

· 实验研究 ·

## 当归有效成分对冷应激小鼠抗氧化功能影响\*

骆亚莉<sup>1</sup>, 李应东<sup>2</sup>, 刘永琦<sup>1</sup>, 夏鹏飞<sup>3</sup>, 颜春鲁<sup>1</sup>, 孙丽姣<sup>4</sup>, 蔡路路<sup>4</sup>

**摘要:**目的 观察当归有效成分对冷应激小鼠抗氧化、红细胞粘附功能的影响。方法 采用水提醇沉法提取当归 3 种有效成分(A、B、C);72 只 SPF 小鼠随机分为对照、模型、当归有效成分 A、B、C、红景天共 6 组;灌胃给药,连续 14 d;从第 10 d 开始,灌胃后 0.5 h 小鼠置于(8±2)℃水中游泳 3 min,连续 5 d,建立冷应激模型;小鼠断头处死,取血备用,记录动物断头后张口呼吸时间、心搏时间,计数胸腺、脾脏指数,检测脾脏、胸腺谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、血清超氧化物歧化酶(SOD)水平、丙二醛(MDA)含量、红细胞粘附能力。结果 与对照组比较,模型组小鼠断头后张口呼吸时间、心搏时间[分别为(20.75±3.11)、(51.63±4.10) s]缩短,胸腺、脾脏指数[分别为(2.19±0.47)、(2.62±0.61) mg/g]下降,脾脏、胸腺 GSH-Px 含量[分别为(19.16±2.15)、(1.65±0.58) U/mgpro]、血清 SOD 含量[(173.53±27.39) U/mL]均降低,MDA 含量[(12.02±0.62) nmol/mL]升高( $P<0.05$ ),红细胞免疫复合物花环率(RBC-IC)、红细胞 C3b 受体花环率(RBC-C3bR)下降;与模型组比较,当归各组小鼠断头后心搏时间均延长,胸腺、脾脏指数升高( $P<0.05$ );当归 B、C 组小鼠胸腺组织 GSH-Px 含量[分别为(5.32±2.47)、(3.76±1.58) U/mgpro]和 RBC-IC 花环率均升高( $P<0.05$ ),当归 B 组小鼠血清 SOD 水平[(220.03±36.33) U/mL]升高、血清 MDA 含量[(7.95±1.55) nmol/mL]降低、脾脏组织 GSH-Px 含量[(49.49±1.77) U/mgpro]和 RBC-C3bR 花环率升高( $P<0.05$ )。结论 当归有效成分 B、C 能增强冷应激小鼠抗氧化能力,提高红细胞粘附功能。

**关键词:**冷应激;当归有效成分;抗氧化

中图分类号:R 181.2<sup>4</sup> 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2014)05-0607-03 DOI:10.11847/zgggws2014-30-05-20

## Effects of active fraction of *Angelica sinensis* on antioxidant function in cool stress mice

LUO Ya-li\*, LI Ying-dong, LIU Yong-qi, et al (\* Institute of Systems Biology and Translational Chinese Medicine, Gansu College of Tradition Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu Province 730000, China)

