

连翘苷抗小鼠衰老作用的研究[△]

颜礼有*, 刘明娟, 闫慧如, 李 晓, 胥谨慧, 杨建雄[#](陕西师范大学生命科学院, 西安 710062)

中图分类号 R285.5;Q946 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)01-0037-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.01.12

摘要 目的:研究连翘苷对衰老模型小鼠的抗衰老作用。方法:小鼠颈部皮下注射D-半乳糖(150 mg/kg),每天1次,连续42 d以复制小鼠衰老模型。50只KM小鼠随机均分为正常对照(等容甲基纤维基钠)组、模型(等容甲基纤维基钠)组与连翘苷高、中、低剂量(45、15、5 mg/kg)组,复制模型同时灌胃给药,每天1次,连续42 d。测定小鼠增质量率与脾脏、心脏、肾脏、肝脏指数,测定小鼠血清、肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)水平,测定小鼠脑组织MDA、B型单胺氧化酶(MAO-B)、SOD、T-AOC水平。结果:各组间心脏、肾脏、肝脏指数差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组比较,模型组小鼠增质量率降低,脾脏指数降低;小鼠血清、肝组织SOD、GSH-Px、T-AOC活性减弱,MDA含量增加;小鼠脑组织MDA含量增加,MAO-B活性增强,SOD、T-AOC活性减弱,差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与模型组比较,连翘苷高、中、低剂量组小鼠增质量率升高,脾脏指数升高;连翘苷高、中剂量组小鼠血清、肝组织SOD、GSH-Px、T-AOC活性增强,MDA含量减少;连翘苷高、中、低剂量组小鼠脑组织MAO-B活性减弱;连翘苷高、中剂量组小鼠脑组织MDA含量减少,差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:15、45 mg/kg剂量下,连翘苷对衰老模型小鼠具有较好的抗衰老作用。
关键词 连翘苷;抗衰老;小鼠;超氧化物歧化酶;丙二醛;B型单胺氧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶;总抗氧化能力

Study on Anti-aging Effects of Phillyrin on Aging Model Mice

YAN Li-you, LIU Ming-juan, YAN Hui-ru, LI Xiao, XU Jin-hui, YANG Jian-xiong (College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-aging effects of phillyrin on aging model mice. METHODS: The aging model was induced by subcutaneous injection of D-galactose (150 mg/kg) on cervical region once a day for consecutive 42 d. 50 KM mice were randomly divided into normal control group (constant volume of CMC-Na), model group (constant volume of CMC-Na), phillyrin high-dose, medium-dose and low-dose groups (45, 15 and 5 mg/kg). They were given relevant medicines intragastrically once a day for consecutive 42 h. The rate of weight gain, the index of spleen, heart, kidney and liver were determined in mice; the levels of SOD, GSH-Px, MDA and T-AOC in serum and liver tissue of mice were all detected; the levels of MDA, MAO-B, SOD and T-AOC were detected in brain tissue of mice. RESULTS: There was no statistical significant difference in the index of heart, kidney and liver ($P>0.05$). Compared with normal control group, the rate of weight gain, the index of spleen, the activities of SOD, GSH-Px and T-AOC in serum and liver tissue were decreased in model group, while the content of MDA was increased; MDA content and MAO-B activity in brain tissue of mice were increased, while SOD and T-AOC activities were decreased; there were statistical significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with model group, the rate of weight gain and the index of spleen were increased in phillyrin high-dose, medium-dose and low-dose groups; SOD, GSH-Px and T-AOC activities in serum and liver tissue were increased in phillyrin high-dose and medium-dose group, while MDA content was decreased; MAO-B activity of brain tissue was decreased in phillyrin high-dose, medium-dose and low-dose groups; MDA content of brain tissue was decreased in phillyrin high-dose and medium-dose groups; there were statistical significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: Phillyrin (15, 45 mg/kg) possesses satisfying function of anti-aging on aging model mice.

