·论　著·

黄芪多糖抑制TGF-β1和Nox4/Akt/mTOR信号通路保护心肌重构的作用研究

张石在[1]，王毅[2]，马瑞莲[2]，刘晶[2]，刘天龙[2*](1.鄂尔多斯应用技术学院医学系，内蒙古 鄂尔多斯 017000；2.内蒙古医科大学附属医院药剂部，呼和浩特 010030)

摘要：目的　研究黄芪多糖(Astragalus polysaccharide，APS)对心肌重构的保护作用及机制。**方法**　通过主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction，TAC)构建心肌重构小鼠模型并使用APS进行干预。利用心脏超声成像系统，心肌组织麦胚凝集素染色、天狼星红染色及Real-time PCR评价APS对心肌重构小鼠模型的保护作用。Western blotting检测心肌组织中Nox4、TGF-β1、mTOR及Akt的表达水平，探讨APS保护心肌重构的机制。**结果**　TAC手术4周后，TAC组小鼠左心室舒张末期后壁厚度(left ventricular end-diastolic posterior wall dimension，LVPWd)较空白对照组显著增加(P<0.01)，左心室收缩功能显著下降，而APS+TAC组小鼠LVPWd较TAC组显著降低(P<0.05)，左心室收缩功能明显改善。APS对TAC诱导的小鼠心体比和心胫比增加具有显著的保护作用(P<0.001)。心肌组织病理染色结果显示，TAC组小鼠心肌细胞肥大水平和心肌纤维化水平较空白对照组小鼠显著增加(P<0.01)，而APS对TAC诱导的心肌细胞肥大和纤维化具有显著的保护作用(P<0.01 或 P<0.05)。与空白对照组比较，TAC 组小鼠心肌组织中心钠素和脑钠肽的表达水平显著升高(P<0.001)，而APS对此有显著的抑制作用(P<0.01或P<0.05)。进一步研究发现，APS干预对TAC诱导的Nox4、TGF-β1、mTOR及p-Akt在心肌组织中的表达具有显著的抑制作用。**结论**　APS能够通过抑制TGF-β1和Nox4/Akt/mTOR信号通路发挥对心肌重构小鼠模型的保护作用。

关键词：黄芪多糖；心肌重构；保护作用；TGF-β1信号通路；Nox4/Akt/mTOR信号通路
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2021)24-3108-07
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.010
引用本文：张石在，王毅，马瑞莲，等. 黄芪多糖抑制TGF-β1和Nox4/Akt/mTOR信号通路保护心肌重构的作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3108-3114.

Study on Effect of Astragalus Polysaccharide in Protecting Cardiac Remodeling by Inhibiting TGF-β1 and Nox4/Akt/mTOR Signal Pathway

ZHANG Shizai[1], WANG Yi[2], MA Ruilian[2], LIU Jing[2], LIU Tianlong[2*](*1.Department of Basic Medicine, Ordos Institute of Technology, Ordos 017000, China; 2.Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To study the protective effect and mechanism of Astragalus polysaccharide(APS) on cardiac remodeling. **METHODS**　Mouse cardiac remodeling model prepared by transverse aortic constriction(TAC) was treated with APS. The protective effect of APS on cardiac remodeling was evaluated by echocardiography, wheat germ agglutinin staining and picrosirius red staining of myocardial tissue and Real-time PCR. Expression level of Nox4, TGF-β1, mTOR and Akt was detected by Western blotting to illustrate the mechanism of APS on cardiac remodeling. **RESULTS**　After TAC for 4 weeks, compared to blank control group, left ventricular end-diastolic posterior wall dimension(LVPWd) was significantly increased(P<0.01), the contractile function of the left ventricle decreased significantly, and the LVPWd of the mice in the APS+TAC group was significantly lower than that in the TAC group(P<0.05), and the contractile function of the left ventricle was significantly improved. APS treatment could inhibit TAC-induced increase in ratio of heart weight to body weight and heart weight to tibial length(P<0.001). The pathological staining results of myocardial tissue showed that a significant increase in cardiac hypertrophy and fibrosis was found in mice in TAC group compared with blank control group(P<0.01), while APS

基金项目：国家自然科学基金项目(81960048)；内蒙古自治区自然科学基金(2019BS08003)；内蒙古医科大学百万工程项目[YKD2018KJBW(LH)026]；内蒙古医科大学附属医院博士启动金计划项目(NYFY BS 202114)

