

丹参酮 II_A 磺酸钠体内外促血管新生作用的研究

苏梅^{1#}, 秦引林^{1#}, 娄雅静¹, 汪飞云², 徐玉兰^{2,3}, 张建革^{2*}

1. 江苏柯菲平医药股份有限公司, 江苏 南京 210014

2. 上海中医药大学 创新中药研究院, 上海 201203

3. 郑州大学 药学院, 河南 郑州 450001

摘要: **目的** 通过体外人脐静脉内皮细胞和海绵植入小鼠模型对丹参酮 II_A 磺酸钠的促进血管新生作用进行研究。**方法** 体外采用人脐静脉内皮细胞 HUVEC-12 诱导模型, 利用细胞迁移及小管生成实验评价丹参酮 II_A 磺酸钠促血管新生的作用影响; 体内实验采用海绵植入小鼠模型, 通过 QPCR 测定不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 VEGF-A mRNA 表达的影响, 采用免疫荧光染色法观察不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对微血管生成及 VEGF 蛋白释放的影响。**结果** 丹参酮 II_A 磺酸钠 40、80 μg/mL 剂量组的迁移率显著高于对照组 ($P < 0.05$ 、 0.01); 丹参酮 II_A 磺酸钠与形成的结节数目呈现一定剂量相关性, 且丹参酮 II_A 磺酸钠 80 μg/mL 剂量组的小管生成结节数显著高于对照组 ($P < 0.05$)。丹参酮 II_A 磺酸钠 12、24 mg 剂量组 VEGF-A mRNA 相对表达值显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而丹参酮 II_A 磺酸钠 12 mg 剂量组作用最强, 优于阳性药丹参多酚酸盐。丹参酮 II_A 磺酸钠 12、16、24 mg 剂量组的 VEGF 蛋白表达量明显优于对照组 ($P < 0.05$ 、 0.01), 丹参酮 II_A 磺酸钠 12 mg 剂量组, VEGF 蛋白表达量最高, 荧光面积最大, 优于阳性药丹参多酚酸盐。**结论** 丹参酮 II_A 磺酸钠具有促血管新生作用, 其作用机制可能通过上调 VEGF-A mRNA 的表达来影响。

关键词: 丹参酮 II_A 磺酸钠; 血管新生; 人脐静脉内皮细胞; 海绵植入; 血管内皮生长因子

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)04-0934-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.04.012

Angiogenesis effect of sodium tanshinone II_A sulfonate *in vitro* and *in vivo*

SU Mei¹, QIN Yin-lin¹, LOU Ya-jing¹, WANG Fei-yun², XU Yu-lan^{2,3}, ZHANG Jian-ge²

1. Jiangsu Carepher Pharmaceutical Co., Ltd, Nanjing 210014, China

2. Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To study the effect of angiogenesis effect of sodium tanshinone II_A sulfonate on human umbilical vein endothelial cell *in vitro* and sponge implantation in rats. **Methods** HUVEC-12 induction model was selected *in vitro*, and the effect of sodium tanshinone II_A sulfonate on angiogenesis was evaluated by cell migration and tubule formation. Sponge implantation assay was selected *in vivo*, and the effect of sodium tanshinone II_A sulfonate in different doses on the expression of VEGF-A mRNA was detected by QPCR. The effects of sodium tanshinone II_A sulfonate in different doses on microvascular production and VEGF protein release were observed by immunofluorescence staining. **Results** The migration rate in sodium tanshinone II_A sulfonate 40 and 80 μg/mL group were significantly higher that in the control group ($P < 0.05$, 0.01). Sodium tanshinone II_A sulfonate had the dosage association with the number of tubule formation, and the number of tubule formation in sodium tanshinone II_A sulfonate 80 μg/mL group was significantly higher that in the control group ($P < 0.05$). VEGF-A mRNA expression in sodium tanshinone II_A sulfonate 12 and 24 mg group were significantly higher that in the control group ($P < 0.01$). VEGF-A mRNA expression in sodium tanshinone II_A sulfonate

