

人参总皂苷对野百合碱诱导的大鼠右室肥厚及 ERK 通路的影响

秦 娜 魏立伟

(河南省洛阳正骨医院, 洛阳, 471000)

摘要 目的:观察人参总皂苷(Total Ginsenosides, TG)对野百合碱(Monocrotaline, MCT)所致大鼠右室肥厚的影响并探讨其与细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路的关系。方法:雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组, MCT 模型组, TG 20 mg/(kg · d)、40 mg/(kg · d)、60 mg/(kg · d) 剂量组, 各组动物均给药 18 d。测定各组大鼠的右室肥厚指数(RVHI)、右心重/体重(RVW/BW);透射电镜观察心肌细胞超微结构的改变;Real time RT-PCR 检测心肌组织 ERK1mRNA 的表达, Western blotting 检测心肌组 MKP-1 蛋白质的表达。结果: TG 预防给药均使 RVHI、RV/BW 表达明显降低, 改善超微结构损伤, 降低心肌组织 ERK1mRNA 和提高 MKP-1 蛋白质的表达。结论: TG 能明显改善 MCT 诱导的大鼠右心室肥厚, 其抗心肌肥厚作用至少与抑制 ERK1 信号转导通路有关。

关键词 人参总皂苷; 右室肥厚; 细胞外信号调节激酶; 丝裂素活化蛋白激酶磷酸酶-1

Effects of Total Ginsenosides on Monocrotaline-induced Cardiac Hypertrophy and ERK Signaling Pathway in Rats

Qin Na, Wei Liwei

(Luoyang Orthopedics Traumatological Hospital, Luoyang 471000, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibition of total ginsenosides (TG) on right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline (MCT) and explore the effects of TG on extracellular-regulated kinase (ERK) signal transduction in rat. **Methods:** Male Sprague Dawley rats were randomly divided into the normal group, MCT group and 20 mg/(kg · d), 40 mg/(kg · d), 60 mg/(kg · d) dose TG treatment group. Ventricular hypertrophy index (RVHI) was measured by the weight ratio of RV to left ventricle plus septum, and by observing the ultrastructural changes of myocardial cell with transmission electron microscope. The ERK1 mRNA and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) protein expression of right ventricle tissue were detected by real-time RT-PCR, Western blotting. **Results:** TG treatment could significantly reduce RVHI, RVW/BW. The swollen and misshapen mitochondria could be improved by TG. TG also could down-regulate ERK1 mRNA expression and enhance MKP-1 protein expression. **Conclusion:** TG could significantly attenuate MCT-induced cardiac hypertrophy in rat by suppressing ERK Signaling pathway.

Key Words Total ginsenosides; Right ventricular hypertrophy; Extracellular-regulated kinase; Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.04.023

心肌肥厚是心肌对多种心血管刺激的适应性反应, 早期有一定代偿意义。但长期的心肌肥厚将发展为心力衰竭、心律失常和猝死^[1]。右室肥厚、右心力衰竭是肺动脉高压死亡的主要原因^[2]。因此, 逆转右室肥厚是提高患者生存率和生存质量的重要环节。

人参主要活性物质人参皂苷有阻滞钙离子通道^[3-4]、抗血管平滑肌细胞增殖^[5-6]、调节一氧化氮(Nitric Oxide, NO)的释放^[7-8]等作用。我们以前的研究表明, 人参皂苷 Rb1 和 Rg1 能显著对抗大鼠心肌肥厚的作用, 其机制可能与抑制钙调神经磷酸酶和丝裂素活化蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK)信号通路有关^[9-10], 人参总皂苷的各单体间结构相似, 推测若干成分可能具有类似单体

的抗心肌肥厚作用, 而且人参总皂苷相对便宜, 来源丰富, 更易于开发利用, 本研究拟探讨人参总皂苷(Total Ginsenosides, TG)对 MCT 诱导的大鼠右心室肥厚作用, 为传统中药人参的开发利用提供基础药理学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD (Sprague - Dawley) 大鼠, 清洁级, 体重(200 ± 20) g。由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供(许可证号: SCXK20020003)。

