

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.03.014

左归降糖通脉方含药血清对晚期糖基化终末产物诱导脑微血管内皮细胞损伤的影响

李钰佳, 李定祥, 马钟丹妮, 周韩, 邓奕辉*

(湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教产业园区学士路 300 号, 410208)

摘要 目的 探讨左归降糖通脉方治疗糖尿病血管并发症的可能作用机制。方法 将 30 只大鼠随机分为空白组、中药组和西药组, 每组 10 只。中药组给予左归降糖通脉方 36 g/(kg·d) 灌胃, 西药组给予尼莫地平片 18.35 mg/(kg·d) 及格列齐特缓释片 27.5 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组予以 4 ml 蒸馏水灌胃, 均每日 1 次, 连续 5 天, 制备含药血清。将晚期糖基化终末产物 (AGEs) 设为 50、100、200、400 mg/L 4 个浓度组, 分别作用 12、24、48 h 3 个时间点, 观察 AGEs 对大鼠脑微血管内皮细胞 (BMECs) 形态结构改变的影响来筛选最佳干预浓度和时间。将左归降糖通脉方含药血清分为 2.5%、5%、10% 3 个浓度组, 作用于 BMECs 24 h 后, 测定 BMECs 增殖率来确定左归降糖通脉方中药含药血清的最佳作用浓度。再将 BMECs 分为空白组、模型组、中药组、西药组, 中药组和西药组分别加入相应含药血清进行干预。检测各组细胞上清液中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 的含量。结果 AGEs 的最佳干预浓度和时间点为 200 mg/L 作用 24 h, 中药含药血清的最佳作用浓度为 5%。与空白组比较, 模型组上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组和西药组 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 明显下调 ($P < 0.05$)。结论 左归降糖通脉方能下调 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 表达, 从而抑制炎症反应, 可能是其治疗糖尿病血管并发症的作用机制之一。

关键词 糖尿病血管并发症; 左归降糖通脉方; 晚期糖基化终末产物; 脑微血管内皮细胞; 炎症因子

糖尿病的发病率逐年上升, 2016 年中国的糖尿病患者人数已达 1.1 亿, 其中糖尿病血管并发症及微血管并发症占了相当大的比例^[1]。糖尿病血管并发症产生的机制较为复杂, 目前认为疾病的发生可能主要与机体的代谢紊乱、炎症因子以及氧化应激密切相关^[2]。研究发现, 晚期糖基化终末产物 (AGEs) 是糖尿病血管并发症的致病因素, 在糖尿病患者体内, AGEs 的含量与糖尿病血管并发症的发生及其严重程度呈正相关^[3]。本课题组前期研究表明, 左归降糖通脉方能显著改善糖尿病合并脑血管并发症患者的临床症状, 临床总有效率达 87.5%, 能显著改善糖尿病并发脑梗死患者的神经功能缺损程度, 并对炎症反应有一定的抑制作用^[4]。本实验观察左归降糖通脉方对 AGEs 诱导脑

微血管内皮细胞损伤及炎症因子的干预作用, 探讨左归降糖通脉方治疗糖尿病血管并发症的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和动物

大鼠脑微血管内皮原代细胞 (BMECs), 购自武汉原生原代生物医药科技有限公司, 编号 RAT-CELL-0039。取 3 或 4 代生长状态良好的细胞用于正式试验。

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 鼠龄 42 天, 体重 (220 $\pm$ 20) g, 购自湖南斯莱克景达公司, 实验动物许可证号: SCXK (湘) 2016-0002。

1.2 药物、试剂和仪器

左归降糖通脉方组成: 熟地黄 20 g, 枸杞子 12 g, 山萸肉 12 g, 黄芪 30 g, 黄连 10 g, 地龙 12 g, 丹参 20 g, 川芎 12 g, 水蛭 8 g, 石菖蒲 8 g, 购自湖南中医药大学第一附属医院中药房, 采用水煎法, 煎药两次后合并煎液, 过滤浓缩至含生药 2 g/ml,

基金项目: 国家自然科学基金 (81373508); 湖南省中医药科研计划项目 (201606); 湖南省教育厅科学研究项目 (16KK063); 湖南省学位与研究生教育教改课题 (JG20168071); 湖南省重点学科建设项目

* 通讯作者: 644138330@qq.com

置于 4℃ 冰箱中贮存备用。尼莫地平片 (20 mg/片, 正大青春宝药业有限公司, 国药准字: H33022285)、格列齐特缓释片 (30 mg/片, 施维雅制药有限公司, 国药准字: H20044694) 分别加入超纯水配成终浓度分别为 3 mg/ml、2 mg/ml 的溶液。

