

## 金线莲-苦荞混合提取物对D-半乳糖致衰老小鼠氧化损伤的改善作用

龚朴双, 胡 或, 段长松, 徐漪沙, 肖 宇

### Effects of *Anoectochilus roxburghii*-*Fagopyrum tataricum* Mixed Extracts on Improving Oxidative Damage Induced by D-Galactose in Aging Mice

GONG Pushuang, HU Yu, DUAN Changsong, XU Yisha, and XIAO Yu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100095>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 苦丁茶黄酮提取物对D-半乳糖致小鼠衰老的改善作用

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

食品工业科技. 2017(16): 303-308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.057>

#### 农大4号'欧李果实花色苷对D-半乳糖致衰老小鼠保护作用研究

Protection Effect of Anthocyanins from the Chinese Dwarf Cherry 'Nongda No 4' on Aging Mouse by D-galactose

食品工业科技. 2020, 41(17): 292-296,307 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.049>

#### 姬松茸多糖的提取及其对D-半乳糖诱导衰老小鼠的免疫调节作用

Extraction of *Agaricus blazei* Polysaccharides and Its Immunomodulatory Effect on D-galactose-induced Aging Mice

食品工业科技. 2019, 40(12): 295-299,308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.048>

#### 沙棘多糖对D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用

Antioxidant Effects of *Hippophae rhamnoides* Polysaccharide on Aging Mouse Induced by D-galactose

食品工业科技. 2020, 41(4): 293-297,306 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.050>

#### 红树莓花色苷对D-半乳糖衰老模型小鼠的保护作用

Protective Effects of Red Raspberry Anthocyanins on D-galactose Induced Mice Aging

食品工业科技. 2019, 40(6): 279-284 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.047>

#### 夏黑葡萄花青素抗氧化活性及对D-半乳糖衰老模型小鼠的保护作用

Antioxidant Activity of Summer Black Grape Anthocyanin and Its Protective Effect on D-galactose Induced Aging Mice

食品工业科技. 2020, 41(3): 22-26,32 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.03.005>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

龚朴双, 胡彧, 段长松, 等. 金线莲-苦荞混合提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠氧化损伤的改善作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(14): 386–395. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100095

GONG Pushuang, HU Yu, DUAN Changsong, et al. Effects of *Anoectochilus roxburghii-Fagopyrum tataricum* Mixed Extracts on Improving Oxidative Damage Induced by D-Galactose in Aging Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(14): 386–395. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100095

· 营养与保健 ·

# 金线莲-苦荞混合提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠氧化损伤的改善作用

龚朴双, 胡 彧, 段长松, 徐漪沙, 肖 宇\*

(成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川成都 610106)

**摘 要:**目的: 研究金线莲-苦荞混合提取物 (*Anoectochilus roxburghii-Fagopyrum tataricum* Mixed Extracts, AFME) 的体外协同抗氧化活性及其抗衰老作用。方法: 制备金线莲、苦荞提取物和不同复配比的 AFME, 通过测定其总黄酮和总酚含量、DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率, 采用等辐射分析法评价金线莲与苦荞的体外协同抗氧化活性; 构建 D-半乳糖衰老小鼠模型, 灌胃给予 AFME (1:1) 低、中、高剂量 (700、1400、2800 mg/kg, 63 d) 和阳性药 (V<sub>C</sub>, 100 mg/kg, 63 d), 评价 AFME 对小鼠体质量、脏器指数、肝脏组织形态、血清和肝脏中氧化损伤等方面的作用。结果: AFME 具有体外协同抗氧化作用, 且 AFME (1:1) 作用最佳; 与对照组相比, 模型组小鼠体重、大脑指数、胸腺指数显著降低 ( $P<0.05$ ), 肝脏指数显著升高 ( $P<0.01$ ); 肝组织切片可见大量肝细胞变性坏死和肝窦扩张等; 血清中超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活力显著降低 ( $P<0.05$ ), 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 显著上调 ( $P<0.01$ ); 肝脏中谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 活力 ( $P<0.01$ ) 及还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 显著下调 ( $P<0.05$ ), MDA 及晚期糖基化终末产物 (Advanced glycation end products, AGEs) 显著上调 ( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。AFME (1:1) 各剂量均能不同程度地缓解模型组小鼠出现的以上异常调节, 且高剂量组可显著增加小鼠体重和大脑及胸腺指数 ( $P<0.05$ )、降低肝脏指数 ( $P<0.01$ )、改善肝脏组织病理损伤, 可显著上调血清中的 SOD 活力及下调 MDA ( $P<0.01$ ), 可显著上调肝脏中的 GSH-Px 活力及 GSH ( $P<0.01$ ) 和下调 AGEs ( $P<0.05$ )。结论: AFME 具有体外协同抗氧化作用, 且 AFME (1:1) 作用最佳。灌胃给予 AFME (1:1) (2800 mg/kg, 63 d) 可显著改善衰老小鼠表现出的体重、大脑指数、胸腺指数、肝脏指数异常, 及肝细胞变性坏死和肝窦扩张等, 对血清及肝脏中的异常氧化应激反应也具有显著的改善作用, 从而可通过减少衰老小鼠体内的氧化损伤, 起到抗衰老的作用。

**关键词:** 金线莲, 苦荞, 混合提取物, 协同抗氧化, D-半乳糖, 衰老

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)14-0386-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100095

本文网刊:



## Effects of *Anoectochilus roxburghii-Fagopyrum tataricum* Mixed Extracts on Improving Oxidative Damage Induced by D-Galactose in Aging Mice

GONG Pushuang, HU Yu, DUAN Changsong, XU Yisha, XIAO Yu\*

(Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

**Abstract:** Objective: To study the synergistic antioxidant activity of *Anoectochilus roxburghii-Fagopyrum tataricum* Mixed Extracts (AFME) *in vitro*, and the effects of AFME on aging in mice exposed to D-galactose. Methods: The synergistic

收稿日期: 2022-10-12

基金项目: 农业农村部杂粮加工重点实验室专项基金项目 (2021HBZ002)。

作者简介: 龚朴双 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 药食同源植物活性成分功效评价, E-mail: 1326259154@qq.com。

\* 通信作者: 肖宇 (1984-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 药食同源植物活性成分功效评价, E-mail: 11593652@qq.com。

antioxidant activity of AFME *in vitro* was evaluated by isoradiation analysis, via determining the contents of total flavonoids and total polyphenols in AFME with different mass ratios of *Anoectochilus roxburghii* and *Fagopyrum tataricum*, and measuring the ability of which to scavenge DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radicals. Low, medium and high dosages of AFME (1:1) (700, 1400, 2800 mg/kg) (AFME-L group, AFME-M group, AFME-H group), and vitamin C (V<sub>C</sub>) (100 mg/kg) (V<sub>C</sub> group) were gavaged to the mice for 63 days, to evaluate the effects of AFME on aging in mice exposed to D-galactose, by measuring the body weight, organ index, liver tissue morphology, and oxidative damage in serum and liver. Results: AFME (1:1) showed the optimum synergistic antioxidant effects *in vitro*. Compared with the control group (C group), the body weight, brain index and thymus index of aging mice were decreased ( $P<0.05$ ), and the liver index was increased ( $P<0.01$ ). Also, a large number of pathological changes such as degeneration and necrosis of hepatocytes and dilatation were observed in liver tissue of aging mice. The activity of superoxide dismutase (SOD) was lowerd ( $P<0.05$ ), and malondialdehyde (MDA) was up-regulated in serum ( $P<0.01$ ) in mice treated with D-galactose. The activity of glutathione peroxide dismutase (GSH-Px) ( $P<0.01$ ), and glutathione (GSH) ( $P<0.05$ ) were down-regulated. MDA ( $P<0.01$ ) and advanced glycation end products (AGEs) ( $P<0.05$ ) were increased in liver of the aging mice. The abnormalities above in the aging mice were improved by different dosages of AFME (1:1). Especially, the higher body weight, the higher brain and thymus index ( $P<0.05$ ), the lower liver index ( $P<0.01$ ), and the improved pathological changes in the liver tissue were observed in AFME-H group. Additionally, the increased activity of SOD ( $P<0.01$ ) and down-regulated MDA ( $P<0.01$ ) in serum, as well as the increased activity of GSH-Px ( $P<0.01$ ), the decreased AGEs ( $P<0.05$ ), and up-regulated GSH ( $P<0.01$ ) in liver were also observed in AFME-H group. Conclusion: AFME (1:1) showed the optimum synergistic antioxidant effects *in vitro*. The abnormalities of body weight, brain index, thymus index, liver index, degeneration and necrosis of hepatocytes, dilatation of hepatic sinuses, and also the oxidative stress in serum and liver in aging mice could be attenuated by treating with AFME (1:1) (2800 mg/kg, i.g., 63 d), in order to slow down the aging, through inhibition of oxidative stress.

