

玉芝灵口服液抗皮肤衰老的药理实验研究

★ 刘永忠 黄丽萍 (江西中医学院药学系 南昌 330006)

★ 漆晓琼 (江西省南昌市消防支队医院 南昌 330003)

★ 陈斌 (江西东风药业有限公司 南昌 333300)

摘要:目的:观察玉芝灵口服液内服抗皮肤衰老作用。方法:昆明种小鼠每日颈背部皮下注射 D-半乳糖(120 mg/kg)造成小鼠衰老模型,同时灌胃 4.5、9.0、18.0 g·kg⁻¹·d⁻¹玉芝灵口服液;45 天后,测定小鼠背部皮肤组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化脂质代谢产物丙二醛(MDA)、脂褐质(LF)、羟脯氨酸含量及皮肤中成纤维细胞数目。结果:玉芝灵口服液低、中、高剂量均能明显升高亚急性衰老小鼠皮肤 SOD 活力,使其 MDA 和 LF 含量均明显下降,增加衰老小鼠皮肤羟脯氨酸含量,提高皮肤成纤维细胞数目。结论:玉芝灵口服液可有效地抵抗 D-半乳糖所致的小鼠皮肤衰老。

关键词:玉芝灵口服液;皮肤衰老;实验研究

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

皮肤衰老是机体衰老的一个重要组成部分,皮肤衰老不仅有损于美容,且与许多皮肤病如脂溢性角化、日光性角化、基底细胞癌、鳞状细胞癌的发生也有着病因学的关系。因此,预防和延缓皮肤衰老已成为生命科学研究热点之一。玉芝灵口服液由人参、生地、甘菊花、枸杞子、茯苓、葛根组成,具有益气养阴、清热生津之效,为研究玉芝灵口服液对衰老皮肤的作用,本文观察了其对于 D-半乳糖所致亚急性衰老模型小鼠一些与皮肤衰老有关指标的影响,现报告如下。

1 材料

1.1 药品 玉芝灵口服液,由江西中医学院药剂教研室制备,每 1 mL 含生药 1.0 g;药物:D-半乳糖,中国医药公司北京采购供应站,批号 970897;维生素 E,中国厦门鱼肝油厂,批号 001163;羟脯氨酸,上海康达氨基酸厂,批号 931003;SOD、MDA 及脂褐质测试盒,均由南京建成生物医学工程研究所提供。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物 昆明种小白鼠,体重(22±2)g,雌雄兼用,由江西中医学院实验动物中心提供。合格证号,医动字 021-9601,饲养环境安静,室温(20±1)℃,自然照明。

1.3 仪器 722 型分光光度计,上海第三分析仪器厂;960 型荧光光度计,上海第三分析仪器厂;水浴恒温振荡器,江苏国华仪器厂。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 取昆明种小白鼠 60

只,先随机分成 6 组,每组 10 只,除空白对照组给予 NS 0.18 g·kg⁻¹·d⁻¹外,其余各组给予 D-半乳糖,120 mg·kg⁻¹·d⁻¹,sc。造模 45 天。造模第 31 天开始给药,此后给药、造模同时进行至 45 天。正常对照组、模型对照组每天给生理盐水 0.18 g·kg⁻¹·d⁻¹,口服;阳性组每天给 VitE 0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹,口服;低剂量组 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹,口服;中剂量组 9.0 g·kg⁻¹·d⁻¹,口服;高剂量组 18.0 g·kg⁻¹·d⁻¹,口服,连续给药 15 天。

2.2 标本取材方法 第 45 天末次给药 1 小时后,小鼠拉脱颈椎处死,背部皮肤取下后冰冻保存,拟作皮肤组织匀浆及测定皮肤羟脯氨酸之用。

2.3 10%皮肤匀浆的制备 取背部脱毛后的皮肤组织块 50 mg 左右,经预冷生理盐水漂洗,除去皮下脂肪和其他结缔组织,滤纸拭干,称重,眼科剪剪碎组织块后倒入匀浆管中,量取该组织块 9 倍重量预冷生理盐水,先取少量倒入装有组织块内切式匀浆器中,约匀浆 15 分钟(在冰水中进行),然后将余下的生理盐水加入,制成 10%的组织匀浆。

