

考。对不同工艺菝葜提取物总黄酮定量测定结果也显示以水提醇沉物总黄酮的量最高,故由此推测,总黄酮有可能是菝葜用于治疗妇科炎症的主要有效部位。

参考文献:

- [1] 曾晓霞,陈锡林.菝葜传统应用和现代研究概况[J].中草药,2008,39(6):952-954.
[2] 赵钟祥,冯育林,阮金兰,等.菝葜化学成分及其抗氧化活

性的研究[J].中草药,2008,39(7):975-977.

- [3] 邵波,郭洪祝,果德安.菝葜中黄酮和二苯乙烯类成分的研究[J].中草药,2009,40(11):1700-1703.
[4] 闻莉,张三元,李莉,等.大鼠慢性盆腔炎模型的技术要求及模型特点[J].浙江中西医结合杂志,2001,11(8):484-486.
[5] 张小丽,张静云,陈瑞明,等.盆炎宁对混合菌液致大鼠慢性盆腔炎治疗作用的实验研究[J].中药药理与临床,21(2):37-39.

人参皂苷 G_K 对心脏蛋白激酶 C 信号转导通路的影响

高艳,刘汉清,苗宁舒,陈方芳,李桂生*

(烟台大学药学院,山东烟台 264005)

摘要:目的 观察人参皂苷 G_K 对心脏蛋白激酶 C 信号转导通路的影响,并探讨其作用机制。方法 采用 oligo GEArray 基因芯片技术观察人参皂苷 G_K 对心脏基因表达的影响;采用放射免疫法观察人参皂苷 G_K 对体外培养的新生 SD 大鼠心肌细胞蛋白激酶 C 活性的影响;采用 Straub's 蛙心灌流法观察人参皂苷 G_K 对蟾蜍离体心脏心肌收缩力的影响。结果 人参皂苷 G_K 可使小鼠心脏基因表达谱发生明显改变,明显上调 Prkc α 、Prkc ϵ 基因表达;可明显增加心肌细胞蛋白激酶 C 活性,并促进其从细胞浆向细胞膜移位,佛波醇酯和白屈菜赤碱分别能加强和抑制该作用;能够明显增强蟾蜍离体心脏的心肌收缩力,肾上腺素能受体阻断剂拉贝洛尔能抑制该作用。结论 人参皂苷 G_K 可激活心脏蛋白激酶 C 系统,可能是肾上腺素能受体激动剂。

关键词: 人参皂苷 G_K; 蛋白激酶 C; 肾上腺素能受体; 心肌收缩力

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2049-03

人参皂苷是人参及其同属植物(三七、西洋参等)的主要药理活性成分,具有多种药理活性^[1-2]。按照传统中医主治病症分析,心血管系统是人参皂苷主要生物学效应器官之一。人参皂苷 G_K 属二醇型皂苷,是人参皂苷在体内发生作用的主要成分之一^[3-5]。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一组富含丝氨酸和苏氨酸残基的蛋白激酶,激活后可使目标蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化,参与心脏多条信号转导通路^[6-8]。关于人参皂苷 G_K 对心脏 PKC 信号转导通路的影响目前尚未见报道。本实验旨在观察人参皂苷 G_K 对心脏 PKC 信号转导通路的影响并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物、试剂与仪器: 人参皂苷 G_K (质量分数>98%) 由山东绿叶天然药物研究开发有限公司提供, oligo GEArray 基因芯片 (上海康成生物技术有限公司), PKC 检测试剂盒 (Gibco 公司), DMEM 培养液 (Sigma 公司), 胶原酶 (Sigma 公司), 盐酸拉贝洛尔注射液 (江苏天禾迪赛诺制药有限公司),

其他常用试剂均为国产分析纯。肌张力换能器, 多道生理记录仪 (RM 6240C, 成都仪器厂制造)。

1.2 动物: 蟾蜍 (15~22 g) 购自烟台师范学院; 昆明种小鼠 (18~22 g), 新生 SD 大鼠 (1~3 d) 由山东绿叶制药有限公司动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK (鲁) 20090009。

