

· 论著 ·

基于心血管芯片模型的4种深海毒素致伤评价与雷公藤甲素的保护作用研究

何晓莉^{1,2}, 施艺玮², 陈 兰^{1,2}, 刘 悦², 洪战英^{1,2} (1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 构建一种心血管芯片模型, 评估四种海洋毒素即大田软海绵酸(OA)、芋螺毒素(CTX)、河豚毒素(TTX)和环亚胺毒素(GYM)对血管糖萼组织的损伤, 初步探索雷公藤甲素对毒素致伤的保护作用。方法 将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)接种于三通道结构的微流控芯片, 并对所构建的心血管芯片模型进行表征。采用CCK-8法和免疫荧光染色法分析低、中、高三个浓度的海洋毒素对细胞活力和糖萼组织损伤情况, 以及雷公藤甲素对毒素致伤的保护作用。结果 所构建心血管器官芯片中的细胞生长状态良好, 具有结构完整的糖萼组织, 与对照组相比, OA中、高浓度以及GYM高浓度均对细胞活力具有一定抑制($P<0.05$), CTX和TTX在所测浓度下对细胞没有明显活力抑制, 但是四种毒素均引起细胞表面糖萼组织的严重损伤($P<0.01$), 且随着浓度增加, 糖萼损伤率升高。经雷公藤甲素预保护后, 四种毒素对HUVEC的毒性显著降低, 糖萼组织损伤率下降。结论 四种毒素对HUVEC细胞活力以及表面的糖萼组织具有损伤, 且呈一定的剂量关系, 而雷公藤甲素对毒素损伤后的HUVEC细胞具有保护作用。

[关键词] 心血管芯片; 海洋生物毒素; 糖萼损伤; 雷公藤甲素

[文章编号] 2097-2024(2023)03-0149-06

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202206018

Evaluation of toxin-induced injury and protective effect of triptolide based on a cardiovascular chip model

HE Xiaoli^{1,2}, SHI Yiwei², CHEN Lan^{1,2}, LIU Yue², HONG Zhanying^{1,2} (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To construct a cardiovascular chip model for evaluating the damage of vascular glycocalyx induced by four marine toxins: okadaic acid (OA), conotoxin (CTX), tetrodotoxin (TTX) and gymnodimine (GYM), and explore the protective effect of triptolide on toxin-induced injury. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were inoculated into a three-channel microfluidic chip. CCK-8 method and immunofluorescence staining were used to analyze the damage of cell viability and glycocalyx tissue induced by low, middle and high concentrations of marine toxin, as well as the protective effect of triptolide on toxin-induced injury. **Results** The cells in the cardiovascular chip grew well and had structurally intact glycocalyx. Compared with the control group, the activity of HUVEC cells were inhibited in group of the medium and high concentration of OA and high concentration of GYM ($P<0.05$). The activity of cells had not been inhibited by CTX and TTX significantly, but all the four toxins caused serious damage to the glycocalyx tissue ($P<0.01$). After pre-protection with triptolide, the toxicity of the four toxins to HUVEC cells and the damage rate of glycocalyx decreased significantly. **Conclusion** The four marine biotoxins could damage the activity and glycocalyx of HUVEC cells in a dose-dependent manner, while triptolide has a protective effect on HUVEC cells injured by toxin.

[Key words] cardiovascular chip; marine biotoxins; glycocalyx damage; triptolide

海洋生物毒素是一类由海洋生物产生的天然活性物质, 具有化学结构新颖, 生物活性高, 作用于

钠、钾、钙等离子通道等特点, 有望开发为先导化合物, 为新型海洋药物的研发提供新策略, 但其强烈毒性和高致死率也对人类健康产生巨大威胁^[1]。目前, 药物毒性评价多采用细胞模型和动物模型, 由于细胞模型不能重现体内真实环境, 动物模型存在伦理和物种差异等问题, 近年来, 在微流控技术基础上发展起来的器官芯片模型, 可以模拟体内组织器官的结构和功能, 再现体内微环境, 在药物毒

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81872829、82173777); 国家科技部重点研发计划(2019YFC0312600)

