

芹菜素在风轮菜改善高糖所致血管内皮细胞损伤中的作用

王立英¹, 吴斐华^{1*}, 马 龙¹, 李伟生¹, 梁敬钰², 马世平^{1*}

1. 中国药科大学 中药药理教研室, 江苏 南京 211198

2. 中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 211198

摘要: **目的** 通过特异剔除芹菜素(AP), 研究AP在风轮菜活性部位(CCE)改善高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(EA.hy926)损伤中的作用地位。**方法** 应用Sephadex LH-20凝胶柱色谱法从CCE中特异剔除AP, 制备剔除AP的CCE(CCE^{AP-})。将培养的内皮细胞随机分为5组: 对照组、高糖模型组、CCE组、CCE^{AP-}组和AP组。以MTT法检测细胞存活率, 流式细胞仪检测胞内活性氧(ROS)水平, 通过Hoechst染色, 荧光显微镜观察细胞凋亡形态, 以Annexin V-FITC染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 以分光光度法检测胞内caspase-3的活性, 并用Western blotting检测Bax的表达情况。**结果** CCE组和AP组均能显著提高高糖损伤的内皮细胞存活率, 降低高糖诱导的内皮细胞胞内ROS水平、内皮细胞凋亡率、caspase-3的活性及Bax的表达。而CCE^{AP-}组对高糖所致内皮细胞损伤的改善作用不明显。**结论** AP是风轮菜改善高糖所致内皮细胞损伤的重要成分之一, 其改善高糖诱导内皮细胞凋亡作用与抗氧化应激有关。

关键词: 风轮菜; 芹菜素; 高糖; 内皮细胞; 凋亡; 特异性剔除

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)20-2946-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.015

Effect of apigenin on amelioration of *Clinopodium chinense* for vascular endothelial cell injury induced by high glucose

WANG Li-ying¹, WU Fei-hua¹, MA Long¹, LI Wei-sheng¹, LIANG Jing-yu², MA Shi-ping¹

1. Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective In this study, we specifically deleted apigenin (AP) from the active fraction of *Clinopodium chinense* (CCE), and aimed at identifying the effect of AP on how CCE exerted its amelioration on high glucose-induced injury in human umbilical vein endothelial cells (EA.hy926). **Methods** By using Sephadex LH-20 gel column chromatography, AP was specifically deleted from CCE, and the apigenin-depleted sample of CCE (CCE^{AP-}) was obtained. The cultured endothelial cells were divided into five groups: normal control group, high glucose model group, CCE group, CCE^{AP-} group, and AP group. The cell viability was assayed by MTT assay. Flow cytometry was used to measure the intracellular reactive oxygen species (ROS). Morphology of cell apoptosis was determined by fluorescence microscopy with Hoechst staining. The rate of apoptosis was measured by flow cytometry staining with AnnexinV-FITC. Caspase-3 activity was measured using caspase-3 colorimetric assay kit. The expression of Bax was detected by Western blotting. **Results** CCE and AP could significantly improve the cell viability, reduce the generation of intracellular ROS in EA.hy926 induced by high glucose. Meanwhile, CCE and AP can reduce the ratio of apoptosis, activity of caspase-3, and expression of Bax, while CCE knocked out apigenin (CCE^{AP-}) had a slight improvement on the high glucose-induced endothelial cell injury. **Conclusion** AP is one of the principal components improving the high glucose-induced endothelial cell injury, and its anti-apoptosis effect may be related to anti-oxidative stress.

