

·实验研究·

本文引用: 龙柳芽, 胡清睿, 熊武, 邹晓玲, 薛冰倩, 罗标, 张熙. 抗氧化视角下黄芪甲苷修复高糖损伤内皮祖细胞体外成管功能的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(9): 1800-1807.

抗氧化视角下黄芪甲苷修复高糖损伤内皮祖细胞 体外成管功能的实验研究

龙柳芽¹, 胡清睿¹, 熊武², 邹晓玲², 薛冰倩², 罗标², 张熙^{1*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 探讨黄芪甲苷(AS-IV)对高糖诱导损伤内皮祖细胞(EPCs)氧化应激状态及体外血管生成能力的影响。**方法** 自人脐带血中分离、培养EPCs, 采用双荧光染色法进行鉴定。将鉴定成功的 EPCs 置于 30 mmol/L 的高糖 DMEM 培养基中处理 120 h, 建立高糖诱导损伤的 EPCs 模型。将高糖损伤的 EPCs 随机分为高糖损伤 EPCs 组、AS-IV 组和 AS-IV+ML385 组, 并设置正常 EPCs 组。AS-IV 组用 100 mg/L AS-IV 干预, AS-IV+ML385 组同时用 100 mg/L AS-IV 和 19 μ mol/L ML385 干预, 正常 EPCs 组和高糖损伤 EPCs 组加入等体积 PBS, 以上各组干预时间均为 48 h。采用荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)水平; 采用流式细胞术检测细胞凋亡率和焦亡比例; 采用 ELISA 检测细胞培养上清液中血管生成相关因子[包括血管内皮生长因子 A(VEGF-A)、血管内皮生长因子 B(VEGF-B)、血管内皮生长因子 C(VEGF-C)、成纤维细胞生长因子(FGF)及血管生成素 1(Ang-1)]水平, 并通过基质胶成管实验分析细胞交叉点数、血管总长度和血管分支长度, 以评价 EPCs 体外血管生成能力。**结果** 与正常 EPCs 组比较, 高糖损伤 EPCs 组细胞内 ROS 水平、细胞早期凋亡率、细胞晚期凋亡率、细胞总凋亡率及细胞焦亡比例均升高($P<0.01$), 细胞培养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平均降低($P<0.01$), 细胞交叉点数、血管总长度及血管分支长度均减少($P<0.01$)。与高糖损伤 EPCs 组比较, AS-IV 组与 AS-IV+ML385 组细胞内 ROS 水平、细胞晚期凋亡率、细胞总凋亡率、细胞焦亡比例均降低($P<0.01$), 细胞培养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平均升高($P<0.01$), 细胞交叉点数、血管总长度及血管分支长度均增加($P<0.01$); AS-IV 组细胞早期凋亡率降低($P<0.01$)。与 AS-IV 组比较, AS-IV+ML385 组细胞内 ROS 水平、细胞早期凋亡率、细胞晚期凋亡率、细胞总凋亡率及细胞焦亡比例均升高($P<0.01$), 细胞培养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平均降低($P<0.05, P<0.01$), 细胞交叉点数、血管总长度及血管分支长度均减少($P<0.01$)。**结论** 黄芪甲苷可改善高糖环境下 EPCs 的功能损伤, 抑制凋亡与焦亡, 改善血管生成相关因子分泌, 并增强其体外血管生成能力, 其机制可能与激活 Nrf2 信号通路、发挥抗氧化作用有关。

[关键词] 黄芪甲苷; 内皮祖细胞; 高糖损伤; 氧化应激; Nrf2 信号通路; 血管生成

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.09.007

Experimental study on repair of high-glucose-induced injury to the *in vitro* angiogenic capacity of endothelial progenitor cells by astragaloside IV from the perspective of antioxidation

LONG Liuya¹, HU Qingrui¹, XIONG Wu², ZOU Xiaoling², XUE Bingqian², LUO Biao², ZHANG Xi^{1*}

1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of astragaloside IV (AS-IV) on oxidative stress status and *in vitro* angiogenic capacity of endothelial progenitor cells (EPCs) with high-glucose-induced injury. **Methods** EPCs were isolated and cultured from

[收稿日期] 2026-06-17

[基金项目] 湖南省自然科学基金高校联合基金重点项目(2025JJ90013); 长沙市自然科学基金项目(KQ2502258); 湖南中医药大学研究生科研创新项目(2025CX073)。

[通信作者] * 张熙, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 1104622012@qq.com。