**Key words:** *Anoectochilus roxburghii*; *Fagopyrum tataricum*; mixed extracts; synergistic antioxidant; D-galactose; aging

金线莲(*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) 为兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoectochilus*)多年生草本植物。其味温且甜美,能“寓医而食”,是我国闽台地区传统地方特色食品<sup>[1]</sup>。现代研究表明,黄酮、多酚、金线莲苷、多糖是金线莲的主要的活性成分<sup>[2]</sup>,具有保肝、降血脂、降血糖、免疫调节、抗氧化、抗衰老及神经保护等作用<sup>[3-4]</sup>。已研究表明,金线莲黄酮在自然衰老小鼠<sup>[5]</sup>及 D-半乳糖致衰老小鼠<sup>[6]</sup>模型中均表现出一定抗衰老作用,其机制可能与提高机体抗氧化酶活性及降低氧化物水平有关。

苦荞为蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum miller*)双子叶植物苦荞麦(*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn)的干燥成熟种子<sup>[7]</sup>,在我国具有悠久的食用历史,素有“五谷杂粮之王”的美誉<sup>[8]</sup>,是一种珍贵的药食同源杂粮品种。经研究发现,苦荞中不仅富含淀粉、膳食纤维、蛋白质、脂肪、矿物质、维生素等多种常见的营养物质,还含有其它禾谷类粮食所缺乏的酚酸、黄酮、手性肌醇等功能活性成分<sup>[9-10]</sup>,以黄酮含量高而出名,具有抗衰老、抗氧化、抗癌、降血压、降血糖和降胆固醇等多种保健功能<sup>[11-12]</sup>。目前,苦荞茶<sup>[13]</sup>和苦荞发酵酒<sup>[14]</sup>均已被证明具有改善氧化应激致衰老模型小鼠脑、肝组织损伤的作用。

中国是世界上老龄化问题最为严重的国家之一,据统计显示,截至 2020 年,我国 65 岁以上老年人口占总人口比为 13.5%,远高于全球 9.4% 的水平<sup>[15]</sup>。由衰老引起的健康状况下降、人口结构失衡等问题,给个人健康、家庭和社会经济方面造成了严重的危

害和负担<sup>[16]</sup>。由于我国幅员辽阔,药食同源植物资源丰富,将其所含有的多种生物活性成分,与传统中医理论体系的整体观辨证论治的观点相结合,是未来解决复杂性健康问题的重要思路之一<sup>[17]</sup>。鉴于苦荞和金线莲本身即已被证明具有抗氧化及抗衰老的作用,但目前尚未见关于两者复方抗衰老作用的相关报道。中医学理论认为:金线莲清热解毒,苦荞补虚敛汗,二者合用可防清热时伤阳伤阴,以驱邪而不伤正<sup>[18]</sup>,且苦荞味苦、性平寒,而金线莲味甘、性平,二者组方,甘苦并用,亦遵循《内经》主旨<sup>[19]</sup>。本研究在现代药理学研究的基础上结合中医学理论,将金线莲和苦荞进行复配,旨在探究金线莲与苦荞的协同抗氧化活性,并确定其最佳混合比例,考察其对 D-半乳糖致衰老小鼠氧化损伤的改善作用。本研究对于充分挖掘利用我国金线莲和苦荞的功能及经济价值方面具有一定的科学价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

金线莲 福建大地金华生物科技有限公司提供,经成都大学药学院王跃华教授鉴定为兰科开唇兰属植物金线莲(*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.)的干燥全草;苦荞麦 成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室提供,经成都大学药学院王跃华教授鉴定为蓼科荞麦属植物苦荞麦(*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn)的干燥籽粒;D-半乳糖 上海阿达玛斯试剂有限公司;维生素 C(V<sub>C</sub>) 上海国药试剂集团;KM 小鼠 雄性,五周龄,体重(18±2 g),

购于成都达硕实验动物有限公司(生产许可证号: SCXK(川)2020-030), 清洁级; 超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)测定试剂盒 南京建成生物工程研究所; 小鼠晚期糖基化终末产物(AGEs)酶联免疫分析试剂盒 江苏酶免实业有限公司; 芦丁标准品 成都麦德生科技有限公司; 没食子酸标准品、DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力检测试剂盒 北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; 其它试剂 均为分析纯, 购于成都市科隆化学制品有限公司。

BSA124S 精密分析天平 德国赛多利斯实验仪器有限公司; H2050R 台式高速大容量冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; UV-1100 紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; 1550 全波长酶标仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 金线莲提取物、苦荞提取物和金线莲-苦荞混合提取物的制备 通过预实验设计金线莲:苦荞麦(1:1、1:2、2:1)三个不同配比组, 并以总黄酮、总酚、金线莲苷含量为考察指标, 确定以下制备金线莲-苦荞混合提取物的工艺参数: 金线莲和苦荞麦于 60 ℃ 烘箱中干燥至恒重, 经粉碎后过 80 目筛。分别称取金线莲, 苦荞麦, 金线莲:苦荞麦(1:1), 金线莲:苦荞麦(1:2), 金线莲:苦荞麦(2:1), 粉末各 3 g 置于锥形瓶中。分别加入 75% 乙醇 600 mL, 于 60 ℃ 水浴, 500 W, 超声提取 30 min。将提取液于 5000 r/min 离心 10 min 收集滤液。再向滤渣中分别加入 70% 乙醇 600 mL, 于 60 ℃ 水浴, 500 W, 超声提取 30 min。5000 r/min 离心 10 min, 取上清液。合并两次滤液, 于 60 ℃, 减压浓缩后定容至 50 mL, 即得金线莲提取物、苦荞提取物和不同复配比的金线莲-苦荞混合提取物(*Anoectochilus roxburghii-Fagopyrum tataricum* Mixed Extracts, AFME)。

### 1.2.2 主要活性成分的含量测定

1.2.2.1 芦丁标准曲线制备及供试品黄酮含量测定 以(0.2~1.2 mg)芦丁为标准品, 参照 DB35/T 1388-2013《地理标志产品 永安金线莲》黄酮含量测定方法<sup>[20]</sup>, 设置试剂空白对照, 于 500 nm 处测定吸光度, 得到线性回归方程  $A=0.5408C-0.0099$  ( $A$  表示吸光度,  $C$  表示样品中黄酮的质量,  $r=0.9994$ ) 作为标准曲线。取“1.2.1”项下各提取物, 用 70% 乙醇稀释至适宜浓度, 取 1 mL 作为供试品溶液, 按照标准曲线的方法处理样品, 根据标准曲线回归方程计算样品中黄酮含量。

$$\text{总黄酮含量(mg/g)} = \frac{m \times N \times V}{W}$$

式中:  $m$  为根据标准曲线计算的供试品溶液中黄酮的质量, mg;  $N$  为供试品溶液稀释倍数;  $V$  为供

试品溶液总体积, mL;  $W$  为所取样品的质量, g。

1.2.2.2 没食子酸标准曲线制备及供试品总酚含量测定 以(5~25 mg/L)没食子酸为标准溶液。参照 Meng 等<sup>[21]</sup>的方法, 设置试剂空白对照, 于 750 nm 处测定吸光度, 得到线性回归方程  $A=8.0114C+0.0129$  ( $A$  表示吸光度,  $C$  表示样品中总酚的质量浓度,  $r=0.9999$ ) 作为标准曲线。取“1.2.1”项下各提取物, 用 70% 乙醇稀释至适宜浓度, 取 200  $\mu$ L 作为供试品溶液, 按照标准曲线的方法处理样品, 根据标准曲线回归方程计算样品中总酚含量。

$$\text{总酚含量(mg/g)} = \frac{c \times N \times V}{W}$$

式中:  $c$  为根据标准曲线计算的供试品溶液中总酚的质量浓度, mg/L;  $N$  为供试品溶液稀释倍数;  $V$  为供试品溶液总体积, L;  $W$  为所取样品的质量, g。

