

◆方药研究◆

补肾方对自然衰老大鼠血清皮质酮含量及海马齿状回超微结构的影响

姚建平, 李亚敏, 封银曼, 马书娟, 龙旭阳

河南中医学院, 河南 郑州 450046

[摘要] 目的: 观察自然衰老大鼠血清皮质酮 (CORT) 含量和海马组织超微结构的变化及补肾方左归丸和右归丸的作用, 探索补肾方延缓衰老的作用机制。方法: SPF 级雄性自然衰老 SD 大鼠 45 只, 随机分为老年组、左归丸组和右归丸组, 每组 15 只; 另设青年组 15 只, 共 4 组。青年组大鼠常规饲养至 5 月龄, 老年组大鼠常规饲养至 24 月龄, 普通饮食、饮水; 从 20 月龄开始, 左归丸组和右归丸组大鼠均按 6.75 g/(kg·d) 生药量食用饲料, 连续给药 4 个月, 每周停药 2 天。采用 ELISA 法检测各组大鼠血清 CORT 含量; 透射电镜观察海马齿状回神经细胞超微结构。结果: 与青年组比较, 老年组大鼠血清 CORT 的含量显著升高, 大鼠海马齿状回神经细胞线粒体参数体密度 (Vv)、比表面 (δ)、比膜面 (δ_m) 和神经细胞突触小泡 Vv 及突触内线粒体 Vv 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与老年组比较, 左归丸组大鼠血清 CORT 含量显著降低, 左归丸组和右归丸组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体 Vv、 δ 、 δ_m 和海马神经细胞突触小泡 Vv 及突触内线粒体 Vv 显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 自然衰老大鼠血清 CORT 含量增高, 海马神经细胞出现能量代谢的结构改变, 补肾方左归丸和右归丸均可通过降低自然衰老大鼠血清 CORT 含量、改善其海马神经细胞能量代谢的结构变化而延缓衰老。

[关键词] 自然衰老; 左归丸; 右归丸; 血清皮质酮 (CORT); 海马齿状回神经细胞超微结构; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 06-0001-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.06.001

Effect of Bushen Formula on Content of Serum CORT of Natural Aging Rat and Ultrastructure of Hippocampal Dentate Gyrus

YAO Jianping, LI Yamin, FENG Yinman, MA Shujuan, LONG Xuyang

Abstract: Objective: To observe the change of content of serum cortisol (CORT) and ultrastructure of hippocampus, and the effect of Bushen formula Zuogui pill and Yougui pill, then to explore mechanism of delaying senility of Bushen formula. Methods: Selected 45 male SD rats in SPF grade, and divided them into the old group, Zuogui pill group and Yougui pill group with 15 cases in each. Another 15 rats were selected as the young group. There were four groups in total. The rats of the young group and the rats of the old group were given routine feeding, regular diet and drinking till 5-month-old and 24-month-old respectively. From 20-month-old, rats of the Zuogui pill group and Yougui pill group were all given feed stuff that contained crude drug of 6.75 g/(kg·d). Medication lasted for four months, and the withdrawal period lasted for two days per week. Detected content of serum CORT in all the groups with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, observed nerve cell ultrastructure of hippocampal dentate gyrus with transmission electron microscope (TEM). Results: Compared with the young group, content of serum CORT in the old group was increased significantly, the volume density of mitochondria (Vv) of nerve cell of hippocampal dentate gyrus, specific surface area (δ), specific membrane (δ_m), and neuron synaptic vesicle Vv and its mitochondria Vv were decreased significantly, the differences being significant ($P < 0.05$). Compared with the old group, content of serum CORT in the Zuogui group was decreased significantly, Vv of nerve cell of hippocampal

[收稿日期] 2016-12-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81273656)

[作者简介] 姚建平 (1974-), 男, 副教授, 研究方向: 方剂配伍规律及中医药延缓衰老。

dentate gyrus, δ and δm , and neuron synaptic vesicle Vv and its mitochondria Vv in zuogui pill group and yougui pill group were increased significantly, the difference being significant ($P < 0.05$). Conclusion: Serum CORT content of natural aging rats was increased, and structural change occurred in energy metabolism of hippocampal neurons. Bushen formula Zuogui pill and Yougui pill can delay aging by reducing the content of serum CORT of natural aging rats, and improving its structural change of energy metabolism.

