

天门冬对 *D*-半乳糖衰老模型小鼠 红细胞膜、肝细胞膜 MDA 影响的实验研究[△]

佳木斯大学医学院药理学系(154002) 曲凤玉* 毛金军 魏晓东** 李士莉** 王玉民**

摘 要 为探讨天门冬的抗衰老机制,采用 *D*-半乳糖衰老模型小鼠,ig 天门冬不同溶媒提取液 30 d,测定红细胞和肝细胞膜 MDA 含量。实验结果表明:天门冬氯仿、乙醇和水提液均可显著降低衰老模型小鼠肝细胞膜 MDA 水平($P<0.01$);天门冬氯仿提取液可显著降低红细胞膜 MDA 含量($P<0.01$),而醇提液和水提液不能降低红细胞膜 MDA 含量。

关键词 天门冬 肝细胞膜 红细胞膜 丙二醛(MDA) 抗衰老

天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour) Merr. 为百合科多年生藤本植物的块根,始载于《本经》,自古即作为益寿延年之上品。《神农本草》记载天门冬“久服轻身益气,延年不饥”。现代药理研究表明天门冬能延长家蚕的寿命,具有较强的清除超氧自由基,延缓衰老的作用^[1]。但有关天门冬不同溶媒提取液对 *D*-半乳糖衰老模型小鼠^[2]红细胞膜、肝细胞膜 MDA 的影响未见报道。为阐明天门冬抗衰老作用机制,我们采用 *D*-半乳糖衰老模型小鼠,给予天门冬氯仿、乙醇和水提液,测定比较 3 种不同溶媒提取液对衰老模型小鼠肝细胞膜和红细胞膜自由基代谢产物 MDA 的影响。

1 材料

1.1 动物:昆明种健康雄性小鼠,3~4 月龄,体重(20±2) g,54 只(由白求恩医科大学动物部提供),随机分成 5 组,正常对照组(12 只),衰老模型组(12 只),模型给药组(3×10只)。

1.2 药材:天门冬由佳木斯药材公司提供,由本院生药教研室鉴定。

1.3 试剂和仪器:*D*-半乳糖由上海试剂二厂生产;三羟甲基氨基甲烷(Tris):AR 级,

由北京帮定提供;MDA 测试盒,蛋白定量测试盒均由南京建成生物工程研究所提供。上海上皿 JA-2003 型电子天平,上海 722-B 型光度计,湖南 GL-20 A 低温高速离心机,江苏 FZQ-2 型旋涡混匀器。

2 实验方法

2.1 天门冬液的制备:将天门冬用热空气烘干,粉碎成粗粉,称取 75 g,用 375 mL 氯仿回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,回收氯仿;水浴挥尽氯仿;将天门冬挥干,继续用 95%乙醇 375 mL 回流提取 3 次,合并提取液,回收乙醇,水浴挥尽乙醇;将天门冬挥干,继续用蒸馏水回流提取 3 次,合并提取液;将 3 种提取液分别稀释至生药浓度 0.7 g/mL,冷藏备用。

2.2 动物处理:正常对照组,每日 sc 生理盐水,ig 温开水;衰老模型组,每日 sc *D*-半乳糖(7 mg/mL,经 130 ℃灭菌,100 mg/kg 体重),ig 温开水;模型给药组,每日 sc *D*-半乳糖(100 mg/kg 体重),同时分别 ig 天门冬氯仿,乙醇和水提液(2 g/kg 体重)。各组分笼饲养,自由进食饮水,自然光照,饲养温度 18 ℃~24 ℃,湿度 50 ℃~60 ℃,连续 30 d。

2.3 红细胞膜制备:小鼠眼眶取血,肝素抗

* Address: Qu Fengyu, Department of Pharmacy, Medical College of Jiamusi University, Jiamusi

曲凤玉 女,35 岁,硕士,副教授。从事衰老的生化机制研究和抗衰老中药的筛选,已在国家级杂志发表 7 篇论文,获黑龙江省教委科技进步奖一项。

** 本院生化教研室

△黑龙江省自然科学基金资助项目(D9818)

