

蒙药手掌参-37 味丸对亚急性衰老模型小鼠的 抗衰老作用及其机制

斯琴, 刘铜华*

(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**研究蒙药手掌参-37 味丸的抗衰老作用及其机制。**方法:**120 只 ICR 雌性小鼠随机分为 6 组:正常对照组、衰老模型组、维生素 E 组、蒙药手掌参-37 味丸高、中、低剂量给药组。除正常对照组外,其余各组均采用颈背部皮下注射 *D*-半乳糖 120 mg·kg⁻¹, 1 次/d, 连续 7 周, 建立亚急性衰老模型小鼠。同时蒙药手掌参-37 味丸高、中、低剂量给药组小鼠 ig(2.4, 1.2, 0.6 g·kg⁻¹)手掌参-37 味丸, 维生素 E 组小鼠灌胃(38.9 mg·kg⁻¹)维生素 E, 连续 7 周。治疗结束后通过避暗实验检测小鼠的学习记忆能力; 计算脑、胸腺、脾脏指数; 检测脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)的活性、丙二醛(MDA)含量; HE 染色检测小鼠大脑皮层组织病理形态改变。**结果:**与模型组比较, 蒙药手掌参-37 味丸中剂量组小鼠学习记忆能力[潜伏期(152.22 ± 38.16), (185.75 ± 35.03) s, (*P* < 0.01), 错误次数(2.11 ± 0.81), (1.26 ± 0.42) 次, (*P* < 0.01)]改善; 脑[(10.43 ± 1.66), (13.39 ± 1.39) mg·g⁻¹, (*P* < 0.01)]、胸腺[(0.91 ± 0.18), (1.21 ± 0.20), (*P* < 0.01) mg·g⁻¹]、脾脏[(3.63 ± 0.55), (4.76 ± 0.82) mg·g⁻¹, (*P* < 0.01)]指数提高, 增强脑组织中 SOD[(156.9 ± 14.5), (180.6 ± 14.7) U·mg⁻¹, (*P* < 0.01)]及 CAT[(5.24 ± 0.51), (7.14 ± 0.72) U·mg⁻¹, (*P* < 0.01)]的活性、降低脑组织中丙二醛[(4.31 ± 0.47), (3.17 ± 0.73) nmol·mg⁻¹, (*P* < 0.01)]含量。**结论:**蒙药手掌参-37 味丸对亚急性衰老模型小鼠具有抗衰老作用, 其作用机制是增强脑组织抗氧化酶的活性, 降低脑组织丙二醛含量, 保护大脑神经细胞, 从而改善小鼠的记忆能力, 增强抗氧化能力和免疫功能。

[关键词] 蒙药手掌参-37 味丸; *D*-半乳糖; 抗衰老作用; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0194-04

[doi] 10.11653/syfj2013150194

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1139.005.html>

[网络出版时间] 2013-05-27 11:39

Anti-aging Effect and Mechanism of Shouzhangshen-37 Pill from Mongolian Medicine on Subacute Aging Mice

SI Qin, LIU Tong-hua*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-aging effect and mechanism of Shouzhangshen-37 pill from Mongolian medicine on subacute aging mice. **Method:** One hundred and twenty ICR females were categorized into six groups randomly: normal control group, aging model group, vitamin E groups (VE) high, middle, low doses of Shouzhangshen-37 pill groups. Except the normal control group, all other groups were injected *D*-galactose (120 mg·kg⁻¹) once per day, lasting 7 weeks, to established subacute aging model. The high, middle, low doses of Shouzhangshen-37 pill groups were ig administered Shouzhangshen-37 pill respectively for 0.5 mL each mouse (2.4, 1.2, 0.6 g·kg⁻¹ prepared with normal saline), VE group was ig administered VE same volume (38.9

[收稿日期] 20121207(006)

[基金项目] 北京中医药大学(教育部)中医养生学重点实验室开放课题项目(2011-SYSKFKT-02-2)

