论著

文章编号:1000-5404(2013)01-0042-04

人参皂苷 Rg1 对大鼠急性缺血心肌血管再生的促进作用

张庆勇[1,2],陈燕萍[3],刘 芬[4],陈 霞[1] (132001 长春,吉林大学:白求恩医学院药理学系[1],机能科学中心[4],化学学院[3];443003 湖北 宜昌,三峡大学第一临床医学院宜昌市中心人民医院检验科[2])

[摘要] **目的** 研究人参皂苷 Rg1 对急性心肌缺血大鼠心肌血管再生的分子机制。**方法** 建立大鼠急性心肌缺血模型,48 只大鼠随机抽签法分为急性心肌缺血模型组,阳性药组(美托洛尔 4.5 mg/kg),人参皂苷 Rg1 5、10、15 mg/kg 组,假手术组,每组各 8 只。连续腹腔注射 14 d 后取材。TTC 法测定心肌梗死面积,免疫组化染色法测定心肌梗死边缘区微血管密度,心肌梗死边缘区 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 和 p-Akt 表达,Griess 法测定大鼠心肌组织 NO 水平。**结果** 与模型组比较,人参皂苷 Rg1 10、15 mg/kg 组心肌梗死面积明显减小($P<0.01$),微血管密度显著增加($P<0.01$)。人参皂苷 Rg1 10 mg/kg 组 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 及 p-Akt 表达均为次强阳性,Rg1 15 mg/kg 组 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 及 p-Akt 表达则均为强阳性,结果与阳性药物作用相当,其中以 Rg1 15 mg/kg 剂量效果最佳。此外,与模型组比较,人参皂苷 Rg1 10、15 mg/kg 组心肌组织 NO 水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 人参皂苷 Rg1 可促进大鼠急性缺血心肌血管再生,该作用与人参皂苷 Rg1 增加心肌组织 VEGF、VEGFR、p-Akt 以及 NO 的表达有关。

[关键词] 心肌缺血;人参皂甙类;血管生成;血管内皮生长因子;一氧化氮
[中图法分类号] R285.5; R364.33; R542.2 [文献标志码] A

Ginsenoside-Rg1 promotes angiogenesis in rats with acute myocardial ischemia

Zhang Qingyong[1,2], Chen Yanping[3], Liu Fen[4], Chen Xia[1] ([1]Department of Pharmacology, [4]Experimental Center of Functional Sciences, Norman Bethune College of Medicine, [3]College of Chemistry, Jilin University, Changchun, Jilin Province, 130021; [2]Department of Clinical Laboratory, Yichang Central People's Hospital, First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang, Hubei Province, 443003, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of ginsenoside-Rg1 in the angiogenesis in rats with acute myocardial ischemia (AMI). **Methods** The acute ischemia model was established by ligation of the left front descending branch of the coronary artery. The rats were divided randomly into the model group, metoprolol treatment (MET, 4.5 mg/kg) group, ginsenoside-Rg1 treatment groups (5, 10, and 15 mg/kg), 8 rats in each group. Another 8 rats receiving sham operation served as sham operation group. The drugs were administered for 14 d. The myocardial infarction area was measured after 2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) staining. The microvascular density (MVD) was observed by immunohistochemistry staining. The expression of myocardial VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and p-Akt was examined by immunohistochemical staining. The myocardial NO levels were examined by Griess assay. **Results** Compared with the model group, the infarct area was reduced obviously in ginsenoside-Rg1 10 mg/kg group and 15 mg/kg group in AMI rats ($P<0.01$). And also, ginsenoside-Rg1 of 10 and 15 mg/kg resulted in an obvious increase in MVD of ischemic myocardium ($P<0.01$). Ginsenoside-Rg1 of 10 mg/kg led to moderate expression of myocardial VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and p-Akt. And that of 15 mg/kg led to strong expression of above proteins. These effects were similar to the positive control group. The best effect was found in the ginsenoside-Rg1 15mg/kg group. In addition, ginsenoside-Rg1 of 10 and 15 mg/kg resulted in an obvious increase in the myocardial NO levels compared with the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Ginsenoside-Rg1 induces angiogenesis in rats after myocardial ischemia. The role of ginsenoside-Rg1 on angiogenesis is correlated with the increased expression of VEGF, VEGFR, p-Akt and NO in the myocardium.

