

黄芪多糖对血管紧张素Ⅱ介导心肌细胞炎症因子的影响

陈添华¹, 周萍萍², 李志樑³

(1. 井冈山大学 临床医学院, 江西 吉安 343000; 2. 井冈山大学附属医院, 江西 吉安 343000; 3. 南方医科大学珠江医院, 广东 广州 510280)

[摘要] 目的: 观察黄芪多糖(APS)对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的大鼠心肌细胞肥大及炎症反应的干预作用。方法: 原代培养大鼠心肌细胞,分为对照组、AngⅡ(10^{-6} mol/L)刺激组、APS低浓度干预组、APS中浓度干预组和APS高浓度干预组,APS各干预组分别加入25 mg/L、50 mg/L及100 mg/L APS,孵育30 min后加入 10^{-6} mol/L AngⅡ;Real-time PCR及ELISA方法测定各组心肌细胞Toll样受体4(TLR4)、心房利钠多肽(ANP)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA表达及细胞培养上清液TNF- α 浓度;Bradford法测定心肌细胞总蛋白含量。结果: 与AngⅡ刺激组比较,不同浓度APS干预后,心肌细胞TLR4、ANP、TNF- α mRNA表达减少,心肌细胞培养液中TNF- α 浓度下降,心肌细胞总蛋白含量减少,随着干预浓度的升高,这种作用逐渐增强。结论: APS对AngⅡ刺激引起的心肌细胞肥大及炎症反应有良好的保护作用,其机制可能是通过抑制TNF- α 等炎症因子实现的。

[关键词] 中药;黄芪多糖;心肌细胞;血管紧张素Ⅱ;肿瘤坏死因子- α ;大鼠,Sprague-Dawley

[中图分类号] R361.3; R285.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)04-0446-04

The Influence of Astragalus Polysaccharides on Angiotensin Ⅱ Induced Cardiomyocyte Inflammation Factor TNF- α

CHEN Tianhua¹, ZHOU Pingping², LI Zhiliang³

(1. School of Medicine, Jinggangshan University, Ji'an 343000, Jiangxi, China; 2. The Affiliated Hospital of Jinggangshan University, Ji'an 343000, Jiangxi, China; 3. The Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intervention effect of astragalus polysaccharides(APS) on angiotensin Ⅱ induced cardiomyocyte hypertrophy and inflammation of rats. **Methods:** The cardiomyocytes of rats of primary culture were divided into control group, AngⅡ stimulation group, low APS concentration intervention group, middle APS concentration intervention group and high APS concentration intervention group. Cardiomyocytes of each APS intervention were treated with different concentrations of APS for 30 minutes and stimulated with angiotensin Ⅱ to induce cardiomyocyte hypertrophy and inflammation. In each group, Real-time PCR was adopted to determine mRNA expression of TLR4, ANP, TNF- α of cardiomyocytes, Elisa was used to determine TNF- α concentration in cell culture supernatant, and Bradford's method was used to determine total protein content of cardiomyocytes. **Results:** Compared with AngⅡ stimulation group, the mRNA expression of TLR4, ANP, TNF- α of cardiomyocytes and cardiomyocyte protein and TNF- α concentration in cell culture supernatant were decreased with APS intervention. **Conclusion:** APS can play a protection role in angiotensin Ⅱ induced cardiomyocyte hypertrophy and inflammation, and the mechanism may be inhibiting inflammation factors such as TNF- α .

[Key words] cardiomyocyte; astragalus polysaccharides; cardiomyocyte; angiotensin Ⅱ; tumour necrosis factor alpha; rats, Sprague-Dawley

黄芪多糖 (astragalus polysaccharides, APS) 是中药黄芪最主要的活性成分,具有提高心肌成活率,抑制细胞凋亡,并对缺氧-复氧心肌细胞有保护作用^[1]。炎症在心血管病的发生发展中起重要作用,肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 与心血管病炎症有关,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 与其受体结合后,可激活多种炎症因子,参与炎症损伤^[2]。本实验采用 Ang II 诱导 SD 大鼠心肌细胞肥大及炎症反应,检测心肌细胞 Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4)、心房利钠多肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 的变化,探讨黄芪多糖对心肌细胞肥大及炎症反应的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

出生 2~3 d 的 SD 大鼠乳鼠,雌雄不拘,由南方医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCKK(粤)2006-0015;黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司,国药准字 Z20040086),质量分数为 98%;Ang II 为美国 Sigma 公司产品,Trizol 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品,大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒为美国 BD Biosciences 公司产品。

