

金莲花中荭草苷和牡荆苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用

蒋 伟, 屈海琪, 袁丹华, 杨国栋, 安 芳, 王书华*

河北北方学院 药理学系, 河北 张家口 075000

摘 要: 目的 研究金莲花中黄酮碳苷单体荭草苷和牡荆苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用。方法 小鼠 ip 给予 *D*-半乳糖 8 周制备亚急性衰老模型, 造模成功后将小鼠分成模型组, 维生素 E (20 mg/kg) 阳性对照组, 荭草苷和牡荆苷高、中、低剂量 (40、20、10 mg/kg) 组, 各组每日上午 ig 给予相应药物 1 次。连续给药 8 周后小鼠断头取脑, 测脑质量, 制备脑组织匀浆上清液, 检测脑组织中抗氧化酶系、丙二醛 (MDA)、脂褐素, 并观察脑组织形态学变化。结果 荭草苷和牡荆苷可改善衰老小鼠一般状态, 延缓脑组织萎缩, 提高脑组织中抗氧化酶的活性和降低 MDA、脂褐素的量, 改善海马区神经细胞结构的功能。荭草苷中、低剂量的抗氧化活性强于同剂量的牡荆苷, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01); 而荭草苷和牡荆苷高剂量的抗氧化活性与维生素 E 的相当。结论 荭草苷和牡荆苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与提高脑组织内抗氧化酶系活性, 降低 MDA、脂褐素的量, 改善海马区神经细胞结构功能相关。

关键词: 金莲花; 荭草苷; 牡荆苷; *D*-半乳糖; 抗氧化; 衰老

中图分类号: R 282.710.5; R977.9 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1376-05

Protection of orientin and vitexin from flowers and flower buds of *Trollius chinensis* on brain injury in aging mice induced by *D*-galactose

JIANG Wei, QU Hai-qi, YUAN Dan-hua, YANG Guo-dong, AN Fang, WANG Shu-hua

Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Key words: *Trollius chinensis* Bunge; orientin; vitexin; *D*-galactose; anti-oxidant; aging

金莲花为毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花及花蕾, 主产于我国西南、西北、华北、东北及台湾等省区^[1], 为民间常用中药, 有清热解毒、消肿明目的功效, 临床上主要用于上呼吸道感染、扁桃体炎^[2]等。近年来国内外对金莲花有效成分的药理研究主要集中在总黄酮抑菌、抗病毒等方面^[3-4]。前期研究表明, 金莲花总黄酮及单体荭草苷和牡荆苷具有清除超氧阴离子、羟基自由基、DPPH 的功能, 对红细胞溶血具保护作用^[5-6]。本实验研究金莲花中荭草苷和牡荆苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用, 探讨该作用是否与其体内抗氧化作用相关。

1 材料

1.1 动物

昆明种小鼠, 体质量 (20±2) g, 河北北方学院动物中心提供, 许可证号 SCXK(京)2004-0001。

1.2 药品与试剂

荭草苷和牡荆苷, 自制, 经 ¹H-NMR 和 HPLC 鉴定, 质量分数为 98.9%。*D*-半乳糖、考马斯亮蓝, 分析纯, 上海试一化学试剂有限公司; *N,N*-二甲基甲酰胺、聚山梨酯-80、乙醇、氯仿、四乙氧基丙烷、硫代巴比妥酸、水合氯醛等均为分析纯, 天津化工有限公司; 三氯醋酸, 分析纯, 上海邦辰试剂有限公司; 总抗氧化能力 [T-AOC, 包括过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)]、Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶试剂盒, 均购自南京建成生物有限公司。

1.3 主要仪器

高速冷冻离心机, Sigma Microelectronics 公司; MP 1100B 型电子天平, 上海精科天平仪器厂; 电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; U—3900 紫外可见分光光度计, 河南普瑞斯实业有限公司。

收稿日期: 2011-10-17

基金项目: 张家口市科技局基金项目 (0711046D-9)

作者简介: 蒋 伟 (1986—), 男, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 研究方向为中药有效成分提取分离及药理学。

