

火麻仁油对衰老模型小鼠皮肤相关指标的影响

李寒冰, 马永洁, 苗静静, 张娟, 任汉阳, 李根林*

(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**观察火麻仁油对衰老模型小鼠皮肤相关指标的影响。**方法:**采用 *D*-半乳糖颈部皮下注射(sc)复制小鼠亚急性衰老模型,造模 1 h 后各给药组灌胃(ig)给与不同剂量试验药物,共 42 d,同时分别观察火麻仁油高、中、低剂量(12.0, 6.0, 3.0 mL·kg⁻¹)对衰老模型小鼠皮肤匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、脂褐质(Lpf)、羟脯氨酸(Hyp)、皮肤水分含量的影响;对比各组实验动物相同部位皮肤的组织病理学形态,表皮及真皮厚度,真皮胶原纤维排列松密情况、弹力纤维面积及形态的差别变化。**结果:**火麻仁油高剂量组 MDA, Lpf 平均含量分别为 7.13 nmol·mg⁻¹ 和 0.83 μg·g⁻¹, 中剂量组 MDA 平均含量为 7.29 nmol·mg⁻¹, 与模型组相比均有显著下降($P < 0.05$);高、中剂量组 SOD 活性平均值分别为 21.95 U·mg⁻¹ 和 21.45 U·mg⁻¹;而 Hyp 含量平均值分别为 8.31 μg·mg⁻¹ 和 7.92 μg·mg⁻¹, 它们与模型组相比均有显著提高($P < 0.01$, $P < 0.05$);高、中剂量组也显著升高皮肤水分的水平($P < 0.01 \sim P < 0.05$),低剂量对上述指标的影响无统计学意义。火麻仁油能改善和促进衰老模型小鼠毛发的生长,病理观察真皮厚度和毛囊数均有增加;胶原纤维、弹力纤维的数量和形态均有明显的改善。**结论:**火麻仁油能够对模型小鼠发挥抗皮肤衰老和抗氧化作用。

[关键词] 火麻仁油; 抗皮肤衰老; 抗氧化; 形态学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0201-05

The Influence of the Hemp Seed Oil on the Related Parameters of the Skin in Aging Mice

LI Han-bing, MA Yong-jie, MIAO Jing-jing, ZHANG Juan, REN Han-yang, LI Gen-lin*

(Pharmacy College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of the hemp seed oil on the related parameters of skin in the aging mice, and study the anti-aging function of the fructus cannabis. **Method:** *D*-galactose was given by hypodermic injection to copy the subacute aging model of the mice. 1 h later, corresponding drugs were given to their groups for 42 days. The influence of hemp seed oil of high, medium, and low doses (12.0, 6.0, 3.0 mL·kg⁻¹) on superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), lipofuscin (Lpf), hydroxyproline (Hyp) and skin moisture content were observed, respectively. Histopathological observation of mice skin including the epidermal and dermal thickness of the mice skin at the same part of the body was observed. The difference between dermal collagen fibers arrays of different experimental groups was compared, and the area and morphological changes of the elastic fibers were examined. **Result:** The average contents of MDA and Lpf in skin homogenates of large dose group were 7.13 nmol·mg⁻¹ and 0.83 μg·g⁻¹, the average contents of MDA in skin homogenates of medium dose group were 7.29 nmol·mg⁻¹, all of these indexes were decreased significantly compared with which of model group ($P < 0.05$). The average activities of SOD in skin homogenates of large & medium dose groups were 21.95 U·mg⁻¹ and 21.45 U·mg⁻¹, the Hyp contents of them were 8.31 μg·mg⁻¹ and 7.92 μg·mg⁻¹,

[收稿日期] 20111113(003)

[基金项目] 河南省科技攻关重点项目(102102310320);河南省自然科学基金项目(2003-11044900);河南中医学院博士科研基金(BSJJ2009-09)

[第一作者] 李寒冰, 博士, 讲师, 从事中药品质评价研究, Tel: 0371-65962746, E-mail: lhb8899@163.com

[通讯作者] *李根林, E-mail: lgln@126.com

all of these indexes were increased significantly compared with which of model group ($P < 0.01 \sim P < 0.05$). The large and medium doses could greatly increase moisture content in the mice skin ($P < 0.01 \sim P < 0.05$). The small dose showed some influence on the above indexes, but the effect was not significant. The hemp seed oil could improve the fur growing condition of the model mice. The dermal thickness and the number of hair follicles of the model mice were considerably increased. The texture of dermal collagen fibers and elastic fibers were obviously improved. **Conclusion:** The hemp seed oil can exert its function of anti-skin-aging and antioxidation.

