

一氧化氮在人参皂甙 Rb1 预处理减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用

张力 夏中元 吴洋 库玛

【摘要】 目的 评价一氧化氮(NO)在人参皂甙 Rb1 预处理减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。**方法** 成年雄性 SD 大鼠,体重 220 ~ 280 g,腹腔注射 1% 链脲佐菌素-柠檬酸盐缓冲液 65 mg/kg 制备糖尿病模型。取糖尿病模型制备成功的大鼠 40 只,随机分为 4 组($n = 10$):假手术组(S 组)、缺血再灌注组(IR 组)、人参皂甙 Rb1 预处理组(R 组)和 L-NAME + 人参皂甙 Rb1 预处理组(LR 组)。IR 组、R 组和 LR 组采用结扎左冠状动脉前降支 30 min,再灌注 120 min 的方法制备大鼠心肌缺血再灌注模型;S 组只穿线。LR 组于缺血前 25 min 时静脉注射一氧化氮合酶抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 10 mg/kg;R 组和 LR 组于缺血前 10 min 时静脉注射人参皂甙 Rb1 40 mg/kg;S 组和 IR 组给予等容量生理盐水。再灌注 120 min 时,颈动脉采集血样,测定血清肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)的活性。然后处死大鼠,取心肌组织,计算心肌梗死范围,测定内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达、MDA 和 NO 的含量以及 SOD 活性,光镜下观察病理结果。**结果** 与 S 组比较,IR 组、R 组和 LR 组血清 CK 和 LDH 的活性升高,心肌梗死范围增大,IR 组和 LR 组心肌 eNOS 表达下调,MDA 含量升高,SOD 活性和 NO 含量降低($P < 0.05$);与 IR 组和 LR 组比较,R 组血清 CK 和 LDH 的活性降低,心肌梗死范围减小,心肌 eNOS 表达上调,MDA 含量降低,SOD 活性和 NO 含量升高($P < 0.05$);IR 组和 LR 组各指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 人参皂甙 Rb1 预处理可通过激活 eNOS,促进 NO 生成,抑制心肌细胞脂质过氧化反应,从而减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。

【关键词】 一氧化氮; 人参皂甙类; 缺血预处理; 糖尿病; 心肌再灌注损伤

Role of NO in reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury by ginsenoside Rb1 preconditioning in diabetic rats ZHANG Li, XIA Zhong-yuan, WU Yang, KU Ma. Department of Anesthesiology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: XIA Zhong-yuan, Email: xiazhongyuan2005@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the role of by NO in reduction of myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury by ginsenoside Rb1 preconditioning in diabetic rats. **Methods** Forty healthy adult male SD rats weighing 220-280 g were used in this study. Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal streptozotocin 65 mg/kg and confirmed by fasting blood glucose > 16.7 mmol/L. The animals were randomly divided into 4 groups ($n = 10$ each): sham operation group (group S), group IR, ginsenoside Rb1 group (group R) and L-NAME + ginsenoside Rb1 group (group LR). IR was produced by occlusion of the anterior descending branch of left coronary artery (LAD) for 30 min followed by 120 min reperfusion in group IR, R and LR. In group S, LAD was exposed but not occluded. In group LR, L-NAME 10 mg/kg was injected iv 25 min before ischemia. In group R and LR, ginsenoside Rb1 40 mg/kg was injected iv 10 min before ischemia. In group S and IR, equal volume of normal saline was injected instead of ginsenoside Rb1. The blood sample was taken from carotid artery at 120 min of reperfusion for determination of serum activities of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH). Then the animals were sacrificed and myocardial tissues were obtained for determination of infarct size, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression, MDA and NO contents, SOD activity and microscopic examination. **Results** The serum

activities of CK and LDH were significantly increased and the myocardial infarct size was enlarged in group IR, R and LR, and eNOS expression was significantly down-regulated, MDA content was increased, and SOD activity and NO content was significantly decreased in group IR and LR compared with group S ($P < 0.05$). The serum activities of CK and LDH, and MDA content were significantly decreased, the myocardial infarct size was reduced, the expression of eNOS was up-regulated and the activity of SOD was increased in group R compared with group IR and LR ($P < 0.05$). There was no significant difference in the indices mentioned above between group IR and LR ($P > 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 preconditioning can attenuate myocardial IR injury in diabetic rats via activation of eNOS, increase in NO production, and inhibition of the lipid peroxidation reaction.