Tel: 15369336723 E-mail: jw13805652416@yahoo.com.cn

*通讯作者 王书华 Tel: 18931316022 E-mail: shwang1988@yahoo.com.cn

司; F—280 荧光分光光度计, 徐州宸飞科技发展有限公司; XDS 生物显微镜, 重庆光电仪器总公司; H—7500 透射电子显微镜, 日本日立公司)。

2 方法

2.1 分组与模型制备

昆明种小鼠 120 只(雌雄各半), 随机分为对照组, 模型组, 荳蔻苷和牡荆苷高、中、低剂量组, 维生素 E (VE) 阳性对照组, 每组 10 只。各组小鼠适应性饲养 1 周后, 采用文献方法^[7]制备亚急性衰老模型: 将 D-半乳糖 10.0 g 溶于 500 mL 生理盐水中, 每天给小鼠 ip 200 mg/kg (0.01 mL/g), 对照组 ip 等体积生理盐水, 连续给予 8 周。每天称体质量 1 次, 依据小鼠体质量调整给药剂量。

将剩余 30 只小鼠分为对照组和模型组, 并在造模第 6、8 周每组分别选取 10 只, 摘眼球采血, 分离血清, 测定 T-AOC、SOD、丙二醛 (MDA) 的量, 以确定小鼠衰老情况, 第 8 周末, 模型组小鼠上述指标与对照组相比具有统计学意义, 表明模型制备成功。

2.2 给药

各给药组从模型制备第 9 周开始每日上午 ig 给药 1 次, VE 组给药剂量为 20 mg/kg, 荳蔻苷和牡荆苷 (N,N' -二甲基甲酰胺-聚山梨酯 80-生理盐水, 1:1:20) 高、中、低剂量组给药剂量均分别为 40、20、10 mg/kg; 对照组和模型组给等体积生理盐水, 连续给药 8 周。

2.3 观察与检测指标

2.3.1 小鼠一般状态 观察各组小鼠摄食、饮水、体质量、活动程度、毛色、光泽度等方面变化。

2.3.2 小鼠脑质量测定 小鼠断头处死后, 在冰冻条件下精密称量各组小鼠的全脑质量。

2.3.3 小鼠脑组织抗氧化酶检测 在冰冻条件下精确称量小鼠脑组织, 用生理盐水制成 10% 脑组织匀浆液, 8 000 r/min 离心得上清液, 按试剂盒说明测定 CAT、GSH-Px 的活性。取 1.0 mL 上清液, 加入 1.0 mL 乙醇-氯仿混合液 (5:3), 震荡 2 min, 4 000 r/min 离心 5 min 以除去蛋白质, 取上清液测定 SOD 的活性。

2.3.4 小鼠脑细胞膜转运能力测定 准确称取小鼠脑组织质量, 用生理盐水制成 10% 匀浆液, 取一定量的匀浆液加 99 倍的生理盐水制成 0.1% 脑组织匀浆液 0.1 mL, 同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白, 计算 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的活性。

2.3.5 小鼠脑组织 MDA 测定 取脑组织匀浆后的上清液 1.5 mL, 在 37 °C 下震荡 1.5 h, 加入 1.5 mL 20% 三氯醋酸, 混匀后 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 0.67% 硫代巴比妥酸溶液, 沸水浴 10 min, 冷却后在 532 nm 处测吸光度, 并计算脑组织内 MDA 的量。

2.3.6 小鼠脑组织脂褐素测定 将小鼠断头处死, 取脑组织在生理盐水中浸泡, 用滤纸吸干表面血液污渍, 按质量与体积的比例为 20:1 加入氯仿-甲醇 (2:1) 混合液, 制成 10% 匀浆, 再加入等体积蒸馏水, 充分振摇 3 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸出氯仿层, 再加氯仿定容至 5 mL。用荧光分光光度计测定其荧光强度 (激发光波长 360 nm, 发射光波长 420 nm, 狭缝 10 nm)。以新配制的硫酸奎宁标准液 (1 $\mu\text{g/mL}$) 荧光强度为 50, 计算每克大脑皮层组织中所含相当于标准荧光强度的荧光物质微克数, 即为脂褐素的量。

2.3.7 小鼠脑组织形态学观察 小鼠用 10% 的水合氯醛 (3 mL/kg) ip 麻醉后打开胸腔, 夹闭腹主动脉, 经左心室插管进入主动脉, 灌注生理盐水 100~150 mL, 快速冲洗, 待血液冲洗干净后立即灌注含 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2~7.4) 以固定脑组织。灌注完毕后断头取脑, 矢状面切取脑组织 0.1 cm, 置于 4% 多聚甲醛中固定。固定完毕后取出标本, 经梯度酒精逐级脱水, HE 染色, 光镜下 (40 $\times$) 观察小鼠脑组织的病理情况。

