

环黄芪醇对 *D*-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用

曹艳玲^{1,2}, 李文兰¹, 韦灵玉², 刘晓亚², 李志慧², 贺卫国³, 张玉杰^{2*}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150028;

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

3. 北京美迪克斯生物技术有限公司, 北京 100102)

【摘要】 目的: 探究环黄芪醇(cycloastragenol, CAG) 延缓衰老作用及其机制。方法: 采用 *D*-半乳糖致小鼠衰老模型, 小鼠随机分为正常组、模型组、环黄芪醇低、中、高 3 个剂量组(2.5, 5.0, 10.0 mg·kg⁻¹) 和维生素 E (VE) 组(2.5 mg·kg⁻¹)。除正常组 ip 给予等量的生理盐水外, 其余各组在给药同时均 ip *D*-半乳糖(125 mg·kg⁻¹) 连续给药 6 周。测定心、肝及皮肤等组织总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(T-SOD) 活性、丙二醛(MDA) 和羟脯氨酸(HYP) 的含量。结果: 与正常组比较, 模型组肝、心和皮肤的 T-SOD, T-AOC 活性以及 HYP 含量均显著降低, 差异显著($P < 0.01$), MDA 含量明显增加, 有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与模型组比较, 环黄芪醇能显著提高小鼠肝、心和皮肤的 T-AOC, T-SOD 活性($P < 0.01$), 对肝、心和皮肤的 MDA 含量呈显著的降低作用($P < 0.01$, $P < 0.05$), 并可提高皮肤、心和肝等组织中 HYP 含量($P < 0.01$, $P < 0.05$)。但环黄芪醇对上述指标的影响并未呈现明显的剂量依赖关系。结论: 环黄芪醇具有显著的抗小鼠衰老作用, 主要作用机制可能与提高 T-SOD, T-AOC 活性, 降低 MDA 含量, 增加 HYP 含量有关。

【关键词】 环黄芪醇; 抗衰老; 总抗氧化活性; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 羟脯氨酸

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2012)19-0208-04

Anti-aging Function of Cycloastragenol in Aging Mice Induced by *D*-galactose

CAO Yan-ling^{1,2}, LI Wen-lan¹, WEI Ling-yu², LIU Xiao-ya², LI Zhi-hui², HE Wei-guo³, ZHANG Yu-jie^{2*}

(1. Research Center for Life Science and Environmental Sciences, Haerbin University

of Commerce, Haerbin 150028, China; 2. School of Chinese Materia Medica,

Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

3. Beijing Medicass Biotechnologies Co. Ltd., Beijing 100012, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effects and mechanism of cycloastragenol (CAG) on aging. **Method:** Mouse aging model was induced by *D*-galactose. Sixty mice were randomly divided into control group, model group, CAG (2.5, 5.0, 10.0 mg·kg⁻¹) group and vitarmine E (VE, 2.5 mg·kg⁻¹) group. Each group was given ip *D*-galactose except normal control group was supplied with equal amount of physiological saline for 6 weeks, the treated mice were given medicines according dose. The activity of total antioxidant capacity (T-AOC) and total superoxide dismutase (T-SOD), the contents of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (HYP) were mwasured. **Result:** Compared with the control group, the activity of T-SOD, T-AOC and the content of HYP in liver, heart and skin were markedly reduced in model group ($P < 0.01$), while the content of MDA was markedly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$); CAG group, compared with model group, significantly improved the activity of T-AOC in liver, heart and skin ($P < 0.01$). Meanwhile, the activity of T-SOD in liver, heart and skin

【收稿日期】 20111212(006)

【第一作者】 曹艳玲, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础研究, E-mail: caoyanling02010@yahoo.cn

【通讯作者】 * 张玉杰, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物制剂新技术及体内外评价研究工作, Tel: 010-84738618, E-mail: zhyj227@126.com

($P < 0.01$) and the content of HYP ($P < 0.01$, $P < 0.05$) were markedly increased. And it significantly reduced the content of MDA ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions:** CAG has a remarkable effect of anti-decrepitude, the possible mechanism is able to improve the activities of T-SOD, T-AOC and reduce the contents of MDA, HYP.

