

黄芪多糖对糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢的影响及血管内皮保护机制

禹博威¹ 潘晓琼² 陈君第¹ 胡臻²

1.温州医科大学 浙江,温州 325000 2.温州医科大学附属第二医院

摘要: [目的]探讨黄芪多糖(Astragalus polysaccharides,APS)对糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢的影响及一氧化氮(nitric oxide,NO)相关的血管内皮保护机制。[方法]选择无特定病原体(specific pathogen free,SPF)级SD健康大鼠,采用高脂饮食+链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)腹腔注射联合维生素D3(vitamin D3,VitD3)灌胃+免疫损伤法建立糖尿病动脉粥样硬化大鼠模型。将未造模的大鼠随机分为空白对照组、APS对照组,造模大鼠分为模型组、治疗组。模型组与治疗组以高脂饲料喂养,空白对照组与APS对照组以正常饲料喂养,模型组和空白对照组给予0.9%氯化钠溶液灌胃,APS对照组和治疗组给予APS 700mg·kg⁻¹灌胃,共灌胃8周。观察记录大鼠健康状态,检测血清空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)、空腹胰岛素(fasting serum insulin,FINS)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDL-C)水平,并计算胰岛素抵抗指数(homeostatic model assessment of insulin resistance,HOMA-IR);采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观察胸主动脉组织病理变化;实时荧光定量PCR(Real-time quantitative polymerase chain reaction,Real-time qPCR)检测胸主动脉组织内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4,NOX4)、磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase,AMPK)的mRNA表达水平。[结果]与空白对照组比较,模型组大鼠一般情况欠佳,出现多食、多饮、多尿症状以及体重减少等现象,FBG、FINS水平及HOMA-IR升高($P<0.05$, $P<0.01$),TC、TG、LDL-C水平增高,HDL-C水平降低($P<0.01$)。HE染色显示胸主动脉内膜结构受损、钙盐沉积,伴泡沫细胞、炎性细胞浸润,并有斑块形成。Real-time qPCR提示胸主动脉中eNOS、AMPK mRNA表达下降($P<0.01$),NOX4 mRNA表达增加($P<0.01$)。APS对照组FBG、FINS、TC、TG、LDL-C、HDL-C、eNOS水平和HOMA-TR、AMPK mRNA、NOX4 mRNA差异不明显,均无统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,治疗组大鼠一般情况改善,FBG、FINS水平及HOMA-IR降低($P<0.05$),TC、TG、LDL-C降低($P<0.05$),HDL-C水平差异无统计学意义($P<0.05$)。HE染色显示胸主动脉内膜病变改善。胸主动脉组织中eNOS mRNA表达增高($P<0.05$),NOX4 mRNA表达降低($P<0.05$),AMPK mRNA表达增高($P<0.05$)。[结论]APS能有效降低糖尿病动脉粥样硬化大鼠血糖、血脂水平,抑制糖尿病动脉粥样硬化形成,其机制可能与激活AMPK信号通路,活化eNOS以及抑制NOX4的表达有关,且APS对健康大鼠无明显影响。

关键词: 黄芪多糖;糖尿病;动脉粥样硬化;一氧化氮;血管内皮功能障碍;AMPK信号通路;糖脂代谢

中图分类号: R331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-5509(2021)05-0447-07

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2021.05.003

Effect of Astragalus Polysaccharides on Glucose and Lipid Metabolism in Diabetic Atherosclerosis Rats and Vascular Endothelial Protection Mechanism YU Bowei¹, PAN Xiaojiong², CHEN Jundixia¹, et al. 1. Wenzhou Medical University, Zhejiang, Wenzhou(325000), China; 2. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University

