

黄芪总皂苷对气虚模型大鼠的补气作用及机制研究^Δ

张丹丹^{1*}, 王天合¹, 余 意², 胡明华², 李慧君¹, 夏和元¹, 罗心遥¹, 杨玉莹¹, 叶晓川^{1#}[1.湖北中医药大学药学院中药资源与中药化学省级重点实验室, 武汉 430065; 2.无限极(中国)有限公司, 广州 510623]

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)24-3020-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.24.12

摘要 目的:研究黄芪总皂苷对气虚模型大鼠的补气作用及可能机制,为阐明黄芪补气的药效物质基础提供参考。方法:将40只雄性Wistar大鼠按体重随机分为正常组、模型组、阳性对照组[补中益气丸,4.5 g/(kg·d),以生药量计]和黄芪总皂苷高、低剂量组[252、28 g/(kg·d),以总皂苷量计],每组8只。除正常组外,其余各组大鼠均采用“饮食不节+疲劳”法复制气虚模型。于造模同时,各给药组大鼠灌胃相应药物,正常组和模型组大鼠灌胃等体积水,每天1次,连续给药21 d。末次给药后,观察大鼠的一般情况;检测大鼠的体质量、胸腺指数、脾指数;记录其负重力竭游泳时间;测定其脾T淋巴细胞亚群CD3、CD4,肝组织中三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP),血清中白蛋白(ALB),全血中红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HBG)以及血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乳酸、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、白细胞介素2(IL-2)、IL-12、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠体质量、胸腺指数、脾指数、负重力竭游泳时间以及脾T淋巴细胞亚群CD3、ATP、ADP、ALB和IL-12水平均显著降低或缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA、乳酸、CK和TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,黄芪总皂苷高剂量组大鼠的体质量、脾指数、负重力竭游泳时间以及T淋巴细胞亚群CD3、ATP、ADP、ALB、RBC水平均显著升高或延长($P<0.05$),MDA、乳酸、CK、TNF- α 水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);黄芪低剂量组大鼠的负重力竭游泳时间、ATP、ADP、IL-2水平均显著升高或延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA、乳酸、CK、TNF- α 水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与阳性对照组比较,黄芪总皂苷高剂量组大鼠脾指数、脾T淋巴细胞亚群CD3水平、负重力竭游泳时间、ATP水平显著升高或延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),黄芪总皂苷高、低剂量组大鼠MDA水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:黄芪总皂苷可通过减少机体乳酸的积累,降低CK活性、体内脂质过氧化物水平以及调节免疫,从而起到补气、延缓疲劳发生、增强运动能力的作用。

关键词 黄芪总皂苷;补气作用;机制;气虚模型;大鼠

Study on “Qi-invigorating” Effect and Its Mechanism of Total Saponins of *Astragalus membranaceus* on Rats with Qi-deficiency

ZHANG Dandan¹, WANG Tianhe¹, YU Yi², HU Minghua², LI Huijun¹, XIA Heyuan¹, LUO Xinyao¹, YANG Yuying¹, YE Xiaochuan¹[1. Hubei Provincial Key Lab of TCM Resource and TCM Chemistry, College of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China; 2. Infinitus (China) Company Limited, Guangzhou 510623, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To study “Qi-invigorating” effect and its possible mechanism of total saponins of *Astragalus membranaceus* on rats with Qi-deficiency, and to provide reference for elucidating the material basis of “Qi-invigorating” effect of *A. membranaceus*. METHODS: Forty male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, positive control group [Buzhong yiqi pills, 4.5 g/(kg·d)], *A. membranaceus* total saponins high-dose and low-dose groups [252, 28 g/(kg·d), by the amount of total saponins] according to body weight, with 8 rats in each group. Except for normal group, the model of Qi-deficiency was made in other groups by the method of “diet disorder+fatigue”. At the same time, administration groups were given relevant medicine intragastrically, and normal group and model group were given constant volume of water, once a day, for consecutive 21 days. After last administration, the general situation of rats was observed; the body weight, spleen index and thymus index of rats were detected; weight-bearing swimming time was recorded; the levels of spleen T lymphocyte subsets CD3 and CD4, the levels of ATP and ADP in liver tissue, serum levels of ALB, RBC and HGB in blood as well as the serum levels of SOD, MDA, lactate, LDH, CK, IL-2, IL-12 and TNF- α were all detected. RESULTS: Compared with normal group, body weight, thymus index, spleen index, weight-bearing swimming time, the level of spleen T lymphocyte subsets CD3, ATP, ADP, ALB, IL-2 and IL-12 were decreased or shortened significantly in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The levels of MDA, lactate, CK and TNF- α were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, body weight, spleen index, weight-bearing swimming time, the level of spleen T lymphocyte subsets CD3 and the levels of ATP, ADP, ALB, RBC and IL-2 were increased significantly or prolonged ($P<$