**Abstract: Objective** To determine the effects of active fraction of *Angelica sinensis* on antioxidant and red cell immune adherence function in cool stress mice. **Methods** The water extraction and alcohol precipitation method were adopted to obtain 3 active fractions of *Angelica sinensis*. Seventy-two healthy SPF mice were randomly divided into control group(M), model group(K), *Angelica sinensis* active fraction A treatment group(A), *Angelica sinensis* active fraction B treatment group(B), *Angelica sinensis* active fraction C treatment group(C), *Rhodiola rosea* treatment group(T). The mice were administered corresponding treatment by gavage for 14 days. Control mice were given normal saline in same volume. On the 10th day of the treatment, 3 minutes forced cold water(8±2℃) swimming 0.5 hour after gavage treatment was used as a stressor to all mice excepted control mice once a day for 5 days. On the 14th day of the treatment, all mice were decapitated and duration of gasping and heart beat after decapitation were investigated. And the blood samples were collected to determine erythrocytic immune function and the content of superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) in blood serum. Immune organ weight of the mice was observed and the level of glutathione peroxidase(GSH-Px) in immune organ tissue was determined. **Results** Compared with the control group, duration of gasping(20.75±3.11 s) and heart beat(51.63±4.10 s) after decapitation, thymus(2.19±0.47 mg/g) and spleen index(2.62±0.61 mg/g) decreased significantly in the model group( $P<0.05$ ). The content of GSH-Px in thymus and spleen(19.16±2.15, 1.65±0.58 U/mgpro), the level of SOD(173.53±27.39 U/mL), and red blood cell C 3b receptor(RBC-C3bR) rosette rate, red blood cell immune complex(RBC-IC) rosette rate decreased significantly, but the level of MDA in serum(12.02±0.62 nmol/mL) significantly increased in the model group( $P<0.05$ ). Experiment tests showed that the duration of heart beat after decapitation prolonged, the thymus and spleen index increased in the mice of group A, B, and C compared with those of the model group( $P<0.05$  for all). The content of GSH-Px in thymus in the mice of group B(5.32±2.47 U/mgpro) and group C(3.76±1.58 U/mgpro), and RBC-IC rosette rate in both groups increased compared with those of the model group( $P<0.05$  for all). The level of serum SOD(220.03±36.33 U/mL), the content of GSH-Px in spleen(49.49±1.77 U/mgpro), and RBC-C3bR rosette rate were obviously increased but MDA(7.95±1.55 nmol/mL) decreased in group B compared with those of the model group( $P<0.05$  for all). **Conclusion** Active fraction B and C of *Angelica sinensis* could enhance the antioxidant ability and strengthen the erythrocytic immune function in cool stress mice.

**Key words:** cool stress; active fraction of *Angelica sinensis*; antioxidant

\* 基金项目:国家“十二五”科技支撑计划(2011BAI05B02)

作者单位:1. 甘肃中医学院系统生物学与中医药转化研究所,甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院附属医院; 3. 甘肃中医学院科研中心; 4. 甘肃中医学院预防医学 2011 级本科

作者简介:骆亚莉(1979-),女,甘肃人,讲师,硕士,研究方向:中医药对常见呼吸系统疾病的防治。

通讯作者:刘永琦, E-mail:lyq@gszy.edu.cn

数字出版日期:2014-4-8 11:46

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140408.1146.026.html>

冷应激可改变机体抗氧化功能,并对动物的免疫功能造成一定程度抑制<sup>[1]</sup>。中药在抗氧化及防治由氧化损伤引起的相关疾病方面疗效较好,红景天可调节低温条件下正常人体特异和非特异性免疫功能,增强抗寒能力和加速冷适应的建立,现已被广泛应用于临床。当归对冷应激所致损伤是否具有保护作用研究较少,本研究采用水提醇沉法提取当归不同有效成分,通过冷水游泳建立冷应激小鼠模型,观察当归有效成分对小鼠抗氧化功能及红细胞粘附功能的改善作用,结果报告如下。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 8~12 周龄 SPF 级昆明种小鼠 72 只,体重 18~22 g,雌雄各半,由甘肃中医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(甘)2011-0001。实验前小鼠适应性饲养 1 周,常规饮食,自由饮水。

1.2 主要试剂 红景天(*Rhodiola rosea*)胶囊(兰州惠仁堂药业),产品批号:20120801。按照临床用量换算,以蒸馏水溶解配成浓度 22.8 g/L 混悬液。当归(*Angelica sinensis*)饮片(甘肃省药材公司)由甘肃中医学院科研中心中药药理与毒理实验室采用水提醇沉法提取 3 种有效成分:水提醇沉总提取物(A,去蛋白的总成分)、当归总多糖(B)、水提醇沉总提取物中除总多糖外的小分子物质(C)。计算得率分别为:A 4.52%,B 2.69%,C 13.45%。分别按照临床当归用量换算剂量,以蒸馏水配成混悬液,4℃冰箱保存。当归 A 浓度:2.10 g/L,当归 B 浓度:1.20 g/L,当归 C 浓度:6.10 g/L。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程有 限 公 司)。

