

# 藏药甘青虎耳草总黄酮的抗衰老作用

崔 玮 杨爱梅<sup>1</sup> 李玉兰<sup>1</sup> (河西学院农业与生物技术学院,甘肃 张掖 734000)

**摘要** 目的 研究甘青虎耳草总黄酮对 D-半乳糖致衰小鼠的抗衰老作用。方法 通过测得致衰老小鼠的肝、脑、心、肾、血清组织的超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量。结果 甘青虎耳草总黄酮能显著提高衰老小鼠体重、增强各组织SOD、GSH-Px活性;明显降低MDA含量;低剂量显效,中剂量次之。结论 甘青虎耳草总黄酮能抑制活性氧导致的脂质过氧化反应,提高抗氧化酶活力。

**关键词** 甘青虎耳草; D-半乳糖; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛

**中图分类号** R961 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9202(2013)04-0877-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2013.04.062

甘青虎耳草为常用藏药,其味苦性凉,清热,治肝、胆热症和创伤。研究表明虎耳草属植物含有丰富的黄酮类成分<sup>(1-3)</sup>。现代药理研究表明黄酮具有多种生物活性,主要表现为对循环系统的作用、护肝作用、免疫激活作用、抗氧化作用等。Lee等<sup>(4)</sup>的研究发现黄酮类物质可以保护自由基的氧化损伤,可开辟一种抑制脑老化的途径。目前未见关于甘青虎耳草抗衰老报道。本实验检测甘青虎耳草总黄酮对 D-半乳糖致衰小鼠肝、脑、心、肾、血清组织的超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量的影响,研究甘青虎耳草总黄酮的抗氧化作用并探究抗脑老化的机制,为藏药甘青虎耳草的开发利用提供实验依据。

## 1 实验部分

**1.1 材料、试剂与仪器** D-半乳糖 上海试剂二厂产品;其余试剂均采用国产分析纯。蛋氨酸、PBS、NBT、核黄素、磷酸、乙二胺四乙酸、谷胱甘肽、NaN<sub>3</sub>、谷胱甘肽还原酶、还原型辅酶 II 四钠、浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、磷钨酸、四乙氧基丙烷、TBA、重蒸水。藏药甘青虎耳草购自青海塔尔寺藏医院。植物标本由兰州大学生命科学院张国梁教授鉴定为 *Saxifraga tangutica* Engl. 昆明小鼠由兰州大学医学部实验动物中心提供。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 实验动物分组及用药** 健康昆明小鼠 50 只,体重(20±2)g,雌雄各半,喂养普通饲料适应 1 w 后,随机分为 5 组,每组 10 只,5 组分别是正常组(腹腔注射(ip)生理盐水+灌胃(ig)生理盐水),模型组(ip)D-半乳糖(D-gal)100 mg/kg,低剂量组(ip)D-gal 100 mg/kg+ig SF100 mg/kg,中剂量组(ip)D-gal 100 mg/kg+ig SF 200 mg/kg,高剂量组(ip)D-gal 100 mg/kg+ig SF 400 mg/kg。实验期间小鼠自由取食和饮水,每日观察记录生长状况,每 2 周称一次体重。

基金项目:兰州理工大学优秀青年教师资助计划(Q200808)

<sup>1</sup> 兰州理工大学生命科学与工程学院

通讯作者:李玉兰(1970-)女,硕士,副教授,硕士生导师,主要从事天然药物化学及药理研究。

第一作者:崔 玮(1969-)男,硕士,副教授,主要从事人体及动物解剖生理研究。

**1.2.2 血清和组织匀浆制备** 灌胃 56 d 摘眼球取血,断颈处死,解剖取出心、肝、脑和肾脏器冻存储用。小鼠血样于 4℃ 冰箱放置 12 h,离心(3 000 r/min,10 min)取血清。测定时取冻存的心脏、肝脏、肾脏和脑组织,制成 10% 组织匀浆液。

