

山药总蛋白对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激的保护作用及机制研究

姜蕾蕾, 冯佳宝, 刘颖, 金辰蓉, 刘美辰, 王思明, 赵大庆, 于士婷

Protective Effect and Mechanism of Chinese Yam Total Protein on High D-Glucose Induced Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

JIANG Leilei, FENG Jiabao, LIU Ying, JIN Chenrong, LIU Meichen, WANG Siming, ZHAO Daqing, and YU Shiting

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060254>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

桦树叶黄酮提取物对人脐静脉内皮细胞抗氧化活性的研究

Study on the influence of flavonoid extracts from birch leaves on antioxidant activity of human umbilical vein endothelial cells

食品工业科技. 2017(09): 82-86 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.007>

人参多糖对氧化应激损伤肝细胞的保护作用机制研究

Mechanism of Protective Effect of Ginseng Polysaccharide on Hepatocytes Induced by Oxidative Stress

食品工业科技. 2020, 41(5): 280-285,292 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.046>

福建养殖仿刺参抗氧化多肽的酶解工艺优化及其对过氧化氢诱导的血管内皮细胞EA.hy926损伤的保护作用

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Aquacultured Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* in Fujian and Protective Effects of Enzymatic Hydrolysate against Hydrogen Peroxide in Human Vascular Endothelial Cells EA.hy926

食品工业科技. 2018, 39(24): 183-191 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.24.032>

植物黄酮调控JNK通路干预氧化应激相关疾病的研究进展

Research Progress of Plant Flavonoids Regulating JNK Signal Pathway to Intervene with Oxidative Stress-related Diseases

食品工业科技. 2021, 42(24): 454-460 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120005>

扁桃斑鸠菊叶酵素发酵过程中理化性质分析、抗氧化能力评价及对氧化应激细胞防护作用研究

Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and Protective Effect on Oxidative Stress Cells of *Vernonia amygdalina* Delile Leaf Jiaosu during Fermentation

食品工业科技. 2021, 42(18): 9-17 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110014>

氧化应激细胞模型建立的研究进展

Research Progress of Establishing Cellular Oxidative Stress Model

食品工业科技. 2019, 40(7): 341-345 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.07.059>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

姜蕾蕾, 冯佳宝, 刘颖, 等. 山药总蛋白对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激的保护作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 307–315. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060254

JIANG Leilei, FENG Jiabao, LIU Ying, et al. Protective Effect and Mechanism of Chinese Yam Total Protein on High D-Glucose Induced Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(11): 307–315. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060254

· 营养与保健 ·

山药总蛋白对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激的保护作用及机制研究

姜蕾蕾¹, 冯佳宝¹, 刘颖¹, 金辰蓉¹, 刘美辰², 王思明², 赵大庆², 于士婷^{2,*}

(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130117;

2. 长春中医药大学东北亚中医药研究院, 吉林长春 130117)

摘要: 探究山药总蛋白对高浓度 D-葡萄糖 (High concentrations of D-glucose, HG) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 氧化应激损伤的保护作用及其机制。利用 50 mmol/L HG 建立 HUVECs 损伤模型。将 HUVECs 随机分为对照组、模型组、山药总蛋白低剂量组 (0.5 mg/mL) 以及山药总蛋白高剂量组 (1 mg/mL), 评估山药总蛋白对 HG 处理的 HUVECs 的细胞活力、细胞形态及血管生成能力的影响; 检测细胞中活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的水平和超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 的活力; 以及培养基上清液中一氧化氮 (Nitric oxide, NO)、8-羟基脱氧鸟苷 (8-Hydroxy deoxyguanosine, 8-OHdG)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 的水平; 测定 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、硫氧还蛋白相互作用蛋白 (Txnip)、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶剪切体-1 (Cleaved caspase-1) 和 IL-1 β 蛋白的表达水平。结果显示, 山药总蛋白能显著提高 HG 处理后的 HUVECs 的细胞活力 ($P<0.01$), 改善细胞凋亡形态, 并显著升高 SOD 和 CAT 的活力 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) 以及凋亡相关蛋白 (Bcl-2/Bax) 的比值、血管形成能力、NO 分泌量。此外, 山药总蛋白还显著降低了 HUVECs 的 ROS、MDA、8-OHdG、IL-1 β 和 IL-6 的水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) 及炎症相关蛋白 (Txnip、NLRP3、cleaved Caspase-1、IL-1 β) 的表达水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并且上述指标的变化均呈现明显的浓度依赖性。本研究结果表明, 山药总蛋白可能通过抑制 Txnip/NLRP3 信号通路从而保护 HUVECs 拮抗 HG 诱导的氧化应激, 恢复 HUVECs 内的氧化平衡, 进一步减轻细胞的炎症反应。

关键词: 山药总蛋白, 人脐静脉内皮细胞, 氧化应激, 炎症反应, Txnip/NLRP3 信号通路

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)11-0307-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060254

本文网刊:



Protective Effect and Mechanism of Chinese Yam Total Protein on High D-Glucose Induced Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

JIANG Leilei¹, FENG Jiabao¹, LIU Ying¹, JIN Chenrong¹, LIU Meichen², WANG Siming², ZHAO Daqing², YU Shiting^{2,*}

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Northeast Asian Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

收稿日期: 2023-06-26

基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (YDZJ202301ZYTS445)。

作者简介: 姜蕾蕾 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药有效成分发现、生物转化及健康产品研究与开发, E-mail: jianglleie0223@163.com。

* 通信作者: 于士婷 (1994-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药有效成分及其传统功效, E-mail: yusting0331@163.com。

