

· 论 著 ·

# 利拉鲁肽对波动高糖所致人髓核细胞损伤的作用

姚明言<sup>1</sup>, 张靖<sup>2</sup>, 马金辉<sup>3</sup>, 李志红<sup>1</sup>, 史鹏鹏<sup>4</sup>, 臧燕伟<sup>5</sup>

1. 保定市第一中心医院内分泌科, 河北 保定 071000;
2. 河北大学附属医院心内科, 河北 保定 071000;
3. 河北大学附属医院内分泌科, 河北 保定 071000;
4. 保定市第一中心医院门诊部, 河北 保定 071000;
5. 保定市第一中心医院放射科, 河北 保定 071000

**摘要:** **目的** 观察利拉鲁肽(LIR)对波动高糖诱导的人髓核细胞氧化应激和炎性损伤的保护作用。**方法** 培养人髓核细胞株,第三代髓核细胞随机分为7组:(1)5.5 mmol/L低浓度葡萄糖对照组(CON组);(2)33 mmol/L持续高浓度葡萄糖组(H组);(3)5.5~33 mmol/L波动高糖组(F组);(4)33 mmol/L高渗对照组(P组);(5)LIR 10 nmol/L(nM)干预组(LIR 10组);5.5~33 mmol/L波动葡萄糖+10 nM LIR;(6)LIR 100 nM干预组(LIR 100组);5.5~33 mmol/L波动葡萄糖+100 nM LIR;(7)LIR 1 000 nM干预组(LIR 1 000组);5.5~33 mmol/L波动葡萄糖+1 000 nM LIR。各组细胞培养72 h,CCK-8对人髓核细胞的增殖活性进行定量分析,流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS)水平,ELISA检测各组细胞上清液中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )与细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的含量。**结果** 与CON组和P组相比,H组、F组、LIR干预组(LIR 10、100、1 000 nM)的细胞增殖活性(OD值)、SOD、GSH降低,ROS水平及MDA、TNF- $\alpha$ 、ICAM-1含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );P组与CON组相比各指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );F组与H组相比,细胞增殖活性、SOD、GSH水平明显下降,MDA、ROS、ICAM-1与TNF- $\alpha$ 含量升高( $P < 0.05$ )。与F组相比,LIR各浓度干预组细胞增殖活性、SOD活性、GSH含量均增加,ROS、MDA、ICAM-1与TNF- $\alpha$ 含量均下降( $P < 0.05$ ),且LIR在中等浓度(100 nM)达到最大作用效果。**结论** LIR可能通过减轻波动高糖诱导的人髓核细胞的氧化应激及炎性反应,从而发挥保护作用。

**关键词:** 利拉鲁肽; 人髓核细胞; 波动; 高血糖; 氧化应激; 炎性损伤

**中图分类号:** R 587.1 R 681.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)08-1019-04

## Effect of liraglutide on human nucleus pulposus cell damage induced by high glucose fluctuation

YAO Ming-yan\*, ZHANG Jing, MA Jin-hui, LI Zhi-hong, SHI Peng-peng, ZANG Yan-wei

\* Department of Endocrinology, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei 071000, China

Corresponding author: ZHANG Jing, E-mail: zhangjingmd@163.com

**Abstract: Objective** To observe the protective effect of liraglutide (LIR) on oxidative stress and inflammatory injury of human nucleus pulposus cells (NPCs) induced by fluctuant high glucose. **Methods** After NPCs lines were cultured, the 3rd generation of NPCs randomly divided into the following 7 groups: (1) 5.5 mmol/L low concentration glucose control group (CON group); (2) 33 mmol/L sustained high concentration glucose group (H group); (3) 5.5~33 mmol/L fluctuant high glucose group (F group); (4) 33 mmol/L hyperosmolar control group (P group); (5) LIR 10 nmol/L (nM) intervention group (LIR 10 group); 5.5~33 mmol/L fluctuant glucose + 10 nM LIR; (6) LIR 100 intervention group (LIR 100 group); 5.5~33 mmol/L fluctuant glucose + 100 nM LIR; (7) LIR 1 000 intervention group (LIR 1 000 group); 5.5~33 mmol/L fluctuant glucose + 1 000 nM LIR. After 72 hours of cell culture in each group, CCK-8 was used to analyze the proliferation activity of NPCs. Flow cytometry was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. ELISA was used to detect the malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) content. **Results** Compared with the CON group and P group, the cell proliferation activity (OD), SOD, GSH levels decreased, ROS level and MDA, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 levels increased in H group, F group, LIR intervention group (LIR 10, 100, 1 000 nM) ( $P < 0.05$ ); there was no

