

红参皂甙药理作用的昼夜变化¹

李经才、郑前娟、金春花、马汝孟 (沈阳药学院生理教研室, 沈阳 110015)

提要 依时间药理学原理和方法, 研究红参皂甙(GS)对小鼠的影响。昼夜12h光-暗迭替, 每隔4h测定。对照组血清皮质酮、脑内5-HT、5-羟吲哚乙酸、肝糖原、DNA、RNA及蛋白质合成均呈现明显昼夜变化。投药后, GS各项药效均成为一天中时间的函数, 周期性地改变, 其作用强弱或有无, 取决于给药的昼夜阶段。

关键词 人参; 皂甙类; 生理昼夜节律; 皮质酮; 肝糖原; 脱氧核糖核酸; 核糖核酸; 蛋白质; 血清素; 羟吲哚乙酸

多种药物的作用呈现昼夜节律变化⁽¹⁾。人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)系滋补强壮药, 药理作用广泛, 报道颇多^(2,3), 但其昼夜节律效应资料尚少。为此选用与滋补作用密切相关的指标, 以红参皂甙(GS)为材料, 研究其对小鼠肾上腺皮质、脑内5-羟色胺(5-HT)系统及肝脏物质代谢的影响与给药时辰的关系。试图揭示GS药理依昼夜阶段变化的规律, 为基础研究和合理用药提供依据。

材料与方 法

昆明种♂小鼠480只, 体重 $20 \pm SD$ 1.3g, 为我院动物室提供。小鼠分窝后即移入密闭室中饲养, $22 \pm 2^\circ C$, 相对湿度60-70%, 荧光灯60lx照明, 自动启闭。07:30-19:30为光期, 其余12h为暗期。每笼4鼠, 任意摄食饮水。每天08:00-09:00喂饲清扫。小鼠在上述环境适应2wk以上用于实验。

药品 辽宁省桓仁县产红参(6yr生), 提取并精制⁽⁴⁾成浅黄色结晶性粉末人参根皂甙(GS)。用香草醛-硫酸反应检测, 皂甙含量为96.4%。原二醇组与原三醇组皂甙比为1:0.7, 其中含有14种单体皂甙, 包括红参特征性成份Rh₂、Rg₃、20(R)Rh₁和20(R)Rg₁。皮质酮为荷兰Organon公司出品, 5-羟色胺硫酸肌酐和5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)为瑞士产品, DNA、RNA、牛血清白蛋白、糖原均为Sigma厂产品, 其余试剂为市售AR级。

测定方法 小鼠断头, 取躯干血分离血清,

1986年10月4日收稿 1987年4月27日接受

¹国家自然科学基金资助课题 No 386075

用 Hitachi 650-60 型荧光分光光度计测血清皮质酮⁽⁵⁾。鼠头放入干冰中冷冻, 然后取全脑, 测 5-HT 和 5-HIAA 的含量⁽⁶⁾。肝糖原和肝葡萄糖测定用微量比色法⁽⁷⁾。DNA 与 RNA 的提取和检测按定量测定法⁽⁸⁾, 该法的优点是简便省时数据稳定。蛋白质测定依 Folin-phenol 法⁽⁹⁾。上述各项指标, 标准品的回收率为 $98 \pm 2\%$ ($n = 7$)。

每项测定, 在昼夜 24 h 中皆进行 6 次。一律 ip 给药, 注药时间视测定项目而定。但所有实验均于 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 或 24:00, 在动物饲养室尽快杀鼠取材, 避免应激刺激。以平均时辰图 (mean chronogram)⁽¹⁰⁾ 展示药物效应的节律特征。

结 果

GS 对血清皮质酮的影响 小鼠 96 只, 一昼夜中每隔 4 h, 进行 6 次测定 (以下实验相同)。每次用鼠 16 只, 其中给药组 8 鼠 ip 70 mg/kg; 对照组 8 鼠, ip 同容量生理盐水。均于 50 min 后杀鼠取血清测定皮质酮。对照组血清皮质酮昼夜变化非常明显 ($p < 0.01$)。光期开始皮质酮含量最低, 暗期开始达到全天的最高峰。如图 1 A 和 B 所示。由给药组可见, 昼夜不同时辰 GS 均促使血清皮质酮含量升高, 但变化幅度不同。08:00 GS 的作用最显著, 小鼠血清皮质酮增加 7 倍。04:00, 12:00, 16:00, 24:00 与对照组比较亦差异显著 ($p < 0.01$)。而 20:00 GS 作用相对较弱, 皮质酮仅增 1.3 倍。给药后皮质酮昼夜节律模式 (pattern) 发生改变, 峰值出现在 08:00, 谷值在 20:00, 两值比较, $p < 0.05$ 。可见 07:10 投药效最强, 19:10 投药效果较差。

