

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80997

# 葛根发酵产物延缓衰老小鼠器官功能衰退的作用机制

张延进<sup>1</sup> 马雅鸽<sup>1,2</sup> 杨雄超<sup>1</sup> 赵兴吕<sup>1</sup> 王奕丹<sup>1</sup>

(1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500;

2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南 昆明 650500)

**摘要:** [目的] 探究葛根素抗衰老作用机制。[方法] 通过 D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠模型, 测定小鼠血清、肝脏和脾脏的氧化应激指标评定其抗氧化能力。以水迷宫试验(MWM)评定小鼠的空间学习记忆能力; 尼氏染色法观察小鼠海马体的病理变化; 测定脑组织氧化应激指标, 综合探讨云芝发酵葛根提取物(FP)对脑衰老的影响。采用 Micro-CT 扫描分析 FP 对衰老小鼠股骨运动能力的影响。采用苏木精和伊红(HE)染色, 观察小鼠睾丸和胸腺的组织结构变化。[结果] 与模型组相比, FP 干预后, 小鼠血清 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.001$ ), GSH 含量显著升高 ( $P < 0.001$ ), SOD 活力显著升高 ( $P < 0.05$ ); 肝组织中 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), GSH 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 对 SOD 活性无显著影响; 脾脏组织中 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性显著升高 ( $P < 0.001$ ), 对 GSH 含量无显著影响; 表明 FP 可通过提高血清抗氧化能力来延缓衰老小鼠肝、脾的抗氧化功能衰退; FP 组小鼠末次训练总路程下降 62.18% ( $P < 0.0001$ ), 平台穿越次数提高 77.14% ( $P < 0.0001$ ); 脑组织 MDA 显著降低 ( $P < 0.001$ ), GSH 含量和 SOD 活力显著升高 ( $P < 0.05$ ); 海马神经元的凋亡得到改善; FP 能够提高小鼠股骨体积分数, 改善衰老股骨状态; FP 组小鼠睾丸和胸腺组织结构异常得到改善。[结论] FP 可延缓衰老小鼠脑组织结构和功能衰退; 股骨运动协调能力衰退; 肝脏和脾脏抗氧化功能衰退及胸腺和睾丸组织结构进行性改变。

**关键词:** 发酵葛根提取物; 葛根素; 器官功能衰退; 氧化应激; 改善记忆; 云芝菌

## Mechanism of fermentation products of *Puerariae lobatae* Radix in delaying organ function decline in aging mice

ZHANG Yanjin<sup>1</sup> MA Yage<sup>1,2</sup> YANG Xiongchao<sup>1</sup> ZHAO Xinglu<sup>1</sup> WANG Yidan<sup>1</sup>

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Key Laboratory of Topical Drug Delivery System and Formulation Technology in Yunnan Provincial Universities, Kunming, Yunnan 650500, China)

**Abstract:** [Objective] This study aims to decipher the mechanism of the anti-aging effect of puerarin. [Methods] A mouse model of D-galactose-induced subacute aging was established. The antioxidant capacity was assessed by measuring oxidative stress indicators in the serum, liver, and spleen. The spatial learning and memory ability of mice was assessed by the Morris water maze test. Pathological changes in the hippocampus of mice were observed by Nissl staining. The oxidative stress indicators of the brain tissue were measured to comprehensively investigate the effect of the fermentation products of *Puerariae lobatae* Radix (FP) on brain aging. Micro-CT scanning was performed to study the effect of FP on femoral motor ability in aging mice. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the histological changes of the testis and thymus in mice. [Results] Compared with the model group, the FP intervention reduced the MDA content ( $P < 0.001$ ) and increased the GSH content ( $P < 0.001$ ) and SOD activity ( $P < 0.05$ ) in the serum. Meanwhile, it reduced the MDA content ( $P < 0.05$ ), increased the GSH content ( $P < 0.01$ ), and had no significant effect on the SOD activity in the liver. It reduced the MDA content ( $P < 0.05$ ), increased the SOD activity ( $P < 0.001$ ), and had no significant effect on the GSH content in the spleen. The results indicated that FP delayed the antioxidant function decline in the liver and spleen of aging mice by improving the antioxidant capacity of the serum. The FP

基金项目: 中医联合专项一面上项目(编号: 202201AG070267); 云南省重大科技专项(编号: 202102AE090031, 202402AE090011)

通信作者: 马雅鸽(1983—), 女, 云南中医药大学副教授, 博士。E-mail: pigeonma@163.com

收稿日期: 2024-09-28 改回日期: 2024-12-02

group showed a decrease of 62.18% in the total distance traveled at the end of training ( $P < 0.0001$ ) and an increase in the number of platform traversals ( $P < 0.0001$ ). Furthermore, FP reduced the MDA content ( $P < 0.001$ ) and increased the GSH content and SOD activity ( $P < 0.05$ ) in the brain tissue, ameliorated the apoptosis of hippocampal neurons, and increased the femur volume fraction, thus delaying the femur aging of mice. In addition, the histological structure abnormalities of the testis and thymus of the mice were ameliorated in the FP group. [Conclusion] FP can delay the brain tissue structure and function decline, motor coordination decline of the femur, antioxidant function decline of the liver and spleen, and degenerative changes in the thymus and testis in aging mice.

**Keywords:** fermentation products of *Puerariae lobatae* Radix; puerarin; organ function decline; oxidative stress; memory improvement; *Coriolus versicolor*

人口老龄化已成为当今社会面临的重要问题,器官功能改变或丧失直接增加机体损伤、疾病和死亡风险<sup>[1-2]</sup>。干预衰老可助人减缓衰老、提升生命质量<sup>[3]</sup>。抗衰老研究领域,许多源于药食同源资源的小分子药物或天然药物具有潜在抗衰老功效,从药食同源资源中筛选抗衰老天然活性成分成为延缓衰老研究的关键<sup>[4-9]</sup>。

目前,有关抗衰老研究主要集中于分析中药原材料或单一成分对 *D*-半乳糖(*D*-gal)诱导的单一器官衰老的影响,如红参可延缓小鼠大脑功能衰退<sup>[10]</sup>、葛根素能延缓小鼠心脏功能衰退<sup>[11]</sup>、菊花能延缓肝脏功能衰退<sup>[12]</sup>、重楼叶多糖能提高小鼠脾脏的抗氧化活性<sup>[13]</sup>、金丝桃苷能延缓大鼠肾脏功能衰退<sup>[14]</sup>、安五脂素能延缓胸腺功能衰退<sup>[15]</sup>、黄芪果糖能延缓小鼠肌肉与骨骼的衰退<sup>[16]</sup>等。但缺乏对多器官衰老的综合探讨,然而衰老常常是多器官并发,目前尚缺乏有关天然成分的多器官多组织的抗衰老综合评价。

