

• 药理与临床 •

人参皂苷 Rg_1 诱导人肝 HL-7702 细胞糖皮质激素受体
报告基因表达的作用李 勇¹, 李毅平¹, 虞 胜¹, 凌昌全²

(1. 上海中医药大学附属上海市中医医院, 上海 200071; 2. 第二军医大学 中医系, 上海 200433)

摘要:目的 探讨人参皂苷 Rg_1 (ginsenoside Rg_1 , G- Rg_1) 对人肝 HL-7702 细胞糖皮质激素受体 (GR) 的调节作用。方法 将含有糖皮质激素受体反应元件 (GRE) 的荧光素酶报告基因的表达式质粒载体 pGRE-tk-LUC 与内参照基因载体质粒 pRL-SV40, 通过脂质体介导瞬时转染至人肝 HL-7702 细胞中, 利用双荧光素酶报告基因检测系统, 观察报告基因的表达变化; 利用 Western blotting 方法检测药物对细胞 GR 蛋白表达的影响。结果 G- Rg_1 与地塞米松均可诱导 pGRF-tk-LUC 报告基因表达, 且呈剂量依赖性, 而且这种诱导作用可以被糖皮质激素受体阻断剂 RU486 (Mifepristone) 所阻断, G- Rg_1 对细胞 GR 蛋白表达有显著的抑制作用。结论 G- Rg_1 在体外能够表现出一些类似糖皮质激素样的生物活性, 可能是 GR 的配体。

关键词: 人参皂苷 Rg_1 ; 糖皮质激素受体 (GR); 报告基因

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)12-1823-04

Inducement of ginsenoside Rg_1 on expression of glucocorticoid
receptor report gene in HL-7702 cellsLI Yong¹, LI Yi-ping¹, YU Sheng, LING Chang-quan²

(1. Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated in Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of ginsenoside Rg_1 (G- Rg_1) on regulation of glucocorticoid receptor (GR) in HL-7702 cells. **Methods** HL-7702 Cells were transiently cotransfected by Lipofect AMINETM 2000 with pGRE-tk-LUC reporter plasmid and pRL-SV40 plasmid. The effects of G- Rg_1 and Dexamethasone on luciferase activity expression were detected by Dual-Luciferase Reporter Assays, the protein expression of GR in HL-7702 cells was analyzed by Western blotting assay, respectively. **Results** A dose-dependent induction of the reporter gene was observed in response to Dex or G- Rg_1 , and the inductive effect was blocked by treatment with the antiglucocorticoid RU486 (Mifepristone). G- Rg_1 also down-regulated the GR protein expression in HL-7702 cells. **Conclusion** These results strongly indicate that G- Rg_1 , which may be a ligand of GR, has some glucocorticoid-like effect *in vitro*.

Key words: ginsenoside Rg_1 (G- Rg_1); glucocorticoid receptor (GR); report gene

人参具有抗衰老、抗应激、抗肿瘤和调节免疫等功能^[1]。人参皂苷是人参的主要药效成分, 人参皂苷可分人参二醇、三醇、齐墩果酸型皂苷。人参有许多与糖皮质激素 (GC) 相似的药理作用, 而 GC 的这些作用都是通过糖皮质激素受体 (GR) 介导的。为了解人参皂苷中是否存在能有效激活 GR 的成分, 本课题组利用双荧光素酶报告基因检测方法, 观察

了人参皂苷单体 Rb_1 、 Re 、 Rg_1 、 Rg_3 对 GR 报告基因表达的影响, 发现人参皂苷 Rg_1 (G- Rg_1) 可特异性诱导 GR 报告基因表达, 具有剂量依赖性, 并且 G- Rg_1 能够显著抑制细胞 GR 的表达。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和药物: 质粒 pGRE-tk-LUC (Dr. Simons 惠赠, 美国 NIH); pRL-SV40、大肠杆菌

收稿日期: 2006-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472271)

