

# 当归芍药散加味方对老年鼠松果体功能的影响

何宏文, 谢 瑶, 田荣波, 姚志彬

(中山大学中山医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究当归芍药散加味方(DSS)对老年鼠松果体功能的影响。【方法】40只老年鼠(18个月)分为对照组、全方组、君臣药组、佐药组,分组灌服DSS及拆方水煎液,3周后,取各组大鼠松果体进行培养,分离松果体培养上清液(PCS),然后加入到ConA诱导的脾细胞增殖培养中,用Giemsa染色法和细胞计数测定脾细胞增殖数量和有丝分裂率、增殖率。【结果】老年对照组、全方组、君臣药组、佐药组有丝分裂率分别为 $(2.25 \pm 1.31)$ 、 $(4.08 \pm 1.14)$ 、 $(3.98 \pm 1.07)$ 、 $(2.46 \pm 1.37)$ ,增殖率分别为 $(1.30 \pm 0.017)$ 、 $(1.86 \pm 0.011)$ 、 $(1.81 \pm 0.013)$ 、 $(1.25 \pm 0.15)$ 。与老年对照组比较,DSS全方组和君臣药组脾细胞有丝分裂率、增殖率明显增多( $P < 0.01$ )。【结论】结果表明服DSS可使老年鼠松果体分泌较多的促进淋巴细胞增殖的物质。

关键词:当归芍药散;老年;松果体;有丝分裂

中图分类号:R749.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2003)05-0333-04

## Effect of Supplemented *Danggui Shaoyao San* on Function of Pineal Body in Aged Rats

HE Hong-wen, XIE Yao, TIAN Rong-bo, YAO Zhi-bin

(Department of Anatomy, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the effect of supplemented *Danggui Shaoyao San* (DSS) on function of pineal body in aged rats. 【Methods】Forty aged rats (18 months) were divided into Control group, DSS group, Junchen group and Zuo group, the rats were fed supplemented DSS or its separating prescription respectively for 21 days. Pineal bodies of rats in different groups were cultured. Pineal culture supernate (PCS) was separated. PCS was added to culture medium. Then, ConA was added to induce splenocyte proliferation. Mitogenetic index and proliferation index were analyzed by Giemsa method. 【Results】Mitogenetic of Control group, DSS group, Junchen group and Zuo group were  $2.25 \pm 1.31$ ,  $4.08 \pm 1.14$ ,  $3.98 \pm 1.07$ ,  $2.46 \pm 1.37$  respectively. Proliferation index in the four groups above were  $1.30 \pm 0.017$ ,  $1.86 \pm 0.011$ ,  $1.81 \pm 0.013$ ,  $1.25 \pm 0.15$  respectively. Compared to the control group, mitogenetic index and proliferation index of DSS group and junchen medicine group were showed significant increase ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】The results show that DSS can help pineal body secrete more material to promote splenocytes proliferation.

Key words: *danggui shaoyao san*; aged; pineal body; mitogenesis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 333 ~ 336]

松果体是机体重要的内分泌器官,日夜周期性分泌褪黑激素(melatonin, MT),衰老时松果体内 $\beta$ 肾上腺能受体( $\beta$ -Adrenergic receptors,  $\beta$ -AR)含量减少,日夜周期性变化消失,MT分泌减少,机体内MT含量显现日低夜高周期性变化消失,加剧机体

衰老的发生<sup>[1,2]</sup>。当归芍药散出自《金匱要略》的妇科名方。研究表明当归芍药散可改善老年性学习、记忆功能低下鼠的空间学习记忆能力,改善老年小鼠平衡和协调运动功能,提高老年机体抗自由基损害能力,促进衰老时中枢胆碱能神经功能低下的恢

收稿日期:2003-01-13

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070952)

