

无瓣海桑果实提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠抗氧化能力的影响*

李家怡¹, 易湘茜^{1,2,3**}, 杜正彩¹, 高程海¹, 郝二伟^{1,3}, 邓家刚^{1,3}

(1. 广西中医药大学药学院 南宁 530020; 2. 暨南大学药学院 广州 510632;
3. 广西壮族自治区药用植物研究所 南宁 530023)

摘要:目的:研究无瓣海桑(*Sonneratia apetala*)果实提取物对D-半乳糖致衰老小鼠抗氧化能力的影响。方法:选用D-半乳糖(D-gal)诱导建立衰老小鼠模型,并分别灌胃无瓣海桑果实醇提物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物,观察无瓣海桑果实各提取物对衰老小鼠血清、心脏和肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)的影响。结果:与模型组相比,无瓣海桑果实提取物可以有效提高衰老小鼠体内SOD、GSH-Px酶活力,降低MDA含量($P < 0.05$)。结论:无瓣海桑果实提取物能有效提高D-半乳糖致衰老小鼠体内抗氧化能力从而达到延缓衰老的作用。

关键词:无瓣海桑果实 抗衰老 超氧化物歧化酶 谷胱甘肽过氧化物酶 丙二醛

doi:10.11842/wst.2019.04.013 中图分类号:R285 文献标识码:A

无瓣海桑(*Sonneratia apetala*)为海桑科海桑属乔木,广泛分布在我国海南岛、广西、广东、福建和台湾等省^[1]。无瓣海桑果实可食用,其产量大,含有大量的氨基酸、总酚、花青素等^[2-4]。研究组对无瓣海桑果实醇提物 and 不同极性提取物研究发现其具有强的体外清除自由基能力^[5]。抗衰老与自由基的清除具有密切关系,体内的自由基大量积累会最终导致机体细胞的衰老与死亡。目前还未见无瓣海桑果实的体内抗衰老作用研究,本研究旨在探讨无瓣海桑果实醇提物和各极性提取物的抗衰老作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性昆明小鼠 108 只,体重 18-22 g,由广西医科

大学实验动物中心提供,许可证号为 SCXK 桂 2014-0002。常规饲养在动物房内,温度为 23℃,湿度为 45-55%,自然光线下养殖,昼夜比为 1:1,自由进食、进水。

1.2 无瓣海桑果实醇提物及不同极性提取物制备

同文献[5],摘取新鲜成熟的无瓣海桑果实,用 95% 乙醇浸泡减压浓缩后得到乙醇提取物(EE),并依次采用乙酸乙酯、正丁醇萃取得到乙酸乙酯提取物(EAE)和正丁醇提取物(BE),减压浓缩,真空冷冻干燥后备用。

1.3 主要试剂

D-半乳糖和水溶性维生素 E(95%)由索莱宝公司提供(批号分别为 D8310、ST9160);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)试剂盒由南京建成生物工程公司所提供(批号分别为 20170214、20170220、20170213)。

1.4 主要仪器

Infinite 200 酶标仪(奥地利 TECAN 公司),ST16R

收稿日期:2018-04-28

修回日期:2019-04-19

* 广西科学技术厅中药药效研究重点实验室建设项目(17-259-20);广西中药药效研究重点实验室,负责人:邓家刚;中国博士后管理委员会中国博士后科学基金面上资助项目(2016M602920XB);红树白骨壤果实中苯乙醇苷类化合物调控 VD 信号通路研究,负责人:易湘茜;广西壮族自治区人力资源与社会保障厅博士后专项资助项目:易湘茜博士后常规性资助,负责人:易湘茜。

