

文章编号:1001-6880(2014)3-0324-05

牛大力多糖对小鼠抗疲劳作用的研究

罗 轩²,林翠梧²,陈洁晶³,温艳蓉²,朱艺萍²,莫 静²,李典鹏^{1*}¹广西植物研究所 广西植物功能物质研究与利用重点实验室,桂林 541006; ²广西大学 化学化工学院,南宁 530004; ³广西代谢性疾病研究重点实验室(中国人民解放军第 181 医院),桂林 541002

摘要:本文以牛大力(*Millettia speciosa* Champ.)为对象,利用小鼠爬杆和负重游泳为实验模型,研究了其多糖的抗疲劳作用。实验随机将小鼠分为五组,分别为空白对照组、阳性药(人参蜂王浆,7 mL/kg)对照组、牛大力多糖低剂量组[212.5 mg/(kg·d)]、中剂量组[425 mg/(kg·d)]、高剂量组[850 mg/(kg·d)],灌胃给药14 d后,考察其对小鼠爬杆时间、负重游泳时间以及血乳酸(LD)、血乳酸脱氢酶(LD-H)、血中尿素氮(BUN)含量的影响。结果表明,牛大力多糖能延长小鼠爬杆时间,增加小鼠游泳耐力,降低 LD、BUN 的含量,提高血中 LD-H 含量。且中剂量的药效与阳性药对照组的基本相当。

关键词:牛大力;多糖;抗疲劳;血乳酸;血乳酸脱氢酶;血清尿素氮

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

In vivo Anti-fatigue Effect of Polysaccharides from *Millettia speciosa* Champ.

LUO Xuan², LIN Cui-wu², CHEN Jie-jing², WEN Yan-rong², ZHU Yi-ping², MO Jing², LI Dian-peng^{1*}¹Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, China;²School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; ³Guangxi Key laboratory of Metabolic Diseases Research, Guilin 181st Hospital, Guilin 541002, China

Abstract: In this paper, the anti-fatigue effect of polysaccharides from *Millettia speciosa* Champ. (NDLs) was studied by models of mice pole-climbing and loaded swimming. Mice were grouped randomly to create five groups, including negative control group; positive control (ginseng royal jelly, 7 mL/kg); and polysaccharide groups at low, medium, and high doses [212.5, 425, 850 mg/(kg·d)]. All groups were treated by gavage for 14 consecutive days. The pole-climbing time, loaded swimming time, the values of blood lactic acid, blood lactate dehydrogenase-L, and blood urea nitrogen were determined. The results indicated that NDLs can significantly prolong the pole-climbing and loaded swimming time of mice, reduce the levels of blood lactic acid and blood urea nitrogen, and improve the content of blood lactate dehydrogenase-L when compared with the control group ($P < 0.05$). Furthermore, the effect of the medium dose group was similar to that of positive control group and was not improved obviously after the dose doubled. Based on the above results, it was concluded that NDLs have an excellent anti-fatigue effect and 425 mg/(kg·d) maybe the limit of gavage after considered absorption effects of mice.

Key words: *Millettia speciosa* Champ.; polysaccharides; anti-fatigue; blood lactic acid; blood lactate dehydrogenase-L; blood urea nitrogen

牛大力为豆科(Leguminosae)崖豆藤属(*Millettia*)植物美丽崖豆藤(*Millettia speciosa* Champ.)的根,民间还称其为猪脚笠、山莲藕、金钟根、倒吊金钟、大力薯,分布福建、台湾、广西、广东、湖北、贵州、

收稿日期:2013-01-11 接受日期:2013-05-20

基金项目:广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金课题(FPRU2011-4);广西代谢性疾病研究重点实验室开放基金课题(181H2011-02);广西大学“大学生创新创业训练计划”项目(1201037);广西自然科学基金青年基金项目(2013GXNSFBA019024)

* 通讯作者 Tel:86-013635187786; E-mail:ldp@gxib.cn

江西等地,具有舒筋活络、润肺滋肾、清热止咳等功效^[1]。自上世纪 70 年代起,牛大力被制药企业加工成众多中成药。在《中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂》^[2]中有 17 种中成药的处方中含有牛大力。而民间(特别在广东、香港等地)则将其作为滋补养身的炖汤原料,用于四肢乏力,产后虚弱,大病初愈。同时,在牛大力产地的一些中药企业,正在对其进行产品开发,包括将牛大力(或其提取物)与其它食材制作成汤料包,提高其保健作用与产品附加值。

