

# 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对急性心肌缺血大鼠模型的保护作用

邓海英\*, 赖为国

(钦州市第二人民医院药剂科, 广西 钦州 535099)

**[摘要]** 目的:研究三七皂苷 R<sub>1</sub> 对垂体后叶素诱导急性心肌梗死(AMI)大鼠的影响。方法:SD 大鼠随机分成 5 组:正常组、模型组、地尔硫草阳性药组(5 mg·kg<sup>-1</sup>)和三七皂苷 R<sub>1</sub> 组(5, 10 mg·kg<sup>-1</sup>)。连续给药 7 d,末次给药 1 h 后,观察给药后 AMI 大鼠心电图的变化。取血,检测血浆门冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶-1(LDH1)水平。双重染色法测定心肌缺血面积。HE 染色观察心肌组织病理学变化。Western blot 法检测心脏组织 B 细胞淋巴瘤-白血病-2(Bcl-2),B-细胞白血病淋巴瘤-2-相关 X 蛋白(Bax)蛋白的表达。结果:与模型组比较,三七皂苷 R<sub>1</sub> 可降低 ST 段抬高值,有效减少血浆心肌酶的水平(P < 0.05),明显减少 AMI 大鼠心肌缺血面积(P < 0.01),并改善心肌缺血病理性损伤。同时上调心脏组织中 Bcl-2 蛋白表达,同时下调 Bax 蛋白的水平(P < 0.01)。结论:三七皂苷 R<sub>1</sub> 对 AMI 大鼠具有保护作用,其机制可能与减少心肌酶释放以及抑制心肌细胞凋亡有关。

**[关键词]** 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 垂体后叶素; 急性心肌梗死; 蛋白质印迹法; 心肌细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0265-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013100265

## Protective Effect of Notoginsenoside R<sub>1</sub> on Acute Myocardial Ischemia in Rats Model

DENG Hai-ying\*, LAI Wei-guo

(Department of Medicament the Second People's Hospital of Qinzhou, Qinzhou 535099, China)

**[收稿日期]** 20120810(013)

**[通讯作者]** \* 邓海英,主管药师,从事心肌梗死研究工作, Tel:1397776009, E-mail:denghaiying2012@163.com

介质在炎症过程中分泌机制不同有关。炎症因子的分泌量与细胞受损程度有关,若药物对细胞有毒性,炎症因子的分泌量也相应增加,而不是降低。本实验前期采用 HepG2 细胞测定其细胞毒性,结果显示,各提取物在质量浓度不高于 20 mg·L<sup>-1</sup>时,对细胞增殖没有影响。同时,倒置显微镜下观察,各组小鼠内皮细胞生长良好,说明炎症因子分泌的降低,不是由细胞毒性引起的。上述实验结果表明半夏具有一定抗炎活性,但半夏中起到抗炎作用的物质,有待进一步研究。本研究后期将对半夏生品及其炮制品各组分进行 HPLC 分析,找出半夏抗炎活性与成分之间的关系,为找出可能的有效化合物奠定基础。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:110.  
[2] 王新胜,吴艳芳,马军营,等. 半夏化学成分和药理作

用研究[J]. 齐鲁药事,2008,27(2):101.  
[3] 桑慧,姚树桐,杨娜娜,等. HDL3 抗脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(10):1857.  
[4] Niculescu F, Rus H G. The role of endothelial cells in inflammation and immunity [J]. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol,1990, 35(3):97.  
[5] Wort S J, Evans T W. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions[J]. Br Med Bull, 1999, 55(12):30.  
[6] 周小彤,沈振亚,腾小梅,等. 小鼠动脉血管内皮细胞的原代培养和鉴定[J]. 徐州医学院学报,2007,27(5):306.  
[7] 史继静,刘朝奇. 白介素 6 与肿瘤相关性的研究进展[J]. 生命的化学,2008,1(6):106.  
[8] 李晓红,齐云,蔡润兰,等. 甘草总皂苷抗炎作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):110.