[**Key words**] myocardial ischemia; ginsenosides; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; nitric oxide

Corresponding author: Chen Xia, Tel: 86-431-85619799, E-mail: xiachen616@yahoo.com.cn

[通信作者] 陈 霞,电话:(0431) 85619799,E-mail: xiachen616@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121123.0942.001.html(2012-11-23)

目前,缺血性心脏病的发病率呈现逐年增高的趋势,严重危害着人们的身体健康。近年,一种新颖的治疗策略因促进心肌缺血区血管新生备受关注,即通过生长因子或药物治疗等刺激心肌缺血区小血管生长和侧支循环形成,实现心肌缺血区的自我搭桥,进而恢复血供。人参皂苷是我国传统中药人参的主要成分,人参皂苷Rg1是人参皂苷的主要有效成分之一,具有抗心律失常、抗细胞凋亡等作用。目前临床上已将其作为复方制剂用于治疗心脑血管疾病,文献[1]报道其不但具有抗心律失常、抗细胞凋亡的作用,还具有促进缺血心肌血管再生的作用。有学者通过体外实验研究发现人参皂苷Rg1可通过PI3K/Akt途径增加VEGF的表达,通过eNOS途径增加NO的释放,从而诱导血管再生[2]。本研究为进一步研究其促血管再生体内分子机制,选用急性心肌缺血模型,从VEGF-VEGFR-Akt-NO途径来探讨人参皂苷Rg1体内促进血管再生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

48只Wistar大鼠,雌雄各半,体质量280~320 g,由吉林大学白求恩医学院动物实验研究中心提供。动物合格证号为SCXK-(吉)2003-0001。

1.2 药品与试剂

人参皂苷Rg1由吉林大学化学学院提供,Rg1纯度为95%以上;氯化三苯基四氮唑(TTC)购于中国医药上海化学试剂公司,批号:20051003;酒石酸美托洛尔片购于阿斯利康制药有限公司,批号:0707042;CD34、VEGF、VEGFR1和VEGFR2免疫组化试剂盒购于武汉博士德有限公司;p-Akt免疫组化试剂盒购于美国Cell Signaling公司;NO试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.3 急性心肌缺血模型建立及分组

急性心肌缺血模型参照文献[3]建立,麻醉大鼠,开胸后于左心耳与肺动脉圆锥间左心耳下1 mm左右穿线结扎左冠脉前降支。大鼠按随机抽签法分为4组,每组8只:急性心肌缺血模型组,阳性药组给予美托洛尔(4.5 mg/kg)[4],人参皂苷Rg1组分别给予人参皂苷Rg1(5、10、15 mg/kg),假手术组左冠状动脉只穿线,不结扎。各组动物于模型制备后1 h腹腔注射给药,假手术组、模型组给予等量生理盐水,每天给药1次,连续给药14 d后,处死大鼠取材。

1.4 TTC染色测量心肌梗死面积

大鼠麻醉后,开胸取出心脏,剪下右心室,将左心室心肌横向切成2~3 mm薄片,置于1% TTC溶液中染色,37 ℃恒温水浴5~10 min,取出放入10%甲醛溶液中固定,正常心肌组织染成红色,梗死区呈白色。利用BI-2000图像分析系统测量左心室心肌梗死面积和左心室全面积,梗死面积=心肌梗死面积/左心室全面积×100%。

1.5 大鼠心肌梗死边缘区微血管密度的测定

取心脏,在左心室结扎线下方,略白的区域为梗死区,其周围为缺血区,取梗死周围2 mm缺血区的心肌,用甲醛固定,石蜡包埋切片后,SABC法免疫组化染色,具体步骤按试剂盒说明书进行,用PBS替换一抗作阴性对照。用抗CD34多克隆抗体免疫组化染色,于光学显微镜下观察微血管密度(MVD)。具体方法为:先在40×视野下找到心肌梗死边缘区,然后在×400视野下进行大鼠心肌梗死边缘区微血管计数,每张切片随机选取5个视野,计数每个视野的微血管数,取其平均值作为该样本的MVD值,MVD以毛细血管个数/视野来表示。微血管判断标准,按参考文献[5]计数。