[Key words] cycloastragenol; anti-aging; T-AOC; T-SOD; MDA; HYP

黄芪为著名的益气类中药,味甘,性温,具有补气固表、利尿、脱毒、排脓、敛疮、生肌等功效^[1]。研究表明黄芪及其皂苷类成分具有显著的免疫调节、抗炎、抗氧化、抗缺血性脑损伤、抗衰老和促智等广泛作用^[1-2],黄芪甲苷(astragaloside IV)为黄芪的主要皂苷类成分,环黄芪醇(cycloastragenol)为黄芪甲苷的苷元,是黄芪甲苷在肠道内的主要水解代谢产物,二者结构见图1。由于黄芪甲苷的相对分子质量较大、亲水性较强等原因使其在体内的相对生物利用度不足3%^[3-5],而苷元环黄芪醇具有相对较小的分子质量和较强的亲脂性,其在生物膜渗透和胃肠道吸收方面具有优势^[6]。近年来,有关黄芪抗衰老研究受到重视,相关研究在分子水平上阐明了黄芪及其相关成分对衰老基因调控、细胞凋亡、DNA损伤修复及端粒长度影响方面有明显作用^[2],而有关环黄芪醇抗衰老药理学研究报道甚少。本实验通过运用D-半乳糖致小鼠衰老模型的建立,灌胃给药环黄芪醇进行抗衰老作用及其机制的研究。

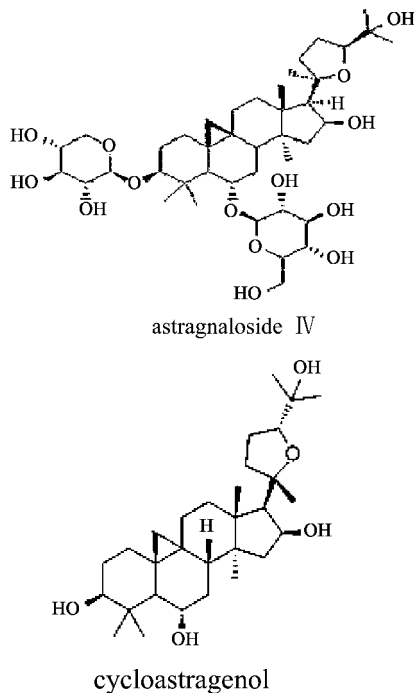


图1 黄芪甲苷(astragaloside IV)和环黄芪醇(cycloastragenol)

1 材料

1.1 动物 健康3月龄昆明种雌性小鼠60只,体重(22 ± 2)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2002-2003。

1.2 药品及试剂 环黄芪醇(北京美迪克斯生物技术有限公司,纯度 $> 98\%$)。维生素E(VE,北京双鹤药业股份有限公司)。D-半乳糖(INALCO公司)、牛血清蛋白、考马斯亮蓝G-250(北京拜尔迪生物技术有限公司)。总抗氧化能力(T-AOC),超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA)和羟脯氨酸(HYP)测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器设备 TU-1901双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);TGL20M台式高速冷冻离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);MVS-1旋涡混合器(北京金北德工贸有限公司);T10basic电动匀浆机(德国IKA公司);CU420型电热恒温水箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、衰老模型的建立及给药 将60只昆明雌性小鼠随机分为6组,正常组、模型组、环黄芪醇低、中、高剂量组与VE组,每组10只。除正常组ip给予等量的生理盐水外,其余各组均ip D-半乳糖($125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[7-8],共连续注射6周。首次注射D-半乳糖后次日开始灌胃给药,正常组和模型组给予等体积的混悬剂,VE组给予VE混悬剂($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),环黄芪醇各剂量组给予相应剂量环黄芪醇混悬剂($2.5, 5.0, 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)共连续给药6周。

2.2 待测样本的采集 于第6周最后1次给药后,用8%硫化钠去除小鼠背部皮肤的毛,断头处死小鼠,在冰浴剥离背部皮肤、心、肝等组织,除去脂肪组织,用预冷的生理盐水漂洗组织至无血色,滤纸吸干,用锡纸包裹,分装冻存于 -80°C 冰箱中备用。

2.3 小鼠各脏器生化指标的测定 测定时,将组织取出常温冻融,称取组织适量,用眼科小剪刀剪碎组织块,加入相应倍数的预冷生理盐水,用内切式组织匀浆器制成测试所需百分含量的组织匀浆(匀浆时

间 10 s/次,间隔 30 s,在冰浴中进行),按照试剂盒说明书进行各组织生化指标的测定。同时用考马斯亮蓝测定组织蛋白质含量。

2.4 统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 16.0 软件进行统计处理,所有计量资料间比较在方差齐性情况下时采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验;如果方差不齐则采用 Welch 法,组间的多重比较采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠的一般表现 模型组动物的精神萎靡、倦

怠少动、喜扎堆、皮毛疏松、欠光泽、易脱落;正常组动物活泼好动,皮毛顺滑有光泽,无明显脱毛现象;VE 组动物的接近正常组,环黄芪醇组动物较正常组表现的更为活泼好动。4 组动物体重差异不明显。

3.2 对肝组织 T-SOD, T-AOC, MDA 和 HYP 的影响

与正常组比较,模型组 T-SOD, T-AOC 和 HYP 显著降低,MDA 明显增加,表明造模成功;与模型组比较,环黄芪醇组能提高 T-SOD, HYP 和 T-AOC,同时能显著降低 MDA。在相同剂量下其作用与 VE 接近。见表 1。

