

黄芪多糖对大鼠心肌缺血再灌注损伤 心肌 p38 信号通路的影响

徐冰¹ 刘蓓¹ 朱海燕² 张莹³ 朱陵群¹ 陈立新^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700;

2. 北京师范大学中药资源与资源药物研究所; 3. 北京市宣武中医院心内科)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772805)

* 通讯作者: rimh2006@yahoo.com.cn, (010)84013190

[摘要] 目的 研究黄芪多糖(APS)对大鼠缺血再灌注损伤心肌的作用。方法 将 70 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注模型组、APS 低剂量组、APS 高剂量组、p38MAPK 阻断剂(SB203580)组、APS 低剂量+SB203580 组、APS 高剂量+SB203580 组, 每组 10 只。采用结扎左冠状动脉前降支复制缺血再灌注损伤模型。各组大鼠尾静脉注射相应药物, 每日 1 次, 连续给药 30 天。氯化硝基四氮唑蓝染色后, 测量心肌梗死面积及梗死重量。结果 与模型组比较, 除 APS 低剂量组外, 其他各给药组均可显著减少缺血再灌注心肌的梗死面积和重量($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并且 APS 高剂量联合 SB203580 组治疗效果明显优于各单药治疗组($P<0.05$)。结论 APS 能够明显改善大鼠心肌缺血再灌注损伤, APS 高剂量与 p38MAPK 阻断剂联合应用对抑制再灌注损伤具有协同作用, 其机制可能与其部分抑制 p38MAPK 信号通路, 阻断其介导的炎症反应对心肌的损伤有关。

[关键词] 黄芪多糖; 心肌缺血再灌注; p38MAPK 信号通路

Effect of Astragalus Polysaccharide on p38 MAPK Signal Pathway of Rats with Myocardial Ischemic Reperfusion Injury

XU Bing¹, LIU Bei¹, ZHU Haiyan², ZHANG Ying³, ZHU Lingqun¹, CHEN Lixin¹

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700; 2. Institute of Chinese Medicine Resources, Beijing Normal University; 3. Beijing Xuanwu TCM Hospital; 4. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of astragalus polysaccharide (APS) on myocardial ischemic reperfusion injury in rats. **Methods** Seventy Wistar rats were randomized into sham operation group, model group, APS low dose group, APS high dose group, p38 MAPK SB203580 group, APS low dose & SB203580 group, and APS high dose & SB203580 group, with 10 in each. The left anterior descending coronary artery was ligated to make models of ischemic reperfusion injury. The corresponding medicine was injected via tail vein of each group of rats, once a day, 30 days in total. The size and weight of the infarcted myocardium were measured after nitro blue tetrazolium chloride dyeing. **Results** Infarcted size and weight of the ischemic reperfusion myocardium were lower in all groups except the APS low dose group than in the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Furthermore, the APS high dose & SB203580 group had better effect than other groups ($P<0.05$). **Conclusion** APS is effective in improving the pathological condition of myocardial ischemic reperfusion injury in rats, and the combination of APS high dose with SB203580 has a synergic function in inhibiting the reperfusion injury. The mechanism may be related to its effect in inhibiting the p38 MAPK signal pathway and blocking the induced inflammatory reaction on myocardium.

Keywords astragalus polysaccharide (APS); SB203580; myocardial ischemia reperfusion; p38 MAPK

黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是黄芪主要活性成分之一, 具有广泛的免疫调节作用。前期研究发现 APS 能够减少离体再灌注心肌的自由基损伤作用, 并可通过抑制 NF- κ B 减少人心肌微血管内皮细胞与白细胞的黏附^[1-2]。本研究将从整体动物方面进一步探讨 APS 对心肌缺血再灌注损伤信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

70 只 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重(225±25)g, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 实验动物许可证号: SCXK(京)2006-0008。

g, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 实验动物许可证号: SCXK(京)2006-0008。

1.2 试剂与药物

氯化硝基四氮唑蓝(NB-T, 上海前进化学试剂厂); 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)阻断剂 SB203580(杭州碧云天科技有限公司); 注射用黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司, 250mg/支, 批号: Z2004008)。

1.3 动物分组

70 只 Wistar 大鼠, 随机分为假手术组、缺血

再灌注模型组、APS 低剂量组、APS 高剂量组、p38MAPK 阻断剂组 (SB203580)、APS 低剂量 + SB203580 组、APS 高剂量 + SB203580 组, 每组 10 只。

1.4 模型制备

采用结扎大鼠左冠状动脉前降支^[3-4]复制大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。大鼠在乙醚麻醉下仰位固定于手术台, 自左侧 3-4 肋间开胸, 暴露心脏, 于肺动脉圆锥及左心房间找出冠状动脉左前降支, 以 0 号线立即结扎冠状动脉, 结扎时用一细小乳胶管垫于血管与结扎线之间, 将心脏送回胸腔, 并挤出胸腔内血液和气体, 迅速关闭胸腔, 开胸时间不超过 30s, 1h 后除去丝线, 恢复血流, 心肌再灌注 2h 后处死。其中假手术组开胸后穿线做套环, 但不收紧结扎线。

