

丹参酮 IIA 磺酸钠不同给药时段对其内皮保护作用的影响

朱益¹, 尹超云^{2a}, 张进^{2b}, 陶政^{2a*} (1.镇江市第一人民医院检验科, 江苏 镇江 212000; 2.江苏大学附属医院, a.血管外科, b.普外科, 江苏 镇江 212000)

摘要:目的 研究不同给药时段对丹参酮 IIA 磺酸钠(sodium tanshinone IIA sulfonate, STS)内皮保护作用的影响。方法 将人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)分组刺激, 分为 5 组: DMEM 组、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理组、STS 预处理+LPS 组、STS+LPS 共处理组、STS 后处理+LPS 组。其中, LPS 终浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, STS 终浓度为 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, LPS 刺激时间为 12 h。处理完成后, CCK-8 法测定 HUVEC 活力; ELISA 检测细胞培养上清中炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的蛋白浓度; Western blotting 检测细胞裂解液中核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)的蛋白水平;划痕试验检测 HUVEC 的迁移能力;光镜观察细胞凋亡状态,并用 Western blotting 检测凋亡相关分子 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 的蛋白水平。结果 与 DMEM 组相比, LPS 处理后 HUVEC 增殖活力减低;IL-1 β 和 NF- κ B 蛋白水平增高;细胞迁移能力降低、细胞凋亡增加并伴有 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白水平的升高($P<0.05$); STS 处理能够部分逆转 LPS 引起的上述现象,其中以 STS 预处理的效果最为明显,而 STS 后处理的效果相对较弱。结论 STS 预处理、共处理和后处理均能部分抑制 LPS 诱导的 HUVEC 功能异常和凋亡,且以预处理时的效果最为明显。

关键词: 丹参酮 IIA 磺酸钠; 给药时段; 人脐静脉内皮细胞; 脂多糖; 内皮功能异常; cleaved caspase-3; cleaved caspase-9

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)02-0161-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.02.006

引用本文: 朱益, 尹超云, 张进, 等. 丹参酮 IIA 磺酸钠不同给药时段对其内皮保护作用的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 161-166.

Influence of Different Administration Timepoints on the Endothelial Protective Effects of Sodium Tanshinone IIA Sulfonate

ZHU Yi¹, YIN Chaoyun^{2a}, ZHANG Jin^{2b}, TAO Zheng^{2a*} (1.Department of Clinical Laboratory, Zhenjiang First People's Hospital, Zhenjiang 212000, China; 2.Affiliated Hospital of Jiangsu University, a.Department of Vascular Surgery, b.Department of General Surgery, Zhenjiang 212000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the influence of different administration timepoints on the endothelial protective effects of sodium tanshinone II A sulfonate(STS). **METHODS** Human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) were divided into five groups, individually stimulated, including DMEM group, lipopolysaccharide(LPS) group, STS pre-treatment+LPS group, STS co-treatment+LPS group, STS post-treatment+LPS group. The final concentration of LPS in the experiment was $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and that of STS was $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, LPS stimulation time was 12 h. After that, HUVEC viability was determined by CCK-8 assay. The protein concentration of inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) in HUVEC culture supernatant was detected by ELISA. The protein levels of nuclear factor κ B(NF- κ B) in HUVEC lysate were detected by Western blotting. The migration capacity of HUVEC was detected by wound-healing test. HUVEC apoptosis was observed under an optical microscopy, and the expression of apoptosis-related proteins including cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were detected by Western blotting. **RESULTS** Compared with DMEM group, after LPS treatment, HUVEC cell viability was decreased; IL-1 β and NF- κ B protein expression increased; migration capacity impaired; increased apoptosis with the higher protein expression of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9($P<0.05$). STS treatments could partially reverse these LPS-induced phenomena, among which the STS pre-treatment was most effective, while the STS post-treatment was with relative lower efficacy. **CONCLUSION** STS pre-treatment, co-treatment and post-treatment can partially reverse LPS-induced HUVEC dysfunction and apoptosis, among which the STS pre-treatment is most effective.