小鼠在取脑前处理同上。灌注完毕后断头取脑, 分离海马区, 放入 2.5% 戊二醛中固定, 用电镜 ($\times 15\,000$) 观察海马区超微结构。

2.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件对数据进行处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 对 D-半乳糖致衰老小鼠一般状态的影响

对照组小鼠饮食正常、活泼好动、毛发光亮浓密、皮肤弹性良好。模型组小鼠在造模后逐渐表现出少动、行动迟缓、喜蜷缩、毛色发黄, 尤其是腹部毛发逐渐变得无光泽、稀疏并渐有脱毛现象, 皮肤松弛、弹性下降。而荳蔻苷和牡荆苷各剂量组小鼠总体状态好于模型组。

3.2 对 D-半乳糖致衰老小鼠脑质量的影响

与对照组相比, 模型组小鼠脑组织萎缩, 脑质量减轻。与模型组相比, 荳蔻苷和牡荆苷高、中、低

剂量组衰老小鼠脑组织质量明显增加 ($P<0.05$)。荇草苷与牡荆苷高、中、低剂量组相比较,并无显著性差异。荇草苷与牡荆苷中、低剂量组延缓小鼠脑萎缩的作用弱于维生素 E,差异显著 ($P<0.05$);而在高剂量时与 VE 相比作用无显著差异。结果见表 1。

3.3 对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织抗氧化酶活性的影响

与对照组相比,模型组小鼠脑组织抗氧化酶活

性明显降低 ($P<0.01$)。与模型组相比,荇草苷和牡荆苷能明显增强小鼠脑组织内抗氧化酶活性 ($P<0.05$ 、 0.01),且荇草苷的中、低剂量组的作用强于同剂量的牡荆苷 ($P<0.05$),而两化合物在高剂量时的作用无显著差异;但荇草苷与牡荆苷中、低剂量组的活性弱于 VE ($P<0.05$),而荇草苷和牡荆苷高剂量组的活性与 VE 组相比无显著差异 ($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 荇草苷和牡荆苷对 D-半乳糖致衰老小鼠脑质量和 SOD、CAT、GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of orientin and vitexin on brain weight and activities of SOD, CAT, and GSH-Px in aging mice induced by D-galactose ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	脑质量 / g	SOD / (U·mL ⁻¹)	CAT / (U·mL ⁻¹)	GSH-Px / (U·μL ⁻¹)
对照	—	0.491 0±0.037 0	110.24±9.8	6.025±0.98	16.58±2.05
模型	—	0.412 0±0.034 0 [△]	41.02±6.07 ^{△△}	2.802±0.67 ^{△△}	8.37±1.43 ^{△△}
荇草苷	40	0.451 0±0.038 0 [▲]	67.36±7.12 ^{▲▲}	5.836±0.712 ^{▲▲}	13.34±1.69 ^{▲▲}
	20	0.442 0±0.026 0 ^{▲▲}	54.36±7.04 ^{▲▲▲}	4.936±0.704 ^{▲▲▲}	12.40±1.37 ^{▲▲}
	10	0.431 0±0.031 0 ^{▲▲}	43.36±6.89 ^{▲▲▲}	4.160±0.689 ^{▲▲}	10.56±2.14 ^{▲▲}
牡荆苷	40	0.446 0±0.025 0 [▲]	58.36±8.01 ^{▲▲▲}	5.536±0.801 ^{▲▲▲}	13.02±2.03 ^{▲▲}
	20	0.423 0±0.022 0 ^{▲▲}	48.36±5.98 ^{▲▲▲}	4.436±0.598 ^{▲▲▲}	11.93±1.97 ^{▲▲▲}
	10	0.426 0±0.031 0 [▲]	43.36±6.13 ^{▲▲▲}	3.636±0.613 ^{▲▲▲}	10.96±1.21 ^{▲▲}
VE	20	0.460 0±0.032 0 [▲]	88.36±6.97 ^{▲▲}	5.736±0.697 ^{▲▲}	14.25±2.07 ^{▲▲}

与对照组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$; 与模型组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$; 与维生素 E 组比较: ^{*} $P<0.05$, 下同
[△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs control group; [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs model group; ^{*} $P<0.05$ vs VE group, same as below

