

归芪多糖对衰老大鼠脑组织的修复作用

蒲秀瑛*, 李浩文, 李虎玲, 宗琦, 马小龙, 李海兵, 李晓玥, 续文君

兰州理工大学 生命科学与工程学院, 兰州 730050; 中藏药筛选评价及深加工重点实验室, 兰州 730050

摘要: 研究归芪多糖对衰老大鼠脑组织的影响。采用水提醇沉法从一定比例的当归和黄芪中提取出多糖, Sevag 法除蛋白, 苯酚-硫酸法测定多糖含量。以 D-半乳糖致衰老模型大鼠为研究对象, 探讨归芪多糖对其脑组织 p16 蛋白的表达、端粒酶活性的影响。并采用差速离心法提取脑组织线粒体, 研究归芪多糖对脑线粒体单胺氧化酶 (MAO)、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性以及丙二醛 (MDA) 含量的影响。结果表明归芪多糖可提高脑组织端粒酶活性和脑线粒体中 SOD、SDH、MDH 的活性, 降低衰老组脑组织 p16 蛋白的表达量及线粒体中 MAO 活力、MDA 含量。归芪多糖通过提高衰老大鼠脑组织抗氧化能力, 减轻线粒体的氧化损伤, 改善线粒体的能量代谢, 起到修复衰老大鼠脑组织的作用。

关键词: 归芪多糖; 线粒体; 衰老大鼠; 能量代谢; 氧化损伤

中图分类号: R284.1; Q946.91

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.016

The repairing effects of the Guiqi polysaccharides on brain tissues of aging rats

PU Xiu-ying*, LI Hao-wen, LI Hu-ling, ZONG Qi, MA Xiao-long, LI Hai-bing, LI Xiao-yue, XU Wen-jun

College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

The Key Lab of Screening, Evaluation and Advanced Processing of TCM and Tibetan Medicine, Education

Department of Gansu Provincial Government, Lanzhou 730050, China

Abstract: The purpose of this study was to research the effects of Guiqi polysaccharides on brain of aging rats. Polysaccharides were extracted from *astragalus* and *angelica* by the method of water-extraction and alcohol-precipitation, Then protein was removed by Sevag's method and polysaccharide content was measured using phenol-sulfuric acid method. The influence of Guiqi polysaccharides on p16 protein expression, telomerase activity of brain tissue, monoamine oxidase (MAO), succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) of brain mitochondria in the aging rats induced by D-galactose were studied. The results showed that Guiqi polysaccharides could enhance the activity of telomerase, SOD, SDH and MDH. Meanwhile, it could reduce p16, MAO and MDA in aging groups. These results indicated Guiqi polysaccharides could improve the antioxidant capacity through reducing mitochondrial oxidative damage and improving mitochondrial energy metabolism of aging rat. Therefore Guiqi polysaccharides might play an important role in repairing brain tissues of aging rats.

Key words: Guiqi polysaccharides; mitochondria; aging rats; energy metabolism; oxidative damage.

近年来, 中药多糖的研究越来越受到重视, 当归和黄芪作为甘肃道地药材, 其多糖在提高机体免疫功能、清除自由基和延缓衰老方面有着广阔的前景。本课题组前期研究结果显示, 归芪多糖可延缓 WI-38 细胞和小鼠的衰老^[8], 但具体的衰老机制, 尤其对衰老大鼠脑组织 p16 蛋白的表达、端粒酶活性及线粒体的影响方面未见任何文献报道。

本研究采用水提醇沉法从一定比例的当归和黄芪中提取出归芪多糖; 通过 D-半乳糖建立大鼠衰老模型, 以维生素 E 作为阳性药物, 研究不同剂量的归芪多糖对衰老大鼠脑组织 p16 蛋白的表达、端粒酶活性以及脑线粒体氧化损伤和能量代谢的影响, 揭示归芪多糖延缓大鼠衰老的作用机制, 为临床应用提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 药材

当归, 黄芪均购自甘肃岷县。样品分别经甘肃

省药品检验所鉴定为当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 和膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge 的干燥的根。

1.2 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 50 只,雌雄各半,(3 月龄,体重 160.8 ± 9.3 g),由甘肃中医药大学科研实验动物中心提供,动物合格证编号为:SYXK(甘)2011-0001。

