

· 药理 ·

## 基于TXNIP信号通路调控的艳山姜挥发油对高糖诱导血管内皮细胞损伤的保护作用

张雯, 张嫩玲, 张彦燕, 陈妍, 付凌云, 潘迪\*, 沈祥春\*  
(贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室, 贵阳 550025)

**[摘要]** 目的:研究艳山姜挥发油(EOAZF)对高浓度葡萄糖(HG)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的保护作用,为研究EOAZF改善糖尿病诱导的心血管疾病提供实验依据。方法:该项目研究分为正常组,模型组(25 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖组),阳性药组(100 mg·L<sup>-1</sup>维生素C),EOAZF低、中、高浓度组(0.25, 1, 4 μg·L<sup>-1</sup>)。通过建立HG诱导HUVECs损伤模型,检测不同给药组内皮细胞中的丙二醛(MDA),一氧化氮(NO)和内皮素1(ET-1)的分泌量,评价EOAZF对高糖诱导HUVECs损伤的保护作用;采用AnnexinV-FITC/PI双染实验以及DCFH-DA荧光探针标记,考察EOAZF对HG诱导HUVECs的凋亡水平和活性氧(ROS)产生的影响;采用蛋白免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),检测硫氧还原蛋白相互结合蛋白(TXNIP)与硫氧还原蛋白(Trx-1)蛋白表达和转录水平,采用胰岛素二硫键还原法测定细胞内总Trx-1的酶活性。结果:细胞形态学结果显示,与正常组比较,模型组HUVECs增殖速度明显降低,细胞形态受损;与模型组比较,0.25, 1, 4 μg·L<sup>-1</sup>EOAZF对HG诱导损伤的HUVECs具有保护作用,且呈浓度依赖性;与正常组比较,模型组显著上调HUVECs内MDA和ET-1分泌量( $P<0.05$ ),下调NO的分泌( $P<0.01$ );与模型组比较,不同浓度EOAZF均能改善HG诱导的MDA, ET-1和NO的分泌,其中4 μg·L<sup>-1</sup>EOAZF能明显降低HG诱导的HUVECs细胞MDA和ET-1的分泌量( $P<0.05$ ),明显上调HUVECs细胞NO的分泌量( $P<0.05$ );细胞凋亡和ROS检测结果显示,与正常组比较,模型组细胞凋亡和ROS水平均显著上调( $P<0.01$ );与模型组比较,4 μg·L<sup>-1</sup>EOAZF明显降低HG诱导的HUVECs中ROS水平和细胞凋亡率( $P<0.05$ );免疫印迹实验结果和Trx-1活性检测结果显示,与正常组比较,造模组细胞中TXNIP的mRNA和蛋白水平显著上调( $P<0.01$ ),Trx-1的活性显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,4 μg·L<sup>-1</sup>EOAZF明显下调HG诱导的TXNIP的mRNA与蛋白的表达上调( $P<0.05$ ),同时增强细胞内总Trx-1的酶活性( $P<0.05$ ),发挥抗氧化应激的作用。结论:EOAZF能改善HG诱导损伤的HUVECs的内皮功能,降低细胞内ROS水平和凋亡水平,发挥显著的内皮细胞保护作用,其机制可能是通过降低TXNIP的mRNA和蛋白水平以及增强Trx-1的活性而发挥的抗氧化应激作用。

**[关键词]** 艳山姜挥发油; 高糖; 人脐静脉内皮细胞(HUVECs); 硫氧还原蛋白相互结合蛋白(TXNIP)信号通路

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)13-0021-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211209

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210510.1558.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-5-10 17:24

### Essential Oil from *Alpiniae Zerumbet Fructus* Alleviates High Glucose-induced HUVEC Injury via TXNIP Signaling Pathway

ZHANG Wen, ZHANG Nen-ling, ZHANG Yan-yan, CHEN Yan, FU Ling-yun,  
PAN Di\*, SHEN Xiang-chun\*

(Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources, Guizhou Medical University,  
Guiyang 550025, China)

**[收稿日期]** 20210210(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81760725,U1812403-4-4);贵州省科技基金重点项目(黔科合基础[2020]1Z069);贵州省科技厅社发公关项目(黔科合支撑[2017]2840,黔科合支撑[2018]2767);贵州医科大学药学国际科技合作基地项目(黔科合平台人才[2017]5802)

