

苦丁茶黄酮提取物 对 D-半乳糖致小鼠衰老的改善作用

赵欣^{1,2,3,4}, 易若琨^{1,2,3,4}, 孙鹏^{1,2,3,4}, 宋家乐^{1,2,3,5,*}

- (1.重庆第二师范学院, 重庆市功能性食品协同创新中心, 重庆 400067;
- 2.重庆第二师范学院, 重庆市功能性食品工程技术研究中心, 重庆 400067;
- 3.重庆第二师范学院, 功能性食品研发重庆市工程实验室, 重庆 400067;
- 4.重庆第二师范学院, 生物与化学工程学院, 重庆 400067;
- 5.桂林医学院公共卫生学院食品卫生与营养学教研室, 广西高校预防医学重点实验室, 广西桂林 541004)

摘要:针对苦丁茶黄酮提取物对 D-半乳糖致小鼠衰老的改善作用进行了研究。以注射 D-半乳糖(120 mg/kg)致衰老模型小鼠为实验对象,以其体质量、脏器指数、血清和组织指标为评价指标,使用试剂盒和 RT-PCR 法检测苦丁茶黄酮提取物(50 和 100 mg/kg)对衰老小鼠的血清和组织的影响,全面考察苦丁茶黄酮提取物的抗衰老作用。实验结果表明,苦丁茶黄酮提取物能显著($p < 0.05$)改善 D-半乳糖造成的小鼠体质量下降及胸腺和脑器官指数下降。苦丁茶黄酮提取物可以提高 D-半乳糖致衰老小鼠血清和肝组织中的总抗氧化能力(T-AOC)和降低丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平;同时苦丁茶黄酮提取物也提高了衰老小鼠血清和肝组织中的超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的酶活力。苦丁茶黄酮提取物还可以显著($p < 0.05$)上调衰老小鼠肝组织中神经型一氧化氮合酶(nNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、铜锌超氧化物歧化酶(Gu/Zn-SOD)、过氧化氢酶(CAT)的 mRNA 表达和下调诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达,且高浓度苦丁茶黄酮提取物(100 mg/kg)的效果优于同浓度的维生素 C。

关键词:苦丁茶,黄酮,D-半乳糖,衰老,mRNA 表达

Improvement effects of Kuding tea flavonoids extracts on D-galactose induced mice aging

ZHAO Xin^{1,2,3,4}, YI Ruo-kun^{1,2,3,4}, SUN Peng^{1,2,3,4}, SONG Jia-le^{1,2,3,5,*}

- (1.Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China;
- 2.Chongqing Engineering Research Center of Functional Food, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China;
- 3.Chongqing Engineering Laboratory for Research and Development of Functional Food, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China;
- 4.College of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China;
- 5.Department of Food Hygiene and Nutrition, School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

Abstract: The improvement effects of Kuding tea flavonoids extracts (KFE) on D-galactose induced aging in mice were studied in this study. Aging moded mice induced by the D-galactose injection (120 mg/kg) were experimental subjects whose body weight, organ index, serum and tissue index were evaluating indicators. Experiment kit and RT-PCR detection methods were used for determination the effects of KFE (50 and 100 mg/kg) on serum and tissue of aging mice, the anti-aging effects of KFE were comprehensive investigated. The experiment results showed that KFE could significantly ($p < 0.05$) improve the weight loss, thymus and brain organ index decreasing of mice by D-galactose treatment. KFE could raise total antioxidative capability (T-AOC) level and reduce malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels, meanwhile KFE also increased enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum and hepatic tissue of aging mice. KFE

收稿日期:2017-02-07

作者简介:赵欣(1981-),男,博士,教授,研究方向:食品营养和功能性食品,E-mail:zhaoxin@cque.edu.cn。

* 通讯作者:宋家乐(1983-),男,博士,副教授,研究方向:食品营养和功能性食品,E-mail:songjiale@glmc.edu.cn。

基金项目:重庆高校创新团队建设计划资助项目(CXTD201601040);重庆第二师范学院引进高层次人才项目(2013BSRC001);重庆市工程技术研究中心建设项目(cstc2015yfpt_gcsjyzz0027)。

also increased significantly ($p < 0.05$) raise neuronal nitric oxide synthase (nNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), copper zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), catalase (CAT) mRNA expressions and reduce inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, and high concentration of KFE (100 mg/kg) showed the better effects than the same concentration of vitamin C.

