

人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤后内膜增生及平滑肌细胞凋亡的影响

陈文明, 赵永超, 刘围围, 龙禹哲, 张 赟, 石 蓓

遵义医学院附属医院 心血管内科, 贵州 遵义 563099

摘 要: **目的** 研究人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增生及平滑肌细胞凋亡的影响。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和人参皂苷 Rg₃ 低、高剂量 (5、10 mg/kg) 组, 各 10 只, 用球囊制备大鼠颈动脉损伤模型, 术后次日 ig 给药, 假手术组和模型组给予等量的生理盐水; 14 d 后取损伤的颈总动脉血管, 用苏木精-伊红 (HE) 染色观察新生内膜组织形态学改变; 采用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的三磷酸脱氧尿嘧啶缺口末端标记 (TUNEL) 法检测平滑肌细胞凋亡; Western blotting 和 qRT-PCR 法检测损伤血管凋亡基因 Fas、抗凋亡基因 Bcl-2 的表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠血管新生内膜明显增厚, 内膜与中膜面积比明显增加, 新生内膜区平滑肌细胞凋亡率显著增加, Fas、Bcl-2 基因表达明显增加; 与模型组比较, 人参皂苷 Rg₃ 低、高剂量组血管内膜增生明显减轻, 内膜与中膜面积比明显下降, 新生内膜区平滑肌细胞凋亡率明显增加, 损伤血管 Fas 基因表达水平明显升高, Bcl-2 基因表达水平明显降低。**结论** 人参皂苷 Rg₃ 可能通过促进平滑肌细胞的凋亡, 从而减轻球囊损伤后血管内膜的增生。

关键词: 人参皂苷 Rg₃; 内膜增生; 平滑肌细胞; 细胞凋亡; 颈动脉损伤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)13-3082-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.019

Effect of ginsenoside Rg₃ on intimal proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells after vascular injury in rats

CHEN Wen-ming, ZHAO Yong-chao, LIU Wei-wei, LONG Yu-zhe, ZHANG Yun, SHI Bei

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of ginsenoside Rg₃ on intimal proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells after vascular injury in rats. **Methods** Forty Sprague Dawley rats were divided into four groups randomly including Sham operation group, model group, ginsenoside Rg₃ low-dose group (5 mg/kg), and ginsenoside Rg₃ high-dose group (10 mg/kg). The carotid artery intima injury model was established by inflation balloons. From the next day after modeling, the rats were treated with ginsenoside Rg₃ by ig administration in ginsenoside Rg₃ groups, and rats in Sham operation group and model group were administered with same amount of normal saline. The injured common carotid arteries were harvested after 14 d and morphological changes of injured arteries were observed by HE staining. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) was used to detect the apoptosis of smooth muscle cells; Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expression of Fas and anti-apoptotic gene Bcl-2. **Results** Compared with the Sham operation group, the vascular neointima of rats in model group was significantly thicker, and the ratio of intima/media area and the apoptosis rate of neointimal hyperplasia were significantly increased. The expression of apoptosis-related gene Fas and anti-apoptotic gene Bcl-2 was significantly increased. Compared with model group, ginsenoside Rg₃ (5 and 10 mg/kg) significantly alleviated vascular intimal hyperplasia, the intima/media area ratio and the expression of Bcl-2 was significantly decreased, and the apoptosis rate of smooth muscle cells in the neointimal area and the expression of Fas in injured vessels were significantly increased. **Conclusion** Ginsenoside Rg₃ can reduce the vascular neointimal hyperplasia induced by balloon injury with the possible underlying mechanism to promote the apoptosis of smooth muscle cells.