[责任编辑 李玉洁]

**[ Abstract ] Objective:** To study the protective effect of notoginsenoside  $R_1$  on acute myocardial ischemia (AMI) in rats. **Method:** The SD rats were randomly assigned to 5 groups: normal group, model group, diltiazem group ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), notoginsenoside  $R_1$  groups ( $5, 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectively). The changes of electrocardiogram in AMI rats were observed after treatment. The levels of aspartate transaminase (AST), creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), and lactate dehydrogenase-1 (LDH1) in serum were detected and analyzed. The double staining method was used for the determination of the ischemic area. Additionally, the histopathological changes of cardiac tissue were observed of by HE staining. The expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) proteins in cardiac tissue were observed using Western blot analysis. **Result:** Compared to model group, notoginsenoside  $R_1$  lessened the elevation value of ST-segment and inversion rate of T-wave ( $P < 0.01$ ), and effectively reduced the levels of myocardium enzyme in serum ( $P < 0.05$ ), in addition, notably reduced the area of myocardial ischemia in AMI rats ( $P < 0.01$ ). And the pathological damages of myocardial ischemia were improved. Meanwhile, the expression of Bcl-2 protein in heart tissue was increased, whereas the level of Bax protein was decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The results suggest that notoginsenoside  $R_1$  has protective effect on AMI rats, and mechanisms may be related to lessening the release of myocardium enzyme in serum and inhibiting the apoptosis of cardiomyocyte.

**[ Key words ]** notoginsenoside  $R_1$ ; pituitrin; acute myocardial ischemia; western blot; apoptosis of cardiomyocyte

三七是广西原产地道药材<sup>[1]</sup>,具有止血,抗血栓,促进造血,保肝作用,改善心血管系统作用等药理活性<sup>[2]</sup>。本实验拟采用  $0.65 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  的垂体后叶素复制急性心肌缺血(AMI)大鼠模型,研究三七总皂苷对 AMI 大鼠影响,探讨其与 AMI 发生、发展的关联性及其干预机制,为其在 AMI 早期防治中提供科学的药理学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠, SPF 级,雌雄各半,体重 ( $200 \pm 20$ )g,动物许可证号 SCXK 桂 2009-0002,购至广西医科大学实验动物中心。

**1.2 药物与试剂** 三七皂苷  $R_1$ ,广西梧州制药(集团)股份有限公司,批号 120502。垂体后叶注射液,上海第一生化药业有限公司,批号 120406。盐酸地尔硫草片,天津田边制药有限公司,批号 12040126。天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶-1(LDH1)试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,批号 20120516。伊文思蓝(上海蓝季科技发展有限公司,批号 JK2469),氯化三苯基四氮唑(青岛海博生物公司,批号 W1204),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(北京博奥森生物技术有限公司,批号 BC120512),多克隆抗体(桂林英美特生物技术有限公司,批号 201205008),预染蛋白 Marker(北京优尼康生物科技有限公司,批号 DC120501342),兔抗羊 HRP 抗体(上海领潮生物科技有限公司,批号

SH12006)。

**1.3 仪器** MS4000 型生物信号分析系统(广州市龙飞达科技有限公司),DDL-5 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),722S 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限责任公司),WBZ-2 型微波真空干燥机(贵阳新奇微波工业有限责任公司),5810 型高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司),酶联免疫分析仪(美国 Thermo Forma 公司),凝胶电泳成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),垂直电泳仪、转膜及显影设备(Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** SD 大鼠随机分成 5 组:正常组、模型组、阳性药组地尔硫草( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),和三七皂苷  $R_1$  组( $5, 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),正常组及模型组给予等量生理盐水,ig,连续 4 d。