作者简介：张石在，男，副教授　Tel: 13624717624　E-mail: zhangshizai1976@163.com　*通信作者：刘天龙，男，博士，副主任药师　Tel: 15247129705　E-mail: tianlongliu1984@163.com

treatment had a significantly protective effect on TAC-induced cardiac hypertrophy and fibrosis(P<0.01 or P<0.05). Compared to blank control group, a significant increased expression level of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide were observed in heart of model mice(P<0.001), which was inhibited in APS-treated mice(P<0.01 or P<0.05). Further study showed that APS had a significant inhibitive effect on TAC-induced expression of Nox4, TGF-β1, mTOR and p-Akt in myocardial tissue. **CONCLUSION** APS protect TAC-induced cardiac remodeling via inhibiting TGF-β1 and Nox4/Akt/mTOR signal pathway.
KEYWORDS: Astragalus polysaccharide; cardiac remodeling; protective effect; TGF-β1 signal pathway; Nox4/Akt/mTOR signal pathway

心肌重构是最常见的高血压靶器官损害[1-2]。流行病学调查结果显示，有 10%~30%，甚至>50%的中、重度高血压患者存在不同程度的心脏结构和功能改变，其中，以左心室重构最为常见[3]。所谓心肌重构是心脏在多种生理或病理条件下出现的代偿性或失代偿性的结构和功能改变，其既包括宏观上心脏尺寸、收缩和舒张功能的改变，也包含微观上心肌基因表达水平的改变、能量代谢模式的改变及心肌细胞微环境的改变等[4]。研究显示，左心室重构作为多种心血管疾病的早期临床症状伴随在慢性心衰和梗死性心律失常的整个病理变化中[5]。目前，虽然发现了一些与心肌重构有关的非编码 RNA[6],小分子生物标志物[7]和细胞信号通路，但心肌重构的发病机制尚不明确，临床上仍以控制血压为主要的治疗手段。不同类型的降压药物通过减少压力负荷和其他途径有效地降低高血压患者的左心室质量，心室壁厚度及抑制心脏的向心性重构，然而，流行病学调查结果显示，即便长期有效地控制血压，仍有一部分高血压患者会出现心肌重构表型，这是单纯依靠控制血压治疗心肌重构的最大局限性[8-9]。因此，筛选对心肌重构具有保护作用的活性天然产物并研究其作用机制，对于深入地理解心肌重构的发病机制和寻找新的干预靶点具有重要的意义。

中药黄芪是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. Mongholicus (Bge.) Hsiao 和膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.的干燥根，为内蒙古自治区的道地药材。黄芪多糖(Astragalus polysaccharide，APS)是黄芪的主要活性成分，具有调节免疫、抗微生物、抗肿瘤、抗纤维化、抗衰老及调节血糖等活性[10-11]。研究显示，APS 能够调控 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase，JNK)、蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白(protein kinase B/mammalian target of rapamycin，Akt/mTOR)、核因子 κB(nuclear factor κB，NF-κB)和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/AKT 等信号通路，而上述信号通路与高血压心肌重构的发生密切相关[12]。本课题组前期研究结果显示，APS 能够抑制 Toll 样受体 4(TLR4)/NF-κB 信号通路缓解柯萨奇病毒 B3(coxsachievirus B3，CVB3)诱导的小鼠心脏炎症反应而发挥保护病毒性心肌炎的活性[13]。本研究旨在系统地评价 APS 对心肌重构的保护作用及机制，为高血压心肌重构的防治策略和药物靶点提供新的线索和理论依据，对于利用现代生物学手段开发民族特色药物资源具有重要的意义。

1 仪器与试剂

1.1 动物

动物实验得到内蒙古医科大学附属医院伦理委员会许可。选择♂12 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 30 只，体质量为 20~22 g，实验动物购于内蒙古大学实验动物中心，动物生产许可证号：SCXK(蒙) 2016-0001，饲养于 12 h 黑白昼夜交替的恒定室温及湿度的环境中，在实验开始前小鼠适应饲养环境 1 周，自由进食饮水。

1.2 仪器

Vevo770 小鼠超声心动图检测平台(加拿大 VISUALSONIC 公司)；10025025 Rev A MINI-PROTEAN®Tetra System(美国 Bio-Rad)；iBright CL1000 成像系统、Varioskan 96-well plate reader 多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific)；7500 Fast Real-time PCRPCR 仪(美国 ABI 公司)；MagNA Lyser 组织破碎仪(美国 Roche 公司)。

1.3 试剂

APS(Solarbio，批号：SA9790；纯度：90%)；天狼星红染色试剂盒(安徽雷根生物有限公司，批号：DC0041)；麦胚凝集素染色剂(Invitrogen，批号：W6748)；电泳液(批号：CW0045S)、电转液(批号：CW0044S)及洗涤液(批号：CW0043S)均购自 Cwbiotech；逆转录及扩增试剂盒(Takara，批号：RR037A)；Novex ™ ECL 化学发光底物试剂盒(Thermo，批号：WP20005)；三溴乙醇(Sigma，批号：T48402)；Akt 抗体(批号：2920)、磷酸化 Akt CPART 抗体(批号：9614)、mTOR 抗体(批号：2983)