收稿日期: 2018-12-26

作者简介: 苏梅 (1974—), 女, 博士, 高级工程师, 从事药物研发与新药产业。

*通信作者 张建革, 女, 博士, 教授, 主要从事心脑血管及肿瘤药理、药效及作用机制研究。E-mail: jgzhang_5500@126.com

#并列第一作者 秦引林 (1970—), 男, 博士, 第二批国家“万人计划”领军人才, 主要从事心脑血管药研究。

12 mg group was the highest, and higher than that in salvianolate group. VEGF protein expression in sodium tanshinone II_A sulfonate 12, 16, and 24 mg group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05, 0.01$). VEGF protein expression in sodium tanshinone II_A sulfonate 12 mg group was the highest, and fluorescence area was the biggest, and better than that in salvianolate group. **Conclusion** Sodium tanshinone II_A sulfonate has the effect of promoting angiogenesis, which is related to promoting the expression of VEGF-A mRNA mainly.

Key words: tanshinone II_A sulfonate; angiogenesis; HUVEC; sponge; VEGF

血管新生在创伤修复、女性月经周期、胚胎发育等生理过程发生, 同时与机体多种病理(如缺血性疾病、溃疡, 中风, 恶性肿瘤、糖尿病视网膜病变, 心脏冠状动脉与外周动脉粥样硬化免疫性及炎症性疾病等)过程也有紧密相关^[1-2]。因此调节血管的生长能有效对疾病的发病过程进行控制, 从而达到治疗效果。治疗性血管生成指通过药物干预、基因治疗或其他方法促进新的小血管生长, 并与原有血管网相交汇, 改善供血的一种方法^[3-5]。如针对血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)或促血管生成素等的基因疗法或蛋白质疗法。

丹参酮 II_A 磺酸钠在临床上主要用于冠心病、心绞痛、心肌梗死的治疗, 药理研究表明丹参酮 II_A 磺酸钠能增加冠脉流量, 改善缺血区心肌的侧支循环及局部供血, 同时改善心肌的代谢紊乱, 抑制血小板聚集及抗血栓形成, 缩小实验动物缺血心肌梗死面积^[6-8]。丹参酮 II_A 磺酸钠在治疗冠心病方面具有非常好的临床疗效, 主治功能明确, 而血管新生能够帮助肌体建立有效的侧支循环, 在冠心病、缺血性脑栓死等缺血性疾病的治疗、恢复和预后中具有重要意义^[9]。因此, 本文通过体内外实验开展丹参酮 II_A 磺酸钠促进血管新生的实验研究, 旨在探讨其作用机制, 研究其促血管新生的内在规律。

1 实验材料

1.1 细胞与动物

人脐静脉内皮细胞(HUVEC-12)由军事医学科学院惠赠。SPF级C57BL/6雄性小鼠60只, 体重(22±2)g, 动物生产许可证号: SCXK(湘)2011-0003, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供; 鼠饲料B级, 许可证号: SCXK(湘)2014-0002; 动物垫料选择舒适、保温、吸湿性能好、无粉尘、无异味、无油脂的玉米芯垫料, 购自河南省实验动物中心。实验动物饲养于郑州大学药学院动物房普通饲养室, 动物使用许可证: SYXK(豫)2012-0006。

1.2 药物与试剂

丹参酮 II_A 磺酸钠, 质量分数>98%, 砖红色结晶性粉末, 产品批号 DS-1405001, 购自苏柯菲平医

药股份有限公司; 丹参多酚酸盐, 质量分数>99%, 浅棕色疏松块状物, 产品批号 1403012, 购自江苏柯菲平医药股份有限公司; DMEM 高糖培养基和胎牛血清(FBS, 美国Hyclone公司); ECGS和肝素(Sigma公司); 戊巴比妥钠(MERCK公司, 质量分数99.03%, 产品批号P11011); 红霉素软膏(新乡华青药业有限公司)。二甲基亚砜及多聚甲醛(SIGMA公司); 左旋聚乳酸(PLLA, 济南岱罡生物工程有限公司); 医用乙醇(新乡市三伟消毒制剂有限公司)。

