

马栗籽提取物对衰老模型小鼠氧化损伤的改善作用[△]

高江霞^{1*}, 王艳红², 孟敏², 翟晶², 葛斌^{2#} (1. 甘肃省人民医院耳鼻喉科, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2175-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.05

摘要 目的: 研究马栗籽提取物(EEHS)对衰老模型小鼠氧化损伤的改善作用。方法: 采用sc给予D-半乳糖(120 mg/kg), 每天1次, 连续42 d以复制小鼠衰老模型。60只小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、维生素E(阳性对照, 50 mg/kg)组与EEHS高、中、低剂量(300、150、75 mg/kg)组, 后5组小鼠复制模型的同时ig给药, 每天1次, 连续42 d。测定小鼠血清、肝脏和脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性与丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量。结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠血清、肝脏和脑组织中SOD、GSH-Px活性减弱, iNOS活性增强, MDA、NO含量增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, EEHS高、中、低剂量组小鼠血清、肝脏和脑组织中SOD、GSH-Px活性增强, iNOS活性减弱, MDA、NO含量减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: EEHS对衰老模型小鼠的氧化损伤有一定改善作用, 其机制可能与增加机体抗氧化酶活性, 提高清除自由基、抗氧化能力有关。

关键词 马栗籽提取物; D-半乳糖; 衰老; 小鼠; 氧化损伤; 抗氧化作用

Improvement Effects of Extract from Hippocastanum Seeds on the Oxidative Damage of Aging Mice Model

GAO Jiang-xia¹, WANG Yan-hong², MENG Min², ZHAI Jing², GE Bin² (1. Dept. of Otolaryngology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the improvement effects of extract from hippocastanum seeds (EEHS) on the oxidative damage of aging model mice. **METHODS:** D-galactose (120 mg/kg) was sc given to mice by hypodermic injection once a day for consecutive 42 d to establish aging models. 60 mice were randomly divided into normal control group (isometric normal saline), model group (isometric normal saline), vitamin E group (positive control, 50 mg/kg), and EEHS high, medium and low doses groups (300, 150, 75 mg/kg). During the establishment of models, the drugs were given to the last five groups of mice, ig, once a day, for consecutive 42 d. The activities of the superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the contents of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in the serum, liver and brain tissues of the mice were determined. **RESULTS:** Compared with normal control group, the activities of the SOD and GSH-Px in the serum, livers and brain tissues of the mice in model group were decreased, the activity of the iNOS therein increased, and the contents of MDA and NO were increased, with significant difference ($P < 0.01$). Compared with model group, the activities of the SOD and GSH-Px in the serum, livers and brain tissues of the mice in the EEHS high, medium and low dose groups were increased, the activity of the iNOS therein was decreased, and the contents of MDA and NO were decreased, with significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** EEHS has certain improvement effects on the oxidative damage of the aging model mice by a mechanism that may be related to the enhancement of the activity of antioxidant enzyme, the elimination of free radical and the improvement in oxidation resistance.

KEYWORDS Extract from hippocastanum seeds; D-galactose; Aging; Mice; Oxidative damage; Antioxidant effects

- 品加工, 2007(12):56.
- [7] 刘维会, 刘雪婷. 微量元素锌与糖尿病[J]. 中国疗养医学, 2009, 18(4):354.
- [8] 滕杨, 侯丽然, 侯巍, 等. 木犀草素-铬配合物的合成及其

△基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(No.145RJZA051)
*副主任护师。研究方向: 临床护理学。E-mail: 279985941@qq.com

#通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 新药临床前研究。E-mail: gjy0630@126.com

- 清除 DPPH 自由基活性的研究[J]. 中国药房, 2013, 24(39):3 666.
- [9] 韩炜, 邢燕, 康廷国. 木犀草素生物活性研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(4):60.
- [10] 陈玲玲, 吴春, 李俊生. 木犀草素-锌(II)配合物的制备及清除自由基活性研究[J]. 化学与黏合, 2009, 31(6):19.

