

## • 药理与临床 •

## 黄芪甲苷和三七的主要有效成分伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响

黄小平, 王 蓓, 邱咏园, 唐映红, 曾 嵘, 邓常清\*

湖南中医药大学 分子病理实验室, 湖南省中西医结合心脑血管疾病重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 湖南长沙 410208

**摘要:** 目的 研究黄芪甲苷和三七的主要有效成分人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 分别伍对小鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织能量代谢的影响。方法 C57BL/6 小鼠随机分组, 连续给药 3 d, 末次给药 1 h 后, 结扎双侧颈总动脉造成脑缺血 20 min, 再灌注 24 h。采用 HPLC 法测定脑组织 ATP、ADP、AMP 水平, 计算能荷 (EC) 值; 采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法和 Western-blotting 法测定脑组织葡萄糖转运蛋白 3 (GLUT3) 基因和蛋白表达。结果 模型组脑组织 ATP、ADP、AMP 的量及 EC 值显著降低 ( $P < 0.01$ ), GLUT3 基因和蛋白表达显著增强 ( $P < 0.05$ )。黄芪甲苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 均可显著增加脑组织 ATP、ADP、AMP 的量, 增强脑组织 GLUT3 基因和蛋白表达, 黄芪甲苷+人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 改善上述指标的作用强于其单个有效成分; 除 4 个有效成分单用外, 黄芪甲苷+人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 可显著增加 EC 值; 黄芪甲苷+人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 伍对改善脑组织能量代谢指标具有协同或相加作用。结论 黄芪甲苷和三七的主要有效成分可改善脑缺血再灌注损伤后脑组织能量代谢, 促进缺血脑组织对能量物质的利用, 黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 伍对改善脑缺血后脑组织能量代谢具有增效作用。

**关键词:** 黄芪甲苷; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 伍; 脑缺血; 能量代谢; 葡萄糖转运蛋白 3

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)02-0220-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.013

## Effects of astragaloside IV with active components in *Panax notoginseng* on energy metabolism in brain tissues after cerebral ischemic-reperfusion in mice

HUANG Xiao-ping, WANG Bei, QIU Yong-yuan, TANG Ying-hong, ZENG Rong, DENG Chang-qing

Molecular Pathology Laboratory, Key Laboratory of Hunan Province for Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardio-Cerebral Diseases, Key Laboratory of Hunan Universities for Cell Biology and Molecular Techniques, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of astragaloside IV respectively combined with the effective components of *Panax notoginseng* such as ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, and notoginsenoside R<sub>1</sub> on energy metabolism of brain tissues after cerebral ischemic-reperfusion in mice. **Methods** C57BL/6 mice were randomly grouped and treated for 3 d. After 1 h of the last

收稿日期: 2013-06-13

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81102557); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20104323110001); 湖南省高校创新平台开放基金资助项目 (11K050); 湖南省中医药管理局重点项目 (201301); 湖南省教育厅项目 (11C0963); “中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究”湖南省高校科技创新团队; “中医药防治心脑血管疾病基础研究”湖南省自然科学创新群体基金支持计划项目

