

人参茎叶皂苷对热损伤大鼠不同脏器糖皮质激素受体的影响

李 敏¹, 凌昌全², 黄雪强², 沈志雷¹

(1. 第二军医大学海军医学系军队卫生学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院中医科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察人参茎叶皂苷(ginsenosides, GSS)对热损伤大鼠不同脏器糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的影响, 并探讨其作用机制。方法: 雄性 SD 大鼠随机分为: (1) 正常对照组, 室温下饲养, 蒸馏水灌胃; (2) GSS 治疗组, 室温下饲养, GSS 灌胃; (3) 热损伤模型组, 蒸馏水灌胃, 制作热损伤模型; (4) 热损伤模型 GSS 治疗组, GSS 灌胃, 制作热损伤模型。采用放射配体结合法检测大鼠脑、胸腺、肺和肝细胞液 GR 结合活性; 逆转录-聚合酶链反应法测定脑、肝细胞液 GR mRNA 的水平; 放射免疫法测定血浆促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropin, ACTH)和皮质酮(corticosterone, CS)的浓度。结果: 热损伤模型 GSS 治疗组大鼠脑、肺和肝细胞液 GR 结合活性以及脑和肝细胞液 GR mRNA 表达水平均明显高于单纯热损伤模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 热损伤模型 GSS 治疗组大鼠血浆 ACTH 和 CS 浓度与单纯热损伤模型组比较则无明显差异。结论: GSS 可缓解热损伤大鼠不同脏器 GR 结合活性的下降幅度, 其作用机制可能与促进 GR mRNA 的表达有关。

[关键词] 人参皂苷; 人参茎叶; 糖皮质激素受体; 热损伤; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2006)02-0156-04

Effects of ginsenosides extracted from ginseng stem and leaves on glucocorticoid receptor in different viscera in heat-damaged rats

Min LI¹, Chang-Quan LING², Xue-Qiang HUANG², Zhi-Lei SHEN¹

(1. Department of Military Hygiene, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effects of ginsenosides (GSS) extracted from ginseng stem and leaves on glucocorticoid receptor (GR) in different viscera in heat-damaged rats, and to find out its action mechanism. Methods: Thirty-two male SD rats were divided into control group and experimental group, and fed 2 mg/d GSS and equal-quantity of distilled water respectively for 7 days. Eight rats of each group were exposed to (42 ± 1) for one hour. The binding activities of GR in brain, thymus, lung and liver cytosols in rats were detected by radioligand binding assay. The expression levels of GR mRNA in brain and liver cytosols were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Plasma adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone (CS) concentrations were determined by radioimmunoassay. Results: The binding activities of GR in brain, lung and liver cytosols, and the expression levels of GR mRNA in brain and liver cytosols were all higher in the GSS-treated and heat-damaged rats than those in the untreated heat-damaged rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no significant differences in plasma concentrations of ACTH and CS between the GSS-treated heat-damaged rats and the untreated heat-damaged rats. Conclusion: GSS can lessen the descending degree of the binding activity of GR in brain, thymus, lung and

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30271675); 国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(No. 30025045)

Correspondence to: Min LI, MD, Professor. E-mail: lilimin115@hotmail.com

liver cytosols, and such efficacy of GSS may be related to improvement of the expression of GR mRNA .

KEY WORDS ginsenosides; ginseng stem and leaves; glucocorticoid receptor; heat damage; rat

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao/ J Chin Integr Med, 2006, 4(2):156-159

www.jcimjournal.com

以往研究发现,热损伤大鼠肝细胞糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的结合活性明显下降,而人参茎叶皂苷(ginsenosides, GSS)对其有一定的保护作用^[1]。但未见有关热损伤大鼠其他脏器细胞 GR 功能的变化以及 GSS 是否对其有调节作用的报道。本实验观察了 GSS 对热损伤大鼠脑、胸腺、肺和肝细胞液 GR 结合活性的影响,并探讨其作用机制,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 药物 人参茎叶皂苷由黑龙江东宁制药厂提供,纯度 91.67%,用蒸馏水配制成 10 mg/ml 水溶液备用。

1.2 动物分组和模型制作 SD 雄性大鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司)32 只,体质量(175±3.6)g,室温(22±1)℃环境适应 3 d 后随机分为 4 组:(1)正常对照组 8 只,室温下饲养,蒸馏水灌胃;(2)GSS 治疗组 8 只,室温下饲养,GSS 灌胃;(3)热损伤模型组 8 只,蒸馏水灌胃,制作热损伤模型;(4)热损伤模型 GSS 治疗组 8 只,GSS 灌胃,制作热损伤模型。各组大鼠灌胃剂量 2 ml/次,1 次/d,连续 7 d。