Abstract: [Objective] To investigate the effect of Astragalus polysaccharides(APS) on glucose and lipid metabolism and nitric oxide(NO) related vascular endothelial protection mechanism in diabetic atherosclerosis rats. [Methods] Healthy specific pathogen free(SPF) grade SD rats were selected to establish diabetic atherosclerotic rat model by high-fat diet combined with streptozotocin(STZ) intraperitoneal injection+vitamin D3 (VitD3) gavage+immune injury method. The unmodeled rats were randomly divided into blank control group and APS control group, model rats are divided into model group and treatment group. Rats in model group were given high-fat feed with the treatment group and rats in blank control group were given normal feed with the APS control group. Model group and blank control group were given 0.9% sodium chloride injection by gavage administration, while APS control group and treatment group were given 700mg·kg⁻¹ APS, and all the groups were gavage administrated for 8 weeks. After 8 weeks, the health status were observed and recorded, levels of fasting blood glucose(FBG), fasting serum insulin(FINS), total cholesterol(TC), triglycerides(TG), low density lipoprotein cholesterol(LDL-C), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C) were detected and homeostatic model assessment of insulin resistance(HOMA-IR) was calculated. Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to observe the histopathological changes in the thoracic aorta; Real-time quantitative polymerase chain reaction(Real-time qPCR) was adopted to detect mRNA expression levels of endothelial nitric oxide synthase(eNOS), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4(NOX4), and adenosine monophosphate-activated protein kinase(AMPK) in the thoracic aorta. [Results] Compared with blank control group, the rats in model group were generally worse off, showing symptoms of overeating, drinking, polyuria and weight loss, with

基金项目:温州市高层次人才创新项目(604090352/417);温州市基础性科研项目(Y20190716)

Fund projects: Wenzhou High-level Talent Innovation Project(604090352/417); Wenzhou Basic Scientific Research Projects(Y20190716)

通讯作者:胡臻,E-mail:1435975104@qq.com

论

著

increased levels of FBG, FINS and HOMA-IR($P<0.05$, $P<0.01$), increased levels of TC, TG, LDL-C and decreased levels of HDL-C($P<0.01$). HE staining revealed impaired thoracic aortic intimal structure with calcium salt deposition, foam cells, inflammatory cell infiltration, and plaque formation. Real-time qPCR showed that the expression of eNOS and AMPK mRNA in the thoracic aorta was decreased($P<0.01$) and NOX4 mRNA expression was increased($P<0.01$). There were no significant differences in levels of FBG, FINS, TC, TG, LDL-C, HDL-C, eNOS and HOMA-IR, AMPK mRNA and NOX4 mRNA in APS control group, and they were not statistically significant($P>0.05$). Compared with model group, the general condition of rats in treatment group improved, the levels of FBG, FINS and HOMA-IR decreased significantly($P<0.05$), while the levels of TC, TG, LDL-C decreased($P<0.05$), and the difference of the level of HDL-C were not statistically significant($P>0.05$). HE staining showed improvement in the endothelial lesion of the thoracic aorta. The expression of eNOS mRNA in thoracic aorta tissue increased($P<0.05$), NOX4 mRNA decreased($P<0.05$), and AMPK mRNA expression increased($P<0.05$). [Conclusion] APS can effectively reduce blood glucose and lipid levels and inhibit diabetic atherosclerosis formation in rats, and the mechanisms may be related to activation of the AMPK signaling pathway, activation of eNOS and inhibition of NOX4 expression, but APS has no significant effect on healthy rats.

Key words: Astragalus polysaccharides; diabetes; atherosclerosis; nitric oxide; vascular endothelial dysfunction; AMPK signaling pathway; glucose and lipid metabolism

2型糖尿病是糖尿病的常见类型,以长期高血糖状态和胰岛素抵抗为主要临床表现,可引发视网膜病变及神经损伤、糖尿病肾病、心血管病变等并发症^[1-2]。在糖尿病诸多大血管并发症中,以动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)最为常见,其发生发展可导致冠心病、脑梗死等一系列心血管疾病,是引起患者死亡的主要危险因素^[3]。血管内皮功能异常是导致AS相关心血管病变的重要因素,早期可表现为血管内膜脂蛋白和单核细胞的渗透积聚,单核细胞在内膜下先分化为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬积聚的脂蛋白后转变成泡沫细胞,活化的内皮细胞和巨噬细胞产生多种细胞因子,引起纤维组织增生,逐步形成纤维斑块,斑块导致的血管堵塞和斑块破裂引起的血栓都会引发的动脉粥样硬化性栓塞^[4],所以防治内皮功能异常是治疗AS的关键点。