**[第一作者]** 张雯, 硕士, 从事民族药药理学研究, Tel: 0851-88416148, E-mail: zhangwen02262242@126.com

**[通信作者]** \* 潘迪, 硕士, 讲师, 从事民族药药理学研究, Tel: 0851-88416148, E-mail: pandipharm@gmc.edu.cn;

\* 沈祥春, 博士, 教授, 从事民族药药理学研究, Tel: 0851-88416148, E-mail: shenxiangchun@126.com

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of essential oil from *Alpiniae Zerumbet Fructus* (EOAZF) against high glucose (HG)-induced injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro*, so as to provide experimental evidence for the treatment of diabetes-induced cardiovascular diseases with EOAZF. **Method:** The cells were divided into the normal group, model group (25 mmol·L<sup>-1</sup> glucose), positive control group (100 mg·L<sup>-1</sup> vitamin C), and the low- (0.25 μg·L<sup>-1</sup>), medium- (1 μg·L<sup>-1</sup>), and high-dose (4 μg·L<sup>-1</sup>) EOAZF groups. The HUVECs were damaged by HG. The secretion amounts of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and endothelin-1 (ET-1) in HUVECs of different groups were measured to assess the protective effect of EOAZF against HG-induced injury. The effects of EOAZF on the apoptosis and reactive oxygen species (ROS) generation of HUVECs damaged by HG were detected by Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (Annexin V-FITC/PI) staining and dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. The protein and mRNA expression levels of thioredoxin interacting protein (TXNIP) and thioredoxin 1 (Trx-1) were determined by Western blot and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), followed by the measurement of total intracellular Trx-1 activity with insulin disulfide reduction method. **Result:** The comparison with the control group revealed that the proliferation of HUVECs in the model group was significantly inhibited and their shape was damaged. Compared with the model group, EOAZF protected HUVECs against HG-induced injury in a concentration-dependent manner. The secretion amounts of MDA and ET-1 ( $P<0.05$ ) in the model group were increased in contrast to those in the control group, while the NO level was decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, EOAZF at all the three concentrations, especially at 4 μg·L<sup>-1</sup>, obviously reduced the secretion of MDA and ET-1 ( $P<0.05$ ), but elevated NO after HG induction ( $P<0.05$ ). The cell apoptosis assay and ROS detection results demonstrated that the apoptosis and ROS level in the model group were higher than those in the control group ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, EOAZF at 4 μg·L<sup>-1</sup> significantly lowered the ROS level and apoptosis ( $P<0.05$ ) of HUVECs damaged by HG. The Western blot assay and Trx-1 activity detection uncovered that the protein and mRNA expression levels of TXNIP in the model group were significantly up-regulated as compared with those in the control group ( $P<0.05$ ), whereas the Trx-1 activity was decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, EOAZF at 4 μg·L<sup>-1</sup> significantly down-regulated the mRNA and protein ( $P<0.05$ ) expression levels of TXNIP and enhanced the total Trx-1 activity ( $P<0.05$ ) in HUVECs, thus suppressing the oxidative stress. **Conclusion:** EOAZF exerts the protective effects against HG-induced injury in HUVECs by improving the endothelial function and reducing intracellular ROS and apoptosis. Its efficacy in anti-oxidative stress may be related to the down-regulation of mRNA and protein expression levels of TXNIP and the enhancement of Trx-1 activity.

**[Key words]** essential oil from *Alpiniae Zerumbet Fructus*; high glucose; human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); thioredoxin interacting protein (TXNIP) signaling pathway

2型糖尿病(T2DM)是一种慢性炎症进展性疾病,可诱发多种微血管和大血管相关并发症(DVC),如糖尿病肾病,动脉粥样硬化,糖尿病视网膜病变和心血管相关疾病等<sup>[1-2]</sup>。其中内皮细胞损伤是引起糖尿病并发症发生发展的关键,加强对血管内皮细胞的保护,恢复血管内皮正常生理功能是防治DVC的关键<sup>[3]</sup>。研究发现,血管内高浓度葡萄糖(HG)水平会诱导内皮细胞产生大量的活性氧(ROS),降低内皮细胞存活率、抑制内皮细胞增殖、加速内皮细胞衰老和凋亡。硫氧还原蛋白(Trx-1)是一种低相对分子质量(10~12 kDa)的细胞氧化还

