

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

王芳¹ 刘健² 叶英法¹ 张晓军^{1,3} 万磊² 郑力⁴

摘要 **目的** 基于 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路探讨黄芪多糖改善干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)模型大鼠心功能变化的机制。**方法** 将 48 只 Wistar 雄性大鼠按随机数字表法分为 4 组:空白对照组(空白组)、模型对照组(模型组)、黄芪多糖组(中药组)和羟氯喹组(西药组),每组 12 只,分别向每只大鼠(空白组除外)两后足跖部注射与弗氏完全佐剂充分乳化后的颌下腺蛋白混合抗原 0.1 mL,诱导 SS 模型。致炎后第 19 天开始干预,空白组及模型组均给予等量生理盐水(1 mL/100 g),其余组分别给予黄芪多糖(1 mg/100 g)、羟氯喹(0.031 25 g/kg),各组每天干预 1 次,连续干预 30 天。给药结束后观察大鼠的体质量变化、饮水量变化、颌下腺指数、脾指数、腺体组织学变化;采用有创血流动力学监测 SS 模型大鼠心功能的变化;采用 ELISA 法检测血清中活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAC)、TNF- α 、IL-35;HE 染色观察心肌组织的病理学改变;免疫组化染色观察 ROS、活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)表达;实时荧光定量 PCR(real time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)检测 Keap1、Nrf2、ARE mRNA 蛋白的表达;Western blot 方法测定大鼠心肌组织 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamic acid and a half long glycine synthetase, γ -GCS)、血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠饮水量、颌下腺指数、脾指数、HR、心脏指数(HI)、左室收缩期压(LVSP)、左室舒张期压(LVEDP)、MDA、ROS、TNF- α 、ROS 蛋白表达、RNS 蛋白表达、Keap1 mRNA、MafmRNA、Nfr2 mRNA、HO-1 蛋白表达、 γ -GCS 蛋白表达升高($P < 0.01$),体质量、左室内压上升下降最大速率($\pm dp/dtmax$)、SOD、TAC、IL-35、GSH、TRX 蛋白表达降低($P < 0.01$)。与模型组比较,两个给药组干预后大鼠饮水量、颌下腺指数、脾指数、LVEDP、MDA、ROS、TNF- α 、ROS 蛋白表达、RNS 蛋白表达、Keap1 mRNA、Maf mRNA、Nfr2 mRNA、HO-1 蛋白表达、 γ -GCS 蛋白表达均降低($P < 0.05$),而大鼠的体质量、 $\pm dp/dtmax$ 、SOD、TAC、IL-35、GSH 蛋白表达、TRX 蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);西药组 HR 升高($P < 0.05$);中药组 HR、LVSP 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与西药组比较,中药组 HR、LVEDP、 $\pm dp/dtmax$ 、 γ -GCS 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),SOD、TAC、GSH、TRX、HO-1 蛋白表达升高($P < 0.01$)。HI 与 ROS 呈正相关($P < 0.05$);LVSP、LVEDP 与 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路呈正相关($P < 0.01$),与 TAC 呈负相关($P < 0.05$, $P < 0.01$); $\pm dp/dtmax$ 与 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路呈负相关($P < 0.05$),与 TNF- α 呈正相关($P < 0.05$)。**结论** 干燥综合征大鼠存在心功能下降,黄芪多糖改善心功能的机制可能是与 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路活化密切相关。

关键词 干燥综合征;心功能;氧化应激;黄芪多糖;Keap1-Nrf2/ARE 信号通路

基金项目:国家中医药重点学科中医痹病学建设项目(No.国中医药发[2009]30号);国家中医药管理局科研课题专项基金(No.04-05LP27);安徽省科技厅科研计划项目(No.11010402170);安徽中医内科应用基础与开发研究省级实验室项目(No.科条[2008]150号);安徽中医学院科技创新团队项目(No.2010TD005)

作者单位:1.安徽中医药大学研究生部(合肥,230031);2.安徽中医药大学第一附属医院风湿免疫科(合肥,230031);3.湖北中医药大学研究生处(武汉 430065);4.Department of Radiation Biology, City of Hope National Medical Center and Beckman Research Institute, Duarte (CA 91010, USA)

通讯作者:刘健, Tel:13955109537, E-mail:liujianahzy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.05.0566

Astragalus Polysaccharides Improved the Cardiac Function in Sjögren's Syndrome Model Rats Based on Keap 1-Nrf2/ARE Signaling Pathway: a Mechanism Exploration WANG Fang¹, LIU Jian², YE Ying-fa¹, ZHANG Xiao-jun^{1,3}, WAN Lei², and ZHENG Li⁴ *1 Department of Graduates, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230031), China; 2 Department of Rheumatism Immunity, First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230031), China; 3 School of Graduates, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430065), China; 4 Department of Radiation Biology, City of Hope National Medical Center and Beckman Research Institute, Duarte, CA (91010), USA*