**作者简介:** 黄小平 (1974—), 女, 硕士, 副教授, 主要研究方向为心脑血管疾病的防治和中药有效组 (成) 分配伍研究。

Tel: (0731)88458201 15116487737 E-mail: jialeliu@hotmail.com

**\*通信作者** 邓常清 (1963—), 男, 博士, 博士生导师, 教授, 主要研究方向为心脑血管疾病的防治和中药有效组 (成) 分配伍研究。

Tel: (0731)88458258 E-mail: dchangq@sohu.com

administration, cerebral ischemia-reperfusion injury was established by bilateral common carotid artery (CCA) ligation for 20 min followed by reperfusion for 24 h. The contents of ATP, ADP, and AMP were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the level of energy charge (EC) was calculated. The expression of glucose transporter 3 (GLUT3) gene and protein in brain tissues was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blotting. **Results** In the model group, the contents of ATP, ADP, and AMP and the level of EC were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression of GLUT3 protein was significantly up-regulated in brain tissues ( $P < 0.05$ ). Astragaloside IV, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, notoginsenoside R<sub>1</sub>, astragaloside IV + ginsenoside Rg<sub>1</sub>, astragaloside IV + ginsenoside Rb<sub>1</sub>, and astragaloside IV + notoginsenoside R<sub>1</sub> could obviously increase the contents of ATP, ADP, and AMP and strengthen the expression of GLUT3 gene and protein. The effects of astragaloside IV + ginsenoside Rg<sub>1</sub>, astragaloside IV + ginsenoside Rb<sub>1</sub>, and astragaloside IV + notoginsenoside R<sub>1</sub> were better than those of the active components alone; Except four active components alone, EC level was obviously increased in astragaloside IV + ginsenoside Rg<sub>1</sub>, astragaloside IV + ginsenoside Rb<sub>1</sub>, and astragaloside IV + notoginsenoside R<sub>1</sub> groups; astragaloside IV respectively combined with ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, and notoginsenoside R<sub>1</sub> had the synergistic or additive effects on improving the indexes of energy metabolism in brain tissues. **Conclusion** Astragaloside IV and the main active components of *P. notoginseng* could improve the energy metabolism in brain tissues after cerebral ischemic-reperfusion and promote the use of energy material in ischemic brain tissues, which is enhanced in astragaloside IV + ginsenoside Rg<sub>1</sub>, astragaloside IV + ginsenoside Rb<sub>1</sub>, and astragaloside IV + notoginsenoside R<sub>1</sub> groups.

**Key words:** astragaloside IV; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; notoginsenoside R<sub>1</sub>; combination; cerebral ischemia; energy metabolism; glucose transporter 3

黄芪和三七为治疗心脑血管缺血性疾病的常用药物。中医学认为,脑缺血的主要病机是气虚血瘀,治疗应当益气活血。黄芪为补气药,三七为活血药,因此,以黄芪和三七配伍符合中医治疗脑缺血的益气活血治疗原则。前期研究表明黄芪的苷类有效组分和三七主要有效组分三七总皂苷具有抗缺血性脑损伤的作用,它们可作用于脑缺血再灌注后多个病理环节,对抗脑组织的缺血性损伤<sup>[1-3]</sup>。黄芪总苷(astragalosides, AST)和三七总皂苷(*Panax Notoginseng* saponins, PNS)配伍可增强抗缺血性脑损伤的效应,其作用与抑制脑缺血再灌注后脑组织氧化应激损伤、保护血脑屏障等有关<sup>[4-5]</sup>。由于黄芪甲苷和人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>分别为黄芪和三七中的主要有效成分,推测AST和PNS配伍增强抗脑缺血再灌注损伤的作用可能是其中的有效成分配伍作用所致。因此,本研究从能量代谢角度研究了黄芪的主要有效成分黄芪甲苷和三七的主要有效成分人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>配伍抗脑缺血再灌注损伤的作用。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级C57BL/6雄性小鼠,体质量22~28g,由湖南维通利华实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2009-0004。饲养于室温25℃,湿度55%的环境。

### 1.2 药物与试剂

黄芪甲苷(批号A0070)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(批号A0237)、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(批号A0234)、三七皂苷 R<sub>1</sub>(批号A0273),质量分数≥98%,由成都曼思特生物科技有限公司提供,临用时用5%羧甲基纤维素钠溶液配制。ATP、ADP、AMP对照品购自Scientific Research Special公司。全蛋白提取试剂盒(批号KGP2100,南京凯基生物科技发展有限公司),SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)(碧云天生物技术研究),宽范围彩色预染蛋白质Marker、增强型HRP-DAB底物显色试剂盒(北京天根生化科技有限公司),改良型二喹啉甲酸(BCA)蛋白质定量检测试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司),兔抗小鼠β-actin抗体、兔抗小鼠葡萄糖转运体3(GLUT3)抗体购自Santa Cruz生物科技公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG购自北京中杉生物技术有限公司,其他试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器