1.3 仪器

德国Sensquest/Labcycler PCR扩增仪; AR153CN型电子天平(奥豪斯仪器有限公司); 倒置相差显微镜及数码摄像装置(奥林巴斯公司); 二氧化碳培养箱(Heraeus公司); 核酸浓度测定仪(南昌市益尔康医疗器械有限公司); 生物安全柜(赛默飞世尔科技有限公司); 离心机(Sigma公司); 带线缝合针(宁波医用缝针有限公司); 海绵Sponges(Ultracell medical technologies Inc); 超声波清洗机(东莞市墨洁超声设备有限公司); 细胞培养皿(费希尔公司)。

2 方法

2.1 丹参酮 II_A 磺酸钠体外对 HUVEC-12 诱导的影响

2.1.1 HUVEC-12 细胞培养 人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC-12 用含 20 ng/mL ECGS、15 U/L 肝素以及含 10% 胎牛血清的 1640 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 倒置显微镜下观察细胞生长情况。待细胞密度为 80% 以上时, 去掉培养液, 用 PBS 清洗细胞两次, 添加 0.25% 胰蛋白酶消化液, 置于 37 °C 培养箱中孵育 30 s 左右, 倒置显微镜下观察细胞, 细胞呈回缩变圆、透亮、轻拍瓶壁呈流沙样脱落后, 快速加入完全培养液终止消化, 轻轻吹打均匀, 使细胞彻底从培养瓶底壁脱落, 按 1:2 比例进行传代培养。取处于对数期的、生长状态良好的细胞进行实验。

2.1.2 丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞迁移的影响 取对数生长期的人脐静脉内皮细胞 HUVEC-12 进行细胞计数, 调整细胞密度为 5×10^5 /mL, 以每

孔 1 mL 接种至 6 孔板。放入培养箱内常规培养形成 90% 融合的单层细胞, 用 200 μ L 无菌枪头将 HUVEC-12 单层细胞层划一道痕迹, 然后用 DPBS 轻轻冲洗脱落的细胞碎片 3 遍, 对照组加入 2 mL DMEM 培养液, 并加入 2 mL 巨噬细胞上清液与 DMEM 培养液等体积混合培养基, 根据文献报道^[10]及前期浓度摸索结果, 丹参酮 II_A 磺酸钠组加入含 20、40、80 μ g/mL 丹参酮 II_A 磺酸钠的 DMEM 培养液, 24 h 后用倒置显微镜观察并拍照测量细胞划痕间距, 每个孔内随机选取 3 个区域记录, 每组实验重复 3 次。采用 IPP 图像分析软件分析图像迁移距离并计算迁移率。

细胞迁移率 = (0h 划痕宽度 - 24h 划痕宽度) / 0h 划痕宽度

2.1.3 丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞小管生成的影响 将 96 孔板和无菌黄枪头放入 -20 °C 冰箱冷藏过夜。将 Matrigel 基质胶置于 4 °C 冰箱冻融, 以每孔 50 μ L 预冷的 Matrigel 基质胶包被提前预冷的 96 孔板, 轻轻拍打使 Matrigel 基质胶均匀的覆盖孔底部, 避免产生气泡。置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中静置孵育 30 min。待 Matrigel 基质胶凝固后, 取对数生长期的 HUVEC-12 细胞, 调整细胞密度, 以 5×10^4 / 孔密度与各组培养液混匀接种到 96 孔板, 加入含 20、40、80 μ g/mL 丹参酮 II_A 磺酸钠的 HG 培养基, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中 3 h, 开始连续在倒置相差显微镜下观察并拍照, 每孔随机选取 5 个视野拍照观察细胞间连接形成的管样结构并采用 Image J 图像分析软件分析管样结构。