human umbilical cord blood and identified by dual fluorescence staining. The successfully identified EPCs were exposed to high-glucose DMEM (30 mmol/L) continuously for 120 h to establish a high-glucose-induced injury EPCs model. The injured EPCs were randomly divided into high-glucose-induced injury EPCs (HG-EPCs), AS-IV, and AS-IV+ML385 groups, with a normal EPCs (N-EPCs) group also included. The AS-IV group was treated with 100 mg/L AS-IV, while the AS-IV+ML385 group received 100 mg/L AS-IV combined with 19 μ mol/L ML385. Equal volumes of PBS were administered to the N-EPCs and HG-EPCs groups. All groups were treated continuously for 48 h. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were detected using fluorescent probe assay. Flow cytometry was applied to determine apoptosis rate and pyroptosis proportion. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of angiogenesis-related factors, including vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), vascular endothelial growth factor B (VEGF-B), vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), fibroblast growth factor (FGF), and angiopoietin-1 (Ang-1), in cell culture supernatants. Matrigel tube formation assay was performed to evaluate the *in vitro* angiogenic capacity of EPCs by analyzing the number of cell junctions, total vessel length, and branch length. **Results** Compared with the N-EPCs group, the HG-EPCs group exhibited significantly higher intracellular ROS levels, early apoptosis rate, late apoptosis rate, total apoptosis rate, and pyroptosis proportion ($P<0.01$), while the levels of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, FGF, and Ang-1 in the supernatants were markedly lower ($P<0.01$), accompanied by a reduced number of junctions, total vessel length, and branch length ($P<0.01$). Compared with the HG-EPCs group, both AS-IV and AS-IV+ML385 groups showed decreased ROS levels, late apoptosis rate, total apoptosis rate, and pyroptosis proportion ($P<0.01$), while the levels of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, FGF, and Ang-1 in the supernatants markedly increased ($P<0.01$), along with an increased number of junctions, total vessel length, and branch length ($P<0.01$). The early apoptosis rate was significantly lower in the AS-IV group ($P<0.01$). Compared with the AS-IV group, the AS-IV+ML385 group displayed increased ROS levels, early apoptosis rate, late apoptosis rate, total apoptosis rate, and pyroptosis proportion ($P<0.01$), reduced levels of angiogenesis-related factors including VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, FGF, and Ang-1 in the supernatants ($P<0.05$, $P<0.01$), and a decreased number of junctions, total vessel length, and branch length ($P<0.01$). **Conclusion** Astragaloside IV can alleviate high-glucose-induced functional damage in EPCs, inhibit apoptosis and pyroptosis, promote the secretion of angiogenesis-related factors, and enhance their *in vitro* angiogenic capacity. Its underlying mechanism may be related to the activation of the Nrf2 signaling pathway and the resulting antioxidant effects.

[**Keywords**] astragaloside IV; endothelial progenitor cells; high-glucose-induced injury; oxidative stress; Nrf2 signaling pathway; angiogenesis

糖尿病是一类以慢性高血糖为主要特征的代谢性疾病,其血管并发症可累及心、脑、肾及外周血管系统,是导致患者生活质量下降和远期预后不良的重要原因^[1-2]。在高糖环境下,血管内皮功能异常被认为是糖尿病血管并发症发生发展的关键环节,而内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在维持血管内皮完整性、促进损伤修复及血管新生过程中发挥重要作用^[3]。然而,研究发现,持续高糖状态可显著抑制 EPCs 的迁移和成管能力,并诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量生成,进一步促进细胞凋亡,导致其血管修复与再生功能受损^[4]。黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)作为中药黄芪中的主要有效成分之一,具有良好的抗炎、抗氧化及保护血管内皮的药理作用,在慢性疾病模型中显示出改善氧化应激损伤、促进血管生成的潜力^[5]。此前,本团队已在体外实验中初步观察到 AS-IV 可在一定程度上逆转高糖对 EPCs 功能的抑制作用^[6],但其是否通过抗氧化机制,尤其是是否依赖于核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)信号通路发挥作用,尚未得到充分证实。因此,本研

究以人脐带血来源的 EPCs 为对象,构建高糖损伤细胞模型,研究 AS-IV 对 EPCs 氧化应激状态及体外血管生成功能的影响,并结合 Nrf2 通路抑制剂 ML385 进行干预,以初步探索 Nrf2 信号通路是否参与其中。

1 材料

1.1 主要实验试剂

黄芪甲苷(中国源叶生物科技有限公司,批号:S31401);EGM-2 培养基(瑞士龙沙集团,批号:CC-3162);DMEM 高糖培养基(美国西格玛-奥德里奇公司,批号:D5796-500ML);外周血单个核细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司,批号:LDS1075);胎牛血清(美国吉布科公司,批号:10099-141);青霉素-链霉素双抗(上海碧云天生物技术有限公司,批号:SV30010);磷酸盐缓冲液(pH7.2~7.6)(美国海克隆公司,批号:SH30256.01);纤连蛋白(美国密理博公司,批号:FC014);胰酶消化液、细胞冻存液(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:AWC0232,AWC0229);基质胶(美国康宁公司,批号:356234);ROS 检测试

剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:S0033);凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:KGA1030);焦亡检测试剂(英国艾博抗公司,批号:ab219935);ML385、尼日利亚霉素(美国 Med-ChemExpress 公司,批号:HY-100523、HY-127019);血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)、血管内皮生长因子 B(vascular endothelial growth factor B, VEGF-B)、血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、血管生成素 1(angiotensin-1, Ang-1)ELISA 试剂盒(英国艾博抗公司,批号:ab119566、ab233503、ab100664、ab99979、ab99972)。

1.2 主要实验仪器

超净工作台(北京亚泰隆实验设备有限公司,型号:YT-CJ-2NB);直热式 CO₂ 培养箱(上海三腾仪器有限公司,型号:DH-160I);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型号:DSZ2000X);低速离心机(长沙知信实验仪器有限公司,型号:SL02);流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司,型号:A00-1-1102);酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司,型号:MK3)。

