

玛咖多糖对 *D*-半乳糖衰老模型小鼠免疫器官的保护作用

周意^{1,2}, 栾洁¹, 蒋静娴³, 储智勇^{1*}

(1. 海军医院研究所, 上海 200433; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004;
3. 海安县食品药品监督管理局, 江苏南通 226600)

[摘要] 目的:研究玛咖多糖对 *D*-半乳糖(*D*-gal)所致亚急性衰老小鼠免疫器官氧化损伤的保护作用及其作用机制。方法:50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组,分别为正常组,*D*-gal 模型组,玛咖多糖低、中、高剂量组。每日 *ih* *D*-半乳糖 500 mg·kg⁻¹ 造模,玛咖多糖给药组另 *ig* 玛咖多糖溶液(75,150,300 mg·kg⁻¹),连续造模给药 56 d 测定小鼠血清或肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),单胺氧化酶(MAO)活性及丙二醛(MDA)含量,透射电镜下观察玛咖多糖对 *D*-gal 损伤小鼠胸腺组织影响,并用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测脾脏组织 p53, SOD2, CAT 在 mRNA 水平表达情况。结果:与正常组比较,模型组细胞出现脾窦扩张,核周间隙大,染色质边集,部分细胞出现凋亡,模型组小鼠血清 SOD, CAT 活性明显降低,MDA 含量明显升高,小鼠肝脏中 SOD, GSH-Px 活性明显降低,MAO 活性及 MDA 含量明显升高,小鼠脾脏组织 p53 mRNA 明显升高, SOD2, CAT mRNA 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,玛咖多糖中、高剂量组胸腺组织中淋巴细胞分布较为均匀,核周分界清晰,胞浆内无空泡,玛咖多糖给药组能明显提高小鼠血清 SOD, CAT 活性,明显降低 MDA 含量,明显升高 SOD, GSH-Px 活性,降低 MAO 活性及 MDA 含量,玛咖多糖高剂量组明显下调小鼠脾脏 p53 mRNA 水平,中、高剂量组明显升高 CAT mRNA 水平,高剂量组明显升高 SOD2 mRNA 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:玛咖多糖对致衰老模型小鼠免疫器官有保护作用,可能机制是提高抗氧化酶活性及抗氧化酶在基因水平的表达,降低老化相关酶活性。

[关键词] 玛咖多糖; 亚急性衰老; 抗衰老; 免疫器官; *D*-半乳糖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0121-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016190121

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1057.040.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 10:57

Protective Effect of Polysaccharide from *Lepidium meyenii* Rhizome on Immune Organs of Aging Mice

ZHOU Yi^{1,2}, LUAN Jie¹, JIANG Jing-xian³, CHU Zhi-yong^{1*}

(1. Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

3. Hai'an Food and Drug Administration, Nantong 226600, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of polysaccharide from *Lepidium meyenii* raizomel (PLR) on the immune organs in subacute aging mice induced by *D*-galactose, and investigate its action mechanism. **Method:** Fifty ICR mice were randomly divided into five groups: normal group, *D*-galactose model group, and PLR low-, middle-, and high-dose groups. 500 mg·kg⁻¹ of *D*-galactose was given to the mice by *ih* administration to produce aging models. The mice in PLR groups were given with PLR solution (75, 150, 300 mg·kg⁻¹) by *ig* administration. The drugs were given for 56 days, and then the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase

[收稿日期] 20150711(009)

[基金项目] 上海市自然科学基金项目(12ZR1444600)

[第一作者] 周意, 硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: 854126589@qq.com

[通讯作者] * 储智勇, 博士, 副研究员, 从事心血管药理学研究, Tel: 021-81883188, E-mail: zhiyongchuleader@163.com

(CAT), glutathion peroxidase (GSH-Px), monoamine oxidase (MAO) and the content of malondialdehyde (MDA) in mice serum or liver tissues were detected; the thymus ultrastructural changes were observed under TEM; the mRNA expression levels of SOD, CAT and p53 in the spleen were determined by qPCR. **Result:** As compared with the normal group, splenic sinusoid was extended in cells of model group, with large perinuclear space and chromatin margination; apoptosis was present in some cells; the SOD and CAT activities in serum of model group mice were significantly decreased; p53 mRNA expression in spleen tissues was significantly increased; SOD2 and CAT mRNA expressions were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the model group, distribution of lymphocytes in thymus was even in PLR middle dose and high dose groups; with clear perinuclear boundaries; no vacuoles in the cytoplasm; PLR could enhance the activities of SOD, CAT, GSH-Px, and reduce the content of MDA and activity of MAO. PLR high dose group significantly down-regulated the expression of p53 mRNA in spleen; middle dose and high dose groups significantly increased CAT mRNA expression; high dose group significantly increased SOD2 mRNA level ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** PLR has a protective effect on the immune organs of aging mice models, and the mechanism may be associated with increasing antioxidant enzyme activity and antioxidant enzyme mRNA expression, and decreasing aging-related enzyme activity.