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of Astragalus polysaccharides (APS) for improving the cardiac function of Sjögren's syndrome (SS) model rats based on Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway. **Methods** Totally 48 male Wistar rats were randomly divided into four groups by random digit table, i.e., the blank control group, the model control group, the APS group, and the hydroxychloroquine group, 12 in each group. Except those in the blank control group, 0.1 mL mixed antigen protein of sufficiently emulsified Freund's complete adjuvant and submandibular gland protein was injected from two feet plantar to induce SS model. The intervention was started from 19th day after inflammation induction. Equal volume of normal saline was given to rats in the blank control group (1 mL/100 g), APS was administered to those in the APS group (1 mg/100 g), and hydroxychloroquine (0.03 125 g/kg) was administered to those in the hydroxychloroquine group. All rats were intervened once per day for 30 consecutive days. Changes of rats' body mass and drinking water quantity, submandibular gland index, spleen index, histological changes of glands were observed. Changes of the heart function were monitored using invasive hemodynamics. Serum reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAC), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interleukin-35 (IL-35) were detected using ELISA method. The pathological changes were observed using HE staining. The protein expression of ROS, reactive nitrogen species (RNS), glutathione (GSH), and thioredoxin (TRX) were observed by immunohistochemical staining. The mRNA expression of Keap1, Nrf2, and ARE was detected using real time fluorescent quantitative PCR. The protein expression levels of γ -glutamic acid and a half long glycine synthetase (γ -GCS) and heme oxygenase 1 (HO-1) in the myocardial tissue were determined by Western blot method. **Results** Compared with the blank control group, the quantity of drinking water, submandibular gland index, spleen index, heart rate (HR), cardiac index (HI), left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular diastolic pressure (LVEDP), MDA, ROS, TNF- α , ROS protein expression, RNS protein expression, Keap1 mRNA expression, Maf mRNA expression, Nrf2 mRNA expression, and HO-1 protein expression, and γ -GCS protein expression significantly increased ($P < 0.01$); body mass, $\pm dp/dt_{max}$, SOD, TAC, IL-35, GSH, and TRX significantly decreased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the quantity of drinking water, submandibular gland index, spleen index, LVEDP, MDA, ROS, TNF- α , ROS protein expression, RNS protein expression, Keap1 mRNA expression, Maf mRNA expression, Nrf2 mRNA expression, and HO-1 protein expression, and γ -GCS protein expression significantly decreased ($P < 0.05$); body mass, $\pm dp/dt_{max}$, SOD, TAC, IL-35, GSH protein expression, and TRX protein expression significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the AR group and the hydroxychloroquine group. In the hydroxychloroquine group HR increased ($P < 0.05$). In the AR group HR and LVSP decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the hydroxychloroquine group, HR, LVEDP, $\pm dp/dt_{max}$, γ -GCS protein expression significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); SOD, TAC, GSH, TRX, HO-1 protein expression increased ($P < 0.01$) in the AR group. HI was positively correlated with ROS ($P < 0.05$). LVSP and LVEDP were positively correlated with Keap1-Nrf2/ARE signaling pathways ($P < 0.01$), and negatively correlated with TAC ($P < 0.05$, $P < 0.01$). $\pm dp/dt_{max}$ was negatively correlated with Keap1-Nrf2/ARE signaling pathways ($P < 0.05$), and positively correlated with TNF α ($P < 0.05$). **Conclusions** Declined heart function exists in SS rats. The mecha-

nism of APS for improving the heart function might be closely correlated with activating Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway.

KEYWORDS Sjögren's syndrome; heart function; oxidative stress; Astragalus polysaccharides; Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway

干燥综合征 (Sjögren's syndrome, SS) 是一种以外分泌腺的慢性炎症病变为主要特点的自身免疫性疾病,临床有多系统的受累,属弥漫性结缔组织病,患者常以明显的口干、眼干、肤干、反复发作的腮腺肿大及关节疼痛为主要临床表现^[1],也可侵犯心、肺、肝、脾、肾、血液、关节等其他器官,表现为多系统、多脏器受累。尹芳蕊等^[2]发现 75 例原发性 SS 患者中 28 例 (37.3%) 心脏彩超检查异常。然而 SS 导致心脏病变的机制目前尚不清楚。本研究通过观察 SS 大鼠的心功能、氧化应激指标、血清细胞因子及心肌结构的变化,初步探讨了黄芪多糖 (Astragalus polysaccharide, APS) 对其作用机制,现将研究结果报告如下。

材料与方法

1 动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 48 只,鼠龄 3~4 个月,体质量 (150 ± 20) g,由安徽省实验动物中心提供,合格证号: SCXK (皖) 2011-002。在室温 22~28 ℃ 下饲养,相对湿度 50%~60%,自然光照周期,实验操作过程均饲养于标准动物房,适应性饲养 2 周。

2 药物 APS: 100 mg/瓶 (纯度 > 90%), 上海源叶生物科技有限公司,批号: 20120802,将 APS 研成细末,加生理盐水,配制成混悬液 (浓度 1 mg/mL); 硫酸羟氯喹片: 0.1 g/片,上海中西制药有限公司,批号: 120705,将硫酸羟氯喹片研成细末,加生理盐水,配制成混悬液 (浓度: 5 mg/mL)。

3 试剂及仪器 弗氏完全佐剂,美国 Sigma 公司 (批号: 098k8730); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 批号: 130485R, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 批号: 130887R, 总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TAC) 批号: 130452R, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 批号: 130895R, 肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 批号: 130915R, IL-35 试剂盒,批号: 130751R, 以上试剂均购自上海源叶生物科技有限公司; TRIzol 试剂 (批号: 15596-026), 美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, 批号: 00064525), 加拿大 Fermentas 公司; PCR 扩增试剂盒 (批号:

00152387), 加拿大 Fermentas 公司; 氯仿 (批号: 20130419), 上海建信化工有限公司试剂厂; 无水乙醇 (批号: 20130526), 上海苏燃化学试剂有限公司; 异丙醇 (批号: 20130512), 南京化学试剂厂; DEPC, 德国 Ruibio 公司。SP 相关试剂: 活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS, 批号: HZ63782); 活性氮自由基 (reactive nitrogen species, RNS, 批号: HZ48943); 谷胱甘肽 (glutathione, GSH, 批号: HZ86572); 硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX, 批号: HZ67258) 兔 IgG 单克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司; SP 试剂盒及 DAB 试剂免疫组化染色试剂盒, 北京康为世纪生物有限公司。大鼠心肌组织血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1)、γ-谷氨酸半胱氨酸合成酶 (γ-glutamic acid and a half long glycine synthetase, γ-GCS) 蛋白试剂, 德国 Abcam 公司。RIPA 细胞裂解液及 BCA 蛋白质定量试剂盒, 江苏碧云天生物技术研究; 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 德国 Serva 公司; 甘氨酸: 美国 AMRESCO 公司; N, N, N', N' - 四甲基二乙胺 (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)、Tris 碱: 美国 Sigma 公司; PVDF 膜: 美国 Millipore 公司。荧光定量试剂及实验耗材, TaKaRa 公司酶标仪 (雷杜, 型号: RT-6000); Biopac 多道生理记录仪 (美国 BIOPAC 公司); 离心机 (安徽嘉文仪器装备有限公司, 型号: JW3021HR); 漩涡混合器 (江苏其林贝尔仪器制造公司, 型号: GL-88B); 排枪 (德国 Eppendorf 公司, 50-300 μL); 电热恒温箱 (上海三发科学仪器有限公司, 型号: DNP-9052BS-III)。普通 PCR 仪 (型号: ABI2720), 美国 ABI 公司; 稳压稳流电泳仪 (型号: DYY-6B), 北京六一仪器厂; 冷冻离心机 (型号: TGL-18R), 珠海黑马医学仪器有限公司; 荧光定量 PCR 仪 (型号: ABI7500), 美国 ABI 公司; 凝胶图像分析仪, 美国 Bio-Rad 公司产品 (型号: Gel Doc XR); X 胶片, 日本 Kodak 公司; 水平摇床 (型号: ZD-9556), 太仓市科教器材厂。

4 抗原制备方法 参照文献[3,4], 超净工作台上按解剖部位取出 SD 大鼠的颌下腺, 仔细剔除腺体包膜及结缔组织, 用氯化钠注射液冲洗。置无菌滤纸上吸干, 称重后剪碎, 加入 0.1 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲

液(1 mol/L 对腺体),在匀浆器内将其制成匀浆(以上操作均在冰浴中进行),采用差速离心法进行抗原的纯化,将此匀浆反复离心后的上清液置于高速低温离心机中离心 2 h,取上清液,用分光光度计测定蛋白抗原含量。用 0.1 mol/L pH 7.2 的 PBS 将其稀释,将羊毛脂和液体石蜡按 1:3 的比例混合,并加入卡介苗,配制成完全弗氏佐剂(CFA)。将稀释后的蛋白抗原与等体积的 CFA 混合,冰浴中充分乳化成 CFA-p。

5 动物模型的制备、分组及干预方法 参照文献[5],将 48 只大鼠随机分为 4 组:空白组、模型组、中药组、西药组,每组 12 只。分别向(空白除外)每只鼠两后足跖部皮下注射抗原 0.1 mL 造模,0.2 mL/鼠,36 只制成 SS 模型,33 只出现干燥症状,饮水量增加,颌下腺肿大,毛发枯燥,造模成功率为 91.67%,失败模型予以替补。致炎后第 19 天开始干预,中药组灌胃 APS (1 mL/100 g,相当于临床用人用药剂量 10 倍),每天 1 次;西药组灌胃硫酸羟氯喹(0.03125 g/kg,相当于临床用人用药剂量 10 倍),每天 1 次,空白组及模型组灌胃等体积生理盐水,各组均连续干预 30 天。

6 检测指标及方法

6.1 一般状态观察 记录各组大鼠造模后 14 天(干预前)及干预后体质量、饮水量、毛色、活动度。

6.2 脾指数、颌下腺指数计算 处死动物后摘除脾脏、颌下腺称重,计算脾指数及颌下腺指数,脾指数(%) = 脾重量(g)/大鼠体质量(g) × 100%;颌下腺指数(%) = 颌下腺重量(g)/大鼠体质量(g) × 100%。

6.3 有创血流动力学检查心功能 参照文献[6]。各组随机取 5 只大鼠称体质量,3.5% 水合氯醛 1 mL/100 g 腹腔麻醉。仰卧位固定,胸部 20% 硫化钠脱毛备皮,右颈总动脉插管逆行进入左心室后,连接多导生理记录仪,记录心率(HR)、心室收缩末压(LVSP)、心室舒张末期压(LVPDP)、左室内压上升下降最大速率(dp/dtmax)。所有导管以 0.13% 肝素生理盐水冲洗。监测完毕后开胸迅速取出心脏并称质量,计算心脏质量指数(HI),HI = 心脏质量/体质量。

6.4 SOD、MDA、TAC、MDA、TNF-α、IL-35 检测 干预结束后乌拉坦(0.17 g/kg)腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,3 000 r/min 离心 5 min,取血清,置 -80 ℃ 冰箱保存待测。血清 SOD、MDA、TAC、ROS、TNF-α、IL-35 测定采用 ELISA 双抗体夹心法,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。结果判定:在波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值;以 OD 值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标,绘制曲线图;根据样品的 OD 值查找对应的浓度范围。

6.5 心肌组织病理观察 每组大鼠脱颈处死,打开胸腔取出心脏,去除周围结缔组织,经生理盐水洗涤后用滤纸吸干,取心尖部置于 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片(4 μm)、HE 染色、免疫组化染色,光镜观察。

6.6 心肌组织胞质接头蛋白(Kelch-likeECH-associatedprotein1,Keap1)、巨噬细胞活化因子(macrophage activating factor,Maf)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)mRNA 检测 采用 RTFQ-PCR 法。根据美国加利福尼亚州 Invitrogen 公司提供的序列号,使用 Primer Premier 5 软件设计并分析引物,引物序列见表 1。mRNA 检测步骤:在液氮罐里取出大鼠心组织(100 ± 20)mg,将心组织用匀浆器匀浆,用 TRIzol 试剂盒提取心组织总 RNA。总 RNA 按照 M-Mulv 反转录试剂盒说明书提供的方法进行反转录。PCR 反应体系为 20 μL,包括反转录产物 2 μL,正、反向引物各 1 μL 及 SYBR Green 染料 10 μL,水补足至 20 μL。反应条件为 95 ℃ 预变性 3 min,变性(95 ℃) 30 min,退火 15 s,延伸(60 ℃) 60 s,40 个循环,4 ℃ 终止。本次实验所使用的分析方法为相对量化分析(relative quantification study),分析所采用的指标为:2^{-ΔΔCt}。

