

注射用丹参多酚酸对H₂O₂诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用

李 智^{1,2}, 许 晴³, 万梅绪^{1,2}, 张燕欣^{1,2}, 李德坤^{1,2}, 鞠爱春^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

3. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091

摘要: 目的 研究注射用丹参多酚酸(SAFI)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的保护作用及机制。方法 体外培养HUVEC, 设置对照组、模型组、SAFI(0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/mL)组, 对照组及模型组不加药, 继续培养24 h, 模型组及SAFI组分别加入1 mmol/L H₂O₂作用1 h, 对照组不加H₂O₂。CCK-8法检测HUVEC增殖;酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞间黏附因子(ICAM-1)、血管细胞黏附因子(VCAM-1)、丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量;TUNEL染色法观察HUVEC凋亡状态;Western blotting法检测凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的变化。结果 与模型组比较, 质量浓度大于0.1 mg/mL的SAFI组细胞存活率显著增加($P<0.05$);质量浓度大于0.2 mg/mL的SAFI组LDH、MDA水平显著降低, SOD水平显著增加($P<0.05$);0.4、0.8 mg/mL的SAFI组ICAM-1、VCAM-1水平显著降低($P<0.05$);TUNEL染色结果显示, 0.4、0.8 mg/mL的SAFI显著抑制凋亡;Western blotting结果显示, 0.4、0.8 mg/mL的SAFI组Bcl-2蛋白表达显著升高($P<0.05$), Bax蛋白表达显著下降($P<0.05$)。结论 SAFI对H₂O₂诱导的HUVEC损伤有保护作用, 主要是通过提高SOD含量,降低氧化指标LDH、MDA以及炎症因子ICAM-1、VCAM-1水平,调节凋亡蛋白Bax、Bcl-2的表达发挥作用。

关键词: 注射用丹参多酚酸;超氧化物歧化酶;细胞间黏附因子;血管细胞黏附因子;凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2385-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.013

Protective effects of Salvianolic Acids for Injection on H₂O₂-induced oxidative damage of HUVEC

LI Zhi^{1,2}, XU Qing³, WAN Meixu^{1,2}, ZHANG Yanxin^{1,2}, LI Dekun^{1,2}, JU Aichun^{1,2}

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

3. Hebei college of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

Abstract: Objective To observe the effect of Salvianolic Acids for Injection (SAFI) on the injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) and its possible mechanism. **Methods** HUVEC was cultured *in vitro* and treated with 1 mmol/L H₂O₂ for one hour to establish the HUVEC model of peroxidation damage. The control group, H₂O₂ model group and SAFI groups with different concentrations (0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/mL) for injection were set. HUVEC cell proliferation was detected by CCK-8 method. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the contents of intercellular adhesion factor (ICAM-1), vascular cell adhesion factor (VCAM-1), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD). Apoptosis status of HUVEC was evaluated by TUNEL (TdT-mediated DUTP Nick end labeling) staining. The changes of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, the survival rate of SAFI group with mass concentration > 0.1 mg/mL was significantly increased ($P < 0.05$). The levels of LDH and MDA in SAFI group with mass concentration > 0.2 mg/mL were significantly decreased, while the level of SOD was significantly increased ($P < 0.05$). The levels of ICAM-1 and VCAM-1 in 0.4 and 0.8 mg/mL SAFI group were significantly decreased ($P < 0.05$). TUNEL staining results showed that 0.4 and 0.8 mg/mL SAFI significantly inhibited apoptosis. Western blotting results showed that

收稿日期: 2021-09-18

第一作者: 李 智(1984—),女,中级工程师,研究方向为药理毒理学及药物安全性评价。Tel:13332058960 E-mail:tsl-lizhi2016@tasly.com

*通信作者: 鞠爱春(1973—),男,高级工程师,研究方向为中药注射剂工艺及生产管理。Tel:(022)86342096 E-mail:juach@tasly.com

Bcl-2 protein expression was significantly increased ($P < 0.05$) and Bax protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$) in 0.4 and 0.8 mg/mL SAFI groups. **Conclusion** SAFI has a protective effect on H_2O_2 -induced HUVEC injury, mainly through increasing the content of SOD, reducing the levels of oxidative indexes LDH and MDA, and inflammatory factors ICAM-1 and VCAM-1, and regulating the expression of apoptotic proteins Bax and Bcl-2.

