

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.05.026

杨子明,刘金磊,颜小捷,等.干花豆抗衰老有效部位的研究[J].广西植物,2014,34(5):723—726

Yang ZM, Liu JL, Yan XJ, et al. Protective effects of *Fordia cauliflora* hemsl on the D-galactose induced senile dementia model mice[J]. *Guihaia*, 2014, 34(5):723—726

干花豆抗衰老有效部位的研究

杨子明, 刘金磊*, 颜小捷, 李典鹏

(广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘要: 采用小鼠避暗行为学实验测定干花豆对老年痴呆小鼠记忆能力的影响,通过测定血液中的甘油三酯、总胆固醇及血液和大脑中的抗氧化指标来评价干花豆抗衰老作用。结果表明:干花豆各剂量组均能降低血脂水平,提高抗氧化能力,其中粗提物和正丁醇组有改善记忆力的作用,说明干花豆抗衰老的有效部位可能在正丁醇提取部位。

关键词: 老年性痴呆症小鼠; 学习记忆能力; 潜伏时间; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: Q946; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)05-0723-04

Protective effects of *fordia cauliflora* hemsl on the D-galactose induced senile dementia model mice

YANG Zi-Ming, LIU Jin-Lei*, YAN Xiao-Jie, LI Dian-Peng

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, China)

Abstract: KM Alzheimer's disease mice models caused by D-galactose, the abilities of learning and memory of mice were investigated by avoid dark experiment in all animals, and antioxidant were used to study protective effects of *fordia cauliflora* hemsl on the D-galactose induced senile dementia model mice. *Fordia cauliflora* hemsl could increased antioxidant and decreased lipids, but the results suggested that *fordia cauliflora* hemsl and *fordia cauliflora* hemsl butanol extract might be beneficial to improving the learning and memory behaviors in mice with Alzheimers' disease induced by D-galactose. The results of pharmacological experiment results confirmed that the active part of *fordia cauliflora* hemsl butanol extract.

Key words: aging mice; ability of learning and memory; latency; SOD; MDA

干花豆(*Fordia cauliflora*)为豆科蝶形花亚科干花豆属植物,又名野京豆、水罗伞、土甘草、虾须草、玉郎伞等,广西壮语称“仁推”,瑶语称“凡台”。干花豆性辛、平,味甘、微酸,无毒,具有散淤消肿、止痛宁神、润肺化痰等功效。在广西壮、瑶族用于风湿骨痛、跌打损伤、骨折、小儿痴呆、小儿疳积、肌痿症、体虚及产妇身体复元等症(梁志远,2005)。现代药

理学研究表明,干花豆具有抗炎(汤祖青等,2003)、抗氧化(吴植强等,2004)、抗衰老(韦奇志等,2003)、提高记忆力(顾正余等,1993)等作用,但提高记忆力和延缓衰老的有效部位并不清楚。本研究为了探讨干花豆抗衰老的有效部位,对干花豆粗提物及其分离得到的各个部位进行研究,以确定干花豆提取物的有效部位,阐明干花豆抗衰老的药理作用机制,为

收稿日期: 2013-12-17 修回日期: 2014-03-10

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 1140001-36); 桂林市科技开发项目(20110107-2); 广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 09034); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室主任基金(ZRJ2013-6)。

作者简介: 杨子明(1982-),男,广西兴安县人,硕士研究生,助理研究员,从事植物活性物开发与利用研究,(E-mail)yangziming198310@126.com。

*通讯作者: 刘金磊,副研究员,从事植物活性物开发与利用研究,(E-mail)liujinlei@126.com。

进一步开发利用干花豆,促进发展我国的珍稀中草药资源,特别是广西少数民族地区的资源打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

干花豆,购自广西贺州八步区;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)测定试剂盒,四川迈克;吡拉西坦片,宜昌人福药业有限责任公司;D-半乳糖,bioshapr 公司;其它试剂是国产分析纯。

