

贡菊多糖对D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用

金声琅¹, 阙斐², 王莹³, 韦笑笑¹

(1. 黄山学院旅游学院, 安徽黄山 245021;

2. 浙江经贸职业技术学院应用工程系, 浙江杭州 310018;

3. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

摘要:目的:探讨贡菊多糖对D-半乳糖所致衰老小鼠的抗衰老的作用。方法:将小鼠随机分为5组:空白对照组,D-半乳糖衰老模型对照组(80mg/kg·d bw),贡菊多糖低、中、高剂量组(50、100、150mg/kg·d bw),考察血清和肝中SOD、GSH-Px、CAT、T-AOC和血清、肝及脑中的MDA等指标。结果:贡菊多糖能拮抗D-半乳糖所致的小鼠衰老,使小鼠血清及肝组织SOD、GSH-Px、CAT、T-AOC活性明显回升,血清、肝脏和脑组织中MDA的水平下降。结论:贡菊多糖具有延缓衰老的作用。

关键词:贡菊,多糖,D-半乳糖,衰老,抗氧化

Anti-aging effect of total polysaccharide from *Dendranthema morifolium* on aging mouse induced by D-galactose

JIN Sheng-lang¹, QUE Fei², WANG Ying³, WEI Xiao-xiao¹

(1. Tourism College, Huangshan University, Huangshan 245021, China;

2. Department of Applied Engineering, Zhejiang Economic and Trade Polytechnic, Hangzhou 310018, China;

3. School of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Objective: To study the anti-ageing effects of polysaccharide from *Dendranthema morifolium* on aging mice induced by D-galactose and explore the underlying mechanisms. Methods: Healthy female mice were randomly divided into 5 groups: control group, aging model group (80mg/kg·d bw), and low-, medium- and high-dose polysaccharide groups (50, 100, 150mg/kg·d bw). The mice were then sacrificed, and the serum, liver and brain tissue were collected. The concentration of malondialdehyde (MDA) in the blood, liver and brain tissue and the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), Catalase (CAT), total antioxidant activity (T-AOC) in the serum and liver were then measured. The polysaccharide from *Dendranthema morifolium* had antagonism effects on the mice aging induced by D-galactose, had evident rebound of activities of SOD, GSH-Px, CAT and T-AOC at all three doses in the blood and liver, and had a decrease of MDA in the serum, liver and brain tissue. Conclusion: The polysaccharide from *Dendranthema morifolium* had anti-aging effects on aging model mice.

Key words: *Dendranthema morifolium*; polysaccharide; D-galactose; aging; antioxidant

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)10-0349-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.10.065

贡菊 (*Dendranthema morifolium*), 菊科植物, 产于安徽省黄山市, 是国家质量监督检验检疫总局批准的实施原产地域保护的植物。贡菊多产于高海拔的山地, 是一种富含多糖成分的野生植物^[1]。作为一类生物大分子, 多糖在动植物和微生物细胞中较为多见, 其生物活性已经成为研究的热点^[2-6]。目前已有研究者开始了关于贡菊多糖提取分离、抗菌性以及

免疫活性等方面的研究^[7-8], 而关于贡菊多糖的抗衰老活性方面的研究尚未见报道。本研究从贡菊中提取多糖, 利用D-半乳糖建立衰老模型, 通过分析小鼠血清、肝脏及脑组织中丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、总抗氧化能力 (T-AOC) 活性的变化, 探讨贡菊多糖的抗衰老作用, 以期今后贡菊的

收稿日期: 2014-08-14

作者简介: 金声琅 (1980-), 男, 博士, 副教授, 主要从事农产品精深加工方面的研究。

基金项目: 2014年度安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (KJ2014A243); 2014年度安徽省哲学社会科学规划项目 (AHSKQ2014D59)。

