

枸杞多肽对 *D*-半乳糖诱导小鼠的抗衰老作用及其可能机制

蒋万志, 张洪泉

[摘要] 目的 研究枸杞多肽对 *D*-半乳糖 (*D*-gal) 衰老模型小鼠的影响及其可能作用机制。方法 ICR 小鼠 60 只, 随机分为正常对照组、衰老模型组、枸杞多肽 200, 400, 800 mg/(kg·d) 剂量组和 100 mg/(kg·d) 维生素 E (VitE) 组。除正常组外均采用 *D*-gal 10 mg/kg 颈背部皮下注射, 每日 1 次, 连续注射 5 周, 同时枸杞多肽和 VitE 组按 20 ml/(kg·d) 灌胃给药。观察各组小鼠的行为学及学习记忆改变, 并于 5 周后检测小鼠血清、心脏、肝脏、脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 含量及端粒酶活性。结果 与正常对照组相比, 衰老模型组小鼠体重增加明显减少, 小鼠跳台错误次数明显增多, 小鼠血清、心脏、肝脏和脑 SOD 和端粒酶活性降低, MDA 含量增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 枸杞多肽组和 VitE 组小鼠体重增加升高 ($P < 0.01$), 小鼠跳台错误次数减少 ($P < 0.05$), 小鼠血清、心脏、肝脏和脑组织 SOD 活性升高, MDA 含量减少 ($P < 0.05$); 枸杞多肽 200 mg/(kg·d) 剂量组及 VitE 组小鼠血清端粒酶活性有升高的趋势, 但差异不显著; 400 和 800 mg/(kg·d) 剂量组小鼠血清和心脏端粒酶活性升高 ($P < 0.01$), VitE 组小鼠心脏端粒酶活性也明显升高; 而各治疗组小鼠肝脏和脑组织端粒酶活性无明显变化。结论 枸杞多肽对 *D*-gal 诱导衰老模型小鼠有抗衰老作用, 其机制可能与提高小鼠血清、心脏、肝脏和脑组织 SOD 活性, 减少 MDA 含量, 以及提高血清和心脏端粒酶活性有关。

[关键词] 枸杞多肽; *D*-半乳糖; 衰老模型, 小鼠; 体重; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 端粒酶

[中图分类号] R285.5; R964 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-0440(2010)01-0047-04

Anti-aging effect of polypeptides from Fructus Lycii on *D*-gal induced aging model mice and the possible mechanism

JIANG Wan-zhi, ZHANG Hong-quan

(Department of Pharmacology, Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

[Abstract] **Objective** To study the anti-aging effect of polypeptides from Fructus Lycii (PFL) on *D*-galactose (*D*-gal) induced aging model mice and the possible mechanism. **Methods** Sixty ICR mice were randomly divided into normal control group, *D*-gal induced model group, PFL 200, 400 and 800 mg/(kg·d) groups and vitamin E (VitE) 100 mg/(kg·d) group. *D*-gal aging mouse model was established by cervicodorsal region subcutaneous injection with *D*-gal (10 mg/kg) once a day for five successive weeks. In the meantime, drugs were given by intragastric administration respectively in PFL and Vit E treatment groups. The effect of PFL on learning and memory ability of mice was observed. After 5 weeks, the superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) content and telomerase activity in serum, heart, liver and brain tissues of mice were measured. **Results** Compared with normal control group, for aging model mice, the weight increasement declined, the number of errors in step-down test increased, the SOD and telomerase activities in serum heart, liver and brain tissues dropped, and the MDA content was raised, $P < 0.01$. Compared with model group, for the mice in PFL and VitE treatment groups, the weight increasement rised ($P < 0.01$), the error number in step-down test decreased ($P < 0.05$), the SOD activity in serum, heart, liver and brain tissues enhanced, and the MDA content reduced ($P < 0.01$). The telomerase activity in serum and heart of 400, 800 mg/(kg·d) PFL and VitE treatment groups also increased significantly than model group, while that in liver and brain did not change. **Conclusion** PFL have anti-aging effect on *D*-gal induced aging mice, and the action mechanism is related to the increasement of SOD activity, the decreasement of MDA content in serum, heart, liver and brain of *D*-gal aging mice, and the increasement of telomerase activity in serum and heart.