KEYWORDS: sodium tanshinone IIA sulfonate; administration timepoints; human umbilical vein endothelial cells; LPS; endothelial dysfunction; cleaved caspase-3; cleaved caspase-9

丹参酮 IIA 磺酸钠(sodium tanshinone IIA sulfonate, STS)是一种广泛用于心血管疾病辅助治

疗的药物,具有抗炎、抗凝、抗凋亡等多种功效。研究表明, STS 能够通过核因子 κ B(nuclear

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20130474)

作者简介: 朱益, 女, 主管技师 Tel: 13815157707 E-mail: maomao7707@126.com *通信作者: 陶政, 男, 硕士, 主任医师, 副教授 Tel: (0511)85082289 E-mail: tao0455@qq.com

factor- κ B, NF- κ B)途径抑制肿瘤坏死因子- α 引起的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)炎症因子表达^[1],同时下调该细胞表面黏附分子的水平,减少单核细胞、中性粒细胞等炎性细胞向血管内皮的黏附^[2]。除了对抗内皮炎症, STS 还能减轻脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起的 HUVEC 凋亡和组织因子高表达,抑制后者引起的血管内皮损伤。不仅如此, STS 还能促进内皮细胞迁移,有利于受损内皮的修复^[3]。尽管 STS 的内皮保护作用及其分子机制已经有了比较深入的研究,但不同给药时段对 STS 疗效的影响仍缺少相关报道。本研究在前期文献的基础上,通过 LPS 处理 HUVEC 建立内皮损伤的体外模型,并在这一模型上探讨 STS 不同给药时段(预处理、共处理或后处理)对其内皮保护作用的影响,寻找 STS 在血管内皮损伤相关疾病中的最佳治疗时机,为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC(美国 ATCC); LPS(上海昂一生物科技有限公司,批号:L26331); STS(上海上药第一生化药业有限公司,批号:2004308); 含 4.5 g·L⁻¹葡萄糖的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号:11965092); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(加拿大 Wisent 公司,批号:085-060); CCK-8 试剂盒(南京厚载生物科技有限公司,批号:180283); 人 IL-1 β ELISA 试剂盒(联科生物工程有限公司,批号:70-EK101BHS); 兔抗人 β -actin 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA2305); 兔抗人 NF- κ B p65 单克隆抗体(批号:8242)、兔抗人 cleaved caspase-3 多克隆抗体(批号:9661)、兔抗人 cleaved caspase-9 多克隆抗体(批号:9509)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(上海康为世纪公司,批号:7074P2); PVDF 膜(德国 Millipore 公司); Olympus CX43 光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 的培养及分组处理 用含 1 000 U·L⁻¹青霉素、100 ng·L⁻¹链霉素以及含 10%FBS 的 DMEM 培养液,在 5%CO₂、37 °C 饱和湿度培养箱中培养 HUVEC 细胞。取传代 6~8 代处于对数生

长的 HUVEC 种于 6 孔板内,待融合率达 80%时,利用 12.5, 25, 50 μ g·mL⁻¹的 STS 对其进行处理以确定 STS 的最适浓度。随后分组处理如下: DMEM 组、LPS 处理组、STS 预处理+LPS 组、STS+LPS 共处理组、STS 后处理+LPS 组。实验所用 LPS 的终浓度为 1 μ g·mL⁻¹, STS 的终浓度为 25 μ g·mL⁻¹,各组的总处理时间均为 24 h。其中, DMEM 组以培养液 DMEM 处理 24 h; LPS 组先以 DMEM 处理 12 h,再加入 LPS 继续处理 12 h; STS 预处理+LPS 组先以 STS 处理 12 h,洗去 STS 后,再以 LPS 继续处理 12 h; STS+LPS 共处理组先以 DMEM 处理 12 h,再同时加入 STS 和 LPS 继续处理 12 h; STS 后处理+LPS 组先以 LPS 处理 12 h,洗去 LPS 后,再以 STS 继续处理 12 h。

1.2.2 CCK-8 检测 HUVEC 细胞增殖 按每孔 100 μ L 向 96 孔板中加入 HUVEC 悬液(细胞浓度为每毫升 6×10^5 个),边缘孔用等体积的 PBS 填充。在培养箱中孵育 12 h 后,按“1.2.1”项下方法分组处理 HUVEC,并按每孔 10 μ L 加入 CCK-8 溶液或等体积 DMEM 后,继续孵育 4 h。以仅含有 DMEM 和 CCK-8 溶液的孔作为空白组,以仅含有 DMEM 溶液的孔作为对照组,测定 450 nm 处的吸光度(A),并按如下公式计算各组处理 HUVEC 的增殖活力: 细胞增殖活力(%)=(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})。