精深加工提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

贡菊 产于黄山;清洁级雌性KM小鼠 50只,体重(25±2)g,购自上海斯莱克实验动物研究中心,合格证号SCXK(沪2014-0005);MDA、SOD、CAT、T-AOC、GSH-Px测定试剂盒 南京建成生物工程研究所;D-半乳糖 上海研域生物科技有限公司;考马斯亮蓝G-250 北京中生瑞泰科技公司;其余试剂 为国产分析纯,市售。

RE-52A旋转蒸发器 常州杰博森仪器有限公司;60-C3数显恒温水浴箱 上海将来实验设备有限公司;FW100中草药粉碎机 上海谱振生物科技有限公司;751-GW可见分光光度计 上海精密仪器仪表有限公司;T10高速组织匀浆机 广州市金晶穗达科学仪器有限公司;H2050R台式高速冷冻离心机 河南兄弟仪器设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖提取和纯化 将贡菊放置干燥箱中干燥,80℃,然后在粉碎机中粉碎,过100目筛。采用热水超声提取(80℃,料液比1:15g/mL,1h,3次),过滤后进行浓缩,选择4倍体积无水乙醇进行醇沉,过夜,第2d离心干燥(3000r/min,8min;60℃,真空烘干)即得贡菊粗多糖制品。选用石油醚多次冲洗贡菊粗多糖制品,溶解脱色后采用Sevage法除蛋白,将上层液浓缩,继续选用4倍体积无水乙醇进行醇沉,过夜,第2d离心干燥(3000r/min,8min;60℃,真空烘干)即得贡菊精多糖制品^[6]。应用硫酸-苯酚法进行检测,测的贡菊多糖的纯度为86.24%。用灭菌生理盐水将纯度为86.24%的贡菊多糖制成浓度分别为50、100、150mg/mL的溶液,过滤除菌后在5℃环境下备用。

1.2.2 动物分组及处理 参照《抗氧化功能评价方法》^[9](国家食品药品监督管理总局,2012)。随机将小鼠分成5组,每组10只,设为模型对照组、空白对照组、高多糖组、中多糖组和低多糖组。采用皮下注射的方式,除空白对照组以外,其他各组每日注射D-半乳糖80mg/kg·d bw;将空白对照组的小鼠每日注射相同剂量(80mg/kg·d bw)生理盐水;将贡菊多糖分别以50、100、150mg/kg·d bw的量灌胃,空白对照组及模型对照组组则灌胃等容积生理盐水。

1.2.3 检测样品的制备 实验第8周后,各组小鼠均禁食1d,并用乙醚进行麻醉。从小鼠眼眶采血,用柠檬酸钠抗凝,5℃,3000r/min离心15min分离血清,上清液-20℃保存以待检测。取小鼠的脑和肝脏以冰生理盐水洗去浮血,并用滤纸将水分吸干,称湿重,再加入生理盐水,放入研磨器内进行匀浆处理,分别制成10%脑匀浆和10%肝匀浆,5℃,2000r/min,离心10min,取上清液在-20℃下保存以待下一步检测^[10]。

1.2.4 生化指标测定 上述检测样品的MDA含量以及T-AOC、SOD、CAT、GSH-Px活性均按照试剂盒规定的方法,分别进行测定。

1.3 数据处理

采用SPSS 16.0软件进行处理,用随即设计的独

立样本 t 检验, $p<0.05$ 表示差异显著, $p<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 小鼠肝组织和血清中SOD活性的测定

由表1可知,小鼠给予D-半乳糖后,模型对照组小鼠肝组织和血清SOD活性均显著低于空白对照组,且差异极显著($p<0.01$),说明此次造模是成功的。从小鼠肝组织SOD活性对比可知,与模型对照组比较,中多糖组、高多糖组SOD活性显著提升,均具有统计学意义($p<0.05$ 或 $p<0.01$),但低多糖组对肝组织SOD活性无明显影响。从小鼠血清SOD活性对比可知,与模型对照组比较,各剂量的贡菊多糖组SOD活性均显著提高,高多糖组和中多糖组差异均为极显著($p<0.01$),低多糖组差异显著($p<0.05$),并且呈现出一定的量效关系。