人血清白蛋白 (货号: 061M700V)、吩噻硫酸二甲酯 (货号: P9625) 均为 Sigma 公司产品; D-葡萄糖 (货号: G8150)、透析袋 (货号: YA1045) 均为 Solarbio 公司产品; 青霉素 (货号: N0521A)、庆大霉素 (货号: J0520A) 均为大连美仑生物科技有限公司产品; 原代细胞培养体系 (武汉原生原代生物医药科技有限公司, 货号: MED-SUP-0002); 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 货号: 25200056); CCK-8 试剂 (日本同仁化学研究所, 货号: KU746); 白细胞介素 1 β (IL-1 β , 货号: K28032830)、细胞间黏附分子 1 (ICAM-1, 货号: K25032831) 及血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1, 货号: L06032832) ELISA 试剂盒均为 Cusabio 公司产品。

电子天平 (上海精密科学仪器有限公司, 型号: JY3002); 荧光倒置显微镜 (德国 OLYMPUS, 型号: IX51); 超净工作台 (苏净安泰公司, 型号: SW-CJ-4FD); 多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司, 型号: Cytation3); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂, 型号: RE-52AA); 电子调温电热套 (河南省泰斯特仪器有限公司, 型号: 98-4-B)。

1.3 AGEs 的制备

体外制备 AGEs, 参照文献 [5] 糖孵育法进行孵育。在含 100 mmol/L 的 D-葡萄糖、200 mg/L 的青霉素、70 μ g/L 庆大霉素和 1.5 mmol/L 吩噻硫酸二甲酯的磷酸缓冲液 (100 mmol/L) 中加入人血清白蛋白, 于 37℃ 孵育 8 周。以相同条件但不含葡萄糖的缓冲液孵育的人血清白蛋白作为对照。孵育结束后以无菌的透析袋置于磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中, 透析 24 h 除去未结合的葡萄糖, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.4 含药血清的制备

SD 大鼠按照随机数字表法分为空白组、中药组和西药组, 每组 10 只。中药组灌胃剂量按动物体表面积剂量换算法^[6], 以 5 倍临床等效剂量 36 g/(kg·d) 的左归降糖通脉方溶液灌胃, 每天 1

次, 持续 5 天。西药组给予尼莫地平片及格列齐特缓释片灌胃, 剂量分别为 18.35 mg/(kg·d) 和 27.5 mg/(kg·d), 每日 1 次; 空白组予以 4 ml 的蒸馏水灌胃。末次灌胃前禁食 12 h, 待末次灌胃 1 h 后无菌条件下腹主动脉采血, 37℃ 水浴 30 min 后置于 4℃ 冰箱过夜, 待充分凝固后 3000 r/min 离心 15 min, 取上清, 分别为空白血清、中药血清和西药血清, -80℃ 冰箱贮存备用。

1.5 AGEs 诱导 BMECs 损伤的剂量与时间的筛选

将糖孵育后得到的 AGEs 用细胞培养液稀释, 根据参考文献 [7-9], 设 50、100、200、400 mg/L 4 个浓度组, 分别作用 12、24、48 h 3 个时间点。

1) 选取贴壁 80% 且生长状态良好的 BMECs, 加入上述各组不同浓度、不同作用时间的 AGEs, 并以未加入 AGEs 的正常 BMECs 培养 12、24、48 h 作为对照组, 倒置显微镜下观察各组 BMECs 的形态变化。2) 将浓度为 10^4 个/ml 的 BMECs 细胞悬液接种至 96 孔板中, 每孔 100 μ l, 每组设 6 个复孔, 放入培养箱中培养 24 h, 待 BMECs 充分贴壁后吸出孔内原细胞培养液, 加入上述各组不同浓度的 AGEs 100 μ l 分别作用 12、24、48 h 后, 吸出 AGEs 加入新鲜细胞培养液, 再向每孔中加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 在培养箱内继续孵育 2 h, 用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光值即 OD 值, 计算各组抑制率: 抑制率 = $[1 - (\text{给药组 OD 值} - \text{空白 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白 OD 值})] \times 100\%$ 。进行统计学分析, 确定 AGEs 的最佳干预剂量及时间进行后续试验。

1.6 左归降糖通脉方含药血清干预损伤 BMECs 剂量的筛选

中药含药血清设 2.5%、5%、10% 3 个浓度组, 作用于 BMECs 24 h, 以正常的细胞作为对照组。将细胞接种至 96 孔板中, 每组设 6 个复孔, 向每孔中加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 在培养箱内继续孵育 2 h, 用酶标仪测定其在 450 nm 处的 OD 值, 计算各组增殖率: 增殖率 = $(\text{给药组 OD 值} - \text{空白 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白 OD 值}) \times 100\%$ 。确定中药含药血清最佳剂量进行后续试验。