3.4 对 D-半乳糖致衰老小鼠脑细胞膜离子转运能力的影响

与对照组相比,模型组小鼠脑细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶的活性明显降低 ($P<0.01$)。与模型组相比,荇草苷和牡荆苷明显提高脑细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶的活性 ($P<0.05$ 、 0.01),其中荇草苷中、低剂量组的作用明显强于同剂量的牡荆苷 ($P<0.05$),而两者高剂量的作用无显著差异。但荇草苷和牡荆苷中、低剂量组的作用弱于 VE 组 ($P<0.05$),荇草苷高剂量组的作用与 VE 组相比无显著差异。结果见表 2。

3.5 对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织中 MDA 和脂褐素水平的影响

与模型组相比,荇草苷和牡荆苷组小鼠脑组织中 MDA 和脂褐素的量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),其中荇草苷中、低剂量组的作用强于同剂量的牡荆苷 ($P<0.05$),而在高剂量时,2 个化合物的作用无显著差异;但荇草苷与牡荆苷中、低剂量组的作用弱于 VE 组 ($P<0.05$),而这 2 个化合物在高剂

量时的作用与 VE 组相比无显著差异。结果见表 2。

3.6 小鼠脑组织形态学观察

光镜观察可见,对照组小鼠脑组织细胞形态、大小、数量正常,细胞完整、排列整齐,无细胞变性。模型组小鼠脑组织细胞数量明显减少,细胞排列不整齐,脑皮层神经细胞可见空泡变性。与模型组比较,荇草苷和牡荆苷组小鼠脑组织细胞的数量和排列均明显得到改善。结果见图 1。

电镜下可见,对照组脑组织细胞轮廓清晰,细胞膜完整,细胞核呈圆形和卵圆形,核仁清晰,细胞浆中线粒体数量很多,线粒体清晰,无脂褐素沉积;模型组脑组织细胞超微结构明显改变,神经细胞萎缩,大部分细胞器结构不清或变形,线粒体膜出现部分损伤,线粒体结构不完整,出现肿胀变性、峭断裂和空泡。结果见图 2。

4 讨论

关于衰老的机制,目前存在多种不同的学说,其中自由基学说被广泛接受^[8]。生物机体抗氧化酶系统中重要的抗氧化酶之一 SOD 是清除机体内超

表 2 荇草苷和牡荆苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠 MDA、脂褐素、Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of orientin and vitexin on MDA, LPE, Na⁺, K⁺-ATPase, and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase in aging mice induced by *D*-galactose ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	MDA / (nmol·mL ⁻¹)	脂褐素 / μg	Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶 / U	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATP 酶 / U
对照	—	8.48 ± 2.37	18.25 ± 1.62	10.254 ± 0.793	11.254 ± 0.793
模型	—	15.97 ± 3.36 ^{△△}	26.54 ± 1.21 ^{△△}	5.027 ± 0.961 ^{△△}	6.027 ± 0.861 ^{△△}
荇草苷	40	11.22 ± 3.76 ^{▲▲}	21.12 ± 1.30 [▲]	8.659 ± 0.604 ^{▲▲}	8.659 ± 1.204 ^{▲▲}
	20	12.25 ± 2.63 [▲]	22.51 ± 0.97 [▲]	8.427 ± 0.769 ^{▲▲}	8.427 ± 0.769 ^{▲▲}
	10	13.69 ± 3.59	23.65 ± 0.82 [▲]	7.238 ± 0.634 ^{▲*}	7.238 ± 0.934
牡荆苷	40	11.97 ± 3.24 ^{▲▲}	22.26 ± 1.03 [▲]	8.021 ± 0.477 ^{▲▲}	8.596 ± 0.877 ^{▲▲}
	20	13.01 ± 3.06 [▲]	24.01 ± 0.95 [▲]	7.812 ± 0.587 ^{▲*}	8.342 ± 0.987 ^{▲*}
	10	13.89 ± 2.52 [*]	25.07 ± 0.67 [*]	6.806 ± 0.732 ^{▲*}	7.094 ± 1.890 ^{▲*}
VE	20	10.26 ± 2.01 ^{▲▲}	21.37 ± 1.23 [▲]	9.124 ± 0.540 ^{▲▲}	10.124 ± 0.940 ^{▲▲}

