doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.16.002

人参皂苷 Rg1 抑制大鼠急性心肌梗死后心肌纤维化 *

彭程飞[1] 李 佳[2] 田孝祥[1] 刘 丹[1] 李 洋[1]

(1 沈阳军区总医院 辽宁 沈阳 110016;2 沈阳药科大学 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的:观察人参皂苷 Rg1 对大鼠心肌梗死后心脏纤维化发生的影响。**方法:**通过结扎 SD 大鼠左冠状动脉前降支建立大鼠急性心肌梗死模型,并将 40 只雄性 SD 大鼠随机分单纯手术组与人参皂苷 Rg1 治疗组。治疗组的大鼠造模 1 h 后将预先配成药液的人参皂甙 Rgl 按 5 rag / (kg·d)剂量腹腔注射,1/ 日至处死当日。对照组则腹腔注射等量生理盐水 1/ 日至处死当日。分别于手术后 1、2 周时对比两组大鼠的基本生命指标,后通过马松染色对比观察各组大鼠心脏细胞形态特征以及瘢痕形成情况。**结果:**① 无论是手术后 1 周还是 2 周,两组大鼠的体重、心脏重量、心重 / 体重、鼠尾收缩压、心率比较均没有统计学意义(P>0.05);② 无论是手术后 1 周后还是 2 周后,人参皂苷 Rg1 治疗组心脏瘢痕形成要明显少于对照组。**结论:**人参皂苷 Rg1 能够有效抑制大鼠急性心肌梗后心脏纤维化的发生。

关键词:人参皂苷 Rg1;急性心肌梗死;心肌纤维化

中图分类号:R-33;R542.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)16-3005-03

Ginsenoside-Rg1 Inhibits the Myocardial Fibrosis of Rat after Acute Myocardial Infarction*

PENG Cheng-fei[1], LI Jia[2], TIAN Xiao-xiang[1], LIU Dan[1], Li Yang[1]

(1 Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Millitary Region of PLA, Shenyang, Liaoning, 110016, China ; 2 Shenyang pharmaceutical university, Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory effects of Ginsenoside-Rg1 on the myocardial fibrosis after acute myocardial infarction. **Methods:** Myocardial infarction was induced by making a knot to permanently occlude the left anterior descending coronary artery (LAD) of rat. The rat divided into two groups: the control and the Rg1. At 1 and 2 weeks after surgery, the basic life index of the two group rats were compare. Then the hearts of rats were taken out. The cell morphological characteristics, myocardial basic institutions and fibrosis were investigated by masson staining. **Results:** ① The body weight (BW), heart weight (HW), HW/BW, Tail-cuff systolic blood pressure (TC-SBP) and heart rate (HR) had no significant difference between the control group and Rg1 group. ② Compared with the control group, the heart developed less fibrosis at 1 weeks and 2 weeks after operation in the Rg1 group. **Conclusion:** Ginsenoside-Rg1 could effectively inhibit the myocardial fibrosis of rat after acute myocardial infarction.

Key words: Ginsenoside-Rg1; Acute myocardial infarction; Fibrosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.22 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)16-3005-03

前言

急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)是冠状动脉闭塞引起的急性心肌缺血坏死，之后心脏尤其是心室的大小、形态及梗死区与非梗死区的心肌厚度产生变化,称之为心室重塑,产生的原因主要是心肌细胞的肥大和纤维细胞的增生以及间质纤维化。有研究显示心肌梗死后 3 天胶原蛋白表达开始增加,7-14 天增加开始减弱,28-56 天到达峰值，另外受血管紧张素和醛固酮的作用,也会使胶原蛋白合成增加,进而促进心肌纤维化[1,2]。因此,采取有效的治疗,抑制急性心肌梗后的纤维化发生是目前研究的热点。

