

复方葛根片对D-半乳糖致衰老模型大鼠心肌的保护作用

陶利*,王玉娟,毕云生,张淑瑜,于燕莉*(济南军区总医院药剂科,济南 250031)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4801-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.16

摘要 目的:研究复方葛根片对衰老模型大鼠的心肌保护作用。方法:将大鼠分为正常组、模型对照组、阳性对照组(维生素E)和复方葛根片高、中、低剂量(800、400、200 mg/kg)组,后5组大鼠连续ip D-半乳糖溶液30 d建立大鼠衰老模型,从第31天起再每7天1次同时给予相应药物连续56 d。末次给药后检测各组大鼠的血清与心肌中的超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及心肌中脂褐素(LPF)水平,计算凋亡心肌细胞数,观察心肌组织病理形态。结果:与正常组比较,模型对照组大鼠血清、心肌组织中SOD活性均明显降低,MDA、LPF水平显著增加,凋亡心肌细胞数明显增加($P<0.01$),心肌细胞明显损伤;与模型对照组比较,复方葛根片各剂量组大鼠血清、心肌组织中SOD活性明显升高,MDA、LPF水平明显降低,凋亡心肌细胞数明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且心肌细胞明显改善。结论:复方葛根片对D-半乳糖导致的大鼠衰老心肌细胞具有明显的保护作用,其机制可能与增加SOD活性与降低MDA、LPF含量有关。

关键词 复方葛根片;抗衰老;大鼠;氧化损伤;心肌细胞;病理形态

Study on Protective Effect of Compound Pueraria Tablets on Myocardium of Aging Model Rats Induced by D-galactose

TAO Li, WANG Yu-juan, BI Yun-sheng, ZHANG Shu-yu, YU Yan-li (Dept. of Pharmacy, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of Compound pueraria tablets on the aging model rats. METHODS: The rats were divided into normal group, model control group, positive control group (vitamin E) and Compound pueraria tablets high-dose, medium-dose and low-dose (800, 400, 200 mg/kg) groups. The aging model rats were made by injection of D-galactose solution for 30 d in latter 5 groups, and they were given relevant medicine at same time every 7 days for consecutive 56 days since 31st day. SOD activity and MDA content in the serum and myocardium and LPF contents in the myocardium were determined after the last dosing, and apoptotic cells were counted and the pathology of cerebral tissues were observed. RESULTS: Compared with normal group, the activity of SOD in the serum and myocardium were decreased significantly in model control group, MDA and LPF contents in the myocardium and the number of apoptotic cells were increased significantly ($P<0.01$); significant myocardial cell injury was found. Compared with model control group, the activity of SOD in the serum and myocardium were increased significantly, while MDA and LPF content in the myocardium and the number of apoptotic cells in Compound pueraria tablets high-dose, medium-dose and low-dose groups were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); myocardial cell morphology was improved significantly. CONCLUSIONS: Compound pueraria tablets has obvious protective effect on myocardial cells in aging rats induced by D-galactose, the mechanism maybe related to the increase of SOD activity and the decrease of the content of MDA and LPF.

KEYWORDS Compound pueraria tablets; Anti-aging; Rats; Oxidative damage; Myocardium cells; Pathological morphology

衰老是随着生长发育和年龄增长,生物体在自环境和多种因素共同作用下,导致体内各组织、各器官发生生理功能减退、机体稳态平衡及抗击外力侵害能力降低的过程^[1]。其具体表现为机体生理功能衰退、代谢紊乱、有害物质在体内积聚,导致机体氧化损伤、免疫功能降低^[2]。复方葛根片处方以葛根为君药,丹参为臣药,茵陈和延胡索为佐使,具有活血化瘀、和气血、生津养心的功效。本研究拟通过观察复方葛根片对D-半乳糖所致衰老模型大鼠血清和心肌组织中相关衰老生化指标的影响及组织病理学变化,探讨该制剂对心肌组织氧化损伤的保护作用及抗衰老作用。