** 通讯作者:易湘茜,硕士生导师,副教授,主要研究方向:海洋中药药效物质基础及产品开发。

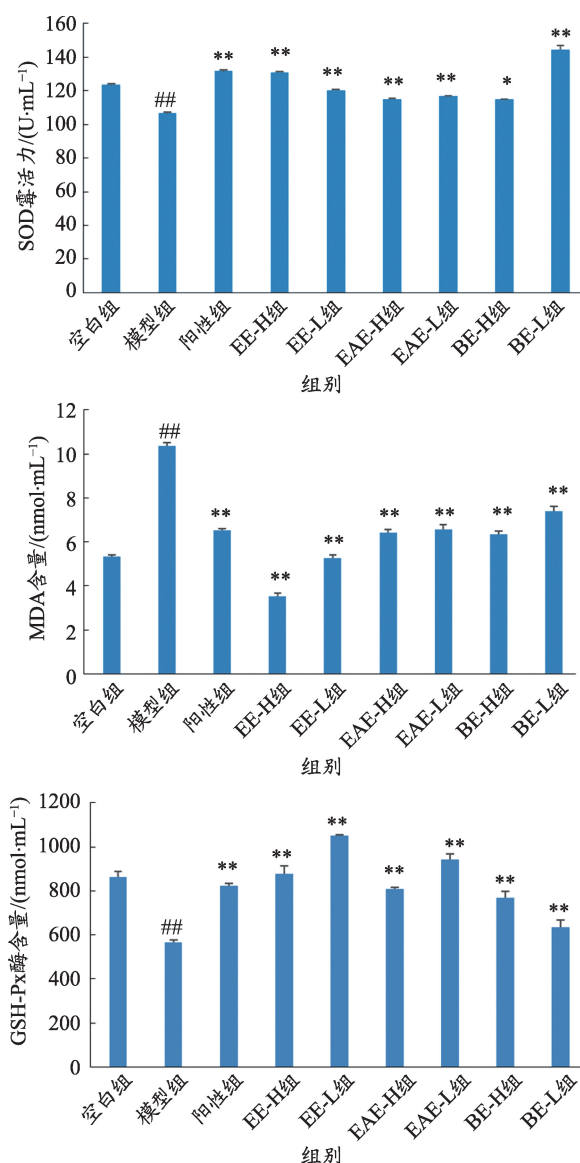


图1 各组小鼠血清中SOD、GSH-Px、MDA测定结果

注:与空白组相比,^{*} $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

台式高速冷冻离心机(德国 Thermo 公司),HH-S6 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),Carry 100 紫外分光光度计(美国瓦里安公司),DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.5 动物分组、衰老模型建立及给药

小鼠适应环境 3~5 天后,将其按体重随机分成空白组、模型组、阳性组(水溶性维生素 E, V_E $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、无瓣海桑果实乙醇提取物高剂量组(EE-H 组)、低剂量组(EE-L 组)结合预实验结果确定浓度分别为 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;按照萃取过程中各自的得率,换算为和乙醇提取物高、低剂量对应同等剂量,无瓣海

桑果实乙酸乙酯提取物高剂量组(EAE-H 组)、低剂量组(EAE-L 组)浓度分别为 $76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,无瓣海桑果实正丁醇提取物高剂量组(BE-H 组)、低剂量组(BE-L 组)浓度分别为 $19 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $9.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每组各 12 只小鼠。除空白组外,其余各组小鼠每日皮下注射 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ D-半乳糖溶液,连续注射 13 周诱导建立衰老小鼠模型,空白组注射等量生理盐水。第 8 周开始灌胃给药,连续灌胃给药 42 天,空白组和模型组灌胃等体积蒸馏水,灌胃体积统一为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,药物全部用蒸馏水溶解。实验结束后次日摘眼球取血,脱臼处死小鼠,采集实验样本,测定相关指标。

1.6 血清中 SOD、GSH-Px、MDA 的测定

小鼠眼球摘除取血,常温静置 1.5 h 后, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离得到血清。参照试剂盒中测定说明书的方法和步骤对血清进行测定 SOD、GSH-Px 和 MDA。

