

# 西归抗疲劳活性组分的筛选研究

董寿堂<sup>1\*</sup>, 王成军<sup>2</sup>, 王雨辰<sup>1</sup>, 杜一民<sup>2</sup>(1.保山中医药高等专科学校, 云南保山 678000; 2.大理学院药学院, 云南大理 671000)

中图分类号 R969.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)01-0043-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.01.14

**摘要** 目的:筛选西归不同溶剂提取物组分的抗疲劳活性。方法:通过负重游泳以复制小鼠疲劳模型。96只KM小鼠随机均分为正常对照(等容生理氯化钠溶液)组、西归A组分[石油醚提取, 667.89(生药)g/kg]组、西归B组分[乙酸乙酯提取, 1 373.58(生药)g/kg]组、西归C组分[正丁醇提取, 758.33(生药)g/kg]组、西归D组分[水提取, 49.09(生药)g/kg]组、西归E组分[水不溶性, 245.95(生药)g/kg]组、西归F组分[水溶性, 48.44(生药)g/kg]组、人参皂苷(0.2 g/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续4 d。末次给药1 h后通过负重游泳实验测定小鼠游泳力竭时间以筛选西归抗疲劳活性成分。60只KM小鼠随机均分为正常对照(等容生理氯化钠溶液)组、人参皂苷(0.2 g/kg)组与西归F组分的高、中、低剂量[96.88、48.44、24.22(生药)g/kg]组,灌胃给药,每天1次,连续7 d。测定小鼠红细胞数(RBC)、血红蛋白(Hb)的含量。72只KM小鼠按上述方法分组给药,另设模型(等容生理氯化钠溶液)组,测定小鼠股四头肌中乳酸(LA)、丙二醛(MDA)、肌糖原(MG)含量与乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结果:西归B、D、F组分可明显延长正常小鼠负重游泳力竭时间( $P<0.01$ )。西归F组分3个剂量可明显增加小鼠血中RBC数;高、低剂量可明显增加小鼠血中Hb含量( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )及增加模型小鼠MG含量,减少MDA含量;中、低剂量可明显减弱模型小鼠LDH活性;3个剂量可明显减少模型小鼠LA浓度;低剂量可明显增强模型小鼠SOD活性( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。结论:水溶性成分可能是西归的抗疲劳活性组分,其与增加能源物质储备、减少不良代谢产物生成、提高机体的抗氧化能力有关。

**关键词** 西归;提取物;小鼠;抗疲劳;作用机制

## Screening of Anti-fatigue Active Fractions of *Vicatia thieticade*

DONG Shou-tang<sup>1</sup>, WANG Cheng-jun<sup>2</sup>, WANG Yu-chen<sup>1</sup>, DU Yi-min<sup>2</sup>(1.Baoshan College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan Baoshan 678000, China; 2.Faculty of Pharmacy, Dali University, Yunnan Dali 671000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To screen the anti-fatigue activity of different solvent extracts from *Vicatia thieticade*. METHODS: The fatigue model mice were induced. 96 KM mice were randomly divided into normal control group (constant volume of sodium chloride physiological solution), *V. thieticade* fraction A group (extracted by petroleum ether, 667.89 medicinal materials g/kg), *V. thieticade* fraction B group (extracted by ethyl acetate, 1 373.58 medicinal materials g/kg), *V. thieticade* fraction C group (extracted by *n*-butyl alcohol, 758.33 medicinal materials g/kg), *V. thieticade* fraction D group (extracted by water, 49.09 medicinal materials g/kg), *V. thieticade* fraction E group (water insolubility, 245.95 medicinal materials g/kg), *V. thieticade* fraction F group (water solubility, 48.44 medicinal materials g/kg) and ginsenoside group (0.2 g/kg); they were given relevant medicines once a day for consecutive 4 d; the anti-fatigue active fractions of *V. thieticade* were screened with burden swimming test 1 h after last medication. 60 KM mice were randomly divided into normal control group, ginsenoside group and *V. thieticade* fraction F high-dose, medium-dose and low-dose groups (96.88, 48.44, 24.22 medicinal materials g/kg); they were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 7 days; RBC and the content of Hb were determined in mice. 72 KM mice were grouped according to above method, and model group was established additionally (constant volume of sodium chloride physiological solution). The contents of LA, MDA and MG and the activities of LDH and SOD were determined. RESULTS: *V. thieticade* fraction B, D and F could prolonged the time of exhaustion due to burden swimming significantly ( $P<0.01$ ); 3 doses of *V. thieticade* fraction F could increase RBC significantly, and high and low-dose could increase Hb content significantly ( $P<0.05$ ); high and low-dose could increase MG content, and decrease MDA content; medium, low-dose of *V. thieticade* could decrease LDH activity; 3 doses could decrease LA concentration significantly; low-dose could increase SOD activity significantly in model rats ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Water soluble components may be the anti-fatigue active ingredient of *V. thieticade*, the effect may be related with the increase of energy source reserve, anti-oxidative ability and the decrease of adverse metabolites.

