

黄芪甲苷对异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚的保护作用

许晓乐, 季 晖*, 谷舒怡, 黄秋菊, 陈艳萍

(中国药科大学药理学教研室, 南京 210009)

摘要 **目的:**考察黄芪甲苷对异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚的保护作用并探讨其机制。**方法:**皮下注射异丙肾上腺素致小鼠心肌肥厚模型,以黄芪甲苷(40, 80 mg/kg)和阳性对照普萘洛尔(40 mg/kg)灌胃给药,测量小鼠心脏重量指数和心肌羟脯氨酸(Hyp)含量,血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)活力,心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量;RT-PCR法检测心肌肌浆网钙泵(SERCA2a)和受磷蛋白(PLB)的mRNA表达。**结果:**与正常对照组相比,异丙肾上腺素组心脏重量指数、心肌Hyp含量、血清LDH和CK水平显著升高,心肌SOD活性下降,心肌MDA含量增加,SERCA2a mRNA表达显著减少,PLB mRNA表达无明显变化。与异丙肾上腺素组相比,黄芪甲苷降低心脏重量指数和心肌Hyp含量,降低血清LDH和CK水平,增加心肌SOD活性,降低心肌MDA含量,上调SERCA2a mRNA表达。**结论:**黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌肥厚具有保护作用,其机制可能与清除氧自由基,增加SERCA2a mRNA表达有关。

关键词 黄芪甲苷;异丙肾上腺素;心肌肥厚;肌浆网钙泵;脂质过氧化

中图分类号 R965 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2007)05-0451-05

Protective effects of astragaloside IV on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice

XU Xiao-le, JI Hui*, GU Shu-yi, HUANG Qiu-ju, CHEN Yan-ping

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract **Aim:** To study the effects and the mechanism of astragaloside IV on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice. **Methods:** Myocardial injury in mice was induced by subcutaneous injection of isoproterenol. Astragaloside IV (40, 80 mg/kg) and propranolol (40 mg/kg, positive drug) were then administered to mice via gavage. The heart weight indexes, the content of hydroxyproline (Hyp) in myocardium, serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK), the malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in myocardium were measured. Expressions of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) mRNA and phospholamban (PLB) mRNA in myocardium were detected by RT-PCR. **Results:** Compared with the control, the heart weight indexes and myocardial Hyp content as well as serum LDH and CK were markedly increased, myocardial SOD activity was decreased and MDA content was increased in isoproterenol-treated mice. RT-PCR analysis showed that the level of SERCA2a mRNA expression was decreased while the level of PLB mRNA expression was not significantly changed in isoproterenol-alone group compared with the control group. Treatment with astragaloside IV reduced heart weight indexes, myocardial Hyp content, serum LDH and CK, increased myocardial SOD activity and decreased MDA content compared with the isoproterenol-treated group. In addition, astragaloside IV attenuated the depression of SERCA2a mRNA level compared with isoproterenol-treated mice. **Conclusion:** Astragaloside IV possesses cardioprotective effects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice. This may be related to the reduction in the oxidative stress and increase of ERCA2a mRNA level in myocardium.

Key words astragaloside IV; isoproterenol; hypertrophy; SERCA2a; lipid peroxidation

心肌肥厚(myocardial hypertrophy, MH)是心脏维持适当收缩功能对各种病理状态的代偿反应,但

* 收稿日期 2007-05-16 * 通讯作者 Tel: 025-86021369 E-mail: huijicpu@163.com

基金项目 中国药科大学药理学基础实验教学中心开放课题

长期的心肌肥厚可导致心肌缺血、心律失常、心衰和猝死。大量临床研究表明,心肌肥厚是重要的心血管危险因素^[1]。因此,防治心肌肥厚的研究具有重要的临床意义。黄芪甲苷为黄芪有效成分皂苷类的单体成分之一。研究报道,黄芪甲苷对急性心肌损伤^[2]、缺血再灌注损伤^[3]、阿霉素引起的心肌损伤^[4]及病毒性心肌炎^[5]均具有保护作用,但黄芪甲苷对肥厚型心肌损伤的保护作用未见报道。此外,目前黄芪甲苷对心肌保护作用的机制尚未阐明,尤其对肌浆网钙泵方面研究甚少。本文旨在观察黄芪甲苷对异丙肾上腺素致小鼠心肌肥大型损伤的影响,对心肌脂质过氧化、肌浆网钙泵基因表达进行了研究,以期在传统中药有效成分的开发和研究提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