Key words: Kuding tea; flavonoid; D-galactose; aging; mRNA expression levels

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)16-0303-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.057

衰老是一种生物体自发的必然过程,生物机体将逐渐表现机能衰退,适应性和抵抗力减退^[1]。衰老与诸多疾病密切相关,包括高血压、2型糖尿病、动脉粥样硬化和老年痴呆等,可通过延缓衰老来减缓这些疾病的发生^[2]。天然植物中包含黄酮在内的多种抗氧化成分,已经逐步被应用到抗氧化保健产品的开发中^[3]。

苦丁茶是一种由冬青科冬青属的苦丁茶种常绿乔木树叶制成的特殊类茶饮品,在我国西南地区较为常见^[4]。苦丁茶常作为保健饮品和药原料,传统中医学认为苦丁茶具有清热消暑、生津止渴和润喉止咳等功效^[5]。最新的研究表明,苦丁茶及其含有的活性成分具有抗氧化、抗炎症和抗癌等作用^[6-7]。不同溶剂的苦丁茶提取物均表现出一定的抗氧化效果,其中乙酸乙酯组分提取物的抗氧化效果最好,其中的主要成分是多酚和黄酮类物质^[8],乙醇和 ADS-17 树脂能够进一步对植物黄酮进行提取及纯化^[9]。同时有研究表明,苦丁茶黄酮具有较好的 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力及三价铁还原能力,表现出良好的体外抗氧化能力^[10]。近年来对黄酮类物质的抗氧化、抗衰老作用的研究表明,植物黄酮物质的绝大部分生理活性作用都是以其抗氧化效果为基础发挥的^[11]。苦丁茶含有的黄酮化合物种类较多,含量也丰富,且不同地区产苦丁茶的黄酮种类和含量也存在差异^[12]。但是由于苦丁茶的使用范围有限,针对其生物活性作用的深入研究不够,缺乏动物体内研究、临床研究和深入的分子层面的机制研究。本研究采用动物实验对苦丁茶中提取的黄酮类物质进行研究,对其抗衰老作用的分子机制进行较为深入的研究,将对进一步开发苦丁茶这种传统资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验动物 雄性 6 周龄 SPF 级 KM(昆明)小鼠 50 只(体质量 20~25 g),购自于重庆医科大学动物实验中心,动物许可证号:SCXK(渝)2012-0001;苦丁茶 安国市祁珍养生食品有限公司出产野生苦丁茶;芦丁标准品 上海源叶生物科技有限公司;T-AOC、NO、SOD、GSH-Px、MDA 试剂盒 南京建成生物工程研究所;CycleTESTTM PLUS DNA 染色试剂盒 德国 Becton Dickinson 公司;Trizol 试剂、oligodT₁₈、RNase、dNTP 和 MLV 美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 引物 nNOS、eNOS、iNOS、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD 和 CAT 天根生化科技有限公司;其余试剂 均为国产分析纯。

Biomate3S 型紫外可见分光光度仪、A200PCR 型仪、LUX 型多功能性酶标仪 美国 Thermo Fisher

Scientific 公司;Tancon2500PCR 型凝胶成像仪 上海天能科技有限公司;ICEN-24R 型高速冷冻离心机 杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苦丁茶黄酮物质的提取 称取 1 kg 冷冻干燥后的苦丁茶样品打粉,然后将苦丁茶粉末平均分为 10 份,每份中加入 1 L 浓度为 70% (V/V) 的乙醇溶液,在 70 °C 水浴下浸提 4 h 后过滤,收集 10 份滤液并将滤液过硅藻土以除去脂溶性杂质,再次收集所有提取液;然后将提取液加入并通过装 ADS-17 树脂的层析柱,使苦丁茶黄酮类物质被树脂吸附。再用 90% (V/V) 的乙醇洗脱树脂,使树脂上吸附的黄酮物质溶于乙醇,最后采用旋蒸法蒸干乙醇得到苦丁茶黄酮粗提取物^[9]。

1.2.2 苦丁茶黄酮物质含量的测定 称取一定量的芦丁标准品加入 25 mL 容量瓶中,加入 10 mL 的 90% (V/V) 的乙醇,依次再加入 0.75 mL 的 5% NaNO₂ 溶液、0.75 mL 的 10% Al(NO₃)₃ 溶液,10 mL 的 4% NaOH 溶液,最后以 90% 的乙醇定容至刻度,配制成浓度分别为 10、20、30、40 和 50 μg/mL 的芦丁标准液,在 500 nm 处测定不同浓度芦丁标准液的吸光度,计算芦丁的标准曲线。取 0.01 g 苦丁茶黄酮提取物溶于 5 mL 90% 的乙醇,再取 2 mL 苦丁茶黄酮提取物溶液于 25 mL 容量瓶中,重复芦丁标准曲线测定方法测定苦丁茶黄酮提取物中黄酮的含量(芦丁计)。