葛根为豆科植物野葛(*Pueraria lobata* (willd.) Ohwi)的干燥根<sup>[17]</sup>,属于药食同源资源,其主要活性成分为葛根素,具有延缓衰老、抗氧化活性<sup>[18]</sup>和降低端粒酶活性<sup>[19]</sup>。Liu 等<sup>[20]</sup>研究表明,葛根素主要通过抑制 p38MAPK 信号通路修复线粒体损伤和延缓乳腺衰老。然而葛根中葛根素含量较低,课题组前期采用微生物发酵技术对葛根进行发酵,筛选出可以提高葛根素含量的菌种——云芝,并优化其发酵技术。研究拟以此技术发酵葛根制备的产物为原料,以清除 ROS 自由基的抗氧化应激能力为指标,综合评价其延缓 *D*-gal 诱导的衰老小鼠脑、肝、脾、胸腺、睾丸和骨骼等器官功能的衰退,为葛根素抗衰老作用机制的深入研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验动物

SFP 级雄性昆明小鼠:60 只,6 周龄,体重(26±2) g,生产许可号为 SCXK(湘)2019-0004,饲养于云南中医药大学动物实验室,楚商生物科技股份有限公司。

#### 1.1.2 药品与试剂

云芝菌(*Coriolus versicolor*):广东微生物研究所微生物菌种保藏中心;

*D*-半乳糖(*D*-gal):上海麦克林生化科技股份有限

公司;

$\beta$ -烟酰胺核苷酸(NMN):阿拉丁试剂(上海)有限公司;

丙二醛(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶检测(SOD)测试试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒:南京建成生物工程研究所;

苏木素、伊红:碧云天生物技术公司。

#### 1.1.3 仪器

冷冻离心机:H1850-R 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

酶标仪:INFINITE M200 PRO 型,瑞士 TECAN 公司;

十万分之一分析天平:AR224CN 型,奥豪斯仪器(常州)有限公司;

高速低温组织研磨仪:KZ-III-F 型,武汉塞维尔生物科技有限公司;

Morris 水迷宫:WMT-200 型,成都泰盟科技有限公司;

微型 CT:Hiscon XM 型,苏州海斯菲德信息科技有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 云芝发酵葛根提取物的制备 称取葛根粉 20.00 g,加入 23 mL 水,搅拌混匀,121 °C 灭菌 20 min。移取云芝二级种子液 10 mL 至已灭菌的葛根粉锥形瓶中,封口,28 °C、150 r/min 发酵 15 d,烘干,粉碎,过 60 目筛,筛下物按 1:20 (g/mL)加入 30% 乙醇,超声辅助醇提,离心取上清,旋蒸,冻干,得云芝发酵葛根提取物(FP),其葛根素含量为 15.61 mg/g(未发酵组 11.21 mg/g)。

1.2.2 造模、分组与给药 SFP 级雄性昆明小鼠适应性饲养 1 周,环境温度为(23±3) °C,相对湿度为 40%~70%,每 12 h 交替照明,饲养期间自由摄食、饮水。将小鼠随机分成 5 组,每组 12 只,分别为空白组(NG)、模型组(MG)、阳性药组(NMN)、葛根发酵产物低剂量组(FPL)和葛根发酵产物高剂量组(FPH)。根据文献[21]并修改,NG 组皮下注射 360 mg/kg *D*-gal;NG 组皮下注射与 MG 组等量生理盐水;NMN、FPL、FPH 组皮下注射 360 mg/kg *D*-gal,同时 NMN 组灌胃 100 mg/(kg·d) NMN、FPL 组灌胃 25 mg/(kg·d) FP、FPH 组灌胃 50 mg/(kg·d) FP。每天 8:30 开始给药,持续 56 d,每 7 d 称重并记录。

1.2.3 样本收集 根据文献[22]并修改。第 56 天灌胃后,小鼠摘眼球取血,4 °C 静置 2 h,4 °C、3 500 r/min 离心 15 min,取血清分装。无菌解剖取出肝脏、肾脏、脾脏、大

脑、睾丸,用生理盐水清洗脏器表面,用滤纸吸干水分,称重。每组取3只小鼠的肺、肝脏、睾丸、胸腺用4%多聚甲醛固定,常温贮藏,其余用液氮速冻后转至-80℃贮藏。无菌收集结肠内容物,用液氮速冻后转至-80℃贮藏。取左侧股骨,用4%多聚甲醛固定,常温贮藏。

1.2.4 体重和脏器指数 根据文献[23],分别按式(1)、式(2)计算小鼠体重增长率、脏器指数。

$$R = \frac{G_1 - G_0}{G_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$I = \frac{M}{G_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R——体重增长率,%;

$G_0$ ——分组前小鼠质量,g;

$G_1$ ——灌胃结束小鼠质量,g;

I——脏器指数,%;

M——脏器湿重,g。

1.2.5 Morris水迷宫试验 根据文献[24]并修改。定位巡航阶段:定时训练4次,小鼠在有逃避平台的水迷宫中进行1 min的自由探索,记录其末次游泳上台的总路程,以评判小鼠的空间学习能力。探查训练试验:将逃避平台移除,小鼠在没有逃避平台的水迷宫中进行1 min的自由探索,记录小鼠在目标象限的停留时间、时间/路程,进入目标象限的次数和穿越平台区域次数。

1.2.6 血清、脑、肝脏和脾脏生化指标检测 按照试剂盒说明书分别检测小鼠血清、脑、肝脏和脾脏组织中总蛋白含量、超氧化物歧化酶活性(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量。

1.2.7 骨骼相关指标检测 对左股骨进行Micro-CT扫描。扫描条件:60 kV,134  $\mu$ A,单次曝光时间500 ms,扫描分辨率10  $\mu$ m,扫描角度间隔0.5°;利用软件Hiscan

Reconstruct software进行重建;利用软件Hiscan Analyzer software进行分析;测定骨矿物含量、骨矿物密度、骨小梁数量、体积分数。

1.2.8 海马体、胸腺和睾丸组织形态学观察 根据文献[25-26]并修改。将胸腺和睾丸组织置于包埋盒中,采用不同浓度的乙醇对组织进行脱水,放入二甲苯中至透明,浸蜡包埋,切成5  $\mu$ m薄片,进行苏木精和伊红(HE)染色,封片,光学显微镜下观察胸腺和睾丸病理形态。小鼠脑组织海马体用石蜡包埋、切片,片厚6  $\mu$ m,常规尼氏染色,中性树胶封固,高倍显微镜下观察各组小鼠海马神经元。