作者简介:何宏文(1962-),男,广东南雄人,医学博士,副教授,硕士生导师。

复。被认为是理想的抗衰老药物<sup>[3-6]</sup>。然而其是否会影响松果体的功能,仍无文献报道。因此,我们用当归芍药散加味方(supplemented Danggui Shaoyao San, DSS)及拆方水煎液灌服老年大鼠3周后,观察老年大鼠松果体培养液对脾细胞 ConA 诱导细胞增殖能力的影响,现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和分组

实验动物选用二级 SD 大鼠,雌雄兼有,月龄 18~20 月,动物笼养,昼夜交替环境(由中山大学实验动物中心提供)。大鼠分为对照组、DSS 全方组、君臣组、佐药组 4 个组,每组 10 只大鼠。

### 1.2 DSS 水煎液制备及给药方法

选用当归、白芍、川芎、白术、泽泻、茯苓等中药(均购于广州药材公司,经广州中医药大学药鉴教研室鉴定)。按 DSS 的全方、君臣药(Junchen)、佐药(Zuo)分别第 1 次用 8 倍水分煎 2 h,第 2 次 6 倍水分煎 1.5 h(剂量和方组根据“中药名方进展”),二次分煎液体合并浓缩至每毫升含生药 1 g 的液体,根据分组分别灌服相应的中药水煎液 5 mL,老年对照组灌服蒸馏水 5 mL,连续 3 周。

### 1.3 动物取材

动物在 10 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg,腹腔注射)麻醉下,在深夜 0 时~1 时红灯下开颅分离松果体。

### 1.4 松果体培养上清液制备

将各组松果体放入含有 1 mmol/L 色氨酸的 100 g/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液(0.5 mL/管),置 37℃ 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20 min 后,每管加入 0.25 mL 异丙肾上腺素(终浓度 10 μmol/L),继续培养 60 min,培养结束后收集上清液,即松果体培养上清液(pineal culture supernate, PC 液)<sup>[7]</sup>。

### 1.5 松果体培养液对刀豆球蛋白 A 诱导脾细胞增殖的影响

用青年鼠(2 个月龄)脾脏分离脾细胞,用含体积分数 10% 小牛血清 RPMI1640 培养液稀释备用,将 1×10<sup>6</sup> 脾细胞移入培养瓶中,加入终质量浓度为 1.25 μg/L 刀豆球蛋白 A (Concanavalin, ConA),同时分别加入各组 PC 液(终浓度分别为 0.625%、1.25%、2.5%、5%、10% PC 液)和普奈洛

尔 10 μmol/L。加入含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液至 10 mL,CO<sub>2</sub> 培养箱培养 3 d(37℃ 体积分数 5% CO<sub>2</sub>),然后制成细胞悬液,稀释后用血球计数器计算活细胞数,每瓶计算 4 次,取均数(用台盼蓝染色)。

### 1.6 松果体培养液对脾细胞分裂和姐妹染色体交换率(Sister-chromatid exchanges, SCE)的影响

1.6.1 细胞制片和染色 用 1×10<sup>6</sup> 脾细胞加到培养瓶内,同时加入体积分数 5% 服 DSS 及拆方 PC 液和含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液至 10 mL,加入 ConA 终质量浓度为 5 μg/L,置 37℃ 培养箱中培养,24 h 后,加入 BrdU(终质量浓度 10 μg/L),再培养 48 h,终止培养前 140 min 加入 0.04 μg 秋水仙素,终止培养时,用吸管将培养液和细胞移入离心管,离心 10 min(1 200 r/min, r=10 cm),去上清液,加入 37℃ 预温的 75 mmol/L 的 KCl 液至 10 mL,在 37℃ 条件下低渗处理 20 min,离心 10 min(1 000 r/min, r=10 cm),去上清液,用新配固定液(3 份甲醇:1 份冰醋酸)10 mL,固定 30 min,离心去上清液,加入固定液,冰箱过夜,离心去上清液,加入 0.5~1 mL 固定液制成细胞悬液,用吸管将细胞悬液滴入冰冷的干净载玻片上,晾干,65℃ 烘烤 2.5 h。置室温 1 周。用上述所制的玻片用 2×SSC 液处理 20 min(60℃),同时用紫外线灯照射,用 Giemsa 染色 10 min。

