

丹参水溶性成分拮抗脂多糖诱导 HTR8/SVneo 滋养层细胞凋亡的作用机制

康宁¹, 张清燕^{1,2*}, 刘真^{1,2}, 岳静宇^{1,2}, 桑锋^{1,2}, 李强^{1,2*}(1.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 2.河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室, 郑州 450000)

摘要: 目的 探讨丹参水溶性成分拮抗脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 HTR8/SVneo 细胞凋亡的相关作用机制。方法 以不同浓度(0, 100, 200, 400, 800, 1 600 ng·mL⁻¹)LPS 处理 HTR8/SVneo 细胞, 采用实时定量聚合酶链式反应验证 HTR8/SVneo 细胞炎症模型的建立; 细胞活力检测试剂盒检测各组细胞活力; 划痕试验评估各组细胞向损伤区域迁移能力; 流式细胞术检测各组细胞凋亡率并分析各组细胞线粒体膜电位。结果 200 ng·mL⁻¹ LPS 干预后 HTR8/SVneo 细胞的 NLRP3 炎症小体指标及炎症因子表达量增高($P<0.05$)。与 LPS 组相比, 丹酚酸 B(0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、丹酚酸 C(0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、紫草酸(0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预后 HTR8/SVneo 细胞活性明显升高($P<0.01$)。与 LPS 组比较, 丹参水溶物质组凋亡率显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 线粒体膜电位水平显著升高。结论 丹参水溶物质能够提高 LPS 干预后 HTR8/SVneo 细胞活力, 改善细胞迁移能力, 提高细胞线粒体膜电位, 进而抑制细胞凋亡。

关键词: 脂多糖; HTR8/SVneo; 丹酚酸 B; 丹酚酸 C; 紫草酸; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)11-1454-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230084

引用本文: 康宁, 张清燕, 刘真, 等. 丹参水溶性成分拮抗脂多糖诱导 HTR8/SVneo 滋养层细胞凋亡的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1454-1460.

Mechanism of Antagonistic Action of Soluble Components of *Salvia Miltiorrhiza* on Apoptosis of HTR8/SVneo Induced by Lipopolysaccharide

KANG Ning¹, ZHANG Qingyan^{1,2*}, LIU Zhen^{1,2}, YUE Jingyu^{1,2}, SANG Feng^{1,2}, LI Qiang^{1,2*}(1.The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2.Henan Key Laboratory of Viral Diseases Prevention and Treatment of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the anti-apoptosis mechanism of *Salvia miltiorrhiza* soluble substances on HTR8/SVneo induced by lipopolysaccharide(LPS). **METHODS** HTR8/SVneo cells were treated with LPS of different concentrations(0, 100, 200, 400, 800, 1 600 ng·mL⁻¹), and Real-time quantitative PCR was used to verify the establishment of HTR8/SVneo cell inflammation model. Cell viability in each group was detected by cell counting Kit-8. Cells migration ability to the injured area was evaluated by scratch test. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate in each group and analyze mitochondrial membrane potential. **RESULTS** After 200 ng·mL⁻¹ LPS intervention, the transcriptional level of NLRP3 inflammasome and inflammatory cytokines in HTR8/SVneo cells were increased($P<0.05$). Compared with LPS group, the activity of HTR8/SVneo was significantly increased after the intervention of salvianolic acid B(0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), salvianolic acid C(0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and lithospermic acid(0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)($P<0.01$). Compared with LPS group, the apoptosis rate of *Salvia miltiorrhiza* soluble substance intervention group was significantly decreased($P<0.05$ or $P<0.01$), the level of mitochondrial membrane potential was significantly increased. **CONCLUSION** *Salvia miltiorrhiza* soluble substance can enhance the cell viability of HTR8/SVneo induced by LPS, improve cell migration ability, enhance mitochondrial membrane potential, and then inhibit cell apoptosis.

KEYWORDS: lipopolysaccharide; HTR8/SVneo; salvianolic acid B; salvianolic acid C; lithospermic acid; apoptosis

滋养层细胞是在胚胎发育为桑椹胚后分化的沿透明带内壁扩展和排列个体较小细胞。滋养层细胞依据其部位、功能及表型可分为合体滋养细

胞(绒毛合体滋养层细胞)和细胞滋养细胞(绒毛细胞滋养层细胞、绒毛外细胞滋养层细胞), 其增殖/凋亡平衡、侵袭能力在胚胎种植、胎盘发育、维

基金项目: 国家自然科学基金项目(82004207); 河南省中医药科学研究专项课题(2022ZY1011, 2022ZY2012); 河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(2022JDZX019)

作者简介: 康宁, 女, 硕士, 副主任医师 E-mail: strongmzkn@163.com *通信作者: 李强, 男, 硕士, 主任药师 E-mail: hnaidstcmkl@163.com 张清燕, 女, 博士, 主管技师 E-mail: hnaiszqy@163.com