1.6 大鼠心肌梗死边缘区VEGF、VEGFR1、VEGFR2和p-Akt表达测定

取心肌梗死边缘区组织经甲醛固定、石蜡包埋切片后,SABC法行免疫组化染色,具体步骤按试剂盒说明书进行,用PBS替换一抗作阴性对照。用抗VEGF、VEGFR1、VEGFR2和p-Akt多克隆抗体免疫组化染色,光学显微镜下观察心肌组织显色。

显色结果半定量分析:以染色强度结合阳性细胞数百分比综合计分,组织切片中细胞质染为淡黄色至棕褐色者为阳性细胞标志。染色强度以多数细胞呈现的染色特性(染色深浅需与背景着色相对比)计分:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。阳性细胞百分比即5个视野(每×400高倍视野计数100个此类细胞)的阳性细胞平均数:0%~5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。每张切片随机取5个400倍视野,每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比计分。染色强度与阳性细胞百分比的计分乘积:0分为阴性,1~4分为阳性,5~8分为次强阳性,9~12分为强阳性。

1.7 大鼠心肌组织NO水平测定

取心肌组织100 mg,置于玻璃匀浆器中加入0.01 mol/L PBS 1 mL,冰浴下匀浆,4 ℃离心4 000 r/min,15 min,取上清测定NO水平,具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.8 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用成组t检验。

2 结果

2.1 人参皂苷Rg1对心肌梗死面积的影响

假手术组心肌组织呈现红色,模型组,阳性药组和Rg1 5、10、15 mg/kg组部分心肌组织呈白色,即为心肌梗死区域。采用BI-2000图像分析系统测量心肌梗死面积结果表明,与模型组比较,阳性药组心肌梗死面积明显减小($P<0.01$);Rg1 5 mg/kg组心肌梗死面积减小($P<0.05$);Rg1 10 mg/kg组和15 mg/kg组心肌梗死面积明显减小($P<0.01$),并呈一定剂量依赖关系,该作用与阳性药作用相当(表1)。

2.2 人参皂苷Rg1对大鼠心肌梗死边缘区微血管密度的影响

与模型组比较,阳性药组MVD明显增加($P<0.01$),Rg1 5 mg/kg组MVD增加($P<0.05$),Rg1 10 mg/kg组和15 mg/kg组MVD显著增加($P<0.01$),并呈一定剂量依赖关系。该作

用与阳性药作用相当,其中以 Rg1 10、15 mg/kg 剂量效果较佳(表1,图1)。

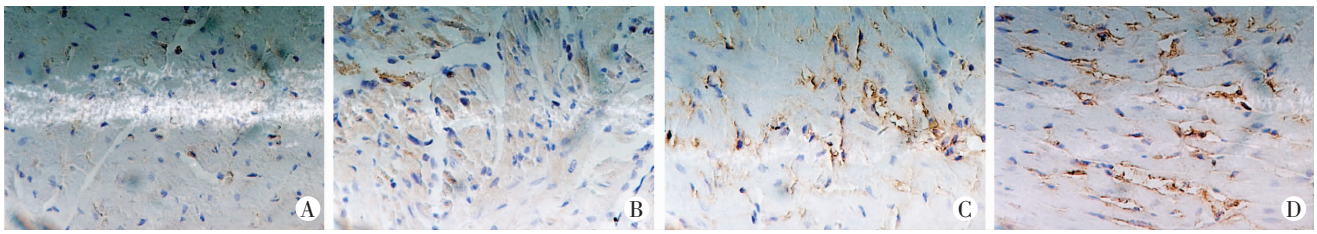
表1 人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死面积、梗死边缘区微血管密度及心肌组织 NO 水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	心肌梗死面积(%)	MVD(个/视野)	NO(μmol/g)
假手术组	0	6.08±0.58	0.810 3±0.256 1
模型组	21.00±6.92	7.23±0.63	0.760 8±0.227 1
阳性药组	8.14±2.64[b]	17.81±1.38[b]	0.954 1±0.255 8
Rg1 5 mg/kg 组	12.81±4.27[a]	8.16±0.76[a]	0.936 2±0.201 3
Rg1 10 mg/kg 组	10.05±3.12[b]	11.63±1.77[b]	1.521 8±0.490 2[a]
Rg1 15mg/kg 组	6.82±2.21[b]	17.19±0.89[b]	2.097 7±0.665 0[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$, 与模型组比较

