

红景天苷对慢性重复悬尾应激动物的保护作用

刘晓晖^{1,2}, 张莉^{1*}, 张岭¹, 陈莉¹, 申去非¹, 李宏树¹, 王雪超¹

(1. 武警医学院预防医学系药学教研室, 天津 300162;

2. 武警江西总队医院检验科, 南昌 330001)

[摘要] 目的: 研究红景天苷(salidroside)对慢性重复悬尾应激模型(repeated tail-suspension test, R-TST)小鼠的保护作用。方法: 昆明种小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 即对照组、应激组、红景天苷高(60 mg·kg⁻¹)、中(30 mg·kg⁻¹)、低剂量组(15 mg·kg⁻¹)。采用重复悬尾应激模型, 重复悬吊应激 11 d, 每天应激 1 次, 每次 2 h, 并每隔 3 d 增加 1 h, 每次应激前 30 min ig 给予相应剂量的红景天苷或生理盐水, 并于末次应激结束 30 min 后眼眶取血, 用 RIA 测定血清中睾酮含量。摘取脾脏、胸腺、肾上腺和睾丸, 称重并计算脏器指数。取肾上腺和睾丸用 4% 多聚甲醛固定并制作组织切片, HE 染色, 显微镜下观察形态学变化。结果: 应激后小鼠体重增长程度明显受抑, 质量增加幅度仅为对照组的 27%; 肾上腺指数上升, 为对照组的 164%; 脾脏指数下降为对照组的 70%; 肾上腺皮质肥厚, 髓质萎缩甚至消失。应激组小鼠血浆睾酮水平显著低于对照组($P < 0.01$)。应激前 30 min 给予低剂量红景天苷可逆转应激导致的体重增加减缓, 降低肾上腺指数, 脾脏指数增加; 肾上腺皮质肥厚及髓质萎缩等病理症状减轻, 睾酮恢复至正常水平。但中剂量组和高剂量红景天苷组上述作用不显著。结论: 低剂量红景天苷可显著改善应激小鼠体重增加减缓、肾上腺指数升高、脾脏指数下降、肾上腺皮质肥厚、髓质萎缩和结构层次模糊等, 且能显著抑制重复悬尾应激所引起的睾酮水平低下并使其恢复正常, 提示红景天苷可能通过改善应激所致的睾酮水平降低及维持肾上腺的正常结构和正常生理功能发挥抗应激作用。

[关键词] 红景天苷; 应激; 吊尾; 睾酮; 肾上腺; 体重

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0199-04

Preventive Effect of Salidroside on Stressed Mice Induced by Repeated Tail Suspension Test

LIU Xiao-hui^{1,2}, ZHANG Li^{1*}, ZHANG Ling¹, CHEN Li¹, SHEN Qu-fei¹, LI Hong-shu¹, WANG Xue-chao¹

(1. Department of Pharmacy, Medical College of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China;

2. Laboratory Medicine, Jiangxi Municipal Corps Hospital of College of Chinese People's Armed Police Force, Nanchang 330001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of salidroside on the stressed mice induced by repeated tail-suspension test(R-TST). **Method:** Fifty Kunming mice were randomly divided into five groups, including control group, stressed group, high-dose salidroside group(ig. 60 mg·kg⁻¹), middle-dose salidroside group(ig. 30 mg·kg⁻¹), low-dose salidroside group(ig. 15 mg·kg⁻¹). Repeated tail suspension test model was adopted in this experiment. All groups were stressed once a day for 11 days and two hours daily, the stress time was progressively increased one hour in every three days. Each group was administered with appropriate dose of salidroside or saline 30 min before the stress, the blood samples were collected from the orbit 30 min after the stress. RIA was used to determined the contents of testosterone in serum. The spleen, thymus, adrenal gland and testis were removed and

[收稿日期] 20101110(005)

[基金项目] 武警部队科研基金(WY200913)

