

中性红染色法检测人参皂苷及其衍生物对 CEF 增殖的影响

苏建青¹, 褚秀玲¹, 李俊霞¹, 付本懂², 申海青², 韦旭斌^{2*}

(1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252000; 2. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林长春 130062)

摘要 [目的] 为体外研制人参皂苷及其衍生物的抗 MDV 作用机制提供理论依据。[方法] 采用中性红染料吸收法, 检测了人参皂苷及其衍生物对鸡胚成纤维细胞(CEF)体外培养中增殖活性的影响。[结果] 各药物的促增殖作用不完全相同, 低毒性的药物促增殖作用更明显。从药物对 CEF 细胞的不同作用时间点来看, 以 72 h 的 OD 值和正常对照的差异最大, 在 24 h 和正常对照组差异不显著。[结论] 人参皂苷及其衍生物在中、低浓度能够促进 CEF 细胞的增殖, 且药物作用具有时间依赖性。

关键词 人参皂苷; 衍生物; 鸡胚成纤维细胞; 安全浓度

中图分类号 S859.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)35-17523-03

Effects of Ginsenoside and Its Derivatives on Proliferation of CEF Determined by Neutral Red Dye Absorption Method

SU Jian-qing et al (Agricultural School of Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000)

Abstract [Objective] The research aimed to provide theoretical basis for studying anti-MDV mechanism of ginsenoside and its derivatives in vitro. [Method] Effects of ginsenoside and its derivatives on proliferation activity of chick embryo fibroblast (CEF) in vitro were determined by using neutral red dye absorption method. [Result] The results showed the proliferation effects of different drugs are not completely same, and are more obvious with low toxic drugs. Seeing from different action time, the differences of OD value was biggest at 72 h when compared with normal control group, while there was no significant difference at 24 h. [Conclusion] Ginsenoside and its derivatives could promote the proliferation of CEF cells in medium and low concentrations, which have time-dependent characteristic.

Key words Ginsenoside; Derivatives; Chicken embryo fibroblast (CEF); Safe concentration

人参(*Panax ginseng*)是传统补益类中草药,性甘、温,归脾、肺经,是我国珍贵的补益类养生佳品^[1-2]。人参皂苷是其活性成分之一。研究发现,部分皂苷类化合物经微生物或化学转化,能够明显改变或增强其某些生物学活性,如抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、诱导细胞凋亡、免疫调节等作用。为系统比较分子修饰前后的人参皂苷抗病毒作用和不同修饰方法产生的人参皂苷衍生物的抗病毒和抗肿瘤差异,笔者对大参皂苷进行了一系列的化学修饰。采用中性红染料吸收法,测定人参皂苷及其衍生物对鸡胚成纤维细胞生长的影响,筛选最大安全浓度,并了解其变化的规律,旨在为进一步体外研究人参皂苷及其衍生物的抗 MDV 作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物。人参皂苷购自吉林大成医药公司;人参皂苷衍生物 1~8,由实验室研制;阳性对照药物盐酸吗啉胍(Moroxydine Hydrochloride, ABOB)粉剂,购自吉林省博大制药有限责任公司。所有实验药物都用细胞培养液作适当稀释,经混合纤维素酯微孔滤膜(孔径 0.22 μm)过滤除菌后,分装, -20℃ 保存备用。

1.1.2 试验细胞及病毒。马立克氏病毒株(MDV)购自北京市农林科学院畜牧兽医学研究所,MDV 的细胞半数感染量(TCID₅₀)为 10^{-5.23},用含 2% 血清的细胞维持液 DMEM 配成含 100TCID₅₀浓度备用;试验用鸡胚成纤维细胞(CEF)由实验室制备。