1.2 心肌细胞培养

无菌条件下开胸取出 SD 大鼠心脏,分离左室心肌,用眼科剪剪成 0.5~1 mm³ 的组织块后用胰蛋白酶分次消化,差速贴壁法分离成纤维细胞,调整细胞浓度为 1×10^9 cells/L,接种到培养瓶,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。培养 3 d 可见细胞出现不规则、整体协调一致的搏动。

1.3 分组

常规培养心肌细胞 72 h 后,将心肌细胞分为 5 组:对照组,不做任何处理;Ang II 刺激组,用 10^{-6} mol/L Ang II 处理;APS 低浓度干预组,用 25 mg/L APS 孵育乳鼠心肌细胞 30 min 后,再加入 10^{-6} mol/L Ang II;APS 中浓度干预组,用 50 mg/L APS 孵育乳鼠心肌细胞 30 min 后,再加入 10^{-6} mol/L Ang II;APS 高浓度干预组,用 100 mg/L APS 孵育乳鼠心肌细胞 30 min 后,再加入 10^{-6} mol/L Ang II。各组细胞加药后继续培养 24 h。

1.4 检测指标

1.4.1 mRNA 心肌细胞 TLR4、ANP 及 TNF- α 的

表达 采用 Real-time PCR 法,各组心肌细胞继续培养 24 h 后,Trizol 试剂盒抽提各组心肌细胞的总 RNA 后,取 4 μ L RNA 模板做逆转录反应,合成 cDNA。反应条件:37℃ 1 h,95℃ 3 min。扩增内参 GAPDH 上游引物序列为 5'-ACAGCAA-CAGGCTGCTGGAC-3',下游引物序列为 5'-TTT-GAGGTGCAGCGAACTT-3';扩增 TLR4 上游引物序列为 5'-GAATCTCAGCAAAATCCCTCA-3',下游引物序列为 5'-TCCTGGGGAAAACTCTTGAT-3';扩增 ANP 上游引物序列为 5'-TGAGCCGAGACAG-CAAACATC-3',下游引物序列为 5'-AGGCCAG-GAAGAGGAAGAAGC-3';扩增 TNF- α 上游引物序列为 5'-CATGGATCTCAAAGACAACCAA-3',下游引物序列为 5'-CTCCTGCTATGAAATGGCAAAT-3'。最后将逆转录产物运用 ABI7500 型定量 PCR 仪检测基因的表达,反应条件:93℃ 2 min,93℃ 15 s、55℃ 25 s、72℃ 25 s、共 40 循环。结果以拷贝数进行分析,考虑到各个样本总 RNA 浓度的差异,最终计算结果按目的基因/内参基因比值换算。

1.4.2 总蛋白含量 心肌细胞继续孵育 24 h 后,收集各组心肌细胞, D-hanks 冲洗 3 次后,加入 SDS 细胞裂解液使心肌细胞裂解,Bradford 法测定各组心肌细胞总蛋白含量。

1.4.3 培养液中 TNF- α 浓度 各组心肌细胞继续孵育 24 h 后,收集上清液,-80℃ 保存。TNF- α 采用 ELISA 试剂盒测定浓度,按照试剂盒操作说明进行操作。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 作数据处理,计量资料采用均数 \pm 标准差表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间进一步比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞 TLR4、ANP 及 TNF- α mRNA 表达

采用 Real-time PCR 检测结果显示,与对照组相比,Ang II 刺激组心肌细胞 TLR4、ANP 及 TNF- α mRNA 表达增加($P < 0.05$);不同溶度 APS 干预后心肌细胞 TLR4、ANP 及 TNF- α mRNA 表达较 Ang II 刺激组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着 APS 干预浓度的升高,TLR4、ANP 及 TNF- α mRNA 表达逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 心肌细胞蛋白含量

与对照组相比,Ang II 刺激组心肌细胞蛋白含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);不同溶度 APS 干预后心肌细胞蛋白含量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);且随着 APS 干预浓度的升高,心肌细胞蛋白含量逐渐下降差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 TNF- α 浓度

