

橄榄苦苷对 D-半乳糖致衰老小鼠衰老相关生化指标的影响

王 昱, 秦 序

(陇南师范高等专科学校生化系, 成县 742500)

摘 要: 为了研究橄榄苦苷对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用及其机制, 将 40 只健康小鼠随机分成正常组、衰老模型组、橄榄苦苷组和维生素 E 组, 采用 D-半乳糖建立亚急性衰老小鼠模型, 测定每组小鼠的脏器指数, 比色法检测心、肝和脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、及丙二醛 (MDA) 含量, PCR-ELISA 检测心、肝和脑组织端粒酶活性, ELISA 检测小鼠血清中 IgG、IgM 和补体 C3、C4 含量, 放射免疫法测定血清中 IL-2 含量。结果显示, 与模型组比较, 橄榄苦苷能增加小鼠脏器指数 ($P < 0.05$); 提高 SOD、GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 提高心、肝和脑端粒酶活性、血清中 IgG、IgM 和补体 C3、C4 及 IL-2 的含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 上述衰老相关生化指标基本恢复到正常水平, 且与维生素 E 的治疗结果无显著差异 ($P > 0.05$)。表明橄榄苦苷能通过拮抗自由基损伤, 增强衰老小鼠心、肝和脑组织端粒酶活性和机体免疫功能发挥抗衰老作用。

关键词: 橄榄苦苷; D-半乳糖; 衰老; 抗氧化酶; 端粒酶; 免疫; 小鼠

中图分类号: R339.38; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0017-04

Effect of oleuropein on the aging related biochemical indexes in aging mice induced by D-galactose

WANG Yu, QIN Xu

(Department of Biology and Chemistry, Longnan Teachers College, Chengxian 742500)

Abstract: An experiment was conducted to explore the anti-aging effect of oleuropein on aging mice induced by D-galactose and relevant mechanisms. Forty mice were randomly divided into normal control group, aging model group, oleuropein treated group, and vitamin E control group. Aging mice models were developed using D-galactose. The viscera index was determined. Spectrophotometry was used to detect the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA) in the heart, liver and brain of the mice. PCR-ELISA was used to measured telomerase activity in the heart, liver and brain. The levels of serum IgG, IgM and complement C3, C4 and interleukin-2 (IL-2) were detected by ELISA and radioimmunoassay, respectively. The results showed that oleuropein could significantly increase the viscera index, elevate the activities of SOD and GSH-Px, decrease the content of MDA, and increase telomerase activity in the heart, liver and brain of the mice and the levels of serum IgG, IgM and complement C3, C4 and IL-2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The above aging related biochemical indexes returned the level close to the normal after oleuropein treatment, and no statistical difference was found in the treatment efficacy compared with those in vitamin E control group ($P > 0.05$). The study suggested that oleuropein could delay aging, which may be related to antagonizing free radical injury and enhancing the telomerase activity in the heart, liver and brain, and immune function of D-galactose-induced aging mice.

收稿日期: 2015-06-30

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(1107RJZK243)和甘肃省高等学校科研资助项目(1128B-01)共同资助。

作者简介: 王 昱, 教授。E-mail: gswangyu@126.com

Key words: oleuropein; D-galactose; aging; antioxidant enzyme; telomerase; immunity; mouse

衰老是生命过程中不可抗拒的自然规律。随着我国老年人口比重的增加和老年性相关疾病的增多,衰老与延缓衰老已经逐步成为了我国重大公共卫生问题^[1]。中药抗衰老作用的研究为目前研究的重点,其药理机制有延缓衰老、抗氧化、增强免疫功能等^[2]。油橄榄 (*Olea europaea* L.) 系木犀科植物,为世界名贵常绿木本油料和果用树种。橄榄油和橄榄叶的粗提物中含大量的多酚、黄酮类天然活性物质,有降血糖、抗高血压、抗氧化及排铅等作用^[3-6]。橄榄苦苷是油橄榄中最主要的组分之一,但关于橄榄苦苷的药理作用研究较少。为此,本研究制备 D-半乳糖致衰老小鼠模型,观察橄榄苦苷对衰老小鼠的抗氧化、延缓衰老及对免疫功能的影响,探讨其抗衰老的可能机制,以期为油橄榄的开发利用提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立与给药

