

益气养阴口服液对 D-半乳糖衰老模型小鼠 HSP70、TNF- α 表达的影响[※]

● 曾庆明^{*}

摘要 目的:探讨益气养阴口服液对 D-半乳糖衰老模型小鼠 HSP70、TNF- α 表达的影响。方法:60 只昆明小鼠,随机分为正常组、模型对照组、治疗组。跳台法测定小鼠学习记忆能力。免疫组化法、ELISA 法检测 HSP70、TNF- α 表达水平。结果:与对照组比较,治疗组可使小鼠错误次数明显减少,潜伏期明显延长($P < 0.05$)。与正常组相比,对照组、治疗组 HSP70 蛋白表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对对照组升高幅度小于治疗组($P < 0.05$)。与正常组相比,对照组、治疗组血清 TNF- α 表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:益气养阴口服液能够改善衰老模型小鼠学习记忆能力,同时,能够改善 HSP70 蛋白、TNF- α 的表达,改善失衡的促-抗炎性反应体系,这可能是益气养阴口服液抗衰老的机制之一。

关键词 益气养阴 D-半乳糖衰老模型 热休克蛋白 70 肿瘤坏死因子

益气养阴口服液是我们临床运用多年的抗衰老制剂,先期临床与实验研究,表明该方能明显延长果蝇寿命、增强小鼠记忆力、抑制小鼠脑、肝组织过氧化脂质生成等作用^[1],本实验拟通过益气养阴口服液对 D-半乳糖衰老模型小鼠 HSP70、TNF- α 的影响,进一步探讨益气养阴口服液抗氧化、延缓衰老的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:采用 2~3 月龄纯系昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22g,由广东省医学实验动物中心提供。(2)药品与试剂:益气养阴口服液(由我院中药制剂室提供),HSP70、TNF- α 试剂盒由购与武汉博士德生物工程有限公司,其余均为市售国产分析纯级。

1.2 方法 (1)衰老模型建立:60 只小鼠,随机分为正常组($n = 20$)、模型对照组($n = 20$)、治疗组($n = 20$)。模型对照组和治疗组给予皮下注射 5D-半乳糖 0.25ml/10g,正常组皮下注射等体积的生理盐水,同时对照组用生理盐水灌胃 2ml/次(按体表面积换

算),1 次/d。治疗组予益气养阴口服液 ml/次,1 次/d。均连续 6 周。最后 1 天灌胃和注射 D-半乳糖 2h 后,进行学习记忆训练实验,次日测定记忆成绩。然后处死动物测定各项衰老指标。(2)标本取材:第 13 周测定小鼠记忆能力,由腹腔静脉取血,离心分离血清,放入 -20℃ 冰箱保存。实验结束时,断头取脑,制成石蜡切片。(3)衰老模型小鼠学习记忆能力测定(跳台法):将动物放入跳台箱内适应 3min,然后立即通 36V 交流电。动物受到电击,其正常反应是跳回平台以躲避伤害性刺激,如此训练 5min。24h 后重做测验,此即记忆保持测验。记录小鼠第 1 次跳下平台的潜伏期和 5min 内的错误次数^[2]。(4)衰老模型小鼠 HSP70、TNF- α 检测:免疫组织化学检测小鼠脑组织中 HSP70 蛋白的表达,具体步骤按试剂盒要求进行操作。DAB 显色光镜下观测,免疫组化染色结果判定:胞浆或胞核呈棕黄色为阳性细胞。ELISA 法检测小鼠血清 TNF- α ,具体步骤按试剂盒要求进行操作。

1.3 统计学方法 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本比较用 t 检验,组间采用方差分析,各组均数采用 q 检验。检验水准 $\alpha = 0.01$ 或 0.05,统计软件采用 SPSS11.0。

2 结果

2.1 益气养阴口服液对衰老模型小鼠学习记忆的影响

※基金项目 广东省中医药管理局课题(No:1060151)。

* 作者简介 曾庆明,男,主任医师,硕士研究生导师。广州中医药大学兼职教授。深圳市名中医,深圳市中医老年病学科带头人。擅长中医治疗老年病。

• 作者单位 广东省深圳市罗湖区中医院(518001)

响 与正常组相比,对照组小鼠记忆明显衰退,表现为错误次数增加,潜伏期缩短($P < 0.01$)。与对照组比较,治疗组可使小鼠错误次数明显减少,潜伏期明显延长($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 益气养阴口服液对衰老模型小鼠学习记忆的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n(只)	潜伏期(s)	错误次数(次)
正常组	20	232.4 ± 112.5	0.854 ± 1.036
对照组	20	134.9 ± 106.7 [△]	2.341 ± 1.527 [△]
治疗组	20	242.6 ± 117.4 ^{*△}	1.524 ± 1.325 ^{*△}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与正常组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

