

## 人参茎叶皂苷预适应对自发性高血压大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

宋清<sup>1</sup>, 张晓文<sup>1\*</sup>, 徐志伟<sup>1</sup>, 陈建文<sup>2</sup>, 唐富天<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学中医基础理论教研室, 广东 广州 510405; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510000)

**摘要:** 目的 研究人参茎叶皂苷(GSLs)预适应对自发性高血压大鼠(SHR)心肌缺血再灌注损伤(I-R)的保护作用及可能机制。方法 SHR于I-R造模前每日1次灌胃给予GSLs 50和100 mg·kg<sup>-1</sup>,连续3周,于缺血40 min和再灌注30 min内测定大鼠血压、心功能和心脏血流动力学指标,生化方法测定心肌ATPase酶、乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)和NO含量,镉血红素饱和法测定心肌和肝脏金属硫蛋白(MT)含量,免疫组化方法测定细胞热休克蛋白70(HSP70)表达。结果 GSLs 50和100 mg·kg<sup>-1</sup>预适应组显著改善I-R损伤SHR的心率、左室内压峰值和左室内压最大变化速率(±dp/dt<sub>max</sub>),明显提高心肌ATPase活性,减少LDH漏出,提高心肌SOD活性,增加NO含量,降低MDA含量,增加心肌和肝脏MT含量,增加心肌HSP70阳性细胞百分数。结论 GSLs预适应对心肌I-R损伤具有保护作用,其作用机制与改善SHR心肌舒缩功能,改善心肌代谢,增强抗氧化活性和诱导内源性心肌保护物质的释放有关。

**关键词:** 皂苷类, 人参属; 心肌缺血; 心肌再灌注损伤; 大鼠, 自发性高血压; 预适应

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)01-0042-07

高血压合并冠心病是临床常见的病症之一,极易出现急性冠脉供血不足,导致心绞痛甚至猝死,而

溶栓和介入治疗是心肌梗死最重要的治疗措施。因此,心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I-R)损伤成为临床心血管研究越来越重视的问题。高血压病患者由于合并左心室肥厚及心肌纤维化等病理改变,导致心脏收缩和舒张功能减退,冠状动脉储备下降,心肌僵硬增加,其发生心肌I-R损伤的比例明显高于正常心肌。以往主要重视改善心肌肥厚和抗纤维化等方面的药物研究,而缺乏对高血压心肌I-R损伤药物防治的前瞻性研究<sup>[1-2]</sup>。近年来,有关心肌缺血预适应的机制研究在动物实验和临床上取得了显著进展。药理性预适应即通过用药物激发机体内源性保护物质,模拟缺血预适应的心脏保护作用,其不但为防治心肌I-R损伤提供了新途径,同时为具有适应原作用的中药防治心肌I-R损伤的研究展现了很好的前景<sup>[3-4]</sup>。传统补益中药人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)是适应原样中药的代表药物,人参茎叶皂苷(ginseng stem and leave saponin, GSLs)是人参的主要药物成分,与人参根总皂苷的成分基本相同,既往研究表明其具有减轻心肌I-R损伤等作用<sup>[5-6]</sup>,但对高血压病理状态的心脏预适应保护作用未见报道。本研究观察GSLs预适应对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)在体心脏心肌I-R损伤的保护作用及机制,以期寻找有效的防治高血压心肌I-R损伤药物提供理论和实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物、药品、试剂和仪器

成年SHR, SPF级, 体重200~250 g, 13周龄, 雌雄兼用。北京维通利华医学实验动物中心提供。合格证号004803。GSLs, 黄白色粉末, 味微苦, 总皂苷含量为90.2% (UV法测定), 购自吉林省抚松县大自然生物工程有限公司, 批号20050615。依那普利(enalapril)片, 扬子江药业有限公司生产。ATP

收稿日期: 2007-01-16 接受日期: 2007-09-10

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2004036492)

作者简介: 宋清(1965-), 女, 主治医师, 中医学博士, 研究方向为中草药与心脑血管疾病防治研究, Tel: (020)36585565; E-mail: Songqing168@hotmail.com

