

# 复方人参制剂对热应激大鼠的保护作用研究

罗炳德, 邹飞, 万为人, 陈雪梅, 杨军

(第一军医大学热带军队卫生学系高温医学研究室, 广东 广州 510515)

**摘要:** 目的 观察复方人参制剂对热应激大鼠的保护作用。方法 34只SD大鼠被随机分为对照组(I组,  $n=17$ )、复方人参制剂组(II组,  $n=17$ )。热应激前1h分别以水及复方人参制剂(0.5ml/100g体重)灌胃。动物于人工气候室内受热直至死亡。测定直肠温度、下丘脑hsp70含量等指标。结果 (1)体温的变化: II组动物热应激过程肛温各时点的测定值均较对照组低, 其中热至40min时低 $0.18^{\circ}\text{C}$ , 热至60min、80min、100min时则分别低 $0.56^{\circ}\text{C}$ 、 $0.70^{\circ}\text{C}$ 、 $0.71^{\circ}\text{C}$  ( $P<0.05$ )。I、II组肛温的平均上升速率分别为( $0.044\pm 0.022$ ) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、( $0.029\pm 0.015$ ) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ( $P<0.05$ )。(2)动物热耐受时间和死亡率: I、II组动物的平均热耐受时间分别为( $162.8\pm 62.9$ )min、( $217.4\pm 59.3$ )min, 后者比前者延长54.6min ( $P<0.05$ ); 其动物死亡率, 在热暴露2小时、3小时、4小时时I组分别为41.2%、52.9%和82.4%, II组则分别为11.8%、23.5%和52.9%,  $P$ 值均小于0.05。(3)下丘脑hsp70含量的变化: I、II组动物分别热暴露至死亡时, 其下丘脑hsp70的含量为( $47.72\pm 19.03$ ) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、( $54.32\pm 18.54$ ) $\mu\text{g}/\text{mg}$  ( $P<0.05$ ), 且hsp70含量与动物的热耐受时间呈高度正相关( $r=0.7074$ ,  $P<0.001$ )。结论 复合人参制剂具潜在的预防性的抗热损伤功能。

**关键词:** 热应激; 热耐受; 人参; 热休克蛋白70

中图分类号: R594.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)03-0136-04

## Studies on the protective effects of compound ginseng preparation on the rats with heat stress

LUO Bing-de, ZOU Fei, WAN Wei-ren, CHEN Xue-mei, YANG Jun

(Institute for Tropical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract: Objective** To study the protective effects of compound ginseng preparation on the rats with heat stress. **Methods**

Thirty-four SD rats were allocated randomly into treatment and control groups respectively, with 17 each. Compound ginseng preparation (0.5ml/100g body weight) and water were fed for the two groups respectively, one hour before heat stress. And the animals stayed at an artificial heat chamber until their death. Their rectal temperature and level of heat shock protein 70 (hsp 70) in the hypothalamus were measured. **Results** The rectal temperature was  $0.18^{\circ}\text{C}$ ,  $0.56^{\circ}\text{C}$ ,  $0.70^{\circ}\text{C}$  and  $0.71^{\circ}\text{C}$  lower in the treatment group than that in the control group at 40min, 60min, 80min and 100min in heat stress respectively. The average rate of temperature increase was ( $0.044\pm 0.022$ ) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and ( $0.029\pm 0.015$ ) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  in the treatment group and control group respectively. The length of heat tolerance was ( $162.8\pm 62.9$ ) min and ( $217.4\pm 59.3$ ) min in the treatment and control groups respectively. Death rate of the animals was 41.2%, 52.9% and 82.4% and 11.8%, 23.5% and 52.9% in the treatment and control groups at two, three and four hours of heat stress respectively, with a  $P$  value less than 0.05. The level of hsp 70 in the hypothalamus was ( $47.72\pm 19.03$ ) $\mu\text{g}/\text{mg}$  and ( $54.32\pm 18.54$ ) $\mu\text{g}/\text{mg}$  in the treatment and control groups, respectively, with a  $P$  value less than 0.05. Level of hsp 70 highly correlated with the length of heat tolerance, with a coefficient of correlation of 0.7074 and  $P<0.001$ . **Conclusions** Compound ginseng preparation could protect the animals from heat injury.

