

玛咖多糖对果蝇的抗衰老作用

周意¹, 栾洁², 刘玉香², 储智勇^{2*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 海军医学研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨玛咖多糖对黑腹果蝇寿命和抗氧化作用的影响。**方法:**采用黑腹果蝇为研究对象,收集8 h内羽化未交配的果蝇,雌雄分开,将果蝇随机分为对照组,玛咖多糖低、中、高剂量组(质量浓度分别为0.03, 0.08, 0.24 g·L⁻¹)。每组10管,每管20只,每2 d记录果蝇的死亡数,每4 d更换1次培养基,直至果蝇全部死亡。每组全部果蝇死亡天数的平均数为该组的平均寿命,每组中半数果蝇死亡的天数为该组的半数死亡时间,每组中最后死亡的20只果蝇存活天数的平均数为该组的最高寿命。测定百草枯和过氧化氢急性氧化损伤下的存活时间、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性以及脂褐素含量。**结果:**与对照组相比,玛咖多糖高剂量组能延长果蝇平均寿命及最高寿命($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),中、高剂量组能延长过氧化氢和百草枯急性氧化损伤下果蝇的存活时间($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),各剂量组均能提高SOD和CAT活性,降低脂褐素含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**玛咖多糖可以提高果蝇的抗氧化能力,抑制脂质过氧化,延长果蝇寿命。

[关键词] 玛咖多糖; 果蝇; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0151-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180151

Effect of Maca Polysaccharide on Life Span and Antioxidative Ability of *Drosophila melanogaster*

ZHOU Yi¹, LUAN Jie², LIU Yu-xiang², CHU Zhi-yong^{2*}

(1. Jiangxi University of Tradition Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Maca polysaccharide on the life span and antioxidative ability of *Drosophila melanogaster*. **Method:** Eight hour eclosion unmated *D. melanogaster* were collected. Male and female were separated, *D. melanogaster* were randomly divided into 4 groups: control group, Maca polysaccharide group (0.03, 0.08, 0.24 g·L⁻¹). The life span, the survival time in paraquat and hydrogen peroxide treatment, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and the content of lipofuscin were determined. **Result:** Compared with the control group, the high dose group extends the maximum life span and mean life span of *D. melanogaster* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), exhibiting a dosage effect. The middle dose group and the high dose group can improve the survival time in paraquat and hydrogen peroxide treatment. The activities of SOD and CAT increase, meanwhile the content of lipofuscin decreases in the experiment. **Conclusion:** Maca polysaccharide might have a satisfactory effect on life span and anti-oxidant.

[Key words] Maca polysaccharide; *Drosophila melanogaster*; antioxidant

玛咖(Maca)全称玛咖独行菜 *Lepidium meyerii* Walp,为形似萝卜的块根类植物,属十字花科,原产秘鲁中部海拔4 000 m以上的安第斯山区。其在

南美已有几千年的食用历史,食用玛咖可以增强精力、消除疲劳、提高生育力、改善性功能及女性更年期综合征等,是世界公认的天然男性活力营

[收稿日期] 20140406(006)

[第一作者] 周意,硕士,从事中药药理的相关工作,Tel:15001837246,E-mail:854126589@qq.com

[通讯作者] * 储智勇,博士,副研究员,从事药理学的相关工作,Tel:021-81883188,E-mail:zhiyongchuleader@163.com

营养素之一^[1]。玛咖中除含有丰富的蛋白质、氨基酸、矿物质等营养物质外,还含有玛咖烯、玛咖酰胺等活性物质^[2]。其中,玛咖多糖也是玛咖中含量较丰富活性物质。已有报道玛咖多糖可显著抑制 CCl_4 引起的大鼠肝脏脂质过氧化反应的发生以及具有体外抗氧化活性^[3-4]。本文以黑腹果蝇为研究对象,研究玛咖多糖对果蝇寿命、相关抗氧化指标、过氧化氢和百草枯氧化损伤下果蝇存活时间的影响,探讨玛咖多糖的体内抗氧化作用。

1 材料

1.1 药材 玛咖块根购自丽江格林恒信生物科技种植有限公司,经第二军医大学药学院黄宝康教授鉴定为十字花科植物玛咖 *Lepidium meyerii* Walp 的干燥块根。

1.2 仪器 高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),OBS-2100 EYELA 型油浴锅(上海爱明仪器有限公司),HWS-850 型智能恒温恒湿培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂),T6 型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),F-7000 型荧光分光光度计(HITACHI)。

1.3 试剂 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20131231),过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号 20130820),蛋白测定试剂盒(批号 20130928),均为南京建成生物工程研究所产品;百草枯(批号 20120109,梯希爱化成工业发展有限公司),过氧化氢(批号 10011218,国药集团化学试剂有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.4 动物 野生型黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 由天津科技大学食品添加剂与营养研究室提供。收集 8 h 内羽化未交配果蝇,雌雄分开,培养温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50% ~ 60% 培养箱中培养。