^Δ 基金项目:湖北省技术创新专项(重点项目)(No.2019AFB865)

* 博士研究生。研究方向:中药及其复方物质基础。E-mail: 1280499642@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药药效物质基础。E-mail: yxxcc1965@163.com

0.05); while the levels of MDA, lactate, CK and TNF- α were decreased significantly in *A. membranaceus* total saponins high-dose group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Weight-bearing swimming time, the levels of ATP, ADP and IL-2 in *A. membranaceus* total saponins low-dose group were increased significantly or prolonged ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the levels of MDA, lactate, CK and TNF- α were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with positive control group, spleen index, spleen T lymphocyte subsets CD3, weight-bearing swimming time and ATP level of *A. membranaceus* total saponins high-dose group were increased significantly or prolonged ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while MDA levels of *A. membranaceus* total saponins high-dose and low-dose groups were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: *A. membranaceus* total saponins can reduce the body's accumulation of blood lactic acid, the activity of CK, the level of lipid peroxide and regulate immunity to tonify Qi, delay fatigue and improve exercise ability.

KEYWORDS *Astragalus membranaceus* total saponins; "Qi-invigorating" effect; Mechanism; Qi-deficiency model; Rat

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿等功效^[1], 用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、久泻脱肛等, 被李时珍称为“补药之长”^[2]。现代药理研究表明, 黄芪具有补气、抗疲劳、调节免疫、抗氧化、护肝、抗胃溃疡、抗炎、镇痛等作用^[3-6], 其中补气为其主要作用。黄芪中主要含有皂苷类、多糖类以及黄酮类等化学成分^[7], 但其发挥补气作用的药效物质还不甚明确。在2015年版《中国药典》(一部)^[8]中, 将黄芪皂苷中的黄芪甲苷作为该药材含量检测的指标之一, 这提示皂苷类成分是其重要的活性成分之一。鉴于此, 本研究以黄芪总皂苷为研究对象, 基于“劳则气耗”^[9]等中医基础理论, 采用“饮食不节+疲劳”法构建气虚动物模型, 探讨黄芪总皂苷的补气作用及可能机制, 为阐明黄芪的补气药效物质基础及其进一步开发利用提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

Spark 10M 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); BSA423S 型千分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; 3100E 型全自动生化分析仪[日立(中国)有限公司]; 10 000 mL ZNHW 型智能恒温电热套(天津工业实验室仪器有限公司); HH-6 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); UV-1800 型紫外分光光度计[岛津企业管理(中国)有限公司]。

1.2 药品与试剂

黄芪药材为本课题组自行采摘自内蒙古通辽市科左后旗朝鲁吐镇, 经湖北中医药大学药学院叶晓川教授鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根; 黄芪总皂苷提取物(本实验室按文献方法^[9]自制, 批号: 20190104, 含量: 50.9%); 补中益气丸(阳性对照, 仲景宛西制药股份有限公司, 批号: 18070102, 规格: 每8丸相当于原生药3g); 大鼠乳酸、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、白

蛋白(ALB)生化试剂盒和乳酸脱氢酶(LDH)、三磷酸腺苷(ATP)、脾T淋巴细胞亚群CD3、脾T淋巴细胞亚群CD4、白细胞介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-12酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20190306、20190308、20190306、20190308、20190306、20190315、20190315、20190314、20190318、20190318、20190423); 肌酸激酶(CK)ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号: E-EL-R0274C); 二磷酸腺苷(ADP)ELISA试剂盒(上海抚生实业有限公司, 批号: 201904); 其余试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

1.3 动物

健康 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 40 只, 体质量(160 \pm 20) g, 购自湖北省疾病预防控制中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(鄂)2015-0018。购入后将大鼠饲养于湖北中医药大学实验动物中心的 SPF 动物房内, 饲养期间自由摄食、饮水。所有大鼠适应性饲养 3 d 后进行实验。本动物实验得到湖北中医药大学动物管理委员会批准。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

