

羧基化促红细胞生成素对糖尿病模型大鼠冠脉微循环内皮细胞的影响^Δ

黄妍*, 曾昆, 徐彪(华中科技大学同济医学院附属普爱医院西院区急诊内科, 武汉 430030)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3488-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.10

摘要 目的:研究羧基化促红细胞生成素(CEPO)对糖尿病模型大鼠冠脉微循环内皮细胞的影响。方法:取大鼠随机分为空白对照组、模型组和CEPO低、中、高剂量组(500、1 000、2 000 u/kg),每组12只,后4组大鼠建立糖尿病模型;各组大鼠ip相应药物,每周2次,连续4周后分离冠脉微循环内皮细胞。采用酶联免疫吸附法检测各组大鼠外周血清中前列环素(PGI₂)、血管收缩因子内皮素1(ET-1)、血管紧张素II(Ang II)、血管性血友病因子(vWF)的水平;体外CCK8试验检测内皮细胞活力(OD值);实时定量聚合酶链式反应检测内皮细胞中增殖相关基因(Ki67、p16)、凋亡相关基因(Bad、Bax)及血管内皮生长因子(VEGF)和Ang I的表达。结果:与空白对照组比较,模型组大鼠外周血清中PGI₂、ET-1、Ang II、vWF水平均增加,内皮细胞OD值降低,Ki67、p16、Bax、VEGF表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,CEPO低、中、高剂量组大鼠外周血清中PGI₂、ET-1、Ang II、vWF水平均减少,内皮细胞OD值增加,Ki67、p16、VEGF表达增强,Bad、Bax表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$);其余差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:CEPO可能通过上调冠脉微循环内皮细胞VEGF表达,促进冠脉微循环内皮细胞再生,从而改善大鼠糖尿病冠脉微循环功能。

关键词 羧基化促红细胞生成素;糖尿病;冠脉微循环;内皮细胞;大鼠

Effects of Carbamylated Erythropoietin on Coronary Microcirculation Endothelial Cells in Rats with Diabetes Mellitus

HUANG Yan, ZENG Kun, XU Biao (Dept. of Emergency Internal Medicine, West Hospital District of Pu'ai Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of carbamylated erythropoietin (CEPO) on cardiovascular microcirculation in rats with diabetes mellitus. METHODS: Rats were randomly divided into blank control group, model group, CEPO low-dose, medium-dose and high-dose groups (500, 1 000, 2 000 u/kg) with 12 in each group. The rats in the last 4 groups were reduced diabetes mellitus model. All rats were given relevant medicine intragastrically twice a week, coronary microcirculation endothelial cells were separated after consecutive 4 weeks. Enzyme-linked immunosorbent assay was conducted to detect levels of peripheral serum prostacyclin (PGI₂), vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1), angiotensin II (Ang II) and von Willebrand factor (vWF) of rats in each group; *in vitro* CCK 8 test was used to detect endothelial cell activity (OD value); real-time quantitative polymerase chain reaction was adopted to detect proliferation-related genes (Ki67, p16), poptosis-related genes (Bad, Bax), and expressions of protein vascular endothelial growth factor (VEGF) and Ang I. RESULTS: Compared with blank control group, levels of PGI₂, ET-1, Ang II and vWF in serum in model group increased; OD value decreased; Ki67, p16, Bax and VEGF expression decreased; the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with model group, levels of PGI₂, ET-1, Ang II and vWF in serum in CEPO low-dose, medium-dose and high-dose groups increased; OD value increased; Ki67, p16 and VEGF expression increased; expressions of Bad and Bax decreased; the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The others had no significant difference ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: CEPO maybe improve the coronary microcirculation function by upregulating VEGF expression in coronary microcirculation endothelial cells and promoting endothelial cells' regeneration.

