

·实验研究·

本文引用:李钰佳,李定祥,张熙,彭珣,刘春华,邓奕辉.基于AGEs/RAGE/NF- κ B通路探讨左归降糖通脉方对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用[J].湖南中医药大学学报,2022,42(7):1057-1063.

基于 AGEs/RAGE/NF- κ B 通路探讨左归降糖通脉方对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用

李钰佳¹,李定祥¹,张熙²,彭珣¹,刘春华¹,邓奕辉^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南省第二人民医院,湖南长沙410035)

[摘要] **目的** 观察左归降糖通脉方对晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)诱导大鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)损伤的干预作用,并基于 AGEs/RAGE/NF- κ B 通路探讨左归降糖通脉方的作用机制。**方法** 将30只SD大鼠随机均分为空白组(同体积蒸馏水)、中药组[左归降糖通脉方36 g/(kg·d)]和西药组[尼莫地平 18.35 mg/(kg·d)+格列齐特 27.5 mg/(kg·d)],每日灌胃1次,连续5 d,用于制备含药血清。将BMECs随机分为空白组、模型组、左归降糖通脉方组、尼莫地平+格列齐特组、晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)抑制剂(FPS-ZM1)组及吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(pyrrolidinedithiocarbamate ammonium, PDTC)组,BMECs加入200 mg/L的AGEs作用24 h后,分别予空白血清、空白血清、左归降糖通脉方含药血清、尼莫地平+格列齐特含药血清、FPS-ZM1、PDTC干预。通过形态学观察及CCK-8法检测细胞存活率,采用Western blot、RT-PCR法检测RAGE、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)的蛋白和mRNA表达情况。**结果** 与空白组比较,模型组细胞存活率明显下降($P<0.01$);与模型组比较,左归降糖通脉方组及尼莫地平+格列齐特组细胞存活率上升($P<0.05$);相较于空白组,模型组RAGE、NF- κ B的蛋白和mRNA表达水平明显上调($P<0.01$);相较于模型组,左归降糖通脉方组、尼莫地平+格列齐特组、FPS-ZM1组及PDTC组RAGE、NF- κ B的蛋白和mRNA表达水平明显下调($P<0.05$);左归降糖通脉方组与FPS-ZM1组RAGE、NF- κ B的蛋白和mRNA表达差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 左归降糖通脉方可能通过抑制AGEs与RAGE的结合,抑制AGEs/RAGE/NF- κ B通路的激活,下调下游炎症因子的释放,对BMECs起到保护作用。

[关键词] 糖尿病血管并发症;糖基化终末产物;左归降糖通脉方;脑微血管内皮细胞;核因子 κ B

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.001

Effect of Zuogui Jiangtang Tongmai Formula on brain microvascular endothelial cells injury in rats based on AGEs/RAGE/NF- κ B signaling pathway

LI Yujia¹, LI Dingxiang¹, ZHANG Xi², PENG Xun¹, LIU Chunhua¹, DENG Yihui^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410035, China)

[Abstract] **Objective** To observe the therapeutic effect of Zuogui Jiangtang Tongmai Formula (ZGJTTF) on the injury of

[收稿日期]2021-06-30

[基金项目]国家自然科学基金项目(81874416);湖南省中医药科研计划项目(201947);湖南省教育厅科学研究项目(16K063)。

[第一作者]李钰佳,女,博士研究生,研究方向:中西医结合防治糖尿病及其血管并发症的研究。

[通信作者]*邓奕辉,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:644138330@qq.com。

