

黄芪甲苷对肾血管性高血压大鼠主动脉内皮细胞线粒体损伤的保护作用

张少君,吴恒芳,陈相健,杨 笛*,朱铁兵*

(南京医科大学第一附属医院心血管内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究黄芪甲苷对肾血管性高血压大鼠主动脉内皮细胞线粒体损伤的保护作用。方法:采用两肾一夹制备肾血管性高血压大鼠,术后 2 周将大鼠随机分为手术组和黄芪甲苷治疗组[5.0 mg/(kg·d)],以假手术组为正常对照,治疗 2 周后,观察大鼠胸主动脉内皮细胞线粒体超微结构的变化,应用免疫组化染色法观察大鼠胸主动脉内皮细胞锰超氧化物歧化酶(SOD2)的表达。结果:术后 2 周大鼠收缩压明显高于正常对照大鼠。手术组大鼠胸主动脉内皮细胞线粒体内嵴断裂、消失,基质电子密度降低,肿胀、空泡化明显;黄芪甲苷治疗后大鼠胸主动脉内皮细胞线粒体损伤程度明显减轻。手术组大鼠胸主动脉内皮细胞 SOD2 表达水平较正常对照大鼠明显降低,黄芪甲苷治疗后恢复至正常大鼠水平。结论:黄芪甲苷对肾血管性高血压大鼠主动脉内皮细胞线粒体的损伤有保护作用,上调主动脉内皮细胞 SOD2 表达是其可能途径之一。

[关键词] 黄芪甲苷;肾血管性高血压大鼠;主动脉内皮细胞;线粒体;锰超氧化物歧化酶

[中图分类号] R544.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-889-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140707

Effect of astragaloside IV on mitochondrial injury of aortic endothelial cells from renovascular hypertensive rats

Zhang Shaojun, Wu Hengfang, Chen Xiangjian, Yang Di*, Zhu Tiebing*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The present study was designed to investigate the protective effect of astragaloside IV on mitochondrial injury of aortic endothelial cells from renovascular hypertensive rats. **Methods:** Two kidney one clip (2K1C) technique was performed to prepare renovascular hypertensive rats. Two weeks after operation, the rats were divided into two groups, the operation group and the astragaloside IV treatment group [5.0 mg/(kg·d)]. The sham operated rats were used as normal control. After treatment for two weeks, the mitochondrial ultrastructure of thoracic aortic endothelial cells from the rats was observed. The expression of Mn-superoxide dismutase (SOD2) in thoracic aortic endothelium was observed by immunohistochemical staining. **Results:** Two weeks after operation, the rats showed significant increase of systolic blood pressure compared to that of control rats. The thoracic aortic endothelial cell mitochondria of hypertensive rats showed fracture and disappearance of cristae, swelling and vacuolation as well as decreased mitochondrial matrix electron density. These changes of mitochondria were ameliorated significantly by astragaloside IV. In addition, astragaloside IV augmented the lower expression level of SOD2 in the aortic endothelium from the hypertensive rats compared with that from the normal controls. **Conclusion:** Astragaloside IV reverses mitochondrial injury of aortic endothelial cells from renovascular hypertensive rats, which may be linked to its ability to increase SOD2 expression in the aortic endothelium of the rats.

[Key words] astragaloside IV; renovascular hypertensive rats; aortic endothelial cells; mitochondria; Mn-superoxide dismutase (SOD2)

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 889-893]

高血压是内皮损伤的始动因素之一^[1],内皮损伤可导致其功能障碍,内皮功能障碍又可导致高血

压的发生发展^[2]而进一步加重高血压。线粒体功能障碍是导致血管内皮氧化应激损伤的主要原因之一^[3]。心血管疾病如动脉粥样硬化、高血压、心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭都与心肌或血管线粒体功能障碍密切相关,线粒体氧化应激反应是其机制之一^[4]。黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)是从黄芪中分离得

[基金项目] 国家自然科学基金(81170220;81100156)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: diyang@njmu.edu.cn; jyfz15117@sina.com

