

赶黄草水提浓缩液抗衰老作用及其机制研究

刘中飞, 刘明华, 孙 琴, 税丕先*

西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000

摘要:目的 研究赶黄草 *Penthorum chinense* 水提浓缩液抗衰老作用及其机制。方法 以 D-半乳糖制备亚急性衰老小鼠模型, 采用小鼠避暗实验考察小鼠的学习记忆功能, 测定脾脏指数、肝组织中单胺氧化酶(MAO)、血清中超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)的水平, Western blotting 检测脑组织中 p53、p21 蛋白的表达。结果 赶黄草水提浓缩液能增强衰老模型小鼠的学习及记忆能力, 增加脾脏指数, 提高血清中 SOD 的活性, 降低血清中 MDA 和肝脏中 MAO 的量, 同时明显抑制脑组织中 p53、p21 蛋白表达, 呈现一定的剂量依赖性。结论 赶黄草水提浓缩液具有明显的抗衰老作用, 其机制可能与其下调衰老信号通路 p53/p21 的蛋白表达、增强机体免疫功能、清除自由基有关。

关键词: 赶黄草; 抗衰老; D-半乳糖; 超氧化物歧化酶; p53/p21; 单胺氧化酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)13-2319-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.019

Anti-aging effect and mechanism of concentrated solution of aqueous extract from *Penthorum chinense*

LIU Zhong-fei, LIU Ming-hua, SUN Qin, SHUI Pi-xian

School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To observe anti-aging effect and mechanism of concentrated solution of aqueous extract from *Penthorum chinense*.

Methods Aging mice models were caused by D-galactose, learning and memory functions were investigated by avoid dark experiment, the spleen index, activity of MAO in liver, activities of SOD and MDA in serum were recorded, and the expression of p21 and p53 protein was detected by Western blotting. **Results** Concentrated solution of *P. chinense* by aqueous extraction increased the ability of learning and memory, improved spleen index and activity of SOD in serum, but it decreased the activity of MDA in serum and the activity of MAO in liver, and inhibited p21 and p53 protein expression in a dose-dependent manner. **Conclusion** Concentrated solution of aqueous extract from *P. chinense* could significantly exhibit anti-aging effects, its mechanism may be related to down-regulating the p53/p21 protein expression in aging signaling pathway, enhancing immune function, and removing free radicals.

Key words: *Penthorum chinense* Pursh; anti-aging; D-galactose; SOD; p53/p21; MAO

衰老是生物界广泛存在的现象,也是生命发展的必然。细胞衰老通常是指在正常状况下生物发育成熟后,随年龄增加细胞增殖能力和生理功能逐渐下降,细胞结构、组分逐步退行性变化,趋向死亡的一种不可逆转的现象^[1]。赶黄草学名扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh, 是四川泸州古蔺出产的一种苗家药材。现代研究表明^[2-4],赶黄草含多种有效成分,均对肝损伤具保护作用,并对甲肝、乙肝、慢性活动性肝炎具有一定的治疗作用。苗家人以其

草入药,可以解肝火、排肝毒,具有清除氧自由基、延缓衰老作用^[5]。在这种理论指导下,本实验研究了赶黄草水提浓缩液抗衰老、增强免疫功能、清除自由基等作用及其对细胞衰老信号通路 p53/p21 蛋白表达的影响,为赶黄草在新食品原料中的开发应用提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

赶黄草采自四川古蔺县境内,经西南医科大学

收稿日期: 2016-01-28

基金项目: 四川省科技厅支撑计划“赶黄草 GAP 种植技术及其质量标准研究”(2014ZC0052); 泸州市科技局重点项目“赶黄草新资源食品研究”(2013LZLY-K66)

作者简介: 刘中飞(1988—),女,四川合江人,中药学在读硕士,主要从事中药鉴定与中药药理学研究。E-mail: 382759834@qq.com

*通信作者 税丕先(1967—),男,教授,硕士研究生导师,主要从事道地药材研究。E-mail: spx6702@163.com

药学院税丕先教授鉴定为虎耳草科植物扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh 的干燥全草。考马斯亮蓝、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、单胺氧化酶 (MAO) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; ECL Plus 超敏发光、RIPA 组织裂解液: 碧云天生物技术研究所; 一抗 p21、一抗 p53、 β -actin, 英国 Abcam 公司; D-半乳糖, 购自上海恒远生物科技有限公司。

