

# 黄芪及其活性成分黄芪多糖对心衰模型小鼠同型半胱氨酸、核因子- $\kappa$ B 和 D-二聚体水平的影响

柴连海, 王丽丽, 陈文生\*

(唐山市工人医院, 河北唐山 063000)

**[摘要]** **目的:**探究中药黄芪及其活性成分黄芪多糖对心衰模型小鼠同型半胱氨酸(Hcy),核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和D-二聚体(D-D)水平的影响。**方法:**SPF级雄性小鼠100只,随机选取20只为正常组,另80只ip异丙肾上腺素建立心衰模型,造模成功后分为黄芪组(3 g·kg<sup>-1</sup>),黄芪多糖组(3 g·kg<sup>-1</sup>),阳性药组(地高辛,0.05 mg·kg<sup>-1</sup>)和模型组,每组各20只,黄芪组以3 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>剂量ig黄芪提取物原液,黄芪多糖组按3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>剂量ip,阳性药组以0.05 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>剂量ig地高辛,模型组无菌生理盐水3 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>ig,ip与ig均为日1次,连续干预4周后,取其心尖部心肌组织进行病理学检查,腹主动脉取血进行Hcy,NF- $\kappa$ B和D-D水平的检测。**结果:**与正常组比较,模型组Hcy,NF- $\kappa$ B和D-D水平明显升高( $P < 0.05$ ),病理结果显示模型组心肌纤维数量减少,染色变浅,横纹模糊,部分坏死灶被瘢痕组织代替;与模型组比较,各给药组Hcy,NF- $\kappa$ B和D-D水平明显降低( $P < 0.05$ ),病理结果显示各给药组心尖部心肌组织坏死病灶明显减轻;与黄芪组及地高辛组比较,黄芪多糖组效果更明显。**结论:**中药黄芪及其活性成分黄芪多糖对心衰模型小鼠Hcy,NF- $\kappa$ B和D-D有明显的降低作用,但后者的作用效果好于前者。

**[关键词]** 黄芪; 黄芪多糖; 同型半胱氨酸; 核因子- $\kappa$ B; D-二聚体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0142-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170142

**Effect of Astragali Radix and Its Active Ingredient Astragalus Polysaccharideits on Homocysteine, NF- $\kappa$ B and D-Dimer in Heart Failure Model Mice** CHAI Lian-hai, WANG Li-li, CHEN Wen-sheng\* (Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Astragali Mongolici Radix and its active ingredient Astragali Mongolici Radix polysaccharideits on the expressions of homocysteine (Hcy), nuclear factor (NF- $\kappa$ B) and D-dimer (D-D) in heart failure model mice. **Method:** Totally 100 SPF male mice were divided into the normal group (20 mice) and the model group (80 mice) by random. The heart failure mice model was induced through the intraperitoneal injection with isoproterenol. After the successful modeling, they were randomly divided into the RA group (Astragali Mongolici Radix, 3 g·kg<sup>-1</sup>), the APS group (Astragali Mongolici Radix polysaccharideits, 3 g·kg<sup>-1</sup>), the positive medicine group (Digoxin, 0.05 mg·kg<sup>-1</sup>) and the model group, with 20 mice in each group. The RA group was orally given 3 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Astragali Mongolici Radix extract liquid (1 g·mL<sup>-1</sup>); the APS group was intraperitoneally injected with 3 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of Astragali Mongolici Radix polysaccharide; the positive drug group was orally given 0.05 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of digoxin; the model control group was orally given 3 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of sterile saline. All of them were treated for 4 weeks. After the experiment, their apex cordis and myocardial tissues were collected for pathological examination. The blood was drawn from abdominal arteries for detecting the expressions of Hcy, NF- $\kappa$ B and D-D. **Result:** The expressions of Hcy, NF- $\kappa$ B and D-D in the model group were higher than that of the normal group ( $P < 0.05$ ). According to the pathological

