

黄芪多糖对异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚大鼠内皮功能的影响

韩镭徽, 王洪新*, 唐富天, 鲁美丽, 许崇华

辽宁医学院 心脑血管药物研究重点实验室, 辽宁 锦州 121001

摘要: 目的 观察黄芪多糖(APS)对异丙肾上腺素(ISO)诱导的心肌肥厚大鼠内皮功能的保护作用及其机制。方法 ip 10 mg/kg ISO 制备大鼠心肌肥厚模型, 60只SD大鼠随机分为6组: 对照组, 模型组, APS 200、400、800 mg/kg组, 阳性药(普萘洛尔 40 mg/kg)组, 每组10只。各给药组连续ig给药2周, 并于给药1d后ip ISO 2周, 对照组给予等体积的生理盐水。末次给药后禁食12h, 取血, 分离循环内皮细胞(CEC)并计数。检测全心质量指数(HMI)、左室质量指数(LVMI); 取主动脉组织进行氢化乙啶(DHE)超氧阴离子染色; Western blotting法检测血管组织p65、Cu/Zn-SOD蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组HMI、LVMI分别增加了38.41%、44.91% ($P < 0.01$), CEC数目增多 ($P < 0.01$), 血管超氧阴离子生成量增加, p65蛋白表达增加, Cu/Zn-SOD蛋白表达下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, APS 400、800 mg/kg剂量组HMI、LVMI降低 ($P < 0.05$), CEC数目减少 ($P < 0.01$), 血管壁超氧阴离子生成减少, p65表达下降, Cu/Zn-SOD蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 APS可能通过降低血管壁超氧阴离子生成, 升高Cu/Zn-SOD表达, 降低p65表达, 改善血管炎症和氧化应激状态, 保护心肌肥厚大鼠血管内皮功能。

关键词: 黄芪多糖; 异丙肾上腺素; 心肌肥厚; 氧化应激; 血管内皮; NF- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)24-3722-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.019

Effects of *Astragalus* polysaccharides on endothelial function in rats with myocardial hypertrophy induced by isoproterenol

HAN Rong-hui, WANG Hong-xin, TANG Fu-tian, LU Mei-li, XU Chong-hua

Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Drug Research of Liaoning Province, Drug Research Institute, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of *Astragalus* polysaccharide (APS) on endothelial function in rats with cardiac hypertrophy induced by isoproterenol (ISO). **Methods** ISO (10 mg/kg) was given by ip injection to set a myocardial hypertrophy model. Sixty SD rats were randomly divided into six groups ($n = 10$): control, ISO model, ISO + APS 200 mg/kg, ISO + APS 400 mg/kg, ISO + APS 800 mg/kg, and ISO + propranolol 40 mg/kg groups. The rats in each group were ig administered for two weeks in a row, and given ISO for two weeks by ip injection from day 2. the rats in control group received an equal volume of normal saline. After the last administration and fasting for 12 h, blood and heart were taken under anesthesia. The circulating endothelial cells (CEC) were isolated and counted. The heart mass index (HMI) and left ventricular mass index (LVMI) were also observed; The level of superoxide anion in aorta tissue was detected by DHE staining; p65 and Cu/Zn-SOD protein expression of vascular tissue was detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, HMI and LVMI in ISO model group increased by 38.41% and 44.91% ($P < 0.01$), and an increase in the number of circulating endothelial cells and superoxide anion generation were also found. The expression of p65 protein was increased. The expression of Cu/Zn-SOD was decreased. Compared with the model group, HMI, LVMI, number of circulating endothelial cells, and expression of p65 in APS (400 and 800 mg/kg) treated group were decreased. The production of superoxide anion in vessel wall was also reduced. However, the expression of Cu/Zn-SOD protein was elevated. **Conclusion** APS improves the vascular endothelial function in cardiac hypertrophy rats possibly through increasing Cu/Zn-SOD protein expression and reducing the superoxide anion generation and p65 expression.