原蛋白,其主要的生物学功能是调节多种氧化还原酶活性,消除细胞内过多的ROS,抵消细胞内氧化应激<sup>[4]</sup>。而硫氧还原蛋白相互作用蛋白(TXNIP)是Trx-1的内在抑制剂,直接与Trx-1的活性位点相结合,进而抑制Trx-1的抗氧化效应<sup>[5]</sup>。HG,ROS及内质网应激等是诱导细胞中TXNIP表达上调的常见刺激因素,其广泛参与了糖尿病、心肌肥厚、心肌缺血/再灌注损伤等多种代谢和心血管疾病的发生,抑制TXNIP能部分改善上述疾病进展<sup>[6]</sup>。近年来,大量研究显示TXNIP上调可能与糖尿病及并发症的发生密切相关。TXNIP一方面可以通过诱导胰岛

素抵抗和增加肝葡萄糖产生引起的血糖紊乱,另一方面葡萄糖是诱导TXNIP表达的最强生理刺激因子,因此,TXNIP可能是导致糖尿病及糖尿病血管并发症的因素之一,是治疗糖尿病及其血管并发症的潜在靶点。

贵州地产特色民族药艳山姜,是姜科山姜属植物的干燥果实,具有温中燥湿,行气止痛,截疟的功效,被广泛用于治疗心血管疾病<sup>[7]</sup>。艳山姜的主要化学成分为挥发油类,黄酮类和二萜类等化合物。国外大多以艳山姜的叶子作为药用部位,主要集中于高血压、动脉粥样硬化、调血脂、抗炎镇痛、抗氧化等药理作用的研究。随着中药现代化研究的发展,从贵州民族药艳山姜的果实中提取出主要活性成分,艳山姜挥发油(EOAZF)。其药理作用广泛,主要具有抗炎镇痛、抗氧化应激和保护胃黏膜等作用<sup>[8]</sup>。近年来,本课题组一直围绕EOAZF对人内皮细胞的保护作用展开多方向的研究,结果显示EOAZF对多种刺激引起的人血管内皮细胞损伤具有显著的改善作用<sup>[9-11]</sup>。前期研究发现,EOAZF可以通过抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号对HG诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤有明显的改善作用<sup>[12]</sup>。然而,关于EOAZF对HG诱导的HUVECs氧化应激的作用及作用机制仍未阐明清晰,EOAZF对HG刺激的TXNIP信号的影响也未有相关研究证实。因此,本研究基于HG诱导人HUVECs损伤模型,探讨EOAZF对该模型的保护作用及TXNIP信号在其中发挥的作用,为防治HG诱导的血管内皮损伤寻找新的药物治疗靶点,也为贵州特色民族药现代化研究与发展提供理论基础。

## 1 材料

**1.1 细胞株** HUVECs购买于美国ScienCell公司,批号16854。

**1.2 药物与试剂** EOAZF:艳山姜采集自贵州省贞丰县连环乡,经贵州医科大学药学院生药学与药用植物学教研室龙庆德副教授鉴定为姜科植物艳山姜 *Alpinia zerumbet* 的干燥成熟果实,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,计算得率1.0%,准确称取艳山姜挥发油溶于少量二甲基亚砜(DMSO)中,加入培养基配置  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  母液,过滤除菌后于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。用时以培养基稀释至不同的质量浓度(DMSO质量分数 $<0.1\%$ );噻唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司,批号M8180);丙二醛(MDA)检测试剂盒(碧云天生物技术研究,批号S0131);总一氧化氮(NO),ROS,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒

(碧云天生物技术研究,批号分别为S0023, S0033, C1062);trizol,一步法cDNA反转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) SYBR Green Master Mix/Low ROX Premixed(南京诺维赞生物科技股份有限公司,批号分别为R401-01, R122-01, Q131-02/03);TXNIP抗体,Trx-1抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为14715, 2429);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,羊抗鼠IgG(南京巴傲得生物科技有限公司,批号分别为MB001H, BS13278, BS12478)。