[作者简介] 何晓莉, 硕士研究生, 研究方向: 细胞代谢组学研究, Email: 919852027@qq.com, Tel: 15980220432

[通信作者] 洪战英, 教授, 研究方向: 微流控芯片药学研究, Email: hongzhy001@163.com, Tel: 81871269

性评价与检测领域展现出极大潜力。本文构建了一种可模拟心血管结构与功能的心血管芯片模型,用于四种典型的深海毒素,即大田软海绵酸(OA)、芋螺毒素(CTX)、河豚毒素(TTX)和环亚胺毒素(GYM)的致伤评价,并初步探索了雷公藤甲素对毒素致伤的保护作用,旨在为深海毒素的防护提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SC-1B 匀胶机、BP-2B 型烘胶台(北京创世威纳科技有限公司);JKG-2A 光刻机(上海学泽光学机械有限公司);PDC-32G-2 型等离子清洗机(美国 Harrick 公司);CKX41 型高倍显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Harris Uni-Corel 15072 型打孔器(美国 Harris 公司);超净工作台、CO₂ 细胞培养箱、离心机、超低温冰箱(美国 Thermo Fisher 公司);Synergy 4 多功能酶标仪(美国 Bio-TEK 公司);Harvard 蠕动泵 p-70(美国 Harvard 仪器公司);十万分之一电子分析天平(日本 A&D 公司)。

聚二甲基硅氧烷(PDMS)预聚剂和固化剂(美国 Dow Corning 公司);硅单面抛光片、显影液(苏州汶颢芯片科技有限公司);SU-82 075 光刻胶(美国 Microchem 公司)、磷酸盐缓冲盐(PBS)、96 培养孔板(美国 Corning 公司);无菌注射器(江苏恒康公司);PE/20 软管(美国 Scientific Commodities 公司);多聚赖氨酸溶液(北京索莱宝科技有限公司);DMEM/F-12 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(加拿大 MULTICELL 公司);青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);CCK-8 检测试剂

盒(大连美仑生物有限公司);山羊血清、Tween-20 溶液(碧云天生物科技公司);荧光素异硫氰酸酯标记的小麦胚芽凝集素(WGA-FITC)、二甲基亚砜(DMSO)、大田软海绵酸、河豚毒素、环亚胺毒素(北京普华仕科技发展有限公司);芋螺毒素(上海楚肽生物科技发展有限公司);雷公藤甲素(上海陶素生物科技公司)。所有化学试剂除特殊说明外均为分析纯。

1.2 溶 液 的 配 制

精密称取 OA 溶解于 DMSO,配置浓度为 31 μmol/L 的储备液;CTX 溶解于超纯水中,配置浓度为 200 μmol/L 的储备液;TTX 溶解于 0.1% 甲酸溶液,配置浓度为 313 μmol/L 的储备液;5 μmol/L 的 GYM 标准溶液,氮气吹干后培养基复溶,于 -20 °C 保存。用培养基稀释至低、中、高三个浓度的溶液:OA(10、50、100 nmol/L)、CTX(0.5、5、20 μmol/L)、TTX(0.04、0.4、4 μmol/L)、GYM(4、10、40 μmol/L)。雷公藤甲素溶解于 DMSO,配置浓度为 10 mmol/L 的储备液,培养基稀释至实验浓度 0.5、1、3、10、20、50 μmol/L。

1.3 细 胞 培 养

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购买自美国 ATCC 细胞库,培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F-12 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.4 心 血 管 芯 片 模 型 的 构 建

