

人参皂甙 Rb1 对应激大鼠肝脏热休克蛋白 70 和蛋白激酶 C 的影响及相关性研究

许利刚¹ 李 宁²

1. 浙江中医药大学 杭州 310053 2. 浙江中医药大学附属第一医院

摘要: [目的] 研究人参皂甙 Rb1 对应激大鼠肝脏 HSP-70 (热休克蛋白 70) 和 PKC (蛋白激酶 C) 的影响及两者的关系。 [方法] 56 只 SD (Sprague-Dawley) 大鼠分为人参皂甙组、生理盐水组、假手术组, 均采用大鼠肝脏缺血再灌注制作应激模型, 手术后于 30min、60min 及 180min 定点处死实验动物, 收集肝脏标本, 应用 ELISA 法测定大鼠肝细胞 HSP70 的表达及 PKC 的水平。 [结果] 人参皂甙 30min 组和 60min 组与生理盐水组比较, HSP70 表达明显较高 ($P < 0.05$); 人参皂甙 60min 组 PKC 水平较生理盐水组高, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 大鼠肝脏的 PKC 水平与 HSP70 的表达进行线性回归分析显示两者呈显著的正相关。 [结论] 人参皂甙 Rb1 可以提高应激时大鼠肝脏 HSP70 的表达和 PKC 水平提高, 且 HSP70 的表达与 PKC 水平的变化呈正相关。

关键词: 人参皂甙 Rb1; 应激; 热休克蛋白 70; 蛋白激酶 C

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-5509 (2009) 04-0480-03

Influence of Ginsenoside Rb1 on Stress Rats' Liver Heat Shock Protein-70 and Protein Kinase C and the Study on the Relativity between Them Xu Ligang¹, Li Ning² Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2. Zhejiang Provincial TCM Hospital

Abstract: [Objective] To study the effect of ginsenoside Rb1 on liver heat shock protein-70 and protein kinase C and the relationship between the two factors. [Methods] 56 SD (Sprague Dawley) rats were divided into 3 groups: ginsenoside group, saline group, sham-operated group. Put these rats to death at 30min, 60min and 180min, extract liver and draw blood, use the ELISA to analyze the expression of HSP-70 and the level of PKC. [Results] (1) To compare the level of PKC at different time points of ginsenosides and the saline group, 60 min ginsenoside group is higher than the saline group. There is a significant difference ($P < 0.05$). Comparison of ginsenosides and saline 30 min and 180 min is no significant difference ($P > 0.05$). (2) To compare HSP70 at different time points of ginsenosides and the saline group, 30 min and 60 min ginsenoside groups are higher than the saline group. There is a significant difference ($P < 0.05$). Comparison of ginsenosides and saline 180 min is no significant difference ($P > 0.05$). (3) The linear regression analysis of the level of PKC and the expression of HSP-70 show that two factors are in significant positive correlation. [Conclusions] 1. Ginsenoside Rb1 can increase the expression of HSP70. 2. Ginsenoside Rb1 can increase the level of PKC. 3. The movement of the expression of HSP-70 and the level of PKC are in significant positive correlation.

Key words: ginsenoside Rb1; stress; heat shock protein-70; protein kinase C

应激是指机体在受到各种强烈因素 (应激原) 刺激时所出现的非特异性全身反应, 又称为应激反应。研究发现应激过程中产生的多种介质、应激激素和细胞因子可以通过直接或间接途径导致肝细胞的损伤和功能变化, 从而影响机体的应激调节功能, 进而影响机体的预后或转归。笔者于 2007 年 7 月至 2008 年 1 月, 采用大鼠肝脏缺血再灌注制作应激模型, 通过检测大鼠肝脏热休克蛋白 70 (HSP70) 和蛋白激酶 C (PKC) 的变化, 观察人参皂甙 Rb1 对应激时对 HSP70 和 PKC 的影响及两者的关系, 从而探讨人参皂甙 Rb1 保护应激机体的机制是否与 PKC 有关。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 56 只, 体重 (200 ± 15) g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器 人参皂甙 Rb1 粉针剂 (上海同田生物技术有限公司); HSP70 ELISA 试剂盒、PKC ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司); 全自动酶标仪: SERIAL RS-232C 型 (浙江中医药大学生物实验室)。