Key words: ginsenoside Rg₃; neointimal; vascular smooth muscle cell; apoptosis; vascular injury

目前, 临床上认为经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 是治疗冠 状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CHD) 的重要手段, 但术后 3~6 个

收稿日期: 2018-02-01

基金项目: 贵州省科技合作计划项目 (黔科合 LH 字 7464 号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题 (QZYY2017-007)

作者简介: 陈文明 (1980—), 男, 硕士, 研究方向为心血管疾病基础研究。Tel: 15870148765 E-mail: 254936118@qq.com

*通信作者 石 蓓 (1964—), 女, 硕士, 教授, 研究方向为心血管疾病临床与基础研究。E-mail: shibei2147@163.com

月血管再度狭窄的发生率仍然高达 30%~50%，严重影响患者的远期愈后效果^[1-2]。近年来，探索寻找经济、有效和安全的药物已成为血管再狭窄防治的研究热点。以往研究发现，人参皂苷 Rg₃ 能够诱导肿瘤细胞的凋亡，从而发挥抑制肿瘤的作用^[3-6]。然而，人参皂苷 Rg₃ 对血管损伤后内膜增生的作用研究较少。本实验研究人参皂苷 Rg₃ 对颈总动脉球囊损伤后对血管内膜增生及平滑肌细胞凋亡的影响，并探讨其作用机制，为临床治疗 PCI 术后血管再狭窄提供新的实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 40 只，体质量 (300±20) g，由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供，动物使用合格证号 SCXK (渝) 2017-0005。

1.2 药物与试剂

人参皂苷 Rg₃ (质量分数 98%，批号 ZL20161016，上海笃玛生物科技有限公司)；TUNEL 凋亡试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司)；Fas、Bcl-2 和 β -actin 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司)；qRT-PCR 试剂盒和 RNA 逆转录试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司]。

1.3 仪器

2.0 mm×12.0 mm 球囊导管 (美国 Baxter Healthcare 公司)；显微镜 (日本 Olympus 公司)；Real-time PCR 仪、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

健康雄性 SD 大鼠 40 只，体质量 (300±20) g，随机分为 4 组，即假手术组，模型组，人参皂苷 Rg₃ 低、高剂量 (5、10 mg/kg) 组，每组 10 只。假手术组大鼠只分离左侧颈总动脉血管，其余各组大鼠的左侧颈总动脉均采用球囊损伤。术后，待动物清醒，人参皂苷 Rg₃ 分别 ig 相应剂量的药物，假手术组及模型组 ig 等量生理盐水，每日 1 次，连续 14 d。

2.2 模型制备

模型制备参照文献方法^[7-8]，大鼠 ip 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉，再 ip 肝素钠 (625 U/kg)，于颈部正中切口，分离出左侧颈总动脉，找到颈外、颈内动脉分叉处；分离出颈外动脉，将其远端结扎。临时阻断大鼠左颈总动脉血流，由颈外动脉将 2.0 mm×12.0 mm 球囊导管插入至颈总动脉，将球囊充

盈，缓慢反复来回抽动 3 次，确保血管内膜损伤，退出球囊，颈外动脉结扎。为了预防感染，术后 im 30 万单位青霉素，连续 3 d，每天 1 次。大鼠喂食普通饲料，自由饮水。

2.3 大鼠颈动脉血管组织 HE 染色

连续 ig 给药 14 d 后，大鼠 ip 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉处死，找到损伤的颈总动脉，取损伤血管中段 (约 4.0 mm) 于 4% 多聚甲醛固定 24 h。大鼠血管组织经石蜡包埋处理，切片，HE 染色，Olympus 正置光学电子显微镜观察，使用 IPP (Image-pro Plus) 图像分析软件对损伤血管内膜厚度、中膜厚度进行测量，并计算内膜与中膜的面积比 (内膜/中膜)。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