1.3 小鼠冷应激模型制备与分组 随机将小鼠分为 6 组,分别为对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、当归 A、B、C 组(当归 A 2.10 g/L、B 1.20 g/L、C 6.10 g/L)、红景天组,每组 12 只;每日灌胃 1 次,每次 0.4 mL,连续 14 d。从第 10 d 开始,每天灌胃 0.5 h 后,各组小鼠(对照组除外)于(8±2)℃的水中游泳 3 min,连续 5 d,单只进行,第 14 d 游泳后 0.5 h 断头处死动物。期间死亡动物 8 只,其中模型组 2 只、当归 A 组 2 只、B 组 2 只、C 组 1 只、红景天组 1 只。

### 1.4 指标与方法

1.4.1 张口呼吸时间及心搏时间测定 小鼠断头后,立即按秒表分别记录每只小鼠断头后至最后一次张口喘气的持续时间(张口呼吸时间)及断头后用手扪及心脏搏动至最后一次所经历的时间(心脏搏动时间),分别计算延长率,延长率=(实验组存活时间-对照组存活时间)/对照组存活时间×100%。

1.4.2 免疫器官指数测定 小鼠断头前称体重,处死后打开胸、腹腔,摘取胸腺、脾脏,剥离干净,分别称重,并计算胸腺指数和脾脏指数。胸腺(脾)指数=胸腺(脾)重量(mg)/体重(g)

1.4.3 胸腺、脾脏及血清抗氧化指标测定 胸腺、脾脏液氮冷冻,制备组织匀浆,2-硝基苯甲酸法测 GSH-Px 含量,参照试剂盒说明书进行,蛋白定量采用考马斯亮兰法;断头取血,离心取血清。黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 水平、硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量。

1.4.4 红细胞粘附功能检测 制备补体致敏的酵母菌悬液,将肝素抗凝的血配成红细胞悬液,加补体致敏酵母菌悬液,摇匀,37℃水浴,加 Hanks 液混匀,戊二醛固定,涂片,待干,甲醇固定,瑞氏法染色,油镜下计数,红细胞粘附≥2 个酵母菌者为花环,分别计数 200 个红细胞,算出红细胞 C3b 受体花环率(RBC-C3bR);红细胞免疫复合物花环率(RBC-IC)检测:方法同 RBC-C3bR,但将致敏酵母悬液改为未致敏酵母悬液。

1.5 统计分析 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 当归对小鼠张口呼吸时间、心搏时间影响(表 1) 与对照组比较,模型组小鼠张口呼吸时间明显缩短( $P < 0.05$ ),心搏时间明显缩短( $P < 0.01$ );与模型组比较,当归 C 组、红景天组小鼠张口呼吸时间明显延长( $P < 0.05$ ),当归 A、B、C 组小鼠心搏时间均明显延长( $P < 0.05$ )。

表 1 当归对小鼠张口呼吸时间、心搏时间影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	张口呼吸时间	延长率	心搏时间	延长率
	(s)	(%)	(s)	(%)
对照组	24.63 ± 3.29	18.67	66.88 ± 4.29	29.53
模型组	20.75 ± 3.11 <sup>a</sup>	0.00	51.63 ± 4.10 <sup>b</sup>	0.00
当归 A	25.50 ± 5.24	22.89	75.38 ± 1.63 <sup>c</sup>	46.00 <sup>c</sup>
B	24.75 ± 4.17	19.28	78.50 ± 8.85 <sup>ad</sup>	52.06 <sup>d</sup>
C	28.13 ± 4.88 <sup>c</sup>	35.54 <sup>c</sup>	76.00 ± 8.95 <sup>ad</sup>	47.22 <sup>d</sup>
红景天	32.88 ± 1.58 <sup>c</sup>	58.43 <sup>c</sup>	86.5 ± 1.81 <sup>ad</sup>	67.55 <sup>d</sup>

