

黄芪甲苷对异丙肾上腺素致乳鼠心肌细胞肥大的影响及其机制

杨娟^{1,2}, 王洪新^{1*}, 张英杰², 张静¹, 鲁美丽¹, 李胜陶¹

1. 辽宁医学院 心血管药物研究重点实验室, 辽宁 锦州 121001

2. 辽宁医学院第一附属医院 心内科, 辽宁 锦州 121001

摘要: **目的** 探讨黄芪甲苷对异丙肾上腺素(ISO)致乳鼠心肌细胞肥大的抑制作用及其机制。**方法** 原代培养新生SD大鼠心肌细胞48 h, 分别加入不同浓度的黄芪甲苷、IκBα磷酸化抑制剂BAY11-7082、β-受体阻滞剂普萘洛尔作用30 min, 加入ISO 10 μmol/L继续培养48 h。消化分离法及计算机图像分析系统检测细胞体积; 考马斯亮蓝法检测细胞中蛋白的量; RT-PCR法检测心肌细胞ANP和TLR4基因的表达; Western blotting法检测心肌细胞TLR4、p65和IκBα蛋白的表达; ELISA法检测细胞外液中TNF-α、IL-6的量。**结果** 与对照组比较, 模型组心肌细胞体积明显增大, 总蛋白的量增加, ANP基因、TLR4基因和蛋白、p65蛋白表达上调, IκBα蛋白表达下调, 细胞外液中TNF-α、IL-6的量显著增加($P < 0.01$)。黄芪甲苷、BAY11-7082和普萘洛尔均能有效抑制ISO诱导的心肌细胞肥大, 使心肌细胞体积减小, 总蛋白的量降低, ANP基因、TLR4基因和蛋白、p65蛋白表达下调, IκBα蛋白表达上调($P < 0.05$), 且上述作用呈一定的剂量相关性。**结论** 黄芪甲苷对ISO诱导的心肌细胞肥大具有保护作用, 其机制可能与抑制TLR4/NF-κB信号通路有关。

关键词: 黄芪甲苷; 异丙肾上腺素; 心肌肥大; 炎症反应; TLR4/NF-κB信号通路

中图分类号: R972.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)21-3018-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.014

Inhibition of astragaloside IV against isoproterenol-induced myocardial hypertrophy in neonatal rats and its mechanism

YANG Juan^{1,2}, WANG Hong-xin¹, ZHANG Ying-jie², ZHANG Jing¹, LU Mei-li¹, LI Sheng-tao¹

1. Key Laboratory of Molecular Biology and Drug Research, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China

2. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of astragaloside IV (As IV) on myocardial hypertrophy induced by isoproterenol (ISO) and its mechanism. **Methods** The primary cultures of neonatal rat cardiac myocytes were cultured for 48 h *in vitro*. The cardiac myocytes were treated with As IV, IκBα phosphorylation inhibitor BAY11-7082, and β-blockers Propranolol for 30 min, followed by 48 h incubation with ISO 10 μmol/L. The cardiomyocyte volume was measured by computer photograph analysis system. Total protein contents were assayed by the method of Bradford. RT-PCR was used to quantify the mRNA expression of ANP and TLR4; Western blotting was used to quantify the expression of TLR4, p65, and IκBα proteins; ELISA was used to quantify TNF-α and IL-6. **Results** Compared with the control group, the cell size, total protein content, ANP and TLR4 mRNA, TLR4, p65, TNF-α and IL-6 were increased, and expression of IκBα protein was decreased in ISO group ($P < 0.01$). As IV, BAY11-7082, and Propranolol could remarkably down-regulate the over-expression of the cell size, total protein content, ANP and TLR4 mRNA, TLR4, p65, TNF-α, and IL-6, and increase the expression of IκBα protein ($P < 0.05$). **Conclusion** As IV has the protective effect on cardiac hypertrophy induced by ISO, which is partially referring to inhibiting the TLR4/NF-κB signaling pathway and more than attenuating inflammatory effect.

