

复方精油对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用

黄玲玲¹, 魏道智¹, 吴亚妮², 姚雷²

(1. 福建农林大学 生命科学学院, 福州 350002; 2. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 探讨复方精油对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用。通过皮下注射 D-半乳糖制备小鼠衰老模型, 同时小鼠背部脱毛并连续涂抹 3 个不同浓度的复方精油 42 d, 取小鼠血清及涂药处皮肤检测超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)含量, 同时检测皮肤中羟脯氨酸(HYP)含量。结果表明, 与模型组比较, 高中低浓度复方精油组小鼠血清中 SOD 活性提高 14.94%~20.27% ($P < 0.01$), MDA 含量降低 17.00%~26.30% ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 皮肤中 SOD 活性升高 58.00%~61.11% ($P < 0.01$), MDA 含量降低 12.23%~26.04% ($P < 0.01$), HYP 含量升高 33.70%~140.70% ($P < 0.01$)。该复方精油具有良好的抗氧化、抗衰老作用, 具有潜在的开发应用价值。

关键词: 复方精油; 抗衰老; 超氧化物歧化酶(SOD); 丙二醛(MDA); 羟脯氨酸(HYP)

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Anti-Aging Function of the Blended Essential Oil in Murine Aging Model Induced by Galactose

HUANG Ling-ling¹, WEI Dao-zhi¹, WU Ya-ni², YAO Lei²

(1. School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: To investigate the anti-aging function of the blended essential oil in murine aging model, mice were injected subcutaneously with D-galactose and the blended essential oil with 3 different concentrations was applied by smearing the mixture on the naked back skin of the mice for 42 days. The serum and skin specimen were collected to determine the activity of superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (HYP). The results showed that, compared with model group without treatment of essential oil, the SOD activity in the serum of the three groups treated with high, medium and low dose of blended essential oil was significantly improved by 14.94%~20.27% ($P < 0.01$) and the MDA content was decreased by 17.00%~26.30% ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). In the skin specimen, on the other hand, the activity of SOD was elevated by 58.00%~61.11% ($P < 0.01$) and the content of MDA decreased by 12.23%~26.04% ($P < 0.01$) while the HYP level was increased 33.70%~140.70% ($P < 0.01$). In conclusion, the blended essential oil possesses satisfying function of anti-oxidation and anti-aging, indicating potential usage in the future.

Key words: compound essential oil; anti-aging; superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA); hydroxyproline (HYP)

收稿日期: 2012-03-29

基金项目: 上海市绿化和市容管理局重大项目(G102407); 上海市科委重大攻关项目(10DZ1200403);
公益性行业(农业)科研专项经费(200903056)

作者简介: 黄玲玲(1986-), 女, 硕士生, 研究方向: 芳香植物利用, E-mail: huangzhf@126.com;

姚雷(1963-)为本文通讯作者, 女, 博士, 博士生导师, 研究方向: 芳香植物, Email: yaolei@sjtu.edu.cn

随着人口老龄化加剧,具有抗衰老功效的化妆品和护肤品在当今个人护理品行业的作用日益重要^[1-4]。目前市场上的抗衰老产品主要是添加维生素E、辅酶Q10、 α -羟基酸、 β -羟基酸等活性成分,或通过补充皮肤中的胶原蛋白和弹性蛋白等^[5]。由小分子物质组成的精油能快速透过皮肤被机体吸收,因此在护肤品中拥有广泛的应用价值。研究表明,很多天然精油如香天竺葵精油、肉桂精油、薰衣草精油、月桂精油、肉豆蔻精油^[10]。等均有一定程度的抗氧化、抗衰老作用;作为中国特色的中草药如红花、川芎、白芷、当归、人参、香附和丹参等也有抗氧化、抗衰老作用。传统复方中药在应用其汤剂的同时挥发性成分没有得到很好的利用。本实验在参考文献资料的基础上选择含红花、川芎、香附、干姜等的复方香味中药,提取其精油进行实验,其主要成分包括香叶醇、4-松油醇、1,8-桉叶素、 β -桉叶油醇、柏木脑、姜烯醇、橙花醇、芳樟醇等,研究了该复方精油对D-半乳糖亚急性衰老小鼠模型的抗衰老功效,为进一步开发应用提供科学依据。

1 材料

1.1 复方精油提取

红花、川芎、香附、干姜等香味中药由上海交通大学芳香植物研发中心提供,经该中心姚雷教授鉴定。

取以上植物材料300g,精密称定,置常压蒸馏提取装置中,加蒸馏水2.5L,冷浸30min,采用水中蒸馏的方法进行精油的提取,至不再有精油产生为止,收集上层精油,放置于棕色玻璃瓶内储存,4℃冷藏保存备用。

