

人参各组分对环磷酰胺诱导的血虚模型大鼠的治疗作用

张玉尧¹, 张兰曹¹, 周吴迪¹, 张旭¹, 宿文杰¹, 魏星华^{2*}, 张鹤^{1,3*}

(1. 长春中医药大学/吉林省中药生物大分子重点实验室, 长春 吉林 130117;

2. 吉林省科学技术协会, 长春 吉林 130021; 3. 长春中医院大学附属医院, 长春 吉林 130021)

摘要:目的 比较人参提取物、总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷对环磷酰胺诱导的血虚模型大鼠的作用。方法 采用高分辨液质联用鉴定皂苷总类, 分别应用高效液相色谱仪和氨基酸分析仪测定单糖和氨基酸含量。乙酰苯肼和环磷酰胺建立大鼠血虚模型, 造模 1 周后分别灌胃给予人参提取物(1g/kg)、总皂苷(0.25 g/kg)、二醇皂苷(0.1 g/kg)和三醇皂苷(0.1 g/kg), 连续给药 3 周。末次给药 24h 后腹主动脉取血, 血液分析仪测定血常规, 酶联免疫吸附测定试剂盒检测造血相关因子促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)。结果 人参提取物、总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷中总皂苷含量分别为 4.39%、81.09%、87.32% 和 86.20%; 总糖含量分别为 76.36%、74.12%、75.16% 和 70.33%; 总氨基酸含量分别为 5.63%、1.41%、0.14% 和 0.12%。通过比较血虚模型大鼠的体质量、白细胞参数、红细胞参数、血红蛋白参数、网织红细胞参数和血清造血相关因子等指标, 发现 4 个组分均能不同程度的治疗血虚模型大鼠。结论 人参中各组分均能改善血虚模型大鼠的指标, 具有补血作用; 其中人参提取物的作用最好, 与其含有大量的糖、蛋白质和皂苷等成分相关, 多组分协同治疗效果更好。

关键词: 人参提取物; 总皂苷; 二醇皂苷; 三醇皂苷; 环磷酰胺; 血虚

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2022.12.12

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2022)12-2861-07

人参被视为百草之王, 为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎。人参味甘、微苦, 微温, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智等功效。现代药理学研究表明人参具有提高免疫力、抗肿瘤、抗氧化、补血等功效^[1-3]。人参中主要活性成分为皂苷、多糖、氨基酸、蛋白质、有机酸、生物碱、黄酮、挥发油等多种化学成分^[4]。目前研究发现人参提取物中主要成分为多糖类, 其次是皂苷类和蛋白多肽类成分^[5], 人参提取物经大孔吸附树脂吸附, 水和不同浓度的乙醇洗脱可去除部分多糖类和蛋白多肽类成分, 得到人参总皂苷; 人参总皂苷经进一步的分离纯化得到二醇皂苷和三醇皂苷^[6]。人参经过提取分离得到不同组分, 后者化学成分的不同将导致活性成分的差异。

据国际癌症研究机构(IARC)发布的全球肿瘤统计数据显示, 2018 年全球新增 1810 万癌症病例, 970 万癌症患者死亡, 癌症将成为全球头号“杀手”。化疗药物可杀灭肿瘤细胞, 其中环磷酰胺为常用的光谱抗肿瘤药, 对白血病和实体瘤都有效, 但环磷酰胺具有骨髓抑制, 破坏造血微环境, 引起外周血各类细胞减少^[7,8], 因此治疗过程中常服用一些中药减少环磷酰胺的副作用。近年来, 人参中的多糖、总皂苷和单体皂苷为研究的热点, 通过研究发现多糖^[9]、总皂苷^[10]、人参皂苷 Rg1^[11]、Rg3^[12]、Rb1^[13]、Rh2^[14]、Re^[15]、CK^[16]等均可提高环磷酰胺诱导的骨髓抑制大鼠的免疫低下。因此本文主要比较人参提取物、总皂苷、

二醇皂苷和三醇皂苷的化学组成差异, 同时比较 4 个组分对环磷酰胺和乙酰苯肼诱导的血虚模型大鼠的治疗作用。

1 材料与仪器

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠(体质量 180~200g)购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司, 许可证号 SCXK(吉)-2016-0003。动物房湿度 60%±5%, 温度(25±2)℃和 12 小时明暗循环, 大鼠自由饮水、摄食, 适应 3 天后开始试验。该实验已由长春中医药大学伦理学委员会和动物保护机构批准, 并根据实验动物的使用指南进行(动物伦理批号: 20190133)。

1.2 试剂 人参提取物、人参总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷由吉林大学化学学院陈燕萍教授提供。甲醇和乙腈均为色谱纯, 美国 Fisher 公司; 甲酸, 瑞士 Sigma-Aldrich 公司; 甘氨酸、L-酪氨酸、L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-亮氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-蛋氨酸、L-赖氨酸、L-脯氨酸、L-组氨酸、L-谷氨酸、L-天冬氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-精氨酸和 L-半胱氨酸, 上海安谱实验科技股份有限公司; 鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、岩藻糖、半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸和核糖, 上海源叶生物有限公司; 木糖和葡萄糖, TMSTANDARD 科技股份有限公司; PMP, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 人参皂苷 Re, 中国药品生物制品检定所; 促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) Elisa 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 Vion IMS-QTOF 离子淌度高分辨液质联用仪, 美国 Waters 公司; Agilent-1200 型液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司; LA8080 氨基酸自动分析仪, 日本株式会社日立高新技术科学; Milli-Q Integral 5 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; MTN-5800 型氮吹仪, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; C-WBS-D 水浴锅, 长信科技有限公司; FA-1004 电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; BR4I 离心机, 美国 Thermo 公司。XT-2000i 全自动血液分析仪, 日本 Sysmex Corporation 公司。

收稿日期: 2022-04-24; 修订日期: 2022-11-26

基金项目: 国家科技部重点研发计划项目(2017YFC1702100)

作者简介: 张玉尧(1999-), 女(汉族), 吉林白山人, 长春中医药大学在读硕士研究生, 主要从事中药物质基础研究工作。

* 通讯作者简介: 魏星华(1983-), 男(汉族), 吉林白山人, 吉林省科学技术协会中级工程师, 硕士学位, 主要从事食品安全研究工作。

* 通讯作者简介: 张鹤(1985-), 女(汉族), 吉林永吉人, 长春中医药大学副教授, 硕士研究生导师, 博士学位, 主要从事中药物质基础研究工作。

2 方法

2.1 人参各组分的提取和分离 取干燥人参,粉碎,按料液比 1:10 加蒸馏水煎煮提取 3 次,合并上清液、过滤,浓缩,一部分人参提取物的浓缩液真空干燥烘箱中烘干,研磨成粉后得到人参提取物。余下的人参提取物浓缩液经大孔吸附树脂柱吸附,先后进行水和不同浓度的乙醇洗脱,回收乙醇至浸膏状,加入 95% 乙醇沉淀,滤过,洗脱,滤液合并浓缩至干燥,采用脱色树脂和活性炭进行脱色后得人总皂苷^[17]。取部分人参总皂苷,用乙醇溶解,加等体积的沉淀剂,静止,待上清液澄清后过滤。滤液部分调 pH = 7,过脱色树脂及阳离子树脂,接收流出液,浓缩至干燥,即得人参三醇皂苷。沉淀部分用水溶解,调 pH = 7,加乙醇,过脱色树脂及阳离子树脂,接收流出液,浓缩至干燥,即得人参二醇皂苷^[18]。

