

基于脑微血管内皮细胞保护的注射用丹参多酚酸质量生物标志物研究

李 珍¹, 申 茜¹, 金博文², 刘 璇², 华文浩³, 张艳军^{4,5}, 庄朋伟^{2,4}, 郭 虹^{1*}

1. 天津中医药大学 中医药研究院, 省部共建组分中药国家重点实验室, 天津 301617

2. 天津中医药大学 中药学院, 现代中医药海河实验室, 天津 301617

3. 北京大学人民医院 检验科, 北京 101109

4. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300072

5. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300072

摘 要: **目的** 基于血管内皮保护的关键药效环节, 发现能够反映注射用丹参多酚酸(SAFI)的质量生物标志物(Q-biomarkers), 为完善其质量控制评价提供参考。**方法** 90 °C加热处理SAFI 4、18、60 h, 得到不同化学质量的SAFI(SAFI4、SAFI18、SAFI60), 高效液相色谱(HPLC)法分析紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸Y、丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸D、迷迭香酸变化趋势。体外培养小鼠脑微血管内皮细胞(bEnd.3), 建立氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型, 给予SAFI、SAFI4、SAFI18、SAFI60处理18 h, CCK-8法检测细胞相对存活率, 试剂盒法检测上清液乳酸脱氢酶(LDH)、NO水平, 划痕实验检测细胞迁移率; 通过DIA蛋白质组学分析不同化学质量的SAFI给药后产生的差异蛋白, 结合药效学及偏最小二乘回归(PLSR)分析筛选SAFI的Q-biomarkers。**结果** 与SAFI相比, SAFI4、SAFI18、SAFI60样品中的紫草酸、丹酚酸B和丹酚酸Y含量下降, 丹参素钠含量上升, 原儿茶醛、丹酚酸D、迷迭香酸变化不明显。药效学结果表明, 与模型组相比, SAFI、SAFI4及SAFI18组细胞相对存活率显著上升、LDH泄漏量显著下降、NO水平显著下降、细胞迁移率显著升高($P<0.05、0.01、0.001$), 对细胞具有显著保护作用; 而SAFI60组无明显保护作用。蛋白质组学结果表明, 18个差异蛋白的含量随药效学和成分的变化而发生一致性上升或下降, 与药效进行相关性分析发现Kdr、Cxcl12的变量重要性投影值(VIP)皆大于1, 尤其Kdr[血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)]与血管内皮功能高度相关, 可能是潜在的SAFI的Q-biomarkers。**结论** 通过不同化学质量的SAFI的内皮保护药效及差异蛋白关联分析发现, VEGFR2可以作为SAFI的Q-biomarker。

关键词: 质量生物标志物; 中药质量控制; 蛋白质组学; 注射用丹参多酚酸; 血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)04-0720-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.04.006

Study on quality biomarkers of Salvianolic Acids for Injection based on protection of cerebral microvascular endothelial cells

LI Zhen¹, SHEN Qian¹, JIN Bowen², LIU Xuan², HUA Wenhao³, ZHANG Yanjun^{4,5}, ZHUANG Pengwei^{2,4}, GUO Hong¹

1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Institute of Chinese Medicine, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. State Key Laboratory of Component Chinese Medicine, Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Chinese Materia Medica College, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Department of Laboratory, Peking University People's Hospital, Beijing 101109, China

4. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300072, China

5. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300072, China

Abstract: Objective Based on the key pharmacodynamic link of the protection of vascular endothelial, we found quality biomarkers (Q-biomarkers) that can reflect the quality of Salvianolic Acid for Injection (SAFI), which can provide a reference for the

收稿日期: 2023-10-25

基金项目: 天津市科技计划项目(21YDTPJC00240); 天津市研究生科研创新项目(2021YJSS178)

第一作者: 李 珍, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: lizhenjinss@163.com

*通信作者: 郭 虹, 副研究员, 研究方向为中药药理。E-mail: cacti1983@163.com

improvement of the quality control of it. **Methods** Preparation of three SAFI samples with different chemical qualities using the 90 °C treated for 4, 18, 60 h, namely SAFI4, SAFI18 and SAFI60. Analyzing for sodium danshensu, protamine sulfates, salvianolic acid D, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid Y using HPLC. Mouse brain microvascular endothelial cells (bEnd.3) were cultured *in vitro* and established oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model, treated with SAFI, SAFI4, SAFI18, and SAFI60 for 18 h. CCK8 method was used to detect the relative survival rate of cells, the reagent kit method was used to detect the levels of lactate dehydrogenase (LDH) and NO in the supernatant, and scratch assay was used to detect cell migration rate. Analysis of differential expressed proteins (DEPs) produced after administration of SAFI with different chemical qualities by DIA proteomics, and the quality biomarkers of SAFI were screened in combination with pharmacodynamics and partial least squares regression (PLSR) analysis. **Results** Compared with SAFI, the content of salvianolic acid B, salvianolic acid Y and lithospermic acid decreased, sodium danshensu increased and protamine sulfates, salvianolic acid D, rosmarinic acid showed no significant changes in SAFI samples of different chemical qualities. The pharmacodynamic results showed that, compared with the model group, the SAFI, SAFI4, and SAFI18 groups showed a significant increase in cell relative survival rate, a significant decrease in LDH leakage, a significant decrease in NO levels, and a significant increase in cell migration rate ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), indicating a significant protective effect on cells; the SAFI60 group showed no significant protective effect. Proteomic analysis showed that there were 89 differentially expressed proteins varied with the changes of pharmacodynamics and composition, of which 18 differentially expressed proteins consistent upward or downward in their content with the changes of pharmacodynamics. Correlation analyses with pharmacodynamics showed that the VIP values of Kdr and Cxcl12 were all greater than one, especially Kdr [vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)] was highly correlated with vascular endothelial function, which may be a potential biomarker of endothelial protective quality for SAFI. **Conclusion** Endothelial protective efficacy of different chemical qualities of SAFI and differentially expressed proteins association analysis revealed that VEGFR2 can be used as a quality biomarker for SAFI.

