

复方葛根片对老龄大鼠肝细胞再生与凋亡的影响

王飞飞^{1*}, 李允江¹, 杨文超¹, 路其康¹, 于燕莉^{2#} (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 济南军区总医院药剂科, 济南 250031)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-3942-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.16

摘要 目的: 研究复方葛根片对老龄大鼠肝细胞再生与凋亡的影响。方法: 40只大鼠随机分为正常组、模型组(生理盐水, 10 ml/kg)和复方葛根片低、中、高剂量组[200、400、800 mg(生药)/kg], 每组8只。除正常组外, 其他各组大鼠每天上午9:00 ip *D*-半乳糖溶液[250 mg/(kg·d)]复制衰老模型, 每天下午15:00 ig 相应药物, 连续给药8周。按相关试剂盒操作分别测定血清、肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量以及肝脏中脂褐素(LPF)含量, 并观察各组大鼠肝脏组织病理变化。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠血清和肝组织中SOD活性显著降低, MDA、LPF含量显著升高($P < 0.01$); 肝脏淋巴细胞显著增加, 散在凋亡细胞增多, 淋巴细胞在汇管区灶性浸润、肝血窦散在浸润。与模型组比较, 复方葛根片低、高剂量组大鼠血清中SOD活性显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中、高剂量组大鼠血清中MDA含量显著降低($P < 0.01$), 肝组织中SOD活性显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 低、中、高剂量组大鼠肝组织中MDA、LPF含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肝脏淋巴细胞减少, 凋亡细胞少见, 双核细胞显著增多。结论: 复方葛根片能增加老龄大鼠肝细胞再生, 减少其凋亡。

关键词 复方葛根片; 抗衰老; 肝脏; 细胞再生; 细胞凋亡; 大鼠

Effects of Compound Puerarin Tablet on the Regeneration and Apoptosis of Liver Cells in Aged Rats

WANG Feifei¹, LI Yunjiang¹, YANG Wenchao¹, LU Qikang¹, YU Yanli² (1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Dept. of Pharmacy, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of Compound puerarin tablet on the regeneration and apoptosis of liver cells in aged rats. METHODS: 40 rats were randomly divided into normal group, model group (normal saline, 10 ml/kg), Compound puerarin tablet low-dose, medium-dose and high-dose groups [200, 400, 800 mg (crude drug)/kg], 8 for each group. Except for normal group, aging model was induced in those groups by irrigation gastric administration of *D*-galactose solution [250 mg/(kg·d)] at 9 o'clock every morning; they were given relevant medicine at 15 o'clock every afternoon, ig, for 8 weeks. The contents of SOD and MDA in serum and liver, and the content of hepatic lipofuscin (LPF) in liver were determined by related kit operation procedure; the pathological change of liver tissue was observed in rats. RESULTS: Compared with normal group, the activity of SOD in serum and liver decreased significantly in model group, while the contents of MDA and LPF increased significantly ($P < 0.01$); the number of leukomonocyte in liver of rats increased significantly, and scattered apoptotic cells increased; lymphocyte periportal focal and scattered infiltration of hepatic sinusoids were found in model group. Compared with model group, the activity of SOD in serum of rats increased significantly in Compound puerarin tablet low-dose and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the content of MDA in serum of rats decreased significantly in medium-dose and high-dose groups ($P < 0.01$); the content of SOD in liver tissue increased significantly in medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the contents of MDA and LPF in liver tissue decreased significantly in low-dose, medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); in low-dose, medium-dose and high-dose groups, the number of leukomonocyte decreased and apoptotic cells were rare, while the number of binucleate cells increased. CONCLUSIONS: Compound puerarin tablet can enhance liver cell regeneration and reduce cell liver apoptosis in aged rats.

