

人参皂苷 CK 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制探讨

荀平, 孙莉*

(吉林市中心医院, 吉林 132013)

[摘要] **目的:**探讨人参皂苷 CK 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及潜在机制。**方法:**SD 大鼠随机均分为 5 组, 分别为假手术组及缺血再灌注模型组给予生理盐水、人参皂苷 CK 低、中、高剂量组 (10, 20, 40 mg·kg⁻¹), 每组 12 只, ip 人参皂苷 CK, 14 d 后, 行在体结扎冠状动脉前降支手术 30 min 后, 再进行 120 min 灌注, 复制心肌缺血再灌注大鼠模型, 检测人参皂苷 CK 对心肌梗死面积, 血清乳酸脱氢酶 (LDH), 肌酸磷酸激酶 (CPK), 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, 心肌组织丙二醛 (MDA) 含量, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 蛋白表达的影响。**结果:**与正常组比较, 缺血再灌注模型组心肌组织 MDA 含量明显升高, SOD 活性明显降低, 血清中 iNOS, IL-6 和 TNF- α 水平明显升高, 心肌组织 HMGB1 蛋白的表达明显升高 ($P < 0.05$); 与缺血再灌注模型组比较, 人参皂苷 CK 能够明显减少心肌梗死面积, 降低 LDH, CPK 活性减少心肌组织 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 明显降低血清中 iNOS, IL-6 和 TNF- α 水平 ($P < 0.05$), 此外, 人参皂苷 CK 能够抑制心肌组织 HMGB1 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。**结论:**人参皂苷 CK 对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 该作用与其提高机体抗氧化能力、减少炎症反应及抑制 HMGB1 表达有关。

[关键词] 人参皂苷 CK; 心肌缺血再灌注; 氧化应激; 炎症; 高迁移率蛋白 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0155-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160155

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1410.024.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 14:10

Protective Effect and Mechanism of Ginsenosides CK on Rat's Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

XUN Ping, SUN Li*

(Jilin City Center Hospital, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the protective effect and potential mechanism of ginsenosides CK on rat's myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI). **Method:** SD rats were randomly divided into 5 groups: sham-operated group, MIRI group (normal saline) and ginsenosides CK low, medium and high-dose groups (10, 20, 40 mg·kg⁻¹). Ginsenosides CK was intraperitoneally injected for 14 days. the anterior descending coronary artery was ligated; 30 min later, reperfusion was performed for 120 min to establish the reperfusion model. Effects of ginsenosides CK on infarct area, levels of serum lactic dehydrogenase (LDH), creatine phosphokinase (CPK), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and malondialdehyde (MDA) content, super oxide dismutase (SOD) activity and high mobility group box-1 (HMGB1) expression were investigated. **Result:** Compared with the normal group, the MIRI group showed significant increase in MDA content in myocardia, serum iNOS, IL-6 and TNF- α levels, and HMGB1 protein in myocardia, and significant decrease in SOD activity ($P < 0.05$). Ginsenosides CK could reduce the infarct size and activities of LDH and CPK compared with those in the MIRI group ($P < 0.05$). Ginsenosides CK could lessen

[收稿日期] 20150822(012)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20140204032YY)

[第一作者] 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

[通讯作者] * 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

the MDA contents and SOD activity of cardiac muscle tissues compared with those in the MIRI group ($P < 0.05$). Ginsenosides CK could lower the levels of iNOS, IL-6 and TNF- α compared with those in the MIRI group ($P < 0.05$). Meanwhile, Ginsenosides CK could inhibit the expression of HMBG1 compared with those in the MIRI group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ginsenosides CK has a certain protective effect on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats, and its effect is related to the enhancement in antioxidant capacity, the reduction of inflammation and the inhibition of the HMBG1 expression.

[Key words] ginsenosides CK; myocardial ischemia reperfusion; oxidative stress; inflammation; high mobility group box-1

