

综 述

国内应用寿命试验和衰老动物模型研究
抗衰老中药的近十年概况

李春生* 侯荣先*

主题词 寿命 衰老/药物作用 抗衰老药(中药)/药理学

中国传统延缓衰老药物(简称抗衰老药物)是我国古今文献中有延缓衰老作用的一类补益、祛病药物的总称。随着我国人口老龄化步伐的加快,这类药物的研究日益受到重视,现将 1988~1997 年的研究概况简介并评述如下。

1 细胞寿命试验

人参根皂甙(SRG)、人参果皂甙(SFG)和人参茎叶皂甙(SSLG)对体外培养细胞(包括人胚肺二倍体成纤维细胞、人羊膜细胞)有不同的剂量一效应关系。药物对细胞贴壁率的半数效量(ED_{50})在 SRG 和 SSLG 之间比较,差异显著($P<0.05$),而同一组织来源不同代龄之间比较,无显著差异($P>0.05$)。^[1]人参根、果和茎叶皂甙(SRG、SFG、SSLG)均能降低低代龄细胞由 MMC 诱导的非程序 DNA 合成水平,其中 SRG、SFG 作用显著($P<0.01$)。对于高代龄细胞 SRG、SSLG 则使非程序 DNA 合成水平显著升高。在没有 MMC 诱导的情况下,人参皂甙对低代龄和高代龄细胞的非程序 DNA 合成水平无明显影响^[2]。

黄芪可延长人胚肺二倍体细胞自然衰老的过程。在细胞培养的营养液中加入黄芪,可使活细胞数增多,细胞在体外生长的寿命延长一倍左右^[3]。同一代龄,黄芪组细胞的增殖能力、SOD 含量和一代存活时间高于对照组。随着代龄的增加,这种差距更加明显^[4]。

何首乌以 $1.0\mu\text{g/ml}$ 和 $0.1\mu\text{g/ml}$ 给药,对人胚肺二倍体细胞有延长传代周期作用,比对照组长 3~4 天。在反相显微镜和扫描显微镜下证实,它能使二倍体细胞外形、细胞表面结构和细胞器维持较好形态^[5]。

绞股蓝能延长组成生物体的细胞繁殖传代。在含绞股蓝总甙 $200\mu\text{g/ml}$ 的培养液中,人胎儿离体正常二

倍体成纤维细胞(WI-1)繁衍至 59 代,而对照组只传至 51 代就停止了生长。两组相比,前者较后者延长了 15.7%。对维尔纳氏综合征患者的皮肤细胞离体培养,绞股蓝组延长至 27 代,而对照组仅延长至 22 代。两组相比,前者较后者延长 22.7%。又绞股蓝尚能增加人表皮纤维母细胞体外培养传代次数^[6],故本品有细胞赋活剂之称。

红景天亦能延长人胚肺二倍体的细胞传代。采用体外培养的人胚肺二倍体成纤维细胞,从 30 代开始在培养液中加入红景天甙为实验组,不加红景天甙为对照组。分别观察了两组细胞的形态、增殖速度及对单胺氧化酶(MAO)活性的影响。结果表明,实验组细胞传至 69 代,而对照组传至 56 代。实验组细胞形态、增殖速度比对照组好,MAO 活性比对照组低^[7]。红景天甙能降低 45 代以后细胞酸性磷酸酶的活性及第 55 代以后细胞内脂褐素的含量,并能抑制细胞超微结构的衰退性变化。如内质网较对照组扩张轻,溶酶体数量少、体积小、且形状规则,细胞内空泡较少,线粒体数量较对照组多,呈杆状,结构基本完整,核膜内折轻。提示红景天对体外培养人胚肺二倍体成纤维细胞具有一定抗衰老作用^[8]。

西番莲对体外培养仓鼠卵巢二倍体细胞 DNA 合成有促进作用。体外培养仓鼠卵巢二倍体细胞群体倍增 25 代之后,西番莲原汁实验组与空白对照组的细胞 DNA 合成量有明显差别,实验组 35 代时 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 摄入量均值(CPM)比对照组 25 代时还高,二者之间相差 5~10 个群体倍增周期。细胞 DNA 合成速率及细胞 DNA 降解率的变化,也表明西番莲具有保持细胞较旺盛增殖能力和推迟细胞衰老的作用^[9]。