Key words: quality biomarkers; quality control of traditional Chinese medicine; proteomics; Salvianolic Acids for Injection; vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)

中药具有多成分、多靶点、多效应的特点,这对于中药的质量控制是巨大的挑战^[1]。现行的中药质量控制大多采用一种或几种成分作为化学标记去制定其质量标准,但其中用于控制中药质量的某些成分往往缺乏足够的药理作用验证或与临床疗效无关,因此导致基于化学基准的质量控制与生物活性相关性较差^[2-3]。此外,还存在以同一成分(比如阿魏酸)作为具有不同基原和功效的中药质量控制指标的现象,导致中药质量评价指标的合理性值得商榷^[4]。基于药物临床适应症的质量生物标志物(Q-biomarker)直接反映药物有效性与安全性,可以评价中药(或复杂成分药物)与生物体作用时的生物效价,为完善中药质量评价体系提供新思路^[5]。

脑微血管内皮细胞是血脑屏障的基本骨架和关键结构,对维持中枢神经系统微环境稳态至关重要^[6],卒中后血脑屏障(BBB)的破坏可导致脑损伤和神经损伤^[7]。注射用丹参多酚酸(SAFI)为丹参水溶性成分制备而成的中药注射剂,临床多用于缺血性脑卒中的治疗^[8]。关于其质量控制研究已有诸多报道, Li 等^[9]利用 UPLC 结合 Q-TOF-MS 确定 SAFI 的质量标志物为丹酚酸 B、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 D。然而,SAFI 的质量标志物仅反映了成

分信息,并不能体现药物在体内的特性。基于此,本课题拟基于缺血性脑卒中血管内皮保护的关键药效环节,通过体外实验与蛋白组学结合的方法,发现 SAFI 的 Q-biomarker,以期提升该品种的质量控制,同时为完善中药质量控制体系提供方法学支撑。

1 材料

1.1 细胞

小鼠脑微血管内皮细胞(bEnd.3),购于北纳创联生物科技有限公司(BNCC),来源编号 ATCCCL-2299。

1.2 药物与主要试剂

SAFI(批号 20210304,规格:每支 0.13 g,含丹参多酚酸 100 mg,天津天士力之骄药业有限公司);丹参素钠(批号 A1018A027,质量分数 $\geq 98\%$)、原儿茶醛(批号 A1228A024,质量分数 $\geq 98\%$)、迷迭香酸(批号 A923E021,质量分数 $> 98\%$)、丹酚酸 B(批号 2230818002,质量分数 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司;紫草酸(批号 J120ZAS,质量分数 $> 98\%$)购自大连美仑生物技术有限公司;丹酚酸 Y(批号 CFS202301,质量分数 $\geq 98\%$)购自武汉天植生物技术有限公司;丹酚酸 D(批号 DST210622-

230,质量分数 $\geq 95\%$)购自成都乐美天医药科技有限公司;DMEM培养基(批号8122517)、胎牛血清(批号2500251P)购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒(货号C0039)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(货号C0017)、NO试剂盒(货号S0021S)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验仪器

LC-20A高效液相色谱仪(岛津公司);3111细胞培养箱(美国Thermo公司);IX53倒置显微镜(Olympus公司);SPARK Flexstation3多功能酶标仪工作站(Molecular Devices公司)。

2 方法

2.1 不同化学质量SAFI样品的制备

取SAFI 4支分别溶于10 mL超纯水,采用加热处理方法模拟药物成分变化过程制备不同样品,90℃加热处理4、18、60 h,得到不同化学质量的SAFI(SAFI4、SAFI18、SAFI60)^[10-11]。

2.2 不同化学质量SAFI成分的确认

2.2.1 HPLC 条件^[12-13] 色谱柱为Kromasil C₁₈(150 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱(0~15 min,10%~23% A;15~30 min,23%~25% A;30~36 min,25%~26% A;36~45 min,26%~10% A);体积流量1 mL $\cdot$ min⁻¹;检测波长280 nm;柱温30℃;进样量10 μ L。

2.2.2 供试品溶液配制 取SAFI、SAFI4、SAFI18、SAFI60样品适量,制备成800 μ g $\cdot$ mL⁻¹的待测样品(终溶剂是50%的色谱甲醇),溶解混匀后使用0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液配制 分别精密称取丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸D、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸Y对照品适量,50%甲醇溶解混匀后使用0.22 μ m微孔滤膜滤过,制成每毫升含丹参素钠280 μ g、原儿茶醛10 μ g、丹酚酸D 600 μ g、迷迭香酸600 μ g、紫草酸600 μ g、丹酚酸B 800 μ g、丹酚酸Y 600 μ g的混合对照品溶液。

2.3 不同化学质量SAFI对bEnd.3细胞的保护作用

2.3.1 bEnd.3细胞的培养 bEnd.3细胞培养于DMEM高糖完全培养基(含10%胎牛血清、青霉素100 U $\cdot$ L⁻¹、链霉素100 mg $\cdot$ L⁻¹)中,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,待细胞密度达到80%左右,用0.25%胰酶消化后进行传代。

2.3.2 bEnd.3细胞氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)模型的建立及分组给药 根据文献报道^[14]建立

bEnd.3细胞OGD/R损伤模型模拟体外脑缺血再灌注损伤模型。将细胞分为6组:对照组、模型组、SAFI组、SAFI4组、SAFI18组、SAFI60组。细胞接种后待生长至融合,弃旧培养液,细胞以预热至37℃的PBS溶液洗涤2次。氧糖剥夺阶段:对照组置换为高糖DMEM置于37℃、5% CO₂常规细胞培养箱培养,其余组置换为无糖DMEM于充满95% N₂、5% CO₂混合气体的缺氧小室37℃培养6 h;复糖复氧阶段:对照组和模型组换为高糖DMEM,给药组换为含药(6.25 μ g $\cdot$ mL⁻¹)的高糖培养基,置于常规细胞培养箱培养18 h。

