

罗汉果甜苷对力竭运动大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 及蛋白表达的影响

莫伟彬^{1,2}, 卜凯¹, 黄丽丽¹, 刘婷¹, 黄东^{1*}, 宫明明³

(1. 广西师范大学体育学院, 广西 桂林 541004;

2. 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室, 广西 桂林 541004;

3. 贺州学院体育学院, 广西 贺州 542800)

[摘要] 目的:研究运动前补充罗汉果甜苷(Mog)对力竭运动大鼠胃组织热休克蛋白70(HSP₇₀)mRNA表达和HSP₇₀蛋白表达的影响,以初步探讨罗汉果甜苷的作用机制。方法:SD雄性大鼠50只,随机分为5组,每组10只,分别为安静组(NC),运动组(ME),运动+低剂量罗汉果甜苷组(MogL),运动+中剂量罗汉果甜苷组(MogM),运动+高剂量罗汉果甜苷组(MogH)。每天在运动前30 min *ig* 1次,连续*ig* 6周,6 d/周,低、中、高3组的*ig* 剂量分别为100,200,400 mg·kg⁻¹,对照组*ig* 等量生理盐水。6周力竭训练结束后,宰杀大鼠。根据试剂盒的方法测定大鼠胃组织HSP₇₀ mRNA及蛋白表达。结果:运动组大鼠胃组织HSP₇₀ mRNA表达和HSP₇₀蛋白表达水平高于安静组($P < 0.05$);MogL, MogM, MogH各组大鼠胃组织HSP₇₀ mRNA表达和HSP₇₀蛋白水平都高于安静组和运动组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:罗汉果甜苷能够提高大鼠胃组织HSP₇₀ mRNA表达和HSP₇₀蛋白表达水平,对减少胃组织的溃疡、促进损伤后的恢复、细胞生长和发育等方面发挥重要的作用。

[关键词] 罗汉果甜苷; 力竭运动; 热休克蛋白70; 表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0103-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070103

Effects of Mogroside on Expression of HSP₇₀ mRNA and Protein in Gastric Tissue of Exhaustive Rats

MO Wei-bin^{1,2}, BU Kai¹, HUANG Li-li¹, LIU Ting¹, HUANG Dong^{1*}, GONG Ming-ming³ (1. Sport School of Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. State Key Laboratory Cultivation Base for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Ministry of Science and Technology of China, Guilin 541004, China; 3. School of Physical Education, Hezhou University, Hezhou 542800, China)

[Abstract] **Objective:** Study on the expression of gastric tissue heat shock protein (HSP₇₀) and HSP₇₀ mRNA after exhaustive exercise in rats which pre-exercise supplement of mogroside (Mog), to preliminary research the mechanism of mogroside. **Method:** Fifty healthy male Sprague-Dawley rats were randomized into five groups, each consisting of 10 rats: the quiet group (NC), the exercise group (ME), the administration of Mog in low dose exercising group (MogL), the administration of Mog in middle dose exercising group (MogM) and the administration of Mog in high dose exercising group (MogH). The rats were administrated by professional gavage once a day half an hour before exercising. This administration was continuously gaved six days in one week, and lasted for six weeks. The low, middle and high doses are respectively 100, 200, 400 mg·kg⁻¹, while the rats in control group were administrated of pure physiological saline at the same dose. The rats were killed after 6-week training. The expression of gastric tissue protein HSP₇₀ and HSP₇₀ mRNA were measured according the corresponding kit method respectively. **Result:** The expression of gastric tissue protein HSP₇₀ and HSP₇₀ mRNA were higher in exercise control group than these in NC group ($P < 0.05$). The expression of gastric tissue protein

[收稿日期] 20140904(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31060121);广西高校科研项目(YB2014384);广西教育厅科研项目(2013YB030);“药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室”开放课题(CMEMR2012-B04)

[第一作者] 莫伟彬, 硕士, 实验师, 从事运动生理学、运动生物化学和药理学研究, Tel:13978327323, E-mail:mogaol@163.com

[通讯作者] *黄东, 硕士, 讲师, 从事运动训练学与生理学研究, Tel:13457372677, E-mail:2930589298@qq.com

HSP₇₀ and HSP₇₀ mRNA in MogL, MogM and MogH were higher than these in NC group and ME group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Supplement of Mog could improve the expression of gastric tissue protein HSP₇₀ and HSP₇₀ mRNA. This could play an important role to reduce gastric ulcer, promote recovery, growth of cell and development after injury.

