

# 益气活血方药对衰老大鼠肝脏细胞增殖和凋亡的影响

俞仲毅<sup>1</sup>, 赵伟康<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学中药药理毒理研究中心, 上海 201203; 2. 上海中医药大学老年医学研究所, 上海 200032)

[摘要] 目的: 了解益气活血方药对自然衰老大鼠肝脏组织细胞增殖和凋亡的影响。方法: 利用自然衰老大鼠模型, 连续给药 4 个月, 观察益气活血方药对模型动物肝脏组织细胞增殖和凋亡衰老性变化的改善作用。结果: (1) 与年轻大鼠比较, 老年大鼠肝脏组织的  $G_0$ - $G_1$  期细胞比例增加 ( $P < 0.01$ ), 而 S 期细胞及  $G_2$ -M 期细胞比例减少 ( $P < 0.01$ ); 同时凋亡细胞的比例增加 ( $P < 0.01$ )。 (2) 与老年大鼠空白组比较, 益气组和活血组动物肝脏组织的  $G_0$ - $G_1$  期细胞比例减少 ( $P < 0.01$ ), 活血组比益气组减少更明显 ( $P < 0.01$ ); S 期和  $G_2$ -M 期细胞比例增加 ( $P < 0.01$ ), 益气组和活血组比较差异不显著 ( $P > 0.05$ )。 (3) 益气活血方药皆能减少老年大鼠肝脏组织细胞的凋亡 ( $P < 0.01$ ), 但益气方药的作用明显优于活血方药 ( $P < 0.01$ )。结论: (1) 自然衰老大鼠肝组织细胞增殖减少而细胞凋亡增加; (2) 益气活血方药均能促进衰老大鼠肝脏组织的细胞增殖, 活血方药作用稍强; (3) 益气活血方药均能抑制自然衰老大鼠肝组织细胞凋亡, 益气方药作用略优。

[关键词] 益气活血; 肝脏细胞; 衰老; 大鼠, 实验

[中图分类号] R242; R329.252 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)03-0196-03

Effect of recipes replenishing qi and activating blood on cell proliferation and apoptosis in the liver of aging rats

YU Zhong-Yi<sup>1</sup>, ZHAO Wei-Kang<sup>2</sup>

(1. Pharmacological and Toxicological Research Center for Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Geriatrics Institute, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of recipes replenishing qi and activating blood on cell proliferation and apoptosis in the liver of natural aging rats. Methods: Natural aging rats were under administration of recipes replenishing qi or activating blood for 4 months. The liver of the rats was prepared into cell suspension for determination of cell proliferation and apoptosis with PI-staining and flow cytometer. Results: (1) Compared with those of the young rats, the cells in  $G_0$ - $G_1$  phase in the liver tissue of aging rats were increased ( $P < 0.01$ ), and apoptosis cells were increased ( $P < 0.01$ ), while the cells in S and  $G_2$ -M phases were decreased ( $P < 0.01$ ). (2) Compared with those of the aging rats, the cells in  $G_0$ - $G_1$  phase in the liver tissue of aging rats administered recipes replenishing qi or activating blood were decreased ( $P < 0.01$ ), and it was more obvious in activating blood group than in replenishing qi group ( $P < 0.01$ ); the cells in S and  $G_2$ -M phases were increased ( $P < 0.01$ ), and there was no significant difference between the activating blood group and the replenishing qi group ( $P > 0.05$ ). (3) The apoptosis cells in replenishing qi or activating blood group were decreased significantly ( $P < 0.01$ ), and the effect of replenishing qi was better than that of activating blood ( $P < 0.01$ ). Conclusion: (1) Cell proliferation is decreased and apoptosis is increased in the liver tissue of natural aging rats. (2) Recipes replenishing qi or activating blood can accelerate cell proliferation in the liver tissue of natural aging rats, and the effect of activating blood was slightly stronger than that of replenishing qi. (3) Recipes replenishing qi or activating blood can inhibit cell apoptosis in the liver tissue of natural aging rats, and the effect of replenishing qi was better than that of activating blood.

KEY WORDS replenishing qi; activating blood; hepatocytes; aging; rats, laboratory

J Chin Integr Med, 2004, 2 (3): 196-198

中医学认为, 老年人的疾病起于阴阳、脏腑、气血的日益衰退, 老年人多气虚血瘀。众多治疗老年疾病的方药常配以益气和/或活血之品。现代研究认为老年人器官组织的储备能力、适应能力和应激能力明显降低的原因之一是组织细胞数目的减少<sup>[1]</sup>, 而大量的离体和整体实验研究还提示器官组织的细胞数目减少可能与细胞增殖<sup>[2,3]</sup>和凋亡<sup>[4-8]</sup>的交织变化有关, 这些变化与老年人多气虚血瘀的

联系可深化我们对气虚血瘀本质的认识。本文就益气和活血方药在肝组织细胞增殖和细胞凋亡方面的作用进行了初步的实验研究, 现报告如下。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070914)