[**Key words**] hemp seed oil; anti-skin-aging; anti-oxidation; morphology

火麻仁为桑科植物大麻的干燥成熟种子。具有润肠通便,滋养补虚的功效,常用治疗老年虚性便秘和习惯性便秘。《神农本草经》云其“味甘、平。主补中益气,肥健不老”。现代药理研究表明,火麻仁可以从多个方面发挥抗衰老的作用^[1-2]。皮肤的衰老是整体衰老的直观反映、是估价机体年龄的第一个指标,中医学和现代医学均有论述论及皮肤老化和毛发变白与衰老关系最密切,因此研究药物对皮肤老化指标的影响也是评价该药物抗衰老作用的重要指标之一^[3-5]。火麻仁的传统应用的记载,如《太平圣惠方》中就有“神仙服大麻子益驻颜色变鬓发延年不老方”的记载;《日华子》曰火麻仁:“补虚劳……长肌肉,益毛发,去皮肤顽痹……”。为进一步深入和更全面的研究和阐明火麻仁的抗衰老作用和机制,本文采用现代药理学方法研究了火麻仁油对皮肤老化的影响,以探讨火麻仁的整体抗衰老效应,为开发、利用火麻仁,研制防治老年病和抗衰老相关产品奠定基础。

1 材料

1.1 药物 火麻仁药材,经河南中医学院中药资源鉴定教研室陈随清教授鉴定为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟种子;七宝美髯丸由佛山德众药业有限公司生产(国药准字 Z44022830,批号 04007)。火麻仁油由上述火麻仁生品去皮后冷榨制得(出油率为 21.65%,比重为 $0.907 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.2 试剂 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,批号 20050525;脂褐质 Lpf 试剂盒,批号 20050523,丙二醛(MDA)试剂盒,批号 20050523;羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(碱水解法),批号 20050528;考马斯亮蓝试剂盒,批号 20050523。上述试剂均购自南京建成生物工程研究所。天狼星红,批号 20040823,上海华硕精细化学品有限公司(Chroma 进口分装);D-半乳糖,批号 20030926,上海恒信化学试剂有限公司生产;三聚乙醛、冰乙酸、甲醛溶液、乙醇等均为市售分析纯。

1.3 仪器 JY6001 型电子秤(上海精科公司天平仪器厂),FA200KA 型分析天平(上海精密电子仪器有限公司),LD4-2 型离心机(北京医用离心机厂),D2kw-C 型恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器厂),UV-2201 分光光度计,日本岛津公司;RT-MR2100 匀浆机,Switzerland KINEMATICA AG 公司。

1.4 动物 昆明种小鼠,体重 18 ~ 22 g,雌雄各半,购自河南省医学实验动物中心(编号 2003LA - 014. 合格证号 410115)。

2 方法^[6-7]

2.1 动物分组及给药 小鼠根据性别和体重,随机分成 6 组,每组 10 只,雌雄分笼饲养,分别是:空白对照组(生理盐水组)、模型对照组(D-半乳糖组)、火麻仁油高、中、低剂量组($12.0, 6.0, 3.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、七宝美髯丸(阳性对照)组($4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。空白对照组每天颈背部 sc 生理盐水(用量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),1 h 后 ig 给予空白对照剂(取 1 mL 吐温-80 和 0.5 g CMC-Na,加生理盐水至 100 mL 用量为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。其他 5 组每只小鼠按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ sc 1% D-半乳糖水溶液,1 h 后各给药组小鼠按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给与不同剂量试验药物,连续 42 d。实验过程中,每 5 d 各鼠称重记录 1 次,每日观察小鼠的皮毛色泽、饮食、饮水、大小便、精神活动情况等。末次给药 2 h 后处死小鼠,取标本,进行各项指标的测定。