Key words: astragaloside IV; isoproterenol; myocardial hypertrophy; inflammatory reaction; TLR4/NF-κB signaling pathway

心肌肥厚已成为威胁人类健康的危险因素之一, 长期的心肌肥厚可增加心力衰竭和猝死的发生^[1]。炎症细胞因子在促进左心室重构中起重要作用, 包括

导致心肌细胞肥大、胚胎基因表达、促进心肌细胞凋亡等^[2]。Serra等^[3]研究发现, β-肾上腺素受体兴奋能促进心肌肥厚, 并且使心肌中促炎症因子肿瘤

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973898/C190702); 辽宁省自然科学基金资助项目(201102141)

作者简介: 杨娟(1986—), 女, 硕士, 研究方向为心血管病学。Tel: 15940699874 E-mail: sixmorning@163.com

*通信作者 王洪新 Tel: 18641637333 E-mail: jyhxwang@163.com

坏死因子(TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)表达增强,同时上调核转录因子- κ B(NF- κ B)的表达。Toll样受体4(TLR4)是介导炎症信号的重要受体,在心血管系统普遍存在,且在心血管疾病的发生和发展及转归中起重要作用。TLR4的活化可使NF- κ B的表达增强,进而引起一系列炎症因子的表达^[4],因此推测TLR4/NF- κ B信号传导通路是导致心肌肥厚的一条重要途径。

黄芪甲苷(astragaloside IV)是从黄芪中分离得到的一种皂苷类化合物,对心血管系统具有广泛的药理作用,能够增强心肌收缩力,改善心肌能量代谢,抑制心肌纤维化和心肌细胞凋亡,并对异丙肾上腺素(ISO)引起的肥厚型心肌损伤有保护作用^[5-12]。前期研究表明,黄芪甲苷对心肌肥大的保护作用与其抑制炎症反应有关^[13]。但有关ISO诱导心肌细胞肥大是否激活TLR4,黄芪甲苷是否通过阻断TLR4/NF- κ B信号通路保护心肌的研究还鲜见报道。本实验通过体外培养心肌细胞模型,观察黄芪甲苷对ISO诱导的心肌肥大和炎症反应的影响,探讨其抑制心肌肥大的作用机制及与TLR4/NF- κ B信号通路的关系。

1 材料

1.1 药品和试剂

黄芪甲苷原料药(质量分数>98%),成都康邦生物科技有限公司,批号120802;ISO(批号BCBF4079V)、普萘洛尔(批号101181527)、鼠抗兔二抗、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶、低糖DMEM培养基, Sigma公司;TNF- α 、IL-6 ELISA试剂盒, R&D公司;核因子 κ B抑制蛋白 α (I κ B α)阻断剂BAY11-7082,江苏碧云天生物技术研究;TLR4一抗、I κ B α 一抗,北京博奥森生物技术有限公司; p65一抗,美国Proteintech Group公司;小牛血清, Hyclone公司; Trizol试剂、RT-PCR试剂盒、引物及标志物,大连宝生物公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物

出生1~3 d的SD大鼠乳鼠,雌雄兼用,由辽宁医学院动物实验中心提供,许可证号SCXK(辽)2003-0007。

1.3 仪器

超净工作台,江苏吴县市净化技术研究所;CO₂孵箱,美国Sheldon Manufacturing Inc公司;79—1磁力加热搅拌器,江苏金坛中大仪器厂;TDL—4型

离心机,上海安亭科学仪器厂;DNM—9602G酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司;倒置相差显微镜,德国Leica公司。