**KEYWORDS** *Vicatia thieticade*; Extract; Mice; Anti-fatigue; Mechanism

西归为伞形科属植物西藏凹乳芹 *Vicatia thieticade* Boiss. 的根, 又称独脚当归, 主要分布于云南西北部、四川西部及西

\* 讲师, 硕士研究生。研究方向: 中草药现代药理学。电话: 0875-2229183。E-mail: 530082485@qq.com

藏等地。西归在民间已有百余年的使用历史, 在云南大理有人工栽培, 当地人用其作为滋补蔬菜食用; 鲜品也可生吃, 风味独特<sup>[1-3]</sup>。西归气芳香, 味甘、微苦, 具有补血、补气、调经等功效<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明, 西归具有抗疲劳、抗缺氧及耐

高温、耐低温作用,可能与其增强血乳酸脱氢酶活力、降低血乳酸水平、提高肝糖原的储存量有关<sup>[4-5]</sup>。本研究将通过小鼠负重游泳实验筛选西归的抗疲劳活性组分,并研究其抗疲劳的作用机制,为下一步研究和开发西归奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

RE52-05型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);XSC型小鼠恒温游泳池(淮北正华生物仪器设备有限公司);YY-AL204-IC型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];DY89-II型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);TL-16R型台式高速冷冻离心机(上海市离心机机械研究所);XT-1800 I型全自动五类血细胞分析仪(日本Sysmex公司);756MC型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.2 药材

西归购于云南省大理州鹤庆县马厂乡(批号:20070916),经大理学院药学院生药教研室马晓匡教授鉴定为真品。

### 1.3 药品与试剂

人参皂苷(GS,惠州市东方植物保健科技有限公司,批号:20070516,纯度:80%);肌糖原(MG)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸(LA)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒均由南京建成生物技术研究所提供(批号分别为20081112、20081026、20081120、20081106、20081027);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,淮南山河药用辅料有限公司,批号:030603)。

### 1.4 动物

清洁级KM小鼠,♂,体质量18~22 g,由四川省科学院·四川省人民医院实验动物研究所提供[实验动物使用许可证号:SCXK(川)2004-15]。

## 2 方法

### 2.1 西归的醇提物及不同极性组分的制备

2.1.1 西归醇提物的制备。取干生药西归粗粉5 084.90 g,用95%乙醇回流4次,然后合并滤液,经减压浓缩,最终得浸膏914.32 g,提取效率为17.98%,即1 g浸膏相当于5.56 g生药。

2.1.2 西归不同极性组分的制备。取浸膏300 g,加水600 ml稀释得混悬液,混悬液依次经石油醚、乙酸乙酯、正丁醇3种溶剂萃取3次,最后得到石油醚(A)、乙酸乙酯(B)、正丁醇(C)及水(D)4个不同极性萃取液,回收溶剂,萃取物经减压浓缩,分别得到18.2、8.9、12.6、247.5 g提取物,提取率分别为1.09%、0.53%、0.96%、4.83%。取浸膏172.1 g,加水30 ml,摇匀,于分液漏斗中静置3 d,得到水不溶(E)、水溶(F)两部分,经减压浓缩得到28.3、143.8 g提取物,提取率分别为2.96%、15.03%。

2.1.3 西归A、B、C、D、E、F组分溶液的制备。分别取各提取物浸膏适量,用1%CMC-Na制备成36.4%溶液,即A、B、C、D、E、F组分溶液。

### 2.2 各组小鼠游泳力竭时间检测<sup>[6-7]</sup>

96只小鼠随机均分为8组,即正常对照(等容生理氯化钠溶液)组、西归A组分[667.89(生药)g/kg]组、西归B组分[1 373.58(生药)g/kg]组、西归C组分[758.33(生药)g/kg]组、西归D组分[49.09(生药)g/kg]组、西归E组分[245.95(生药)g/kg]组、西归F组分[48.44(生药)g/kg]组、人参皂苷(0.2 g/kg)组,灌胃(ig)给药,每天1次,连续4 d。末次给药1 h后以小鼠体质量10%的负荷(保

险丝)系于1/3尾巴上,放入水深18 cm的水槽(50 cm×40 cm×30 cm)中,水温控制在(25±1)℃,然后进行负重游泳,记录小鼠从放入水槽至小鼠沉入水7 s未能浮在水面上的时间,即为小鼠力竭游泳时间,以此作为筛选西归抗疲劳活性组分的依据。

