

古方地黄饮子抗衰老作用的研究

谢 鸣 白 晶 卞一明 路雪雅¹

(北京中医药大学基础部方剂教研室, 气功所生化研究室, 北京, 100029)

摘要 实验观察了古方地黄饮子的抗衰老作用。结果表明地黄饮子(2% 和 4%)能延长果蝇平均寿命($P < 0.05$)和最高寿命;能降低 3 月龄小鼠血浆过氧化脂质(LPO),升高红细胞谷胱甘肽(GSH)($20 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 28 d, ig, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);能显著减低 9 月龄小鼠随增龄增加的血浆 LPO($1.0 \text{ g} & 2.5 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 16 w, ig, $P < 0.05$);能抑制体外大鼠肝、脑匀浆 LPO 生成($P < 0.01$),抑制率与剂量呈良好相关;延长小鼠游泳和常压下耐缺氧时间($20 \text{ g} & 12 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 8 d, ig, $P < 0.05$)。结果提示地黄饮子有延寿抗衰作用。

关键词 中药; 地黄饮子; 抗衰老; 寿命; 过氧化脂质, 红细胞谷胱甘肽

中医认为肾为五脏之根本, 在机体生长衰老中具有重要作用。源于宋《宣明论方》的地黄饮子系中医著名补肾息风方, 本方填精滋阴, 益火壮阳, 强力补肾, 与中医传统延年益寿方的组方配伍特征^[1]非常接近, 近代临床也有用其治疗肾虚及衰老性疾病^[2,3], 提示本方可能有益寿抗衰作用。本文对地黄饮子抗衰老作用进行了初步的实验探讨。

1 材料

1.1 动物

美国野生型黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, American wild type), 雌雄兼用, 20 日龄, 由北京农业大学畜牧系遗传室提供。昆明种小鼠 2 3 5 和 9 月龄, 雌雄兼用; Wistar 大鼠, $150 \pm 20 \text{ g}$, 雄性, 均由中国中医研究院动物室提供。

1.2 药物及试剂

中药地黄饮子口服液(含生药 1 g/ml), 由本室自制(处方组成和剂量按文献^[4]制备: 分别用药材总体积的 2.5 倍量 70°C 水浸泡 45 min, 煎沸后改文火慢煎 1 h, 取煎液; 继用 2 倍量水再煎二次, 每次 30 min, 合并

三次煎液, 滤过; 滤液用文火浓缩至体积使药液浓度为 100%; 无菌条件下装瓶, 置 4°C 备用)。硫代巴比妥酸(TBA, 分析纯); 正丁醇(TCA, 分析纯), 北京化学试剂厂生产。四乙氧基丙烷(1, 1, 3, 3-Tetraethoxypropan, 分析纯)和谷胱甘肽(GSH), Fluka 生产。

1.3 仪器

UV-120-02 紫外可见分光光度计, 日本产。

2 方法和结果

2.1 地黄饮子对果蝇寿命的影响

按文献^[5]配制培养基, 分别将不含中药含不同浓度中药的培养基 20 g 倾入 3.0 × 11 cm 指管中, 斜置。果蝇经乙醚麻醉后随机分成正常对照、中药低浓度(2%)和中药高浓度(4%)三组, 分别放入指管中培养。每管果蝇 25 只, 用灭菌脱脂棉封口。培养基每 3d 更换一次。培养温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 60% ~ 70%。每天上午 9 时观察并记录死蝇数目。规定每组最后一个死亡的果蝇寿命为该组的最高寿命。除去各组中在换培养基中飞走或封口时挤压致死的果蝇数, 统计各组果蝇的平

均寿命(组内各个果蝇生存天数的代数和除以果蝇数目)以及最高寿命天数。全部数据经POMS软件处理 结果见表 1

Tab 1. Effect of DHYZ on the life span in fruit fly

Group	Dosage, %	Fly, n	Mean day, $\bar{x} \pm s$	Maximun day, d
Male				
Control	-	145	65.6±14.7	84
DHYZ	2	81	72.6±12.2	88
DHYZ	4	90	71.1±10.8*	87
Female				
Control	-	102	67.3±10.6	81
DHYZ	2	69	71.8±8.2*	89
DHYZ	4	71	72.3±8.3*	87

* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, compared with control.

