

## 银杏叶复方对脾虚证小鼠肠道推进功能、 抗疲劳和抗氧化作用的影响

李 焰<sup>1,2</sup>, 杨小燕<sup>1,3</sup>, 黄其春<sup>1,2</sup>, 王 华<sup>1,2</sup>

(1. 龙岩学院生命科学学院, 龙岩 364000; 2. 福建省高校预防兽医学重点实验室, 龙岩 364000;  
3. 福建省人畜寄生与病毒性疫病防控工程技术研究中心, 龙岩 364000)

**摘 要:** 采用利血平复制脾虚证小鼠模型, 观察银杏叶复方对脾虚证小鼠肠道推进功能、抗疲劳和抗氧化作用的影响。结果表明, 与脾虚模型组相比, 银杏叶复方能显著提高脾虚证小鼠肠道推进率和游泳时间 ( $P<0.05$ ), 显著提高小鼠肝糖原 (HG) 含量 ( $P<0.01$ )、血清过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活力 ( $P<0.05$ ), 显著减少血清中乳酸 (LD)、尿素氮 (BUN) 和一氧化氮 (NO) 含量 ( $P<0.05$ )。银杏叶复方是通过减轻血清中过量的一氧化氮对机体的损伤作用, 参与调节肠道运动功能, 提高了脾虚证小鼠肠道吸收功能; 银杏叶复方的抗疲劳作用则与其降低运动后血清尿素氮含量, 提高肝糖元的储备量, 增强清除乳酸能力有关。

**关键词:** 银杏叶复方; 脾虚证; 肠道推进功能; 抗疲劳; 抗氧化作用; 小鼠

中图分类号: S816.79

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)02-0170-04

### Effects of Ginkgo biloba compound on small intestine movement, antifatigue and antioxidant in mice of spleen deficiency induced by Reserpine

LI Yan<sup>1,2</sup>, YANG Xiao-yan<sup>1,3</sup>, HUANG Qi-chun<sup>1,2</sup>, WANG Hua<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Longyan University, Longyan 364000;

2. Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Educational Commission of Fujian Province, Longyan 364000;

3. Fujian Engineering Research Center for Prevention and Control of Zoonosis and Viral Diseases; Longyan 364000)

**Abstract:** To study the effect of Ginkgo biloba compound on small intestine movement, antifatigue and antioxidant, the experiments were observed using the model mice of spleen deficiency syndrome induced by reserpine. The results showed that Ginkgo biloba compound could increased the propulsive rate of intestines and swimming time of mice ( $P<0.05$ ); increased the content of hepatic glycogen (HG) in the test mice ( $P<0.01$ ) and the activities of peroxidase (POD) and catalase (CAT) in the test mice serum ( $P<0.05$ ). It decreased the content of lactic acid (LD), urea nitrogen (BUN) and nitric oxide (NO) comparing to the model of spleen deficiency syndrome groups ( $P<0.05$ ). Ginkgo biloba compound can participate and improve the function of intestine movement and absorption in mice by decreasing the damage result from excessive NO in serum. Ginkgo biloba compound has the function of anti-fatigue by decreasing the content of BUN in serum after movement and increasing the content of HG and the ability of clearing away LD in serum.

**Key words:** Ginkgo biloba compound; spleen deficiency syndrome; propulsive rate of intestines in mice; antifatigue; antioxidant; mice

银杏是世界上残存的植物活化石之一, 作为中生代的孑遗植物, 为中国特有。银杏叶味甘、苦、涩, 性平。归心、肺经, 具有敛肺, 平喘, 活血化

瘀, 止痛的功效<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明银杏叶及其提取物具有改善心脑血管循环、降低血脂、提高机体免疫力、抗菌消炎、延缓衰老等功效<sup>[2]</sup>。我国

收稿日期: 2011-09-07

基金项目: 福建省科技厅重点项目(2011N0024), 福建省科技厅资助省属高校科研专项项目 (JK2010057) 和福建省龙岩市科技局资助项目 (2009LY17) 共同资助。