1.3 主要试剂与仪器

D-半乳糖(Sigma 公司),总蛋白定量测试盒(BCA 法),批号 20150320;丙二醛(MDA)测试试剂盒,批号 20150517;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒,批号 20150326;单胺氧化酶(MAO)测试盒,批号 20150417;琥珀酸脱氢酶(SDH)测试盒,批号 20150417;苹果酸脱氢酶(MDH)测试盒,批号 20150417;均购自南京建成科技有限公司。大鼠 p16 蛋白(p16)ELISA 检测试剂盒,批号 20150321;大鼠端粒酶 ELISA 检测试剂盒,批号 20150321;均购自上海酶联生物科技有限公司。无水乙醇、苯酚、浓硫酸、维生素 E、蔗糖均为分析纯。

电子天平(ES-2002H,长沙湘平科技发展有限公司)、恒温水浴锅(HH-S249,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)、高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)、可见分光光度计(N4S,上海仪电分析仪器有限公司)、电动匀浆器。

1.4 归芪多糖的制备

将当归与黄芪的混合物(1:5)以 10 倍量(体积质量比)80% 的乙醇水溶液回流提取两次,每次 2 h;过滤得归芪粗粉。然后将归芪残渣加入圆底烧瓶中,加蒸馏水 1:10 料液比,80 °C 蒸馏水超声、回流两次,每次 2 h。水提取物加 3 倍乙醇 4 °C 沉淀 12 h;沉淀物蒸馏水溶解,离心,得上清液,减压浓缩,得归芪多糖粗品^[5]。

1.4.1 Sevag 法除蛋白

将归芪多糖粗品用少量蒸馏水溶解,将氯仿按多糖水溶液 1/5 体积加入,然后加氯仿体积 1/5 的正丁醇,剧烈振摇 20 min 后离心,分去水层与溶液层交界处的变性蛋白,重复 3~5 次;收集上层多糖溶液,减压浓缩得归芪多糖^[6]。避光,冷藏,待用做组分定性检测及含量测定。

1.4.2 归芪多糖中多糖含量的测定

应用苯酚-硫酸法测定归芪多糖的多糖含量^[7]。

1.5 动物分组及给药,样品采集

将大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,分别为正常组、模型对照组、阳性药物对照组(维生素 E 混悬液(100 mg/kg))、归芪多糖高剂量组(2 g/kg/d)、归芪多糖低剂量组(0.5 g/kg/d)。除正常组外各组大鼠按 150 mg/kg/d 皮下注射 D-半乳糖^[15]。注射 7 d 后开始给药,归芪多糖高、低剂量组灌胃给予 200 mg/mL 的归芪多糖水溶液,分别为 2 g/kg/d 和 0.5 g/kg/d,阳性对照组灌胃给予维生素 E 100 mg/kg/d,1 次/天,连续 49 d。正常对照组按相同体积皮下注射生理盐水。49 d 后,脱颈处死,分离脑组织,置 -20 °C 冰箱保存,供后续研究使用。

1.6 脑组织 p16 蛋白的表达,端粒酶活性的测定

将脑组织用生理盐水清洗,洗净后剪碎加入 0.25 mol/L 的匀浆介质,在 4 °C 的环境中用手动搅拌机搅拌 10 min,匀浆后的脑组织取其上清液 3000 rpm 离心 10 min,取上清液,采用酶联免疫吸附法测定 p16 蛋白的表达和端粒酶的活性。

1.7 脑组织线粒体的提取和指标的检测

同上法制备脑组织匀浆,移去离心后的上清液加入 0.34 mol/L 匀浆介质于离心管底部,再 10000 rpm 离心 20 min,重复 2 次,沉淀物即为线粒体。再采用物理机械法破膜,电动匀浆器 30 s 破碎线粒体细胞膜,分别利用相应的试剂盒测定 MAO、SDH、MDH、SOD 的活性及 MDA 含量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件对所有数据进行统计分析。实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著统计学意义。

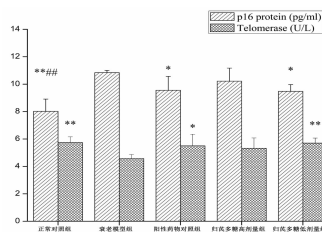


图 1 归芪多糖对 D-半乳糖衰老大鼠脑组织 p16 蛋白和端粒酶的影响结果

Fig. 1 Effect of Guiqi polysaccharides on p16 protein expression and telomerase activity of brain tissue of aging rats