2 方法

2.1 玛咖多糖的提取及含量测定

2.1.1 玛咖多糖的提取 玛咖多糖提取参照文献^[3-4],由实验室制备。玛咖根茎,经干燥至恒重,粉碎机粉碎,过 60 目筛,料-水比 1:20 浸泡 24 h 后 95 $^{\circ}\text{C}$ 油浴浸提 1 h,重复 2 次,合并 2 次提取液,过滤后浓缩至体积的 1/3,以 1:5 比例加入 95% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,10 min,弃上清,得棕黄色粗多糖沉淀。依次用 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚各洗涤沉淀 2 次,离心去上清,沉淀用 Sevage 法除蛋白,沉淀真空干燥,得粗多糖干制品。得率为

13.36%,纯度为 71%。

2.1.2 玛咖多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法。精确称取 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的葡萄糖 50 mg,用蒸馏水定容至 500 mL,分别吸取 0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.6 mL,各补水至 2.0 mL,然后加入 1.0 mL 6% 的苯酚溶液,振荡。再加入 5.0 mL 浓硫酸,迅速振荡摇匀,置于沸水浴中加热 15 min 后冷却,于 490 nm 处测定吸光度(A)。以水做空白对照,绘制标准曲线。精确称取玛咖多糖干品 10 mg,加少量热水溶解后定容至 10 mL。精确量取 1.0 mL,按上述步骤操作,测定其 A,试验重复 3 次。根据葡萄糖标准曲线计算多糖含量。

2.2 培养基的制备 玉米粉 72 g,无水葡萄糖 72 g,琼脂粉 6 g,干酵母粉 10 g,加水至 750 mL,煮熟后冷却 2 min,加防腐剂(1% 对羟基苯甲酸乙酯) 40 mL,制成普通培养基。在普通培养基基础上,分别加入不同体积的玛咖多糖溶液,配成 0.03,0.08,0.24 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含药培养基。

2.3 果蝇寿命试验 取 5 日龄果蝇,随机分 4 组。对照组接入普通培养基中,给药组接入含玛咖多糖培养基中(0.03,0.08,0.24 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。每组 10 管,每管 20 只。每 2 d 记录果蝇的死亡数,每 4 d 更换 1 次培养基,直至果蝇全部死亡。每组全部果蝇死亡天数的平均数为该组的平均寿命,每组中半数果蝇死亡的天数为该组的半数死亡时间,每组中最后死亡的 20 只果蝇存活天数的平均数为该组的最高寿命^[5-6]。

2.4 急性损伤模型果蝇存活实验^[7-8]

2.4.1 百草枯急性试验对果蝇存活时间的影响 果蝇分组情况同 2.3。培养 25 d 后,将果蝇先饥饿 2 h,后将蘸有 1 mL 6% 葡萄糖溶液配制的 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 百草枯溶液滤纸条放入培养管中,每隔 4 h 观察果蝇死亡数目,直至果蝇全部死亡,记录每组果蝇的平均存活时间、半数存活时间、最高存活时间。

2.4.2 双氧水急性试验对果蝇存活时间的影响 果蝇分组情况同 2.3。培养 25 d 后,将果蝇先饥饿 2 h,后将蘸有 1 mL 6% 葡萄糖溶液配制的 9% H_2O_2 滤纸条放入培养管中,每隔 4 h 观察果蝇死亡数目,直至果蝇全部死亡,记录每组果蝇的平均存活时间、半数存活时间、最高存活时间。

2.5 果蝇 SOD, CAT 活性测定^[9] 果蝇分组情况同 2.3。培养 25 d 后,将果蝇先饥饿 2 h,用 CO_2 麻醉后称重,按 1:49 的比例加入生理盐水在冰浴下匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 取上清。采

用羟胺法测定 SOD 活性:样品中的 SOD 对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,在 550 nm 比色时测定管的 A 低于对照管的 A ,通过公示计算可求出被测样品中的 SOD 活力。使用可见光法测定 CAT 活性:过氧化氢 (CAT) 分解 H_2O_2 的反应可通过加入钼酸铵而迅速终止,剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物,在 405 nm 处测定其生成量,可计算出 CAT 的活力。

2.6 果蝇脂褐素 (LF) 含量测定 果蝇分组情况同 2.3。饲养 25 d 后,将果蝇先饥饿 2 h,后用 CO_2 麻醉后称重,用三氯甲烷-甲醇 (2:1) 的混合溶液将每管果蝇研磨成 4 mL 匀浆,在 40 °C 的水浴锅中反应 5 min,3 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,取上清液于荧光分光光度计测脂褐素的荧光强度 (发射波长为 430 nm,激发波长 360 nm,夹缝 10 nm),以 0.1 $mg \cdot L^{-1}$ 硫酸奎宁溶液的荧光强度为 10 个脂褐素单位 (U),计算 1 mg 果蝇脂褐素相当于硫酸奎宁标准液的荧光强度,计算 10 管的平均值并统计最终结果。