1.2.3 动物实验 将适应环境喂养 1 周后的 KM(昆明)小鼠随机分为正常组、衰老对照组、维生素 C 灌胃组(阳性对照组)、苦丁茶黄酮低浓度灌胃组和苦丁茶黄酮高浓度灌胃组,每组 10 只。实验开始后,正常组和衰老对照组小鼠每日灌胃 0.2 mL 蒸馏水;维生素 C 灌胃组、苦丁茶黄酮低浓度灌胃组和苦丁茶黄酮高浓度灌胃组小鼠每日分别灌胃维生素 C (100 mg/kg) 和苦丁茶黄酮(50 和 100 mg/kg)。2 周后正常组小鼠每日继续灌胃 0.2 mL 蒸馏水;衰老对照组小鼠每日除继续灌胃 0.2 mL 蒸馏水外每日腹腔注射一次 D-半乳糖(120 mg/kg);维生素 C 灌胃组和苦丁茶黄酮灌胃组小鼠除继续分别灌胃维生素 C 和苦丁茶黄酮提取物外也每日腹腔注射一次 D-半乳糖(120 mg/kg),持续 6 周,每周测量小鼠体质量,然后对所有小鼠禁食 24 h 后断颈处死小鼠^[12],心脏取血及取肝脏进行后续实验,同时测定胸腺和脑组织质量,计算指数:胸腺和脑组织器官指数(g/kg) = 脏器质量(g)/小鼠体质量(kg)。

1.2.4 血清和肝脏组织 T-AOC、NO 和 MDA 水平测

表1 本研究中 RT-PCR 实验的引物序列
Table 1 Primer sequence of RT-PCR experiment in this study

引物	序列
nNOS	上游引物:5'-GAA TAC CAG CCT GAT CCA TGG AA-3'
	下游引物:5'-TCC TCC AGG AGG GTG TCC ACC GCA TG-3'
eNOS	上游引物:5'-GGA GAG GCT GCA TGA CAT TG-3'
	下游引物:5'-GGT AGA GCC ATA GTG GAA TGA C-3'
iNOS	上游引物:5'-AGA GAG ATC GGG TTC ACA-3'
	下游引物:5'-CAC AGA ACT GAG GG TAC A-3'
Mn-SOD	上游引物:5'-TTC AAT AAG GAG CAG GGA C-3'
	下游引物:5'-CAG TGT AAG GCT GAC GGT TT-3'
Gu/Zn-SOD	上游引物:5'-GAA GAG AGG CAT GTT GGA GA-3'
	下游引物:5'-CCA ATT ACA CCA CGA GCC AA-3'
CAT	上游引物:5'-AGA TAC TCC AAG GCG AAG GTG-3'
	下游引物:5'-AAA GCC ACG AGG GTC ACG AAC-3'
GAPDH	上游引物:5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TC-3'
	下游引物:5'-AGC CTT CTC CAT GGT CGT GA-3'

定 将小鼠的血浆静置 1 h 后离心分离 (4 ℃ , 4000 r/min, 15 min) 后取上层血清, 按试剂盒说明书测定小鼠血清中 T-AOC、SOD 和 GSH-Px 的活性。将小鼠肝脏制成 10% 的匀浆后离心分离 (4 ℃ , 4000 r/min, 15 min), 取上清液按试剂盒说明书测定肝组织中 T-AOC、NO 和 MDA 的水平。

1.2.5 血清和肝脏组织 SOD 和 GSH-Px 活性测定 使用 1.2.4 的方法制备小鼠血清和肝脏匀浆, 然后按试剂盒说明书测定血清和肝组织中 SOD 和 GSH-Px 的活性。

1.2.6 RT-PCR 法测定肝组织的 mRNA 表达 取小鼠的肝组织匀浆用 RNAzol 提取肝组织的总 RNA, 然后将各组小鼠肝组织的总 RNA 浓度稀释到 1 μg/μL。取 2 μL 稀释后的总 RNA 提取液, 在其中依次加入 1 μL 的 OligodT18、RNase、dNTP、MLV 酶和 10 μL 的 5 × Buffer, 在 37 ℃ 120 min, 99 ℃ 4 min, 4 ℃ 3 min 条件下合成 cDNA。然后以反转录-聚合酶链反应法扩增 nNOS、eNOS、iNOS、Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 CAT 的 mRNA 表达 (表 1), 同时以持家基因 (GAPDH) 作为内参照按同样条件进行扩增。最后用含溴化乙锭琼脂 (1% 浓度) 电泳检查 PCR 扩增产物, 并用 Image1.44 软件进行半定量分析^[13]。

