受损内皮细胞,促进其增殖、黏附、迁移和体外成管等生物学功能,最终发挥促进内皮细胞增殖和血管新生作用<sup>[27]</sup>。目前有研究<sup>[28]</sup>证实,黄芪甲苷可以在体外促进EPCs分泌血管生长因子,以促进新生血管形成。另有研究表明,给予AS-IV处理EPCs后,AS-IV抑制ROS和NF- $\kappa$ B信号通路<sup>[29]</sup>,同时可能通过促进Hsp-70、Bcl-2表达和下调Bax、Caspase-3表达<sup>[30]</sup>,实现清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生的氧自由基,从而导致细胞的ROS水平明显降低,增强抗氧化酶的活性。此外,细胞增殖能力得到恢复,细胞凋亡率降低,这有助于改善EPCs的功能。这些结果表明,AS-IV对高糖诱导氧化应激损伤的EPCs具有保护和修复作用。

本研究结果显示,在高糖环境下,人内皮祖细胞产生大量活性氧(ROS),诱导氧化应激损伤,降低GSH-Px、CAT、SOD等抗氧化酶的活性<sup>[31]</sup>,进而降低EPCs增殖、迁移、黏附和体外血管生成能力等生物学功能<sup>[32]</sup>。黄芪甲苷的干预显著降低了ROS水平,同时提高了依赖性抗氧化酶及氧化应激相关蛋白的相对表达量,进一步证实了黄芪甲苷能够增强抗氧化酶的活性<sup>[33]</sup>,提高细胞对氧化应激的抵抗力,从而有助于修复高糖受损EPCs的氧化应激损伤<sup>[34]</sup>。核转录因子Nrf2介导的抗氧化反应是抗氧化应激调节的核心机制<sup>[35]</sup>,也是抗氧化应激药物研发的靶点。在本研究中,使用黄芪甲苷处理高糖受损EPCs后,Nrf2、HMOX1等蛋白的相对表达量显著提高,而在使用Nrf2抑制剂干预情况下,这些蛋白的相对表达量降低,同时Nox2、Keap1等蛋白的相对表达量有所升高。这些结果表明,调控NFE2L2(Nrf2)/ARE信号通路有助于减轻高糖对EPCs的损伤,以恢复其损伤血管修复和血管新生功能。本研究结果

表3 各组 Nrf2、Keap1 及 NFE2L2/ARE 依赖性信号通路蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Nox2	Nrf2	Keap1	HMOX1	NQO1	xCT	GPX4
正常EPCs组	3	0.59 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.13	0.59 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.09	1.22 $\pm$ 0.01	1.42 $\pm$ 0.13	1.34 $\pm$ 0.20
高糖受损EPCs组	3	2.28 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.49 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
黄芪甲苷+高糖受损EPCs组	3	1.00 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	1.01 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
黄芪甲苷+高糖受损EPCs+ML385组	3	1.63 $\pm$ 0.38	0.41 $\pm$ 0.06	1.53 $\pm$ 0.24	0.41 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.01

注:与正常EPCs组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与高糖受损EPCs组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

证实黄芪甲苷也可以通过调控高糖受损EPCs中NFE2L2(Nrf2)/ARE信号通路发挥抗氧化应激作用<sup>[6]</sup>。

黄芪甲苷通过激活NFE2L2(Nrf2)/ARE信号通路发挥抗氧化应激作用为糖尿病血管并发症的治疗提供了新的思路和方法,将为临床开发应用黄芪甲苷奠定基础。然而,本实验是通过细胞实验得到的结果,与相对复杂的机体相比尚有一定的差距,需进一步通过动物实验和临床试验论证黄芪甲苷通过NFE2L2(Nrf2)/ARE信号通路抗高糖诱导损伤内皮祖细胞(EPCs)氧化应激损伤的保护机制。

