

冠舒滴丸对衰老模型大鼠脑组织的保护作用

于燕莉*, 范云飞, 毕云生, 张淑瑜, 倪晨明(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(2013)47-4439-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.07

摘要 目的:研究冠舒滴丸对衰老模型大鼠脑组织氧化损伤的保护作用。方法:大鼠腹腔注射D-半乳糖以复制衰老模型。60只Wistar大鼠分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、维生素E(27 mg/kg)组与冠舒滴丸高、中、低剂量(800、400、200 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续8周。测定大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)含量,大鼠脑组织匀浆SOD活性与MDA、脂褐素(LPF)含量,并对大鼠脑组织进行病理学观察。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血清SOD活性显著减弱,MDA含量显著减少,大鼠脑组织匀浆SOD活性显著减弱,MDA、LPF含量显著减少($P<0.01$);模型组大鼠神经元与胶质细胞排列紊乱,部分神经元萎缩变性,局灶性神经元核固缩,小胶质细胞增生;与模型组比较,冠舒滴丸高、中剂量组大鼠血清SOD活性显著增强,MDA含量显著增加,大鼠脑组织匀浆SOD活性显著增强,MDA、LPF含量显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$),大鼠神经元及胶质细胞排列较为规则,细胞大小及形态较为正常,脑膜无充血水肿,未见炎细胞浸润。结论:冠舒滴丸对衰老模型大鼠脑组织氧化损伤有一定的保护作用。

关键词 冠舒滴丸;D-半乳糖;氧化损伤

Protective Effect of Guanshu Drop Pills on Brain Tissues of Aging Model Rats

YU Yan-li, FAN Yun-fei, BI Yun-sheng, ZHANG Shu-yu, NI Chen-ming (Dept. of Pharmacy, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of Guanshu drop pills on brain tissues oxidative damage of aging model rats. METHODS: The aging model was induced by intraperitoneal injection of D-galactose. Rats were divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), vitamin E group (27mg/kg) and Guanshu drop pills high-dose, medium-dose and low-dose groups (800, 400, 200 mg/kg). They were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 8 weeks. The SOD activity, MDA and LPF contents in serum and cerebral tissue were determined, and the pathology of cerebral tissues was observed. RESULTS: Compared with normal control group, the activity of SOD, the contents of MDA in serum were decreased significantly in model group, the activity of SOD, the contents of MDA and LPF in brain tissue homogenate were decreased significantly in model group ($P<0.01$); neuron and colloid cells disarranged, and denaturation and atrophy were found in some of neuron; focal neuron karyopyknosis and microglia hyperplasia were also observed. Compared with model group, the activity of SOD, the contents of MDA in serum were increased significantly in Guanshu drop pills high-dose, medium-dose group, the activity of SOD, the contents of MDA and LPF in brain tissue homogenate were increased significantly in Guanshu drop pills high-dose, medium-dose and low-dose groups ($P<0.01$ or $P<0.05$); neuron and colloid cells regularly arranged, and size and morphology of cells were in normal level; no meningeal congestion and edema was found, and no inflammatory cell infiltration was found. CONCLUSIONS: Guanshu drop pills has protective effect on oxidative damage in the brain tissue of aging model rats.

KEY WORDS Guanshu drop pills; D-galactose; Oxidative damage

衰老是生物体在生长发育成熟后,随着年龄增长由多种因素共同作用导致生物体发生的全身各组织、器官功能减退,以及抵抗环境伤害和恢复机体平衡能力下降的现象或过程^[1]。具体表现为机体各组织、器官的生理功能逐渐衰退、代谢迟缓,从而导致有害物质在体内积聚,进一步加速衰老进程,甚至引发疾病^[2]。脑组织是机体重要的神经中枢,是衰老较早的器官之一。现代研究表明,机体代谢产物自由基导致的氧化损伤是机体组织、器官衰老的主要原因之一^[1,3]。冠舒滴丸是《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(2002年增补版)收录的复方葛根片的改型制剂,处方由丹参、葛根、茵陈和延胡索组成,具

*副主任药师,硕士研究生导师,硕士。研究方向:中药制剂及其药效物质基础。电话:0531-51666293。E-mail:yuyanli323@sohu.com

有活血化瘀、和气止痛、生津养心的作用^[4]。本研究拟通过观察冠舒滴丸对D-半乳糖所致大鼠衰老模型血清和脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及脂质过氧化反应产物丙二醛(MDA)和脂褐素(LPF)含量的影响,探讨该制剂对脑组织氧化损伤的保护作用机制及抗衰老作用。