到的具有多种药理活性的皂苷类化合物,是黄芪的主要活性成分,具有抗氧化特性,有调节机体免疫力、保护组织器官、降低血糖、抗细胞凋亡和抗炎抗病毒等药理作用^[5]。已有实验研究表明 AS-IV 可以通过蛋白激酶 A(PKA)途径减轻缺氧/复氧时大鼠心肌细胞的损伤^[6]。然而,AS-IV 是否对高血压大鼠主动脉内皮细胞线粒体损伤起保护作用未见文献报道。本研究将以肾血管性高血压大鼠主动脉内皮作为研究对象,研究 AS-IV 对肾血管性高血压大鼠的主动脉内皮线粒体损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 Sprague Dawley (SD) 大鼠,体重(180 ± 10)g,南京医科大学实验动物中心提供,单位许可证:SCXK(苏)2013-0005;黄芪甲苷(南京春秋生物工程有限公司,纯度 ≥ 98%);锰超氧化物歧化酶(SOD2)一抗、DAB 显色试剂(武汉博士德生物工程有限公司);HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(南京迪兆生物科技有限公司);银制肾动脉夹(内径 0.2 mm);大、小鼠无创血压仪 BP-2000 (江苏省医药动物实验基地);透射电子显微镜 JEM-1010 (日本电子公司 JEOL);双目体式显微镜(南京江南永新光学有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肾性高血压大鼠制备与分组

所有大鼠均饲以常规清洁固体饲料,自由饮水适应 3 d,手术前禁食 8 h,手术器械高压蒸汽灭菌消毒。用 10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔灌注麻醉实验大鼠,然后将其固定、备皮、75%酒精消毒、铺无菌巾,于剑突下沿腹正中左侧 2 cm 切开腹腔,暴露左侧肾脏,钝性分离左侧肾动脉,于肾动脉中段放置银夹,缩窄肾动脉。假手术组仅钝性分离左肾动脉,不进行缩窄处理。所有手术大鼠逐层缝合,关闭腹腔后再次用 75%酒精消毒切口,术后分笼,置于室温,苏醒后给予常规饮食。

实验大鼠随机分为假手术组(8只)和手术组(16只)。术后 2 周再随机分为 3 组:假手术组(CTL 组, $n = 7$)、两肾一夹组(2K1C 组, $n = 7$)、黄芪甲苷组(AS-IV 组, $n = 7$)。AS-IV 组于术后 2 周腹腔注射给药,注射剂量为 5.0 mg/(kg·d)^[7],AS-IV (药物浓度为 6 mg/ml)用 0.9%生理盐水稀释(终体积为 1 ml),CTL 组和 2K1C 组给予等体积 0.9%生理盐水腹腔注射。实验过程中对所有动物处理符合伦理学标准。

1.2.2 大鼠血压监测

采用大小鼠无创血压仪 BP-2000 系统,经套尾法分别于术前、术后每周测量各组大鼠血压,每只大鼠测量 10 次,取平均值;术后 2 周收缩压 > 140 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 作为高血压模型制作成功标准,用于进一步实验^[8]。

1.2.3 主动脉内皮线粒体观察

大鼠用 10%水合氯醛腹腔麻醉,仰卧固定,剪开胸腹钝性分离主动脉,用锋利的剪刀剪取胸主动脉,迅速用预冷的 PBS 缓冲液清洗 2 遍后,再迅速剪成 1 cm³ 的组织块浸入 2.5%戊二醛固定液中,4℃ 冰箱中保存 2 h。样品经 0.1 mol/L PBS 缓冲液室温清洗 4 次,每次 15 min。1%四氧化锇固定液室温后固定 2 h,然后用 0.1 mol/L PBS 缓冲液清洗 2 次,每次 5 min。2%醋酸铀染色 2 h。样品再经 50%、70%、90%、100%(2 次)丙酮酸逐级脱水,每次 15 min。样品最后经 100%丙酮与包埋剂浸渍后,纯包埋剂渗透和包埋,60℃恒温箱聚合 36 h,获得样品树脂包埋块。树脂包埋块在超薄切片机上切取超薄切片。超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后,在 JEM-1010 透射电子显微镜下观察与拍照。

1.2.4 主动脉内皮 SOD2 表达检测

取大鼠胸主动脉放入 4%多聚甲醛(PFA)中,固定 24 h 后置包埋机上制作大鼠胸主动脉石蜡包块,用石蜡切片机制作大鼠胸主动脉石蜡切片(厚度 4 μm),石蜡切片常规脱蜡水化。一抗为兔抗大鼠 SOD2 多克隆抗体(1:100 稀释),二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG(1:1 000 稀释),通过两步法将切片免疫组化染色,DAB 显色,中性树脂封片,阳性部位显色为蓝黑色。每组随机取 3 张切片,每张切片再随机选出 2 个视野,在 400 倍光镜视野下获取图像,采用形态学图像分析系统 Image-ProPlus Version 6.0 软件进行主动脉内皮细胞阳性染色面积和总光密度值的测量,计算得出平均光密度值(总光密度值/阳性染色面积,IOD/area),以平均光密度值代表 SOD2 的表达水平。

