

· 论 著 ·

黄芪多糖通过抑制钙蛋白酶 1/NF- κ B 信号通路减轻低氧诱导的肺动脉高压小鼠肺炎症反应和纤维化

刘欢, 邓海艳, 田小雪, 孙鹤宁, 刘晓健, 王洪新

(锦州医科大学辽宁省心脑血管药物重点实验室, 辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 探讨黄芪多糖(APS)对低氧诱导的肺动脉高压(PAH)模型小鼠产生的肺炎症和纤维化的保护作用及机制。方法 ① 体内实验:采用低氧舱(10%O₂, 90%N₂)内饲养 C57BL/6 小鼠制备肺动脉高压模型。雄性野生型 C57BL/6 小鼠分为正常对照组、低氧模型组、模型+APS 200 和 400 mg·kg⁻¹组(每日 ig 给予)、模型+BAY11-7082 5 mg·kg⁻¹组(NF- κ B 抑制剂, ip 给予, 每周 3 次);钙蛋白酶 1 敲除(Capn1 EK684 FN^{-/-})雄性小鼠分为敲除对照组和敲除低氧组;28 d 后,测定右心室压(RVSP)和右心室肥厚指数(RVHI);HE 染色观察肺组织病理形态并检测血管壁厚度比(WTR)和血管壁面积比(WAR);Masson 染色观察肺组织胶原纤维沉积;ELISA 检测血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平及肺组织中羟脯氨酸(HYP)水平;Western 印迹法检测肺组织钙蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)蛋白表达水平以及 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平。② 体外实验:原代培养肺动脉平滑肌细胞(PASMC)分为细胞对照组、低氧组、低氧+APS 0.6 g·L⁻¹、低氧+BAY11-7082 10 μ mol·L⁻¹和低氧+MDL-28170(钙蛋白酶 1 抑制剂)10 μ mol·L⁻¹组。除细胞对照组外,其余组加药后直接置低氧培养箱(3%O₂、97%N₂)培养 24 h;CCK-8 法检测细胞存活率;ELISA 检测细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 水平;Western 印迹法检测细胞钙蛋白酶 1、MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达水平以及 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平。结果 ① 体内实验:与野生型正常对照组比较,低氧模型组小鼠 RVSP、RVHI、WAR、WTR、肺组织胶原纤维沉积面积、小鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平、肺组织中 HYP 水平、钙蛋白酶 1、MMP-9、TGF- β_1 蛋白表达水平及 NF- κ B P65 磷酸化水平显著升高($P < 0.05$);与低氧模型组相比,模型+APS 组、敲除低氧组和模型+BAY11-7082 组小鼠的 RVSP、RVHI、WAR、WTR、肺组织胶原纤维沉积面积、血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平、肺组织中 HYP 水平、钙蛋白酶 1、MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达水平及 NF- κ B P65 磷酸化水平显著降低($P < 0.05$)。② 体外实验:与细胞对照组相比,低氧组细胞存活率、细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 水平、钙蛋白酶 1、MMP-9、TGF- β_1 蛋白表达水平及 NF- κ B P65 磷酸化水平显著升高($P < 0.05$);与低氧组相比,低氧+APS 组、低氧+BAY11-7082 组、低氧+MDL-28170 组细胞存活率、细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 水平、钙蛋白酶 1、MMP-9、TGF- β_1 蛋白表达水平及 NF- κ B P65 磷酸化水平显著降低($P < 0.05$)。结论 APS 对低氧诱导的小鼠 PAH 具有改善作用,可通过抑制钙蛋白酶 1/NF- κ B 信号通路减轻肺组织炎症反应和纤维化反应。

关键词: 黄芪多糖; 钙蛋白酶 1; 肺动脉高压; 肺纤维化; 肺炎症

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)02-0098-10

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.02.003

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是以肺血管阻力和肺动脉压升高为特征的一组临床综合征,是慢性心力衰竭和慢性阻塞性肺疾

病最常见的并发症之一^[1]。有研究表明,炎症是 PAH 的显著病理特征之一,PAH 患者中肺组织促炎细胞因子增加^[2]。同时据报道,PAH 可能加重肺纤维化,严重 PAH 患者也可能患有肺纤维化。在 PAH 发展过程中,肺血管重构是由特发性肺纤维化引起的,促纤维化因子的分泌可使细胞外基质蛋白增加,从而加剧肺血管重构或肺损伤,导致 PAH^[1],基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、转化生长因子 β_1 (transforming growth

基金项目:国家自然科学基金(81973553)

作者简介:刘欢,硕士研究生,主要从事心血管疾病方面的研究。

通讯作者:刘晓健, E-mail: lxj9199@sina.com; 王洪新, E-mail: hongxinwang@jzmu.edu.cn

factor- β_1 , TGF- β_1) 和羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 等均参与肺纤维化的形成和发展^[3-4]。缺氧是 PAH 发病机制中的一个危险因素^[5]。到目前为止, 由于缺乏有效的治疗方法, PAH 患者的死亡率仍然很高^[6]。因此, 寻找新的 PAH 治疗药物并揭示其潜在的分子机制具有重要意义。

钙蛋白酶 1 属非溶酶体半胱氨酸蛋白酶家族, 主要通过细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加而激活, 与许多慢性血管性疾病有密切联系^[7-9]。NF- κB 是控制炎症信号及先天性和适应性免疫的转录调节剂, 能够上调多种炎症因子表达, 在包括 PAH 在内的多种疾病发生发展中具有重要作用^[10-11]。有研究表明, 在低氧缺血状态下, 组织细胞可表现出细胞内 Ca^{2+} 超载, 从而激活钙蛋白酶 1^[12]。而活化钙蛋白酶 1 能够激活 NF- κB , 进而使其下游因子表达增多, 如 TNF- α , IL-1 β , MMP-9 和 TGF- β_1 等^[13-14], 产生炎症反应和纤维化反应, 加剧 PAH 的发展。

黄芪多糖 (Astragalus polysaccharides, APS) 是我国传统中药黄芪的主要成分之一, 具有抗炎、抗凋亡、抗病毒和抗氧化作用, 并对心血管疾病有很好的治疗作用^[15-16]。有实验表明, APS 对野百合碱诱导的 PAH 有保护作用^[17], 但对低氧诱导的 PAH 的作用尚未见文献报道。本研究旨在探讨 APS 对低氧诱导小鼠 PAH 的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和仪器

