

蜂眠宁胶囊对 D-半乳糖小鼠抗衰老作用的实验研究

陈洪燕¹, 敖明章², 熊义涛^{1*}

(1. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430074; 2. 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要:目的 观察蜂眠宁胶囊对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的抗衰老作用, 为蜂眠宁胶囊预防和治疗老年痴呆症提供临床依据。方法 用 D-半乳糖制备小鼠衰老模型, 采用 Morris 水迷宫进行定位航行试验、空间搜索试验, 测定各组小鼠的逃避潜伏期及穿越平台次数; 并测定各组小鼠组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量。结果 与模型组相比, 蜂眠宁胶囊低剂量组(0.6g·kg⁻¹·d⁻¹)、高剂量组(0.9g·kg⁻¹·d⁻¹)逃避潜伏期均明显减少(P<0.05), 且穿越平台次数均显著增多(P<0.05, P<0.01); 蜂眠宁胶囊高剂量组(0.9g·kg⁻¹·d⁻¹)能显著提升 D-半乳糖所致衰老小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px 的活性, 降低脑组织中 MDA 的含量。结论 蜂眠宁胶囊能改善 D-半乳糖致衰老模型小鼠的学习记忆能力, 抑制其脑组织脂质过氧化, 具有抗衰老作用。

关键词:蜂眠宁胶囊; D-半乳糖衰老模型; 学习记忆; 抗氧化

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2017.01.028

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2017)01-0084-02

老年痴呆症根据其病因主要分为三大类, 即阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、血管性痴呆(VD)和混合型痴呆。老年痴呆症是一种多因素造成的神经退行性病变, 其临床主要症状表现为记忆力、智力、语言思维能力不可逆地进行性退化。蜂眠宁胶囊是由蜂胎冻干粉、黄芪、缬草、酸枣仁制备而成, 具有益肾养血、理气活血之功效。其中含有多种氨基酸^[1]、多种活性酶^[1]、多糖^[2]、缬草挥发油^[3]等生理活性物质, 具有较强的抗氧化活性。相关功能试验研究表明: 本产品具有显著地改善睡眠、延缓衰老的保健作用。本研究旨在观察蜂眠宁胶囊对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的学习记忆能力及机体抗氧化能力等抗衰老作用的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物 50 只健康昆明种雌性小鼠, SPF 级, 体重(30±3)g, 购自湖北省实验动物中心, 合格证号 SCXK(鄂)2012-0007。饲养时室内温度保持 24℃~28℃, 湿度在 50%~60%, 专室分笼饲养, 隔日更换垫料, 自由摄水, 摄食(标准饲料喂养)。

1.2 材料及试剂 蜂眠宁胶囊(由武汉惠尔生物科技有限公司生产, 批号: 20121101), D-半乳糖(购自美国 sigma 公司); 吡拉西坦(购自杭州民生药业集团有限公司, 批号: 20121010); 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20120801); 超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号为 20120725); 丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所生产, 批号: 20120318); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20120330); Morris 水迷宫(上海欣软信息科技有限公司); TDL-80-2B 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 方 法

1.3.1 动物分组及给药 50 只健康雌性小鼠, 随机分为 5 组, 每组 10 只。分别为: 空白对照组、模型对照组、蜂眠宁胶囊低剂量组、蜂眠宁胶囊高剂量组、吡拉西坦组。其中空白对照组每天颈

背部皮下注射生理盐水 15ml·kg⁻¹·d⁻¹, 其余各组每天颈背部皮下注射 D-半乳糖 120mg·kg⁻¹·d⁻¹。同时每天灌胃给药, 模型组、空白对照组灌胃给予生理盐水 10ml·kg⁻¹·d⁻¹, 蜂眠宁胶囊低、高剂量组分别灌胃给予蜂眠宁胶囊 0.6g·kg⁻¹·d⁻¹、0.9g·kg⁻¹·d⁻¹, 吡拉西坦组灌胃给予吡拉西坦 0.5g·kg⁻¹·d⁻¹。连续 30d。