# 参考文献

- [1] WANG Z C, QI J, LIU L M, et al. Valsartan reduces AT1-AA-induced apoptosis through suppression oxidative stress mediated ER stress in endothelial progenitor cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(5): 1159-1168.
- [2] SUKMAWATI D, TANAKA R. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: A promise in vascular medicine[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(3): 411-421.
- [3] HAMED S, BRENNER B, ROGUIN A. Nitric oxide: A key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2[J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(1): 9-15.
- [4] 熊武, 白雪, 肖慧, 等. 阿魏酸对高糖受损内皮祖细胞生物学功能和分泌SOD的影响[J]. 吉林中医药, 2021, 41(7): 919-923.
- [5] 余亦程, 熊武, 蔡响, 等. 黄芪甲苷改善高糖受损内皮祖细胞生物学功能的实验研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3244-3249.
- [6] 沈艺, 谢南姿. 黄芪甲苷对人外周血内皮祖细胞体外血管生成能力的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(10): 1214-1216.
- [7] 蔡响, 邹晓玲, 王禹萌, 等. 黄芪甲苷改善人内皮祖细胞生物学功能的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(1): 34-37.
- [8] 熊武, 陈四红, 王禹萌, 等. 黄芪甲苷对人内皮祖细胞活性及增殖功能的影响[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(8): 1152-1155.
- [9] BAIRAGI U, MITTAL P, SINGH J, et al. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nano formulations of ferulic acid in diabetic wound healing[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2018, 44(11): 1783-1796.
- [10] 肖慧, 白雪, 余亦程, 等. 黄芪甲苷对高糖受损人内皮祖细胞分泌SDF-1 $\alpha$ 和CXCR4的影响[J]. 中医导报, 2020, 26(12): 1-4.
- [11] 陆涵之, 王怡, 郭冬婕, 等. 中草药提取物治疗糖尿病溃疡的研究进展[J]. 药学实践与服务, 2023, 41(6): 335-340, 357.
- [12] CHEN Z, GAO H Y, WANG L, et al. Farrerol alleviates high glucose-induced renal mesangial cell injury through the ROS/Nox4/ERK1/2 pathway[J]. Chem Biol Interact, 2020, 316: 108921.
- [13] INGRAM D A, KRIER T R, MEAD L E, et al. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress[J]. Stem Cells, 2007, 25(2): 297-304.
- [14] 秦臻, 韦正新, 辛青青, 等. 黄精降低活性氧水平促进衰老内皮祖细胞功能的研究[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(1): 123-127.
- [15] LU C H, ZHANG X P, ZHANG D H, et al. Short time tripterine treatment enhances endothelial progenitor cell function via heat shock protein 32[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(5): 1139-1147.
- [16] HO J C Y, LAI W H, LI M F, et al. Reversal of endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2012, 28(5): 462-473.
- [17] FADINI G P, BOSCARO E, DE KREUTZENBERG S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2010, 33(5): 1097-1102.
- [18] MARROTTE E J, CHEN D D, HAKIM J S, et al. Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(12): 4207-4219.
- [19] BALESTRIERI M L, RIENZO M, FELICE F, et al. High glucose downregulates endothelial progenitor cell number via SIRT1[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784(6): 936-945.
- [20] 韦玉和, 罗春媛, 周斌, 等. 2型糖尿病患者外周血中SDF-1水平和内皮祖细胞CXCR4表达率的变化[J]. 江苏大学学报(医学版), 2009, 19(5): 413-416.
- [21] 马可可, 鞠莹辉, 陈青青, 等. 黄芪甲苷对2型糖尿病肾病大鼠肾组织PI3K/Akt/FoxO1信号调控的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 74-81.
- [22] 刘钰, 周建大, 张熙, 等. 黄芪甲苷通过SDF-1 $\alpha$ /CXCR4轴促进高糖受损人内皮祖细胞迁移的研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4714-4719.
- [23] 李杨, 王凡, 贾宁. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究[J]. 黑龙江医学, 2019, 43(1): 96-97.
- [24] 田春雨, 薄海美, 林飞武, 等. 双益方改善2型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的药效及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 137-142.
- [25] 彭阿建, 欧阳范馨, 张熙, 等. 黄芪甲苷干预的EPC-Exos对高糖诱导损伤间充质干细胞向内皮分化的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 8(4): 1593-1602.
- [26] 余亦程. 黄芪甲苷调节SDF-1 $\alpha$ /CXCR4轴对高糖下内皮祖细胞迁移的影响[D]. 长沙: 湖南中医(下转第19页)