2 方法

2.1 细胞培养

SD乳鼠在无菌条件下开胸取出心脏, D-hanks液冲洗,取心室肌,剪成约1 mm³的碎块,加入0.8 g/L胰蛋白酶,37℃恒温消化,收集消化并离心后的细胞,加入15%小牛血清、84%DMEM培养基、1%的含双抗液(30 mg/L青霉素,100 mg/L链霉素)的培养基,吹打均匀后,采用差速贴壁的方法获得较纯的心肌细胞,根据实验所需密度接种,于5%CO₂、37℃的孵箱中培养。

2.2 分组与给药

心肌细胞常规培养48 h后,更换为含0.04%小牛血清的培养基,以避免血清成分对实验结果产生影响,实验共分成8组:对照组,模型组(ISO 10 μ mol/L), BAY11-7082(5 μ mol/L)组, ISO(10 μ mol/L)+BAY11-7082(5 μ mol/L)组, ISO(10 μ mol/L)+黄芪甲苷低、中、高浓度(3、10、30 μ mol/L)组, ISO(10 μ mol/L)+普萘洛尔(2 μ mol/L)组。黄芪甲苷和BAY11-7082用DMSO溶解至终体积分数为0.1%,其他药物用无菌蒸馏水溶解。各给药组分别给予相应药物,对照组加入同体积DMSO,置孵箱中作用30 min,加入ISO作用48 h后进行各项指标的测定。

2.3 考马斯亮蓝法测定心肌细胞总蛋白的量

取“2.2”项下各组处理后的细胞,弃上清液,用D-hank's溶液冲洗3遍,加入0.3 mol/L NaOH 0.5 mL,于100℃裂解30 min。根据计数,每孔细胞数约为 5×10^5 个,采用考马斯亮蓝法测定总蛋白的量。

2.4 心肌细胞体积的测定

取“2.2”项下各组处理后的细胞,弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)快速冲洗长满细胞的培养孔3次,每孔加入0.1 g/L胰酶0.3 mL,放入37℃恒温箱中孵育10 min,每孔加入含0.1 g/L小牛血清的培养基0.2 mL以终止消化。将合并收集的细胞注入一细胞室内(细胞室底部是一硅化的盖玻片,防止心肌细胞贴壁),倒置显微镜下观察($\times 400$)细胞几乎呈球形。每组随机选取4个视野,每个视野测量20个细胞,以计算机CIAS大恒细胞图像分析系统测量单个细胞的直径,用球体积公式计算细胞体积。

2.5 RT-PCR 法检测 ANP 和 TLR4 基因的表达

用细胞刮刀刮下“2.2”项下各组处理后细胞, PBS 冲洗, 离心后弃上清, 收集沉淀的细胞, -80°C 冰箱冷藏备用。Trizol 法提取心肌细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 260、280 nm 处吸光度 (A) 值, 并据此测定 RNA 纯度和浓度。取约 1 μg 总 RNA 进行逆转录。逆转录条件: 30°C , 10 min; 42°C , 30 min; 95°C , 5 min。以 GAPDH 为内参照, 引物合成由大连宝生物公司完成。GAPDH 引物序列: 正向 5'-AATGCATCCTGCCACCACCAACTGC-3', 反向 5'-GGAGGCCATGTAGTAGGCCATGAGGTC-3', 扩增产物长度 550 bp; 心钠肽 (ANP) 引物序列: 正向 5'-GGGCTCCTTCTCCATCAC-3', 反向 5'-CCCTCAGTTTGCTTTTCA-3', 扩增产物长度 344 bp; TLR4 引物序列: 正向 5'-CTATCATCAGTGTATCGGTG-3', 反向 5'-CAGTCCTCATTCTGGC-TC-3', 扩增产物长度 186 bp。通过逆转录合成的 cDNA (1 μL) 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: ANP, 94°C 、45 s, 55°C 、50 s, 72°C 、75 s; TLR4, 94°C 、30 s, 57°C 、30 s, 72°C 、1 min。取 10 μL 反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后, 置于凝胶成像系统进行观察, 用凝胶图像分析系统软件对 RT-PCR 产物电泳条带进行密度分析, 以 GAPDH 为内参基因, 根据 GAPDH、ANP、TLR4 密度比值, 计算 ANP、TLR4 的相对表达量。