[第一作者] 斯琴, 博士研究生, 内蒙古民族大学高级实验师

[通讯作者] * 刘铜华, Tel: 010-64286642, E-mail: thliu@tom.com

mg·kg⁻¹, prepared with normal saline) for 7 weeks. After the treatment, the anti-aging effect and mechanism were evaluated by observing the learning and memory ability by step-through test, calculating indexes of brain, thymus, spleen, taking brain tissue, measuring the content of SOD, CAT and MDA and observing the changes of pathomorphism of cerebral tissue in mice by HE coloration. **Result:** Compared with model group, the Shouzhangshen-37 pill improved memory ability in mice [incubation period (152.22 ± 38.16), (185.75 ± 35.03) s, (*P* < 0.01)], enhanced the indexes of brain [(10.43 ± 1.66), (13.39 ± 1.39) mg·g⁻¹, (*P* < 0.01)], thymus [(0.91 ± 0.18), (1.21 ± 0.20) mg·g⁻¹, (*P* < 0.01)], spleen, [(3.63 ± 0.55), (4.76 ± 0.82) mg·g⁻¹, (*P* < 0.01)], improved the ability of SOD [(156.9 ± 14.5), (180.6 ± 14.7) U·mg⁻¹, (*P* < 0.01)] and CAT [(5.24 ± 0.51), (7.14 ± 0.72) U·mg⁻¹, (*P* < 0.01)] in brain tissue, decreased content of MDA in brain tissue [(4.31 ± 0.47), (3.17 ± 0.73) nmol·mg⁻¹, (*P* < 0.01)]. **Conclusion:** Shouzhangshen-37 pill has an anti-aging effect in subacute aging mice. The mechanism may enhance antioxidant activity in brain tissue, decrease content of MDA in brain tissue, protect the brain nerve cells, improve memory ability in mice.

[**Key words**] Shouzhangshen-37 pill of Mongolian medicine; *D*-galactose; anti-aging; mechanism

蒙药手掌参-37味丸由手掌参、寒水石、益智仁、全石榴、干姜、五灵脂、肉桂、葶苈、蛤蚧(制)、诃子、紫硃砂、照白杜鹃等37味药材组成,具有祛“巴达干、赫依”,补肾,调元,燥“协日乌素”功效,用于肾寒肾虚,浮肿,耳鸣,遗精阳痿,胃寒,消化不良等疾病^[1]。在蒙医临床上该药的使用范围广,治疗效果好,最近研究报道该药有增强免疫功效、延缓衰老、壮阳等功效^[2]。为了进一步探讨其作用机制,本实验观察了蒙药手掌参-37味丸对亚急性衰老模型小鼠的学习记忆能力、脑、脾、胸腺等脏器指数、脑自由基代谢的影响。

1 材料

1.1 动物 6~7周龄的雌性ICR小鼠120只,体重(28 ± 2)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号SCXK(京)2012-0001。饲养于SPF级设施,温度(23 ± 2)℃,相对湿度60%~70%。

1.2 药品与试剂 蒙药手掌参-37味丸,由内蒙古民族大学附属医院蒙药制剂室自制,批号20110830;维生素E软胶囊,生产批号10514001,由厦门星鲨制药有限公司生产;*D*-半乳糖(*D*-Galactose);超氧化物歧化酶(SOD,批号20120424)、过氧化氢酶(CAT,20120624)、丙二醛(MDA,批号20120425)试剂盒,均购自南京建成生物科技有限公司。

1.3 仪器设备 YLS-17B避暗穿梭测试仪(北京众实迪科技发展有限公司);MK3酶标仪(美国Thermo);冷冻离心机(美国Thermo);-80℃冰箱(美国FORMA);分光光度计等。

2 方法

2.1 模型建立与给药方法 6~7周龄雌性ICR小

鼠适应喂养1周后,将动物随机分成6组:正常对照组、衰老模型组、蒙药手掌参-37味丸高、中、低剂量组、维生素E组,每组20只。衰老模型组和各给药组小鼠每日颈部sc *D*-半乳糖120 mg·kg⁻¹,建立亚急性衰老模型,正常对照组小鼠颈部皮下注射等容量生理盐水,同时蒙药手掌参-37味丸高、中、低剂量给药组小鼠ig 20 mL·kg⁻¹(2.4,1.2,0.6 g·kg⁻¹,生理盐水配制)手掌参-37味丸,维生素E组小鼠ig 体积(38.9 mg·kg⁻¹,生理盐水配制)维生素E,正常对照组和衰老模型组小鼠ig等容量生理盐水20 mL·kg⁻¹,连续7周^[3]。