心血管疾病发病率高,危害大,严重威胁人类健康,而心肌缺血是引起心血管疾病的最常见因素,其中急性心肌缺血最为常见^[1]。急性心肌缺血发生后,常采用溶栓药物、搭桥血管再通等手段恢复心肌的血液供应,即缺血心肌再灌注^[2]。然而,研究表明,缺血心肌的血液供应在短期内迅速恢复,会进一步加重原有的缺血性损伤,出现心肌梗死面积扩大、心律失常、衰竭等更为严重的损伤,这种现象称为心肌缺血再灌注损伤^[3]。因此,缓解心肌缺血再灌注损伤对于急性心肌缺血的治疗具有重要意义。人参皂苷 CK 是通过生物转化等技术制备的非天然二醇类人参皂苷,具有抗肿瘤、降糖、调节免疫等多方面的药理作用,而人参皂苷对心肌缺血再灌注损伤的保护作用未见报道^[4-5]。同时,鉴于其他种类的人参皂苷 Rg₁、Rg₂、Rb₁ 和 Re 等对心肌缺血再灌注损伤保护作用的广泛报道^[6-7],本研究以人参皂苷 CK 为研究对象,探讨其对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及可能机制,为后续研究提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,体重(200 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物及试剂 人参皂苷 CK(纯度 > 90%,四川维克奇生物科技有限公司,批号 1201011),乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸磷酸激酶(CPK)检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司,批号分别为 20120328,20120524),丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 201211108,20121214);诱导型一氧化氮合酶(iNOS),白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒(北京北方生物技术研究,批号分别为 120518,120709,120324),高迁移率蛋白 1(HMGB1)兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号 20130528)。

1.3 仪器 Power Poc 型蛋白质免疫印迹(Western

blot)电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),Epoch 2 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将 SD 大鼠随机均分为 5 组,分别为假手术组及缺血再灌注组给予生理盐水、人参皂苷 CK 低、中、高剂量组分别给予 10, 20, 40 mg · kg⁻¹ 的人参皂苷 CK,采用 ip 给药方式,每天 1 次,注射体积均为 2 mL · kg⁻¹,给药 14 d。

2.2 心肌缺血再灌注模型的制备^[7] 末次给药后 30 min,ip 戊巴比妥钠麻醉,行气管插管术后连接呼吸机,频率为 48 ~ 54 次/min,潮气量 15 ~ 2.0 mL · kg⁻¹,将右颈总动脉分离后,在左心室插管;在胸骨正中处切口,在左缘 3 ~ 4 肋间开胸,将心脏暴露并打开心包膜;在左心耳后,左冠状动脉前降支下的位置处穿 0 号线,除假手术组外,其余组均结扎冠状动脉,造成心肌缺血。30 min 后,松开结扎线,进行 120 min 再灌注。

2.3 心肌梗死面积测定 再灌注结束后,重新结扎左前降支,采用 TTC 法检测心肌梗死面积,采用 Image Pro-Plus 软件分析梗死面积和缺血区面积,“梗死面积/缺血区面积 × 100%”表示梗死面积。

2.4 血清 LDH,CPK,iNOS,IL-6 和 TNF- α 水平检测 再灌注结束后,颈总动脉取血,按照试剂盒中操作测定血清中 LDH,CPK,iNOS,IL-6 和 TNF- α 水平。

2.5 心肌组织中 MDA 含量和 SOD 活性检测 再灌注结束后,立即取 0.2 g 左心室缺血区心肌组织,按照试剂盒说明书中的操作步骤,检测心肌组织中 MDA 含量和 SOD 活性。

2.6 Western blot 检测心肌组织中 HMGB1 含量 取心肌组织,低温匀浆后提总蛋白,BCA 法定量后取总蛋白 40 μ g;经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳、转膜及封闭后,加入 HMGB1 兔多克隆抗体,辣根过氧化物酶标记二抗,增强型化学发光试剂(ECL)发光试剂盒显色;ABB 成像分析系统扫描,以 HMGB1 蛋白与甘油醛-3-磷酸

脱氢酶(GAPDH)蛋白灰度值的比值半定量分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠心肌梗死面积及血清 LDH,CPK 活性

表 1 人参皂苷 CK 对大鼠心肌梗死面积及血清 LDH,CPK 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	心肌梗死面积/%	LDH/U·mL ⁻¹	CPK/U·mL ⁻¹
假手术	-	4.34 ± 0.96	212.53 ± 17.39	115.35 ± 15.56
缺血再灌注	-	19.95 ± 4.27 ¹⁾	337.49 ± 41.62 ¹⁾	153.11 ± 19.78 ¹⁾
人参皂苷 CK	10	14.18 ± 2.60 ²⁾	284.73 ± 36.47 ²⁾	139.06 ± 14.23 ²⁾
	20	8.76 ± 1.18 ²⁾	256.48 ± 28.71 ²⁾	132.97 ± 12.18 ²⁾
	40	7.51 ± 1.99 ²⁾	241.36 ± 26.83 ²⁾	128.53 ± 16.94 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与缺血再灌注模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 及图 1 同)。

