

党参多糖抗衰老作用机制的实验研究

许爱霞, 张振明, 葛斌, 蒲君峰(甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000)

摘要:目的 研究党参多糖的抗衰老作用及其机制。方法 用 D-半乳糖致衰老模型小鼠, 同时党参多糖 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 连续灌胃 8 周, 观察其对衰老模型小鼠器官及系统功能的影响。结果 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 党参多糖能使衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数升高, 血清和肝组织中 MDA 明显下降及 SOD 活力明显上升, 脑组织中 LF 明显下降, 肾组织中 GSH-PX 活力及 NOS 活力明显升高。结论 党参多糖有抗衰老作用, 其机制可能与增强机体免疫功能, 清除自由基及抗脂质过氧化有关。

关键词: 党参多糖; 抗衰老作用; 清除自由基; 抗脂质过氧化; 提高免疫功能

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)08-0729-03

Study effect and its mechanism on resisting senility of PCPN

XU Ai-xia, ZHANG Zheng-ming, GE Bin, PU Jun-feng(People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study effect and its mechanism of polysaccharide from *Codonopsis Pilosula* Nannf. (PCPN) on resisting senility. **METHODS** To observe effect on organs and systems of rats with senile model caused by D-galactose (D-gal) and meanwhile administered 50 or 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹ PCPN. **RESULTS** Thymus index and spleen index notably rose, MDA notably dropped and SOD notably ascended in serums and livers, LF notably descended in brains, activities of GSH-PX and NOS notably rose in kidneys of rats with senile model administered PCPN. **CONCLUSION** PCPN may postpone senility, its mechanism probably connected with rising immunity, eliminating free radicals, antilipoperoxidation.

KEY WORDS: PCPN; mechanism of resisting senility; eliminating free radical; Antilipoperoxidation; rising immunity

党参(*Codonopsis Pilosula* Nannf., CPN)为补气中药, 具有补中益气、健脾益肺的功效, 现代研究表明党参有增强机体免疫功能、抗辐射、抗疲劳、抗溃疡等作用。党参多糖(polysaccharide from CPN, PCPN)系其有效成分。本实验用 D-半乳糖(D-gal)致衰老模型小鼠, 同时灌服 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 党参多糖, 观察其对衰老小鼠胸腺指数和脾脏指数, 血清和肝组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD), 脑组织中脂褐质(LF), 肾组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)及一氧化氮合酶(NOS)的影响, 旨在探讨党参多糖的抗衰老作用及其机制, 为开发中药类抗衰老剂及防治与衰老有关的疾病提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 试剂及动物

丙二醛(MDA)测试盒, 超氧化物歧化酶(SOD)测试盒, 一氧化氮合酶(NOS)测试盒, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒均为南京建成生物工程研究所产品, 其他试剂为进口或国产分析纯级产品。实验用昆明种小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体重(20±2)g, 由兰州医学院实验动物中心提供。党参购自甘肃省人民医院药房, 由甘肃省药品检验所宋平顺主任药师鉴定。

1.2 党参多糖的提取及纯化^[1-2]

将党参适度粉碎, 用蒸馏水浸泡, 加热提取, 冷却离心, 浓缩, 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, Sevege 法除蛋白, 常规干燥得党参多糖。纸层析分析表明, 党参多糖由葡萄糖、果糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖等组成。硫酸-苯酚法测多糖含量为 88.2%。

1.3 动物分组及给药

实验用昆明种小鼠 52 只, 随机分为 4 组, 即对照组, 模型组, 大小剂量试药组。采用灌胃法给药, 试药组分别灌胃给予党参多糖 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹。模型组与对照组灌胃相当量的对照液(只含防腐剂-尼泊金乙酯)。给药同时, 模型组和试药组小鼠每天颈背部皮下注射 5% D-gal 0.5mL, 对照组皮下注射等量注射用水, 造型及给药 8 周后进行各项指标测定。

