

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.03.006

牛樟叶水提物对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠的作用机制研究*

张蓓¹, 余潇琴², 万永艳¹, 梁学政¹, 覃开羽^{1△}

(1. 广西壮族自治区柳州市中医医院, 广西 柳州 545026; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

摘要:目的 探讨牛樟叶水提物(AECL)对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠的作用机制。方法 取KM小鼠,于颈背部皮下注射 *D*-半乳糖(100 mg/kg,连续20 d),建立衰老小鼠模型。另取10只同批健康小鼠作为正常对照组(A组);模型小鼠随机分为模型组(B组),阳性对照组(C组,维生素E 200 mg/kg),AECL高、中、低剂量组(D₁组、D₂组、D₃组,生药20,10,5 g/kg),各10只。C组、D₁组、D₂组、D₃组小鼠灌胃给药,每日2次,连续30 d;A组和B组给予等体积生理盐水。末次给药2 h后,剖取肝脏、心脏、肾脏和脑,制备成10%组织匀浆,以酶联免疫吸附(ELISA)法检测上述组织、器官匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮(NO)和总抗氧化能力(T-AOC)的水平。结果 与A组比较,B组小鼠血清中SOD、GSH-Px、T-AOC水平均显著降低($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组、D₂组小鼠血清中SOD和GSH-Px水平均显著升高($P < 0.05$),C组、D₁组T-AOC水平均显著升高($P < 0.05$)。与A组比较,B组小鼠肝组织匀浆中SOD和CAT水平均显著降低($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组、D₂组、D₃组肝组织匀浆中SOD和CAT水平均显著升高($P < 0.05$)。与A组比较,B组小鼠肾脏组织匀浆中SOD水平显著降低($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₂组SOD水平均显著升高($P < 0.05$)。与A组比较,B组小鼠心脏组织匀浆中SOD显著降低($P < 0.05$);与B组比较,C组和D₂组SOD均显著升高,D₁组CAT水平均显著升高($P < 0.05$)。与A组比较,B组小鼠脑组织匀浆中SOD、GSH-Px、NO水平均显著降低($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组NO水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 AECL具有延缓衰老的作用,其作用机制可能与改善机体心、脑、肝、肾等器官的抗氧化能力有关。

关键词:牛樟叶;水提物;衰老;*D*-半乳糖;小鼠;作用机制

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)03-0018-04

Effect and Mechanism of Aqueous Extracts of *Cinnamomum Kanehirae* Leaves on *D*-Galactose-Induced Aging Model Mice

ZHANG Bei¹, YU Xiaoling², WAN Yongyan¹, LIANG Xuezheng¹, QIN Kaiyu¹

(1. Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545026; 2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang, China 310006)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of aqueous extracts of *Cinnamomum Kanehirae* Leaves(AECL) on *D*-galactose-induced aging model mice. **Methods** KM mice were subcutaneously injected with *D*-galactose(100 mg/kg, 20 d) at the neck and back to establish the aging model mice. Ten healthy mice in the same batch were selected as normal control group(group A), and the model mice were randomly divided into model group(group B), positive control group(group C, 200 mg/kg of vitamin E), AECL high-dose, medium-dose and low-dose groups(groups D₁, D₂ and D₃, 20, 10, 5 g/kg of herb-drug), 10 rats in each group. The mice in groups C, D₁, D₂ and D₃ were given intragastric administration, twice a day for 30 d, the mice in group A and group B were given the equal volume of normal saline. 2 h after the last administration, the liver, heart, kidney and brain were dissected to prepare 10% tissue homogenate, and the levels of superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSH-Px), nitric oxide(NO) and total antioxidant capacity(T-AOC) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Compared with those in group A, the levels of SOD, GSH-Px and T-AOC in group B were significantly decreased($P < 0.05$). Compared with those in group B, the levels of SOD and GSH-Px in groups C, D₁ and D₂ were significantly increased($P < 0.05$), and the level of T-AOC in groups C, D₁ was significantly increased($P < 0.05$). Compared with those in group A, the levels of SOD and CAT in liver homogenate in group B were significantly decreased($P < 0.05$). Compared with those in group B, the levels of SOD and CAT in liver homogenate in groups C, D₁, D₂, D₃ were significantly increased($P < 0.05$). Compared with that in group A, the level of SOD in renal homogenate in group B was significantly decreased($P < 0.05$). Compared with that in group B, the level of SOD in renal homogenate in groups D₁, D₂ was significantly increased($P < 0.05$). Compared with those in group A, the level of SOD in heart homogenate in group B was significantly decreased($P < 0.05$). Compared with those in group B, the level of SOD in heart homogenate in group C, D₂ was significantly increased, and the level of CAT in heart homogenate in group D₁ was significantly increased($P < 0.05$). Compared with those in group A, and the levels of SOD, GSH-Px and NO in brain homogenate in group B were significantly decreased($P < 0.05$). Compared with that in group B, the level of NO in brain homogenate in groups C, D₁ was significantly increased($P < 0.05$). **Conclusion** AECL has an anti-aging effect, and its mechanism may be related to improving the antioxidant capacity of heart, brain, liver, kidney and other organs.