表 1 RTFQ-PCR 引物序列及扩增长度		
基因	引物序列	扩增长度 (bp)
β-actin	上游 5'- CGCGAGTACAACCTTCTTGC-3'	70
	下游 5'- CGTCATCCATGGCGAACTGG-3'	
Keap1	上游 5'- TGGGTCAAATACGACTGCCC-3'	582
	下游 5'- TGGCTCATATCTCTCCACGC-3'	
Maf	上游 5'- GCTACACACACGCGATTTC-3'	687
	下游 5'- GCTCTTACCCCACTCAA-3'	
Nrf2	上游 5'- CCCAGCAGGACATGGATTTG-3'	293
	下游 5'- TTTGGGAATGTGGGCAACCT-3'	

6.7 心肌组织 ROS、RNS、GSH、TrX 蛋白检测 采用 SP 法,参照试剂盒说明操作。ROS、RNS、GSH、TrX 单克隆抗体 1:200 稀释,每组切片中任选 1 张用 0.01 mol/L PBS 液代替一抗进行染色,为阴性对照。每张切片任选 5 个视野,以细胞胞浆、胞质、胞核中出现黄色或棕褐色颗粒为阳性反应。免疫组化染色的半定量判定:蛋白表达染色指数染色强度 A:无色、淡黄、棕黄、棕褐分别计为 0、1、2、3 分;染色广度 B:阳性细胞数占总细胞数的百分比;A、B 两项所得相乘所得数值为免疫组化染色指数,染色指数越高,蛋白表达越强。积分光密度(IOD)采用图象分析软件(Im-

age-proplus 专业图像分析软件系统,美国 Media Cybernetics 公司)进行图像分析,用 IOD 表示 ROS、RNS、GSH、TrX 蛋白的表达;计算公式:IOD = 面积密度 × 平均光密度。阳性反应 IOD 越大,表示蛋白表达越强。

6.8 HO-1 及 γ-GCS 蛋白表达水平检测 RI-PA 液提取心脏组织蛋白,用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,用 Western blot 法检测 HO-1、γ-GCS 蛋白表达,用 BandScan 软件测定凝胶各条带的积分吸光度 (integrated absorbance, IA) 值,以 β-actin 为内参照,以 HO-1 /β-actin、γ-GCS /β-actin 比值表示 HO-1、γ-GCS 蛋白表达水平。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态性分布数据,组间比较采用独立样本 *t* 检验;非正态分布数据采用秩和检验;相关性分析采用 Spearman 相关性分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般状态、脾指数、颌下腺指数比较 (表 2) 造模后 14 天,模型组大鼠出现饮水量增加,颌下腺肿大,饮食、体质量下降,毛发干枯稀疏,偶有耸毛,蜷缩少动,眯眼呆滞,反应迟钝。正常组无上述症状。干预后,模型组大鼠饮水量显著增加,颌下腺明显肿大,饮食、体重量明显下降,毛发干枯失去光泽,耸毛明显,懒动,扎堆,精神萎靡,偶有呼吸急促现象;中药组饮水量明显减少,颌下腺接近正常,饮食恢复正常,毛发有光泽,偶有掉毛现象,活动灵敏;西药组饮水量

减少,颌下腺正常,饮食量少,毛发略有光泽,活动灵敏。各组干预期间均无死亡。与空白组比较,模型组大鼠饮水量、脾指数、颌下腺指数升高 (*P* < 0.05),体质量降低 (*P* < 0.01)。与模型组比较,中药组、西药组干预后大鼠饮水量、脾指数、颌下腺指数降低 (*P* < 0.05),大鼠体质量升高 (*P* < 0.05)。

2 各组大鼠心功能比较 (表 3) 与空白组比较,模型组大鼠 HR、HI、LVSP、LVEDP 升高 (*P* < 0.05), ± dp/dtmax 降低 (*P* < 0.05)。与模型组比较,西药组 HR、± dp/dtmax 升高 (*P* < 0.05), LVEDP 降低 (*P* < 0.01);中药组 HR、LVSP、LVEDP 降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), ± dp/dtmax 升高 (*P* < 0.05)。与西药组比较,中药组 HR、LVEDP、± dp/dtmax 降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

3 各组大鼠氧化应激指标、血清细胞因子比较 (表 4) 与空白组比较,模型组 MDA、ROS、TNF-α 含量均升高,而 SOD、TAC、IL-35 含量降低 (*P* < 0.01)。与模型组比较,中药组、西药组 SOD、TAC、IL-35 升高 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),而 MDA、ROS、TNF-α 均降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01);与西药组比较,中药组 SOD、TAC 升高 (*P* < 0.01)。

4 各组心肌组织病理结果比较 (图 1) 空白组心肌细胞排列整齐,无心肌细胞水肿;模型组心肌细胞排列紊乱,有明显的心肌细胞水肿;西药组心肌细胞排列稍紊乱,心肌细胞轻度水肿;中药组心肌细胞排列尚可,心肌细胞水肿不明显,病变程度轻于西药组。