Keywords: Natural aging; Zuogui pill; Yougui pill; Serum cortisol (CORT); Nerve cell ultrastructure of hippocampal dentate gyrus; Animal experiment; Rats

机体在衰老过程中,神经内分泌系统的结构和功能会发生显著的衰老性变化,神经系统的神经元(树突、轴突、突触等)、神经胶质细胞以及小胶质细胞的形态、结构、组成及功能均发生改变^[1]。线粒体作为细胞的ATP库,在维持生命运动、生物合成及维护细胞结构和生命活动必须的能量等方面具有重要意义。内外环境应激因素导致的线粒体结构和功能的变化会介导细胞和生物的衰老进程。本实验建立自然衰老大鼠模型,观察其下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴功能与海马超微结构的变化及补肾方左归丸和右归丸的作用。

1 材料与方药

1.1 实验动物及分组 SPF级雄性自然衰老SD大鼠45只,随机分为老年组、左归丸组和右归丸组,每组15只;另设青年组15只,共4组。温度18~22℃,光暗周期12h/12h,群养,5只/笼,常规饲养饲料,自由饮水。大鼠购买于河南省实验动物中心,许可证号:SCXK(豫)2010-0002。

1.2 实验方药 左归丸、右归丸组方及用量参照《方剂学》第六版教材原方用量(单位:g)。左归丸:熟地黄24g,山药、枸杞子、山茱萸、菟丝子、鹿角胶、龟甲各12g,川牛膝9g。右归丸:熟地黄24g,山药、菟丝子、鹿角胶、炒杜仲各12g,山茱萸、枸杞子、当归各9g,肉桂、炮附子各6g。中药饮片一次性购于郑州东升药业有限公司。

1.3 实验试剂和仪器 大鼠CORT ELISA检测试剂盒,上海科敏生物科技有限公司。酶标仪,Thermo;JEM-1400透射电镜,日本电子SC-3610;UCT型超薄切片机,奥地利徕卡仪器有限公司;离心机,安徽中科中佳;自动玻璃匀浆机,QILINBEIER;电子分析天平,DENVER INSTRUMENT。

1.4 饲养及给药 青年组大鼠常规饲养至5月龄,老年组大鼠常规饲养至24月龄,普通饮食、饮水;从20月龄开始,左归丸组和右归丸组大鼠均按6.75g/(kg·d)生药量(相当成人临床用量15倍,根据大鼠食用量,将药物打粉按比例混入饲料)食用饲料,连续4个月,每周停药2天。

1.5 Elisa法检测大鼠血清CORT含量 取样:大鼠腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉(按体质量0.3mL/kg),腹主动脉采血,静置30min后,3000r/min离心10min,分离血清,待测。检测:剔除不合格的样本,每组取10个样本检测。按试剂盒说明,96孔板存放在4℃冰箱中,使用前室温平衡20min,设置6个标准品孔、6个复孔、2个空白孔、40个血清样品孔

和40个复孔,在标准品孔各加不同浓度的标准品50μL;样品孔中依次加入10μL血清样品和40μL样品稀释液;标准孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体100μL,用封板膜封好,37℃恒温箱中孵育60min;每孔注入洗液350μL,浸泡1min,漂洗5次;每孔加入底物A、B各50μL,锡箔纸包裹避光,37℃孵育15min;在孔中均加入终止液50μL;15min内用酶标仪在450nm波长条件下测各孔的OD值。根据标准品OD值绘制标准曲线,根据曲线方程式计算各样品的浓度。