2.3.3 细胞活力测定 bEnd.3细胞以 5×10^4 个 $\cdot$ mL⁻¹的密度接种于96孔板,待细胞充分贴壁,弃旧培养液,对照组换成DMEM培养基,给药组分别换成含SAFI(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹)的DMEM培养基(每孔100 μ L)作用24 h,或按“2.3.2”项下方法对各组细胞进行OGD处理后给予含SAFI(6.25、12.50、25.00、50.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹)的高糖培养基复糖复氧18 h。实验结束后每孔加入100 μ L含10% CCK-8工作液于37℃避光孵育30 min,用酶标仪测定450 nm处各组吸光度(A)值,计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3.4 细胞上清液中LDH活性检测 将bEnd.3细胞以每孔 1×10^5 个 $\cdot$ mL⁻¹接种到6孔板中,按“2.3.2”项下方法处理细胞,收集各组细胞上清液,并按试剂盒说明书操作加入LDH工作液,用酶标仪测定490 nm处各组A值。

2.3.5 细胞上清液中NO含量检测 按“2.3.4”项下方法处理bEnd.3细胞,收集每孔细胞上清液,转移至新的96孔板中,按照总NO检测试剂盒说明书进行实验操作。用酶标仪测定540 nm处各组A值,根据标准品曲线计算细胞上清中NO的浓度。

2.3.6 划痕实验检测细胞迁移能力 将bEnd.3细胞以每孔 1×10^5 个 $\cdot$ mL⁻¹接种到6孔板中,按照“2.3.2”项下方法处理细胞,复糖复氧后各组使用200 μ L枪头做划痕处理,拍照记录划痕后0、18 h时划痕愈合情况。使用Image J处理图像并计算各组细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (0 \text{ h划痕面积} - 18 \text{ h划痕面积}) / 0 \text{ h划痕面积}$$

2.4 DIA蛋白质组学分析

按照“2.3.4”项下方法处理细胞,取SAFI、SAFI4、SAFI18、SAFI60 4个实验组的细胞蛋白样品进行DIA蛋白质组学^[15-16]分析,筛选出差异常蛋白作为潜在的SAFI的Q-biomarker。

2.5 SAFI Q-biomarker的发现

用偏最小二乘回归(PLSR)分析确定一致性变化差异蛋白与细胞活力、LDH释放量、NO含量、细胞迁移率间的相关性,确定SAFI的Q-biomarker。

2.6 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,使用GraphPad Prism软件绘图。

3 结果

3.1 不同化学质量的SAFI成分的确证

采用HPLC法对SAFI、SAFI4、SAFI18、SAFI60样品进行分析。如图1所示,与SAFI相比,SAFI4、SAFI18、SAFI60样品中的紫草酸、丹酚酸B和丹酚酸Y含量下降,丹参素钠含量上升,原儿茶醛、丹酚酸D、迷迭香酸变化不明显。加热法对SAFI进行处理,可得到化学质量不同的SAFI样品。

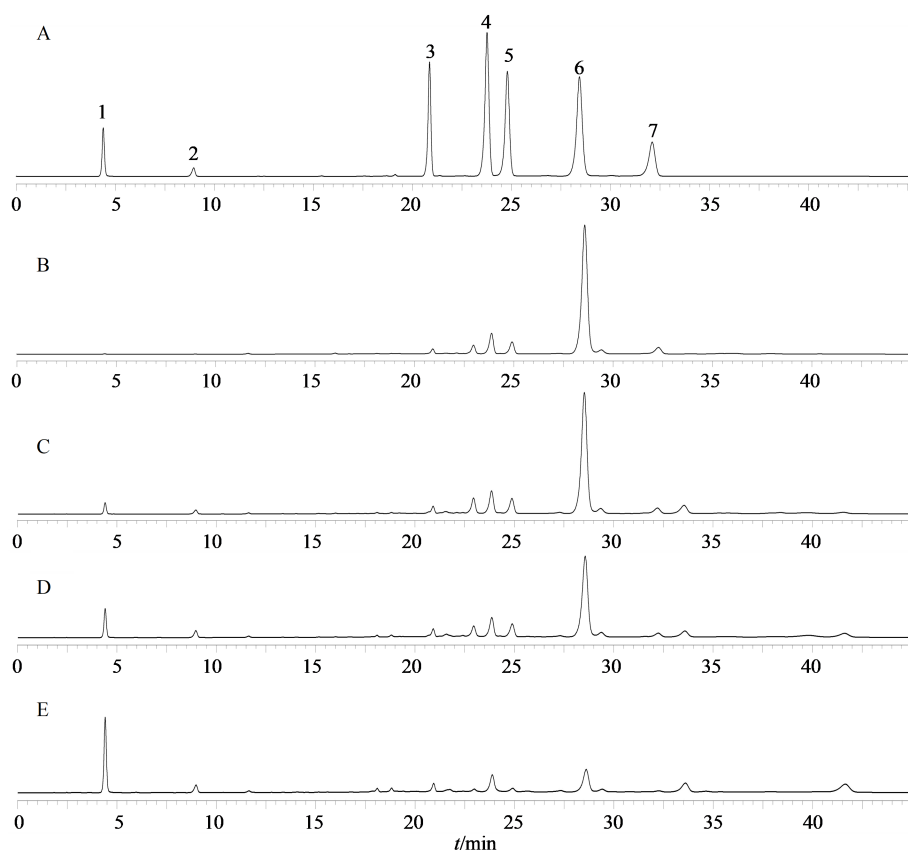
3.2 不同化学质量的SAFI对OGD/R bEnd.3细胞的保护作用

3.2.1 bEnd.3细胞给药浓度的确定 如图2-A所

示,与对照组比较,SAFI $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组bEnd.3细胞存活率显著降低($P < 0.05$),SAFI给药质量浓度在 $6.25 \sim 50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对正常培养的bEnd.3细胞存活率无显著影响。如图2-B所示,与对照组相比,模型组细胞存活率显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,SAFI给药质量浓度在 $6.25 \sim 50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞活力均显著升高($P < 0.001$),且作用呈质量浓度相关性。后续选择给药质量浓度 $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行实验。