作者简介: 李 焰, 女, 副教授。E-mail: tina680605@tom.com

银杏树占全世界总量的 70% 以上, 国外 90% 银杏叶药用货来源于我国, 为充分保护和利用这种珍贵资源, 采用现代高科技, 系统研究开发应用银杏叶制剂, 防治疾病, 前景积极可观。但我国对银杏叶的开发利用尚处于起步阶段, 落后于世界上一些先进国家, 较长时间停留在叶子出口或提取粗产品的水平, 高层次深度开发和根据祖国中医药理论对银杏复方制剂的研究尚少, 造成了国有资源的浪费<sup>[3]</sup>。目前临床上银杏叶制剂和复方银杏叶制剂多用于治疗心血管疾病, 有关银杏叶及其复方制剂对畜禽疾病防治且作为畜禽饲料添加剂的报道, 不仅十分少见, 并且只停留在单方制剂(银杏叶提取物)这个小范围内探讨, 还很缺乏在银杏叶复方制剂这方面的深入研究。因此, 作者以健脾益气、养阴活血化瘀中医理论为指导, 将经典的健脾益气方“四君子汤”进行化裁, 利用银杏叶与党参、黄芪、白术等中草药配制成银杏叶复方制剂, 研究银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠各种生理机能的影响。在前期研究中, 发现银杏叶复方制剂对实验性脾虚证小鼠的脾、肾和肝脏功能有良好的保护作用, 同时对脾虚证小鼠的消化酶活性有保护作用, 并可通过降低血清中丙二醛(MDA)含量, 提高超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性, 达到清除自由基, 维持膜功能稳定的作用<sup>[4]</sup>。在此基础上, 拟进一步研究银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠肠道推进功能、抗疲劳和抗氧化作用的影响, 为深入开发和利用银杏叶复方制剂提供科学的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 银杏叶复方制备** 银杏叶复方制备方法参照前期研究结果, 制得每 mL 含有 1 g 生药的浓缩液<sup>[4]</sup>。

**1.1.2 利血平注射液** 1 mg·mL<sup>-1</sup> 利血平注射液, 由广东邦民制药有限公司生产, 产品批号 080307。

**1.1.3 试验动物** 6 周龄清洁级 KM 种小鼠, 雌性, 体质量 23~26 g, 购于上海斯莱克实验动物有限公司, 合格证编号 2007000502350。

**1.1.4 实验性脾虚证模型小鼠的建立** 依据中医脾虚证诊断参考标准<sup>[5]</sup>。选择利血平造脾虚模型, 通过动物试验, 以小鼠便溏、食欲减少、消瘦、呆立、群聚、活动明显减少等明显脾虚体征为脾虚证模型复制成功, 确定小鼠脾虚证模型使用利血平剂量为 0.2 mL·kg<sup>-1</sup>。

### 1.2 试验动物分组

KM 种小鼠 120 只, 雌性, 随机分为对照组、

脾虚模型组和银杏叶复方组。每组设 5 个重复, 每个重复 8 只小鼠。对照组给予生理盐水, 分别腹腔注射 (0.2 mL·kg<sup>-1</sup>) 和灌胃 (0.3 mL·只<sup>-1</sup>); 脾虚模型组给予利血平腹腔注射 (0.2 mL·kg<sup>-1</sup>) 和生理盐水灌胃 (0.3 mL·只<sup>-1</sup>), 于第 3 天出现与文献报道相符的症状; 银杏叶复方组给予利血平腹腔注射 (0.2 mL·kg<sup>-1</sup>) 和银杏叶复方灌胃 (0.3 mL·只<sup>-1</sup>)。每天给药 1 次, 连续 14 d。

### 1.3 测定指标与方法

**1.3.1 小鼠肠道推进功能的测定** 小鼠在结束造模后, 从每个重复组取 1 只小鼠, 禁食 1 夜, 于次日上午每只灌胃伊红美蓝 0.5 mL, 记录给药时间, 给药 15 min 后, 将各小鼠断颈椎处死, 迅速剖开腹腔, 找到胃幽门和回盲部, 剪断小肠肠管, 分离肠系膜, 小心置于湿润的搪瓷盘内, 轻轻将肠管摆成直线。测量小肠的总长度和伊红美蓝在肠内移动的距离(即幽门至肠内伊红美蓝最前沿处的长度), 计算伊红美蓝移动率。公式如下:

伊红美蓝移动率(%) = 伊红美蓝在肠内移动的距离/小肠的总长度 × 100

**1.3.2 小鼠游泳时间的测定** 末次灌胃给予受试物 30 min 后, 从每个重复组取 1 只小鼠, 分别放入单独长 70 cm, 宽 50 cm, 深 50 cm, 水温 25℃ 的水箱中游泳, 记录每只小鼠自放入水槽至口鼻沉没水面以下 > 5 s 的时间, 此时即为小鼠游泳耗竭的时间<sup>[6]</sup>。

**1.3.3 血清乳酸、肝糖原和血清尿素氮含量测定** 末次灌胃给予受试物 30 min 后, 从每个重复组取 2 只小鼠, 在温度为 25℃ 的水中游泳 90 min 并休息 60 min 后眼眶采血, 血清以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集血清放 -20℃ 冰箱待测; 然后剖取肝脏, 经生理盐水漂洗后用滤纸吸干, 精确称取 75 mg。LD、HG 和 BUN 含量用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定, 试剂配制和操作步骤按说明书进行。

**1.3.4 血清抗氧化指标的测定** 小鼠在结束造模后, 禁食 1 夜, 于次日上午从每个重复组取 2 只小鼠, 眼眶取血, 血清以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集血清放 -20℃ 冰箱待测。NO、CAT、POD 含量均用购自南京建成生物工程研究所的试剂盒测定, 试剂配制和操作步骤按说明书进行。

### 1.4 数据处理

采用 SPSS10.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析和 Duncan 氏多重比较, 结果以平均值 ± 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠肠道推进功能和抗疲劳作用的影响

如表 1 所示,脾虚模型组小鼠肠道推进率低于对照组和银杏叶复方组差异显著( $P<0.05$ );脾虚模

型组小鼠游泳耐力显著低于对照组和银杏叶复方组( $P<0.05$ );银杏叶复方组小鼠 LD 含量显著低于对照组和脾虚模型组( $P<0.05$ );脾虚模型组小鼠 HG 含量极显著低于对照组和脾虚模型组( $P<0.01$ );脾虚模型组小鼠 BUN 含量则显著高于对照组和银杏叶复方组( $P<0.05$ )。

表 1 银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠肠道推进功能和抗疲劳作用的影响

Table 1 Effects of Ginkgo biloba compound on small intestine movement and antifatigue in mice of spleen deficiency induced by Reserpine

项目 Item	对照组 Control group	脾虚模型组 Spleen deciciency group	银杏叶复方组 Ginkgo biloba compound group
肠道推进率/% Propulsive rate of intestines	0.36±0.04 <sup>a</sup>	0.23±0.05 <sup>b</sup>	0.35±0.07 <sup>a</sup>
耐力/min Physical stamina	161.22 ± 19.21 <sup>a</sup>	101.45 ± 6.30 <sup>b</sup>	150.66 ± 10.78 <sup>a</sup>
乳酸/mmol·L <sup>-1</sup> LD	11.41 ± 0.73 <sup>a</sup>	10.62 ± 1.24 <sup>a</sup>	8.35 ± 0.20 <sup>b</sup>
肝糖原/mg·g <sup>-1</sup> HG	27.92 ± 2.33 <sup>A</sup>	7.48 ± 1.24 <sup>B</sup>	14.56 ± 1.15 <sup>C</sup>
尿素氮/mmol·L <sup>-1</sup> BUN	6.46 ± 0.58 <sup>a</sup>	34.61 ± 2.54 <sup>b</sup>	7.83 ± 0.83 <sup>a</sup>

注:同行数据后相同小写字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母者表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母者表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

Note: In the same row, the data followed with the same small letters mean no significant difference at the 0.05 level, while those with different small letters mean significant difference at the 0.05 level. The data followed with different capital letters mean significant difference at the 0.01 level. The same below.

表 2 银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠血清抗氧化指标的影响

Table 2 Effects of Ginkgo biloba compound on serum antioxidant in mice of spleen deficiency induced by Reserpine

项目 Item	对照组 Control group	脾虚模型组 Spleen deciciency group	银杏叶复方组 Ginkgo biloba compound group
一氧化氮/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NO	39.92±12.70 <sup>a</sup>	91.31±16.89 <sup>b</sup>	54.78±10.38 <sup>a</sup>
过氧化物酶/U·mL <sup>-1</sup> POD	22.93±3.87 <sup>a</sup>	11.26±2.73 <sup>b</sup>	22.17±2.12 <sup>a</sup>
过氧化氢酶/U·mL <sup>-1</sup> CAT	3.63±1.49 <sup>a</sup>	1.24±0.37 <sup>b</sup>	3.42±0.99 <sup>a</sup>