[**Key words**] polysaccharide from *Lepidium meyenii* rhizome; subacute aging; anti-aging; immune organs; D-galactose

玛咖是生长在秘鲁海拔 4 000 ~ 4 500 m 安第斯山脉的一种十字花科植物^[1]。2003 年在我国云南丽江引种成功^[2], 传统上主要用于提高生育力。其清除自由基, 提高细胞抗氧化力的功效也得到了证实^[3]。作为许多高等植物的有效成分, 多糖具有广泛的药理作用, 一般多用于免疫调节, 近年来其抗氧化功效也受到越来越多研究者的重视, 研究表明, 多糖能通过提高过氧化物酶活性、抑制脂质过氧化、清除自由基而产生抗氧化、抗衰老的功效^[4]。过度的氧化应激是引起衰老这一随着年龄增加而机体细胞、组织等发生退行性病变综合症的主要原因。因此抗氧化剂在一定程度上也能延缓衰老的进程。多糖是玛咖中主要的活性成分之一, 报道表明玛咖多糖能显著抑制四氯化碳 (CCl₄) 引起的大鼠离体肝脏脂质过氧化反应的发生^[5], 以及对羟自由基, 氧自由基, 基苯肼 (DPPH) 自由基均有清除作用^[6]。目前对玛咖多糖的研究主要集中在提取纯化工艺方面, 玛咖多糖对衰老机体内胸腺、脾脏等免疫器官的保护作用尚未见报道。本研究通过构建 D-半乳糖小鼠衰老模型, 用玛咖多糖进行实验干预, 研究玛咖多糖对衰老小鼠体内免疫器官的保护作用及可能机制。以为玛咖多糖的进一步研究与开发提供理论基础和实验依据。

1 材料

1.1 动物 50 只 ICR 小鼠, 雄性, 体重 (20 ± 2) g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物合

格证号 SCXK(沪)2013-0016。

1.2 药物及试剂 玛咖由丽江格林恒信生物种植有限公司生产, 采用水提醇沉法提取获得玛咖多糖, 具体见先前发表的文献 [7]。D-半乳糖 (美国 Life Sciences 试剂有限公司, 批号 GB0215); 超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (CAT), 丙二醛 (MDA), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px), 单胺氧化酶 (MAO), ATP 酶测定及一氧化碳合酶 (NOS) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20140406, 20140411, 20140407, 20140406, 20140411, 20140411, 20140513)。其余试剂均为产分析纯。

1.3 仪器 T6 型新世纪紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司), ABI 7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 系统 (美国 Applied Biosystems 公司), GR22G 型高速冷冻离心机及 H-7000 型透射电子显微镜 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将 50 只小鼠适应培养 7 d 后, 随机分为 5 组, 分别为正常组, D-半乳糖模型组, 玛咖多糖低、中、高剂量组 (75, 150, 300 mg · kg⁻¹), 每组 10 只。正常组颈背部 *ih* 生理盐水, 其余 4 组连续 8 周每日颈背部 *ih* D-半乳糖溶液 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹。正常组每日注射等量生理盐水, 动物每 3 d 称体重 1 次, 根据体重调整造模给药量。给药组从造模之日起每日另 *ig* 玛咖多糖溶液 (75, 150, 300 mg · kg⁻¹), 模型组和正常组 *ig* 等体积生理盐水。

2.2 玛咖多糖对 D-半乳糖亚急性损伤后小鼠胸腺超微结构影响 切取各组小鼠胸腺组织于 4% 的多聚甲醛溶液中固定(4 ℃),后改用 1% 四氧化锇做后固定,并用乙醇和丙酮逐级洗脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片,醋酸双氧铀、柠檬酸双重染色,最后用透射电子显微镜观察并拍照。