均购自 CST；NADPA 氧化酶 4(NADPH oxidase 4, Nox4)抗体(批号：ab154244)、TGF-β1 抗体(批号：ab215715)、GAPDH 抗体(批号：ab8245)均购自 Abcam。

2 方法

2.1 心肌重构小鼠模型制备

根据文献[14]报道的方法通过主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction，TAC)制备心肌重构小鼠模型：腹腔注射 2%的三溴乙醇麻醉小鼠，给药剂量为 0.15 mL·(10 g)$^{-1}$，待小鼠全身放松昏迷后，将小鼠固定在自制鼠板上，用胶布固定小鼠呈自然仰卧位。手术区域脱毛并消毒，沿中位线在小鼠颈部剪开 2 cm 纵向切口，顿性分离甲状腺，沿气管向下剥离暴露胸骨上缘，剪开胸骨，暴露主动脉弓。将主动脉弓、头臂干及左颈总动脉之间的软组织撕开一小口，穿 6-0 号线并使用 27 G 的注射器针头作为垫针，结扎后取下垫针，使用 3-0 号线缝合颈部皮肤并消毒。手术结束后，将小鼠置于恒温垫上，待小鼠苏醒后放回鼠笼饲养。

2.2 分组及干预

使用生理盐水配置 20 mg·mL^{-1} 的 APS 溶液 4 mL，40 ℃加热和超声 3 min 以促进其充分溶解，备用。共设置 3 个实验组，即空白对照组，心肌重构模型组(TAC 组)及 APS 干预组(TAC+APS 组)，每组 10 只 12 周龄 SPF 级 C57BL/6♂小鼠。TAC 手术前，TAC+APS 组小鼠每天以 0.1 mL·(10 g)$^{-1}$ 的剂量灌胃 APS 溶液进行预干预[APS 的干预剂量为 2 mg·(10 g)$^{-1}$][13]，TAC 组和空白对照组小鼠给予 0.1 mL·(10 g)$^{-1}$ 的生理盐水，预干预时间为 2 周。预干预结束后，对 TAC 组和 TAC+APS 组小鼠进行主动脉缩窄手术，手术完成后，TAC+APS 组小鼠继续接受 APS 灌胃治疗，TAC 组和空白对照组小鼠灌胃相同剂量的生理盐水。TAC 手术 4 周后，在大体解剖水平、病理水平和分子水平评价 APS 对心肌重构的保护作用。

2.3 小鼠心脏超声检测

模型建立 4 周后，通过心脏超声评价小鼠左心室肥厚情况和心脏功能的改变情况。采用 M 型超声在左室最大腔径处记录左心室前后壁运动曲线。分析测量连续 3 个不受呼吸影响的心动周期参数，计算其平均值。分别记录舒张末期左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness in diastole，LVPWd)、舒张末期左室内径(left ventricular internal diameter in diastole，LVIDd)、收缩末期左室前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness at end-systole，LVAWs)、收缩末期左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness in systole，LVPWs)、收缩末左室内径(left ventricular internal diameter at end-systole，LVIDs)、舒张末左室容积(left ventricular end-diastolic volume，LVEDV)、收缩末左室容积(left ventricular end-systolic volume，LVESV)，并计算左室射血分数(left ventricular ejection fraction，LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening，LVFS)，计算公式如下：

LVEF(%)=(LVEDV− LVESV)/LVEDV×100%；

LVFS(%)=(LVIDd− LVIDs)/LVIDd×100%。

2.4 心脏取材和称重

小鼠称重后，使用 2%的三溴乙醇麻醉小鼠，摘眼球取血后脱臼处死小鼠，迅速剪开其胸廓，取出心脏放入 PBS(0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% KH_2PO_4, 0.4% Na_2HPO_4)中冲洗，去除心脏表面及房室腔中的血液并去除部分主动脉及其他相连的脏器，在滤纸上轻轻按压以吸干心脏表面的 PBS，称重并记录。使用游标卡尺测量每只小鼠胫骨长度并记录。按如下公式计算小鼠的心体比和心胫比：

心体比=心脏质量(mg)/小鼠体质量(g)；

心胫比=心脏质量(mg)/小鼠胫骨长度(mm)。

心脏称重完成后，剪掉两侧的心耳，将剩下的心室平均分成 3 段，取上端和下端迅速放入液氮中冻存，用于提取心肌蛋白和总 RNA。心室的中段置于 4%多聚甲醛中固定用于病理染色。

2.5 心肌组织麦胚凝集素染色(wheat germ agglutinin，WGA)和天狼星红染色(picrosirius red stain，PRS)