表 1 环黄芪醇对小鼠肝组织 T-SOD, T-AOC 活性和 MDA, HYP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | T-SOD/U·mg ⁻¹ | MDA/nmol·mg ⁻¹ | HYP/μg·mg ⁻¹ | T-AOC/U·mg ⁻¹ |
|------|------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 模型 | - | 58.20 ± 31.4 ²⁾ | 3.09 ± 0.17 ²⁾ | 0.49 ± 0.07 ²⁾ | 0.54 ± 0.22 ²⁾ |
| 正常 | - | 195.03 ± 21.61 ⁴⁾ | 1.78 ± 0.36 ⁴⁾ | 1.18 ± 0.15 ⁴⁾ | 1.19 ± 0.17 ⁴⁾ |
| 环黄芪醇 | 10 | 109.29 ± 15.30 ⁴⁾ | 2.37 ± 0.18 ³⁾ | 0.62 ± 0.08 ³⁾ | 0.68 ± 0.17 |
| | 5 | 68.66 ± 18.17 | 1.95 ± 0.15 ⁴⁾ | 0.66 ± 0.17 ⁴⁾ | 0.87 ± 0.25 ⁴⁾ |
| | 2.5 | 85.64 ± 21.50 ⁴⁾ | 2.38 ± 0.72 ³⁾ | 0.78 ± 0.13 ⁴⁾ | 1.08 ± 0.12 ⁴⁾ |
| VE | 2.5 | 81.99 ± 12.37 ⁴⁾ | 2.30 ± 0.24 ³⁾ | 0.65 ± 0.09 ⁴⁾ | 1.09 ± 0.18 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对皮肤组织 T-SOD, T-AOC, MDA 和 HYP 的影响 与正常组比较,模型组 MDA 明显增加, T-SOD, T-AOC 和 HYP 显著降低,表明造模成功;与模型组

比较,环黄芪醇组能显著降低 MDA,对 T-SOD, HYP 和 T-AOC 具有明显的提高作用,结果与 VE 相近。见表 2。

表 2 环黄芪醇对小鼠皮肤组织 T-AOC, T-SOD 活性和 MDA, HYP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | T-SOD/U·mg ⁻¹ | MDA/nmol·mg ⁻¹ | HYP/μg·mg ⁻¹ | T-AOC/U·mg ⁻¹ |
|------|------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 模型 | - | 38.35 ± 5.23 ²⁾ | 6.93 ± 1.03 ²⁾ | 1.00 ± 0.26 ²⁾ | 1.18 ± 0.46 ²⁾ |
| 正常 | - | 68.36 ± 7.45 ⁴⁾ | 2.69 ± 0.76 ⁴⁾ | 2.08 ± 0.55 ⁴⁾ | 3.37 ± 0.44 ⁴⁾ |
| 环黄芪醇 | 10 | 54.42 ± 8.97 ³⁾ | 4.60 ± 1.72 ⁴⁾ | 1.24 ± 0.26 | 1.84 ± 0.74 ⁴⁾ |
| | 5 | 55.28 ± 6.54 ⁴⁾ | 4.03 ± 0.72 ⁴⁾ | 1.73 ± 0.82 ⁴⁾ | 1.98 ± 0.76 ⁴⁾ |
| | 2.5 | 46.49 ± 7.63 ³⁾ | 4.01 ± 1.25 ⁴⁾ | 1.43 ± 0.52 | 1.35 ± 0.55 |
| VE | 2.5 | 50.12 ± 3.56 ³⁾ | 4.28 ± 1.03 ⁴⁾ | 1.51 ± 0.57 ³⁾ | 1.67 ± 0.62 ³⁾ |

3.4 对心组织 T-SOD, T-AOC, MDA 和 HYP 的影响 与正常组比较,模型组 T-SOD, T-AOC 和 HYP 显著降低,MDA 明显增加,表明造模成功;与模型

