

- 3070-3077.
- [6] WANG Y, SUN J, LIU C, et al. Protective effects of crocetin pretreatment on myocardial injury in an ischemia/reperfusion rat model[J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 741: 290-296.
- [7] SHAHZAD T, KASSECKERT S A, IRAQI W, et al. Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury[J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2013, 58(1): 209-216.
- [8] MOUSAVI SH, TAYARANI NZ, PARSAAEE H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species-mediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells[J]. Cellular & Molecular Neurobiology, 2010, 30(2): 185-191.
- [9] VAKILI A, EINALI MR, BANDEGI AR. Protective effect of crocin against cerebral ischemia in a dose-dependent manner in a rat model of ischemic stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(1): 106-113.
- [10] SUSSMAN MA, VÖLKERS M, FISCHER K, et al. Myocardial AKT: the omnipresent nexus[J]. Physiological Reviews, 2011, 91(3): 1023-1070.
- [11] STILES BL. PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61(14): 1276-1282.
- [12] LANG LL, WANG L, LIU L. Exogenous MD-2 confers lipopolysaccharide responsiveness to human corneal epithelial cells with intracellular expression of TLR4 and CD14[J]. Inflammation, 2011, 34(5): 371-378.
- [13] SCHUBERT C, RAPARELLI V, WESTPHAL C, et al. Reduction of apoptosis and preservation of mitochondrial integrity under ischemia/reperfusion injury is mediated by estrogen receptor β [J]. Biology of Sex Differences, 2016, 7(1): 53.
- [14] DONG Y, VVR U, PRZYKLENK K. Inhibition of mitochondrial fission as a molecular target for cardioprotection: critical importance of the timing of treatment[J]. Basic Research in Cardiology, 2016, 111(5): 59.
- [15] XIN M, DENG X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of bax through phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(11): 10781-10789.

(收稿日期: 2018-12-12, 修回日期: 2019-02-17)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.006

◇ 药学研究 ◇

外用鹿茸膏剂抗小鼠皮肤衰老的实验研究

郁兵¹, 何凤琴¹, 杨章民²作者单位:¹西安文理学院生物与环境工程学院, 陕西 西安 710065;²陕西师范大学生命科学院, 陕西 西安 710061

基金项目: 西安市科技计划项目(2019KJWL17)

摘要: **目的** 检验外用鹿茸膏剂抗皮肤衰老的效果。 **方法** 连续30 d给小鼠皮下注射D-半乳糖, 建立皮肤衰老模型; 三个实验组每天涂抹浓度分别为5%、10%、15%的鹿茸膏剂, 空白组涂抹凡士林, 连续涂抹21 d后, 观察各组小鼠的皮肤外观特征, 并测定各组皮肤含水率、羟脯氨酸(HYP)含量、透明质酸(HA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力。 **结果** 三个鹿茸膏剂实验组小鼠皮肤的松弛、皱褶状况都有所改善, 以15%组效果最佳。皮肤含水率模型组为(57.72±0.89)%, 5%鹿茸膏剂实验组为(66.22±1.21)%, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 10%、15%鹿茸膏剂实验组皮肤含水率为(68.82±0.64)%、(70.70±1.05)%, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。HYP含量模型组为(3.604±0.20) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 10%鹿茸膏剂实验组为(3.956±0.12) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 15%鹿茸膏剂实验组为(4.080±0.12) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。HA含量模型组为(6.163±0.54) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10%鹿茸膏剂实验组为(8.514±0.63) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 15%鹿茸膏剂实验组为(9.024±0.24) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。SOD活力模型组为(304.84±12.026) U/mg, 5%鹿茸膏剂实验组为(338.36±7.848) U/mg, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 10%、15%鹿茸膏剂实验组为(353.12±5.964) U/mg、(357.20±10.634) U/mg, 和模型组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。 **结论** 外用10%和15%鹿茸膏剂有抗皮肤衰老作用。

