

肾脾阳虚大鼠模型及桂附理中丸 对大鼠海马衰老变化的影响

郭煜晖¹, 周安方², 陈涛^{1*}, 胡卫¹, 梅志刚¹

(1. 三峡大学, 湖北 宜昌 443002; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的: 本实验首次采用 im 氢化可的松和 ig 大黄水煎液复合方法复制肾脾阳虚模型, 观察桂附理中丸对肾脾阳虚大鼠大脑海马组织的影响以及温补脾肾方药的调节作用。方法: 8 周龄 SD 大鼠 40 只, 雄性, 随机分为正常对照组、模型组、维生素 E 组和桂附理中丸组 4 组。正常对照组大鼠每天上午 8:00 im 生理盐水 5 mL·kg⁻¹, 同时 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹, 下午 14:00 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹; 其余组大鼠上午 8:00 im 氢化可的松 25 mg·kg⁻¹, 同时 ig 大黄水煎液 4 g·kg⁻¹, 下午 14:00 模型组 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹, 维生素 E 组 ig 维生素 E 混悬液 18 × 10⁻³ g·kg⁻¹, 桂附理中丸组 ig 桂附理中丸混悬液 1.62 g·kg⁻¹, 共 30 d。电镜下观察海马组织超微结构改变; 流式细胞仪检测细胞周期。结果: 肾脾阳虚模型可使大鼠海马 CA1 区细胞器及神经元出现衰老表现, 细胞老化率明显升高 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 维生素 E 组及桂附理中丸组大鼠海马细胞器增多, 脂褐素沉积减少, 细胞老化率明显下降 ($P < 0.05$), 桂附理中丸组大鼠海马 CA1 区细胞轮廓清晰, 无细胞器及神经元细胞衰老征象。结论: 实验大鼠海马组织的衰老变化是肾脾阳虚模型的明显病理改变, 桂附理中丸具有调节海马神经细胞、恢复细胞周期的功效。

[关键词] 肾脾阳虚; 桂附理中丸; 大脑海马

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0182-04

[doi] 10.11653/syfy2013140182

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130514.1002.005.html>

[网络出版时间] 2013-05-14 10:02

Effects of Guifu Lizhong Wan on Hippocampus Aging in Mice Deficiency of Kidney and Spleen Model

GUO Yu-hui¹, ZHOU An-fang², CHEN Tao^{1*}, HU Wei¹, MEI Zhi-gang¹

(1. China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[收稿日期] 20121129(021)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81102529)

[第一作者] 郭煜晖, 博士, 从事藏象理论及其应用研究, Tel: 18642907592, E-mail: guoyuhui320@yeah.net

[通讯作者] * 陈涛, 博士, 教授, 从事中医脏象理论研究、中西医结合抗肿瘤研究, Tel: 0717-6397378, E-mail: chentao@ctgu.edu.cn