2.6 Western blotting 法检测心肌细胞 TLR4、p65、I κ B α 蛋白表达

同“2.5”项下方法收集细胞, -80°C 冷冻备用。待测样品加入 100 μL RIPA 裂解液, 超声波破碎仪破碎细胞 (冰上操作), 每次 10 s, 共 3 次, 冰上放置 30 min, 4°C 、12 000 $\times g$ 离心 20 min, 提取上清液。BCA 法测定蛋白的量, 在上样量相同条件下计算每组应吸取的样品上清的体积, 补以上样缓冲液使总体积为 80 μL , 加入 100 μL 溴酚蓝染液煮沸 4 min。灌胶上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 90 V 恒压电泳, 观察 Marker 移动情况, 适时终止电泳。半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 封闭, 洗膜, 按照对应相对分子质量切割后分别置于 1:600 稀释的兔抗大鼠 TLR4、p65、I κ B α 一抗溶液中, 4°C 杂交过夜, 洗膜液漂洗后加入 1:1 000 稀释的二抗, 摇床上杂交 1 h, 洗膜液冲洗, ECL 显色, 上机检测。以 β -actin 为内标, 用目标条带与内标的积分吸光度值的比值表示 TLR4、p65、I κ B α 的相对表达水平。

2.7 ELISA 法检测细胞外液 TNF- α 和 IL-6 的量

在无菌条件下按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测前试剂盒于 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 平衡。取出 96 孔反应板, 分别加入 50 μL 标准品、各组给药 48 h 后的上清液 40 μL 于反应孔中, 吸取 10 μL 抗体置待测样品孔, 37°C 孵育 1 h, 倒出液体, 洗板 3 次, 加入显色液 A、B, 室温孵育 10 min, 每孔加入终止液。全自动酶标仪检测 450 nm 波长处 A 值, 绘制标准曲线, 根据各样品 A 值在标准曲线查得 TNF- α 、IL-6 相应的量。

2.8 数据处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件的单因素方差分析和 LSD 法进行统计学分析。

3 结果

3.1 对 ISO 致肥大鼠心肌细胞体积和总蛋白量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞体积增大 81.33%, 总蛋白的量增加 49.67% ($P < 0.01$)。与模型组比较, ISO+黄芪甲苷 (3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 组、ISO+普萘洛尔组、ISO+BAY11-7082 组大鼠心肌细胞体积分别减小 5.62%、25.90%、40.23%、41.09%、35.96%, 总蛋白的量分别减少 8.11%、23.27%、31.02%、32.38%、28.56% ($P < 0.05$ 、0.01)。BAY 11-7082 对大鼠正常心肌细胞体积和蛋白的量无影响, 且可抑制 ISO 导致的大鼠心肌细胞体积和蛋白量的增加 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表1 黄芪甲苷对 ISO 致肥大鼠心肌细胞体积和蛋白量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of As IV on cell size and protein content of myocardial hypertrophy in neonatal rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s$)

组别	C/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞体积 / μm^3 ($n=80$)	总蛋白 / μg ($n=10$)
对照	—	1 216 $\pm$ 152	18.20 $\pm$ 1.52
模型	—	2 205 $\pm$ 187**	27.24 $\pm$ 1.77**
ISO+BAY 11-7082	5	1 412 $\pm$ 141 ^{##}	19.46 $\pm$ 1.85 ^{##}
BAY 11-7082	5	1 202 $\pm$ 114 $\Delta\Delta$	18.07 $\pm$ 1.59 $\Delta\Delta$
ISO+黄芪甲苷	3	2 081 $\pm$ 156 [#]	25.03 $\pm$ 1.83 [#]
	10	1 634 $\pm$ 143 ^{##}	20.90 $\pm$ 1.91 ^{##}
	30	1 318 $\pm$ 174 ^{##}	18.79 $\pm$ 1.97 ^{##}
ISO+普萘洛尔	2	1 299 $\pm$ 194 ^{##}	18.42 $\pm$ 2.01 ^{##}