APS (纯度 95%) (南京景竹生物科技有限公司); BAY11-7082 和 MDL-28170 (上海蓝木化工有限公司); 兔抗小鼠钙蛋白酶 1 和 NF- κB P65 多克隆抗体、兔抗小鼠 β 肌动蛋白单克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); 兔抗小鼠磷酸化 NF- κB P65 (phosphorylated NF- κB P65, p-NF- κB P65) 和 TGF- β_1 多克隆抗体 (万类生物有限公司); 兔抗小鼠 MMP-9 多克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体 (二抗) (武汉爱博泰克生物技术有限公司); ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); HE 染色试剂盒 (碧云天生物技术研究室)。Masson 染色液 (北京雷根生物技术有限公司); 胎牛血清 (美国 Sigma 公司); 高糖 DMEM (美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (上海奥默生物技术有限公司)。低温高速离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); BL-420S 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司); 凝胶成像仪和半干转印仪 (美国 Bio-Rad 公司); Leica DMI 3000B

倒置显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.2 动物、模型制备和分组给药

野生型雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 6~9 周龄, 体重 20~30 g (辽宁生物技术股份有限公司), 动物许可证编号: SYXK (辽) 2019-0007; 雌性钙蛋白酶 1 敲除 (*calpain-1* knockout, *Capn1* EK684 FN^{-/-}) 型小鼠 16 只, 6~9 周龄, 体重 15~30 g (广州赛业生物科技有限公司), 动物许可证编号: SYXK (辽) 2017-0003。小鼠自由摄食饮水, 预适应 7 d 后进行分组处理。采用低氧舱 (10%O₂, 90%N₂) 内饲养制备肺动脉高压模型小鼠。野生型小鼠分为 5 组, 每组 8 只: 正常对照组、低氧模型组、模型+APS 200 和 400 mg·kg⁻¹ 组 (ig 给予, 每日 1 次), 模型+ BAY11-7082 5 mg·kg⁻¹ (ip 给予, 每周 3 次); *Capn1* EK684 FN^{-/-} 小鼠分为敲除对照组和敲除低氧模型组。正常对照和敲除对照组小鼠饲养于正常环境中, 其余组均置低氧舱内, 持续低氧饲养 28 d, 舱内用无水氯化钙吸收水蒸气和 CO₂。

1.3 右心室收缩压和右心室肥厚指数检测及样本制备

28 d 后, 小鼠 ip 给予 10% 水合氯醛 (3.5 mL·kg⁻¹) 麻醉, 采用经肋间肌穿刺法检测小鼠右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP)。眼球取血液后立即取双肺和心脏, 血液 694×g 离心 15 min, 取上清液, 置 -20℃ 冰箱备用。称全心重量及右心室重量, 计算右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI), RVHI=右心室重量 (g)/(左心室重量+室间隔重量) (g); 右肺置于 -80℃ 冰箱中保存, 用于 HYP 水平检测和 Western 印迹法实验; 左肺置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 后续进行 HE 染色和 Masson 染色。

1.4 HE 染色观察肺小血管重构

取 1.3 用 4% 多聚甲醛固定的左肺组织, 石蜡包埋, 制成厚度 5 μm 的切片, 进行 HE 染色。采用 Image-Pro Plus 程序收集和分析图像, 计算血管壁厚度比和血管壁面积比。血管壁厚度比 (%) = (血管外径 - 血管内径) / 血管外径 × 100%; 血管壁面积比 (%) = (血管总面积 - 管腔面积) / 血管总面积 × 100%。

1.5 Masson 染色观察肺组织胶原纤维沉积

取 1.3 制备的左肺组织, 石蜡包埋, 切片, 常规脱蜡至水, 加 Bouin 固定液固定 2 h, 天青石蓝染色液进行染色, 水洗; 苏木精染色, 盐酸乙醇溶液分化, 蒸馏水洗涤, 丽春红酸品红溶液染色, 蒸馏水洗涤, 1% 磷钼酸染色, 无需水洗直接滴加苯胺蓝溶液, 弱酸处理。之后快速脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。采用 Image-Pro Plus 分析图像, 计算胶原纤维沉积

面积百分数(即胶原纤维面积/总面积 $\times 100\%$)。

1.6 肺动脉平滑肌细胞的培养

分离野生型 C57BL/6 小鼠肺动脉,用含 1%青、链霉素的 PBS 冲洗数次,直至液体清亮。纵向剪开肺动脉,将内外膜刮去,所得的中膜转移到含 20%胎牛血清的 DMEM 培养基中。把分离的肺动脉切成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 小块,将其转移到培养瓶中,加入培养液。瓶底朝上,静置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 4~5 h,待组织块干涸后,翻转培养瓶,让培养液慢慢浸润组织块。待细胞长到 80%~90% 时可进行细胞传代。倒去培养瓶中旧培养基,加 PBS 充分清洗细胞面。倒去 PBS 加 0.25% 胰蛋白酶 1 mL,37 $^{\circ}$ C 消化 1 min 细胞收缩变圆形,立即加入含血清培养基终止消化。反复吹打细胞使其脱落,1:3 分瓶接种。

1.7 细胞分组

取 1.6 培养的细胞,制备成 2×10^7 L⁻¹ 细胞悬液,取 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温细胞培养箱中 24 h。根据预实验结果,确定 APS 浓度为 0.6 g \cdot L⁻¹。细胞分为细胞对照组、低氧组、低氧+APS 0.6 g \cdot L⁻¹、低氧+BAY11-7082 10 μ mol \cdot L⁻¹、低氧+MDL-28170 10 μ mol \cdot L⁻¹ 组。除细胞对照组外,其余组加药后直接置低氧培养箱(3% O₂、97% N₂) 培养 24 h。收集细胞并转移至离心管内,2775 \times g,离心 3 min,弃上清,加入细胞裂解液重悬细胞,每隔 5 min 振荡 20 s,共 6 次。静置 30 min 后 15 984 \times g,离心 20 min,取上清。

