

抗衰老胶囊的动物实验研究

陈华良, 邓倩(浙江省绍兴市第七人民医院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 目的 研究抗衰老胶囊的药理作用。方法 用复杂水迷路法测试小鼠的学习记忆状况。分别建立记忆获得障碍病理模型、记忆巩固障碍病理模型和记忆再现缺失病理模型。将抗衰老胶囊分散于鼠饲料中制成颗粒型, 定量喂食, 作为治疗模型。分别测定小鼠的用药后药物对外周血管与脑血管的扩张作用; 和药物的抗衰老状况。结果 抗衰老胶囊对记忆获得障碍有非常显著的治疗意义, 治疗组与病理组($P < 0.01$), 病理组与空白组($P < 0.01$)的差异有非常显著意义。对记忆再现缺失有非常显著意义, 治疗组与病理组($P < 0.01$), 病理组与空白组($P < 0.01$), 治疗组与空白组($P < 0.01$)的差异有显著意义。结果表明抗衰老胶囊能扩张外周循环, 脑内微循环, 能减少小鼠脑部的脂褐质量。结论 抗衰老胶囊能使小鼠提高学习记忆的能力, 能扩张外周循环, 能增加对脑部的供血量, 减缓衰老程度。

关键词: 抗衰老胶囊; 学习记忆; 血管扩张; 抗衰老

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)12-0967-05

Experimental Study of Anti-aging Capsule on Mice

CHEN Hualiang, DENG Qian (Seventh People's Hospital of Shaoxing, Shaoxing 312000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the pharmacological effects of the anti-aging capsule. **METHODS** Using complex labyrinth of water to test the situation of mice's learning and memory. To establish the models of memory access barriers of pathological model, memory consolidation of obstacles pathological model and memory loss of the pathological model of reproduction. The anti-aging capsules were scattered around the mouse's feed which is articles, quantitative feeding, the establishment of therapeutic models; using *in vivo* experimental observation microcirculation peripheral vascular drugs and the expansion of the role of cerebrovascular, analysis of blood vessel expansion; to observe the situation of slow down the aging degree. **RESULTS** It has a significant meaning of the treatment of anti-memory access obstacle, the treatment group and pathological group ($P < 0.01$), pathological group and the blank group ($P < 0.01$). The difference was significant. It also has a significant meaning of the memory again missing, the treatment group and pathological group ($P < 0.01$), pathological group and the blank group ($P < 0.01$). The difference was significant. To the expansion of peripheral circulation, it also has a significant meaning. Can improve the brain microcirculation, can improve the mice anti-fatigue ability. **CONCLUSION** Mouse anti-aging capsule can improve learning and memory abilities, the anti-fatigue ability of mice to the expansion of peripheral circulation, can increase brain blood flow, the extent of links aging.

KEY WORDS: anti-aging capsule; learning and memory; blood vessel expansion; anti-aging

截至 2008 年底, 中国 60 岁以上老年人口已经达到 1.598 9 亿, 约占全国总人口的 12%, 今后将以年均 800 万人的规模递增^[1]。张振馨教授课题组的研究显示 65 岁以上中国人每 100 人中有 4.8

人患阿尔茨海默病(AD), 是血管性痴呆(VaD)的 4.36 倍^[2]。老年性痴呆疾病成为老年人中死亡率仅次于心血管疾病、癌症、脑血管病的疾病, 成为影响老年人及其家庭生活的重大问题。老年性痴

