

# 四君子汤对 D-半乳糖衰老模型小鼠心、肝、脑组织 MDA 含量及端粒酶活性的影响

杨 靖<sup>1</sup> 詹向红<sup>2</sup> 孙 晔<sup>3</sup> 李秀昌<sup>1</sup> 李厚刚<sup>1</sup>

**摘要 目的** 研究四君子汤(SJ)对 D-半乳糖(D-gal)衰老模型小鼠心、肝、脑组织丙二醛(MDA)含量及端粒酶活性的影响。**方法** 60 只小鼠分为 5 组,除正常对照组外其余 4 组采用 10% 的 D-gal 0.01g/g 注射于小鼠颈背部皮下,每日 1 次,连续 6 周,建立小鼠衰老模型;于造模同时,3 个给药组(低、中、高剂量)分别按 6g/(kg·d)、12g/(kg·d)、24g/(kg·d) 的药量(容积为 0.2ml/10g 体重)喂饲四君子汤,连续用药 6 周;正常对照组和模型对照组喂饲同体积的蒸馏水。TBA 比色法检测小鼠心、肝、脑组织 MDA 含量;PCR-ELISA 法检测小鼠心、肝、脑组织端粒酶活性。**结果** 与正常对照组相比,模型对照组小鼠心、肝、脑组织 MDA 含量明显增加( $P < 0.01$ ),心、肝脏组织端粒酶活性明显降低( $P < 0.01$ ),脑组织端粒酶活性无明显变化( $P > 0.05$ );与模型对照组比较,3 个给药组小鼠心、肝、脑 MDA 含量明显减少( $P < 0.01$ ),低、中剂量给药组小鼠心脏组织端粒酶活性有升高的趋势,但差异不显著( $P > 0.05$ ),高剂量给药组小鼠心脏组织端粒酶活性明显升高( $P < 0.05$ );3 个给药组小鼠肝组织端粒酶活性均无明显变化( $P > 0.05$ );低、中剂量给药组小鼠脑组织端粒酶活性无明显变化( $P > 0.05$ ),高剂量给药组小鼠脑组织端粒酶活性明显升高( $P < 0.01$ )。**结论** 四君子汤能拮抗自由基损伤,减少 D-gal 衰老模型小鼠心、肝、脑组织 MDA 含量,并能提高其心、脑组织端粒酶活性,但对肝组织端粒酶活性无影响。

**关键词** 四君子汤;衰老;丙二醛;端粒酶

**Effect of Sijunzi Decoction on Malondialdehyde Content and Telomerase Activity in Heart, Liver and Brain Tissues of D-galactose Induced Aging Model Mice** YANG Jing, ZHAN Xiang-hong, SUN Ye, et al *Changchun College of Traditional Chinese Medicine, Changchun (130117)*

**Abstract Objective** To investigate the effect of Sijunzi decoction (SJZD) on malondialdehyde (MDA) content and telomerase activity in heart, liver and brain tissues of D-galactose (D-gal) induced aging model mice. **Methods** D-gal aging mice model was established by cervicodorsal region subcutaneous injection with 10% D-gal once a day for six successive months. The model mice in the low-, middle- and high-dose SJZD treated groups were treated with SJZD in a dose of 6 g/kg, 12 g/kg, 24 g/kg per day respectively in the volume of 0.2 ml/10 g for 6 successive weeks. While the mice in the normal control group (NCG, non-modeled) and the model control group (MCG, modeled but untreated) were treated with distilled water instead. The MDA content and telomerase activity in heart, liver and brain tissues of mice was measured with TBA colorimetric method and PCR-ELISA respectively. **Results** In MCG, the MDA content in heart, liver and brain tissues was significantly higher ( $P < 0.01$ ), and the telomerase activity in liver and heart tissues was significantly lower ( $P < 0.01$ ) but that in brain tissue was insignificant different to that in NCG ( $P > 0.05$ ) respectively. As compared with MCG, the MDA content was significantly lower in the three SJZD treated group ( $P < 0.01$ ). In comparison of telomerase activity between MCG and SJZD treated groups, it was shown that in heart tissue, there was an increased trend of the activity in the low-dose and middle-dose group, but with statistical insignificance ( $P > 0.05$ ), but it did show a significant increase in the high-dose group ( $P < 0.05$ ); in liver tissue no significant difference was shown between the three SJZD treated groups and MCG ( $P > 0.05$ ); as for that in brain tissue, significant increase only shown in the high-dose group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** SJZD can antagonize free radical injury, decrease the MDA content of heart, liver and brain in D-gal aging mice, and increase the telomerase activity in heart and brain tissues but with no effect on that in liver tissue.