**[收稿日期]** 20150121(017)

**[基金项目]** 2013年唐山市科学技术研究与发展指导计划项目(13130269b)

**[第一作者]** 柴连海,主管检验师,从事血同型半胱氨酸方面相关研究工作,Tel:15176537748,E-mail:dr\_clh@126.com

**[通讯作者]** \*陈文生,博士,副主任医师,从事冠心病和心力衰竭等的诊断和治疗工作,Tel:15176537748,E-mail:drchenwensheng@126.com

results, the model group showed less myocardial fiber, lighter staining, vague bands and partial replacement of necrotic lesions with scar tissues. Compared with the model group, all of treatment groups showed obvious reductions in Hcy, NF- $\kappa$ B and D-D levels ( $P < 0.05$ ). The pathological results also showed significant reduction in necrotic lesions in apex cordis and myocardial tissues in all of treatment groups. Compared with the RA group and the Digoxin group, the APS showed more significant effects. **Conclusion:** Astragali Mongolici Radix and its active ingredient APS could obviously reduce the expressions of Hcy, NF- $\kappa$ B and D-D in mice with heart failure; but the latter drug has a better effect than the former.

[Key words] Astragali Mongolici Radix; Astragali Mongolici Radix polysaccharide; homocysteine; nuclear factor- $\kappa$ B; D-dimer

心力衰竭(heart failure, HF),指心脏不能搏出同静脉回流及身体组织代谢所需相称血液供应,往往由各种疾病引起心肌收缩能力减弱,从而使心脏的血液输出量减少,不足以满足机体的需要,并由此产生一系列症状和体征<sup>[1]</sup>。黄芪是豆科多年生草本植物,已有 2 000 多年的应用历史<sup>[2]</sup>,是常用的补气中药,在治疗如病毒性心肌炎、冠心病、心力衰竭的治疗上已获得了很好的疗效和理论基础<sup>[3]</sup>。黄芪多糖是黄芪提取物的主要成分,其可以下降总外周阻力、引起心排出量增加、改善心肌的供氧,抗炎免疫调节活性等作用<sup>[4-5]</sup>。中药益气法治疗心衰的理念与改善衰竭心脏能量代谢有共通之处。从黄芪中所提取出的黄芪甲苷、黄芪多糖、黄芪总提取物都对心功能改善均具有很好的作用,目前在临床上被广泛用于治疗心脏疾患。研究表明,黄芪甲苷主要是通过其抗氧化作用而保护心脏功能。虽然有研究展示黄芪等补气中药及/或有效成分也有调节其他组织器官脂质和糖代谢的功能,但对于其是否通过直接参与调解心肌细胞能量底物的选择、利用及产能而发挥其改善心脏功能尚无人涉足。因此本文以黄芪用药的主要形式为线索,探究了黄芪以及其有效成分黄芪多糖,在治疗心衰模型小鼠过程中对同型半胱氨酸(Hcy),核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和 D-二聚体(D-D)水平的影响。

## 1 方法

**1.1 动物** 清洁级小鼠 100 只,雄性,10 周龄,体重(22.79  $\pm$  1.6) g,由北京维通利华实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京) 2002-0009。

**1.2 药物及试剂** 注射用黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司,黄芪注射液,批号 20130825),黄芪饮片购自北京同仁堂药房(黄芪饮片 9.6 g,粉碎后水煮 3 次,过滤,浓缩,生药含量(1 g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>),地高辛(上海信谊药厂有限公司,批号 20121210),兔抗人 NF- $\kappa$ B 蛋白多克隆抗体、兔抗人 D-D 蛋白多克隆抗

体,以上试剂均购自武汉博士德公司,浓缩型 DAB 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 K1266071)。

**1.3 仪器** 制胶、电泳及转膜仪[美国威泰克公司(wealtec)elite300 plus],LC-9A 型色谱仪(徐州三矿通测控技术有限公司),VEVO 7.0 超声显像仪等(扬州康岭医用电子有限公司)。

## 2 方法

**2.1 模型的建立**<sup>[6]</sup> 随机选取小鼠 80 只进行心衰模型复制,连续腹腔注射异丙肾肾上腺素每次 3 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>,2 次/d,其余小鼠作为正常组,腹腔注射等剂量的生理盐水,连续干预 4 周,对小鼠进行心脏彩超测定,测定心脏射血分数。