石蜡切片经脱蜡、水化后，按照 TUNEL 试剂盒说明书操作，凋亡细胞核呈棕黄色，计数阳性细胞数占细胞总数的百分比。

2.5 Western blotting 法检测凋亡基因 Fas、抗凋亡基因 Bcl-2 的蛋白表达情况

提取大鼠颈动脉损伤血管组织的总蛋白，测定蛋白浓度，调整上样质量浓度 (60 μ g/ μ L)。配胶上样，SDS 恒压电泳后转膜 (湿转)，将膜置于脱脂奶粉中封闭孵育 2 h，加一抗 (兔抗大鼠 Fas 1:200、兔抗大鼠 Bcl-2 1:200、兔抗大鼠 β -actin 1:200)，4 $^{\circ}$ C 过夜。加二抗孵育 1 h，加入化学发光显色剂，在凝胶成像仪中曝光。利用 IPP 图像分析软件对电泳条带灰度值进行分析，计算目的蛋白相对表达量。

2.6 qRT-PCR 检测凋亡基因 Fas、抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达

利用 RNA 提取试剂盒，提取大鼠颈动脉损伤血管组织的总 RNA，定量，逆转录。根据 qRT-PCR 试剂盒说明书，确认引物的反应性和反应体系 (25 μ L)，按照 PCR 反应扩增步骤进行：①预变性：95 $^{\circ}$ C、3 min；②PCR 反应 40 循环：95 $^{\circ}$ C、10 s，60 $^{\circ}$ C、30 s；③熔解曲线：95 $^{\circ}$ C、10 s，55 $^{\circ}$ C、5 min。将 β -actin 作为计算结果的内参，计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

2.7 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。所有实验数据均按照完全随机设计要求收集整理，结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析和/或 t 检验。

3 结果

3.1 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤后血管内膜增生的影响

假手术组大鼠颈动脉血管内膜光滑, 无明显增

表1 qRT-PCR 引物序列和扩增产物长度

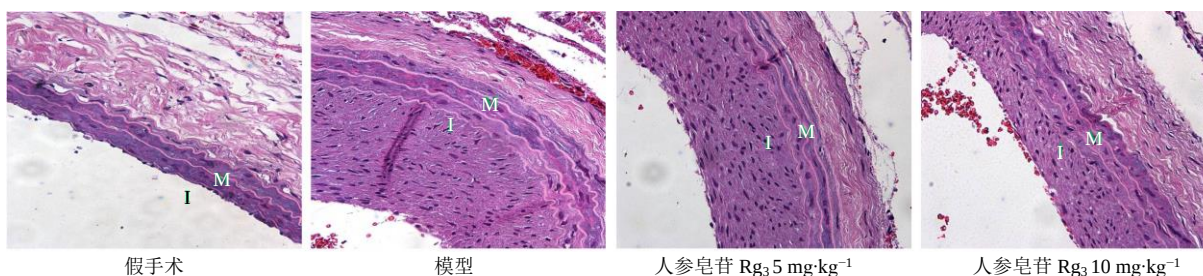
Table 1 Primer sequence and amplification product length

基因	序列 (5'→3')	长度/bp
Fas	上游: CTCCAAGGGATTGGAATTGA	399
	下游: TTGGTGTGCTGGTGAGTGT	
Bcl-2	上游: GGGTACGATAACCGGGAGAT	395
	下游: CTGAAGAGCTCCTCCACCAC	
β-actin	上游: GGCATCCTCACCCTGAAGTA	203
	下游: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	

厚现象。与假手术组比较, 模型组大鼠颈动脉损伤血管的内膜显著增厚 ($P<0.01$), 内膜/中膜明显增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 给予人参皂苷 Rg₃ (5、10 mg/kg) 治疗后, 大鼠颈动脉损伤血管内膜增厚的程度明显减轻 ($P<0.01$), 内膜/中膜也明显下降 ($P<0.01$), 结果见图1和表2。

3.2 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤血管平滑肌细胞凋亡的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠颈动脉血管新生内膜区平滑肌细胞凋亡率明显增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 给予低、高剂量人参皂苷 Rg₃ 干预后, 大鼠颈动脉血管新生内膜区平滑肌细胞凋亡率明显增加 ($P<0.01$), 结果见图2、表3。