KEYWORDS Compound puerarin tablet; Anti-aging; Liver; Cell regeneration; Cell apoptosis; Rats

肝脏具有调畅气机、促进脾胃运动和胆汁分泌、调畅情志、贮藏血液、调节血量、防止出血的功能。这一中医基础理论决定了肝脏在五脏中的重要地位, 被称为“将军之官”。因此有“人之衰老, 肝为先导”^[1]这一理论, 即肝脏对衰老的病程、病机具有“率先、引导”的作用。复方葛根片为济南军区总医院制剂, 处方由葛根、丹参、茵陈和延胡索组成, 具有活血化

瘀、生津养心之功效^[2], 临床主要用于冠心病、心绞痛、心肌梗死等疾病的治疗。研究表明, 复方葛根片具有较强的活血化痰、抗氧化损伤、清除自由基等抗衰老作用^[3-4]。本研究主要通过复制 *D*-半乳糖致衰老模型大鼠^[5]观察复方葛根片对老龄大鼠肝细胞再生与凋亡的影响, 为复方葛根片抗衰老的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

B600A 医用低速离心机(河北省安新县白洋离心机厂); UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); BS124S 万

* 硕士研究生。研究方向: 中药质量控制与药理研究。电话: 0531-51665173。E-mail: 13793197726@163.com

通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 中药质量控制与药理研究。电话: 0531-51666293。E-mail: yuyanli323@sohu.com

分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);AS-3120 超声清洗器(北京华瑞博远科技发展有限公司);BIO-RAD680 酶标仪(美国Bio-Rad Laboratories公司);TGL-16G-A冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);奥林巴斯显微镜(上海普赫光电科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方葛根片[济南军区总医院药剂科制剂室,批号:20151112,规格:0.3 g(生药)/片;使用时去糖衣,研磨成细粉,加纯水配制成一定的质量浓度];D-半乳糖(张家港市华昌药业有限公司,批号:15121101,纯度:≥98%);0.9%氯化钠注射液(山东齐鲁药业有限公司,批号:8B15111306);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20141112、20141105);大鼠脂褐素(LPF)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海柯丰生物科技有限公司,批号:Lotisc-e111601)。

1.3 动物

健康Wistar大鼠40只,♂,体质量200~250 g,由山东大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(鲁)2015-0014。实验前稳定饲养1周,饲养环境湿度50%~70%、室温25~27℃、自然光照,自由进食、饮水。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

40只大鼠随机分为正常组、模型组(生理盐水,10 ml/kg)和复方葛根片低、中、高剂量组[200、400、800 mg(生药)/kg,给药剂量按临床给药剂量的0.5、1、2倍系数^[6]计算,每组8只。除正常组外,其他各组大鼠每天上午9:00 ip D-半乳糖溶液[250 mg/(kg·d)]以复制衰老模型,每天下午15:00 ig相应药物,连续给药8周。每周记录各组大鼠体质量以调整用药剂量。

2.2 各组大鼠指标检测^[7]

末次给药后,各组大鼠禁食不禁水12 h,ip水合氯醛溶液麻醉,于腹腔静脉取血适量,4℃离心(离心半径为5 cm,3 000 r/min,下同)20 min,用微量移液器吸取上清液备用;迅速摘取肝脏,切割部分称定质量,加入一定量的冰生理盐水,采用匀浆器将组织充分匀浆,制备10%组织匀浆,低温离心20 min,用微量移液器吸取上清液,备用。按照试剂盒说明书操作分别测定血清和肝组织中SOD活性、MDA含量以及肝组织中LPF含量。

2.3 各组大鼠肝组织病理变化观察^[8]

各组大鼠摘取肝脏后,取部分肝组织用生理盐水冲洗表面血液,放入10%中性福尔马林溶液中固定48 h后取出,用梯度浓度的酒精逐级脱水,浸蜡包埋,制备肝脏组织病理切片。行苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下行组织形态学观察,分析各组大鼠肝脏细胞形态及组织病理变化。

2.4 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件对所得数据进行分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清SOD活性、MDA含量测定结果

与正常组比较,模型组大鼠血清SOD活性显著降低($P < 0.01$),MDA含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,复方葛根片低、高剂量组大鼠SOD活性显著升高($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01),中、高剂量组大鼠MDA含量显著降低($P < 0.01$),结果详见表1。

表1 各组大鼠血清中SOD活性、MDA含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 The activity of SOD and contents of MDA in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD,u/mg	MDA,nmol/mg
正常组	239.05±9.76	8.46±0.79
模型组	161.37±12.44*	11.92±1.07*
复方葛根片低剂量组	179.13±5.62*	11.68±0.63
复方葛根片中剂量组	193.08±11.59	9.35±0.85**
复方葛根片高剂量组	222.69±8.36**	8.57±1.28**

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note:vs. normal group,* $P < 0.01$;vs. model group,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

