

• 药理与临床 •

## 丹参茎叶提取物及其主要成分对人脐静脉内皮细胞的保护作用及机制研究

孙成静<sup>1</sup>, 曾慧婷<sup>2</sup>, 宿树兰<sup>1\*</sup>, 项 想<sup>1</sup>, 朱 悦<sup>1</sup>, 顾俊菲<sup>1</sup>, 唐志书<sup>3</sup>, 段金廛<sup>1\*</sup>

1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程中心, 江苏 南京 210023
2. 江西省中医药研究院, 江西 南昌 330046
3. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712000

**摘要:** **目的** 探讨丹参茎叶提取物及其主要成分对氧化应激和高糖损伤的人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的保护作用及机制。**方法** 建立 HUVECs 氧化应激与高糖损伤模型, 分别给予不同剂量的丹参茎叶醇提物 (CJ)、丹参茎叶水提物 (SJ)、丹参根醇提物 (CG)、丹参根水提物 (SG) 及迷迭香酸、丹酚酸 B、芦丁、异槲皮苷、隐丹参酮等, MTT 法检测细胞活力, 检测谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、一氧化氮 (NO)、内皮素 (ET-1)、细胞黏附因子 (ICAM-1) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达水平。**结果** 与对照组比较, HUVECs 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, GSH-Px、CAT 和 NO 含量降低 ( $P < 0.01$ ), ET-1 含量升高 ( $P < 0.01$ ); HUVECs 经高糖处理后, ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  含量升高 ( $P < 0.01$ ), NO 含量降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, CJ、CG、SJ、SG 组 GSH-Px、CAT 和 NO 含量升高, ET-1、ICAM-1、TNF- $\alpha$  含量降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。迷迭香酸、丹酚酸 B、芦丁等的高、中剂量组, 异槲皮苷、隐丹参酮高剂量组均能显著提高 GSH-Px、CAT 和 NO 含量 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 降低 ET-1 含量 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 丹酚酸 B、异槲皮苷和芦丁的高剂量组及迷迭香酸的高、中剂量组均可显著降低 ICAM-1 含量 ( $P < 0.01$ ), 除氨基胍给药组外, 其他给药组 TNF- $\alpha$  含量相比模型组明显降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。除氨基胍和异槲皮苷低剂量组, 其他给药组 NO 含量均明显升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。**结论** 一定质量浓度范围内的丹参茎叶与丹参根醇提物及水提物、迷迭香酸、丹酚酸 B、芦丁、异槲皮苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和高糖引起的 HUVECs 细胞损伤具有明显保护作用, 其作用机制与抑制细胞间黏附分子的表达, 调节 NO 和 TNF- $\alpha$  生成密切相关。本研究将为丹参药材生产过程产生的非药用部位茎叶的资源价值发现及转化利用提供参考。

**关键词:** 丹参; 茎叶; 人脐静脉内皮细胞; 资源价值发现; 资源化利用; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 芦丁; 异槲皮苷; 隐丹参酮  
**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2019)14 - 3357 - 11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.014

## Protective effect and mechanism of extracts and main components from stem and leaves of *Salvia miltiorrhiza* on HUVECS

SUN Cheng-jing<sup>1</sup>, ZENG Hui-ting<sup>2</sup>, SU Shu-lan<sup>1</sup>, XIANG Xiang<sup>1</sup>, ZHU Yue<sup>1</sup>, GU Jun-fei<sup>1</sup>, TANG Zhi-shu<sup>3</sup>, DUAN Jin-ao<sup>1</sup>

1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Jiangxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046, China
3. Shaanxi Province Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resource Industrialization, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

**Abstract: Objective** To investigate the protective effects of the extracts and active components from stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* on oxidative stress and high glucose-injured human umbilical endothelial cells (HUVECs). **Methods** The models of

收稿日期: 2018-12-26

作者简介: 孙成静 (1995—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药化学。Tel/Fax: (025)85811916 E-mail: 874661518@qq.com

\*通信作者 宿树兰 (1974—), 女, 教授, 研究方向为中药资源化学与方药功效物质基础研究。

Tel/Fax: (025) 85811916 E-mail: sushulan1974@163.com

段金廛 (1956—), 教授, 博士生导师, 中国自然资源学会中药及天然药物资源专业委员会主任委员, 国家“973”计划首席科学家。  
 Tel/Fax: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

oxidative stress and high glucose injury in HUVECs were established. The ethanol extract of *S. miltiorrhiza* stems and leaves (CJ), ethanol extract of *S. miltiorrhiza* roots (CG), water extract of *S. miltiorrhiza* stems and leaves (SJ), water extract of *S. miltiorrhiza* roots (SG), rosmarinic acid, salvianolic acid B, rutin, isoquercitrin, cryptotanshinone, aminoguanidine and VC were administrated to cells. MTT were used to observe the cell viability. The levels of glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), nitric oxide (NO), endothelin (ET-1), ICAM-1 and TNF- $\alpha$  were detected. **Results** Compared with the control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased the levels of GSH-Px, CAT and NO ( $P < 0.01$ ) and increased the level of ET-1 ( $P < 0.01$ ), glucose increased the levels of ICAM-1 and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) and decreased the level of NO ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the levels of GSH-Px, CAT and NO in CJ, CG, SJ and SG groups were increased, and the levels of ET-1, ICAM-1 and TNF- $\alpha$  were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). VC, rosmarinic acid, salvianolic acid B and rutin high and medium dose groups, and isoquercitrin, cryptotanshinone high dose group significantly increased the levels of GSH-Px, CAT and NO ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and decreased the level of ET-1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). ICAM-1 levels were significantly decreased in the high dose groups of salvianolic acid B, isoquercitrin and rutin as well as in the high and medium dose groups of rosmarinic acid ( $P < 0.01$ ). In addition to the aminoguanidine group, the levels of TNF- $\alpha$  of other groups were significantly lower than the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Except the aminoguanidine group and isoquercetin low dose group, the levels of NO of other groups were significantly higher than the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** In certain concentration range of alcohol extract and water extract of stems, leaves and roots of *S. miltiorrhiza*, rosmarinic acid, salvianolic acid B, rutin and isoquercitrin have protective effects on HUVECs injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose. And the mechanisms are related to inhibition of intercellular adhesion molecule expression and regulation of NO and TNF- $\alpha$  production. This study will provide reference for the discovery and transformation of the resource value of non-medicinal stems and leaves produced during the production of *S. miltiorrhiza*.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bge.; stems and leaves; HUVECs; resource value discovery; resource utilization; rosmarinic acid; salvianolic acid B; rutin; isoquercitrin; cryptotanshinone

