



# 复方红景天制剂对高正加速度应激大鼠血清皮质酮及心肌组织糖皮质激素受体的影响

陈良恩, 詹皓, 吴峰, 赵安东, 杨明浩

(空军航空医学研究所, 北京 100142)

**【摘要】** 目的 研究复方红景天制剂对高正加速度(positive acceleration, +Gz)应激大鼠血清皮质酮及心肌组织糖皮质激素受体的影响。方法 72只雄性SD大鼠随机分为6组,分别为空白对照组、应激对照组、+10 Gz应激组以及药物低、中、高剂量组,每组12只。各组均灌胃给药14 d,低、中、高剂量组大鼠每天分别按0.75 g/kg、1.5 g/kg和3.0 g/kg给予复方红景天中药制剂,其余3组动物给等量的生理盐水。第15天进行+10 Gz离心机暴露,ELISA方法测定各组动物血清皮质酮浓度,免疫印迹法分析各组动物心肌组织糖皮质激素受体表达变化。结果 与空白对照组和应激对照组相比,+10 Gz应激组大鼠血清皮质酮浓度明显升高,而心肌组织糖皮质激素受体表达水平明显降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。复方红景天制剂预处理可以降低+10 Gz应激大鼠血清皮质酮浓度,上调心肌组织糖皮质激素受体表达水平,药物中、高剂量组大鼠血清皮质酮浓度明显低于+10 Gz应激组( $P < 0.05$ ),而心肌组织糖皮质激素受体表达水平明显高于+10 Gz应激组( $P < 0.01$ )。结论 复方红景天制剂可以调节+Gz应激大鼠血清糖皮质激素浓度及其心肌受体表达水平,可能与该制剂对持续正加速度致心肌损伤的防护作用有关。

**【关键词】** 复方红景天制剂;持续高正加速度应激;皮质酮;糖皮质激素受体

**【中图分类号】** R852.21 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014)05-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.005.001

## Effects of rhodiola crenulata compound on serum corticosterone and myocardial glucocorticoid receptor in rats exposed high sustained positive acceleration

CHEN Liang-en, ZHAN Hao, WU Feng, ZHAO An-dong, YANG Ming-hao  
(Institute of Aviation Medicine, Air Force, Beijing 100142, China)

**【Abstract】 Objective** To study the effect of rhodiola crenulata compound on serum corticosterone and myocardial glucocorticoid receptor (GR) in rats exposed high sustained +Gz. **Methods** Seventy-two healthy SD rats were randomly divided into six groups: blank control group, stress control group, +10 Gz stress group and low, medium, high dose drug group, with twelve rats in each. 20 mL/kg menstruum was fed to each rat once per day for 14 days. Low, medium and high dose drug group were fed with rhodiola crenulata compound at doses of 0.75 g/kg, 1.5 g/kg and 3.0 g/kg respectively, the other three groups were fed with equal volume saline. Rats were exposed to high +Gz in 15<sup>th</sup> day. The concentration of corticosterone in the serum of each group rats was detected with ELISA. Western blot was used to detect the expressions of GR in the myocardium of each group rats. **Results** The content of corticosterone was significantly elevated in +10Gz stress group, while the expression of GR in the myocardium was markedly declined ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). However, compound preconditioning could decrease concentration of

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073083)。

[作者简介] 陈良恩(1974-), 博士, 研究方向: 应激医学。

[通讯作者] 詹皓(1962-), 研究员, 博士生导师, 研究方向: 航空药理学, E-mail: zhanhaohy@sohu.com。

corticosterone in the serum and enhance the expression of GR in the myocardium from rats after +10 Gz exposure. The corticosterone concentration of medium and high dose drug groups was significantly lower and the level of GR expression in the myocardium was significantly higher than that of +10Gz stress group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Rhodiola crenulata compound preconditioning could regulate the concentration of corticosterone in the serum and the level of GR expression in the myocardium of the rats exposed +10 Gz, which may be related with its protective effect on high sustained +Gz-induced injury of myocardium.