## 1.2.3 生化指标测定

**1.2.3.1 血清和组织 MDA 含量的测定** 改良的八木国夫法(TBA 法)<sup>(5)</sup>。取上述 10% 的组织匀浆液 0.2 ml 即酶液,加 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.0 ml 和 10% 磷钨酸 0.5 ml,放置 5 min,3 000 r/min 离心 10 min,倾去上清液,沉淀物加 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 ml 和 10% 磷钨酸 0.3 ml,3 000 r/min 离心 10 min,倾去上清液。标准管以标准液(四乙氧基丙烷 25 mmol/ml)0.2 ml 和洗涤过的沉淀物分别加蒸馏水 2.0 ml 和 0.67% TBA 液 0.5 ml 混匀,加塞在 100℃ 水浴中加热 1 h 后,放在冷水中冷却,然后加正丁醇 3.0 ml,立即在振荡器 1 min,离心 5 min 分离有机层(浅紫色),在分光光度计 533 nm 处测光密度。

**1.2.3.2 血清和组织 SOD 活力测定** SOD 酶活测定采用氯化硝基氮蓝四唑光还原法(NBT 法)。取上述各组织匀浆液 0.05 ml,加入下述溶液体系中:0.05 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)(pH=7.8)1.5 ml,0.013 mol/L 蛋氨酸 0.3 ml,750 mol/L(NBT)0.3 ml,0.1 mmol/L EDTA 0.3 ml,20 μmol/L 核黄素 0.3 ml,蒸馏水定容至 3 ml 混匀;另取 6 支对照管加 PBS 0.05 ml 代替酶液,蒸馏水定容至 3 ml,混匀后将其中 3 支对照管置暗处,其他各管于 4 000 Lx 日光下反应 20 min,立即在波长 560 nm 处测 OD 值,并计算 SOD 活性。

**1.2.3.3 血清和组织 GSH-Px 活力测定** DTNB 显色法<sup>(5)</sup>。反应溶液由如下部分组成:0.1 mol/L PBS(pH7.0),1 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA),10 mmol/L 谷胱甘肽,1 mmol/L 的 NaN<sub>3</sub>,1 单位谷胱甘肽还原酶,1.5 mmol/L 的还原型辅酶 II 四钠(NADPH)和 0.1 ml 细胞裂解液,37℃ 水浴 10 min,加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使之浓度为 1 mmol/L,于 340 nm 波长处测定 OD 值。NADPH 氧化的速度表示 GSH-Px 活性。

**1.2.3.4 组织中蛋白含量的测定** 考马斯亮蓝 G2250 法测定心、脑、肝、肾组织匀浆的蛋白含量。

**1.3 统计学数据处理** 采用 SPSS11.5 统计软件,采用 Duncan 新复极差法(SSR)进行多重比较,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

2 结果

2.1 小鼠体重测定结果 从表 1 可知,各时期模型组小鼠体重均比正常组轻,并且随时间推移与正常组的差距进一步加大,至第 6 周时,模型组与正常组差异显著 ( $P < 0.05$ ),低剂量组体重接近正常组,与模型组有显著差异 ( $P < 0.05$ ),表明 SF 具有较好的拮抗 D-gal 所致衰老小鼠体重降低作用。

2.2 甘青虎耳草总黄酮对小鼠血清和脏器中 MDA 含量的影响 从表 2 可知,在血清和各组织中,模型组小鼠 MDA 的含量显著高于正常组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),说明造模成功。与模型组相比,低剂量组血清和各组织 MDA 含量显著下降 ( $P < 0.05$ );中剂量组次之;在脑组织中,低剂量组 MDA 含量下降 30.8%,效果较好,表明低浓度 SF 具有较好地拮抗 D-gal 所致衰老小鼠脑组织 MDA 升高的作用。

2.3 甘青虎耳草总黄酮对小鼠血清和脏器组织 SOD 活力的影响

影响 从表 3 结果可知,模型组小鼠血清和各组织中 SOD 活力明显低于正常组和中、低剂量组,具有显著差异 ( $P < 0.01$ );低剂量组处理效果最好,使脑组织与心组织 SOD 活性比模型组提高了 34.6% 与 37.6%,表明低浓度 SF 能显著提高 D-gal 所致衰老小鼠心、脑组织的 SOD 活性。

表 1 不同给药时间小鼠体重的测定结果 ( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常组	25.81 ± 1.65	31.40 ± 3.87	37.18 ± 5.20 <sup>2)</sup>
模型组	24.8 ± 1.56	29.40 ± 2.58	32.66 ± 3.47 <sup>1)</sup>
低剂量组	25.67 ± 1.47	31.18 ± 3.33	36.88 ± 4.42 <sup>2)</sup>
中剂量组	25.94 ± 1.81	30.00 ± 3.09	34.77 ± 3.58
高剂量组	25.83 ± 1.57	29.60 ± 4.15	32.82 ± 3.71 <sup>1)</sup>