1.3 实验分组及造模 将大鼠分为人参皂甙组、生理盐水组、假手术组。根据 Pringle's 改良法造模: 大鼠禁食不禁水 12h, 人参皂甙组尾静脉注射人参皂甙 Rb1 1ml/kg, 生理盐水组注射生理盐水 1ml/kg, 30min 后腹腔注射 10% 水合氯醛 0.4ml/100g (400mg/kg) 麻醉。

基金项目: 浙江省教育厅科技项目 (No: 20040678)

Fund project: Sci-tech Item of Zhejiang Provincial Educational Bureau (No: 20040678)

1.4 实验方法 250u/ml 肝素钠按 2~4ml/kg 静脉注射全身肝素化。将大鼠平卧位固定于手术台上,手术区备皮,PVP 碘消毒,铺巾。常规手术操作沿腹白线作约 2.5cm 的切口,暴露肝脏,轻轻游离肝动脉、门静脉、胆总管,用无创伤微血管夹夹闭肝十二指肠韧带,阻断入肝血流,造成肝脏缺血,30 min 后松开微血管夹,恢复血供。术后立即于双侧腹股沟皮下各注射 1ml 生理盐水,以补充术中液体丢失。操作过程中所有动物腹腔注射 37 生理盐水 10ml,以保持血液动力学的稳定。术后分别于 30、60、180min 处死后取肝脏标本,称重 0.1g 左右,放入匀浆器,加入细胞裂解液 1ml,0 冰浴环境中手工匀浆至肝脏组织完全磨碎溶解。将匀浆液倒入离心管,于 4 低温离心机离心(20000rpm,20min),吸取上清液,标记后置于 -80 冰箱内冷冻保存。

1.5 观测指标及检测方法 HSP70 及 PKC 测定:酶联免疫吸附(ELISA)法测定,试剂购自武汉华美生物工程有限公司,严格按照试剂盒说明书操作。

1.6 统计方法 应用 SPSS17.0 统计软件包进行统计分析处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数间两两比较用 q 检验(SNK 法)。取双侧 $P < 0.05$ 为统计学有显著性差异。

2 结果

2.1 肝脏 HSP70 表达 模型组大鼠肝脏 HSP70 表达较假手术组明显增高,与假手术组比较有显著性差异($P < 0.05$),造模成功。人参皂甙 30min 组和 60min 组与生理盐水组比较,HSP70 表达明显较高($P < 0.05$),说明人参皂甙 Rb1 在肝脏缺血再灌注后相应时间点能提高 HSP70 的表达。而 180min 两组比较无明显差异($P > 0.05$),说明人参皂甙 Rb1 在肝脏缺血再灌注后相应时间点对 HSP70 的表达效果不明显,详见表 1。

表 1 人参皂甙 Rb1 对缺血再灌注大鼠肝脏 HSP70 含量的影响(ng/ml , $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	作用时间(min)		
	30	60	180
假手术组	-	-	150.58 ± 24.15
人参皂甙组	241.5 ± 25.99*	264.60 ± 65.76*	296.39 ± 84.93*
生理盐水组	185.59 ± 37.18	208.20 ± 52.73*	274.35 ± 60.30*

与假手术组比较, * $P < 0.05$, 人参皂甙组与生理盐水组同一时间点相比较, $P < 0.05$

2.2 肝脏 PKC 水平 模型组大鼠肝脏 PKC 水平较假手术组明显增高,与假手术组比较有显著性差异($P < 0.05$),造模成功。人参皂甙 60min 组 PKC 水平较生理盐水组高,有显著性差异($P < 0.05$),说

明人参皂甙 Rb1 在肝脏缺血再灌注后相应时间点能提高 HSP70 的表达。而 30min 和 180min 两组分别比较无明显差异($P > 0.05$),说明人参皂甙 Rb1 在肝脏缺血再灌注后相应时间点对 PKC 的水平影响不明显,详见表 2。

