

益寿调脂片对衰老模型小鼠自由基代谢作用的实验研究*

朱秉匡¹ 孙立² 郑仕富¹ 张荣华³

内容提要 目的:观察益寿调脂片对衰老模型小鼠自由基代谢调整作用。方法:利用 5% D-半乳糖皮下注射 40 天所致亚急性衰老模型小鼠,造模同时分别给予 1% 淀粉溶液(空白对照组、衰老模型组)、益寿调脂片溶液(低剂抗衰组、高剂抗衰组)及绞股蓝总甙片(阳性抗衰组)40 天后,观察自由基代谢指标如血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及大脑 B 型单胺氧化酶(MAO-B)、 Na^+ - K^+ -ATP 酶改善情况。并观察益寿调脂片对不造模小鼠体能及应激能力的影响。结果:与衰老模型组比较,益寿调脂片能显著降低衰老模型小鼠的血清 MDA 含量及脑组织 MAO-B 活性($P < 0.01$),而使血清 SOD、GSH-Px 及脑组织中 Na^+ - K^+ -ATP 酶活性明显提高($P < 0.01$)。并与正常组比较,益寿调脂片能显著提高小鼠抗疲劳及耐缺氧能力,且具一定的量效关系。结论:益寿调脂片能有效的改善衰老机体自由基代谢,是理想而有效的延缓衰老的药物;并为衰老的“脾肾两虚、夹瘀夹痰”的理论提供了有力的实验依据。

关键词 益寿调脂片 衰老模型 自由基

Experimental Study of Yishou Tiaozhi Tablet on Free Radical Metabolism in Aging Model Mice Zhu Bingkuang, Sun Li, Zheng Shifu, et al *Department of Qi-Blood Research, Medical College, Jinan University, Guangzhou (510632)*

Objective: To observe the effect of Yishou Tiaozhi tablet (YSTZT) on the metabolism of free radical in mice of aging model. **Methods:** Using the aging model induced by hypodermic injection of 5% D-Galactose in mice for forty days. The content of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum, activity of monoamine oxidase B (MAO-B), Na^+ - K^+ -ATPase in brain were investigated after the treatment. **Results:** In comparing to the aging model group, it showed that YSTZT could obviously inhibit the increase of level of MDA in serum and the activities of MAO-B in brain; and enhance the activities of SOD, GSH-Px in serum, and the activities of Na^+ - K^+ -ATPase in brain. Furthermore, YSTZT could obviously elevate the tolerance to fatigue and hypoxia in mice. **Conclusions:** YSTZT can effectively improve the free radical metabolism of senile body, it is an ideal and effective medicine in preventing aging, which is also one of the experimental basis in proving the theory of "Spleen and Kidney deficiency complicated with stasis and phlegm cause aging".

Key words Yishou Tiaozhi tablet, aging model, free radical

益寿调脂片具有补肾健脾益气、活血化痰之功,主要用于治疗原发性高脂血症。临床及实验研究已经初步证实具有明显抑制高脂饮食诱发的兔血中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、载脂蛋白 B(apoB)、脂蛋白(a)[Lp(a)]、氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、羟脯氨酸(HYP)、钙离子浓度(Ca^{2+})、血栓素 B_2 (TXB_2)的升高

及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、载脂蛋白 A_1 (apoA₁)、6-酮-前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α})的降低⁽¹⁾,并能明显改善患者血液流变学的作用。为证实本方还具有延缓衰老的功能和机理,我们观察了该方对昆明种小鼠的抗衰老作用及抗疲劳和耐缺氧作用,现将结果报告如下。

材料和方法

1 材料

1.1 药品 益寿调脂片(由黄芪、泽泻、丹参、枸杞、山楂、大蒜、海藻、何首乌等组成,广州中药一厂制

* 国务院侨办基金资助课题(No. 93-95-47)