(收稿日期: 2014-07-27 修回日期: 2014-10-12)

(编辑: 张静)

衰老又称老化,是机体自身结构和机能衰退、适应性和抵抗力下降的一个自发必然过程^[1]。衰老的发生常伴随多个组织器官功能的下降,而延缓衰老、阐明衰老的机制一直是国内外医学界研究的热点。大量实验已证实自由基能通过细胞组成物质脂类、蛋白质、核酸等发生反应,产生脂质过氧化物,对细胞产生损害,引发衰老^[2]。

马栗籽提取物(EEHS)是欧洲马栗树籽的提取物,主要成分为七叶皂苷素,研究表明 EEHS 具有较强的抗氧化、清除氧自由基作用和抗炎活性^[3-4]。自由基在衰老的过程中发挥着重要的作用,而有关 EEHS 延缓衰老方面的研究迄今未见文献报道。为此,本研究采用 sc 给予 D-半乳糖复制亚急性衰老小鼠模型,并观察 EEHS 对模型小鼠的保护作用,并对其作用机制进行探讨,以期延缓衰老寻找新的药物,并为 EEHS 的应用和推广提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

KA-1000 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DY-2 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);722S 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);SPX-250B-D 型振荡培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);ELX800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.2 药品与试剂

EEHS(商品名为迈之灵片,德国礼达大药厂,批号:1401012-31,规格:150 mg EEHS/片);维生素 E 软胶囊(阳性对照,天然型,浙江医药股份有限公司新昌制药厂,批号:140721,规格:100 mg/片);D-半乳糖(分析纯,批号:KG90439,纯度:99%)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、考马斯亮蓝测试盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物

KM 小鼠 60 只,♀,体质量 18~22 g,由兰州大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(甘)2008-0009]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

60 只 KM 小鼠随机均分为 6 组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、维生素 E (50 mg/kg)组与 EEHS 高、中、低剂量(300、150、75 mg/kg)组。正常对照组小鼠 sc 给予生理盐水;其余各组小鼠颈部 sc 给予 D-半乳糖(120 mg/kg),每天 1 次,连续 42 d 以复制小鼠衰老模型。复制模型的同时 ig 给药,每天 1 次,连续 42 d。根据预实验确定 EEHS 剂量,根据人临床剂量按相应方法计算出维生素 E 的剂量。

2.2 生化指标的测定

末次给药 1 h 后,小鼠摘取眼球取血,4 ℃下放置 2 h 后,1 000×g 离心 10 min,分离血清,4 ℃贮藏,备用。取出小鼠肝脏与脑组织,用冷生理盐水冲洗肝脏、脑组织上残余血清,冲洗干净后,用滤纸拭干;分别剪取部分组织块,准确称定质量,用眼科剪剪碎,加冷生理盐水于低温下制成 10% 组织匀浆,1 000×g 离心 10 min,分离上清液,-20 ℃贮藏,备用。严格按相应测试盒说明书操作,检测小鼠血清、肝脏和脑组织中

SOD、GSH-Px、iNOS 活性与 MDA、NO 含量。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件处理实验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠血清生化指标的测定结果

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中 SOD、GSH-Px 活性减弱,iNOS 活性增强,MDA、NO 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,EEHS 高、中、低剂量组小鼠血清中 SOD、GSH-Px 活性增强,iNOS 活性减弱,MDA、NO 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测定结果见表 1。