### 2.2 银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠血清抗氧化指标的影响

如表 2 所示,脾虚模型组小鼠血清 NO 含量显著高于对照组和银杏叶复方组( $P<0.05$ );脾虚模型组血清 POD 和 CAT 活力显著低于对照组和银杏叶复方组( $P<0.05$ )。

小肠推进运动无明显影响,但能增加脾虚动物小肠推进运动,后者与临床实际相符,与补气药健脾益气功效相符,是健脾益气功效在肠功能中的体现<sup>[8]</sup>。本试验中,脾虚模型小鼠的肠道推进功能低于正常对照组,而银杏叶复方能增加脾虚小鼠的肠道推进功能,与“四君子汤”作用相符,说明银杏叶复方亦具有健脾益气功效。

## 3 小结与讨论

### 3.1 银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠肠道推进功能和抗氧化作用的影响

胃肠运动在食物消化吸收中起着重要作用,胃肠运动过快过慢均不利于食物的消化吸收。脾虚动物胃肠运动缺乏动力,胃肠蠕动减弱,加之消化酶活性减弱,小肠吸收功能下降,故而出现腹泻<sup>[7]</sup>。本试验用的银杏叶复方是以健脾益气、养阴活血化瘀中医理论为指导,将经典的健脾益气方“四君子汤”进行化裁,利用银杏叶与党参、黄芪、白术等中草药配制而成,研究表明“四君子汤”能改善因利血平致脾虚动物胃肠运动障碍,对正常在体动物

研究证实 NO 是非肾上腺素能非胆碱能(NANC)抑制性神经递质,可介导平滑肌的松弛效应,在胃肠道蠕动反射中产生下行性抑制作用,在胃肠道内广泛分布,并对胃肠黏膜具有双重效应,即保护效应和损伤效应,同时对胃肠运动和内脏感觉起调节作用。当 NO 含量减少时,胃肠运动加快;反之,减慢<sup>[9]</sup>。本试验中脾虚小鼠血清 NO 含量显著高于对照组和银杏叶复方组,而肠道推进功能显著低于对照组和银杏叶复方组,说明血清中过量的 NO 减弱了脾虚小鼠的肠道推进功能。研究还表明,血清 NO 还在机体的衰老变化中起一定作用。若体内 NO 生成不足则 NO 介导的生理过程无法实现,而过量

NO 则会通过与蛋白质、脂肪、核酸等生物分子的相互作用而损伤机体组织, 破坏细胞和机体稳态, 对机体产生毒性作用<sup>[10]</sup>。本试验中, 银杏叶复方制剂能显著降低脾虚证小鼠血清 NO 含量, 说明银杏叶复方不仅提高了脾虚证小鼠的肠道推进功能, 还能减轻血清中过量的 NO 对机体的损伤作用。

CAT 能催化过氧化氢分解成水和氧, 而 POD 能催化过氧化氢氧化其他物质, 并生成水, 从而消除自由基对细胞的毒性<sup>[11]</sup>。在本试验中, 脾虚模型组小鼠 CAT 和 POD 的活性较对照组均显著降低 ( $P<0.05$ ), 而用银杏叶复方进行预防的小鼠 POD 和 CAT 的活性则显著增加 ( $P<0.05$ )。作者在前期研究中还发现, 脾虚模型组小鼠 SOD 和 GSH-PX 的活性较对照组均显著降低 ( $P<0.01$ ), MDA 含量较对照组显著升高 ( $P<0.01$ ); 用银杏叶复方进行预防小鼠血清中 MDA 含量极显著低于脾虚模型组 ( $P<0.01$ ), 而 SOD 和 GSH-PX 的活性显著高于脾虚模型组 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )<sup>[4]</sup>。综合以上试验结果, 证明了自由基参与脾虚证的产生、抗氧化酶活性降低是脾虚的病理基础之一, 而银杏叶复方不仅能提高抗氧化酶的活性, 也能消除自由基细胞的毒性, 具有维持膜功能稳定的作用。