Key words: *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze; apigenin; high glucose; endothelial cell; apoptosis; specific deletion

收稿日期: 2013-12-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(81102862); 国家科技重大专项重大新药创制(2011ZX09307-002-02); 江苏省高校青蓝工程资助项目; 中国药科大学中央高校基本科研业务费专项基金培育项目(02410018)

作者简介: 王立英(1988—), 女, 山东滕州人, 硕士研究生, 研究方向为2型糖尿病及其血管并发症药物研究。

Tel: 15252481606 E-mail: wangliying_1988@163.com

*通信作者 吴斐华 Tel: (025)86185147 E-mail: fhwu2000@sina.com

马世平 Tel: (025)86185232 E-mail: spma@cpu.edu.cn

由于中药所含成分复杂,为研究某一成分在该中药中的作用和地位,通常是先分离中药的化学成分,再进行药理学活性研究。这种方法虽然能够直接反映该成分的药理活性,但不能确切反映该成分在该中药中的作用地位及与其他成分间的相互作用^[1]。为此,相关学者通过特异性剔除中药某一成分,而保留其他所有成分不变,研究剔除前后活性的变化,来反向研究该成分在中药中的地位和作用^[2-8]。植物风轮菜 *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze 的全草,在福建民间用于治疗糖尿病。实验室前期研究证实风轮菜活性部位(CCE)能够改善链脲佐菌素(STZ)致糖尿病小鼠糖脂代谢,改善高糖所致内皮细胞损伤^[9-10]。已有文献报道芹菜素(apigenin, AP)具有降血糖^[11]和保护血管内皮^[12]作用。本实验室采用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法从 CCE 中剔除 AP,制备剔除 AP 的 CCE(CCE^{AP-})。通过研究 CCE、CCE^{AP-}和 AP 对高糖诱导的内皮细胞损伤的影响及其机制,探讨 AP 在风轮菜改善高糖诱导内皮细胞损伤作用中的地位。

1 材料

1.1 细胞株与药材

人脐静脉内皮细胞(EA.hy926)由中国药科大学中药药理教研室刘保林教授馈赠。风轮菜全草采集于福建莆田市莆田县,经中国药科大学生药研究室濮社班副教授鉴定为唇形科风轮菜属植物风轮菜 *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze。AP 对照品(质量分数 98%)由中国药科大学天然药物化学教研室提供。

1.2 试剂

甲醇(色谱纯),江苏汉邦科技有限公司;DMEM 低糖培养基, Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青公司;胰蛋白酶和噻唑蓝(MTT), Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO),上海凌峰化学试剂有限公司;2',7'-二氯荧光素双乙酸盐(DCFH DA)试剂盒,碧云天生物技术研究所;细胞凋亡荧光 Hoechst 3258 检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒及 caspase-3 分光光度法检测试剂盒,南京凯基生物技术有限公司。十二烷基磺酸钠(SDS)和三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)以及过硫酸铵, Amresco 公司;蛋白质相对分子质量标准样品(Blue Plue II Protein Marker, 10 000~170 000), Fermentas 公司;PVDF 膜, Millipore 公司。单克隆的兔抗-3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、Bax 特异

性一抗, Cell Signaling Technology 公司。

1.3 仪器

TP-114 电子天平,丹佛仪器(北京)有限公司;SHIMADZU LC-2010A HT 高效液相色谱仪,岛津有限公司;Multiskan Spectrum1500-320 酶标仪、702 型超低温冰箱及 3111 型细胞培养箱, Thermo Electron Corporation;JB-CJ-1FDS 超净工作台,苏州佳宝净化工程设备有限公司;XSZ-D2 倒置显微镜,重庆光学仪器厂;1-15K 低温离心机, Sigma Corporation;流式细胞仪, BD FACSCalibur;IX51 S8F-3 荧光显微镜(Olympus);Mini Protein 3 Cell 垂直电泳槽及 Trans-Blot SD Cell 电转仪, Bio-Rad。

2 方法

2.1 CCE 和 CCE^{AP-}的制备

2.1.1 CCE 的制备^[9] 风轮菜用 80%乙醇回流提取 3 次,合并提取液,减压浓缩,将浓缩液依次用 3 倍量的石油醚、醋酸乙酯分别萃取 4 次,将醋酸乙酯萃取物用大孔树脂进行柱色谱,以水洗脱杂质后,用乙醇-水进行梯度洗脱(乙醇体积分数 20%~80%),合并乙醇洗脱液,减压浓缩干燥,得到 CE(得率 1.56%)。经 HPLC 定量测定^[13], CCE 中含 AP 11.01%。

