薏灵酒对 *D*- 半乳糖致衰老小鼠抗衰老作用的药效研究

刘继朔[1,2]，潘绵立[1,2]，胡 寒[1,2]，刘 艺[1,2]，沈龙海[1,2]*

（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437；
2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心，上海 200437）

摘要 目的 探讨薏灵酒对 *D*- 半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用。**方法** 除正常对照组，其余小鼠建立 *D*- 半乳糖致小鼠衰老模型，随机分为正常对照组、模型组、维生素 E 组、2% 和 5% 薏灵酒高剂量组和低剂量组，分析各组小鼠血清中超氧化物岐化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、过氧化氢酶（CAT）和总抗氧化能力（T-AOC）等指标，探讨薏灵酒对 *D*- 半乳糖致衰老小鼠的保护作用。通过 Morris 水迷宫试验评估薏灵酒对 *D*- 半乳糖致衰老小鼠学习、记忆能力的改善作用。**结果** 水迷宫试验结果显示，各组小鼠目标象限的游泳距离差异无统计学意义（$P > 0.05$），与正常对照组小鼠比较，模型组小鼠穿越原平台次数减少，2% 薏灵酒各剂量组和维生素 E 组穿越原平台次数均增加，但差异也无统计学意义（$P > 0.05$）；脾脏指数分析结果显示，与模型组小鼠比较，维生素 E 组、2% 和 5% 薏灵酒高剂量组小鼠脾脏指数增高，差异均具有统计学意义（$P < 0.01$）；与正常对照组小鼠比较，模型组小鼠血清 CAT 和 T-AOC 含量下降，MDA 含量增加（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；给予薏灵酒灌胃后，与模型组小鼠比较，2% 薏灵酒高剂量组和 5% 薏灵酒各剂量组小鼠血清 MDA 含量下降，2% 薏灵酒高剂量组小鼠 T-AOC 含量升高，2% 和 5% 薏灵酒各剂量组小鼠血清 SOD 和 CAT 含量均升高，且差异均具有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。**结论** 薏灵酒能改善 *D*- 半乳糖致衰老小鼠模型的学习记忆能力，能提高机体的抗氧化能力和免疫力，具有一定延缓衰老的作用。

关键词：薏灵酒；*D*- 半乳糖；衰老模型；抗氧化；学习记忆能力

中图分类号：R93；R-33 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-9188（2018）02-0120-05

DOI：10.13683/j.wph.2018.02.009

Anti-aging effect of Yiling wine in the *D*-galactose-induced aging mice

LIU Ji-shuo[1,2], PAN Mian-li[1,2], HU Han[1,2], LIU Yi[1,2], SHEN Long-hai[1,2]*

（*1.State Key Lab of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437;*
2. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation , Shanghai 200437, China）

Abstract: ***Objective*** To explore the anti-aging effect of Yiling wine on model of *D*-galactose-induced aging mice. ***Methods*** The other groups except the control group were establish the model of *D*-galactose-induced aging mice, all mice were randomly divided into control group, model group, vitamin E group, 2% and 5% each dose Yiling wine group. Obseving and collecting mice serum samples for biochemical indicators of superoxide dismutase（SOD）, malondialdehyde（MDA）, catalase（CAT）, and total antioxidant capacity（T-AOC）. Meanwhile, the effect of improving learning and memory abilities were investigated through the Morris water maze test. ***Results*** In Morris water maze test, there was no significant difference in swimming distance of the mice in each group（$P>0.05$）. But compared with the control group, times that mice across the platform of model group were decreased, different doses of 2% Yiling wine and vitamin E groups increased the frequency of crossing the original platform, but there were no significant differences（$P>0.05$）; Compared with the model group, spleen index in vitamin E group, 2% and 5% high dose Yiling wine groups were higher, the differences were statistical

收稿日期：2017-11-16；**修回日期**：2017-12-04

作者简介：刘继朔，硕士研究生，研究方向：免疫药理学。

通信作者：沈龙海，硕士生导师，研究方向：免疫药理学与肿瘤药理。

基金项目：上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台（编号：15DZ2291700）。

significance（*P*<0.01）. Compared with the control group, model group decreased the levels of serum CAT and T-AOC but increased MDA level（*P*<0.05 or *P*<0.01）; After intragastric administration of Yiling wine, compared with model group, the levels of serum MDA were decreased in 2% high dose Yiling wine group and 5% Yiling wine in each dose group, the level of serum T-AOC was increased in 2% high dose Yiling wine group, the levels of serum SOD and CAT were increased in 2% and 5% Yiling wine in each dose group , and the differences were statistically significant（*P*<0.05 or *P*< 0.01）. ***Conclusion*** Yiling wine can improve the antioxidant capacity and immunity in *D*-galactose-induced aging mice, it can also improve their antioxidant capacity and immunity, it has a certain effect on retarding aging.