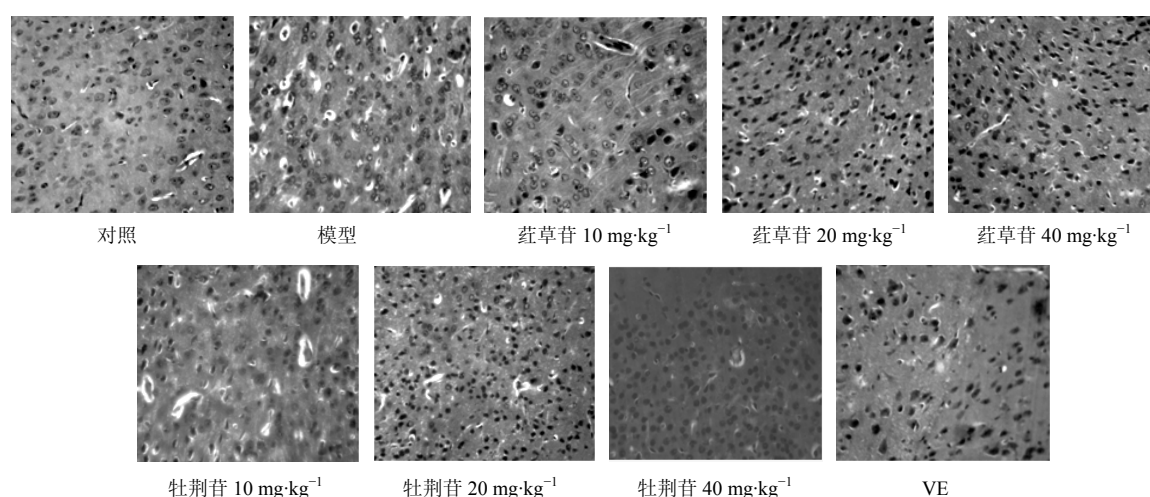


图 1 各组小鼠脑组织 HE 染色结果

Fig. 1 HE staining of brain tissue in mice of each group

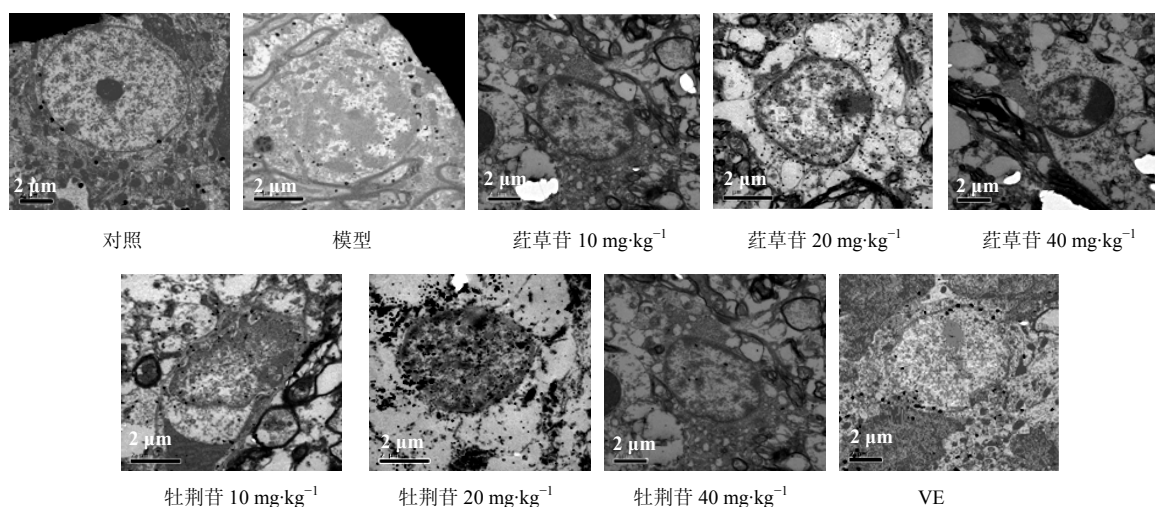


图 2 各组小鼠脑组织形态学电镜观察

Fig. 2 Electron microscope images of brain tissue morphology of mice in each group