\*联系作者 E-mail: xiaowenzhang1@hotmail.com

Tel: (020)36588578 Fax: (020)36585092

酶、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(NO)含量检测试剂盒购自南京建成生物工程公司。牛血红蛋白购自Sigma公司,氯化镉由天津化学试剂厂生产。兔抗热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,即时SP免疫组化染色超敏试剂盒、DAB显色剂购于福州迈新生物技术开发公司。其余试剂均为市售分析纯。BL-420<sup>+</sup>生物机能实验系统,四川省成都泰盟科技有限公司产品;RM-6000型四道生理多导仪为日本光电公司产品。

## 1.2 分组与给药

SHR饲养于室温为20~24℃正常光照的SPF级动物室中,每笼6只,适应7d。实验前测量大鼠尾动脉收缩压在21.28~23.94 kPa为入选标准。将符合血压标准的40只SHR随机分为5组,假手术组、I-R模型组、依那普利1 mg·kg<sup>-1</sup>阳性对照组、GSLs 50和100 mg·kg<sup>-1</sup>组。给药组大鼠于I-R造模前每日1次灌胃给予GSLs和依那普利,连续3周,假手术组和I-R组相应给予等量生理盐水。

## 1.3 心肌缺血再灌注及心功能和心脏血流动力学指标测定

将大鼠用3%戊巴比妥钠(45 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉,背位固定。切开气管,插入气管套管,保持呼吸通畅。右侧颈总动脉插管并与压力换能器相连,经放大器测量外周动脉收缩压。标准II导程导联与生物电放大器相连,RM-6000型四道生理多导仪记录心电图。用心电R波触发AT-601G心率计测量心率,颈总动脉导管插到左心室测量左室内压,气管插管接呼吸机行正压人工呼吸(70 min<sup>-1</sup>)。右侧卧位固定,从左侧胸骨旁第3~4肋间开胸挤出心脏,在适当位置剪开心包膜一小口,暴露冠状动脉左前降支主干部位(左心耳与肺动脉圆锥之间,下方距离左心耳约0.6 mm处),用5个0线穿线做结扎准备。在动脉圆锥和左心耳交界处高位结扎左冠状动脉前降支后,将心脏放回原位,关闭胸腔<sup>[7]</sup>。I-R造模方法为冠脉结扎缺血40 min,再灌注30 min。用BL-420<sup>+</sup>生物机能实验系统分别记录实验前、缺血10,20,30,40 min和再灌注后10,20,30 min的心率、左室内压峰值(LVSP)、左室内压最大上升和下降速率( $\pm dp/dt_{max}$ )。假手术组的手术步骤相同,但只穿线而不结扎冠状动脉。断头处死大鼠,取心尖

以上缺血区横切2 mm厚心肌,固定、脱水、浸蜡、切片,用免疫组化SP法观察心肌细胞HSP70的表达。

## 1.4 生化指标测定

取心肌组织,按重量体积比加生理盐水制备10%组织匀浆,考马斯亮蓝法测定蛋白含量。比色法测定心肌LDH活性,邻苯三酚自氧化法测定SOD活性,硫代巴比妥酸法测定MDA含量,硝酸还原酶法测定NO活力,ATP酶活性测定所生成的无机磷(Pi)量,均参照南京建成生物工程公司检测试剂盒说明书进行操作。

## 1.5 金属硫蛋白(metallothionein, MT)含量测定

实验结束后取心肌和肝脏组织,以血红蛋白镉(Cd)饱和法测定MT含量<sup>[8]</sup>。称取组织1.0 g,加0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液4 mL,充分匀浆后,以17 000×g离心20 min。取上清液0.2 mL,加89 μmol·L<sup>-1</sup>镉溶液1.0 mL,0.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.0)2.2 mL,混匀后静置10 min,加红细胞溶血素0.2 mL,混匀后置100℃水浴3 min,然后以5000×g离心10 min,弃去沉淀物,重复2次加红细胞溶血素,上清移入带塞的试管中4℃保存待测。用石墨炉原子吸收分光光度计测定上清液中的Cd含量,按公式换算成MT含量:MT含量(μg·g<sup>-1</sup>组织)为9.08×上清液Cd含量(mg·L<sup>-1</sup>)。