1.1.3 溶液配制。中性红购于长春宝泰克生物公司,用 153 mmol/L 的 NaCl 溶液配制成 0.05% 的溶液,高压灭菌,4℃ 避

光保存。脱色液为 50% 乙醇溶液配成含 NaH₂PO₄ 0.05 mol/L 的溶液。

1.2 方法

1.2.1 试验药物的稀释。分别吸取试验药物溶液 0.5 ml 至 24 孔细胞培养板第 1 孔中,然后 1~10 孔每孔加入 0.5 ml 细胞维持液,再将第 1 孔内液体混匀,吸取 0.5 ml 至第 2 孔内,再混匀,吸取 0.5 ml 至第 3 孔内,如此反复至第 10 孔。则药物的稀释倍数分别为 2¹~2¹⁰。其浓度分别是 3.000 × 10³, 1.500 × 10³, 0.750 × 10³, 0.375 × 10³, 187.500, 93.750, 46.880, 23.440, 11.720, 5.860 μg/ml。按以上方法稀释所有药物。

1.2.2 鸡胚成纤维细胞(CEF)的制备^[3-5]。取 9~10 d SPF 鸡胚,常规处理、消化后以灭菌纱布过滤,并以细胞生长液调细胞密度至 1 × 10⁶ 个/ml。将细胞悬液加入细胞培养瓶中,置二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 24~48 h,待细胞长成均匀完整单层后取出,吸去各孔内细胞生长液,加 D-Hank's 轻洗一遍后,弃 D-Hank's 液,供试验用。

1.2.3 应用中性红染料吸收法^[6]确定药物对细胞的毒性。用中性红染料吸收法测定药物对 CEF 单层细胞的影响,具体操作如下:测定前 2 h 每孔加入 50 μl 中性红染液,测定时倒掉孔内液体,用 PBS 洗细胞 3 次,每孔加入 200 μl 脱色液,置微量振荡器上振荡 10 min,使结晶溶解。然后用酶联免疫检测仪测定 OD₅₉₀ 值,作为细胞增殖的指标。OD 值与活细胞的增殖呈正比,OD 值越大,表明细胞增殖越旺盛。

1.2.4 数据统计。OD 值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计算 4 孔的平均值和标准差,用 SPSS 统计软件分析各药物浓度的差异。

2 结果与分析

为进一步准确定量药物对 CEF 细胞的毒性作用规律,采用中性红染料吸收法评价药物的毒性作用。所测 OD 值能够直接反映活细胞的数量,与细胞增殖的程度成正比。实验结果见表 1。