使用 4%的多聚甲醛溶液对心肌组织进行固定，固定 48 h 后将组织转移至包埋盒流水冲洗 2 h，然后再依序置入 70%乙醇 25 min、80%乙醇 25 min、90%乙醇 30 min、95%乙醇 I 30 min、95%乙醇 II 20 min、100%乙醇 I 10 min、100%乙醇 II 10 min、二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min、石蜡 I 10 min、石蜡 II 10 min、石蜡 III 10 min，得到可供切片的蜡块。石蜡切片厚度 6 μm，于乳头肌水平横切，经脱蜡、去除内源性过氧化物酶和抗原活化后，行 WGA 和 PRS 染色评价小鼠心肌细胞肥大程度和纤维化程度。

2.6 心肌蛋白水平检测

利用RIPA裂解液和MagNA Lyser匀浆仪提取心肌总蛋白，通过 Western blotting 检测心肌组织中 Nox4、TGF-β1、mTOR 及 Akt 的表达水平，探讨 APS 保护心肌重构的机制。

2.7 Real-time(RT)-PCR 法检测

TRIzol 法提取心肌组织的总 RNA，使用 TaKaRa 逆转录试剂盒将其转化为 cDNA，利用特异性引物进行 RT-PCR 扩增。扩增结束后以 GAPDH 为内参，采用 Quante Studio Soft 1.3 软件通过 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行相对定量分析。扩增引物如下，*ANP*：F–5'-GCTTCCAGGCCATATTGGAG-3'，R–5'-GGGGGCATGACCTCATCTT-3'；*BNP*：F–5'-GAGGTCACTCCTATCCTCTGG-3'，R–5'-GCCATTTCCTCCGACTTTTCTC-3'；*GAPDH*：F–5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'，R–5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。上述引物由北京澳科鼎盛生物科技有限公司合成。

2.8 数据处理

采用 GraphPad 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK 法。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 APS 对 TAC 诱导的小鼠心脏功能改变的保护作用

模型建立 4 周后，利用心脏超声检测小鼠心脏的结构和功能改变情况，结果显示，与空白对照组比较，TAC 组小鼠心脏的结构、收缩和舒张功能发生明显改变，结果见图 1。进一步测量和统计发现，TAC 组小鼠 LVPWd 较空白对照组小鼠显著增加($P<0.01$)，左心室的收缩功能显著降低，主要表现在模型组小鼠心脏的 LVEF 和 LVFS 较空白对照组小鼠显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。与 TAC 组小鼠比较，TAC+APS 组小鼠 LVPWd 显著降低($P<0.05$)，LVEF 和 LVFS 显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，结果见表 1。

表 1 小鼠心脏功能改变($\bar{x}\pm s$，n=10)

Tab. 1 Change in mice's heart function($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	LVPWd/mm	LVEF/%	LVFS/%
空白对照组	0.65±0.08	73.57±5.58	40.7±5.43
TAC 组	1.12±0.13[1)]	46.25±6.4[1)]	24.31±4.48[2)]
TAC+APS 组	0.78±0.12[3)]	64.28±7.77[3)]	34.74±4.9[4)]

注：与空白对照组比较，[1)]$P<0.01$，[2)]$P<0.001$；与 TAC 组比较，[3)]$P<0.05$，[4)]$P<0.01$。

Note: Compared with blank control, [1)]$P<0.01$, [2)]$P<0.001$; compared with TAC group, [3)]$P<0.05$, [4)]$P<0.01$.

3.2 APS 对 TAC 诱导的小鼠心肌肥厚的保护作用

实验结束后，处死小鼠并行心脏取材，结果显示，TAC 手术 4 周后，TAC 组小鼠心脏的形态学特征较空白对照组小鼠发生明显改变，主要表现在心脏体积增加，左心室壁增厚，心室容积减小，而 APS 干预对小鼠心脏的形态学改变具有显著的保护作用，结果见图 2A。心脏取材后，称量小鼠心脏质量和胫骨长度，计算心体比和心胫比。结果显示，TAC 手术 4 周后，TAC 组小鼠的心体比和心胫比较空白对照组小鼠显著增加($P<0.001$)，而 APS 干预对 TAC 诱导的小鼠心体比和心胫比增加具有显著的保护作用($P<0.001$)，具体见图 2B。

3.3 APS 对 TAC 诱导的小鼠心肌细胞肥大和心肌纤维化的保护作用

通过心肌组织 WGA 染色和 PRS 染色在病理水平评价小鼠心肌细胞肥大程度和纤维化程度。使用 Image J(Version 1.52v)软件测量小鼠心肌组织中 PRS 染色阳性区域的面积和 WGA 染色后心肌细胞的表面积。心肌组织 WGA 染色结果显示，TAC 手术 4 周后，小鼠左心室心肌细胞表面积较空白对照组显著增加($P<0.01$)，说明 TAC 组小鼠出现一定程度的心肌细胞肥大，而 APS 干预对 TAC 诱导的心肌细胞肥大具有显著的保护作用($P<0.01$)。心肌组织 PRS 染色结果显示，APS 干预对 TAC 诱导的心肌组织纤维化具有显著的保护作用($P<0.05$)，结果见图 3。