Abstract: To explore the protective effect and mechanism of Chinese yam total protein in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with high-concentration D-glucose (HG)-induced oxidative stress injury. The HUVECs injury model was established by 50 mmol/L HG. HUVECs were randomly divided into control, model, low-dose Chinese yam total protein (0.5 mg/mL), and high-dose Chinese yam total protein (1 mg/mL) groups. The effects of Chinese yam total protein on the viability, morphology, and angiogenic ability of HUVECs treated with HG were evaluated. The reactive oxygen species (ROS) level, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in cells were determined. The nitric oxide (NO), 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG), malondialdehyde (MDA), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) levels in culture medium supernatant were measured. Protein expression levels of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax), thioredoxin-interacting protein (Txnip), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cleaved Caspase-1, and IL-1 β were determined. The results showed that Chinese yam total protein could significantly increase the cell viability of HUVECs treated with HG ($P<0.01$), improve cell apoptotic morphology, and significantly increase the activities of SOD and CAT ($P<0.05$, $P<0.01$) and ratio of apoptosis-related proteins (Bcl-2/Bax), angiogenic ability and nitric oxide (NO) secretion. Moreover, Chinese yam total protein significantly decreased the levels of ROS, MDA, 8-OHdG, IL-1 β , and IL-6 ($P<0.05$, $P<0.01$) and the expression levels of inflammation-related proteins (Txnip, NLRP3, cleaved Caspase-1, and IL-1 β) ($P<0.05$, $P<0.01$). Changes in these indicators showed a significant concentration-dependent manner. The results indicate that Chinese yam total protein may protect against HG-induced oxidative stress by inhibiting the Txnip/NLRP3 signaling pathway, restoring the oxidative balance, and reducing the inflammatory response of HUVECs.

Key words: Chinese yam total protein; human umbilical vein endothelial cells; oxidative stress; inflammation; Txnip/NLRP3 signaling pathway

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是一种由糖代谢紊乱引起的、严重危害人类健康的全身性代谢疾病^[1]。DM 可导致血管疾病、视网膜病变、肾病和神经损伤等多种并发症,其中大血管病变是 DM 并发症患者致死、致残的重要原因,死亡率高达 70%~80%^[2]。由于内皮是位于血管内表面的单层细胞,可促进血管生成并产生活性物质,具有调节血管收缩和舒张平衡的作用,故其在维持血管稳态中发挥关键作用。然而,高血糖引起的内皮功能障碍是大血管病变发生的共同病理基础和推动剂^[3-4],因此,寻找能够修复内皮损伤的功能性食品对于改善或延缓 DM 血管疾病具有重要意义。

山药是薯蓣科薯蓣的干燥根茎,是我国传统的药食同源佳品,含有丰富的多糖、皂苷类、氨基酸、维生素、脂肪酸等营养成分,具有抗炎、免疫调节、降血糖、抗肿瘤、抗氧化、预防心血管疾病等多种生物学功能^[5-8]。山药蛋白作为山药中的有效成分,具有促进外周免疫器官的发育以及免疫活性物质的分泌表达,提高机体免疫能力等作用^[9-10]。山药蛋白防治 DM 的研究主要是通过降低促炎细胞因子白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)的合成,提高一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、环磷鸟嘌呤核苷(Cyclic guanosine monophosphate, cGMP)含量,以降低内皮细胞中的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的水平,来改善微血管内皮细胞的生理功能^[10-13],但其对大血管内皮细胞的修复作用机制尚不明确。本研究以大血管内皮细胞-人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)作为研究对象,利用高浓度 D-葡萄糖(High concentrations of D-glucose, HG)建立内皮细胞损伤模型,

深入探究山药总蛋白对 HG 诱导的内皮功能障碍的保护作用,为山药防治 DM 相关血管疾病提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

山药总蛋白 蛋白含量为 40%,制备参考本课题组前期方法,由长春中医药大学大健康创新中心制备^[14];HUVECs 中国科学院上海细胞库;RIPA(Radio immunoprecipitation assay)裂解液(20210115)、苯甲磺酰氟(Phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)

北京索莱宝科技有限公司;过氧化氢酶(Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮(Nitric oxide, NO)、8-羟基脱氧鸟苷(8-Hydroxy deoxyguanosine, 8-OHdG)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 酶联免疫吸附(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒 上海优选生物科技有限公司;ROS 检测试剂盒、聚羧基丙烯酸正丁酯(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(092221211217)、化学发光(Efficient chemiluminescence, ECL)试剂盒、2 $\times$ 蛋白上样缓冲溶液(P0015B)、4,6-联脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液 上海碧云天公司;B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体 美国 Bioworld 公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶剪切体-1(cleaved Caspase-1)抗体 武汉三鹰生物技术有限公司;硫氧还蛋白相互作用蛋白(Txnip)抗体 美国 CST 公司;NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、IL-1 β 抗体 美国 Abcam 公司;F-12K 培养基 武汉普诺赛生命科技有限公司;M199 培养基 美国 Sigma 公司;Matrigel 基质胶

美国 Corning 公司; CCK-8 试剂盒 美国 Bioss 公司; 磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffer saline, PBS, AH30026711) 美国 HyClone 公司; 其余试剂均为分析纯; 水 超纯水。

iBright FL 1000 型智能成像系统、3111 型 CO₂ 细胞培养箱、EVOS FL Auto 荧光显微镜 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Infinite 200 PRO 型酶标仪 美国 Life Sciences 公司; Mini Protean 型电泳仪 美国 Bio-rad 公司; TS-200 型摇床 江苏其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HUVECs 用含有 1% 青霉素/链霉素溶液和 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基培养, 将细胞置于 37 °C 培养箱中, 贴壁培养 2~3 d 后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。使用血球计数板进行细胞计数。

1.2.2 山药总蛋白溶液制备 将山药总蛋白冻干粉末溶解于 50 mmol/L HG 溶液中, 充分混匀后使用 0.22 μm 过滤器过滤除菌, 实验前, 使用 50 mmol/L HG 溶液稀释至实验所需浓度。

1.2.3 山药总蛋白对 HG 损伤的 HUVECs 的细胞存活率的影响 取处于对数生长期的 HUVECs 以 2×10^4 /mL 细胞密度, 每孔 100 μL 均匀铺至 96 孔板中, 待细胞贴壁, 弃去培养基, 更换成 F-12K 基础培养基饥饿培养 24 h。将细胞分为对照组 (F-12K 完全培养基, 100 μL)、模型组 (50 mmol/L HG, 100 μL) 和山药总蛋白组 (50 mmol/L HG+0.5、1 mg/mL 山药总蛋白, 100 μL) 培养 48 h。培养结束后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 将培养板置于 37 °C 培养箱中, 避光条件下孵育 1 h, 酶标仪 450 nm 处测定各孔 OD 值, 计算细胞存活率。细胞存活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100$$

式中; $A_{\text{实验组}}$ 为模型组和不同剂量山药总蛋白组测得的 OD 值; $A_{\text{对照组}}$ 为正常培养液培养的细胞测得的 OD 值; $A_{\text{空白组}}$ 为只加正常培养液未加细胞测得的 OD 值。

