

引用:刘颖,李花,刘旺华,别明珂.川芎对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用研究[J].湖南中医杂志,2021,37(2): 147-149.

川芎对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用研究

刘颖^{1,2},李花^{1,2},刘旺华^{1,2,3},别明珂¹

- (1. 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科,湖南 长沙,410208;
2. 湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南 长沙,410208;
3. 湖南中医药大学数字中医药协同创新中心,湖南 长沙,410208)

[摘要] 目的:研究川芎对 D-半乳糖衰老模型小鼠抗衰老的作用机制。方法:将 50 只小鼠随机分为正常对照组 10 只和造模组 40 只,采用颈背部皮下注射 D-半乳糖溶液的方法建立小鼠衰老模型,再将其分为衰老模型组及川芎低、中、高剂量组,每组各 10 只。药物干预 50 d 后检测小鼠脑组织中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、单胺氧化酶(MAO)。结果:与正常对照组比较,衰老模型组脑组织中 SOD、GSH-Px 含量降低,MDA、MAO 含量升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与衰老模型组比较,川芎低、中、高剂量组 SOD、GSH-Px 含量增加,MDA、MAO 含量降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:川芎可增加脑组织中 SOD、GSH-Px 含量,降低 MDA、MAO 含量,具有良好的延缓衰老的作用。

[关键词] 衰老;川芎;D-半乳糖;作用机制;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.02.051

Anti-senescence mechanism of Rhizoma Ligustici Chuanxiong in a mouse model of senescence induced by D-galactose

LIU Ying^{1,2}, LI Hua^{1,2}, LIU Wanghua^{1,2,3}, BIE Mingke¹

- (1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;
3. Collaborative Innovation Center of Digital Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the anti-senescence mechanism of Rhizoma Ligustici Chuanxiong in a mouse model of senescence induced by D-galactose. Methods: A total of 50 mice were randomly divided into normal control group with 10 mice and modeling group with 40 mice. A mouse model of senescence was established by subcutaneous injection of D-galactose solution at the neck and back, and then the modeling group was further divided into senescence model group and low-, middle-, and high-dose Rhizoma Ligustici Chuanxiong groups, with 10 mice in each group. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), and monoamine oxidase (MAO) in brain tissue were measured after 50 days of drug intervention. Results: Compared with the normal control group, the senescence model group had significant reductions in SOD and GSH-Px and significant increases in MDA and MAO in brain tissue ($P<0.05$). Compared with the senescence model group, the low-, middle-, and high-dose Rhizoma Ligustici Chuanxiong groups had significant increases in SOD and GSH-Px and significant reductions in MDA and MAO in brain tissue ($P<0.05$). Conclusion: Rhizoma Ligustici Chuanxiong can increase the levels of SOD and GSH-Px and reduce the levels of MDA and MAO in brain tissue and thus has a good effect in delaying senescence.

[Keywords] senescence; Rhizoma Ligustici Chuanxiong; D-galactose; mechanism of action; experimental study

基金项目:国家自然科学基金项目(81473567);湖南省自然科学基金项目(2019JJ40219);湖南省教育厅科研项目(18A208);湖南省中医药科研计划重点项目(202008);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科开放基金项目(2018ZXY03);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(422)

第一作者:刘颖,女,2019 级硕士研究生,研究方向:心血管病的防治

通讯作者:李花,女,医学博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:《内经》治则治法研究与心血管病的防治, E-mail: 420039931@qq.com

中医学认为,气滞血瘀是导致衰老的重要原因之一^[1]。川芎属于活血化瘀药,具有良好的活血行气、祛风止痛之功,临床广泛用于血瘀气滞痛证、头痛和风湿痹痛。现代研究表明其所含的川芎嗪具有扩张冠状动脉、扩张脑血管、降低血小板活性之效,所含阿魏酸具有抗维生素 E 缺乏的作用^[2-3]。本实验通过皮下注射 D-半乳糖建立小鼠衰老模型,研究川芎水煎剂的抗衰老作用。

1 实验材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性昆明小鼠 50 只,2 月龄,体重 25~30 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物许可证号:SYXK(湘)2013-0005,动物合格证号:NO.43004700019101。