2.2 丹参酮 II_A 磺酸钠对海绵植入小鼠血管生成的影响

2.2.1 供试品及阳性对照药品制备 因采用灌胃给药的方法, 丹参酮 II_A 磺酸钠无法直接作用于海绵 (炎症) 部位, 因此本课题首先制备丹参酮 II_A 磺酸钠缓控凝胶制剂, 使丹参酮 II_A 磺酸钠在两周时间内在海绵周围释放。经摸索确定丹参酮 II_A 磺酸钠缓控凝胶制备合适的条件是在 25 °C、240 W 功率下超声 5 h。分别称取 0、2~48 mg 的丹参酮 II_A 磺酸钠粉末以及 21 mg 的阳性对照丹参多酚酸盐粉末置于模具 EP 管中, 与相同体积的 DMSO 及 PLLA 混合后涡漩均匀, 在 25 °C、240 W 功率下超声 5 h 可得空白对照凝胶、DST 缓控凝胶及阳性丹参多酚酸盐缓控凝胶。

参考《中国药典》2015 年版四部通则, 凝胶剂应均匀、细腻, 在常温时保持胶状, 不干涸或液化,

将凝胶剂的涂展性、稳定性、pH 值作为质量控制标准, 结果显示样品涂于培养皿中观察到黏稠状液体, 无明显气味, 具有良好的涂展性, 同时凝胶剂经离心、热恒温试验显示样品无分层, 分布均匀, 外观变化不明显, 连续测定 3 批样品的 pH 值, 数值均在 4.5~6.5, 符合皮肤表面 pH 值, 表明样品符合质量要求。

2.2.2 分组及给药 小鼠适应性喂养 1 周, 取 60 只, 随机分成 6 组, 每组 10 只, 根据文献报道^[11]及前期浓度摸索结果, 分为空白凝胶组, 丹参酮 II_A 磺酸钠缓释凝胶 4、12、16、24 mg 组, 阳性对照 21 mg 丹参多酚酸盐的缓释凝胶组。采用海绵植入动物模型^[12], 先用配制好的 1% 戊巴比妥钠溶液作为麻醉剂对小鼠腹腔注射 0.15 mL, 麻醉起效后将小鼠固定在实验台上, 背部朝上, 使用退毛机将小鼠背部毛发褪去, 用碘伏消毒后剪开外表皮, 将相应的海绵和缓控凝胶制剂植入介于外表皮和肌肉中间并缝好伤口, 在伤口上涂抹一层红霉素软膏。术后第 1 天每隔 1 h 观察一次小鼠, 4 h 内小鼠恢复正常行动, 24 h 内小鼠全部存活, 3 d 后小鼠全部恢复正常状态, 实验成功。2 周后对实验鼠进行海绵取出实验。用 1% 戊巴比妥钠溶液对小鼠进行麻醉, 起效后将小鼠固定, 将小鼠背部手术部位皮肤连同海绵一起剪下, 将海绵一分为二。

2.2.3 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 VEGF-A mRNA 的表达作用 小鼠海绵取出后, 用胶原酶溶液将海绵从 PBS 溶液中转移到胶原酶溶液中, 在细胞培养箱中温育 1 h。将海绵滤过, 收集滤液, 将滤液离心后, 除去上清液。用 0.5 mL 试剂盒提取 RNA, 测定 RNA 浓度, 然后进行反转录获得 cDNA, 由 cDNA 进行实时定量 PCR, 分析血管内皮生长因子 VEGF mRNA 相对于空白对照的表达量, 并与阳性药丹参多酚酸盐进行比较。

2.2.4 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对新生血管生成的作用 小鼠海绵取出后, 放入 4% PFA 溶液中浸泡, 室温下过夜保存, 第 2 天再转入到 70% 乙醇中进行脱水处理。将脱过水的海绵取出, 泡在二甲苯中进行透明处理, 在温箱内, 将已经透明化的海绵放入到加热溶解的石蜡中, 使其被石蜡浸透, 将已浸蜡的海绵放入热融的包埋石蜡中, 迅速冷凝, 海绵便被蜡包埋。用轮转式切片机对已经包埋的海绵进行切片, 厚度 4~6 μ m。

