

无花果乳浆石油醚萃取产物对高糖诱导血管内皮细胞损伤的保护作用

李保宏^{1,2}, 李忠原¹, 刘苗苗¹, 倪雯婷¹, 尹怡铭¹, 赵方舒¹, 田景振¹, 张晓平^{1,3*}, 崔清华^{2,3*}

(1. 山东中医药大学药学院, 山东济南 250355) (2. 山东中医药大学中医药创新研究院, 山东济南 250355)

(3. 山东中医药大学青岛中医药科学院, 山东青岛 266112)

摘要: 该文研究了药食两用植物无花果所含有的乳浆对于高糖所致人脐静脉血管内皮细胞 (Huvec) 损伤的保护作用, 并初步探讨作用机制。采用系统溶剂萃取法制得无花果乳浆的不同极性供试品, 建立 Huvec 细胞高糖损伤模型, 分别采用 MTT 法、“划痕实验”、Transwell 侵袭实验、流式细胞仪凋亡检测、血管生成试验和 ELISA 法考察无花果乳浆的保护效果及作用机制。结果显示, 高糖环境使 Huvec 细胞 48 h 内增殖率、迁移率、侵袭率分别下降至 76.04%、28.36%、22.09% ($p < 0.001$), 凋亡率上升至 24.23% ($p < 0.001$), 血管形成能力下降, 乳酸脱氢酶 (LDH)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和内皮素-1 (ET-1) 含量分别升高至 20.96 $\mu\text{g/L}$ 、90.03 ng/L 、839.41 ng/L ($p < 0.01$), 超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮 (NO) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 含量分别下降至 3.52 $\mu\text{g/L}$ 、184.75 $\mu\text{mol/L}$ 、0.59 IU/mL ($p < 0.01$), 100、200、400 mg/L 无花果乳浆石油醚萃取产物可显著性提高 Huvec 细胞增殖、迁移和侵袭能力及降低凋亡率 ($p < 0.001$), 恢复紊乱的血管生理因子水平。无花果乳浆的石油醚萃取产物可以减轻高糖引起的 Huvec 损伤, 具有明显的细胞保护作用。

关键词: 无花果乳浆; 高糖; 血管内皮细胞; 损伤保护; 血管生成; 药食两用

文章编号: 1673-9078(2022)09-38-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1318

The Protective Effect of Petroleum Ether Extract from *Ficus carica* Latex on Endothelial Cells Damaged by High Glucose

LI Baohong^{1,2}, LI Zhongyuan¹, LIU Miaomiao¹, NI Wenting¹, YIN Yiming¹, ZHAO Fangshu¹, TIAN Jingzhen¹, ZHANG Xiaoping^{1,3*}, CUI Qinghua^{2,3*}

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

(2. Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China) (3. Qingdao Academy of Chinese Medicinal Sciences, Shandong University of Traditional Chinese

Medicine, Qingdao 266112, China)

Abstract: Different polar concentrations of *Ficus carica* latex were obtained by systematic solvent extraction, and a high glucose human umbilical vein endothelial cell (Huvec) model was established. The MTT assay, scratch test, Transwell invasion test, apoptosis detection by flow cytometry, angiogenesis test, and ELISA were used to investigate the detrimental effects and mechanism of action of high glucose on Huvec and the protective effect of *Ficus carica* latex. The rate of proliferation, migration, and invasion of Huvec decreased to 76.04%, 28.36%, and 22.09%

引文格式:

李保宏, 李忠原, 刘苗苗, 等. 无花果乳浆石油醚萃取产物对高糖诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 38-45

LI Baohong, LI Zhongyuan, LIU Miaomiao, et al. The protective effect of petroleum ether extract from *Ficus carica* latex on endothelial cells damaged by high glucose [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 38-45

收稿日期: 2021-11-24

基金项目: 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) 项目 (2020CXGC010505; 2021CXGC010511); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2020MH383)

作者简介: 李保宏 (1997-), 男, 研究生, 研究方向: 中药新药研发, E-mail: libaohong1019@163.com

通讯作者: 张晓平 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药新药研发, E-mail: xia_opingzhang@126.com; 共同通讯作者: 崔清华 (1980-), 女, 博士, 副

教授, 研究方向: 中药抗病毒、中药新药研发, E-mail: cuiqinghua1122@163.com

($p < 0.001$), respectively. The rate of apoptosis increased to 24.23% ($p < 0.001$), and angiogenesis decreased in 48 h under a high glucose environment. Contents of lactate dehydrogenase (LDH), vascular endothelial growth factor (VEGF), and endothelin-1 (ET-1) increased to 20.96 $\mu\text{g/L}$, 90.03 ng/L , and 839.41 ng/L ($p < 0.01$), respectively. The concentration of superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) decreased to 3.52 $\mu\text{g/L}$, 184.75 $\mu\text{mol/L}$, and 0.59 IU/mL ($p < 0.01$), respectively. The extracts of petroleum ether from *Ficus carica* latex (100, 200, and 400 mg/L) increased the proliferation, migration, and invasion of Huvec; reduced the rate of apoptosis ($p < 0.001$); and restored disturbed vascular blood flow. Petroleum ether extract of *Ficus carica* latex can reduce Huvec damage caused by high levels of glucose, demonstrating an obvious protective effect.