使用 AutoCAD 软件设计、软光刻技术制备三通道并列的微流控芯片,如图 1 所示。将凝血酶(4 U/ml)、PBS 和纤维蛋白原(100 mg/ml)按

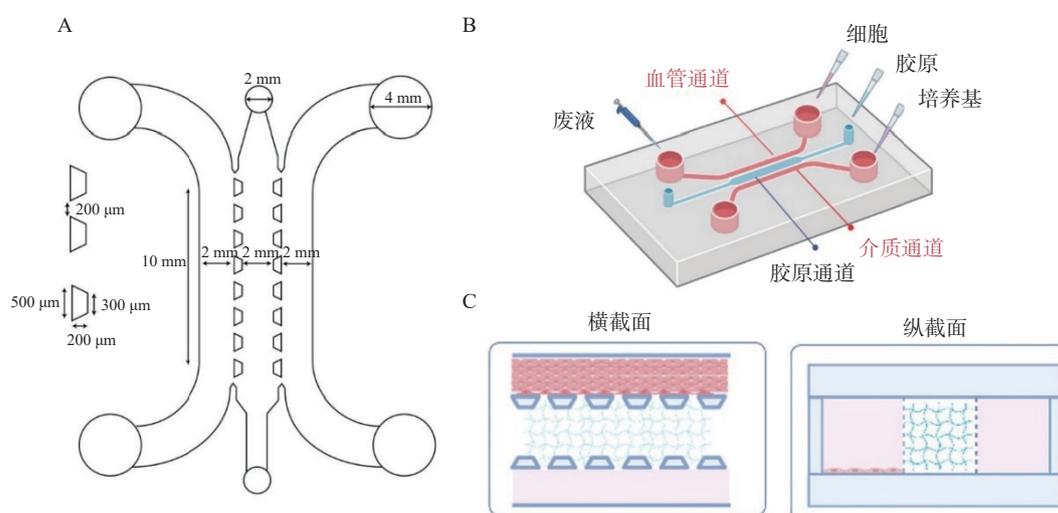


图 1 心血管芯片模拟图

A. 芯片结构设计图; B. 心血管芯片结构示意图; C. 通道截面图

25 : 22 : 3 比例混匀加入芯片胶原通道;血管通道加入 PBS 稀释的基质胶(1 : 50, V/V)后加入对数生长期的 HUVEC 细胞(3×10^6 cells/ml);在外部设备上,使用蠕动泵灌注培养基,人体血流剪切应力为 5 ~ 20 dyn/cm²,参照剪切应力公式 $\tau = 6 \mu Q/h^2 w$ 计算流体流速(其中 τ 为流体剪切应力, μ 为流体粘滞度, Q 为流体流速, h 和 w 分别为芯片内细胞培养腔的高度和宽度),模拟细胞在体内所受的血流剪切应力,于体外重构心血管微环境^[2]。

1.5 细胞活力评价

取对数生长期的 HUVEC 细胞,按 5 000 cells/孔的细胞密度接种于 96 孔板,空白组不加细胞。24 h 后吸除原培养基,空白组与正常对照组各孔中只加入细胞培养液,实验组中加入含有不同浓度的毒素试液,每孔 100 μ l,每组 6 个平行。24 h 后观察细胞形态,向各组每孔中加入 10% 的 CCK-8 溶液,避光孵育 1 h。酶标仪检测 450 nm 处各样品的吸光度值(OD)计算相对细胞活力。

$$\text{相对细胞活力}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\text{药物}} - \text{OD}_{\text{空白}})}{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}})} \times 100$$

1.6 毒素对心血管芯片模型的糖萼损伤评价

于心血管芯片模型血管通道加入 20 μ l 不同浓度的毒素,24 h 后用 PBS 缓慢润洗通道内细胞。将 4% 多聚甲醛缓慢注入到芯片微通道内,固定 20 min, PBS 润洗去除通道内残留的多聚甲醛。加入 10% 山羊血清的 PBST(PBS+0.1% Tween-20),封闭 30 min。在通道内加入适量的 WGA-FITC (WGA-FITC : PBS=1 : 200, V/V),避光孵育 1 h。芯片通道 PBS 润洗 3 次,每次 5 min,荧光倒置显微镜下观察并采集数据。根据毒素损伤前后 WGA-FITC 染色荧光强度(MFI)变化情况计算糖萼损伤率。

$$\text{糖萼损伤率}(\%) = [1 - (\text{MFI}_{\text{损伤}}/\text{MFI}_{\text{正常}})] \times 100$$

1.7 雷公藤甲素的预保护作用

考察不同浓度的雷公藤甲素对 HUVEC 细胞活性的影响,筛选出雷公藤甲素的最佳预保护浓度用于后续实验。取对数生长期的 HUVEC 细胞接种于 96 孔板,向实验组、对照组各孔中分别加入雷公藤甲素预保护 1 h。实验组加入不同浓度的毒素溶液, CCK-8 法评价雷公藤甲素对毒素损伤后 HUVEC 细胞的保护作用,实验步骤详见“1.5”项。

采用上述构建的心血管芯片模型,于血管通道内加入雷公藤甲素预保护 1 h 后,实验组加入不同浓度的毒素,考察雷公藤甲素对毒素损伤血管糖萼组织保护作用,实验步骤详见“1.6”项。

1.8 统计学方法

采用 Image J 软件计算免疫荧光强度表达, GraphPad Prism 7 统计学软件进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心血管芯片模型建立

以 1 μ l/min 的流速动态培养细胞, HUVEC 细胞在所构建的心血管器官芯片模型中生长状态良好,存活率高。经 WGA-FITC 免疫荧光染色,可清楚观察到结构完整的血管内皮糖萼,符合体外心血管模型的要求,如图 2 所示。

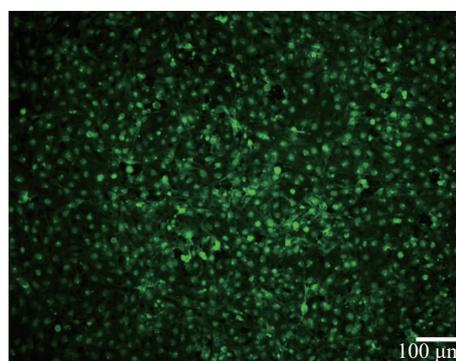


图 2 糖萼免疫荧光染色图

2.2 雷公藤甲素的细胞活力评价

采用 CCK-8 法考察不同浓度的雷公藤甲素对 HUVEC 细胞活力的影响,结果如图 3 所示,在测试浓度范围内,雷公藤甲素对 HUVEC 细胞不存在明显的活力抑制,选择浓度为 1 μ mol/L 的雷公藤甲素进行后续实验。