**2.2 分组及处理** 心衰模型小鼠随机分为模型组、黄芪组、黄芪多糖组和阳性药组,每组 20 只,未经干预的小鼠作为正常组。造模后第 4 周开始,黄芪组每日 1 次按 3 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 剂量 ig 黄芪提取物原液(1 g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>),黄芪多糖组每日 1 次按 3 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> ig 黄芪多糖注射液(质量浓度为 20 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),阳性药组每日 1 次按 0.05 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> ig 地高辛(质量浓度为 0.25 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),正常组与模型组每日 ig 无菌生理盐水 3 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>,连续 4 周,黄芪组、黄芪多糖组及阳性药给药剂量均参照文献[7]方法。

## 2.3 检测指标及观察方法

**2.3.1 心肌病理学形态** 各组小鼠麻醉后立即开胸,剪下心脏取心尖部心肌,冲洗干净后,用 4% 多聚甲醛溶液固定。48 h 后常规脱水、石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜观察。

**2.3.2 血浆 Hcy 水平测定** 取各组小鼠颈动脉血浆标本,采用高效液相色谱(HPLC)分析法<sup>[8]</sup>测定血浆 Hcy 水平。

**2.3.3 NF- $\kappa$ B 和 D-D 水平测定** 本研究采用双抗体夹心法检测 NF- $\kappa$ B 和 D-D 水平。首先用还原酶抗体免疫实验微孔板,再分次向微孔中加入亚 NF-

$\kappa$ B 和 D-D, 与 NF- $\kappa$ B 和 D-D 水平标记的白介素抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 最后加底物 TMB 显色。显色后, TMB 在 HRP 酶的催化下发生连续的颜色转化, 最后变为黄色。由于颜色深浅与标本血清中的白介素浓度呈正比例关系, 用全自动酶标仪测定标本的吸光度 (A), 最终通过绘制标准曲线可精确计算对照品中的 NF- $\kappa$ B 和 D-D 水平浓度。具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。

**2.4 统计学分析** 采用统计学软件 SPSS 19.0 进行统计学分析, 计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用卡方检验处理, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 模型验证** 小鼠自造模第 10 天左右出现明显的心衰体征, 表现为被毛松软、光泽减退、脱毛、精神状态差、活动及进食减少、体温下降、呼吸加快、被抓取时反抗减少等。行心脏无创心功能检测, 超声测

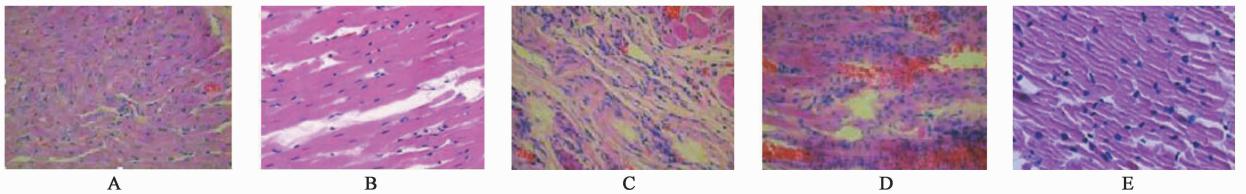
量依据美国超声心动学会制定的小鼠心衰诊断标准: 射血数 (ejection fraction, EF)  $\leq 45\%$ 。见表 1。

表 1 黄芪及其黄芪多糖对小鼠射血数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 1 Effects of Astragali Mongolici Radix and Astragali Mongolici Radix polysaccharides on number of ejection fraction ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	EF/%
模型	-	38.5 $\pm$ 8.2
黄芪	3	38.1 $\pm$ 7.2
黄芪多糖	0.06	37.9 $\pm$ 6.8
阳性药	$1.25 \times 10^{-5}$	36.8 $\pm$ 9.1

**3.2 对小鼠心脏病理学的影响** 治疗各组残余心肌细胞比较多, 心肌细胞稍肿胀, 横纹较清晰, 可见少量瘢痕组织及炎细胞。模型组心肌纤维数量减少, 染色变浅, 横纹模糊, 部分坏死灶被瘢痕组织代替; 正常组心肌细胞胞核清楚, 心肌纤维排列有序, 横纹清晰, 未见变性、坏死, 心肌细胞无肿胀。见图 1。



