

化损伤和无氧酵解,而四逆汤及其有效部位可以对抗这种氧化损伤和无氧酵解。

从上述实验可知四逆汤有效部位和四逆汤都可不同程度地减轻心肌缺血-再灌注过程中缺血、无氧酵解及氧化应激反应,改善心肌细胞的代谢环境,使心肌得

到了适当的保护,从而改善了缺血-再灌注损伤心肌的收缩功能,减少了再灌注初期心律失常的发生。

References:

- [1] Wu W K, Feng J F, Huang X R, *et al* Preliminary study on extraction process of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 210-212.

玛咖醇提取物对小鼠的抗衰老作用

余龙江, 张永忠*, 金文闻, 吉臻宇, 熊婉婷

(华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要:目的 探讨玛咖醇提取物的抗衰老作用及其机制。方法 采用自然衰老小鼠为模型,连续 ig 给予玛咖醇提取物 60 d 后,测定小鼠血清、肝脏、心脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)的水平以及皮肤羟脯氨酸水平,免疫功能实验采用 PHA 刺激淋巴细胞转化及免疫器官指数的方法。结果 玛咖醇提取物能显著提高老龄小鼠心脏和肝脏中 GSH-Px 活性及血清和肝脏中 SOD 活性,降低血清及肝脏中 MDA 水平,增加皮肤羟脯氨酸水平,提高 PHA 刺激的淋巴细胞转化率。结论 玛咖醇提取物可能通过改善自由基代谢,增强细胞免疫发挥其抗衰老作用。

关键词: 玛咖; 抗衰老; 脂质过氧化; 羟脯氨酸

中图分类号: R 286.75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0081-03

Anti-senility effect of ethanol extract in rhizome of *Lepidium meyenii* in mice

YU Long-jiang, ZHANG Yong-zhong, JIN Wen-wen, JI Zhen-yu, XIONG Wan-ting

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: **Objective** To study the anti-senility effect and its mechanism of ethanol extract of the rhizome of *Lepidium meyenii* (Maca). **Methods** The model of natural aging mice was used. Ethanol extract of Maca was orally administered to aging mice for 60 d. The activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA) in serum, liver, and heart tissues, and hydroxyproline level in skin of aging mice were measured. The immunological functions were assessed using indexes of immune organs and lymphocyte transformation induced by PHA. **Results** The ethanol extract of Maca markedly made the activity of GSH-Px in liver and heart, SOD in serum and liver, and the content of hydroxyproline in skin increased, and MDA in serum and liver decreased in aging mice. It also significantly raised the rate of lymphocyte transformation in mice, but it had no marked effect on the indexes of thymus and spleen. **Conclusion** Ethanol extract of Maca possesses the anti-senility effect by improving free radical metabolism and enhancing immune function.

Key words: the rhizome of *Lepidium meyenii* Walp. (Maca); anti-senility; lipid peroxide; hydroxyproline

Maca (音译为玛咖)为十字花科独行菜属植物玛卡独行菜 *Lepidium meyenii* Walp. 的形似萝卜的根茎,原产于海拔 3 500~4 500 m 的南美安第斯山区,传统上作为食物和草药用于强壮身体、提高生育力、改善性功能、治疗女性更年期综合征等^[1]。目

前,以玛咖为主要原料的保健品在世界上得到广泛青睐,联合国粮农组织(FAO)建议世界各国推广对玛咖的种植。已有研究表明,玛咖体外具有抗氧化活性^[2],为进一步深入研究玛咖,促进其在我国的开发和利用,本实验以衰老的自由基和免疫学理论为

* 收稿日期: 2005-04-27

基金项目: 湖北省科技攻关项目 (2002AA 301C04)

作者简介: 余龙江(1966—),男,湖北黄冈人,博士生导师,教授,主要从事植物次生代谢途径分子生物学、天然产物化学、生物制药、植物生物技术等方面的研究。Tel: (027) 87792265