作者单位:1. 长春中医学院(长春 130117);2. 河南中医学院;3. 吉林大学

通讯作者:杨 靖,博士, Tel: 0431-6172306, E-mail: dryangjing@sohu.com

万方数据

**Key words** Sijunzi decoction; aging; malondialdehyde; telomerase

四君子汤是中医学健脾益气的代表方剂,原方出自《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓、炙甘草组成。功效补气健脾,用于治疗脾胃虚弱、气短乏力、语言轻微、食少便溏。现代药理研究表明,四君子汤能提高机体抗氧化酶活性,调节代谢、内分泌及免疫功能等。本研究从衰老的自由基学说和端粒学说入手,采用 D-半乳糖(D-gal)衰老小鼠模型,观察四君子汤对其心、肝、脑组织丙二醛(MDA)含量及端粒酶活性的影响,并对其作用机理进行初步探讨。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 动物 3 月龄昆明种小鼠,雌雄各半,体重 22~28g,由吉林省药品检验所实验动物中心提供,动物合格证号:10-1008。实验室温度 18~26℃,相对湿度 60%~20%,自然照明。实验前适应环境饲养 1 周。

1.2 药物 人参(红参)、茯苓、白术(炒)、甘草(炙),由长春中医学院附属医院药局一次性购进,经生药学鉴定均为合格药材。上述 4 味中药各取等分,煎煮 2 次,药液浓缩成每毫升相当于 0.6g 生药的浓度。

1.3 试剂 D-gal(批号 980923,上海试剂二厂产品),牛血清白蛋白(BSA 中国科学院上海生化所产品),三氯乙酸(TCA,北京化学试剂公司产品),正丁醇(北京化学试剂公司产品),端粒酶活性检测试剂盒(中国联星实业有限公司产品)。其余均为国产分析纯。

1.4 仪器 恒温水浴(瑞典 LKB 公司),PCR 仪(上海 HEAL FORCE TCS-24),酶标仪(Bio-Rad450)。UV-120 型分光光度计(日本岛津公司),台式低温高速离心机(德国 HettichMIKO22R 公司),DY89-I 型玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所)。

### 2 方法

2.1 模型制备 按文献<sup>[1]</sup>方法操作。将 D-gal 溶于注射用水,浓度 10%,注射容量为 0.01ml/g 体重,颈背部皮下注射,每天 1 次,连续 6 周。

2.2 动物分组与处理 小鼠随机分为 5 组:正常对照组(N)、模型对照组(M)、四君子汤低剂量组(SD)、四君子汤中剂量组(SZ)、四君子汤高剂量组(SG),每组 12 只。模型对照组和 SD、SZ 及 SG 组小鼠依法造模,正常对照组注射同体积的注射用水。在造模的同时,SD、SZ 及 SG 组分别按 6g/(kg·d)、12g/(kg·d)、24g/(kg·d) 的给药量(容量为 0.2ml/10g 体重)喂饲四君子汤,连续用药 6 周。模型对照组和正常

对照组分别喂饲同体积的蒸馏水。实验 6 周后处死小鼠,快速摘取心、肝、脑,在低温条件下进行新鲜组织匀浆,离心,取上清检测。

2.3 检测指标及方法 (1)MDA 含量测定:TBA 比色法<sup>[2]</sup>,用分光光度法定量。具体操作如下:取样品 0.3 ml,加入 20% 的 TCA 2.5 ml,边加边摇,混匀;加入 0.67% TBA 1.0 ml,再次摇匀,沸水浴 30 min,流水冷却至室温,加入正丁醇 4.0 ml,振荡或颠倒混匀数次。5000 r/min,离心 10 min,吸取上清于 535 nm 处比色。(2)端粒酶活性检测:采用 PCR-ELISA 法<sup>[3]</sup>。操作步骤按试剂盒说明书进行。