1.2.9 统计学分析 使用SPSS软件分析试验结果,数据以平均值±标准差表示,采用One-way ANOVA中的Tukey检验进行多组之间的差异比较。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示具有显著统计学意义。利用Graphpad Prism 8.0.2软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 FP对衰老小鼠行为学的影响

NG组小鼠精神状态及活动性良好,皮毛有光泽,食量正常;与NG组比,MG组小鼠出现不同程度精神不佳、倦怠懒动、皮毛枯槁、进食减少等情况。经FP干预后,FP组小鼠精神状态、毛色、活动性、饮食情况均有所改善。

### 2.2 FP对衰老小鼠体重及脏器指数的影响

2.2.1 小鼠体重 由图1可知,与NG组比,MG组小鼠体重增长缓慢,各治疗组体重增长趋势与空白组几乎一致。NMN组小鼠出现增长缓慢现象;其余治疗组小鼠增长较稳定,说明NMN存在减重的作用。NMN可增加机体对糖分的消耗<sup>[27]</sup>,高剂量补充可能会对机体产生一定的代谢负担<sup>[28]</sup>。因此,NMN组小鼠减重可能是NMN的不良反应之一。

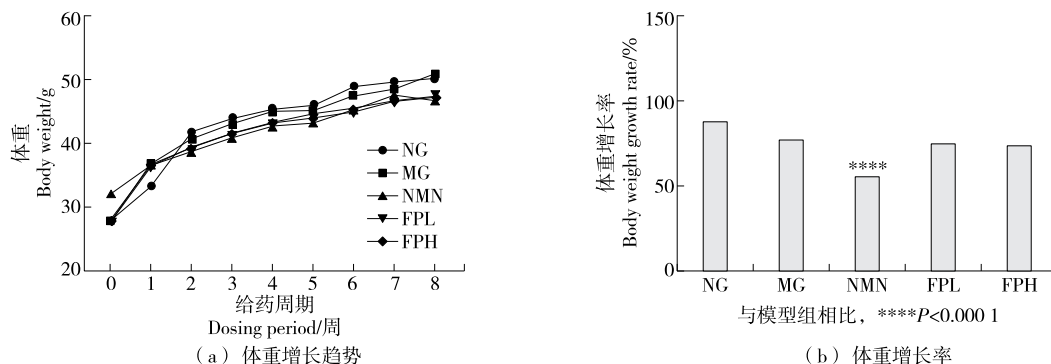
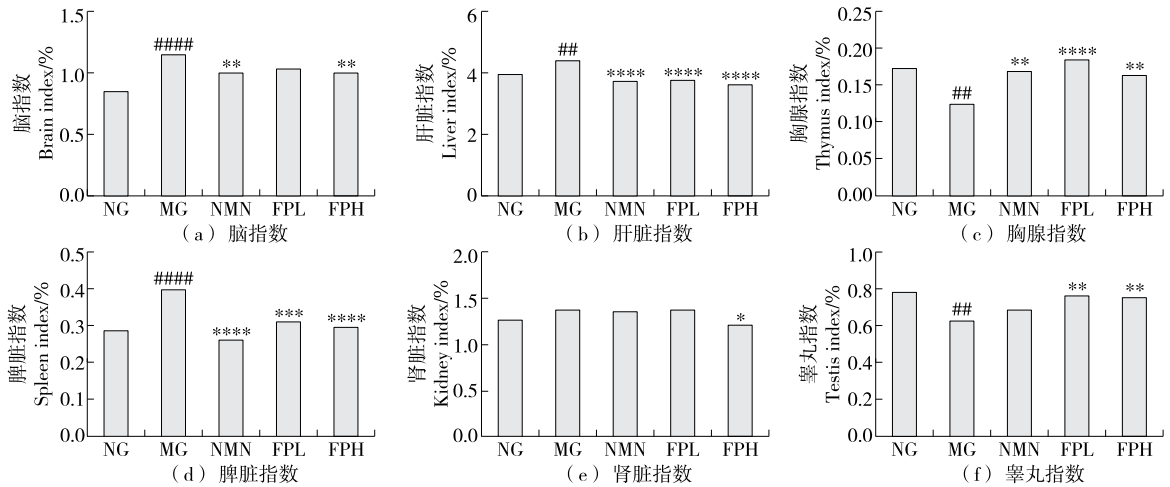


图1 FP对D-gal致衰老小鼠体重的影响

Figure 1 Effect of FP on the body weight of D-gal-induced aging mice

2.2.2 小鼠脏器指数 胸腺和脾脏作为免疫器官,胸腺指数下降和脾脏指数升高表明免疫功能下降;肝脏在身体的新陈代谢中起着极其重要的作用,其指数改变表明

代谢能力下降<sup>[29]</sup>。大脑作为认知及学习记忆中枢,脑指数变化会影响认知功能;睾丸作为雄性哺乳动物生殖器官,其指数下降表明性功能下降;肾脏作为排泄器官,其



与空白组相比,## $P < 0.01$ ,#### $P < 0.0001$ ;与模型组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$

图 2 FP 对 *D-gal* 致衰老小鼠脏器指数影响

Figure 2 Effects of FP on organ indexes in *D-gal*-induced aging mice

指数变化表明排泄功能下降。

由图 2 可知,与 NG 相比,MG 组小鼠脑、肝脏和脾脏指数显著上升( $P < 0.01$ ),睾丸和胸腺指数显著下降( $P < 0.01$ ),肾脏指数上升。FP 干预后,脑、肝脏和脾脏指数下调,睾丸和胸腺指数显著上调( $P < 0.01$ )。表明 FP 干预后,可以提升亚急性衰老小鼠免疫功能、恢复肝脏代谢能力、改善认知功能并提升性能力。

Wang 等<sup>[29]</sup>研究表明,与对照组相比,长双歧杆菌 T37a 可显著提高胸腺指数( $P < 0.05$ ),T37a 高剂量组可显著降低脾脏和肝指数( $P < 0.05$ ),与试验结果一致,但其具体作用机制需深层剖析。