随着人们生活水平的提高和生活方式的改变, 心血管疾病及其并发症发病率均呈逐年上升的趋势, 而血管内皮细胞结构损伤和功能异常为导致高血压、血栓、动脉粥样硬化等多种心血管疾病的病理基础<sup>[1]</sup>。血管内皮作为血液与组织物质交换的屏障, 通过分泌多种生物活性物质, 起到维持血管张力、调节血压、抗凝血、促凝等作用以维持血管及血液流变的正常状态<sup>[2-3]</sup>。目前, 氧化应激损伤为引起血管内皮细胞功能障碍的主要因素之一。正常情况下, 血管内皮细胞增殖与凋亡两者保持平衡以维持血管稳定<sup>[4]</sup>。血管内皮细胞功能异常是引起糖尿病血管病变的早期标志, 也是糖尿病病变的关键环节<sup>[5]</sup>。高糖环境下, 机体清除氧自由基能力下降, 氧化应激与高糖环境对血管内皮细胞造成毒性作用, 使细胞受损, 导致内皮细胞分泌和释放活性因子、炎性介质等功能失调。因此抗氧化药物用于心血管疾病治疗具有重要意义<sup>[6-7]</sup>。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 及其制剂为治疗心血管相关疾病的常用药, 研究表明, 丹参中活性成分丹酚酸类和丹参酮类化合物对血管内皮细胞具有保护作用<sup>[8-10]</sup>。近年来随着对丹参地上部分化学成分及生物活性的研究, 发现丹参茎叶中富含大量丹酚酸类、黄酮类成分, 具有活血化瘀、抗氧化、抗病毒、抗动脉粥样硬化、改善糖尿病、调节糖脂

代谢等多种生物活性<sup>[11-15]</sup>。本研究在前期研究基础上<sup>[16-18]</sup>, 采用双氧水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 和高糖诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 损伤模型, 通过建立体外细胞氧化应激模型和高糖损伤模型, 从细胞增殖、细胞结构变化、炎症反应、细胞黏附、血管内皮功能、氧化损伤等方面评价丹参茎叶提取物及活性成分对 HUVECs 损伤的保护作用及其机制。以期对丹参茎叶资源价值发现及其开发利用提供科学依据和参考。

## 1 材料

### 1.1 试剂

高糖 DMEM 培养基、抗生素 P/S (青霉素 10 000 U/mL, 链霉素 10 000  $\mu$ g/mL)、胎牛血清 (FBS) 和胰酶 (TE) 均购自美国 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、焦碳酸二乙酯 (DEPC)、葡萄糖、氨基胍均购自美国 Sigma 公司; 超纯水由 Milli-Q 超纯水制备仪制备; 迷迭香酸 (批号 111871-201203)、芦丁 (批号 100080-200707)、隐丹参酮 (批号 110852-200806) 均购自中国食品药品检定研究院; 丹酚酸 B (批号 MUST-13030203)、异槲皮苷 (批号 15070211) 均购自北京普天同创生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (上海沪试实验室器材有限公司); 维生素 C (VC, Sigma 公司); 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、一氧化氮 (NO)、

内皮素 (ET-1)、细胞黏附因子 (ICAM-1) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒均购自南京奥青生物技术有限公司。

## 1.2 仪器

Forma seriesII water jacket 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo 公司); 1300 series A2 超净工作台 (Thermo 公司); Auto Vert A1 倒置荧光显微镜、PrimoStar 倒置显微镜 (ZEISS 公司); TOMY SX-500 高压灭菌锅 (南京基天生物技术有限公司); Enspire 多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); Allegra X-12R Centrifuge 和 Microfuge 22R Centrifuge 高速离心机 (Beckman 公司); MINI-4K 微型离心机 (杭州米欧仪器有限公司); BWS-10 恒温水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司); Milli-Q 超纯水制备仪 (Millipore 公司); 移液器 (Eppendorf 公司); WGL-230B 电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); X025-12DT 超声波清洗器 (南京先欧仪器有限公司); SIM-F140AY65-PC 制冰机 (日本松下电器产业株式会社)。

## 1.3 实验细胞

人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 购自南京凯基生物科技发展有限公司, 细胞在含 10% FBS+1% P/S 的高糖 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

## 1.4 药材

丹参茎叶样品于 2016 年 7 月采于南京中医药大学药用植物园, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的茎叶。丹参茎叶样品采集后于 50 °C 烘干, 粉碎成粗粉 (40 目), 常温密封干燥保存, 供分析用; 丹参药材 (批号 20161001) 购自陕西省丹参种植基地, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根及根茎。

## 2 方法

### 2.1 丹参各提取物的制备

取丹参茎叶和丹参 (根) 粉末 100 g, 水提物和醇提物分别用 10 倍量的水和 80% 乙醇热回流 1 h, 提取 3 次, 合并 3 次提取液, 真空减压浓缩得浸膏 (每克浸膏相当于 1 g 生药), 挥干得到供试样品, 分别为丹参茎叶醇提物 (CJ)、丹参根醇提物 (CG)、丹参茎叶水提物 (SJ) 和丹参根水提物 (SG), 冷藏备用。各提取物含量测定结果表明, SJ 中丹参素、

咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 质量分数分别为 30.15、3.06、5.51、3.23、0.56、56.16、8.86、82.53、8.11 mg/g; SG 中丹参素、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 质量分数分别为 17.87、4.78、13.40、10.69、128.08 mg/g; CJ 中丹参素、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 质量分数分别为 15.5、5.18、6.88、4.67、8.93、48.11、8.93、102.59、4.12 mg/g; CG 中丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮质量分数分别为 4.85、6.96、7.22、91.53、3.21、0.26、1.40、1.00 mg/g。

### 2.2 细胞培养

将 HUVECs 细胞冻存管从液氮罐中迅速取出, 立即置于 37 °C 水浴中 1 min 左右, 待细胞解冻后, 转移至超净工作台将细胞加入装有 4 mL 完全培养基的培养皿中, 轻轻摇匀, 置于培养箱中培养 6 h, 待细胞贴壁后, 换液, 再培养 24 h 后, 按 1:3 进行传代培养, 每 2 天换液 1 次, 传至第 5~7 代的细胞可用于实验。

### 2.3 细胞种板

细胞用 TE 消化后, 加入适量培养基用移液枪将细胞吹打至单个均匀悬浮细胞分散于培养液中, 计数, 调整细胞密度至  $6 \times 10^7$  个/L, 每孔 100  $\mu$ L, 边缘每孔加入 PBS 100  $\mu$ L 以避免边缘效应, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 24 h。

### 2.4 丹参茎叶各提取物及主要成分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 细胞损伤模型的影响

**2.4.1** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 细胞损伤模型的制备 细胞换液, 以 1% FBS+DMEM 培养基培养 24 h, 待细胞贴壁长至 80%~90% 融合状态时, 先弃去上清, 加入新培养基 90  $\mu$ L 孵育 3 h 后加入不同浓度梯度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 使终浓度分别为 24.250 0、12.125 0、6.062 5、3.031 2、1.515 6 mmol/L, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h 后, 弃去旧培养基, 加入新 1% FBS+DMEM 培养基培养 2 h 使细胞状态稳定后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 10  $\mu$ L, 于培养箱孵育 3 h, 吸走上清, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 37 °C, 摇床 30 min, 酶标仪测定 570 nm 下各孔吸光度 (A) 值。计算各组细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{加药}} / A_{\text{对照}}$$

**2.4.2** 实验分组 分为对照组、模型组、阳性药 (VC) 组和各给药组 (CJ、CG、SJ、SG、迷迭香

酸、丹酚酸 B、芦丁、异槲皮苷和隐丹参酮), 其中各给药组分别设高、中、低 3 个质量浓度。

**2.4.3 细胞形态学观察** 按“2.4.2”项分组, 将 HUVECs 细胞以  $6 \times 10^7/L$  密度接种于 96 孔板, 每孔  $100 \mu L$ ,  $6.062 5 \text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$  诱导 HUVECs 损伤 2 h, 造模同时给予药物干预, 倒置显微镜下观察各组细胞形态。