Key words: Salvianolic Acids for Injection; superoxide dismutase (SOD); intercellular adhesion factor (ICAM-1), vascular cell adhesion factor (VCAM-1); apoptosis

脑卒中是导致人类致死和致残的主要病因之一,其中以急性脑梗死最为常见。脑梗死发生后,脑组织内积累大量的活性氧自由基,高的氧化应激水平损伤细胞及组织,出现炎症反应、氧化应激、细胞凋亡和血脑屏障的破坏等病理过程^[1-8],极大危害人类的健康,如何减轻缺血后脑组织的氧化损伤已成为临床治疗的重点。血管内皮细胞在维持血管结构和功能的完整中具有重要作用,除了作为屏障外,还可以分泌多种活性物质,参与凝血、炎症过程中的白细胞黏附、维持凝血-纤溶系统的稳态,调节血管的收缩与舒张功能,在维持血管壁的完整和抑制血小板聚集方面起重要作用。血管内皮功能紊乱,与血管内皮细胞损伤密切相关^[9]。

注射用丹参多酚酸(SAFI)是应用现代工艺从丹参中提取的水溶性成分,主要成分是丹酚酸B、丹酚酸D、紫草酸、迷迭香酸,体外研究表明其能够清除 DPPH 自由基发挥抗氧化作用^[10],可以抑制神经胶质细胞的炎症反应减轻局灶性脑缺血大鼠的脑损伤^[11-12],但是,其对血管内皮细胞损伤的作用未见相关报道。

过氧化氢(H_2O_2)是一种活性氧(ROS),通过氧化损伤DNA、膜脂和蛋白质,导致细胞的功能障碍,在诱导心脑血管细胞的损伤乃至凋亡过程中起关键作用^[13-14]。 H_2O_2 诱导的细胞损伤模型已成为研究细胞氧化损伤的重要工具之一。 H_2O_2 易穿透细胞膜,生成高度毒性的羟自由基,可以对细胞造成损伤,引起凋亡。本研究通过 H_2O_2 诱导人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的损伤模型,检测SAFI对损伤血管内皮的保护作用并初步分析其作用机制,为深入研究其在临床治疗脑梗死发挥血管保护作用提供参考。

1 材料

1.1 细胞

HUVEC 购自中科院上海生科院细胞资源中心。

1.2 药物及主要试剂

SAFI(天津天士力之骄药物有限公司,批号20170104,规格:每支装0.13 g,含丹参多酚酸100 mg);

DMEM 高糖培养基(批号 11965-084)、PBS 溶液(批号 1897215)、胰酶(批号 1742078),购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(批号 DB10194785)购自美国 Hyclone 公司;青-链双抗(批号 C0222)购自碧云天生物技术公司; H_2O_2 溶液(分析纯,批号 HX0636)购自无锡市苏强化工有限公司;CCK-8 检测试剂盒(批号 CB45525049)购自日本同仁;超氧化物歧化酶(SOD)活性试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;TUNEL 检测试剂盒(批号 E-CK-A320)购自美国 Elabscience 公司;细胞间黏附因子1(ICAM-1)、血管细胞黏附因子1(VCAM-1)ELISA 试剂盒(达科为生物技术有限公司);单克隆兔抗人 Bcl-2、Bax 及 β -actin 抗体购自 abcam 公司;HRP 标记山羊抗兔抗体 IgG 二抗、ECL 化学发光检测试剂盒购自中杉金桥公司。

1.3 主要仪器

细胞培养箱,美国 Thermo 公司;多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司;倒置显微镜,德国 Leica 公司;细胞计数仪,美国 Millipore 公司;高速离心机,美国 Thermo 公司;电子分析天平,瑞士 Mettler 公司。

2 方法

2.1 SAFI对正常 HUVEC 的影响

取对数生长期的 HUVEC 以 5×10^5 /mL、每孔 200 μ L 接种于 96 孔板。24 h 后吸弃培养液 20 μ L,加入 SAFI 药液,使各组终质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/mL,对照组不加药。继续培养 24 h,加入 CCK-8,37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min 后,酶标仪检测 450 nm 波长出吸光度(A)值,计算细胞存活率,实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 SAFI对 H_2O_2 损伤后 HUVEC 增殖的影响

细胞接种操作同“2.1”项,加入终质量浓度为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/mL 的 SAFI,对照组及模型组不加药,继续培养 24 h,模型组及 SAFI 组分别加入 1 mmol/L H_2O_2 作用 1 h,对照组不加 H_2O_2 。各组加入 CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min 后,酶标仪检测 450 nm 波长处的 A 值,计算各组细