1.2.3 ELISA 检测 IL-1 β 的表达 按“1.2.1”项下方法分组处理 HUVEC 并收集其培养液。1 000 $\times$ g 离心 20 min 后,取上清分装保存于 -80 °C。按试剂盒说明书进行 ELISA 检测,简要过程如下: 配制样本和标准品,加样至预包被人 IL-1 抗体的酶标板,37 °C 孵育 2 h。1 $\times$ wash buffer 洗板 3 次后,按每孔 100 μ L 加入 HRP 标记的检测抗体,37 °C 孵育 2 h。1 $\times$ wash buffer 洗板 3 次后,依次加入显色液 A 和显色液 B 各每孔 50 μ L。37 °C 孵育 30 min 后,加终止液每孔 100 μ L,立即测定各孔在 450 nm 处的 A 值,并按照标准曲线计算各组的 IL-1 β 浓度。

1.2.4 划痕试验观察 HUVEC 迁移能力 培养 HUVEC,待细胞融合率达 80%左右时,用无菌 200 μ L 的加样枪头在细胞层中缓缓地纵向划一条直线,保持划痕的宽度均匀一致。PBS 洗 3 遍后,按“1.2.1”项下方法分组处理。24 h 后,用光学

倒置显微镜观察并拍照。采用 Image pro plus 软件分析图像,并按如下公式计算各组 HUVEC 的迁移率:细胞迁移率=(0 h 时划痕宽度-24 h 时划痕宽度)/0 h 时划痕宽度。

1.2.5 STS 对 HUVEC 细胞形态学变化的影响

将 HUVEC 细胞接种至 6 孔板培养,按“1.2.1”项下方法进行分组及处理,倒置显微镜下观察 HUVEC 的细胞形态。

1.2.6 光学显微镜观察不同处理后 HUVEC 的形态学变化 按“1.2.1”项下方法分组处理 HUVEC,光学倒置显微镜下观察 HUVEC 的细胞形态。正常 HUVEC 牢固贴壁,并呈典型的“铺路石”样生长。当发生凋亡时, HUVEC 形态产生不规则改变,且培养液中可见部分细胞漂浮。

1.2.7 Western blotting 检测相关 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、NF- κ B 蛋白表达 提取“1.2.1”项下准备好的 6 孔板里的细胞蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,再转膜,5%BSA 封闭 1 h,分别加入兔抗 cleaved caspase-3(1:400)、cleaved caspase-9(1:400)、NF- κ B(1:400)、兔抗 β -actin 蛋白抗体(1:2 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入羊抗兔 HRP-IgG(1:3 000)室温孵育 1 h;TBST 洗膜;ECL 显色扫描,LANE1D 软件进行条带 A 值定量分析。

1.2.8 流式细胞术检测凋亡 按“1.2.1”项下方法分组处理 HUVEC,弃去培养基,预冷 PBS 洗 3 次后,用 0.25%胰蛋白酶消化重悬。PBS 漂洗 2 遍,取 5×10^5 个细胞转移至 EP 管中,1 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 后,弃去上清液,加入 500 μ L 预冷 PBS 重悬细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 于细胞悬液中,轻轻混匀。冰上避光孵育染色 10 min 后,按说明书进行流式细胞术检测,所得数据采用 FlowJo V10.5.3 进行分析。

1.2.9 统计学分析 数据分析采用 GraphPad Prism 7.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),进一步两两比较采用 LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 STS 不同给药时段对 LPS 引起的 HUVEC 增殖活力改变的影响

不同浓度 STS 处理 HUVEC 后发现, LPS 能够导致 HUVEC 增殖活力减低, 25, 50 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的 STS 能够以类似的效率显著减弱 LPS 的作用,

两浓度之间对 LPS 作用没有统计学差异, 且其保护作用优于 12.5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的 STS($P < 0.05$)。此外与 DMEM 组比较, LPS 显著降低 HUVEC 的增殖活力($P < 0.05$)。与 LPS 处理组比, STS 预处理、共处理和后处理均能提高 HUVEC 增殖活力($P < 0.05$), 其中预处理的效果最为明显, 而后处理的效果则相对较弱($P < 0.05$)。结果见图 1。

