

人参总皂苷对脾虚模型大鼠的保护作用研究

潘爱珍*, 易伟民, 余晓娟, 陈克芳, 李建军*(中山大学孙逸仙纪念医院中医科, 广州 510120)

中图分类号 R285;R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3682-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.11

摘要 目的:研究人参总皂苷对脾虚模型大鼠的保护作用。方法:连续12周迫使大鼠在冷水[(10±1)℃]中游泳至“力竭”并联合单日禁食、双日高脂饮食以复制大鼠脾虚模型。实验分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、人参总皂苷(50 μg/kg)组,腹腔注射给药,每天1次,连续12周。检测大鼠体质量、体温、胸腺指数、脾脏指数与血清中白细胞介素(IL)-2、IL-6、肿瘤坏死因子α(TNF-α)的水平。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠体质量、胸腺指数、脾脏指数显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),血清中IL-2、IL-6、TNF-α含量显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,人参总皂苷组大鼠体质量、胸腺指数、脾脏指数显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),血清中IL-2、IL-6、TNF-α含量显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:人参总皂苷对脾虚模型大鼠有一定保护作用,其机制可能是通过提高细胞因子水平,恢复机体免疫功能,从而达到健脾益气的功效。

关键词 脾虚证;人参总皂苷;白细胞介素2;白细胞介素6;肿瘤坏死因子α

Protective Effects of Total Saponins of *Panax ginseng* on Spleen Deficiency Model Rats

PAN Ai-zhen, YI Wei-min, YU Xiao-juan, CHEN Ke-fang, LI Jian-jun (Dept. of TCM, Sun Yat-Sen Memory Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study protective effects of total saponins of *Panax ginseng* (TSPG) on spleen deficiency model rats. METHODS: Rats swam in cold water[(10±1)℃] to be exhaustive for 12 consecutive weeks and were given fasting on odd days and high fat diet on even days to induce spleen deficiency model rats. Model rats were divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and TSPG group (50 μg/kg). They were given intraperitoneal injection of TSPG once a day continuous 12 weeks. Body weight, body temperature, thymus index, spleen index, the levels of IL-2, IL-6 and TNF-α were detected. RESULTS: Compared with normal control group, body weight, body temperature, thymus index and spleen index of model group were decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$); the levels of IL-2, IL-6 and TNF-α in serum were decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with model group, body weight, body temperature, thymus index and spleen index of TSPG group were increased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$); the serum levels of IL-2, IL-6 and TNF-α were increased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: TSPG can protect against spleen deficiency syndrome. The mechanisms of TSPG treatment may be related to the improvement of cytokine and immune function so as to strengthen the spleen and replenish qi.

KEY WORDS Spleen deficiency syndrome; Total saponins of *Panax ginseng*; IL-2; IL-6; TNF-α

藏象学说、气血津液理论与经络学说是中医基础理论体系的核心。脾为藏象学说的核心内容,脾虚证是中医临床常见的一种证型,脾虚证本质的研究一直是中医学界瞩目的课题。随着脾虚证实质研究的进一步开展,脾虚证治疗的方药研究向着更为客观、明确的指标迈进,中药单体活性成分的临床应用成为中医科研的热点。人参作为中医临床“补气”要药,已有2000多年的应用历史,人参总皂苷是其重要的有效活性成分之一。诸多临床及实验研究^[1-2]表明,人参总皂苷具有抗氧化、抗衰老、抗疲劳及抗肿瘤等重要药理作用。本研究选用人参总皂苷作为脾虚证的干预治疗药物,通过观察大鼠脾脏指数、胸腺指数和测定血清中白细胞介素(IL)-2、IL-6、肿瘤坏死因子α(TNF-α)的水平,探讨脾虚证的发病机制及人参总皂苷治疗脾虚证的可能作用机制。

* 主治医师,博士。研究方向:中西医结合临床。E-mail: keshan333@163.com

通信作者:主任医师,博士。研究方向:中西医结合临床。E-mail: ljj1965wuan@126.com

1 材料

1.1 仪器

DFM-96型10管放射免疫γ计数器(合肥众成机电公司);电子天平(德国Sartorius公司);LD4型离心机(北京京立离心机有限公司)。

1.2 试剂

人参总皂苷(辽宁生物医药有限公司,批号:20090510,质量分数:80%);IL-2、IL-6、TNF-α试剂盒(广东雅怡试剂公司)。

1.3 动物

6周龄SPF级SD大鼠24只,♂,体质量150~180g,由广东省实验动物中心提供[动物使用合格证号:SCXK(粤)2003-0001]。饲养环境:清洁级动物实验室,温度22~26℃,相对湿度60%~80%,定时通风换气,常规标准大鼠颗粒饲料喂养。自由摄食、饮水、活动、睡眠。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

