

黄芪甲苷对高糖诱导的乳大鼠心肌肥大的保护作用

李香华¹, 王洪新², 王秋宁³

(辽宁省心脑血管药物基础研究重点实验室 辽宁医学院药物研究所, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 黄芪甲苷; 高糖; 心肌肥厚

[摘要] 目的 探讨黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞肥大的保护作用。方法 利用体外培养模型, 以 25 mmol/L 高糖诱导心肌肥大。新生大鼠心肌细胞分为正常对照组、高糖组、高糖 + 16 μ mol/L 黄芪甲苷组、高糖 + 32 μ mol/L 黄芪甲苷组和高糖 + 64 μ mol/L 黄芪甲苷组, 用 Lowry 法检测心肌细胞蛋白含量; 消化分离法及计算机图像分析系统检测心肌细胞体积; MTT 法检测细胞存活率; 采用 Till 阳离子测定系统, 以 Fura-2/AM 为荧光探针, 观察心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的瞬间变化。结果 与正常对照组相比, 高糖使心肌细胞蛋白质含量增加 35.7%, 体积增大 81.3%, $[Ca^{2+}]_i$ 瞬变增加 62.5%, 心肌细胞存活率降低 36.1%。加入 16 μ mol/L 黄芪甲苷后, 与高糖组相比, 心肌细胞蛋白质的含量和细胞体积分别降低 20.3% 和 10.6%, $[Ca^{2+}]_i$ 瞬变变化降低 8.0%, 心肌细胞的存活率增加 20.0%。结论 黄芪甲苷对高糖诱导的乳大鼠心肌细胞肥大具有保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effects of Astragaloside ⑤ on High Glucose Induced Cardiac Myocytes Hypertrophy in Neonatal Rats

LI Xianghua¹, WANG Hongxin², and WANG Qiuning³

(Provincial Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Drug Basic Research, Liaoning Drug Research Institute, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

[KEY WORDS] Astragaloside ⑤ High Glucose Cardiac myocyte Hypertrophy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of astragaloside ⑤ on high glucose induced cardiac myocyte hypertrophy in neonatal rats. **Methods** Myocardial cells of neonatal rats were cultured in vitro, the hypertrophic myocytes were induced by 25 mmol/L high glucose (HG). Cultured neonatal rats' cardiac myocytes were divided into normal group, HG group, HG + 16 μ mol/L astragaloside ⑤, HG + 32 μ mol/L astragaloside ⑤, HG + 64 μ mol/L astragaloside ⑤. 48 h later, total protein content was assayed by Lowry method. The cardiac myocyte volume was measured by computer photograph analysis system. The cardiac myocyte viability was analysed by MTT assay. $[Ca^{2+}]_i$ transient was measured by Till image system and by cell-loading Fura-2/AM. **Results** Compared with normal control group, HG increased the total protein content, cardiac myocytes size, $[Ca^{2+}]_i$ transient by 35.7%, 81.3%, 62.5% and decreased the cardiac myocyte viability by 36.1%. Compared with HG group, astragaloside ⑤ 16 μ mol/L reduced the total protein content, cardiac myocytes size, $[Ca^{2+}]_i$ transient by 20.3%, 10.6%, 8.0% and cardiac myocyte viability was increased by 20.0%.

There was dose-dependent relationship. **Conclusion** astragaloside ⑤ could protect cardiac myocyte hypertrophy in glucose-induced rats.

糖尿病心肌病是糖尿病的一个独立的心脏并发症, 最新研究认为, 糖尿病心肌病是以心肌细胞肥大、凋亡以及心肌间质纤维增生为主要病理特征的心肌病, 临床主要表现为左心室重构和心脏功能缺陷, 随着病变进展出现心脏收缩功能异常^[1], 是导致糖尿病患者心力衰竭的主要原因。发病机制可能与心肌细胞的代谢障碍、钙离子转运以及自由基异

常有关。

黄芪甲苷 (astragaloside ⑤ AS- ⑤) 是从传统中药黄芪中提取的一种皂苷类的单体, 是黄芪的主要有效成分之一。研究表明, 黄芪甲苷在心血管疾病中的作用广泛, 尤其是对心肌重构的保护。在动物在体实验中, 许晓乐等^[2]采用皮下注射异丙肾上腺素致小鼠心肌肥厚模型, 黄芪甲苷 80 mg/kg 可显著降低小鼠心重指数和左心指数, 黄芪甲苷 40 mg/kg 可显著降低左心指数, 表明黄芪甲苷能抑制异丙肾上腺素引起的心脏肥厚。石海莲等^[3]研究表明黄芪甲苷能够抑制压力超载型大鼠心肌肥大。有研究者发现黄芪甲苷在钙离子转运过程中, 可通过干扰 SR 内 Ca^{2+} 的转运来改善心肌的收缩和舒张, 保护