与对照组相比,Ang II 刺激组上清液 TNF- α 浓度增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);不同溶度 APS 干预后上清液 TNF- α 浓度下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);且随着 APS 干预浓度的升高,TNF- α 浓度逐渐下降差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 1 各组心肌细胞 TLR4、ANP 及 TNF- α mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The mRNA expression of TLR4, ANP, TNF- α of cardiomyocytes in each group

组别	TLR4	TNF- α	ANP
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Ang II 刺激组	12.30 \pm 1.51 ⁽¹⁾	2.18 \pm 0.16 ⁽¹⁾	2.73 \pm 0.22 ⁽¹⁾
低溶度 APS 干预组	10.90 \pm 1.32	1.99 \pm 0.16	2.37 \pm 0.17 ⁽²⁾
中浓度 APS 干预组	9.35 \pm 0.99 ⁽²⁾	1.55 \pm 0.07 ⁽²⁾⁽³⁾	2.06 \pm 0.24 ⁽²⁾
高浓度 APS 干预组	7.38 \pm 0.78 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	1.35 \pm 0.06 ⁽²⁾⁽³⁾	1.63 \pm 0.17 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
F	52.01	56.69	40.29
P	<0.001	<0.001	<0.001

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与刺激组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与低溶度组比较, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾与中溶度组比较, $P < 0.05$

表 2 各组心肌细胞总蛋白含量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Total protein content of cardiomyocytes in each group

组别	蛋白含量(μ g)
对照组	14.33 \pm 1.23
Ang II 刺激组	21.50 \pm 2.19 ⁽¹⁾
低溶度 APS 干预组	18.42 \pm 1.03 ⁽²⁾
中浓度 APS 干预组	17.02 \pm 1.85 ⁽²⁾
高浓度 APS 干预组	15.67 \pm 1.01 ⁽²⁾⁽³⁾
F	9.66
P	<0.002

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与刺激组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与低溶度组比较, $P < 0.05$

3 讨论

高血压病严重危害人类身体健康,最终导致严

表 3 各组心肌细胞培养上清液中 TNF- α 的浓度($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 TNF- α concentration in cell culture supernatant in each group

组别	TNF- α (ng/L)
对照组	73.95 \pm 9.18
Ang II 刺激组	150.19 \pm 23.03 ⁽¹⁾
低溶度 APS 干预组	129.57 \pm 17.53
中浓度 APS 干预组	103.77 \pm 11.80 ⁽²⁾
高浓度 APS 干预组	92.80 \pm 11.71 ⁽²⁾
F	11.365
P	0.001

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与刺激组比较, $P < 0.05$

重的心脑肾等靶器官功能损害,其中 RAS 发挥着重要作用。Ang II 是 RAS 的主要效应分子,参与了高血压心肌损伤的全过程,与心脏疾病的发展密切相关^[3]。Ang II 生物学功能主要体现在调节血管张力和血流、促进细胞生长和增生。研究发现,Ang II 还具有致炎作用,Ang II 通过调节细胞因子、化学趋化因子和黏附因子等多种炎性介质的表达参与机体炎症反应相关疾病的发生和发展,在动脉粥样硬化、心肌肥厚等心血管疾病中发挥着炎症因子的作用^[4-5]。

TLR4 属于跨膜信号传递受体家族,在免疫反应中起着重要作用。TLR4 与其配体结合,通过胞内区与接头蛋白髓样细胞分化因子(myeloid differentiation factor, MyD88)的 TH 结构域相互作用,使胞浆内 NF- κ B 从静息状态下激活,活化的 NF- κ B 转移到细胞核内与 DNA 分子上炎症反应调节基因中启动子区域的 NF- κ B 结合位点相结合,启动细胞因子(IL-6, TNF- α 等)以及协同刺激因子 CD86 等基因转录和翻译,导致炎症因子大量释放^[6]。TLR4 可在心肌细胞膜上表达,Ang II 可通过 TLR4 活化 NF- κ B,使心肌细胞内 TNF- α 表达增加,诱导心肌细胞炎症反应^[7]。研究表明,TLR4-NF- κ B 信号转导通路活化过程中产生多种炎症因子,这些炎症因子参与了心肌细胞炎症反应过程,并且在心肌肥厚、心肌细胞调亡等病理生理过程中发挥着重要的作用^[8]。

既往研究表明 Ang II 刺激可引起心肌细胞肥厚,肥厚的心肌细胞肌动蛋白重组,总蛋白含量升高,ANP 上调^[9-10]。ANP 由心肌细胞合成和分泌,在心肌肥厚过程中,伴随有 ANP 升高,是公论的反映心肌细胞肥大的特征性指标^[11]。早期研究表