1.2.4 DAPI 染色法观察细胞形态变化 HUVECs 按“1.2.3”项下方法分组和给药后, 用 PBS (pH7.2, 0.0067 mol/L) 漂洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 弃去固定液。PBS 漂洗 3 次, 加入 DAPI 染色液, 常温下避光 5 min。于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 Western Blot 实验 HUVECs 按“1.2.3”项下方法分组和给药后, 收集各组细胞, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白浓度并调整至浓度一致。每 100 μL 样品加 $2 \times$ 蛋白上样缓冲液 100 μL, 共同煮沸 5 min, 利用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE) 分离, 湿转条件为电压 110 V, 90 min 进行转印, 转膜完毕后在 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 0.05% PBST (含有 0.05% 吐温的 PBS) 洗涤 3 次后, 分别用 Bcl-2、Bax、Txnip、NLRP3、cleaved Caspase-1、IL-1β、GAPDH 一抗 (稀释比例 1:1000) 4 °C 孵育过夜; 0.05% PBST 洗涤 3 次, 加入二抗 (稀释比例 1:1000), 室温孵育 1 h; 0.05% PBST 洗涤 3 次后, 利用 ECL 化学发光试剂在 iBright FL1000 成像系统中进行成像, 并利用 Image J 软件分析灰度值。

1.2.6 血管生成实验 将 Matrigel 基质胶按每孔 50 μL 涂覆至预冷的 96 孔培养板底, 在 37 °C 培养箱中放置 30 min。HUVECs 按“1.2.3”项下方法分组和给药后, 收集各组细胞, 制备 37 °C 培养箱中孵育 12 h, 使用倒置显微镜进行拍照并对其结节数量、管腔数、总血管长度计数。

1.2.7 活性氧水平测定 HUVECs 按“1.2.3”项下方法分组和给药后, 利用无血清培养基础以 1:1000 稀释 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA), 配制其终浓度为 10 μmol/L。去除孔板中细胞培养基, PBS 洗涤 3 次, 加入 1 mL 浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA, 在 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min, 无血清细胞培养基洗涤细胞 3 次, 在酶标仪 488/525 nm 处测定荧光强度。

1.2.8 ELISA 检测试剂盒检测生化指标 HUVECs 按“1.2.3”项下方法分组和给药后 48 h 后, 3000 r/min 离心 10 min, 收集各组细胞以及培养基的上清液, 再向细胞中加入 RIPA 裂解液 (含 1 mmol/L 的 PMSF) 150 μL, 裂解 5 min 后 12000 r/min 离心 10 min, 取细胞裂解液。利用 ELISA 检测试剂盒测定细胞裂解液中的 SOD、CAT 活力及培养基的上清液中的 NO、MDA、8-OHdG、IL-1β、IL-6 的水平。

1.3 数据处理

实验数据至少进行 3 次生物学重复, 数据均采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件中 *t* test 或 One-way ANOVA 方法进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 山药总蛋白对 HG 致 HUVECs 损伤的保护作用

2.1.1 山药总蛋白对 HG 损伤模型细胞活力的影响

HG 环境会抑制血管内皮细胞增殖并产生的过量 ROS 对细胞造成严重损伤, 细胞活力降低。并且随着 HG 浓度的不断增加及培养时间的延长, 细胞活力与之呈现明显的负相关^[15]。如图 1 所示, HG 处理 HUVECs 48 h 后, 与对照组比较, 模型组细胞存活率极显著降低至 60.57% ($P < 0.01$), 表明造模成功; 山药总蛋白低剂量组细胞存活率为 85.76%, 显著高于模型组 ($P < 0.05$), 山药总蛋白高剂量组细胞存活率

为 93.78%, 极显著高于模型组 ($P < 0.01$)。以上结果表明, 山药总蛋白可改善 HG 造成的 HUVECs 活力降低。

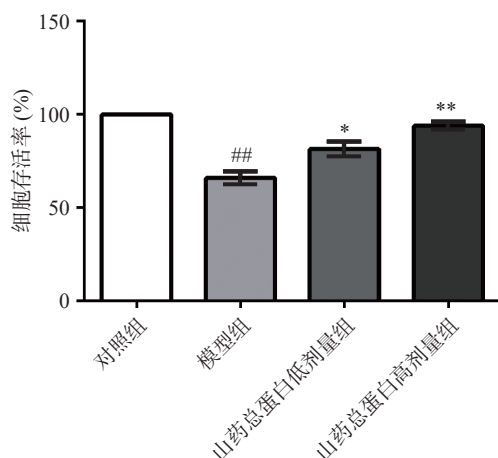


图1 山药总蛋白对 HG 损伤的 HUVECs 存活率的影响
Fig.1 Effect of Chinese yam total protein on the survival rate in HG-injured HUVECs

注: 与对照组相比, ## $P < 0.01$; 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 图3、图6同。

2.1.2 山药总蛋白对 HG 损伤模型细胞凋亡的影响

染色体 DNA 降解是细胞凋亡典型特征。DAPI 荧光染料可穿透完整的细胞膜, 与细胞内 DNA 强力结合, 从而反应细胞的凋亡程度^[16]。如图2所示, 与对照组相比, 模型组细胞核皱缩, 体积变小呈不规则形状, 核内呈现致密浓染的块状凝聚强荧光, 表明 HUVECs 的凋亡程度增强。此外, 凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 的比值也决定了细胞凋亡^[17]。由图3可知, HG 诱导后 HUVECs 的 Bcl-2 的表达显著下调, Bax 的表达显著上调, 使 Bcl-2/Bax 的比值极显著降低 ($P < 0.01$), 与 DAPI 染色的结果相一致, 说明 HG

