

药理实验

体外培育牛黄抗衰老作用的实验研究

蔡红娇¹ 刘烈刚² 姚平² 郭庆华¹ 吴荣庆¹

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院 湖北武汉 430030

2 华中科技大学同济医学院营养和保健食品卫生学系 湖北武汉 430030

摘要 目的:探讨体外培育牛黄(ICB)抗衰老的作用。方法:将已饲养1年以上的老年雌性小鼠70只,随机分为ICB组和对照组各35只。ICB组小鼠除喂普通饲料之外,在饮水中加入6% ICB悬浮液0.5ml/只/d(500mg/kg)喂395d;对照组喂普通饲料,自由饮水。观察760d,将存活小鼠处死,取血清及脑、心、肝脏组织作匀浆,检测SOD、GSH - px、GSH、T - AOC、MAO活性、脂褐素、MDA含量。结果:小鼠喂养到760d时,ICB组小鼠存活12只(34.28%);对照组存活7只(20.0%)。ICB组脑、心、肝组织及血清SOD、GSH - px、GSH、T - AOC水平明显高于对照组($P < 0.05$)。MAO活性、MDA、脂褐素含量明显低于对照组($P < 0.05$)。结论:ICB能提高小鼠生存率,有抗衰老作用。

关键词 体外培育牛黄 自由基 抗衰老

体外培育牛黄(ICB)是模拟体内胆结石形成的原理和生化过程,应用生物工程技术,在体外牛胆汁内培育的牛胆红素钙结石。经研究证明,其性状、结构、成分及其含量、药效、临床疗效均与优质天然牛黄一致,具有镇静、抗惊厥、退热、降压、抗菌、抗炎作用。用于治疗热病神昏、中风痰迷、惊厥抽搐、癫痫发狂、咽喉肿痛、口舌生疮、痈肿疔疮等疾病。经国家卫生部、国家药监局多次审评,已批准正式生产(国药准字20010075号)。SFDA发文(国食药监字2004第21号)批准ICB与天然牛黄等同使用。

材料与方法

1 实验材料

动物:昆明小鼠,均为雌性,已经饲养1年以上(由华中科技大学同济医学院动物饲养中心提供)。用药:体外培育牛黄制成悬浮液(6%)。

2 实验方法

取喂养1年以上的老年小鼠70只,体重55~60g,随机分为ICB组和对照组各35只。给药方式:对照组喂普通饲料,自由饮水,ICB组除此外,每日用6% ICB悬浮液0.5ml(500mg/kg)加入饮水中,摇匀,并每天振摇水瓶4~5次,喂养395d。服药前称体重1次,以后每月称重1次,观察小鼠饮食、二便、行为、毛发、活动及死亡情况,并详细记录。标本采用:小鼠存活760d后,从眼球取血,用颈椎脱位法处死,立即取脑、肝、心脏组织匀浆作SOD、GSH - px、T - AOC、MAO活

性和MDA、脂褐素含量测定。测定方法:SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法测定,于550nm波长处比色测定吸光度;GSH - px用DTNB直接显色法于405nm波长处测定;T - AOC活性用FRAP法于540nm波长处测定;MDA含量采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定,其红色产物于532nm波长处比色定量。^[1]MAO活性测定采用紫外分光光度法;脂褐素测定采用荧光光度法。^[1-2]

结果

1 小鼠存活数生存质量

ICB组老年小鼠口服ICB 395d后存活12只,存活率34.28%,精神好,饮食、二便正常,毛发光滑,瘦长体形,体重60~65g。对照组存活7只,存活率20.0%,饮食、二便正常,腹部特别膨大,呈现梭型体形,体重65~75g。为了取检测标本而处死存活小鼠,因此,未能观察到小鼠的最长寿命。

2 ICB对老年小鼠血清、脑、心、肝的影响

老年小鼠口服ICB 395d后,ICB对血清及脑、心、肝组织SOD活性的影响见表1;ICB对血清及脑、心、肝匀浆GSH - px活性的影响见表2;ICB对血清及脑、心、肝匀浆GSH水平的的影响见表3;ICB对血清及脑、心、肝组织匀浆T - AOC水平的影响见表4;ICB对小鼠血清、脑、心、肝匀浆MAO活性的影响见表5;ICB对血清及脑、心、肝匀浆MDA含量的影响见表6;ICB对脑、心组织匀浆脂褐素含量的影响见表7。