明,在许多组织或器官,如肾脏、心脏和血管中存在着独立的局部 RAS 系统,局部组织中的 Ang II 具有胞内作用,可促进心肌细胞的 DNA 合成, mRNA 转录,导致细胞肥大^[12]。正常心肌组织中 TNF- α 表达水平较低或不表达,肥厚心肌组织 TNF- α 表达明显增加^[13]。Sriramula 等^[14]在动物实验研究发现,在由血管紧张素 II 诱导的心肌肥厚过程中, TNF- α 基因敲除大鼠相比野生型大鼠心肌肥厚明显减轻,提示 TNF- α 在血管紧张素 II 诱导的心肌肥厚中起重要作用。Devorah Gurantz 等^[15]报道 TNF- α 使心肌中成纤维细胞的血管紧张素 II AT1 受体上调,两者均可以在心肌组织局部合成分泌,具有自分泌和旁分泌作用,共同参与心肌病变的进展和演变过程。本实验中用 Ang II 刺激心肌细胞后, TLR4 表达增加, TNF- α 分泌增多,同时心肌细胞总蛋白含量和反映心肌肥大指标 ANP 增多。加用黄芪多糖后,心肌细胞 TLR4 表达下降, TNF- α 分泌下降,心肌细胞蛋白含量和 ANP 下降,随着剂量增加,这种作用逐渐增强,表明黄芪多糖可抑制 Ang II 刺激引起的心肌细胞肥大和炎症反应。

综上所述,黄芪多糖 Ang II 刺激引起的心肌细胞肥厚和炎症反应有良好的保护作用,黄芪多糖的这种作用为高血压心肌损害的防治研究提供了新的思路 and 理论依据。

4 参考文献

- [1] Min Q, Bai YT, 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(12):1661–1664.
- [2] Holownia A, Braszko JD. The effect of angiotensin II and IV on ERK1/2 and CREB signalling in cultured rat astroglial cells [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2007(3):157–163.
- [3] Rodriguez IB, Vaziri ND, Johnson RJ. Inflammation, angiotensin II, and hypertension [J]. *Hypertension*, 2008(5):135–136.
- [4] De Giusti VC, Garcarena CD, Aiello EA. Role of reactive oxygen species (ROS) in angiotensin II-induced stimulation of the cardiac Na⁺/HCO₃⁻ cotransport [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009(5):716–722.
- [5] Kaczorowski DJ, Nakao A, Vallabhaneni R, et al. Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart [J]. *Transplantation*, 2009(10):1455–1463.
- [6] Bernard NJ, O'Neill LA. Mal, more than a bridge to MyD88 [J]. *IUBMB Life*, 2013(9):777–786.
- [7] Wang J, Zhang Y, Guo LL, et al. Salvianolic acid B inhibits the TLR4-NF κ B-TNF α pathway and attenuates neonatal rat cardiomyocyte injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Integr Med*, 2011(10):775–779.
- [8] Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, et al. Proinflammatory cytokines in heart failure: double edged swords [J]. *Heart Fail Rev*, 2010(6):543–562.
- [9] Yu L, She T, Li M, et al. Tetramethylpyrazine inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and tumor necrosis factor- α secretion through an NF- κ B-dependent mechanism [J]. *Int J Mol Med*, 2013(3):717–722.
- [10] 汪海宁, 刘晨, 李艳辉, 等. 自噬在血管紧张素 II 诱导心肌细胞肥大中的作用 [J]. *中山大学学报*, 2012(4):440–443.
- [11] Leite MF, Page E, Ambler SK. Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype [J]. *Am J Physiol*, 1994(6):193–203.
- [12] Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system [J]. *Circulation*, 1993(6):1816–1828.
- [13] Wu QQ, Xu M, Yuan Y, et al. Cathepsin B deficiency attenuates cardiac remodeling in response to pressure overload via TNF- α /ASK1/JNK pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015(9):1143–1154.
- [14] Sriramula S, Haque M, Maild DS, et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in angiotensin II-mediated effects on appetite, hypertension and cardiac hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2008(5):1345–1351.
- [15] Devorah G, Randy T, Francisco J, et al. Tumor necrosis factor- α upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts [J]. *Circ Res*, 1999(7):272–279.

(2016-02-17 收稿, 2016-03-29 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华