综上所述, 银杏叶复方制剂具有健脾益气和抗氧化作用, 首先是与方中各味药的健脾和抗氧化作用分不开<sup>[4]</sup>。其次, 银杏叶性味甘、苦、涩、平, 归心、肺经, 有敛肺, 平喘, 活血化瘀, 止痛之功效, 就五行生克关系而言, 心属火, 脾属土, 火又生土, 故银杏叶有利脾之功效。而方中黄芪、党参、白术、茯苓均为补气健脾药, 黄芪补脾肺之气, 升阳固表; 党参长于补中; 茯苓兼能除湿, 中湿得除, 脾自健运; 白术温运脾阳, 燥湿利水, 使方温而不燥。所以五味药相须相使, 相得益彰。

### 3.2 银杏叶复方对实验性脾虚证小鼠抗疲劳作用的影响

疲劳是肌肉不能产生所要求的或预想的收缩力, 所谓抗疲劳, 是指延缓疲劳的产生或加速疲劳的消除。疲劳的产生主要表现在活动所需的基质耗竭、基质的生理化学状态改变、代谢产物堆积、调节和协调机能失调及运动能力下降等方面。因此, 可选择运动耐力、运动所需的能源物质 HG 及运动代谢产物 BUN 和 LD 作为疲劳的评价指标<sup>[12]</sup>。本试验中, 银杏叶复方组小鼠 LD 和 BUN 含量显著低于脾虚模型组, 说明银杏叶复方不仅能减少运动时 LD 的堆积, 还能减轻运动时机体利用蛋白质供能

的程度; 而银杏叶复方组小鼠 HG 含量极显著高于脾虚模型组, 说明银杏叶复方可增加肝细胞糖原含量。乳酸、尿素氮、自由基都是机体运动过程中产生、并能引起机体疲劳的物质, 本试验中, 银杏叶复方能延长小鼠的游泳时间, 降低了运动后 BUN 浓度, 提高 HG 的储备量, 增强清除 LD 能力。以上作用首先与复方中含有多种植物多糖, 如银杏叶多糖、党参多糖、茯苓多糖、黄芪多糖有关, 当动物自身运动消耗过大时, 都可将植物多糖转化为葡萄糖, 从而提高动物的游泳时间。其次, 与银杏叶的提取物 (EGb) 中黄酮类活性物质改善了骨骼肌的血液循环, 促进新陈代谢的作用有关。银杏叶中的黄酮类物质能使肌肉中的微动脉血管显著扩张, 血流量增加, 能及时给机体补充氧气和其他能量物质, 并将代谢产物及时运走, 对运动后疲劳的消除具有重要的促进作用<sup>[13]</sup>, 从而提高肌肉的抗疲劳能力。

### 参考文献:

- [1] 侯家玉, 方泰惠. 中药药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [2] 黄其春, 何玉琴, 李焰, 等. 银杏叶提取物的免疫调节作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(2): 278-280.
- [3] 梁淑轩, 孙汉文. 银杏叶资源开发利用研究进展[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2003, 26(2): 204-207.
- [4] 李焰, 王华, 周孝琼, 等. 银杏叶复方对实验性脾虚证模型小鼠消化酶活性和抗氧化性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(21): 52-55.
- [5] 沈自尹. 中医虚辨证参考标准[J]. 中西医结合杂志, 1986, 7(10): 598-600.
- [6] 王克芳, 徐长庆, 李志超, 等. 冬虫夏草抗小鼠运动性疲劳的作用及机制研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37(4): 311-314.
- [7] 彭成, 雷载权. 四君子汤对消化、运动、吸收作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 1995(5): 6-8.
- [8] 彭成. 试论中药药理动物模型[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(5): 47-49.
- [9] 张利棕, 徐剑钦. 脾虚型 IBS 模型 WHBE 兔的抗氧化活性研究[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(4): 273-276.
- [10] 温仲民. 自由基, 一氧化氮与衰老[J]. 医学综述, 1999, 5(9): 388-389.
- [11] 邹思湘. 动物生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 166-168.
- [12] 何来英, 严卫星, 楼密密, 等. 左旋肉碱的抗疲劳作用[J]. 中国自然医学杂志, 2004, 6(3): 146-148.
- [13] 谢伟, 杨永亮, 郑红英. 银杏叶提取物对小鼠抗运动性疲劳能力影响的实验研究[J]. 山东体育学院学报, 2004, 20(5): 51-53.