Key words: *Ficus carica* latex; high glucose; human umbilical vein endothelial cells; damage protection; angiogenesis; food-medicine

我国是糖尿病发病率较高的国家, 糖尿病可造成组织炎症、病理损伤和多种心血管疾病^[1,2], 而高糖是糖尿病微血管病变的关键因素之一^[3]。高浓度葡萄糖及其有毒的副产物, 如晚期糖基化终末产物 (AGEs) 等, 会导致糖尿病患者大血管和微血管的内皮功能障碍, 包括细胞通透性增加、细胞凋亡、糖萼破裂, 造成机体氧化应激和细胞因子分泌异常等^[4], 高血糖导致的异常生成的新血管通常是未成熟的, 并在视网膜病变中起病理作用, 导致玻璃体出血和纤维化, 这也是引起糖尿病大血管并发症的始动环节^[5]。

无花果乳浆是桑科榕属药食两用植物无花果 (*Ficus carica* L.) 的鲜果和茎秆挤出的乳白色粘稠乳汁, 是一种在植物特殊分泌细胞中发现的复杂分子混合物的水悬浮液, 可以合成和储存相当数量的不同次生代谢物, 如含有有机酸、脂肪酸、三萜类化合物、类固醇、蛋白质和氨基酸等^[6,7]。无花果乳浆部分来自于无花果, 在化学成分和功能上具有一定相似性, 无花果作为药食两用的植物果实, 主要含有黄酮、香豆素、甾醇和三萜类等化合物^[8], 其各部位在治疗皮肤病、抗肿瘤、免疫调节、抗菌等方面具有突出效果, 中医记载无花果可治疗便秘, 作为泻药, 治疗痢疾和肠炎^[9], 现代研究^[10]显示可抑制结直肠癌、乳腺癌、肝癌等及肿瘤血管形成; 无花果叶提取物可通过刺激胰腺 β 细胞产生胰岛素, 降低 2 型糖尿病大鼠的血糖和血脂^[11], 也可抑制 VEGF-A 的 mRNA 表达水平^[12]; 无花果乳浆在民间可治痢^[13,14]。但截止目前, 无花果乳浆对糖尿病微血管作用效果的基础研究较少, 本研究从微血管生理角度, 探究无花果乳浆对于高糖诱导血管内皮细胞的损伤保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜采摘于广西玉林的无花果乳浆 (批号:

20210901); 胰蛋白酶 (不含 EDTA) (货号: 25200056)、胎牛血清 (FBS) (货号: 16140071)、磷酸缓冲液 (PBS), 美国 Gibco 公司; Transwell 侵袭小室 (批号: 351157)、Matrigel 基质胶 (批号: 256234), 美国康宁公司; ECM 培养基, 美国 Sciencell 公司; Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒 (批号: 556547), 美国 BD 公司; SOD (货号: ml063052)、LDH (货号: ml024518)、NO (货号: ml022390) ELISA 试剂盒, 上海酶联生物; VEGF (货号: C18013036)、ET-1 (货号: C19013037)、eNOs (货号: C13013038) ELISA 试剂盒, 武汉华美生物; Huvec 人脐静脉血管内皮细胞 (ATCC CRL-1730) 购自普诺赛, 在质量分数 5% ECM 完全培养基中传代培养; 其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

N-1100 旋转蒸发器, 东京理化器械株式会社; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物; safe-1200TE 生物安全柜, 上海力新仪器公司; HF90 二氧化碳培养箱, 上海力新仪器公司; Spectra Max M5 酶标仪, 美国分子仪器公司; CKX41 倒置显微镜, 日本奥林巴斯公司; Accuri C6 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.3 无花果乳浆的萃取分离

取广西夏季 (九月) 新鲜采集的无花果挤出乳浆混悬液, 经山东中医药大学中医药创新研究院崔清华副教授鉴定确认, 取新鲜收集的无花果乳浆, 在磁力搅拌器作用下, 缓慢多次地搅拌加入无水乙醇, 使其体积分数达 60%, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h, 使用 10 层纱布过滤, 抽滤, 收集上清液和沉淀。所得上清液, 按前述步骤搅拌加入无水乙醇至体系醇浓度达 90%, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h, 抽滤, 上清液旋转蒸发至无醇味, 分别按 1:1 (V/V) 比例加入石油醚、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇进行系统溶剂萃取, 充分振摇后静置分层, 旋转蒸发至无溶剂残留, 冷冻干燥得固体。