1.3 数据统计

对每只小鼠的血清和组织测定实验进行三次平行实验后取平均值, 然后使用 SAS 9.1 统计软件采用 one-way ANOVA 方法分析各组数据在 $p < 0.05$ 水平上相互是否具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 苦丁茶黄酮提取物的纯度

通过不同浓度芦丁标准液的 OD 值, 绘制标准曲线为 $Y = 0.0012X - 0.001$ ($R^2 = 0.9936$), 然后计算得出苦丁茶提取物中黄酮物质的纯度为 43.4%, 有较多研究表明, 黄酮提取液经过大孔树脂吸附后获得的物质中主要成分为黄酮类物质^[14-16], 因此, 本研究中粗提取物的主要成分是苦丁茶黄酮类物质。

2.2 苦丁茶黄酮提取物对小鼠体质量变化的影响

本研究发现, 小鼠在注射 D-半乳糖后逐渐出现体质量增加缓慢, 毛发失去光泽并开始脱落等情况, 这与季文静等^[17]的研究结果相一致。如图 1 所示, 与正常组相比, 衰老对照组小鼠体质量显著下降 ($p < 0.05$), 表明腹腔注射 D-半乳糖可使小鼠体质量下降; 与衰老对照组小鼠相比, 苦丁茶黄酮提取物处理组和维生素 C 处理组小鼠体质量显著 ($p < 0.05$) 升高, 表明苦丁茶黄酮和微生物可以缓解 D-半乳糖造成的小鼠体质量下降。

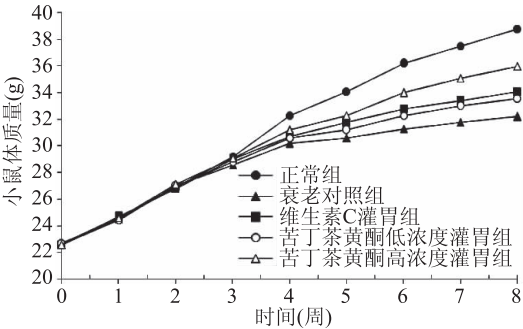


图1 实验期间各组小鼠体质量变化 (n = 10)
Fig.1 Changes of body weight of mice in each group during the experiment (n = 10)

2.3 苦丁茶黄酮提取物对小鼠器官指数的影响

当机体出现衰老时, 胸腺和脑部将出现较其他器官更为明显的萎缩, 胸腺衰老是免疫衰老的主导因素, 大脑衰老则是机体衰老的特征性变化^[17]。由表 2 可知, 与正常组相比, 衰老对照组小鼠胸腺指数和脑指数显著下降 ($p < 0.05$), 表明腹腔注射 D-半乳糖造成胸腺和脑组织萎缩; 与衰老对照组小鼠相比, 苦丁茶黄酮提取物处理组和维生素 C 处理组小鼠的胸腺指数和脑指数都显著升高 ($p < 0.05$), 表明这两组小鼠的胸腺和脑组织萎缩程度低于衰老对照组。可见, 苦丁茶黄酮可以有效的抑制衰老造成的器官指数下降, 缓解由 D-半乳糖造成的胸腺和脑组织萎缩。

表2 各组小鼠器官指数($n=10$)Table 2 Organ indexes of mice in each group($n=10$)

组别	胸腺指数 (g/kg)	脾指数 (g/kg)
正常组	2.31 ± 0.22 ^a	18.03 ± 1.21 ^a
衰老对照组	1.66 ± 0.17 ^e	14.38 ± 0.72 ^d
维生素 C 灌胃组	1.95 ± 0.14 ^c	15.76 ± 1.14 ^{bc}
苦丁茶黄酮低浓度灌胃组	1.83 ± 0.11 ^d	15.03 ± 0.76 ^c
苦丁茶黄酮高浓度灌胃组	2.10 ± 0.18 ^b	16.88 ± 1.03 ^b

注:同列不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$),表3~表8同。

2.4 苦丁茶黄酮提取物对小鼠血清和肝组织中 T-AOC、NO、MDA 水平的影响

T-AOC 是评价总抗氧化能力的重要指标,氧化自由基是导致人体衰老的最主要原因之一,通过提高机体 T-AOC 水平可起到减缓衰老的作用^[18]。一氧化氮在机体内具有十分重要的作用,NO 可以维持体内氧化平衡,当机体发生氧化损伤时,NO 将大量产生,使机体失衡^[13,19]。MDA 同样是评价机体受氧化损伤的重要物质,高水平的 MDA 将导致机体脂质过氧化^[13,20]。由表 3 和表 4 可知,与对照组小鼠相比,衰老对照组小鼠血清和肝脏组织中总抗氧化能力(T-AOC)显著降低($p < 0.05$),而 NO 和 MDA 含量显著升高($p < 0.05$),表明腹腔注射 D-半乳糖造成了小鼠机体氧化损伤。与衰老对照组小鼠相比,苦丁茶黄酮提取物处理组小鼠血清和肝脏组织中总抗氧化能力(T-AOC)显著升高($p < 0.05$),而 NO 和 MDA 含量显著降低($p < 0.05$),表明灌喂 50 和 100 mg/kg 苦丁茶黄酮提取物能够显著改善 D-半乳糖造成的氧化损伤。

