

# 人参皂苷 Rg1 对心肌肥厚模型大鼠的保护作用及机制研究

张新磊,李明慧,杨少华,张瑶俊,陈绍良,张丰富\*

(南京医科大学附属南京医院心内科,江苏 南京 210006)

**[摘要]** 目的:研究人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1)对主动脉缩窄致左室肥厚大鼠模型的保护作用,并对其作用机制作初步探讨。方法:通过结扎成年雄性大鼠胸主动脉法构建大鼠心肌肥厚模型,将胸主动脉缩窄造模成功的 24 只 SD 大鼠随机分为单纯手术组(TAC 组)及 Rg1 治疗组(Rg1 组)。另外,将假结扎胸主动脉的 12 只大鼠作为假手术组(Sham 组)。4 周后分离左室称重,测定各组大鼠左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI);采用 HE 染色观察心室壁厚度、心肌组织结构;采用 Real-time PCR 法检测左室心肌组织中心房利钠因子(ANF)、B 型脑利钠肽(BNP)和缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )的 mRNA 表达;采用 Western blot 法检测左室心肌组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达。结果:与 TAC 组相比,人参皂苷 Rg1 给药组动物的左心室质量指数、心肌细胞肥大程度、ANP、BNP 表达均有显著下降( $P < 0.05$ );HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 和蛋白的表达均有显著增加( $P < 0.05$ )。结论:人参皂苷 Rg1 有效地缓解压力超负荷诱导的大鼠心肌肥厚并改善左室功能,而这种保护作用可能通过增加 HIF-1 $\alpha$  表达有关。

**[关键词]** 人参皂苷 Rg1;心肌肥厚;缺氧诱导因子 1 $\alpha$

**[中图分类号]** R542.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)03-332-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130309

## Beneficial effects and mechanisms of ginsenoside Rg1 on left ventricular hypertrophy after transverse aortic constriction

Zhang Xinlei, Li Minghui, Yang Shaohua, Zhang Yaojun, Chen Shaoliang, Zhang Fengfu\*

(Department of Cardiovascular Diseases, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the beneficial effects of ginsenoside Rg1 (Rg1) in the treatment of cardiac hypertrophy induced by transverse aortic contraction (TAC) and the potential molecular mechanisms in rats. **Methods:** Adult male SD rats were conducted in the study; twenty-four rats which are managed to present left ventricular hypertrophy (LVH) after TAC were randomly divided into two groups: the TAC group and the Rg1 group. Another 12 rats which was absence of the aortic artery ligated after analogous operation was included in the Sham group. The administration of Rg1 was conducted at 10 mg/(kg·d) for 4 weeks. After that, the left ventricular mass index (LVMI) were examined as hypertrophic parameters; left ventricle sections were stained with hematoxylin and eosin for ventricular wall thickness and myocardial microstructure. The mRNA transcription of ANP, BNP and HIF-1 $\alpha$  was detected by Real-time quantitative PCR. The protein expression of HIF-1 $\alpha$  was evaluated through Western blot test. **Results:** Compared with TAC group, the treatment with Rg1 significantly reduced the LVMI, the size of cardiomyocyte, and the mRNA expression of transcripts of ANF, BNP ( $P < 0.05$ , respectively). In the Rg1 group, the protein and mRNA levels of HIF-1 $\alpha$  were significantly increased comparing to the control group ( $P < 0.05$ , respectively). **Conclusion:** Ginsenoside Rg1 attenuates the left ventricular hypertrophy and improves the cardiac function in the experimental rat model after TAC undertaken. This beneficial effects may be partially attributed to the increase of HIF-1 $\alpha$  expression.

