

人参皂苷 Rb1 通过 AMPK 途径改善心力衰竭大鼠
心脏能量代谢研究

张 娜¹, 朱 芳¹, 孔宏亮¹, 赵雨婷²

(1. 辽宁省人民医院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 大连大学附属新华医院, 辽宁 大连 116021)

[摘要] 目的:探讨人参皂苷 Rb1(Gs-Rb1)对慢性心力衰竭(CHF)大鼠心脏能量代谢的影响,以及腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)在其中的作用。方法:将阿霉素(Adr)诱导的心力衰竭大鼠随机分为 CHF 组、Gs-Rb1 组、腺嘌呤 9-β-D-阿拉伯呋喃糖苷(AraA)-1 组、AraA-2 组(AraA+Gs-Rb1),5'-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷(Aicar)-1 组和 Aicar-2 组(Aicar+Gs-Rb1),每组 5 只,另外选取 5 只健康大鼠作为对照组。除 CHF 组和对照组腹腔注射等体积生理盐水外,余五组分别予相应药物腹腔注射。干预结束并经心脏超声心动图检查左心室射血分数(LVEF)后,分离左心室心肌组织并分别测定心肌细胞 AMPK 活性和高能磷酸盐底物水平。结果:与 CHF 组比较,Gs-Rb1 组、Aicar-1 组和 Aicar-2 组 LVEF 均显著升高($P<0.05$),但 AraA-1 组、AraA-2 组显著降低($P<0.05$)。与 CHF 组比较,AraA-1 组、AraA-2 组 AMPK 活性显著降低($P<0.05$),Gs-Rb1 组、Aicar-1 组和 Aicar-2 组 AMPK 活性均显著升高($P<0.05$)。与 CHF 组比较,Gs-Rb1 组、Aicar-1 组和 Aicar-2 组的磷酸肌酸(PCr)、二磷酸腺苷(ADP)和三磷酸腺苷(ATP)水平均显著升高($P<0.05$),且 ATP/PCr 显著提高($P<0.05$),而 ADP/ATP 均显著降低($P<0.05$)。结论:Gs-Rb1 可能通过 AMPK 途径改善衰竭心脏的能量代谢,进而改善衰竭心脏的功能。

[关键词] 人参皂苷 Rb1;慢性心力衰竭;腺苷酸活化蛋白激酶;心肌高能磷酸盐底物;心脏能量代谢;三磷酸腺苷;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 1007-659X(2023)02-0202-05
DOI:10.16294/j.cnki.1007-659x.2023.02.014

Ginsenoside Rb1 Improving Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure Rats Through AMPK Pathway

ZHANG Na¹, ZHU Fang¹, KONG Hongliang¹, ZHAO Yuting²

(1. People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, China; 2. Affiliated Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116021, China)

[收稿日期] 2022-11-06
[基金项目] 辽宁省科学技术基金项目(编号:20180550245);沈阳市科技创新资金应用基础研究专项(编号:19-112-4-057)
[作者简介] 张娜(1982—),女,河北定州人,副主任医师,医学硕士,主要从事心力衰竭研究。电话:17702487858;邮箱:crabzhang@126.com。
[通信作者] 孔宏亮(1969—),男,河南郑州人,主任医师,医学博士,主要从事心肌能量代谢重塑研究。电话:17702487789;邮箱:khl339@163.com。

Abstract Objective: To investigate the effect of ginsenoside Rb1(Gs-Rb1) on cardiac energy metabolism in rats with chronic heart failure (CHF), and the role of adenylate activated protein kinase (AMPK) in it. **Methods:** The heart failure rats which were injected Adriamycin(Adr) were randomly grouped into CHF group, Gs-Rb1 group, Adenine 9-β-D-