2.3 小鼠血清中生化指标测定 取小鼠血清,按说明书测定血清中 SOD, CAT 活性及 MDA 含量,并采用 BCA 法测定蛋白浓度。

2.4 小鼠肝组织中生化指标测定 取肝组织,切取 100 mg,置于匀浆器中,加入 PBS 溶液 1 mL,冰上进行匀浆,制成 10% 的肝匀浆液,3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清贮存在 -20 ℃ 环境中,按说明书测定 GSH-Px 酶活性,MAO 活性及 MDA 含量,并采用 BCA 法测定蛋白含量。

2.5 qPCR 检测 p53, CAT, SOD2 基因的表达

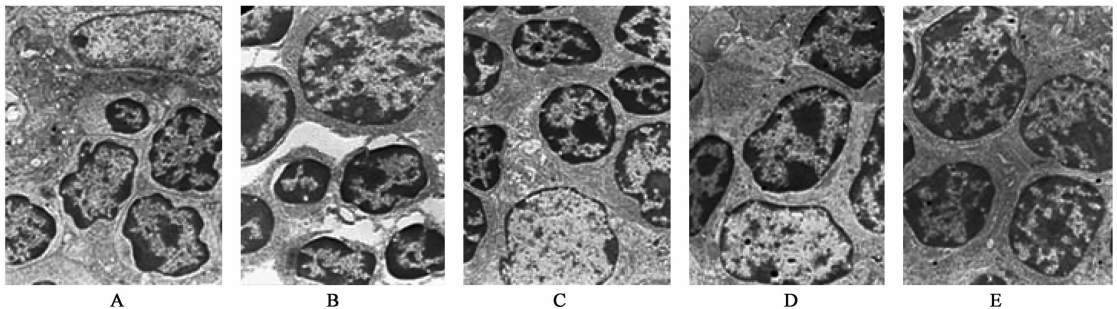
2.5.1 RNA 的提取与浓度测定 取脾脏组织约 100 mg 加入预先放好 Trizol 1 mL 的匀浆器中,于冰上进行匀浆,室温放置 5 min 后,12 000 r·min⁻¹, 4 ℃ 离心 15 min,取上清加入三氯甲烷溶液 200 μL,用力震摇,室温放置 5 min;12 000 r·min⁻¹, 4 ℃ 离心 15 min,取上层水相转移至新的离心管中;加入等体积的异丙醇(约 500 mL),用力颠倒混匀后室温放置 10 min;12 000 r·min⁻¹, 4 ℃ 离心 10 min,弃上清,沉淀用 1 mL 预冷的 75% 乙醇洗涤;7 500 r·min⁻¹, 4 ℃ 离心 5 min,沉淀于室温下晾干;加入 100 μL DEPC 水吹打溶解沉淀,并用 55 ~ 60 ℃ 水浴助溶 5 min。待完全溶解后,打开微量分光光度计,测定 RNA 样品检测浓度及吸光度 A,计算 A₂₆₀/A₂₈₀,若 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8 ~ 2.1,则表示 RNA 的纯度较高,没有收到蛋白质的污染,可以进行下一步的逆转录。

2.5.2 逆转录合成 cDNA 及 qPCR 将提取的总 RNA 用 Oligo(dt)₁₈ 和 AMV 逆转录试剂(TaKaRa)进行逆转录合成 cDNA,采用 SYBR Green 染料,用 qPCR 仪进行检测,使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因对模板进行均一化处理。实验用到的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。GAPDH 引物上游 5'-AGCCCGGTGCTGAGTATG-3' 和下游 5'-TGCCTGCTTCACCACCTTCT-3';CAT 引物上游 5'-ATGAAGCAGTGGAAGGAGCA-3' 和下游 5'-TCAAAGTGTGCCATCTCGTC-3';p53 引物上游 5'-GGGCTGAGACACAATCCTC-3' 和下游 5'-TGCCAGGGTCCAACAAC-3';SOD2 引物上游 5'-TGGAGAACCCAAAGGAGAGT-3' 和下游 5'-GAGCAGGCAGCAATCTGTAA-3'。所有 RNA 反应条件设置为 95 ℃, 10 min 预变性;95 ℃, 5 s 变性;60 ℃, 34 s 退火,循环 40 次;72 ℃, 10 min 延伸。采用相对定量法对 qPCR 的数据进行分析, $\Delta C_t = C_{t, \text{目的基因}} - C_{t, \text{内参基因}}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t, \text{实验组}} - \Delta C_{t, \text{正常组}}$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值即为实验组基因的表达相对于正常组的变化倍数。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件进行方差统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠胸腺组织超微结构的影响 正常组可见淋巴细胞分布均匀,核周分界清晰,胞浆内无空泡;模型组细胞出现脾窦扩张,核周间隙大,染色质边集,部分细胞出现凋亡;玛咖多糖低剂量组少数核周有空隙,偶见染色质分布不均匀;玛咖多糖中、高剂量组淋巴细胞分布均匀,核周分界清晰,胞浆内无空泡。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 玛咖多糖 75 mg·kg⁻¹ 组; D. 玛咖多糖 150 mg·kg⁻¹ 组; E. 玛咖多糖 300 mg·kg⁻¹ 组

