

管花肉苁蓉麦角甾苷对衰老小鼠端粒酶活性和免疫功能的影响

张洪泉*, 翁晓静, 陈莉莉, 李 心
(扬州大学医药研究所, 江苏 扬州 225001)

摘要:目的 观察管花肉苁蓉麦角甾苷(CTWA)对实验性衰老小鼠心、肝和脑组织中丙二醛(MDA)含量、端粒酶活性和免疫功能的影响。方法 小鼠 sc 10% D-半乳糖 10 mL·kg⁻¹, 每天1次, 连续8周, 建立亚急性衰老模型。给药组小鼠从造模第9周起, 分别 ig 给予 CTWA 10, 20 和 40 mg·kg⁻¹, 每天1次, 连续2周。硫代巴比妥酸比色法检测 MDA 含量; PCR-ELISA 法检测端粒酶活性; [³H]TdR 掺入法测定淋巴细胞增殖反应; 中性红实验测定小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能; 放射免疫法测定外周血白细胞介素 2(IL-2)含量。结果 模型组小鼠心、肝和脑 MDA 含量明显增加, 心和肝端粒酶活性明显降低, 淋巴细胞增殖反应、腹腔巨噬细胞吞噬功能和外周血 IL-2 含量均显著下降。给予 CTWA 2 周, 小鼠心、肝和脑 MDA 含量明显降低, CTWA 40 mg·kg⁻¹ 组小鼠心和脑组织端粒酶活性明显升高, 淋巴细胞增殖反应、腹腔巨噬细胞吞噬功能和外周血 IL-2 含量明显升高。结论 CTWA 能拮抗自由基损伤, 增强衰老小鼠心和脑组织端粒酶活性和机体免疫功能, 这些可能与 CTWA 的抗衰老作用有关。

关键词:管花肉苁蓉; 衰老; 丙二醛; 端粒, 末端转移酶; 免疫

中图分类号: R979.5, R285

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)04-0270-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.04.005

管花肉苁蓉 [*Cistanche tubulosa* (Scheuk) Whight] 归入列当科植物肉苁蓉属, 以干燥带鳞片的肉质茎为正品入药, 是常用的补肾壮阳中药, 具有补肾益精、润燥的功能, 在历代抗老延年古方中出现

的频率仅次于人参。现代医学研究表明, 管花肉苁蓉具有一定的抗衰老作用, 其总提取物在延长实验动物寿命、增强机体免疫功能和降低体内褐脂质堆积等方面显示出一定的活性^[1]。为了深入探讨管花肉苁蓉抗衰老的活性成分及其作用机制, 本研究制备衰老小鼠模型观察管花肉苁蓉麦角甾苷 [*Cistanche tubulosa* (Scheuk) Whight acteoside, CTWA] 延缓小鼠衰老的作用。

1 材料与方 法

1.1 动物、药物、试剂及仪器

3月龄 ICR 小鼠, 清洁级, 26~32 g, 雌雄各半, 由扬州大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号: SCXK(苏)2002-0009。室温 18~26℃, 自然照明, 实验前适应环境饲养 1 周。CTWA(纯度 > 99.7%, 批号 20060205, 蒸馏水溶解), 和田帝辰沙生药物开发有限公司; D-半乳糖(D-galactose, D-Gal), 上海试剂二厂; 端粒酶活性检测试剂盒, 美国 BPB 公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒和小鼠白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2) ELISA 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。722 型分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; PT-MR3100D 组织匀浆机, 瑞士 Polytron 公司; ELX800UV 酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; 台式低温高速离心机, 德国 Hettich 公司; BP110S 电子天秤, 德国 Sartorius 公司; THZ-95 恒温振荡仪, 太仓医疗器械厂; HHW 21-600A 电热恒温水浴箱, 黄石市恒丰医疗器械有限公司。

1.2 亚急性衰老小鼠模型的制备及给药

按文献[2]方法制备衰老小鼠模型。注射用水配制 10% D-Gal, 小鼠颈背部皮下注射 10 mL·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 8 周。小鼠随机分为 5 组: 正常对照组、模型对照组、CTWA 10, 20 和 40 mg·kg⁻¹ 组, 每组 8 只。模型组和 CTWA 给药组小鼠依法造模, 从第 9 周起, 分别灌胃给予 CTWA 0, 10, 20 和 40 mg·