参照文献资料^[3],采用训练大鼠游泳致“力竭”的方法,在

(10±1)℃水温下,大鼠游泳至下沉连续“冒泡”5次终止,每天训练2次,其间隔为5h;单号日禁食,双号日高脂饮食喂养,其热量组成为基础饲料55%,猪油15%,蔗糖20.5%,蛋黄粉9%,胆酸盐0.5%,复制大鼠劳倦过度脾虚证模型。复制模型时间为12周。实验分为3组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、人参总皂苷(50 μg/kg)组。复制模型的同时ip给药,每天1次,连续12周。

2.2 检测指标

ip 3%的戊巴比妥钠(2 ml/kg)麻醉大鼠,麻醉后使其仰卧手术台上,以手术剪剪开大鼠胸腔,用注射器心脏采血10 ml,以离心半径为8 cm、4 000 r/min离心15 min,分离血清,待测。剥离脾脏及胸腺,称定质量,计算脏器指数[脏器质量(mg)/体质量(g)×100%]。

2.3 大鼠脾虚模型的评估标准^[4]

(1)体质量下降,消瘦;(2)倦怠,懒动;(3)肛温无明显变化;(4)粪便时软、时溏;(5)食量减少;(6)游泳耐力下降。上述6项标准中,前4项为主要指标。

2.4 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间的比较采用方差分析,非正态分布数据采用Kruskal-Wallis检验;两组间比较采用Mann-Whitney U检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 人参总皂苷对模型大鼠体质量、体温的影响

正常对照组大鼠眼睛有神,活动敏捷,被毛浓密而有光泽,摄食、饮水适中,大便正常,体质量稳定增长。模型组大鼠复制模型后第6天起开始出现饮水减少、糊状稀便、食欲下降、倦怠、懒动、喜聚堆等特征;后相继出现嗜卧懒动、萎靡不振、行动迟缓、嗜睡,并有毛色不荣、散乱竖起现象,部分大鼠表现出消瘦、体质量减轻、食欲明显下降;复制模型17~22 d后大鼠以上症状持续加重;复制模型37~42 d后大鼠饮水量大幅度下降,身体虚弱,毛色晦暗发黄。人参总皂苷组大鼠食欲增强,进食量逐日改善,体形趋于正常,毛色变光泽,大鼠症状、体征接近正常对照组。实验过程中各组大鼠体温稳定,无明显变化。人参总皂苷对模型大鼠体质量、体温的影响见表1。

表1 人参总皂苷对模型大鼠体质量、体温的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of TSPG on body weight and body temperature in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量,g		体温,℃	
		实验前	实验后	实验前	实验后
正常对照组	8	175.23±9.24	316.1±12.48	34.53±0.32	34.54±0.30
模型组	8	173.57±10.13	257.3±11.76*	34.49±0.28	34.05±0.31
人参总皂苷组	8	169.95±9.61	318.5±13.84 [#]	34.51±0.35	35.33±0.39

与正常对照组比较:* $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.01$

vs.normal control group:* $P < 0.01$;vs.model group:[#] $P < 0.01$

3.2 人参总皂苷对模型大鼠胸腺指数与脾脏指数的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠胸腺、脾脏指数显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,人参总皂苷组胸腺、脾

脏指数显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。人参总皂苷对模型大鼠胸腺指数与脾脏指数的影响见表2。

表2 人参总皂苷对模型大鼠胸腺指数和脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of TSPG on thymus index and spleen index in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胸腺指数	脾脏指数
正常对照组	8	2.56±0.81	3.54±0.62
模型组	8	2.21±0.46*	2.73±0.58**
人参总皂苷组	8	2.79±0.59 [#]	3.84±1.22 ^{#*}

与正常对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$,^{#*} $P < 0.01$

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

3.3 人参总皂苷对模型大鼠血清生化指标的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清IL-2、IL-6、TNF-α含量显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,人参总皂苷组大鼠血清IL-2、IL-6、TNF-α含量显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。人参总皂苷对模型大鼠血清中IL-2、IL-6、TNF-α水平的影响见表3。