1.1.2 试剂与材料 TG 由北京天然药物研究院赵锐教授惠赠(用 JTY-300 型反相制备色谱固定相分离, 纯度 > 93%)。MCT(批号: 106K1602, 美国 Sig-

ma 公司);ERK1、 β -actin 和逆转录试剂盒由大连宝生物工程有限公司;SYBR® GREEN PCRMaster Mix(ABI 公司)。

1.1.3 实验仪器 实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);逆转录(仪德国 Eppendorf 公司), Model 550 型酶标仪(美国 BIO-Tek 公司);Icycler 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)

1.2 实验方法

1.2.1 MCT 模型制备及实验分组 实验大鼠随机分成正常组对照、MCT 模型组、TG 低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常对照组外其他各组单次腹腔注射(i.p.)2% MCT 60 mg/kg,24 h 后 TG 低、中、高剂量组分别腹腔注射 TG 20 mg/(kg·d)、40 mg/(kg·d)、60 mg/(kg·d),给药共 18 d。

1.2.2 右室肥厚指数测定 称右室(RV)和左室及室间隔(LV+S)的重量,计算右心肥厚指数,即 RVHI = RV/(LV+S)以及 RV/BW。

1.2.3 右心肌组织超微结构的观察 取新鲜右心室组织约 1 mm³,电镜液中固定,环氧树脂包埋,铀铅双染色,超薄(600A)切片,日立 H-600 型透射电镜观察各组标本细胞核、细胞器、线粒体等超微结构的变化。

1.2.4 Real-Time RT-PCR 检测心肌组织 ERK1mRNA 的表达 右心肌组织总 RNA 的提取及逆转录操作按试剂盒说明进行。以 PCR 仪逆转录后,RT-PCR 仪进行扩增。 β -actin 引物:正向 5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3',反向 5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3',扩增产物长度 104 bp, ERK1 引物正向 5'-GTTCCCAAACGCT-GACTCAA-3',反向 5'-GTAAGTCGTCCAGCTCCA

TGTCAA-3',扩增产物长度 182 bp,PCR 反应条件:95℃,10 min 进入循环;95℃,15 s,60℃,1 min,循环 45 次。以 β -actin 为内参,用相对定量法计算 ERK1 mRNA 的表达水平。以循环阈值(Ct 值)为统计参数,用目的基因表达/ β -actin 基因表达对 ERK1 mRNA 进行相对定量。

1.2.5 Western blotting 检测心肌组织中 MKP-1 蛋白表达 右心室组织约 100 mg 经 T-PER™蛋白提取混合液处理后,取上清液用 Bradford 蛋白浓度检测试剂盒进行蛋白定量。以 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电压 36 V,3 h 电转。封闭、分别加 MKP-1 一抗(1:400)及内参 anti- β -actin(1:2 000),孵育 2 h;二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,孵育 1 h 后通过 BCIP/NBT 进行显色,采用 Syn-

gene 凝胶成像系统分析。

1.2.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行 ANOVA 或 *t* 检验进行统计学处理,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态的变化 正常对照组在用药前后一般状态无明显差异,BW18 d 较前增加了 36%,MCT 模型组大鼠在腹腔注射 MCT 7 d 出现活动明显减少,毛发直立,口唇发绀,呼吸急促,食欲下降。18 d 处死开胸,可见肺表面凹凸不平,弹性差,并可见灶性瘀血;BW 较前增加了 2%,TG 各预防给药组一般状态较 MCT 模型组明显好转(见图 1)。

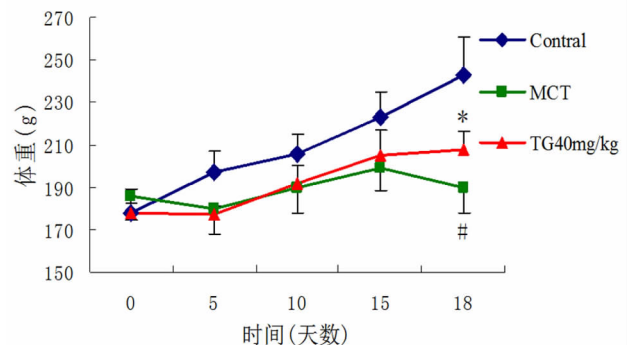


图 1 TG40 mg/kg 预防给药对大鼠体重的影响

(vs Control * $P < 0.05$, vs Model * $P < 0.05$)