1.2 试剂与仪器

小鼠超氧化物歧化酶(SOD) ELISA 检测试剂盒、小鼠羟脯氨酸(HYP) ELISA 检测试剂盒、小鼠丙二醛(MDA) ELISA 检测试剂盒购自上海丽臣生物科技有限公司;养生堂维生素E软胶囊,杭州养生堂保健品有限公司生产,卫生许可证号:浙卫食健产字[2009]第004号。

352型酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS); AC8洗板机(芬兰 Thermo Labsystems); TG16W微量高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司); GNP-9080型隔水式恒温培养箱(苏州江东精密仪器有限公司); CP-800科德士宠物用电推剪(深圳市宝安区沙井科德士电子厂)。

1.3 实验动物

SPF级雌性昆明种小鼠60只,体重 20 ± 2 g,由上海交通大学药学院动物实验中心提供,许可证编号SYXK(沪)2007-0025。

2 方法

2.1 药效试验

取昆明种小鼠60只,使用脱毛器背部脱毛

2.5cm \times 2.5cm,随机分为空白组、模型组、维生素E组、10%精油组、5%精油组、2%精油组,共6组,每组10只小鼠。对模型组、维生素E组、精油高、中、低剂量组小鼠颈背部进行皮下注射30% D-半乳糖1000mg/kg/d,并同时在脱毛处皮肤涂抹相应药物0.5mL/d,而空白组则注射生理盐水,连续42d^[11,13]。第42天,末次处理1h后,摘眼球取血,处死,迅速取背部脱毛处皮肤,生理盐水冲洗后用滤纸吸去水分,-20℃保存,用于制作皮肤组织匀浆。

2.2 血清及皮肤组织匀浆制备

血清的制备:眼球取血,3000r/min离心10min将血清和红细胞迅速小心地分离,取上层血清备用。

皮肤组织匀浆的制备:取脱毛后背部皮肤组织0.5g,量筒量取。该组织块9倍质量预冷生理盐水,先取2/3量倒入装有组织块烧杯中,剪碎组织块后倒入匀浆管中,将剩余1/3生理盐水冲洗烧杯壁,一起倒入匀浆器中进行匀浆,上下转动研磨数十次(10~15min),充分研磨(制作过程在冰水中进行),然后反复冻融3次,使细胞完全破碎,内容物全部游离在液相中。再将制备好的10%匀浆用低温低速离心机以转速3000r/min离心10min,取上清液备用。

2.3 指标检测

将按上述方法制备的血清及皮肤组织匀浆,通过双抗体一步夹心法酶联免疫吸附的方法(ELISA),分别按照小鼠超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和羟脯氨酸(HYP) ELISA试剂盒测定其相应指标。

2.4 统计学处理

采用SPSS 16.0进行实验数据的统计学分析,测定数据以 $\bar{X}\pm S_{\bar{X}}$ 表示,组间比较采用t检验。

3 结果

3.1 对小鼠血清中SOD活性和MDA含量的影响

由表1可见,模型组与空白组比较小鼠血清中SOD活性降低14.90%($P<0.01$),MDA含量升高36.64%($P<0.01$),说明实验造模成功,模型可以导致小鼠衰老。与模型组比较,精油高中低浓度组小鼠血清中SOD活性提高14.94%~20.27%($P<0.01$),MDA含量降低17.00%~26.30%($P<0.01$ 或 $P<0.05$),说明该精油可以增强小鼠血清中清除自由基能力,减少脂质过氧化物含量,从而达到抗氧化、抗衰老作用。但给药组间随着使用浓度的增大,SOD活性降低,MDA含量升高,说明过量的该精油反而会降低其在血清中的效果。精油高中低剂量组小鼠血清中的SOD活性已相当于空白组,且优于VE阳性对照组;2%精油组小鼠血清中的MDA含量已相当于空白组,且优于VE阳性对照组。

表1 小鼠血清生化指标检测结果($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

组别 Groups	<i>n</i>	SOD / (U · mL ⁻¹)	MDA / (nmol · mL ⁻¹)
空白组 Blank group	10	99.53 ± 1.62	4.23 ± 0.05
模型组 Model group	10	84.70 ± 1.37 ^Δ	5.78 ± 0.10 ^Δ
VE组 VE group	10	87.37 ± 1.36 ^Δ	5.32 ± 0.12 ^{*Δ}
10%精油组 10% EO group	10	99.00 ± 1.54 [*]	4.80 ± 0.14 ^{**Δ}
5%精油组 5% EO group	10	97.35 ± 1.68 [*]	4.74 ± 0.16 ^{*Δ}
2%精油组 2% EO group	10	101.87 ± 1.89 [*]	4.26 ± 0.13 [*]