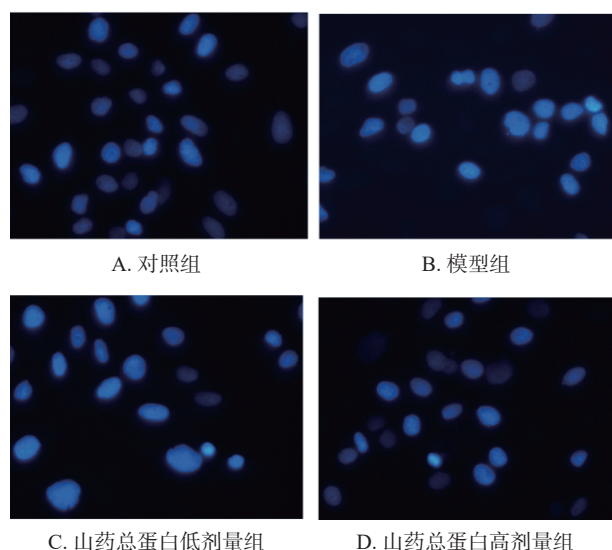


图2 山药总蛋白对 HG 损伤的 HUVECs 形态变化的影响 (400×)

Fig.2 Effect of Chinese yam total protein on cell morphology in HG-injured HUVECs (400×)

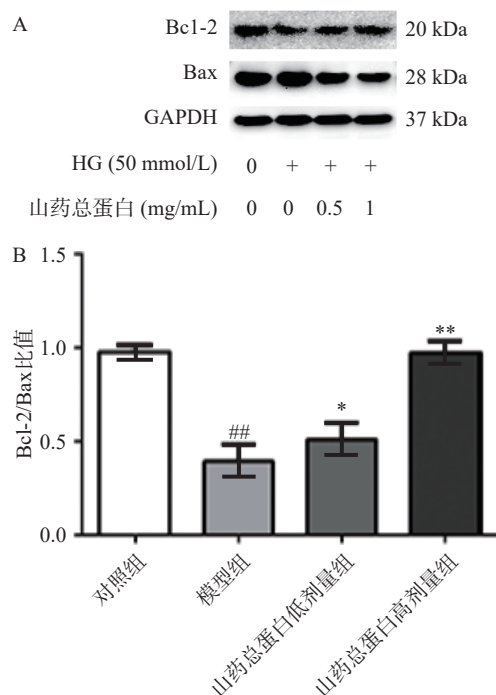


图3 Western Blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达水平
Fig.3 Expression levels of cell apoptosis-related proteins by Western Blot

能显著诱导 HUVECs 产生凋亡。山药总蛋白干预 48 h 后, 与模型组相比, 山药总蛋白低剂量组 Bcl-2/Bax 的比值显著升高 ($P < 0.05$), 山药总蛋白高剂量组 Bcl-2/Bax 的比值极显著升高 ($P < 0.01$) 且呈现明显的浓度依赖性。表明山药总蛋白可抑制 HG 造成的 HUVECs 凋亡。

2.1.3 山药总蛋白对 HG 损伤模型中内皮功能的影响

利用体外血管形成实验模拟山药总蛋白对血管生成的影响。通过图4和表1可以明显观察到, 给予山药总蛋白治疗 48 h 后, 山药总蛋白低剂量组能够显著改善 HG 对 HUVECs 成管的结节数量、管腔

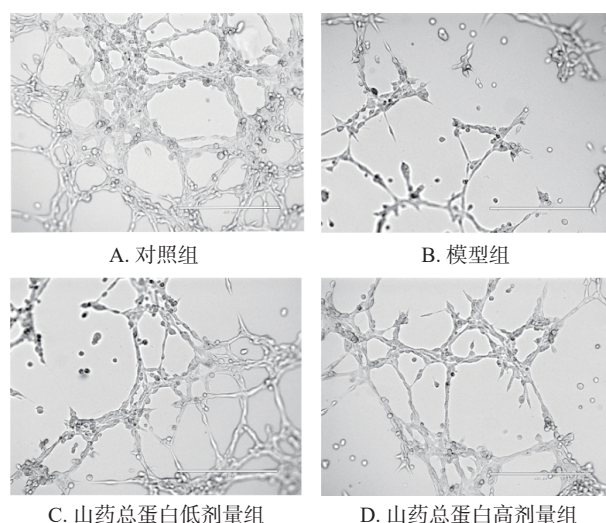


图4 山药总蛋白对 HG 损伤的 HUVECs 血管生成的影响 (400×)

Fig.4 Effect of Chinese yam total protein on angiogenesis in HG-injured HUVECs (400×)

表 1 山药总蛋白对 HG 损伤的 HUVECs 结节数量、管腔数、总血管长度以及 NO 分泌量的影响

Table 1 Effect of Chinese yam total protein on the number of nodules and lumens, the length of total blood vessels and NO levels in HG-injured HUVECs

组别	结节数量(个)	管腔数(个)	总血管长度(μm)	NO(μmol/L)
对照组	489.1±74.2	37.0±5.3	15346.5±619.5	124.8±5.3
模型组	136.1±18.2 ^{##}	6.4±1.3 ^{##}	6474.1±900.4 ^{##}	91.6±7.1 ^{##}
山药总蛋白低剂量组	222.3±17.0 [*]	16.3±1.5 [*]	9676.1±737.7 [*]	105.9±5.2 [*]
山药总蛋白高剂量组	283.4±7.1 ^{**}	20.7±2.1 ^{**}	11630.7±1148.2 ^{**}	117.7±7.9 ^{**}

注: 与对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 表2~表3同。

数和总血管长度的抑制作用($P<0.05$), 山药总蛋白高剂量组能够极显著改善 HG 对 HUVECs 成管的结节数量、管腔数和总血管长度的抑制作用($P<0.01$), 提高 HUVECs 的血管生成能力。并且内皮细胞分裂以及迁移生成血管的同时可分泌 NO 来维持血管稳态, NO 的释放量增加对维持内皮功能有着重要意义^[18-19]。结果如表 1 所示, 与对照组相比, 模型组可极显著抑制 NO 的释放量($P<0.01$), 山药总蛋白作用 48 h 后, 山药总蛋白低剂量组可显著缓解 HG 对 HUVECs 的抑制作用($P<0.05$), 山药总蛋白高剂量组可极显著缓解 HG 对 HUVECs 的抑制作用($P<0.01$), 修复 HG 诱导的 HUVECs 功能损伤。