[Key words] polypeptides from Fructus Lycii (PFL); *D*-galactose; aging model, mice; weight; superoxide dismutase; malondialdehyde; telomerase

中药枸杞子始载于《神农本草经》, 历版《中国药典》均有记载。现代药理学研究表明, 枸杞子具

有提高机体免疫功能、抗氧化、抗衰老、保肝、增加白细胞等作用, 被列为重要的滋补性药物^[1-3]。枸杞多肽是其主要的有效生物活性成分之一, 但以往的实验多集中于研究枸杞多糖, 对枸杞多肽的药理学研究少有报道。本研究从衰老的氧化损伤学说和端粒学说入手, 采用 *D*-半乳糖衰老小鼠模型^[4], 以抗

作者简介: 蒋万志, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学

作者单位: 225001 扬州, 扬州大学医学院药理教研室 (蒋万志, 张洪泉)

通讯作者: 张洪泉, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药药理学,

Tel: 0514-87978877, E-mail: hqzhang@126.com

氧化剂维生素 E (VitE)^[5] 作为对照,通过观察枸杞多肽对小鼠行为学及学习记忆的影响研究其抗衰老作用,并通过测定枸杞多肽对小鼠血清、心脏、肝脏、脑组织超氧化物歧化酶(SOD)和端粒酶活性以及对丙二醛(MDA)含量的影响,初步探讨其抗氧化、抗衰老作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

3月龄 ICR 小鼠,清洁级,雌雄各半,体重 26~32 g,由扬州大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(苏)2006-0009。实验室温度 18~26℃,自然照明,实验前适应性饲养 1 周。

1.2 药品和试剂

枸杞多肽由西安冠羽生物技术有限公司提供,纯度 > 90%。*D*-半乳糖(上海试剂二厂,批号 981013),VitE(东海制药厂,批号 20090102),端粒酶活性检测试剂盒(美国 BPB 公司,批号 lot706215),考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(批号 20080211)、SOD(批号 20080810)、MDA(批号 20081208)检测试剂盒均由南京建成生物研究所提供,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物分组与处理

小鼠随机分为 6 组:正常对照组、衰老模型组、枸杞多肽 200、400、800 mg/(kg·d) 剂量组、100 mg/(kg·d) VitE 组,每组 10 只。除正常对照组外,其他各组按文献[6]方法造模。将 *D*-gal 溶于注射用水,体积分数 10%,注射剂量为 10 ml/kg,颈背部皮下注射,每日 1 次,连续 5 周,正常对照组注射同体积的注射用水。在造模的同时,枸杞多肽和 VitE 组按 20 ml/kg,每日 1 次,灌胃给药,正常组和模型组给同体积的 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液。5 周后,摘眼球取血处死小鼠,分离血清,快速摘取心脏、肝脏和脑组织,在低温条件下进行新鲜组织匀浆、离心,取上清检测。

1.4 小鼠一般行为学观察

实验期间每天观察小鼠一般行为改变,包括进食、活动、毛色改变等情况,每 5 天称小鼠体重,观察各组小鼠体重变化情况。

1.5 小鼠跳台实验

给药后 30 d 各组小鼠分别进行跳台实验。实验开始前将动物置于实验室适应环境 1 h,实验开始时,将动物放在跳台装置的安全台上,适应环境 3 min,然后通以 36 V 电压,动物跳至铜栅时即受到电击,为错误反应,其正确反应是跳回安全台。如此

训练 5 min,记录错误次数为学习成绩。24 h 后重复测验,测验时先将跳台装置通以 36 V 电流,然后将动物放在安全台上,记录 3 min 内的错误次数及潜伏期(从安全台第 1 次跳下的时间)为记忆成绩。

1.6 SOD 和端粒酶活性测定及 MDA 含量测定

小鼠心脏、肝脏和脑组织用滤纸拭干后,精密称重并尽快剪碎,与冷生理盐水按体积比 1:9 混合,用匀浆器打匀 3~5 次,每次 10 s,之后以 800 × *g* 离心 10 min,分离出上清液即得 10% 的组织匀浆,按照试剂盒说明书方法测定 MDA 含量(硫代巴比妥酸法)。将 10% 组织匀浆稀释 10 倍后按照试剂盒说明书方法分别测定 SOD 活性(黄嘌呤氧化酶法)和蛋白含量(考马斯亮蓝显色法)。采用 PCR-ELISA 法^[7]测定端粒酶活性。操作步骤按试剂盒说明书进行,于酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度(*A*)值。

1.7 统计方法

实验结果采用 SPSS11.0 版本软件进行统计分析。两组间均数比较采用 *t* 检验;多组间均数比较采用单因素方差分析,多组间均数两两比较采用 *Q* 检验。

2 结果

2.1 枸杞多肽对小鼠一般行为学指标的影响

造模前各组动物反应良好,毛发光滑,饮食正常,行动敏捷。与正常对照组相比,造模后 2 周起模型组小鼠进食减少,体重减轻,活动减少,行动缓慢,反应迟钝,嗜睡,毛发干枯发黄缺乏光泽,尾部出现色素斑点沉着并逐渐加重。枸杞多肽各剂量组和 VitE 组异常改变均不同程度得到缓解。

