

引用:王祯,李亚金,沈奕玮,王倍翔,董媛媛,金振辉,王玉英,王景霞.基于Wnt/β-catenin通路探讨三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠肾脏的抗氧化作用及机制[J].中医药导报,2025,31(12):1-7.

实验

基于Wnt/β-catenin通路探讨三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠肾脏的抗氧化作用及机制*

王 祯¹,李亚金²,沈奕玮¹,王倍翔¹,董媛媛²,金振辉¹,王玉英¹,王景霞¹
 (1.北京中医药大学,北京 100029;
 2.新疆医科大学,新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:评价三七复方对肾脏的抗氧化及保护作用,并探究基于Wnt/β-catenin通路的抗氧化延缓衰老的作用机制。方法:将72只雄性SD大鼠按照体质量随机分为空白组、模型组、维生素E组、三七复方低剂量组、三七复方中剂量组、三七复方高剂量组,每组12只。除空白组外,其余各组大鼠连续4周腹腔注射D-半乳糖以制备衰老大鼠模型。造模期间,空白组、模型组大鼠每天灌胃蒸馏水,维生素E组大鼠灌胃维生素E溶液,三七复方低、中、高剂量组大鼠分别灌胃低、中、高剂量三七复方药液,连续4周。给药期间每日观察大鼠精神状态和毛色,每周检测大鼠体质量。给药结束后观测大鼠肾脏系数、肾一般损伤情况(包括肾功能指标BUN、Cr、UA)、肾脏氧化应激水平(过氧化产物MDA、8-OHdG)、抗氧化系统指标(T-SOD活力、GSH-Px活力、CAT活力、T-AOC、GSH/GSSG)、肾组织形态结构(HE观察)以及肾组织中Wnt/β-catenin通路相关蛋白(Wnt4、GSK-3β、p-GSK-3β、β-catenin、c-Myc)相对表达量。结果:使用D-半乳糖造模后,与空白组相比,大鼠肾脏系数降低、肾功能减退、过氧化产物(MDA和8-OHdG)含量明显升高、肾中抗氧化指标(T-SOD活力、GSH-Px活力、CAT活力、T-AOC、T-GSH/GSSG比值)明显降低,肾脏组织内Wnt4、p-GSK3β、β-catenin和c-Myc蛋白表达量增加,GSK3β蛋白表达量下降,p-GSK3β/GSK3β上升;与模型组相比,三七复方组大鼠肾功能显著改善,氧化损伤减轻,机体抗氧化能力提高,肾脏组织内Wnt4、p-GSK3β、β-catenin和c-Myc蛋白表达量减少,p-GSK3β/GSK3β降低。结论:三七复方能够通过抑制D-半乳糖致衰老模型大鼠的氧化应激反应,减轻机体氧化损伤,减轻肾损伤,起到延缓衰老的作用。三七复方可能通过抑制Wnt/β-catenin通路,促进β-catenin的降解,减少β-catenin进入细胞核与TCF/LEF结合,抑制TCF/LEF调控的c-Myc基因表达,减少ROS的产生,降低机体氧化损伤,起到抗氧化延缓衰老的作用。

[关键词] 衰老;抗氧化;三七复方;Wnt/β-catenin通路;氧化应激;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)12-0001-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.001

Exploring the Antioxidant Effects and Mechanisms of Panaxnotoginseng Formula on D-Galactose-Induced Aging Rat Kidneys via the Wnt/ β -Catenin Pathway

WANG Zhen¹, LI Yajin², SHEN Yiwei¹, WANG Beixiang¹, DONG Yuanyuan², JIN Zhenhui¹,

WANG Yuying¹, WANG Jingxia¹

(1.Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2.Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the antioxidant and protective effects of Panaxnotoginseng formula (PNF) on the kidneys and to explore its mechanism in delaying aging through antioxidant effects via the Wnt/β-catenin

*基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2018YFC1706803);北京中医药薪火传承“新3+3”工程建设单位王玉英三名传承工作室(2023-SZ-F-22)

通信作者:王景霞,女,教授,研究方向为中药药性理论研究

pathway. Methods: Totally 72 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, model group, vitamin E group, PNF low dose group, PNF medium dose group, and PNF high dose group, 12 rats in each group, based on body weight. Except for the control group, all other groups received daily intraperitoneal injections of D-galactose for four weeks to establish an aging model. During modeling, the control and model groups were given distilled water via oral gavage daily. The vitamin E group received vitamin E solution. The PNF low dose group, PNF medium dose group, and PNF high dose group received low dose, medium dose and high dose of PNF solution respectively for four weeks. The mental state and coat color of the rats were observed daily, and body weight was measured weekly. After treatment, kidney indices, renal function (BUN, Cr, UA), oxidative stress markers (MDA and Q18-OHdG), antioxidant indicators (T-SOD, GSH-Px, CAT, T-AOC and GSH/GSSG), renal morphology (HE staining), and protein expression levels of Wnt/β-catenin pathway components (Wnt4, GSK-3β, p-GSK-3β, β-catenin, c-Myc) were measured. Results: After D-galactose modeling, compared with the control group, the model group showed a decreased kidney index, impaired renal function, significantly increased levels of peroxidation products (MDA and 8-OHdG), and significantly decreased antioxidant indicators (T-SOD activity, GSH-Px activity, CAT activity, T-AOC, and GSH/GSSG ratio). The protein expression of Wnt4, p-GSK-3β, β-catenin, and c-Myc in renal tissue increased, while GSK-3β expression decreased and the p-GSK-3β/GSK-3β ratio increased. Compared with the model group, PNF group significantly improved renal function, alleviated oxidative damage, enhanced systemic antioxidant capacity, reduced the protein expression of Wnt4, p-GSK-3β, β-catenin, and c-Myc, and decreased the p-GSK-3β/GSK-3β ratio. Conclusion: Panaxnotoginseng formula can mitigate oxidative stress, reduce oxidative damage and renal injury, thereby exerting an anti-aging effect in D-galactose-induced aging model rats. The mechanism may involve inhibiting the Wnt/β-catenin pathway, promoting the degradation of β-catenin, reducing its translocation into the nucleus and binding to TCF/LEF, and suppressing the expression of the TCF/LEF-regulated c-Myc gene. This leads to reduced ROS production, decreased systemic oxidative damage, and ultimately contributes to its antioxidant and anti-aging effects.

