

黄芪及其有效成分对脓毒症心肌保护作用的研究进展

王承娟¹ 祝益民²

(1. 南华大学儿科学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省人民医院, 湖南 长沙 410005)

【摘要】 脓毒症患者易并发心肌损伤, 心肌损伤出现越早, 病情越重, 一旦出现心血管并发症, 病死率急剧升高。近年来研究表明, 心肌氧化应激、钙超载、线粒体损伤、细胞凋亡、炎症反应在其中起重要作用。然而黄芪及其有效成分对心肌有一定的保护作用, 本研究就黄芪及其有效成分对脓毒症心肌保护作用机制的研究进展进行综述。

【关键词】 脓毒症; 心肌损伤; 作用机制

心脏是脓毒症易损的靶器官之一, 脓毒症早期即存在心肌损伤, 包括心肌收缩和舒张功能障碍、射血分数降低以及心肌细胞超微结构的改变, 发生率高达 40%~50%, 且易伴发低血压、心力衰竭(心衰)和心律失常, 临床约 40% 的脓毒症患者可出现不同程度的心肌损伤^[1]。如出现心脏合并症, 脓毒症患者的病死率可从 20%~30% 上升到 70%~90%^[2]。中医认为黄芪具有补气升阳、益气固表、利水消肿、托毒生肌的功效。现代药理学研究表明, 黄芪具有改善心功能、保护心肌细胞, 增强心肌收缩力的作用。近年来众多研究者针对黄芪及其有效成分在心血管系统方面的作用机制进行了大量研究, 证实黄芪对心肌缺血缺氧、缺血/再灌注(I/R)损伤、细胞凋亡及病毒感染的心肌均有显著的保护作用, 主要体现在以下方面。

1 清除氧自由基, 提高超氧化物歧化酶(SOD)活性

脓毒症时, 体内氧化和抗氧化系统失衡, 导致心肌损伤和氧化应激。活性氧(ROS)在心肌缺血缺氧、I/R 损伤过程中起重要作用。过量的 ROS 可通过氧化细胞成分如蛋白质、脂质和 DNA 及活化的蛋白水解酶如基质金属蛋白酶(MMP)使细胞膜脂质过氧化, 损伤膜系统, 影响心肌组织功能, 降低心肌收缩力, 减少心排量^[3]。过量 ROS 导致心肌损伤与 SOD、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等内源性抗氧化酶密切相关, 它们对于评估清除氧自由基活性和监测过氧化物毒性非常重要^[4]。

多项研究已证实黄芪是氧自由基的良好清除剂。在大鼠心肌缺血模型中, 黄芪预处理后能显著降低血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌钙蛋白水平, 抑制 ROS 的生成, 清除氧自由基, 显著提高心肌细胞中的 SOD 活性, 显著降低丙二醛(MDA)含量, 使心肌梗死面积明显减少, 从而改善心脏功能^[5]。在离体豚鼠心脏 I/R 实验中, 探讨黄芪及其有效成分对离体豚鼠心脏损伤的影响发现, 黄芪和黄芪总黄酮可清除氧自由基, 显著提高心肌 SOD 活性和降低丙二醛(MDA)含量, 减少脂质过氧化连锁反应, 维持心肌细胞氧化和抗氧化平衡, 从而减轻心肌 I/R 损伤^[6]。在干

燥综合征(SS)大鼠心肌模型中, 有创血流动力学监测 SS 模型大鼠心功能的变化, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 ROS、MDA、SOD、总抗氧化能力(TAC)均发现, 黄芪干预后大鼠心率(HR)、左室收缩压(LVSP)、左室舒张期末压(LVEDP)降低, 血清抗氧化反应成分 SOD、TAC 表达升高, 而氧化反应成分 MDA、ROS 表达降低, 提示黄芪多糖通过下调 ROS、提高 SOD 活性抗氧化以减少心肌组织损伤, 从而改善心功能^[7]。在糖尿病心肌损伤模型中, 黄芪总苷(AST)40、60、120 mg/kg 能显著提高糖尿病小鼠和糖尿病大鼠血清总 SOD(T-SOD)、GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量, 提示 AST 能在一定程度上通过纠正糖尿病动物血清 T-SOD 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量的异常变化, 帮助恢复机体正常的抗氧化能力对延缓糖尿病动物心肌损伤起保护作用^[8]。