Key words: *Astragalus* polysaccharide; isoproterenol; cardiac hypertrophy; oxidative stress; vascular endothelial; NF- κ B

心肌肥厚是心肌细胞对慢性压力或血流动力 肥厚过程中存在严重的炎症反应, 而炎症反应在内
学过负荷产生的适应性增生反应。研究表明在心肌 皮功能障碍的发生、发展过程中起着重要作用。血

收稿日期: 2015-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81374008)

作者简介: 韩镭徽(1990—), 男, 硕士, 主要从事心血管药理学研究。Tel: 18104964058 E-mail: 15204539981@163.com

*通信作者 王洪新(1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事心血管药理学及天然药物研究。Tel: 18641637333 E-mail: jyhxwang@163.com

管内皮细胞不仅是血管壁上的一层机械屏障而且具有很重要的内分泌作用。内皮功能紊乱时其分泌的血管紧张素 II^[1]、内皮素^[2]等血管活性物质增多,可以加重心肌肥厚。Yeboah 等^[3]研究发现血管内皮功能与左室质量呈明显的负相关。Davel 等^[4]研究表明异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的心肌肥厚大鼠存在内皮功能障碍。

黄芪多糖(Astragalus polysaccharide, APS)是从黄芪中提取的一种活性成分,具有抗炎^[5]、抗氧化^[6]、提高机体免疫力^[7]等作用。已有研究证实 APS 对 ISO 诱导的乳鼠心肌细胞肥厚有保护作用^[8],并且 APS 能有效减少 ISO 及血管紧张素 II 诱导的心肌肥大发生过程中炎症因子的表达。然而 APS 对 ISO 诱导的心肌肥厚大鼠内皮功能是否有保护作用,及其具体机制目前尚不明确。本实验采用 ip ISO 的方法制备大鼠心肌肥厚模型,探讨 APS 对心肌肥厚大鼠内皮功能的保护作用及其可能机制。

1 材料

1.1 动物

健康 SD 大鼠,雄性,4~6 周龄,体质量 180~200 g,由辽宁医学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(辽)2009-0004。

1.2 药品和试剂

APS(质量分数为 98%,南京景竹生物科技有限公司,批号 HQ090312);ISO、普萘洛尔、腺苷二磷酸(ADP,美国 Sigma 公司);Hydroethidine(上海浩然生物技术有限公司);兔抗人 XIII-R:Ag 抗血清、Cu/Zn-SOD 一抗(北京博奥森生物技术有限公司);羊抗兔 FITC-IgG 荧光抗体、p65 一抗(美国 Proteintech Group 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;Sigma 3K15 低温离心机,德国 Sigma 公司;DNM-9602G 酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司;Leica DMI 3000B 倒置荧光显微镜,德国 Leica 公司;凝胶成像仪、电泳仪、电泳槽,美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 分组给药及大鼠心肌肥厚模型的制备

60 只 SD 大鼠,随机分为 6 组:对照组,模型组,APS 低、中、高剂量(200、400、800 mg/kg)组、阳性药(普萘洛尔 40 mg/kg)组,每组 10 只。给药组连续 ig 给药 2 周,模型组和给药组于 ig 给药 1 d 后连续 ip 10 mg/kg ISO 2 周,对照组给予等

体积的生理盐水。

2.2 心脏质量参数测定

末次给药后禁食 12 h,称体质量(BW),ip 5 mL/kg 的 20%乌拉坦麻醉。开胸,取心脏剪去周围组织和血管,称全心质量(HW)和左心室质量(LVW)。计算心重指数(HMI=HW/BW)和左室质量指数(LVMI=LVW/BW)。分离大鼠主动脉血管,剪取部分血管-80℃保存,用于 Western blotting 检测;剩余部分放在 OCT 组织冻存液中,-80℃保存,用于超氧负离子检测。

2.3 循环内皮细胞(CEC)计数

参照文献方法^[9-10]进行 CEC 分离、计数。大鼠麻醉后,腹主动脉插管取动脉血,肝素抗凝,4℃、395×g 离心 20 min,取上清液按 5:1 的比例加入 ADP(1 mg/mL)涡旋震荡 10 min,4℃、395×g 离心 20 min 去除血小板;取上清,4℃、2 100×g 离心 20 min 即可得 CEC,加入 0.1 mL 生理盐水制成细胞悬液。取悬液显微镜下计数。