2.2 人参各组分的成分测定

2.2.1 皂苷类成分分析 应用 Vion IMS-QTOF 离子淌度高分辨液质联用仪测定样品中皂苷种类^[19]。色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 30 °C,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A) - 0.1% 甲酸乙腈(B)。梯度条件: 0 ~ 5 min, 1% B; 5 ~ 7 min, 1% ~ 5% B; 7 ~ 13 min, 5% ~ 11% B; 13 ~ 15 min, 11% ~ 20% B; 15 ~ 25 min, 20% ~ 22% B; 25 ~ 27 min, 22% ~ 32% B; 27 ~ 32 min, 32% ~ 34% B; 32 ~ 37 min, 34% ~ 70% B; 37 ~ 40 min, 70% ~ 85% B; 40 ~ 41 min, 85% ~ 98% B; 41 ~ 44 min, 98% ~ 98% B。流速为 0.3 mL/min,供试品进样量为 3 μL,标准品进样量为 3 μL。使用实验室自建 UNIFI 平台的人参皂苷数据库对皂苷定性鉴别^[20]。

总皂苷含量测定:以 Re 为标准对照品,采用香草醛比色法测定各样品中总皂苷的含量。

2.2.2 单糖含量分析 取适量样品于水解管中,加入 4 mol/L 三氟乙酸(TFA) 1 mL,于 120 °C 烘箱中水解 2 h。取出后,氮气吹干;衍生化反应:向吹干后的样品中加 1 mL 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液和 0.5 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液,70 °C 水浴 60 min,冷却,加 0.5 mL 0.3 mol/L HCl 溶液后,加 0.5 mL 氯仿,振荡摇匀后静置 20 分钟,弃去下层,萃取三次,取水层过膜上机。10 种单糖混合标准品溶液(浓度分别为 0.2, 1, 5, 10, 50 和 100 μg/mL)按照上述步骤衍生后分别上机。色谱柱: SHISEIDO C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相: A - 0.1 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.8), B - 乙腈, A:B = 82:18;流速: 1.0 mL/min,柱温为 25 °C,进样量 10 μL,波长为 245 nm。记录峰面积,根据标准品的浓度和峰面积分别绘制 10 种单糖的标准曲线。根据标准曲线计算样品中单糖含量。

2.2.3 氨基酸成分分析 称取混合均匀的适量样品,在水解管中加入 10 ~ 15 mL 6 mol/L 盐酸溶液,将水解管放入冷冻剂中,冷冻 3 ~ 5 min,充氮保护,拧紧瓶盖,将水解管放在(110 ± 1) °C 的电热鼓风恒温箱中水解 22 h 后取出,冷却至室温。打开水解管,将水解液过滤至 50 mL 容量瓶中,用少量水多次冲洗水解管,水洗液移入同一 50 mL 容量瓶内,最后用水定容至刻度,摇匀。准确吸取 1.0 mL 滤液移入至 15 mL 试管内,40 °C 减压至干,用 1.0 mL pH 2.2 的柠檬酸钠缓冲溶液溶解,振荡混匀后,过 0.22 μm 滤膜后,注入 LA8080 氨基酸自动分析仪进行测定。17 种氨基酸标准品混合溶液(浓度分别为 7.5, 15, 30, 60 和 120 nmol/mL)按上述步骤处理后上机,记录峰面积。根据标准品的浓度和峰面积分别绘制 17 种氨基酸的标准曲线。根据标准曲线计算样品中氨基酸含量。

2.3 环磷酸腺苷诱导血虚模型大鼠

2.3.1 造模、分组和给药 将 36 只大鼠按体重随机分为 6 组,空白组、模型组、人参提取物组(1 g/kg)、总皂苷组(0.25 g/kg)、二醇皂苷组(0.1 g/kg)和三醇皂苷组(0.1 g/kg)。除空白组外,其余各组大鼠第 1、4 天皮下注射 2% 乙酰苯肼生理盐水溶液,剂量分别为 20 和 40 mg/kg,第 4 天皮下注射乙酰苯肼后 2 h,腹腔

注射环磷酸腺苷生理盐水溶液,剂量为 20 mg/kg,连续给药 4 天,造模过程为 7 天。造模后 1 天开始给药,连续灌胃给药 21 天,空白组和模型组大鼠均灌胃给予等量生理盐水。

2.3.2 动物体质量 造模第一天开始至给药 21 天结束,每天测定大鼠体质量的变化;末次给药后禁食不禁水,24 h 后腹腔注射 10% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血用于血常规和血清因子测定。

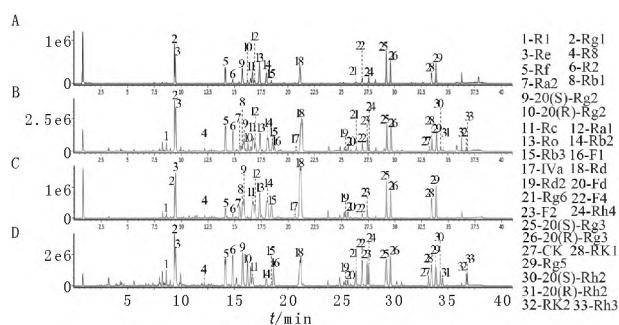
2.3.3 血常规和血清因子测定 腹主动脉血加入 0.5 mL EDTA-K2 抗凝管中,采用 XT-2000i 全自动血液分析仪测定血常规检测。血浆 3000 r/min 离心 10 min,取上清,采用 Elisa 试剂盒测定 TPO、EPO 和 GM-CSF(具体步骤见说明书)。

2.4 统计学方法 采用 Prism 8.0 统计软件分析数据,采用双因素方差分析方法(two-way ANOVA)进行比较,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有明显统计学意义。

3 结果

3.1 皂苷鉴定结果 采用 Vion IMS-QTOF 离子淌度高分辨液质联用仪测定样品中皂苷种类,从图 1 可以看出,共鉴定得到 33 个单体皂苷,其中在人参提取物中鉴定得到 19 个单体皂苷,总皂苷中鉴定得到 33 个单体皂苷,二醇皂苷和三醇皂苷分别鉴定得到 24 个和 28 个单体皂苷。原人参二醇型皂苷包括 R₈、Ra₂、Rb₁、Rc、Ra₁、Ro、Rb₂、Rb₃、IVa、Rd、Rd₂、Fd、F₂、20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、CK、Rg₅、20(S)-Rh₂、20(R)-Rh₂、RK₁、RK₂、Rh₃ 等 22 个皂苷;原人参三醇型皂苷包括 R₁、Rg₁、Re、Rf、R₂、20(S)-Rg₂、20(R)-Rg₂、F₁、Rg₆、F₄、Rh₄ 等 11 个皂苷^[21]。表 1 为香草醛比色法测定各组分中总皂苷含量结果,其中人参提取物、总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷分别为 4.39%、81.09%、87.32% 和 86.20%。

3.2 单糖测定结果 采用 PMP 柱前衍生化 HPLC 测定各组分中单糖的含量。图 2 结果显示共鉴定得到 10 种单糖,其中人参提取物鉴定得到 10 种单糖;总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷分别鉴定得到 8 种不同单糖;总皂苷和三醇皂苷中均未检测到半乳糖醛酸和核糖;二醇皂苷中未检测到半乳糖和核糖。表 2 结果显示葡萄糖在 4 个组分中含量均为最高,且有略微差异,在人参提取物、总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷中葡萄糖含量分别为 72.80%、63.27%、64.26% 和 58.09%;总糖含量分别为 76.36%、74.12%、75.16% 和 70.33%。其次在人参提取物中含量较高的单糖为阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖等;在总皂苷和三醇皂苷中含量较高的单糖为阿拉伯糖、鼠李糖和木糖;在二醇皂苷中位阿拉伯糖和木糖含量较高。