人参皂苷 Rg1 是一种从人参中提取的无毒单一化学小分子物质,其作用的机制尚不明确[3,4]。我们的前期体外实验显示人参皂苷 Rg1 处理的骨髓间充质干细胞能够提高旁分泌血管内皮生长因子。本研究拟建立心肌梗死模型大鼠,观察人参皂苷 Rg1 对心肌梗死后心肌纤维化发生的影响并探讨其机制,以期为人参皂苷 Rg1 用于治疗心肌梗死提供更多的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验使用 SD 雄性大鼠 40 只,体重约 150 g,由沈阳军区总医院动物实验科提供。人参皂苷 Rg1 由辽宁中医药大学提供;马松燃料由美国 GIBCOBRL 公司提供;水合氯醛由上海试剂公司提供。Inspira 动物呼吸机系统以及麻醉机由沈阳军区总医院心脏病研究所提供。

1.2 实验方法和步骤

* 基金项目:全军医学科技青年培育计划(16QNP057);辽宁省博士科研启动基金(201601399)

作者简介:彭程飞(1984-),男,博士,主治医师,主要研究方向:缺血性再灌注损伤机制,E-mail:pengchengfei2000@126.com

(收稿日期:2016-08-22 接受日期:2016-09-16)

1.2.1 **大鼠心肌梗死模型的建立** 取体重约 150g 成年 SD 大鼠,雄性,应用水合氯醛进行麻醉机麻醉。麻醉好后固定颈部去毛, 暴露气管后插入 14G 静脉留置针拔出针芯连接呼吸机并固定。呼吸机无报警同时气道导管中有呼吸产生的水雾,证明插管成功。之后去除大鼠左侧胸毛。于胸骨左缘 2-3 mm 作约 2.5 左右长的纵行切口,分离皮下筋膜、胸大肌、前锯肌后充分暴露 3、4 肋,进一步分离 3、4 肋骨的肋间肌,剪开胸膜与心包膜。扩胸器撑开胸腔,暴露心底在心耳边缘距心大静脉左侧 2 mm 进针,跨过静脉结扎。结扎成功表现:1)结扎下方心肌表面苍白,室壁搏动减弱,左心耳充血显著;2)心电图Ⅱ导联可见 J 点上移与 T 波形成旗帜样波。后关胸缝合,撤除呼吸机与麻醉机,给予烤灯照射 1 h 后,大鼠苏醒即为模型制作成功。

1.2.2 **实验分组与处理** 分组与处理造模后 1 h 存活 40 只大鼠,随机分为对照组和治疗组,每组 20 只。治疗组的大鼠造模 1 h 后将预先配成药液的人参皂甙 Rgl 按 5 rag / (kg·d)剂量腹腔注射,1/ 日。对照组则腹腔注射等量生理盐水 1/ 日。各组分别于 1 周、2 周后先后处死大鼠(8～11)只(观察期间有大鼠死亡),测量每只大鼠体重、血压、心率后取出心脏冲洗干净,滤纸吸干后计算心脏质量 / 体重。

1.2.3 **马松三色染色** 心脏石蜡切片脱蜡至水,铬化处理或去汞盐沉淀(甲醛固定的组织此步可略),依次自来水和蒸馏水洗,用试剂 A 染核 5-15 min,充分水洗,显蓝后镜检,至胞核呈蓝色为止,如过染可盐酸酒精分化,蒸馏水洗;将玻片上的水分甩干,玻片放入 65 度烘箱或者 37 度培养箱若干分钟,至玻 片表面没有水分,标本表面干燥发白即可,将干燥好的玻片水平放置在免疫组化湿盒上。在标本上,滴加数滴试剂 B,染液覆盖住标本即可。水平放置,室温染色染色 10-20 min,使用试剂 C,清洗玻片,去除染液 B,每次 3 分钟,3 次,甩干玻片上的水分,滴加试剂 D 水溶液分化处理 3-5 min,用滤纸滤去试剂 D,注意滤纸不要接触到样本。不经水洗,直接用试剂 E 染 5-15 秒,以试剂 C 水溶液清洗玻片,去除多余染液,使染色色调清晰鲜艳即可,95%酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树胶封固。

1.3 **统计学分析**

各分组所得计量数据采用均数± 标准误($\overline{X}$± SE)表示,用 SPSS17.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 **两组不同时点体重、心脏重量、心重 / 体重、鼠尾收缩压、心率的比较**