1.7 肝脏和心脏中 SOD、GSH-Px、MDA 的测定

脱臼处死小鼠,低温条件下取出其心脏和肝脏,用生理盐水洗去多余的血液,滤纸吸干后称重,分别用匀浆器匀浆,用生理盐水稀释成 10% 肝脏匀浆和心脏匀浆, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液参照试剂盒中说明书要求测定肝脏和心脏中 SOD、GSH-Px 和 MDA 水平。

1.8 统计分析

实验结果采用 SPSS20.0 软件进行分析。使用单因素方差分析进行统计学分析,然后进行 Tukey 检验, $P < 0.05$ 时表示具有统计学差异,数据表示为 $(\bar{x} \pm s)$ 。

2 结果

2.1 无瓣海桑果实提取物对衰老小鼠血清 SOD、GSH-Px、MDA 的影响

结果如图 1 所示,与空白组相比,模型组小鼠血清中的 SOD、GSH-Px 酶活力显著下降($P < 0.01$),MDA 含量显著增加($P < 0.01$),表明衰老模型建立成功,模型组小鼠抗氧化能力下降。与模型组相比,阳性组小鼠血清中 SOD、GSH-Px 酶活力显著增加($P < 0.01$),MDA 含量显著降低($P < 0.01$),表明 VE 能有效提高衰老小鼠抗氧化能力,与前人研究一致^[6]。与模型组相比,EE-H 组和 EE-L 组小鼠血清中 SOD、GSH-Px 活力均显著增加($P < 0.01$),MDA 的含量显著减少($P < 0.01$),无瓣海桑果实醇提物能有效提高衰老小鼠体内的抗氧化酶活力,减少脂质过氧化。与模型组相比,EAE-H 组和 EAE-L 组小鼠血清中 SOD、GSH-Px 酶活

力显著提高($P < 0.01$),MDA 含量显著降低($P < 0.01$),表明无瓣海桑果实乙酸乙酯提取物能有效改善因衰老造成的抗氧化酶活力下降和脂质过氧化含量增加。与模型组相比,BE-H 组和 BE-L 组小鼠血清中 SOD 活力均具有差异性($P < 0.05$)。BE-H 组和 BE-L 组小鼠血清中的 GSH-Px 酶活力与 MDA 含量均具有显著性差异($P < 0.01$),表明无瓣海桑果实正丁醇提取物能有效提高衰老模型小鼠血清中 SOD、GSH-Px 酶活力,减少 MDA 的含量。

2.2 无瓣海桑果实提取物对衰老小鼠心脏 SOD、GSH-Px、MDA 的影响

结果如图 2 所示,与空白组相比,模型组小鼠心脏中 SOD、GSH-Px 活力显著降低($P < 0.01$),体内清除自由基能力下降,MDA 含量显著提高($P < 0.01$),表明衰老模型建立成功。与模型组相比,EE-H 组和 EE-L 组小鼠心脏中 SOD 活力显著上升($P < 0.01$),MDA 含量显著下降($P < 0.01$),无瓣海桑果实醇提物能有效提高衰老小鼠心脏中抗氧化能力,高剂量效果优于低剂量效果。与模型组相比,EAE-L 组小鼠心脏中 SOD、GSH-Px 酶活力显著增加($P < 0.01$)。EAE-H 组和 EAE-L 组小鼠心脏中 MDA 含量显著性下降($P < 0.01$),其中 EAE-L 组效果与空白组接近。与模型组相比,BE-H 组小鼠心脏中 SOD 酶活力显著增加($P < 0.01$),MDA 含量显著下降($P < 0.01$),效果与给药浓度呈一定的量效关系。