健康昆明小鼠 40 只(购于兰州大学实验动物中心,生产许可证编号:14-006,体质量 18~20 g,雌雄各半),同条件饲养,喂食普通固体饲料,自由饮水。随机分正常组、衰老模型组、橄榄苦苷组和维生素 E 组,每组 10 只。除正常组外,其余各组动物颈背部皮下注射 10% D-半乳糖 10 mL kg⁻¹ (北京优尼康生物科技,编号 MG05201),每天 1 次,连续注射 14 d,于第 15 天开始(每天继续注射 D-半乳糖),橄榄苦苷组每天灌胃 100 mg kg⁻¹ 的橄榄苦苷^[7] (陇南田园油橄榄科技开发有限公司提供),正常组和模型组每天灌胃等体积的生理盐水,维生素 E 组每天灌胃 50 mg kg⁻¹ 的维生素 E,各组连续给药和造模 32 d。

1.2 血清 IgG、IgM 和补体 C3、C4 及 IL-2 含量的测定

于末次给药的次日,摘眼球取血,离心 10 min (3000 r min⁻¹),取上清液,按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作,分别检测小鼠血清中 IgG、IgM 和补体 C3、C4 (购自上海拜沃生物科技有限公司) 及 IL-2 (购自南京建成生物工程研究所) 含量。

1.3 计算脾脏指数和胸腺指数

每组小鼠称体质量后,颈椎脱臼处死各组小鼠,取小鼠的心、脑、肝、肾、脾脏和胸腺,用生理盐水洗净,吸干生理盐水,称质量。脏器指数 (mg g⁻¹) = 脏器湿重 (mg) / 小鼠体质量 (g)。

1.4 抗氧化酶活性测定

取小鼠心、脑和肝组织,在预冷的生理盐水中漂洗,滤纸吸干,精确称重后,滴加组织重量 9 倍的生理盐水,置入匀浆器中在冰水中匀浆 (5 min),再 3 000 r min⁻¹ 离心 (10 min),用微量移液器吸取上清液按试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所) 的操作要求用 U-1800 型 UV-VIS 全自动分光光度计 spectrophotometer (日本 Tokyo) 分别测定 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 的含量。

1.5 端粒酶活性的测定

取小鼠心、脑和肝组织,按照 PCR-ELISA 试剂盒 (购自上海嵘崑达实业有限公司) 操作步骤进行,SpectraMax M5 型酶标仪 (Molecular Devices, 美国) 450 nm 处测定吸光度值。

1.6 数据处理

用 SPSS13.0 软件中 ANOVA 模块进行单因素方差分析,数据用“平均数±标准差”表示, $P<0.05$ 表示具有显著差异, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 对衰老小鼠脏器指数的影响

由表 1 可知,与正常组相比,衰老模型组小鼠各脏器指数均显著减小 ($P<0.05$, $P<0.01$)。橄榄苦苷组中除胸腺指数与正常组相比差异显著外 ($P<0.05$),其他各脏器指数与正常组相比无显著差异。与衰老模型组相比,橄榄苦苷组和维生素 E 组小鼠的脏器指数显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。橄榄苦苷组和维生素 E 组间小鼠的脏器指数无显著差异。

2.2 对衰老小鼠免疫功能的影响

由表 2 可知,与正常组相比,衰老模型组小鼠血清中 IgG、IgM 和补体 C3、C4 及 IL-2 含量显著减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。橄榄苦苷组小鼠血清中 IgG、IgM 和补体 C3、C4 及 IL-2 含量与正常组相比均无显著差异。与衰老模型组比较,橄榄苦苷组和维生素 E 组小鼠血清中 IgG、IgM 和补体 C3、C4 及 IL-2 含量显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$),而橄榄苦苷组和维生素 E 组间无显著差异。

2.3 对衰老小鼠心、脑和肝端粒酶及抗氧化酶活性的影响

由表 3 可知,与正常组相比,衰老模型组小鼠心、脑和肝的端粒酶、SOD 及 GSH-Px 活性显著降低 ($P<0.01$),MDA 含量显著升高 ($P<0.01$)。橄榄苦苷组中除脑端粒酶活性与正常组相比差异显著外