1.2 实验动物

清洁级昆明种小鼠, 体质量 (20 ± 2) g, 雌雄各半, 由西南医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (川) 2013-017。

1.3 仪器

756PC 紫外-可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); XW-80A 旋涡混匀器 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 恒温水浴锅 (重庆实验设备厂); 全自动凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 赶黄草水提浓缩液的制备

称取 10 kg 赶黄草药材, 粉碎成粗粉, 加蒸馏水 100 L, 加热至 $80 \sim 90$ °C, 浸泡提取 30~60 min, 滤过, 收集提取液, 残渣加蒸馏水 100 L, 加热至 $80 \sim 90$ °C, 浸泡提取 30~60 min, 滤过, 合并浸泡提取液, 将提取液减压浓缩至 5 L 即可。水提浓缩液的生药质量浓度为 2 g/mL。取芦丁对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 100080-201408), 照紫外-可见分光光度法 (《中国药典》2015 年版一部附录 VA) 于 510 nm 处测定, 赶黄草水提浓缩液中含总黄酮为 98.68 mg/mL。

2.2 分组及造模

将 50 只小鼠适应性喂养 1 周后, 按体质量随机分为 5 组: 对照组, 模型组及赶黄草水提浓缩液低、中、高剂量 (生药 0.167、0.334、0.668 g/kg) 组。除对照组外, 其他各组均每天颈背部 sc 5% D-半乳糖生理盐水溶液 25 μ L/g, 对照组每天颈背部 sc 等容量的生理盐水, 连续注射 42 d。各组造模同时开始 ig 给药, 每日给药 1 次, 连续 42 d。

2.3 避暗实验^[2]

于末次给药 1 h 后, 进行行为学实验。记录 5 min 内小鼠进入暗室的电击次数 (错误次数), 作为学习获得成绩。24 h 后再次测试, 记录第 1 次触电潜伏期 (即将小鼠放入明室开始计时, 到第 1 次双足触电时间) 和 5 min 内小鼠进入暗室的电击次数,

作为记忆保持成绩。

2.4 脾脏指数的测定

行为学测试结束后, 将小鼠称体质量, 摘眼球取血后, 脱臼处死, 取脾脏, 称质量, 计算小鼠脾脏指数, 即脾脏指数 = 脾脏质量 (mg) / 小鼠体质量 (g)。

2.5 生化指标的检测

各组小鼠于行为学测试完毕后, 摘取小鼠眼球取血约 1 mL, 取血完毕后, 脱臼处死小鼠, 取小鼠肝组织。血液离心取血清、组织制成 10% 匀浆置于 4 °C 冰箱储存备用。SOD、MDA、MAO 定量测定按试剂盒说明书进行。

2.6 Western blotting 检测脑组织 p53、p21 蛋白的表达

取小鼠脑组织, 研磨后 PBS 漂洗 2 遍, 加入组织裂解液, 提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白量, SDS-PAGE 胶电泳, 转膜后将 PVDF 膜进行封闭 2 h, p53 或 p21 一抗 (1:1 000 稀释) 孵育 1 h 后, 加入稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温或 4 °C 孵育 1 h, 用 Luminate crescendo western HRP Substrate 显影液对膜进行预染, 后在 Bio-Rad 凝胶成像系统内曝光显影, Image Lab 3.0 软件分析。

2.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析及组间两两比较。

3 结果

3.1 对避暗实验的影响

模型组小鼠 sc 5% D-半乳糖生理盐水溶液 25 μ L/g 后, 5 min 错误次数及 24 h 后 5 min 错误次数明显增加, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$), 造模成功。赶黄草水提浓缩液高、中剂量组能降低衰老模型小鼠避暗的错误次数, 改善其学习及记忆能力, 具有明显促智作用, 与模型组相比, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 1。

3.2 对衰老小鼠脾脏指数的影响

模型组小鼠 sc 5% D-半乳糖生理盐水溶液 25 μ L/g 后, 脾脏指数降低, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。赶黄草水提浓缩液组能增加衰老模型小鼠的脾脏指数, 与模型组相比, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 1。