1.8 CCK-8 法检测肺动脉平滑肌细胞存活率

取 1.7 分组的细胞,每个孔中加入 10 μ L CCK-8 试剂,并在恒温培养箱中孵育 3 h,最后在 450 nm 处测定吸光度($A_{450\text{ nm}}$)值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组 $A_{450\text{ nm}}$ -空白孔 $A_{450\text{ nm}}$)/(细胞对照组 $A_{450\text{ nm}}$ -空白孔 $A_{450\text{ nm}}$) $\times 100\%$ 。

1.9 ELISA 检测小鼠血清和肺动脉平滑肌细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 水平及肺组织中 HYP 水平

取 1.3 制备的小鼠血清和 1.7 分组的细胞,按 ELISA 试剂盒说明检测小鼠血清和细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 水平及 1.3 制备的肺组织中 HYP 水平。

1.10 Western 印迹法检测小鼠肺组织和肺动脉平滑肌细胞中钙蛋白酶 1, TGF- β_1 和 MMP-9 蛋白表达水平和 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平

取 1.3 制备的肺组织,加 1% PMSF 的 RIPA 缓冲液分离出总蛋白以及取 1.7 制备的细胞进行蛋白定量。将等量的蛋白质样品经 SDS-PAGE(10%~12% 聚丙烯酰胺凝胶)分离后转移到硝酸纤维素滤

膜上,用 1% BSA 室温封闭 1.5 h,然后在 4 $^{\circ}$ C 下与一抗[钙蛋白酶 1(1:1000)、NF- κ B P65(1:1500)、p-NF- κ B P65(1:800)、TGF- β_1 (1:800)、MMP-9(1:1500)和 β 肌动蛋白(1:3000)]孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,然后在室温下与二抗(1:10 000)孵育 2 h。用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行图像采集,Image J 软件进行半定量分析,用目的蛋白条带和内参蛋白条带积分吸光度值的比值表示目的蛋白相对表达水平,p-NF- κ B P65 与 NF- κ B P65 条带吸光度值的比值表示 NF- κ B P65 磷酸化水平。

1.11 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 SPSS20.0 进行统计分析。多组间检验采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉高压小鼠右心室收缩压及右心室肥厚指数的影响

如表 1 所示,与野生型正常对照组比较,低氧模型组小鼠 RVSP 和 RVHI 显著升高($P < 0.05$);与低氧模型组相比,模型+APS 组、模型+BAY11-7082 组和敲除低氧组的 RVSP 和 RVHI 显著降低($P < 0.05$)。

Tab.1 Effect of Astragalus polysaccharides (APS) on right ventricular systolic pressure (RVSP) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) of mice with pulmonary arterial hypertension (PAH) induced by hypoxia

Group	RVSP/kPa	RVHI
Normal control	2.38 \pm 0.25	0.24 \pm 0.02
Model	4.35 \pm 0.17*	0.35 \pm 0.02*
Model+APS 200	3.46 \pm 0.24 [#]	0.31 \pm 0.02 [#]
400	3.07 \pm 0.20 [#]	0.28 \pm 0.01 [#]
Model+BAY11-7082 5	3.24 \pm 0.16 [#]	0.29 \pm 0.02 [#]
KO control	2.23 \pm 0.19	0.22 \pm 0.01
KO hypoxia	3.43 \pm 0.23 [#]	0.29 \pm 0.01 [#]

Pulmonary hypertension model mice were fed in a hypoxia chamber (10% O₂, 90% N₂). C57BL/6 mice were ig given APS 200 and 400 mg \cdot kg⁻¹ once per day or ip given BAY11-7082 5 mg \cdot kg⁻¹ three times a week for 28 d. RVHI=right ventricular mass/(left ventricular mass+interventricular septum mass). KO: *calpain-1* knockout mice. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. * $P < 0.05$, compared with normal control group; [#] $P < 0.05$, compared with model group.

2.2 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉高压小鼠肺小血管重构的影响

HE(图 1)结果显示,野生型正常对照组小鼠肺小动脉管壁较薄,管腔较大;低氧模型组小鼠肺小

动脉管壁明显增厚,管腔明显狭窄,血管平滑肌细胞增生明显,出现肺小血管重构现象;而模型+APS组、模型+BAY11-7082和敲除低氧组的小鼠肺小动脉管壁明显变薄,管腔变大,肺小血管重构程度较低氧模型组明显减轻。肺小动脉图像分析结果显示(表2),与野生型正常对照组比较,低氧模型组小鼠的血管壁面积比和血管壁厚度比显著升高($P<0.05$);与低氧模型组相比,模型+APS组、模型+BAY11-7082组和敲除低氧组的血管壁面积比和血管壁厚度比显著降低($P<0.05$)。

2.3 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉高压小鼠肺组织纤维化的影响

Masson结果(图2)显示,野生型正常对照组小鼠肺组织中胶原纤维渗出较少,低氧模型组小鼠肺组织胶原纤维渗出增多;模型+APS组、模型+BAY11-7082和敲除低氧组小鼠肺组织胶原纤维渗出减少。Masson图像分析结果(表3)显示,与野生型正常对照组比较,低氧模型组小鼠胶原沉积面积指

Tab.2 Effect of APS on vascular wall thickness ratio (WTR) and wall area ratio (WAR) of mice with PAH induced by hypoxia

Group	WTR/%	WAR/%
Normal control	6.76±0.85	27.0±3.4
Model	18.71±1.07*	74.8±4.3*
Model+APS 200	10.68±1.24 [#]	42.7±4.9 [#]
400	7.92±0.70 [#]	31.7±2.8 [#]
Model+BAY11-7082 5	10.26±1.06 [#]	41.0±4.2 [#]
KO control	4.91±0.26	19.6±1.0
KO hypoxia	11.07±1.13 [#]	44.3±4.5 [#]

See Tab.1 for the mouse treatment. Vascular WTR (%)=(vessel outer diameter-vessel inner diameter)/vessel outer diameter × 100%. Vascular WAR (%)=(total vessel area-lumen area)/total vessel area × 100%. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with normal control group; [#] $P<0.05$, compared with model group.