2.1.2 CCE^{AP-}的制备 称取 CCE 100 mg, 甲醇溶解,抽滤,滤液进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,分别用甲醇及丙酮-水(1:1)溶剂洗脱,20 mL 为 1 份,以 AP 对照品作为对照,用硅胶 TLC 法追踪,剔除含有 AP 的洗脱液后,将所有洗脱液合并、减压浓缩、干燥,即得 CCE^{AP-}。

2.1.3 HPLC 法分析 CCE 和 CCE^{AP-} Inertsil ODS-SP 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-水(B),梯度洗脱:0~10 min, 30% A, 10~30 min, 50% A, 30~45 min, 70% A, 45~50 min, 50% A, 50~55 min, 30% A;体积流量 1 mL/min;柱温 30 °C;检测波长 335 nm。

2.1.4 供试品溶液的制备 取样品(CCE、CCE^{AP-}、AP)适量,用 50%甲醇溶解制成 1 mg/mL 的 CCE 和 CCE^{AP-}样品液、250 μg/mL 的 AP 溶液,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2 细胞培养

EA.hy926 细胞在 10%胎牛血清的 DMEM 低糖培养基中于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养。每天换培养液 1 次,接种后 2~4 d,细胞呈单层密集生长,待细胞生长至融合期时用 0.25%胰蛋白酶消

化传代, 按 1:3 传代培养。

2.3 CCE、CCE^{AP-}和 AP 对高糖损伤内皮细胞活力的影响

取生长良好的 EA.hy926 细胞消化成单细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板 (每孔 1×10^4), 培养 24 h 后更换培养基。将细胞分为 5 组: 对照组 (5.5 mmol/L 葡萄糖)、模型组 (33 mmol/L 葡萄糖)、药物组 (33 mmol/L 葡萄糖 + 30 mg/L CCE / 30 mg/L CCE^{AP-} / 3 mg/L AP)。各组分别培养 72 h 后, 加入含 0.5% MTT 的培养基 20 μ L, 继续培养 4 h, 弃培养液, 加入 150 μ L DMSO 原液, 振荡 10 min, 待结晶完全溶解后, 用酶联免疫仪于 490 nm 波长处测定吸光度 (A_{490}) 值, 以存活率表示细胞活力。

$$\text{存活率} = \text{药物组 } A_{490} / \text{对照组 } A_{490}$$

2.4 CCE、CCE^{AP-}和 AP 对高糖诱导内皮细胞胞内活性氧 (ROS) 生成的影响

取生长良好的 EA.hy926 细胞消化成单细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板 (每孔 1×10^5), 培养 24 h 后更换培养基。将细胞同 “2.3” 项分组给药, 分别按各组培养条件培养 48 h 后, 用无血清培养基洗涤 2 次。将 DCFH-DA 用无血清培养基按 1:1 000 稀释 (终浓度 10 μ mol/L), 每组加稀释液 1 mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育染色 20 min。染色后 PBS 洗涤 3 次, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 含血清培养基终止。将细胞用 500 μ L PBS 重悬, 用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。用 WinMDI 2.9 图像分析软件分析平均荧光强度以表示细胞内 ROS 的量。

2.5 CCE、CCE^{AP-}和 AP 对高糖诱导内皮细胞凋亡形态的改善作用

取生长良好的 EA.hy926 细胞消化成单细胞悬液接种于 48 孔细胞培养板 (每孔 2×10^4), 培养 24 h 后更换培养基。细胞分组、给药同 “2.3” 项, 分别按各组培养条件培养 48 h 后, 弃培养液, 无血清培养基洗涤细胞 2 次, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 缓冲液 A 洗 2 遍, 加入 Hoechst 33258 染色液, 避光反应 15 min, PBS 洗涤 2 次, 荧光显微镜 (激发波长 365 nm) 下观察 ($\times 200$) 细胞核形态。凋亡细胞荧光强度较强, 细胞核变小、浓缩。