statistically significant difference in the above indicators between the P group and the CON group ( $P > 0.05$ ); compared with H group, cell proliferation activity, SOD, and GSH levels decreased, and MDA, ROS, ICAM-1, TNF- $\alpha$  increased in F group ( $P < 0.05$ ). Compared with F group, the cell proliferation activity, SOD activity, and GSH content increased, and the ROS, MDA, ICAM-1, TNF- $\alpha$  contents decreased in each LIR intervention group ( $P < 0.05$ ), and the LIR achieved its maximum effect at medium concentration (100 nM). **Conclusion** LIR may play a protective role by reducing the oxidative stress and inflammatory response of human NPCs induced by fluctuant high glucose.

**Key words:** Liraglutide; Human nucleus pulposus cells; Fluctuation; High glucose; Oxidative stress; Inflammatory injury

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (31701238)

椎间盘退变是一种常见的肌肉骨骼疾病,可引起脊柱不稳、椎管狭窄和神经压迫,是导致腰、腿痛的主要原因<sup>[1]</sup>。目前,椎间盘退变的发病机制尚不清楚。近年研究表明,糖尿病患者椎间盘退变的发病率高于非糖尿病患者,长期的高血糖状态,是导致椎间盘退变的重要病因<sup>[2-4]</sup>。糖尿病对机体的损伤不仅与患者平均血糖水平升高有关,而且与血糖波动也有十分密切的关系<sup>[5]</sup>。与持续性高糖相比,波动性高糖更易引起氧化应激状态及炎性损伤,从而造成靶器官的损伤<sup>[6]</sup>。因此,抑制波动高糖诱导的氧化应激及炎性损伤可能是延缓糖尿病患者椎间盘退变的潜在策略。

胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一种肠促胰岛素,由肠道 L 细胞合成并分泌,调节血糖和能量稳态<sup>[7]</sup>。GLP-1 主要通过 G 蛋白偶联受体家族的 GLP-1 受体 (GLP-1R) 相结合在胰腺、心脏、肺、胃、肠、肾、脑、骨等多种组织中发挥作用<sup>[8-11]</sup>。利拉鲁肽 (Liraglutide, LIR) 是一种长效的 GLP-1 类似物,与内源性 GLP-1 同源性达 97%,被认为是治疗 2 型糖尿病强有力的选择。在细胞动力学水平上, LIR 可以改善内皮细胞功能,影响包括抗炎、抗氧化应激在内的多种细胞通路<sup>[12]</sup>。然而,笔者迄今尚未见 GLP-1 在椎间盘退变中作用的相关报道。本研究应用不同浓度的 LIR 作用于体外培养人髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 72 h, 观察各组 NPCs 增殖活性、氧化应激水平及 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 分泌含量的变化,探讨 LIR 对波动高糖环境下 NPCs 的保护作用。

## 1 材料与方法

1.1 材料 人 NPCs 株:美国 ScienceCell 研究实验室;倒置显微镜:日本奥林巴斯公司;CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱:Heal Force;净化工作台:苏州安泰空气技术有限公司;低温离心机:eppendorf;酶标仪器:Well scan MR3 Lab systems Dragon;流式细胞仪器:Beckman Coulter France;NPCM 细胞培养液:北京赛默飞世尔

生物化学制品有限公司;胎牛血清培养液:美国 HyClone 公司;二甲基亚砷 (DMSO):北京 Solarbio 公司;胰蛋白酶:美国 Sigma;CCK-8 试剂盒:美国 Sigma-Aldrich;ROS 试剂盒:中国 Beyotime;MDA, SOD, GSH 检测试剂盒:碧云天生物技术研究;ICAM-1 ELISA 试剂盒:美国 R&D 公司;TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒:美国 R&D 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 NPCs 购买于美国 ScienceCell 实验室, NPCM 包含 500 ml 基础培养基,髓核细胞生长因子 5 ml, 胎牛血清 10 ml, 青霉素/链霉素溶液 5 ml, 细胞复苏后在 5% 的二氧化碳, 37 °C 的培养箱中培养 24 h。次日更换培养基, 去除未贴壁细胞和残留的 DMSO。每 2 ~ 3 日更换培养基。当 NPCs 达到约 80% ~ 90% 的融合时, 用 0.25% (w/v) 胰蛋白酶溶液消化传代, 取生长良好的对数期细胞用于实验。

