

黄芪甲甙下调 CaSR 对异丙肾上腺素诱导的缺血缺氧心肌损伤的保护作用

邓 纯¹, 杨云华^{2*}, 左袁博教², 张雅林¹, 蒋德林¹

(1.永州市中心医院儿科, 湖南 永州 425000; 2.南华大学附属第一医院儿科)

摘要: **目的** 探讨黄芪甲甙介导钙感受体(CaSR)对缺血缺氧心肌的保护作用及机制。**方法** 将32只SD大鼠随机分为正常对照组、模型组(ISO)、黄芪甲甙低剂量组(ISO+AST IV 10 mg/kg)、黄芪甲甙高剂量组(ISO+AST IV 20 mg/kg);HE染色光镜下观察不同组别心肌组织的病理学改变,检测不同组别血清肌酸激酶及肌酸激酶同工酶含量;Western blotting法检测CaSR蛋白的表达。**结果** 与模型组相比黄芪甲甙低、高剂量组能不同程度减轻心肌病理改变,降低血清肌酸激酶以及肌酸激酶同工酶含量,下调CaSR蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** 黄芪甲甙对异丙肾上腺素诱导大鼠缺血缺氧心肌有保护作用;其机制可能为下调CaSR蛋白表达减轻CaSR对心肌损伤的作用。

关键词: 黄芪甲甙; CaSR; 异丙肾上腺素

中图分类号:R54 **文献标识码:**A

The protective effect of astragaloside IV mediated calcium sensitive receptor on ischemia anoxic myocardial induced by isoproterenol

DENG Chun, YANG Yunhua, ZUO Yuanbojiao, et al

(Department of Pediatrics, Central Hospital of Yongzhou, Yongzhou 425000, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To explore the protective effects and mechanism of Astragaloside IV mediated calcium sensitive receptor (CaSR) on ischemia anoxic myocardial. **Methods** 32 SD rats were randomly divided into normal control group, model group (ISO) glucoside, astragaloside IV low dose group (ISO + AST IV 10 mg/kg), astragaloside IV high dose group (ISO + AST IV 20 mg/kg). Observing myocardial tissue pathology change of different groups by HE staining, detecting CK and CK-MB content; detecting CaSR protein expression by Western Blotting method. **Results** Compared with model group astragaloside IV low dose group and high dose group can reduce the myocardial pathological varying degrees changes, reduce serum CK and CK-MB, lower CaSR protein expression levels ($P<0.05$). **Conclusion** Astragaloside IV can protect ischemia anoxic myocardial injury induced by ISO; The mechanism may reduce the CaSR protein expression and effects on myocardial injury.

Key words: Astragaloside IV; CaSR; Isoproterenol

心肌缺血缺氧损伤是指血管痉挛、堵塞等其他各种原因引起冠状动脉血流量减少,致使心肌血液供应、氧气供给以及其他营养物质供给减少、有毒物质产生增多及代谢产物清除减少从而导致心肌受损的病理状态。钙感受受体(Calcium sensing receptor, CaSR)为隶属于G蛋白耦联受体超家族中C家族的

一种跨膜受体。研究表明,在心肌缺血缺氧时CaSR蛋白表达较正常心肌组织表达增多^[1]。CaSR能引起细胞内Ca²⁺超载、氧自由基生成增多、NO合成减少、激活凋亡信号通路等途径而引起心肌损伤。黄芪甲甙(Astragaloside IV, AST IV)为临床治疗心肌炎与心力衰竭中药黄芪中一种有代表性的单体有效活性成分^[2-4],而黄芪甲甙在心血管系统疾病的保护作用中的研究提示其有明显抗凋亡、抗病毒、抗炎、抗氧化等作用;黄芪甲甙对细胞内钙离子也有调

控作用,能减轻钙超载从而对损伤细胞起到保护作用。两者之间是否有直接联系,黄芪甲甙是否可以通过下调 CaSR 蛋白减轻钙超载及细胞凋亡,目前国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康、清洁 SD 雄性大鼠 35 只,体重(255.8±5.2)g,由南华大学动物部提供。4 只/笼,自由进食、进水。

1.1.2 实验药品 黄芪甲甙(纯度大于 98%)购于上海拓旸生物科技公司。异丙肾上腺素,购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 试剂 β -actin 兔抗人一抗、CaSR 兔抗人一抗(博奥森生物公司)、山羊抗兔二抗(广州索莱宝公司) SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(强)、PMSF、上样缓冲液(江苏碧云天生物科技公司)。