1.4 MTT 法测定供试品对 Huvec 细胞高糖模型的增殖影响

取烘干的无水葡萄糖溶于 PBS 中, 配制成 75 mmol/L 的葡萄糖溶液, 超滤除菌, 加入 ECM 培养基中配制成高糖培养基 (葡萄糖含量为 35 mmol/L), 将不同极性萃取部位固体使用 DMSO 溶解, 再稀释于高糖 (35 mmol/L) 低血清培养基中 (含质量分数 0.5% DMSO), 供试品起始浓度为 3 mg/mL, 2 倍比连续稀释 8 次, 终浓度为 23.44 mg/L, 共得 8 个浓度梯度。

取 10 代以内的 Huvec 细胞, 胰酶消化后铺于 96 孔板内 (每孔 1×10^5 个细胞), 孵育过夜。每孔加入 100 μ L 含供试品高糖 (35 mmol/L) 低血清培养基, 每个浓度设 3 个复孔, 设置高糖模型组 (35 mmol/L) 和正常对照组 (5.5 mmol/L), 均含有质量分数 0.5% DMSO。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 48 h, 每孔加入 MTT 溶液 120 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 加入 DMSO 溶液 100 μ L, 570 nm 处观察吸光度值 (OD), 计算细胞存活率 (实验组 OD 值与正常对照组 OD 值的比值)。

1.5 “划痕试验”考察供试品对 Huvec 高糖模型的迁移影响

将 Huvec 接种在 6 孔板中 (每孔 3×10^5 个细胞), 使用枪头尖划痕, PBS 清洗, 每孔加入含供试品高糖低血清培养基, 每个浓度设置 3 个复孔, 设置高糖模型组和正常对照组, 在 0、24、48 h 用倒置显微镜在事先标记的固定位置拍照, 以 0 h 划痕面积作为参照, 使用 ImageJ 软件计算迁移率 (观察时刻与 0 时的面积差与 0 时面积的比值)。

1.6 Transwell 侵袭试验考察供试品对 Huvec 高糖模型的侵袭影响

采用 24 孔、8 μ m 孔径的 Transwell 板, 每孔加入 100 μ L 基质胶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 胰酶消化 Huvec, 用低血清高糖培养基重悬细胞至每毫升 1.5×10^5 个细胞, 上室加入 200 μ L 细胞悬液, 下室加入含供试品高糖培养基溶液 750 μ L, 高糖模型组下室加入不含供试品的高糖完全培养基, 正常对照组下室加入低糖完全培养基。孵育 48 h 后, 4% 甲醛、甲醇固定, 0.1% 结晶紫染色, 倒放在显微镜下拍摄, 使用 ImageJ 软件计算侵袭率 (结晶紫染色面积与小室面积比值)。

1.7 血管形成试验

将枪头和 96 孔板 4 $^{\circ}$ C 预冷, 每孔加入 50 μ L Matrigel 基质胶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。每孔接种 Huvec (4×10^5 个), 加入 100 μ L 含供试品高糖低血清培养基, 设置高糖模型组和正常对照组, 孵育 6 h 后, 用倒置显微镜观察成管情况。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

胰酶消化 Huvec, 接种在六孔板内 (每孔 3×10^5 个细胞), 每孔加入含供试品高糖培养基, 设置高糖模型组和正常对照组, 孵育 48 h 后, 使用不含 EDTA 的胰酶消化, 按照说明书加入 Annexin V-FITC、PI 染液, 1 h 内在流式细胞仪中检测。

1.9 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定供试品对 Huvec 高糖模型中 VEGF、ET-1、SOD、LDH、NO、eNOs 因子的影响

胰酶消化 Huvec, 接种在 6 孔板内 (每孔 3×10^5 个细胞), 每孔加入含供试品高糖培养基, 设置高糖模型组和正常对照组。孵育 48 h 后, 取超滤后细胞上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

1.10 统计学处理

实验数据采用 Graphpad Prism 8 进行处理, 每次结果至少包含 3 次样本, 数据以平均值 \pm 标准误差表示, 组间两两比较采用独立 *t* 检验, 多组间比较采用多因素方差分析和 LSD-*t* 检验, $p < 0.05$ 认为具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 供试品对 Huvec 高糖模型的增殖影响

与正常对照组相比, 高糖环境可使 Huvec 细胞存活率显著下降至 76.04% ($p < 0.001$)。在各萃取产物中, 只有石油醚可以对高糖环境下的 Huvec 细胞起到较显著的保护作用。石油醚萃取产物在 750 mg/L 及以下浓度时均可显著提高细胞活力至约 100% ($p < 0.05$), 维持高糖环境下的细胞活性, 结果见图 1。此外, 石油醚萃取产物在 750 mg/L 浓度时细胞存活率为 93.85%, 此浓度以下无明显的细胞毒性, 结果见图 2。故以下试验采用无花果乳浆石油醚萃取产物 (质量浓