**[Key words]** ginsenoside Rg1; myocardial hypertrophy; HIF-1 $\alpha$

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 332-336]

**[基金项目]** 江苏省普通高等学校研究生科研创新项目(2011CX LX11-0719)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhffnj@126.com

心肌肥厚是导致心血管疾病发病及病死率显著升高的独立危险因素<sup>[1]</sup>,是心功能从代偿期向失代偿期演变及心室结构从可逆向不可逆发展的关键阶段,是心功能衰竭的病理生理基础。深入研究心肌肥大的发生发展参与因素,寻求有效的抑制心肌肥厚的药物,对于降低心脏病的发生率和病死率具有重要的意义。

人参皂苷是人参中的主要的活性成分之一,对中枢神经系统、心血管、内分泌及免疫系统发挥着广泛的药理学作用<sup>[2-4]</sup>。有研究表明,Rg1 通过促进心血管组织产生内源性一氧化氮(NO)<sup>[5]</sup>,抑制钙神经素和促分裂原活化蛋白激酶发挥抗心肌肥厚效应<sup>[6]</sup>。然而,心肌肥厚是一个复杂的病理生理过程,要阐明 Rg1 介导的抗心肌肥厚作用,需要进一步的实验。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )是一种依赖于氧调控的转录因子,其在维持氧稳态方面发挥重要作用。许多心脏疾病都有不同程度的缺氧,缺氧时 HIF-1 $\alpha$  可以稳定地表达,从而调控一系列缺氧相关基因的表达,其诱导表达的基因与能量代谢、细胞生存与增殖、血管新生、红细胞生成、肿瘤生长以及肿瘤多药耐药等相关。Rg1 保护心肌肥厚及其可能涉及机制的报道尚少,其中 HIF-1 $\alpha$  是否参与其中目前仍然不清楚。故本文提出假设,Rg1 通过上调心肌肥厚中 HIF-1 $\alpha$  水平,发挥抑制心肌肥厚作用,进一步探讨 Rg1 对抗心肌肥厚的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,由南京医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(苏)2008-0004]。

人参皂苷 Rg1(上海生科院),兔抗大鼠 HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz 公司,美国),小鼠抗大鼠  $\beta$ -actin (Santa Cruz 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG

抗体 (CST 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司),TRIzol (Invitrogen 公司,美国) 蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),real-time PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),电泳仪、电泳槽 (BIO-RAD 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型制备及分组

在雄性 SD 大鼠右无名动脉和左颈总动脉之间将主动脉结扎于 8 G 针头上<sup>[7]</sup>,随后将针头退出即可,假手术组不结扎手术线,其他与 TAC 组相同。动物模型建立之后,将胸主动脉缩窄处理的大鼠随机分为胸主动脉缩窄组 (TAC 组, $n = 12$ )和人参皂苷 Rg1 治疗组(Rg1 组, $n = 12$ ),Sham 组和 TAC 组用生理盐水灌胃,Rg1 组用 Rg1 [(10 mg/kg·d)]灌胃<sup>[8]</sup>,术后 4 周进行各种指标检测。

#### 1.2.2 检测指标

LVM1 4 周后称量各组大鼠体重 ( $n = 5$ ),处死动物,开胸取出心脏,用 4% 甲醛灌洗,以房室沟为界分离心房和心室,以室间沟为界去处右心室。滤纸吸干后称取左心室质量。LVM1 以左室质量除以体重计算(mg/g)。

心肌组织 HE 染色,查看心肌细胞排列以及细胞及细胞核形态情况 大鼠心肌肥厚的组织学测定取多聚甲醛固定的心室肌块,石蜡包埋、切片,片厚 4  $\mu$ m,常规 HE 染色,用 IPP6.0 图像分析软件,在 400 倍视野下,每个标本随机取 5 个视野,每个视野选择细胞边界清楚且细胞核位于细胞中央的 10 个心肌细胞,测量心肌细胞截面积 (cardiocyte area, CA),计算其平均值作为测量结果。

左室组织总 RNA 的提取:称取一定量的左室组织,加入 TRIzol 试剂,提取总 RNA,real-time PCR 反应体系为 20  $\mu$ l,反应条件按试剂盒说明进行。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers

基因名	引物序列	片段长度
HIF-1 $\alpha$	上游 5'-TCCTGCACTGAATCAAGAGG-3'	103 bp
	下游 5'-AGGACTTGCTGGCTGATCTT-3'	
ANF	上游 5'-ACCACCTGGAGGAGAAG-3'	141 bp
	下游 5'-TCTGAGACGGGTTGACTT-3'	
BNP	上游 5'-GTCTCAAGACAGCGCCTTCC-3'	132 bp
	下游 5'-AACCTCAGCCCCTCACAGC-3'	
GAPDH	上游 5'-TGTCGTGGAGTCTACTGGCGTCTT-3'	151 bp
	下游 5'-GAGGGAGTTGTCATATTTCTCGTGGT-3'	