基金项目 国家自然科学基金(30471272)。

作者简介 苏建青(1972-),男,河北原阳人,博士,讲师,从事分子病毒学与中药抗病毒研究。*通讯作者。

收稿日期 2009-09-25

表1 药物对 CEF 细胞的细胞毒性作用
Table 1 The cytotoxic effect of drugs on CEF cells

药物 Drug	时间 h Time	浓度// $\mu\text{g/ml}$ Concentration										
		3 000	1 500	750	375	187.5	93.75	46.88	23.44	11.72	5.86	0
人参皂苷 Ginsenoside	24	0.047a ± 0.002	0.051a ± 0.004	0.050a ± 0.002	0.069 ± 0.006	0.082 ± 0.003	0.075 ± 0.004	0.085b ± 0.004	0.094b ± 0.002	0.086b ± 0.004	0.078 ± 0.002	0.076 ± 0.001
	48	0.050a ± 0.004	0.054a ± 0.001	0.063a ± 0.002	0.068 ± 0.003	0.077 ± 0.004	0.078 ± 0.005	0.081b ± 0.001	0.080b ± 0.002	0.075 ± 0.004	0.073 ± 0.002	0.072 ± 0.003
	72	0.052a ± 0.001	0.061a ± 0.002	0.067 ± 0.003	0.069 ± 0.003	0.076 ± 0.004	0.074 ± 0.003	0.081b ± 0.002	0.069 ± 0.005	0.084b ± 0.002	0.081b ± 0.001	0.073 ± 0.002
衍生物 1 Derivative 1	24	0.039a ± 0.003	0.041a ± 0.003	0.042a ± 0.003	0.056a ± 0.004	0.054 ± 0.002	0.060 ± 0.003	0.067 ± 0.001	0.065 ± 0.002	0.078b ± 0.003	0.068 ± 0.003	0.067 ± 0.001
	48	0.041a ± 0.002	0.037a ± 0.003	0.044a ± 0.002	0.047a ± 0.003	0.052 ± 0.002	0.059 ± 0.002	0.070b ± 0.003	0.053 ± 0.004	0.056 ± 0.001	0.058 ± 0.003	0.059 ± 0.003
	72	0.047a ± 0.002	0.046a ± 0.001	0.050a ± 0.002	0.054a ± 0.003	0.055 ± 0.001	0.057 ± 0.003	0.054 ± 0.002	0.060 ± 0.002	0.058 ± 0.003	0.054 ± 0.003	0.064 ± 0.001
衍生物 2 Derivative 2	24	0.039a ± 0.002	0.046a ± 0.003	0.048a ± 0.004	0.054a ± 0.003	0.051 ± 0.005	0.046a ± 0.005	0.046a ± 0.002	0.051 ± 0.005	0.057 ± 0.004	0.057 ± 0.002	0.063 ± 0.004
	48	0.038a ± 0.001	0.047a ± 0.001	0.052a ± 0.002	0.055a ± 0.001	0.053a ± 0.003	0.056 ± 0.004	0.053 ± 0.003	0.058 ± 0.006	0.060 ± 0.004	0.058 ± 0.003	0.067 ± 0.002
	72	0.040a ± 0.003	0.040a ± 0.002	0.045a ± 0.005	0.050a ± 0.004	0.047a ± 0.005	0.044a ± 0.005	0.051 ± 0.005	0.054 ± 0.004	0.059 ± 0.001	0.057 ± 0.001	0.062 ± 0.001
衍生物 3 Derivative 3	24	0.039a ± 0.005	0.049a ± 0.004	0.052a ± 0.006	0.056a ± 0.001	0.064 ± 0.005	0.066 ± 0.002	0.068 ± 0.003	0.066 ± 0.001	0.063 ± 0.004	0.065 ± 0.004	0.067 ± 0.003
	48	0.042a ± 0.002	0.050a ± 0.003	0.058a ± 0.003	0.058a ± 0.004	0.062 ± 0.003	0.055 ± 0.001	0.064 ± 0.003	0.065 ± 0.006	0.067 ± 0.003	0.069 ± 0.003	0.070 ± 0.006
	72	0.040a ± 0.004	0.051a ± 0.005	0.058a ± 0.001	0.056a ± 0.006	0.059a ± 0.004	0.056 ± 0.006	0.061 ± 0.002	0.074 ± 0.004	0.079b ± 0.004	0.078b ± 0.002	0.069 ± 0.002
衍生物 4 Derivative 4	24	0.041a ± 0.003	0.039a ± 0.005	0.039a ± 0.006	0.041a ± 0.002	0.043a ± 0.002	0.042a ± 0.001	0.048a ± 0.004	0.054 ± 0.003	0.056 ± 0.003	0.064 ± 0.004	0.060 ± 0.004
	48	0.038a ± 0.004	0.038a ± 0.001	0.040a ± 0.002	0.041a ± 0.005	0.041a ± 0.003	0.041a ± 0.005	0.047 ± 0.001	0.055 ± 0.004	0.058 ± 0.004	0.062 ± 0.002	0.055 ± 0.001