[收稿日期] 2010-08-22 [修回日期] 2010-11-08

[基金项目] 国家自然科学基金 (30973898); 辽宁省教育厅优秀人才基金 (2008RC33)

[作者简介] 李香华, 硕士, 主要从事心血管药理学研究, E-mail 为 hblxianghua@163.com。通讯作者王洪新, 博士, 教授, 主要从事心血管药理学及天然药物研究, E-mail 为 jhxwang@163.com。

心脏^[4]。在研究黄芪甲苷对大鼠心肌局部缺血的影响时,发现黄芪甲苷可显著改善心肌的功能和血流动力学,降低心肌中 $[Ca^{2+}]_i$,提示黄芪甲苷可能通过降低心肌中钙离子的过度蓄积而改善心肌缺血时的心脏的功能^[5]。目前,黄芪甲苷在糖尿病心脏病引发的心肌肥厚中的保护作用尚无报道,本实验主要利用体外培养的方法,观察黄芪甲苷对高糖诱导的大鼠心肌细胞肥大的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物、药品和试剂

出生2~3天的SD乳大鼠雌雄不限,由辽宁医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(辽)2003-0007。黄芪甲苷购自成都普思生物科技有限公司;低糖培养基和胰蛋白酶等购自美国Sigma公司。小牛血清为杭州四季青生物材料所产品。其他试剂均为分析纯。

1.2 大鼠心肌原代培养、分组及给药方法

在无菌条件下,取出生2~3天的SD乳大鼠,开胸取出心脏,用D-Hanks液洗涤3次后,剪成1 mm³的小块,加入0.8 g/L的胰蛋白酶消化细胞,将消化完毕的细胞,加入体积分数为15%的小牛血清,84% DMEM培养基及1%的双抗液(含100 ku/L青霉素,100 mg/L链霉素),吹打均匀后以 1×10^8 个/L的密度接种于24孔培养板中,每孔加入1 mL,置于0.05 CO₂及0.95空气的37℃ CO₂孵箱中培养。常规培养2天后,换液,为了减少血清中成分对实验结果的影响,换液时更换含体积分数为0.04%的小牛血清的培养基及各种浓度的试剂。实验共分5组,设正常对照组,25 mmol/L高糖(high glucose, HG)组, HG+16 μmol/L AS-₁组, HG+32 μmol/L AS-₂组, HG+64 μmol/L AS-₃组,给药48 h后进行各项指标测定。

1.3 培养心肌细胞蛋白含量的测定

吸去细胞板内的培养液,用PBS液快速冲洗3次后,加入10 g/L SDS 0.5 mL溶解细胞,根据计数,每孔细胞数约为 5×10^5 个,Lowry等^[6]方法测定每孔细胞蛋白含量。

1.4 细胞体积的测定

细胞体积是通过测量细胞直径获得的。用D-Hanks液快速冲洗长满细胞的培养孔3次,每次加0.3 mL胰蛋白酶1 g/L,放入37℃恒温箱中30 min后,再加入0.2 mL含体积分数为0.1血清的培养基终止消化,每组2孔,将2孔细胞合并收集注入一细

胞室内(该细胞室底部是一经硅化的盖玻片,以防心肌细胞贴壁),在放大400倍的倒置显微镜下观察细胞,几乎均呈球形。用计算机CIAS大恒细胞图像分析系统测量单个细胞的直径,进而计算出细胞的体积。每组随机选择4个视野,每个视野测20个细胞。

1.5 MTT法测定心肌细胞的存活率

取1.2中经各药物处理48 h的细胞接种于96孔板中,加入MTT(5 g/L)20 μL,置37℃,5% CO₂培养箱中孵育4 h后去除培养基后,加入150 μL DMSO溶解结晶体,轻轻晃动15~20 min后,酶标仪在波长为570 nm处测定吸光度(A)值,用此表示细胞的存活率。