1 材料

1.1 仪器

玻璃组织匀浆器、UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津公司);BS124S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);AS-3120型超声清洗器(北京华瑞博远科技发展有限公司);BIO-RAD680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);TGL-16G-A型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

冠舒滴丸(济南军区总医院制剂室,批号:20110620,规格:38 mg/丸);维生素E软胶囊(山东威高药业有限公司,批号:110301,规格:100 mg/粒,);D-半乳糖(张家港市华昌药业有限公司,批号:20111021);氯化钠注射液(辰欣药业股份有限公司,批号:1203100541,规格:100 ml:0.9 g);SOD、MDA、考马斯亮蓝蛋白测试盒均由南京建成生物工程研究所提供;LPF酶联免疫分析试剂盒(上海柯丰生物科技有限公司)。

1.3 动物

健康Wistar大鼠60只,体质量250~300 g,♀♂兼半,由山东大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(鲁)2009-0001]。购入后,稳定饲养1周,温度:25~27℃,湿度:50%~70%,自然光照,自由进食饮水。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药^[6-7]

大鼠ip D-半乳糖溶液(100 mg/kg)以复制衰老模型。实验分为六组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、维生素E(27 mg/kg)组与冠舒滴丸高、中、低剂量(800、400、200 mg/kg)组。ig给药,每天1次,每隔7天称体质量1次,调整给药剂量,连续8周。

2.2 指标的检测

末次给药后,大鼠禁食不禁水12 h,水合氯醛麻醉,腹腔静脉取血,以离心半径为8 cm、4℃3 000~3 500 r/min离心15 min,微量移液器吸取上清液,备用;摘取大鼠脑组织,称定质量,加入冰生理盐水制备10%组织匀浆,备用。按照试剂盒说明书中的操作步骤分别测定血清中SOD活性与MDA含量,测定脑组织匀浆中SOD活性与MDA、LPF含量;切取小块脑组织,生理盐水冲洗表面血液,放入10%中性福尔马林溶液中固定,固定完毕后以梯度浓度的酒精逐级脱水,HE染色,制备组织病理切片,光学显微镜下进行组织形态学观察,对比分析各组大鼠脑组织的细胞形态及组织病理变化。

2.3 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件对实验数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 冠舒滴丸对模型大鼠血清SOD活性和MDA含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中SOD活性显著减弱($P < 0.01$),MDA含量显著增加($P < 0.01$),表明模型复制成功;与模型组比较,冠舒滴丸高、中剂量组大鼠血清SOD活性显著增强($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),MDA含量显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。冠舒滴丸对模型大鼠血清SOD活性和MDA含量的影响见表1。

3.2 冠舒滴丸对模型大鼠脑组织匀浆SOD活性与MDA、LPF含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织匀浆SOD活性显著减弱($P < 0.01$),MDA和LPF含量显著增加($P < 0.01$),表明模型复制成功;与模型组比较,冠舒滴丸高、中、低剂量组大鼠脑组织匀浆SOD活性显著增强($P < 0.01$),MDA和LPF含量显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。冠舒滴丸对模型大鼠脑组织匀浆SOD活性与MDA、LPF含量的影响见表2。

3.3 脑组织形态学观察

经在光镜下对比分析脑组织病理切片,发现正常对照组

表1 冠舒滴丸对模型大鼠血清SOD活性和MDA含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of Guanshu drop pills on the activity of SOD and contents of MDA in blood serum of rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD,U/mg	MDA,nmol/mg
正常对照组	241.07±9.83	8.25±0.81
模型组	163.26±12.41 [*]	12.72±1.17 [*]
维生素E组	194.04±7.67	11.32±1.12 [*]
冠舒滴丸高剂量组	224.65±8.21 ^{##}	8.76±1.33 ^{##}
冠舒滴丸中剂量组	195.02±11.38 [#]	9.29±0.81 [#]
冠舒滴丸低剂量组	181.11±5.47	11.77±0.79

与正常对照组比较:^{*} $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.01$,^{##} $P < 0.05$
vs. blank control group: ^{*} $P < 0.01$; vs. model control group: [#] $P < 0.01$,^{##} $P < 0.05$