GS 对全脑 5-HT 和 5-HIAA 的影响 全脑 5-HT 和 5-HIAA 用同一小鼠分别测定。ip GS 200 mg/kg 或生理盐水 2 h 后取材。由图 1 E 和 F 可见, 5-HT 呈现明显昼夜节律。对照组脑内 5-HT 含量光期较高, 峰值在 12:00; 暗期含量下降, 谷值在 24:00。昼夜节律的振

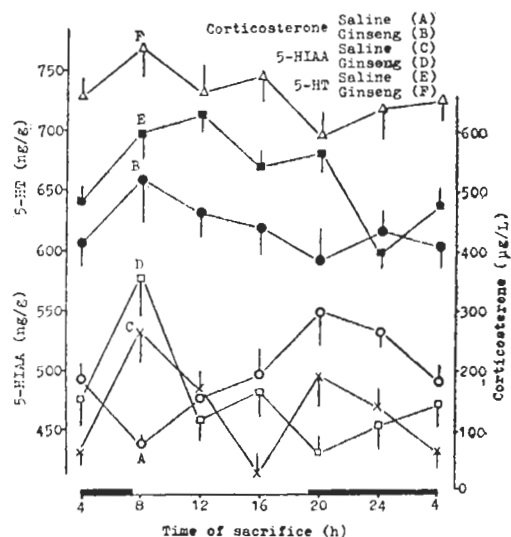


Fig 1. Effect of ginseng saponins on circadian rhythms of serum corticosterone (70 mg/kg, ip), 5-HT (200 mg/kg, ip) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA 200 mg/kg, ip) in mice. $n = 8$, $\bar{x} \pm SD$. The horizontal bar illustrates the light-dark cycle.

幅较小, 峰值比谷值高 21%, 但其差异显著 ($p < 0.05$)。给药组昼夜节律模式改变, 08:00 出现峰值, 20:00 为谷值。与对照组比较, 04:00, 08:00, 16:00 和 24:00 脑内 5-HT 含量显著升高 ($p < 0.05$); 而 12:00 和 20:00 GS 作用不显著 ($p > 0.05$)。

对照组脑内 5-HIAA 昼夜节律呈双峰型 (图 1 C 和 D)。08:00 和 20:00 出现大、小两峰, 提示此时脑内 5-HT 利用增多, 代谢加速。谷值出现在 16:00 和 04:00。5-HT 第一峰值与夜行动物睡眠开始和自发活动减少的时相一致, 第二峰值与肾上腺皮质激素分泌高峰吻合。投与 GS 后, 04:00, 08:00 和 16:00 5-HIAA 升高 ($p < 0.05$), 在 12:00 和 24:00 变化不大, 而在 20:00 降低 ($p < 0.05$)。表明 GS 对 5-HT 代谢的影响因时而异。

GS 对肝糖原和肝葡萄糖的影响 GS 100 mg/kg ip 小鼠, 给药后 8 h 杀鼠取肝。以新鲜肝重计糖原含量, 结果见图 2 A、B。光期为鼠类休息期, 肝糖原积累占优势; 暗期为鼠类活动时间, 肝糖原利用增强。昼夜不同时辰投

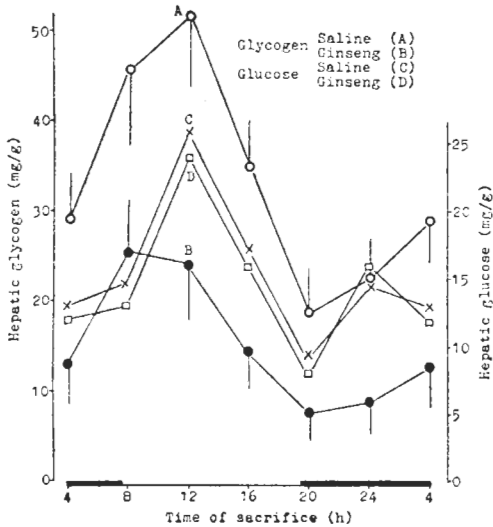


Fig 2. Effect of ip ginseng saponins 100 mg/kg on circadian rhythms of hepatic glycogen and glucose in mice. $n = 8$, $\bar{x} \pm SD$. The horizontal bar illustrates the light-dark cycle.

