

· 药理 ·

黄芪多糖干预缺血-再灌注损伤大鼠心肌黏附分子 ICAM-1, VCAM-1 及 p38 通路的研究

张莹¹, 徐冰², 李庆祥³, 朱海燕⁴, 刘蓓⁴, 朱陵群⁴, 陈立新^{4*}

(1. 北京市宣武中医医院心内科, 北京 100050;

2. 中国藏学研究中心北京藏医院, 北京 100029;

3. 首都医科大学附属北京安贞医院, 北京 100029;

4. 北京中医药大学附属东直门医院中医内科学教育部重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究黄芪多糖 (APS) 对大鼠缺血再灌注损伤心脏微血管内皮细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1) 和血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1), p38 MAPK 及 p38 MAPK 通路的影响。方法: 70 只 Wistar 大鼠随机分为 7 组, 假手术组、缺血再灌注组、APS 低、高剂量组 (20, 40 mg·kg⁻¹)、p28 MAPK 阻断剂 SB203580 组 (5 mg·kg⁻¹)、APS 低剂量 + SB203580 组 (APS 20 mg·kg⁻¹, SB203580 5 mg·kg⁻¹)、APS 高剂量 + SB203580 组 (APS 40 mg·kg⁻¹, SB203580 5 mg·kg⁻¹), 给药 30 d 后, 进行冠状动脉左前降支结扎 1 h 后除去丝线恢复血流, 心肌再灌注 2 h 后处死, 取心肌组织, Western blot 法测定心肌中 ICAM-1, VCAM-1, p38, p-p38 蛋白表达。结果: 缺血再灌注模型组 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达 (1.367 3 ± 0.131 9, 0.810 3 ± 0.051 3) 及信号通路蛋白 p-p38 (1.110 7 ± 0.046 1), 与假手术组 (0.535 0 ± 0.076 5, 0.345 3 ± 0.035 6, 0.576 7 ± 0.015 0) 比较均显著增加 ($P < 0.01$); 与缺血再灌注模型组比较, 黄芪多糖高剂量与 SB203580 联合应用时对 ICAM-1, VCAM-1, p-p38 蛋白表达 (0.870 2 ± 0.120 7, 0.474 5 ± 0.047 2, 0.807 5 ± 0.076 2) 的抑制作用, 要强于单独应用黄芪多糖高剂量 (1.225 1 ± 0.086 5, 0.657 3 ± 0.062 1, 1.056 3 ± 0.070 3) 或 SB203580 (1.013 1 ± 0.073 1, 0.562 3 ± 0.045 6, 0.942 3 ± 0.035 8) 的作用 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: 黄芪多糖与 SB203580 联合应用时, 可以明显抑制 p38 通路, 下调由其介导的 ICAM-1, VCAM-1 在内皮细胞质膜上的表达, 对抑制再灌注损伤有协同作用。

[关键词] 黄芪多糖; 内皮细胞黏附分子-1; 血管细胞黏附分子-1; 心肌缺血再灌注; p38 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0151-04

[doi] 10.11653/syfy2013120151

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130412.0934.001.html>

[网络出版时间] 2013-04-12 9:34

Protective Effects of Astragalus Polysaccharide on Adhesion Molecules ICAM-1, VCAM-1, p38 MAPK in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

ZHANG Ying¹, XU Bing², LI Qing-xiang³; ZHU Hai-yan⁴, LIU Bei⁴, ZHU Ling-qun⁴, CHEN Li-xin^{4*}

(1. Beijing Xuanwu Traditional Chinese Medicine Hospital, Beijing 100050, China;

2. China Tibetology Beijing Tibetan Medicine Hospital and Beijing National Hospital, Beijing 100029, China;

3. Anzhen Hospital, Capital Medical University & Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases,

Beijing 100029, China; 4. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of the Ministry of Educational,

Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 20121114(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30772805)

[第一作者] 张莹, 博士, 主治医师, 从事中医药对冠心病的防治研究, Tel: 010-63155217, E-mail: hmzy80@sohu.com

[通讯作者] * 陈立新, 博士, 主任医师, 从事中医药对冠心病的防治研究, Tel: 010-84013190, E-mail: rimh2006@yahoo.com.cn

