

## 丹参酮 II A 磺酸钠对尿毒症毒素作用下人脐静脉内皮细胞功能的影响

王立华<sup>1</sup>, 贾岚<sup>1</sup>, 陈海燕<sup>1</sup>, 杨波<sup>2</sup>, 王喆<sup>1</sup>, 毕学青<sup>1</sup>  
(1. 天津医科大学第二医院肾脏病血液净化科, 天津 300211;  
2. 天津中医药大学第一附属医院肾内科, 天津 301617)

**[摘要]** **目的:** 探讨丹参酮 II A 磺酸钠 (STS) 对尿毒症毒素作用下人脐静脉内皮细胞 (hUVECs) 功能的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 将 hUVECs 进行传代培养并分为空白对照组、尿毒症毒素刺激组、尿毒症毒素+STS 组和尿毒症毒素+STS+细胞外信号调节激酶 (ERK) 抑制剂组, 其中后 2 组中 STS 的浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 先给予各组剪切力刺激, 剪切力大小为  $12 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; 采用 CCK-8 法测定各组细胞增殖活性, Western blotting 法检测各组细胞中 ERK、核因子  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 和 I 型胶原蛋白表达水平, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测细胞中 ERK、NF- $\kappa\text{B}$  和 I 型胶原 mRNA 表达情况; 原位末端转移酶标记技术 (TUNEL) 法检测各组细胞凋亡率。**结果:** CCK-8 法检测, 在剪切力作用后, 尿毒症毒素刺激组和尿毒症毒素+STS+ERK 抑制剂组细胞增殖活性低于尿毒症毒素+STS 组 ( $P < 0.01$ )。Western blotting 法检测, 与尿毒症毒素组比较, 尿毒症毒素+STS 组细胞中 ERK、NF- $\kappa\text{B}$  和 I 型胶原蛋白表达水平升高 ( $P < 0.01$ ); 抑制 ERK 信号通路后, 与空白对照组、尿毒症毒素组和尿毒症毒素+STS 组比较, 尿毒症毒素+STS+ERK 抑制剂组细胞中 ERK、NF- $\kappa\text{B}$  和 I 型胶原蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。RT-qPCR 法检测, 与尿毒症毒素组比较, 尿毒症毒素+STS 组细胞中 ERK、NF- $\kappa\text{B}$  和 I 型胶原 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.01$ ); 抑制 ERK 通路后, 与空白对照组、尿毒症毒素组和尿毒症毒素+STS 组比较, 尿毒症毒素+STS+ERK 抑制剂组细胞中 ERK、NF- $\kappa\text{B}$  和 I 型胶原 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。TUNEL 法检测, 尿毒症毒素+STS 组的细胞凋亡率小于尿毒症毒素刺激组和尿毒症毒素+STS+ERK 抑制剂组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 一定浓度 STS 能通过 ERK 信号通路调节 NF- $\kappa\text{B}$  和 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达来改善尿毒症毒素作用下的内皮细胞增殖, 减少细胞凋亡。

**[关键词]** 血液透析; 动静脉内瘘; 人脐静脉内皮细胞; 尿毒症; 丹参酮 II A 磺酸钠

**[中图分类号]** R459.5;R543.6 **[文献标志码]** A

## Effect of tanshinone II A on function of human umbilical vein endothelial cells after treated with uremic toxin

WANG Lihua<sup>1</sup>, JIA Lan<sup>1</sup>, CHEN Haiyan<sup>1</sup>, YANG Bo<sup>2</sup>, WANG Zhe<sup>1</sup>, BI Xueqing<sup>1</sup>

(1. Kidney Disease and Blood Purification Center, Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Department of Nephrology, First Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of sodium tanshinone II A sulfonate (STS) on the function of

[收稿日期] 2023-04-11

[基金项目] 天津市卫健委中医中西医结合项目 (2021173)