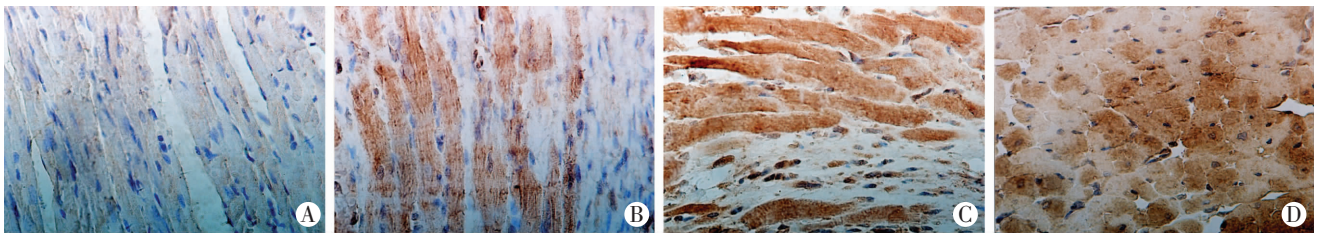
2.3 人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死边缘区 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 和 p-Akt 表达的影响

免疫组化结果显示,光镜下 VEGF 阳性染色呈棕黄色,阳性区域主要分布于心肌细胞质。假手术组心肌细胞中未见明显 VEGF 表达,模型组阳性染色范围较小,呈不规则棕黄色片状物,与模型组比较,Rg1 5、10 mg/kg 组表达为次强阳性,Rg1 15 mg/kg 组及阳性药组表达为强阳性(图2)。光镜下可见 VEGFR1、VEGFR2 阳性染色呈棕黄色。假手术组心肌细胞中未见 VEGFR1 表达,模型组阳性表达范围较小,与模型组比较,Rg1 5 mg/kg 组表达为阳性,Rg1 10 mg/kg 组表达为次强阳性,Rg1 15 mg/kg 组及阳性药组表达为强阳性。假手术组心肌细胞中可见微弱 VEGFR2 表达,模型组阳性染色范围较小,与模型组比较,Rg1 5 mg/kg 组表达为阳性,Rg1 10 mg/kg 组表达为次强阳性,Rg1 15 mg/kg 组及阳性药组表达为强阳性(图3、4)。光镜下可见 p-Akt 阳性染色呈棕黄色,假手术组心肌细胞中未见 p-Akt 表达,模型组阳性染色范围较小,与模型组比较,Rg1 5、10 mg/kg 组表达为次强阳性,Rg1 15 mg/kg 组及阳性药组表达为强阳性(图5)。



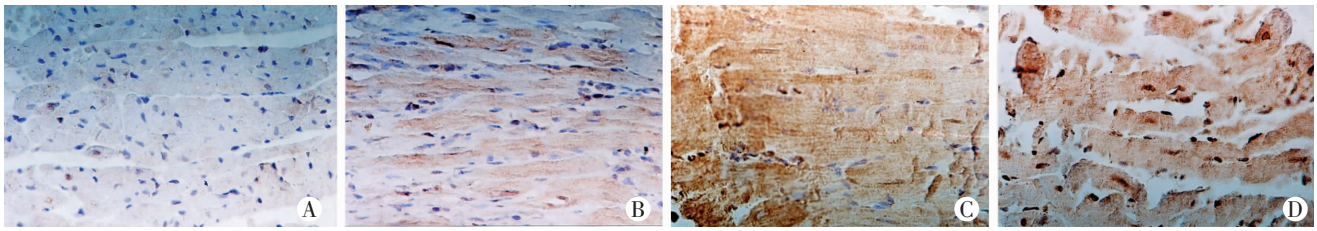
A:假手术组;B:模型组;C:阳性药组;D:Rg1 15 mg/kg 组

图1 人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死边缘区 MVD 的影响 (SABC ×400)