2.2 学习记忆能力测试 使用YLS-17B避暗穿梭测试仪做避暗实验,将小鼠放入明箱内熟悉环境3 min后按动测试键以暗箱内通45 V,0.10 mA交流电,小鼠喜暗进入暗箱,受电击而退出,因而产生暗箱有电的记忆,如此训练5 min。24 h后重做测试,记录小鼠第1次进入暗箱的潜伏期和5 min之内进入暗箱受到电击的次数(错误次数)^[4-5]。

2.3 测试指标 学习记忆能力测试结束后,不给小鼠饲料和水,第2天称取每只小鼠的体重,摘眼球取血后取出全脑、脾脏、胸腺组织,电子天平称量取组织的质量。用于切片的脑组织置于10%甲醛中固定,其余脑组织用锡箔纸包好,置于-80℃超低温冰箱中保存待用。

2.3.1 脏器指数的测定 准确称取小鼠体重(空腹体重)和全脑、胸腺、脾脏湿重,计算各脏器指数(mg·g⁻¹)[脏器质量(mg)/体重(g)]。

2.3.2 脑组织生化指标测定 将冻存的脑组织放入组织匀浆机配用管中,加入9倍体积预冷生理盐水,充分研磨制成10%脑组织匀浆,离心取上清检

测。采用 WST-1 法测定 SOD 活性,可见光法测定 CAT 的活性,硫代巴比妥酸 (TBA) 反应物法测定 MDA 含量。具体操作严格按试剂盒说明书进行。

2.3.3 大脑组织病理形态学观察 10% 甲醛溶液中固定 1 周的脑组织标本,左、右大脑顶部及颞部切取约 3 mm × 3 mm × 2 mm 的皮质组织,将其脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,制成 5 μm 石蜡切片,行苏木素-伊红 (HE) 染色,光学显微镜下观察、拍照。

2.4 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 SPSS 13.0 统计学分析软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对亚急性衰老小鼠避暗实验的影响 第 1 天学习测试中,模型组小鼠在 5 min 内错误次数较正常对照组明显增多,蒙药手掌参-37 味丸高、中、低剂量组小鼠在 5 min 内错误次数较模型组明显减少。在第 2 天记忆能力测试中,模型组小鼠第 1 次进入暗箱的潜伏期较正常对照组显著缩短,5 min 内错误次数明显增多 ($P < 0.01, P < 0.05$),蒙药手掌参-37 味丸高、中、低剂量组小鼠第 1 次进入暗箱

的潜伏期明显延长,5 min 内错误次数明显减少 ($P < 0.01, P < 0.05$),见表 1。

表 1 蒙药手掌参-37 味丸对亚急性衰老小鼠避暗实验的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	记忆能力 (300 s)	
			潜伏期/s	错误数/次
正常对照	20	-	203.91 ± 54.56	0.89 ± 0.31
衰老模型	19	-	152.22 ± 38.16 ¹⁾	2.11 ± 0.81 ²⁾
蒙药手掌参-37 味丸	19	2.4	177.80 ± 21.36 ³⁾	1.54 ± 0.53 ³⁾
	20	1.2	185.75 ± 35.03 ⁴⁾	1.26 ± 0.42 ⁴⁾
	20	0.6	170.11 ± 37.26 ³⁾	1.71 ± 0.82 ³⁾
维生素 E	20	38.9 × 10 ⁻³	192.23 ± 33.82 ⁴⁾	1.26 ± 0.42 ⁴⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与衰老模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对亚急性衰老小鼠脏器指数的影响 与正常对照组比较,衰老模型组小鼠脑、胸腺、脾脏指数均显著减小 ($P < 0.01, P < 0.05$)。蒙药手掌参-37 味丸高、中、低剂量组小鼠脑、胸腺、脾脏指数明显增大 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 蒙药手掌参-37 味丸对亚急性衰老小鼠脏器指数和脑组织中生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	脑指数 /mg·g ⁻¹	脾指数 /mg·g ⁻¹	胸腺指数 /mg·g ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	CAT /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹
正常对照	20	-	13.65 ± 2.76	4.64 ± 0.94	1.36 ± 0.46	179.5 ± 24.4	7.06 ± 0.98	3.13 ± 0.74
衰老模型	19	-	10.43 ± 1.66 ¹⁾	3.63 ± 0.55 ²⁾	0.91 ± 0.18 ¹⁾	156.9 ± 14.5 ²⁾	5.24 ± 0.51 ¹⁾	4.31 ± 0.47 ²⁾
蒙药手掌参-37 味丸	19	2.4	12.97 ± 1.89 ³⁾	4.53 ± 0.66 ³⁾	1.11 ± 0.12 ³⁾	170.8 ± 20.3 ³⁾	6.51 ± 0.22 ³⁾	3.21 ± 0.98 ³⁾
	20	1.2	13.39 ± 1.39 ⁴⁾	4.76 ± 0.82 ⁴⁾	1.21 ± 0.20 ⁴⁾	180.6 ± 14.7 ⁴⁾	7.14 ± 0.72 ³⁾	3.17 ± 0.73 ⁴⁾
	20	0.6	13.05 ± 2.25 ³⁾	4.58 ± 0.65 ³⁾	1.14 ± 0.25 ³⁾	177.3 ± 20.1 ³⁾	6.32 ± 0.23 ³⁾	3.36 ± 0.81 ³⁾
维生素 E	20	38.9 × 10 ⁻³	13.12 ± 1.31 ⁴⁾	4.54 ± 0.79 ⁴⁾	1.23 ± 0.23 ³⁾	183.4 ± 17.5 ⁴⁾	7.71 ± 0.88 ³⁾	3.18 ± 0.59 ⁴⁾