### 2.3 各组小鼠血中红细胞(RBC)数、血红蛋白(Hb)含量检测

60只小鼠随机均分为5组,即正常对照(等容生理氯化钠溶液)组、人参皂苷(0.2 g/kg)组与西归F组分的高、中、低剂量[96.88、48.44、24.22(生药)g/kg]组,ig给药,每天1次,连续7 d。于末次给药后1 h,摘小鼠眼球取血,然后测定小鼠血中RBC、Hb的含量。

### 2.4 各组大鼠MG、LDH、LA、SOD、MDA水平检测<sup>[8-9]</sup>

72只小鼠随机均分为6组,即正常对照(等容生理氯化钠溶液)组、模型(等容生理氯化钠溶液)组、人参皂苷(0.2 g/kg)组与西归F组分高、中、低剂量[96.88、48.44、24.22(生药)g/kg]组,ig给药,每天1次,连续7 d。于末次给药后1 h,小鼠均放入游泳箱中(25±1)℃游泳30 min,立即取出,颈椎脱臼处死,取两后肢的股四头肌,用冰生理盐水洗净,然后擦干,称取0.50 g组织,用组织匀浆机(900 r/min)在低温下制备成10%组织磷酸缓冲液(PBS),取上清液3 ml,测定小鼠股四头肌中LA、MDA、MG的含量与LDH、SOD的活性。

### 2.5 统计学方法

采用SPSS13.0软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠游泳力竭时间检测结果

与正常对照组比较,人参皂苷组与西归B、D、F组小鼠游泳力竭时间延长,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );西归A、C、E组分小鼠游泳时间无明显改变( $P > 0.01$ )。各组小鼠游泳力竭时间检测结果见表1。

表1 各组小鼠游泳力竭时间检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Swimming time of exhaustion test on mice in different groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量,g/kg	游泳力竭时间,s
正常对照组	12		389.84±353.22
人参皂苷组	12	0.2	1 015.52±603.07*
西归A组分	10	667.89	290.69±417.61
西归B组分	11	1 373.58	971.82±572.71*
西归C组分	12	758.33	674.68±562.71
西归D组分	12	49.09	912.87±549.08*
西归E组分	10	245.95	313.70±449.36
西归F组分	12	48.44	811.13±569.72*

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.01$

### 3.2 各组小鼠血中RBC数、Hb含量检测结果

与正常对照组比较,人参皂苷组与西归F组分高、中、低剂量组小鼠RBC数增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ );人参皂苷组与西归F组分高、低剂量组小鼠Hb含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。各组小鼠血中RBC、Hb含量检测结果见表2。

### 3.3 各组小鼠MG、LDH、LA、SOD、MDA水平检测结果

与正常对照组比较,模型组小鼠MG含量减少,MDA含

表2 各组小鼠血中RBC、Hb含量检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Contents of RBC and Hb on mice in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量, g/kg	RBC, $10^{12} L^{-1}$	Hb, g/L
正常对照组	10		9.22±0.55	156.00±11.46
人参皂苷组	10	0.20	10.05±0.59**	168.80±11.04**
西归F组分高剂量组	12	96.88	10.06±0.67**	170.00±9.00*
西归F组分中剂量组	12	48.44	9.74±0.38*	164.67±6.73
西归F组分低剂量组	10	24.22	10.12±0.68**	172.50±11.63**

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. normal control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

量增加,LDH活性增强,SOD活性减弱,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。与模型组比较,人参皂苷组小鼠MG含量增加,LDH活性减弱,LA含量减少,MDA含量减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ );西归F组分高、中、低剂量组小鼠LA含量减少;高、低剂量组小鼠MG含量增加,MDA含量减少;中、低剂量组小鼠LDH活性减弱;低剂量组小鼠SOD活性增强,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。各组大鼠MG、LDH、LA、SOD、MDA水平检测结果见表3。

表3 各组小鼠MG、LDH、LA、SOD、MDA水平检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Levels of MG、LDH、LA、SOD、MDA on mice in different groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量, g/kg	MG, mg/g	LDH, U/g	LA, mmol/g	SOD, U/mg	MDA, nmol/mg
正常对照组	10		10.52±3.82	1 875.30±434.50	1.10±0.27	25.75±9.39	17.49±9.84
模型组	12		5.01±1.30**	2 413.83±903.21*	1.24±0.34	18.50±5.80**	26.70±11.34*
人参皂苷组	10	0.2	7.50±0.91*	1 655.75±248.40**	0.64±0.39**	23.31±7.19	11.32±6.64**
西归F组分高剂量组	11	96.88	6.92±1.59*	2 342.64±374.88	0.92±0.41*	22.94±5.97	18.93±7.94**
西归F组分中剂量组	12	48.44	5.55±1.22	1 953.08±365.46*	0.74±0.23**	21.19±4.11	22.29±7.23
西归F组分低剂量组	12	24.22	7.58±3.07**	1 880.33±400.68*	0.71±0.18**	24.05±4.41*	14.06±5.03**