	72	0.042a ± 0.002	0.034a ± 0.003	0.039a ± 0.004	0.038a ± 0.004	0.038a ± 0.006	0.040a ± 0.004	0.045a ± 0.004	0.051 ± 0.002	0.056 ± 0.002	0.060 ± 0.005	0.057 ± 0.006
衍生物 5 Derivative 5	24	0.041a ± 0.005	0.044a ± 0.004	0.052a ± 0.003	0.054a ± 0.004	0.057a ± 0.003	0.064 ± 0.004	0.064 ± 0.002	0.068 ± 0.005	0.079b ± 0.004	0.077 ± 0.003	0.068 ± 0.004
	48	0.042a ± 0.003	0.056a ± 0.003	0.054a ± 0.002	0.056a ± 0.005	0.057 ± 0.004	0.059 ± 0.003	0.064 ± 0.004	0.068 ± 0.004	0.069 ± 0.002	0.075 ± 0.003	0.067 ± 0.001
	72	0.044a ± 0.002	0.051a ± 0.005	0.053a ± 0.004	0.055 ± 0.003	0.053a ± 0.001	0.056 ± 0.004	0.066 ± 0.003	0.070 ± 0.005	0.077b ± 0.004	0.072 ± 0.004	0.065 ± 0.002
衍生物 6 Derivative 6	24	0.042a ± 0.004	0.041a ± 0.004	0.045a ± 0.001	0.041a ± 0.006	0.047a ± 0.003	0.044a ± 0.004	0.051a ± 0.003	0.068 ± 0.004	0.070 ± 0.004	0.071 ± 0.002	0.066 ± 0.004
	48	0.043a ± 0.005	0.042a ± 0.001	0.043a ± 0.003	0.043a ± 0.002	0.043a ± 0.002	0.042a ± 0.003	0.048a ± 0.006	0.062 ± 0.003	0.074 ± 0.004	0.075 ± 0.001	0.067 ± 0.003
	72	0.041a ± 0.003	0.043a ± 0.006	0.041a ± 0.003	0.043a ± 0.001	0.043a ± 0.003	0.041a ± 0.001	0.054a ± 0.001	0.070 ± 0.002	0.078 ± 0.005	0.076 ± 0.004	0.070 ± 0.002
衍生物 7 Derivative 7	24	0.056a ± 0.003	0.061a ± 0.003	0.063 ± 0.003	0.067 ± 0.004	0.071 ± 0.002	0.074 ± 0.004	0.077 ± 0.006	0.079 ± 0.005	0.078 ± 0.006	0.082 ± 0.001	0.072 ± 0.005
	48	0.057a ± 0.005	0.060a ± 0.004	0.065 ± 0.004	0.064 ± 0.002	0.068 ± 0.004	0.072 ± 0.001	0.079b ± 0.002	0.080b ± 0.004	0.081b ± 0.002	0.077 ± 0.003	0.069 ± 0.003
	72	0.049a ± 0.002	0.059a ± 0.006	0.062a ± 0.003	0.068 ± 0.003	0.069 ± 0.004	0.075 ± 0.003	0.072 ± 0.003	0.080b ± 0.003	0.081b ± 0.003	0.079 ± 0.002	0.071 ± 0.004
衍生物 8 Derivative 8	24	0.041a ± 0.003	0.043a ± 0.002	0.044a ± 0.004	0.048a ± 0.003	0.063 ± 0.004	0.071 ± 0.005	0.073 ± 0.003	0.076 ± 0.004	0.081 ± 0.003	0.079 ± 0.003	0.069 ± 0.002
	48	0.042a ± 0.004	0.043a ± 0.004	0.041a ± 0.002	0.050a ± 0.004	0.067 ± 0.002	0.070 ± 0.003	0.075 ± 0.002	0.078 ± 0.001	0.076 ± 0.004	0.082 ± 0.005	0.073 ± 0.004
	72	0.045a ± 0.001	0.044a ± 0.002	0.048a ± 0.002	0.051a ± 0.002	0.071 ± 0.003	0.068 ± 0.002	0.073 ± 0.004	0.077 ± 0.002	0.080b ± 0.002	0.083b ± 0.002	0.070 ± 0.002
盐酸吗啉胍 Moroxydine hydrochloride	24	0.051a ± 0.003	0.067 ± 0.006	0.071 ± 0.003	0.072 ± 0.002	0.069 ± 0.001	0.074 ± 0.001	0.074 ± 0.001	0.071 ± 0.003	0.074 ± 0.003	0.071 ± 0.002	0.073 ± 0.002
	48	0.062 ± 0.001	0.066 ± 0.004	0.069 ± 0.004	0.068 ± 0.002	0.073 ± 0.001	0.070 ± 0.003	0.071 ± 0.002	0.072 ± 0.001	0.071 ± 0.002	0.070 ± 0.001	0.069 ± 0.004
	72	0.054a ± 0.002	0.069 ± 0.003	0.072 ± 0.001	0.070 ± 0.007	0.073 ± 0.002	0.072 ± 0.002	0.068 ± 0.001	0.069 ± 0.002	0.072 ± 0.003	0.072 ± 0.003	0.072 ± 0.001