**2.4.4 MTT 法检测各组细胞增殖情况** 细胞接种、分组、造模、加药方法同“2.4.3”项, 弃去旧培养基, 加入新 1% FBS+DMEM 培养基培养 2 h 后, 每孔加入  $5 \text{ mg/mL MTT } 10 \mu L$ , 于培养箱孵育 3 h, 吸走上清, 每孔加入  $\text{DMSO } 150 \mu L$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 摇床 30 min, 酶标仪测定  $570 \text{ nm}$  下各孔  $A$  值。

**2.4.5 细胞培养液中 NO、ET-1、GSH-Px、CAT 水平测定** 细胞接种、分组、造模、加药方法同“2.4.3”项, 造模给药处理 2 h, 弃去旧培养基, 加入新 1% FBS+DMEM 培养基培养 2 h 后, 取细胞上清液, 按照试剂盒说明书的操作步骤, 分别测定 NO、GSH-Px、CAT 的水平。ELISA 法检测上清液中 ET-1 水平。

## 2.5 丹参茎叶各提取物及主要成分对葡萄糖诱导 HUVECs 细胞损伤模型的影响

**2.5.1 葡萄糖诱导 HUVECs 细胞损伤模型的制备** 细胞换液, 以 1% FBS+DMEM 培养基培养 24 h, 待细胞贴壁长至 80%~90% 融合状态时, 先弃去上清, 加入新培养基  $90 \mu L$  孵育 3 h 后加入不同质量浓度梯度的葡萄糖溶液, 使终质量浓度分别为 200.0、100.0、50.0、25.0、12.5  $\text{mg/mL}$ , 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h 后, 弃去旧培养基, 加入新 1% FBS+DMEM 培养基培养 2 h 后, 每孔加入  $5 \text{ mg/mL MTT } 10 \mu L$ , 于培养箱孵育 3 h, 吸走上清, 每孔加入  $\text{DMSO } 150 \mu L$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 摇床 30 min, 酶标仪测定  $570 \text{ nm}$  下各孔  $A$  值。

**2.5.2 实验分组** 分为对照组、模型组、阳性药(氨基胍)组和各给药组(CJ、CG、SJ、SG、迷迭香酸、丹酚酸 B、芦丁、异槲皮苷和隐丹参酮), 其中各给药组分别设高、中、低 3 个质量浓度。

**2.5.3 细胞形态学观察** 按“2.5.2”项分组, 将 HUVECs 细胞以  $6 \times 10^7/L$  密度接种于 96 孔板, 每孔  $100 \mu L$ ,  $50 \text{ mg/mL}$  葡萄糖诱导 HUVECs 损伤 24 h, 造模同时给予药物干预, 倒置显微镜下观察细胞形态。

**2.5.4 MTT 法检测各组细胞增殖情况** 细胞接种、

分组同“2.5.2”项,  $50 \text{ mg/mL}$  葡萄糖诱导 HUVECs 损伤 24 h, 造模同时给予药物干预, 弃去旧培养基, 加入新 1% FBS+DMEM 培养基培养 2 h 后, 每孔加入  $5 \text{ mg/mL MTT } 10 \mu L$ , 于培养箱孵育 3 h, 吸走上清, 每孔加入  $\text{DMSO } 150 \mu L$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 摇床 30 min, 酶标仪测定  $570 \text{ nm}$  下各孔  $A$  值。

**2.5.5 细胞培养液中 NO、ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  水平测定** 细胞接种、分组、造模、加药方法同“2.5.4”项, 造模同时给药处理 24 h 后, 弃去旧培养基, 加入新 1% FBS+DMEM 培养基培养 2 h 后, 取细胞上清液, 按照试剂盒说明书的操作步骤, 测定 NO 水平。ELISA 法检测上清液中 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  水平。

## 2.6 统计学分析

实验结果采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较数据符合正态分布且方差齐时用 ANOVA 方差分析, 否则采用 Kruskal-Wallis 检验。

## 3 结果

### 3.1 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导 HUVECs 细胞损伤模型的影响

**3.1.1  $\text{H}_2\text{O}_2$  最佳浓度的确定** 在一定范围内, 随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低, 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为  $6.062 5 \text{ mmol/L}$  时, MTT 检测细胞存活率为 42.81%, 表明在此浓度下诱导细胞损伤适中, 因此确定  $\text{H}_2\text{O}_2 6.062 5 \text{ mmol/L}$  为最佳造模浓度。结果见图 1。

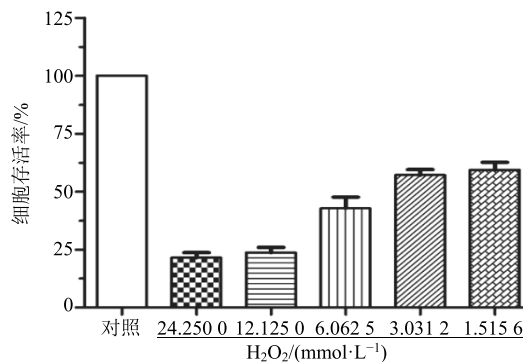


图 1  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 HUVECs 存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on survival rates of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.1.2 对细胞形态的影响** 结果见图 2, 对照组细胞生长状态良好, 形态正常, 排列紧密, 细胞呈梭形, 单层铺路石样排列; 模型组细胞形态皱缩, 大小分布不均匀, 细胞间隙增大, 排列紊乱; 与模型组比较, 各给药组细胞数增多, 边界清晰, 细胞形态趋于对照组, 且不同给药组之间细胞形态也存在一定差异。