A - 人参提取物; B - 总皂苷; C - 二醇总皂苷; D - 三醇总皂苷

图 1 人参各组分中鉴定到的皂苷类成分

表 1 人参各组分中总皂苷含量($\bar{x} \pm s$)

样品	总皂苷含量 /g · 100g ⁻¹	样品	总皂苷含量 /g · 100g ⁻¹
人参提取物	4.39 ± 0.96	二醇皂苷	87.32 ± 0.75
总皂苷	81.09 ± 0.23	三醇皂苷	86.20 ± 0.34

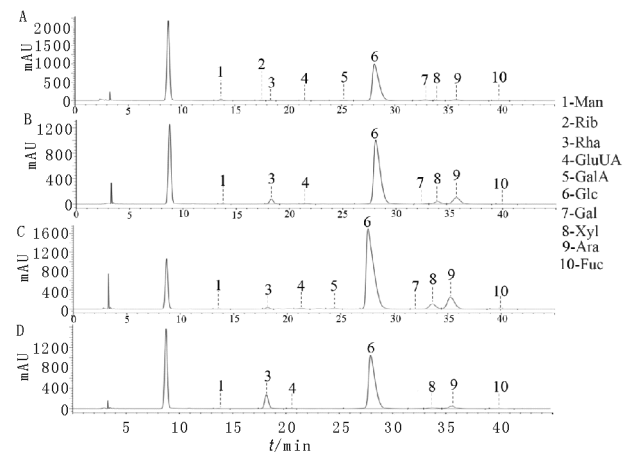
n = 3

3.3 氨基酸测定结果 采用氨基酸自动分析仪检测各组中 17 种氨基酸的含量(图 3)。表 3 结果显示在 4 个组分中,人参提取物中氨基酸总含量最高,为 5.63%,纯化后的总皂苷氨基酸总量为 1.41%,进一步分离纯化后的二醇皂苷和三醇皂苷中各氨基酸显著降低,分别为 0.14% 和 0.12%。谷氨酸是人参提取物、总皂苷和三醇皂苷中含量最高的氨基酸;其次人参提取物中含量较高的氨基酸为精氨酸、天冬氨酸和丙氨酸等;总皂苷中含量较高的氨基酸为精氨酸、蛋氨酸和亮氨酸等;三醇皂苷含量较高的氨基酸为胱氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸等。二醇皂苷中含量最高的氨基酸为胱氨酸,其次为亮氨酸和谷氨酸。

3.4 人参各组分对血虚模型大鼠的体质量的影响 采用乙酰苯肼和环磷酸胺建立血虚大鼠模型,造模 1 周后,模型组和各给药组大鼠体质量明显低于空白组大鼠体质量(0 周, $P < 0.001$)。给药 2 周后,各给药组大鼠体质量明显高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但仍显著低于空白组大鼠体质量($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);给药 3 周后,人参提取物和二醇皂苷均能显著增加模型大鼠体质量($P < 0.001$),与空白组大鼠无显著差异($P > 0.05$);人参总皂苷和三醇皂苷显著增加模型大鼠体质量($P < 0.001$),但仍低于空白组大鼠体质量($P < 0.01$)。以上结果表明,4 个组分均能显著提高环磷酸胺诱导的血虚模型大鼠的体质量,人参提取物和二醇皂苷作用更明显。见表 4。

3.5 人参各组分对血虚模型大鼠血常规 - 白细胞参数的影响 采用乙酰苯肼和环磷酸胺建立血虚模型大鼠,二者可显著影响血清的各指标见表 5~9。从表 5 可以看出,与空白组比较,模型组大鼠白细胞(white blood cell, WBC)、淋巴细胞(lymphocyte, LYMPH)、中性粒细胞(neutrophil, NEUT)和单核细胞(monocyte, MONO)显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。给药 3 周

后,人参提取物、总皂苷和二醇皂苷能显著增加模型大鼠血清中 WBC 和 LYMPH($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);总皂苷可显著增加模型大鼠血清中 NEUT($P < 0.05$);人参提取物和二醇皂苷能显著增加 MONO($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。三醇皂苷对大鼠血清中 WBC 参数中 4 个指标均未改善,其中 WBC 和 NEUT 显著低于空白组($P < 0.01$)。与三醇皂苷组比较,人参提取物、总皂苷和二醇皂苷组大鼠血浆中 WBC 显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);总皂苷显著增加 NEUT($P < 0.05$);二醇皂苷显著增加 MONO($P < 0.05$)。以上结果表明,人参提取物恢复模型大鼠白细胞参数最强,其次是总皂苷和二醇皂苷。



A - 人参提取物; B - 人参总皂苷; C - 原人参二醇总皂苷;
D - 原人参三醇总皂苷

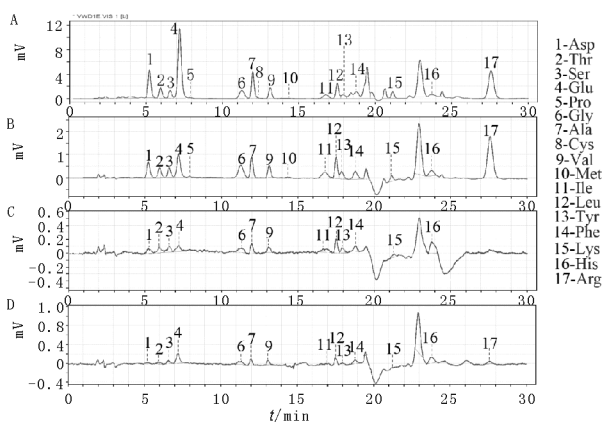
图 2 人参各组分中鉴定到单糖类成分

表 2 人参各组分中单糖成分分析($\bar{x} \pm s$)

$g \cdot 100g^{-1}$

样品	葡萄糖(Glc)	阿拉伯糖(Ara)	半乳糖(Gal)	甘露糖(Man)	半乳糖醛酸(GalA)	鼠李糖(Rha)
人参提取物	72.80 ± 1.54	0.94 ± 0.01	0.87 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.02 ± 0.00
总皂苷	63.27 ± 0.94	5.24 ± 0.25	0.13 ± 0.01	0.06 ± 0.02	—	3.08 ± 0.15
二醇皂苷	64.26 ± 1.85	6.67 ± 0.17	—	0.08 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.62 ± 0.03
三醇皂苷	58.09 ± 2.21	2.19 ± 0.15	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	—	8.78 ± 0.22
样品	核糖(Rib)	葡萄糖醛酸(GlcUA)	木糖(Xyl)	甘露糖(Fuc)	总糖含量	
人参提取物	0.14 ± 0.00	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.01 ± 0.00	76.36 ± 1.57	
总皂苷	—	0.30 ± 0.03	2.01 ± 0.16	0.04 ± 0.01	74.12 ± 0.43	
二醇皂苷	—	0.53 ± 0.03	2.69 ± 0.13	0.03 ± 0.00	75.16 ± 1.77	
三醇皂苷	—	0.06 ± 0.05	1.04 ± 0.07	0.05 ± 0.00	70.33 ± 1.80	

$n = 3$



(A - 人参提取物; B - 人参总皂苷; C - 原人参二醇总皂苷;
D - 原人参三醇总皂苷)