注:与模型组比较, * : $P < 0.01$, ** : $P < 0.05$; 与空白组比较, Δ : $P < 0.01$, $\Delta\Delta$: $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group, * : $P < 0.01$, ** : $P < 0.05$; compared with the blank group, Δ : $P < 0.01$, $\Delta\Delta$: $P < 0.05$ 。

3.2 对小鼠皮肤中 SOD 活性及 MDA、HYP 含量的影响

由表2可见,模型组与空白组比较小鼠皮肤中 SOD 活性降低 15.11% ($P < 0.01$), MDA 含量升高 6.54% ($P < 0.01$), 羟脯氨酸含量降低 44.13% ($P < 0.01$), 说明实验造模成功,模型可以导致小鼠衰老。与模型组比较,精油高中低浓度组小鼠皮肤中 SOD 活性升高 58.00%~61.11% ($P < 0.01$), MDA 含量降低 12.23%~26.04% ($P < 0.01$), HYP 含量升高 33.70%~140.70% ($P < 0.01$), 说明该精油可以增强小鼠皮肤中清除自由基能力,减少脂质过氧化物含量,提高羟脯氨酸含量,从而达到抗氧化、抗衰老作用。在增强皮肤清除自由基能力方面,中、高浓度精油都优于空白组和 VE 阳性对照组,中浓度的效果最好,说明该精油达到一定使用浓度后继续提高使用浓度, SOD 活性不会继续增强;在减少脂质过氧化物含量和提高羟脯氨酸含量方面,浓度越高,作用效果越好,且中、高浓度精油都优于空白组的效果,高浓度精油优于 VE 阳性对照组的效果。

4 讨论

D-半乳糖衰老动物模型造模方法简便易行,价格低廉,结果稳定,已广泛应用于抗衰老药物研究领域^[11-12]。本实验结果表明,小鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 1 000 mg/kg/d 共 42 d, 可导致模型组小鼠较空白组血清和皮肤中 SOD 活性显著降低, SOD 是机体主要的抗氧化酶,从而机体抗氧化能力和自

表2 小鼠皮肤生化指标检测结果($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

组别 Groups	<i>n</i>	SOD/ (U · mg ⁻¹)	MDA/ (nmol · mg ⁻¹)	HYP/ (ug · mg ⁻¹)
空白组 Blank group	10	270.75 ± 3.20	36.23 ± 0.22	8.18 ± 0.08
模型组 Model group	10	229.85 ± 2.16 ^Δ	38.60 ± 0.21 ^Δ	4.57 ± 0.05 ^Δ
VE组 VE group	10	358.35 ± 2.12 ^{*Δ}	30.82 ± 0.17 ^{*Δ}	10.68 ± 0.07 ^{*Δ}
10%精油组 10% EO group	10	369.56 ± 2.21 ^{*Δ}	28.55 ± 0.23 ^{*Δ}	11.00 ± 0.06 ^{*Δ}
5%精油组 5% EO group	10	370.32 ± 2.32 ^{*Δ}	31.48 ± 0.24 ^{*Δ}	8.20 ± 0.06 [*]
2%精油组 2% EO group	10	363.16 ± 2.93 ^{*Δ}	33.88 ± 0.21 [*]	6.11 ± 0.66 ^{*Δ}

注:与模型组比较, * : $P < 0.01$, ** : $P < 0.05$; 与空白组比较, Δ : $P < 0.01$, $\Delta\Delta$: $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group, * : $P < 0.01$, ** : $P < 0.05$; compared with the blank group, Δ : $P < 0.01$, $\Delta\Delta$: $P < 0.05$ 。

由基防护功能下降,体内脂质过氧化产物 MDA 堆积,造成细胞组织的氧化损伤,且真皮中成纤维细胞及其胞内羟化酶在自由基的攻击下失去羟化功能,导致 HYP 的生成减少, HYP 是构成皮肤中胶原纤维和胶原蛋白的一种主要氨基酸,因此皮肤中胶原纤维和胶原蛋白减少,最终导致皮肤老化,成功制备小鼠亚急性衰老模型。