目前,从牛大力分离鉴定出了31个化学成分,包括:八个酚甙、13个黄酮类化合物、四个紫檀烷类化合物以及圆齿火棘酸、(-)-丁香脂素、dihydrodehydrodiconiferyl alcohol、5-羟甲基糠醛、 α -甲氧基-2,5-呋喃二甲醇和2,5-二羟基苯甲酸^[3-7]。同时,暨南大学的郑元升^[8]对牛大力多糖的组成的活性进行了初步研究,表明组成多糖的单糖成分主要为鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖。与此同时,对牛大力提取物活性研究表明,其水提物具有祛痰、镇咳、平喘、抗炎、增强免疫力和保肝的作用^[9-13];其多糖具有较好的抗炎和抗肿瘤作用^[8];有进一步深入开发利用的前景。特别是近几年,不少研究人员选择食品和中药(尤其是药食同源的中药)作为研究对象,且研究结果表明这些食品和中药的多糖都具有比较好的抗疲劳作用。因此,本研究将在前期研究的基础上进一步探讨牛大力多糖的抗疲劳作用,为综合开发牛大力提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

昆明种小鼠,SPF级(合格证号:SCXK桂2009-0002),雌雄各半,体质量18~22 g,由广西医科大学实验动物中心提供。

牛大力粗多糖(NDL,含量为62.3%),多糖中单糖组成主要为鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖^[8],由本实验室提供;阳性药人参蜂王浆,北京市东风保健营养品有限责任公司产品;乳酸(LD)测试盒,南京建成生物工程研究所产品;尿素氮(BUN)测试盒、乳酸脱氢酶(LDH-L)测试盒,均为长春汇力生物技术有限公司产品。

爬杆架;游泳桶(大小约40 cm × 60 cm),自制;JMA20002电子天平(余姚纪铭稳重校验设备有限公司);722型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);LG16-W型离心机(北京医用离心机厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药

昆明种小鼠50只(18~22 g),雌雄各半,随机分成空白对照组(NC),阳性药人参蜂王浆(7 mL/kg)组(PC),牛大力提取物高、中、低剂量组(NDL-H、NDL-M、NDL-L),每组10只。NDL-H、NDL-M、NDL-L组按850、425、212.5 mg/(kg·d)进行给药。除NC组每天灌胃给予等体积的蒸馏水外,其余各

组按照20 mL/kg体重灌胃相应药液,1次/d,连续14 d,灌喂期间自由摄食饮水。

1.2.2 小鼠一般情况与体重记录

每天观察小鼠的饮食、精神、毛发、大小便等情况。3 d称重1次,共5次,记录体重变化情况。

1.2.3 小鼠爬杆实验^[14,15]

各组小鼠连续给药14 d,在第13 d给药后30 min,将小鼠进行爬杆训练,将不会爬杆的小鼠淘汰。在第14 d给药后30 min,将小鼠置于长48 cm、直径1.0 cm的玻璃棒上,记录小鼠自置于杆上至肌肉疲劳无力从杆上滑落下来所用的时间作为小鼠爬杆时间。

1.2.4 小鼠负重游泳实验^[14,15]

各组小鼠连续给药14 d,末次给药后30 min,给小鼠尾负重5%体重的铅丝,放入水温28±1°C,水深不小于50 cm的游泳桶中游泳,用秒表记录自游泳开始至头部沉入水中8 s不能浮出水面的时间为力竭游泳时间。小鼠力竭游泳后,从小鼠眼眶静脉丛取血约1 mL,待血液凝固后,3000 rpm离心10 min分离血清,取上清液,待用。

1.2.5 运动后小鼠血清乳酸、乳酸脱氢酶和尿素氮含量测定

取血清上清液20 μL(尿素氮含量测定取10 μL),参照试剂盒说明书方法进行相关含量测定和计算。血清乳酸含量按公式(1)计算,乳酸脱氢酶和尿素氮含量按公式(2)计算。

$$\text{血清中乳酸含量}(\text{mmol/L}) =$$

$$\frac{\text{(测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \times \text{标准浓度}(3 \text{ mmol/L}) \times \text{样本稀释倍数}}{\text{(标准管吸光度} - \text{空白管吸光度})}$$

(1)

$$C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times C_{\text{标}} \quad (2)$$