2.2 山药总蛋白对 HG 诱导的 HUVECs 损伤的保护作用机制研究

2.2.1 对氧化应激相关因子水平的影响 HG 环境下, 机体对自由基的清除功能遭到破坏, 平衡被打破, 导致过量 ROS 生成, 同时产生大量的 MDA 和 8-OHdG 堆积, 致使细胞内抗氧化系统失衡 SOD、CAT 活力下降^[20]。通过表 2 可知 HG 诱导 48 h 后, 与对照组相比, 模型组中的 8-OHdG 水平显著升高($P<0.05$), ROS、MDA 水平极显著升高($P<0.01$), SOD 和 CAT 活力显著降低($P<0.01$)。说明 HG 环境可诱导 HUVECs 产生氧化应激反应^[21]。山药总蛋白干预 48 h 后, 与模型组相比, 山药总蛋白低剂量组 ROS、MDA、8-OHdG 水平显著降低($P<0.05$), SOD 和 CAT 活力无显著性差异($P>0.05$); 山药总蛋白高

剂量组 ROS、MDA、8-OHdG 水平极显著降低($P<0.01$), SOD 和 CAT 活力显著升高($P<0.05$), 表明山药总蛋白可拮抗 HG 诱导的氧化应激, 恢复 HUVECs 的抗氧化系统的平衡。

2.2.2 对炎症相关因子水平的影响 氧化应激状态往往伴随炎症反应并产生 IL-1 β 和 IL-6 等一系列炎症因子, 加剧内皮细胞的功能紊乱^[22]。结果如表 3 所示, HG 诱导后, 与对照组相比, 模型组 IL-1 β 水平极显著升高($P<0.01$), IL-6 水平显著升高($P<0.05$), 说明 HG 环境能够诱发 HUVECs 的炎症反应^[23]。不同剂量山药总蛋白干预 48 h 后, 与模型组相比, 山药总蛋白低剂量组 IL-1 β 水平显著降低($P<0.05$), IL-6 水平无显著性差异($P>0.05$); 山药总蛋白高剂量组 IL-1 β 水平极显著降低($P<0.01$), IL-6 水平显著性降低($P<0.05$), 表明山药总蛋白可减少 HG 诱导的炎症因子的分泌, 抵御氧化应激损伤, 改善 HUVECs 的功能。

2.2.3 对炎症相关蛋白表达的影响 Txnip/NLRP3 通路的激活与炎症反应的发生密切相关, Txnip 蛋白在 ROS 的刺激下引起 NLRP3 炎性小体的活化, 激活 TXNIP/NLRP3 通路, 发挥其促炎作用^[24]。由图 5 和图 6 所示, HG 诱导 48 h 后, 与对照组相比, 模型组 Txnip、NLRP3、Cleaved caspase-1、IL-1 β 蛋白表达极显著升高($P<0.01$)。不同剂量山药总蛋白干预 48 h 后, 与模型组相比, 山药总蛋白低剂量组 Txnip、NLRP3、Cleaved caspase-1、IL-1 β 蛋白表达显著降

表 2 山药总蛋白对 HG 损伤的 HUVECs 氧化应激水平的影响

Table 2 Effect of Chinese yam total protein on the levels of oxidative stress in HG-injured HUVECs

组别	ROS	SOD(U/mL)	CAT(U/mL)	MDA(nmol/mL)	8-OHdG(pg/mL)
对照组	100.1±0.1	271.6±12.8	154.3±9.6	2.5±0.6	423.4±10.8
模型组	245.4±3.3 ^{##}	222.3±8.8 ^{##}	128.5±3.9 ^{##}	3.5±0.2 ^{##}	461.7±14.8 [#]
山药总蛋白低剂量组	213.5±2.2 [*]	229.3±9.8	133.1±7.4	2.9±0.1 [*]	437.8±7.1 [*]
山药总蛋白高剂量组	194.3±2.7 ^{**}	237.8±5.3 [*]	139.4±8.3 [*]	2.7±0.1 ^{**}	425.3±7.4 ^{**}

表 3 山药总蛋白对炎症相关因子水平的影响

Table 3 Effect of Chinese yam total protein on the levels of inflammatory factors

组别	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
对照组	0.39±0.02	0.36±0.02
模型组	0.48±0.05 ^{##}	0.47±0.03 [#]
山药总蛋白低剂量组	0.42±1.03 [*]	0.45±0.13
山药总蛋白高剂量组	0.39±0.21 ^{**}	0.41±0.02 [*]

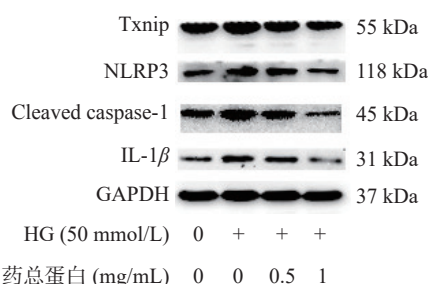


图5 山药总蛋白对 HG 损伤的 HUVECs Txnip、NLRP3、Cleaved caspase-1 和 IL-1β 蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of Chinese yam total protein on Txnip, NLRP3, Cleaved caspase-1 and IL-1β protein expressions in HG-injured HUVECs

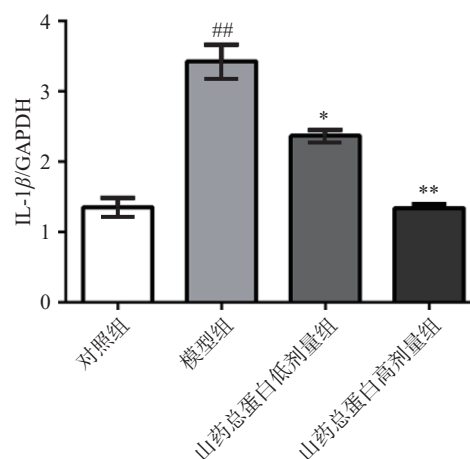
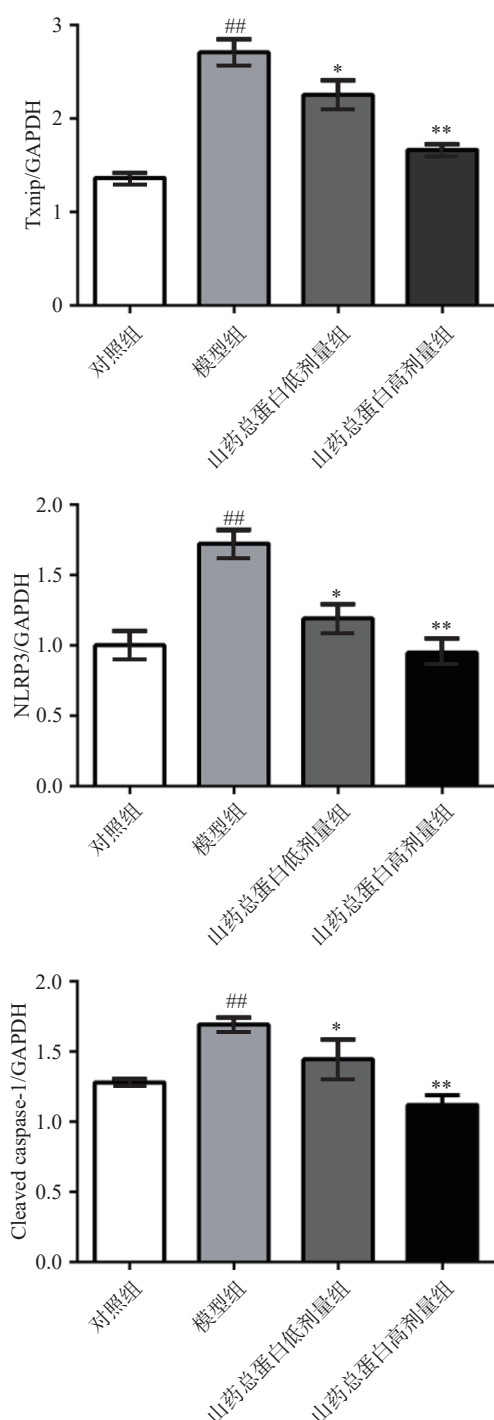