3 结果

3.1 玛咖中玛咖多糖的含量 按照 2.1.2 项下方法得葡萄糖标准曲线公式为: $Y = 0.0064X + 0.0344$, $R^2 = 0.9957$,表明在葡萄糖溶液体积取 0 ~ 1.6 mL,葡萄糖的浓度与 A 呈现出良好的线性关系。测得玛咖多糖溶液 3 次的平均 A 为 0.533,计算得出玛咖中的多糖含量为 9.49%。

3.2 对果蝇寿命的影响 与对照组相比,玛咖多糖高剂量组平均寿命延寿率达 5.94% ($P < 0.05$);最高寿命延寿率为 9.01% ($P < 0.01$)。见表 1。

3.3 对百草枯急性试验果蝇存活时间的影响 与模型组相比,玛咖多糖低、中、高剂量组平均存活时间均延长了约 2 h;最高存活时间分别延长了 1.6, 2.4, 2.8 h,延长率分别为 4.34%, 6.5%, 7.6%,玛咖多糖中、高剂量组具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 4 玛咖多糖对果蝇抗氧化酶活性和 LF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	CAT/U· mg^{-1}	T-SOD/U· mg^{-1}	Cu, Zn-SOD/U· mg^{-1}	LF/U· mg^{-1}
对照	-	19.5 ± 1.4	99.7 ± 7.3	48.1 ± 6.9	5.7 ± 0.6
玛咖多糖	0.03	20.5 ± 1.5 ¹⁾	112.0 ± 5.1 ¹⁾	58.6 ± 6.4 ¹⁾	4.5 ± 0.4 ¹⁾
	0.08	20.5 ± 0.4 ¹⁾	112.9 ± 9.3 ¹⁾	60.1 ± 5.6 ¹⁾	4.3 ± 0.3 ²⁾
	0.24	20.9 ± 0.8 ¹⁾	113.1 ± 7.2 ¹⁾	59.7 ± 6.3 ¹⁾	4.2 ± 0.5 ²⁾

4 讨论

寿命是衡量衰老过程的最确切指标,寿命实验

表 1 玛咖多糖对果蝇寿命的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 200$)

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	平均寿命/d	半数死亡时间/d	最高寿命/d
对照	-	51.9 ± 13.7	53	69.9 ± 3.0
玛咖多糖	0.03	52.2 ± 13.2	53	71.7 ± 3.3
	0.08	53.2 ± 13.9	55	71.0 ± 3.8
	0.24	55.0 ± 14.9 ¹⁾	57	76.2 ± 4.4 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 2 玛咖多糖对百草枯急性试验果蝇存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 200$)

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	平均存活时间/h	半数存活时间/h	最长存活时间/h
模型	-	23.6 ± 7.4	22	36.8 ± 3.6
玛咖多糖	0.03	25.2 ± 7.5	24	38.4 ± 3.8
	0.08	25.2 ± 7.3	23	39.2 ± 4.9 ¹⁾
	0.24	25.3 ± 7.7	24	39.6 ± 5.7 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.4 对过氧化氢急性试验果蝇存活时间的影响 与模型组相比,玛咖多糖中、高剂量组平均存活时间延长了约 1 h。最长存活时间分别延长了 3.6, 4.8 h,延长率分别为 10.46%, 13.95%,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 玛咖多糖对过氧化氢急性试验果蝇寿命的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 200$)

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	平均存活时间/h	半数存活时间/h	最长存活时间/h
模型	-	22.3 ± 5.9	20	34.4 ± 3.3
玛咖多糖	0.03	22.4 ± 5.9	20	35.2 ± 4.5
	0.08	23.0 ± 6.4	21	38.0 ± 3.3 ¹⁾
	0.24	23.8 ± 7.1	21	39.2 ± 4.1 ¹⁾

3.5 对果蝇抗氧化酶活性和 LF 含量的影响 与对照组相比,玛咖多糖低、中、高剂量组均能提高 CAT, T-SOD, Cu, Zn-SOD 活性,降低 LF 含量,且具有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 4。

