

苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导的脐静脉内皮细胞 NOX4 蛋白表达的影响

冯晓帆^{*}, 柳春, 赵丹玉, 刘恋, 王艳杰, 洪涌涛, 刘博通
(辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:观察苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导的人脐静脉内皮(EA.hy926)细胞中还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(NOX4)表达等指标的影响,探讨苦荞麦总黄酮在胰岛素抵抗(IR)信号传导通路中的作用机制。方法:将EA.hy926细胞株常规培养、传代,加入终浓度 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胰岛素,分为空白组、模型组、苦荞麦总黄酮组($31.25, 62.5, 125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和二甲双胍组,除空白组外,其他各组先用 $600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 软脂酸造IR模型,苦荞麦总黄酮组进一步加入 $125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苦荞麦总黄酮,二甲双胍组加入 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲双胍。利用双抗体夹心法测定非对称性三甲基精氨酸(ADMA)含量,硝酸还原酶法测定NO含量,Western blot测定NOX4蛋白表达。结果:苦荞麦总黄酮中、高剂量组与模型组比较,ADMA含量明显减少,NO含量明显增加,均有显著性差异;苦荞麦总黄酮组高剂量组与模型组比较,NOX4蛋白表达量显著减少。结论:苦荞麦总黄酮可通过抑制软脂酸诱导下产生IR的EA.hy926细胞中NOX4和ADMA的合成来促进NO的合成,进而抑制IR的发生。

[关键词] 原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(NOX4); 苦荞麦; 总黄酮; 脐静脉内皮细胞; 软脂酸; 胰岛素抵抗

[中图分类号] R945;R285.5;R696⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0106-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090106

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160314.1613.024.html>

[网络出版时间] 2016-03-14 16:13

Effect of Total Flavonoids from *Fagopyrum tataricum* on Expression of NOX4 Protein in EA.hy926 Cell Induced by Palmitic Acid

FENG Xiao-fan^{*}, LIU Chun, ZHAO Dan-yu, LIU Lian, WANG Yan-jie, HONG Yong-tao, LIU Bo-tong
(College of Basical Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of total flavonoids from *Fagopyrum tataricum* on expression of nicotinamide adenine dinucleotidephosphateoxidase-4 (NOX4) in EA.hy926 cell induced by palmitic acid, and to discuss mechanism of total flavonoids from *F. tataricum* in signal transduction pathway of insulin resistance. **Method:** EA.hy 926 cells were divided into blank group, insulin resistance model group, total flavonoids of *F. tataricum* group ($31.25, 62.5, 125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and metformin group. Every groups were combined insulin with $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the blank group, other groups were combined $600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ palmitic acid. Total flavonoids of *F. tataricum* group was combined $125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ total flavonoids of *F. tataricum*. Metformin group was combined $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ metformin. The content of asymmetric dimethylarginine (ADMA) was tested by double antibody sandwich method. The content of NO was tested by nitrate reductase method. NOX4 protein expression levels were determined by Western blot. **Result:** Compared with model group, contents of ADMA in the middle and high dose groups of total flavonoids were significantly reduced, contents of NO were increased significantly. Compared with model group, expression levels of NOX4 protein were reduced significantly in high

[收稿日期] 20150705(015)

[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目(2013226012)

[通讯作者] ^{*} 冯晓帆,博士,副教授,从事天然药物受体及受体后信号转导研究,Tel:024-31207093,E-mail:taxi1977@126.com

dose groups of total flavonoids. **Conclusion:** Total flavonoids from *F. tataricum* can promote synthesis of NO by inhibiting synthesis of NOX4 and ADMA in EA. hy926 cell induced by palmitic acid, then it may restrain insulin resistance.