1.2.3 DPPH 自由基清除率 取“1.2.1”项下各提取物, 用 70% 乙醇配制生药浓度分别为 0.313、0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000 mg/mL 的溶液。设置空白对照及样品对照。按照试剂盒说明书进行操作, 于 515 nm 处测定吸光度。各样品重复测定 3 次, 取均值, 并按以下公式计算清除率:

$$\text{DPPH自由基清除率(\%)} = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

式中:  $A_0$  为空白对照溶液吸光度;  $A_1$  为各样品溶液吸光度;  $A_2$  为各样品对照溶液吸光度。

1.2.4 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率 取“1.2.1”项下各提取物, 用 70% 乙醇配制生药浓度分别为 0.313、0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000 mg/mL 的溶液。设置空白对照及样品对照。按照试剂盒说明书进行操作, 于 405 nm 处测定吸光度。各样品重复测定 3 次, 取均值, 并按以下公式计算清除率:

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率(\%)} = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

式中:  $A_0$  为空白对照溶液吸光度;  $A_1$  为各样品溶液吸光度;  $A_2$  为各样品对照溶液吸光度。

1.2.5 等辐射分析法(Isobolographic analysis) 根据拟合曲线求出三种不同复配比的 AFME 对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基的  $IC_{50\text{mix}}$ , 将两种混合提取物没有相互作用时的理论  $IC_{50}$  值作为  $IC_{50\text{add}}$ 。若  $IC_{50\text{mix}} < IC_{50\text{add}}$ , 说明二者具有协同作用; 若  $IC_{50\text{mix}} > IC_{50\text{add}}$ , 说明二者具有拮抗作用<sup>[22]</sup>。

$$IC_{50\text{add}} = \frac{IC_{50A}}{P_A + R \times P_B}$$

式中:  $IC_{50A}$  为金线莲提取物单独作用时的  $IC_{50}$  值;  $P_A$ 、 $P_B$  分别为金线莲、苦荞在混合组分中占有的比例;  $R$  为金线莲、苦荞两组分单独作用时  $IC_{50}$  的比值, 即  $R=IC_{50A}/IC_{50B}$ 。

通过相互作用指数( $\gamma$ )对金线莲和苦荞相互作用的程度进行表征:  $\gamma=1$  表明组分间具有叠加作用;

$\gamma > 1$  表明组间具有拮抗作用,  $\gamma$  值越大, 说明拮抗作用越强;  $\gamma < 1$  表明组间具有协同作用,  $\gamma$  值越小, 说明其协同作用就越强<sup>[23]</sup>。

$$\gamma = \frac{IC_{50mixA}}{IC_{50A}} + \frac{IC_{50mixB}}{IC_{50B}}$$

式中:  $IC_{50mixA}$  为金线莲在 AFME 中的  $IC_{50}$  权重值, 即  $IC_{50mix} \times P_A$ ;  $IC_{50B}$  为苦荞在 AFME 中的  $IC_{50}$  权重值, 即  $IC_{50mix} \times P_B$ ;  $IC_{50A}$ 、 $IC_{50B}$  分别为金线莲、苦荞单独作用时的  $IC_{50}$  值。

### 1.2.6 动物分组、给药及样品处理

**1.2.6.1 动物分组及给药** 本实验方案开展前已获得成都大学伦理委员会的审查许可。48 只雄性 KM 小鼠, 适应性饲养一周后随机分为对照组(C)、模型组(D-gal)、 $V_C$  阳性药组( $V_C$ )、AFME 低剂量组(AFME-L)、AFME 中剂量组(AFME-M)、AFME 高剂量组(AFME-H), 每组 8 只( $n=8$ )。衰老小鼠氧化损伤模型参照文献报道方法<sup>[24]</sup> 并适当调整。于每日上午固定时间, C 组小鼠给予腹腔注射生理盐水(0.1 mL/10 g), 其余各组小鼠均给予腹腔注射 D-半乳糖(300 mg/kg)。给药与造模同步进行, 均持续 63 d, C 组和 D-gal 组小鼠每日灌胃给予蒸馏水(0.1 mL/10 g),  $V_C$  组灌胃给予  $V_C$ (100 mg/kg), AFME 低、中、高剂量组灌胃给予 AFME(700、1400、2800 mg/kg, 按生药浓度计算)。具体流程及后续实验如图 1 所示。

**1.2.6.2 样品处理** 末次给药 24 h 后收集血清。用生理盐水和多聚甲醛进行心脏灌流, 并于冰上快速分离肝脏、脑、脾脏和胸腺。

**1.2.7 脏器指数测定** 用 4 ℃ 预冷的生理盐水洗净, 去除结缔组织, 吸水纸吸干后, 称取各脏器组织重量, 按以下公式计算各组织的脏器指数:

$$\text{脏器指数(mg/g)} = \frac{\text{脏器重量(mg)}}{\text{小鼠体重(g)}}$$

**1.2.8 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色** 每组随机选取 3 只小鼠的左叶肝脏( $n=3$ ), 用

4 ℃ 预冷的生理盐水清洗后, 置于 4% 多聚甲醛固定 24 h。按照常规操作进行石蜡包埋、制片、HE 染色与镜检。

**1.2.9 生化指标测定** 按照各试剂盒操作说明测定小鼠血清中 SOD 活力和 MDA 含量。取分离后的小鼠右叶 1/4 肝脏, 用 4 ℃ 预冷的生理盐水制备组织匀浆, 于 4 ℃, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清。按照各试剂盒操作说明测定小鼠肝脏组织中 GSH-Px 活力及 GSH、MDA、AGEs 含量。

### 1.3 数据处理

实验数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 SPSS 23.0 及 GraphPad Prism 8.00 进行多样本均数间比较, 并进行两两比较的方差分析。若方差不齐, 将其进行编秩后, 再两两比较进行方差分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 金线莲、苦荞及 AFME 中黄酮和总酚含量测定结果

金线莲和苦荞中含有丰富的黄酮和多酚类物质, 是其发挥抗氧化、抗衰老等诸多功效的重要物质基础<sup>[4,12]</sup>。对金线莲提取物、苦荞提取物及不同复配比的 AFME 中总黄酮和总酚含量进行测定, 结果如表 1 所示。

表 1 显示, 本研究采用的提取条件下制备的各提取物中, 苦荞提取物中的总黄酮、总酚含量最高, 分别为  $32.37 \pm 0.13$ 、 $36.43 \pm 0.21$  mg/g; 金线莲提取物中的总黄酮、总酚含量最低, 分别为  $12.83 \pm 0.09$ 、 $18.12 \pm 0.21$  mg/g; AFME(1:1)中的总黄酮和总酚含量、AFME(1:2)中的黄酮含量高于理论加和值, 且差异具有显著性( $P < 0.01$ ); AFME(1:2)中的总酚含量、AFME(2:1)中的总黄酮和总酚含量与理论加和值相比较, 无显著性差异( $P > 0.05$ )。研究表明, 苦荞全谷中总酚主要包括芦丁、槲皮素、桑色素、山奈酚、儿茶素类等<sup>[25]</sup>。金线莲中总黄酮主要为槲皮素、山奈酚、异鼠李素及其衍生物等<sup>[26]</sup>。苦荞和金线莲