1.6.2 观察指标 ①用 100 倍显微镜观察,各组细胞测定 100 个中期细胞,计算第 1 周期(M<sub>1</sub>,染色体双侧均染色)、第 2 周期(M<sub>2</sub>,染色体单侧染色)、第 3 周期(M<sub>3</sub>,部分染色体染色)的细胞数。②有丝分裂率,计算 1 000 个细胞中中期细胞数。③增殖率,100 个中期细胞中(1×M<sub>1</sub> 细胞数)+(2×M<sub>2</sub> 细胞数)+(3×M<sub>3</sub> 细胞数)/100。④姐妹染色体交换率,各组测定 30 个 M<sub>2</sub> 期细胞染色体交换的次数。

### 1.7 统计学方法

先行 ANOVA 分析,再用 Student-Newman-Keuls 方法对各组数据进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 服 DSS 鼠松果体培养液对培养脾细胞的一般形态改变

加入松果体培养液脾细胞培养 Giemsa 染色标本在镜下显示,全方组和君臣药组中期细胞明显多

于其它各组(图1)。SCE 各组间差别不明显,其它细胞形态未见明显改变。

## 2.2 服 DSS 及拆方鼠 PC 液对脾细胞分裂和 SCE 的影响

加入服 DSS 及拆方鼠 PC 液对培养脾细胞 Giemsa 染色标本显示(表1),加入 DSS 及拆方鼠 PC 液培养脾细胞 Giemsa 染色标本细胞有丝分裂率和增殖率全方组和君臣组明显高于其余各组,差别有高度显著性意义( $P < 0.01$ )。

表1 服 DSS 鼠松果体培养液对脾细胞分裂和 SCE 的影响  
Table 1 Effect of PCS of rat fed with DSS on splenocyte mitosis and SCE  $n = 10$

Group	SCE/cell	Mitotic index	Proliferation index
Control	6.17 ± 1.21	2.25 ± 1.31	1.30 ± 0.017
DSS	5.92 ± 1.13	4.08 ± 1.14 <sup>1)</sup>	1.86 ± 0.011 <sup>1)</sup>
Junchen	5.64 ± 1.14	3.98 ± 1.07 <sup>1)</sup>	1.81 ± 0.013 <sup>1)</sup>
Zuo	6.63 ± 1.15	2.46 ± 1.37	1.25 ± 0.15

1) Compared with control group,  $P < 0.01$

表2 不同浓度 PC 液对培养脾细胞增殖的影响

Table 2 Effect of different doses of PC solution on cultured splenocyte proliferation (cell × 10<sup>5</sup>/mL,  $n = 10$ )

Group	0.625%	1.25%	2.5%	5%	10%
DSS	1.56 ± 0.13	1.61 ± 0.15	1.71 ± 0.11 <sup>1)</sup>	1.83 ± 0.21 <sup>1)</sup>	1.69 ± 0.17 <sup>1)</sup>
Junchen	1.51 ± 0.23	1.58 ± 0.16	1.62 ± 0.19	1.72 ± 0.13 <sup>1)</sup>	1.76 ± 0.19 <sup>1)</sup>
Zuo	1.52 ± 0.11	1.55 ± 0.21	1.53 ± 0.18	1.52 ± 0.17	1.52 ± 0.22

1) Compared with the cell number with the concentration 0.625%,  $P < 0.01$

## 3 讨论

松果体分泌的 MT 对机体有多方面的功能,如调节生殖系统、免疫调节、抗自由基损害、影响其他神经内分泌腺、应激和睡眠等<sup>[8-10]</sup>。MT 对免疫系统和抗自由基损害作用近年来尤其引起人们极大关注,被认为是 MT 抗衰老及其它生理作用的基础。研究表明 MT 可明显提高机体淋巴细胞功能,促进淋巴细胞增殖。