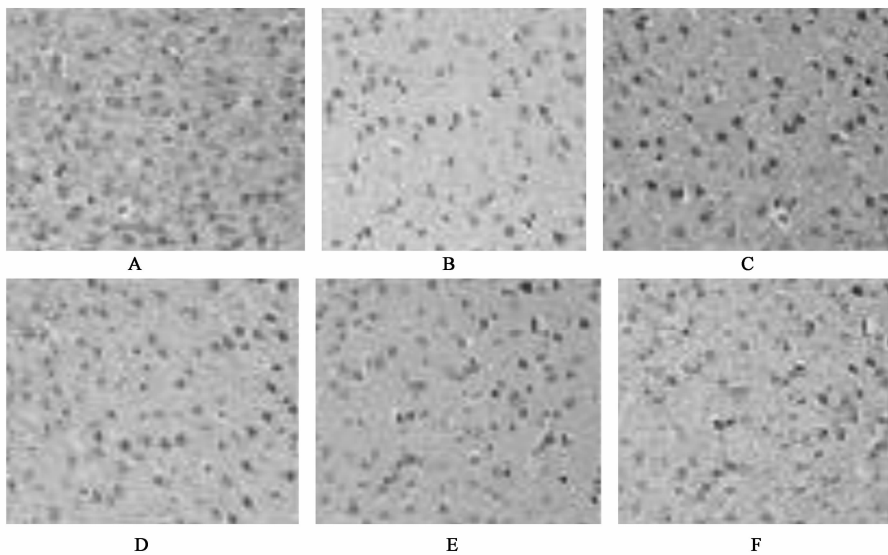
3.3 对亚急性衰老小鼠脑组织 SOD, CAT, MDA 的影响 与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织 SOD, CAT 活性明显降低,MDA 含量提高,差异有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$)。蒙药手掌参-37 味丸高、中、低剂量组及维生素 E 组小鼠脑组织 SOD, CAT 活性明显升高,MDA 含量降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$),见表 2。

3.4 病理形态学的影响 正常对照组小鼠大脑皮质神经细胞丰富,排列整齐,着色正常;模型组小鼠大脑皮质神经细胞数量明显减少,排列疏松,着色变浅,残存神经细胞固缩变圆;蒙药手掌参-37 味丸低剂量组小鼠大脑皮质神经细胞形态结构介于正常对照组和衰老模型组之间;高剂量组小鼠大脑皮质神经细胞略减少,部分神经细胞胞体变小、淡染;中