KEYWORDS Phillyrin; Anti-aging; Mice; SOD; MDA; MAO-B; GSH-Px; T-AOC

连翘(*Forsythia suspensa*)是木犀科植物连翘属落叶灌木,传统以果实入药,是最常见的中药材之一,具有抗菌消炎、保肝、镇痛等作用^[1-3]。其有效单体成分连翘苷和连翘酯苷被证明具有良好的抗氧化作用。笔者早前的研究工作发现,富含连翘苷和连翘酯苷的连翘叶提取物有抗氧化^[3]、抗衰老^[4]和抗

疲劳^[5]作用。本研究通过观察连翘苷对D-半乳糖致衰老小鼠的血清、肝脏、大脑中抗衰老相关指标的影响,为其作为抗衰老药物的开发和利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Epoch超微量微孔板分光光度计(美国Bio Tek公司);PI-CO17台式离心机(美国Thermo公司,半径:5 cm);AG eppendorf台式离心机(德国Eppendorf公司,半径:7.5 cm);DY89-II型电动玻璃匀浆机(宁波新生生物科技股份有限公司);HH-B型数显恒温水浴锅(深圳国华电器有限公司);LRH-150-II型微电脑控制生化培养箱(广东省医疗器械厂);BP221S型精密

[△] 基金项目:陕西师范大学2013年大学生创新创业训练计划项目(No.cx13071)

* 硕士研究生。研究方向:应用生物化学。E-mail: yanliyou1987@163.com

[#] 通信作者:教授。研究方向:从事天然产物的分离、纯化与功能评价。电话:029-85307619。E-mail: jxyang@snnu.edu.cn

电子天平(德国 Sartorius 公司);pH 计(上海精密科学仪器有限公司);RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

连翘酯苷、连翘苷(陕西师范大学生命科学院自制,经高效液相色谱分析纯度: $>98\%$);D-半乳糖(美国 Sigma 公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)、B 型单胺氧化酶(MAO-B)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

健康 KM 小鼠 50 只,体质量 18~22 g,♀ ♂ 兼半,由西安交通大学医学院实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(陕)2007-001]。按国家标准啮齿类动物干燥饲料喂养,自由饮食饮水。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

小鼠颈部皮下注射(sc)给药 D-半乳糖(150 mg/kg),每天 1 次,连续 42 d 以复制小鼠衰老模型。50 只 KM 小鼠随机均分为正常对照(等容羧甲基纤维素钠)组、模型(等容羧甲基纤维素钠)组与连翘苷高、中、低剂量(45、15、5 mg/kg)组,复制模型同时 ig 给药,每天 1 次,连续 42 d。成年人建议连翘苷每日用量 405.6~3 652.8 mg,按成人体质量 60 kg 计,用量约为 6.76~60.88 mg/kg,折合成小鼠使用量约为 5~45 mg/kg,故选择 5、15、45 mg/kg 为实验用剂量。

2.2 各组小鼠增质量率、脏器指数的检测

给药前与给药后称定小鼠体质量并记录。处死小鼠后取出新鲜脾脏吸干表面水分测质量,计算脾脏指数和增质量率,计算公式:脾脏指数=脾脏质量(mg)/体质量(g);增质量率=(终体质量-初始体质量)/初始体质量 $\times 100\%$ 。

2.3 各组小鼠生化指标的检测

小鼠眼眶采血,血样以离心半径为 5 cm,3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液待测。颈椎脱臼处死小鼠后迅速取出大脑和肝脏,用冰冷的生理盐水冲洗血渍,再取部分脑组织和肝脏组织用生理盐水分别制成 5% 的脑、肝脏匀浆,以离心半径为 7.5 cm,3 500 r/min 离心 15 min 后取上清待测。按试剂盒说明书检测小鼠血清和肝脏、脑组织 SOD、GSH-Px、T-AOC 活性,MAO-B 含量。

2.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以 LSD 法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠增质量率、脏器指数

与正常对照组比较,模型组小鼠增质量率降低,脾脏指数降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组比较,连翘苷高、中、低剂量组小鼠增质量率升高,脾脏指数升高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组小鼠心脏、肾脏、肝脏指数差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠增质量率、脏器指数的检测结果见表 1。

3.2 各组小鼠血清生化指标

表 1 各组小鼠增质量率、脏器指数的检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 The rate of weight gain and spleen index of mice each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	增质量率, %	脾脏指数	心脏指数	肾脏指数	肝脏指数
正常对照组	30.94 ± 3.14	3.75 ± 0.49	5.07 ± 0.84	12.56 ± 0.63	47.86 ± 5.72
模型组	25.80 ± 2.88**	3.31 ± 0.25*	4.99 ± 0.48	12.50 ± 1.72	47.18 ± 7.18
连翘苷低剂量组	28.43 ± 2.84*	3.69 ± 0.43*	5.09 ± 0.40	12.88 ± 1.88	47.75 ± 7.07
连翘苷中剂量组	28.95 ± 2.91*	3.74 ± 0.56*	5.26 ± 0.61	13.06 ± 1.03	47.83 ± 4.87
连翘苷高剂量组	29.35 ± 2.96**	3.94 ± 0.47**	5.30 ± 0.86	13.65 ± 1.91	48.17 ± 5.73