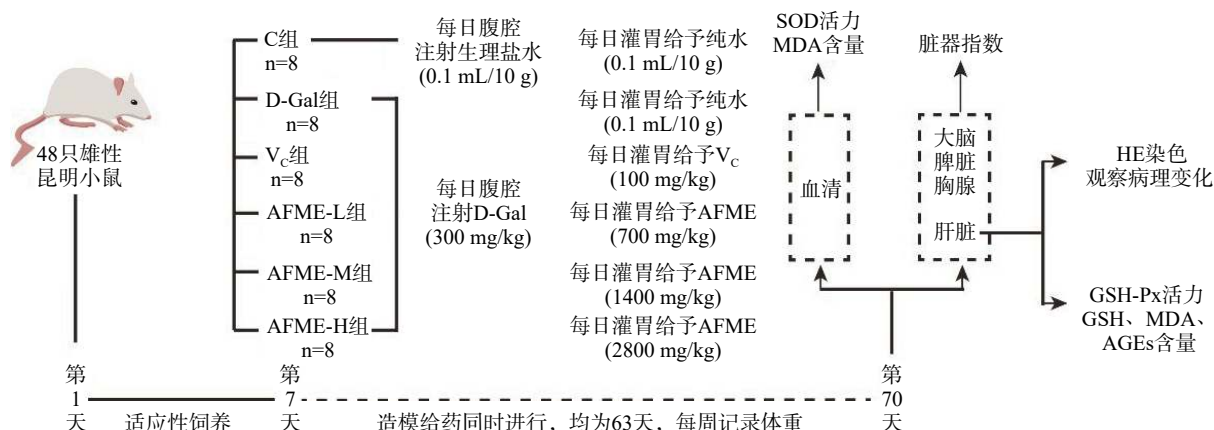


图 1 动物实验流程图

Fig.1 Flow chart of animal experiment

表 1 金线莲提取物、苦荞提取物及 AFME 中总黄酮与总酚的含量

Table 1 Contents of total flavonoids and total polyphenols in *Anoectochilus roxburghii* extract, *Fagopyrum tataricum* extract and AFME

活性成分		总黄酮(mg/g)	总酚(mg/g)
金线莲提取物		12.83±0.09	18.12±0.21
苦荞提取物		32.37±0.13	36.43±0.21
AFME(1:1)	实际测量值	23.64±0.13**	28.52±0.21**
	理论加和值	22.60±0.09	27.27±0.10
AFME(1:2)	实际测量值	26.54±0.16**	30.60±0.42
	理论加和值	25.86±0.10	30.32±0.12
AFME(2:1)	实际测量值	19.35±0.06	24.71±0.32
	理论加和值	19.35±0.09	24.22±0.12

注:各比例AFME实际测量值与理论加和值相比,\*\*表示存在极显著性差异( $P<0.01$ );\*表示存在显著性差异( $P<0.05$ )。

中的总黄酮和总酚类物质因具有多酚羟基的结构,具有较强的抗氧化性,其抗氧化活性与酚羟基的位置和数量有关<sup>[27]</sup>。在本研究的提取条件下,苦荞和金线莲中的黄酮(多酚)类物质等抗氧化活性成分不可避免地会被氧化破坏。由于不同成分间抗氧化活性的差异,在两者混合提取时,苦荞和金线莲中的部分抗氧化成分较单独提取时可能被更多地保留了下来。因此,在采用本研究的总黄酮、总酚含量测定方法进行测定时,AFME 中的总黄酮、总酚含量相较于单独提取物更高。结果提示,金线莲与苦荞复配提取可提高 AFME 中总黄酮和总酚的含量,且复配比例为 1:1 时,总黄酮与总酚的增长率最高。

## 2.2 金线莲、苦荞及 AFME 的体外抗氧化活性

DPPH 法、ABTS<sup>+</sup>法是基于电子转移途经的自由基清除法,被广泛应用于评价抗氧化剂的体外抗氧化能力<sup>[28]</sup>,通常,抗氧化剂对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基清除的 IC<sub>50</sub> 值越小说明自由基清除能力越强。对金线莲、苦荞及不同复配比的 AFME 对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基清除率进行测定,评价各提取物的体外抗氧化能力,结果如图 2 所示。

图 2 显示,随着金线莲、苦荞和 AFME 生药浓度增加,DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基清除率逐渐升高,呈现出一定的量效关系。各提取物清除 ABTS<sup>+</sup>自由基能力高于 DPPH。经 SPSS 拟合后,计算得到的 IC<sub>50</sub> 值的结果显示,各提取物对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 值由小到大依次为:苦荞(IC<sub>50</sub>=3.460 mg/mL)<AFME(1:2)(IC<sub>50</sub>=4.419 mg/mL)<AFME(1:1)(IC<sub>50</sub>=5.118 mg/mL)<AFME(2:1)(IC<sub>50</sub>=6.894 mg/mL)<金线莲(IC<sub>50</sub>=14.310 mg/mL);各提取物对 ABTS<sup>+</sup>自由基的 IC<sub>50</sub> 值由小到大依次为苦荞(IC<sub>50</sub>=1.588 mg/mL)<AFME(1:2)(IC<sub>50</sub>=2.140 mg/mL)<AFME(1:1)(IC<sub>50</sub>=2.618 mg/mL)<AFME(2:1)(IC<sub>50</sub>=3.786 mg/mL)<金线莲(IC<sub>50</sub>=12.350 mg/mL)。结果提示,各提取物的体外抗氧化活性由高到低依次为:苦荞>AFME(1:2)>AFME(1:1)>AFME(2:1)>金线莲。

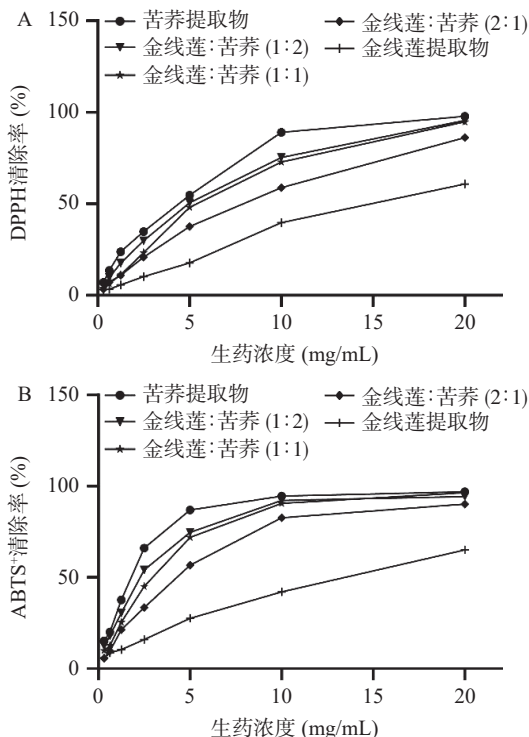


图 2 金线莲提取物、苦荞提取物及 AFME 对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基清除作用

Fig.2 The DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging ability of *Anoectochilus roxburghii* extract, *Fagopyrum tataricum* extract and AFME

## 2.3 金线莲与苦荞的协同抗氧化作用

等辐射分析法是研究药物之间相互作用的常用方法,可以快速有效地评价不同物质之间的复配效应,目前已被应用于食品抗氧化相互作用的分析中<sup>[29]</sup>。通过等辐射分析法对三种不同复配比的 AFME 的体外相互作用进行评价。按“1.2.5”项下公式,计算不同复配比的 AFME 清除 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基的 IC<sub>50add</sub> 值和  $\gamma$  值,结果见表 2。

表 2 不同复配比的 AFME 对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基的 IC<sub>50mix</sub> 值、IC<sub>50add</sub> 值和  $\gamma$  值

Table 2 IC<sub>50mix</sub>, IC<sub>50add</sub>,  $\gamma$  values of DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging by AFME with different mass ratios of *Anoectochilus roxburghii* and *Fagopyrum tataricum*

自由基	金线莲:苦荞比例	IC <sub>50mix</sub>	IC <sub>50add</sub>	$\gamma$
DPPH	1:1	5.118	5.573	0.918
	1:2	4.419	4.630	0.954
	2:1	6.894	6.997	0.985
ABTS <sup>+</sup>	1:1	2.618	2.814	0.930
	1:2	2.140	3.789	0.999
	2:1	3.786	4.071	0.973