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

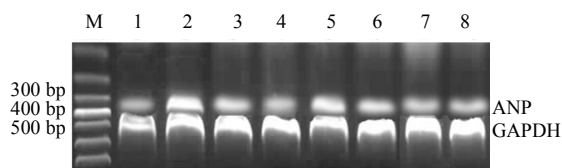
与 ISO+BAY 11-7082 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$, 表 2、3 同

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

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISO + BAY11-7082 group, same as Tables 2 and 3

3.2 对 ISO 致肥大心肌细胞 ANP 基因和 TLR4 基因和蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞中 ANP 基因表达上调 54.28% ($P<0.01$)。与模型组比较, ISO+黄芪甲苷 (10、30) $\mu\text{mol/L}$ 组、ISO+普萘洛尔组、ISO+BAY 11-7082 组大鼠心肌细胞 ANP 基因表达明显下调 ($P<0.01$)。BAY 11-7082 对大鼠正常心肌细胞 ANP 基因表达无影响, 且可以抑制 ISO 诱导的肥大心肌细胞 ANP 基因表达上调 ($P<0.01$)。结果图 1、表 2。



1-对照 2-模型 3-ISO+BAY11-7082 4-BAY11-7082
5-ISO+黄芪甲苷 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-ISO+黄芪甲苷 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
7-ISO+黄芪甲苷 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 8-ISO+普萘洛尔 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 下同
1-control 2-model 3-ISO+BAY 11-7082 4-BAY 11-7082
5-ISO+As IV 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-ISO+As IV 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
7-ISO+As IV 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 8-ISO+Propranolol 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, same as below

图 1 黄芪甲苷对 ISO 致肥大心肌细胞 ANP 基因表达的影响
Fig. 1 Effects of As IV on ANP mRNA expression in myocardial cells

表 2 黄芪甲苷对 ISO 致肥大心肌细胞 ANP 基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effects of As IV on ANP mRNA expression in myocardial hypertrophy induced by ISO ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ANP
对照	—	0.479 $\pm$ 0.019
模型	—	0.739 $\pm$ 0.020**
ISO+BAY11-7082	5	0.574 $\pm$ 0.023 ^{###}
BAY11-7082	5	0.484 $\pm$ 0.018 ^{△△}
ISO+黄芪甲苷	3	0.716 $\pm$ 0.016
	10	0.612 $\pm$ 0.012 ^{###}
	30	0.501 $\pm$ 0.015 ^{###}
ISO+普萘洛尔	2	0.495 $\pm$ 0.019 ^{###}

与对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞 TLR4 基因和蛋白表达分别上调 59.81%、92.06%。与模型组比较, ISO+黄芪甲苷 (3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 组、ISO+普萘洛尔组、ISO+BAY11-7082 组大鼠心肌细胞

TLR4 基因和蛋白表达明显下调 ($P<0.05$ 、0.01)。BAY11-7082 对大鼠正常心肌细胞 TLR4 基因和蛋白表达无影响, 且可抑制 ISO 诱导的肥大心肌细胞 TLR4 基因和蛋白的表达 ($P<0.01$)。结果见图 2、表 3。

