

芹菜素改善 D-半乳糖衰老模型小鼠衰老指征的研究

The anti-aging effect of apigenin on aging mice induced by D-galactose

周鸣鸣^{1,2}, 谢焕松¹, 张 洁², 张 谦¹

(1. 江苏省南通大学生命科学学院, 南通 226007; 2. 复旦大学上海医学院教育部分子医学重点实验室, 上海 200032)

[摘要] **目的:**观察芹菜素对 D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠的影响。**方法:**建立 D-半乳糖致小鼠衰老模型,以 Y 型电迷宫检测其学习记忆能力,分别采用黄嘌呤氧化酶法、TBA 比色法测定大脑超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,观察小鼠服用不同剂量芹菜素后上述指标的变化。**结果:**芹菜素低、中、高剂量均可显著提高衰老模型小鼠的学习记忆能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显著增加 D-半乳糖所致衰老模型小鼠大脑 SOD 活性、降低 MDA 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**芹菜素能改善 D-半乳糖所致衰老小鼠的多项体征。

[关键词] 芹菜素;半乳糖;衰老;学习障碍;记忆障碍

[中图分类号] R 339.38 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0452-02

芹菜素(apigenin),又称芹黄素,化学结构为 5,7,4'-三羟基黄酮,是芹菜中的主要生物活性成分,广泛存在于多种水果、蔬菜、豆类和茶叶中。研究发现它具有神经保护、抗氧化、自由基清除剂、抗肿瘤、抗炎、碳水化合物代谢促进因子、免疫调节剂等作用,并且与其他黄酮类物质(槲皮素、山奈黄酮)相比具有低毒、无诱变性等特点^[1]。随着对芹菜素研究的深入,大量实验表明芹菜素是一种抗氧化和抗脂质过氧化作用的天然存在的黄酮类化合物^[2]。本研究观察了芹菜素对 D-半乳糖所致衰老模型小鼠学习记忆、大脑超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的影响,探讨其抗衰老作用。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂 芹菜素:陕西慧科植物开发有限公司(批号:510-36-0);吡拉西坦片(脑复康片):扬州市星斗药业有限公司生产(批号:020901);D-半乳糖(D-gal):上海生工生物工程技术有限公司进口分装;SOD、MDA 检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 D-半乳糖衰老小鼠模型的建立^[3] 健康成年 ICR 小鼠 60 只,雌雄各半,体质量 18~20 g,由南通大学实验动物中心提供。随机分为 6 组:① D-gal + 芹菜素低剂量组;② D-gal + 芹菜素中剂量组;③ D-gal + 芹菜素高剂量组;④ D-gal + 脑复康组;⑤ D-gal 组;⑥ 正常对照组。①、②、③、④、⑤ 组小鼠每日颈背部皮下注射 5% D-gal (0.25 ml/10 g),连续注射 6 周建立衰老动物模型;其中①、②、③、④ 组小鼠于第 3 周分别每日灌胃给药芹菜素 350 mg/kg、700 mg/kg、1 400 mg/kg 及脑复康 6.2 mg/10 g;⑤ 组小鼠给予等量双蒸水;⑥ 组小鼠颈背部皮下注射等量生理盐水并于第 3 周给予等量双蒸水作为非模型正常对照组。

1.3 衰老指征评定

1.3.1 Y 迷宫分辨学习记忆能力检测^[4] Y 迷宫为三等分辐射式反射箱。以小鼠被电击后逃至安全区为一次正确反应,连续 10 次测试中有 9 次(90%)正确反应,定为学会标准。记录各实验组和对照组每只小鼠达到学会标准的训练次数。

1.3.2 大脑 SOD 活性测定 小鼠断头处死,迅速取大脑组织,加入适量组织匀浆液,在冰浴中匀浆,采用 Bradford 法测定总蛋白含量。取 1% 大脑组织匀浆液,采用黄嘌呤氧化酶法(SOD 检测试剂盒),于波长 550 nm 处分别测定各实验组和对照组小鼠大脑组织匀浆液的光密度(D)值。

1.3.3 大脑 MDA 含量测定 小鼠大脑组织蛋白匀浆和定量方法同上。采用 TBA 比色法(MDA 检测试剂盒),于波长 532 nm 处分别测定各实验组和对照组小鼠大脑组织匀浆液的 D 值。

1.4 统计学处理 采用 SATAR 7.0 统计分析软件对实验结果进行统计学分析,两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 芹菜素对 D-半乳糖衰老模型小鼠的学习记忆能力影响 由表 1 可见,与正常对照组相比,D-半乳糖造模 6 周后,模型组小鼠达到学会标准所训练的次数明显增加($P < 0.01$),而芹菜素低、中、高剂量组小鼠达到学会标准所训练的次数明显低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 芹菜素对 D-半乳糖衰老模型小鼠学习记忆能力的影响

(n=10, $\bar{x} \pm s$)	
组别	学会所用次数
D-gal + 芹菜素低剂量组	85.3 ± 7.1*
D-gal + 芹菜素中剂量组	81.0 ± 8.6**
D-gal + 芹菜素高剂量组	69.9 ± 5.6**
D-gal + 脑复康组	77.1 ± 8.8**
D-gal 组	98.8 ± 10.7
正常对照组	64.8 ± 6.2**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 D-gal 组比较

[基金项目] 南通大学自然科学研究项目(05Z030). Supported by Natural Science Foundation of Nantong University(05Z030).