2 减轻钙超负荷, 调节钙平衡

心肌细胞钙超载在心肌损伤的发展过程中起重要作用, 是引起心肌细胞结构和功能损害、导致细胞死亡的重要原因。脓毒症时心肌 L-型钙通道减少和肌原纤维对 Ca²⁺ 的敏感性降低, 诱导心肌细胞 Ca²⁺ 稳态显著改变^[9]。钙超载通过激活钙依赖的巯基蛋白水解酶家族(Calpain)、开放线粒体膜通透性转换孔、过度收缩心肌纤维造成再灌注性心律失常、损伤肌(内)质网钙-ATP 酶(SERCA)功能等进一步加重心肌损伤^[10]。故细胞内钙稳态对保护心肌细胞有重要意义。

多项研究表明黄芪可减轻细胞内钙超载。心肌细胞 SERCA 是将胞质内游离钙主动转运至肌质网内贮存的一种钙调节蛋白, 对调节细胞内游离 Ca²⁺ 浓度非常重要。在夹闭腹主动脉诱导心衰模型中, 通过半定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western Bolt)可发现, 模型大鼠 LVSP 和 LVEDP 均显著增加, 表明黄芪能改善压力超负荷导致的心衰舒张功能, 提示黄芪可上调左室组织中的 SERCA2a 基因表达, 减轻钙超载^[11]。在缺氧/复氧心肌损伤模型中, 通过观察心肌缺氧 6 h 复氧 3 h 黄芪甲苷干预后 SERCA 活性和心肌损伤指标, 发现黄芪甲苷可显著降低 CK-MB 释放及通过调节蛋白激酶 A 途径恢复 SERCA2a 活性, 逆转异常舒张期游离钙([Ca²⁺]_i)浓度升高从而改善心脏收缩和舒张功能^[12]。在异丙肾上腺素诱导的体外心肌肥厚模型中探讨黄芪多糖的抗心肌肥厚作用, 用 10 μmol/L 异丙肾上腺素处理 48 h 后心肌细胞的静息细胞内 Ca²⁺ 显著

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.029

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAI04B01); 湖南省中医药管理局中医药科研计划项目(201133)

通讯作者: 祝益民, Email: cszhuyimin@163.com

增加,观察黄芪多糖干预后心肌细胞面积、总蛋白、肥大标志物表达发现,黄芪多糖以剂量依赖性方式抑制细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的积聚,提示黄芪多糖通过钙拮抗作用减轻肥大心肌细胞内的钙超载,从而达到保护心肌的效果^[13]。

3 保护线粒体功能,改善能量代谢

细胞线粒体是心肌能量代谢的主要场所,是细胞活动的主要供能场所,是物质代谢和能量转化的中心站,脓毒症时心肌能量障碍或衰竭可能是心功能障碍或心肌损伤的根本原因^[14]。脓毒症时,过多的 ROS 不仅可侵犯心肌线粒体,引起心肌线粒体膜的脂质过氧化、损伤膜系统,使得线粒体膜心磷脂显著减少、线粒体细胞色素氧化酶活性下降,过氧化物进一步增多,形成恶性循环,最终导致线粒体内膜完整性受到破坏;同时还通过“钙超载”使线粒体发生不可逆性损害,最终引起心肌收缩力下降、心脏功能失调^[15-16]。在炎症反应、I/R 等病理条件下,氧化应激及钙超载引起线粒体动力学障碍,诱导心室重构,最终导致心力衰竭(心衰)^[17]。因此维持心肌细胞线粒体功能,对于心肌 I/R 损伤有一定改善作用。