表1 ICB对老年小鼠血清、脑、心、肝组织匀浆SOD活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	脑/nU · (mg · pro) ⁻¹	心/nU · (mg · pro) ⁻¹	肝/nU · (mg · pro) ⁻¹	血清/nU · L ⁻¹
对照组(n=7)	30.475 ± 5.49	59.81 ± 3.071	77.958 ± 11.534	161.31 ± 32.068
ICB组(n=7)	41.636 ± 4.503 ^{**}	75.875 ± 3.725 ^{**}	98.914 ± 14.526 [*]	212.12 ± 23.529 [*]

与对照组比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{**} $P < 0.001$ 。下同。

表 2 ICCB对老年小鼠血清、脑、心、肝匀浆 GSH - px活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑 /U · (mg · p10) ⁻¹	心 /U · (mg · p10) ⁻¹	肝 /U · (mg · p10) ⁻¹	血清 /U · L ⁻¹
对照组 (n=7)	5.826 ±0.932	6.798 ±0.918	11.715 ±3.540	435.0 ±14.572
ICCB组 (n=7)	8.410 ±0.632 ^{***}	9.098 ±0.594 ^{***}	20.138 ±3.613 ^{**}	488.22 ±9.576 ^{***}

表 3 ICCB对老年小鼠血清、脑、心、肝匀浆 GSH的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑 /mg · (mg · p10) ⁻¹	心 /mg · (mg · p10) ⁻¹	肝 /mg · (mg · p10) ⁻¹	血清 /mg · L ⁻¹
对照组 (n=7)	41.594 ±5.959	32.012 ±3.095	25.382 ±4.395	205.6 ±12.835
ICCB组 (n=7)	53.234 ±4.633 ^{**}	41.002 ±4.692 ^{**}	32.758 ±1.608 ^{**}	265.8 ±14.333 ^{***}

表 4 ICCB对老年小鼠血清、脑、心、肝匀浆 T - AOC活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑 /U · (mg · p10) ⁻¹	心 /U · (mg · p10) ⁻¹	肝 /U · (mg · p10) ⁻¹	血清 /U · L ⁻¹
对照组 (n=7)	0.618 ±0.082	0.598 ±0.041	0.363 ±0.068	7.152 ±0.762
ICCB组 (n=7)	0.945 ±0.160 ^{**}	0.881 ±0.077 ^{***}	0.692 ±0.033 ^{***}	13.77 ±3.200 ^{**}

表 5 ICCB对老年小鼠血清、脑、心、肝匀浆 MAO活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑 /U · (h · mg) ⁻¹	心 /U · (h · mg) ⁻¹	肝 /U · (h · mg) ⁻¹	血清 /U · (h · ml) ⁻¹
对照组 (n=7)	6.408 ±0.666	9.124 ±2.099	14.736 ±3.760	13.336 ±3.140
ICCB组 (n=7)	4.540 ±0.851 ^{**}	4.788 ±1.122 ^{**}	0.072 ±1517 [*]	10.12 ±1.446

表 6 ICCB对老年小鼠血清、脑、心、肝匀浆 MDA含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑 /mg · (mg · p10) ⁻¹	心 /mg · (mg · p10) ⁻¹	肝 /mg · (mg · p10) ⁻¹	血清 /mmol · ml ⁻¹
对照组 (n=7)	4.129 ±0.479	4.196 ±0.585	1.864 ±0.270	16.728 ±0.618
ICCB组 (n=7)	2.539 ±0.457 ^{***}	2.728 ±0.504 ^{**}	1.260 ±0.153 ^{**}	12.322 ±1.361 ^{***}

表 7 ICCB对老年小鼠脑、心、肝组织匀浆脂褐素含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑 /μg · g ⁻¹	心 /μg · g ⁻¹	肝 /μg · g ⁻¹
对照组 (n=7)	1.547 ±0.111	1.997 ±0.360	1.722 ±0.141
ICCB组 (n=7)	0.886 ±0.115 ^{***}	1.290 ±0.141 ^{**}	1.513 ±0.271