1.7 左归降糖通脉方含药血清干预 AGEs 诱导 BMECs 损伤

将贴壁 80% ~ 90% 的 BMECs 用胰酶消化至 5 ml 离心管中, 调节细胞浓度至 10^4 个/ml, 将细胞悬液平均分为 4 组后贴壁培养, 分别为空白组

(BMECs + 正常细胞培养基 4 ml)、模型组(BMECs + AGEs 4 ml)、中药组 (BMECs + AGEs 4 ml + 中药血清 4 ml)、西药组 (BMECs + AGEs 4 ml + 西药血清 4 ml)。采用酶联免疫吸附试验检测各组细胞上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 的含量。参照试剂盒中说明书进行操作,放入酶标仪中检测各组在 450nm 波长中的 OD 值,根据标准曲线计算出各个样本中炎症因子的含量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据符合正态分布且方差齐使用单因素方差分析; 方差不齐则用秩和检验。

2 结果

2.1 不同浓度不同作用时间下 AGEs 对 BMECs 形态结构影响结果

显微镜下观察: 正常 BMECs 为梭形, 为单层贴壁生长, 融合后呈鹅卵状排列, 可见旋涡状特征, 细胞膜明显且完整, 细胞透光性较强。用不同浓度 AGEs 不同时间作用于 BMECs, 镜下可见随着 AGEs 浓度的增加和作用时间的延长, BMECs 出现不同程度的变形, 细胞间隙增宽细胞分离, 胞膜皱缩、胞膜轮廓不清甚至胞膜破裂, 导致细胞的损伤和坏死。

2.2 不同浓度不同作用时间下 AGEs 对 BMECs 抑制率比较

表 1 示, 与对照组同时间比较, 当 AGEs 作用 12、24 h 时, 400、200 mg/L 组对 BMECs 的生长有抑制作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 当干预时间延长至 48 h 时, 各浓度组对 BMECs 皆有损伤和抑制作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。为了不过分损伤细胞而影响到后续实验中中药含药血清的促增殖作用, 故 AGEs 选择浓度 200 mg/L、作用 24 h 作为最佳浓度及时间点进行后续试验。

表 1 不同浓度不同作用时间下 AGEs 对 BMECs 抑制率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	48 h
对照组	6	0.02 $\pm$ 0.47	-0.04 $\pm$ 2.02	0.01 $\pm$ 3.29
50 mg/L 组	6	0.59 $\pm$ 0.50	5.47 $\pm$ 4.35	13.9 $\pm$ 3.2*##
100 mg/L 组	6	0.91 $\pm$ 0.44 $\Delta\Delta$	9.16 $\pm$ 3.15* $\Delta\Delta$	16.57 $\pm$ 4.92*#
200 mg/L 组	6	1.65 $\pm$ 0.31* $\Delta\Delta$	17.35 $\pm$ 2.53** $\Delta\Delta$	25.82 $\pm$ 1.39** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
400 mg/L 组	6	3.25 $\pm$ 0.57* $\Delta\Delta\Delta$	23.72 $\pm$ 3.68** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	39.12 $\pm$ 3.44** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: AGEs, 晚期糖基化终末产物; BMECs, 脑微血管内皮原代细胞; 与对照组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 50 mg/L 组同时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 100 mg/L 组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与 200 mg/L 组同时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与本组 12 h 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 不同浓度中药含药血清干预 BMECs 24 h 后增殖率比较

表 2 示, 与对照组比较, 5%、10% 中药含药血清组增殖率升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 5% 中药含药血清组的增殖率较 2.5%、10% 中药含药血清组高 ($P < 0.05$), 故选择浓度为 5% 中药含药血清作为最佳剂量进行后续试验。

表 2 不同浓度中药含药血清干预 BMECs 24 h 后增殖率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	增殖率
对照组	6	100.00 $\pm$ 1.77
2.5% 中药含药血清组	6	103.00 $\pm$ 1.51
5% 中药含药血清组	6	120.78 $\pm$ 1.71** Δ
10% 中药含药血清组	6	108.33 $\pm$ 1.24* Δ

注: BMECs, 脑微血管内皮原代细胞; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 2.5% 中药含药血清组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 5% 中药含药血清组比较, $\Delta P < 0.01$