**1.3 仪器** 3111型二氧化碳培养箱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];SW-CJ-2F型单人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司);HF240-5810R型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);NovoCyte 3008型流式细胞仪(美国艾森生物有限公司);VE-180型免疫印迹电泳仪,VE-186型免疫印迹转膜仪(上海天能科技有限公司);CFX Connect™型Real-time PCR检测仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 细胞换液,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗1~2遍后加入新鲜培养基培养。当细胞融合达90%时,使用0.25%的胰酶消化,中和液终止消化,  $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心5 min(离心半径16 cm,下同)收集细胞,按照1:3~1:2的比例传代。

**2.2 MTT比色法检测细胞抑制情况** 取对数生长期的细胞,以每孔  $8\times 10^3$  个细胞接种于96孔板中,每孔100  $\mu\text{L}$ 。同步化12 h后,使用不同浓度的葡萄糖处理24 h。每孔避光加入MTT 20  $\mu\text{L}$ ,培养箱中孵育4 h,弃上清,每孔加入DMSO 200  $\mu\text{L}$ ,振板2 min,于490 nm的波长下检测其吸光度A。

**2.3 Annexin V-FITC/PI凋亡检测** 检测细胞凋亡 采用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。使用流式细胞仪在488 nm/530 nm的条件下采集数据,Flowjo 7软件进行数据分析。细胞凋亡早期,Annexin V阳性,PI阴性;而细胞凋亡后期Annexin V和PI均为阳性。

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测TXNIP和Trx-1蛋白表达** 接种细胞于25  $\text{cm}^2$  的培养瓶中,24 h后同步化12 h,然后EOAZF预保护3 h,最后给药处理24 h。弃培养基,PBS清洗2次,将裂解液(RIPI与PMSF)按照99:1的比例配置,然后点加在培养瓶中,置于冰上,摇床裂解20 min后,用预先清

洗过后再用双蒸水润洗过的刮子刮下所有的细胞, 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C离心 20 min, 收集上清。使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 调平后变性, 存于-20 °C。使用 SDS 凝胶试剂盒配制 12%的凝胶, 取蛋白样品上样(每组蛋白总上样质量为 50 μg), 80 V 电压进行电泳。含 20 %的甲醛转膜液转膜 90 min。1% BSA 封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。将膜根据所需蛋白的分子量裁剪, 分别孵育一抗(1:1 000), 摇床 1 h 后, 4 °C 过夜。次日 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 孵育二抗(1:1 万), 摇床 1 h 后 TBST 洗 3 次, 每次 10 min。最后进行 ECL 显影。使用 Image-Lab TM 软件对条带进行分析, 并通过 Graph Pad Prism 6.0 软件进行统计。

**2.5 Real-time PCR 检测 TXNIP 和 Trx-1 mRNA 表达** 通过 trizol-三氯甲烷法分离提取总 RNA, 使用 TransGen Biotech cDNA 合成试剂盒以 20 μL 体积合成 cDNA。使用 Bio-Rad Chromo 4 检测系统和 SYBR Green PCR Master Mix 通过 Real-time PCR 分析 mRNA 表达。将 PCR 循环程序设定为 94 °C 30 s, 94 °C 5 s 和 55 °C 30 s, 40 个循环, 随后将温度从 65 °C 增加至 95 °C, 来构建解链曲线。使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 计算 β-肌动蛋白(β-actin)和 GAPDH 标准化后 mRNA 的相对表达水平。引物购买自生工生物工程(上海)股份有限公司, TXNIP(扩增长度 93 bp)上游 5'-TGATCTATGTTAGCGTTCCT-3', 下游 5'-TGGATGTTCTGCTGCTTA-3'; Trx-1(扩增长度 94 bp)上游 5'-TGTTGCTTCAGAGTGTGA-3', 下游 5'-TTCCTTATTGGCTCCAGAA-3'; β-actin(扩增长度 250 bp)上游 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 下游 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'; GAPDH(扩增长度 101 bp)上游 5'-TGACAACAGCCTCAAGAT-3', 下游 5'-GTCCTTCCACGATACCA A-3'。

**2.6 试剂盒检测总 Trx-1 活性** 使用胰岛素二硫键还原测定来测量 Trx-1 的活性<sup>[13]</sup>。用裂解缓冲液(20 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES pH 7.9, 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 g·L<sup>-1</sup> 蛋白酶抑制剂混合物 III -Calbiochem)提取总细胞蛋白质。将蛋白与缓冲液[50 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES pH 7.6, 1 mmol·L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸(EDTA), 1 g·L<sup>-1</sup> BSA 和 2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT]在 37 °C 孵育 15 min。然后再用 Trx-1 还原酶与反应缓冲液[20 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES pH 7.6, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 200 μmol·L<sup>-1</sup> 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