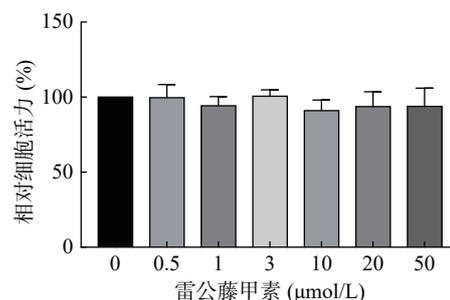


图 3 雷公藤甲素对 HUVEC 细胞活力评价结果

2.3 四种毒素的细胞活力评价

采用 CCK-8 法测定雷公藤甲素预保护前后,低、中、高三个浓度的毒素对 HUVEC 细胞活力的影响。与对照组相比,OA 在中、高浓度下对细胞活力具有较强的抑制作用($P < 0.01$),其 IC_{50} 为 54.12 nmol/L。GYM 在高浓度对细胞活力有较大

影响($P<0.05$),但是在加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素预保护后,OA 与 GYM 对细胞的毒性显著降低,细胞活力与对照组相比无显著性差异,说明雷公藤甲素对 OA 和 GYM 损伤 HUVEC 细胞具有一定的保护作用。而 CTX、TTX 在雷公藤甲素预保护前后,对 HUVEC 细胞活力均无显著抑制作用,结果如图 4、5 所示。

2.4 糖萼损伤评价

在所建立的心血管芯片平台上研究雷公藤甲素对四种毒素产生细胞内皮糖萼损伤的保护作用,免疫荧光染色结果如图 6 和图 7 所示。OA 作用后, HUVEC 细胞出现皱缩、变圆、体积变小等形态变化,且随着实验浓度的增大,所呈现的上述细胞形态变化加剧,培养液中可见大量细胞碎片和悬浮的死细胞,说明 OA 对 HUVEC 细胞毒性较强,不仅对细胞糖萼有较严重的损伤,还影响了细胞与芯片 PDMS 基底的贴附水平,心血管芯片结构和功能受损。CTX、TTX 和 GYM 作用后, HUVEC 细胞受到不同程度的损伤,内皮细胞糖萼的 WGA-FITC 染色荧光强度信号与对照组相比均明显降低,具有统计学意义($P<0.01$)。经雷公藤甲素预保护后,低浓度 OA 所产生的细胞损伤得以减轻,糖萼损伤率为 28.20%,但是中浓度和高浓度作用下的细胞依旧损伤严重。除 OA 外,其余三种毒素作用后的糖萼 WGA-FITC 染色荧光强度均有明显升高,糖萼损伤率见表 1。

3 讨论

海洋生物中的活性物质有很多,对海洋生物毒素研究却是冰山一角。海洋生物毒素根据化学结构的不同常分为三类:聚醚类、多肽类和生物碱类毒素^[3]。OA 是一种聚醚类化合物,是近年来研究最突出的一种海洋生物毒素,研究发现暴露于 OA 会导致细胞凋亡以及促进肿瘤和癌症的发生,对人体造成很大危害^[4]。多肽类毒素以 CTX 最具代表性,CTX 能特异性地作用于神经递质受体以及多种离子通道,不仅可直接作为药物,还可作为分子工具发展新药先导化合物,对神经生物学的研究具有重要意义^[5]。TTX 是一种生物碱类毒素,可选择性地与钠离子通道受体结合,研究发现,TTX 的麻醉效果强,持续时间长,在镇痛、镇静方面应用前景广泛^[6]。随着对海洋生物研究的深入,一些新的毒素也陆续被发现。GYM 是一种具有环亚胺结构的毒素,相对于其他三种毒素发现较晚、毒性较弱,但其降解速度缓慢,存在长期毒性效应,在生态系统中的潜在风险不容忽视^[7]。尽管海洋生物毒素的研究越来越受到人们的重视,但是现有的评价模型限制了毒素研究工作的进一步开展。

微流控器官芯片模型利用微流控技术对流体进行精确调控,模拟生物体内环境,在体外进行器官生理及病理状态的复制,到目前为止,已经实现肝、肾、肠道等多种器官芯片的构建,在药物筛选、