昆明种雄性小鼠,体重(20±2)g,清洁级,购自南京军区南京总医院,动物质量合格证号:SCXK(苏)2003-0004。

1.2 药品和试剂

黄芪甲苷(纯度大于95%,江苏省药物研究所);异丙肾上腺素、普萘洛尔(美国Sigma公司);羟脯氨酸(Hyp)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);RT-PCR试剂盒(天根生化科技有限公司);引物(大连宝生物工程有限公司)。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

722可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);DYY-2稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂);PCR仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 异丙肾上腺素致小鼠心肌损伤模型

小鼠背部皮下注射异丙肾上腺素,首次剂量为40 mg/kg,第2天剂量为20 mg/kg,第3天剂量为10 mg/kg,第4天剂量为5 mg/kg,并以此剂量再维持10 d,自由进食、给水,对照组小鼠皮下注射相同体积的生理盐水^[6]。

2.2 给药和分组

小鼠随机分为5组,即对照组、模型组、黄芪甲

苷高、低剂量组(80,40 mg/kg)、普萘洛尔组(40 mg/kg)。给药组小鼠连续灌胃14 d,对照组和模型组给予相同体积的生理盐水。

2.3 测量指标

2.3.1 心脏重量参数测定 小鼠末次给药后禁食12 h,称重,取血处死小鼠,取心脏,生理盐水洗净残血,滤纸吸干后称量全心重(heart weight, HW)和左心室重量(left ventricle weight, LVW),计算心重指数(HWI=HW/BW)和左心指数(LVWI=LVW/BW)。

2.3.2 心肌Hyp含量测定 Hyp含量测定采用碱水解法,按照试剂盒说明在550 nm处测定心肌组织Hyp含量。

2.3.3 血清LDH和CK活性测定 LDH活性测定采用丙酮酸法,CK活性测定采用肌酸显色法,按照试剂盒说明分别在440 nm和660 nm处测定血清LDH和CK活性。

2.3.4 心肌SOD活性和MDA含量测定 SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法,MDA含量测定采用硫代巴比妥酸法,按照试剂盒说明分别在550 nm和532 nm处测定心肌组织SOD活性和MDA含量。

2.3.5 SERCA2a和受磷蛋白(PLB)mRNA含量测定 用Trizol法提取心肌组织总RNA,分别测定A₂₆₀和A₂₈₀,检测RNA纯度。计算总RNA含量。以GAPDH为内参照,设计引物如下:

SERCA2a上游引物:5'-TGCCTGGTAGAGAAGATGAA-3';

SERCA2a下游引物:5'-CTGTTTAACACCAGGCGTCA-3'(扩增产物288 bp);

PLB上游引物:5'-TACCTTACTCGCTCGGCTATC-3';

PLB下游引物:5'-CAGAAGCATCACAATGATGCAG-3'(扩增产物141 bp);

GAPDH上游引物:5'-AATGCATCCTGCACCACCACTGC-3';

GAPDH下游引物:5'-GGAGGCCATGTAGGCCATGAGGTC-3'(扩增产物555 bp)。

通过逆转录合成的cDNA 2 μL进行PCR扩增。SERCA2a的PCR反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 50 s,57℃ 1 min,72℃ 50 s循环28次;72℃ 5 min;PLB的PCR反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 50 s,62℃ 1 min,72℃ 50 s循环30次,72℃ 5 min。产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,运用计算机图像分析系统(Quantity One 软件),计算目的基因相对表达量。

2.3.6 统计学处理 所有资料的各项数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析方法进行分析,组间比

较用 Student-Newman-Keuls 检验。

3 结 果

3.1 小鼠心重指数的改变

小鼠连续皮下注射异丙肾上腺素 14 d 后,与对照组相比,全心指数(HWI)和左心指数(LVWI)显著增加($P<0.01$,见表 1),普萘洛尔和黄芪甲苷高、低剂量组给药 2 周后可不同程度降低 HWI 和 LVWI,其中黄芪甲苷高剂量组和普萘洛尔均可显著降低 HWI 和 LVWI ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),黄芪甲苷低剂量组可显著降低 LVWI ($P<0.05$),表明黄芪甲苷能抑制异丙肾上腺素引起的心脏肥大。

Tab.1 Effects of astragaloside IV and propranolol on heart weight indexes (HWI) and left ventricle weight index (LVWI) in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	Dose (mg kg)	HWI (mg g)	LVWI (mg g)
Control		4.76 ± 0.31	3.02 ± 0.19
Model		$5.54 \pm 0.35^{##}$	$3.75 \pm 0.21^{##}$
Propranolol	40	$4.96 \pm 0.29^{**}$	$3.19 \pm 0.25^{**}$
Astragaloside IV	40	$5.31 \pm 0.31^{##}$	$3.41 \pm 0.23^{**}$
	80	$5.15 \pm 0.26^{##}$	$3.28 \pm 0.27^{**}$