2.5 苦丁茶黄酮提取物对小鼠血清和肝组织中 SOD 和 GSH-Px 酶活的影响

SOD 和 GSH-Px 是机体重要的抗氧化酶,提高机体中的 SOD 和 GSH-Px 酶活力可以有效的抑制氧化防止衰老^[21-22]。由表 5 和表 6 可知,与对照组小鼠

相比,衰老对照组小鼠血清和肝脏组织中 SOD 和 GSH-Px 活力显著降低($p < 0.05$),表明腹腔注射 D-半乳糖能够降低小鼠机体抗氧化能力。与衰老对照组小鼠相比,苦丁茶黄酮提取物处理组小鼠血清和肝脏组织中 SOD 及 GSH-Px 活力显著升高($p < 0.05$),表明灌喂 50 和 100 mg/kg 苦丁茶黄酮提取物能够显著改善 D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化能力。

表5 小鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 酶活力($n=10$)Table 5 The enzyme activities of SOD and GSH-Px in serum of mice($n=10$)

组别	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)
对照组	226.37 ± 21.86 ^a	154.48 ± 6.82 ^a
衰老对照组	133.76 ± 12.37 ^e	82.71 ± 4.98 ^e
维生素 C 灌胃组	168.09 ± 10.86 ^c	122.83 ± 4.29 ^c
苦丁茶黄酮低浓度灌胃组	157.83 ± 13.27 ^d	109.27 ± 4.07 ^d
苦丁茶黄酮高浓度灌胃组	189.76 ± 18.83 ^b	137.20 ± 5.58 ^b

表6 小鼠肝脏中 SOD 和 GSH-Px 酶活力($n=10$)Table 6 The enzyme activities of SOD and GSH-Px in liver of mice($n=10$)

组别	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)
正常组	90.88 ± 6.81 ^a	138.39 ± 6.62 ^a
衰老对照组	33.82 ± 3.62 ^e	87.38 ± 4.78 ^e
维生素 C 灌胃组	68.33 ± 5.08 ^c	108.22 ± 5.32 ^c
苦丁茶黄酮低浓度灌胃组	46.23 ± 4.28 ^d	94.30 ± 4.71 ^d
苦丁茶黄酮高浓度灌胃组	78.21 ± 5.32 ^b	117.07 ± 5.18 ^b

2.6 苦丁茶黄酮提取物对小鼠肝脏中 nNOS、eNOS 和 iNOS mRNA 表达的影响

由图 2 和表 7 可知,与对照组小鼠相比,衰老对照组肝脏组织中神经型一氧化氮合酶(nNOS)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的 mRNA 表达水平显著降低($p < 0.05$),而诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的 mRNA 表达水平显著升高($p < 0.05$),表明腹腔注射

表3 小鼠血清中 T-AOC、NO 和 MDA 水平($n=10$)Table 3 The levels of T-AOC, NO and MDA in serum of mice($n=10$)

组别	T-AOC(U/mL)	NO(μmol/L)	MDA(nmol/mL)
对照组	15.21 ± 0.87 ^a	28.87 ± 1.07 ^e	8.08 ± 0.56 ^e
衰老对照组	8.31 ± 0.42 ^e	63.56 ± 1.31 ^a	22.28 ± 1.16 ^a
维生素 C 灌胃组	10.82 ± 0.42 ^c	45.35 ± 1.39 ^c	14.92 ± 0.60 ^c
苦丁茶黄酮低浓度灌胃组	9.48 ± 0.27 ^d	51.08 ± 1.42 ^b	17.33 ± 0.72 ^b
苦丁茶黄酮高浓度灌胃组	12.41 ± 0.56 ^b	35.68 ± 0.88 ^d	12.28 ± 0.83 ^d

表4 小鼠肝脏中 T-AOC、NO 和 MDA 水平($n=10$)Table 4 The levels of T-AOC, NO and MDA in liver of mice($n=10$)

