

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001790

丹参酮 II A 对缺氧/复氧损伤肾小管上皮细胞的作用
及机制研究

杨紫依, 陈 刚, 朱芸霄, 熊超玉, 陈 函, 文 爽, 李 毅

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨丹参酮磺酸钠 II A (Tanshinone II A, TSN II A) 对缺氧/复氧(hypoxia/reperfusion, H/R) 肾小管上皮细胞(human kidney-2, HK-2) 氧化应激和凋亡的影响。**方法:**取传代培养的 HK-2 细胞建立 H/R 诱导细胞模型, 实验分为正常对照组, 单纯 H/R 组, H/R+20 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A 组, H/R+10 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A 组, H/R+5 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A 组共 5 组。光镜下观察各组细胞的形态变化; CCK-8 法测定 H/R HK-2 细胞增殖水平; 流式细胞术检测细胞凋亡水平; 荧光显微镜观察细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS) 的产生; Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达。**结果:**与正常对照组比较, 单纯 H/R 组 HK-2 细胞增殖活性明显减少, 为 $(43.6 \pm 10.1)\%$; 中低浓度 TSN 可提高 H/R HK-2 细胞的增殖活性, 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 TSN II A 对 H/R HK-2 细胞的增殖具有最明显的保护作用, 为 $(79.1 \pm 11.1)\%$, 与单纯 H/R 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 TSN II A 组相对于 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组对细胞增殖有一定的抑制作用, 为 $(51.0 \pm 10.4)\%$ ($P < 0.05$)。与 H/R 组比较, 共聚焦荧光显微镜下 TSN II A 减少细胞内活性氧产生。流式细胞术检测发现各浓度 TSN II A 均对 H/R HK-2 细胞凋亡有一定抑制作用, 其中以 20 $\mu\text{g/mL}$ 最为明显 ($P < 0.05$)。Western blot 结果提示 TSN II A 作用 H/R HK-2 细胞后凋亡抑制蛋白 Bcl-2 上调, 而促凋亡蛋白 Bax 下调。**结论:**TSN II A 可能通过抑制氧化应激反应减少细胞凋亡, 对 H/R HK-2 细胞产生保护作用。

【关键词】丹参酮磺酸钠 II A; 肾小管上皮细胞; 缺氧/复氧损伤; 缺血/再灌注损伤

【中图分类号】R692.9; R392.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-10-17

Effects of Tanshinone II A on hypoxia/reperfusion human kidney-2 cells
and their mechanism

Yang Ziyi, Chen Gang, Zhu Yunxiao, Xiong Chaoyu, Chen Han, Wen Shuang, Li Yi

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine the effect and mechanism of Tanshinone II A (TSN II A) on oxidative stress and apoptosis of hypoxia/reperfusion (H/R) HK-2 cells. **Methods:** HK-2 cells were cultured *in vitro* for establishment of H/R-induced models. HK-2 cells were divided into the control group, H/R group, H/R+20 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A group, H/R+10 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A group, and H/R+5 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A group. The morphological changes of all groups were detected by light microscope. The cell proliferation of H/R HK-2 cells was measured by CCK-8, and the cell apoptosis by flow cytometry. The levels of ROS were observed by fluorescence microscope, and the expressions of bcl-2, bax, and Cleaved Caspase-3 by Western blot assay. **Results:** The cell proliferation of H/R group decreased obviously compared with that of the control group [$(43.6 \pm 10.1)\%$ vs. 100%]. Low and medium concentrations of TSN IIA could improve H/R cell proliferation, among which, 10 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A group presented significant proliferation protection effects compared with H/R group [$(79.1 \pm 11.1)\%$ vs. $(43.6 \pm 10.1)\%$] ($P < 0.05$). In contrast, high concentration of TSN IIA (20 $\mu\text{g/mL}$) might reduce the cell proliferation as compared with 10 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A group [$(51.0 \pm 10.4)\%$ vs. $(79.1 \pm 11.1)\%$] ($P < 0.05$). Compared with H/R group, the levels of ROS detected by fluorescence microscope were decreased. The flow cytometry showed the apoptosis of all TSNIIA-treated groups were prohibited, especially for the 20 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A group ($P < 0.05$). The Western blot results indicated that TSN II A up-regulated the expression of bcl-2 and meanwhile down-regulated the expression of Bax ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tanshinone IIA may protect the H/R injury by inhibiting oxidative stress and attenuating cell apoptosis.