图6 定量分析炎症相关蛋白表达水平

Fig.6 Quantitative analysis of inflammation-related proteins expression levels

低 ($P<0.05$); 山药总蛋白高剂量组 Txnip、NLRP3、Cleaved caspase-1、IL-1β 蛋白表达极显著降低 ($P<0.01$), 说明山药总蛋白对 HG 诱导的 HUVECs 炎症反应的抑制作用可能与调控 Txnip/NLRP3 信号通路相关。

3 讨论与结论

长期以来, 内皮功能障碍与 DM 血管并发症的关系一直是学者研究的热点之一, DM 引起的内皮细胞的结构及功能变化都可能影响血管疾病的发病进程。已有研究发现, 可修复内皮细胞功能的天然产物在 DM 血管并发症的预防和治疗领域具有广阔的前景^[25]。

HG 损伤模型能模拟 DM 大血管疾病病理情况下的细胞状态, 是 DM 大血管内皮功能障碍的经典细胞模型。因此, 本研究以 HG 诱导的 HUVECs 氧化应激损伤建立体外研究模型, 探讨山药总蛋白对 HG 诱导的内皮细胞氧化损伤的保护机制。结果表明, 山药总蛋白可显著改善 HG 诱导所致的 HUVECs 活力降低。细胞凋亡是由多种因子或蛋白参与的复杂的病理生理过程, 其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 相互作用失衡是启动细胞凋亡的重要开关^[26], 当细胞收到凋亡信号后, Bcl-2 和 Bax 通过形成同源二聚体引起 Bcl-2 抑制, 从而促进细胞凋亡。本研究的结果表明, 山药总蛋白能够增加凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 的比值, 并减弱 DAPI 染色的 HUVECs 的蓝色荧光强度, 降低 HUVECs 凋亡, 减少细胞损伤, 进一步提升内皮细胞的抗氧化应激能力, 增强对 DM 大血管相关疾病的抵抗力。

内皮细胞最重要的功能是维持血管稳态, 是血管的第一防线。一方面, 内皮细胞通过分裂及迁移生成血管, 在胚胎生长、子宫内膜增殖、伤口愈合、组织修复等生理过程发挥着关键作用^[27-28]。另一方面, 内皮细胞通过分泌多种生物活性物质(如 NO)确保血管正常的收缩和舒张^[29-30]。本研究发现, HG 损伤后细胞血管样结构的形成能力以及 NO 的释放量显

著降低,表明 HG 诱导下 HUVECs 发生了内皮功能障碍。山药总蛋白干预后, HUVECs 血管生成能力及 NO 的水平显著提高。以上结果说明, 山药总蛋白对 HG 诱导的内皮功能障碍具有明显的保护作用。

DM 患者在高血糖刺激下, 血管内皮细胞发生严重的氧化应激, 造成体内抗炎因子和促炎因子表达失衡, 引起炎症损伤, 导致内皮功能障碍。因此减轻氧化应激和炎症反应是改善 DM 患者内皮功能障碍的有效策略^[31-33]。Txnip/NLRP3 信号是很有前景的 DM 血管疾病治疗靶点。研究表明, Txnip 是 ROS 的重要调节剂: 其启动子上的碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)易被高血糖激活而使表达量上调, 诱导 ROS 过量产生, 通过合成脂质过氧化物 MDA、抑制抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性、刺激氧化应激标志物 8-OHdG 生成等方式诱发氧化应激^[34-36]。此外, Txnip 表达升高是激活 NLRP3 炎症小体的重要机制, 炎症小体复合物的组装是引发炎症反应的关键环节^[37-38]。研究表明, Txnip 激活后, 促进 NLRP3 与接头蛋白(ASC)相互作用, 招募胞内 Caspase-1 前体组装成炎症小体复合物, 同时激活 Caspase-1, 剪切胞浆中 pro-IL-1 β 、pro-IL-6, 诱导具有促炎功能的 IL-1 β 、IL-6 成熟和分泌, 发生炎症反应^[39-40]。因此, 抑制 Txnip/NLRP3 信号通路是阻滞内皮细胞氧化应激和炎症反应, 进而修复内皮功能的关键。本研究通过 HG 诱导后发现细胞中氧化应激产物 ROS、MDA 和 8-OHdG 水平增加, 抗氧化酶 SOD 和 CAT 活力降低, 细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 水平升高, 发现是 HG 的诱导使 HUVECs 发生了氧化应激和炎症反应, 最终造成内皮细胞损伤。同时 Txnip、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达量的显著升高, 表明了 HG 诱导的 HUVECs 氧化损伤的过程加重了炎症反应。山药总蛋白干预后, 上述指标均得到了显著改善, 说明山药总蛋白可拮抗 HG 诱导的 HUVECs 氧化应激损伤和炎症反应, 这种作用可能与山药总蛋白对 Txnip/NLRP3 信号通路的抑制有关, 未来还需深入研究来验证这一推测。