表 2 显示,不同复配比 AFME 的 IC<sub>50mix</sub> 值均小于 IC<sub>50add</sub> 值,各组  $\gamma$  值均小于 1。其中,AFME(1:1)对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基均表现出最强的协同清除作用, $\gamma$  值分别为 0.918 和 0.930。目前已知的关于抗氧化剂复配后发挥协同作用的机理,主要有修复再

生或新生、偶联氧化、吸收氧气、改变酶的活性、络合金属离子等<sup>[30]</sup>。龚茵茵等<sup>[31]</sup>将 C6-C3-C6 型槲皮素、儿茶素与 C6-C3 型绿原酸、原儿茶酸四种单体多酚两两复配后, 进行体外协同抗氧化活性研究, 结果表明不同结构类型的多酚组合更易表现出协同作用, 而结构类型相同的多酚组合则拮抗作用更明显。金线莲中黄酮类物质主要为槲皮素、异鼠李素、山萘酚及其衍生物<sup>[1]</sup>, 苦荞中黄酮类物质则主要为芦丁, 占其类黄酮总量的 50%~80%, 芦丁在高温及遇水等条件下易脱去一分子鼠李糖和葡萄糖转化为槲皮素<sup>[25]</sup>, 故 AFME 中黄酮类物质多以 C6-C3-C6 构型的槲皮素形式存在。苦荞中的酚酸类成分主要为原儿茶酸和对羟基苯甲酸<sup>[25]</sup>, 与金线莲复配时或许会因结构差异产生抗氧化协同作用。此外, 还有研究表明, 复配体系中, 抗氧化能力相对较弱的成分可对抗氧化能力较强的成分产生修复再生作用, 形成氧化还原闭环, 从而产生协同抗氧化作用。如段方娥等<sup>[32]</sup>的研究表明, 辣椒素可对抗氧化能力相对较强的槲皮素和芦丁产生修复再生作用, 从而增强复配体系的抗氧化能力。因此, 根据本研究结果推测, 金线莲与苦荞复配时, 抗氧化能力相对较弱的原儿茶酸可能对抗氧化能力较强的槲皮素产生修复再生作用, 从而增强了 AFME 清除 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基的能力。结果提示, 金线莲与苦荞复配后在 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力方面存在协同效应, 并且协同效应的程度与配伍比例相关。对上述两种自由基的协同清除作用排序均为 AFME(1:1)>AFME(1:2)>AFME(2:1)。

2.4 AFME 对衰老模型小鼠一般体征及体质量的影响

通过对实验过程中小鼠日常体征行为学观察发现: 实验初期各组小鼠行为活跃, 毛色正常, 进食量大, 反抗能力强, 难以抓取, 随着实验进行, 小鼠反抗较弱。模型组小鼠与对照组相比, 反应迟钝, 倦怠蜷卧, 活动量减少, 毛色枯黄, 皮肤松弛, 小便增加。V<sub>C</sub> 组及 AFME 低、中、高剂量组小鼠日常状态均有所好转且优于模型组, AFME 高剂量组小鼠状态接

近对照组。

体重可以作为机体生理变化的一个指标, 可反映小鼠的生长发育情况。本实验周期内每周称量并记录一次小鼠的体重, 结果如图 3 所示。结果显示, 实验开始前小鼠平均体质量大致相同, 组间无显著差异( $P>0.05$ )。造模及给药前期, 各组小鼠体重增长较快, 随后趋于平稳。造模 5 周后, 与对照组相比, 模型组小鼠体重显著降低( $P<0.05$ ), 与模型组相比, 其余给药各组小鼠体重与模型组体重相近, 组间无显著差异( $P>0.05$ )。在第 6 周~第 9 周期间, 模型组小鼠体重总体低于其他各组。造模结束后, 与对照组相比, 模型组小鼠体重显著降低( $P<0.01$ ), 与模型组相比, V<sub>C</sub> 组与 AFME 高剂量组小鼠体重显著提高( $P<0.05$ )。结果提示, 随着动物的衰老其体重会下降, AFME 具有缓解衰老小鼠体重下降的作用, 且高剂量组作用优于 V<sub>C</sub> 组。

2.5 AFME 对衰老模型小鼠脏器指数的影响

脏器指数的变化可以反映出各器官的衰老情况, 与各器官功能状态密切相关。大脑萎缩表明小鼠神经衰老的发生<sup>[33]</sup>。作为机体重要的免疫器官, 胸腺和脾脏的增龄性退化是免疫衰老的直接原因<sup>[34]</sup>。肝脏是机体主要的代谢器官, 能发挥抗氧化、储存糖原、蛋白质合成等重要生理作用, 在 D-半乳糖致衰老小鼠模型中表现出肝硬化、肝肿大的状态<sup>[35]</sup>。各组小鼠脏器色泽鲜艳, 对其脏器系数进行测定, 结果见表 3。

表 3 AFME 对衰老模型小鼠脏器指数的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )  
Table 3 Effects of AFME on organ indexes of aging model mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

分组	剂量 (mg/kg)	脏器指数(mg/g)			
		大脑	肝脏	胸腺	脾脏
对照组	/	13.38±1.10	51.94±3.85	0.74±0.13	3.49±0.37
模型组	300	11.68±1.42 <sup>*</sup>	60.27±3.63 <sup>**</sup>	0.57±0.17 <sup>*</sup>	3.26±0.50
V <sub>C</sub> 组	100	12.95±0.76 <sup>#</sup>	53.26±3.09 <sup>##</sup>	0.70±0.26	3.43±0.34
AFME低剂量组	700	12.64±1.24	54.75±6.86	0.62±0.28	3.32±0.31
AFME中剂量组	1400	12.54±1.47	53.13±3.70 <sup>##</sup>	0.71±0.17	3.43±0.34
AFME高剂量组	2800	13.05±1.05 <sup>#</sup>	51.36±5.28 <sup>##</sup>	0.76±0.19 <sup>#</sup>	3.31±0.35

表 3 显示, 小鼠腹腔注射 D-半乳糖 9 周后, 与对照组相比, 模型组小鼠的大脑指数、胸腺指数显著降低( $P<0.05$ ), 肝脏指数显著升高( $P<0.01$ ), 脾脏指数降低, 但无显著性差异。说明小鼠出现一定程度的大脑、脾脏和肾脏萎缩, 同时肝脏出现了肿大现象。本结果提示, 随着动物衰老的发生, 小鼠的大脑、肝脏、脾脏出现功能减退, 生命质量下降, 表明成功建立衰老模型。该结果与张雨曦等<sup>[36]</sup>建立 D-半乳糖致衰老小鼠的脏器指数测定结果一致。与模型组相比, AFME 低剂量组对大脑、肝脏、胸腺及脾脏脏器指数无显著影响( $P>0.05$ ); AFME 中剂量组肝脏指数极显著降低( $P<0.01$ ), 对大脑、胸腺及脾脏脏器指数无显著影响( $P>0.05$ ); AFME 高剂量组肝脏指数

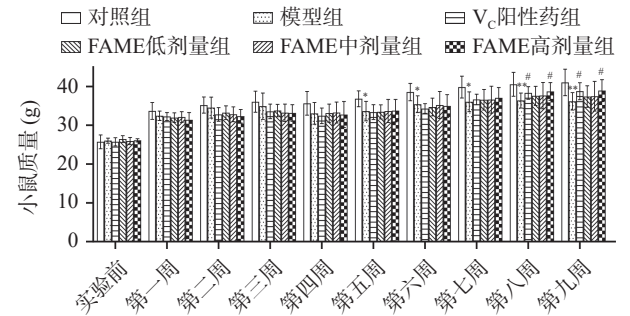


图 3 AFME 对衰老模型小鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )  
Fig.3 Effects of AFME on body weight of aging model mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

注: 与对照组相比, \*\*表示存在极显著性差异( $P<0.01$ ), \*表示存在显著性差异( $P<0.05$ ), ns 表示无显著性差异; 与模型组相比, ##表示存在极显著性差异( $P<0.01$ ); #表示存在显著性差异( $P<0.05$ ); ns 表示无显著性差异; 表 3、图 5~图 6 同。