度分别为 400、200、100 mg/L) 作为供试品。

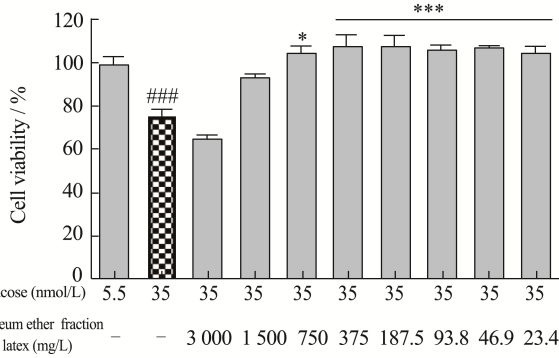


图1 不同浓度无花果乳浆石油醚萃取产物对Huvec 高糖模型增殖的影响

Fig.1 Effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on the proliferation of Huvec cells with high glucose

注: 与正常对照组比较: # $p<0.05$ 、## $p<0.01$ 、### $p<0.001$; 与高糖模型组比较: * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$; 图4、6、9、10同。

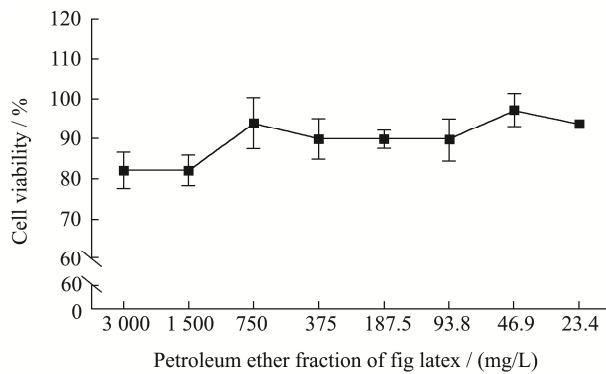


图2 不同浓度无花果乳浆石油醚萃取产物对Huvec 细胞毒性 Fig.2 Cytotoxicity of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex to Huvec cells

2.2 供试品对 Huvec 高糖模型的迁移影响

细胞划痕实验可以反应细胞的转移生长能力, 通过显微图像和 Image J 量化分析, 在 24 h 内, 正常对照组 Huvec 细胞迁移率为 40.26%, 高糖模型组的细胞迁移率明显下降至 28.36% ($p<0.01$), 在 48 h 内, 正常对照组 Huvec 细胞迁移率为 55.47%, 高糖模型组的细胞迁移率显著下降至 32.39% ($p<0.001$); 与高糖模型组相比, 在 24 h 和 48 h 内无花果乳浆石油醚萃取产物具有较好的保护作用 ($p<0.001$), 24 h 时, 100、200、400 mg/L 浓度时迁移率分别为 44.73%、51.08%、42.12%, 48 h 时, 100、200、400 mg/L 浓度时迁移率分别为 61.01%、66.30%、46.40%。随着无花果乳浆石油醚萃取产物浓度增高, 促迁移效果略有下降, 推测可能与轻微的细胞毒性有关, 结果见图 3、图 4。

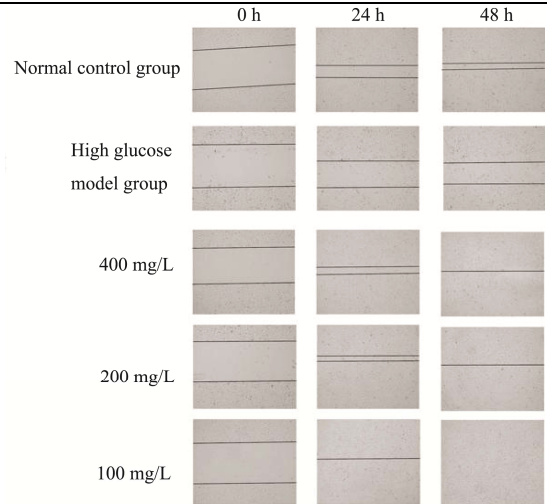


图3 显微镜观察无花果乳浆石油醚萃取产物对Huvec 高糖模型的迁移影响 (×40)

Fig.3 Micrographs of the migration effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on Huvec cells with high glucose

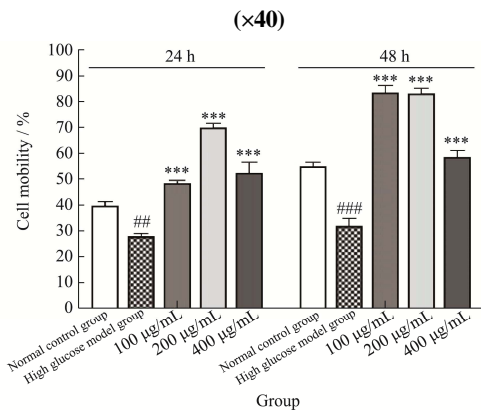


图4 无花果乳浆石油醚萃取产物对Huvec 高糖模型的迁移率 Fig.4 Effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on the migration rate of Huvec cells with high glucose