数显著升高($P<0.05$);与低氧模型组相比,模型+APS组、模型+BAY11-7082组和敲除低氧组小鼠肺组织胶原沉积面积指数显著降低($P<0.05$)。

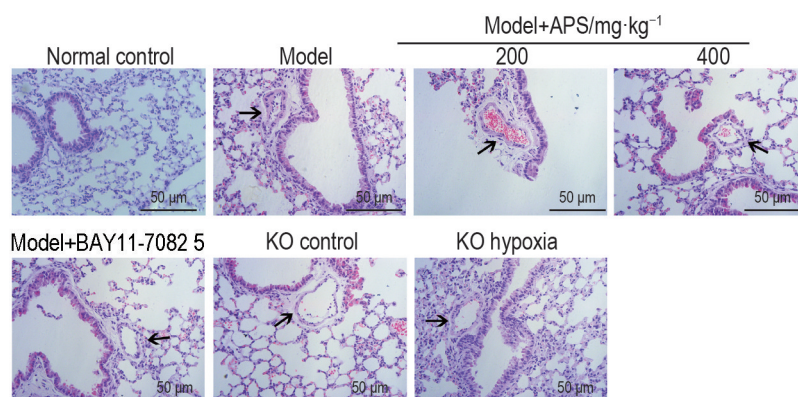


Fig.1 Effect of APS on pulmonary small vessel remodeling of mice with PAH induced by hypoxia (HE staining). See Tab.1 for the mouse treatment. The arrows show thickening of the pulmonary arteriole wall, stenosis of the lumen and proliferation of vascular smooth muscle cells.

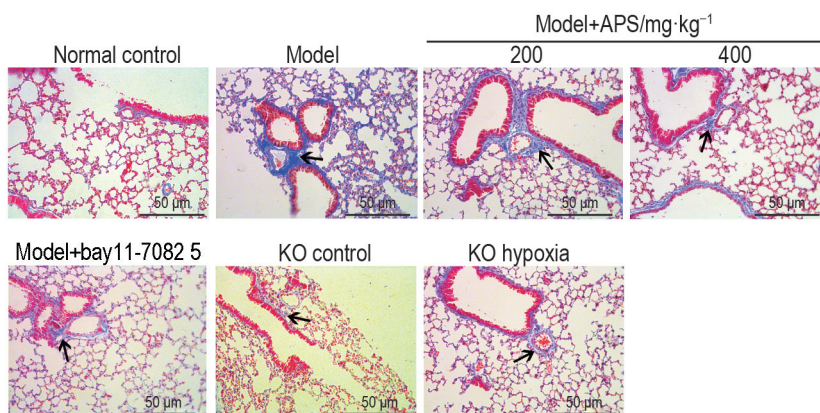


Fig.2 Effect of APS on pulmonary fibrosis of mice with PAH induced by hypoxia (Masson staining). See Tab.1 for the mouse treatment. The arrows show exuded collagen fibers which are blue, resulting in pulmonary fibrosis.

Tab.3 Effect of APS on collagen fiber deposition area in lung tissue of mice with PAH induced by hypoxia

Group	Collagen fiber deposition area index /%
Normal control	6.97±0.42
Model	35.58±1.16*
Model+APS 200	22.74±1.03 [#]
400	16.17±1.26 [#]
Model+BAY11-7082 5	18.46±0.74 [#]
KO control	5.10±0.54
KO hypoxia	20.13±1.59 [#]

See Tab.1 for the mouse treatment. Collagen fiber deposition area index (%) = collagen fiber area/overall area × 100%. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with normal control group; [#] $P<0.05$, compared with model group.

2.4 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞存活率的影响

CCK-8 检测结果(表 4)显示,与细胞对照组比较,低氧模型组细胞存活率显著升高($P<0.05$),说明低氧可诱导 PASMCM 增殖;与低氧模型组相比,低氧+APS 组、低氧+MDL-28170 组、低氧+BAY11-7082 组细胞存活率均下降($P<0.05$),说明 APS 对 PASMCM 增殖有抑制作用。

Tab.4 Effect of APS on viability of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCMs) treated with hypoxia

Group	Cell viability/%
Cell control	100±0
Hypoxia	432±28*
Hypoxia+APS	215±16 [#]
Hypoxia+MDL-28170	228±19 [#]
Hypoxia+BAY11-7082	269±24 [#]

PASMCMs were treated with MDL-28170 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BAY11-7082 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and APS $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ under hypoxia for 24 h. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with cell control group; [#] $P<0.05$, compared with hypoxia group.

2.5 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉高压小鼠血清及肺动脉平滑肌细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响

2.5.1 小鼠血清

ELISA 结果(表 5)显示,与野生型正常对照组比较,低氧模型组小鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平显著升高($P<0.05$);与低氧模型组相比,模型+APS 组、敲除低氧组和模型+BAY11-7082 组小鼠血清中的 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低($P<0.05$)。

2.5.2 肺动脉平滑肌细胞

ELISA 结果(表 6)显示,与细胞对照组比较,低氧组的 PASMCM 中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平显著升高

($P<0.05$);与低氧组相比,低氧+APS 组、低氧+MDL-28170 组和低氧+BAY11-7082 组 PASMCM 中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平显著降低($P<0.05$)。

Tab.5 Effect of APS on interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF- α) levels in serum of mice with PAH induced by hypoxia

Group	IL-1 β /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
Normal control	6.3±1.4	51.5±1.2
Model	22.7±3.1*	154.1±5.4*
Model+APS 200	13.4±1.2 [#]	105.7±3.3 [#]
400	12.0±1.0 [#]	82.6±4.5 [#]
Model+BAY11-7082 5	12.4±1.8 [#]	80.8±3.5 [#]
KO control	5.7±1.4	49.4±3.5
KO hypoxia	15.2±1.1 [#]	107.0±4.5 [#]

See Tab.1 for the mouse treatment. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. * $P<0.05$, compared with normal control group; [#] $P<0.05$, compared with model group.

Tab.6 Effect of APS on levels of IL-1 β and TNF- α in PASMCMs treated with hypoxia

Group	IL-1 β /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
Cell control	7.6±0.4	58±4
Hypoxia	15.4±1.7*	163±6*
Hypoxia+APS	9.3±0.4 [#]	105±5 [#]
Hypoxia+MDL-28170	12.2±1.1 [#]	109±6 [#]
Hypoxia+BAY11-7082	8.9±1.0 [#]	107±4 [#]

See Tab.4 for the cell treatment. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with cell control group; [#] $P<0.05$, compared with hypoxia group.

