

# 人参三七川芎提取物对衰老大鼠免疫器官及行为学的影响

景晓杨, 雷燕\*, 修成全

(中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**观察人参三七川芎提取物对老龄大鼠免疫器官功能及行为学的影响。**方法:**选取100只SD大鼠,饲养至18~19月龄,建立自然衰老大鼠模型。按体重水平分层后将成模大鼠随机分为5组,分别为衰老模型组、人参三七川芎中药低、中、高剂量组(2 305.64, 1 152.82, 576.41 mg·kg<sup>-1</sup>)和白藜芦醇组(50 mg·kg<sup>-1</sup>),另设2月龄SD大鼠做为青年对照组。干预3个月后,进行旷场实验,记录大鼠跨越方格总数和总行径距离,检测大鼠血清活性氧族(reactive oxygen species, ROS)含量,胸腺系数和脾脏系数。**结果:**与青年组大鼠比较,自然衰老组大鼠跨格总数减少( $P < 0.01$ ),总行径距离减少( $P < 0.05$ ),血清ROS含量增高( $P < 0.01$ ),胸腺系数和脾脏指数下降(均 $P < 0.01$ )。与衰老模型组比较,中药各组和白藜芦醇组大鼠的跨格次数和总行径距离均有增加( $P < 0.05$ );血清活性氧族(ROS)含量降低( $P < 0.05$ );中药高剂量组和白藜芦醇组可以增高大鼠的胸腺系数和脾脏系数(均 $P < 0.01$ ),中药中剂量组可以增高大鼠的胸腺系数( $P < 0.05$ )。**结论:**人参三七川芎提取物可以改善自然衰老大鼠精神迟缓状态,增强其空间探索性,同时能够提高免疫器官功能和降低血清活性氧含量。

**[关键词]** 人参三七川芎提取物; 衰老; 免疫; 行为学; 活性氧

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0184-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220184

**Effect of Extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on Immune Organs and Behavior of Aging Rats** JING Xiao-yang, LEI Yan\*, XIU Cheng-kui  
(*Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (GNC) on immune organ function and behavior of aging rats. **Method:** Totally 100 SD (Sprague Dawley) rats were selected to raise for 18-19 months to establish the model of natural aging rats. According to the horizontal stratification of weight, the model aging rats were randomly divided into 5 groups: aging model group, traditional Chinese medicine low-dose, medium-dose, high-dose groups (2 305.64, 1 152.82, 576.41 mg·kg<sup>-1</sup>) and resveratrol group (50 mg·kg<sup>-1</sup>). And another group of 2 month old SD rats was set up as young group. After 3-month intervention, the total number of cell crossing and the total behavior distance of rats were recorded through open field test. Rat serum reactive oxygen species (ROS) content, thymus index and spleen index were detected. **Result:** Compared with young group rats, the total number of cell crossing decreased in aging model group ( $P < 0.01$ ), the total action distance of natural aging rats decreased ( $P < 0.05$ ), serum ROS content increased ( $P < 0.01$ ), and thymus index and spleen index decreased (both  $P < 0.01$ ). Compared with the aging model group, the number of cell crossing and total action distance of all traditional Chinese medicine groups and resveratrol group increased ( $P < 0.05$ ). The serum content of ROS decreased ( $P < 0.05$ ). Traditional Chinese medicine high-dose group and resveratrol group showed increase in the thymus index and spleen index ( $P < 0.01$ ), the traditional Chinese medicine medium-dose group showed increase in the rat thymus index ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The extracts from GNC can improve the mental retardation state of natural aging rats and enhance their space exploration capacity, improve the function of immune organs and reduce the serum ROS content of aging rats.

**[收稿日期]** 20150918(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273976);中国中医科学院自主选题项目(ZZ2013002)

**[第一作者]** 景晓杨,在读硕士,从事心血管病研究, Tel:18810958970, E-mail:jingxy321@163.com

**[通讯作者]** \*雷燕,博士,研究员,从事心血管病研究, Tel:13651217893, E-mail:leiy999@163.com

[Key words] Extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma; aging; immune; behavior; reactive oxygen species

旷场实验是评价啮齿类实验动物状态及焦虑行为的经典方法,可以从行为学上分析大鼠衰老情况。胸腺和脾脏作为两个主要的免疫器官,其脏器系数的变化可以反映机体免疫功能的强弱。活性氧学说是目前较公认的衰老假说。课题组前期已经证明人参三七川芎提取物可以从一定程度上延缓血管老化,进而延缓衰老<sup>[1-3]</sup>,但关于益气活血中药对于衰老大鼠免疫功能的研究甚少。本研究通过观察衰老大鼠免疫器官脏器系数及其行为学的变化,检测血清 ROS 的含量,探讨人参三七川芎提取物对于自然衰老大鼠免疫功能和行为学的影响,进而阐明人参三七川芎提取物对于衰老的作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 100 只 8~9 月龄 SD 退役大鼠,雌雄各半,SPF 级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号 SCXK(京)2012-0001,饲养于中国中医科学院西苑医院动物中心,该中心为屏障环境,符合 SPF 级动物饲养标准。动物室内温度(20~24℃),湿度(50%~60%),光照和通风条件均符合规定标准。饲养方式:雌性每笼 1 只,雌性每笼 5 只。饲养至 18 月龄时,开始药物干预,干预 3 个月 after 取材。同时设 2 月龄 SD 大鼠 14 只作为青年组。