2.4 CEC 鉴定与观察

取 CEC 悬液涂片,干燥后加甲醇固定 5 min,磷酸缓冲液(PBS)漂洗 3 次,干燥后滴加兔抗人 XIII-R:Ag 抗血清,37℃温孵 30 min,PBS 再洗 3 次,干燥后滴加羊抗兔 FITC-IgG 荧光抗体,温孵 30 min 后 PBS 冲洗,干燥后滴加缓冲甘油,倒置荧光显微镜下观察,免疫荧光细胞即为 CEC。

2.5 血管超氧阴离子测定

采用氢化乙吡啶(DHE)染色的方法^[7]检测血管壁中的超氧阴离子水平。从冻存的主动脉中取出一段由冰冻切片机切片(厚 14 μm),冷浴条件下放到载玻片上,在 Krebs-Henseleit 缓冲液中 37℃平衡 30 min。将含有 2 mmol/L DHE 的新鲜缓冲液添加到每一个组织切片并封片。37℃避光孵育 30 min。采用倒置荧光显微镜采集图片。

2.6 Western blotting 测定血管组织 p65 和 Cu/Zn-SOD 蛋白表达

取 100 mg 冻存血管组织放于无菌 EP 管中,加入 1 mL 含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液,提取总蛋白。BCA 法进行蛋白浓度测定,每孔上样量 30 μg,进行 12% SDS-PAGE 电泳。半干法转膜,将得到的 PVDF 膜浸入封闭液,置于摇床上缓慢震荡 1 h 以上,洗膜,按照对应相对分子质量将膜切割后置于 p65(1:500)、Cu/Zn-SOD(1:400)一抗溶液中,4℃杂交过夜,用洗膜液漂洗后加入稀释的二抗,

震荡 1 h, 取出后洗膜液冲洗, ECL 显色, 上机检测。采用 Image Lab 5.0 进行灰度分析。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 组间检验采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对心肌肥厚大鼠 HMI、LVMI 指数的影响

ISO 造模后, 与对照组比较, 模型组 HMI 增加了 38.41%, LVMI 增加了 44.91%, 差异显著 ($P < 0.01$), 提示 ISO 诱导心肌肥厚模型成功。与模型组比较, APS 400、800 mg/kg 组 HMI 和 LVMI 降低, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 APS 对 ISO 诱导的心肌肥厚大鼠 HMI 和 LVMI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of APS on HMI and LVMI in rats with myocardial hypertrophy induced by ISO ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HMI/(mg·g ⁻¹)	LVMI/(mg·g ⁻¹)
对照	—	2.67 ± 0.19	1.86 ± 0.12
模型	—	3.82 ± 0.22**	2.70 ± 0.24**
APS	200	3.65 ± 0.14	2.52 ± 0.15
	400	3.22 ± 0.21 [#]	2.18 ± 0.20 [#]
	800	2.83 ± 0.15 [#]	1.95 ± 0.11 [#]
普萘洛尔	40	2.80 ± 0.16 ^{##}	1.92 ± 0.18 ^{##}

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

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

3.2 对心肌肥厚大鼠 CEC 数目的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 CEC 数目明显增多, 且差异显著 ($P < 0.01$), 提示在 ISO 诱导的心肌肥厚大鼠中存在明显的内皮损伤。与模型组比较, APS 400、800 mg/kg 组 CEC 数目下降, 差异显著 ($P < 0.01$), 提示 APS 在改善心肌肥厚的同时具有保护血管内皮功能的作用。结果见表 2 和图 1。

3.3 对血管组织超氧阴离子生成的影响

经 DHE 染色, 模型组血管壁的荧光强度高于对照组, 提示在心肌肥厚大鼠血管超氧负离子生成增多; 与模型组比较, APS 800 mg/kg 组荧光强度下降, 提示 APS 可以降低心肌肥厚大鼠血管壁超氧阴离子的产生。结果见图 2。