作者简介: 李 勇 (1968—), 男, 河南省唐河县人, 医学博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事中西医结合消化疾病的临床与基础研究
工作。Tel: (021) 56624066 E-mail: liyong8256@sohu.com

DH5 α (第二军医大学病生教研室李忆东硕士惠赠)。质粒抽提试剂盒 (Qiagen 公司); Lipofect AMINE™ 2000 转染试剂盒 (Invitrogen 公司产品); Dual-Ruciferase Reporter Assay System 试剂盒 (Promega 公司); 鼠抗 GR 单克隆抗体 (GR H-300, Santa Cruz, 美国); 活性炭 (Serva 公司); 地塞米松 (Sigma 公司), 3 g 地塞米松用无水乙醇 0.76 mL 溶解后制成 10 mmol/L 母液, 4 °C 贮存; 4.3 mg 糖皮质激素受体阻断剂 RU486 (Sigma 公司), 无水乙醇 1 mL, 溶解后 4 °C 贮存。G-Rg₁ (质量分数 $\geq 98.8\%$) 购自中国药品生物制品检定所; G-Rg₁ 20 mg 经 75% 乙醇处理, 用细胞培养液配至终质量浓度为 10 mg/mL 母液备用; 其他材料及试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞系及细胞培养: HL-7702 为人正常肝组织来源细胞 (中国科学院上海细胞研究所建株), 置含 5% 小牛血清及抗生素的 RPMI-1640 (Gibco BRL 公司) 培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿润空气中培养。

1.3 荧光素酶报告基因检测

1.3.1 质粒的扩增及纯化: 按文献方法^[2], 制作感受态细胞、质粒转化、阳性克隆细胞筛选、质粒扩增, 按 Qiagen-tip 100 (Midi) plasmid purification kit 质粒抽提试剂盒说明书进行质粒抽提、纯化并定量。

1.3.2 脂质体介导的细胞瞬时转染: 严格按转染试剂盒说明书操作。HL-7702 细胞以每孔 8×10^4 个接种于 24 孔培养板中, 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养液培养细胞 2 d (细胞长至 80% 满), 去培养液, 用 PBS 洗细胞两次。取 500 ng 荧光素酶报告基因质粒 pGRE-tk-LUC、5 ng 内参照基因质粒 pRL-SV40 (二者比例为 100 : 1) 与 1.2 μ g 脂质体共同加入 0.6 mL 无血清、无抗生素的 RPMI-1640 培养液中, 混匀室温孵育 30 min 后转入培养孔中。于 5% CO₂、37 °C 培养 8 h。弃去转染混合液, 更换含 10% FBS (DCC 处理) 的 RPMI-1640 培养液 0.5 mL, 用试验药物或地塞米松进行相应处理, 而对照组用 70% 乙醇代替。根据需要培养所需时间后, 弃去培养液, 用 1 $\times$ PLB (passive lysis buffer) 裂解细胞后, 立即上机检测。

1.3.3 报告基因荧光素酶 (LUC) 的测定: LUC 活性测定按双荧光素酶报告基因检测系统 (Dual-Luciferase Reporter Assay) 试剂盒说明书进行, 用 Minilumat LB 9506 单光子检测仪 (Berthold 公司, 德国) 检测, 记录报告基因 pGRE-tk-LUC 荧光素

酶与内参照基因 pRL-SV40 荧光素酶活性的比值。

1.4 Western blotting 检测

1.4.1 样品的制备: 取对数生长期细胞按每孔 1.2×10^6 的密度接种于 6 孔板。按试验设计加入含药物培养液培养细胞到预定时间, 离心收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞后, 加入上样缓冲液 100 μ L, 剧烈振荡后冰浴下超声处理 1 min。100 °C 加热 10 min 使蛋白变性, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液存于 -20 °C 待测。蛋白浓度用 Bradford 法^[3]测定。