(NADPH)和 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> 胰岛素]于 37 °C 处理 20 min。通过加入终止混合物(0.2 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0 中含有 1 mmol·L<sup>-1</sup> 二硫硝基苯(DTNB)与 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸胍]来终止反应, 并且测量在 412 nm 处的 A。

**2.7 统计学方法** 所有统计分析均使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行, 数据以 3 次独立实验的  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间的比较采用 Student *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 HG 诱导的 HUVECs 损伤的影响** 与正常葡萄糖浓度组相比, 各浓度葡萄糖组均显著诱导 HUVECs 细胞损伤, 且呈浓度依赖性。最终选择 25 mmol·L<sup>-1</sup> 作为后续实验中葡萄糖浓度, 因该浓度可作为模拟糖尿病患者血糖水平, 常用作体外 HG 损伤模型的浓度<sup>[14]</sup>。见表 1。进一步, 给予 HG 损伤模型中的 HUVECs 不同浓度的 EOAZF, 考察其对损伤模型中 HUVECs 的保护作用。与模型组比较, 在一定范围内, EOAZF 对葡萄糖诱导 HUVECs 损伤的模型具有明显的保护作用(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。于是, 选择 0.25, 1, 4 μg·L<sup>-1</sup> 作为 EOAZF 的后续实验的浓度, 作用时间为 24 h, 该结果提示 EOAZF 对 HG 诱导损伤的内皮细胞具有明显的保护作用。见表 2。

表 1 不同浓度葡萄糖对 HUVECs 的损伤作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of high glucose on HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/mmol·L <sup>-1</sup>	细胞存活率/%
空白		100.00±0.00
葡萄糖	15	87.60±1.34 <sup>2)</sup>
	25	80.48±1.82 <sup>2)</sup>
	35	79.57±3.11 <sup>2)</sup>
	45	74.27±4.44 <sup>2)</sup>

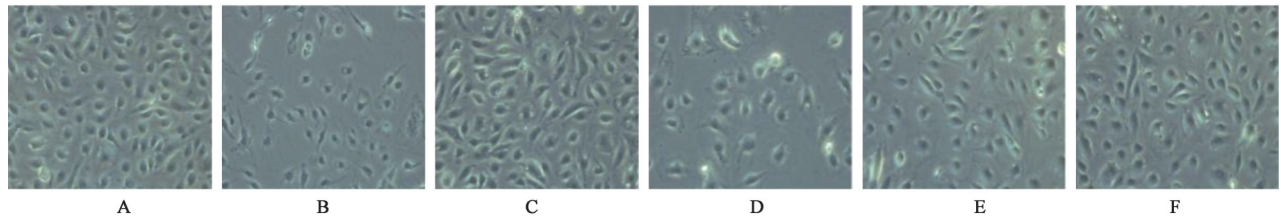
注:与空白组比较<sup>2)</sup>*P* < 0.01。

**3.2 对 HG 损伤的 HUVECs 内皮功能的影响** 使用光学显微镜观察不同质量浓度 EOAZF(0.25, 1, 4 μg·L<sup>-1</sup>)处理 HUVECs 24 h 后的形态学变化, 发现与正常组细胞比较, 25 mmol·L<sup>-1</sup> 的 HG 处理后, HUVECs 皱缩, 严重变形, 且生长缓慢。选择维生素 C 作为抗氧化的阳性药组, 发现抗氧化处理的细胞对 HG 诱导的细胞损伤抵抗显著增强。EOAZF 处理显著改善 HG 诱导的内皮细胞损伤, 且呈浓度依赖性。见图 1。与空白组比较, 模型组 MDA 和 ET-1 水平明显升高(*P* < 0.05), NO 水平显著降低