1.1.4 仪器设备 电子分析天平(北京赛多利斯天平公司)、低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、酶标仪(美国 ELX800)、显影机(美国 Fluorchem E)、高压蒸汽灭菌锅(日本 TOMY 公司)、-80 °C 低温冰箱(日本 SANYO)。

1.2 方法

1.2.1 异丙肾上腺素诱导大鼠缺血缺氧心肌损伤模型 大鼠连续 2 天背部多点皮下注射异丙肾上腺素,剂量为 60 mg/kg,自由进食、给水,对照组小鼠背部皮下注射相同体积的生理盐水。

1.2.2 给药和分组 大鼠 4 只/笼喂养,自由进食、进水,将大鼠采用随机数字法随机分为 4 组,即正常对照组、模型组、黄芪甲甙低剂量组(以 1%羧甲基纤维素钠溶解 10 mg/kg)、黄芪甲甙高剂量组(以 1%羧甲基纤维素钠溶解 20 mg/kg),每组 8 只,黄芪甲甙低、高剂量组大鼠按体重剂量(最终定容至 1.5 mL)连续腹腔注射黄芪甲甙 7 天,正常对照组和模型组腹腔注射相同体积羧甲基纤维素钠。给药第 6、7 天模型组、黄芪甲甙低剂量组(10 mg/kg)、黄芪甲甙高剂量组(20 mg/kg)大鼠加用 60 mg/kg(定容至 1 mL)异丙肾上腺素背部多点皮下注射,正常对照组背部皮下注射同体积生理盐水。

1.2.3 动物处死 大鼠末次给药后 12 h,腹腔注射

10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)麻醉大鼠,待大鼠充分麻醉后,逐层解剖,暴露心脏,心脏取血留取大鼠心脏。

1.2.4 心肌组织病理学检查 取心尖部心肌组织,约 0.3 cm×0.5 cm 大小,用纱布吸尽组织上的血液,放入 10%甲醛固定,编号,经脱水、浸蜡、包埋,再切成 4 μ m 厚切片,HE 染色,光镜观察并摄片。

1.2.5 血清肌酸激酶及肌酸激酶同工酶含量检测 将大鼠血液标本于 4 °C 离心,2 500 转/分,10 min,离心后,取上清液,送检南华大学附属第一医院检验科。

1.2.6 Western blotting 检测心肌钙感受体蛋白的表达 (1)蛋白的提取:取小鼠心肌组织,加入蛋白裂解液,4 °C 条件下 12 000 转离心 10 min,取上清。用 BCA 定量法对所提蛋白进行定量。(2)电泳、转膜封闭:用微量进样器将样品缓慢加入加样孔中,用 10% SDS-PAGE 电泳 2 h,然后 200 毫安转膜 1.5 h,5%脱脂奶粉的封闭液中封闭 37 °C 1 h。(3)抗体孵育:用 5% 封闭液稀释一抗(β -actin:1:500, CaSR:1:200),加入新鲜封闭液配制的一抗溶液,摇床上放置 1 h 后,4 °C 孵育过夜,弃一抗溶液用 TBST 将 PVDF 膜在摇床上洗 3 次,10 min/次。加入二抗溶液(兔抗 1:4 000),37 °C 摇床 1~2 h。

1.3 显影 用 ECL 显影剂在 Western blotting 分析仪成像系统中显像。

1.4 实验数据统计学处理及分析 采用 SPSS13.0 软件做统计学分析,所有实验数据均采用均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠血清肌酸激酶、肌酸激酶同工酶值

经过异丙肾上腺素诱导大鼠缺血缺氧损伤及黄芪甲甙药物保护处理后,与正常对照组比较,模型组大鼠血浆 CK、CK-MB 含量明显升高($P < 0.01$),表明模型组大鼠心肌已受损,大鼠缺血缺氧心肌损伤模型制备成功。与模型组比较,黄芪甲甙高剂量组(20 mg/kg),大鼠血浆 CK、CK-MB 值明显降低($P < 0.01$);黄芪甲甙低剂量组(10 mg/kg),大鼠血浆 CK 值明显降低($P < 0.01$),CK-MB 未见明显降低($P > 0.05$)。见表 1 及图 1、2。

2.2 各组大鼠心肌病理形态学变化 正常对照

表 1 不同组别 CK、CK-MB 检测值

组别	n	CK(U/L)	CK-MB(U/L)
正常对照组	8	546.7±28.60	531.7±49.64
模型组	8	1 216.0±102.70 ^a	1 028.0±108.80 ^a
黄芪甲甙低剂量组	8	877.7±46.62 ^b	836.7±49.12
黄芪甲甙高剂量组	8	771.3±51.17 ^b	710.4±40.5 ^b