注: 同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Data in the same column marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

2.1 人参皂苷对 CEF 细胞的毒性影响 人参皂苷组在 24 和 48 h 时,浓度 3 000、1 500、750 $\mu\text{g/ml}$ 的 *OD* 值显著低于细胞对照组,72 h 时,浓度 3 000、1 500 $\mu\text{g/ml}$ 的 *OD* 值显著低于细胞对照组,可能是在 72 h,药物的毒力下降,或细胞已经适应。人参皂苷组在 24 h 时,浓度 46.88、23.44 和 11.72 $\mu\text{g/ml}$ 的 *OD* 值显著大于细胞对照组。在 48 h,浓度 46.88 和 23.44 $\mu\text{g/ml}$ 的 *OD* 值显著大于细胞对照组。72 h 时,浓度 46.88、11.72 和 5.86 $\mu\text{g/ml}$ 的 *OD* 值显著大于细胞对照组。可见人参皂苷在大于 750 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下对细胞有毒性,在 5.86~46.88 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下对细胞有促增殖作用。毒性作用在 72 h 下降了,24 和 48 h 有 3 组差异显著,72 h 仅有 2 组。而促增殖作用在给药 24 h 后就表现出来,24 和 72 h 差异显著的组数相同,均是 3 组。

2.2 人参皂苷衍生物对 CEF 细胞的毒性影响 衍生物 1 在高浓度的 4 组均有毒性,*OD* 值显著低于细胞对照组,但衍生物 1 的促增殖作用不明显,仅在 24 和 48 h 各有 1 组与细胞对照组差异显著。衍生物 2 在 48~72 h 分别有 5~6 组高浓度的 *OD* 值显著低于细胞对照组。在低浓度下的 *OD* 值与细胞对照没有差异。可能是因为药物对细胞毒性大,没有表现增殖作用。衍生物 3 在高于 187.5 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度时,*OD* 值低于细胞对照组,并且在 72 h 时,有 2 组 *OD* 值(11.72 和 5.86 $\mu\text{g/ml}$)高于细胞对照组,表现出促增殖作用。衍生物 4 的毒性较高,大部分孔的 *OD* 值显著低于正常对照组。衍生物 5 在浓度高于 187.5 $\mu\text{g/ml}$ 时,*OD* 值低于正常细胞对照组 ($P < 0.05$),在 24 和 72 h,分别有一组的 *OD* 值显著大于细胞对照组。衍生物 6 的毒性较大。衍生物 7 的促增殖作用较明显,从浓度从 93.75 $\mu\text{g/ml}$ 开始以后的 *OD* 值都大于细胞对照组,且在 48 h 有 2 组,72 h 有 3 组显著大于细胞对照组。衍生物 8 在 72 h 时,低浓度表现出促增殖作用。

盐酸吗啉胍没有促增殖作用,3 000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下与细胞对照组的 *OD* 值差异显著。