rat brain microvascular endothelial cells (BMECs) induced by advanced glycation end products (AGEs), and to explore the mechanism of ZGJTTMF based on the AGEs/RAGE/NF- κ B signaling pathway. **Methods** A total of 30 rats were randomly divided into blank group (the same volume of distilled water), Chinese medicine group [ZGJTTMF 36 g/(kg·d)] and western medicine group [nimodipine 18.35 mg/(kg·d) and gliclazide 27.5 mg/(kg·d)]. The rats were used to prepare medicated serum by gavage, once a day for 5 d. BMECs were divided into blank group, model group, ZGJTTMF group, nimodipine+gliclazide group, receptor for advanced glycation end products inhibitor (FPS-ZM1) group and pyrrolidinedithiocarbamate ammonium (PDTC) group. After adding 200 mg/L of AGEs to BMECs for 24 h, blank serum, blank serum, ZGJTTMF medicated serum, nimodipine+gliclazide medicated serum, FPS-ZM1 and PDTC were added. The cell survival rate was detected by morphological observation and CCK-8. Western blot and RT-PCR were used to detect the protein and mRNA expression of RAGE and nuclear factor kappa-B (NF- κ B) in each group. **Results** Compared with the blank group, the cell survival rate of the model group was significantly decreased ($P<0.01$); compared with the model group, the cell survival rate of ZGJTTMF group and nimodipine+gliclazide group was increased ($P<0.05$). Compared with the blank group, the protein and mRNA expression levels of RAGE and NF- κ B were significantly increased in the model group ($P<0.01$); compared with the model group, the protein and mRNA expression levels of RAGE and NF- κ B were significantly decreased in ZGJTTMF group, nimodipine+gliclazide group, FPS-ZM1 group and PDTC group ($P<0.05$); there was no significant difference in the protein and mRNA expression levels of RAGE and NF- κ B between ZGJTTMF group and FPS-ZM1 group. **Conclusion** ZGJTTMF may protect BMECs by inhibiting the binding of AGEs and RAGE, inhibiting the activation of AGEs/RAGE/NF- κ B pathway, and down-regulating the release of downstream inflammatory factors.

[**Keywords**] diabetic vascular complications; advanced glycation end products; Zuogui Jiangtang Tongmai Formula; brain microvascular endothelial cells; nuclear factor kappa-B

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢异常疾病。2019年国际糖尿病联合会的统计结果显示,全球糖尿病患病率为9.3%(4.63亿人),预计到2030年,糖尿病患病率将增至10.2%(5.78亿人)^[1]。糖尿病因其病因复杂、病情控制不理想、并发症多、致残率及致死率高,目前仍需寻求多种有效治疗方法及药物。研究认为,慢性高血糖引起的体内各种糖基化蛋白的过量堆积所形成的晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)是造成糖尿病血管病变的主要因素之一^[2]。AGEs是由蛋白质、核酸和脂质非特异性糖基化结合形成的稳定不可逆的终末产物^[3]。AGEs可通过结合晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)、破坏正常的分子构象、促进交联、改变酶的活性、损害受体识别等来影响血管的正常功能^[4]。AGEs通过与RAGE结合,诱导核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)的活化,激活一系列下游信号通路,上调炎症因子如白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor

necrosis factor- α , TNF- α)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular adhesion molecule-1, VCAM-1)等的释放,最终引起血管壁的损伤,诱发一系列血管并发症^[5]。大量研究认为,抑制RAGE活性能阻断炎症反应发生途径,该结论提示RAGE可能成为糖尿病相关炎症反应通路中的潜在作用靶点,抑制AGEs/RAGE/NF- κ B通路的激活可成为治疗糖尿病脑血管疾病的潜在作用机制^[6]。左归降糖通脉方是中医临床有效方剂,临床研究表明其对糖尿病脑血管并发症的治疗有显著的疗效^[7],但目前对该方作用于脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)的作用机制尚不明确。本实验基于AGEs/RAGE/NF- κ B通路探讨左归降糖通脉方对AGEs诱导BMECs损伤的干预机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞和动物 实验细胞株选用原代大鼠

BMECs,购自武汉原生原代生物医药科技有限公司,批号:RAT-CELL-0039。

SPF级健康雄性SD大鼠30只,鼠龄42d,体质量(220±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2016-0002,于湖南中医药大学动物实验中心内饲养。大鼠均采用无菌颗粒饲料饲养,自由饮水,环境温度稳定在20~25℃,室内通风良好,定时更换垫料。所有操作符合实验动物伦理学要求,已通过湖南中医药大学实验动物中心伦理审查,伦理审查编号:LL202060301。

