

女贞子多糖的抗衰老作用

张振明¹, 葛 斌^{1*}, 许爱霞¹, 蔡曦光²

(甘肃省人民医院 1. 药剂科, 2. 呼吸科, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 研究女贞子多糖(PFLL)是否有抗衰老作用。**方法** 昆明种小鼠 60 只, 随机分为正常对照组, 模型组, 维生素 E(Vit E) 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组, PFLL 100, 200 及 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组。小鼠颈背部 sc 5% D-半乳糖 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 7 周, 制备衰老模型; 正常对照组小鼠 sc 等量注射用水。同时按分组 ig 给予相应药物, 对照组和模型组 ig 等量溶剂(只含防腐剂泥泊金), 每日 1 次, 给药 7 周。分别用 TBA 比色法、亚硝酸盐法、DTNB 法及 Sohal 等方法测定心、肝、肾中丙二醛(MDA)含量, 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和脑中脂褐质(LF)含量。**结果** 衰老模型组小鼠胸腺指数和脾脏指数较正常对照组下降, 脑组织中 LF 升高, 心、肝、肾组织中 MDA 含量升高, SOD 及 GSH-Px 活力下降。与模型组比, PFLL 和 Vit E 抑制胸腺指数和脾脏指数下降, 其量效关系呈正相关; 对抗心、肝、肾组织中 MDA 升高及脑组织中 LF 升高, 其量效关系均呈负相关; 抑制心、肝、肾组织中 SOD 及 GSH-Px 活力下降, 其量效关系均呈正相关。**结论** PFLL 具有抗衰老作用, 其机制可能与其增强免疫功能, 清除氧自由基和活性氧, 提高机体抗氧化酶活力有关。

关键词: 女贞子多糖; 衰老; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 谷胱甘肽过氧化物酶

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2006)02-0108-04

女贞子(*Fructus ligustri lucidi*)系木犀科植物女贞的成熟果实, 女贞子多糖(polysaccharide from

Fructus ligustri lucidi)为其有效成分, 根据传统中医理论, 肝肾不足可导致人体衰老, 女贞子可防治因肝肾不足引起的头晕耳鸣, 双目昏糊, 腰膝酸软, 须发早白。现代研究表明, 女贞子多糖具有显著的免疫增强作用^[1], 而衰老与免疫功能减退及自由基水平密切相关^[2]。本研究拟对女贞子多糖的抗衰老作用及其机制进行探讨, 旨在寻求有效的抗衰老剂及自由基清除剂, 为延缓人体衰老及防治与自由基有关的疾病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂及动物

选浙江产冬季采摘的女贞子干燥果实药材, 由甘肃省人民医院药理基地药物实验室按文献[1, 3]方法制备女贞子多糖, 经甘肃省药检所鉴定, 其成分为鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖及岩藻糖等, 苯酚-硫酸法测定多糖含量, 其样品纯度为 87.6%。丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试盒, 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测试盒均为南京建成生物工程研究所产品。D-半乳糖为上海恒信化学试剂有限公司产品。三氯甲烷为天津市化学试剂六厂产品。甲醇为天津市科蜜欧化学试剂中心产品。实验用昆明种清洁级雌性小鼠, 7~8 周龄, 体重 18~22 g, 由兰州生物制品研究所提供(动物合格证编号: 2004-049)。

1.2 动物分组及给药^[4]

昆明种小鼠 60 只, 按完全随机设计法分为 6 组, 每组 10 只, 即正常对照组, 模型组, 维生素 E(vitamin E) 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组, 女贞子多糖 100, 200 及 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组。在小鼠颈背部 sc 5% D-半乳糖 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 共 7 周, 制备衰老模型; 正常对照组小鼠 sc 等量注射用水。同时按分组 ig 给予相应药物, 对照组和模型组 ig 等量溶剂(只含防腐剂泥泊金), 每日 1 次, 7 周后进行各项指标测定。

收稿日期: 2005-07-20 接受日期: 2005-11-09

基金项目: 甘肃省科学事业科研项目(QS041-C33-25)