5 各组大鼠心肌组织 ROS、RNS、GSH、TrX 蛋白表达比较 (表 5,图 2) 空白组大鼠心肌组织 ROS、

表 2 各组大鼠体质量、饮水量、脾指数、颌下腺指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	<i>n</i>	体质量 (g)	饮水量 (mL)	脾指数 (%)	颌下腺指数 (%)
空白	干预前	12	221 ± 37 ^{△△}	20 ± 7 [△]	2.21 ± 0.11 [△]	4.5 ± 0.7 [△]
	干预后	12	347 ± 47	43 ± 5	1.43 ± 0.35	2.6 ± 0.5
模型	干预前	12	186 ± 32	38 ± 4	2.65 ± 0.25	5.3 ± 1.2
	干预后	12	208 ± 37 ^{**}	58 ± 4 ^{**}	2.45 ± 0.26 [*]	4.7 ± 1.1 [*]
西药	干预前	12	166 ± 22	36 ± 5	3.06 ± 0.28	6.0 ± 1.2
	干预后	12	228 ± 26 ^{**△}	45 ± 3 ^{**△}	2.17 ± 0.54 ^{*△}	4.3 ± 1.1 ^{**△}
中药	干预前	12	176 ± 21	35 ± 4	2.88 ± 0.36	5.6 ± 1.3
	干预后	12	235 ± 39 ^{**△}	49 ± 3 ^{**△}	2.16 ± 0.39 [*]	4.2 ± 0.7 ^{**△}

注:与本组干预前比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与模型组同期比较,△*P* < 0.05,△△*P* < 0.01

表 3 各组大鼠心功能各指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

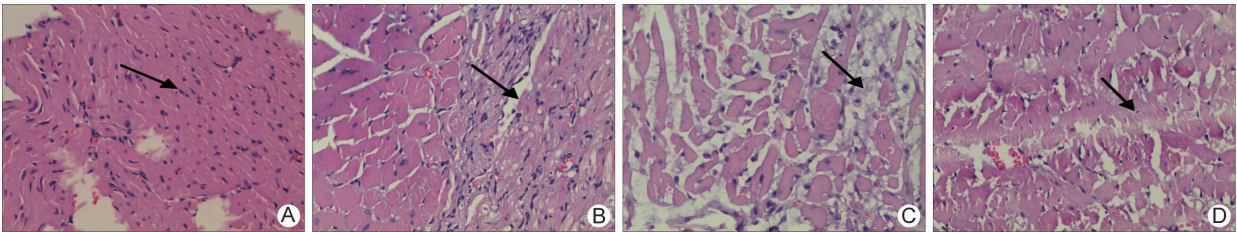
组别	<i>n</i>	HR (次/min)	HI (mg/g)	LVSP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	dp/dtmax 率 (mm Hg/ms)
空白	8	401 ± 16 [*]	2.45 ± 0.21 [*]	117 ± 4 [*]	-1.33 ± 0.52 [*]	556 ± 24 [*]
模型	8	439 ± 16	3.46 ± 0.55	168 ± 5	6.32 ± 0.29	297 ± 21
西药	8	527 ± 22 ^{*△}	3.27 ± 0.62	128 ± 3	1.83 ± 0.75 ^{**△}	1 134 ± 64 ^{*△}
中药	8	343 ± 58 [*]	3.26 ± 0.73	132 ± 3 [*]	1.67 ± 0.82 ^{**}	470 ± 34 [*]

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与西药组比较,△*P* < 0.01

表 4 各组大鼠氧化应激指标及血清细胞因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

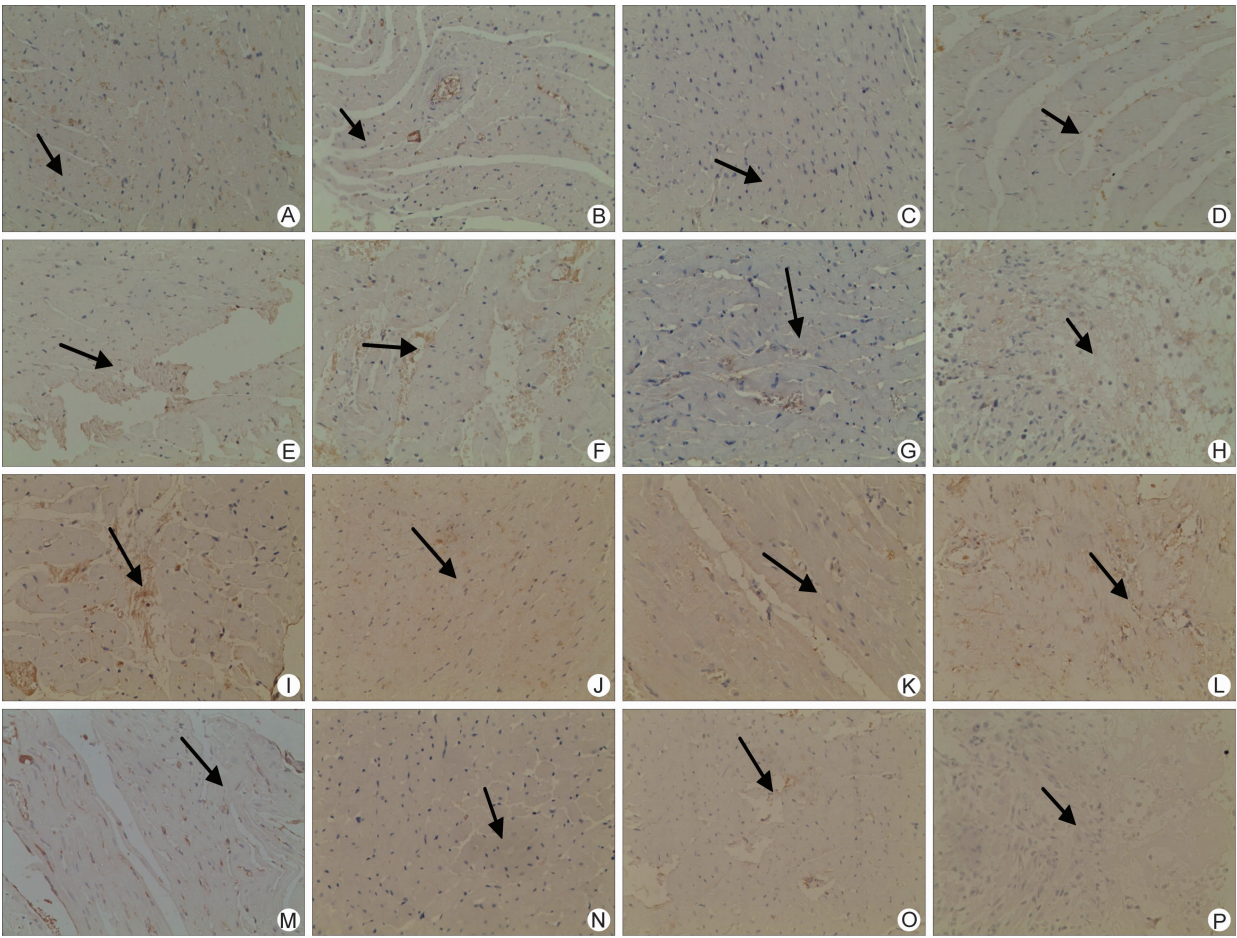
组别	<i>n</i>	SOD (U/L)	MDA (nmol/L)	ROS (U/mL)	TAC (U/mL)	TNF-α (ng/L)	IL-35 (pg/mL)
空白	12	77 ± 5 **	1.46 ± 0.23 **	89 ± 4 **	3.4 ± 0.8 **	49 ± 2 **	3.74 ± 1.75 **
模型	12	53 ± 6	2.57 ± 0.43	177 ± 5	1.8 ± 0.3	68 ± 6	3.17 ± 0.40
西药	12	55 ± 4 *	1.17 ± 0.21 **	118 ± 3 **	2.3 ± 0.7 *	54 ± 6 *	3.46 ± 0.29 *
中药	12	63 ± 5 **△	1.25 ± 0.37 *	132 ± 3 *	2.5 ± 0.8 **△	59 ± 6 *	3.48 ± 0.30 *