表2 冠舒滴丸对模型大鼠脑组织匀浆SOD活性及MDA、LPF含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of Guanshu drop pills on the activity of SOD and contents of MDA and LPF in myocardium of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD,U/mg	MDA,nmol/mg	LPF,μg/g
正常对照组	156.58±7.25	7.99±0.57	0.327±0.016
模型组	122.88±5.28 [*]	13.06±0.51 [*]	0.656±0.020 [*]
维生素E组	137.54±2.45 ^{##}	9.07±0.38	0.589±0.013
冠舒滴丸高剂量组	148.07±1.74 ^{##}	8.51±0.43 ^{##}	0.424±0.008 ^{##}
冠舒滴丸中剂量组	139.15±1.66 ^{##}	9.41±0.30 ^{##}	0.496±0.013 [#]
冠舒滴丸低剂量组	135.33±1.28 ^{##}	10.88±0.38 ^{##}	0.586±0.007 [#]

与正常对照组比较:^{*} $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.01$,^{##} $P < 0.05$
vs. blank control group: ^{*} $P < 0.01$; vs. model control group: [#] $P < 0.01$,^{##} $P < 0.05$

大鼠神经元及胶质细胞分布正常,排列较规则,神经元未见核固缩及细胞水肿,脑膜血管无充血水肿现象;模型组大鼠则出现神经元及胶质细胞排列紊乱、部分神经元萎缩变性、局灶性神经元核固缩、小胶质细胞增生等衰老现象。表明D-半乳糖能够引起脑组织神经元萎缩变性或者坏死,引起组织细胞排列紊乱,形态功能改变,进而呈现衰老症状。

与模型组比较,冠舒滴丸高、中、低剂量组大鼠症状明显改善,神经元及胶质细胞排列较为规则,细胞大小及形态较为正常,脑膜无充血水肿,未见炎细胞浸润。尤其是冠舒滴丸高剂量组神经元未见变性坏死,效果显著。冠舒滴丸中、低剂量组则出现部分神经元细胞萎缩或变性、胶质细胞增生、神经元及胶质细胞排列较为紊乱、局灶性白质水肿等症。表明存在一定的量效关系。脑组织形态学变化见图1。

4 讨论

D-半乳糖所致的亚急性衰老模型,是在一定时间内连续给动物ip高剂量D-半乳糖,使其机体细胞内半乳糖浓度增高,在醛糖还原酶的催化下还原成不能被细胞进一步代谢的半乳糖醇,进而堆积在细胞内,影响细胞正常渗透压,导致细胞肿胀、功能障碍、代谢紊乱,破坏并消耗机体清除自由基的能力(如减弱SOD活性);同时,在半乳糖还原成半乳糖醇的过程中又产生超氧阴离子自由基,这样使机体氧自由基聚集,攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,细胞膜脂质受损,以及脂质过氧化物如LPF、MDA等增加^[6-7]。最终引起全身代谢紊乱,各组织、器官功能衰退,将6~8周龄的幼鼠诱导成相当于两年多的自然衰老动物,是一种较为理想的模型。

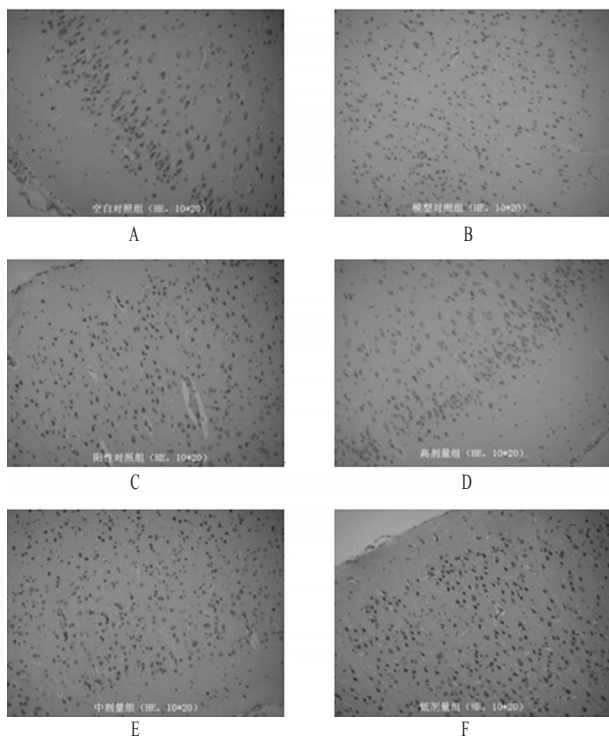


图1 脑组织形态学变化(HE, 20×10)