[第一作者] 刘晓晖, 硕士研究生, Tel: 022-60578196, E-mail: zhli62tianjin@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 张莉, 教授, Tel: 022-60578196, E-mail: zhli62tianjin@yahoo.com.cn

the organ indexes were calculated after weighing. Adrenal gland and testes were fixed with 4% paraformaldehyde and tissue sections prepared, stained with HE, morphological changes were observed under a microscope. **Result:** After the stress, body weight gain was suppressed significantly for the stressed mice, and the weight gain was only 27% of controls. The adrenal gland index was increased to 164%, spleen index were reduced to 70%, comparing with the control group. Along with adrenal index increase, adrenal hypertrophy, medulla atrophy or even disappeared. And the testosterone level in plasma in mice of the stressed group was significantly lowered compared with that of the control group ($P < 0.01$). Giving low dosage of salidroside 30 min before the stress could reverse the slow weight gain caused by stress, reduce adrenal index, relieve the pathological syndrome, such as adrenal hypertrophy and medullary atrophy, and make the testosterone recovered to normal level. However, the similar effects were not found in the mice of middle dose salidroside group and high dose salidroside group. **Conclusion:** The low-dose salidroside can significantly improve the following problems in the stressed mice: suppressed weight gain, the increased adrenal gland index, adrenal cortical hypertrophy, medulla atrophy and blurred microscopic structure and the low testosterone level. It indicates that salidroside may perform the anti-stress function by means of improving the decreased testosterone level caused by stress and maintaining the normal tissues structure as well as the physiological function of adrenal gland. And high dosage salidroside may have adverse effects.

[**Key words**] salidroside; stress; tail suspension test; testosterone; adrenal gland; body weight

应激尤其是长期慢性应激严重影响人类的身心健康,并促进机体衰老。临床上与应激有关的疾病屡见报道,如抑郁症、免疫功能低下、不育症等^[1-3]。随着应激对人类的危害日益受重视,抗应激药物的研究显得尤为重要和紧迫。前苏联学者曾提出红景天具有适应原作用,即能非特异性地增强人体抵抗,而不干扰人体正常生化指标^[4],但对红景天中主要有效成分红景天苷深入的抗应激研究未见文献报道。随着人们对应激性损伤和抗衰老理论的认识,重新深入研究红景天苷抗应激损伤及机制很有必要。本研究采用慢性重复悬吊应激模型(repeated tail-suspension test, R-TST),观察红景天苷对应激小鼠的保护作用。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雄性,体重(22 ± 2)g,50只,适应环境1周,实验室和动物室温度为 $25 \sim 30$ ℃,自由饮食。动物和饲料均由军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号为SCXK-(军)2002-2001。

1.2 仪器 悬吊应激装置(自制);电子天平(SHANGPING JA3003)、显微镜(Motic B1 series)、Leica RM2016 切片机(上海莱卡仪器有限公司)、Leica ASP300 全自动组织脱水机(上海莱卡仪器公司)、YD-6D 生物组织石蜡包埋机(金华市益迪医疗设备厂)。

1.3 试剂 红景天苷,纯度98%(中国药品生物制品检定所,批号110818-200404)、睾酮放免试剂盒(天津九鼎生物医学工程公司,批号080316)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 实验动物随机分为5组,每组10只。包括正常对照组(对照组)、重复悬吊应激模型组(应激组)、重复应激+高剂量红景天苷组(HS)、重复应激+中剂量红景天苷组(MS)、重复应激+低剂量红景天苷组(LS)。对照组:每日ig给予生理盐水(ig,0.5 mL/只),连续11d;应激组:按要求给予重复悬吊应激刺激,每日ig给予生理盐水(ig,0.5 mL/只),连续11d;参考文献方法^[5-6],红景天苷高、中、低剂量组:按要求给予重复悬吊刺激,每日分别于应激前30 min ig给予红景天苷水溶液60, 30, 15 mg·g⁻¹,连续11d。

2.2 应激动物模型的建立及脏器指数测定 本实验连续进行11d,每天以悬吊为应激原刺激动物,对照组饲养于同一环境,与各实验组动物处于同一房间。具体实验过程如下:将小鼠尾朝上头朝下悬吊于水面上,水温(20 ± 2)℃,悬吊高度以前爪刚接触水面为准,每天1次,连续11d,并循序增加应激强度。d 1~d 3 应激2 h, d 4~d 6 应激3 h, d 7~d 9 应激4 h, d 10~d 11 应激5 h。应激时间安排在9:00 am~2:00 pm之间,应激前30 min ig给予生理盐水或红景天苷。d 11 应激5 h,应激后30 min 处

死动物。取血,离心分离血清, -20 ℃ 保存备用。RIA 法测定睾酮。分别摘取小鼠的脾脏、胸腺、肾上腺和睾丸称质量,并计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