作者介绍: 杨紫依, Email: cwhyang@163.com,

研究方向: 肾移植、肾缺血再灌注损伤等。

通信作者: 陈 刚, Email: changang127@163.com。

基金项目: 重庆市科委基金资助项目 (编号: cstc2015shmszx120067);

重庆市教委基金资助项目 (编号: KJ1400233)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180615.0839.004.html>

(2018-06-15)

regulated the expression of bcl-2 and meanwhile down-regulated the expression of Bax ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tanshinone IIA may protect the H/R injury by inhibiting oxidative stress and attenuating cell apoptosis.

【Key words】 Tanshinone II A; human kidney-2 cell; hypoxia/reoxygenation injury; ischemia/reperfusion injury

肾缺血/再灌注损伤(ischemia and reperfusion injury, IRI)是急性肾衰竭的主要原因,也是肾移植术后移植肾功能延迟恢复、排斥反应及慢性移植肾功能障碍相关的原因^[1]。肾 IRI 目前成为肾病学、肾移植医学等关注的重点。由此,如何避免和减少肾 IRI,提高移植肾的成活率和各种肾病终末期患者的生存率,成为临床亟需解决的问题。丹参是唇形科鼠尾草属植物的干燥根及根茎,是临床最常用的中药之一。丹参的脂溶性成分丹参酮磺酸钠 II A (Tanshinone II A, TSN II A)已广泛应用于心血管疾病的预防和治疗,在临床治疗中发挥了多种作用。其中抗氧化自由基、钙拮抗以及广泛的抗血栓、抗炎作用^[2],均提示其可能具有抗 IRI 的药理作用。然而在肾脏疾病中的作用却少见报道。本实验旨在通过体外培养人肾近曲小管上皮细胞(human kidney-2, HK-2)细胞,建立 HK-2 缺氧/复氧模型模拟肾脏缺血再灌注损伤,观察 TSN II A 处理后对缺氧/复氧 HK-2 细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HK-2。

1.1.2 药物与试剂 丹参酮磺酸钠 II A (TSN II A, 成都植标化纯生物技术有限公司)纯度高于 95%;DMEM/F12 培养基(美国 hyclone 公司);青霉素-链霉素溶液(上海碧云天生物技术有限公司);D-Hanks 液(博士德生物);胎牛血清(PAN-Biotech gMbh);胰蛋白酶(美国 hyclone 公司)。CCK-8 试剂盒(日本同仁公司);ROS 试剂盒(上海贝博生物);二甲基亚砜(DMSO, sigma);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒;Bax、Bcl、Cleaved Caspase-3、HIF-1 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);SOD1 抗体(美国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG、苯甲基磺酰氟(PMSF);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术研究);ECL 显色液(Milipore 公司)。

1.1.3 仪器 Bio-Tek ELX800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);三气培养箱、二氧化碳培养箱、超净工作台(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 H/R 模型的制备 HK-2 细胞于二氧化碳培养箱中含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基常规培养,细胞状态良好时接种至实验所需培养板或培养皿中常规培养,贴壁生长 12 h

后弃去完全培养基(DMEM/F12 培养基+10%FBS),PBS 洗 2 遍,换为 D-Hanks 液^[3]于缺氧培养箱(94% N₂, 5%CO₂, 1%O₂)中培养 24 h^[4-5],此过程为缺氧。缺氧完毕后,换为完全培养基于二氧化碳培养箱中培养 6 h,此过程为复氧。

1.2.2 实验分组 对照组:HK-2 细胞常规培养条件下与其余组相同时间培养。缺氧/复氧(H/R)组:细胞贴壁后,常规培养 24 h,将常规培养基换为 D-Hanks 液于缺氧培养箱(94% N₂, 5%CO₂, 1%O₂)中培养 24 h,后续完全培养基于二氧化碳培养箱中培养 6 h。20 μg/mL TSN II A 组:经预实验,TSN II A 处理 24 h 使 CCK-8 趋势最明显。于 H/R 前给予细胞 20 μg/mL TSN II A 溶液预处理 24 h,其余操作同 H/R 组。10 μg/mL TSN II A 组:于 H/R 前给予细胞 10 μg/mL TSN II A 溶液预处理 24 h,其余操作同 H/R 组。5 μg/mL TSN II A 组:于 H/R 前给予细胞 5 μg/mL TSN II A 溶液预处理 24 h,其余操作同 H/R 组。