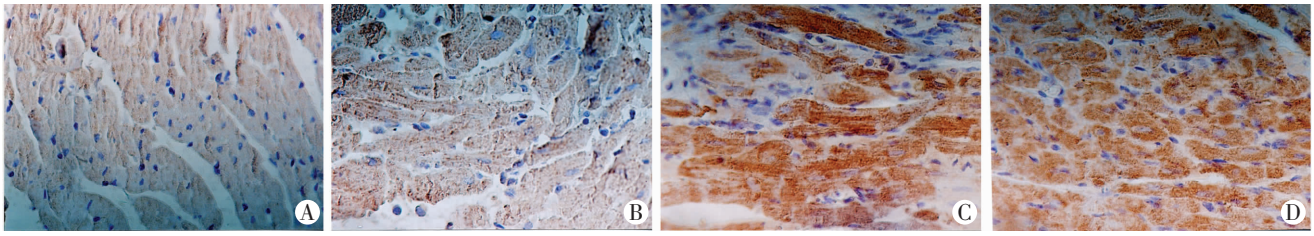
A:假手术组;B:模型组;C:阳性药组;D:Rg1 15 mg/kg 组

图2 人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死边缘区 VEGF 表达的影响 (SABC ×400)



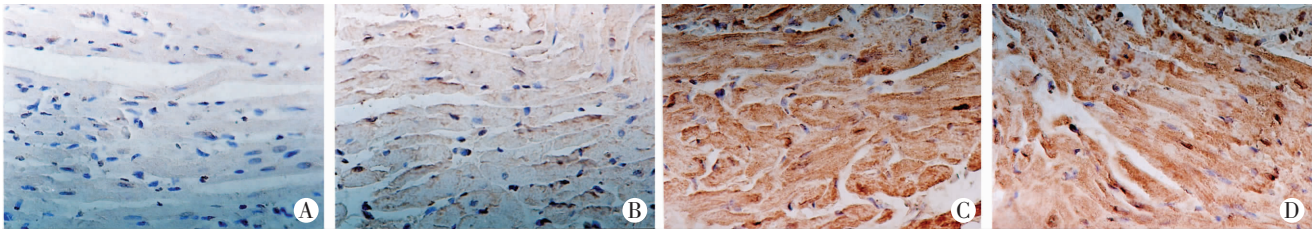
A:假手术组;B:模型组;C:阳性药组;D:Rg1 15 mg/kg 组

图3 人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死边缘区 VEGFR1 表达的影响 (SABC ×400)



A:假手术组;B:模型组;C:阳性药组;D:Rg1 15 mg/kg 组

图4 人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死边缘区 VEGFR2 表达的影响 (SABC ×400)



A:假手术组;B:模型组;C:阳性药组;D:Rg1 15 mg/kg 组

图 5 人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死边缘区 p-Akt 表达的影响 (SABC ×400)

2.4 人参皂苷 Rg1 对急性心肌缺血大鼠心肌组织 NO 水平的影响

与模型组比较,阳性药组大鼠心肌组织 NO 水平升高趋势不明显($P>0.05$),而给予人参皂苷 Rg1 组大鼠心肌组织 NO 水平均具有升高趋势,其中 Rg1 10、15 mg/kg 剂量组心肌组织的 NO 水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),并呈一定剂量依赖关系(表 1)。