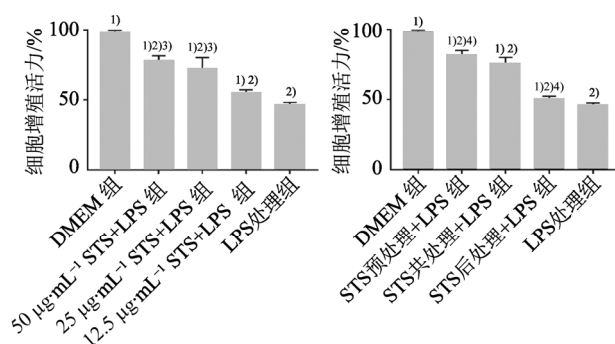


图 1 STS 不同给药时段对 LPS 引起的 HUVEC 增殖活力改变的影响($n=3$) 与 LPS 处理组比, $^1P < 0.05$; 与 DMEM 组比, $^2P < 0.05$; 与 12.5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ STS+LPS 组比, $^3P < 0.05$; 与 STS 共处理+LPS 组比, $^4P < 0.05$ 。

Fig. 1 Effects of different STS administration timepoints on LPS-induced changes in HUVEC proliferation activity($n=3$) Compared with the LPS-treated group, $^1P < 0.05$; compared with the DMEM group, $^2P < 0.05$; compared with the 12.5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ STS+LPS group, $^3P < 0.05$; compared with the STS co-treatment+LPS group, $^4P < 0.05$.

2.2 STS 不同给药时段对 LPS 引起的 HUVEC IL-1 β 和 NF- κ B 蛋白表达的影响

与 DMEM 相比, LPS 能够显著提高 HUVEC 培养上清中 IL-1 β 的蛋白水平($P < 0.05$)。与培养上清中 IL-1 β 的表达趋势相类似, LPS 能够明显促进 HUVEC 细胞内 NF- κ B 的蛋白表达($P < 0.05$)。STS 预处理和共处理均能部分逆转 LPS 引起的 IL-1 β 和 NF- κ B 蛋白高表达, 其中以预处理的效果最为明显($P < 0.05$), 而 STS 后处理不具备上述效应。结果见图 2。

2.3 STS 不同给药时段对 LPS 引起的 HUVEC 迁移能力改变的影响

与 DMEM 相比, LPS 显著减少 HUVEC 的迁移距离, 而 STS 预处理和共处理能够减弱 LPS 的作用。通过计算细胞迁移率, 并对不同处理下 HUVEC 的迁移能力进行半定量分析可知: 相比 DMEM 组, LPS 刺激显著降低了 HUVEC 的迁移率($P < 0.05$)。STS 预处理和共处理能够部分逆转 LPS 导致的 HUVEC 迁移率减低, 其中以预处理的效果最为明显($P < 0.05$), 而 STS 后处理并不具备上述效应。结果见图 3。

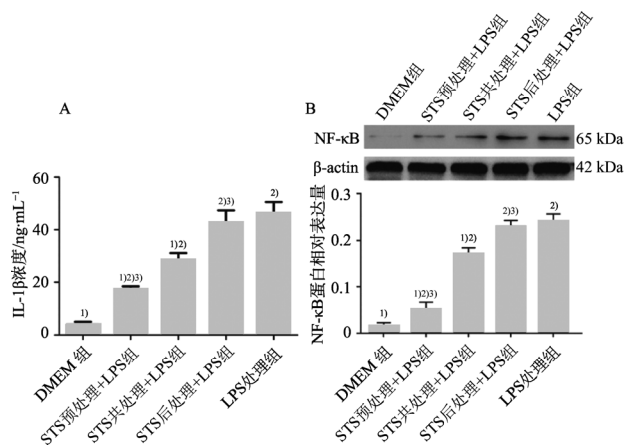


图2 STS不同给药时段对LPS引起的HUVEC IL-1 β 和NF- κ B蛋白表达的影响($n=3$)

A-ELISA检测HUVEC培养上清中IL-1 β 的蛋白浓度; B-Western blotting检测HUVEC细胞裂解液中NF- κ B蛋白的相对表达量;与LPS处理组比, ¹⁾ $P<0.05$;与DMEM组比, ²⁾ $P<0.05$;与STS共处理+LPS组比, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effects of different STS administration timepoints on LPS-induced IL-1 β and NF- κ B protein secretion by HUVEC($n=3$)

