

开心散各组分体外抗脂质过氧化的研究

黄芳*, 黄子杰, 汪家梨

(福建医科大学公共卫生学院, 福建 福州 350004)

[摘要] 目的: 研究开心散及其各成分(人参、远志、石菖蒲和茯苓)的体外抗氧化作用, 并对其有效成分进行研究, 寻找最佳配比。方法: 研究开心散的体外抗脂质过氧化(LPO)作用, 再选用均匀设计和正交设计, 研究开心散体外抗LPO作用的配伍规律, 找出其中的有效成分, 并对其有效成分进行研究。结果: 选用320、160、40mg/mL三个剂量组, 通过与阴性对照组比较, 发现开心散具有降LPO的作用, 其中高剂量组和低剂量组抗LPO作用更明显, 但3个剂量组与维生素E组比较后提示开心散抗LPO的作用不如维生素E; 应用 U_{10}^* (10^8)设计对开心散进行研究, 发现四个组成成分中远志具有抗LPO的作用, 而茯苓的作用则正好相反, 其它成分作用不显著, 而通过 $L_{12}(2^{11})$ 设计验证, 仅远志具有较明显的抗LPO作用; 另对远志与维生素E比较后发现, 0.5g/mL远志与10mg/L维生素E的抗LPO作用相当。结论: 开心散具有降LPO的作用, 其中起作用的为远志。

[关键词] 开心散; 体外抗脂质过氧化作用; 均匀设计; 正交设计; 远志

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)01-0055-03

开心散始见于《备急千金方》^[1], 由远志、人参、茯苓、石菖蒲组成, “主好忘”。根据国内近几年来有关开心散的对自由基代谢的影响与抗衰老作用研究^[2], 表明开心散能提高动物血浆及组织中SOD活性, 降低MDA含量, 并具有减轻脂质过氧化反应、消除自由基的作用, 但目前均未研究过该方的有效成分及其最佳配比。此次实验采用变异系数较小的体外实验方法, 应用均匀设计方法, 对开心散进行拆方分析, 初筛出该方的有效成分和最佳配比, 再通过正交设计证实了其分析的正确性。为进一步探讨开心散及其各组分的体外抗氧化作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 250~300g SD雄性大鼠, 由福建医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物 远志(*Radix Polygalae*)产地山东; 石菖蒲(*Grassleaf Sweetflag Rhizome*)产地安徽; 茯苓(*Indian Bread*)产地福建, 均购自回春大药店。人参(*Radix Ginseng*)产地东北, 购于同仁堂大药房。取上述药材各200g, 分别以1000mL蒸馏水浸泡24h, 煮沸半小时纱布过滤, 同法再煮一次, 合并两次滤液, 于水浴上浓缩成200% (2g/mL)的浓度。药液置4℃

冰箱保存备用。

1.3 方法 按文献[3]方法, 取250~300g雄性大鼠, 断头处死, 取肝脏, 吸去残血, 将肝剪成碎块, 用生理盐水配成10%匀浆, 取新鲜匀浆1.5mL加入离心管内, 加待试液0.1mL, 于37℃振荡温水浴1.5h, 取出后加入20%的三氯醋酸1.5mL。混匀后静置10min, 3000r·min⁻¹离心10min, 取上清1.5mL, 加0.7%硫代巴比妥酸1mL, 沸水浴加热10min。以生理盐水代替硫代巴比妥酸为空白对照。冷却后在721分光光度计532nm比色测定大鼠肝LPO含量。

1.4 统计方法 运用SPSS10.0软件进行方差分析和回归分析。

2 结果

2.1 开心散原方抗LPO的研究 开心散各组成成分人参(A)、远志(B)、石菖蒲(C)、茯苓(D), A:B:C:D=1:1:1:1, 浓度分别取320、160、20(mg/mL), 维生素E三个剂量即: 1、10、100(g/mL)作为阳性对照, 生理盐水为阴性对照, 应用方差分析结果见表1。