($P < 0.05$), 其他各器官的端粒酶、SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量与正常组相比均为无显著差异。与衰老模型组相比, 橄榄苦苷组和维生素 E 组小鼠心、脑和肝的端粒酶、SOD 及 GSH-Px 活性明显升

高($P < 0.05, P < 0.01$), MDA 含量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。橄榄苦苷组和维生素 E 组间小鼠心、脑和肝的端粒酶、SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量无显著差异。

表 1 橄榄苦苷对衰老小鼠脏器指数的影响

Table 1 Effects of oleuropein on the viscera indexes of aging mice

组别 Group	脏器指数/mg g ⁻¹ viscera index					
	脑 Brain	肝 Liver	脾 Spleen	胸腺 Thymus gland	肾 Kidney	心 Heart
正常组 Normal control group	12.14±2.42	48.33 ±3.65	5.24 ±1.05	4.32 ±1.12	14.62 ±2.03	10.55 ±1.44
衰老模型组 Aging model group	9.88 ±1.10 ^a	30.07 ±4.18 ^b	3.14 ±1.14 ^b	2.01 ±1.11 ^b	11.88 ±1.09 ^a	9.48 ±1.11 ^a
橄榄苦苷组 Oleuropein treated group	11.77 ±1.36 ^c	43.26 ±3.59 ^d	5.76 ±1.62 ^d	3.87 ±1.17 ^{ad}	13.53 ±1.22 ^c	10.67 ±1.23 ^c
维生素 E 组 Vitamin E control group	10.06 ±0.79 ^a	38.79 ±2.27 ^{ac}	4.87 ±1.42 ^{ad}	3.26 ±0.81 ^{bc}	12.65 ±2.19 ^a	10.04 ±1.33

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。下同。

Note: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. normal control group; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs. model group. The same below.

表 2 橄榄苦苷对衰老小鼠血清 IgG、IgM 和补体 C3、C4 及 IL-2 含量的影响

Table 2 Effects of oleuropein on the levels of serum IgG, IgM and complement C3, C4 and IL-2 of aging mice

组别 Group	IgG /μg·mL ⁻¹	IgM /μg·mL ⁻¹	C3 /μg·mL ⁻¹	C4 /μg·mL ⁻¹	IL-2 content /μmol·L ⁻¹
正常组 Normal control group	25.60±3.73	3.34±0.84	6.81±1.60	9.23±0.76	10.55±2.04
衰老模型组 Aging model group	16.95±3.04 ^b	2.48±0.47 ^a	5.79±1.07 ^a	6.77±1.22 ^b	5.17±1.12 ^b
橄榄苦苷组 Oleuropein treated group	26.49±3.18 ^d	3.68±0.77 ^d	6.55±1.01 ^c	9.01±1.16 ^d	9.24±1.36 ^d
维生素 E 组 Vitamin E control group	21.02±2.66 ^c	3.17±0.64 ^c	6.24±1.54	8.84±1.44 ^{ad}	9.02±1.41 ^{ad}

表 3 橄榄苦苷对衰老小鼠心、肝和脑端粒酶及抗氧化酶活性的影响

Table 3 Effects of oleuropein on the telomerase and antioxidant enzyme activities in the heart, liver and brain of aging mice