A. 黄芪 3  $g \cdot kg^{-1}$  组; B. 黄芪多糖 3  $mL \cdot kg^{-1}$  组; C. 地高辛 0.05  $mL \cdot kg^{-1}$  组; D. 模型组; E. 正常组

图 1 黄芪及其黄芪多糖对小鼠心脏病理学的影响 (HE,  $\times 100$ )

Fig. 1 Effects of Astragali Mongolici Radix and Astragali Mongolici Radix polysaccharides on cardiopathology in mice (HE,  $\times 100$ )

**3.3 对小鼠血浆 Hcy 水平的影响** 治疗后实验各组血浆 Hcy 水平均有所改善, 与模型组比较, 实验各组血浆 Hcy 水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与正常组相比, 黄芪组, 黄芪多糖组与地高辛组 Hcy 值较高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与黄芪组及地高辛组比较, 黄芪多糖组 Hcy 水平下降更为明显并且水平接近正常组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 黄芪及其活性成分黄芪多糖对小鼠 Hcy 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 2 Effects of Astragali Mongolici Radix and Astragali Mongolici Radix polysaccharides on Hcy level in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Hcy/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	
		治疗前	治疗后
正常	-	8.93 $\pm$ 2.12	9.15 $\pm$ 2.33
模型	-	25.65 $\pm$ 4.25	23.78 $\pm$ 3.54
黄芪	3	26.74 $\pm$ 4.18	14.13 $\pm$ 3.74 <sup>1)</sup>
黄芪多糖	0.06	27.21 $\pm$ 3.63	10.32 $\pm$ 3.11 <sup>1, 2)</sup>
地高辛	$1.25 \times 10^{-5}$	26.43 $\pm$ 3.88	15.65 $\pm$ 4.19 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与地高辛组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)。

( $P < 0.05$ ), 但其水平还是比正常组高。见表 3。

### 4 讨论

目前每年约有 300 万心衰患者, 并呈不断上升的趋势, 预计到 2016 年, 老年人心衰发病率将达到 50% 以上<sup>[9]</sup>。近年来对心衰的治疗水平也大大提高, 但心衰的死亡率仍然居高不下, 因此对于心衰的

**3.4 对小鼠 NF- $\kappa$ B, D-D 水平的影响** 治疗后实验各组血浆 NF- $\kappa$ B 水平均有明显改善, 与模型组比较, 实验各组 NF- $\kappa$ B 水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与正常组比较, 黄芪组, 黄芪多糖组与地高辛组 Hcy 值较高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与黄芪组及地高辛组比较, 黄芪多糖组 NF- $\kappa$ B 下降更为明显, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。治疗后实验各组 D-D 水平均有明显下降, 与模型组比较, 实验各组 D-D 水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与黄芪组及地高辛组比较, 黄芪多糖组 D-D 下降更为明显, 差异具有统计学意义

表 3 黄芪及黄芪多糖对小鼠 NF- $\kappa$ B, D-D 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 3 Effect of Astragali Mongolici Radix and Astragali Mongolici Radix polysaccharides on NF- $\kappa$ B and D-D levels in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	NF- $\kappa$ B/ng·L <sup>-1</sup>		D-D/mg·L <sup>-1</sup>	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常	-	35.62 ± 6.25	2.15 ± 0.35	2.15 ± 0.35	1.23 ± 0.85 <sup>1)</sup>
模型	-	109.43 ± 15.11	2.09 ± 0.54	2.09 ± 0.54	0.86 ± 0.65 <sup>1,2)</sup>
黄芪	3	107.55 ± 18.63	2.18 ± 0.62	2.18 ± 0.62	1.19 ± 0.7 <sup>1)</sup>
黄芪多糖	0.06	109.82 ± 17.99	2.14 ± 0.58	2.14 ± 0.58	2.15 ± 0.78
地高辛	1.25 × 10 <sup>-5</sup>	109.43 ± 15.11	0.41 ± 0.05	0.41 ± 0.05	0.40 ± 0.03