表1结果提示: 开心散三个剂量组均与阴性对照组有统计学差异, 其中高剂量组和低剂量组抗LPO作用更明显; 维生素E三个剂量组亦均与阴性对照组有差异显著性, 但10mg/L的维生素E作用最强; 开心散与维生素E组比较后提示开心散抗LPO的作用不如维生素E。

[收稿日期] 2005-12-05

[通讯作者] 黄芳, Tel: (0591) 3569269; E-mail: hf289@sina.com

表 1 开心散原方抗 LPO 对 OD 值的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度水平 mg/mL	OD 值
1 开心散	320	0.112 ± 0.031 ⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁷⁾
2 开心散	160	0.209 ± 0.015 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾
3 开心散	40	0.157 ± 0.054 ⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾
4NS 对照组	—	0.280 ± 0.031 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾
5VitE	0.001	0.180 ± 0.021 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
6VitE	0.01	0.023 ± 0.005 ⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾
7VitE	0.10	0.079 ± 0.003 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾

注: 与 320mg/mL 开心散比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 40mg/mL 开心散比较²⁾ $P < 0.05$; 与 160mg/mL 开心散比较³⁾ $P < 0.05$; 与对照组比较⁴⁾ $P < 0.05$; 与 1mg/L VitE 比较⁵⁾ $P < 0.05$; 与 10mg/mL VitE 比较⁶⁾ $P < 0.05$; 与 100mg/L VitE 比较⁷⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 开心散抗 LPO 作用的有效成分研究

2.2.1 通过均匀设计(UD)进行初筛 以开心散各组成药味人参(A)、远志(B)、石菖蒲(C)、茯苓(D)作为考察因子,每因子取五个水平,各因子的水平均取:320、160、80、40 和 20(mg/mL)。取均匀设计表 $U_{10}^*(10^8)$,得 10 种开心散配方的实验方案,每种配方平行做 2 管,并取其均值,结果见表 2、3。

表 2 开心散不同配比抗 LPO 对 OD 值影响

组别	人参 A	远志 B	石菖蒲 C	茯苓 D	OD
1	1	3	4	5	0.146
2	2	1	3	5	0.066
3	3	4	1	4	0.250
4	4	1	5	4	0.067
5	5	4	4	3	0.222
6	1	2	2	3	0.109
7	2	5	1	2	0.296
8	3	2	5	2	0.199
9	4	5	3	1	0.399
10	5	3	2	1	0.354

注: 1= 320, 2= 160, 3= 80, 4= 40, 5= 20(mg/mL)。

表 3 方差分析表

差异源	df	SS	MS	F	R^2	P
回归	2	0.108	0.054	27.257	0.893	0.011
误差	7	0.013	0.002			
总计	9	0.121				

采用直观分析法由表 2 得第 2 组的 OD 值最小,说明 2 组配比 $A_2B_1C_3D_5$ 抗 LPO 作用最强。

如对上述试验结果进行回归分析,得回归方程为: $y = 0.202 + 4.387 \times 10^{-2} B - 4.11 \times 10^{-2} D$

这是二元线性回归方程,为检验其可信性,对该回归方程进行方差分析,其方差分析表如表 3 所示。

由方差分析知,所得的回归方程显著,该回归方程是可信的。B 的系数为正,表明实验指标随因素 B 的增加而增加;而 D 的系数为负,表明实验指标随因素 D 的增加而减少。即四个组成成分中远志具有

抗 LPO 的作用,而茯苓的作用则正好相反,其它成分作用不显著,各组分之间未见交互作用。

2.2.2 通过正交设计(OD)进一步验证 以开心散各组成成分人参(A)、远志(B)、石菖蒲(C)、茯苓(D)作为考察因子,每因子取两个水平,各因子的水平均取:320 和 20(mg/mL)。取正交表 $L_{12}(2^{11})$,得到表 4 的实验方案得 12 种开心散配方,每种配方平行做 2 管,并取其均值,结果见表 5。