1.3 统计学方法

使用统计软件 SPSS13.0 进行统计学处理,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 LSD 法检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗前后收缩压变化

鼠尾法测定大鼠血压显示,手术前各组大鼠

基础血压差异无统计学意义。术后 2 周末,2K1C 组、AS-IV 组与 CTL 组比较收缩压明显升高。治疗 2 周后,AS-IV 组与 2K1C 组比较收缩压均有明显降低(表 1)。

2.2 大鼠主动脉内皮线粒体超微结构

CTL 组主动脉内皮细胞线粒体双层膜清晰完

整,线粒体嵴、嵴间隙清楚,基质电子密度正常(图 1A)。2K1C 组主动脉内皮细胞线粒体的嵴断裂缺失,仅留部分残端,基质电子密度降低,可见明显肿胀、空泡化(图 1B)。AS-IV 组线粒体嵴清楚,但有少量缺失,基质电子密度正常,空泡化明显减轻(图 1C)。

表 1 各组大鼠收缩压

Table 1 Systolic blood pressure of rats in each group (mmHg, $\bar{x} \pm s, n=7$)					
组别	术前	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周
CTL 组	121.0 ± 2.9	122.0 ± 7.1	125.0 ± 5.8	126.0 ± 3.0	122.0 ± 9.0
2K1C 组	118.0 ± 2.5	137.0 ± 5.9	146.0 ± 5.9 [#]	149.0 ± 5.3 [#]	157.0 ± 7.6 [#]
AS-IV 组	115.0 ± 7.0	133.0 ± 6.7	157.0 ± 13.2 [#]	142.0 ± 11.0	133.0 ± 12.6 [*]

与 CTL 组相比较, [#] $P < 0.01$; 与 2K1C 组比较, ^{*} $P < 0.01$ 。



A:CTL 组;B:2K1C 组;C:AS-IV 组。黑色箭头指示线粒体。

图 1 大鼠主动脉内皮细胞线粒体超微结构电镜图($\times 80\ 000$)

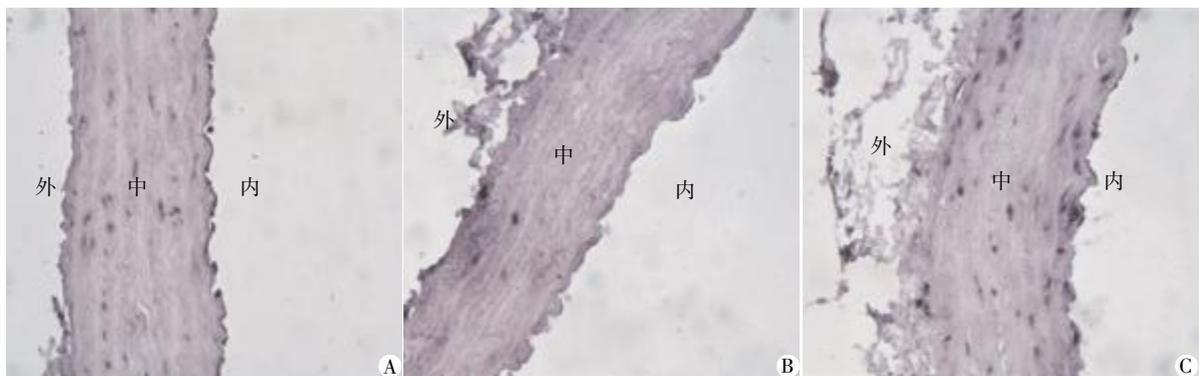
Figure 1 Mitochondrial ultrastructure of rat aortic endothelial cells by transmission electron microscopy($\times 80\ 000$)

2.3 大鼠主动脉内皮 SOD2 表达

与 CTL 组比较,2K1C 组大鼠主动脉内皮细胞 SOD2 蛋白表达水平显著降低;AS-IV 治疗后,大鼠主动脉内皮细胞 SOD2 蛋白表达水平明显增高(图 2,表 2)。

