

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.21.028

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190730.1314.006.html>(2019-07-30)

黄芪甲苷对缺血缺氧性脑血管内皮损伤作用的研究进展*

杜澍金 综述,高维娟[△] 审校

(河北中医学院河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室,石家庄 050200)

[摘要] 黄芪甲苷是中药黄芪的主要活性单体,具有免疫调节、抗炎、抗凋亡、神经保护、血管重构等多种药理作用,临床上常用于治疗缺血性脑血管疾病。大多数脑血管疾病都是由于血管内皮损伤、通透性增加所致,因此积极控制损伤因素,保护血管内皮功能,改善损伤引起的血管屏障的破坏,对脑血管疾病的防治有重要作用。综合近期的研究,就血管内皮的损伤机制及黄芪甲苷对其保护作用进行综述,以期进行进一步研究,并为其在临床脑血管疾病中的应用提供指导。

[关键词] 黄芪甲苷;内皮,血管;通透性;内皮屏障

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)21-3720-04

Research progress on role of Astragaloside IV in ischemic hypoxic cerebral vascular endothelium injury*

DU Shujin,GAO Weijuan[△]

(Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-Cerebrovascular Disease, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050200, China)

[Abstract] Astragaloside IV is the primary active monomer of Chinese medicine Astragalus, which has the multiple pharmaceutical actions such as the immune regulation, anti-inflammation, anti-apoptosis, nerve protection, vascular remodeling and so on, and is usually used to treat ischemic cerebrovascular disease. The majority of cerebrovascular diseases are mainly caused by the vascular endothelial injury and permeability increase. Therefore, actively controlling the damage factors, protecting the vascular endothelial function and improving the damage caused vascular barrier destroy have important effects on the prevention and treatment of cerebrovascular diseases. The recent researches were integrated to review the protective effect of astragaloside on vascular endothelial damage and its mechanism, in order to conduct the further research and provide the guidance for its application in clinical cerebrovascular diseases.

[Key words] Astragaloside IV; endothelium, vascular; permeability; endothelial barrier

缺血缺氧性脑血管疾病是临床常见病、多发病,其致死率、致残率和复发率极高^[1]。随着现代化的进展,人类饮食结构和生活方式的改变,使得脑缺血缺氧性疾病发病率迅速增长,严重威胁人类的健康及生活质量。《2018 版中国缺血性脑卒中诊治指南》显示,每年发生脑卒中、脑卒中相关死亡和脑卒中的全球总负担的绝对数量巨大,而且持续增加,脑卒中已成为我国城市和农村人口第一位致残和死亡原因,其中缺血性脑卒中占 70%。因此,降低缺血性脑血管疾病的发病率、致残率和致死率已成为目前亟待解决的临床问题。

黄芪具有补气升阳、利水消肿、行滞通痹等功效,用于治疗缺血性脑血管病已有 2 000 多年历史,其主要的活性成分之一为黄芪甲苷^[2]。前期研究发现黄

芪甲苷可以减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤,发挥脑保护作用^[3]。其他研究也发现黄芪甲苷在心、脑、肾、胃、肺等多种器官和组织的缺血及再灌注损伤中发挥作用,其机制与黄芪甲苷对内皮细胞的保护作用有关。因此,本文就黄芪甲苷对血管内皮及其连接的保护作用进行综述,为进一步发掘黄芪甲苷的作用及其对缺血缺氧性脑血管疾病的防治提供参考。

1 缺血缺氧对脑血管内皮的损伤

脑血管内皮细胞是内覆于血管腔表面的连续单层扁平细胞,构成血液和组织细胞间的半通透性屏障,维持血管壁通透性和液体平衡。内皮细胞彼此重叠覆盖,借由内皮间连接形成连续性结构,并与细胞外基质和星形胶质细胞脚板等共同构成血脑屏障,使脑组织免受循环中有害物质的损害,保持内环境的相

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873180);河北省 2019 年研究生创新项目(CXZZBS2019156);河北省中医药管理局课题项目(2018111,2017005);河北中医学院青年基金项目(2017001)。 作者简介:杜澍金(1986—),讲师,在读博士,主要从事缺血缺氧性脑血管疾病的发生机制及中医药防治作用的研究。 [△] 通信作者,E-mail:gwj6088@163.com。

对恒定,对维持中枢神经系统功能具有重要意义。此外,血管内皮细胞还可分泌多种血管活性物质,维持血管壁张力、血流动力学、血管新生和纤维基质增生,同时还可参与炎症反应和免疫调节等生理病理过程^[4-6]。