注: * :与衰老模型组相比 $P < 0.05$; ** :与衰老模型组相比 $P < 0.01$; ### :与阳性药物对照组相比 $P < 0.01$

2 结果与分析

2.1 多糖含量

归芪多糖得率为 8.79%，苯酚-硫酸法测得其多糖含量为 87.6%。

2.2 归芪多糖对衰老大鼠脑组织中 p16 蛋白和端粒酶的影响

结果如图 1 所示,衰老模型组 p16 蛋白含量显著提高,端粒酶活性明显降低,与正常对照组相比差异极显著($P < 0.01$),说明衰老大鼠 p16 基因高度表达,p16 蛋白含量升高,端粒酶活性明显下降;但经阳性药物 VitE 和归芪多糖干预后,能够显著降低脑组织中的 p16 蛋白含量,提高端粒酶活性($P < 0.05$; $P < 0.01$),表明归芪多糖可降低 D-半乳糖衰老大鼠 p16 蛋白的表达的作用。但不同剂量归芪多糖之间、与 VitE 之间相比均无显著性差异,提示归芪多糖的作用效果与阳性药物 VitE 类似。

2.3 脑组织线粒体鉴定

利用生物学鉴定方法,确定从脑组织中提取出来的成分为线粒体,结果显示,线粒体被特异性染液成蓝绿色,呈椭圆形或球形,满足实验需要,为后续指标测定提供有效材料。

2.4 归芪多糖对衰老大鼠脑线粒体能量代谢的影响

从表 1 可以看出:与正常组相比,衰老组 MAO 活力明显上升,呈显著性差异($P < 0.05$),说明 MAO 活性异常,可能引起衰老大鼠体内多重功能障碍。经过归芪多糖干预后,单胺氧化酶活力极度下降($P < 0.01$),提示归芪多糖可抑制单胺氧化酶活力,且低剂量组的效果更好。

模型对照组 SDH 活力明显下降($P < 0.01$),表明衰老大鼠体内线粒体能量代谢受损,影响了机体正常代谢;给药后,SDH 明显上升($P < 0.01$),提示归芪多糖能增强 SDH 活力,保护受损线粒体使其能量代谢正常,达到抗氧化延缓衰老的作用。低剂量组的效果要优于维生素 E 和归芪多糖高剂量组,但没有呈现出显著性差异。

模型对照组 MDH 活力显著降低($P < 0.05$),表明 D-半乳糖可损伤大鼠脑组织线粒体能量代谢,导致线粒体供能不足;归芪多糖干预后,MDH 活力显著升高,提示归芪多糖可对抗 MDH 的降低,从而维持线粒体的正常代谢,尤其以低剂量组更为显著($P < 0.01$)。

表 1 归芪多糖对衰老大鼠脑线粒体能量代谢的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Guiqi polysaccharides on brain mitochondrial energy metabolism of aging rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	MAO 活力 MAO activity (U/mgprot)	SDH 活力 SDH activity (U/mgprot)	MDH 活力 MDH activity (U/mgprot)
正常对照组 Control group	146.09 ± 5.84	23.39 ± 4.10	61.01 ± 3.53
模型对照组 Model group	162.48 ± 1.79*	15.39 ± 2.61**	52.51 ± 1.59*
维生素 E 组 Vitamin E group	111.45 ± 17.00##	22.33 ± 5.50##	59.53 ± 9.96#
归芪多糖高剂量组 Higher dose group	111.07 ± 18.11##	23.83 ± 6.11##	57.24 ± 5.12#
归芪多糖低剂量组 Lower does group	109.58 ± 13.22***	25.50 ± 4.66##	61.63 ± 9.42##

注:与正常组相比 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$,与衰老对照组相比# $P < 0.05$;## $P < 0.01$ 。

表 2 归芪多糖对衰老大鼠脑线粒体氧化损伤的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Guiqi polysaccharides on brain mitochondrial oxidative damage of aging rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	SOD 活力 SOD activity (U/mgprot)	MDA 含量 MDA content (nmol/mgprot)
正常对照组 Control group	11.94 ± 3.71	8.90 ± 1.02
模型对照组 Model group	8.77 ± 1.44*	11.63 ± 1.11**
维生素 E 组 Vitamin E group	10.20 ± 2.24	10.09 ± 1.76
归芪多糖高剂量组 Higher dose group	10.09 ± 1.76	9.89 ± 0.93#
归芪多糖低剂量组 Lower does group	12.84 ± 0.98##	9.74 ± 1.64#

注:与正常组相比 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$,与衰老对照组相比# $P < 0.05$;## $P < 0.01$ 。