呆常见的症状有认知障碍、时间和空间定向力障碍、性格改变和精神行为障碍等。痴呆病人记忆退化的特点是：首先近期记忆消退，其次为语言障碍，丧失记忆由轻度渐进到重度，学习能力严重不足，难以形成新的记忆^[3]。痴呆的一般症状如行动、意欲、感情等通过脑循环代谢改善药和抗精神病药可得到某种程度改善，但这些药物对痴呆的主要症状如记忆力、思考力、判断力等认知障碍疗效极差。同时，老年期痴呆患者由于机体老化的因素，在血管方面呈现出血管硬化，血管壁致密度降低，血管弹性下降等老年性血管问题。由于血管的弹性下降，血管的供血能力下降。目前研究认为脑血流量降低是痴呆的一个指征。在神经系统方面由于神经细胞功能衰退，呈现出大脑中神经递质合成减少，神经兴奋度下降，记忆下降等衰退现象。同时由于免疫能力的下降，更进一步促进了肌体的衰老。老年期痴呆是综合因素产生的结果，根据临床治疗的结果来看，任何单一因素的治疗都不能有效地治疗老年期痴呆的疾病，治疗效果不理想。

抗衰老胶囊是我院自行研制的以葛根黄酮、胆碱酯酶抑制剂、VE 为主的复方固体脂质体制剂，采用固体脂质体制剂技术，制成胶囊便于服用。主要目的是用以治疗老年性痴呆，提高和改善脑的学习记忆功能。长期临床使用表明在治疗阿尔茨海默病(AD)上疗效明显，配合使用安里申比单独使用安里申疗效更明显。对自述记忆下降的非老年痴呆病人自述记忆功能增强较明显。对耳鸣有减轻作用。本试验用动物记忆获得障碍病理模型、记忆巩固障碍病理模型、记忆再现缺失病理模型等，对抗衰老胶囊进行了实验研究。

1 材料

1.1 动物

小鼠：远交系，15~30 g，♂，200 只，浙江医学科学院实验动物中心，实验动物合格证号：浙医实动单项准第 94(001)号。

1.2 仪器

复杂水迷路：根据文献有机玻璃自制，见图 1^[4]；电休克机：上海医疗器械专科学校，X-II 型；双目显微镜；恒温箱；恒温恒压灌流瓶。

1.3 药品

抗衰老胶囊含药饲料：本院试制品(含葛根黄酮 10%)分散于鼠饲料中制成颗粒型，分高、中、

低剂量，含药分别为 45 mg·(3 g)⁻¹、30 mg·(3 g)⁻¹、15 mg·(3 g)⁻¹，按葛根素注射剂使用说明书 0.6 g·d⁻¹，按不同种属的动物体型系数计算，每只 20 g 小鼠日耗食 3 g，损耗 20%；氢溴酸东莨菪碱(浙江宁波制药二厂，0.3 mg·mL⁻¹)。

1.4 试剂

30%乙醇：药用乙醇配制；Ringer 溶液 10%；1/3 000 中性红溶液；1/5 000 Janus green B 溶；K-H 液(自配)；石蜡；10% Formalin 缓冲液；苦味酸；冰醋酸。水温：(37±2)℃；室温：(20±2)℃；实验时间：10:00~15:30。

2 实验方法

2.1 学习记忆实验

2.1.1 训练 采用中国医学科学院药物研究所张均田研究员介绍的复杂水迷路，按所介绍的三阶段训练方法进行训练。①第一阶段训练：第 1 天在复杂水迷路 1 区放置一爬梯，取小鼠置 S 区(起步区)，小鼠游泳至 1 区爬梯处使休息 30 s，训练 10 次，第 2 天在复杂水迷路 1 区放置一爬梯，取小鼠置 S 区(起步区)，小鼠游泳至 1 区爬梯处使休息 30 s，训练 10 次，巩固记忆。②第二阶段训练：第 3 天在复杂水迷路 2 区放置一爬梯，取小鼠置 S 区(起步区)，小鼠游泳至 2 区爬梯处使休息 30 s，训练 10 次，第 4 天在复杂水迷路 2 区放置一爬梯，取小鼠置 S 区(起步区)，小鼠游泳至 2 区爬梯处使休息 30 s，训练 10 次，巩固记忆。③第三阶段训练：第 5 天在复杂水迷路 F 区放置一爬梯，取小鼠置 S 区(起步区)，小鼠游泳至 F 区爬梯处使休息 30 s，训练 10 次，第 6 天在复杂水迷路 F 区放置一爬梯，取小鼠置 S 区(起步区)，小鼠游泳至 F 区爬梯处使休息 30 s，训练 10 次。第 7 天在复杂水迷路 F 区放置一爬梯，取小鼠置 S 区(起步区)，小鼠游泳至 F 区爬梯处使休息 30 s，训练 10 次，巩固记忆。