### 2.3 FP 对衰老小鼠血清、肝脏、脾脏氧化应激的影响

由图 3 可知,FP 干预急性衰老小鼠可显著降低血清中 MDA 含量( $P < 0.001$ ),显著升高 SOD 活性( $P < 0.001$ )和 GSH 含量( $P < 0.05$ );小鼠肝组织中 MDA 含量显著降低( $P < 0.05$ ),GSH 含量显著升高( $P < 0.01$ ),对 SOD 活性无显著影响;小鼠脾脏组织中 MDA 含量显著降低( $P < 0.05$ ),SOD 活性显著升高( $P < 0.001$ ),对 GSH 含量无显著影响;说明 FP 可缓解急性衰老小鼠血清、肝脏和脾脏氧化应激作用,但其作用机制有所不同。*D-gal* 的持续摄入可显著降低小鼠肝脏中的抗氧化能力、加剧小鼠脾脏中的脂质过氧化。FP 干预可通过增加血清 SOD 的活性、清除脂质过氧化物 MDA 含量和增加抗氧化物 GSH 含量来改善小鼠的氧化应激,从而保护小鼠免受损伤;FP 干预能够提高肝脏抗氧化能力、提高脾脏脂质氧化能力,保护脾脏免受氧化损伤,尤其是在高剂量组(FPH)中体现出显著的效果,说明 FP 提高机体抗氧化能力存在剂量依赖性且正相关。

李梦婷等<sup>[30]</sup>研究发现,与模型组相比,各剂量组均能增强小鼠血清与睾丸组织中 SOD 活力( $P < 0.01$ )和 GSH 含量( $P < 0.01$ ),降低 MDA 含量( $P < 0.01$ ),与试验结果

一致。

### 2.4 FP 对衰老小鼠脑功能的影响

2.4.1 海马体组织结构 大脑的学习与记忆功能极易在衰老过程中受损<sup>[31]</sup>,海马区神经元的数量和密度与年龄<sup>[32]</sup>呈负相关。在衰老过程中,神经元发生不同程度的凋亡会导致记忆能力下降。

由图 4 可知,MG 组小鼠的海马体组织出现萎缩变形,左右两半球海马体形状有明显差异,而 FP 可减少海马神经元的凋亡,维持海马体的正常形态和功能。说明 FP 干预后,急性衰老小鼠海马体及皮层中组织结构紊乱程度有所改善,形态较规则,细胞核趋于正常,神经元间隙较均匀,损伤程度明显减轻。

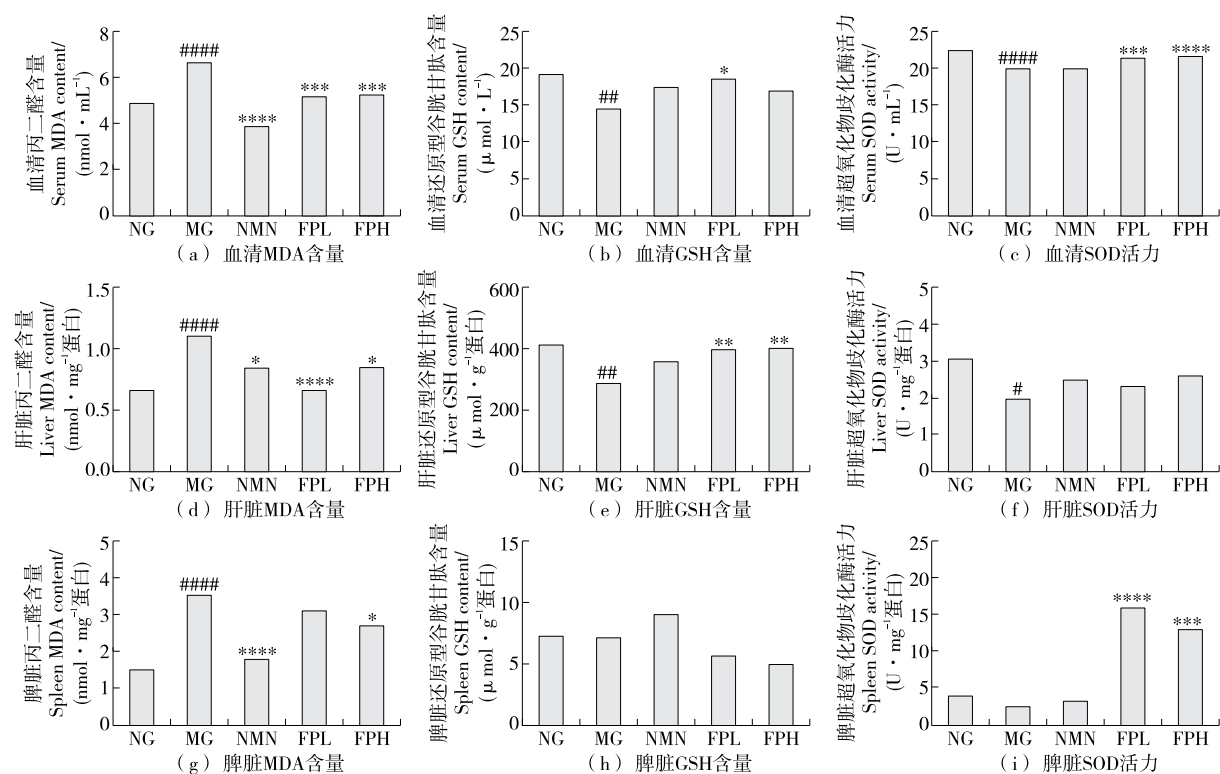
2.4.2 认知功能 由图 5 和图 6 可知,长期的 *D-gal* 干预可使小鼠找到平台次数下降,导致其出现空间学习记忆障碍,认知功能下降。FP 干预后,末次训练总路程和逃避潜伏期极显著降低( $P < 0.0001$ ),目标象限停留时间和停留时间/总路程极显著增加( $P < 0.001$ ),小鼠穿越平台次数和目标象限进入次数极显著增加( $P < 0.0001$ )。表明 FP 干预后,急性衰老小鼠空间学习、记忆能力障碍得到较好改善。

FP 干预急性衰老小鼠,其脑组织中 MDA 含量显著降低( $P < 0.001$ ),GSH 含量显著升高( $P < 0.05$ ),SOD 活性显著升高( $P < 0.05$ ),说明 FP 可显著延缓衰老小鼠脑组织结构退化性改变、海马神经元的凋亡、抗氧化能力减弱、空间学习和记忆能力衰退,且高剂量下的效果更好。综上,FP 可显著提高衰老小鼠脑功能。