2.6 CCE、CCE^{AP-}和 AP 对高糖诱导内皮细胞凋亡率的影响

取生长良好的 EA.hy926 细胞消化成单细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板 (每孔 1×10^5), 培养 24 h

后更换培养基。细胞分组、给药同 “2.3” 项, 分别按各组培养条件培养 48 h 后, 弃培养上清, 每组细胞按 Annexin V-FITC/PI 染色试剂盒说明书进行染色处理, 最后通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。用 WinMDI 2.9 图像分析软件分析平均荧光强度以表示细胞凋亡率。

2.7 CCE、CCE^{AP-}和 AP 对高糖诱导内皮细胞 caspase-3 活性的影响

取生长良好的 EA.hy926 细胞消化成单细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板 (每孔 1×10^5), 培养 24 h 后更换培养基。细胞分组、给药同 “2.3” 项, 分别按各组培养条件培养 48 h 后, 按 caspase-3 活性检测试剂盒说明进行细胞收集、裂解, 最后进行反应, 检测 caspase-3 的活性。

2.8 CCE、CCE^{AP-}和 AP 对高糖诱导内皮细胞中 Bax 表达的影响

取生长良好的 EA.hy926 消化成单细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板 (每孔 1×10^5), 培养 24 h 后更换培养基。细胞分组同 “2.3” 项, 分别按各组培养条件培养 48 h 后, 用冰 PBS 洗涤 3 次以去除培养基, 收集细胞后每个样本加入 100 μ L 蛋白裂解液, 冰浴裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集蛋白上清液。采用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。蛋白质样品与 1/4 倍量 5 \times SDS 上样缓冲液混合均匀, 煮沸变性 5 min, 12% SDS-PAGE 95 V 恒压电泳分离 2 h, 10 V 恒压 30 min 湿转至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉制成的封闭液中, 室温摇床上封闭 2 h, 加抗 Bax (GAPDH) 单抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后 TBST 稀释的二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 与化学发光剂 ECL 反应, X 线胶片曝光显影, 通过 Image J 软件处理条带光密度, 并进行数据处理。

2.9 统计学处理

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 CCE 和 CCE^{AP-}的 HPLC 分析

如图 1 所示, HPLC 检测 CCE 与 CCE^{AP-}的图谱可知, 本实验采用的 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法基本能从 CCE 中完全剔除 AP。

3.2 对高糖损伤的内皮细胞活力的影响

与对照组比较, 高糖模型组 EA.hy926 细胞存

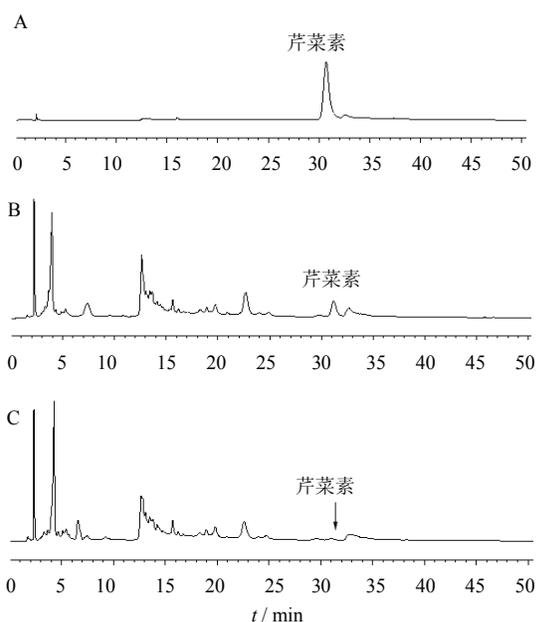
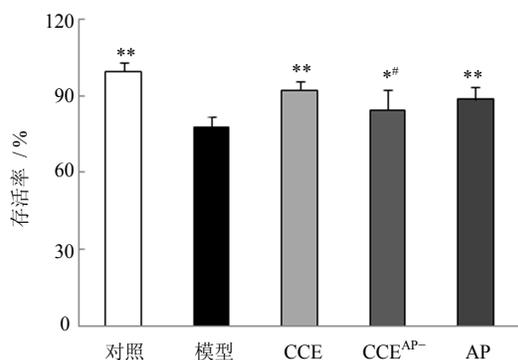