A-ELISA detection of IL-1 β protein concentration of in culture supernatant of HUVEC; B-Western blotting detection of NF- κ B protein relative expression in HUVEC cell lysate; compared with the LPS-treated group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the DMEM group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the STS co-treatment+LPS group, ³⁾ $P<0.05$ 。

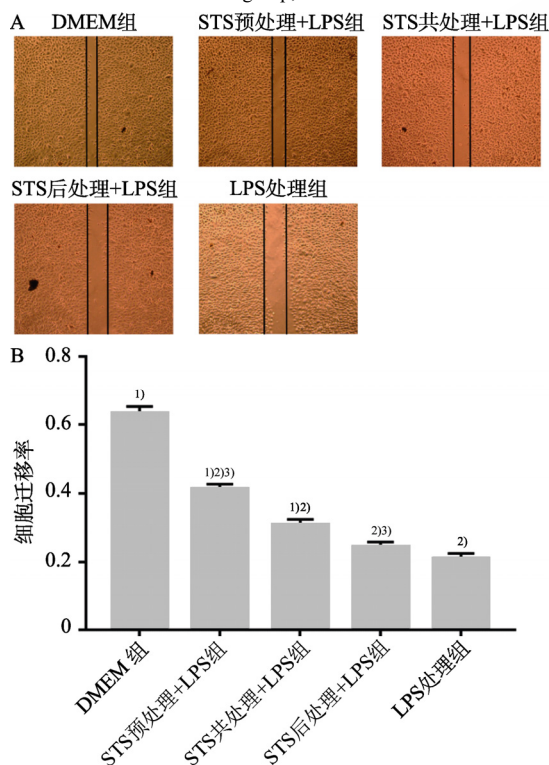


图3 STS不同给药时段对LPS引起的HUVEC迁移能力改变的影响($n=3$)

A-光镜观察HUVEC迁移; B-HUVEC细胞迁移率;与LPS处理组比, ¹⁾ $P<0.05$;与DMEM组比, ²⁾ $P<0.05$;与STS共处理+LPS组比, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effects of different STS administration timepoints on LPS-induced change of HUVEC migration capacity($n=3$)

A-HUVEC migration observed by optical microscope; B-HUVEC migration rate; compared with the LPS-treated group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the DMEM group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the STS co-treatment+LPS group, ³⁾ $P<0.05$ 。

2.4 STS不同给药时段对LPS引起的HUVEC凋亡的影响

LPS刺激导致HUVEC细胞膜皱缩并可见部分细胞漂浮, STS预处理、共处理和后处理均能部分逆转这种现象。其中, STS预处理的效果最为明显, 后处理的效果则相对较弱。Western blotting结果显示, LPS能够提高HUVEC中凋亡相关蛋白cleaved caspase-3的水平, STS预处理能够极显著逆转LPS的作用, 而共处理和后处理均只能部分抑制上述效应($P<0.05$)。类似的, LPS引起的cleaved caspase-9高表达能够被STS部分逆转, 其中STS预处理及共处理的效果较为明显, 而后处理的效果则相对较弱($P<0.05$)。与凋亡相关蛋白的表达趋势相一致, Annexin V/PI凋亡双染结果发现, LPS能够引起HUVEC凋亡率增高[(83.2 $\pm$ 4.37)%, $P<0.05$], STS预处理能够很明显逆转这一效应[(58.22 $\pm$ 3.89)%, $P<0.05$], 但STS共处理及后处理的效果则相对较弱。结果见图4。

3 讨论

血管内皮细胞凋亡增加、通透性增高和炎症因子过表达等改变是动脉粥样硬化等心血管病变的重要起始因素。此外, 受损的血管内皮能够大量产生氧自由基等过氧化物, 并可由此进一步加剧内膜损伤。丹参是中医的传统活血化瘀药物, 其主要的活性成分为磺酸。脂溶性的STS是磺酸的盐类化合物, 因其具有抗炎^[4]、抗凋亡^[5]、抗纤维化^[6]等作用, 被广泛用于临床疾病, 尤其是心脑血管疾病的预防和治疗。