KEYWORDS Carbamylated erythropoietin; Diabetes mellitus; Coronary microcirculation; Endothelial cells; Rat

糖尿病是现今威胁人类健康的主要疾病之一,其中糖尿病并发症是降低患者预后效果的重要因素^[1],心脑血管并发症是导致糖尿病患者死亡的最常见原因。虽然口服降糖药物及胰岛素可大大缓解患者的病情,但仍存在较多副作用。因此,制订预防和治疗糖尿病的有效策略有着重要的意义。

促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是由肾小管周围间质细胞以及肝细胞所分泌的一肾源性激素,其主要生理作用

是促进机体骨髓造血。研究发现,EPO还具有包括组织保护、促进组织损伤的修复,以及促进血管内皮再生等众多生理作用^[2]。但长期或大剂量使用EPO,可引起骨髓造血系统过度刺激,以致红细胞过度增多,引起循环血液高凝、血栓以及高血压等并发症,联合用于糖尿病患者还可能加重患者病情的恶性程度^[3-4]。羧基化促红细胞生成素(CEPO)是EPO的一种衍生物^[5],其与EPO拥有相同的生理效应、药动学等特点,但却可避免过度刺激骨髓所致的并发症。研究显示,CEPO可有效改善糖尿病模型大鼠心功能,具有保护心肌、改善心肌功能、抗心肌纤维化、抑制炎症反应以及抗凋亡的作用^[6]。机体心功能

^Δ 基金项目:武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(No. WX16B13)

* 主治医师, 硕士。研究方向:心血管疾病。E-mail: huang-yan8420@sina.com

的维持有赖于心肌活力与冠脉微循环的共同配合,而心肌生理活动又依赖于微循环的畅通。因此,本研究针对糖尿病心肌病,以大鼠2型糖尿病为模型,通过生理、细胞分子生物学实验,探究CEPO对糖尿病模型大鼠心肌病冠脉微循环的影响,以期为后续糖尿病心肌病的防治提供新的理论依据。

1 材料

1.1 仪器

UV1901型紫外分光光度仪(中国北京普析公司);9700型二代实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测仪(德国赛默飞世尔公司);FV500型激光共聚焦扫描显微镜(日本Olympus公司);罗康全型血糖仪(德国罗氏公司);酶联免疫吸附(ELISA)检测仪、Thermo Multiskan FC全自动酶标仪(德国赛默飞世尔公司)

1.2 药品与试剂

CEPO(德国Warren Pharmaceuticals公司,批号:CCG8657,化学纯);链脲佐菌素(STZ,批号:5637)、胎牛血清(FBS,批号:SZ231)和前列腺素(PGI₂)(批号:56745)、血管收缩因子内皮素1(ET-1,批号:56234)、血管紧张素II(Ang II,批号:56712)、血管性血友病因子(vWF,批号:56423)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒均为美国Gibco公司产品;Trizol核酸裂解液(批号:8901256)、反转录试剂盒(批号:CD156)、RT-PCR试剂(批号:QH890)、CCK8细胞增殖检测试剂盒(批号:HJ789054)均为碧云天生物科技有限公司产品;增殖相关基因Ki67、p16和凋亡相关基因Bad、Bax以及血管内皮生长因子(VEGF)、Ang I引物及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物均购于中国华大生物技术有限公司。

1.3 动物

健康Wistar大鼠,♂,体质量为220~240 g,购买于华中科技大学同济医学院动物实验中心,合格证号为SCXK(鄂)2009-0002。

2 方法

2.1 糖尿病模型的建立

取大鼠以高糖高脂饲料喂养6周,随即禁食12 h,称体质量并抽取尾静脉血,测定血糖。然后分别ip 50 mg/kg的STZ,空白对照组大鼠ip等量生理盐水,高糖高脂饲料继续喂养1周后再次重复给药,取静脉血测定血糖。如果血糖值>18 mmol/L,表明大鼠糖尿病模型建立成功。本次研究成功建立模型大鼠64只。

2.2 分组与给药

取大鼠随机分为空白对照组、模型组和CEPO低、中、高剂量组(500、1 000、2 000 u/kg),每组12只,其中CEPO中剂量按临床常用日剂量换算而得。后4组大鼠按“2.1”项下方法建立糖尿病模型,然后各组大鼠ip相应药物,空白对照组和模型组大鼠ip等量生理盐水,每周2次,连续给药4周。