实验开始后, 所有大鼠均在恒温水槽[(25 \pm 1) $^{\circ}$ C, 水深 40 cm, 下同]中适应性游泳 3 d, 每天游泳 5 min。分组前 1 天, 在大鼠尾部负 5% 体质量的重物后进行力竭游泳(大鼠游泳最后下沉至鼻尖浸入水中, 经 10 s 后仍不能返回水面即为力竭), 剔除负重力竭游泳时间(从开始游泳到出现力竭的时间)差异较大的以及不会游泳的大鼠, 保留负重力竭游泳时间在 10~50 min 的合格大鼠^[10]。将合格大鼠(本研究中所有大鼠均合格)按体质量随机分为正常组、模型组、阳性对照组和黄芪总皂苷高、低剂量组, 每组 8 只。正常组大鼠正常饲养, 不作特殊处理; 其余各组大鼠均采用“饮食不节+疲劳”法^[11-12]构建气虚动物模型: 每天上午 9:00 在恒温水槽中通过尾部负 5% 体质量的重物进行力竭游泳, 并禁食 1 天后限饲料量饲养, 连续 21 d。于造模同时, 阳性对照组大鼠灌胃补中益气丸 4.5 g/(kg·d)(以生药量计, 以水溶解)^[13],

黄芪总皂苷高、低剂量组大鼠分别灌胃黄芪总皂苷 252、28 mg/(kg·d)[在结合黄芪的临床用量以及参考文献[14]的基础上,根据提取工艺^[9]的黄芪总皂苷得率折合后确定的剂量;以总皂苷量计,用水溶解],正常组和模型组大鼠均灌胃等体积水。每天1次,连续给药 21 d。

2.2 大鼠一般情况观察

实验过程中,观察大鼠的精神状态、活动情况、摄食量、体质量、二便形态以及鼻、唇、耳、爪皮毛色泽等外观、行为的变化。

2.3 大鼠负重力竭游泳时间测定

实验结束前1天,按“2.1”项下方法操作,大鼠尾部负5%体质量的重物后在恒温水槽中进行力竭游泳实验,记录其负重力竭游泳时间。

2.4 实验取材及处理

末次给药结束后,称定各组大鼠体质量,然后禁食不禁水 12 h。次日,采用 10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,腹主动脉取血,将部分血样在 4 ℃条件下以 3 000 r/min 离心 15 min,吸取上层血清,分装后置于 -80 ℃冰箱中保存,待测。取血后将大鼠处死,摘取大鼠新鲜胸腺、脾、肝组织,用冰冷生理盐水冲洗,滤纸吸干,迅速称定质量;在冰块上取肝、脾组织约 0.5 g,按 1:9(g/mL)的比例准确加入磷酸盐缓冲液(PBS)制备组织匀浆,置于 -80 ℃冰箱中保存,待测;剩余组织在液氮中快速冷冻,再转入 -80 ℃冰箱中保存,待测。

2.5 指标检测

根据各组大鼠实验结束时的体质量和各脏器质量计算其脏器指数:脏器(胸腺、脾)指数=脏器(胸腺、脾)质量(mg)/体质量(g)。采用相应生化试剂盒检测各组大鼠血清中乳酸、MDA、SOD、ALB水平;采用全自动生化分析仪检测各组大鼠全血的红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)水平;采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 CK、LDH 水平,肝组织匀浆中 ATP、ADP 水平,脾 T 淋巴细胞亚群 CD3、CD4 水平以及血清中 IL-2、IL-12、TNF- α 水平。各指标检测方法均严格按照相应试剂盒或仪器说明书进行。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析。试验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时两组间比较采用 LSD 检验,方差不齐时两组间比较采用 Tamhanes T_2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况

与正常组比较,模型组大鼠精神萎靡,活动量显著减少,皮毛蓬松、无光泽,鼻尾色淡,有缩肩拱背的现象,行动迟缓,表明气虚模型造模成功。各给药组大鼠的一般情况均趋于正常,表明给药后各给药组大鼠的气虚症