Agilent 1200 series 高压液相色谱(HPLC)仪,美国安捷伦生物仪器公司;C<sub>18</sub>液相色谱柱(Hypersil, ODS2, 250 mm×4.6 mm, 5 μm),武汉恒信世纪科技有限公司;UV3010紫外分光光度计,日本日立公司;DYY-12型电泳仪,北京市六一仪器厂;MRS-4800U2型扫描仪,上海中晶科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 动物分组和给药

将小鼠随机分为 9 组：假手术组、模型组、黄芪甲苷 (40 mg/kg) 组、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (50 mg/kg) 组、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (40 mg/kg) 组、三七皂苷 R<sub>1</sub> (10 mg/kg) 组、黄芪甲苷 (40 mg/kg) + 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (50 mg/kg) 组、黄芪甲苷 (40 mg/kg) + 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (40 mg/kg) 组、黄芪甲苷 (40 mg/kg) + 三七皂苷 R<sub>1</sub> (10 mg/kg) 组。假手术组和模型组 ig 等量的 5% 羧甲基纤维素钠溶液，各给药组 ig 给药，每日 1 次，连续给药 3 d，于末次给药 1 h 后造模，术前禁食 12 h。

### 2.2 动物模型的复制

按文献方法制备脑缺血再灌注模型<sup>[6]</sup>。将实验组小鼠以无水乙醚吸入麻醉后仰卧位固定，在颈部正中做 1 cm 垂直切口，分离颈总动脉及伴行的迷走神经，夹闭双侧颈总动脉，造成脑缺血，20 min 后恢复血流并缝合，继续饲养和给药，再灌注 24 h 后断头取脑，去除小脑和脑干，做相应指标检测。假手术组也进行同样操作，但不进行缺血再灌注。

### 2.3 能量代谢指标测定

**2.3.1 样本处理** 取右脑视交叉前脑组织约 120 mg，按质量-体积 1:9 以 5% 冷高氯酸制成 10% 脑组织匀浆，4 °C 离心 15 min (15 000 r/min)，取上清液约 0.8 mL，加入 3 mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.12 mL，调 pH 至中性，4 °C 离心 5 min (3 000 r/min)，取上清液进行 ATP、ADP、AMP 的 HPLC 分析<sup>[7]</sup>，并计算能荷 (EC) 值， $EC = (ATP + 0.5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$ 。

**2.3.2 对照品的制备** 分别精密称取对照品 ATP 16.4 mg、ADP 15.0 mg、AMP 13.1 mg 置 50 mL 量瓶中，用流动相溶解得质量浓度分别为 328.0、300.0、262.0 μg/mL 的对照品溶液。

**2.3.3 HPLC 测定条件** 色谱柱为 Hypersil ODS2 C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (A) - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (B)，梯度洗脱：0~12 min, 86.8% B, 12~22 min, 85.5% B, 22~38 min, 86.8% B；柱温 25 °C；检测波长 254 nm；体积流量 0.7 mL/min；进样量为 10 μL。

**2.3.4 线性关系考察** 分别取对照品溶液 1~5 μL 进样测定，以对照品质量浓度 (ng/mL) 为纵坐标 (Y)、峰面积值为横坐标 (X) 绘制标准曲线，得回归方程，ATP:  $Y = -27.3268X + 0.5658$  ( $r = 0.9998$ )；ADP:

$Y = -9.5499X + 0.5761$  ( $r = 0.9999$ )；AMP:  $Y = -18.3040X + 0.2822$  ( $r = 0.9998$ )。