持胎儿宫内营养中发挥至关重要作用^[1]。高糖^[2]、低氧^[3]、细菌感染^[4]等因素均能造成滋养层细胞损伤,导致胎盘生长发育受限、先兆子痫、自然流产等病理妊娠的发生。其中,细菌感染将会导致滋养层细胞凋亡引起病理学妊娠,其主要机制为细胞膜表面内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)靶向滋养层细胞表面 Toll 样受体 4(Toll-like receptors 4, TLR4)进而调控胞内信号通路引起靶细胞凋亡^[5]。因此,以 LPS 诱导的滋养层细胞凋亡为入手点展开体外研究对子痫前期、自然流产等病理妊娠临床防治具有研究价值。

丹参的化学成分主要包含二萜醌类的脂溶性成分及多种结构的水溶性成分(如酚酸类、黄酮类及甾体类化合物)^[6],主要具有抗肿瘤、抗凋亡、抗血栓、抗氧化、抗炎等作用^[7]。丹酚酸、紫草酸等水溶性物质在丹参中具有含量高、活性强、稳定性强等特点,故成为基础功能及临床应用的研究热点。其中,丹酚酸 B 通过抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗细胞凋亡、抗抑郁等对心血管、脑、肝、皮肤等器官起到保护作用^[8]。丹酚酸 C 通过抗氧化损伤保护神经细胞^[9]及抑制脊髓星形胶质细胞活化减轻大鼠骨癌痛^[10]。紫草酸通过 PI3K/AKT、notch/PARP-1 等通路抑制病理条件下多种细胞凋亡^[11-12]。前期笔者所在团队的网络药理学及分子对接研究显示,丹酚酸 B、丹酚酸 C 及紫草酸等丹参水溶性物质可通过靶向 TP53、AKT1、IL-10 等蛋白调控细胞凋亡^[13]。然而,丹参水溶性物质对 LPS 所诱导滋养层细胞凋亡的影响及作用机制仍需进一步实验验证。本研究探讨丹参水溶性成分调控 LPS 诱导滋养层细胞凋亡的作用机制,为丹参临床治疗先兆流产及习惯性流产提供实验理论依据。

1 仪器与试剂

3111CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SW-CJ-2FD 生物洁净工作台(苏州安泰空气科技有限公司); Nano Vue Plus 微量核酸蛋白测定仪(美国 Biochrom 公司); LightCycler 96 全自动实时荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 科技有限公司); Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

HTR8/Svneo 细胞系购自美国典型微生物菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。丹酚酸 B(批号: T001-10027358/T2727)、丹酚酸 C(批号: T001-10027364/T3149)、紫草酸(批

号: T001-10015324/T3683)均为色谱纯,均购自上海陶素生化(中国)科技有限公司,纯度分别为 99.20%, 98.69%, 98.87%; RPMI 1640 培养基(批号: 31800)、胰蛋白酶(批号: T1300)均购自北京索莱宝科技有限公司; LPS(批号: 297-473-0)、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(批号: BB05071707)、线粒体膜电位 JC-1 检测试剂盒(批号: BB05253082)均购自北京博奥森生物科技有限公司; Cell Counting Kit-8(CCK8)试剂盒(批号: K101821133EF5E)购自维百奥(北京)生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒(批号: 017E2220CA)、cDNA 反转录试剂盒(批号: 7E581K1)、SYBP qPCR Master Mix(批号: 7E492L0)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养方法

HTR8/SVneo 细胞培养于含有 100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 mg·mL⁻¹ 链霉素及 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 的培养基中,将其放置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。HTR8/SVneo 细胞的汇合度到达 80% 时进行细胞传代。

2.2 HTR8/SVneo 细胞炎症模型的建立及验证

取对数生长期 HTR8/SVneo 细胞,按 5×10⁴·mL⁻¹ 的细胞密度接种于 24 孔培养板,37 °C、5% CO₂ 孵育培养 24 h,加入 LPS 继续培养 24 h,其终浓度梯度设置为 0, 100, 200, 400, 800, 1 600 ng·mL⁻¹,建立 HTR8/SVneo 细胞炎症模型。胰蛋白酶消化并收集 HTR8/SVneo 细胞,使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,并按照 cDNA 反转录试剂盒说明书将 0.6 μg RNA 逆转录获得 cDNA。以炎症小体关键基因及促炎细胞因子为炎症模型建立检测指标,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内部参照,进行实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)验证 HTR8/SVneo 细胞炎症模型的建立。检测指标的引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并且合成,具体信息见表 1。RT-qPCR 采用反应条件:95 °C 5 min 预变性,95 °C 10 s,60 °C 30 s,45 个循环。反应结束后分析相关指标溶解曲线,利用 2^{-ΔΔCT} 方法计算指标基因相对表达量的倍数变化。