1.1.2 药物、试剂和仪器 左归降糖通脉方的方剂组成:熟地黄20g,枸杞子12g,山茱萸12g,黄芪30g,黄连10g,地龙12g,丹参20g,川芎12g,水蛭8g,石菖蒲8g。共144g,购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。采用水煎法,水煎2次后合并煎液,过滤药渣浓缩至含生药2g/mL,4℃冰箱中储存备用。尼莫地平片(20mg/片,正大青春宝药业有限公司,国药准字:H33022285,批号:BJ57178);格列齐特缓释片(30mg/片,施维雅制药有限公司,国药准字:H20044694,批号:1182108109);RAGE抑制剂(FPS-ZM1)、吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(pyrrolidinedithiocarbamate ammonium, PDTC)(美国Med-ChemExpress公司,批号:945714-67-0,5108-96-3)。

原代细胞培养体系(武汉原生原代生物医药科技有限公司,批号:MED-SUP-0002);人血清白蛋白、吩嗪硫酸二甲酯(美国Sigma公司,批号:061M700V、P9625);D-葡萄糖、透析袋(北京索莱宝科技有限公司,批号:G8150、YA1045);青霉素、庆大霉素(大连美仑生物科技有限公司,批号:N0521A、J0520A);CCK-8试剂(日本同仁化学研究所,批号:21208262);兔抗RAGE抗体(英国Abcam公司,批号:ab3611);兔抗NF-κB抗体(美国CST公司,批号:8242);山羊抗兔IgG、β-actin抗体(美国Proteintech公司,批号:SA00001-2、60008);TRIzol(美国Invitrogen公司,批号:15596018);逆转录试剂盒(北京康为世纪科技有限公司,批号:CW2020S)。引物由上海生物工程公司合成。

高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司,型号:5910R);倒置显微镜(德国Olympus公司,型号:IX51);电泳仪、电泳槽、荧光定量RCP仪(美国Bio-

rad公司,型号:164-5050、165-8000、1855195);转膜仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DY CZ-40A);多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,型号:Cytation3);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂,型号:RE-52AA)。

1.2 方法

1.2.1 BMECs原代细胞的培养 原代细胞培养体系培养,加入胰蛋白酶1mL覆盖于细胞后吸出消化液,作用1~3min,倒置显微镜下观察,待细胞变圆变亮后与胰蛋白酶脱离、弃去,加入2mL完全培养液终止消化,用吸管轻轻吹打培养瓶底部,至细胞脱落,15mL离心管中离心(离心半径17.8cm,800r/min,5min),吸去上清液。加入2mL培养液,以1mL的Tip头上下吸放数次以打散细胞团块,混和均匀后,转移至新的培养瓶中,每个培养瓶再加完全培养基,置于37℃含5%CO₂的培养箱中培养。每1~2天换液1次,取传代至4~5代生长状态良好的细胞用于正式实验。

1.2.2 体外制备AGEs AGEs的体外制备参照糖孵育法^[8],在含100mmol/L的D-葡萄糖、200mg/L的青霉素、70μg/L庆大霉素和1.5mmol/L吩嗪硫酸二甲酯的磷酸缓冲液(100mmol/L)中加入人血清白蛋白,于37℃恒温箱孵育8周。以相同条件但不含葡萄糖的缓冲液孵育的人血清白蛋白作为对照。孵育结束后以无菌的透析袋置于磷酸盐缓冲液(pH7.4)中,透析24h除去未结合的D-葡萄糖,用0.22μm微孔滤膜过滤除菌后置于4℃冰箱中保存。

1.2.3 空白血清及含药血清的制备 SD大鼠适应性喂养1周,根据体质量按照随机数字表法分为空白组、左归降糖通脉方组和尼莫地平+格列齐特组,每组10只。左归降糖通脉方组的灌胃剂量按动物体表面积剂量换算法^[9],以60kg成人2倍临床等效剂量的药液灌胃[36g/(kg·d),即4mL/d],每天1次,持续5d;尼莫地平+格列齐特组给予尼莫地平片及格列齐特缓释片灌胃,将尼莫地平片及格列齐特缓释片研磨成粉末,加入超纯水配成终浓度分别为2mg/mL、3mg/mL的溶液,以60kg成人2倍临床等效剂量灌胃,分别为18.35mg/(kg·d)、27.5mg/(kg·d)^[10],共4mL/d;空白组予以相同体积的蒸馏水灌胃。末次灌胃前禁食12h,待末次灌胃1h后,无菌条件下