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

与正常对照组比较,模型组小鼠血清 SOD、GSH-Px、T-AOC 活性减弱,MDA 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,连翘苷高、中剂量组小鼠血清 SOD、GSH-Px、T-AOC 活性增强,MDA 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组小鼠血清生化指标的检测结果见表 2。

表 2 各组小鼠血清生化指标的检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Serum biochemical indicators of mice each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD,U/ml	GSH-Px,U/ml	T-AOC,U/ml	MDA,nmol/ml
正常对照组	84.63 ± 10.58	232.8 ± 30.5	8.25 ± 1.01	17.50 ± 2.43
模型组	71.38 ± 11.04*	198.9 ± 30.8*	6.63 ± 1.78*	20.78 ± 2.79*
连翘苷低剂量组	75.81 ± 9.57	208.6 ± 26.2	7.39 ± 1.03	18.76 ± 2.48
连翘苷中剂量组	84.90 ± 9.12**	233.6 ± 24.9*	8.30 ± 0.96*	17.65 ± 2.32*
连翘苷高剂量组	86.42 ± 9.17**	239.5 ± 27.4**	8.29 ± 0.83*	17.73 ± 2.11*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$; vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.3 各组小鼠肝组织生化指标

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织 SOD、GSH-Px、T-AOC 活性减弱,MDA 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组比较,连翘苷高、中剂量组小鼠肝组织 SOD、GSH-Px、T-AOC 活性增强,MDA 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠肝组织生化指标的检测结果见表 3。

表 3 各组小鼠肝组织生化指标的检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 The biochemical indicators of liver tissue in mice each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD,U/mg	GSH-Px,U/mg	T-AOC,U/mg	MDA,nmol/mg
正常对照组	193.8 ± 17.3	719.7 ± 79.2	1.41 ± 0.13	1.55 ± 0.13
模型组	174.1 ± 19.9*	625.1 ± 78.7*	1.21 ± 0.14**	1.77 ± 0.20*
连翘苷低剂量组	185.7 ± 19.1	660.1 ± 69.2	1.34 ± 0.14	1.65 ± 0.14
连翘苷中剂量组	193.3 ± 17.6*	700.7 ± 56.2*	1.36 ± 0.14*	1.56 ± 0.13*
连翘苷高剂量组	194.9 ± 18.3*	701.4 ± 58.2*	1.38 ± 0.11*	1.54 ± 0.12*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.05$

3.4 各组小鼠脑组织生化指标

与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织MDA含量增加,MAO-B活性增强,SOD、T-AOC活性减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与模型组比较,连翘苷高、中、低剂量组小鼠脑组织MAO-B活性减弱,中、高剂量组小鼠脑组织MDA含量减少,SOD、T-AOC活性增强($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。各组小鼠脑组织生化指标的检测结果见表4。

表4 各组小鼠脑组织生化指标的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 4 The biochemical indicators of brain tissue in mice each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MDA, nmol/mg	MAO-B, U/mg	SOD, U/mg	T-AOC, U/mg
正常对照组	2.54±0.13	12.95±2.26	93.22±12.51	1.40±0.12
模型组	2.77±0.21*	15.64±2.28*	80.19±13.83*	1.21±0.14**
连翘苷低剂量组	2.63±0.15	13.51±1.87*	87.10±12.45	1.34±0.15
连翘苷中剂量组	2.58±0.12*	13.09±1.89*	92.94±9.58*	1.36±0.13*
连翘苷高剂量组	2.57±0.12*	12.76±1.79**	93.02±9.88*	1.36±0.11*

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

4 讨论

自由基衰老学说认为,人体在生命活动过程中必然产生一些自由基,自由基连锁反应导致生物膜损伤及生物大分子交联。其结果使蛋白质和核酸分子损伤,酶活性降低,生物膜功能发生障碍,脂褐素堆积,从而导致机体的衰老和死亡^[6]。进行衰老研究需要建立衰老动物模型,目前使用较多的是D-半乳糖衰老模型。D-半乳糖能影响自由基在体内的代谢而加速衰老,使体内SOD和GSH-Px活性减弱,MDA含量增加^[7]。研究表明,D-半乳糖衰老模型引发自由基损伤和免疫指标的变化与人体衰老指标变化规律相似^[8]。

本研究表明,小鼠sc给予D-半乳糖42d后,其心脏、肾脏、肝脏指数没有明显的变化,而其增质量率和脾脏指数降低,血清、肝脏和脑SOD、T-AOC和GSH-Px活性均明显减弱,MDA含量增加,MAO-B活性增强,结果与前人的研究相符,说明衰老模型复制成功。