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. normal control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

#### 4 讨论

近年来,人们对西归乙醇提取物的抗疲劳、耐缺氧、耐高温相关生化指标进行了初步研究,但由于西归粗提物化学成分复杂,为了减少西归各组间相互干扰,故本试验在研究西归的抗疲劳作用机制时,对西归进行了抗疲劳活性组分的筛选,去除了一些干扰、无效组分。此外,本试验可为今后西归的抗疲劳组分提取提供理论依据。在试验中,笔者首先采用两种萃取方法(醇提、水提)对西归粗提物进行萃取分离,得到不同极性的A、B、C、D、E、F 6种组分,然后通过负重游泳实验对各组分进行抗疲劳活性的筛选。结果显示,西归B、D、F组分均能明显延长小鼠负重游泳力竭的时间。但由于第一种萃取方法比较烦琐,成本相对比较高,不利于西归的开发研究;而第二种萃取方法比较简单,成本比较低,有利于西归的开发研究,故选用水提法进行分离成分。此外,从实验结果看,西归的抗疲劳活性组分主要集中在水溶液中。因此,选择F组分

作为研究西归的抗疲劳活性组分。

西归乙醇提取物中水溶组分,即F组分能明显延长小鼠负重游泳的力竭时间,提高小鼠耐缺氧的能力。其主要机制是:①西归F组分明显增加了小鼠的RBC数与Hb含量,从而提高小鼠耐缺氧能力。②机体在长时间剧烈运动过程中,糖是主要的能源物质,而西归F组分能明显增加MG储存量,即可延长了小鼠游泳力竭时间。③西归F组分能降低小鼠股四头肌中LA的含量。LA在体内的累积取决于LA的产生与消除速度,LA的生成及消除速度又取决于LDH活力的高低。通过降低或提高LDH活性,以减少LA的产生或加快LA的消除,从而延缓疲劳发生<sup>[10]</sup>。西归主要通过降低股四头肌中LDH的活性,使LA生成减少,导致股四头肌中LA的堆积量降低。④西归F组分能降低小鼠运动后股四头肌中MDA的含量,从而提高SOD的活性。MDA是氧自由基对生物细胞膜上多不饱和脂肪酸氧化的终产物,其含量可间接反映氧自由基的产生和组织损伤程度。SOD是抗氧化酶类,其活性高低可以间接反映机体清除氧自由基的能力<sup>[11]</sup>。MDA主要是通过破坏细胞膜通透性、完整性、流动性,使三磷酸腺苷(ATP)产生减少,引起疲劳<sup>[11]</sup>。西归降低MDA含量,原因主要是增强SOD活性,从而加速了MDA的消除,导致小鼠股四头肌中MDA含量降低。

经本研究结果分析表明,西归F组分可能是通过增加小鼠体内RBC数、Hb含量、减慢股四头肌中MG消耗、降低股四头肌中LDH活性而减少LA生成、提高股四头肌中SOD活性而增加MDA消除,从而起到抗疲劳作用。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第55卷:第一分册[M].北京:科学出版社,1979:185.
- [2] 云南省药材公司.云南中药资源目录[M].北京:科学出版社,1993:366.
- [3] 周浓,段意梅,陈强,等.白族药西归的生药学鉴定[J].安徽农业科学,2007,35(8):2 307.
- [4] 黄斌,孙艳琳,张朴芬,等.西归药理作用的初步实验研究[J].大理学院学报,2006,5(6):78.
- [5] 董寿堂,王成军,刘家成,等.西归乙醇提取物抗疲劳作用的实验研究[J].中国药物警戒,2011,8(5):323.
- [6] 陈琦.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:778.
- [7] 王莹,蔡东联.人参抗疲劳作用研究进展[J].氨基酸和生物资源,2005,27(3):68.
- [8] 李伟,马襄城,刘旺根,等.增力祛疲口服液对训练大鼠骨骼肌部分生化指标影响的观察[J].中国运动医学杂志,2006,25(1):96.
- [9] 陈理标,黄丽英,秦鉴.中药补气养阴清热活血方抗运动性疲劳的实验研究[J].中国临床康复,2004,8(12):2 338.
- [10] 张蕾,邓树勋.运动疲劳与神经递质的生理学研究进展[J].体育学刊,2002,9(2):118.
- [11] 韦翠萍,常唐喜,於学良,等.沙苑子黄酮对D-半乳糖所致亚急性衰老模型小鼠的抗衰老作用研究[J].中国药房,2009,20(36):2 807.

(收稿日期:2014-01-23 修回日期:2014-04-02)

(编辑:张 静)