

人参二醇组皂苷对内毒素休克大鼠脑皮质损伤的保护作用

刘 磊 王宏英¹ 方艳秋 谭 岩² 赵雪俭² (吉林省人民医院医学诊治实验中心, 吉林 长春 130021)

(摘要) 目的 探讨内毒素休克时大鼠脑皮质损伤状况及人参二醇组皂苷对大鼠脑保护作用机制。方法 将 28 只 Wistar 成年大鼠随机分为实验对照(control)组, 内毒素休克(LPS)组, 地塞米松(LPS+DEX)组和人参二醇组皂苷(LPS+PDS)组。大鼠静脉注射内毒素制作内毒素休克大鼠模型。生物化学法检测脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量。蛋白印迹检测大鼠核转录因子(NF)- κ B 蛋白 P65 亚基表达含量的变化。ELISA 法检测脑组织内白细胞介素(IL-1 β), 肿瘤坏死因子(TNF- α)和 IL-6 水平。结果 与 LPS 组比较, LPS+DEX 组和 LPS+PDS 组大鼠脑组织 MDA 含量降低, SOD 活性上调, NF- κ B 蛋白表达降低, IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 水平显著降低($P<0.05$)。结论 PDS 能够下调内毒素休克脑组织中 NF- κ B 蛋白表达, 改善自由基和炎症因子对脑组织的损伤作用, 对中枢神经系统具有保护作用。

(关键词) 内毒素; 人参; 休克; 自由基; 炎症因子

(中图分类号) S567.5+1; R651.1+5 **(文献标识码)** A **(文章编号)** 1005-9202(2014)23-6694-08; doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2014.23.072

人参的药学开发已由总皂苷类药物向分组皂苷及单体皂苷方向发展。人参二醇组皂苷(PDS)为从人参中提取的活性成分, 有与地塞米松类似的抗失血性休克与抗内毒素(LPS)休克的作用, 而无糖皮质激素样副作用^[1,2]。本研究通过观察 LPS 致 LPS 休克大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)水平, NF- κ B 蛋白表达情况及炎症因子白细胞介素(IL)-1 β , 肿瘤坏死因子(TNF)- α 和 IL-6 含量, 观察 PDS 和地塞米松(DEX)对脑组织损伤的保护作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器 PDS(吉林大学基础医学院化学教研室提供); DEX 注射液(天津药业集团新郑万股份有限公司); 大肠杆菌 LPS 血清型 0111 和 B4: 购于 Sigma 公司, 5% 葡萄糖溶液配制。SOD 活力和 MDA 含量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。大鼠 IL-6, IL-1 β 和 TNF- α ELISA 试剂盒购自上海奥生物科技有限公司。

1.2 实验动物分组与处理^[3] 健康 Wistar 大鼠 28 只, 雌雄不拘, 鼠龄 4~7 个月, 体重 280~350 g, 吉林大学实验动物中心提供和喂养。随机分为四组(每组 7 只): 对照(control)组、内毒素休克(LPS)组、地塞米松(LPS+DEX)组、人参二醇组皂苷(LPS+PDS)组。大鼠用 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g)腹腔注射麻醉, 分离一侧股动脉插动脉插管, 通过压力传感器连接 RM6000 型四导生理记录仪记录血压; 分离一侧股静脉备给药。待血压平稳后记录正常的心率、血压。实验前 control 和 LPS 组大鼠静注 5% 葡萄糖溶液 5 ml/kg, LPS+DEX 组静注 Dex (2 mg/kg) 葡萄糖溶液 5 ml/kg, LPS+PDS 组静注 PDS (45 mg/kg) 葡萄糖溶液 5 ml/kg。10 min 后除 control 组外均静脉注射

LPS 4 mg/kg, control 组静脉注射等量的葡萄糖溶液。以血压降到实验前基础血压的 2/3 判断为休克状态。4 h 后处死动物, 断头, 无菌采集大脑皮质, 生理盐水冲洗干净, 脑组织迅速放于液氮中冻存。

1.3 脑组织中 MDA 含量和 SOD 活力的检测 组织称重后, 加入 9 倍冰生理盐水, 电动匀浆机中研磨成 10% 匀浆, 3 500 r/min, 离心 10 min。取上清液, G250 法测定总蛋白含量, 以供生化指标检测。用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性, 用硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 水平。