[Keywords] aging; antioxidant; Panaxnotoginseng formula; Wnt/β-catenin pathway; oxidative stress; rat

随着时代和经济发展,人口老龄化日益严重。许多老年性疾病严重影响老年人的身心健康和生活质量,同时老龄化给社会医疗、经济带来了沉重的负担。如何减缓衰老并延长健康寿命是当下社会亟待解决的问题。中医学认为衰老是脏腑精气虚损、气血阴阳失调所导致的机体功能减退;肾是衰老的代表性脏腑,肾气的盛衰与衰老密切相关。现代医学中,衰老通常被定义为机体随着年龄的增长,器官、组织、细胞、分子出现的渐进式生理衰退;肾脏被认为是衰老的代表性器官,肾脏衰老与肾功能减退密切相关。

三七复方遵循中医“扶正固本”思想,由三七提取物、谷胱甘肽、维生素C按6:1:2的质量比例组成。三七性温,味甘微苦,归肝、胃经,具有活血化瘀、补血强壮之效,被誉为“参中之王”,能通补兼施,活血而不伤正,补虚而不滞瘀。其提取物能促进精血化生。再佐以谷胱甘肽和维生素C两种现代抗氧化剂,三者合用,共奏补衰抗老之效。

关于衰老的理论学说众多,其中广为接受的是自由基理论,即氧化应激理论。目前,在抗衰老研究领域中,最常见的研究策略之一是应用抗氧化剂进行干预,通过调节氧化应激相关分子信号或通路,以减轻氧化应激造成的损伤,从而延缓细胞衰老。本研究采用D-半乳糖诱导的老年大鼠模型,评价三七复方在衰老大鼠体内的抗氧化作用,并探究其抗氧化

的作用机制。

1 材 料

1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠72只,体质量(180±40)g,4周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0011;动物质量合格证号:110318218778753476;动物使用许可证号:SYXK(京)2023-0011。大鼠饲养于北京中医药大学良乡校区动物实验中心,温度(24±2)℃,相对湿度40%~60%,自由进食进水,12 h明暗交替,适应性喂养1周后实验。本实验已通过北京中医药大学伦理审核委员会批准,审批号:BUCKM-4-2021052405-2038。

1.2 药物与试剂 三七复方(三七提取物、谷胱甘肽、维生素C按6:1:2的质量比例组成),人体日服用量为0.9 g(三七提取物0.6 g/d,谷胱甘肽0.1 g/d,维生素C 0.2 g/d)。三七提取物为水提取,干燥过程不添加辅料,提取率约20%,三七皂苷 \geqslant 10 g/100 g。谷胱甘肽使用注射用还原型谷胱甘肽。维生素C为符合国家GB14754标准的维生素C粉剂。三七复方药液制备:使用精确天平称取适量三七复方粉末,量取适量去离子水,充分混匀,分别配制为7.5 mg/mL、15.0 mg/mL、22.5 mg/mL的三七复方溶液,置4 ℃冰箱保存备用。D-半乳糖注射液制备方法:使用精确天平称取适量D-半乳糖粉末(上海吉至生化科技有限公司,批号:D13838724),量取适量0.9%氯化钠溶液,

充分混匀,配制成100 mg/mL的D-半乳糖注射液,置4℃冰箱保存备用。维生素E溶液制备方法:使用精确天平称取适量水溶性维生素E粉末(北京博奥拓达科技有限公司,批号:202310),量取适量去离子水,充分混匀,配制成1.67 mg/mL的维生素E溶液,置4℃冰箱保存备用。

苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒(批号:CR2402037)、BCA蛋白定量试剂盒(批号:CR2203100-1)、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(批号:MPC2401004)和总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(T-GSH/GSSG)比色法测试盒(批号:MPC2309028)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒(羟胺法)(批号:20240116)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒(批号:20240118)和丙二醛(MDA)测试盒(TBA法)(批号:20240119)均购于南京建成生物工程研究所有限公司;8羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)酶联免疫吸附测定试剂盒(上海源桔生物科技中心,批号:20240401022A);总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(微量法)(北京索莱宝科技有限公司,批号:2402002);Wnt4抗体(批号:AC240223013)、P-GSK3β抗体(批号:AC240219042)、GSK3β抗体(批号:AC240219019)、β-catenin抗体(批号:AC240227047)、GAPDH抗体(批号:AC2401261)和HRP-山羊抗兔抗体(批号:AC240327053)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;c-Myc抗体(北京索莱宝科技有限公司,批号:A123214001)。

