

西洋参茎叶皂苷抗大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及机制

孙莉, 荀平*

(吉林省吉林市中心医院 心血管诊疗中心, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:观察西洋参茎叶皂苷(*Panax quinquefolius* saponins, PQS)对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其作用机制。方法:大鼠50只随机分5组,每组10只,即假手术组、模型组、PQS低、高剂量组及尼莫地平组。假手术组和模型组*ig*给予生理盐水,给药组*ig*给予PQS(100,300 mg·kg⁻¹)和尼莫地平(21.6 mg·kg⁻¹),每日1次,连续给药15 d后,除假手术组外,手术结扎冠脉建立心肌缺血再灌注模型。观察PQS对大鼠心脏功能及心肌梗死面积的影响;检测PQS对血清肌酸磷酸激酶(CPK)、乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)及心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)水平的影响。结果:模型组左室收缩压(LVSP)降低,左室舒张末压(LVEDP)升高,心肌梗死面积增加,血清中CPK,LDH活性及MDA,TNF- α 和IL-6含量升高,SOD和GSH-Px活性降低,与假手术组比较均具有显著统计学差异($P < 0.01$);与模型组比较,PQS和尼莫地平平均可以使LVSP升高,LVEDP降低,减少心肌梗死面积,降低血清中CPK,LDH活性及MDA,TNF- α 和IL-6含量,升高SOD和GSH-Px活性,均具有统计学差异($P < 0.01, P < 0.05$)。结论:PQS预处理能够有效的减弱心肌缺血再灌注引起的损伤,该作用与抑制心肌缺血再灌注引起的活性氧增加及减少炎症反应的发生有关。

[关键词] 西洋参茎叶皂苷; 缺血再灌注; 抗氧化; 抗炎

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0176-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240176

Protective Effects and Mechanism of *Panax quinquefolius* Saponins on Myocardial Ischemia of Rats

SUN Li, XUN Ping*

(Cardiovascular Clinical Center of Jilin City Center Hospital, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects of *Panax quinquefolius* saponins (PQS) and to investigate its possible mechanism on myocardial ischemia-reperfusion model of rats. **Method:** Fifty rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, model group, low-and high-dose PQS groups (100, 300 mg·kg⁻¹), and nimodipine group (21.6 mg·kg⁻¹) of 10 rats each. The myocardial ischemia-reperfusion model was induced by ligation of coronary artery and reperfusion of rats except for rats in sham operation group. All rats were *ig* administrated with corresponding medicines once daily for 15 days. The heart function and cardiac infarction area were observed. The contents of creatine phosphokinase (CPK), lactic dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor (TNF) - α and interleukin (IL) -6 in serum and superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px) and malonaldehyde (MDA) in cardiac muscle tissue were tested. **Result:** Compared with sham operation group, the left ventricular systolic pressure was increased, the left ventricular end-diastolic pressure was decreased, cardiac infarction area was increased, and the contents of CPK, LDH, MDA, TNF- α and IL-6 were decreased, the activities of SOD and GSH-Px were inhibited in model group ($P < 0.01, P < 0.05$). The above indexes were improved in the PQS groups ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion:** PQS can attenuate the damage caused by myocardial ischemia reperfusion and its mechanism may be involved with the anti-oxidation and anti-

[收稿日期] 20140722(003)

[基金项目] 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(吉教科合字2014第203号)

[第一作者] 孙莉, 硕士, 主治医师, 从事心血管内科工作, Tel:15543526057, E-mail:sunli_jl@163.com

[通讯作者] *荀平, 硕士, 主治医师, 从事心血管内科工作, Tel:15543436545, E-mail:xunping_jl@163.com

inflammatory activities.

[Key words] *Panax quinquefolius* saponins; ischemia reperfusion; anti-oxidation; anti-inflammatory

心肌缺血是心血管疾病最常见的致病因素,死亡病例中的40%是由心血管疾病导致的,其中以急性心肌缺血病例居多^[1]。临床上常用的治疗方法即为缺血心肌再灌注,而研究发现,缺血后恢复心肌血供,不仅未能完全改善心脏功能,反而加重了缺血性心肌损伤,出现心肌梗死面积增大、心脏衰竭、心律失常等更为严重的损伤,这种现象被称为心肌缺血再灌注损伤^[2]。因此,寻找有效的药物抑制或减轻心肌缺血再灌注损伤具有十分重要的意义。西洋参为五加科人参属植物,有性凉、味苦、甘厚、补肺降火、生津液、除烦倦等作用^[3]。西洋参茎叶皂苷(*Panax quinquefolius* saponins, PQS)是西洋参中的主要成分,具有抗肿瘤、护肝、增强免疫力、抗氧化、抗疲劳等广泛的生物活性^[4]。PQS对脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,其抑制作用主要与减少脑神经元细胞凋亡有关^[5]。而PQS对心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究较少,因此,本文拟通过建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型,观察PQS对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,并初步探讨对缺血心肌保护的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠40只,(200±20)g,雌雄各半,购于吉林大学实验动物中心,合格证号SCXK(辽)2007-003。

