

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research人参总皂苷调控过氧化物酶体增殖物激活
受体通路治疗心力衰竭大鼠的研究Effects of total ginsenosides on peroxisome proliferator activated receptor pathway
in rats with heart failure杨乐乐¹, 林丽君², 吴小芬¹,
曹晓静¹, 张万里³(1. 温州医科大学 附属第二医院 药学部 浙江
温州 325000; 2. 平阳县人民医院 药剂科, 浙江
平阳 325400; 3. 温州医科大学 附属第一医院
神经内科, 浙江 温州 325000)YANG Le-le¹, LIN Li-jun²,
WU Xiao-fen¹, CAO Xiao-jing¹,
ZHANG Wan-li³(1. Department of Pharmacy, The Second
Affiliated Hospital of Wenzhou Medical
University, Wenzhou 325000, Zhejiang
Province, China; 2. Department of
Pharmacy, Pingyang People's Hospital,
Pingyang 325400, Zhejiang Province,
China; 3. Department of Neurology, The
First Affiliated Hospital of Wenzhou
Medical University, Wenzhou 325000,
Zhejiang Province, China)作者简介: 杨乐乐(1990-), 女, 药师, 主要从
事药理学方面的相关研究

通信作者: 杨乐乐

MP: 15088554633

E-mail: honset_loyal@163.com

摘要:目的 探索人参总皂苷对心力衰竭大鼠的治疗作用及其相关作用机制。
方法 用皮下多点注射异丙肾上腺素的方法建立心力衰竭大鼠模型。将造模成
功的大鼠随机分为模型组和实验组, 每组 20 只; 另取 20 只正常大鼠作为正常
组。实验组灌胃给予 60 mg · kg⁻¹ 人参总皂苷, qd; 正常组和模型组均灌胃给予
等量 0.9% NaCl。3 组大鼠均连续给药 28 d。用超声心动图检测大鼠心脏功能,
用蛋白质印迹法检测 p38 丝裂原活化蛋白酶(p38MAPK)和过氧化物酶体增殖
物激活受体-γ(PPAR-γ)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白
(Bax)的表达水平。**结果** 实验组、模型组和正常组的左心室射血分数分别为
(61.52 ± 6.78)%、(36.52 ± 5.38)% 和 (87.62 ± 15.36)%, 左心室收缩末期内
径分别为(6.59 ± 0.34)、(9.66 ± 0.64)和(5.61 ± 0.38)mm, 左心室舒张末期内
径分别为(7.52 ± 0.26)、(9.78 ± 0.56)和(6.65 ± 0.45)mm, p38MAPK 蛋白相对
表达水平分别为 1.46 ± 0.17、1.78 ± 0.18 和 0.98 ± 0.10, PPAR-γ 蛋白相对表
达水平分别为 0.72 ± 0.04、0.38 ± 0.02 和 0.99 ± 0.02, Bcl-2 蛋白相对表达水
平分别为 1.39 ± 0.06、0.98 ± 0.03 和 1.76 ± 0.24, Bax 蛋白相对表达水平分别为
0.72 ± 0.07、1.03 ± 0.08 和 0.48 ± 0.03。实验组的上述指标与模型组和正常组
比较, 差异均有统计学意义(均 P < 0.05)。**结论** 人参总皂苷可改善心力衰竭
大鼠的心功能, 延缓心力衰竭疾病发展, 其机制可能与人参总皂苷调控 PPAR 通
路相关蛋白表达有关。

关键词: 人参总皂苷; 过氧化物酶体增殖物激活受体通路; 心力衰竭; 大鼠**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.07.014**中图分类号:** R28**文献标志码:** A**文章编号:** 1001-6821(2023)07-0976-04

Abstract: **Objective** To analyze the therapeutic effect and related mechanism of Ginsenoside on the rats with heart failure. **Methods** The model of heart failure was developed by subcutaneous multipoint injection of isoproterenol. After successful modeling, the rats were randomly divided into model and experimental groups with 20 rats per group; and another 20 normal rats were selected as normal group. The experimental group was given 60 mg · kg⁻¹ total ginsenosides qd by gavage, while rats in the normal and model groups were given the same amount of normal saline by gavage. Three groups were treated for 28 days. Rat cardiac function was determined by echocardiography. The expression levels of mitogen activated protease P38 (p38MAPK), peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 related X protein (Bax) were determined by Western blot.