1. 暨南大学医学院第一附属医院中西医结合气血研究室(广州 510632); 2. 暨南大学医学院; 3. 暨南大学医学院第一附属医院

作, 每片含生药 0.53g), 绞股蓝总甙片(陕西省安康中药厂产品, 批号 940626, 每粒 20mg), 5% D-半乳糖注射液系中国医药公司北京采购供应站晶粉配制; 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶测定试剂盒(南京建成医学研究所出品), B 型单胺氧化酶(MAO-B)测定试剂盒(伊利康生物技术有限公司出品)。

1.2 动物 昆明种小鼠, 雄性, $(19 \pm 2)\text{g}$, 由暨南大学医学院实验动物所提供。

1.3 仪器 Bankman 700 型全自动生化分析仪, 由美国 Beckman 公司产。

2 方法

2.1 自由基代谢实验 取体重 $(19 \pm 2)\text{g}$ 雄性昆明种小鼠 50 只, 随机分成 5 组, 每组 10 只。并从实验第 1 天开始, 对其中 40 只利用 5% D-半乳糖每天皮下注射 1 次, 连续 40 天所致亚急性衰老模型小鼠, 造模同时分别灌胃给予空白对照组及衰老模型组 1% 淀粉溶液 0.5ml; 给予低剂抗衰组及高剂抗衰组 0.04g/(10g·d) 和 0.08g/(10g·d) 益寿调脂片混悬液 0.5ml (相当于成人剂量的 5 倍和 10 倍, 以 1% 淀粉溶液作为助悬剂); 给予阳性抗衰组 7.5mg/(10g·d) 绞股蓝总甙片混悬液 0.5ml (相当于成人剂量的 5 倍, 以 1% 淀粉溶液作为助悬剂), 各组均以普通饲料喂养, 共计 40 天。

2.1.1 血清 SOD、MDA、GSH-Px 测定 实验结束后, 于小鼠眼眶取血, 2000r/min, 离心 10min, 分离血清。SOD、MDA 测定均采用季健平微量测定法⁽²⁾, GSH-Px 测定采用酶法(参照试剂盒说明书进行操作)。

2.1.2 大脑 MAO-B、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 测定 实验结束处死小鼠后, 迅速剥离小鼠大脑, 以冰冷的生理盐水冲洗, 滤纸吸干后, 立即于电子天平称重, 置于匀浆器中用 9 倍生理盐水匀浆 10min (匀浆器的末端置于放冰块的冷水中), 后以 4000r/min 离心 10min, 取上清。MAO-B 测定采用快速比色法, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶测定采用酶法(均参照试剂盒说明书进行操作)。

2.2 耐缺氧实验 取体重 $(20 \pm 2)\text{g}$ 雌性昆明种小鼠 48 只, 随机分成 4 组, 分别每天灌胃 1% 淀粉溶液 0.5ml/20g (对照组)、0.08g/20g 益寿调脂片混悬液 0.5ml (低剂组)、0.16g/20g 益寿调脂片混悬液 0.5ml (高剂组)、0.015g/20g 绞股蓝总甙片混悬液 0.5ml (阳性组)。连续给药 7 天, 末次给药 30min 后, 将小鼠单只置入放有 10g 钠石灰的 250ml 广口瓶中, 加盖以凡士林密封瓶口, 记录小鼠窒息死亡时间。

2.3 抗疲劳实验 分组与给药方法同上。末次给药 1h 后称重, 于鼠尾根部缚以体重 10% 的橡皮泥, 单个置于玻璃缸中, 水深 25cm, 水温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 记录小鼠入水至口鼻沉入水下达 10s 以上时间。

3 统计学方法 各指标均用方差分析进行检验, 采用 SPSS 8.0 软件进行分析。

结 果

1 自由基代谢实验

1.1 血清 SOD 活性、MDA 含量、GSH-Px 活性 见表 1。衰老模型组与正常对照组比较, 血清 MDA 含量明显增高, 而血清 SOD 含量及 GSH-Px 活性均有明显下降。低剂抗衰组、高剂抗衰组、阳性抗衰组与衰老模型组比较, 血清 MDA 含量明显下降, 而血清 SOD 含量及 GSH-Px 活性均有明显的升高 ($P < 0.05 \sim 0.001$), 且具有一定的量效关系, 即随剂量的增加, 则对各指标的影响也越强。