2.4 皮肤 SOD 活力测定 参照南京建成生物工程公司 SOD 试剂盒说明书方法测定 SOD 活力。

2.5 皮肤 MDA 活力测定 参照南京建成生物工程公司 MDA 试剂盒说明书方法测定 MDA 含量。

2.6 皮肤脂褐质测定 参照南京建成生物工程公司 MDA 试剂盒说明书方法测定,荧光光度计在激发波长 450 nm,荧光波长 360 nm 下测定其荧光强度。以 0.1 μg/mL 的奎宁液为标准,氯仿甲醇液为

空白,按公式计算出脂褐质含量。

2.7 小鼠皮肤羟脯氨酸测定 取背部两肩胛间皮肤 200 g(去毛),投入适量的冷丙酮中,于 4 ℃ 脱脂 2 天,放入 0.05 mol/L 醋酸去丙酮 12 小时,中途换液 1 次后加 20.0 mL 16 mol/L HCl,于 110 ℃ 中水解 24 小时,过滤水解液稀释到 20.0 mL,取待测液 0.1 mL,加水 1.9 mL,加入 0.05 mol/L 的氯胺 T 1.0 mL,摇匀,放在 25 ℃ 水浴锅中加热 20 分钟,再加 3.15 mol/L 过氯酸 1.0 mL,摇匀,室温下放置 5 分钟,再加 10% 对二甲基氨基甲醛 1.0 mL,摇匀,于 60 ℃ 恒温加热 20 分钟,冷却后用 722 分光光度计在波长 550 nm 进行比色。

2.8 小鼠皮肤成纤维细胞计数 每只小鼠在背部肩胛之间去毛取一块皮肤约 2 cm²,用 20% 的福尔马林溶液固定,HE 染色切片,在显微镜下进行成纤维细胞计数,每片计算 2 000 个细胞,查出其中成纤维细胞数目。

3 结果

3.1 玉芝灵对小鼠皮肤 SOD、MDA、LF 的影响 结果见表 1。小鼠皮下注射 D-半乳糖 120 mg·kg⁻¹ d⁻¹,连续 45 天后,皮肤中 SOD 活力明显下降,而 MDA、LF 的含量明显增加,说明造模是成功的。而同时灌胃玉芝灵口服液低、中、高剂量均能明显升高亚急性衰老小鼠皮肤 SOD 活力,使其 MDA 和 LF 含量均明显下降,提示玉芝灵口服液可明显对抗衰老模型小鼠的皮肤衰老。

表 1 玉芝灵对小鼠皮肤 SOD、MDA、LF 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /nmol·mL ⁻¹	MDA /nmol·g ⁻¹	脂褐质含量 /μg·g ⁻¹
空白对照组	10	0.18	21.22 ± 2.11	6.44 ± 1.42	4.52 ± 1.01
模型组	10	0.12	17.95 ± 2.26★	9.23 ± 1.33★	6.93 ± 1.26★
VitE 组	10	0.05	24.05 ± 4.09▲	7.87 ± 2.21▲	4.86 ± 1.09▲
低剂量组	10	4.5	19.82 ± 1.07▲	7.82 ± 1.50▲	5.82 ± 1.80
中剂量组	10	9.0	22.47 ± 2.32▲	6.76 ± 2.15▲	4.76 ± 1.23▲
高剂量组	10	18.0	22.65 ± 3.25▲	6.96 ± 1.45▲	4.69 ± 1.05▲

与空白组比较,★P<0.05,★★P<0.01;与模型组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01。下表同。