2.2 皮肤样本的处理 将小鼠处死立即剥皮肤,留取 1 g 待测含水量用;其余迅速用 5% 硫化钠溶液脱毛后即用清水冲洗干净。取背部皮肤 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 大小,迅速放入 10% 中性甲醛液中固定,拟作组织切片进行组织形态学观察;余皮肤取下后迅速冰冻保存,拟作皮肤组织匀浆及测定皮肤羟脯氨酸之用。各指标所选取材部位相同。

2.3 指标测定

2.3.1 10% 皮肤匀浆的制备 取脱毛皮肤组织 0.5 g,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,量筒量取该组织块 9 倍质量预冷生理盐水,用匀浆机制成 10% 组织匀浆

(在低温环境中使组织细胞完全破碎,显微镜下观察内容物全部游离在液相中)。

2.3.2 各项指标的测定 测皮肤匀浆中 Lpf, SOD, MDA, Hyp 含量或活力,均根据测试盒所附方法、步骤测定。

2.3.3 皮肤中水分含量的测定 采用烘干法按 2.3 的方法取 1 g 左右皮肤,精密称取湿重后置烘箱中,于 80 ℃ 烘干 12 h,称其干重,计算皮肤含水量。

2.3.4 皮肤组织病理学形态观察 取小鼠脱毛皮肤,固定于 10% 的甲醛溶液中,脱水、石蜡包埋、切片。HE 染色法染色,于光镜下观察表皮及真皮厚度、毛孔及毛囊的状态变化。

2.3.5 统计学处理 数据分析采用 SPSS 13.0 软

件包,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对衰老模型小鼠皮肤组织匀浆中 SOD, MDA, Lpf 的影响 与空白对照组相比,模型组小鼠皮肤匀浆中 SOD 活力均显著下降 ($P < 0.01$), MDA, Lpf 均显著升高 ($P < 0.01$),说明造模成功。火麻仁油高、中剂量组、七宝美髯丸组小鼠皮肤匀浆中 SOD 活力增高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。火麻仁油高剂量组、七宝美髯丸组的 MDA, Lpf 以及中剂量组的 MDA 含量均显著降低 ($P < 0.01$, 或 $P < 0.05$); 火麻仁油低剂量对以上指标影响不明显。见表 1。

表 1 火麻仁油对衰老模型小鼠皮肤中 SOD, MDA, Lpf 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	Lpf /μg·g ⁻¹
空白对照	-	25.69 ± 2.69	6.15 ± 1.56	0.79 ± 0.10
模型对照	-	16.70 ± 3.60 ¹⁾	9.96 ± 1.70 ¹⁾	1.06 ± 0.14 ¹⁾
火麻仁油	12	21.95 ± 3.83 ³⁾	7.13 ± 1.81 ²⁾	0.83 ± 0.20 ²⁾
	6	21.45 ± 3.75 ²⁾	7.29 ± 1.59 ²⁾	0.84 ± 0.19
	3	18.13 ± 5.40	8.63 ± 2.57	0.88 ± 0.17
七宝美髯丸 ⁴⁾	4	22.93 ± 2.64 ³⁾	6.74 ± 1.76 ³⁾	0.83 ± 0.17 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ 剂量单位为 g·kg⁻¹·d⁻¹ (表 2 同)。

3.2 对衰老模型小鼠皮肤匀浆中 Hyp 和皮肤含水量的影响 与空白对照组相比,模型组小鼠皮肤匀浆中 Hyp、皮肤含水量均显著减少 ($P < 0.01$)。与模型组小鼠相比,火麻仁油高、中剂量组、七宝美髯丸组小鼠皮肤匀浆中 Hyp、皮肤含水量均显著提高 ($P < 0.01$, 或 $P < 0.05$); 火麻仁油低剂量对皮肤含水量及 Hyp 含量的影响不明显。见表 2。