- Systemic parathyroid hormone enhances fracture healing in multiple murine models of type 2 diabetes mellitus[J]. JBMR Plus, 2020, 4(5):e10359.
- [22] NAM S W, KIM S H, HAN Y. Discovery and development of berberine derivatives as stimulants of osteoblast differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 527(1):110-116.
- [23] TOLEDANO -OSORIO M, DE LUNA -BERTOS E, TOLEDANO M, et al. Doxycycline -doped collagen membranes accelerate in vitro osteoblast proliferation and differentiation[J]. J Periodontal Res, 2023, 58(2):296-307.
- [24] 易生辉, 招文华, 任辉, 等. 中西医结合治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5):274-282.
- [25] 彭斯伟, 宋敏, 范凯, 等. 铁代谢与骨质疏松症的相关因素研究现状[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(12):1868-1872.
- [26] REN M X, LIU H D, JIANG W K, et al. Melatonin repairs osteoporotic bone defects in iron-overloaded rats through PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ /P70S6k signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2023, 2023:7718155.
- [27] 方文焕, 麦伟, 颜志坚, 等. 绝经后骨质疏松性椎体压缩性骨折患者血清雌激素、前脂肪因子-1水平与骨代谢和骨密度相关性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(12):1763-1766, 1773.
- [28] TOMINAGA N, YONAHARA T, YAMANOUCHI M, et al. Bone responsiveness to parathyroid hormone is negatively associated with parathyroid hormone-lowering drug use in patients undergoing hemodialysis: A cross-sectional study[J]. BMC Nephrol, 2021, 22(1):275.
- [29] 夏宁, 蔡云, 刘达, 等. 骨转换标志物在骨质疏松症诊断与治疗中的应用进展[J]. 国际骨科学杂志, 2021, 42(3):144-148.
- [30] YANG Y, WEI Q, AN R, et al. Anti-osteoporosis effect of SemenCuscutae in ovariectomized mice through inhibition of bone resorption by osteoclasts[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 285:114834.
- [31] TSUKASAKI M, TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: Evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(10):626-642.
- [32] 范荣, 刘玉金, 白曼莫, 等. 补肾活血汤加减配合LCP治疗四肢长骨干骨折不愈合的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(7):80-85.
- [33] YEOM J, MA S, LIM Y H. Probiotic Propionibacteriumfreudenreichii MJ2 enhances osteoblast differentiation and mineralization by increasing the OPG/RANKL ratio[J]. Microorganisms, 2021, 9(4):673.
- [34] LIANG F Q, SUN L, WANG Y B. The relationship between GNRI changes and bone metabolism parameters and the occurrence of osteoporosis in elderly male patients with T2D[J]. Altern Ther Health Med, 2023, 29(1):85-89.
- (收稿日期:2024-05-09 编辑:蒋凯彪)

(上接第12页)药大学, 2021.

- [27] 白雪, 梁文菲, 彭阿建, 等. 黄芪甲苷介导内皮祖细胞分泌体对高糖受损内皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(15):2048-2050.
- [28] 王禹萌, 邹晓玲, 余亦程, 等. 黄芪甲苷促人内皮祖细胞分泌血管生长因子的实验研究[J]. 中医学报, 2020, 35(5):1050-1054.
- [29] 安小翠, 朱瑞雪, 蒯淑梅, 等. 黄芪甲苷抑制ROS NF- $\kappa$ B信号通路促进肝癌细胞增殖、凋亡的作用机制[J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 5(12):1399-1403.
- [30] 职玉娟. 黄芪甲苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导心肌细胞凋亡及相关调控蛋白表达的影响[J]. 国医论坛, 2022, 37(6):68-71.
- [31] LIU T, HU J, ZUO Y H, et al. Identification of microRNA-like RNAs from Curvularia lunata associated with maize leaf spot by bioinformation analysis and deep sequencing[J]. Mol Genet Genomics, 2016, 291(2):587-596.
- [32] 郭静, 莫友胜, 王奇, 等. 当归补血汤对内皮祖细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20):39-45.
- [33] 刘建平, 何建峰. 黄芪甲苷对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[J]. 西部中医药, 2018, 31(2):21-25.
- [34] 于婧文, 郭敏芳, 杨鹏伟, 等. 黄芪甲苷IV通过激活Nrf-2/HO-1信号通路抑制氧化应激介导的人SY5Y细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2022, 38(11):979-985.
- [35] 边义莹, 皮静波. Nfe2l2/Nrf2可通过干扰红细胞抗氧化能力及促凝活性增加TiO<sub>2</sub>NP<sub>s</sub>暴露致小鼠静脉血栓形成[C]//中国毒理学会. 中国毒理学会第十次全国毒理学大会论文集. 珠海, 2023.
- [36] 邓长青, 张京兰, 金海涛. 基于NRF2/FPN1通路探究黄芪甲苷减轻糖尿病心肌梗死大鼠心肌损伤的作用机制[J]. 西部医学, 2023, 35(10):1439-1443, 1451.
- (收稿日期:2024-04-07 编辑:罗英姣)