关键词: 鹿茸; 膏剂; 外用; 皮肤衰老; 小鼠; 透明质酸; 超氧化物歧化酶

An experimental study on the anti-skin aging effect of *Pilose antler ointment*

YU Bing¹, HE Fengqin¹, YANG Zhangmin²

Author Affiliations: ¹College of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an, Shaanxi 710065, China; ²Academy of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: Objective This paper is to test the anti-aging effect of *Pilose antler* ointment for external use. **Methods** The mice were subcutaneously injected with D-galactose for 30 days to establish the skin aging model. The three experimental groups were smeared daily with deer antler ointment of 5%, 10% and 15% concentration respectively, and the blank group was smeared continuously with Vaseline for 21 days. Then the skin apparent features of each group were observed, and the skin moisture content, hydroxyproline (HYP), hyaluronic acid (HA) content and the activity of superoxide dismutase (SOD) were measured. **Results** The flabby and wrinkled skin of the mice in the three *Pilose antler* ointment groups were improved, with the best effect in the 15% group. The skin moisture content of model group was $(57.72 \pm 0.89)\%$, and that of 5% *Pilose antler* ointment group was $(66.22 \pm 1.21)\%$, $P < 0.05$; the skin moisture content of 10% and 15% *Pilose antler* ointment group was $(68.82 \pm 0.64)\%$ and $(70.70 \pm 1.05)\%$, $P < 0.01$. The content of HYP in model group was $(3.604 \pm 0.20) \mu\text{g}/\text{mg}$, in 10% *Pilose antler* ointment group was $(3.956 \pm 0.12) \mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.05$, and in 15% *Pilose antler* ointment group was $(4.080 \pm 0.12) \mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.01$. The content of HA in model group was $(6.163 \pm 0.54) \mu\text{g}/\text{mL}$, in 10% *Pilose antler* ointment group was $(8.514 \pm 0.63) \mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.05$; and in 15% *Pilose antler* ointment group was $(9.024 \pm 0.24) \mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.01$. The SOD activity of model group was $(304.84 \pm 12.026) \text{U}/\text{mg}$, and that of the 5% *Pilose antler* ointment experimental group was $(338.36 \pm 7.848) \text{U}/\text{mg}$, $P < 0.05$; 10% and 15% *Pilose antler* ointment experimental group was $(353.12 \pm 5.964) \text{U}/\text{mg}$ and $(357.20 \pm 10.634) \text{U}/\text{mg}$, $P < 0.01$. **Conclusion** 10% and 15% *Pilose antler* ointment have anti-aging effect on skin. **Key words:** *Pilose antler*; Unguentum; External use; Skin aging; Mice; Hyaluronic acid; Superoxide dismutase

鹿茸是梅花鹿或马鹿的成年雄鹿处于生长期、未骨化的幼角,是一味被祖国医学数千年实践所验证的名贵中药,其性温、咸,味甘,具有壮肾阳、益精血、强筋健骨、调冲任、托疮毒的作用^[1]。鹿茸在生长阶段生长速度很快,最多每天可以生长1~2 cm,其原因在于内部含有大量复杂的生物活性物质。近年来对中药材抗衰老的研究非常多,如:人参、黄芪、枸杞、黄精等,现代生物学对鹿茸的研究也证明了鹿茸具有抗衰老功效^[2-5],但是对应用鹿茸全组份抗皮肤衰老的研究并不多见。本文作者认为,鹿茸是一种成分非常复杂的中药材,其抗衰老很可能是多种组份互相协同产生的功效,本课题自2018年1月至2019年5月研究外用鹿茸抗皮肤衰老的功效,为进一步将鹿茸开发成抗皮肤衰老化妆品提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雌性昆明种小鼠30只,体重 $(20 \pm 2) \text{g}$,购自西安交通大学医学院实验动物中心,使用许可证号:SCXK(陕)2018-001,合格证号:61001700003029。由于本研究最终目的是为了研制适用于女性的抗皮肤衰老化妆品,所以全部选用雌性小鼠作为实验动物。小鼠的处置符合动物伦理学原则。

1.2 试验药物和主要试剂 成年梅花鹿茸最多可以分枝两次,第一次分枝后叫做二杠茸,该阶段是鹿茸生长旺盛时期,粗灰分含量低,含有较多活性物质。根据鹿茸不同部位组织特征的差异,鹿茸切片由顶端向下依次为蜡片、粉片、血片和骨片,越靠近顶端的茸片,品质越高。试验用鹿茸由本课题组成员到项目合作方铜川鹿苑实业有限公司现场割取,并取其中下部颜色鲜红、血液丰富的切片——