腹主动脉采血。将所采集的血清置于4℃冰箱过夜,待充分凝固后离心(离心半径17.8 cm,3000 r/min,15 min),取上清液,恒温水浴锅56℃水浴30 min,灭菌后存放于-80℃冰箱。

1.3 药物干预及分组

参考课题组前期研究结果^[11],根据CCK-8结果计算细胞存活率,选取最接近细胞半数抑制率的AGEs浓度200 mg/L作用24 h,左归降糖通脉方含药血清最高增殖率浓度5%作用24 h为造模及给药的最佳作用浓度及时间。将贴壁70%~80%的BMECs用胰蛋白酶消化至5 mL离心管中,细胞计数后调节细胞浓度至 10^4 个/mL,细胞悬液随机分成6组后贴壁培养。分组为空白组(BMECs+细胞培养液4 mL)、模型组(BMECs+200 mg/L AGEs细胞培养液4 mL)、左归降糖通脉方组(BMECs+200 mg/L AGEs细胞培养液4 mL作用24 h+5%左归降糖通脉方含药血清4 mL)、尼莫地平+格列齐特组(BMECs+200 mg/L AGEs细胞培养液4 mL作用24 h+5%尼莫地平+格列齐特含药血清4 mL)、FPS-ZM1组(为RAGE抑制剂,BMECs+FPS-ZM1预处理1 h+200 mg/L AGEs细胞培养液4 mL作用24 h)及PDTC组(为NF-κB抑制剂,BMECs+PDTC预处理1 h+200 mg/L AGEs细胞培养液4 mL作用24 h)。

1.4 CCK-8法检测细胞存活率

将贴壁70%~80%的BMECs用胰蛋白酶消化至5 mL离心管中,细胞计数后将吹打混匀的细胞悬液浓度调节至1000个/孔,接种于96孔板中,孔内的细胞随机分为4组:空白组(BMECs+细胞培养液)、模型组(BMECs+200 mg/L AGEs细胞培养液)、左归降糖通脉方组(BMECs+5%左归降糖通脉方含药血清)、尼莫地平+格列齐特组(BMECs+5%尼莫地平+格列齐特含药血清),每孔100 μL,另设仅加细胞培养液的空白孔作为对照。每组设6个复孔,放入培养箱中培养24 h,待BMECs充分贴壁后吸出孔内原细胞培养液,加入上述各组不同干预药物,作用24 h,吸出AGEs,加入新鲜细胞培养液,再向每孔中加入10 μL的CCK-8溶液,在培养箱内继续孵育15 h,用酶标仪测定其在450 nm处的光密度(optical density, OD)值并进行统计学分析,计算各组细胞存活率。细胞存活率计算公式:细胞存活率=(给药组OD值-空白孔OD值)/(空白组OD值-空白孔OD值)×100。

1.5 Western blot法检测RAGE、NF-κB蛋白表达

PBS洗涤各组细胞1~2次,加入RIPA裂解液60 μL,冰上裂解30 min,用细胞刮子将裂解后的细胞刮下,低温高速离心机4℃低温离心(离心半径17.1 cm,3000 r/min,15 min),取上清液。采用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量;每孔上样40 μg蛋白量,经缓冲液处理后加热变性,以10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,先恒压80 V电泳30 min,待样品至分离胶时,调整电压至110 V继续电泳90 min;电转移法将蛋白条带转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,200 mA转膜,约2 h;用1×TBST配制5%的脱脂奶粉,室温封闭1 h;漂洗后分别加入兔抗RAGE抗体(1:1000)及兔抗NF-κB抗体(1:1000),4℃冰箱过夜;1×TBST洗3次,每次10 min;加入山羊抗兔IgG(1:5000),37℃恒温箱孵育1 h;将洗好的膜用滤纸吸去表面液体,加入1 mL配制好的显影液,放进化学发光凝胶成像仪中进行显影,分析目的蛋白条带的相对灰度值,目的条带灰度值/内参条带灰度值即为目的蛋白相对表达量。每个样品重复3次。