1.2 药物及试剂 川芎从湖南中医药大学第一附属医院一次性购齐。取药物加水适量,浸泡 2 h,水煎煮。第一次用 6 倍水,煎煮 1 h;第二次用 3 倍水,煎煮 0.5 h。2 次水煎液混合,浓缩至生药浓度为 1 g/ml,成人临床用量为 15 g,按 70 kg 成人与 20 g 小鼠体表面积比值换算,小鼠给药剂量 0.7、1.4、2.8 g/kg(临床等效剂量的 1/2、1、2 倍)。D-半乳糖(D-gal,由上海试剂二厂提供),在无菌条件下用 0.9%氯化钠注射液配制成 1 g/dl 的 D-gal 溶液。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒(批号:A005)、单胺氧化酶(MAO)测试盒(批号:A034)、丙二醛(MDA)测试盒(批号:A003-1)、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号:A001-3),均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 主要仪器 AB204-WO 型电子天平(瑞士,梅特勒-托力多有限公司);台式高速冷冻离心机(湘仪生产,型号 H1650R);全自动酶标洗板机(汇松生产,型号 PW-812);多功能酶标分析仪(汇松生产,型号 MB-530);恒温培养箱(光明生产,型号 DHP-500);自动平衡离心机(湘仪生产,型号 L530)。

2 实验方法

2.1 模型制备 所有动物适应性饲养 3d 后,将其随机分为正常对照组 10 只、造模组 40 只。衰老模型组给予 100 mg/(kg·d)的 D-gal 溶液,经小鼠颈部皮下注射 6 周,建立衰老模型;正常对照组颈部皮下注射等量 0.9%氯化钠注射液。6 周后衰老模型组较正常对照组小鼠出现毛色暗淡、饮食量低、反应力下降、喜睡眠等特征,表明造模成功。

2.2 动物分组和给药方法 将造模成功的小鼠随机分为 4 组,即衰老模型组、川芎低剂量组、川芎中剂量组、川芎高剂量组,每组各 10 只,正常对照组、衰老模型组每天灌服 1.4 g/kg 蒸馏水,川芎低、中、高剂量组每天灌服川芎药液 0.7、1.4、2.8 g/kg,连续用药 50d。

2.3 观察指标 颈椎脱臼处死小鼠,取脑用冰 0.9%氯化钠注射液冲洗,除去血液,滤纸拭干。制成 10%组织匀浆,测定指标。SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶法,MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法,GSH-Px 测定采用 5·5-二硫代双 2-硝基苯甲酸比色法测定,MAO-B 含量测定采用紫

外线分光光度测定法。实验步骤严格按照实验说明书,依照公式计算含量。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间两两比较用单因素方差分析,方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnet's T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

实验过程中衰老模型组小鼠死亡 1 只,其余组小鼠无死亡。

3.1 各组小鼠 SOD、GSH-Px 含量比较 与正常对照组比较,衰老模型组 SOD、GSH-Px 含量降低,差异具有统计学意义。与衰老模型组比较,川芎低、中、高剂量组 SOD、GSH-Px 含量升高,差异具有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组小鼠 SOD、GSH-Px 含量比较($\bar{x} \pm s$, U/mgprot)

组别	只数	剂量	SOD	GSH-Px
正常对照组	10		9.90±0.67	19.37±3.86
衰老模型组	9		8.70±0.71 ^a	15.28±2.11 ^a
川芎低剂量组	10	0.7 g/kg	9.46±0.53 ^b	16.31±1.86 ^b
川芎中剂量组	10	1.4 g/kg	9.54±0.48 ^b	17.40±2.03 ^b
川芎高剂量组	10	2.8 g/kg	9.65±0.51 ^b	17.90±1.87 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与衰老模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3.2 各组小鼠 MDA、MAO 含量比较 与正常对照组比较,衰老模型组 MDA、MAO 含量降低,差异有统计学意义。与衰老模型组比较,川芎低、中、高剂量组 MDA、MAO 含量升高,差异有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组小鼠 MDA、MAO 含量比较($\bar{x} \pm s$, U/mgprot)