血管内皮易受多种因素的影响,如缺血缺氧等刺激均可致血管内皮损伤和凋亡、内皮间紧密连接蛋白表达下降及细胞外基质合成减少或降解增多,进而破坏血脑屏障结构的完整性,导致组织间隙液体体积聚、信号传导通路障碍、内皮分泌功能受损、血管损伤、血栓生成等,破坏脑组织内环境稳态、损伤组织细胞,引起脑功能的减退甚至丧失。由此可见,血管内皮功能的损害是多种心脑血管疾病发生、发展的共同病理生理基础,防治脑血管内皮的损伤也就成为治疗这些疾病的关键。

2 黄芪甲苷对缺血缺氧性脑血管内皮损伤的保护作用

血管内皮细胞之间黏附连接、紧密连接、缝隙连接和桥粒连接,与细胞外基质和内皮细胞表达的整合素形成的基膜共同构成血管内皮屏障,尤其是内皮间黏附连接和紧密连接在保护脑组织免受缺血缺氧性损害中起重要作用。有研究显示,黄芪甲苷可以通过抑制内皮细胞的凋亡、炎症,促进内皮细胞的增殖和迁移,促进细胞间连接蛋白的表达,参与血管重构和新生,进而发挥对血管内皮的保护作用,抑制或减轻其凋亡和损伤,保护内皮屏障结构和功能的完整性,减轻缺血缺氧性脑损伤。

2.1 黄芪甲苷抑制缺血缺氧性脑血管内皮损伤和凋亡

脑血管内皮细胞直接与循环血液接触,易受血液中的各种有毒有害物质的损害,而致其屏障结构和内分泌功能的破坏,进而参与多种疾病的发生、发展。如缺血缺氧引起的脑血管内皮损伤可以引起脑水肿,加重脑组织缺血缺氧性损伤,如此又进一步引起炎症因子的释放,形成恶性循环,逐步加重脑损伤进程。因此,减轻脑内皮细胞的损伤和凋亡是维持脑血管壁完整和促进新生血管重建的关键。

2.1.1 黄芪甲苷抑制脑血管内皮细胞凋亡

有关黄芪甲苷药物作用的研究发现,其可以通过阻止 pro-caspase-8 断裂,下调促凋亡蛋白 Bax 和 p53 表达,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 表达,减少细胞线粒体 Cyto C 的释放,抑制 caspase-3 的活性来发挥抗凋亡作用。崔伟等^[6]通过建立过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤细胞模型,发现黄芪甲苷可降低氧化应激导致的内皮细胞凋亡率,其保护血管内皮的机制可能为黄芪甲苷激活 PI3K/Akt 信号通路抑制内皮细胞内质网应激有关。黄芪甲苷可以通过激活低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor, HIF-1),抑制缺氧诱导的内皮细胞凋亡^[5]。还有研究表明黄芪、川芎的有

效成分配伍对 SD 乳鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMVEC)缺氧损伤有显著的保护作用,其机制可能与保护细胞膜稳定性,提高氧自由基清除能力,抑制细胞凋亡有关^[7]。黄芪甲苷可通过抗氧化应激作用,缓解内皮损伤^[8],通过内质网应激机制抑制炎症反应而减少凋亡^[9]。另外,黄芪甲苷可抑制血管内皮损伤后细胞及内膜过度增生,进而避免损伤后血管腔狭窄的出现,防止供血区域组织的缺血缺氧。

由此可见,黄芪甲苷可以通过多种途径抑制内皮细胞凋亡的发生,从而保护内皮屏障,减轻循环中有害物质对组织器官的损伤作用。

2.1.2 黄芪甲苷上调血管内皮生长因子(VEGF)表达,促进脑血管内皮细胞增殖

王欢等^[10]在体外实验证明,黄芪甲苷与当归以 3:1 的比例,且总浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可通过促进细胞增殖来促进血管的生成,其机制可能与 VEGF 有关。

有关脑缺血及缺血再灌注的研究发现,在脑组织缺血缺氧时 VEGF 分泌增多,可以促进血管内皮细胞增生,诱导血管生成,减轻脑水肿,缓解脑组织损伤^[11]。VEGF 是体内诱导血管新生的重要生长因子,主要通过血管内皮细胞上的 VEGF 受体特异性结合来发挥作用^[12]。因此,研究脑缺血时黄芪甲苷对 VEGF 的调节作用,将对缺血性脑血管病的治疗带来新的前景。