检测 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达:从液氮罐中取出大鼠心脏左室组织,使用蛋白提取试剂盒提取蛋白,测量其蛋白浓度。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,用半干转法将凝胶电泳分离的蛋白分子转移到 PVDF 膜上。5%牛血清白蛋白室温封闭 1h,按抗 HIF-1 $\alpha$  抗体 (1:500 稀释)或抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:750 稀释)加入相应一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。HRP 标记山羊抗小鼠二抗 (1:2 000 稀释)或 HRP 标记山羊抗兔二抗 (1:3 000 稀释),室温孵育 2 h,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。与化学发光试剂 ECL 反应后曝光、显影和定影,最后对结果进行吸光度扫描分析,以相对于内参的灰度代表蛋白的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

所有数据应用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析。数据均采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组比较用单因素方差分析,组间的两两比较用 LSD,以  $P \leq 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Rg1 对主动脉缩窄介导的心肌肥厚大鼠心室重量指数的影响

TAC 组与 Sham 组相比较,LVMI 显著增高 ( $P < 0.05$ ),表明造模成功;Rg1 组与 TAC 组相比较,LVMI 显著降低 ( $P < 0.05$ ),表明 Rg1 能显著抑制由 TAC 诱导的心室肥厚(表 2)。

表 2 3 组动物体重(BW)、左室重量(LVM)和左室心肌重量指数(LVMI)的比较

组别	BM(g)	LVM(mg)	LVMI(mg/g)
Sham 组	372.00 $\pm$ 17.09	690.00 $\pm$ 10.00	1.85 $\pm$ 0.06
TAC 组	390.33 $\pm$ 7.51	643.30 $\pm$ 145.72	4.21 $\pm$ 0.31*
Rg1 组	402.33 $\pm$ 39.07	1 262.70 $\pm$ 231.86	2.94 $\pm$ 0.24#

LVMI=LVM/BM;与 Sham 组相比,\* $P < 0.001$ ;与 TAC 组相比,# $P = 0.002$ 。

### 2.2 Rg1 对主动脉缩窄介导的心肌肥厚大鼠心肌细胞截面积的影响

TAC 组与 Sham 组相比较,心肌细胞排列紊乱,细胞及细胞核形态不规整,CA 明显增大 ( $P < 0.05$ ),表明造模成功;Rg1 组与 TAC 组相比较,心肌细胞排列整齐,细胞及细胞核形态规整,CA 明显减小 ( $P < 0.05$ ),表明 Rg1 能显著抑制由 TAC 诱导的心肌肥厚(图 1)。

### 2.3 Rg1 对主动脉缩窄诱导的心肌肥厚大鼠左室 ANF、BNP 和 HIF-1 $\alpha$ 的 mRNA 表达的影响

与 Sham 组相比,TAC 组左室 ANF、BNP 表达明显上调 ( $P < 0.05$ ,图 2A),Rg1 组较 TAC 组,左室 ANF、BNP 表达明显减少 ( $P < 0.05$ 图 2A);与 Sham 组相比,TAC 组 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 表达增多 ( $P < 0.05$ ,图 2B),与 TAC 组相比,Rg1 组 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 表达增多 ( $P < 0.05$ ,图 2B)。