与正常组比较: 1)  $P < 0.05$ ; 与模型组比较: 2)  $P < 0.05$

表 2 不同剂量甘青虎耳草总黄酮对小鼠血清和脏器中 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	血清 (nmol/ml)	肝脏组织 (nmol/mg)	脑组织 (nmol/mg)	心脏组织 (nmol/mg)	肾脏组织 (nmol/mg)
正常组	4.14 ± 0.66 <sup>4)</sup>	10.28 ± 2.04 <sup>4)</sup>	9.73 ± 2.08 <sup>4)</sup>	6.23 ± 1.62 <sup>3)</sup>	4.42 ± 1.32 <sup>3)</sup>
模型组	6.41 ± 0.96 <sup>2)</sup>	14.14 ± 2.47 <sup>2)</sup>	15.24 ± 1.54 <sup>2)</sup>	8.69 ± 1.05 <sup>2)</sup>	6.03 ± 1.59 <sup>1)</sup>
低剂量组	4.58 ± 0.65 <sup>4)</sup>	9.99 ± 0.94 <sup>4)</sup>	10.54 ± 1.39 <sup>4)</sup>	6.67 ± 1.33 <sup>3)</sup>	4.39 ± 0.56 <sup>3)</sup>
中剂量组	4.98 ± 0.72 <sup>4)</sup>	11.04 ± 2.24 <sup>4)</sup>	13.13 ± 1.90 <sup>2)</sup>	7.19 ± 1.47 <sup>3)</sup>	5.03 ± 0.70
高剂量组	5.79 ± 0.83 <sup>1)3)</sup>	12.48 ± 1.39	14.28 ± 1.20 <sup>2)</sup>	8.39 ± 1.79 <sup>2)</sup>	5.93 ± 0.94 <sup>1)</sup>

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)  $P < 0.01$ , 下表同

表 3 不同剂量甘青虎耳草总黄酮对小鼠血清和脏器中 SOD 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	血清 (nU/ml)	肝脏组织 (nU/mg)	脑组织 (nU/mg)	心脏组织 (nU/mg)	肾脏组织 (nU/mg)
正常组	46.06 ± 6.31 <sup>4)</sup>	20.74 ± 1.71 <sup>4)</sup>	24.00 ± 1.62 <sup>4)</sup>	10.97 ± 1.49 <sup>4)</sup>	18.65 ± 3.09 <sup>4)</sup>
模型组	30.80 ± 2.97 <sup>2)</sup>	11.69 ± 2.06 <sup>2)</sup>	16.82 ± 3.09 <sup>2)</sup>	8.49 ± 1.74 <sup>2)</sup>	13.64 ± 1.48 <sup>2)</sup>
低剂量组	43.43 ± 6.37 <sup>4)</sup>	18.72 ± 1.53 <sup>4)</sup>	25.71 ± 3.62 <sup>4)</sup>	11.45 ± 1.38 <sup>4)</sup>	18.80 ± 1.46 <sup>4)</sup>
中剂量组	38.12 ± 7.39 <sup>1)3)</sup>	16.97 ± 2.57 <sup>2)4)</sup>	24.19 ± 2.72 <sup>4)</sup>	10.33 ± 1.17	16.80 ± 1.55 <sup>4)</sup>
高剂量组	33.99 ± 3.32 <sup>2)</sup>	13.09 ± 1.08 <sup>2)</sup>	22.50 ± 2.84 <sup>4)</sup>	9.00 ± 1.31	15.73 ± 1.68 <sup>2)</sup>