Fig 1 Morphological changes of cerebral tissue(HE, 20×10)

A.正常对照组;B.模型组;C.维生素E组;D.冠舒滴丸高剂量组;E.冠舒滴丸中剂量组;F.冠舒滴丸低剂量组

A.normal control group; B.model group; C.Vitamin E group; D.Guanshu drop pill high dose group; E. Guanshu drop pill medium dose group; F. Guanshu drop pill low dose group

目前已经广泛应用于衰老机制、老年疾病、抗衰老药物筛选等方面的研究^[8]。

LPF是过氧化脂质分解产物,是一种长期积累在细胞内的残余体,它随年龄增长而增多。因其常在老年动物细胞中存在,故又称老年色素(老年斑),主要沉积在神经、肝脏、心肌等组织、器官的衰老细胞中,导致细胞代谢减缓、功能降低,最终导致机体组织、器官功能衰退而引起衰老^[9],是衰老的重要标志物之一,检测其含量可以反映细胞最终受损伤的程度^[10]。MDA是自由基作用于脂质发生过氧化反应的最终产物,能较客观地反映体内过氧化脂质含量,进而间接反映体内过氧化脂质自由基的多少,既是评价衰老的重要指标之一,又可反映组织氧化的程度。SOD活性随年龄增长而下降,在机体抗氧化防御体系中,对氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用。它可有效地清除自由基反应的启动因子(O_2^-)来抑制和阻断自由基引起的连锁反应,降低自由基代谢产物(MDA)生成,从而起到抗氧化、抗衰老作用。SOD活力的高低,能够体现出机体清除自由基能力的强弱^[11-12]。

现代研究表明,冠舒滴丸处方所含的葛根、丹参等药材的主要有效成分能够显著抑制机体自由基的产生,明显减少自由基导致的氧化损伤^[13-15],保护细胞膜,维持生物膜及细胞的正常功能。本课题组的研究表明,冠舒滴丸能够改善血液流变性、血液载氧功能,改善微循环,增加组织、器官的供血供氧量,改善组织、器官的生理活性,有效延缓因气血瘀滞、运行

不畅而导致的机体代谢异常所引起的自由基升高。同时,冠舒滴丸能够明显增加衰老模型大鼠血清与脑组织中SOD活性($P<0.01$),降低脂质过氧化反应产物MDA和LPF含量,减少氧化应激反应引起的细胞凋亡^[16],从而起到保护细胞,延缓机体衰老的作用。

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] 刘永源,贺松其,张锡滔,等.二陈汤对亚急性衰老小鼠的实验研究[J].辽宁中医学院学报,2003,5(4):373.
- [3] 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.
- [4] 中国人民解放军总后勤部卫生部.中国人民解放军医疗机构制剂规范:增补本[M].2002年版.北京:人民军医出版社,2007:21.
- [5] 黄晓,谷松,小柴胡汤对D-半乳糖致亚急性衰老模型大鼠血清和海马组织中SOD活性MDA及心肌LPF含量影响的实验研究[J].中华中医药学刊,2007,25(3):542.
- [6] 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.
- [7] 陈奇.中药药理学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:940,953.
- [8] 饶娜,杨国栋,安芳,等.金莲花中荜草苷和牡荆苷对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.
- [9] 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.
- [10] 张晓杰,张静艳,赵坤,等.通络救脑口服液对AD大鼠海马单胺氧化酶活性、脂褐素含量的影响[J].中国老年学杂志,2010,30(18):2 634.
- [11] 谢展雄,吴建伟,吴铁松,等.吡拉西坦对D-半乳糖致衰老模型大鼠脑组织超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响[J].中国药房,2009,20(19):1 459.
- [12] 范学辉,张清安,胡柏平.黄芩籽油的体内抗氧化功能研究[J].江西农业学报,2007,19(10):111.
- [13] 张远荣,蒋企洲.葛根素的抗氧化活性作用[J].实用临床医药杂志,2005,9(5):92.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.

(收稿日期:2013-10-16 修回日期:2013-11-03)