论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1326-03

菟丝子多糖抑制衰老小鼠模型中氧自由基域的作用

蔡曦光[1],许爱霞[2],葛 斌[2],高 湘[2],杨社华[2] (甘肃省人民医院:[1]呼吸科,[2]药剂科,兰州 730000)

提 要:目的 研究菟丝子多糖的抗衰老作用及其机制。**方法** 用D-半乳糖造衰老小鼠模型,同时分别灌胃给予100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1}菟丝子多糖,观察其对衰老模型小鼠免疫器官及抗氧化系统的影响。**结果** 衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数下降,组织中脂褐质(lipofuscin, LF)升高,肝、肾组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)升高及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)活力下降。分别灌胃给予100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1}菟丝子多糖能使衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数不同程度升高;肝、肾组织中MDA不同程度下降;SOD及GSH-PX活力不同程度提高;脑组织中LF不同程度下降。**结论** 菟丝子多糖有抗衰老作用,其机制可能与提高免疫功能,清除氧自由基及抗脂质过氧化有关。

关键词:菟丝子多糖;抗衰老;清除自由基;抗脂质过氧化;提高免疫功能
中图法分类号:R-332; R282.71; R339.38 **文献标识码**:A

Effects of a polysaccharide from CCL on inhibiting oxygen free radical threshold of senile mice model

CAI Xi-guang[1], XU Ai-xia[2], GE Bin[2], GAO Xiang[2], YANG She-hua[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, [2]Department of Pharmaceutics, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective To study the effect of a polysaccharide from cuscuta chinensis lam (PCCL) on antisenility and its mechanism. **Methods** Sixty Kunming mice were randomized into 6 groups. The three PCCL groups were administrated with PCCL of 100, 200, 400 mg·kg^{-1}·d^{-1} orally, the positive control group with vitamin E of 200 mg·kg^{-1}·d^{-1}, the model group and control group with the same volume of control solution only. At the same time, the model group, the positive group and the three PCCL groups were subcutaneously injected of 5% D-gal at the dose of 0.5 ml at the nape, and the control with the same volume of saline solution. Seven weeks later, the MDA, SOD activity, GSH-PX activity in the liver and kidney of mice and lipofuscin (LF) in mouse brain were detected with the methods of TBA, Nitrate, DTNB and Sohal, respectively. The data were analyzed with SPSS software and the data between groups were analyzed with one-factor variance analysis. **Results** Thymus index and spleen index dropped, LF rose in brain, malondialdehyde (MDA) content rose and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) dropped in liver and kidney in senile mouse model. PCCL administration of 100, 200, 400 mg·kg^{-1}·d^{-1} made thymus index and spleen index rising, LF dropping in brain, MDA content dropping, SOD and GSH-PX LF rising in liver and kidney of senile mouse model. **Conclusion** PCCL may postpone senility, which mechanism probably connected with rising immunity, eliminating oxygen free radicals and antilipoperoxidation.

Key words: polysaccharide from cuscuta chinensis lam; antisenility; free radicals; antilipoperoxidation; immunity

菟丝子(cuscuta chinensis lam, CCL)系旋花科植物菟丝子的种子,具有补肾固精、养肝明目功效。菟丝子多糖(polysaccharide from cuscuta chinensis lam, PCCL)系其有效成分。本实验用D-半乳糖(D-gal)造衰老小鼠模型,同时分别给予100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1}菟丝子多糖灌胃,观察其对衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响;对肝、组织中丙二醛(malondialdehyde,

基金项目:甘肃省科学事业科研资助项目(QS041-C33-25)
Supported by the Research Funds for Sci & Tech of Gansu Province (QS041-C33-25)
作者简介:蔡曦光(1951-),男,甘肃省秦安县人,主任医师,主要从事呼吸病及老年病方面的研究,发表论文20余篇。电话:(0931)8281899
通讯作者:葛 斌,电话:(0931)8281809,E-mail: gebin1965@sina.com
收稿日期:2004-10-05;**修回日期**:2005-01-03

MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)的影响和对脑组织中脂褐质(lipofuscin, LF)的影响，旨在探讨菟丝子多糖的抗衰老作用及其机制。

1　材料和方法

1.1　试剂及动物

丙二醛测试盒，超氧化物岐化酶测试盒，谷胱甘肽过氧化物酶测试盒均为南京建成生物工程研究所产品，其它试剂均为进口或国产分析纯级产品。实验用昆明种清洁级雌性小鼠 60 只，5～8 周龄，体质量(23 ± 4.27)g，由兰州生物制品研究所提供。菟丝子多糖由甘肃省人民医院药理基地药物实验室制备(由甘肃省药检所鉴定)。

1.2　菟丝子多糖的提取及纯化

按照文献[1,2]方法，选辽宁产秋季采集的菟丝子成熟干燥种子，用蒸馏水浸泡，加热提取，静置，2 000 × g 离心 10 min，2 次，浓缩至原体积的 30%，浓缩液加入 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀，沉淀物依次用无水乙醇，丙酮 及乙醚洗涤，用蒸馏水复溶，透析，Sevage 法除蛋白，DEAE-纤维素柱层析，收集洗脱液，常规干燥得灰白色粉末菟丝子多糖，厚质层析纸分析表明，菟丝子多糖由甘露糖，葡萄糖及果糖组成，硫酸-苯酚法测定含量，纯度为 89.7%。

1.3　动物分组及给药

实验用昆明种小鼠，按完全随机设计法分为 6 组，每组 10 只，即对照组、模型组、阳性对照组及试药 1、2、3 组。采用灌胃法给药，试药 1 组、2 组、3 组分别灌胃给予菟丝子多糖 100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1}。阳性对照组灌胃维生素 E 200 mg·kg^{-1}·d^{-1}。模型组和对照组灌胃相当量的对照液(只含防腐剂-泥泊金)。给药同时，模型组、阳性对照组和试药组小鼠每天颈背部皮下注射 5%D-半乳糖 0.5 ml，对照组皮下注射等量注射用水，造模及给药 7 周后进行各项指标测定[3]。

1.4　小鼠肝、肾组织中过氧化脂质降解产物 MDA 的测定

用 TBA 比色法[4]，肝、肾组织用 Tris 缓冲液(pH 7.4，0.01 mol/L Tris-HCl，0.000 1 mol/L EDTA-2Na，0.01 mol/L 蔗糖，0.8% NaCl) 配成 10%组织匀浆，取肝或肾匀浆 0.1 ml，按测试盒操作法加入试剂，反应终体积为 4.2 ml。反应管振荡混匀，水浴中煮沸 40 min，3 500 × g 离心 10 min，上清液于 532 nm 处测 D 值。

1.5　小鼠肝、肾组织中 SOD 活力的测定

用亚硝酸盐法[5]，肝、肾组织用 Tris 缓冲液配成 1%组织匀浆，取肝匀浆或肾匀浆 50 μl，按测试盒操作法加入试剂，反应体积为 1.8 ml。反应管振荡混匀，37 ℃恒温水浴中温育 40 min，加入显色剂 10 min 后，于 550 nm 处测 D 值。

1.6　小鼠肝、肾组织中 GSH-PX 活力的测定

用 DTNB 法[6]，取 1%肝匀浆或肾匀浆及 1 mmol/L GSH 各 0.2 ml(对照管不含 GSH)，37 ℃水浴中预温 5 min，按测试盒操作法加入试剂，37 ℃水浴中反应 5 min，3 500 × g 离心 10 min，取上清液加入显色剂，室温静置 15 min，于 412 nm 处测 D 值。

1.7　小鼠脑组织中 LF 的测定

用 Sohal 法[7]，取小鼠大脑 100 mg，加入 2∶1 氯仿-甲醇提取液 2 ml，充分匀浆，滤纸过滤，滤渣用提取液洗涤，加提取液至 5 ml，测定荧光强度(发射波长 435 nm，激发波长 365 nm)。

1.8　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　PCCL 对 D-gal 致衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