2.2 TG 对右心室肥厚指数的影响 与空白对照组比较,MCT 模型组在腹腔注射 MCT18 d RVHI、RVW/BW 分别增加了 30%、44%,TG 各预防给药组与 MCT 模型组比较,上述指标明显降低($P < 0.01$),但 TG 各剂量组之间无统计学意义。(见表 1)

表 1 TG 预防给药对野百合碱诱导心肌肥厚大鼠肥厚指标的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	RVHI	RVW/BW
对照组	0.251 ± 0.016	0.459 ± 0.021
MCT 组	0.327 ± 0.032 ^{##}	0.632 ± 0.037 ^{##}
MCT + TG 20 mg/kg	0.274 ± 0.011 ^{**}	0.491 ± 0.010 ^{**}
MCT + TG 40 mg/kg	0.269 ± 0.013 ^{**}	0.476 ± 0.009 ^{**}
MCT + TG 60 mg/kg	0.254 ± 0.013 ^{**}	0.455 ± 0.011 ^{**}

注:与对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与 MCT 组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 TG 对心肌肥厚大鼠心肌超微结构的影响 正常大鼠的超微结构无异常表现(C),MCT 模型组大鼠心肌组织出现闰盘中断,肌丝稀疏,灶性溶解,并出现空白水肿,收缩带形成;线粒体增生,肿胀变形,嵴排列紊乱、溶解,巨线粒体形成;细胞核增大,核周间隙增宽,核仁增多(M)。TG40、60 mg/(kg·d)预防给药 18 d 上述变化明显改善,肌丝排列尚可,线

粒体轻度肥大,基质水肿不明显,未见闰盘中断和空白水肿,但线粒体仍然明显增生(M^{''}、H)。(见图2)

2.4 Real time RT-PCR 检测 ERK1mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示,正常对照组大鼠 RV 中 ERK1mRNA 表达较低。MCT 促进 ERK1mRNA 的表达明显增加,与正常对照组比较,ERK1mRNA 增加了 2.6 倍($P < 0.01$)。TG 预防给药均明显抑制 ERK1mRNA 的表达,与 MCT 模型组比较,TG 20 mg/kg 使 ERK1mRNA 的表达减少 29.3% ($P < 0.01$),各剂量组间差异无统计学意义。(见图3)

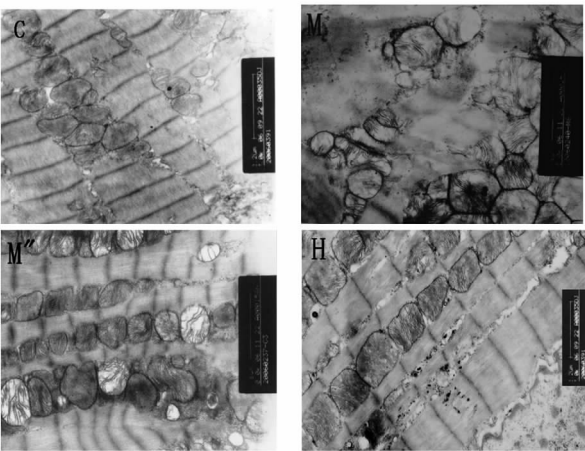


图2 TG 预防给药对心肌细胞超微结构的影响

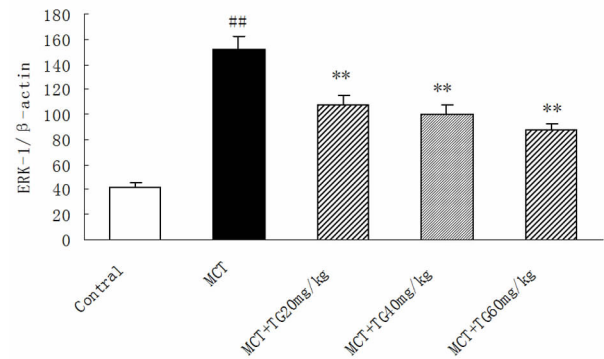


图3 TG 预防给药对 MCT 诱导心肌肥厚大鼠 RV 中 ERK1mRNA 表达的影响 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