2.3 形态观察 取小鼠左侧肾上腺、睾丸固定于4%多聚甲醛液中,脱水,石蜡包埋,切片,厚度4 μm,HE染色,光镜下观察小鼠肾上腺和睾丸组织的形态学变化。

2.4 数据处理 文中数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用统计学软件 SPSS 16.0 进行统计分析,采用方差分析和 *t* 检验,检验差异的显著性。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 体重变化 实验前各组间小鼠体重无差异,实验进行 11 d 后,各组小鼠体重均有不同程度的增长 ($P < 0.01$)。但各组小鼠实验后与实验前相比,增长幅度有显著性差异,其中对照组小鼠体重增加明显,应激组小鼠体重增加迟缓,而红景天苷高、中、低剂量组体重增幅均高于应激组,其中红景天苷低剂量组小鼠体重增加幅度接近正常组,而高、中剂量组虽有增高趋势,但与应激组相比无统计学意义(表 1)。

表 2 红景天苷对悬尾应激小鼠肾上腺、睾丸、脾脏、胸腺指数和血清睾酮水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肾上腺 /mg·g ⁻¹	睾丸 /mg·g ⁻¹	脾脏 /mg·g ⁻¹	胸腺 /mg·g ⁻¹	睾酮 /ng·L ⁻¹
正常对照	-	0.22 ± 0.08	3.53 ± 0.32	3.62 ± 0.54	6.74 ± 1.23	1 106.7 ± 306.3
应激	-	0.36 ± 0.04 ¹⁾	3.64 ± 0.67	2.55 ± 0.51 ¹⁾	6.30 ± 0.81	239.6 ± 246.9 ¹⁾
红景天苷	15	0.23 ± 0.08 ³⁾	3.80 ± 0.61	3.65 ± 0.81 ²⁾	6.71 ± 0.83	1 187.7 ± 328.9 ³⁾
	30	0.30 ± 0.09	3.80 ± 0.65	2.60 ± 0.50	6.76 ± 1.09	368.9 ± 311.8
	60	0.33 ± 0.06	3.71 ± 0.49	2.78 ± 0.39	6.47 ± 1.09	435.9 ± 310.5

注:与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;与应激组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 血清睾酮含量 悬尾应激 11 d 后,各组小鼠睾酮水平如表 2 所示。与对照组相比,应激组小鼠血清睾酮水平显著降低 ($P < 0.01$)。与应激组相比,红景天苷高、中、低剂量组血清睾酮水平均增加,其中低剂量红景天苷作用最为显著,该组睾酮水平与对照组接近,而中、高剂量虽有增高趋势但无统计学差异。

3.4 睾丸组织结构变化 对照组睾丸生精小管从基底膜到腔面可见精原细胞、精母细胞和精子细胞,腔内可见大量的成熟精子。与对照组相比,应激组生精小管的形态结构,精原细胞、精母细胞及精子细胞数无明显变化。与对照组相比,红景天苷组生精

表 1 红景天苷对悬尾应激小鼠体重及体重增长的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) g

组别	剂量 /mg·g ⁻¹	应激前体重	应激后体重	体重增长
正常对照	-	32.29 ± 2.80	38.87 ± 3.24	6.58 ± 1.34
应激	-	32.52 ± 2.23	34.29 ± 2.00	1.77 ± 0.84 ¹⁾
红景天苷	15	31.77 ± 1.97	36.86 ± 2.23	5.09 ± 1.32 ²⁾
	30	32.66 ± 2.04	35.09 ± 2.14	2.43 ± 0.72
	60	33.03 ± 1.80	35.60 ± 1.81	2.57 ± 0.89

注:与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;与应激组相比²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 脏器指数变化 各组实验动物脏器指数见表 2。与对照组相比,应激组小鼠的肾上腺指数增加 ($P < 0.01$),脾脏指数下降 ($P < 0.05$),而睾丸指数和胸腺指数无变化。与应激组相比,红景天苷 3 个剂量组小鼠的肾上腺指数均下降,脾脏指数均增加,但其中只有低剂量组小鼠的肾上腺指数和脾脏指数变化有统计学意义 ($P < 0.01 \sim P < 0.05$),而红景天苷高、中剂量组小鼠肾上腺指数和脾脏指数变化无统计学意义。红景天苷 3 个剂量组小鼠的睾丸指数和胸腺指数均无明显变化。