Results Left ventricular ejection fractions of experimental, model and normal groups were $(61.52 \pm 6.78)\%$, $(36.52 \pm 5.38)\%$ and $(87.62 \pm 15.36)\%$; left ventricular end systolic diameter were (6.59 ± 0.34) , (9.66 ± 0.64) and (5.61 ± 0.38) mm; left ventricular end diastolic diameter were (7.52 ± 0.26) , (9.78 ± 0.56) and (6.65 ± 0.45) mm; the relative expression levels of p38MAPK protein were 1.46 ± 0.17 , 1.78 ± 0.18 and 0.98 ± 0.10 ; the relative expression levels of PPAR- γ protein were 0.72 ± 0.04 , 0.38 ± 0.02 and 0.99 ± 0.02 ; the relative expression levels of Bcl-2 protein were 1.39 ± 0.06 , 0.98 ± 0.03 and 1.76 ± 0.24 ; the relative expression levels of Bax protein were 0.72 ± 0.07 , 1.03 ± 0.08 and 0.48 ± 0.03 , respectively. Compared the experimental group with the model and normal groups, the differences of above indexes were statistically significant (all $P < 0.05$).

Conclusion Ginsenoside can delay the development of heart failure in rats with heart failure. The mechanism may be related to the regulation of Ginsenoside on PPAR pathway related proteins.

Key words: ginsenoside; peroxisome proliferator activated receptor pathway; heart failure; rat

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是原发性心肌损伤及心脏负荷过重致使心功能受损的一种病理状态^[1]。目前,临床治疗心力衰竭的目标包括防治心肌重构、改善患者症状及生活质量、减少心力衰竭的住院率和死亡率^[2]。人参总皂苷可调节机体糖脂代谢,具有改善血管内皮细胞功能和心功能的作用,广泛应用于心血管疾病^[3],其治疗心力衰竭有一定的疗效^[4]。本研究旨在探索人参总皂苷对心力衰竭大鼠的治疗作用及其相关作用机制。

材料与方法

1 材料

动物 清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,鼠龄 8 周,体重 200 ~ 220 g,由黑龙江中医药大学动物中心提供。动物许可证号:SYXK(黑)2020-0035。本实验经温州医科大学附属第二医院动物伦理委员会批准(伦理批号:wydw2019-0809)。

药品与试剂 人参总皂苷,纯度:99.86%,批号:20200811,由白山市长白山制药有限公司提供;异丙肾上腺素,规格:每支 200 mg,批号:20190625,德国默克公司生产。脑钠素(brain natriuretic peptide, BNP)、腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)、腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测试剂盒,均由深圳容金科技有限公司生产;单克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司生产;HRP 羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)等二抗,均由美国 Thermo 公司生产;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,碧云天生物技术有限公司生产。

仪器 DW-T6 彩色多普勒超声仪,江苏大为医疗有限公司产品;Sysmex-chemix-180 全自动生化

分析仪,日本 Furuno Electric 公司产品;MiniBIS Pro 凝胶成像系统,以色列 DNR 公司产品。

2 实验方法

2.1 模型建立^[5-6]

分别于 1 ~ 14 d 皮下多点注射异丙肾上腺素,其中第 1 天剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 2 天剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 3 ~ 14 天剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。若左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) $\leq 45\%$,则表明心力衰竭大鼠模型成功构建。

2.2 动物分组与给药方法

将造模成功的大鼠随机分为模型组和实验组,每组 20 只;另取 20 只正常大鼠作为正常组。实验组灌胃给予 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 人参总皂苷, *qd*;正常组和模型组均灌胃给予等量 0.9% NaCl。3 组大鼠均连续给药 28 d。