1.3.2 定位航行试验 使用 Morris 水迷宫^[4]测定小鼠的学习和记忆能力。第 31 天开始进行试验, 共 4d。实验开始前小鼠自由游泳 2 min。正式实验每天训练 4 次, 每次 60s, 随机选择东、南、西、北 4 个入水点中的一个, 将小鼠面向池壁放入水中, 记录小鼠寻找并爬上平台所需时间, 该时间即为逃避潜伏期。如果实验小鼠在 60s 内未找到平台, 则由实验者将其引至平台, 该实验小鼠的逃避潜伏期记为 60s, 小鼠在平台上停留 20s。在每次训练完成后, 为防止小鼠体温过低导致死亡, 应迅速将小鼠洗净擦干, 并置于加热器旁烘干。每只小鼠训练次数共 16 次。计算每天各组小鼠 4 次逃避潜伏期。

1.3.3 空间搜索试验 用于测定小鼠对平台空间位置的记忆保持能力。试验小鼠训练 4 天后, 于第 5d 将平台撤离, 随机选取一个入水点将小鼠放入池中, 使小鼠在水中游泳 60s, 记录 60s 内小鼠第 1 次穿越平台所在位置所需的时间以及穿越原平台所在位置的次数。

1.3.4 生化指标测定^[5] 于第 37 天脱臼处死动物, 取全脑, 称重, 进行匀浆, 匀浆液再经 10000 r·min⁻¹ 低温离心, 取上清液, 测定组织蛋白含量、SOD 活性、GSH-Px 活性及 MDA 含量。组织中蛋白质含量使用马斯亮蓝法测定, 其他指标均按试剂盒说明进行操作。

1.4 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析, 各组间比较采用 t 检验, 显著性水平采用 P<0.05 和 P<0.01。

2 结 果

2.1 一般情况 经过 5d 的适应性饲养, 观察发现各组小鼠饮食正常, 精神状态良好、反应敏捷, 毛发柔顺光亮, 尿液浅黄色、透明; 模型复制期间, 空白对照组小鼠仅体重稳定增加, 其余无变化。模型组小鼠体重亦增加, 活动量减少, 精神萎靡, 反应迟钝, 皮毛稀疏干枯, 后期出现皮毛杂乱。体重测量结果表明: 5 组小鼠体重处死前与给药前相比均有明显增加, 但是小鼠组间体重在给药前和处死前均无显著性差异。

收稿日期: 2016-05-21; 修订日期: 2016-10-26

基金项目: 湖北省卫生厅中医药中西医结合科研项目(No. 2012Z-Y41)

作者简介: 陈洪燕(1973-), 女(汉族), 湖北蕲春人, 湖北省中医院副主任药师, 硕士学位, 主要从事中药新药研发、中药制剂工作。

* 通讯作者简介: 熊义涛(1966-), 男(汉族), 湖北广水人, 湖北省中医院主任药师, 学士学位, 主要从事中药新药研发工作。

2.2 定位航行试验结果 定位航行实验进行 4d 后,与空白对照组相比,模型组的潜伏期延长非常显著($P < 0.01$),说明造模成功。与模型组相比,蜂眠宁胶囊低剂量组、高剂量组及吡拉西坦组的潜伏期均显著缩短($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组小鼠定位航行试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	逃避潜伏期/s			
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
空白对照组	26.36 ± 11.24	19.97 ± 10.67	15.85 ± 8.27	18.75 ± 11.38
模型对照组	44.58 ± 22.71 [#]	39.23 ± 15.36 ^{##}	38.13 ± 14.94 ^{##}	37.06 ± 13.49 ^{##}
蜂眠宁胶囊低剂量组	35.53 ± 18.77	25.48 ± 14.01	24.98 ± 15.19	24.26 ± 12.52 [*]
蜂眠宁胶囊高剂量组	33.41 ± 17.52	22.26 ± 10.38	22.65 ± 15.88	23.14 ± 10.47 [*]
吡拉西坦组	32.87 ± 16.47	21.44 ± 11.52	22.95 ± 13.44	22.84 ± 10.42 [*]