- [11] 孔祥训. 大肠癌中医辨证分型与外周血 VEGF 及 P53 基因表达水平的相关性研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2011.
- [12] 刘永惠, 郭少贤, 常靖, 等. 丹参酮对血瘀证乳腺癌 P53 基因、mdm2 基因表达的影响[J]. 陕西中医, 2011, 32(12): 1666.
- [13] Patil A S, Sable R B, Kothari R M. Occurrence, biochemical profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms and their functions in endochondral ossification[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(4): 1298.
- [14] Mackenzie F, Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system [J]. Development, 2012, 139(8): 1371.
- [15] 王轩, 李引刚, 桃仁、木香、黄芪分别与红花配伍对大鼠早期桡骨骨折愈合及 VEGF 表达的影响[J]. 山西中医学院学报, 2009, 10(3): 18.
- [16] 卢正华, 张雨, 宫丽鸿, 等. 核桃承气改良方对家兔血管内皮损伤后 STAT3 和 VEGF 影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(5): 1022.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To study the effects of Guifu Lizhong Wan on hippocampus aging in mice deficiency of kidney and spleen model. **Method:** Forty SD male mice were randomly divided into normal control group, model group, vitamin E group, Guifu Lizhong Wan group, 10 each group. The normal control group was im treated with $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ saline and ig with $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ at 8:00 am, and 2:00 pm, respectively. The other groups were injected hydrocortisone with $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and liquid of *Rheum palmatum* decoction were administered with $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ at 8:00 am, the model group was administered saline with $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, vitamin E group was administered vitamin E with $18 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and Guifu Lizhong Wan groups were given Guifu Lizhong Wan with $1.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ at 2:00 pm, once a day 30 days. Observation of ultrastructure of hippocampus changes; testing the brain hippocampus cells cycles by flow cytometry. **Result:** In Hippocampus the highest proportion of G_1 phase ($P < 0.05$) was found, compared with the model control group, the vitamin E and Guifu Lizhong Wan increased organization organelles with fewer neuron atrophy, and neurons synaptic gap widening, meanwhile the cell aging rate decreased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion:** Guifu Lizhong Wan has an effect on hippocampus aging in mice deficiency of kidney and spleen model

[Key words] deficiency of kidney and spleen-Yan; Guifu Lizhong Wan; hippocampus of the brain

大脑海马区是与学习记忆、空间定位等高级神经活动有关的重要中枢,其中CA1区对脑老化最敏感,当机体出现衰老时,大脑海马必然出现相应的衰老改变。本研究率先采用肌注氢化可的松和灌胃大黄水煎液的复合因素造模方法复制肾脾阳虚模型大鼠,观察在肾脾阳虚状态下大鼠海马的形态学变化与细胞周期各时相区的百分率,以明确肾脾阳虚对衰老的影响以及温补肾脾药物所发挥的作用。

1 材料

1.1 动物 40只8周龄SD大鼠,雄性,体重(200 ± 20)g, SPF级,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,动物许可证号SCXK(鄂)2004-0007。大鼠自由饮水和采食,室温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照明暗各12h,适应性喂养1周后进行实验。

1.2 药物及制备 氢化可的松注射液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,郑州羚锐制药股份有限公司,批号1005181),大黄水煎液(生大黄*Rheum palmatum* L.)由湖北中医药大学附属门诊部周安方教授鉴定,煎制成含生药质量浓度为 $400 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水煎液)。维生素E胶丸(江新昌制药生产,批号100703),临用前将维生素E胶丸药液溶于大豆油中,并于超声波振荡15min以保证分散均匀,稀释成 $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液,即配即用。

桂附理中丸由肉桂、附片、炮姜、党参、白术、甘草等组成。水蜜丸,每丸重9g(佛山冯了性药业有限公司生产,批号0039165),临用前配制成含成药 $162 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液。

1.3 试剂与仪器 Bouin溶液(1.22%饱和苦味酸溶液75mL,40%甲醛溶液25mL,冰醋酸5mL);

Rnase A50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,碘化丙锭(ProPidium iodide, PI)染液(pH 7.4),100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,0.1% TritonX-100,0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA,用棕色瓶4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

LKB-IV超薄切片机(杭州崎美精密机械有限公司);光学复合显微镜(上海光学仪器厂);日立H-600型透射电镜(日本,日立公司);BMJ-1型生物组织包埋机(天津航空机电公司);TGL-16G-A型离心机(上海金鹏分析仪器有限公司);FACSCalibur流式细胞仪(美国,B-D公司)。

2 方法

2.1 分组和给药剂量 40只大鼠,随机分为正常对照组、模型组、维生素E组和桂附理中丸组,每组10只。采用氢化可的松肌注^[1]加大黄水煎液灌胃^[2]复制肾脾阳虚大鼠模型。