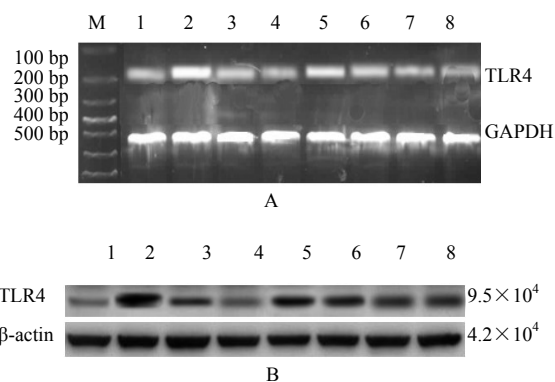


图 2 黄芪甲苷对 ISO 致肥大心肌细胞 TLR4 基因 (A) 和蛋白 (B) 表达的影响

Fig. 2 Effects of As IV on TLR4 expression in myocardial hypertrophy cells induced by ISO

表 3 黄芪甲苷对 ISO 致肥大心肌细胞 TLR4 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effects of As IV on TLR4 expression in myocardial hypertrophy induced by ISO ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TLR4 基因	TLR4 蛋白
对照	—	0.525 $\pm$ 0.017	0.491 $\pm$ 0.019
模型	—	0.839 $\pm$ 0.021**	0.943 $\pm$ 0.012**
ISO+BAY 11-7082	5	0.694 $\pm$ 0.013 ^{###}	0.638 $\pm$ 0.012 ^{###}
BAY 11-7082	5	0.536 $\pm$ 0.017 ^{△△}	0.485 $\pm$ 0.020 ^{△△}
ISO+黄芪甲苷	3	0.811 $\pm$ 0.012 [#]	0.927 $\pm$ 0.011 [#]
	10	0.638 $\pm$ 0.015 ^{###}	0.743 $\pm$ 0.020 ^{###}
	30	0.537 $\pm$ 0.018 ^{###}	0.503 $\pm$ 0.012 ^{###}
ISO+普萘洛尔	2	0.546 $\pm$ 0.016 ^{###}	0.498 $\pm$ 0.008 ^{###}

3.3 对 ISO 致肥大心肌细胞 I κ B α 和 p65 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞 I κ B α 蛋白表达下调 45.73%, p65 蛋白上调 91.70%。与模型组比较, ISO+黄芪甲苷 (3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 组、ISO+普萘洛尔组和 ISO+BAY11-7082 组大鼠心肌细胞核 I κ B α 蛋白表达均明显上调 ($P<0.05$ 、0.01), 而 p65 蛋白表达均明显下调 ($P<0.05$ 、0.01)。BAY 11-7082 对大鼠心肌细胞 I κ B α 和 p65 蛋白表达无明

显影响,且可以抑制 ISO 诱导的肥大心肌细胞 IκBα 蛋白表达的下调和 p65 蛋白表达的上调 ($P<0.01$)。结果见图 3、表 4。

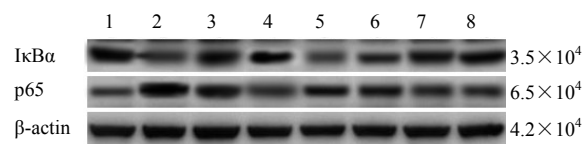


图 3 黄芪甲苷对 ISO 致肥大心肌细胞 IκBα 和 p65 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of As IV on IκBα and p65 protein expression in myocardial hypertrophy cells induced by ISO

表 4 黄芪甲苷对 ISO 致肥大心肌细胞 IκBα 和 p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of As IV on IκBα and p65 protein expression in myocardial hypertrophy induced by ISO ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	IκBα	p65
对照	—	0.971 ± 0.008	0.470 ± 0.013
模型	—	0.527 ± 0.010**	0.901 ± 0.014**
ISO+BAY 11-7082	5	0.673 ± 0.017 ^{###}	0.567 ± 0.022 ^{###}
BAY 11-7082	5	0.968 ± 0.021 ^{△△}	0.464 ± 0.017 ^{△△}
ISO+黄芪甲苷	3	0.554 ± 0.024 [‡]	0.877 ± 0.019 [‡]
	10	0.638 ± 0.019 ^{###}	0.712 ± 0.014 ^{###}
	30	0.951 ± 0.021 ^{###}	0.473 ± 0.011 ^{###}
ISO+普萘洛尔	2	0.955 ± 0.009 ^{###}	0.471 ± 0.008 ^{###}

