基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001029

欧亚旋覆花总黄酮对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用

陈　慧，龙媛媛，果　磊

（重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨欧亚旋覆花总黄酮（Inula britannica flower total flavonoids，IBFTF）对 D-半乳糖诱导的亚急性衰老模型小鼠的抗衰老作用。**方法**：随机将昆明小鼠分为 6 组（每组 10 只）：空白对照组，模型组，维生素 E（vitamin E，VE）组，欧亚旋覆花总黄酮低、中、高剂量组。空白对照组给予颈背部皮下注射 0.3 mL 生理盐水，其余组均给予等体积 500 mg/kg D-半乳糖，每日 1 次，连续 8 周。造模第 3 周，低、中、高剂量组分别灌服 0.5 mL 欧亚旋覆花总黄酮 100、200 和 400 mg/kg，VE 组灌服等体积维生素 E 100 mg/kg，空白对照组和模型组灌服等体积生理盐水，每日 1 次，连续 6 周。检测小鼠体质量、胸腺指数和脾指数，同时测定血清中抗氧化酶活性如超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、过氧化氢酶（catalase，CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）等衰老指标。β 半乳糖苷酶染色试剂盒检测小鼠海马组织中衰老相关的 β 半乳糖苷酶含量。**结果**：低、中、高剂量组小鼠体质量明显高于模型组，差异具有统计学意义（P=0.053、P=0.001、P=0.000）；低、中、高剂量组小鼠胸腺指数和脾指数明显高于模型组（均 P=0.000）；低、中、高剂量组小鼠血清中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力明显高于模型组，其 MDA 含量低于模型组（均 P=0.000）；低、中、高剂量组小鼠海马组织 β 半乳糖苷酶（senescence-associated beta-galactosidase，SA-β-gal）阳性率明显低于模型组，差异有统计学意义（P=0.001、P=0.000、P=0.000）。**结论**：欧亚旋覆花总黄酮是一种天然抗氧化剂，可延缓 D-半乳糖诱导的模型小鼠的机体衰老。

【关键词】欧亚旋覆花；总黄酮；D-半乳糖；抗衰老

【中图分类号】R28　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-28

Anti-aging effect of Inula britannica flower total flavonoids on mice in D-galactose induced aging model

Chen Hui，Long Yuanyuan，Guo Lei

（*Department of Burn and Plastic Surgery，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To investigate the anti-aging effect of Inula britannica flower total flavonoids（IBFTF）on mice in D-galactose induced aging model. ***Methods***：Kunming mice were randomly divided into 6 groups（10 mice in each group）：control group，model group，vitamin E（VE）group，low，medium and high dose of IBFTF group. Mice in control group were subcutaneously injected with 0.3 mL saline，while those in other groups were injected with the same volume of D-galactose（500 mg/kg），once daily for 8 weeks. From the third week，mice in low，medium

作者介绍：陈　慧，Email：fengxinbinger@126.com，
研究方向：创面愈合与瘢痕防治。

通信作者：果　磊，Email：cqguolei@sina.com。

基金项目：重庆市卫生局中医药科技资助项目（编号：ZY20132123）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.0910.002.html（2016-10-27）

Acta Neuropathol，2010，119(1)：7-35.

[15] Patricio P，Mateus-Pinheiro A，Sousa N，et al. Re-cycling paradigms：cell cycle regulation in adult hippocampal neurogenesis and implications for depression[J]. Mol Neurobiol，2013，48(1)：84-96.

[16] Cunningham KA，Watson CS. Cell cycle regulation，neurogenesis，and depression[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2008，105(7)：2259-2260.

[17] van den Heuvel S. Cell-cycle regulation[J]. WormBook，2005：1-16.

[18] Lim S，Kaldis P. Cdks，cyclins and CKIs：roles beyond cell cycle regulation[J]. Development，2013，140(15)：3079-3093.

[19] Gubbay O，Rae MT，McNeilly AS，et al. cAMP response element-binding（CREB）signalling and ovarian surface epithelial cell survival [J]. J Endocrinol，2006，191(1)：275-285.

