

- phonuclear leucocyte chemokinesis. *Chin J Pathophysiol* 1986; 2: 91
- 3 Grimm RH Jr, Neaton JD, Ludwig W. Prognostic importance of the white blood cell count for coronary, cancer, and all-cause mortality. *JAMA* 1985; 254: 1932
 - 4 Ostřádal B, Rychterová V, Poupa O. Isoproterenol-induced acute experimental cardiac necrosis in the turtle (*Testudo Horsfieldi*). *Am Heart J* 1968; 76: 645
 - 5 Mullane KM, Read N, Salmon JA, Moncada S. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228: 510
 - 6 Dow D, Whitaker RH. Prostatic contribution to normal serum acid phosphatase. *Br Med J* 1970; 4: 470
 - 7 Tang RY, Yao DF, He FC, Liu YX, Li SH. Effects of indomethacin and phenylpropionates on quantity of leukocytes, phagocytosis of macrophages and intracellular cAMP level in mouse peritoneal exudate. *Bull Third Milit Med Coll* 1985; 7: 13
 - 8 Halliday WJ, Maluish A, Isbister WH. Detection of anti-tumour cell mediated immunity and serum blocking factors in cancer patients by the leucocyte adherence inhibition test. *Br J Cancer* 1974; 29: 31
 - 9 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351
 - 10 Li YX, Fang YZ. A new assay for superoxide dismutase activity: chemiluminescence method. *Biochem Biophys* 1983; (2): 59
 - 11 Cheng JX, Duan JH, Han FY, Ge L, Wang ZG, Shi YQ. Radioimmunoassay for prostaglandin E2. *Acta Acad Med Sin* 1987; 9: 229
 - 12 Jacob HS, Hammerschmidt DE. Complement-induced granulocyte aggregation: importance in myocardial infarction and shock lung. *JAMA* 1981; 245: 2013
 - 13 Hou YN, Tang RY, Yao DF. Effects of neutrophils emigration on vascular permeability and anti-inflammatory mechanism of dexamethasone. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9: 258

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 May; 12 (3) : 272-275

人参多糖降低肝糖原的作用

杨 明、王本祥 (吉林省中医中药研究院, 长春 130021, 中国)

Effects of the ginseng polysaccharides on reducing liver glycogen

YANG Ming, WANG Ben-Xiang (*Academy of Traditional Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China*)

ABSTRACT The ginseng polysaccharides GH₁ (100, 200 mg · kg⁻¹) iv reduced liver glycogen and increased adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) level and adenylyl cyclase (AC) activity in

mice. The action of GH₁ was completely antagonized by propranolol, inhibitor of adrenergic beta receptor. The stimulating effect of GH₁ on AC activity was significant 2 and 4 h after iv GH₁. However, GH₁ at concentration of 20-120 μmol · L⁻¹ *in vitro* showed no manifest effect on AC activity. GH₁ stimulated the activities of 3',5'-cyclic-GMP phosphodiesterases (PDE) and calmodulin (CaM) in a dose-dependent manner. It is suggested that the reduction of liver glycogen induced by GH₁ resulted from its obvious increase of cAMP which promoted glycogenolysis and decreased glycogenesis.

Received 1990 Jul 19

Accepted 1991 Jan 14

KEY WORDS ginseng; polysaccharides; liver glycogen; adenylyl cyclase; phosphodiesterases; calmodulin

提要 小鼠一次 iv 人参多糖 GH₁ 100, 200 mg · kg⁻¹ 可明显降低肝糖原含量, 同时使腺苷酸环化酶(AC)活性增强, 并增加 cAMP 的含量。上述作用可被 β 肾上腺素受体拮抗剂普萘洛尔完全阻滞, 提示其降低肝糖原作用与 β 肾上腺素受体有关。GH₁ 可明显增加钙调素(CaM)的含量, 使磷酸二酯酶(PDE)活性增强。离体实验表明: GH₁ 对 AC 活性无明显影响。