[**Key words**] nicotinamide adenine dinucleotidephosphateoxidase-4 (NOX4); *Fagopyrum tataricum*; total flavonoids; EA. hy926 cell; palmitic acid; insulin resistance

苦荞麦又称乌麦、花荞或菠麦,为荞麦属一年生草本植物,在我国东北、西北、华北、西南等地均有大面积种植分布,来源广泛^[1]。苦荞麦性平、寒,味苦,《本草纲目》记载“苦荞出南方,春社前后种之。茎青多枝,叶似荞麦而尖,开花带绿色,结实亦似荞麦,稍尖而棱角不峭”,有宽肠、健胃、益气力、续精神、利耳目之功效^[2-3]。现代医学研究发现苦荞麦有清除自由基、延缓衰老、防治心脑血管疾病等药理作用^[4]。

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是 2 型糖尿病发病机制之一^[5],且有研究证实血液中高浓度软脂酸能使血管内皮细胞受损,导致 IR^[6]。在前期已对苦荞麦总黄酮研究的基础上^[7-8],本实验利用高浓度软脂酸诱导 EA. hy926 细胞产生 IR,加入苦荞麦总黄酮,观察与 IR 产生密切相关的 NOX4/ADMA 信号通路中还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(NOX4)表达的变化及其对非对称性二甲基精氨酸(ADMA),一氧化氮(NO)含量等的影响,探讨苦荞麦总黄酮对 IR 的作用机制。

1 材料

DW-HL388 型低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司),DFC320 型倒置显微镜(德国 Leica 公司),Anthos 2010 型全自动酶标仪(奥地利 CE 公司),HR/T20M 型台式冷冻高速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司),BioSpec-nano 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),S1000 Thermal Cycler 型梯度聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司),EPS 300 型电泳仪(上海天能科技有限公司),G-Box 系列凝胶成像系统(英国 Syngene 公司)。

EA. hy926 人脐静脉内皮细胞株(中科院上海生命科学研究院细胞资源中心),苦荞麦总黄酮(日本三益制药株式会社,质量分数 991.65 mg·g⁻¹),二甲双胍(上海生工生物工程有限公司),兔抗人非对称性二甲基精氨酸(ADMA)一抗、兔抗人还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(NOX4)一抗(美国 Proteintech Group 公司),羊抗兔 IgG 二抗(美国 CST 公司),双抗(美国 Hyclone 公司),RT-PCR 引物和 RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限

公司),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所),ADMA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 细胞培养 在紫外灯灭菌后的超净工作台内进行操作,将 EA. hy926 细胞株置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,于 37 °C 培养箱中常规培养、传代;取生长状态良好的细胞按 400 mL/瓶加入 0.25% 胰酶对细胞消化;当电镜下观察到有细胞脱落时,倒掉胰酶,加入 DMEM 完全培养基终止反应;吹打细胞成单细胞悬液后,分装后置于 37 °C 培养箱中培养。

2.2 模型建立 胰岛素抵抗(IR)细胞模型可通过一定浓度的软脂酸建立^[9]。取生长处于对数期且状态良好的细胞,用胰酶消化后吹打均匀,用细胞计数板计数,将单细胞悬液的密度稀释到 5 × 10⁴ 个/mL 后接种到 24 孔板上(200 μL/孔)。设定正常组和 4 个不同浓度梯度的软脂酸组,每组设 6 复孔,待细胞在 37 °C 培养箱中 90% 生长融合时,除正常组,其他各组分别加浓度 300,400,500,600 μmol·L⁻¹的软脂酸溶液,孵育 1 h 后加入 50 nmol·L⁻¹胰岛素溶液 5 μL,采用噻唑蓝法(MTT)检测,计算细胞增殖率分别约为正常组的 85%,78%,71%,60%,故选择软脂酸复制 IR 细胞模型的浓度 600 μmol·L⁻¹。