图 1 AP 对照品 (A)、CCE (B) 和 CCE^{AP} (C) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of AP reference(A), CCE (B), and CCE^{AP} (C)

活率显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 30 mg/L CCE 组及 3 mg/L AP 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$), CCE^{AP} 30 mg/L 组细胞存活率也显著高于模型组 ($P < 0.05$), 但明显低于 CCE 组 ($P < 0.05$)。另外, CCE^{AP} 组与 AP 组比较, CCE 组与 AP 组比较, 均无显著差异 ($P > 0.05$)。表明 CCE、CCE^{AP} 和 AP 均能明显改善高糖对内皮细胞的损伤作用, 提高内皮细胞的存活率。但 CCE^{AP} 作用弱于 CCE。可见, AP 是 CCE 改善高糖对内皮细胞损伤的一个重要成分。结果见图 2。

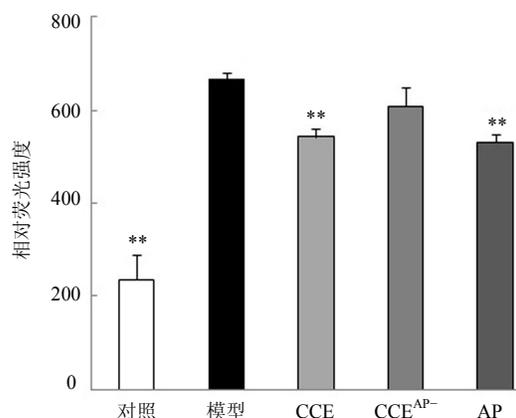


与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 CCE 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs CCE group

图 2 CCE、CCE^{AP} 和 AP 对高糖诱导损伤的 EA.hy926 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of CCE, CCE^{AP}, and AP on viability of EA.hy926 cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对高糖诱导内皮细胞胞内 ROS 生成的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 高糖模型组内皮细胞 ROS 荧光强度明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, CCE 组和 AP 组胞内 ROS 荧光强度显著降低 ($P < 0.01$), CCE^{AP} 组荧光强度较模型组有所降低, 但无显著差异。表明 AP 是 CCE 中抑制高糖所致的内皮细胞内 ROS 生成的一个重要成分。



与模型组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs model group

图 3 CCE、CCE^{AP} 和 AP 对高糖诱导 EA.hy926 细胞胞内 ROS 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of CCE, CCE^{AP}, and AP on ROS level in EA.hy926 cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 对高糖诱导内皮细胞凋亡形态及凋亡率的改善作用

如图 4 所示, 荧光显微镜下观察, 高糖模型组显示明显增多的细胞凋亡特征: 染色质浓缩, 核染呈亮蓝色荧光。而对照组细胞的胞核形态较为一致, 均发出均匀淡蓝色荧光, 染色较弱。CCE 组和 AP 组细胞凋亡形态均明显改善, 而 CCE^{AP} 组作用不明显。与对照组相比, 高糖模型组的细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, CCE 组和 AP 组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$), CCE^{AP} 组细胞凋亡率无显著变化。CCE^{AP} 组与 CCE 组比较, CCE^{AP} 组与 AP 组比较, 均有显著差异 ($P < 0.05$)。表明 AP 是 CCE 中抑制高糖所致的内皮细胞凋亡的一个重要成分, 与其他成分之间存在协同作用。

3.5 对高糖诱导内皮细胞 caspase-3 活性的影响

如图 5 所示, 与对照组相比, 高糖模型组细胞 caspase-3 活性显著升高 ($P < 0.01$), 是对照组的 3.4 倍。与模型组相比, CCE、CCE^{AP} 及 AP 组 caspase-3 活性显著降低 ($P < 0.01$)。CCE^{AP} 组与 CCE 组、CCE^{AP}