状有所改善。

3.2 黄芪总皂苷对气虚模型大鼠体质量及免疫相关指标的影响

与正常组比较,模型组大鼠体质量、胸腺指数、脾指数和脾 T 淋巴细胞亚群 CD3 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组和黄芪总皂苷高剂量组大鼠体质量以及黄芪总皂苷高剂量组大鼠脾指数、脾 T 淋巴细胞亚群 CD3 水平均显著升高($P < 0.05$);与阳性对照组比较,黄芪总皂苷高剂量组大鼠脾指数和脾 T 淋巴细胞亚群 CD3 水平有显著升高($P < 0.05$);与黄芪皂苷高剂量组比较,黄芪皂苷低剂量组大鼠各指标水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);各组大鼠脾 T 淋巴细胞亚群 CD4 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠体质量和免疫相关指标测定结果见表 1。

表 1 各组大鼠体质量和免疫相关指标测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab 1 Results of body weight and immunity-related indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	体质量,g	胸腺指数,mg/g	脾指数,mg/g	T淋巴细胞亚群 CD3,ng/mg	T淋巴细胞亚群 CD4,ng/mg
正常组	328.71 ± 18.34	1.99 ± 0.39	2.42 ± 0.49	12.36 ± 2.99	67.41 ± 9.04
模型组	234.14 ± 15.65**	1.64 ± 0.21*	1.93 ± 0.29*	6.90 ± 2.77*	67.49 ± 21.12
阳性对照组	247.71 ± 11.95*	1.73 ± 0.38	1.93 ± 0.34	6.20 ± 1.63	63.04 ± 7.18
黄芪总皂苷高剂量组	248.75 ± 14.04*	1.73 ± 0.18	2.26 ± 0.40 ^Δ	12.86 ± 4.66 ^Δ	66.00 ± 22.19
黄芪总皂苷低剂量组	239.75 ± 17.14	1.84 ± 0.46	2.12 ± 0.33	10.73 ± 5.41	63.72 ± 15.96

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^Δ $P < 0.05$

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

3.3 黄芪总皂苷对气虚模型大鼠负重力竭游泳时间和肝组织中 ATP、ADP 水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠的负重力竭游泳时间显著缩短($P < 0.01$),肝组织中 ATP、ADP 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠的负重力竭游泳时间均显著性延长($P < 0.01$),黄芪总皂苷高、低剂量组大鼠肝组织中 ATP、ADP 水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与阳性对照组比较,黄芪总皂苷高剂量组大鼠的负重力竭游泳时间显著延长($P < 0.01$),肝组织中 ATP 水平显著升高($P < 0.01$);与黄芪总皂苷高剂量组比较,黄芪总皂苷低剂量组大鼠的负重力竭游泳时间显著缩短($P < 0.01$),肝组织中 ATP 水平显著降低($P < 0.01$)。各组大鼠的负重力竭游泳时间和肝组织中 ATP、ADP 水平测定结果见表 2。

3.4 黄芪总皂苷对气虚模型大鼠血清中 ALB 和全血中 RBC、HGB 水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中 ALB 水平显著降低($P < 0.05$),全血中 RBC、HGB 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和黄芪总皂苷

表2 各组大鼠的负重力竭游泳时间和肝组织中ATP、ADP水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Results of weight-bearing swimming time, ATP and ADP levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	负重力竭游泳时间, min	ATP, $\mu\text{mol/g prot}$	ADP, $\mu\text{mol/g prot}$
正常组	18.03 ± 4.91	333.77 ± 53.56	0.28 ± 0.06
模型组	8.16 ± 0.63**	165.59 ± 46.57**	0.20 ± 0.07*
阳性对照组	11.54 ± 2.10 [#]	192.69 ± 42.87	0.26 ± 0.05
黄芪总皂苷高剂量组	14.05 ± 1.32 ^{#ΔΔ}	387.86 ± 84.64 ^{#ΔΔ}	0.27 ± 0.02 [#]
黄芪总皂苷低剂量组	10.74 ± 0.48 ^{#**}	221.09 ± 61.13 ^{#**}	0.27 ± 0.09 [#]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$;与阳性对照组比较, ^{ΔΔ} $P < 0.01$;与黄芪总皂苷高剂量组比较, ^{**} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; vs. positive control group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; vs. *A. membranaceus* total saponins high-dose group, ^{**} $P < 0.01$

高剂量组大鼠血清中ALB和全血中HGB水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与阳性对照组比较,黄芪总皂苷高剂量组大鼠血清中ALB和全血中RBC水平以及黄芪总皂苷低剂量组大鼠血清中ALB和全血中HGB水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);与黄芪总皂苷高剂量组比较,黄芪总皂苷低剂量组大鼠血清中RBC水平显著降低($P < 0.01$);各组大鼠全血中HGB水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中ALB和全血中RBC、HGB水平测定结果见表3。