1 材料

1.1 仪器

* 副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。E-mail: l.tao@163.com

通信作者:主任药师,硕士生导师,硕士。研究方向:中药质量控制与药理学。电话:0531-51666293。E-mail: yuyanli323@sohu.com

UV-2550紫外分光光度计(日本Shimadzu公司);BS124S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);AS-3120型超声波清洗器(北京华瑞博远科技发展有限公司);680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);TGL-16G-A型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

复方葛根片(济南军区总医院药剂科制剂室,批号:20141013,规格:每片0.4 g,其中含生药量0.3 g);维生素E软胶囊(山东威海药业有限公司,批号:110301,规格:每粒100 mg);D-半乳糖(张家港市华昌药业有限公司,批号:20111021,纯度: $\geq 98\%$);0.9%氯化钠注射液(辰欣药业股份有限公司,批号:1203100541);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、细胞凋亡检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供;大鼠脂褐素(LPF)酶联免疫分析试剂盒由上海柯丰生物科技有限公司提供。

1.3 动物

健康 Wistar 大鼠 60 只, ♀ ♂ 各半, 体质量 250~300 g, 山东大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(鲁)2013-0009。购入后, 稳定饲养 1 周, 室温 25~27 ℃, 湿度 50%~70%, 自然光照, 自由进食饮水。

2 方法

2.1 造模、分组与给药^[9-7]

取大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 即正常组、模型对照组、阳性对照组和复方葛根片高、中、低剂量组。除正常组外, 其他 5 组 ip *D*-半乳糖溶液 100 mg/(kg·d), 连续 30 d; 从第 31 天起, 在 ip *D*-半乳糖溶液同时各组给予相应药物。给药量按大鼠与人体型系数计算, 给药剂量作为中剂量组, 2 倍量为高剂量组, 0.5 倍为低剂量组。阳性对照组给予维生素 E 27 mg/kg, 复方葛根片高、中、低剂量组分别给予复方葛根片 800、400、200 mg/kg, 临用前加蒸馏水溶解, 使给药量为 10 ml/kg; 正常组和模型对照组分别灌胃给予等体积的蒸馏水。每天给药 1 次, 每隔 7 d 称质量 1 次, 调整给药剂量, 连续给药 56 d。

2.2 指标检测

末次给药后, 大鼠禁食不禁水 12 h 后, 以水合氯醛溶液麻醉大鼠, 腹腔静脉取血, 低温离心(离心半径: 8 cm, 3 000~3 500 r/min) 10 min, 微量移液器吸取上清液备用; 摘取心脏, 称质量, 其中一部分加入冰生理盐水制备 10% 组织匀浆, 备用。按照试剂盒说明中的操作步骤分别测定血清、心肌中的 SOD 活性以及 MDA、LPF 含量。

取各组大鼠部分心肌组织, 制备成 5 μm 厚的石蜡切片。每只大鼠随机取 2 张石蜡切片, 采用末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT 酶)介导荧光的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)标记凋亡细胞核的 DNA 3'-OH 末端, 然后在显微镜下观察, 根据心肌细胞核颜色的不同, 观察心肌细胞凋亡的情况。上述操作严格按细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。

将心脏剩余部分用生理盐水冲洗表面血液后, 放入 10% 中性福尔马林溶液中固定。固定完毕后, 取出标本, 以梯度浓度的乙醇逐级脱水, 苏木精-伊红(HE)染色, 制备组织病理切片。光学显微镜下观察组织形态学特征, 对比分析各组大鼠心脏的细胞形态及组织病理变化。

2.3 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 16.0 软件进行分析。结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对血清、心肌中 SOD 活性的影响

与正常组比较, 模型对照组大鼠血清、心肌中 SOD 活性显著降低($P < 0.01$), 表明模型复制成功。与模型对照组比较, 阳性对照组及复方葛根片各剂量组大鼠血清、心肌中 SOD 活性明显升高($P < 0.01$), 且活性水平与剂量呈正比, 尤以高剂量组升高更明显, 接近正常组。各组大鼠血清和心肌中 SOD 活性测定结果见表 1。