与正常对照组比较, a: $P < 0.01$; 与模型组比较, b: $P < 0.01$

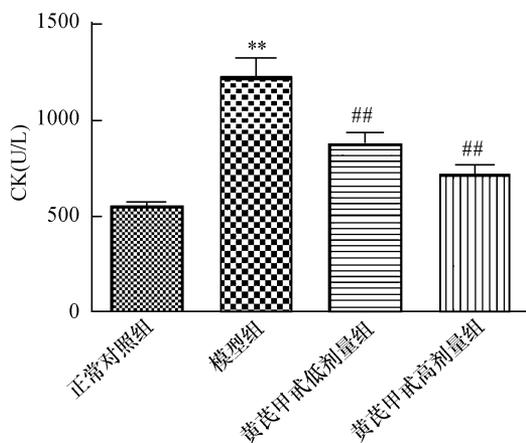


图 1 不同组别血清肌酸激酶含量

与正常对照组比较, * * $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

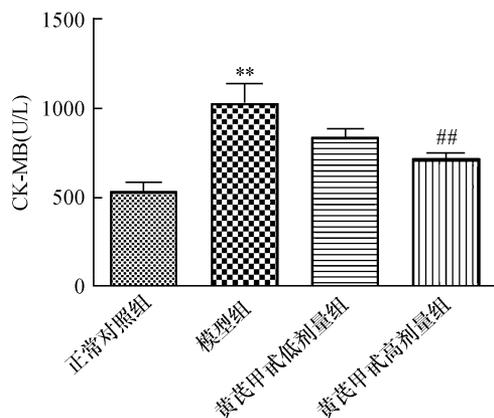


图 2 不同组别血清肌酸激酶同工酶含量

与正常对照组比较, * * $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

组心肌纤维排列整齐, 心肌细胞连续完整, 大小均匀, 胞核居中, 胞质着色均匀, 无水肿及炎症细胞浸润, 未见明显病理形态学改变。模型组心肌纤维肿胀、断裂, 心肌细胞排列显著紊乱, 肌纤维横纹不清, 坏死心肌融合成大片均质状坏死灶, 细胞空泡变性明显, 细胞皱缩, 胞核皱缩甚至消失, 间质水肿, 组织间隙明显增宽, 可见炎症细胞浸润。黄芪甲甙高剂量组 (20 mg/kg) 对心肌组织病理形态学改善明显,

心肌纤维排列整齐, 未见明显坏死灶出现, 间质轻度水肿, 组织间隙轻度增宽, 少量细胞皱缩, 未见明显细胞空泡。黄芪甲甙低剂量组 (10 mg/kg) 细胞少量空泡变性, 可见少量炎症细胞浸润, 心肌纤维局灶性断裂, 病理改变介于模型组与黄芪甲甙高剂量组之间。见图 3。

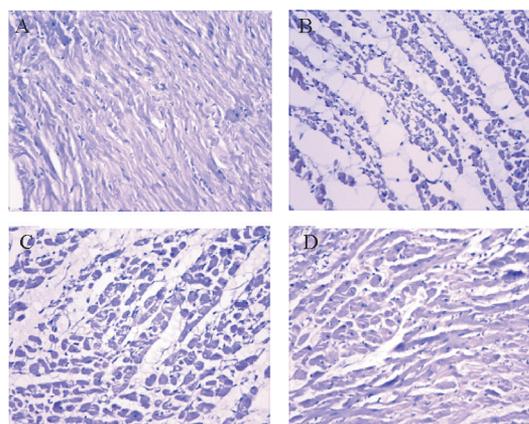


图 3 各组心肌组织病理学改变结果 (HE 400×)

A: 正常对照组; B: 模型组; C: 黄芪甲甙低剂量组; D: 黄芪甲甙高剂量组

2.3 Western-Blotting 法检测 CaSR 蛋白表达 经过异丙肾上腺素诱导大鼠缺血缺氧损伤及黄芪甲甙药物保护处理后, 用蛋白印迹法检测各组 CaSR 蛋白表达情况, 跟正常对照组比较, 模型组 CaSR 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 黄芪甲甙处理组跟模型组比较, CaSR 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$), 黄芪甲甙高剂量组 (20 mg/kg) CaSR 表达下降更明显 ($P < 0.01$)。见表 2 及图 4、图 5。