1.2 大脑 MAO-B、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性 见表 1。衰老模型组与正常对照组比较, 大脑 MAO-B 活性明显增高, 而 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性则明显下降。低剂抗衰组、高剂抗衰组、阳性抗衰组与衰老模型组比较, 大脑 MAO-B 活性明显下降, 而 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性则明显升高 ($P < 0.05 \sim 0.001$), 且也具有一定的量效关系。

2 耐缺氧实验结果 见表 2。低剂组、高剂组、阳性组与对照组比较小鼠窒息死亡时间分别延长了 29.73%、30.72%、20.20%, 且都有显著性差异 ($P <$

表 1 益寿调脂片对小鼠血清 SOD、MDA、GSH-Px 含量及对小鼠大脑 MAO-B 及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (NU/ml)	MDA (nmol/ml)	GSH-Px (U/0.1ml)	MAO-B (U)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ($\mu\text{mol pi/mg pro}$)
正常对照	10	$154.73 \pm 16.92^{**}$	$201.82 \pm 13.61^{**}$	$230.99 \pm 9.85^{***}$	$14.23 \pm 1.66^{***}$	$70.28 \pm 4.57^*$
衰老模型	10	133.36 ± 18.20	222.00 ± 15.65	205.92 ± 8.65	17.40 ± 1.70	63.44 ± 6.19
低剂抗衰	10	$152.40 \pm 13.88^*$	$203.45 \pm 17.01^*$	$216.62 \pm 9.71^*$	$15.61 \pm 1.33^*$	$70.62 \pm 5.53^{**}$
高剂抗衰	10	$170.38 \pm 16.01^{***}$	$200.18 \pm 16.27^{**}$	$230.99 \pm 8.50^{***}$	$13.07 \pm 1.66^{***}$	$75.12 \pm 5.80^{***}$
阳性抗衰	10	$161.92 \pm 14.01^{***}$	$202.91 \pm 16.02^*$	$223.10 \pm 10.44^{***}$	$15.03 \pm 1.22^{**}$	$73.40 \pm 6.77^{***}$

注: 与衰老模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

表 2 益寿调脂片对小鼠常压耐缺氧
及游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	耐缺氧时间 (min)	延长率 (%)	游泳时间 (min)	延长率 (%)
对照	12	32.32 ± 5.68	0	16.77 ± 6.50	0
低剂	12	41.93 ± 7.88***	29.73	24.63 ± 7.13***	46.87
高剂	12	42.25 ± 6.08***	30.72	26.83 ± 8.17**	59.93
阳性	12	38.85 ± 4.72*	20.20	25.53 ± 5.82**	52.24

注:各组与对照组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (0.05~0.001)。说明益寿调脂片耐缺氧能力非常显著,并有一定的量效关系。

3 抗疲劳实验结果 见表 2。低剂组、高剂组、阳性组与对照组比较游泳时间分别延长了 46.87%、59.93%、52.24%,且都有显著性差异($P < 0.05 \sim 0.01$)。说明益寿调脂片具有明显的抗疲劳能力,并有一定的量效关系。

讨 论

建立类似自然衰老的早衰老动物模型是进行衰老机理研究、衰老对策研究的关键,也是老年医学一直致力于解决的课题之一。近年来,国内诸多学者提出建立持续注射 D-半乳糖引起糖代谢紊乱致动物衰老模型,并通过一系列实验证实该模型与老年动物的各种生理、病理改变相一致^[3]。并一致认为是一种可以依赖且简便易行的衰老模型。本结果也证实 D-半乳糖使小鼠血清 SOD、GSH-Px 下降,而 MDA 升高;并使大脑 MAO-B 浓度升高、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性降低,较好的反映了衰老的病理特征,这也为益寿调脂片的延缓衰老作用的评价打下基础。