图 3 人参各组分中鉴定到氨基酸类成分

3.6 人参各组分对血虚模型大鼠血常规 - 红细胞参数的影响

与空白组比较,模型组大鼠血浆中红细胞(red blood cell, RBC)的数量显著降低($P < 0.001$);平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、红细胞分布宽度标准差(red cell distribution width - standard deviation, RDW - SD)和红细胞分布宽度变异系数(red cell distribution width - coefficient of variation, RDW - CV)均显著增加($p < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);模型组大鼠血浆中红细胞压积(hematocrit, HCT)水平较高,但与空白组比较没有统计学差异($P > 0.05$)。给予人参提取物和总皂苷后,大鼠体内 RBC 数量显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但总皂苷组仍低于空白对照组($P < 0.05$);与空白组比,二醇皂苷和三醇皂苷对恢复模型大鼠 RBC 能力较弱($P < 0.01$)。二醇皂苷和三醇皂苷均能降低模型大鼠 HCT,但与模型组无统计学差异($P > 0.05$),而人参提取物和总皂苷未改善模型大鼠 HCT 指标。四个组分均未改善模型大鼠 MCV、RDW - SD 和 RDW - CV,仍显著高于空白组($P < 0.001$)。与三醇皂苷组比较,人参提取物和总皂苷增加大鼠的 RBC($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其余各指标给药组间无统计学差异。以上结果可以得出,人参提取物和总皂苷可显著增加模型大鼠红细胞数量。见表 6。

3.7 人参各组分对血虚模型大鼠血常规-血红蛋白参数的影响
表 7 结果显示,与空白组比较,乙酰苯肼和环磷酸腺苷造血虚模型导致大鼠血浆中血红蛋白(hemoglobin,HGB)和平均血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration,MCHC)水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$),平均血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin,MCH)显著增加($P<0.001$)。给药 3 周后,人参提取物、总皂苷和二醇皂苷均显著增加模型大鼠血浆中 HGB 的含量;

人参提取物显著增加模型大鼠 MCHC 含量($P<0.001$),总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷组血浆中 MCHC 含量也增加,但显著低于空白对照组($P<0.05$);各给药组大鼠血浆中 MCH 仍显著高于空白组($P<0.001$),与模型组大鼠无统计学差异($P>0.05$)。与三醇皂苷组比较,人参提取物组大鼠体内 MCHC 显著增加($P<0.05$)。以上结果可以看出,人参提取物可显著改善模型大鼠 HGB 和 MCHC 其次是总皂苷和二醇皂苷。见表 7。

表 3 人参各组分中氨基酸含量($\bar{x} \pm s$)

$g \cdot 100g^{-1}$

样品	谷氨酸 ¹ (Glu)	精氨酸 ² (Arg)	天冬氨酸 ¹ (Asp)	丙氨酸 ¹ (Ala)	亮氨酸 ³ (Leu)	苯丙氨酸 ³ (Phe)	脯氨酸 ¹ (Pro)	苏氨酸 ³ (Thr)	缬氨酸 ³ (Val)
人参提取物	1.667 ± 0.021	1.290 ± 0.010	0.563 ± 0.015	0.310 ± 0.010	0.273 ± 0.006	0.250 ± 0.010	0.210 ± 0.010	0.173 ± 0.006	0.173 ± 0.012
总皂苷	0.133 ± 0.012	0.467 ± 0.042	0.074 ± 0.007	0.058 ± 0.008	0.092 ± 0.007	0.069 ± 0.010	0.041 ± 0.004	0.049 ± 0.007	0.003 ± 0.001
二醇皂苷	0.012 ± 0.001	—	0.010 ± 0.001	—	0.019 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.007 ± 0.002	—
三醇皂苷	0.025 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.005 ± 0.001	—	0.014 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.002	—
样品	甘氨酸 ¹ (Gly)	异亮氨酸 ³ (Ile)	酪氨酸 ¹ (Tyr)	赖氨酸 ³ (Lys)	丝氨酸 ¹ (Ser)	组氨酸 ² (His)	蛋氨酸 ³ (Met)	胱氨酸 ¹ (Cys)	总含量
人参提取物	0.160 ± 0.017	0.120 ± 0.010	0.140 ± 0.010	0.117 ± 0.012	0.107 ± 0.006	0.052 ± 0.004	0.014 ± 0.002	0.013 ± 0.001	5.632 ± 0.056
总皂苷	0.056 ± 0.005	—	0.055 ± 0.003	0.051 ± 0.002	0.037 ± 0.006	0.025 ± 0.003	0.148 ± 0.016	0.048 ± 0.009	1.407 ± 0.136
二醇皂苷	0.007 ± 0.002	—	0.011 ± 0.004	0.011 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.004 ± 0.001	—	0.029 ± 0.001	0.137 ± 0.004
三醇皂苷	0.006 ± 0.001	—	—	0.008 ± 0.001	0.006 ± 0.003	0.003 ± 0.001	—	0.022 ± 0.002	0.123 ± 0.006

1. 非必需氨基酸,2. 半必需氨基酸,3. 必需氨基酸; $n=3$

表 4 人参各组分对血虚模型大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$)

g

组别	-1 周(造模前)	0 周(造模)	1 周(给药)	2 周(给药)	3 周(给药)
空白组	288.80 ± 10.11	334.80 ± 16.33 ***	352.40 ± 17.86 ***	375.20 ± 21.90 ***	392.80 ± 22.95 ***
模型组	281.20 ± 9.88	290.80 ± 11.35 ###	298.40 ± 11.57 ###	306.40 ± 11.08 ###	317.20 ± 10.50 ###
人参提取物	280.57 ± 8.12	295.29 ± 6.23 ###	310.29 ± 14.96 ###	336.57 ± 16.62 ### **	371.00 ± 16.42 ***
总皂苷	279.14 ± 11.54	293.14 ± 14.02 ###	311.57 ± 20.87 ###	332.86 ± 23.56 ### **	361.86 ± 20.78 ### **
二醇皂苷	279.57 ± 12.04	295.00 ± 10.89 ###	320.67 ± 16.27 ###	341.50 ± 18.52 ### **	369.17 ± 24.77 ***
三醇皂苷	280.33 ± 7.26	291.83 ± 11.50 ###	316.50 ± 13.34 ###	340.67 ± 19.69 ### **	362.17 ± 26.50 ### **

与空白组比较,### $P<0.01$ 和#### $P<0.001$,与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$; $n=6$

表 5 人参各组分对血虚模型大鼠白细胞的影响 $K \cdot \mu L^{-1}$

组别	WBC	LYMPH	NEUT	MONO
空白组	3.41 ± 0.53 ***	2.93 ± 1.11 **	0.82 ± 0.27 **	0.23 ± 0.08 *
模型组	1.06 ± 0.07 ###	0.62 ± 0.09 ##	0.34 ± 0.07 ##	0.06 ± 0.01 #
人参提取物	4.71 ± 2.09 *** &&&	2.86 ± 1.749 **	0.57 ± 0.24	0.32 ± 0.23 *
总皂苷	3.32 ± 1.31 *** &&	2.34 ± 1.06 *	0.73 ± 0.23 * &	0.10 ± 0.04
二醇皂苷	2.71 ± 0.65 * &	2.20 ± 0.89 *	0.52 ± 0.28	0.39 ± 0.21 ** &
三醇皂苷	1.60 ± 0.32 ##	1.35 ± 0.33	0.36 ± 0.12 ##	0.13 ± 0.10