[作者简介] 俞仲毅 (1957-), 男, 硕士, 副研究员。

Correspondence to: YU Zhong-Yi, Associate Professor. E-mail: zhongyiyu2002@hotmail.com

### 1 材料与方

1.1 药物制备 益气方: 党参、黄芪、炙甘草; 活血方: 川芎、当归、赤芍。药物采用水提醇沉法制备。以上二方分别加 6.5 倍水浸泡 30 min, 煎煮 150 min, 分离煎出液与药渣; 药渣再加 3.5 倍水, 煎煮 100 min, 分离煎出液。合并两次煎出液, 滤过, 滤液浓缩, 加入适量 95% 乙醇使含量达到 70%。搅拌, 静置 24 h 滤取乙醇溶液, 回收乙醇至无醇味, -20℃ 保存备用。最后所得浓缩药液浓度(相当于每毫升所含生药量)如下: 益气方 1.80 g/ml, 活血方 2.25 g/ml。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠, 1 月龄 10 只(年轻大鼠), 18 月龄 33 只(老年大鼠), 由上海中医药大学实验动物中心提供(合格证号: 医动字第 07-49-3)。

1.3 试剂 碘化丙啶(PI), Sigma 公司产品(批号: 51K3666)。

1.4 仪器 流式细胞测定仪, FACS Calibur, 美国 Becton Dickinson 公司生产。

1.5 实验方法 将老年大鼠体重均衡后, 随机分为 3 组: 空白组 11 只, 益气组 11 只, 活血组 11 只。另将年轻大鼠 10 只设为对照组。益气组、活血组给药剂量为临床成人用量的 20 倍(按公斤体重折算), 采用饮料方式给药, 饮完后给予正常饮水。每周给药 5 d, 连续给药 4 个月, 其间每周称量体重 1 次, 用以调整给药剂量。空白组与年轻对照组不加处置。给药结束时, 老年空白组和两个给药组大鼠为 22 月龄, 年轻对照组大鼠为 5 月龄。称重麻醉后, 抽血处死。取全部肝组织, 称取肝重, 迅速置于液氮中, 后移入 -70℃ 冰箱保存备用。取适量冷冻之肝组织复苏后, 用 300 目尼龙网和 PBS 制成细胞悬液。细胞增殖和凋亡率采用 PI 染色-流式细胞仪

记数测定。由于老年期大鼠有死亡现象, 本次实验每组均取 6 只动物之肝脏。

1.6 统计学方法 流式细胞仪记数以各期细胞和凋亡细胞占总测定细胞的百分比表示。经组间方差均匀性检验未通过, 因而采用加权等级秩和法进行组间比较。

### 2 结果

与年轻大鼠比较, 老年大鼠肝组织的 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期细胞比例增加(P < 0.01)、G<sub>2</sub> 与 G<sub>1</sub> 期细胞比值降低(P < 0.01), 同时凋亡细胞的比例增加(P < 0.01), 证实了老年器官组织细胞减少与组织细胞的增殖降低和凋亡增加有关的设想。老年大鼠肝组织 S 期细胞和 G<sub>2</sub>-M 期细胞比例均减少(P < 0.01), 也说明老年器官组织细胞增殖减少与 G<sub>1</sub> 期细胞向 S 期转变、S 期细胞向 G<sub>2</sub>-M 期转变受到抑制有关。

与老年大鼠空白组比较, 益气组和活血组动物肝脏组织的 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期细胞比例减少(P < 0.01), 尽管 S 期细胞比例也减少(P < 0.01), 但 G<sub>2</sub>-M 期细胞比例增加(P < 0.01), G<sub>2</sub> 与 G<sub>1</sub> 期细胞比值增加(P < 0.01), 说明益气和活血方药皆能促进衰老动物肝脏组织细胞的增殖, 该作用与促进 G<sub>1</sub> 期细胞向 S 期转变、尽管 S 期向 G<sub>2</sub>-M 期转变作用有关。活血组比益气组的 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期细胞比例减少更明显(P < 0.01), G<sub>2</sub> 与 G<sub>1</sub> 期细胞比值活血组比益气组增加也明显(P < 0.01), 提示活血方药促进组织细胞增殖的作用优于益气方药。

实验结果还说明, 益气和活血方药皆能减少自然衰老大鼠肝脏组织细胞的凋亡(P < 0.01), 但益气方药的作用优于活血方药(P < 0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠肝脏细胞增殖和凋亡测定

Tab 1 Determination of cell proliferation and apoptosis in liver tissue of rats

Group	n	Cells in G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> phase	Cells in S phase	Cells in G <sub>2</sub> -M phase	Cells in G <sub>2</sub> phase / Cells in G <sub>1</sub> phase	apoptosis cells
Aging control	6	67.7 ± 9.0	8.0 ± 6.8	24.2 ± 12.7	1.78 ± 0.34	9.29 ± 4.68
Replenishing qi	6	62.2 ± 12.9**	5.3 ± 1.5**	34.5 ± 12.2**	1.98 ± 0.07**	6.58 ± 2.01**
Activating blood	6	58.5 ± 7.9**	5.7 ± 3.9**	35.7 ± 4.7**	2.01 ± 0.03**	7.39 ± 5.66**
Young control	6	49.9 ± 13.3**	8.3 ± 2.5**	41.8 ± 15.7**	2.03 ± 1.78**	6.97 ± 1.22**