2.4 统计学方法 实验结果采用 SPSS 11.0 版本进行处理。两组间均数比较采用 *t* 检验;多组间均数比较采用单因素方差分析。

## 结果

1 各组小鼠心、脑、肝 MDA 含量比较见表 1。与 N 组比较,M 组小鼠心、脑、肝 MDA 含量明显增加( $P < 0.01$ ),与 M 组比较,SD、SZ、SG 组小鼠心、脑、肝 MDA 含量均明显减少( $P < 0.01$ ),减少的程度依次为 SG 组 > SZ 组 > SD 组。

表 1 各组小鼠心、肝、脑中 MDA 含量比较 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 <i>n</i>	MDA		
	心	肝	脑
N 6	0.230 ± 0.090	0.207 ± 0.010	0.149 ± 0.008
M 6	0.671 ± 0.042*	0.535 ± 0.027*	0.455 ± 0.023*
SD 6	0.469 ± 0.018*°	0.392 ± 0.021*°	0.340 ± 0.019*°
SZ 6	0.331 ± 0.012*°	0.289 ± 0.015*°	0.228 ± 0.012*°
SG 6	0.250 ± 0.015 <sup>△△</sup>	0.206 ± 0.014 <sup>△△</sup>	0.147 ± 0.013 <sup>△△</sup>

注:与 N 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 SD 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与 SZ 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与 M 组比较,<sup>°</sup> $P < 0.01$

2 各组小鼠心、脑、肝组织端粒酶活性比较 见表 2。在心脏组织中,与 N 组比较,M 组小鼠端粒酶活性明显降低( $P < 0.01$ );与 M 组比较,SD 组和 SZ 组端粒酶活性无明显变化( $P > 0.05$ ),即低、中剂量的 SJ 对心脏组织端粒酶活性无明显作用,而 SG 组的端粒酶活性升高( $P < 0.05$ ),即高剂量的 SJ 能提高 D-gal 衰老模型小鼠心脏组织端粒酶活性。在肝脏组织中,与 N 组相比,M 组小鼠端粒酶活性明显降低( $P < 0.01$ );与 M 组相比,3 个 SJ 给药组的端粒酶活性无明显差异( $P > 0.05$ ),即 SJ 对 D-gal 衰老模型小鼠肝脏组织端粒酶活性无影响。在脑组织中,与 N 组比较,M 组小鼠端粒酶活性无明显变化( $P > 0.05$ );与 M 组比较,SD 和 SZ 两组小鼠脑组织端粒酶活性变化均不

明显,两者比较差异无显著性( $P > 0.05$ ),SG 组小鼠脑组织组织端粒酶活性明显增高,差异十分显著( $P < 0.01$ )。

表 2 各组小鼠心、肝、脑组织端粒酶活性比较 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 n	组织端粒酶活性		
	心	肝	脑
N 6	54.17 ± 10.11	22.84 ± 5.66	93.88 ± 27.08
M 6	27.98 ± 9.25*	9.07 ± 4.35*	89.81 ± 24.01
SD 6	30.72 ± 13.56*	9.14 ± 4.60*	94.69 ± 19.24
SZ 6	40.00 ± 11.16	12.99 ± 5.86*	95.51 ± 26.16
SG 6	42.70 ± 10.59°	12.83 ± 6.99*	141.78 ± 25.84* <sup>△▲°</sup>

注:与 N 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 SD 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与 SZ 组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.01$ ;与 M 组比较,<sup>°</sup> $P < 0.05$ ,<sup>°°</sup> $P < 0.01$