3.2.2 不同化学质量的SAFI对OGD/R损伤bEnd.3细胞存活率及LDH漏出的影响 如图3-A、B所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低($P < 0.001$),细胞上清液中LDH漏出量显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,SAFI、SAFI4和SAFI18组细胞存活率显著升高($P < 0.05, 0.001$),且LDH显著降低($P < 0.05, 0.001$),SAFI60组细胞存活率及细胞上清液中LDH无显著变化。

3.2.3 不同化学质量的SAFI对OGD/R损伤bEnd.3细胞上清液NO含量的影响 如图4所示,与对照组相比,模型组细胞上清液中NO含量显著降低($P <$



1-丹参素钠; 2-原儿茶醛; 3-丹酚酸D; 4-迷迭香酸; 5-紫草酸; 6-丹酚酸B; 7-丹酚酸Y。

1-sodium danshensu; 2-protocatechuic sulfates; 3-salvianolic acid D; 4-rosmarinic acid; 5-lithospermic acid; 6-salvianolic acid B; 7-salvianolic acid Y.

图1 混合对照品(A)、SAFI(B)、SAFI4(C)、SAFI18(D)、SAFI60(E)HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A), SAFI (B), SAFI4 (C), SAFI18 (D), and SAFI60 (E)

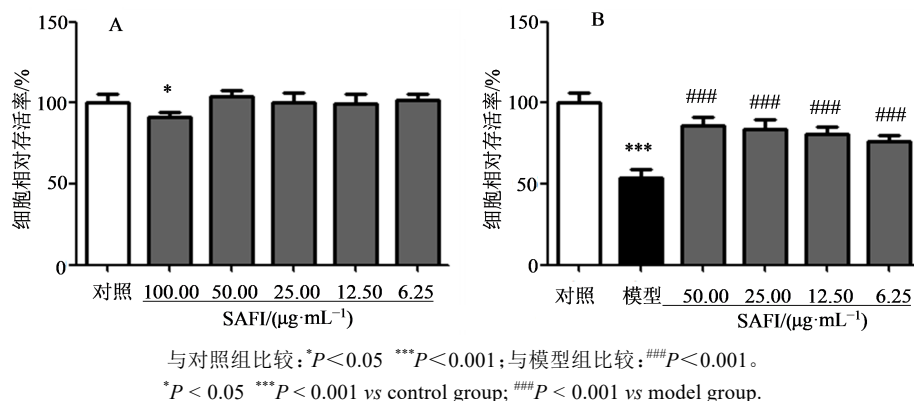


图2 不同浓度SAFI对正常(A)或OGD/R(B)后bEnd.3细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effects of different concentrations of SAFI on viability of normal (A) or OGD/R-damaged (B) bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

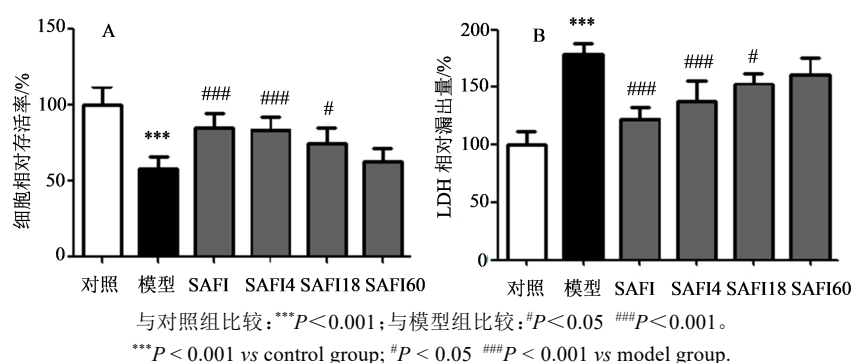


图3 不同化学质量SAFI对OGD/R损伤的bEnd.3细胞存活率(A)及细胞上清液LDH漏出量(B)的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of different chemical qualities of SAFI on survival rate (A) and LDH release (B) of bEnd.3 cells induced by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n=6$)

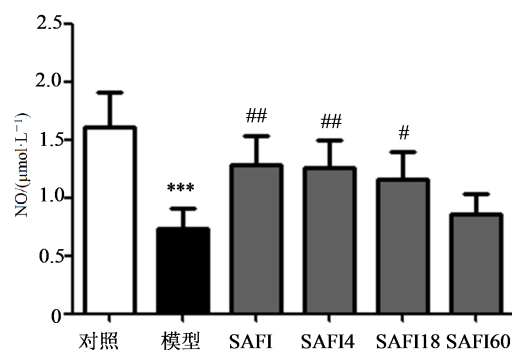


图4 不同化学质量的SAFI对OGD/R损伤bEnd.3细胞上清NO水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Effect of different chemical qualities of SAFI on NO release of bEnd.3 cells induced by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n=6$)

0.001); 与模型组比较, SAFI、SAFI4 和 SAFI18 组 NO 含量显著升高($P < 0.05, 0.01$), SAFI60 组细胞 NO 含量无显著变化。

3.2.4 不同化学质量的 SAFI 对 OGD/R 损伤的 bEnd.3 细胞迁移能力的影响 如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组细胞迁移率显著降低($P < 0.001$); 与

模型组比较, SAFI、SAFI4、SAFI18 组细胞迁移率显著升高($P < 0.05, 0.001$), SAFI60 组细胞迁移率无显著变化。

3.3 不同化学质量的 SAFI 对 OGD/R 损伤 bEnd.3 细胞差异蛋白的筛选

如图 6 所示, 蛋白组学分析显示 SAFI、SAFI4 与 SAFI18 组共有无差异蛋白 7 867 个, SAFI 与 SAFI60 组差异蛋白 113 个, 两者交集 89 个差异蛋白, 涉及 Kdr、Cxcl12、Ssnal、Crim1 等蛋白表达的变化, 其中随药效变化的一致性上调蛋白 11 个, 下调蛋白 7 个。