[作者简介] 王立华 (1979-), 男, 天津市人, 副主任医师, 医学博士, 主要从事肾脏病基础及临床方面的研究。

[通信作者] 王立华, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: sizho27099@163.com)

human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) after treated with uremic toxin, and to clarify its mechanism. **Methods:** The hUVECs were passaged and divided into blank control group, uremic toxin-stimulation group, uremic toxin + STS group, and uremic toxin + STS + extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor group. The concentration of STS used in the last two groups was  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The shear stress stimulation at  $12 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$  was applied to the cells in various groups. The proliferation activities of the cells in various groups were detected by CCK-8 assay; the expression levels of ERK, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), and type I collagen proteins in the cells in various groups were detected by Western blotting method; the expression levels of ERK, NF- $\kappa$ B, and type I collagen mRNA in the cells in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method; the apoptotic rates the cells in various groups were detected by TUNEL method. **Results:** The CCK-8 assay results showed that after treated with shear stress, the proliferation activities of the cells in uremic toxin-stimulation group and uremic toxin + STS + ERK inhibitor group were lower than that in uremic toxin + STS group ( $P < 0.01$ ). The Western blotting results showed that compared with uremic toxin group, the expression levels of ERK, NF- $\kappa$ B, and type I collagen proteins in the cells in uremic toxin + STS group were increased ( $P < 0.01$ ). After inhibiting the ERK pathway, compared with blank control group, uremic toxin group, and uremic toxin + STS group, the expression levels of ERK, NF- $\kappa$ B, and type I collagen proteins in the cells in uremic toxin + STS + ERK inhibitor group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The RT-qPCR results showed that compared with uremic toxin group, the expression levels of ERK, NF- $\kappa$ B, and type I collagen mRNA in the cells in uremic toxin + STS group were increased ( $P < 0.01$ ). After inhibiting the ERK signaling pathway, compared with blank control group, uremic toxin group, and uremic toxin + STS group, the expression levels of ERK, NF- $\kappa$ B, and type I collagen mRNA in the cells in uremic toxin + STS + ERK inhibitor group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The TUNEL method detection results showed that the apoptotic rate in the cells in uremic toxin + STS group was lower than those in uremic toxin-stimulation group and uremic toxin + STS + ERK inhibitor group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** A certain concentration of STS can improve the proliferation of the endothelial cells and reduce the apoptosis of the cells after treated with uremic toxins by modulating the expressions of NF- $\kappa$ B and type I collagen mRNA and proteins through the ERK signaling pathway.

**KEYWORDS** Hemodialysis; Arterial-venous fistula; Human umbilical vein endothelial cell; Uremia; Sodium tanshinone II A sulphonase

动静脉内瘘 (arteriovenous fistula, AVF) 是尿毒症患者血液透析的首选血管通路, 但其功能障碍是影响尿毒症血液透析患者长期预后的关键因素<sup>[1-3]</sup>, AVF 建立后在血流剪切力影响下, 由静脉新生内膜增生引起的静脉狭窄是 AVF 功能障碍的主要原因。同时, 尿毒症状态下各种毒素也会诱导血管内皮细胞增殖从而出现内膜增生情况。丹参酮是从丹参根中提取的一种脂溶性化合物, 是丹参的主要活性成分, 其中丹参酮 II A 是丹参酮的主要活性单体成分, 其分子中的醌型结构易氧化, 具有较强的生物活性, 参与机体抗氧化反应。丹参酮 II A 的磺化产物丹参酮 II A 磺酸钠 (sodium tanshinone II A sulphonate, STS) 能溶解于水, 在冠心病、高脂血症和糖尿病的治疗中被广泛应用, 同时可清

除氧自由基, 抑制组胺形成, 对血管内皮具有较好的保护作用<sup>[4-7]</sup>。但是 STS 在尿毒症环境下对血管内皮细胞功能异常的影响尚未明确。因此, 本研究以尿毒症环境下培养的血管内皮细胞为研究对象, 探讨 STS 对尿毒症环境下内皮细胞功能的影响, 并阐明其作用机制, 为 AVF 功能不良的防治提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, hUVECs) (中国科学院)。STS 注射液 (上海第一生化药业有限公司), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) [生工生物工程 (上海) 股份有限公

司]、胰蛋白酶和CCK-8试剂盒(碧云天生物技术有限公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和DMEM培养基(美国Gibco公司),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国Sigma公司),细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)抑制剂PD98059(美国ApexBio公司),超纯RNA提取试剂盒、反转录试剂盒和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)试剂盒(宝日生物技术有限公司),引物(美国ThermoFisher公司)。倒置荧光显微镜(型号:TE300,日本Nikon公司)。