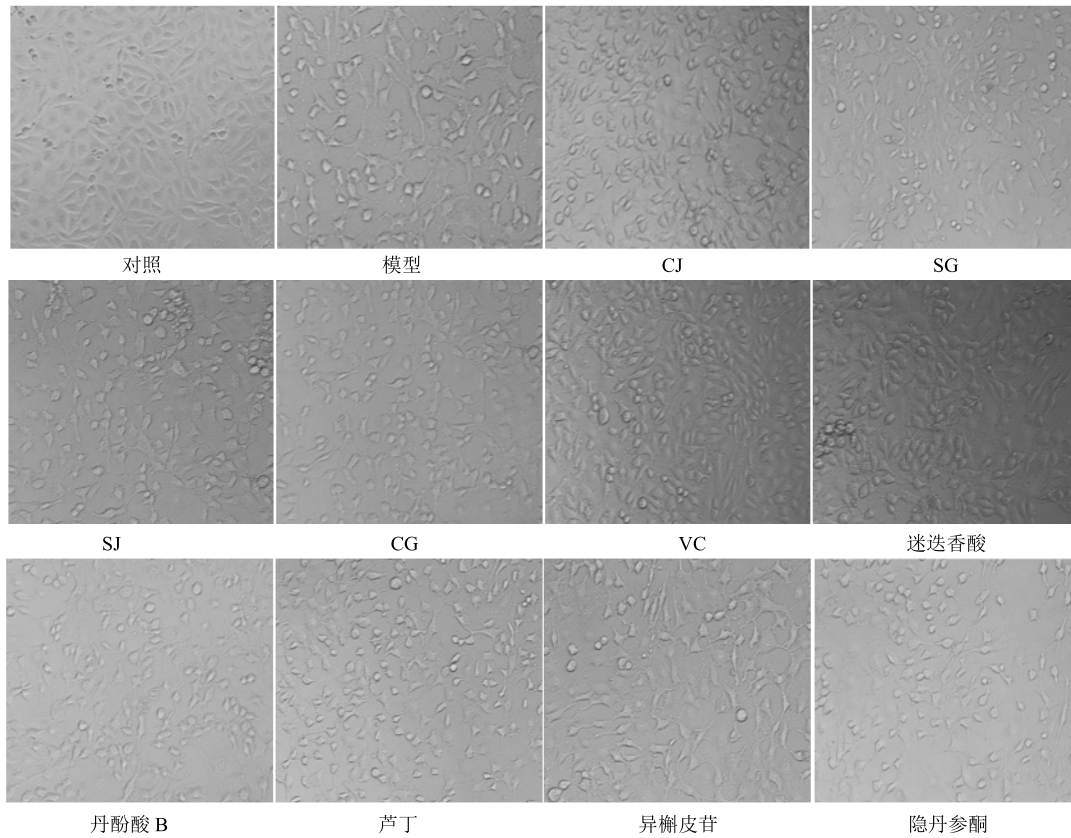
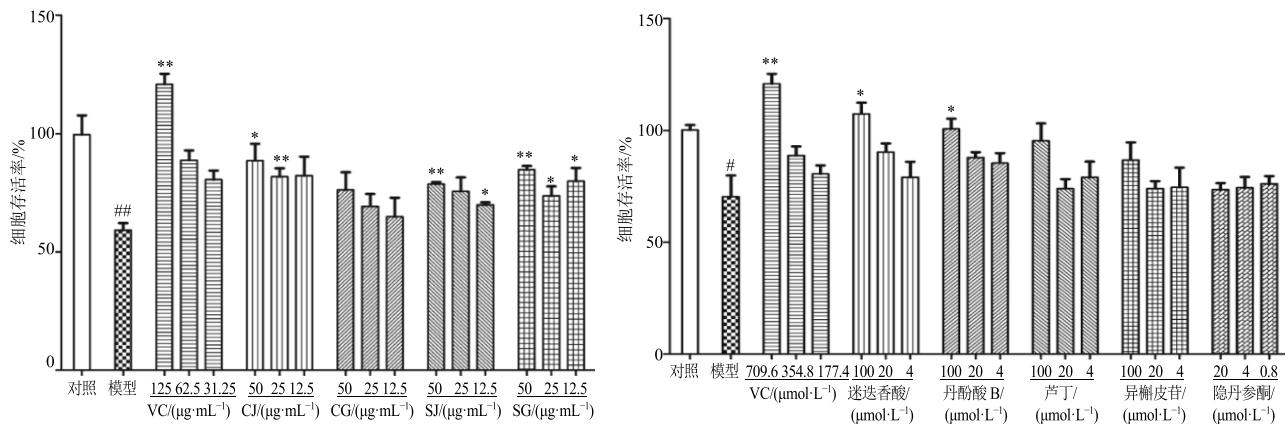


图 2 各高剂量给药组 HUVECs 形态学观察

Fig. 2 Morphological observation of HUVECs in each high-dose group

3.1.3 各提取物及化合物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVECs 存活率的影响 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 损伤后, 模型组 A 值显著低于对照组 (P<0.01), 表明造模成功。与模型组相比较, 各受试药物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 具有明显保护作用, 且呈现浓度相关性, 各提取物在相同质量浓度下作用大小为 CJ>SG>SJ>CG,

结果见图 3。阳性对照 VC 以及迷迭香酸、丹酚酸 B、芦丁、异槲皮苷和隐丹参酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVECs 亦具有明显保护作用, 活性最强的单体化合物为迷迭香酸, 其次为丹酚酸 B, 各单体化合物对 HUVECs 损伤的保护作用呈现浓度相关性, 隐丹参酮对 HUVECs 损伤的保护作用则较弱, 且可能在低浓度



与对照组比较: #P<0.05 ##P<0.01; 与模型组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01, 下同  
#P<0.05 ##P<0.01 vs control group; \*P<0.05 \*\*P<0.01 vs model group, same as below

图 3 丹参各提取物及活性成分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Protective effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on HUVECs injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

时才具有对 HUVECs 损伤的保护作用。

**3.1.4 各提取物及化合物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 分泌 GSH-Px、CAT、NO 和 ET-1 的影响** 结果见图 4~7, HUVECs 细胞给予 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 2 h 后, 与对照组相比较, 模型组细胞分泌的 GSH-Px、CAT 和 NO 均明显降低 ( $P < 0.01$ ), ET-1 明显升高 ( $P < 0.01$ )。给予药物干涉后, 与模型组比较, CJ、CG、SJ 和 SG 高、中、低剂量组细胞上清中分泌的 GSH-Px、CAT 和 NO 水平升高, ET-1 水平降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), 且呈现一定的量效关系。VC、迷迭香酸、丹酚酸 B 和芦丁的高、中剂量以及异槲皮苷、隐丹参酮高剂量均能显著提高 GSH-Px、CAT 和 NO 水平 ( $P < 0.05$ 、0.01), 降低 ET-1 水平 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

**3.2 对葡萄糖诱导 HUVECs 细胞损伤模型的影响**

**3.2.1 葡萄糖最佳质量浓度的确定** 在一定范围内, 随着葡萄糖质量浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低, 当葡萄糖质量浓度为 50 mg/mL 时, MTT 检测细胞存活率为 54.2%, 表明在此质量浓度下诱导细胞损伤适中, 因此确定葡萄糖 50 mg/mL 为最佳造模质量浓度。结果见图 8。

**3.2.2 对细胞形态学的影响** 从细胞形态学观察可知, 对照组 HUVECs 细胞贴壁生长为单层, 呈典型铺路石状排列, 细胞形态为扁平长梭形, 边界清晰。葡萄糖诱导 HUVECs 细胞损伤后, 细胞形态均一性差, 表面不完整, 细胞结构受到明显破坏。给药组细胞形态较模型组完整, 细胞间隙变小, 各给药组对 HUVECs 细胞损伤呈不同程度保护作用, 结果见图 9。