组别	只数	剂量	MDA	MAO
正常对照组	10		8.02±2.79	1.03±0.92
衰老模型组	9		9.52±3.45 ^a	2.35±0.39 ^a
川芎低剂量组	10	0.7 g/kg	8.77±2.73 ^b	1.94±0.59 ^b
川芎中剂量组	10	1.4 g/kg	8.62±1.68 ^b	1.78±0.52 ^b
川芎高剂量组	10	2.8 g/kg	8.24±1.73 ^b	1.55±0.42 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与衰老模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

4 讨论

自由基学说认为机体内的抗氧化防御与自身产生的自由基在正常生理条件下维持相对平衡,而衰老过程会产生大量自由基,超出机体抗氧化能力,导致细胞受损、死亡^[4]。SOD、GSP-Px、MAO、MDA 是现代研究抗氧化和抗衰老的重要指标。SOD 是机体内重要的抗氧化酶,能够清除机体内多余自由基^[5]。MDA 是氧自由基攻击生物膜上的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化反应的产物,其浓度高低反应了自由基攻击的严重程度及细胞损伤程度。研究显示,衰老导致抗氧化酶活性降低,机体过氧阴离子自由基损伤细胞,过氧化产物 MDA 含量增多^[6]。MAO 为一组作用于不同单胺

类化合物的酶,广泛存在于肝、肾、脑等组织中,在胶原形成过程中参与胶原成熟最后阶段的架桥形成,使胶原和弹性硬蛋白结合,形成稳定的胶原纤维后,MAO含量升高,是反映肝纤维化及肝细胞损耗的重要指标^[7]。

刘克明等^[8]研究表明,自然衰老组与D-gal糖模型组小鼠SOD活性均低于正常对照组,MDA含量高于正常对照组。朱庆磊等^[9]研究发现D-gal致衰组和自然衰老组小鼠血清、心、脑、肝、肺、肾等组织的MDA含量增加,血清GSH-Px活性以及血清、脑、肝、肺、肾等脏器的SOD活性降低。宫铁红等^[10]在研究D-gal致亚急性衰老大鼠和自然衰老大鼠睾丸组织SOD、MDA和血清睾酮含量的变化时发现,与正常组大鼠比较,模型组和自然衰老组大鼠血清睾酮含量、睾丸组织SOD含量明显降低,睾丸组织MDA含量明显升高($P<0.01$),3个指标模型组和自然衰老组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。关萍等^[11]在探讨不同剂量D-gal对小鼠的促衰程度及其与自然生长鼠年龄的对应关系中发现,自然生长鼠随月龄增加肝脏SOD活性呈下降趋势,各组间多重对比表明年龄增长与SOD活力下降成正相关性但不成线性关系。不同剂量的D-gal均造成小鼠肝脏SOD活性下降,同年轻对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。通过组间多重比较,剂量与衰老程度成正相关性但不成线性关系。隋雨桐等^[12]实验研究发现,自然衰老组小鼠血清SOD和NO含量下降,MDA含量升高,四君子汤可提高血清中SOD含量,降低血清中MDA含量。刘杰等^[13]实验结果显示,衰老模型组小鼠细胞代谢紊乱,皮肤的SOD活性减低,MDA含量增多,枸杞多糖可提高衰老模型组SOD、GSH-Px含量,降低MDA含量。唐汉庆等^[14]研究发现,不同浓度铁皮石斛水溶液可不同程度提高D-gal致衰小鼠血清中SOD、GSP-Px活性,表明铁皮石斛能提高小鼠的抗氧化能力。

川芎是常用的活血化瘀药物,现代药理研究表明,川芎有良好的抗血小板聚集和抗血栓形成活性,能够抑制学习记忆能力损伤^[15]。其有效成分还有调节心脏功能以及防护脑缺血症的作用^[16-17]。颜德馨教授临证常用川芎之类活血化瘀药治疗老年痴呆、脑梗死等老年性疾病,取得良好疗效^[18]。临床研究发现,天麻川芎汤结合西药能够改善老年难治性高血压^[19]。

