·基础研究·

姜黄素在内脂素诱导内皮细胞炎症损伤中的作用机制

何晓乐[1],王晓明[1],葛 伟[1],李 榕[1],王 琳[1],王 宁[1],许 荣[1],贾 新[1],刘 军[1,2*]
([1]第四军医大学西京医院老年病科,西安 710032;[2]兰州军区总兰州医院全军骨科研究所,兰州 730000)

【摘 要】 **目的** 观察姜黄素(Cur)对内脂素(visfatin)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)炎症损伤过程的影响,探讨Cur改善内皮功能的信号传导机制。**方法** 将HUVECs随机分组,根据前期实验结果,给予1×10^{-5}mol/L的visfatin进行诱导,加入Cur后MTT法检测内皮细胞活力变化。通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、E选择素(E-selectin)的含量变化,蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞黏附分子-1(ICAM-1)、需肌醇激酶/核酸内切酶1(IRE1)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)的表达。**结果** MTT检测结果表明,正常HUVECs加入Cur后,不影响内皮细胞活力;而与正常对照组相比,给予1×10^{-5}mol/L visfatin处理后,MCP-1和E-selectin含量明显增加,ICAM-1、IRE1及GRP78的表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与visfatin组相比,给予不同浓度Cur处理后,可显著降低MCP-1和E-selectin的含量,同时ICAM-1、IRE1及GRP78的表达也显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Cur可能通过抑制内质网应激(ESR)来拮抗visfatin诱导HUVECs炎症损伤。

【关键词】 姜黄素;内脂素;人脐静脉内皮细胞;炎症;内质网应激
【中图分类号】 R285 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.03.046

Role of curcumin in endothelial cell injury induced by visfatin

HE Xiao-Le[1], WANG Xiao-Ming[1], GE Wei[1], LI Rong[1], WANG Lin[1], WANG Ning[1], XU Rong[1], JIA Xin[1], LIU Jun[1,2*]
([1]Department of Gerontology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; [2]Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of curcumin (Cur) on the process of visfatin-induced injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and investigate the underlying mechanism of signal pathway induced by Cur treatment in the improvement of endothelial functions. **Methods** After the HUVECs were induced by 1×10^{-5}mol/L visfatin, the cells were treated by Cur. Then cell viability was determined by MTT assay, the expression levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and E-selectin were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the levels of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease 1 (IRE1), glucose-regulated protein 78 (GRP78) were measured by Western blotting. **Results** MTT assay showed that Cur treatment had no effect on cell viability. Compared with the normal control group, 1×10^{-5}mol/L visfatin significantly increased the protein expression levels of MCP-1 and E-selectin ($P<0.05$), and obviously enhanced the protein expression of ICAM-1, IRE1 and GRP78 ($P<0.05$). However, different doses of Cur treatment exerted inhibitory effects on the above phenomena induced by visfatin ($P<0.05$). **Conclusion** Cur may mitigate visfatin-induced injury in HUVECs *via* the inhibition of endoplasmic reticulum stress.

【**Key words**】 curcumin; visfatin; human umbilical vein endothelial cells; inflammation; endoplasmic reticulum stress
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81370927), *the Natural Science Foundation of Shaanxi Province* (2013JM4009) *and the Science and Technology Foundation for Young Scholars of Gansu Province* (1606RJYA300).
Corresponding author: *LIU Jun*, *E-mail*: *tutuhehtt@163.com*

内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)是细胞为了维持内环境稳定而对未折叠或错误折叠蛋白和其他损伤内质网功能的一种自我保护反应[1]。ERS发生后,未折叠蛋白反应可引起一系列

收稿日期:2016-09-13;**修回日期**:2016-09-28
基金项目:国家自然科学基金(81370927);陕西省自然科学基金(2013JM4009);甘肃省青年科技基金(1606RJYA300)
通信作者:刘 军,E-mail:tutuhehtt@163.com