Key words: Yiling wine; *D*-galactose; aging model; anti-oxidation; learing and memory abilities

随着社会的进步及经济水平的发展，民众保健意识逐渐提高，对自身的健康日益关注[1]。“保持健康，延缓衰老”逐渐成为人们共同的追求目标。因此，提供更多优质功能性保健品满足日益增长的需求，十分必要。薏灵酒选用薏苡仁和灵芝为生产原料，具有保肝、护肝和降低血脂等功效，但其抗氧化、抗衰老作用鲜有报道。本研究采用 *D*- 半乳糖致小鼠衰老模型，探讨薏灵酒体内抗氧化作用和对模型动物学习记忆能力的影响，为薏灵酒的进一步开发提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物

ICR 小鼠（SPF 级，雌雄兼有，140 只，20 ～ 25 g）由上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司提供，生产许可证：SCXK（沪）2013-0016；动物质量合格证号：2008001665028；使用许可证：SYXK（沪）2014-0018。

1.2　药品与试剂

2% 薏灵酒（生产批号：201611011）、5% 薏灵酒（生产批号：201611012）均由杭州莱福特酒业有限公司生产；D- 半乳糖（生产批号：20161124）由国药集团化学试剂有限公司提供；维生素 E 胶丸（生产批号：160907）由上海信谊延安药业有限公司生产；生理盐水（生产批号：1612196T）由安徽双鹤药业有限责任公司生产；丙二醛（MDA）检测试剂盒（生产批号：20170316）、超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（生产批号：20170313）、总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒（生产批号：20170320）及过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒（生产批号：20170316）均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3　药物配制

D- 半乳糖配制：*D*- 半乳糖溶于生理盐水中，配成体积浓度为 20 mg/ml，储存于 4 ℃冰箱备用。维生素 E 配制：将维生素 E 胶丸用玉米油配制成 20 mg/ml 的药液，储存于 4℃冰箱备用。

1.4　分组及给药

将所有小鼠随机分为正常对照组、模型组、2% 薏灵酒低剂量组和高剂量组、5% 薏灵酒低剂量和高剂量组以及维生素 E 组，每组 20 只。除正常对照组外，其他各组小鼠每日颈背部皮下注射 *D*- 半乳糖 200 mg/kg（容量 0.1 ml/100 g 体重），一日 1 次，连续 66 d，正常对照组注射等体积生理盐水。同时 2% 薏灵酒低剂量组给予 2% 薏灵酒 0.25 ml/ 只灌胃，2% 薏灵酒高剂量组给予 2% 薏灵酒 0.5 ml/ 只灌胃，5% 薏灵酒低剂量组给予 5% 薏灵酒 0.25 ml/ 只灌胃，5% 薏灵酒高剂量组给予 5% 薏灵酒 0.5 ml/ 只灌胃，维生素 E 组给予 0.2 ml/ 只灌胃，正常对照组和模型组给予等量的纯水灌胃，所有组别均连续给药 66 d[2-3]。

1.5　Morris 水迷宫（MWM）行为测试试验

给药 66 d 后，正常对照组、模型组、维生素 E 组以及 2% 薏灵酒低剂量组和高剂量组，各组随机选出 5 只小鼠，进行水迷宫试验。各组小鼠训练 4 d，第 5 d 进行空间探索试验[4-5]。

仪器主要由直径分别为 120 cm 和 100 cm 以及高 50 cm 的双层不锈钢制成的圆形水池和可移动位置的平台组成，平台、水和池壁均染成黑色以隐蔽平台，试验过程中水池及周围环境保持不变。平台

