

·论 著·

海南槟榔提取物抗衰老作用研究

刘月丽¹, 徐汪伟¹, 周丹¹, 虞道锐², 任瑞², 刘辉², 易西南^{2*}

1. 海南医学院药学院, 海南 海口 571199; 2. 海南医学院理学院, 海南 海口 571199

摘要:目的 研究海南槟榔提取物的抗衰老作用。方法 昆明种小鼠150只,分为正常组、模型组、石杉碱甲组、槟榔提取物高、低剂量组,每组30只。除正常组外,其余小鼠每日上午皮下注射D-半乳糖800 mg/kg,连续8周,建立衰老模型。石杉碱甲组和槟榔提取物高、低剂量组分别预防性灌胃给予石杉碱甲(0.4 mg/kg)、海南槟榔提取物高(500 mg/kg)、低剂量(170 mg/kg)。8周后, Morris 水迷宫检测衰老小鼠的学习记忆能力;处死小鼠,取海马组织,测定SOD、SDH、GSH-Px的活性和MDA含量;取大脑皮层,10%甲醛固定,HE染色,观察大脑皮层神经细胞的组织学变化。结果 与正常组比较,模型组小鼠的逃避潜伏期明显增加,跨越平台次数明显降低($P<0.01$),海马组织MDA含量增加($P<0.01$),SOD($P<0.05$)、SDH($P<0.01$)和GSH-Px($P<0.05$)的活性明显增加,大脑皮质神经细胞深染,排列紊乱。槟榔提取物高、低剂量均能显著降低衰老小鼠逃避潜伏期,增加跨越平台次数($P<0.01$);增强海马组织SOD($P<0.05$)、SDH活性($P<0.01$),降低MDA含量($P<0.01$),低剂量还能增强GSH-Px的活性($P<0.05$),改善衰老小鼠大脑皮质神经细胞的组织学变化。结论 海南槟榔提取物能改善衰老小鼠的学习记忆能力、脑组织抗氧化能力和组织学改变,有抗衰老作用。

关键词: 槟榔;提取物;抗衰老

中图分类号:R285 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2017)02-0123-03 DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2017.02.04

Anti-ageing effects of betel nut extract grown in Hainan

LIU Yue-li¹, XU Wangwei, ZHOU Dan, YU Daorui, REN Rui, LIU Hui, YI Xinan

1. School of Pharmacy, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199, China

Corresponding author: YI Xinan, E-mail: 1272791897@qq.com

Abstract: Objective To investigate the anti-ageing effects of betel nut extract grown in Hainan island. Methods A total of 150 Kunming mice were divided into 5 groups, that is, normal control, model, huperzine a, high- and low-dosed betel nut extract groups, with 30 mice in each group. Ageing mice models were established by subcutaneous injection of D-galactose at a dose of 800 mg/kg every morning for 8 weeks. And 0.4 mg/kg huperzine a and 500 and 170 mg/kg betel nut extracts were administered intragastrically. In 8 weeks later, learning-memory ability of ageing mice was tested by Morris water maze test. After the mice were sacrificed and their hippocampal tissues were collected to detect the activities of SOD, SDH, GSH-Px and MDA. HE staining was used to observe the morphological changes of the nerve cells in the cerebral cortex after 10% formaldehyde fixation. Results Compared with the normal control group, the mice in the model group exhibited longer escape latency and lower platform-crossing times ($P<0.01$), increased content of MDA ($P<0.01$) and enhanced activities of SOD ($P<0.05$), SDH ($P<0.01$) and GSH-Px ($P<0.05$) in the hippocampal tissues, and deeply dyed neural cells with irregular alignment. High- and low-dosed betel nut extract shortened escape latency and increased platform-crossing times in Morris water maze test ($P<0.01$); increased the activities of SOD ($P<0.05$), SDH ($P<0.01$), but decreased the amount of MDA ($P<0.01$) in the hippocampus. What's more, the low-dosed extract also could enhance the activity of GSH-Px ($P<0.05$), and improve histological changes in ageing mice. Conclusion Betel nut extract grown in Hainan island exerts the anti-ageing effects by enhancing learning-memory, and promoting brain anti-oxidative ability and histological changes in ageing mice.