STS能够抑制血管内皮细胞中丝裂原活化蛋白激酶p38的激活, 并下调细胞表面极低密度脂蛋白受体的水平, 对抗缺血/再灌注引起的血管内膜损伤^[7]。此外, STS能够抑制LPS引起的血管内皮细胞活性氧簇生成, 同时提高胞内超氧化物歧化酶的水平, 缓解血管内膜的氧化压力^[8]。STS还能抑制LPS引起的TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路活化, 并以此下调内皮细胞中IL-6、IL-1 β 等炎症因子表达^[2-9]。除了上述作用, STS还能调节HUVEC中Bcl-2/Bax的平衡, 降低caspase的表达和活化, 抑制LPS等损伤因素导致的内皮细胞凋亡^[10]。

研究表明, 除药物自身的作用外, 不同的给药时段是影响临床治疗效果的另一关键因素^[11]。例如, 在术后应用右美托咪啶, 其对抗麻醉应激的效果优于术中或术前给药^[12]; 对合并糖尿病的

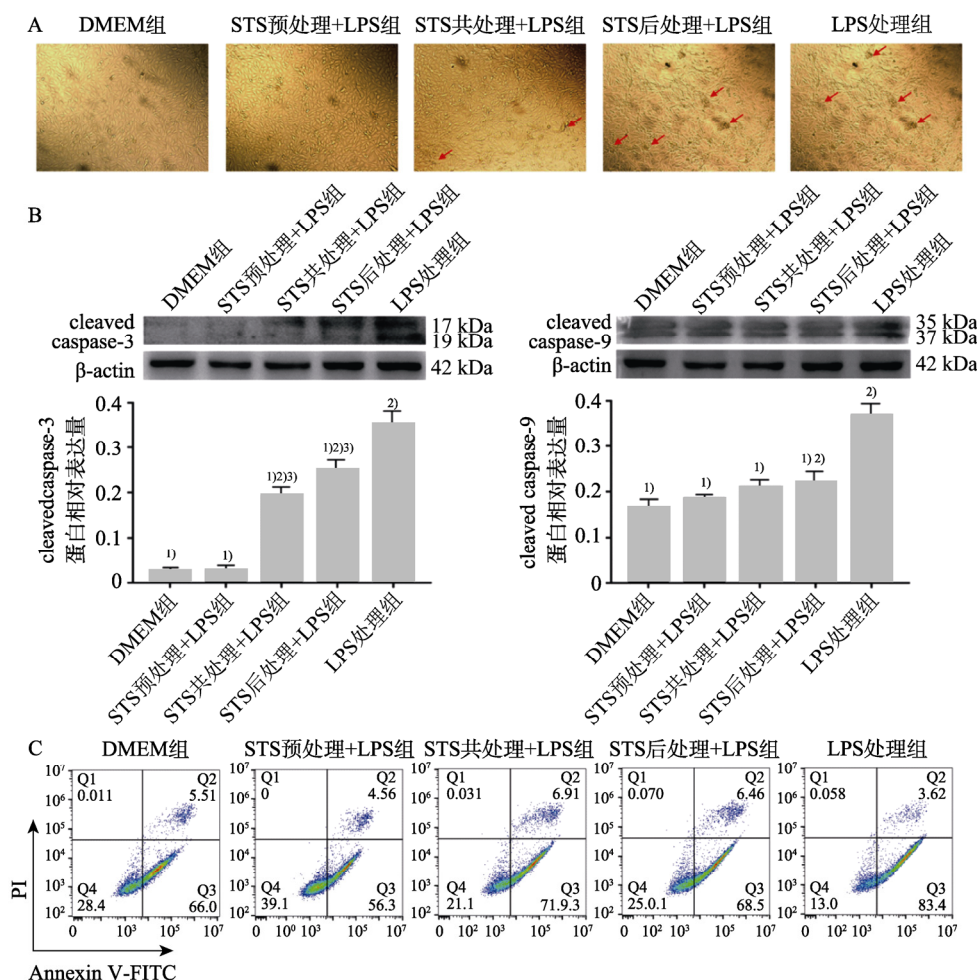


图 4 STS 不同给药时段对 LPS 引起的 HUVEC 凋亡的影响($n=3$)

A—光镜观察 HUVEC 细胞形态和生长状态的变化(箭头所示为形态改变或悬浮的 HUVEC);B—Western blotting 检测 HUVEC 细胞裂解液中 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白的相对表达量;C—凋亡双染法检测 HUVEC 的凋亡情况;与 LPS 处理组比, $^{1)}P<0.05$; 与 DMEM 组比, $^{2)}P<0.05$; 与 STS 预处理+LPS 组比, $^{3)}P<0.05$ 。