1.2.2 分组 实验分为 7 组, (1) 5.5 mmol/L 低浓度葡萄糖对照组 (CON 组); (2) 33 mmol/L 持续高浓度葡萄糖组 (H 组); (3) 5.5 ~ 33 mmol/L 波动高浓度葡萄糖组 (F 组): 先用 33 mmol/L 的高浓度葡萄糖培养基培养 3 h, 再用 5.5 mmol/L 低浓度葡萄糖培养基培养 2 h, 日间波动 3 次, 高糖过夜; (4) 33 mmol/L 高渗对照组 (P 组): 含 5.5 mmol/L 低浓度葡萄糖和 27.5 mmol/L 的甘露醇培养基 (总渗透压浓度为 33 mmol/L) 培养; (5) LIR 三种浓度干预组 (LIR 10 组、LIR 100 组、LIR 1 000 组): 先用 33 mmol/L 糖浓度分别与 10、100、1 000 nmol/L (nM) 的 LIR 培养基培养 3 h, 再用 5.5 mmol/L 低浓度葡萄糖分别与 10、100、1 000 nM 的 LIR 培养 2 h, 日间波动 3 次, 高浓度葡萄糖过夜。每组设置 3 个复孔, 置于 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 72 h。

1.2.3 CCK-8 实验 应用 CCK-8 法检测细胞增殖活性。人 NPCs 接种于 96 孔板上, 细胞密度约为  $2 \times 10^5$  细胞/100  $\mu$ l 孔。培养 48 h 后, 每个孔中加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液, 去除孔中气泡, 放置培养板于 37 °C, 含有 5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱中, 孵育 3 h, 细胞增殖

用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度进行测量。

1.2.4 活性氧(ROS)检测 根据实验分组设计对NPCs 进行处理。从每组取出 200 μl 的细胞混悬液添加 300 μl 的 PBS 液,用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

1.2.5 ELISA 检测 干预 72 h 以后,收集细胞上清液于 EP 管。(1)丙二醛(MDA)检测:过氧化脂降解产物中的 MDA 与硫代巴比妥酸可以缩合后形成红色产物,在 532 nm 处测定吸光度值。(2)超氧化物歧化酶(SOD)检测:采用黄嘌呤氧化酶法,在 550 nm 处应用 722 型分光光度计进行比色并计算 SOD 活力。(3)还原型谷胱甘肽(GSH)的检测:于 420 nm 处应用 722 型分光光度计测各管吸光度(A)值,巯基化合物与二硫代二硝基苯甲酸反应时能生成一种黄色化合物,可通过比色法进行定量并计算细胞上清液中 GSH 的含量。(4)细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)含量的测定:取细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒检测说明测定 ICAM-1、TNF-α 的含量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。数据来源于至少 3 个独立试验的结果,主要为计量资料,以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间的统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CCK-8 法细胞增殖活性检测结果 与 CON 组和 P 组相比, H 组、F 组、LIR 干预组(10、100、1 000 nM)细胞增殖活性(OD 值)降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), CON 组和 P 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); F 组细胞增殖活性低于 H 组( $P < 0.05$ ); LIR 干预组(10、100、1 000 nM)与 F 组相比,细胞增殖活性均增加,且在 LIR 100 nM 浓度组中作用最明显( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 细胞内 ROS 水平 各组 ROS 检测结果见表 1。与 CON 组和 P 组比较, H 组及 F 组均诱导细胞内 ROS 的增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 F 组相比, LIR(10、100、1 000 nM)干预组显著降低 NPCs 细胞内 ROS 水平( $P < 0.05$ )。

2.3 ELISA 检测 与 CON 组和 P 组比较, H 组、F 组、LIR 干预组(10、100、1 000 nM)的 SOD、GSH 显著降低, MDA、TNF-α 与 ICAM-1 含量显著增高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), CON 组和 P 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与 H 组相比, F 组 NPCs 内

SOD 及 GSH 水平明显下降, MDA、TNF-α 和 ICAM-1 水平明显升高( $P < 0.05$ )。与 F 组相比, LIR 干预组(10、100、1 000 nM)明显升高波动高糖培养下 NPCs 中 SOD 活性与 GSH 水平,降低 MDA、ICAM-1 与 TNF-α 水平( $P < 0.05$ ),且 LIR 100 nM 浓度组中作用最明显。见表 2、表 3。