胞存活率。

2.3 MDA、SOD、LDH、ICAM-1、VCAM-1 含量测定

将HUVEC接种于6孔板中,细胞分组、给药、造模方法同“2.2”项,轻轻吸取细胞培养上清,按照相应试剂盒说明测定各组LDH、ICAM-1、VCAM-1的含量;收集各组细胞,超声破碎后,按照试剂盒说明测定各组MDA、SOD含量。

2.4 TUNEL染色法观察HUVEC凋亡

将对数生长期的HUVEC接种于放有无菌盖玻片的6孔板中,SAFI质量浓度设置为0.4、0.8 mg/mL,其余细胞分组、给药、造模方法同“2.2”项,按照TUNEL试剂盒说明书进行凋亡检测。

2.5 Western blotting检测Bcl-2、Bax蛋白表达

SAFI质量浓度设置为0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL,其余细胞接种、分组、给药、造模方法同“2.3”项,离心收集细胞,用RIPA强蛋白裂解液提取各组细胞中总蛋白。Bradford蛋白定量试剂盒测定各组细胞中总蛋白的浓度。每组上样20 μ g总蛋白量,进行SDS-PAGE凝胶电泳,1.5 h后转PVDF膜,封闭后孵育单克隆抗体Bcl-2、Bax及actin一抗,4 $^{\circ}$ C过夜,TBST洗涤3次,室温孵育山羊抗兔IgG二抗2 h。孵育结束后TBST洗涤3次,用ECL化学发光法显影检测。Image J软件分析灰度值,并以各目的蛋白与内参GAPDH灰度值的比值,计算相对灰度值,表示目的蛋白的含量。

2.6 数据统计分析

运用SPSS17.0软件处理数据,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。先进行方差齐性检验,再采用单因素方差分析(one way ANOVA)。若有差异进行两组间比较SD检验,若方差不齐,采用Tamhane'T2检验。

3 结果

3.1 SAFI对正常HUVEC增殖的影响

如图1所示,HUVEC在不同的SAFI浓度作用下,细胞增殖稍有变化,与对照组比较无统计学意义。结果表明SAFI对HUVEC的增殖没有影响。

3.2 SAFI对H₂O₂损伤HUVEC增殖的影响

结果如图2所示,与对照组比较,H₂O₂模型组的细胞存活率显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,经质量浓度 ≥ 0.1 mg/mL的SAFI孵育后,细胞存活率显著增加($P < 0.05$)。

3.3 SAFI对LDH、SOD、MDA水平的影响

与对照组比较,模型组SOD水平显著降低,

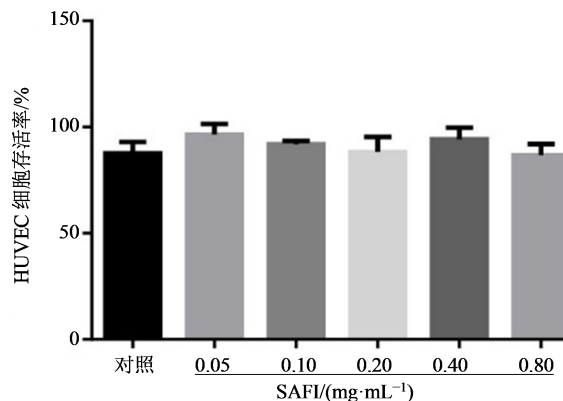
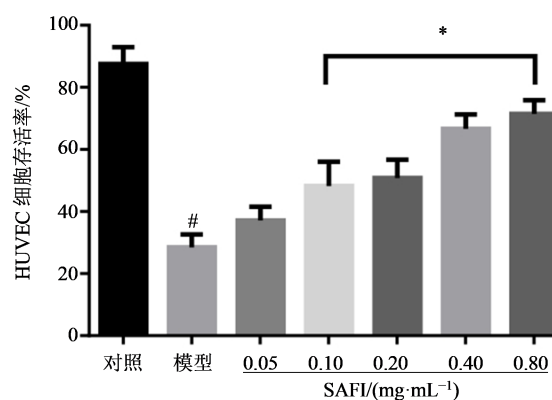


图1 SAFI对HUVEC活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of SAFI on cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group

图2 SAFI对H₂O₂损伤后HUVEC活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of SAFI on HUVEC viability after H₂O₂-induced oxidative damage ($\bar{x} \pm s, n=6$)