直径 10 cm，高 28 cm，上面有横纹以便小鼠站稳。水池上空放置摄像机并与监视器和计算机连接。预先在水池里注入清水，使水面高出平台 1 ～ 2 cm，水温控制在 (20±2)℃左右，水中不能明显见到安全平台。水池等分为 4 个象限（从右下、右上、左上、左下分别是一至四象限）。将平台放在第三象限（目标象限）中间，在其他三个象限任选一点面向水池池壁将小鼠放入水中。

训练试验：用于测量小鼠对水迷宫学习和记忆的能力。试验历时 4 d。一日 4 次训练小鼠分别从 4 个不同的入水点入水，将小鼠面向池壁放入水中，每次 60 s。如果小鼠在 60 s 内未找到平台，需将其引至平台，这时潜伏期以 60 s 计。让小鼠停留 10 s，再放回笼中。

空间探索试验：用于测量小鼠学会寻找平台后，对平台空间位置记忆的能力。第 5 天试验时撤去平台，然后任选一个入水点将小鼠面向池壁放入水中，记录小鼠在 60 s 内经过平台的次数以及在原平台所在象限内游泳的距离。

1.6 脾脏指数的测定

试验终点，各组小鼠称重，摘眼球处死后常规解剖，取出脾脏进行称重，计算脏器指数，公式如下[6]：

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器重量/mg}\times 100}{\text{体重/g}}$$

1.7 组织标本采集及处理

小鼠摘眼球取血，放于非抗凝的 1.5 ml 移液管中，静置 2 h 后，3 000 r/min 离心 15 min，取上清，－ 80 ℃保存。

1.8 血清抗氧化指标检测

利用 **1.7** 方法制备血清上清液，按照试剂盒说明书，分别检测小鼠血清中 SOD、MDA、CAT 及 T-AOC 各项指标。

1.9 统计学方法

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，采用单因素方差分析比较各组差异，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 薏灵酒对小鼠学习记忆能力的影响

小鼠空间探索试验结果如表 1 所示，各组小鼠在目标象限游泳的距离差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组小鼠比较，模型组小鼠穿越原平台次数减少，2% 薏灵酒各剂量组和维生素 E 组小鼠穿越原平台次数均有所增加，但差异无统计学意义。

表 1 各组小鼠游泳距离以及穿越平台的次数
($\bar{x}\pm s$，$n = 5$)

Table 1 Swimming distance and times of crossed the platform in mice model ($\bar{x}\pm s$，$n = 5$)

组别	目标象限游泳距离/m	60 s内穿越平台次数/次
正常对照组	47.60±6.96	2.33±1.25
模型组	52.23±24.77	1.75±1.30
维生素 E 组	40.55±15.32	2.25±1.30
2% 薏灵酒低剂量组	46.68±8.07	2.67±1.70
2% 薏灵酒高剂量组	39.82±10.18	2.50±1.50

2.2 薏灵酒对小鼠脾脏指数的影响

小鼠脾脏指数分析显示，正常对照组与模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；但与模型组比较，维生素 E 组、2% 及 5% 薏灵酒高剂量组脾脏指数均升高，且差异有统计学意义 ($P < 0.01$，表 2)。

表 2 薏灵酒对模型小鼠脾脏指数的影响
($\bar{x}\pm s$，$n = 20$)

Table 2 Effect of Yiling wine on spleen index in mice model ($\bar{x}\pm s$，$n = 20$)

组别	体重/g	脾脏重量/mg	脾脏指数/mg·g^{-1}
正常对照组	38.18±1.63	0.11±0.02	2.86±0.61
模型组	36.05±3.17	0.11±0.02	3.08±0.51
维生素 E 组	34.64±1.63	0.13±0.02	3.64±0.45**
2% 薏灵酒低剂量组	34.26±2.14	0.11±0.01	3.34±0.36
2% 薏灵酒高剂量组	33.12±1.94	0.12±0.02	3.50±0.56**
5% 薏灵酒低剂量组	33.80±2.39	0.12±0.02	3.41±0.45
5% 薏灵酒高剂量组	34.02±2.58	0.12±0.02	3.52±0.55**