**1.2 药物及试剂** 人参(Ginseng Radix et Rhizoma,批号 YL-302-1403-001),三七(Notoginseng Radix et Rhizoma,批号 YL-201-1403-001),川芎(Chuanxiong Rhizoma,批号 YL-018-1403-001),对于人参三七川芎提取物指标性成分阿魏酸,三七皂苷 R<sub>1</sub>,人参皂苷 Rg<sub>1</sub>,人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 通过高效液相色谱法(HPLC)分析法进行含量测定,均符合 2010 年版《中国药典》的规定和标准。将人参,三七,川芎按照 3:2:4 破碎成最粗粉,70% 乙醇提取,回收乙醇,浓缩至相对密度 1.20~1.30(60~70℃),减压干燥得干膏粉。出膏率 23.33%,每 1 g 干膏相当于 4.286 g 生药量,由北京因科瑞斯医药科技公司制备提供;西药对照药白藜芦醇(C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>,纯度>98%,白色粉末,批号 140903,上海融禾医药科技发展有限公司),活性氧(ROS)高质荧光测定试剂盒(批号 GMS10016.11 v. A,上海杰美基因医药科技有限公司)。

**1.3 仪器** 自制旷场木箱(100 cm×100 cm×40

cm),箱底均分为 25 个方格,内部墙壁涂黑,摄像头为百脑通 BNT 相影 HD720P 高清版(054WS),Noldus EthVision 3.1 图像分析软件(荷兰 Noldus 公司),Synergy2 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司),风棱 HSX-150 型恒温恒湿箱(上海申贤恒温设备厂)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 造模过程中,100 只大鼠自然死亡 9 只,丢失 1 只。动物饲养至 18 月龄时剩余大鼠 90 只,按体重分层后随机分为 5 组,分别为衰老模型组、人参三七川芎提取物低、中、高剂量组、白藜芦醇组。

**2.2 给药方法** 按成人标准体重(70 kg)给药量 27 g·d<sup>-1</sup> 换算大鼠给药剂量,每日高、中、低剂量组的醇提取物浸膏剂量分别为 2 305.64,1 152.82,576.41 mg·kg<sup>-1</sup>。白藜芦醇组每日剂量为 50 mg·kg<sup>-1</sup>,用溶解了羧甲基纤维素钠的蒸馏水配成质量浓度为 1 g·L<sup>-1</sup> 的溶液,衰老模型组和青年组给予同体积的蒸馏水。每日给药 1 次,共 3 个月。

**2.3 旷场实验** 旷场实验是评价啮齿类动物状态及焦虑行为的经典方法。在本实验中药物干预后,进行旷场实验,每次捏住大鼠尾巴距根部 2/3 处轻放入旷场木箱正中的格中,显示器中观察其 5 min 内活动情况,每次测定结束将动物排泄物清除干净,每只仅测定 1 次。实验时间结束观看录像分析,记录大鼠跨越方格总数和总行径路程,分析自然衰老大鼠空间自发性探索运动活性和精神状态改变,可以间接反映大鼠的衰老情况。

**2.4 取材** 药物干预后,称重记录,用 4% 水合氯醛麻醉(0.9 mL·kg<sup>-1</sup>)后,麻醉成功后,于腹主动脉分叉处取血,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,将上清分装到 EP 管中,-80℃ 冰箱保存待测。剖腹取脾脏和胸腺,剥离其周围结缔组织,称重并记录。

**2.5 脏器系数测定** 取材后按下列公式分别计算每只大鼠的胸腺系数和脾脏系数。

$$\text{脾脏系数} = \text{脾重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

$$\text{胸腺系数} = \text{胸腺重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

**2.6 血清 ROS 测定** 采用化学荧光法测定血清 ROS 含量,具体按试剂盒说明操作。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 软件进行统计

分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据为正态分布时, 多组间比较采用单因素方差分析, 用 *Levene* 法进行方差齐性检验, 若方差齐, 两两比较采用 *LSD* 法; 若方差不齐, 两两比较采用 *Tamhane's* 法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般状态** 青年组毛发紧密光滑, 有光泽, 不易脱落, 色纯白, 活泼好动, 精神状态极好; 模型组毛发蓬松枯槁, 无光泽, 精神萎靡易脱落, 色发黄, 行动迟缓, 精神萎靡; 中药各组和白藜芦醇组给药后状态良好。给药过程中衰老模型组, 中药低、中、高剂量和白藜芦醇组大鼠死亡只数分别为 4, 6, 7, 8 和 2 只。为平衡各组数据, 各组随机选取 8 只大鼠入组。