作者简介: 张振明(1954-), 男, 医学学士, 副主任医师, 从事基础药理及临床药理研究。Tel: (0931)8281682。

*联系作者 E-mail: gjy0630@163.com Tel: (0931)8281345

1.3 小鼠胸腺指数和脾脏指数

小鼠处死前称重,处死后分别取出胸腺和脾脏,电子天平上称重,胸腺(或脾脏)指数 = 胸腺(或脾脏)重(mg)/小鼠体重(g)。

1.4 小鼠脑组织中脂褐质含量的测定

用 Sohal 等法^[5],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,激发波长 365 nm,发射波长 435 nm。

1.5 小鼠心、肝及肾组织中丙二醛含量测定

用 MDA 试剂盒检测,心、肝、肾组织用 Tris 缓冲液(pH 7.4, 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA-2Na, 10 mmol·L⁻¹ 蔗糖, 0.8% NaCl) 制备 10% 组织匀浆,取肝或肾匀浆 0.1 mL,按试剂盒操作法加入试剂,反应终体积为 4.2 mL。反应管振荡混匀,水浴中煮沸 40 min,3500 × g 离心 10 min,上清液于 532 nm 处测吸光度(A)值。考马斯亮蓝 G-250 染色法^[6]测组织蛋白含量。

1.6 小鼠心、肝及肾组织中超氧化物歧化酶活性的测定

SOD 活性表示为试剂盒对照管与样品管间亚硝酸盐含量的差值(ΔA)。亚硝酸盐量根据亚硝酸盐的标准曲线计算得出。本实验的标准曲线为: $Y = -4.70826 + 137.7962X$ ($r = 0.9998$)。

1.7 小鼠心、肝及肾组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定

用 GSH-Px 试剂盒检测,取 1% 组织匀浆及 1 mmol·L⁻¹ GSH 各 0.2 mL(对照管不含 GSH),37℃ 水浴中预温 5 min,按试剂盒操作法加入试剂,

37℃ 水浴中反应 5 min,3500 × 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 A 值,根据试剂盒提供的公式,将 GSH-Px 单位换算成 μmol·min⁻¹·g⁻¹ 蛋白。用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[6]测组织蛋白含量,取组织匀浆 60 μL,加 3 mL 染色液混匀,室温放置 15 min 后,于 595 nm 处测定 A 值,用标准曲线对应的回归方程 $Y = 104.5648X - 3.7525$ ($r = 0.9946$) 求算蛋白含量,蛋白含量(mg·L⁻¹) = Y/取样量。

1.8 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,t 检验分析组间实验数据显著性差异,受试药量-效相关显著性用相关性检验分析。

2 结果

2.1 女贞子多糖对衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数及脑组织中脂褐质含量的影响

小鼠连续 sc D-半乳糖 7 周后,胸腺指数和脾脏指数明显下降,而 ig 女贞子多糖能剂量依赖地抑制衰老模型小鼠胸腺指数、脾脏指数的下降和脑组织中脂褐质含量的升高。Vit E 组胸腺指数和脾脏指数与正常对照组接近(表 1)。

2.2 女贞子多糖对衰老模型小鼠心、肝和肾组织中丙二醛含量,超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响

D-半乳糖致衰老模型小鼠心、肝、肾组织中 MDA 含量明显升高,SOD 及 GSH-Px 活性均明显下降,女贞子多糖能剂量依赖地抑制心、肝、肾组织中 MDA 含量升高和 SOD 及 GSH-Px 活性下降(表 2)。

Tab 1. Effect of polysaccharide from *Fructus ligustri lucidi* (PFL) on thymus index, spleen index and lipofuscin content of brain in senile model mice caused by D-galactose(D-Gal)

Agent /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Thymus index /mg·g ⁻¹	Spleen index /mg·g ⁻¹	Lipofuscin (Fluorescence value)
Control	2.2 ± 0.2	4.5 ± 0.3	18.7 ± 1.7
D-Gal 1	1.8 ± 0.2 ^{**}	3.9 ± 0.2 ^{**}	22.3 ± 2.1 ^{**}
D-Gal 1 + Vit E 200	1.9 ± 0.2	4.0 ± 0.2	20.1 ± 2.0 [#]
D-Gal 1 + PFL 100	2.0 ± 0.2 [#]	4.1 ± 0.2 [*]	20.7 ± 1.9 [#]
200	2.2 ± 0.2 ^{##}	4.3 ± 0.2 ^{##}	18.9 ± 1.5 ^{##}
400	2.4 ± 0.2 ^{##}	4.6 ± 0.3 ^{##}	17.2 ± 1.5 ^{##}

D-galactose(sc) and vitamin E(Vit E) or PFL(ig) were given once a day for 7 weeks, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ^{**} $P < 0.01$, compared with control group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with D-galactose model group.