AraA glycoside(AraA)-1 group, AraA-2 group(AraA+Gs-Rb1), 5'-aminoimidazol-4-formamide nucleoside(Aicar)-1 group and Aicar-2 group(Aicar+Gs-Rb1), with 5 rats in each group. Age-matched 5 healthy rats were served as control group. Except for the CHF group and the control group, which were injected intraperitoneally with the same volume of normal saline, the other five groups were injected intraperitoneally with corresponding drugs. After the intervention and left ventricular ejection fraction(LVEF) checked by echocardiography, the left ventricular myocardial tissues were separated and AMPK activity and high energy phosphate substrate levels of myocardial cells were measured. **Results:** Compared with CHF group, the LVEF of Gs-Rb1, Aicar-1 and Aicar-2 groups was significantly increased($P<0.05$), but that of AraA-1 and AraA-2 groups was significantly decreased($P<0.05$). Compared with CHF group, the activity of AMPK in AraA-1 and AraA-2 groups was significantly decreased($P<0.05$), and the activity of AMPK in Gs-Rb1, Aicar-1 and Aicar-2 groups was significantly increased($P<0.05$). Compared with CHF group, the levels of phosphocreatine(PCr), adenosine diphosphate(ADP) and adenosine triphosphate(ATP) in Gs-Rb1, Aicar-1 and Aicar-2 groups were significantly increased($P<0.05$), and the ATP/PCr was significantly increased($P<0.05$), and the ADP/ATP was significantly decreased($P<0.05$). **Conclusion:** Gs-Rb1 may improve the cardiac energy metabolism and function of the failing heart, which may be mediated by AMPK pathway.

Keywords ginsenoside Rb1; chronic heart failure; adenylate activated protein kinase; myocardial high energy phosphate substrate; cardiac energy metabolism; adenosine triphosphate; rat

慢性心力衰竭(CHF)是世界范围内的卫生健康问题,在首次入院的 CHF 患者中,5 年病死率为 40% 以上,经济负担日益增长。CHF 与异常心肌能量代谢相关^[1],心肌基质利用异常、三磷酸腺苷(ATP)下降和游离脂肪酸水平升高与 CHF 的进展直接相关^[2-6]。目前对 CHF 的治疗主要通过降低心率、减轻心脏负荷和抑制重塑来降低能量消耗,而不是改善能量产生不足的问题。因此,如何改善高能代谢产物的稳态成为心血管领域研究的热点。

人参皂苷 Rb1(Gs-Rb1)是从五加科植物人参中提取的人参皂苷的主要成分,在体内和体外均可改善 CHF,保护心脏免受缺血和/或再灌注损伤^[7-13]。本课题组既往研究表明,Gs-Rb1 可以改善衰竭心脏的脂肪酸 β -氧化^[12]、葡萄糖摄取^[7]和糖酵解^[13]过程,提示 Gs-Rb1 可能是一种改善 CHF 心肌能量代谢的潜在药物。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是脂代谢及糖代谢的主要调控分子,在细胞能量稳态调节中起关键作用,可促进各种组织中 ATP 的产生并抑制 ATP 的消耗途径。本研究尝试证实 Gs-Rb1 可通过 AMPK 途径改善心肌能量代谢,进而改善心功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

8 周龄雄性 Wistar 大鼠,35 只,体质量 150~180 g,购自中国医科大学实验动物中心,许可证

号:SCXK(Liao)2010-0001。本研究获得辽宁省人民医院伦理委员会批准(审批号 20200511)。

1.2 试剂

阿霉素(Adr,美国 Sigma 公司,批号 1382733), Gs-Rb1(纯度 99.5%,中国武汉市中医药研究中心,批号 20030213),腺嘌呤 9- β -D-阿拉伯呋喃糖苷(AraA,美国 Gibco 公司,批号 1581483),5'-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷(Aicar,美国 Gibco 公司,批号 1273347)。

1.3 CHF 模型的建立及动物分组

按下述方法构建大鼠 CHF 模型^[14]:根据大鼠体质量腹腔内注射 Adr (0.4 mg/mL),3 d 注射 1 次,连续 5 次;之后每周 1 次,共 5 次。应用 Adr 14 天,经心脏超声心动图检查证实 CHF 模型成功构建后,随机将其分为 6 个实验组:CHF 组、Gs-Rb1 组、AraA-1 组(单纯给予 AraA)、AraA-2 组(联合给予 AraA 和 Gs-Rb1)、Aicar-1 组(单纯给予 Aicar)和 Aicar-2 组(联合给予 Aicar 和 Gs-Rb1),每组 5 只。另外选取鼠龄、体质量匹配的健康大鼠 5 只作为对照组。Gs-Rb1、AraA 和 Aicar 均新鲜配置,即溶于 1 mL 无菌生理盐水,根据大鼠体质量分别完成腹腔注射 Gs-Rb1 (10 mg/mL)、AraA (50 mg/mL)和 Aicar (50 mg/mL),每日 1 次,连续 7 d。对照组和 CHF 组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。第 8 天心脏超声心动图检查后,