**2.2 AMI 大鼠造模**<sup>[3]</sup> 给药 4 d 后,末次给药后 20 min,记录 II 导联心电图。除正常组,其余各组恒速舌下 iv 垂体后叶素  $0.65 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,并记录给予垂体后叶素 10,15 s 时 ST 段抬高值,其中以 ST 水平下移或抬高值  $\geq 0.1 \text{ mV}$  和 T 波降低值  $\geq 50\%$  为判断的指标<sup>[4]</sup>。

**2.3 指标检测** 连续给药 7 d,末次给药 1 h 后,检测给药后 AMI 大鼠心电图的变化。取血,用速率酶法检测血浆 AST, CK, CK-MB, LDH, LDH1 水平。取出心脏,生理盐水洗净心脏。从主动脉注入  $0.25\%$  伊文思蓝 30 min 后,将心脏放入  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱

冷冻 30 min,拿出切为厚约 2 mm 的薄片 5~8 片,置于含 1% TTC 的 PBS 液(pH 7.4)中 37 ℃ 孵育 15 min,然后放入 10% 甲醛固定染色,测定心肌缺血面积。HE 染色观察心肌组织病理学变化。Western blot 法检测心脏组织 Bcl-2, Bax 蛋白的表达。实验过程均严格按照说明书操作。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对 AMI 大鼠心电图的影响** 模型组大鼠出现 ST 段明显抬高,T 波倒置,提示 AMI 造模成功。而地尔硫草和三七皂苷 R<sub>1</sub> 组有效地降低 10,15 s 时 ST 段抬高值( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对 AMI 大鼠 ST 段抬高值的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	ST 段抬高值 mV	
		10 s	15 s
模型	-	0.283 ± 0.065	0.387 ± 0.092
三七皂苷 R <sub>1</sub>	5	0.167 ± 0.039 <sup>2)</sup>	0.271 ± 0.068 <sup>2)</sup>
	10	0.152 ± 0.028 <sup>2)</sup>	0.237 ± 0.054 <sup>2)</sup>
地尔硫草	5	0.143 ± 0.032 <sup>2)</sup>	0.265 ± 0.063 <sup>2)</sup>

**3.2 对 AMI 大鼠血浆心肌酶的影响** 模型组大鼠血浆各心肌酶明显增高,与正常组比较差别显著( $P < 0.05$ )。地尔硫草和三七皂苷 R<sub>1</sub> 组大鼠血浆各心肌酶均有所降低,与模型组比较差别显著( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对 AMI 大鼠血浆心肌酶的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	AST	CK	CK-MB	LDH	LDH1
正常	-	189.63 ± 32.04	6.02 ± 0.78	7.35 ± 0.82	311.28 ± 46.35 <sup>2)</sup>	47.93 ± 18.54
模型	-	352.49 ± 60.37 <sup>1)</sup>	14.59 ± 2.03 <sup>1)</sup>	16.14 ± 2.79 <sup>1)</sup>	964.72 ± 128.14 <sup>1)</sup>	158.64 ± 49.78 <sup>1)</sup>
三七皂苷 R <sub>1</sub>	5	327.21 ± 56.25 <sup>2)</sup>	12.36 ± 1.78 <sup>2)</sup>	13.53 ± 1.84 <sup>2)</sup>	835.46 ± 103.26 <sup>2)</sup>	126.53 ± 40.16 <sup>2)</sup>
	10	263.56 ± 47.38 <sup>2)</sup>	11.07 ± 1.23 <sup>2)</sup>	12.19 ± 1.41 <sup>2)</sup>	626.38 ± 87.55 <sup>2)</sup>	98.21 ± 31.38 <sup>2)</sup>
地尔硫草	5	257.84 ± 45.62 <sup>2)</sup>	10.23 ± 1.14 <sup>2)</sup>	11.83 ± 1.39 <sup>2)</sup>	604.52 ± 84.93 <sup>2)</sup>	95.34 ± 30.76 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