1.4.2 Western blotting 分析: 取 50 μ g 蛋白在 SDS-PAGE 电泳下分离, 分离胶为 12%, 积层胶为 5%。根据预染的蛋白 Marker 指示, 小心割取 GR (相对分子质量 94 000) 所在区带, 电转移至硝酸纤维素膜, 用 15% 脱脂奶粉于室温下摇动封闭膜 2 h。膜在抗 GR 多克隆抗体 (1 : 500) 稀释液中 4 °C 孵育过夜, 聚山梨酯 20-PBS 洗膜 15 min, 共 3 次后, 在二抗 (HRP 标记) 稀释液 (1 : 500) 中孵育 4 h。再次洗膜后加入 ECL 试剂, 反应 1 min, 用 X 片曝光 1~5 min (根据荧光强度而定), 对底片上的显影条带进行计算机吸光度扫描定量。

1.5 统计学方法: 所有实验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *F* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 对 HL-7702 细胞内 pGRE-tk-LUC 的诱导表达: 使用地塞米松 (10 nmol/L)、G-Rg₁ (5 μ g/mL) 分别处理 HL-7702 细胞 12、24、36、48、72 h 后, 观察药物对细胞报告基因表达的影响, 结果显示, 地塞米松可明显诱导报告基因的表达, 作用细胞 36 h 可以得到最大的 51 倍的诱导效应; 5 μ g/mL G-Rg₁ 也可以诱导细胞内 pGRE-tk-LUC 的表达, 48 h 时最大诱导效应为 23 倍 (图 1)。为了更进一步探讨药物对 HL-7702 细胞中的 GR 报告基因的转录激活效应, 利用不同浓度的地塞米松 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L) 以及 G-Rg₁ (0.625~10 μ g/mL) 诱导细胞 48 h 后检测报告基因的表达。见图 2。当地塞米松浓度为 100 nmol/L 时, 可以获得最高达 97 倍的诱导效应; 而当 G-Rg₁ 质量浓度为 5 μ g/mL 时, 可以获得最大的诱导效应 (图 3)。

2.2 糖皮质激素受体阻断剂 RU486 对地塞米松及 G-Rg₁ 诱导效应的抑制作用: 为确定地塞米松及 G-Rg₁ 对 GR 报告基因的诱导表达是通过 GR 途径来实现的, 进一步利用 RU486 (1×10^{-6} mol/L) 分别与地塞米松 (1×10^{-7} mol/L) 和 G-Rg₁ (5 μ g/mL) 共同作用细胞, 48 h 后检测报告基因的表达变

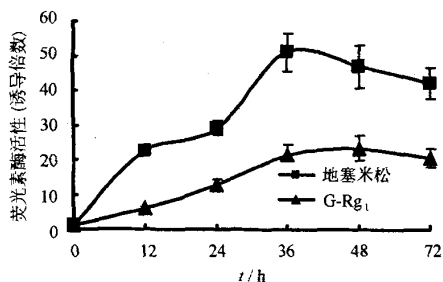


图 1 G-Rg₁对 HL-7702 细胞内 pGRE-tk-LUC 的诱导表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Inducement of G-Rg₁ on expression of pGRE-tk-LUC gene in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

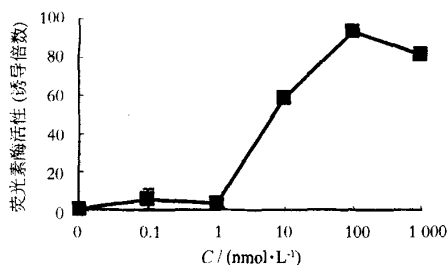


图 2 不同浓度的地塞米松对 HL-7702 细胞内 pGRE-tk-LUC 的诱导表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Inducement of Dexamethasone at various concentrations on expression of pGRE-tk-LUC gene in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