表 2 APS 对 ISO 诱导的心肌肥厚大鼠 CEC 数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of APS on CEC in rats with myocardial hypertrophy induced by ISO ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CEC 数目/(个·μL ⁻¹)
对照	—	18.8 ± 1.8
模型	—	42.3 ± 3.4**
APS	200	38.5 ± 2.7
	400	32.7 ± 2.5 ^{##}
	800	26.3 ± 1.4 ^{##}
普萘洛尔	40	23.5 ± 2.5 ^{##}

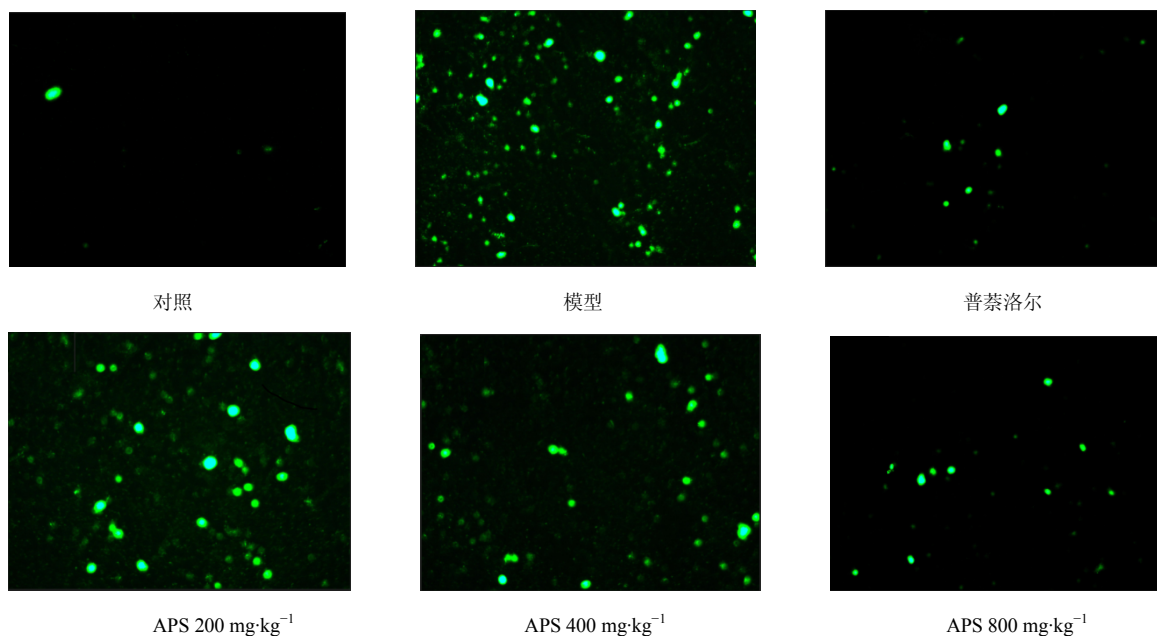


图 1 APS 对 ISO 诱导的心肌肥厚大鼠 CEC 数目的影响

Fig. 1 Effects of APS on CEC in rats with myocardial hypertrophy induced by ISO

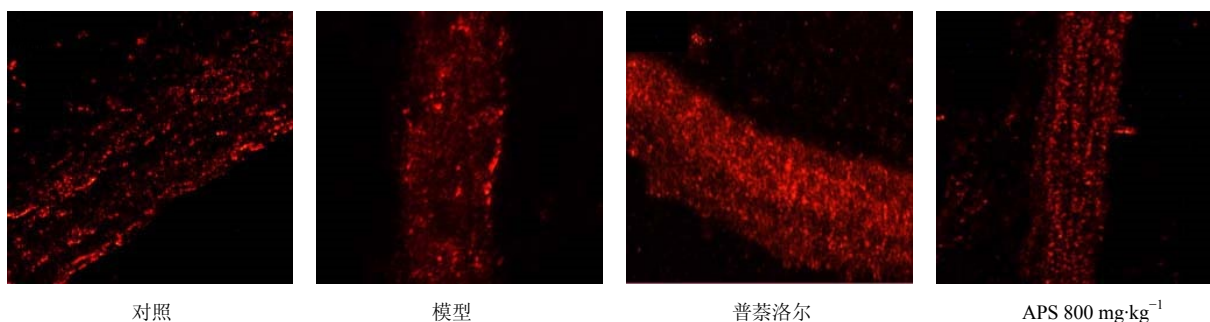


图 2 APS 对血管组织超氧阴离子水平的影响

Fig. 2 Effects of APS on content of superoxide anion in vascular tissue

3.4 对血管组织 p65、Cu/Zn-SOD 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组中与炎症信号通路NF-κB 相关的 p65 蛋白表达升高 ($P<0.01$),提示在 ISO 诱导的心肌肥厚大鼠血管中存在炎症。模型组 Cu/Zn-SOD 蛋白表达下降 ($P<0.01$),结合血管壁组织超氧阴离子检测结果,表明模型组大鼠血管壁氧化应激反应增加且抗氧化能力下降。