表 2 CaSR 蛋白相对表达量

组别	n	CaSR 蛋白相对表达量
正常对照组	8	1.028±0.030
模型组	8	1.187±0.021 ^a
黄芪甲甙低剂量组	8	1.122±0.008 ^c
黄芪甲甙高剂量组	8	1.041±0.029 ^b

与正常对照组比较, a: $P < 0.01$; 与模型组比较, b: $P < 0.01$; 与模型组比较, c: $P < 0.05$

3 讨 论

异丙肾上腺素 (Isoproterenol ISO) 是一种强 β 受体激动剂, 主要使心率增快、心肌收缩力增强等使

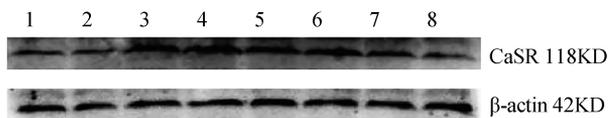


图 4 不同组别心肌组织 Western blotting 法检测 CaSR 蛋白表达

注:1,2:正常对照组;3,4:模型组;5,6:黄芪甲甙低剂量组;7,8:黄芪甲甙高剂量组

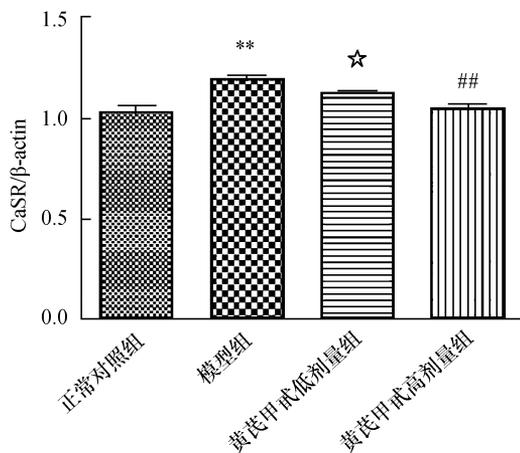


图 5 不同组别心肌组织 Western-Blotting 法检测 CaSR 蛋白表达

与正常对照组比较, * * : $P < 0.01$;与模型组比较,##: $P < 0.01$;与模型组比较,☆: $P < 0.05$

心脏负荷加重,可引起冠状动脉痉挛,造成心肌微循环障碍,导致心肌缺血、缺氧,发生心肌梗死、坏死;造成心肌酶等生化指标、心电图以及心肌组织形态结构改变。简单易行的异丙肾上腺素诱导大鼠缺血缺氧心肌损伤产生的变化与人类心肌缺血及梗死所发生病理生理变化、病理形态学的改变具有相似性^[5-6],因而被广泛用于研究心血管疾病领域的研究^[7]。

黄芪甲甙(Astragaloside)为黄芪中一种有代表性的单体有效活性成分,具有明显的抗氧化活性、抗病毒、抗炎、抗凋亡作用^[8-11],黄芪甲甙也可抑制缺血心肌细胞的细胞内钙超载^[12]。不同浓度的黄芪甲甙对于缺血缺氧心肌保护作用程度不一样^[13]。CaSR 主要通过引起钙超载及诱导心肌细胞凋亡在缺血缺氧心肌损伤中发挥作用。

心肌细胞膜的完整性和心肌损伤程度的改变可通过血浆中肌酸激酶、肌酸激酶同工酶等心肌酶的活性反映^[14-15]。本实验结果表明,模型组肌酸激酶及肌酸激酶同工酶活性较普通组显著升高,与模型

组比较,黄芪甲甙各组血清肌酸激酶及肌酸激酶同工酶降低,表明黄芪甲甙对异丙肾上腺素诱导的大鼠缺血缺氧损伤心肌有保护作用,高剂量(20 mg/kg)较低剂量(10 mg/kg)效果明显。该实验结果显示,正常对照组心肌组织未见明显病理学改变,ISO 所致缺血缺氧损伤大鼠心肌病理切片出现心肌断裂,细胞排列紊乱,坏死心肌融合成片,细胞皱缩,组织间隙增宽,细胞空泡变性明显,胞核皱缩甚至消失,炎性细胞浸润,间质水肿等改变,提示细胞明显坏死及凋亡现象。黄芪甲甙各组对病理形态学均有改善作用,能明显减轻细胞凋亡、坏死及炎性细胞浸润,高剂量较低剂量改善明显,表明黄芪甲甙能减轻细胞坏死及凋亡从而对异丙肾上腺素诱导的缺血缺氧损伤大鼠心肌有保护作用,且与药物剂量相关,高剂量作用大于低剂量。ISO 诱导的心肌缺血缺氧时可使 CaSR 表达增加,可引起钙超载和激活细胞凋亡通路对心肌细胞造成损伤。实验结果表明模型组 CaSR 蛋白表达较普通组增高,说明以异丙肾上腺素诱导缺血缺氧心肌损伤模型成功,CaSR 表达上调;而使用药物黄芪甲甙实验组,CaSR 蛋白均表达下降,高剂量较低剂量下降明显,提示黄芪甲甙可下调受损心肌 CaSR 表达,从而减轻 CaSR 对心肌损伤的作用而保护心肌,且有剂量依赖性。