式中:C_样为样品管浓度;A_样为样品管吸光度值;A_标为标准液吸光度值;C_标为标准液浓度。

1.3 统计分析

应用SPSS 21.0软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态分布数据,采用单因素方差分析t检验,不满足正态分布数据用秩和检验,显著性水平设在 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 牛大力多糖对小鼠体重的影响

实验过程中对小鼠体重进行称量和比较发现,在饲料量不加控制而自由摄食的情况下,各剂量

NDL 对雌、雄小鼠体重增长均有不同程度影响,具体数据见表 1。

表 1 NDL 对小鼠体重的影响($n = 5, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of NDLS on mice's body weight($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别 Group		初体重 Initial body weight (g)	最终体重 The final body weight (g)	体重增量 Weight increment (g)	体重增加率 The increasing rate of weight (%)
空白对照组 NC	雌性组	22.0 ± 1.0	27.4 ± 1.3	5.4 ± 1.4	24.5
阳性对照组 PC		21.8 ± 1.0	25.9 ± 0.8	4.1 ± 0.8	18.8
牛大力多糖低剂量组 NDL-L		22.6 ± 1.6	27.8 ± 2.5	5.2 ± 1.2	23.0
牛大力多糖中剂量组 NDL-M		23.0 ± 1.6	28.5 ± 1.9	5.5 ± 0.7	23.9
牛大力多糖高剂量组 NDL-H		23.9 ± 1.2	29.1 ± 1.0	5.2 ± 1.0	21.7
空白对照组 NC	雄性组	24.1 ± 1.6	34.6 ± 2.2	10.6 ± 0.8	44.0
阳性对照组 PC		23.0 ± 1.5	32.8 ± 1.0	9.8 ± 1.8	42.6
牛大力多糖低剂量组 NDL-L		23.6 ± 0.4	33.5 ± 1.8	9.9 ± 1.6	41.9
牛大力多糖中剂量组 NDL-M		22.5 ± 0.9	31.5 ± 1.3	8.9 ± 1.8	39.6
牛大力多糖高剂量组 NDL-H		23.8 ± 1.8	32.0 ± 1.8	7.7 ± 1.1	32.3

从表 1 可知, 雌性的 NDL-L、NDL-M 和 NDL-H 组小鼠实验末均重与初始均重相比较分别增加了 23.0%、23.9% 和 21.7%, 都低于雌性 NC 组的 24.5%。雄性的 NDL-L、NDL-M 和 NDL-H 组小鼠实验末均重与初始均重相比较分别增加了 41.9%、39.6% 和 32.3%, 都低于雄性 NC 组的 44.0%。

2.2 牛大力多糖对小鼠运动耐力的影响

从表 2 数据说明, 小鼠喂服牛大力多糖后,

表 2 NDL 对小鼠爬杆时间及其游泳时间的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of NDLS on the pole-climbing and loaded swimming time of mice($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	爬杆实验 The pole-climbing assay			游泳实验 The loaded swimming assay	
	时间 Time (min)	延长率 The rate of change (%)	时间 Time (min)	延长率 The rate of change (%)	
空白对照组 NC	0.91 ± 0.55		7.70 ± 3.97		
阳性对照组 PC	2.45 ± 0.92 **	169.9	12.90 ± 6.27 *	67.6	
牛大力多糖低剂量组 NDL-L	1.35 ± 0.99	49.5	5.08 ± 3.75 ^a	-34.0	
牛大力多糖中剂量组 NDL-M	2.45 ± 0.85 **	169.2	12.67 ± 5.38 *	64.6	
牛大力多糖高剂量组 NDL-H	2.78 ± 1.87 **	206.4	13.60 ± 5.67 *	72.9	

注:a. NDL-L 组在游泳实验中有一只小鼠负重脱落,因此 $n = 9$ 。与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note:a. In NDL-L group, $n=9$, because the load on the mouse tail dropped. Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.3 牛大力多糖对小鼠血乳酸含量的影响

表 3 数据说明, 各受试组小鼠在连续喂服牛大力多糖 14 d 并负重游泳后, 血乳酸含量与 NC 组对比有明显下降($P < 0.05$)。与爬杆和游泳时间得出的规律类似, NDL-M 组的血乳酸含量降低率与

NDL-L 组的数据与 NC 组对比, 无显著性差异。而 NDL-M 和 NDL-H 组小鼠在爬杆和游泳时间与 NC 组对比具有极显著性差异($P < 0.01$), 且接近或好于 PC 组数据, 说明牛大力多糖能够提高小鼠的运动耐力, 具有延长小鼠运动时间的功能, 且最低起效浓度在 212.5 mg/kg, 当浓度达到 425 mg/kg 时, 与 7 mL/kg 人参蜂王浆的功效基本相当。