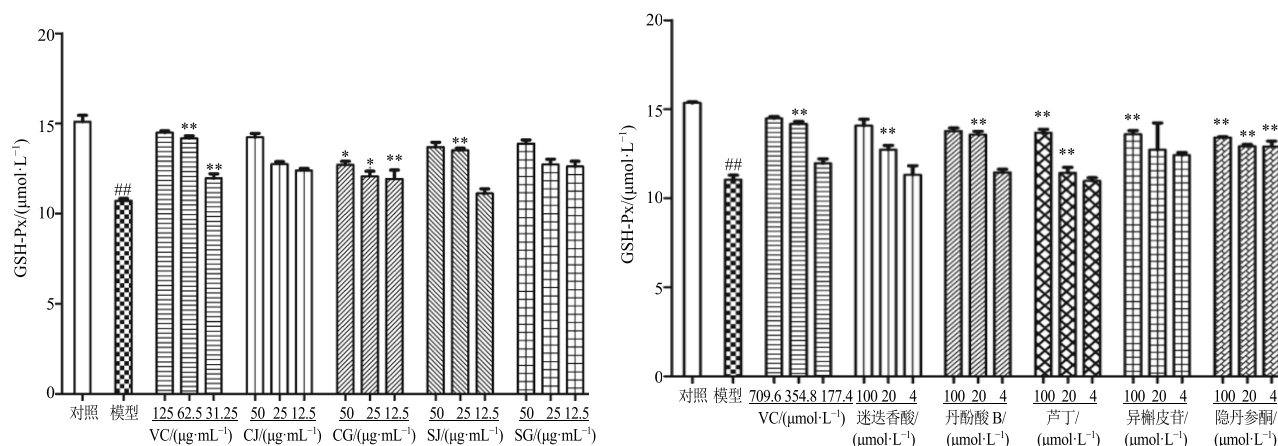


图 4 丹参各提取物及活性成分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 细胞 GSH-Px 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on levels of GSH-Px in HUVECs induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

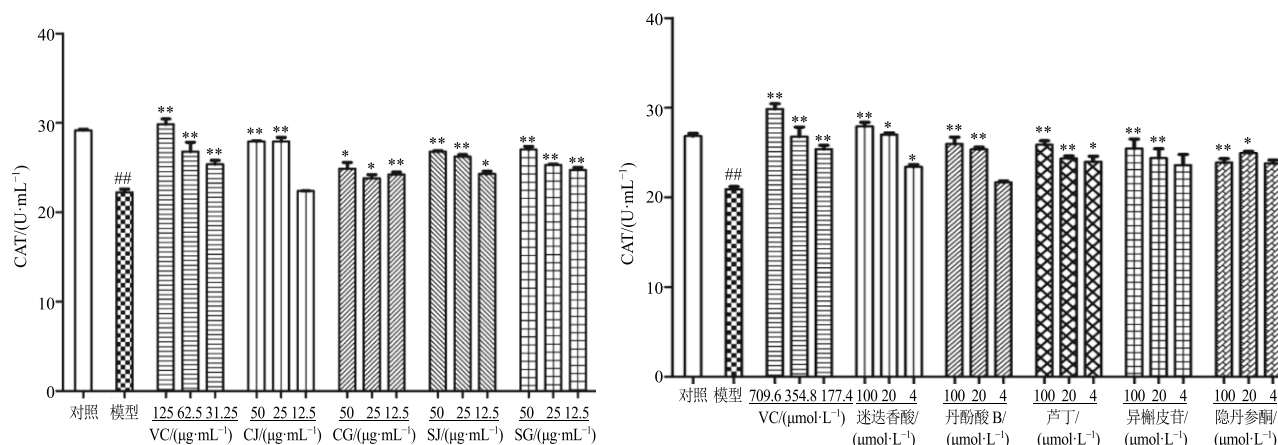


图 5 丹参各提取物及活性成分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 细胞 CAT 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on levels of CAT in HUVECs induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

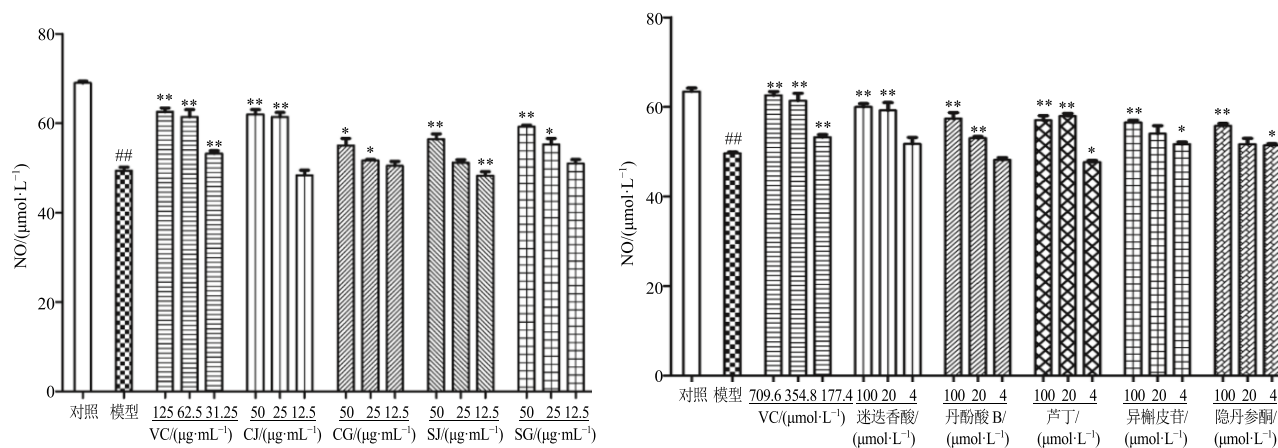


图 6 丹参各提取物及活性成分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 细胞 NO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on levels of NO in HUVECs induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

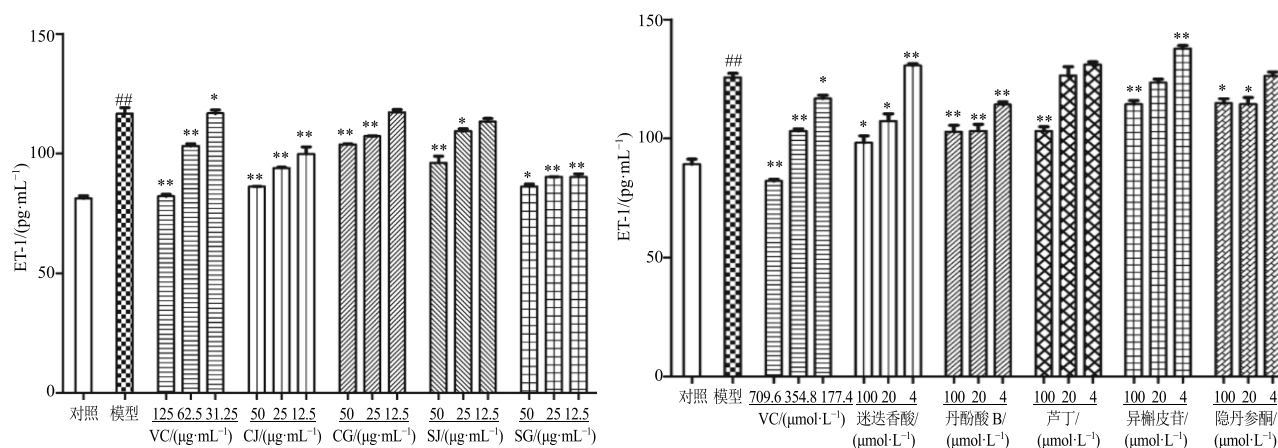


图 7 丹参各提取物及活性成分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVECs 细胞 ET-1 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on levels of ET-1 in HUVECs induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

