

地黄饮子对老龄大鼠的血、脑组织过氧化脂质及相关酶的影响

谢 鸣, 袁学勤, 张家俊, 陈文为, 张 伟, 王 雪
(北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 为探讨古方地黄饮子延缓衰老的效用及机理, 老年大鼠按 4g/kg 和 12g/kg 连续灌服地黄饮子 10 周后, 测定血、脑过氧化脂质(LPO)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及红细胞膜、线粒体膜的流动性。结果地黄饮子能使老年大鼠血、脑 LPO 含量明显下降, SOD、GSH-Px 活性明显升高, 红细胞膜、脑线粒体膜流动性显著提高。表明地黄饮子的抗衰老效用与其提高老龄机体的抗氧化能力有关。

关键词: 地黄饮子; 老龄大鼠; LPO; SOD; GSH-Px; 膜流动性

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)06-0021-03

The Effect of Anti-oxidation of Dihuang Yinzi on LPO and Enzymes Concerned in the Blood and Brain of Aging Rat

XIE Ming, YUAN Xue-qin, ZHANG Jia-jun, CHEN Weng-wei, ZHANG Wei, WANG Xue
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029)

Abstract: To study the effect and mechanism of "Dihuang Yinzi" (DHYZ) in delaying aging, the aging rats were orally administrated with DHYZ or NS for 10 weeks ($4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ or $12\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and the lipid peroxides (LPO), superoxide dismutase (SOD), glutamate peroxidase (GSH-Px), the fluidity of erythrocyte and mitochondria membrane were measured, respectively. The results indicated that DHYZ obviously reduced the rose content of LPO in serum and brain, increased the down activity of SOD and GSH-Px, and enhanced the fluidity of erythrocyte and mitochondria membrane of erythrocyte and brain tissue of aging rat on contrast to the young control group.

Key words: Dihuang Yinzi; aging rat; LPO; SOD; GSH-px; membrane fluidity.

在现代医学关于衰老的各种学说中, 衰老的自由基学说已基本得到公认。大量实验表明, 动物体内过氧化脂质(LPO)含量随增龄逐渐升高, 抗氧化酶活性逐渐降低。为探讨地黄饮子延缓衰老的作用及机制, 我们于 1997 年 8 月至 1998 年 4 月对地黄饮子进行研究, 观察了该方对自然衰老模型大鼠血和脑的 LPO 含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及红细胞膜、线粒体膜流动性的影响。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, 20~21 月龄(体重 350~600g)和 2 月龄(体重 160~170g), 雌雄兼用。由中国预防医学科学院流行病和微生物学研究所动物室提供。

1.2 药物 地黄饮子由熟地、山萸肉、肉苁蓉、巴戟

天、石斛、麦冬、五味子、肉桂、附子、远志、菖蒲、茯苓等份组成, 药材购自北京永安堂药店, 经本校中药鉴定教研室黄建梅老师鉴定。按常规煎煮法制成浓度为 100%(W/V)药液。VitE 为 Sigma 产品, 将 VitE、双蒸水、吐温-80 按 4:2:1 混合, 制成 10mg/ml 混悬液, 冷藏备用。

1.3 主要试剂 硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)、考马斯亮兰-G-250、次黄嘌呤、1,6-二苯-1,3,5-己三烯(DPH)、1,1,3,3-四乙氧基丙烷(Tetraethoxypropane, TEP)、5,5'-二硫对硝基苯甲酸(DTNB), 均为 Fluka 产品; 十二烷基磺酸钠(Sodium Lauryl Sulfate, SDS)、牛血清白蛋白, 均为 Serva 公司产品; SOD 标准液、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(Hepes), 为 Sigma 公司产品; 黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XO), 为 Boehringer Mannheim GmbH 公司产品; Tris, 为

Gibco-BRL 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.4 主要仪器 UV-120-02 型紫外-可见分光光度仪,日本岛津产品;SHZ-82 型水浴恒温振荡器,江苏太仓医疗器械厂产品;20-PR520 高速低温离心机和 MPF-4 型荧光分光光度仪,日立公司产;D-8401 型电动匀浆器,天津华兴科学仪器厂产品。

2 方法

2.1 实验分组及处理 老龄大鼠随机分为自然衰老模型组、模型加地黄饮子低剂量组 ($4g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)、模型加地黄饮子高剂量组 ($12g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)、模型加维生素 E 组 ($V_E, 16mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) 共四组,分笼饲养,每笼 6 只。各组大鼠分别给生理盐水、中药及 V_E 灌胃,连续 10 周。于给药第 9 周另设青年组大鼠,饲养条件同前,生理盐水灌胃 1 周。各组大鼠最后 1 次灌胃后 4h,断头处死,接取全血,低温条件下快速取脑,去除小脑。