血片为试验药物。血片靠近鹿茸基部,品质中下,能够代表鹿茸的基本药效^[6]。

HA测定试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;HYP测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;SOD测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;D-半乳糖,上海化学试剂二厂;考马斯亮兰,南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器 超微量微孔板分光光度计(EPOCH,美国Bio-Tek公司);台式高速离心机(SF-TGL-16GS,上海菲恰尔分析仪器有限公司);冷冻干燥仪(CTAL PH2-4/LSC,德国CHRIST公司);远红外快速恒温干燥箱(YHG-400-S,上海跃进医疗器械有限公司);恒温水浴锅(SHHW21.420A II,天津市泰斯特仪器有限公司);粉碎机(FSJ-A05N6,广东小熊电器有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组与造模 首先将雌性小鼠适应性饲养7 d,保证小鼠适应现环境后开始进行实验。

将30只雌性小鼠按照随机数字表分组的方法分成5组,其中4组小鼠作为造模组,皮下注射D-半乳糖 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,一共注射30 d;余下一组小鼠作为空白组,每天注射同体积生理盐水^[7-9]。30 d后造模组和空白组皮肤外观比对,模型组明显皮肤松弛,出现细密皱纹,而空白组则相反,见图1。

将4组皮肤衰老模型小鼠分为:模型组、鹿茸膏剂A、B、C组。用剪刀将小鼠背部毛发剪短,再用剃须刀剃毛备用。

1.4.2 制备鹿茸膏剂 将鹿茸血茸片100 g剪切成碎片,粉碎机高速档粉碎10次,每次1 min。精确称取粉碎后的鹿茸组织和凡士林,充分搅拌均匀,配

制成模型组(0%)、鹿茸膏剂A组(5%)、鹿茸膏剂B组(10%)、鹿茸膏剂C组(15%)4个浓度鹿茸膏剂各50 g,置于冰箱冷藏室中保存。

1.4.3 皮肤外用鹿茸膏剂 选取小鼠背部中央位置4 cm×7 cm的区域,将各组膏剂涂抹在对应各组小鼠选取的皮肤区域表面,每只每天涂抹0.3 g,24 h后清洁皮肤并再次涂抹,连续涂抹21 d,期间还需手工脱毛4次。

1.4.4 小鼠皮肤的表现特征观察 比对各组小鼠用药部位皮肤的色泽、光滑程度、皱纹等表现特征并拍照记录。然后脱颈法处死实验小鼠,迅速剥下用药部位皮肤,去除皮下脂肪和其他结缔组织,铺平后用直径2 cm打孔器在正中位置切取小鼠皮肤用于含水率测定,余下的皮肤于-20℃冷冻保存,用于测定HYP等成分。

1.4.5 皮肤含水率的测定 精确称量打孔器切取的皮肤湿重,随即将其放入烘箱中,于50℃烘干12 h,然后称取干重,计算出各实验组皮肤含水率。公式如下:

$$\text{皮肤含水率} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

1.4.6 皮肤羟脯氨酸(HYP)含量测定 取涂药部位皮肤组织0.5 g,用冰浴预冷的生理盐水进行漂洗,滤纸擦干,加入冰浴预冷的生理盐水,使用玻璃匀浆器研磨成浓度为10%的匀浆液。将得到的匀浆液在0℃下3 000 r/min离心10 min,取上清液。按照HYP试剂盒说明书所示方法,使用超微量微孔板分光光度计测定OD值,计算各实验组小鼠皮肤HYP含量。

1.4.7 皮肤透明质酸(HA)含量测定 取涂药部位皮肤组织0.5 g,加入冰浴预冷的PBS缓冲溶液,使用玻璃匀浆器研磨成浓度为10%的匀浆液。将得到的匀浆液在0℃下1 000 r/min离心4 min,取上清液。按照HA试剂盒说明书所示方法,使用超微量

微孔板分光光度计测定OD值,计算各实验组小鼠皮肤HA的含量。

1.4.8 皮肤超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定 取涂药部位皮肤组织0.5 g,用冰浴预冷的生理盐水进行漂洗,之后加入冰浴预冷后的生理盐水,使用玻璃匀浆器研磨成浓度为10%的匀浆液。将得到的匀浆液在0℃下3 000 r/min离心10 min,取上清液。按照SOD试剂盒说明书所示方法,使用超微量微孔板分光光度计测定OD值,计算各实验组小鼠皮肤SOD活力。