极显著降低( $P<0.01$ ), 大脑及胸腺指数显著提高( $P<0.05$ ), 对脾脏指数无显著影响( $P>0.05$ )。结果提示, AFME 对于衰老引起的脑组织萎缩、肝脏肿大及免疫功能下降有缓解作用, 且高剂量组改善作用优于  $V_C$  组。

## 2.6 AFME 对衰老模型小鼠肝组织形态的影响

氧化损伤对肝脏组织的影响十分明显, 对衰老模型肝脏组织的观察是评价小鼠衰老程度的一个重要指标<sup>[37]</sup>。各组小鼠左叶肝脏组织切片结果如图 4 所示。

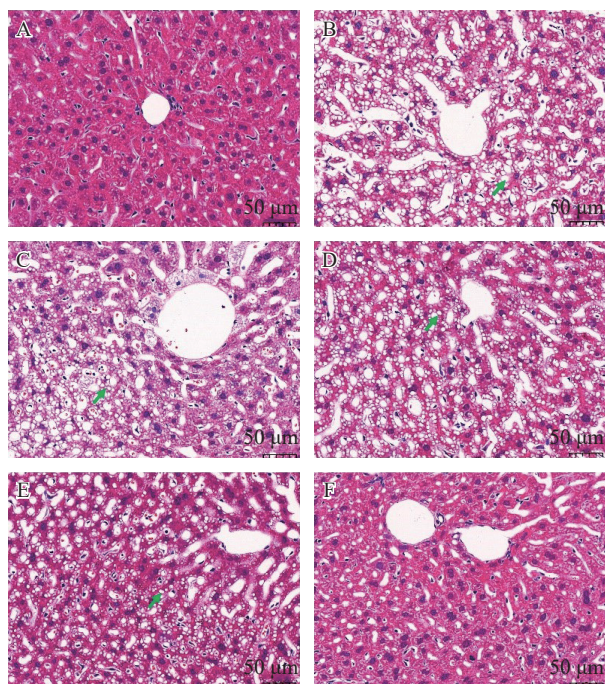


图 4 小鼠肝组织切片 HE 染色结果(400×)

Fig.4 HE staining results of mice liver tissue sections (400×)  
注: A~F 分别代表对照组、模型组、 $V_C$  组、AFME 低剂量组、AFME 中剂量组、AFME 高剂量组。

图 4 显示, 对照组小鼠肝脏组织被膜完整, 肝索排列较为整齐, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列, 形态正常, 未见明显变性坏死, 肝窦结构正常, 未见明显病理改变。模型组肝索排列较为紊乱, 出现大量肝细胞变性, 炎性细胞浸润, 可见胞质内含不着色、边缘光滑的细小圆形脂滴或空泡, 肝窦扩张等明显病理改变。 $V_C$  组肝脏组织被膜完整, 部分肝细胞轻度变性, 或见变性肝细胞着色不均, 胞质嗜碱性增强。AFME 低剂量组肝脏组织被膜完整, 肝索排列略紊乱, 部分肝细胞轻度变性, 局部肝窦扩张。AFME 中剂量组肝索排列较为整齐, 有少量肝细胞可见轻微变性。AFME 高剂量组肝脏组织被膜完整, 肝小叶结构及形态正常, 肝索排列较整齐, 肝细胞排列整齐, 未见明显变性坏死, 肝窦结构正常, 未见明显病理改变。结果提示, 模型组小鼠肝细胞形态异常, 观察到大量肝细胞变性坏死和肝窦扩张等病理改变, 与模型组相比, AFME 低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳组的病变不同程度地减轻, AFME 高剂量组改善作

用相对明显, 且效果优于  $V_C$  组。

## 2.7 AFME 对衰老模型小鼠抗氧化能力的影响

### 2.7.1 AFME 对衰老模型小鼠血清中 SOD 活力及 MDA 含量的影响

SOD 是机体酶抗氧化系统中唯一以氧自由基为底物的酶, 负责将具有强氧化性、高度不稳定性的超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )转化成氧化性较低且较稳定的过氧化氢( $H_2O_2$ ), 其活性水平的高低能够反映机体清除氧自由基的能力, 通常被认为是考察机体抗氧化防御系统能力的重要指标<sup>[38]</sup>。MDA 是由机体内高浓度的自由基与细胞膜中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应形成的醛基类脂质过氧化物(LOOH), 其含量的高低间接反映了机体氧化损伤的程度<sup>[36]</sup>。对小鼠血清中 SOD 活力和 MDA 含量进行测定, 结果如图 5 所示。

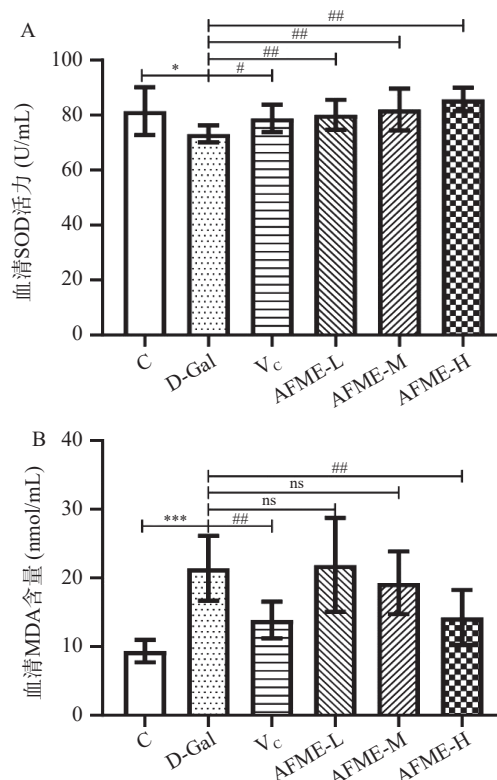


图 5 AFME 对衰老模型小鼠血清中 SOD 活力(A)及 MDA 含量(B)的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

Fig.5 Effects of AFME on the activity of SOD (A) and contents of MDA (B) in serum of aging model mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

图 5 显示, 小鼠腹腔注射 D-半乳糖 9 周后, 与对照组相比, 模型组小鼠血清中 SOD 活力显著下降( $P<0.05$ ), MDA 含量极显著升高( $P<0.01$ )。与模型组相比,  $V_C$  组 SOD 活力显著升高( $P<0.05$ ), MDA 含量极显著下降( $P<0.01$ )。AFME 低、中、高剂量组 SOD 活力极显著升高( $P<0.01$ ); AFME 高剂量组 MDA 含量极显著下降( $P<0.01$ )。结果提示, AFME 能以剂量依赖的方式提高衰老模型小鼠血清中 SOD 活力, 降低 MDA 含量, 且高剂量组作用优于  $V_C$ 。