3.2 各组大鼠肝组织中SOD活性和MDA、LPF含量测定结果

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中SOD活性显著降低($P < 0.01$),MDA、LPF含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,复方葛根片中、高剂量组大鼠SOD活性显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),低、中、高剂量组大鼠MDA、LPF含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果详见表2。

表2 各组大鼠肝组织中SOD活性和MDA、LPF含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 The activity of SOD and contents of MDA, LPF in liver tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD,U/mg	MDA,nmol/mg	LPF,μg/g
正常组	225.51±6.17	4.95±0.28	0.373±0.045
模型组	144.09±7.55*	7.26±0.61*	0.862±0.038*
复方葛根片低剂量组	170.55±2.56	6.05±0.19*	0.601±0.017*
复方葛根片中剂量组	181.75±4.43*	5.54±0.32**	0.532±0.013*
复方葛根片高剂量组	196.37±4.49**	5.11±0.68**	0.437±0.015**

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note:vs. normal group,* $P < 0.01$;vs. model group,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

3.3 各组大鼠肝组织病理变化观察结果

各组大鼠肝组织病理变化观察结果见图1。

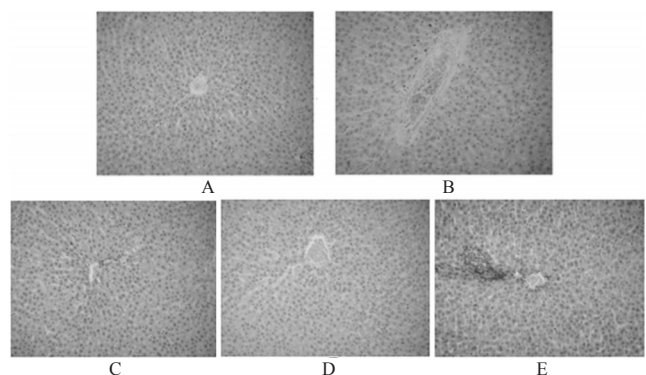


图1 各组大鼠肝组织病理变化观察结果(HE,×200)

A. 正常组; B. 模型组; C. 复方葛根片高剂量组; D. 复方葛根片中剂量组; E. 复方葛根片低剂量组

Fig 1 Histological sections of liver tissue of rats in each group(HE,×200)

A. normal group; B. model group; C. Compound puerarin tablet high-dose group; D. Compound puerarin tablet medium-dose group; E. Compound puerarin tablet low-dose group

正常组大鼠肝脏细胞中淋巴细胞少,凋亡细胞罕见,双核细胞约6个/高倍视野(HPF),详见图1A;模型组大鼠肝脏细胞中淋巴细胞多于正常组,散在凋亡细胞增多,汇管区灶性淋巴细胞浸润,肝血窦散在淋巴细胞浸润,详见图1B;复方葛根片高剂量组大鼠肝脏细胞中淋巴细胞少于正常组,凋亡细胞罕见,双核细胞约6个/HPF,详见图1C;复方葛根片中剂量组大鼠肝脏细胞中少数汇管区可见灶性淋巴细胞浸润,凋亡细胞少见,双核细胞约3~5个/HPF,详见图1D;复方葛根片低剂量组大鼠肝脏细胞中可见凋亡细胞,部分汇管区可见灶性淋巴细胞浸润,肝血窦淋巴细胞多于中剂量组,双核细胞约3~4个/HPF,详见图1E。

4 讨论

衰老的特征是机体所有组织稳态的逐渐失衡,导致其对各种刺激、压力的反应能力和功能下降,并使机体病变和死亡的风险大大增加^[9]。肝脏是人体新陈代谢的主要器官,参与人体中各种物质的合成、分解、代谢、排泄等,当肝脏功能紊乱时,整个机体都会受到影响。随着年龄的增长,肝脏会发生许多结构和功能的变化^[10],包括肝体积缩小、肝血流灌注量减少、肝细胞增大、细胞核大小不均和假毛细血管化等^[11],这些变化可导致肝脏的抵抗能力、贮备能力和再生能力下降。