**3.2 对旷场实验的影响** 与青年组比较, 衰老模型组的跨格总数均减少 ( $P < 0.01$ ), 总行径距离减少 ( $P < 0.05$ ); 与衰老模型组比较, 中药各组和白藜芦醇组大鼠的跨格总数和总行径距离均有增加 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 人参三七川芎提取物对衰老大鼠旷场实验的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Effects of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on open field test of aging rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | n  | 跨格总数<br>/次                  | 总行径距离<br>/cm                    |
|--------|----------------------------|----|-----------------------------|---------------------------------|
| 青年     | -                          | 14 | 98.75 ± 46.67               | 2 223.21 ± 1 081.32             |
| 衰老模型   | -                          | 14 | 35.00 ± 17.85 <sup>1)</sup> | 950.09 ± 482.51 <sup>2)</sup>   |
| 白藜芦醇   | 50                         | 16 | 73.88 ± 29.46 <sup>3)</sup> | 1 654.18 ± 511.33 <sup>4)</sup> |
| 人参三七川芎 | 576.41                     | 12 | 62.25 ± 24.76 <sup>4)</sup> | 1 510.13 ± 426.56 <sup>4)</sup> |
|        | 1 152.82                   | 11 | 66.67 ± 26.05 <sup>4)</sup> | 1 595.69 ± 689.56 <sup>4)</sup> |
|        | 2 305.64                   | 10 | 69.63 ± 24.70 <sup>4)</sup> | 1 670.59 ± 472.34 <sup>4)</sup> |

注: 与青年组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与衰老模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.05$  (表 2~3 同)。

**3.3 对大鼠血清 ROS 表达的影响** 与青年组比较, 衰老模型组 ROS 荧光强度 (RFU) 明显增高, 表明其活性氧簇 (ROS) 含量增高 ( $P < 0.01$ ); 与衰老模型组比较, 中药各组和白藜芦醇组 ROS 荧光强度下降, 表明其活性氧簇 (ROS) 含量低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.4 对大鼠脏器系数的影响** 与青年组比较, 衰老模型组的胸腺系数和脾脏系数下降 ( $P < 0.01$ ); 与衰老模型组比较, 中药高剂量组和白藜芦醇组可以明显增高大鼠的胸腺系数和脾脏系数 ( $P < 0.01$ ), 中药中剂量组可以增高大鼠的胸腺系数 ( $P < 0.05$ ) 和脾脏系数, 中药低剂量组有增高大鼠胸腺系数和

脾脏系数的趋势。见表 3。

表 2 人参三七川芎提取物对衰老大鼠血清 ROS 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 2 Effects of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on serum ROS of aging rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别     | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | ROS/RFU                      |
|--------|------------------------|------------------------------|
| 青年     | -                      | 70.25 ± 14.36                |
| 衰老模型   | -                      | 185.50 ± 27.16 <sup>1)</sup> |
| 白藜芦醇   | 50                     | 62.50 ± 6.66 <sup>4)</sup>   |
| 人参三七川芎 | 576.41                 | 63.00 ± 8.37 <sup>4)</sup>   |
|        | 1 152.82               | 62.00 ± 5.48 <sup>4)</sup>   |
|        | 2 305.64               | 51.75 ± 8.38 <sup>4)</sup>   |

表 3 人参三七川芎提取物对衰老大鼠脏器系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 3 Effects of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on organ coefficient of aging rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别     | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | 胸腺系数<br>/mg·g <sup>-1</sup> | 脾脏系数<br>/mg·g <sup>-1</sup> |
|--------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 青年     | -                          | 1.44 ± 0.21                 | 2.15 ± 0.14                 |
| 衰老模型   | -                          | 0.11 ± 0.07 <sup>1)</sup>   | 1.13 ± 0.16 <sup>1)</sup>   |
| 白藜芦醇   | 50                         | 0.37 ± 0.53 <sup>3)</sup>   | 1.42 ± 0.16 <sup>3)</sup>   |
| 人参三七川芎 | 576.41                     | 0.13 ± 0.05                 | 1.15 ± 0.23                 |
|        | 1 152.82                   | 0.17 ± 0.06 <sup>4)</sup>   | 1.21 ± 0.12                 |
|        | 2 305.64                   | 0.21 ± 0.06 <sup>3)</sup>   | 1.42 ± 0.21 <sup>3)</sup>   |