与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$,与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$,各给药组与三醇皂苷组比,& $P<0.05$,&& $P<0.01$ 和&&& $P<0.001$; $n=6$

3.8 人参各组分对血虚模型大鼠血常规-网织红细胞参数的影响
乙酰苯肼和环磷酸腺苷可降低大鼠的网织红细胞(reticulocyte,RET)和低荧光强度网织红细胞(low fluorescent reticulocyte,LRF)

($P<0.05$ 或 $P<0.01$),增加未成熟网织红细胞(immature reticulocyte fraction,IRF)和高荧光强度网织红细胞(high fluorescent reticulocyte,HFR)($P<0.01$);同时增加中荧光强度网织红细胞(medium fluorescent reticulocyte,MFR)水平增加,但与空白组没有统计学差异($P>0.05$)。给药 3 周后,4 个组分均显著增加 RET($P<0.05$ 或 $P<0.01$);人参提取物和总皂苷能显著降低模型大鼠 IRF($P<0.05$ 或 $P<0.01$)和 HRF($P<0.01$ 或 $P<0.001$),增加 LRF($P<0.01$);各组分对 MFR 的影响没有统计学差异($P>0.05$)。与三醇皂苷组比较,人参提取物组大鼠血浆中 HRF 显著降低($P<0.05$),其余各指标 4 个给药组间无统计学差异。以上结果可以看出,人参提取物对模型大鼠网织红细胞的恢复作用最好,其次是总皂苷。见表 8。

表 6 人参各组分对血虚模型大鼠红细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	RBC/M · μL^{-1}	HCT /%	MCV /fL	RDW - SD /fL	RDW - CV /%
空白组	7.94 ± 0.19 ***	44.28 ± 1.17	56.23 ± 1.30 ***	28.12 ± 0.97 ***	16.25 ± 0.53 ***
模型组	6.71 ± 0.33 ###	46.30 ± 0.62	66.83 ± 2.07 ###	44.62 ± 5.68 ###	21.20 ± 1.71 ###
人参提取物	7.37 ± 0.44 * &&&	49.13 ± 4.54	66.63 ± 3.61 ###	44.81 ± 3.62 ###	21.44 ± 1.59 ###
总皂苷	7.27 ± 0.28 * &	47.35 ± 2.22	66.50 ± 3.28 ###	45.28 ± 3.19 ###	21.63 ± 1.26 ###
二醇皂苷	6.56 ± 0.51 ##	44.31 ± 1.63	66.77 ± 2.96 ###	45.46 ± 6.25 ###	21.59 ± 1.65 ###
三醇皂苷	6.60 ± 0.34 ###	43.73 ± 2.98	66.12 ± 2.49 ###	46.01 ± 4.29 ###	22.06 ± 1.42 ###

与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$,与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$,各给药组与三醇皂苷组比,& $P<0.05$ 和&& $P<0.01$, $n=6$

表 7 人参各组分对血虚模型大鼠血红蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	HGB/g · dL^{-1}	MCH /pg	MCHC /g · dL^{-1}
空白组	15.57 ± 0.40 *	18.72 ± 0.34 ***	33.43 ± 0.42 ***
模型组	14.24 ± 0.54 #	21.83 ± 0.50 ###	31.85 ± 0.73 ###
人参提取物	16.20 ± 1.27 ***	21.89 ± 0.96 ###	32.89 ± 0.38 * &
总皂苷	15.52 ± 0.74 *	21.57 ± 0.90 ###	32.47 ± 0.73 #
二醇皂苷	15.61 ± 0.38 *	21.73 ± 0.53 ###	32.43 ± 0.44 #
三醇皂苷	15.25 ± 0.80	21.37 ± 1.01 ###	32.02 ± 0.69 #

与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$,与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$,各给药组与三醇皂苷组比,& $P<0.05$; $n=6$

3.9 人参各组分对血虚模型大鼠血常规-血小板参数的影响
与空白组比较,模型组大鼠血浆中血小板(platelet,PLT)和血小板压积(platelet crit,PCT)显著降低($P<0.001$);血小板分布宽度(platelet distribution width,PDW)、平均血小板体积(mean platelet volume,MPV)和大型血小板比率(platelet larger cell ratio,P-LCR)显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。给药后,模型大鼠血小板指标都有改善。4 个药物均可显著增加模型大鼠血浆中 PLT 和 PCT($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$),降低 MPV 和 P-LCR

水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而二乙醇皂苷作用最强($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);人参提取物、总皂苷和二乙醇皂苷能显著降低 PDW($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。与三乙醇皂苷组比较,人参提取物、总皂苷和二乙醇皂苷组大鼠血浆中 PDW 水平显著降低,其余指标各给药组间没有统计学差异。以上结果可以得出,4 个人参组均可改善血虚大鼠的血小板参数。见表 9。

3.10 人参各组分对血虚模型大鼠血清中造血因子的影响 模型组大鼠血清中血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(gran-

ulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)水平均显著低于空白组($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。给药 3 周后,各给药大鼠血清中 TPO、EPO 和 GM-CSF 水平均有提升,其中人参提取物和总皂苷显著增加 TPO 水平($P < 0.05$);4 个组分均可提升 EPO 水平,但与模型组无统计学差异($P > 0.05$);4 个组分均可显著增加 GM-CSF($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。3 个指标在各给药组间无统计学差异。以上结果得出,4 个组分均可改善血虚模型大鼠血清造血因子。见表 10。

表 8 人参各组分对血虚模型大鼠网织红细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

样品	RET / $K \cdot \mu L^{-1}$	IRF / %	LRF / %	MRF / %	HRF / %
空白组	402.98 \pm 20.20 [*]	44.45 \pm 1.73 [*]	55.97 \pm 1.26 ^{**}	26.27 \pm 1.83	18.18 \pm 0.97 ^{**}
模型组	293.08 \pm 25.68 ^{##}	54.55 \pm 4.4 [#]	44.63 \pm 4.51 ^{###}	27.98 \pm 2.0	26.57 \pm 6.11 ^{###}
人参提取物	368.70 \pm 41.83 [*]	44.44 \pm 6.10 ^{**}	55.63 \pm 6.12 ^{**}	29.37 \pm 1.88	15.07 \pm 4.38 ^{***&}
总皂苷	403.20 \pm 61.67 ^{**}	44.47 \pm 6.19 [*]	55.53 \pm 6.19 ^{**}	26.70 \pm 2.38	17.77 \pm 4.75 ^{**}
三乙醇皂苷	377.08 \pm 57.85 [*]	49.16 \pm 4.54	53.84 \pm 4.54	28.32 \pm 2.01	20.84 \pm 3.75
二乙醇皂苷	368.25 \pm 74.55 [*]	51.73 \pm 7.25	48.27 \pm 7.25	29.33 \pm 4.25	22.40 \pm 3.52

与空白组比较,^{*} $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 和^{###} $P < 0.001$,与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 和^{**} $P < 0.01$,各给药组与三乙醇皂苷组比,[&] $P < 0.05$; $n = 6$