### 2.5 FP 对衰老小鼠股骨相关指标的影响

黄宏兴等<sup>[33]</sup>研究表明,衰老过程中,神经系统损伤可以逐渐诱导骨骼肌发生退化性改变,包括运动协调能力、肌肉强度及力量的减弱。

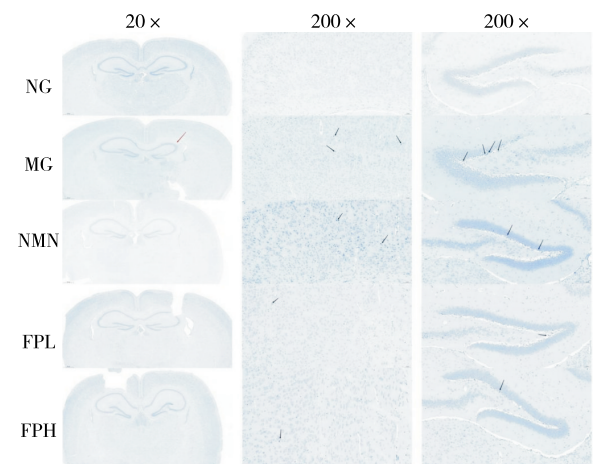




与空白组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.0001$ ; 与模型组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

图3 FP对D-gal致衰老小鼠血清、肝脏和脾脏氧化应激的影响

Figure 3 Effect of FP on oxidative stress in the serum, liver, and spleen of D-gal-induced aging mice



红色箭头表示海马体组织萎缩形变;黑色箭头表示神经元胞核皱缩深染

图4 各药物组对D-gal诱导的亚急性衰老小鼠海马体组织结构的影响

Figure 4 Effects of drug interventions on the organizational structure of hippocampus in D-gal-induced subacute aging mice

由图7和图8可知,与NG相比,MG小鼠股骨综合骨密度和体积分数显著降低( $P < 0.05$ ),骨小梁数量和骨矿物含量降低。与MG相比,FP干预后,股骨体积分数显著

升高( $P < 0.05$ ),综合骨密度、骨小梁数量和骨矿物含量升高。梁美婷等<sup>[16]</sup>研究表明,与模型组相比,黄芪果糖干预组可使D-半乳糖雌性小鼠股骨体积分数提高224.45% ( $P < 0.05$ ),与试验结果相似。说明D-gal的持续摄入对小鼠股骨造成损伤,FP高剂量组能够显著提高股骨体积分数,提高骨强度。综上,FP可以延缓衰老小鼠股骨运动协调能力衰退。

## 2.6 FP对衰老小鼠胸腺和睾丸组织形态的影响

由图9可知,FP干预可以改善急性衰老小鼠胸腺组织皮髓质分界不清晰、皮质细胞数量少、着色较浅及炎性细胞浸润等现象,预示FP对衰老小鼠胸腺组织结构有明显的改善作用。FP干预可以改善急性衰老小鼠睾丸组织生精小管形状不规则,排列松弛,管腔增大,间质松散,精原细胞和精母细胞减少等现象,预示FP对衰老小鼠睾丸组织结构有明显的改善作用。

Zhang等<sup>[34]</sup>研究发现,黄酮类化合物柚皮素能提高核因子红细胞2(Nrf2)、磷酸化的PI3K(p-PI3K)和磷酸化的Akt(p-Akt)的表达,激活PI3K/Akt/Nrf2信号通路,改善衰老小鼠的认知功能障碍和神经损伤,提高D-gal诱导的衰老小鼠的氧化应激能力。Ali等<sup>[35]</sup>发现,花青素通过PI3K/Akt/Nrf2信号传导刺激Nrf2/HO-1通路的主要内源性抗氧化系统,减弱氧化应激引起的细胞损伤及阿尔茨海默病小鼠的神经退行性改变。Gao等<sup>[36]</sup>发现,用红景天

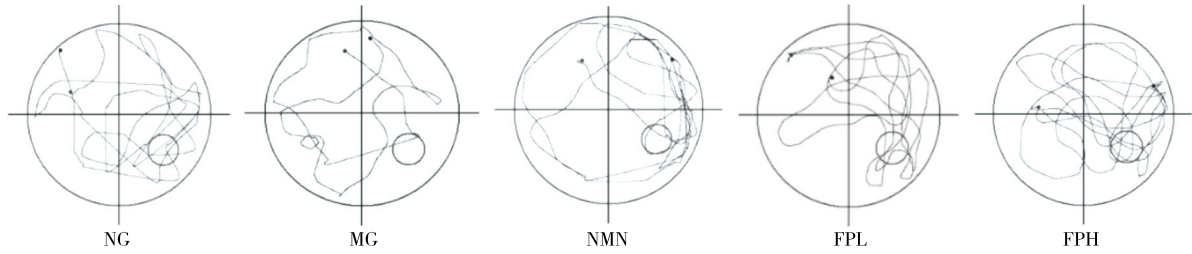
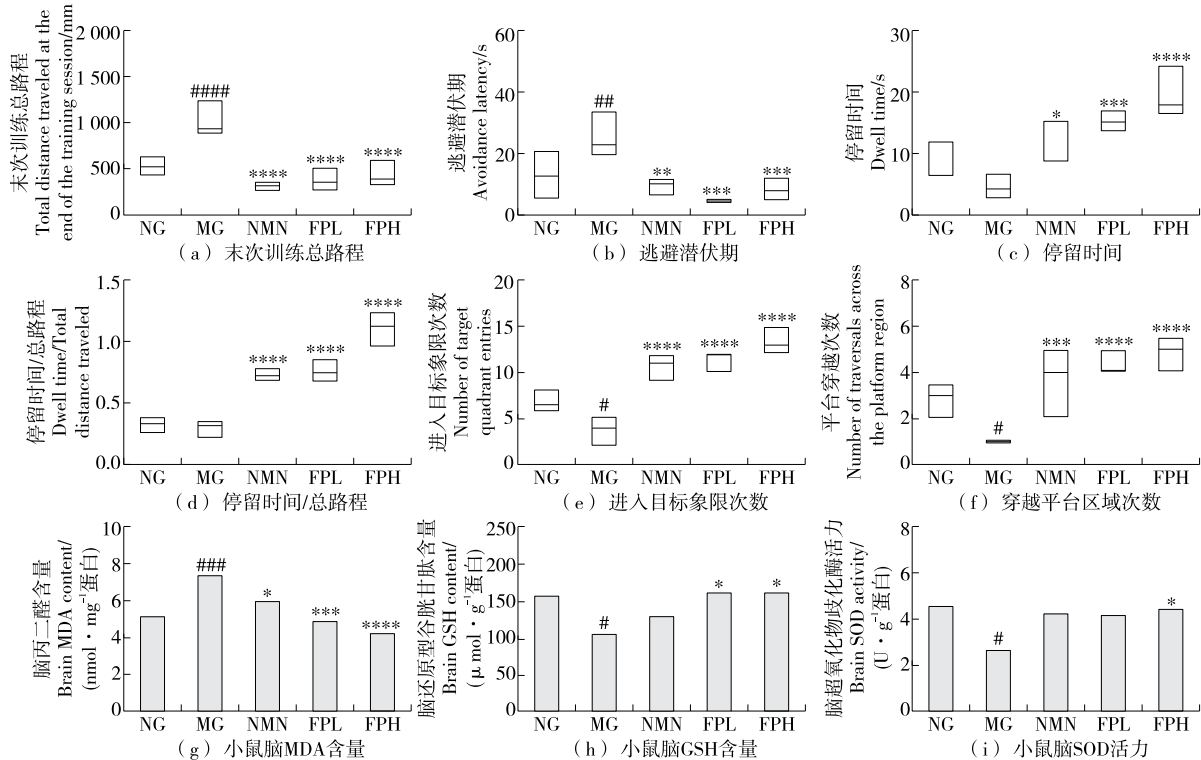