2 方法

2.1 EPCs 的分离和培养

在无菌环境下,于湖南中医药大学第一附属医院采集 3 份足月健康新生儿脐带血,经密度梯度离心分离获得脐带血单个核细胞,各供体样本分别进行 EPCs 分离、培养、鉴定及后续分组处理,以避免不同供体来源细胞混合影响生物学重复判断。随后将分离所得细胞用 EGM-2 培养基重悬,置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。当细胞融合度达到约 80%时,收集贴壁细胞并经胰酶消化后进行传代培养^[7]。本研究经湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理批准号为:HN-LL-GZR-2023-34)。

2.2 EPCs 的鉴定

将“2.1”中收集的细胞接种于置有无菌爬片的 24 孔培养板中,置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养过夜,依次进行 Dil-ac-LDL 摄取(10 μg/mL,孵育 4 h)、FITC-UEA-1 结合(10 μg/mL,孵育 1 h)和 DAPI(1 μg/mL,孵育 10 min)染核试验。所有步骤均在避光条件下完成,并经 PBS 充分洗涤及 4% 多聚甲醛固定处理,最终在荧光显微镜下观察并采

集图像,进行双荧光标记鉴定。

2.3 建立高糖损伤 EPCs 模型

将经鉴定符合 EPCs 特征且生长状态良好的细胞分为正常培养细胞和高糖造模细胞。正常培养细胞作为正常 EPCs 组,采用常规 EGM-2 培养基培养 120 h;高糖造模细胞参考 Kim 等^[8]的方法,将鉴定成功的 EPCs 置于 30 mmol/L 的 DMEM 高糖培养基中培养 120 h,以建立高糖损伤 EPCs 模型。

2.4 细胞的分组与给药

将高糖损伤 EPCs 模型随机分为高糖损伤 EPCs 组、AS-IV 组及 AS-IV+ML385 组,并设置正常 EPCs 组。前期研究证实,AS-IV 的最佳干预浓度为 100 mg/L^[9],故 AS-IV 组加入 100 mg/L 的 AS-IV 干预;AS-IV+ML385 组同时加入 100 mg/L 的 AS-IV 和 19 μmol/L 的 ML385 干预;正常 EPCs 组和高糖损伤 EPCs 组加入等体积 PBS。各组继续培养 48 h。

2.5 ROS 水平检测

将消化后的细胞悬液用 70 μm 滤网过滤并洗涤离心后,按 1:1 000 稀释 DCFH-DA 探针至终浓度为 10 μmol/L,将细胞重悬于稀释好的 DCFH-DA 中,37 ℃孵育 30 min,PBS 洗涤 1 次以去除多余探针,最后使用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

2.6 细胞凋亡检测

采用 Annexin V-APC/PI 双染结合流式细胞术检测各组 EPCs 凋亡水平。各组细胞处理完成后,以不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,随后以 1 000 r/min(离心半径:8 cm)离心 5 min,去除上清液后加入 500 μL Binding buffer 重悬细胞,随后加入 5 μL Annexin V-APC 及 5 μL PI,轻轻混匀,室温避光反应 10 min,于 1 h 内采用流式细胞仪检测。根据流式细胞术结果进行象限分析,并计算各组细胞凋亡率。

2.7 细胞焦亡检测

采用 FAM-YVAD-FMK/PI 双染结合流式细胞术检测各组 EPCs 焦亡水平。各组细胞处理结束后,按试剂盒说明书配制染色液:按每个样本 300 μL Washing buffer 加入 2 μL FAM-YVAD-FMK 原液,避光混匀。各样本分别加入 300 μL 染色液,室温避光染色 1 h;随后以 1 000 r/min(离心半径:8 cm)离心 5 min,去除上清液后用 200 μL Washing buffer 洗涤 2 次。之后加入 PI 工作液,于 37 ℃染色 10 min,再以 PBS 洗涤 3 次,最终采用流式细胞仪检测。根据试剂盒说明书及流式细胞术象限分析结果计算各组细胞焦亡比例。

2.8 血管生成相关因子检测

采用 ELISA 法检测各组细胞培养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平。各组细胞处理结束后,收集培养上清液,按相应试剂盒说明书操作。标准品按要求稀释为 800、400、200、100、50、0 pg/mL 系列浓度。酶标板设空白孔、标准孔、待测样品孔,每孔加入标准品或待测样品 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;弃去孔板内液体后洗板 5 次,每孔加入酶标试剂 50 μ L,再于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,重复洗板。随后每孔依次加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min,再加入终止液 50 μ L 终止反应,并于 450 nm 波长处读取各孔吸光度值。根据标准曲线计算各因子浓度。

2.9 EPCs 体外成管实验

细胞培养于 EGM-2 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。当细胞汇合率达 80% 左右时,经胰酶消化传代,并取对数生长期细胞用于实验。基质胶及 96 孔板于 4 $^{\circ}$ C 预冷过夜,次日每孔加入 70 μ L 基质胶均匀铺底,10 min 后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中凝胶 30 min。将不同处理后的 EPCs 消化并制备成单细胞悬液,按 1×10^4 个/孔接种于预包被基质胶的 96 孔板中,置于培养箱中孵育 6 h。随机选择 5 个视野拍照,使用 ImageJ 软件分析交叉点数、血管总长度及血管分支长度,以评价 EPCs 体外血管生成能力。