2.5 归芪多糖对衰老大鼠脑线粒体氧化损伤的影响

从表2可以看出:与正常组相比,模型对照组SOD活力明显降低($P < 0.05$),表明D-半乳糖可加剧大鼠线粒体内自由基的积累,导致线粒体形态和功能的损害。灌服一定剂量的归芪多糖后,超氧化物歧化酶活力明显提高,提示归芪多糖可增强衰老大鼠线粒体超氧化物歧化酶的活力,其低剂量组效果更为明显($P < 0.01$)。同时,线粒体中MDA含量呈现出与SOD活力相反的趋势,说明D-半乳糖可引发线粒体内脂质过氧化,不饱和脂肪酸破坏,导致MDA的产生增多;而经归芪多糖灌服后,MDA含量明显减少($P < 0.05$),提示归芪多糖能保护脑组织,免遭自由基的攻击。

3 讨论

p16基因是一种抑癌基因,但目前研究发现其在许多细胞进入衰老时均过度表达,是细胞寿命的关键调控基因^[1]。p16基因是一种通过p16-cyclinD/CDK-Rb途径来调控细胞周期的负调控因子,p16基因高度表达,会抑制cyclinD1-CDK4的活性,使靶蛋白不能磷酸化,导致细胞由G1期进入S期被停滞,直接影响细胞寿命^[13]。p16基因高度表达是导致端粒长度不断缩短的诱因,端粒是一段特殊的DNA-蛋白质复合物存在于线性染色体末端,端粒主要保证染色体的完整性和稳定性,端粒酶的活化可延长染色体末端DNA,维持基因组的稳定,是维持端粒长度的一种特殊的DNA聚合酶,但当端粒缩短到一定长度,细胞将停止分裂,从而导致衰老的发生^[12]。

本研究结果提示,衰老模型组大鼠p16蛋白高度表达、端粒酶活性降低,但归芪多糖干预给药后,端粒酶活性明显升高,p16蛋白表达明显降低,提示归芪多糖能够使p16蛋白的表达量下降,提高端粒酶活性,其相关作用机制可能是对p16-pRb基因的信号通路具有抑制作用,提高了端粒酶的活性、使端粒的长度得以维持。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种存在于生命体的活性物质,具有专一有效的清除生命体内的超氧离子的功能,平衡机体的氧自由基^[14]。丙二醛(MDA)在生物体内自然生成,是氧化应激的标志物^[11]。非酶系统产生氧自由基,攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质进行过氧化作用,产生脂质

过氧化物,使组织细胞受损。

本实验结果发现,D-半乳糖皮下注射大鼠之后,大鼠肝线粒体中SOD酶活性下降,MDA含量上升,表明衰老大鼠脑组织线粒体受自由基攻击损伤,脂质过氧化物的含量增多,抗氧化酶活性降低,导致脑组织氧化损伤。灌服不同剂量的归芪多糖后,衰老大鼠脑组织中SOD活力均有不同程度的升高,MDA有不同程度的降低。

单胺氧化酶(MAO)是体内参与单胺类物质代谢的主要酶,单胺氧化酶的活性变化对机体的代谢有重要的影响。琥珀酸脱氢酶(SDH)是线粒体内膜上的酶,为呼吸链提供电子,连接氧化磷酸化与电子传递,作为参与三羧酸循环的关键酶,是反映线粒体功能的标志酶之一^[2]。苹果酸脱氢酶(MDH)是细胞溶酶体中的一种氧化还原酶,参与三羧酸循环,苹果酸在苹果酸脱氢酶催化下脱氢生成草酰乙酸,脱下的氢由NAD⁺接受生成NADH + H⁺。再生的草酰乙酸可再次进入三羧酸循环用于柠檬酸的合成。在线粒体中,MDH决定三羧酸循环(TCA)运转速度的调节酶之一,是一种影响细胞代谢的重要标志酶。

本实验结果显示,衰老组大鼠脑线粒体中MAO活力增强,SDH、MDH活力降低,表明衰老大鼠脑组织线粒体受自由基攻击损伤,三羧酸循环受到影响,能量代谢紊乱。而灌胃不同剂量的归芪多糖后,降低了衰老大鼠线粒体外膜MAO的活性,提高了内膜SDH和基质上MDH两种酶的活性,稳定了三羧酸循环,维持了线粒体能量代谢和物质交换的正常进行。

上述结果提示归芪多糖的抗衰老作用与其提高抗氧化酶的活性和抑制脂质过氧化物的产生等作用密切相关。多个指标检测结果显示,归芪多糖低剂量组的效果要优于高剂量组,可能的原因是高剂量组给药量超过了大鼠最适药物剂量,产生了反馈抑制,而低剂量组给药量符合衰老大鼠每日用药量,因此产生了更好的治疗效果。