表 2 火麻仁油对模型小鼠皮肤中 Hyp 和皮肤含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mL·kg·d ⁻¹	Hyp/μg·mg ⁻¹ 组织湿重	含水量 /%
空白对照	-	9.44 ± 1.42	61.37 ± 3.32
模型对照	-	5.37 ± 1.66 ¹⁾	52.22 ± 2.24 ¹⁾
火麻仁油	12	8.31 ± 1.78 ³⁾	57.80 ± 3.73 ³⁾
	6	7.92 ± 1.92 ²⁾	56.95 ± 3.45 ²⁾
	3	7.12 ± 1.80	55.83 ± 3.86
七宝美髯丸 ⁴⁾	4	8.20 ± 1.67 ³⁾	56.96 ± 3.65 ²⁾

3.3 皮肤组织病理学形态观察 空白对照组:各鼠取背部相同部位皮肤经 HE 染色,光镜下可见小鼠皮肤形态正常,表皮的基底层、棘细胞层、颗粒层及角质层界限清楚,真皮位于表皮下面,此层内有血

管、汗腺、毛囊和皮脂腺等;经特殊染色后观察可见小鼠皮肤真皮胶原纤维束细长,染呈红色,胞体丰富,排列成束状,紧密,呈波纹状,弹力纤维略细长,数量丰富,呈波纹或呈钩状,染呈紫黑色,排列均匀、紧密,缠绕于胶原纤维束中间,于毛囊周围呈环形排列。见图 1。

亚急性衰老模型组:经 HE 染色,光镜下可见皮肤组织生长受到障碍,真皮层明显变薄,毛囊与皮脂腺数量锐减;经特殊染色后观察可见胶原纤维层减少,排列疏松,部分弹力纤维明显断裂,排列紊乱,少部分弹力纤维分布于环绕毛囊周围,呈环形排列,其总数量明显稀少。见图 1。

火麻仁油高剂量组:可见小鼠皮肤生长良好,毛囊数较亚急性衰老模型组明显增加;胶原纤维束一般,呈波纹状排列还紧密,弹力纤维着色深染。散在于真皮区域内和环绕毛囊周围的弹力纤维总数量较正常小鼠减少。见图 1。

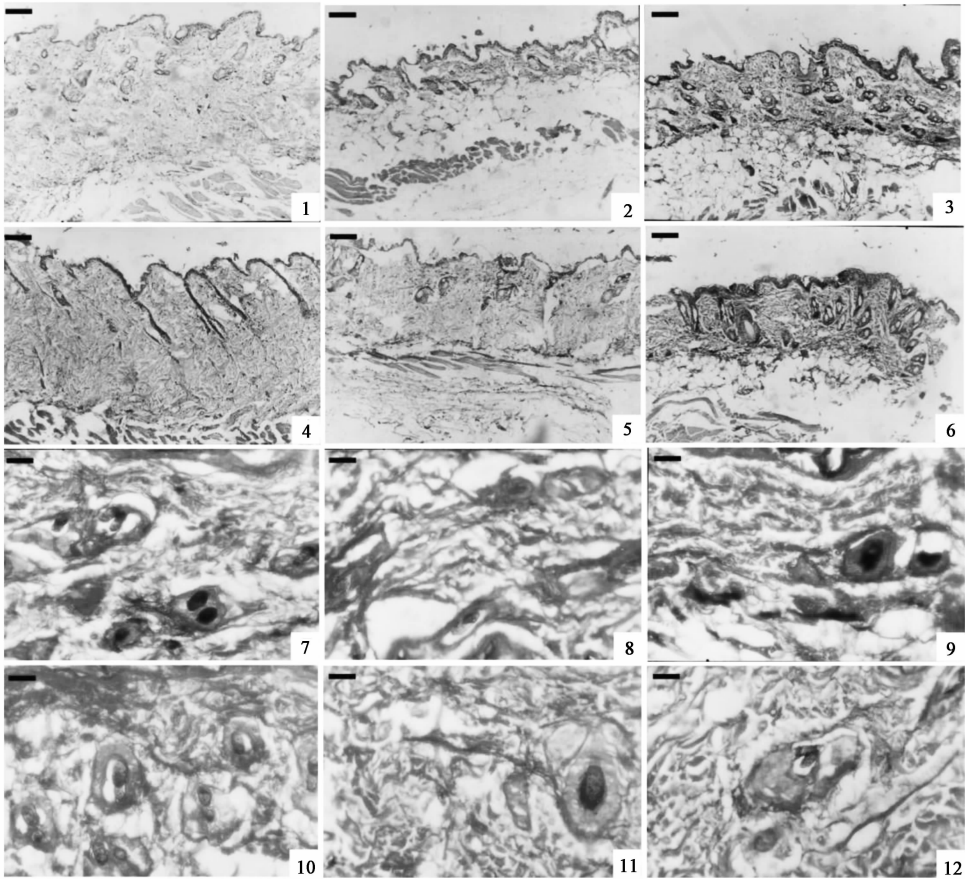
火麻仁油中剂量组:试验小鼠皮肤真皮厚度略有增加,毛囊数增加不明显;胶原纤维和弹力纤维情况与火麻仁油高剂量组相似。见图 1。