李军昌等^[4]通过实验证明,黄芪甲苷可通过稳定梗死组织 HIF-1 和 VEGF 的表达,促进血管内皮细胞的增殖及体外实验中离体管腔的形成,促使血管新生和成熟,并形成有效灌注功能的微血管,改善组织血供和氧供。通过缺氧诱导 HUVECs 损伤后,给予川芎嗪与黄芪甲苷干预可以上调 VEGF 的表达、减轻内皮损伤^[13]。可见,黄芪甲苷可以通过对 VEGF 的调节发挥其抗缺血缺氧性血管内皮损伤和促血管新生作用,进而维持血管内皮屏障的功能和结构完整性。

2.2 黄芪甲苷通过上调血管内皮间连接蛋白表达,保护脑血管内皮屏障

内皮间连接,尤其是黏附连接和紧密连接在血管内皮屏障功能中起重要作用。在致伤因素影响下,保护连接蛋白免受损伤或促使其表达上调,对内皮屏障功能的维持有重要作用。用药物诱导单层 HUVECs 间连接蛋白 VE-cadherin 和紧密连接蛋白 ZO-1、咬合蛋白(Occludin)、闭合蛋白家族(Claudins)-5 的基因和蛋白表达的明显下降后可致细胞连接松散、断裂,结构不完整,血管内皮屏障功能障碍^[14]。研究证明,黄芪甲苷可以上调内皮间连接蛋白的表达以维持内皮屏障功能的稳定。

2.2.1 黄芪甲苷促进脑血管内皮间紧密连接蛋白表达

毛细血管内皮之间的紧密连接是血脑屏障结构和功能的基础,内皮间紧密连接蛋白的缺失导致血脑

屏障的破坏,进而引起血管源性脑水肿。紧密连接主要由 Occludin、Claudins、JAM 家族蛋白及闭环蛋白等组成,其中跨膜蛋白 Claudins 和 Occludin 是形成紧密连接屏障的主要结构。

Claudins 可与闭合蛋白结合调控内皮细胞间的黏附、极性及屏障功能,还可参与细胞外基质的降解。其中 Claudin-5 是 BMVEC 紧密连接中的特异性蛋白,其外源性表达可诱导血脑屏障的形成,而缺血缺氧可导致其分布的连续性和表达量明显降低或者磷酸化增多,引起脑血管内皮细胞通透性增高。ASLAM 等^[15]发现,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)能下调 Claudin-5 的表达而损伤大鼠 BMVEC 的紧密连接。而黄芪甲苷可以明显降低脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织炎症因子 TNF- α 的表达水平^[16]。因此,推测黄芪甲苷通过下调 TNF- α 的表达间接上调 Claudin-5 蛋白,以维持紧密连接结构和功能的完整。

Occludin 是内皮细胞封闭细胞间隙的主要成分,是紧密连接的基础结构。在脑缺血或氧化剂诱导血脑屏障功能损害的研究中发现, Occludin 表达量减少,磷酸化增加,在细胞中的位置分布和结构发生改变。曲友直等^[17]发现,黄芪甲苷可通过上调 Occludin 的表达,维持紧密连接复合体结构的完整性,抑制缺血再灌注引起的血脑屏障的破坏。

闭环蛋白是紧密连接的膜周边蛋白,可部分调节、稳定内皮细胞的浆膜层。其中闭锁小带蛋白-1 可以通过调节紧密连接和黏附连接蛋白的相互作用来改变内皮的通透性,其功能和结构的改变可导致紧密连接解离、细胞间隙增大、血管通透性升高。黄芪甲苷可以通过上调 Occludin 及闭锁小带蛋白-1 的表达,维持内皮紧密连接的稳定性,进而抑制内皮屏障的破坏,对抗脑缺血再灌注导致的脑水肿^[18]。

2.2.2 黄芪甲苷增强脑血管内皮间连接蛋白表达 缝隙连接由亚基蛋白 Connexins(Cx)形成,控制着水和离子的运输。研究显示,Cx43 的表达增加可以进一步加重炎症因子所诱导的血管通透性的增加^[19]。CHU 等^[20]配伍使用芍药花甙和黄芪甲苷可以减轻缺血所致脑水肿,机制与下调 Cx43 蛋白表达密切相关。黄芪甲苷可以逆转梗死组织中 Cx43 蛋白表达减少和分布紊乱,其机制可能与抗氧化作用有关^[21]。由此可知,黄芪甲苷可以通过促进缝隙连接蛋白的表达减轻缺血缺氧对血管内皮屏障的损伤。