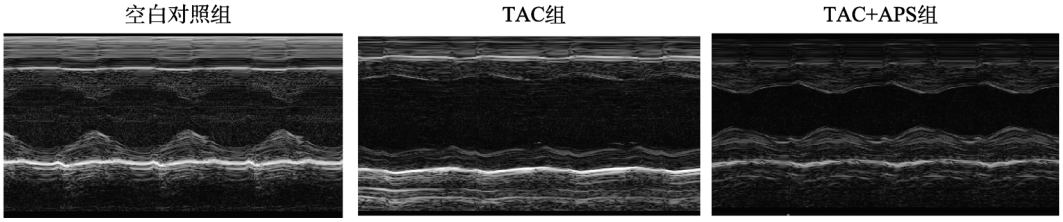

图 1 典型 M 型超声心动图

Fig. 1 Representative M-mode echocardiograms

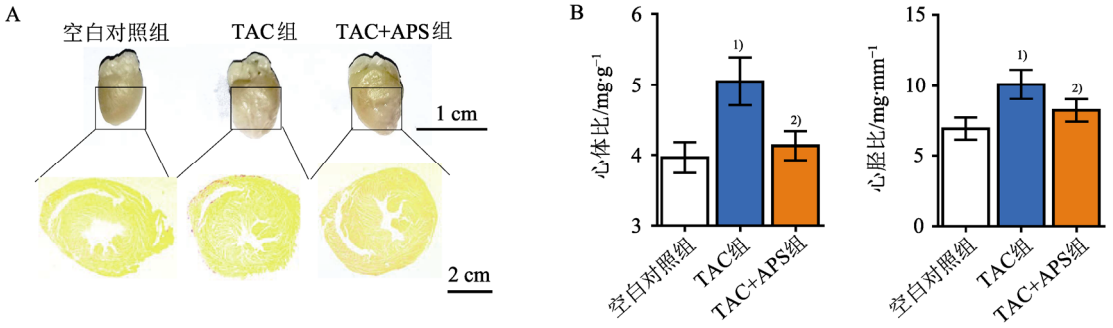

图 2 小鼠心脏的形态学改变($\bar{x}\pm s$，n=10)

A–小鼠心脏的结构改变(上方为心脏整体形态，下方为心肌组织天狼星红染色结果)；B–小鼠心体比和心胫比统计结果。与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.001；与 TAC 组比较，$^{2)}P$<0.001。

Fig. 2 Change in morphology of mouse heart($\bar{x}\pm s$, n=10)

A–change in structure of mouse heart(Up: morphology of mouse heart; Down: PRS results); B–result of ratio of heart weight to body weight and heart weight to tibial length. Compared with blank control group, $^{1)}P$<0.001; compared with TAC group, $^{2)}P$<0.001.

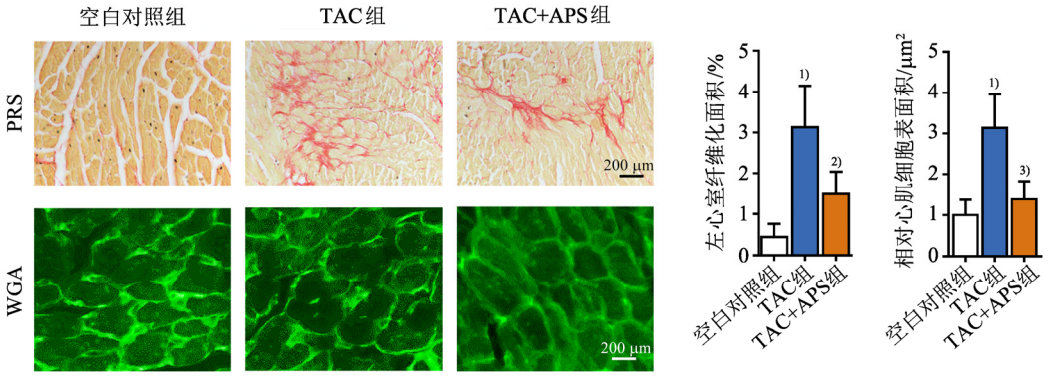

图 3 心肌组织 WGA 染色和 PRS 染色结果($\bar{x}\pm s$，n=6)

与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.01；与 TAC 组比较，$^{2)}P$<0.05，$^{3)}P$<0.01。

Fig. 3 WGA staining and PRS staining results of myocardial tissue($\bar{x}\pm s$, n=6)

Compared with blank control group, $^{1)}P$<0.01; compared with TAC group, $^{2)}P$<0.05, $^{3)}P$<0.01.