本研究显示,服 DSS 全方中药和君臣中药老年大鼠松果体培养液可明显促进 ConA 诱导脾细胞增殖的细胞数和脾细胞中期分裂率和增殖率,说明该 2 组脾细胞分裂活跃,增殖明显增多,表明松果体培养液中含有促进脾细胞增殖的活性物质。松果体分泌最主要的活性物质是 MT,而 MT 同样有

## 2.3 服药大鼠 PC 液对培养脾细胞增殖的影响

服 DSS 及拆方老年大鼠 PC 液对 ConA 诱导脾细胞增殖培养的细胞数对照组为  $(1.53 \pm 0.22) \times 10^5/\text{mL}$ , DSS 组  $(1.83 \pm 0.21) \times 10^5/\text{mL}$ , 君臣组  $(1.72 \pm 0.13) \times 10^5/\text{mL}$ , 佐药组  $(1.52 \pm 0.17) \times 10^5/\text{mL}$ 。结果显示 DSS 全方组和君臣组的细胞数明显高于对照组,差别有显著性意义( $P < 0.01$ )。全方组的升高作用较君臣组更大,差别有显著性意义( $P < 0.05$ )。

## 2.4 不同浓度服 DSS 及拆方老年大鼠 PC 液对培养脾细胞增殖的影响

不同浓度服 DSS 全方和 DSS 君臣、佐药的老年大鼠 PC 液对脾细胞 ConA 诱导增殖培养的细胞数如表 2。结果显示,随着 PC 液增加 DSS 全方和 DSS 君臣组的培养脾细胞数明显增加,全方组 PC 液浓度为 2.5%、5%、10% 和君臣组为 5%、10% 的脾细胞数明显多于两组含量为 0.625% 剂量组( $P < 0.01$ )。佐药组的培养脾细胞数各 PC 液浓度组差别不明显。

促进脾细胞增殖作用。因此我们可以认为服 DSS 全方和君臣中药后老年大鼠松果体处于一个较好的分泌状态,受到异丙肾上腺素刺激后引起松果体内  $\beta$ -AR 兴奋分泌 MT 增加。不同浓度 DSS 全方和君臣组 PC 液对脾细胞增殖作用 2 组间差别不明显,说明全方组和君臣组 PC 液中有相近的 MT 含量。已有研究证明白芍总甙可促进松果体功能低下大鼠胸腺和脾淋巴细胞的致分裂素反应低下和 IL-2 生成减少<sup>[11]</sup>,而 DSS 全方和君臣均含有大量的白芍总甙。因此,DSS 促进老年鼠松果体功能作用有可能是通过白芍总甙作用使老年鼠松果体分泌 MT 增加。此外,我们以往研究表明 DSS 全方组可明显提高老年鼠松果体  $\beta$ -AR 含量,而  $\beta$ -AR 是松果体分泌 MT 主要调节受体,这也可能是服 DSS 老年大鼠松果体分泌较多的活性物质机制之一。

已有许多研究表明,MT 保护细胞内 DNA 免受

自由基、放射线、致癌物等的损害作用,可减少细胞内 SCE 发生。我们原本设想松果体培养液也可能影响细胞内 SCE 发生,然而本研究并没有得到服 DSS 中药老年大鼠松果体培养液可减少脾细胞内 SCE 发生的结果,这可能是 DSS 使老年鼠松果体分泌 MT 增加的量还不足以引起脾细胞 SCE 发生差别。

总之,本研究发现 DSS 使松果体处于较好的功能状态,可分泌较多的促进脾细胞增殖的活性物质。DSS 药理作用和 MT 对机体的作用极相似,使我们联想到 DSS 对机体的作用可能是通过 DSS 促进机体松果体分泌较多的 MT 实现的。

(本文图 1 见第 416 页。Fig. 1 shown in page 416)