3.2 对血清中 MDA 与心肌中 MDA、LPF 含量的影响

与正常组比较, 模型对照组大鼠血清中 MDA 与心肌中 MDA、LPF 含量明显增加($P < 0.01$), 表明模型复制成功。与模型对照组比较, 阳性对照组大鼠血清中 MDA 含量明显降低($P < 0.05$), 心肌中 MDA、LPF 含量明显降低($P < 0.01$); 复方葛根片各剂量组大鼠血清中 MDA 含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 心肌中 MDA、LPF 含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并与剂量呈正比, 且高剂量组较中、低剂量组降低更明显。各组大鼠血清中 MDA 与心肌中 MDA、LPF 含量测定结果

见表 2。

表 1 各组大鼠血清和心肌中 SOD 活性测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 SOD activity of serum and myocardium of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血清 SOD, U/ml	心肌 SOD, U/mg·prot
正常组	241.08 ± 9.83	176.18 ± 4.76
模型对照组	163.27 ± 12.41 [#]	118.29 ± 3.13 [#]
阳性对照组	194.05 ± 7.67 [*]	150.45 ± 4.12 [*]
复方葛根片高剂量组	213.42 ± 6.51 [*]	151.33 ± 4.71 [*]
复方葛根片中剂量组	187.15 ± 9.27 [*]	137.26 ± 3.73 [*]
复方葛根片低剂量组	175.36 ± 4.37 [*]	128.63 ± 2.62 [*]

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^{*} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, [#] $P < 0.01$; vs. model control group, ^{*} $P < 0.01$

表 2 各组大鼠血清中 MDA 与心肌中 MDA、LPF 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 MDA content of serum and MDA, LPF content of myocardium of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血清 MDA, nmol/ml	心肌 MDA, nmol/mg·prot	心肌 LPF, μg/g
正常组	8.25 ± 0.81	6.31 ± 0.44	0.176 ± 0.015
模型对照组	12.72 ± 1.17 [#]	8.68 ± 0.70 [#]	0.367 ± 0.077 [#]
阳性对照组	11.32 ± 1.12 [*]	7.39 ± 0.65 ^{**}	0.281 ± 0.024 ^{**}
复方葛根片高剂量组	9.02 ± 1.43 ^{**}	7.27 ± 0.43 ^{**}	0.215 ± 0.021 ^{**}
复方葛根片中剂量组	9.69 ± 1.75 ^{**}	7.58 ± 0.57 ^{**}	0.273 ± 0.056 ^{**}
复方葛根片低剂量组	11.85 ± 0.63 [*]	7.93 ± 0.48 [*]	0.317 ± 0.028 [*]

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, [#] $P < 0.01$; vs. model control group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3.3 对大鼠心肌细胞的影响

与正常组比较, 模型对照组大鼠凋亡心肌细胞数显著增加($P < 0.01$), 表明模型复制成功。与模型对照组比较, 阳性对照组及复方葛根片各剂量组大鼠凋亡心肌细胞数明显降低($P < 0.01$); 复方葛根片各剂量组间凋亡心肌细胞数与剂量呈正比。各组大鼠凋亡心肌细胞计数结果见表 3。

表 3 各组大鼠凋亡心肌细胞计数结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 The number of apoptotic myocardium cells of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	凋亡心肌细胞计数
正常组	8.25 ± 6.2
模型对照组	71.2 ± 23.5 [#]
阳性对照组	25.7 ± 16.8 [*]
复方葛根片高剂量组	21.5 ± 15.6 [*]
复方葛根片中剂量组	27.2 ± 13.4 [*]
复方葛根片低剂量组	35.9 ± 17.5 [*]

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^{*} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, [#] $P < 0.01$; vs. model control group, ^{*} $P < 0.01$