LDH、MDA水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,质量浓度 ≥ 0.2 mg/mL的SAFI组LDH、MDA水平显著降低,SOD水平显著增加($P < 0.05$),见表1。结果表明,质量浓度高于0.2 mg/mL的SAFI对H₂O₂所诱导的HUVEC氧化损伤有保护作用。

3.4 SAFI对ICAM-1、VCAM-1水平的影响

经过H₂O₂作用1 h后,黏附因子ICAM-1、VCAM-1的水平与对照组比较显著增加($P < 0.05$);质量浓度为0.4、0.8 mg/mL的SAFI组ICAM-1、VCAM-1水平与模型组比较显著降低($P < 0.05$)。见表2。

3.5 SAFI对H₂O₂损伤后HUVEC凋亡的影响

通过TUNEL染色法检测各组细胞的凋亡状态发现,与对照组比较,H₂O₂诱导HUVEC凋亡现象显著($P < 0.05$);与模型组比较,0.4、0.8 mg/mL的SAFI能显著的抑制H₂O₂诱导HUVEC凋亡现象。结果见图3。

表1 SAFI对SOD、MDA、LDH水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Effects of SAFI on level of SOD, MDA and LDH ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	SOD/ (kU·g ⁻¹)	MDA/ (μmol·g ⁻¹)	LDH/ (kU·L ⁻¹)
对照	—	233.72±11.23	3.06±0.43	0.97±0.03
模型	—	97.63±8.14 [#]	8.29±0.17 [#]	1.84±0.04 [#]
SAFI	0.05	94.23±10.05	8.02±0.52	1.73±0.08
	0.10	109.21±6.42	7.99±0.39	1.64±0.07
	0.20	129.35±7.13 [*]	6.03±0.41 [*]	1.34±0.06 [*]
	0.40	168.45±6.78 ^{**}	5.17±0.34 [*]	1.46±0.05 [*]
	0.80	179.26±8.54 ^{**}	4.68±0.73 ^{**}	1.12±0.04 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

表2 SAFI对ICAM-1、VCAM-1水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Effects of SAFI on content of ICAM-1 and VCAM-1 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	VCAM-1/ (pg·mL ⁻¹)	ICAM-1/ (pg·mL ⁻¹)
对照	—	1.97±0.21	0.97±0.04
模型	—	7.64±0.32 [#]	6.32±0.11 [#]
SAFI	0.05	7.53±0.18	6.38±0.07
	0.10	6.94±0.21	5.96±0.09
	0.20	6.24±0.36	4.62±0.14 [*]
	0.40	5.46±0.45 [*]	4.03±0.12 [*]
	0.80	3.68±0.54 ^{**}	3.87±0.17 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

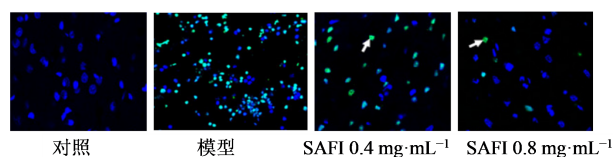
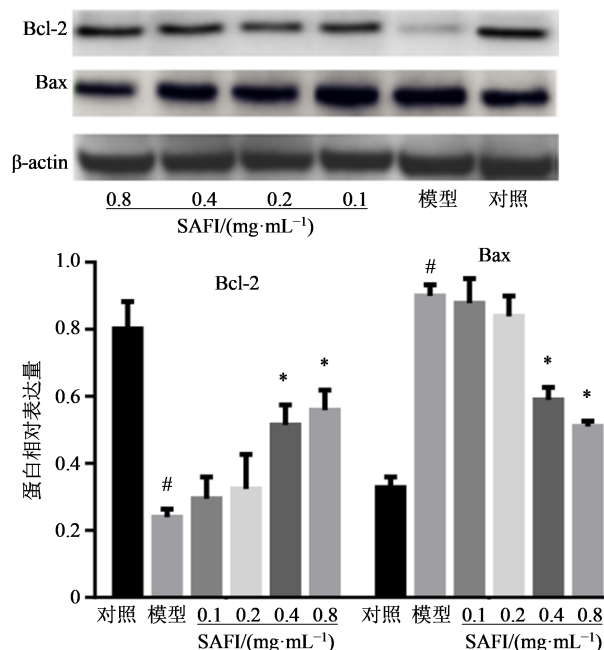


图3 TUNEL法检测SAFI对HUVEC凋亡的影响($\times 200$)

Fig. 3 TUNEL assay was used to detect the effect of salvi-anolic acid on apoptosis of HUVEC ($\times 200$)