项目 Item	正常组	衰老模型组	橄榄苦苷组	维生素 E 组	
	Normal control group	Aging model group	Oleuropein treated group	Vitamin E control group	
心 Heart	端粒酶/nU mg ⁻¹ Telomerase	55.48±5.77	39.62±5.14 ^b	50.91±4.03 ^d	47.82±4.37 ^{ad}
	SOD 活性/U mg ⁻¹ SOD activity	45.72±3.11	36.64±2.67 ^b	52.09±3.03 ^d	45.77±2.37 ^c
	GSH-Px 活性/U mg ⁻¹ GSH-Px activity	324.11±63.60	244.42±42.29 ^b	317.50±50.88 ^d	288.98±49.09 ^{ac}
	MDA 含量/nmol mg ⁻¹ MDA content	5.18±0.74	8.60±1.14 ^b	5.67±0.73 ^d	6.12±1.07 ^{ad}
脑 Brain	端粒酶/nU mg ⁻¹ Telomerase	93.05±10.26	76.39±8.22 ^b	113.61±12.47 ^{ad}	108.18±9.80 ^c
	SOD 活性/U mg ⁻¹ SOD activity	57.05±6.25	41.30±3.02 ^a	63.66±5.44 ^d	58.12±4.81 ^c
	GSH-Px 活性/U mg ⁻¹ GSH-Px activity	254.14±67.94	210.81±78.77 ^a	274.33±61.61 ^c	256.67±55.36 ^c
	MDA 含量/nmol mg ⁻¹ MDA content	4.65±0.52	7.39±0.97 ^b	4.38±0.67 ^d	5.40±0.79 ^{ac}
肝 Liver	端粒酶/nU mg ⁻¹ Telomerase	24.64±2.18	10.01±2.06 ^b	20.06±3.11 ^d	16.62±2.33 ^{bd}
	SOD 活性/U mg ⁻¹ SOD activity	64.61±2.72	40.02±2.26 ^b	62.28±5.15 ^d	58.46±3.34 ^c
	GSH-Px 活性/U mg ⁻¹ GSH-Px activity	404.82±62.66	250.93±74.77 ^b	360.22±53.40 ^d	316.55±72.27 ^{ac}
	MDA 含量/nmol mg ⁻¹ MDA content	3.77±0.61	7.06±1.02 ^b	4.64±0.81 ^d	4.92±1.03 ^{ad}

3 讨论

衰老是机体的生理功能逐渐下降, 组织器官逐步发生退行性改变, 并最终走向死亡的过程。目前衰老研究的模型中, 比较公认的是在一定时间内连续给小鼠注射 D-半乳糖可诱导产生与老龄鼠相似的衰老症状, 可用于行为学、抗氧化以及免疫等方

面的抗衰老药物药效的研究^[8-9], 故采用此模型。

国内外对抗衰老及其机制的研究日益增多, 有关衰老的具体机制比较重要的观点有以下 3 个方面: (1) 自由基学说认为机体代谢过程产生的自由基与体内蛋白质、脂肪等物质发生反应, 对细胞产生严重损伤, 从而引起衰老^[10]。(2) 遗传基因学说认为人类 DNA 每复制一次, 端粒 DNA 就丢失 50~

200 bp, 随着细胞分裂次数的增加, 端粒 DNA 进行性的缩短, 当缩短到一定程度时, 细胞有丝分裂便不可逆地被阻断在细胞周期的 G1 期和 G2/M 期之间的某个时期, 细胞失去分裂增殖的能力而衰老死亡^[11-12]。(3) 免疫学说认为免疫组织和免疫器官的功能状态与衰老的发生与发展密切相关, 机体免疫功能失调, 可诱发严重的疾病, 加剧细胞、组织和器官的衰老过程^[13]。

本结果显示, 衰老模型组小鼠的心、脑、肝、肾脏、脾和胸腺等脏器指数显著降低, 而橄榄苦苷使衰老小鼠的脏器指数增加, 除胸腺指数外, 橄榄苦苷组中其他各脏器指数与正常组相比无明显差异, 说明橄榄苦苷能修复受损的内脏器官。SOD 和 GSH-Px 是动物机体内重要的抗氧化剂, MDA 是自由基和脂质过氧化的代谢终产物。因此, 检测组织中 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 含量, 可以了解组织过氧化损伤的程度^[6]。本实验发现, 衰老模型组小鼠心、脑和肝中 SOD 及 GSH-Px 的活性均显著低于正常组, MDA 含量的显著增加, 经橄榄苦苷处理后小鼠心、脑和肝中 SOD 和 GSH-Px 的活性均显著升高, MDA 含量的显著降低, 抗氧化指标 (SOD、GSH-Px、MDA) 与正常组差异不显著, 表明橄榄苦苷有抗脂质过氧化和清除氧自由基的作用。

端粒酶是基本的核蛋白逆转录酶, 可将端粒 DNA 加至真核细胞染色体末端, 使因每次细胞分裂而逐渐缩短的端粒长度得以补偿, 进而稳定端粒长度。端粒 DNA 作为细胞的“生命钟”, 端粒长短和稳定性决定细胞的寿命^[11]。本研究显示, 衰老模型组小鼠心、脑和肝端粒酶活性显著降低, 橄榄苦苷组小鼠心、脑和肝端粒酶活性与模型组相比显著升高, 除脑端粒酶活性与正常组相比差异显著外, 其他各器官的端粒酶活性与正常无差异, 表明橄榄苦苷具有延缓衰老的作用。