1.6 RT-PCR法检测RAGE、NF-κB mRNA表达

采用TRIzol试剂提取各组细胞总mRNA。按照试剂盒操作说明于PCR仪中进行逆转录;反应完成后,按照说明进行扩增。反应条件为95℃10 min,95℃15 s,60℃1 min,共40个循环。每组取3个样本,每个样本3个复管进行逆转录,确认PCR的扩增曲线和熔解曲线,记录各个基因的循环阈(cycle threshold, Ct)值。以β-actin作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,计算mRNA的相对表达量,每组重复3次。详见表1。

表1 各基因引物序列表

名称	正向	反向	长度/bp
RAGE	CTGCCTCTGAACCTCACAGCCAATG	GTGCCTCTGGTCTCCTCCTTC	155
NF-κB	ACTATGGATTTCCTGCTTACGG	GCACAATCTCTAGGCTCGTT	118
β-actin	ACATCCCGTAAAGACCTCTATGCC	TACTCTGCTTGCTGATCCAC	223

1.7 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件进行分析。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。数据符合正态分布且方差齐者,使用单因素方差分析,两两比较采用ANOVA分析;方差不齐则用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AGEs 对 BMECs 形态的影响

镜下观察 BMECs 为梭形,单层贴壁生长,融合后呈“鹅卵石”排列。镜下可见正常细胞胞膜完整,细胞透光性较强;加入 200 mg/L 的 AGEs 作用 24 h 后,倒置显微镜下可见 BMECs 形态发生明显改变,细胞间隙增宽,细胞分离,胞膜皱缩、轮廓不清甚至破裂。详见图 1。

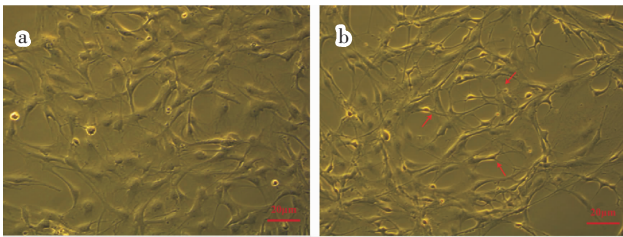


图 1 AGEs 对 BMECs 形态的改变(倒置显微镜,×200)

注:a.正常BMECs细胞;b.加入 200 mg/L AGEs 作用 24 h 的 BMECs 细胞。

2.2 各组细胞存活率比较

与空白组比较,模型组细胞存活率明显下降($P<0.01$);与模型组比较,左归降糖通脉方组及尼莫地平+格列齐特组细胞存活率升高($P<0.01$);与左归降糖通脉方组比较,尼莫地平+格列齐特组细胞存活率降低($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组 BMECs 中细胞存活率比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	存活率/%
空白组	100.00±7.88
模型组	74.30±4.75**
左归降糖通脉方组	121.19±2.72** ^{##}
尼莫地平+格列齐特组	107.82±1.53** ^{##}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与左归降糖通脉方组比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.3 各组 RAGE、NF-κB 的蛋白表达水平比较

与空白组相比,模型组 RAGE、NF-κB 蛋白表达水平明显上调($P<0.01$);与模型组比较,左归降糖通脉方组、尼莫地平+格列齐特组、FPS-ZM1 组及 PDTC 组 RAGE、NF-κB 的蛋白表达水平明显下调($P<0.05$);与左归降糖通脉方组比较,尼莫地平+格列齐特组 RAGE、NF-κB 及 PDTC 组 RAGE 蛋白表达水平降低($P<0.05$);与尼莫地平+格列齐特组比较,FPS-ZM1 组 RAGE、NF-κB 的蛋白表达水平升高

($P<0.05$);与 FPS-ZM1 组比较,PDTC 组 RAGE 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。详见图 2、表 3。

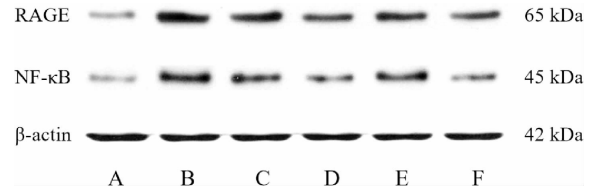


图 2 各组 BMECs 中 RAGE、NF-κB 的蛋白表达电泳图
注:A.空白组;B.模型组;C.左归降糖通脉方组;D.尼莫地平+格列齐特组;E.FPS-ZM1 组;F.PDTC 组。