[20] Wang Z，Kar S，Carr BI. Cdc25A protein phosphatase：a therapeutic target for liver cancer therapies[J]. Anticancer Agents Med Chem，2008，8(8)：863-871.

[21] Sherr CJ，Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases[J]. Genes Dev，2004，18(22)：2699-2711.

[22] Matsuura I，Denissova NG，Wang G，et al. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads[J]. Nature，2004，430(6996)：226-231.

[23] Heine VM，Maslam S，Joels M，et al. Increased P27KIP1 protein expression in the dentate gyrus of chronically stressed rats indicates G1 arrest involvement[J]. Neuroscience，2004，129(3)：593-601.

（责任编辑：张辉洁）

and high dose group were orally administered with 0.5 mL 100,200,400 mg/kg IBFTF; those in VE group received 100 mg/kg vitamin E via intragastric administration; those in control group and model group were orally administered equal volume of saline once a day for 6 weeks. Body weight, thymus index and spleen index were detected, and antioxidant enzymes activities in serum such as superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were also measured. Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) activity in hippocampus was determined using a SA-β-gal staining kit. ***Results***: The body weight of mice in low, medium and high dose IBFTF groups were significantly higher than that in the model group, with statistically significant difference (P=0.053, P=0.001, P=0.000). The thymus indexes and spleen indexes of mice in low, medium and high dose IBFTF groups were significantly higher than those in model group (P=0.000). The activity of GSH-Px, CAT and SOD in the serum of low, medium and high dose IBFTF groups was significantly higher than that in the model group, while the MDA content was lower than that in the model group (P=0.000); β-galactosidase positive rate in hippocampus of low, medium and high dose IBFTF groups was significantly lower than that in model group, with statistically significant differences (P=0.001, P=0.000, P=0.000). ***Conclusion***: The IBFTF is a potent natural antioxidant, which can delay the body aging induced by D-galactose.

【Key words】Inula britannica flower; total flavonoids; D-galactose; anti-aging

衰老是指生物体随着年龄增长所发生的一种不可避免的自发的复杂的退化过程[1]。引起衰老的因素很多，主要包括端粒缩短、癌基因激活及活性氧自由基引起的 DNA 损伤等，其中最为关键的因素是氧自由基代谢失衡[2]。自由基学说认为：由于机体自由基代谢失衡，导致组织器官结构和功能发生紊乱，引起机体衰老[3]。

D-半乳糖诱导的衰老动物模型已被国内外所公认，且在抗衰老药物研究等领域得到广泛应用[4]。该模型的衰老程度接近正常小鼠 16~24 月龄水平，这些变化和自然衰老的变化相一致[5]。然而，在应用 D-半乳糖构建小鼠的衰老模型时，所应用的剂量差异较大，从 50~1 000 mg/(kg·d)均有使用[4,6]，尤以 125 mg/kg[7]、250 mg/kg[6]、500 mg/kg[5]和 1 000 mg/kg[8]浓度组使用最为广泛。

由于中草药植物在抗氧化效果方面有低毒、高效、价格低廉等优点，所以越来越多的人更青睐于选择纯天然的植物制剂来延缓衰老。欧亚旋覆花是中国传统草药，具有抗氧化[9-10]、抗糖尿病[11]、免疫调节[12]、抗肝炎[9]、抗肿瘤[13]等多种生物活性，其抗氧化活性与其含有的黄酮类化合物有关[14]。然而，欧亚旋覆花总黄酮能否延缓衰老，目前还未见报道。

本实验通过提取欧亚旋覆花总黄酮，将其用于 D-半乳糖成功构建的小鼠衰老模型，以此来验证其延缓衰老作用。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本实验使用的植物材料是从重庆中药材市场购买的欧亚旋覆花（中国，江苏），由重庆医科大学中医研究所鉴定认证。此植物身份的证实，是通过解剖分析并与存放在中国医学科学院吉林省学院长白山天然资源研究所标本馆的权威样品进行比较来完成。