2.2 益气养阴口服液对衰老模型小鼠脑组织 HSP70 蛋白表达的影响 与正常组相比,对照组、治疗组 HSP70 蛋白表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对照组升高幅度小于治疗组($P < 0.05$)。与正常组相比,对照组、治疗组血清 TNF- α 表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对照组升高幅度大于治疗组。见表 2。

表 2 益气养阴口服液对衰老模型小鼠脑组织 HSP70 蛋白、血清 TNF- α 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n(只)	HSP70 蛋白 阳性细胞数(个)	TNF- α (pg/m)
正常组	20	0.17 ± 0.01	10.24 ± 1.08
对照组	20	0.22 ± 0.04 [*]	13.79 ± 1.65 [△]
治疗组	20	0.27 ± 0.02 [*]	11.35 ± 1.12 ^{*△}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与正常组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

随着老龄人口的比率越来越高,抗衰老研究已经成为 21 世纪国际医学研究中的热点前沿之一。目前有许多研究认为,衰老的最大特点就是对各种应激反应能力的减退。

近年来不少研究发现热休克蛋白(Heat shock proteins,HSPs)与衰老关系密切,HSP 表达的改变不仅是判断细胞生理状态和应激能力的指标,而且可作为机体衰老或细胞老化的一个重要因素。其中尤以诱导型 HSP70 为 HSPs 中最受关注,是研究最深入的一种。目前大量体内、外实验表明,随着机体衰老的进程,诱导型 HSP70 的表达呈下降趋势^[3-5],国外研究发现通过转染 HSP70 基因,能够延长果蝇、美丽线虫的寿命^[6,7],由于 HSPs 参与了蛋白质的折叠、聚集、信号转导、基因表达及细胞凋亡的调节等多个环节,因此,可以认为,HSPs 水平下降促进了衰老的发生。同时,HSF 和 HSPs 活性的减弱可以导致细胞内氧化还原作用失衡,清除变性损伤蛋白的能力降低,对衰

老引起的一系列病理改变起到了促进作用。同时有研究表明 HSP70 与 SOD 关系密切,诱导型 HSP70 的显著增高可增强人细胞内源性抗氧自由基能力,可提高抗氧化酶的活性,防止自由基对机体的危害,对延缓衰老过程有积极的作用。促炎性反应细胞因子 TNF- α 有“广谱炎症介质”之称,是目前研究和衡量炎症反应程度通用的有效指标,可能是炎性衰老的炎性细胞因子调控机制的核心。TNF- α 蛋白表达上升,说明在炎性衰老进程中促炎性细胞因子蛋白高表达,使机体处于高促炎性反应状态,机体促炎和抗炎反应平衡失调,从而加重衰老过程。

祖国医学认为五脏的虚衰是衰老的根本原因。我们以调补五脏、益气养阴延缓衰老为治则,采用补益五脏气阴的药物制成“益气养阴口服液”。方中主要药物有:人参大补元气、补益五脏之气;麦冬补心肺之阴、益胃生津;首乌、枸杞滋肝肾之阴;茯苓健脾宁心,等。全方功能益气养阴、调补五脏,使五脏精气充盈,本固邪去,健康延年。临床运用于抗衰老治疗,取得良好疗效。

本实验研究发现,益气养阴口服液能够改善衰老模型小鼠学习记忆能力,使小鼠错误次数明显减少,潜伏期明显延长($P < 0.05$)。同时,益气养阴口服液能够改善 HSP70 蛋白、TNF- α 的表达,改善失衡的促-抗炎性反应体系,这可能是益气养阴口服液抗衰老的机制之一。

参考文献

[1]张崇泉,金幼兰,刘礼意等. 益气养阴口服液延缓衰老的临床和实验研究[J]. 湖南中医杂志,1994,10(4):45-47.
[2]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:826-827.
[3]Blake MJ,Fargnoli J,Gershon D,et al. Concomitant decline in heat-induced hyperthermia and HSP70mRNA expression in aged rats[J]. Am JPhysio,1991,260(4 Pt2):R663-7.
[4]Muramatsu T,HatokoM,TadaH,etal. Age-related decrease in the inducibility of heat shock protein 72 in normal human skin[J]. Bri JDerma to,1996,134(6):1035-8.
[5]Gutsmann-Conrad A,Heydari AR, You S,et al. The expression of heat shock protein 70 decreases with cellular senescence in vitro and in cells derived from young and old human subjects[J]. Exp CellRes,1998,241(2):404-13.
[6]Marc T,AzizA,KhazaeliA,etal. Chaperoning extending life[J]. Nature,1997,390(11):30-1.
[7]Yokoyama K,Fukumoto K,Murakami T,et al. Extended longevity of Caenorhabditis elegans by knocking in extra copies of hsp70F,a homolog of mot-2(mortalin)/mthsp70/Grp75[J]. FEBS Lett,2002,516(1-3):53-7.