2.3 试验分组 分为 6 组,包括空白组,模型组,苦荞麦总黄酮低、中、高剂量组和二甲双胍组,各加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基和 50 nmol·L⁻¹胰岛素,除空白组外,其他各组加入 600 μmol·L⁻¹软脂酸;苦荞麦总黄酮低、中、高剂量组加入苦荞麦总黄酮,使加入后苦荞麦总黄酮质量浓度分别为 31.25,62.5,125 mg·L⁻¹;二甲双胍组加入 2 mmol·L⁻¹二甲双胍 4 μL。

2.4 生化指标的测定

2.4.1 硝酸还原酶法测定 NO 含量 依照 NO 试剂盒说明书操作,将紫外-可见分光光度计波长设定 550 nm,测定各样本的吸光度 A,检测硝酸盐和亚硝酸盐的含量。

2.4.2 双抗体夹心法测定 ADMA 含量 按照

ADMA 检测试剂盒说明书操作。用 ADMA 抗体包被微孔板制固相抗体后,加入含有 ADMA 的样本,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记过的羊抗人抗体,构成抗体-抗原-酶标抗体复合物,洗涤后加底物四甲基联苯胺(TMB)显色,在酸的作用下由蓝色变为稳定的黄色,ADMA 含量与显色深浅正相关。于 450 nm 测定各样本 A。

2.4.3 甲基精氨酸二甲胺水解酶 2 (DDAH2) mRNA 表达的检测 将培养瓶里的细胞用预冷磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,加入 Trizol 试剂 1 mL,转移到离心管中吹打均匀,室温静置 5 min 后加入三氯甲烷 200 μ L,震荡 15 s 后室温静置 5 min,离心 5 min (4 $^{\circ}$ C, 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$,下同),吸取上清液转移至新离心管中,加入等体积异丙醇,混匀静置 10 min,离心 10 min,弃去上清液,加入 75% 乙醇 1 mL 洗涤沉淀,离心 5 min,弃去上清液,加不含杂质 RNA, DNA 和蛋白质的纯水来溶解 RNA 沉淀。

按试剂盒说明要求建立 10 μ L 的逆转录(RT)反应体系,利用紫外分光光度法测定细胞总 RNA 浓度,加样量 = 0.5/RNA 浓度,反应条件为 30 $^{\circ}$ C 保持 10 min,50 $^{\circ}$ C 保持 30 min,95 $^{\circ}$ C 保持 5 min,4 $^{\circ}$ C 持续保温;建立 25 μ L 的 PCR 反应体系,其中 DDAH2 上游引物序列 5'-TTCTCCACCAACTCTGTCCTC-3',下游引物序列 5'-CAACCGCTCGGATTTCTTA-3',扩增片段长度 949 bp,退火温度 56 $^{\circ}$ C; β -肌动蛋白(β -actin)上游引物序列 5'-ACACGAAAGCAATGC TATCACCTC-3',下游引物序列 5'-TGACAGCAG TCGGTTGGAGCGA-3',扩增片段长度 153 bp,退火温度 60 $^{\circ}$ C;反应条件设为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 保持 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 保持 45 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 保持 5 min,4 $^{\circ}$ C 持续保温。取 PCR 扩增产物和 Marker 各 5 μ L 分别与含有核酸染料的上样缓冲液 1 μ L 混匀,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,通过凝胶成像系统测定各组样本 A。计算目的基因条带与内参 β -actin 条带 A 的比值。

2.4.4 Western blot 测定 NOX4 蛋白表达 倒净培养瓶液体后加预冷 PBS 3 mL 清洗 2 次,吸净 PBS 后加蛋白裂解液 200 μ L,转移至新离心管中,冰上裂解 30 min。于 4 $^{\circ}$ C,14 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,转移上清液至新离心管中,利用 BCA 蛋白定量试剂盒检测样本蛋白质浓度。将各组样本与上样缓冲液混合,煮沸 5 min,把上样量调整至 55 μ g 后进行 10% 十二烷基磺酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)电泳,恒压进行 90 min,恒流转聚偏氟乙烯