中药黄芪是豆科植物黄芪的干燥根茎,其主要活性提取物黄芪多糖(Astragalus polysaccharides, APS)及黄芪甲苷等具有一系列药理作用,包括促进免疫反应、抗炎、保护血管、抗氧化、改善胰岛素抵抗和抗肿瘤等^[5-9],已被广泛用于心血管疾病的治疗。研究显示,APS能够促进一氧化氮(nitric oxide, NO)的产生,改善NO相关的血管内皮依赖性舒张功能障碍^[10]。NO是血管内皮细胞分泌的血管内皮舒张因子,除了维持血管内皮舒张功能外,还具有抑制白细胞和血小板聚集和黏附、诱导血小板解聚、促进血管内皮细胞生长等作用^[11-12]。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX)是NO生成和消除的关键酶。有研究表明,磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)能够

通过激活eNOS,提高NO水平,以维持血管内皮功能^[13-14]。NOX活性升高,ROS产生增多,则会抑制eNOS活性,引起NO释放减少^[15]。另外有报道证实,APS能够通过AMPK通路促进葡萄糖摄取,改善胰岛素抵抗并减轻炎症反应^[7,16]。但APS促进NO生成是否与AMPK途径有关尚不明确,因此本研究以高脂饮食联合链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)腹腔注射+维生素D3(vitamin D3, VitD3)灌胃+免疫损伤法建立糖尿病AS大鼠模型,探讨APS对AS大鼠NO调节信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级SD雄性大鼠50只,4周龄,体质量80~120g,由温州医科大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号码:SCXK(浙)2015-0001],饲养于温州医科大学实验动物中心[实验动物使用许可证号码:SYXK(浙)2016-0006]。

1.1.2 主要试剂 70%APS购于上海士锋生物科技有限公司(批号:89250-26-0);弗氏完全佐剂、卵清蛋白均购于美国Sigma公司(批号:F5881、A5503);98%VitD3购于上海源叶生物科技有限公司(批号:S28148);STZ、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司(批号:S8050、G1121);大鼠胰岛素(insulin, INS)酶联免疫吸附检测(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购于上海博蕴生物科技有限公司(BF-E30620);Trizol、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒均购于美国Invitrogen公司(批号:15596026、4374967、1176102K);血糖仪及血糖试纸均购于瑞士罗氏公司(批号:10151134、26000931)。

1.1.3 主要仪器 AU5800全自动生化分析仪购于美

国 Beckman Coulter 公司;DM2500 荧光正置显微镜、EG1150 石蜡包埋机、RM2235 石蜡切片机均为德国徕卡公司产品;TPJ-A 型推片机、TPJ-A 型烘片机均购于常州中威电子仪器有限公司;DW-86L626 超低温冰箱为中国海尔公司产品;超速低温离心机购于美国 Thermo Forma 公司;Light Cycler480 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time qPCR) 仪为瑞士罗氏公司产品。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病 AS 模型建立 50 只大鼠适应性饲养 1 周后,选取 30 只造模,剩余 20 只不作处理。造模大鼠予高脂饲料饲养 4 周,配方为 78.8% 基础饮食、10% 蛋黄粉、10% 猪油、1% 胆固醇、0.2% 猪胆汁盐,使之产生胰岛素抵抗;其余大鼠饲喂普通饲料。STZ 以 pH 值为 4.5 的 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液溶解,配制成浓度为 1% 的 STZ 溶液。注射前大鼠禁食不禁饮 12h,造模大鼠以 $35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量一次性腹腔注射 STZ,未造模大鼠注射等量 0.9% 氯化钠注射液。VitD3 以无水乙醇溶解,配制成浓度为 $30\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,再与食用油按 1:4 的比例混合配成混合溶液,在造模大鼠注射 STZ 1 周后,以 VitD3 $15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃 1 次,未造模大鼠给予乙醇食用油混合溶液灌胃。次日,将弗氏完全佐剂与卵清蛋白混合成抗原乳液,在造模大鼠背部按照 $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量皮下注射 1 次,间隔 3 周后以 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射,加强免疫诱导,1 次/周,连续注射 3 周;未造模大鼠只注射等量 0.9% 氯化钠注射液。STZ 注射 1 周后,在大鼠尾尖取血,连续 2 次,以快速血糖仪测空腹 6h 后血糖,空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) $\geq 11.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 者为糖尿病模型造模成功^[17]。