### 2.4 Rg1 对主动脉缩窄诱导的心肌肥厚大鼠 HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的影响

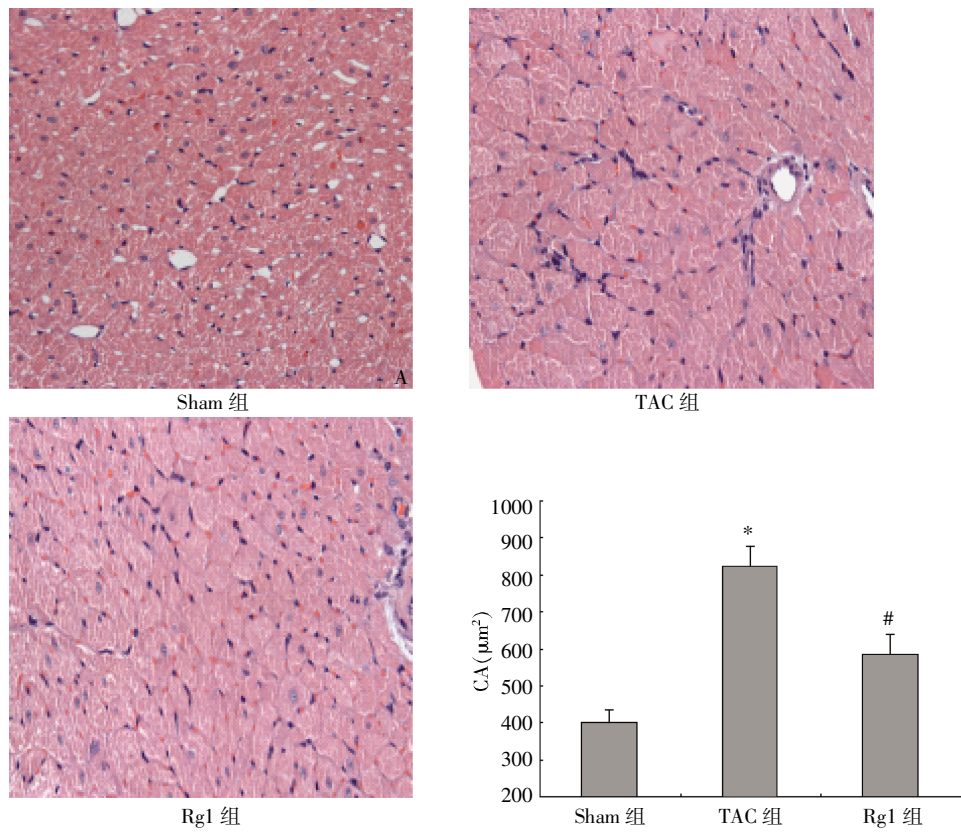
与 Sham 组相比,TAC 手术组 HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达增多 ( $P < 0.001$ ),与 TAC 组相比,Rg1 组 HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达增多 ( $P < 0.001$ ,图 3)。

## 3 讨论

心肌肥厚是长期压力负荷过载下出现的心肌重构,导致心肌收缩力降低,诱发心力衰竭。本文采用不完全结扎胸主动脉的方法,制备心肌肥厚模型。实验结果表明,Rg1 可以降低心肌肥厚大鼠左室质量分数和减少心肌细胞截面积,改善左室肥厚;Rg1 可以减少心肌肥厚大鼠左室 ANF、BNP<sup>[9-10]</sup>表达,改善心功能;Rg1 可以增加心肌肥厚大鼠左室缺氧诱导因子 1 $\alpha$  的表达,可能通过上调 HIF-1 $\alpha$  来发挥对心肌肥厚保护作用。

心肌肥厚最初是在应对多种压力下,为维持心脏功能的适应性反应<sup>[11-12]</sup>。然而,在持续的压力负荷过载下,心脏发展到失代偿阶段,最终导致心脏扩大和收缩功能丧失。心肌肥厚能够代偿心脏压力负荷和容量负荷的增加,成为进行性心衰的基本病理过程和决定心力衰竭演变的重要病理因素。低氧诱导因子是广泛参与缺血性心脏病和心功能失调等心脏疾病后心肌重塑的主要诱导因子。