与模型组比较，$^{**}P < 0.01$

vs model group, $^{**}P<0.01$

2.3　薏灵酒对模型小鼠血清抗氧化指标的影响

各组小鼠血清 MDA、SOD、T-AOC 和 CAT 含量如表 3 所示。与正常对照组相比，模型组 MDA 含量升高，T-AOC、CAT 含量降低，差异具有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。与模型组相比，维生素 E 组、2% 薏灵酒高剂量组及 5% 薏灵酒各剂量组血清 MDA 含量均降低；维生素 E 组以及薏灵酒各剂量组血清 CAT 和 SOD 含量均升高；2% 薏灵酒高剂量组血清中 T-AOC 含量提高，差异均具有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。

3　讨论

D- 半乳糖建立的衰老模型是目前国内较常应用的衰老动物模型，其衰老反应接近于自然衰老。研究表明，*D*- 半乳糖造成的衰老模型可使受试动物出现认知功能障碍 [1]。Morris 水迷宫试验是一种强迫试验，动物在固定的水箱内游泳，学习寻找隐藏在水中的平台，通过记录动物在目标象限游泳距离、穿越水中平台的次数以及运动轨迹等数据，可以分析和推断动物的学习记忆能力，是一种有效测试小鼠空间记忆能力的方法 [7-8]。本研究结果显示，各组小鼠在目标象限的游泳距离虽没有明显的差异，但是 2% 薏灵酒和维生素 E 组小鼠穿越水中隐藏平台的次数比模型组明显增多，表明 2% 薏灵酒和维生素 E 组小鼠的学习记忆能力有了一定程度的改善。同时，数据显示，薏灵酒和维生素 E 组小鼠中，2% 薏灵酒低剂量组穿越平台的次数最多，多于 2% 薏灵酒高剂量组和维生素 E 组，提示低浓度薏灵酒有利于改善衰老小鼠的学习记忆功能，但是超过一定剂量范围的薏灵酒可能会对小鼠学习记忆功能造成一定的影响。

脾脏是机体重要的免疫器官，其结构的正常与否直接影响机体的免疫功能，脾脏指数是反映机体脾脏免疫功能的重要指征之一，其数值高低的变化可以反映机体免疫功能的状态 [6]。本次研究结果表明，高剂量薏灵酒可明显增加 *D*- 半乳糖致衰老模型小鼠的脾脏指数，提高衰老小鼠免疫力。

机体氧化应激与衰老有着密不可分的联系，SOD 和 CAT 在活性氧的代谢过程中发挥主要作用，体内 MDA 含量可间接反映体内自由基对机体的损伤程度，T-AOC 是机体防御体系抗氧化能力强弱的重要指标之一 [3, 9, 10-11]。本研究对相关氧化指标考察发现，*D*- 半乳糖致衰老模型小鼠血清中 SOD、CAT 和 T-AOC 含量均下降，MDA 含量增加。分别给予不同浓度、不同剂量的薏灵酒灌胃能使衰老模型小鼠血清 SOD、CAT 以及 T-AOC 不同程度升高，MDA 含量下降。提示薏灵酒能提高衰老小鼠清除自由基的能力，减少过氧化产物对机体的损伤，进而降低机体的老化程度，发挥其抗衰老作用。

4　结论

表 3　薏灵酒对小鼠血清中 MDA、SOD、T-AOC 及 CAT 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 20$）

Table 3　Effects of Yiling wine on the levels of serum MDA, SOD, T-AOC and CAT in model mice（$\bar{x}\pm s$，$n = 20$）

组别	血清 MDA/nmol·ml^{-1}	血清 SOD/U·ml^{-1}	血清 T-AOC/U·ml^{-1}	血清 CAT/U·ml^{-1}
正常对照组	4.52±0.93	49.15±1.27	8.81±1.42	4.59±1.50
模型组	6.27±1.93$^{\#\#}$	48.98±1.29	6.14±1.50$^{\#}$	1.38±0.72$^{\#\#}$
维生素 E 组	4.89±1.24*	50.99±1.54*	7.63±1.15	9.04±1.65**
2% 薏灵酒低剂量组	5.60±0.76	51.48±1.56**	7.96±1.03	4.54±1.24**
2% 薏灵酒高剂量组	4.56±1.66**	52.17±1.42**	9.19±2.86*	5.16±1.62**
5% 薏灵酒低剂量组	4.67±1.06*	51.02±1.57*	7.73±1.15	8.45±1.09**
5% 薏灵酒高剂量组	4.48±1.04**	51.95±1.50**	8.09±0.98	7.98±2.59**

与正常对照组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

vs normal control group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; *vs* model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

综上所述，在一定剂量范围内，薏灵酒对 *D*- 半乳糖致衰老小鼠脂质过氧化具有保护作用，可对抗氧化反应、延缓衰老，同时兼具改善衰老小鼠学习记忆能力和提高小鼠免疫力的功效。

参考文献：

[1] 朱坤杰, 孙建宁. 六味地黄丸对*D*-半乳糖所致衰老大鼠学习记忆的改善作用及机理[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(8): 44-46.