小管的形态结构,精原细胞、精母细胞及精子细胞数亦无显著性差异,表明红景天苷对小鼠睾丸的正常生理结构无影响。

3.5 肾上腺组织结构变化 对照组小鼠肾上腺皮质和髓质层次清晰,应激组肾上腺皮质和髓质结构层次模糊,皮质肥厚,髓质萎缩甚至消失。当给予低剂量红景天苷 ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 可见小鼠肾上腺皮质和髓质层次清晰,但中剂量和高剂量组小鼠肾上腺仍有一定的病理改变。

4 讨论

实验中亦发现小鼠重复悬吊应激后,体重增加幅度与对照组相比显著减缓。低剂量红景天苷能显

著拮抗应激所致的小鼠体重减缓幅度。而文献报道红景天具有蛋白同化作用,其作用包括改善肌肉-脂肪比率,促进骨骼肌细胞葡萄糖的摄取,增加血红蛋白和红细胞,提高肌蛋白和谷氨酸水平等,且作用强度与低剂量的睾酮相似^[7];亦有研究显示红景天苷能够适当降低在应激反应中发挥着重要作用的去甲肾上腺素水平。提示红景天苷可能通过改善应激小鼠食欲,增加小鼠肌肉-脂肪比率等方面发挥抗应激作用。

本研究应激组小鼠脾脏指数下降,提示应激后小鼠免疫功能受影响。用红景天苷干预后,高、中、低剂量的红景天苷均能不同程度地抑制应激所致的脾脏指数下降,其中低剂量组与应激组相比有统计学差异,中剂量和高剂量组虽有增高趋势但无显著差异。研究结果与 Saratikov 等^[8]报道的一致。提示低剂量红景天苷能够拮抗应激所致的小鼠免疫力下降。

实验中我们发现经 11 d 重复悬吊应激后,小鼠肾上腺指数增高,肾上腺皮质出现增生、肥厚以及髓质出现萎缩甚至消失现象,给予低剂量红景天苷干预后,应激小鼠肾上腺指数升高、肾上腺皮质肥厚、髓质萎缩、结构层次模糊等有明显改善。有文献报道红景天可显著降低应激时皮质醇的产生,使体内糖皮质激素水平维持平衡,从而增强机体对应激的抵抗力^[9]。提示红景天苷可能通过维持肾上腺的正常结构和正常生理功能而发挥抗应激作用,具体通过何种途径发挥作用有待于进一步研究。

在研究中亦发现低剂量红景天苷能拮抗悬尾应激所引起的睾酮水平低下并使其恢复至正常水平,提示红景天苷可能具有拮抗应激所致的睾酮水平下降的作用,从而改善应激所致的性功能低下。

[参考文献]

- [1] 刘春丽,周文霞,张永祥. 糖皮质激素对下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的影响[J]. 军事医学科学院院刊, 2004,28(1):71.
- [2] 郑金焱,林贤浩. 慢性应激动物模型研究进展[J]. 四川精神卫生,2010,23(2):1003.
- [3] 艾秀峰,冷晓霞,陈民利,等. 束缚应激致亚健康状态大鼠的免疫功能改变与中药干预的影响[J]. 实验动物与比较医学,2010,30(2):117.
- [4] 魏平平,张莉,袁堃,等. 红景天苷的提取分离、生物合成与生物活性研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(6):1320.
- [5] Wu Y L, Piao D M, Han X H, et al. Protective effects of salidroside against acetaminophen-induced toxicity in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2008,31(8):1523.
- [6] Shevtsov V A, Zhohus B I, Shervarly V I, et al. Wikman G. A randomized trial of two different doses of a SHR-5 *Rhodiola rosea* extract versus placebo and control of capacity for mental work [J]. Phytomedicine, 2003,10(2/3):95.
- [7] Li H B, Ge Y K, Zheng X X, et al. Salidroside stimulated glucose uptake in skeletal muscle cells by activating AMP-activated protein kinase [J]. Eur J Pharmacol, 2008,588(2/3):165.
- [8] Saratikov A S. Rose-root stonecrop [J]. Pharmaceu Chem J,1977,11(4):492.
- [9] Kucinskaite A, Briedis V, Savickas A. Experimental analysis of therapeutic properties of *Rhodiola rosea* L. and its possible application in medicine [J]. Medicina,2004,40(7):614.

[责任编辑 聂淑琴]