与空白对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$; $n = 10$

2.3 空间搜索试验结果 与模型组相比,蜂眠宁胶囊低、高剂量组的潜伏期均显著缩短($P < 0.05$),穿越平台次数均显著增多($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中蜂眠宁胶囊高剂量组呈现出非常显著性差异。结果见表 2。

表 2 各组小鼠空间搜索试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	潜伏期/s	穿越平台次数
空白对照组	16.21 ± 8.63	3.9 ± 1.6
模型对照组	28.13 ± 14.51 [#]	1.9 ± 1.8 [#]
蜂眠宁胶囊低剂量组	17.15 ± 4.29 [*]	3.7 ± 1.9 [*]
蜂眠宁胶囊高剂量组	14.77 ± 3.23 [*]	4.4 ± 1.9 ^{**}
吡拉西坦组	16.45 ± 8.51 [*]	3.6 ± 1.6 [*]

与空白对照组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$; $n = 10$

2.4 蜂眠宁胶囊对小鼠脑组织中 SOD、MDA、GSH - Px 的影响 通过测定各组小鼠脑组织中的 SOD 活性,结果表明 D - 半乳糖诱导的模型组小鼠脑组织 SOD 活性相较于空白对照组下降非常显著($P < 0.01$),说明实验小鼠经 D - 半乳糖致诱导后脑组织出现了严重的损伤,由此说明模型复制成功。相较于模型组,蜂眠宁胶囊低剂量组、高剂量组及吡拉西坦组的小鼠脑组织中的 SOD 活性均有不同程度的提高,且差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中蜂眠宁高剂量组效果更为显著($P < 0.01$)。结果见表 3。

各组小鼠脑组织中的 MDA 含量测定结果显示,模型组小鼠脑组织中的 MDA 含量显著高于空白对照组($P < 0.05$),表明氧化应激及过氧化作用参与了脑氧化损伤模型的形成。蜂眠宁胶囊低剂量组、高剂量组均能在不同程度上降低脑组织中 MDA 含量($P < 0.05$)。结果见表 3。

测定各组小鼠脑组织中 GSH - Px 活性,结果表明:模型组小鼠脑组织匀浆中 GSH - Px 活性相较于空白对照组降低非常显著($P < 0.01$),说明模型复制成功。蜂眠宁胶囊高剂量组和吡拉西坦组与模型组相比均能提高 GSH - Px 活性($P < 0.05$),但蜂眠宁胶囊低剂量组与模型组比较,有一定提高,但无显著性差异。结果见表 3。

表 3 各组小鼠 SOD、MDA、GSH - Px 测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/	MDA/	GSH - Px/
	U · mg port ⁻¹	nmol · mg prot ⁻¹	U · mg port ⁻¹
空白对照组	151.7 ± 27.6	17.6 ± 8.7	2556.2 ± 578.3
模型对照组	104.5 ± 33.2 ^{##}	26.7 ± 10.5 [#]	1594.2 ± 479.5 ^{##}
蜂眠宁胶囊低剂量组	139.2 ± 38.3 [*]	17.3 ± 9.1 [*]	1913.5 ± 873.3
蜂眠宁胶囊高剂量组	145.5 ± 27.6 ^{**}	16.3 ± 6.1 [*]	2331.8 ± 969.4 [*]
吡拉西坦组	138.7 ± 36.1 [*]	17.1 ± 9.4 [*]	2366.1 ± 932.7 [*]