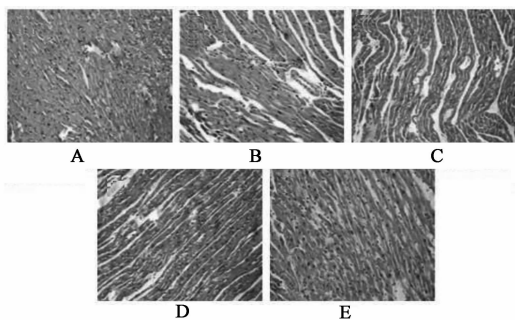
**3.3 对 AMI 大鼠缺血面积的影响** 双重染色结果显示,模型组大鼠心肌缺血面积显著扩大( $P < 0.01$ )。地尔硫草和三七皂苷 R<sub>1</sub> 可有效地减少心肌缺血面积( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对 AMI 大鼠缺血面积的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	缺血面积/左心室/%
模型	-	36.82 ± 5.94
三七皂苷 R <sub>1</sub>	5	25.49 ± 4.71 <sup>2)</sup>
	10	19.78 ± 3.85 <sup>2)</sup>
地尔硫草	5	24.65 ± 4.62 <sup>2)</sup>

**3.4 对 AMI 大鼠心肌组织病理学的影响** 镜下观察,正常组心肌细胞排列整齐,肌纤维横纹清晰,未见变性或坏死以及炎细胞浸润。模型组细胞分布紊乱,明显肿胀,肌纤维部分断裂,横纹模糊或消失,片状坏死区细胞核碎裂或崩解,炎性浸润明显。地尔硫草组心肌细胞排列较整齐,部分细胞水肿变性,肌纤维间隙水肿,偶见炎性细胞浸润。三七皂苷 R<sub>1</sub> 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组心肌细胞结构有部分恢复,但细胞损伤明显,偶见炎性浸润及红细胞漏出。三七皂苷 R<sub>1</sub> 10 mg·kg<sup>-1</sup> 组心肌细胞数量和结构恢复较好,坏死和

炎性征象有所减轻,有效地对抗心肌细胞损伤。见图 1。

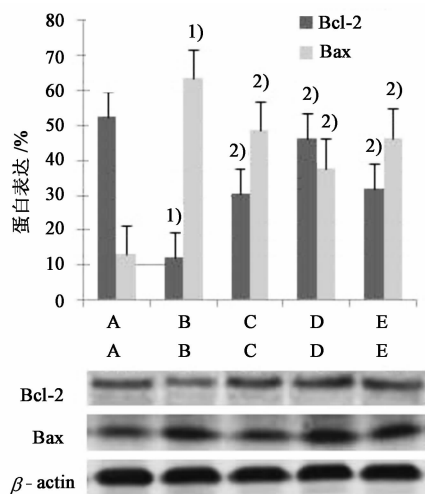


A. 正常组;B. 模型组;C. 地尔硫草 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组; D. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组; E. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 10 mg·kg<sup>-1</sup> 组

图 1 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对垂体后叶素致 AMI 大鼠心肌细胞的影响(HE 染色, ×100)

**3.5 对 AMI 大鼠心脏组织 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠心脏组织 Bcl-2 蛋白表达明显下调, Bax 蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ )。地尔硫草和三七皂苷 R<sub>1</sub> 能有效地上调大鼠心脏组织中 Bcl-2 蛋白的表达,同时减少 Bax 蛋

白表达,与模型组比较差别显著( $P < 0.01$ )。见图 2。



与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;

A. 正常组; B. 模型组; C. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 5 mg·kg<sup>-1</sup>组;

D. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 10 mg·kg<sup>-1</sup>组; E. 地尔硫草 5 mg·kg<sup>-1</sup>组

图 2 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对 AMI 大鼠心脏组织中 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