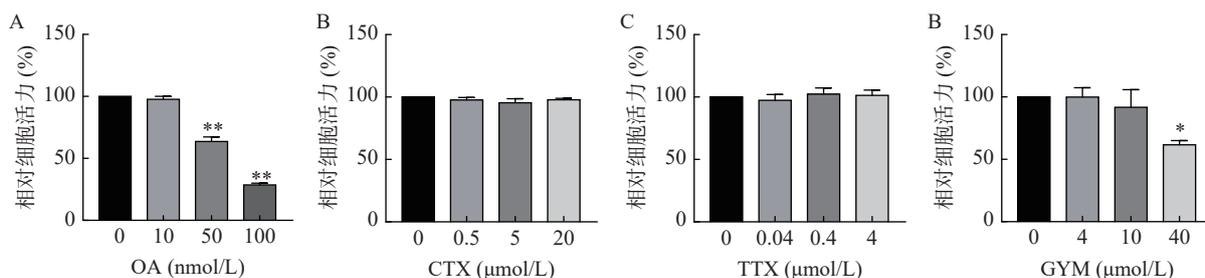


图 4 四种毒素对 HUVEC 细胞活力评价结果

A.大田软海绵酸; B.芋螺毒素; C.河豚毒素; D.环亚胺毒素
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较