表3 各组大鼠血清中ALB和全血中RBC、HGB水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Results of the level of ALB in serum, the levels of RBC and HGB in blood of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ALB, g/L	RBC, 10^9 个/ μL	HGB, g/L
正常组	44.91 ± 4.11	735.38 ± 11.16	158.25 ± 9.59
模型组	38.86 ± 4.03*	736.11 ± 50.09	161.00 ± 8.47
阳性对照组	44.78 ± 5.90 [#]	791.40 ± 40.01 [#]	163.40 ± 7.57
黄芪总皂苷高剂量组	43.72 ± 4.89 [#]	772.64 ± 33.06 [#]	164.36 ± 6.25
黄芪总皂苷低剂量组	42.98 ± 7.19	720.22 ± 33.70 ^{ΔΔ*}	163.78 ± 8.81

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$;与阳性对照组比较, ^{ΔΔ} $P < 0.01$;与黄芪总皂苷高剂量组比较, ^{**} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; vs. positive control group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; vs. *A. membranaceus* total saponins high-dose group, ^{**} $P < 0.01$

3.5 黄芪总皂苷对气虚模型大鼠血清中SOD、MDA水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中MDA水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中MDA水平均显著降低($P < 0.01$);与阳性对照组比较,黄芪总皂苷高、低剂量大鼠血清中MDA水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与黄芪总皂苷高剂量组比较,

黄芪总皂苷低剂量组大鼠血清中MDA水平差异无统计学意义($P > 0.05$);各组大鼠血清中SOD水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中SOD、MDA水平测定结果见表4。

表4 各组大鼠血清中SOD、MDA水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 4 Results of serum levels of SOD and MDA of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD, U/mL	MDA, nmol/mL
正常组	20.53 ± 0.71	10.97 ± 2.27
模型组	20.17 ± 0.66	17.39 ± 2.89*
阳性对照组	19.98 ± 0.77	10.44 ± 2.67 [#]
黄芪总皂苷高剂量组	20.32 ± 1.18	6.31 ± 1.06 ^{#ΔΔ}
黄芪总皂苷低剂量组	20.58 ± 0.78	7.08 ± 1.31 ^{#Δ}

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$;与阳性对照组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; vs. positive control group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

3.6 黄芪总皂苷对气虚模型大鼠血清中乳酸、LDH、CK水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中乳酸、CK水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组和黄芪总皂苷高、低剂量组大鼠血清中乳酸、CK水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与阳性对照组比较,黄芪总皂苷高、低剂量组大鼠血清中乳酸、CK水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与黄芪总皂苷高剂量组比较,黄芪总皂苷低剂量组大鼠血清中乳酸、CK水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中LDH水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中乳酸、LDH、CK水平测定结果见表5。

表5 各组大鼠血清中乳酸、LDH、CK水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 5 Results of serum levels of lactate, LDH and CK of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	乳酸, mmol/L	LDH, U/L	CK, ng/mL
正常组	5.09 ± 0.52	468.47 ± 84.60	19.86 ± 7.29
模型组	6.81 ± 0.74**	521.71 ± 70.02	30.60 ± 4.92**
阳性对照组	5.91 ± 0.75 [#]	489.00 ± 66.52	17.29 ± 6.29 [#]
黄芪总皂苷高剂量组	5.73 ± 0.70 [#]	466.70 ± 89.26	17.77 ± 5.54 [#]
黄芪总皂苷低剂量组	5.37 ± 1.35 [#]	502.57 ± 75.21	18.42 ± 3.08 [#]

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

3.7 黄芪总皂苷对气虚模型大鼠血清中IL-2、IL-12、TNF- α 水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中IL-12水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组大鼠血清中IL-2、IL-12水平以及黄芪总皂苷低剂量组大鼠血清中IL-2水平均显著升高($P < 0.05$),各给药组大鼠血清中TNF- α 水

平均显著降低($P<0.01$);与阳性对照组比较,黄芪总皂苷高、低剂量组大鼠血清中IL-12水平均显著降低,黄芪总皂苷低剂量组大鼠血清中TNF- α 水平均显著升高($P<0.01$);与黄芪总皂苷高剂量组比较,黄芪总皂苷低剂量组大鼠血清中TNF- α 水平显著升高($P<0.05$)。各组大鼠血清中IL-2、IL-12、TNF- α 水平测定结果见表6。