[Key words] Nitric oxide; Ginsenosides; Ischemic preconditioning; Diabetes mellitus; Myocardial reperfusion injury

心血管并发症是糖尿病患者主要的致死原因^[1]。糖尿病状态下的高血糖、氧自由基增多及脂质代谢紊乱加重了心肌及血管内皮细胞损伤^[2]。人参皂甙 Rb1 是参附注射液的主要生物活性成分,具有清除氧自由基、阻断神经细胞钙超载、抑制 Na^+ 通道活性、改善能量代谢等作用^[3]。研究表明,人参皂甙 Rb1 预处理可减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤^[4]。NO 是重要的血管内皮舒张因子,由一氧化氮合酶(NOS)催化底物 L-精氨酸合成。慢性糖尿病患者内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达下调,其介导的 NO 生成减少、可利用度降低,加剧了糖尿病患者的血管内皮功能紊乱^[5-6];激活血管内皮细胞 eNOS、增加 NO 的生物利用度,可减轻心肌再灌注损伤^[7]。本研究拟评价 NO 在人参皂甙 Rb1 预处理减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。

材料与方法

清洁级成年雄性 SD 大鼠,体重 220 ~ 280 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。适应性观察 1 周,禁食 12 h,腹腔注射 1% 链脲佐菌素-柠檬酸盐缓冲液(Sigma 公司,美国)65 mg/kg。3 d 后禁食 4 h,断尾取血样,测定空腹血糖,若空腹血糖 $> 16.7 \text{ mmol/L}$,并出现多饮、多食、多尿即为糖尿病模型制备成功^[8]。大鼠自由饮水,此后每 2 周测定一次空腹 4 h 时的血糖和体重,普食饲养 8 周。

取糖尿病模型制备成功的大鼠 40 只,随机分为 4 组($n = 10$):假手术组(S 组)、缺血再灌注组(IR 组)、人参皂甙 Rb1 预处理组(R 组)和 L-NAME + 人参皂甙 Rb1 预处理组(LR 组)。LR 组于缺血前 25 min 时经 30 s 静脉注射 NO 合酶抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)(南通市碧云天生物技术研究)10 mg/kg,溶于 1 ml 生理盐水中;R 组和 LR 组于缺血前 10 min 时经 30 s 静脉注射人参皂甙 Rb1(纯度 $\geq 98\%$,批号:110704-200420,中国药品生物制品

检定所) 40 mg/kg,溶于 1 ml 生理盐水;S 组和 IR 组静脉注射生理盐水 1 ml。

大鼠术前禁食 12 h。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉下固定大鼠。气管插管后接动物呼吸机行机械通气。右侧股静脉置管建立静脉通道。放置皮下电极监测 II 导联心电图。左侧股动脉置管,注射肝素 500 U/kg,监测 ECG、HR 和 MAP。采用结扎左冠状动脉前降支(LAD)的方法制备大鼠心肌缺血再灌注模型。前胸壁左锁骨中线处切开,在左心耳根部与肺动脉圆锥夹交点下约 3 ~ 4 mm 处用无创小圆针经 LAD 下方的心肌穿线包绕。IR 组、R 组和 LR 组稳定 10 min 后结扎 LAD 缺血 30 min,松开结扎线再灌注 120 min。缺血成功的标准为:心前区变白,II 导联心电图 T 波高耸,与 QRS 波融合,QRS 波增宽、变高。再灌注成功标准为:S-T 段回落,心尖恢复红润。S 组只穿线,不结扎 LAD。

再灌注 120 min 时,颈动脉采血样 3 ml,离心后取血清,测定肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)的活性。然后经右侧颈内静脉注射 1.5% 伊文氏蓝 1 ml 和 10% 氯化钾 2 ml,处死大鼠,快速摘取心脏,以冷 PBS 溶液洗净。

取 5 只大鼠的心脏,垂直于长轴方向将其切成 2 mm 厚的薄片,置于 1% 氯化三苯四氮唑溶液中 37 °C 孵育 20 min。存活的心肌呈蓝色,梗死区心肌呈灰白色,缺血区心肌呈砖红色。仔细分离梗死区心肌和缺血区心肌,用电子天平分别称重,以梗死区心肌重量与缺血区心肌重量的比值反映心肌梗死范围。

取 5 只大鼠的心脏,进行下述指标的测定。取缺血区心肌组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋后常规切片,HE 染色,光镜下观察病理结果。取心肌组织切片,进行免疫组化染色(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供),于光镜下($\times 400$)进行观察,每张切片随机选取 5 个视野,采用 Image-

