

七宝美髯丹对衰老生物学影响的综合实验研究

瞿延晖¹, 张六通², 梅家俊², 谭功恩¹

(1 湖南中医学院, 湖南 长沙 410007; 2 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061)

摘要: 实验表明, 七宝美髯丹具有延长家蚕寿命、提高人胚肺二倍体细胞传代次数、改善老年动物 SOD、LPO 与大脑脂褐素、提高 T 淋巴细胞转化率、增强耐缺氧、抗疲劳能力和记忆力、改善血清微量元素、血脂及血浆胰岛素等作用。

关键词: 七宝美髯丹; 衰老; 维生素 E

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)03-0020-04

Experiment Study of Biology Longevity and Biochemistry of Qibaomeirandan

QU Yan-hui¹, ZHANG Liu-tong², MEI Jian-jun², TAN Guong-en¹

(¹Hunan College Of TCM, Changsha, 410007, CHina; ²Hubei College of TCM, Wuhan, 430061, China)

Abstract: Comparing with vitamin E, Qibaomeirandan could prolong longevity of domestic silkworm, increase activity of erythrocyte SOD, lymphocyte transformation ratio, and serum track elements; decrease plasma LPO content. It showed antifatiguetire and improved memory. It also showed a good improvement for condition of blood fat and insulin.

Key words: Qibaomeirandan; senescence; vitamin E

七宝美髯丹为传统抗老延年名方。原方为明·

李时珍《本草纲目》引自明·万密斋《积善堂方》，功用为：“补肾元，乌须发，延年益寿。治血气不足，羸岫

周痹,肾虚无子,消渴,淋漓,遗精,崩带,痈疮,痔肿”等。

为探讨本方的衰老生物学干预作用,多年来,我们以动物和人胚肺二倍体细胞等为研究对象,先后从生物寿命、衰老生化与生理,以及神经生物学(另文报道)等多方面对本方进行了实验观察。本研究主要为该方对生物寿命、衰老生化、抗应激能力以及微量元素等方面的实验干预作用,现报道如下:

1 实验材料

1.1 药物 ①七宝美髯丹,药物与用药比例为:何首乌 3、茯苓、牛膝、当归、枸杞子、菟丝子、补骨脂各 1,药材由湖北中医学院专家门诊部提供。水煎 3 次,纱布过滤,浓缩为 100% 浓度。②维生素 E(VE),油剂,由湖北中医学院附属医院药剂科提供,加蒸馏水以超声震荡仪制为 1% 浓度混悬液。

其中用以细胞培养的药物处理:七宝美髯丹药液进一步以乙醇提取法制备,含生药浓度为 10%,与 VE 混悬液均各以安瓿封装,流动蒸气灭菌,4℃冰箱保存备用。

1.2 动物与细胞株 家蚕,黄鹤种,由湖北省农科院蚕种场提供。Vistar 大白鼠,♂,18 月龄,4 月龄,体重分别为 500g ± 15g、200g ± 10g;昆明种小白鼠,♂、♀,体重 20 ± 2g,均由武汉同济医科大学动物实验中心提供。MRC-5 人胚肺二倍体细胞,引进于美国,由中国典型物培养中心提供。

1.3 材料与仪器 桑叶,由湖北省农科院蚕种场提供,每日采摘新鲜桑叶。1640 细胞培养液,1640 粉(美国产),无菌三蒸水配制,加小牛血清(湖北老年病研究提供)为细胞培养液浓度的 10%,青、链霉素各 10 万^u/1000ml。SOD(超氧化物歧化酶)标准品,由湖北省老年病研究所提供。MDA(丙二醛),瑞典产。TC、TG、LDL-c、HDL-c 试剂盒,由上海长征医学科学有限公司提供。胰岛素放免试剂盒,北京北方免疫试剂研究所提供。SHEL-LAB 二氧化碳培养箱,美国产。FT-632 生物化学光度计,北京核仪器厂产。930 荧光计,江西医疗器械厂产。CPS-A 超声粉碎仪,上海超声波仪器厂产。GDHP-81 电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂产。H600 电子显微镜,日本产。WFX-1F 原子吸收分光光度计,北京第二光学仪器厂产。气态化原子装置,同济医科大学制。自动生化分析仪,美国 Bncore 公司产。FH-2008γ 免疫计数器,国营二六二厂产。Y 型水迷路水槽,湖北中医学院综合实验室提供。

2 实验方法和结果

2.1 家蚕寿命实验 取同一小时内破壳出蚁的家蚕,随机分为 3 组及药物浓度为:七宝美髯丹(10%)组、VE(0.1%)组、空白对照(生理盐水)组,每组 60 条。从第二龄开始,将药液或生理盐水均匀涂布于新鲜桑叶上,以不滴为度,晾干,自由取食,每日一换。观察至蛾死亡,统计存活天数。