1.2 试剂

所有化学试剂均为分析纯。D-半乳糖购自 Sigma 公司；测定超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）、过氧化氢酶（catalase, CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px）的商业试剂盒均购自南京建成生物工程研究；β-半乳糖苷酶细胞化学染色试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.3 欧亚旋覆花总黄酮的制备及含量测定[9,15-16]

欧亚旋覆花加水煮沸 2 次，每次 1 h。用纱布过滤，得滤液。欧亚旋覆花总黄酮经 AB-8 树脂柱富集，条件如下：样品浓度为 20 mg/mL，上样速度 2 mL/min，70%乙醇洗脱。

吸取标准品溶液 1 mL，加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL，摇匀，放置 6 min 后，加 10%硝酸铝溶液 1 mL，摇匀，放置 6 min 后再加入 4% NaOH 溶液 10 mL，加 50%乙醇至 25 mL，摇匀。放置 15 min，510 nm 比色。芦丁作为参考标准。结果显示欧亚旋覆花中总黄酮的含量为 82.6%。

1.4 动物模型和分组

1.4.1 探索 D-半乳糖诱导的亚急性衰老模型的最佳浓度[4-6]

昆明种小鼠 25 只，SPF 级，雄性，体质量（18 ± 2）g，由重庆医科大学动物实验中心提供。本实验研究经过重庆医科大学伦理委员会批准。实验小鼠随机分成 5 组（每组 5 只），空白对照组给予颈背部皮下注射 0.3 ml 生理盐水，其余 4 组给予不同浓度等体积 D-半乳糖（125、250、500 及 1 000 mg/kg），每日 1 次，连续 8 周。8 周后，空腹取材。用 4%水合氯醛麻醉小鼠，腹主动脉取血，并在 4 ℃条件下，12 000 r/min 离心 15 min，在-20 ℃保存备用。

1.4.2 探讨欧亚旋覆花总黄酮对衰老模型小鼠的抗衰老作用[9,17]

实验小鼠 60 只，随机分为 6 组（每组 10 只），空白对照组给予颈背部皮下注射 0.3 mL 生理盐水，其余 5 组均给予

同体积 D-半乳糖[500 mg/(kg·d)]，连续 8 周。从第 3 周开始，模型组小鼠给予 0.5 mL 生理盐水灌胃，连续 6 周；总黄酮低、中、高剂量组小鼠分别给予 0.5 mL 100、200 和 400 mg/kg 欧亚旋覆花总黄酮灌胃，连续 6 周；VE 组小鼠给予 0.5 mL 100 mg/kg 维生素 E 灌胃，空白对照组给予同体积生理盐水灌胃，连续 6 周。8 周后，空腹取材，方法同上。

1.5 细胞周期测定

将肝组织制成肝细胞悬液，预冷的 70%乙醇固定，4 ℃过夜，用含有 RNase A 酶的碘化丙啶在暗环境下，37 ℃染色 30 min。使用流式细胞仪测定细胞周期，数据采用多周期软件分析。

1.6 免疫器官指数测定

实验小鼠每 7 天称重，观察各组小鼠体质量变化情况。8 周后，摘取小鼠胸腺和脾脏洗净并称重。胸腺指数和脾指数的计算公式分别为：胸腺指数=(胸腺重量/小鼠体质量)×10；脾脏指数=(脾脏重量/小鼠体质量)×10。

1.7 生化分析

小鼠血清中 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量测定均采用南京建成生物工程研究的商业试剂盒完成。所有步骤均按生产说明书进行。

1.8 细胞化学染色

根据产品说明书，使用 β 半乳糖苷酶染色试剂盒检测衰老相关的 β 半乳糖苷酶含量。将冰冻切片中海马组织室温固定 15 min，然后将其浸泡在染色液中 37 ℃过夜孵化。在光学显微镜下蓝染的细胞即为衰老细胞，使用 Image J 软件进行阳性率统计。