Pro Plus 彩色图像分析系统进行分析,测定光密度值,反映 eNOS 的表达。取缺血区心肌组织,制成 10%匀浆,采用比色法测定 MDA 含量,采用羟胺法测定 SOD 活性,采用化学法测定 NO 含量,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 S 组比较,IR 组、R 组和 LR 组心肌梗死范围增大 ($P < 0.05$);与 IR 组和 LR 组比较,R 组心肌梗死范围减小 ($P < 0.05$);IR 组和 LR 组心肌梗死范围差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠心肌梗死范围的比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

S 组	IR 组	R 组	LR 组
0	51.7 \pm 4.3 ^a	36.9 \pm 2.3 ^{ab}	50.0 \pm 3.1 ^{abc}

注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$ 与 IR 组比较,^b $P < 0.05$ 与 R 组比较,^c $P < 0.05$

与 S 组比较,IR 组、R 组和 LR 组血清 CK 和 LDH 的活性升高 ($P < 0.05$);与 IR 组和 LR 组比较,R 组血清 CK 和 LDH 的活性降低 ($P < 0.05$);IR 组和 LR 组血清 CK 和 LDH 的活性比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠血清 CK 和 LDH 活性的比较 (U/L, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

指标	S 组	IR 组	R 组	LR 组
CK	1404 \pm 265	3270 \pm 312 ^a	2240 \pm 164 ^{ab}	2886 \pm 213 ^{acd}
LDH	913 \pm 164	2204 \pm 236 ^a	1365 \pm 227 ^{ab}	1716 \pm 188 ^{acd}

注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$ 与 IR 组比较,^b $P < 0.05$ 与 R 组比较,^c $P < 0.05$

与 S 组比较,IR 组和 LR 组心肌 MDA 含量升高,SOD 活性降低 ($P < 0.05$),R 组心肌 MDA 含量和 SOD 活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 IR 组和 LR 组比较,R 组心肌 MDA 含量降低,SOD 活性升高 ($P < 0.05$);IR 组和 LR 组心肌 MDA 含量和 SOD 活性比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠心肌 MDA 和 SOD 水平的比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

指标	S 组	IR 组	R 组	LR 组
MDA ($\mu\text{mol/g}$)	5.4 \pm 0.6	8.2 \pm 1.1 ^a	5.6 \pm 1.0 ^b	7.8 \pm 1.0 ^{ac}
SOD (U/g)	23 \pm 3	14 \pm 3 ^a	20 \pm 3 ^b	16 \pm 4 ^c

注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$ 与 IR 组比较,^b $P < 0.05$ 与 R 组比较,^c $P < 0.05$

与 S 组比较,IR 组和 LR 组心肌 eNOS 表达下

调,NO 含量降低 ($P < 0.05$),R 组心肌 eNOS 表达和 NO 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 IR 组和 LR 组比较,R 组心肌 eNOS 表达上调,NO 含量升高 ($P < 0.05$);IR 组和 LR 组心肌 eNOS 表达和 NO 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠心肌 eNOS 表达和 NO 含量的比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

指标	S 组	IR 组	R 组	LR 组
eNOS	116 \pm 7	98 \pm 6 ^a	114 \pm 6 ^{ab}	108 \pm 7 ^b
NO ($\mu\text{mol/L}$)	4.8 \pm 0.6	3.4 \pm 0.6 ^a	4.6 \pm 0.7 ^b	3.6 \pm 0.7 ^{bc}

注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$ 与 IR 组比较,^b $P < 0.05$ 与 R 组比较,^c $P < 0.05$

光镜下 S 组心肌纤维排列稍紊乱,心肌细胞轻度断裂、水肿,中性粒细胞浸润,间质纤维化;IR 组心肌纤维增生、水肿,灶状坏死、断裂,心肌间质充血水肿伴大量炎性细胞浸润;R 组心肌纤维排列较紧密,少数心肌纤维胞浆玻璃样变呈波浪状排列,轻度变性水肿,少量坏死,病理学损伤较 IR 组减轻;LR 组心肌纤维排列稍紊乱,局部少量炎性细胞浸润,间质水肿,间隙增大。

讨 论

本研究成功制备糖尿病大鼠模型后,维持空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 继续饲养 8 周,以确保大鼠糖尿病心肌改变形成。与 S 组比较,IR 组再灌注 120 min 时心肌梗死体积增大,血清 CK 和 LDH 的活性升高,光镜下心肌纤维增生水肿,灶状坏死,断裂,心肌间质充血水肿伴大量炎性细胞浸润,提示糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤模型制备成功。参照文献[3]选择人参皂甙 Rb1 预处理的剂量为 40 mg/kg,结果表明,与 IR 组比较,R 组心肌梗死面积减小,血清 CK 和 LDH 的活性降低,光镜下心肌纤维排列较紧密,少数心肌纤维胞浆玻璃样变呈波浪状排列,轻度变性水肿,少量坏死,病理学损伤减轻,提示人参皂甙 Rb1 预处理可减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。