### 2.4 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法测定脑组织 GLUT3 mRNA 表达

取右脑视交叉前组织，以 Trizol 法提取脑组织总 RNA，测定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.8~2.0，质量分数 >90%。逆转录成互补脱氧核糖核酸 (cDNA)，以此为模板进行 PCR 扩增。GLUT3 基因：上游引物为 5'-GGACTTTGCTTGCTTGCTTT-3'，下游引物为 5'-GCCCATCCTGTTTTCTTGAC-3'，扩增片段为 377 bp。β-actin 基因：上游引物为 5'-GAGACCTTCAACACCCAGC-3'，下游引物为 5'-CCACAGGATTCCATAACCCAA-3'，扩增片段 446 bp。按 PCR 试剂盒操作，反应体系 20 μL，GLUT3、β-actin 的 PCR 扩增条件为先 95 °C、2 min，再 94 °C、45 s，60 °C、30 s，72 °C、2 min，35 个循环。最后 72 °C、延伸 10 min。取扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳，ChampGel 5500 凝胶成像系统对目的条带进行扫描，Image-Pro Plus 图像分析软件测定目的条带的积分吸光度值，以目的基因条带与内参 β-actin 条带的积分吸光度值的比值表示目的基因的表达量。

### 2.5 Western-blotting 测定脑组织 GLUT3 蛋白表达

取左侧大脑组织，按说明书提取脑组织总蛋白，以改良型 BCA 法定量蛋白质的量，确定蛋白上样量。取 110 μg 蛋白样品与 1/3 量的 4×SDS 凝胶上样缓冲液混合使上样总体积为 20 μL，煮沸变性 5~10 min。SDS-PAGE 电泳分离 2~3 h，300 mA 恒流 1 h 湿转至硝酸纤维素 (PVDF) 膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 溶液封闭 3 h，TBST 溶液洗 3 次，每次 10 min。再分别与兔抗小鼠 β-actin 抗体 (1:1 000)、兔抗小鼠 GLUT3 抗体 (1:500) 3 mL 混合，4 °C 静置过夜，TBST 溶液洗 3 次，每次 15 min。然后与 HRP 标记的二抗 (1:1 000) 5~8 mL 室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次。取增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒进行显影。将 PVDF 膜进行扫描，Image Pro-Plus 6.0 图像分析软件测定目的条带的积分吸光度值，以 β-actin 为内参对照，以目的条带与 β-actin 条带的积分吸光度值比值作为该目的蛋白的相对表达量。

### 2.6 统计分析

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。多组间数据比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两两比较采用 LSD 法。配伍

后交互作用性质的判断采用析因设计实验交互作用分析方法：以各给药组的效应值与模型组效应值的差值为各药物组的实际效应值。当A、B两药合用时的实际效应值>A单用效应+B单用效应则为协同作用，A、B两药合用时的实际效应值<A单用效应+B单用效应则为拮抗作用，A、B两药合用时的实际效应值=A单用效应+B单用效应则为相加作用。

### 3 结果

#### 3.1 各组小鼠脑组织能量代谢指标的比较

与假手术组比较，模型组脑组织ATP、ADP水平显著降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较，各药物组ATP、ADP水平均显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。黄

芪甲苷+人参皂苷Rg<sub>1</sub>组、黄芪甲苷+人参皂苷Rb<sub>1</sub>组及黄芪甲苷+三七皂苷R<sub>1</sub>组ATP、ADP水平均分别高于各单药组 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。交互作用分析表明：在脑组织ATP水平方面，黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>分别配伍的实际效应约等于其单用的效应之和，表明黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>配伍增加脑组织ATP的效应均为相加作用；在脑组织ADP水平方面，黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>分别配伍的实际效应均大于其单用的效应之和，表明黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>配伍增加脑组织ADP的效应均为协同作用。结果见表1。