$P<0.05$, ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model group

3.2 心肌组织中 Hyp 含量变化

小鼠连续皮下注射异丙肾上腺素 14 d 后,心肌组织中 Hyp 含量与对照组相比显著增加($P<0.01$,表 2)。普萘洛尔和黄芪甲苷高、低剂量组给药 2 周后均显著降低心肌组织中 Hyp 含量($P<0.01$)。由于测定心肌 Hyp 的含量,可反映心肌胶原蛋白的含量,从而判断心肌间质细胞增殖和纤维组织增生的程度^[7],因此,结果表明黄芪甲苷能抑制异丙肾上腺素引起的间质细胞胶原增生,减轻间质纤维变性。

Tab.2 Effects of astragaloside IV and propranolol on myocardial hydroxyproline (Hyp) content in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	Dose (mg kg)	Hyp ($\mu\text{g g protein}$)
Control		221 ± 38
Model		$368 \pm 60^{##}$
Propranolol	40	$256 \pm 45^{**}$
Astragaloside IV	40	$300 \pm 50^{##**}$
	80	$269 \pm 43^{**}$

$P<0.05$, ## $P<0.01$ vs control group; ** $P<0.01$ vs model group

3.3 血清 LDH 和 CK 活性的变化

小鼠连续皮下注射异丙肾上腺素 14 d 后,与

对照组相比,血清 LDH 和 CK 显著增加(表 3),普萘洛尔和黄芪甲苷高、低剂量组给药 2 周后均显著降低血清内 LDH 和 CK 水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明黄芪甲苷可减轻异丙肾上腺素引起心肌肥厚型损伤。

Tab.3 Effects of astragaloside IV and propranolol on serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) activity in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	Dose (mg kg)	LDH (U L)	CK (U L)
Control		$1\,858 \pm 333$	652 ± 175
Model		$2\,751 \pm 383^{##}$	$1\,016 \pm 209^{#}$
Propranolol	40	$2\,008 \pm 293^{**}$	$720 \pm 216^{*}$
Astragaloside IV	40	$2\,333 \pm 229^{##*}$	$800 \pm 185^{*}$
	80	$2\,167 \pm 389^{**}$	$726 \pm 242^{*}$

$P<0.05$, ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model group

3.4 心肌组织中 SOD 活性和 MDA 含量的变化

小鼠连续皮下注射异丙肾上腺素 14 d 后,心肌组织中 SOD 活性与对照组相比显著下降($P<0.01$,表 4),MDA 含量显著增加($P<0.05$)。普萘洛尔和黄芪甲苷高、低剂量组给药 2 周后均显著增加心肌组织中 SOD 活性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并且普萘洛尔和黄芪甲苷高剂量组与模型组相比能显著降低心肌组织中 MDA 含量($P<0.05$)。结果表明黄芪甲苷可减轻心肌损伤时脂质过氧化程度。

Tab.4 Effects of astragaloside IV and propranolol on myocardial superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	Dose (mg kg)	SOD (U mg prot)	MDA (nmol mg prot)
Control		119 ± 16	3.45 ± 0.68
Model		$78 \pm 12^{##}$	$5.02 \pm 0.78^{#}$
Propranolol	40	$108 \pm 14^{**}$	$3.73 \pm 0.74^{*}$
Astragaloside IV	40	$95 \pm 12^{##*}$	4.28 ± 0.89
	80	$109 \pm 11^{**}$	$3.85 \pm 0.58^{*}$

$P<0.05$, ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model group

3.5 心肌 SERCA2a 和 PLB mRNA 水平

小鼠连续皮下注射异丙肾上腺素 14 d 后,与对照组相比,心肌 SERCA2a mRNA 表达显著下降($P<0.01$,图 1 和表 5),而 PLB mRNA 表达未见显著性差异,SERCA2a PLB 显著下降($P<0.01$)。普萘洛尔和黄芪甲苷高、低剂量组给药 2 周后均显著增加心肌 SERCA2a mRNA 表达及 SERCA2a PLB 比值($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明黄芪甲苷可通过调