1.2.3 光镜下细胞形态学的观察 按各分组进行分别处理,处理完毕后,在光镜下直接观察细胞形态的改变并进行拍摄。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性 以 2×10^4 个/孔的密度将 HK-2 细胞接种于 96 孔板中,贴壁 12 h,按各分组分别处理。处理完成后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 °C 孵育 2 h,酶标仪 450 nm 检测吸光度并计算细胞活性。

1.2.5 荧光显微镜检测细胞内 ROS 水平 各组完成处理细胞含有 ROS 探针(DCFH-DA)的完全培养基染色 30 min,每 10 min 震荡 1 次,吸出染液,培养基清洗 3 次,激光共聚焦显微镜激发波长 488 nm,检测波长 525 nm 显像及拍摄。使用 Image J 软件对图像进行荧光强度统计。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组处理过程中收集细胞培养液,处理后收集细胞,离心取细胞沉淀,用 PBS 洗涤细胞 2 次,用 500 μL PBS 溶液重悬细胞,加入 Annexin-V 和 PI 各 5 μL 混匀,室温避光反应 15 min,上流式细胞仪检测样本。Annexin-V(+)和 PI(-)为早期凋亡,Annexin-V(+)和 PI(+)为晚期凋亡。

1.2.7 蛋白表达的检测 取各组细胞,用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,加入适量 RIPA+PMSF 裂解 5 min。将细胞悬液超声破碎,4 °C 离心后取上清,加入 SDS 上样缓冲液后煮沸 5 min,放入-80 °C 进行保存。取 20 μL 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至甲醇浸泡 2 min 的 PVDF 膜。室温封闭 3~4 h,一抗孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次用化学发光法显影成像。图像进行灰度分析,以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白 β-actin 条带灰度值的比值为目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件分析数据。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行方差齐性分析数据符合正态分布;多组均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

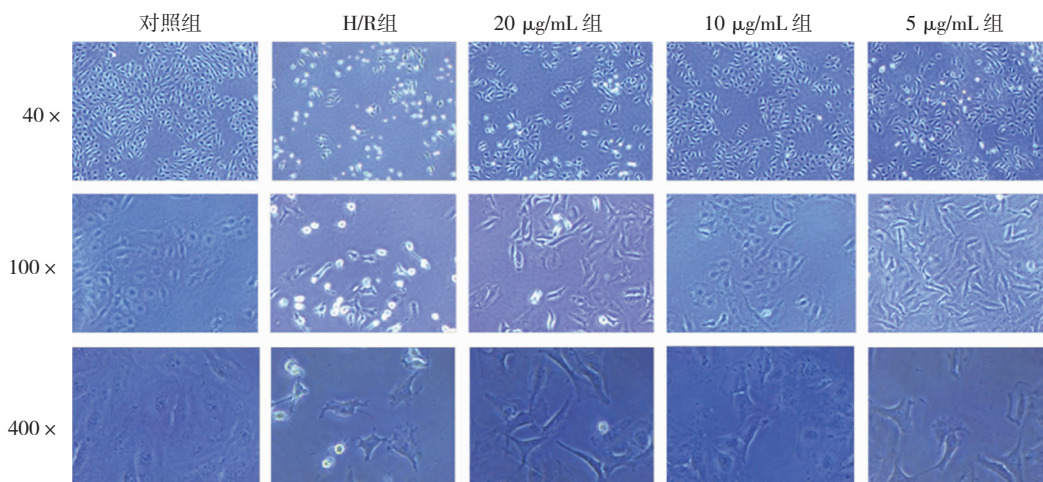


图 1 光镜下观察对照组、H/R 组及 TSN 处理后 HK-2 细胞的形态学变化

2 结果

2.1 TSN II A 对 H/R HK-2 细胞形态的影响

光镜下对照组呈椭圆梭形,较少有突起,细胞密度较高;H/R 处理后表现出明显的细胞损伤,细胞大小不一,有伪足出现,边界不清,透明细胞比例增多,部分细胞核碎裂、不清,细胞总数明显减少。TSN II A 作用后细胞形态有所恢复,较单纯 H/R 组细胞及细胞核边缘规则,细胞生长速度恢复(图1)。