2.10 统计学方法

应用 SPSS 30.0 统计软件分析处理数据,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。符合正态分布且方差齐时,采用 one-way ANOVA 进行多组间比较,采用 LSD 法进行组间两两比较;方差不齐时,采用 Welch 校正方差分析,并采用 Games-Howell 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 EPCs 的形态特征与鉴定

培养至第 7 天,EPCs 逐渐呈集落样生长,集落中央细胞以圆形为主,周边细胞多呈梭形或放射状排列,部分细胞可见内皮样贴壁生长特征。详见图 1。双荧光染色结果显示,细胞可摄取 Dil-ac-LDL 并呈红色荧光,同时可结合 FITC-UEA-1 并呈绿色荧光;合并图像中,Dil-ac-LDL 与 FITC-UEA-1 双阳性细胞的红、绿荧光重叠呈橙黄色,提示所培养的细胞具有 EPCs 的内皮样表型特征。详见图 2。

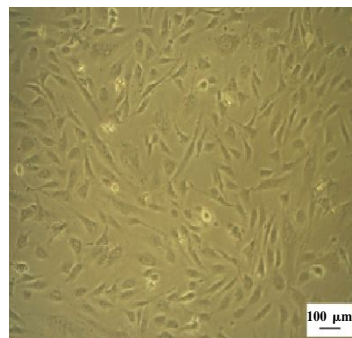


图 1 倒置显微镜下 EPCs 形态观察(×100)

Fig.1 Morphological observation of EPCs under an inverted microscope (×100)

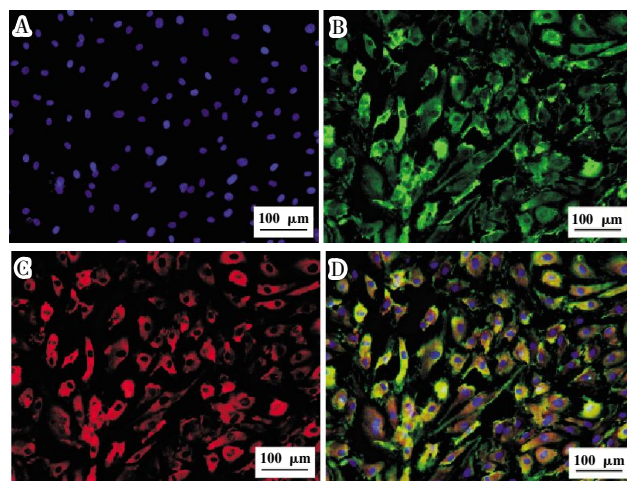


图 2 EPCs 的鉴定(×200)

Fig.2 Identification of EPCs (×200)

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

3.2 AS-IV 对高糖损伤 EPCs ROS 水平的影响

与正常 EPCs 组相比,高糖损伤 EPCs 组细胞内 ROS 水平升高($P < 0.01$);与高糖损伤 EPCs 组相比,AS-IV 组与 AS-IV+ML385 组细胞内 ROS 水平降低($P < 0.01$);而 AS-IV+ML385 组细胞内 ROS 水平较 AS-IV 组升高($P < 0.01$)。详见图 3、表 1。

3.3 AS-IV 对高糖损伤 EPCs 凋亡的影响

与正常 EPCs 组比较,高糖损伤 EPCs 组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均升高($P < 0.01$)。与高糖损伤 EPCs 组比较,AS-IV 组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均降低($P < 0.01$),AS-IV+ML385 组细胞晚期凋亡率和总凋亡率均降低($P < 0.01$)。与 AS-IV 组比较,AS-IV+ML385 组早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均升高($P < 0.01$)。详见图 4、表 2。

3.4 AS-IV 对高糖损伤 EPCs 焦亡的影响

与正常 EPCs 组比较,高糖损伤 EPCs 组细胞焦

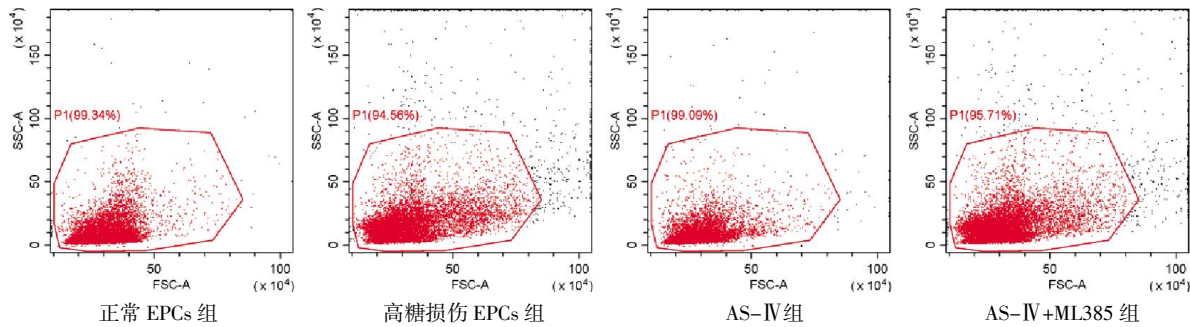


图 3 流式细胞术检测各组细胞 ROS 水平的代表性图像

Fig.3 Representative flow cytometry images of intracellular ROS levels in cells from each group