由表 1 可看出, 较之对照组, 4% 剂量能显著提高雌、雄蝇平均寿命 ($P < 0.05$), 2% 能显著提高雌蝇平均寿命 ($P < 0.05$), 提高雄蝇平均寿命仅显示作用趋势。地黄饮子二个剂量均能提高雌、雄蝇最高寿命, 其中 2% 组果蝇最高寿命较 4% 组高。

2.2 地黄饮子对不同月龄小鼠血浆过氧化脂质(LPO)和红细胞 GSH 的影响

2月龄小鼠随机分成对照、中药高(20 g/kg)低(10 g/kg)剂量三组, 每组10只, 给药组每日灌胃 0.4 ml/只, 对照组给予等量生理盐水, 连续给药 30 d 末次给药后 1 h, 摘眼球取抗凝血, 离心分离血浆和红细胞, 以四乙基丙烷和谷胱甘肽为标准, 分别按文献^[6,7]测血浆丙二醛(MDA)和红细胞 GSH 含量 结果见表 2

Tab 2. Effects of DHYZ on plasma LPO and erythrocyte GSH in the mice aged 2 months ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Dosage, g/kg	MDA, nmol/ml	GSH, mg/100ml
Control	-	1.938±0.306	49.78±5.81
DHYZ	10	1.822±0.186	55.86±9.15*
DHYZ	20	1.643±0.155*	61.64±10.45**

* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, compared with control

由表 2 可看出, 地黄饮子高、低剂量组小鼠血浆 LPO 均较对照组低, 其中低剂量仅有

降低作用趋势 ($P > 0.05$), 高剂量组降低作用明显, 差异显著 ($P < 0.05$); 地黄饮子二个剂量组小鼠红细胞 GSH 含量均较对照组高, 差异显著或非常显著 ($P < 0.05, P < 0.01$); 高、低剂量组间无显著差异。

5月龄小鼠随机分成三组, 每组 8 只, 用自来水稀释地黄饮子成 2% 和 5%, 按饮水方式由小鼠自由摄入(按平均饮水量和体重折算, 给药剂量约为 1.0 g/kg 和 2.5 g/kg), 对照组仅给予自来水, 连续给药 4 个月后测血浆 LPO 和红细胞 GSH 测定方法同上。设 3 月龄小鼠作为年青对照组 结果见表 3

Tab 3. Plasma LPO and erythrocyte GSH in the mice aged 9 months with administration of DHYZ for 4 months ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dosage, g/kg	MDA, nmol/ml	GSH, mg/100ml
N control	-	4.065±1.582	54.19±5.43 [△]
DHYZ	1.0	3.068±0.674*	58.85±7.57
DHYZ	2.5	3.066±0.468*	56.10±6.27 [†]
T control	-	3.652±0.876	57.13±3.59

Tcontrol mice aged 3 months. △ $P > 0.05$, compared with Tcontrol; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with Tcontrol.

由表 3 可看出, 较之 3 月龄组, 9 月龄组鼠血浆 LPO 升高及红细胞 GSH 水平下降, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 较之 9 月龄对照组, 地黄饮子高、低剂量组小鼠血浆 LPO 均显著降低 ($P < 0.05$), 红细胞 GSH 虽也见升高, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。地黄饮子高、低两个剂量作用相当。

2.3 地黄饮子对体外诱导的大鼠肝、脑组织 LPO 生成的影响

大鼠断头处死, 取出脑、肝脏小块, 生理盐水洗去残血, 滤纸吸干, 用生理盐水制备成 10% 肝、脑匀浆; 分别取肝、脑匀浆 1.0 ml, 中药管加入 25, 50, 100 μl 地黄饮子, 诱导对照管加入 100 μl 生理盐水, 空白对照管加入 20% TCA 1.0 ml, 在 37°C 恒温水浴中振荡保温 1 h 后, 取出, 各管加入 20% TCA 1.0 ml, 0.67% TB A 1.0 ml(空白对照管不加), 加生理盐水使各管终体积为 4 ml; 在沸水浴

中加热 10 min, 冷却后 3000 r/min 离心 10 min, 以四乙氧基丙烷为标准, 在 532 nm 处测定光密度, 结果以 MDA nmol/g 组织表示。每组重复三管。结果见表 4