## 1.6 热休克蛋白阳性细胞计数

取左心室缺血心肌组织,10%中性甲醛固定24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片。每只动物取1张石蜡切片,每组6张,常规脱蜡入水,进行HSP70免疫组织化学反应:①3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温封闭15 min, PBS 3 min×3次;②1%胰蛋白酶消化10 min, PBS 3 min×3次;③滴加正常山羊血清封闭液,室温30 min;④滴加HSP70单克隆抗体(1:100),37℃ 1 h;⑤生物素标记的二抗工作液37℃ 60 min, PBS 3 min×3次;⑥滴加辣根过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白工作液,37℃ 15 min; PBS 3 min×3次;⑦DAB显色,自来水冲洗,苏木素复染,脱水、透明、封片。阴性对照组用PBS代替一抗,其他步骤与实验组相同。光镜(40×10倍)下观察,每组6张切片,每张切片随机选择5个无重叠视野进行HSP70表达阳性细胞计数,计算每个视野的阳性细胞数平均值。细胞浆呈棕褐色为HSP70阳性表达<sup>[9]</sup>。

## 1.7 统计学处理

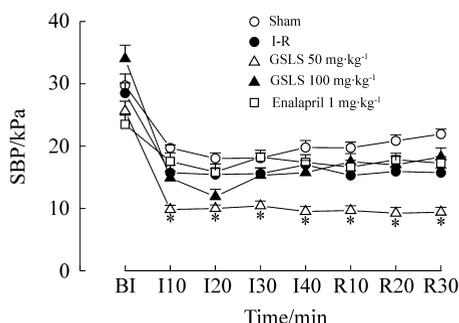
数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS11.0软件进行统计学处理。组内比较采用配对t检验,组间比较

采用单因素方差分析及 Dunnett *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 GSLS 预适应对 SHR 缺血再灌注时收缩压的影响

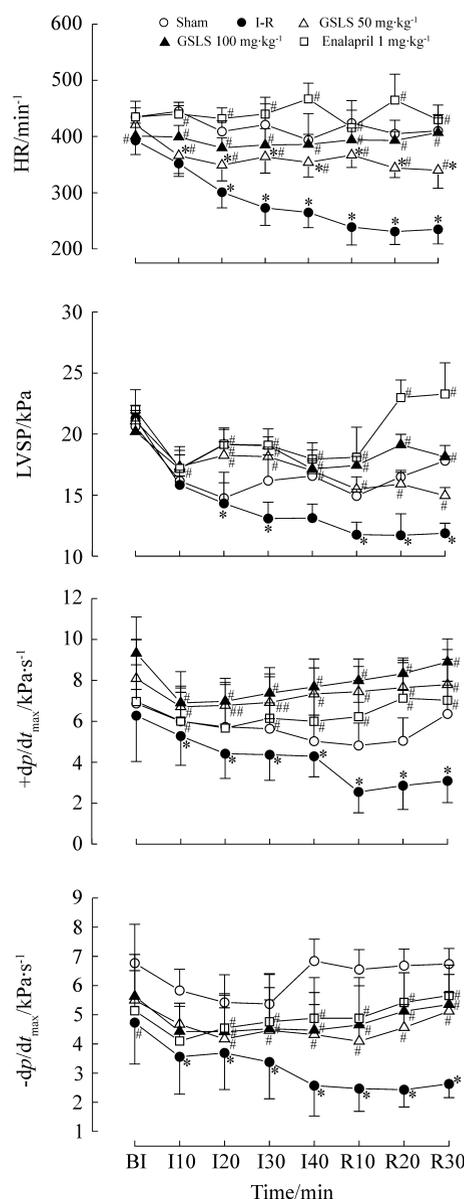
给药前, I-R 组、假手术组、GSLS 50, 100 mg · kg<sup>-1</sup>组和依那普利组 SHR 的收缩压分别为(26.1 ± 0.9), (25.2 ± 0.9), (26.2 ± 0.9), (26.4 ± 1.0)和(26.6 ± 1.1) kPa, 各组间无显著差异。灌胃给药3周, I-R 组和假手术组收缩压分别为(28.5 ± 2.7)和(29.7 ± 2.6) kPa, 与给药前相比明显升高, 表明 SHR 收缩压随年龄增长而逐渐升高, 而 GSLS 50 和 100 mg · kg<sup>-1</sup>组和依那普利组分别为(25.6 ± 2.5), (25.1 ± 2.1)和(23.5 ± 1.8) kPa, 与给药前比较未见明显升高。心肌缺血开始后, 各组收缩压均下降 6.5 ~ 15.0 kPa, 其中 GSLS 50 mg · kg<sup>-1</sup>组与假手术组比较血压下降更为显著, 但至再灌注末无显著变化(图 1)。