Fig. 4 Effects of different STS administration timepoints on LPS-induced HUVEC apoptosis($n=3$)

A—observation of changes in morphology and growth status of HUVEC by optical microscopy(arrows indicate morphological changed or suspended HUVEC); B—Western blotting detection of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 protein relative expression in HUVEC lysate; C—HUVEC apoptosis detected by Annexin V/PI staining; compared with the LPS-treated group, $^{1)}P<0.05$; compared with the DMEM group, $^{2)}P<0.05$; compared with the STS pre-treatment+LPS group, $^{3)}P<0.05$ 。

孕妇, 胰岛素预防性给药能够明显改善患者的妊娠结局^[13]; 对具有弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)风险的患者, 在解除 DIC 诱因的同时提前给予血管活性药物, 可以有效降低 DIC 的发生率^[14]。而就 STS 而言, 不同研究中的给药时段差异较大。例如, STS 预防性给药能够对乳腺癌合并心肌缺血的小鼠模型起到保护作用^[15]; 在尤瑞克林治疗的同时给予 STS 干预可以有效改善急性脑梗死患者的神经功能^[16]; 而在术后应用丹参酮注射液能够有效降低急性 ST 段抬高型心肌梗死患者心血管不良事件的发生率^[17]。因此, 尽管 STS 的抗内皮损伤作用及其机制已得到较为全面的论证, 探讨不同给药时段对其疗效的影响仍具有重要意义。本研究在文献报道和前

期研究的基础上, 选择 HUVEC 作为体外模型, 用 LPS 诱导其发生功能异常(增殖活力减低、炎症反应、迁移能力减弱)和凋亡。在此基础上, 分别以预处理、共处理和后处理的方式, 探讨 STS 不同的给药时段对其内皮保护作用的影响。结果发现, 相对 DMEM, LPS 显著降低 HUVEC 的增殖活力, 这与文献[18]的报道一致。STS 预处理、共处理或后处理均能减轻 LPS 引起的细胞增殖活力减低, 并以预处理的保护作用最为明显(图 1)。IL-1 β 是内皮细胞功能异常过程中的代表性炎症因子, 其合成与分泌受到 NF- κ B 的调控^[19]。本研究结果显示, LPS 能够显著上调 HUVEC 培养上清中 IL-1 β 的蛋白浓度。STS 预处理和共处理均能够部分逆转 LPS 引起的 IL-1 β 高表达, 并以预处理的作用

最为明显(图 2A, $P<0.05$); 而 STS 后处理则未能显著降低 HUVEC 培养上清中 IL-1 β 的蛋白水平。NF- κ B 的蛋白表达趋势和 IL-1 β 相一致, 即 STS 预处理能够显著降低 HUVEC 中 NF- κ B 的水平且其作用强于共处理(图 2B, $P<0.05$), 而 STS 后处理则不具备这一效应。这一结果说明, 相比其他处理方式, STS 预处理能够更加有效的对抗内皮炎症, 后处理没有明显效果。迁移障碍是内皮细胞功能异常的标志之一, 通过划痕试验发现, 相对 DMEM, LPS 显著抑制了 HUVEC 的迁移活性。STS 预处理和共处理均能够部分减弱 LPS 引起的 HUVEC 迁移抑制, 并以预处理的效果最为明显(图 3, $P<0.05$); 而 STS 后处理不具有这一效应。该结果说明, STS 预处理最有利于内皮细胞的迁移修复, 后处理则对该过程没有明显影响。除上述作用外, STS 还能抑制内皮细胞凋亡^[5], 为此检测了 HUVEC 中凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 的表达。结果发现, LPS 能够显著上调 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 的表达, STS 预处理和共处理均能部分逆转这一效应, 而 STS 后处理的效果相对较弱(图 4B, $P<0.05$)。类似的, Annexin V/PI 凋亡双染的结果也显示, LPS 能够引起 HUVEC 凋亡, 此外, 相对共处理或后处理, STS 预处理能够更加有效地逆转 LPS 的效应, 呈现出更强的内皮保护作用(图 4C, $P<0.05$)。

综上所述, 不同的给药时段能够显著影响 STS 的内皮保护作用, STS 预处理的保护作用最为明显, 能够显著促进内皮细胞增殖、炎症、迁移, 并抑制其凋亡。STS 共处理具有类似的效应, 但其作用弱于预处理。STS 后处理能够促进内皮细胞增殖并抑制其凋亡, 但对炎症反应和迁移的影响并不明显。这就提示损伤发生之后或预计损伤之前, 早期给予 STS 进行干预, 可能会取得更为理想的内皮保护的治疗效果。