Key words: *Cinnamomum Kanehirae* Leaves; aqueous extracts; aging; *D*-galactose; mice; mechanism

*基金项目:国家自然科学基金[81460549];广西壮族自治区柳州市柳北区应用技术与开发计划项目[LB201801];广西壮族自治区柳州市阳和工业新区应用技术研究开发与科技创新项目[2019007]。

第一作者:张蓓,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药品质评价及活性成分,(电子信箱)zhangbei8402@126.com。

△通信作者:覃开羽,男,大学本科,副主任药师,研究方向为医院药学和药物临床试验管理规范,(电子信箱)22015820@qq.com。

牛樟 *Cinnamomum Kanehirae* Hayata 分布在中国南部,为台湾特有树种,近年来被中国大陆地区多地引进栽培。其根、皮、果、叶均可入药,但功效略有不同,牛樟叶的功效以祛风除湿、止痛、杀虫为主^[1]。现代研究主要以牛樟的无性繁殖、引种栽培、生长特性和分子鉴定为主^[2-3],药理学部分仅见牛樟叶精油成分研究,未见药理学和化学成分的报道^[4]。衰老是生物生命周期的重要组成部分,是任何生命活动的必然规律,虽不可阻滞,但可延迟。随着世界人口老龄化的加快,探讨延缓衰老作用机制和抗衰老研究已成为医学领域的热门课题之一。自由基理论是衰老机制的重要理论之一,以氧化应激为特点的氧化还原失衡是衰老的重要病理进程^[5-6]。多糖类物质是抗衰老的活性成分^[7]。课题组前期研究发现,牛樟叶富含多糖成分,但尚未阐明牛樟叶多糖延缓衰老的药效和作用机制。本研究中建立 D-半乳糖衰老小鼠模型,以抗氧化相关酶为指标,探讨了牛樟叶水提物(AECL)的抗衰老作用及其作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:Epoch 型全波长酶标仪(美国 Bio Tek 公司);ME204E 型分析电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,精度为 0.01 mg);UV1780-5 型紫外分光光度计(岛津企业管理(中国)有限公司);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 240 W,频率为 40 kHz,转速为 500~5 000 r/min)。

试剂:维生素 E(桂林南药股份有限公司,批号为 VE181101);D-半乳糖(上海惠兴生化试剂有限公司,批号为 120214)。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号为 20190815),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号为 20190414),一氧化氮(NO)试剂盒(批号为 20181114),总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(批号为 20190801),过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号为 20190719),BCA 试剂盒(批号为 20190815),均购自南京建成生物工程研究所。牛樟叶由柳州市天姿园艺有限公司提供,经广西中医药大学药学院杨柯教授鉴定为正品,标本保存于广西壮族自治区柳州市中医医院药学部标本室。

动物:清洁级 KM 小鼠 60 只,体质量(20±2)g,雌雄各半,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号为 SCXK(湘)2016-0002。饲养环境为温度(23±2)℃,相对湿度 60%~65%,明暗 12 h/12 h 交替,分笼饲养,给予标准饲料,自由进食、饮水。

1.2 方法

1.2.1 衰老动物模型建立

每天于小鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 100 mg/kg,

连续造模 20 d 后,每周周一、周四按相同方法造模 2 次,共 3 周^[8]。

1.2.2 分组及给药

称取干燥牛樟叶 10 kg,按物料 30 倍、20 倍加水,加热提取 3 次,每次 3 h,合并 3 次滤液,常压加热,浓缩至流浸膏,分装,4℃冰箱冷藏保存,备用,流浸膏 1 g 相当于 8.805 g 牛樟叶,即得 AECL。取造模后 10 d 的 KM 小鼠,雌雄各半,按体质量随机分为 5 组,即模型组(B 组),阳性对照组(C 组,维生素 E,200 mg/kg),AECL 高、中、低剂量组[D₁组、D₂组、D₃组,给药剂量相当于每 1 kg 体质量 20,10,5 g(生药)],每组 10 只;另取 10 只同批健康 KM 种小鼠,雌雄各半,作为正常对照组(A 组)。C 组和 D₁,D₂,D₃组灌胃给药,每日 2 次,连续 30 d,A 组和 B 组给予等体积生理盐水。末次给药 2 h 后,摘取眼球取血,分离血清,立即处死动物,剖取肝脏、心脏、肾脏、脑。