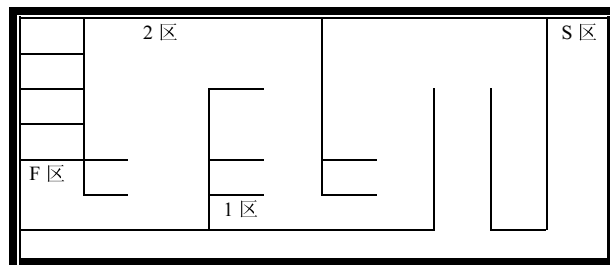


图 1 复杂水迷路

注：S 为起步区；F 为目标区；1、2 分阶段爬梯放置区

Fig 1 Complex water maze

Note: S is the starting area; F is the goal area; 1, 2 is the area of the ladder setting in stages

2.1.2 病理模型建立^[4] ①记忆获得障碍病理模型:小鼠于训前 20 min, ip, 东莨菪碱 5 mg·kg⁻¹。

②记忆巩固障碍病理模型:动物训练后将两电极接于该组小鼠头部和鼻部通以 7 mA 的电流,持续 1 s。

③记忆再现缺失病理模型:经训练小鼠于重测前 0.5 h 以 0.1 mL·(10g)⁻¹ 乙醇(30%)灌胃。

2.1.3 分组 随机分组,分成空白组对照组、病理对照组和药物治疗组(病理+药物)。将按上述方法建立的模型,空白组对照组以 3 g·(20 g)⁻¹(小鼠)不含药饲料给食。病理对照组以 3 g·(20 g)⁻¹(小鼠)不含药饲料给食,按“2.1.2”法建立病理模型。治疗对照组以 3 g·(20 g)⁻¹(小鼠)含药饲料给食,按“2.1.2”法建立病理模型。

2.1.4 给药方法 ①记忆再现缺失实验:病理组给标准饲料,计量给食,测试前 0.5 h 以 0.1 mL·(10 g)⁻¹ 乙醇(30%)灌胃;治疗组在开始训练前 1 天起每天给含药饲料,计量给食,测试前 0.5 h 以 0.1 mL·(10g)⁻¹ 乙醇(30%)灌胃;空白组给标准饲料,计量给食,测试前 0.5 h 以 0.1 mL·(10 g)⁻¹ 蒸馏水灌胃。②记忆获得障碍实验:病理组给标准饲料,计量给食,经 4 d 训练后快速到达 2 区,于训练到 F 区前 20 min, ip, 东莨菪碱 5 mg·kg⁻¹;治疗组于开始训练前 1 天起每天给含药饲料,计量给食,经 4 d 训练后快速到达 2 区,于训练到 F 区前 20 min, ip, 东莨菪碱 5mg·kg⁻¹ 1 次;空白组给标准饲料,计量给食,于训前 20 min, ip 蒸馏水 0.4 mL。③记忆巩固障碍实验:病理组给标准饲料,计量给食,动物训练后,立即将两电极接于该组小鼠头部和鼻部通以 7 mA 的电流,持续 1 s。(小鼠用 70%乙醇擦拭以增加导电性)24 h 后测试成绩;治疗组于开始训练前一天起每天给含药饲料,计量给食,动物训练后,立即将两电极接于该组小鼠头部和鼻部通以 7 mA 的电流,持续 1 s。(小鼠用 70%乙醇擦拭以增加导电性)24 h 后测试成绩;空白组给标准饲料,计量给食。动物训练后,立即将两电极接于该组小鼠头部和鼻部,不通电流,持续 1 s, 24 h 后测试成绩。休克鼠用洗耳球作人工呼吸抢救。