1.9 统计分析

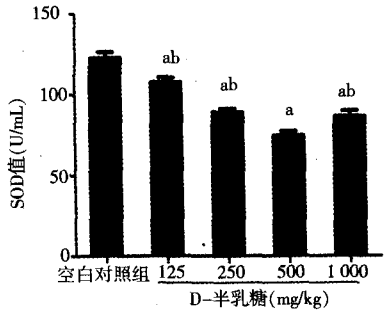
实验数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS 19.0 软件对数据进行处理，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较时采用 LSD-t 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

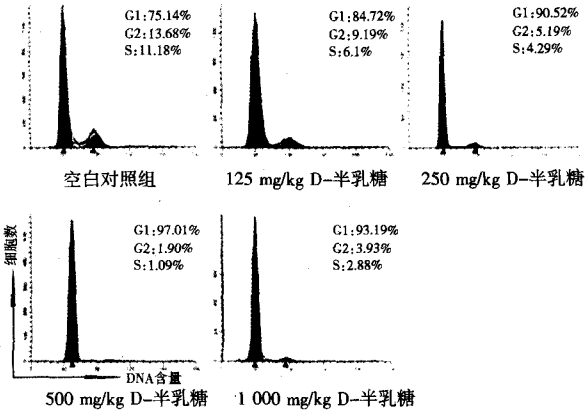
2.1 D-半乳糖诱导的亚急性衰老模型的最佳浓度

2.1.1 不同浓度 D-半乳糖对血清 SOD 活性的影响 空白对照组，125、250、500 和 1 000 mg/kg D-半乳糖组小鼠血清 SOD 活性分别为(122.73 ± 7.88)、(107.39 ± 6.52)、(89.16 ± 5.04)、(74.64 ± 6.05)和(86.43 ± 7.51) U/mL，组间比较有差异，差异有统计学意义(F=40.318，P=0.000)；125、250、500 和 1 000 mg/kg D-半乳糖组小鼠血清 SOD 活性均明显低于空白对照组，差异均有统计学意义(P=0.002、P=0.000、P=0.000、P=0.000)；500 mg/kg D-半乳糖组 SOD 活性明显低于 125、250 和 1 000 mg/kg D-半乳糖组(P=0.000、P=0.003、P=0.011)，如图 1A 所示。

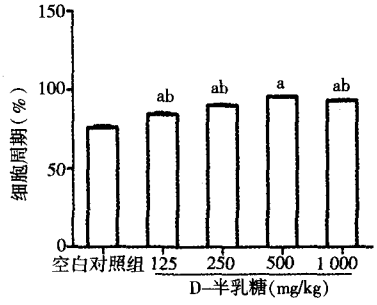
2.1.2 不同浓度 D-半乳糖对细胞周期的影响 流式细胞技术检测细胞周期分布情况，PI 染液和膜联蛋白对细胞进行标记。空白对照组，125、250、500 和 1 000 mg/kg D-半乳糖组小鼠阻滞于 G0/G1 期的细胞数量分别为(75.93 ± 2.17)%、(84.41 ± 1.39)%、(90.19 ± 1.02)%、(95.50 ± 1.11)%和(93.14 ± 0.60)%，组间比较均有差异(F=165.669，P=0.000)；125、250、500 和 1 000 mg/kg D-半乳糖组小鼠阻滞于 G0/G1 期的细胞数量均明显高于空白对照组(均 P=0.000)；500 mg/kg D-半乳糖组阻滞于 G0/G1 期的细胞数量明显高于 125、250 和 1 000 mg/kg D-半乳糖组(P=0.000、P=0.000、P=0.012)，如图 1B、C 所示。



A. 不同剂量 D- 半乳糖对衰老模型小鼠血清 SOD 活性的影响



B. 各组阻滞于 G0/G1 期的细胞数量的定量分析



a：不同剂量总黄酮组与空白对照组比较，均 P<0.05；b：其余剂量总黄酮组与 500 mg/kg D-半乳糖组比较，均 P<0.05

C. 不同剂量 D- 半乳糖对小鼠阻滞于 G0/G1 期的细胞数量的影响

图 1 血清 SOD 活性及细胞周期分布的变化

Fig.1 Change of SOD activity in serum and cell cycle distribution

2.2 欧亚旋覆花总黄酮对衰老模型小鼠的抗衰老作用

2.2.1 欧亚旋覆花总黄酮对体质量的影响 模型组小鼠表现出明显的衰老体征，如精神萎靡、反应迟钝、行动迟缓、毛发暗淡。模型组小鼠体质量低于空白对照组，差异有统计学意义(P=0.000)；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠体质量较模型组明显提高(P=0.053、P=0.001、P=0.000、