3.2 对大鼠心肌组织 MDA 含量和 SOD 活性的影响 与假手术组比较,缺血再灌注组 MDA 含量升高,SOD 活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与缺血再灌注模型组比较,人参皂苷 CK 低、中、高剂量组均可以显著降低 MDA 含量,升高 SOD 活性,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对大鼠血清 iNOS,IL-6 和 TNF- α 的影响 缺血再灌注组 iNOS,IL-6 和 TNF- α 水平明显高于假手术组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与缺血再灌注模型组比较,人参皂苷 CK 低、中、高剂量组均能显著降低 iNOS,IL-6 和 TNF- α 水平($P < 0.05$),且呈剂量依赖关系。见表 3。

表 3 人参皂苷 CK 对血清 iNOS,IL-6 和 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	iNOS	IL-6	TNF- α
假手术	-	12.83 ± 3.74	23.58 ± 3.71	20.37 ± 3.52
缺血再灌注	-	85.01 ± 16.85 ¹⁾	739.84 ± 96.45 ¹⁾	341.44 ± 43.64 ¹⁾
人参皂苷 CK	10	42.85 ± 11.44 ²⁾	360.15 ± 54.94 ²⁾	212.52 ± 23.57 ²⁾
	20	30.34 ± 8.97 ²⁾	181.92 ± 35.86 ²⁾	154.74 ± 16.91 ²⁾
	40	17.13 ± 5.61 ²⁾	131.09 ± 12.73 ²⁾	119.57 ± 15.56 ²⁾

中、高剂量组均能显著降低 HMGB1 含量($P < 0.05$),且呈剂量依赖关系。见图 1。

4 讨论

相关研究表明,心肌缺血再灌注损伤会使心肌梗死面积进一步增加,其导致的心脏功能障碍要强于心肌梗塞本身,会引起更高的病死率^[8]。心肌缺血再灌注损伤发生时,由于钙离子超载和自由基大量堆积,从而引起心肌细胞膜完整性破坏,导致 LDH,CPK 等心肌酶入血,引起血清酶学变化^[9]。

的影响 缺血再灌注组心肌梗死面积、大鼠血清 LDH,CPK 活性显著高于假手术组($P < 0.05$);与缺血再灌注模型组比较,人参皂苷 CK 低(10 mg·kg⁻¹),中(20 mg·kg⁻¹),高(40 mg·kg⁻¹)剂量组均能剂量依赖性的降低心肌梗死面积及大鼠血清 LDH,CPK 活性($P < 0.05$)。见表 1。

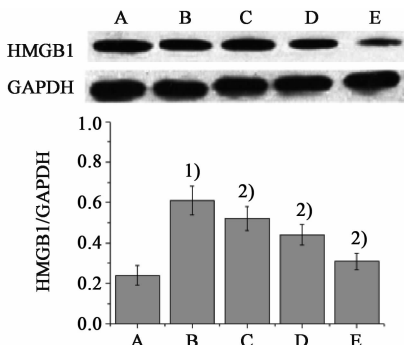
表 2 人参皂苷 CK 对大鼠心肌组织 MDA 含量和 SOD 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MDA/ μ mol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹
假手术	-	4.76 ± 0.92	296.48 ± 42.27
缺血再灌注	-	7.55 ± 1.43 ¹⁾	196.13 ± 24.69 ¹⁾
人参皂苷 CK	10	6.24 ± 1.29 ²⁾	220.25 ± 31.23 ²⁾
	20	5.24 ± 0.84 ²⁾	232.59 ± 26.64 ²⁾
	40	4.47 ± 0.68 ²⁾	268.46 ± 29.85 ²⁾

3.4 对大鼠心肌组织 HMGB1 含量的影响 缺血再灌注组 HMGB1 含量明显高于假手术组($P < 0.05$);与缺血再灌注模型组比较,人参皂苷 CK 低、

本研究结果发现,人参皂苷 CK 可以降低心肌梗死面积及血清中 LDH,CPK 活性,表明其对大鼠心肌缺血再灌注后的损伤具有一定的保护作用。

生理状态下,细胞内的 SOD 等自由基清除剂可以使过氧化氢转变为分子氧和水,而在心肌缺血时,细胞内 SOD 含量减少,导致体内的自由基不能被迅速清除。而细胞膜中的不饱和双键结构容易被氧自由基攻击,发生脂质过氧化反应,从而触发连锁反应,产生一系列的脂质自由基和降解产物 MDA,产