枸杞和骨碎补对人二倍体牙龈成纤维细胞体外培养有较明显的延寿作用。实验发现, 1.25mg/ml 的枸杞和骨碎补溶液,能使细胞附着率增加,铺展过程加快,群体倍增时间缩短,生长饱和密度增大,分裂代数增加 18.8%和 20.0%,寿命延长 41.2%和 38.1%^[10]。

灵芝能延长体外人胚肺二倍体传代细胞的分裂代

* 中国中医研究院西苑医院,北京市海淀区西苑 (100091)

收稿日期:1998-02-02;修回日期:1998-04-28

数,促进细胞 DNA 合成。有人通过加入灵芝多糖了解它对人胚肺二倍体细胞 DNA 合成作用,观察其细胞分裂代数的能力,结果以灵芝多糖对二倍体细胞核标记率(DNA 合成率)表示。25 代、35 代、40 代、45 代分别测定云头状赤芝多糖 BN_3B 、 BN_3C 对人胚肺二倍体细胞核标记率,均较对照组标记率高。45 代时标记率分别为 BN_3B :82、76, BN_3C :86、88,对照组:72、26。说明 BN_3B 、 BN_3C 确有促进 DNA 合成,推迟衰老作用^[11]。

2 整体寿命试验

应用整体寿命试验的手段,在既往确认灵芝、银耳、人参茎叶、党参、黄芪、玉竹、黄精、菟丝子、肉苁蓉、补骨脂、珍珠、蚂蚁、茶叶、蜂花粉、乌骨鸡、兰花草、麦饭石具有抗衰老作用的基础上,近年来又有新的进展。

灵芝能延长棘尾虫、隆线蚤的生存时间。哈尔滨师范大学应用灵芝浸液培养原生动植物棘尾虫,观察到实验分裂次数和平均存活天数分别是对照组的 2.19 和 1.53 倍,大核 DNA 的消减变慢,核仁老化程度较轻。用灵芝浸液培养隆线蚤,实验组的总生殖量和平均寿命分别是对照组的 1.99 和 1.26 倍。证实灵芝有明显的延缓衰老作用^[12]。

枸杞子、覆盆子、黄芪能延长四膜虫的生存时间。四膜虫的生长规律,以 0~110 天为全期。实验结果表明,枸杞子、覆盆子、黄芪有显著促进四膜虫生长繁殖、延缓衰老和延长生存期的作用,药物效应与其浓度呈正相关^[13,14]。

绞股蓝能延长多刺裸腹蚤的生存时间。多刺裸腹蚤(*Moina macrocpa*)又名水蚤,为节肢动物门甲壳纲双甲目枝角亚目裸腹蚤科裸腹蚤属动物。体长 0.83~1.20mm,可居于小型水域中。该动物易于培养,性成熟前死亡率低,生活周期短,便于研究整个生命过程。在同一环境下易于得到遗传性基本相同的个体,具有与哺乳动物相似的生活、发育、繁殖、衰老阶段。故有人认为比常用的果蝇模型优越。实验结果表明,0.0125%、0.0250%、0.0500%、0.1000%的绞股蓝提取液对蚤的生长、发育、繁殖和寿命均有明显影响。有延长水蚤平均寿命的作用,一般延长 10%,长的甚至达 30%以上^[15]。

牛膝、玉竹、补骨脂、菟丝子、珍珠、乌骨鸡、灵芝、黄芪、黄精、香附、人参茎叶皂甙、党参、蜂花粉、蛇床子等 14 种药物,可延长家蚕的生存时间。实验结果表明,牛膝组、牛膝与地黄、山药、菊花所组成的四大怀药合剂组家蚕龄期较蒸馏水组明显延长。牛膝组家蚕身长、体重较同龄蒸馏水组增加缓慢,且生长、发育正常,食量亦减少。牛膝单用、四药合用的抗老延寿作用比其它