PC 组基本一致, 而当喂服牛大力多糖浓度提高一倍后, 对运动后血乳酸含量降低的影响非常有限, 因此 425 mg/kg 的牛大力多糖可能是喂服小鼠的极限值。超过该值后, 对小鼠运动后血乳酸含量的降低没有明显影响。

表 3 NDL 对小鼠血乳酸含量的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of NDLs on blood lactic acid of mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	泳后乳酸含量 The content of blood lactic acid after swimming (mmol/L)	降低率 The rate of change (%)
空白对照组 NC	107.7 ± 65.8	
阳性对照组 PC	57.6 ± 37.7 *	46.6
牛大力多糖低剂量组 NDL-L	64.6 ± 14.3	40.3
牛大力多糖中剂量组 NDL-M	57.4 ± 34.5 *	46.7
牛大力多糖高剂量组 NDL-H	56.3 ± 19.0 *	47.7

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$.

2.4 牛大力多糖对小鼠血乳酸脱氢酶含量的影响

表 4 数据表明,连续喂服牛大力多糖 14 d,且进行负重游泳后,各受试组小鼠的血乳酸含量与 NC 组对比,均有明显下降($P < 0.05$),说明牛大力多糖可以通过乳酸脱氢酶加速分解乳酸以及减少运动中乳酸的生成,达到延缓疲劳产生的效果。

表 4 NDL 对小鼠血乳酸脱氢酶含量的影响($n = 8, \bar{x} \pm s$)
Table 4 Effect of NDLs on blood lactate dehydrogenase-L of mice ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	泳后乳酸脱氢酶含量 The content of blood lactate dehydrogenase-L after swimming (mmol/L)	增加率 The rate of change (%)
空白对照组 NC	985.6 ± 398.0	
阳性对照组 PC	1926.5 ± 758.0 **	95.5
牛大力多糖低剂量组 NDL-L	1742.4 ± 707.4 **	76.8
牛大力多糖中剂量组 NDL-M	2009.9 ± 828.9 **	103.9
牛大力多糖高剂量组 NDL-H	1710.8 ± 610.2 *	73.6

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.5 牛大力多糖对小鼠血清尿素氮含量的影响

表 5 数据反映了在负重游泳后,各受试组小鼠尿素氮含量的变化趋势。实验结果表明,牛大力多糖能明显减少运动后小鼠血清尿素氮的产生,使小鼠更能适应大强度的运动。该组数据的变化规律与前三个数据的变化规律略有不同。当牛大力多糖喂服量达最高值时,其对小鼠血清尿素氮含量的影响与 PC 组基本相当。

3 结论

疲劳的评价方法主要有运动耐力试验和生化改

表 5 NDL 对小鼠血清尿素氮含量的影响($n = 5, \bar{x} \pm s$)
Table 5 Effect of NDLs on serum urea nitrogen of mice ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	泳后血清尿素氮含量 The content of serum urea nitrogen after swimming (mmol/L)	降低率 The rate of change (%)
空白对照组 NC	14.7 ± 4.7	
阳性对照组 PC	8.5 ± 4.1 *	42.3
牛大力多糖低剂量组 NDL-L	11.0 ± 0.9 *	25.3
牛大力多糖中剂量组 NDL-M	9.5 ± 0.9 *	34.9
牛大力多糖高剂量组 NDL-H	8.8 ± 3.7 *	39.8

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$.

变的检测。运动耐力的提高是抗疲劳能力加强最直接的表现。游泳和爬杆时间的长短可以反映动物运动疲劳(动态和静态)的程度,因此一直以来被作为反映运动耐力的重要指标。实验结果表明,比 NC 组小鼠的力竭游泳和爬杆时间对比,牛大力多糖可明显延长小鼠力竭游泳和爬杆时间,降低运动后小鼠血乳酸和尿素氮水平,提高乳酸脱氢酶水平,说明牛大力多糖在提高机体对运动负荷的适应能力,提高运动耐力和快速消除代谢废物方面有很明显的作用。根据抗疲劳保健食品的评价程序和检验方法,若一项以上(含一项)运动实验和两项以上(含两项)生化指标为阳性,即可判断该受试物具有抗疲劳作用^[16]。