2.1.5 评定方法 根据复杂水迷路实验方法,测试各组小鼠从 S 区(起步区)游到 F 区成绩,游泳成绩用秒记数,测试时间控制在 10:00~15:30。

2.2 活体微循环实验^[4]

2.2.1 肠系膜活体微循环实验

2.2.1.1 分组 取小鼠 32 只。随机分 4 组,空白

对照、大剂量组、中剂量组和小剂量组。

2.2.1.2 给药方法 实验以 3 g·(20 g)⁻¹ 含药饲料给食高,中,低剂量,含药分别为 45, 30, 15 mg·(3 g)⁻¹。4 组同时自由取食 7 d。实验前禁食不禁水 24 h。

2.2.1.3 评定方法 用苯巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ 作腹腔麻醉。下腹毛剪净,于右侧腹壁部作 1.5~2 cm 长切口,轻轻拉出一段空肠袢,平铺于有机玻璃灌流小池上,以大头针将肠管下方肠系膜固定于小池两侧软木上,将小池侧管与一高于手术台 30 cm 的恒温恒压灌流瓶相连,内装 K-H 液,流速调节使其缓慢流经肠系膜下,再自小池溢至外槽,投以斜落射光,以放大 100 显微镜观察。固定视野,调节测微尺的位置,使其可以测量血管直径的变化。滴加给药。分别在造模后 10, 20, 30 min 时,连续观察选定的同一位置,记录微动、静脉管径及血液流态的变化。同时对微静脉血液的流态进行评分,并作为观察指标,评分标准 4 分,线粒流,血流快速,成直线,但有沙粒感;3 分,粒线流,血流较快,成直线,但明显有沙粒感;2 分,粒流,血流快,成直线,可区分细胞;1 分,粒缓流,血流缓慢,明显区分细胞,可见细胞团。

2.2.2 大脑活体微循环实验^[4]

2.2.2.1 分组和给药 取小鼠 32 只,随机分成 4 组,空白对照、大剂量组、中剂量组和小剂量组。同时自由取食 7 d。

2.2.2.2 评定方法 麻醉后小鼠剪去头部毛,切开脑颅上肌肉层,打开颅骨,滴加生理盐水,用 100 显微镜观察。固定视野,调节测微尺的位置,使其可以测量血管直径的变化。药物用蒸馏水溶解后注入小鼠尾静脉。

2.3 活体染色法实验^[5]

2.3.1 分组和给药 取小鼠 32 只,药物组分 3 个剂量组,空白对照组,每组 8 只。同时自由取食 20 d。

2.3.2 评定方法 按 0.1 mL·(10 g)⁻¹ 体重尾静脉注入 0.5%中性红染料,经 15 min 后,即用剪刀剪断动物颈总动脉放血处死。将血放尽后取出所需之组织,表面用滤纸吸干,分别置于盛有 10 mL 1%盐酸乙醇溶液(75%乙醇配制)的试管中脱色,隔 24, 48 h 后用 721 分光光度计 λ 540 nm 进行比色,以 1%盐酸乙醇溶液作参比。

2.4 脂褐质组织学观察实验^[4]

2.4.1 分组 取体重为(32±3)g, ♂, 健康, 8 月龄小鼠 32 只,分高剂量组、中剂量组,低剂量组、

空白对照组, 每组 8 只。

2.4.2 给药方法 同时自由取食 60 d。

2.4.3 评定方法 给药结束。给动物灌注缓冲液 10%福尔马林液, 然后取出大脑、脊髓、心、肝等组织, 固定于 10%福尔马林缓冲液中, 脱水、脱色, 石蜡包埋, 切片, 染色, 染色方法采用排除法。观察指标: ①含脂褐质的细胞百分率; ②平均每只细胞所含脂褐质颗粒的数目与大小; ③平均每只细胞所含脂褐质占细胞浆面积的百分率。