3.4 APS 对 TAC 诱导的 ANP 和 BNP 在心肌组织中的表达具有显著的抑制作用

为了在分子水平评价 APS 对心肌重构的保护作用，通过 RT-PCR 检测心肌组织中肥厚标志物 ANP 和 BNP 的表达水平。结果显示，TAC 手术 4 周后，TAC 组小鼠心肌组织中 ANP 和 BNP 的表达水平较空白对照组小鼠显著升高(P<0.001)，而 APS 干预对 ANP 和 BNP 在心肌组织中的表达具有显著的抑制作用(P<0.01 或 P<0.05)，结果见图 4。

3.5 APS 抑制 Nox4、TGF-β1、mTOR 及 P-Akt 在心肌组织中的表达

为了研究 APS 保护心肌重构的机制，本研究检测了小鼠心肌组织中 Nox4、TGF-β1、mTOR 及 Akt 的表达水平。结果显示，TAC 组小鼠心肌组织中 Nox4、TGF-β1、mTOR 及 P-Akt 的表达水平较空白对照组小鼠显著升高(P<0.001 或 P<0.01)，而 TAC+APS 组小鼠心肌组织中上述蛋白因子的表达水平较 TAC 组显著降低(P<0.05)，结果见图 5。

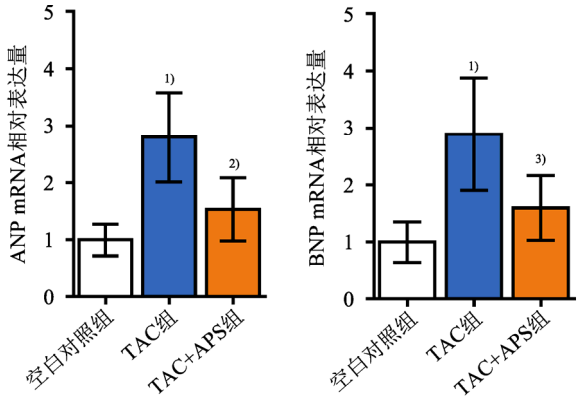

图 4 ANP 和 BNP 在心肌组织中的表达水平($\bar{x}\pm s$，n=6)

与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.001；与 TAC 组比较，$^{2)}P$<0.01，$^{3)}P$<0.05。

Fig. 4 Expression level of ANP and BNP in myocardial tissue ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Compared with blank control group, $^{1)}P$<0.001; compared with TAC group, $^{2)}P$<0.01, $^{3)}P$<0.05.

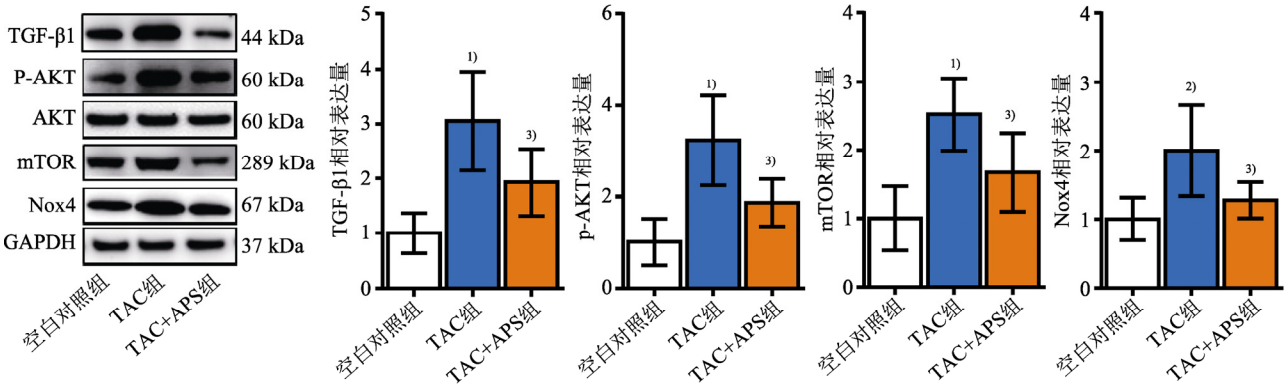

图 5 Nox4、TGF-β1、mTOR 及 p-Akt 在心肌组织中的表达水平($\bar{x} \pm s$，n=6)

与空白对照组比较，[1)]P<0.001，[2)]P<0.01；与 TAC 组比较，[3)]P<0.05。

Fig. 5 Expression level of Nox4, TGF-β1, mTOR and p-Akt in myocardial tissue($\bar{x} \pm s$, n=6)

Compared with blank control group, [1)]P<0.001, [2)]P<0.01; compared with TAC group, [3)]P<0.05.