### 4 讨论

基于啮齿类动物同时具有畏惧空旷场地和探究新事物、新环境的天性<sup>[4]</sup>, 其空间认知能力及兴奋性又存在着年龄上的差异, 因此通过旷场实验中大鼠行为学的变化间接反映大鼠衰老的情况。与青年组大鼠比较, 衰老大鼠神态倦怠, 行动迟缓, 跨格总数减少, 总行径距离减少, 不仅可以从行为学方面说明自然衰老大鼠模型造模成功, 也提示青壮年大鼠空间认知能力及对新异环境的适应性均强于老年大鼠。与衰老模型组比较, 中药各组和白藜芦醇组大鼠的跨格次数和总行径距离均有增加, 表明通过人参三七川芎提取物和白藜芦醇干预后, 可以从行为学角度改善大鼠的衰老状态, 增强大鼠对未知空间的探索性和兴奋性。

活性氧簇是指分子氧单电子还原后生成的化学反应性质活泼的某些氧代谢产物及其衍生物, 包括过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 超氧阴离子 (O<sup>2-</sup>), 羟基 (-OH), 单

线氧和脂质代谢产物。随着年龄的增长,活性氧产生增加,氧化损伤产物在细胞内积聚,最终导致细胞功能失调和衰老改变。研究表明,ROS 参与血管损伤过程中许多细胞信号转导,可引起内皮细胞衰老<sup>[1]</sup>。结合本实验结果可以说明衰老大鼠体内 ROS 明显增加,而人参三七川芎提取物和白藜芦醇作用后可以明显降低血清 ROS 含量,延缓衰老。

有关衰老的理论有很多,其中免疫学说在导致衰老的过程中起着重要的作用。有研究表明<sup>[5]</sup>衰老机体免疫功能变化显著,具体表现为 D-半乳糖衰老模型鼠胸腺指数明显降低,胸腺细胞凋亡高于对照组,T 淋巴细胞刺激指数低于对照组。胸腺和脾脏作为两个主要的免疫器官,其脏器系数的大小可以从一定程度上反映机体免疫功能的强弱。本研究表明与青年大鼠比较,衰老大鼠的胸腺系数和脾脏系数下降,可见随着年龄增长,机体免疫器官发生相应的变化,免疫功能也随之减弱。人参三七川芎提取物作为益气活血中药,有研究表明其能够延缓内皮细胞复制性衰老<sup>[1]</sup>,降低增龄和高血压大鼠主动脉 VSMCs 过度增殖水平,延缓血管细胞的老化<sup>[6]</sup>。本实验结果表明中药高剂量组可以明显增高大鼠的胸腺系数和脾脏系数,中药中剂量组可以增高大鼠的胸腺系数和脾脏系数,中药低剂量组有增高大鼠胸腺系数和脾脏系数的趋势,提示人参三七川芎提取物可能通过刺激增大免疫器官而提高免疫功能。白藜芦醇是第一个被发现的组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 激活剂,而 SIRT1 是一个多功能的抗衰老因子。SIRT1 能够对抗氧化应激,减轻炎症,抑制细胞衰老,保护动脉粥样硬化性疾病<sup>[7]</sup>。本实验表明白藜芦醇能明显增高大鼠的胸腺系数和脾脏系数,说

明白藜芦醇在激活 SIRT1 同时,还可以减缓机体胸腺和脾脏萎缩,提高机体的免疫功能。

综上,本实验结果表明人参三七川芎提取物可能通过降低血清活性氧含量,刺激免疫器官,提高免疫功能和增强大鼠的空间探索性以及精神状态而达到延缓衰老的作用,但具体机制不详,有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 王强,雷燕,杨静,等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老内皮细胞的影响和钙黏蛋白的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):123-127.
- [2] 杨静,雷燕,崔巍,等. 人参三七川芎提取物延缓内皮细胞复制性衰老的机制研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(12):1544-1548.
- [3] 陶丽丽,雷燕. 人参、三七、川芎提取物对血管平滑肌细胞衰老相关  $\beta$  半乳糖苷酶及 p16-cyclinD/CDK-Rb 通路的影响[J]. 中西医结合学报,2012,10(1):76-84.
- [4] 王维刚,刘震泽,吴文婷,等. 旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J]. 中国细胞生物学学报,2011,33(11):1191-1196.
- [5] 曹湘博,于乐洋,常雅萍. D-半乳糖亚急性中毒拟衰老模型鼠免疫功能及生化指标变化的研究[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(7):382-385.
- [6] 雷燕,陶丽丽,王国利,等. 人参三七川芎提取物对增龄和高血压大鼠血管平滑肌细胞的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(10):1374-1379.
- [7] 陈厚早,刘德培. 组蛋白去乙酰化酶 SIRT1: 血管性疾病新的潜在治疗靶点[J]. 中国基础科学,2012,14(6):3-8.

[责任编辑 周冰冰]