2.3 供试品对 Huvec 高糖模型的侵袭影响

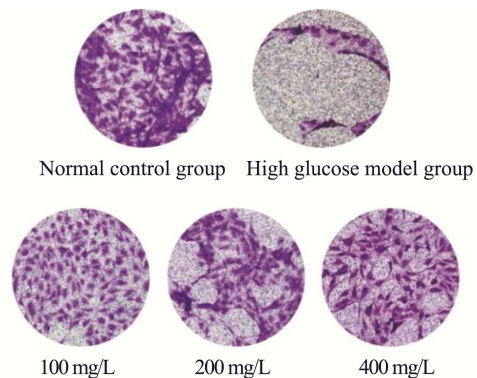


图5 显微镜观察无花果乳浆石油醚萃取产物对Huvec 高糖模型的侵袭影响 (×200)

Fig.5 Micrographs of the invasion effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on Huvec cells with high glucose (×200)

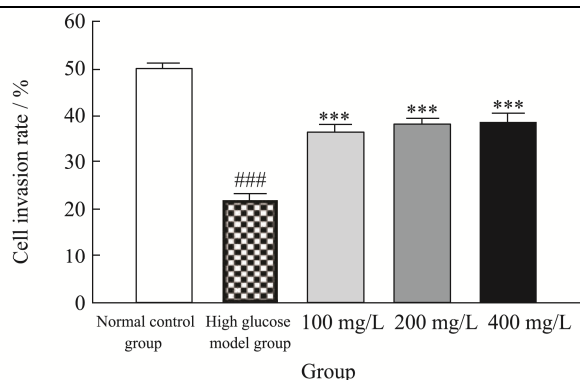


图6 无花果乳浆石油醚萃取产物对 Huvec 高糖模型的侵袭率

Fig.6 Effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on the invasion rate of Huvec cells with high glucose

细胞侵袭试验可以反应细胞的侵袭转移能力,通过显微图像和 Image J 量化分析发现,相较于正常对照组,高糖模型组侵袭细胞数显著减少至 22.09%

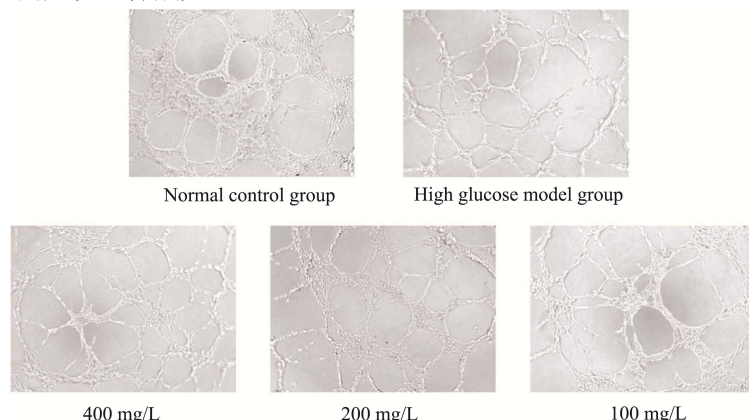


图7 显微镜观察无花果乳浆石油醚萃取产物对 Huvec 高糖模型血管形成能力的影响 (×100)

Fig.7 Micrographs of the effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on the angiogenesis of Huvec cells with high glucose (×100)

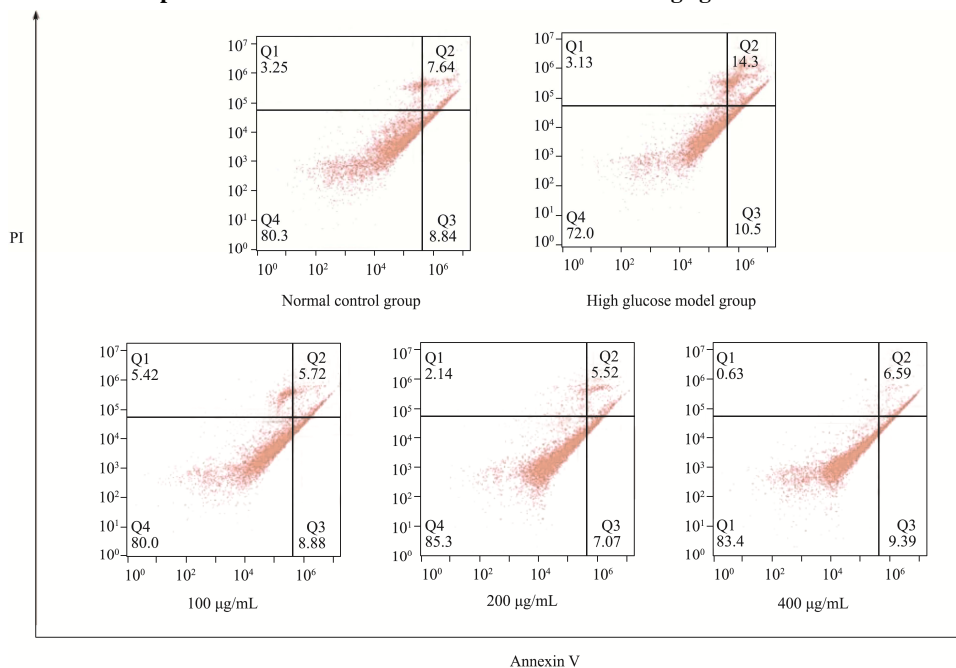


图8 无花果乳浆石油醚萃取产物对 Huvec 高糖模型凋亡影响

Fig.8 Effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on apoptosis of Huvec cells with high glucose