表 1 各组细胞 ROS 水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of intracellular ROS levels among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ROS 水平
正常 EPCs 组	3	1 446.10±131.77
高糖损伤 EPCs 组	3	6 407.17±199.78**
AS-IV 组	3	2 114.20±304.34 ^{##}
AS-IV+ML385 组	3	3 760.03±210.58 ^{##△△}

注:与正常 EPCs 组比较,** $P<0.01$;与高糖损伤 EPCs 组比较,^{##} $P<0.01$;与 AS-IV 组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

表 2 各组细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 2 Comparison of cell apoptosis rates among groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
正常 EPCs 组	3	1.23±0.10	1.81±0.34	3.04±0.44
高糖损伤 EPCs 组	3	5.27±0.34**	21.46±1.07**	26.72±0.76**
AS-IV 组	3	2.64±0.10 ^{##}	9.32±0.23 ^{##}	11.96±0.28 ^{##}
AS-IV+ML385 组	3	4.73±0.48 ^{△△}	17.97±0.44 ^{##△△}	22.70±0.55 ^{##△△}

注:与正常 EPCs 组比较,** $P<0.01$;与高糖损伤 EPCs 组比较,^{##} $P<0.01$;与 AS-IV 组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

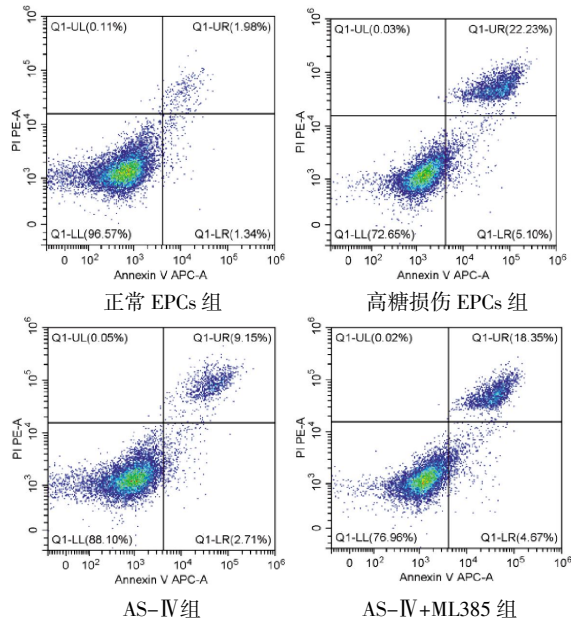


图 4 流式细胞术检测各组细胞凋亡的代表性图像

Fig.4 Representative flow cytometry images of cell apoptosis from each group

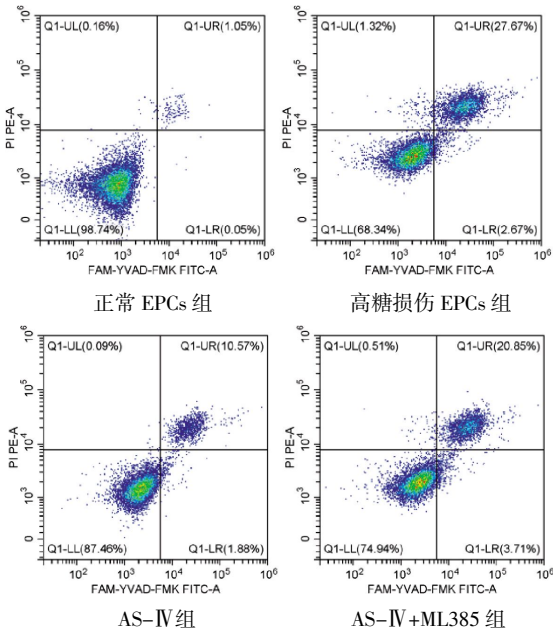


图 5 流式细胞术检测各组细胞焦亡的代表性图像

Fig.5 Representative flow cytometry images of cell pyroptosis from each group

亡比例升高($P<0.01$)。与高糖损伤 EPCs 组比较, AS-IV 组与 AS-IV+ML385 组细胞焦亡比例均降低($P<0.01$)。与 AS-IV 组比较, AS-IV+ML385 组细胞焦亡比例升高($P<0.01$)。详见图 5、表 3。

3.5 AS-IV 对高糖损伤 EPCs 血管生成相关因子分泌的影响

与正常 EPCs 组比较,高糖损伤 EPCs 组细胞培

养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平均降低($P<0.01$)。与高糖损伤 EPCs 组比较, AS-IV 组与 AS-IV+ML385 组细胞培养上清中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平均升高($P<0.01$)。与 AS-IV 组比较, AS-IV+ML385 组细胞培养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平均降低($P<0.05, P<0.01$)。详见表 4。

表 3 各组细胞焦亡比例比较($\bar{x}\pm s, \%$)
Table 3 Comparison of cell pyroptosis proportions among groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	焦亡比例
正常 EPCs 组	3	0.91±0.11
高糖损伤 EPCs 组	3	28.55±0.83**
AS-IV 组	3	10.78±0.49 [#]
AS-IV+ML385 组	3	20.88±0.62 ^{#△△}

注:与正常 EPCs 组比较,** $P<0.01$;与高糖损伤 EPCs 组比较,[#] $P<0.01$;与 AS-IV 组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

