

胎肾细胞悬液对去卵巢大鼠自由基的影响

彭宇¹ 郑清莲² 李信民³ 刘俊田⁴

摘要 目的 探讨大鼠去卵巢后自由基的变化以及胎肾细胞悬液对其干预作用。方法 48 只 SD 大鼠,取 8 只作为正常对照组,行假手术;其余 40 只行去卵巢手术,术后随机分为 4 组。正常对照组及模型对照组给予生理盐水;阳性对照组给予尼尔雌醇;胎肾活细胞悬液组给予活细胞悬液、胎肾死细胞悬液组给予死细胞悬液。药物干预 4 周后,检测血清超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量、一氧化氮(NO)含量以及一氧化氮合酶(NOS)活力。结果 与正常对照组比较,模型对照组血清 SOD、NOS 活力以及 NO 含量均明显下降,MDA 含量明显上升(均 $P < 0.01$);与模型对照组比较,胎肾活细胞悬液组及胎肾死细胞悬液组 SOD 活力均有上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);NO 含量、NOS 活力均明显上升($P < 0.05$);MDA 含量均明显降低($P < 0.01$);干预 3 组间两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 去卵巢后大鼠自由基增高,应用胎肾细胞悬液进行干预,能减轻自由基的损伤,增强机体的抗氧化能力。

关键词 胎肾细胞悬液;去卵巢大鼠;自由基

Effects of Fetal Renal Cell Suspension on Free Radicals in Ovariectomized Rats PENG Yu, ZHENG Qinglian, LI Xin-min, et al *Encephalopathy Department of Rehabilitation Center, the First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an (710061)*

ABSTRACT **Objective** To observe the changes of free radicals in rats after ovariectomy and the intervention effect of fetal renal cell suspension (FRCS) on them. **Methods** Totally 48 Sprague-Dawley rats, eight in the normal control group were sham-operated and treated with saline; the other 40 were ovariectomized and randomly divided into four groups: the model control group (A) administered with normal saline, the positive control group (B) administered with nilestriol, the two testing groups (C and D) administered respectively with living and dead FRCS. The administration was beginning from 12 weeks after operation and lasted for four weeks. Levels of serum superoxide dismutase (SOD) and nitric monoxide synthase (NOS) activity, malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) contents were measured at the terminal of the study. **Results** Compared with the sham-operated group, levels of SOD, NOS and NO in Group A were significantly lower, while level of MDA was significantly higher ($P < 0.01$). Compared with Group A, all above-mentioned abnormalities of indices were inversely changed in the three intervened groups significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but showed insignificant difference in the paired comparisons of the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** High free radical condition is surely present in ovariectomized rats, FRCS can lessen the injury of free radicals and enhance the oxidation antagonizing capacity of the organism.

KEYWORDS fetal renal cell suspension; ovariectomized rat; free radicals

随着生活水平的提高,人类的平均预期寿命逐步延长,世界上有越来越多的老年人享有高龄,一个人口老龄的时代已经来临。增龄可使各脏器功能减弱或衰退而引发多种老年疾病,妇女在绝经过渡期或绝经之后卵巢功能减退,性激素减少而导致的健康问题引起

医学界乃至社会的广泛关注^[1]。卵巢功能的衰退从中医学理论来说,属“肾虚”范畴,根据中医学“以脏补脏”理论,利用动物肾脏能够改善肾虚所致的各种证候,从而达到治病防病的目的。本研究通过动物实验观察去卵巢后大鼠自由基的变化以及胎肾细胞悬液对其影响,初步探讨去卵巢与衰老的关系以及胎肾细胞悬液的抗衰老作用。

基金项目:陕西省科技研究发展(攻关)计划项目(No. 2004K16-G17)

作者单位:1. 西安交通大学第一附属医院康复中心脑病科(西安 710061); 2. 西安交通大学第一附属医院中医科; 3. 西安交通大学医学院生化教研室; 4. 西安交通大学医学院药理学

通讯作者:彭宇, Tel:13279243699, E-mail: pydyp258@yahoo.cn

材料与方

1 动物 4 月龄未交配健康纯种雌性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体重 290 ~ 330 g;孕 19 ~ 21 天

Sprague-Dawley 大鼠, 112 只, 普通级, 标准大鼠饲料 (均由西安交通大学医学院实验动物中心提供)。所有实验动物饲养条件一致。

2 药物

2.1 胎肾活细胞悬液的制备 参考文献[2]: 将孕 19~21 天的 SD 雌性大鼠, 脱臼处死, 常规备皮, 消毒, 取出胎鼠, 将胎鼠消毒后移入超净台, 取出胎肾, 放入小培养皿内, 生理盐水洗涤 3 遍, 去肾包膜、肾蒂, 放入另一培养皿内。眼科剪将胎肾剪碎, 转移入 200 目尼龙网, 用 5mL 注射器针芯研磨, 边研磨, 边用生理盐水缓慢冲洗, 收集细胞悬液, 调整细胞数至 2×10^7 /mL, 台盼蓝染色活细胞数在 85%~95% 以上。