根据衰老的免疫学说,随着机体年龄的增长,其免疫功能呈下降趋势,增质量率也会下降。脾脏指数在一定程度上可间接反映衰老状况^[9-10]。本研究表明,模型组小鼠增质量率和脾脏指数明显低于正常对照组,而高、中、低剂量连翘苷均能抑制由于衰老而导致的增质量率下降和脾脏萎缩,其中高剂量连翘苷效果最好。

SOD是体内清除自由基的关键酶,其活力可反映机体清除超氧自由基的能力;MDA是自由基攻击生物体的降解产物,其含量可反映组织和细胞损伤的程度。测定SOD活性和MDA含量可作为机体衰老的重要指标^[11-13]。GSH-Px存在于人体各种组织和细胞中,可使谷胱甘肽(GSH)还原细胞内产生的H₂O₂,清除体内的过氧化物,具有抗脂质氧化的作用^[14]。MAO-B与衰老关系密切,MAO存在于神经胶质细胞内,在神经系统主要调节单胺类递质的含量,其活性随年龄而增强。MAO-B活性下降有利于保持神经系统的正常功能,对机体的抗氧化及抗衰老有促进作用^[15-16]。本研究表明,高、中剂量连

翘苷能明显提高衰老模型小鼠血清、肝脏、脑组织中SOD、T-AOC和GSH-Px活性,减少MDA的堆积,降低MAO-B的活性,保护机体免受自由基损伤;同时,中、高剂量作用差别不大,表明中剂量已达其作用的较佳剂量。

综上所述,15、45 mg/kg连翘苷具有较好的抗衰老作用。

参考文献

- [1] 张炜,张汉明,郭美丽,等.连翘的药理学研究[J].中国现代应用药学杂志,2000,17(1):7.
- [2] 徐春媚,王文生,曹艳红,等.连翘保肝作用的实验研究[J].黑龙江医药科学,2001,24(1):10.
- [3] 杨建雄,朱淑云,李发荣.连翘叶茶的体外抗氧化活性[J].食品科学,2002,23(12):120.
- [4] 杨建雄,刘静,李发荣,等.连翘叶茶抗氧化抗衰老作用的实验研究[J].营养学报,2004,26(1):65.
- [5] 侯改霞,杨建雄.连翘叶茶提取物对力竭运动及恢复期小鼠心肌抗氧化酶和LDH同工酶活性的影响[J].中国运动医学杂志,2006,25(1):90.
- [6] 屈泽强,谢智光,王乃平,等.三七总皂苷抗衰老作用的实验研究[J].广州中医药大学学报,2005,22(2):130.
- [7] 李笑萍,俞培先,赵东. D-半乳糖衰老模型的新指标[J].中国现代应用药学杂志,2004,21(6):443.
- [8] 刘显明,李月芬,李国.茶氨酸对D-半乳糖衰老模型小鼠抗衰老作用的实验研究[J].创伤外科杂志,2008,10(3):257.
- [9] Caruso C, Candore G, Romano GC, et al. Immunogenetics of longevity. Is major histocompatibility complex polymorphism relevant to the control of human longevity? A review of literature data[J]. Mech Aging Dev, 2001, 122(5):445.
- [10] Hayakawa T, Takanaga A, Tanaka K, et al. Ultrastructure of the rostral ventral respiratory group neurons in the ventrolateral medulla of the rat[J]. Brain Res, 2004, 153(2):94.
- [11] 秦红兵,杨朝晖,朱清,等.麋鹿角乙醇提取液抗衰老作用的研究[J].中成药,2004,26(4):324.
- [12] 兰鸿,杜士明.菟丝子提取物对自然衰老小鼠的抗衰老作用研究[J].中国药房,2010,21(39):3667.
- [13] 申进宝,孙红武.绞股蓝总皂苷纳米乳的制备及其抗衰老作用研究[J].中国药房,2012,23(39):3667.
- [14] De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, et al. Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Metabolism, 1998, 47(8):993.
- [15] Nicotra A, Pierucci F, Parvez H, et al. Monoamine oxidase expression during development and aging[J]. Neurotoxicology, 2004, 25(1/2):155.
- [16] 唐粉芳,金宗濂,王磊,等.香菇发酵液对小鼠抗衰老及增强免疫功能的评价[J].北京联合大学学报,1994(8):9.

(收稿日期:2014-02-25 修回日期:2014-05-08)

(编辑:张静)