表 9 人参各组分对血虚模型大鼠血小板的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	PLT / $K \cdot \mu L^{-1}$	PCT / %	PDW / %	MPV / fL	P-LCR / %
空白组	1091.75 \pm 56.10 ^{***}	0.84 \pm 0.06 ^{***}	7.30 \pm 0.23 ^{***}	7.80 \pm 0.21 ^{**}	4.50 \pm 0.90 ^{***}
模型组	637.80 \pm 131.17 ^{###}	0.54 \pm 0.10 ^{###}	8.20 \pm 0.28 ^{###}	8.35 \pm 0.27 ^{##}	8.48 \pm 1.06 ^{###}
人参提取物	888.75 \pm 122.84 [*]	0.73 \pm 0.09 [*]	7.26 \pm 0.30 ^{**&}	7.93 \pm 0.26 [*]	5.84 \pm 1.51 ^{**}
总皂苷	934.33 \pm 138.96 ^{**}	0.76 \pm 0.13 ^{**}	7.42 \pm 0.41 ^{**&}	8.08 \pm 0.20 [*]	6.70 \pm 1.28 [*]
二乙醇皂苷	1014.33 \pm 190.56 ^{***}	0.81 \pm 0.17 ^{***}	7.29 \pm 0.12 ^{***&}	7.90 \pm 0.15 ^{**}	5.85 \pm 0.89 ^{**}
三乙醇皂苷	914.75 \pm 191.57 [*]	0.72 \pm 0.12 [*]	7.99 \pm 0.52 ^{##}	8.00 \pm 0.17 [*]	5.90 \pm 1.30 ^{**}

与空白组比较,^{*} $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 和^{###} $P < 0.001$,与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 和^{***} $P < 0.001$,各给药组与三乙醇皂苷组比,[&] $P < 0.05$ 和[&] $P < 0.01$; $n = 6$

表 10 人参各组分对血虚模型大鼠血清造血因子的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	TPO / $pg \cdot mL^{-1}$	EPO / $mIU \cdot mL^{-1}$	GM-CSF / $pg \cdot mL^{-1}$
空白组	14.94 \pm 1.61 ^{**}	22.35 \pm 2.19 ^{**}	21.08 \pm 1.99 ^{***}
模型组	11.45 \pm 1.22 ^{##}	18.57 \pm 1.72 ^{##}	17.23 \pm 1.11 ^{###}
人参提取物	13.95 \pm 0.62 [*]	20.47 \pm 1.31	19.45 \pm 1.17 [*]
总皂苷	13.96 \pm 2.88 [*]	20.66 \pm 1.40	19.51 \pm 1.86 ^{**}
二乙醇皂苷	13.06 \pm 2.03	20.12 \pm 2.12	19.76 \pm 0.80 ^{**}
三乙醇皂苷	13.38 \pm 0.44	20.16 \pm 1.09	19.39 \pm 0.74 [*]

与空白组比较,^{*} $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 和^{###} $P < 0.001$,与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 和^{***} $P < 0.001$; $n = 3$

4 讨论

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是一种细胞毒性化疗药物,同时属于烷化剂类免疫抑制剂,可破坏 DNA 结构,阻断复制,从而导致细胞死亡^[22]。环磷酰胺和乙酰苯肼联用是常用造血虚模型的方法,此方法引起小鼠骨髓超微结构发生改变,破坏造血微环境,骨髓各类细胞数量减少^[7]。本研究中环磷酰胺和乙酰苯肼严重影响大鼠的体质量、WBC、RBC、RET、PLT、血清造血相关因子等指标,与之前的报道相一致,表明大鼠血虚模型造模成功^[23]。给药 3 周后,与模型组比较,人参提取物、总皂苷、二乙醇皂苷和三乙醇皂苷对环磷酰胺和乙酰苯肼造血虚模型大鼠的治疗作用中发现,4 个组分均能改善血虚模型大鼠的体质量、血常规和血清造血因子等指标,综合比较人参提取物对血虚模型大鼠的治疗作用最强。

人参作为我国的名贵中药材,其药效物质一直是研究的热点。人参中化学成分包括皂苷类、多糖类、挥发油、蛋白质、氨基酸、维生素、微量元素等^[24]。目前研究认为人参中皂苷类和多糖类成分是重要的活性成分。本研究中人参提取物采用水煎煮的方法制备^[25],经过水提醇沉,大孔吸附树脂、阳离子树脂、脱色树脂等进行吸附洗脱之后得到人参总皂苷、二乙醇皂苷和三乙醇皂苷^[26]。通过对 4 个组分进行皂苷单体、总皂苷、单糖和氨基酸含量分析,发现 4 个组分中二乙醇皂苷中总皂苷含量最高为 87.32%,

其次是三乙醇皂苷(86.20%)和总皂苷(81.09%),人参提取物中总皂苷含量最低,为 4.39%。在单糖分析中,人参提取物中总糖含量最高,为 76.36%,其次是二乙醇皂苷为 75.16%和总皂苷为 74.12%,三乙醇皂苷中总糖含量相对最低,为 70.33%。4 个组分中总糖的含量相差不多,而皂苷含量差异较大。在人参提取物中的糖主要为单糖(葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖等)、二糖(麦芽糖、蔗糖、乳糖等)、多糖(淀粉、纤维素、糖原、木糖等)、结合糖(糖脂、糖蛋白等)和来自皂苷中的糖;而 3 个皂苷组分中的糖主要为结合糖,是与皂苷元一起组成的单糖,主要因为人参提取物经过乙醇沉淀、过滤、阳离子树脂脱色等步骤,将游离的单糖、多糖和部分结合糖等去除。本实验中采用 4 mol/L 三氟乙酸将样品中的多糖和结合糖水解为单糖,进一步衍生后测定 4 个组分中单糖的组成和含量,根据单糖的含量计算总糖的含量;而皂苷是由皂苷元和糖组成,因此三个皂苷组分中糖含量也特别高。在 4 个组分中,人参提取物中的糖是具有生物学功能的,而 3 个皂苷组分中的糖是与皂苷元结合后发挥药物活性的,不具有单独的功能。佟彤等^[27]报道人参多糖对环磷酰胺诱导的免疫低下的小鼠的炎症有明显的改善作用,同时在维持免疫系统稳态中起到重要作用。Song 等^[28]分离纯化得到的人参多糖 FGEP-CA 主要包含鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸和葡萄糖,可明显改善环磷酰胺诱导的免疫低下大鼠的脾脏和胸腺指数,白细胞的数量、血清细胞因子等指标。人参中多糖类成分可调节肠道菌群稳态,促进有益菌的功能,抑制有害菌的产生^[29],在乙酰苯肼和环磷酰胺诱导的血虚模型大鼠的治疗过程中起到重要的作用。

在皂苷的质谱鉴定中,二乙醇皂苷中 Ra₂、Ra₁、Ro 和 Iva 为特有的, Rb₂、Rb₃、Rd、Rd₂、20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃ 和 Rg₅ 等含量较高;三乙醇皂苷鉴定到 20(R)-Rg₂、F₁、Rg₆、Rh₄ 和 Rh₃ 为特有的, R₁、Rg₁、Rf、R₂、20(S)-Rg₂ 和 F₄ 等含量相对较高;其它皂苷在二乙醇和三乙醇皂苷均含有。三乙醇皂苷中总皂苷含量为 86.20%,二乙醇皂苷中总皂苷含量为 87.32%。在人参总皂苷、二乙醇皂苷和