**Key words:** Heat stress; Heat tolerance; Ginseng; Heat shock protein 70

中暑是由于机体产热量大大超过机体的散热能力, 心血管系统负荷过重, 以致体温调节障碍、水盐代谢紊乱、循环衰竭而发生<sup>[1]</sup>。特别是重症中暑死亡率甚高, 严重危害身体健康与生命安全。为此, 加强

中暑的防治措施研究及寻找新型的有效防治途径乃十分必要。人参具有抗应激作用, 可增强机体对不良刺激的抵抗力<sup>[2]</sup>。随着人们生活水平的提高, 不但人参滋补保健和抗衰老作用得到广泛应用, 而且人参对抗热应激的能力日益受到重视, 但人参对热应激机体的保护作用究竟如何, 则文献报道不多。故本实验采用以人参为主药制成复合制剂, 观察其对热应激大鼠的保护作用。

### 1 材料与方法

收稿日期: 2000-12-11; 修回日期: 2001-03-19

基金项目: “九五”军队指令性课题资助(96L033)

作者简介: 罗炳德(1952-), 男, 研究员, 从事中暑基础与应用

研究。

### 1.1 动物分组与处理

雄性SD大鼠体质量(210±15)g(由第一军医大学实验动物中心提供),随机分成I组:对照组(n=17),II组:复方人参制剂[组分为人参根皂甙(系棕黄色粉末,用甲醇冷渗法提取)+解热镇痛类药物-百复宁]灌胃组(n=17)。I和II组动物热应激前1h分别以凉开水和复方人参制剂(0.5ml/100g体质量,含人参0.4g/ml)灌胃。动物于人工气候室内[干球温度:(41±0.5)℃,湿球温度:(35±0.5)℃,相对湿度:(68±5)%]受热直至死亡。用直肠温度探头监测中心体温,每20min记录一次肛温变化,并记录实验过程动物的死亡时间。比较两组的肛温变化、存活时间及死亡率。

### 1.2 总蛋白提取

分离下丘脑并于0℃以PBS洗涤,4℃3 000r/min离心5min。用冰预冷的悬浮缓冲液(0.01mol/L Tris·Cl pH7.6, 0.001mol/L EDTA, 1μg/ml Aprotinin, 100μg/ml PMSF)分散沉淀,超声剪切粘稠DNAs。总蛋白量以lowry法测定。

### 1.3 Western blot

提取的蛋白质均取两份平行样品作10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。其中一块胶上的蛋白质条带及分子量标准以考马斯亮蓝染色,另一胶含热休克蛋白

70(hsp70)标准品(Sigma产品),用Bio-Rad电转移槽将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,以丽春红S确定转移效果。其后,硝酸纤维素膜作如下处理:TBST缓冲液(10mmol/L Tris, 0.25mol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH7.5)洗涤4×5min,以含2%BSA的TBST室温封闭2h,与抗-hsp70单克隆抗体(Sigma BRN-22)4℃孵育14~16h,稀释度为1:50 000。TBST洗膜4×10min,室温与辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠二抗(1:200)孵育2h, TBST洗膜6×5min,用DAB、CoCl<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>配成的显色液显色。

### 1.4 定量分析

用图像分析仪(英国产UVP75000)扫描, Gel base/Gel blot 软件检测分析。

### 1.5 统计分析

用SPSS软件进行t检验、方差分析。

## 2 结果

### 2.1 大鼠肛温的变化

表1显示,受热前给药物的II组大鼠肛温较I组高0.2℃,但受热40min后各时点的测定值均较I组偏低,其中热至40min时低0.18℃,热至60min、80min、100min时则分别低0.56℃、0.71℃、0.72℃(P<0.05)。

表1 大鼠热暴露100min过程中的肛温变化均值(℃,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	热暴露时间 (min)					
		0	20	40	60	80	100
I	17	35.95±0.91	37.86±0.91	39.83±0.63	40.39±1.04	40.61±1.37	40.72±1.45
II	17	36.15±0.70	37.96±0.61	39.65±0.41	39.83±0.65*	39.9±0.80*	40.0±1.09*

II组与I相比, \*P<0.05(下同)。

### 2.2 大鼠肛温上升速率与存活时间

I、II两组大鼠在热暴露过程中,其肛温平均上升速率及存活时间是有很大差异的。由表2结果可以看出,II组肛温的上升速率显著慢于I组(P<0.05)。而且前者的平均存活时间较后者延长54.6min(P<0.05)。