3.6 AS-IV 对高糖损伤 EPCs 体外成管能力的影响

正常 EPCs 组细胞可形成较完整的毛细血管样网络结构,表现出良好的体外成管能力;高糖损伤 EPCs 组体外成管能力下降,表现为细胞连接减少、网络结构紊乱、管样结构稀疏;AS-IV 组成管能力明显改善,毛细血管样网络结构较前增多,细胞连接

增强;AS-IV+ML385 组成管能力较 AS-IV 组下降。详见图 6。

与正常 EPCs 组比较,高糖损伤 EPCs 组细胞交叉点数、血管总长度及血管分支长度均减少($P<0.01$)。与高糖损伤 EPCs 组比较,AS-IV 组与 AS-IV+ML385 组细胞交叉点数、血管总长度及血管分支长度均增加($P<0.01$)。与 AS-IV 组比较,AS-IV+ML385 组细胞交叉点数、血管总长度及血管分支长度均减少($P<0.01$)。详见表 5。

4 讨论

糖尿病血管病变的发生发展与内皮功能受损及血管新生不足密切相关^[10]。持续高糖刺激可诱导内皮细胞凋亡,并促进炎症反应和氧化应激,进而破坏血管内皮结构完整性^[11]。在糖尿病相关血管损

表 4 各组细胞培养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF、Ang-1 水平比较($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)
Table 4 Comparison of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, FGF and Ang-1 levels in cell culture supernatant among groups ($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)

组别	<i>n</i>	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	FGF	Ang-1
正常 EPCs 组	3	747.28±36.53	737.55±16.72	642.67±27.59	57.05±6.21	119.30±16.78
高糖损伤 EPCs 组	3	115.81±21.78**	187.97±20.81**	140.71±26.60**	9.60±2.27**	23.76±4.70**
AS-IV 组	3	553.30±18.94 [#]	603.89±20.50 [#]	533.05±32.16 [#]	42.95±2.63 [#]	79.19±4.74 [#]
AS-IV+ML385 组	3	304.17±20.53 ^{#△△}	355.86±20.74 ^{#△△}	264.18±26.27 ^{#△△}	22.19±2.18 ^{#△△}	54.74±3.74 ^{#△△}

注:与正常 EPCs 组比较,** $P<0.01$;与高糖损伤 EPCs 组比较,[#] $P<0.01$;与 AS-IV 组比较,^{△△} $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

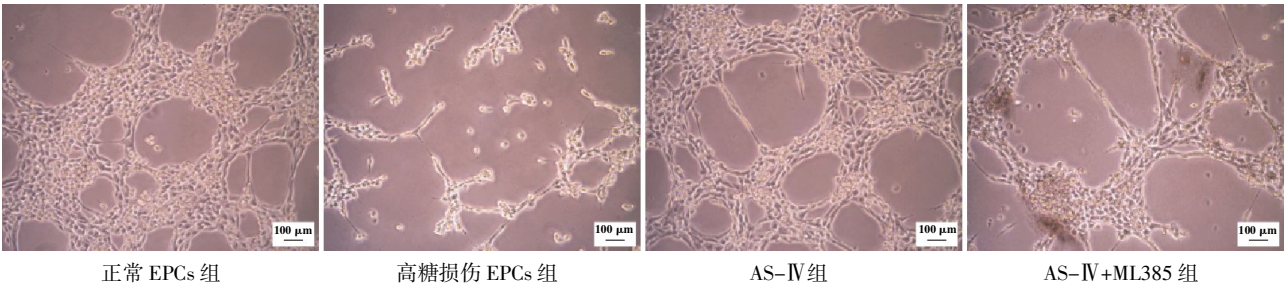


图 6 各组细胞基质胶成管结构的代表性图像($\times 100$)

Fig.6 Representative images of Matrigel tube formation in cells from each group ($\times 100$)

表 5 各组细胞体外成管能力定量结果比较($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Quantitative results of in vitro angiogenic capacity of cells among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	交叉点数/个	血管总长度/ μM	血管分支长度/ μM
正常 EPCs 组	3	278.67±17.01	22 265.33±1 643.69	22 168.33±1 699.07
高糖损伤 EPCs 组	3	41.00±3.00**	7 035.33±546.54**	6 226.33±516.04**
AS-IV 组	3	215.33±7.64 [#]	19 065.67±573.87 [#]	18 965.67±535.17 [#]
AS-IV+ML385 组	3	123.00±5.01 ^{#△△}	13 123.67±644.22 ^{#△△}	13 325.67±326.20 ^{#△△}

注:与正常 EPCs 组比较,** $P<0.01$;与高糖损伤 EPCs 组比较,[#] $P<0.01$;与 AS-IV 组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