3 讨论

本实验发现 AS-IV 对高血压大鼠受损的主动脉内皮线粒体有保护作用。本研究采用两肾一夹制备肾血管性高血压大鼠,其机制是由于肾脏缺血导致



A:CTL 组;B:2K1C 组;C:AS-IV 组。

图 2 各组大鼠主动脉内皮细胞 SOD2 表达变化($\times 400$)

Figure 2 The expression of SOD2 in aortic endothelial cells of rats in various groups ($\times 400$)

表2 各组大鼠主动脉内皮细胞 SOD2 表达变化

Table 2 The expression of SOD2 in aortic endothelial cells of rats in various groups (IOD/area, $\bar{x} \pm s$)

组别	图像个数	SOD2
CTL组	6	99.27 ± 3.64
2K1C组	6	87.31 ± 4.69 [#]
AS-IV组	6	96.04 ± 9.01 [*]

与2K1C组相比较, * $P < 0.05$; 与CTL组相比较, [#] $P < 0.05$ 。

的肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RASS)过度激活。由于单侧肾脏缺血导致血浆中肾素及血管紧张素增多,使血压持续升高;升高的血管紧张素 II (Ang II), 通过激活细胞膜上 NADH 或 NADPH 氧化酶刺激活性氧(ROS)的产生如超氧化物^[9]。ROS 超过了细胞抗氧化应激的能力,过量的 ROS 激活细胞内线粒体相关的凋亡通路^[10],如依赖于 caspase 的线粒体凋亡途径^[11]。实验结果显示术后 2 周大鼠血压明显升高,经 AS-IV 治疗 2 周后血压明显下降,AS-IV 的降压作用与文献报道一致^[12]。曾有文献报道两肾一夹肾血管性高血压大鼠的心肌细胞线粒体有明显的损伤^[13],转入肾素基因(Ren2)的高血压大鼠血管细胞内的线粒体有损伤^[14],提示压力负荷对心血管的线粒体有损伤作用。线粒体受损造成细胞能量代谢紊乱,所以线粒体的损伤可直接导致血管内皮的功能失调甚至死亡^[15]。在本实验中,两肾一夹肾血管性大鼠胸主动脉内皮线粒体呈现出线粒体嵴断裂、消失,基质电子密度降低,肿胀、空泡化等明显,与高血压动物心肌细胞线粒体改变相似,经 AS-IV 治疗后线粒体损伤程度明显减轻,提示 AS-IV 具有线粒体保护功能。造成内皮线粒体损伤的可能机制有:线粒体氧化应激、线粒体钙紊乱、线粒体生物合成减少、线粒体通透性转变、线粒体 DNA 突变等^[4]。已有文献报道,AS-IV 能够通过提高线粒体膜电位减轻线粒体损伤保护视网膜神经节细胞^[16],还可通过降低线粒体氧化应激产物来减少心肌细胞的凋亡^[17]。本文分析 AS-IV 对线粒体的保护功能可能与其抗氧化应激有关。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种具有特定的生物催化功能的蛋白质,有蛋白质和金属离子组成,它是生物体内抗氧化酶系统中的重要一员,在保护细胞免受活性氧诱发的氧毒性损伤中发挥着重要作用^[18]。SOD 有 3 种异构体分为铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)、SOD2/Mn-SOD 和铁超氧化物歧化酶(Fe-SOD),3 种 SOD 在它们各自的部位发挥其保护作用。线粒体的氧化呼吸链是体

内自由基产生的主要场所,而锰超氧化物歧化酶(SOD2/Mn-SOD)主要存在于原核生物和真核生物细胞的线粒体基质内,是线粒体内清除超氧阴离子抗氧化应激的关键酶^[19],因此被认为抵御线粒体损伤的关键性屏障。在本实验中,肾性高血压大鼠胸主动脉内皮细胞 SOD2 表达水平较正常大鼠明显降低,提示内皮细胞线粒体的损伤可能是由于线粒体内氧自由基清除能力下降所致^[20-21]。AS-IV 治疗后内皮细胞 SOD2 表达水平与正常大鼠主动脉内皮细胞表达水平接近,表明受损线粒体清除氧自由基的能力提高,有益于受损线粒体的修复。实际上作为黄芪的主要活性成分,AS-IV 具有抑制氧化应激并且提高抗氧化应激的酶类(如 SOD)活性和上调 SOD2 表达的药理作用^[22-23],这也可以解释本实验中 AS-IV 可能通过上调高血压大鼠主动脉内皮细胞 SOD2 表达,起到线粒体的保护作用。阐明 AS-IV 的线粒体保护作用机制,将有益于开发 AS-IV 药物作用靶点。