正常对照组大鼠每天上午8:00肌肉im生理盐水 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,同时ig生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,下午14:00ig生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;其余组大鼠上午8:00im氢化可的松 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,药物质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),同时ig大黄水煎液 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药物质量浓度 $400 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),下午14:00模型组ig生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,维生素E组灌胃维生素E混悬液 $18 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药物质量浓度为 $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),桂附理中丸组ig桂附理中丸混悬液 $1.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药物质量浓度为 $162 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。共30d。

2.2 取材与制样 ①应用4%多聚甲醛心脏灌注法取得大脑海马组织标本用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液冲洗3次,经2.5%戊二醛固定2h,1%锇酸后固定1h,梯度丙酮脱水,EPon-812环氧树脂包埋,在

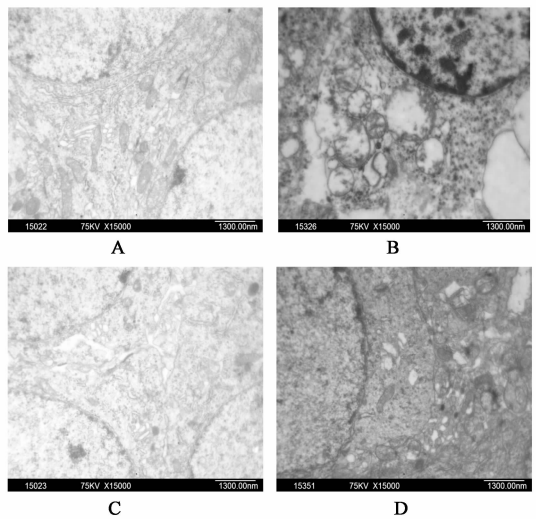
KLB-IV 超薄切片机上手动操作进行超薄切片,厚约 4 μm ,铀铅双重染色后电镜下观察大鼠海马 CA1 区细胞膜、细胞核、核仁、线粒体、粗面内质网、高尔基体、游离核糖体、糖元、脂褐素、神经元细胞的病理改变。②制备好的细胞悬液用 1 mL 的 PBS 清洗 1 次后,分别用 0.1% Triton X-100,0.1% RNA 酶处理, DNA 特异性荧光染料 0.05% PI 染色时每管细胞加入磷酸盐缓冲液 (PBS 300 μL)、RNA 水解酶 (RNase 50 μL) 和 PI 200 μL ,染色 30 min 后作流式细胞仪 (FCM) 检测^[3-4]。

2.3 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据应用 SPSS 15.0 统计包进行分析,计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大脑海马组织超微结构观察 电镜下可见正常对照组大鼠海马 CA1 区细胞膜完整,边界清晰,胞浆内细胞器较多,无脂褐素沉积,无神经元细胞突触间隙加宽、神经元萎缩、水样变性等现象。见图 1。模型组大鼠海马 CA1 区细胞核圆形或椭圆形,核仁可见,胞浆细胞器数量减少,严重者消失;较多见到线粒体肿大,线粒体嵴变短;大量脂褐素沉积,另见神经元细胞突触间隙加宽、神经元萎缩、水样变性等现象。维生素 E 组大鼠海马 CA1 区胞浆内可见少量变性的细胞器,少见神经元细胞突触间隙加宽、神经元萎缩、水样变性等现象。桂附理中丸组大鼠海马 CA1 区细胞轮廓清晰,细胞膜比较完整,浆内细胞器较多,很少见到变性的线粒体、内质网、高尔基体,无脂褐素沉积,比较接近正常对照组。见图 1。

3.2 大脑海马组织细胞周期检测 与正常对照组



A. 正常对照组; B. 模型组;
C. 维生素 E $18 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 桂附理中丸 $1.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 各组大鼠大脑海马组织超微结构观察 (电镜 $\times 1500$)