2.2 人胚肺二倍体细胞传代实验 ①预实验:取第 25 代细胞,作七宝美髯丹细胞培养用药适宜浓度实验,分别设培养液药物浓度为 100、200、400、800、1600ppm 共 5 个组,续传 10 代左右,结果以 400ppm 药物浓度的细胞生长繁殖最好。②正式实验:取第 25 代细胞,分为 3 组及用药浓度:七宝美髯丹组(400ppm)、VE(100ppm)组、空白对照组,每组 6 瓶细胞。细胞培养方法:常规 1:2 传代法。二氧化碳培养浓度 5%。直至细胞传代自然衰亡结束,统计学处理细胞生存的传代次数。

表 1 家蚕寿命和人胚肺二倍体细胞传代实验($\bar{x} \pm s$)

实验项目		空白对照组	七宝美髯丹组	VE 组
家蚕 (n=60)	平均寿命(d)	47.68 ± 1.96	51.45 ± 1.83 ^{#####}	49.11 ± 2.29 ^{***}
	最高寿命(d)	52.36	54.00	54.00
	次高寿命(d)	52.04	53.38	53.38
	半数死亡寿命(d)	47.42	50.41	48.58
MRC-5 (n=6)	细胞传代(代)	50.33 ± 1.21	55.67 ± 1.82 ^{#####}	67.86 ± 1.72 ^{***}

注:与空白对照组比较* P > 0.05, ** P < 0.05, *** P < 0.01;
与 VE 组比较# P > 0.05, ## P < 0.05, ### P < 0.01。

2.3 SOD(超氧化物歧化酶)、LPO(过氧化脂质)、大脑脂褐素、淋巴细胞转换率、微量元素、血脂和胰岛素实验 以老龄大白鼠随机分为 3 组:七宝美髯丹组、VE 组、空白对照组,另取青龄大白鼠为青年空白对照组,共 4 组,每组 10 只大鼠。给药:剂量按大鼠与人体表面积计算等效给药,老、青空白组给予生理盐水,灌胃容量为 10ml/kg,1 次/天,连续 3 个月。检测:①脂褐素:取大脑组织,硫酸奎宁荧光法测定含量。②淋巴细胞转换率:无菌断尾取血,以 PHA 为刺激原,细胞培养,T 淋巴细胞计数法统计。其余 5 个实验均颈动脉插管取血,③全血 SOD:化学发光法测定。④血清 LPO:荧光 MDA 法测定。⑤微量元素:血清硒(Se)以气态发生法测定,锌(Zn)、铜(Cu)为火焰法测定,锰(Mn)、镉(Cd)为石墨炉法测定。⑥血脂:血清总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、低密度脂蛋白(LDL-c)、高密度脂蛋白(HDL-c)均为酶法测定。⑦血浆胰岛素:放免法测定。

表 2 老年大鼠生化与免疫实验($\bar{x} \pm s$)

实验项目	七宝美髯丹组	VE 组	青年空白组	老年空白组
SOD(ug/g·Hb)	956.36 ± 144.83 ^{***}	883.79 ± 249.10 [*]	1079.06 ± 153.1 ^{***}	809.95 ± 114.23
LPO(nmol/ml)	5.01 ± 0.72 ^{***}	5.15 ± 0.77 ^{**}	4.54 ± 0.94 ^{***}	6.14 ± 0.89
大脑脂褐素(ug/g)	7.06 ± 0.70 ^{***}	7.55 ± 0.97 ^{***}	6.02 ± 0.46 ^{***}	8.09 ± 0.88
淋巴细胞转化率(%)	51.0 ± 5.0 ^{***}	51.0 ± 10.0 ^{**}	46.0 ± 6.0 ^{**}	40.0 ± 5.0
TC	1.78 ± 0.42 ^{***}	1.53 ± 0.31 [*]	1.36 ± 0.16 ^{**}	1.60 ± 0.24
血脂 TG	0.87 ± 0.23 ^{***}	1.07 ± 0.27 ^{***}	0.40 ± 0.05 ^{**}	0.69 ± 0.21
(mmol/L) LDL-c	0.68 ± 0.15 ^{***}	0.67 ± 0.22 ^{**}	0.64 ± 0.08 ^{***}	0.88 ± 0.16
HDL-c	0.65 ± 0.11 ^{***}	0.53 ± 0.12 ^{***}	0.64 ± 0.05 ^{**}	0.54 ± 0.09
胰岛素(μu/ml)	21.0 ± 6.5 ^{***}	26.4 ± 8.4 ^{***}	15.75 ± 5.2 ^{***}	42.63 ± 19.1