1.6 电镜观测大鼠海马齿状回神经细胞超微结构 取样:大鼠腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉(按体质量0.3mL/kg),打开胸腔,将输液针头插入左心室,剪开右心耳,快速推注50mL生理盐水(1min~2min),再推注200mL4%戊二醛。灌流结束后,于冰上分离海马组织,将海马置于4℃蜡块上切成1mm³大小,放入4%戊二醛固定液,2h后换液,4℃保存备用。切片制备:将海马修剪后放入1.5mL离心管中,0.1mol PBS液漂洗4遍,10min;锇酸固定1.5h;0.1mol PBS液漂洗4遍,10min;梯度丙酮脱水;超薄切片机切片,片厚80nm;醋酸铀、柠檬酸铅分别染色5min。观测方法:电镜观察大鼠海马神经细胞线粒体数量、突触小泡和突触内线粒体。海马神经细胞中细胞器结构定量分析(每组取2个组织,每个组织取3个细胞,每个细胞选5个细胞器n=30),采用国际通用的细胞立体计量学点分析法,一个交叉点代表一个面积,通过二维图像推导三维空间结构的计量方法。参数体密度(Vv)、比表面(δ)、比膜面(δm),计算公式:

$$V_v = \frac{V_x(\text{结构体积})}{V_r(\text{参照物体积})} \quad \delta = \frac{S_x(\text{膜的点数})}{V_x(\text{参照系体积})}$$

$$\delta m = \frac{S_x(\text{膜的结构面积})}{V_x(\text{参照系体积})}$$

1.7 统计学方法 用SPSS19.0统计软件分析数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 各组大鼠血清CORT含量比较 见表1。与青年组比较,老年组大鼠血清CORT的含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与老年组比较,左归丸组大鼠血清CORT含量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠血清CORT含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CORT(ng/mL)
青年组	10	257.016± 18.700
老年组	10	356.858± 42.540 ^①
右归丸组	10	309.951± 21.923
左归丸组	10	273.708± 27.445 ^②

与青年组比较, ①P<0.05; 与老年组比较, ②P<0.05

2.2 各组大鼠海马齿状回神经细胞超微结构电镜观察 见图1。与青年组比较, 老年组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体减少, 神经突触小泡明显减少, 突触内的线粒体明显减少。与老年组比较, 右归丸组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体有所增加, 神经突触小泡明显增大且数量增加, 突触内的线粒体明显增加; 左归丸组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体明显增加, 神经突触小泡明显增大、数量明显增多, 突触内的线粒体明显增加。

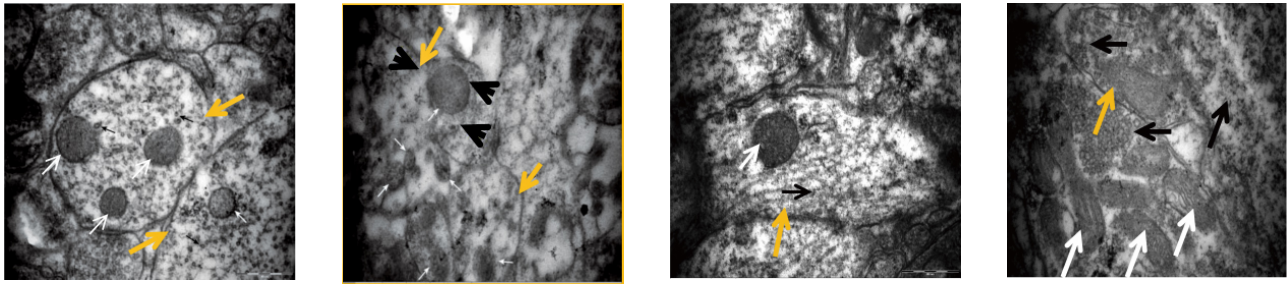


图1 各组大鼠海马齿状回神经细胞超微结构(箭头标注: 白色是线粒体; 黑色是突触小泡; 黄色是突触。)