3.2 玉芝灵口服液对小鼠皮肤羟脯氨酸含量的影响 结果见表 2。结果表明,玉芝灵口服液中、高剂量组和 VitE 组小鼠皮肤中羟脯氨酸的含量比 D-半乳糖组有明显的升高,其中高剂量组升高了 32.20%,已达正常组水平,差异显著,提示玉芝灵口服液可促进皮肤胶原蛋白的合成,使皮肤趋于年轻化改变。

3.3 玉芝灵口服液对小鼠皮肤成纤维细胞计数的影响 结果见表 3。结果表明,玉芝灵口服液能有效地提高衰老小鼠皮肤组织中成纤维细胞的数量。提示本品有延缓皮肤衰老的作用。

表 2 玉芝灵口服液对小鼠皮肤羟脯氨酸含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	剂量 /g·kg ⁻¹	羟脯氨酸含量 /μg·mg ⁻¹	上升率 (%)
空白对照组	10	0.18	0.77 ± 0.19	30.51
模型组	10	0.12	0.59 ± 0.16★	
VitE 组	10	0.05	0.75 ± 0.15▲	27.12
低剂量组	10	4.5	0.66 ± 0.18	11.86
中剂量组	10	9.0	0.74 ± 0.14▲	25.42
高剂量组	10	18.0	0.78 ± 0.16▲	32.20

表 3 玉芝灵口服液对小鼠皮肤成纤维细胞计数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	剂量 /g·kg ⁻¹	成纤维细胞数目 /个·2000 ⁻¹
空白对照组	10	0.18	106.60 ± 20.58
模型组	10	0.12	75.50 ± 19.76★
VitE 组	10	0.05	99.85 ± 18.53▲
低剂量组	10	4.5	96.52 ± 18.44▲
中剂量组	10	9.0	98.76 ± 21.32▲
高剂量组	10	18.0	104.45 ± 21.59▲

4 讨论

皮肤衰老的特征是失去弹性和柔软性,出现皱纹、干燥角化、色素过量沉积(老年斑)等。关于皮肤衰老学说有多种。自由基学说认为,皮肤老年斑的形成是由于体内自由基的作用,引起脂质过氧化,脂质过氧化的最终产物是丙二醛(MDA),它与体内的一些生物大分子交联而形成 Schiff 碱,即脂褐质(LF),LF 难溶于水,不易被排除,大量堆积于皮肤细胞内出现黄褐色老年斑。皮肤是否保持光滑细嫩主要取决于真皮下的胶原蛋白,羟脯氨酸是胶原蛋白的特有氨基酸之一,约占胶原蛋白全部氨基酸残基的 13.4%。随着年龄增加,体内如 SOD 等清除自由基能力下降,自由基大量增加可引起胶原蛋白交联,老化,失去弹性。

本实验采用了 D-半乳糖所致的小鼠衰老模型,该模型为抗衰老研究中常用的模型,耗时短且结果稳定可靠,我们的实验亦证实了该模型亦可导致小鼠皮肤出现明显衰老,如皮肤中 MDA、LF 升高, SOD 水平、羟脯氨酸含量和成纤维细胞数目减少。本实验在造模的同时,每日灌服玉芝灵口服液,给药 15 天后,可有效地抵抗 D-半乳糖所致的小鼠皮肤衰老。如可升高小鼠皮肤中 SOD 水平、羟脯氨酸的含量和成纤维细胞的数目,同时使衰老皮肤中 MDA 和 LF 升高的含量降低,其中中、高剂量的作用与阳性药 VitE 相近。说明玉芝灵口服液可发挥较强的抗氧化和清除自由基的作用,恢复细胞正常的生理功能,同时,本品还可刺激皮肤成纤维细胞的活性,促进羟脯氨酸的含量,增加胶原蛋白的合成,从而延缓皮肤的衰老过程。

(收稿日期:2003-12-15)