**1.2 hUVECs的培养及处理** hUVECs培养:用含10% FBS的L-DMEM培养液(含糖葡萄糖 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 饱和湿度的细胞培养箱中进行培养,每隔1~2 d更换培养液1次,待细胞长至80%时,用含0.25%胰酶-0.05% EDTA消化2~3 min,用含30% FBS的M199完全培养液终止消化,离心,用10% FBS的M199完全培养液重悬,传代培养。将细胞分为空白对照组(不做任何处理)、尿毒症毒素刺激组[采用尿毒症毒素( $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 肌酐、 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿酸、 $2\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲状旁腺激素和 $1\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 精脲的混合液)刺激细胞]<sup>[25]</sup>、尿毒症毒素+STS组( $10\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  STS);尿毒症毒素+STS组( $10\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  STS)+ERK抑制剂(PD98059)组,培养24 h后将培养液换成无血清M199培养液,并用胰岛素( $5\text{ mIU}\cdot\text{L}^{-1}$ )刺激细胞15 min。在细胞分组后,每组细胞利用平板流动腔、蠕动泵、硅胶软管和储液瓶搭建流体剪切力系统<sup>[23]</sup>,调节液体流速至 $75\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,对hUVECs进行剪切力刺激6 h。

**1.3 CCK-8法检测hUVECs的增殖活性** 在96孔细胞培养板中加入hUVECs悬液100  $\mu\text{L}$ (浓度为每毫升 $6\times 10^5$ 个细胞),边缘孔用等体积的PBS缓冲液填充;在培养箱中孵育12 h后,按上述方法分组处理;之后向每孔中加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液或等体积DMEM,继续孵育4 h;以仅含有培养基和CCK-8溶液而无hUVECs的孔作为空白组,以加入DMEM而非CCK-8溶液的孔作为对照组,采用分光光度计测定450 nm处的吸光度(A)值,根据细胞活性计算公式计算各组hUVECs的增殖活性。细胞增殖活性=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。

**1.4 RT-qPCR法检测各组hUVECs中ERK、I型胶原和核因子 $\kappa\text{B}$ (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ) mRNA表达水平** 取冻存于液氮中hUVECs细胞,按试剂盒操作步骤提取总RNA,测定RNA纯度,逆转录反应合成cDNA,再进行PCR扩增,引物序列:ERK上游引物5'-GGCTGTTCCCAAAT-GCTGAC-3',ERK下游引物5'-AACTTGAATG-GTGCTTCGGC-3';NF- $\kappa\text{B}$ 上游引物5'-GTGG-TGCGGCTCATGTTTAC-3',NF- $\kappa\text{B}$ 下游引物5'-CGTCTGATACCACGGGTTCC-3';Collagen I上游引物5'-AGTGGTTTGGATGGTGCCAA-3',Collagen I下游引物5'-GCACCATCATTTCCA-CGAGC-3';GAPDH上游引物5'-AGATCCCT-CCAAAATCAAGTGG-3',GAPDH下游引物5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTT-3'。PCR反应体系:2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu\text{L}$ ,上游引物和下游引物( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA模板2  $\mu\text{L}$ ,加入ddH<sub>2</sub>O至总体积25  $\mu\text{L}$ 。扩增条件:变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s;退火 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 s,延伸 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、34 s,共30个循环。将各样品cDNA稀释10倍后取2  $\mu\text{L}$ 为模板,分别以目的基因引物和内参基因(GAPDH)引物进行扩增,每组重复8次,在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行熔解曲线分析。采取 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据的相对定量分析。

**1.5 Western blotting法检测各组hUVECs中ERK、I型胶原和NF- $\kappa\text{B}$ 蛋白表达水平** 按“1.2”所述方法分组处理hUVECs,RIPA裂解细胞后提取蛋白。其中ERK抑制剂使用时用完全培养基稀释至工作浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。所得蛋白样本以12% SDS-PAGE进行电泳并将目的蛋白转移至PVDF膜。5%牛血清白蛋白封闭1 h后,分别加入兔抗人I型胶原抗体、兔抗人NF- $\kappa\text{B}$  p65抗体(以Tris缓冲盐溶液,TBS溶液按1:400稀释)和兔抗人ERK抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第2天,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG抗体(用TBS溶液按1:3000稀释),室温孵育1 h。TBST溶液洗膜3次后,加入ECL显色液并曝光条带。样品测定:①分别取100  $\mu\text{L}$ 检测样品(稀释100倍)加入到微孔板中,每个样品取3个平行样进行测定;②加入100  $\mu\text{L}$ 工作液后,立即混匀;③ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应60 min后,冷却至室温;④采用酶标仪在波长562 nm处测定蛋白灰度值,在20 min内检测完毕所有样品;⑤采用

Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.6 原位末端转移酶标记技术(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)法检测各组细胞凋亡情况** 采用1×PBS缓冲液浸泡润洗样本2~3次,每次3~5 min;按照1:100的比例用1×PBS缓冲液稀释浓度为 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Proteinase K溶液,使其终浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个样本上滴加100  $\mu\text{L}$ 稀释好的Proteinase K溶液,使溶液覆盖全部样本区域,室温孵育20 min;用1×PBS缓冲液浸泡润洗样本2~3次,按照1:5的比例用 $\text{ddH}_2\text{O}$ 将5×Equilibration Buffer稀释成1×Equilibration Buffer;滴加100  $\mu\text{L}$  1×Equilibration Buffer使其全部覆盖待检样本区域,室温平衡10~30 min;滴加DAPI避光孵育5 min,对标本进行染核,1×PBS缓冲液浸洗爬片3次;用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察,计算细胞凋亡率。

**1.7 统计学分析** 采用GraphPad Prism 7.0和SPSS 20.0统计软件进行统计学分析。各组细胞凋亡率,hUVECs中ERK、I型胶原和NF- $\kappa\text{B}$  mRNA及蛋白表达水平符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 hUVECs的形态表现** hUVECs传代培养24 h后开始单层贴壁生长,光镜下可见细胞呈多边形,生长融合后呈铺路石状排列,具有典型上皮

细胞形态。见图1。

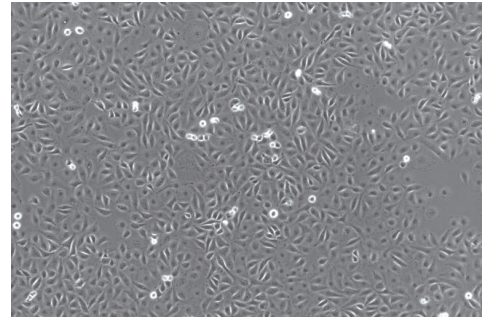
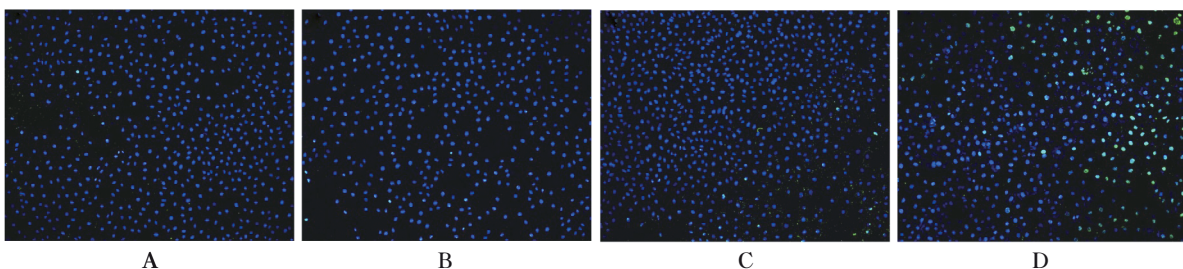


图1 倒置显微镜下观察hUVECs形态表现( $\times 100$ )

Fig. 1 Morphology of hUVECs observed under inverted microscope ( $\times 100$ )

**2.2 各组细胞增殖活性** CCK-8法检测结果显示:与空白对照组( $99.86\%\pm 0.12\%$ )比较,尿毒症毒素刺激组细胞增殖活性( $76.85\%\pm 0.59\%$ )降低( $P<0.001$ );与尿毒症毒素刺激组比较,尿毒症毒素+STS组细胞增殖活性( $84.35\%\pm 0.92\%$ )升高( $P<0.001$ );与尿毒症毒素刺激组和尿毒症毒素+STS组比较,尿毒症毒素+STS+ERK抑制剂组细胞增殖活性( $50.98\%\pm 0.92\%$ )降低( $P<0.001$ )。