从 *OD* 值的规律看,药物对 CEF 细胞的毒性规律和细胞病变观察法的结果相同。从各组药物和正常对照组不同浓度点的比较来看,高浓度的 *OD* 值显著低于正常细胞对照 ($P < 0.05$)。中、低浓度的 *OD* 值显著大于正常细胞对照 ($P < 0.05$) 或等于正常细胞对照。这说明药物在中、低浓度能够促进 CEF 细胞的增殖。各药物的促增殖作用也不完全相同,低毒性的药物促增殖作用更明显。从药物对 CEF 细胞的不同作用时间点来看,以 72 h 的 *OD* 值和正常对照的差异最大,24 h 的和正常对照组差异不显著,说明药物作用具有时间依赖性。

3 讨论

3.1 细胞毒性的测定方法 该试验采用中性红染色法测定药物对细胞的毒性。染料吸收法是目前药物毒性检测中的一种常用的方法。用该法检测药物对细胞毒性的作用,节约时间,客观准确,但是,却受到多种因素如细胞生长密度、状态和检测时间等的影响,因此,该法重复性差。试验中必须结合细胞病变观察法,通过在光镜下观察细胞的 CPE,确定进行测定的最佳时间,以保证结果的准确性。

中性红染料吸收法^[6]的原理是活细胞能够吸收中性红,

中性红是一种弱阳离子染料,能与活细胞胞浆中的阴离子结合而滞留于活细胞中,并不被细胞洗涤液洗脱,渗入活细胞的中性红量与活细胞数量成正比,因此 *OD* 值直接反映活细胞的数量,与细胞增殖的程度成正比。影响 *OD* 值的常见因素有:①细胞接种的密度。因为 *OD* 值的大小和活细胞的数量成正比,如果在试验中接种细胞的密度太低,细胞长成单层的时间长,结果会出现细胞生长不良现象,甚至拉网,形不成单层;但是接种细胞密度过大,出现接触抑制,又容易形成细胞叠加,细胞面杂乱等现象。这都会影响 *OD* 值和细胞量的线性关系。孔祥峰^[7]等认为在细胞量为 5×10^5 个/孔左右时最理想。②各孔间细胞的均度。在加样过程中,由于试验者操作的误差、排枪各道的不准和接种来源细胞密度的不一致等都可造成各加样孔细胞数量的不一值,导致最终的 *OD* 值不一致而影响实验结果。③检测时间。在试验中,至少要做到可比数据间的执行时间要一致,如细胞生长的时间、中性红染色和脱色液脱色的时间及 PBS 洗涤的时间等。

3.2 人参皂苷及其衍生物的促增殖作用 试验结果显示,药物在一定的浓度和时间点的 *OD* 值均显著大于同期对照组,表明它们均有不同程度的促进 CEF 增殖作用。并且药物对 CEF 细胞增殖的影响有一定的量效和时效关系。试验结果可知,人参皂苷及其衍生物的促增殖作用与其浓度和给药后的时间有一定的相关性。在量效方面,人参皂苷及其衍生物均有在高浓度时抑制细胞增殖,中低浓度时促进增殖的规律。这说明中药成分必须有合适的剂量才能发挥最佳效应。但高浓度时,不能对中药的细胞毒性和抑制细胞生长作用予以区别。在时效方面,多数中药成分在作用初期促细胞增殖作用不明显,可能是因为这些中药成分影响细胞的贴壁或刚开始细胞不适应加药环境。而后期效果显著,如 72 h 的促增殖效果比较明显,此时,多数浓度组均能显著促进细胞增殖。可能是因为这些中药成分需经过一定时间进入细胞内才可发挥作用或通过细胞内代谢产物发挥作用。但仍有部分药物在 24 h 就表现出促增殖效应,可能是因为这些中药成分可通过直接作用于细胞表面的某些标记而影响细胞的代谢。