1.5 给药方法

APS 高、低剂量组和 APS 高剂量 + SB203580 组、低剂量 + SB203580 组分别按 40mg/kg 和 20mg/kg 尾静脉注射用 APS, 每日 1 次, 连续给药 30 天; 假手术组、缺血再灌注组及 SB203580 组给予等量生理盐水。SB203580 组和 APS 高剂量 + SB203580 组、APS 低剂量 + SB203580 组将 SB203580 溶于 DMSO 配成 5mg/ml 溶液在造模前 30min 按 5mg/kg 一次性尾静脉注射^[5]。各组均于结扎后立即尾静脉注射给予相应组别的药物 1 次。

1.6 指标检测

心肌标本梗死面积和梗死重量的测定待实验完毕后剖取大鼠心脏, 用冰生理盐水洗净心腔内积血, 滤纸吸干, 称取全心重量, 液氮固定, 将心肌横切 4 片, 然后浸入新鲜配制的 NB-T 磷酸缓冲液中 (pH7.4 磷酸缓冲液加入 0.5% NB-T), 置 37℃ 恒温水浴 1h 进行染色, 待染色完全后取出, 此时正常组织 (即缺血危险区) 染色呈蓝色, 梗死组织 (即梗死区) 不染色, 呈白色。用数码相机记录心肌标本, 采用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统分析, 计算梗死面积占心肌切片总面积的百分比。将心肌标本的梗死区与缺血危险区分离, 称取梗死区组织的重量, 计算梗死区占全心重量的百分比。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组之间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏梗死重量及面积比较

表 1 示, 模型组梗死重量比值和面积比值最高, 而各治疗组呈不同程度降低, 其中以 APS 高剂量 + SB203580 组梗死重量比值和面积比值最低。与模型组比较, 除 APS 低剂量组外, 其他各给药组均能降低梗死重量比值和面积的比值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。APS 高剂量 + SB203580 组对降低梗死重量比值和面积比值明显优于各单药治疗组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌梗死重量及面积比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	梗死重量/全心重量	梗死面积/全心面积
假手术组	10	0**##	0**##
模型组	10	36.21 ± 8.33	32.53 ± 8.53
APS 低剂量组	10	34.80 ± 7.86#	31.20 ± 6.63#
APS 高剂量组	10	28.79 ± 10.22**	26.07 ± 5.82**
SB203580 组	10	30.11 ± 7.24**	27.87 ± 5.83**
APS 低剂量 + SB203580 组	10	26.95 ± 10.31*	24.13 ± 7.35**
APS 高剂量 + SB203580 组	10	23.34 ± 6.70**	22.20 ± 5.41**

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 APS 高剂量 + SB203580 组比较, # $P < 0.05$

2.2 各组大鼠组织形态学比较

模型组白色梗死区所呈面积明显比其他组所呈面积大, 而 APS 高剂量 + SB203580 组的白色梗死区相对其他组最小。

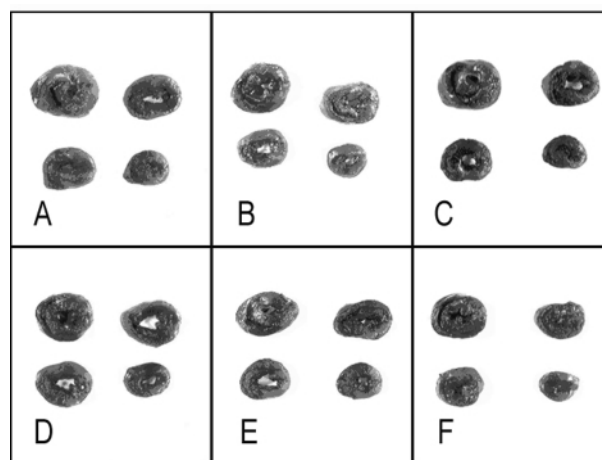


图 1 各组大鼠心肌形态学比较

(A: 模型组; B: APS 低剂量组; C: APS 高剂量组; D: SB203580 组; E: APS 低剂量 + SB203580 组; F: APS 高剂量 + SB203580 组)

3 讨论

缺血性心脏疾病多由于心之阳气不足, 推动无力, 气虚而致血瘀。因黄芪有“温阳益气以补阳气不

足之虚,活血通脉以泻血脉瘀滞之实”的独特功效,故其常用于治疗缺血性心脏疾病,并且取得了较好的疗效^[6]。APS具有明显降低氧自由基以及血浆过氧化脂质和血浆纤维蛋白原含量,提高红细胞膜流动性及超氧化物歧化酶(SOD)活性的作用,能够有效地减缓体内代谢的紊乱,降低全身耗氧及增加组织耐缺氧的作用^[7]。