Tab 2. Effect of PFL on MDA content, SOD and GSH-Px activities in heart, liver and kidney of senile model caused by *D*-galactose

Agent /mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	MDA/μmol · g ⁻¹			SOD/μmol · min ⁻¹ · g ⁻¹			GSH-Px/μmol · min ⁻¹ · g ⁻¹		
	Heart	Liver	Kidney	Heart	Liver	Kidney	Heart	Liver	Kidney
Control	13.4 ± 1.0	7.6 ± 0.6	16.6 ± 1.3	3.93 ± 0.36	7.57 ± 0.28	5.60 ± 0.50	13.5 ± 1.4	65.7 ± 5.9	29.2 ± 1.3
<i>D</i> -Gal 1	16.9 ± 1.4 **	10.6 ± 0.9 **	20.5 ± 1.4 **	2.46 ± 0.25 **	4.63 ± 0.39 **	3.85 ± 0.31 **	9.0 ± 1.3 **	45.5 ± 4.3 **	21.9 ± 2.6 **
<i>D</i> -Gal 1 + Vit E 200	15.8 ± 1.3	9.6 ± 0.8 #	19.0 ± 1.7 #	2.78 ± 0.33 #	5.13 ± 0.61 #	4.24 ± 0.45	10.6 ± 1.2 #	49.5 ± 5.8 #	24.0 ± 2.8 #
<i>D</i> -Gal 1 + PFL 100	15.4 ± 1.2 #	9.6 ± 0.9 #	18.9 ± 1.3 #	2.77 ± 0.27 #	5.25 ± 0.53 #	4.17 ± 0.42 #	10.5 ± 1.1 #	51.5 ± 4.0 #	24.5 ± 2.5 #
200	14.0 ± 1.1 ##	8.7 ± 0.7 ##	17.6 ± 1.4 ##	3.20 ± 0.37 ##	6.36 ± 0.50 ##	4.76 ± 0.50 ##	12.1 ± 1.4 ##	59.2 ± 6.2 ##	26.9 ± 3.1 ##
400	13.0 ± 0.9 ##	7.5 ± 0.7 ##	16.4 ± 1.1 ##	3.89 ± 0.41 ##	7.24 ± 0.64 ##	5.69 ± 0.69 ##	14.9 ± 1.5 ##	64.8 ± 7.8 ##	30.2 ± 2.7 ##

See legend of Tab 1 for mice treatment. SOD; superoxide dismutase; MDA; malondialdehyde; GSH-Px; glutathione peroxidase. $\bar{x} \pm s, n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with *D*-galactose model group.

2.3 女贞子多糖对衰老小鼠各指标作用的药效关系

PFL 可显著抑制 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠胸腺指数和脾脏指数下降,其量效关系均呈正相关,相关系数分别为 0.990 (相关性检验 $P < 0.01$) 及 0.992 ($P < 0.01$);对抗脑组织中脂褐质含量上升,其量效关系呈负相关,相关系数为 -0.983 ($P < 0.01$);对抗心、肝、肾组织中 MDA 上升,其量效关系均呈负相关,相关系数分别为 -0.963 , -0.992 及 -0.971 ,相关性检验 P 值均小于 0.01;抑制心、肝、肾组织中 SOD 活力下降,其量效关系均呈正相关,相关系数分别为 0.995, 0.982 及 0.997,相关性检验 P 值均小于 0.01;可显著抑制心、肝、肾组织中 GSH-Px 活力下降,其量效关系均呈正相关,相关系数分别为 0.999, 0.973 及 0.994,相关性检验 P 值均小于 0.01。