3.4 心肌病理形态分析

光镜(HE, ×100)下对比分析心肌组织病理切片, 可见正常组大鼠心肌细胞排列规则, 形态大小正常, 未见心肌细胞损伤; 模型对照组大鼠心肌细胞排列紊乱, 部分心肌细胞萎缩, 可见心肌细胞损伤, 局部间质内淋巴细胞浸润, 表明 *D*-半乳糖能够引起心肌细胞核固缩出现细胞萎缩或凋亡从而影响心肌细胞的正常形态及功能, 引起细胞损伤。与模型对照组比较, 各给药组大鼠心肌细胞明显改善, 尤其是高剂量组大鼠心肌细胞排列规则, 细胞形态、大小正常, 无细胞水肿及核固缩现

象,未见间质内淋巴细胞浸润和心肌细胞损伤,与正常组比较无明显差异;中剂量组大鼠心肌细胞排列较为规则,局部细胞轻度水肿,间质内血管扩张充血;低剂量组大鼠心肌细胞排列紊乱,部分细胞萎缩,并见少量核损伤,部分心肌细胞出现水肿。以上表明心肌形态改善与给药剂量高低存在一定的量效关系。各组大鼠心肌病理组织切片结果见图1。

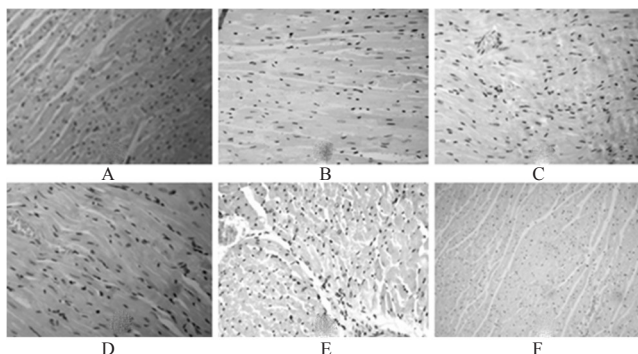


图1 各组大鼠心肌病理组织切片(HE,×100)

A.正常组;B.模型对照组;C.阳性对照组;D.复方葛根片中高剂量组;E.复方葛根片中剂量组;F.复方葛根片低剂量组

Fig 1 Myocardial pathological tissue section of rats in each group(HE,×100)

A. normal group; B. model control group; C. positive control group; D. Compound pueraria tablets high-dose group; E. Compound pueraria tablets medium-dose group; F. Compound pueraria tablets low-dose group

4 讨论

D-半乳糖诱导机体衰老,主要是促使机体细胞内半乳糖浓度升高,使其在体内还原酶作用下生成难以被机体降解的半乳糖醇。半乳糖醇的出现,致使机体产生大量的自由基,自由基作用于脂质发生过氧化反应,使脂质氧化终产物MDA含量升高,导致SOD活性降低^[8]。因此,清除自由基能力下降可致氧化与抗氧化作用失衡。过量的MDA会引起蛋白质核酸等生命大分子的交联聚合,导致其功能丧失,产生过量的LPF等过氧化物。这些过氧化物在体内产生的负面作用是导致机体免疫功能降低、衰老和死亡的重要因素。本实验用D-半乳糖诱导的大鼠衰老模型,证实了衰老模型大鼠与体内氧自由基代谢障碍、过氧化物增加、SOD含量降低有关。该模型技术成熟、简便易行、价格低廉,现已广泛应用于老年疾病、抗衰老药物筛选及药物作用机制等方面的研究^[9]。

LPF是由于机体过度氧化致细胞内脂类成分分解的产物,又称老年色素(老年斑),其随年龄增长而增加。因LPF主要在神经、心肌等器官的衰老细胞中沉积,会引起细胞代谢紊乱、功能受损,最终会因机体器官、组织衰退而引起衰老^[10],是衰老的代表性标志物之一。MDA是自由基与脂质在体内发生过氧化反应而产生的最终产物,该指标不仅能反映机体内过氧化脂质的含量,及组织中自由基的多少且通过反映组织氧化程度还可评价衰老程度,故也是衰老的重要指标。SOD是一种重要的抗氧化剂,在对抗氧化的过程中起着至关重要的作用。其能有效抑制和阻断氧化过程中的一系列反应,降低组织中MDA的生成,是反映机体清除自由基能力强弱的重要指标之一。