凝,2 500 r/min 离心 5 min,用滴管吸出血浆层(包括白细胞层),用 50 mmol Tris-HCl-1 mmol EDTA 生理盐水吹打 5 次,混匀后离心 2 min,反复洗 3 次。按 1:20 的比例加入预冷的 10 mmol Tris-HCl,轻摇 3 min 使其充分溶血。 1×10^4 r/min 离心 20 min,去掉含血红蛋白的上清层,并去掉离心管底层的硬层沉淀物。再用 10 mmol Tris-HCl 缓冲溶液洗涤离心 20 min,反复 3 次。显微镜下观察红细胞"ghost",即红细胞有无破的影子。加 50 mmol Tris-HCl 缓冲液,据标准曲线光密度对应的浓度配成 1~2 mg/mL 浓度的膜蛋白溶液,分装于一次性塑料管中,放-40℃冰箱保存,整个过程在 0℃~4℃下操作。

2.4 肝细胞膜制备^[3]:将小鼠断头处死,立即取出肝脏,取部分称重,加入 4 倍体积冷生理盐水匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,得去核上清,将此上清 1×10^4 r/min 离心 10 min 得去膜上清,沉淀为破碎细胞膜和线粒体等。用 10 mmol/L Tris 缓冲液(pH=7.4)洗 2 次, 1×10^4 r/min 离心 10 min 弃上清,沉淀用 Tris 缓冲液悬浮,供膜 MDA 测定。

2.5 指标测定:MDA 测定采用 TBA 比色法,蛋白测定采用双缩脲法,测定步骤按试剂盒说明程序进行。

2.6 统计学处理:各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析 q 检验。

3 实验结果

与衰老模型组比较,天门冬氯仿、乙醇和水提液均可显著降低小鼠肝细胞膜 MDA 的含量($P < 0.01$),尤以水提液抑制脂质过氧化作用最佳;天门冬脂溶性的氯仿提取液可显著降低小鼠红细胞膜 MDA 的含量($P < 0.01$),而醇提液和水提液不能降低红细胞膜 MDA 的含量,见表 1。

4 讨论

机体衰老是一个复杂的过程,自 1956 年 Harman 提出衰老的自由基学说以来,众多的实验表明自由基及其诱导的脂质过氧化反应是引起生物衰老的重要原因。脂质过氧化

表 1 对小鼠红细胞膜、肝细胞膜 MDA 含量的影响

组别	剂量 (g/kg)	n	MDA(nmol/mg prot.)	
			红细胞膜	肝细胞膜
正常对照	—	12	31.52±3.32	29.84±2.81
衰老模型	—	12	41.83±4.51△△	37.15±2.88△△
天门冬氯仿提取液	2	10	32.27±3.24**	29.23±4.46**
天门冬乙醇提取液	2	10	39.09±5.09**	29.14±4.09**
天门冬水提液	2	10	40.67±4.57**	24.44±3.80**

与正常对照组比较:△△ $P < 0.01$

与衰老模型组比较:** $P < 0.01$

反应的最终产物 MDA 含量可代表机体受自由基损伤的程度,大量研究表明 MDA 含量随增龄而增加,到目前为止尚未见到相反的报道,所以用它作衰老指标是可靠的。

许多学者认为细胞衰老是整体衰老的基础,而细胞水平的改变主要表现在细胞膜上^[4],因细胞膜系统上富含多不饱和脂肪酸,使得细胞膜成为自由基进攻的主要靶部位。自由基进攻细胞膜,诱发膜上不饱和脂肪酸过氧化反应,引起膜脂间或脂质与膜蛋白间的交联,导致膜的结构和功能发生改变。

祖国医学应用补益药,从不同方面增强机体抗病机能,促进体内生理生化反应向有利于健康的方向发展,对脂质过氧化反应的抑制就是保护机体免于受伤害的方式之一^[5]。天门冬抗衰老机制可能是多方面的,对脂质过氧化反应的抑制无疑是其抗衰老的机制之一。天门冬不同溶媒提取液对肝细胞膜 MDA 影响的差异可能是由于抗氧化成分在不同溶媒中的溶出率不同所致,其醇提液和水提液可显著降低肝细胞膜 MDA 含量而对红细胞膜无显著影响,可能是由于不同的组织其药物的生化机能不同,对药物作用的反应也不同,即药物作用的选择性所致^[6]。

参考文献

- 1 臧堃堂主编.传统益寿精要.北京:世界图书出版公司,1992:262
- 2 龚国清,等.中国药科大学学报,1991,22:103
- 3 唐筑灵,等.老年学杂志,1992,12:356
- 4 刘俊达.老年学杂志,1992,12:377
- 5 裘月,等.中国中药杂志,1996,31:83
- 6 杨藻宸主编.医用药理学.第3版.北京:人民卫生出版社,1997:49

(1999-01-04 收稿)