3.3 对衰老小鼠血清中 SOD、MDA 及肝组织中 MAO 水平的影响

模型组小鼠 sc 5% D-半乳糖生理盐水溶液 25 μ L/g 后, 血清中 SOD 水平降低, 血清中 MDA 及

表 1 赶黄草水提浓缩液对衰老小鼠避暗试验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of concentrated solution of *P. chinense* on step-through test in aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	5 min 错误次数	24 h 后潜伏期/s	24 h 后 5 min 错误次数
对照	—	4.89±1.65	119.63±29.74	2.71±0.76
模型	—	8.39±2.73**	75.66±22.56**	4.68±0.98**
赶黄草水提浓缩液	0.167	7.56±2.42**	83.76±24.82**	3.86±0.93**
	0.334	6.75±1.88*	97.29±27.06**	3.37±0.82**
	0.668	5.27±1.71**	105.33±28.67**	2.95±0.79**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

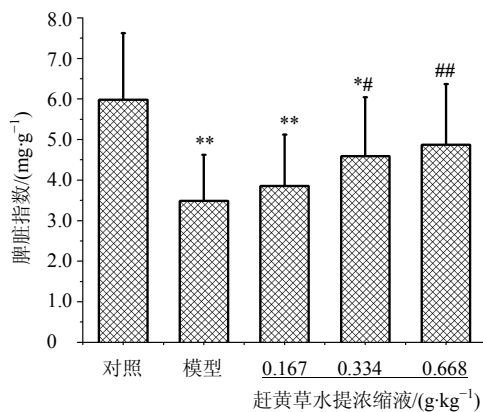


图 1 赶黄草水提浓缩液对衰老小鼠脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of concentrated solution of *P. chinense* on spleen index of aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 2 赶黄草水提浓缩液对衰老小鼠血清中 SOD、MDA 及肝脏中 MAO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of concentrated solution of *P. chinense* on SOD and MDA in serum and MAO in liver tissue of aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血清 SOD/(U·mL ⁻¹)	血清 MDA/(nmol·mL ⁻¹)	肝脏 MAO/(U·mg ⁻¹)
对照	—	215.85±34.92	8.47±2.68	2.83±0.52
模型	—	135.46±24.37**	14.57±4.36**	4.54±0.79**
赶黄草水提浓缩液	0.167	147.55±25.72**	12.85±3.88**	4.10±0.62*
	0.334	172.29±29.33**	10.15±3.71**	3.54±0.53**
	0.668	192.74±28.86**	9.72±2.75**	3.03±0.49**

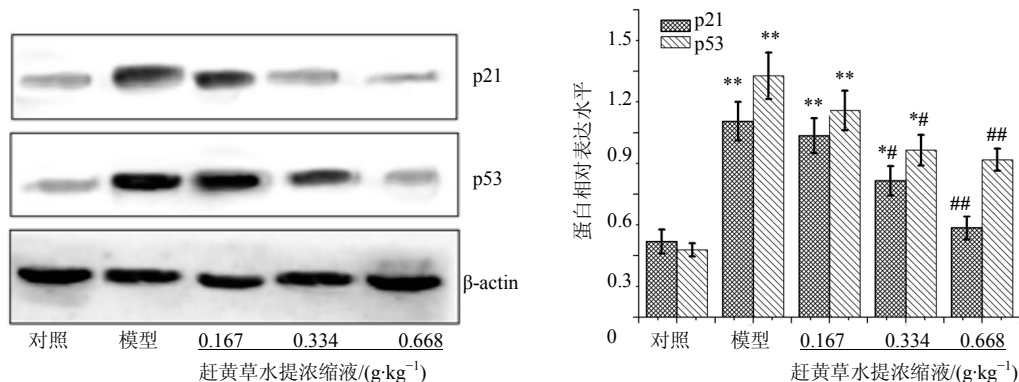


图 2 赶黄草水提浓缩液对衰老小鼠脑组织 p21 和 p53 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of concentrated solution of *P. chinense* on p21 and p53 protein expression in brain tissue of aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