2.3 冠脉微循环内皮细胞的分离与培养

连续给药4周后,取各组大鼠心脏,显微镜下分离微循环组织,于37℃、5%CO₂条件下的DMEM完全培养基中培养,观察组织周围细胞向外周生长情况。

2.4 ELISA法检测外周血清中微循环标志物水平

用包被缓冲液将已知抗原(PGI₂、ET-1、Ang II、vWF)稀释至10 μg/ml,4℃过夜。次日加各组大鼠的血清0.1 ml于上述已包被的反应孔中,37℃孵育1 h;加入新鲜稀释的酶标二抗0.1 ml,37℃孵育30 min;加入四甲基联苯胺(TMB)底物溶液0.1 ml,37℃孵育10 min;加入2 mol/L硫酸0.05 ml,在ELISA

检测仪450 nm波长处测定光密度(OD值)。同时测定PGI₂、ET-1、Ang II、vWF标准品OD值,绘制标准曲线,计算各组大鼠外周血清中PGI₂、ET-1、Ang II、vWF水平。

2.5 CCK8法检测冠脉微循环内皮细胞活力

原代分离并培养冠脉微循环内皮细胞,待其生长稳定后,提前1 d以30%密度接种于96孔板,3 d后以1:10的比例加入CCK8试剂,37℃孵育2 h。吸取上清液,紫外分光光度仪检测450 nm下OD值,以此评价各组大鼠冠脉微循环内皮细胞的细胞活力。

2.6 RT-PCR法检测冠脉微循环内皮细胞中Ki67、p16、Bad、Bax、VEGF、Ang I的表达

细胞经磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)洗涤2次,胰蛋白酶消化后收集对数期冠脉微循环内皮细胞,加入适量Trizol核酸裂解液,冰上孵育15 min,12 000×g离心10 min,75%乙醇清洗沉淀,沉淀溶于DEPC水,-70℃保存。提取总RNA反转录成cDNA,进行荧光定量PCR反应。反应条件:95℃预变性10 min,(95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s)×40循环,72℃末次延伸5 min。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法(Ct为目标扩增产物达到设定阈值所需的循环数)进行相对定量分析,检测各组大鼠冠脉微循环内皮细胞中Ki67、p16、Bad、Bax及VEGF、Ang I的表达。具体引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Primers of the genes

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增长度, bp
VEGF	上游引物:GCTGTACCTCCACCATGCCAAG	237
	下游引物:ACGCACTCCAGGGCTTCATCA	
Ang I	上游引物:CATTCTTCGCTGCCATTCTGACTCA	175
	下游引物:GCGTGTGGTGTGACTGCTCTGT	
Ki67	上游引物:CTTTATGGCTGCTGGGTGCT	85
	下游引物:GAGGTTGAAGCCGGACACAC	
p16	上游引物:AGCATGGAGCCTTCGGCTGA	120
	下游引物:ACCGTAACATATTCGGTGGCT	
Bax	上游引物:CAGAACAGGCTCGAGAGTGT	264
	下游引物:TCACGGAGGAAGTCCAGTGT	
Bad	上游引物:ACCACAAGTCCATGCCATCAC	433
	下游引物:TCCACACCCTTTTGGGCA	

2.7 统计学方法

采用Graph Pad 6.0软件进行分析。检测资料主要为计量数据,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较为单因素方差分析与HSD-*q*多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 外周血清中微循环标志物水平变化

与空白对照组比较,模型组大鼠外周血清中PGI₂、ET-1、Ang II、vWF水平均增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,CEPO低、中、高剂量组大鼠外周血清中PGI₂、ET-1、Ang II、vWF水平均减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中中剂量组效果最明显($P < 0.05$)。提示,CEPO可改善糖尿病模型大鼠冠脉微循环功能。各组大鼠外周血清中PGI₂、ET-1、Ang II、vWF水平的检测结果见表2。