[Abstract] Objective: To study the effects of astragalus polysaccharide (APS) on intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and p38 MAPK signal pathway in myocardial ischemia reperfusion injury. **Method:** Wistar rats were randomly divided into 7 groups: normal, model, APS (20 mg · kg⁻¹), APS (40 mg · kg⁻¹), SB203580 (5 mg · kg⁻¹), APS + SB203580 (APS 20 mg · kg⁻¹, SB203580 5 mg · kg⁻¹), APS + SB203580 (APS 40 mg · kg⁻¹, SB203580 5 mg · kg⁻¹). After 30 days of administration, the left anterior descending coronary artery ligation was performed. Western blot method was used for the determination of myocardial ICAM-1, VCAM-1, p38, p-p38 protein expression. **Result:** Compared with ICAM-1, VCAM-1, p-p38 of protein of the sham operation group (0.535 0 ± 0.076 5, 0.345 3 ± 0.035 6, 0.576 7 ± 0.015 0), in ischemia reperfusion model group ICAM-1 and VCAM-1 protein expression (1.367 3 ± 0.131 9, 0.810 3 ± 0.051 3) and signaling pathway of protein p-p38 protein (1.110 7 ± 0.046 1) were significantly increased (*P* < 0.01). Compared with a model group, APS combination with SB203580 showed a stronger inhibition on ICAM-1, VCAM-1, p-p38 protein (0.870 2 ± 0.120 7, 0.474 5 ± 0.047 2, 0.807 5 ± 0.076 2) expression than the single application of APS (1.225 1 ± 0.086 5, 0.657 3 ± 0.062 1, 1.056 3 ± 0.070 3) or action of SB203580 (1.013 1 ± 0.073 1, 0.562 3 ± 0.045 6, 0.942 3 ± 0.035 8) (*P* < 0.01, *P* < 0.05). **Conclusion:** APS combination with SB203580, can inhibit the p38 pathway by down-regulating ICAM-1, VCAM-1 expression in the endothelial plasma membrane, which contributed to the protection of ischemia and reperfusion injury.

[Key words] astragalus polysaccharide; ICAM-1; VCAM-1; myocardial ischemia reperfusion; p38 MAPK

黄芪多糖为黄芪的主要提取活性成分之一,具有抗病毒、抗辐射、抗衰老、抗应激、抗氧化、抗肿瘤等多种免疫促进或调节作用。笔者前期研究发现,黄芪多糖能够抑制心肌微血管内皮细胞缺氧再灌注损伤中微血管内皮细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1) 和血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 的蛋白表达,减轻由黏附分子介导中性粒细胞与血管内皮黏附所导致的炎症反应对血管的损伤,保护心脏功能^[1]。本研究将从动物方面进一步探讨黄芪多糖对心肌缺血再灌注损伤黏附分子 ICAM-1, VCAM-1 及 p38 信号通路的影响。

1 材料

1.1 动物 70 只 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 (225 ± 25) g,由北京医科大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(京)2006-0008。

1.2 试剂 注射用黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司,250 mg/支,批号 Z2004008);兔多克隆 VCAM-1 抗体(1:1 000,货号 ab134047)、兔多克隆 ICAM-1 抗体(1:1 000,货号 ab25375)均为 abcam 公司;兔多克隆 p38 抗体(1:1 000,货号 8690)、兔多克隆 p-p38 抗体(1:1 000,货号 4631)均为 Cell signal 公司;小鼠单克隆 GAPDH 抗体(1:20000,货号 sc-166574)为 Sigma 公司;IRDye700,IRDye 800 标记的荧光二抗;p38 MAPK 阻断剂 SB203580(货号 S8307, Sigma 公

司)。

1.3 仪器 CO₂ 恒温细胞培养箱:稳压稳流电泳仪、垂直电泳槽、半干转电转印仪 (Bio-Rad); Odyssey 红外荧光扫描成像系统 (LI-COR); 4 ℃ 低温高速离心机 (Thermo); 常温高速离心机 (Eppendorf); 超声波组织匀浆器 (Cole Parmer)。

2 方法

2.1 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的建立

2.1.1 模型建立 70 只 Wistar 大鼠,除正常死亡外,随机分为假手术组、缺血再灌注组、黄芪多糖低、高剂量组、SB203580 组 (p38 MAPK 阻断剂)、黄芪多糖低剂量 + SB203580 组、黄芪多糖高剂量 + SB203580 组。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支复制大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。大鼠冠脉结扎采纳文献报道方法并有所改进^[2-3]。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脉左前降支,除假手术组仅穿线不结扎外,其余各组以 0 号线立即结扎冠脉,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 30 s,1 h 后除去丝线,恢复血流,心肌再灌注 2 h 后处死。其中假手术组,开胸后穿线做套环,但不收紧结扎线。

2.1.2 给药方法 黄芪多糖低、高剂量组分别按

20, 40 mg·kg⁻¹, 尾静脉注射连续给药 30 d; SB203580 组(将 SB203580 溶于 DMSO 配成 5 g·L⁻¹ 溶液)在造模前 30 min 按 5 mg·kg⁻¹ 一次性尾静脉注射^[4]; 黄芪多糖低、高剂量 + SB203580 组分别按 APS 20, 40 mg·kg⁻¹, 尾静脉注射连续给药 30 d 后, 在造模前 30 min 按 5 mg·kg⁻¹ 将 SB203580 一次性尾静脉注射; 假手术组予等容积的生理盐水。