[**Key words**] mogroside; exhaustive exercise; heat shock protein; expression

大强度力竭运动刺激机体内会产生不同量度的自由基,从而使机体内的各系统器官发生不同程度的症状或体征的改变,如胃肠道系统、神经系统、内分泌系统和心血管系统等。最近研究发现,长时间的大强度运动会使胃组织发生一些功能性变化,严重的时候会出现胃出血和溃疡等损伤^[1]。罗汉果为广西桂北地区传统的特产药材,其成分主要由甜苷、多糖、槲皮素、黄酮等多种化学活性成分组成^[2-4]。研究发现,罗汉果甜苷(mogrosides, Mog)具有滑肠通便、抗氧化活性、清除自由基和抗病毒及抑制肿瘤细胞生长等药理作用^[5-6]。笔者的前期研究表明罗汉果黄酮对改善机体能量代谢和保护心肌组织的过度损伤具有良好的作用^[4]。笔者通过建立力竭游泳大鼠模型,观察罗汉果甜苷对力竭运动大鼠保护胃黏膜的作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 50 只,45 d 周龄,大鼠的体重为(210 ± 16) g。由桂林医学院附属医院实验动物教学示范中心提供,合格证号 SCXK(桂)2007-0001。在整个饲养过程中,室内温度为 23 ~ 27 °C,湿度控制在 58% ~ 70%,光照和通风环境随自然变化,大鼠以基础饲料饲养,自由摄食和饮水。

1.2 药物与试剂 罗汉果甜苷(Mog,桂林兴达制药有限责任公司,批号 2012103,纯度 > 80%),胃组织热休克蛋白 70(HSP₇₀)表达的逆转录聚合酶链式反应试剂盒(RT-PCR,湖南晶科生物科技有限公司,批号 20131211),100 bp Ladder DNA Marker(批号 MK-14-004),6 × DNA loading buffer 电泳上样缓冲液(批号 MK-13-012)均为广州东盛生物科技有限公司产品,Trizol 总 RNA 抽取试剂盒(Sigma-aldrich,批号 2013-46301),考马斯亮蓝(Fluka 公司,批号 T20130104),HSP₇₀,β-actin 抗体为鼠单抗(一抗体,武汉博士德,批号 C20117),羊抗鼠 HRP-IgG(二抗体,南京生兴生物技术有限公司,批号 20133012),PVDF 膜(Millipore 公司,批号 F03017),Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P006)。

1.3 仪器 Labcyclerbas 型 PCR 扩增仪(德国

SENSO 公司),DYY-6C 型水平电泳仪和半干式电转移仪(北京六一仪器厂),K241R 型台式高速冷冻离心机(英国 Centurion 公司),Keta-M 型化学发光成像系统(美国 Carestream 公司),Bioserss-l805 型凝胶成像及分析系统(上海山富科学仪器有限公司),721 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器),YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸气灭菌器(上海博迅实业有限公司),ABS220-4 型电子天平(德国 KERN 公司),WD-86L338 型超低温冰箱(海尔公司),DK-8AX 型电热恒温水槽(上海一恒科学仪器公司),DHZ-032R 型大型冷冻空气恒温摇床(上海博彩科技公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将 50 只大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 5 组,即安静组(NC),运动组(ME),运动 + 低剂量罗汉果甜苷组(MogL),运动 + 中剂量罗汉果甜苷组(MogM),运动 + 高剂量罗汉果甜苷组(MogH)。