2.2 TSN II A 对 H/R HK-2 细胞增殖的影响

TSN II A 处理对 H/R HK-2 细胞的增殖活性有一定的保护作用,高浓度(20 $\mu\text{g/mL}$)TSN II A 的保护作用不明显,但中低浓度(10、5 $\mu\text{g/mL}$)具有较明显作用,以 10 $\mu\text{g/mL}$ 最为显著,以对照组细胞活性为 100%作为对照,H/R 组增殖活性为(43.6 $\pm$ 10.1)%,20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A 预处理的细胞增殖活性分别为(51.0 $\pm$ 10.4)%、(79.1 $\pm$ 11.1)%、(73.2 $\pm$ 11.1)%,组间差异具有统计学意义($F=16.719, P=0.000$),其中 H/R 组分别与 20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ 组进行 LSD- t 检验,除 20 $\mu\text{g/mL}$ 组以外差异均具有统计学差异($P=0.372, P=0.001, P=0.004$),10 $\mu\text{g/mL}$ 与 5 $\mu\text{g/mL}$ 之间差异没有统计学意义($P=0.479$) (图2)。

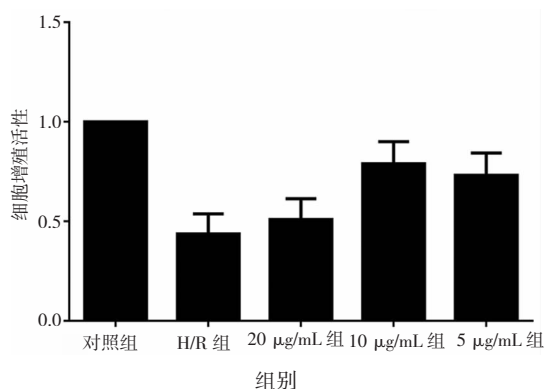


图 2 TSN II A 作用于缺氧复氧 HK-2 细胞的增殖活性曲线

2.3 TSN II A 对 H/RHK-2 细胞内 ROS 水平的影响

各组活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平差异经方差分析存在统计学意义($F=548.467, P=0.000$),各组比较采用 LSD- t 检验。与对照组比较,H/R 组细胞内 ROS 水平荧光强度明显增强,其平均荧光强度达 82.03 ± 2.85 ,而对照组仅 20.21 ± 0.42 ,两者差异存在统计学意义($P=0.000$);与 H/R 组比较,各种浓度 TSN II A 均可减少由缺氧复氧损伤产生 ROS 水平,20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ TSN II A 组分别为 45.66 ± 2.31 、 13.92 ± 0.69 、 24.34 ± 2.64 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$),以 5 $\mu\text{g/mL}$ 减少程度最为明显(图3)。

2.4 TSN II A 对 H/RHK-2 细胞凋亡率的影响

本研究使用 Annexin V-PI 双染法流式细胞术检测凋亡率。对照组的细胞凋亡率为(6.0 $\pm$ 2.0)%,H/R 组为(13.5 $\pm$ 2.1)%,20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 TSN II A 组为(5.5 $\pm$ 1.1)%,10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组为(8.4 $\pm$ 0.5)%,5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组为(7.0 $\pm$ 1.0)%,差异存在统计学意义($F=14.417, P=0.000$),其中 H/R 组与各组差异均存在差异($P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.000$)。见图4。

2.5 TSN II A 对 H/RHK-2 细胞氧化应激、凋亡相关蛋白的影响

Western blot 结果显示,HK-2 细胞 H/R 后,Bcl-2 的表达下降,Bax 的表达增高,Cleaved Caspase-3 表达增加,各组具体相对灰度值见图5、表1。Cleaved Caspase-3 蛋白表达各组存在统计学差异($F=15.607, P=0.000$),H/R 组与对照组、20 $\mu\text{g/mL}$ 组、10 $\mu\text{g/mL}$ 组、5 $\mu\text{g/mL}$ 组进行 LSD- t 检验,组间差异存在统计学差异($P=0.000, P=0.001, P=0.000, P=0.039$)。Bax 蛋白的表达各组间差异具有统计学意义($F=10.735, P=0.003$),H/R 组与对照组、20 $\mu\text{g/mL}$ 组、10 $\mu\text{g/mL}$ 组、5 $\mu\text{g/mL}$ 组进行 LSD- t 检验,组间差异存在统计学差异($P=0.001, P=0.001, P=0.000, P=0.002$)。Bcl-2 蛋白的表达组间差异具有统计学意义($F=4.153, P=0.031$),H/R 组与对照组、20 $\mu\text{g/mL}$ 组、10 $\mu\text{g/mL}$ 组、5 $\mu\text{g/mL}$ 组进行 LSD- t 检验,组间差异存在统计学差异($P=0.006, P=0.008, P=0.015, P=0.016$)。