3.6 SAFI对H₂O₂氧化损伤后凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测发现,与对照组比较,H₂O₂氧化损伤后,模型组 Bax 表达显著升高、Bcl-2 表达显著降低($P<0.05$);质量浓度大于 0.1 mg/mL 的 SAFI 有诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 高表达,抑制促凋亡蛋白 Bax 表达的趋势,与模型组比较,0.4、0.8 mg/mL 的 SAFI 组 Bax 蛋白表达显著降低,Bcl-2 蛋白表达显著升高($P<0.05$),结果见表 4。



与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group

图4 SAFI对凋亡蛋白相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of SAFI on relative expression of apoptotic proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

SAFI 是以唇形科丹参药材为原料,采用现代先进工艺提取、分离其水溶性酚酸类有效成分研制而成的新一代中药注射剂,其主要由丹酚酸 B、丹酚酸 D、丹酚酸 E、迷迭香酸和紫草酸组成,前期研究发现,各单体表现出较强的抗氧化作用特点,现代药理研究表明,丹参多酚酸对局部缺血性脑损伤具有抗炎、神经营养、再生和保护的作用^[15-17],为此利用 H₂O₂ 诱导 HUVEC 引起的氧化损伤模型,初步推测 SAFI 对缺血性脑损伤的改善作用是通过血管内皮细胞 HUVEC 氧化损伤的保护作用实现的。

氧化应激是体内氧化与抗氧化作用失衡,产生大量氧化中间产物的过程。梗死后,过量的自由基会破坏几乎所有细胞组件,包括 DNA、脂类、蛋白质等,同时启动导致梗死性损伤的细胞分子途径,造成组织器官的持续性破坏。其中,中枢血管系统特别容易受到活性自由基攻击,引起神经功能紊乱直接导致血脑屏障完整性遭到破坏,形成脑水肿和细胞死亡^[18-19]。生理条件下,机体内广泛存在能够防止氧化代谢物损伤的抗氧化酶。SOD 为自由基清除剂,本身可以清除机体过多的氧自由基,于体内外均可作为抗氧化系统的主要标记物^[20]。SOD 在清除超氧阴离子的同时也易受到氧自由基的破坏而失活,因此,梗死后受损细胞内的氧自由基不能得

到及时有效的清除,造成脑组织持续性破坏,MDA是脂质过氧化的产物,其含量的高低既能直接反应脂质被氧化的水平和程度,又可间接反应机体清除氧自由基的能力^[21]。当细胞膜受到损伤时,胞内的LDH会释放到培养液中,LDH、MDA含量显著增加,因此LDH、MDA是一个检测血管内皮细胞损伤的重要指标。血管内皮损伤后,检测到ICAM-1和VCAM-1表达增加,ICAM-1、VCAM-1介导循环中的白细胞和内皮细胞黏附,进而浸润到血管外脑组织,导致脑缺血后炎症反应^[22-24],抑制ICAM-1、VCAM-1的表达可以减轻脑部缺血损伤。

CCK-8实验是测定细胞活力的常用方法,在不同浓度SAFI作用于正常的HUVEC实验中,各组细胞活力没有显著性差异,说明SAFI对HUVEC没有毒性。在H₂O₂诱导的HUVEC氧化损伤条件下,浓度高于0.1 mg/mL的SAFI组细胞的存活率升高;SOD的活性增加,LDH、MDA含量随浓度的增高降低,与模型组比较有显著性差异;浓度高于0.2 mg/mL时,SAFI组黏附因子ICAM-1、VCAM-1的含量显著降低,说明SAFI可以缓解H₂O₂诱导的血管内皮细胞HUVEC的氧化损伤。细胞凋亡时,染色体DNA双链断裂或单链断裂而产生大量的黏性3'-OH末端,TUNEL染色可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下,将脱氧核糖核苷酸和荧光素的衍生物标记在DNA的3'-OH末端,使凋亡细胞发荧光,而正常细胞则没有DNA分裂,因此没有荧光。Bcl-2是抑制细胞凋亡的关键蛋白,而Bax作为促凋亡因子,在调控细胞凋亡过程中发挥重要调节作用^[22]。本研究通过TUNEL染色法,发现H₂O₂诱导的HUVEC凋亡显著,0.4、0.8 mg/mL的SAFI能降低凋亡的发生。Western blotting对凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax表达的检测分析发现,H₂O₂损伤时,Bax蛋白表达量显著增加,Bcl-2蛋白表达量降低,0.4、0.8 mg/mL的SAFI组Bcl-2蛋白表达量显著升高,Bax蛋白表达量显著降低,说明SAFI通过调节Bcl-2、Bax表达量抑制HUVEC凋亡。

本研究结果表明,SAFI能保护H₂O₂诱导的HUVEC,主要是通过提高SOD含量,降低氧化指标LDH、MDA以及炎症因子ICAM-1、VCAM-1,调节凋亡蛋白Bax、Bcl-2的表达发挥作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M A. Pathobiology of

ischaemic stroke: an integrated view [J]. Trends Neurosci, 1999, 22(9): 391-397.