2.2 胎肾死细胞悬液的制备 将胎肾活细胞悬液置于小烧杯中, 小烧杯放入盛有冰水的容器内, 使小烧杯中的液面接近超声粉碎机的探头, 将粉碎机调到 40 Hz, 定时 30 s, 重复 4 次, 将胎肾活细胞灭活, 即可得到胎肾死细胞悬液。

2.3 尼尔雌醇片 1 mg/片, 由北京四环制药二厂生产, 批号: 200010801, 使用前用生理盐水配成 0.25 mg/mL 的混悬液, 按照 4 mL/kg 大鼠体重灌胃。

3 主要试剂及仪器 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)试剂盒(南京建成生物工程研究所); SCW-BCM 生物超净工作台(苏州市长春电子仪器厂); 752C 紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂); Cap-Rial6 γ -免疫计数器(美国 CAPINTEC-INC 有限公司)。

4 方法

4.1 造模方法 参考文献[3], 48 只大鼠随机分为 2 组, 其中一组 8 只为正常对照组, 行假手术, 另一组 40 只为造模组。各组大鼠均以 10% 的水合氯醛溶液, 按 0.3 mL/kg 大鼠体重腹腔注射麻醉。采用背侧入路, 摘除双侧卵巢进行手术造模。正常对照组仅切除双侧卵巢附近小块脂肪, 随即止血缝合。

4.2 分组及给药方法 术后 1 周, 将造模组动物随机分为模型对照组, 阳性对照组, 胎肾活细胞悬液组, 胎肾死细胞悬液组, 每组 10 只。术后 12 周开始药物干预, 正常对照组、模型对照组按生理盐水 2 mL/kg 尾静脉注射, 阳性对照组按 1 mg/kg 尼尔雌醇剂量灌胃, 每周 1 次; 胎肾活细胞组按 2 mL/kg 剂量尾静脉注射胎肾活细胞悬液, 每周 2 次; 胎肾死细胞组按 2 mL/kg 剂量尾静脉注射胎肾死细胞悬液, 每周 2 次。

4.3 标本的收集制作 连续干预处理 4 周后, 禁食 24 h, 第 2 天统一乙醚吸入麻醉, 腹主动脉抽取全血 5 mL, 3 000 r/min, 离心 5 min, 分离血清, -20 °C 冰箱保存。

4.4 观测指标及检测方法 SOD 测定: 采用黄嘌呤氧化酶法; MDA 含量测定: 采用硫代巴比妥比色(TBA)法; NO 测定: 采用硝酸还原酶法; NOS 测定: 采用化学比色法。均严格按照试剂盒使用说明操作。

4.5 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行多组间单因素方差分析, 两两间比较采用 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠血清 SOD 活力及 MDA 含量的变化比较(表 1) 与正常对照组比较, 模型对照组血清 SOD 活力明显下降, MDA 含量明显升高(均 *P* < 0.01); 与模型对照组比较, 阳性对照组 MDA 含量明显升高(*P* < 0.01); 胎肾活细胞悬液组及胎肾死细胞悬液组 SOD 活力均有升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01), MDA 含量均明显降低(*P* < 0.01); 但 3 处理组间两两比较, 差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 各组大鼠血清 SOD 活力及 MDA 含量的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 血清 SOD 活力 (U/mL) | 血清 MDA 含量 (nmol/mL) |
|---------|---|-------------------------------|----------------------------|
| 正常对照 | 8 | 273.03 ± 8.52 | 5.28 ± 0.71 |
| 模型对照 | 8 | 216.91 ± 42.25* | 7.68 ± 0.94* |
| 阳性对照 | 8 | 234.20 ± 25.48 | 6.18 ± 0.61 $\Delta\Delta$ |
| 胎肾活细胞悬液 | 8 | 245.38 ± 14.15 Δ | 6.01 ± 1.06 $\Delta\Delta$ |
| 胎肾死细胞悬液 | 7 | 256.88 ± 14.00 $\Delta\Delta$ | 5.85 ± 1.40 $\Delta\Delta$ |

注: 与正常对照组比较, **P* < 0.01; 与模型对照组比较, Δ *P* < 0.05, $\Delta\Delta$ *P* < 0.01; 下表同

2 各组大鼠血清 NO 含量及 NOS 活力的变化比较(表 2) 与正常对照组比较, 模型对照组血清 NO 含量及 NOS 活力均明显下降, 差异有统计学意义(*P* < 0.01); 与模型对照组比较, 阳性对照组、胎肾活细胞悬液组及胎肾死细胞悬液组血清 NO 含量及 NOS 活力均明显升高, 差异有统计学意义(*P* < 0.05); 3 处理组间两两比较, 差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 2 各组大鼠血清 NO 含量及 NOS 活力的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 血清 NO 含量 (μ mol/L) | 血清 NOS 活力 (U/mL) |
|---------|---|-------------------------|------------------------|
| 正常对照 | 8 | 103.43 ± 53.00 | 47.42 ± 20.45 |
| 模型对照 | 8 | 44.13 ± 23.57* | 26.62 ± 6.54* |
| 阳性对照 | 8 | 87.37 ± 34.30 Δ | 41.47 ± 7.06 Δ |
| 胎肾活细胞悬液 | 8 | 92.17 ± 42.02 Δ | 43.42 ± 15.05 Δ |
| 胎肾死细胞悬液 | 7 | 94.32 ± 45.52 Δ | 44.21 ± 16.98 Δ |