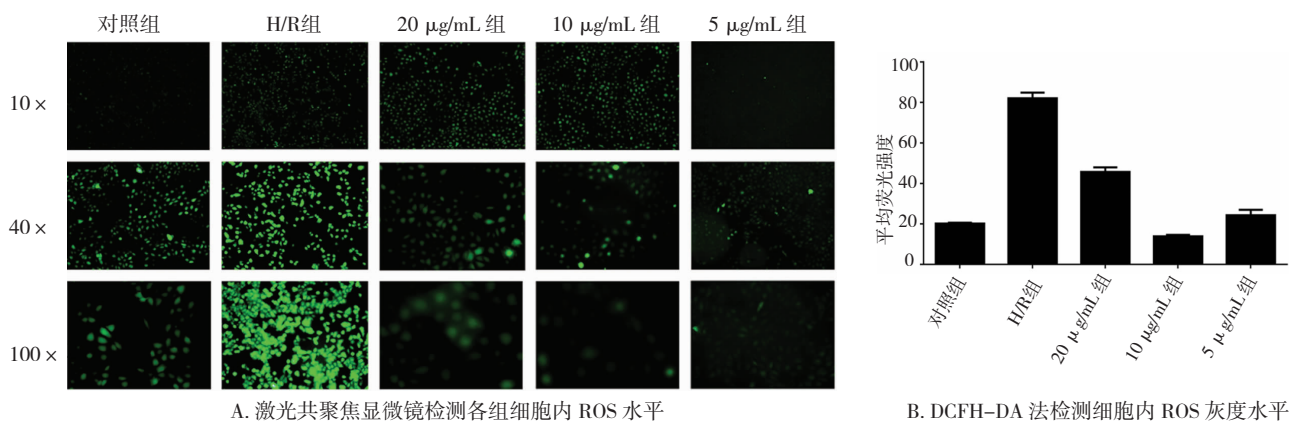


图 3 对照组、H/R 组及 TSN II A 处理后细胞内氧化应激水平变化

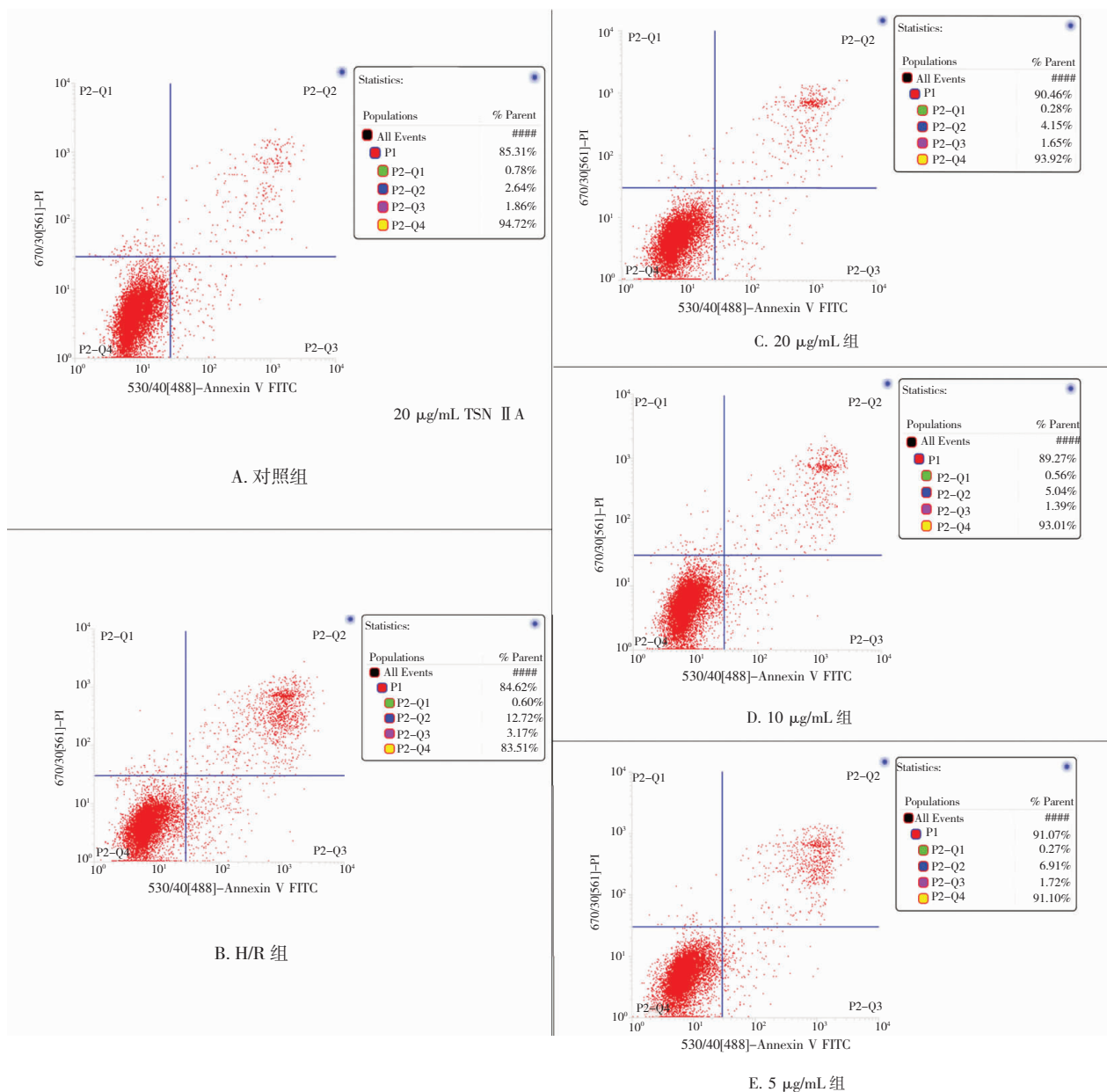


图 4 流式细胞术检测对照组、H/R 组及各 TSN II A 处理组细胞凋亡

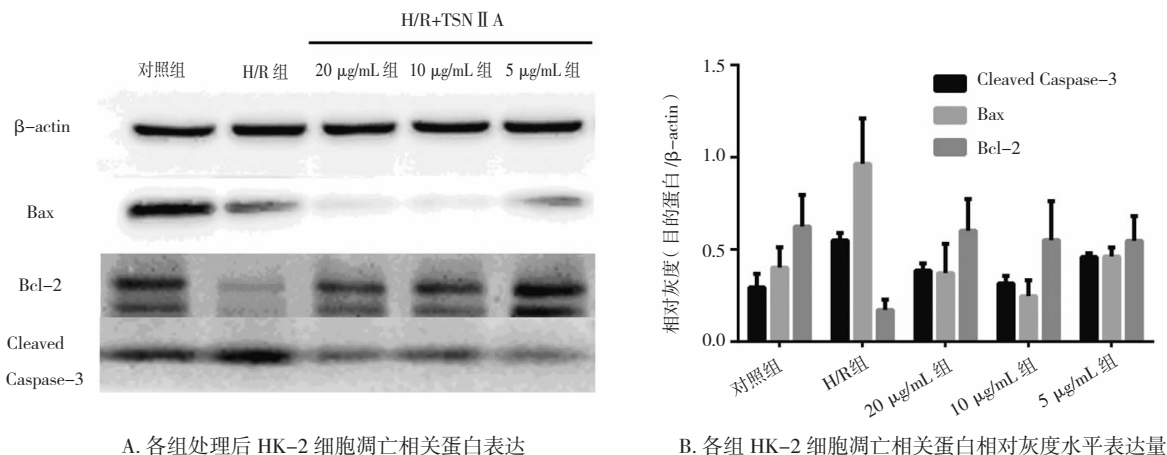


图5 对照组、H/R 组及 TSN II A 处理组凋亡相关蛋白表达

表1 各组处理后各目的蛋白相对灰度值

组别	Cleaved Caspase-3	Bax	Bcl-2
对照组	0.29 ± 0.07	0.40 ± 0.10	0.62 ± 0.17
H/R组	0.55 ± 0.04	0.96 ± 0.25	0.17 ± 0.06
H/R+20 μg/mL 组	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.16	0.60 ± 0.17
H/R+10 μg/mL 组	0.32 ± 0.04	0.25 ± 0.09	0.55 ± 0.21
H/R+5 μg/mL 组	0.45 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.54 ± 0.13
F 值	15.607	10.735	4.153
P 值	0.001	0.003	0.031