表 2 人参皂甙 Rb1 对缺血再灌注大鼠肝脏 PKC 水平的影响(pg/ml , $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	作用时间(min)		
	30	60	180
假手术组	-	-	49.04 ± 7.51
人参皂甙组	75.21 ± 11.89*	125.49 ± 18.47*	83.63 ± 17.94*
生理盐水组	68.91 ± 16.49*	90.42 ± 73.14*	73.14 ± 15.86*

与假手术组比较, * $P < 0.05$, 人参皂甙组与生理盐水组同一时间点相比较, $P < 0.05$

2.3 肝脏 HSP70 与 PKC 水平的相关性分析 静注人参皂甙大鼠肝脏 PKC 水平随着时间点总体变化呈 V 字形,而肝细胞 HSP70 的表达总体也呈 V 字形。利用 SPSS17.0 做出 PKC-HSP70 拟合曲线见图 1。对 HSP70 和 PKC 进行线性回归分析,结果表明:PKC 与 HSP70 呈显著正相关。

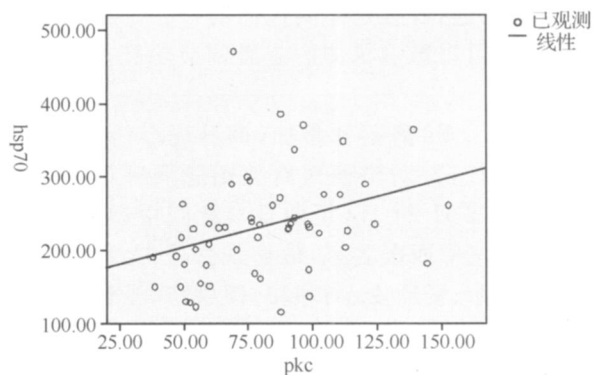


图 1 PKC-HSP70 拟合曲线

3 讨论

HSP 是一组高度保守的蛋白质,是细胞内一种内源性具有保护作用的物质,能增强机体或细胞对于打击的耐受。其中 HSP70 在热休克、微生物感染及自身免疫性疾病等应激条件下具有重要的细胞保护作用^[1]。HSP70 对肝脏损伤的保护作用表现在:(1)氧化损伤的保护;(2)缺血再灌注的保护;(3)抗细胞凋亡;(4)抗炎作用。本研究结果显示,造模后各组大鼠肝脏 HSP70 的表达先后升高,与文献报道一致^[2-3]。PKC 是属丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶的多基因超家族^[4],是肌醇磷脂系统的中心酶,它可使大量的底物磷酸化而广泛参与保护性蛋白质的合成、细胞的生长分化、细胞的分泌等作用的生理调节。Yang 等^[5]研究发现缺血可以促使某些内源性物质

释放,这些物质包括儿茶酚胺、氧自由基、腺苷等,它们作用于细胞膜上的特异性受体,通过 G 蛋白的介导,激活磷脂酶 C 或 D,使磷脂酰肌醇二磷酸或肌醇磷脂胆碱水解,引起二酰基甘油生成及细胞内 Ca^{2+} 浓度增高,从而激活 PKC。PKC 激活后产生的保护作用是一些效应蛋白磷酸化的结果。ATP 依赖的钾通道、5-核苷酸酶、热休克蛋白和丝裂素活化蛋白激酶等有可能成为 PKC 的底物。本研究结果显示:而大鼠 PKC 水平变化与 HSP70 的表达变化根据线性回归分析呈显著的正相关,表明人参皂甙 Rb1 促进 HSP70 表达的机制与 PKC 有关。

人参主补五脏,安精神,大补元气,生津止渴,可挽救气脱危症及肺虚喘促、脾虚泄泻、消渴少津等一切虚症。人参增强免疫系统功能,促进生长发育,增强动物对外部或内部因素引起功能低下的抵抗力和适应性即抗应激作用与中医滋补强壮含义是接近的。现代药理学研究表明人参是适应原性药物,具有双向调节作用。人参的双向调节作用是指向着有利于机体功能恢复和加强的方向进行调节。这个结论与传统中医关于人参“扶正祛邪”的作用是相符的。