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与西药组比较,△*P* < 0.01



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药组

图 1 各组大鼠心肌组织病理 (HE, ×400)



注:A、E、I、M 为空白组;B、F、J、N 为模型组;C、G、K、O 为中药组;D、H、L、P 为西药组;A-D 为 ROS 蛋白表达;E-H 为 RNS 蛋白表达;I-L 为 GSH 蛋白表达;M-P 为 Trx 蛋白表达;箭头所指为 ROS、RNS、GSH、Trx 蛋白的表达,其阳性表达在细胞核和细胞浆中

图 2 各组大鼠心肌组织 ROS、RNS、GSH、Trx 表达 (SP, ×400)

RNS 表达呈弱阳性,GSH、TRX 表达呈强阳性;在模型组蛋白表达相反。与空白组比较,模型组 ROS、RNS 蛋白表达升高,GSH、TRX 蛋白表达降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);与模型组比较,中药组、西药组 ROS、RNS 蛋白表达降低,GSH、TRX 蛋白表达升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与西药组比较,中药组 GSH、TRX 升高($P < 0.01$)。

表 5 各组大鼠心肌组织 ROS、RNS、GSH、TrX 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ROS	RNS	GSH	TRX
空白	12	3±7**	3±7**	7±11**	5±7*
模型	12	4±8	4±11	2±3	4±3
西药	12	3±8*	4±5*	3±5**	4±10*
中药	12	3±8**	4±4*	5±11**△	5±6*△

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与西药组比较,△ $P < 0.01$

6 各组心肌组织 Keap1、Maf、Nfr2 mRNA 表达比较(表 6) 与空白组比较,模型组 Keap1、Maf、Nfr2 mRNA 均升高($P < 0.01$)。与模型组比较,中药组、西药组 Keap1、Maf、Nfr2 mRNA 均降低($P < 0.01$)。

表 6 各组心肌组织 Keap1、Maf、Nfr2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Keap1 mRNA	Maf mRNA	Nfr2 mRNA
空白	12	0.848±0.106*	1.09±0.21*	0.90±0.08*
模型	12	5.861±0.561	3.32±0.24	3.32±0.35
西药	12	1.124±0.024*	1.34±0.10*	1.22±0.16*
中药	12	1.204±0.136*	1.37±0.11*	1.29±0.08*

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

7 各组心肌组织 HO-1、γ-GCS 蛋白表达比较(表 7,图 3) 与空白组比较,模型组大鼠心肌组织 HO-1、γ-GCS 蛋白表达升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药组、西药组大鼠心肌组织 HO-1、γ-GCS 蛋白表达量降低($P < 0.01$)。与西药组比较,中药组 γ-GCS 蛋白表达降低,HO-1 蛋白表达升高($P < 0.01$)。

表 7 各组心肌组织 HO-1、γ-GCS 蛋白表达比较 (IA, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HO-1	γ-GCS
空白	12	0.203±0.016*	0.396±0.025*
模型	12	0.623±0.026	0.883±0.043
西药	12	0.279±0.021*	0.279±0.135*
中药	12	0.223±0.019*△	0.419±0.011*△

注:与模型组比较,* $P < 0.01$;与西药组比较,△ $P < 0.01$

8 SS 大鼠心功能与氧化应激、细胞因子相关性分析(表 8) HI 与 ROS 呈正相关($P < 0.05$);LVSP、

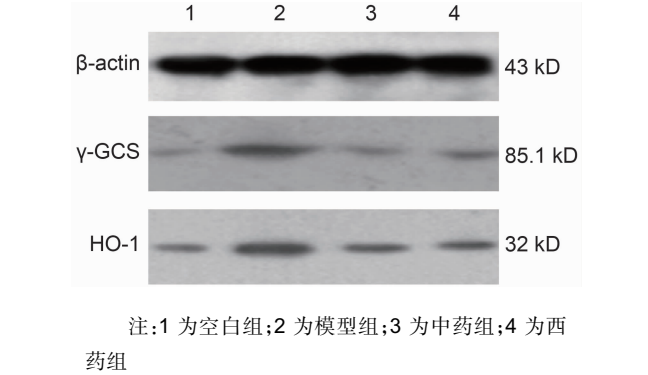


图 3 各组心肌组织 HO-1、γ-GCS 蛋白表达比较

LVEDP 与 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路呈正相关($P < 0.01$),与 TAC 呈负相关($P < 0.05$, $P < 0.01$); $\pm dp/dtmax$ 与 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路呈负相关($P < 0.05$),与 TNF-α 呈正相关($P < 0.05$)。