2.3 无瓣海桑果实提取物对衰老小鼠肝脏 SOD、GSH-Px、MDA 的影响

结果如图 3 所示,与空白组相比,模型组肝脏中的 SOD、GSH-Px 酶活力显著降低($P < 0.01$),肝脏抗氧化酶活力降低,MDA 的含量增加并具有差异($P < 0.05$),表明衰老模型建立成功。与模型组相比,EE-H 组和 EE-L 组小鼠肝脏中 SOD 酶活力显著增加($P < 0.01$),EE-H 组小鼠肝脏中 MDA 含量降低,并具有差异性($P < 0.05$),表明无瓣海桑果实醇提物能提高衰老小鼠肝脏的抗氧化酶活力,减少脂质过氧化,高剂量效果优于低剂量组效果。与模型组相比,EAE-L 组小鼠肝脏中 MDA 含量显著降低($P < 0.01$),EAE-H 组小鼠肝脏中 GSH-Px 酶活力显著增加($P < 0.01$),表明无瓣海桑果实乙酸乙酯提取物能在一定剂量上增加衰老小鼠肝脏的抗氧化酶活力,并减少有害物质在肝脏的积累。与模型组相比,BE-L 组小鼠肝脏 SOD 酶活力和 GSH-Px 酶活力具有差异性($P < 0.01$, $P < 0.05$),MDA 含量

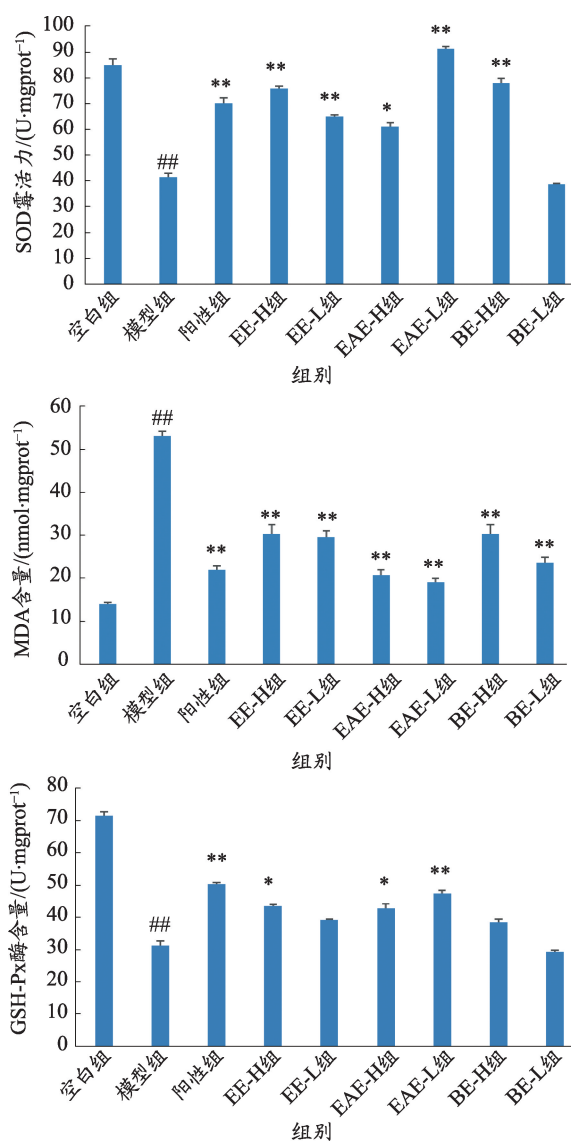


图2 各组小鼠心脏中SOD、GSH-Px、MDA测定结果

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

降低,具有统计学意义($P < 0.05$),表明无瓣海桑果实正丁醇提取物能有效改善由于衰老引起的SOD、GSH-Px 酶活力下降和MDA大量积累。其中BE-L组效果接近空白组效果。

3 总结与讨论

自由基与衰老密切相关,活性氧的增多,会导致体内自由基失衡,促进机体体内脂质过氧化,对细胞产生损伤^[7]。超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内主要的抗氧化酶,其活力的高低可间接反映机体消除自由基的能力大小^[8]。丙二醛