综上所述,黄芪甲甙对异丙肾上腺素诱导大鼠缺血缺氧心肌有保护作用;其机制可能是为下调 CaSR 蛋白表达从而减轻 CaSR 对心肌损伤的作用。

参考文献:

- [1] Zhang WH, Fu SB, Lu FH, et al. Involvement of calcium-sensing receptor in ischemia/reperfusion-induced apoptosis in rat cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006,347(4):872-881.
- [2] Qi LW, Li P, Ren MT, et al. Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of Radix Astragali and its preparations [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11):2087-2097.
- [3] Yang QY, Chen KJ, Lu S, et al. Research progress on mechanism of action of Radix Astragalus in the treatment of heart failure [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(3):235-240.
- [4] Fu S, Zhang J, Menniti-Ippolito F, et al. Huangqi injection (a traditional Chinese patent medicine) for chronic heart failure: a systematic review [J]. PLoS One, 2011, 6(5):e19604.

- [5] Karthikeyan K, Bai B R, Devaraj S N. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 115(3):326-333.
- [6] Panda V S, N S R. Evaluation of cardioprotective activity of Ginkgo biloba and Ocimum sanctum in rodents[J]. *Altern Med Rev*, 2009, 14(2):161-171.
- [7] Stanely M P P, Priya S. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: biochemical, histological and in vitro evidences[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1-3):229-235.
- [8] Lee D Y, Noh H J, Choi J, et al. Anti-inflammatory cycloartane-type saponins of *Astragalus membranaceus* [J]. *Molecules*, 2013, 18(4):3725-3732.
- [9] Gui D, Guo Y, Wang F, et al. Astragaloside IV, a novel antioxidant, prevents glucose-induced podocyte apoptosis in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e39824.
- [10] Lee D Y, Noh H J, Choi J, et al. Anti-inflammatory cycloartane-type saponins of *Astragalus membranaceus* [J]. *Molecules*, 2013, 18(4):3725-3732.
- [11] Zhao J, Yang P, Li F, et al. Therapeutic effects of astragaloside IV on myocardial injuries: multi-target identification and network analysis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e44938.
- [12] Li Z P, 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.
- [13] 李真真, 徐志懿, 关新强, 等. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导心肌梗死保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(3):275-278.
- [14] Levinson SS, Hobbs GA. Usefulness of various lactate dehydrogenase isoenzyme profiles after myocardial infarction[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1994, 24(4):364-370.
- [15] Ahmed KK, Rana AC, Dixit VK. Effect of *Calotropis procera* latex on isoproterenol induced myocardial infarction in albino rats [J]. *Phytomedicine*, 2004, 11(4):327-330.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 112 页)

- [13] Kim HS, Shin SJ, Beom SH, et al. Comprehensive expression profiles of gastric cancer molecular subtypes by immunohistochemistry: implications for individualized therapy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):44608-44620.
- [14] Zhang T, Zhang L, Fan S, et al. Patient-derived gastric carcinoma xenograft mouse models faithfully represent human tumor molecular diversity[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0134493.
- [15] Tapia O, Riquelme I, Leal P, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance[J]. *Virchows Arch*, 2014, 465(1):25-33.
- [16] Chen J, Li T, Liu Q, et al. Clinical and prognostic significance of HIF-1 α , PTEN, CD44v6, and survivin for gastric cancer: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e91842.
- [17] Zhang X, Park JS, Park KH, et al. PTEN deficiency as a predictive biomarker of resistance to HER2-targeted therapy in advanced gastric cancer[J]. *Oncology*, 2015, 88(2):76-85.
- [18] Li Y, Cui J, Zhang CH, et al. High-expression of DJ-1 and loss of PTEN associated with tumor metastasis and correlated with poor prognosis of gastric carcinoma[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(12):1689-1697.
- [19] Ling H, He J, Tan H, et al. Identification of potential targets for differentiation in human leukemia HL-60 cells induced by diallyl disulfide [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2):697-707.

(本文编辑:蒋湘莲)