1.5 统计学方法 运用SPSS18.0统计软件进行数据分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用单因素方差分析;方差齐性检验结果显著,两两比较采用Dunnett T3检验;方差齐性检验结果不显著,两两比较采用LSD检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮肤外观比较 观察各组小鼠皮肤发现:与空白组动物比较,模型组小鼠皮肤松弛,有大量褶皱,体毛再生较慢。涂抹了鹿茸膏剂的三组小鼠与模型组相比,在皮肤褶皱、光滑、松弛等方面都有较为明显的改善,改善效果随鹿茸含量增高而增强,以鹿茸膏剂C组最佳,结果见图2。

2.2 鹿茸对小鼠皮肤含水率、HYP含量、HA含量、SOD活力的影响测定 五组小鼠皮肤组织含水率、HYP含量、HA含量、SOD活力测定结果见表1。模型组小鼠皮肤组织含水率、HYP含量、HA含量、SOD活力均显著低于空白组($P < 0.01$),说明小鼠的皮肤衰老模型造模成功。鹿茸膏剂A组在皮肤含水率和SOD活力方面显著高于模型组($P < 0.05$),在HYP和HA含量方面与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。鹿茸膏剂B组在皮肤含水率、HYP含量、HA含量、SOD活力方面显著高于模型组($P < 0.05$),在

表1 五组小鼠皮肤组织含水率、HYP含量、HA含量、SOD活力的测定($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	皮肤含水率/%	羟脯氨酸含量/(μg/mg)	透明质酸含量/(μg/mL)	SOD活力/(U/mg)
空白组	6	75.44±0.73 ^a	4.168±0.06 ^a	9.273±0.29 ^a	365.80±16.259 ^a
模型组	6	57.72±0.89	3.604±0.20	6.163±0.54	304.84±12.026
鹿茸膏剂A组	6	66.22±1.21 ^b	3.850±0.38	6.164±0.80	338.36±7.848 ^b
鹿茸膏剂B组	6	68.82±0.64 ^a	3.956±0.12 ^b	8.514±0.63 ^b	353.12±5.964 ^a
鹿茸膏剂C组	6	70.70±1.05 ^a	4.080±0.12 ^a	9.024±0.24 ^a	357.20±10.634 ^a
F值		384.33	10.84	254.209	34.975
P值		0.000	0.000	0.000	0.000
事后检验(两两比较)		LSD	Dunnett T3	Dunnett T3	LSD

注:与模型组相比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

皮肤含水率和SOD活力方面和模型组差异有统计学意义($P < 0.01$)。鹿茸膏剂C组在皮肤含水率、HYP含量、HA含量、SOD活力方面和模型组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

本实验的结果发现空白组小鼠的皮肤光滑,较为紧致,富有弹性。注射D-半乳糖的皮肤衰老模型小鼠皮肤松弛,皱褶大量增多,在皮肤含水率、羟脯氨酸含量、透明质酸含量、超氧化物歧化酶活力等指标明显下降。经测定,模型小鼠在外用鹿茸膏剂后,10%和15%浓度鹿茸膏剂组小鼠皮肤外观改善的效果明显,而且这两个浓度组小鼠皮肤的含水率、透明质酸含量、羟脯氨酸含量、超氧化物歧化酶活力等指标也得到了显著提高。

衰老机制的假说有很多,一般认为,自由基普遍存在机体内,随着机体的衰老,皮肤组织具有抗氧化功能的超氧化物歧化酶等成分含量下降,导致自由基大量积累,过量的自由基会过氧化蛋白质、核酸、脂质等细胞成分,从而破坏细胞膜、线粒体、染色体等细胞结构,引起蛋白质交联变性和DNA链断裂;而皮肤成纤维细胞功能的衰退,会引起羟脯氨酸生成减少,胶原蛋白合成减少,透明质酸含量下降。这些伤害在皮肤组织学方面表现为:表皮和真皮层变薄,真皮内的胶原蛋白减少,透明质酸含量下降,皮肤含水率下降,胶原纤维交联,脂褐素堆积;于是皮肤外观出现干燥、松弛、皱纹、暗沉等衰老症状^[10-11]。