本研究显示 AS-IV 对肾血管性高血压大鼠主动脉内皮细胞线粒体的损伤有保护作用,上调主动脉内皮细胞 SOD 表达可能是其途径之一,其保护作用的具体分子机制和信号转导通路有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Spencer CH, Martin SC, Felmeden DC, et al. Relationship of homocysteine to markers of platelet and endothelial activation in "high risk" hypertensives: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial [J]. *Int J Cardiol*, 2004, 94(2-3): 293-300
- [2] Vasudevan H, Nagareddy PR, McNeill JH. Gonadectomy prevents endothelial dysfunction in fructose-fed male rats, a factor contributing to the development of hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(6): H3058-3064
- [3] Chang HC, Chen TG, Tai YT, et al. Resveratrol attenuates oxidized LDL-evoked Lox-1 signaling and consequently protects against apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(3): 842-854
- [4] 熊燕, 张梅, 陈菲, 等. 线粒体功能障碍与心血管疾病 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(2): 364-370
- [5] 段立军, 孙博航. 黄芪甲苷的研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2011, 28(5): 410-415
- [6] 张大伟, 徐晋妣, 卞智萍, 等. 黄芪皂苷 IV 通过 PKA 途径减轻缺氧/复氧心肌损伤的机制研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(1): 30-34
- [7] 张晶, 王洪新, 宋莹, 等. 黄芪甲苷抑制大鼠心肌肥

- 厚及改善心肌能量代谢的作用观察[J]. 中成药, 2012, 34(5):924-928
- [8] Cao YJ, He X, Wang N, et al. Effects of imperatorin, the active component from Radix Angelicae (Baizhi), on the blood pressure and oxidative stress in 2K1C hypertensive rats[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(12): 1048-1054
- [9] Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 302(2): 148-158
- [10] Kim DS, Jeon BK, Lee YE, et al. Diosgenin induces apoptosis in HepG2 cells through generation of reactive oxygen species and mitochondrial pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012:981675
- [11] 王晓菲, 吴强, 孙志华, 等. 雷公藤甲素通过依赖于 caspase 的线粒体途径促进子宫内瘤细胞凋亡[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(2): 168-171
- [12] Zhang N, Wang XH, Mao SL, et al. Astragaloside IV Improves metabolic syndrome and endothelium dysfunction in Fructose-Fed rats [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 3896-3907
- [13] Baba HA, Takeda A, Nagano M. The influence of decreased left-ventricular afterload on cardiac morphology in hypertrophied rat hearts [J]. *Int J Cardiol*, 1995, 49(2): 107-117
- [14] Wei Y, Whaley-Connell AT, Habibi J, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates vascular apoptosis and injury via rescuing akt activation [J]. *Hypertension*, 2009, 53(2): 158-165
- [15] Sanchez-Lozada LG, Lanaspa MA, Cristobal-Garcia M, et al. Uric acid-induced endothelial dysfunction is associated with mitochondrial alterations and decreased intracellular ATP concentrations [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2012, 121(3-4): e71-e78
- [16] 郝明, 匡洪宇, 傅铮, 等. 黄芪甲苷对高糖培养下视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(30): 2104-2107
- [17] 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
- [18] 王占庆, 敖水晶, 王金萍. 超氧化物歧化酶同工酶异常表达与活性的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(7): 485-488
- [19] Ying YL, Balaban CD. Regional distribution of manganese superoxide dismutase 2 (Mn SOD) expression in rodent and primate spiral ganglion cells [J]. *Hear Res*, 2009, 253(1-2): 116-124
- [20] Orr AL, Ashok D, Sarantos MR, et al. Inhibitors of ROS production by the ubiquinone-binding site of mitochondrial complex I identified by chemical screening [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 1047-1059
- [21] Klein LE, Cui L, Gong Z, et al. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(2): 197-203
- [22] Yang J, Li J, Lu J, et al. Synergistic protective effect of astragaloside IV-tetramethylpyrazine against cerebral ischemic-reperfusion injury induced by transient focal ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(1): 64-72
- [23] Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(3): 413-416

[收稿日期] 2014-02-28



欢迎投稿 欢迎订阅