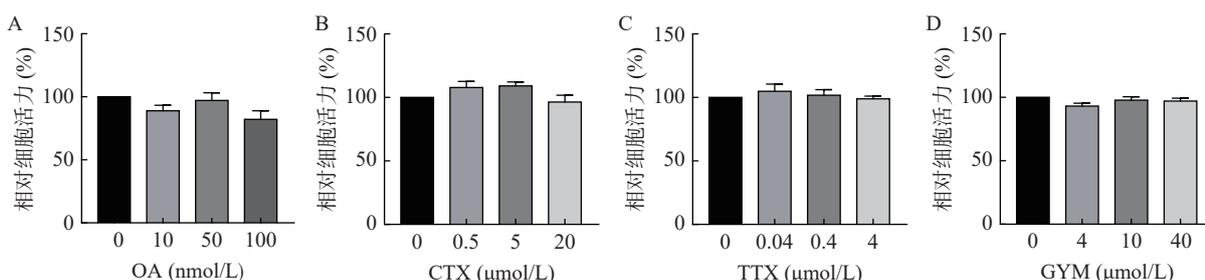


图 5 四种毒素在雷公藤甲素预保护后对 HUVEC 细胞活力评价结果

A.大田软海绵酸; B.芋螺毒素; C.河豚毒素; D.环亚胺毒素

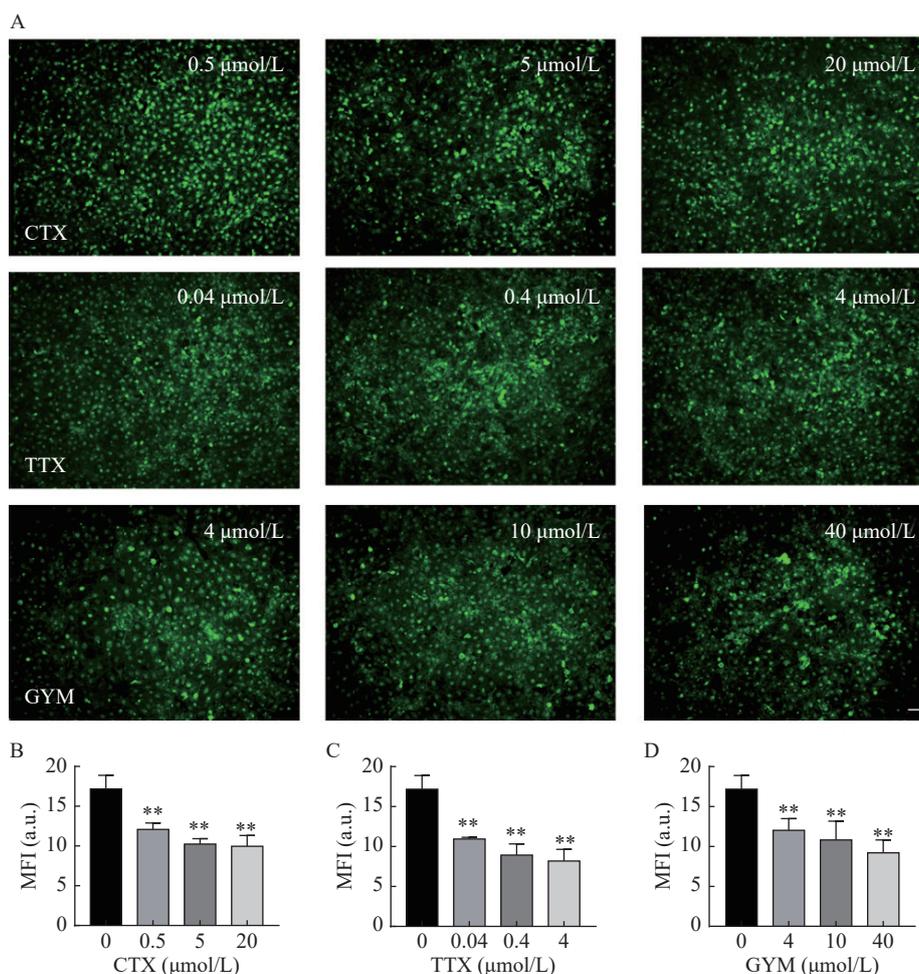


图6 毒素对心血管芯片上糖萼的损伤情况

A.糖萼免疫荧光染色图; B~D.分别为芋螺毒素、河豚毒素、环亚胺毒素的糖萼量化分析结果, ** $P < 0.01$, 与对照组比较

药效和毒性评价方面显示出良好的应用前景^[8]。大量研究表明, 血液循环流动产生的剪切应力对内皮细胞分化、生长状态和功能表达有着重要作用^[9]。本研究基于微流控技术构建心血管芯片模型, 将HUVEC细胞接种于三通道的微流控芯片中, 通过蠕动泵控制培养基流动速度为 $1 \mu\text{l}/\text{min}$, 有利于营养物质的输送和废物排出, 与静态培养相比, 细胞所处的动态环境更接近体内生理条件, 心血管芯片模型中的细胞生长状态良好, 形态呈铺路石样。

糖萼是存在于内皮细胞表面的多糖-蛋白复合物, 参与调节炎症反应、血管通透性、凝血平衡在内的多种生理过程, 是血管内皮细胞发挥生物功能的重要结构^[10]。本研究采用免疫荧光染色法, 通过FITC-WGA与HUVEC细胞中糖萼的葡萄糖胺基团选择性结合, 测量其荧光强度以反映细胞糖萼损伤情况。结果显示, 在实验浓度范围内, OA对细胞具有较大毒性, 对糖萼组织损害严重; $40 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的GYM对细胞活力有较强的抑制作用, 糖萼损伤率高达40.41%; 而TTX和CTX两种毒素对HUVEC

细胞无明显活力抑制, 但是其糖萼组织受损严重, 可见这两种毒素虽然本身对细胞不存在明显的毒性作用, 但是通过其他途径与细胞上的结构组织相互作用, 从而影响细胞的功能表达。

雷公藤甲素是卫矛科植物雷公藤的主要活性成分, 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用, 但是对心血管的作用尚未完全明确。张诗雨等^[11]发现雷公藤甲素可作用于血管内皮细胞核转录因子NF- κB , 改善脂多糖(LPS)刺激HUVEC细胞所产生的炎症反应。宗佳琪等^[12]在LPS诱导的内毒症大鼠的心血管功能损伤研究中, 同样也发现雷公藤甲素对血管内皮相似的保护作用。本研究初步探索了雷公藤甲素对毒素致伤的保护作用, 结果显示, 经 $1 \mu\text{mol}/\text{L}$ 雷公藤甲素预保护后, 四种毒素作用下的细胞活力与对照组相当, 对实验浓度范围内CTX、TTX、GYM以及低浓度OA所产生的糖萼损伤具有一定保护作用。