2.2 指标测定 脑组织及血浆 MDA 含量测定采用 TBA 比色法^[1];脑组织及全血 SOD 活力测定采用亚硝酸法^[2];脑组织及全血 GSH-Px 含量测定采用 DT-NB 直接显色法^[3];红细胞膜及线粒体膜流动性测定采用荧光偏振法^[4]。

2.3 统计学处理 各项指标结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异显著性采用 q 检验。

3 结果

3.1 地黄饮子对老年大鼠血浆和脑 MDA 含量的影响 结果见表 1。

表 1 地黄饮子对老年大鼠血浆及脑组织 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	MDA	
			血浆 (nmol/ml)	脑 (nmol/g 湿组织)
青年对照组	-	10	42.92 ± 6.59	1862.5 ± 250.1
老年对照组	-	10	91.00 ± 13.13***	2300.4 ± 166.4**
VitE 对照组	0.016	10	68.44 ± 11.10 ^{^^^}	1962.7 ± 151.4 ^{^^^}
中药低剂量组	4	9	53.47 ± 8.86 ^{^^^}	1978.4 ± 130.6 ^{^^^}
中药高剂量组	12	9	45.60 ± 11.01 ^{^^^#}	1965.3 ± 133.1 ^{^^^}

注:与青年对照组比较,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$;与老年对照组比较^{^^^} $P < 0.001$,^{^^} $P < 0.01$,[^] $P < 0.05$;与中药低剂量组比较[#] $P < 0.05$ 。以下同。

从表 1 中可看出:老年组血浆及脑组织 MDA 含量较青年对照组相比明显增加 ($P < 0.001$);中药地黄饮子高、低剂量及 VitE 均能明显降低老年大鼠升高的 MDA 含量 ($P < 0.001$);其中中药高剂量组的血浆 MDA 含量低于低剂量组 ($P < 0.05$),接近青年对照组的水平。

3.2 地黄饮子对老年大鼠全血和脑 SOD 活力的影响 结果见表 2。

从表 2 中可看出,老年大鼠全血和脑组织 SOD 活力明显低于青年对照组 ($P < 0.01$),地黄饮子低剂量组全血及脑组织 SOD 活力明显增加,与老年对照组比较,有统计学意义 ($P < 0.05$);VitE 对老年大鼠下降的脑 SOD 活力亦有升高作用 ($P < 0.05$);地黄饮子高剂量组血、脑 SOD 的活力有升高趋势。

表 2 地黄饮子对老年大鼠血浆及脑组织 SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	SOD 活力	
			全血 (Nu/ml)	脑 (Nu/g 湿组织)
青年对照组	-	10	1575.07 ± 88.3	911.02 ± 49.38
老年对照组	-	10	1424.74 ± 58.74***	831.50 ± 67.51**
VitE 对照组	0.016	10	1513.13 ± 105.88	885.93 ± 35.84 [^]
中药低剂量组	4	9	1547.98 ± 70.41 [^]	906.43 ± 53.02 [^]
中药高剂量组	12	9	1515.42 ± 103.27	873.43 ± 63.03

3.3 地黄饮子对老年大鼠全血和脑 GSH-Px 活力的影响 结果见表 3。

表 3 地黄饮子对老年大鼠全血和脑 GSH-Px 活力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	GSH-Px	
			血浆 (u/ml)	脑 (u/g 湿组织)
青年对照组	-	10	99.18 ± 7.86	18.60 ± 3.74
老年对照组	-	10	90.93 ± 5.98*	11.45 ± 3.77**
VitE 对照组	0.016	10	92.16 ± 5.08	13.65 ± 4.94
中药低剂量组	4	9	89.87 ± 11.96	17.77 ± 5.02 ^{^^}
中药高剂量组	12	9	96.68 ± 13.31 [^]	19.89 ± 3.08 ^{^^^}

从表 3 中可以看出:与青年对照组比较,老年大鼠全血及脑组织 GSH-Px 活力均明显下降 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$);中药高剂量组的全血 GSH-Px 活力较老年对照组有明显增加 ($P < 0.05$),其他两组血 GSH-Px 活力均无明显改变;中药高、低剂量组脑组织 GSH-Px 活力均有明显升高 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$),其中高剂量组 GSH-Px 活力已接近青年组水平。

3.4 地黄饮子对老年大鼠脑线粒体和红细胞膜流动性的影响 结果见表 4。

从表 4 中可以看出,与青年对照组比较,老年大鼠脑线粒体膜及红细胞膜 γ 值显著升高 (P 均 < 0.001);较老年组,地黄饮子高、低剂量组脑线粒体膜及红细胞膜 γ 值均有明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);VitE 对照组仅表现出脑线粒体膜 γ 值的降低