与 GS 皆使肝糖原下降。光期降低幅度较大, 12:00 变化最显著(04:00 投药), 下降 28 mg/kg; 暗期下降较少, 20:00 仅下降 11 mg/g. 给药后峰值在 08:00 出现。

肝葡萄糖含量亦有昼夜节律。对照组小鼠不同时辰变化的模式与肝糖原相似, 表明两者有依从关系, 唯振幅较小。经 GS 处理后, 肝葡萄糖无明显变化(图 2 C、D)。

GS 对肝脏 DNA、RNA 和蛋白质合成的影响 小鼠禁食 12-14 h, 杀鼠取肝前 6 h, ip GS 100 mg/kg 或 0.9% NaCl, 在同一小鼠测定 DNA 和 RNA。结果如图 3 所示。小鼠肝脏核酸昼夜节律呈双峰型。对照组 DNA 第一峰值较高在 08:00, 第二峰值较低在 20:00 出现; 16:00 和 04:00 为谷值。峰值与谷值比较, $p < 0.05$ 。昼夜不同时辰投与 GS 均可使肝脏 DNA 含量升高。16:00 药效最强(10:00 投药)。给药组小鼠 DNA 的变化几乎与对照组节律平行。

小鼠肝脏 RNA 与 DNA 比较, 两者昼夜节律曲线相近, 第二峰值均在暗期开始出现, 但第一峰值位相向后推移 4 h。将最低值与其

他值比较 $p < 0.05$ 。投药后, 16:00、20:00、24:00 和 04:00 肝 RNA 含量增长显著。表明 GS 促进 DNA 合成也促进 RNA 合成, 但其效应可因给药的时辰而有所不同。

肝脏蛋白质的测定, 小鼠禁食 12-14 h, 取材前 10 h 投与 GS 100 mg/kg 或 0.9% NaCl。肝脏蛋白质含量的昼夜变化与核酸近似, 但第一峰值推迟到 16:00 出现, 第二峰值变得不甚明显。昼夜节律的振幅变小, 最高值比最低值高 18% ($p < 0.05$)。投予 GS 后蛋白质合成增强(图 3)。除 04:00 外, GS 均有显著作用 ($p < 0.05$), 其中以 20:00(10:00 投药)刺激肝脏蛋白质合成的作用最显著。

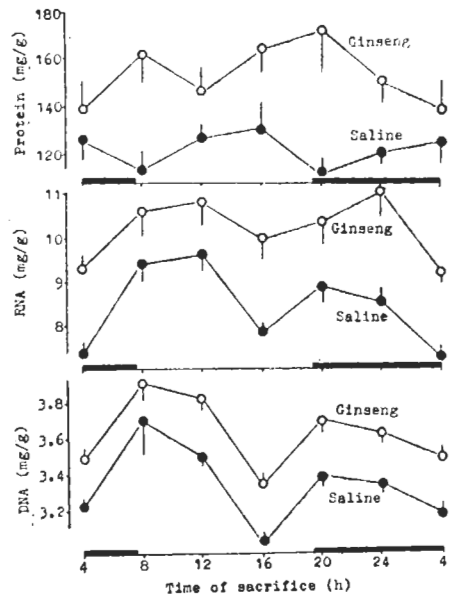


Fig 3. Effect of ip ginseng saponins 100 mg/kg on circadian rhythms of hepatic DNA, RNA and protein in mice. $n = 8$, $\bar{x} \pm SD$. The horizontal bar illustrates the light-dark cycle.

讨 论

实验结果表明, 对照组小鼠血清皮质酮、脑内 5-HT 和 5-HIAA、肝脏内糖原、葡萄糖、DNA、RNA 与蛋白质含量均有明显昼夜节律。GS 处理鼠, 上述指标依投药时辰呈现不同程度的改变。曾有报道涉及早、晚施予人参对皮

质酮⁽¹¹⁾与肝糖原⁽²⁾的影响, 但 24 h 中仅 2 次投药显然不足以揭示其节律变化全貌。本研究较为系统地阐明了人参昼夜节律作用的规律, GS 各项药理指标皆作为一天中时间的函数, 周期性地出现。对于小鼠(夜行动物位相与人相反)04:00-10:00 h 投药, GS 综合药效较好, 而傍晚用药效果较差。

GS 的时辰性变化, 似乎与机体内源物质多寡和所处昼夜阶段的机能状态有关。傍晚小鼠皮质激素达一日高峰, 负反馈可能减弱 GS 对皮质酮的影响。肝糖原与皮质酮位相相反。GS 通过肝糖原分解酶⁽¹²⁾起作用, 而分解酶系统又有自身昼夜节律⁽¹³⁾。肝脏 DNA、RNA 和蛋白质的节律模式有许多相似处, 可能受蛋白质合成“中心法则”的某种制约。脑内 5-HT 系统功能较多, 有报道其通过视交叉上核影响皮质酮昼夜节律⁽¹⁴⁾。本实验表明, 在皮质酮高峰期 5-HT 与 5-HIAA 相应升高, 提示 5-HT 合成与利用加强。支持此论点。