2.2 枸杞多肽对小鼠体重的影响

实验期间,模型组小鼠体重增加较正常组明显降低,枸杞多肽各剂量组和 VitE 组体重增加均大于模型组。体重变化差异在给药后 2 周出现并逐渐扩大,与模型组 5 周后体重变化相比差异显著(表 1)。

2.3 枸杞多肽对小鼠学习记忆能力的影响

与模型组比较,枸杞多肽能够明显减少小鼠 5 min 内受电击次数。24 h 重复实验,枸杞多肽能够明显延长小鼠第 1 次跳下平台潜伏期,缩短小鼠的逃避潜伏期,降低急性衰老小鼠 3 min 内错误次数。提示枸杞多肽能抵御 *D*-半乳糖对小鼠学习记忆功能的损伤作用(表 2)。

2.4 枸杞多肽对小鼠血清、心脏、肝脏、脑组织 SOD 活性影响

如表 3 所示,与正常对照组比较,模型组小鼠心脏、肝脏和脑组织 SOD 活性降低;与模型组相比,枸

表1 枸杞多肽对D-gal诱导衰老小鼠体重的影响

Tab 1. Effect of polypeptides from Fructus Lycii (PFL) on weight of aging mice induced by D-gal

分组	剂量 (mg/kg)	5周后体重变化(g)
正常对照组	-	5.8 ± 1.13
模型组	-	0.6 ± 1.26 ^{△△}
VitE组	100	4.8 ± 1.13 ^{**}
PFL组	800	4.5 ± 1.35 ^{**}
	400	3.0 ± 2.05 ^{**◇◇}
	200	2.6 ± 1.96 ^{**◇◇}

^{△△}P < 0.01, 与正常对照组比较; ^{**}P < 0.01, 与衰老模型组比较; ^{◇◇}P < 0.01, 与 VitE 组比较. $\bar{x} \pm s, n = 10$.

杞多肽和 VitE 组小鼠 SOD 活性均有明显提高。

2.5 枸杞多肽对小鼠血清、心脏、脑、肝脏 MDA 含量的影响

与正常组比较,模型组小鼠心脏、脑、肝脏 MDA 含量增加;与模型组比较,枸杞多肽和 VitE 组小鼠血清、心脏、脑、肝脏 MDA 含量减少(表4)。

2.6 枸杞多肽对小鼠心脏、肝脏、脑组织端粒酶活性的影响

如表5所示,枸杞多肽和 VitE 均能升高 D-半乳糖衰老模型小鼠血清、心脏和肝脏中的端粒酶活性,但在脑组织中,仅枸杞多肽高剂量组小鼠的端粒酶活性变化较模型组有差异(P < 0.05),其余均无明显变化。

表2 枸杞多肽对D-gal诱导衰老小鼠跳台实验结果的影响

Tab 2. Effect of PFL on jumping board of aging mice induced by D-gal

分组	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (min)	错误次数	24 h 后潜伏期	24 h 后错误次数
正常对照组	-	2.33 ± 1.17	2.13 ± 0.83	215.25 ± 69.88	0.88 ± 0.64
模型组	-	3.00 ± 1.54	4.43 ± 1.51 [△]	197.5 ± 90.84	2.19 ± 0.81 [△]
VitE组	100	3.30 ± 1.17	2.25 ± 1.28 [*]	152.30 ± 15.30	2.00 ± 0.52
PFL组	800	2.99 ± 0.94	2.93 ± 1.33 [*]	159.00 ± 60.73	2.08 ± 1.09
	400	2.97 ± 0.85	2.56 ± 1.77 [*]	175.36 ± 16.33	2.06 ± 0.13
	200	3.01 ± 0.82	2.61 ± 1.08 [*]	170.56 ± 15.42	1.88 ± 1.13

[△]P < 0.05, 与正常对照组比较; ^{*}P < 0.05, 与衰老模型组比较. $\bar{x} \pm s, n = 10$.