1.6 Ca^{2+} 的测定

将长有自发性搏动的心肌细胞的盖玻片从培养板中取出置于含有Fura-2/AM(3 μmol/L)的DMEM培养基中,其中含有白蛋白0.2%,在37℃水浴中孵育30 min,取出盖玻片,用HEPES缓冲液冲洗后,放于荧光显微镜下的灌流槽中,恒温37℃,用HEPES缓冲液冲洗灌流,灌流速度为1 mL/min,所有药物均在指定时间加入灌流液中。所用的测定仪器为Till阳离子测定系统(德国)采用DM3000软件,激发光波长分别为340 nm及380 nm,发射光波长为505 nm,采样间隔为300 ms。每次选取5~10个细胞,测量心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的瞬间变化,连续记录心肌细胞在给药前后的荧光强度。根据文献[7]方法计算心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$;计算 $[Ca^{2+}]_i$ 前应减去细胞自身的荧光。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在高糖存在下,不同处理因素对心肌细胞蛋白含量的影响

与正常对照组相比,高糖组心肌细胞蛋白含量增加35.7%,与HG组相比,黄芪甲苷低剂量组(16 μmol/L)、中剂量组(32 μmol/L)、高剂量组(64 μmol/L)分别降低20.3%, 27.4%, 35.3%,黄芪甲苷低剂量组、中剂量组和高剂量组与高糖组差异存在显著性。表明黄芪甲苷低、中、高剂量组均能抑制HG诱导的心肌细胞蛋白含量的增加。低剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞蛋白增加具有抑制作用

($P < 0.05$), 中剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞蛋白增大的阻断作用进一步增强 ($P < 0.01$), 与中剂量组相比, 高剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞蛋白增加的抑制作用也进一步增强 ($P < 0.05$), 提示低中高剂量的黄芪甲苷均可阻断 HG 诱导的心肌细胞蛋白增加。

表 1 不同药物对高糖诱导的乳大鼠心肌细胞蛋白含量的影响

分 组	蛋白浓度 / μg (5×10^5 cells)
正常对照组	17.1 $\pm$ 1.5
HG (25 mmol/L) 组	26.6 $\pm$ 1.6 ^a
HG + AS- ② 16 $\mu\text{mol/L}$ 组	21.2 $\pm$ 1.6 ^{be}
HG + AS- ② 32 $\mu\text{mol/L}$ 组	19.3 $\pm$ 1.5 ^c
HG + AS- ② 64 $\mu\text{mol/L}$ 组	17.2 $\pm$ 1.4 ^{cd}

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ c为 $P < 0.01$, 与 HG 组比较; d为 $P < 0.05$ e为 $P < 0.01$, 与中剂量组比较。

2.2 在高糖存在下, 不同处理因素对心肌细胞体积的影响

与正常对照组相比, 高糖组心肌细胞体积增大 81.3%, 与 HG 组相比, 黄芪甲苷低剂量组、中剂量组、高剂量组心肌细胞体积均减小, 分别减小 10.6%, 37.9%, 44.7%, 而与黄芪甲苷低剂量组相比, 中剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞体积增大的阻断作用进一步增强 ($P < 0.01$), 同样与中剂量组相比, 高剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞体积增大的抑制作用也进一步增强 ($P < 0.05$), 提示低剂量和中高剂量黄芪甲苷均可阻断高糖诱导的心肌细胞体积增大。

表 2 不同药物对高糖诱导的乳大鼠心肌细胞体积的影响

分 组	Cell size / μm^3
正常对照组	1 224 $\pm$ 144
HG (25 mmol/L) 组	2 219 $\pm$ 181 ^a
HG + AS- ② 16 $\mu\text{mol/L}$ 组	1 984 $\pm$ 137 ^{be}
HG + AS- ② 32 $\mu\text{mol/L}$ 组	1 378 $\pm$ 125 ^c
HG + AS- ② 64 $\mu\text{mol/L}$ 组	1 227 $\pm$ 145 ^{cd}

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ c为 $P < 0.01$, 与 HG 组比较; d为 $P < 0.05$ e为 $P < 0.01$, 与中剂量组比较。

2.3 黄芪甲苷对心肌细胞存活率的影响

与正常对照组相比, HG 组细胞活力降低 36.1%, 而与 HG 组相比, 黄芪甲苷低剂量、中剂量、高剂量组的细胞存活率分别增加 20.0%, 34.0%,

52.0%, 黄芪甲苷低剂量组对高糖诱导的心肌细胞存活率降低具有抑制作用 ($P < 0.05$)。而与黄芪甲苷低剂量组相比, 黄芪甲苷中剂量组对高糖诱导的心肌细胞存活率降低的阻断作用进一步增强 ($P < 0.01$), 同样与中剂量组相比, 高剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞存活率降低的抑制作用也进一步增强 ($P < 0.05$), 提示黄芪甲苷低中高剂量组均可阻断 HG 诱导的心肌细胞存活率的降低。