3.4 对细胞外液中 TNF-α 和 IL-6 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠心肌细胞外液中炎症因子 TNF-α、IL-6 水平明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,ISO+黄芪甲苷 (10、30 $\mu\text{mol/L}$) 组、ISO+普萘洛尔组和 ISO+BAY11-7082 组明显降低心肌细胞外液中 TNF-α、IL-6 的水平 ($P<0.05$ 、0.01),其中黄芪甲苷的作用与浓度相关,且其在 30 $\mu\text{mol/L}$ 时的作用强度与普萘洛尔相当。黄芪甲苷 3 $\mu\text{mol/L}$ 仅明显降低 TNF-α 水平 ($P<0.01$)。提示黄芪甲苷通过抑制炎症因子 TNF-α、IL-6 的表达而保护心脏。结果见表 5

4 讨论

心肌肥厚是许多心脏疾病的共同特征之一,而炎症反应是心脏舒张功能不全合并心肌肥厚早期阶段的潜在机制,肥厚的心肌更易发生严重心律失常,导致心力衰竭和心源性猝死。在正常生理情况下,

表 5 黄芪甲苷对 ISO 致肥大心肌细胞外液中 TNF-α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effects of As IV on TNF-α and IL-6 expression in myocardial hypertrophy induced by ISO ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TNF-α / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-6 / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	17.84 ± 1.76	21.17 ± 1.27
模型	—	79.32 ± 4.46**	27.08 ± 2.44**
ISO+BAY11-7082	5	46.08 ± 2.40 ^{###}	23.05 ± 2.02 ^{###}
BAY 11-7082	5	18.83 ± 1.97 ^{△△}	21.07 ± 1.38 [△]
ISO+黄芪甲苷	3	71.75 ± 4.19 ^{###}	26.13 ± 2.93
	10	47.66 ± 2.59 ^{###} ^{☆☆}	24.63 ± 1.95 ^{☆☆}
	30	20.71 ± 1.75 ^{###} ^{***}	22.62 ± 2.08 ^{###} ^{***}
ISO+普萘洛尔	2	20.52 ± 1.88 ^{###} ^{***}	22.71 ± 1.91 ^{###} ^{***}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$; 与 ISO+BAY11-7082 组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$; 与 ISO+黄芪甲苷 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与 ISO+黄芪甲苷 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

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

[△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs ISO + BAY 11-7082 group

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs ISO + As IV 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs ISO + As IV 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

众多细胞炎症信号通路及炎症因子构成的网络处于平衡状态,但在心肌病理情况下,这一平衡被打破,抑炎症因子减弱,促炎症因子加强,从而导致心肌发生肥大及纤维化。通过抑制 NF-κB 信号通路来减轻心脏的炎症反应,可以有效防止心肌肥厚并减缓心衰的发展;抑制 TLR4/NF-κB 信号通路能有效抑制心肌细胞肥大及减轻心肌的炎症反应^[14-16]。

本实验结果表明,模型组大鼠心肌细胞体积、总蛋白的量及心肌肥厚基因 ANP 的表达明显上调;而黄芪甲苷 30 $\mu\text{mol/L}$ 及 IκBα 特异性阻断剂 BAY 11-7082、普萘洛尔组可有效对抗这种改变,且对心肌细胞肥大的保护作用相似。模型组大鼠心肌细胞 TLR4 基因和蛋白、p65 蛋白的表达明显上调,IκBα 蛋白表达下调;而黄芪甲苷 30 $\mu\text{mol/L}$ 以及普萘洛尔、BAY 11-7082 有效抑制 TLR4 基因和蛋白、p65 蛋白、IκBα 蛋白表达的改变。黄芪甲苷还以浓度相关方式有效地抑制心肌细胞外液中炎症因子 TNF-α、IL-6 的分泌。以上结果表明,黄芪甲苷和普萘洛尔可以抑制 ISO 引起的 IκBα 的降解,从而抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的激活,进而减缓心肌细胞的炎症反应,提示对 TLR4/NF-κB 信号通路的影响可能是黄芪甲苷抑制 ISO 诱导的心肌细胞肥大