A. 假手术组; B. 缺血再灌注模型组; C. 人参皂苷 CK 10 mg·kg⁻¹组; D. 人参皂苷 CK 20 mg·kg⁻¹组; E. 人参皂苷 CK 40 mg·kg⁻¹组

图 1 人参皂苷 CK 对大鼠心肌组织 HMGB1 蛋白表达的影响

($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Effects of ginsenosides CK on expression of HMGB1 protein in myocardial tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

生的脂质自由基可以进一步改变细胞膜的通透性、引起线粒体肿胀、导致溶酶体被破坏及释放溶酶体酶。因而,MDA 含量及 SOD 活性可以反映体内氧化应激的水平,可以作为评价生物体内氧化应激程度的重要指标^[10]。本研究结果发现,人参皂苷 CK 可以显著降低 MDA 含量,升高 SOD 活性,表明人参皂苷 CK 能够具有增加心肌抗氧化应激能力、减少氧化损伤的作用。心肌缺血再灌注损伤与炎症因子的释放关系密切,缺血再灌注发生时,巨噬细胞内 iNOS 的 mRNA 表达水平上调,iNOS 大量产生,从而导致缺血再灌注损伤^[11]。此外,IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的释放,可以反馈性地造成氧自由基的大量生成,从而加重缺血再灌注损伤^[12]。本研究结果发现,人参皂苷 CK 能剂量依赖性的显著降低 iNOS, IL-6 和 TNF- α 水平,表明人参皂苷 CK 具有抑制炎症因子产生,减少炎症反应的作用。

HMGB1 是一组高度保守的非组织核蛋白,为重要的“晚期”炎性细胞因子,其在心肌缺血再灌注损伤中扮演着重要作用^[13]。研究表明,通过干预 HMGB1 的表达,可以显著降低心肌梗死面积,抑制 LDH,IL-6 水平,从而发挥对心肌缺血再灌注损伤的保护作用^[14]。本研究结果证实,人参皂苷 CK 能剂量依赖性地降低心肌组织 HMGB1 的表达,表明人参皂苷 CK 预处理对 HMGB1 的表达具有明显的抑制作用。因此,笔者推测人参皂苷 CK 预处理可能通过降低 HMGB1 的表达,进而减少炎症反应的发生,最终起到对心肌缺血再灌注损伤的作用。

综上所述,通过本研究结果表明,人参皂苷 CK 对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,该作用与其提高机体抗氧化能力、减少炎症反应及

抑制 HMGB1 表达有关。

[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 [J]. Circulation, 1997, 96 (11): 3849-3859.

[2] Jennings R B. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemiareperfusion injury [J]. Circ Res, 2013, 113(4): 428-438.

[3] 孙莉, 荀平. 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 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 176-179.

[4] Yang Z, Wang J R, Niu T. Inhibition of p-glycoprotein leads to improved oral bioavailability of compound K, an anticancer metabolite of red ginseng extract produced by gut microflora [J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(8), 1538-1544.

[5] Jiang S, Ren D, Li J, et al. Effects of compound K on hyperglycemia and insulin resistance in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. Fitoterapia, 2014, 95 (10): 58-64.

[6] 张庆勇, 陈燕萍, 刘芬, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对大鼠急性缺血性心血管再生的促进作用 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(1): 42-45.

[7] 高莹, 杨积武, 王艳春, 等. 人参皂苷 Re 对大鼠心肌缺血再灌注细胞凋亡及 Caspase-3 的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(2): 123-124.

[8] 曲绍春, 睢诚, 于晓风, 等. 人参 Rb 组皂苷对大鼠实验性心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2007, 33(5): 849-851.

[9] Turer A T, Hill J A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. Am J Cardiol, 2010, 106(3): 360-368.

[10] 朱慧民, 李辉, 朱天民, 等. 红豆杉多糖对 Beagle 犬心肌缺血再灌注损伤模型心肌 NADPH 氧化酶 mRNA 及 SOD、MDA 的影响 [J]. 中草药, 2011, 42 (5): 935-939.

[11] Warren J B, Pons F, Brady A J. Nitric oxide biology: implications for cardiovascular therapeutics [J]. Cardiovas Res, 1994, 28(1): 25-30.

[12] Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF- α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2011, 16(1): 49-69.

[13] Hu X, Jiang H, Cui B, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 protein protects against myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2009, 63 (7): 690-692.

[14] 翟昌林, 黎莉, 张运. 丹皮酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护中 HMGB1 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(10): 2284-2286.

[责任编辑 周冰冰]