三药或单独用药效果更好^[16]。

蜂花粉、香菇多糖、麦饭石、麦冬、肉桂、山楂精等 6 种药物,可延长家蝇的生存时间。例如,蜂花粉可使给药组家蝇存活曲线比对照组(奶粉加白糖)右移,前者半数存活时间为 26 天,而后者为 24 天。但蜂花粉不延长家蝇的最大(高)寿命^[17]。

蛤蚧、蚂蚁、紫茵、茶叶、肉苁蓉、覆盆子、山葡萄、枸杞(包括枸杞多糖)、黄刺玫果汁、紫苏油、紫菜多糖、桑椹、黑木耳、太子参、三七、罗布麻、绞股蓝、珍珠层粉、油菜花粉、沙棘、黄精、红芪多糖、波叶大黄多糖、荷叶等 24 种药物,可提高果蝇生存时间。例如,蛤蚧的乙醇提取物,可延长雌、雄果蝇的平均寿命及半数死亡时间,提高果蝇飞翔力和耐寒力,对雌性果蝇效果较好^[18]。以蚂蚁粉 300mg/ml 和 600mg/ml 喂饲果蝇后,其平均寿命分别为 49.7 天、59.15 天,最高寿命达 74.4 天、85.4 天,与基础培养基对照组相比,均有非常显著之差异($P < 0.01$);同时,蚂蚁粉还能使老龄果蝇飞行次数增加,揭示晚期生命质量提高^[19]。紫茵系健康妊娠 12 周内的人工流产组织,将其制成浓度为 0.1%之培养基,美国野生型果蝇食用后,幼龄期明显延长($P < 0.05$),表明可能有抗衰老作用^[20]。

五味子、人参、麦饭石、枸杞和枸杞多糖,可提高小鼠的生存时间。例如短期喂饲较大剂量(即成人口服量的 10 倍)的枸杞,能延长小鼠寿命。从 12 月龄开始喂饲枸杞的实验组比 18 月龄开始喂饲枸杞的实验组平均寿命延长了 0.57%,最高寿命延长了 41 天^[21]。此外,何首乌尚能提高高脂血症豚鼠的生存时间。

3 衰老动物模型

3.1 D-一半乳糖衰老模型: D-一半乳糖化对大鼠和小鼠可产生拟老化效应,是一个有发展前途的衰老模型。应用 D-一半乳糖衰老模型证实药物抗衰老作用的有:绞股蓝、蒺藜总皂甙、淫羊藿、天麻、人参、人参茎叶皂甙、托盘根等。

绞股蓝。采用 D-一半乳糖造成小鼠亚急性衰老模型,研究观察绞股蓝及其复方抗衰老作用。结果表明,绞股蓝及其复方可以显著地对抗衰老模型组小鼠主动逃避反应能力的下降,脑 MAO-B 活力的异常升高及脑脂褐质的增集。能提高小鼠免疫力,使衰老模型小鼠萎缩的胸腺恢复到正常水平。提示绞股蓝可延缓小鼠的衰老^[22]。

蒺藜总皂甙。本品对 D-一半乳糖所致的小鼠亚急性衰老模型动物的体重减轻、脾脏及胸腺萎缩有抑制作用。并降低其血糖及胆固醇水平,增加幼年小鼠肝及胸腺重量,对老年小鼠脾内色素颗粒的沉着和积聚,呈

明显改善趋势^[23]。

淫羊藿。雄性小白鼠隔日皮下注射 D-半乳糖 40mg/kg 68 天,造成亚急性衰老模型。在注射 D-半乳糖同时,灌胃给予淫羊藿黄酮 0.708g/kg。结果表明,淫羊藿黄酮能显著恢复 D-半乳糖衰老模型小鼠 T 和 B 淋巴细胞增殖反应的能力,明显提高小鼠肝脏总 SOD 活性,减少肝组织过氧化脂质的形成,减少心、肝等组织的脂褐素含量,但对脑的脂褐素减少不明显^[24]。