2.2 动物模型 大鼠在适应性饲养分组后进行游泳训练,采用 120 cm × 70 cm × 60 cm 玻璃箱进行游泳训练,水的深度为 50 cm,水温控制在(30 ± 2) °C 左右。各训练组大鼠(ME, MogL, MogM 和 MogH 组)正式训练时按照前期实验动物模型^[4,7-8]进行为期 6 周的力竭负重游泳训练,负重标准为每只鼠尾部负自身重量 3% 的铅坠游泳^[9],1 次/d,6 d/周。力竭标准:大鼠头部沉入水下超过 10 s 仍未返回水面;大鼠协调运动消失,在水中不定向乱窜,未达到 10 s 亦定为力竭。

2.3 动物给药量与取材 各组大鼠分别在训练前 30 min *ig* 不同浓度的罗汉果甜苷溶液,罗汉果甜苷低、中、高剂量组(100, 200, 400 mg · kg⁻¹),相当于成人推荐剂量的 5, 10, 20 倍,各组 *ig* 体积 7.5 mL · kg⁻¹,安静组和运动组均以 *ig* 等量生理盐水,连续 *ig* 6 周,6 d/周。训练结束后,取材大鼠禁食 12 h 以上,于次日 8 时经 20% 乌拉坦溶液(3 mL · kg⁻¹)麻醉,迅速解剖取胃,并置于 -80 °C 冰箱中保存待测。

2.4 胃组织 HSP₇₀ mRNA 表达检测 用 RT-PCR 方法。

2.4.1 引物合成 大鼠 HSP₇₀ 基因与内参基因 β -actin 引物由上海生工设计合成, 具体序列与扩增长度见表 1。

表 1 引物序列与扩增长度

引物	引物序列(5'-3')	扩增长度 /bp
HSP ₇₀	AGCGAGGCTGACAAGAAGAAG	403
	AACCCACGAGCATACAAAATGT	
β -actin	TGGTGGGTATGGGTCAGAAGGACTC	266
	CATGGCTGGGGTGTGAAGGTCTCA	

2.4.2 HSP₇₀ mRNA 表达水平 按照前期实验^[4,7-8]方法检测 HSP₇₀ 基因的表达水平。首先, 取 50 ~ 100 mg 胃组织匀浆, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 严格按照说明书进行操作, 经 721 紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的浓度和纯度。然后, 取 5.5 μ L 根据逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 其反应条件: 室温反应 10 min; 42 $^{\circ}$ C, 45 min; 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 4 $^{\circ}$ C, 5 min。取 cDNA 2.5 μ L 进行 PCR 扩增反应, 其反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 3 min; 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。最后, 取 10 μ L PCR 反应产物与上样液充分混合, 点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶板中电泳 70 min。用 Bioserss-1805 型凝胶成像系统进行成像分析 HSP₇₀ 和 β -actin 的吸光度, 采用 HSP₇₀/ β -actin 来表示。

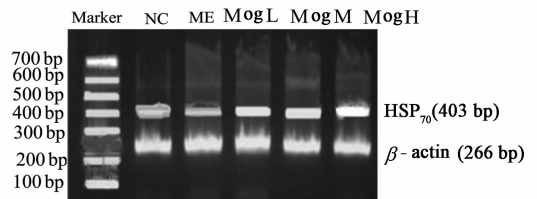
2.5 HSP₇₀ 蛋白检测 制备样品蛋白: 取 100 mg 胃组织, 液氮研磨, 加入组织裂解液并静置于冰上裂解 20 min 至充分裂解, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min, 取上清, 采用 Bradford 方法检测蛋白浓度, 调整匀浆液蛋白浓度后, 20 μ L 样品中加入 5 倍的上样缓冲液 5 μ L, 沸水中煮 5 min, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。电泳: 配制 15% SDS-PAGE 分离胶, 灌胶, 封胶, 配制 5% 的浓缩胶, 灌胶, 上梳, 填满空隙, 放置 25 min。放入电泳槽, 加样(每孔上样量为 10 μ L), 初始电泳电压为 60 V, 溴酚蓝进入分离胶后电压改为 90 V, 电泳大约 2 h。然后, 将分离胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。转膜条件: 恒定电流 14 V, 100 mA, 转印 2 h。转膜结束后将膜放入封闭液中封闭过夜。加入一抗: HSP₇₀ (1:200), β -actin (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 振荡过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入二抗: 羊抗鼠 IgG (1:2 000), 室温振荡 40 min。PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。二抗结合结束后, 加 ECL 化学发光底物于膜上, 5 min 后置于转移膜上进行曝光, 显