一般认为中药促成纤维细胞增殖的作用可能与成纤维细胞生长因子(FGF)有关^[8-11]。FGF 对很多类型的细胞,如成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞、成肌细胞和神经胶质细胞等均有促增殖反应。它是通过受体-信号转导系统而最终通过基因表达来实现的。FGF 受体只有在和某些特定结构的糖胺聚糖结合,形成稳定的三元复合物后才能更好地发挥作用。这些生长因子与一些细胞间质中的糖类结合而成的复合物被认为是细胞外的生长因子库,通过控制生长因子的浓度来调节它们的作用。该试验证明人参皂苷、衍生物 7、1、5 等中药成分均有促增殖作用,因此,推测这些药物很可能是通过影响 FGF 及其受体复合物的形成而发挥作用的。由于药物的作用需要一定的时间,所以呈现出多在中、后期促增殖作用显著的时效关系。且其机理还有待于进一步试验进行验证。

参考文献

[1] 匡海学,刘树民.人参[M].北京:北京科学技术出版社,2002:1-23.

(下转第 17527 页)

表 1 3 组小鼠运动时间比较

Table 1 The swimming time comparison of mice in three groups

组别 Group	力竭游泳时间 Exhaustive swimming time//min
A	112.15 ± 9.08
B	91.13 ± 13.17*
C	108.12 ± 7.34#

注: * 表示与 A 组比较在 0.05 水平有差异, # 表示与 B 组比较在 0.05 水平有差异。

Note: * means difference with group A at 0.05 level; # means difference with group B at 0.05 level.

2.2 山药粗提液对小鼠红细胞数量、血红蛋白和血尿素氮含量的影响 由表 2 可见, 与 B 组比较, C 组小鼠 BUN 含量显著降低, 两组有极显著性差异。与 A 组小鼠相比, B 组小鼠 RBC 数显著减少, B、C 组间 RBC 数无显著差异, 但 Hb 含量差异显著。

表 2 3 组小鼠血红蛋白、红细胞数和血尿素氮含量比较

Table 2 The comparison of Hb, RBC number and BUN in mice in three groups

组别 Group	Hb 含量//g/100 ml	RBC 数 RBC number	BUN
	Hb content	10 ⁶ × mm ³	mmol/L
A	12.53 ± 0.75	10.51 ± 1.54	10.55 ± 2.12
B	11.50 ± 0.43*	9.22 ± 0.84*	15.39 ± 1.11**
C	12.36 ± 0.60#	9.98 ± 0.89	11.20 ± 2.59##

注: * 表示与 A 组相比在 0.05 水平有差异, ** 表示与 A 组相比在 0.01 水平有差异; # 表示与 B 组相比在 0.05 水平有差异; ## 表示与 B 组相比在 0.01 水平有差异。下表同。

Note: * means difference with group A at 0.05 level and ** means difference with group A at 0.01 level; # means significant with group B at 0.05 level; ## means significant with group B at 0.01 level; The same as below.

2.3 山药粗提液对小鼠胸腺指数、脾指数的影响 由表 3 可见, A 组和 C 组小鼠的胸腺指数、脾脏指数均高于 B 组, 这表明山药对老龄小鼠的免疫器官具有一定的保护作用。

3 结论与讨论

(1) 试验结果显示, 老龄组小鼠运动时间最短, 血尿素氮含量最高。机体血尿素氮含量随运动负荷的增加而增加, 身体对负荷的适应性越差, 则产生的血尿素氮越多^[7]。随着年龄增长, 机体抗氧化能力和清除自由基的能力逐渐减低; 老

龄小鼠利用氧和糖原氧化供能的能力减低, 较早地动用了蛋白质供能, 故 B 组小鼠运动时间最短, 而 BUN 含量最高。与 B 组比较, C 组小鼠运动时间明显延长, 血尿素氮含量显著下降, 这与山药多糖的强抗氧化活性, 促进血糖利用, 延缓疲劳产生的作用有关^[8-9]。