2 方法

2.1 人参皂苷 G_K 对心脏 PKC 基因表达的影响: oligo GEArray 基因芯片测定由上海康成生物技术有限公司完成, 过程简述如下: 健康雄性小鼠 6 只, 体质量 20~25 g, 随机分为对照组 (给予溶剂) 和人参皂苷 G_K (5 mg/kg, 由前期实验确定) 组, 尾 iv 给药, 连续给药 3 d, 末次给药后 30 min, 脱臼处死动物, 取出心脏, 冰生理盐水中挤出心室内余血后立即投入液氮中备用。Trizol 试剂法抽提 RNA, 获得的 RNA 溶液 -70℃ 保存。紫外分光光度法测定浓度和纯度, 变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。探针合成芯片杂交、洗膜严格按照试剂盒说明书进行, 使用芯片配套软件对原始数据进行分析,

收稿日期: 2010-08-30

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助 (2007BS02022)

作者简介: 高艳 (1984—), 女, 山东日照人, 烟台大学药学院 2008 级药理学研究生, 研究方向为抗损伤药物的筛选及其机制研究。

* 通讯作者 李桂生 (1967—), 男, 烟台大学药学院副教授, 研究方向为药物化学和新药开发。

Tel: (0535) 2108899 E-mail: guisheng@lu.ye.cn

每张芯片都点有对照。

2.2 人参皂苷 G-K 对心肌细胞 PKC 活性的影响: 参照文献方法^[9] 培养新生大鼠心肌细胞。摘取新生 SD 大鼠 (1~3 d) 心脏后用 PBS (0.1 mmol/L) 冲洗 3 次, 分离心室并剪成 1 mm³ 的碎块, 37 ℃ 消化 10 min (0.1% 胶原酶, 0.1% 胰蛋白酶), 制成单细胞悬液, 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中预培养 90 min, 去除贴壁的非心肌细胞, 未贴壁心肌细胞按 1×10⁵ 的密度接种于 90 mm 培养皿中, 加入的 5'-溴脱氧尿苷 (0.1 mmol/L) 抑制非心肌细胞生长, 每 24 h 换液 1 次。将细胞分为对照组, 人参皂苷 C-K 小、中、大剂量组 (0.05、0.10、0.20 mmol/L), 佛波醇酯 (PMA, 0.10 μmol/L) 组, 人参皂苷 C-K+PMA (0.10 mmol/L+0.10 μmol/L) 组, 人参皂苷 G-K+白屈菜赤碱 (CHE) (0.10 mmol/L+0.10 μmol/L) 组。分别加入不同药物后, 37 ℃ 培养 10 min, 及时终止药物作用, 刮取细胞, -85 ℃ 保存备用。PKC 活性检测采用放射免疫法^[10], 按试剂盒 (Gibco, America) 说明进行, 根据公式计算细胞膜和细胞浆 PKC 活性。

2.3 人参皂苷 C-K 对蟾蜍离体心脏收缩功能的影响: 取蟾蜍 30 只, 随机分为 5 组, 溶剂对照组, 人参皂苷 C-K 小、中、大剂量 (0.04、0.08、0.16 mmol/L) 组, 人参皂苷 C-K+拉贝洛尔 [(0.08+0.01) mmol/L] 组。蟾蜍处死后按 Straub's 蛙心灌流法制备离体心脏标本, 用恒定量的任氏液 2 mL 灌流, 心脏搏动经机械-电换能器输出至计算机。待心脏活动稳定后, 描记一段正常心脏活动曲线为基础值, 然后依次加入相应药物, 记录心肌收缩幅度变化。

2.4 统计学处理: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

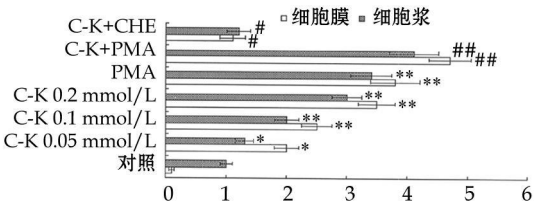
3.1 人参皂苷 G-K 对 PKC 基因表达的影响: oligo GEArray 基因芯片测定显示, 人参皂苷 G-K 可使小鼠心脏基因表达谱发生明显改变, 能够明显使钙蛋白激酶 C 相关基因 Prkc α、Prkc ε 上调, 人参皂苷 G-K 与对照比值大于 2 或小于 0.5 分别表示基因表达增高或降低 (表 1)。