影、定影并采用凝胶成像系统对 HSP₇₀ 与 β -actin 蛋白条带的灰度扫描并用比值表示。

2.6 统计学处理 对各组数据统计均用 SPSS 19.0 进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用多重比较和单因素方差分析, 并进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

3 结果

3.1 对运动大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 表达的影响 力竭游泳运动组大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 表达水平高于安静组 ($P < 0.05$), 在 Mog 各组大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 表达水平都高于安静组和运动组 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 1, 表 2。



NC. 安静组; ME. 运动组; MogL. 运动 + 罗汉果甜苷 100 mg \cdot kg⁻¹ 组; MogM. 运动 + 罗汉果甜苷 200 mg \cdot kg⁻¹ 组; MogH. 运动 + 罗汉果甜苷 400 mg \cdot kg⁻¹ 组 (图 2 同)

图 1 各组大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 产物电泳

Fig. 1 Electrophoresis of HSP₇₀ mRNA product in gastric tissue of rats in each group

表 2 各组大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of the relative expression of HSP₇₀ mRNA in gastric tissue of rats between each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg \cdot kg ⁻¹	HSP ₇₀ mRNA	HSP ₇₀ 蛋白
		/ β -actin	/ β -actin
安静	-	0.87 \pm 0.12	1.15 \pm 0.13
运动	-	1.12 \pm 0.10 ¹⁾	1.43 \pm 0.10 ¹⁾
运动 + 罗汉果甜苷	100	1.52 \pm 0.14 ^{2,3)}	1.82 \pm 0.11 ^{2,3)}
	200	1.59 \pm 0.15 ^{2,3)}	1.89 \pm 0.14 ^{2,3)}
	400	1.61 \pm 0.19 ^{2,3)}	1.94 \pm 0.16 ^{2,4)}

注: 与安静组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; 与运动组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对运动大鼠胃组织 HSP₇₀ 蛋白表达的影响 通过比较 HSP₇₀ 与 β -actin 条带的灰度比值, 发现运动组 HSP₇₀ 蛋白表达高于安静组 ($P < 0.05$), 在 Mog 3 个剂量组大鼠胃组织 HSP₇₀ 蛋白表达水平都高于运动组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 2。

4 讨论

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 又称应激蛋白, 是一组具有重要生理功能、高度保守的蛋白