免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 是评价机体体液免疫状况的常用指标。血清 Ig 包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE, 其中 IgG、IgM 是血清抗体的主要成分, 其含量的多少, 可反映机体的免疫应答能力和体液免疫的水平。作为机体的非特异性免疫因素之一, 补体系统在人体的免疫应答及免疫适应中起着调理、免疫附着、吞噬、白细胞化学趋化及中和病毒等重要作用^[14]。白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 对机体的免疫应答和抗病毒感染等有重要作用^[15]。本实验结果显示, 衰老模型组小鼠血清中免疫球蛋白 IgG、IgM 及补体 C3、C4 和 IL-2 含量显著减少, 橄榄苦苷使衰老小鼠血清中免疫球蛋白

IgG、IgM 及补体 C3、C4 和 IL-2 含量显著增加, 血清中免疫球蛋白 IgG、IgM 及补体 C3、C4 和 IL-2 含量与正常组相比无显著差异。说明橄榄苦苷能够提高机体的免疫应答能力、增强体液免疫功能。

综上所述, 橄榄苦苷通过提高心、脑和肝组织的端粒酶及 SOD 和 GSH-Px 活性, 降低 MDA 的含量, 提高血清 IgG、IgM 及补体 C3、C4 和 IL-2 的含量, 来减弱或阻止 D-半乳糖小鼠衰老过程中组织器官的退行性改变, 增强机体的抗氧化能力及细胞和体液免疫功能, 从而延缓机体的衰老进程。

参考文献:

- [1] 雷超, 张力华, 苏婷. 加味四君子汤对衰老大鼠的脾脏及细胞因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2941-2944.
- [2] 何敏, 伍春, 明海霞, 等. 甘肃党参水煎剂对 D-半乳糖诱导衰老小鼠免疫功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(8): 794-797.
- [3] BADAWI S, AHMED S, AL-ANI N. Effect of ethanol olive leaf and its callus ethanol extracts in alloxan-induced diabetic mice (blood glucose and lipid profiles) [J]. Journal of Biotechnology Research Center, 2013, 7(2): 62-66.
- [4] TURKEZ H, TOGAR B, POLAT E. Olive leaf extract modulates permethrin induced genetic and oxidative damage in rats[J]. Cytotechnology, 2012, 64(4): 459-464.
- [5] KAEIDI A, ESMAEILI-MAHANI S, SHEIBANI V, et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 188-196.
- [6] WANG Y, WANG S Q, CUI W H, et al. Olive leaf extract inhibits lead poisoning-induced brain injury[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(22): 2021-2029.
- [7] 尹营松, 苏占辉, 刘丽艳, 等. 橄榄苦苷在大鼠体内药代动力学研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1896-1898.
- [8] 秦红兵, 杨朝晖, 范忆江, 等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立与评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7): 1275-1278.
- [9] 刘洋, 程清洲, 彭超华, 等. D-半乳糖致小鼠衰老模型的制作及效果评价[J]. 武汉工业学院学报, 2009, 28(1): 32-33.
- [10] PALMER D M, KITCHIN J S. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system[J]. Journal of Drugs in Dermatology, 2010, 9(1): 11-15.
- [11] HONG Y, QUINTERO M, FRAKICH N M, et al. Evidence against the involvement of nitric oxide in the modulation of telomerase activity or replicative capacity of human endothelial cells [J]. Exp Gerontol, 2007, 42(9): 904-910.
- [12] HANSSMAN M F, WINKLER D W, HUNTINGTON C E, et al. Telomerase activity is maintained throughout the lifespan of long-lived birds[J]. Exp Gerontol, 2007, 42(6): 610-618.
- [13] 张洪泉, 翁晓静, 陈莉莉, 等. 管花肉苁蓉麦角甾苷对衰老小鼠端粒酶活性和免疫功能的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(4): 270-274.
- [14] 李培兵, 金宏, 仲济学, 等. 网纹甜瓜瓜汁对 D-半乳糖衰老小鼠免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2010, 32(2): 153-156.

- [15] 黄其春, 杨小燕, 林淑慧, 等. 银杏叶提取物对体外培养的肉仔鸡脾脏淋巴细胞增殖及分泌 IL-2 的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(3): 348-351.