2.3 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞活力的影响

取对数生长期的 HTR8/SVneo 细胞,以体积

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequence of primers

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>NLRP3</i>	CCACAAGATCGTGAGAA AACC	CGGTCTATGTGCTCGT CA
<i>caspase-1</i>	TTTCCGCAAGGTTTCGATT TTCA	GGCATCTGCGCTCTACCA TC
<i>GSDME</i>	CCCAGGATGGACCATTAA GTG	GGTCCAGGACCATGAGT AGT
<i>IL-1β</i>	TTCGACACATGGGATAAC GAG	TTTTTGTGTGAGTCCCG GAG
<i>IL-18</i>	TCTTCATTGACCAAGGAA ATC	TCCGGGGTGCATTATCTC TAC
<i>GAPDH</i>	CGTGGAAAGGACTCATGAC CA	GCGGCAGGGATGATGTCTG CA

100 μL 、 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育培养 24 h 后加入终浓度为 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 建立 HTR8/SVneo 细胞炎症模型。每孔分别加入 10 μL 浓度为 0.000 64, 0.003 2, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丹酚酸 B、丹酚酸 C 及紫草酸。以加入同等体积的培养基作为空白组, 以 LPS 处理 HTR8/SVneo 细胞作为对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育培养 48 h 后每孔加入 10 μL CCK8 试剂, 继续培养 2 h。使用多功能酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值(A_{450}), 计算 HTR8/SVneo 细胞活性。细胞活性 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

2.4 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞迁移能力的影响

在 6 孔培养板中, 使用终浓度 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 建立 HTR8/SVneo 细胞炎症模型成功后行划痕试验。用 10 μL 枪头垂直于单层 HTR8/SVneo 炎症模型细胞直线划线, 用 PBS 轻柔清洗 3 遍。然后加入 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丹酚酸 B、丹酚酸 C 及紫草酸及同等体积完全培养基, 倒置显微镜下观察并记录 0, 24 h 划痕区域的细胞生长情况, 使用 Image J 软件分析细胞划痕面积并计算其划痕愈合率。愈合率 = $1 - (24 \text{ h 划痕面积} / 0 \text{ h 划痕面积}) \times 100\%$ 。

2.5 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞凋亡的影响

在 6 孔培养板中, 使用终浓度 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 建立 HTR8/SVneo 细胞炎症模型。加入终浓度 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丹酚酸 B、丹酚酸 C 及紫草酸及对照组完全培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育培养 24 h。胰蛋白酶消化并收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 使用 500 μL Annexin V Binding Solution 重悬细胞, 加入 10 μL 等量的 Annexin V-FITC 和 PI Solution 的混合液, 避光室温孵育 20 min, 使

用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型线粒体膜电位的影响

将终浓度 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸及对照组完全培养基加入 LPS 诱导的 HTR8/SVneo 细胞炎症模型中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育培养 24 h 后收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 弃上清, 500 μL JC-1 染色工作液重悬细胞, 避光室温孵育 20 min。使用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位。

2.7 统计学分析

数据资料使用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 其结果数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间统计分析采用 t 检验, 多组统计分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 LPS 诱导 HTR8/SVneo 细胞炎症模型及模型验证

与 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 组相比, 加入 LPS 后 HTR8/SVneo 细胞的 NLRP3 炎症小体指标及炎症因子指标表达量增高, 且具有一定的剂量依赖性, 见图 1。与 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 组相比, 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 模型建立组 caspase1 及 IL-18 的转录水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 NLRP3、GSDME 及 IL-1 β 转录水平升高存在极显著差异, 有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 组相比, 400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 模型建立组 NLRP3、GSDME、IL-1 β 及 IL-18 的转录水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 组相比, 800 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 模型建立组 GSDME、IL-1 β 、IL-18 转录水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 组相比, 1 600 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 模型建立组 NLRP3 转录水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而其余指标升高为极显著性差异, 有统计学意义 ($P < 0.01$)。综上, 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 干预下即可使 IL-1 β 和 IL-18 表达存在显著差异, 符合 HTR8/SVneo 细胞炎症模型的建立标准, 因此选定 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为模型建立的干预浓度。

3.2 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞活力的影响

丹酚酸 B 干预 HTR8/SVneo 炎症模型 CCK8 结果显示, 与 LPS 组(模型组)相比, 丹酚酸 B 干预后 HTR8/SVneo 细胞活性明显升高, 且存在剂