2.3 用经胸壁超声心动图检测大鼠心脏功能^[4]

末次给药后 24 h,用 2% 异氟烷麻醉大鼠,大鼠平卧并给予固定,在 M 型模式下以 MX 250s 探头置于左胸部探查心脏功能,检测 3 组大鼠左心室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVDS)、左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVDD)、左心室舒张末期后壁厚度(left ventricular end diastolic posterior wall thickness, LVPWD)、LVEF 和左心室收缩末期后壁厚度(left ventricular end systolic posterior wall thickness, LVPWS),连续检测 3 次取平均值。

2.4 心脏质量指数^[5]

待心脏功能检测后,称重大鼠体质量,打开大鼠胸腔,取出心脏,清洗后称取心脏质量,计算 3 组大鼠心脏质量指数。

2.5 用 ELISA 法检测血清指标^[5]

待心脏功能检测后,于腹主动脉取血,于室温静置后,以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,置于

-70 ℃ 保存,备用。用 ELISA 法检测血清 BNP、ATP 和 ADP 水平。

2.6 用蛋白质印迹法检测相关蛋白的表达水平

取 3 组大鼠心肌组织,剪碎研磨加入细胞裂解液,抽提蛋白质,用 BCA 法检测蛋白浓度。取蛋白提取液 50 μL,按文献[6]的方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PDVF 膜,脱脂牛奶封闭 1 h,一抗过夜,二抗封闭 1 h。以 β-actin 为内参,用图像分析软件分析 p38 丝裂原活化蛋白酶(p38 mitogen activated proteinase,p38MAPK)、磷酸化 p38MAPK(phosphorylated p38MAPK,p-p38MAPK)、过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator activated receptor-γ,PPAR-γ)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)蛋白的相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK-q 检验。

结 果

1 3 组大鼠心功能的比较

实验组给予 60 mg·kg⁻¹人参总皂苷;正常组和模型组均给予等量 0.9% NaCl。

模型组与正常组相比,大鼠的 LVDD 和 LVDS 均显著升高,LVEF、LVPWD 和 LVPWS 均显著降低,差

异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与模型组相比,实验组大鼠的 LVDD 和 LVDS 水平均显著降低,而 LVEF、LVPWD 和 LVPWS 水平均显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见表 1。

2 3 组大鼠心脏质量指数的比较

实验组、模型组和正常组的心脏质量指数分别为(3.89 ± 0.24)、(4.34 ± 0.19)和(3.56 ± 0.27) mg·g⁻¹,实验组的心脏质量指数与正常组和模型组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 3 组大鼠血清指标的比较

模型组与正常组相比,大鼠的 ATP 显著降低,BNP 和 ADP 均显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);实验组与模型组相比,大鼠的 ATP 显著升高,BNP 和 ADP 均显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见表 2。

4 3 组大鼠心肌凋亡及 PPAR 通路相关蛋白表达水平的比较

实验组、模型组和正常组的 Bax 蛋白相对表达水平分别为 0.72 ± 0.07、1.03 ± 0.08 和 0.48 ± 0.03,Bcl-2 蛋白相对表达水平分别为 1.39 ± 0.06、0.98 ± 0.03 和 1.76 ± 0.24,p38MAPK 蛋白相对表达水平分别为 1.46 ± 0.17、1.78 ± 0.18 和 0.98 ± 0.10,p-p38MAPK 蛋白相对表达水平分别为 1.37 ± 0.13、1.73 ± 0.12 和 1.09 ± 0.08,PPAR-γ 蛋白相对表达水平分别为 0.72 ± 0.04、0.38 ± 0.02 和 0.99 ± 0.02。实验组大鼠的上述指标与正常组和模型组相比,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见图 1。