组相比,环黄芪醇组 T-SOD, T-AOC 和 HYP 显著增高,MDA 明显降低,高、中剂量组优于 VE。结果见表 3。

表 3 环黄芪醇对小鼠心组织 T-SOD, T-AOC 活性和 MDA, HYP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | T-SOD/U·mg ⁻¹ | MDA/nmol·mg ⁻¹ | HYP/μg·mg ⁻¹ | T-AOC/U·mg ⁻¹ |
|------|------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 模型 | - | 51.57 ± 4.77 ²⁾ | 3.92 ± 2.38 ¹⁾ | 0.41 ± 0.24 ²⁾ | 0.42 ± 0.05 ²⁾ |
| 正常 | - | 74.30 ± 6.42 ⁴⁾ | 1.18 ± 0.15 ³⁾ | 0.74 ± 0.09 ⁴⁾ | 0.57 ± 0.08 ⁴⁾ |
| 环黄芪醇 | 10 | 69.80 ± 3.45 ⁴⁾ | 1.39 ± 0.18 ⁴⁾ | 0.57 ± 0.14 ⁴⁾ | 0.56 ± 0.51 ⁴⁾ |
| | 5 | 67.99 ± 5.25 ⁴⁾ | 2.00 ± 0.36 ⁴⁾ | 0.71 ± 0.84 ⁴⁾ | 0.55 ± 0.09 ⁴⁾ |
| | 2.5 | 57.88 ± 6.66 ⁴⁾ | 2.92 ± 0.72 ³⁾ | 0.49 ± 0.13 | 0.45 ± 0.08 |
| VE | 2.5 | 61.97 ± 4.87 ⁴⁾ | 1.86 ± 0.33 ⁴⁾ | 0.69 ± 0.15 ⁴⁾ | 0.56 ± 0.08 ⁴⁾ |

4 讨论

本实验采用的D-半乳糖造衰老模型是抗衰老实验公认的经典模型^[9-11]。采用小鼠腹腔注射D-半乳糖造模的目的是为了便于皮肤测定的需要。

以往关于检测抗氧化酶报道有很多,但仅是单一指标,只能反映某一酶的活性且不包括非酶系统,难以全面地反映机体的抗氧化能力,而总抗氧化能力(T-AOC)则可全面地反映酶与非酶整个防御体系的抗氧化能力。T-SOD作为机体主要的抗氧化酶之一,能清除自由基保护细胞免受损伤,T-SOD活性的高低反应了机体清除氧自由基的能力^[12]。MDA是氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸而形成的脂质过氧化物,MDA的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度^[13]。羟脯氨酸在胶原蛋白中占13.4%,胶原蛋白是结缔组织的主要基质,胶原蛋白是生命存在的支架。因此,测定羟脯氨酸含量的高低可以间接反应机体衰老的程度。

本试验结果表明环黄芪醇可以通过提高小鼠组织中的T-AOC,T-SOD和降低MDA而提高整个机体的抗氧化能力,显著改善或调整衰老细胞的新陈代谢,提高细胞的生命力,而环黄芪醇还可以提高肝脏、心和皮肤组织的HYP含量,增加皮肤弹性,起到同时延缓机体和皮肤衰老进程的多重抗衰老作用。综上所述,环黄芪醇可能通过改善自由基代谢发挥抗衰老作用。该作用可能与环黄芪醇提高小鼠机体的T-AOC,T-SOD活性,降低MDA含量,提高HYP含量有关。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:283.
 [2] 李静,陈超.黄芪抗衰老作用分子机制的研究进展[J].中国现代药物应用2008,1(2):92.
 [3] 余俊先,张银娣,张淳文,等.黄芪总苷包含体的药动

- 学和生物利用度研究[J].中国药学杂志,2011,46(8):615.
 [4] 王娜,朱科,岳华.黄芪总皂苷对心肌细胞氧化损伤的保护作用研究[J].河北中医药学报,2007,22(2):830.
 [5] Gu Yongchuan, Wang Guangji, Pan Guoyu, et al. Transport and bioavailability studies of astragaloside IV, an active ingredient in Radix Astragali [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004, 95(6): 297.
 [6] JING Zhu, Stephanie Lee, Maurice K C Ho, et al. *In vitro* intestinal absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of cycloastragenol, a potent small molecule telomerase activator [J]. Drug Meta Pharmacokinet, 2010, 25(5): 479.
 [7] 孙琳林.左归丸对D-半乳糖致亚急性衰老大鼠抗氧化能力影响实验研究[D].黑龙江中医药大学,2009:50.
 [8] 余兴华,李滔,李长伟.远志清脑颗粒对拟痴呆模型小鼠学习记忆的影响及机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):185.
 [9] 龚国清.小鼠衰老模型研究[J].中国药科大学学报,1991,22(2):102.
 [10] 刘克明,王春花,李国星,等.D-半乳糖模型鼠与自然衰老鼠的比较研究[J].卫生研究,2007,36(6):686.
 [11] 邱柏程,刘庆丰.D-半乳糖大鼠衰老模型的评价[J].广西医学,2009,31(7):919.
 [12] Giardion R, Giavaresi G, Fini M, et al. The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/reperfusion injury [J]. Arit Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2002, 30(1):190.
 [13] Limoli C L, Kaplan M I, Giedzinski E, et al. Attenuation of radiation reduced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation [J]. Free Radic Boil Med 2001, 31(1):12.

[责任编辑 聂淑琴]