1.2 药品及试剂 PQS(安益盛药业股份有限公司,批号130524),尼莫地平(西安博爱制药有限公司,批号121201),肌酸磷酸激酶(creatine phosphokinase,CPK)检测试剂盒(批号20120524),乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase,LDH)检测试剂盒(批号20120328),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒(批号20111208),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathion peroxidase,GSH-Px)检测试剂盒(批号20111212),丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒(批号20111206),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)检测试剂盒(批号20120205),白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)检测试剂盒(批号201200309),以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 RM6240型生理记录仪(成都仪器厂),UNICO LTV 2000型紫外分光光度计(中国尤尼柯仪器有限公司),Z323K型低温离心机(德国Hermle公司),CX-41型生物显微镜(日本Olympus公司),

AU2700型自动生化分析仪(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将大鼠适应性喂养1周,随机均分为5组:假手术组、缺血再灌注组(模型组)、21.6 mg·kg⁻¹尼莫地平组、PQS低、高剂量组(100,300 mg·kg⁻¹)。给药组大鼠按5 mL·kg⁻¹体积*ig*给药,假手术组、缺血再灌注组*ig*给予等体积生理盐水,每日1次,连续15 d。

2.2 心肌缺血再灌注模型的制备^[6] 2%戊巴比妥钠*ip*麻醉,气管插管后连接小动物呼吸机,频率48~54次/min,潮气量1.5~2 mL·100 g⁻¹,记录Ⅱ导联心电图,分离右颈总动脉,左心室内插管,注入肝素1.5 mL。胸骨正中切口,胸骨左缘3~4肋间开胸,暴露心脏,打开心包膜,在左心耳后,左冠状动脉前降支下穿0号线,除假手术组外,其余各组均结扎冠脉,结扎时两端结扎线穿过乳胶管,结扎造成心肌缺血。心电图监测显示进行性心肌缺血变化证明造模成功,结扎30 min后,松开线,进行再灌注180 min。

2.3 心脏功能检测 分离右侧颈总动脉,插入颈总动脉的导管与生物信号处理系统的压力传感器相连。稳定10 min后描记一段颈动脉波形后,将导管轻轻送入左室,记录各组缺血后和再灌注后的左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)和左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)。

2.4 心肌梗死面积测定 采用TTC法检测心肌梗死面积。再灌注180 min后,重新结扎左前降支(LAD),股静脉注入2 mL伊文思蓝(1%)。心脏经预冷的PBS冲洗后,从心尖至心底均匀横切成5块,置入1% TTC溶液中,37℃恒温孵育15 min。采用计算机图像分析系统测出梗死区面积与缺血区面积,二者的比值即为梗死面积百分比。

2.5 血清中CPK,LDH,TNF- α 和IL-6水平检测 颈总动脉取血5 mL,加肝素,1 500 r·min⁻¹离心10 min,收集血清,用于测定血清中CPK,LDH,TNF- α 和IL-6水平。

2.6 心肌组织中SOD,GSH-Px活性及MDA含量检测 取0.2 g心肌组织,剪碎后,加入PIPA裂解液,组织匀浆机匀浆后,提取心肌组织总蛋白,静置、离心后取上清,按照试剂盒说明书中的操作步骤,检测心肌组织中SOD,GSH-Px的活性及MDA含量。

2.7 数据统计 采用 SPSS 17.0 软件,对所得数据进行单因素方差分析,所得结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对心脏功能的影响 与假手术组比较,各组大