1.4 免疫印迹方法检测脑组织中 NF- κ B (P65) 蛋白量变化 取大鼠的脑组织, 立即放入预冷的 RIPA buffer 裂解缓冲液中, 冰上超声匀浆后, 4℃, 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清, G250 法测定总蛋白含量, 将蛋白样品浓度调整为 40 μ g/ μ l。10% 十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜 2 h, 10% 脱脂奶封闭液 1 h。弃去封闭液, 加入用封闭液稀释的一抗工作液(抗 p65 及抗 β -actin 抗体), 4℃ 振摇孵育过夜。Tris 盐酸缓冲液(TBST)洗膜 3 次, 加入 1:3 000 稀释的相应二抗, 室温反应 1 h; TBST 洗膜 3 次, 增强化学发光试剂显色, BandScan5.0 分析软件进行灰度分析, 以目的蛋白条带的灰度值与 β -actin 蛋白条带的灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.5 脑组织内 TNF- α 和 IL-6、IL-1 β 含量测定 ELISA 检测脑组织匀浆上层清中 TNF- α 和 IL-6、IL-1 β 含量。

1.6 统计学方法 应用 SPSS10.0 软件, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数采用单因素方差分析(one way ANOVA), 组间均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 PDS 对 LPS 休克大鼠平均动脉压(MABP)的影响 见表 1。对照组大鼠在实验过程中血压平稳, MABP 为 (15.69 ± 3.75) kPa。注入 LPS 后 5 min 各实验组大鼠均进入休克状态, LPS 组从休克第 45 分钟开始血压进行性下降, 直至处死时该组动物均已进入濒死状态。然而, PDS 组与 DEX 组在 LPS 组进入明显的失代偿阶段后, 仍维持稳定而持久的代偿性变化直至 4 h 处死, 与 LPS 组比较差异显著性($P<0.05$)。

基金项目: 吉林省科技厅重点项目(20110953); 吉林省参茸办人参科研成果推广应用和转化项目(吉参茸办 2010-13 号, 2011-47 号)

¹ 长春中医药大学基础医学院生物化学教研室

² 吉林大学病理生理教研室

通讯作者: 方艳秋(1968), 女, 教授, 博士, 主要从事中药免疫学相关研究。

第一作者: 刘 磊(1978), 男, 医师, 博士, 主要从事免疫学相关研究。

表1 各组大鼠MABP的变化(kPa, $\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	基线	休克时	1 h	2 h	3 h	4 h
control 组	15.69±3.75	16.18±3.29	16.54±3.62	16.88±4.12	17.02±4.10	16.28±2.52
LPS 组	16.08±3.25	8.62±1.51	8.01±2.52	7.32±2.10	7.04±1.67	6.05±2.17
DEX+LPS 组	17.28±2.10	8.67±1.65	12.42±2.41	12.01±2.64	12.17±2.12	12.05±2.12 ¹⁾
PDS+LPS 组	16.66±2.11	8.41±1.72	11.68±2.56	11.25±2.46	11.43±2.21	11.33±2.05 ¹⁾

与 LPS 组比较:¹⁾ $P<0.05$;下表同

2.2 大鼠脑组织中MDA含量与SOD活力测定 与对照组比较,LPS组大鼠脑组织SOD活力显著降低,MDA水平显著增高($P<0.05$)。PDS+LPS组与DEX+LPS组大鼠脑组织MDA含量均明显低于LPS组,而SOD活力明显增加,见表2。

表2 各组大鼠脑组织内SOD活性、MDA含量($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
control 组	152.24±36.68	0.92±0.312
LPS+LPS 组	64.45±14.35	1.67±0.445
DEX+LPS 组	139.5±21.54 ¹⁾	1.13±0.375 ¹⁾
PDS 组	141.5±21.54 ¹⁾	1.17±0.360 ¹⁾

2.3 大鼠脑组织NF-κB P65蛋白表达量变化 Western印迹结果显示,LPS组大鼠脑组织NF-κB表达水平较对照组明显增强,PDS+LPS和DEX+LPS组可抑制该蛋白的表达,使其表达丰度与正常大鼠一致。见图1。