表 4 不同剂量甘青虎耳草总黄酮对小鼠血清和脏器 GSH-Px 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	血清 (nU/ml)	肝脏组织 (nU/mg)	脑组织 (nU/mg)	心脏组织 (nU/mg)	肾脏组织 (nU/mg)
正常组	9.05 ± 1.14 <sup>4)</sup>	151.23 ± 5.48 <sup>3)</sup>	10.98 ± 2.02 <sup>4)</sup>	2.68 ± 0.74 <sup>4)</sup>	18.10 ± 3.14 <sup>4)</sup>
模型组	5.95 ± 1.70 <sup>2)</sup>	137.96 ± 7.02 <sup>1)</sup>	6.63 ± 1.05 <sup>2)</sup>	1.41 ± 0.26 * *	13.70 ± 2.54 <sup>2)</sup>
低剂量组	9.13 ± 1.78 <sup>4)</sup>	150.56 ± 12.89 <sup>3)</sup>	10.03 ± 2.72 <sup>4)</sup>	2.14 ± 0.46 <sup>3)</sup>	22.03 ± 2.81 <sup>2)4)</sup>
中剂量组	7.68 ± 1.36	138.50 ± 10.42 <sup>1)</sup>	8.52 ± 1.16 <sup>2)</sup>	1.55 ± 0.32 <sup>2)</sup>	18.62 ± 2.04 <sup>4)</sup>
高剂量组	6.60 ± 1.88 <sup>2)</sup>	114.64 ± 7.83 <sup>1)3)</sup>	7.18 ± 0.80 <sup>2)</sup>	1.20 ± 0.43 <sup>2)</sup>	12.02 ± 1.95 <sup>2)</sup>

2.4 甘青虎耳草总黄酮对小鼠血清和脏器中 GSH-Px 活力的影响 见表 4 模型组 GSH-Px 活力最低,与正常组和低剂量组有显著性差异 ( $P < 0.05$ );中、低剂量 SF 对衰老小鼠各组织中 GSH-Px 活力有较大的影响 ( $P < 0.05$   $P < 0.01$ ),尤其在肾组织中,GSH-Px 活力高于模型组 62.3%。表明 SF 对提高 D-gal 所致衰老小鼠各组织(尤其是肾组织) GSH-Px 活力效果明显。

3 讨论

D-半乳糖模型是常用的一种衰老实验动物模型,得到了自由基衰老学说的支持和验证<sup>[6]</sup>。其中分解产物之一 MDA 的含

量能间接反映机体内自由基的产生情况和机体组织细胞的脂质过氧化程度,作为评价衰老的指标<sup>[7]</sup>。本实验模型组血清和肾脏组织 MDA 含量明显高于正常组,小鼠在造模后,逐渐表现为少动,毛色发黄,足跖皮肤脆性大易出血,体重增加行动速度变慢。这些数据和现象表明衰老模型成功。

氧自由基决定衰老进程<sup>[8]</sup>。SOD 是体内清除氧自由基的关键酶,通过催化超氧阴离子歧化为 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>,有效地降低自由基代谢产物(如 MDA)生成从而清除自由基,达到抗衰老作用<sup>[9]</sup>。本实验低、中剂量的 SF 组与模型组相比,均能显著提高血清和肝、脑、心、肾组织的 SOD 活性,降低其 MDA 含量。表明

SF 具有较强的清除自由基的能力,能够有效地拮抗自由基损伤所致的小鼠衰老。

GSH-Px 是机体抗氧化的重要酶,它特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化物的还原反应,催化对生物体有害的 $H_2O_2$ 的分解,减少氧自由基和过氧化脂质的形成<sup>[10]</sup>。在实验中,低、中剂量的 SF 使小鼠各组织的 GSH-Px 比模型组高。表明 SF 能够通过降解 $O_2 \cdot$ 和 $H_2O_2$ 为无毒性的 $H_2O$ 和 $O_2$ ,去除氧自由基和过氧化脂质对组织的损伤,起到抗衰老作用。

#### 4 参考文献

- 1 左国营,张志军,陈丽蓉,等.藏药黑蕊虎耳草的化学成分(J).云南植物研究,2005;27(6):691-3.
- 2 Chen Z, Liu YM, Yang S. Studies on the chemical constituents of saxifraga stolonifera (J). Bioorganic Med Chem 2008; 16(3): 1337-44.
- 3 冯卫生,李振,郑晓珂,等.虎耳草的化学成分研究(J).药学报,2010;45(6):742-6.
- 4 Lee YS, Chen XW, Anderson John JB, et al. Physiological concentrations

of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast like cells (J). Nutrition Res 2001; 21(9): 1287-98.