天麻。昆明种小鼠球后注射 D-半乳糖 80mg/kg, 50 天后造成亚急性衰老模型。同时口服天麻 4.8g/kg, 能显著恢复 D-半乳糖衰老模型小鼠被动回避反应能力的下降 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 明显提高血红细胞中 SOD 活力和皮肤羟脯氨酸含量, 减少心肌脂褐质^[25]。

人参、人参茎叶皂甙、人参总皂甙。昆明种小鼠球后每日静脉注射 D-半乳糖 80mg/kg, 连续 30 天。与制作模型同时, 实验各组分别给予 0.5 和 1.0g/kg 人参根水提取物、50mg/kg 人参茎叶皂甙, 对照组给予同体积水。结果表明, 人参、人参茎叶皂甙可促进亚急性衰老动物的学习记忆, 增加脑内神经介质去甲肾上腺素 (NE) 和多巴胺 (DA) 的含量, 减少 MAO-B 和心肌脂褐素含量。在增强学习记忆和增加神经介质方面人参强于人参茎叶皂甙, 在抗自由基氧化方面人参茎叶皂甙优于人参^[26]。人参总皂甙经衰老动物模型研究表明, 本品能减少自由基对细胞的损伤, 改善模型小鼠的免疫及内分泌等多种功能, 具有一定抗衰老作用^[27]。

3.2 其它衰老模型

3.2.1 依据现代衰老学说设计的动物模型。包括: O_3 损伤衰老模型, 去胸腺衰老模型, 自然衰老模型, 记忆障碍动物模型等。采用这些衰老模型, 对某些中药的抗衰老作用认识有所深化。例如人参皂甙、枸杞多糖对去胸腺衰老模型小鼠的抗衰老作用。模型组小鼠去胸腺 3.5 个月后, 灌胃分别给予人参皂甙 10mg/kg、枸杞多糖 5mg/kg, 1 周 3 次, 连续用药 8 周。成年对照组 (假手术) 及模型对照组同法给予等体积生理盐水。结果表明, 人参皂甙和枸杞多糖均可增强衰老模型小鼠的细胞免疫功能, 后者还可以改善衰老模型小鼠的性功能^[28]。

千层塔 (即蛇足草) 提取物石杉碱甲对记忆障碍动物模型有改善作用。我国近年以中草药提取物樟柳碱代替东莨菪碱制备的记忆障碍动物模型, 用来研究千层塔中提取的强效胆碱酯酶抑制剂—石杉碱甲。实验观察到, 石杉碱甲不但能促进或改善实验动物的记忆障碍, 而且也能治疗老年性记忆功能减退^[29]。临床用双盲法观察石杉碱甲对老年及初老期记忆障碍的疗效,

共 60 对 120 例, 以 Wais 记忆量表 (WMS) 评定效果, 治疗组与生理盐水对照组注射给药后 WMS 增值分别为 15.82 ± 10.10 及 4.48 ± 8.79 , 有极显著差异 ($P < 0.001$)。总有效率分别为 63.33% 及 26.37%, 显示石杉碱甲确有增强记忆功能的效力^[30]。与实验结果相吻合。

3.2.2 依据引进的动物模型。如快速老化痴呆小白鼠模型 (SAM-P/8), 有人观察六味地黄口服液口服 4 个月对 SAM 学习记忆的影响^[31]。

4 评述与展望

一切抗衰老措施的根本作用, 在于尽可能地延长寿命, 并在此基础上提高生命活力。故国内外医界把细胞和整体寿命试验作为药物抗衰老研究的最主要检测手段。近十年来, 国内做细胞寿命试验的中药已达 14 种, 做整体寿命试验的中药已达 45 种。其中人参、黄芪、绞股蓝、罗布麻、茶叶等, 既做了细胞寿命试验, 又做了整体寿命试验, 用科学数据证明了它们确有延年益寿作用。这些工作将中药抗衰老研究向前推进了一步, 所取得的成绩令人鼓舞。