1.2.2 分组和给药 30 只造模大鼠中,实验期间死亡 10 只,将余下 20 只造模大鼠,分为模型组和治疗组;另将 20 只未造模大鼠分为空白对照组和 APS 对照组,每组 10 只。查阅文献发现多数研究者采用 $700\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的 APS 进行灌胃治疗,均有比较明显的延缓糖尿病进展的作用^[18-20]。前期预实验发现,高浓度(大于 $700\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 灌胃过程中容易出现药物返流,引发肺炎和窒息,难以保证大鼠生存率。综合考虑后,最终以 $700\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 作为灌胃治疗的剂量。APS 对照组与治疗组以 $700\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ APS 灌胃治疗;空白对照组与模型组以等量 0.9% 氯化钠注射液灌胃,连续给药 8 周。

1.2.3 检测指标

1.2.3.1 大鼠一般情况 观察并记录各组大鼠的精神状态、活动情况、毛色情况、饮食饮水量以及二便情况。

1.2.3.2 样本采集 末次给药后,大鼠以 10% 水合氯醛 $3.5\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,心脏取血 3~5mL 置于冰上备用。打开胸腔后分离胸主动脉,部分样本 -80°C 冻存;部分样本以 4% 多聚甲醛溶液固定备用。

1.2.3.3 血生化指标检测 将冷凝后的大鼠血液, $3000\text{r}/\text{min}$ 离心 15min 后取血清 -20°C 保存,以全自动生化分析仪检测血清 FBG、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平。以 ELISA 法检测空腹胰岛素(fasting serum insulin, FINS)水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。根据 FBG 和 FINS 计算胰岛素抵抗指数(homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR), $\text{HOMA-IR} = \text{FINS} \times \text{FBG} / 22.5$ 。

1.2.3.4 胸主动脉病理形态学观察 将经多聚甲醛溶液固定 24h 的胸主动脉组织取出,洗涤后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋, $5\mu\text{m}$ 切片,按照 HE 染色试剂盒说明书脱蜡、染色、封片,光镜下观察。

1.2.3.5 Real-time qPCR 检测胸主动脉组织 eNOS、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4)、AMPK mRNA 的表达 取 150mg 样本组织,充分研磨后,以 Trizol 试剂抽提总 RNA。参照反转录试剂盒和荧光定量试剂盒说明书,反转录合成 cDNA 后,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,进行 PCR 反应,引物设计和合成在 Invitrogen 公司完成,序列见表 1。反应体系共 $25\mu\text{L}$,由 $5 \times \text{PCR Buffer } 5.0\mu\text{L}$ 、 $250\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+} 0.3\mu\text{L}$ 、 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) $0.75\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $0.5\mu\text{L}$ 、 $25 \times \text{SYBRGreen I } 1.0\mu\text{L}$ 、 $10^{-3} \times \text{Calibration } 1.0\mu\text{L}$ 、 $5\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1} \text{ HS-Ex-Taq 酶 } 0.25\mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O } 14.7\mu\text{L}$ 、cDNA $1.0\mu\text{L}$ 组成。反应条件见表 2,产物 4°C 保存。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析。服从正态分布的计量数据,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。若满足方差齐性,两