将固定有石蜡切片的载玻片放到免疫组化染色

盒中，用二甲苯浸洗 3 次，随后依次用乙醇进行梯度洗脱，用 PBS 缓冲液浸洗 5~10 min，后用柠檬酸缓冲液浸洗，免疫组化封闭液封闭 1 h，用 PBS 缓冲液洗掉封闭液，BS1-Lectin 染色，荧光显微镜观察 BS1-lectin 的绿色荧光，并对不同的视野进行拍照。用 Image J 软件处理得到绿色荧光的面积，根据荧光面积多少确定药物对于新生血管生成的影响。

2.3 统计学分析

统计学方法采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析。计量资料符合正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间数据比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 丹参酮 II_A 磺酸钠体外对 HUVEC-12 诱导的影响

3.1.1 丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞迁移的影响 细胞划痕法检测对照组、丹参酮 II_A 磺酸钠 20、40、80 μg/mL 剂量组对细胞迁移能力的影响结果见

表 1 和图 1。24 h 后，与对照组比较，丹参酮 II_A 磺酸钠 40、80 μg/mL 剂量组的迁移率显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，表明丹参酮 II_A 磺酸钠能刺激 HUVEC-12 细胞迁移，显著增加细胞迁移率，且呈剂量相关方式迁移。

表 1 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞的迁移率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Cell migration rate of tanshinone II_A sulfonic sodium in different doses on migration of HUVEC-12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	24 h 迁移率/%
对照	0	51.93 ± 1.43
丹参酮 II _A 磺酸钠	20	52.89 ± 1.20
	40	56.49 ± 1.16*
	80	60.88 ± 1.41**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

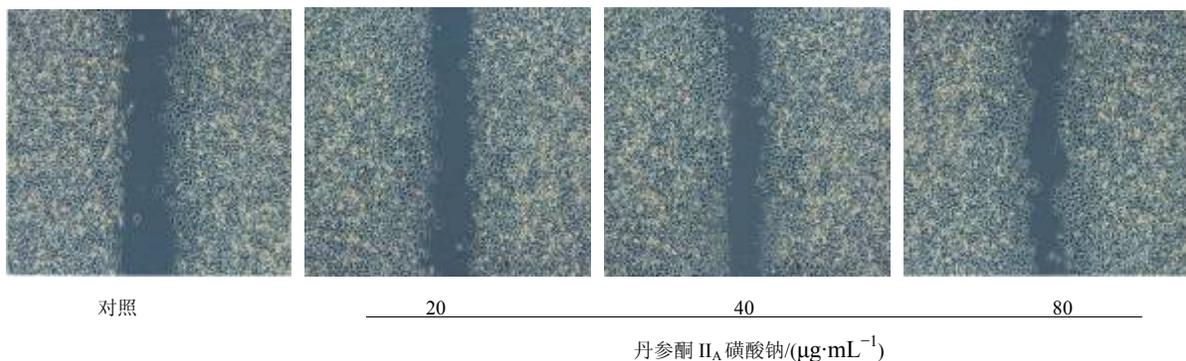


图 1 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞迁移的影响

Fig. 1 Effects of tanshinone II_A sulfonic sodium in different doses on migration of HUVEC-12 cells

3.1.2 丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞小管生成的影响 对照组与丹参酮 II_A 磺酸钠组相比，其管腔结构不结实，管状不完整，小管生成的结节点少于丹参酮 II_A 磺酸钠组。随着丹参酮 II_A 磺酸钠浓度的提高，形成的结节数目也增多，呈现一定剂量相关性。丹参酮 II_A 磺酸钠 80 μg/mL 剂量组的小管生成节结数显著高于对照组 ($P < 0.05$)，见表 2 和图 2。

3.2 丹参酮 II_A 磺酸钠对海绵植入小鼠血管生成的影响

3.2.1 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 VEGF-A mRNA 的表达作用 结果显示实验期间小鼠均未出现明显药物不良反应，海绵上均出现一定程度的新生血管，

