

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.007

人参皂苷 Rg1 促进大鼠急性心肌梗死后血管新生 *

彭程飞 田孝祥 刘 丹 李 洋 赵 丽 赵 巍

(北部战区总医院(原沈阳军区总医院) 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的:明确人参皂苷 Rg1 在大鼠发生急性心肌梗死后是否能够促进心脏血管新生。**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 60 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苷 Rg1 按 5 rag / (kg·d)剂量腹腔注射,1 次 / 日至处死当日。对照组则腹腔注射等量生理盐水 1 次 / 日至处死当日。分别于手术后 3、7 天时对比两组大鼠的基本生命指标,后通过免疫荧光染色 CD31 对比观察两组大鼠心脏细胞中 CD31 的表达来评判血管新生水平。**结果:**① 手术后 3 天、7 天,两组大鼠的体重、心脏重量、心重 / 体重、鼠尾收缩压、心率比较差异均没有统计学意义($P>0.05$);② 手术后 3 天、7 天,人参皂苷 Rg1 治疗组心脏 CD31 表达水平明显高于对照组。**结论:**人参皂苷 Rg1 能够促进大鼠急性心肌梗死后心脏的血管新生。

关键词:人参皂苷 Rg1;急性心肌梗死;血管新生

中图分类号:R-33;R542.22;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2638-04

Ginsenoside-Rg1 Promotes the Myocardial Angiogenesis in Rat after Acute Myocardial Infarction*

PENG Cheng-fei, TIAN Xiao-xiang, LIU Dan, LI Yang, ZHAO Li, ZHAO Wei

(Department of Cardiology, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the promotion effects of Ginsenoside-Rg1 on angiogenesis of rat 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 rats have been divided into two groups: the control and the Rg1. After 3 and 7 days of surgery, we compare the basic life index of the two group rats. Then the hearts of rat have been taken out. We investigate the cells morphological characteristics, myocardial basic institutions and angiogenesis by immunofluorescence staining. **Results:** ① We found that body weight (BW), heart weight(HW), HW/BW, Tail-cuff systolic blood pressure(TC-SBP) and heart rate(HR) have no difference between the control group and Rg1 group. ② Comparing the control group, we found that the heart has higher level of the CD31 expression after 3 days and 7days in Rg1 group. **Conclusion:** Ginsenoside-Rg1 can effectively promote angiogenesis of rat after acute myocardial infarction leading to prevent ventricular remodeling.

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

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.22; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019) 14-2638-04

前言

缺血性心脏病被公认是导致人类死亡和致残的主要原因,尤其是急性心肌梗死。尽管目前已经采取了及时的紧急救治,但是患者还是更容易出现包括心源性休克或者慢性心力衰竭在内的并发症^[1,2]。主要原因是冠状动脉闭塞导致心肌细胞缺血,进而导致心肌细胞死亡和心脏重塑^[3,4]。因此,采取有效措施促进急性心肌梗死后的心肌恢复,才能能够有效减少并发症发生,进而提高临床治疗效果。

人参皂苷 Rg1 是人参主要的成分之一,但其作用的机制尚不明确^[5,6]。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^[7],并且能够

在治疗大鼠急性心肌梗死时能够有效抑制心肌纤维化^[8]。本研究拟在前期的实验研究基础上进一步探究人参皂苷 Rg1 用于治疗心肌梗死时促进血管新生作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验使用 SD 雄性大鼠 60 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;CD31、Actinin、DAPI 由美国 RD 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项目(16QNP057);辽宁省博士启动基金项目(201601399; 201601405)

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:2018-12-07 接受日期:2018-12-30)

1.2.1 大鼠心肌梗死模型的建立 取体重约 150 g 成年 SD 大鼠, 雄性。麻醉后固定, 暴露气管插 14G 静脉留置针连接呼吸机。之后于胸骨左缘 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。然后关胸缝合, 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^[9-11]。

1.2.2 实验分组与处理 分组与处理造模后 1 h 存活 60 只大鼠, 随机分为对照组和治疗组, 每组 30 只。治疗组的大鼠造模 1 h 后将预先配成药液的人参皂甙 Rg1 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 3 天、7 天后先后处死大鼠(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 免疫荧光染色 处死大鼠后, 快速取出心脏并放置于

PBS 中, 经过一段时间起将组织中残存的血液排尽之后使用 OCT 包埋剂对心脏进行包埋处理从而固定形态。再使用冰冻切片机进行切片(厚度 10 μ m)。使用山羊封闭液封闭 30 分钟之后使用 PBS 清洗 3 遍(将周围水吸干); 按照一抗的说明书将其按比例稀释后上在组织片上, 4℃ 过夜; 第二天取出片子 PBS 清洗 3 遍, 按照说明书稀释二抗后添加并进行室温孵育 2 个小时; PBS 清洗片子 3 遍后晾干, 滴加淬灭剂后盖上盖玻片指甲油封闭。镜下观察。