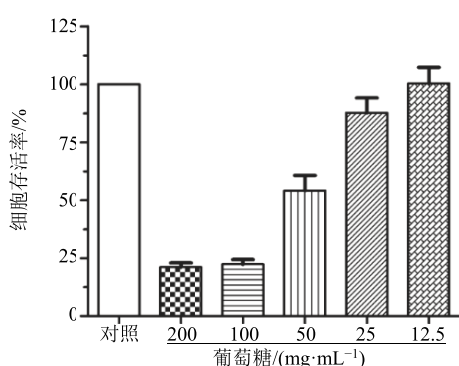


图 8 葡萄糖对 HUVECs 存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 8 Effect of glucose on survival rates of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

3.2.3 各提取物及单体化合物对高糖损伤 HUVECs 存活率的影响 结果见图 10, 高糖诱导 HUVECs 损伤后, 模型组 A 值显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ),

表明造模成功。与模型组比较, 丹参各提取物在一定质量浓度下对高糖诱导的 HUVECs 具有明显保护作用, 且呈现浓度相关性, 各提取物在相同质量浓度下作用大小为 CJ>SG>SJ>CG。阳性对照氨基胍及迷迭香酸、丹酚酸 B、芦丁、异槲皮苷和隐丹参酮对高糖诱导的 HUVECs 也具有明显保护作用, 且呈现一定量效关系, 各化合物活性大小为丹酚酸 B>迷迭香酸>异槲皮苷>芦丁>隐丹参酮, 隐丹参酮对 HUVECs 损伤的保护作用则较弱。

3.2.4 各提取物及单体化合物对高糖诱导 HUVECs 细胞 ICAM-1、TNF- $\alpha$  和 NO 的影响 给予高糖刺激 24 h 后, 与对照组比较, 模型组 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), NO 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。不同质量浓度 CJ、CG、SJ 和 SG 干预后, ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  分泌水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), NO 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 并趋于正常水平, 提示丹参各提取物

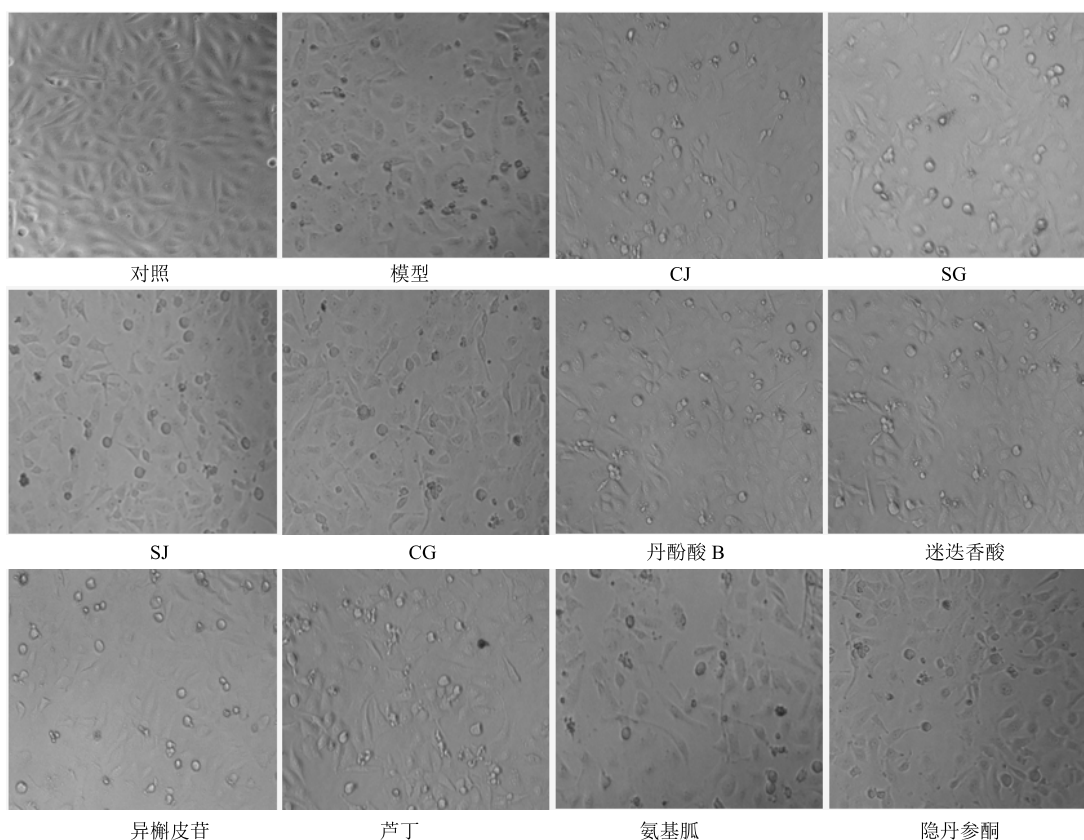


图 9 各高剂量给药组 HUVECs 形态学观察

Fig. 9 Morphological observation of HUVECs in each high-dose group

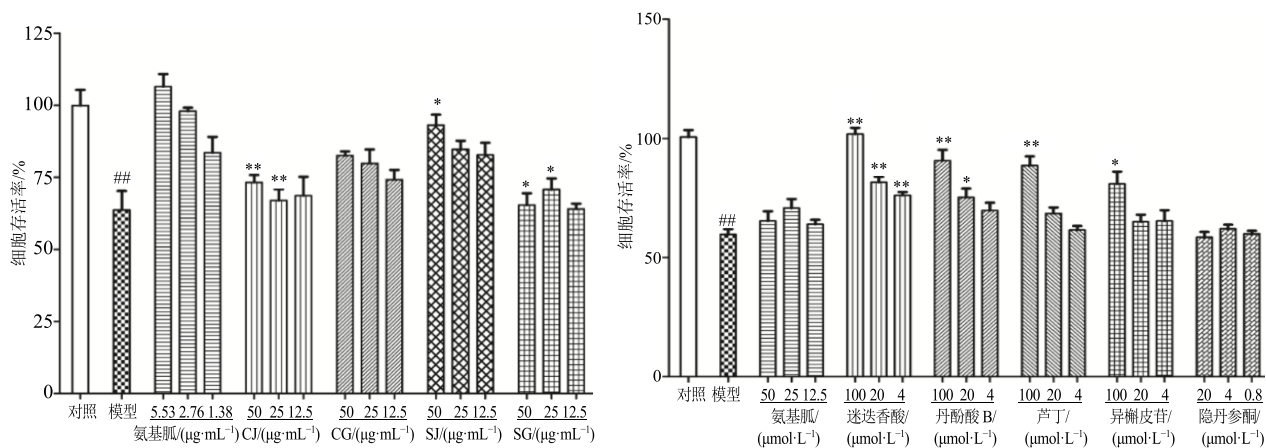


图 10 丹参各提取物及活性成分对高糖诱导 HUVECs 损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Protective effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on HUVECs injury induced by glucose ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

对高糖损伤 HUVECs 细胞具有明显保护作用, 且表现出质量浓度依赖性, 结果见图 11~13。此外, 高糖诱导的 HUVECs 细胞经阳性药氨基胍和各单体化合物处理后, 丹酚酸 B、异槲皮苷和芦丁的高剂量及迷迭香酸的高、中剂量均可显著降低 ICAM-1

含量 ( $P < 0.01$ ), 对 TNF- $\alpha$  而言, 除氨基胍给药组外, 各单体化合物给药组中 TNF- $\alpha$  水平相对模型组明显降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。同样, 在 NO 测定中, 除氨基胍和异槲皮苷低剂量组外, 其他给药组 NO 水平均明显升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。