($P < 0.05$)。

表4 地黄饮子对老年大鼠脑线粒体和红细胞膜流动性
(γ 值)的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	γ 值	
			脑线粒体	红细胞
青年对照	-	10	0.147 ± 0.012	0.180 ± 0.010
老年对照	-	10	0.174 ± 0.015***	0.212 ± 0.007***
VitE 对照	0.016	10	0.158 ± 0.013 [^]	0.213 ± 0.009
中药低剂量	4	9	0.157 ± 0.015 [^]	0.197 ± 0.010 [^]
中药高剂量	12	9	0.155 ± 0.022 [^]	0.196 ± 0.016 [^]

4 讨论

衰老自由基学说认为,随着年龄的增长,机体抗氧化系统功能逐渐下降,导致体内自由基及其代谢中间产物大量堆积,攻击生物膜磷脂生成脂质过氧化物(LPO)。LPO及其降解产物的大量积聚破坏生物膜的正常结构和功能是导致细胞衰老的一个重要原因。实验观察到,较之青年对照组,21月龄Wistar大鼠脑及血浆中LPO含量明显升高,血、脑SOD、GSH-Px活性均明显降低,这与大多数报道^[5]相一致,表明21月龄大鼠体内清除自由基的能力明显下降,已进入老年期,可作为衰老动物模型应用于研究。

脂质过氧化产生的短链产物丙二醛(MDA)与膜蛋白、膜脂上的NH₂交联形成Schiff's碱而降低膜的流动性。膜流动性的下降可导致膜功能的降低甚至丢失,从而影响到整个细胞代谢、功能、结构的改变,最终引起细胞的老化、死亡,进而导致整个机体的衰老。线粒体及红细胞因其特殊的呼吸功能及携氧功能而更易遭受自由基的侵袭,发生膜的脂质过氧化反应^[6]。本实验中观察到21月龄大鼠红细胞膜及脑线粒体膜的流动性均显著下降,说明大鼠生物膜的流动性确有随年龄增加而降低的趋势,联系大鼠脑及血浆中LPO含量明显升高和SOD、GSH-Px活性降低的证据,推测老龄大鼠体内抗氧化系统功能降低导致细胞膜流动性降低是器官或细胞衰老的重要生物学基础。

曾有临床报道用古方地黄饮子治疗老年疾病^[7],先前的实验研究亦曾显示本方具有延长动物寿命、抗氧化及益智作用^[8-10]。本实验则进一步观

察到地黄饮子能显著降低自然老年大鼠升高的LPO含量,提高其降低的抗氧化酶活性和膜的流动性,提示地黄饮子抗衰效用可能与提高体内抗氧化酶活性,降低LPO的积聚从而提高膜的流动性,保持生物膜的正常结构与功能有关。值得注意的是,本实验中老年大鼠脑组织中GSH-Px活力较青年对照组降低约35.21%,而血中GSH-Px活力仅降低约8.32%,二者比较可以看出脑中GSH-Px活力的降低可能是脑组织中LPO生成增加的主要因素。地黄饮子对脑组织GSH-Px活力的促进作用优于对血浆GSH-Px活力的作用,提示地黄饮子对脑中GSH-Px可能具有选择性作用,其机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 大石诚子. 过氧化脂酯的测定方法[J]. 最新医学(日), 1978, 33(4): 660-662.
- [2] Yoshihiko Oyanagui. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity[J]. Analytical Biochemistry. 1984, 142: 290-292.
- [3] 夏奕明, 朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法[J]. 卫生研究, 1987, 16(4): 29-31.
- [4] 吴荣青, 祁颂平, 刘春梅, 等. 没食子酸丙酯和没食子酸异丁酯对人红细胞膜结构与功能的影响[J]. 生物物理学报, 1987, 3(1): 13-15.
- [5] 周玫, 陈媛, 乔凤菊, 等. 大鼠肝、心、主动脉脂质过氧化物含量与硒谷胱甘肽过氧化物酶活性的随龄变化[J]. 中华老年医学杂志, 1989, 8(4): 240-242.
- [6] Miquel J and Fleming J. Theoretical and experimental support for an "Oxygen radical injury hypothesis of cell aging" [J]. Ibid, 1986, 51-74.
- [7] 尚焱昌, 蒋士卿, 张尚臣, 等. 地黄饮子加味治疗髓海不足型老年痴呆病的临床报道[J]. 中国医药学报, 1996, 11(5): 36-37.
- [8] 谢鸣, 卞一明, 白晶. 地黄饮子对果蝇寿命的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(2): 20-22.
- [9] 谢鸣, 白晶, 卞一明, 等. 古方地黄饮子抗衰老作用的研究[J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(5): 300-302.
- [10] 谢鸣, 白晶. 地黄饮子对东莨菪碱所致小鼠记忆损伤模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(3): 47-48.