表 4 开心散不同配比抗 LPO 对 OD 值影响

组别	人参 A	远志 B	石菖蒲 C	茯苓 D	OD
1	1	1	1	1	0.129
2	1	1	1	2	0.118
3	1	1	2	1	0.053
4	1	2	2	2	0.082
5	1	2	1	2	0.170
6	1	2	2	1	0.175
7	2	1	2	2	0.026
8	2	1	1	1	0.055
9	2	1	2	2	0.034
10	2	2	1	2	0.171
11	2	2	2	1	0.365
12	2	2	1	1	0.325
k1	0.121	0.069	0.161	0.184	
k2	0.163	0.214	0.123	0.100	
极差	0.042	0.145	0.038	0.084	

注: 1= 320(mg/mL), 2= 20(mg/mL)。

表 5 正交设计回归方程分析

方法	回归方程	t	R^2	P
OD	$y = 0.146B - 0.074$	3.070	0.485	0.012

表 4 极差分析得各因素的主次关系为远志 > 茯苓 > 人参 > 石菖蒲,表 5 列出了 OD 法的线性回归方程,显示远志具有较显著作用,各组分之间未见交互作用。

2.3 远志抗 LPO 研究 根据以上实验结果,选取远志四个剂量分别为 2、1、0.5、0.25(g/mL)、维生素 E 10(mg/L)和阴性对照组进行体外抗 LPO 实验,进行方差分析结果见表 6。

表 6 远志、维生素 E 抗 LPO 对 OD 值的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度水平 g/mL	OD 值
1 远志	2	0.190 ± 0.015 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾
2 远志	1	0.089 ± 0.007 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾
3 远志	0.5	0.038 ± 0.003 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾
4 远志	0.25	0.046 ± 0.007 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾
5NS 对照组	—	0.290 ± 0.038 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁶⁾
6VitE	1×10^{-5}	0.023 ± 0.005 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾

注: 与 2g/mL 远志比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 1g/mL 远志比较²⁾ $P < 0.05$; 与 0.5g/mL 远志比较³⁾ $P < 0.05$; 与 0.25g/mL 远志比较⁴⁾ $P < 0.05$; 与对照组比较⁵⁾ $P < 0.05$; 与 10mg/L VitE 比较⁶⁾ $P < 0.05$ 。

根据表 6 得到远志的各浓度组与阴性对照组比较,均有显著性差异,与维生素 E 比较后发现,0.5g/mL 浓度远志与 10mg/L 维生素 E 的抗 LPO 作用相当,表明远志具有较强的抗 LPO 作用,其中以 0.5g/mL 浓度组抗 LPO 作用最强。

3 讨论

现代药理研究表明开心散具有广泛的药理作用,特别是在促智抗衰老抗氧化方面有明显的作用,具有延长生存期,改善伴衰老而发生的学习记忆衰退的作用。本次原方实验表明,开心散三个剂量组均与阴性对照组有统计学差异,其中高剂量组和低剂量组抗 LPO 作用更明显;开心散与维生素 E 组比较后提示开心散抗 LPO 的作用不如维生素 E。本次实验发现远志的各浓度组与阴性对照组比较,均有显著性差异,与维生素 E 比较后发现,0.5g/mL 浓度远志与 10mg/L 维生素 E 抗 LPO 作用相当,表明远志具有较强的抗 LPO 作用。远志在药理活性方面的研究都已经比较系统、比较深入^[4]。但我们通过查找

文献资料,自古以来远志主要是作为安神益智药应用,关于远志单剂抗 LPO 作用未见有报道。故我们将深入地研究这方面的药理作用和活性成分,为远志在抗氧化抗衰老方面的应用提出新的思路。

实验中发现人参等不具抗氧化作用,可能与本次实验所选剂量有一定关系。提示我们在接下来的研究中应调整相应的用药量,以期得到该药方的最佳配比。

[参考文献]

- [1] 王欣. 开心散的源流与发展[J]. 山东中医药大学学报, 1997, 21(5): 393-394.
- [2] 黄玉芳, 卞慧敏, 龚婕定, 等. 开心散对四种动物模型 SOD MDA 含量的影响[J]. 南京中医药大学学报, 1995, 15(3): 151-152.
- [3] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 191.
- [4] 张晓萍. 远志的药理活性研究[J]. 黑龙江医药, 2004, 17(2): 139.