2.3 黄芪甲苷通过抑制基质金属蛋白酶(MMPs)维持脑血管内皮屏障的稳定性 在正常状态下,细胞外基质成分的合成和降解保持动态平衡,主要由 MMPs 调控。MMPs 生理情况下主要以无活性的酶原形式存在;在病理状态下通过降解毛细血管基底膜的某些基质蛋白,导致血管的完整性受到破坏,通透性增加,介导血管源性脑水肿的发生,其中起主要作用的是明胶酶 A(MMP-2)和明胶酶 B(MMP-9)。

以往的研究发现,MMP-9 对血管内皮细胞胞外基质和血管基底膜的损伤机制与降解毛细血管基底膜 IV 型胶原和层黏蛋白等成分,激活核因子(NF)- κ B 细胞信号转导通路下调细胞间紧密连接蛋白的表达相关,最终导致毛细血管通透性增加。此外,MMPs 可导致 Claudin-5 和 Occludin 连续性 & 稳定性的变化,破坏紧密连接,使血管壁通透性增加,应用 MMPs 抑制剂可以抑制其介导的 Claudin-5 和 Occludin 连续性 & 稳定性的变化,从而保持紧密连接的完整性^[14]。

研究发现,黄芪甲苷可明显下调缺血再灌注后脑组织 MMP-9 蛋白的高表达,减少细胞外基质的降解,保护血管壁结构和功能的稳定,减轻血管源性脑水肿^[22]。LI 等^[23]证明腹腔注射黄芪甲苷可明显降低大鼠中动脉闭塞/再灌注模型 MMP-9 表达,维持血脑屏障结构完整性,有效减轻脑水肿程度。可见,黄芪甲苷可以通过上调 MMP-9 的表达来保护脑缺血/再灌注动物模型血管内皮屏障的稳定性。

2.4 黄芪甲苷抑制缺血缺氧性脑血管内皮细胞炎症反应 血管内皮损伤是缺血再灌注损伤的关键环节。再灌注时产生大量氧自由基使内皮细胞激活并表达多种炎症因子,导致细胞的损伤、凋亡和坏死。活化的内皮细胞表面表达黏附分子-1,与相应配体结合后介导白细胞与血管壁的黏附过程,启动白细胞的趋化作用,导致血管通透性的增高及血管狭窄,进而引起组织水肿等。抑制 NF- κ B 的活性可以下调黏附分子的表达,抑制其介导的炎症反应。研究发现,经黄芪甲苷处理后,培养的 HUVECs 表达 NF- κ B 减少,细胞培养液中黏附分子-1 浓度降低,这表明黄芪甲苷可以通过下调炎症因子 NF- κ B、黏附分子等的表达保护血管内皮免受缺氧等刺激的损伤^[24]。因此,黄芪甲苷清除氧自由基引起的脂质过氧化作用,在一定程度上避免了氧自由基对血管内皮的直接损伤及其诱发的炎症反应对血管内皮的损伤。

魏冰等^[25]实验证明 ox-LDL 可以诱导内皮细胞局部炎症反应,而在内皮细胞培养液中加入黄芪甲苷后,细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-8、细胞间黏附分子-1 等的表达下降,证明黄芪甲苷发挥了良好的抗炎作用。崔伟等^[6]的研究也发现黄芪甲苷可通过抑制 TNF- α 和 IL-6 的表达减轻 H₂O₂ 诱导的 HUVECs 炎症反应。有研究证实,脑缺血再灌注损伤可诱导 NLRP3 炎症小体在血管内皮细胞中的活化和表达增强,并通过下游 IL-1 β 、IL-18 等加重脑损伤,而给予脑缺血再灌注损伤大鼠黄芪甲苷灌胃后,炎症因子 NLRP3、pro-IL-1 β 、IL-1 β 、pro-IL-18 和 IL-18 水平明显降低。有其他实验证明黄芪甲苷可通过调节多种炎症因子的表达,降低培养细胞及在体组织的炎症反应。

3 展 望

缺血缺氧性脑血管疾病发生、发展的关键环节与

内皮的损伤及内皮屏障的破坏密切相关。黄芪的主要活性成分黄芪甲苷可以通过抑制内皮细胞凋亡,促进内皮细胞的增殖和迁移、细胞间连接蛋白的表达和调节内皮细胞的分泌功能来保护血管内皮功能,维持血管内皮屏障功能和促进血管再生,其机制涉及 MAPK、ERK、PI3K/Akt 等信号通路,与多种受体、细胞因子、生长因子等相关。此外,黄芪甲苷还对神经元的损伤及星形胶质细胞的激活有调节作用。因此,深入研究黄芪甲苷对于血管内皮的保护作用靶点和其机制,以及对神经元、胶质细胞等的保护作用机制,将对于人类健康和心脑血管疾病的治疗和预防有重要价值。