表 2 EOAZF 对 HG 诱导 HUVEC 抑制率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Table 2 Effect of EOAZF on inhibitory rate of HUVECs effected by HG injury model ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白		0.00±0.00
模型		20.35±4.62 <sup>2)</sup>
EOAZF	0.125	14.31±6.09
	0.25	5.51±7.91 <sup>3)</sup>
	0.5	2.72±11.90 <sup>3)</sup>
	1	4.43±9.06 <sup>4)</sup>
	2	5.62±6.94 <sup>4)</sup>
	4	3.09±6.47 <sup>4)</sup>
	8	9.76±4.50 <sup>4)</sup>
16	9.80±5.24 <sup>4)</sup>	

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表 3~5 同)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 维生素 C 组; D. EOAZF 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组; E. EOAZF 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组; F. EOAZF 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组

图 1 细胞形态学观察 (倒置显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 1 EOAZF improve endothelial functions upon high glucose condition on HUVECs (inverted microscope,  $\times 200$ )

3.3 对 HG 损伤的 HUVECs 细胞凋亡和 ROS 的影响  
与空白组比较,模型组细胞总凋亡率显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,EOAZF 中、高质量浓度组明显降低细胞总凋亡率 ( $P<0.05$ ),维生素 C 组显著降低细胞总凋亡率 ( $P<0.01$ )。与空白组比较,模型组 HUVECs 中 ROS 的含量显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,维生素 C 组和 EOAZF 高质量浓度组显著降低 ROS 含量 ( $P<0.01$ )。见表 4,图 2。

表 4 EOAZF 对 HG 诱导损伤的 HUVECs 凋亡和 ROS 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of EOAZF on apoptosis and level of ROS in HG-injured HUVECs ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

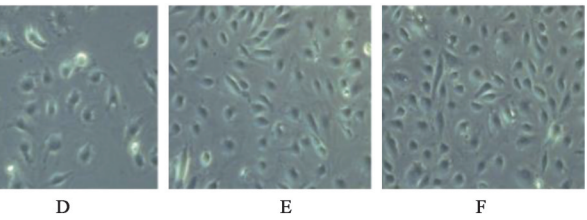
组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%	ROS 荧光值
空白		0.503±0.20	50.38±3.37
模型		15.93±2.03 <sup>2)</sup>	61.02±3.18 <sup>2)</sup>
维生素 C	$1\times 10^5$	8.39±1.01 <sup>4)</sup>	51.78±2.38 <sup>4)</sup>
EOAZF	0.25	13.23±1.39	57.17±7.54
	1	9.79±1.14 <sup>3)</sup>	54.67±5.29
	4	8.68±1.14 <sup>3)</sup>	53.61±2.37 <sup>4)</sup>

( $P<0.01$ );与模型组比较,维生素 C 和 EOAZF 高质量浓度组明显降低 MDA 和 ET-1 水平 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),明显升高 NO 水平 ( $P<0.05$ )。见表 3。

表 3 EOAZF 对 HG 诱导的 HUVECs 细胞分泌 MDA, NO, ET-1 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of EOAZF on MDA, NO, ET-1 levels of HUVECs effected by HG injury model ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ET-1/ $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$
空白		82.48±10.69	20.95±3.30	277.74±38.28
模型		101.47±9.04 <sup>1)</sup>	11.46±2.61 <sup>2)</sup>	364.39±49.61 <sup>1)</sup>
维生素 C	$1\times 10^5$	70.28±5.73 <sup>4)</sup>	18.45±3.27 <sup>3)</sup>	260.78±48.37 <sup>3)</sup>
EOAZF	0.25	90.74±11.23	14.95±6.35	341.94±38.26
	1	85.32±9.97 <sup>3)</sup>	15.33±4.12	284.70±57.23
	4	82.97±8.54 <sup>4)</sup>	17.87±4.20 <sup>3)</sup>	277.76±31.00 <sup>3)</sup>



A. 空白组; B. 模型组; C. 维生素 C 组; D. EOAZF 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组

图 2 EOAZF 对 HG 诱导损伤的 HUVECs 内 ROS 的影响 (免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of EOAZF on intracellular ROS level affected by EOAZF in HUVECs under HG injury (IF,  $\times 200$ )

3.4 对 HUVECs 内 TXNIP, Trx-1 表达的影响  
与空白组比较,模型组 TXNIP 蛋白和 mRNA 表达显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,EOAZF 高质量浓度组明显降低 TXNIP 蛋白和 mRNA 表达 ( $P<0.05$ ), Trx-1 蛋白和 mRNA 表达差异无统计学意义,与空