组别	T-AOC(U/mg prot)	NO(μmol/g prot)	MDA(nmol/mg prot)
正常组	4.68 ± 0.42 ^a	4.22 ± 0.18 ^e	3.21 ± 0.26 ^e
衰老对照组	0.68 ± 0.15 ^e	8.36 ± 0.43 ^a	8.23 ± 0.48 ^a
维生素 C 灌胃组	3.06 ± 0.32 ^c	5.69 ± 0.25 ^c	5.39 ± 0.30 ^c
苦丁茶黄酮低浓度灌胃组	2.27 ± 0.28 ^d	6.28 ± 0.22 ^b	6.48 ± 0.22 ^b
苦丁茶黄酮高浓度灌胃组	3.77 ± 0.35 ^b	5.07 ± 0.21 ^d	4.64 ± 0.36 ^d

表7 各组小鼠肝组织中 nNOS、eNOS 和 iNOS 的 mRNA 表达强度的半定量分析(n = 10)
Table 7 Semi-quantitative analysis of mRNA expression of nNOS, eNOS and iNOS in liver tissue of mice in each group mice(n = 10)

组别	nNOS	eNOS	iNOS
正常组	4.18 ± 0.33 ^a	2.79 ± 0.27 ^a	0.02 ± 0.01 ^e
衰老对照组	1.00 ± 0.11 ^e	1.00 ± 0.08 ^e	1.00 ± 0.04 ^a
维生素 C 灌胃组	2.54 ± 0.26 ^e	1.73 ± 0.14 ^e	0.24 ± 0.08 ^e
苦丁茶黄酮低浓度灌胃组	1.98 ± 0.21 ^d	1.30 ± 0.12 ^d	0.52 ± 0.11 ^b
苦丁茶黄酮高浓度灌胃组	3.39 ± 0.16 ^b	1.94 ± 0.15 ^b	0.15 ± 0.05 ^d

表8 各组小鼠肝组织中 Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 CAT 的 mRNA 表达强度的半定量分析(n = 10)
Table 8 Semi-quantitative analysis of mRNA expressions levels of Mn-SOD, Gu/Zn-SOD, and CAT in liver tissue of mice in each group mice(n = 10)

组别	Mn-SOD	Gu/Zn-SOD	CAT
正常组	4.75 ± 0.31 ^a	3.53 ± 0.29 ^a	6.00 ± 0.47 ^a
衰老对照组	1.00 ± 0.10 ^e	1.00 ± 0.07 ^e	1.00 ± 0.08 ^e
维生素 C 灌胃组	2.48 ± 0.38 ^e	2.03 ± 0.25 ^e	4.83 ± 0.33 ^e
苦丁茶黄酮低浓度灌胃组	1.18 ± 0.19 ^d	1.52 ± 0.18 ^d	4.08 ± 0.37 ^d
苦丁茶黄酮高浓度灌胃组	3.66 ± 0.23 ^b	2.78 ± 0.27 ^b	5.80 ± 0.24 ^b

D-半乳糖能够对小鼠肝组织中的一氧化氮合酶产生影响。与衰老对照组小鼠相比,苦丁茶黄酮提取物处理组小鼠肝脏组织中 nNOS 和 eNOS 的 mRNA 表达水平显著升高($p < 0.05$), iNOS mRNA 表达水平显著降低($p < 0.05$),表明灌喂 50 和 100 mg/kg 苦丁茶黄酮提取物能使肝组织中的 nNOS、eNOS 和 iNOS 表达接近正常组小鼠。iNOS 在被诱导后的短时间内可释放大量的 NO,高浓度 NO 与氧自由基产生过氧亚硝酸根,诱导氧化应激,导致机体进一步氧化衰老; iNOS 是与阿尔茨海默病发病相关应激酶之一,能通过释放高浓度 NO 导致氧化损伤^[23]。研究表明 nNOS 基因敲除小鼠显示出由于加速衰老造成的记忆功能损伤^[23-24],nNOS 和 eNOS 均是基础表达的组织构成酶,参与学习记忆障碍的整个进程,通过延缓衰老改善学习记忆功能损伤后机体 eNOS 蛋白和表达均出现上升^[23,25],而 nNOS 和 eNOS 在机体出现氧化受损后含量下降,提高机体内的 nNOS 和 eNOS 含量也将有效控制衰老^[13,26]。本研究中苦丁茶黄酮也可以有效的控制小鼠肝组织中 iNOS 表达含量,提高 nNOS、eNOS 表达含量以达到减缓衰老的目的。