膜 90 min;5% 脱脂奶粉封闭于 37 $^{\circ}$ C 水浴中震荡 1 h,加入一抗兔抗人(1:100 封闭液稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST 冲洗 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:1 000 封闭液稀释),37 $^{\circ}$ C 水浴中震荡 2 h, TBST 冲洗 4 次,3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色。扫描条带分析,计算各组目的蛋白条带 A 与内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)蛋白条带 A 的比值。

2.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异显著性检验用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2.6 人脐静脉内皮细胞中 NO 含量的变化 模型组与空白组比较,NO 含量明显减少;苦荞麦中、高剂量组与模型组比较,NO 含量明显增加,见表 1。

表 1 各组人脐静脉内皮细胞内 NO 和 ADMA 的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Contents of NO and ADMA in EA. hy926 cell of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ADMA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	123.64 \pm 6.56	3.68 \pm 0.19
模型	-	68.44 \pm 4.64 ¹⁾	8.16 \pm 0.22 ¹⁾
苦荞麦总黄酮	31.25	68.02 \pm 4.52	8.02 \pm 0.17
	62.5	90.10 \pm 5.12 ²⁾	6.93 \pm 0.15 ²⁾
	125	110.07 \pm 6.17 ²⁾	4.91 \pm 0.14 ²⁾
二甲双胍	-	110.35 \pm 6.32 ²⁾	4.80 \pm 0.20 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

2.7 人脐静脉内皮细胞中 ADMA 含量的变化 模型组与空白组比较,ADMA 含量明显增加;苦荞麦中、高剂量组与模型组比较,ADMA 含量明显减少,见表 1。

2.8 人脐静脉内皮细胞中 DDAH2 mRNA 表达情况 空白组、模型组、苦荞麦总黄酮高剂量组和二甲双胍组的 DDAH2 与 β -actin mRNA 的 A 比值分别为 0.89 \pm 0.04,0.55 \pm 0.03,0.82 \pm 0.02,0.85 \pm 0.03。模型组与空白组比较,DDAH2 mRNA 表达显著减少;苦荞麦总黄酮高剂量组与模型组比较,DDAH2 mRNA 表达显著增加,见图 1。

2.9 人脐静脉内皮细胞中 NOX4 蛋白表达情况 空白组、模型组、苦荞麦总黄酮高剂量组和二甲双胍组的 NOX4 与 GAPDH 蛋白表达的 A 比值分别为 0.11 \pm 0.01,0.15 \pm 0.01,0.12 \pm 0,0.12 \pm 0.01。模型组与空白组比较,NOX4 蛋白表达量增加,有显著性差异($P < 0.05$);苦荞麦总黄酮高剂量组与模型组比较,NOX4 蛋白表达量减少,有显著性差异

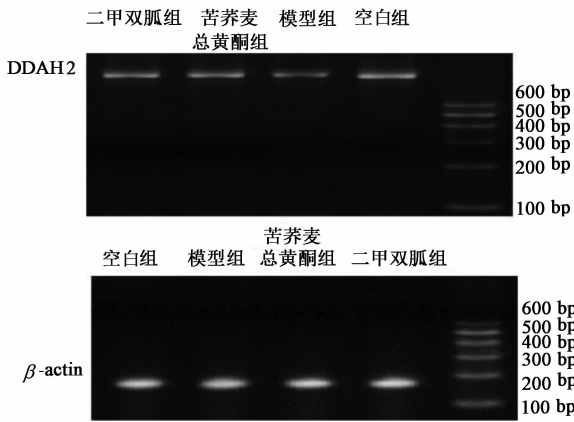


图 1 各组人脐静脉内皮细胞中 DDAH2 mRNA 和 β -actin mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of DDAH2 mRNA and β -actin mRNA in EA. hy926 cell of each group