表2 热暴露过程大鼠肛温平均上升速率与存活时间( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	肛温上升速率 (℃/min)	存活时间 (min)
I	17	0.044±0.022	162.8±62.9
II	17	0.029±0.015*	217.4±59.3*

### 2.3 热暴露大鼠的死亡率

表3为大鼠不同受热时间的死亡率,受热至120min、180min、240min时,II组动物死亡率与I组

相比,分别降低29.4%、29.4%和29.5%,P均小于0.05。

表3 大鼠热暴露不同时间段的死亡率(%)

组别	n	热暴露时间 (h)			
		1	2	3	4
I	17	0	41.2	52.9	82.4
II	17	0	11.8*	23.5*	52.9*

### 2.4 大鼠下丘脑 hsp70 水平

I、II组动物下丘脑hsp70含量的平均值分别为(47.72±19.03)和(54.32±18.54)μg/mg。可以看出热应激动物至死亡时,II组的hsp70水平明显高于对照组(P<0.05)。

为便于比较,表4列出了不同存活时间段的大鼠下丘脑hsp70水平的变化值。结果发现,随着受热时

间的延长, 下丘脑区 hsp70 合成增加, 不能及时合成 hsp70 或合成量不足的动物迅速死亡。存活时间  $\leq 120\text{min}$  组动物与存活时间  $> 240\text{min}$  组动物 hsp70 水平差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。经统计学处理还发现 hsp70 的合成量与存活时间呈高度正相关 ( $r = 0.7074$ ,  $P < 0.001$ )。

表 4 不同存活时间的大鼠下丘脑 hsp70 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

存活时间 (min)	hsp70 水平 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	
	I 组	II 组
~ 120	18.62 $\pm$ 8.93	31.18 $\pm$ 11.69
~ 180	32.72 $\pm$ 19.94	46.31 $\pm$ 12.14
~ 240	44.50 $\pm$ 21.74	74.85 $\pm$ 31.11 <sup>#</sup>
> 240	64.44 $\pm$ 18.77 <sup>*#</sup>	75.98 $\pm$ 17.72 <sup>*</sup>

\*  $P < 0.01$ , 与存活时间  $\leq 120\text{min}$  比较; # 与 I 组相比, II 组 hsp70 合成高峰出现较早。

### 3 讨论

人参 (*Panax ginseng* C A Mey) 为大补元气、扶正固表之代表药, 其主要活性成分人参根皂甙 (GRS) 具有增强机体活动能力和抗疲劳等药理作用。可以提高对各种不良刺激的抵抗力。本实验观察到 II 组动物肛温比 I 组上升速率减慢, 存活时间延长, 可能是 GRS 抗热应激的结果之一。人参抗高温作用依赖于肾上腺的存在。人参使高温鼠的肾上腺内抗坏血酸含量减少<sup>[3]</sup>。中枢胆碱能神经影响体温调节过程, 在温热环境下 Ach 释放减少, 体温降低。国内学者<sup>[3]</sup>观察到大鼠在热应激时, 脑内 Ach 减少, 体温上升; 而 GRS 抑制热应激大鼠体温上升时, 鼠脑 Ach 显著增多, 血浆皮质酮急剧上升, 达高温对照大鼠的 3 倍, 说明 GRS 抗热应激时, 抑制体温上升与调节中枢胆碱能神经有关, 前者可能是通过增加机体的散热, 后者是作用于丘脑下部-腺垂体-肾上腺皮质系统, 促进该系统机能活动增强, 合成并释放大量糖皮质激素, 提高了机体对高温刺激的耐受性, 从而延缓了动物在热应激中的衰竭期。此也证明复合人参制剂具有生津益血营养脏腑之功能<sup>[4]</sup>。此外, 有研究表明<sup>[5]</sup>, 人参能提高机体的抗疲劳、耐缺氧、耐寒、耐高温等作用。而且人参抗热应激作用与人参制剂中 GRS 的含量有关, 在抗热应激作用方面新配制的人参制剂比存放的人参制剂更为有效<sup>[6]</sup>。