综上所述, 人参既作用于机体物质基础(核酸、蛋白质和多糖)又影响其调节系统(激素和递质), 从而起到滋补强壮作用。这种作用的强弱或有无, 因投药时辰而异。对此应引起药理和临床学者重视。

参 考 文 献

- 1 Reinberg A, Smolensky MN, Labrecque G. New aspects in chronopharmacology. *Annu Rev Chronopharmacol* 1986; 2 : 3
- 2 大浦彦吉、熊谷 朗、柴田承二、高木敬次郎。藥用人参——その研究と進歩。第1版。東京都: 共立出版株式会社, 1981 : 80-144

- 3 王本祥。人参的研究。天津: 天津科学技术出版社, 1985 : 107-185
- 4 Shibata S, Tanaka O, Ando T, Sado M, Tsuchima S, Ohsawa T. Chemical studies on oriental plant drugs. XIV. protopanaxadiol, a genuine sapogenin of ginseng saponins. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 1966; 14 : 595
- 5 Vernikos-Danellis J, Anderson E, Trigg L. Changes in adrenal corticosterone concentration in rats : method of bioassay for ACTH. *Endocrinology* 1966; 79 : 624
- 6 Curzon G, Green AR. Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in small regions of rat brain. *Br J Pharmacol* 1970; 39 : 653
- 7 Kemp A, Kits van Heijningen AJM. A colorimetric micromethod for the determination of glycogen in tissues. *Biochem J* 1954; 56 : 646
- 8 Rafael J, Vsiansky P. Quantitative determination of nucleic acids in brown and white adipose tissue. *Anal Biochem* 1981; 115 : 158
- 9 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 10 Halberg F. Chronobiology. *Annu Rev Physiol* 1969; 31 : 675
- 11 Hiai S, Yokoyama H, Oura H. Features of ginseng saponin-induced corticosterone secretion. *Endocrinol Jpn* 1979; 26 : 737
- 12 Yokozawa T, Kitahara N, Okuda S, Oura H. Effect of ginseng principle on pyruvate kinase activity in rat liver. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 1979; 27 : 419
- 13 Roesler WJ, Khandelwal RL. The diurnal rhythm of liver glycogen phosphorylase : correlating changes in enzyme activity and enzymic protein. *FEBS Lett* 1986; 195 : 344
- 14 Bennett GW, Whitehead SA. *Mammalian neuroendocrinology*. 1st ed. London: Croom Helm Ltd, 1983: 125

Circadian changes of pharmacological effects of red ginseng saponins in mice

LI Jing-Cai, ZHENG Qian-Juan, JIN Chun-Hua, MA Ru-Meng

(Department of Physiology, Shenyang College of Pharmacy, Shenyang 110015)

ABSTRACT Pharmacological effects of the saponins extracted from root of *Panax ginseng* C. A. Meyer (Chinese red ginseng; GS) were studied with adult ♂ mice standardized to 12 h of light (from 07:30 to 19:30) alternating with 12 h of darkness. Functional activities were assessed every 4 h within 24 h. The levels of serum corticosterone, 5-HT and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the whole brain as well as the contents of glycogen, glucose, DNA, RNA and protein in the liver exhibited circadian variations. After administration of GS at the dose of 70 mg/kg (ip) to mice the serum corticosterone rose dramatically from 73 ± 17 to 518 ± 71 $\mu\text{g/L}$ at the beginning of light span (peak) but it only increased 88 $\mu\text{g/L}$ at the beginning of dark span (trough). ip administration of GS (100 mg/kg) accelerated the syntheses of DNA, RNA and protein, had no effect to glucose, but depleted the content of glycogen

in the liver. Circadian patterns of hepatic DNA, RNA and glycogen almost paralleled to that of control mice. The maximal and significant changes from control levels of glycogen DNA, RNA or protein occurred at 12:00, 16:00, 00:00, or 20:00, respectively. Ip treatment with GS 200 mg/kg to mice increased the level of 5-HT which had a circadian pattern approximately similar to that of serum corticosterone; it increased the level of 5-HIAA at 08:00 and 16:00 but decreased at 20:00. To conclude, the pharmacological effects of GS showed a circadian stage-dependent changes, and the range of those changes may be related to the control levels in many cases.

KEY WORDS ginseng; saponins; circadian rhythm; corticosterone; liver glycogen; DNA; RNA; serotonin; 5-hydroxyindoleacetic acid; protein