表 3 不同药物对高糖诱导的乳大鼠心肌细胞活力的影响

分 组	A ₅₇₀ 值
正常对照组	0.78 $\pm$ 0.03
HG (25 mmol/L) 组	0.50 $\pm$ 0.04 ^a
HG + AS- ② 16 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.60 $\pm$ 0.04 ^{be}
HG + AS- ② 32 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.67 $\pm$ 0.02 ^c
HG + AS- ② 64 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.76 $\pm$ 0.03 ^{cd}

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ c为 $P < 0.01$, 与 HG 组比较; d为 $P < 0.05$ e为 $P < 0.01$, 与中剂量组比较。

2.4 不同浓度黄芪甲苷对高糖作用的心肌细胞 [Ca²⁺] 瞬间变化的影响

25 mmol/L 高糖能使心肌细胞 [Ca²⁺] 瞬间变化幅度增高频率加快, 但不影响基线水平, 与正常对照组间差异存在着显著 ($P < 0.01$)。黄芪甲苷低、中、高剂量组均能降低 HG 诱导的心肌细胞 [Ca²⁺] 瞬间变化幅度和频率。而与黄芪甲苷低剂量组相比, 中剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞 [Ca²⁺] 瞬间变化幅度和频率增加的阻断作用进一步增强 ($P < 0.01$), 同样与中剂量组相比, 高剂量黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞 [Ca²⁺] 瞬间变化幅度和频率增加的抑制作用也进一步增强 ($P < 0.05$), 低中高剂量黄芪甲苷均可阻断高糖诱导的心肌细胞 [Ca²⁺] 瞬间变化幅度和频率的增加。

表 4 不同药物对高糖诱导的乳大鼠心肌细胞 [Ca²⁺] 瞬间变化的影响

分 组	[Ca ²⁺] i/nmol/L		f/min
	峰值	静息	
对照组	176 $\pm$ 11	104 $\pm$ 8	52.1 $\pm$ 2.4
HG (25 mmol/L) 组	286 $\pm$ 11 ^a	102 $\pm$ 8	79.9 $\pm$ 1.3 ^a
HG + AS- ② 16 $\mu\text{mol/L}$ 组	263 $\pm$ 10 ^b	103 $\pm$ 5	74.9 $\pm$ 2.1 ^{be}
HG + AS- ② 32 $\mu\text{mol/L}$ 组	204 $\pm$ 11 ^c	102 $\pm$ 7	58.0 $\pm$ 1.9 ^c
HG + AS- ② 64 $\mu\text{mol/L}$ 组	176 $\pm$ 9 ^{cd}	102 $\pm$ 9	54.1 $\pm$ 2.0 ^{cd}

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ c为 $P < 0.01$, 与 HG 组比较; d为 $P < 0.05$ e为 $P < 0.01$, 与中剂量组比较。