无论治疗 1 周后与 2 周后,两组大鼠的体重、心脏重量、心重 / 体重、鼠尾收缩压、心率比较均无统计学差异(P>0.05),见表 1。

表 1 两组大鼠在不同时点的生命指征的比较(1 周与 2 周)

Table 1 Comparison of the physical data of rats at the end of the study period(1w and 2w) between two groups

		Group 1	Group 2	P
1 w	BW(kg)	0.198± 0.013	0.193± 0.014	0.893
	HW(g)	0.48± 0.04	0.47± 0.01	0.517
	HW/BW(g/kg)	2.42± 0.08	2.43± 0.09	0.449
	TC-SBP(mmHg)	96± 7	99± 8	0.869
	HR(bpm)	323± 27	319± 23	0.988
2 w	BW(kg)	0.239± 0.018	0.241± 0.012	0.817
	HW(g)	0.56± 0.06	0.58± 0.04	0.524
	HW/BW(g/kg)	2.34± 0.04	2.41± 0.03	0.441
	TC-SBP(mmHg)	91± 8	94± 6	0.856
	HR(bpm)	318± 25	321± 24	0.975

Note: BW, body weight; HW, heart weight; TC-SBP, tail-cuff systolic blood pressure; HR, heart rate.

2.2 **两组不同时点心脏瘢痕形成情况的比较**

急性心肌梗死后梗死区与非梗死区室壁张力、容量扩展,梗死区纤维化修复,非梗死区增生。因此,采取有效的治疗方法减少梗死区的纤维化发生及瘢痕形成,能够有效阻止心室重塑进而保护梗死后的心功能。实验选择观察人参皂苷 Rg1 治疗对梗死后心脏瘢痕形成的影响。实验结果显示:急性心肌梗死后,人参皂苷 Rg1 治疗后的心脏瘢痕形成明显的少于单纯手术组(P<0.05,见图 1)。

3 讨论

心脏纤维化即细胞外结缔组织的形成和积累过程,是心脏对病理刺激的一个主要的最普通的应激反应[4,5]。重要的是纤维化反应和纤维化对心脏功能的影响依赖于疾病的病因或形式。在不稳定心绞痛及心肌梗死的早期阶段,依据心肌坏死的程度调控这一过程。这一过程主要依赖于细胞外基质降解酶的激活,包括基质金属蛋白酶,之后免疫细胞通过结合细胞粘附分子侵袭,在第一周和第二周分别到达一次高峰[4,6-8]。在梗死区域Ⅰ和Ⅲ型胶原开始增加,伴随着在该区域出现疤痕组织同时心肌细胞丢失。在这一过程中主要依赖于心肌纤维细胞。心肌纤维细胞是由心脏成纤维细胞分化而来,这类细胞的特点是具有收缩表型特征[9-11]。尽管从成纤维细胞到心肌纤维细胞的分化过程尚不清楚,但是粘附蛋白(包括整合素蛋白及蛋白粘多糖)

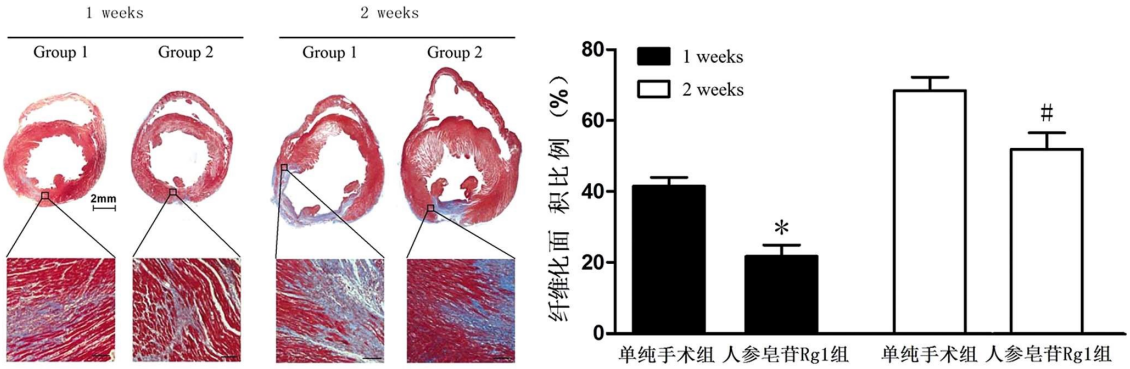


图 1 两组不同时点心脏瘢痕形成情况的比较

Fig. 1 Comparison of the formation of scar at the end of the study period(1w and 2w) between two groups