**Fig 1. Effects of pharmacological preconditioning with ginseng stem and leave saponin (GSLS) on systolic blood pressure (SBP) during myocardium ischemia and reperfusion in spontaneously hypertensive rats (SHR).** GSLS and enalapril were given ig, once daily for 3 weeks prior to myocardium 40 min ischemia and 30 min reperfusion (I-R). BI: before ischemia; I10, I20, I30 and I40: 10, 20, 30 and 40 min after ischemia; R10, R20 and R30: 10, 20 and 30 min after reperfusion.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$ , compared with sham group.

### 2.2 GSLS 预适应对 SHR 缺血再灌注心功能和血流动力学的影响

图 2 结果显示, I-R 组缺血后 20 min 心率开始下降, 至再灌注末较缺血前下降 40.2%, 明显低于假手术组。I-R 组心脏在缺血后 10 min LVSP 和  $\pm dp/dt_{max}$  开始下降, 缺血 40 min 时明显下降, 分别较缺血前下降 38.4%, 31.7% 和 24.5%, 再灌注后



**Fig 2. Effects of pharmacological preconditioning with GSLS on cardiac function and hemodynamics during myocardium I-R in SHR.** See Fig 1 for experimental protocol. HR: heart rate; LVSP: left ventricular systolic pressure;  $\pm dp/dt_{max}$ : maximal rate of rise and decline of ventricular pressure.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$ , compared with sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with I-R group.

10 min 时下降更明显, 再灌注 20 和 30 min 时稍有恢复, 但至再灌末只恢复至 I-R 前水平的 55.8%, 49.2% 和 55.6%, 表明再灌注后 SHR 心脏功能显著降低。GSLS 50 和 100 mg · kg<sup>-1</sup> 预适应均可使 I-R 心脏功能明显改善, 再灌末心率较 I-R 组分别增加 44.7% 和 73.2%; GSLS 组在缺血期间的血流动力学指标仅有较小幅度的降低, 缺血 40 min 时 50

mg·kg<sup>-1</sup>组 LVSP, + dp/dt<sub>max</sub> 和 - dp/dt<sub>max</sub> 分别为缺血前水平的 80.7%, 75.97% 和 78.55%, 100 mg·kg<sup>-1</sup>组分别为 84.8%, 82.3% 和 79.4%。复灌期间 GSLS 预适应组各项指标的恢复也均显著高于 I-R 组, 提示 GSLS 预适应组的保护作用显著。

### 2.3 GSLS 预适应对 SHR 缺血再灌注心肌 ATP 酶活性的影响

表 1 结果可见, I-R 组大鼠心肌组织 ATP 酶活性明显下降, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性较假手术组分别降低 57.4%, 51.0%, 64.1% 和 61.8%, 提示心肌 ATP 酶活性明显抑制。GSLS 50 和 100 mg·kg<sup>-1</sup> 预适应组 ATP 酶活性均明显提高, 与 I-R 组比较, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性分别增加 36.5% 和 92.0%, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性分别增加 43.2% 和 62.5%, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶和 Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性也呈现相同的升高趋势, 表明 GSLS 预适应能拮抗 I-R 引起的心肌 ATP 酶活性下降。

### 2.4 GSLS 预适应对 SHR 缺血再灌注心肌 LDH, SOD 活性和 MDA, NO 含量的影响

表 2 结果显示, 复灌末 I-R 组心肌 LDH 活性较假手术组增高 2.7 倍, 表明心肌严重受损; SOD 活性

下降 32.3%, MDA 含量升高 42.4%, 间接反映了氧自由基生成增加, NO 水平也降低 37.1%。GSLS 50 和 100 mg·kg<sup>-1</sup> 预适应组与 I-R 组比较, 心肌 LDH 活性明显降低, SOD 活性明显增高, MDA 含量明显减少, NO 水平显著升高, 均基本达到假手术组水平。表明 GSLS 预适应可以提高心肌抗氧化酶活性、减少脂质过氧化反应, 减轻心脏 I-R 损伤。