2.5 TG 预防给药对 MCT 诱导心肌肥厚大鼠 RV 中 MKP-1 蛋白质的影响 Western blotting 实验结果表明,与正常对照组比较,MCT 模型组 MKP-1 蛋白的表达稍有增高,TG 预防给药能使提高 MKP-1 蛋白的表达,与 MCT 模型组比较,低、中、高剂量组分别增加了 11%、81%、190%,但仅有中、高剂量组差异有统计学意义($P < 0.01$)。(见图4、图5)

3 讨论

目前,心肌肥厚发展为心力衰竭在各种心血管病症中死亡率占居首位^[11]。故对其预防和治疗的研究

研究显得尤为重要。本实验利用大鼠 MCT 右室肥厚模型,观察了 TG 对心肌肥厚的作用并分析其可能的作用机制。

MCT 右室肥厚模型被广泛用于非原发于心脏的右心室肥厚和心力衰竭研究^[12]。本实验结果表明,大鼠在单次腹腔注射 MCT 18 d 后,RVHI、RVW/BW 均明显高于正常对照组,说明 MCT 右室肥厚的模型制备成功,TG 预防给药组能明显减轻上述指标的增高,其中,由于模型组给药前后 BW 无差别甚至略低,与相应正常对照组比较明显偏轻,RV/BW 可能因模型组体重减轻而产生一定的非特异效应,但 RVHI 的明显升高强烈提示 RVH 的发生。单从检测指标上看,TG 高剂量给药组比低剂量效果更为明显,然统计学分析表明,各剂量组间无明显差异。另外,心肌组织透射电镜结果显示模型组心肌组织出现了心肌肥厚的病理改变,而 TG 能明显改善 MCT 所引起的心肌超微结构的损伤,提示 TG 对右室的心肌线粒体具有保护作用。以上结果提示 TG 具有减轻 MCT 引起心肌肥厚的作用。

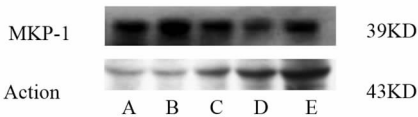


图4 Western blot 检测各组大鼠右心室 MKP-1 蛋白质表达

注:A 为正常对照组,B 为模型组,C 为 TG 低剂量组,D 为 TG 中剂量组,E 为 TG 高剂量组

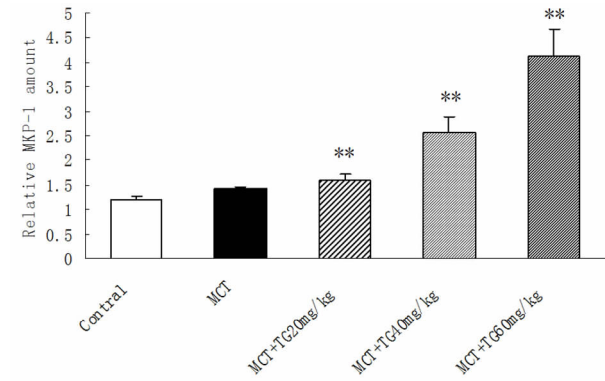


图5 TG 对野百合碱诱导大鼠右心室 MKP-1 蛋白质表达变化的影响 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

结合以上实验结果,本研究进一步探讨了 TG 预防心肌肥厚可能的作用机制。MAPK 是调节心肌肥厚的重要信号通路,被认为是多种细胞外信号引起细胞增生、肥大的细胞内信息传递的汇聚点或共同通路,MAPK 其成员 ERKs 与细胞生长、分化和增殖的调控关系最为密切,参与多种刺激引起的心肌肥大^[13]。活化的 MAPK 主要因被其磷酸酶去磷酸