P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠体质量低于空白对照组（P=0.000、P=0.000、P=0.025、P=0.002）；总黄酮低、中剂量组体质量低于 VE 组（P=0.000、P=0.042），而高剂量组小鼠体质量高于 VE 组（P=0.265），差异无统计学意义（表 1）。

表 1 欧亚旋覆花总黄酮对体质量和免疫器官指数的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Tab.1 Effect of IBFTF on body weight and organ indexes（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	体质量（g）	胸腺指数（mg/10 g 体质量）	脾指数（mg/10 g 体质量）
空白对照组	49.51 ± 3.16[a]	62.91 ± 2.01[a]	28.22 ± 1.55[a]
模型组	38.94 ± 2.66	48.79 ± 1.26	20.96 ± 0.83
低剂量组	41.17 ± 1.77[abc]	55.56 ± 3.23[ab]	23.94 ± 2.16[abc]
中剂量组	43.25 ± 1.91[abc]	56.43 ± 2.73[ab]	25.78 ± 2.39[ab]
高剂量组	46.90 ± 1.52[ab]	59.91 ± 3.16[ab]	27.45 ± 1.07[a]
VE组	45.67 ± 2.92[ab]	57.87 ± 1.59[ab]	26.20 ± 1.36[ab]
F 值	23.185	32.775	23.343
P 值	0.000	0.000	0.000

注：a，所有其他组与模型组比较，P<0.05；b：VE 组和总黄酮低、中、高剂量组与空白对照组相比较；P<0.05；c：总黄酮低、中、高剂量组与 VE 组比较，P<0.05

2.2.2 欧亚旋覆花总黄酮对免疫器官指数的影响 模型组小鼠的胸腺指数低于空白对照组，差异有统计学意义（P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组胸腺指数明显高于模型组（均 P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠胸腺指数均低于空白对照组（P=0.000、P=0.000、P=0.014、P=0.000）；总黄酮低、中剂量组胸腺指数低于 VE 组（P=0.053、P=0.237），差异无统计学意义；高剂量组胸腺指数高于 VE 组（P=0.077），差异无统计学意义（表 1）。

模型组小鼠脾指数低于空白对照组（P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组脾指数高于模型组（均 P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组脾指数低于空白对照组（P=0.000、P=0.004、P=0.325、P=0.014）；总黄酮低、中剂量组脾指数明显低于 VE 组（P=0.005、P=0.591），低剂量组与 VE 组间差异有统计学意义；高剂量组脾指数高于 VE 组（P=0.102），差异无统计学意义（表 1）。

2.2.3 欧亚旋覆花总黄酮对衰老小鼠血清中抗氧化酶活性的影响 模型组小鼠血 SOD 活性低于空白对照组（P=0.000），说明衰老模型小鼠建造成功；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 SOD 活性较模型组明显提高（均 P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 SOD 活性明显低于空白对照组（均 P=0.000）；总黄酮低、中剂量组血 SOD 活性明显低于 VE 组（P=0.000、P=0.384），且低剂量组与 VE 组之间差异有统计学意义；高剂量组血 SOD 活性高于 VE 组（P=0.264），差异无统计学意义（表 2）。

模型组小鼠血 MDA 含量高于空白对照组，差异有统计学意义（P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 MDA 含量较模型组明显降低（均 P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 MDA 含量明显高于空白对照组（P=0.000、P=0.001、P=0.002、P=0.001）；总黄酮低、中剂量组血MDA 含量高于 VE 组（P=0.001、P=0.148），且低剂量组与 VE 组之间差异有统计学意义；高剂量组血 MDA 含量低于 VE 组（P=0.671），差异无统计学意义（表 2）。