根据表 1 小鼠体重的变化,以及实验中对小鼠体型的观察(高剂量组小鼠都明显较 NC 组瘦长),NDL 可能具有一定毒性,对小鼠体重的增长具有一定的抑制作用,且抑制作用在雄性中更为明显。而表 2 至表 5 的结果表明,NDL-M 组小鼠的各项数据与 PC 组的数据非常相近,说明该剂量的牛大力多糖与 7 mL/kg 人参蜂王浆的功效基本相当。当牛大力多糖喂服含量提高一倍后,小鼠的爬杆和游泳时间并没有大幅度提高,且乳酸脱氢酶的影响出现下降,这可能是由于“超量抑制效应”造成的^[17]。有关牛大力多糖发挥抗疲劳作用的具体机制尚有待于进一步研究探讨,以扩展牛大力资源在医药、保健等领域应用。

参考文献

- 1 Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). Dictionary Traditional Drugs (中药大辞典). Shanghai: Shanghai Scien-

- tific and Technical Press, 1986. 194.
- 2 The Central People's Government of the People's Republic of China(中华人民共和国卫生部). Drug Standard for Traditional Drug Prescription Preparation(中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂). Beijing: Capital Normal University Press, 1998. Vol. 1-20.
- 3 Yin T, Liang H, Wang B, et al. A new flavonol glycoside from *Millettia speciosa*. *Fitoterapia*, 2010, 81: 274-275.
- 4 Yin T, Tu GZ, Zhang QY, et al. Three new phenolic glycosides from the Caulis of *Millettia speciosa*. *Magn Reson Chem*, 2008, 46: 287-391.
- 5 Zhang SY, Yin T, Ling XM, et al. Interactions between thrombin and natural products of *Millettia speciosa* Champ. using Capillary Zone Electrophoresis. *Electrophoresis*, 2008, 29: 3391-3397.
- 6 Wang CH(王春华), Wang Y(王英), Wang GC(王国才), et al. Chemical constituents from roots of *Millettia speciosa*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2008, 39: 972-975.
- 7 Zong XK(宗鑫凯), Lai FL(赖富丽), Wang ZN(王祝年), et al. Study on chemical constituents from roots of *Millettia speciosa*. *J Chin Med Mat*(中药材), 2009, 32: 520-521.
- 8 Zheng YS(郑元升). Studies on extract techniques and pharmacological activities of polysaccharide from *Millettia speciosa* Champ. Guangzhou: Jinan University (暨南大学), MSc. 2009.
- 9 Liu DD(刘丹丹), Tang LH(唐立海), Wang Y(王艳), et al. Experimental study on the expectorant, antitussive and antiasthmatic effects of radix *Millettia speciosae*. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*(广州中医药大学学报), 2009, 26: 266-269.
- 10 Lv SJ(吕世静), Huang KL(黄槐莲), Wu NX(吴宁夏). The effects on antibodies and IL-2 by *Millettia speciosa*. *Shanghai J Immu*(上海免疫学杂志), 1997, 17: 56.
- 11 Wei CP(韦翠萍), Liu DD(刘丹丹), Tang LH(唐立海), et al. Effect of radix *Millettia speciosae* on mice immune function. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*(广州中医药大学学报), 2009, 26: 539-542.
- 12 Shi Y(石焱), Gong XX(弓小雪), Na J(那婕). Immuno-regulatory effects of polysaccharide on immunosuppressed mice. *Clin J Med Offic*(临床军医杂志), 2008, 36: 530-532.
- 13 Zhou TN(周添浓), Liu DD(刘丹丹), Tang LH(唐立海), et al. Experimental study on Hepatic-protective effects of radix *Millettia speciosae*. *Lishizhen Med Mat med Res*(时珍国医国药), 2008, 20: 2585-2587.
- 14 The Central People's Government of the People's Republic of China(中华人民共和国卫生部). The Standard Evaluation Procedure and Examination Method of Health Foods in Functional Science(保健食品功能学评价程序和检验方法规范). Beijing: Peking University Press, 2003. 87-89.
- 15 Huang YW(黄业伟), Zhang DY(张冬英), Shao WF(邵宛芳), et al. Anti-fatigue effect of black tea. *Food Sci*(食品科学), 2011, 32: 218-220.
- 16 Cai DL(蔡东联). Practical Handbook of dietitian(实用营养师手册). Beijing: People's Medical Publishing House, 2009. 418-454.
- 17 Zhang M(张民), Wang JH(王建华), Gan L(甘璐), et al. Study on *Lycium barbarum* polysaccharide-4. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2003, 29(2): 22-25.