表1 各组小鼠脑组织能量代谢指标比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Comparison on indexes of energy metabolism in brain tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	ATP/(ng·mL <sup>-1</sup> )	ADP/(ng·mL <sup>-1</sup> )	AMP/(ng·mL <sup>-1</sup> )	EC
假手术	101.52±9.99	250.52±11.17	426.42±25.28	0.29±0.01
模型	41.08±5.84 <sup>♦♦</sup>	170.79±10.49 <sup>♦♦</sup>	294.97±24.34 <sup>♦♦</sup>	0.25±0.02 <sup>♦♦</sup>
黄芪甲苷	63.90±6.83 <sup>△△</sup>	189.09±13.13 <sup>△</sup>	375.55±25.91 <sup>△△</sup>	0.25±0.01
人参皂苷Rg <sub>1</sub>	58.76±5.34 <sup>△△</sup>	188.93±15.63 <sup>△</sup>	364.13±22.50 <sup>△△</sup>	0.25±0.01
人参皂苷Rb <sub>1</sub>	58.55±7.83 <sup>△△</sup>	190.59±17.56 <sup>△△</sup>	373.11±21.91 <sup>△△</sup>	0.24±0.02
三七皂苷R <sub>1</sub>	64.07±8.72 <sup>△△</sup>	192.97±15.61 <sup>△△</sup>	375.79±27.92 <sup>△△</sup>	0.25±0.02
黄芪甲苷+人参皂苷Rg <sub>1</sub>	80.09±6.75 <sup>△△**□□</sup>	212.53±12.79 <sup>△△**□□</sup>	404.66±26.39 <sup>△△*□□</sup>	0.27±0.01 <sup>△□□</sup>
黄芪甲苷+人参皂苷Rb <sub>1</sub>	83.52±9.96 <sup>△△**■</sup>	211.92±17.59 <sup>△△**■</sup>	405.56±25.10 <sup>△△*■</sup>	0.27±0.02 <sup>△*■</sup>
黄芪甲苷+三七皂苷R <sub>1</sub>	87.43±9.72 <sup>△△**☆☆</sup>	221.75±13.04 <sup>△△**☆☆</sup>	399.99±22.09 <sup>△△</sup>	0.28±0.01 <sup>△△**☆☆</sup>

与假手术组比较：♦ $P<0.05$  ♦♦ $P<0.01$ ；与模型组比较：△ $P<0.05$  △△ $P<0.01$ ；与黄芪甲苷组比较：\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ；与人参皂苷Rg<sub>1</sub>组比较：□ $P<0.05$  □□ $P<0.01$ ；与人参皂苷Rb<sub>1</sub>组比较：■ $P<0.05$  ■■ $P<0.01$ ；与三七皂苷R<sub>1</sub>组比较：\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ，下表同  
♦ $P<0.05$  ♦♦ $P<0.01$  vs Sham group; △ $P<0.05$  △△ $P<0.01$  vs model group; \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs astragaloside IV group; □ $P<0.05$  □□ $P<0.01$  vs ginsenoside Rg<sub>1</sub> group; ■ $P<0.05$  ■■ $P<0.01$  vs ginsenoside Rb<sub>1</sub> group; \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs notoginsenoside R<sub>1</sub> group, same as below

与假手术组比较，模型组AMP水平显著降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较，各药物组AMP水平均显著升高 ( $P<0.01$ )。黄芪甲苷+人参皂苷Rg<sub>1</sub>组和黄芪甲苷+人参皂苷Rb<sub>1</sub>组AMP的水平分别显著大于各单药组 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。交互作用分析表明：针对AMP水平，黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>分别配伍的实际效应均小于两药单用的效应之和，表明黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>配伍增加脑组织AMP的效应均为拮抗作用。结果见表1。

与假手术组比较，模型组EC值显著降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较，各药单用对EC值无显著影响 ( $P>0.05$ )；黄芪甲苷+人参皂苷Rg<sub>1</sub>组、黄芪甲苷+人参皂苷Rb<sub>1</sub>组、黄芪甲苷+三七皂苷R<sub>1</sub>

组EC值显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。黄芪甲苷+人参皂苷Rg<sub>1</sub>组、黄芪甲苷+人参皂苷Rb<sub>1</sub>组及黄芪甲苷+三七皂苷R<sub>1</sub>组EC值分别大于人参皂苷Rg<sub>1</sub>组、人参皂苷Rb<sub>1</sub>组和三七皂苷R<sub>1</sub>组 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )；黄芪甲苷+人参皂苷Rb<sub>1</sub>组和黄芪甲苷+三七皂苷R<sub>1</sub>组EC值显著高于黄芪甲苷组 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。交互作用分析表明：黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>分别配伍的实际效应均大于其单用的效应之和，表明黄芪甲苷与人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>配伍增加脑组织EC值的效应均为协同作用。结果见表1。