**2.3 各组细胞凋亡率** 与空白对照组( $5.96\%\pm 4.31\%$ )比较,尿毒症毒素刺激组细胞凋亡率( $27.88\%\pm 8.61\%$ )升高( $P=0.0218$ );与尿毒症毒素刺激组比较,尿毒症毒素+STS组细胞凋亡率( $19.69\%\pm 3.51\%$ )差异无统计学意义( $P=0.6695$ );与尿毒症毒素+STS组比较,尿毒症毒素+STS+ERK抑制剂组细胞凋亡率( $46.57\%\pm 8.40\%$ )升高( $P=0.0007$ )。见图2。



A: Blank control group; B: Uremic toxin-stimulation group; C: Uremic toxin+STS group; D: Uremic toxin+STS+ERK inhibitor group.

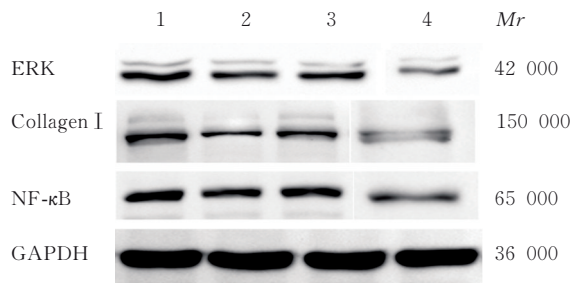
图2 TUNEL染色法观察各组细胞凋亡情况( $\times 100$ )

Fig. 2 Apoptosis of cells in various groups detected by TUNEL method( $\times 100$ )

**2.4 各组hUVECs中ERK、I型胶原和NF- $\kappa\text{B}$ 蛋白表达水平** 与空白对照组比较,尿毒症毒素刺激

组hUVECs中ERK、I型胶原和NF- $\kappa\text{B}$ 蛋白表达水平降低( $P<0.01$ );与尿毒症毒素刺激组比较,

尿毒症毒素+STS组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平升高 ( $P<0.01$ ); 与尿毒症毒素+STS 组比较, 尿毒症毒素+STS+ERK 抑制剂组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平降低 ( $P<0.01$ )。见图 3 和表 1。



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Uremic toxin-stimulation group; Lane 3: Uremic toxin+STS+group; Lane 4: Uremic toxin+STS+ERK inhibitor group.

图 3 各组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of ERK, type I collagen, and NF- $\kappa$ B in hUVECs in various groups detected by Western blotting method

**2.5 各组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平** 与空白对照组比较, 尿毒症毒素刺激组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平降低 ( $P<0.01$ ); 与尿毒症毒素刺激组比较, 尿毒症毒素+STS 组 hUVECs 中

ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平升高 ( $P<0.01$ ); 与尿毒症毒素+STS 组比较, 尿毒症毒素+STS+ERK 抑制剂组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平降低 ( $P<0.01$ )。见表 2。

### 3 讨论

在本研究中, CCK-8 法检测结果显示: 与尿毒症毒素刺激组比较, STS 预处理的 hUVECs 活力增强, 提示 STS 能改善内皮细胞活性, 与既往文献<sup>[8-11]</sup>报道一致。

在 AVF 内膜增生过程中, 一直存在血流动力学的改变, 剪切力作用也起重要作用。血流动力学是对内皮细胞最直接的生理刺激, 在各种血管生物学过程中起重要作用<sup>[12-17]</sup>。研究<sup>[18]</sup>显示: 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路介导低剪切力诱导的氧化损伤, 而低剪切力可促进 ERK、p38 和 JNK 磷酸化, 表明 ERK、p38 和 JNK 通路与剪切力作用下细胞的内皮功能障碍有关。ERK1/2 磷酸化后可与细胞核内的 Egr-1 结合, 并促进早期生长反应因子 1 (early growth responsive-1, Egr-1) 转录和激活, 而 Egr-1 是剪切力调控血管内皮细胞的主要细胞信号转导因子<sup>[19-24]</sup>。