小鼠连续皮下注射 D-gal 7 周后，胸腺指数和脾脏指数明显下降，同时灌胃给予菟丝子多糖 100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1}，能使衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数不同程度升高。而同时灌胃给予维生素 E 200 mg·kg^{-1}·d^{-1} 对衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数无影响(表 1)。

表 1　PCCL 对 D-gal 致衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数及脑组织中 LF 的影响(n = 10，$\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effect of PCCL on thymus index and spleen index and LF in brain of senile mouse model caused by D-gal (n = 10，$\bar{x} \pm s$)

Group	Dose (mg·kg^{-1}·d^{-1})	Thymus index (mg/g)	Spleen index (mg/g)	Lipofuscin Fluorescent value
Control	0	2.18 ± 0.17	4.17 ± 0.21	17.4 ± 1.1
Model	0	1.87 ± 0.24△△	3.94 ± 0.12△	22.2 ± 2.3△△
Vitamin E	200	1.93 ± 0.12	4.00 ± 0.20	1.98 ± 0.19**
Drug Ⅰ	100	2.29 ± 0.20**	4.21 ± 0.18**	20.0 ± 1.5**
Drug Ⅱ	200	2.31 ± 0.26**	4.37 ± 0.29**	18.1 ± 1.4**
Drug Ⅲ	400	2.47 ± 0.16**	4.43 ± 0.20**	17.5 ± 1.8**
F		11.281	9.049	11.991
P		0.000	0.000	0.000

**：$P < 0.01$，*vs* model；△：$P < 0.05$，△△：$P < 0.01$，*vs* control

2.2　PCCL 对 D-gal 致衰老模型小鼠脑组织中 LF 及肝、肾组织中 MDA 的影响

D-gal 致衰老模型小鼠脑组织中 LF 及肝、肾组织中 MDA 显著升高，同时灌胃给予菟丝子多糖 100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1}，能不同程度对抗脑组织中 LF 升高(表 1)及肝、肾组织中 MDA 升高(表 2)。

2.3　PCCL 对 D-gal 致衰老模型小鼠肝、肾组织中 SOD 及 GSH-PX 活力的影响

D-gal 致衰老模型小鼠肝、肾组织中 SOD 及 GSH-PX 活力均明显下降。同时灌胃给予菟丝子多糖 100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1}，能不同程度对抗肝、肾组织中 SOD 及 GSH-PX 活力下降(表 2)。

表2 PCCL对D-gal致衰老小鼠肝、肾组织中MDA、SODG及GSH-PX活力的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of PCCL on MDA, activities of SOD and GSH-PX in liver and kidney of senile mouse model caused by D-gal ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Liver			Kidney		
	MDA (μmol/g)	SOD (μmol/g)	GSH-PX (μmol/g)	MDA (μmol/g)	SOD (μmol/g)	GSH-PX (μmol/g)
Control	8.17±0.96	81.5±9.0	8.93±0.79	12.5±1.5	54.1±6.4	5.53±0.53
Model	10.70±1.00△△	62.2±7.5△△	6.17±0.76△△	14.9±1.1△△	40.4±4.1△△	3.98±0.48△△
Vitamin E	9.89±1.16	70.2±7.4*	6.95±0.70*	13.6±1.2*	44.2±4.4	4.62±0.57*
Drug Ⅰ	9.73±0.76*	70.8±7.3*	7.05±1.00*	13.5±1.3*	45.7±5.2*	4.59±0.44*
Drug Ⅱ	8.77±0.82**	77.0±7.5**	8.14±0.64**	13.0±1.2**	51.6±4.9**	5.13±0.64**
Drug Ⅲ	8.24±0.96**	80.6±9.3**	8.84±0.94**	12.5±1.4**	54.6±5.7**	5.42±0.65**
F	11.389	8.500	19.005	4.651	12.664	11.194
P	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* model; △△: $P<0.01$, *vs* control