表6 各组大鼠血清中IL-2、IL-12、TNF- α 水平测定结果($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 6 Results of serum levels of IL-2, IL-12 and TNF- α of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	IL-2, pg/mL	IL-12, pg/mL	TNF- α , ng/L
正常组	123.74 \pm 11.54	64.57 \pm 12.00	182.28 \pm 33.61
模型组	103.61 \pm 4.48	54.68 \pm 3.06*	458.34 \pm 89.16**
阳性对照组	132.56 \pm 11.19 [#]	86.05 \pm 17.81 ^{##}	179.74 \pm 37.95 ^{###}
黄芪总皂苷高剂量组	120.90 \pm 20.06	55.22 \pm 15.52 ^{ΔΔ}	213.57 \pm 73.45 ^{###}
黄芪总皂苷低剂量组	129.89 \pm 8.53 [#]	52.70 \pm 1.62 ^{ΔΔ}	310.63 \pm 53.57 ^{###ΔΔ}

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与阳性对照组比较,^{ΔΔ} $P<0.01$;与黄芪总皂苷高剂量组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. positive control group, ^{ΔΔ} $P<0.01$; vs. *A. membranaceus* total saponins high-dose group, [#] $P<0.05$

4 讨论

黄芪是一味健脾益气、扶正固本的要药,在临床中应用广泛,常用于治疗气虚自汗、盗汗、浮肿、痛疽不溃或溃久不敛、脾虚泄泻及各种气衰血虚之症^[1]。本研究基于黄芪补气功效,对其活性物质总皂苷的补气作用及相关机制进行了探讨。根据“人之所受气者,谷也”(《灵枢·玉版篇》)、“谷不入半日则气衰,以日则气少矣”(《灵枢·五味篇》)、“劳则气耗”(《素问·举痛论》)等中医基础理论^[8],限食可致“气”的生成不足,疲劳则耗气,故本研究采用“饮食不节+疲劳”法构建气虚动物模型。补中益气丸具有调补脾胃、益气升阳的功效,主治脾胃虚弱、中气下陷等脾气虚之症^[13],而本研究的造模方式主要是造成气虚之脾气虚,故选择补脾气的补中益气丸作为阳性对照药。

气虚最直接和客观的表现是疲劳、运动耐力、免疫力下降,而力竭游泳时间是反映运动耐力的重要指标^[15]。气虚则机体免疫功能下降,而胸腺、脾与机体的免疫功能密切相关。作为重要的外周免疫器官,胸腺和脾是T、B淋巴细胞成熟、分化及免疫应答的重要场所,其体积大小是评价机体非特异性免疫的重要指标^[16]。脾T淋巴细胞亚群CD3和CD4主管细胞免疫,具有抗病毒和调节免疫系统功能的作用^[17]。在本研究中,黄芪总皂苷组大鼠表现出较好的运动耐力,给药后其负重力竭游泳时间显著延长,证实了黄芪总皂苷具有缓解疲劳的作用;并且,黄芪总皂苷能显著升高气虚模型大鼠的脾指数和脾T淋巴细胞亚群CD3水平,从而起到增强免疫的作用。通过与阳性对照药比较发现,高剂量黄芪总皂

苷在升高气虚模型大鼠脾指数、脾T淋巴细胞亚群CD3水平以及延长负重力竭游泳时间方面的效果更优。

高能磷酸化合物,尤其是ATP,是心肌能量的直接提供者,可直接进入细胞,在线粒体中通过磷酸化反应参与能量传递。ATP储备水平的高低不仅直接关系着细胞正常生理功能的维持,还与细胞生长及凋亡密切相关,而增加高能磷酸化合物水平可以促进心肌膜电位和舒缩功能的维持,防止细胞凋亡,对心肌具有保护作用^[18]。ATP不能经自由扩散方式通过线粒体膜,而必须先由位于线粒体内膜的腺苷酸转位酶(ANT)转运到细胞质才能被细胞利用。ANT能将线粒体内合成的ATP转运至膜间隙,同时催化线粒体外的ADP转入线粒体基质,以供再合成ATP,在为线粒体磷酸化过程提供ADP的同时也刺激了氧化呼吸作用,从而确保线粒体能量转换的顺利进行^[18-19]。本研究结果显示,气虚模型大鼠肝组织中ATP、ADP水平均显著降低;而给予黄芪总皂苷后,黄芪总皂苷组大鼠肝组织中ATP、ADP水平均显著升高;并且,高剂量黄芪总皂苷在升高ATP水平方面的作用显著优于低剂量黄芪总皂苷和阳性对照药。