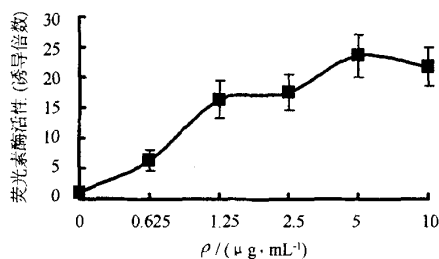


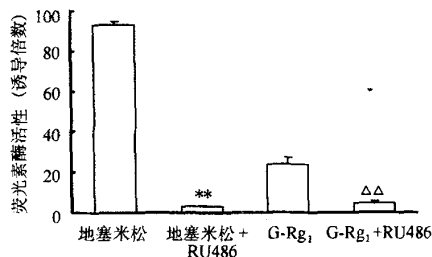
图 3 不同质量浓度 G-Rg₁对 HL-7702 细胞内 pGRE-tk-LUC 的诱导表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Inducement of G-Rg₁ at various concentrations on pGRE-tk-LUC gene in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

化。结果显示,地塞米松、G-Rg₁ 对 HL-7702 细胞内 GR 特异性荧光素酶报告基因的诱导表达作用可被 GR 阻断剂 RU486 阻断 (图 4)。

2.3 药物对 HL-7702 细胞 GR 蛋白的下调作用: 为了进一步探讨 G-Rg₁对 HL-7702 细胞内 GR 蛋白的影响,利用地塞米松 (1×10^{-7} mol/L)、G-Rg₁ (5 μg/mL) 共同作用细胞 48 h 后,通过 Western

blotting 方法检测细胞内 GR 蛋白的表达变化。结果地塞米松、G-Rg₁作用细胞后,细胞内 GR 蛋白表达明显减少,与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$) (图 5)。



与地塞米松组比较: ** $P < 0.01$

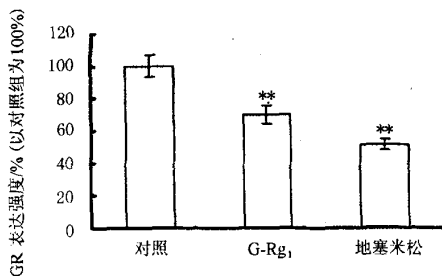
与 G-Rg₁组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Dexamethasone group

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs G-Rg₁ group

图 4 RU486 对 G-Rg₁诱导效应的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Inhibition of RU486 on G-Rg₁-inducement ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

图 5 G-Rg₁对 HL-7702 细胞 GR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of G-Rg₁ on protein expression of GR in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

GC 对机体的发育、分化和代谢起着重要作用, GC 的作用主要是由细胞内 GR 所介导的,在人体肝和胸腺组织中 GR 表达最多,这种配基依赖的转录因子的作用机制已被阐明。目前认为,GC 调节基因表达的基本模式:GC 与 GR 结合导致 GR 的活化,活化的 GR 以同二聚体的形式与靶基因中的糖皮质激素反应元件 (glucocorticoid response element, GRE) 结合,通过与共调节因子和基础转录成分相互作用,促进或抑制靶基因的表达,引起生物学效应^[4];而 GC 在诱导 GR 激活的同时也会抑制 GR 的表达^[5]。

人参系五加科多年生草本植物,为传统补虚中

药,人参中成分复杂。人参皂苷是人参的主要活性成分,属于三萜类物质,在结构上具有类似 GC 样的甾环结构。人参在抗应激、调节免疫等方面作用有类似 GC 样作用。先前的研究发现,人参茎叶总皂苷在体外能够增强地塞米松诱导的 GR 受体特异性荧光素酶报告基因的表达^[6],进一步的研究发现,这种作用可能是通过其抑制地塞米松对 GRmRNA 以及蛋白的下调作用而实现的^[7]。人参茎叶总皂苷是多苷元的复合物,不同的人参单体皂苷的作用及其机制也不完全一致。本课题组利用双荧光素酶报告基因检测方法,以地塞米松作为参照,观察了人参二醇以及三醇皂苷单体 Rb₁、Re、Rg₁、Rg₃对 GR 报告基因的诱导表达,结果显示,G-Rg₁可特异性诱导 GR 报告基因表达,具有剂量依赖性;并且 G-Rg₁作用 HL-7702 细胞后,细胞 GR 蛋白表达明显下降,本实验结果初步显示 G-Rg₁具有 GC 样的活性,此结果可能对发现人参以及人参皂苷新的药理学作用以及作用靶点奠定一定的实验基础。