本课题组前期研究<sup>[25]</sup>发现: 剪切力可以通过调控小窝蛋白-1-ERK1/2 信号通路影响内皮细胞的

表 1 各组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平

Tab. 1 Expression levels of ERK, type I collagen, and NF- $\kappa$ B proteins in hUVECs in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	ERK	Type I collagen	NF- $\kappa$ B
Blank control	0.040 $\pm$ 0.010	0.040 $\pm$ 0.010	0.530 $\pm$ 0.060
Uremic toxin-stimulation	0.020 $\pm$ 0.008*	0.250 $\pm$ 0.018*	0.220 $\pm$ 0.010*
Uremic toxin+STS	0.030 $\pm$ 0.010 $\Delta$	0.340 $\pm$ 0.030 $\Delta$	0.410 $\pm$ 0.030 $\Delta$
Uremic toxin+STS+ERK inhibitor	0.002 $\pm$ 0.010 $\#$	0.140 $\pm$ 0.020 $\#$	0.230 $\pm$ 0.010 $\#$

\* $P<0.01$  vs blank control group;  $\Delta P<0.01$  vs uremic toxin-stimulation group;  $\#P<0.01$  vs uremic toxin+STS group.

表 2 各组 hUVECs 中 ERK、I 型胶原和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平

Tab. 2 Expression levels of ERK, type I collagen, and NF- $\kappa$ B mRNA in HUVECs in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	ERK	Type I collagen	NF- $\kappa$ B
Blank control	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
Uremic toxin-stimulation	0.53 $\pm$ 0.03*	0.44 $\pm$ 0.03*	0.56 $\pm$ 0.18*
Uremic toxin+STS	0.73 $\pm$ 0.05 $\Delta$	0.81 $\pm$ 0.03 $\Delta$	0.76 $\pm$ 0.01 $\Delta$
Uremic toxin+STS+ERK inhibitor	0.28 $\pm$ 0.01 $\#$	0.44 $\pm$ 0.02 $\#$	0.33 $\pm$ 0.02 $\#$

\* $P<0.01$  vs blank control group;  $\Delta P<0.01$  vs uremic toxin-stimulation group;  $\#P<0.01$  vs uremic toxin+STS group.

增殖。本研究结果显示：在尿毒症毒素刺激下的 hUVECs 经过 STS 预处理后，给予一定时间的剪切力刺激模拟 AVF 建立后的剪切力改变，发现 hUVECs 中与细胞增殖相关的细胞因子 I 型胶原在经 STS 预处理后较处理前升高，而进一步抑制 ERK 通路，可以明显降低 I 型胶原的表达，提示 STS 能通过激活 ERK 通路增强细胞增殖因子的表达，从而改善内皮细胞的功能。在 mRNA 水平，给予 STS 处理后，也存在相关转录因子水平表达的变化。

尿毒症毒素刺激下也存在微炎症状态，其对 AVF 的内膜增生也有影响。在与细胞增殖相关的细胞因子中，NF- $\kappa$ B 途径可以引起内皮细胞炎症因子的表达以及凋亡发生<sup>[17]</sup>。本研究结果显示：尿毒症环境下 hUVECs 中 NF- $\kappa$ B 表达水平升高，而经 STS 处理后表达水平降低，而经过一定时间的剪切力刺激后，尿毒症环境下 NF- $\kappa$ B 表达水平降低，而经 STS 处理后其表达水平升高，抑制 ERK 信号通路后其表达水平降低。提示尿毒症环境下内皮细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达与剪切力刺激有关，长期剪切力刺激后可使 STS 促进内皮细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达。同时 ERK 通路作为参与细胞增殖的重要信号通路，在静态尿毒症环境中也呈类似的变化，提示在血流动力学影响下，STS 对内皮细胞功能的影响可能与静态条件的作用不同，可能是通过 ERK 通路参与细胞增殖。而 AVF 的成熟需要适当的外向性内膜扩张，维持适度的弹性。STS 的作用可能会有助于这种 AVF 的成熟。

综上所述，STS 作为一种中药成分，未来需要在不同剪切力环境下探讨其对 AVF 功能的影响，并进行更加深入的分子机制研究，以期 AVF 功能不良防治提供新的治疗策略。

#### 利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明：

王立华参与实验设计和实施、统计学分析及论文撰写，贾岚参与实验技术操作，陈海燕参与实验技术指导和数据分析，杨波参与实验技术指导，王喆和毕学青参与实验设计和数据统计学分析。

#### [参考文献]

[1] DEMBER L M, BECK G J, ALLON M, et al. Effect of clopidogrel on early failure of arteriovenous fistulas for

hemodialysis: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2008, 299(18): 2164-2171.

[2] LEE T, ULLAH A, ALLON M, et al. Decreased cumulative access survival in arteriovenous fistulas requiring interventions to promote maturation[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6(3): 575-581.