讨 论

早年有学者把生命定义为抵抗死亡力量的总和,衰老总是伴随年龄增加,机体发生进行性改变的积累,普遍认为衰老是由于能引起进行性细胞损伤和死亡的各种外在因素和与基因有关的内在因素共同作用的结果。^[3,4,6]有人认为,衰老是自由基反应引起的,它参与环境,疾病和遗传控制的衰老过程有关的衰老改变。^[3,5]许多实验资料支持氧化损伤是衰老过程的直接原因。需氧生物为了防止氧及其代谢产物对机体的毒性效应,形成完备的抗氧化防御系统。^[3,4,6]由于抗氧化剂抗氧化酶均起阻断、防御作用,使机体在生理代谢过程中自由基的产生和清除保持动态平衡。^[4,6]SOD是清除超氧阴离子自由基的第一线防卫,具有保护细胞、抗炎、抗病毒、抗辐射、抗衰老作用。^[6,7]GSH - px有很强的清除脂质过氧化的能力,主要是使 H₂O₂ 或脂质过氧化物分解生成醇和水,T - AOC代表机体清除自由基的总能力。GSH是细胞合成的抗氧化剂,是 GSH - px催化过氧化物还原和脱氢抗坏血酸还原酶催化脱氢抗坏血酸还原的供氢体,也是解毒酶谷胱甘肽硫转移酶催化酶,与亲电子物质结合的解毒剂,是 OH·、H₂O₂、和

O₂ 的清除剂。^[1,2]但是抗氧化剂和抗氧化酶都随着年龄增长而减少,新陈代谢逐渐失调,使代谢产物,特别是脂质过氧化分解产物丙二醛增高,自由基堆积,而产生连锁反应,破坏细胞膜、线粒体、DNA、蛋白质、糖等导致衰老。^[6,7,8]许多实验证明,抗氧化剂、抗氧化酶是寿命的决定因子,总抗氧化能力,包括组织总抗氧化水平的各个抗氧化酶和抗氧化剂都是物种最高寿限的决定因子。^[3]本实验结果表明,ICCB能显著提高脑、心、肝组织及血清中 SOD、GSH - px、GSH活性,提高总抗氧化能力。明显降低脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量。表明 ICCB有提高机体阻断、清除自由基,减少脂质过氧化对细胞的损害,保护细胞的完整性而发挥抗衰老作用。

单胺氧化酶(MAO)与衰老有密切关系,人脑中 MAO活性在 45岁之后随年龄而急剧增加,被认为是老化标志,又称老化相关酶^[2],脑组织内 MAO的增龄变化可引起脑内儿茶酚胺含量紊乱,促使生理活动失调,从而导致衰老和产生老年精神性疾病。^[2,9]本组实验结果表明,ICCB组的脑、心、肝组织中 MAO活性低于对照组,表明 ICCB对 MAO活性有抑制作用,提示

栀子提取物保肝利胆作用的实验研究

陈明 龙子江 王靓

安徽中医学院药理室 合肥 230038

摘要 目的:实验观察栀子提取物的利胆作用和对 D-半乳糖胺(D-GlaN)诱导的急性肝损伤模型小鼠的保肝作用。方法:利胆实验:将 50 只大鼠分为正常组、阳性组(复方胆通片)、大量组(栀子提取物大剂量)、中量组(栀子提取物中剂量)、小量组(栀子提取物小剂量),每组 10 只。除正常组外,每天灌胃给药,共 7d。大鼠预先灌胃给药 7d 后行胆总管插管术,以导管引出胆汁,4h 内每隔 0.5h 计量胆汁流量。收集的胆汁检测总胆红素(TBL)、直接胆红素(DBL)、胆固醇(TC)的含量。保肝实验:将 60 只小鼠分成正常组(等容量蒸馏水)、模型组(等容量蒸馏水)、阳性组(护肝片)、大量组(栀子提取物大剂量)、中量组(栀子提取物中剂量)、小量组(栀子提取物小剂量),每组 10 只。每天给小鼠灌胃 1 次,连续 7d。末次药后 1h,除第 1 组静滴生理盐水外,其他各组均按文献方法腹腔注射 D-GlaN 650mg/kg 1 次。24h 后眼底静脉丛取血测定血清谷丙转氨酶(ALT)和 TBL,同时取肝脏用 4% 甲醛固定,做 HE 染色,进行病理组织学检查。结果:栀子提取物促进大鼠胆汁流量,使 TBL 和 TC 排泄增加;使模型小鼠 ALT 活性下降,肝细胞坏死、肝细胞变性等明显改善。结论:栀子提取物具有明显的利胆作用和保肝作用。
关键词 栀子提取物 肝炎模型 保肝 利胆 胆汁流量 胆汁成分