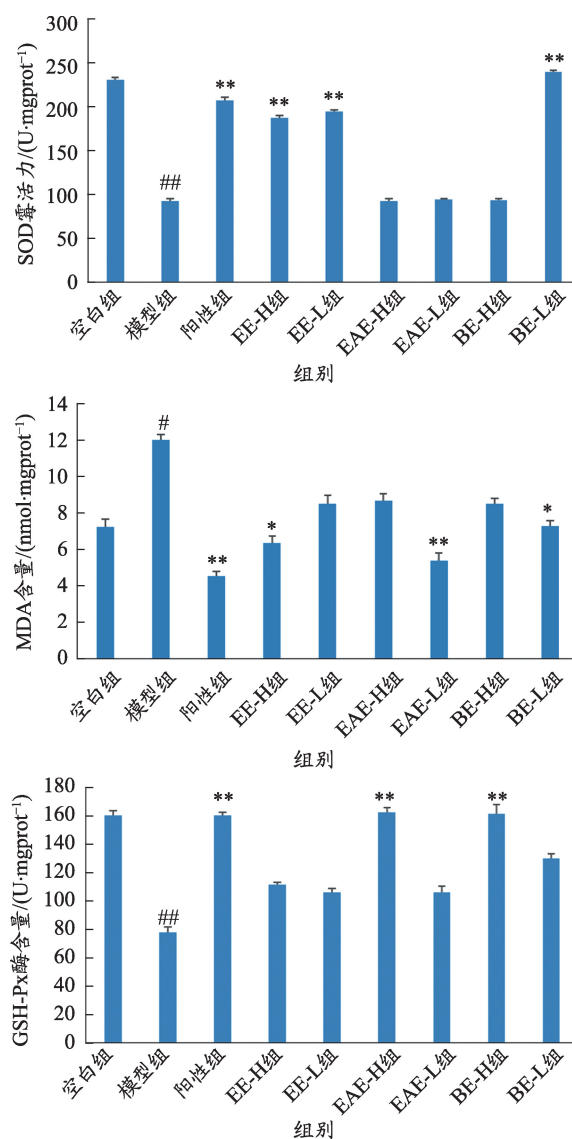


图3 各组小鼠肝脏中SOD、GSH-Px、MDA测定结果

与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

(MDA)是衡量机体自由基代谢的敏感指标,其含量能客观地反映机体产生自由基的水平^[9]。许多研究结果表明,衰老小鼠或大鼠体内过量产生的自由基造成氧自由基代谢失衡,各项细胞功能紊乱,SOD活力和GSH-PX活力明显下降,MDA含量明显上升,是机体已

经衰老的表现^[10]。所以测定SOD、GSH-Px和MDA有助于了解机体的衰老情况。

实验中采用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇三种极性溶剂对乙醇提取物进行萃取。氯仿极性最小,获得的氯仿萃取物成分都是小极性油类成分。前期用体外细胞学定量分析方法(CAA法)测试了各萃取物的活性,实验结果发现氯仿萃取物及残余水相没有显示出活性。另外,如果只用氯仿和正丁醇来做乙醇提取物的萃取溶剂,虽能分别获得小极性分子萃取部分和大极性分子萃取部分,但会造成中大极性成分都集中在正丁醇层,特别是该萃取部分又显示出良好的活性,较难区分究竟是中极性分子部分还是大极性分子部分的活性更强。因此,选择两者分子有部分交叉的乙酸乙酯和正丁醇相作为活性测试部位更适合。

本次实验结果显示,与空白组相比,模型组小鼠的SOD、GSH-Px活力均显著性下降,MDA含量显著增加,表明使用D-半乳糖连续注射小鼠可造成小鼠衰老,致衰老模型建模成功。而阳性药物维生素E作为具有显著抗氧化效果并被广泛使用的抗衰老药物,在实验结果中,各项指标与模型组相比均具有差异性,表明维生素E具有良好的抗衰老效果,与前人研究结果相同。