REFERENCES

- [1] WEI B, LI W W, JI J, et al. The cardioprotective effect of sodium tanshinone IIA sulfonate and the optimizing of therapeutic time window in myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235(2): 318-327.
- [2] ZHAO M, FENG Y L, XIAO J P, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate prevents hypoxic trophoblast-induced endothelial cell dysfunction via targeting HMGB1 release[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(7). Doi: 10. 1002/jbt. 21903.
- [3] ZHU J, XU Y L, REN G Y, et al. Tanshinone IIA sodium sulfonate regulates antioxidant system, inflammation, and endothelial dysfunction in atherosclerosis by downregulation of CLIC1[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017(815): 427-436.
- [4] CHENG J, CHEN T T, LI P Y, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing nuclear factor- κ B signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(1): 26-31.
- [5] WANG F, LU X S, LI Y, et al. Protective effects of sodium Tanshinone IIA sulfonate on oxidative stress injury and apoptosis in EA. hy926 cells induced by PM2.5[J]. *J Guangdong Pharmaceut Univ(广东药科大学学报)*, 2017, 33(2): 207-210.
- [6] WU P, DU Y Q, XU Z H, et al. Protective effects of sodium tanshinone IIA sulfonate on cardiac function after myocardial infarction in mice[J]. *Am J Transl Res*, 2019; 11(1): 351-360.
- [7] ZHANG Y Q, TANG Y, WU A L, et al. Salvianolic acid A displays cardioprotective effects in *in vitro* models of heart hypoxia/reoxygenation injury[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(10): 899-915.
- [8] WEI B, YOU M G, LING J J, et al. Regulation of antioxidant system, lipids and fatty acid β -oxidation contributes to the cardioprotective effect of sodium tanshinone IIA sulphonate in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 230(1): 148-156.
- [9] WU Y J, SU J, HUANG P J, et al. Buddleioside prevents TNF- α -induced human aortic endothelial cells inflammatory injury through inhibiting TLR4/I κ B α /NF- κ B signaling pathway[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2017, 34(5): 637-643.
- [10] ZHANG G X, ZHANG Y Y, ZHANG X X, et al. Different network pharmacology mechanisms of Danshen-based Fangjis in the treatment of stable angina[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(6): 952-960.
- [11] CHEN X W, TAO L P, JIN S Q, et al. Rectal indomethacin for prevention of Post-ERCP pancreatitis[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2013, 30(10): 1135-1139.
- [12] 王芳. 不同时段泵注右美托咪定对开颅手术麻醉苏醒期血流动力学的影响[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 18(23): 98-99.
- [13] 张敏. 胰岛素不同时段供给对妊娠合并糖尿病患者妊娠结局的影响[J]. *中国医药指南*, 2016, 14(2): 39.
- [14] WANG S J. Advances in the diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation[J]. *Chin J Pract Inter Med(中国实用内科杂志)*, 2017, 37(2): 91-95.
- [15] QIN Y, YANG G S, ZHANG N, et al. Protective effect of Salvia miltiorrhiza extract on tumor with myocardial ischemic injury[J]. *J Hebei Med Univ(河北医科大学学报)*, 2019, 40(6): 633-636, 641, 745.
- [16] HUANG Z E, LI X Y, LI Y Q, et al. Evaluation of Salvianolate use in 87 patients with acute cerebral infarction[J]. *Pharm Today(今日药理学)*, 2019, 29(2): 108-112.
- [17] 叶红艳. 丹参酮注射液在急性 ST 段抬高型心肌梗死术后的作用价值的分析[J]. *临床研究*, 2019, 27(11): 129-130.
- [18] LI K M, TAO J, ZHANG L M, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide injury human umbilical vein endothelial cell and activation signal pathway of NF- κ B/iNOS/NO[J]. *J Clin Stomatol(临床口腔医学杂志)*, 2019, 35(2): 79-82.
- [19] SHI C G, HU G, WANG H. Nuclear factor- κ B and the pathogenesis of the atherosclerosis[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2004, 20(4): 382-385.

收稿日期: 2020-01-20
(本文责编: 沈倩)