表 1 人参皂苷 G-K 对 Prkcα、Prkcε 基因表达的影响

Table 1 Effect of ginsenoside G-K on expression of Prkc α and Prkc ε

基 因	位置	基因库	比值(G-K: 对照)
Prkc α	83	NM_0111101	2.40
Prkc ε	84	NM_0111104	3.67

3.2 人参皂苷 G-K 对心肌细胞 PKC 活性的影响: 人参皂苷 G-K 各剂量组均可激活心肌细胞 PKC, 并促使 PKC 从胞浆移位到细胞膜。PKC 强效激动剂 PMA 在 0.10 μmol/L 时即可强烈激活 PKC, 促进膜转移, 并能增强人参皂苷 G-K (0.10 mmol/L) 对 PKC 的激活作用及膜转移促进作用; PKC 选择性抑制剂 CHE (0.10 μmol/L) 则抑制人参皂苷 G-K (0.10 mmol/L) 对 PKC 的激活作用及膜转移促进作用 (图 1)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 人参皂苷 G-K 0.1 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$
$P < 0.01$ vs ginsenoside G-K 0.1 mmol·L⁻¹ group

图 1 人参皂苷 G-K 对心肌细胞 PKC 活性的影响
Fig. 1 Effect of ginsenoside G-K on activity of PKC in cardiocyte

3.3 人参皂苷 G-K 对蟾蜍离体心脏收缩功能的影响: 人参皂苷 C-K 在 0.08、0.16 mmol/L 浓度下能够明显增强蟾蜍离体心脏的心肌收缩力, 肾上腺素受体阻断剂拉贝洛尔可明显抑制该作用 (表 2)。

表 2 人参皂苷 G-K 对蟾蜍离体心脏心肌收缩力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of ginsenoside G-K on myocardial contractility of toads heart in vitro ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	心肌收缩力增幅/%
对照	-	0.3 ± 0.4
人参皂苷 G-K	0.04	0.6 ± 0.4
	0.08	7.1 ± 3.2*
	0.16	20.4 ± 5.4**
人参皂苷 G-K+ 拉贝洛尔	0.08+0.01	0.4 ± 0.5 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
与 人参皂苷 G-K 0.08 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group
$P < 0.05$ vs ginsenoside G-K 0.08 mmol·L⁻¹ group

4 讨论

人参是我国的传统中药, 按照传统中医主治病症分析, 心血管系统是人参皂苷主要生物学效应器官之一。目前人参已分离出 40 余种人参皂苷单体^[11], 有关人参皂苷单体作用于心血管系统的研究近年来也有报道。Furukawa^[12] 等报道人参皂苷 Re 可兴奋心脏钾通道; Xie 等^[13] 报道人参皂苷 Re 对

心肌细胞具有抗氧化作用。人参皂苷 G-K 属二醇型皂苷,它在天然人参中并不存在,有报道认为人参皂苷 G-K 为二醇型人参皂苷在人肠道内的代谢产物,是人参皂苷在体内发生作用的主要成分之一^[3]。