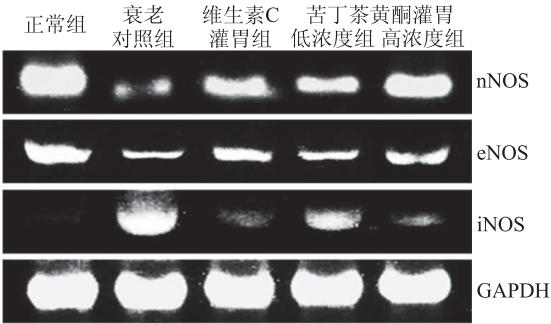


图2 各组小鼠肝组织中 nNOS、eNOS 和 iNOS 的 mRNA 表达强度(n = 10)
Fig.2 mRNA expressions levels of nNOS, eNOS, and iNOS in liver tissue of mice in each group(n = 10)

2.7 苦丁茶黄酮提取物对小鼠肝脏中 Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 CAT 的 mRNA 表达的影响

SOD 存在三种异构体, Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 EC-SOD, 机体内的 Mn-SOD 和 Gu/Zn-SOD 能控制自由基保持在低水平,保持机体健康。CAT 具有清除氧自由基和促进过氧化氢分解的功效,能避免氧化对体内细胞的损伤^[13,27]。由图 3 和表 8 可以看出,与对照组小鼠相比,衰老对照组肝脏组织中 Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 CAT 的 mRNA 表达水平显著降低($p < 0.05$),表明腹腔注射 D-半乳糖能够导致小鼠衰老。与衰老对照组小鼠相比,苦丁茶黄酮提取物处理组小鼠肝脏组织中 Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 CAT 的 mRNA 表达水平显著升高($p < 0.05$)。实验结果显示苦丁茶黄酮可通过提高机体内 Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 CAT 的含量抑制 D-半乳糖对小鼠造成的氧化衰老。

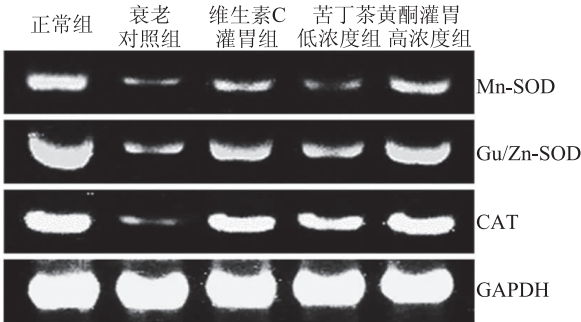


图3 各组小鼠肝组织中 Mn-SOD、Gu/Zn-SOD 和 CAT 的 mRNA 表达强度(n = 10)
Fig.3 mRNA expressions levels of Mn-SOD, Gu/Zn-SOD, and CAT in liver tissue of mice in each group(n = 10)

3 结论

本研究通过 D-半乳糖建立小鼠衰老模型来检测苦丁茶黄酮的衰老预防作用。实验结果显示,苦丁茶黄酮可以有效的抑制衰老造成的小鼠体质量下降,同时可以抑制衰老造成的胸腺和脑器官指数下

降。通过对小鼠血清和肝组织的检测进一步发现苦丁茶黄酮能够提高 D-半乳糖导致衰老小鼠的 T-AOC 水平和降低 MDA、NO 水平,同时也能提高 SOD 和 GSH-Px 酶活力。通过 RT-PCR 实验证明,苦丁茶黄酮可上调衰老小鼠肝组织中 nNOS、eNOS、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、CAT 的 mRNA 表达和下调 iNOS 表达。以上的实验结果充分证实了苦丁茶黄酮具有很好的衰老预防作用,且效果优于同浓度的维生素 C。通过本研究的结果将为进一步对苦丁茶黄酮的纯化和抗衰老作用的临床研究提供支持。

参考文献

- [1] 宋朝春,魏冉磊,樊晓兰,等.衰老及抗衰老药物的研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,35(1):163-170.
- [2] 刘俊平.衰老及相关疾病细胞分子机制研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2014,41(3):215-230.
- [3] 赵露露,邓乾春,安杰,等.天然植物及其护肤功效[J].当代化工,2016,45(7):1540-1542.
- [4] Zhao X, Wang Q, Qiao Y, et al. Ilex kudingcha C.J. Tseng (Kudingcha) has *in vitro* anticancer activities in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells and exerts anti-metastatic effects *in vivo* [J]. *Oncology Letters*, 2013, 5(5):1744-1748.
- [5] 冯霞,赵欣.苦丁茶对 SD 大鼠的胃损伤预防效果[J].现代食品科技,2014,30(4):21-25.
- [6] 王睿,赵欣.苦丁茶香气成分分析和体外功能性效果研究[J].食品工业科技,2013,35(8):131-134.
- [7] 刘佳,焦士蓉,唐远谋,等.苦丁茶多酚的提取及抗氧化活性[J].食品科学,2011,32(14):134-138.
- [8] 金亚香,孙晶,李洪军.大叶苦丁茶抗氧化成分的提取及活性的比较研究[J].食品工业科技,2015,36(4):151-158.
- [9] 赵欣,王睿,庞谅,等.苦丁茶黄酮通过 caspases 活化诱导人 HSC-3 口腔癌细胞凋亡的效果[J].现代食品科技,2015,31(4):1-7.
- [10] 吕雨晴,许海丹,鲍洁.不同方法提取苦丁茶黄酮及其抗氧化活性研究[J].食品与发酵科技,2016,52(4):37-40,60.
- [11] 黄爱玲.黄酮类化合物药理作用研究进展[J].安徽农学通报,2007,13(10):71-72.
- [12] 张倩茹,南莹,娄方明,等.女贞属苦丁茶中总黄酮的含量测定[J].遵义医学院学报,2011,34(1):79-81.
- [13] 冯霞,赵欣.不同容器发酵水豆豉预防 CCl₄ 诱导肝损伤的研究[J].现代食品科技,2016,37(7):338-342.