比较,模型组的 G_1 期细胞比例显著升高、S 期所占细胞比例有显著降低 ($P < 0.01$),模型组的 G_2 期所在细胞比例明显降低 ($P < 0.05$),维生素 E 组的 G_1 期所占细胞比例显著升高 ($P < 0.01$)、S 期及 G_2 期所占细胞比例明显降低 ($P < 0.05$),桂附理中丸组的 G_1, S, G_2 所占细胞比例无明显差异;与模型组比较,维生素 E 组及桂附理中丸组的 G_1 期所占细胞比例明显降低 ($P < 0.05$),S, G_2 期所占细胞比例明显升高 ($P < 0.05$);与维生素 E 组比较,桂附理中丸组的 G_1 期所占细胞比例明显降低 ($P < 0.05$),S 期所占细胞比例无明显变化, G_2 期所占细胞比例明显升高 ($P < 0.05$)。各组大鼠海马细胞周期变化比较见表 1。

表 1 各组大鼠大脑海马组织 CA1 区细胞周期变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	G_1 期	S 期	G_2 期	%
正常对照	-	86.58 \pm 0.50	8.40 \pm 0.41	2.91 \pm 0.22	
模型	-	96.18 \pm 0.30 ²⁾	2.62 \pm 0.39 ²⁾	0.00 \pm 0.00 ¹⁾	
维生素 E	18×10^{-3}	93.53 \pm 0.44 ^{2,3)}	5.51 \pm 0.50 ^{1,3)}	1.16 \pm 0.09 ^{1,3)}	
桂附理中丸	1.62	90.50 \pm 0.51 ^{3,4)}	7.25 \pm 0.60 ³⁾	1.80 \pm 0.11 ^{3,4)}	

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$;与维生素 E 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

解剖学家 Giulio Cesare Aranzi (约 1564 年) 首先使用海马 (hippocampus) 一词形容这一大脑器官,源于此部位貌似海马。俄国学者 Vladimir Bekhterev 基于对一位有严重记忆紊乱的病患者的长期观察,首先提出海马与记忆相关。大脑海马区是与学习、记忆等高级神经活动有关的重要核团,也是参与空

间定位的重要中枢。海马组织 CA1 区是对脑老化最敏感的脑区^[5]。大脑的海马组织线粒体、内质网减少、变性,脂褐素的大量沉积,神经元突触间隙加宽、萎缩、水样变性,可引发学习记忆功能下降、空间定位的错乱等一系列衰老表现。

线粒体被称为体内的“能量加工厂”,维持细胞的正常生理功能,与细胞生命活动有极为密切的关

系。线粒体含有三羧酸循环、氧化磷酸化及呼吸链等一系列酶系,是细胞的能量中心,因而也是产生大量氧自由基的场所。线粒体功能随年龄的增加而减退,生成的氧自由基随年龄增长而增多,而这也是标志生物衰老的重要特征之一^[6]。近年研究表明,线粒体还参与细胞凋亡的调控。线粒体中的一系列代谢过程如呼吸链中氧自由基的过度生成、线粒体膜通透性转运孔(PTP)的异常开放、凋亡诱导因子(AIF)与线粒体细胞色素C释放等,均为介导细胞凋亡的重要途径。故而线粒体衰退是衰老及相关疾病发生发展的重要原因。

脂褐素是活性氧自由基与存在于细胞膜上的多不饱和脂肪酸作用能产生过氧化脂质。过氧化脂质分解后产生MDA,MDA与蛋白质、肽类或脂类聚合交联可形成老年色素或脂褐质的积累。大量脂褐素的沉积则使胞质RNA持续减少,终致RNA不能维持正常代谢,使细胞萎缩或死亡^[7]。因此,脂褐素的大量沉积是细胞衰老的重要特征之一。