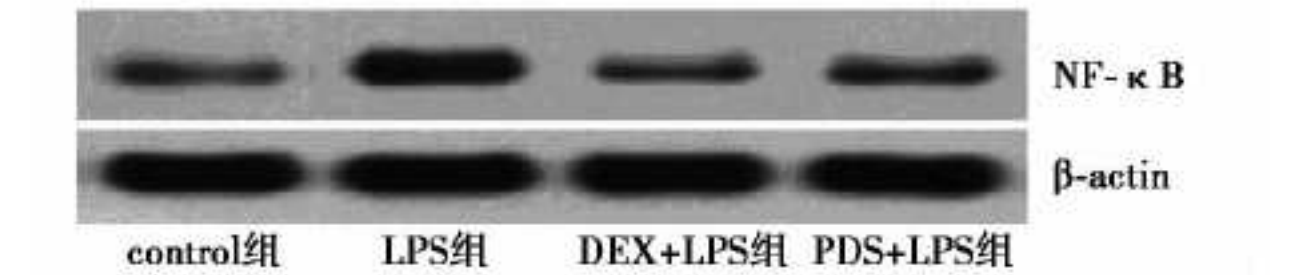


图1 大鼠脑组织NF-κB(P65)蛋白表达量变化

2.4 脑组织内炎症因子IL-1β、TNF-α和IL-6水平 LPS组大鼠脑组织匀浆IL-1β、TNF-α和IL-6水平显著高于对照组。PDS和DEX可以显著抑制大鼠脑组织中IL-1β、TNF-α和IL-6的分泌水平($P<0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠脑组织IL-1β、IL-6、TNF-α水平比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	IL-1β	TNF-α	IL-6
control 组	34.54±6.56	39.59±4.83	40.81±5.19
LPS 组	58.52±9.91	67.59±9.44	65.72±14.04
DEX+LPS 组	40.25±9.32 ¹⁾	47.21±6.54 ¹⁾	46.26±6.37 ¹⁾
PDS+LPS 组	43.59±8.78 ¹⁾	49.32±5.73 ¹⁾	48.52±7.16 ¹⁾

3 讨论

人参提取物PDS具有与DEX一样的诱导糖皮质激素受体转录活性的作用,能够提高机体促炎因子产生的自限性,避免炎症介质泛滥所导致的自身破坏性全身性炎症反应综合征,具有相当广阔的应用前景^[3]。课题组前期研究发现^[4],PDS可明显降低LPS休克所致的脑组织损伤作用,其作用可能与PDS下调TLR4 mRNA表达有关。本文在应用LPS诱导的大鼠休克模型

的基础上,初步探索PDS对LPS休克所致的脑组织损伤作用的分子机制。

本文发现PDS有与DEX类似作用,能够提高LPS休克大鼠平均动脉血压,发挥抗LPS休克的效应。研究认为,LPS休克时自由基的毒性作用是神经细胞坏死或凋亡的主要因素,自由基的浓度或剂量是神经元损伤程度及进程的主要因素之一^[5,6]。自由基在休克脑损伤中发挥重要作用。PDS与DEX一样可以有效增加SOD活性、减少MDA含量,对抗自由基损伤、保护脑组织的作用。

前期研究^[7,8]发现,LPS可以与细胞膜表面的CD14分子以及TLR4结合而促发对脑组织细胞的损伤作用。本研究进一步证实LPS可以降低LPS休克组大鼠脑组织Iκ-Bα mRNA表达结论的可靠性。细胞中NF-κB的抑制蛋白Iκ-Bα表达降低是活化的NF-κB释放并进入细胞核中与相应的靶序列结合调节基因的表的关键因素^[9]。

本研究进一步发现,PDS可以阻抑LPS所致的脑组织内急性炎症细胞因子IL-1β、TNF-α和IL-6的过表达,改善由脑损伤引发的炎症反应,从而减轻神经元坏死程度,起到保护神经元的作用。IL-1β、TNF-α和IL-6被证实NF-κB活化后入核调控的靶基因,因而推测,PDS通过抑制NF-κB信号通路的活化减少LPS休克组大鼠脑组织中炎症因子的释放,保护中枢神经系统的损伤。

本研究证实,PDS通过提高SOD活力增加自由基的清除,抑制LPS激活的NF-κB信号通路,减少炎症因子对脑组织的损伤作用,有可能代替DEX,成为有应用前景的辅助新药。

4 参考文献

1 郭鹏,赵丽晶,闫喜惠,等. 人参二醇组皂苷对内毒素休克大鼠心肌组织CD14、IκB和NF-κB p65表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2013;23(26):16-20.