1.3 统计学分析

本研究中计量数据采用均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, 以 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

治疗 3 天、7 天后, 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
3 d	BW(kg)	0.167 $\pm$ 0.013	0.188 $\pm$ 0.011	0.859
	HW(g)	0.43 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.04	0.517
	HW/BW(g/kg)	2.28 $\pm$ 0.14	2.40 $\pm$ 0.07	0.432
	TC-SBP(mmHg)	93 $\pm$ 8	98 $\pm$ 7	0.833
	HR(bpm)	318 $\pm$ 21	325 $\pm$ 21	0.936
7 d	BW(kg)	0.212 $\pm$ 0.015	0.222 $\pm$ 0.011	0.823
	HW(g)	0.59 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.01	0.521
	HW/BW(g/kg)	2.23 $\pm$ 0.08	2.39 $\pm$ 0.04	0.415
	TC-SBP(mmHg)	91 $\pm$ 10	95 $\pm$ 9	0.807
	HR(bpm)	313 $\pm$ 21	321 $\pm$ 19	0.901

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

2.2 两组不同时点心脏血管新生情况的比较

急性心肌梗死后心肌细胞发生缺血坏死, 开始代偿出现血管新生, 促进缺血损伤心肌恢复。因此, 采取有效的治疗方法促进血管新生发生, 能够有效抑制阻止心肌坏死, 避免心室重塑进而保护梗死后的心功能。因此, 本实验选择观察人参皂甙 Rg1 治疗对梗死后心脏血管新生的影响, 新生的毛细血管主要由内皮细胞组成, 而内皮细胞的主要标志是 CD31, 实验结果显示: 急性心肌梗死后, 人参皂甙 Rg1 治疗后的心脏 CD31 的表达量明显的高于单纯手术组(见图 1)。

3 讨论

急性心肌梗死是由于冠状动脉阻塞引起心肌供血完全或不完全阻断, 并由此发生心肌细胞死亡和心肌重塑, 是导致这些患者心力衰竭的最重要危险因素^[1]。因此, 无论是否需要紧急血管重建或溶栓治疗, 再灌注治疗策略在临床上得到了广泛

的应用, 并被证明是有益的^[13]。应用中药单一成分刺激机体受损组织的再生能力的概念已被提出, 并作为一种潜在的 AMI 治疗策略。

人参(*Panax ginseng* C1 A1 Meyer)作为传统中药材中的明星, 生物活性广泛, 药理作用独特, 但其化学构成复杂, 具体的作用机制仍不明确。人参皂甙(Ginsenoside)作为人参的主要活性成分, 具有改善缺血再灌注损伤, 清除自由基, 抑制钙超载, 抑制细胞凋亡, 促进细胞再生修复等作用。而其中人参皂甙 Rg1 是人参皂甙中含量最多且有明确活性作用的人参皂甙三醇型的单体皂甙成分。因糖基侧链的不同人参皂甙也显示出较大的性质和功能差异, 不同的单体型具有不同的药理活性, 既往研究显示三醇型皂甙 Rg1 有兴奋中枢作用, 而二醇型皂甙 Rb1 则是相反的作用, 但其都具有保护心、脑和减轻肾缺血 - 再灌注损伤的作用^[14]。同时, 我们对人参皂甙 Rg1 的前期研究也发现其在心肌细胞缺血缺氧的情况下通过激活 VEGF 促进