### 2.5 GSLS 预适应对 SHR 缺血再灌注金属硫蛋白含量的影响

图 3 结果显示, I-R 模型组 MT 含量与假手术组无显著差别。与 I-R 组比较, GSLS 50 和 100 mg·kg<sup>-1</sup> 预适应组大鼠心肌 MT 含量分别较 I-R 组增加 1.83 和 1.27 倍, 肝脏 MT 含量分别较 I-R 组增加 2.31 和 2.07 倍, 表明 GSLS 显著升高大鼠肝脏和心肌中的 MT 含量, 依那普利组肝脏和心肌中的 MT 含量也明显升高, 作用与 GSLS 50 mg·kg<sup>-1</sup> 相当。

### 2.6 GSLS 预适应对 SHR 缺血再灌注心肌 HSP70 表达的影响

采用免疫组化 SP 法检测心肌组织 HSP70 的表达, 光镜下可见, 假手术组和 I-R 组仅有少量阳性细胞。GSLS 预适应组和依那普利组心肌细胞 HSP70

**Tab 1. Effects of pharmacological preconditioning with GSLS on myocardium ATPase activities in I-R injured SHR**

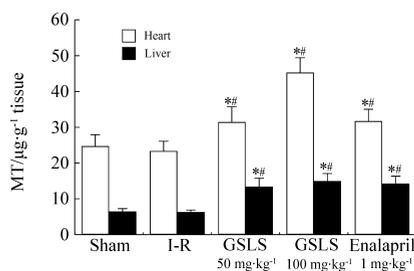
Group	ATPase/mmol Pi·h <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> protein			
	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> -ATPase	Mg <sup>2+</sup> -ATPase	Ca <sup>2+</sup> -ATPase
Sham	19.0 ± 7.2	17.3 ± 5.2	21.4 ± 3.9	18.6 ± 4.9
I-R	8.1 ± 1.1*	8.5 ± 4.4*	7.7 ± 13.5*	7.1 ± 2.6*
I-R + GSLS 50	11.0 ± 1.5 <sup>#</sup>	12.1 ± 2.4 <sup>#</sup>	20.4 ± 3.9 <sup>#</sup>	15.2 ± 5.0 <sup>#</sup>
I-R + GSLS 100	15.5 ± 4.0 <sup>#</sup>	13.8 ± 3.3 <sup>#</sup>	21.3 ± 3.7 <sup>#</sup>	15.5 ± 4.0 <sup>#</sup>
I-R + Enalapril 1	16.2 ± 4.1 <sup>#</sup>	17.6 ± 3.8 <sup>#</sup>	22.6 ± 4.0 <sup>#</sup>	15.5 ± 4.1 <sup>#</sup>

See Fig 1 for experimental protocol.  $\bar{x} \pm s$ , n = 8. \* P < 0.05, compared with sham group; <sup>#</sup> P < 0.05, compared with I-R group.

**Tab 2. Effects of pharmacological preconditioning with GSLS on activities of LDH and SOD, and contents of MDA and NO in I-R injured SHR myocardium**

Group	LDH/	SOD/	MDA/	NO/
	kU·g <sup>-1</sup> protein	kU·g <sup>-1</sup> protein	mmol·g <sup>-1</sup> protein	μmol·g <sup>-1</sup> protein
Sham	6.4 ± 2.4	187 ± 19	7.9 ± 2.7	61.96 ± 14.53
I-R	17.0 ± 2.7*	126 ± 12*	13.7 ± 4.9*	38.99 ± 10.12*
I-R + GSLS 50	6.7 ± 1.3 <sup>#</sup>	167 ± 15 <sup>#</sup>	8.5 ± 2.4 <sup>#</sup>	58.54 ± 11.03 <sup>#</sup>
I-R + GSLS 100	6.6 ± 1.0 <sup>#</sup>	177 ± 17 <sup>#</sup>	8.8 ± 1.2 <sup>#</sup>	62.32 ± 12.84 <sup>#</sup>
I-R + Enalapril 1	7.8 ± 1.1 <sup>#</sup>	182 ± 10 <sup>#</sup>	6.8 ± 1.4 <sup>#</sup>	59.50 ± 9.86 <sup>#</sup>

See Fig 1 for experimental protocol. LDH: lactate dehydrogenase; SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde; NO: nitric oxide.  $\bar{x} \pm s$ , n = 8. \* P < 0.05, compared with sham group; <sup>#</sup> P < 0.05, compared with I-R group.