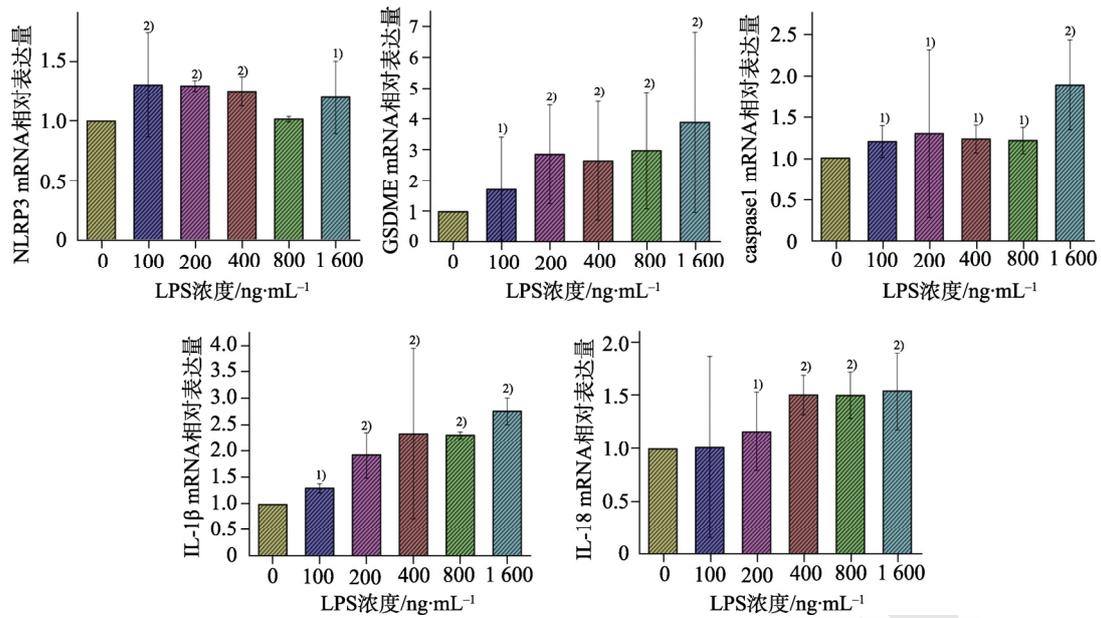


图1 LPS 诱导 HTR8/SVneo 细胞 NLRP3 炎症小体及下游炎症因子的表达情况
与 0 ng·mL⁻¹ LPS 组相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Fig. 1 Expression of NLRP3 inflammasome and downstream inflammatory cytokines induced by LPS in HTR8/SVneo cells
Compared with 0 ng·mL⁻¹ LPS group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

量依赖性。与模型组相比, 0.08, 0.4, 2, 10 μmol·L⁻¹ 丹酚酸 B 干预组细胞活性显著增加, 差异具有统计学意义(P<0.01)。丹酚酸 C 的细胞活性结果表明, 与模型组相比, 0.4, 2 μmol·L⁻¹ 丹酚酸 C 干预组细胞活性升高存在极显著性差异, 具有统计学意义(P<0.01)。与模型组相比, 0.08 μmol·L⁻¹ 紫草酸干预组可显著提高 HTR8/SVneo 细胞活性, 差异具有统计学意义(P<0.05)。与模型组相比, 0.4, 2, 10 μmol·L⁻¹ 紫草酸干预组的细胞活性存在极显著性差异, 具有统计学意义(P<0.01)。结果见图 2。

3.3 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞迁移能力的影响

与空白组比较, LPS 组迁移能力下降, 迁移率

显著降低(0.858±0.061 vs 0.710±0.113)(P<0.05); 与 LPS 组比较, 丹酚酸 B 组迁移能力提高, 迁移率显著上升(0.710±0.113 vs 0.907±0.072) (P<0.01); 同时, 与 LPS 组比较, 丹酚酸 C 组迁移能力改善, 迁移率显著上升(0.710±0.113 vs 0.912±0.083) (P<0.01); 最后, 与 LPS 组比较, 紫草酸组迁移能力显著提高, 迁移率显著升高(0.710±0.113 vs 0.950±0.034)(P<0.01)。结果见图 3。