3.4 SAFI Q-biomarker 的发现

如图 7 所示, 用 PLSR 分析确定了一致性变化差异蛋白与细胞活力、LDH 释放量、NO 含量、细胞迁移率间的相关性。变量重要性投影值(VIP)越大, 表明该变量对于分类贡献越大, 即为不同化学质量 SAFI 引起不同效应的 Q-biomarker。18 个差异蛋白与药效进行相关性分析发现 Kdr、Cxcl12 的 VIP 值皆大于 1, 尤其 Kdr [血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)] 与血管内皮功能高度相关。因此,

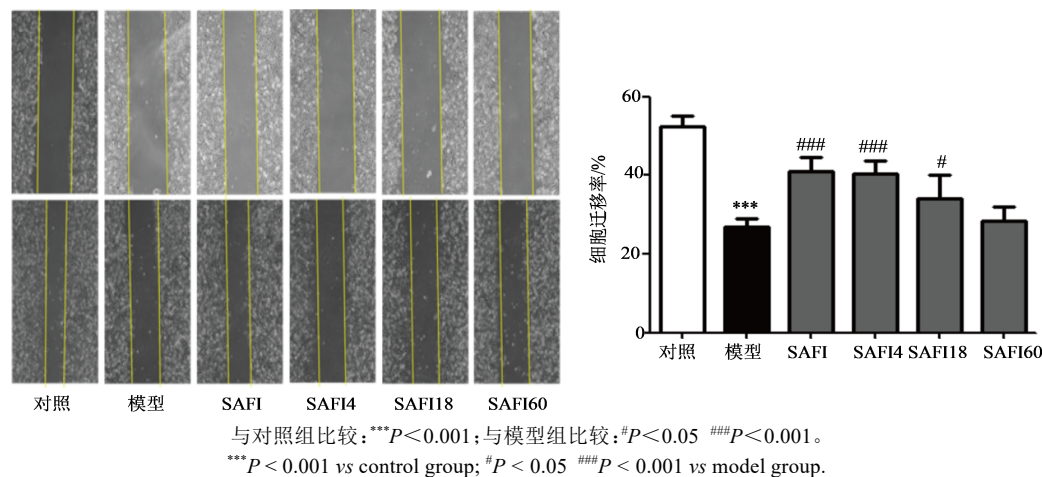
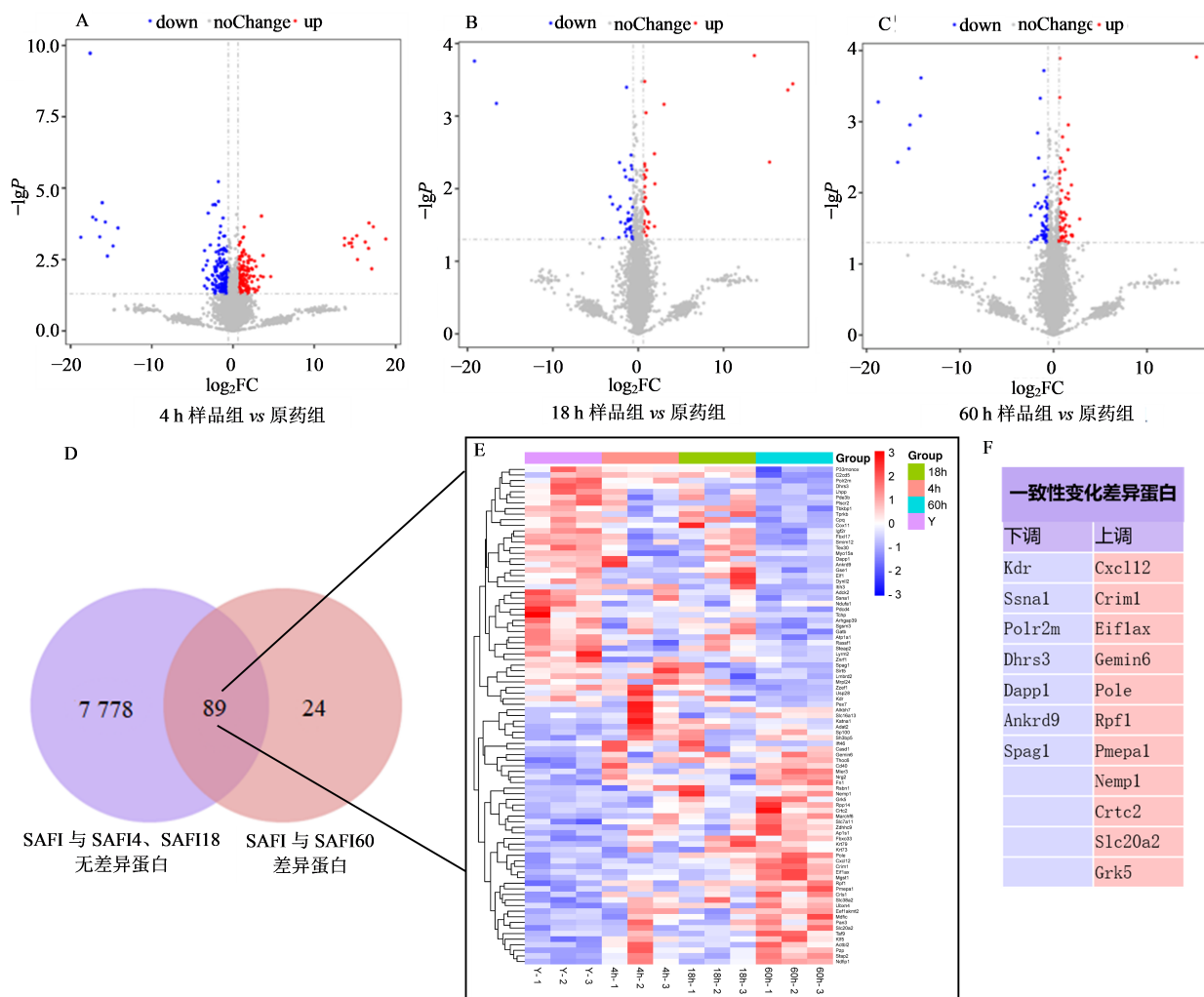