表1 小鼠肝组织和血清SOD活性的测定结果

Table 1 The content of SOD in liver and serum in aging mice

组别	肝(U/mg prot)	血清(U/mL)
空白对照组	237.43±7.13	188.12±2.8
模型对照组	172.24±22.63 ^{▲▲}	121.64±6.74 ^{▲▲}
高多糖组	226.51±17.71 ^{**}	154.87±12.29 ^{**}
中多糖组	217.54±13.28 [*]	141.54±10.27 ^{**}
低多糖组	183.72±20.63	124.45±10.97 [*]

注:▲表示与空白对照组相比, $p<0.05$;▲▲表示与空白对照组相比, $p<0.01$;*表示与模型对照组相比, $p<0.05$;**表示与模型对照组相比, $p<0.01$;表2~表5同。

2.2 小鼠血清、脑和肝组织中MDA含量的测定

由表2可知,小鼠给予D-半乳糖后,模型对照组小鼠肝组织和血清MDA含量均显著高于空白对照组,且差异极显著($p<0.01$),说明此次造模是成功的。从小鼠血清、脑和肝组织MDA含量对比可知,贡菊多糖能拮抗D-半乳糖的作用,与模型对照组比较,各剂量多糖组MDA含量显著下降,均具有统计学意义($p<0.05$),其中小鼠血清中高多糖组中MDA含量差异极显著($p<0.01$),并且各组之间呈现出一定的量效关系。

表2 小鼠血清、脑、肝组织MDA含量的测定结果

Table 2 The content of MDA in serum, brain and liver in aging mice

组别	血清(nmol/mL)	脑(nmol/mg prot)	肝(nmol/mg prot)
空白对照组	11.52±1.24	1.77±0.28	2.24±0.56
模型对照组	17.62±1.48 ^{▲▲}	2.51±0.13 ^{▲▲}	3.81±0.42 ^{▲▲}
高多糖组	11.96±1.17 ^{**}	1.98±0.15 [*]	2.96±0.21 [*]
中多糖组	13.65±0.84 [*]	2.16±0.17 [*]	3.21±0.55 [*]
低多糖组	15.63±1.29 [*]	2.38±0.14 [*]	3.58±0.64 [*]

2.3 小鼠肝组织和血清中CAT活性的测定

由表3可知,小鼠给予D-半乳糖后,模型对照组中小鼠血清CAT活性均显著低于空白对照组,且差

异显著 ($p < 0.05$), 小鼠肝组织CAT活性显著低于空白对照组, 且差异极显著 ($p < 0.01$), 说明此次造模是成功的。从小鼠肝组织CAT活性对比可知, 与模型对照组比较, 中多糖组、高多糖组SOD活性显著提升, 均具有统计学意义 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 但低多糖组对肝组织CAT活性无明显影响。从小鼠血清CAT活性对比可知, 与模型对照组比较, 各剂量的贡菊多糖组CAT活性均显著提高, 高多糖组差异为极显著 ($p < 0.01$), 低多糖和中多糖组差异均为较为显著 ($p < 0.05$), 并且呈现出一定的量效关系。

表3 小鼠肝组织和血清CAT活性的测定结果

Table 3 The activities of CAT in liver and serum in aging mice

组别	肝 (U/mg Prot)	血清 (U/mL)
空白对照组	472.77±6.74	210.27±11.35
模型对照组	321.21±9.47 ^{▲▲}	151.81±7.08 [▲]
高多糖组	458.60±5.52 ^{**}	194.97±0.25 ^{**}
中多糖组	411.42±10.22 [*]	172.58±0.55 [*]
低多糖组	352.82±7.54	162.27±0.31 [*]