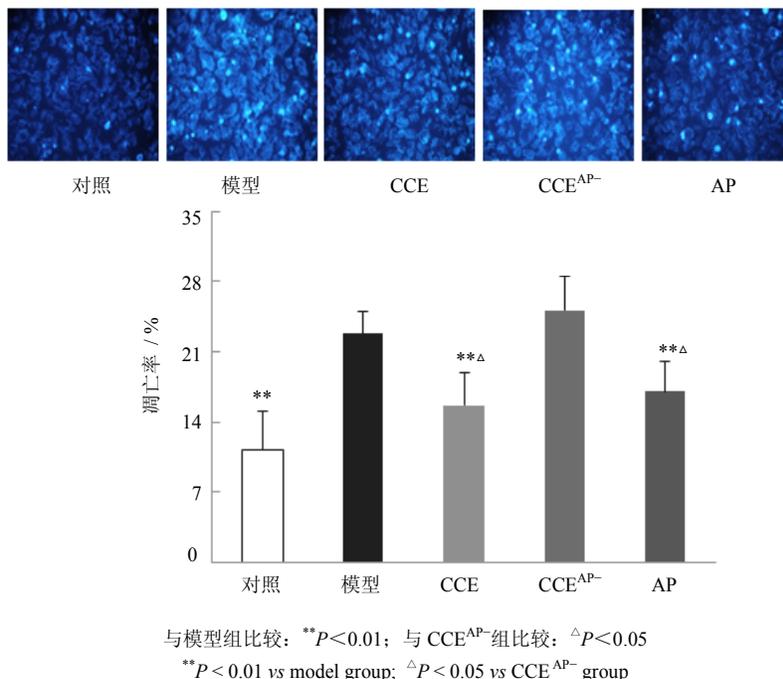


图 4 CCE、CCE^{AP-/-}和 AP 对高糖诱导 EA.hy926 凋亡形态及凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of CCE, CCE^{AP-/-}, and AP on morphology and ratio of apoptosis in EA.hy926 cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

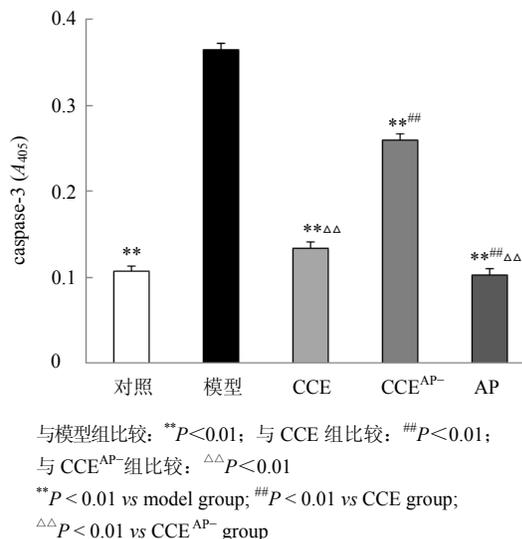


图 5 CCE、CCE^{AP-/-}和 AP 对高糖诱导 EA.hy926 中 caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of CCE, CCE^{AP-/-}, and AP on activity of caspase-3 in EA.hy926 cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组和 AP 组、CCE 组与 AP 组相比较均有显著差异 ($P < 0.01$)。表明 AP 是 CCE 中抑制高糖所致的内皮细胞中 caspase-3 活性的一个重要成分。

3.6 对高糖诱导内皮细胞中 Bax 表达的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 高糖模型组细胞促凋亡蛋白 Bax 的表达量显著升高 ($P < 0.01$), 与