从研究的深度和广度看, 寿命试验的水平有较大幅度的提高。例如, 我国学者不仅依据 Hayflick 细胞寿命学说建立了人胚肺二倍体细胞株, 运用它进行抗衰老药物筛选。还建立了仓鼠卵巢二倍体细胞、大鼠表皮纤维母细胞、维尔纳氏综合征患者皮肤细胞、人表皮纤维母细胞、人二倍体牙龈成纤维细胞、人羊膜细胞、神经细胞等多种细胞水平的抗衰老药物筛选方法。尤其是皮肤成纤维细胞的传代次数及 DNA 修复合成效率, 国外哈特 (Hart) 及塞特洛 (Setlow) 研究认为与动物的最高寿命有着良好的线性关系。因此采用这些筛选方法, 利于研究抗衰老中药对最高寿命的影响。再者, 在对细胞传代研究的过程中, 不少实验观察了细胞的增殖速度、亚微结构和超微结构, 探索了细胞内 DNA 非程序合成水平、老化相关酶 SOD、酸性磷酸酶活性, 以及老化代谢产物脂褐素含量等, 使人们对体外培养之细胞活力也有了较全面的了解。在整体寿命试验领域, 不仅既往已有的家蚕、果蝇、小鼠生存试验得到广泛应用, 而且新建立了一批采用棘尾虫、四膜虫、隆线蚤、多刺裸腹蚤等短寿命、低等动物快速筛选方法, 扩展了整体寿命试验可选择范围。对于家蝇寿命试验的研究, 还做了脑内自由基发光体强度试验, 使之有所深化。

衰老动物模型的研究, 近十年来取得了可喜的进展。特别是亚急性衰老动物模型 D-半乳糖模型, 由我国借鉴 1979 年 Christopher 等人半乳糖白内障动物模型的基础上建立。本法实验周期短, 与人类衰老症状的相关性好, 在解剖、生理、病理、生化等方面检测指标较

多,综合评价实验结果的意义较大。故近年来得到较快的推广和应用。

随着基础医学研究的发展,细胞凋亡(Apoptosis)成为 90 年代研究的热点。现已证明,细胞凋亡是机体内一种基因调节的自主控制过程,属于程序性死亡。它与细胞的增殖和分裂,形成机体细胞水平的一对与阴阳相似的矛盾,其对立、统一及阴阳消长,构成了生命运动的生长、发育、衰老和死亡。由此可见,在既往的中药抗衰老研究中,细胞和整体寿命试验只涉及到对不同层次延长寿命现象的观察,而衰老动物模型则只涉及到对不同层次衰老短寿现象的观察。至于在细胞水平应用中药后,如何增加细胞繁殖,减少细胞凋亡,从而使二者的动态平衡右移,呈现延年益寿现象,目前研究报道甚少。笔者相信,这一研究的深化及其与医学遗传学、分子生物学结合,必将在 21 世纪到来之际,把中药抗衰老研究推向新的科学高度,更多的造福于中国和世界老人。

5 参考文献

- 1 刘平,葛迎春,孙红,等. 人参不同部位皂甙对外培养细胞的剂量一效应关系影响研究. 老年学杂志, 1989, 9(4):242.
- 2 张树臣,刘平,张伟,等. 人参不同部位皂甙对人胚肺二倍体成纤维细胞 DNA 修复功能的影响. 中草药, 1992, 23(10):528.
- 3 陈新谦.《本草纲目》对动植物补益药的收载及其中 20 种药物的现代研究. 中国药学杂志, 1993, 28(9):518.
- 4 孙晓莉,刘裕,乐效辉. 黄芪对体外人胚肺二倍体成纤维细胞抗衰老作用的研究 I、细胞寿命、增殖能力和超氧化物歧化酶含量的研究. 首都医学院学报, 1993, 14(3):213.
- 5 郑志学,王赞舜,杨毓英,等. 何首乌对二倍体细胞的作用及其微量元素含量的观察. 老年学杂志, 1988, 8(6):357.
- 6 邱正荣,周寿然. 绞股蓝药理研究十年. 江西中医药杂志, 1988, 21(6):54.
- 7 肖雪媛,王淑兰,李淑莲,等. 红景天甙对外培养人胚肺二倍体细胞的影响. 老年学杂志, 1991, 11(3):164.
- 8 肖雪媛,杨崇敬,苏雪梅,等. 红景天甙对外培养人胚肺二倍体成纤维细胞组织化学及其超微结构的影响. 中国老年学杂志, 1997, 17(2):113.
- 9 黄靖雄,马运输,吴开国,等. 西蕃莲对外培养二倍体细胞的 DNA 合成作用. 中国老年学杂志, 1994, 14(5):292.
- 10 刘斌,司马镇强,吴军正,等. 枸杞和骨碎补对人牙龈成纤维细胞体外寿命的影响. 老年学杂志, 1993, 13(5):296.