收稿日期: 2007-09-12 接受日期: 2008-01-03

作者简介: 张洪泉, 博士生导师, 主要研究方向为抗衰老及免疫药理学。

* 联系作者 E-mail: hqzhangyz@126.com Tel: (0514)87978821

kg⁻¹, 容量为 20 mL·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 2 周。正常对照组小鼠相应注射等体积的注射用水和灌胃给予等体积的生理盐水。

1.3 MDA 含量和端粒酶活性的测定

给药 8 周后摘眼球取血, 处死小鼠, 快速摘取心、肝和脑, 在低温条件下进行新鲜组织匀浆, 离心, 取上清。硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量。PCR-ELISA 法检测端粒酶活性, 操作步骤按试剂盒说明书进行, 酶标仪 450 nm 处测定吸光度($A_{450\text{ nm}}$)值。

1.4 淋巴细胞增殖反应测定

小鼠脾脏细胞悬液, 调细胞密度为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) 作为刺激原在体外培养 5 d 后, [³H]TdR 掺入法测定细胞增殖反应。结果以刺激指数 (stimulation index, SI) 表示 (SI = 实验组 cpm 值/对照组 cpm 值)。

1.5 中性红法测定腹腔巨噬细胞吞噬功能

无菌收集小鼠腹腔液, 4℃ 离心, $250 \times g$, 10 min, Hanks 液洗涤细胞 3 次, 1640 培养液制备细胞悬液。取 3 mL 置培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 培养 2 h, 巨噬细胞黏附于容器表面, 用 4℃ Hanks 液吹吸, 收集黏附细胞, 血球计数板计数并调整细胞密度为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 置 37℃ 培养箱培养 2 h 后, 弃上清和非贴壁细胞。取贴壁巨噬细胞, 加 0.1% 中性红生理盐水, 37℃ 继续培养 30 min, 弃中性红, 用 37℃ PBS 反复冲洗巨噬细胞, 用 50% 乙酸和 50% 乙醇稀释后, 用 722 型分光光度计测 $A_{540\text{ nm}}$ 值。

1.6 放射免疫法测定外周血 IL-2 含量

小鼠眼球取血于试管中, 待凝固后分离血清, 按照试剂盒说明书操作, 在计数器上测定 cpm 值。

1.7 统计学分析

实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 采用 SPSS 11.0 版软件进行单因素方差分析和组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 CTWA 对衰老小鼠心、脑和肝 MDA 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠心、肝和脑的 MDA 含量明显增加。灌胃给予 CTWA 10 ~ 40 mg·kg⁻¹ 2 周, 小鼠心、脑和肝 MDA 含量较模型组呈剂量依赖性降低, 高剂量组 MDA 含量接近正常水平 (表 1)。

2.2 CTWA 对衰老小鼠心、脑和肝组织端粒酶活性的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠心、肝和脑组织的端粒酶活性明显降低。灌胃给予 CTWA 10 ~ 40 mg·kg⁻¹ 2 周, 能剂量依赖性升高心脏组织中端粒酶活性, 高剂量组接近正常对照组水平。CTWA 10 ~ 40 mg·kg⁻¹ 对衰老小鼠肝脏组织端粒酶活性无明显影响; 而 40 mg·kg⁻¹ 使衰老小鼠脑组织端粒酶活性明显升高, 甚至超过正常组水平 (表 2)。

2.3 CTWA 对衰老小鼠淋巴细胞增殖反应、腹腔巨噬细胞吞噬功能和外周血 IL-2 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠淋巴细胞增殖反应、腹腔巨噬细胞吞噬功能和外周血 IL-2 含量均显著下降。灌胃给予 CTWA 10 ~ 40 mg·kg⁻¹ 2 周, 高剂量组小鼠的淋巴细胞增殖反应、腹腔巨噬细胞吞噬功能和外周血 IL-2 含量显著升高 (表 3)。

Tab 1. Effect of *Cistanche tubulosa* (Scheuk) Whight acteoside (CTWA) on malondialdehyde (MDA) content in heart, liver and brain of aging mice induced by *D*-galactose (*D*-Gal)