[3] 林燕婷, 吴禹池, 杨敏, 等. 中医药促进血液透析患者动静脉内瘘成熟的用药规律[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(3): 224-227.

[4] SHANG Q H, XU H, HUANG L. Tanshinone II A: a promising natural cardioprotective agent[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 716459.

[5] TIAN X H, WU J H. Tanshinone derivatives: a patent review (January 2006-September 2012)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23(1): 19-29.

[6] DUAN H T, MA L J, LIU H G, et al. Tanshinone II A attenuates epithelial-mesenchymal transition to inhibit the tracheal narrowing [J]. *J Surg Res*, 2016, 206 (1): 252-262.

[7] DURAN C L, KAUNAS R, BAYLESS K J. S1P synergizes with wall shear stress and other angiogenic factors to induce endothelial cell sprouting responses[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1697: 99-115.

[8] BASHAR K, CONLON P J, KHEIRELSEID E A, et al. Arteriovenous fistula in dialysis patients: factors implicated in early and late AVF maturation failure[J]. *Surgeon*, 2016, 14(5): 294-300.

[9] GARCÍA-JÉREZ A, LUENGO A, CARRACEDO J, et al. Effect of uraemia on endothelial cell damage is mediated by the integrin linked kinase pathway [J]. *J Physiol*, 2015, 593(3): 601-618.

[10] MORRIS S T, MCMURRAY J J, RODGER R S, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in uraemia [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(8): 1194-1200.

[11] 毛俐婵, 王文荣, 蒋贤辉, 等. 中药熏洗联合穴位注射对自体动静脉内瘘成熟影响的临床研究[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2018, 28(5): 384-386.

[12] CHUNG J, KIM K H, AN S H, et al. Coxsackievirus and adenovirus receptor mediates the responses of endothelial cells to fluid shear stress[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(11): 1-15.

[13] YOSHINO D, SAKAMOTO N, SATO M. Fluid shear stress combined with shear stress spatial gradients regulates vascular endothelial morphology [J]. *Integr Biol*, 2017, 9(7): 584-594.

[14] CHENG C, TEMPEL D, VAN HAPEREN R, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are

- determined by patterns of fluid shear stress [J]. *Circulation*, 2006, 113(23): 2744-2753.
- [15] HEO K S, FUJIWARA K, ABE J. Shear stress and atherosclerosis[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(6): 435-440.
- [16] CHEN L J, CHUANG L, HUANG Y H, et al. MicroRNA mediation of endothelial inflammatory response to smooth muscle cells and its inhibition by atheroprotective shear stress [J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1157-1169.
- [17] RUZE A, ZHAO Y W, LI H, et al. Low shear stress upregulates the expression of fractalkine through the activation of mitogen-activated protein kinases in endothelial cells [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2018, 29(4): 361-368.
- [18] AKIMOTO S, MITSUMATA M, SASAGURI T, et al. Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (Sdi1/Cip1/Waf1) [J]. *Circ Res*, 2000, 86(2): 185-190.
- [19] SAKAO S, TARASEVICIENE-STEWART L, LEE J D, et al. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells [J]. *FASEB J*, 2005, 19(9): 1178-1180.
- [20] BUROTTO M, CHIOU V L, LEE J M, et al. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective[J]. *Cancer*, 2014, 120(22): 3446-3456.
- [21] SAMATAR A A, POULIKAKOS P I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(12): 928-942.
- [22] NACKMAN G B, FILLINGER M F, SHAFRITZ R, et al. Flow modulates endothelial regulation of smooth muscle cell proliferation: a new model [J]. *Surgery*, 1998, 124(2): 353-360;discussion 360-361.
- [23] SONG M, FINLEY S D. Mechanistic characterization of endothelial sprouting mediated by pro-angiogenic signaling[J]. *Microcirculation*, 2022, 29(2): e12744.
- [24] KYRIAKIDIS N C, COBO G, DAI L, et al. Role of uremic toxins in early vascular ageing and calcification[J]. *Toxins*, 2021, 13(1): 26.
- [25] JIA L, WANG L H, WEI F, et al. Effects of Caveolin-1-ERK1/2 pathway on endothelial cells and smooth muscle cells under shear stress[J]. *Exp Biol Med*, 2020, 245(1): 21-33.