($p < 0.001$), 100、200、400 mg/L 无花果乳浆石油醚萃取产物可分别显著提高细胞侵袭率至 36.63%、38.42%、38.75% ($p < 0.001$), 结果见图 5、图 6。

2.4 供试品对 Huvec 高糖模型血管形成能力的影响

将 Huvec 细胞接种在基质胶上,可在体外模拟血管的体内形成。相比于正常对照组,高糖模型组显著降低了 Huvec 细胞的血管形成能力,血管形成不连贯,变细,管状数目变少。而无花果乳浆石油醚萃取产物可以呈剂量依赖性的提高血管形成的能力,保护因高糖受损的模拟血管,防止其形成中断,形成表观形状规则的管状集合体,数量增多,结果见图 7。

2.5 供试品对 Huvec 高糖模型凋亡的影响

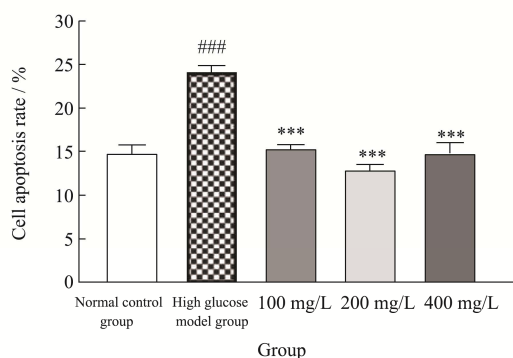


图9 无花果乳浆石油醚萃取产物对 Huvec 高糖模型的凋亡率
Fig.9 Apoptosis rate of petroleum ether extract of *Ficus carica*

latex on Huvec cells with high glucose

细胞凋亡异常可能导致病理状态，细胞凋亡是内

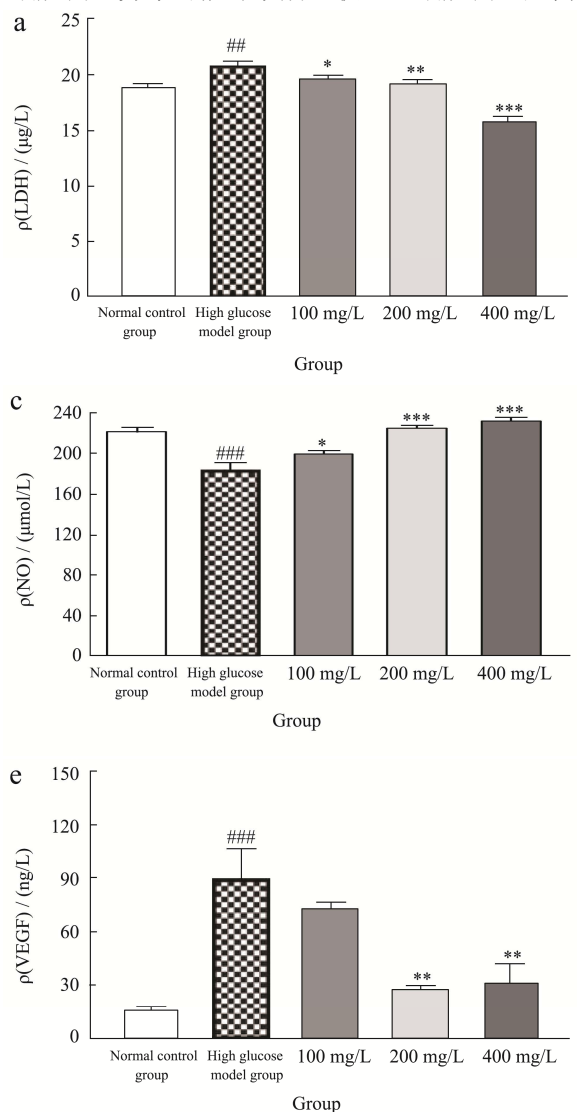


图 10 无花果乳浆石油醚萃取产物对 Huvec 高糖模型的因子影响

Fig.10 Effect of petroleum ether extract of *Ficus carica* latex on the factors of Huvec cells with high glucose

皮保护的重要因素，它的发展直接关系到内皮损伤的程度^[15]。高糖环境下导致 ROS 的增加，可以触发 JNK 的激活，最终介导 Caspase-3 诱导的内皮细胞凋亡^[16]，此外，内皮细胞还可以通过 ET-1 途径增加线粒体 ROS 的产生，促进细胞凋亡^[17,18]。与正常对照组相比，高糖模型组凋亡的细胞数显著性提升，达到 24.23% ($p < 0.001$)，说明高糖环境促使了 Huvec 细胞凋亡。100、200、400 mg/L 无花果石油醚萃取产物均可显著性抑制 Huvec 细胞凋亡，凋亡率分别为 15.37%、12.96%、14.96% ($p < 0.001$)，其中 200 mg/L 的保护效果最佳，不同浓度之间差异较小，结果见图 8、图 9。