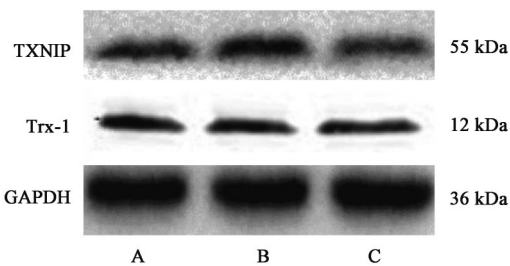
白组比较,模型组 Trx-1 酶活力显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,EOAZF 高质量浓度组明显升高 Trx-

1 酶活力( $P<0.05$ ),差异有明显统计学意义。见表5,图3。

表5 EOAZF对HG诱导HUVECs中TXNIP和Trx-1蛋白和mRNA水平,及Trx-1酶活力的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of EOAZF on protein and mRNA expression of TXNIP and Trx-1, and activity of Trx-1 in HUVECs under HG-induced injury ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	TXNIP/GAPDH	Trx-1/GAPDH	TXNIP mRNA	Trx-1 mRNA	Trx-1 酶活力/%
空白		100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
模型		160.43±32.30 <sup>2)</sup>	94.12±18.34	187.32±28.45 <sup>2)</sup>	96.43±18.85	74.34±12.86 <sup>2)</sup>
EOAZF	4	127.07±34.22 <sup>3)</sup>	90.12±20.13	145.19±19.67 <sup>3)</sup>	103.66±20.48	83.65±14.34 <sup>3)</sup>



A. 空白组; B. 模型组; C. EOAZF  $4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图3 各组HUVECs中TXNIP和Trx-1蛋白水平电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of TXNIP and Trx-1 in HUVECs

#### 4 讨论

高血糖血管并发症,是导致糖尿病患者死亡的首要原因,目前尚无任何有效的药物防止血管并发症的发生。近年来,许多证据表明糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、血管性病变的发生均与TXNIP表达的上调有密切的关系,其中糖尿病血管性病变与TXNIP的关系研究最为深入<sup>[15-17]</sup>。文献报道,沉默TXNIP基因可以阻止HG诱导的内皮细胞迁移障碍和血管形成损伤。在低氧化应激条件下, TXNIP过表达降低内皮细胞的存活与迁移能力,而当TXNIP表达上调时,可与Trx-1结合形成复合物,并迁移到细胞膜上导致血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)对VEGF的应答能力减弱<sup>[18]</sup>。目前,越来越多的证据指出,抑制TXNIP对于缓解糖尿病及其血管并发症的作用是显著的。一方面, TXNIP与胰岛 $\beta$ 细胞功能受损存在明显的相关性, TXNIP缺陷的HcB-19小鼠的胰岛细胞体积增加<sup>[19]</sup>;  $\beta$ 细胞特定敲除的TXNIP小鼠对低剂量链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病有抵抗作用<sup>[20]</sup>。因此,抑制TXNIP可以保护胰岛 $\beta$ 细胞,并有助于恢复其分泌胰岛素的功能,抑制过表达的TXNIP理论上是潜在预防和治疗T1DM和T2DM的有效方法。另一方面,在血管中抑制过表