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
eNOS	上游 ATTGCACCCTTCCGGGATT	329
	下游 ACGGTTTGCAGGACGCTGCTT	
NOX4	上游 GCTTGTGAAGTATCAAACCAAT	236
	下游 TCCAGAAATCCAAATCCAGGT	
AMPK	上游 ATCCGCAGAGAGATCCAGAA	79
	下游 CGTCGACTCTCCTTTTCGTC	
GAPDH	上游 CCAAGGAGTAAGACCCCTGG	212
	下游 TGCTTGAGCACAGGCTACTT	

表2 反应条件

Tab.2 Reaction conditions

温度	时间	循环次数(次)
95℃	90s	1
95℃	5s	40
58℃	30s	
95℃	1min	1
58℃	1min	1
58℃	10s	每个循环升高 0.5℃, 共 68 个循环

组间多重比较采用Bonferroni法;若方差不齐,采用Tamhane T2法检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较 未造模大鼠一般情况良好;造模大鼠活动减少,精神欠佳,毛发干枯易脱落,缺少光泽,出现2型糖尿病典型的多食、多饮、多尿症状,体重减少;治疗组大鼠上述症状有所好转。

2.2 各组大鼠血清FBG、FINS水平和HOMA-IR比较 与空白对照组比较,模型组和治疗组血清FBG、FINS水平和HOMA-IR均升高($P<0.05$, $P<0.01$);APS对照组

FBG、FINS水平和HOMA-IR差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,治疗组血清FBG、FINS水平和HOMA-IR降低($P<0.05$)。见表3。

2.3 各组大鼠TC、TG、LDL-C、HDL-C水平比较 与空白对照组比较,模型组和治疗组TC、TG、LDL-C水平升高($P<0.01$),HDL-C水平降低($P<0.01$);APS对照组TC、TG、LDL-C、HDL-C水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,治疗组TC、TG、LDL-C水平下降($P<0.05$),HDL-C水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表4。

表3 各组大鼠FBG、FINS及HOMA-IR比较($\bar{x}\pm s$)Tab.3 Comparison of FBG, FINS and HOMA-IR in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FBG(mmol·L ⁻¹)	FINS(mU·mL ⁻¹)	HOMA-IR
空白对照组	10	5.82±0.97	12.91±1.40	3.31±0.46
APS 对照组	10	5.38±1.05	12.87±1.12	3.05±0.43
模型组	10	26.60±3.10*	22.62±2.53*	26.93±5.58**
治疗组	10	21.80±3.30**	19.05±2.76**	18.57±4.38**#

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$

Note:Compared with blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$; compared with model group,# $P<0.05$

2.4 各组大鼠胸主动脉病理形态学比较 空白对照组和APS对照组胸主动脉组织管腔结构完整,内皮光滑,无明显增生,平滑肌细胞排列规则,无钙化和泡沫细胞生成。模型组主动脉内膜不规则增厚,向管腔内凸起形成斑块,并伴有泡沫细胞、炎性细胞浸润,中膜钙化,平滑肌细胞排列紊乱。治疗组内膜仍有大量泡沫细胞沉积,内膜局部增厚形成粥样斑块,细胞增生广泛明显,排列不规则,但病变程度较模型组轻。见图1。

2.5 各组大鼠胸主动脉组织 eNOS、NOX4、AMPK

mRNA表达水平比较 治疗8周后,与空白对照组比较,模型组和治疗组胸主动脉组织中eNOS mRNA和AMPK mRNA表达水平下降,NOX4 mRNA表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.01$);APS对照组eNOS、NOX4、AMPK mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,治疗组eNOS mRNA和AMPK mRNA表达水平升高,NOX4 mRNA表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图2。