2.4 各组细胞上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 含量比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 含量均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组、西药组细胞上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 含量均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药组、西药组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组细胞上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 含量比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-1 β	ICAM-1	VCAM-1
空白组	6	33.52 $\pm$ 3.51*	45.21 $\pm$ 5.53*	18.00 $\pm$ 1.24*
模型组	6	60.20 $\pm$ 4.90	57.86 $\pm$ 1.67	24.20 $\pm$ 2.30
中药组	6	38.61 $\pm$ 1.38*	46.90 $\pm$ 2.33**	19.29 $\pm$ 0.96*
西药组	6	40.65 $\pm$ 1.55**	46.92 $\pm$ 3.44*	19.31 $\pm$ 1.07*

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; ICAM-1, 细胞间黏附分子 1; VCAM-1, 血管细胞黏附分子 1; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

AGEs 已经被证实与糖尿病、慢性炎症、阿兹海默病、癌症和肾衰竭等疾病相关^[10-11]。AGEs 通过与特定细胞表面的受体晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 相结合来介导其产生效应^[12]。AGEs 主要是通过与其细胞膜上的受体结合, 激活并启动一系列的受体信号转导途径, 使细胞释放多种炎症分子, 造成血管内皮的损伤, 这也是糖尿病引起血管病变的主要分子机制^[13]。AGEs 损伤细胞还存在其他的途径, 如 AGEs 能通过交联蛋白、修饰细胞组分等方式直接引起内皮细胞的损伤^[14]。AGEs 与 RAGE 结合使核因子 κ B (NF- κ B) 活化, 刺激转录并激活下游多条相关信号通路, 诱导释放 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 等炎症因子^[15], 引起炎症反应的发生, 改变血管的通透性及黏附性, 引起内皮细胞损伤, 血流调节受阻, 诱发一系列的血管并发症^[16]。

中医学认为, 糖尿病病因病机可归结于正虚及邪实两个方面。正虚的方面, 消渴病典型的“三多一少”症状多属气虚和阴虚证候; 邪实方面, 外感和内伤皆可导致病理产物的产生, 与消渴病的发生密切相关的病理因素主要为血瘀、痰浊、燥热。“瘀血痹阻脉络”是糖尿病血管并发症发生的主要致病机制, 所以活血化瘀是血管并发症的基本治疗原则。左归降糖通脉方具有滋阴补气活血解毒之效, 其中熟地黄、枸杞子、山萸肉滋阴补肾, 黄芪补气健脾, 黄连清热解毒, 川芎、丹参、地龙、水蛭活血通络, 石菖蒲开窍化湿。

本研究结果表明, AGEs 对 BMECs 有损伤作用, 其作用效果随着 AGEs 浓度的升高及干预时间的延长愈加明显。倒置显微镜下观察 BMECs 的形态结果变化证实了这一损伤作用, 说明 AGEs 的浓度和作用时间的延长会引起细胞膜皱缩破裂, 导致细胞结构出现了严重损伤甚至死亡。这进一步证实了糖尿病患者体内持续的血管内皮高糖状态会引起并加速内皮细胞的损伤, 诱导脑微血管病变或大血管病变等诸多并发症的发生。结果还表明, AGEs 引起的细胞损伤能上调细胞上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 的含量, 说明 AGEs 引起的细胞损伤主要为炎性损伤, 这一损伤可能是通过 AGEs 与细胞膜表面的 RAGE 结合, 激活下游信号通路发生炎症反应分泌多种炎症因子引起的。而左归降糖通脉方含药血清对 AGEs 引起 BMECs 的炎性损

伤有明显的保护作用, 减少了炎症因子的释放, 说明其能一定程度上缓解血管内皮细胞的损伤, 且这一作用与尼莫地平片及格列齐特缓释片效果相同。

综上所述, AGEs 能引起 BMECs 的损伤, 且损伤作用随着浓度的增加和作用时间的延长愈加明显, 其机制可能是 AGEs 诱导了血管内皮细胞发生炎性反应。而左归降糖通脉方含药血清对炎症因子有明显的抑制作用, 提示该方可能对糖尿病脑血管并发症有显著的治疗作用。