#### 参考文献:

- [1] Greeberg L H, Weiss B.  $\beta$ -adrenergic receptors in aged rat brain: reduced number and capacity of pineal gland to develop supersensitivity [J]. *Science*, 1978, 201(4350): 61.
- [2] Moajir F, Recter R J, Rodriguez G, *et al.*  $\beta$ -adrenergic and peptide N-terminal histidine and c-terminal isoleucine stimulation of N-acetyltransferase activity and helatinin production in the cultured rat pineal gland[J]. *Endocrinology*, 1999, 130(4): 2074.
- [3] 水岛宣昭. 当归芍药散治疗老年性痴呆有效 [J]. 和汉医药学会志(日), 1989, 6(3): 456.
- [4] 何宏文, 姚志彬. 当归芍药散对老年小白鼠运动功能的影响[J]. *中国行为医学科学*, 1998, 7(7): 12.
- [5] Komatsu M, Ueda Y, Hiramatsu M. Different changes in concentrations of monoamines and their metabolites and amino acids in various brain regions by the herbal medicine/Toki-Shakuyaku-San between female and male senescence-accelerated mice (SAMP8) [J]. *Neuroch Neem-Res*, 1999, 24(7): 825.
- [6] 鸟居家生和. 当归芍药散对摘除卵巢小鼠、大鼠的免疫功能以及记忆的作用[J]. *日本东洋医学杂志*, 1993, 43(5): 145.
- [7] 魏伟, 丁长海, 沈玉先. 大鼠松果腺及松果腺细胞培养方法的探讨[J]. *中国药理学通报*, 1995, 11(4): 334.
- [8] Uchida K, Okamoto N, Ohara K, *et al.* Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type[J]. *Brain Res*, 1996, 717(1-2): 154.
- [9] Maurino S G, Haba G, Calvo J R, *et al.* Melatonin enhances IL-1, IL-6 and IFN-r production by human circulation CD4+ cells[J]. *J Immunol*, 1997, 159(2): 574.
- [10] Benot S, Goberna R, Reiter R J, *et al.* Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum[J]. *J Pineal Res*, 1999, 27(1): 59.
- [11] 许杜娟, 魏伟, 徐叔云. 松果体与细胞免疫的关系及白芍总甙的作用[J]. *中国药理学通报*, 1997, 13(4): 37.

(编辑 张恩健)

## 启 事

本刊原名为《中山医科大学学报》,自 2001 年 10 月中山大学与中山医科大学合并后,刊名于 2003 年 1 月起更名为现刊名。依据有关规定,期刊更名后,ISSN 号亦应相应更改。本刊原刊号为:ISSN 1000-257X, CN44-1120/R, 经国际标准连续出版物编码系统中国国家中心批准,自 2003 年 5 月起正式改为:ISSN 1672-3554, CN44-1575/R。本刊刊名与刊号更改后,内容与宗旨延续,邮发代号不变,欢迎有关单位及个人订阅。本刊由广东省报刊发行局发行,各地邮局有订,代号:46-141,全年订价:60 元。