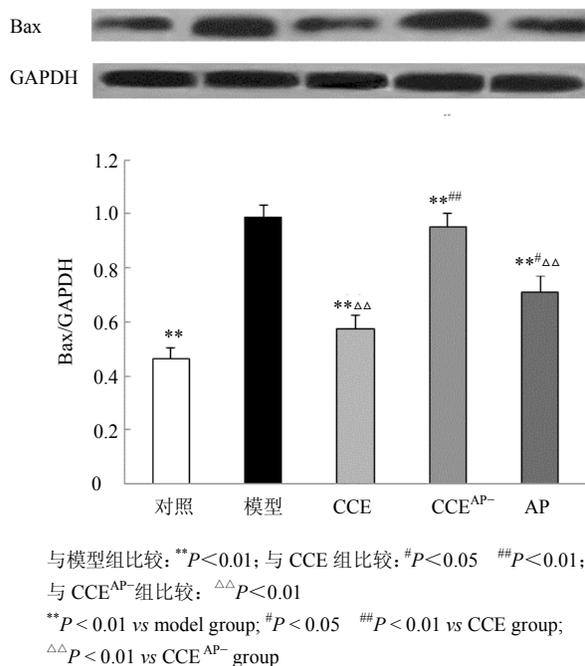


图 6 CCE、CCE^{AP-/-}和 AP 对高糖诱导 EA.hy926 中 Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of CCE, CCE^{AP-/-}, and AP on expression of Bax in EA.hy926 cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

模型组相比, CCE 组及 AP 组显著降低 Bax 的表达 ($P < 0.01$), 抑制率分别为 42.1%、28.2%; CCE^{AP-/-}组无显著差异, 抑制率为 3.6%。CCE^{AP-/-}组与 CCE

组、CCE^{AP-}组和 AP 组相比,对 Bax 的表达均有显著差异 ($P < 0.01$), CCE 组与 AP 组相比,差异显著 ($P < 0.05$)。表明 AP 是 CCE 中抑制高糖所致的内皮细胞中 Bax 高表达的一个重要成分,与其他成分之间存在协同作用。

4 讨论

由于中药成分的复杂性,中药研究尤其是所含成分在中药中的作用地位及各成分之间相互作用的研究,目前尚缺乏理想的研究方法。已有文献报道采用免疫亲和色谱柱^[14]、薄层色谱法、化学分离后根据出膏率重新组合等方法进行目标成分的剔除,研究剔除前后活性的变化,明确该成分在该中药中的作用地位,从而阐明中药作用的物质基础。本实验采用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法从 CCE 中特异剔除 AP,制备了 CCE^{AP-}。

血管内皮细胞通过产生多种活性物质对细胞内理化信号产生应答,产生多重生物学功能,从而保持血管正常张力,维持内皮细胞正常功能^[15]。已有研究证明血管内皮功能障碍是糖尿病血管并发症发生的重要因素,被认为是动脉粥样硬化发生发展的始动因素^[16]。高血糖可通过多种途径诱导血管内皮细胞凋亡,进而导致血管内皮细胞功能障碍^[17]。

高糖通过诱导氧化应激反应所致的血管内皮细胞凋亡是高血糖引起糖尿病患者血管内皮损伤和功能障碍过程中的一个重要的早期事件^[18-20]。细胞凋亡又称程序性死亡,是通过激活特定的信号通路严格控制的过程。其形态学变化特点是细胞皱缩、DNA 降解、染色质凝聚、凋亡小体形成^[21]。Caspase 家族属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶,与细胞凋亡调控密切相关。其中, caspase-3 作为凋亡执行蛋白,其直接参与了细胞的凋亡过程。Bcl-2 蛋白家族通过调控线粒体膜孔道决定细胞对凋亡刺激的相对敏感性^[22]。

本实验通过 MTT 法、Hoechst 染色法、流式细胞术、分光光度法及蛋白免疫印迹法检测,发现 CCE 及 AP 能够显著提高高糖损伤的血管内皮细胞活力,提高细胞存活率,降低胞内 ROS 水平,减弱 caspase-3 活性,及抑制 Bax 的表达,从而抑制凋亡的发生。而剔除 AP 的 CCE 虽然也能改善内皮细胞损伤,但效果弱于 AP 及 CCE。可见, AP 是风轮菜改善高糖所致内皮细胞损伤的重要成分之一,其改善高糖诱导内皮细胞凋亡作用与抗氧化应