2.3 各组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体和突触小泡结构定量分析结果比较 见表2和表3。与青年组比较, 老年组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体 Vv、 δ 、 δ_m 和神经细胞突触小泡 Vv 及突触内线粒体 Vv 显著降低, 差异均有统计学意义(P<0.05)。与老年组比较, 左归丸组和右归丸组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体 Vv、 δ 、 δ_m 和海马神经细胞突触小泡 Vv 及突触内线粒体 Vv 显著升高, 差异均有统计学意义(P<0.05)。

表2 各组大鼠海马齿状回神经细胞线粒体 Vv、 δ 、 δ_m 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	线粒体 Vv(%)	线粒体 δ (%)	线粒体 δ_m (%)
青年组	30	48.967± 3.908	20.272± 1.615	62.095± 3.744
老年组	30	11.764± 1.445 ^①	15.193± 3.655 ^①	29.600± 2.103 ^①
右归丸组	30	19.409± 1.607 ^②	20.920± 1.928 ^②	60.031± 2.856 ^②
左归丸组	30	22.045± 1.458 ^②	20.249± 3.767 ^②	63.773± 3.727 ^②

与青年组比较, ①P<0.05; 与老年组比较, ②P<0.05

表3 各组大鼠海马齿状回神经细胞突触小泡及突触内线粒体 Vv 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	突触小泡 Vv(%)	突触内线粒体 Vv(%)
青年组	30	42.573± 1.879	49.410± 2.620
老年组	30	4.763± 2.203 ^①	10.208± 1.385 ^①
右归丸组	30	38.795± 1.493 ^②	23.760± 2.836 ^②
左归丸组	30	29.520± 2.056 ^②	18.744± 1.678 ^②

与青年组比较, ①P<0.05; 与老年组比较, ②P<0.05

3 讨论

衰老是各种内外因素共同作用于机体的结果, 体内糖皮质激素(GCs)分泌功能的亢进是衰老机体的一个共性表现。老年人基础皮质醇水平升高^[2], 老年大鼠外周血皮质酮(CORT)水平异常增高^[3]。海马是与衰老密切相关的重要脑分区, 海马含有丰富的糖皮质激素受体(GRs), 是 GCs 作用的一个明确部位^[4~5]。机体衰老时, 海马神经发生的能力明显下降, 目前研究表明, 衰老时海马仍含有神经干细胞, 神经干细胞仍具有增殖和分化能力的分区在齿状回。成年海马齿状回的神经发生伴随着突触增多和突触整合, 新生的神经元成熟后参与整合到已存在的神经环路中, 可补充和替代衰老的细胞而发挥生理功能。高浓度的 CORT 抑制大鼠海马齿状回神经前体细胞增殖, 而低浓度则有促进作用^[6]。应激情况下海马齿状回颗粒细胞增殖下降, 使齿状回神经发生受损^[7]; 肾上腺切除后, 老年大鼠与青年大鼠的海马神经发生水平相似^[8]。因此, GCs 对于脑发育是必须的, 但过量的 GCs 会对海马神经细胞产生危害。各种干预衰老进程的研究发现, 补肾方药能不同程度降低老年大鼠异常增高的皮质酮水平, 减轻皮质酮对于海马的毒性作用^[9~10]。

能量代谢异常也是衰老机体的一个重要表现, 机体能量代谢包括产能和耗能, 两者在神经内分泌调节下处于动态平衡状态。随着机体的衰老, 线粒体 ATP 生成减少以及神经内分泌调控紊乱, 紊乱的神经内分泌功能又会影响能量代谢的变化^[11~12]。老年机体脑内神经元有不同程度的丧失, 神经元丧失的同时可能会存在一定程度的脑功能代偿, 而脑功能的这种代偿机制主要是由中枢神经系统的环路来完成的, 组成环路的

神经元的大量轴突、突触和树突以及其分支起着至关重要的作用。研究发现,脑衰老改变主要见于海马和大脑皮质,特别是海马是对脑老化最敏感的脑区^[13]。衰老是导致海马组织形态学改变的一个重要因素,而且它的结构和功能改变在衰老时发生较早和较为严重^[14]。随着年龄的增长及海马结构和功能的改变,机体葡萄糖转运、利用能力及线粒体结构成分和代谢功能下降^[15-16]。