\*\* P < 0.01, vs aging control group; P < 0.01, vs activating blood group

### 3 讨论

中医学认为, 气为血之帅, 能够统摄血液于脉内, 温煦和推动血液, 使其循环不息。老年人气血日

益衰退, 气对血的推动无力是老年人气虚血瘀的病理机制。因而益气可增强气对血的推动力, 促进血的运行; 同时活血亦可以促进血液的周流不息, 改善老年人气虚血瘀之病理状态。本次实验结果表明,

益气和活血方药均能够改善自然衰老大鼠肝组织细胞的增殖降低( $P < 0.01$ )、抑制肝脏组织细胞的凋亡( $P < 0.01$ ),表明益气和活血改善衰老时细胞增殖能力下降和细胞凋亡增加的作用很可能与它们都能促进“气血”的周流不息作用有关。因此,研究益气 and 活血方药对生命基本单位——细胞的增殖和凋亡的作用途径和环节,有助于对中医“气血”概念本质的认识。

有关研究表明,益气和活血等方药在抗氧化、抗自由基、调节免疫功能、降低血脂、抑制血栓形成、改善微循环等诸多方面均有不同程度的作用,可以从不同环节起到延缓衰老的作用<sup>[9~11]</sup>。但益气 and 活血等养生方药延缓衰老的作用机制并非仅此而已。陈方敏等<sup>[12]</sup>从离体细胞(人胚肺二倍体成纤维细胞 2BS 细胞株)增殖角度,观察到益气方药对细胞传代次数、细胞增殖动力学、细胞代谢活力有明显的促进作用,对衰老相关半乳糖苷酶活力有明显的抑制作用;活血方药对衰老细胞的代谢活力和衰老相关半乳糖苷酶活力亦有明显的改善作用,说明益气 and 活血等养生方药对细胞的增殖老化也有直接的作用。本次实验结果表明,益气方药抑制自然衰老大鼠肝组织细胞凋亡的作用优于活血方药( $P < 0.01$ ),而活血方药促进组织细胞增殖的作用优于益气方药,其作用各有侧重,说明益气 and 活血等养生方药对细胞的直接作用在分子生物学机制方面可能是不同的。本次实验仅观察了益气 and 活血方药对自然衰老大鼠肝组织细胞增殖和凋亡的影响,对于益气活血方药的这种作用是否具有普遍性,此种影响是否为对衰老肝脏细胞特有的?还有待进一步研究。

综合上述实验结果,中医的“气”、“血”具有不同层次的含义,因而由气血衰退引起的病理机制亦有不同层次的含义;“气”与“血”既有联系又有区

别,主要表现为作用的环节既有相似性,但侧重点又不同。相信深入的研究能够从分子生物学角度揭示气与血的物质基础。

#### [参考文献]

- 1 童坦君,张宗玉主编.医学老年学[M].北京:人民卫生出版社,1995.12-16.
- 2 Cristofalo VJ, Volker C, Francis MK, et al. Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1998, 8(1): 43-80.
- 3 Shelton DN, Chang E, Whittier PS, et al. Microarray analysis of replicative senescence[J]. Curr Biol, 1999, 9(17): 939-945.
- 4 Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, et al. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(19): 10630-10635.
- 5 Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, et al. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction[J]. Science, 1999, 285(5432): 1390-1393.
- 6 Prolla TA. DNA microarray analysis of the aging brain[J]. Chem Senses, 2002, 27(3): 299-306.
- 7 Weindruch R, Kayo T, Lee CK, et al. Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice[J]. J Nutr, 2001, 131(3): 918S-923S.
- 8 Wang E, Lacelle C, Xu S, et al. Designer microarrays: from soup to nuts[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2002, 57(11): B400-B405.
- 9 周文泉,李祥国主编.实用中医老年病学[M].北京:人民卫生出版社,2000.8-11,27-28.
- 10 穆静,李仪奎,符胜光.参芪方血清对慢性肾衰大鼠肾脏细胞增殖的影响[J].中西医结合学报,2003,1(2):122-124.
- 11 郇章安,吴春福主编.现代老年药理学[M].北京:中国医药科技出版社,2001.430-441.
- 12 陈方敏,赵伟康.补肾健脾益气活血法对衰老细胞增殖的调控作用[J].中药药理与临床,2003,19(1):26-28.

[收稿日期] 2004-02-06 [本文编辑] 白玉金

提供学术升华平台,创造学习交流空间

热烈庆祝《中西医结合学报》创刊一周年