1.3 观察指标

分离血清和肝、心、肾、脑组织匀浆后,严格按试剂盒说明书方法检测相应组织器官的 SOD, GSH-Px, CAT, T-AOC, NO 水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件处理数据,结果以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药效学评价

D-半乳糖干预 5 周后,小鼠出现行动迟缓,皮毛逐渐无光泽和变灰色,体质量逐渐下降,表现出明显的衰老特征。与 A 组比较,B 组小鼠血清中 SOD, GSH-Px, T-AOC 水平均明显下降(*P* < 0.05),表明成功构建 D-半乳糖衰老小鼠模型。与 B 组比较,C 组、D₁组、D₂组小鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 水平均明显升高,C 组、D₁组 SOD, GSH-Px, T-AOC 水平差异均显著升高(*P* < 0.05)。详见表 1。

表 1 AECL 对 D-半乳糖衰老小鼠血液生化指标的影响
($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Effect of AECL on blood biochemical indexes of D-galactose-induced aging mice($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U)	T-AOC(mmol/L)
A 组		16.16 ± 3.36	240.17 ± 31.43	2.83 ± 0.06
B 组		12.13 ± 2.62 [#]	215.69 ± 19.07 [#]	2.73 ± 0.09 [#]
C 组	0.20	16.40 ± 4.22 [*]	243.97 ± 36.23 [*]	2.82 ± 0.06 [*]
D ₁ 组	20	15.32 ± 3.12 [*]	233.28 ± 17.22 [*]	2.80 ± 0.06 [*]
D ₂ 组	10	14.65 ± 3.03 [*]	236.72 ± 28.67 [*]	2.73 ± 0.09
D ₃ 组	5	11.52 ± 2.03	236.72 ± 32.69	2.69 ± 0.06

注:与 A 组比较,[#]*P* < 0.05;与 B 组比较,^{*}*P* < 0.05。下表同。

Note: Compared with those in group A, [#]*P* < 0.05; compared with those in group B, ^{*}*P* < 0.05; as well as the following tables.

表2 AECL对D-半乳糖衰老小鼠肝脏、心脏SOD和CAT及肾脏SOD的影响($\bar{X} \pm s$, U/ $\mu\text{g pro}$, $n=10$)

Tab. 2 Effect of AECL on the levels of SOD and CAT in liver and heart, the level of SOD in kidney of D-galactose-induced aging mice ($\bar{X} \pm s$, U/ $\mu\text{g pro}$, $n=10$)

组别	剂量(g/kg)	肝组织		心脏		肾脏 SOD
		SOD	CAT	SOD	CAT	
A组		27.85 $\pm$ 1.23	197.87 $\pm$ 92.93	35.43 $\pm$ 18.00	93.91 $\pm$ 44.58	321.25 $\pm$ 54.42
B组		21.43 $\pm$ 2.58 [#]	113.22 $\pm$ 34.21 [#]	20.13 $\pm$ 11.51 [#]	56.66 $\pm$ 48.07	259.05 $\pm$ 41.77 [#]
C组	0.20	26.69 $\pm$ 2.60 [*]	221.58 $\pm$ 86.01 [*]	39.14 $\pm$ 25.96 [*]	103.71 $\pm$ 59.18	294.45 $\pm$ 34.87
D ₁ 组	20	29.91 $\pm$ 1.69 [*]	215.46 $\pm$ 110.43 [*]	42.69 $\pm$ 36.92	138.33 $\pm$ 86.22 [*]	305.35 $\pm$ 35.60 [*]
D ₂ 组	10	32.24 $\pm$ 2.26 [*]	220.19 $\pm$ 135.48 [*]	80.14 $\pm$ 79.91 [*]	128.08 $\pm$ 107.45	296.29 $\pm$ 33.48 [*]
D ₃ 组	5	32.34 $\pm$ 2.48 [*]	220.79 $\pm$ 130.33 [*]	30.13 $\pm$ 19.39	64.56 $\pm$ 51.14	287.31 $\pm$ 39.7

2.2 对肝脏SOD和CAT的影响

与A组比较,B组小鼠肝组织匀浆中SOD和CAT活性均明显降低($P<0.05$),表明D-半乳糖衰老小鼠肝脏抗氧化能力下降;与B组比较,C组、D₁组、D₂组、D₃组小鼠肝组织匀浆中SOD和CAT水平显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