综上, 本文构建了一种心血管芯片模拟心血管结构与功能, 包括血管表面的糖萼组织。应用该芯

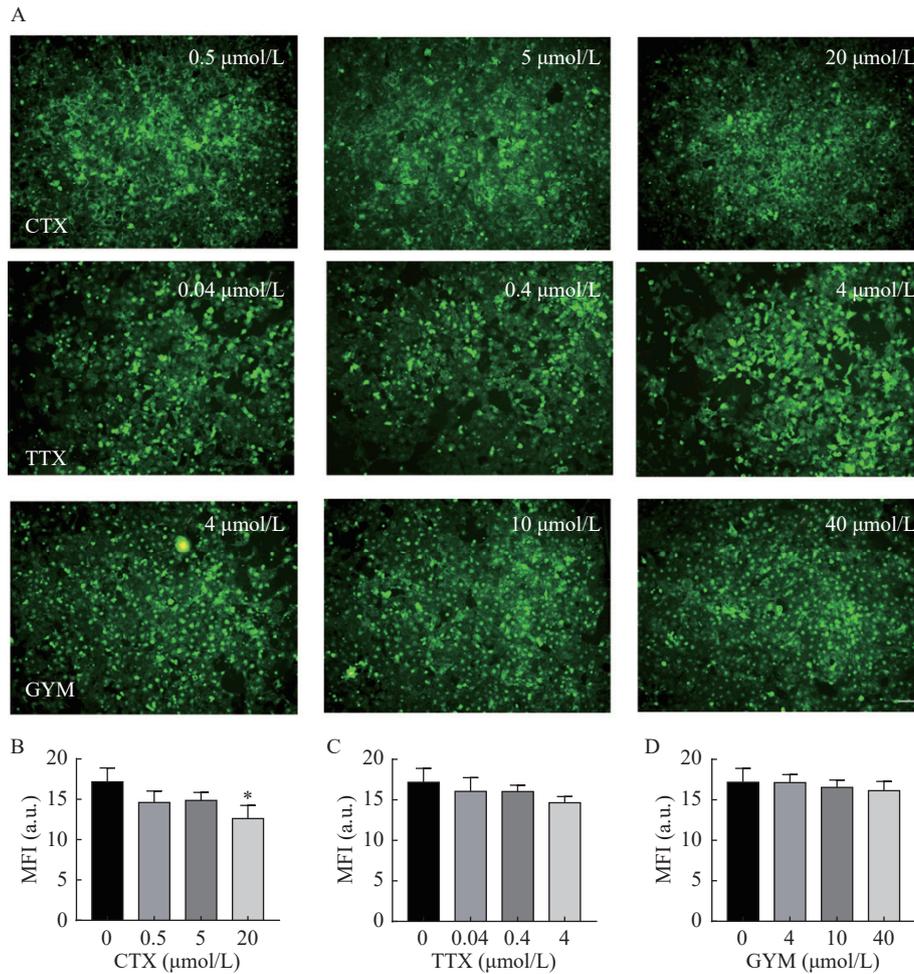


图7 雷公藤甲素预保护后毒素对心血管芯片上糖萼的损伤情况

A.糖萼免疫荧光染色图; B~D.分别为芋螺毒素、河豚毒素、环亚胺毒素的糖萼量化分析结果, * $P < 0.05$, 与对照组比较

表1 心血管芯片上的糖萼损伤率

毒素	给药浓度($\mu\text{mol/L}$)	糖萼损伤率(%)	
		预保护前	预保护后
CTX	0.5	36.30	14.90
	5	48.04	13.47
	20	52.28	26.52
TTX	0.04	29.55	6.52
	0.4	40.30	6.69
	4	41.97	14.60
GYM	4	23.53	0.22
	10	25.89	3.65
	40	40.41	6.01

片考察了OA、TTX、CTX和GYM四种深海毒素的毒性效应,发现四种毒素对HUVEC细胞活力以及表面的糖萼组织具有损伤,且呈一定的剂量关系,而雷公藤甲素对上述毒素致伤具有保护作用。

【参考文献】

[1] BARRECA M, SPANÒ V, MONTALBANO A, et al. Marine an-

ticancer agents: an overview with a particular focus on their chemical classes[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(12): 619.

- [2] YOSHIKAZUMI M, ABE J I, TSUCHIYA K, et al. Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases[J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 91(3): 172-176.
- [3] 陈巧莉, 杨兵, 洪晴悦, 等. 海洋生物毒素的分类、毒害作用机制及检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(5): 321-331.
- [4] FU L L, ZHAO X Y, JI L D, et al. Okadaic acid (OA): Toxicity, detection and detoxification[J]. *Toxicol*, 2019, 160: 1-7.
- [5] JIN A H, MUTTENTHALER M, DUTERTRE S, et al. Conotoxins: chemistry and biology[J]. *Chem Rev*, 2019, 119(21): 11510-11549.
- [6] BUCCIARELLI G M, LECHNER M, FONTES A, et al. From poison to promise: the evolution of tetrodotoxin and its potential as a therapeutic[J]. *Toxins*, 2021, 13(8): 517.
- [7] OTERO P, SILVA M. Emerging marine biotoxins in European waters: potential risks and analytical challenges[J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(3): 199.
- [8] KIMURA H, SAKAI Y, FUJII T. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2018, 33(1): 43-48.