表 2 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞小管生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of tanshinone II_A sulfonic sodium in different doses on tubule formation of HUVEC-12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	小管生成节结数
对照	0	106.67 ± 3.06
丹参酮 II _A 磺酸钠	20	112.00 ± 2.00
	40	113.29 ± 4.16
	80	116.30 ± 3.51*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

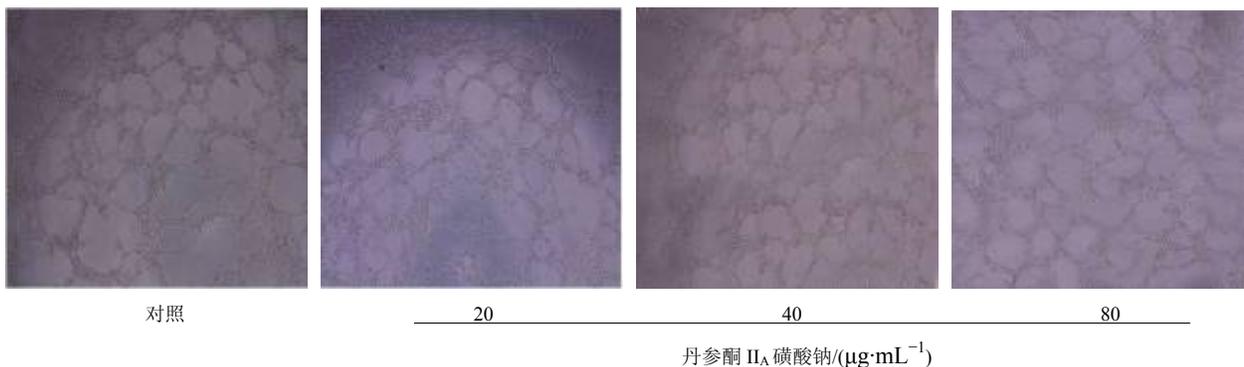


图 2 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 HUVEC-12 细胞小管生成的影响

Fig. 2 Effects of tanshinone II_A sulfonic sodium in different doses on tubule formation of HUVEC-12 cells

但是当丹参酮 II_A 磺酸钠剂量增大时, 会对小鼠皮肤造成一定的损伤。在两周时间内当丹参酮 II_A 磺酸钠的剂量为 12、24 mg 时, 其促进 VEGF-A mRNA 表达作用与对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$), 而在 12 mg 时作用最强, 同时比阳性对照药丹参多酚酸盐在 21 mg 剂量时的作用强。见表 3。

表 3 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对 VEGF-A mRNA 的表达作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of tanshinone II_A sulfonic sodium in different doses on expression levels of VEGF-A mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg	VEGF-A mRNA 相对表达值
对照	0	1
丹参多酚酸盐	21	2.02 ± 1.30*
丹参酮 II _A 磺酸钠	4	1.52 ± 0.61*
	12	3.04 ± 1.38**
	16	1.12 ± 0.87*
	24	2.17 ± 1.08**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2.2 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对新生血管生成的作用 结果显示免疫荧光实验中丹参酮 II_A 磺酸钠 12、16、24 mg 剂量组的 VEGF 蛋白表达量明显优于对照组 ($P < 0.05, 0.01$), 当剂量为 12 mg 时, VEGF 蛋白表达量最高, 荧光面积最大, 其促进新生血管生成的作用为最强, 同时比阳性对照药丹参多酚酸盐在 21 mg 剂量时的作用强, 见表 4 和图 3。

表 4 不同剂量丹参酮 II_A 磺酸钠对新生血管生成的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of tanshinone II_A sulfonic sodium in different doses on angiogenesis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg	VEGF 蛋白表达量
对照	0	5 390.38 ± 1 980.47
丹参多酚酸盐	21	7 860.59 ± 3 800.37*
丹参酮 II _A 磺酸钠	4	5 915.10 ± 2 022.59
	12	11 321.28 ± 5 645.17**
	16	6 806.76 ± 1 726.85*
	24	6 617.95 ± 3 184.21*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