热损伤模型制作:于末次灌胃 30 min 后将大鼠放入(42±1)℃、相对湿度 80% 的恒温箱中热暴露 1 h,测肛温(41±0.5)℃,耳、爪、尾等暴露部位潮红,大量流涎,呼吸急促,四肢伸展,呈昏睡状态,表明大鼠已处于热损伤阶段。

1.3 动物处死 为避免昼夜节律对激素分泌及其受体的影响,各组动物均于统一时间完成实验程序后快速断头处死,取所需组织备用。

1.4 指标测定 采用放射免疫法测定血浆促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropin, ACTH)和皮质酮(corticosterone, CS)的浓度。采用单点分析法测定脑、肺和肝细胞液 GR 最大结合容量。因胸腺细胞较少,故采用单点分析法测定胸腺淋巴细胞 GR 特异性结合位点。采用逆转录-聚合酶链反应法测定脑、肝细胞液 GR mRNA 的水平,用一步法抽提总 RNA。RT, 4 μl 5× First Strand Buffer(美国 Gibco BRL 公司产品),0.5 μl RNase Inhibitor(美国 Promega 公司产品),2 μl 100 mmol/L 二硫苏糖

醇(DL-dithiothreitol, DTT)(美国 Gibco BRL 公司产品),2 μl 4× dNTP mix(上海博彩生物科技有限公司产品),1 μl 200 U MMLV Reverse Transcriptase(美国 Gibco BRL 公司产品),37℃保温 60 min。90℃处理 5 min,冰上冷却,室温离心将溶液收集至管底。PCR 扩增,引物由上海博彩生物科技有限公司合成,上游 5' AGG CCG GTC AGT GTT TTC TA 3',下游 5' AGG GGT GAG CTG TGG TAA TG 3',扩增得 GR mRNA 长度 433 bp,每个反应用 2.5 μl 10× PCR buffer(w/ 20 mmol/L MgCl₂),19.25 μl H₂O,0.5 μl 10 mmol/L 4× dNTP mix,0.25 μl iNos-UP,0.25 μl iNos-Down,0.25 μl Taq DNA 聚合酶(1.25 U,上海博彩生物科技有限公司产品),分装至 0.2 ml PCR 薄壁管里,每管 23 μl。内参 β -actin 用同样方式进行。每管加 2 μl RT 产物,加 30 μl 石蜡油。PCR 扩增条件:94℃45 s,预变性 120 s,54℃退火 45 s,72℃延伸 60 s,循环 35 次,最后延伸 300 s。DNA 扩增产物用 1.6% 琼脂糖电泳和溴乙锭(ethidium bromide, EB)染色后,Tasnon GIS-100 数码凝胶图像分析系统进行扩增结果检测和半定量分析。

1.5 统计学方法 所有实验数据均用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,计量资料均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 GSS 对热损伤大鼠脑、胸腺、肺和肝细胞液 GR 结合活性的影响 经热暴露 1 h,大鼠脑、胸腺、肺和肝细胞液 GR 结合活性急剧下降,而 GSS 可不同程度缓解热暴露时 GR 结合活性的下降幅度。见表 1。

2.2 GSS 对热损伤大鼠脑、肝细胞液 GR mRNA 水平的影响 经热暴露 1 h,大鼠脑、肝细胞液 GR mRNA 的表达受到了明显抑制,而 GSS 可以缓解这种抑制作用。见图 1、表 2。

2.3 GSS 对热损伤大鼠血浆 ACTH 和 CS 含量的影响 急性热暴露使大鼠血浆 ACTH 和 CS 含量明显上升,而 GSS 与蒸馏水灌胃大鼠血浆 ACTH 和 CS 含量的比较无明显差异。见表 3。

表 1 GSS 对热损伤大鼠脑、胸腺、肺和肝细胞液 GR 结合活性的影响

Table 1 Effects of GSS on binding activities of GR in brain, thymus, lung and liver cytosols in heat-damaged rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Brain (fmol/ mg protein)	Thymus (site/ cell)	Lung (fmol/ mg protein)	Liver (fmol/ mg protein)
Normal control	8	165.03 ± 30.46	4457.88 ± 669.43	404.98 ± 87.16	649.48 ± 115.85
GSS-treated	8	166.86 ± 29.12	4879.38 ± 889.32	402.79 ± 82.74	590.90 ± 77.16
Heat-damaged	8	10.25 ± 3.53**	3221.75 ± 593.86*	231.63 ± 41.18**	298.29 ± 79.22**
GSS-treated and heat-damaged	8	42.01 ± 12.62**	3975.43 ± 898.39	300.44 ± 39.92**	465.95 ± 88.95**

* P < 0.05, ** P < 0.01, vs normal control group; P < 0.05, P < 0.01, vs heat-damaged group.