鹿茸本身就是处于快速生长阶段的幼角,因此内部含有大量促进组织生长的生物活性物质,鹿茸的成分包括蛋白多肽类、氨基酸、糖类、生物胺类、甾体类、脂类和无机元素。蛋白多肽类是鹿茸最主要的活性成分,与抗衰老有关的主要是酶类和生长因子类。酶类包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、单胺氧化酶(MAO)等,这些酶类具有抗氧化、抗衰老作用。胰岛素样生长因子、表皮生长因子等能够促进皮肤成纤维细胞的功能,增加胶原蛋白和透明质酸的合成。鹿茸中的糖类包括硫酸软骨素、酸性黏多糖、中性糖、半乳糖胺等,这些成分往往具有抗氧化或者保湿的作用。鹿茸多胺可以抗脂质过氧化,促进核酸和蛋白质合成。鹿茸中的甾体类包

括雌二醇、胆甾醇、5 α -雄甾烷-1,3-二酮、睾丸酮、胆甾-3,5-二烯,5 α -胆甾-7-烯-3-酮等成分,这些激素类成分能够抑制黑色素细胞络氨酸酶活性、促进成纤维细胞增生和增加胶原蛋白和透明质酸合成、抑制炎症形成、延缓皮肤衰老^[12-15]。由此可见,鹿茸所含活性成分复杂多样,其抗衰老是多种组份互相协同产生的功效,而且外用全组分鹿茸,可以起到很好的抗皮肤衰老的效果。本研究证明,鹿茸可能是一种良好的抗皮肤衰老的天然药物。

(本文图1,2见插图9-1)

参考文献

- [1] 王楠,高晓霞,代子彦,等.鹿茸药效物质基础、药理作用、临床应用及质量控制的研究进展[J].中草药,2017,48(22):4884-4790.
- [2] 向丽娟,夏新中,毛坤,等.黄芪抗衰老研究现状[J].中国现代中药,2014,16(2):177-180.
- [3] 黄斌,刘仍海,刘薇,等.单味中药抗衰老研究进展[J].中华中医药学刊,2016,34(12):2874-2877.
- [4] 薛立英,高丽,秦雪梅,等.药食同源中药抗衰老研究进展[J].食品科学,2017,38(15):302-309.
- [5] 刘佳,赵海平,李春义.鹿茸成分研究进展[J].特产研究,2016,38(4):50-54.
- [6] 王艳梅.东北梅花鹿茸主要成分系统性比较研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2004:14-18.
- [7] 翟慧娟,朱明明.心脑宁对皮肤衰老小鼠的干预性作用[J].新乡医学院学报,2017,34(2):104-106.
- [8] 范超,李慧萍,李冰,等.参茸护肤乳对亚急性皮肤衰老模型小鼠皮肤的影响[J].中医杂志,2017,58(20):1778-1782.
- [9] 赵文斌,欧阳晓勇,郑喜,等.中药祛斑剂对衰老模型小鼠皮肤相关指标的影响[J].云南中医中药杂志,2018,39(1):75-76.
- [10] 李想,胡君姣,李琼,等.抗衰老化妆品及其功效评价[J].香料香精化妆品,2013,5:58-62.
- [11] 曹蕾,陈逸青,陈勤,等.西施口服液延缓小鼠皮肤衰老的作用[J].中国医院药学杂志,2016,36(17):1447-1451.
- [12] 魏征人,陈智嘉,刘洋,等.基于shotgun技术对鹿茸蛋白质组学的初步分析[J].中国实验诊断学,2014,18(1):18-21.
- [13] 张梦莹,赵玉娟,李倩竹,等.梅花鹿茸可溶性蛋白提取工艺及免疫活性[J].东北林业大学学报,2014,42(9):158-160.
- [14] 宗颖,刘炯,王志颖,等.鹿茸多肽成分及其药理作用研究[J].吉林中医药,2013,33(11):1135-1137.
- [15] 周勇,谢臻蔚,金杭美.雌激素在抗皮肤衰老中的生物学作用[J].中国美容医学,2017,26(1):27-30.

(收稿日期:2019-07-01,修回日期:2019-07-23)