表 1 3 组大鼠心功能的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cardiac function among three groups($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose	n	LVDD(mm)	LVDS(mm)	LVEF(%)	LVPWD(mm)	LVPWS(mm)
Normal	-	20	6.65 ± 0.45	5.61 ± 0.38	87.62 ± 15.36	3.25 ± 0.38	4.65 ± 0.58
Model	-	20	9.78 ± 0.56 *	9.66 ± 0.64 *	36.52 ± 5.38 *	1.97 ± 0.25 *	1.23 ± 0.28 *
Experimental	60 mg·kg ⁻¹	20	7.52 ± 0.26 **	6.59 ± 0.34 **	61.52 ± 6.78 **	2.78 ± 0.26 **	2.58 ± 0.54 **

LVDD: Left ventricular end diastolic diameter; LVDS: Left ventricular end systolic diameter; LVEF: Left ventricular ejection fraction; LVPWD: Left ventricular end diastolic posterior wall thickness; LVPWS: Left ventricular end systolic posterior wall thickness; Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, ** $P < 0.05$.

表 2 3 组大鼠血清指标的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum indexes among three groups($\bar{x} \pm s$)

Group	ATP(μg·L ⁻¹)	BNP(ng·L ⁻¹)	ADP(μg·L ⁻¹)
Normal	762.58 ± 185.24	63.52 ± 11.52	234.61 ± 50.64
Model	387.95 ± 154.23 *	151.26 ± 20.56 *	596.34 ± 125.64 *
Experimental	582.62 ± 256.34 **	105.62 ± 15.82 **	352.64 ± 80.46 **

Dose and n refer to table 1; ATP: Adenosine triphosphate; BNP: Brain natriuretic peptide; ADP: Adenosine diphosphate; Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, ** $P < 0.05$.

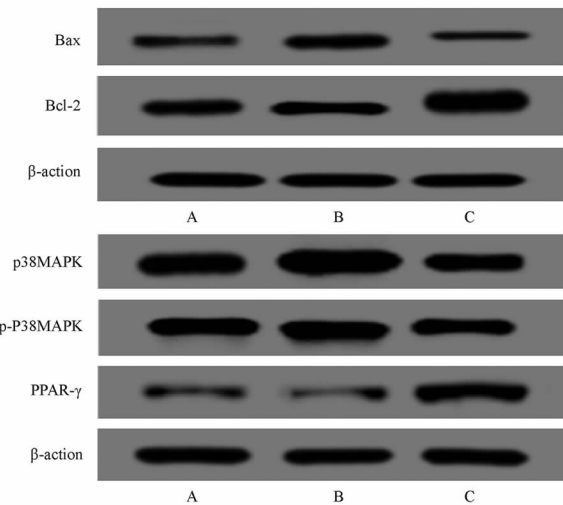


图1 3组大鼠心肌凋亡相关蛋白和过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)通路相关蛋白的表达情况

Figure 1 Expression of myocardial apoptosis-related proteins and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) pathway-related proteins of rats among three groups

A: Experimental group; B: Model group; C: Normal group.

讨论

人参总皂苷作为类固醇类化合物,是人参中重要活性成分,在心肌缺血、心肌梗死等心血管疾病的治疗中发挥一定的疗效^[7]。周芹等^[8]研究认为,人参皂苷 Rh2 可通过提高血清血管内皮生长因子水平,提高高脂膳食大鼠心肌缺血再灌注后外周血内皮祖细胞数量,达到减轻心肌缺血再灌注损伤的目的。臧安缘等^[9]研究发现,人参皂苷素 Rb1 通过调控磷脂酰肌醇三激酶-蛋白激酶 B-内皮一氧化氮合酶信号转导通路相关蛋白的表达,从而发挥对心肌缺血的保护作用。孔宏亮等^[10]研究发现,人参皂苷 Rb1 通过调控心肌细胞水平、肌质网和线粒体等的 Ca^{2+} “交流”,改善心力衰竭大鼠模型的心肌细胞代谢。此外,人参皂苷 Rb1 还可通过调节线粒体钠钙交换体、线粒体钙离子单向转运体、电压依赖性阴离子通道和线粒体钙离子摄入蛋白 1 的表达介导心肌细胞内线粒体膜电位,达到改善心力衰竭的目的。景雅婷等^[11]研究证实,人参皂苷 Rb1 通过调控心肌组织 Periostin 蛋白的表达,抑制转化生长因子- β 信号通路,从而改善心力衰竭大鼠心室重塑,与本研究的结果相似。张秀等^[12]研究证实,Bax 和 Bcl-2 介导的细胞凋亡参与心室重塑的过程,说明人参总皂苷可通过抑制心脏细胞凋亡,延缓心室重塑过程。这说明人参总皂苷能够有效改善心力衰竭大鼠的心室重塑,但其机制可能是多条信