I-内膜 M-中膜, 图2同

I-intima M-media, same as Fig. 2

图1 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤后内膜增生的影响 (×400)

Fig. 1 Effect of ginsenoside Rg₃ on endothelial morphology of rats after vascular injury (×400)

表2 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤后内膜增生的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of ginsenoside Rg₃ on endothelial morphology of rats after vascular injury ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	内膜面积/mm ²	中膜面积/mm ²	内膜/中膜
假手术	—	0.010±0.000	0.105±0.005	0.095±0.010
模型	—	0.311±0.017**	0.113±0.018	2.752±0.351**
人参皂苷 Rg ₃	5	0.198±0.019##	0.101±0.011	1.960±0.210##
	10	0.154±0.028##	0.109±0.014	1.413±0.301##

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ## $P<0.01$, 下同

** $P<0.01$ vs Sham group; ## $P<0.01$ vs model group, same as below

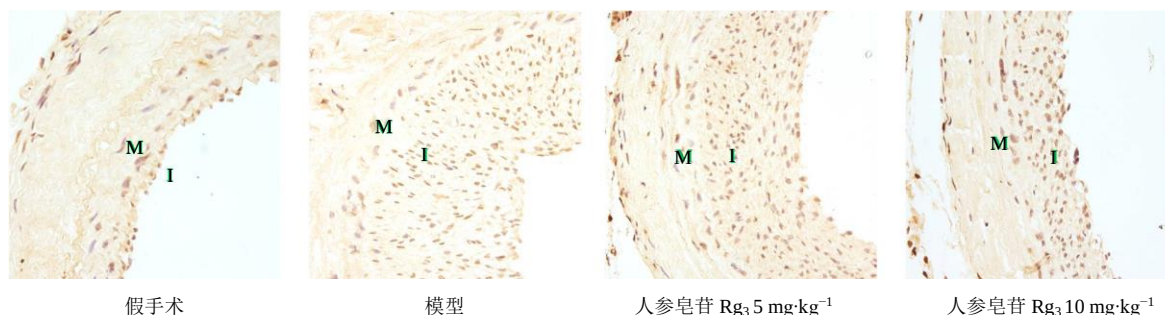


图2 各组大鼠颈动脉损伤后血管平滑肌细胞的凋亡情况 (×400)

Fig. 2 Apoptotic changes of vascular smooth muscle cells of rats after carotid artery injury in each group (×400)

表 3 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤后平滑肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of ginsenoside Rg₃ on apoptosis of smooth muscle cells of rats after carotid artery injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	细胞凋亡率/%
假手术	—	0.051 ± 0.007
模型	—	20.124 ± 1.235**
人参皂苷 Rg ₃	5	29.785 ± 1.625##
	10	31.698 ± 2.354##

3.3 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤血管 Fas、Bcl-2 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠颈动脉损伤血管 Fas、Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 给予人参皂苷 Rg₃ 干预后, 大鼠颈动脉损伤血管 Fas 蛋白表达水平明显升高, Bcl-2 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 结果见图 3。

3.4 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤血管 Fas、Bcl-2 mRNA 表达的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠颈动脉损伤血管凋亡基因 Fas 和抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$, 图 4)。与模型组比较, 给予人参皂苷 Rg₃ 干预后, 大鼠颈动脉损伤血管 Fas