3 讨论

心肌缺血后的心肌修复过程与血管再生密切相关,缺血区内是否有血管迅速再生对心肌缺血的预后有十分重要的作用[6]。微血管密度是直接反映血管再生的较可靠的解剖学指标,梗死范围可间接反映血管再生情况,梗死面积越小,说明血管再生越丰富。采用这两个指标,基本上能反映缺血心肌内血管新生情况[7]。本研究结果显示,与模型组相比,人参皂苷 Rg1 各剂量组均可减小心肌梗死面积,增加心肌梗死边缘区微血管密度,提示人参皂苷 Rg1 具有促进心肌血管再生的作用。

为了进一步研究人参皂苷 Rg1 促进心肌血管再生的作用机制,本研究选择 VEGF-VEGFR-Akt-NO 途径进行研究,其中,VEGF 是有高度特异性的血管内皮细胞生长刺激因子,能特异性地与其相应受体(VEGFR)结合刺激血管内皮细胞增殖,促进侧支血管的形成[8]。VEGFR 主要包括 VEGFR1 和 VEGFR2,VEGFR1 主要转导内皮细胞和周边细胞的生长和存活信号,这些细胞可以间接地促进血管生成;VEGFR2 可调节内皮细胞的增殖和分化,从而调节血管生成[9]。Akt 是 VEGF 与受体结合后细胞内生存信号通路的重要分子[10],Akt 的激活需要磷酸化(p-Akt),p-Akt 可以促进血管再生。有研究[11]表明,VEGF 与 VEGFR2 结合后,可诱导 PI3K 活化,继而激活 Akt,变成 p-Akt,从而调节内皮细胞的活性。此外,p-Akt 还可激活 eNOS 从而促进 NO 的产生,NO 在血管再生过程中起非常重要的作用[12]。本研究结果显示,人参皂苷 Rg1 能够明显增加 VEGFR、VEGFR1、VEGFR2 以及 p-Akt 的表达,提示人参皂苷 Rg1 可能是通过该途径促进血管再生。为了进一步验证这个设想,我们测量了该途径的下游分子 NO,结果发现人参皂苷 Rg1 增加了心肌组织 NO 的水平。这些结果提示 VEGF-VEGFR-Akt-NO 途径可能是人参皂苷 Rg1 促进血管再生的途径之一。

综上所述,人参皂苷 Rg1 能够促进大鼠急性缺血心肌血管再生,该作用与人参皂苷 Rg1 增加心肌组织 VEGF、VEGFR、p-Akt 以及 NO 的表达有关。

参考文献:

[1] 金岩, 刘闰男. 人参皂苷 Rg1 对急性心肌梗死大鼠血管新生的作用[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(5): 517-519.
[2] 安明, 赵国君, 韦新成. 人参皂苷 Rg1 保护心血管和中枢神经系统的药理活性研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(1): 75-77.
[3] 王旺, 吴晓华, 黄文. 结扎大鼠左冠状动脉前降支造成心肌缺血模型的实验研究 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(10): 1899-1900.
[4] 王承龙, 史大卓, 殷惠军, 等. 西洋参茎叶总皂苷对急性心肌梗死大鼠心肌 VEGF、bFGF 表达及血管新生的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(4): 331-334.
[5] 金鑫, 陈玉成, 曾智, 等. 雌激素对心肌梗死大鼠外周血干细胞及血管生成的影响 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 40-44.
[6] 周志益, 黄晶. 心肌血管再生治疗技术的研究进展 [J]. 国际心血管病杂志, 2010, 37(3): 129-131, 165.
[7] 肖华, 迟路湘. 血管再生研究的现状及进展[J]. 西南国防医药, 2009, 19(9): 952-954.
[8] Liu S Q, Tefft B J, Zhang D, *et al*. Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischemia[J]. Mol Cell Biomech, 2011, 8(4): 319-338.
[9] Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis[J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39(5): 469-478.
[10] Olsson A K, Dimberg A, Kreuger J, *et al*. VEGF receptor signalling-in control of vascular function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(5): 359-371.
[11] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(5): 549-560.
[12] 张琼, 张士胜, 王玲, 等. 一氧化氮与血管生成的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(3): 788-790.

(**收稿**:2012-07-04;**修回**:2012-09-11)
(编辑 张 维)