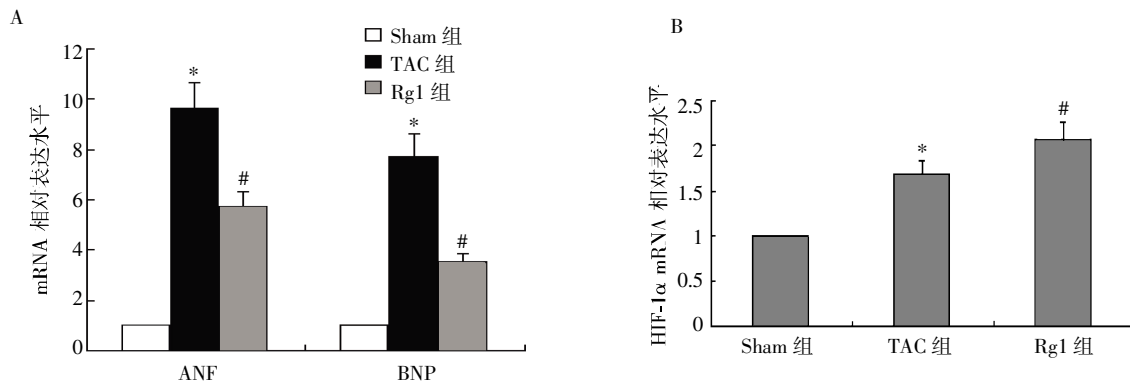
HIF-1 是一种由缺氧诱导产生的、可以激活缺氧反应基因转录的 DNA 结合蛋白,以异源二聚体的形式存在,由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基组成<sup>[13]</sup>,其中  $\alpha$  亚基既是 HIF-1 的调节亚基又是活性亚基,因此 HIF-1 $\alpha$  是缺氧研究的重点。常氧状态时,HIF-1 $\alpha$  在脯氨酸羟化酶的作用下,其 402 位和 564 位的脯氨酸残基被羟化。被羟化的 HIF-1 $\alpha$  可与肿瘤抑制蛋白(VHL)结合,后者成为 E3 泛素-蛋白连接酶复合体作用于 HIF-1 $\alpha$  的识别部位,从而使 HIF-1 $\alpha$  被蛋白酶体降解。在缺氧情况下,HIF-1 $\alpha$  得以稳定,同 HIF-1 $\beta$  聚合并上调多种下游靶基因表达以适应缺氧性改变<sup>[14]</sup>。HIF-1 $\alpha$  作为一种转录因子,低氧时在组织细胞中广



与 Sham 组相比, \* $P < 0.001$ ; 与 TAC 组相比, # $P < 0.001$  ( $n = 5$ )。

图 1 Rg1 对主动脉缩窄诱导的心肌肥厚大鼠心肌细胞横截面积的影响 (HE, ×400)

Figure 1 Effect of ginsenoside Rg1 on cardiocyte area of myocardial hypertrophy induced by TAC in rats (HE, ×400)



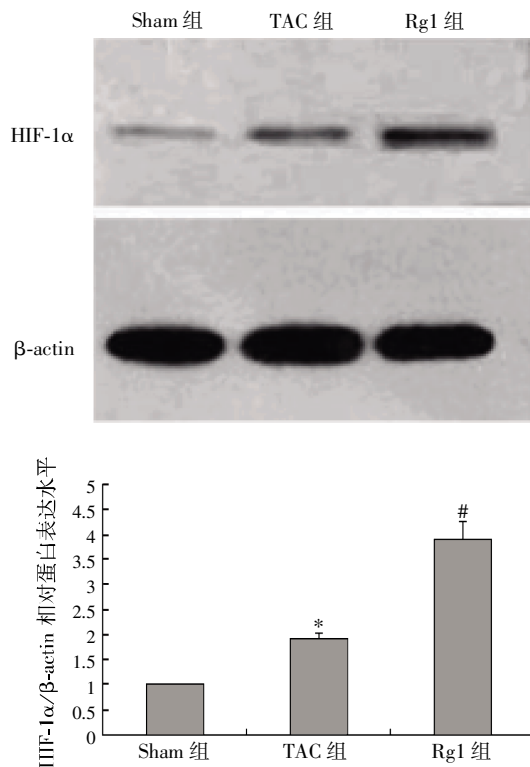
A: ANF 和 BNP mRNA 的表达水平; B: HIF-1α mRNA 的表达水平。与 Sham 组相比, \* $P < 0.001$ ; 与 TAC 组相比, # $P = 0.001$  ( $n = 5$ )。