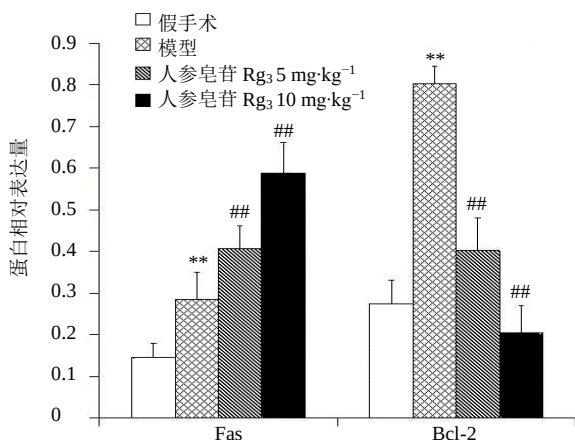
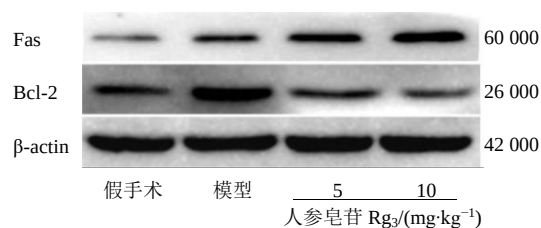


图 3 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤血管 Fas、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rg₃ on expression of Fas and Bcl-2 protein in injured carotid artery of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

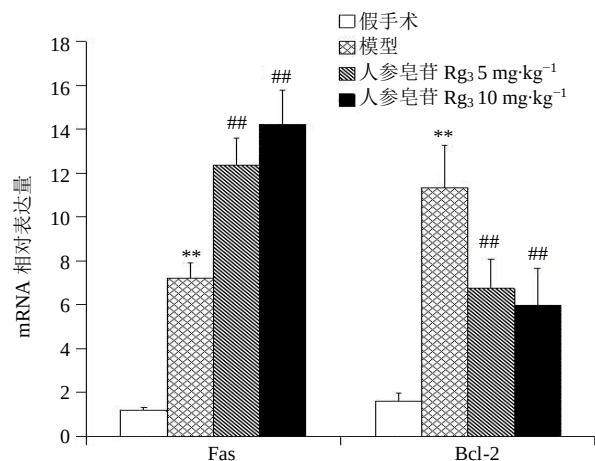


图 4 人参皂苷 Rg₃ 对大鼠颈动脉损伤血管 Fas 和 Bcl-2 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effects of ginsenoside Rg₃ on expression of Fas and Bcl-2 mRNA in injured carotid artery of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

近年来, 随着对 PCI 术后血管再狭窄基础病理的研究发现, 平滑肌细胞在血管再狭窄的发生发展中起着重要的作用^[9-10], 因此, 抑制平滑肌细胞增殖、诱导平滑肌细胞凋亡、减轻内膜增生可降低 PCI 术后血管再狭窄的发生率。在正常细胞中, 细胞的增殖和凋亡处于动态平衡, 血管的形态结构保持相对的稳定, 该平衡一旦被打破, 将导致许多疾病的发生。本研究通过制备大鼠颈动脉球囊损伤模型发现, 模型组大鼠血管新生内膜较假手术组明显增厚, 内膜/中膜明显增加, 新生内膜区平滑肌细胞凋亡率显著增加。给予人参皂苷 Rg₃ 干预后, 大鼠颈动脉损伤血管内膜增生明显减轻, 内膜/中膜明显下降, 新生内膜区平滑肌细胞凋亡率明显增加, 表明人参皂苷 Rg₃ 能促进平滑肌细胞凋亡, 抑制血管新生内膜增生。

在细胞凋亡机制研究中, 主要信号途径是 Fas 与 FasL 在细胞膜表面结合后, 在细胞内形成死亡诱导信号复合体 (death-inducing signaling complex, DISC), DISC 大量活化 caspase-8, 并进一步引发细胞凋亡执行者 caspase-3、caspase-6 和 caspase-7 的活化, 活化后 caspase-3、6、7 破坏细胞骨架和修复蛋白, 进而导致细胞凋亡^[11-13]。另外, 细胞凋亡的起始发生在线粒体内, 细胞内 caspase-8 的量较少, 不能直接激活细胞凋亡的执行者, 而是先激活 Bid (BH3 死亡结构域的激动剂), 继而通过抑制 Bcl-2