[作者简介] 周鸣鸣, 博士生, 讲师。

E-mail: zmm771@ntu.edu.cn

2.2 芹菜素对D-半乳糖所致衰老模型小鼠大脑组织SOD活性、MDA含量的影响 如表2所示,与正常对照组相比,D-半乳糖造模6周后,模型组小鼠大脑组织SOD的活性显著降低($P < 0.01$),而MDA的含量却明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,芹菜素低、中、高剂量均可使小鼠大脑组织SOD活性明显增加($P < 0.05$ 或 < 0.01)、MDA含量明显降低($P < 0.05$ 或 < 0.01)。

表2 芹菜素对D-半乳糖衰老模型小鼠脑SOD活性和MDA含量的影响

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	脑SOD活性 (nU/mg)	脑MDA含量 (nmol/mg)
D-gal + 芹菜素低剂量组	4.288 ± 0.691*	15.429 ± 1.517*
D-gal + 芹菜素中剂量组	4.538 ± 0.328*	14.509 ± 1.432*
D-gal + 芹菜素高剂量组	4.976 ± 1.314**	13.839 ± 3.588**
D-gal + 脑复康组	4.601 ± 0.341*	13.987 ± 3.564**
D-gal 组	3.279 ± 0.152	19.785 ± 1.498
空白对照组	4.872 ± 0.790**	14.083 ± 2.625**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与D-gal组比较

3 讨论

D-半乳糖致衰老模型是基于衰老代谢学说而复制的一种衰老模型,具有与自然衰老相似的自由基代谢紊乱特征,其衰老反应接近或相当于自然衰老^[5]。D-半乳糖可在体内氧化产生大量自由基,从而引起脂质过氧化作用的链式反应,导致细胞膜损伤。同时过氧化脂质(LPO)的分解终产物如MDA可与DNA或RNA及蛋白质和磷脂的有关物质结合,使细胞膜成分改变、功能障碍,促进衰老。同时其脂质过氧化终产物如MDA可引起精神行为改变,并通过交联、结合形成脂褐质,导致神经系统的障碍。研究表明,MDA含量随年龄的增加而增高,而SOD活性却随年龄的增加而降低。SOD在保护心脑功能、延缓衰老方面具有重要的作用。SOD活性与物种寿命呈正相关。本研究结果证实,D-半乳糖造模组小鼠的学习记忆力下降、大脑SOD活力降低,而MDA含量却明显升高,表现出明显的衰老特征^[6]。

以往研究表明芹菜素是一种抗氧化和抗脂质过氧化作用的天然存在的黄酮类化合物。神经系统富含不饱和脂肪酸和铁,这种脂类的氧化代谢活动需要氧和铁离子的参与。研究发现在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者的大脑中可见脂质过氧化和铁离子浓度的上升^[7]。Sugihara等^[8]研究证实了芹菜素对铁依赖脂质过氧化反应有明显的抑制作用。芹菜素是一种很强的金属离子螯合剂(例如铁和铜离子),它可以通过螯合作用降低金属离子参与的自由基反应,减少氧自由基的生成。研究发现芹菜素对氧自由基、NO自由基、超氧阴离子自由基等均有一定的清除作用。芹菜素在SH-SY5Y细胞中可抑制导致细胞死亡的氧化作用,从而体现了神经保护的作用^[9]。生物胺集中在神经组织中,

芹菜素通过抑制A型单胺氧化酶(type A monoamine oxidase, MAO-A)的活性达到抗氧化效应,介导单胺的分解代谢达到神经保护的作用^[10]。AD发病与 β 淀粉样蛋白前体基因变异有关,此蛋白质异常对神经元有毒性作用,致脑神经退化或渐进死亡。动物细胞试验发现,自中草药中提炼出的山柰酚,可通过抗氧化作用保护脑神经细胞免于 $A\beta$ 的毒害,对AD中 $A\beta$ 前体基因的表达没有影响;如果再加上另两种植物性雌激素芹菜素及槲皮素,抗氧化效果会倍增,可减少反应性氧化物对脑神经细胞的损伤。

本研究结果表明,芹菜素可显著改善D-半乳糖衰老模型小鼠的衰老指征,使D-半乳糖衰老模型小鼠学习记忆力提高,大脑SOD活性增加,而MDA含量下降。这提示芹菜素具有抗衰老作用,值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Losi G, Puia G, Garzon G, et al. Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 502(1-2): 41-46.
- [2] Campbell E L, Chebib M, Johnston G A. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin galate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA(A) receptors [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68: 1631-1638.
- [3] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model [J]. Mech Ageing Dev, 1999, 108: 239-251.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 738-739.
- [5] 王少康, 孙桂菊, 张建新, 等. 亚急性衰老模型的建立及评价 [J]. 东南大学学报(医学版), 2002, 21: 217-219.
- [6] 薛红丽, 赵佩霞. 衰老小鼠皮层NO, MDA, SOD水平变化及其相互关系的研究 [J]. 中国老年学杂志, 2000, 20: 89-90.
- [7] Andorn A C, Britton R S, Bacon B R, et al. Ascorbate-stimulated lipid peroxidation and non-heme iron concentrations in Alzheimer disease [J]. Mol Chem Neuropathol, 1998, 33: 15-26.
- [8] Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, et al. Anti-and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27(11-12): 1313-1323.
- [9] Kang S S, Lee J Y, Choi Y K, et al. Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14: 2261-2264.
- [10] Sloley B D, Ufichuk L J, Morley P, et al. Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of Ginkgo biloba leaves [J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52: 451-459.

[收稿日期] 2006-10-09

[修回日期] 2007-03-15

[本文编辑] 孙岩