鼠缺血 30 min 及再灌注 180 min 后, LVSP 均明显降低 ($P < 0.01$), LVEDP 均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,缺血 30 min 和再灌注 180 min 后, PQS 低、高剂量组的 LVSP 升高, LVEDP 降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 PQS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	LVSP		LVEDP	
		缺血 30 min	再灌注 180 min	缺血 30 min	再灌注 180 min
假手术	-	126.12 \pm 10.85	129.72 \pm 8.13	8.16 \pm 1.38	6.15 \pm 0.47
模型	-	64.15 \pm 9.63 ²⁾	77.29 \pm 9.17 ²⁾	37.20 \pm 4.51 ²⁾	35.11 \pm 4.25 ²⁾
PQS	100	81.26 \pm 7.64 ⁴⁾	83.72 \pm 10.87 ³⁾	25.13 \pm 3.29 ⁴⁾	24.72 \pm 2.67 ³⁾
	300	84.64 \pm 10.26 ⁴⁾	94.21 \pm 9.20 ⁴⁾	22.12 \pm 3.46 ⁴⁾	19.91 \pm 4.76 ⁴⁾
尼莫地平	21.6	91.43 \pm 8.78 ⁴⁾	108.66 \pm 11.38 ⁴⁾	20.81 \pm 6.95 ⁴⁾	15.14 \pm 3.28 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对心肌梗死面积及血清中 CPK, LDH 活性的影响 与假手术组比较,模型组心肌梗死面积百分比明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较, PQS 低、高剂量组均能降低心肌梗死面积百分比 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且具有剂量依赖性。

与假手术组比较,模型组 CPK, LDH 活性明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较, PQS 低、高剂量组 CPK 活性分别下降了 10.3% 和 17.2%, LDH 活性分别下降了 14.3% 和 22.9%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 PQS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌梗死面积及血清中 CPK, LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	心肌梗死面积/%	CPK/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
假手术	-	4.98 \pm 0.74	105.84 \pm 8.21	221.63 \pm 14.91
模型	-	20.51 \pm 3.23 ²⁾	143.78 \pm 18.84 ²⁾	356.56 \pm 43.82 ²⁾
PQS	100	14.84 \pm 2.56 ³⁾	138.52 \pm 11.63	295.49 \pm 33.58 ⁴⁾
	300	9.42 \pm 0.74 ⁴⁾	127.86 \pm 14.87 ³⁾	268.74 \pm 20.04 ⁴⁾
尼莫地平	21.6	8.17 \pm 0.96 ⁴⁾	120.57 \pm 9.59 ⁴⁾	231.92 \pm 16.39 ⁴⁾

3.3 对心肌组织中 SOD, GSH-Px 和 MDA 的影响 与假手术组比较,模型组 SOD, GSH-Px 活性降低, MDA 含量升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);

与模型组比较, PQS 低、高剂量组均可以使 SOD, GSH-Px 活性升高, MDA 含量降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 PQS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织中 SOD, GSH-Px 和 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
假手术	-	262.64 \pm 32.49	126.02 \pm 24.43	3.94 \pm 0.46
模型	-	163.79 \pm 15.48 ²⁾	89.52 \pm 13.18 ²⁾	6.82 \pm 0.79 ²⁾
PQS	100	192.25 \pm 22.36 ⁴⁾	97.38 \pm 11.21 ³⁾	5.46 \pm 0.72 ⁴⁾
	300	235.69 \pm 25.67 ⁴⁾	105.54 \pm 9.86 ⁴⁾	4.71 \pm 0.35 ⁴⁾
尼莫地平	21.6	251.73 \pm 22.81 ⁴⁾	104.75 \pm 11.84 ⁴⁾	4.07 \pm 0.58 ⁴⁾

3.4 对血清中 TNF- α 和 IL-6 的影响 与假手术组比较,模型组 TNF- α 和 IL-6 含量明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较, PQS 低、高剂量组均能显著降低 TNF- α 和 IL-6 含量 ($P < 0.01$), 且高剂量组降低程度更为明显。见表 4。

表 4 PQS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	20.12 \pm 3.74	15.95 \pm 2.43
模型	-	391.83 \pm 45.51 ²⁾	834.65 \pm 100.46 ²⁾
PQS	100	252.29 \pm 30.28 ⁴⁾	480.36 \pm 51.26 ⁴⁾
	300	195.74 \pm 15.88 ⁴⁾	270.96 \pm 15.38 ⁴⁾
尼莫地平	21.6	112.53 \pm 9.37 ⁴⁾	204.64 \pm 12.07 ⁴⁾

4 讨论

心肌缺血再灌注可引起心脏功能障碍、生化代谢异常、心肌梗死面积扩大及心肌组织病理改变等。心脏功能障碍的程度主要是由心肌梗死面积的大小

所决定,心肌缺血或缺血再灌注可以破坏心肌细胞膜的完整性,使心肌细胞膜通透性增加,从而造成心肌细胞内各种酶释放入血,最终引起一系列血清酶学变化。血清 CPK 和 LDH 的活性变化,可以作为判断心肌缺血再灌注损伤程度及抗心肌缺血再灌注损伤药物疗效的重要指标^[7]。本研究结果发现,PQS 具有改善 I/R 大鼠心脏功能、减小心肌梗死面积、降低血清 CPK 和 LDH 活性的作用,证实其对缺血再灌注后的心肌损伤具有明显保护作用。