1.3 主要仪器 脱水机(意大利DIAPATH公司,型号:Donatello);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);正置光学显微镜(尼康株式会社,型号:NIKONECLIPSEE100);酶标检测仪(美国伯腾仪器有限公司,型号:Epoch2C);全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技股份有限公司,型号:Chemray240);垂直电泳仪(型号:SVE-2)和转印电泳仪(型号:SVT-2)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将72只雄性SD大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法按体质量分为空白组、模型组、维生素E组、三七复方低剂量组、三七复方中剂量、三七复方高剂量组,每组12只。造模和给药同步进行,连续6周。模型组、维生素E组、三七复方低剂量组、三七复方中剂量组、三七复方高剂量组根据体质量每日给予500 mg/kg的D-半乳糖腹腔注射,空白组给予等量生理盐水腹腔注射。大鼠按10 mL/kg进行灌胃处理,空白组与模型组每日灌胃去离子水;维生素E组每日给予相应剂量的维生素E;三七复方低、中、高剂量组则分别按复方相应浓度进行灌胃。药物用量为三七提取物0.6 g、谷胱甘肽0.1 g、维生素C 0.2 g及维生素E 0.2 g。剂量设计以人体质量60 kg为参考,按动物系数5倍进行折算。三七复方低、中、高剂量分别相当于人体日服用量的5、10、15倍。

2.2 观察指标

2.2.1 大鼠肾脏系数 称取大鼠体质量、肾脏质量,计算各组大鼠肾脏系数。肾脏系数=肾脏质量(mg)/大鼠体质量(g)。

2.2.2 大鼠血清中BUN、Cr、UA含量测定 使用全自动生化仪检测血清中尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、肌酐(creatinine,Cr)和尿酸(uric acid,UA)。

2.2.3 大鼠肾脏中8-OHdG、MDA含量测定 采用酶联免疫

吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒测定肾组织8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine,8-OHdG);采用硫代巴比妥酸法(thiobarbituric acid assay,TBA)试剂盒测定肾组织丙二醛(malondialdehyde,MDA)。

2.2.4 大鼠肾脏中T-SOD活力、GSH-Px活力、CAT活力、T-AOC、T-GSH/GSSG测定 用电子天平准确称取大鼠肾组织,按1:9(mg/μL)的质量体积比加入预冷的0.9%氯化钠溶液。在冰水浴条件下进行机械匀浆,制备10%的组织匀浆液。将匀浆液于3 000 r/min离心10 min,小心吸取上清液备用。首先,采用二辛可宁酸法(bicinchoninic acid assay,BCA)试剂盒测定上清液中的总蛋白浓度;随后严格按照相应试剂盒说明书操作步骤,依次测定总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase,T-SOD)活力、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)活力、过氧化氢酶(catalase,CAT)活力、总抗氧化能力(total antioxidant capacity,T-AOC)及总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(total glutathione/glutathione disulfide,T-GSH/GSSG)。所有反应的吸光度值均用酶标仪读取,并据此计算结果。

2.2.5 大鼠肾脏形态结构观察 将大鼠肾脏组织固定于4%多聚甲醛溶液中。充分固定后,对组织进行脱水、石蜡包埋并制备切片。切片经脱蜡水化后,依次进行苏木素-伊红(HE)染色、脱水、透明与中性树胶封片。最终于光学显微镜下观察组织结构并采集图像用于分析。

2.2.6 Western blotting法检测大鼠肾组织内Wnt4、GSK-3β、p-GSK3β、β-catenin和c-Myc蛋白表达量 取出冻存于-80℃冰箱的大鼠肾组织,称取约100 mg,剪碎并用预冷的生理盐水清洗。加入裂解液进行充分匀浆,随后于4℃条件下高速离心,收集上清液即为蛋白提取物。采用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白样品与上样缓冲液混合,于100℃煮沸10 min进行变性。制备10% SDS-PAGE凝胶,每孔上样30 μg蛋白。进行电泳分离后,恒压条件下将蛋白转印至PVDF膜。用5%脱脂奶粉室温封闭2 h。封闭结束后,分别加入经适当稀释的一抗:Wnt4(1:1 000)、GSK3β(1:1 000)、p-GSK3β(1:1 000)、β-catenin(1:1 000)、c-Myc(1:1 000)、p38(1:1 000)、p-p38(1:1 000)、MCP-1(1:1 000)、CCR2(1:1 000)及GAPDH(1:3 000),4℃孵育过夜。次日,洗膜后加入相应种属的HRP标记二抗(1:2 000),室温孵育2 h。充分洗涤后,滴加ECL化学发光液,使用化学发光成像系统进行曝光显影。最后,使用Image J软件对目标条带的灰度值进行分析。