### 2.7.2 AFME 对衰老模型小鼠肝脏中 GSH-Px 活力

及 GSH、MDA、AGEs 含量的影响 GSH-Px 能将  $H_2O_2$  还原为无害的  $H_2O$ , 从而清除机体内过量的超

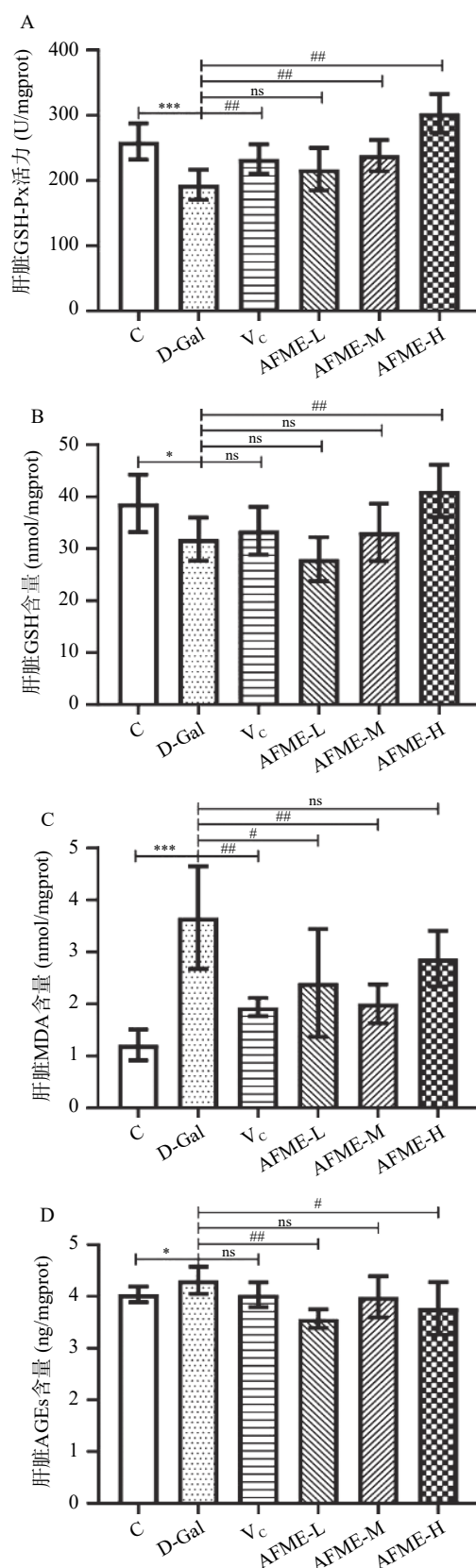


图 6 AFME 对衰老模型小鼠肝脏中 GSH-Px 活力(A)及 GSH(B)、MDA(C)、AGEs(D)含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig.6 Effects of AFME on the activity of GSH-Px (A) and contents of GSH (B), MDA (C), AGEs (D) in liver of aging model mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

氧阴离子自由基。此外, GSH 可以保护机体细胞中蛋白质分子的巯基(-SH)免遭氧化, GSH-Px 还能特异性地将还原型谷胱甘肽(GSH)转化为氧化型谷胱甘肽(GSSG), 因而 GSH-Px 活性及 GSH 的含量是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素<sup>[39]</sup>。AGEs 是蛋白质、脂质、核酸等大分子上的游离氨基在非酶促条件下, 与还原糖经过一系列复杂的反应后形成的不可逆产物, 并伴随年龄的增长而增多。AGEs 的堆积可诱导细胞内氧应激水平增加, 使组织细胞受损的同时又可促进非酶糖基化, 是机体衰老标志物之一<sup>[5]</sup>。对小鼠肝脏中 GSH-Px 活力及 GSH、MDA、AGEs 含量进行测定, 结果见图 6。

图 6 显示, 小鼠腹腔注射 D-半乳糖 9 周后, 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏中 GSH-Px 活力及 GSH 含量显著下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), MDA 含量及 AGEs 含量显著升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与模型组相比,  $V_c$  组 GSH-Px 活力显著升高( $P<0.05$ ), MDA 含量极显著下降( $P<0.01$ ); AFME 低剂量组 MDA 含量及 AGEs 含量显著下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); AFME 中剂量组 GSH-Px 活力极显著升高( $P<0.01$ ), MDA 含量极显著下降( $P<0.01$ ); AFME 高剂量组 GSH-Px 活力及 GSH 含量极显著升高( $P<0.01$ ), AGEs 含量显著下降( $P<0.05$ )。结果提示, AFME 各剂量组均能在一定程度提高机体抗氧化因子的水平, 发挥抗氧化作用, 且高剂量组对提高 GSH-Px 活力及 GSH 含量, 降低 AGEs 含量的作用优于  $V_c$ 。

### 3 结论

本研究在现代药理学研究的基础上, 结合中医理论, 将金线莲与苦荞进行复配提取。证实了 AFME 具有体外协同抗氧化作用, 且 AFME(1:1)作用最佳。通过 D-半乳糖致衰老小鼠动物模型评价了 AFME(1:1)的抗衰老作用。结果表明, 与模型组相比, 连续 63 d 向衰老模型小鼠灌胃给予 AFME(1:1)低、中、高剂量(700、1400、2800 mg/kg), 各剂量均能不同程度地减轻模型小鼠的衰老症状。其中, AFME(1:1)高剂量组可显著提高小鼠体重、大脑及胸腺指数( $P<0.05$ ), 显著降低肝脏指数( $P<0.01$ ); 并且能够改善衰老小鼠肝脏组织中肝细胞变性坏死和肝窦扩张等, 显著提高血清中 SOD 活力, 降低 MDA 含量( $P<0.01$ ); 同时, 可显著提高肝脏中 GSH-Px 活力及 GSH 含量( $P<0.01$ ), 并显著降低 AGEs 含量( $P<0.05$ )。本研究结果表明, 灌胃给予 AFME(1:1) (2800 mg/kg, 63 d)可显著改善衰老小鼠表现出的体重、大脑指数、胸腺指数、肝脏指数异常, 及肝细胞变性坏死和肝窦扩张等, 对血清及肝脏中的异常氧化应激反应也具有显著的改善作用, 从而可通过减少衰老小鼠体内的氧化损伤, 起到抗衰老的作用。