图 2 Rg1 对主动脉缩窄诱导的心肌肥厚大鼠 ANF、BNP 和 HIF-1α mRNA 表达的影响

Figure 2 The mRNA transcription of ANF, BNP and HIF-1α in each group

泛表达,诱导大量与氧或能量代谢有关的基因表达,包括促红细胞生成素 (EPO)、血管内皮生长因子 (VEGF)、糖酵解酶、诱导型 NO 合酶 (iNOS)、血红素氧化酶-1 (HO-1)、环氧合酶 (COX)、血栓素合酶 (TXS)、铁蛋白基因等<sup>[15-16]</sup>。本实验表明, Rg1 可以上调心肌肥厚大鼠左室 HIF-1α 的表达,进而发挥保护心肌肥厚作用。我们推测 HIF-1α 对心肌肥厚的

保护作用从作用途径上可能存在以下 3 个途径:①通过促进红细胞增殖以增加全身组织氧的输送,如转铁蛋白及其受体、HO-1 和 EPO 等基因产物水平升高;②通过血管扩张和新生血管生成增加局部组织氧供,如 iNOS 和 VEGF<sup>[17]</sup> 等基因产物增多,而 HO-1 会产生潜在的血管舒张剂一氧化氮,同时通过前两种作用机制发生作用;③增强细胞在低氧情况



与 Sham 组相比, \* $P < 0.001$ ; 与 TAC 组相比, # $P < 0.001$  ( $n = 5$ )。

图3 Rg1 对主动脉缩窄诱导的心肌肥厚大鼠 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of ginsenoside Rg1 on the protein expressions of HIF-1 $\alpha$  of myocardial hypertrophy Induced by TAC in rats

下的代谢适应能力,而不是增加组织氧供,如葡萄糖转运蛋白 1(GLUT-1)和糖酵解酶合成增加。

但是,心肌肥厚的病理生理是一个复杂的过程,不是单一信号通路作用的结果,不同的信号通路间存在交叉,Rg1 对心肌肥厚的保护作用所涉及的 HIF-1 $\alpha$  上、下游的一些信号通路都还有待于进一步的深入研究。因此,Rg1 对心肌肥厚的保护作用机制的研究将是一个长期的过程。

[参考文献]

[1] Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, et al. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(1): H8-H16

[2] Gillis CN. Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link? [J]. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54(1): 1-8

[3] Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(11): 1685-1693

[4] Xiang YZ, Shang HC, Gao XM, et al. A comparison of the ancient use of ginseng in traditional Chinese medicine

with modern pharmacological experiments and clinical trials [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(7): 851-858

[5] Deng J, Wang YW, Chen WM, et al. Role of nitric oxide in ginsenoside Rg(1)-induced protection against left ventricular hypertrophy produced by abdominal aorta coarctation in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(4): 631-635

[6] Deng J, Lv XT, Wu Q, et al. Ginsenoside Rg (1) inhibits rat left ventricular hypertrophy induced by abdominal aorta coarctation: involvement of calcineurin and mitogen-activated protein kinase signalings [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 608(1-3): 42-47

[7] 周亚光, 屠恩远, 王照华, 等. 大鼠胸主动脉缩窄诱导心肌肥厚模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008(12): 21-24

[8] Yamaguchi Y, Higashi M, Kobayashi H. Effects of ginsenosides on maze performance and brain choline acetyltransferase activity in scopolamine-treated young rats and aged rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 329(1): 37-41

[9] Boheler KR, Schwartz K. Gene expression in cardiac hypertrophy [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1992, 2(5): 176-182

[10] Rockman HA, Ross RS, Harris AN, et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(18): 8277-8281

[11] Gerdes AM, Kellerman SE, Moore JA, et al. Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 1992, 86(2): 426-430

[12] Olivetti G, Quaini F, Lagrasta C, et al. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction in rats [J]. *Cardioscience*, 1995, 6(2): 101-106

[13] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia [J]. *J Appl Physiol*, 2000, 88(4): 1474-1480

[14] Lefer DJ. Induction of HIF-1 $\alpha$  and iNOS with siRNA: a novel mechanism for myocardial protection [J]. *Circ Res*, 2006, 98(1): 10-11

[15] Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1): 47-53

[16] Minet E, Michel G, Mottet D, et al. Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(7): 847-855

[17] 吴冬鸣, 唐燕, 韩艺, 等. 大鼠心肌缺血再灌注后不同时间点心脏及肝脏中 HIF-1、VEGF 的表达 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(8): 1047-1051

[收稿日期] 2012-11-17