2.6 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉高压小鼠肺组织 HYP 水平的影响

ELISA 结果(表 7)显示,与野生型正常对照组比较,低氧模型组小鼠肺组织 HYP 水平显著升高($P<0.05$);与低氧模型组相比,模型+APS 组、模型+BAY11-7082 组和敲除低氧组小鼠肺组织 HYP 水平显著降低($P<0.05$)。

2.7 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉高压小鼠肺组织及肺动脉平滑肌细胞 MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达水平的影响

2.7.1 小鼠肺组织

Western 印迹结果(图 3)显示,与野生型正常对照组比较,低氧模型组小鼠肺组织 MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与低氧模型组相比,模型+APS 组、模型+BAY11-7082 和敲除低氧组小鼠肺组织 MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。

Tab.7 Effect of APS on level of hydroxyproline (HYP) in lung tissue of mice with PAH induced by hypoxia

Group	HYP/mg·g ⁻¹
Normal control	8.7±0.6
Model	34.9±2.2*
Model+APS 200	17.3±1.3 [#]
400	13.3±1.3 [#]
Model+BAY11-7082 5	16.6±0.8 [#]
KO control	8.5±0.8
KO hypoxia	18.3±1.1 [#]

See Tab.1 for the mouse treatment. $\bar{x}\pm s$, $n=8$. * $P<0.05$, compared with normal control group; [#] $P<0.05$, compared with model group.

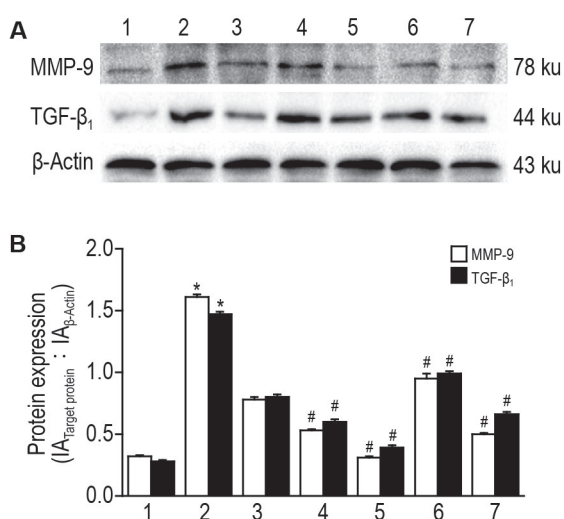


Fig.3 Effect of APS on protein expression levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) in lung tissue of mice with PAH induced by hypoxia detected by Western blotting. See Tab.1 for the mouse treatment. Lane 1: normal control; lane 2: model; lane 3: KO control; lane 4: KO hypoxia; lane 5: model+BAY11-7082; lane 6: model+APS 200; lane 7: model+APS 400. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with normal control group; [#] $P<0.05$, compared with model group.

2.7.2 肺动脉平滑肌细胞

Western 印迹结果 (图 4) 显示, 与细胞对照组比较, 低氧组 PASC 中 MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); 而与低氧组相比, 低氧+APS 组、低氧+MDL-28170 组、低氧+BAY11-7082 组 PASC 中 MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。

2.8 黄芪多糖对低氧诱导的肺动脉高压小鼠肺组织及肺动脉平滑肌细胞中钙蛋白酶 1 蛋白表达水平和 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平的影响

2.8.1 小鼠肺组织

Western 印迹结果 (图 5) 显示, 与野生型正常对照组比较, 钙蛋白酶 1 敲除型正常对照组小鼠钙

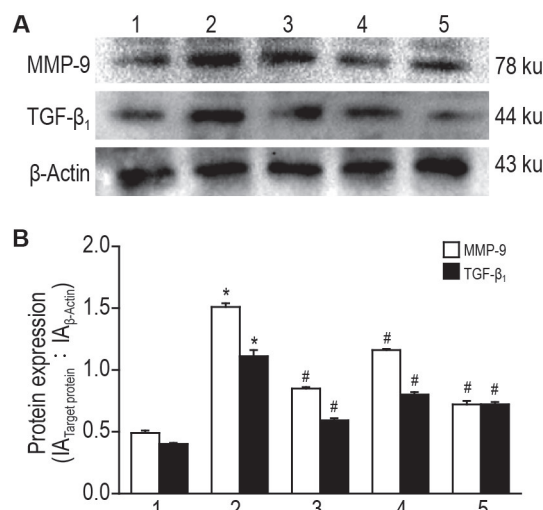


Fig.4 Effect of APS on protein expression levels of MMP-9 and TGF- β_1 in PASCs treated with hypoxia detected by Western blotting. See Tab.4 for the cell treatment. Lane 1: cell control; lane 2: hypoxia; lane 3: hypoxia+MDL-28170; lane 4: hypoxia+BAY11-7082; lane 5: hypoxia+APS. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with cell control group; [#] $P<0.05$, compared with hypoxia group.