2.4 小鼠肝组织和血清中T-AOC活性的测定

由表4可知, 小鼠给予D-半乳糖后, 模型对照中小鼠肝组织T-AOC活性低于空白对照组, 且差异极显著 ($p < 0.01$), 鼠血清T-AOC活性低于空白对照组, 且差异显著 ($p < 0.05$), 说明此次造模是成功的。从小鼠肝组织T-AOC活性对比可知, 与模型对照组比较, 各剂量多糖组SOD活性显著提升, 均具有统计学意义 ($p < 0.05$), 并且呈现出一定的量效关系。从小鼠血清T-AOC活性对比可知, 与模型对照组比较, 各剂量的贡菊多糖组T-AOC活性均显著提高 ($p < 0.05$), 也呈现出一定的量效关系。

表4 小鼠肝组织和血清T-AOC活性的测定结果

Table 4 The activities of T-AOC in liver and serum in aging mice

组别	肝 (U/mg Prot)	血清 (U/mL)
空白对照组	5.51±0.23	7.28±1.09
模型对照组	3.18±0.78 ^{▲▲}	5.34±0.28 ^{▲▲}
高多糖组	5.26±0.26 [*]	7.01±0.24 [*]
中多糖组	4.97±0.32 [*]	6.52±0.33 [*]
低多糖组	4.12±0.57 [*]	5.87±0.26 [*]

2.5 小鼠肝组织和血清中GSH-Px活性的测定

表5 小鼠肝组织和血清GSH-Px活性的测定结果

Table 5 The activities of GSH-Px in liver and serum in aging mice

组别	肝 (nmol/mgprot)	血清 (nmol/mgprot)
空白对照组	324.28±25.81	522.93±32.10
模型对照组	178.41±36.58 ^{▲▲}	328.46±30.21 ^{▲▲}
高多糖组	304.43±10.49 ^{**}	492.49±23.18 [*]
中多糖组	267.87±26.31 [*]	398.23±31.07 [*]
低多糖组	217.64±22.48 [*]	346.52±19.28

由表5可知, 小鼠给予D-半乳糖后, 模型对照中小鼠肝组织和血清GSH-Px活性均显著低于空白对照组, 且差异极显著 ($p < 0.01$), 说明此次造模是成功的。从小鼠肝组织GSH-Px活性对比可知, 与模型对照组比较, 各剂量的贡菊多糖组GSH-Px活性显著提升, 且均具有统计学意义 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。从小鼠血清GSH-Px活性对比可知, 与模型对照组比较, 中多糖组和高多糖组GSH-Px活性均显著提高 ($p < 0.05$), 但低多糖组对小鼠血清GSH-Px活性无显著影响。

3 结论与讨论

D-半乳糖模型作为衰老模型, 目前被国内外学者普遍用在关于衰老机理方面的实验和分析^[10-12]。我国科学家首先发现了注射D-半乳糖可诱导啮齿类动物发生与自然衰老相似的变化^[13]。小鼠在一段时间内连续被注射大剂量D-半乳糖后, 机体内D-半乳糖浓度增高, D-半乳糖在小鼠体内醛糖还原酶的作用下被还原成半乳糖醇, 然后在羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶的作用下, 又被氧化成半乳糖醛和过氧化氢。在二价铁离子的影响之下, 过氧化氢跟小鼠体内超氧阴离子进一步反应生成了活性更强的羟自由基。小鼠体内过量的过氧化氢、羟自由基、超氧阴离子等自由基会使体内的SOD、CAT、T-AOC、GSH-PX等抗氧化物水平降低, 从而表现出衰老^[14-16]。

实验结果显示, 贡菊多糖50、100、150mg/kg·d bw剂量组均可使D-半乳糖诱导衰老小鼠血清和肝组织SOD、T-AOC、CAT、GSH-Px活性升高和血清、肝脏和脑组织的脂质过氧化物MDA水平下降, 从而实现其小鼠体内的抗氧化作用, 并且呈现一定的量效关系。这可能是因为贡菊多糖抑制了自由基的产生, 通过降解超氧阴离子和过氧化氢为无毒性的水和氧, 从而增加了体内抗氧化酶的活性, 也减轻了自由基对小鼠体内组织的损伤作用。本实验为深入探讨贡菊多糖抗衰老机理提供实验依据和理论基础, 对进一步综合利用和深加工贡菊具有一定的参考意义。