4 讨论

本研究是在前期研究的基础上系统地评价了 APS 对心肌重构的保护作用及机制，结果显示，APS 对 TAC 诱导的小鼠心肌重构模型具有显著的保护作用，进一步研究发现，APS 能够抑制 TAC 诱导的 Nox4、TGF-β1、mTOR 及 p-Akt 在小鼠心肌组织中的表达，基于上述结果，认为 APS 能够通过抑制 TGF-β1 和 Nox4/Akt/mTOR 信号通路发挥对小鼠心肌重构模型的保护作用。

黄芪是豆科植物蒙古黄芪的干燥根，具有抗炎、免疫刺激、抗氧化应激及抗病毒等活性，是内蒙古自治区的道地药材[10]。目前，有近百种与黄芪有关的中成药及中医、蒙医方剂被广泛地用于心血管疾病的临床治疗，如芪冬颐心口服液，芪参胶囊及当归黄芪汤等。APS 是蒙古黄芪重要的生物活性成分[10]。目前，有市售的黄芪多糖注射液，其主要用于倦怠乏力，少气懒言，自汗，气短，食欲不振，气虚症，因化疗后白细胞减少、生活质量降低、免疫功能低下的肿瘤患者。研究显示，APS 具有非常广泛的药理作用，特别是在调节免疫、抗肿瘤、抗衰老及调节血糖等方面。笔者所在课题组前期研究结果发现，APS 对 CVB3 诱导的小鼠心肌组织纤维化具有显著的保护作用，而心肌纤维化是心肌重构重要的临床表型，基于此，本实验在动物水平验证了 APS 对心肌重构的保护作用。

Nox4 是一种多亚基跨膜酶，对心肌组织超氧离子及氧自由基的形成具有重要的调节作用[15]。目前，Nox 家族共有 5 种同工酶，即 Nox1、Nox2、Nox3、Nox4 和 Nox5，其中，Nox2 和 Nox4 主要分布在心肌组织[16]。与 Nox2 不同，Nox4 主要以跨膜形式广泛分布在线粒体膜、内质网膜及核膜上[17]。研究显示，心肌细胞中的 Nox4 接受 NADPH 传递的氢原子将氧原子还原为活性氧(reactive oxygen species，ROS)，其通过对细胞中氧化应激水平和线粒体功能的调节作用参与多种心血管疾病的发生[18-19]。更重要的是，已有明确证据表明，小鼠心脏特异性过表达 Nox4 可通过活化 Akt/mTOR 和 NF-κB 信号通路引起左心室肥厚和纤维化[20]。本研究发现，TAC 组小鼠心肌组织中 Nox4 表达水平较空白对照组小鼠显著增加，而 APS 干预能够抑制 TAC 诱导的 Nox4 在心肌组织中的表达，这可能是 APS 保护心肌重构的重要原因。

Nox4 被报道参与组织 ROS 的形成，因此，心肌组织中 Nox4 表达升高预示着 TAC 手术后心肌组织处于较高的氧化应激状态，而作为丝氨酸/苏氨酸激酶的 mTOR 被报道受氧化应激的调节[21]。研究显示，过量的 ROS 将激活心肌组织中的 PI3K-AKT 依赖的磷酸化级联反应，这将导致 mTOR 磷酸化水平增加，促使其调控与心肌肥厚形成相关基因的表达[22]。因此，氧化应激介导的 Akt/mTOR 信号通路活化是病理性心肌重构形成的重要原因[23]。虽然笔者没有检测心肌组织的氧化应激水平，但文献已经报道，心肌重构常伴随着心肌细胞线粒体功能障碍，主要表现在心肌重构后心肌细胞利用脂肪酸的能力显著下降，而对葡萄糖的依赖性增加，这种能量代谢模式的转变不仅降低了心肌细胞合成 ATP 的能力，而且形成过多的 ROS，ROS 将激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进心肌重构的形成[24]。在本研究中，TAC 组小鼠心肌组织中 p-AKT 和 mTOR 的表达水平较空白对照组显著增加，而 APS 干预能够显著抑制

TAC 诱导的 AKT 和 mTOR 在心肌组织中的表达，这也是 APS 保护心肌重构的重要机制。

除了心肌细胞肥大，心肌组织纤维化也是心肌重构的重要临床表现。在长期的压力负荷和其他病理因素下，心肌成纤维细胞将发生表型转化，其增殖能力和细胞外基质的合成能力显著增加，细胞外基质的异常沉积是心肌纤维化形成的重要原因[25]。研究显示，TGF-β1 在心肌纤维化形成中发挥重要的调节作用。细胞外基质中的 TGF-β1 通常与其结合蛋白形成无活性的复合物，在病理条件下，表达水平显著增加的基质蛋白酶，如纤溶酶、基质金属蛋白酶(MMP) 2、MMP9 和血小板反应蛋白等能够将复合物水解，释放出有活性的 TGF-β1[26]。有活性的 TGF-β 与其受体结合使 Smad2 和 Smad3 发生磷酸化，磷酸化的 Smad2 和 Smad3 与 Smad4 形成复合物并入核调控与细胞外基质相关基因的转录[27]。最终，由于细胞外基质的异常沉积形成心肌组织纤维化。在本研究中，APS 干预能够抑制 TAC 诱导的 TGF-β1 在心肌组织中表达，这是 APS 保护心肌纤维化的重要机制。

REFERENCES

[1] KENCHAIAH S, PFEFFER M A. Cardiac remodeling in systemic hypertension[J]. Med Clin North Am, 2004, 88(1): 115-130.