2.3 统计学方法 数据分析采用SPSS Statistics 20.0进行统计处理。计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,数据进行正态分布及方差齐性检验。数据符合正态分布,组间数据比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析,两两比较方差齐时采用LSD进行统计分析;方差不齐采用Dunnett's T3进行统计分析;数据不符合正态分布,用中位数(四分位数)描述,用非参数检验作显著性分析,用Kruskall wallis H检验作多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 三七复方对衰老大鼠肾脏系数的影响 模型组肾脏系数显著降低($P < 0.05$)。维生素E组和三七复方各剂量组大鼠肾脏系数较模型组呈现上升趋势,但差异无统计学意义($P >$

0.05)。(见表1)

表1 三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠肾脏系数的影响
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肾脏系数/(mg/g)
空白组	12	6.440±0.331
模型组	12	5.910±0.039 ^a
维生素E组	12	6.276±0.396
三七复方低剂量组	12	6.212±0.448
三七复方中剂量组	12	6.308±0.313
三七复方高剂量组	12	6.251±0.378

注:与空白组比较,^aP<0.05。

3.2 三七复方对衰老大鼠肾功能的影响 与空白组比较,模型组及三七复方低、中、高剂量组血清BUN水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,维生素E组、三七复方低剂量组大鼠血清BUN水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠血清Cr水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,维生素E组及三七复方低、中、高剂量组大鼠血清Cr水平显著降低($P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠血清UA水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,维生素E组及三七复方低、中、高剂量组大鼠血清UA水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。(见表2)

表2 三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠血清BUN、Cr、UA的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN/(mg/dL)	Cr/(μmol/L)	UA/(μmol/L)
空白组	12	17.262±1.436	39.898±0.794	92.691±11.289
模型组	12	27.235±4.583 ^a	45.650±2.290 ^a	118.780±12.190 ^a
维生素E组	12	20.687±2.749 ^b	38.868±3.364 ^b	101.780±9.878 ^c
三七复方低剂量组	12	23.181±3.488 ^{a,c}	37.514±3.257 ^b	79.334±28.165 ^b
三七复方中剂量组	12	24.850±1.967 ^a	39.162±3.835 ^b	85.312±23.231 ^b
三七复方高剂量组	12	26.935±3.731 ^a	41.921±2.952 ^b	102.495±8.146 ^b

注:与空白组比较,^aP<0.01;与模型组比较,^bP<0.01,^cP<0.05。

3.3 三七复方对衰老大鼠肾脏氧化应激水平的影响 与空白组比较,模型组、维生素E组和三七复方低、中、高剂量组大鼠肾组织中的8-OHdG含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,维生素E组和三七复方低、中、高剂量组大鼠肾组织中的8-OHdG含量显著降低($P<0.05$)。

与空白组比较,模型组及三七复方低剂量组大鼠肾组织中MDA含量显著上升($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,维生素E组及三七复方中、高剂量组大鼠肾组织中MDA含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见表3)

表3 三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠肾8-OHdG、MDA含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	8-OHdG/(ng/mL)	MDA/(nmol/mgprot)
空白组	12	66.350±1.380	0.528±0.082
模型组	12	80.138±4.383 ^a	0.674±0.086 ^a
维生素E组	12	70.969±1.255 ^{a,c}	0.560±0.095 ^a
三七复方低剂量组	12	71.062±1.377 ^{a,c}	0.620±0.069 ^b
三七复方中剂量组	12	71.447±0.802 ^{a,c}	0.578±0.088 ^d
三七复方高剂量组	12	73.012±3.074 ^{a,c}	0.554±0.072 ^d

注:与空白组比较,^aP<0.01,^bP<0.05;与模型组比较,^cP<0.01,^dP<0.05。

3.4 三七复方对衰老大鼠肾脏抗氧化功能的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾组织中T-SOD和GSH-Px活力显著降低($P<0.05$);与模型组比较,维生素E组和三七复方低剂量组大鼠肾组织中T-SOD和GSH-Px活力显著升高($P<0.05$)。与空白组比较,模型组肾组织中CAT活力显著降低($P<0.05$);与模型组比较,维生素E组和三七复方低、中、高剂量组肾组织中T-SOD和GSH-Px活力显著升高($P<0.05$)。(见表4)

表4 三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠肾T-SOD、GSH-Px、CAT活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T-SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mgprot)	CAT/(U/mgprot)
空白组	12	705.909±63.871	128.577±9.208	522.684±59.994
模型组	12	622.536±60.394 ^a	116.818±6.174 ^a	432.868±59.300 ^a
维生素E组	12	704.402±40.117 ^b	129.720±10.747 ^b	500.288±83.911 ^b
三七复方低剂量组	12	741.536±102.732 ^b	138.721±15.338 ^b	557.278±87.396
三七复方中剂量组	12	686.787±96.963	126.374±13.086	535.730±83.860 ^b
三七复方高剂量组	12	688.645±114.578	129.815±14.704	535.360±28.779 ^b

注:与空白组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05。

与空白组比较,模型组大鼠肾组织中T-AOC显著降低($P<0.01$);与模型组比较,维生素E组和三七复方低、中剂量组大鼠肾组织中的T-AOC显著升高($P<0.05$)。(见表5)

表5 三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠肾T-AOC的影响
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T-AOC/(μmol/mgprot)
空白组	12	0.232±0.049
模型组	12	0.161±0.025 ^a
维生素E组	12	0.199±0.040 ^b
三七复方低剂量组	12	0.211±1.803 ^b
三七复方中剂量组	12	0.209±0.047 ^b
三七复方高剂量组	12	0.185±0.036