(下转第159页)

导致细胞内的氧化还原反应失衡,扰乱正常的生物功能,导致氧化应激^[11-12]。本研究中,*D*-gal 损伤成骨细胞后,细胞的增殖及骨形成指标 ALP 水平明显降低,细胞内活性氧水平显著上升,而巴戟天丸能够显著促进 *D*-gal 损伤成骨细胞的增殖能力和 ALP 活性,并能显著降低细胞内活性氧水平,表明巴戟天丸可通过抑制胞内 ROS 释放缓解成骨细胞氧化应激,从而增强成骨细胞的活性,以促进骨的形成。

作为主要的氧化应激调控因子,在骨代谢调控中,Nrf2 同样起着重要的作用^[13-14]。研究发现,敲除 Nrf2 基因的小鼠,其股骨的骨密度和骨量显著降低,骨小梁面积减少^[15];同时缺失 Nrf2 会抑制成骨细胞抗氧化酶的表达,提高胞内 ROS 水平,从而抑制成骨细胞的分化^[16]。此外,PI3K/AKT 通路作为 Nrf2 的上游信号通路,在氧化应激调控方面同样起到关键作用^[17]。本研究中,药物干预后,巴戟天丸可促进成骨细胞内 AKT 磷酸化增加,促进 Nrf2 入核,同时激活下游的 HO-1 和 NQO1 的表达,表明巴戟天丸可能通过激活 PI3K/AKT 和 Nrf2 信号通路,进而促进通路中相关的蛋白表达,进而增加成骨细胞的抗氧化应激水平,促进骨形成。本研究可为老年性骨质疏松症的临床用药提供一定的实验依据。

【参考文献】

[1] DOMAZETOVIC V, MARCUCCI G, IANTOMASI T, et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants[J]. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2017, 14(2): 209-216.
[2] REN X X, LIU H, WU X M, et al. Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials for the treatment of bone-related diseases[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 820468.
[3] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview[J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782.
[4] KOLOSOVA N G, STEFANOVA N A, KORBOLINA E E, et al. The senescence-accelerated oxys rats: a genetic model of premature aging and age-dependent degenerative diseases[J]. *Adv Gerontol*, 2014, 27(2): 336-340.
[5] XU W M, LIU X Y, HE X H, et al. Bajitianwan attenuates D-

galactose-induced memory impairment and bone loss through suppression of oxidative stress in aging rat model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 112992.
[6] 徐武牧. 巴戟天丸抗老年性骨质疏松作用及其制剂工艺研究[D]. 上海: 海军军医大学, 2020.
[7] KIM J M, LIN C J, STAVRE Z, et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2073.
[8] Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling[J]. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2017, 26(6): 2017Nov;26(6).
[9] 夏天爽, 刘晓燕, 蒋益萍, 等. 啤酒花经抗氧化途径减轻Aβ损伤成骨细胞作用研究[J]. *药与实践杂志*, 2021, 39(6): 509-514.
[10] AN J, YANG H, ZHANG Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: the effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation[J]. *Life Sci*, 2016, 147: 46-58.
[11] AGIDIGBI T S, KIM C. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3576.
[12] KUDRYAVTSEVA A V, KRASNOV G S, DMITRIEV A A, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 44879-44905.
[13] SIM H J, KIM J H, KOOK S H, et al. Glucose oxidase facilitates osteogenic differentiation and mineralization of embryonic stem cells through the activation of Nrf2 and ERK signal transduction pathways[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 419(1-2): 157-163.
[14] 孙晓蕾. 啤酒花及黄酮酚改善铁超载致学习记忆损伤及骨丢失作用研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.
[15] IBÁÑEZ L, FERRÁNDIZ M L, BRINES R, et al. Effects of Nrf2 deficiency on bone microarchitecture in an experimental model of osteoporosis[J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2014, 2014: 726590.
[16] RANA T, SCHULTZ M A, FREEMAN M L, et al. Loss of Nrf2 accelerates ionizing radiation-induced bone loss by upregulating RANKL[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(12): 2298-2307.
[17] SAMAKOVA A, GAZOVA A, SABOVA N, et al. The PI₃k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiological condition in ischemia[J]. *Physiol Res*, 2019, 68(Suppl 2): S131-S138.

【收稿日期】 2022-02-14 【修回日期】 2022-10-04

【本文编辑】 李春德

(上接第 154 页)

[9] CUCULLO L, HOSSAIN M, PUVENNA V, et al. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology[J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 40.
[10] TARBELL J M, CANCEL L M. The glycocalyx and its significance in human medicine[J]. *J Intern Med*, 2016, 280(1): 97-113.

[11] 张诗雨, 张静, 高攀, 等. 雷公藤甲素对血管内皮细胞炎症反应的影响及机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(7): 1537-1541.
[12] 宗佳琪, 王烁阳, 苏萍, 等. TLR4/NF-κB p65信号通路介导雷公藤甲素对内毒血症大鼠内皮保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(22): 4912-4917.

【收稿日期】 2022-06-06 【修回日期】 2022-09-01

【本文编辑】 崔俐俊