[2] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-1158.

[3] LAM C S P, TENG T H K, TAY W T, et al. Regional and ethnic differences among patients with heart failure in Asia: The Asian sudden cardiac death in heart failure registry[J]. Eur Heart J, 2016, 37(41): 3141-3153.

[4] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(7): 387-407.

[5] DICKHOUT J G, CARLISLE R E, AUSTIN R C. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: Endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis[J]. Circ Res, 2011, 108(5): 629-642.

[6] OTTAVIANI L, DA COSTA MARTINS P A. Non-coding RNAs in cardiac hypertrophy[J]. J Physiol, 2017, 595(12): 4037-4050.

[7] CHAN C T, KAYSEN G A, BECK G J, et al. Changes in biomarker profile and left ventricular hypertrophy regression: Results from the frequent hemodialysis network trials[J]. Am J Nephrol, 2018, 47(3): 208-217.

[8] AXELSSON A, IVERSEN K, VEJLSTRUP N, et al. Efficacy and safety of the angiotensin II receptor blocker losartan for hypertrophic cardiomyopathy: The INHERIT randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015, 3(2): 123-131.

[9] ISO H, KIYAMA M, DOI M, et al. Left ventricular mass and subsequent blood pressure changes among middle-aged men in rural and urban Japanese populations[J]. Circulation, 1994, 89(4): 1717-1724.

[10] ZHANG R X, QIN X Z, ZHANG T, et al. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes[J]. Molecules, 2018, 23(10): 2711. Doi: 10.3390/molecules23102711.

[11] SHI S H, DONG D X, LI S Y, et al. Comparative study on anti-aging effect between Hedysari Radix polysaccharides and Astragali Radix polysaccharides in rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(16): 2024-2028.

[12] XIE L, WU Y, FAN Z, et al. Astragalus polysaccharide protects human cardiac microvascular endothelial cells from hypoxia/reoxygenation injury: The role of PI3K/AKT, Bax/Bcl-2 and caspase-3[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 904-910.

[13] LIU T, ZHANG M, NIU H, et al. Astragalus polysaccharide from Astragalus melittin ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF-κB p65 signal pathway and protects mice from CVB_3-induced virus myocarditis[J]. Int J Biol Macromol, 2019(126): 179-186.

[14] TAVAKOLI R, NEMSKA S, JAMSHIDI P, et al. Technique of minimally invasive transverse aortic constriction in mice for induction of left ventricular hypertrophy[J]. JoVE, 2017(127). Doi: 10.3791/56231.

[15] YOUN J Y, ZHANG J, ZHANG Y, et al. Oxidative stress in atrial fibrillation: An emerging role of NADPH oxidase[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013(62): 72-79.

[16] JIANG F, LIU G S, DUSTING G J, et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-β-mediated fibrotic responses[J]. Redox Biol, 2014(2): 267-272.

[17] KURODA J, AGO T, MATSUSHIMA S, et al. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(35): 15565-15570.

[18] MATSUSHIMA S, KURODA J, AGO T, et al. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2013, 112(4): 651-663.

[19] ZHANG M, MONGUE-DIN H, MARTIN D, et al. Both cardiomyocyte and endothelial cell Nox4 mediate protection against hemodynamic overload-induced remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(3): 401-408.

[20] ZHAO Q D, VISWANADHAPALLI S, WILLIAMS P, et al. NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NF-κB signaling pathways[J]. Circulation, 2015, 131(7): 643-655.

[21] KIM J H, CHOI T G, PARK S, et al. Mitochondrial ROS-derived PTEN oxidation activates PI3K pathway for mTOR-induced myogenic autophagy[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(11): 1921-1937.

[22] CHEN L, LIU P, FENG X, et al. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3178-3189.

[23] WANG C, YIN M S, LIU C X. Intervention of semaglutide on the expression of mTOR signaling pathway in the early stage of diabetic cardiomyopathy rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(14): 1761-1766.

[24] FRANGOGIANNIS N G. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities[J]. Mol Aspects Med, 2019(65): 70-99.

[25] TRAVERS J G, KAMAL F A, ROBBINS J, et al. Cardiac fibrosis[J]. Circ Res, 2016, 118(6): 1021-1040.

[26] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF-β: The master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6):325-338.

[27] MA Z G, YUAN Y P, WU H M, et al. Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(12): 1645-1657.

收稿日期：2021-04-06

(本文责编：陈怡心)