3 讨论

我国传统中药具有医治百病的悠久历史,从滋肝补肾中药寻求抗衰老剂是发展新药的重要途径。本实验用 *D*-半乳糖制备衰老小鼠模型,发现了女贞子多糖的抗衰老作用及其机制。结果提示,女贞子多糖可显著抑制机体免疫器官退化及提高免疫功能,清除羟自由基,超氧阴离子自由基和活性氧,提高抗氧化酶活力,量效变化说明其作用呈剂量依赖性,这可能是女贞子防治肝肾不足所致衰老的中医理论依据。可见,女贞子多糖有抗衰老作用,其机制可能与提高免疫功能,清除氧自由基和活性氧,增强机体抗氧化酶活力有关。

业已证明,自由基可诱发炎症、免疫失调及恶性肿瘤等多种疾病^[7],也是导致肝、肾缺血性损伤及

心脑血管缺血-再灌注损伤的关键因素^[8]。结果提示,女贞子多糖是一种有效的抗衰老剂及自由基清除剂,可能对与衰老和自由基有关的疾病有防护作用。

4 参考文献:

- [1] Yu LG, Hao LM, Yang M. Abstracting and effect of polysaccharide from *Fructus ligustri lucidi* on immunity of mice [J]. *Chin Pharmaceut J* (中国药理学杂志), 1992, 27(1):26.
- [2] Ge B, Chen LD, Zhang ZM. Antioxidative activity of 4-sulfonate-2,2,6,6-tetramethylpiperidineoxyl in tissues and erythrocytes from rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15(1):47-50.
- [3] Chen Q, Yang GW, An LG. Isolation purification and analysis of polysaccharide from *Ginkgo biloba* seed [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2002, 37(5):331-333.
- [4] Xu QP, Wu JY. Effect of complex ginseng root on mice with subacute senile model caused by *D*-galactose [A]. In: Chen Q, eds. *Methodology of Study Pharmacology in Chinese Herbal Medicine* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Hygiene Press, 2000. 937-939.
- [5] Sohal RS, Donato H Jr. Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica* [J]. *J Gerontol*, 1979, 34(4):489-496.
- [6] Sun Y, Zhang HQ. The method to measure protein content [A]. In: Xu SY, Ka RJ, Chen X. *Pharmacology Experiment Methodology* (药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Hygiene Press, 2002. 1481-

- 1483.
- [7] Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. *Science*, 1987, **235**(4788):529-531.
- [8] Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend and

foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1984, **16**(11):969-985.

Antisenile effect of polysaccharides from *Fructus ligustri lucidi*

ZHANG Zhen-Ming¹, GE Bin^{1*}, XU Ai-Xia¹, CAI Xi-Guang²

(1. Department of Pharmaceutics, 2. Department of Respiration, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

Abstract: **AIM** To study if the polysaccharides from *Fructus ligustri lucidi* (PFL) possesses antisenile effect. **METHODS** Kunming mice were randomly divided into control, model, vitamin E (Vit E) 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹, PFL 100, 200 and 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ groups, 10 mice in each group. Mice were injected sc *D*-galactose 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 7 weeks to prepare senile model. At the same time, PFL 100, 200 and 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ or Vit E 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ were given ig for 7 weeks. Malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in heart, liver and kidney were measured by TBA colorimetric method, nitrite method and DTNB method, respectively, and lipofuscin (LF) content in brain was determined by Sohal method. **RESULTS** Compared with control, thymus index and spleen index significantly descended; LF content in brain significantly ascended; MDA content sig-

nificantly rose and SOD and GSH-Px activities significantly dropped in heart, liver and kidney of mice in model group. Compared with model, descending of thymus index, spleen index, SOD activity and GSH-Px activity was dose-dependently inhibited in PFL groups. Ascending of LF content in brain and MDA content in heart, liver and kidney. **CONCLUSION** PFL has the notable antisenile effect, its mechanism probably related to improving immunity, eliminate oxygen free radicals and active oxygen and strengthen activity of antioxidase.

Key words: polysaccharide, *Fructus ligustri lucidi*; aging; superoxide dismutase; malondialdehyde; glutathion peroxidase

Foundation item: The project supported by Gansu Province Science Program (QS041-C33-25)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)