内皮细胞血管新生,同时在心梗的情况下抑制心脏纤维化的发生。因此我们的研究进一步在大鼠心梗模型下观察人参皂苷

Rg1 是否能够促进血管新生的发生,进而改善新功能。

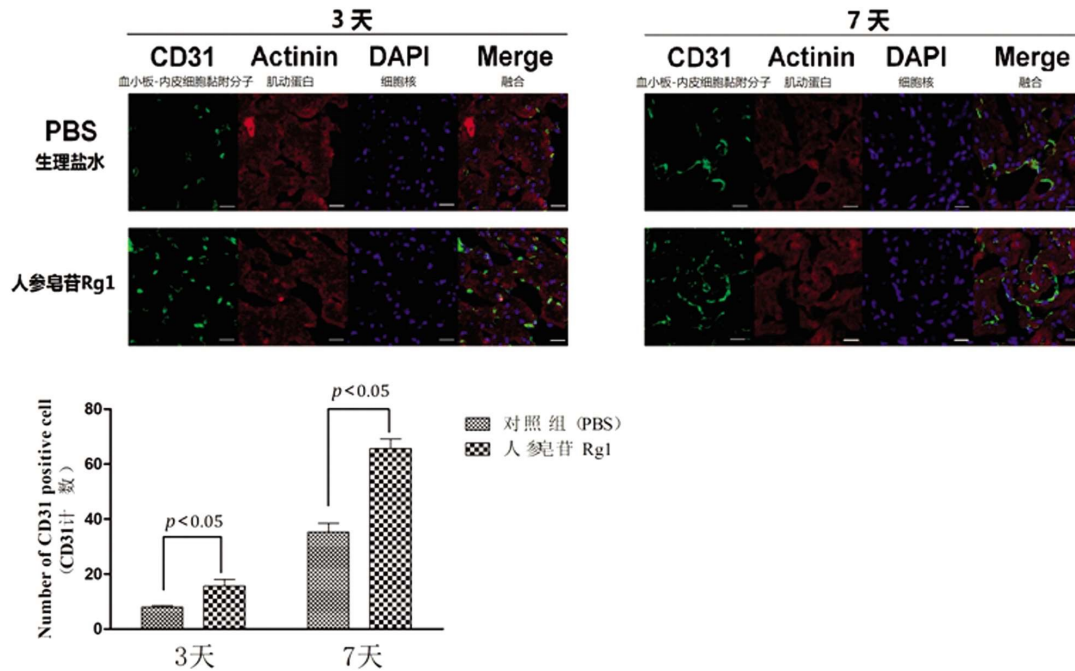


图1 两组不同时间点心脏血管新生情况的比较

Fig. 1 Comparison of the angiogenesis at the end of the study period(3d and 7d) between two groups

心脏的梗死后发生心肌细胞缺血损伤进一步发生凋亡,及时给予对症治疗恢复血流供应,建立新生毛细血管网达到挽救心肌细胞,改善心室重塑,成为当前冠心病基础研究的热点^[15]。目前国内外的研究,有通过给急性梗死心脏注射骨髓间充质干细胞促进梗死区域血管新生,改善心功能^[16],但是干细胞必须来源于自体组织,提取麻烦且数量很小,在实际临床治疗中操作性差且花费较高,因此未能在临床中广泛开展。还有 Nikol 等制作猪的心肌梗死及外周动脉闭塞模型中,在冠状动脉注射 VEGF 的 DNA 质粒,在治疗后 1~3 周可以检测到 VEGF 的表达,并且通过血管造影证实冠状动脉闭塞处有新的动脉生成^[17,18]。并且在兔子心肌梗死缺血区域注射 Ang-1 基因也取得类似的结果^[19,21]。还有将 HIF-1 α 基因转染至家兔后肢缺血部位同样可以使局部毛细血管密度增加^[22-24]。Arif M 等发现 MicroRNA-210 通过促进增殖、生存及血管新生从而参与介导心肌梗死后的心功能恢复^[25-27]。Takawale A 等通过心肌细胞过表达 TIMP3 预处理提高血管新生并抑制早期蛋白降解从而保护心肌梗死后心脏^[28,29]。这些通过基因调控促进心肌梗死后血管新生从而保护心肌梗死后的心功能因为其方法复杂尚处于实验研究阶段还不具备临床应用的可能,同时其他一些新的治疗手段尽管简单方便,例如低强度脉冲超声^[30]疗效是否确切尚有争议。而中药单一成分提取简便,治疗应用方便,如果能在心梗治疗中发挥作用具有非常好的临床价值。

本实验主要观察心肌梗死后在人参皂苷 Rg1 治疗下新生血管的情况,而观察指标则选择内皮细胞的主要标志之一 CD31。CD31 又称为血小板-内皮细胞粘附分子 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31), 分子量为

130kDa,属于免疫球蛋白超家族成员,具有清除体内老化中性粒细胞的作用。CD-31 主要表达于血管内皮细胞、血小板、巨噬细胞和嗜中性粒细胞。本结果显示人参皂苷 Rg1 治疗组的大鼠心脏组织中新生血管明显多于生理盐水对照治疗组,提示人参皂苷 Rg1 具有促进心梗后心脏血管新生的作用,但是具体的作用机制还有待进一步研究探索。

参考文献 (References)

- [1] Goldberg RJ, Spencer FA, Gore JM, et al. Thirty year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute: A population based perspective[J]. Circulation, 2009, 119(9): 1211-1219
- [2] McManus DD, Chinai M, Saczynski JS, et al. 30 year trends in heart failure in patients hospitalized with acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2011, 107(3): 353-359
- [3] Poku N, Noble S. Myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries (MINOCA): a whole new ball game [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2017, 15(1): 7-14
- [4] Bulluck H, Chan MHH, Paradies V, et al. Incidence and predictors of left ventricular thrombus by cardiovascular magnetic resonance in acute ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: a meta-analysis [J]. J Cardiovasc Magn Reson, 2018, 20(1): 72
- [5] Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(1): 30-41
- [6] Mann DL, Zipes DP, Libby P, et al. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine [M]. 10th edn. 2014; Elsevier Saunders, Philadelphia