4 结论

归芪多糖通过降低衰老大鼠脑组织中p16蛋白的表达,提高端粒酶活性起到修复D-半乳糖所致衰老的脑组织的作用。同时还通过提高衰老大鼠脑组织线粒体中SOD、SDH、MDH活力,降低MAO活性和MDA含量,增强线粒体对自由基的抵抗能力,减

少自由基对细胞膜的攻击,增强线粒体能量代谢,维持脑线粒体和脑组织的正常功能。

参考文献

- 1 Zhou J(周佳),Kang YN(康亚妮). A model organism for cellular aging research; *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin Bull Life Sci* (生命科学),2013,25:511-517.
- 2 Sudheesh NP, AE TA. Ajith AE K. K. Janardhanan. Ganoderma lucidum (Fr.) P. Karst enhances activities of heart mitochondrial enzymes and respiratory chain complexes in the aged rat. *Biogerontology*,2009,10:627-636.
- 3 Tan ZJ(谭周进),Xie DP(谢达平). 多糖的研究进展. *Food Science and Technology* (食品科技),2002,3:10-12.
- 4 Chen LW(陈亮稳), et al. Anti-aging mechanism of polysaccharide from rhizomorph of *Armillaria mellea* in *C. elegans*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2013,44:449-453.
- 5 Pu XY(蒲秀瑛),Li Y(李言), et al. Study on anti-aging effect of Guiqi polysaccharides. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2012,24:1630-1633.
- 6 Zhou HL(周鸿立),Yang XH(杨晓红),Li CH(李春华), et al. 玉米须多糖 Sevag 法脱蛋白的方法研究. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学),2010,38:15517-15518.
- 7 Zhang W(张薇),Li YL(李雁来),Lu FG(卢芳国). 麻石杏甘汤多糖含量测定方法研究. *Practical Preventive Medicine*(实用预防医学),2010,17:2145-2147.
- 8 Pu XY(蒲秀瑛),Yu S(于双),Fan WB(樊文博). Guiqi polysaccharide protects the normal human fetal lung fibroblast WI-38 cells from H₂O₂-induced premature senescence. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*,2015;8:4398-4407.
- 9 Harley CB,Vaziri H,Counter CM,Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol*. 1992,27:375-82.
- 10 May Shawi, Chantal Autexier. Telomerase, senescence and aging. *Mechanisms of Aging and Development*,2008,129:3-10.
- 11 Li L(李琳),Monika Pischetsrieder,Raymond J. St. Leger, et al. Associated links among mtDNA glycation, oxidative stress and colony sectorization in *Metarhiziumanisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*,2008,45:1300-1306.
- 12 Ross JM,Stewart JB,Hagstrom E, et al. Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature*,2013,501:412-415.
- 13 Baker DJ,Wijshake T,Tchkonia T, et al. Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*,2011,479:232-236.
- 14 Piao L(朴龙),Zhang XW(张学武),Jin XZ(金香子),Li SH(李善花), et al. 草苈蓉提取物对衰老大鼠脑组织自由基的影响. *J Chin Integr Med* (中西医结合学报),2003,2:125-127.
- 15 Signer RA, Morrison SJ. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell*,2013,12: 152-165.
- 16 Zhang F(张帆), et al. Impact of Gansu water extract Codonopsis aging model mouse brain cells apoptosis and related gene expression. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志),2010,30:2807-2809.
- 17 Zandis G, et al. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging* (Albany NY),2012,4:768-789.
- 12 Yang SL(杨世龙),Huang CL(黄春丽),Tang Y(唐颖), et al. Effects of coordination method on removing ginkgolic acids from *Ginkgo biloba* (EGb). *Chin Fore Sci Tech* (林业技术开发),2015,29(2):66-69.
- 13 Shao JJ(邵江娟),Zheng YX(郑佑轩),Liu PP(刘平平), et al. Spectroscopic studies on coordination reaction between Ginkgolic acids and Terbium (III). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药),2012,23:1733-1734.
- 14 Zhou FY(周发阳),Xu YW(徐翊文),Sun Y(孙宇), et al. Research advances in coordination chemistry of traditional Chinese medicine. *Mod Chin Med* (中国现代中药),2015,17:502-508.
- 15 Fukuda I,Ito A,Hirai G, et al. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chem Biol*,2009,16:133-140.

(上接第 381 页)