模型组小鼠血 CAT 活性低于空白对照组（P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 CAT 活性较模型组明显提高（均 P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 CAT 活性明显低于空白对照组（P=0.000、P=0.000、P=0.004、P=0.000）；低、中剂量组血 CAT 活性明显低于 VE 组（P=0.000、P=0.003），而高剂量组血 CAT 活性高于 VE 组（P=0.258），差异无统计学意义（表 2）。

模型组小鼠血 GSH-Px 活性低于空白对照组（P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 GSH-Px 活性明显高于模型组（均 P=0.000）；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠血 GSH-Px 活性明显低于空白对照组（均 P=0.000）；低、中剂量组血 GSH-Px 活性明显低于 VE 组（P=0.000、P=0.020），而高剂量组血 GSH-Px 活性高于 VE 组（P=0.419），差异无统计学意义（表 2）。

表 2 欧亚旋覆花总黄酮对血清 SOD、MDA、CAT 和 GSH-Px 的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Tab.2 Effect of IBFTF on the contents of SOD,MDA,CAT and GSH-Px in blood（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)	CAT(U/mL)	GSH-Px(nmol/mg prot)
空白对照组	124.38 ± 7.03[a]	4.11 ± 0.55[a]	10.43 ± 0.56[a]	665.46 ± 35.77[a]
模型组	67.78 ± 9.81	7.32 ± 0.56	5.57 ± 0.66	431.97 ± 31.07
低剂量组	83.35 ± 5.06[abc]	6.04 ± 0.54[abc]	6.86 ± 0.53[abc]	502.46 ± 37.68[abc]
中剂量组	97.56 ± 6.10[ab]	5.47 ± 0.68[ab]	7.95 ± 0.70[abc]	551.14 ± 35.45[abc]
高剂量组	103.82 ± 4.28[ab]	4.98 ± 0.45[ab]	9.39 ± 0.74[ab]	601.62 ± 23.68[ab]
VE组	100.39 ± 6.22[ab]	5.08 ± 0.49[ab]	9.02 ± 0.71[ab]	588.90 ± 26.06[ab]
F 值	72.473	34.881	54.025	52.787
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，所有组与模型组比较，P<0.05；b：VE 组和总黄酮低、中、高剂量组与空白对照组比较，P<0.05；c：总黄酮低、中、高剂量与 VE 组比较，P<0.05

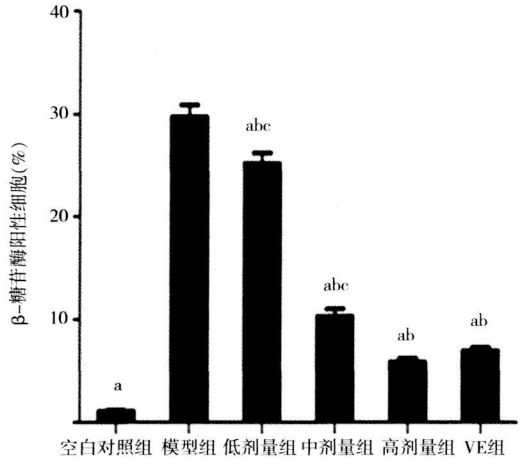
2.2.4 欧亚旋覆花总黄酮对 D-半乳糖诱导的 β 半乳糖苷酶阳性率的影响 目前检测衰老细胞最常用的方法是改良了的 β 半乳糖苷酶活力检测[16]。空白对照组，模型组，总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠 β 半乳糖苷酶阳性率分别为(1.10 ± 0.20)%、(29.73 ± 1.96)%、(25.20 ± 1.73)%、(10.30 ± 1.25)%、(5.83 ± 0.70)%、(6.97 ± 0.60)%，组间比较有差异，差异有统计学意义(F=257.810，P=0.000)；模型组小鼠 β 半乳糖苷酶阳性率明显高于空白对照组(P=0.000)；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠 β 半乳糖苷酶阳性率较模型组明显降低(P=0.001、P=0.000、P=0.000、P=0.000)；总黄酮低、中、高剂量组和 VE 组小鼠 β 半乳糖苷酶阳性率明显高于空白对照组(P=0.000、P=0.000、P=0.001、P=0.000)；低、中剂量组 β 半乳糖苷酶阳性率明显高于 VE 组(P=0.000、P=0.007)，而高剂量组 β 半乳糖苷酶阳性率低于 VE 组，差异无统计学意义(图 2、3)。