是通过统计生物的平均寿命 (mean life span) 和最高寿命 (maximum life span) 及其变化来衡量生命衰老

规律和抗衰老效果的方法^[10]。寿命实验常用的哺乳动物有大鼠、小鼠和豚鼠等,但由于哺乳动物寿命较长,一般为 2~3 年,而利用生活周期短暂的生物既可获得高度纯种,还可缩短实验周期,容易多次重复,其结果也与许多哺乳动物模型具有一致性^[11]。果蝇是一种真核多细胞生物,具有寿命短、生长迅速、繁殖力强、高度纯种、饲养简便等优点。它的生长发育、繁殖衰老、代谢途径、生理学功能和发育阶段同哺乳动物基本相似,故常被用于生存与衰老实验研究^[12]。本研究采用黑腹果蝇为研究对象,其寿命实验表明:含 0.24 g·L⁻¹ 玛咖多糖的培养基能显著延长果蝇的平均寿命和最高寿命,达到延缓衰老的目的。

自由基氧化是比较公认的衰老学说之一^[13],认为代谢中产生的超氧阴离子自由基、H₂O₂、·OH⁻ 等可引发脂质、蛋白质和核酸分子的氧化性损伤,从而导致衰老。百草枯(Paraquat, 1,1-二甲基-4,4-二氯二吡啶)是一种速效触杀型季胺盐类除草剂,具有较强毒性,它能够通过机体的代谢反应产生超氧阴离子自由基,进而对机体产生氧化应激造成机体的氧化损伤。双氧水是一种活性氧,在某些金属离子存在的条件下可以产生羟基自由基,而羟基自由基是活性最强的自由基,可与活细胞中所有的功能性生物大分子起反应,导致其产生功能性衰退,从而对机体造成氧化损伤。本研究中,含 0.24 g·L⁻¹ 玛咖多糖的培养基能显著提高果蝇在百草枯损伤下的最长存活时间,含 0.08, 0.24 g·L⁻¹ 玛咖多糖的培养基能显著提高果蝇在 H₂O₂ 损伤下的平均存活时间和最长存活时间。表明,玛咖多糖对清除超氧阴离子自由基和羟自由基都有一定的功效。

SOD 和 CAT 是清除活性氧的主要抗氧化酶^[14],脂褐素是被公认的生物衰老的主要特征之一^[15],既是评价衰老的重要指标,又能间接反映细胞损伤程度。这 3 个指标可用以评价抗氧化能力。本实验研究表明,含 0.03, 0.08, 0.24 g·L⁻¹ 玛咖多糖的培养基均能提高果蝇体内 T-SOD, Cu, Zn-SOD, CAT 活性,降低 LF 含量。

综上所述,作为一种天然的植物多糖,玛咖多糖的抗衰老作用是通过提高体内抗氧化酶活性来增强清除自由基能力和降低脂质过氧化而实现的。

[参考文献]

[1] Lee M S, Shin B C, Yang E J, et al. Maca (*Lepidium*

meyenii) for treatment of menopausal symptoms: A systematic review[J]. *Maturitas*, 2011, 70:227.

[2] Shin B C, Lee M S, Yang E J, et al. Maca (*Lepidium meyenii*) for improving sexual function: a systematic review[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10 (44):1.

[3] 张永忠,余龙江,金文闻,等. 玛咖多糖抗氧化保健作用研究[J]. *食品科技*, 2005(8):97.

[4] 浦跃武,王金全. 玛咖多糖抗氧化性研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(28):13803.

[5] Zou S, Carey J R, Liedo P, et al. Prolongevity effects of an oregano and cranberry extract are diet dependent in the mexican fruit fly (*Anastrepha ludens*) [J]. *Biological Sciences*, 2010, 65(1):41.

[6] Peng C, Zuo Y Y, Kwan K M, et al. Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster* [J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(2):170.

[7] Peng C, Chan H Y E, Li Y M, et al. Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies [J]. *Exp Gerontol*, 2009, 44:773.

[8] Li Y M, Chan H Y E, Yao X Q, et al. Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies[J]. *J Nutr Biochem*, 2008, 19:376.

[9] 丘婷,吴思,陈朋,等. 六味地黄生物制剂多糖对果蝇抗氧化作用的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(22):215.

[10] 王鑫. 菱角壳水提物的提取及其抗衰老药理活性的研究[D]. 天津:天津大学药物科学与技术学院, 2008.

[11] 杨科峰,厉曙光,蔡智鸣. 酞酸酯对果蝇生存天数影响及其遗传毒性[J]. *中国公共卫生*, 2005, 21 (4):432.

[12] 刘贵珊,张泽生,杨博,等. 白藜芦醇对果蝇寿命和抗氧化能力的影响[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34 (9):19.

[13] Zhong W Q, Liu N, Xie Y G, et al. Antioxidant and anti-aging activities of mycelial polysaccharides from *Lepista sordid* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 60:355.

[14] Schriener S E, Lineord N J, Martin G M, et al. Extension of murine life span by over expression of catalase targeted to mitochondria [J]. *Science*, 2005, 308:1909.

[15] 展俊娟,张铮,张序贵,等. 灰树花多糖对果蝇繁殖力及抗氧化作用的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24:520.

[责任编辑 聂淑琴]