Group	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ wet weight		
	Heart	Liver	Brain
Normal	106 ± 9	101 ± 5	100 ± 5
<i>D</i> -Gal	308 ± 19**	262 ± 13**	306 ± 15**
<i>D</i> -Gal + CTWA 10	215 ± 8***	192 ± 10***	228 ± 13***
<i>D</i> -Gal + CTWA 20	152 ± 5***	141 ± 7***	153 ± 8***
<i>D</i> -Gal + CTWA 40	115 ± 7##	101 ± 7##	99 ± 9##

Mice were given sc 10% *D*-Gal 10 mL·kg⁻¹, once daily for 8 weeks to establish model of aging mice. CTWA 10, 20 and 40 mg·kg⁻¹ were given ig, respectively, from the ninth week once daily for 2 weeks. Mice in normal control group were given sc and ig corresponding volume of distilled water and normal saline. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. ** $P < 0.01$, compared with normal group; ## $P < 0.01$, compared with *D*-Gal model group.

Tab 2. Effect of CTWA on telomerase activity in heart, liver and brain of aging mice induced by D-galactose

Group	Telomerase activity ($A_{450\text{ nm}}$)		
	Heart	Liver	Brain
Normal	54 ± 10	23 ± 6	94 ± 27
D-Gal	28 ± 9 ^{**}	9 ± 4 ^{**}	71 ± 14 ^{**}
D-Gal + CTWA 10	31 ± 14 ^{**}	9 ± 5 ^{**}	95 ± 19
D-Gal + CTWA 20	37 ± 11 ^{**#}	12 ± 6 ^{**}	96 ± 26
D-Gal + CTWA 40	43 ± 11 ^{##}	13 ± 7 ^{**}	142 ± 26 ^{**##}

See legend of Tab 1 for mouse treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. ^{**} $P < 0.01$, compared with normal group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with D-Gal model group.

Tab 3. Effect of CTWA on lymphocyte proliferation, phagocytosis of peritoneal macrophages and peripheral blood interleukin-2 (IL-2) content of aging mice induced by D-galactose

Group	Lymphocyte proliferation (Stimulation index)	Phagocytosis of peritoneal macrophages ($A_{540\text{ nm}}$)	IL-2 content / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
Normal	72 ± 17	0.142 ± 0.032	10.8 ± 2.1
D-Gal	54 ± 12 [*]	0.087 ± 0.013 ^{**}	6.8 ± 1.5 ^{**}
D-Gal + CTWA 10	60 ± 14	0.098 ± 0.019 ^{**}	7.2 ± 1.7 ^{**}
D-Gal + CTWA 20	65 ± 15	0.127 ± 0.020 ^{##}	8.2 ± 1.9 [*]
D-Gal + CTWA 40	70 ± 17 [#]	0.140 ± 0.027 ^{##}	10.0 ± 1.6 [#]

See legend of Tab 1 for mouse treatments. Lymphocyte proliferation was measured by [³H]TdR incorporation method, and expressed as stimulation index. Phagocytosis of peritoneal macrophages was tested by neutral red test. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with normal group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with D-Gal model group.

3 讨论

衰老是生命过程中正常而又复杂的生理现象,是机体内各种生化反应的综合过程。医学界对衰老机制及抗衰老的研究日益增多,专家们从不同的方面来阐述衰老的机制,如①遗传基因学说:人的正常体细胞分裂次数达到最大限度(Hayflick's limit)时,染色体端粒长度缩短到一定程度,有丝分裂便不可逆地被阻断在细胞周期的G₁期和G₂/M期之间的某个时期,这时的细胞便进入了老化期,随后死亡^[3]。人类端粒长度大约2~15 kb,由于存在末端复制问题,DNA每复制1次,端粒DNA就会丢失50~200 bp,随着细胞分裂次数的增加,端粒DNA进行性地缩短,缩短到一定限度后,便不能维持染色体的稳定,细胞便失去了分裂增殖能力而衰老死亡^[4],这种缩短就是衰老的标志。因此,端粒也被称为细胞的“生命钟”,细胞的衰老决定着整个机体的衰老^[5]。②自由基学说:随着机体的增龄变化,其代谢过程必然会产生一些自由基,这些自由基与