在研究黄芪甲苷对阿尔茨海默症神经细胞的保护作用中,通过测定线粒体的膜电位水平发现,黄芪甲苷预处理可抑制线粒体通透性转换孔(MPTP)开放,增加线粒体膜电位(DYM),增加 ATP 的生成,提高线粒体细胞色素 C 氧化酶的活性,从而保护线粒体功能^[18]。在研究黄芪注射液对血管紧张素 II 诱导的心肌肥厚实验中发现,黄芪注射液可减少心肌细胞总蛋白质含量及细胞直径,降低心肌细胞线粒体单胺氧化酶活性,显著提高线粒体细胞色素氧化酶活性和 ATP 及 ADP 的含量,降低 AMP 含量,说明黄芪注射液可逆转心肌细胞的线粒体结构和功能,从而提高心肌细胞能量代谢^[19]。在原代培养乳鼠心肌阿霉素诱导心肌凋亡中,黄芪甲苷降低了线粒体 ROS 产生和 LDH、CK-MB 和细胞色素 C 的释放,并恢复了 ATP 水平,表明黄芪甲苷能显著减少阿霉素诱导的线粒体损伤和功能障碍^[20]。

4 抑制心肌细胞凋亡,减轻心肌损伤

脓毒症氧化应激时线粒体内膜发生通透性转换,释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子,导致凋亡蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)级联反应的发生,最终引起细胞凋亡^[21]。研究表明黄芪对损伤细胞的凋亡也有影响,细胞中肿瘤坏死因子样配体 1A(TL1A)死亡受体 3(DR3)的过表达可诱导核转录因子- κ B(NF- κ B)活化而触发细胞凋亡,DR3 可能是通过联合肿瘤坏死因子受体 1 相关死亡区域而起作用^[22]。在探讨黄芪甲苷对病毒性心肌炎作用机制的动物模型中发现,黄芪甲苷可明显抑制柯萨奇病毒 B3 病毒性心肌炎小鼠心肌 TL1A mRNA 的表达,并且具有明显的量效关系,提示黄芪甲苷可能部分通过下调 TL1A 的 mRNA 表达来减少心肌细胞凋亡,从而减轻心肌损伤^[23]。在观察多柔比星诱导的乳鼠心肌细胞凋亡模型中发现,黄芪甲苷能通过显著恢复跳动心肌细胞的比例和搏动频率来改善心肌功能障碍,能通过显著增强抑凋亡基因(Bcl-2)和降低促凋亡基因(Bax)的蛋白表达和细胞色素 C 的释放,从而抑制线粒体

凋亡通路(MAP)的激活^[20]。在培养的缺氧心肌细胞模型中也发现,黄芪甲苷预先干预缺氧的心肌细胞可使心肌细胞凋亡率减少 34.63%,同时 NF- κ B 的表达也减少,提示一定浓度的黄芪甲苷可减少缺氧心肌细胞的凋亡及损伤,这可能与抑制 NF- κ B 的表达有关^[24]。在阿霉素诱导的心肌凋亡模型中观察到,黄芪多糖可降低凋亡相关信号蛋白如蛋白酶 3 以及 p38 的水平,抑制心室重构,改善心肌收缩功能,从而减轻心肌细胞损伤^[25]。在人类心肌细胞中,通过膜联蛋白双标记染色法评估心肌细胞凋亡,采用定量 PCR 和蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)分析基因和蛋白质的表达,发现黄芪多糖可调节凋亡相关 mRNA 和蛋白质表达,降低细胞凋亡率,从而减轻心肌损伤,机制可能与抑制心肌细胞氧化应激有关^[26]。在柔红霉素诱导的心肌凋亡模型中,黄芪预处理可显著降低 ROS 水平,清除氧自由基,保护线粒体膜电位,抑制细胞裂解、活化、凋亡和核碎裂,从而保护心肌的结构和功能,减少心肌损伤^[27]。