## 当归芍药散加味方对老年鼠松果体功能的影响 (正文见第 333 页)

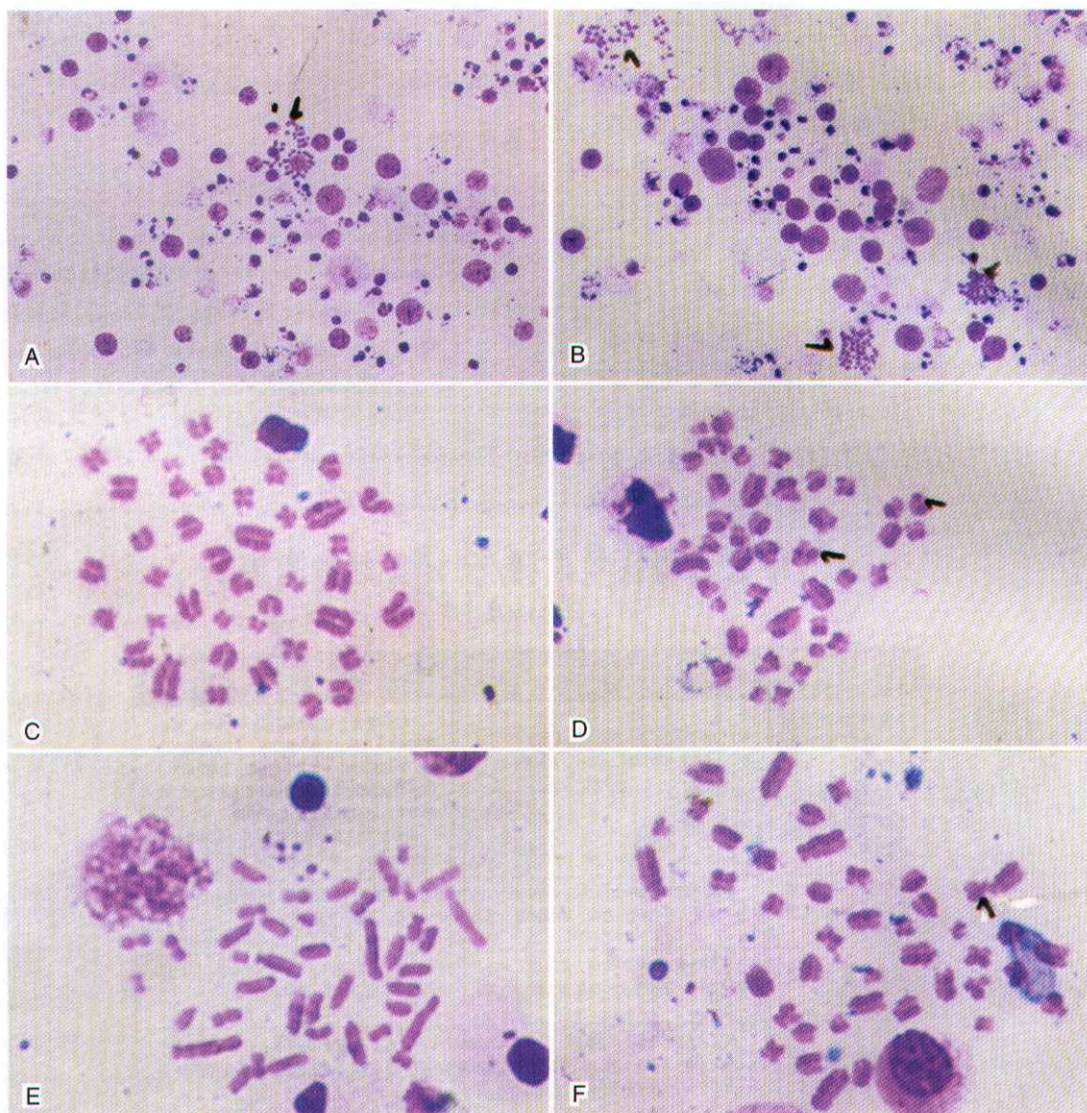
Effect of Supplemented *Danggui Shaoyao San* on Function of Pineal Body in Aged Rats (Text in page 333)

图 1 服 DSS 鼠松果体培养液对脾细胞分裂的影响

Fig. 1 Effect of PCS of rat fed with DSS on splenocyte mitosis

- A: Splenocyte of control group, arrow showed mitotic cell. 20 ×  
 B: Splenocyte of DSS group, arrow showed mitotic cell. 20 ×  
 C: Chromosome of M<sub>1</sub> period cell. 100 ×  
 D: Chromosome of M<sub>2</sub> period cell of control group, arrow showed SCE. 100 ×  
 E: Chromosome of M<sub>3</sub> period cell. 100 ×  
 F: Chromosome of M<sub>2</sub> period cell of DSS group, arrow showed SCE. 100 ×