3 讨论

IRI是一种病理状态,在肾移植过程中,IRI 不仅引起急性排斥反应,而且同时也导致移植肾功能延迟恢复、移植肾功能衰竭等严重后果。多项实验研究表明,TSN II A 对多种 IRI 组织和细胞具有一定的保护作用^[6-7],但研究多集中于心血管系统疾病,对肾脏 IRI 研究较少。本课题组的前期工作已证实丹参酮能在一定程度上减轻大鼠肾 IRI^[8-9]。肾脏组织 IRI,在多种肾脏细胞内表现为 H/R 损伤。为本实验选取肾小管上皮细胞进行研究,使用缺氧培养箱和 D-Hanks 液营造缺氧环境处理 HK-2 细胞模拟体内肾脏缺血再灌注环境,通过观察细胞形态学、增殖与凋亡、氧化应激以及凋亡、氧化应激相关蛋白的表达的变化,探讨 TSN II A 对 H/R HK-2 细胞氧化应激和凋亡的影响及其可能作用机制。

本研究中,显微镜观察发现 TSN II A 作用后 H/R HK-2 细胞形态学发生明显变化,细胞形态趋于正常。TSN II A 在作用于血管内皮细胞的研究中,证

实 TSN II A 有一定程度上保护 H/R 细胞形态的作用,但各浓度组作用相似^[10];本研究发现中低浓度 (5~10 μg/mL)TSN II A 作用较高浓度组(20 μg/mL)细胞形态更为正常,提示高浓度 TSN II A 可能对 H/R 细胞的保护作用不如中低浓度,甚至可能有一定抑制作用。

本研究采用 CCK-8 法检测了细胞增殖活性,发现 20 μg/mL TSN II A 组增殖活性较 H/R 组增加,但 10 μg/mL 浓度时细胞增殖活性最高,与 H/R 组的差别存在统计学意义($P=0.028$);在更低浓度(2.5~10 μg/mL)时,细胞增殖活性的保护作用随浓度提高而明显,故可能提示 TSN II A 在一定浓度范围内对 H/R HK-2 细胞的保护作用呈浓度依赖性。在研究 TSN II A 对 H/R 心肌细胞作用中,也曾证实过高浓度 TSN II A 处理的 H/R 细胞增殖活性低于较低浓度处理组^[11]。此实验结果与形态学结果均提示高浓度 TSN II A 可能对细胞有一定抑制作用。

本研究使用 DCFH-DA 染色检测细胞内 ROS 水平,H/R 组内荧光强度明显强于对照组及各浓度 TSN II A 处理组,5 μg/mL 组浓度荧光强度最低。在 TSN II A 处理如 IRI 导致的 ROS 升高的实验研究中,损伤细胞的 ROS 升高亦被 TSN II A 显著逆转,且 5 μg/mL 浓度最为明显^[12]。表明 H/R 处理能明显增强 HK-2 细胞内 ROS 水平,且各浓度 TSN II A 均一定程度降低细胞内 ROS 水平作用,以 5 μg/mL 浓度最为明显。

为了进一步研究 TSN II A 对 H/R HK-2 细胞的作用,本实验使用流式细胞术分析了 TSN II A 对 H/R HK-2 细胞凋亡的影响,流式细胞分析结果提示

TSN II A 干预后, H/R 组较对照组凋亡明显增多, 各 TSN II A 组较单纯 H/R 组凋亡细胞减少, 20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 TSN II A 凋亡程度最低, 10 $\mu\text{g/mL}$ 凋亡程度在丹参酮处理组中最高。在 TSN II A 处理缺氧导致心肌细胞损伤的研究中, 缺氧明显增加流式细胞术所检测到的细胞早期及晚期凋亡, TSN II A 在一定程度上可以减少其凋亡^[13]。TSN II A 促进增殖和抑制凋亡并不呈正比关系, 表明 TSN II A 可能除凋亡外还存在其他机制对 H/R 细胞产生一定的保护作用。