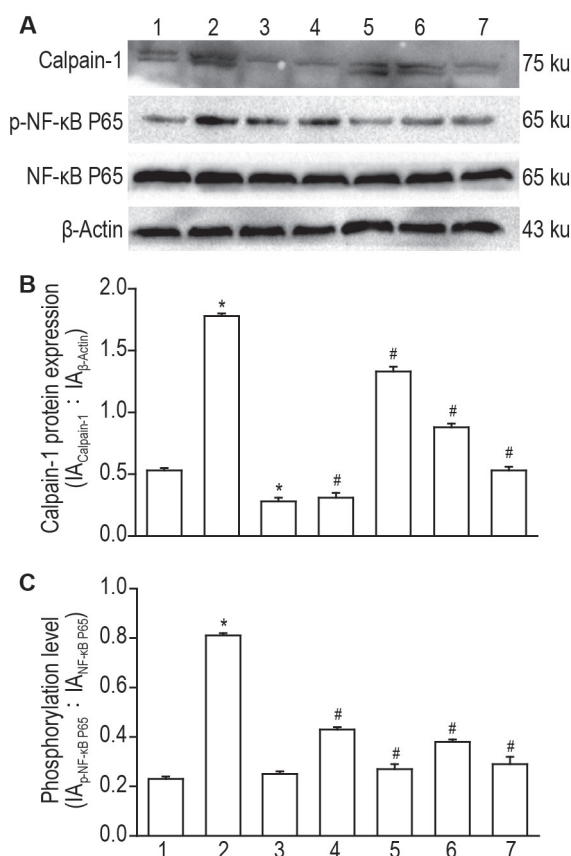


Fig.5 Effect of APS on protein expression level of calpain-1 and protein phosphorylation level of NF- κ B P65 in lung tissue of mice with PAH induced by hypoxia detected by Western blotting. See Tab.1 for the mouse treatment. Lane 1: normal control; lane 2: model; lane 3: KO control; lane 4: KO hypoxia; lane 5: model+BAY11-7082; lane 6: model+APS 200; lane 7: model+APS 400. B and C were the semi-quantitative results of A. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with normal control group; [#] $P<0.05$, compared with model group.

蛋白酶 1 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 说明敲除钙蛋白酶 1 成功。与野生型正常对照组比较, 低氧模型组小鼠钙蛋白酶 1 蛋白表达水平和 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$); 与低氧模型组相比, 模型+APS 组、模型+BAY11-7082 组和敲除低氧组钙蛋白酶 1 蛋白表达水平和 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$)。

2.8.2 肺动脉平滑肌细胞

Western 印迹结果 (图 6) 显示, 与细胞对照组比较, 低氧组 PASM 中钙蛋白酶 1 蛋白表达水平和 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$); 与低氧模型组相比, 低氧+MDL-28170 组、低氧+BAY11-7082 组、低氧+APS 组 PASM 钙蛋白酶 1 蛋白表达水平和 NF- κ B P65 蛋白磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$)。

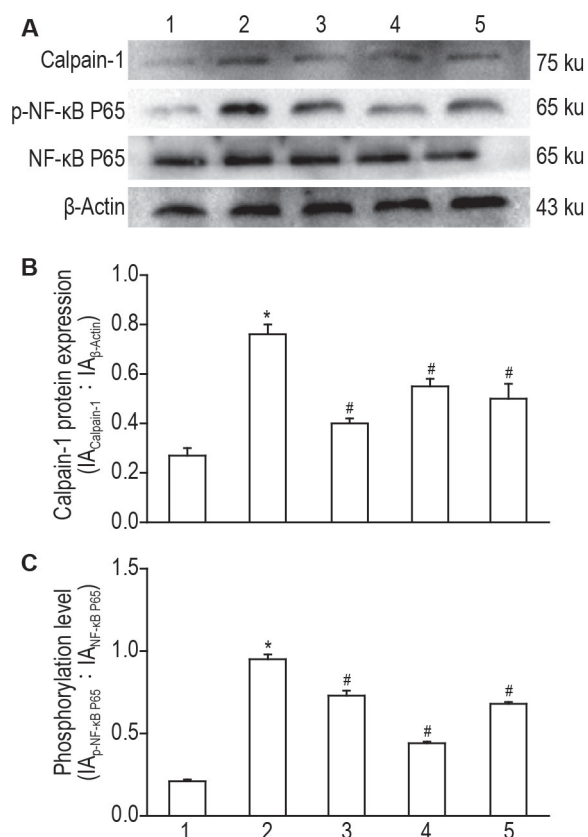


Fig. 6 Effect of APS on protein expression level of calpain-1 and protein phosphorylation level of NF- κ B P65 in PSMCs treated with hypoxia detected by Western blotting. See Tab.4 for the cell treatment. Lane 1: cell control; lane 2: hypoxia; lane 3: hypoxia+MDL-28170; lane 4: hypoxia+BAY11-7082; lane 5: hypoxia+APS. B and C were the semi-quantitative results of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, compared with cell control group; # $P < 0.05$, compared with hypoxia group.

3 讨论

PAH 作为一种临床常见疾病和多发病, 其主要

的临床病理特征包括肺血管阻力升高和肺血管重构, 并伴随着右心室前后负荷增加, 右心功能障碍, 严重者可导致右心室衰竭, 甚至死亡。因此正确评价右心室功能对 PAH 的临床诊断具有一定的参考价值, 其中 RVSP 和 RVHI 是评价 PAH 重要的指标^[18-19]。本研究结果发现, 低氧诱导的 PAH 小鼠肺小血管增厚, RVSP 和 RVHI 显著升高。而 APS 可以显著抑制肺小血管的重塑, 降低 PAH 小鼠的 RVSP 和 RVHI, 提示 APS 对低氧诱导的 PAH 小鼠具有保护作用。

PAH 是肺纤维化严重的并发症之一, 同时严重的 PAH 患者也伴随着肺纤维化^[20]。有研究发现, PAH 模型小鼠肺组织纤维化, 减轻肺纤维化对 PAH 有显著改善作用^[21]。Zhang 等^[16]研究发现, APS 可以显著降低肺组织 HYP 水平, 并抑制 TGF- β_1 表达, 减轻肺组织纤维化。本研究体内实验结果表明, 低氧诱导的 PAH 小鼠肺组织中胶原纤维沉积面积增大, MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达显著上调, 且肺组织中 HYP 水平显著升高, 而 APS 可显著减少小鼠肺组织胶原纤维沉积面积, 降低 MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达及 HYP 水平。体外实验结果同体内实验结果一致, 低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞中 MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达显著升高, 经 APS 干预后 MMP-9 和 TGF- β_1 的蛋白表达显著下降。本研究结果与上述文献报道结果相符, 说明 APS 能够改善低氧诱导的肺动脉高压所产生的肺纤维化。

低氧诱导的 PAH 会发生炎症反应。在 PAH 患者和模型动物的肺组织中发现大量炎症细胞在重构的肺血管周围积累并向血管内浸润, 并在局部产生大量的促炎细胞因子如 IL-1 β 和 TNF- α 等, 炎症因子会促进血管细胞过度收缩与增殖, 导致肺血管重构^[22]。研究表明, APS 能够减轻野百合碱诱导的 PAH 大鼠的炎症反应^[17], 还可以通过 NF- κ B 丝裂原活化蛋白激酶通路减轻脂多糖诱导的炎症^[15], 有明显的抗炎作用。本研究体内、外实验结果发现, 在低氧条件下, PAH 小鼠血清和 PASM 中 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著升高, 而 APS 可明显降低 IL-1 β 和 TNF- α 水平, 表明 APS 可通过抗炎对低氧诱导的 PAH 起保护作用。