3 讨论

目前认为,AS是一种血管炎性疾病,其特征在于

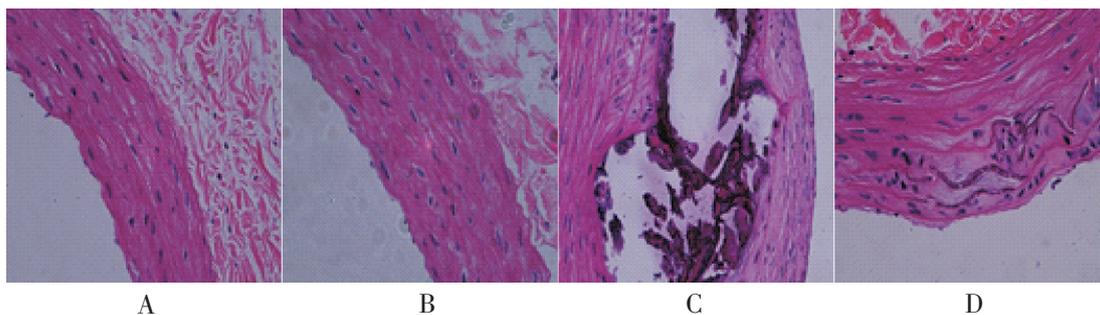
表4 各组大鼠TC、TG、LDL-C、HDL-C水平比较($\bar{x}\pm s, \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tab.4 Comparison of levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C in each group($\bar{x}\pm s, \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白对照组	10	1.99±0.55	0.48±0.11	1.10±0.10	0.25±0.08
APS 对照组	10	1.84±0.59	0.48±0.17	1.15±0.11	0.27±0.09
模型组	10	5.68±0.61**	1.05±0.21**	0.64±0.16**	0.58±0.14**
治疗组	10	4.77±1.05**#	0.84±0.15**#	0.77±0.09**	0.43±0.12**#

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$

Note: Compared with blank control group, ** $P<0.01$; compared with model group, # $P<0.05$

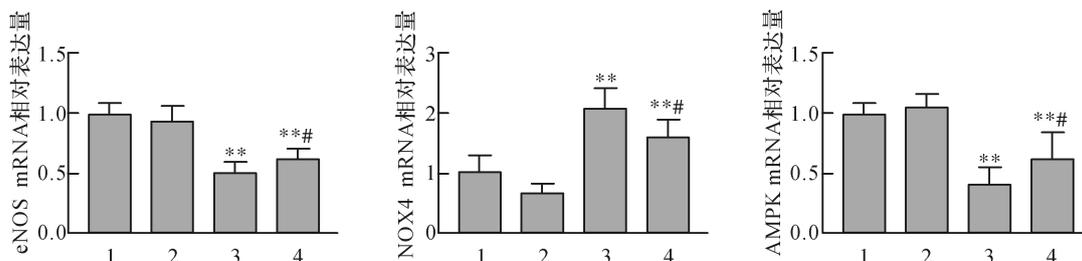


注:A.空白对照组;B.APS对照组;C.模型组;D.治疗组

Note:A. Blank control group; B. APS control group; C. Model group; D. Treatment group

图1 各组大鼠胸主动脉病理形态学比较(HE染色,400×)

Fig.1 Comparison of pathomorphology of thoracic aorta in each group(HE staining,400×)



注:1.空白对照组;2.APS对照组;3.模型组;4.治疗组。与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$

Note:1.Blank control group; 2.APS control group; 3.Model group; 4.Treatment group. Compared with blank control group, ** $P<0.01$; compared with model group, # $P<0.05$

图2 各组大鼠胸主动脉组织中eNOS、NOX4、AMPK mRNA表达比较

Fig.2 Comparison of the mRNA expression of eNOS, NOX4 and AMPK of thoracic aorta tissue in each group

禹博威,等:黄芪多糖对糖尿病动脉硬化大鼠糖脂代谢的影响及血管内皮保护机制

脂质积累、炎性细胞积聚、血管平滑肌细胞在内膜层迁移和增殖导致的血管腔狭窄,以及脂质过氧化、内皮功能障碍、活化的巨噬细胞释放的炎症介质等因素激活血小板,使其黏附、聚集^[21],其中血管内皮细胞的活化和功能障碍是形成AS的关键步骤^[22]。研究证实,内皮eNOS功能受损引起的NO生成减少是内皮功能障碍的一个重要标志^[23]。