2.6 供试品对 Huvec 高糖模型中相关因子的影响

高糖环境所致细胞损伤是血管内皮功能障碍的重要原因, LDH 是一种稳定的细胞质酶, 细胞受到损伤后, 膜内 LDH 会不可逆地渗漏到周围介质中, 是细胞膜完整性和活力遭到破坏的重要标志之一^[19], 可反映细胞膜的损伤程度。SOD 作为重要的抗氧化酶, 被认为是抵抗 ROS 的第一线防御系统, 能通过清除 ROS 来保护细胞免受损伤, 2001 年, Brownlee 提出了“糖尿病并发症的共同机制”理论^[20], 认为过量产生超氧化物和活性氧 (ROS) 会导致高血糖的血管内皮损伤, 在糖尿病并发症的发生机制中起着关键作用。

血管内皮细胞合成多种蛋白因子参与微血管的生理功能调控, ET-1 是目前发现最强的缩血管活性物质, 可调节人体血管微循环^[21], 血管内皮细胞产生的 NO 是重要的保护性因子, 具有舒张血管, 抑制平滑肌增生, 避免血管管腔狭窄的作用, 正常情况下 ET-1/NO 处于一种动态的平衡状态^[22]。在糖尿病模型中, 胰岛素和生长因子受体酪氨酸激酶结合后, 激活 PI3K 通路, 进而激活 eNOs, 生成 NO^[23,24]。然而, 高糖环境减少人内皮细胞产生 NO^[25], AGEs 减少 eNOS 表达并使 NO 失活, 由于氧化应激和 AGEs 的产生降低了 NO 的生物利用度^[26,27], 有研究表明, eNOs 的缺乏增加了小鼠足细胞的损伤, 加速了糖尿病肾病的进展^[28]。VEGF 是一种强效的促血管生成因子, 与受体结合后, 可增加血管通透性, 促进血管内皮细胞生长, 糖尿病患者和啮齿动物肾脏中 VEGF 表达上调和下调均有报道。通常, 高血糖和 AGEs 通过减少血管内皮细胞上 VEGFR2 受体的表达影响 VEGF 生成, 造成 VEGF 过度积累, 并导致血管内皮细胞对血管内皮生长因子的反应性降低, 造成内皮细胞功能障碍, 在体内 VEGF 的上调可能是有害的, 但也可能是代偿性的^[29-31]。

与正常对照组相比, 高糖模型组的乳酸脱氢酶 (LDH)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和内皮素-1 (ET-1) 因子水平分别显著性提高至 20.96 $\mu\text{g/L}$ 、90.03 ng/L 、839.41 ng/L ($p < 0.01$), 超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮 (NO) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOs) 含量分别显著性下降至 3.52 $\mu\text{g/L}$ 、184.75 $\mu\text{mol/L}$ 、0.59 IU/mL ($p < 0.01$)。100、200、400 mg/L 石油醚萃取产物均可分别显著性降低 LDH 至 19.73、19.29、15.80 $\mu\text{g/L}$ 、分别降低 ET-1 至 465.05、343.74、146.58 ng/L 、分别提高 NO 水平至 200.89、226.25、232.55 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0.05$), 200、400 mg/L 浓度时可以分别显著降低 VEGF 含量至 28.19、31.66 ng/L ($p < 0.01$), 400 mg/L 浓度时可明显提高 eNOs 含量至 1.12 IU/mL ($p < 0.001$) 和 SOD 水平至 15.80 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.01$), 结果见图 10。

3 结论

综上所述, 本研究发现高糖模型在体外可以显著性阻碍 Huvec 人脐静脉内皮细胞的正常生理功能, 如增殖、迁移、侵袭和血管形成, 并促进细胞凋亡, 无花果乳浆的石油醚萃取产物可明显改善上述功能, 抑制细胞凋亡。高糖环境下可导致细胞受损和生理因子分泌紊乱, 具体表现为上清液中 LDH 显著增高, SOD 显著降低, VEGF 和 ET-1 显著增高, NO 和 eNOs 显著降低。无花果乳浆的石油醚萃取产物可以减轻细胞损伤, 可能通过恢复正常的血管相关因子水平, 保护内皮细胞正常生理功能, 防止微血管发生病变。然而, 无花果乳浆物质基础并不明确, 本研究也只考察了高糖和无花果乳浆对 Huvec 细胞的体外作用, 在体内经过复杂的代谢和生化反应则可能得到不同的结果, 所以下一步将进行体内实验验证本研究所得结论, 进一步支持其作为药食两用植物的基础研究和开发应用。