**Fig 3. Effects of pharmacological preconditioning with GSLS on metallothionein (MT) contents of myocardium and liver of I-R injured SHR.** See Fig 1 for experimental protocol.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$ , compared with sham group; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , compared with corresponding I-R group.

在胞浆中均有成片表达,呈棕褐色反应,胞核不染。但各组 HSP70 表达强度不一, GSLS 50 和 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 HSP70 阳性细胞数分别为每个视野  $7.4 \pm 1.1$  ( $n = 30$ ) 和  $6.7 \pm 1.3$  ( $n = 30$ ), 依那普利组为每个视野  $3.5 \pm 0.7$  ( $n = 30$ ), 表明 GSLS 预适应明显增强心肌 HSP70 表达(图 4)。

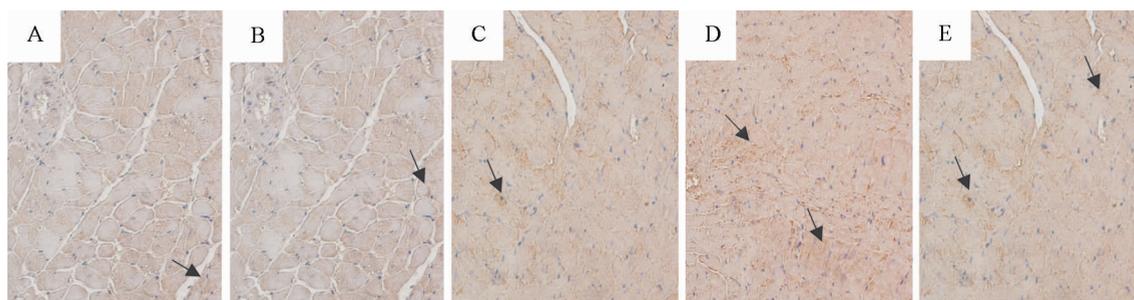
### 3 讨论

研究证实,高血压患者普遍存在冠脉舒张功能障碍,心肌发生代偿性肥大以及纤维化等病理状况,比正常心肌更容易发生 I-R 性损伤。许多抗高血压药如血管紧张素转换酶抑制剂除了降压效应外,还具有药理预适应性心脏保护作用。本研究采用 GSLS 进行药理性预适应,对心肌缺血和再灌注期的心功能重要指标心率、LVSP 和  $\pm dp/dt_{\max}$  都有显著改善,证实 GSLS 预适应能够提高心脏的舒缩功能,促进心脏血流动力学指标的恢复,对心肌 I-R 损伤有保护作用。文献报道 GSLS 主要含有 GS-Rb2, -Rc, -Rd, -Re,

-Rg2 和 -Rf 等 6 种人参皂苷,且人参茎叶比人参根的人参总皂苷含量更高<sup>[6]</sup>,本研究为阐明 GSLS 预适应的心脏保护作用提供了实验依据。

I-R 损伤的表现有心功能受损、心肌酶漏出、氧自由基增多和钙超载等。以往研究报道, GSLS 对心脏 I-R 损伤的保护可能主要作用于心脏而非外周血管,使冠脉血流量增加,心肌收缩力增加而耗氧量下降,并调节正常体循环血压,增加心脏舒缩功能,改善心肌 I-R 时心脏血流动力学障碍,利于缺血心脏维持和恢复正常泵血功能<sup>[7-8]</sup>。本研究中 GSLS 药理预适应后不仅明显减少 I-R 损伤心肌 LDH 漏出量、增加心肌  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶等酶的活性、逆转心肌细胞异常代谢、改善心肌能量代谢及减轻心肌细胞钙超载,而且升高 NO, MT 和 HSP70 等物质的水平,表明 GSLS 除了直接修复受损心肌细胞外,还促进内源性心肌保护物质的释放而发挥减轻心肌 I-R 损伤的作用。