1.4 小鼠血清及肝组织中过氧化脂质降解产物 MDA 的测定

用 TBA 比色法^[3], 肝组织用 Tris 缓冲液(pH7.4, 0.01 mol · L⁻¹ Tris-HCl, 0.0001 mol · L⁻¹ EDTA-2Na, 0.01 mol · L⁻¹ 蔗糖, 0.8% NaCl)配成 10% 肝组织匀浆, 取小鼠血清或肝组织匀浆 0.1mL, 按测试盒操作法加入试剂, 反应终体积为 4.2mL。反应管振荡混匀, 水浴中煮沸 40min, 冷却, 3500r ·

min⁻¹离心 10min,上清液于 532nm 处测吸光度(A)值。

1.5 小鼠血清及肝组织中 SOD 活力的测定

用亚硝酸盐法^[4],取小鼠血清 10μL 或 1% 肝组织匀浆 50μL,按测试盒操作法加入试剂,反应体积为 1.8mL。反应管振荡混匀,37℃ 恒温水浴中温育 40min,加入显色剂,10min 后于 550nm 处测 A 值。

1.6 小鼠肾组织中 GSH-PX 活力的测定

用 DTNB 法^[5],取 1% 肾组织匀浆和 1mmol · L⁻¹GSH 各 0.2mL,37℃ 水浴中育温 5min,按测试盒操作法加入试剂,37℃ 水浴中反应 3min,3500r · min⁻¹离心 10min,取上清液加入显色剂,室温静置 15min,于 412nm 处测 A 值。

1.7 小鼠肾组织中 NOS 活力的测定^[6]

取 10% 肾组织匀浆 50μL,按测试盒操作法加入试剂,37℃ 水浴中反应 15min,加入终止剂,振荡混匀,530nm 处测定 A 值,计算总一氧化氮合酶(NOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)。

1.8 小鼠脑组织中 LF 的测定

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

2 结果

2.1 PCPN 对 D-gal 致衰老小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

小鼠连续皮下注射 D-gal 8 周后,胸腺指数和脾脏指数与对照组比较有所下降,但脾脏指数无统计学意义,同时灌服 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹PCPN 能使衰老小鼠胸腺指数明显回升($P < 0.01$),脾脏指数有所上升,但无统计学意义(见表 1)。

表 2 PCPN 对 D-gal 致衰老小鼠血清和肝组织中 MDA 及 SOD 的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of PCPN on MDA and SOD in serums and livers of rats with senile model caused by D-ga($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量	血清 MDA nmol · mL ⁻¹	肝 MDA nmol · mg ⁻¹ 蛋白	血 SOD NU · mL ⁻¹	肝 SOD NU · mg ⁻¹ 蛋白
	mg · kg ⁻¹				
对照组	—	4.96 ± 0.36	2.89 ± 0.22	149.16 ± 8.13	9.21 ± 0.44
模型组	—	6.45 ± 0.71 **	3.73 ± 0.55 **	115.37 ± 5.00 **	7.24 ± 0.23 **
PCPN I 组	50	5.23 ± 0.49 ^{ΔΔ}	3.10 ± 0.32 ^{ΔΔ}	136.42 ± 3.18 ^{ΔΔ}	8.54 ± 0.14 ^{ΔΔ}
PCPN II 组	150	4.67 ± 0.67 ^{ΔΔ}	2.64 ± 0.13 ^{ΔΔ}	144.55 ± 6.74 ^{ΔΔ}	9.02 ± 0.27 ^{ΔΔ}

注: t 检验,与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: t test, compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with model group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

表 3 PCPN 对 D-gal 致衰老小鼠肾组织中 GSH-PX 和 NOS 及脑组织中 LF 的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of PCPN on GSH-PX and NOS in kidneys, LF in brains of rats with senile model caused by D-gal($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量	动物数 n	肾 GSH-PX	肾 NOS	肾 iNOS	脑 LF
	mg · kg ⁻¹		活力单位 · mg ⁻¹ 蛋白	U · mg ⁻¹ 蛋白	U · mg ⁻¹ 蛋白	荧光值
对照组	—	10	96.39 ± 3.38	0.867 ± 0.041	0.548 ± 0.015	17.87 ± 1.62
模型组	—	10	77.77 ± 4.83 **	0.635 ± 0.093 **	0.326 ± 0.027 **	19.87 ± 2.11 **
PCPN I 组	50	10	88.01 ± 2.93 ^{ΔΔ}	0.744 ± 0.048 ^{ΔΔ}	0.418 ± 0.019 ^{ΔΔ}	15.94 ± 1.21 ^{ΔΔ}
PCPN II 组	150	10	100.74 ± 3.92 ^{ΔΔ}	0.909 ± 0.063 ^{ΔΔ}	0.611 ± 0.036 ^{ΔΔ}	14.21 ± 1.85 ^{ΔΔ}

注: t 检验,与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: t test, compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with model group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