达的TXNIP可以防止氧化应激, HG等因素带来的血管炎症,这对血管内皮的保护作用尤为重要<sup>[21-22]</sup>。因此,这些证据均表明TXNIP在防治糖尿病及其血管并发症中有重要的意义。EOAZF被报道具有广泛的药理作用,其中对于血管内皮细胞的保护作用研究比较深入。在本研究中,证实EOAZF能显著降低HG介导的内皮细胞损伤作用,在机制研究中发现EOAZF能显著逆转HG刺激介导的血管内皮细胞TXNIP的表达上调,同时增加Trx-1的活性。该结果提示TXNIP可能是EOAZF作用的关键靶点, TXNIP/Trx-1相关信号通路在EOAZF改善HG诱导的内皮损伤中发挥重要的作用。本研究为EOAZF作为TXNIP抑制剂有效防治糖尿病血管并发症提供了新的药物和思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] AZIZ Z, ABSETZ P, OLDROYD J, et al. A systematic review of real-world diabetes prevention programs: learnings from the last 15 years [J]. Implement Sci, 2015, 10: 172.
- [2] LI J, DONG Y, WU T, et al. Differences between Western and Asian type 2 diabetes patients in the incidence of vascular complications and mortality: a systematic review of randomized controlled trials on lowering blood glucose [J]. J Diabetes, 2016, 8 (6): 824-833.
- [3] EKONG G, KAVOOKJIAN J. Motivational interviewing and outcomes in adults with type 2 diabetes: a systematic review [J]. Patient Educ Couns, 2016, 99(6): 944-952.
- [4] PAN D, LI W, MIAO H, 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 ] DE MARINIS Y, CAI M, BOMPADA P, et al. Epigenetic regulation of the thioredoxin-interacting protein (TXNIP) gene by hyperglycemia in kidney [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(2):342-353.
- [ 6 ] SORIANO-TÁRRAGA C, JIMÉNEZ-CONDE J, GIRALT-STEINHAEUER E, et al. Epigenome-wide association study identifies TXNIP gene associated with type 2 diabetes mellitus and sustained hyperglycemia [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25 (3) : 609-619.
- [ 7 ] JI Y P, SHI T Y, ZHANG Y Y, et al. Essential oil from *Fructus Alpinia zerumbet* (fruit of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith) protected against aortic endothelial cell injury and inflammation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 237:149-158.
- [ 8 ] XIAO T, ZENG Y, XU Y, et al. The endothelial protective properties of essential oil from *Fructus Alpiniae zerumbet* via the Akt/NOS-NO signaling pathway *in vitro* [J]. *Planta Med*, 2014, 80(17) : 1628-1634.
- [ 9 ] 张彦燕,文波,陶玲,等. 艳山姜挥发油对脂多糖诱导损伤的血管内皮细胞保护作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(4):66-68.
- [ 10 ] 张彦燕,赵爽,付凌云,等. 艳山姜挥发油对TGF- $\beta_1$ 诱导内皮细胞氧化应激损伤的保护作用研究[J]. *西南民族大学学报:自然科学版*, 2018, 44(6):556-560.
- [ 11 ] 赵爽,何丽,黄梅,等. 艳山姜挥发油通过Nrf2/Notch1信号通路抑制高糖诱导的内皮间质转分化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(23):99-105.
- [ 12 ] HUANG N, XU Y, ZHOU H, et al. Essential oil from *Fructus Alpiniae zerumbet* protects human umbilical vein endothelial cells *in vitro* from injury induced by high glucose levels by suppressing nuclear transcription factor-kappa B signaling [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23:4760-4767.
- [ 13 ] CHEN M, ZHANG J, XIE X, et al. Cloning and functional characterization of thioredoxin genes from large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 77:385-391.
- [ 14 ] MENEGAZZO L, CICILIOT S, PONCINA N, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes [J]. *Acta Diabetol*, 2015, 52(3) : 497-503.
- [ 15 ] 林丽明,张美金,许昌声,等. 维生素D通过抑制Pin1介导线粒体氧化应激拮抗高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(1) : 15-21.
- [ 16 ] TSUBAKI H, TOOYAMA I, WALKER D G. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) with focus on brain and neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24):9357.
- [ 17 ] ZHANG C, ABDUKERIM M, ABILAILIETI M, et al. The protective effects of orexin a against high glucose-induced activation of NLRP3 inflammasome in human vascular endothelial cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 672:108052.
- [ 18 ] DOMINGUES A, JOLIBOIS J, MARQUET DE ROUGÉ P, et al. The emerging role of TXNIP in ischemic and cardiovascular diseases; a novel marker and therapeutic target [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4) : 1693.
- [ 19 ] SPINDEL O N, WORLD C, BERK B C. Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(6):587-596.
- [ 20 ] AMIN F M, ABDELAZIZ R R, HAMED M F, et al. Dimethyl fumarate ameliorates diabetes-associated vascular complications through ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117887.
- [ 21 ] DUNN L L, BUCKLE A M, COOKE J P, et al. The emerging role of the thioredoxin system in angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (11) : 2089-2098.
- [ 22 ] NASOOHI S, ISMAEL S, ISHRAT T. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in cerebrovascular and neurodegenerative diseases: regulation and implication [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(10):7900-7920.

[责任编辑 周冰冰]