NOX介导的ROS生成是引起血管功能障碍的重要因素^[24]。NOX4作为NOX家族的一种亚型,主要在内皮细胞上表达,其主要作用是诱导ROS产生,而ROS的产生会影响eNOS活性,引起NO释放减少。AMPK是一种广泛表达于血管内皮细胞的能量传感器,通过AMPK/蛋白激酶B(protein kinase B,PKB/AKT)/eNOS信号通路提高NO水平,以维持血管内皮细胞功能^[25-26]。

黄芪是历史悠久的传统药材,具有补气升阳、固表止汗、托毒排脓、敛疮生肌等作用,临床上常用黄芪治疗气虚乏力、脱肛、子宫脱垂、痈疽、慢性肾炎、糖尿病等病症。APS是从黄芪中提取的主要活性成分之一,研究发现APS可以通过激活AMPK,从而改善糖尿病大鼠的高血糖状态、肝糖原合成和骨骼肌葡萄糖转运^[27]。

本研究采用高脂饮食联合STZ腹腔注射+VitD3灌胃+免疫损伤法建立糖尿病AS模型,观察APS对糖脂代谢、胰岛素抵抗和AMPK、eNOS及NOX4 mRNA表达的影响,从而进一步验证APS能否通过AMPK信号通路,调节eNOS与NOX4的活性,从而影响NO生成。

本研究结果显示,经APS干预的治疗组大鼠血糖、血脂水平下降、胰岛素抵抗情况改善,AMPK、eNOS mRNA表达上升,NOX4 mRNA表达下降,HE染色显示大鼠胸主动脉的病变程度较模型组明显改善。这些均提示APS可以改善糖尿病AS大鼠的高血糖和高血脂状态,促进胰岛功能恢复,增加胰岛素敏感性以减轻胰岛素抵抗;同时能够激活AMPK信号通路,升高eNOS活性,抑制NOX4活性。升高eNOS活性、抑制NOX4活性可以确保内皮细胞生成足够的NO,从而减轻NO依赖的血管内皮功能损害,起到延缓AS发展的作用。本研究还设置了APS对照组,与空白对照组比较发现,两组大鼠血糖、血脂差异无统计学意义,而且NOX4、eNOS、AMPK mRNA的表达水平差异无统计学意义。由此笔者推测,APS可能对健康大鼠无明显影响,仅对患病大鼠AMPK相关信号通路有着比较

明显的作用。

综上所述,本研究提示APS能有效改善大鼠的糖尿病和AS状态,调节血糖血脂水平,保护血管内皮功能,抑制粥样斑块形成,这可能与激活AMPK相关信号通路、活化eNOS、抑制NOX4表达有关,但APS对健康大鼠无明显影响。

参考文献:

References:

- [1] Babaei-Balderlou F, Zare S, Heidari R, et al. Effects of melatonin and vitamin E on peripheral neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2010, 13(2):1-8.
- [2] Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. Glucose metabolism and hyperglycemia[J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(1):217s-222s.
- [3] Xu J, Zou M H. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction[J]. Circulation, 2009, 120(13):1266-1286.
- [4] Gimbrone M A Jr, Garcia-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. Circ Res, 2016, 118(4):620-636.
- [5] Yang J, Wang H X, Zhang Y J, et al. Astragaloside IV attenuates inflammatory cytokines by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway in isoproterenol-induced myocardial hypertrophy[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3):1062-1070.
- [6] Huang W M, Liang Y Q, Tang L J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Astragalus polysaccharide on EA.hy926 cells[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(1):199-203.
- [7] Lu J, Chen X, Zhang Y, et al. Astragalus polysaccharide induces anti-inflammatory effects dependent on AMPK activity in palmitate-treated RAW264.7 cells[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(6):1463-1470.
- [8] Shao B M, Xu W, Dai H, et al. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(4):1103-1111.
- [9] Wang D, Hu Y, Sun J, et al. Comparative study on adjuvanticity of compound Chinese herbal medicinal ingredients[J]. Vaccine, 2005, 23(28):3704-3708.
- [10] Han R, Tang F, Lu M, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates H₂O₂-induced human umbilical vein endothelial cell injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(6):4027-4034.
- [11] Roman A, Legallo R, Mcgahren E D. Blocking of endogenous nitric oxide increases white blood cell accumulation in rat lung[J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(1):48-52.
- [12] Feng Q, Hedner T. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and nitric oxide (NO). I. Physiology, pharmacology and pathophysiological implications[J]. Clin Physiol, 1990, 10(5):407-426.
- [13] Xu L, Wang S, Li B, et al. A protective role of ciglitazone in ox-LDL-induced rat microvascular endothelial cells via modulating PPAR γ -dependent AMPK/