#### 3.2 各组小鼠脑组织GLUT3 mRNA表达的比较

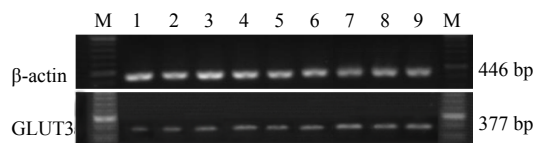
与假手术组比较，模型组GLUT3 mRNA表达显著升高 ( $P<0.05$ )。与模型组比较，黄芪甲苷组、

人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组、人参皂苷 R<sub>b1</sub> 组、三七皂苷 R<sub>1</sub> 组、黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组、黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>b1</sub> 组及黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 组 GLUT3 mRNA 的表达均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>g1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>b1</sub> 及黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 组升高 GLUT3 mRNA 的效应分别高于各单药组 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。交互作用分析表明：黄芪甲苷与人参皂苷 R<sub>g1</sub> 配伍的实际效应大于其单用的效应之和，表明黄芪甲苷与人参皂苷 R<sub>g1</sub> 配伍增强脑组织 GLUT3 mRNA 表达的效应为协同作用；黄芪甲苷与人参皂苷 R<sub>b1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 分别配伍的实际效应均约等于其单用的效应之和，表明黄芪甲苷与人参皂苷 R<sub>b1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍增加脑组织 GLUT3 mRNA 表达的效应均为相加作用。结果见图 1 和表 2。

### 3.3 各组小鼠脑组织 GLUT3 蛋白表达的比较

与假手术组比较，模型组 GLUT3 蛋白表达显著增强 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较，黄芪甲苷、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>g1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>b1</sub> 及黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 组均能显著提高脑组织 GLUT3 蛋白表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )；黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组和黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>b1</sub> 组 GLUT3 蛋白表达量分别高于人参皂

苷 R<sub>g1</sub> 组和人参皂苷 R<sub>b1</sub> 组 ( $P < 0.05$ )，黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组 GLUT3 蛋白表达量显著高于黄芪甲苷组 ( $P < 0.05$ )。交互作用分析表明：黄芪甲苷与人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 分别配伍的实际效应均约等于其单用的效应之和，表明黄芪甲苷与人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍增加脑组织 GLUT3 蛋白表达的效应均为相加作用。结果见表 2 和图 2。



M-Marker 1-假手术组 2-模型组 3-黄芪甲苷组 4-人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组 5-人参皂苷 R<sub>b1</sub> 组 6-三七皂苷 R<sub>1</sub> 组 7-黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组 8-黄芪甲苷+人参皂苷 R<sub>b1</sub> 组 9-黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 组，下图同

M-Marker 1-Sham group 2-model group 3-astragaloside IV group 4-ginsenoside R<sub>g1</sub> group 5-ginsenoside R<sub>b1</sub> group 6-notoginsenoside R<sub>1</sub> group 7-astragaloside IV + ginsenoside R<sub>g1</sub> group 8-astragaloside IV + ginsenoside R<sub>b1</sub> group 9-astragaloside IV + notoginsenoside R<sub>1</sub> group, same as below

图 1 各组小鼠脑组织 GLUT3 mRNA 表达

Fig. 1 Expression of GLUT3 mRNA in brain tissue of mice in each group

表 2 各组小鼠脑组织 GLUT3 蛋白和基因表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Comparison on expression of GLUT3 protein and mRNA in brain tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	GLUT3 mRNA	GLUT3 蛋白
假手术	0.118 ± 0.034	0.363 ± 0.024
模型	0.217 ± 0.086 <sup>◆</sup>	0.411 ± 0.054 <sup>◆</sup>
黄芪甲苷	0.312 ± 0.072 <sup>△</sup>	0.461 ± 0.029 <sup>△</sup>
人参皂苷 R <sub>g1</sub>	0.317 ± 0.045 <sup>△</sup>	0.460 ± 0.027 <sup>△</sup>
人参皂苷 R <sub>b1</sub>	0.310 ± 0.103 <sup>△</sup>	0.443 ± 0.033
三七皂苷 R <sub>1</sub>	0.313 ± 0.062 <sup>△</sup>	0.457 ± 0.040 <sup>△</sup>
黄芪甲苷+人参皂苷 R <sub>g1</sub>	0.428 ± 0.073 <sup>△△**□□</sup>	0.513 ± 0.024 <sup>△△*□</sup>
黄芪甲苷+人参皂苷 R <sub>b1</sub>	0.393 ± 0.052 <sup>△△*■</sup>	0.495 ± 0.034 <sup>△△■</sup>
黄芪甲苷+三七皂苷 R <sub>1</sub>	0.405 ± 0.068 <sup>△△*☆☆</sup>	0.495 ± 0.024 <sup>△△</sup>