讨 论

女性衰老的一个重要方面是卵巢功能的减退, 反

过来,卵巢功能的减退又加速了衰老的进程。已有研究证实,卵巢功能减退所导致的雌激素水平减低是妇女绝经后出现一系列疾病的主要原因,如围绝经期综合征^[4]及绝经后骨质疏松症^[5]等疾病的发生与雌激素水平减低密切相关。自由基学说是衰老的经典学说之一^[6]。那么,去卵巢后机体的自由基是怎样的一种状态?治疗妇女绝经后相关疾病的药物是否对自由基也有一定的影响?

从中医学的角度来看,不管是衰老,还是卵巢功能的减退,均属“肾虚”范畴。对于雌激素水平降低引起的各种老年疾病,临床多应用补肾为主的中草药进行治疗,有一定的效果,且具有不良反应小,多环节、多靶点全面调节的作用,是目前研究的热点之一^[7]。

胎肾属于中药动物药的范畴,根据中医“以脏补脏”理论,对肾虚引起的各种老年病症有较好疗效。胎肾细胞悬液对去卵巢所致大鼠骨质疏松的改善作用已在前期研究中得到证实^[8]。

本研究结果显示,去卵巢大鼠的自由基是增高的,抗氧化剂的含量是降低的,表明去卵巢可导致机体的自由基损伤加剧,抗氧化能力下降,加速机体的衰老过程;而应用胎肾细胞悬液进行干预,可提高机体的抗氧化能力,降低自由基的损伤,有良好的抗衰老作用。通过衰老的各种动物模型以及选择与衰老相关的多种指标进行检测,以确定胎肾细胞悬液的抗衰老作用及作用途径,是今后进一步研究的方向。

参 考 文 献

- [1] 魏杨. 老年妇女常见病与性激素缺乏[J]. 解放军保健医学杂志, 2000, 2(3):63-65.
Wei Y. Common disease and lack of sex hormones of older women[J]. J Health Care Med Chin PLA, 2000, 2(3):63-65.
- [2] 彭宁,李锐,张维,等. 胎肾细胞移植对维甲酸所致大鼠骨质疏松症的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(4):300-304.
Peng N, Li R, Zhang W, et al. Effect of fetal renal cell transplantation on rats with osteoporosis induced by retinoic acid: an experimental study[J]. Chin J Osteoporosis, 2001, 7(4):300-304.
- [3] 蒙艳斌,贺莉萍. 雌性大鼠去势方法的改进[J]. 郴州医学高等专科学校学报, 2004, 6(1):59-60.
Meng YB, He LP. Improvement of castration in female rats[J]. J Chenzhou Med Coll, 2004, 6(1):59-60.
- [4] 张晓晴,于小薇,刘蒙娜. 女性围绝经期综合征雌激素替代治疗的进展[J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(3):281-283.
Zhang XQ, Yu XW, Liu MN. Further exploration in the clinical application of female perimenopausal syndrome HRT[J]. J Liaoning Med Univ, 2009, 30(3):281-283.
- [5] 张健,赵斐,张勇. 雌激素、运动与绝经后骨质疏松症[J]. 沈阳体育学院学报, 2009, 28(3):67-69.
Zhang J, Zhao F, Zhang Y. Estrogen, exercise and postmenopausal osteoporosis[J]. J Shenyang Sport Univ, 2009, 28(3):67-69.
- [6] 李素云,王立芹,郑稼琳,等. 自由基与衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(20):2046-2048.
Li SY, Wang LQ, Zheng JL, et al. Relationship between free radicals and aging research[J]. Chin J Gerontol, 2007, 27(20):2046-2048.
- [7] 田李军. 中医药治疗绝经后骨质疏松症的研究概况[J]. 四川中医, 2002, 20(2):22-24.
Tian LJ. Chinese medicine treatment of postmenopausal osteoporosis research[J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2002, 20(2):22-24.
- [8] 霍志刚,郑清莲,李信民,等. 胎肾细胞悬液对去卵巢骨质疏松大鼠骨生物力学性能的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(12):854-857.
Huo ZG, Zheng QL, Li XM, et al. Effects of renal cell suspension (FRCS) on biomechanical properties of bones in ovariectomized osteoporosis rats[J]. Chin J Osteoporosis, 2007, 13(12):854-857.

(收稿:2009-10-10 修回:2010-01-08)