3.2 冠脉微循环内皮细胞活力变化

结果表明,空白对照组、模型组和CEPO低、中、高剂量组大鼠冠脉微循环内皮细胞的OD值分别为 11.79 ± 0.59 、 7.92 ± 0.3 、 11.49 ± 0.70 、 11.43 ± 0.80 、 11.58 ± 0.89 , $F = 41.367$, $P = 0.000$ 。与空白对照组比较,模型组大鼠冠脉微循环内皮细胞活力降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,CEPO低、中、高剂量组大鼠冠脉微循环内皮细胞活力增加,差异有

统计学意义($P<0.05$)。这提示,CEPO可促进糖尿病模型大鼠冠脉微循环内皮细胞的体外增殖。

表2 各组大鼠外周血清中PGI2、ET-1、Ang II、vWF水平的检测结果($\bar{x}\pm s, n=12, \text{ng/L}$)

Tab 2 Detection results of the levels of PGI2, ET-1, Ang II and vWF in rat peripheral serum in each group ($\bar{x}\pm s, n=12, \text{ng/L}$)

组别	PGI2	ET-1	Ang II	vWF
空白对照组	4.21±0.40	0.70±0.10	5.19±0.90	5.20±0.91
模型组	11.84±0.80*	7.30±0.91*	13.13±1.49*	8.62±0.30*
CEPO低剂量组	6.89±0.10**	4.89±0.10**	8.01±0.30**	5.88±0.10**
CEPO中剂量组	5.09±0.10*** ^Δ	3.11±0.51*** ^Δ	6.27±0.10*** ^Δ	5.08±0.90*** ^Δ
CEPO高剂量组	6.90±0.10*** ^Δ	4.70±0.10*** ^Δ	7.78±0.20*** ^Δ	5.59±0.10*** ^Δ
F	625.822	319.839	176.580	72.391
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与CEPO低剂量组比较,^Δ $P<0.05$;与CEPO中剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, ** $P<0.05$; vs. CEPO low-dose group, ^Δ $P<0.05$; vs. CEPO medium-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.3 冠脉微循环内皮细胞中增殖相关基因和凋亡相关基因表达变化

与空白对照组比较,模型组大鼠冠脉微循环内皮细胞中Ki67、p16、Bax表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,CEPO低、中、高剂量组大鼠冠脉微循环内皮细胞中Ki67、p16表达增强,Bad、Bax表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组大鼠冠脉微循环内皮细胞中Ki67、p16、Bad、Bax表达的检测结果见表3。

表3 各组大鼠冠脉微循环内皮细胞中Ki67、p16、Bad、Bax表达的检测结果($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab 3 Detection results of the expressions of Ki67, p16, Bad and Bax in coronary microcirculation endothelial cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	Ki67	p16	Bad	Bax
空白对照组	11.08±0.30	10.01±0.33	19.19±3.37	18.83±3.19
模型组	8.50±0.20*	8.10±0.17*	16.95±1.19	12.46±0.68*
CEPO低剂量组	19.56±2.00**	19.13±2.59**	10.25±0.70**	11.57±0.70**
CEPO中剂量组	20.45±2.01**	18.73±2.20**	8.47±1.38*** ^Δ	8.38±1.25*** ^Δ
CEPO高剂量组	22.28±3.22**	20.04±2.46**	8.61±1.79**	8.20±1.32*** ^Δ
F	131.360	146.787	128.963	146.235
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与CEPO低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, ** $P<0.05$; vs. CEPO low-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.4 冠脉微循环内皮细胞中VEGF、Ang I表达变化

与空白对照组比较,模型组大鼠冠脉微循环内皮细胞中VEGF表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,CEPO低、中、高剂量组大鼠冠脉微循环内皮细胞中VEGF表达增强,差异有统计学意义($P<0.05$),其中高剂量组效果最明显($P<0.05$);各组间Ang I表达差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠冠脉微循环内皮细胞中VEGF、Ang I表达的检测结果见表4。

4 讨论

在糖尿病众多的并发症中,心肌病占全部并发症的三分之一^[7-10]。因此,寻找合理有效的干预措施、可逆性逆转糖尿病心肌病,具有重要的社会及医学价值。糖尿病心肌病主要由