参考文献

- [1] 胡晓倩, 朱洋洋, 陈乐, 等. 新鲜黄山贡菊叶中挥发油的提取[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(3): 210-214.
- [2] 林志超, 余金富, 潘裕添. 香蕉皮多糖提取分离纯化及分子量测定[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 104-106.
- [3] 刘芳, 陈贵堂, 胡秋辉. 金针菇多糖分离纯化及其结构特征[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 1-7.
- [4] 李正鹏, 吴萍, 孙玉军, 等. 树舌胞外富锌多糖体外抗氧化活性研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(5): 890-893.
- [5] 郑义, 王卫东, 李勇, 等. 高良姜多糖提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 126-131.
- [6] 李姣, 王珂, 王瑞坡, 等. 芦笋多糖提取纯化工艺及其体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 65-69.
- [7] 徐洁昕, 方红霞, 楚文靖, 等. 黄山贡菊多糖的微波浸提工艺和抑菌效果研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(9): 280-283.
- [8] 于慧, 王锡昌, 奚印慈. 甜叶菊废弃物制得生物制剂的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 65-69.

(下转第355页)

量组均能显著延长小鼠力竭游泳时间($p < 0.01$),其中低剂量组作用最佳,高剂量组作用次之,皆显著高于中剂量组($p < 0.01$),这与张梅等^[11]研究的哈蟆油对小鼠负重游泳实验的影响结果近似。但低剂量组在血清尿素氮、血乳酸含量等方面并未表现出显著影响。查阅许多相关文献,很多都存在类似问题^[11, 18-19],猜测生化指标与运动指标无直接对应关系,那么,低剂量哈蟆油发酵乳通过什么途径发挥缓解体力疲劳作用,还有待于进一步研究。

血糖是中枢神经系统的主要能源,也是长时间运动时骨骼肌可动用的重要燃料。长时间高强度运动中肝糖原的储备量决定运动达到力竭的时间^[17]。本研究中小鼠经30d实验后,各剂量组肝糖原含量均为增加,但差异均无统计学意义($p > 0.05$),说明哈蟆油发酵乳未能增加小鼠肝糖原储备量。血清尿素氮是体内蛋白质代谢的终产物,在运动时,血清尿素氮可以评定运动负荷量的大小^[13]。本实验中,经过60min恢复,哈蟆油发酵乳低、中、高剂量组血清尿素氮水平均较空白组低,且高剂量组有显著性差异($p < 0.05$);说明哈蟆油发酵乳可以抑制血清尿素氮的生成或促进其的清除,促进疲劳小鼠的恢复。高强度运动时,机体产生大量乳酸,造成乳酸堆积,影响运动组织和器官的功能,进而导致疲劳产生^[13]。本实验结果显示,各剂量组哈蟆油发酵乳对小鼠游泳前与游泳10min血乳酸含量均无明显影响,但运动恢复后与运动后即刻比较,有不同程度的下降。说明哈蟆油发酵乳未减缓小鼠运动后机体乳酸堆积的程度,但加速了血乳酸的消除,其原因是通过增强乳酸脱氢酶活性而使乳酸得以消除,还是通过其他途径,还有待于进一步研究。

根据卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003年),负重游泳实验结果阳性,且血乳酸、血清尿素氮、肝糖原3项生化指标中任意2项指标阳性,即可判定该受试物具有缓解体力疲劳的作用。本实验负重游泳实验结果阳性,同时血乳酸、血清尿素氮2项生化指标也为阳性。据此,本文初步证明了实验室所研发的哈蟆油发酵乳具有缓解体力疲劳作用,为哈蟆油在缓解体力疲劳方面的保健产品开发提供了一些理论依据。

(上接第351页)