2.5 统计方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 学习记忆实验

3.1.1 乙醇引起记忆再现缺失实验 同条件下交互测试, 差异有显著意义, 见表 1。

3.1.2 东莨菪碱引起记忆获得障碍实验 同条件下顺序交互测试, 差异有非常显著意义, 见表 1。

3.1.3 电休克致记忆巩固障碍实验 同条件下交互测试, 差异无意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 小鼠学习记忆实验成绩 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Experiment results of the mice learning and memory ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	记忆再现缺失实验 游泳成绩/s	记忆获得障碍 实验 F 区成绩/s	记忆巩固障碍 实验成绩/s
病理组	3 045.00±721.25 ²⁾	1 618.2±1 458.7 ²⁾	92.8±58.6
治疗组	1 219.00±1 215.93 ¹⁾²⁾	249.9±168.6 ¹⁾	78.8±24.5
空白组	99.67±190.71	161.4±91.5	88.2±43.2

注: 未游到以 3 000 s 计值。与病理组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与空白组相比, ²⁾ $P < 0.01$

Note: The mice which haven't finish were scored 3000 s. Compared with pathological group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with blank group, ²⁾ $P < 0.01$

3.2 活体微循环实验

3.2.1 肠系膜活体微循环实验 观测药物对外周血管与脑血管的扩张作用 同条件下交互测试, 结果见表 2。观察结果表明药物能扩张外周血管。

表 2 实验组与对照组外周血管的扩张作用比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The experimental group and control group's comparison of the expand action with peripheral vascular blood vessels ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	微动脉管径 /μm	微静脉管径 /μm	流态/min
高剂量药物组	23.32±6.71 ¹⁾	32.84±5.82 ¹⁾	3.7±0.5 ¹⁾
中剂量药物组	22.64±5.37 ²⁾	33.85±6.18 ¹⁾	3.6±0.7
低剂量药物组	20.23±4.53	29.82±5.63	3.5±0.8
空白组	18.27±4.53	27.65±5.66	3.2±0.4

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.10$

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.10$

3.2.2 大脑活体微循环实验 同条件下交互测试, 结果见表 3。大脑活体微循环实验观测结果表明药物能扩张脑血管, 但作用较弱。

表 3 实验组与对照组大脑活体微循环实验脑血管扩张作用比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The experimental group and control group's comparison of the cerebrovascular expand action with cerebral microcirculation *in vivo* experiments ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	微动脉管径 /μm	微静脉管径 /μm	流态/min
高剂量药物组	22.28±5.45 ¹⁾	33.16±6.37 ¹⁾	3.6±0.8
中剂量药物组	22.64±4.49 ¹⁾	32.44±3.78 ²⁾	3.7±0.6
低剂量药物组	21.18±6.78	27.82±6.37	3.4±0.4
空白组	17.78±4.16	26.75±6.84	3.3±0.7

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.10$

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.10$

3.3 活体染色法实验结果

实验动物脑血管管径的改变也可影响吸附的量。在同等条件和无毒物损害的情况下, 由于脑血管扩张而致中性红染料脑内进入增多, 说明药物能增加血脑屏障的通透性, 扩张脑部微循环。实验在同条件下交互测试脑脱色液 24, 48 h 中性红含量(%), 结果见表 4。

表 4 实验组与对照组活体染色法实验结果 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The results of the experimental group and control group's vivo staining ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	体重/g	脑脱色液 24 h 中性红含量/%	脑脱色液 48 h 中性红含量/%
高剂量药物组	16.3±1.5	86.7±7.3 ¹⁾	87.3±6.8 ¹⁾
中剂量药物组	15.9±1.7	88.3±5.9 ¹⁾	89.5±7.1 ¹⁾
低剂量药物组	17.0±1.6	82.4±6.1 ¹⁾	83.6±5.7 ¹⁾
空白组	15.9±1.6	61.2±4.8	63.4±4.6