图 5 各组小鼠的水迷宫轨迹图

Figure 5 Trajectory diagrams of each group of mice in Morris water maze



与空白组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$ ; 与模型组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

图 6 FP 对衰老小鼠空间认知功能和抗氧化能力的影响

Figure 6 Effects of FP on spatial cognitive function and antioxidant capacity in aging mice

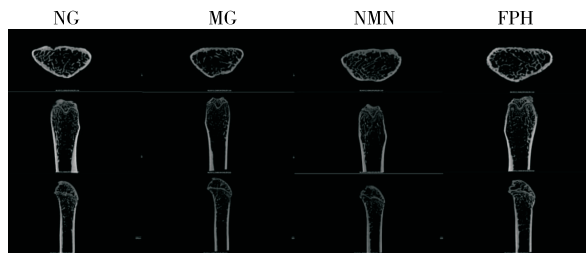


图 7 Micro-CT 扫描图

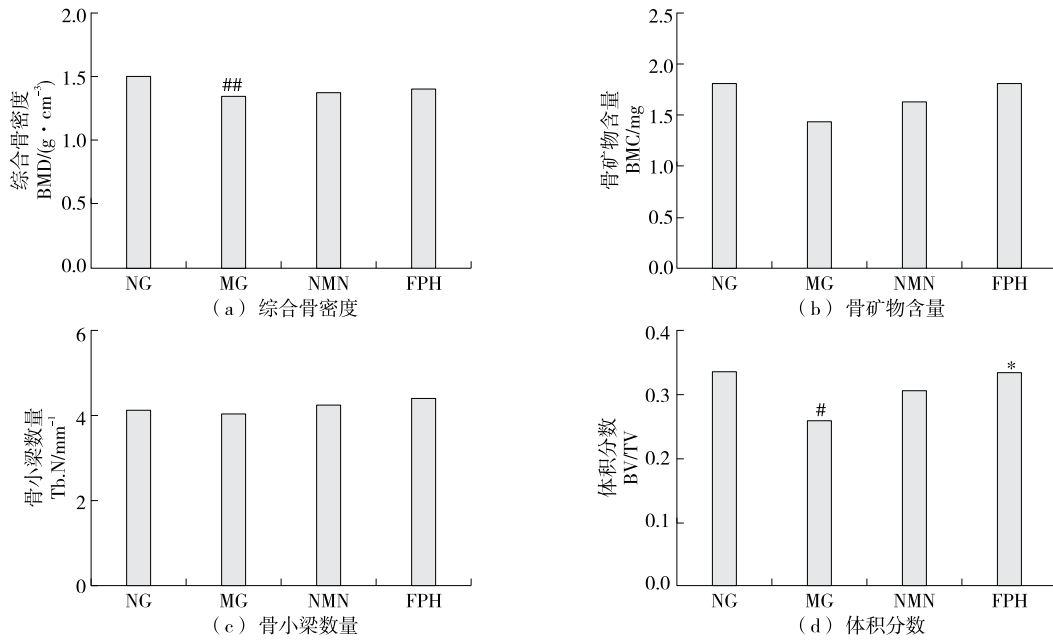
Figure 7 Micro-CT scan images

甘干预可上调 SIRT1 进而抑制 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  的表达, 对海马体组织产生保护作用, 推测 D-gal 触发的记忆障碍和炎症反应可能与 SIRT1/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。夏世金等<sup>[37]</sup>

发现, 淫羊藿总黄酮可通过提高 NF- $\kappa$ B 的活性和诱导 P65 表达来抑制淋巴细胞凋亡从而延缓免疫衰老进程。肖瀛等<sup>[38]</sup>发现, 原花青素 B2 能显著回调三羧酸循环有关的柠檬酸与  $\alpha$ -酮戊二酸含量, 调节糖酵解, 使三羧酸循环趋于正常, 从而延缓衰老。王珂欣等<sup>[39]</sup>研究发现, 给予黄芩素能回调模型组大鼠体内的甘氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、乙酰糖蛋白水平, 涉及相关的丙酮酸代谢、甘氨酸代谢和糖代谢, 推测黄芩素可能通过调控代谢途径保护线粒体功能, 进而延缓衰老。综上, 黄酮类化合物延缓衰老机制涉及其自身结构抗氧化、能量代谢和信号传导通路等多个方面。