表 8 SS 大鼠心功能参数与氧化应激、细胞因子相关性分析 (r)

指标	心功能参数				
	HR	HI	LVSP	LVEDP	dp/dtmax
ROS	0.114	0.695*	0.546	0.626	-0.261
RNS	0.152	0.561	0.142	0.213	0.049
GSH	-0.238	-0.027	-0.529	-0.557	0.276
TRX	0.707	0.486	0.016	-0.642	0.808
SOD	-0.362	-0.267	-0.581	0.861	0.161
MDA	-0.046	0.125	0.163	0.166	-0.194
TAC	-0.338	-0.512	-0.735*	-0.820**	0.259
Keap1	0.179	0.477	0.987**	0.959**	-0.747*
Maf	0.187	0.488	0.991**	0.969**	-0.743*
Nfr2 mRNA	0.187	0.536	0.990**	0.974**	-0.725*
TNF-α	0.254	-0.063	-0.065	-0.613	0.667*
IL-35	0.059	0.335	0.348	0.344	-0.287

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

SS 是以大量淋巴细胞浸润泪腺、唾液腺等外分泌腺为特征的自身免疫性疾病,可同时侵犯肝、脾、肾、血液、关节等其他器官,表现为多系统、多脏器受累。有文献报道 SS 患者心包积液发生率为 33%^[7]。本研究结果显示,与空白组比较,SS 大鼠心功能下降,表现在 HR、HI、LVSP、LVEDP 显著升高($P < 0.05$), $\pm dp/dtmax$ 显著下降,同时致炎细胞因子 TNF-α、MDA、ROS、RNS、Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路、HO-1、γ-GCS 显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),抑炎细胞因子 IL-35、TAC、SOD、GSH、TRX 的表达显著降低($P < 0.01$),说明 SS 大鼠在发生炎症反应及氧化应激的同时,其心功能也发生了改变。与 SS 模型大鼠比较,各治疗组大鼠体质量、IL-35、SOD、TAC、GSH、

TRX 的表达显著升高,HR、LVEDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、MDA、ROS、TNF- α 、ROS、RNS、Keap1、Maf、Nrf2 mRNA、HO-1、 γ -GCS 蛋白表达量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明药物干预后,SS 大鼠心功能、炎症反应、氧化应激状态明显改善,而中药组改善更为显著。Keap1-Nrf2-ARE 是近年新发现的机体抵抗内外界氧化损伤的防御性转导通路。研究发现:Nrf2 是一种间接发挥抗氧化作用、控制外周淋巴系统、维持内环境稳定及对自身免疫监督的重要内源性保护因子^[8]。Nrf2 能调节促炎症反应的刺激因素并能保护炎症损伤的细胞和组织,在病理性炎症反应中起到保护作用^[9,10]。Nrf2 诱导的下游靶基因 HO-1 是重要的抗炎酶,其抗炎机制被认为是增加一氧化碳水平和抑制巨噬细胞的活性^[11]。Nrf2 本身能够负性调节炎症调节因子和酶类,如炎症细胞因子、炎症趋化因子、细胞黏附分子、金属蛋白酶、环氧合酶 2(COX-2)等。Kim J 等^[12]已经详细综述了 Nrf2 与先天性和自身性免疫疾病的关系。Nrf2-ARE 的激活可介导了一系列酶类的产生,如 SOD、过氧化氢酶(catalase)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidases, GPxs)、过氧化氧化还原酶(peroxiredoxins, Prxs)、HO-1 等。这些自由基清除酶类组成了一个强大的抗氧化防御体系^[13]。研究证实:心脏保护作用的作用机制与通过 Nrf2-ARE 信号通路诱导 HO-1 表达相关,HO-1 系统被认为具有抗氧化、维持微循环、调节细胞周期及抗炎等功能^[14-16]。本研究结果提示经药物治疗后,SS 大鼠心功能改善,可能与 Nrf2-ARE 信号通路参与了心脏的保护功能有关。

APS 是黄芪的有效活性成分之一,可通过抑制人心脏微血管内皮细胞(human cardiac microvascular endothelial cells, HCMEC)的 NF- κ B 信号通路,从而减少炎症相关基因表达^[17]。它能提高人体免疫功能,增强细胞生理代谢,提高巨噬细胞活性,是理想的免疫增强剂,它能促进 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等免疫细胞的功能^[18]。APS 可通过提高细胞表面黏附分子的表达而促进淋巴细胞及内皮细胞的黏附,促使淋巴细胞再循环,增加淋巴细胞与抗原接触机会,发挥免疫增强作用,调节 T 淋巴细胞活化的细胞免疫,逆转细胞免疫功能低下^[19]。目前羟氯喹(HCQ)是公认的治疗 SS 的药物^[20-21],HCQ 平均有效率 $P_{HCQ} = 64.52\%$,本研究结果显示黄芪多糖在改善 SS 大鼠整体功能方面优于羟氯喹。

研究表明,细胞因子可降低心肌收缩力及心输出量,促发自发性功能障碍,胰岛素抵抗,内皮损伤及血液高凝状态等^[22]。TNF- α 浓度与原发病无关,但与心

功能级别呈正相关,与 LVEF 呈负相关^[23]。TNF- α 主要是通过下调肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶的表达,从而推迟舒张心肌细胞钙离子的再吸收和衰减,最终导致心脏舒张功能不全^[24,25]。