激有关。

总之,本实验通过特异剔除 CCE 中的 AP,验证了 AP 在 CCE 改善高糖所致内皮细胞损伤中的作用地位,这为阐明风轮菜改善高糖所致的血管内皮损伤的物质基础提供了实验依据。

参考文献

- [1] 徐 强. 中药成分在方剂中的作用及其研究思路 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(5): 327-331.
- [2] 肖小河, 鄢 丹, 袁海龙, 等. 基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1345-1348.
- [3] Yan D, Li J X, Xiong Y, et al. Promotion of quality standard of herbal medicine by constituent removing and adding [J]. *Sci Rep*, 2014, doi: org/10.1038/srep03668.
- [4] 张甜甜. 基于成分敲除/敲入的中药金银花药效组分辨识与质量评价研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [5] Kong W J, Wang J B, Zang Q C, et al. Fingerprint-efficacy study of artificial *Calculus bovis* in quality control of Chinese materia medica [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1342-1347.
- [6] Sun Y, Dong Y, Jiang H J, et al. Dissection of the role of paeoniflorin in the traditional Chinese medicinal formula Si-Ni-San against contact dermatitis in mice [J]. *Life Sci*, 2009, 84: 337-344.
- [7] Zhang L, Sun Y, Chen T, et al. Selective depletion of glycyrrhizin from Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription, blocks its effect on contact sensitivity in mice and recovers adhesion and metalloproteinases production of T lymphocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5: 1193-1204.
- [8] 徐 强, 孙 洋, 陈 婷, 等. 以四逆散为例谈中药成分在复方中的作用地位 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 45.
- [9] Li J, Wu F H, Chen K, et al. Extract of *Clinopodium chinense* inhibits high glucose-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 61: 265-271.
- [10] 吴斐华, 梁敬钰, 刘 洋, 等. 一种防治糖尿病的风轮菜有效部位的制备方法与药物用途: ZL201010267636.4 [P]. 2010-08-31.
- [11] Panda S, Kar A. Apigenin (4, 5, 7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(11): 1543-1548.
- [12] 李永齐, 季 晖, 马 飞, 等. 芹菜素延缓人脐静脉内皮细胞衰老的体外实验研究 [J]. 药学进展, 2009, 33(10): 463-466.

- [13] 郭 英. HPLC 法测定大叶水芹菜中芹菜素含量 [J]. 微量元素与健康研究, 2010, 27(3): 37-38.
- [14] 陈 亮, 陈 婷, 徐 强. 免疫亲和色谱特异性剔除中药方剂四逆散中的柚皮苷 [J]. 色谱, 2006, 24(3): 243-246.
- [15] Hennig B, Toborek M. Nutrition and endothelial cell function: implications in atherosclerosis [J]. *Nutr Res*, 2001, 21: 279-293.
- [16] Chai D J, Wang B Y, Shen L H, *et al.* RXR agonists inhibit high glucose-induced oxidative stress by repressing PKC activity in human endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44: 1334-1347.
- [17] Allen D A, Yaqoob M M, Harwood S M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications [J]. *J Nutr Biochem*, 2005, 16: 705-713.
- [18] Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes Elsa M, *et al.* Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois [J]. *Mutat Res*, 2009, 674: 3-22.
- [19] Mah E, Bruno R S. Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences [J]. *Nutr Res*, 2012, 32: 727-740.
- [20] Doina P. Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes [J]. *Int J Diabetes Mellitus*, 2010, 2: 189-195.
- [21] Pulido M D, Parrish A R. Metal-induced apoptosis: mechanisms [J]. *Mutat Res*, 2003, 533: 227-241.
- [22] Khalil H, Bertrand M J M, Vandenabeele P, *et al.* Caspase-3 and RasGAP: a stress-sensing survival/demise switch [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(2): 83-89.