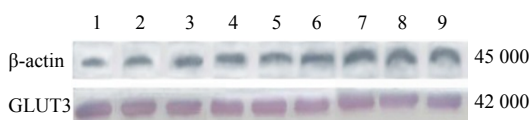


图 2 各组小鼠脑组织 GLUT3 蛋白表达比较

Fig. 2 Expression of GLUT3 protein in brain tissue of mice in each group

## 4 讨论

脑缺血后，引起脑细胞产生损伤级联反应，主要包括：能量代谢障碍、自由基和兴奋性氨基酸毒性、血脑屏障破坏、炎症反应和细胞凋亡。它们均由脑缺血引发，发生在不同的时期，彼此相互影响。根据脑缺血后脑组织的损伤形式，可将其分为两个时期：(1) 急性损伤：此期是由于脑缺血引发一系

列反应导致神经细胞急性坏死。主要病理生理机制有能量代谢障碍, 自由基、一氧化氮和兴奋性氨基酸的神经毒作用, 血脑屏障破坏<sup>[8-11]</sup>。(2) 延迟性损伤: 在脑缺血及再灌注后, 由于缺血触发继发性损伤机制, 进一步损伤神经细胞, 使缺血损伤范围扩大。其主要病理生理机制为炎症反应和细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。在脑缺血性损伤中, 以急性损伤尤为重要。脑缺血后, 脑组织的主要化学能量 ATP 急剧减少, 高能磷酸化合物生成减少, 造成脑组织能量代谢障碍。此时脑组织糖酵解增强, 使细胞酸中毒, 促进 Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> 进入细胞并伴大量水摄入, 促发并加重脑水肿。同时进入线粒体内的 Ca<sup>2+</sup> 不能封存, 使细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高, 触发一系列病理反应, 导致细胞损伤进一步加重<sup>[8]</sup>。而且在脑缺血再灌注时, 产生大量的超氧阴离子和羟自由基, 自由基可破坏线粒体的呼吸功能, 使能量生成障碍<sup>[9]</sup>。因而, 脑缺血早期在尽快恢复脑血流的同时, 增加脑组织中能量物质的量及其利用, 增强脑组织的能量代谢, 具有重要的治疗意义。

本实验结果表明, 黄芪甲苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 单用, 黄芪甲苷分别与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍, 均可显著增加脑组织中 ATP、ADP、AMP 的量, 说明 4 种有效成分单用, 黄芪甲苷分别与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍, 均可改善脑组织能量代谢。且 4 种有效成分单用并不能升高 EC 值, 而黄芪甲苷分别与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍可显著升高 EC 值, 说明黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍改善能量代谢的作用强于黄芪甲苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 单用。对其配伍作用的性质分析表明, 黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 分别配伍增加脑组织 ATP 的效应均为相加作用, 增加脑组织 ADP 的效应均为协同作用, 增加脑组织 EC 值的效应均为协同作用, 增加脑组织 AMP 的效应均为拮抗作用。ATP 和 ADP 均为高能磷酸化合物, 为脑组织的主要能量来源。AMP 为 ATP、ADP 的主要分解产物。EC 值主要取决于 ATP 和 ADP 的量。黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 分别配伍增加脑组织 ATP、ADP 和 EC 值的作用具有协同或相加效应, 表明黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍对增加缺血脑组织 ATP、