- [7] 彭程飞, 王艳春, 汪洁, 等. 人参皂苷 Rg1 通过缺氧诱导因子 1 α 促进血管内皮生长因子分泌[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(4): 617-620
- [8] 彭程飞, 李佳, 田孝祥, 等. 人参皂苷 Rg1 抑制大鼠急性心肌梗死后心肌纤维化[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(16): 3005-3007
- [9] Hemalatha KL, Stanely Mainzen Prince P. Anti-inflammatory and anti-thrombotic effects of zingerone in a rat model of myocardial infarction[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 595-602
- [10] Blom JN, Lu X, Arnold P, et al. Myocardial Infarction in Neonatal Mice, A Model of Cardiac Regeneration[J]. J Vis Exp, 2016, (111)
- [11] Cahill TJ, Choudhury RP, Riley PR. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(10): 699-717
- [12] McManus DD, Chinali M, Saczynski JS, et al. 30 year trends in heart failure in patients hospitalized with acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2011, 107(3): 353-359
- [13] Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2015 ACC/AHA/SCAI focused update on primary percutaneous coronary intervention for patients with ST-segment elevation myocardial infarction: An update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention and the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-segment elevation myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 67 (10): 1235-1250
- [14] Chen CF, Chiou WF, Zhang JT. Comparison of the pharmacological effects of Panax ginseng and Panax quinquefolium [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(9): 1103-1108
- [15] Girolami A, Ferrari S, Sambado L, et al. Myocardial infarctions and other acute coronary syndromes in rare congenital bleeding disorders: a critical analysis of all reported cases[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2015, 21(4): 359-364
- [16] Peng C, Pei H, Wei F, et al. Cellular repressor of E1A-stimulated gene overexpression in bone mesenchymal stem cells protects against rat myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2015, 183: 232-341
- [17] Nikol S. Therapeutic angiogenesis using gene transfer and stem cell therapy in peripheral artery disease[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2011, 136(14): 672-674
- [18] Kastrup J, Jørgensen E, Fuchs S, et al. A randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of the safety and efficacy of BIOBYPASS (AdGVVEGF121.10NH) gene therapy in patients with refractory advanced coronary artery disease: the NOVA trial [J]. EuroIntervention, 2011, 6(7): 813-818
- [19] Shalaby SM, El-Shal AS, Zidan HE, et al. Comparing the effects of MSCs and CD34+ cell therapy in a rat model of myocardial infarction [J]. IUBMB Life, 2016, 68(5): 343-354
- [20] Wang J, He W, Guo L, et al. The ACE2-Ang (1-7)-Mas receptor axis attenuates cardiac remodeling and fibrosis in post-myocardial infarction[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1973-1981
- [21] Zhang F, Li S, Song J, et al. Angiotensin- (1-7) regulates angiotensin II-induced matrix metalloproteinase-8 in vascular smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 2017, 261: 90-98
- [22] Li H, Liu D, Li C, et al. Exosomes secreted from mutant-HIF-1 α -modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(12): 1379-1390
- [23] Li DQ, Lu GM, Liang YD, et al. CD54+ rabbit adipose-derived stem cells overexpressing HIF-1 α facilitate vascularized fat flap regeneration[J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 46875-46890
- [24] Li J, Fan L, Yu Z, et al. The effect of deferoxamine on angiogenesis and bone repair in steroid-induced osteonecrosis of rabbit femoral heads[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(2): 273-280
- [25] Arif M1, Pandey R1, Alam P, et al. MicroRNA-210-mediated proliferation, survival, and angiogenesis promote cardiac repair post myocardial infarction in rodents [J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(12): 1369-1385
- [26] Ren CX, Leng RX, Fan YG, et al. MicroRNA-210 and its therapeutic potential[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(11): 1325-1338
- [27] Martinez SR, Ma Q, Dasgupta C, et al. MicroRNA-210 suppresses glucocorticoid receptor expression in response to hypoxia in fetal rat cardiomyocytes[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 80249-80264
- [28] Takawale A1, Zhang P, Azad A, et al. Myocardial overexpression of TIMP3 after myocardial infarction exerts beneficial effects by promoting angiogenesis and suppressing early proteolysis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313(2): H224-H236
- [29] Chintalgattu V, Greenberg J, Singh S, et al. Utility of Glycosylated TIMP3 molecules: Inhibition of MMPs and TACE to improve cardiac function in rat myocardial infarction model [J]. Pharmacol Res Perspect, 2018, 6(6): e00442
- [30] Shindo T, Ito K, Ogata T, et al. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Enhances Angiogenesis and Ameliorates Left Ventricular Dysfunction in a Mouse Model of Acute Myocardial Infarction [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(6): 1220-1229