号通路共同作用的结果。

PPAR 信号通路可参与心肌细胞能量代谢转换的调节^[13]。PPAR- α 可通过调节脂肪酸氧化,维持其心肌功能和能量,参与心力衰竭的早期进展。WU 等^[13]研究表明,人参总皂苷与作为 PPAR- γ 激活剂的 TZDs 具有相似的生物学作用。本实验结果发现,人参总皂苷干预心力衰竭大鼠后可调控 p38MAPK、p-p38MAPK 和 PPAR- γ 表达,说明人参总皂苷干预心力衰竭大鼠的机制可能与 PPAR 通路激活相关。

参考文献:

- [1] ALPER A B, CAMPBELL R C, ANKER S D, *et al.* A propensity-matched study of low serum potassium and mortality in older adults with chronic heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2016,137(1): 1-8.
- [2] DICK S A, EPELMAN S. Chronic heart failure and inflammation: What do we really know? [J]. *Circ Res*, 2016,119(1):159-176.
- [3] 鹿祺,邱智东,王蕾,等. 人参总皂苷对皮肤细胞的修复作用机制研究[J]. *吉林中医药*, 2020,40(4):518-521.
- [4] LI J, CHEN Y, ZHANG L, *et al.* Total saponins of panaxnotogin-seng promotes lymphangiogenesis by activation VEGF-C expression of lymphatic endothelial cells [J/OL]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193:e293-e302. 2016-12-04 [2022-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27553977/>.
- [5] 刘昕,林琳,张超英,等. 木犀草素抑制异丙肾上腺素诱导的心力衰竭大鼠的外周血淋巴细胞 DNA 损伤[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2019,40(2):323-327.
- [6] ZHONG M, ZHOU H, LONG C, *et al.* Natakalin ameliorates isoproterenol-induced chronic heart failure by protecting against endothelial dysfunction [J]. *Pharmacology*, 2016,98(3-4):99-110.
- [7] 林益群,罗明艳,张望. 人参总皂苷对功能性消化不良大鼠胃窦平滑肌组织的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(20):3313-3316.
- [8] 周芹,王晔,王龙. 人参皂苷 Rh2 对高脂膳食大鼠心肌缺血再灌注时内皮祖细胞的影响[J]. *实用药物与临床*, 2016,19(1):1-6.
- [9] 臧安缘,冷雪,李其芳. PI3K/Akt/eNOS 信号通路调控人参皂苷素 Rb1 对急性心肌梗死大鼠心肌的作用[J]. *中医药信息*, 2018,35(2):17-21.
- [10] 孔宏亮,赵雨婷,蒋玉昆. 人参皂苷 Rb1 对心力衰竭大鼠心肌细胞钙调控的影响[J]. *岭南心血管病杂志*, 2021,27(3):356-360.
- [11] 景雅婷,郑娟,王凤荣. 人参皂苷对心衰大鼠 Periostin 蛋白及 TGF- β 信号通路影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(8):44-47.
- [12] 张秀,程怡慧,张心彤,等. 生理性缺血训练改善心肌梗死后慢性心力衰竭大鼠心功能及心室重塑的神经机制[J]. *中国康复医学杂志*, 2021,36(8):915-922.
- [13] WU Y Y, CUI Y N, ZHANG T Y, *et al.* Transformation of ginsenoside Rh4 and its aglycone from the total saponins of stems and leaves of *Panax ginseng* by *Aspergillus tubingensis* [J]. *Phytochem Lett*, 2018,27(4):123-128.

(定稿日期 2023-01-13;本文编辑 戴荣源)