图 5 不同质量的SAFI对OGD/R损伤的bEnd.3细胞迁移率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Effect of different chemical qualities of SAFI on migration of bEnd.3 cells induced by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A-SAFI vs SAFI4火山图; B-SAFI vs SAFI18火山图; C-SAFI vs SAFI60火山图; D-SAFI与SAFI4、SAFI18无差异蛋白,与SAFI60差异蛋白Venny图; E-89个差异蛋白热图; F-一致性变化差异蛋白(蓝色为下调蛋白,红色为上调蛋白)。

A-SAFI vs SAFI4 volcano maps; B-SAFI vs SAFI18 volcano maps; C-SAFI vs SAFI60 volcano maps; D-Venny diagram of no differential protein between SAFI with SAFI4 and SAFI18, and differential protein between SAFI with SAFI60; E-89 differential protein heatmaps; F-consistency change differential protein (blue represents downregulated protein, red represents upregulated protein).

图 6 不同质量的SAFI对OGD/R损伤的bEnd.3细胞中蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of different chemical qualities of SAFI on proteins of bEnd.3 cells induced by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

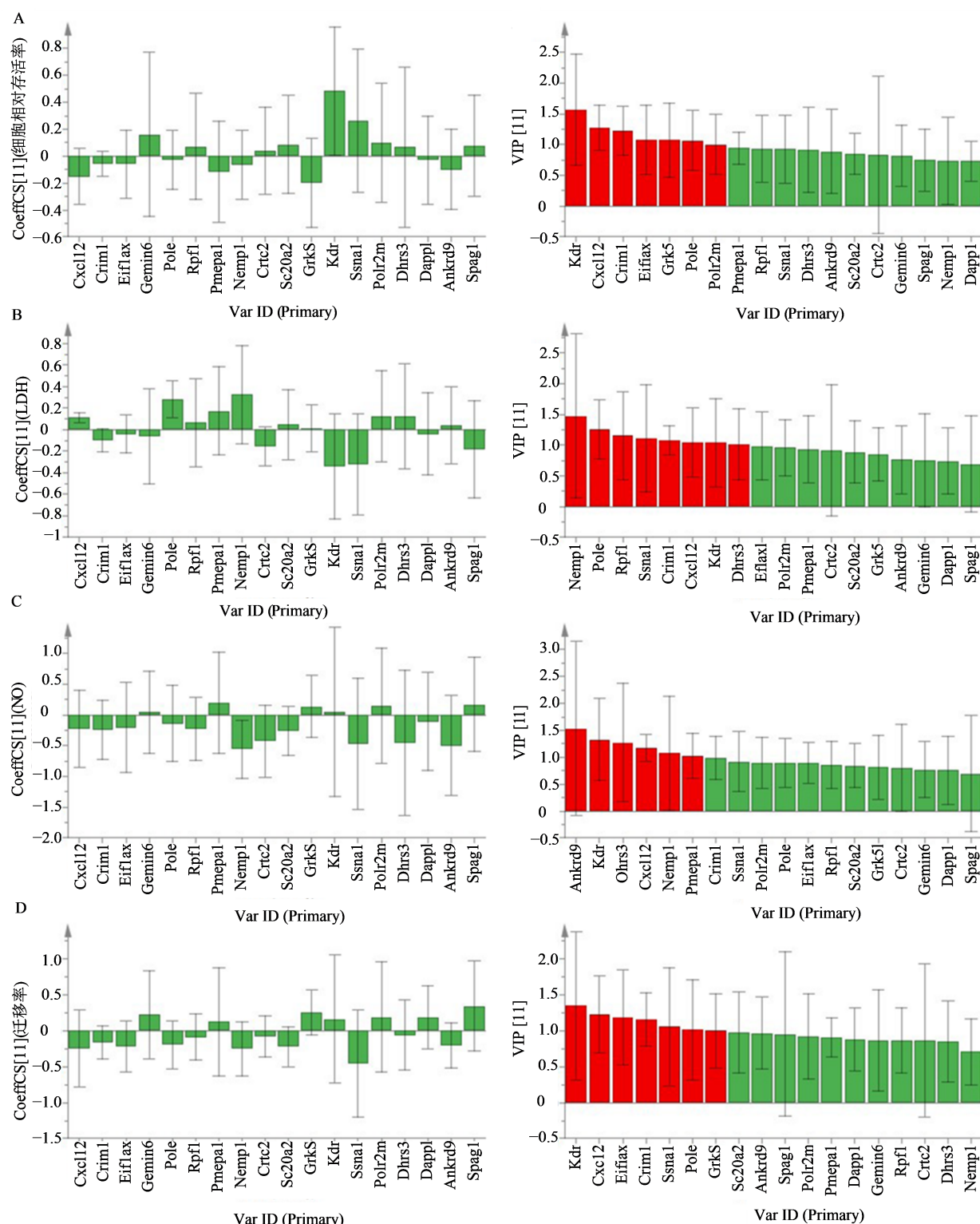


图 7 PLSR 分析细胞活力 (A)、LDH (B)、NO (C)、细胞迁移率 (D) 与差异蛋白的相关性及 VIP 值图
Fig. 7 PLSR analyzed correlation between cell viability (A), LDH (B), NO (C), cell migration (D) and differential proteins, and VIP value plots

Kdr 可以作为 SAFI 的 Q-biomarker。

4 讨论

中药质量研究和应用关系到中药产业长远发展, 质量标准的可行性及公认性成为影响其现代

化、国际化的重要瓶颈。Q-biomarkers^[17]的提出为中药质量控制研究指明了新方向, 相较于传统中药质量感官评价方法的主观性^[18]和现代化学评价方法的单一性^[19], 其具有与中药疗效相关性强, 能反

映中药整体质量的优势,具有重要的学术意义和应用价值。

当中药作用于人体时,随药效发生变化而变化的效应靶蛋白被定义为潜在的Q-biomarkers,这种评价方法尤其适用于多成分、多靶点、药效作用机制尚不明确的中药及其制剂^[15]。随着现代技术的不断进步及多学科交叉方法的联用,推动中药Q-biomarker检测逐渐走向成熟,可以更好地服务于中药质量评价的研究,促进中医药现代化与国际化发展。