($P < 0.05$), 见图 2。

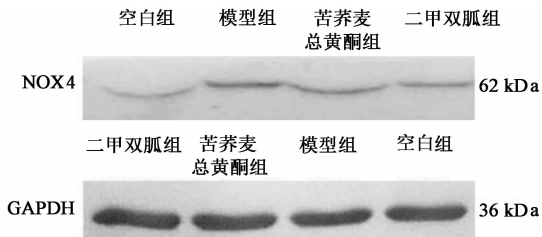


图 2 各组人脐静脉内皮细胞中 NOX4 蛋白和 GAPDH 蛋白表达

Fig. 2 Expression of NOX4 protein and GAPDH protein in EA. hy926 cell of each group

3 讨论

2 型糖尿病是由多种致病因素导致 IR 或机体胰岛功能减弱而产生的一种以糖代谢紊乱为主的综合征^[10]。IR 是指正常分泌量的胰岛素不足以使机体靶细胞产生正常的胰岛素效应。IR 是 2 型糖尿病发生与发展的基础,具有内皮功能障碍的特征——血管内皮的 NO 合成系统受损,导致血管内皮功能障碍。NO 是内皮细胞产生的具有扩张血管等多种生物学作用的内源性血管因子,也是血管内皮细胞释放的重要效应分子,如果 NO 能正常合成释放,毛细血管内皮舒张正常,胰岛素就可顺利通过毛细血管到达靶细胞产生正常的生物学效应。内皮型一氧化氮合成酶 (endothelial NOS, eNOS) 为 NO 生成过程的重要调节酶^[11],有研究证实 eNOS 蛋白功能和活性的变化会对 NO 的生成产生影响^[12]。NO 生成不足可以阻碍机体正常的胰岛素信号转导途径,通过影响内皮依赖性血管的舒张功能形成了外周组织 IR 来影响胰岛素正常作用的发挥^[13]。

血管内皮细胞中 NO 的合成、释放与 NOX4/ADMA 信号通路密切相关,胰岛素通过此通路产生

的效应透过血管内皮作用于靶组织。有研究表明通过一定浓度软脂酸建立的血管内皮细胞模型中 NOX4 含量增加^[14],NOX4 主要于血管内皮细胞表达^[15],其过度激活会使 ADMA 表达增加;同时 NOX4 又是 DDAH2 的抑制剂^[16],因此,NOX4 过度激活会引起 DDAH2 表达减少。本文研究结果中模型组与空白组比较,NOX4 蛋白表达明显增加,ADMA 含量明显增加,DDAH2 mRNA 表达明显降低,说明产生 IR 的血管内皮细胞中 NOX4 和 ADMA 含量增加,DDAH2 减少。ADMA 为 eNOS 的内源性抑制剂^[17-18],如果内皮细胞中 ADMA 增加,则可通过抑制 eNOS 引起 NO 合成减少。而多数 ADMA 会被 DDAH2 分解^[19]。所以 DDAH2 的减少可间接引起 NO 合成增加。本实验中模型组与空白组比较,在 ADMA 含量明显增加和 DDAH2 mRNA 表达明显降低前提下,出现了 NO 含量明显减少。

2 型糖尿病患者血管内皮功能紊乱,NOX4/ADMA 信号通路中 NOX4 含量增加,会抑制 DDAH2 的表达,又因为 DDAH2 能够使 ADMA 分解,所以 DDAH2 表达的减少会使 ADMA 表达相应增加,而增加的 ADMA 能够通过抑制 eNOS 活性使内源性 NO 生成减少^[20],是引发 2 型糖尿病的重要信号转导途径之一。因此,降低此途径中 NOX4 和 ADMA 的表达,提高 DDAH2 对 ADMA 的分解代谢,都能够增加通路中 NO 合成,进而通过缓解 IR 来防治 2 型糖尿病。本实验中将苦荞麦总黄酮作为干预因素后,苦荞麦总黄酮组与模型组比较,NOX4 蛋白表达明显降低,ADMA 含量明显减少,而 DDAH2 mRNA 表达明显增加,NO 含量明显增加,表明苦荞麦总黄酮可提高血管内皮细胞中 NO 的含量。NO 合成释放量的恢复可使毛细血管内皮舒张趋于正常,胰岛素就能顺利通过毛细血管壁到达靶细胞而产生正常的生物学效应。因此,本文以苦荞麦总黄酮作为干预条件能够改善软脂酸诱导 EA. hy926 细胞产生的 IR,具体机制可能是通过调节 NOX4/ADMA 信号通路中相关联的 NOX4,DDAH2 表达及 ADMA 含量来增加 NO 的合成与释放,改善血管内皮通透性,促进胰岛素顺利到达靶组织发挥作用来改善 IR,防治 2 型糖尿病。