**【Key words】** Rhodiola crenulata compound; High sustained + Gz stress; Corticosterone; Glucocorticoid receptor

持续高正加速度 (positive acceleration, +Gz) 作用可以导致机体剧烈的应激反应和血液动力学变化, 激活神经内分泌系统。国内外大量研究表明<sup>[1-3]</sup>, 交感肾上腺素能系统、肾素血管紧张素系统、内皮素以及前列环素等在高 +Gz 应激时均会发生明显变化。神经内分泌系统的改变有助于高 +Gz 应激时机体血流量的调节和血压的保持, 提高机体抗 +Gz 应激能力, 但应激激素的分泌紊乱以及持续作用容易造成组织细胞的损伤<sup>[4]</sup>。复方红景天制剂是由红景天、黄芪、白芍、当归等组成的中药制剂, 单体成分具有清除氧自由基、改善微循环及心血管功能、增强免疫力、提高机体抗应激能力等作用。前期研究表明<sup>[5-6]</sup>, 该复方制剂对大鼠高 +Gz 应激导致的心脑损伤具有一定的保护作用。本文采用 +10 Gz 持续性作用建立大鼠 +Gz 损伤模型, 通过观察复方红景天制剂对机体重要的应激激素 - 糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 及其受体 (glucocorticoid receptor, GR) 表达的影响, 进一步揭示该制剂对高 +Gz 应激大鼠神经内分泌的调节作用, 探讨该制剂对持续正加速度致心肌损伤的相关保护机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验药物

复方红景天制剂, 中国医学科学院药用植物研究所化学室提供, 该制剂主要由红景天、黄芪、当归、白芍、丹参等成分组成, 采用乙醇回流提取工艺提取复方有效成分。

### 1.2 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 72 只, 体重 (200 ± 25) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证: [SCXK(京) 2011-0004]; 饲养于解放军总医院第 304 临床部 [SYXK(军) 2007-011]。

### 1.3 试剂与仪器

兔抗大鼠 GR 多克隆抗体及 GAPDH 多克隆抗体, 美国 Santa Cruze 公司; 过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 北京中杉金桥生物技术有限公司; 超敏 ECL

化学发光试剂盒, 北京科宇深蓝科技有限公司; GC 酶联免疫检测试剂盒, 美国 R&D 公司; 其余试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。动物离心机, 长春奥普光电公司; Wellscan MK3 全自动酶标仪, 芬兰 Labsystems Dragon 公司。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 动物分组与给药

大鼠适应性喂养 3 d 后, 采用抽签法将大鼠随机分为空白对照组、应激对照组、+10 Gz 应激组和药物低、中、高剂量组, 每组 12 只, 各组动物分笼饲养并作标记。各组动物每天上午灌胃给药 1 次, 连续 14 d, 给药体积为 20 mL/kg, 每只动物每天灌胃前称取体重以确定灌药量, 低、中、高剂量组大鼠每天分别按 0.75 g/kg、1.5 g/kg 和 3.0 g/kg 给予复方红景天中药制剂, 其余 3 组动物给等量的生理盐水。末次给药当日 20:00 开始禁食, 次日进行离心机暴露。

### 1.4.2 动物离心机暴露模型建立

采用动物离心机进行 +Gz 暴露, 将大鼠束缚固定在通气的动物舱中, 置于离心机的转臂上, 大鼠头部朝向离心机旋转轴心。离心机半径为 2 m, 由计算机进行加速度程序控制。实验组大鼠暴露 +10 Gz 水平, 持续 5 min, 加速度增长率为 1G/s。空白对照组不做任何处理, 应激对照组动物在离心机舱内转臂上束缚 5 min, 不做离心处理。