在这一过程中增加已经被证实[12-14]。机械应力和细胞因子如转化生长因子 β(TGF-β),是负责分化的主要信号[15,-16]。

心肌纤维细胞在急性梗死后产生胶原纤维形成疤痕组织。除了在梗死区域形成疤痕,纤维化和心肌细胞生长因子在非梗死区引起心脏形态及大小改变,这一过程就是心室重塑[4]。在心室重塑的后期阶段,心肌细胞死亡形成疤痕。临床上非常重视这个过程,在心肌梗死后的早期阶段,可能发生心室或动脉瘤破裂并因此死亡。在后期阶段,重塑过程失败导致心脏功能恶化、收缩功能障碍和心力衰竭。纤维化是阻止这些结果发生的重要病理生理过程。因此,采取有效措施保护损伤后的心肌细胞,抑制心肌的纤维化发生,继而阻止心室重塑具有重要的临床意义。

人参的主要成分就是皂苷,既往的研究显示其对心血管疾病与糖尿病具有较好的作用,并且毒副作用非常小[17,18]。人参皂苷 Rg1 是从人参中提取出来的一种新型小分子肽[19,20]。我们前期的研究发现其作用于骨髓间充质干细胞能够促血管内皮生长因子分泌,并且作用机制与 HIF-1 相关。本研究结果显示其能够有效的抑制心梗后心脏纤维化的发生及心脏瘢痕的形成,有效的保护了心脏结构的完整性,避免了心室重塑的进一步发展。

有研究显示人参皂苷 Rg1 能够通过调控 HIF-1α 促进血管新生,并具有促进 HIF-1α 合成的功能[21]。HIF-1 作为异二聚体转录因子广泛存在于各种类型细胞中，具有氧感受器的作用,其中一个主要的功能就是调节诸如 VFGF 一类生长因子的基因表达,从而发挥生物学效应。HIF-1 包含两个亚单位,分别是 α 亚基与 β 亚基，尤其是 HIF-1α 又可通过对其下游基因如 VEGF、EPO、内皮一氧化氮合成酶的转录进行调节,从而发挥其调节血管生成、红细胞的生存、能量代谢和激素代谢的功能。同时,急性心肌梗死后缺血梗死区域是缺氧微环境,HIF-1 是会大量表达的。因此,人参皂苷 Rg1 也有可能是通过 HIF-1 抑制急性心肌梗死后心肌的纤维化。

参 考 文 献(References)

[1] Vannan MA, Taylor DJE. Ventricular remodeling after myocardial infarction[J]. Br Heart J, 1982, 68: 257

[2] Haddod CJ, Decker ML, Hsieh LC, et al. Attachment and maintenance of adult rabbit cardiac myocytes in primary cell culture [J]. Am J Physiol, 1988, 255: C19

[3] Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8: 30-41

[4] Mann DL, Zipes DP, Libby P, et al. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine [M]. 10th edn. 2014; Elsevier Saunders, Philadelphia

[5] Almaas VM, Haugaa KH, Str?m EH, et al. Increased amount of interstitial fibrosis predicts ventricular arrhythmias, and is associated with reduced myocardial septal function in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy[J]. Europace, 2013, 15: 1319-1327

[6] Bielecka-Dabrowa A, Haehling S von, AronowWS, et al. Heart failure biomarkers in patients with dilated cardiomyopathy [J]. Int J Cardiol, 2013, 168: 2404-2410