1.2 仪器

RT-9100 型半自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);TGL-16R 型高速冷冻离心机(珠海黑马公司);BA-200 小鼠避暗仪(成都泰盟);METTLER AT200 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,体重 18~22 g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司。生产许可证号:SCXK(湘)2009-0004。

1.4 干花豆的制备方法

取干花豆根、枝共 28.6 kg,阴干,粉碎,用 95% 乙醇冷浸提取 2 次,合并提取液减压浓缩,得乙醇浸膏约 470 g,取 410 g 乙醇浸膏用去离子水溶解,用乙酸乙酯 2.5 L 萃取后处理得乙酸乙酯浸膏 148 g,正丁醇 2.5 L 萃取后处理得正丁醇浸膏 59 g,取后水溶液浓缩得水部分浸膏 200 g。

1.5 老年痴呆模型小鼠的建立

取昆明系小鼠 84 只,随机分成 7 组:对照组、模型组、吡拉西坦片组(阳性组)、干花豆粗提物组和干花豆乙酸乙酯组、干花豆正丁醇组、干花豆水洗组,每组 12 只。除对照组注射生理盐水外,其余各组每天按 1 200 mg·kg⁻¹腹腔注射 D-半乳糖,连续注射 6 周。干花豆各组小鼠按生药量 60 g·kg⁻¹灌胃,对照组和模型组小鼠灌胃等量的蒸馏水,每天 1 次,连续 6 周。

1.6 避暗行为学实验检查

实验第 43 天,将小鼠放入明室,记录首次小鼠进入暗室次数(错误次数),作为学习能力成绩。24 h 后再次测验,记录潜伏期(将小鼠放入明室的时候,开始

计时,到小鼠进入暗室被电击的时间)和 10 min 内小鼠被电击次数(错误次数),作为记忆保持成绩。

1.7 胸腺指数、脾脏指数、血脂及抗氧化能力的测定

第 45 天,小鼠禁食不禁水,称重,眼球取血,7℃ 保存备用。处死小鼠后,取胸腺、脾脏和大脑,称重,计算胸腺指数、脾脏指数。取出的大脑,用冰冷的 0.9% 的生理盐水制成的匀浆液,离心,取上清液,-20℃ 保存备用。血脂指标及血浆、大脑抗氧化能力指标的测定按试剂盒说明进行操作。

1.8 统计学方法

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本之间的两两比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 干花豆对小鼠记忆力的影响

从表 1 可以看出,连续给药 42 d 后,与正常组比较,模型组首次错误数增加,潜伏期缩短,24 h 后错误次数增加,但没有统计学意义;与模型组比较,干花豆正丁醇组首次错误数减少,潜伏期延长,24 h 后错误次数减少,有统计学意义。

表 1 干花豆对小鼠记忆力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Effect of *fordia cauliflora* hemsl on memory in mice

组别 Group	首次错误 次数 (n) No. of first errors	潜伏期 (s) Incubation period	24 h 后 错误次数 (n) No. of 24 h errors
正常对照组 Solvent control	1.1±0.3	486.5±208.1	0.3±0.5
模型组 Model control	2.2±0.4	380.0±0.0	0.9±0.5
吡拉西坦片组 Piracetam	1.2±0.4	521.3±186.5	0.2±0.4
干花豆粗提物组 Total extract	1.0±0.0 [#]	600.0±0.0 [#]	0.0±0.0 [#]
干花豆乙酸乙酯组 Ethyl acetate extract	1.0±0.0	534.8±112.8	0.3±0.5
干花豆正丁醇组 Butyl alcohol extract	1.0±0.0 [#]	600.0±0.0 [#]	0.0±0.0 [#]
干花豆水洗组 Water extract	1.3±0.5	483.0±206.0	0.4±0.5

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; Compared with model group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$. The same below.