表3 枸杞多肽对D-gal诱导衰老小鼠血清、心脏、肝脏和脑组织SOD活性的影响

Tab 3. Effect of PFL on SOD activity in serum, heart, liver and brain of aging mice induced by D-gal

分组	剂量 (mg/kg)	血清 (nU/ml)	心脏 (nU/mg)	肝脏 (nU/mg)	脑 (nU/mg)
正常对照组	-	185.94 ± 5.71	66.21 ± 2.22	190.32 ± 5.30	53.45 ± 4.53
模型组	-	112.51 ± 6.36 ^{△△}	35.30 ± 3.50 ^{△△}	165.30 ± 3.30 ^{△△}	41.38 ± 3.34 ^{△△}
VitE组	100	177.06 ± 6.88 ^{**}	64.10 ± 3.13 ^{**}	185.20 ± 15.30 ^{**}	50.12 ± 6.52 ^{**}
PFL组	800	187.94 ± 15.32 ^{**}	62.18 ± 10.38 ^{**}	180.12 ± 10.73 ^{**}	51.20 ± 6.98 ^{**}
	400	173.52 ± 5.34 ^{**}	61.35 ± 16.77 [*]	175.36 ± 6.33 ^{**◇◇}	46.23 ± 9.12 ^{**◇◇}
	200	157.67 ± 10.82 ^{**}	60.36 ± 4.86 [*]	170.56 ± 15.42 ^{*◇◇}	42.36 ± 8.56 ^{*◇◇}

^{△△}P < 0.01, 与正常对照组比较; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, 与衰老模型组比较; ^{◇◇}P < 0.05, ^{◇◇◇}P < 0.01, 与 VitE 组比较. $\bar{x} \pm s, n = 10$

表4 枸杞多肽对D-gal诱导衰老小鼠血清、心脏、肝脏和脑组织MDA含量的影响

Tab 4. Effect of PFL on MDA content in serum, heart, liver and brain of aging mice induced by D-gal

分组	剂量 (mg/kg)	血清 (nU/ml)	心脏 (nU/mg)	肝脏 (nU/mg)	脑 (nU/mg)
正常对照组	-	6.86 ± 0.44	2.14 ± 0.21	3.34 ± 0.30	3.20 ± 0.17
模型组	-	14.97 ± 0.92 ^{△△}	5.18 ± 0.23 ^{△△}	5.30 ± 0.18 ^{△△}	6.09 ± 0.21 ^{△△}
VitE组	100	7.10 ± 0.19 ^{**}	2.24 ± 0.27 ^{**}	4.40 ± 0.17 ^{**}	4.41 ± 0.31 ^{**}
PFL组	800	7.17 ± 0.47 ^{**}	2.31 ± 0.40 ^{**}	4.10 ± 0.24 ^{**◇◇}	4.78 ± 0.28 ^{**◇◇}
	400	8.02 ± 1.17 ^{**}	3.76 ± 0.35 ^{**◇◇}	3.72 ± 0.16 ^{**◇◇}	5.35 ± 0.28 ^{**◇◇}
	200	11.03 ± 9.24 [*]	3.87 ± 1.25 [*]	4.90 ± 0.30 ^{*◇◇}	6.01 ± 0.21 ^{◇◇}

^{△△}P < 0.01, 与正常对照组比较; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, 与衰老模型组比较; ^{◇◇}P < 0.05, ^{◇◇◇}P < 0.01, 与 VitE 组比较. $\bar{x} \pm s, n = 10$.

表5 枸杞多肽对 *D*-gal 诱导衰老小鼠血清、心脏、肝脏和脑组织端粒酶活性的影响Tab 5. Effect of PFL on telomerase activity in heart, liver and brain of aging mice induced by *D*-gal

分组	剂量(mg/kg)	血清(nU/ml)	心脏(nU/mg)	肝脏(nU/mg)	脑(nU/mg)
正常对照组	-	75.23 ± 7.45	55.22 ± 6.24	27.55 ± 3.52	74.23 ± 10.36
模型组	-	50.39 ± 8.73 ^{△△}	33.45 ± 5.64 [△]	18.10 ± 4.16 ^{△△}	69.88 ± 16.31 ^{△△}
VitE 组	100	68.21 ± 7.32 ^{**}	45.02 ± 8.94 ^{**}	20.32 ± 5.61 ^{**}	70.12 ± 9.37
PFL 组	800	67.36 ± 4.95 ^{**}	47.85 ± 5.89 ^{**}	21.20 ± 4.62 ^{**}	72.12 ± 9.03 [*]
	400	60.48 ± 3.73 ^{**◇◇}	39.88 ± 16.34 [*]	20.03 ± 6.24 ^{**}	70.05 ± 10.65
	200	52.31 ± 10.62 ^{**◇◇}	35.16 ± 7.32 ^{**◇◇}	19.02 ± 4.20 [*]	71.00 ± 10.54

[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, 与衰老模型组比较; ^{◇◇} $P < 0.01$, 与 VitE 组比较. $\bar{x} \pm s, n = 10$.