注:与空白组比较,^aP<0.01;与模型组比较,^bP<0.05。

与空白组比较,模型组大鼠肾组织中GSH含量显著降低($P<0.05$);与模型组比较,维生素E组和三七复方中剂量组大鼠肾组织中GSH含量显著升高($P<0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠肾组织中GSSG含量显著升高($P<0.05$);与模型组比较,维生素E组和三七复方低、中、高剂量组大鼠肾组织中GSSG含量显著降低($P<0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠肾组织中GSH/GSSG显著降低($P<0.01$);与模型组比较,维生素E组和三七复方低、中剂量组大鼠肾组织中GSH/GSSG显著升高($P<0.01$)。(见表6)

表6 三七复方对D-半乳糖致衰老大鼠肾GSH、GSSG、GSH/GSSG的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH/(μmol/kg)	GSSG/(μmol/kg)	GSH/GSSG
空白组	12	4.950±1.378	2.090±0.547	2.561±1.108
模型组	12	2.638±1.150 ^a	3.642±0.803 ^a	0.748±0.343 ^b
维生素E组	12	4.308±1.183 ^b	2.426±0.828 ^b	1.980±0.982 ^b
三七复方低剂量组	12	4.397±1.293	2.627±0.975 ^b	2.029±1.200 ^b
三七复方中剂量组	12	4.325±1.803 ^b	1.370±0.679 ^b	1.804±0.219 ^b
三七复方高剂量组	12	3.912±2.050	2.947±0.636 ^b	1.393±0.499

注:与空白组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与模型组比较,^bP<0.05,^cP<0.01。

3.5 三七复方对衰老大鼠肾组织形态学影响 由图1可见空白组肾脏组织表面被膜清晰,未见明显增生;皮质中肾小球分布均匀,肾小球内细胞数量与基质均匀;可见少量肾小管扩张(橙色箭头),管腔扩张,形状不规则,上皮细胞扁平化。模型组肾脏组织表面被膜清晰,未见明显增生;皮质中肾小球分布均匀,多见肾小囊狭窄(灰色箭头);可见少量肾小管小灶性萎缩(黄色箭头),体积减小,管腔狭窄或消失,可见少量纤维细胞增生(棕色箭头),并伴有少量淋巴细胞浸润(红色箭头);可见少量肾小管扩张(橙色箭头),管腔扩张,形状不规则,上皮细胞扁平化。维生素E组肾脏组织表面被膜清晰,未见明显增生;皮质中肾小球分布均匀,少量肾小囊内可见嗜酸性物(紫色箭头);可见少量肾小管上皮细胞水样变性(蓝色箭头),细胞肿胀,胞质疏松淡染;可见少量肾小管扩张(橙色箭头),管腔扩张,形状不规则,上皮细胞扁平化。三七复方低剂量组肾脏组织表面被膜清晰,未见明显增生;皮质中肾小球分布均匀,可见少量肾小囊狭窄(灰色箭头);可见少量肾小管扩张(橙色箭头),管腔扩张,形状不规则,上皮细胞扁平化。三七复方中剂量组肾脏组织表面被膜清晰,未见明显增生;皮质中肾小球分布均匀,肾小球内细胞数量与基质均匀;可见少量肾小管扩张(橙色箭头),管腔扩张,形状不规则,上皮细胞扁平化。三七复方高剂量组肾脏组织中多见肾小管上皮细胞坏死(黑色箭头),胞核固缩碎裂,并可见多量粒细胞浸润(红色箭头);可见少量肾小管上皮细胞水样变性(蓝色箭头),细胞肿胀,胞质疏松淡染;偶见肾小管扩张(橙色箭头),管腔扩张,形状不规则,上皮细胞扁平化。与模型组相比维生素E组和三七复方组不同剂量组病理状态明显缓解。其中维生素E组及三七复方中、高剂量组镜下肾组织形态接近空白组,表明三七复方可减轻D-半乳糖致衰老大鼠肾脏病理损伤。

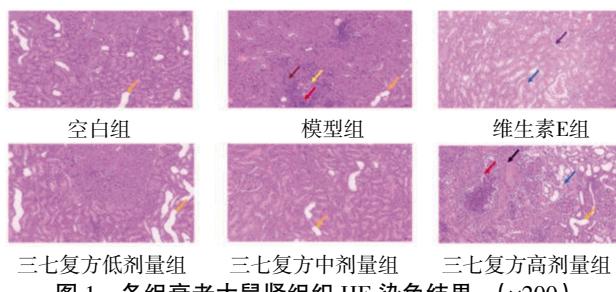


图1 各组衰老大鼠肾组织HE染色结果 ($\times 200$)

3.6 肾组织中Wnt4、GSK-3 β 、p-GSK3 β 、 β -catenin和c-Myc蛋白表达 与空白组比较,模型组大鼠肾组织Wnt4蛋白表达显著升高($P<0.01$);各给药组大鼠肾组织中Wnt4蛋白表达较模型组有降低趋势,其中三七复方中剂量组与模型组的差异有统计学意义($P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠肾组织p-GSK3 β 蛋白表达显著升高($P<0.01$);各给药组大鼠肾组织中p-GSK3 β 蛋白表达较模型组有降低趋势,其中三七复方中剂量组与模型组的差异有统计学意义($P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠肾组织 β -catenin蛋白表达显著升高($P<0.01$);各给药组大鼠肾组织中 β -catenin蛋白表达较模型组有降低趋势,其中三七复方中剂量组与模型组的差异有统计学意义($P<0.01$)。与空白组大鼠比较,模型组肾组织中c-Myc蛋白表达