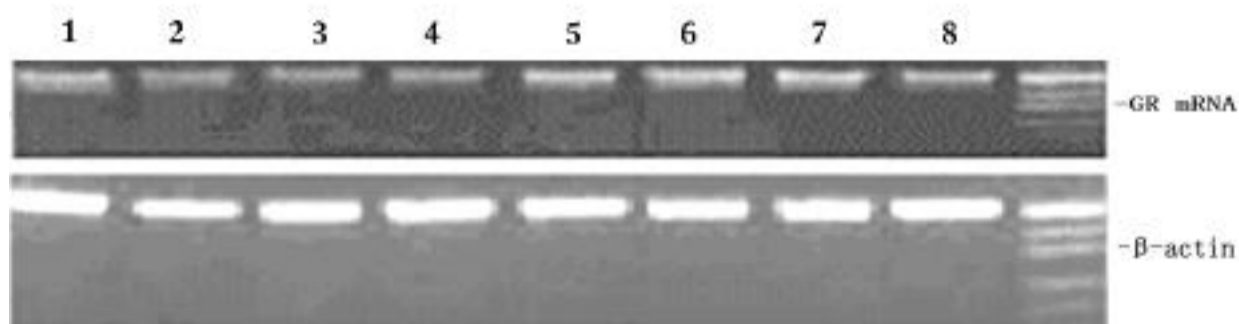


图 1 GSS 对热损伤大鼠脑、肝细胞液 GR mRNA 水平的影响

Figure 1 Effects of GSS on expression levels of GR mRNA in brain and liver cytosols in heat-damaged rats

1-4: GR mRNA in cell sap of brain; 5-8: GR mRNA in cell sap of liver; 1 and 5: Normal control; 2 and 6: GSS-treated; 3 and 7: Untreated with heat damage; 4 and 8: GSS-treated with heat damage.

表 2 GSS 对热损伤大鼠脑、肝细胞液 GR mRNA 表达水平的影响

Table 2 Effects of GSS on expression levels of GR mRNA in brain and liver cytosols in heat-damaged rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	GR mRNA/ -actin	
		Brain cytosol	Liver cytosol
Normal control	8	0.41 ± 0.02	0.45 ± 0.05
GSS-treated	8	0.43 ± 0.04	0.49 ± 0.08
Heat-damaged	8	0.21 ± 0.03**	0.27 ± 0.04**
GSS-treated and heat-damaged	8	0.34 ± 0.07**	0.40 ± 0.06

** P < 0.01, vs normal control group; P < 0.05, vs heat-damaged group.

表 3 GSS 对热损伤大鼠血浆 ACTH 和 CS 含量的影响

Table 3 Effects of GSS on concentrations of plasma ACTH and CS in heat-damaged rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ACTH (ng/ L)	CS (µg/ L)
Normal control	8	52.14 ± 13.81	39.32 ± 24.60
GSS-treated	8	61.11 ± 14.52	41.63 ± 19.81
Heat-damaged	8	205.32 ± 42.00**	473.50 ± 56.30**
GSS-treated and heat-damaged	8	210.23 ± 52.64**	448.12 ± 44.25**

** P < 0.01, vs normal control group.

3 讨论

CS 在维持应激时机体内环境稳定方面起着极其重要的作用,其生物效应的发挥主要依赖细胞内 GR 的介导^[2,3]。有研究表明,应激过程中 GR 结合活性下降导致细胞水平 CS 功能不全是休克发生、发展的关键因素之一^[4,5]。因此,寻找调节 GR 的物

物,具有十分重要的临床意义。本实验结果显示,热损伤大鼠脑、胸腺、肺和肝细胞的 GR 结合活性均大幅度下降,其中以脑细胞液 GR 结合活性的下降幅度最大,这可能与脑细胞热耐受能力最差有关。本实验结果还显示,GSS 对热损伤大鼠脑、胸腺、肺和肝细胞 GR 结合活性均有不同程度的保护作用,结合以往实验,我们认为 GSS 具有提高机体热耐受能