[7] Bielecka-Dabrowa A, Gluba-Brzó zka A, Michalska-KasiczakM, Misztal M, et al. The multi-biomarker approach for heart failure in patients with hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16: 10715-10733

[8] Bielecka-Dabrowa A, Michalska-Kasiczak M, Gluba A, et al. Biomarkers and echocardiographic predictors of myocardial dysfunction in patients with hypertension[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8916

[9] Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing[J]. Lab Invest, 1990, 63: 21-29

[10] Karin D, Koyama Y, Brenner D, et al. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis [J]. Differentiation. 2016, 4681(15): 30100-30106

[11] Li JP, Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2016, 325: 215-273

[12] Kroll T, Schmidt D, Schwanitz G, et al. High-Content Microscopy Analysis of Subcellular Structures: Assay Development and Application to Focal Adhesion Quantification [J]. Curr Protoc Cytom, 2016, 77(12): 1-44

[13] Das S, Majid M, Baker AB. Syndecan-4 enhances PDGF-BB activity in diabetic wound healing[J]. Acta Biomater, 2016, 15(42): 56-65

[14] Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The function of Rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 276

[15] Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-β signaling in cardiac remodeling [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51: 600-606

（下转第 3128 页）

腰椎管狭窄症的疗效比较[J].重庆医学, 2014, 43(10): 1259-1261
Wang Peng-fei, Xie Wei, Wang Min-jie. PLIF and TLIF of treatment of elderly patients with degenerative lumbar spondylolisthesis and lumbar spinal stenosis [J]. Chongqing medical, 2014, 43 (10): 1259-1261

[7] Wu H, Yu WD, Jiang R, et al. Treatment of multilevel degenerative lumbar spinal stenosis with spondylolisthesis using a combination of microendoscopic discectomy and minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(2): 567-571

[8] 肖波, 毛克亚, 王岩, 等. 微创经椎间孔腰椎椎体间融合术与传统后路腰椎椎体间融合术并发症的比较分析 [J]. 脊柱外科杂志, 2013, 11(1): 23-27
Xiao Bo, Mao Ke-li, Wang Yan, et al. A comparative analysis of the complications of minimally invasive posterior lumbar interbody fusion and posterior lumbar interbody fusion [J]. Journal of spine surgery, 2013, 11 (1): 23-27

[9] Kim HJ, Bak KH, Chun HJ, et al. Posterior interspinous fusion device for one-level fusion in degenerative lumbar spine disease: comparison with pedicle screw fixation - preliminary report of at least one year follow up[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2012, 52(4): 359-364

[10] Schroeder GD, Kepler CK, Kurd MF, et al. Rationale for the surgical treatment of lumbar degenerative spondylolisthesis[J]. Spine (Phila Pa 1976) 2015, 40 (21): 1161-1166

[11] 占道禄, 沈宁江, 林明侠, 等. 椎弓根钉固定联合 PLIF 手术治疗多节段腰椎滑脱的疗效分析[J].实用骨科杂志, 2013, 19(3):193-195
Zhan Dao-lu, Shen Ning-jiang, Lin Ming-xia, et al. Effect of pedicle screw fixation combined with PLIF surgery in the treatment of multi segmental lumbar spondylolisthesis of practical [J]. Department of orthopedics magazine, 2013, 19(3): 193-195

[12] Enyo Y, Yoshimura N, Yamada H, et al. Radiographic natural course of lumbar degenerative spondylolisthesis and its risk factors related to the progression and onset in a 15-year community-based cohort study: the Miyama study[J]. J Orthop Sci, 2015, 20(6): 978-984

[13] Anekstein Y, Floman Y, Smorgick Y, et al. Seven years follow-up for total lumbar facet joint replacement (TOPS) in the management of lumbar spinal stenosis and degenerative spondylolisthesis [J]. Eur Spine J, 2015, 24(10): 2306-2314