3.4 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞凋亡的影响

与空白组比较, LPS 组凋亡率显著上升, 差异具有统计学意义(P<0.05)。与 LPS 组比较, 丹酚酸 B 组凋亡率显著降低, 差异具有统计学意义

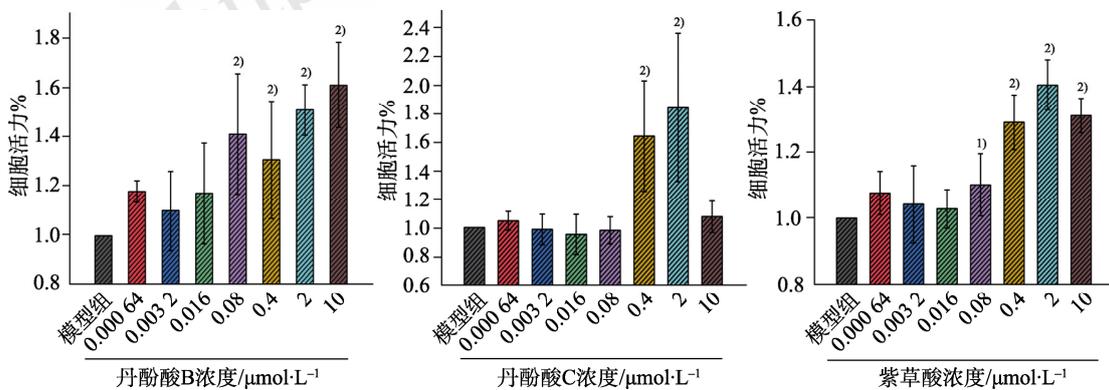


图2 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞活性的影响
与 LPS 组(模型组)相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Fig. 2 Effect of soluble components of *Salvia miltiorrhiza* on the activity of HTR8/SVneo inflammatory model cells
Compared with LPS group(model group), ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

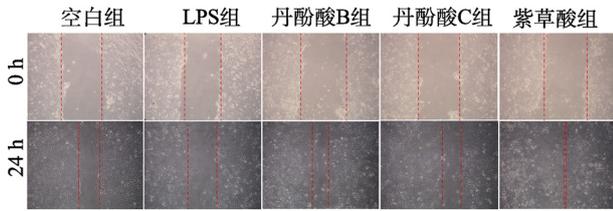


图3 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞迁徙能力的影响(40×)

Fig. 3 Effect of soluble composition of *Salvia miltiorrhiza* on migration ability of HTR8/SVneo inflammatory model cells(40×)

($P < 0.05$); 同时, 与 LPS 组比较, 丹酚酸 C 组凋亡率降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 最后, 与 LPS 组比较, 紫草酸组的凋亡率显著下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图 4。

3.5 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞线粒体膜电位的影响

与空白组比较, LPS 组线粒体膜电位显著下降(318 vs. 215)。与 LPS 组相比, 丹酚酸 B 组线粒体膜电位升高(215 vs. 359); 同时, 与 LPS 组比较, 丹酚酸 C 组线粒体膜电位提高(215 vs. 353); 最后, 与 LPS 组比较, 紫草酸组线粒体膜电位上升(215 vs. 442)。结果见图 5。

4 讨论

滋养层细胞是妊娠的关键功能细胞, 其侵袭、内分泌及形成胎盘屏障等功能在胎盘形成及胚胎

发育等过程中至关重要^[14]。妊娠期间高糖、间歇性缺氧等环境导致滋养层细胞凋亡^[15], 打破滋养层细胞增殖/凋亡动态平衡, 导致合体滋养层细胞母胎物质交换、内分泌功能紊乱, 破坏母胎界面免疫耐受, 导致先兆子痫、复发性流产等^[16-17]。临床研究发现, 妊娠早期流产与滋养层细胞异常凋亡相关, 且反复性流产患者的滋养层细胞大量凋亡^[18-19]。故滋养层细胞异常凋亡的临床药物研发至关重要。

丹参的抗氧化、抗炎、改善微循环等功能促使其在临床治疗中得到广泛应用^[20-21]。其中, 丹参对妇产科多种疾病具有良好的临床疗效, 主要涉及妊娠高血压综合征、流产、输卵管妊娠等多种妊娠疾病。而丹参治疗妊娠疾病的相关机制与调控滋养层细胞凋亡密不可分。临床研究表明, 丹参注射液可显著降低重度子痫前期患者胎盘滋养细胞的凋亡率^[22]。体外实验显示, 隐丹参酮作为丹参的主要成分能够诱导绒毛滋养层细胞的凋亡、抑制 hCG 的合成及分泌进而治疗输卵管妊娠^[23]。综上, 探索丹参水溶性成分对滋养层细胞凋亡的影响具有重要意义。