各实验组相比较单纯 H/R 组线粒体凋亡通路中的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加, 促凋亡蛋白 Bax 减少, 凋亡执行者 Cleaved Caspase-3 表达减少; 以 10 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度最为明显, 与 H/R 组的 Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 蛋白表达差异存在统计学差异 ($P=0.001$, $P=0.022$, $P=0.001$)。以上结果说明, TSN II A 抑制凋亡可能是通过线粒体凋亡途径, 上调 Bcl-2 表达, 下调 Bax 以及 Cleaved Caspase-3 表达实现的, 所以 TSN II A 可能是通过减少 Bax/Bcl-2 值, 从而保护 H/R HK-2 细胞增殖活性并抑制细胞凋亡, 在多个研究中均表明 TSN II A 可能是通过调节 Bcl-2 家族蛋白影响凋亡^[10,14]。在 TSN II A 对大鼠脊髓 IRI 的研究中, 亦得到类似的结果^[15], 但其保护作用亦可能通过其他通路实现^[16]。有研究提出 TSN II A 可以通过启动 PI3K/Akt/mTOR 信号通路减轻大鼠 IRI 损伤。PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与凋亡和自噬的调节, TSN II A 可能亦通过凋亡和自噬对 H/R 损伤起保护作用。

综上所述, TSN II A 在一定浓度下可能通过抑制氧化应激反应, 减少细胞凋亡, 对 H/R HK-2 细胞产生保护作用^[17]。本研究为中药丹参运用于肾 IRI 提供了一定实验室依据, 但其更明确作用机制还需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: pathogenesis and treatment[J]. World J Transplant, 2015, 5(2): 52-67.
- [2] 杨志霞, 林 谦, 马 利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 93-96.
- [3] Cui LY, Yang S, Zhang J. Protective effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin on hypoxia/reoxygenation injury of HK-2 cells[J].

Transplant Proc, 2011, 43(10): 3622-3627.

- [4] Xu Y, Wang W, Jin K, et al. Perillyl alcohol protects human renal tubular epithelial cells from hypoxia/reoxygenation injury via inhibition of ROS, endoplasmic reticulum stress and activation of PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95(11): 662-669.
- [5] Yu W, Sheng M, Xu R, et al. Berberine protects human renal proximal tubular cells from hypoxia/reoxygenation injury via inhibiting endoplasmic reticulum and mitochondrial stress pathways[J]. J Transl Med, 2013, 11: 24.
- [6] Li Q, Shen L, Wang Z, et al. Tanshinone IIA protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 9(84): 106-114.
- [7] Zhang L, Gan W, An G. Influence of Tanshinone IIA on heat shock protein 70, Bcl-2 and Bax expression in rats with spinal ischemia/reperfusion injury[J]. Neural Regen Res, 2012, 7(36): 2882-2888.
- [8] Chen G, Fu Y, Wu X. Protective Effect of salvia miltiorrhiza extract against renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats[J]. Molecules, 2012, 17(2): 1191-1202.
- [9] Chen G, Mi J, Wu X, et al. Structural features and bioactivities of the chitosan[J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49(4): 543-547.
- [10] Cui ZT, Liu JP, Wan LW. The effects of Tanshinone IIA on hypoxia/reoxygenation-induced myocardial microvascular endothelial cell apoptosis in rats via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 1116-1126.
- [11] Jin HJ, Xie XL, Ye JM, et al. Tanshinone IIA and cryptotanshinone protect against hypoxia-induced mitochondrial apoptosis in H9c2 cells[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e51720.
- [12] Zhu Y, Tang Q, Wang G, et al. Tanshinone IIA protects hippocampal neuronal cells from reactive oxygen species through changes in autophagy and activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase b, and mechanistic target of rapamycin pathways[J]. Curr Neurovasc Res, 2017, 14(2): 132-140.
- [13] Wang D, Liu Y, Zhong G, et al. Compatibility of Tanshinone IIA and astragaloside IV in attenuating hypoxia-induced cardiomyocytes injury[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 204: 67-76.
- [14] Zhang W, Li Y, Li R, et al. Sodium Tanshinone IIA sulfonate prevents radiation-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 4537974.
- [15] Yao NW, Lu Y, Shi LQ, et al. Neuroprotective effect of combining Tanshinone IIA with low-dose methylprednisolone following acute spinal cord injury in rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 2193-2202.
- [16] Zhang WJ, Feng J, Zhou R, et al. Tanshinone IIA protects the human blood-brain barrier model from leukocyte-associated hypoxia-reoxygenation injury[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 648(1): 146-152.
- [17] Li Q, Shen L, Wang Z. Tanshinone IIA protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 106-114.

(责任编辑: 冉明会)