本次实验结果显示,无瓣海桑果实醇提物具有提高衰老小鼠体内SOD、GSH-Px酶活力,降低MDA含量的作用,效果与浓度具有一定的量效关系。无瓣海桑果实醇提物的乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物均能有效改善衰老小鼠体内抗氧化水平。其中BE-L组能有效提高衰老小鼠血清、肝脏中SOD、GSH-Px酶活力,降低MDA含量,且效果接近空白组。

综上所述,无瓣海桑果实醇提物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物均具有一定的抗衰老作用,通过增加SOD、GSH-Px酶活力和降低MDA的含量,清除机体内过量的自由基,达到抗衰老的目的。其中,无瓣海桑果实正丁醇提取物组抗氧化效果与空白组接近,推测其是无瓣海桑果实延缓衰老、改善记忆的主要活性部位。

参考文献

- 王瑞江, 陈忠毅. 海桑科的系统进化及地理分布. 广西植物, 2002, 22(3): 214-219.
- 林海生, 宋文东. 无瓣海桑叶子和果实中氨基酸成分的检测分析. 氨基酸和生物资源, 2009, 31(2): 76-78.
- 林海生, 宋文东, 吴婕, 等. 无瓣海桑叶子和果实中脂肪酸成分的检测分析. 福建分析测试, 2009, 18(3): 5-9.
- Patra J K, Das S K, Thatoi H. Phytochemical profiling and bioactivity of a mangrove plant, *Sonneratia apetala*, from Odisha Coast of India. *Chin J*

- Integr Med*, 2015, 21(4): 274–285.
- 5 易湘茜, 李家怡, 高程海, 等. 无瓣海桑果实乙醇提取物及其不同极性萃取物抗氧化活性. *食品工业科技*, 2017, 38(19): 27–30.
 - 6 邱玉朗, 万伶俐, 刘海燕, 等. 维生素E和有机硒对小鼠生长性能、应激时抗氧化指标的影响. *黑龙江畜牧兽医*, 2010, 21: 125–126.
 - 7 张延英, 李广远, 吴红彦, 等. 锁阳蜜对小鼠抗应激及抗衰老的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(2): 33–34.
 - 8 何志坚, 施旻, 刘海云. 菟丝子提取D-半乳糖所致衰老小鼠的抗衰老作用. *中国老年学杂志*, 2015, 35(19): 5444–5446.
 - 9 王岚, 梁日欣, 杨滨, 等. 黄芩及红花水提物对快速老化模型小鼠的抗衰老作用研究. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 16(13): 159–161.
 - 10 邓秀婷, 罗姮, 李彦彬, 等. 桑葚提取液D-半乳糖致衰老小鼠抗氧化能力的影响. *中国老年学杂志*, 2016, 36(1): 36–37.

Effect of the Extracts of *Sonneratiaapetala* Fruit on Antioxidative Ability in Aging Mice Induced by D-galactose

Li Jiayi¹, Yi Xiangxi^{1,2,3}, Du Zhengcai¹, Gao Chenghai¹, Hao Erwei^{1,3}, Deng Jiagang^{1,3}

(1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China;

2. School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

3. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

Abstract: To study the effect of extracts of *Sonneratiaapetala* fruit on the antioxidant capacity of aging mice induced by D-galactose. D-galactose (D-gal) was selected to establish a mouse model of aging. The aged mice were fed with extracts of *Sonneratiaapetala* fruit, alcohol extracts, and ethyl acetate extracts respectively. The effects of extracts on superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) in serum, heart and liver of aging mice were observed. The experimental results show that, compared with the model group, the extract of *Sonneratiaapetala* fruit can effectively increase the activity of SOD and GSH-Px enzymes and reduce the content of MDA in aging mice ($P < 0.05$). The results showed that the extract of *Sonneratiaapetala* fruit extract can effectively improve the anti-oxidation ability of aging mice induced by D-galactose, so as to achieve the effect of delaying aging.

Keywords: *Sonneratiaapetala* fruit, anti-aging, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, malondialdehyde

(责任编辑:刘 宁,责任译审:王 昭)