滋养层细胞凋亡的诱因较多, 如细胞因子释放异常、免疫功能紊乱、不明原因导致绒毛炎症等^[24]。而不明原因炎症为细胞凋亡的主要诱因,

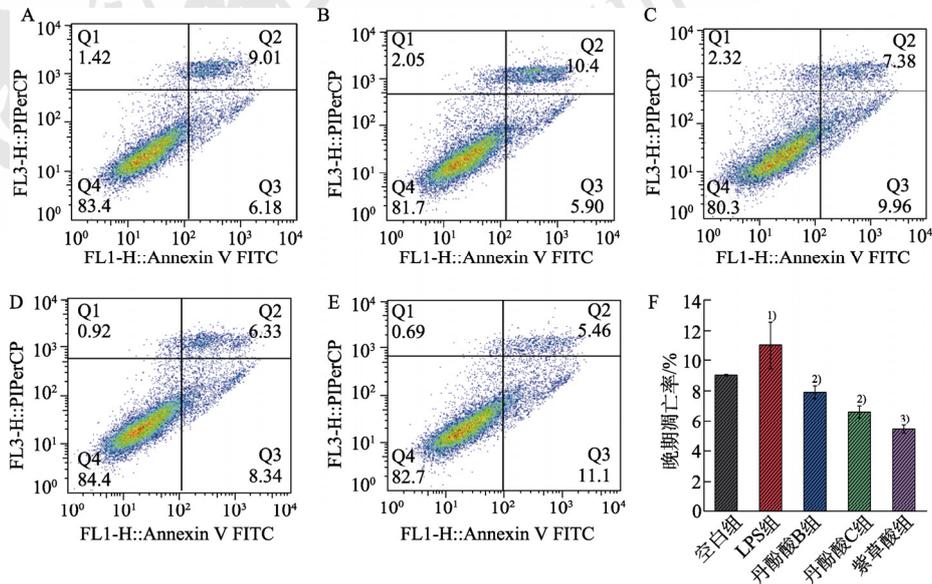


图4 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞凋亡的影响

A-空白组; B-LPS 组; C-丹酚酸 B 组; D-丹酚酸 C 组; E-紫草酸组; F-HTR8/SVneo 炎症模型细胞晚期凋亡率; 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Effects of soluble components of *Salvia Miltiorrhiza* on apoptosis of HTR8/SVneo inflammatory model

A-blank group; B-LPS group; C-salvianolic acid B group; D-salvianolic acid C group; E-lithospermic acid group; F-late apoptosis rate of HTR8/SVneo inflammatory model cells. Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

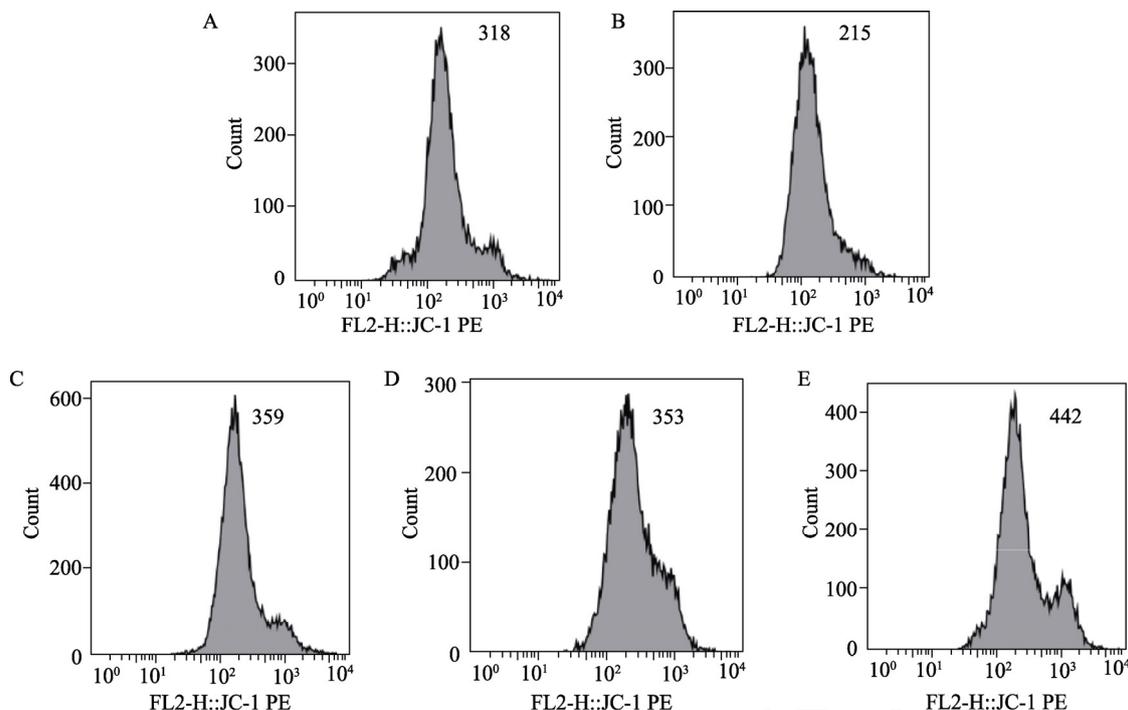


图5 丹参水溶性成分对 HTR8/SVneo 炎症模型细胞线粒体膜电位的影响

A-空白组; B-LPS 组; C-丹酚酸 B 组; D-丹酚酸 C 组; E-紫草酸组。

Fig. 5 Effects of soluble components of *Salvia Miltiorrhiza* on mitochondrial membrane potential of HTR8/SVneo inflammatory model

A-blank group; B-LPS group; C-salvianolic acid B group; D-salvianolic acid C group; E-lithospermic acid group.