与模型组比较,APS 给药组,p65 表达均有不同程度下降,其中 800 mg/kg 组表达下降最为明显 ($P<0.01$)。400、800 mg/kg 组 Cu/Zn-SOD 蛋白表达较模型组升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。提示 APS 可以通过抗炎、抗氧化对心肌肥厚大鼠血管产生保护作用。结果见图 3。

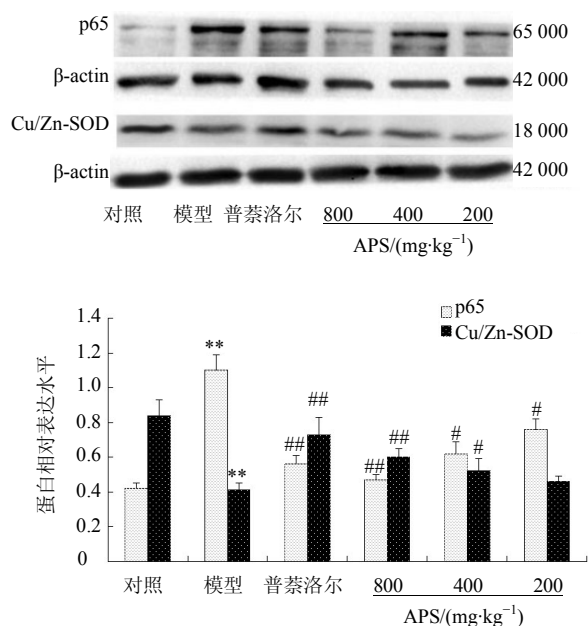


图 3 APS 对血管组织 p65、Cu/Zn-SOD 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Effects of APS on expression of p65 and Cu/Zn-SOD protein in vascular tissue ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

由各种病理因素引起的交感神经张力增加而产生的对肾上腺素能受体的持续刺激可引起一系列的心血管疾病。研究表明,采用 ISO 持续刺激 β 受体可以引起心肌肥厚^[11]、心室胶原蛋白水平增加产生心肌损害。因此,本实验采用 ip ISO 制备大鼠心肌肥厚模型,选用普萘洛尔^[12]作为阳性对照。在心血管疾病中左室肥厚和内皮功能障碍对心血管事件都有着独立的预示性作用^[13]。研究发现,在心肌肥厚过程中存在严重的炎症反应^[14],炎症表达增加可进一步激活 NADPH 氧化酶,进而引起氧化应激反应增加。炎症、氧化应激是引起内皮功能障碍的两个重要因素。一项关于成年人群中内皮功能障碍和左室质量联系的调查研究表明内皮功能与左室质量呈明显的负相关^[3]。此外,在对慢性肾病患者的研究中发现,加重的内皮功能障碍和增加的左室肥厚之间存在联系^[15]。因此,在心肌肥厚发展过程中内皮功能损伤是不能忽视的。已有研究证明,APS 对 ISO 诱导的心肌肥厚有保护作用^[6],但 APS 对心肌肥厚时内皮功能的作用及其机制尚不完全清楚。