### 1.4.3 大鼠血清 GC 测定

大鼠 +10 Gz 作用后 4 h, 麻醉, 心脏取血, 分离血清。采用 GC 酶联免疫检测试剂盒测定血清皮质酮浓度。

### 1.4.4 大鼠心肌组织 GR 测定

大鼠断头处死, 速取心脏, 用 4℃ 生理盐水冲洗, 剪取大鼠新鲜的左心室肌组织, 将组织称量后切成几个较小的组织块, 匀浆, 使用哺乳动物组织总蛋白抽提试剂盒提取蛋白样品, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质含量测定, 操作步骤按说明书进行。每个样品取 50 μg 蛋白质加入等体积 2 × SDS 凝胶加样缓冲液, 100℃ 煮沸 5 min, 经 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至 NC 膜, 1% BSA 封闭过夜, PBST 洗膜两

次,加入 1:800 稀释兔抗大鼠 GR 多克隆抗体,37℃ 孵育 1 h,内参采用兔抗大鼠三磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体。PBST 洗膜,加 1:3000 稀释的羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 h, PBST 洗膜。在 NC 膜上滴加超敏 ECL 化学发光试剂,然后在暗室中曝光 X 线片。采用 Quantity One v4.6.2 软件进行光密度值分析,GR 蛋白的表达量以 GR 对应条带与同组 GAPDH 条带的光密度值的比值表示。

1.5 统计学处理

所有参数用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 统计软件分析处理,均数差异显著性检验采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为显著性水平界值。

2 结果

2.1 复方红景天制剂对大鼠 +10 Gz 暴露后血清皮质酮浓度的影响

与空白对照组和应激对照组大鼠相比, +10 Gz 应激组大鼠血清皮质酮浓度明显升高 ( $P < 0.01$ )。复方红景天制剂剂量依赖式降低血清皮质酮浓度,药物中剂量组和高剂量组大鼠血清皮质酮浓度明显低于 +10 Gz 应激组 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

2.2 复方红景天制剂对大鼠 +10 Gz 暴露后心肌组织糖皮质激素受体表达的影响

大鼠心肌 GR 表达的 western blot 结果如图 1。测定各条带光密度,分析各组大鼠心肌 GR 表达水平,结果如表 2。+10 Gz 应激组大鼠心肌 GR 的表达水平与空白对照组和应激对照组相比明显降低 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。复方红景天制剂预处理大鼠心肌 GR 表达水平明显升高,三个不同剂量的药物组大鼠 GR 表达水平均显著高于 +10 Gz 应激组

( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠血清皮质酮浓度的变化 (n = 12)  
Tab.1 Concentration of corticosterone in the serum of rats in each group (n = 12)

组别 (Groups)	GC (μg/L)
空白对照组 (Blank control)	27.94 ± 2.35
应激对照组 (Stress control)	28.49 ± 2.18
+10 Gz 应激组 (+10 Gz stress)	33.71 ± 5.13 <sup>bc</sup>
药物低剂量组 (Low dose drug)	32.63 ± 1.17 <sup>bc</sup>
药物中剂量组 (Medium dose drug)	30.65 ± 1.50 <sup>ad</sup>
药物高剂量组 (High dose drug)	30.38 ± 5.14 <sup>d</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与应激对照组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与 +10Gz 应激组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。  
Note: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs. blank control group; <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs. stress control group; <sup>d</sup> $P < 0.05$  vs. +10Gz stress group.

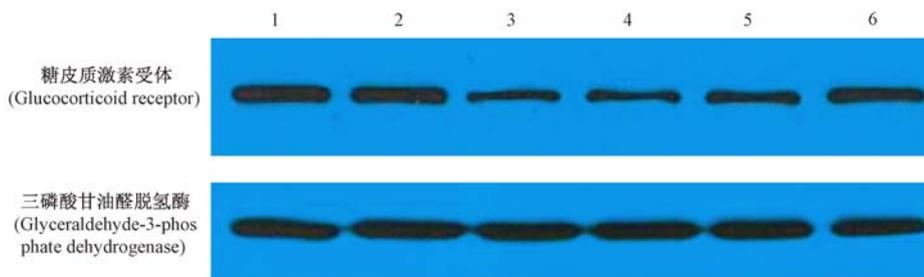
表 2 各组大鼠心肌组织 GR 蛋白表达变化 (n = 6)  
Tab.2 Expression of GR in myocardium of rats in each group (n = 6)