本制剂中的主药材是葛根和丹参。葛根中的总黄酮和葛根素对心肌的氧化代谢能产生有益作用,如增加SOD活性、降低MDA含量、减少凋亡基因的激活,从而对抗心肌细胞坏死、凋

亡和氧化损伤。特别是其能增加血管弹性和韧性,防止血管粥样硬化,使血液循环得以改善,并能显著降低心肌缺血造成的超微结构损伤^[11-12]。有关研究已证实,丹参能够显著抑制机体自由基的产生、减少自由基导致的氧化损伤、保护细胞膜、降低细胞线粒体自由基产生量、维持细胞正常功能,同时增加机体代谢废物的排出^[13]。实验结果显示,复方葛根片能够显著增加衰老模型大鼠血清和心肌组织中SOD活性($P<0.01$),明显降低脂质过氧化物MDA和LPF的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),能改善衰老模型大鼠的心肌细胞。故本项研究表明,含有葛根、丹参的复方葛根片,能明显对抗机体的氧化、衰老,并对心肌细胞有显著的保护作用。

同时本课题组另一项研究表明,本制剂能够显著改善急性血瘀模型大鼠异常升高的血液流变学状态,提高血氧饱和度,使组织、器官供血供氧增加^[14]。上述研究充分体现了葛根与丹参在多种功效共同作用下可发挥保护细胞、维持组织器官功能、延缓机体衰老的作用,即两药配比合用,其功效相得益彰。

参考文献

- [1] 李超,张丹参,宋金燕,等.衰老机制的研究进展[J].空军医学杂志,2011,27(2):99.
- [2] 周倩倩,李应东.衰老机制研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(6):148.
- [3] 于燕莉,范云飞,毕云生,等.冠舒滴丸对衰老模型大鼠脑组织的保护作用[J].中国药房,2013,24(47):4 439.
- [4] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:31.
- [5] 赵梦琳,张羊,陈晓蕾.豆丹对D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):157.
- [6] 关萍,郭博,王惠,等. D-半乳糖促小鼠衰老模型的衰老程度与自然生长鼠龄的比较[J].动物医学进展,2013,34(1):71.
- [7] 洪亮,方胜.3种不同方法建立小鼠衰老模型比较[J].中国老年学杂志,2010,30(18):2 607.
- [8] 刘芳,靳虹,张云智.益气活血方药对D-半乳糖拟衰老大鼠免疫器官质量及大脑皮层SOD、MDA的影响[J].中国老年学杂志,2009,29(24):3 213.
- [9] 饶娜,杨国栋,安芳,等.金莲花中菝葜苷和牡荆苷对D-半乳糖致衰老小鼠脂褐素和脑组织形态学的影响[J].中国老年学杂志,2012,32(2):562.
- [10] 胡梅,刘群良,舒畅,等.还少丹对老年小鼠脂褐素含量和DNA分子结构稳定性的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(3):33.
- [11] 巩红岩,秦元旭,王更富,等.葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165.
- [12] 郭密,韦倩,张仲君,等.中药葛根素抗缺氧及抗氧化的药理学研究[J].解放军保健医学杂志,2007,9(2):104.
- [13] 程亮星,闫玉华,汪宝军,等.丹参素异丙酯对D-半乳糖致衰老大鼠的抗氧化作用[J].中国中药杂志,2011,36(8):1 094.
- [14] 范云飞,刘世君,梁竹,等.复方葛根片对急性血瘀模型大鼠血液流变学及血气分析指标的影响[J].中国医院药学杂志,2013,33(2):118.

(收稿日期:2015-08-11 修回日期:2015-09-10)

(编辑:刘 萍)