治疗研究从未间断。赵伟<sup>[10]</sup>研究结果表明,血浆中 Hcy, NF- $\kappa$ B 和 D-D 水平与心衰具有非常强的相关性,因此其对于心衰具有潜在的诊断价值。Hcy 具有激活氧化应激的过程,导致血管内皮损伤,促进动脉硬化的过程,近年来的研究显示 Hcy 参与多种心血管疾病的发生、发展,其水平的升高与心衰关系密切,在整个心衰过程中发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。近年来的研究发现,心力衰竭时,心脏可表达多种炎症因子,这些炎症因子则利用 NF- $\kappa$ B 通路作为其激活和持续释放的机制,从而引起或加重心衰,心衰患者血清 NF- $\kappa$ B 水平增高可能对心衰的加重有促进作用<sup>[12]</sup>,因此其在心衰发病中的作用受到关注。心衰患者的血液处于高凝状态, D-D 与心力衰竭的严重程度密切相关<sup>[13]</sup>。

本文研究结果显示黄芪及其活性成分黄芪多糖能够显著的降低心衰模型小鼠血浆中 Hcy, NF- $\kappa$ B 和 D-D 水平,并且黄芪多糖作用效果最好,其治疗后的这 3 组数值基本接近正常组。本研究结果也证实了黄芪总提取物对心衰具有较好的治疗效果,推测可能起主要作用的是总提取物中的黄芪甲苷的作用,但是由于中药的多成分特性,并且一些成分具有毒副作用,因此其治疗效果往往较慢,如本实验中黄芪组对于这 3 个指标的作用效果虽略好于地高辛,但显著低于黄芪多糖。黄芪多糖在治疗心疾时有增效减毒等优点,在临床上被视为理想的免疫增强剂。其目前已被证实能够改变 SERCA 的反应性,进而影响肌浆网的摄钙功能,从而增加其正性肌力作用。而这是黄芪煎剂不具有的作用,推断这是黄芪多糖药效优于黄芪的原因之一。

总之,中药黄芪及其活性成分黄芪多糖对心衰模型小鼠 Hcy, NF- $\kappa$ B 和 D-D 有明显的降低作用,对临床有指导意义,值得临床推广。

[参考文献]

[ 1 ] Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease

and stroke statistics-2008 update; a report from the American heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee[J]. Circulation, 2008, 117 (4): e25-e146.

[ 2 ] Yndestad A, Damas J K, Qie E, et al. Role of inflammation in the progression of heart failure[J]. Curr Cardiol Rep, 2007, 9(3): 236-241.

[ 3 ] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.

[ 4 ] Kell D T. Our future society; a global challenge[J]. Circulation, 1997, 95: 2459-2464.

[ 5 ] 李梅秀, 田国忠, 欧叶涛, 等. 大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定[J]. 解剖学研究, 2005, 27(3): 176-178.

[ 6 ] 朱丹, 郭艳红, 于海奕, 等. 两种早期心衰大鼠模型的建立和心功能的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 20-24.

[ 7 ] 王玉敏. 黄芪总提取物及黄芪有效成分治疗心衰的心肌力能学机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2012.

[ 8 ] Chen J O, Chen M Q, Zhao Q L, et al. Effect of folic acid in patients with coronary heart disease and two asymmetric dimethylarginine and homocysteine[J]. China Microcirculation, 2007, 3: 203-205.

[ 9 ] 胡献国. 补药之长-黄芪[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 13-14

[ 10 ] 赵伟. 同型半胱氨酸、核因子-B 与实验性大鼠心力衰竭相关性的研究[D]. 泰安: 泰山医学院, 2006.

[ 11 ] 郭瑞威, 杨丽霞. 核因子 2- $\kappa$ B 在心力衰竭治疗中的研究进展[J]. 心血管学进展, 2005, 26(3): 288-290.

[ 12 ] Zhang W D, Zhang C, Liu R H, et al. Preclinical pharmacokinetics and tissue distribution of a natural cardioprotective agent astragaloside IV in rats and dogs[J]. Life Sci, 2006, 79(8): 808-815.

[责任编辑 周冰冰]