伤中,EPCs 数量下降和功能缺陷会削弱机体血管修复能力,并影响损伤后内皮再生^[12]。体外研究进一步表明,高糖处理可明显降低 EPCs 的迁移和成管能力,提示高糖微环境可直接损害 EPCs 的血管生成潜能^[13-14]。EPCs 具有向成熟内皮细胞分化、分泌促血管生成因子及参与内皮完整性维持等功能,因此其功能健全性对血管再生和内皮修复具有重要意义^[15]。在高糖环境下,EPCs 易受到糖基化终末产物积累、线粒体功能障碍和 ROS 过量生成等因素影响,表现为分化能力下降、迁移与成管功能减弱及细胞凋亡增加,从而参与糖尿病微血管病变、动脉粥样硬化和慢性创面难愈等病理过程^[16]。机制研究显示,高糖可通过激活 NADPH 氧化酶诱导 ROS 生成,破坏 EPCs 抗氧化稳态^[17];线粒体功能障碍也是高糖诱导 EPCs 氧化损伤和血管生成能力下降的重要机制^[18]。Yang 等^[19]进一步发现,糖基化终末产物可经 ROS 介导的 p38 丝裂原活化蛋白激酶/c-Jun 氨基末端激酶信号通路诱导 EPCs 凋亡。由此可见,激活以 Nrf2 为代表的内源性抗氧化防御信号,减轻高糖诱导的氧化损伤并恢复 EPCs 血管生成潜能,可能是防治糖尿病血管并发症的重要切入点。

近年来,关于天然药物在糖尿病血管并发症防治中的作用逐渐受到关注,其在调节内皮功能、改善血管生成及抗炎、抗氧化方面表现出良好效果^[20]。其中,AS-IV 作为黄芪中主要的活性单体成分,已被证实具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、促进血管新生与改善微循环等多重药理效应^[21-22]。尽管 AS-IV 在成熟血管内皮细胞模型中具有明确保护作用,但其对 EPCs 在高糖损伤状态下的分化调控能力及血管生成功能恢复机制仍缺乏研究^[23]。对于 AS-IV 是否能通过调节 Nrf2 通路,改善高糖诱导的 EPCs 功能障碍仍处于探索阶段。本团队前期研究发现,AS-IV 可在一定程度上增强 EPCs 的增殖、分化、迁移及体外成管等关键功能^[24]。糖尿病状态下,EPCs 长期暴露于高糖微环境易发生不同程度的功能受损,进而削弱其血管修复与再生能力。然而,AS-IV 能否通过 Nrf2 信号通路改善高糖诱导的 EPCs 功能障碍进而促进血管新生,目前仍缺少相应的基础研究证据。

本实验结果表明,在高糖损伤 EPCs 组中,EPCs 内 ROS 水平升高,提示氧化应激已成为其功能障碍的重要介导因素;AS-IV 干预后,ROS 水平降低,说明 AS-IV 具备明确的抗氧化特性,这与 Zou 等^[25]的研究结果一致,他们发现 AS-IV 能通过调控 GSK-3 β /

Nrf2 信号轴,显著缓解糖尿病小鼠 EPCs 的线粒体氧化应激损伤与功能障碍。进一步分析发现,高糖不仅造成氧化损伤,还会明显诱导 EPCs 发生凋亡和焦亡,说明高糖微环境可通过多种细胞死亡途径共同削弱 EPCs 存活能力和修复潜能;而 AS-IV 干预后,总凋亡率、焦亡比例均下降,表明 AS-IV 不仅能够减少 ROS 积聚,还可减轻高糖诱导的 EPCs 程序性细胞损伤,从而为维持其血管修复功能提供了有利条件。Zhao 等^[26]的研究指出,Ang-1 和 VEGF 是调控血管生成、血管稳定及功能维持的重要因子。本研究结果显示,高糖处理后,EPCs 培养上清液中 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、FGF 及 Ang-1 水平均降低,提示高糖可削弱 EPCs 的旁分泌促血管生成能力;AS-IV 干预后,上述因子水平均回升,说明 AS-IV 可能通过改善 EPCs 旁分泌功能,优化高糖状态下的血管生成微环境。基质胶成管实验进一步从功能层面验证了 AS-IV 对高糖损伤 EPCs 血管生成能力的改善作用,表现为交叉点数、血管总长度及血管分支长度增加。这与 Wang 等^[27]的研究结果相互印证,该研究发现,AS-IV 可增强脂肪来源间充质干细胞的迁移和促血管生成能力,并促进人脐静脉内皮细胞募集;在基质胶及后肢缺血模型中,AS-IV 预处理后,细胞表现出更强的血管新生潜能,其机制可能与 CXCR2 介导的 FAK 磷酸化有关。此外,本研究进一步观察到,加入 Nrf2 抑制剂 ML385 后,AS-IV 对 ROS 积聚、凋亡、焦亡、血管生成相关因子分泌及成管能力的改善作用均被部分削弱,提示 AS-IV 的保护效应可能与 Nrf2 信号通路的激活有关。

综上所述,AS-IV 能够减轻高糖诱导的 EPCs 氧化应激损伤,降低凋亡和焦亡水平,改善血管生成相关因子分泌,并增强其体外成管能力,对高糖损伤 EPCs 具有较明显的保护作用,在糖尿病血管并发症防治中具有一定潜在应用价值。进一步结合 ML385 干预结果分析,AS-IV 的上述保护效应可能与 Nrf2 信号通路的激活有关,但其具体作用机制有待进一步探索。本研究仍存在一定局限,仅采用体外模型,未进行动物实验验证;DiI-ac-LDL/UEA-1 双染可用于 EPCs 的初步鉴定,但该方法主要反映细胞摄取乙酰化低密度脂蛋白及结合荆豆凝集素-1 的内皮样功能特征,不能完全替代表面标志物鉴定;也未进一步检测胱天蛋白酶-1、消皮素-D、白细胞介素 1- β 等焦亡相关指标;对信号通路的验证较为初步,缺乏对 Nrf2 下游关键靶点的深入探讨。未来可通过动物