的细胞反应,持续或者急性 ERS 可导致细胞周期阻滞或细胞凋亡[2]。人类多种疾病的发生,如代谢紊乱疾病、神经变性疾病、炎性疾病和癌症等,都与 ERS 信号传导失调相关。研究表明,ERS 参与多种细胞调节过程,如氧化应激、钙稳态失衡、自身免疫等。Fu 等[3]的研究表明,金属硫蛋白可通过调节 ERS 来降低心肌细胞对阿霉素敏感性及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)的释放,从而抑制阿霉素对心肌的损伤作用。Ceylan-lsik 等[4]通过老年 C57BL 小鼠试验发现,内皮素 -1 通过 ERS 可上调锌指转录因子(GATA binding factor-4,GATA-4)、心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide,ANP)、自噬体蛋白 P62,下调细胞内 Ca^{2+} 及自噬标志物胰岛 β 细胞自噬相关基因 1(islet β cell autophagy related gene 1,Beclin-1)、自噬相关基因 5(autophagy related gene 5,ATG5)、ATG7 等,诱导心肌细胞肥大和心脏间质纤维化。内脂素(visfatin)是 Fukuhara 等[5]发现的由一种脂肪细胞分泌的细胞因子,已证实重组内脂素可以剂量依赖形式产生炎症因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素 1β(interleukin1β)、IL-6、IL-10 等,也可成为 $CD14^+$ 单核细胞和 $CD19^+$ B 淋巴细胞的潜在趋化因子。研究发现,visfatin 浓度为 1×10^{-5}mol/L 时对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)的影响最为明显[6]。本研究采用姜黄素(curcumin,Cur)干预 visfatin 诱导的 HUVECs损伤,探讨 Cur 改善内皮细胞炎症损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

HUVECs 细胞株及 MTT 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(第四军医大学免疫教研室),细胞黏附分子 -1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)、需肌醇激酶/核酸内切酶 1(inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease-1,IRE1)、葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein78,GRP78)一抗(江苏:碧云天生物技术研究所);HRP 羊抗鼠 IgG 二抗、siRNA、IRE1α siRNA、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)、胰蛋白酶、visfatin 及 Cur(Sigma 公司,美国);低糖 DMEM(dulbecco modified eagle medium)细胞培养基(HycLone 公司,美国);小牛血清(四季青公司,杭州);RPMI-1640(roswell park memorial institute-1640)培养基(GIBCO 公司,美国);细胞裂解液(碧云天公司,上海)。

1.2 HUVECs 的培养

用含 10% 小牛血清的 DMEM 细胞培养基,在 37℃、含 5% CO_2 的培养箱内培养 2 ~ 3 d,之后用 0.25% 胰蛋白酶进行消化。镜下观察到细胞收缩变圆时弃去消化液,加入培养液以终止胰蛋白酶的作用。用滴管吹打壁上的细胞,使其完全脱落并分离,根据实验需要按不同浓度接种于培养板或培养瓶中。

1.3 细胞分组及 MTT 法检测 HUVECs 活力

取对数生长期细胞,以 2×10^5 mol/ml 浓度接种于多聚赖氨酸包被的 96 孔培养板中,于 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育,24 h 内细胞达 80% ~90% 融合,用含 0.01% 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,FBS)的 DMEM 培养液孵育细胞 24 h,使细胞同步化。接种时分为 4 组:(1)正常对照组HUVECs 在培养液中孵育 24 h;(2)visfatin 组 HUVECs 在加入 1×10^{-5}mol/L visfatin 的培养液中以 2×10^5 mol/ml 浓度孵育 24 h;(3)HUVECs 在加入 1×10^{-5}mol/L visfatin 和 10 μmol/L Cur 的培养液中孵育 24 h;(4)HUVECs在加入 1×10^{-5}mol/L visfatin 和 20 μmol/L Cur 的培养中孵育 24 h。每组按实验要求分别重复 8 孔。各组细胞孵育 8 h 后,弃去培养液,加入 100 μl DMEM 培养液和含 0.5% 的 10 μl 培养液,37℃、5% CO_2 的培养箱内孵育 4 h 后,弃培养液,加入 100 μl DMSO 原液,振荡 10 min,待结晶完全溶解后拍照,酶标仪检测吸光度 A 值(λ = 492 nm),记录结果,实验重复 3 次。