参考文献

- [1] FONAROW G C, ZHAO X, SMITH E E, et al. Door-to-needle times for tissue plasminogen activator administration and clinical outcomes in acute ischemic stroke before and after a quality improvement initiative [J]. *JAMA*, 2014, 311(16):1632-1640.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:302-303.
- [3] 李媛, 吴增, 靳晓飞, 等. 黄芪甲苷对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的影响[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(1):108-112.
- [4] 李军昌, 司静文, 刘海涛, 等. 黄芪甲苷 IV 对梗死小鼠心肌新生血管成熟及 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达的影响[J]. *心脏杂志*, 2017, 29(3):269-175.
- [5] 付卫云, 刘暖, 王延柯, 等. 黄芪甲苷通过调控 PKD1-HDAC5-VEGF 通路促进心肌梗死大鼠血管新生[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(4):643-649.
- [6] 崔伟, 王高频, 卢美丽, 等. 黄芪甲苷通过激活 PI3K/AKT 通路抑制内皮细胞内质网应激介导的细胞凋亡的研究[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(5):39-44.
- [7] 杨珍, 周慧芬, 周鹏, 等. 川芎、黄芪有效成分伍伍对缺氧脑微血管内皮细胞的影响[J]. *中草药*, 2015, 46(9):1326-1332.
- [8] 陈宇琼, 孙东岳, 吴恒芳, 等. 黄芪甲苷改善过氧化氢诱导的人主动脉内皮细胞氧化应激损伤的研究[J]. *南京医科大学学报*, 2017, 37(8):949-954.
- [9] ZHAO Y, LI Q, ZHAO W, et al. Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169:210-218.
- [10] 王欢, 李孝红. 不同浓度和比例黄芪甲苷和阿魏酸对人脐静脉内皮细胞增殖的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(2):263-264.
- [11] 庄朋伟, 张艳军, 庞坦. 黄芩苷作用于脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞对神经干细胞分化的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(1):43-47.
- [12] LAPI D, VAGNANI S, SAPIO D, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) on rat pial microvascular remodeling after transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 25(9):329.
- [13] 李玉梅, 杨欣欣, 韩旭, 等. 川芎嗪与黄芪甲苷伍伍对人脐静脉内皮细胞血管生成的作用及机制探讨[J]. *中草药*, 2017, 48(4):722-727.
- [14] 秦伟伟. 褪黑素抑制基质金属蛋白酶-9 对人脐静脉内皮细胞屏障保护机制的研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2012.
- [15] ASLAM M, AHMAD N, SRIVASTAVA R, et al. TNF-alpha induced NF- κ B signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells [J]. *Cytokine*, 2012, 57(2):269-275.
- [16] 黄顺贵, 钟晓闵, 刘梅. 黄芪甲苷下调 TNF- α 和 iNOS 水平保护缺血再灌注大鼠脑损伤的实验研究[J]. *药学与临床研究*, 2013, 21(4):326-328.
- [17] 曲友直, 赵燕玲, 李敏. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用及 Occludin 蛋白表达的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2010, 17(2):96-78.
- [18] ZHU H, WANG Z, XING Y, et al. Baicalin reduces the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia in vitro by increasing the expression of tight junction proteins in brain microvascular endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2):714-720.
- [19] O DONNELL J J, BIRUKOVA A A, BEYER E C, et al. Gap junction protein connexin43 exacerbates lung vascular permeability [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e100931.
- [20] CHU H L, HUANG K L, GAO Z D, et al. Reduction of ischemic brain edema by combined use of paeoniflorin and astragaloside IV via down-regulating connexin 43 [J]. *Phytother Res*, 2017, 31:1410-1418.
- [21] 李真真. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素所致心肌梗死的保护作用及 Cx43 表达的影响[D]. 兰州:兰州大学, 2013.
- [22] 曲友直, 杨震, 李敏, 等. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用及 IL-1 β 含量、MMP-9 蛋白表达的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2016, 23(6):389-391.
- [23] LI M, MA R N, LI H L, et al. Astragaloside IV reduces cerebral edema post-ischemia/reperfusion correlating the suppression of MMP-9 and AQP4 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715(1/3):189-195.
- [24] 杨富国, 刘革新, 王力. 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤血管内皮细胞核转录因子- κ B 表达的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(6):367-369.
- [25] 魏冰, 姜希娟, 卢斌, 等. ox-LDL 对内皮细胞 CD40 信号表达的影响及黄芪甲苷的抗炎作用[J]. *天津中医药大学学报*, 2017, 36(4):282-285.