表 3 3 组小鼠胸腺指数和脾指数的比较

Table 3 The comparison of thymus index and spleen index of mice in three groups

组别 Group	胸腺指数//mg/10 g	脾指数//mg/10 g
	Thymus index	Spleen index
A	51.38 ± 4.56	13.48 ± 2.50
B	41.02 ± 6.57**	10.68 ± 1.09**
C	48.29 ± 2.22#	13.76 ± 3.54#

(2) C 组的胸腺指数、脾指数远高于 B 组, 显示山药延缓了免疫器官的衰退进程。这与山药提高机体免疫功能作用相一致^[10], 运动能力的提高一般与免疫机能强弱呈正相关^[11]。该试验结果显示, 山药可改善与运动机能相关的一些生理指标, 提高老龄小鼠的游泳耐力, 对延缓老龄小鼠免疫器官组织结构的衰退具有一定的作用。

参考文献

- 王桂杰, 白晶. 雌性大鼠抗氧化系统的年龄性变化及肉桂抗衰老作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 1998, 18(4): 146-147.
- 黄丽英, 林文骏. 冷刺激和力竭运动对小鼠 LPO 及抗氧化能力的影响[J]. 西安体育学院学报, 2002, 19(2): 52-53.
- 由文华, 刘青云, 熊正英. 自由基与运动性疲劳关系的研究进展[J]. 陕西师范大学继续教育学报, 2007, 24(2): 125-128.
- BROTTO M A, NOSEK T M, KOLBECK R C. Influence of ageing on the fatigability of isolated mouse skeletal muscles from mature and aged mice[J]. Exp Physiol, 2008, 87(1): 77-82.
- 冉靛, 杨小生, 王伯初, 等. 抗氧化剂多糖的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 494-496.
- 王林丽, 孟德胜. 山药及其制剂的临床应用进展[J]. 中国药业, 2005, 14(5): 77-78.
- 曾明, 李守汉, 郭层城, 等. 松针提取液对运动能力的影响[J]. 天津体育学院学报, 2005, 20(2): 69-71.
- 宋刚, 郑红英, 杨永亮. 中药抗运动性疲劳的作用及机理[J]. 辽宁体育科技, 2006, 28(3): 32-33.
- 袁书林. 山药的化学成分和生物活性作用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 176-179.
- 赵国华, 陈宗道, 李志孝, 等. 山药多糖对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2003, 25(1): 110-112.
- 陈艳珍. 酸奶对老年雌性小鼠免疫功能和游泳耐力的影响[J]. 营养学报, 2007, 29(3): 298-299.
- 的影响[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(11): 4-7.
- 孔祥峰, 胡元亮, 刘家国, 等. 10 种中药成分对单层鸡胚成纤维细胞增殖的影响[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(2): 84-87.
- 刘家国, 胡元亮, 陈玉库, 等. 几种中药粗提物对鸡胚成纤维细胞生长的影响[J]. 江苏农业学报, 2002, 18(4): 228-232.
- LIU J, HENKEL T. Traditional chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients riggering biological activities[J]. Curr Med Chem, 2002, 9(15): 1483-1485.
- 刘福春, 丁光霞, 李菊仙. 淫羊藿多糖对羟基腺所致“阳虚”动物骨髓细胞 DNA 合成率的影响[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(10): 620-622.

(上接第 17525 页)

- [2] 胡元亮, 陈文喜. 中药免疫药理学研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 1997, 13(S1): 96-98.
- 斯佩克特 D L, 戈德曼 R D, 莱因万德 L A. 细胞实验指南(上册)[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 27-31.
- 辛华. 细胞生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 117-119.
- 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1999: 103-131.
- 闻平, 何艳, 叶庆林, 等. 中性红比色法检测细胞增殖活性[J]. 镇江医学院学报, 2000, 10(1): 161-163.
- 孔祥峰, 胡元亮, 王得云, 等. 中药成分对培养细胞的生长和抵抗病毒