注:与对照组比较,a  $P < 0.05$ ,b  $P < 0.01$ ;与模型组比较,c  $P < 0.05$ ,d  $P < 0.01$ 。

2.2 当归对小鼠免疫器官指数影响 对照组、模型组、当归 A、B、C 组小鼠胸腺、脾脏指数分别为(3.81 ± 0.70)、(2.19 ± 0.47)、(3.56 ± 0.53)、(3.58 ± 0.83)、(3.28 ± 0.50)和(4.16 ± 0.54)、(2.62 ± 0.61)、(3.94 ± 0.81)、(4.28 ± 1.43)、(3.64 ± 0.36) mg/g。与对照组比较,模型组小鼠胸腺、脾脏指数明显下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,当归各组小鼠胸腺、脾脏指数均明显升高( $P < 0.05$ )。

2.3 当归对小鼠氧化应激指标影响(表 2) 与对照组比较,模型组小鼠胸腺组织 GSH - Px 活性明显下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,当归 B、C 组、红景天组小鼠胸腺组织 GSH - Px 活性均明显升高( $P < 0.05$ )。与对照组比较,模型组小鼠脾脏组织 GSH-Px 活性明显下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,当归 B 组、

红景天组小鼠脾脏组织 GSH - Px 活性均明显升高( $P < 0.05$ )。与对照组比较,模型组小鼠血清 SOD 水平明显降低,MDA 含量明显增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,当归 B 组、红景天组小鼠血清 SOD 水平明显增高,MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ )。

表 2 当归对小鼠胸腺、脾脏 GSH - Px 含量、血清 SOD、MDA 含量影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	胸腺 GSH - Px (U/mgpro)	脾脏 GSH - Px (U/mgpro)	血清 SOD (U/mL)	血清 MDA (nmol/mL)
对照组	5.45 ± 2.09	55.48 ± 1.48	241.42 ± 30.45	7.16 ± 1.21
模型组	1.65 ± 0.58 <sup>a</sup>	19.16 ± 2.15 <sup>b</sup>	173.53 ± 27.39 <sup>b</sup>	12.02 ± 0.62 <sup>b</sup>
当归 A	3.17 ± 1.41	28.27 ± 1.12 <sup>a</sup>	197.53 ± 33.74 <sup>a</sup>	11.13 ± 0.94 <sup>b</sup>
B	5.32 ± 2.47 <sup>c</sup>	49.49 ± 1.77 <sup>c</sup>	220.03 ± 36.33 <sup>c</sup>	7.95 ± 1.55 <sup>d</sup>
C	3.76 ± 1.58 <sup>c</sup>	30.82 ± 1.91	182.65 ± 19.33 <sup>b</sup>	10.99 ± 1.20 <sup>b</sup>
红景天	4.27 ± 1.29 <sup>c</sup>	55.64 ± 2.21 <sup>d</sup>	229.70 ± 23.88 <sup>d</sup>	8.09 ± 0.88 <sup>d</sup>

注:与对照组比较, a  $P < 0.05$ , b  $P < 0.01$ ;与模型组比较, c  $P < 0.05$ , d  $P < 0.01$ 。

2.4 当归对小鼠红细胞粘附能力影响(表 3) 与对照组比较,模型组小鼠 RBC - C3bR 花环率明显下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,当归 B 组、红景天组小鼠 RBC - C3bR 花环率均明显升高( $P < 0.05$ )。与对照组比较,模型组小鼠 RBC - IC 花环率下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,当归 B、C 组、红景天组小鼠 RBC - IC 花环率均明显升高( $P < 0.05$ )。

表 3 当归对小鼠 RBC - C3bR、RBC - IC 花环率影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	RBC - C3bR 花环率	RBC - IC 花环率
对照组	14.25 ± 1.72	12.42 ± 1.88
模型组	10.58 ± 0.86 <sup>a</sup>	8.08 ± 1.28 <sup>a</sup>
当归 A	12.58 ± 3.63	9.17 ± 1.08
B	13.42 ± 1.32 <sup>b</sup>	10.50 ± 1.30 <sup>b</sup>
C	11.08 ± 4.25	10.92 ± 1.07 <sup>b</sup>
红景天	12.92 ± 1.88 <sup>b</sup>	11.58 ± 1.24 <sup>b</sup>