Key words: betel nut; extract; anti-ageing

槟榔果富含酚类和多糖^[1],现代药理研究表明,槟榔提取物具有抗氧化、抗疲劳等作用^[2-3]。衰老是以细胞氧自由基产生增多为特征,损伤蛋白、脂质、核酸,可导致生物死亡。槟榔提取物能清除DDPH,其是否具有抗衰老作用,尚未见报道。本研究采用皮下注射D-半乳糖制备衰老小鼠模型,观察槟榔提取物对衰老

小鼠学习记忆能力、海马组织抗氧化能力及大脑皮质神经细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物 健康昆明种小鼠150只,体重18~22 g,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SCXK(粤)2013-0002。实验动物饲养条件:温度

基金项目:海南省重点科技计划项目(No.ZDXM20120050)

作者简介:刘月丽(1980—),女,硕士,副教授,研究方向:心血管药理学。

*通信作者:易西南, E-mail: 1272791897@qq.com

(25±2)℃,湿度(55±5)%,12 h明暗交替,定期喂食,自由饮水。

1.2 药品与试剂 槟榔80%乙醇提取物来自海南医学院化学教研室,富含多酚类物质,多酚类物质含量为10.54 mg/g。D半乳糖购于美国Sigma,石杉碱甲购于大连美仑生物技术有限公司,总蛋白定量测试盒、

丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.3 衰老模型的制备 小鼠颈背部皮下注射D半乳糖800 mg/kg,每日1次,连续8周,制备衰老模型^[4]。

1.4 分组与给药 小鼠适应性喂养7 d后,按体重随机分为正常对照组,模型组,石杉碱甲组,槟榔提取物高、低剂量组。除正常对照组外,其余各组均皮下注射造模药物D-半乳糖800 mg/kg;同时,石杉碱甲组小鼠灌胃给予石杉碱甲0.4 mg/kg,槟榔提取物高、低剂量组分别给予槟榔提取物500 mg/kg、170 mg/kg;正常对照组和模型小鼠给予等体积的0.5%羧甲基纤维素钠,均每日上午给药,连续8周。D-半乳糖用注射用生理盐水配制,其余用0.5%羧甲基纤维素钠配制,给药体积为0.1 mL/10 g。

1.5 指标检测 8周末,参照张晓裕等^[5]和刘月丽等^[6]的方法,Morris水迷宫检测衰老小鼠的学习记忆能力(逃避潜伏期、跨越平台次数)。颈椎脱臼法处死小鼠,迅速取海马,冰冻生理盐水洗去血污,制成1%的组织匀浆,3 000 r/min离心10 min,取上清,按照试剂盒要求测定SOD、SDH、GSH-Px活性以及MDA含量。取大脑皮质,10%甲醛固定,HE染色,40倍显微镜下观察大脑皮层神经细胞组织学变化。

1.6 统计学分析 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS17.0统计软件包进行one-way ANOVN,方差齐时用LSD检验,方差不齐时用Tamhane检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海南槟榔提取物对衰老小鼠学习记忆能力的影响 模型组小鼠逃避潜伏期明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),穿越平台次数明显小于正常对照组($P < 0.01$),石杉碱甲组,槟榔提取物高、低剂量组小鼠逃避潜伏期明显低于模型组小鼠($P < 0.01$),穿越平台次数明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。具体见表1。

表1 海南槟榔提取物对衰老小鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effects of betel nut extract cultivated in Hainan Island on learning-memory ability of ageing mice

组别 Group	剂量 Does (mg/kg)	逃避潜伏期 Escape latency (s)	跨越平台次数 Platform crossing times
正常 Normal	—	46.41±2.03**	1.21±0.50**
模型 Model	—	56.58±2.34 ^{△△}	0.62±0.50 ^{△△}
石杉碱甲 Huperzine A	0.4	46.73±1.87**	1.23±0.43**
槟榔提取物 Betel nut extract	500.0	52.17±1.63**	1.17±0.38**
	170.0	53.20±1.88**	1.10±0.61**
<i>F</i>		133.86	7.04
<i>P</i>		< 0.01	< 0.01

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与正常组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

Note: Compared to model, ** $P < 0.01$; Compared to control, ^{△△} $P < 0.01$.