- 11 李荣芷,何云庆. 灵芝多糖抗衰老机理探讨. 老年学杂志, 1992, 12(3):184.
- 12 张国玺,陶国枢,陈可冀. 中华医学会老年医学学会第二届全国老年基础医学学术会议纪要. 中华老年医学杂志, 1997, 16(1):5.
- 13 中华医学会老年医学学会编. 全国衰老机理与对策研讨会论文集. 1991:143.
- 14 董群,吴敏毓,曲卫敏. 黄芪为主三种方剂的抗衰老作用探讨. 中国老年学杂志, 1996, 16(6):376.
- 15 陈钦耀,冀元棠,孙玉林. 绞股蓝对多刺裸腹蚤的生物效应——一种抗衰老药物筛选模型. 中草药, 1995, 26(10):527.
- 16 李献平,刘世昌. 四大怀药对家蚕寿命及生长发育的影响. 中国中药杂志, 1990, 15(9):51.
- 17 金道山,余颂涛,周健群,等. 花粉对家蝇脑内自由基水平及寿命的影响. 老年学杂志, 1988, 8(2):104.
- 18 罗谋伦,谢干琼,赵一,等. 蛤蚧抗衰老作用的实验研究. 老年学杂志, 1990, 10(6):347.
- 19 冀肇华,樊荣,张继伟. 蚂蚁粉对果蝇寿命的影响. 老年学杂志, 1988, 8(5):288.
- 20 李书田,洪贞霞,王作豪,等. 紫茵抗衰老的研究. 老年学杂志, 1990, 10(5):299.
- 21 戴寿芝,文润玲,李为,等. 枸杞、枸杞多糖与抗衰老. 老年学杂志, 1994, 14(1):33.
- 22 徐麒木,胡晓明,周宏辉. 绞股蓝及其复方的抗衰老实验研究. 中成药, 1989, 11(5):29.
- 23 张秀芹,王珏玫,金春花. 蕤蕤皂甙抗衰老作用的研究. 中药材, 1990, 13(2):34.
- 24 阴健,郭力弓主编. 中药现代研究与临床应用(1). 北京:学苑出版社, 1993:648.
- 25 高南南,于澍仁,刘睿红,等. 天麻对 D-半乳糖所致衰老小鼠的改善作用. 中草药, 1994, 25(10):521.
- 26 程秀娟,邸林,韩大庆,等. 人参、人参茎叶皂甙和参杞安泰抗衰老作用的比较研究. 老年学杂志, 1992, 12(1):52.
- 27 潘鑫鑫,郑卫红,傅万玉. 人参总皂甙抗衰老作用的实验研究. 中国老年学杂志, 1995, 15(5):52.
- 28 陈勤主编. 抗衰老研究实验方法. 北京:中国医药科技出版社, 1996:19.
- 29 胡继身. 抗衰老药物研究中有记忆障碍动物模型的探讨. 中国药学杂志 1993, 28(3):141.
- 30 马永兴,王赞舜,俞正英,等. 改善老年认知功能的进一步观察. 中华医学会第四次全国老年医学学术会议论文汇编, 1989, 111.
- 31 宋涛. 六味地黄口服液口服 4 个月对早衰大鼠(SAM)学习记忆的影响. 中国药理学通讯, 1996, 13(2):21.