2 于蕾,王健春,黄民,等. 人参二醇组皂苷对内毒素休克大鼠体内血管活性物质的调节作用[J]. 中国老年学杂志,2011;31(15):2877-8.

3 李璐,王星云,陈万才,等. 人参二醇皂苷对内毒素休克大鼠肝脏IL-18、Fas基因表达的影响[J]. 吉林中医药,2010;30(5):444-5.

4 王健春,孙晓霞,王志,等. 人参二醇组皂苷对内毒素休克大鼠脑皮质TLR4 mRNA表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2005;21(12):2431-3.

5 任丽薇,张宇忠,吴海燕,等. 加味生脉饮注射液防治内毒素休克大鼠脑损伤的实验研究[J]. 中国药师,2013;16(9):1271-5.

6 Wang Z, Kang JS, Li Y, et al. The effects of dexamethasone on rat brain cortical nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in endotoxic shock [J]. Appl Pharmacol 2006;214(3):263-9.

- 7 王 志, 李金成, 刘 潇, 等. 人参二醇组皂苷对内毒素休克大鼠脑皮质 I κ B α mRNA 表达的影响 (J). 吉林大学学报 (医学版), 2005; 31 (1): 42-4.
- 8 王 志, 李 扬, 苏 静, 等. 人参二醇组皂苷对脂多糖攻击大鼠脑皮质 NF- κ B 的影响 (J). 中国病理生理杂志, 2007; 23 (8): 1540-2.
- 9 Bartuzi P, Hofker MH, van de Sluis B. Tuning NF- κ B activity: a touch of COMMD proteins. (J). Biochim Biophys Acta, 2013; 1832 (12): 2315-21.

(2013-08-20 修回)

(编辑 袁左鸣)

抗阻训练及营养干预对老龄大鼠肌组织衰老及 MG29 蛋白的影响

周 波 (南京森林警察学院, 江苏 南京 210023)

〔摘 要〕 目的 探讨抗阻训练结合营养干预对衰老大鼠肌组织 MG29 蛋白的影响。方法 选择 8 只 3 月龄大鼠和 32 只 20 月龄大鼠。选择 24 只老龄大鼠随机分为五组, 观察抗阻训练和抗阻训练结合乳清蛋白喂养等干预对大鼠肌组织 MG29 的影响。分别以 8 只 3 月龄和 8 只 20 月龄大鼠为成年和老年对照组。结果 抗阻训练结合乳清蛋白喂养组大鼠肌组织 MG29 蛋白基因表达最高, 其次为抗阻训练组。与老龄对照组相比差异显著 (P 均 < 0.05)。结论 适宜的抗阻训练及乳清蛋白喂养可以促进肌组织 MG29 蛋白表达量的增加, 同时伴有肌组织抗氧化能力增强, 表明肌组织衰老得到抑制。

〔关键词〕 MG29; 衰老; 肌肉功能; 抗阻训练; 营养干预

〔中图分类号〕 G841 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2014)23-6696-03; doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2014.23.073