其体外研究多以 LPS 诱导滋养层细胞炎症模型。炎症反应是由 NLRP3 炎症小体、IL-18 及 IL-1 β 参与的复杂过程。NLRP3 炎症小体即可激活 IL-18 前体及 IL-1 β 前体的转录,能够调控 GSDME 蛋白剪切及 Caspase-1 的招募,进而诱导细胞凋亡。本研究结果显示,不同浓度 LPS 干预 HTR8/SVneo 细胞后,NLRP3、GSDME、caspase-1、IL-18、IL-1 β 表达量显著升高。炎症相关基因转录水平升高可能导致 HTR8/SVneo 细胞凋亡水平增高。

滋养层细胞炎症状态下,大量释放炎症介质严重影响细胞活力、增殖、迁移及凋亡。滋养层细胞的活力与增殖能力与胚胎坐床、子宫内膜侵袭、胎儿发育密不可分。滋养层细胞活力较低影响胎盘营养供给、防御、激素合成以及免疫等功能,进而导致胎儿发育不良、畸形等^[25]。绒毛滋养层细胞的侵袭迁移能力是妊娠过程至关重要的功能。细胞微环境是迁移能力的关键调控因素,大量释放炎症因子(如 IL-6、IFN、CSF-1 等)破坏细胞迁移能力,影响滋养层细胞分化^[26]、血管重塑、胎盘发育^[1]、免疫活化^[27]等。本研究结果表明,LPS 干预后,HTR8/SVneo 细胞的细胞活力降低,

迁移能力下降、凋亡率增加、线粒体膜电位降低。丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸干预后 HTR8/SVneo 细胞活力上升,并且存在一定的剂量关系,其中以丹酚酸 C 提高细胞活力能力更强,相应地,丹参水溶成分明显提高细胞的迁徙能力。丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸干预后 HTR8/SVneo 滋养层细胞凋亡率降低,同时细胞线粒体膜电位增加。本研究首次证实丹参水溶性物质可有效缓解绒毛滋养层细胞凋亡,但其相关分子机制仍需进一步验证,丹参水溶物质有效成分的协同作用亦需进一步研究。

综上所述,复发性流产等妊娠期疾病常用丹参注射液进行治疗。前期本团队网络药理学及分子对接研究显示,丹酚酸 B、丹酚酸 C 及紫草酸等丹参水溶性物质可通过靶向关键蛋白调控细胞凋亡。本研究从体外细胞实验研究的角度出发,通过 LPS 干预建立 HTR8/SVneo 细胞炎症模型。在此基础上深入研究丹参水溶性物质(丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸)对 HTR8/SVneo 滋养层细胞的影响,研究表明丹参水溶性物质丹酚酸 B、丹酚酸 C 及紫草酸在较低浓度时即可改善滋养层细胞的病理状态,此结果与已发表的丹参等活血化淤药