火麻仁油低剂量组:真皮厚度、毛囊数未见明显

增加;胶原纤维和弹力纤维情况与火麻仁油高剂量组相似。见图 1。

七宝美髯丸组:真皮厚度和毛囊数较亚急性衰

老模型组均有增加;胶原纤维束中度粗细,呈波纹状排列,不甚紧密,弹力纤维着色浅染,总数量较空白对照组呈减少趋势。见图 1。



1~6:皮肤形态学变化与观察(HE染色,bar=100 μm);
7~12:皮肤胶原纤维、弹力纤维变化与观察(特殊染色,bar=50 μm);
1,7. 空白对照组;2,8. 衰老模型组;3,9. 火麻仁油 12.0 mL·kg⁻¹剂量组;
4,10. 火麻仁油 6.0 mL·kg⁻¹剂量组;5,11. 火麻仁油 3.0 mL·kg⁻¹剂量组;6,12. 七宝美髯丸组

图 1 火麻仁油对小鼠皮肤组织影响的病理切片

4 讨论

火麻仁是同时具有补益与润下作用的传统中药,本课题组前期采用鹌鹑、小鼠、家蚕等多种动物模型研究了火麻仁的抗衰老作用^[8-10],表明火麻仁对实验动物的循环系统、免疫系统、消化系统的功能或作用有显著促进或改善作用,也表现出显著延长家蚕寿命的作用^[11]。研究结果提示火麻仁具有延缓衰老作用,并可能与其良好的抗氧化和清除自由基活性有关^[2,9-10]。

根据中医“藏居于内,形见于外”的论点,说明皮肤衰老与内脏的衰老以及整体衰老具有密切的相关性,皮肤的衰老指标可以作为说明机体整体衰老特征之一^[12],皮肤的状态往往作为估价机体年龄的第一个指标^[13]。现代研究表明超氧化物歧化酶

(SOD)、丙二醛(MDA)和脂褐素(Lpf)等是直接关切生物体内“氧化”损害与“抗氧化”的相关指标^[14-15],而它们有可能是引起或延缓诸如皮肤衰老、皮肤褐斑的关键因素^[16-18]。皮肤中羟脯氨酸(Hyp)和水分的含量常常是评价皮肤状态的重要指标,其中Hyp大量存在于皮肤的胶原蛋白和弹性蛋白中,胶原蛋白和弹性蛋白都具有一定的防老化和促再生作用,共同维持着皮肤的光滑性、柔顺性和弹性,因此常用皮肤中Hyp含量来作为皮肤衰老的指标^[19]。火麻仁油中不饱和脂肪酸的含量高达90%以上,具有良好的清除自由基和抗氧化作用^[1],同时这些必需脂肪酸极易渗入皮肤表层甚至深层,增强表皮细胞的水合和保湿作用,减少经皮水分损失^[20];其润下通便作用则能及时排出肠道内的诸多