Tab 4. Effects of DHYZ on LPO of the brain & liver hemogenate in Wistar rats (MDA, nmol/g, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dosage, Tube		MDA (Inhibition Rate)	
	μ l	n	Brain, %	Liver, %
Control	-	3	2.214 \pm 0.121	2.423 \pm 0.025
DHYZ	25	3	1.242 \pm 0.029 (43.9) ^{**}	1.420 \pm 0.037 (41.4) ^{***}
DHYZ	50	3	0.749 \pm 0.046 (66.2) ^{**}	0.845 \pm 0.007 (65.1) ^{***}
DHYZ	100	3	0.174 \pm 0.024 (92.1) ^{**}	0.126 \pm 0.004 (94.8) ^{***}

* * * $P < 0.01$, compared with control.

由表 4 可以看出, 地黄饮子在体外能非常显著地抑制肝、脑组织脂质过氧化物生成, 地黄饮子 50 μ l 即能抑制脂质过氧化物生成 60% 以上, 各中药组作用强度呈良好的剂量相关性, 表明地黄饮子有较强的抗氧化作用。

2.4 地黄饮子对小鼠抗应激能力的影响

小鼠随机分成对照和中药二组, 给药组按 0.4 ml/只或 0.5 ml/只(相当于 20 g/kg 或 12 g/kg)灌胃, 对照组给予等量生理盐水。连续给药 8 d, 末次给药后 45 min, 参照文献^[8]进行游泳和耐缺氧试验。耐缺氧试验中 3 月龄和 9 月龄鼠分别使用 250 ml 和 500 ml 的广口瓶。结果见表 5 和表 6

Tab 5. Effect of DHYZ on swimming endurance in the mice aged of 3 & 9 months ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dosage, g/kg		Animal n	Duration, min
T control	-		10	22.42 \pm 36.22
DHYZ	20		10	93.64 \pm 92.86 [*]
N control	-		10	97.52 \pm 94.31
DHYZ	12		10	154.6 \pm 92.90 [†]

T control mice aged 3 months, N control; mice aged 9 months. * $P > 0.05$, compared with N control; [†] $P < 0.05$, compared with T control.

表 5 表明, 较之与对照组, 地黄饮子能延长 3 月和 9 月龄小鼠游泳持续时间, 其中对 3 月龄鼠作用显著 ($P < 0.05$), 对 9 月龄仅有作用趋势 ($P > 0.05$)。

表 6 可看出, 较之 3 月和 9 月龄鼠的对照组, 地黄饮子均能显著延长其存活时间 ($P < 0.05$)。

Tab 6. Effect of DHYZ on hypoxia tolerance under ordinary pressure in the mice aged 3 and 9 months ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dosage, g/kg	Animal n	Survival time, min
T control	-	10	13.79 \pm 2.22
DHYZ	20	10	16.04 \pm 3.05 [*]
N control	-	14	25.44 \pm 9.19
DHYZ	12	14	48.65 \pm 11.74 [†]

* * $P < 0.05$, compared with T control; [†] $P < 0.05$ compared with N control.

3 讨 论

本研究观察到古方地黄饮子能显著延长果蝇的平均和最高寿命, 初步表明该方有延寿作用。试验中高低不同剂量对果蝇平均寿命作用未见明显差别, 低剂量似对雌蝇最高寿命影响较大, 提示中医临床使用补肾方药延寿可能存在不同性别和适宜剂量的选择问题。有报道补肾方药能增加动物寿命^[9], 本研究也观察到地黄饮子有延寿作用, 为理解中医肾在生命中重要性和探索传统补肾方药用于抗衰的临床实践意义提供了一定的证据。

衰老过程与体内自由基对机体的损伤过程密切相关, 由氧自由基引起的膜脂类的过氧化过程及其中间产物对细胞结构和功能的破坏是衰老发生发展的重要原因^[10], 促进生物体内消除活性氧或抗脂类过氧化能力的措施具有预防衰老的作用^[11~13]。本研究观察到, 小鼠血中 LPO 和红细胞 GSH 有随增龄分别增加和减少的趋势, 地黄饮子给药一周即能降低 2 月龄小鼠血中 LPO 和增加红细胞 GSH。连续 4 个月饮用能改善 5 月龄鼠血中 LPO 和红细胞 GSH 随增龄的变化; 体外能显著抑制大鼠肝、脑组织 LPO 生成, 提示该方有抗氧化作用, 其延寿效用可能与此作用有关。