表 1 PCPN 对 D-gal 致衰老小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of PCPN on thymus index and spleen index of rats with senile model caused by D-gal($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量	动物数 n	胸腺指数	脾脏指数
	mg · kg ⁻¹		mg · (10g) ⁻¹	mg · (10g) ⁻¹
对照组	—	10	22.17 ± 2.64	42.63 ± 6.91
模型组	—	10	19.50 ± 2.54 **	40.98 ± 5.75
PCPN I 组	50	10	25.36 ± 4.25 ^{ΔΔ}	41.52 ± 4.67
PCPN II 组	150	10	27.96 ± 5.32 ^{ΔΔ}	42.97 ± 8.94

注: t 检验,与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: t test, compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with model group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

2.2 PCPN 对 D-gal 致衰老小鼠血清和肝组织中 MDA 及 SOD 的影响

D-gal 致衰老小鼠血清和肝组织中 MDA 含量明显升高, SOD 活力明显下降,同时灌服 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹PCPN 可明显对抗血清和肝组织中 MDA 含量升高及 SOD 活力下降(见表 2)。

2.3 PCPN 对 D-gal 致衰老小鼠肾组织中 GSH-PX 和 NOS 的影响

D-gal 致衰老小鼠肾组织中 GSH-PX 活力及 NOS 活力均明显下降,同时灌服 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹PCPN 可明显对抗肾组织中 GSH-PX 活力及 NOS 活力下降(见表 3)。

2.4 PCPN 对 D-gal 致衰老小鼠脑组织中 LF 的影响

D-gal 致衰老小鼠脑组织中 LF 含量明显升高,同时灌服 50 或 150mg · kg⁻¹ · d⁻¹PCPN 能使脑组织中 LF 含量明显下降(见表 3)。

3 讨论

3.1 小鼠长期注射 D-gal 是人造衰老小鼠模型的经典方法,衰老模型小鼠可出现全身代谢紊乱,免疫器官退化,自由基过剩。自由基过剩可诱发炎症、免疫失调、恶性肿瘤等多种疾病,也是促进机体衰老的因素之一。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^[8],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要意义。

3.2 丙二醛和脂褐质是脂质过氧化的产物,其含量的变化间接反应了氧自由基的含量。机体自身存在抗氧化系统,SOD 是体内重要的抗氧化酶,清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$),保护细胞免受损伤。GSH-PX 是体内过氧化氢分解的催化酶,它对活性氧和羟自由基($\cdot OH$)诱发的脂氢过氧化物及组织产生的 H_2O_2 有较强的清除能力,可以起到保护细胞结构和功能完整的作用。NOS 是 L-Arg 和分子氧反应生成 NO 的催化酶,NO 是巨噬细胞发挥功能的关键介质,也是血管舒张必须依赖的因子,高血压、肾炎等多种疾病状态下体内 NO 减少。

3.3 本实验结果表明,D-gal 致衰老模型小鼠每天每公斤体重灌服 50 或 150mg 的党参多糖,能使胸腺指数和脾脏指数不同程度回升;血清和肝组织中 MDA 及脑组织中 LF 明显降低;血清、肝组织中 SOD、肾组织中 GSH-PX 及 NOS 酶活力明显上升。提示党参多糖能不同程度对抗衰老机体免疫器官

退化及提高免疫功能;能不同程度地清除 $\cdot OH$ 和抗脂质过氧化;能不同程度地清除 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 及活性氧;可不同程度上调体内 NO,提高机体生理机能。可见党参多糖有显著的抗衰老作用,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] 李艳,鲁建江,孙萍等.新疆党参多糖的提取及含量测定[J].新疆中医药,2001,3:9-10.
- [2] 陈群,杨桂文,安利国.银杏白果多糖的提取,纯化和分析[J].中国药理学杂志,2002,37(5):331-333.
- [3] 陈奇主编.中药药理研究方法学.第1版.[M].北京:人民卫生出版社,2000,940-942.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修主编.药理实验方法学.第3版.[M].北京:人民卫生出版社,2002,529-531.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修主编.药理实验方法学.第3版.[M].北京:人民卫生出版社,2002,549-551.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修主编.药理实验方法学.第3版.[M].北京:人民卫生出版社,2002,413-415.
- [7] 陈奇主编.中药药理研究方法学.第1版.[M].北京:人民卫生出版社,2000,938.
- [8] 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.

收稿日期:2005-01-11