与空白对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.05$; $n = 10$

3 讨论

蜂眠宁胶囊是由蜂胎冻干粉、黄芪、缬草、酸枣仁制备而成。现代研究发现,蜂王幼虫粉具有延缓衰老和抗疲劳作用^[6]。黄芪的主要活性成分黄芪多糖可清除多种自由基,可抑制机体内的脂质过氧化反应,具有较好的抗氧化性^[7]。缬草挥发油具有一定的抗氧化作用^[8]。酸枣仁含皂苷类、黄酮类、脂肪油等成分^[9],具有抗肿瘤、增强免疫、耐缺氧、抗脂质过氧化等作用^[10]。诸药合奏,具有增强机体免疫功能,抗疲劳、延缓衰老,抗脂质过氧化等作用。

本实验采用 D - 半乳糖成功诱导小鼠致衰老模型^[11]。采用 Morris 水迷宫用于评判学习记忆功能^[4]。经水迷宫的定位航行实验发现,蜂眠宁胶囊各剂量组与模型组相比,小鼠寻找平台的潜伏期在第 4 天开始有明显减小,且具有显著性差异。空间搜索实验中,蜂眠宁胶囊各剂量组逃避潜伏期显著小于模型组,穿越平台次数显著高于模型组,表明蜂眠宁胶囊能明显改善 D - 半乳糖所致衰老模型小鼠的学习记忆能力。超氧化物歧化酶 SOD (Superoxide dismutase) 是消除氧自由基毒性效应最重要的酶性抗氧化剂。随着年龄的增长,体内 SOD 活力逐渐下降,产生的过量自由基无法及时清除,即攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化物(如 MDA 等),最终引起细胞破裂和进行性病变,造成衰老并加速细胞的凋亡。通过检测大脑皮质的 SOD 活性和 MDA 含量可间接反映脑细胞内脂质过氧化及细胞损伤的程度。GSH - Px 是体内重要的抗氧化酶之一,具有清除脂质过氧化物的功能,其活性水平能反映机体的抗氧化能力。因此,我们采用小鼠脑组织中 SOD、GSH - Px 活性水平和 MDA 含量大小作为评价蜂眠宁胶囊抗氧化作用的指标。实验中该三项指标检测结果表明,蜂眠宁胶囊能显著提高 D - 半乳糖所致衰老小鼠脑组织 SOD、GSH - Px 活性,抑制自由基的脂质过氧化反应,降低脂质代谢产物 MDA 的含量,减轻自由基对脑组织的损伤,提示蜂眠宁胶囊具有抗氧化作用,从而改善 D - 半乳糖所致衰老模型小鼠的学习记忆能力,有效地预防老年痴呆的发生与发展。

参考文献:

- [1] 冯建新. 神奇的蜂皇胎——试论蜂皇胎的医疗保健作用(二) [J]. 养生月刊 2008, 29(3): 274.
- [2] 孙政华, 邵晶, 郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医临床研究 2015, 7(25): 22.
- [3] 周霖, 黄宝康. 缬草挥发油的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 时珍国医国药 2008, 19(11): 2663.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社 2002: 828.
- [5] 秦红兵, 杨朝晖, 熊存全, 等. 鹿藿角醇提液对衰老小鼠的抗氧化作用 [J]. 时珍国医国药 2009, 20(10): 2451.
- [6] 倪彬, 陈丰, 刘建伟, 等. 蜂王幼虫粉延缓衰老和抗应激能力的实验研究 [J]. 营养学报 2002, 24(4): 398.
- [7] 柏冬志, 东方, 唐文婷, 等. 黄芪多糖药理作用的研究进展 [J]. 黑龙江医药 2014, 26(1): 985.
- [8] 赵兵, 郝萍, 高昂, 等. 缬草与蜘蛛香挥发油的抗菌抗氧化活性研究 [J]. 天然产物研究与开发 2013, 25(8): 1037.
- [9] 陈雯, 黄世敬. 酸枣仁化学成分及药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药 2011, 22(7): 1726.
- [10] 胡明亚. 酸枣仁的药理作用及现代临床应用研究 [J]. 中医临床研究 2012, 4(19): 20.
- [11] 龚国清, 徐赓本. 小鼠衰老模型研究 [J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(2): 101.