图 1 玛咖多糖对小鼠胸腺组织超微结构的影响(电镜扫描, ×3 500)

Fig. 1 Effect of polysaccharide from *Lepidium meyenii* rhizome (PLR) on thymus tissue ultrastructure in mice (SEM, ×3 500)

3.2 对血清 SOD, CAT 活性和 MDA 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 SOD 活性显著降低

($P < 0.01$), CAT 活性明显降低($P < 0.05$), MDA 含量明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,玛咖多糖

中、高剂量组明显升高 SOD 活性 ($P < 0.05$), 玛咖多糖低、中、高剂量组明显升高 CAT 活性 ($P < 0.05$), 玛咖多糖高剂量组明显降低 MDA 含量 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 玛咖多糖对衰老模型小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of PLR on biochemical indicators of blood serum in aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	CAT/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
正常	-	116.7 ± 9.7	5.85 ± 1.44	2.36 ± 0.80
模型	-	68.5 ± 7.4 ²⁾	4.29 ± 0.87 ¹⁾	4.07 ± 0.88 ¹⁾
玛咖多糖	75	82.9 ± 19.0	5.56 ± 0.67 ³⁾	3.34 ± 0.68
	150	86.3 ± 14.9 ³⁾	5.83 ± 1.13 ³⁾	3.19 ± 0.70
	300	84.3 ± 11.8 ³⁾	6.05 ± 1.21 ³⁾	3.03 ± 0.55 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 对肝脏组织 SOD, GSH-Px, MAO, MDA 的影响
与正常组比较,模型组肝组织 SOD, GSH-Px 活性明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), MAO 活性及 MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,玛咖多糖高剂

量组明显提高 SOD, GSH-Px 活性 ($P < 0.05, P < 0.01$), 玛咖多糖中剂量组明显升高 SOD 活性 ($P < 0.05$), 玛咖多糖低、中、高剂量组明显降低 MAO 活性及 MDA 含量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 玛咖多糖对衰老模型小鼠肝组织 SOD, GSH-Px, MAO 酶活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

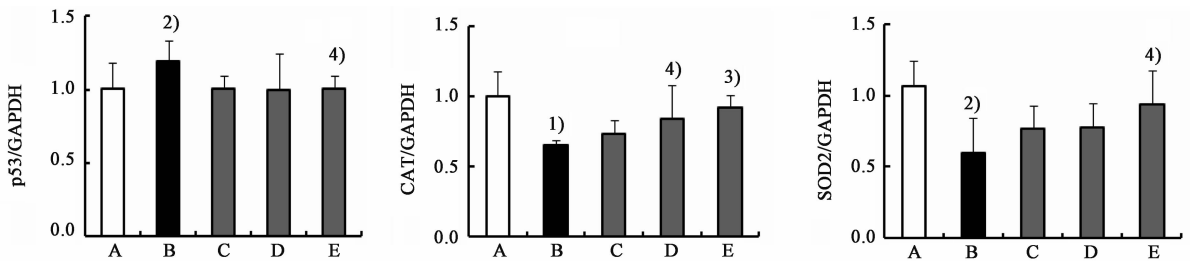
Table 2 Effects of PLR on SOD, GSH-Px, MAO activity and MDA content of liver in aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	MAO/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹
正常	-	141.8 ± 13.7	578.5 ± 94.2	47.7 ± 4.0	0.9 ± 0.15
模型	-	118.8 ± 20.0 ¹⁾	422.3 ± 70.4 ²⁾	58.9 ± 4.3 ²⁾	1.6 ± 0.15 ²⁾
玛咖多糖	75	133.2 ± 4.13	424.2 ± 64.5	47.2 ± 3.3 ⁴⁾	1.1 ± 0.20 ⁴⁾
	150	137.8 ± 11.9 ³⁾	462.2 ± 57.2	48.8 ± 6.8 ⁴⁾	1.2 ± 0.20 ⁴⁾
	300	139.2 ± 7.8 ³⁾	562.1 ± 56.5 ⁴⁾	51.5 ± 3.5 ³⁾	1.1 ± 0.35 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对衰老模型小鼠脾脏组织 p53, CAT, SOD2 mRNA 水平的影响
模型组小鼠的脾脏组织 p53 mRNA 水平明显高于正常组 ($P < 0.05$), CAT, SOD2 mRNA 水平明显低于正常组 ($P < 0.05, P < 0.01$);