剂量组和维生素 E 组小鼠大脑皮质神经细胞排列整齐,着色正常。见图 1。

4 讨论

本实验采用小鼠皮下注射 D-半乳糖 7 周,造成亚急性衰老小鼠模型。避暗实验结果表明模型组小鼠记忆能力显著减退,蒙药手掌参-37 味丸治疗组小鼠学习记忆能力明显改善。脑、胸腺、脾等重要器官的质量变化是反映生物体衰老程度的重要指标^[6-7],胸腺和脾质量的降低、萎缩、功能衰退可使免疫功能降低,导致加速老化进程。本实验结果显示 D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠脑、胸腺和脾脏指数均显著下降,蒙药手掌参-37 味丸治疗明显提高了衰老小鼠脑、胸腺及脾脏质量,说明蒙药手掌参-37 味丸能够对抗小鼠脑的衰老,保持机体的免



A. 正常组;B. 模型组;C. 维生素 E 38.9 mg·kg⁻¹ 给药组;D. 蒙药手掌参-37 味丸 2.4 g·kg⁻¹ 给药组;
E. 蒙药手掌参-37 味丸 1.2 g·kg⁻¹ 给药组;F. 蒙药手掌参-37 味丸 0.6 g·kg⁻¹ 给药组
图 1 蒙药手掌参-37 味丸对亚急性衰老小鼠脑组织病理形态学的影响(HE, ×100)

疫功能,从而对延缓衰老具有积极的意义。SOD 是体内重要的抗氧化酶之一,可以抑制和阻断自由基反应,降低自由基代谢产物 MDA 的生成。SOD 的活力反应了机体清除自由基的能力,是评价抗衰老药物的主要标志之一。实验结果表明,蒙药手掌参-37 味丸通过提高 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑组织中 SOD 活性发挥抗氧化作用,抑制和阻断自由基反应而抗衰老。CAT 清除体内的 H₂O₂,阻断由超氧化阴离子所启动产生的自由基的连锁反应,减少活性氧的产生,保护各脏器免受自由基的损伤,从而防止畸变,延缓衰老作用。MDA 是脂质过氧化的主要产物之一,其在脑组织中的水平随着年龄的增加而升高,可反映自由基对机体的损伤程度^[8-9]。本实验表明蒙药手掌参-37 味丸可降低 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑组织 MDA 含量,中、高剂量组可显著降低脑组织 MDA 的含量,提示其可减轻脂质过氧化损伤,而发挥抗衰老作用。此外,病理形态学研究结果亦显示蒙药手掌参-37 味丸能够改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠大脑皮质的形态结构改变。

蒙药手掌参-37 味丸具有清除自由基,抗氧化等作用。能保护神经细胞,免于氧化应激损伤,有很强的减慢神经退行性改变的作用,从而改善衰老的行为学变化,提高亚急性衰老小鼠的学习记忆能力,延缓衰老的进程^[10]。本研究为将蒙药手掌参-37 丸的开发利用提供了实验依据。有关蒙药手掌参-37 味丸抗衰老作用的分子机制及其主要有效成分仍需要进一步研究和探讨。

[参考文献]

- [1] 白清云. 中国医学百科全书蒙医学卷[M]. 赤峰:内蒙古科技出版社,1987:168.
- [2] 包桂兰,赵中华. 手掌参-37 味丸的药理作用研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(5):739.
- [3] 朱亚珍,朱虹光. *D*-半乳糖致衰老动物模型的建立及其检测方法[J]. 复旦学报:医学版,2007,34(4):617.
- [4] 张丹,王亚芳,张建军. 藏药旺拉提取物 CE 对亚急性衰老小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响[J]. 中国新药杂志,2005,14(11):1301.
- [5] 徐孝平,潘永明. 衰老片对肾虚小鼠空间学习记忆和脑自由基代谢的影响[J]. 中华中医药学刊,2011,29(8):1771.
- [6] 刘晓秋,李卫东,唐惠琼,等. *D*-半乳糖衰老大鼠自由基代谢状况分析[J]. 中国老年学杂志,2001,21(6):456.
- [7] Cheng Peng, He Yin, Edwin Chan, et al. Black tea thea-flavins extend the lifespan of fruit flies[J]. Exp Gerontol, 2009,44(6):773.
- [8] 童坦君,张宗玉. 衰老机制及其学说[J]. 生理科学进展,2007,38(1):14.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:914.
- [10] 马宏,张宗玉,童坦军. 衰老的生物学指标[J]. 生理科学进展,2002,33(1):14.

[责任编辑 聂淑琴]