量上升;与模型组大鼠比较,三七复方组肾组织中c-Myc蛋白表达量降低。(见图2~3)

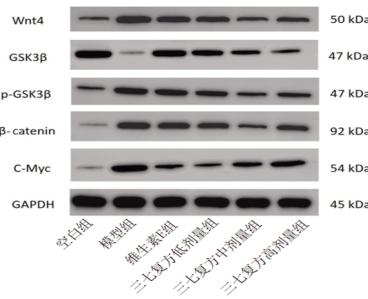
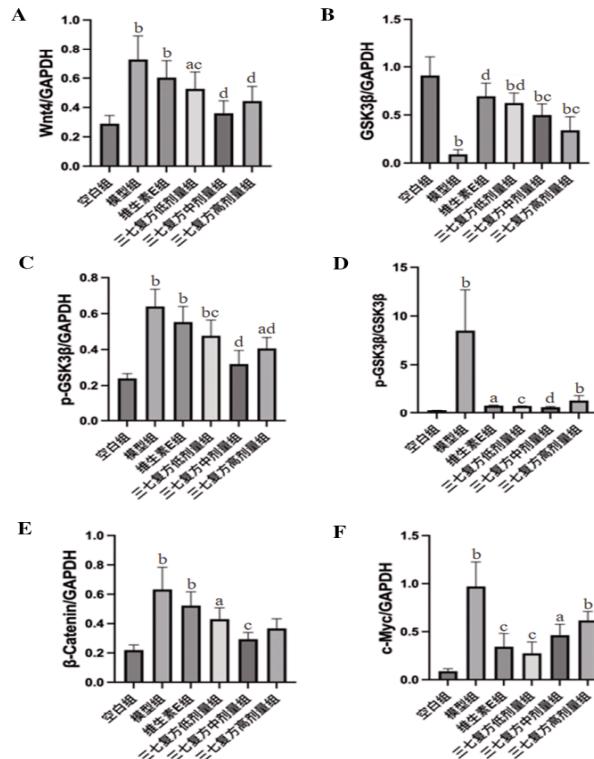


图2 各组大鼠肾组织蛋白条带图



注: A.Wnt4蛋白表达半定量分析;B.GSK3 β 蛋白表达半定量分析;C.p-GSK3 β 蛋白表达半定量分析;D.p-GSK3 β /GSK3 β 蛋白表达半定量分析;E. β -catenin蛋白表达半定量分析;F.c-Myc蛋白表达半定量分析。与空白组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

图3 D-半乳糖致衰老模型大鼠肾组织蛋白Western blotting法检测目的蛋白表达

4 讨论

本实验研究结果表明,三七复方(三七提取物、谷胱甘肽、维生素C)能够显著改善D-半乳糖致衰老大鼠多项相关指标,表现出显著的抗氧化和抗衰老作用。

中医学认为肾为先天之本,为“五脏之根”,是衰老的代表性脏腑。肾气的盛衰与衰老密切相关。现代医学同样认为肾脏是衰老的代表性器官^[1-2],肾脏衰老与肾功能减退密切相关。肾脏的衰老可表现为肾小球滤过率下降、肾血流量下降、肾单位减少、肾小球硬化、肾小管萎缩以及肾间质纤维化等病理性改变。研究表明,D-半乳糖通过诱导肾组织氧化应激加速肾脏衰老^[3]。本研究结果显示,连续注射D-半乳糖使正常

大鼠肾脏系数升高;肾中尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)含量显著升高;肾组织发生病理变化。肾脏病理结果显示,相较空白组,模型组肾脏组织多见肾小囊狭窄,肾小管小灶性萎缩、体积减小、管腔狭窄或消失、纤维细胞增生以及淋巴细胞浸润。而三七复方组大鼠肾脏系数升高;血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)含量显著降低;病理结果显示肾小管扩张、管腔扩张、形状不规则以及上皮细胞扁平化,由此说明三七复方能够改善D-半乳糖致衰老大鼠肾功能,减轻肾脏病理损伤。

三七复方组成部分为三七提取物、谷胱甘肽以及维生素C。其中三七提取物能显著降低细胞内ROS和MDA含量,促进CAT酶活性^[4]。谷胱甘肽作为体内一种重要的抗氧化剂,能够清除掉人体内的自由基并且保护细胞不被有害物质氧化。维生素C能够调控蛋白ALKBHs来去除组蛋白H2A上的甲基化修饰以及与核心多能因子相互作用,共同调控胚胎干细胞特异性miRNA的表达,发挥了延缓细胞的衰老和凋亡以及对促进部分组织修复的作用^[5]。三药配伍使用,协同增效,充分发挥出三七复方“补衰抗老”的功效。