综上所述,肝脏是体内代谢的中心,又是重要的免疫器官,可以影响机体的应激调节功能,进而影响

机体的预后或转归。HSP70 是细胞内一种内源性具有保护作用的物质,增强机体或细胞对于打击的耐受。我们的实验表明,人参皂甙 Rb1 可以提高应激时大鼠肝脏 HSP70 的表达和 PKC 水平提高,且 HSP70 的表达与 PKC 水平的变化呈正相关。

参考文献:

- [1] 赵祯,安冬艳,秦丽娟,等. HSP70 在经热应激预处理后减少大鼠肝脏缺血再灌注损伤过程中的作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(4):454-7.
- [2] Kano R, Abe K, Hasegawa A. cDNA of canine heat shock protein70(HSP70) [J]. Veterinary Research Communications,2004,28(5):395.
- [3] 罗东林,周继红,刘宝华,等. 热休克蛋白 70 与严重多发伤后早期继发性肝脏损害[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(4):204.
- [4] Carini R,DeCesaris MG,Splendore R,et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes[J]. Hepatology,2001,33(1):131-139.
- [5] Yang XM, Sato H, Downey JM. Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C action[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1997, 29: 143-151.

(收稿日期 2009-01-16)

(上接第 471 页)高福林参加,询其近今所治何证居多,方法如何,并对中西医有关话题展开讨论。(甲戌)1934 年 6 月 24 日(星期日),杜同甲邀请了绍兴城内的八位中西医名家,他们是张爱白、单轶凡、杨厚斋、裘士东、杨质安、周家枚、田康济、王铁如,除王铁如有事未到外,余皆赴会。席间议决,(一)定名:为甲戌中西医联欢会。(二)旨趣:以增加中西医界感情及研讨学术、阐发真理为主旨。(三)会议日期:定每月第一个星期日,轮值先后,以年龄长幼为序。嗣后,众人或述医理,或议时事,海阔天空,一时觥筹交错,从下午四时至晚上九时,始尽欢而散。这是绍兴早期的中西医沙龙,在全国也属先行。

重视医学知识的普及。30 年代的《绍兴新闻日报》,专门辟有《医药与社会》专栏,每逢周二刊行,由赵能谷(名医赵晴初之孙)主持,以“发皇古义,融会新知,提高中医学学术之水准,介绍合理的医药常识”为宗旨,除介绍一般的中西医保健用药知识外,还发表诸如《重要传染病中西名词对照表及概说》等文章,对普及人们对中西汇通的认识,有一定作用。张若霞《通俗内科学·自序》说,“本书病理多采新学,处方均用中药”,也是中西汇通的一种方式。这些做法是 20 世纪三、四十年代中国中西医汇通实践的宿

影,并影响着今天中西医研究的方向。

投身反对取缔中医活动的前列。1929 年 3 月,裘吉生(杭州代表)、曹炳章、何幼廉(绍兴代表)赴沪参加全国中医药团体大会,裘吉生被选为大会执行主席之一。会上,裘吉生提议以 3 月 17 日为中医药界的纪念日,当场即获热烈鼓掌通过,这就是“三一七”国医节的由来。会后,裘吉生与陆仲安等名老中医作为顾问随五人代表团赴宁请愿。在南京,裘吉生治愈了行政院长谭延的病,并利用私人关系会晤了蔡元培、胡汉民、宣铁吾、蒋梦麟、邵元冲等国民党政要,为请愿奔走活动。期间,上海《申报》还以《总理遗墨》作为醒目标题,刊登孙中山赠裘吉生的题词“救民疾苦”,以孙中山表彰中医中药之事实,驳斥废止中医案的无理。

千年越医,越医千年。愿海内外当代越医秉承先贤遗风,齐心协力,共创越医新辉煌!

参考文献:

- [1] 王国强. 千年越医,秀若奇葩[N]. 中国中医药报,2008,15(6):21.
- [2] 邓铁涛,程之范. 中国医学通史近代卷[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:168.

(收稿日期 2008-03-15)