CEC 在正常的循环血液中极少出现,当血管内皮受损时其数目明显增加可作为血管损伤的指标。健康的内皮细胞分泌的 NO 等活性物质不仅可以产生舒张血管、抗炎、抗凝血等作用,还可以抑制心肌肥厚。NO 生物利用度的降低在内皮功能障碍的发生发展过程中发挥着重要作用^[16]。血管超氧阴离子生成增多不仅可以灭活 NO,损伤血管内皮舒张功能还可以通过激活 NF-κB 加重炎症反应而加重血管损伤。p65 在炎症信号通路 NF-κB 的调节中具有重要作用。

本实验研究表明,采用 ISO 造模 2 周后,模型组 HMI、LVMI 明显增加;CEC 数目增多、血管壁

超氧阴离子生成增加。Western blotting 结果显示模型组 Cu/Zn-SOD 蛋白表达下降,炎症相关蛋白 p65 表达升高。APS 各剂量组可有效对抗这些改变,在保护心肌功能的同时,降低血管壁超氧阴离子生成以及改善血管炎症相关蛋白的表达、保护血管内皮功能。提示,APS 在保护肥厚心肌功能的同时可通过降低超氧阴离子产生、抑制血管 p65 的表达、增加 Cu/Zn-SOD 蛋白表达,缓解血管壁的炎症和氧化应激状态,保护血管内皮。

综上所述,APS 可减轻 ISO 引起的心肌肥厚保护血管内皮功能,其作用机制可能与降低血管氧化应激状态、抑制炎症有关,但 APS 的抗心肌肥厚机制是否与保护血管内皮功能有关有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Di Zhang A, Nguyen Dinh Cat A, Soukaseum C, *et al.* Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling [J]. *Hypertension*, 2008, 52(6): 1060-1067.
- [2] de Jonge H W, Dekkers D H, Houtsmuller A B, *et al.* Differential signaling and hypertrophic responses in cyclically stretched vs endothelin-1 stimulated neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2007, 47(1): 21-32.
- [3] Yeboah J, Crouse J R, Bluemke D A, *et al.* Endothelial dysfunction is associated with left ventricular mass (assessed using MRI) in an adult population (MESA) [J]. *J Hum Hypertens*, 2011, 25(1): 25-31.
- [4] Davel A P, Kawamoto E M, Scavone C, *et al.* Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 148(5): 629-639.
- [5] 李胜陶, 王洪新, 杨娟. 黄芪多糖对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚中 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中成药*, 2014, 36(4): 674-679.
- [6] Min Q, Bai Y T, Yu W, *et al.* Protective effects of *Astragalus polysaccharide* on cultured myocardial cells subjected to anoxia/reoxygenation injury in neonatal rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26(12): 1661-1664.
- [7] Yang Y F, Feng J Q, Xu H Y, *et al.* Influence of different extraction and purification methods on *Astragalus polysaccharides* and pharmacological evaluation [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 54-61.
- [8] Zhao S L, Wang H X, Zhou Z H, *et al.* Protective effects of *Astragalus polysaccharides* on isoproterenol induced myocardial hypertrophy in neonatal rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(12): 1682-1686.
- [9] Tong H S, Wan P, Zhang X Q, *et al.* Vascular endothelial cell injury partly induced by mesenteric lymph in heat stroke [J]. *Inflammation*, 2014, 37(1): 27-34.
- [10] Takahashi H, Harker L A. Measurement of human endothelial cells in whole blood [J]. *Thrombo Res*, 1983, 31(1): 1-12.
- [11] Taylor P B, Tang Q. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy [J]. *Canadian J Physiol Pharmacol*, 1984, 62(4): 384-389.
- [12] Zhang J, Wang H X, Yang J, *et al.* Effects of CaMK II signaling pathway on astragalus polysaccharides inhibition of isoproterenol induced cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2013, 29(8): 1109-1113.
- [13] Perticone F, Maio R, Perticone M, *et al.* Endothelial dysfunction predicts regression of hypertensive cardiac mass [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(4): 1188-1192.
- [14] 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(Pt13): 2431-2442.
- [15] Poulidakos D, Ross L, Recio-Mayoral A, *et al.* Left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in chronic kidney disease [J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2014, 15(1): 56-61.
- [16] Clapp B R, Hingorani A D, Kharbanda R K, *et al.* Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64(1): 172-178.