缺血预适应对心肌的保护作用根据发生时间规律表现为早期预适应和延迟期预适应两个时相<sup>[9]</sup>,早期预适应为 I-R 后数分钟至 2~3 h 出现的保护作用,而延迟期预适应的保护作用出现在 I-R 后 12~24 h,并持续到 72 h。研究表明,缺血预适应通过缺血刺激诱发心脏合成并释放大量的内源性心肌保护物质,作用于心肌细胞表面的特异性受体,激活细胞内信号转导通路,从而发挥心肌保护作用。目前一般认为缺血预适应细胞内信号转导通路的机制涉及细胞内触发因子、中介因子和效应子三个环节,其中腺苷、缓激肽、阿片肽、前列腺素、NO 和自由基等参与预适应的早期触发环节,中介环节包括蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、丝裂素活化蛋白激酶等酶的激活,活化后的 PKC 自细胞浆转移



**Fig 4. Effects of pharmacological preconditioning with GSLS on heat shock protein 70 expression in myocardium of I-R injured SHR ( $\times 400$ ).** See Fig 1 for experimental protocol. Arrows show positive expression for heat shock protein 70. A: sham group; B: I-R group; C: GSLS 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; D: GSLS 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; E: enalapril 1  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

至线粒体膜上,最终诱发开放 ATP 敏感性钾通道 ( $K_{ATP}$ 通道),HSP 和 MT 等效应子的生成<sup>[10-11]</sup>。本研究中 GSLS 明显增加 SHR 心肌 NO 含量,提高 SOD 活性,降低 MDA 含量,增加心肌 HSP70 表达和 MT 含量,根据上述变化推测其可能通过影响类似缺血预适应的不同环节而表现出对心肌的早期保护作用,但尚未知其是否具有延迟期预适应作用。文献报道,外源性应用 NO 及促进内源性 NO 释放均能模拟预适应的延迟心肌保护效应<sup>[12]</sup>,而在药理性预适应保护效应中,NO 作为诱因触发预适应因子在高血压条件下起着重要代偿作用,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)-NO 途径在血压处于较高水平时可被激活并开放线粒体  $K_{ATP}$ 通道、核转录因子(NF- $\kappa$ B)的活化等关键环节,iNOS-NO 同时也是参与血流动力学调控的一个重要组成部分<sup>[13]</sup>,本研究中 GSLS 药理预适应可明显升高大鼠心肌组织 NO 含量,这可能是其在高血压条件下发挥预适应作用而保护 I-R 损伤心肌的机制之一。

HSP70 具有“分子伴侣”的作用,可结合于新生多肽或蛋白质,使受损蛋白质解聚,重新折叠成生物活性蛋白。MT 是存在于心肌和肝脏的可诱导内源性保护蛋白,具有清除羟自由基、稳定细胞膜、调节细胞  $Ca^{2+}$  稳态、参与心肌细胞修复等效应,在心肌 I-R 损伤中具有保护作用,这些效应分子的表达增加被认为是预适应保护的重要物质基础<sup>[14-18]</sup>。

本研究证实,GSLS 药理性预适应可提高 SHR 心肌 I-R 时 SOD 活性,抑制 MDA 生成,减轻细胞脂质过氧化反应;同时心肌细胞内 HSP70 表达增加,肝脏和心肌 MT 含量升高,表明 GSLS 预适应增加内源性保护蛋白的产生是其减轻 I-R 致心肌损伤的重要机制之一。