References:

- [1] Wang B X. *Ginseng Research* (人参的研究) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Publishing House, 1985.
- [2] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72 (5): 248-250.
- [4] Meier C A. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors [J]. *J Recept Sign Transd Res*, 1997, 17(1-3): 319-335.
- [5] Hoeck W, Rusconi S, Groner B. Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells. Investigations with a monospecific antiserum against a bacterially expressed receptor fragment [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(24): 14396-14402.
- [6] Li Y, Li M, Wang X, et al. Experimental study on effect of ginsenosides of ginseng stem and leaf in enhancing the transactivation of glucocorticoid receptor induced by Dexamethasone *in vitro* [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24(8): 710-713.
- [7] Ling C Q, Li Y, Zhu X Y, et al. Ginsenosides may reverse the Dexamethasone-induced down-regulation of glucocorticoid receptor [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 140: 203-209.

洋金花有效部位及其组分对二甲基亚砷损伤的中国仓鼠卵巢细胞的保护作用

唐 玲¹, 王秋红¹, 杨炳友¹, 肖洪彬¹, 孙艳萍², 匡海学^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 北京大学中国药物依赖性研究所, 北京 100083)

摘要:目的 观察洋金花不同提取物(有效部位、醉茄甙内酯组分和黄酮组分)对二甲基亚砷(DMSO)损伤的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的保护作用。方法 常规传代培养 CHO 细胞,采用噻唑蓝(MTT)法和乳酸脱氢酶(LDH)法测定细胞活性。结果 3% DMSO 与 CHO 细胞共同孵育 24 h 后,经 MTT 法检测细胞存活率明显下降。洋金花有效部位(10~80 μg/mL)剂量依赖性增加细胞活性;洋金花醉茄甙内酯组分(30~120 μg/mL)对 DMSO 的细胞损伤作用无明显影响,而洋金花黄酮组分(2.5~20 μg/mL)呈剂量依赖性减轻 DMSO 对细胞的损伤作用。4.5% DMSO 与 CHO 细胞共同孵育 24 h 后,细胞 LDH 的漏出率明显增加。洋金花有效部位(10~80 μg/mL)、洋金花醉茄甙内酯组分(30~120 μg/mL)和洋金花黄酮组分(2.5~20 μg/mL)均不能降低细胞 LDH 的漏出率。结论 洋金花中的黄酮组分可以减轻 DMSO 的细胞毒性,此种药理作用可能与改善细胞线粒体的功能有关,而对细胞膜的损伤无明显保护作用。

关键词:洋金花;中国仓鼠卵巢(CHO)细胞;二甲基亚砷(DMSO);醉茄甙内酯;黄酮组分(FC)

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)12-1826-06

Protective effects of active fraction and constituents from *Flos Daturae* on Chinese hamster ovary cells injured by dimethyl sulfoxide

TANG Ling¹, WANG Qiu-hong¹, YANG Bing-you¹, XIAO Hong-bin¹,
SUN Yan-ping², KUANG Hai-xue¹

收稿日期:2006-03-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371736)

作者简介:唐 玲(1977—),女,黑龙江省哈尔滨市人,黑龙江中医药大学博士研究生,主要从事中药复方药效物质基础及其作用机制研究。E-mail: tangyuling6688@163.com

* 通讯作者 匡海学 Tel: (0451) 82110803 Fax: (0451) 82110803 E-mail: hxkuang@hotmail.com