### 3 结论

通过 D-半乳糖诱导的衰老小鼠模型, 对发酵葛根提



与空白组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与模型组相比, \* $P < 0.05$

图8 FP对衰老小鼠股骨相关指标的影响

Figure 8 Effects of FP on femur-related indexes in aging mice

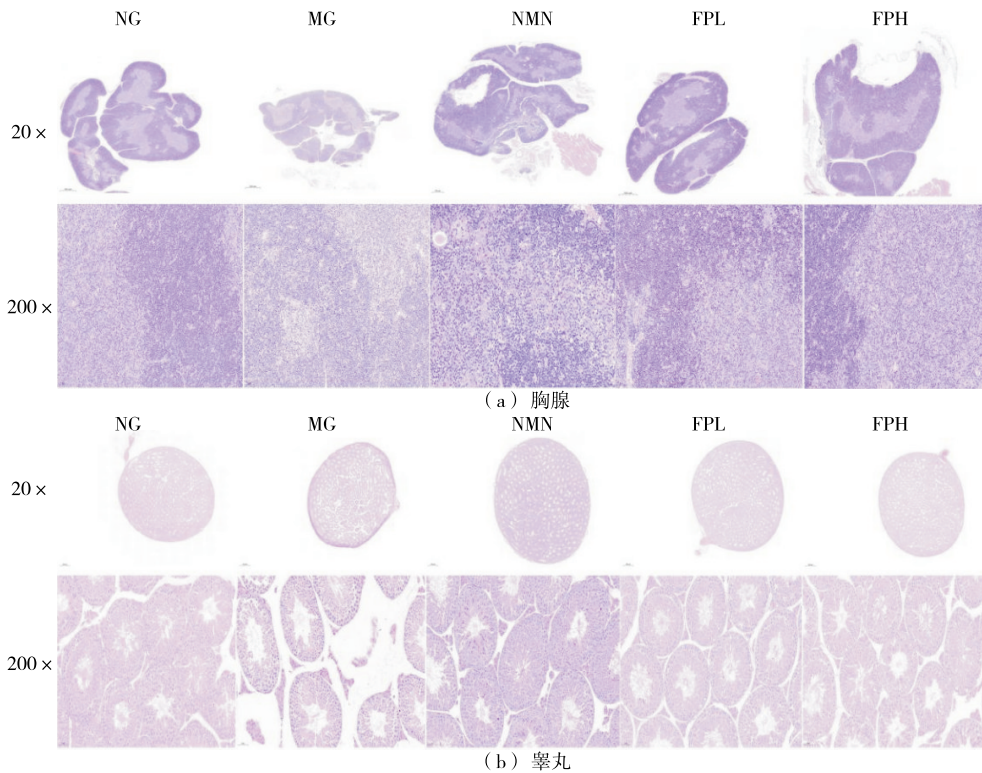


图9 FP对D-gal诱导衰老小鼠胸腺和睾丸组织形态的影响

Figure 9 Effects of FP on the morphology of thymus and testis in D-gal-induced aging mice

取物延缓衰老小鼠器官功能衰退进行了分析。结果表明,模型组小鼠血清丙二醛含量显著升高( $P < 0.0001$ )、超氧化物歧化酶含量和还原性谷胱甘肽活力显著降低

( $P < 0.001$ ),表明D-半乳糖诱导亚急性衰老小鼠模型成功。经发酵葛根提取物干预后,丙二醛含量显著下降,超氧化物歧化酶含量和还原性谷胱甘肽活力不同程度升

高,表明发酵葛根提取物可显著提高衰老小鼠的机体抗氧化能力。此外,发酵葛根提取物可延缓衰老小鼠脑组织结构 and 认知功能衰退、股骨运动协调能力衰退、肝脏和脾脏抗氧化功能衰退、胸腺和睾丸组织结构退行性改变。后续可在此基础上,从自身结构抗氧化、能量代谢和信号传导通路等多方面对葛根延缓衰老机制进行深入探究。

### 参考文献

- [1] RIVAS F, POBLETE-ARO C, PANDO M E, et al. Effects of polyphenols in aging and neurodegeneration associated with oxidative stress[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2022, 29(6): 1 045-1 060.
- [2] BJØRKLUND G, SHANAIDA M, LYSIUK R, et al. Natural compounds and products from an anti-aging perspective[J]. *Molecules*, 2022, 27(20): 7 084.
- [3] SCHMEER C, KRETZ A, WENGERODT D, et al. Dissecting aging and senescence-current concepts and open lessons[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1 446.
- [4] CUI B Y, LIU L Y, SHI T, et al. The ethanolic extract of *Lycium ruthenicum* ameliorates age-related physiological damage in mice[J]. *Molecules*, 2023, 28(22): 7 615.
- [5] XU D P, LI Y, MENG X, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(1): 96.
- [6] PENG C, WANG X B, CHEN J N, et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2 014(1): 831841.
- [7] LI M Y, XU X X, JIA Y F, et al. Transformation of mulberry polyphenols by *Lactobacillus plantarum* SC-5: increasing phenolic acids and enhancement of anti-aging effect[J]. *Food Research International*, 2024, 192: 114778.
- [8] KANG T, ZHENG J Y, JIANG C, et al. Amelioration of walnut, peony seed and camellia seed oils against *D*-galactose-induced cognitive impairment in mice by regulating gut microbiota[J]. *Food & Function*, 2024, 15(13): 7 063-7 080.
- [9] YIMAM M, HORM T, O'NEAL A, et al. An aloe-based composition constituting polysaccharides and polyphenols protected mice against *D*-galactose-induced immunosenescence [J]. *Journal of Immunology Research*, 2024, 2 024(1): 9307906.
- [10] 张君婕. 红参中抗脑衰老的药效物质筛选与作用机制研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2023: 131.
- ZHANG J J. Study on screening of pharmacodynamic substances and mechanism of anti-brain aging in red ginseng [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023: 131.
- [11] 宋冲, 杜青, 李心亮. 葛根素对 *D*-半乳糖诱导衰老小鼠心脏的保护作用[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(1): 35-40.
- SONG C, DU Q, LI X L. Protective effect of puerarin on the heart of *D*-galactose induced aging mice[J]. *Journal of Basic Chinese Medicine*, 2024, 30(1): 35-40.
- [12] ZHANG X, WU J Z, LIN Z X, et al. Ameliorative effect of supercritical fluid extract of *Chrysanthemum indicum* Linné against *D*-galactose induced brain and liver injury in senescent mice via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 234: 44-56.
- [13] 刘功成, 王作伟, 李亭亭, 等. 重楼叶多糖改善 *D*-半乳糖衰老模型小鼠脾脏免疫功能和抗氧化能力[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(16): 366-369, 383.
- LIU G C, WANG Z W, LI T T, et al. Effect of polysaccharides from the leaves of *Paris polyphylla* on immune function and antioxidant capacities of mouse spleen tissue in a *D*-galactose-induced aging mouse model[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(16): 366-369, 383.
- [14] 刘不梅. 金丝桃苷调控 AMPK-ULK1 介导自噬改善 *D*-半乳糖诱导肾脏衰老与损伤的作用和机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019: 22.
- LIU B H. Hyperoside attenuates renal aging and injury induced by *D*-galactose via inhibiting AMPK-ULK1 signaling-mediated autophagy[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2019: 22.
- [15] 李欣, 孙靖辉, 王春梅, 等. 安五脂素对 *D*-gal 致衰老小鼠胸腺的保护作用及其相关机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(12): 1 451-1 457.
- LI X, SUN J H, WANG C M, et al. Anwulignan protects thymus of aging mice induced by *D*-galactose and its related mechanism[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2022, 38(12): 1 451-1 457.
- [16] 梁美婷, 王可欣, 吕思敏, 等. 黄芪果糖制剂对 *D*-半乳糖衰老模型小鼠肌肉与骨骼的影响[J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2 485-2 489.
- LIANG M T, WANG K X, LU S M, et al. Effects of astragalus fructose preparations on muscle and bone in a *D*-galactose model of aging in mice[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2021, 43(9): 2 485-2 489.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 347.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 1st[M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2020: 347.
- [18] LI C C, PAN Z, XU T J, et al. Puerarin induces the upregulation of glutathione levels and nuclear translocation of Nrf2 through PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling events in PC<sub>12</sub> cells exposed to lead[J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2014, 46: 1-9.
- [19] ZHU J H, WANG X X, SHANG Y P, et al. Puerarin reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity[J]. *Vascular Pharmacology*, 2008, 49(2/3): 106-110.
- [20] LIU S, HU H J, ZHANG M, et al. Puerarin delays mammary gland aging by regulating gut microbiota and inhibiting the p38MAPK signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(19): 10 879-10 896.
- [21] 陈杨, 朱梓强, 陆韞青, 等. 杞参益智方改善 *D*-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠学习与记忆能力的效应评价研究[J]. 南