[参考文献]

[1] 王炜,欧巧明,杨随庄. 苦荞麦化学成分及生物活性研究进展[J]. 杂粮作物,2010,30(6):419-423.
[2] 王小芳,董晓宁,付威君,等. 苦荞麦化学成分分析及

- 药理作用的研究进展[J]. 国外畜牧学, 2011, 31(1): 81-83.
- [3] 周则卫. 2 型糖尿病发生胰岛素抵抗机理的中医探讨[J]. 天津中医, 2002, 19(4): 38-39.
- [4] 罗光宏, 陈天仁, 祖廷勋, 等. 苦荞生物类黄酮及其测定方法研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 542-545.
- [5] 刘恋, 李刚, 柳春, 等. 苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导 EA. hy926 细胞 IRS-2 合成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 182-185.
- [6] 杨雪峰, 张瑞鹏, 李刚, 等. 苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导 EA. hy926 细胞 NO 合成的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(10): 1055-1057.
- [7] 王春怡, 陈艳芬, 李卫民, 等. 黄芪葛根汤对实验性糖尿病及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 144-149.
- [8] Kelsey M M, Forster J E, Van Pelt R E, et al. Adipose tissue insulin resistance in adolescents with and without type 2 diabetes[J]. *Pediatr Obes*, 2014, 9(5): 373-380.
- [9] 王春梅, 李贺, 吴金滢. 黄连素调节 eNOS/NO 保护软脂酸诱导的 HUVECs 损伤作用机制研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2015, 15(6): 743-746.
- [10] 刘洋, 马世平, 吴斐华. 胰岛素抵抗与内皮功能紊乱的共同发病机制[J]. 海峡药学, 2010, 22(5): 115-118.
- [11] Nitesh N, Deena W M. Analysis of the effects of nitric oxide and oxygen on nitric oxide production by macrophages[J]. *J Theoretical Biol*, 2004, 226(4): 409-419.
- [12] Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a mutation associated with coronary spastic angina[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(18): 2629-2637.
- [13] 宋春红, 李瑞峰. 一氧化氮在 2 型糖尿病发病机制中的作用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 226(4): 409-419.
- [14] 于洋, 赵丹玉, 王艳杰, 等. 六味地黄丸含药血清对软脂酸诱导人脐静脉内皮细胞损伤抗氧化的机制[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(10): 2794-2796.
- [15] Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase[J]. *Circulation*, 2004, 109(2): 227-233.
- [16] Venkatesan B, Valente A J, Das N A, et al. CIKS (Act1 or TRAF3IP2) mediates high glucose-induced endothelial dysfunction[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 359-371.
- [17] Boger R H. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2003, 41(11): 1467-1472.
- [18] Gable D G, Celotto A C, Evora P R, et al. Asymmetric dimethylarginine endogenous inhibition of nitric oxide synthase causes differential vasculature effects[J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15(9): 248-253.
- [19] Nijveldt R J, Teerlink T, Prins H A, et al. Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(12): 2542-2550.
- [20] Xiao J, Pang P K. Does a general alteration in nitric oxide synthesis system occur in spontaneously hypertensive rate[J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(35): 272-278.

[责任编辑 刘德文]