2.2 海南槟榔提取物对衰老小鼠海马组织抗氧化能力的影响 模型组小鼠SOD、GSH-Px、SDH活性低于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA含量高于正常对照组($P < 0.01$),有统计学差异;海南槟榔提取物高、低剂量明显增强衰老小鼠的SOD、SDH活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显著降低MDA的含量($P < 0.01$),差异具有统计学意义;海南槟榔提取物低剂量能提高衰老小鼠GSH-Px活性($P < 0.05$),差异具有统计学意义。具体见表2。

表2 海南槟榔提取物对衰老小鼠海马组织抗氧化能力的影响

Table 2 The effects of betel nut extract cultivated in Hainan Island on anti-oxidative capacity of ageing mice

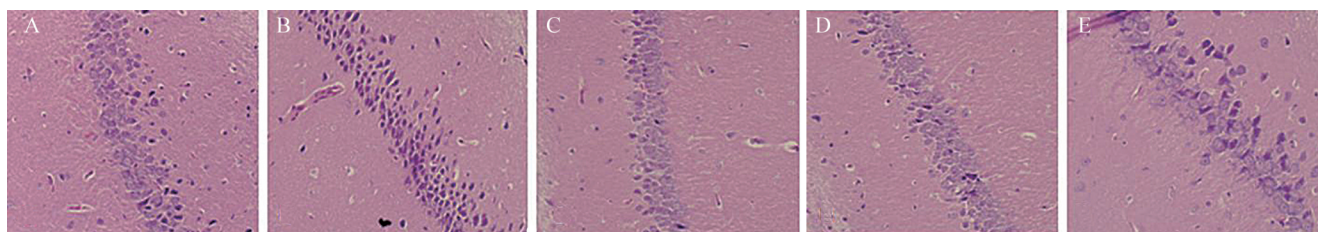
组别 Group	剂量 Does mg/kg	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)	SDH (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)
正常 Normal	—	2.11±1.17**	8.48±3.44*	10.18±2.46**	92.99±29.48*
模型 Model	—	5.28±0.69 ^{△△}	3.16±0.65 [△]	3.58±1.07 ^{△△}	49.23.30±31.17 [△]
石杉碱甲 Huperzine A	0.4	2.29±1.00**	3.26±0.97	5.94±2.31*	101.58±53.95*
槟榔提取物 Betel nut extract	500.0	2.75±0.69**	5.85±1.54*	6.71±2.64**	90.27±41.95
	170.0	2.44±0.80**	4.69±1.21*	7.11±1.99**	97.11±42.80*
<i>F</i>		15.38	11.75	10.12	2.00
<i>P</i>		< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

Note: Compared to model, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$; Compared to control, [△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$.

2.3 海南槟榔提取物对衰老小鼠大脑皮层组织学变化的影响 正常组小鼠脑皮质神经细胞排列整齐,着色均匀,形态均一;模型组小鼠脑皮质神经细胞排

列稀疏,着色较深,形态不规则;石杉碱甲和槟榔提取物高、低剂量组均能改善衰老小鼠大脑皮层皮质神经细胞的组织学变化。如图1所示。



注:A正常对照组,B模型组,C石杉碱甲组,D为槟榔提取物高剂量组,E为槟榔提取物低剂量组。

Note: A is from control group, B is from model group, C is from huperzine a group, D and E are from betel nut extract at high dose and low dose groups.