表 1 各组小鼠血清生化指标的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Determination results of biochemical index in the mice's serum in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	SOD, U/ml	MDA, nmol/ml	GSH-Px, U/g	NO, μ mol/ml	iNOS, U/ml
正常对照组		245.93 ± 11.90	3.42 ± 0.35	1 314 ± 45	9.60 ± 2.32	9.88 ± 0.70
模型组		226.58 ± 17.16*	4.92 ± 0.55*	1 158 ± 118*	17.57 ± 2.35*	14.21 ± 1.56*
维生素 E 组	50	249.92 ± 15.68**	4.03 ± 0.48**	1 284 ± 107**	12.40 ± 3.27**	10.38 ± 1.35**
EEHS 低剂量组	75	251.06 ± 22.06**	4.21 ± 0.40**	1 187 ± 101*	14.60 ± 3.37**	11.23 ± 1.30**
EEHS 中剂量组	150	253.40 ± 5.53**	3.89 ± 0.36**	1 280 ± 144**	12.80 ± 1.75**	10.89 ± 1.22**
EEHS 高剂量组	300	254.60 ± 7.60**	3.53 ± 0.33**	1 365 ± 135**	11.80 ± 2.15**	10.11 ± 1.39**

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

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

3.2 各组小鼠肝组织生化指标的测定结果

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中 SOD、GSH-Px 活性减弱,iNOS 活性增强,MDA、NO 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,EEHS 高、中、低剂量组小鼠肝组织中 SOD、GSH-Px 活性增强,iNOS 活性减弱,MDA、NO 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组小鼠肝组织生化指标的测定结果见表 2。

表 2 各组小鼠肝组织生化指标的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Determination results of biochemical index in the mice's liver tissue in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	SOD, U/mg	MDA, nmol/mg	GSH-Px, U/g	NO, μ mol/mg	iNOS, U/mg
正常对照组		82.42 ± 9.26	0.59 ± 0.17	78.5 ± 8.6	1.58 ± 0.29	1.12 ± 0.18
模型组		66.08 ± 10.18*	0.87 ± 0.13*	61.5 ± 8.7*	3.14 ± 0.30*	2.14 ± 0.17*
维生素 E 组	50	78.94 ± 10.42**	0.68 ± 0.16**	74.6 ± 10.0**	2.35 ± 0.23**	1.27 ± 0.43**
EEHS 低剂量组	75	76.79 ± 9.19**	0.75 ± 0.07**	72.7 ± 10.4*	2.02 ± 0.25**	1.31 ± 0.30**
EEHS 中剂量组	150	80.43 ± 8.19**	0.73 ± 0.09**	76.1 ± 7.7**	1.92 ± 0.26**	1.23 ± 0.28**
EEHS 高剂量组	300	81.73 ± 9.37**	0.65 ± 0.08**	78.7 ± 9.8**	1.62 ± 0.17**	1.18 ± 0.28**

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

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

3.3 各组小鼠脑组织生化指标的测定结果

与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px

活性减弱, iNOS 活性增强, MDA、NO 含量增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, EEHS 高、中、低剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px 活性增强, iNOS 活性减弱, MDA、NO 含量减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组小鼠脑组织中生化指标的测定结果见表 3。

表 3 各组小鼠脑组织生化指标的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Determination results of biochemical index in the mice's brain tissue in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	SOD, U/mg	MDA, nmol/mg	GSH-Px, U/g	NO, μ .mol/mg	iNOS, U/mg
正常对照组		89.08 ± 12.90	1.10 ± 0.34	85.7 ± 12.1	6.45 ± 0.89	1.01 ± 0.18
模型组		71.95 ± 11.42*	1.91 ± 0.41*	53.0 ± 13.5*	9.72 ± 1.74*	2.50 ± 0.66*
维生素 E 组	50	86.09 ± 10.67 [#]	1.51 ± 0.42 [#]	82.0 ± 14.5 [#]	6.94 ± 1.22 [#]	1.41 ± 0.59 [#]
EEHS 低剂量组	75	80.28 ± 11.24 [#]	1.37 ± 0.20 [#]	70.0 ± 16.8 [#]	7.88 ± 1.30 [#]	1.20 ± 0.30 [#]
EEHS 中剂量组	150	81.74 ± 7.69 [#]	1.30 ± 0.27 [#]	73.0 ± 13.1 [#]	7.27 ± 0.55 [#]	1.17 ± 0.34 [#]
EEHS 高剂量组	300	87.73 ± 10.05 [#]	1.25 ± 0.18 [#]	75.4 ± 13.1 [#]	7.01 ± 1.18 [#]	1.14 ± 0.23 [#]