3 讨论

3.1 氧自由基的正常生理作用

在生命过程中,生物体不断产生氧自由基,即超氧阴离子自由基(O_2^-)和羟自由基(·OH)及有机自由基(R^-,RO^-,ROO^-),它们有很强的生物活性。适量自由基对细胞的分裂,生长,消炎,解毒等起积极作用。机体自身存在抗氧化系统,包括GSH-PX,SOD等抗氧化酶。GSH-PX对活性氧和组织产生的·OH及H_2O_2有较强的清除能力,对保护细胞结构和功能完整,延缓细胞衰老起着重要作用。SOD对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要作用,此酶能清O_2^-,保护细胞免受损伤。抗氧化剂可直接清除过剩自由基,或通过增强体内抗氧化系统起抗氧化作用[8]。

3.2 氧自由基的病理作用

自由基过剩会损伤细胞膜,使DNA断裂,蛋白质变性,酶失活,最后导致细胞解体和死亡。还有一些含氧产物如单线态氧,过氧化氢(H_2O_2)等,它们虽不属自由基,但含有活性氧,化学性质较基态氧活泼,可在自由基反应中产生,同时还可直接或间接触发自由基反应。它们和自由基一样,当产生过剩时会损伤机体。

3.3 抗氧自由基的重要性

自由基过剩可诱发炎症,免疫失调,恶性肿瘤等多种疾病[9]。脂质过氧化是氧自由基损伤组织的重要方式,其损伤途径为:氧自由基+细胞膜脂质→脂质过氧化反应→过氧化脂质→丙二醛+细胞成分→脂褐质。可见,脂质过氧化与氧自由基及衰老密切相关[10]。研究和开发抗氧化剂和自由基清除剂对延缓衰老和防治疾病有重大意义。

3.4 菟丝子多糖的抗氧自由基及抗衰老作用

本实验结果表明,衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数下降,组织中LF升高,肝、肾组织中MDA升高及SOD及GSH-PX活力下降。衰老模型小鼠分别灌胃给予菟丝子多糖100、200、400 mg·kg^{-1}·d^{-1},能使胸腺指数和脾脏指数不同程度升高,提示菟丝子多糖能显著对抗免疫器官退化及提高免疫功能;能使肝、肾组织中MDA及脑组织中LF不同程度下降,提示菟丝子多糖能显著清除·OH和抗脂质过氧化;能使肝、肾组织中SOD及GSH-PX活力不同程度提高,提示菟丝子多糖能显著清除O_2^-,H_2O_2及活性氧。可见菟丝子多糖有显著抗衰老作用,其机制可能与提高免疫功能,清除自由基及抗脂质过氧化有关。

参考文献:

[1] 叶 平. 大菟丝子与菟丝子化学成分的比较研究[J]. 中成药, 1992, 14(3): 36-37.

[2] 陈 群, 杨桂文, 安利国. 银杏白果多糖的提取, 纯化和分析[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(5): 331-333.

[3] 徐秋萍, 吴金英. 复方人生对D-半乳糖所致小鼠亚急性衰老模型的作用[A]. 见: 陈 奇 主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 937-939.

[4] 张其兰, 于庆海. 复方何首乌对大鼠血浆过氧化脂质的影响[A]. 见: 陈 奇 主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 940-942.

[5] 沈 乃, 陈 修. 超氧化物歧化酶测定法[A]. 见: 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 529-531.

[6] 孙 云, 吴希美, 张洪泉. 谷胱甘肽过氧化物酶测定法[A]. 见: 徐叔云, 卞如濂, 陈 修 主编. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 549-551.

[7] 吴春福, 于庆海. 人参茎叶对大鼠大脑皮层和肝脏脂褐质生成的抑制作用[A]. 见: 陈 奇 主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 943.

[8] Yang H L. Free radical and tumor [A]. In: Yang H L, Pan X X, Wu Y K. Advanced Pathophysiology[M]. Beijing: Sciece Pree, 1998. 433-451.

[9] Marx J L. Oxgen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235(4788): 529-531.

[10] 邓柯玉, 辛洪波, 张宝恒, 等. 云南甘草总皂甙清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(5): 350-354.

(编辑 陈聪连)