[2] Moskowitz M A, Lo E H, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments [J]. Neuron, 2010, 67(2): 181-198.

[3] Liu Y, Zhang X J, Yang C H, et al. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB expression [J]. Brain Res, 2009, 1268: 174-180.

[4] Lakhan S E, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches [J]. J Transl Med, 2009, 7: 97.

[5] Yang C, Zhang X, Fan H, et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia [J]. Brain Res, 2009, 1282: 133-141.

[6] Crowder R J, Freeman R S. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons [J]. J Neurosci, 1998, 18(8): 2933-2943.

[7] Chan P H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(1): 2-14.

[8] Budd S L. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation [J]. Pharmacol Ther, 1998, 80(2): 203-229.

[9] 李德坤, 苏志刚, 苏小琴, 等. 注射用丹参多酚酸化学成分及质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(2): 362-368.

Li D K, Su Z G, Su X Q, et al. Research progress on chemical composition and quality control of Salvianolic Acids for Injection [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(2): 362-368.

[10] 李莉, 李小凡, 文旺, 等. 注射用丹参多酚酸体外抗氧化研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1535-1540.

Li L, Li X F, Wen W, et al. Study on antioxidant activity of Salvianolic acid for Injection *in vitro* [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1535-1540.

[11] Zhuang P W, Wan Y J, Geng S H, et al. Salvianolic Acids for Injection (SAFI) suppresses inflammatory responses in activated microglia to attenuate brain damage in focal cerebral ischemia [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198: 194-204.

[12] 郝晨伟, 李正翔, 张铭慧, 等. 丹参及其配伍制剂治疗冠心病的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 4096-4106.

Hao C W, Li Z X, Zhang M H, et al. Research progress of *Salvia miltiorrhiza* and its compatible preparations in

- treatment of coronary heart disease [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(13): 4096-4106.
- [13] Buonocore G, Perrone S, Tataranno M L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2010, 15(4): 186-190.
- [14] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6): 749-762.
- [15] 王 伟. 丹参多酚酸对大鼠脑缺血再灌注内质网应激的影响 [J]. 中国老年保健医学, 2018(1): 52-54.
Wang W. Effects of salvianolic acid on endoplasmic reticulum stress induced by cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. Chin J Geriatr, 2018(1): 52-54.
- [16] Chen Y H, Du G H, Zhang J T. Salvianolic acid B protects brain against injuries caused by ischemia-reperfusion in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(5): 463-466.
- [17] Krizbai I A, Bauer H, Bresgen N, et al. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells [J]. Cell Mol Neurobiol, 2005, 25(1): 129-139.
- [18] Loch head J J, McCaffrey G, Quigley C E. Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30: 1625-1636.
- [19] Zhu Y Z, Huang S H, Tan B K. Antioxidants in Chinese herbal medicine: a biochemical perspective [J]. Nat Prod Rep, 2004, 21(4): 478.
- [20] Ji X, Tan B K, Zhu Y C, et al. Comparison of cardioprotective effects using ramipril and DanShen for the treatment of acute myocardial infarction in rats [J]. Life Sci, 2003, 73(11): 1413-1426.
- [21] Danton G H, Dietrich W D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(2): 127-136.
- [22] Frijns C J, Kappelle L J. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease [J]. Stroke, 2002, 33(8): 2115-2122.
- [23] Zhao B, Rickert C H, Filler T J, et al. Adhesion of washed blood platelets in vitro is advanced, accelerated, and enlarged by oxidized low-density lipoprotein [J]. Am J Hematol, 1995, 49(3): 177-182.
- [24] Ling Y, Lu N, Gao Y, et al. Endostar induces apoptotic effects in HUVECs through activation of caspase-3 and decrease of Bcl-2 [J]. Anticancer Res, 2009, 29(1): 411-417.

[责任编辑 兰新新]