本研究中三七复方共设置3个剂量组,8-OHdG、T-SOD、GSH-Px、CAT、T-AOC、GSH/GSSG及肾功能指标(BUN、Cr、UA)均在低剂量组效果最优;MDA中、高剂量组有显著性差异,低剂量虽没有显著性差异,但有降低的趋势。此结果为三七复方的临床开发提供了关键的剂量学依据,提示在以增强整体功能、延缓衰老进程为目标的预防性干预中,低剂量可能是更具优势、更经济且更安全的策略。也由此可以说明三七复方是通过多组分、多途径、多靶点来实现抗衰老作用的。此外,尽管各组间的肾脏系数差异未达到统计学显著性($P>0.05$),但仍有一定趋势,相较空白组,模型组肾脏系数有所降低;相较模型组,三七复方组肾脏系数有所升高,向空白组趋近。虽然这一趋势未达统计显著性,但其变化方向与肾功能指标的显著改善结果相一致,在一定程度上支持了三七复方对肾脏的保护效应。

衰老的自由基理论认为,导致细胞和组织老化的重要原因是机体氧化和抗氧化系统失衡,抗氧化系统不能及时清除多余的活性氧而导致活性氧的积累。恢复抗氧化系统的正常功能可以让机体及时清除多余活性氧,减缓衰老进程。T-SOD、GSH-Px和CAT是酶促抗氧化系统的重要组成部分^[6-8],其主要作用是清除机体产生的过多的自由基和活性氧,防止脂质过氧化物产生^[9]。T-AOC可以从整体上反映机体的抗氧化能力^[10]。GSH为非酶促抗氧化系统的重要组成成分之一。游离的谷胱甘肽主要以还原形式(GSH)存在,在氧化应激期间可以转化为氧化形式(GSSG),在谷胱甘肽还原酶的作用下可以恢复为还原形式。氧化还原状态取决于谷胱甘肽还原形式和氧化形式的相对量(GSH/GSSG)^[11]。GSH/GSSG的比值越大,表明机体抗氧化能力越强。MDA是脂质过氧化的副产物。它的含量可以反映体内氧自由基的构成以及氧自由基造成组织损伤的严重程度^[12-13],可用于评价脂质过氧化^[14]。8-OHdG是目前学术界公认的DNA氧化损伤及氧化应激的高效指标^[15]。本研究结果显示,相较模型组,三七复方组肾组织中酶促抗氧化

成分T-SOD、GSH-Px、CAT含量、GSH/GSSG比值、总抗氧化能力T-AOC显著提高;脂质过氧化物MDA含量、氧化应激损伤标志物8-OHdG显著降低。表明三七复方能够降低衰老大鼠肾组织中脂质过氧化水平,提高其抗氧化能力。而氧化损伤是肾损伤的重要机制之一。膜脂质过氧化以及DNA和蛋白质的氧化损伤不仅会导致肾功能障碍,还会对肾实质等肾脏组织产生负面影响。抑制肾脏氧化损伤可以改善肾功能,减轻肾损伤^[16-19]。三七复方可以通过发挥肾脏抗氧化作用,从而改善衰老大鼠的肾损伤。

氧化应激是Wnt/β-catenin信号通路调控的重要生物学环节,大量研究表明它通过调控氧化应激加速了衰老的发生。Wnt4蛋白是非经典Wnt信号通路的启动子,但也可以通过经典Wnt信号通路发挥作用^[20-22]。GSK3β是Wnt/β-catenin通路的关键通路分子之一^[23-24],是β-catenin降解复合体的一部分,可负向调控Wnt信号通路。β-catenin是经典Wnt信号通路在细胞核中的关键核效应因子^[25-26],在Wnt/β-catenin通路中由腺瘤性结肠息肉病(APC)、AXIN、CK1和GSK-3β组成的破坏复合物调节和破坏。c-Myc是Wnt/β-catenin通路下游靶基因,在Wnt/β-catenin通路中,β-catenin入核后,促进TCF及LEF1结合,激活c-Myc基因的表达。Wnt/β-catenin通路对氧化应激过程的调控可能是通过通路靶基因c-Myc刺激细胞产生ROS实现的。本研究结果显示,与空白组大鼠比较,模型组肾组织中c-Myc蛋白表达量上升;与模型组大鼠比较,三七复方组肾组织中c-Myc蛋白表达量降低。本实验采用腹腔注射D-半乳糖的造模方法,激活了Wnt/β-catenin通路,使得大鼠体内Wnt4蛋白表达升高。Wnt又与细胞膜上的受体复合体FZD和LRP5/6结合,介导了降解复合体的重要组分之一GSK3β蛋白的磷酸化,致使降解复合体被破坏,使得β-catenin的降解受到抑制。未被降解的β-catenin在胞质的浓度上升并向细胞核中转运。β-catenin入核后,促进了TCF和LEF1的结合,激活了c-Myc基因的表达,使得细胞ROS水平增加,提升了机体氧化应激水平。而三七复方能够抑制Wnt/β-catenin通路、下调大鼠体内Wnt4蛋白表达、抑制Wnt与细胞膜上的受体复合体FZD和IRP5/6结合、减少GSK3β蛋白的磷酸化以及保护降解复合体完整性,进而促进β-catenin的降解,抑制其向细胞核中转运,从而进一步抑制TCF和LEF1结合来降低c-Myc基因的表达以及细胞ROS水平,发挥出增强肾脏抗氧化能力以及维持氧化与抗氧化系统稳态的作用。