取新鲜左心室组织供后续研究使用。

1.4 实验数据监测

1.4.1 超声心动图检查

超声心动图检查是由 1 名对治疗分配不知情的研究人员操作超声心动图系统(型号 CFM-725,7.5 mhz 宽带换能器,美国 Vingmed 公司)完成。腹腔注射 10%水合氯醛,大鼠麻醉后仰卧位固定,应用二维和 M 型超声心动图获得乳头肌水平的左室舒张末期容积(EDV)和收缩末期容积(ESV);至少测量连续三个心动周期的上述左心室参数。左心室射血分数(LVEF)=(EDV-ESV)/EDV×100%。LVEF<45.00%为 CHF 诊断标准。取全血后,迅速分离、提取左心室,-80℃保存准备后续检测。

1.4.2 AMPK 活性测定

根据 AMPK 检测试剂盒(日本 CycLex 公司,批号 1382451)使用手册的操作步骤测定 AMPK 活性。

1.4.3 心肌高能磷酸盐底物测定

通过高效液相色谱-紫外光谱法(HPLC-UV)测定高能磷酸盐底物水平,包括磷酸肌酸(PCr)、二磷酸腺苷(ADP)和三磷酸腺苷(ATP)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。取 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 各组大鼠 LVEF 比较

成功构建 CHF 大鼠模型,即 ADR 干预大鼠的

LVEF 值均小于 45.00%。与 CHF 组比较,Gs-Rb1 组、Aicar-1 组和 Aicar-2 组 LVEF 均显著升高($P<0.05$),但 AraA-1 组、AraA-2 组显著降低($P<0.05$)。与 Gs-Rb1 组比较,AraA-1 组、AraA-2 组 LVEF 均降低($P<0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠 AMPK 活性比较

与对照组比较,CHF 组 AMPK 活性显著升高($P<0.05$)。与 CHF 组比较,AraA-1 组、AraA-2 组 AMPK 活性显著降低($P<0.05$),Gs-Rb1 组、Aicar-1 组和 Aicar-2 组 AMPK 活性均显著升高($P<0.05$)。与 Gs-Rb1 组比较,AraA-1 组、AraA-2 组 AMPK 活性均显著降低($P<0.05$)。见图 1。

2.3 各组大鼠高能磷酸盐底物水平

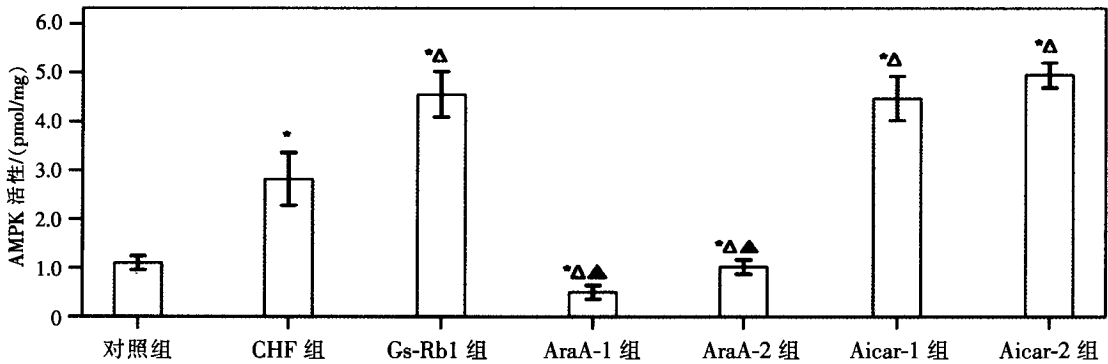
与对照组比较,CHF 组 PCr、ATP、ADP 水平均显

表 1 各组大鼠 LVEF 比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	只数	LVEF
对照组	5	57.20±5.26
CHF 组	5	39.60±1.14*
Gs-Rb1 组	5	44.00±1.87 [△]
AraA-1 组	5	31.80±1.30* ^{△△}
AraA-2 组	5	35.20±1.30* ^{△△}
Aicar-1 组	5	43.40±1.52 [△]
Aicar-2 组	5	44.80±1.64 [△]