参考文献

- [1] Bugger H, Abel E D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(4): 660-671
- [2] Varga Z V, Giricz Z, Liaudet L, et al. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 232-242
- [3] Lin Y, Berg A H, Iyengar P, et al. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(6): 4617-4626
- [4] Dou L, Jourde-Chiche N. Endothelial toxicity of high glucose and its by-products in diabetic kidney disease [J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(10)
- [5] Strojek K. Features of macrovascular complications in type 2 diabetic patients [J]. *Acta Diabetol*, 2003, 40 Suppl 2: S334-337
- [6] Oliveira A P, Silva L R, Andrade P B, et al. Further insight into the latex metabolite profile of *Ficus carica* [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(20): 10855-10863
- [7] Oliveira A P, Silva L R, Ferreres F, et al. Chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity of *Ficus carica* latex [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(6): 3393-3398
- [8] Barolo M I, Ruiz Mostacero N, López S N. *Ficus carica* L. (Moraceae): an ancient source of food and health [J]. *Food Chem*, 2014, 164: 119-127
- [9] Abbasi A M, Khan M A, Khan N, et al. Ethnobotanical survey of medicinally important wild edible fruits species

- used by tribal communities of Lesser Himalayas-Pakistan [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 528-536
- [10] 柴金珍,黄远英,袁根良,等.无花果的药理作用研究进展[J]. *中成药*,2016,38(8):1805-1810
CHAI Jinzhen, HUANG Yuanying, YUAN Genliang, et al. Research progress on pharmacological action of *Ficus* figs [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2016, 38(8): 1805-1810
- [11] Stephen Irudayaraj S, Christudas S, Antony S, et al. Protective effects of *Ficus carica* leaves on glucose and lipids levels, carbohydrate metabolism enzymes and β -cells in type 2 diabetic rats [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1074-1081
- [12] Ghambarali Z, Bidmeshkipouri A, Akrami H, et al. Ethanol extract of *Ficus carica* leave suppresses angiogenesis by regulating VEGF-A and Integrin $\beta 3$ mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2014, 58(4): 407-415
- [13] Bohlooli S, Mohebipoor A, Mohammadi S, et al. Comparative study of fig tree efficacy in the treatment of common warts (*Verruca vulgaris*) vs. cryotherapy [J]. *Int J Dermatol*, 2007, 46(5): 524-526
- [14] Martínez G. Farmacopea natural y tratamiento de afecciones de la piel en la medicina tradicional de los campesinos de las sierras de Córdoba (República Argentina) [J]. *Dominguezia*, 2008, 24(1): 27-46
- [15] Li X, Zhang Q, Hou N, et al. Carnosol as a Nrf2 activator improves endothelial barrier function through antioxidative mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 880
- [16] Ho F M, Liu S H, Liau C S, et al. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3 [J]. *Circulation*, 2000, 101(22): 2618-2624
- [17] Nishikawa T, Edelstein D, Du X L, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage [J]. *Nature*, 2000, 404(6779): 787-790
- [18] Qi H, Casalena G, Shi S, et al. Glomerular endothelial mitochondrial dysfunction is essential and characteristic of diabetic kidney disease susceptibility [J]. *Diabetes*, 2017, 66(3): 763-778
- [19] Zou Y, Kim D, Yagi M, et al. Application of LDH-release assay to cellular-level evaluation of the toxic potential of harmful algal species [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(2): 345-352
- [20] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813-820
- [21] Homma S, Kimura T, Sakai S, et al. Calcitonin gene-related peptide protects the myocardium from ischemia induced by endothelin-1: intravital microscopic observation and (31)P-MR spectroscopic studies [J]. *Life Sci*, 2014, 118(2): 248-254
- [22] 杜智超,姜睿.血管外周脂肪组织与血管内皮细胞功能障碍的研究进展[J].*西南医科大学学报*,2018,41(3):284-286
DU Zhichao, JIANG Rui. Research advances in perivascular adipose tissue and vascular endothelial dysfunction [J]. *Journal of Southwest Medical University*, 2018, 41(3): 284-286
- [23] Yu W, Zha W, Ke Z, et al. Curcumin protects neonatal rat cardiomyocytes against high glucose-induced apoptosis via PI3K/Akt signalling pathway [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 4158591
- [24] Wang X T, Gong Y, Zhou B, et al. Ursolic acid ameliorates oxidative stress, inflammation and fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1461-1467
- [25] Jaimes E A, Hua P, Tian R X, et al. Human glomerular endothelium: interplay among glucose, free fatty acids, angiotensin II, and oxidative stress [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(1): F125-132
- [26] Cheng H, Harris R C. Renal endothelial dysfunction in diabetic nephropathy [J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2014, 14(1): 22-33
- [27] Daroux M, Prévost G, Maillard-Lefebvre H, et al. Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies [J]. *Diabetes Metab*, 2010, 36(1): 1-10
- [28] Jourde-Chiche N, Fakhouri F, Dou L, et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(2): 87-108
- [29] Gilbert R E. The endothelium in diabetic nephropathy [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2014, 16(5): 410
- [30] Majumder S, Advani A. VEGF and the diabetic kidney: more than too much of a good thing [J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31(1): 273-279
- [31] Hohenstein B, Hausknecht B, Boehmer K, et al. Local VEGF activity but not VEGF expression is tightly regulated during diabetic nephropathy in man [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(9): 1654-1661