综上所述,SS 大鼠存在心功能的降低和心肌结构破坏。APS 在改善 SS 大鼠免疫炎症反应的同时,改善其心功能,其机制可能与 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路活化有关;下调氧化反应元件 MDA、ROS、ROS、HO-1、 γ -GCS 蛋白表达量,上调抗氧化反应元件 SOD、TAC;同时下调血清致炎因子 TNF- α 水平,上调抑炎因子 IL-35 的表达,降低免疫复合物的沉积,减少炎症反应对心肌组织的损伤,从而改善心功能。同时由于本实验周期不够长,且在心功能检测方面可能存在少许误差,是今后实验需要注意的问题。

参 考 文 献

- [1] 陈晓云,陈湘君,顾军花.酸甘生津法治疗干燥综合征 40 例[J].陕西中医,2006,27(11):1361-1363.
- [2] 尹芳蕊,王永福.原发性干燥综合征心脏损伤的危险因素研究[J].中国全科医学,2013,16(23):2693-2695.
- [3] Cutler LS, Greiner DL, Rozenski D. Experimental autoallergic sialadenitis in the LEW rat. II. Target antigen are associated with cell surface and intracellular particulate fractions derived from the submandibular gland[J]. Cell Immunol, 1991, 135(2):346-353.
- [4] 贾波,张丽,王旭丹,等.大鼠颌下腺 SS 模型初探[J].中国免疫学杂志,2005,21(5):364-366.
- [5] 肖林,杨军,暨兴华,等.干燥综合征动物模型的建立[J].重庆医学,2003,32(3):306-309.
- [6] 雷立权,韩启德,高广道,等.大鼠左室心肌收缩性能指标的测定[J].生理学报,1982,34(3):360-366.
- [7] Gyöngyösi M, Pokorny G, Jambrik Z, et al. Cardiac manifestations in primary Sjögren's syndrome[J]. Ann Rheum Dis, 1996, 55(7):450-454.
- [8] 徐毅.NF-E2 相关因子在烧伤脓毒症大鼠中免疫脏器中的表达[D].长沙:中南大学,2008.
- [9] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. The relationship between *Helicobacter pylori*-infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(1):143-148.
- [10] Chen XL, Dodd G, Thomas S, et al. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(5):H1862-H1870.
- [11] Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, et al. Signa-

- ling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(12): 1895-1903.
- [12] Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders [J]. *Mutat Res*, 2010, 690(1-2): 12-23.
- [13] De Vries HE, Witte M, Hondius D, et al. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(10): 1375-1383.
- [14] Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, et al. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the hemeoxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin [J]. *FASEB J*, 2006, 20(14): 2651-2653.
- [15] 朱晓洁,梁飞,王秀宏,等.钴原卟啉对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(3): 352-356.
- [16] 李珂.姜黄素对酒精诱导的肝细胞损伤的保护作用及其机制研究[D].武汉:华中科技大学, 2006.
- [17] 艾连中,吴艳,郭本恒,等.黄芪多糖的研究进展[J]. *山东食品发酵*, 2008, 15(1): 39-41.
- [18] 张灼,陈立新,宋崇顺,等.黄芪多糖对大鼠心肌缺血一再灌注损伤后的保护作用[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(2): 33-34.
- [19] 季宇彬,孙宇,江森主编.中药抗炎免疫有效成分药理与应用[M].北京:人民卫生出版社, 2007:627-628.
- [20] Fox RI, Dixon R, Guarrasi V, et al. Treatment of primary Sjögren's syndrome with hydroxychloroquine: a retrospective, open-label study [J]. *Lupus*, 1996, 5(Suppl 1): S31-S36.
- [21] 夏光涛,许菁,付敏,等.硫酸羟氯喹治疗风湿病的疗效评价[J]. *世界临床药物*, 2010, 31(8): 466-468.
- [22] Parish RC, Evans JD. Inflammation in chronic heart failure [J]. *Ann Pharmacother*, 2008, 42(7): 1002-1003.
- [23] Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family value[J]. *Cell*, 1995, 80(4): 529-532.
- [24] Meyer T, Stanske B, Kochen MM, et al. Elevated serum levels of interleukin-10 and tumor necrosis factor- α are both associated with vital exhaustion in patients with cardiovascular risk factors [J]. *Psychosomatics*, 2010, 51(3): 248-256.
- [25] Wu CK, Lee JK, Chiang FT, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 are associated with diastolic heart failure through down-regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase [J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(5): 984-992.

(收稿:2013-10-27 修回:2014-02-13)

第十八次全国儿科中西医结合学术会议征文通知

由中国中西医结合学会儿科专业委员会主办、贵州省人民医院承办的第十八次全国儿科中西医结合学术会议拟于2014年8月15—17日在贵州省贵阳市召开,届时将邀请儿科全国知名专家进行专题报告,并进行学术论文交流。现将征文要求通知如下。

征文内容 (1)中西医结合及中医、西医儿科的临床论著、实验研究和专题综述;(2)临床儿科疑难、重症、少见病例报道;(3)中西医结合药理或诊断研究;(4)儿科中西医结合理论及方法研究等。(5)对儿科中西医结合工作的建议等。

征文要求 (1)尚未公开发表的学术论文,具有科学性、先进性和实用性;(2)稿件应为全文并附400~800字摘要,摘要必须包括目的、方法、结果和结论四项要素;(3)稿件中请注明作者单位、通信地址、邮政编码、电子邮箱及电话等联系信息;(4)一律采用Microsoft Word文档投稿;(5)稿件或意向参会者的信息,请发至电子邮箱:cuiyuxia1969@163.com。(6)征文截止日期:2014年6月30日。

联系方式 联系人:贵州省人民医院儿科 崔玉霞,电话:0851-5923907;手机:13985105620,电子邮箱:cuiyuxia1969@163.com