注:与青年空白组比较,* P > 0.05,** P < 0.05,*** P < 0.01;与老年空白组比较,+ P > 0.05,** P < 0.05,*** P < 0.01

表 3 老年大鼠微量元素实验($\bar{x} \pm s$)

实验项目	七宝美髯丹组	VE 组	青年空白组	老年空白组
Se(I/150ug/ml)	2.49 ± 0.17 ^{***}	2.34 ± 0.26 ^{**}	2.19 ± 0.22 [*]	2.24 ± 0.26
Zn(ug/ml)	0.966 ± 0.09 ^{***}	1.06 ± 0.32 ^{**}	1.203 ± 0.07 [*]	1.095 ± 0.163
Cu(ug/ml)	1.217 ± 0.533 ^{**}	1.223 ± 0.402 [*]	1.439 ± 0.515 [*]	1.262 ± 0.429
Mn(I/100ug/ml)	8.83 ± 2.558 ^{**}	8.06 ± 3.76 [*]	10.316 ± 4.57 [*]	7.63 ± 3.78
Cd(I/100ug/ml)	11.116 ± 0.85 ^{***}	11.576 ± 0.85 ^{***}	12.433 ± 0.40 [*]	12.826 ± 0.61

2.4 记忆力、抗疲劳、耐缺氧实验 各取小白鼠 30 只,随机分为 3 组:七宝美髯丹组、VE 组、空白对照组,每组 10 只。给药:剂量按小鼠与人体表面积计算等效量给药,空白组给生理盐水。灌胃容量为 20ml/kg。连续 10d。检测:①记忆力(♂):Y 型水迷路法测定。②抗疲劳(♀):鼠尾负重 10% 游泳法测定。③耐缺氧(♀):250ml 玻璃瓶密闭法测定。

表 4 小鼠抗应激与记忆能力实验($\bar{x} \pm s, n = 10$)

实验项目	空白对照组	七宝美髯丹组	VE 组
抗疲劳游泳时间(m)	4.097 ± 1.25	6.289 ± 1.56 ^{***}	3.539 ± 0.58 [*]
耐缺氧时间(m)	25.875 ± 3.66	29.309 ± 4.12 ^{**}	26.701 ± 2.66 [*]
记忆力水迷路时间(S)	11.2 ± 5.75	8.6 ± 4.19 ^{**}	7.5 ± 3.44 [*]

2.5 统计方法 方差分析,方差齐性检验,q 检验。

3 讨论

我国运用中药抗老延年历史悠久,自二千多年前《内经》提出肾气盛衰决定着人的“生、长、壮、老、已”理论以来,历代至今,大多均以肾虚致衰老立论,并且传统的抗老延年方,其中以补肾为主的方约达总延缓衰老方的 80%^[1],七宝美髯丹即是其中著名抗老延年名方之一。

生物衰老(Senescence)是一个组织与机能全面退化的进程,由于很多非衰老性原因也可以导致某些组织与生理生化的改变,因此,国际公认在抗衰老

药物作用研究中,必须进行以生物寿命实验为主,并进行衰老组织形态、生理、生化等多方面的综合实验,才能比较可靠地评价药物的抗衰老作用。在抗衰老西药方面,迄今虽提出公认有效的 VE(在抗自由基氧化等方面具有突出作用)等药物,但也认为其作用十分有限^[2,3]。

3.1 生物寿命(biology longevity)实验 能否延长生物的整体寿命,是国际衡量抗衰老药物作用的首要实验方法。为此,我们进行了动物家蚕寿命和人胚肺二倍体细胞传代的 2 项实验,结果表明,七宝美髯丹与 VE 均有非常显著性延长家蚕寿命和细胞繁殖传代的存活寿命的作用,但七宝美髯丹在延长整体生物家蚕的平均寿命、最高寿命、次高寿命和半数死亡寿命方面,能够非常显著性优于 VE;而 VE 在单纯延长细胞传代方面,则非常显著性优于七宝美髯丹。但结合其他多方面的实验结果,表明七宝美髯丹比 VE 具有更为良好的抗生物整体衰老的作用。

3.2 自由基(Free radical)实验 主要包括 SOD 和 LPO 实验,本实验结果显示,七宝美髯丹和 VE 均能显著性降低血浆 LPO 含量;但七宝美髯丹还能显著性升高血 SOD 水平,而 VE 对此则没有显著性作用。提示 VE 虽具有清除自由基而抗强氧化的作用,但可能并没有升高体内抗氧化酶水平的作用,实验符

