人参皂甙 Rb_1 对应激性性行为缺损的保护作用及机制

连晓媛　张均田

（中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所，北京 100050）

摘要　用悬吊应激模型，小鼠连续应激小鼠 10 d，每天应激一次，并循序增加应激强度，每次应激前 30 min，ip 人参皂甙 Rb_1，观察人参皂甙 Rb_1 对应激性性行为低下的保护作用。结果表明，应激模型组小鼠性行为明显减少，甚至达到缺损的程度，同时血浆睾酮水平明显降低，而 Rb_1 各剂量组（2.5，5，10 $mg\cdot kg^{-1}$）对应激引起的性行为低下及血浆睾酮水平下降均有明显的对抗作用。提示人参皂甙 Rb_1 对应激性性行为低下有保护作用，其机制可能与 Rb_1 抑制应激动物血浆皮质酮升高和提高睾酮水平有关。

关键词　慢性应激；性行为；睾酮；人参皂甙 Rb_1

强烈应激尤其是长期慢性应激严重影响人类的身心健康，促进机体衰老[1～3]。临床上与应激相关的疾病屡见不鲜，如肌病、固醇类糖尿病、高血压、免疫功能低下症、不育症等[4]。应激对人类的危害愈来愈烈，因此抗应激药物的研究有非常重要的意义。本世纪初苏联学者提出人参具有抗应激作用，但未见深入研究的文献报道。随着人们对应激性损伤和抗衰老理论的认识，重新深入研究人参抗应激损伤及机制很有必要。本文用重复悬吊应激模型，观察人参皂甙 Rb_1 对应激性性行为低下的保护作用及机制。

材　料　与　方　法

药品和试剂　人参皂甙 Rb_1（含量 96% 以上）；睾酮放免试剂盒（卫生部上海生物制品研究所产品）。

动物　昆明种小鼠，♂ 体重 32～36 g，♀ 体重 30～32 g，中国医学科学院动物中心提供，室温 18～22℃。光照 12 h:12 h（光:暗）使用前适应环境 3 d。

动物准备及分组　（1）动情期♀小鼠准备[5]：取性成熟昆明种♀小鼠，去卵巢，恢复 2 周待用，临用前 48 h sc 苯甲酸雌二醇 100 $\mu g\cdot kg^{-1}$，4～6 h 前再 sc 孕酮 500 μg/只，即得动情期♀鼠。（2）♂小鼠性经验获得：将♂小鼠与动情期♀小鼠按 3:1（♂:♀）合笼饲养 3 d，获得性交经验。（3）分组与给药：将有性交经验的♂小鼠分为正常对照组，应激组，应激给药组（人参皂甙 Rb_1 2.5，5，10 $mg\cdot kg^{-1}$，ip），单只饲养，给药组每次应激前 30 min 给药，其他组给等量生理盐水。

应激实验　将小鼠尾朝上头朝下悬吊于水面上，水温 20±2℃，悬吊高度以前肢刚接触水面为准，每天 1 次，连续 10 d，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 9:00 am～2:00 pm，d 10 7:00～9:00 pm 观察性行为。d 11 应激 5 h，应激后 30 min 取血，肝素抗凝，分离血浆，－20℃ 保存备用。

性行为观察　按文献[6]方法，将♂小鼠放入单只饲养的动情期♀小鼠笼中，观察 15 min，并记录如下性行为：舔（licking），跨骑（mounting），交配（mating）的潜伏期及 15 min 内发生数和发生率。

血浆睾酮水平测定　按试剂盒说明书方法稍加改进。（1）每管加血浆 0.1 ml，用无水乙

本文于 1997 年 5 月 16 日收到。

醚 4 ml 振旋提取 2 min。(2) 葡聚糖活性碳分离膜制备,按 G.B.S. 10 ml 中加入葡聚糖 10 mg、活性炭 100 mg 的比例配制。(3) 活性炭分离时,加入活性炭静置时间为 10 min。

结　果

1　人参皂甙 Rb_1 对应激性性行为缺损的影响

连续悬吊 10 d 小鼠性行为明显低下。人参皂甙 Rb_1 每次应激前 30 min 给药(2.5,5,10 $mg\cdot kg^{-1}$,ip)对应激引起的性行为缺损均有明显的保护作用(表 1～3)。

Tab 1　Effect of ginsenoside Rb_1 on repeated stress-induced reduction of licking behavior in male mice

Treatment ($mg\cdot kg^{-1}$, ip)		n	Licking latency(s)	Licking numbers in 15 min
Control		15	25.0±18.6	10.9±4.0
Stress		12	107.2±57.4$^{\#}$	4.9±3.2$^{\#\#\#}$
Rb_1	2.5	11	10.4±9.5**	8.8±5.4*
Rb_1	5	12	28.0±19.4*	10.2±4.1**
Rb_1	10	14	18.3±11.4**	13.9±7.1***

$\bar{x}\pm s$. $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs stress.