2.2 检测指标 大鼠的心肌组织标本留样, 对各组进行 ICAM-1, VCAM-1, p38, p-p38 的蛋白提取、定量, Western blot 分析。

2.3 数据处理 以 GAPDH 作为内参, 对目标蛋白的灰度值进行校正; 再以对照组作为 100%, 对其余各组进行校正。一批样本只有在 3 次的重复实验中结果稳定, 才可将其均值纳入统计学分析。

2.4 统计分析 采用 SPSS 13.0 软件分析, 多组数

据间差异用单因素方差分析(ANOVAS)并继之以 Newman Keul's post-hoc 检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 示有统计学差异。

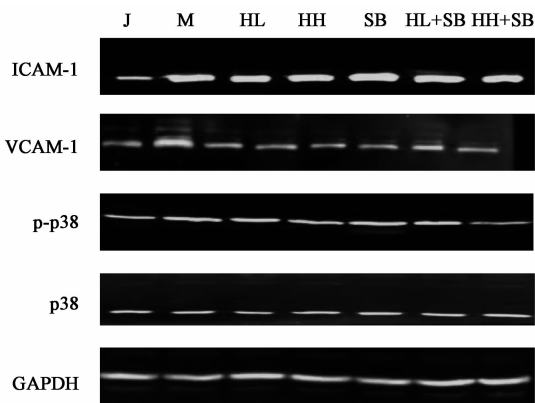
3 结果

与假手术组比较, 缺血再灌注模型组 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达及信号通路蛋白 p-p38 均显著增加($P < 0.01$), p38 无统计学差异。与缺血再灌注模型组比较, 单独应用黄芪多糖对 ICAM-1, VCAM-1, p-p38 的蛋白表达有所抑制, 但无统计学差异; 而 SB203580 组可明显降低两种黏附分子及 p-p38 的蛋白表达($P < 0.05$); 黄芪多糖与 SB203580 联合应用时对 ICAM-1, VCAM-1, p-p38 蛋白表达的抑制作用, 要强于单独应用黄芪多糖或 SB203580 的作用($P < 0.01, P < 0.05$), 其作用强弱具有浓度依赖性。

表 1 黄芪多糖对缺血-再灌注损伤大鼠心肌组织 ICAM-1, VCAM-1, p-p38, p38 蛋白相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ICAM-1	VCAM-1	p-p38	p38
假手术	-	0.535 0 ± 0.076 5 ⁴⁾	0.345 3 ± 0.035 6 ⁴⁾	0.576 7 ± 0.015 0 ⁴⁾	0.594 4 ± 0.070 1
缺血再灌模型	-	1.367 3 ± 0.131 9 ²⁾	0.810 3 ± 0.051 3 ²⁾	1.110 7 ± 0.046 1 ²⁾	0.644 1 ± 0.152 7
黄芪多糖	20	1.218 8 ± 0.131 8 ²⁾	0.685 7 ± 0.045 4 ¹⁾	1.092 4 ± 0.077 3 ¹⁾	0.703 1 ± 0.188 9
	40	1.225 1 ± 0.086 5 ²⁾	0.657 3 ± 0.062 1 ¹⁾	1.056 3 ± 0.070 3 ¹⁾	0.662 0 ± 0.140 4
SB203580	5	1.013 1 ± 0.073 1 ^{1,3)}	0.562 3 ± 0.045 6 ³⁾	0.942 3 ± 0.035 8 ^{1,3)}	0.622 4 ± 0.080 4
黄芪多糖 + SB203580	20 + 5	0.870 2 ± 0.120 7 ⁴⁾	0.474 5 ± 0.047 2 ⁴⁾	0.807 5 ± 0.076 2 ³⁾	0.614 3 ± 0.114 9
黄芪多糖 + SB203580	40 + 5	0.731 4 ± 0.076 3 ⁴⁾	0.433 6 ± 0.038 5 ⁴⁾	0.716 6 ± 0.050 1 ⁴⁾	0.591 8 ± 0.078 3

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与缺血再灌注组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。



J. 假手术组; M. 缺血再灌注模型组; HL. 黄芪多糖 20 mg·kg⁻¹ 组; HH. 黄芪多糖 40 mg·kg⁻¹ 组; SB. SB203580 5 mg·kg⁻¹ 组; HL + SB. 黄芪多糖 20 mg·kg⁻¹ + SB203580 5 mg·kg⁻¹ 组; HH + SB. 黄芪多糖 40 mg·kg⁻¹ + SB203580 5 mg·kg⁻¹ 组