MDA是体内脂质过氧化物的重要代谢产物,其水平量高低能较好地反映组织脂质过氧化程度,还可间接反映细胞损伤程度^[20]。SOD作为反映氧自由基清除能力的指标,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,可防止自由基对机体的直接和间接损伤^[20-21]。CK、LDH均为细胞内酶,当细胞正常时其活性低,当各种原因引发细胞膜通透性增加或细胞凋亡时其活性增强;其中,CK分布于心肌、骨骼肌和脑组织中,大量高负荷运动后,细胞能量代谢消耗过多,可导致血清中CK及其同工酶水平升高^[22]。乳酸是糖酵解的主要代谢产物,机体中乳酸含量与疲劳程度呈正相关^[23]。在本研究中,黄芪总皂苷可较好地降低气虚模型大鼠血清中MDA、乳酸和CK水平。这提示其可以通过减少乳酸的产生来减少乳酸在体内的积累,同时降低CK活力;并且,高、低剂量黄芪总皂苷在降低MDA水平方面的作用显著优于阳性对照药。

ALB是人体血浆中的重要载体蛋白,可维持机体营养与渗透压,许多水溶性差的物质可以通过与ALB结合而被运输;当其含量降低时,提示机体可能存在营养不良的情况,且可能存在物质转运功能失衡^[24]。在本研究中,模型组大鼠ALB水平显著降低,说明气虚模型大鼠体内已经存在了物质转运功能失衡、营养不良的状况。给予黄芪总皂苷后,黄芪总皂苷高剂量组大鼠ALB水平显著升高,说明黄芪皂苷有一定调节人体营养平衡的作用。临床常用HGB和RBC来评价患者有无贫血及其严重程度^[25]。在本研究中,模型组大鼠全血中HGB、RBC与正常组比较均没有显著差异,说明大鼠只是气虚尚未发展到血虚;高剂量黄芪总皂苷可以一定程度升高气虚

大鼠的RBC,提示其具有一定的补血作用。

Th1细胞分泌的IL-2可抑制Th2细胞刺激B淋巴细胞合成免疫球蛋白E(IgE)^[26]。IL-12是促进Th1细胞分化的关键细胞因子,是细胞免疫中一类重要的调节因子,其能够抑制B淋巴细胞合成IgE,抑制肥大细胞和嗜碱性粒细胞Th2型细胞因子的合成^[27-28]。力竭游泳运动使心肌缺血缺氧、引起心脏受损时,机体自身能够产生TNF- α , TNF- α 作为致炎细胞因子可致白细胞趋化、聚积并释放化学物质而引起组织损伤^[29-30]。本研究结果显示,黄芪总皂苷可通过显著提高抑炎因子IL-2水平、降低促炎因子TNF- α 水平来调节体内的炎症反应,这提示其能够调节气虚模型大鼠的炎症过程和免疫过程。

综上所述,黄芪总皂苷可通过减少机体乳酸的积累,降低CK活性、体内脂质过氧化物水平以及调节免疫,从而起到补气、延缓疲劳发生、增强运动耐力的作用。本研究结果初步阐明了黄芪总皂苷补气的作用机制,为对其深入开发利用提供了科学依据,但其更具体的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:302.

[2] 李时珍.本草纲目:校点本:第2册[M].北京:人民卫生出版社,1979:691、696、839.

[3] 吴强.黄芪总苷抗肝纤维化作用机制的研究[D].合肥:安徽医科大学,2003.

[4] 米红,李燕舞,王晓燕,等.黄芪总苷对脾虚大鼠胃黏膜保护机制探讨[J].中药药理与临床,2012,28(5):61-63.

[5] 胡清宇.黄芪总苷的提取及药理作用的研究[J].科技信息:学术研究,2007(5):237-238.

[6] 杨沁,陈敏珠.黄芪总苷的抗炎与镇痛作用及其作用机制[J].安徽医科大学学报,2000,35(5):376.