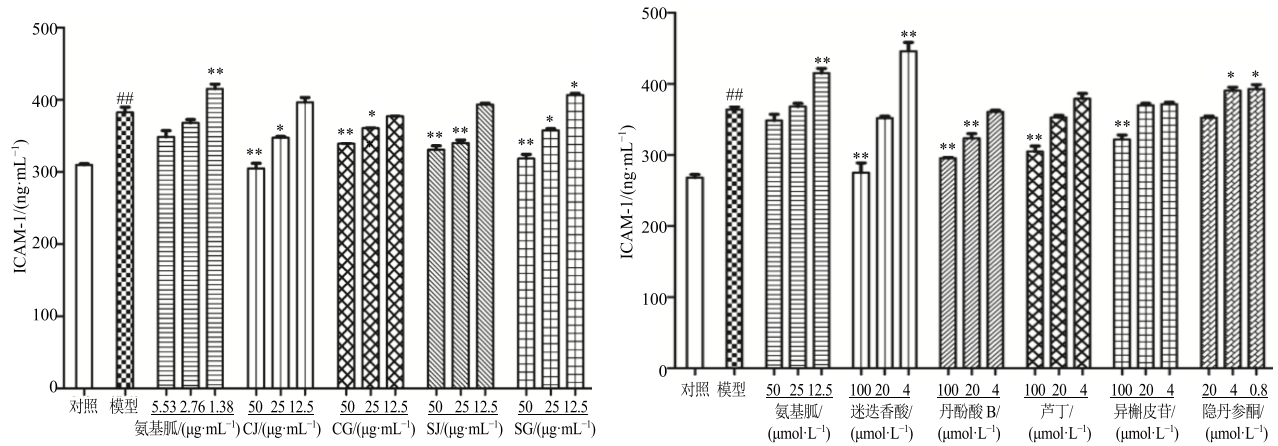


图 11 丹参各提取物及活性成分对高糖诱导 HUVECs 细胞 ICAM-1 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on levels of ICAM-1 in HUVECs induced by glucose ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

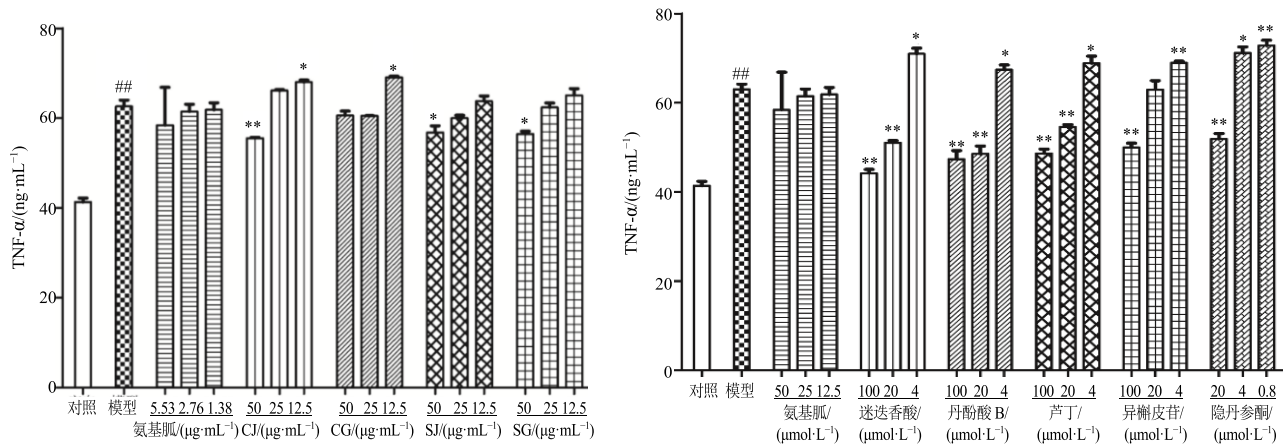


图 12 丹参各提取物及活性成分对 HUVECs 细胞 TNF-α 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 12 Effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on levels of TNF-α in HUVECs induced by glucose ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

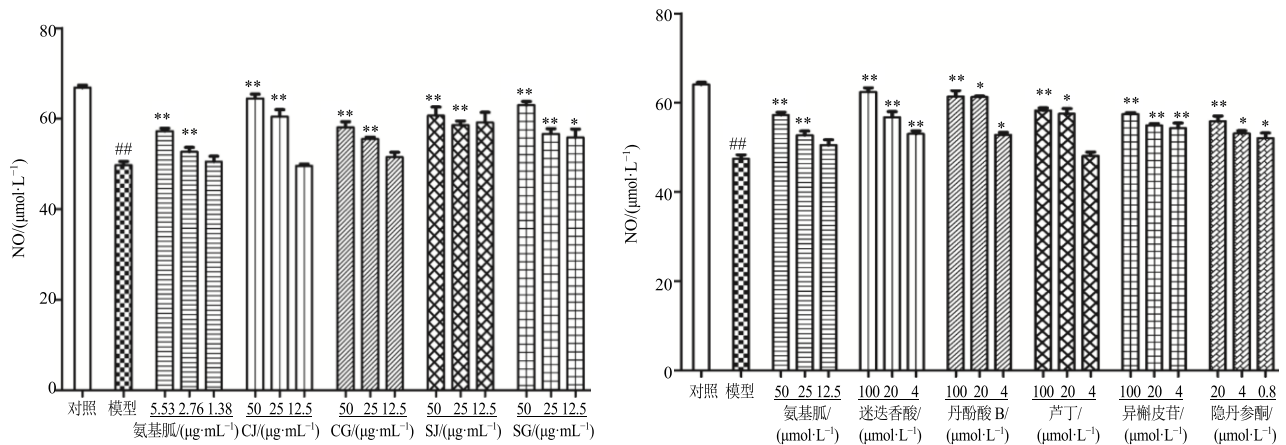


图 13 丹参各提取物及活性成分对高糖诱导 HUVECs 细胞 NO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 13 Effects of different solvent extracts and compounds of *S. miltiorrhiza* on levels of NO in HUVECs induced by glucose ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

氧化应激是指机体在受到外界刺激时,氧自由基过度形成并积累,与抗氧化体系间的平衡失调引起内皮细胞损伤,  $H_2O_2$  致 HUVECs 细胞损伤为经典模型,可能与细胞内活性氧的产生有关<sup>[19]</sup>。NO 为内源性血管舒张因子,在维持血管内皮细胞稳态、抑制血管平滑肌细胞增殖、舒张血管、抑制内皮细胞黏附等方面发挥作用,ET-1 为内皮细胞分泌的强烈收缩血管的活性多肽物质,可促进血管平滑肌细胞增殖及内皮细胞间黏附,两者共同作用调节血管舒张与收缩,ET-1 异常升高或 NO 降低,可引起血管收缩、微循环障碍。GSH-Px 和 CAT 为体内具有清除活性氧作用的主要酶,GSH-Px 通过还原  $H_2O_2$  达到清除活性氧的目的,CAT 则可分解  $H_2O_2$  从而减轻对细胞乃至机体的毒害作用。因此在氧化应激研究中选择 GSH-Px、CAT、NO 和 ET-1 作为体内抗氧化能力的评价指标,并结合了药物干预后 HUVECs 细胞存活率变化及对细胞形态的影响。实验结果表明,丹参茎叶与丹参(根)水提物和醇提物对  $H_2O_2$  诱导 HUVECs 细胞损伤具有不同程度保护作用,作用最强的为 CJ,且丹参中主要效应物质具有明显保护内皮功能作用,其中酚酸类(迷迭香酸和丹酚酸 B)作用强于黄酮类(芦丁和异槲皮苷),丹参酮类(隐丹参酮)则活性较差。实验结果表明丹参各提取物发挥保护血管内皮功能作用机制可能与提高 GSH-Px 和 CAT 水平,激活过氧化物酶活性有关,同时,升高 NO 水平,降低 ET-1 水平,恢复 NO 与 ET-1 之间的动态平衡,进而改变内皮功能,其更深入的作用机制还需进一步探讨。