图1 HE染色($\times 40$)

Fig. 1 Hematoxylin and eosin stain ($\times 40$)

3 讨论

衰老是多种因素共同作用的结果^[7]。衰老机理中较为公认的是自由基学说。细胞产生过多的氧自由基可以氧化修饰生物分子(如脂质、蛋白、核酸等),导致衰老和生物的死亡。植物中广泛存在多酚类物质,并且植物的抗氧化能力与多酚的含量有直接的关系^[8-9]。槟榔果中所含的酚类化合物主要包括一些儿茶酚二聚体、无色花青素二聚体、白三竺葵苷元等^[10],前期已经证明槟榔提取物具有抗氧化的作用,可能与槟榔提取物富含多酚类物质有关^[2]。

本研究通过皮下注射D-半乳糖,成功复制衰老模型,衰老小鼠出现学习记忆能力减退、海马组织抗氧化能力降低,大脑皮层神经细胞损伤。石杉碱甲是胆碱酯酶抑制剂,前期研究已证明其对D-半乳糖诱导的衰老小鼠有改善学习记忆能力、改善脑组织抗氧化能力,与本研究结果一致^[11-12]。本研究以石杉碱甲为阳性对照药,对比槟榔提取物与石杉碱甲抗衰老作用的异同。研究结果发现槟榔提取物也增强衰老小鼠的学习记忆能力,提高SOD、SDH、GSH-Px活性,减少MDA产生并加快其在机体内的清除,从而减少过氧化损伤。槟榔提取物对SOD的提高作用优于石杉碱甲,对GSH-Px的提高作用略逊于石杉碱甲。

槟榔是在海南广泛种植的经济作物,因其免疫、神经毒性以及口腔黏膜下纤维变性等限制了槟榔的食用^[13]。槟榔提取物可以清除衰老机体内的过氧化产物,提高其抗氧化能力,具有改善学习记忆能力和抗衰老的作用,其抗衰老药理作用研究将会拓宽槟榔的使用范围,增加槟榔的经济价值。

参考文献

- [1] 黄永华. 槟榔有效化学成份分析测定[J]. 食品与机械, 2002(3): 38-39.
- [2] 张海德, 黄玉林, 范燕忠. 槟榔提取物对DDPH自由基的清除作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 74-77.
- [3] 何双, 李忠海, 钟海燕, 等. 槟榔提取物对小鼠抗疲劳作用的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(2): 67-70.
- [4] 李文彬, 韦丰, 范明, 等. D-半乳糖在小鼠上诱导的拟脑老化效应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 93-95.
- [5] 张晓裕, 何利明, 侯军代, 等. 去痴灵对AD模型小鼠学习记忆及脑内突触素表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(4): 495-498.
- [6] 刘月丽, 林连波. 海南山苦茶提取物对衰老小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国热带医学, 2012, 12(1): 21-23.
- [7] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247.
- [8] Ferreira I C F R, Baptista P, Vilas-Boas M, et al. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal [J]. Journal of Food Chemistry, 2007, 100: 1511-1516.
- [9] 王明月, 罗建辉, 李建国. HPLC法测定槟榔中的多酚类物质[J]. 天然产物研究与开发, 2011(23): 101-104.
- [10] WETWITAYAKLUNG P, PHAECHAMUD T, LIMMATVAPIRAT C, et al. The study of antioxidant capacity in various parts of *Araca catechu* L [J]. Naresuan University Journal, 2006, 14(1): 1-14.
- [11] QIU P Y, CHEN Z Y, WANG Y X, et al. Effects of Huperzine A on the memory and learning behavior in D-galactose senile mice [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(4): 247-249.
- [12] 吕俊华, 唐东蕾, 方文娟, 等. 石杉碱甲对D-半乳糖诱导衰老小鼠脑抗氧化能力和胞浆钙离子的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(10): 1403-1406.
- [13] 李习雄, 胡冠英, 张三印. 槟榔毒性机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 212-216.

收稿日期: 2016-07-20 编辑: 谢永慧