表4 各组大鼠冠脉微循环内皮细胞中VEGF、Ang I表达的检测结果($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab 4 Detection results of the expressions of VEGF and Ang I in coronary microcirculation endothelial cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	VEGF	Ang I
空白对照组	4.71±0.90	14.77±1.20
模型组	1.80±0.30*	14.24±1.78
CEPO低剂量组	12.47±1.39**	14.45±2.49
CEPO中剂量组	13.59±1.21**	13.90±2.01
CEPO高剂量组	16.00±0.71*** ^Δ	15.07±1.72
F	234.820	0.354
P	0.000	0.839

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与CEPO低剂量组比较,^Δ $P<0.05$;与CEPO中剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, ** $P<0.05$; vs. CEPO low-dose group, ^Δ $P<0.05$; vs. CEPO medium-dose group, ^Δ $P<0.05$

血糖升高所致心肌损伤及冠脉微循环低灌注两方面因素共同造成。由于心肌活动在极大程度上依赖微循环血氧、营养素的供应及代谢产物的运出^[11-12],因此,恢复冠脉微循环是改善心肌活力的重要途径。

本研究发现,CEPO可促进糖尿病模型大鼠冠脉微循环内皮细胞体外增殖、改善模型大鼠冠脉微循环功能、上调VEGF表达。由于CEPO对机体的效应是全身性的,而特异性针对VEGF靶向微循环内皮细胞,将有助于在治疗糖尿病心肌病的同时,避免CEPO的其他未知副作用^[13]。此外,本研究发现,VEGF可显著影响冠脉微循环内皮细胞的增殖,结合糖尿病众多并发症基于微小血管病变的理论依据,笔者大胆猜测,CEPO还可能通过VEGF作用于其他微循环,譬如视网膜等,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Gurav AN. Management of diabolical diabetes mellitus and periodontitis nexus: are we doing enough?[J]. *World J Diabetes*, 2016, 7(4): 50.
- [2] 侯兰.促红细胞生成素的多器官保护作用研究进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(17): 1 626.
- [3] Schöffel N, Börger JA, Quarcoo D, et al. Erythropoietin - state of science[J]. *Sportverletz Sportschaden*, 2008, 22(4): 201.
- [4] Xu K, George I, Klotz S, et al. Erythropoietin derivate improves left ventricular systolic performance and attenuates left ventricular remodeling in rats with myocardial infarct-induced heart failure[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(5): 506.
- [5] Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Pareja-Galeano H, et al. Erythropoietin and the heart: physiological effects and the therapeutic perspective[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 171(2): 116.
- [6] Ogunshola OO, Bogdanova AY. Epo and non-hematopoietic cells: what do we know?[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-308-4_2.
- [7] He H, Qiao X, Wu S, et al. Carbamylated erythropoietin attenuates cardiomyopathy via PI3K/Akt activation in rats with diabetic cardiomyopathy[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(2): 567.

牡荆素-4'-O-葡萄糖苷在大鼠体内的首关效应研究[△]

吴成举^{1*}, 柴纪严¹, 张文洁²(1. 辽宁中医药大学教学实验中心, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116011)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3491-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.11

摘要 目的: 研究牡荆素-4'-O-葡萄糖苷(VG)在大鼠体内的首关效应及其机制, 为其新药剂型研究提供依据。方法: 10只SD大鼠分为肝门静脉给药组和股静脉给药组, 分别于肠系膜上静脉iv VG、股静脉灌注VG, 通过测定VG在肝脏的AUC计算代谢率; 15只SD大鼠分为胃灌注组、肠灌注组和肝门静脉给药组, 分别于胃底、十二指肠灌注VG及肠系膜上静脉iv VG, 通过测定VG在胃、肠的AUC计算代谢率; 15只SD大鼠分为肠灌注组、股静脉给药组和生理盐水组, 在给药前10 min, 前2组大鼠灌注细胞色素P₄₅₀(CYP)3A与P糖蛋白(P-gp)的底物维拉帕米注射液(60 ml/kg), 生理盐水组大鼠灌注等体积生理盐水, 之后按照上述方法给药, 考察维拉帕米对VG肠吸收的影响。结果: VG在肝脏、胃、肠道的代谢率分别为54.9%、1.7%、91.9%; 灌注维拉帕米后, 肠灌注组大鼠VG的AUC表现出轻微的增加趋势。结论: 肝、肠首关作用是导致VG生物利用度低的主要因素, 初步判断VG是肠道CYP 3A和/或P-gp的底物。