解热镇痛类药物对内源性致热原引起的发热有良好的降温效果, 但对于物理因素所致的体温过高效果不佳。我们在实验中发现, 单纯解热镇痛类药物虽使体温有所下降, 但无明显统计学意义; 而单纯人参制剂

组的抑温效果也不及人参复合解热镇痛类药物组, 从而表明二者复合后效果最佳。此也提示在热应激后期, 由于血浆脂多糖 (LPS) 浓度升高造成肿瘤坏死因子、白细胞介素-1 等内源性致热原合成与释放增加, 此时解热镇痛类药物也就会发挥一定作用。

该复方人参制剂能明显减缓大鼠肛温的上升速率, 有效地延长在高温环境下的存活时间, 降低其死亡率, 说明复方人参制剂可使大鼠的热耐受能力明显提高。依据上述结果可以推测, 此复方人参制剂可能对从事高温作业的部队指战员以及其他作业人员亦会具有一定的保护作用。

hsp70 是一类于多种应激条件下合成的高度保守的蛋白质。一般认为, hsp70 对培养细胞具有直接、明确的热保护功能。体外实验支持 hsp70 在应激耐受中的直接作用<sup>[7-8]</sup>。过量表达诱导型 hsp70 的细胞对肿瘤杀伤因子细胞毒作用抵抗性增强<sup>[9]</sup>, 且通过显微注射技术将抗 hsp70 的抗体注入细胞, 可致热敏感性增强。但在整体水平, hsp70 的直接保护作用仍不甚明了<sup>[10,11]</sup>, 尤其是下丘脑 hsp70 的合成规律及其作用机制有待探讨。本研究将 SD 大鼠受热致死, 监测直肠温度并检测下丘脑 hsp70 含量。结果显示下丘脑区 hsp70 含量与动物存活时间呈高度正相关 ( $P < 0.001$ ), 且复方人参制剂能延长存活时间、降低中心体温上升速率并使 hsp70 的合成量明显增加且合成高峰提前。推测此可能是复方人参制剂提高机体耐热能力的作用机制之一。

鉴于上述结果不难看出: (1) 该实验性解暑药具潜在的预防性的抗热损伤功能; (2) 下丘脑区 hsp70 水平是热耐受程度的重要、敏感指标; (3) 复方人参制剂抵抗热应激的作用机制之一可能是促进 hsp70 合成量的增加, 从而起到对细胞的热保护作用。

### 参考文献:

- [1] 程天民. 军事预防医学概论 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 152.
- [2] 吴英良, 程秀娟, 袁文学. 人参根总皂甙对热应激小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 1993, 9 (2): 135-137.
- [3] 程秀娟, 刘玉兰, 林桂凤, 等. 人参根皂甙对热应激大鼠中枢递质及血浆皮质酮的影响 [J]. 中国药理学报, 1986, 7 (1): 6-8.
- [4] 秦红岩, 张惠云, 高苏堤, 等. 复方洋参片对应激能力的影响 [J]. 时珍国药研究, 1997, 8 (3): 221-222.
- [5] 鲁耀邦, 郭国华, 张鹤鸣. 人参五灵脂配伍对小鼠热应激性损伤能力的影响 [J]. 湖南中医学院学报, 1994, 14 (4): 35-37.
- [6] 郑宁喜, 张琪凤, 桂英杰. 新配人参汁存放人参汁提高小鼠热应激能力比较 [J]. 中草药, 1992, 23 (1): 53-55.

(下转 145 页)

肾脏是 PDCB 毒性作用的另一个重要器官<sup>[3,4]</sup>, 大鼠连续 6 个月吸入 3 000mg/m<sup>3</sup>PDCB 可引起肾脏质量增加以及尿蛋白排泄量增加<sup>[8]</sup>, 连续 6 个月灌胃染毒 376mg/kg PDCB 可引起肾脏质量增加和肾小管上皮细胞混浊肿胀<sup>[5]</sup>, 大鼠和小鼠以 150、300、600mg/kg 剂量灌胃染毒两年均观察到肾病发病率增加<sup>[9]</sup>。本文尿蛋白和尿 NAG 检测结果发现 PDCB 作业工人尿 NAG 水平显著高于对照组, 且有 2 例尿蛋白阳性, 表明 PDCB 可能对肾脏, 特别是近曲小管有一定的损害作用, 其原因可能与 PDCB 代谢产物在肾小管内蓄积有关。文献记载在 PDCB 中毒患者中 5 例具有中枢神经系统损害表现, 3 例以头痛表现为主, 2 例以头晕和乏力表现为主, 其中 1 例以头痛表现为主者尚有腿部麻木、活动不灵和烧灼感<sup>[7]</sup>。本文 PDCB 作业工人头晕、乏力、失眠、多梦、四肢麻木症状显著高于对照组, 提示 PDCB 可损害中枢神经系统。