力的作用^[6]。由此推测, GSS 之所以能够维护热应激机体内环境稳定以及减轻热损伤可能与其调节 GR 的结合活性相关。

应激过程中 GR 结合活性的下降与垂体-肾上腺皮质激素调节、GR 蛋白的降解速度大于合成速度,或因脱磷酸化作用使结合型 GR 转变为非结合型 GR 等因素有关^[5]。本实验结果显示,热暴露 1 h 后,大鼠血浆 ACTH 和 CS 含量明显升高,而脑细胞液和肝细胞液 GR mRNA 的表达水平则明显降低,提示引起热损伤机体 GR 结合活性下调的原因可能是多方面的。此外, GSS 灌胃的热损伤大鼠与蒸馏水灌胃的热损伤大鼠相比,其血浆 ACTH 和 CS 含量并无明显差异,但脑细胞液和肝细胞液 GR mRNA 的表达水平则有明显提高,提示 GSS 对热暴露大鼠 GR 结合活性的保护作用可能不是通过垂体-肾上腺皮质激素进行调节的,而可能是通过提高 GR 蛋白的合成速度以发挥其效应。至于磷酸化脱磷酸化是否也发挥了一定的作用,尚待进一步研究。

[参考文献]

- 1 李 敏, 凌昌全, 沈志雷, 等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠糖皮质激素受体的影响. 第二军医大学学报, 2003, 24(8): S16-17.
- 2 徐仁宝, 卢 健, 蒋左庶主编. 受体的基础与临床. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 100-135.
- 3 Filipovic D, Gavrilovic L, Dronjak S, *et al*. Brain glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to acute, chronic or combined stress. *Neuropsychobiology*, 2005, 51(2): 107-114.
- 4 徐仁宝. 糖皮质激素受体减少在休克发生中的作用: 一个新假说. *生命科学*, 1997, 9(2): 78-80.
- 5 Li D, Sancher ER. Glucocorticoid receptor and heat shock factor 1: novel mechanism of reciprocal regulation. *Vitam Horm*, 2005, 71: 239-262.
- 6 李 敏, 凌昌全, 沈志雷, 等. 人参茎叶皂甙提高机体热耐受能力的作用. *中国公共卫生*, 2003, 19(12): 1473-1474.

[收稿日期] 2005-12-20

2006 年全国时间生物医学学术会议征文通知

经中国中西医结合学会批准, 将于 2006 年 6 月下旬召开 2006 年全国时间生物医学学术会议并正式成立中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会, 有关会议内容及征文通知如下。

- 1 会议时间 2006 年 6 月 28 日~7 月 1 日, 会期 4 天。
- 2 会议地点 江苏省苏州市苏州大学东吴饭店。
- 3 会议内容 (1) 时间医学与时间生物学的临床、基础研究与教学等方面学术交流, 包括时间生理学、时间药理学、时间毒理学、时间中医学、针灸时间治疗(子午流注、灵龟八法等)、时间养生学、肿瘤时间治疗、生物节律研究、生物钟基因研究、动态血压及动态心电图研究与应用、睡眠研究等; (2) 邀请国际时间生物学著名专家作有关时间生物学研究进展学术报告; (3) 正式成立中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会。
- 4 主办单位 中国中西医结合学会及其时间生物医学专业委员会筹委会主办, 苏州大学承办, 山东省医学科学院山东省抗衰老研究中心协办。
- 5 会议费用 代表注册费 800 元/人, 学生注册费 500 元/人。
- 6 征稿要求 (1) 关于时间医学与时间生物学方面的研究论文、综述等。论文全文(包括 1 000 字以内的摘要, 研究性论文请按目的、方法、结果、结论四部分撰写)以电子邮件附件方式(Word 或纯文本文件)或 A4 纸打印件和软盘寄送会议联系人, 可参见网址: E-mail: yjwang88@hotmail.com。(2) 寄交地址: 山东省济南市经十路 89 号山东省医学科学院抗衰老研究中心; 联系人: 赵子彦; 电子信箱: ziyanzhao@163.com 或 ziyanzhao@sina.com.cn; 邮政编码: 250062; 电话: 0531-82919892; 传真: 0531-82601295。请自留底稿, 恕不退稿。(3) 截稿日期: 2006 年 5 月 15 日。

中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会筹委会