[2] Haider S, Liaquat L, Shahzad S, *et al*. A high dose of short term exogenous *D*-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process[J]. Life Sci, 2015, 124(3): 110-119.

[3] 黄双. *D*-半乳糖致衰老小鼠模型的研究：剂量和给药途径的影响[D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.

[4] Ting W, Guo J, Yang L, *et al*. Saponins from Panax japonicus, attenuate *D*-galactose-induced cognitive impairment throughits anti-oxidative and anti-apoptotic effects in rats[J]. J Pharm Pharmacol, 2015, 67(9): 1284-1296.

[5] Xian YF, Lin ZX, Zhao M, *et al*. Uncaria rhynchophylla ameliorates cognitive deficits induced by *D*-galactose in mice[J]. Planta Med, 2011, 77(18): 1977-1983.

[6] 王朝兰, 刘向国, 方正清, 等. 补肺汤对 COPD 肺气虚证模型大鼠胸腺指数和脾脏指数的影响[J]. 甘肃中医学院学报, 2011, 28(3): 1-4.

[7] Qu Z, Zhang J, Yang H, *et al*. Protective effect of tetrahydropalmatine against *D*-galactose induced memory impairmentin rat[J]. Physiol Behav, 2016, 154(2): 114-125.

[8] Ullah F, Ali T, Ullah N, *et al*. Caffeine prevents *D*-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain[J]. Neurochem Int, 2015, 90(11): 114-124.

[9] Shan Q, Lu J, Zheng Y, *et al*. Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by *D*-galactose[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, doi: 10.1155/2009/564737.

[10] Mladenov M, Gokik M, Hadzi-Petrushev N, *et al*. The relationship between antioxidant enzymes and lipid peroxidetion in senescent rat erythrocytes[J]. Physiol Res, 2015, 64(6): 891-896.

[11] Li WJ, Nie SP, Xie MY, *et al*. Ganoderma atrum polysaccharide attenuates oxidative stress induced by *D*-galactose in mouse brain[J]. Life Sci, 2011, 88(15-16): 713-718.

（责任编辑：王　佳）

（上接第 107 页）

[16] 雒湲, 熊明霞, 周良, 等. 导管腔内球囊扩张辅助拔除长期透析导管嵌顿1例[J]. 中国血液净化, 2016, 15(7): 383-384.

[17] 李洪, 白亚飞, 贺纪清, 等. 球囊扩张法拔取炭顿血液透析导管一例[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(2): 151-152.

[18] Foley PT, Carter RM, Uberoi R. Endovascular removal of long-term hemodialysis catheters[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2007, 30(5): 1079-1081.

[19] Curnis A, Coppola G, Racheli M, *et al.* Jugular pacing lead extraction with laser sheath: a case report[J]. Europace, 2010, 12(3): 447-448.

[20] Carrillo RG, Garisto JD, Salman L, *et al.* A novel technique for tethered dialysis catheter removal using the laser sheath[J]. Semin Dial, 2010, 22(6): 688-691.

[21] Calvagna GM, Evola R, Scardace G, *et al*. Single-operator experience with a mechanical approach for removal of pacing and implantable defibrillator leads[J]. Europace, 2009, 11(11): 1505-1509.

[22] Akgun S, Ak K, Tugrular S, *et al.* Median sternotomy for an unexpected complication of permanent hemodialysis catheters: "stuck catheter"[J]. Vasa, 2008, 37(3): 293-296.

[23] Liu T, Hanna N, Summers D. Retained central venous hemodialysis access catheters (Letter)[J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(3): 960-961.

[24] Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, *et al*. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from kidney disease: improving global outcomes (KDIGO)[J]. Kidney Int, 2005, 67(6): 2089-2100.

（责任编辑：雷　玲）