注:与对照组比较, a  $P < 0.05$ ;与模型组比较, b  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

机体在寒冷应激状态下竭力维持着自身的复杂动态平衡<sup>[2]</sup>,体内平衡不停地通过生理反应或者适应性反应重建,应激调节的过度或者紊乱会引发疾病<sup>[3]</sup>。冷应激通过改变机体内环境的稳定性影响其生理和行为<sup>[4-5]</sup>,如抗氧化功能发生改变<sup>[6]</sup>。SOD 在一定程度上反映机体自由基清除系统的功能,MDA 含量可反映脂膜脂质过氧化损伤的程度,GSH - Px 能够特异催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应,清除脂质过氧化产物和自由基。本研究结果显示,冷应激模型小鼠血清 SOD 水平下降,MDA 含量升高,胸腺、脾脏 GSH - Px 活性均明显下降,与文献报道相符<sup>[7-8]</sup>。

免疫器官的重量与免疫功能密切相关,其脏器指数是衡量免疫功能的指标之一。长期冷刺激可引起免疫功能抑制,动物胸腺及脾脏组织萎缩<sup>[9]</sup>。本实验结果显示,冷应激模型组小鼠免疫器官胸腺、脾脏指数均下降,与文献<sup>[9]</sup>报道一致。红细胞其可通过表面的 C3b 受体,在补体参与下粘附并清除循

环血液中的免疫复合物,进行机体的免疫调控,红细胞免疫粘附活性可因疾病因素的影响而发生改变<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,当归各有效成分可升高冷应激小鼠胸腺、脾脏指数;成分 B、C 均升高胸腺组织 GSH-Px 含量和 RBC-IC 花环率;成分 B 升高血清 SOD 水平、脾脏组织 GSH-Px 含量和 RBC-C3bR 花环率,同时降低血清 MDA 含量。提示当归有效成分可增强冷应激小鼠的抗氧化作用,还可能通过增加免疫器官重量及提高红细胞免疫粘附功而发挥对冷应激所致免疫抑制的干预作用。成分 B 的抗氧化作用与相关文献报道<sup>[11-12]</sup>一致。其具体机制还有待深入探讨。

### 参考文献

- [1] 刘莉莉,初芹,徐青,等. 动物冷应激的研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(16):8937-8940.
- [2] Kudielka BM, Wüst S. Human models in acute chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus pituitary adrenal axis activity and reactivity[J]. Stress,2010,13(1):1-14.
- [3] Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system[J]. Nat Rev Endocrinol,2009,5(7):374-381.
- [4] 王阳,张纓,陈洋,等. 冷暴露对运动机体代谢的影响[J]. 中国运动医学杂志,2008,27(5):658-660.
- [5] Martarelli D, Coechnioni M, Scuri S. Cold exposure increase exercise-induced oxidative stress[J]. J Sports Med Phys Fitness, 2011,51(2):299-304.
- [6] Shustanova TA, Bondarenko TI, Miliutina NP. Free radical mechanism of the cold stress development in rats[J]. Ross Fiziol Zh Im IM Sechenova,2004,90(1):73-82.
- [7] 吴步猛,陈锡文,金月玲,等. 冷应激对铜预投大鼠血清铜代谢、SOD 活性及 GSH 含量的影响[J]. 广东微量元素科学, 2005,12(4):18.
- [8] Sahin E, Gumuslu S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2007,34(5-6):425-431.
- [9] 王建华,陈红艳,耿森,等. 六味地黄口服液对冷应激小鼠的保护作用[J]. 解放军药学报,2008,24(5):398-403.
- [10] 郭峰. 从红细胞天然免疫学研究角度浅谈现代免疫学理论研究的思路与方法[J]. 自然杂志,2008,30(3):177-179.
- [11] 李成军,金香兰,沈云虹. 当归多糖的成分及其生物学作用[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2007,28(9):1096-1098.
- [12] 侯潇,刘剑利,常浩,等. 香蕉皮多糖对小鼠抗氧化损伤作用[J]. 中国公共卫生,2008,24(11):1398-1399.