自由基学说认为自由基氧化损伤是衰老过程中细胞损伤的主要原因,机体代谢过程中会产生一系列活性氧簇(ROS),同时,机体内存在抗氧化防御体系以清除过多的自由基。在正常生理状态下,自由基的产生与清除是动态平衡的,但随着年龄的增长,体内抗氧化防御功能逐渐减退,自由基的动态平衡被打破,过多的自由基可引发过氧化反应,导致细胞功能损伤,从而产生衰老现象^[12-13]。

SOD是机体中重要的抗氧化酶,可清除自由基,在防止机体氧化损伤、抗衰老等方面具有重要作用^[14]。MDA是脂质过氧化代谢的毒性终产物,能破坏细胞或细胞器生物膜形态结构,影响生物膜功能。同时测定两者含量可以更好地反映机体抗氧化损伤的能力。LPF又称老年素,是溶酶体作用后剩余的不再能被消化的物质形成的残余体,多沉积于神经、心肌、肝脏等组织的衰老细胞中,且其积累量随年龄的增长而增多,是衰老的重要指征之一^[15]。

现代研究表明,复方葛根片处方中的葛根、丹参中含有大量的抗氧化损伤有效成分,如葛根素、丹参多酚酸等,其可有效增强机体清除自由基能力,降低脂质过氧化反应,抑制自由基攻击细胞生物膜中不饱和脂肪酸而引起的氧化损伤^[16-17]。

本研究结果显示,复方葛根片具有抗氧化损伤的能力,同时可改善肝脏功能,且高剂量抗衰老作用更明显。各组大鼠肝组织病理变化结果表明,高剂量复方葛根片可使肝脏细胞形态基本恢复至正常水平。

综上所述,复方葛根片对老龄大鼠的肝脏具有抗衰老作用,能增强抗肝脏氧化损伤能力,减少凋亡细胞的产生,增加再生细胞的数量。本文可为复方葛根片在抗衰老方面的作用

提供依据。

参考文献

- [1] 李晓康,赵建国.人之衰老,肝为先导:论肝的理论特点及其在衰老中的地位[J].天津中医学院学报,1999,18(3):3.
- [2] 邓钟,吴敏,韩永平.新版《中国人民解放军医疗机构制剂规范》介绍[J].解放军药学学报,2004,20(5):398.
- [3] 范云飞,刘世君,于燕莉,等.冠舒滴丸对急性血淤模型大鼠血液流变学及血气分析指标的影响[J].中国医院药学杂志,2013,33(2):118.
- [4] 于燕莉,范云飞,毕云生,等.冠舒滴丸对衰老模型大鼠脑组织的保护作用[J].中国药房,2013,24(47):4 439.
- [5] 陶利,王玉娟,毕云生,等.复方葛根片对D-半乳糖致衰老模型大鼠心肌的保护作用[J].中国药房,2015,26(34):4 801.
- [6] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:31.
- [7] 颜礼有,刘明娟,闫慧如,等.连翘苷抗小鼠衰老作用的研究[J].中国药房,2015,26(1):37.
- [8] 白瑜,张玉玲,周忠友,等.中药对衰老大鼠肝细胞超微结构的影响[J].时珍国医国药,2007,18(9):2 117.
- [9] Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging[J]. Cell,2005,120(4):437.
- [10] Mclean AJ, Cogger VC, Chong GC, et al. Age-related pseudocapillarization of the human liver[J]. J Pathol, 2003, 200(1):112.
- [11] Schmucker DL. Age-related changes in liver structure and function: implications for disease? [J]. Exp Gerontol, 2005, 40(8/9):650.
- [12] 李超,张丹参,宋金燕,等.衰老机制的研究进展[J].空军医学杂志,2011,27(2):99.
- [13] 周倩倩,李应东.衰老机制研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(6):148.
- [14] 胥冰,席孝贤,贺新怀.千佛菌对D-半乳糖致衰老小鼠脑组织SOD、GSH-PX和MDA的影响[J].现代中医药,2010,30(6):100.
- [15] 胡梅,刘群良,舒畅,等.还少丹对老年小鼠脂褐素含量和DNA分子结构稳定性的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(3):33.
- [16] 孙建,董小萍,程永现,等.抗衰老中药研究进展[J].亚太传统医药,2011,7(5):165.
- [17] 姜国贤,杨银盛,陈霞云,等.丹参抗衰老作用的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(12):82.

(收稿日期:2016-06-02 修回日期:2016-08-16)

(编辑:刘明伟)