1.4 ELISA 法检测单核细胞趋化因子和 E - 选择素

HUVECs 以 2×10^5 mol/ml 浓度接种于 24 孔培养板中,实验分组同上,将稀释好的包被抗体加入 ELISA 板,100 μl/孔,4℃放置 48 h。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 min。各组分别加待检样品 100 μl/孔,置 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h,然后洗涤。于各反应孔中,加入新鲜稀释的 HRP 羊抗鼠 IgG 二抗(经滴定后的稀释度)100 μl/孔,37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 0.5 ~ 1 h,洗涤。于各反应孔中加入临时配制的 3', 3', 5', 5', - 四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine,TMB)底物溶液 100 μl/孔,37℃下处理 10 ~ 30 min。在 ELISA 检测仪上,调至 450nm 处,以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,并绘制标准曲线,计算单核细胞趋化因子 -1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)及 E - 选择素(E-selectin)的含量。

1.5 Western blotting 测定 IRE1、GRP78 和 ICAM-1 蛋白表达

弃去培养液,使用预冷 PBS 轻轻漂洗一遍,随

即加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂以裂解细胞。收集各组细胞加入细胞裂解液提取总蛋白，并用Bradford法测定蛋白质浓度，补上样缓冲液使总体积为80 μl，再加100 μl溴酚蓝染液煮沸4 min。然后各取10 μl样品，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophresis，SDS-PAGE）进行分离，半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜，封闭，洗膜，加入1∶600稀释的抗ICAM-1、IRE1及GRP78的抗体，4℃过夜，用洗膜液漂洗后加入1∶5000稀释的二抗，摇床1 h，TBST（Tris-Buffer Solution Tween）冲洗3遍，每次5 min，加ECL荧光液显色，上机检测。用目标条带与内参条带（β-actin）积分吸光度值（integrated absorbance，IA）比值的百分率表示所检测蛋白的表达水平。

1.6 统计学处理

采用SPSS16.0统计软件对数据进行分析，计量资料中呈正态分布者用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各组比较前先进行方差齐性检验，组间比较采用Newmane Keuls检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT法检测HUVECs活力结果

MTT检测结果表明，与正常组相比，HUVECs单纯给予1×10^{-5} mol/L visfatin或给予1×10^{-5} mol/L visfatin与不同浓度的Cur联合处理24 h后，细胞活力没有明显变化。相比对照组和visfatin组，不同浓度Cur组（10、20 μmol/L）的HUVECs细胞活力未降低，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2 Cur对visfatin诱导的HUVECs MCP-1和E-selectin含量的影响

与正常对照组相比，HUVECs给予1×10^{-5} mol/L visfatin处理24 h后，HUVECs的MCP-1和E-selectin含量升高；而当给予10 μmol/L Cur和20 μmol/L Cur处理后，可显著降低HUVECs的MCP-1和E-selectin含量，差异有统计学意义（$P<0.05$；图1），提示Cur可抑制visfatin诱导的HUVECs的MCP-1和E-selectin含量的增加（图1）。

2.3 Cur对visfatin诱导的HUVECs ICAM-1、IRE1和GRP78表达的影响

与正常对照组相比，HUVECs给予visfatin处理24 h后，ICAM-1、IRE1和GRP78表达增加。而给予10 μmol/L和20 μmol/L Cur处理后，显著降低ICAM-1、IRE1和GRP78表达。提示Cur可通过减少ICAM-1、IRE1和GRP78的表达从而减轻visfatin诱导的HUVECs损伤（图2）。