表3 人参总皂苷对模型大鼠血清中IL-2、IL-6、TNF-α水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of TSPG on serum levels of IL-2, IL-6 and TNF-α in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2,ng/ml	IL-6,ng/ml	TNF-α,ng/ml
正常对照组	8	6.56±1.79	30.24±6.52	1.53±0.15
模型组	8	5.38±1.46*	26.65±7.55**	1.15±0.12*
人参总皂苷组	8	6.72±1.80 [#]	31.46±6.64 ^{#*}	1.84±0.25 [#]

与正常对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$,^{#*} $P < 0.01$

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

4 讨论

作为实验研究中的基础环节,脾虚模型的制备起到了举足轻重的作用,优良的模型可揭示脾虚证的发病、病理及方药作用机制,为脾虚证的研究提供新的途径。脾虚证既因先天体质虚弱所致,也可能是饮食不节、劳倦内伤、外感湿邪等后天因素长期作用的结果。复杂的病因是中医临床证候的一个特点,因此,脾虚动物模型的复制应倾向于采用多因素、长时间的复制模型方法为宜。《素问·本病论》云“人饮食劳倦即伤脾”。《景岳全书·杂证谟》云“脾胃之伤于外者,惟劳倦最能伤脾”。随着人们生活水平的提高及生活节奏加快,不良的生活习惯如劳倦过度及饮食失节成为现代人致病的重要原因,使脾虚证发病逐渐增多。本研究中选用劳倦伤脾及饮食不节复合因素复制模型,具体方法为采用冷水力竭游泳法加饥饱失节法,从外湿、劳倦内伤与饮食不节三个病因方面考虑,是以脾虚证为基础而复制病因模型,弥补了单一因素复制模型的不足。

《内经》云“衰者补之,损者益之”;脾胃大家李东垣提倡

“病从脾胃所生,养生当实之气”。健脾益气为脾虚证基本治法,临床治疗脾虚证的经典优选方有补中益气汤、四君子汤、六君子汤与参苓白术散等,上述方中均以人参为君药,起着主要治疗作用。我国现存最早的药理学专著《神农本草经》把人参列为上品,记载人参具有“补五脏、安精神、定魂魄、止惊悸、明目开心益智”之功效,久服可延年益寿,享有“百草之王”的美誉^[9]。《本草经疏》记载人参药性“气味不厚不薄,升多于降”。人参总皂苷是人参的主要活性成分,富含人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 和三七皂苷 R₁ 等几十种人参单体皂苷,药理作用甚广,具有明显的抗氧化、调节机体免疫、物质代谢及调节细胞酶活性的作用。人参总皂苷是一种调节机体免疫反应的生物反应调节剂,其作为免疫调节剂的作用近年得到越来越多的重视和认同^[6-7]。张善玉等^[8]研究证明,人参总皂苷与黄芪多糖联用能促进正常人外周血 T 细胞增殖和增强小鼠免疫功能,并具有一定的协同作用。储继红等^[9]通过研究探索人参皂苷 Rg₁ 的免疫剂量,发现免疫剂量在 5 μg/kg 时没有明显的抗体反应,20 μg/kg 时中度激活,50 μg/kg 时最强。所以,本研究中人参总皂苷应用剂量为 50 μg/kg。但是,人参总皂苷对生物膜的渗透性差,其中绝大多数天然人参皂苷在胃肠道中吸收都很弱,口服生物利用度仅为 1%~20%,故在本研究中人参总皂苷给药方式选用 ip,以增加其生物利用度。

古代医家已经认识到脾虚证的本质与免疫功能低下有密切关系。张仲景认为“四季脾旺不受邪”,李东垣则认为“百病皆由脾胃衰而生之”。《脾胃论·脾胃虚实传变论》云“脾胃之气既伤,元气亦不能充,而诸病之所由生也”。“脾”的防卫功能与现代医学免疫功能有许多相似之处^[10]。胸腺和脾脏是机体重要免疫器官,其中胸腺由淋巴组织构成而具内分泌机能,脾是人体及动物体内最大的免疫器官,脾脏中含有较多淋巴细胞和巨噬细胞,占有全身约 1/4 的淋巴组织。脾脏和胸腺指数是反映动物机体免疫功能的最基本的指标。IL-2、IL-6 与 TNF-α 作为免疫系统中重要的细胞因子,具有广泛的免疫调节作用。检测胸腺、脾脏指数及上述细胞因子的活性水平,可以初步反映整个机体免疫功能的状态。本研究结果表明,模型组大鼠脾脏指数和胸腺指数与正常对照组比较明显下降,提示脾虚时大鼠免疫器官的发育受到了抑制;血清中 IL-2、IL-6 与 TNF-α 水平较正常对照组表达下降,表明脾虚时参与机体免疫