总之,三七复方能够通过抑制D-半乳糖致衰老模型大鼠的氧化应激反应及Wnt/β-catenin通路来起到延缓衰老的作用。本方将经典抗衰老中药三七与两种公认具有抗氧化、抗衰老作用的食品添加剂谷胱甘肽和维生素C共同组方,能够发挥出事半功倍的作用。后续还需继续探究其发生机制,并进一步开展人体试验,为三七复方的安全、有效使用提供依据。

参考文献

- [1] FANG E F, XIE C L, SCHENKEL J A, et al. A research agenda for ageing in China in the 21st century (2nd edition): Focusing on basic and translational research,

- long-term care, policy and social networks [J]. Ageing Res Rev, 2020, 64: 101174.
- [2] DYBIEC J, SZLAGOR M, MŁYNARSKA E, et al. Structural and functional changes in aging kidneys[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15435.
- [3] FENG Y, YU Y H, WANG S T, et al. Chlorogenic acid protects D-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice[J]. Pharm Biol, 2016, 54(6): 1027–1034.
- [4] 石秀芹, 吴迪, 李国庆, 等. 三七提取物在抗衰老护肤品中的应用探究[J]. 中国美容医学, 2024, 33(11): 17–21.
- [5] 翟卫民. 维生素C研究进展及其在宠物临床中的应用[J]. 现代畜牧兽医, 2022, (3): 64–67.
- [6] CHEN Z, TIAN R F, SHE Z G, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 116–141.
- [7] WIDYANINGSIH W, PRAMONO S, ZULAYLA, et al. Protection by ethanolic extract from *Ulva lactuca* L. against acute myocardial infarction: Antioxidant and anti-apoptotic activities[J]. Malays J Med Sci, 2017, 24(6): 39–49.
- [8] YU W, LIU Q, ZHU S J. Carvacrol protects against acute myocardial infarction of rats via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(4): 579–584.
- [9] ZHANG W D, FU T, ZHANG Z, et al. GSH intervened spermatogenesis by oxygen free radicals-mitochondrial signaling pathway[J]. Life Science Journal, 2014, 11(4): DOI: 10.7537/marslsj110414.54.
- [10] DE OLIVEIRA U O, DA ROSA ARAÚJO A S, BELLÓ-KLEIN A, et al. Effects of environmental *Anoxia* and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2005, 140(1): 51–57.
- [11] CHAIY C, ASHRAFS S, ROKUTAN K, et al. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: Evidence against a role for glutathione disulfide[J]. Arch Biochem Biophys, 1994, 310(1): 273–281.
- [12] BOARESCU P M, BOARESCU I, BOCSAN I C, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin nanoparticles on drug-induced acute myocardial infarction in diabetic rats[J]. Antioxidants, 2019, 8(10): 504.
- [13] LIN X Y, BAI D P, WEI Z X, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW_{264.7} cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway[J]. PLo S One, 2019, 14(5): e0216711.
- [14] 王一霖, 翟熙, 李梦茹, 等. 基于氧化应激Wnt/β-catenin通路与白癜风关系研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2023, 45(5): 315–318.
- [15] VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOТАKIS C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2009, 27(2): 120–139.
- [16] 王璐, 何恒, 蔡晓敏, 等. 氧化应激在环境酚类暴露与估计肾小球滤过率关联中的中介效应[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2023, 52(4): 431–438.
- [17] 张红. 酮酸类似物通过调控肠道菌群及改变物质代谢延缓CKD进展的研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2023.
- [18] 龙吉美, 黄德彬, 李魁武, 等. 钩藤碱对阿霉素诱导的大鼠肾损伤的作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(10): 1887–1891.
- [19] DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function[J]. Physiol Rev, 2002, 82(1): 47–95.
- [20] LI L, SUN R F, MIAO Y, et al. PD-1/PD-L1 expression and interaction by automated quantitative immunofluorescent analysis show adverse prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma having T-cell infiltration: A study from the International DLBCL Consortium Program[J]. Mod Pathol, 2019, 32(6): 741–754.
- [21] DOGAN S, VASUDEVARAJA V, XU B, et al. DNA methylation-based classification of sinonasal undifferentiated carcinoma[J]. Mod Pathol, 2019, 32(10): 1447–1459.
- [22] 罗显锋, 何平, 赵彩霞. 荆花消紫合剂对大鼠紫癜性肾炎的保护作用及Wnt/β-catenin通路相关信号分子的影响[J]. 中医药导报, 2024, 30(12): 33–37.
- [23] MANCINELLI R, CARPINO G, PETRUNGARO S, et al. Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 4629495.
- [24] ROBERTSON H, HAYES J D, SUTHERLAND C. A partnership with the proteasome: the destructive nature of GSK3[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 147: 77–92.
- [25] PEIFER M, RAUSKOLB C, WILLIAMS M, et al. The segment polarity gene *Armadillo* interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation[J]. Development, 1991, 111(4): 1029–1043.
- [26] NOORDERMEER J, KLINGENSMITH J, PERRIMON N, et al. Dishevelled and *Armadillo* act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*[J]. Nature, 1994, 367(6458): 80–83.

(收稿日期: 2025-07-09 编辑: 时格格)