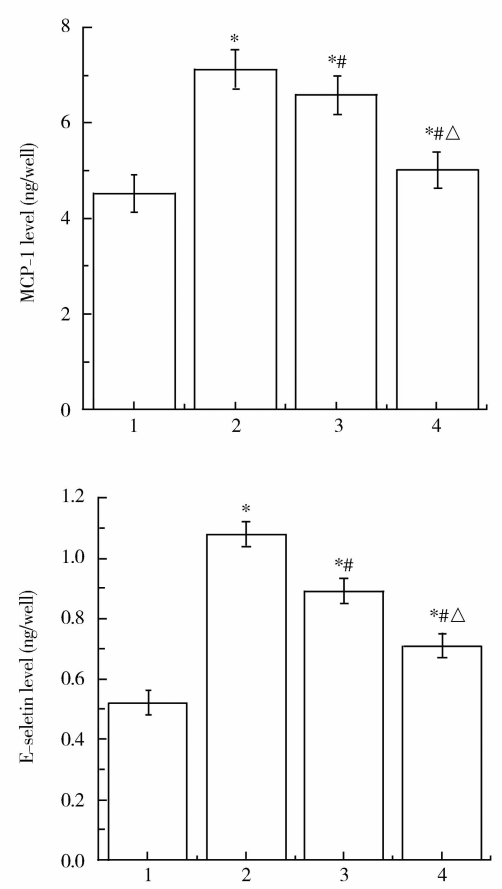


图1 Cur对visfatin诱导的HUVECs MCP-1和E-selectin含量的影响

Figure 1 Effect of Cur on MCP-1 and E-selectin production of the HUVECs induced by visfatin

1: Control group; 2: visfatin 1×10^{-5} mol/L group; 3: visfatin 1×10^{-5} mol/L + Cur 10 μmol/ml group; 4: visfatin 1×10^{-5} mol/L + Cur 20 μmol/ml group; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with visfatin group, $^{\#}P<0.05$; compared with Cur group, $^{\triangle}P<0.05$

3 讨 论

ERS及相应的未折叠蛋白反应（unfolded protein response，UPR）贯穿整个细胞周期。UPR主要通过以下3种感受蛋白发挥作用：蛋白激酶R样内质网激酶、活化转录因子-6和IRE1。UPR发生时，IRE1腔内结构域与GRP78解离，IRE1寡聚化引起自身磷酸化，从而激活许多与免疫、炎症和调亡相关的蛋白激酶。Hong等[7]发现IRE1α/c-Jun氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase，JNK）途径参与氧化低密度脂蛋白及其脂质氧化产物7-酮基胆固醇和4-羟基壬烯醛诱导的人微血管内皮细胞凋亡和动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）形成。β受体阻滞剂体内和体外研究表明，它可通过抑制ERS反