表 1 LIR 对波动性高糖环境下 NPCs 增殖活性和 ROS 水平的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	OD 值(%)	ROS(IU/ml)
CON 组	91.17 ± 1.46	188.87 ± 8.56
H 组	50.87 ± 2.10 <sup>a</sup>	470.43 ± 5.86 <sup>a</sup>
F 组	37.53 ± 2.48 <sup>ab</sup>	519.17 ± 4.21 <sup>ab</sup>
P 组	91.03 ± 1.05	201.90 ± 6.75
LIR 10 组	60.53 ± 2.48 <sup>ace</sup>	430.57 ± 8.36 <sup>ace</sup>
LIR 100 组	74.87 ± 3.46 <sup>acd</sup>	370.03 ± 6.10 <sup>acd</sup>
LIR 1000 组	63.67 ± 3.00 <sup>ace</sup>	410.93 ± 6.90 <sup>ace</sup>
F 值	233.50	1060.25
P 值	<0.01	<0.01

注:与 CON 组和 P 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 H 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 F 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 LIR 10 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与 LIR 100 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 LIR 对波动性高糖所致 NPCs 氧化应激损伤的保护作用 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	SOD(U/ml)	GSH(mg/L)	MDA(nmol/ml)
CON 组	32.47 ± 1.60	138.07 ± 2.44	5.40 ± 0.43
H 组	21.41 ± 0.98 <sup>a</sup>	94.67 ± 2.45 <sup>a</sup>	15.47 ± 0.93 <sup>a</sup>
F 组	16.45 ± 1.30 <sup>abde</sup>	76.17 ± 2.36 <sup>abde</sup>	19.28 ± 1.70 <sup>abde</sup>
P 组	33.00 ± 1.61	140.73 ± 2.67	5.00 ± 0.65
LIR 10 组	22.50 ± 1.35 <sup>ace</sup>	106.20 ± 2.61 <sup>abce</sup>	14.57 ± 0.80 <sup>abce</sup>
LIR 100 组	28.80 ± 1.93 <sup>abcd</sup>	125.07 ± 2.46 <sup>abcd</sup>	10.17 ± 0.75 <sup>abcd</sup>
LIR 1000 组	23.40 ± 1.91 <sup>ace</sup>	112.73 ± 2.47 <sup>abde</sup>	13.27 ± 1.20 <sup>abde</sup>
F 值	46.87	264.00	84.24
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与 CON 组和 P 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 H 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 F 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 LIR 10 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与 LIR 100 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

表 3 LIR 对波动性高糖所致 NPCs 炎症损伤的保护作用 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-α(pg/ml)	ICAM-1(nmol/ml)
CON 组	33.65 ± 2.90	2039.07 ± 36.06
H 组	54.91 ± 2.03 <sup>a</sup>	2472.07 ± 38.35 <sup>a</sup>
F 组	68.72 ± 3.96 <sup>abde</sup>	2672.57 ± 39.72 <sup>abde</sup>
P 组	35.68 ± 2.61	2081.33 ± 23.25
LIR 10 组	48.02 ± 3.48 <sup>abce</sup>	2386.93 ± 85.21 <sup>ace</sup>
LIR 100 组	40.21 ± 3.42 <sup>bed</sup>	2214.67 ± 111.29 <sup>abcd</sup>
LIR 1000 组	47.32 ± 2.11 <sup>abce</sup>	2320.10 ± 52.44 <sup>abc</sup>
F 值	45.48	38.29
P 值	<0.01	<0.01

注:与 CON 组和 P 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 H 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 F 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 LIR 10 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与 LIR 100 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨 论

椎间盘退变是一种常见的疾病。最近的基础和流行病学研究表明,糖尿病是椎间盘退变的重要病因<sup>[2-4]</sup>。研究认为,氧化应激反应、炎症因子和黏附分子的分泌和释放在糖尿病及其并发症的发生发展中具有重要作用<sup>[13]</sup>。高血糖尤其是波动性高糖可显著增加 ROS 产生,诱导脂质过氧化,导致细胞膜完整性丧失,线粒体膜去极化,凋亡信号通路激活,诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。GSH、SOD 和 MDA 是机体受到氧自由基攻击及氧化损伤的重要指标。当细胞受到氧化应激损伤时,抗氧化指标 GSH、SOD 降低,过氧化指标 MDA 升高。TNF- $\alpha$  主要由单核/巨噬细胞分泌,是一种炎性细胞因子,参与包括糖尿病在内的多种疾病的发生和病情演变<sup>[15]</sup>。ICAM-1 (CD54) 是一种跨膜单链糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族,在炎症细胞黏附和聚集起着重要作用。本研究结果显示,高糖及波动高糖能抑制 NPCs 的增殖活性,使 NPCs 的 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 合成增多,并显著诱导 ROS、MDA 的生成及 SOD 活性与 GSH 含量下降,而波动高糖效应更加明显。因此,寻找有效的药物抑制高糖及波动高糖介导的氧化、炎症损伤可能是延缓糖尿病椎间盘退变的潜在策略。