有研究发现, 肺动脉高压动物模型中钙蛋白酶 1 和 NF- κ B 表达显著上调, 通过抑制钙蛋白酶 1 和 NF- κ B 的活性, 可显著改善肺动脉高压的症状^[23-24]。研究结果显示, 钙蛋白酶 1 敲除鼠及使用 NF- κ B 抑制剂可以降低低氧诱导的 PAH 小鼠的 RVSP 和 RVHI, 减少肺血管重构和肺纤维化面积以及降低致

纤维化因子 MMP-9、HYP 和 TGF- β_1 及炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达。同时,使用钙蛋白酶 1 抑制剂及 NF- κ B 抑制剂可以降低低氧诱导的 PASM C 中致纤维化因子 MMP-9 和 TGF- β_1 及炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达。此结果表明,钙蛋白酶 1 敲除鼠、钙蛋白酶抑制剂和 NF- κ B 抑制剂可以改善低氧诱导 PAH 的症状。

本研究体内、外实验结果表明,低氧诱导的 PAH 小鼠肺组织及 PASM C 中钙蛋白酶 1 表达水平和 NF- κ B P65 磷酸化水平显著升高,而经敲除或抑制钙蛋白酶 1、使用 NF- κ B 抑制剂及 APS 干预后,钙蛋白酶 1 表达水平和 NF- κ B P65 磷酸化水平显著降低。因此,APS 可以通过调控钙蛋白酶 1/NF- κ B 通路对低氧诱导的 PAH 小鼠起到保护作用。

综上所述,APS 可降低低氧诱导的 PAH 小鼠的 RVSP 和 RVHI,抑制肺小血管的重塑,并改善炎症反应和肺纤维化,对低氧诱导的 PAH 小鼠具有明显的保护作用。其作用机制可能与抑制钙蛋白酶 1/NF- κ B 信号通路的激活有关。

参考文献:

- [1] Li Y, Ren W, Wang X, *et al.* MicroRNA-150 relieves vascular remodeling and fibrosis in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1740-1749.
- [2] Hu Y, Chi L, Kuebler WM, *et al.* Perivascular inflammation in pulmonary arterial hypertension[J / OL]. *Cells*, 2020, 9(11): 2338 [2021-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7690279/>. DOI: 10.3390/cells 9112338.
- [3] Jia L, Ping S, Hui G, *et al.* Mangiferin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through inhibiting TLR4/p65 and TGF- β_1 / Smad2/3 pathway[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(6): 1017-1028.
- [4] Liu Y, Zhang H, Yan L, *et al.* MMP-2 and MMP-9 contribute to the angiogenic effect produced by hypoxia/15-HETE in pulmonary endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 36-50.
- [5] Kim D, George MP. Pulmonary hypertension[J]. *Med Clin North Am*, 2019, 103(3): 413-423.
- [6] Hoeper MM, Huscher D, Ghofrani HA, *et al.* Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(2): 871-880.
- [7] Yu L, Yin M, Yang X, *et al.* Calpain inhibitor I attenuates atherosclerosis and inflammation in atherosclerotic rats through eNOS/NO/NF- κ B pathway[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(1): 60-67.
- [8] Kovacs L, Han W, Rafikov R, *et al.* Activation of calpain-2 by mediators in pulmonary vascular remodeling of pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(3): 384-393.
- [9] Tabata C, Tabata R, Nakano T. The calpain inhibitor calpeptin prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 162(3): 560-567.
- [10] Farkas D, Alhussaini AA, Kraskauskas D, *et al.* Nuclear factor- κ B inhibition reduces lung vascular lumen obliteration in severe pulmonary hypertension in rats[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 51(3): 413-425.
- [11] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF- κ B system[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016, 8(3): 227-241.
- [12] Zhao H, Xu M, Chu G. Association between myocardial cell apoptosis and calpain-1/caspase-3 expression in rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2727-2731.
- [13] Han Q, Liu Q, Zhang H, *et al.* Simvastatin improves cardiac hypertrophy in diabetic rats by attenuation of oxidative stress and inflammation induced by calpain-1-mediated activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B)[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1232-1241.
- [14] Sun L, Xu Q, Zhang W, *et al.* The involvement of spinal annexin A10/NF- κ B/MMP-9 pathway in the development of neuropathic pain in rats[J / OL]. *BMC Neurosci*, 2019, 20(1): 28 [2021-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6580616/>. DOI: 10.1186/s12868-019-0513-9.
- [15] Dong N, Li X, Xue C, *et al.* Astragalus polysaccharides alleviates LPS-induced inflammation via the NF- κ B/MAPK signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(7-8): 5525-5540.
- [16] Zhang R, Xu L, An X, *et al.* Astragalus polysaccharides attenuate pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition and NF- κ B pathway activation[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(1): 331-339.
- [17] Yuan LB, Hua CY, Gao S, *et al.* Astragalus polysaccharides attenuate monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(4): 773-789.
- [18] Wang B, Huang LT, Hsieh ML, *et al.* Diastolic and systolic right ventricular diameters for predicting pulmonary hypertension in children with congenital

- heart disease[J]. *Clin Imaging*, 2021, 70: 67-73.
- [19] Inuzuka R, Hsu S, Tedford RJ, *et al.* Single-beat estimation of right ventricular contractility and its coupling to pulmonary arterial load in patients with pulmonary hypertension[J/OL]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(10): e007929 [2021-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6015338/>. DOI: 10.1161/JAHA.117.007929.
- [20] Ruffenach G, Hong J, Vaillancourt M, *et al.* Pulmonary hypertension secondary to pulmonary fibrosis: clinical data, histopathology and molecular insights [J/OL]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 303[2021-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677848/>. DOI:10.1186/s12931-020-01570-2.
- [21] Mori H, Ishibashi T, Inagaki T, *et al.* Pristane/hypoxia (PriHx) mouse as a novel model of pulmonary hypertension reflecting inflammation and fibrosis[J]. *Circ J*, 2020, 84(7): 1163-1172.
- [22] Jin H, Jiao Y, Guo L, *et al.* Astragaloside IV blocks monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by improving inflammation and pulmonary artery remodeling[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(2): 595-606.
- [23] Chen M, Ding Z, Zhang F, *et al.* A20 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting NF- κ B activation and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J/OL]. *Exp Cell Res*, 2020, 390(2): 111982 [2021-09-16]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014-4827\(20\)30197-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014-4827(20)30197-X). DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.111982.
- [24] Sun Y, Lu M, Sun T, *et al.* Astragaloside IV attenuates inflammatory response mediated by NLRP-3/calpain-1 is involved in the development of pulmonary hypertension[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 586-590.