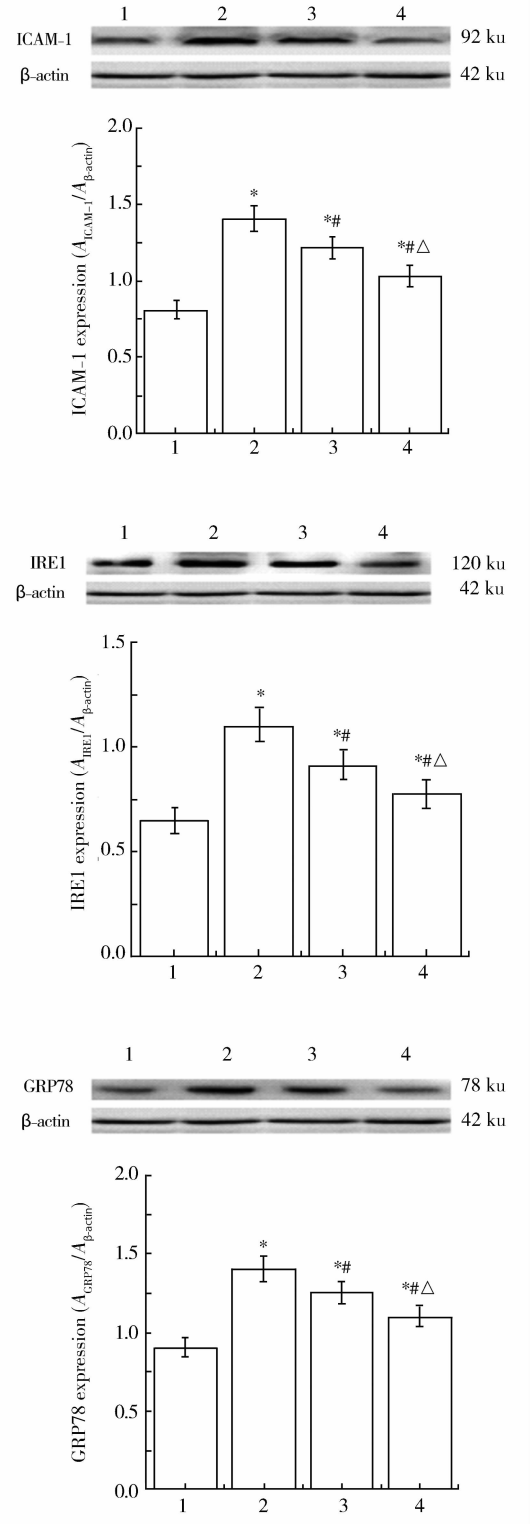


图 2 Cur 对 visfatin 诱导的 HUVECs ICAM-1、IRE1 和 GRP78 表达的影响

Figure 2 Effect of Cur on ICAM-1, IRE1 and GRP78 expression in the HUVECs induced by visfatin

1: control group; 2: visfatin 1×10^{-5} mol/L group; 3: visfatin 1×10^{-5} mol/L + Cur 10 μmol/mL group; 4: visfatin 1×10^{-5} mol/L + Cur 20 μmol/ml group. HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; IRE1: inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease-1; GRP78: glucose-regulated protein 78. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with visfatin group, $^{\#}P<0.05$; compared with Cur group, $^{\triangle}P<0.05$

应减轻细胞凋亡，并改善心肌肥大和心力衰竭问题[8]。体内外的研究发现，膜稳定剂（钠离子通道阻滞剂）亦能通过减轻 ERS 反应减少细胞凋亡，从而改善模型动物的心功能。Herzog 等[9]发现，氧化低密度脂蛋白可通过修饰抑制蛋白二硫键异构酶，进而诱导 ERS 反应，引发血管内皮细胞凋亡。兔 AS 模型研究表明，高浓度同型半胱氨酸可诱导产生 UPR，内皮细胞中 C/EBP 同源蛋白（C/EBP homologous protein）表达及内皮细胞凋亡与斑块大小呈正相关[10]。

具有前炎症作用的 visfatin 能促进 AS 进程[11]。体外研究表明：visfatin 通过增加细胞内的 ICAM-1、血管黏附分子－1（vascular adhesion molecule, VCAM-1）、E-selectin 及 IL-6 和 IL-8 的表达而诱使白细胞黏附于血管内皮细胞[12]。visfatin 可促进机体内活性氧（reactive oxygen species, ROS）生成，活化多种因子如成纤维细胞生长因子－2、基质金属蛋白酶－2 和 9 等[13]。Sahebkar 等[14]报道，在 AS 及急性心肌梗死的活动斑块破裂处 visfatin 含量明显增高，提示其可导致斑块失稳。在临床研究中，冠状动脉硬化综合征患者血清 visfatin 含量明显增高。我们前期研究发现内皮细胞的炎症损伤和 visfatin 呈浓度依赖性，当 visfatin 为 1×10^{-5} mol/L 时，损伤程度最高。