ADP 的生成或降低其消耗具有增效作用, 从而增强了对缺血脑组织能量代谢的改善作用, 减轻了脑组织缺血性损伤。而黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍对脑组织 AMP 呈拮抗作用, 这可能是由于黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍后, 可进一步抑制脑组织 ATP、ADP 的分解, 防止能高能磷酸化合物的过多消耗。

脑缺血缺氧后脑组织对葡萄糖的利用增强, 这可能是由于缺血引起神经细胞的一种代偿性反应。组织对葡萄糖的利用有赖于葡萄糖转运蛋白 (GLUTs), 其中以 GLUT3 尤为重要, GLUT3 又称神经元葡萄糖转运体, 神经元激活的葡萄糖利用率增高与 GLUT3 表达上调密切相关, GLUT3 表达上调对维持脑功能有重要的作用, 是脑缺血后的一种防御机制。因而, 在脑缺血时, 促进脑组织 GLUT3 的表达, 可促进脑组织对葡萄糖的利用, 增强脑组织对缺血缺氧的耐受性<sup>[11-12]</sup>。本研究结果表明, 各药物均能提高 GLUT3 基因表达, 且黄芪甲苷+人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 组的脑组织 GLUT3 基因表达量高于各有效成分单用; 黄芪甲苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、黄芪甲苷+人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和黄芪甲苷+三七皂苷 R<sub>1</sub> 均能促进脑组织中 GLUT3 蛋白表达, 且黄芪甲苷+人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和黄芪甲苷+人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的 GLUT3 蛋白表达高于单个有效成分。交互作用分析表明, 黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍增强脑组织 GLUT3 mRNA 表达的效应为协同或相加作用, 增加脑组织 GLUT3 蛋白表达的效应均为相加作用。表明黄芪甲苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 配伍对脑组织 GLUT3 表达的增加具有增效作用, 从而增加葡萄糖进入神经细胞, 增强神经细胞对葡萄糖的利用, 改善脑缺血后脑组织能量代谢, 对抗脑缺血再灌注损伤。

#### 参考文献

- [1] Huang X P, Tan H, Chen B Y, *et al.* Astragalus extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(4): 449-454.
- [2] 唐映红, 黄小平, 谭华, 等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注后神经元凋亡及凋亡线粒体途径 c-Jun 氨基末端激酶表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010,

- 16(16): 129-132.
- [3] 王 薇. 三七总皂苷对脑出血患者血肿吸收及血浆基质金属蛋白酶-9 的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 963-965.
- [4] 黄小平, 谭 华, 陈北阳, 等. 黄芪总苷和三七总皂苷配伍对脑缺血再灌注后 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2187-2191.
- [5] 谭 华, 黄小平, 邓常清. 黄芪总苷和三七总皂苷配伍对小鼠脑缺血再灌注脑组织氧化应激的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(5): 448-452.
- [6] Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, *et al.* A model of global cerebral ischemia in C57 BL/6 mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(2): 151-158.
- [7] 詹 春, 杨 静, 詹 莉. RP-HPLC 法测定异甘草素对脑缺血再灌注小鼠脑能量代谢的影响 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 639-642.
- [8] Nielson C, Fleming R M. Blood glucose and cerebrovascular disease in nondiabetic patients [J]. *Angiology*, 2007, 58(5): 625-629.
- [9] Choi Y S, Cho K O, Kim E J, *et al.* Ischemic preconditioning in the rat hippocampus increases antioxidant activities but does not affect the level of hydroxyl radicals during subsequent severe ischemia [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(4): 556-563.
- [10] Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, *et al.* Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms [J]. *Circulation*, 2008, 117(2): 216-223.
- [11] McEwen B S, Reagan L P. Glucose transporter expression in the central nervous system: Relationship to synaptic function [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1/3): 13-24.
- [12] 李方成, 陶宗玉, 刘安民, 等. 葡萄糖转运体 3 在脑缺血/再灌注后半影区表达的变化及意义 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(12): 2276-2279.
- [13] Turnley A M, Stapleton D, Mann R J, *et al.* Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system [J]. *J Neurochem*, 1999, 72(4): 1707-1716.