氧阴离子自由基的重要生物酶,可催化超氧阴离子自由基的歧化反应,产生破坏能力相对较低的 H_2O_2 ,CAT和GSH-Px能将上述过程中产生的 H_2O_2 分解成水和分子氧,减轻或阻断脂质过氧化作用的一级引发作用,保护机体免受过氧化氢物的侵害,延缓细胞的衰老,从而预防自由基导致的疾病的发生。如果体内的SOD、CAT和GSH-Px等酶减少,将导致体内自由基增加,加强过氧化反应,使组织和细胞收到破坏,从而使组织功能下降,引起生物体的衰老^[9]。有研究表明,细胞内 Ca^{2+} 超载与老年性疾病密切相关,而 Na^+ 、 K^+ -ATP酶、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP酶的活性是 Ca^{2+} 分布的基础,并已作为观察衰老的新指标^[10]。ATP酶活性下降,将影响细胞的整体功能,导致细胞内 Ca^{2+} 浓度大增,而神经细胞内 Ca^{2+} 水平升高可使细胞骨架和膜结构不稳定,使膜通透性增加,造成恶性循环^[11]。金莲花中主要活性成分为荭草苷和牡荆苷^[12],本研究结果提示,金莲花中荭草苷和牡荆苷均能较明显地提高机体内抗氧化酶活性,荭草苷中、低剂量的作用强于同剂量的牡荆苷,而两者在高剂量时的作用无显著差异。有研究表明,B环上连有一个酚羟基的黄酮类化合物的抗氧化活性比B环上具有邻二酚羟基的黄酮类化合物的抗氧化活性弱^[13],荭草苷和牡荆苷的结构与抗氧化活性与文献报道相一致。

脂质过氧化是氧自由基引起细胞损伤的主要途径,MDA是过氧化脂质的分解产物,能与蛋白质、核酸等交联,从而使细胞变性甚至失活,导致组织弹性降低。交联物具有异常的氢键,经溶酶体吞噬后不能被分解,蓄积于细胞内成为脂褐素,随年龄增长脂褐素增多,因此脂褐素是目前公认的机体衰老的标志之一^[14]。本实验结果提示,荭草苷与牡荆苷均能降低脑组织内MDA和脂褐素的量,荭草苷中、低剂量组的作用强同剂量的牡荆苷,而在高剂量时两者的作用无显著差异。

小鼠脑组织形态学观察表明,荭草苷与牡荆苷组小鼠细胞数量明显增多,细胞结构改善明显,提示这2个化合物通过维持细胞形态结构的正常,减少脑神经细胞的衰老或凋亡,以确保其功能的发

挥,从而延缓衰老,这也可能是它们抗衰老的机制之一。

参考文献

- [1] 李良. 毛茛科金莲花亚科植物的地理分布 [J]. 植物分类学报, 1995, 33(6): 535-537.
- [2] 李药兰, 叶绍明, 王凌云, 等. 长瓣金莲花中原金莲酸的分离和生物活性 [J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2002, 23(1): 124-126.
- [3] 刘丽娟, 王秀坤, 匡海学. 长瓣金莲花茎叶化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1992, 7(11): 837-840.
- [4] 吴新安, 赵毅民, 朱捷, 等. 短瓣金莲花中一个新的黄酮碳苷化合物 [J]. 天然药物研究与开发, 2009, 21: 1-5.
- [5] 颜娟, 胡海娜, 曲彩红, 等. 金莲花总黄酮抗氧化作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 386.
- [6] 杨国栋, 饶娜, 田嘉铭, 等. 金莲花中荭草苷和牡荆苷体外抗氧化作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 110-111.
- [7] 苗明三. 五味子多糖对衰老模型小鼠的影响 [J]. 中国医药学报, 2002, 27(3): 187.
- [8] Droge W. Oxidative stress and aging [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 543: 191-200.
- [9] Buttke T M, Sandstrom P A. Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes [J]. *Free Radic Res*, 1995, 22(5): 389-397.
- [10] Paradies G, Petrosillo G, Pistolesse M, *et al*. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage [J]. *Gene*, 2002, 286(1): 135-141.
- [11] Germann I, Hagelauer D, Kelber O, *et al*. Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5 (Iberogast) [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13 (Suppl 1): 45-50.
- [12] 温瑞卿, 张贵君, 杨洋, 等. 金莲花中药效成分荭草苷和牡荆苷的色谱鉴定 [J]. 现代药物与临床, 2008, 23(5): 214-216.
- [13] Husain S, Cillard J, Coard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(9): 2487-2491.
- [14] Suganuma H, Hirano T, Inakuma T. Amelioratory effect of dietary ingestion with red bell pepper on learning impairment in senescence-accelerated mice (SAMP8) [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1999, 45(1): 143-149.