与过往对 DM 采用的抑制 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路的治疗方式不同^[41-42], 本研究利用 HG 环境建立的体外 HUVECs 氧化应激损伤模型, 验证了山药总蛋白对大血管内皮细胞的修复作用, 证实了山药总蛋白能有效抑制 HG 诱导的 HUVECs 氧化应激损伤, 提高细胞中抗氧化酶的活力, 降低促炎因子分泌及细胞炎症, 改善 HUVECs 的细胞形态及生理功能。此外, 本研究对山药总蛋白在功能性食品开发及 DM 相关疾病的治疗领域奠定了实验基础, 并为进一步探索山药总蛋白在抑制 Txnip/NLRP3 信号通路方面的相关研究提供了理论支持。

参考文献

- [1] TERENTES D, IOAKEIMIDIS N, ROKKAS K, et al. Interactions between erectile dysfunction, cardiovascular disease and cardiovascular drugs[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2022, 19(1): 59-74.
- [2] 杨华, 刘云涛. 血清脂肪细胞脂肪酸结合蛋白与 2 型糖尿病大血管病变的相关性研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(9): 784-786. [YANG H, LIU Y T. The correlation between serum adipocyte fatty acid-binding protein and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2014, 22(9): 784-786.]
- [3] MICHIELS C. Endothelial cell functions[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 196(3): 430-443.
- [4] YUAN T, YANG T, CHEN H, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis[J]. *Redox Biology*, 2019, 20: 247-260.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. [Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.]
- [6] 杨雁, 孙羽灵, 孙建梅, 等. 山药活性成分药理作用研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2022, 41(12): 55-60. [YANG Y, SUN Y L, SUN J M, et al. Progress on pharmacological effects of active ingredients in Chinese Yam[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2022, 41(12): 55-60.]
- [7] 崔艺钗, 张璐佳, 丰宇, 等. 山药活性成分及营养功能研究进展[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(7): 372-383. [CUI Y F, ZHANG L J, FENG Y, et al. Research progress on active components and nutritional functions of Chinese yam[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(7): 372-383.]
- [8] 陈梦雨, 刘伟, 俞桂新, 等. 山药化学成分与药理活性研究进展[J]. *中医药学报*, 2020, 48(2): 62-66. [CHEN M Y, LIU W, CHOU G X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Dioscorea opposita* thunb[J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2020, 48(2): 62-66.]
- [9] 樊乃境, 王冬梅, 高悦, 等. 山药蛋白肽对免疫能力低下小鼠的免疫调节作用[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(6): 101-107. [FAN N J, WANG D M, GAO Y, et al. Immunomodulatory effects of the iron yam peptides on mice with immunocompromised[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(6): 101-107.]
- [10] 李懿轩, 赵大庆, 王思明, 等. PI3K/Akt/eNOS 通路介导山药蛋白对肾虚大鼠阴茎勃起功能障碍的改善作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(24): 2607-2611. [LI Y X, ZHAO D Q, WANG S M, et al. PI3K/Akt/eNOS pathway mediated the amelioration effect of Chinese yam protein on penile erectile dysfunction in kidney-yang deficiency rats[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2022, 42(24): 2607-2611.]
- [11] LEE W, JEONG S Y, GU M J, et al. Inhibitory effects of compounds isolated from *Dioscorea batatas* Decne peel on particulate matter-induced pulmonary injury in mice[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2019, 82(12): 727-740.
- [12] WANG L S, BAI Y Y, YANG Y, et al. Diabetes mellitus stimulates pancreatic cancer growth and epithelial-mesenchymal transition-mediated metastasis via a p38 MAPK pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 38539-38550.
- [13] 邢欣, 赵大庆, 王思明, 等. 基于转录组测序技术分析山药蛋