三醇皂苷对血虚模型大鼠的治疗作用比较中,我们发现三醇皂苷的作用显著低于人参总皂苷和二醇皂苷。Yang 等^[30]研究达玛烷型皂苷能有效的保护环磷酸胺诱导的免疫低下小鼠,其中三醇型皂苷占 33%,二醇型皂苷占 16%。因此我们认为人参总皂苷中二醇皂苷起着更重要的作用。韩旻等^[31]研究发现分别在大鼠皮下注射 Rg₁ 和 Rb₁, 10h 后 Rg₁ 和 Rb₁ 胆汁排泄累积量分别为给药剂量的 61.48% 和 3.94%;灌胃给药 12h 后, Rg₁ 和 Rb₁ 胆汁排泄累积量分别为给药剂量的 0.91% 和 0.055%;Rg₁ 和 Rb₁ 的血浆蛋白结合率分别为 6.56% ~ 12.74% 和 80.11% ~ 89.69%。Rg₁ 在胃、肠和肝的通过率 (FS、FI 和 FH) 分别为 49.85%、13.05% 和 50.56%;Rb₁ 分别为 25.82%、4.18% 和 65.77%。因此肠壁吸收差是 Rg₁ 和 Rb₁ 生物利用度低的主要原因。Rg₁ 具有较高的胆汁排泄和较低的血浆蛋白结合率, Rb₁ 的胆汁排泄较低,而血浆蛋白结合率较高。Rb₁ 的肠黏膜透过性和体内消除速度都低于 Rg₁,但前者的平均滞留时间 (MRT) 和血药浓度曲线下面积 (AUC) 均大于后者。Rb₁ 和 Rg₁ 分别为二醇型皂苷和三醇型皂苷的代表性成分,同一类型的皂苷在体内吸收、分布、代谢和排泄的规律相似;因此三醇型皂苷比二醇型皂苷在体内吸收和消除的较快^[32,33]。同时研究发现, Rb₁ 在酸、酶、肠道菌等作用下可水解产生 XVII, Rd, F2, CK 和 PPD 等^[34]; Rg₁ 水解产生 Rh1 和 PPT;水解产生的中间产物具有较高的生物活性,在体内有更高的生物利用度^[35]。CK 是皂苷 Rb₁、Rb₂ 和 Rc 的重要中间产物,研究发现 CK 能显著改善环磷酸胺诱导的免疫抑制大鼠的外周血常规水平和骨髓造血功能,增加造血因子 (TPO、EPO 和 GM-CSF) 水平,恢复骨髓细胞周期和增加集落形成^[36]。综合以上二醇型皂苷在乙酰苯肼和环磷酸胺诱导的血虚模型大鼠的治疗中起到重要作用。

在氨基酸分析中,人参提取物中总氨基酸含量最高为 5.632%,其次是总皂苷为 1.407%。人参提取物经过多步的乙醇洗脱,破坏了蛋白质中的氢键,使蛋白质变性、析出,因此纯化步骤的增加导致氨基酸含量降低^[37],特别是在二醇皂苷和三醇皂苷中氨基酸含量极低,分别为 0.137% 和 0.123%。严梦思等^[38]研究发现土鳖虫多肽能保护正常和免疫抑制小鼠的胸腺和脾脏,提高单核/巨噬细胞的吞噬功能,提高正常和免疫抑制小鼠的免疫能力。刁静静^[39]采用 Sephadex G-15 层析法分离纯化得到 P3 绿豆肽,包括 Lys、Asp、Asn、Val、Ile、Ser、Glu、Leu、Phe、Pro、Arg 等氨基酸,可显著改善环磷酸胺致免疫低下小鼠的脾脏状态,增加小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力,同时提出免疫活性与多肽的分子量、氨基酸含量、疏水性及二级机构性质相关。在本研究中 Glu、Arg 和 Asp 在人参提取物中含量较高;在总皂苷中 Arg、Met 和 Glu 含量相对较高。人参提取物和总皂苷中的蛋白质类成分经过体内胃肠代谢,水解成寡肽或氨基酸而起作用^[40]。Glu 是一种酸性氨基酸,是肠上皮的主要能源物质,参与蛋白质的合成和氧化供能^[41],还具有改善肠道完整性、增强肠道屏障功能和抗氧化能力,提高肠道干细胞的活性和促进肠道发育的作用^[42]。Arg 属于半必需氨基酸,在饥饿、创伤、应激及快速生长等状态下需要体外摄取满足机体需要。精氨酸在精氨酸酶和一氧化碳合酶的作用下分解为鸟氨酸、尿素、一氧化氮 (NO) 和瓜氨酸,间接参与血管舒张、调节免疫功能、减少细胞发炎、预防感染等过程^[43]。Asp 是酸性氨基酸,属非必须氨基酸,它是生物体内赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸等氨基酸及嘌呤、嘧啶碱基的合成前体。它可作为 K⁺、Mg²⁺ 离子的载体向心肌输送电解质,从而改善心肌收缩功能,同时降低氧消耗,在冠状动脉循环障碍缺氧时,对心肌有保护作用。它参与鸟氨酸循环,促进氧和二氧化碳生成尿素,降低血液中氮和二氧化碳的量,增强肝脏功能,消除疲劳^[44]。Met 是含硫的必需氨基酸,可通过缓解氧化应激,参与免疫调节过程,促进肠道消化吸收和维持肠道的屏障功能^[45]。白玉洁等^[46]比

较醇提取物和水提取物对环磷酸胺诱导免疫低下小鼠的作用发现两种方法制备的提取物均能不同程度改善模型小鼠的免疫功能,但水提取物的治疗效果最好。醇提取物中蛋白质和多糖类成分多数被弃掉^[47],主要为皂苷类等醇溶性的成分,而水提取物中包含大量的蛋白质、多糖、皂苷等水溶性的成分。Zhou 等^[29]比较人参多糖和人参皂苷对疲劳和急性冷应激大鼠的治疗作用,研究发现人参多糖改善了人参皂苷的肠道代谢和吸收,同时恢复了肠道菌群紊乱,尤其促进了两种主要的人参皂苷代谢菌 - 乳酸菌和拟杆菌的生长。Shen 等^[48]研究发现人参多糖可通过增强微生物对 Rb₁ 去糖基化和增加 Rb₁ 在小肠的暴露和吸收,进而减轻右旋糖酐硫酸钠诱导的结肠炎样症状。因此我们认为人参提取物中糖、蛋白质和皂苷对环磷酸胺和乙酰苯肼诱导的血虚模型大鼠的治疗作用起到重要的作用。

本文通过比较人参提取物、总皂苷、二醇皂苷和三醇皂苷对乙酰苯肼和环磷酸胺诱导的血虚模型大鼠的治疗作用中发现,4 个组分对模型大鼠均具有一定的治疗作用,其中人参提取物的作用较好,能显著改善血虚模型大鼠的各项指标,表明多糖、蛋白质和皂苷等成分的协同作用比单纯的高含量的皂苷效果更好。本文的结果支持了中药经典汤剂在疾病预防和治疗中的科学化和合理化。

参考文献:

- [1] 陈 颖, 黄 琦. 人参皂苷免疫调节作用的研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2014, 15(5): 75.
- [2] 姜卫卫, 刘 嘉. 人参皂苷 Rb₁、Rg₃、Rh₂ 抗肿瘤作用与机制概况[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2013, 15(7): 1634.
- [3] 黄 鑫, 陈 雪, 王恩鹏, 等. 人参对血虚小鼠抗疲劳作用及其机制研究[J]. 特产研究, 2019, 41(2): 54.
- [4] 宋 齐. 人参化学成分和药理作用研究进展[J]. 人参研究, 2017, 29(2): 47.
- [5] 姚梦杰, 吕金朋, 张 乔, 等. 人参化学成分及药理作用研究[J]. 吉林中医药, 2017, 37(12): 1261.
- [6] 孙成鹏, 高维平, 赵宝中, 等. D101C 大孔吸附树脂分离提纯原人参二醇皂苷研究[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(6): 90.
- [7] 徐章猛, 周 静, 冯栋宏, 等. 环磷酸胺诱导气虚体质大鼠模型的探索性研究[J]. 四川中医, 2020, 38(5): 90.
- [8] 刘 啸, 祝彼得, 徐 浩, 等. 再生障碍性贫血小鼠造模方法的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2004, 21(4): 17.
- [9] Sun Y, Guo M, Feng Y, et al. Effect of ginseng polysaccharides on NK cell cytotoxicity in immunosuppressed mice [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016, 12(6): 3773.
- [10] Zhang QH, Wu CF, Lian D, et al. Protective effects of total saponins from stem and leaf of Panax ginseng against cyclophosphamide - induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(1): 293.
- [11] Balaji R, Rekha S, Jangwoo S, et al. Panax ginseng Modulates Cytokines in Bone Marrow Toxicity and Myelopoiesis; Ginsenoside Rg₁ Partially Supports Myelopoiesis [J]. Plos One, 2012, 7(4): e33733.
- [12] Wei X, Fei S, Su X, et al. Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg₃ on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4): 636.
- [13] Saba E, Lee YY, Kim MK, et al. A comparative study on immune - stimulatory and anti - oxidant activities of various types of ginseng extracts in murine and rodent models [J]. Journal of ginseng research, 2018, 42(4): 577.
- [14] Wang Z, Zheng Q, Liu K, et al. Ginsenoside Rh(2) enhances antitumour activity and decreases genotoxic effect of cyclophosphamide [J]. Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology, 2010, 98(4): 411.
- [15] Han J, Xia J, Zhang L, et al. Studies of the effects and mechanisms of

- ginsenoside Re and Rk3 on myelosuppression induced by cyclophosphamide[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2019, 43(4): 618.
- [16] Han J, Wang Y, Cai E, et al. Study of the Effects and Mechanisms of Ginsenoside Compound K on Myelosuppression[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019, 67(5): 1402.
- [17] 蔡 雄, 刘中秋, 王培训, 等. 大孔吸附树脂富集纯化人总皂苷工艺[J]. *中成药*, 2001, 23(9): 631.
- [18] 孙成鹏, 高维平, 赵宝中, 等. D101C 大孔吸附树脂分离提纯原人参二醇皂苷研究[J]. *东北农业大学学报*, 2013, 44(6): 90.
- [19] Zuo T, Zhang C, Li W, et al. Offline two-dimensional liquid chromatography coupled with ion mobility-quadrupole time-of-flight mass spectrometry enabling four-dimensional separation and characterization of the multicomponents from white ginseng and red ginseng[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, 10(6): 597.
- [20] 张春霞. 人参皂苷系统表征多技术比较人参属多品种中药同时鉴别研究[D]. 天津中医药大学硕士学位论文, 2020.
- [21] 李珂珂, 杨秀伟. 人参茎叶化学成分的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2012, 14(1): 47.
- [22] 宋 雁, 贾旭东, 崔文明, 等. 不同途径和剂量环磷酸腺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25(3): 218.
- [23] Sun C, Jian Y, Pan L, et al. Improvement of icaritin on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced myelosuppression mice[J]. *Immunopharmacology & Immunotoxicology*, 2018, 40(1): 1.
- [24] 张 彩, 史 磊. 人参化学成分和药理作用研究进展[J]. *食品与药品*, 2016, 18(4): 300.
- [25] 杨秀伟, 张 雷. 人参水煎煮的科学性探索—水煎煮引发人参皂苷化学结构的转化[J]. *中国现代中药*, 2019, 21(8): 1009.
- [26] 张崇禧, 郑友兰, 张春红, 等. 大孔树脂吸附人参总皂苷工艺及再生使用的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38(9): 661.
- [27] 佟 彤, 董文茜, 梁晓雨, 等. 人参多糖免疫调节作用的实验研究[J]. *北京中医药*, 2016, 35(1): 41.
- [28] Song YR, Sung SK, Jang M, et al. Enzyme-assisted extraction, chemical characteristics, and immunostimulatory activity of polysaccharides from Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 116: 1089.
- [29] Zhou SS, Xu J, Zhu H, et al. Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22474.
- [30] Yang Y, Xu S, Xu Q, et al. Protective effect of dammarane sapogenins against chemotherapy-induced myelosuppression in mice[J]. *Experimental Biology & Medicine*, 2011, 236(6): 729.
- [31] 韩 旻, 傅 韶, 方晓玲. 三七皂苷中人参皂苷 Rg1 与 Rb1 口服吸收及其体内药代动力学的研究和比较[J]. *药学报*, 2007, 42(8): 849.
- [32] Kong LT, Wang Q, Xiao BX, et al. Different pharmacokinetics of the two structurally similar dammarane sapogenins, protopanaxatriol and protopanaxadiol, in rats[J]. *Fitoterapia*, 2013, 86: 48.
- [33] 徐利云, 杨志宏, 孙晓波. 达玛烷型人参皂苷的药物代谢动力学研究概述[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(1): 8.
- [34] Quan LH, Piao JY, Min JW, et al. Biotransformation of Ginsenoside Rb1 to Prosapogenins, Gypenoside XVII, Ginsenoside Rd, Ginsenoside F2, and Compound K by *Leuconostoc mesenteroides* DC102[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2011, 35(3): 344.
- [35] Li Z, Jin H, Nam A, et al. Korean ginseng berry fermented by mycotoxin non-producing *aspergillus niger* and *aspergillus oryzae*: ginsenoside analyses and anti-proliferative activities[J]. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2016, 39(9): 1461.
- [36] Han J, Wang Y, Cai E, et al. Study of the effects and mechanisms of ginsenoside compound K on myelosuppression[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019, 67: 1402.
- [37] 曹红光, 李燕妮. 硫酸软骨素中蛋白质类杂质去除方法研究[J]. *食品与药品*, 2018, 20(4): 257.
- [38] 严梦思, 李兴暖, 赵 勇, 等. 土鳖虫多肽对正常和免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(8): 1940.
- [39] 刁静静. 绿豆肽对小鼠巨噬细胞免疫活性的影响及其作用机制[D]. 黑龙江八一农垦大学博士学位论文, 2019.
- [40] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和, 等. 蛋白质的消化吸收及其功能评述[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 375.
- [41] Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: a truly functional amino acid[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(3): 413.
- [42] Wu X, Zhang Y, Liu Z, et al. Effects of oral supplementation with glutamate or combination of glutamate and N-carbamylglutamate on intestinal mucosa morphology and epithelium cell proliferation in weanling piglets[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(Suppl. 4): 337.
- [43] 孙红暖, 杨海明, 王志跃, 等. 精氨酸对动物的营养生理及免疫作用[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(1): 54.
- [44] Hevia EM, Morales DM. L-aspartic acid for the treatment of assorted health problems[P]: US, US20060183803 A1. 2006.
- [45] 冯 艳, 杨 琳, 朱勇文, 等. 蛋氨酸调控动物主要生理功能的机制[J]. *中国科学*, 2019, 49(3): 228.
- [46] 白玉洁, 郑斯文, 郑厚胜, 等. 生晒参不同提取物对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. *人参研究*, 2019, 31(1): 9.
- [47] 张黎明, 朱 丽, 李 雪, 等. 玉屏风总多糖水提醇沉工艺条件优化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(1): 24.
- [48] Shen H, Gao XJ, Li T, et al. Ginseng polysaccharides enhanced ginsenoside Rb1 and microbial metabolites exposure through enhancing intestinal absorption and affecting gut microbial metabolism[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 216: 47.