Tab 2　Effect of ginsenoside Rb_1 on repeated stress-induced reduction of mounting behavior in male mice

Treatment ($mg\cdot kg^{-1}$, ip)		n	Mounting latency(min)	Mounting numbers in 15 min	Mounting rate(%)
Control		15	3.8±2.4	11.3±8.5	100
Stress		12	12.3±5.2$^{\#\#\#}$	1.1±2.6$^{\#\#\#}$	33.3$^{\#}$
Rb_1	2.5	11	8.6±5.2*	5.5±5.0*	81.8*
Rb_1	5	12	4.3±2.7**	8.3±6.3**	91.7*
Rb_1	10	14	3.5±1.4***	10.2±5.3***	92.9*

$\bar{x}\pm s$. $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs stress. Mounting rate was tested by exact test for 2×2 tab.

Tab 3　Effect of ginsenoside Rb_1 on repeated stress-induced reduction of mating behavior in male mice

Treatment ($mg\cdot kg^{-1}$, ip)		n	Mating numbers in 15 min	Mating rate(%)
Control		8	5.5±5.6	87.5
Stress		6	0.5±1.2$^{\#}$	16.7$^{\#}$
Rb_1	2.5	6	1.5±3.2	33.3
Rb_1	5	6	3.0±2.6*	83.3
Rb_1	10	6	6.0±4.9*	83.3

$\bar{x}\pm s$. $^{\#}P<0.05$ vs control; $^{*}P<0.05$ vs stress. Mating rate was tested by exact test for 2×2 tab.

2　Rb_1 对应激引起血浆睾酮水平下降的影响

连续应激 11 d,血浆睾酮水平明显降低,Rb_1(2.5,5,10 $mg\cdot kg^{-1}$,ip)对应激引起的血浆睾酮水平的降低有明显对抗作用(表 4)。

Tab 4　Effect of ginsenoside Rb_1 on repeated stress-induced reduction of plasma testosterone level in male mice

Treatment ($mg\cdot kg^{-1}$, ip)		n	Testosterone ($fmol\cdot ml^{-1}$)
Control		12	3535.3±1194.7
Stress		11	1150.4±364.5$^{\#}$
Rb_1	2.5	9	2710.0±1700.4*
Rb_1	5	12	1697.8±448.0***
Rb_1	10	14	3021.2±1634.1***

$\bar{x}\pm s$. $^{\#}P<0.001$ vs control; $^{*}P<0.005$, $^{***}P<0.001$ vs stress.

讨　论

脑的老化和性功能低下是机体衰老的重要标志。应激参与并促进机体衰老,一方面,由于在应激状态下,下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴

兴奋性提高,肾上腺皮质大量释放应激激素-糖皮质激素(鼠类以皮质酮为主),高水平的糖皮质激素累积作用机体可导致与衰老相关性疾病[4]。此外糖皮质激素选择性作用海马引起海马损伤,表现为学习记忆功能下降,海马形态发生退行性变化[7~12],导致脑的衰老。另一方面,由于 HPA 轴过度兴奋,势必影响下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的功能,或过度释放的糖皮质激素直接作用于 HPG 轴某个环节或某个相关激素。Hales 等报道皮质酮可直接抑制睾丸间质细胞合成睾丸酮[13]。若长期累积作用必将导致 HPG 轴功能衰退。所以,研究应激状态下 HPG 轴功能的改变,寻找对抗 HPG 轴功能退化的药物研究对防止人类衰老具有非常重要的意义。

目前,应激对 HPG 轴和性功能的影响及药物作用研究报道甚少。本文研究结果表明,重复悬吊应激可引起小鼠性行为低下,甚至达到缺损的程度,同时血浆睾酮水平下降。有趣的是睾酮水平与血浆皮质酮升高呈显著负线性相关(另见报道),与 Hales 报道一致。Bingaman 等报道,雄性激素双氢睾酮和睾酮能抑制下丘脑 CRH 释放[14]。可见雄性激素参与了 HPA 轴功能调节,有利于防止应激机体皮质酮过度释放。