活性氧是指需氧细胞在有氧代谢过程中由一氧化氮或氧分子衍生而形成的副产物。生理条件下,需氧细胞都会生成少量的活性氧,同时细胞内也存在相应的抗氧化防御体系,二者之间处于动态平衡状态。当活性氧过度产生或抗氧化防御能力减弱,平衡被打破时,就会发生氧化应激损伤,该过程在心肌缺血及心肌缺血再灌注损伤等病变过程中发挥着重要作用^[8]。Zweier 等^[9]研究者采用核磁法直接检测心肌活性氧生成状态,发现心肌缺血再灌注后立即有大量的活性氧产生,并持续数 10 min,心肌缺血再灌注损伤时,活性氧生成增多,机体的抗氧化能力减弱,造成活性氧大量蓄积,引起严重的氧化损伤。SOD 与 GSH-Px 是机体清除活性氧的主要酶类,其活性可以直接反映出机体清除活性氧的能力^[10];MDA 是细胞膜中多不饱和脂肪酸与活性氧相互作用而生成的产物,其含量可以间接反映机体受活性氧损伤的严重程度^[11]。本研究发现,PQS 预处理能够增加心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 的活性,减少 MDA 含量,此结果表明,PQS 的抗心肌缺血再灌注损伤作用与其抗氧化应激作用有关。炎症因子释放与心肌缺血再灌注损伤的发生密切相关,心肌缺血再灌注后,TNF- α 和 IL-6 等炎症反应因子释放,它们可以促进中性粒细胞及黏附分子的激活与表达,反馈性地生成大量的氧自由基,加重缺血再灌注损伤程度^[12-13]。本研究证实,PQS 预处理能够降低心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 TNF- α 及 IL-6 水平,此结果进一步表明,PQS 的抗心肌缺血再灌注损伤作用与减少炎症反应的发生有关。

综上所述,通过本研究证实,PQS 预处理能够有效的减弱心肌缺血再灌注引起的损伤,并阐明了该作用与抑制心肌缺血再灌注引起的活性增加及减少炎症反应的发生有关。

[参考文献]

[1] Chambless L, Keil U, Dobson A, et al. Population

versus clinical view of case fatality from acute coronary heart disease: results from the WHO MONICA Project 1985-1990. Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 1997, 96 (11):3849.

- [2] Maximilian B L. Myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2005, 14:170.
- [3] 殷惠军,张颖,蒋悦绒,等. 西洋参总皂苷对四氧嘧啶高血糖大鼠血脂代谢的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*,2004, 2 (11):647.
- [4] 韩婧,冯丽君,闫磊,等. 西洋参总皂苷的分离纯化工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10):66.
- [5] Liu W, Zheng Y, Han L, et al. Saponins (Ginsenosides) from stems and leaves of *Panax quinquefolium* prevented high-fat diet-induced obesity in mice [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15 (12):140.
- [5] 关利新,翟凤国,聂影,等. 西洋参茎叶皂苷对脑缺血大鼠细胞凋亡及 caspase-3 表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(1):30.
- [6] 赵秀梅,孙胜,刘秀华. 垫扎球囊法复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型 [J]. *中国微循环*, 2007, 11 (3):206.
- [7] Shao Y, Wu Q N, Tang Y P, et al. Simultaneous quantitative determination of seven polyphenols constituents from herba lophatheri by high performance liquid chromatography [J]. *Instrumentation Sci Technol*, 2011, 39(5):419.
- [8] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82 (1):47.
- [9] Zweier J L, Kuppusamy P, Williams R, et al. Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264 (32):18890.
- [10] Karthikeyan K, Bai B R, Gauthaman K, et al. Cardioprotective effect of the alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark in an *in vivo* model of myocardial ischemic reperfusion injury [J]. *Life Sciences*, 2003, 73 (21):2727.
- [11] Milaeva E R. The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation [J]. *J Inorg Biochem*, 2006, 100 (5/6):905.
- [12] Stangl V, Baumann G, Stangl K, et al. Negative inotropic mediators released from the heart after myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 53 (1):12.
- [13] Vinten Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61 (3):481.

[责任编辑 周冰冰]