LIR 是一种长效的 GLP-1 类似物,与内源性 GLP-1 同源性达 97%,被认为是治疗 2 型糖尿病强有力的选择。本研究发现,LIR 可显著改善波动高糖诱导的 NPCs 氧化应激和炎症反应,且在 LIR 中等浓度 (100 nM) 时达到最大效果,并不呈浓度依赖性。可能的解释是较小浓度的作用不能引起显著的变化,较高的刺激反而可能引起相反效果。此外,因为 GLP-1 受体属于 G 蛋白偶联受体家族,在暴露于激动剂后可能发生脱敏效应或受体敏感性快速衰减<sup>[16]</sup>。

综上所述,LIR 作为一种降糖药物,可能通过调节 NPCs 的氧化应激和炎症反应从而对椎间盘退变产生有益的作用,这可能是一种潜在的延缓糖尿病患者椎间盘退变的治疗策略,但仍有待进一步的研究验证。

#### 参考文献

[1] Luoma K, Riihimäki H, Luukkonen R, et al. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration [J]. *Spine*, 2000, 25 (4): 487-492.

[2] Yang D, Zhu DJ, Zhu SY, et al. 17 $\beta$ -Estradiol/estrogen receptor  $\beta$  alleviates apoptosis and enhances matrix biosynthesis of nucleus pul-

posus cells through regulating oxidative damage under a high glucose condition [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1004-1009.

- [3] Jiang ZX, Lu W, Zeng QM, et al. High glucose-induced excessive reactive oxygen species promote apoptosis through mitochondrial damage in rat cartilage endplate cells [J]. *J Orthop Res*, 2018, 36 (9): 2476-2483.
- [4] Liu XM, Pan FM, Ba ZY, et al. The potential effect of type 2 diabetes mellitus on lumbar disc degeneration: a retrospective single-center study [J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13 (1): 52.
- [5] 陈名道. 波动性高血糖与糖尿病并发症 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2006, 26 (5): 312-314.
- [6] Ceriello A, Ihnat MA. 'Glycaemic variability': a new therapeutic challenge in diabetes and the critical care setting [J]. *Diabet Med*, 2010, 27 (8): 862-867.
- [7] Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment [J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60 (4): 470-512.
- [8] Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor [J]. *Endocrinology*, 1996, 137 (7): 2968-2978.
- [9] Marlet IR, Ölmestig JNE, Vilsbøll T, et al. Neuroprotective mechanisms of glucagon-like peptide-1-based therapies in ischaemic stroke: a systematic review based on pre-clinical studies [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122 (6): 559-569.
- [10] Hansen MSS, Tencerova M, Frølich J, et al. Effects of gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-1 receptor agonists on Bone Cell Metabolism [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122 (1): 25-37.
- [11] Chen J, Xie JJ, Shi KS, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor regulates endoplasmic Reticulum stress-induced apoptosis and the associated inflammatory response in chondrocytes and the progression of osteoarthritis in rat [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (2): 212.
- [12] Hendaro H, Inoguchi T, Maeda Y, et al. GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases [J]. *Metab Clin Exp*, 2012, 61 (10): 1422-1434.
- [13] Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors [J]. *Cell Metab*, 2013, 17 (1): 20-33.
- [14] Park JS, Park JB, Park IJ, et al. Accelerated premature stress-induced senescence of young annulus fibrosus cells of rats by high glucose-induced oxidative stress [J]. *Int Orthop*, 2014, 38 (6): 1311-1320.
- [15] Liu CX, Feng X, Li Q, et al. Adiponectin, TNF- $\alpha$  and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cytokine*, 2016, 86: 100-109.
- [16] Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53 (1): 1-24.

收稿日期: 2020-01-16 修回日期: 2020-01-28 编辑: 石嘉莹