3 讨论

宁夏的枸杞质优,与当地干旱少雨、昼夜温差大的气候特征密不可分。研究表明,枸杞多肽是枸杞子的主要有效成分之一,但近年来应用整体衰老动物模型研究枸杞多肽的抗衰老作用少见报道。*D*-半乳糖致亚急性衰老模型为一种国内常用的衰老相关研究的动物模型,实验周期短、个体差异小、重现性稳定、方法可靠^[6,7]。

SOD 是机体防御体系的一种重要抗氧化酶,作为体内清除自由基的关键酶,通过清除 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 和 O_2^- ,从而保护细胞免受氧自由基损伤,故检测 SOD 活性高低可间接反映机体清除自由基、保护细胞免受自由基损伤的能力。MDA 是机体在氧自由基作用下生成的脂质过氧化物,可反映机体内脂质过氧化物的水平,间接反映出细胞的损伤程度^[8]。依据自由基学说,若能通过适量补充外源性抗氧化剂,增强机体自由基防御系统机能,即可达到抗衰老的目的。本研究结果显示,衰老模型组在连续注射 *D*-半乳糖 5 周后,小鼠体重增加缓慢、反应力差,活动能力降低,跳台实验反应迟钝,其体内 SOD 活性降低、MDA 含量升高。应用枸杞多肽能够明显增加 *D*-半乳糖致衰老小鼠的体重,提高模型小鼠学习记忆能力。同时,血清、心脏、肝脏和脑组织检测发现,枸杞多肽治疗组小鼠 SOD 活性明显增强,且 MDA 含量明显降低,提示其可能通过直接清除体内氧自由基和激活抗氧化防御系统等作用提高机体的抗氧化能力,减少自由基对机体的损伤,从而起到延缓衰老的作用。

VitE 为自由基清除剂,研究表明,其防治肿瘤和抗衰老作用可能与影响端粒酶与细胞生长、发育和凋亡等过程密切相关^[9]。而端粒及端粒酶很可能是抗衰老药物作用的靶点^[10,11]。本实验结果显示,枸杞多肽对 *D*-半乳糖衰老模型小鼠血清、组织端粒酶活性的影响具有明显的器官差异性,枸杞多

肽对小鼠血清、肝脏和心肌组织端粒酶活性有提高作用,而对脑组织中的端粒酶活性影响不明显。提示激活部分组织细胞的端粒酶活性,延缓端粒缩短可能是其抗衰老作用的机制之一。对不同器官组织中的端粒酶活性影响有差异,可能与各组织的细胞代谢状态有关。

【参考文献】

- [1] 湖北省老区建设促进会. 银杏的魅力[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2000, 58-62.
- [2] 张英,董绍华. 氨基酸清除活性氧自由基作用的研究[J]. 科技通报, 1997, 13(5):312-315.
- [3] 梅全喜,毕焕新. 现代中药药理手册[M]. 北京:中国中医药出版社, 1998:585.
- [4] 郭红艳,张鹏霞,欧芹,等. 山茱萸对衰老大鼠蛋白质非酶糖化及 DNA 损伤的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(19):136-137.
- [5] Arivazhagan P, Thilakavathy T, Panneerselvam C. Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats[J]. *Nutr Biochem*, 2000, 11(3):122-127.
- [6] 赵鹏,杨玉英. 半乳糖制备亚急性衰老动物模型的可行性[J]. 中国食品卫生杂志, 1999, 11(1):52.
- [7] 徐志,吴国明,钱桂生,等. 大鼠衰老模型的初步建立[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(4):312-315.
- [8] Rodriguez MA, Garcia EC, Briones A, et al. Changes in plasma oxidative state with age and their influence on contractions elicited by noradrenaline in the rat tail artery[J]. *Life Sci*, 1999, 65(9):915-924.
- [9] De Lange T. Protection of mammalian telomerase[J]. *Oncogene*, 2002, 21(4):532-541.
- [10] Yuan Z, Mei HD. Inhibition of telomerase activity with hTERT antisense increases the effect of CDDP-induced apoptosis in myeloid leukemia[J]. *Hematol J*, 2003, 3(4):201-205.
- [11] Takahiro E, Kiyotaka N, Teruo M. Down-regulation of telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells by tocotrienol biochemical and biophysical[J]. *Res Commun*, 2006, 348:170-178.

(收稿日期:2009-06-10 修回日期:2009-10-16)