本实验通过小鼠皮下注射D-gal建立衰老模型,与正常对照组比较,衰老模型组小鼠脑组织内SOD、GSH-Px含量明显下降($P<0.05$),MDA、MAO含量明显升高($P<0.05$),表明D-gal造模成功。SOD、GSH-Px是机体内重要的抗氧化酶,实验表明川芎低、中、高剂量组脑组织内SOD、GSH-Px含量均高于衰老模型组($P<0.05$),说明川芎能有效提高小鼠体内抗氧化酶含量,从而清除自由基,延缓机体衰老。MDA浓度高低反应了自由基攻击的严重程度及细胞损伤程度,研究显示衰老导致抗氧化酶活性降低,机体过氧阴离子自由基损伤细胞,过氧化产物MDA含量增多。本实验中川

芎低、中、高剂量组内MDA含量显著低于衰老模型组,且随实验中药物浓度升高而减少,表明川芎能降低脂质过氧化水平,减轻氧化反应对细胞的损伤。

参考文献

- [1] 李露露,颜新,韩天雄,等.论气血病机学说的演变与创新[J].浙江中医药大学学报,2013,37(3):240-243.
- [2] 高学敏.中药学[M].新世纪第二版.北京:中国中医药出版社,2007:312-313.
- [3] 杨立娟.川芎的药理作用研究进展[J].黑龙江医学,2010,21(4):599-600.
- [4] HEKIMI S, WEN Y. Taking a "good" looking at free radicals in the aging process[J]. Trends in Cell Biology, 2011, 21(10):569-576.
- [5] 许荣生.桃红四物汤加味治疗黄褐斑的临床疗效及抗氧化作用机制研究[J].中医药信息,2015,32(4):100-102.
- [6] ZIEGLER DV, WILEY CD, VELARDE MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging[J]. Aging Cell, 2014, 14(1):1-7.
- [7] 徐士勋,周荣,绪扩,等.鳖甲水提物和醇提物对单胺氧化酶活性影响的研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(1):139-142.
- [8] 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):685-688.
- [9] 朱庆磊,杨契,薛桥,等.人工致衰老和自然衰老小鼠抗氧化能力改变的对比研究[J].中国老年学杂志,2003,23(7):448-450.
- [10] 宫铁红,付淑华,牛嗣云,等.衰老大鼠睾丸组织SOD、MDA和血清睾酮含量的变化[J].承德医学院学报,2012,29(1):14-16.
- [11] 关萍,郭搏,王惠,等.D-半乳糖促小鼠衰老模型的衰老程度与自然生长鼠龄的比较[J].动物医学进展,2013,34(1):71-74.
- [12] 隋雨桐,李泽光,朱明雪,等.四君子汤对自然衰老小鼠干预作用的代谢组学研究[J].中医药学报,2017,45(1):16-19.
- [13] 刘杰,潘晓秋,周晖,等.枸杞多糖的提取及其抗衰老的研究[J].中国医院用药评价与分析,2016,16(3):357-359.
- [14] 唐汉庆,韦祎,卢兰,等.铁皮石斛对小鼠端粒酶活性及抗衰老能力的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(8):1809-1811.
- [15] LIN G, CHAN S SK, LI SL, et al. Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides in studies in natural products chemistry[J]. Bioactive Natural Products (Part L), 2006, 32(5):611-669.
- [16] NAITO T, KUBOTA K, SHIMODA Y, et al. Effects of constituents in a chinese crude drug, ligustici chuanxiong rhizome on vasoconstriction and blood viscosity[J]. Nat Med, 1995(49):288-292.
- [17] OR TCT, YANG CLH, LAW AHY, et al. Isolation and identification of anti-inflammatory constituents from ligusticum chuanxiong and their underlying mechanisms of action on microglia[J]. Neuropharmacology, 2011, 60(6):823-831.
- [18] 张建,韩鑫冰,颜新,等.国医大师颜德馨教授临证处方用药相关数据分析[J].中国中医急症,2014,23(3):455-457.
- [19] 解道正,徐赛琼.自拟天麻川芎汤联合非洛地平及厄贝沙坦氢氯噻嗪治疗老年难治性高血压的临床效果[J].内蒙古中医药,2017,16(36):68-69.

(收稿日期:2020-07-20)