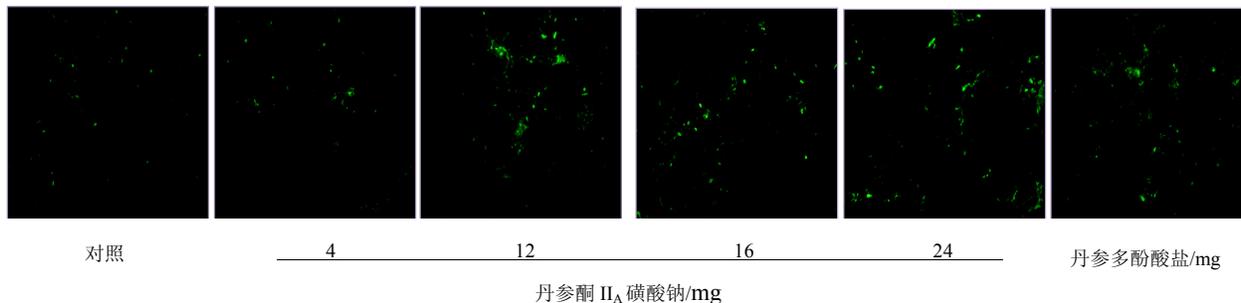


图 3 不同剂量药物对新生血管影响的荧光研究

Fig. 3 Fluorescence study on neovascularization of different doses drugs

4 讨论

中医文献中有“去瘀生新”“活血生肌”等理论,与血管新生理论密切相关,大量临床研究也已表明活血化瘀类中药对诸多缺血性疾病具有一定的疗效^[13]。新血管的形成是由不同的蛋白质组成,包括细胞黏附分子、细胞外基质组分和血管内皮生长因子受体(VEGFRs)^[14],其中 VEGFRs 作为促有丝分裂素,可以促进血管内皮细胞的迁移、增殖,且能够诱导产生内皮一氧化氮合成酶提高,引起血管的舒张,提高血管的通透性,对于血管新生发挥着重要作用,可大大促进血管新生^[15-16]。血管新生作为冠心病的内科治疗手段,已成为治疗冠心病的一种可能^[17],并在心血管疾病中表现出了积极的治疗作用。丹参具有活血祛瘀、痛经止痛的功效,在冠心病治疗方面广泛应用,有文献报道通过斑马鱼实验研究显示丹参酮的 10 个衍生物可以促血管新生,通过基因表达和激酶抑制剂阻断实验显示其作用机制可能与 VEGF/FGF-*Src*-MAPK 和 PI3K-P38 信号通路有关^[18],提示其潜在促血管新生机制。

血管新生为在原有毛细血管的基础上通过血管内皮细胞的增殖与迁移,从先前存在的血管处以芽生或非芽生的形式生成新毛细血管的过程^[19]。本文先从体外建立人脐静脉内皮细胞划痕和小管生成作用实验,该研究周期短,且人脐静脉内皮细胞株是研究血管新生直观有效的一种方法^[20],可直观分析丹参酮 II_A 磺酸钠对血管内皮细胞迁移、小管生成作用的影响,本研究以前期研究结果为基础,采用具有良好促进内皮细胞体外作用的药物浓度处理 HUVEC-12,结果显示在这两项试验中该药物均呈现一定量效关系,在血管内皮迁移试验中,丹参酮 II_A 磺酸钠 12、24 mg 剂量组与对照组相比具有统计学差异 ($P < 0.05$ 、 0.01),而在小管生成作用试验中,丹参酮 II_A 磺酸钠 24 mg 剂量组与对照组相比具有统计学差异 ($P < 0.05$),该体外研究表明丹参酮 II_A 磺酸钠对血管新生的积极作用。

为进一步探究其对血管新生的作用,首次构建小鼠体内海绵植入模型探索丹参酮 II_A 磺酸钠对体内血管新生的作用及其可能机制,研究显示当参酮 II_A 磺酸钠浓度为 12 mg 时 VEGF-A mRNA 的表达和 VEGF 蛋白表达量效果均优于 16、24 mg 组,呈现一定饱和现象,说明丹参酮 II_A 磺酸钠给药组在一定浓度范围内为非剂量相关性,对于剂量饱和现象后期尚需开展其他模型试验进行进一步深入探