细胞周期是20世纪50年代细胞学上的一项重大发现。细胞周期(cell cycle)是通过细胞分裂产生的新细胞的生长开始到下一次细胞分裂形成子细胞结束为止所经历的整个过程,分为间期和分裂期2个阶段,共有 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ 4期。细胞周期第一个阶段是间期,又分3期,即① G_1 (gaP Phase)期:为DNA合成前期,从有丝分裂到DNA复制前的一段时期,主要合成RNA和核糖体。②S(synthesis phase)期:为DNA合成期,在此期,除了合成DNA外,同时还要合成组蛋白。另外,DNA复制所需要的酶都在这一时期合成。③ G_2 期:为DNA合成后期,是从DNA复制完成到有丝分裂开始的时期。在这一时期,大量合成RNA及蛋白质,包括微管蛋白和促成成熟因子等。第二阶段是分裂期,即M(tosis phase)期:为细胞分裂期,又分为前期、中期、后期和末期,在此期间染色体平均分配到2个子细胞中,细胞形态结构会出现急速变化,包括纺锤体的出现、染色质的浓缩以及一系列核的变化^[8,9]。实验结果表明,模型组大鼠大脑海马细胞周期中 G_1 期细胞比例明显增多,S, G_2 期细胞比例明显减少、其中 G_2 期细胞细胞比例为零,细胞老化率明显升高;桂附理中丸组大鼠海马组织细胞老化率未见明显变化,接近正常对照组海马细胞周期, G_1 期细胞可以进入S, G_2 ,M期完成细胞增殖活动。

实验结果表明,模型组大鼠与正常对照组、维生素E组及桂附理中丸组比较,线粒体的改变和脂褐

素的增加是最明显的特征,并见神经元细胞突触间隙加宽、神经元萎缩、水样变性等现象,其大脑海马细胞老化率明显升高,细胞周期中 G_1 期细胞比例明显增多,S, G_2 期细胞比例明显减少,其中 G_2 期细胞细胞比例为零;桂附理中丸组大鼠海马细胞结构比较完整,胞浆内细胞器较多,未见神经元病理改变,细胞老化率未见明显变化,接近正常对照组海马细胞周期, G_1 期细胞可以进入S, G_2 ,M期完成细胞增殖活动。

桂附理中丸由肉桂、附片、炮姜、党参、白术、甘草共6味药组成。方中肉桂气厚纯阳,主入肾经,擅补命门之火,与补火助阳的附子相须为用,以增强温补肾阳之功;炮姜,与附子同性,专顾中焦,共逐中焦之寒,以收健脾还阳之效;附子配白术,可温脾燥湿。党参,补中益气;甘草,调和诸药。全方合用,可使阳气复,寒气散,共奏温肾益脾之功。本实验结果表明,温补脾肾方药-桂附理中丸通过激发机体正气改善大脑海马组织神经元细胞的病理改变,降低大脑海马组织细胞老化率,修复大脑受损神经元,从而延缓肾脾阳虚导致衰老的进程。

[参考文献]

- [1] 邝安堃,吴裕,丁霆,等.某些助阳药对于大剂量皮质激素所致耗竭现象的影响[J].中华内科杂志,1963,2(2):113.
- [2] 陈小野.脾虚证动物模型的造模思路[J].中医杂志,1995,36(4):239.
- [3] 史云峰,胡兵,安红梅.细胞衰老研究与中医药[J].陕西中医学院学报,2007,30(2):62.
- [4] 丘婷,李天河,吴思,等.六味地黄生物制剂对衰老模型小鼠海马区神经元Bcl-2和BaxmRNA表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):196.
- [5] 郑小波,刘迢迢,田心.快速老化小鼠海马脑片CA1区神经元放电特征模式研究[J].中华老年医学杂志,2010,32(1):24.
- [6] 吴正平,周智兴,雷波.四君子汤对衰老模型大鼠免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):128.
- [7] 孙琳琳.左归丸对D-半乳糖致急性衰老大鼠抗氧化能力影响的实验研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2009:26.
- [8] 赵增翰.脂褐素的研究及其进展[J].国外医学:老年医学分册,1981,1(4):1.
- [9] 李崧,刘仁慧,康学,等.择时合用滋阴、益阳方对肾虚衰老模型HPAT轴的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):256.

[责任编辑 聂淑琴]