- eNOS pathway[J].J Cell Mol Med,2015,19(1):92-102.
- [14] Yu J W, Deng Y P, Han X, et al. Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice[J]. Cardiovasc Diabetol,2016,15:88.
- [15] Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. NADPH oxidases in vascular pathology[J].Antioxid Redox Signal,2014,20(17):2794-2814.
- [16] Zhang R, Qin X, Zhang T, et al. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes[J].Molecules,2018,23(10):2711.
- [17] Liu Y, Wang C, Li J, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Phellinus linteus* mycelial extract from solid-state culture in a rat model of type 2 diabetes[J].Nutrients,2019,11(2):296.
- [18] 吴德红,王凤杰,邓娟,等.黄芪多糖对2型糖尿病大鼠肝脏 AMPK 苏氨酸磷酸化的影响[J].微循环学杂志,2009,19(3):1-3,79,81.
- WU Dehong, WANG Fengjie, DENG Juan, et al. Effect of APS on the expression of phosphorylation of AMPK in liver tissue of type 2 diabetic rat[J].Chin J Microcirculation,2009,19(3):1-3,79,81.
- [19] 唐思梦,杨泽民,陈伟强,等.黄芪多糖保护胰岛 β 细胞改善大鼠2型糖尿病[J].第二军医大学学报,2017,38(4):482-487.
- TANG Simeng, YANG Zemin, CHEN Weiqiang, et al. Astragalus polysaccharide improves type 2 diabetes mellitus in rats by protecting islet β cells[J].Acad J Second Military Med Univ,2017,38(4):482-487.
- [20] 王凤杰,邓娟,苏慧,等.黄芪多糖对2型糖尿病大鼠心肌 UCP2 表达和 AMPK 活性的影响[J].武汉大学学报(医学版),2009,30(5):574-578.
- WANG Fengjie, DENG Juan, SU Hui, et al. Effect of APS on the expression of UCP2 and activation of AMPK in myocardium of diabetic cardiomyopathy rats[J].Med J Wuhan Univ,2009,30(5):574-578.
- [21] Paudel K R, Panth N, Kim D W. Circulating endothelial microparticles: A key hallmark of atherosclerosis progression[J].Scientifica(Cairo),2016,2016:8514056.
- [22] Libby P, Ridker P M, Hansson G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J].Nature,2011,473(7347):317-325.
- [23] Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis[J].Circ Res,2017,120(4):713-735.
- [24] Rong S, Hu X, Zhao S, et al. Procyanidins extracted from the litchi pericarp ameliorate atherosclerosis in ApoE knockout mice: Their effects on nitric oxide bioavailability and oxidative stress [J].Food Funct,2017,8(11):4210-4216.
- [25] Ou H C, Hsieh Y L, Yang N C, et al. *Ginkgo biloba* extract attenuates oxLDL-induced endothelial dysfunction via an AMPK-dependent mechanism[J].J Appl Physiol(1985),2013,114(2):274-285.
- [26] Zhang Y, Qiu J, Wang X, et al. AMP-activated protein kinase suppresses endothelial cell inflammation through phosphorylation of transcriptional coactivator p300[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2011,31(12):2897-2908.
- [27] Zou F, Mao X Q, Wang N, et al. Astragalus polysaccharides alleviates glucose toxicity and restores glucose homeostasis in diabetic states via activation of AMPK[J].Acta Pharmacol Sin,2009,30(12):1607-1615.

(收稿日期:2020-10-20)