注:CHF 为慢性心力衰竭,Gs-Rb1 为人参皂苷 Rb1,AraA 为腺嘌呤 9-β-D-阿拉伯呋喃糖苷,Aicar 为 5'-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷,LVEF 为左心室射血分数。

与对照组比较,* $P<0.05$;与 CHF 组比较,[△] $P<0.05$;与 Gs-Rb1 组比较,^{△△} $P<0.05$ 。



注:CHF 为慢性心力衰竭,Gs-Rb1 为人参皂苷 Rb1,AraA 为腺嘌呤 9-β-D-阿拉伯呋喃糖苷,Aicar 为 5'-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷。

与对照组比较,* $P<0.05$;与 CHF 组比较,[△] $P<0.05$;与 Gs-Rb1 组比较,^{△△} $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)活性比较

著降低($P<0.05$);与 CHF 组比较,Gs-Rb1 组、Aicar-1 组、Aicar-2 组 PCr、ADP、ATP 水平均显著升高($P<0.05$)。与对照组比较,CHF 组 ATP/PCr 显著降低($P<0.05$);与 CHF 组比较,Gs-Rb1 组和 Aicar-1 组、Aicar-2 组 ATP/PCr 显著提高($P<0.05$)。与对照组比较,CHF 组 ADP/ATP 显著升高($P<0.05$);与 CHF 组比较,Gs-Rb1 组和 Aicar-1 组、Aicar-2 组 ADP/ATP 均显著降低($P<0.05$)。与 Gs-Rb1 组比较,AraA-1 组、AraA-2 组 PCr、ATP、ADP 水平及 ATP/PCr 均降低($P<0.05$),而 ADP/ATP 升高($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠高能磷酸盐底物水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	PCr/($\mu\text{mol/g}$)	ATP/($\mu\text{mol/g}$)	ADP/($\mu\text{mol/g}$)	ATP/PCr	ADP/ATP
对照组	5	3.78 \pm 0.19	7.11 \pm 0.59	6.40 \pm 0.89	1.88 \pm 0.08	0.90 \pm 0.09
CHF 组	5	2.06 \pm 0.27*	2.40 \pm 0.39*	3.40 \pm 0.50*	1.16 \pm 0.10*	1.42 \pm 0.50*
Gs-Rb1 组	5	2.88 \pm 0.13* ^Δ	4.10 \pm 0.45* ^Δ	4.88 \pm 0.40* ^Δ	1.49 \pm 0.08* ^Δ	1.19 \pm 0.04* ^Δ
AraA-1 组	5	1.38 \pm 0.13* ^{ΔΔ}	1.17 \pm 0.17* ^{ΔΔ}	1.97 \pm 0.24* ^{ΔΔ}	0.85 \pm 0.12* ^{ΔΔ}	1.69 \pm 0.05* ^{ΔΔ}
AraA-2 组	5	1.78 \pm 0.15* ^{ΔΔ}	1.96 \pm 0.22* ^{ΔΔ}	2.66 \pm 0.35* ^{ΔΔ}	1.10 \pm 0.08* ^{ΔΔ}	1.36 \pm 0.04* ^{ΔΔ}
Aicar-1 组	5	2.80 \pm 0.07* ^Δ	4.03 \pm 0.12* ^Δ	4.50 \pm 0.34* ^Δ	1.44 \pm 0.05* ^Δ	1.11 \pm 0.06* ^Δ
Aicar-2 组	5	2.98 \pm 0.18* ^Δ	4.57 \pm 0.33* ^Δ	5.31 \pm 0.53* ^Δ	1.53 \pm 0.05* ^Δ	1.16 \pm 0.08* ^Δ

注:CHF 为慢性心力衰竭,Gs-Rb1 为人参皂苷 Rb1,AraA 为腺嘌呤 9- β -D-阿拉伯呋喃糖苷,Aicar 为 5'-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷,PCr 为磷酸肌酸,ATP 为三磷酸腺苷,ADP 为二磷酸腺苷。