表 3 各组 BMECs 中 RAGE、NF-κB 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	RAGE	NF-κB
空白组	0.077±0.018	0.128±0.038
模型组	0.477±0.037**	0.428±0.012**
左归降糖通脉方组	0.243±0.008** [#]	0.253±0.035** ^{##}
尼莫地平+格列齐特组	0.187±0.016** ^{##}	0.194±0.028** ^{##}
FPS-ZM1 组	0.222±0.021** ^{##} [△]	0.249±0.029** ^{##} [△]
PDTC 组	0.188±0.022** ^{##} ^{▲▲}	0.206±0.022** ^{##}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与左归降糖通脉方组比较,^{*} $P<0.05$;与尼莫地平+格列齐特组比较,[△] $P<0.05$;与 FPS-ZM1 组比较,^{▲▲} $P<0.01$ 。

2.4 各组 RAGE、NF-κB mRNA 表达水平比较

与空白组比较,模型组 RAGE、NF-κB mRNA 表达水平明显上调($P<0.01$);与模型组比较,左归降糖通脉方组、尼莫地平+格列齐特组、FPS-ZM1 组及 PDTC 组 RAGE、NF-κB mRNA 表达水平明显下调($P<0.05$);与左归降糖通脉方组比较,尼莫地平+格列齐特组及 PDTC 组 RAGE mRNA 表达水平降低($P<0.05$);与尼莫地平+格列齐特组比较,FPS-ZM1 组 RAGE mRNA 及 PDTC 组 RAGE、NF-κB mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组 BMECs 中 RAGE、NF-κB 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	RAGE	NF-κB
空白组	0.778±0.214	1.034±0.044
模型组	12.354±1.200**	3.072±0.246**
左归降糖通脉方组	8.580±0.479** [#]	1.992±0.187* [#]
尼莫地平+格列齐特组	4.470±0.141** ^{##} ^{§§}	1.365±0.101* ^{##}
FPS-ZM1 组	6.763±0.525** [#] [△]	1.754±0.162* ^{##}
PDTC 组	6.336±0.354** ^{##} ^{△△}	1.635±0.103** ^{##} ^{△△}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与左归降糖通脉方组比较,^{*} $P<0.05$,^{§§} $P<0.01$;与尼莫地平+格列齐特组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

3 讨论

AGEs能介导内皮细胞、平滑肌细胞和单核吞噬细胞等细胞的促炎作用并诱导氧化应激,是引起糖尿病及其并发症发生、发展的主要因素^[12]。AGEs作用于机体导致疾病发生的途径有多种,目前认为受体途径是引起血管内皮损伤导致疾病发生的最主要途径^[4]。RAGE是AGEs的主要作用受体,当细胞或局部组织处出现RAGE的配体或炎症因子聚集时,可上调RAGE的表达。NF- κ B是一种蛋白质复合物,是促炎症因子的转录因子之一,能对有害的细胞刺激,如感染、炎症反应等作出迅速的反应^[13]。当细胞处于静息状态时,NF- κ B与其抑制分子相结合,以非活化的状态存在于胞质中;NF- κ B被促炎症因子、细菌成分、病毒等刺激后,NF- κ B复合物发生磷酸化并降解,激活后的NF- κ B发生核转移,与下游靶基因的增强子位点结合,启动靶基因的转录和表达,激活下游信号通路,诱导各种炎症反应的发生并释放炎症因子,破坏了血管内皮细胞的正常生理功能及形态结构,最终造成血管细胞的损伤^[14]。NF- κ B参与了AGEs介导的多条信号通路,在与AGEs相关的炎症反应中起着关键作用。RAGE的激活能活化静息状态下的NF- κ B,活化后的NF- κ B又能上调RAGE的活化和表达,形成反馈调节系统,放大炎症反应效应。糖尿病患者长期的高血糖状态引起血液中AGEs含量的增多,RAGE表达上调,激活NF- κ B,诱导释放多种炎症因子,造成不同程度的血管内皮损伤,从而引起血管并发症的发生^[15]。