脑卒中是全球残疾和致死的主要原因,其中缺血性卒中约占所有卒中病例的87%^[20]。中医认为缺血性卒中属于血瘀证,SAFI是以活血化瘀类的丹参为原料药的制剂,临床上主要用于卒中病中经络(轻、中度脑梗死)恢复期瘀血阻络证的治疗^[21],其主要成分是水溶性酚酸类,包括丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸等,对缺血性脑卒中具有良好的疗效^[22]。通过紧密连接结合在一起的脑微血管内皮细胞是构成血脑屏障的关键组成部分,在脑缺血再灌注期间受损,可以分泌活性因子对抗外部损伤起到保护作用,维持脑内微循环稳态正常运行^[23]。脑微血管内皮细胞受损后导致微血管损伤以及血脑屏障破坏等加剧脑损伤。因此,脑微血管内皮细胞损伤作为脑缺血再灌注的初始阶段起到主导作用,可成为治疗脑缺血再灌注损伤的关键靶点^[24]。

脑缺血再灌注时,内皮细胞活力降低,细胞内LDH外渗,通过检测细胞活力及LDH漏出可以判断细胞损伤程度。血管内皮是体内合成和释放NO最主要的细胞,NO可调节血管舒张、血管通透性等进而保护心脑血管^[25]。细胞迁移是内皮细胞的基本功能之一,血管生成靠内皮细胞的激活、增殖、迁移等一系生理活动来完成^[26]。本研究对SAFI进行加热处理得到不同化学质量的SAFI,建立体外OGD/R模型模拟体内脑缺血再灌注损伤,观察SAFI、SAFI4、SAFI18、SAFI60对体外培养OGD/R后bEnd.3细胞增殖、上清液LDH和NO水平、细胞迁移的影响。结果发现,SAFI、SAFI4、SAFI18可显著增加OGD/R后bEnd.3的细胞活力、NO含量、细胞迁移率及显著抑制LDH漏出,而SAFI60无法逆转OGD/R引起的上述变化。因此,以上述细胞活力、LDH、NO、细胞迁移率为关键药效指标,可以特异性反应不同化学质量的SAFI对OGD/R损伤内皮细胞的保护作用。

蛋白质组学DIA技术是近几年发展的质谱技

术,与传统的DDA技术相比,它具备高通量、高灵敏度和高准确性的特点,已成功用于各种蛋白质组学应用^[27-29]。利用DIA蛋白组学数据筛选SAFI、SAFI4及SAFI18无差异蛋白以及SAFI与SAFI60差异蛋白,并取交集后共得到89个差异蛋白,其中随药效一致性变化的蛋白共18个(下调7个,上调11个)。进一步将18个一致性变化的差异蛋白与相应药效进行相关性分析,其中发现Kdr、Cxcl12的VIP值大于1,与药效相关性较强。CXCL12也称基质细胞衍生因子1(SDF-1),在细胞趋化中起关键作用,可介导单核细胞分化和巨噬细胞浸润^[30]。Kdr(VEGFR2)是血管内皮生长因子(VEGF)受体,VEGF/VEGFR-2介导的信号通路可以促进内皮细胞增殖、迁移以及增加血管生成等,与内皮细胞功能密切相关^[31]。最终确定与内皮细胞功能密切相关的VEGFR2是SAFI的Q-biomarker。

本研究通过不同化学质量的SAFI的内皮保护药效及差异蛋白关联分析发现了VEGFR2可以作为SAFI的Q-biomarker。本研究的完成不仅为提高SAFI质量评价标准及安全性提供方法学支撑,同时为完善中药质量评价方法提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lu X Y, Jin Y Y, Wang Y Z, et al. Multimodal integrated strategy for the discovery and identification of quality markers in traditional Chinese medicine [J]. J Pharm Anal, 2022, 12(5): 701-710.
- [2] Li Y L, Ju S S, Lin Z J, et al. Bioactive-chemical quality markers revealed: An integrated strategy for quality control of chicory [J]. Front Nutr, 2022, 9: 934176.
- [3] Ren J L, Zhang A H, Kong L, et al. Analytical strategies for the discovery and validation of quality-markers of traditional Chinese medicine [J]. Phytomedicine, 2020, 67: 153165.
- [4] 王卫明, 彭慧, 张贵君. «中华人民共和国药典»中阿魏酸作为多味中药质量评价指标的特异性 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5677-5679.
Wang W M, Peng H, Zhang G J. Specificity of ferulic acid in the Chinese Pharmacopoeia as a quality evaluation index for various Chinese medicinal materials [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(12): 5677-5679.
- [5] 李小锦, 黄莹莹, 杨珍, 等. 基于效应基准的中药质量生物标志物研究策略 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 204-210.