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

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

4 讨论

衰老自由基理论认为, 氧化应激和活性氧自由基是引起衰老和导致一些神经退行性疾病的主要原因^[5]。衰老的自由基机制提示, 提高体内抗氧化酶活性或减少体内自由基将有助于防治衰老性疾病^[6-8]。

可靠的衰老模型是开展衰老机制及其防治研究的基础。目前使用较多的是 sc 给予 D-半乳糖复制衰老模型^[7, 9]。D-半乳糖能影响自由基在体内的代谢而加速衰老, 使体内抗氧化酶的活性减弱, 而脂质过氧化物质的含量增加^[5, 7, 10]。

SOD 是体内重要的抗氧化酶类, 作为自由基清除剂, 其活性反映了机体清除氧自由基的能力^[10]; GSH-Px 是机体内广泛存在的一种含硒抗氧化酶, 具有抗脂质氧化的作用, 其活性的高低可以作为评价组织细胞衰老的又一个重要指标^[8-10]; 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^[10]。本研究通过复制 D-半乳糖衰老小鼠模型, 检测小鼠血清、肝脏、脑组织中的 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的变化来研究 EEHS 的抗氧化作用。本研究显示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠血清、肝脏和脑组织中 SOD、GSH-Px 活性明显减弱, MDA 含量明显增加, 说明复制模型成功。给予不同剂量的 EEHS 后, 衰老模型小鼠血清、肝脏和脑组织中的 SOD、GSH-Px 活性明显增强, MDA 含量明显减少。

iNOS 可催化精氨酸产生 NO, 高浓度的 NO 与氧自由基反应生成超氧化亚硝基阴离子 (ONOO⁻), 后者可攻击机体引

发脂质过氧化连锁反应, 因此 NO 对自由基损伤作用有放大效应, 是氧化应激损伤的最主要自由基之一^[11]。研究结果显示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠血清、肝脏和脑组织中 iNOS 活性和 NO 含量升高, 不同剂量 EEHS 可降低模型小鼠血清、肝脏和脑组织中的 iNOS 活性和 NO 含量。这提示 EEHS 可通过抑制 iNOS 活性从而减少 NO 的含量。

综上所述, EEHS 具有延缓衰老作用, 其作用机制可能与增强机体抗氧化酶活性, 提高清除自由基、抗氧化能力有关。

参考文献

- [1] 林映雪, 庄朋伟, 张金保, 等. D-半乳糖剂量及小鼠性别对衰老模型的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(3): 144.
- [2] 张柱海, 陈雪红, 张鲁平, 等. 盐藻 β -胡萝卜素抗衰老作用研究[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(11): 1324.
- [3] 杨社华, 葛斌, 王艳红, 等. 马栗提取物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2014, 40(1): 29.
- [4] 杨社华, 葛斌, 王艳红, 等. 马栗籽提取物对急性肝损伤小鼠自由基及 TNF- α 含量的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(17): 1453.
- [5] 颜礼有, 刘明娟, 闫慧如, 等. 连翘苷抗小鼠衰老作用的研究[J]. 中国药房, 2015, 26(1): 37.
- [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] 刘显明, 李月芬, 李国平. 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.
- [8] 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.
- [9] 朴日龙, 吴红梅, 张红英. 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 240.
- [10] 卢海庆, 李俊, 刘成军, 等. 鲨血中超氧化物歧化酶对 D-半乳糖致衰老小鼠抗氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(12): 1733.
- [11] 王艳红, 杨孝来, 王莉, 等. 葡萄籽原花青素对复发性结肠炎大鼠血清抗氧化能力及 NO 含量的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(1): 47.

(收稿日期: 2015-03-11 修回日期: 2015-04-02)

(编辑: 张静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