[14] 李素明, 杭柏亚, 杨开锦. 经椎间孔及经后路椎间融合术治疗退行性腰椎滑脱合并腰椎管狭窄的疗效对比[J].中国中西医结合外科杂志, 2016, 22(1): 53-55
Li Su-ming, Bo Ya-hang, Yang Kai-jin. Comparison of therapeutic effects of transforaminal lumbar interbody fusion and posterior lumbar interbody fusion for degenerative spondylolisthesis with lumbar spinal stenosis[J]. Chinese combining traditional Chinese and Western Medicine Journal of surgery, 2016, 22(1): 53-55

[15] Rao PJ, Ghent F, Phan K, et al. Stand-alone anterior lumbar interbody fusion for treatment of degenerative spondylolisthesis [J]. J Clin Neurosci, 2015, 22(10): 1619-1624

[16] Jalalpour K, Neumann P, Johansson C, et al. A randomized controlled trial comparing transforaminal lumbar interbody fusion and uninstrumented posterolateral fusion in the degenerative lumbar spine [J]. Global Spine J, 2015, 5(4): 322-328

[17] 张国威, 林宏生, 吴昊, 等. TLIF 与 PLIF 治疗腰椎退变性疾病的疗效对比 [J]. 暨南大学学报（自然科学与医学版), 2012, 33(6): 591-596
Zhang Guo-wei, Lin Hong-sheng, Wu Hao,et al .TLIF and PLIF curative effect in treatment of lumbar degenerative disease between [J]. Journal of Jinan University (Natural Science and Medicine Edition), 2012, 33(6): 591-596

[18] 汪凡栋, 张智, 郑佳状, 等.两种椎体间融合术治疗老年腰椎滑脱合并腰椎管狭窄疗效比较[J].临床骨科杂志, 2016, 19(3): 315-317
Wang Fan-dong, Zhang Zhi, Zheng Jia-zhuang, et al. Comparison of the curative effect of two lumbar interbody fusion in the treatment of lumbar spondylolisthesis and lumbar spinal stenosis in elderly [J]. Journal of Clinical Department of orthopedics, 2016, 19(3): 315-317

[19] Fujimori T, Le H, Schairer WW, et al. Does transforaminal lumbar interbody fusion have advantages over posterolateral lumbar fusion for degenerative spondylolisthesis? [J]. Global Spine J, 2015, 5 (2): 102-109

[20] 林景波, 张洪涛, 何平, 等. 经后路椎体间融合术与经椎间孔椎体间融合术治疗老年退行性腰椎滑脱合并腰椎管狭窄症的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19): 5568-5569
Lin Jing-bo, Zhang Hong-tao, He Ping, et al. Curative effect of posterior lumbar interbody fusion with lumbar interbody fusion in the treatment of senile degenerative lumbar spondylolisthesis combined with lumbar spinal stenosis [J]. China Journal of Gerontology, 2015, 35(19): 5568-5569

（上接第 3007 页）

[16] Herum KM, Lunde IG, Skrbic B, et al. Syndecan-4 is a key determinant of collagen cross-linking and passive myocardial stiffness in the pressure overloaded heart [J]. Cardiovasc Res, 2015, 106: 217-226

[17] Wang Y, Huang X, Tang Y, et al. Effects of panax notoginseng saponins on the osteogenic differentiation of rabbit bone mesenchymal stem cells through TGF-β1 signaling pathway [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1): 319

[18] Liu Y, Yi L, Wang L, et al. Ginsenoside Rg1 protects human umbilical cord blood-derived stromal cells against tert-Butyl hydroperoxide-induced apoptosis through Akt-FoxO3a-Bim signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2016[Epub ahead of print]

[19] Wang H, Wang J, Li G. A simple real-time polymerase chain reaction (PCR)-based assay for authentication of the Chinese Panax ginseng cultivar Damaya from a local ginseng population [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2): 1-2

[20] Zheng M, Zhao M, Tang L, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates hypoxia and hypercapnia-induced vasoconstriction in isolated rat pulmonary arterial rings by reducing the expression of p38 [J]. J Thorac Dis, 2016, 8(7): 1513-1523

[21] Leung KW, Ng HM, Tang MK, et al. Ginsenoside-Rg1 mediates a hypoxia-independent upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha to promote angiogenesis[J]. Angiogenesis, 2011, 14(5): 515-522