索。VEGF 作为血管新生的关键调控因子之一,丹参酮 II_A 磺酸钠能有效调节其水平,在 VEGF-A mRNA 的表达作用中,12、24 mg 剂量组均优于阳性对照组,并与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01),体现出一定优势,同时推测丹参酮 II_A 磺酸钠的可能作用机制为在炎症状态下通过促进巨噬细胞释放而上调血管内皮生长因子 VEGFR-A 基因的表达及蛋白的释放,进而促进新生血管的生成。

综上所述,丹参酮 II_A 磺酸钠具有促血管新生作用,其作用机制可能通过上调 VEGF-A mRNA 的表达来影响,但由于血管新生的作用机制较为复杂,故尚需进一步深入探索。

参考文献

- [1] 陈荣荣,郭浩,徐砚通,等. 中药复方和有效成分对血管新生促进或抑制作用的研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3413-3420.
- [2] 郭浩,李磊,候金才,等. 中药促治疗性血管新生防治缺血性心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 24-28.
- [3] Sellke F W, Simons M. Angiogenesis in cardiovascular disease: current status and therapeutic potential [J]. *Drugs*, 1999, 58(3): 391-396.
- [4] Timothy D H. Therapeutic angiogenesis [J]. *Brit Med J*, 1999, 318(7197): 1536-1539.
- [5] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis [J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 389-395.
- [6] 陈飞,乔祺,王张丹,等. 参酮 II_A 磺酸钠在缺血性斑马鱼模型中的促血管新生作用 [J]. 中国临床医学, 2017, 24(2): 166-170.
- [7] 李双,王琳. 丹参酮 II_A 磺酸钠注射液的药理及临床应用进展 [J]. 中药与临床, 2011, 2(3): 61-63.
- [8] 张民,张骅,徐鹏,等. 丹参酮 II_A 的药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2008, 27(10): 1237-1239.
- [9] 李玉娟. 双参通冠方促血管新生作用的物质基础及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2010.
- [10] 程单单. CXCL12 协同 VEGF 促进内皮祖细胞的增殖迁移及血管新生 [D]. 芜湖: 皖南医学院, 2018.
- [11] 王科,铁明慧,樊涛,等. 丹参酮 II_A 对鼠新生血管的影响研究 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2017, 30(6): 400-407.
- [12] 吴家明,陆茵,郜明,等. 血管生成实验模型研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 11-14.
- [13] 张哲睿,黎响,王佑华,等. 三七及三七花总皂苷对斑马鱼模型促血管新生作用的研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2013, 27(1): 45-49.
- [14] Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor [J]. *Mol Med (Berl)*, 1999,

- 77(7): 527-543.
- [15] 朱思行, 曲 畅, 朱灵妍, 等. 活血软坚方在斑马鱼和内皮细胞模型上的促血管新生作用及其机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 129-136.
- [16] Hoeben A, Landuty B, Highley M S, *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(4): 549-580.
- [17] Syed I S, Sanborn T A, Rosengart T K. Therapeutic angiogenesis: a biologic bypass [J]. *Cardiology*, 2004, 101(1/3): 131-143.
- [18] Zhang Z R, Li J H, Li S, *et al.* *In vivo* angiogenesis screening and mechanism of action of novel tanshinone derivatives produced by one-pot combinatorial modification of natural tanshinone mixture from *Salvia Miltiorrhiza* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): 1-15.
- [19] 张少言, 林赞霄, 陈 浩, 等. 血管新生与冠心病治疗性血管生成 [J]. 心血管病学进展, 2014, 35(1): 55-59.
- [20] 张 曼, 杨 骏, 王 萍, 等. 化瘀通络灸法对 VD 大鼠血管内皮细胞增殖迁移变化的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2017, 36(4): 467-472.