体内某些成分(蛋白质、脂肪)发生反应,对机体造成损害,从而引起衰老^[6]。③免疫学说:现代研究表明,与自身免疫有关的某些疾病都随增龄而增加,自身抗体的发生率也随增龄上升^[7]。此外,免疫组织和免疫器官的功能状态与衰老的发生与发展密切相关,老年人的各种特异性抗体都较年轻人少,机体免疫功能的失调,可以诱发严重的疾病,加剧细胞、组织和器官的衰老过程^[8]。

本研究结果显示,CTWA能明显减少心、脑和肝组织中MDA含量,表明其在拮抗自由基损伤方面具有良好作用。CTWA 40 mg·kg⁻¹能提高D-Gal衰老模型小鼠心、脑组织端粒酶活性,从而达到延缓衰老的作用。在免疫功能方面,CTWA 40 mg·kg⁻¹能提高衰老模型小鼠淋巴细胞增殖反应、腹腔巨噬细胞吞噬功能和外周血IL-2含量。由此推断,CTWA可以促进淋巴细胞增殖,提高机体非特异性细胞免疫和免疫调节功能,通过提高T淋巴细胞产生IL-2、增强老年小鼠免疫功能而达到延缓免疫老化的作用。

4 参考文献:

- [1] Liu J. The research development of *Cistanche* on anti-aging[J]. *Inf Tradit Chin Med*(中医药信息), 2005, 22(2):20-21.
- [2] Xu SY, Bian RL, Chen X. *Methodology of Pharmacological Experiments* (药理实验方法学)[M]//3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 1465-1466.
- [3] Hong Y, Quintero M, Frakich NM, Trivier E, Erusalimsky JD. Evidence against the involvement of nitric oxide in the modulation of telomerase activity or replicative capacity of human endothelial cells[J]. *Exp Gerontol*, 2007, 42(9):904-910.
- [4] Haussmann MF, Winkler DW, Huntington CE, Nisbet IC, Vleck CM. Telomerase activity is maintained throughout the lifespan of long-lived birds [J]. *Exp Gerontol*, 2007, 42(7):610-618.
- [5] Hornsby PJ. Telomerase and the aging process[J]. *Exp Gerontol*, 2007, 42(7):575-581.
- [6] Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1067:10-21.
- [7] Marzetti E, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(2):160-168.
- [8] Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nyström T. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis [J]. *Science*, 2003, 299(5613):1751-1753.

Effect of *Cistanche tubulosa* (Scheuk) Whight acteoside on telomerase activity and immunity of aging mice

ZHANG Hong-Quan*, WENG Xiao-Jing, CHEN Li-Li, LI Xin
(Medical and Pharmaceutical Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: **AIM** To study the effect of *Cistanche tubulosa* (Scheuk) Whight acteoside (CTWA) on malondialdehyde (MDA) content, telomerase activity in heart, liver and brain tissues and immune function of experimentally aging model mice. **METHODS** Mice were given sc 10% *D*-galactose 10 mL · kg⁻¹, once daily for 8 weeks to establish model of aging mice. CTWA 10, 20 and 40 mg · kg⁻¹ were given ig, respectively, from the ninth week once daily for 2 weeks. The MDA content and telomerase activity were measured with thiobarbituric acid colorimetric method and PCR-ELISA, respectively. The lymphocyte proliferation was measured by [³H]TdR incorporation test. Phagocytosis of peritoneal macrophages was tested by neutral red test. The interleukin-2 (IL-2) content in peripheral blood was measured by radioimmunoassay. **RESULTS** In model group, MDA content was significantly increased in heart, liver and brain, telomerase activity was significantly

decreased in heart and liver, and lymphocyte proliferation, phagocytosis of peritoneal macrophages and blood IL-2 content were obviously decreased. After treatment with CTWA for 2 weeks, MDA content in heart, liver and brain was significantly decreased. In CTWA 40 mg · kg⁻¹ group telomerase activity in heart and brain was significantly increased, lymphocyte proliferation, phagocytosis of peritoneal macrophages and peripheral blood IL-2 content obviously enhanced. **CONCLUSION** CTWA may delay aging, which may be related to antagonizing free radical injury and enhancing immunity of aging mice.

Key words: *Cistanche tubulosa* (Scheuk) Whight; aging; malondialdehyde; telomerase; immunity

* Corresponding author.