糖尿病血管并发症包括各种大血管及微血管并发症,大血管在体内直行分布,运输血液沟通上下,微血管为大血管的分支,呈网状分布于全身,将营养物质运输至各组织器官。在生理结构及功能上,大血管类似于中医的“经脉”,微血管类似于中医的“络脉”,共同构成了人体的经络网络体系^[16-17]。基于中医络病学理论,现代医家认为糖尿病血管并发症的病位在脉络,痰瘀阻滞,日久化热,瘀、热、痰等多种病理产物在络脉中相互胶结,合而为毒,糖尿病性脑病的主要病机为络脉瘀结,毒损脑络^[18]。消渴日久,气血日益亏虚,气血运行无力,久则化瘀,加之消渴病本为阴虚燥热,阴虚津亏则瘀愈甚,津凝为痰,痰

瘀互结,阻滞脉络则发而为病^[19-20]。左归降糖通脉方由左归丸加减化裁而来,滋阴益气、化痰解毒,使祛瘀而不伤正、扶正而不留滞。前期研究证明,该方可对抗实验性糖尿病大鼠的脂质过氧化对机体的损伤,能显著缓解糖尿病合并脑血管并发症患者的临床症状,改善糖尿病并发脑梗死患者的神经功能缺损,并在一定程度上抑制炎症反应的发生和发展,具有良好的降糖、降脂、抗炎等作用^[7]。

本课题组前期研究了AGEs对人静脉内皮细胞及BMECs的影响,认为其对内皮细胞的损伤作用主要为炎性损伤^[8],为了证实中药复方的有效性,选择尼莫地平片+格列齐特缓释片作为阳性对照药物^[10]。既往研究表明,随着浓度的增加和作用时间的延长,一定浓度的AGEs可造成细胞不可逆损伤,释放IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1等炎症因子^[11]。倒置显微镜下可见加入AGEs后,BMECs结构遭到明显破坏,提示糖尿病患者体内持续的血管内皮高糖状态导致BMECs活力下降,损伤甚至死亡。Western blot及RT-PCR结果表明,与加入了AGEs的受损细胞的模型组相比,左归降糖通脉方含药血清能明显降低细胞内RAGE、NF- κ B蛋白及mRNA的表达;通过各药物组与模型组之间的比较以及药物组间的比较发现,左归降糖通脉方组、尼莫地平+格列齐特组、FPS-ZM1组和PDTC组细胞的RAGE、NF- κ B蛋白和mRNA的表达水平均出现不同程度的降低,其中左归降糖通脉方组表达水平的下降程度与FPS-ZM1组更为接近,由此可以推测左归降糖通脉方含药血清干预BMECs的作用机制可能与FPS-ZM1的作用机制更为接近。FPS-ZM1和PDTC分别抑制了下游炎症反应信号通路发生的两个作用阶段,即AGEs与RAGE的结合以及NF- κ B的激活。FPS-ZM1是高亲和力的RAGE抑制剂,可在高糖环境中通过抑制RAGE的表达抑制神经炎症反应的发生^[21]。PDTC是一种可以通透细胞膜的NF- κ B活化抑制剂,能直接抑制NF- κ B信号通路的激活及下游信号的传递,阻断多种炎症反应的发生^[22]。本研究结果提示,左归降糖通脉方干预AGEs损伤BMECs可能是通过直接阻断AGEs与膜蛋白受体RAGE的结合,进而抑制下游关键因子NF- κ B的活化,阻断下游信号的传递,抑制炎症反应的发生和炎症因

子的释放,降低AGEs对BMECs的炎性损伤。RAGE阻滞剂和NF- κ B抑制剂两组之间的蛋白和mRNA的表达较为接近,这可能是由于NF- κ B与RAGE之间存在反馈调节机制,以至于两组间差异不明显。

综上所述,本研究证明左归降糖通脉方能有效抑制AGEs对BMECs的炎性损伤,其作用机制可能是通过抑制AGEs与RAGE的结合,抑制了AGEs/RAGE/NF- κ B通路,并下调了炎症因子的释放,从而对BMECs起到保护作用。