从以上研究结果提示,应激、皮质酮和睾酮之间可能存在以下关系:应激→血浆皮质酮水平↑→血浆睾酮水平↓→血浆皮质酮↑↑→血浆睾酮水平↓↓,即皮质酮的升高和睾酮的下降起着互相放大的作用。众所周知,睾酮与男性性功能密切相关,文献报道阉割动物性行为明显降低,表现为:跨骑数与血浆睾酮水平呈负线性相关,射精潜伏期延长和交配数减少[5,6]。可见,应激引起的性行为低下,很大程度上是由于皮质酮水平升高,从而使睾酮水平降低所致。

人参具有十分广泛的药理活性,以往我们的研究表明,人参皂甙为其主要活性物质,Rb_1 和 Rg_1 的药理作用尤为突出。本文研究结果表明:Rb_1 对应激性性行为低下具有显著的保护作用,并使其维持在正常水平。人参总皂甙与 Rb_1 作用相似,但稍弱于 Rb_1。而 Rg_1 无作用(结果未显示)。综上所述,我们认为:(1) Rb_1 为人参适应原样作用的主要活性成分。(2) 其作用机制与 Rb_1 抑制应激动物血浆皮质酮升高和提高睾酮水平有关。(3) 阻止应激动物血浆睾酮水平降低有利于防止其血浆皮质酮的升高,从而避免机体遭受损害。关于 Rb_1 在垂体、下丘脑和海马水平的作用还不清楚,有待进一步研究。

参 考 文 献

1 Pare W. The effect of chronic environmental stress on premature aging in the rat. *J Gerontol*, 1965, **20**:78

2 Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging. The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*, 1986, **7**:284

3 Seeman TE, Robbins RJ. Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans. *Endocr Rev*, 1994, **15**:233

4 Munck A, Guyre P, Holhrook N. Physiological functions of glucocorticoids during stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*, 1984, **5**:25

5 Ctark J, Smith E, Davidson J. Testosterone is not required for the enhancement of sexual motivation by yohimbine. *Physiol Behav*, 1985, **35**:517

6 Clark J, Smith E, Davidson J. Enhancement of sexual motivation in male rats by yohimbine. *Science*, 1984, **225**:847

7 Luine V, Villegas M, Martine ZC, *et al*. Repeated stress causes reversible impairment of spatial memory performance. *Brain Res*, 1994, **639**:167

8 Luine V, Spencer R, McEwen BS. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain Res*, 1993, **616**:65

9 Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, *et al*. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci*, 1995, **15**:61

10 Uno H, Tarara R, Else J, *et al*. Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in

primate. *J Neurosci*, 1989, **9**:1705

11 Watanable Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA_3 Pyramidal neurons. *Brain Res*, 1992, **588**: 341

12 Woolley CS, Gould E, McEwen BS. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, 1990, **531**:225

13 Hales DB, Payne AH. Glucocorticoid mediated repression of P450scc mRNA and *de novo* synthesis in cultured leydig cells. *Endocrinology*, 1989, **124**: 2099

14 Bingaman EW, Magnuson DJ, Gray TS, *et al*. Androgen inhibits the increases in hypothalamic corticotropin-releasing hormone(CRH) and CRH-immunoreactivity following gonadectomy. *Neuroendocrinology*, 1994, **59**:228

EFFECT OF GINSENOSIDE Rb_1 ON REPEATED STRESS-INDUCED SEXUAL DEFICIENCIES IN MALE MICE

Lian Xiaoyuan(Lian XY) and Zhang Juntian(Zhang JT)

(*Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciecces and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT The effect of ginsenoside Rb_1 has been studied on sexual deficiencies induced by repeated hanging stress. Male mice were stressed by hanging once daily(9:00 am～2:00 pm) for 10 days(1～3 day hung for 2 h, 4～6 day hung for 3 h, 7～9 day hung for 4 h, 10～11 day hung for 5 h). On day 10, they were exposed to female mice treated with estradiol and progestone and their sexual benaviors (licking, mounting, mating) were assessed at 7:00～9:00 pm. The repeated hanging stress was found to reduce sexual behaviors and decrease plasma testosterone level in mice. Treatments with ginsenoside Rb_1(2.5, 5, 10 $mg \cdot kg^{-1}$, ip) 30 min before each stress prevented the repeated stress-induced sexual deficiencies and raised plasma testosterone level. The mechanism of the protective action of ginsenoside Rb_1 may be attributed to its action in maintaining normal plasma tesosterone level.

KEY WORDS Repeated stress; Sexual behaviors; Plasma testosterone; Ginsenoside Rb_1