与对照组比较,* $P<0.05$;与 CHF 组比较,^Δ $P<0.05$;与 Gs-Rb1 组比较,^{ΔΔ} $P<0.05$ 。

3 讨论

CHF 是多种心血管疾病的终末阶段,是导致心源性死亡的主要原因之一。目前血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素 II 受体阻滞剂及 β 受体阻滞剂可以抑制 CHF 后心室重塑,降低患者病死率,但因其对血压及心率的不良影响,使其在部分患者中不能应用。目前,多种中药制剂已经被广泛应用于心血管疾病的治疗中,且临床效果明显^[15-16]。Gs-Rb1 是人参提取物的主要成分,本研究发现,Gs-Rb1 组大鼠 LVEF 较 CHF 组升高,CHF 大鼠的心功能得到显著改善,与既往研究结果一致^[17-18],提示 Gs-Rb1 对 CHF 大鼠心肌能量代谢产生了积极影响。

AraA 为特异性 AMPK 抑制剂,Aicar 为特异性 AMPK 激活剂。Aicar 可以改善 CHF,AraA 则会导致 CHF 恶化。AMPK 作为一种细胞能量调节器,被低细胞能量状态激活,从而发挥其在调解糖脂代谢方面的作用,包括糖酵解、游离脂肪酸代谢等^[17]。当细胞内的 ATP 减少,AMPK 活性增加,一方面通过抑制胆固醇、糖原、脂肪的合成,减少 ATP 的利用;另一方面,通过促进葡萄糖转运、脂肪酸氧化,增加 ATP 的产生。AMPK 的激活进一步提高 ATP 水平,ATP 水平的提高可以为衰竭的心脏提供更多的能量,以维持正常的心功能。本研究发现 CHF 组大鼠 AMPK 活性显著升高,其升高可能与衰竭心肌的 ATP 减少相关。Gs-Rb1 组大鼠 AMPK 活性较 CHF 组明显升

高,说明 Gs-Rb1 具有与 Aicar 相似的作用,能提高 AMPK 的活性,其可通过 AMPK 途径改善心肌能量代谢。

与代谢相关的 AMPK 在维持心肌能量稳定方面具有重要作用,ATP 消耗增加及产生减少,均可激活 AMPK,从而调节糖脂代谢活动,促进 ATP 生成增加,维持正常心脏功能^[19-21]。本实验显示,CHF 组大鼠 PCr、ATP、ADP 水平显著降低,而 Gs-Rb1 组大鼠以上指标均明显升高,说明 Gs-Rb1 可以增加 CHF 大鼠心肌 PCr、ATP、ADP 水平,提高对衰竭心脏的能量供应。AMPK 活化与受损心肌脂肪酸及葡萄糖代谢改变相关,在心肌能量代谢过程中发挥重要作用^[22],其活化能有效改善心功能^[23]。本实验显示,CHF 组 ATP/PCr 较对照组降低,而 ADP/ATP 较对照组升高,说明在 CHF 大鼠心肌组织中 ATP 的降低更明显,进一步证实了 AMPK 的激活可能与 ATP 相关。

在 CHF 的治疗上,中医药疗法灵活多样,大量临床研究表明中医药治疗 CHF 疗效确切。中药成分复杂,作用途径多样,可以通过不同的作用机制提高衰竭心肌中 ATP 水平,提高对心肌细胞的能量供应,改善心功能。本研究虽印证了 Gs-Rb1 对大鼠心功能的影响,但因样本量较少,尚有诸多不足,后续当扩大样本量,继续深入研究。

[参考文献]

[1] KATZ A M. Is the failing heart energy depleted?[J].