国内外已有大量文献报道了红花、川芎、香附、干姜等香味中药精油具有良好的抗氧化能力,本实验将以上香味中药为主的复方提取精油在衰老小鼠背部皮肤上使用。结果显示,与模型组比较,精油各浓度组小鼠血清及皮肤中 SOD 的活性显著提高, MDA 含量显著降低,同时皮肤中 HYP 含量显著增加;且其作用相当于或优于空白对照组,甚至优于 VE 阳性对照组。表明该精油能有效提高机体抗氧化酶的活性,从而提高了皮肤组织清除自由基与抗氧化的能力,抑制脂质过氧化,减少对细胞组织的氧化性损伤,并且提高了皮肤中胶原蛋白的含量,从而发挥了抗氧化、抗衰老的作用。因此,本复方精油具有良好的开发应用潜力,对于精油中何种活性成分发挥延缓衰老作用,以及其对机体代谢影响的分子生物学机制还有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] 来吉祥,何聪芬,董银卯. 皮肤衰老机理及延缓衰老化妆品的研究进展[J]. 中国美容医学, 2009, 18(8): 1208-1212.
- [2] Bermann P E. Aging skin: causes, treatments, and pre-

- vention [J]. *Nursing Clinics of North America*, 2007, 42(3):485-500.
- [3] Richard A, Baxter M D. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation [J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2008, 7(1):2-7.
- [4] Cho S, Won C H, Lee D H, *et al.* Red ginseng root extract mixed with *Torilus fructus* and *Corni fructus* improves facial wrinkles and increases type I procollagen synthesis in human skin: a randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2009, 12(6):1252-1259.
- [5] 梁雪. 植物提取物在抗衰老化妆品中的应用及研究进展[J]. *太原科技*, 2009(10):66-67.
- [6] 宋丽, 甄萍萍, 李大红, 香天竺葵精油抗氧化活性研究[J]. *河南农业科学*, 2011, 40(2):135-137.
- [7] 李荣, 路冠茹, 姜子涛. 肉桂精油抗氧化性能及清除自由基能力的研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(2):166-171.
- [8] 陈计峦, 宋丽军, 张云, 等. 薰衣草精油抗氧化成分提取及其对 DPPH · 清除率的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 39(1):173-176.
- [9] 李荣, 姜子涛, 马丽. 月桂精油抗氧化性能及清除自由基能力的研究[J]. *中国调味品*, 2009, 11(34):58-63.
- [10] 李荣, 孙健平, 姜子涛. 肉豆蔻精油抗氧化性能及清除自由基能力的研究[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(11):75-80.
- [11] Ho S C, Liu J H, Wu R Y. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose [J]. *Biogerontology*, 2003, 4:15-18.
- [12] Cui X, Zuo P, Zhang Q, *et al.* Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(3):647-654.

(上接第31页)

- [15] Botto L D, Mulinare J, Erickson J D. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2000, 151(9):874-884.
- [16] Wilcox A J, Lie R T, Solvoll K, *et al.* Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case control study [J]. *British Medical Journal*, 2007, 334(7591):464.
- [17] Botto L D, Mulinare J, Erickson J D. Occurrence of omphalocele in relation to maternal multivitamin use: a population-based study [J]. *Pediatrics*, 2002, 109:9.
- [18] Myers M F, Li S, Corea V A, *et al.* Folic acid supplementation and risk for imperforate anus in China [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2001, 154(11):1051-1056.
- [19] Basset G, Quinlivan E P, Ziemak M J, *et al.* Folate synthesis in plants: The first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99:12489-12494.
- [20] Tahzebahossain, Irwinrosenberg, Jacobselhub, *et al.* Enhancement of folates in plants through metabolic engineering [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101:5158-5163.
- [21] Basset G, Quinlivan E P, *et al.* Folate synthesis in plants: The p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101:1496-1501.
- [22] Mayne S T, Risch H A, Dubrow R, *et al.* Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer [J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2001, 10:1055-1062.
- [23] Della Penna D. Nutritional genomics: Manipulating plant micronutrients to improve human health [J]. *Science*, 1999, 285:375-379.
- [24] Sybesma W M, Starrenburg, Kleerebezem M, *et al.* Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69:3069-3076.
- [25] 朱永兴, 周建, 王磊. 拟南芥 γ -生育酚甲基转移酶启动子在转基因烟草中的表达特性分析 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22(8):65-68.
- [26] 王利军, 范三红, 郭蔼光. 拟南芥 *ats1A* 基因启动子的克隆和功能分析 [J]. *西北植物学报*, 2004, 24(10):1856-1860.
- [27] Dfaz de la Garza R, Gregory J F, Hanson A D. Folate biofortification of tomato fruit [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(10):4218-4222.
- [28] 王维鹏, 郭新波, 唐克轩. 拟南芥 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因转化生菜的研究 [J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2011, 29(2):43-49.
- [29] Dewanto V, Wu X Z, Liu R H, *et al.* Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50:3010-3014.
- [30] GB 5413.16, 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中叶酸(叶酸盐活性)的测定[S], 2010.