关键词 人参; 多糖类; 肝糖原; 腺苷酸环化酶; 磷酸二酯酶; 钙调素

前文⁽¹⁾论述了人参多糖 GH₁ 具有降血糖和肝糖原作用。其降血糖作用主要是由于其明显增强了与线粒体氧化磷酸化作用和反映呼吸链中段和末段活性状态的二个重要呼吸酶—琥珀酸脱氢酶和细胞色素氧化酶的活性。从而加速了糖的有氧氧化代谢过程。而降低肝糖原作用可能与其抑制乳酸脱氢酶活性使乳酸减少有一定关系。本文进一步研究 GH₁ 降低肝糖原作用及其机制。

MATERIALS AND METHODS

昆明种小鼠 128 只, 体重 20.9 ± SD 1.8 g, Wistar 大鼠 20 只, 体重 182 ± 27 g, ♀ ♂ 不拘。

单体 GH₁ 由我院植化室徐东铭提供。GH₁ 用醋酸纤维素薄膜电泳, 甲苯胺蓝显色为一清晰斑点, 用琼脂糖 4 B 柱层析分离得单一峰。

[³H]cAMP, 比放射强度 1028 TBq · mol⁻¹, [³H]cGMP, 比放射强度 874 TBq · mol⁻¹, 均为中国科学院原子能研究所产品, ATP (Sigma 公司), 鸟苷(Fluka 公司), 蛇毒(Sigma 公司), 阴离子交换树脂(Dowex-1 氯型, 200-400 目, Sigma 公司), PDE 和 CaM 购自中国医学科学院基础医学研究所, 其它试剂均为 AR。

肝糖原含量测定按碘试剂法⁽²⁾。

AC 的制备 按文献方法⁽³⁾略加改进, 将大鼠脑组织在含 sucrose 0.32 mol · L⁻¹, EGTA 1.6 mmol · L⁻¹ 和 HEPES 10 mmol · L⁻¹ (pH 7.4) 的缓冲液中制成匀浆, 1 000 × g, 10 min, 取上清液, 离心 22 500 × g, 20 min, 将沉淀部分用 HEPES 10 mmol · L⁻¹, EGTA 1.6 mmol · L⁻¹ (pH 7.4) 缓冲液稀释至含蛋白量为 2.5 mg · ml⁻¹。

AC 活性测定⁽⁴⁾ 反应体系中含 HEPES 40 mmol · L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol · L⁻¹, 茶碱 4.5 mmol · L⁻¹, 待测酶液及 ATP 10 mmol · L⁻¹, 30℃ 孵育 5 min, 煮沸 3 min, 离心取上清按蛋白结合法⁽⁵⁾测定 cAMP 含量。酶活力以 cAMP 生成量 pmol · min⁻¹ · (mg protein)⁻¹ 表示。

组织匀浆中蛋白量以双缩脲法⁽⁶⁾测定。

PDE 活性测定⁽⁷⁾ 以在 35℃ 条件下每毫克蛋白每分钟水解 cGMP 的量(水解率)表示。未反应的 cGMP 用 Dowex-1 阴离子交换树脂除去, [³H]鸟苷用液体闪烁计数器(LS 9800, Beckman)测定。

CaM 的测定⁽⁸⁾ 采用 PDE 法, 改用 Dowex-1 阴离子交换树脂除去未反应的 cGMP。

RESULTS

GH₁ 对小鼠肝糖原, cAMP 及 AC 活性的影响 ♂ 小鼠 24 只随机分成 3 组, 第 1 组 iv 生理盐水 5 ml · kg⁻¹, 第 2 和 3 组分别 iv GH₁ 100, 200 mg · kg⁻¹, iv 后 2 h, 断头处死小鼠, 取肝, 按前述方法测定肝糖原和 cAMP 含量及 AC 活性。结果表明: GH₁ 可明显降低小鼠肝糖原含量, 并增强 AC 活性, 使 cAMP 含量增加。

GH₁ 一次 iv 后不同时间对 AC 活性的影响 ♂ 小鼠 48 只, 随机分成 2 组, 第 1 组 iv 生理盐水 5 ml · kg⁻¹, 第 2 组 iv GH₁ 200

mg · kg⁻¹, 按 Tab 2 所示不同时间, 每组剪头处死 8 只小鼠, 取肝, 测 AC. 由 Tab 2 可见, 给药后 4 h, GH₁ 有增强 AC 活性的作用.