- [9] 中国食品药品监督管理局. 保健食品抗氧化功能评价方法[S]. 2012.
- [10] 倪爱威,崔桂友,陆广念,等. 马齿苋提取物对D-半乳糖致衰老的小鼠体内抗氧化效应[J]. 营养学报,2010,32(3):297-298.
- [11] 余强,聂少平,李文娟,等. 黑灵芝多糖对D-半乳糖致衰老小鼠的作用研究[J]. 食品科学,2009,30(17):305-307.
- [12] 闫倩,俞龙泉,陈野,等. 苹果甲醇溶出物对D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用机理研究[J]. 食品工业科技,2014,35(6):351-356.

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典2010版(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:239.
- [2] 肖炜,邓虹珠. 哈蟆油化学成分与药理研究概况[J]. 中药材,2002,25(9):681-683.
- [3] 王永生,张小兰. 哈蟆油质量控制方法[J]. 时珍国医国药,2008,19(3):768-769.
- [4] 李军训,罗学刚,高洁,等. 益生菌的分类、生理功能与有效性评价研究进展[J]. 中国农业科技导报,2010,12(6):49-55.
- [5] 秦顺义,黄克和,高建忠. 富硒益生菌对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响[J]. 营养学报,2006,28(5):423-426.
- [6] 王豪,郭本恒,王荫榆,等. 益生菌潜在的抗衰老作用[J]. 中国微生物学杂志,2009,21(4):374-379.
- [7] 孙静,马琳,吕斯琦,等. 中药发酵技术研究进展[J]. 药物评价研究,2011,34(1):49-52.
- [8] 杨志敏,黄鹂,杨小波,等. 亚健康人群的中医体质特点分析[J]. 广州中医药大学学报,2009,26(6):589-592.
- [9] 瞿新明,李芸彤,张惠,等. 哈蟆油非水溶性成分及其酶解物的抗氧化功效研究[J]. 食品科技,2012,37(10):211-213.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003:87-93.
- [11] 张梅,赵雨,杨士慧,等. 哈蟆油抗疲劳药理活性研究[J]. 现代预防医学,2012,39(8):1978-1979.
- [12] 姚嘉赞. 哈士蟆油及其复方抗疲劳作用的研究[D]. 西安:西北农林科技大学,2007.
- [13] 张颖捷,杜万红. 国内外抗疲劳研究进展[J]. 实用预防医学,2012,19(7):1112-1116.
- [14] 陈玉满,蔡德雷,陈江. 红景天抗疲劳作用研究[J]. 浙江预防医学,2006,18(4):12-13.
- [15] 陈成香,孙炜,张峰. 中草药对骨骼肌能量代谢的影响[J]. 中国临床康复,2006,10(27):128-130.
- [16] 李宁川,祝瑾,金其贯. 刺五加制剂抗疲劳的实验研究[J]. 安徽体育科技,2000,21(3):89-93.
- [17] 唐晖,汪保和,贺洪. 人参皂甙Rg1促进小鼠力竭游泳后体能恢复的作用[J]. 中国运动医学杂志,2002,21(4):375-377.
- [18] 张梅,赵雨,李芸彤,等. 哈蟆油非水溶性成分酶解物的抗疲劳作用[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(9):1891-1892.
- [19] 张梅,赵雨,李芸彤,等. 哈蟆油水溶性总蛋白抗疲劳活性的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(11):417-419.

- [13] 龚国清,徐麒本. 小鼠衰老模型研究[J]. 中国药科大学学报,1991,22(2):101-103.
- [14] 任旭,陈贵林. 唐古特白刺果实提取物抗氧化活性评价[J]. 食品科学,2011,32(3):95-97.
- [15] Kirakosyan A, Seymour e M, Noon K R, et al. Interactions of antioxidants isolated from tart cherry (*Prunus cerasus*) fruits[J]. Food Chemistry, 2010, 122(1):78-83.
- [16] Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts[J]. Food Chemistry, 2007, 104:21-29.