- 5 齐凤菊,周玫,陈玻,等.血丙二醛含量测定-改良的八木国夫法(J).第一军医大学学报,1986;6(2):152-4.
- 6 李文彬,韦丰,范明,等.D-半乳糖在小鼠上诱导的拟脑老化效应(J).中国药理学与毒理学志,1995;9(2):93-5.
- 7 贾秀月,高艳华,赵晓莲,等.自由基与抗衰老的研究概况(J).黑龙江医药科学,2007;30(2):75-6.
- 8 李素云,王立芹,郑稼琳,等.自由基与衰老的研究进展(J).中国老年学杂志,2007;27(10):2046-8.
- 9 Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer (J). Bioessays, 1999; 21(3): 238-46.
- 10 陈向.丹参的药理作用研究新进展(J).中国医院药学杂志,2001;21(1):44-5.

(2011-07-06 收稿 2011-12-30 修回)

(编辑 曹梦园)

## 红景天冻干粉针对犬急性心肌缺血的保护作用

汪春红<sup>1</sup> 吕文伟<sup>1</sup> 刘芬<sup>1</sup> 陈霞<sup>2</sup> 吕若谷<sup>3</sup> (长春医学高等专科学校,吉林 长春 130031)

**【摘要】**目的 观察红景天冻干粉针对犬急性心肌缺血的保护作用。方法 麻醉犬冠状动脉结扎造成心肌梗死模型,采用心外膜标测和定量组织学硝基四氮唑蓝染色法,测定心肌损伤范围及损伤程度,测定血清肌酸激酶(CK)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)的含量。结果 红景天冻干粉针可明显减轻由心外膜电图所标测的心肌缺血程度及心肌缺血范围;显著减小通过N-BT染色所显示的梗死区;可显著抑制血清CK、LDH、AST、SOD活性,明显降低MDA水平。结论 红景天冻干粉针对心肌缺血有保护作用。

**【关键词】**红景天冻干粉针;心肌缺血;心肌酶

(中图分类号) R285 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2013)04-0879-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2013.04.063

红景天为景天科红景天属多年生草本或亚灌木植物。性寒,味甘涩,具有清肺止咳、活血止血、治疗跌打损伤、调和阴阳、滋补强身等作用<sup>[1]</sup>。红景天含有多种药用成分,包括红景天苷、红景天素、苷元酪醇及超氧化物歧化酶等生物活性物质,具有较高的药用价值。近年来,国内外对红景天的功效进行大量研究,发现其可对循环、免疫、神经、内分泌系统及代谢等多方面发挥药理作用,尤对心血管系统作用的研究较为深入<sup>[2]</sup>。目前关于红景天冻干粉针对急性心肌缺血的保护作用研究尚未见报道,为探讨红景天冻干粉针抗心肌缺血作用,本实验从电生理学、酶学、定量组织学方面进行了深入研究。

### 1 材料与方 法

1 吉林大学白求恩医学院机能科学实验中心

2 吉林大学白求恩医学院药理学系

3 北华大学公共卫生学院2010预防医学

通讯作者:陈霞(1964-),女,教授,博士生导师,主要从事药理学研究。

第一作者:汪春红(1967-),女,医学硕士,高级实验师,主要从事药理学实验研究。

**1.1 材料** 健康成年杂种犬,雌雄兼用,体重12~16 kg,由吉林大学实验动物部提供(许可证号:SYXK(吉2003-0001))。红景天冻干粉针由吉林大学白求恩医学院药理学系提供;舒血宁注射液由山西银湖制药有限责任公司生产,批号2005071401;硝基四氮唑蓝由上海惠世生化试剂有限公司生产,批号2004070;LDH、AST、CK试剂盒由中生北控生物科技股份有限公司生产,批号分别为130031.020051.090061。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒由南京建成生物工程研究所生产,批号20060405、0060404。多道生理记录仪(RM-6000型),日本光电公司生产;电动呼吸机(SC-3型),上海医疗器械厂生产;GF-D200型半自动生化分析仪,山东高密彩虹分析仪器有限公司。

**1.2 方法** 将杂种犬用戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉注射麻醉。背位固定,切开颈部皮肤,气管插管,分离股静脉,以备给药和取血。连接电动呼吸机,于左侧第四肋间施开胸术,暴露心脏,剪开心包,做心包床,分离冠状动脉左前降支主干中下1/3交界处,穿线以备结扎,术毕,稳定20 min。结扎冠状动脉,制备实验性急性心肌梗死模型。将造模后犬随机分为4组:空白对照组静注等容量的生理盐水1.0 mg/kg,舒血宁注射液0.15 mg/kg组,红景天冻干粉针2.5和5.0 mg/kg组,每组6