Tab 1. Effects of the ginseng polysaccharides GH₁ iv on contents of liver glycogen and adenosine cyclic monophosphate and on activity of adenylyl cyclase. n=8, $\bar{x} \pm SD$. **P<0.05, ***P<0.01.

GH ₁ , mg · kg ⁻¹	0	100	200
Liver glycogen, mg · (g wet tissue) ⁻¹	27 ± 6	21 ± 4**	18 ± 4***
cAMP, pmol · (mg liver) ⁻¹	2.6 ± 1.1	4.2 ± 1.3**	4.4 ± 0.8***
Adenylyl cyclase, pmol · min ⁻¹ · (mg protein) ⁻¹	2.0 ± 0.8	3.0 ± 0.6*	3.0 ± 0.3**

Tab 2. Dynamic changes of adenylyl cyclase activity induced by GH₁ iv. n=8, $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, **P<0.05.

GH ₁ , mg · kg ⁻¹	Adenylyl cyclase pmol · min ⁻¹ · (mg protein) ⁻¹		
	1 h	4 h	8 h
0	2.0 ± 0.4	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.6
200	2.3 ± 0.4*	3.4 ± 0.6**	2.9 ± 0.6*

普萘洛尔对 GH₁ 降低小鼠肝糖原作用的影响 小鼠 32 只, ♀♂ 各半, 随机分成 4 组, 第 1 和 2 组 ip 生理盐水 5 ml · kg⁻¹, 第 3

和 4 组 ip 普萘洛尔 40 mg · kg⁻¹, 40 min 后, 第 1 和 3 组 iv 生理盐水 5 ml · kg⁻¹, 第 2, 4 组 iv GH₁ 200 mg · kg⁻¹ 2 h 后断头处死小鼠, 测定肝糖原, cAMP 和 AC. 结果表明: 普萘洛尔可完全拮抗 GH₁ 的作用.

GH₁ 对小鼠 CaM 及 PDE 活性的影响

♂ 小鼠 24 只, 随机分成 3 组, 按 Tab 4 所示剂量 iv GH₁, 对照组 iv 生理盐水 5 ml · kg⁻¹, iv 后 2 h, 断头处死小鼠, 取肝测 CaM 和 PDE, 结果表明: GH₁ 可明显增加 CaM 含量, 并使 PDE 活性增强.

Tab 4. Effects of GH₁ iv on activities of phosphodiesterase and calmodulin. n=8, $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, **P<0.05, ***P<0.01.

GH ₁ , mg · kg ⁻¹	Phosphodiesterase (Rate of hydrolyze)	Calmodulin (μmol · kg ⁻¹)
0	7.3 ± 2.1	1.8 ± 0.8
100	14 ± 6**	2.4 ± 1.0*
200	17 ± 7**	2.7 ± 0.8**

体外 GH₁ 对 AC 活性的影响 GH₁ 在 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 μmol · L⁻¹ 浓度下, 对 AC 活性无显著影响. AC 活力值分别为 11.7 ± 0.4, 11.6 ± 0.3, 11.8 ± 0.3, 11.72 ± 0.28, 11.9 ± 0.4, 11.8 ± 0.3, 11.58 ± 0.29 pmol · min⁻¹ · (mg protein)⁻¹, n=6.

Tab 3. Effects of propranolol on the decreasing liver glycogen contents induced by GH₁ iv. n=8, $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, **P<0.05, ***P<0.01.