β 半乳糖苷酶染色用来检测衰老细胞，蓝染的细胞即为 β 半乳糖苷酶阳性细胞

图 2 欧亚旋覆花总黄酮对衰老模型小鼠 β 半乳糖苷酶阳性率的影响（β 半乳糖苷酶染色，200×）

Fig.2 Effect of IBFTF on activity of SA-β-Gal staining in the aging mice (SA-β-Gal staining, 200×)



a：所有组与模型组比较，P<0.05；b：VE 组和总黄酮低、中、高剂量组与空白对照组比较，P<0.05；c：总黄酮低、中、高剂量组与 VE 组比较，P<0.05

图 3 β 半乳糖苷酶阳性细胞定量分析

Fig.3 Quan titative analysis of activity of SA-β-Gal

3 讨 论

1956 年 Denham Harman 提出衰老的自由基学说，在抗衰老研究中 SOD 活性可间接判断衰老程度[18]。空白对照组和不同剂量 D-半乳糖组小鼠 SOD 值，组间比较有差异，且以 500 mg/kg D-半乳糖最明显。细胞停滞在 G0/G1 期，使得进入 S 期的细胞数量减少，从而引发衰老现象[19]。空白对照组和不同剂量 D-半乳糖组小鼠阻滞于 G0/G1 期的细胞数量，组间比较有差异，且以 500 mg/kg D-半乳糖最明显。上述结果均表明 D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠模型建立的最佳浓度为 500 mg/kg。

随着机体衰老，器官功能开始衰退，组织开始萎缩。免疫器官的质量也会发生改变，而器官指数是衰老的一个重要指标[20]。本实验发现，与模型组相比较，欧亚旋覆花总黄酮组免疫器官指数明显升高，差异有统计学意义，说明欧亚旋覆花总黄酮可阻止由 D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型免疫器官的衰退。

随着年龄增加，机体抗氧化能力减弱，如体内 SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶活性降低，清除自由基能力下降，导致自由基连锁反应，引起脂质过氧化终产物 MDA 增加[21]。MDA 是活泼的交联剂，能引起细胞结构和功能的破坏，从而导致皮肤衰老，因此 MDA 含量的高低间接反映细胞衰老程度[22]。SOD 作

为体内重要的抗氧化酶，其活性高低可间接反映机体清除氧自由基的能力，与衰老有密切关系[18]。机体对于过氧化氢的清除，虽主要依靠 CAT，但 GSH-Px 催化分解部分 H_2O_2 的作用也相当重要，二者具有协同作用，共同起到保护机体细胞结构和功能完整的作用，在抗衰老研究中有重要意义[20]。与模型组相比，低、中、高剂量总黄酮组的抗氧化酶活性明显提高而 MDA 显著降低，具有剂量依赖性，这表明欧亚旋覆花总黄酮可以通过清除自由基来延缓衰老。

在 pH 6.0 条件下，衰老细胞表达有高酶活性的 β 半乳糖苷酶，因此与衰老相关的 β 半乳糖苷酶是细胞衰老的一种重要分子标志物[23]。低、中、高剂量总黄酮组小鼠 β 半乳糖苷酶阳性率较模型组明显降低，具有剂量依赖性，差异具有统计学意义；这表明欧亚旋覆花总黄酮可以通过降低 β 半乳糖苷酶活性来延缓衰老。

综上结果表明，欧亚旋覆花总黄酮可以延缓D-半乳糖诱导的模型小鼠的机体衰老，具有剂量依赖性。

参 考 文 献

[1] Dulcy CP, Singh HK, Preethi J, et al. Standardized extract of Bacopa monniera (BESEB CDRI-08) attenuates contextual associative learning deficits in the aging rat's brain induced by D-galactose[J]. Journal of Neuroscience Research, 2012, 90(10):2053-2064.