化而失活,在心肌细胞, MKP-1 是重要的 MAPK 磷酸酶,对 MAPK 的活性调节具有重要意义^[14]。另有研究表明,许多人参皂苷单体(Rb1、Rc、Re、Rg1、Rg3)均能降低 TPA 诱导的 ERK1/2 的激活,降低 ERK1/2 蛋白表达水平^[15-16]。本研究发现, MCT 模型组 ERK1mRNA 水平表达显著增高, MKP-1 蛋白水平稍有增高,与正常对照组比较无统计学意义, TG 低、中、高预防给药都能降低 ERK1mRNA 的表达,同时提高 MKP-1 蛋白表达水平,从而增加对 ERK1 的灭活,延缓心肌肥厚的发展进程。需要指出的是, TG 对 ERK1mRNA 表达的影响各个剂量组之间差异无统计学意义,但对 MKP-1 蛋白水平的影响各个剂量组之间差异有统计学意义,能剂量依赖性提高蛋白的表达,其原因可能是本实验所用 ERK1 的引物不是针对其活性部分的;机体对 ERK1 活性的调节发生在蛋白水平。TG 抗心肌肥厚的作用至少与调控 MAPK 信号通路有关。

心肌肥厚的发生发展是一个多因素参与的复杂的病理生理过程, TG 抗心肌肥厚的作用除影响 MAPK 信号通路外,还可能与其他信号通路有关,值得进一步研究。

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] Voswinckel R, Hoepfer MM, Kramm T, et al. Right heart failure in chronic pulmonary hypertension and acute pulmonary embolism [J]. Internist (Berl), 2012, 53(5): 545-556.
- [3] Zhong GG, Sun CW, Li YY, et al. Calcium channel blockade and anti-free-radical actions of panaxadiol saponins Rb1, Rb2, Rb3, Rc, and Rd [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1995, 16(3): 255-260.
- [4] Jiang Y, Liu W, Wang XM, et al. Calcium channel blockade and anti-free-radical actions of panaxatriol saponins in cultured myocytes [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1996, 17(2): 138-141.
- [5] Zhang S, Deng J, Gao Y, et al. Ginsenoside Rb₁ inhibits the carotid neointimal hyperplasia induced by balloon injury in rats via suppressing the phenotype modulation of vascular smooth muscle cells [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 685(1-3): 126-132.
- [6] Huang J, Li LS, Yang DL, et al. Inhibitory Effect of Ginsenoside Rg1 on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by PDGF-BB Is Involved in Nitric Oxide Formation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 314-395.
- [7] Ahn HY, Hong SY, Kim JY, et al. Panax ginseng extract rich in ginsenoside protopanaxatriol offers combinatorial effects in nitric oxide production via multiple signaling pathways [J]. Springerplus, 2013, 2(1): 96.
- [8] J Yu, M Eto, M Akishita, et al. Signaling pathway of nitric oxide production induced by ginsenoside Rb1 in human aortic endothelial cells: a possible involvement of androgen receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(3): 764-769.
- [9] Jiang QS, Huang XN, Yang GZ, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 on calcineurin signal pathway in cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F2 [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2007, 28(8): 1149-1154.
- [10] Deng J, Lv XT, Wu Q, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits rat left ventricular hypertrophy induced by abdominal aorta coarctation: Involvement of calcineurin and mitogen-activated protein kinase signalings [J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 608(1-3): 42-47.
- [11] Blozik E, Eisele M, Scherer M. Improvements in survival in patients with heart failure [J]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2012, 55(4): 552-557.
- [12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1030-1032.
- [13] Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death [J]. CircRes, 2002, 91(9): 776-781.
- [14] Fuller S J, Davies E L, Gillespie B J, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac cardiomyocytes [J]. Biochem J, 1997, 323(Pt 2): 313-319.
- [15] Surh YJ, Lee JY, Choi KJ, et al. Effects of selected ginsenosides on phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 and activation of NF- κ B and ERK1/2 in mouse skin [J]. Ann. N. Y. Acad. Sci, 2002, 973: 396-401.
- [16] Jung SH, Woo MS, Kim SY, et al. Ginseng saponin metabolite suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression through inhibition of activator protein-1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human astrogloma cells [J]. Cancer, 2006, 118(2): 490-497.

(2014-04-24 收稿 责任编辑: 王明)