参考文献

- [1] 何洪波, 祝之明. 我国糖尿病合并高血压的流行病学和治疗现状 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(8): 855-865.
- [2] 岳宗相, 曾洪长, 谢春光, 等. 糖尿病血管并发症病因学研究进展 [J]. 现代临床医学, 2012, 38(4): 247-250.
- [3] YAMAGISHI S, MATSUI T, FUKAMI K. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligands in cancer risk [J]. Rejuvenation Res, 2015, 18(1): 48-56.
- [4] 邓奕辉, 喻嵘, 陈大舜. 降糖通脉方治疗糖尿病合并脑梗死 32 例临床观察 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(5): 40-42.
- [5] COOKE JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(9): 2032-2037.
- [6] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学: 中医科研设计与统计方法 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 64.
- [7] 李振宇, 谢秀梅, 杨天伦, 等. 前纤维蛋白 1 在糖基化终末产物介导内皮损伤中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(1): 11-16.
- [8] 李静, 张振, 姜新魁, 等. 糖基化终末产物对肠道 L 细胞株胰高血糖素肽-1 分泌水平及 L 细胞凋亡的影响 [J]. 广东医学, 2015, 36(7): 1013-1016.
- [9] 廖俞强, 邓奕辉, 颜佳博, 等. 滋阴活血解毒方对 AGEs 诱导 VEC 损伤黏附分子及凝血相关因子表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(5): 485-488.
- [10] XUE J, RAY R, SINGER D, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs [J]. Biochemistry, 2014, 53(20): 3327-3335.
- [11] BASTA G, LAZZERINI G, MASSARO M, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses [J]. Circulation, 2002, 105(7): 816-822.
- [12] URIBARRI J, DEL CASTILLO MD, DE LA MAZA MP,

et al. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease [J]. Adv Nutr, 2015, 6(4): 461-473.

[3] BARZILAY JI, ABRAHAM L, HECKBERT SR, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the cardiovascular health study [J]. Diabetes, 2001, 50(10): 2384-2389.

[4] 乔爱敏, 李乐, 刘青. 晚期糖基化终产物及其受体

RAGE 在糖尿病血管并发症中的作用机制 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(11): 1306-1311.

[5] 高红丽, 李虹伟. 糖基化终末代谢产物及其受体与动脉粥样硬化的关系及抑制剂的研究进展 [J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(6): 610-613.

[6] 汤运梁, 徐积兄. 糖基化终末产物与糖尿病慢性并发症研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(4): 1012-1015.

Effects of Zuogui Jiangtang Tongmai Formulae (左归降糖通脉方) Drug-Containing Serum on Brain Microvascular Endothelial Cells Injury Induced by Advanced Glycation End Products

LI Yujia, LI Dingxiang, MAZHONG Danni, ZHOU Han, DENG Yihui

(College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of Zuogui Jiangtang Tongmai Formulae (ZGJTTMF) (左归降糖通脉方) in the treatment of diabetic vascular complications. **Methods** Thirty rats were randomly divided into the blank group, the Chinese medicine group and the western medicine group, with 10 rats in each group. The Chinese medicine group was intragastrically given ZGJTTMF 36 g/(kg · d), and the western medicine group was given nimodipine tablets 18.35 mg/(kg · d) and gliclazide sustained-release tablets 27.5 mg/(kg · d) by gavage. The blank group was intragastrically administered with 4 ml of distilled water. Rats were all given once a day for 5 consecutive days to prepare the drug-containing serum. The advanced glycation end products (AGEs) were set to four concentrations of 50, 100, 200, and 400 mg/L for 12, 24, and 48 h. Effects of AGEs on morphological structural changes of rat brain microvascular endothelial cells (BMECs) were observed to screen for optimal intervention concentrations and times. The drug-containing serum of ZGJTTMF was divided into three concentration groups of 2.5%, 5% and 10%. After 24 hours of action on BMECs, the proliferation rate of BMECs was measured to determine the optimal action concentration of serum containing the drug of ZGJTTMF. The BMECs were divided into the blank group, the model group, the Chinese medicine group and the western medicine group. The Chinese medicine group and the western medicine group were respectively added with corresponding drug-containing serum for intervention. The contents of interleukin-1 β (IL-1 β), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in the supernatant of each group were detected. **Results** The optimal concentration and time point of AGEs was 200 mg/L for 24 h, and the optimal concentration of Chinese medicine containing serum was 5%. Compared with the blank group, the contents of IL-1 β , ICAM-1 and VCAM-1 in the supernatant of the model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, IL-1 β , ICAM-1 and VCAM-1 in the Chinese medicine group and the western medicine group were significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** ZGJTTMF can down-regulate the expression of IL-1 β , ICAM-1 and VCAM-1, thus inhibiting the inflammatory response, which may be one of the mechanisms of its treatment of diabetic vascular complications.

Keywords diabetic vascular complications; Zuogui Jiangtang Tongmai Formulae; advanced glycation end products; brain microvascular endothelial cells; inflammatory factors

(收稿日期: 2018-03-18; 修回日期: 2018-11-12)

编辑: 王利菊