糖尿病是由胰岛素分泌相对或绝对不足引起的功能性代谢紊乱疾病,主要表现为高血糖,糖尿病血管病变为糖尿病常见并发症之一,高血糖可直接诱发内皮细胞分泌释放黏附分子,引起血管内皮细胞炎症反应。ICAM-1,又称为 CD54,是免疫球蛋白家庭中成员之一,主要分布于白细胞和内皮细胞中,且在各种心血管疾病中发挥重要作用,正常情况下 ICAM-1 在细胞中呈低水平表达,但当受到外界刺激时,黏附因子形成增加,因而加强了白细胞、血小板和红细胞之间的相互作用,进一步激活并引起血管内皮损伤<sup>[20-21]</sup>。NO 为反映血管细胞内皮功能的重要标志,经 NOS 酶催化并由内皮细胞分泌,具有维持血管舒张的功能,高糖作用下,内皮细胞分泌 TNF- $\alpha$  增加,研究报道炎症因子 TNF- $\alpha$

通过抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性降低 NO 生成,NO 量减少又进一步诱导炎症因子合成增加,使血管内皮细胞的舒张功能受到损伤<sup>[16,22-23]</sup>。本研究基于细胞及分子水平,以丹参茎叶及丹参(根)水提物和醇提物为研究对象,建立了高糖诱导的 HUVECs 细胞氧化应激模型,同时分析了丹参中主要活性成分对血管内皮功能的保护作用,结果显示,丹参茎叶及丹参(根)提取物能够降低 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  水平,增加 NO 含量,从而改善高糖诱导 HUVECs 细胞损伤。其作用机制可能为通过抑制细胞间黏附分子的表达而降低白细胞与内皮细胞之间的黏附作用,防止白细胞在黏附过程中产生的氧自由基、细胞因子等,同时调节 NO 和 TNF- $\alpha$  生成从而保护氧化应激对内皮细胞的损伤。

本研究结果表明对于  $H_2O_2$  和高糖造成的 HUVECs 损伤,保护作用大小依次为 CJ>SG>SJ>CG,酚酸类成分>黄酮类成分>丹参酮类成分。CJ 的保护作用最佳,且对 HUVECs 损伤后的各种因子的分泌有显著的调节作用,证明丹参茎叶具有良好的药用开发潜力。本研究结果为丹参茎叶资源价值发现及其开发利用提供了参考依据。

#### 参考文献

- [1] 边金铎,邓同乐,许健.丹参素对  $H_2O_2$  诱导的内皮细胞氧化损伤的保护作用研究[J].上海中医药大学学报,2012,26(3):61-65.
- [2] 沈红胜,许惠琴,陆春红,等.山茱萸环烯醚萜苷类成分对 AGEs 诱导 HUVEC 损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2016,32(8):1063-1067.
- [3] 顾俊菲,封亮,袁嘉瑞,等.赤芍总苷、川芎总酚酸组分组成结构对缺氧损伤人脐静脉内皮细胞的影响[J].中国中药杂志,2015,40(5):920-926.
- [4] 林敏华,林宇涵,许双临,等.高糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤的实验研究[J].中国临床药理学杂志,2014,30(1):20-22.
- [5] Potenza M A, Gagliardi S, Nacci C, et al. Endothelial dysfunction in diabetes: From mechanisms to therapeutic targets[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(1): 94-112.
- [6] Gu J F, Su S L, Guo J M, et al. The aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* Bge. strengthen intestinal barrier and modulate gut microbiota imbalance in streptozocin-induced diabetic mice[J]. *J Funct Foods*, 2017, 36(7): 362-374.
- [7] 陈霁晖,杨宝学,周虹.心血管疾病中氧化应激与一氧化氮合酶脱耦联[J].中国心血管杂志,2012,17(2):149-151.

- [8] Chan P, Chen Y C, Lin L J, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Am J Chin Med*, 2012, 40(6): 1307-1319.
- [9] 冯 帅, 沙 爽, 常 庆, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对缺血性心脏病中细胞凋亡与自噬的调控机制研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4670-4677.
- [10] Wang C, Zhao R, Li B, *et al.* An *in vivo* and *in vitro* study: High-dosage danshen injection induces peripheral vascular endothelial cells injury [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2016, 35(4): 404-417.
- [11] Chen H, Zhang Q, Wang X M, *et al.* Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MS [J]. *Phytochem Anal*, 2011, 22(3): 247-257.
- [12] Zhang Y, Li X, Wang Z Z. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents [J]. *Food Chem Toxic*, 2010, 48(10): 2656-2662.
- [13] Leng J, Chen M H, Zhou Z H, *et al.* Triterpenoids-enriched extract from the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* regulates macrophage polarization and smeliorates insulin resistance in high-fat fed mice [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(1): 100-107.
- [14] 曾慧婷, 宿树兰, 沙秀秀, 等. 丹参茎叶提取物抗氧化活性物质基础与量效关系研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(22): 4688-4694.
- [15] 俞辰亚代, 于金高, 顾俊菲, 等. 丹参茎叶提取物对高糖诱导的果蝇代谢紊乱模型的糖脂代谢的调节作用及其机制 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(7): 1-15.
- [16] 曾慧婷. 丹参茎叶资源化学研究及心血管活性评价 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [17] 蔡红蝶. 丹参茎叶对慢性肾功能损伤的改善作用及机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [18] 沙秀秀. 丹参茎叶资源化学研究与药材质量标准的建立 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [19] 鹿文葆. 褪黑素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠脑微血管周细胞损伤的影响 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [20] 修 春, 宓穗卿, 王宁生. 隐丹参酮对 TNF- $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞粘附分子 ICAM-1 表达的作用 [J]. *中药药理与临床*, 2009, 25(2): 16-19.
- [21] 王 鹏, 赵启韬, 郭庆梅, 等. 丹参活性成分保护血管内皮细胞研究进展 [J]. *山东中医药大学学报*, 2011, 35(2): 184-186.
- [22] Zhang H, Park Y, Wu J, *et al.* Role of TNF-alpha in vascular dysfunction [J]. *Clin Sci*, 2009, 116(3): 219-230.
- [23] Ren D C, Du G H, Zhang J T. Inhibitory effect of the water-soluble extract of *Salvia miltiorrhiza* on neutrophil-endothelial [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 90(3): 276-280.