Cur 是从姜黄属中药块茎中提取出来的一种酚性色素，经济安全、副反应小且毒性低。目前已证实 Cur 具有如下功能：（1）具有酚及 β－二酮的化学结构，其酚性羟基可结合或清除自由基，从而发挥抗氧化特性；（2）可在机体内增加载脂蛋白 A 含量，通过促进高密度脂蛋白胆固醇代谢和降低载脂蛋白 B 含量，降低低密度脂蛋白胆固醇－C 的水平，从而达到降脂目的；（3）降低体内 C 反应蛋白、结合珠蛋白及 IL-1β 水平，提高一氧化氮水平，其可作为抑制剂拮抗花生四烯酸代谢中的环氧酶和脂氧酶，减少前列腺素 D_2、E_2、F_{2a} 及白三烯等促炎症因子的释放；（4）通过下调核转录因子－κB 活性，干扰蛋白激酶 C 信号传导，直接或间接抑制肿瘤细胞增殖。

本研究采用前期研究摸索出的 visfatin 的浓度作用于 HUVECs，建立实验组后，加入不同浓度 Cur，MTT 法结果表明细胞活力未见明显变化，差异无统计学意义，表明 Cur 对 HUVECs 生长活性无抑制和毒性作用。后期实验结果表明，与 visfatin 组相比，HUVECs 给予 10 μmol/L 和 20 μmol/L Cur 的处理后，MCP-1、E-selectin 等炎症指标含量下降，同时 Cur 可下调 ICAM-1、IRE1、GRP78 的表达，且浓度为

20 μmol/L 时作用最显著。分析其机制,可能为:(1)Cur分子中的2个苯丙烯酰基骨架、苯环上的酚羟基和甲氧基及丙烯基与β-双酮/烯醇式结构的连接有助于其发挥抗氧化应激作用,其中甲氧基的存在进一步增加其抗氧化活性[15];(2)Cur通过直接抑制微粒体的前列腺素 E_2 合酶-1阻断 PGE_2 的生物合成,在转录或翻译水平调节液态氧和环氧化酶2[16];(3)Cur具有抑制 MCP-1 激活单核细胞和巨噬细胞、释放溶菌酶、上调单核细胞和巨噬细胞黏附分子和 IL-1、IL-6 水平的作用;(4)Cur可通过过氧化物酶产生苯氧基团,协同氧化细胞内谷胱苷肽或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADH),通过摄入 O_2 形成 ROS[17]。

综上所述,ERS 可能参与 visfatin 诱导的 HUVECs炎症损伤过程,Cur 可抑制 visfatin 的作用,对内皮细胞具有保护功能,其机制可能与抑制 ERS 相关。本研究为我们将来更好地研究 Cur 的作用效果和 ERS 在血管内皮损伤中的机制提供初步依据,但它们之间是否涉及其他信号传导通路尚需进一步研究。

【参考文献】

[1] Marí M, Morales A, Colell A, *et al*. Mitochondrial cholesterol accumulation in alcoholic liver disease: role of ASMase and endoplasmic reticulum stress[J]. Redox Biol, 2014, 3: 100-108. DOI: 10.1016/j.redox.2014.09.005.

[2] Wang G, Liu K, Li Y, *et al*. Endoplasmic reticulum stress mediates the anti-inflammatory effect of ethyl pyruvate in endothelial cells[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113983. DOI: 10.1371/journal.pone.0113983.

[3] Fu Z, Guo J, Jing L, *et al*. Enhanced toxicity and ROS generation by doxorubicin in primary cultures cardiomyocytes from neonatal metallothionein-Ⅰ/Ⅱ null mice[J]. Toxicol *in Vitro*, 2010, 24(6): 1584-1591. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.06.009.