#### 4 参考文献:

- [1] Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, et al. The heart in hypertension [J]. *N Engl J Med*, 1992, **327**(14):998-1008.
- [2] Forman MB, Virmani R, Puett DW. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury [J]. *Circulation*, 1990, **81**(3 Suppl):IV69-IV78.
- [3] Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005, **29**(2):106-115.
- [4] Arrell DK, Elliott ST, Kane LA, Guo Y, Ko YH, Pedersen PL, et al. Proteomic analysis of pharmacological preconditioning: novel protein targets converge to mitochondrial metabolism pathways [J]. *Circ Res*, 2006, **99**(7):706-714.
- [5] Li YJ, Deng HW, Chen X. The protective effect of ginsenosides and its components on myocytes anoxia/reoxygenation and myocardial reperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin*(药理学学报), 1987, **22**(1):1-5.
- [6] Li XZ, Liu JX, Shang XH, Fu JH. Comparative study on the protective effects of ginsenosides extracts from different parts of *Ginseng* on acute myocardial ischemia in dogs [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2006, **17**(2):83-86.
- [7] Zhang JM, Chen LB, Zhao HX, Wang Y, Tong L. Effects of ginsenosides on myocardial ischemia and reperfusion injury and concentration-effect relationship [J]. *J Jilin Univ: Med Ed*(吉林大学学报:医学版), 1998, **24**(3):254-256.
- [8] Lou JS, Bai FJ, Tian XY, Jiang XR. The effect of ginsenoside in root and leaves on cardiac function in rats [J]. *J Tianjin Med Univ*(天津医科大学学报), 2001, **7**(4):488-491.
- [9] Zhou X, Zhai X, Ashraf M. Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes [J]. *Circulation*, 1996, **93**(6):1177-1184.
- [10] Lepicier P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D. Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, **102**(2):155-166.
- [11] Song QJ, Li JY. Ischemic preconditioning: present situation and future prospects [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2000, **14**(1):1-7.
- [12] Cao ZL, Yang TS, Long CL, Wang H. Advances in study of endogenous protective mechanisms of cardiac ischemia/reperfusion injuries [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2006, **22**(8):912-916.
- [13] Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Yang WW, Yang HT, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury [J]. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 2005, **26**(3):315-322.
- [14] Petrishchev NN, Shliakhto EV, Tsyrlin VA, Vlasov TD, Syrenskii AV, Galagudza MM. The role of oxygen free radicals in the mechanisms of local and distant ischemic myocardial preconditioning [J]. *Vestn Ross Akad*

- Med Nauk*, 2006, (8):10–15.
- [15] Gauthaman K, Banerjee SK, Dinda AK, Ghosh CC, Maulik SK. *Terminalia arjuna* (Roxb.) protects rabbit heart against ischemic-reperfusion injury: role of antioxidant enzymes and heat shock protein[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96(3):403–409.
- [16] Kim HP, Morse D, Choi AM. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, 10(5):759–769.
- [17] Chen K, Zhang JH, Ye C, Liu XH, Pang YZ, Chen J, *et al.* Metallothionein involvement in the delayed protection after ischemic or anoxic preconditioning in myocardium or cultured cardiomyocytes[J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1997, 77(2):106–110.
- [18] Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, *et al.* STAT<sub>3</sub> mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(2):428–435.

## Protective effects of preconditioning with ginseng stem and leave saponin against myocardium ischemia and reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats

SONG Qing<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-Wen<sup>1\*</sup>, XU Zhi-Wei<sup>1</sup>, CHEN Jian-Wen<sup>2</sup>, TANG Fu-Tian<sup>2</sup>

(1. Department of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510000, China)

**Abstract: AIM** To investigate the cardioprotective effects of pharmacological preconditioning with ginseng stem and leave saponin (GSLs) against myocardium ischemia and reperfusion (I-R) injury in spontaneously hypertensive rats (SHR) and its possible mechanisms. **METHODS** The SHR were subjected to 40 min ischemia followed by 30 min reperfusion, pharmacological preconditioning groups were administered GSLs 50 or 100 mg·kg<sup>-1</sup> for 3 weeks before I-R. The blood pressure, heart rate and parameters of cardiac function and the hemodynamics involving left ventricular systolic pressure (LVSP) and  $\pm dp/dt_{\max}$  were recorded continuously through the process of I-R. The activities of ATPase, lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), and also contents of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) in myocardium were determined by biochemistry methods. The metallothionein (MT) content in liver and myocardium was detected, the expression of heat shock protein 70 (HSP70) in myocardium was measured by immunohistochemistry method. **RESULTS**

Compared with I-R model group, GSLs preconditioning group significantly improved heart rate, LVSP and  $\pm dp/dt_{\max}$  in SHR hearts. Furthermore, the activities of ATPase and SOD increased, the release of LDH reduced, and the content of NO increased, while the MDA content decreased in myocardium. The contents of MT in liver and myocardium enhanced and the expression of HSP70 in myocardium increased. **CONCLUSION** Preconditioning with GSLs has protective effects on I-R injured myocardium in SHR, which may be related to improving the systolic and diastolic function and hemodynamics indexes, promoting antioxidization capacity, and inducing increment of endogenous protective protein MT and HSP70.

**Key words:** saponins, *Panax*; myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; rats, inbred SHR; preconditioning

**Foundation item:** The project supported by China Postdoctoral Sciences Foundation (2004036492)

\* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)