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.01$

3.4 褐质组织学观察实验

观察药物的抗衰老状况。同条件下交互测试, 结果见表 5。切片观察表明空白组小鼠左脑平均细胞内脂褐质多于药物组一等级倍, 显示药物有一定抗衰老作用。

表 5 脂褐质组织学观察实验结果比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 5 The experimental results of Lipofuscin histologic observation ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	左脑脂褐 质数量个 /0.014 mm×mm	右脑脂褐 质数量个 /0.014 mm×mm	左脑脂褐 质颗粒直 径/μm	右脑脂褐 质直径 /μm
高剂量药物组	9.4±3.6 ¹⁾	11.2±4.2 ¹⁾	0.54±0.12 ¹⁾	0.62±0.14 ¹⁾
中剂量药物组	11.4±4.3 ¹⁾	10.6±1.7 ¹⁾	0.61±0.16	0.66±0.19 ¹⁾
低剂量药物组	15.7±5.2	14.4±3.8	0.68±0.24	0.72±0.31
空白组	17.3±4.6	18.4±3.2	0.74±0.15	0.86±0.21

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.01$

4 讨论

抗胆碱能药物影响记忆的机制比较清楚。结果易重复,且无明显非特异反应;口服乙醇可明显干扰记忆的再现,本试验采用此作病理模型。而电休克致记忆巩固障碍作病理模型不理想。有关文献根据实验结果表明脑中产生的记忆痕迹,属于电活动过程,学习之后所产生的电变化,会逐渐转化为化学变化而将记忆固定下来,一旦这种化学变化形成之后,再施以电痉挛性休克,就不会产生逆行性健忘了,即记忆便巩固下来不受影响了^[6]。

本实验复杂水迷路,按所介绍的三阶段训练方法,经7d训练,使记忆非常巩固,使实验具有较好的说服力。

中性红活体染色实验主要是用于观察毒性反应,实验动物在一定量的毒物作用下,某些器官受损的细胞原生质可发生一系列改变,导致对染料的吸附力的增强。在本实验中利用药物对脑血管管径的改变可影响脑血管内吸附的量的特点来观察脑部微循环情况。实验结果表明,在同等条件和无毒物损害的情况下,由于脑血管扩张而致中性红染料脑内进入增多,说明药物能增加血脑屏障的通透性,扩张脑部微循环。

本药理实验表明,抗衰老胶囊对记忆获得障

碍有非常显著的治疗意义,对记忆再现缺失有非常显著意义。在其它药理实验中发现有扩张脑血管,增加血脑屏障通透性的作用和减少脂褐质的作用。提示该药在老年性痴呆、小儿弱智的临床治疗上有一定价值。

REFERENCES

- [1] ZHOU R J. The old who are over sixty year's old are beyond 1.5 hundred million in China [EB/OL]. Main page of China view—the society of Xinhua(新华网主页-新华社会), 2009, [2009-04-12]. http://news.xinhuanet.com/newscenter/2009-04/12/content_11172411.htm.
- [2] KOU J. *The Research of Parkinson sickness and Stupid epidemiology's intervention and coercion* which was led by the professor of Zhenxin Zhang got the second prize of National scientific and technological progress [EB/OL]. The net of Beijing Union Medical College Hospital (北京协和医院网站), 2009, [2009-3-6]. <http://www.pumc.ac.cn/Article/ShowArticle.asp?ArticleID=1675>.
- [3] LI W B, ZHOU J H. Nervous system changes in old age. *Anti-Aging, Geriatrics (衰老·抗衰老·老年医学)* [M]. Beijing: Science and Technology of China Press, 1993: 46.
- [4] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. *Pharmacological experimental methodology(药理实验方法学)* [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991: 659-664, 992-1003, 659-664.
- [5] *The preparation of group. Industrial Toxicology Experimental Methodology (工业毒理学实验方法学)* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1977: 226.
- [6] YAN L K. Electric shock and forgotten [EB/OL]. Not famous psychological website(无名心理网站), 2002, [2002-3-9]. <http://psycho.hebtu.edu.cn/xinlidaguan/QUWEI/dxk.htm>.

收稿日期: 2009-02-01