### 讨 论

近年来,国际医学界对端粒缩短和端粒酶缺乏与衰老关系的研究十分活跃,认为人的正常体细胞分裂次数达到界限(Hayflick 界限)时,染色体端粒长度缩短到一定程度,有丝分裂便不可逆地被阻断在细胞周期的 G<sub>1</sub> 期和 G<sub>2</sub>/M 期之间的某个时期,这时的细胞便进入了老化期,随后死亡<sup>[4]</sup>。研究证明,端粒与细胞寿命的控制密切相关。人类端粒长度大约 2~15kb,由于存在末端复制问题,DNA 每复制 1 次,端粒 DNA 就会丢失 50~200bp,随着细胞分裂次数的增加,端粒 DNA 进行性地缩短,缩短到一定限度后,便不能维持染色体的稳定,细胞便失去了分裂增殖能力而衰老死亡<sup>[5]</sup>,这种缩短就是衰老的标志。因此,端粒也被称为细胞的“生命钟”,细胞的衰老决定着整个机体的衰老。

端粒酶是目前发现的惟一由 RNA 和蛋白质构成的核糖核蛋白酶,具有逆转录活性,能够以自身的 RNA 为模板合成端粒 DNA。端粒酶的功能主要有二:一是对端粒 DNA 的延伸作用;二是能够修复断裂的染色体末端,通过修复,可使染色体保持完整,防止染色体的相互融合、重组及其它损害,从而保持基因组的完整和稳定。目前认为,细胞内的端粒酶缺失,导致端粒缩短,当端粒缩短到一个“临界长度”,染色体的稳定性便被破坏,其 DNA 双链可能断裂并激活细胞的自身检验系统,这时细胞便进入了“M<sub>1</sub> 期死亡状态”,随后染色体进一步遭到破坏,如染色体重排,双着丝粒染色体的形成和非整倍性变化等异常情况发生,细胞便进入了“M<sub>2</sub> 期死亡状态”,最终便是死亡的来临。

如果是端粒酶活性的相对缺乏造成了端粒长度的缩短并诱导细胞衰老,可推测通过激活端粒酶活性来维持端粒长度及稳定。减缓端粒缩短的速率而延缓细胞衰老。但如果重新激活端粒酶,这些重新获得端粒

酶活性的细胞将可能成为永生细胞,继而衍变成癌症。体外实验证实,端粒酶的表达及端粒完整性的维持并不能逃避细胞周期关卡的控制,从而造成基因不稳定;端粒酶使细胞永生化也能防止或逆转衰老细胞生理功能的丧失,而不会引起与癌相关的其他改变<sup>[6]</sup>。重建端粒酶活性可使人的细胞寿命延长,而不改变其特征性表现。因此,找出延缓衰老、预防癌症的最佳治疗点,并寻找其中的调控机制是关键所在。

四君子汤是健脾益气的代表方剂,也是缓衰保健类方剂的基本方。方中人参、白术、茯苓、甘草均为《神农本草经》之上品,有“轻身延年”之功效。现代药理研究表明,四君子汤能拮抗自由基损伤,增加机体免疫功能,调节代谢功能等。本研究结果显示,四君子汤能明显减少心、脑、肝组织中 MDA 含量(但其变化与端粒酶活性无显著相关性),表明四君子汤在拮抗自由基损伤方面有良好作用。四君子汤对 D-gal 衰老模型小鼠组织端粒酶活性的影响有组织器官的差别,它能提高 D-gal 衰老模型小鼠心、脑组织中端粒酶活性,而对肝组织端粒酶活性无明显影响。出现这样结果的机理尚需探讨。

### 参 考 文 献

- 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:1465—1467.  
Xu SY, Bian RL, Chen X. Methodology of pharmacological experiments. 3th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001:1465—1467.
- 庞战军,周玫,陈媛. 自由基医学研究方法. 北京:人民卫生出版社. 2000:62—69.  
Pang ZJ, Zhou M, Chen Y. Methods of free radical medical research. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000:62—69.
- Yuan Z, Mei HD. Inhibition of telomerase activity with hTERT antisense increases the effect of CDDP-induced apoptosis in myeloid leukemia. Hematology 2003;3(4):201—205.
- Gryfe R, Swallow C, Bapat B, et al. Molecular biology of colorectal cancer. Curr Probl Cancer 1997;21(5):233—300.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. Nature 1990;345(6274):458—460.
- Funk WD, Wang CK, Shelton DN, et al. Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model. Exp Cell Res 2000;258(2):270—278.

(收稿:2004-11-24 修回:2005-03-15)