毒素,同样有助于清除体内自由基,而通过排除肠道毒素也有助于防治一些皮肤疾患^[21]。本文观察了火麻仁对亚急性衰老模型小鼠皮肤相关指标的影响,结果表明它能够提高皮肤内 SOD 活性、清除过氧化物、改善蛋白质代谢、提高皮肤含水量以及改善皮肤的形态功能等,有很好的抗衰老作用,本研究丰富了火麻仁油抗衰老的理论内涵,并为它的实际应用提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] Callaway JC. Hempseed as a nutritional resource: an overview[J]. *Euphytica*, 2004, 140 (122): 65.
- [2] 韩娜,赵建邦,宋平顺. 气相色谱法测定火麻仁中亚油酸及 α -亚麻酸的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(3): 83.
- [3] Kobayashi K, Maehata Y, Kawamura Y, et al. Direct assessments of the antioxidant effects of the novel collagen peptide on reactive oxygen species using electron spin resonance spectroscopy[J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 116(1): 97.
- [4] Blatt T, Littarru G P. Biochemical rationale and experimental data on the antiaging properties of CoQ10 at skin level[J]. *Biofactors*, 2011, 37(5): 381.
- [5] 周密思,赵映前,梅国强,等. 小柴胡汤延缓皮肤衰老功效的理论探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(10): 277.
- [6] 周光春,李琦仙,冯丽莉,等. 益寿饮延缓衰老作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9): 123.
- [7] 袁电杰,张印发,姚春香. 灵芝多糖对实验性衰老大鼠海马内 NR2B 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9): 147.
- [8] 任汉阳,孙红光,张瑜,等. 火麻仁油对鹌鹑的降脂及抗动脉粥样硬化作用[J]. *河南中医*, 1998, 18(5): 294.
- [9] 任汉阳,张瑜,刘红雨,等. 火麻仁油对便秘模型小鼠抗氧化作用的实验研究[J]. *中国医药学报*, 2004, 19(2): 123.
- [10] 曹俊岭,陈刚正,任汉阳,等. 火麻仁油对 D-半乳糖致亚急性衰老模型小鼠脑组织 NO、SOD、GSH-Px、MDA 的影响[J]. *四川中医*, 2004, 22(5): 17.
- [11] 任汉阳,李寒冰,张瑜,等. 火麻仁油对家蚕寿命影响的实验研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2007, 2(2): 79.
- [12] 田金洲,李曰庆. *中医老年病学*. 上海:上海科学技术出版社, 2002: 21.
- [13] 刘承煌. *皮肤病理生理学*[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000: 375.
- [14] 王岚,梁日欣,杨滨,等. 黄芩及红花水提物对快速老化模型小鼠的抗衰老作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13): 159.
- [15] 陈玉兴,黄雪君,曾晓会,等. 益智汤对正常大鼠及 D-半乳糖致衰老小鼠抗氧化能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(7): 62.
- [16] Peng X B, Li Q, Ou L N, et al. GC-MS, FT-IR analysis of black fungus polysaccharides and its inhibition against skin aging in mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47(2): 304.
- [17] 李华,叶杰,李伯勤,等. 虫草多糖对皮肤成纤维细胞抗氧化能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 12(4): 160.
- [18] Tian Y, Zou B, Yang L, et al. High molecular weight persimmon tannin ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by d-galactose [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(8): 1728.
- [19] Peterszegi G, Andres E, Molinari J. Effect of cellular aging on collagen biosynthesis: I. Methodological considerations and pharmacological applications [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2008, 47(3): 356.
- [20] BRENNER J. Applications of essential fatty acids in skin care, cosmetics and cosmeceuticals [J]. *Cosmetics & Technology Magazine*, 2005, 3: 75.
- [21] 钱方,纪云西,蒋历,等. 皮肤病从肺与大肠论治[J]. *世界中医药*, 2010, 5(2): 132.

[责任编辑 聂淑琴]