合并支持了VE为一种强抗氧化剂的认识。而七宝美髯丹除了可通过升高体内抗氧化酶水平,间接以发挥抗强氧化作用而降低LPO,是否还具有类似VE的直接清除自由基作用,则有待进一步研究。

3.3 脂褐素(Lipofuscin)实验 动物在初生时,虽然一些细胞内即已有一定的脂褐素,但数量很少且体积小,但随着年龄增长直至老年,尤其在大脑、脑干、脊髓、心脏、肝脏等细胞内脂褐素累积量多,体积大,因而又称之为老年色素,起着扰乱细胞空间、影响细胞功能甚至导致细胞萎缩和死亡等的危害作用。实验表明七宝美髯丹具有显著性减少大脑脂褐素含量的作用;VE虽对大脑脂褐素含量有一定减少,但统计无显著性意义。此与我们在对老年大鼠大脑前额皮质、老年小鼠海马CA₁区神经元超微结构的组织形态观察中(另文报道),对大脑脂褐素形态影响的结果基本一致。

3.4 免疫(Immunity)实验 对于PHA刺激的T淋巴细胞转换率,七宝美髯丹具有非常显著性升高的作用,VE对其具有显著性升高作用,表明二药均有增强细胞免疫功能的作用,而以七宝美髯丹作用更强。

3.5 应激(Stress)实验 包括记忆力(Memory)、抗疲劳与耐缺氧实验,老年具有应激能力的明显降低。实验表明,七宝美髯丹具有非常显著的增强抗疲劳能力,显著性增强记忆力和耐缺氧能力的作用,而VE对此3方面均无显著性作用。

3.6 微量元素(Microelement)实验 现有不少研究发现,Se是体内另一种抗氧化酶GSH-Px(谷胱甘肽氧化酶)的必需组成成分;而Zn与Cu均是人体必需微量元素之一;并有调查表明长寿地区的头发中的Mn含量显著高于非长寿地区者;Cd则是人体有害元素之一;一些长寿地区的Zn/Cd比值高于非长寿地区等。七宝美髯丹有显著性升高Se、降低Cd和升高Zn/Cd比值的作用,对Mn、Cu和Zn的绝对含量则无显著性影响;而VE对各微量元素均无显著性影响,其有关作用机理尚不清楚,或许与中药本身含有多种微量元素,及其成分和作用机理复杂等原因有

关。

3.7 血脂与血糖实验 老年大多有TG、TC、LDL-c升高,而HDL-c降低的高脂血症(Hyperlipemia),是导致许多心脑血管疾病的重要原因之一,并在一定程度上与衰老相关。实验表明,七宝美髯丹对TC、TG无改善作用,但具有显著性降低LDL-c、升高HDL-c以及升高HDL-c/LDL-c比值的作用,说明该方具有较好抗血脂作用。VE也有一定升高HDL-c的作用,但对其它3项均无显著改善作用。老年糖尿病也是老年高发性疾病之一,实验表明七宝美髯丹与VE,均能使老年动物过高的胰岛素(Insulin)水平下降,并接近青年对照组水平,但其机理尚不清楚。

3.8 小结 数年来,我们对传统中医药延缓衰老进行了大量理论与实验研究^[1,4,5],通过本实验,我们可进一步认为,衰老生物具有广泛的生化与生理退行性改变,而七宝美髯丹对衰老生物具有广泛改善生化及生理功能方面的作用,并可能是其具有较好的抗生物整体衰老作用的生物药理学基础。相对VE也具有一定的抗衰老作用,但或许由于其主要为抗氧化剂,突出体现为抗氧化作用强,但对衰老生物的广泛生化与生理退行改变以及对生物整体衰老的改善作用有限,而不及七宝美髯丹。从而也表明,传统以补肾抗老延年,仍不失为行之有效的重要方法之一。但七宝美髯丹虽为有效延缓衰老方之一,由于其药物组成较多,有效成分以及作用机理十分复杂等,因此,尚有待不断进行深入研究。

参考文献:

- [1] 瞿延晖. 中医药抗衰老方剂的现代研究概况与展望[J]. 中医药信息, 1995, 12(1): 27-29.
- [2] 夏谦博, 肖德楨, 王厚德, 等. 衰老生物学[M]. 上海: 知识出版社, 1987. 105-125.
- [3] 许士凯. 抗衰老药物的药理与应用[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1987. 187-189.
- [4] 瞿延晖, 张六通, 梅家俊. 中医药衰老机理思想的形成与发展[J]. 光明中医, 1995, (6): 1-3.
- [5] 瞿延晖, 张六通, 梅家俊. 析中医学衰老机理[J]. 中国中医基础学杂志, 1996, (1): 27-28.