综上所述,衰老机体内神经内分泌功能出现紊乱,血中GCs浓度增高,高浓度的GCs持续作用于海马,可通过影响海马组织形态结构的改变,最终影响海马功能。本实验结果表明,自然衰老大鼠血清CORT含量增高,与文献及我们以往的研究结果一致。CORT是下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的终末激素,其分泌增多说明自然衰老大鼠HPA轴功能出现亢进。同时,本实验重点观察了与能量代谢相关的线粒体超微结构的变化情况,发现老年组大鼠海马齿状回神经细胞的线粒体明显减少,神经突触小泡及突触内的线粒体明显减少。表明老年组大鼠海马齿状回神经细胞出现能量代谢相关超微结构的变化,而这一变化会影响老年大鼠神经细胞能量代谢的严重不足。因此,我们推测衰老机体海马齿状回神经细胞能量代谢超微结构的变化是海马功能降低及机体衰老的重要机制之一。通过经典补肾方左归丸和右归丸的干预,我们发现两种补肾方均有降低自然衰老大鼠血清CORT和改善海马齿状回神经细胞超微结构变化的作用,而以左归丸作用较为显著。研究结果表明,左归丸和右归丸可能通过调节HPA轴功能,降低血中CORT的含量,进而修复海马齿状回神经细胞超微结构的病理变化而改善海马功能和延缓衰老。

[参考文献]

- [1] 孙瑞坦. 脑老化过程中组织形态学改变及S100蛋白表达[D]. 大连:大连医科大学,2007.
- [2] Tanoue A, Ito S, Honda K, et al. The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting reconditions[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(2): 302-319.
- [3] Garrido P, de Blas M, Del Arco A, et al. Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(2): 375-382.
- [4] Ginsberg AB, Campeau S, Day HE, et al. Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus [J]. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15 (11): 1075-1083.
- [5] Duan Y, Wang SH, Song J, et al. Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells.[J]. *Elife*, 2014, PMID: 25313870.
- [6] Lemkine GF, Naji A, Alfama G, et al. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor[J]. *FASEB J*, 2005, 19(7): 863-865.
- [7] Calhoun JD, Lambert NA, Mitalipova MM, et al. Differentiation of rhesus embryonic stem cells to neural progenitors and neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(1): 191-197.
- [8] Klempin F, Kempermann G. Adult hippocampal neurogenesis and aging [J]. *Eur Arch Psychiat Clin Neurosci*, 2007, 257(5): 271-280.
- [9] 康湘萍, 金国琴, 董献文, 等. 补肾方药对老年大鼠血清皮质酮含量、LTP及空间学习记忆能力的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(24): 4815-4818.
- [10] 姚建平, 金国琴, 戴薇薇, 等. 左归丸和右归丸对老年大鼠海马GRmRNA表达与HPA轴活性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(10): 67-69.
- [11] 赵增翰. 衰老的生物学研究进展[J]. *国外医学:老年医学分册*, 1996, 17(4): 145-148.
- [12] 周志东, 赵伟康, 金国琴. 老年大鼠线粒体能量代谢及其调控的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2001, 21(3): 208-210.
- [13] 姚志彬. 海马—研究神经科学的理想模型[J]. *广东解剖学通报*, 1989, 11(1): 17-19.
- [14] 李怡秋, 谭红, 李芳芳, 等. 何首乌对衰老大鼠学习记忆能力和海马超微结构的影响[J]. *职业与健康*, 2008, 24(14): 1391-1392.
- [15] 吴鹤鸣, 李静, 郭国祯, 等. 慢性应激抑郁大鼠学习记忆及海马非对称性超微结构的改变[J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(1): 9-11.
- [16] 张玉娜, 夏伟, 叶蓓鸿, 等. 中西药物联合治疗阿尔茨海默病疗效观察[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(3): 258-260.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)