关键词 牡荆素-4'-O-葡萄糖苷; 首关效应; 代谢率; CYP3A; P-糖蛋白; 大鼠

Study on the First-Pass Effects of Vitexin-4'-O-Glucoside in Rats *in vivo*

WU Chengju¹, CHAI Jiyan¹, ZHANG Wenjie²(1. Teaching and Experiment Center, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China; 2. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the first-pass effect and mechanism of vitexin-4'-O-glucoside (VG) in rats so as to provide a basis for new drug development. METHODS: 10 SD rats were divided into a group of hepatic portal venous administration and a group of femoral venous administration, which respectively received VG iv at superior mesenteric vein and femoral vein, and then metabolic rate was calculated by finding out the AUC of VG in the rats' livers. 15 SD rats were divided into a group of gastric infusion, a group of intestinal infusion and a group of hepatic portal venous infusion, which respectively received VG by infusion at gastric fundus and duodenum and iv at superior mesenteric vein, and then metabolic rate was calculated by finding out the AUC of VG in the rats' stomachs and intestines. 15 SD rats were divided into a group of intestinal infusion, a group of femoral venous administration and a group of normal saline. At 10 min before administration, the former two groups were given by infusion verapamil injection (60 ml/kg), the substrate of CYP3A and P-glycoprotein (P-gp); and the group of normal saline were given by infusion of isometric normal saline, and then the rats were given VG as above to observe the effect of verapamil on intestinal absorption of VG. RESULTS: The metabolic rates of VG in the liver, stomach and intestine were 54.9%, 1.7% and 91.9% respectively. After infusion of verapamil, slight increase in AUC of VG was found in the rats in the group of intestinal infusion. CONCLUSIONS: The first-pass effects in the liver and intestine are the main factors related to the low bioavailability of VG. Based on preliminary judgment, VG is the substrate of intestinal CYP3A and/or P-gp.

KEYWORDS Vitexin-4'-O-glucoside; The first-pass effect; Metabolic rate; CYP3A; P-glycoprotein; Rats

- [8] Xu X, Cao Z, Cao B. Carbamylated erythropoietin protects the myocardium from acute ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism[J]. *Surgery*, 2009, 146(3):506.
- [9] Dashkevich A, Hagl C, Beyersdorf F, et al. VEGF pathways in the lymphatics of healthy and diseased heart[J]. *Microcirculation*, 2016, 23(1):5.
- [10] Cubranić A, Redzovic A, Dobrila-Dintinjana R, et al. Mystery story about erythropoietin (Epo) and erythropoietin receptor (EpoR) are disguised?[J]. *Hepatogastroenterology*, 2015, 62(139):585.
- [11] Bjornstad P, Truong U, Dorosz JL, et al. Cardiopulmonary dysfunction and adiponectin in adolescents with type 2 diabetes[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, doi: 10.1161/JAHA.115.e002804.
- [12] Meredith IT, Tanguay JF, Kereiakes DJ, et al. Diabetes mellitus and prevention of late myocardial infarction after coronary stenting in the randomized dual antiplatelet therapy study[J]. *Circulation*, 2016, 133(18):1772.
- [13] Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury[J]. *PNAS*, 2005, 102(6):2046.

△基金项目: 沈阳市科技计划项目(No.F13-194-9-00)

*高级实验师。研究方向: 生理药理与实验针灸。电话: 024-31207016。E-mail: 1935116200@qq.com

(收稿日期: 2016-03-28 修回日期: 2016-07-15)

(编辑: 邹丽娟)