[7] 姜辉,顾胜龙,张玉婷,等.黄芪化学成分和药理作用研究进展[J].安徽中医药大学学报,2020,39(5):93-96.

[8] 陈进成,刘建勋,林成仁,等.基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法[J].中国中药杂志,2018,43(11):2177-2183.

[9] 张丹丹,王天合,李慧君,等.黄芪总皂苷的分离纯化工艺研究[J].湖北中医药大学学报,2020,22(5):42-44.

[10] 张富婷,马俊,惠玲.高原环境下大鼠力竭运动后急性肾损伤及其新标志物的研究[J].西北国防医学杂志,2018,39(9):561-565.

[11] 陈银芳,傅应军,刘超,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的代谢组学法探索补气药干预气虚大鼠的生物学基础[J].中药新药与临床药理,2017,28(2):191-195.

[12] 刘文俊,柴纪严,谢鑫,等.脾气虚大鼠焦虑样行为及其初步机制研究[J].中国当代医药,2017,24(20):4-6.

[13] 罗心遥.基于谱效关系的茯苓健脾药效物质基础研究[D].武汉:湖北中医药大学,2020.

[14] 武云,吴大正,胡之璧.黄芪提取物对大鼠负重力竭游泳

的抗疲劳作用[J].上海中医药大学学报,2008,22(1):36-39.

[15] 于海玲,李华伟,李雪花,等.复方黄芪多糖对小鼠的抗疲劳和耐缺氧作用[J].延边大学医学学报,2009,32(3):160-162.

[16] 杨廷彬.实用免疫学[M].长春:长春出版社,1994:143.

[17] 王斌,孙进,马玉华,等.白藜芦醇对高脂膳食小鼠氧化应激与T淋巴细胞亚群免疫功能的影响[J].中国免疫学杂志,2014,30(9):1198-1203.

[18] KOLWICZ SC, PUROHIT S, TIAN R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2013, 113(5):603-616.

[19] 陈丽芬.缺氧对大鼠脑线粒体氧化呼吸功能和ANT活性及异构体表达的影响[D].重庆:第三军医大学,2004.

[20] 石晶晶,陈雯,师帅,等.芪珀生脉颗粒对心气虚模型小鼠心肌结构、SOD、MDA及TNF- α 的影响[J].北京中医药,2017,36(5):420-424.

[21] 袁志柳,刘兴德,陈保林,等.缺血后处理对缺血再灌注大鼠心肌梗死面积、CK、MDA及SOD的影响[J].微循环学杂志,2006(2):27-28、31、85、87-88.

[22] 徐国栋,骆清铭.运动时的血乳酸与血红蛋白饱和度关系的研究:1种新型血红蛋白含量测定法[J].武汉体育学院学报,2001(3):40-42.

[23] 胡太超,刘玉敏,陶荣珊,等.鹿茸多肽的抗疲劳作用机制研究[J].吉林农业大学学报,2015,37(4):469-476.

[24] 熊桂林,付志新,曹随忠,等.奶牛围产期血清脂肪代谢、肝脏功能和氧化指标的变化[J].畜牧兽医学报,2010,41(8):1039-1045.

[25] 陈富华,王琴,王筱霞,等.血红蛋白联合红细胞分布宽度预测维持性血液透析患者心血管事件的临床研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(9):789-791.

[26] 姜丽娜,姚春艳,金齐力,等.IL-12增强结核病患者中性粒细胞吞噬和杀伤结核杆菌的活性[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(11):1191-1194.

[27] SUZUKI M, MATSUMOTO T, OHTA N, et al. Intranasal CpG DNA therapy during allergen exposure in allergic rhinitis[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 136(2):246-251.

[28] PINI M, SENNELLO JA, CABAY RJ, et al. Effect of diet-induced obesity on acute pancreatitis induced by administration of inter-leukin-12 plus interleukin-18 in mice[J]. *Obesity:Silver Spring*, 2010, 18(3):476-481.

[29] 李秋凤,朱明军,刘宏飞,等.冠心病心肌梗死后慢性心力衰竭心气虚、心阳虚证与肿瘤坏死因子 α 及射血分数关系的研究[J].世界中西医结合杂志,2011,6(2):115-118.

[30] 邓世雄,田田. TNF- α 在鼠心肌急性损伤中表达的实验研究[J].重庆医科大学学报,2004,29(3):315-317.

(收稿日期:2020-09-21 修回日期:2020-11-16)

(编辑:林静)