节肌浆网钙泵基因表达从而保护心肌、减轻损伤。

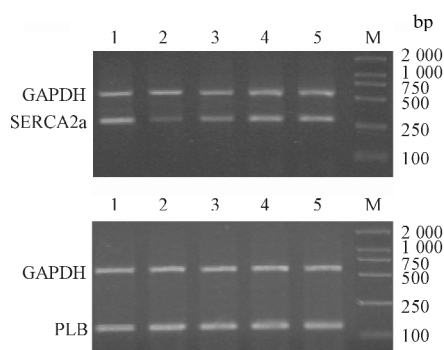


Fig.1 Effects of astragaloside IV and propranolol on SERCA2a and PLB mRNA expression by RT-PCR

1:Control;2:Model;3:Astragaloside IV (40 mg/kg);4:Astragaloside IV (80 mg/kg);5:Propranolol;M:Marker

Tab.5 Effects of astragaloside IV and propranolol on SERCA2a and PLB mRNA expression in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	Dose (mg/kg)	SERCA2a	PLB	SERCA2a/PLB
Control		0.92 ± 0.14	0.91 ± 0.13	1.03 ± 0.19
Model		$0.37 \pm 0.11^{##}$	0.96 ± 0.16	$0.39 \pm 0.12^{##}$
Propranolol	40	$0.79 \pm 0.13^{**}$	0.91 ± 0.16	$0.88 \pm 0.14^{**}$
Astragaloside IV	40	$0.59 \pm 0.14^{##}$	0.90 ± 0.13	$0.66 \pm 0.18^{##}$
	80	$0.75 \pm 0.14^{**}$	0.88 ± 0.12	$0.86 \pm 0.16^{**}$

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

4 讨论

本研究观察到异丙肾上腺素连续皮下注射 14 d 后,小鼠心重指数和左室指数增加,心肌 Hyp 含量升高,同时由于心肌细胞的肥大进而导致细胞膜通透性增高,细胞中 CK 和 LDH 外漏而致血中 CK 和 LDH 升高等变化,表明已出现了明显的心肌肥厚型损伤。而黄芪甲苷能有效降低心肌肥厚小鼠的心重指数、左室指数和心肌 Hyp 含量,降低血清 LDH 和 CK 的漏出量,表明黄芪甲苷对异丙肾上腺素所致的心肌肥厚及心脏纤维化具有一定的保护作用。

SOD 是心肌组织内重要的抗氧化酶,MDA 为脂质过氧化反应的主要终产物,测定其含量可间接反应机体中自由基水平及脂质过氧化反应程度^[8]。本实验表明:与正常组相比,模型组小鼠心肌组织总 SOD 活性下降,MDA 含量上升。黄芪甲苷能升高心肌组织总 SOD 活性,减少心肌损伤后心肌组织 MDA 生成,说明黄芪甲苷可能通过增强

心肌组织清除氧自由基的能力、减少心肌组织脂质过氧化物生成等机制来减轻心肌损伤。

肌浆网钙泵对钙的摄取是影响心肌舒缩功能的重要机制^[9]。肌浆网钙泵蛋白有 3 种类型基因,其中 SERCA2a 型基因主要在心肌中表达。受磷蛋白(PLB)是肌浆网钙泵活性的关键性调控蛋白,去磷酸化的 PLB 可抑制肌浆网钙泵活性,常用 SERCA2a 与 PLB 的比值反映这两个蛋白对肌浆网钙泵的调控^[9]。郑霞等^[10]报道在缺血再灌注心肌损伤模型中,SERCA2a 基因表达显著降低,PLB 基因表达未见显著性变化。在心肌梗死模型中,有研究报道 SERCA2a 及 PLB 基因及蛋白表达均显著降低^[11];但亦有报道指出 PLB 基因及蛋白表达增高^[12]。本研究显示,在异丙肾上腺素致小鼠心肌损伤的模型中,SERCA2a mRNA 的表达显著降低,而 PLB mRNA 的表达与对照组相比无显著性差异,这可能与不同的基因在不同的病理生理条件下其基因表达情况有差异相关。由于 SERCA2a mRNA 表达降低,SERCA2a 与 PLB 的比值降低,可能使肌浆网钙泵对胞浆内游离钙的再摄取功能减低,细胞内钙超载,从而导致心肌肥大型损伤。本实验观察到黄芪甲苷高剂量组能显著提高受损心肌中 SERCA2a mRNA 表达,可能因此增强肌浆网摄取钙的能力,有利于维持细胞内钙的稳态,保护心肌。