实验、结合免疫荧光、Western blot、RT-qPCR 及基因干预等方法,进一步完善机制研究,拓展 AS-IV 在血管再生与糖尿病并发症干预中的转化应用路径。

参考文献

- [1] 倪青,王世东,于秀辰,等. 糖尿病周围血管病变相关性糖尿病足中西医结合诊疗指南[J]. 中国临床保健杂志, 2025, 28(2): 145–156.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国糖尿病防治指南(2024版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2025, 17(1): 16–139.
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964–966.
- [4] 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.
- [5] 刘钰,周建大,张熙,等. 黄芪甲苷通过 SDF-1 α /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.
- [6] 刘向男,梁译文,周思源,等. 黄芪甲苷促过氧化氢诱导损伤的人内皮祖细胞向内皮细胞分化和成管的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(10): 138–141.
- [7] 付亚茹,孙阳阳,王洪星,等. 冻存脐带血中内皮祖细胞的分离培养及生物学特性鉴定[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(1): 215–220.
- [8] Kim K A, Shin Y J, Akram M, et al. High glucose condition induces autophagy in endothelial progenitor cells contributing to angiogenic impairment[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2014, 37(7): 1248–1252.
- [9] 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.
- [10] American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes. 2. diagnosis and classification of diabetes: standards of care in diabetes–2026[J]. Diabetes Care, 2026, 49(Supplement_1): S27–S49.
- [11] Dai X Z, Wang K, Fan J W, et al. Nrf2 transcriptional upregulation of IDH2 to tune mitochondrial dynamics and rescue angiogenic function of diabetic EPCs[J]. Redox Biology, 2022, 56: 102449.
- [12] 陶克,曹涛,郝彤. 糖尿病足溃疡血管形成障碍的机制及干预策略[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2025, 41(2): 120–126.
- [13] Raleigh M J, Pasricha S V, Nauth A, et al. Endothelial progenitor cells for diabetic cardiac and kidney disease[J]. Stem Cells Translational Medicine, 2024, 13(7): 625–636.
- [14] Li X, Mu S W, Huang S T, et al. AGGF1-primed endothelial progenitor cells alleviate ischaemia-reperfusion injury in diabetic hearts[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 21803.
- [15] 张璐瑶,蔡诗敏,张熙,等. 黄芪甲苷促糖尿病皮肤溃疡大鼠骨髓内皮祖细胞动员的机制[J]. 中国医师杂志, 2024, 26(3): 376–381.
- [16] 陈艳,高入春,广可颜,等. 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.
- [17] 中国微循环学会糖尿病与微循环专业委员会,中华医学会内分泌学会基层内分泌代谢病学组. 基层糖尿病微血管疾病筛查与防治专家共识(2024)[J]. 中国全科医学, 2024, 27(32): 3969–3986.
- [18] 王道鑫,张添光,缪朝玉. 血管内皮细胞线粒体氧化应激与动脉粥样硬化[J]. 药学实践与服务, 2023, 41(6): 329–334, 388.
- [19] Yang X, Zhu Z, Li Z, et al. AGEs inducing EPCs apoptosis via ROS and p38 MAPK/JNK pathways in diabetic vascular complications[J]. Physiological Research, 2025, 74(4): 601–611.
- [20] Ma H Y, Li J Q. The ginger extract could improve diabetic retinopathy by inhibiting the expression of eNOS and G6PDH, apoptosis, inflammation, and angiogenesis[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(5): e14084.
- [21] Liang Y T, Chen B Q, Liang D, et al. Pharmacological effects of astragaloside IV: a review[J]. Molecules, 2023, 28(16): 6118.
- [22] Zhang Y, Xu G N, Huang B Y, et al. Astragaloside IV regulates insulin resistance and inflammatory response of adipocytes via modulating CTRP3 and PI3K/AKT signaling[J]. Diabetes Therapy, 2022, 13(11): 1823–1834.
- [23] Meng P P, Yang R, Jiang F J, et al. Molecular mechanism of astragaloside IV in improving endothelial dysfunction of cardiovascular diseases mediated by oxidative stress[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021(1): 1481236.
- [24] Shi J T, Xuan Y, Zhang Q Y, et al. Astragaloside IV attenuates chronic prostatitis by activating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway: suppressing ferroptosis and enhancing antioxidant defense [J]. Journal of Inflammation Research, 2025, 18: 10061–10079.
- [25] Zou X L, Liu X N, Qu W J, et al. Astragaloside IV relieves mitochondrial oxidative stress damage and dysfunction in diabetic mice endothelial progenitor cells by regulating the GSK-3 β /Nrf2 axis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2025, 197(6): 3964–3981.
- [26] Zhao Y Q, Yu B, Wang Y X, et al. Ang-1 and VEGF: central regulators of angiogenesis[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2025, 480(2): 621–637.
- [27] Wang W Y, Shen Z K, Tang Y N, et al. Astragaloside IV promotes the angiogenic capacity of adipose-derived mesenchymal stem cells in a hindlimb ischemia model by FAK phosphorylation via CXCR2[J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153908.

(本文编辑 陈晨)