组别 (Groups)	GR/GAPDH
空白对照组 (Blank control)	0.757 ± 0.122
应激对照组 (Stress control)	0.682 ± 0.233
+10 Gz 应激组 (+10 Gz stress)	0.424 ± 0.068 <sup>ab</sup>
药物低剂量组 (Low dose drug)	0.620 ± 0.173 <sup>c</sup>
药物中剂量组 (Medium dose drug)	0.703 ± 0.215 <sup>d</sup>
药物高剂量组 (High dose drug)	0.721 ± 0.114 <sup>d</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与应激对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 +10Gz 应激组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: <sup>a</sup> $P < 0.01$  vs. blank control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. stress control group; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs. +10Gz stress group.

3 讨论

当机体受到强烈刺激时,下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 的强烈兴奋导致肾上腺皮质生成和释放 GC 增加,导致血液中 GC 水平的升高。GC 生物学效应的发挥取决于靶细胞上 GR 的介导。GR 属于激素核受体家族的主要成员,同时也是一种重要的核转录因子。游离的 GC 通过弥散进入细胞内,迅速与胞浆内 GR 结合,此时受体被活化,激素受体复合物进而



注:1. 空白对照组; 2. 应激对照组; 3. +10 Gz 应激组; 4. 药物低剂量组; 5. 药物中剂量组; 6. 药物高剂量组。

图 1 Western blot 分析各组大鼠心肌糖皮质激素受体表达变化

Note: 1. Blank control; 2. Stress control; 3. +10Gz stress; 4. Low dose drug; 5. Medium dose drug; 6. High dose drug.

Fig.1 Western blot of glucocorticoid receptor protein in myocardium of rats in each group

转移到核内与靶基因的 GC 反应元件相互作用,调节靶基因的表达,并最终引起各种生物学效应<sup>[7]</sup>。GR 的含量是细胞对 GC 反应的一个决定性因素<sup>[8]</sup>。

同以往对肾上腺素、去甲肾上腺素以及内皮素等其他应激激素的研究结果相似,高 + Gz 应激大鼠血清 GC 水平明显升高,GC 水平的升高对提高大鼠的抗 + Gz 应激能力有一定作用,它可以减少应激反应有害介质(缓激肽、蛋白水解酶、前列腺素等)的产生和释放;使能量代谢以糖代谢为中心,保证葡萄糖对脑、心脏重要器官的供应;同时对儿茶酚胺的允许作用,使心肌收缩力增强,升高血压。但高水平 GC 可以诱导细胞凋亡已被许多研究证实<sup>[9-10]</sup>。高 + Gz 应激大鼠心肌细胞和海马神经元细胞凋亡的增多<sup>[11-12]</sup>,可能与高 + Gz 应激条件下 GC 水平升高有关。

本研究还发现,与空白对照和应激对照相比,高 + Gz 应激组大鼠 GR 表达水平明显降低。有研究认为,应激情况下,GR 的降低与血浆 GC 浓度的升高有关,GC 对 GR 和 GR mRNA 均具有反向调节作用<sup>[13]</sup>。同时,也有研究认为 GR 的下调还存在以下几种可能:激素受体复合物转移到核内;应激时受体蛋白分解加速,而合成减少;糖皮质激素受体的结合活性降低<sup>[14]</sup>。此外,研究发现,应激状态下炎症因子如 TNF、IL-1 等也可以抑制 GR 的表达<sup>[15]</sup>。应激状态下 GR 表达水平下调一定程度上可以降低靶细胞对激素的反应性,防止因激素的持续作用对靶细胞造成损伤<sup>[13]</sup>。但 GR 的降低会造成机体对 GC 的抵抗,继发性的引起大量炎症因子分泌增多,导致严重的炎症反应的发生。在各种应激过程中,GR 的减少可促使休克、多器官功能衰竭的发生,且糖皮质激素受体的减少幅度与病理性应激损伤严重程度平行<sup>[16]</sup>。