#### 4 讨论

冠心病严重危害人类的健康,其主要临床表现为心绞痛或心肌梗死。垂体后叶素可在实验动物体内造成冠状动脉痉挛,引起严重供血不足,导致心脏负荷急剧加重,在心电图可检测到心肌缺血的变化<sup>[5]</sup>。改善血供和供氧是防治心肌缺血根本措施之一,心肌缺血发生时常伴有心电图的异常变化,而其中的 ST 段和 T 波的波动可作为监测评估心肌缺血程度的重要指标<sup>[6]</sup>。本实验显示,给予地尔硫草和三七皂苷 R<sub>1</sub> 治疗后明显降低各时间段 ST 值,提示三七皂苷 R<sub>1</sub> 具有改善心肌缺血的作用。

心肌细胞受损伤时,AST,CK 等心肌酶渗漏进血液中,故检测血浆心肌酶含量可反映心肌受损程度,特别是心肌同工酶如 LDH1,CK-MB 等<sup>[7]</sup>。本研究发现,模型组大鼠血浆各心肌酶活性明显升高,提示 AMI 大鼠触发心肌细胞损伤。地尔硫草和三七皂苷 R<sub>1</sub> 可明显减少心肌酶水平,提示三七皂苷 R<sub>1</sub> 对 AMI 大鼠具有保护作用,可能与其减少心肌酶释放而减轻心肌损伤有关。此外,本结果与 HE 染色和双重染色实验结果一致。

细胞凋亡指的是程序性细胞死亡,伴随有 Caspase 级联反应和 Bcl-2 家族效应<sup>[8]</sup>。Bcl-2 为抗凋亡蛋白,而 Bax 为促凋亡蛋白。它们的表达与心

肌缺血发生的细胞凋亡密切相关<sup>[9-10]</sup>。有效调控 Bcl-2/Bax 的正向表达可以发挥抗心肌缺血损伤的作用<sup>[11]</sup>。本实验结果表明,三七皂苷 R<sub>1</sub> 可明显上调 AMI 大鼠心肌组织 Bcl-2 蛋白的表达,下调 Bax 蛋白的表达,Bcl-2/Bax 明显升高。提示三七皂苷 R<sub>1</sub> 对急性心肌缺血大鼠具有保护作用,可能与其抑制细胞凋亡途径有关。

#### [参考文献]

[1] 刘华钢,梁秋云,赖茂祥,等. 广西三七中皂苷成分的含量测定及其变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(5):5.

[2] 杨志刚,陈阿琴,俞颂东. 三七药理研究新进展[J]. 上海中医药杂志,2005,39(4):59.

[3] 覃斐章,简洁,焦杨,等. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮对垂体后叶素致大鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):145.

[4] 张玲,龙子江,王靓,等. 双丹注射液对急性心肌缺血模型大鼠心电图与血清酶的影响[J]. 中药药理与临床,2006,22(6):55.

[5] Arndt P, Silvio T, Livio T, et al. Cardiac necrosis markers associated with low nitric oxide levels in the plasma of rabbits after treatment with vasopressin: protective effects of nitroglycerin administration [J]. Pharmacol Res, 2002, 45 (6):427.

[6] 臧璞,秦永文. 冠状动脉痉挛的研究进展[J]. 心脏杂志,2010,22(6):937.

[7] Klein G, Kampmann M, Baum H, et al. Clinical performance of the new cardiac markers troponin T and CK-MB on the Elecsys 2010. A multicentre evaluation [J]. Wien Klin Wochenschr,1998,110(3):40.

[8] Martinou J C, Youle R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. Dev Cell, 2011,21(1):92.

[9] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008,9(1):47.

[10] Ji E S, Yue H, Wu Y M, et al. Effects of phytoestrogen genistein on myocardial ischemia/reperfusion injury and apoptosis in rabbits [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004,25 (3):306.

[11] 高玉峰,王小杰,闫文翠,等. 生黄合剂对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):244.

[责任编辑 李玉洁]