Group mg · kg ⁻¹	Control 0	GH ₁ 200	Propranolol 40	Propranolol 40 + GH ₁ 200
Liver glycogen mg · (g wet tissue) ⁻¹	22 ± 5	14 ± 4***	21 ± 5*	20 ± 4*
Adenylyl cyclase pmol · min ⁻¹ · (mg protein) ⁻¹	1.5 ± 0.5	2.3 ± 0.7*	1.4 ± 0.4*	1.4 ± 0.3*
cAMP	0.64 ± 0.29	2.9 ± 0.9**	0.7 ± 0.2*	0.9 ± 0.4*

DISCUSSION

GH₁ iv 100, 200 mg · kg⁻¹ 可明显降低小鼠肝糖原含量, 使 AC 活性增强, 并增加 cAMP 含量. 如给小鼠预先注射 β 肾上腺素受体拮抗剂普萘洛尔, 则可取消 GH₁ 降低肝糖原, 增强 AC 活性及使 cAMP 增加的作用. 离体实验表明: GH₁ 在 20, 40, 60, 80, 100, 120 μmol · L⁻¹ 浓度下, 对 AC 活性无明显影响. 提示 GH₁ 并不是直接作用于 AC, 使其活性增强. 结合普萘洛尔可完全拮抗 GH₁ 增强 AC 活性的作用, 进一步提示 GH₁ 很可能先通过激动 β 肾上腺素受体, 然后才能激活膜结合酶—AC, 使 ATP 转变成 cAMP. 另外, GH₁ 可明显增强 G-PDE 的活性, G-PDE 活性增强可引起 cGMP 分解加速, 因而使 cAMP/cGMP 比值升高, 而第二信使体系的作用主要取决于这个比例, 而不是单个环苷酸的浓度⁽⁹⁾. cAMP 含量增加可导致一系列代谢及生理变化, 其中包括促进糖原分解和抑制糖原合成.

另外, 钙调素对磷酸化酶激酶和糖原合成酶激酶均具有刺激作用⁽¹⁰⁾, 而我们的实验结果表明: GH₁ 可增加 CaM 的含量, 但 CaM 还可调控许多重要生理功能的酶, 协调许多细胞的活动⁽¹¹⁾. 因此 GH₁ 降低肝糖原作用是否由于增加了 CaM 含量, 尚不能确定.

实验结果提示 GH₁ 很可能与肾上腺素一样是一种 β 肾上腺素受体激动剂. 已知肾上腺素与细胞膜 β 肾上腺素受体结合后, 使 cAMP 增加, 刺激糖原分解并抑制糖原合成, 结合 GH₁ 的上述作用进一步提示 GH₁ 降低肝糖原作用机制可能与肾上腺素相似. 但

GH₁ 却不是通过促进肾上腺素的释放引起糖原降低. 因为 GH₁ 对去肾上腺大鼠仍不失其降低肝糖原作用⁽¹⁾.

ACKNOWLEDGMENTS 陶进贤, 李淑云协助部分技术工作, 张伟协助液闪计数测定.

REFERENCES

- 1 Yang M, Wang BX, Jin YL, Wang Y, Cui ZY. Effects of ginseng polysaccharides on reducing blood glucose and liver glycogen. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11: 520
- 2 Van der Vies J. Two methods for the determination of glycogen in liver. *Biochem J* 1954; 57: 410
- 3 Sutherland EW, Rall TW, Menon T. Adenyl cyclase. 1. Distribution, preparation and properties. *J Biol Chem* 1962; 237: 1220
- 4 Shima S, Kawashima Y, Hirai M, Asakura M. Effect of adrenergic stimulation on adenylate cyclase activity in rat prostate. *Biochem Biophys Acta* 1980; 628: 255
- 5 Gilman AG. A protein binding assay for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67: 305
- 6 Flack CP, Woollen JW. Prevention of interference by dextran with biuret-type assay of serum proteins. *Clin Chem* 1984; 30: 559
- 7 Zhang LH, Wu ZF, Liu BW, Lan TH. A rapid and reliable assay of 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase. *Prog Biochem Biophys* 1986; 13 (3): 58
- 8 Liu JS, Liu Y, Jin YC. Preparation and assay of calmodulin. *Acta Acad Med Sin* 1985; 7: 453
- 9 Xu YH. Structure and function of Calmodulin (I). *Prog Biochem Biophys* 1985; 12 (1): 22
- 10 Shui DX, Ma YL. Protein Kinases connected with hormone action. *Prog Biochem Biophys* 1990; 17 (2): 110
- 11 Xu YH, Zhang SB. Advance in Calmodulin. *Prog Biochem Biophys* 1987; 14 (4): 10