肝脏中 MAO 水平升高, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 赶黄草水提浓缩液组均能升高衰老模型小鼠血清中 SOD 水平, 降低 MDA 及 MAO 水平 ($P < 0.05, 0.01$), 具有一定的抗氧化作用。结果见表 2。

3.4 对 p21、p53 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果表明, 赶黄草水提浓缩液能明显降低脑组织中 p21、p53 蛋白表达, 呈现一定的剂量依赖性, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见图 2。

4 讨论

衰老是一种自然现象, 是机体分子、细胞、器官乃至整个机体衰退的生理、病理变化过程。自由基理论认为, 细胞的衰老是细胞内发生化学反应过

程中有害物质堆积的结果。自由基最终损伤细胞,引起个体衰老。*D*-半乳糖在正常浓度时可被代谢,但在高浓度时,它可以被催化转化成半乳糖醇、半乳糖氧化酶,产生超氧阴离子与氧自由基^[6]。*D*-半乳糖注射已被广泛用于建立衰老模型,用于抗衰老的研究^[7-8]。学习记忆功能与语言、思维、情绪以及运动控制等功能一样,同属于脑的高级功能,其在衰老过程中最易受损。越来越多的证据表明,衰老及由衰老引起的神经退行性疾病阿尔茨海默病(AD)等可导致认知能力特别是空间记忆能力的减退。避暗实验结果发现,赶黄草水提浓缩液能降低衰老模型小鼠避暗的错误次数,改善其学习及记忆能力,揭示其具有明显的抗衰老作用。

SOD 能作为超氧阴离子和 H_2O_2 清除剂来防止活性氧(ROS)引起的损伤,这可能会导致一些生物标志物的变化^[9]。MDA、MAO 的产生是氧化过程中出现的主要生物标志物,在脂质过氧化反应的最后阶段其能发起过多的 ROS。在肝脏,MDA 和 MAO 浓度的增加能表示发生脂质过氧化反应的程度、组织损伤和破坏的程度。因此,抗氧化防御系统能防止过多的自由基的形成^[10]。此外,科学研究发现,衰老是与免疫功能的下降相关。免疫系统已被提议作为生物年龄和寿命的标志,因此,免疫系统功能的降低可能与过量的自由基在老化过程中的出现相关联^[11]。本研究发现,赶黄草水提浓缩液不仅升高衰老模型小鼠的脾脏指数、增强机体免疫功能,还能升高衰老模型小鼠血清中 SOD 水平,降低 MDA、MAO 的量,具有一定的抗氧化作用。因此,提高衰老小鼠的免疫功能和清除氧自由基是赶黄草水提浓缩液抗衰老的作用机制。

细胞衰老作为衰老的基本过程是借助于信号传导途径实现的,许多细胞因子亦参与到这些信号途径中。其中最经典的细胞衰老途径为 p53-p21^{WAF1/CIP1}-Rb,当该途径所涉及的关键调控因子,如细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白(CKI) p21、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白激酶(CDK)、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)等发生改变,细胞将延缓衰老或绕过衰老程序继续增殖^[12]。在人类和小鼠细胞中,研究者通过各种技术策略使 p53/p21 途径失活导致细胞逃逸老化^[13]。在细胞中加强 p53 或 p21 表达能诱导老化样细胞表型,并且各种刺激信号能诱导 p53-p21 依赖的细胞老化反应。这些均提示 p53 在诱导细胞老化中不可缺少^[14]。DNA 损伤检测点

的核心是 p53, p53 接受上游蛋白传来的 DNA 损伤信号并传递给下游的效应蛋白,从而使细胞周期停滞,因此 p53 是 DNA 损伤反应的中介物。DNA 损伤可通过磷酸化 p53 使其蛋白活性稳定,表达水平上升,并诱导其转录活性。p53 活化的一个主要效应分子就是 p21, p21 水平上调可抑制 CDK2 和 CDK4 的活性,它们不能磷酸化 pRb,处于低磷酸化状态的 pRb 结合到 E2Fs 上,使 E2Fs 不能与其靶基因结合,细胞不能进入 S 期,最终导致细胞周期停滞^[15]。