调节作用的细胞因子水平降低,验证了免疫系统功能紊乱是脾虚证发生的重要机制之一。中医理论认为,脾虚气血生化乏源,血的生化障碍,后天之本不固,失其卫外功能,机体防御抗病免疫减弱,百病由生。人参总皂苷组大鼠脾脏与胸腺指数提高,血清中细胞因子水平均提高,并恢复至正常水平,提示人参总皂苷可促进细胞因子的产生,改善脾虚时机体免疫功能,从而达到健脾益气的作用。

参考文献

- [1] Xiang YZ, Shang HC, Gao XM, *et al.* A comparison of the ancient use of ginseng in traditional Chinese medicine with modern pharmacological experiments and clinical trials[J]. *Phytother Res*, 2008, 22(7):851
- [2] 周超群,周珮.人参皂苷 Rd 的研究进展[J]. *中草药*, 2009, 40(5):832.
- [3] 周永生,樊雅莉,陈小野,等.脾气虚证动物模型规范化的初步研究:部分免疫功能方面[J]. *实验动物科学与管理*, 2003, 20(2):1.
- [4] 王彩霞,李德新,王淑娟,等.补益脾胃方药对脾虚衰老大鼠生物膜磷脂构成的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2004, 31(10):84.
- [5] 陈辉. *神农本草经校注*[M]. 北京:学苑出版社, 2008:44.
- [6] Son YM, Kwak CW, Lee YJ, *et al.* Ginsenoside Re enhance survival of human CD4⁺ T cells through regulation of autophagy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(5):626.
- [7] Xu QF, Fang XL, Chen DF. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb₁ and Rg₁ from *Panax notoginseng* in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84(2/3):187.
- [8] 张善玉,林惠顺,申英爱.黄芪多糖与人参总皂苷联用的免疫调节作用初步研究[J]. *中国药房*, 2005, 16(21):1620.
- [9] 储继红,许美娟,吴婷.人参皂苷 Rg₁ 药理学及药代动力学研究进展[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(2):180.
- [10] 修宗昌,余绍源,黄穗平.脾虚免疫学机制研究的回顾与思考[J]. *中国中医药信息杂志*, 2003, 10(4):10.

(收稿日期:2013-01-07 修回日期:2013-02-22)

国家临床医学研究中心启动会在京召开

本刊讯 2013年8月29日,科技部、国家卫生计生委、总后卫生部联合启动了首批13家国家临床医学研究中心的建设工作。科技部王伟中副部长、国家卫生计生委刘谦副主任、总后卫生部方国恩副部长出席会议并致辞。

国家临床医学研究中心建设工作是落实全国科技创新大会精神,贯彻《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006—2020年)》和《医学科技发展“十二五”规划》的具体举措,是完善国家医学科技创新体系的重要组成部分,是整合集成临床医学科技研究资源和研究力量的重要平台,对于加强多学科的协同攻关,提高医药卫生科技创新能力并更好地服务于临床需求、提高临床转化医学研究效率、加快创新成果的转化应用具有十分重要的意义。

会议上,科技部王伟中副部长和总后卫生部方国恩副部长分别对国家临床医学研究中心的定位和下一步工作提出了具体要求,希望国家临床医学研究中心切实发挥好引领、集成和带动作用,从国家科技创新体系整体建设的战略高度、从切实保障公众的健康需求出发、从服务于我国医疗卫生体系建设和医疗卫生体制改革的大局出发,推进临床与科研交融并举和相互促进。

刘谦副主任在讲话中要求各有关卫生和计划生育行政部门和医疗机构要重视和珍惜参与临床中心建设的宝贵机遇,进一步明确方向和任务,凝心聚力,扎实推进,确保各项工作落到实处。