- Cardiol Clin,1998,16(4):633-644.
- [2] VENTURA-CLAPIER R,GARNIER A,VEKSLER V. Energy metabolism in heart failure[J]. J Physiol,2004,555(Pt1): 1-13.
- [3] STANLEY W C,RECCHIA F A,LOPASCHUK G D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart[J]. Physiol Rev,2005,85(3):1093-1129.
- [4] INGWALL J S,WEISS R G. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function[J]. Circ Res,2004,95(2):135-145.
- [5] NEUBAUER S. The failing heart:an engine out of fuel[J]. N Engl J Med,2007,356(11):1140-1151.
- [6] ZHANG M,SHAH A M. Role of reactive oxygen species in myocardial remodeling[J]. Curr Heart Fail Rep,2007, 4(1):26-30.
- [7] KONG K,WANG W,LI Z Q,et al. Anti-hypoxic effect of ginsenoside Rb1 on neonatal rat cardiomyocytes is mediated through the specific activation of glucose transporter-4 ex vivo[J]. Acta Pharmacol Sin,2009,30(4):396-403.
- [8] ZHAO H P,LV D,ZHANG W,et al. Ginsenoside-Rb1 attenuates dilated cardiomyopathy in cTnT(R141W) transgenic mouse[J]. J Pharmacol Sci,2010,112(2):214-222.
- [9] KONG H L,LI Z Q,ZHAO Y J,et al. Ginsenoside Rb1 protects cardiomyocytes against CoCl₂-induced apoptosis in neonatal rats by inhibiting mitochondria permeability transition pore opening[J]. Acta Pharmacol Sin,2010, 31(6):687-695.
- [10] JIANG Q S,HUANG X N,YANG G Z,et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 on calcineurin signal pathway in cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F_{2α}[J]. Acta Pharmacol Sin,2007,28(8):1149-1154.
- [11] KONG H L,LI Z Q,ZHAO S M,,et al. Apelin-APJ effects of ginsenoside-Rb1 depending on hypoxia-induced factor 1α in hypoxia neonatal cardiomyocytes[J]. Chin J Integr Med,2015,21(2):139-146.
- [12] KONG H L,HOU A J,LIU N N,et al. The effects of ginsenoside Rb1 on fatty acid β-oxidation,mediated by AMPK,in the failing heart[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018,21(7):731-737.
- [13] 孔宏亮,侯爱洁,陈晓明,等. HIF-1α介导人参皂甙 Rb1 对缺氧心肌细胞葡萄糖代谢的调节[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(9):1621-1626.
- [14] KONG H L,HOU A J,LIU N N,et al. The effects of ginsenoside Rb1 on fatty acid β-oxidation,mediated by AMPK,in the failing heart[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018,21(7):731-737.
- [15] 刘慧,刘静,刘聪,等. 丹七片对缺血性心脏病大鼠模型能量代谢的调节作用[J]. 世界中医药,2021,16(15): 2322-2327.
- [16] 刘聪聪,闫建玲,李达,等. 中药注射液治疗慢性心力衰竭患者临床研究进展[J]. 山西中医药大学学报,2020, 21(5):388-391.
- [17] JURIC D,WOJCIECHOWSKI P,DAS D K,et al. Prevention of concentric hypertrophy and diastolic impairment in aortic-banded rats treated with resveratrol[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2007,292(5):H2138-H2143.
- [18] TOWLER M C,HARDIE D G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling[J]. Circ Res,2007,100(3):328-341.
- [19] BEER M,SEYFARTH T,SANDSTEDT J,et al. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with 31P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy[J]. J Am Coll Cardiol,2002,40(7): 1267-1274.
- [20] CONWAY M A,ALLIS J,OUWERKERK R,et al. Detection of low phosphocreatine to ATP ratio in failing hypertrophied human myocardium by 31P magnetic resonance spectroscopy[J]. Lancet,1991,338(8773):973-976.
- [21] TIAN R,NASCIMBEN L,KADDURAH-DAOUK R,et al. Depletion of energy reserve via the creatine kinase reaction during the evolution of heart failure in cardiomyopathic hamsters[J]. J Mol Cell Cardiol,1996,28(4): 755-765.
- [22] DONG H W,ZHANG L F,BAO S L. AMPK regulates energy metabolism through the SIRT1 signaling pathway to improve myocardial hypertrophy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2018,22(9):2757-2766.
- [23] 金爱萍,李蔚,李冰,等. AMP 激活蛋白激酶对慢性心力衰竭进展影响的实验研究[J]. 陕西医学杂志,2021, 50(1):3-6.