来干扰线粒体的功能。Bcl-2 阻断后,线粒体膜的通透性增加,导致线粒体内的蛋白质进入细胞质内,维持线粒体存活所必需的细胞色素 C 也随之进入细胞质,激活启动细胞凋亡的 caspase-9,进而活化细胞凋亡执行者 caspase-3,最终导致细胞凋亡^[14-16]。在本研究中发现,模型组大鼠损伤血管中凋亡基因 Fas 和抗凋亡基因 Bcl-2 的表达量较假手术组明显增加,给予人参皂苷 Rg₃ 干预后,发现 Fas 的表达水平显著升高,而 Bcl-2 的表达则显著降低,表明人参皂苷 Rg₃ 在一定程度上能抑制大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜的增生,可能与调节 Fas、Bcl-2 的表达有关。

综上所述,大鼠颈动脉球囊损伤后,人参皂苷 Rg₃ 通过调节 Fas、Bcl-2 的表达,诱导新生内膜区平滑肌细胞的凋亡,从而抑制损伤血管内膜的增生。但其具体的作用机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] Eyeuboglu M. In stent restenosis after percutaneous coronary intervention [J]. *Anatol J Cardiol*, 2016, 16(1): 68-77.
- [2] 陆元喜,李 浪. 支架内再狭窄的治疗进展 [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(5): 515-517.
- [3] 江 昌,缪雨青,周文丽,等. 人参皂苷 Rg₃ 的抗肿瘤作用及研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(7): 664-667.
- [4] 严春花,张大力,安昌善. 人参皂苷 Rg₃ 诱导肺癌细胞株凋亡的机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(11): 2634-2637.
- [5] 尹素改,吴耀松,周 凌,等. 人参皂苷 Rg₃ 通过干预细胞周期和诱导凋亡影响人食管癌 Eca9706 细胞生长 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(3): 48-50.
- [6] 程 慧,宋新波,张丽娟. 人参皂苷 Rg₃ 与 Rh₂ 的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(4): 307-311.
- [7] 高晨盈,王俊逸,罗云梅,等. 人参皂苷 Re 对球囊损伤大鼠血管内膜增殖及 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(1): 143-148.
- [8] 张耀雷,李 昆,杨 炯,等. 大黄素缓解球囊损伤致大鼠颈动脉狭窄及其机制 [J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(1): 48-53.
- [9] 邓婵翠,邓文文,许官学,等. 冠心病 PCI 术后支架内再狭窄的相关因素分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(3): 278-283.
- [10] 王正东,李 平,林智海,等. 血管损伤及 PCI 术后再狭窄机制的研究进展和相应对策 [J]. *医学综述*, 2016, 22(2): 280-283.
- [11] 王晓丽,韩翠艳,李宏铃,等. Fas/FasL 信号途径参与 17- β -羟-岩大戟内酯 B 诱导 U251 细胞凋亡 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(1): 46-49.
- [12] 彭 伟,骆泓洁,元小冬. 死亡受体介导的细胞凋亡研究进展 [J]. *生命的化学*, 2016(5): 629-632.
- [13] 李天富,罗玉敏,吕传真. 细胞凋亡与 caspase 机制的调控 [J]. *中国临床神经科学*, 2003, 11(3): 313-315.
- [14] 王 琼,蓝孝斐,周丽娜,等. 间歇低氧致人脐静脉内皮细胞凋亡与线粒体细胞色素 C 释放的相关性 [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(30): 2385-2389.
- [15] 尹智勇,杨俊元,祁 宏. Bcl-2 蛋白质家族调控细胞凋亡机制的研究进展 [J]. *信阳师范学院学报: 自然科学版*, 2017, 30(2): 340-344.
- [16] 崔连鹭,王 博,张晓伟,等. 胰腺癌细胞外泌体通过激活线粒体凋亡途径促进 β 细胞凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(12): 2172-2178.