- Li X J, Huang Y Y, Yang Z, et al. Research strategy for quality-biomarkers of traditional Chinese medicine based on effect benchmarks [J]. *Acta Pharm Sin*, 2019, 54(2): 204-210.
- [6] Wei J, Xie J X, He J H, et al. Active fraction of *Polyrhachis vicina* (Roger) alleviated cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting SIRT3-mediated mitophagy and angiogenesis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155104.
- [7] Chen X Y, Wan S F, Yao N N, et al. Inhibition of the immunoproteasome LMP2 ameliorates ischemia/hypoxia-induced blood-brain barrier injury through the Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *Mil Med Res*, 2021, 8(1): 62.
- [8] Wang L D, Liu Y, Wei J J, et al. Effects of intravenous thrombolysis with and without salvianolic acids for injection on the functional recovery of patients with acute ischemic stroke: A systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(6): 2513-2530.
- [9] Li W, Polachi N, Wang X Y, et al. A quality marker study on salvianolic acids for injection [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 138-147.
- [10] 黄世超, 瞿海斌. 丹酚酸B稳定性研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2015, 32(5): 644-648.
- Huang S C, Qu H B. Advances of stability of salvianolic acid B [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2015, 32(5): 644-648.
- [11] 李珊珊, 赵紫伟, 何蕊, 等. 原料药丹酚酸B粉末及其水溶液稳定性研究 [J]. *云南中医学院学报*, 2012, 35(4): 44-46.
- Li S S, Zhao Z W, He R, et al. Study on raw materials of salvianolic acid B for the stability in powder and aqueous solution [J]. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med*, 2012, 35(4): 44-46.
- [12] 杨婷, 谢涛, 张臻臻, 等. 一标多测法同时测定注射用丹参多酚酸中5种成分的含量 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(1): 42-49.
- Yang T, Xie T, Zhang Z Z, et al. Simultaneous determination of five components in salvianolic acid for injection by quantitative analysis of multi-components with single-marker method [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2023, 40(1): 42-49.
- [13] 徐静瑶, 刘小琳, 佟玲, 等. 高效液相色谱法测定注射用丹参多酚酸中6种水溶性成分的含量 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(14): 1599-1603.
- Xu J Y, Liu X L, Tong L, et al. HPLC determination of six water-soluble chemical constituents in salvianolic acid for injection [J]. *Chin J N Drugs*, 2015, 24(14): 1599-1603.
- [14] 张雯琪, 李东娜, 马萌萌, 等. 注射用丹参多酚酸通过调节Akt/mTOR通路介导的自噬对氧糖剥夺/再灌注Neuro-2a细胞凋亡的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(9): 2706-2714.
- Zhang W Q, Li D N, Ma M M, et al. Salvianolate Lyophilized Injection induced autophagy against neuronal apoptosis through Akt/mTOR pathway in Neuro-2a cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(9): 2706-2714.
- [15] Shen Q, Wu Y, Li Z, et al. Quality assessment of traditional Chinese medicine using quality biomarkers: Compound DanShen dripping pills as an example [J]. *Phytochem Anal*, 2023, 34(5): 580-593.
- [16] Poulos R C, Cai Z, Robinson P J, et al. Opportunities for pharmacoproteomics in biomarker discovery [J]. *Proteomics*, 2023, 23(7-8): e2200031.
- [17] Wu X, Zhang H B, Fan S S, et al. Quality markers based on biological activity: A new strategy for the quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 103-108.
- [18] 伍振峰, 林瑞华, 王学成, 等. 基于中药制药工程质量观的质量控制模式研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(1): 271-278.
- Wu Z F, Lin R H, Wang X C, et al. Quality control mode based on engineering quality view of Chinese medicine pharmacy [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(1): 271-278.
- [19] Jiang H Y, Zhang Y X, Liu Z G, et al. Advanced applications of mass spectrometry imaging technology in quality control and safety assessments of traditional Chinese medicines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114760.
- [20] Ajoolabady A, Wang S Y, Kroemer G, et al. Targeting autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107848.
- [21] 祖赛, 刘晨曦, 商佳, 等. 注射用丹参多酚酸治疗急性期缺血性脑卒中的临床疗效及对血清细胞间黏附分子-1、肿瘤坏死因子- α 水平的影响 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(8): 1691-1696.
- Zu S, Liu C x, Shang J, et al. Clinical effect of Salvianolic Acids for Injection in treatment of acute cerebral ischemic stroke and effect on levels of serum intercellular adhesion molecule-1 and tumor necrosis factor- α [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(8): 1691-1696.
- [22] 陈璐, 聂永伟, 张燕欣, 等. 丹参单体化合物及丹参类制剂对心脑血管系统信号通路影响的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(11): 2333-2342.

- Chen L, Nie Y W, Zhang Y X, et al. Research progress on signaling pathway effect of cardiovascular and cerebrovascular system of *Salvia miltiorrhiza* monomer and its preparationson [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(11): 2333-2342.
- [23] Gu C F, Mo W C, Wang K L, et al. Exosomal miR-370-3p increases the permeability of blood-brain barrier in ischemia/reperfusion stroke of brain by targeting MPK1 [J]. *Aging*, 2023, 15(6): 1931-1943.
- [24] 肖湑, 杨丽萍, 陈普, 等. 对羟基苯甲醛对氧糖剥夺/复氧模型脑微血管内皮细胞的保护作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(11): 1201-1205.
- Xiao T, Yang L P, Chen P, et al. P-Hydroxybenzaldehyde protects brain microvascular endothelial cells against OGD/R injury [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2022, 24(11): 1201-1205.
- [25] Janaszak-Jasiecka A, Płoska A, Wierońska J M, et al. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: Molecular mechanisms as potential therapeutic targets [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 21.
- [26] Guan Y Y, Liu J, Gu Y K, et al. Effects of hypoxia on cerebral microvascular angiogenesis: Benefits or damages? [J]. *Aging Dis*, 2023, 14(2): 370-385.
- [27] 邓秋媚, 黄泽, 黎军宏, 等. 基于蛋白组学的加味四逆汤治疗缺血性中风恢复期的作用机制 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(6): 1378-1381.
- Deng Q M, Huang Z, Li J H, et al. Study on the mechanism of modified Sini Decoction in treating ischemic stroke in recovery period based on proteomics [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(6): 1378-1381.
- [28] Robinson A E, Binek A, Venkatraman V, et al. Lysine and arginine protein post-translational modifications by enhanced DIA libraries: Quantification in murine liver disease [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(10): 4163-4178.
- [29] Kitata R B, Yang J C, Chen Y J. Advances in data-independent acquisition mass spectrometry towards comprehensive digital proteome landscape [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2023, 42(6): 2324-2348.
- [30] Gao J H, Yu X H, Tang C K. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: An underlying therapeutic target [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 495: 538-544.
- [31] Chen L M, Xie X S, Wang T T, et al. ARL13B promotes angiogenesis and glioma growth by activating VEGFA-VEGFR2 signaling [J]. *Neuro-oncology*, 2023, 25(5): 871-885.

[责任编辑 兰新新]