本调查 PDCB 对呼吸道具有刺激作用, 导致咳嗽、咳痰、咽干咽痛、鼻干鼻痒症状显著增加, 这一结果与国外 58 名 PDCB 作业工人在平均浓度为 960mg/m<sup>3</sup> 条件下连续或间断接触 PDCB 4.75 年出现眼鼻刺激感的调查结果基本一致<sup>[2]</sup>。

本次调查检出 1 例 PDCB 作业工人 Hb、WBC、PLT 3 项指标均低于正常值和 1 例单纯 WBC 低于正常值, 而且 PDCB 作业工人齿龈出血症状显著高于对照组, 提示 PDCB 可能对血液系统具有一定的损害。文献报道 PDCB 中毒病例可出现各种类型贫血<sup>[7]</sup> 以及可能引起白血病<sup>[9]</sup>。因此, 应警惕 PDCB 对血液系统的影响。

调查中还发现 PDCB 作业女工月经异常发生率与对照组女工比较差异具有显著性, 而且 PDCB 作业女

工中发生早产和死产各 2 例, 提示 PDCB 可能对女性生殖功能也有一定损害作用。

综上所述, PDCB 可能对多系统有不同程度的影响。因此, 有必要对 PDCB 作业工人进行动态观察, 从而全面客观地评价 PDCB 的职业危害, 为今后进一步制订我国 PDCB 职业接触限值标准提供准确可靠的卫生学参考依据。

#### 参考文献:

- [1] IARC. Ortho and Para-Dichlorobenzene. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to Human [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1982, 29: 213.
- [2] Hollingsworth RL, Rowe V K, Oyen F, et al. Toxicity of para-dichlorobenzene: Determinations on experimental animal and human subjects [J]. Arch Ind Health, 1956, 14: 138.
- [3] Den Besten C, Vet J J, Besselink H T, et al. The liver, kidney, and thyroid toxicity of chlorinated benzene [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1991, 111: 69.
- [4] Valentovic MA, Ball J G, Anestis D, et al. Acute hepatic and renal toxicity of dichlorobenzene isomers in Fischer 344 rats [J]. J Appl Toxicol, 1993, 13: 1.
- [5] IPCS. Environmental Health Criteria 128. Chlrobenzenes other than hexachlorobenzene [R]. Geneva: International Programme on Chemical Safety. 1991.
- [6] NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of 1, 4-Dichlorobenzene in F344/N rats and B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> mice (Gavage Studies) [R]. National Toxicology Program Technical Report, 1987. 319.
- [7] EPA. Final Draft Criteria Document for Ortho-Dichlorobenzene, Meta-Dichlorobenzene, Para-Dichlorobenzene [R]. Washington DC: Environmental Protection Agency. 1987.
- [8] Loeser E, Litchfield MH. Review of recent toxicology studies on para-dichlorobenzene [J]. Fd Chem Toxicol, 1983, 21: 825.
- [9] IARC. Ortho and Para-Dichlorobenzene. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1974, 7: 240.

(上接 138 页)

- [7] Manzeria P, Brown IR. The neuronal stress response; nuclear translocation of heat shock proteins as an indicator of hyperthermic stress [J]. Exp Cell Res, 1996, 229: 35-47.
- [8] Pope L, Moseley MD MS Heat shock proteins: abroad perspective [J]. J Lab Clin Med, 1996, 128: 233-234.
- [9] Jaattela M, Wissing D. Heat shock proteins protect cells from monocyte

cytotoxicity; possible mechanism of self-protection [J]. J Exp Med, 1993, 177: 213-216

- [10] Snyder YM, Guthrie L. Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages [J]. J Leukoc Biol, 1992, 51: 181-187.
- [11] Moseley PL, Gapen C. Thermal stress induces epithelial permeability [J]. Am J Physiol, 1994, 36: 425-434.