2.2 干花豆对小鼠体重的影响

从表 2 可以看出,连续给药 42 d 后,与正常组比较,模型组小鼠体重没有显著性影响;与模型组比较,干花豆各组小鼠体重没有显著性影响。

表 2 干花豆对小鼠体重的影响

Table 2 Effect of *fordia cauliflora* hemsl on body weight levels in mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别 Group	第一天 (g) The first day	第四十二天 (g) The 42 day
正常对照组 Solvent control	35.2±3.1	40.6±4.3
模型组 Model control	34.4±1.5	41.7±2.9
吡拉西坦片组 Piracetam	35.2±2.2	41.7±4.9
干花豆粗提取物组 Total extract	34.2±2.3	41.7±3.2
干花豆乙酸乙酯组 Ethyl acetate extract	35.9±2.7	41.1±3.4
干花豆正丁醇组 Butyl alcohol extract	34.7±2.7	42.4±3.2
干花豆水洗组 Water extract	34.6±2.0	43.5±3.6

2.3 干花豆对小鼠胸腺指数、脾脏指数的影响

从表 3 看出,连续给药 42 d 后,与正常组比较,模型组胸腺指数降低,有统计学意义;与模型组比较,干花豆粗提取物组胸腺指数升高,有统计学意义。

表 3 干花豆对小鼠胸腺指数、脾脏指数的影响

Tab. 3 Effect of *fordia cauliflora* hemsl on immune organ indexes in mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别 Group	胸腺指数 (mg/g) Thymus index	脾脏指数 (mg/g) Spleen index
正常对照组 Solvent control	2.09±0.48	2.09±0.28
模型组 Model control	1.78±0.43 *	2.18±0.78
吡拉西坦片组 Piracetam	1.78±0.26	2.06±0.50
干花豆粗提取物组 Total extract	2.08±0.22 [#]	2.28±0.43
干花豆乙酸乙酯组 Ethyl acetate extract	1.78±0.44	2.30±0.58
干花豆正丁醇组 Butyl alcohol extract	1.76±0.26	2.46±0.71
干花豆水洗组 Water extract	2.00±0.51	2.28±0.47

2.4 干花豆对小鼠血脂的影响

从表 4 可以看出,连续给药 42 d 后,与正常组比较,模型组对甘油三酯和总胆固醇没有影响;与模型组比较,干花豆各剂量组均可降低甘油三酯和胆固醇浓度,有统计学意义。

2.5 干花豆对小鼠血液抗氧化能力的影响

从表 5 可以看出,连续给药 42 d 后,与正常对照组比较,模型组 SOD 活性降低、MDA 含量升高,有统计学意义;与模型组比较,干花豆各剂量组均能升高 SOD 活性,降低 MDA 含量,有统计学意义;与模型组比较,阳性组能够降低 MDA 含量;有统计学意义。

表 4 干花豆对小鼠血脂的影响

Table 4 Effect of *fordia cauliflora* hemsl on lipids in mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别 Group	甘油三酯 TG (mmol/L)	总胆固醇 TC (mmol/L)
正常对照组 Solvent control	2.14±0.17	5.02±0.55
模型组 Model control	2.13±0.14	4.82±0.29
吡拉西坦片组 Piracetam	2.22±0.21	4.70±0.23
干花豆粗提取物组 Total extract	1.97±0.19 [#]	4.49±0.17 [#]
干花豆乙酸乙酯组 Ethyl acetate extract	1.88±0.10 [#]	4.36±0.37 [#]
干花豆正丁醇组 Butyl alcohol extract	1.98±0.22 [#]	4.42±0.41 [#]
干花豆水洗组 Water extract	1.96±0.08 [#]	4.42±0.21 [#]