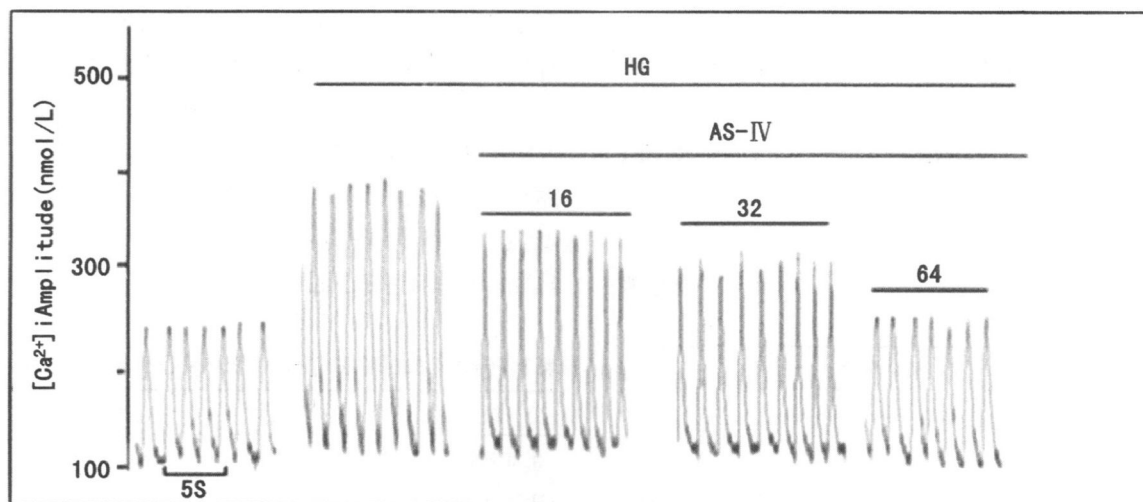


图 1 不同药物对高糖诱导的乳大鼠心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬间变化的影响

3 讨论

心肌肥大是 2 型糖尿病患者常见并发症, 是糖尿病心病的一个重要的特征, 也是糖尿病病人并发心力衰竭和猝死的病理生理基础。大量研究表明, 心肌细胞 Ca^{2+} 超载是心肌功能降低的直接原因, 心肌细胞中 Ca^{2+} 转运的改变与糖尿病本身有关, 在高糖环境下, 高糖可诱导心肌细胞肥大^[8]。

目前关于黄芪甲苷能降低 Ca^{2+} 超载, 保护心肌, 已有相关报道。如高卫真等^[9, 10]观察黄芪甲苷对阿霉素致心肌细胞氧化损伤的影响, 结果黄芪甲苷可使阿霉素损伤的心肌细胞 MTT 代谢率提高, $[Ca^{2+}]_i$ 降低。提示黄芪甲苷能够抑制氧自由基生成, 从而减轻氧自由基引起的心肌损伤, 使细胞的生存能力提高。Meng 等^[11]在研究黄芪皂苷对乳鼠心肌细胞的钙超载的影响时发现, 黄芪皂苷可以改善细胞的能量代谢, 保护心肌。

本研究也发现黄芪甲苷提高了心肌细胞 MTT 代谢率, $[Ca^{2+}]_i$ 降低, 虽然尚不清楚黄芪甲苷对心肌细胞肥大保护作用的机制, 但是结果显示黄芪甲苷通过减少细胞的体积和蛋白含量, 影响心肌细胞肥大, 来改善心肌细胞重塑, 可以预防高糖诱导的心肌细胞钙超载, 提高心肌细胞代谢率, 进一步证明黄芪甲苷具有保护心肌细胞肥大的作用。

有研究表明黄芪甲苷对细胞能量代谢有一定的作用^[12, 13], 而黄芪甲苷对高糖诱导的心肌细胞肥大, 是否与改善细胞能量代谢, 抑制细胞凋亡等有关尚不清楚, 其作用机制尚需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Vaughan TR, Bell DS. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Heart Fail Clin*, 2006, 2 (1): 71-80
- [2] 许晓乐, 季晖, 谷舒怡, 等. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚的保护作用 [J]. *中国药科大学学报*, 2008, 38 (5): 451-455
- [3] 石海莲, 马春来, 刘燕, 等. 黄芪皂苷甲抑制压力过载型心肌肥厚大鼠肾素血管紧张素的过度激活 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34 (24): 242-245
- [4] Xu XL, Ji H, Gu SY, et al. Modification of alterations in cardiac function and sarcoplasmic reticulum by astragaloside in myocardial injury in vivo [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568 (1-3): 203-212
- [5] Li ZP, Cao Q. Effects of astragaloside on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23 (10): 898-904
- [6] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193 (1): 265-275
- [7] Chen S, Khan ZA, Kamazyn M, et al. Role of endothelin-1, sodium hydrogen exchanger-1 and mitogen activated protein kinase (MAPK) activation in glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2007, 23 (5): 356-367
- [8] Wang HX, Kwan CY, Wong TM. Electrically induced intracellular Ca^{2+} transient in single ventricular myocytes: a useful parameter for the study of cardiac drugs [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1999, 26 (10): 835-836
- [9] 高卫真, 康毅, 姜建石, 等. 黄芪甲苷对心肌细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *中国心血管杂志*, 2005, 10 (3): 166-169
- [10] Xu XL, Chen XJ, Ji H, et al. Astragaloside improved intracellular calcium handling in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes via the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase [J]. *Pharmacology*, 2008, 81 (4): 325-332
- [11] Meng D, Chen XJ, Bian YY, et al. Effect of astragalosides on intracellular calcium overload in cultured cardiac myocytes of neonatal rats [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33 (1): 11-20
- [12] Xu ME, Xiao SZ, Sun YH, et al. Effects of astragaloside on pathogenesis of metabolic syndrome in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27 (2): 229-236
- [13] Jiang B, Yang Y, Jin H, et al. Astragaloside attenuates lipolysis and improves insulin resistance induced by TNF alpha in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Phytother Res*, 2008, 22 (11): 1434-439

(此文编辑 李玲玲)