- [14] 邵承斌,张玲,黄娟,等.大孔吸附树脂分离纯化川明参茎叶中的总黄酮[J].华西药理学杂志,2009,24(6):576-579.
- [15] 张静泽,陈虹,白淑芳.大孔吸附树脂在中草药活性成分研究中的应用[J].辽宁中医学院学报,2004,6(4):290-291.
- [16] 杨立刚,孙桂菊,付为琳,等.大孔吸附树脂分离纯化杭白菊黄酮及其成分鉴定[J].食品工业科技,2010,31(8):125-128.
- [17] 季文静,张翠平,魏文挺,等.蜂王浆酶解产物对 D-半乳糖模型小鼠体内抗衰老的作用[J].中国食品学报,2016,16(1):18-25.
- [18] 景波,吕程,李顺旭,等.苜蓿多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用[J].中药材,2015,38(12):2563-2567.
- [19] 钟萍,李萍,张昕蕾.当归多糖对小鼠化学性肝损伤抗氧化酶及一氧化氮含量的影响[J].现代预防医学,2011,38(22):4725-4727.
- [20] 万全,王艳梅,林琳,等.黄缘盒龟多肽对 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠抗氧化能力的影响[J].现代食品科技,2013,29(9):2075-2080.
- [21] 胡志红,林搏浩,王晓娜,等.山茱萸果核水提取物对 D-半乳糖致衰老模型小鼠抗氧化能力的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(16):3906-3908.
- [22] 周意,栾洁,蒋静娴,等.玛咖多糖对 D-半乳糖衰老模型小鼠免疫器官的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(19):121-125.
- [23] 吴晓强,王琰萍,余波,等.丰富环境对快速衰老小鼠行为及一氧化氮合成酶表达的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2015,18(24):4-6.
- [24] Wultsch T, Chourbaji S, Fritzen S, et al. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals[J]. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 2007, 72(72):69-85.
- [25] Austin SA, Santhanam AV, Katusic ZS. Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein[J]. *Circulation Research*, 2010, 107(12):1498-502.
- [26] Darra E, Rungtatscher A, Carcereri De Prati A, et al. Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 104(2):200-206.
- [27] 吕翠岩,张胜容,徐瞰海,等.中药复方糖痹康改善氧化应激的分子机制探讨[J].中华中医药学刊,2016(3):529-531.

(上接第 279 页)

- [14] Potash M J, Chao W, Bentsman G, et al. A mouse model for study of systemic HIV-1 immune responses, and neuroinvasiveness[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(10):3760-3765.
- [15] 彭帅,石磊.环介导恒温扩增法快速检测海产品中的副溶血弧菌[J].生物技术通报,2011(2):184-186.
- [16] Sreenivas R K. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork [J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(9):1470-1474.
- [17] 邱阳,王刚,卢行安. PCR 技术检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因[J].中国微生态学杂志,2004,16(2):115-116.
- [18] 张喆,吕淑霞,祝儒刚,等.单增李斯特菌基因组 DNA 提取方法比较[J].江苏农业科学,2011,39(2):67-69.

- [19] GB 4789.30-2010.食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].中华人民共和国卫生部,2010.
- [20] Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(3):584-640.
- [21] 徐德顺,查赞峰.食品中单核细胞增生李斯特菌实时荧光 PCR 快速检测方法的建立[J].中国人兽共患病学报,2007,23(4):380-383.
- [22] 袁耀武,张亚爽,马晓燕,等. LAMP 检测单核细胞增生性李斯特氏菌的研究[J].中国食品学报,2009,9(3):168-173.
- [23] Shan X X, Zhang Y Q, Zhang Z G. Rapid detection of food borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative Loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(1):101-106.