地黄饮子降低血 LPO 的确切机制还不清楚, 但可能与提高红细胞 GSH 有关。已知

GSH是生物体内修复自由基损伤和防护脂类过氧化物造成损伤的有效因子。红细胞为机体供氧所必需,红细胞中 GSH在 GSH过氧化物酶作用下能清除 H₂O₂,阻断其对细胞的损伤。地黄饮子增加红细胞 GSH不仅有益于维持红细胞正常功能,还可能通过提供血液系统更多的抗氧化因子对机体产生广泛而重要的抗衰效用。

地黄饮子连续给药 8 d,能增加 2月龄和 9月龄小鼠持续游泳时间并延长其常压缺氧状态下的生存时间,表明本方能增强机体抗应激能力,地黄饮子这种作用对于提高生物体对环境的适应能力从而延长寿命是十分有益的。

参 考 文 献

- 1 戴 慎 . 补肾类延年益寿方药分类统计及探讨 . 南京中医学院学报 , 1989, (3): 3
- 2 朱文虎 . 河间地黄饮子治疗老年杂症 . 山西中医 , 1985, 1(3): 21

- 3 傅崇林 . 地黄饮子的临床应用 . 浙江 中医杂志 , 1992, 17(3): 21
- 4 许济群,王绵之主编 . 方剂学 . 上海: 上海科学技术出版社 , 1985. 169
- 5 王厚德 . 老年学实验用果蝇饲养管理方法的研究 . 老年学杂志 , 1984, 1(2): 4
- 6 魏明竟 . 血浆过氧化脂质的测定及临床意义 . 国外医学 . 临床生物化学与检验分册 , 1984, 5(1): 6
- 7 Valenzuela A, Lagos C, Schmidt K, et al. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem Pharmacol* , 1985, 34: 2209
- 8 陈 奇主编 . 中医药理实验方法 . 北京: 人民卫生出版社 , 1994. 163~ 164
- 9 王 巍,陈可冀 . 寿命试验的中西医结合研究概况 . 中西医结合杂志 , 1984, 4(11): 703
- 10 Adelman RC& Roth GS. Testing the theories of aging. *Boca Raton*, Florid: CRC Press. Inc. 1982, 137
- 11 Harman D. *Biological Aspects of Aging*. Columbia University Press. New York and London, 1962, 267
- 12 Hochschild R. Effect of Dimethylaminoethyl-p-chlorophenoxyacetate on the life span of male Swiss Webster Albino mice. *Exp Geronto* , 1973, (8): 177
- 13 Blackett AD & Hall DA. Vitamin E's significance in mouse ageing. *Age and Ageing* , 1981, (10): 191

Study on Anti-ageing Effects of Ancient Recipe Dihuang Yinzi

Xie Ming, Bai Jing, Bian Yiming, ¹Lu Xueya

Reserching and Teaching Section of Prescription, Basic Department; Biochemical Laboratory, Faculty of Qi-gong, Beijing Traditional Chinese Medicine University, Beijing 100029

Abstract Anti-ageing effects of Dihuang Yinzi (DHYZ), a famous recipe of tonifying the kidney in traditional Chinese medicine, were investigated in animal experiments. The results indicated that DHYZ (culture medium containing 2% & 4% DHYZ) could prolong the mean and maximum lifespan in *Drosophila melanogaster* of American wild type. DHYZ(ig, 10 g & 20 g° kg⁻¹° d⁻¹ for 1 or 16 weeks) could significantly decrease plasma LPO and enhance erythrocyte GSH in the mice aged 3 and 9 months). LPO induced by the hemogenated of the brain and liver of rat *in vitro* being given 25μl, 50μl and 100μl of DHYZ were markedly decreased. There was a positive corelation between concentration of the drug and the inhibition rate. DHYZ(ig 20 g° kg⁻¹ or 12 g° kg⁻¹° d⁻¹ for 8 days) could obviously elongate survival time under hypoxia and the duration of swimming in the mice. It is suggested that Dihuang Yinzi may have an action of prolonging the lifespan and delaying ageing.

Key words Traditional Chinese Medicine; Dihuang Yinzi; Anti-ageing; Lifespan; LPO; Erythrocyte GSH