衰老肌细胞的胞外溶液的渗透压改变是肌细胞衰老的更明显的特征。近年研究发现^{〔1〕}, 有一种物质同时与增龄过程中肌细胞渗透压改变和“钙火花”反应的变化有着密切关系, 该物质是存在于肌细胞肌质网膜并接近 T 管系统的膜蛋白 Mitsugumin, 由于其分子量是 29 kD, 因而被称为 MG29 蛋白。研究者们发现^{〔2,3〕}, 在疲劳、衰老等多种状态下肌细胞中 MG29 的基因表达明显下降。而动物实验证明, 在衰老过程中, MG29 与肌细胞中钙储运能力以及 Ca^{2+} 对肌纤维渗透压改变的反应能力都存在着密切关系^{〔4,5〕}。可见 MG29 是与衰老和肌肉功能衰退直接有关。闫万军^{〔6〕} 研究发现, 抗阻训练可以使老龄大鼠肌组织中 MG29 的基因表达增加, 肌肉功能增强。本文旨在研究抗阻训练结合蛋白补充对肌细胞中 MG29 的表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验对象 雄性 SD 大鼠 3 月龄 8 只, 20 月龄 32 只, 购自中山大学实验动物中心, 在广东药学院动物房饲养并完成实验。饲养条件: 自由饮食, 自然光照, 室温 $20^{\circ}\text{C} \sim 22^{\circ}\text{C}$, 湿度 $40\% \sim 45\%$, 分笼饲养。

1.2 实验分组 将 32 只 20 月龄大鼠 (老龄大鼠) 随机分成四组, 分别为老龄负重训练组 (老训组, 负重体重的 30%)、老龄负重训练+乳清蛋白组 (老训喂养组)、老龄无训练乳清蛋白组 (老无训喂养组) 和老龄无训练普通喂食对照组 (老龄对照组)。8 只 3 月龄大鼠作为成年对照组 (成年对照组)。

1.3 仪器与试剂 ZH-PT 型国产动物实验跑台, 安徽淮北正华生物仪器设备有限公司生产。丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、脂褐素测试试剂盒购自南京建成生物工程研究所 MG29 抗体: 采用美国 Santa Cruz 生物技术有

限公司生产的 MG29 抗体, 货号为: Mg29 (A-14): sc-23441。二抗采用同一家公司生产的驴羊抗体, 货号为: IgG-HRP: sc-2024。以 β -actin 为内参蛋白。乳清蛋白粉购自加拿大 Protein 公司。动物饲料购自广东药学院动物实验中心。

1.4 实验方案

1.4.1 运动方案 两个训练组采用跑台负重跑方式进行。训练前称量大鼠体重, 根据体重给大鼠穿上相当于体重 30% 重量的“铁片衣” (本研究组自制), 令大鼠在 0° 坡度的跑台上以 10 m/min 的速度跑 1.5 min , 间歇 2 min 为一组, 每次训练跑 4 组。完成训练后令大鼠在训练房内自由活动 1 h 后再放回笼中。每天训练, 每周三休息 1 d , 共训练 10 w 。

成年对照组正常饲养, 每天将大鼠放出笼自由活动 1 h 。负重训练+乳清蛋白组和无训练乳清蛋白组喂食时, 每只大鼠的饲料中掺入 5 g 乳清蛋白粉。

1.4.2 衰老标志物检验 ①肌组织脂褐素的测试: 取大鼠股直肌组织 200 mg , 制备组织匀浆。采用 F-4500 荧光光度计进行测试, 具体操作步骤与方法依试剂盒所附的说明书进行。②SOD、MDA 的测试: 从大鼠尾尖部采血 $20\text{ }\mu\text{l}$, $3\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min , 取血清进行紫外分光光度计测试, 具体步骤与方法依试剂盒说明书所示进行操作。

1.4.3 Western 印迹检测大鼠股直肌组织中 MG29 蛋白的基因表达 ①蛋白质抽提: 测试组织取自大鼠后右侧大腿股直肌, 截取 250 mg 作为测试对象, 加 1 ml 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂, 匀浆后抽提总蛋白; 实验对象为细胞样品, 每份样品取 $10^6 \sim 10^7$ 细胞。磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞, 去 PBS 加 0.1 ml 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂抽提总蛋白。②蛋白质测定: 按 KCTMBCA 蛋白质定量测试试剂盒操作说明进行操作, 测定样品蛋白浓度。③SDS-PAGE: 将准备好的样品液和生物素标记的蛋白质分子量标准分别上样, 标准加进第一个孔中, 电泳分离蛋白。④蛋白质转移到 PVDF 膜上: 按 Bio-Rad 蛋白转移说明组装滤纸凝胶纤维素夹层, 在 30 mA 恒流条件下,

第一作者: 周 波 (1974), 男, 副教授, 主要从事运动锻炼与运动免疫学研究。