为了探讨栀子提取物的利胆和对肝细胞损伤的保护作用,我们进行了如下实验研究。

材料与方法

1 实验材料

1.1 动物 Wistar 大鼠、昆明种小鼠,清洁级。安徽省实验中心提供。

1.2 药物 栀子提取物,由合肥信风有限责任公司提供。护肝片,黑龙江省五常葵花药业有限公司产品,批号:200411119。复方胆通片,广东永康药业有限公司生产,批号:0410007。

1.3 仪器和试剂 日产 7020 自动生化分析仪。D-GlaN,由北京科技协作中心精细化学分部提供,临用前

用生理盐水溶解,配成浓度为 32.5g/L 的溶液备用。

2 实验与统计方法

2.1 栀子提取物对大鼠胆汁流量和胆汁成分的影响

取雄性大鼠 50 只,体重 200~250g,随机分成 5 组,每组 10 只,分空白对照组、复方胆通片阳性对照组(复方胆通片 0.3g/kg,临床人用量 6 片 1.8g 的 10 倍)及栀子提取物高、中、低剂量组。除空白组外,每天灌胃给药,共 7d,最后 1 次给药后 12h 内禁食不禁水,按文献^[1]方法,实验时将大鼠用乌拉坦(5ml/100kg)腹腔注射麻醉,固定于手术台上,进行胆总管插管术,插入直径为 0.6mm 的塑料细管,待胆汁入管后,用丝线结扎,导管引出腹腔,用 10ml 的离心管收集胆汁,手术后

参考文献

- 徐叔云,卞如濂,陈修,等.药理学实验方法学.第 3 版.北京:人民卫生出版社,2002.529~549
- 许士凯主编.抗衰老药理学.北京:中国医药科技出版社,1992.40~58
- 陈瑗,周玫主编.自由基与衰老.北京:人民卫生出版社,2004.10~22
- Dhar HL. Physiology of aging. Indian J Med sci, 1998. 52(11): 485~491
- Ashok BT, And Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. 1999. 34: 293~303
- 杜子威主编.生物化学与分子生物学.北京:人民卫生出版社,1997.390~398
- 蔡红娇,汪世元,刘烈刚.体外培育牛黄耐缺氧和清除自由基作用研究.中药药理与临床,2003,11(6):20~22
- 王桂杰,欧芹,魏晓冬.雌性大鼠抗氧化系统的变化及肉桂抗衰老作用的实验研究.中国老年学杂志,1998,18(4):241~243
- 曹凯,刘永平,李素婷.熟地、菊花、山药、牛膝四大怀药对小鼠脑线粒体单胺氧化酶活性的影响.中国老年学杂志,1998,18(2):102~103
- Zeman W. J. Neuropathol EXP Neurol 1974. 33: 1
- Mann DNA & Yates FO. Brain 1974. 97: 481
- Mineti M, Mallozzi C, Di Stasi AM, Pietraforte D. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. Arch Biochem Biophys, 1998, 352(2): 165~174

收稿日期:2006-07-18 责任编辑:张玉琴

ICCB 有一定的抗衰老作用。

脂褐素是老年动物细胞内沉积的色素颗粒,它的形成与自由基有关,自由基产生的后果,出现脂质过氧化物,导致大分子交联,产生不溶性脂褐素,而且随年龄增大而增加。^[2,9]脂褐素沉积扰乱了细胞的空间,改变了扩散渠道,挤开了一些亚微结构,因此可能对细胞有害。^[3,10]早期脂褐素对细胞无影响,到一定水平而继续增加则可使脂质 RNA 持续减少,终至 RNA 不能维持代谢需要,使细胞萎缩或死亡。^[11]说明脂褐素大量沉积对机体是有害的。^[11,12]本组老年小鼠服用 ICCB 1 年以后脑、心组织匀浆的脂褐素含量明显低于对照组。提示 ICCB 有抗衰老功能。

抗氧化酶的活性需要适量的微量元素参与激活。^[3]体外培育牛黄含有铜、锌、锰、硒等多种微量元素,因此,能增强老化动物机体内的抗氧化酶的活性和总抗氧化能力,阻断或清除自由基形成及其连锁反应。保持机体内产生和清除自由基的动态平衡,保护细胞完整性,发挥抗衰老作用。