综上, 本研究为金线莲和苦荞在新型复合抗衰老保健食品的研发方面, 提供了理论支持, 对于充分

挖掘利用我国金线莲和苦荞的功能及经济价值方面具有一定的科学价值。但 AFME 中发挥抗氧化及抗衰老作用的具体物质基础还不明确, 尚需进一步地深入研究。

### 参考文献

- [1] YE S Y, SHAO Q S, ZHANG A L. *Anoectochilus roxburghii*: A review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 209: 184–202.
- [2] WANG Y Q, ZUO R, WANG Z W, et al. Kinsenoside ameliorates intervertebral disc degeneration through the activation of AKT-ERK1/2-Nrf2 signaling pathway[J]. *Aging*, 2019(18): 7961–7977.
- [3] 马娟. 金线莲 (*Anoectochilus roxburghii*) 提取物保肝护肝作用及其物质基础研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014. [MA J. Study on the hepatoprotective effect and material basis of *Anoectochilus roxburghii* extracts[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014.]
- [4] 刘英孟, 张海燕, 汪镇朝, 等. 金线莲的研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(1): 186–192. [LIU Y M, ZHANG H Y, WANG Z C, et al. Research progress of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2022, 44(1): 186–192.]
- [5] 曾芷筠, 陈强威, 江涛, 等. 金线莲乙醇提取物对自然衰老小鼠抗衰老作用的研究[J]. 中药材, 2020, 43(5): 1200–1204. [ZENG Z J, CHEN Q W, JIANG T, et al. Study on the anti-aging effect of ethanol extract from *Anoectochilus roxburghii* in senescent mice[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2020, 43(5): 1200–1204.]
- [6] WANG L P, CHEN Q W, ZHUANG S Q, et al. Effect of *Anoectochilus roxburghii* flavonoids extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress in LO2 cells and D-gal induced aging mice model[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 254: 112670.
- [7] 沈灵智, 盛宇华, 鲁清峰, 等. 苦荞功能性及食品开发研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 192–199. [SHEN L Z, SHENG Y H, LU Q F, et al. Progress in functional research and food development of tartary buckwheat[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(19): 192–199.]
- [8] 闫文杰, 段昊, 吕燕妮, 等. 苦荞在我国保健食品中的应用进展[J]. 食品科技, 2021, 46(6): 55–61. [YAN W J, DUAN H, LÜ Y N, et al. Application progress of tartary buckwheat in health food in china[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(6): 55–61.]
- [9] JING R, LI H Q, HU C L, et al. Phytochemical and pharmacological profiles of three fagopyrum buckwheats[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 589.
- [10] 钟灵允, 赵钢, 赵江林. 荞麦黄酮及其生物合成调控研究进展[J]. 广西植物, 2021, 41(6): 1021–1034. [ZHONG L Y, ZHAO G, ZHAO J L. Research progress on buckwheat flavonoids and their biosyntheses and regulations[J]. *Guihaia*, 2021, 41(6): 1021–1034.]
- [11] LÜ L J, XIA Y, ZOU D Z, et al. *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.: A review on its traditional uses, phytochemical and pharmacology[J]. *Food Science and Technology Research*, 2017, 23(1): 1–7.
- [12] 蒲升惠, 高颖, 赵志峰, 等. 苦荞中活性物质及其保健功效研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 331–336. [PU S H, GAO Y, ZHAO Z F, et al. Research progress on bioactive components and health benefits of tartary buckwheat[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(8): 331–336.]
- [13] 李颖, 许秀举, 邓洋. 苦荞茶对衰老小鼠肝组织 SOD 和 MDA 影响的研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(18): 42–43, 133. [LI Y, XU X J, DENG Y. Study the effect of buckwheat tea on liver tissue SOD and MDA of aging mice[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(18): 42–43, 133.]
- [14] 王秀萍, 邹亮, 王战国, 等. 苦荞发酵酒抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2015, 36(5): 129–133. [WANG X P, ZOU L, WANG Z G, et al. Study on anti-oxidation activity of tartary buckwheat fermented wine[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(5): 129–133.]
- [15] 刘厚莲. 世界和中国人口老龄化发展态势[J]. 老龄科学研究, 2021, 9(12): 1–16. [LIU H L. Trends of population aging in china and the world as a whole[J]. *Scientific Research on Aging*, 2021, 9(12): 1–16.]
- [16] MARTA G F, ALBERTO D R, DAVID H, et al. The road ahead for health and lifespan interventions[J]. *Ageing Research Reviews*, 2020, 59: 101037.
- [17] 杨艺辉, 任利文, 郑湘锦, 等. 抗衰老靶点及药物的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(16): 1282–1290. [YANG Y H, REN L W, ZHENG X J, et al. Research progress of anti-aging related targets and anti-aging drugs[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2021, 56(16): 1282–1290.]
- [18] 廖水亨. 闽台名医临证处方用药配伍特色研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2017. [LIAO S H. Study on clinical prescriptions and drug compatibility features of Fujian and Taiwan famous doctors of traditional chinese medicine[D]. Fozhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2017.]
- [19] 卫向龙, 许二平. 《脾胃论》甘苦配伍法探析[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2424. [WEI X L, XU E P. Analysis on the compatibility of sweet and bitter in spleen and stomach[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica*, 2010, 21(10): 2424.]
- [20] 福建省质量技术监督局. DB 35/1388—2013 地理标志产品永安金线莲[S]. 福建: 中国标准出版社, 2014: 10–11. [Fujian Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. DB 35/1388—2013 Geographical indication product Yong'an golden lotus[S]. Fujian: China Standards Publishing House, 2014: 10–11.]
- [21] MENG F B, LEI Y T, LIU D Y, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* fermentation on antioxidant activity and metabolomic profiles of loquat juice[J]. *LWT*, 2022, 171: 114104.
- [22] 吕平, 潘思轶. 陈皮与普洱茶总黄酮的协同抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 59–64. [LÜ P, PAN S Y. Synergistic antioxidant effects of total flavonoids from tangerine peel and pu'er tea[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(3): 59–64.]
- [23] 史文娟. 罗布麻和红三叶中多糖与黄酮的抗氧化活性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020. [SHI W J. The study on antioxidant activities of polysaccharide and flavonoid in *Apocynum venetum* L. and *Trifolium pratense* L.[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2020.]
- [24] ALI T, BADSHAH H, KIM T H, et al. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- $\kappa$ B/JNK signaling pathway in aging mouse model[J]. *Journal of Pineal Research*, 2014(1): 71–85.
- [25] 蔡启玲, 李小平, 丁欣欣. 加工方式对苦荞中的多酚及其抗氧化活性的影响研究进展[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(8): 305–313. [CAI Q L, LI X P, DING X X. Research progress on effects of processing methods on polyphenols and antioxidant activities in tartary buckwheat[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils*, 2022, 37(8): 305–313.]
- [26] 吴佳溶. 不同地理种源金线莲有效成分含量测定及 SRAP 标记[D]. 福州: 福建农林大学, 2012. [WU J R. Determination of effective components and SRAP analysis of *Anoectochilus*

- roxburghii* in different geographical provenances[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012. ]
- [ 27 ] 孙庆雷, 王晓, 刘建华, 等. 黄酮类化合物抗氧化反应性的构效关系[J]. 食品科学, 2005(4): 69–73. [ SUN Q L, WANG X, LIU J H, et al. Study on structure antioxidation relationship of plant flavonoids[J]. Food Science, 2005(4): 69–73. ]
- [ 28 ] 刘玉婷, 李井雷. 多糖体外抗氧化活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(6): 214–219. [ LIU Y T, LI J L. Advances in research on antioxidant activity of polysaccharides *in vitro*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(6): 214–219. ]
- [ 29 ] 潘瑶, 郑时莲, 邹兴平, 等. 葡萄、芒果、草莓乙醇提取物抗氧化活性组分分析及其抗氧化相互作用[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 133–140. [ PAN Y, ZHENG S L, ZOU X P, et al. Analysis of antioxidant compounds in ethanol extracts of grape, mango and strawberry and their interactions[J]. Food Science, 2017, 38(4): 133–140. ]
- [ 30 ] 高静. 天然抗氧化剂及其协同作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 1859–1864. [ GAO J. Natural antioxidants and synergistic effects[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(6): 1859–1864. ]
- [ 31 ] 龚茵茵, 杨大伟. C6-C3-C6 与 C6-C3 型单体多酚体外协同抗氧化活性[J]. 食品与营养科学, 2016(3): 87–89. [ GONG Y Y, YANG D W. Synergistic antioxidant properties of C6-C3-C6 polyphenol monomer with C6-C3 *in vitro*[J]. Hans Journal of Food and Nutrition Science, 2016(3): 87–89. ]
- [ 32 ] 段方娥, 何强. 辣椒素与槲皮素、芦丁协同抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 294–299. [ DUAN F E, HE Q. Synergistic antioxidant effect of capsaicin with quercetin or rutin[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(10): 294–299. ]
- [ 33 ] 刘建亚, 冯文静, 王仁萍, 等. D-半乳糖致衰老动物模型及其机制研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(3): 224–227. [ LIU J Y, FENG W J, WANG R P, et al. Research progress in D-galactose induced aging animal model and its mechanisms[J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2018, 17(3): 224–227. ]
- [ 34 ] 邢秋娟, 施杞, 王拥军. D-半乳糖诱导衰老动物模型的机制及其在中医药方面的应用[J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(3): 93–98. [ XING Q J, SHI J, WANG Y J. Mechanism of establishing aging model with D-galactose and its application in research of traditional chinese medicine[J]. Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2010, 24(3): 93–98. ]
- [ 35 ] 汪学德. 亚临界萃取芝麻脂溶性和水溶性木酚素及其生物活性研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2016. [ WANG X D. Subcritical extraction of fat-soluble and water-soluble lignans of sesame and their's bioactivity[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2016. ]
- [ 36 ] 张雨曦, 曾丹. 菊花三七胶囊及其功效成分对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗氧化作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(11): 3627–3635. [ ZHANG Y X, ZENG D. Antioxidant effects of *Chrysanthemum-Panax notoginseng* capsule and its functional components on senescent model mice induced by D-galactose[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(11): 3627–3635. ]
- [ 37 ] ZHAO Y L, YANG Y, LI Q, et al. Understanding the unique microenvironment in the aging liver[J]. Frontiers in Medicine, 2022(9): 842024.
- [ 38 ] 崔明宇, 尹义凤, 朱凤梅, 等. 蓬子菜总黄酮对 D-半乳糖致过氧化损伤大鼠 SOD、MDA 和 GSH-Px 水平的影响[J]. 中医药学报, 2021, 49(12): 47–51. [ CUI M Y, YING Y F, ZHU F G, et al. Effects of FVGL (flavonoids from *Galium verum* L.) on levels of SOD, MDA and GSP-Px in rats with oxidative damage induced by D-galactose[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2021, 49(12): 47–51. ]
- [ 39 ] HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *Journal of Gerontology*, 1956, 11(3): 298–300.