在本研究中,实验观察到复方红景天制剂预处理可以降低高 + Gz 应激大鼠血浆 GC 水平,并且呈现剂量依赖性,提示该复方制剂对高 + Gz 应激大鼠神经内分泌系统具有一定的调节作用。进一步检测心肌细胞 GR 表达水平,复方红景天制剂预处理组大鼠心肌 GR 高于高 + Gz 应激组,并且也呈现剂量依赖性。GC 浓度的降低和 GR 表达水平的升高,既增强了靶细胞对激素的敏感性,保证了应激状态下 GC 的有效生理效应,同时也避免 GC 浓度过高导致的细胞凋亡。因此,该复方制剂对于保持高 + Gz 应激状态下机体内环境的稳定、预防心肌细胞的损伤具有重要作用。有关复方红景天制剂对 GC 和 GR 作用的确切机制,有待于今后进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 傅凤英,詹皓,张政,等. 低 G 预适应对重复 +10Gz 应激大鼠左心室收缩功能和心肌内皮素与前列环素含量的影响[J]. 航天医学与医学工程,2003,16(6):414-417.
- [ 2 ] 刘红巾,蔡庆,陈友纯. +Gz 重复暴露对大鼠心肌组织内皮素和一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响[J]. 中华航空航天医学杂志,1998,9(4):209-212.
- [ 3 ] Miyamoto Y, Shimazu H, Nakamura A. Plasma catecholamine and cortisol concentrations during acceleration stress[J]. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1995, 70(5):407-412.
- [ 4 ] Redfors B, Shao Y, Omerovic E. Stress-induced cardiomyopathy (Takotsubo)—broken heart and mind [J]. Vasc Health Risk Manag, 2013,9:149-154.
- [ 5 ] 王永新,陈良恩,魏日胞. 复方红景天片对高 + Gz 应激致大鼠心肌损伤的保护作用研究[J]. 中国药物应用与监测, 2011,8(2):81-85.
- [ 6 ] 杜挺媛,王永春,高原,等. 复方中药“天芪航力片”提取物对 + Gz 致大鼠脑损伤的防护作用[J]. 神经解剖学杂志, 2012,28(1):43-48.
- [ 7 ] Burnstein KL, Jewell CM, Cidlowski JA. Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation[J]. J Biol Chem, 1990,265(13):7284-7291.
- [ 8 ] Rousseau GG. Control of gene expression by glucocorticoid hormones in rat choroid plexus: effects on apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2013,376(1-2):41-51.
- [ 9 ] Cohen O, Ish-Shalom E, Kfir-Erenfeld S, et al. Nitric oxide and glucocorticoids synergize in inducing apoptosis of CD4<sup>+</sup> 8<sup>+</sup> thymocytes: implications for ‘Death by Neglect’ and T-cell function[J]. Int Immunol, 2012,24(12):783-791.
- [ 10 ] Kaiser G, Gerst F, Michael D, et al. Regulation of forkhead box O1 (FOXO1) by protein kinase B and glucocorticoids: different mechanisms of induction of beta cell death in vitro [J]. Diabetologia, 2013,56(7):1587-1595.
- [ 11 ] 周瑛,王冰,王永春,等. 重复 + Gz 暴露后大鼠心室肌的细胞凋亡现象[J]. 中国应用生理学杂志, 2010,26(3):275-277.
- [ 12 ] 蔡庆,刘红巾,占志,等. + Gz 重复暴露大鼠海马细胞凋亡及相关基因 bcl-2 和 p53 表达的观察[J]. 航天医学与医学工程, 2000,13(4):263-266.
- [ 13 ] Kurihara I, Shibata H, Suzuki T, et al. Transcriptional regulation of steroid receptor coactivator - 1 (SRC - 1) in glucocorticoid action [J]. Endocr Res, 2000, 26(4): 1033-1038.
- [ 14 ] 欧珠美朵,马洪升. 糖皮质激素受体在应激反应中的变化及相关机制[J]. 医学综述,2010,16(22):3375-3377.
- [ 15 ] Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms[J]. Clin Sci (Lond), 1998,94(6):557-572.
- [ 16 ] 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[J]. 生命科学,1997,9(2):78-80.