物的临床疗效相符^[28], 可为丹参干预复发性流产等妊娠疾病的分子机制研究提供实验基础, 同时为推广丹参临床应用提供理论依据。

REFERENCES

- [1] 郑婉珊, 胡晓倩, 王雁玲, 等. 胎盘屏障建立与维持的机制[J]. 生理学报, 2020, 72(1): 115-124.
- [2] LI Q, XIE Y Y. Effects of IGF-II methylation on apoptosis of trophoblast cells induced by high glucose and PI3K/Akt pathway[J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2020, 55(5): 665-670.
- [3] YUAN S, ZHANG J Q, WANG X Y, et al. Effects of Huayu Xiaozheng Granules on proliferation, adhesion and autophagy of trophoblast cells under hypoxia[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2021, 62(19): 1715-1719, 1731.
- [4] WU M J, DONG Q L, LU X X, et al. Placenta-specific virulence factors involved in *Listeria monocytogenes* infection[J]. Chin J Biotechnol(生物工程学报), 2022, 38(6): 2139-2152.
- [5] NU ER BI YE·Dilxiati, ZU LI FEI YA·Abulikemu, RE MI LA·Aierken. miR-146 regulates TLR2 pathway to antagonize lipopolysaccharide induced trophoblast injury and its mechanism[J]. Chin J Birth Health Hered(中国优生与遗传杂志), 2021, 29(8): 1060-1065.
- [6] WANG M M, JI L F, CUI S N. Advances in basic research on the efficacy of *Salvia miltiorrhiza*[J]. Acta Chin Med(中医学报), 2019, 34(5): 944-949.
- [7] SHAN X X, HONG B Z, LIU J, et al. Review of chemical composition, pharmacological effects, and clinical application of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and prediction of its Q-markers[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(21): 5496-5511.
- [8] WEI X Y, YANG T, LIU H R, et al. Research progress on pharmacological effects of salvianolic acid B[J]. J Pharm Res(药学研究), 2021, 40(11): 748-752.
- [9] SONG J K, ZHANG W, ZHANG X, et al. Effects of salvianolic acid D on mitochondrial function and biosynthesis in SH-SY₅Y cells after MPP⁺ injury[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2018, 34(9): 1211-1218.
- [10] LIU K, XIE G L. Analgesic effect of salvianolic acid C on bone cancer pain in rats: The role of spinal astrocytes and inflammatory responses[J]. Chin J Anesthesiol(中华麻醉学杂志), 2019, 39(12): 1476-1479.
- [11] LI W Y, ZHOU Y L, LI T, et al. Pretreatment with lithospermic acid attenuates oxidative stress-induced apoptosis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells via anti-oxidation and activation of PI3K/Akt pathway[J]. Digit Chin Med(数字中医药: 英文), 2019(1): 29-40.
- [12] JING P J, ZHU D M. Influence of lithospermic acid on human retinal vascular endothelial cells apoptosis induced by high glucose and Notch1 and PARP-1 expression levels[J]. J Trop Med(热带医学杂志), 2018, 18(6): 733-737, 840.
- [13] KANG N, DUAN C C, ZHANG Q Y, et al. Exploring potential mechanism of *Radix Salviae Miltiorrhizae* in treatment of habitual abortion based on network pharmacology and molecular docking[J]. Acta Chin Med(中医学报), 2022, 37(8): 1711-1718.
- [14] HUANG J, MA H Y. Function of placental trophoblast cells[J]. J Southeast Univ Med Sci Ed(东南大学学报: 医学版), 2015, 34(2): 304-308.
- [15] LIAO (Q /X), CHEN W, YU X M, et al. Intermittent hypoxia induces apoptosis of trophoblast cells through endoplasmic reticulum pathway[J]. Sichuan Med J(四川医学), 2022, 43(8): 751-756.
- [16] JIN Y Y, LI M D, LIU Y, et al. Research progress of apoptosis and recurrent abortion mediated by p53 gene[J]. J Dev Med Electron Version(发育医学电子杂志), 2022, 10(4): 315-320.
- [17] XIAO Q, ZENG F L, TANG G Y, et al. Expression of galectin-3 and apoptosis in placental villi from patients with missed abortion during early pregnancy[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(4): 2623-2631.
- [18] IM D H, KIM Y N, CHO H J, et al. Placental pathologic changes associated with fetal growth restriction and consequent neonatal outcomes[J]. Fetal Pediatr Pathol, 2021, 40(5): 430-441.
- [19] SUN D D, WU H B, PING Z P, et al. PLAC1 regulates the occurrence of fetal growth restriction by inhibiting the apoptosis of trophoblast cells[J]. Ann Clin Lab Sci, 2021, 51(2): 182-189.
- [20] XU H L, WANG T F, ZHANG C. Research advances in pharmacological mechanism and application of Danshensu and its derivatives[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(2): 237-243.
- [21] WU Y Y, SUN Y, WANG Y. The diversified pharmacological functions of salvianolate in promoting blood circulation to resolve stasis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(11): 975-979.
- [22] HOU Y Q, LIU Z Y, CHEN M. Effect of compound Danshen injection on apoptosis of placental trophoblast in patients with severe preeclampsia[J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急救), 2012, 21(3): 405-406.
- [23] SUN J H, ZHANG Y X, LI L F, et al. Effects of cryptotanshinone on proliferation, apoptosis, invasion, migration and hCG expression in HTR-8/SVneo cells[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2019, 34(5): 2107-2111.
- [24] ZHANG L Z, MI Y Y. Cell apoptosis in placenta and spontaneous abortion[J]. Med Recap(医学综述), 2007, 13(3): 166-168.
- [25] GUO J, WANG Y F, ZHANG M Z, et al. Effects of Liuwei Dihuang glycosides on proliferation and invasion of placental trophoblast cells induced by high glucose and the mechanism of ERK/MMP-9 signaling pathway[J]. New Chin Med(新中医), 2021, 53(17): 6-11.
- [26] WANG H M, DU M R. Human placental trophoblast differentiation and related diseases[J]. Chin Bull Life Sci(生命科学), 2017, 29(1): 15-20.
- [27] MA J, SA R N, YU L. Research progress on invasion behavior of placental trophoblast cells and MMP-2 and MMP-9[J]. J Med Res(医学研究杂志), 2021, 50(12): 152-155.
- [28] CHEN X L. Clinical analysis of Danshen combined with low molecular weight heparin in the treatment of recurrent abortion[J]. Clin Res(临床研究), 2021, 29(7): 124-126.

收稿日期: 2023-01-12
(本文责编: 陈怡心)