本研究参照文献[9]选择 NOS 抑制剂 L-NAME 的剂量。结果表明,与 S 组相比,IR 组心肌 eNOS 表达下调,NO 含量降低,MDA 含量升高,SOD 活性降低,提示缺血再灌注可抑制 eNOS 的活性,抑制 NO 的生成,诱发脂质过氧化反应。与 IR 组和 LR 组比较,R 组心肌 eNOS 表达上调,NO 含量升高,MDA 含量降低,SOD 活性升高,提示人参皂甙 Rb1 预处理可通过激活 eNOS,促进 NO 生成,抑制脂质过氧化反

应,从而减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。

在心肌缺血再灌注过程中,内源性 NO 含量显著降低,NOS 的活性被抑制,进一步降低 NO 的含量,从而加剧心肌缺血再灌注损伤^[10]。糖尿病时机体内的代谢异常,包括线粒体活性氧自由基产生增多、糖基化终末产物的生成增多、血糖的自氧化,参与了慢性高血糖的脂质过氧化反应;并且过度氧化应激产生内源性 NOS 抑制物,使 eNOS 活性降低,NO 生物利用度降低,又可导致微血管循环障碍,加重组织缺氧,同时清除氧自由基的能力减弱^[11]。研究表明,人参皂甙 Rb1 可直接升高 NOS 的活性,使 NO 的生成增加^[12],抑制脂质过氧化反应;也可通过激活 PI3K/Akt 信号通路^[4],提高内皮细胞 eNOS 活性,促进 NO 的生成,从而发挥保护作用^[13]。

综上所述,人参皂甙 Rb1 预处理可通过激活 eNOS,促进 NO 生成,抑制心肌细胞脂质过氧化反应,从而减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。

参 考 文 献

- [1] Cerghizan A, Bala C, Nita C, et al. Practical aspects of the control of cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Exp Clin Cardiol*, 2007, 12(2): 83-86.
- [2] Bell DS. Diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care*, 2003, 26(10): 2949-2951.
- [3] Wang Z, Li M, Wu WK, et al. Ginsenoside Rb1 preconditioning protects against myocardial infarction after regional ischemia and reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2008, 22(6): 443-452.
- [4] 张力, 夏中元. 人参皂甙 Rb1 预处理对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用. *中国医药导刊*, 2010, 12(3): 446-449.
- [5] Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, et al. Activation of vascular protein kinase C- β inhibits akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*, 2006, 55(3): 691-698.
- [6] Vicent D, Ilany J, Kondo T, et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest*, 2003, 111(9): 1373-1380.
- [7] Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev*, 2002, 7(4): 391-405.
- [8] Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, et al. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(5): 720-729.
- [9] Maslov LN, Lishmanov YB, Oeltgen PR, et al. Activation of peripheral delta2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury involvement of protein kinase C, NO-synthase, K_{ATP} channels and the autonomic nervous system. *Life Sci*, 2009, 84(19-20): 657-663.
- [10] Calvert JW, Lefer DJ. Myocardial protection by nitrite. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(2): 195-203.
- [11] Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37(5): 959-968.
- [12] Scott GI, Colligan PB, Ren BH. Ginsenosides Rb1 and Re decrease cardiac contraction in adult rat ventricular myocytes: role of nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(6): 1159-1165.
- [13] Yu J, Eto M, Akishita M, et al. Signaling pathway of nitric oxide production induced by ginsenoside Rb1 in human aortic endothelial cells: a possible involvement of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(3): 764-769.

(收稿日期:2010-04-21)

(本文编辑:王娟)

· 消息 ·

关于《中华麻醉学杂志》调整稿件处理费的通告

自 2001 年以来,本刊一直严格按照“中华医学会系列杂志稿件处理费的收取办法”收取稿件处理费,每篇文稿 1500 字以下 20 元,1500 字以上 40 元,第一作者为中华医学会会员者减半(需附会员证复印件)。

随着经济发展,物价普遍上扬,成本大幅上升,中华医学会杂志社根据实际情况制定了新的“中华医学会系列杂志有关稿件费用给付和收取办法”,自 2009 年 1 月 1 日起执行,其中明确规定:来稿须付稿件处理费,中华医学会会员 50 元/篇(需附会员证复印件),非会员 100 元/篇。

本刊自 2010 年 2 月 1 日起执行,调整稿件处理费如下:中华医学会会员 50 元/篇(需附会员证复印件),非会员 100 元/篇。特此通告!

本刊编辑部