表 5 干花豆对小鼠血液抗氧化能力的影响

Table 5 Effect of *fordia cauliflora* hemsl on the antioxidant capacity in plasma of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别 Group	超氧化物歧化酶 SOD (U/mL)	丙二醛 MDA (nmol/mL)
正常对照组 Solvent control	63.18±22.94	11.21±6.35
模型组 Model control	43.90±25.78 **	19.18±6.89 **
吡拉西坦片组 Piracetam	42.72±27.32	5.79±1.90 [#]
干花豆粗提取物组 Total extract	88.54±9.27 [#]	10.2±2.4 [#]
干花豆乙酸乙酯组 Ethyl acetate extract	98.14±12.69 [#]	4.54±0.94 [#]
干花豆正丁醇组 Butyl alcohol extract	106.35±10.34 [#]	6.78±5.68 [#]
干花豆水洗组 Water extract	107.70±18.02 [#]	5.58±5.13 [#]

2.6 干花豆对小鼠大脑抗氧化能力的影响

从表 6 可以看出,连续给药 42 d 后,与正常对照组比较,模型组 T-AOC、SOD、MDA 没有显著性影响;与模型组比较,干花豆各剂量组均能升高大脑 SOD、MDA 活性,有统计学意义;干花豆粗提取物组、干花豆正丁醇组、干花豆水洗组均能提高大脑总抗氧化能力,有同统计学意义;阳性组能降低 MDA 含量,有统计学意义。

3 讨论与结论

随着人类物质文明和生活水平的不断提高,人的寿命普遍延长,但脑的学习记忆功能却逐渐衰退。因此研究提高记忆力和抗衰老的药物有着重要的社会意义。D-半乳糖诱导衰老模型最早是徐敞本(1985)

表 6 干花豆对小鼠脑抗氧化能力的影响

Table 6 Effect of *fordia cauliflora* hemsl on the antioxidant capacity in brain of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别 Group	总抗氧化能力 (单位/g) T-AOC	超氧化物 歧化酶 (U/g) SOD	丙二醛 MDA (nmol/g)
正常对照组 Solvent control	12.32±1.49	435.5±128.1	0.849±0.151
模型组 Model control	13.25±1.31	484.2±198.5	0.748±0.191
吡拉西坦片组 Piracetam	12.98±1.42	499.9±99.7	0.680±0.116 [#]
干花豆粗提物组 Total extract	15.29±1.55 [#]	565.2±124.2 [#]	0.280±0.084 [#]
干花豆乙酸乙酯组 Ethyl acetate extract	13.98±0.64	555.5±107.7 [#]	0.401±0.217 [#]
干花豆正丁醇组 Butyl alcohol extract	15.58±1.80 [#]	567.3±208.5 [#]	0.226±0.103 [#]
干花豆水洗组 Water extract	16.08±2.11 [#]	599.2±146.9 [#]	0.320±0.217 [#]

提出使用 D-半乳糖诱导啮齿动物衰老模型进行延缓衰老药物研究。D-半乳糖特殊诱导动物衰老的机制与氧化应激损伤(Bosch, 2006)、钙稳态失调、线粒体老化(Wiesner *et al.*, 2004)、非酶糖基化反应、端粒短缩及端粒酶的活性下降(Serrano *et al.*, 2004),以及免疫功能减退(Chidgey *et al.*, 2006)有关。自由基理论在老年痴呆症中占有非常重要地位,实验研究已证实自由基具有致衰老的作用,D-半乳糖导致衰老模型也得到了自由基学说的验证(陈嘉等, 2013)。大脑组织中含有高浓度的不饱和脂肪酸,它们的氧化代谢十分旺盛,是自由基最容易攻击的靶器官,也是最容易发生病变及衰老的组织(Sheydina *et al.*, 2011)。使用 D-半乳糖导致的亚急性衰老小鼠模型非常接近自然衰老小鼠,当连续注射一定剂量的 D-半乳糖后,小鼠会出现行动迟缓、学习记忆能力下降等一系列衰老行为,同时使小鼠抗氧化能力降低(Kumar *et al.*, 2010)。衰老小鼠的血脂也有一定的升高,因此降血脂作用也可以作为抗衰老的指标之一。