[2] Yin D, Chen K. The essential mechanisms of aging: irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions[J]. Experimental Gerontology, 2005, 40(6): 455-465.

[3] Zhu M, Lu M, Li QJ, et al. Hyperbaric oxygen suppresses hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats[J]. Journal of Child Neurology, 2015, 30(1): 75-82.

[4] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model[J]. Mechanisms of Ageing & Development, 1999, 108(3): 239-251.

[5] Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose[J]. Biogerontology, 2003, 4(1): 15-18.

[6] Wei H, Li L, Song Q, et al. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice[J]. Behav Brain Res, 2006, 157(3): 56-57.

[7] 宗灿华，马 山，于国萍.荷叶黄酮抗衰老作用研究[J]. 中国食物与营养，2008，14(10)：52-53.

[8] 曹瑞珍，张国文，佘集凯，等. 地锦草总黄酮对老化模型小鼠血清衰老指标的影响[J]. 中国老年学杂志，2008，28(6)：562-563.

[9] Dong M, Hong T, Liu S, et al. Hepatoprotective effect of the flavonoid fraction isolated from the flower of Inula britannica against D-Galactosamine-induced hepatic injury[J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 7(6): 1919-1923.

[10] Zhang HB, Wen JK, Zhang J, et al. Flavonoids from Inula britannica reduces oxidative stress through inhibiting expression and phosphorylation of p47(phox) in VSMCs[J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(8): 815-820.

[11] Kobayashi T, Song QH, Hong T, et al. Preventative effects of the flowers of Inula britannica on autoimmune diabetes in C57BL/KsJ mice induced by multiple low doses of streptozotocin[J]. Ritmo, 2002, 16(4): 377-382.

[12] Song QH, Kobayashi T, Hong T, et al. Effects of Inula britannica on the production of antibodies and cytokines and on T cell differentiation in C57BL/6 mice immunized by ovalbumin[J]. Am J Chin Med, 2002, 30(3): 297-305.

[13] Rafi MM, Bai NS, Chi-Tang-Ho, et al. A sesquiterpenelactone from Inula britannica induces anti-tumor effects dependent on Bcl-2 phosphorylation[J]. Anticancer Research, 2005, 25(1A): 313-318.

[14] Huang J, Cheng ZH, Xie HH, et al. Secondary metabolites from Inula britannica L. and their biological activities[J]. Molecules, 2010, 15(15): 1562-1577.

[15] Hong T, Zhao J, Dong M, et al. Composition and bioactivity of polysaccharides from Inula britannica flower[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(4): 550-554.

[16] Zhang HB, Wen JK, Wang YY, et al. Flavonoids from Inula britannica L. inhibit injury-induced neointimal formation by suppressing oxidative-stress generation[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 126(1): 176-183.

[17] 樊莲莲，刘金荣，苏文成，等. 维药白刺总黄酮对亚急性衰老模型小鼠抗氧化作用的研究[J]. 时珍国医国药，2007，18(10)：2438-2440.

[18] Giardino 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]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2002, 30(3): 189-198.

[19] Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, et al. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence[J]. Nature, 2001, 409(6823): 1067-1070.

[20] Jin SL, Yin YG. In vivo antioxidant activity of total flavonoids from indocalamus leaves in aging mice caused by D-galactose[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(50): 3814-3818.

[21] Proksch E, Segger D, Degwert J, et al. Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2013, 27(1): 47-55.

[22] Zhang SC, Dong ZQ, Peng ZS, et al. Anti-aging effect of adipose-derived stem cells in a mouse model of skin aging induced by D-galactose[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97573.

[23] Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo[J]. Nat Protoc, 2009, 4(12): 1798-1806.

（责任编辑：冉明会）