我们的前期研究发现 APS 能抑制 NF- κ B 基因的表达,即通过抑制 NF- κ B 信号通路,降低与其相关的下游炎症基因的激活和蛋白的表达,进而抑制与外周血中性粒细胞的黏附,减轻心肌缺血再灌注损伤时的炎症反应^[8-10]。核转录因子 NF- κ B 可被一些因素直接激活,又可被 p38MAPK 信号通路激活。心肌缺血损伤等刺激激活 p38MAPK 通路后^[11],磷酸化的 p38 可以活化核因子 κ B 抑制蛋白磷酸化激酶(IKK),后者将使 NF- κ B 的抑制蛋白(I κ B)磷酸化降解,激活 NF- κ B,启动 NF- κ B 信号通路;同时 p38MAPK 通路本身也是一条与炎症相关的重要信号通路,它还可磷酸化激活多种转录因子,启动基因转录,调节许多炎症蛋白的表达^[12]。如果 p38MAPK 通路在长时程心肌缺血过程中被持续激活,会加快心肌损伤^[13],而使用 p38 的抑制剂或用遗传学方法抑制 p38 表达,损伤过程会被减慢^[14]。

本实验表明,APS可以减少缺血再灌注损伤中心肌的梗死重量及面积,并且呈现出剂量相关趋势,这与吕文伟等^[15]对实验性急性心肌梗死犬静脉给予 APS 治疗的结果相一致。可见 APS 对缺血损伤和再灌注损伤的心脏均能起到保护作用,且 APS 高剂量组效果优于 SB203580 组,提示再灌注损伤是由多条信号通路参与形成的,单独抑制某一通路并不能完全抑制心肌损伤,而 APS 很可能在抑制了复杂信号传导网络中的核心成分 NF- κ B 外,还抑制了因缺血损伤而激活的 p38 通路。同时,APS 与 SB203580 联合应用可以增强疗效,对减少心肌缺血再灌注损伤具有协同作用。因此,APS 可能具有部分阻断 p38MAPK 信号通路的作用。

本研究结果提示 APS 除了能抑制 NF- κ B 信号通路,还能部分干预 p38MAPK 信号通路,从而通过多条途径抑制炎症反应,发挥抗心肌缺血再灌注损伤的作用。但其具体干预位点还不明确,有可能在两条炎症信号通路的共同上游,或者在两通路的交叉点,亦有可能有多个作用靶点,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1]孙成文,钟国赣. 黄芪多糖抗氧化损伤作用的研究[J]. 中国药理学通报,1996,12(2):161-163.
- [2]张灼,陈立新,宋崇顺,等. 黄芪多糖对大鼠心肌缺血一再灌注损伤后的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(2):33-34.
- [3]Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. Physiol Rev,2008,88(2):581-609.
- [4]杨建业,张迎春. 大鼠心肌缺血再灌注后心功能变化与心肌梗死面积的相关性分析[J]. 实验动物与比较医学,2008,28(1):4-9.
- [5]孙立倩,景晓彬,崔建忠. SB203580 对 IR 鼠模型脑组织中神经元凋亡的影响[J]. 山东医药,2009,49(2):34-35.
- [6]徐旭,汤立达. 黄芪的心血管药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2003,12(11):899-901.
- [7]黄桢. 黄芪多糖的药理研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2002,11(5):315-318.
- [8]陈立新,朱海燕,朱陵群,等. 黄芪多糖对人心脏微血管内皮细胞增殖及再灌注后内皮细胞与中性粒细胞黏附的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(27):5382-5386.
- [9]朱海燕,陈立新,朱陵群. 黄芪多糖对人心脏微血管内皮细胞缺氧再复氧损伤后核因子- κ B 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(1):7-9.
- [10]吕国菊,白智峰,李大强. 抑制转录因子核因子保护大鼠心肌缺血的研究[J]. 临床心血管病杂志,2002,18(8):389-391.
- [11]Baines CP, Molkenstein JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis[J]. J Mol Cell Cardiol,2005,38(1):47-62.
- [12]黄文林,朱孝峰. 信号转导[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:322-326.
- [13]Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, et al. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes[J]. FASEB J,2000,14(14):2237-2246.
- [14]Martin JL, Avkiran M, Quinlan RA, et al. Antiischemic effects of SB203580 are mediated through the inhibition of p38alpha mitogen-activated protein kinase: Evidence from ectopic expression of an inhibition-resistant kinase [J]. Circ Res,2001,89(9):750-752.
- [15]吕文伟,雷春利,陈羽,等. 黄芪多糖对急梗犬心的保护作用及其机制分析[J]. 中草药,1994,25(11):586.

(收稿日期:2011-05-04;修回日期:2011-07-07)

[编辑:行之]