综上所述,黄芪甲苷对异丙肾上腺素所致心肌损伤具有保护作用,其机制可能与黄芪甲苷抗心肌自由基损伤,上调 SERCA2a 基因表达从而抑制钙超载有关。

参考文献

- [1] Kang YJ. Cardiac hypertrophy: a risk factor for QT-prolongation and cardiac sudden death[J]. *Toxicol Pathol*, 2006, **34**(1):58-66.
- [2] Li ZP, Cao Q. Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23**(10):898-904.
- [3] Zhang WD, Chen H, Zhang C, et al. Astragaloside IV from astragalus membranaceus shows cardioprotection during myocardial ischemia *in vivo* and *in vitro*[J]. *Planta Med*, 2006, **72**(1):4-8.
- [4] 李丽(Li L),陶辉宇(Tao HY),陈杰斌(Chen JB)等.黄芪甲苷保护阿霉素心肌损伤的抗氧化机制研究[J]. *临床儿科杂志* (*J Clin Pediatr*), 2007, **25**(1):58-61.
- [5] 张召才(Zhang ZC),杨英珍(Yang YZ),李双杰(Li SJ)等.黄芪甲苷对病毒性心肌炎小鼠心肌纤维化的影响[J]. *中国新药与临床杂志* (*Chin J New Drugs Clin Rem*), 2003, **22**(9):515-519.

[6] 李 明(Li M),张 军(Zhang J),陈 燕(Chen Y),等.丹参抑制异丙肾上腺素引起的小鼠心肌肥厚和纤维化及其作用机制[J].中国药科大学学报(J China Pharm Univ),2003,34(6):565-568.

[7] 洪 纓(Hong Y),王 晶(Wang J),赵海苹(Zhao HP),等.小檗碱对 2 肾 1 夹致心肌肥厚大鼠心室重构的影响[J].北京中医药大学学报(J Beijing Univ Tradit Chin Med),2005,6(28):28-31.

[8] Tang LQ, Wei W, Chen LM. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat high-cholesterol diet in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 108(1):109-115.

[9] Frank KF, Bolck B, Erdmann E, et al. Sarcoplasmic reticulum Ca₂⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation [J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(1):20-27.

[10] 郑 霞(Zheng X),孙 坚(Sun J),胡申江(Hu SJ)等.缺血再灌注心肌肌浆网肌钙调控蛋白 mRNA 表达的变化[J].中国应用生理学杂志(Chin J Appl Physiol),2006,22(2):142-146.

[11] Guo X, Chapman D, Dhalla NS. Partial prevention of changes in SR gene expression in congestive heart failure due to myocardial infarction by enalapril or losartan[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 254(1-2):163-172.

[12] Sun YL, Hu SJ, Wang LH, et al. Comparison of low and high doses of carvedilol on restoration of cardiac function and calcium-handling proteins in rat failing heart[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005, 32(7):553-560.

2007 年度国家自然科学基金项目评审结果于日前揭晓,据不完全统计,中国药科大学共有 19 个项目获准国家自然科学基金项目资助。

项目名称	负责人
递层式自组装微凝胶脉冲释药系统的研究	朱家壁
中药复方多组分配伍体内协同吸收机理研究	朱丹妮
紫苑款冬花药对的配伍理论及机理研究	张 勉
优化近红外量子点实现肺靶向药物体内动态特征无损实时监测	张 俊
中国民族植物化学成分、遗传基因与其系统位置的相关性研究	张朝凤
梳形高分子材料用作 pH 敏感及靶向药物载体的研究	张 灿
具有抗肿瘤作用的微管动力蛋白 Eg5 抑制剂的全新设计、合成和生物活性研究	尤启东
尿酸酶分子修饰及其构效关系研究	姚文兵
中药盐制与咸入肾、肾主骨理论相关性研究	杨中林
汉黄芩素诱导肿瘤细胞分化的作用与靶点研究	杨 勇
细菌群体感应对鱼虾腐败过程的调控作用及其分子机制	綦国红
丹参多组分多靶点间接药动学-药效学模型研究	柳晓泉
一种威灵仙新皂苷-Clematichinenoside AR 抑制肿瘤坏死因子 TNF-α 活性的作用机制研究	刘丽芳
血管内皮生长因子的分子重构	刘景晶
基于在线色谱-胆碱酯酶-质谱联用技术的活性检测方法的建立及其筛选贝母中药中胆碱酯酶抑制剂的应用	李会军
一种具有抗动脉粥样硬化和抗糖尿病双功能蛋白的分子定向改造	金 亮
芦笋甾体皂苷成分抗肿瘤构效关系及作用机理深入研究	黄雪峰
穿心莲内酯衍生物的合成及其抑制 COX-2、TNF-α 及 IL-6 表达的生物活性研究	黄文龙
鲨肝 S-8300 防治糖尿病作用机制及其基因克隆表达	黄凤杰

(科技处)