Astragalus polysaccharides alleviates pulmonary inflammation and fibrosis in mice with hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting calpain-1/ NF- κ B signaling pathway

LIU Huan, DENG Hai-yan, TIAN Xiao-xue, SUN He-ning, LIU Xiao-jian, WANG Hong-xin
(Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Drug of Liaoning Province,
Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate the protective effect and mechanism of Astragalus polysaccharide (APS) on pulmonary inflammation and a fibrosis in mice with hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension (PAH). **METHODS** ① *In vivo*: pulmonary hypertension model was established by feeding C57BL/6 mice in a hypoxic chamber (10% O₂, 90% N₂). Male wild-type C57BL/6 mice were divided into the normal control group, model group, model+APS 200, 400 mg·kg⁻¹ group (daily ig given) and the model+BAY11-7082 5 mg·kg⁻¹ group (NF- κ B inhibitor, ip given, 3 times per week), while calpain-1 knockout (CAPN1 EK684 FN^{-/-}) male mice were divided into the knockout control group and knockout hypoxia group. After 28 d, the right ventricular pressure (RVSP) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) were measured. The pathological morphology of the lung was observed by HE staining, and the vascular wall thickness ratio (WTR) and vascular area ratio (WAR) were detected. Deposition of collagen fibers in lung tissues was observed by Masson staining. ELISA was performed to detect interleukin-1 (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF- α) levels in serum and hydroxyproline (HYP) levels in lung tissue. The protein expressions of calpain-1, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and phosphorylated NF- κ B P65 in lung tissue were assayed by Western blotting. ② *In vitro*: primarily cultured pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) were divided into the cell control group, hypoxia group, hypoxia+APS 0.6 g·L⁻¹, hypoxia+BAY11-7082 10 μ mol·L⁻¹ and the hypoxia+MDL-28170 10 μ mol·L⁻¹ group (calpain-1 inhibitor). Except the cell control group, these groups were immediately put into the hypoxia incubator (3% O₂, 97% N₂) after dosing for 24 h. The viability of cells was determined using the CCK-8 method. ELISA was performed to detect the expressions of IL-1 β and

TNF- α in cells. The protein expressions of calpain-1, MMP-9, TGF- β_1 and phosphorylated NF- κ B P65 in cells were assayed by Western blotting. **RESULTS** ① *In vivo*: compared with the wild normal control group, the RVSP, RVHI, WAR, WTR, collagen fiber deposition areas in the lung and IL-1 β , TNF- α levels in serum, HYP level of the lung tissue, the protein expressions of calpain-1, MMP-9, TGF- β_1 and phosphorylated NF- κ B P65 in lung tissues were increased significantly in the hypoxia model group ($P < 0.05$). Compared with the hypoxia model group, the RVSP, RVHI, WTR, WAR, collagen fiber deposition areas in the lung tissue and IL-1 β , TNF- α levels in serum, HYP levels in lung tissue, the protein expressions of calpain-1, MMP-9, TGF- β_1 and phosphorylated NF- κ B P65 in lung tissues were decreased significantly in the model+APS 0.6 g·L⁻¹ group, knockout hypoxia group and model+BAY11-7082 10 μ mol·L⁻¹ group, respectively ($P < 0.05$). ② *In vitro*: compared with the normal control group, the viability of cells, IL-1 β and TNF- α levels in cells, the protein expressions of calpain-1, MMP-9, TGF- β_1 and phosphorylated NF- κ B P65 in cells were increased significantly in the hypoxia model group ($P < 0.05$). Compared with the hypoxia model group, the viability of cells, IL-1 β , TNF- α levels in cells, the protein expressions of calpain-1, MMP-9, TGF- β_1 and phosphorylated NF- κ B P65 in cells were decreased significantly in the model+APS 0.6 g·L⁻¹ group, hypoxia+BAY11-7082 10 μ mol·L⁻¹ group and hypoxia+MDL-28170 10 μ mol·L⁻¹ group ($P < 0.05$). **CONCLUSION** APS has a protective effect on mice with hypoxia-induced PAH and can inhibit pulmonary inflammation and fibrosis by down-regulating calpain-1/NF- κ B signaling pathway.

Key words: Astragalus polysaccharide; calpain-1; pulmonary hypertension; pulmonary fibrosis; pulmonary inflammation

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81973553)

Corresponding author: LIU Xiao-jian, E-mail: lxj9199@sina.com; WANG Hong-xin, E-mail: hongxinwang@jzmu.edu.cn

(收稿日期: 2021-09-16 接受日期: 2021-11-10)

(本文编辑: 乔虹)

文献类型标志符号含义及统计表的书写原则

1. 文献类型标志如下:普通图书 M, 会议录 C, 汇编 G, 报纸 N, 期刊 J, 学位论文 D, 报告 R, 标准 S, 专利 P, 数据库 DB, 计算机程序 CP, 电子公告 EB。会议录包括座谈会、研讨会、学术年会等会议的文集;汇编包括多著者或个人著者的论文集,也可标注为 M。电子文献载体类型标志如下:磁带 MT, 磁盘 DK, 光盘 CD, 联机网络 OL。

2. 统计表内不应空格,若使用符号表示“未测”或“未做”,可用“…”或“ND”表示;如果表示“未测到”或数值小于有效数字,可用“-”或“0.0”“0.00”(据有效数字位数而定)。