[4] Ceylan-Isik AF, Dong M, Zhang Y, *et al*. Cardiomyocyte-specific deletion of endothelin receptor A rescues aging-associated cardiac hypertrophy and contractile dysfunction: role of autophagy[J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(2): 335. DOI: 10.1007/s00395-013-0335-3.

[5] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, *et al*. visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin[J]. Science, 2005, 307(5708): 426-430. DOI: 10.1126/science.1097243.

[6] 何晓乐, 刘 军, 张航向, 等. TLR4/NF-κB 信号转导通路介导吡格列酮在内脂素诱导内皮细胞炎症损伤过程中作用机制的探讨[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2015, 14(4): 301-306. DOI: 10.i1915/j.issn.1671-5403.2015.04.06.
He XJ, Liu J, Zhang HX, *et al*. TLR4/NF-κB signal pathway mediates pioglitazone protecting human vascular endothelial cells against visfatin-induced injury[J]. Chin J Mult Organ Dis Elerly, 2015, 14(4): 301-306. DOI: 10.i1915/j.issn.1671-5403.2015.04.06.

[7] Hong S, Gu Y, Gao Z, *et al*. EGFR inhibitor-driven endoplasmic reticulum stress-mediated injury on intestinal epithelial cells[J]. Life Sci, 2014, 119(1-2): 28-33. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.10.008.

[8] Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, *et al*. Tracking the inflammatory response in stroke *in vivo* by sensing the enzyme myeloperoxidase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(47): 18584-18589. DOI: 10.1073/pnas.0803945105.

[9] Herzog DP, Dohle E, Bischoff I, *et al*. Cell communication in a coculture system consisting of outgrowth endothelial cells and primary osteoblasts[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 320123. DOI: 10.1155/2014/320123.

[10] Lu H, Lu L, Xu ZC, *et al*. Tauroursodeoxycholic acid and 4-phenyl butyric acid alleviate endoplasmic reticulum stress and improve prognosis of donation after cardiac death liver transplantation in rats[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13(6): 586-593. DOI: 10.1016/S1499-3872(14)60269-1.

[11] Bułdak RJ, Bułdak Ł, Polaniak R, *et al*. Visfatin affects redox adaptative responses and proliferation in Me45 human malignant melanoma cells: an *in vitro* study[J]. Oncol Rep, 2013, 29(2): 771-778. DOI: 10.3892/or.2012.2175.

[12] Hognogi LD, Simiti LV. The cardiovascular impact of visfatin — an inflammation predictor biomarker in metabolic syndrome[J]. Clujul Med, 2016, 89(3): 322-326. DOI: 10.15386/cjmed-591.

[13] Chełchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, *et al*. Cord blood adiponectin and visfatin concentrations in relation to oxidative stress markers in neonates exposed and nonexposed in utero to tobacco smoke[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4569108. DOI: 10.1155/2016/4569108.

[14] Sahebkar A, Giorgini P, Ludovici V, *et al*. Impact of statin therapy on plasma resistin and visfatin concentrations: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials[J]. Pharmacol Res, 2016, 111: 827-837. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.07.031.

[15] Lewis JD, Ferrara A, Peng T, *et al*. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with Cur: interim report of a longitudinal cohort study[J]. Diabetes Care, 2011, 34(4): 916-922. DOI: 10.2337/dc10-1068.

[16] Sato K, Awasaki Y, Kandori H, *et al*. Suppressive effects of acid-forming diet against the tumorigenic potential of Cur hydrochloride in the urinary bladder of male rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 251(13): 234-244. DOI: 10.1016/j.taap.2011.01.006.

[17] Yang X, Chan JC. Comment: analyses using time-dependent pioglitazone usage in Cox models may lead to wrong conclusions about its association with cancer[J]. Diabetes Care, 2011, 34(8): 136-137. DOI: 10.2337/dc11-0627.

(编辑:王彩霞)