避暗实验测量小鼠学习记忆能力是生理学、药理学及病理生理学实验中的一种经典方法。我们的实验研究发现只有干花豆粗提物组、干花豆正丁醇组能够提高 D-半乳糖诱导的老年痴呆小鼠学习记忆能力,但各组都能够提高抗氧化能力,降低血脂水平,这说明干花豆具有抗衰老作用,其有效部位可能在正丁醇部位。我们的研究还发现 D-半乳糖并不引起昆明小鼠大脑抗氧化能力的减弱,这与许扬等(2009)研究不同,其原因有待进一步研究。

参考文献:

- Chidgey AP, Boyd RL. 2006. Stemming the tide of thymic aging [J]. *Nat Immunol*, **7**(10):1 013—1 016
- Chen J(陈嘉), Gu FH(顾丰华), Liu X(刘翔), *et al.* 2013. Effect of SIPI-SCPd on improving learning and memory of dementia mice caused by D-galactose(石菖蒲水提取物 SIPI-SCPd 改善 D-半乳糖诱导的痴呆模型小鼠学习记忆的研究)[J]. *World Clin Drug*(世界临床药物)**34**(1):21—26
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging[J]. *Nature*, **408**(6 809):239—471
- Gu ZY(顾正余), Liu JL(刘建瓴), Zhang CC(张朝纯). 1993. Influence of *fordia cauliflora* hemsl on memory of mice(干花豆对小鼠记忆力的影响南京铁荀医学院学报)[J]. *J Nanjing Rail Med Coll*, **12**(2):84—86
- Kumar A, Prakash A, Dogra S. Naringin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by D-galactode in mice[J]. *Agr Food Chem Toxicol*, **48**(2):626—632
- Lian ZY(梁志远). 2005. Survey in research of chemical constituents and pharmacology function of *fordia cauliflora* hemsl(干花豆化学成分和药理作用研究概况)[J]. *J Guizhou Edu Coll: Nat Sci Edit*(贵州教育学院学报·自然科学), **16**(2):51—53
- Sheydina A, Riordon DR, Boheler KR. 2011. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging[J]. *Clin Sci (Lond)*, **121**(8):315—329
- Serrano F, Klann E. 2004. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus[J]. *Ageing Res Rev*, **3**(4):431
- Tang ZQ(汤祖青), Chen BS(陈邦树), Zhou Z(周智), *et al.* 2003. Studies on the anti-inflammatory activity of different extracts from *fordia cauliflora* hemsl(水罗伞多种提取物的抗炎作用研究)[J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*(中国民族民间医药杂志), **63**:223—225
- Wu ZQ(吴植强), Zhou Z(周智), Wei QZ(韦奇志), *et al.* 2004. Effects of probucol on the metabolism of high density lipoprotein cholesterol and their mechanism(水罗伞提取物对溴代苯小鼠肝损伤的保护作用和抗氧化作用)[J]. *Chin Pharmac Bull*(中国药理学通报), **20**(11):1 221—1 223
- Wei QQ(韦奇志), Wu ZQ(吴植强), Zhou Z(周智), *et al.* 2003. Researches on the acuity, toxicity and antisenility of the abstracts of *fordia cauliflora* hemsl(水罗伞提取物的抗衰老作用及急性毒性研究)[J]. *J Guangxi Trad Chin Med Univ*(广西中医药大学学报), **6**(2):37—40
- Wiesner RJ, Zsurka G, Kunz WS. 2006. Mitochondrial DNA damage and the aging process: facta and imaginations[J]. *Free Radic Res*, **40**(12):1 284—1 294
- Xu BB(徐敞本). 1985. Study on sub-acute toxicity of D-galactose (D-半乳糖的亚急性毒性)[R]. Second International Research Conference on Aging(第二届国际衰老研究会议), China(中国): Harbin(哈尔滨)
- Xu Y(许扬), Wu T(吴涛), Gu JL(顾佳黎), *et al.* 2009. Progress on dementia animal caused by D-galactose(D-半乳糖诱导衰老动物模型研究进展)[J]. *Chin J Ger*(中国老年学杂志), **29**(13):1 710—1 713