5 抑制炎症反应,保护内皮细胞

严重脓毒症通过各种炎症反应,以“瀑布效应”方式损伤患者的心肌细胞。促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、Toll 样受体 4(TLR4)均能直接影响心肌收缩功能,并导致慢性心衰。脓毒症时心肌细胞自身可产生 TNF- α 、IL-6 等,这些细胞因子又可损害心肌功能,因此抑制炎症细胞因子释放能有效改善脓毒症患者的预后^[28]。在探讨黄芪多糖对 TNF- α 诱导的炎症反应及其可能机制中,用免疫荧光法检测 NF- κ B 活化,发现 TNF- α 以剂量和时间依赖性增加细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附-1(VCAM-1)在内皮细胞的表达,黄芪预处理可很大程度上抑制 TNF- α 诱导的 ICAM-1、VCAM-1 和 NF- κ B 的表达,减轻血清中炎症因子水平,其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号转导通路的激活有关^[29]。在异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚模型中,黄芪预处理可减少左心室与体质量的比值,改善心脏血流动力学,下调心房利钠肽(ANP)和脑钠肽(BNP)mRNA 的表达,增加 ATP/AMP 的比例,降低大鼠心脏组织游离脂肪酸(FFA)的含量,表明黄芪主要通过调节 NF- κ B/过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)介导的信号转导能量合成实现抑制心肌肥厚^[30]。在脂多糖诱导的小鼠心衰模型中,脂多糖可增加血清 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 含量,而黄芪甲苷预处理可有效降低血清促炎介质水平,表明黄芪甲苷的心脏保护作用可能与其抗炎作用相关^[31]。在 I/R 损伤模型中,通过评价内皮细胞活性、观察心脏微血管内皮细胞与中性粒细胞的黏附率发现,黄芪多糖能显著降低心脏微血管内皮细胞与中性粒细胞的黏附率,表明黄芪多糖通过调控炎症反应、减轻心肌 I/R 损伤而保护内皮细胞^[32]。在内皮细胞刺激和内质网应激模型中观察到,环黄苷醇硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)表达,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体和线粒体依赖性凋亡活化;黄芪甲苷可抑制促炎性细胞因子 IL-6 和 IL-1 β 的产生,激活 NLRP3 炎性小体,从而改善血管内皮功能障碍,抑制炎症反