参考文献

- [1] ASCHNER P, KARURANGA S, JAMES S, et al. The International Diabetes Federation's guide for diabetes epidemiological studies[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2021, 172: 108630.
- [2] 李晓燕,钱玲玲,王如兴.晚期糖基化终末产物对糖尿病心肌病影响的研究进展[J].*中国分子心脏病学杂志*,2021,21(2):3895-3898.
- [3] LIU Y, CHEN Z Z, LIU L, et al. Role of moesin in the effect of glucagon-like peptide-1 on advanced glycation end products-induced endothelial barrier dysfunction [J]. *Cellular Signalling*, 2022, 90: 110193.
- [4] 刘言言,黄楷,郎江莉,等.晚期糖基化终末产物诱导糖尿病血管病变机制的初步探讨[J].*中华血管外科杂志*,2020,5(2):129-134.
- [5] 赵珂,王小磊,张宪党,等.糖基化终末产物对糖尿病肾脏疾病作用机制的研究进展[J].*中国糖尿病杂志*,2020,28(12):951-954.
- [6] 郑玲,李虹,张文生.晚期糖基化终末产物受体小分子拮抗剂研究进展[J].*中国药物化学杂志*,2021,31(2):142-151.
- [7] 邓奕辉,崔莲珠,喻嵘,等.降糖通脉方治疗糖尿病合并脑梗死32例临床观察[J].*湖南中医学院学报*,2004,24(5):40-42.
- [8] 颜佳博,邓奕辉,廖俞强,等.基于RAGE/NF- κ B/mTOR信号通路探讨滋阴活血解毒方对AGEs诱导VEC损伤的干预作用[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(7):719-722.
- [9] 贺石林.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2001:64.
- [10] 邓奕辉,李定祥,陈大舜.降糖通脉方对糖尿病合并缺血性脑损伤模型大鼠的影响[J].*湖南中医学院学报*,2002,22(1):10-13.
- [11] 李钰佳,李定祥,马钟丹妮,等.左归降糖通脉方含药血清对晚期糖基化终末产物诱导脑微血管内皮细胞损伤的影响[J].*中医杂志*,2019,60(3):237-241.
- [12] VAN DONGEN K C W, LINKENS A M A, WETZELS S M W, et al. Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) increase their concentration in plasma and tissues, result in inflammation and modulate gut microbial composition in mice; evidence for reversibility[J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110547.
- [13] 肖瑶,刘百祥,封迎帅,等.加味椒艾丸贴敷神阙穴对轮状病毒腹泻小鼠NOD1/NF- κ B信号通路的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(7):1042-1047.
- [14] 张禹,王广伟,王新爱,等.五味消毒饮对脂多糖诱导大鼠肾系膜细胞NF- κ B信号通路的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2022,28(9):16-22.
- [15] 方颖,王亚东,周雯,等.黄芪桂枝五物汤对糖尿病周围神经病变大鼠模型AGEs/RAGE/NF- κ B信号通路的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2020,26(13):52-58.
- [16] 余瑞宁,方锐,周月,等.葛金文教授基于“血实宜决,气虚宜掣”运用脑泰方治疗高血压脑小血管病临床证萃[J].*湖南中医药大学学报*,2022,42(3):445-448.
- [17] 彭珣,李定祥,李钰佳,等.从络病学角度探讨2型糖尿病并发脑梗死的病机演变[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(8):1239-1243.
- [18] 田恺,张向宇,牛博真,等.基于“毒损脑络”理论中医脑病因病机 and 辨证施治的研究进展[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2021,19(8):1308-1310.
- [19] 张健,江振国,冯兴中.从“虚损-痰瘀毒”论糖尿病认知功能障碍治疗[J].*北京中医药*,2020,39(10):1051-1054.
- [20] 曲金芝,杨宇峰,石岩.基于络病理论探析糖尿病及其并发症中医病机[J].*辽宁中医药大学学报*,2021,23(12):199-203.
- [21] 朱延东,李艳,周晓燕.RAGE抑制剂FPS-ZM1对db/db小鼠抑郁的影响及机制[J].*安徽医科大学学报*,2022,57(4):540-544.
- [22] JIANG J Y, LIU D J, LIU M X. The protective effect of NF- κ B signaling pathway inhibitor PDTC on mice with chronic atrophic gastritis [J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2021, 56(10): 1131-1139.

(本文编辑 周旦)