PKC 是一组富含丝氨酸和苏氨酸残基的蛋白激酶,激活后可使目标蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化,参与心脏多条信号传导通路。目前已发现 PKC 至少有 14 种同工酶,其中 Prkc α 和 Prkc ϵ 因其在心脏中的丰富表达及重要作用而引起广泛关注。Vijayan 等^[14]研究表明 Prkc α 的过度表达可诱导新生小鼠心室肌肥厚;孙巍等^[15]证实 Prkc ϵ 抑制剂可减弱蒺藜皂苷对离体大鼠缺血再灌注心肌的保护作用,表明蒺藜皂苷对缺血再灌注损伤的保护作用机制与 Prkc ϵ 磷酸化程度及转位有关。为观察人参皂苷 G-K 对心脏 PKC 信号转导通路的影响,本实验采用 oligo GEArray 基因芯片测定了人参皂苷 G-K 对心脏基因表达的影响。结果显示,人参皂苷 G-K 可明显上调 Prkc α 和 Prkc ϵ 的基因表达。在培养的新生大鼠心室肌细胞上,人参皂苷 G-K (0.05、0.1、0.2 mmol/L) 可激活心肌细胞 PKC,并促使 PKC 从胞浆移位到细胞膜。PKC 强效激动剂 PMA 在 0.1 μ mol/L 时,即可强烈地激活 PKC,促进膜转移,并能增强人参皂苷 G-K (0.1 mmol/L) 对 PKC 的激活作用及膜转移促进作用;PKC 选择性抑制剂 CHE 在 0.1 μ mol/L 时则明显抑制人参皂苷 G-K (0.1 mmol/L) 对 PKC 的激活作用及膜转移促进作用。以上结果表明人参皂苷 G-K 能够激活 PKC 系统。

体外 Straub's 蛙心灌流试验显示人参皂苷 G-K (0.08、0.16 mmol/L) 能够明显增加蟾蜍离体心脏的心肌收缩力,肾上腺素能受体阻断剂拉贝洛尔却可明显抑制该作用,提示人参皂苷 G-K 可能是肾上腺素能受体激动剂。肾上腺素能受体广泛分布于心血管系统,激动后可引起心肌收缩力增加。有研究^[7]表明肾上腺素能受体激活后,是通过进一步激活 PKC 系统产生心脏效应,从而引起心肌收缩力增加的。

综上所述,人参皂苷 G-K 可激活 PKC 系统,可能是肾上腺素能受体激动剂,其对 PKC 系统的激

活作用与对肾上腺素能受体的作用之间的关系尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 黎阳,张铁军,刘素香,等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(1): 164 附 2
- [2] 潘欣萍,王玉芹. 精制原人参二醇皂苷对小鼠学习记忆的影响[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 290-292
- [3] Hasegawa H, Sung J H, Benno Y. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins [J]. *Planta Med*, 1997, 63(5): 436-440
- [4] 姜彬慧,韩颖,赵余庆,等. 酶转化三七叶总皂苷制备人参皂苷 G-K 的工艺优化[J]. 中草药, 2004, 35(9): 986-988
- [5] Dong H J, Jiang B H, Han Y, *et al.* Transformation of compound K from saponins in leaves of *Panax notoginseng* by immobilized β -glucanase [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 44-47
- [6] Hambleton M, Hahn H, Plegier S T, *et al.* Pharmacological and gene therapy-based inhibition of protein kinase C α /beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure [J]. *Circulation*, 2006, 114(6): 574-582
- [7] Hahn H S, Marreez Y, Odley A, *et al.* Protein kinase C α negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2003, 93(11): 1111-1119
- [8] Cross H R, Murphy E, Bolli R, *et al.* Expression of activated PKC epsilon (PKC epsilon) protects the ischemic heart, without attenuating ischemic H^+ production [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 43: 361-367
- [9] 孙巍,李晶莹,李红,等. 蒺藜皂苷对缺血心肌细胞内核转录因子 κ B 的作用[J]. 中草药, 2008, 39(6): 889-892
- [10] 周军,李沧海,霍海如,等. 桂枝汤对发热大鼠下丘脑组织 PKA, PKC 活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 66-69
- [11] 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
- [12] Furukawa T, Bai C X, Kaihara A, *et al.* Ginsenoside Re, a main phytosterol of *Panax ginseng*, activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(6): 1916-1924
- [13] Xie J T, Shao Z H, Vanden Hoek T L, *et al.* Antioxidant effects of ginsenoside Re in cardiomyocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 532(3): 201-207
- [14] Vijayan K, Szotek E L, Martin J L, *et al.* Protein kinase C α -induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(6): 2777-2789
- [15] 孙巍,李红,遇红梅,等. 蛋白激酶 C Epsilon 亚型在蒺藜皂苷诱导心脏保护中的作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(9): 1193-1197