应,减少细胞凋亡^[33]。

综上所述,黄芪及其有效成分对心肌的保护作用已在细胞分子、受体、信号转导及基因调控的水平被证实,这将为研究和开发新的黄芪有效成分或提取物提供理论依据。

参考文献

- [1] Landesberg G, Levin PD, Gilon D, et al. Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: No Correlation With Inflammatory Cytokines in Real-life Clinical Setting [J]. *Chest*, 2015, 148(1): 93-102.
- [2] 陈欣,周丽华,黄志民,等. 乌司他丁对内毒素心肌损伤大鼠 Toll 样受体 4 表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2012, 24(12): 763-765.
- [3] Zhou T, Chuang CC, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 864946.
- [4] Xu X, Li F, Zhang X, et al. In vitro synergistic antioxidant activity and identification of antioxidant components from *Astragalus membranaceus* and *Paeonia lactiflora* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96780.
- [5] Ma X, Zhang K, Li H, et al. Extracts from *Astragalus membranaceus* limit myocardial cell death and improve cardiac function in a rat model of myocardial ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(3): 720-728.
- [6] 张海宇, 闵冬雨, 傅明玉, 等. 黄芪及其活性成分对离体豚鼠心脏的作用 [J]. *中华心血管病杂志*, 2014, 42(9): 759-764.
- [7] 王芳, 刘健, 叶英法, 等. 基于 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路探讨黄芪多糖改善干燥综合征模型大鼠心功能的机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(5): 566-574.
- [8] 韩佳. 黄芪总苷对实验性糖尿病动物心肌的保护作用及机理研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [9] 赵志伶, 樊巧鹰, 汪宗显, 等. 脓毒症心肌抑制的临床表现及发病机制研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(7): 525-528.
- [10] 罗涛, 岳荣川. 心肌缺血/再灌注损伤钙超载及其防治策略 [J]. *国际心血管病杂志*, 2011, 38(1): 21-23, 40.
- [11] 苏丹, 严浩然, 张蓓蓓, 等. 黄芪对慢性心衰大鼠心功能及心肌肌浆网钙泵基因表达的影响 [J]. *中药材*, 2009, 32(1): 85-88.
- [12] Zhang DW, Bian ZP, Xu JD, et al. Astragaloside IV alleviates hypoxia/reoxygenation-induced neonatal rat cardiomyocyte injury via the protein kinase A pathway [J]. *Pharmacology*, 2012, 90(1-2): 95-101.
- [13] Dai H, Jia G, Liu X, et al. Astragalus polysaccharide inhibits isoprenaline-induced cardiac hypertrophy via suppressing Ca²⁺ mediated calcineurin/NFATc3 and CaMK II signaling cascades [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(1): 263-271.
- [14] 邵婧, 王国兴, 金明, 等. 中药 912 液对脓毒症大鼠心肌细胞线粒体抗氧化防御体系酶的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17(3): 163-165.
- [15] Smeding L, Plötz FB, Groeneveld AB, et al. Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock [J]. *Shock*, 2012, 37(5): 449-456.
- [16] Zang QS, Wolf SE, Minei JP. Sepsis-induced Cardiac Mitochondrial Damage and Potential Therapeutic Interventions in the Elderly [J]. *Aging Dis*, 2014, 5(2): 137-149.
- [17] Verdejo HE, del CA, Troncoso R, et al. Mitochondria, myocardial remodeling, and cardiovascular disease [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2012, 14(6): 532-539.
- [18] Sun Q, Jia N, Wang W, et al. Protective effects of astragaloside IV against amyloid beta1-42 neurotoxicity by inhibiting the mitochondrial permeability transition pore opening [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98866.
- [19] 于妍, 王硕仁, 聂波, 等. 黄芪注射液在逆转心肌细胞肥大过程中对心肌细胞线粒体结构和功能的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(7): 979-984.
- [20] Jia Y, Zuo D, Li Z, et al. Astragaloside IV inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis mediated by mitochondrial apoptotic pathway via activating the PI3K/Akt pathway [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2014, 62(1): 45-53.
- [21] 杜萌, 常平, 刘占国. 线粒体靶向抗氧化剂在治疗脓毒症中的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(2): 148-151.
- [22] McLaren JE, Calder CJ, McSharry BP, et al. The TNF-like protein 1A-death receptor 3 pathway promotes macrophage foam cell formation in vitro [J]. *J Immunol*, 2010, 184(10): 5827-5834.
- [23] 田琳, 何春枝, 李双杰. 黄芪甲苷对病毒性心肌炎小鼠心肌中 TL1A 表达的影响及意义 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2015, 40(2): 150-157.
- [24] 廖景光, 王茜, 赖碧艳, 等. 黄芪甲苷对缺氧培养心肌细胞的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(2): 133-135.
- [25] Cao Y, Ruan Y, Shen T, et al. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 674219.
- [26] Zhang J, Gu JY, Chen ZS, et al. Astragalus polysaccharide suppresses palmitate-induced apoptosis in human cardiac myocytes: the role of Nrf1 and antioxidant response [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2515-2524.
- [27] Luo Z, Zhong L, Han X, et al. Astragalus membranaceus prevents daunorubicin-induced apoptosis of cultured neonatal cardiomyocytes: role of free radical effect of Astragalus membranaceus on daunorubicin cardiotoxicity [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(6): 761-767.
- [28] 吉春玲, 瞿详, 任亦频, 等. 右美托咪定对脓毒症大鼠心肌组织水通道蛋白-1 及炎症细胞因子水平的干预作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 22(4): 266-269.
- [29] Zhu YP, Shen T, Lin YJ, et al. Astragalus polysaccharides suppress ICAM-1 and VCAM-1 expression in TNF- α -treated human vascular endothelial cells by blocking NF- κ B activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(8): 1036-1042.
- [30] Zhang S, Tang F, Yang Y, et al. Astragaloside IV protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating NF- κ B/PGC-1 α signaling mediated energy biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118759.
- [31] Zhao P, Wang Y, Zeng S, et al. Protective effect of astragaloside IV on lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction via downregulation of inflammatory signaling in mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015, 37(5): 428-433.
- [32] Hai-Yan Z, Yong-Hong G, Zhi-Yao W, et al. Astragalus Polysaccharide Suppresses the Expression of Adhesion Molecules through the Regulation of the p38MAPK Signaling Pathway in Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells after Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 280493.
- [33] Zhao Y, Li Q, Zhao W, et al. Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 210-218.

(收稿日期: 2016-03-31)

(本文编辑: 邸美仙 李银平)