- 白防治糖尿病性勃起功能障碍的作用机制[J]. 中国药房, 2021, 32(23): 2859–2868. [XING X, ZHAO D Q, WANG S M, et al. Analysis of the mechanism of yam protein in the prevention and treatment of diabetes-induced erectile dysfunction based on RNA-Seq technology[J]. China Pharmacy, 2021, 32(23): 2859–2868.]
- [14] 韩冰, 赵大庆, 白雪媛, 等. 山药总蛋白对大鼠睾丸损伤后生精功能的修复[J/OL]. 吉林农业大学学报, 1–9[2024-03-07]. <https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2020.6070>. [HAN B, ZHAO D Q, BAI X Y, et al. Yam total protein for repairing testicular spermatogenic injury in rats[J/OL]. Journal of Jilin Agricultural University, 1–9[2024-03-07]. <https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2020.6070>.]
- [15] 谢利亚, 张虹, 陆吴霞, 等. 黄芪甲苷通过 SIRT1/AMPK 抑制高糖诱导人脐静脉内皮细胞衰老[J]. 浙江中西医结合杂志, 2023, 33(3): 225–229. [XIE L Y, ZHANG H, LU W X, et al. Astragaloside IV inhibits high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell senescence through activation of the SIRT1/AMPK signaling[J]. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2023, 33(3): 225–229.]
- [16] 朱熹, 林辰涛. 一种新型的 DNA 荧光染料—DAPI 的光学特性及其应用[J]. 武汉植物学研究, 1986(1): 91–102. [ZHU C, LIN C T. Optical properties and applications of a new DNA fluorochrome 4',6-diamidino-2-phenylindole[J]. Plant Science Journal, 1986(1): 91–102.]
- [17] 高赛红, 张小良, 杨迎春, 等. 聚肌苷酸聚胞苷酸对高脂大鼠脑缺血/再灌注后 Bcl-2 和 Bax 表达的影响及神经保护作用[J]. 解剖学报, 2023, 54(2): 175–180. [GAO S H, ZHANG X L, YANG Y C, et al. Polyinosinic-polycytidylic acid affecting the expressions of Bcl-2 and Bax after cerebral ischemia-reperfusion in hyperlipidemic rats and its neuroprotective effect[J]. Acta Anatomica Sinica, 2023, 54(2): 175–180.]
- [18] HEIN T W, OMAE T, XU W, et al. Role of arginase in selective impairment of endothelium-dependent nitric oxide synthase-mediated dilation of retinal arterioles during early diabetes[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2020, 61(5): 36.
- [19] 章玉兰, 王梅, 叶文凤. 硝苯地平治疗妊娠期高血压的有效性以及对患者内皮功能和妊娠结局的影响[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2023, 7(8): 139–141. [ZHANG Y L, WANG M, YE W F. Efficacy of nifedipine in the treatment of hypertension in pregnancy and its effect on endothelial function and pregnancy outcome in patients[J]. Modern Medicine and Health Research Electronic Journal, 2023, 7(8): 139–141.]
- [20] LI H L, TANG Z Y, CHU P, et al. Neuroprotective effect of phosphocreatine on oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*: Involvement of dual PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 pathways[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 120: 228–238.
- [21] 江颖娟, 蒋作锋, 岑俊林, 等. 槲皮素预处理高糖环境培养的人脐静脉内皮细胞氧化应激、内质网应激反应观察[J]. 山东医药, 2022, 62(6): 39–43. [JIANG Y J, JIANG Z F, CEN J L, et al. Effects of quercetin on oxidative stress and endoplasmic reticulum stress of human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose[J]. Shandong Medical Journal, 2022, 62(6): 39–43.]
- [22] 吴俊荣, 张嘉琳, 吕贵东, 等. 瓜蒌皮提取物通过调控 NQO1 对高糖诱导的人肾小管上皮细胞炎症因子表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(8): 1585–1589. [WU J R, ZHANG J L, LÜ G D, et al. Effect of pericarpium trichosanthis extract on expressions of inflammatory factors in human renal tubular epithelial cells induced by high glucose by regulating NQO1[J]. Chinese Journal of Immunology, 2023, 39(8): 1585–1589.]
- [23] 黄柳慧. 糖肾宝对高糖培养小鼠肾脏内皮细胞 Fli-1 表达的影响[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020. [HUANG L H. Effect of Sugar Nephro on the expression of Fli-1 in renal endothelial cells of mice cultured with high glucose[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2020.]
- [24] LU L, LU Q, CHEN W, et al. Vitamin D3 protects against diabetic retinopathy by inhibiting high-glucose-induced activation of the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway[J]. Journal of Diabetes Research, 2018, 2018: 8193523.
- [25] KOCAMAN G, ALTINOZ E, ERDEMLI ME, et al. Crocin attenuates oxidative and inflammatory stress-related periodontitis in cardiac tissues in rats[J]. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 2021, 30(5): 517–524.
- [26] 李攀登, 王永红, 肖芸, 等. 氢醌对人白血病细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 表达的影响[J]. 现代预防医学, 2018, 45(5): 878–882. [LI P D, WANG Y H, XIAO Y, et al. Effects of hydroquinone on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 in human leukemia cells[J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45(5): 878–882.]
- [27] AZIZ N S, YUSOP N, AHMAD A. Importance of stem cell migration and angiogenesis study for regenerative cell-based therapy: A review[J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2020, 15(3): 284–299.
- [28] ZHANG Y, WANG S, CHEN X, et al. Liraglutide prevents high glucose induced HUVECs dysfunction via inhibition of PINK1/Parkin-dependent mitophagy[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2022, 545: 111560.
- [29] LI C Y, WANG L X, DONG S S, et al. Phlorizin exerts direct protective effects on palmitic acid (PA)-induced endothelial dysfunction by activating the PI3K/AKT/eNOS signaling pathway and increasing the levels of nitric oxide (NO)[J]. Medical Science Monitor Basic Research, 2018, 24: 1–9.
- [30] WILSON A J, GILL E K, ABUDALO R A, et al. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: Emerging prospect for therapeutic targeting[J]. Heart, 2018, 104(4): 293–299.
- [31] FEILLET C C, FOURET G, VIGOR C, et al. Long-term measures of dyslipidemia, inflammation, and oxidative stress in rats fed a high-fat/high-fructose diet[J]. Lipids, 2019, 54(1): 81–97.
- [32] FORBES J M, COOPER M E. Mechanisms of diabetic complications[J]. Physiological Reviews, 2013, 93(1): 137–188.
- [33] SHARMA D, KANNEGANTI T D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation[J]. Journal of Cell Biology, 2016, 213(6): 617–629.
- [34] DOMINGUETI C P, DUSSE L M, CARVALHO M, et al. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications[J]. Journal of Diabetes and Its Complications, 2016, 30(4): 738–745.
- [35] VALLANCE P, CHAN N. Endothelial function and nitric oxide: Clinical relevance[J]. Heart, 2001, 85: 342–350.
- [36] RAMUS S M, CILENSEK I, PETROVIC M G, et al. Single nucleotide polymorphisms in the Trx2/TXNIP and TrxR2 genes of the mitochondrial thioredoxin antioxidant system and the risk of diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus[J]. Jour-

nal of Diabetes and Its Complications, 2016, 30(2): 192–198.

[37] LÜ H, ZHU C, WEI W, et al. Enhanced Keap1-Nrf2/Trx-1 axis by daphnetin protects against oxidative stress-driven hepatotoxicity via inhibiting ASK1/JNK and Txnip/NLRP3 inflammasome activation[J]. *Phytomedicine*, 2020, 71: 153241.

[38] FAN Z, YANG J, YANG C, et al. MicroRNA-24 attenuates diabetic vascular remodeling by suppressing the NLRP3/caspase-1/IL-1 β signaling pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 45(5): 1534–1542.

[39] SHARMA B R, KANNEGANTI T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases[J]. *Nature Immunology*, 2021, 22(5): 550–559.

[40] FENG S, FOX D, MAN S M. Mechanisms of gasdermin family members in inflammasome signaling and cell death[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(18PtB): 3068–3080.

[41] 张超. 四妙勇安汤对糖尿病大鼠肢体缺血的治疗作用及对 Akt、p38MAPK 通路的影响[D]. 北京:首都医科大学, 2014. [ZHANG C. Therapeutical effect of simiaoyongan recipe on diabetic rats of limb ischemia via Akt and p38MAPK signal pathways [D]. Beijing: Capital Medical University, 2014.]

[42] 孙艳. LncRNA HOTTIP 通过调节 p38-MAPK 信号通路来促进糖尿病视网膜病变[D]. 济南:山东大学, 2019. [SUN Y. LncRNA hottip promotes diabetic retinopathy by regulating p38-MAPK signaling pathways[D]. Jinan: Shandong University, 2019.]