的作用机制之一。

前期实验通过能量代谢证实黄芪甲苷可抑制ISO诱导的心肌细胞肥大^[17]。本实验进一步证实黄芪甲苷对心肌肥大具有保护作用,因此其具有抑制心肌的炎症反应、改善心肌肥大的潜力。在未来的心血管疾病治疗中,改善炎症反应的药物可能会成为治疗的一个必要环节,有广阔的研发前景。黄芪甲苷的吸收性和生物利用度还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kang Y J. Cardiac hypertrophy: a risk factor for QT-Prolongation and cardiac sudden death [J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(1): 58-66.
- [2] Hedayat M, Mohammadi M J, Hedayat M, *et al*. Pro-inflammatory cytokines in heart failure: double edged swords [J]. *Heart Fail Rev*, 2010, 15(6): 543-562.
- [3] Serra A J, Santos M H, Bocalini D S, *et al*. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained β -adrenergic hyperactivity [J]. *J Physiol*, 2010, 588(13): 2431-2442.
- [4] Avlas O, Fallach R, Shainberg A, *et al*. Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7): 1895-1909.
- [5] Xu X L, Ji H, Gu S Y, *et al*. Modification of alterations in cardiac function and sarcoplasmic reticulum by astragaloside IV in myocardial injury *in vivo* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568(1/3): 203-212.
- [6] Xu M E, Xiao S Z, Sun Y H, *et al*. Effects of astragaloside IV on pathogenesis of metabolic syndrome *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2006, 27(2): 229-236.
- [7] 张召才, 李双杰, 杨英珍, 等. 黄芪甲苷对慢性心肌炎心肌纤维化的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(8): 728-731.
- [8] Zhang Z C, Li S J, Yang Y Z, *et al*. Effect of astragaloside on cardiomyocyte apoptosis in murine coxsackievirus B3 myocarditis [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(2): 145-151.
- [9] 关凤英, 李红, 杨世杰. 黄芪甲苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1146-1150.
- [10] 王建, 刘佳骅, 姚鹏. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导心肌损伤的保护作用 [J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2007, 27(4): 384-386.
- [11] Wang W T, Zhao Z Y, Han Y M, *et al*. Effects of astragaloside IV derivative on heart failure in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 48-53.
- [12] 罗文继, 陈旭, 郝春华, 等. 黄芪甲苷衍生物 ASID 治疗慢性心力衰竭的机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(6): 416-420.
- [13] 顾洁莹, 王洪新, 赵素玲. 黄芪甲苷抑制肿瘤坏死因子- α 诱导的乳大鼠心肌细胞肥大 [J]. *中华高血压杂志*, 2012, 20(9): 383-482.
- [14] Gupta S, Young D, Maitra R K, *et al*. Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappa B [J]. *J Mol Biol*, 2008, 375(3): 637-649.
- [15] 梁灵君, 王洪新, 孙雪芳, 等. Toll样受体4/NF- κ B 信号通路参与黄芪多糖对肿瘤坏死因子- α 诱导的乳大鼠心肌细胞肥大的抑制作用 [J/OL]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1155.R.20130118.1135.002.html>.
- [16] 孙雪芳, 王洪新, 梁灵君. 黄芪多糖通过TLR4/NF- κ B 信号通路抑制脂多糖诱导的大鼠心肌细胞肥大 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2): 208-212.
- [17] 王秋宁, 王洪新, 杨育红. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的乳大鼠心肌细胞肥大的保护作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2011, 25(1): 29-33.