2.3 对心脏SOD和CAT水平的影响

与A组比较,B组小鼠心脏组织匀浆中SOD水平明显降低($P<0.05$),CAT水平有降低趋势,但无显著差异($P>0.05$);与B组比较,C组、D₂组小鼠心脏组织匀浆中SOD水平均显著升高($P<0.05$),D₁组CAT水平显著升高($P<0.05$),表明AECL能显著提高衰老小鼠心脏的抗氧化能力。详见表2。

2.4 对肾脏SOD的影响

与A组比较,B组小鼠肾脏组织匀浆SOD水平明显降低($P<0.05$);与B组比较,D₁组、D₂组小鼠肾脏组织匀浆中SOD水平均显著升高($P<0.05$)。详见表2。

2.5 对脑组织SOD,GSH-Px,NO的影响

与A组比较,B组小鼠脑组织匀浆中SOD,GSH-Px,NO水平均明显降低($P<0.05$);与B组比较,C组、D₁组小鼠脑组织匀浆中NO水平均显著升高($P<0.05$),SOD和GSH-Px水平均呈升高趋势,但无显著差异($P>0.05$)。详见表3。

表3 AECL对D-半乳糖衰老小鼠脑组织指标影响($\bar{X} \pm s$, $n=10$)

Tab. 3 Effect of AECL on brain tissue indexes of D-galactose-induced aging mice ($\bar{X} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量(g/kg)	SOD(U/ $\mu\text{g pro}$)	GSH-Px(活力单位/ $\mu\text{g pro}$)	NO($\mu\text{mol/L}$)
A组		42.30 $\pm$ 2.55	148.48 $\pm$ 50.52	14.21 $\pm$ 8.96
B组		28.65 $\pm$ 9.24 [#]	104.37 $\pm$ 29.65 [#]	6.64 $\pm$ 5.46 [#]
C组	0.20	33.53 $\pm$ 7.95	136.65 $\pm$ 46.81	23.32 $\pm$ 12.04 [*]
D ₁ 组	20	33.14 $\pm$ 7.52	123.37 $\pm$ 30.61	16.03 $\pm$ 8.06 [*]
D ₂ 组	10	32.17 $\pm$ 7.80	117.79 $\pm$ 39.50	10.07 $\pm$ 7.60
D ₃ 组	5	33.68 $\pm$ 7.98	112.19 $\pm$ 40.19	10.32 $\pm$ 6.01

3 讨论

研究表明,机体衰老与氧化应激密切相关,生化指标测定一般多集中在氧化应激相关酶的测定^[9]。SOD,CAT,GSH-Px可清除超氧阴离子,维持机体氧化还原平衡^[10]。

本研究结果显示,与模型组比较,药物干预组动物血清的T-AOC,SOD,CAT,GSH-Px生化指标均明显改善,表明AECL有抗衰老作用。SOD调节活性氧簇(ROS)和活性氮簇(RNS)的水平,减少对蛋白质和核酸的损害^[11]。本研究中,AECL明显提高衰老模型小鼠肝脏、肾脏和心脏匀浆的SOD水平,加快ROS的清除,维持机体的氧化还原平衡。CAT负责将SOD催化生成的过氧化氢转化成氧分子,降低过氧化氢浓度,促进超氧阴离子的清除^[12]。本研究中,AECL处理后,衰老模型小鼠心脏和肝脏匀浆的CAT水平明显升高,抗氧化能力增强。NO可通过隔离铁离子的方式发挥抗氧化作用^[13],可通过调节SOD活性发挥抗氧化作用^[14]。AECL可提高心脏SOD水平,D₂组小鼠SOD水平明显高于D₁组和D₃组。由于中药具有多靶点、多组分的特点,各活性成分间又存在协同作用及拮抗作用。因此,量效曲线可能呈钟形曲线。AECL处理D-半乳糖衰老小鼠后,小鼠脑组织匀浆中NO水平明显上升,AECL的抗衰老作用可能与提高脑组织NO水平有关;脑组织匀浆中SOD和GSH-Px水平并未显著改善,但影响心脏和肾脏中SOD水平,肝脏、心脏匀浆CAT水平及脑组织匀浆中NO水平的详细作用机制还需进一步研究。

综上所述,AECL具有一定的延缓衰老作用,其作用机制可能与提高肝脏、心脏、肾脏和脑组织的抗氧化能力有关,但详细作用机制需要作进一步探讨。

参考文献

- [1] 李冈荣. 汉方中草药对症图典(第1册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社,2015:206.
- [2] 邢文婷,许奕,陈培,等. 台湾牛樟在海南引种栽培及生长特性研究[J]. 热带作物学报,2018,39(4):630-634.