- 京中医药大学学报, 2024, 40(2): 37-44.
- CHEN Y, ZHU Z Q, LU Y Q, et al. Efficacy evaluation of Qishen Yizhi formulain improving the learning and memory ability of *D*-galactose induced subacute aging mice[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2024, 40(2): 37-44.
- [22] 李晓丽, 苏建青, 李莹, 等. 硒化刺五加多糖对 *D*-半乳糖诱导小鼠氧化损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(16): 368-375.
- LI X L, SU J Q, LI Y, et al. Protective effects of selenated *acanthopanax senticosus* polysaccharide against *D*-galactose-induced oxidative damage in mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(16): 368-375.
- [23] 杨萍, 李蓉, 李明鉴, 等. 发酵枸杞多糖对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠肠道的保护作用[J]. 食品科学, 2024, 45(19): 77-86.
- YANG P, LI R, LI M J, et al. Protective effects of fermented *Lycium barbarum* polysaccharides on the intestine in *D*-galactose-induced aging mouse model[J]. Food Science, 2024, 45(19): 77-86.
- [24] WANG D X, WANG E H, LI Y, et al. Anti-aging effect of *Momordica charantia* L. on *D*-galactose-induced subacute aging in mice by activating PI3K/AKT signaling pathway[J]. Molecules, 2022, 27(14): 4 502.
- [25] 张重阳, 于森, 陈荣昌, 等. 党参总皂苷对衰老小鼠认知功能障碍保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(20): 70-76.
- ZHANG C Y, YU M, CHEN R C, et al. Protective effect and mechanism of total saponins of codonopsis radix on cognitive dysfunction in aging mice[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(20): 70-76.
- [26] 朱凯丽, 张长城, 刘尚雨, 等. 淫羊藿苷通过激活 ATF6/c-fos 信号通路改善自然衰老大鼠睾丸支持细胞功能减退的研究[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(23): 2 004-2 012.
- ZHU K L, ZHANG C C, LIU S Y, et al. Icarin attenuates decline in sertoli cell function in natural aging rats by activating ATF6/c-fos signa-Ling pathway[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2022, 57(23): 2 004-2 012.
- [27] YOSHINO M, YOSHINO J, KAYSER B D, et al. Nicotinamide mononucleotide increases muscle insulin sensitivity in prediabetic women[J]. Science, 2021, 372(6 547): 1 224-1 229.
- [28] 陈韬, 曹卉, 董丽, 等.  $\beta$ -烟酰胺核苷酸对生理机能影响的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 382-391.
- CHEN T, CAO H, DONG L, et al. Advance in understanding the effect of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotide on physiological functions[J]. Food Science, 2023, 44(9): 382-391.
- [29] WANG Y, WANG J H, LI H H, et al. Antioxidant effects of *Bifidobacterium longum* T37a in mice weight loss and aging model induced by *D*-galactose[J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 103.
- [30] 李梦婷, 郑慧丽, 朱梓强, 等. 杞蛎还少方改善 *D*-半乳糖致亚急性衰老小鼠性激素水平紊乱与睾丸氧化损伤的效用评价研究[J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(11): 1 102-1 112.
- LI M T, ZHENG H L, ZHU Z Q, et al. Study on efficacy evaluation of Qili Huanshao formula in ameliorating sex hormone disturbance and oxidative damage in testicular of *D*-galactose-induced subacute aging mice[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2023, 39(11): 1 102-1 112.
- [31] SU H M. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2010, 21(5): 364-373.
- [32] JI Z H, XU Z Q, ZHAO H, et al. Neuroprotective effect and mechanism of daucosterol palmitate in ameliorating learning and memory impairment in a rat model of Alzheimer's disease [J]. Steroids, 2017, 119: 31-35.
- [33] 黄宏兴, 吴青, 李跃华, 等. 肌肉、骨骼与骨质疏松专家共识 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1 221-1 229, 1 236.
- HUANG H X, WU Q, LI Y H, et al. Expert consensus on muscle, bone and osteoporosis[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2016, 22(10): 1 221-1 229, 1 236.
- [34] ZHANG Y, LIU B, CHEN X, et al. Naringenin ameliorates behavioral dysfunction and neurological deficits in a *D*-galactose-induced aging mouse model through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. Rejuvenation Research, 2017, 20(6): 462-472.
- [35] ALI T, KIM T, REHMAN S U, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Molecular Neurobiology, 2018, 55(7): 6 076-6 093.
- [36] GAO J, ZHOU R, YOU X T, et al. Salidroside suppresses inflammation in a *D*-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease via SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Metabolic Brain Disease, 2016, 31(4): 771-778.
- [37] 夏世金, 沈自尹, 刘小雨, 等. 核因子- $\kappa$ B 调控老年大鼠脾淋巴细胞凋亡及淫羊藿总黄酮对其影响[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(2): 105-108.
- XIA S J, SHEN Z Y, LIU X Y, et al. Regulatory function of nuclear factor-kappa B on spleen lymphocyte apoptosis in aged rats and effect of epimedium total flavonoids[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2008, 28(2): 105-108.
- [38] 肖瀛, 吴其国, 尹志婷, 等. 原花青素 B<sub>2</sub> 对 *D*-半乳糖模型小鼠的代谢组学研究[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 134-139.
- XIAO Y, WU Q G, YIN Z T, et al. Metabonomics study on anti-aging effect of procyanidin B<sub>2</sub> in *D*-galactose-induced aging in mice[J]. Food Science, 2018, 39(17): 134-139.
- [39] 王珂欣, 高丽, 段丹丹, 等. 基于 <sup>1</sup>H-NMR 代谢组学的黄芩素干预 *D*-半乳糖致衰老大鼠作用研究[J]. 中草药, 2017, 48(3): 511-518.
- WANG K X, GAO L, DUAN D D, et al. Effects of baicalin on *D*-galactose-induced aging rats based on <sup>1</sup>H-NMR metabonomics[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(3): 511-518.