图 1 黄芪多糖对缺血-再灌注损伤大鼠心肌组织 ICAM-1, VCAM-1, p-p38, p38 的蛋白表达的影响

4 讨论

《难经·八难》云:“气者,人之根本也”。黄芪为

益气要药, 助心气有推动血液在脉管中运行并营养全身的功能。黄芪多糖是黄芪有效部位中含量最多的一种, 其按低相对分子质量分布提纯, 纯度很高, 值得深入研究^[5]。

研究认为, 在心肌缺血再灌注损伤中, 内皮细胞损伤是关键因素^[6], 而黏附分子是介导内皮细胞损伤的重要环节^[7]。首先由黏附分子选择素家族(如 P-选择素、E-选择素)使白细胞沿微血管内皮缓慢滚动, 形成相对疏松的结合^[8]; 之后白细胞在 ICAM-1、VCAM-1 的介导下与微血管内皮形成牢固结合^[9]; 同时 ICAM-1 可诱导内皮细胞骨架相关蛋白酪氨酸磷酸化, 引起细胞骨架的改变, 有利于活化白细胞变形穿过内皮细胞及基膜向局部组织聚集浸润^[10], 使白细胞渗透到内皮细胞下, 并分泌释放各种细胞活性物质, 损伤心肌微血管内皮细胞, 造成血管功能障碍及心肌组织损伤。

而对黏附分子转录和表达的调控, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号转导通路起到了重要的作

用^[11-12],当缺氧、氧自由基等应激刺激、前炎性因子(TNF- α ,IL-1 β 等)等作用于内皮细胞,经一系列的信号传导激活 MKK3/6 后,使 p38 MAPK 被磷酸化激活(p-p38),激活下游靶分子 I κ B 激酶,使 NF- κ B 产生活性,促进内皮细胞表达黏附分子 ICAM-1, VCAM-1,损伤内皮细胞;并且 p38 还可以磷酸化丝裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶 2^[13](MAPKAP2),激活炎性细胞因子基因 TNF- α ,同时 TNF- α 也可反向激活 p38,使这条通路被自身放大,加重炎症反应^[14-15]。可见,有效抑制 p38 信号通路,对心脏细胞的保护起到重要作用。

本研究中黄芪多糖能够抑制缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞黏附分子 ICAM-1, VCAM-1 及 p38 信号通路中 p-p38 蛋白的表达水平,但无统计差异;当黄芪多糖与 SB203580 联合应用时,表现出协同抑制的作用,其对 ICAM-1, VCAM-1 和 p38 通路的抑制作用明显增强,显著高于单独应用黄芪多糖或 SB203580,作用具有浓度依赖性。机制可能与下调由其介导的 ICAM-1, VCAM-1 在内皮细胞质膜上的表达,从而削弱中性粒细胞与血管壁形成的牢固结合和向内皮细胞及组织浸润,减轻黏附后释放的炎症介质对心肌细胞的损伤有关。本实验结果黄芪多糖对缺血再灌注损伤心肌黏附分子 ICAM-1, VCAM-1 表达的抑制作用弱于既往细胞试验中的结果,可能与药物在体内吸收代谢受多种因素的影响有关^[16];关于黄芪多糖协同作用的具体原理在今后进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. *Physiol Rev*,2008,88(2):581.

[3] 杨建业,张迎春. 大鼠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.

[4] 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.

[5] 蔡亚平,赵蕊,朱丹. 黄芪多糖的组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):81.

[6] 韩学杰. 沈绍功教授从痰论治冠心病经验[J]. 中国中医急症,2004,13(1):31.

[7] 刘应柯,张玉峰,刘尚岭,等. 脂脉宁对动脉粥样硬化家兔氧化应激反应及 LDL-R, VCAM-1 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):214.

[8] Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A, et al. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease [J]. *In Vivo*, 2007,21(5):757.

[9] Ley K. The role of selectins in inflammation and disease [J]. *Trends Mol Med*,2003,9(6):263.

[10] Alcaide P, Auerbach S, Lusinskas F W. Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps [J]. *Microcirculation*, 2008, 16(1):43.

[11] Lin W N, Luo S F, Lee C W, et al. Involvement of MAPKs and NF-kappaB in LPS-induced VCAM-1 expression in human tracheal smooth muscle cells [J]. *Cell Signal*,2007,19(6):1258.

[12] Nizamutdinova I T, Oh H M, Min Y N, et al. Paeonol suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells by blocking p38, ERK and nuclear factor-kappaB signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*,2007,7(3):343.

[13] Kim H P, Wang X, Zhang J, et al. Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 β MAPK and heat shock factor-1 [J]. *J Immunol*,2005,175(4):2622.

[14] Kuma Y, Sabio G, Bain J, et al. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2005,280(20):19472.

[15] 潘会君,唐宁,华晓东,等. 中药调控一氧化氮合酶-一氧化氮系统的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):202.

[16] 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.

[责任编辑 聂淑琴]