在上述衰老模型中,同时给予益寿调脂片连续 40 天,可以明显改善其向衰老方向进一步发展。自由基学说认为由于机体在新陈代谢中不断产生自由基,自由基对细胞膜上的不饱和脂肪酸攻击,产生脂质过氧化,同时触发一系列连锁反应,导致自由基的扩增和膜脂质过氧化加深,最终使细胞功能丧失,组织受到损伤。研究发现脂质过氧化物及其分解产物丙二醛(MDA)水平随增龄而升高,而清除自由基和抑制自由基反应的重要物质 SOD 及 GSH-Px 却随增龄而明显下降^[4]。本结果表明益寿调脂片可增强机体抗氧化能力,具有提高机体清除自由基、减少自由基过氧化损伤的作用,从而改善机体的各种病理变化,这可能是益寿调脂片抗衰老的机理之一。

MAO-B 主要存在于脑、肝、血小板及血清中。参与体内单胺类物质和儿茶酚胺的代谢,研究表明,人过 45 岁后脑中 MAO-B 活性急剧上升,并随增龄而升高,

与衰老关系十分密切^[4]。本研究表明益寿调脂片可使衰老小鼠 MAO-B 活性下降,从而减轻衰老引起的中枢儿茶酚胺水平下降及其互相之间的比例失调所造成的“生化损伤”,可能是益寿调脂片抗衰老的机理之二。

另外, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶是生命活动的主要能源物质,实验表明益寿调脂片能延长小鼠持续游泳时间及耐缺氧时间,这可能与增强机体 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性有关,从而成为益寿调脂片延缓衰老机理之三。

作者认为,人体衰老是虚实夹杂多因素共同的结果,其中“虚”在于脾肾两虚^[5],而“实”则在于瘀血^[6]与痰浊^[7]两大类。脾肾两虚与瘀血痰浊对机体来说并不是孤立存在的,而时常相兼为病。脾肾两虚是衰老的本质,而瘀血与痰浊这两大病理产物则是衰老在脾肾两虚的前提下的必然结果。益寿调脂片正是通过补肾(何首乌、枸杞)、健脾益气(黄芪)、活血(丹参、山楂)、化痰(泽泻、大蒜、海藻),不仅补充正气使脏器虚损得到恢复,而且还能清除体内瘀血与痰浊等病理产物,达到虚得以补,实得以泻,脏腑功能得以正常发挥的目的,保证机体阴平阳秘,维持机体平衡,促进机体健康长寿。

本实验的结果证明益寿调脂片在改善老化机体自由基代谢、增强抗氧化酶活性、减少自由基对机体损伤及提高机体应激能力具有明显的作用;并表明益寿调脂片是理想而有效的延缓衰老的药物;也进一步反证了衰老机体确实存在脾肾两虚夹瘀夹痰的实质,为衰老的脾肾两虚夹瘀夹痰的观点提供了有力的证据。

参 考 文 献

1. 钟毅,朱秉匡,郑仕富. 益寿调脂片抗高脂血症及动脉粥样硬化的实验研究. 中国中西医结合杂志 1998;18(10):616—619.
2. 季建平. 超氧化物歧化酶超微量快速测定法. 南京铁道医学院学报 1991;10(1):27—30.
3. 龚国清,徐献本. 小鼠衰老模型研究. 中国药科大学学报 1991;22(2):101—103.
4. 田清涑,李云兰. 酶与衰老. 老年学杂志 1993;13(6):372—374.
5. 瞿延辉,张六通,梅家俊. 析中医衰老机理——兼论多虚实因素综合致衰老. 中国中医基础医学杂志 1996;2(1):27,61.
6. 李顺成,蒋文跃,王传社,等. 扶正化瘀复方康寿饮延缓衰老的研究回顾. 中国中西医结合杂志 1996;16(4):244—245.
7. 方永奇. 痰证研究思路探讨. 中国中医基础医学杂志 1996;2(6):20—23.

(收稿:1998-12-04 修回:1999-07-29)