与模型组比较,玛咖多糖高剂量组明显降低 p53 mRNA 水平 ($P < 0.05$), 玛咖多糖中、高剂量组明显升高 CAT mRNA 水平, 玛咖多糖高剂量组明显升高 SOD2 mRNA 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 玛咖多糖 75 mg·kg⁻¹ 组; D. 玛咖多糖 150 mg·kg⁻¹ 组; E. 玛咖多糖 300 mg·kg⁻¹ 组。与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$

图 2 玛咖多糖对衰老模型小鼠脾脏组织 p53, CAT, SOD2 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of PLR on p53, CAT, SOD2 mRNA level of spleen in aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

氧化应激与衰老及衰老相关的疾病密切相关^[8], 有研究表明过多摄入 D-半乳糖会产生与自然衰老相似的症状^[9]。免疫系统是维护和协调整个

生命活动的一个完整自主的系统, 免疫系统的功能下降和结构老化是衰老最主要的特征。胸腺是衰老过程中免疫系统的中心器官, 对调节免疫反应起着重要的作用, 胸腺的发育, 退化具有明显的年龄特

征。脾脏作为外周免疫器官,是免疫细胞进行免疫应答的场所,其功能也随着年龄增加而逐渐衰退。

在衰老过程中,自由基和脂质过氧化的代谢产物 MDA,老年化酶 MAO 蓄积,SOD,CAT,GSH-Px 等抗氧化酶被消耗^[10]。因此检测免疫组织中抗氧化酶 SOD, CAT, GSH-Px 活性和衰老相关酶 MDA, MAO 含量或者活性能在一定程度上了解免疫器官的氧化损伤程度。p53 是一种肿瘤抑制因子,在调控细胞凋亡中有着重要的作用,当外界的氧化应激作用于机体时,会导致机体细胞的凋亡或坏死,这时 p53 这种肿瘤防御蛋白会激活使凋亡细胞停滞增殖^[11]。CAT,SOD2 是细胞中与抗氧化酶相关的因子,其在 mRNA 的表达对体内抗氧化酶活性有很大影响。检测 p53, CAT, SOD2 等在基因水平的表达能进一步了解免疫器官的损伤的作用机制。

本实验结果表明玛咖多糖可以通过提高小鼠血清、肝脏中的抗氧化酶活性降低老化相关酶的活性,降低免疫细胞的损伤程度,提高细胞生命力,还能提高脾脏中抗氧化因子在基因水平的表达,达到保护免疫器官的功效。

[参考文献]

[1] Tu X H, Zheng H, Zhang H, et al. Experimental study on fluidized bed drying process of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) tuber[J]. J Chem Pharm Res, 2014, 6(4):1185.
[2] 李磊,周昇昇. 玛咖的食品营养与安全评价及开发前景[J]. 食品工业科技,2012,33(5): 376-379.

[3] Vecera R, Orolin J, Skottová N, et al. The influence of Maca (*Lepidium meyenii*) on antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat[J]. Plant Foods Hum Nutr,2007,62(2):59-63.
[4] 兰美华,吴红彦. 中药植物多糖抗氧化作用研究进展[J]. 实用中医药杂志,2012,28(4):326-327.
[5] 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):97-99.
[6] 蒲跃武,王金全. 玛咖多糖的抗氧化性研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(28):130803-130805.
[7] 周意,栾洁,刘玉香,等. 玛咖多糖对果蝇抗衰老作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):151-154.
[8] Fu C W, Wang T J, Wang Y, et al. Metabonomics study of the protective effects of green tea polyphenols on aging rats induced by D-galactose[J]. J Pharm Biomed Anal,2011,55(5):1067-1074.
[9] Peng X Y, Kong B H, Yu H Y, et al. Protective effect of whey protein hydrolysates against oxidative stress in D-galactose-induced ageing rats[J]. Int Dairy J, 2014, 34(34):80-85.
[10] 曹艳玲,李文兰,韦灵玉. 环黄芪醇对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):208-211.
[11] Tissenbaum H A, Guarente L. Increased dosage of *daf-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature,2001,410:227.

[责任编辑 周冰冰]