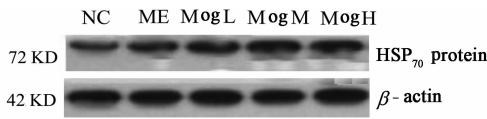


图 2 各组大鼠 HSP₇₀ 蛋白表达

Fig. 2 Expression of HSP₇₀ protein in rats of each group

质分子家族,其种类繁多,按照其相对分子质量大小将 HSPs 分为 4 个家族,即 HSP₉₀ (83 ~ 90 kDa) 家族, HSP₇₀ (66 ~ 78 kDa) 家族, HSP₆₀ 家族及小 HSP 家族。其中 HSP₇₀ 是胃黏膜保护中一类重要蛋白,具有抗炎、抗凋亡,保护细胞免受刺激损伤以及促进受损细胞修复和细胞生长、发育等方面发挥重要的作用^[10]。诸多的研究发现, HSP₇₀ 是其家族中最主要的一类保护胃黏膜的 HSP, HSP₇₀ 的表达能够对运动形成的生理应激状态细胞产生保护作用,且与运动强度、局部缺血和缺氧等因素有关^[11]。Tsukimi 等^[12] 研究发现, HSP₇₀ 在正常胃黏膜和胃溃疡组织中均有表达,且胃溃疡组织的 HSP₇₀ 的表达比正常胃黏膜的表达高,且胃组织细胞在修复胃溃疡时 HSP₇₀ 的表达也随之升高。王小梅等^[13] 通过建立运动应激性胃溃疡动物模型发现,力竭运动引起大鼠出现胃溃疡,且 HSP₇₀ mRNA 的表达有上升的趋势,通过服用白术水提取液后有利于胃黏膜腺体细胞中 HSP₇₀ mRNA 的表达和胃组织的合成,防止胃组织的损伤和细胞的凋亡。本实验研究发现,运动组大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 以及蛋白表达都高于安静组,提示这可能是力竭游泳引起大鼠胃组织溃疡或损伤,导致 HSP₇₀ 表达的增加。通过补充不同剂量的罗汉果甜苷后,大鼠胃组织 HSP₇₀ mRNA 表达和 HSP₇₀ 蛋白表达都高于安静组和运动组,并且在高剂量组时 HSP₇₀ mRNA 表达和 HSP₇₀ 蛋白表达达到峰值。这与王小梅等^[14] 研究的结果相一致,提示罗汉果甜苷有助于减少胃组织的溃疡、促进损伤后的恢复。但罗汉果甜苷在 HSP₇₀ 的表达下能否对其他的机体组织产生保护作用还有待研究。

[参考文献]

[1] 赵敬国,王福文. 大鼠运动应激性胃溃疡的观察[J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(1):100-101.

[2] 陈全斌,杨瑞云,义祥辉,等. RP-HPLC 法测定罗汉果鲜果及甜苷中总黄酮含量[J]. 食品科学, 2003, 24(5):133-135.

[3] 陈全斌,沈钟苏,韦正波,等. 罗汉果黄酮的活血化痰药理作用研究[J]. 广西科学, 2005, 12(4):316-319.

[4] 莫伟彬,宫明明,刘婷,等. 罗汉果黄酮对运动大鼠心肌能量代谢酶及 PPAR α mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14):203-208.

[5] 杨秀伟,张建业,徐巍. 罗汉果皂苷 III 的人肠内细菌生物转化[J]. 北京大学学报:医学版, 2007, 39(6):657-662.

[6] 李海云,王秀丽,潘英明,等. 罗汉果不同溶剂提取物抗氧化及清除活性氧自由基作用[J]. 广西植物, 2008, 28(5):698-702.

[7] 阳毅,莫伟彬,李启畅. 甘草黄酮对运动大鼠肝组织自由基代谢及 P53 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19):245-249.

[8] 黄东,卜凯,阳毅. 甘草黄酮对运动大鼠体内糖及脂肪组织 RBP4 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2):124-127.

[9] Thomas D P, Marshall K I. Effects of repeated exhaustive exercise on myocardial subcellular membrane structures [J]. Int J Sports Med, 1988, (9):257-260.

[10] Lepore D A, Knight K R, Anderson R L, et al. Role of priming stresses and HSP₇₀ in protection from ischemia-reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle [J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6(2):93-96.

[11] Febhrich I A, koukoulas I. HSOP₇₂ gene expression progressively in crexes in human skeletal muscle during prolonged exhaustive exercise [J]. J Appl Physiol, 2000, 89(3):1055-1060.

[12] Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, et al. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats [J]. Physiol Pharmacol, 2001, 52(3):391-406.

[13] 王小梅,景会锋. 白术对运动应激性胃溃疡大鼠胃组织中自由基含量及 HSP₇₀ 表达的影响[J]. 天津体育学院学报, 2008, 23(5):453-456.

[责任编辑 聂淑琴]