Western blotting 检测结果表明,赶黄草水提浓缩液能明显下调脑组织中 p21、p53 的蛋白表达,呈现一定的剂量依赖性,揭示其能通过抑制细胞衰老信号通路 p53/p21 蛋白的高表达,从而提高衰老小鼠的免疫功能和清除氧自由基能力,延缓机体的衰老。

参考文献

- [1] 张大勇,项晓霞,陈 律,等.不同年龄大鼠血清对骨髓间充质干细胞衰老影响的实验研究[J].中国细胞生物学学报,2011,33(10):1109-1115.
- [2] 胡祥宇,魏 颀,袁叶飞,等.赶黄草对小鼠酒精性脂肪肝的实验研究[J].西南军医,2015,17(3):288-290.
- [3] Ikura Y, Caldwell S H. Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8): 8699-8708.
- [4] 肖丽萍,宋洋洋,周彦希,等.赶黄草抗非酒精性脂肪肝的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):125-129.
- [5] 贺晓华,许 龙,谈满良,等.不同提取方法赶黄草提取物清除 DPPH 自由基的作用研究[J].时珍国医国药,2009,20(8):1924-1926.
- [6] Kumar A, Prakash A, Dogra S. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*) against D-galactose-induced senescence in mice[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(1): 42-55.
- [7] 范红艳,顾饶胜,王艳春,等.大豆异黄酮抗衰老作用研究[J].中草药,2010,41(12):2054-2057.
- [8] Chen H L, Wang C H, Kuo Y W, et al. Antioxidative and hepatoprotective effects of fructo-oligosaccharide in D-galactose-treated Balb/c J mice[J]. *Br J Nutr*, 2011, 105(6): 805-809.
- [9] Yoo D Y, Kim W, Kim I H, et al. Combination effects of sodium butyrate and pyridoxine treatment on cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of D-galactose-induced aging model mice[J].

- Neurochem Res*, 2012, 37(1): 223-231.
- [10] Oliveira B F, Nogueira-Machado J A, Chaves M M. The role of oxidative stress in the aging process [J]. *Sci World J*, 2010, 10(4): 1121-1128.
- [11] 段文明. 玉郎伞多糖抗衰老作用及机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- [12] 张 涛, 钱济先, 姬振伟, 等. 沉默 p53 和 p21 基因延缓髓核细胞衰老退变实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(7): 789-795.
- [13] Ben-Porath I, Weinberg R A. The signals and pathways activating cellular senescence [J]. *Int J Biochem cell Biol*, 2005, 37(5): 961-976.
- [14] Wu X, Gao H, Ke W, *et al.* VentX *trans*-Activates p53 and p16^{ink4a} to regulate cellular senescence [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(14): 12693-12701.
- [15] 蒲秀瑛, 于 双, 樊文博, 等. 归芪多糖对衰老细胞周期及 p53、p16 蛋白的影响 [J]. *中医药学报*, 2015, 43(4): 36-39.

• 封面图片介绍 •

怀地黄花



地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根，为多年生草本。植株高 20~30 cm，根茎肉质，鲜时黄色，在栽培条件下，茎紫红色；直径可达 5.5 cm，叶片卵形至长椭圆形，叶脉在上面凹陷，花在茎顶部略排列成总状花序，花冠外紫红色，内黄紫色，药室矩圆形，蒴果卵形至长卵形，花果期 4~7 月。宜温和干燥气候，以松肥沃土壤为好，忌重茬，我国许多地方均可栽种。最优以怀地黄为上，其显著特点是油性大，柔软、皮细、内为黑褐色并有光泽，味微甜，尤其是断面呈菊花心状。怀地黄分为鲜地黄、生地黄和熟地黄。

鲜地黄甘、苦、寒，归心、肝、肾经；生地黄甘、寒，归心、肝、肾经；熟地黄甘、微温，归肝、肾经。鲜地黄清热生津、凉血止血，用于热病伤阴、舌绛烦渴、发斑发疹、吐血、衄血、咽喉肿痛。生地黄清热凉血、养阴、生津，用于热病舌绛烦渴、阴虚内热、骨蒸劳热、内热消渴、吐血、衄血、发斑发疹。熟地黄滋阴补血、益精填髓；用于肝肾阴虚、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、内热消渴、血虚萎黄、心悸怔忡、月经不调、崩漏下血、眩晕、耳鸣、须发早白。