* 通讯作者 张永忠 Tel: (027) 62124641 E-mail: zyz-1228@sina.com

指导,探讨玛咖醇提取物对衰老小鼠抗氧化酶活性、过氧化脂质水平及皮肤羟脯氨酸水平的影响,并初步研究其对正常小鼠免疫功能的作用。

1 材料

1.1 动物:自然衰老小鼠,昆明种,14月龄,雌性,体重 (47.5 ± 5) g;正常雌性小鼠,2月龄,体重 (20 ± 2) g;由湖北省医学科学院实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂:玛咖(原产于秘鲁)干粉由玛雅生物工程有限公司提供,玛咖干粉 200 g,加 70% 乙醇 3 L,冷浸振摇 48 h,共提两次,抽滤,滤液在旋转蒸发器上浓缩到 100 mL,此为玛咖醇提取物原液,相当于干粉 2 g/mL (经测定含总生物碱约为 18.8 mg/mL)。灵芝多糖(质量分数 30%),由深圳仙芝楼公司提供,批号 020020823。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品(批号 20040417);考马斯亮蓝 G-250, Sigma 公司产品,批号 20040302;牛血清白蛋白,上海伯奥生物科技有限公司;二甲氨基苯甲醛,武汉有机合成化工厂;氯胺 T,天津化学试剂公司;L-羟脯氨酸,上海康达氨基酸厂;植物血凝素(PHA),上海伊华医学科技有限公司,批号 20030703;其余试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.3 主要仪器:W FJ 7200 型紫外-可见分光光度仪(尤尼柯上海仪器有限公司),旋转蒸发器 RE—52A(上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 玛咖醇提取物对自然衰老小鼠脂质过氧化的影响:正常老龄雌性小鼠随机分为对照组、玛咖给药组、阳性药组,并设青年对照组。每组 10 只,均 ig 给药,玛咖给药组设 3 个剂量组,即 5.0、2.5、1.0 g/kg,阳性药为灵芝多糖,剂量为 1.0 g/kg,对照组 ig 蒸馏水,每日 1 次,连续给药 60 d。末次给药 1 h 后,

摘眼球取血,分离血清,并取脏器和皮肤样品, - 20℃ 保存备测。制备组织匀浆,匀浆液以 3 000 r/min 离心 10 min,上清液经考马斯亮蓝法定量蛋白后,按试剂盒方法测定 SOD、GSH-Px 的活性以及 MDA 的水平。皮肤样品用于测定羟脯氨酸水平。

2.2 皮肤羟脯氨酸水平的测定:取皮肤组织约 50 mg 剪碎后,加适量氯仿-甲醇液,研匀,浸泡 2 h 后,滤过,再用乙醇-水混合液、丙酮依次冲洗滤过,60℃ 烤箱过夜。精确称取脱水、脱脂的皮肤样品 3 mg,放入带塞试管中,加入 6 mol/L 盐酸 1.5 mL,于高压蒸汽锅内水解 3 h,压力 0.15 MPa 磅,自然冷却后取出,各加入 10 mol/L NaOH 0.9 mL,调 pH 值至 7,用蒸馏水稀释至 10 mL,滤过后取 1.0 mL 用氯胺 T 法测定^[3]。

2.3 玛咖醇提取物对正常小鼠免疫功能的影响:正常小鼠随机分为对照组、玛咖给药组及阳性药组,剂量及给药方式同 2.1 项,连续给药 21 d 后,各组小鼠 im 10 mg/kg PHA,连续 3 d,末次注射 96 h 后,剪尾取血作血涂片,晾干,瑞氏染色,油镜下观察淋巴细胞转化情况,计数 100 个淋巴细胞、淋巴母细胞及过渡态细胞数,求其淋巴细胞转化百分率(淋转率)。处死小鼠,取出胸腺、脾脏,剥离脂肪组织称质量,计算脏器指数。

2.4 统计分析:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行多组间单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 玛咖醇提取物对衰老小鼠体内 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平的影响:结果见表 1。老龄对照组与青年对照组相比,其 SOD、GSH-Px 活性显著降低,而 MDA 水平升高,说明老年小鼠体内抗氧化酶活性降低,清除自由基及过氧化物的能力减弱,因而过氧化脂质 MDA 水平增加。玛咖给药组大部分都

表 1 玛咖醇提取物对老龄小鼠 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of Maca ethanol extract on activities of SOD and GSH-Px, and MDA level in aging mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	SOD 活性		GSH-Px 活性		MDA 水平	
		血清/(U · mL ⁻¹)	肝脏/(U · mg ⁻¹)	心脏/(U · mg ⁻¹)	肝脏/(U · mg ⁻¹)	血清/(nmol · mL ⁻¹)	肝脏/(nmol · mg ⁻¹)
老龄对照	-	381.6 ± 43.0	318.1 ± 41.0	5.05 ± 0.05	53.4 ± 2.3	7.67 ± 0.56	2.22 ± 0.33
青年对照	-	431.7 ± 28.5 [*]	408.6 ± 47.4 [*]	6.86 ± 0.33 [*]	59.8 ± 2.4 [*]	6.34 ± 1.25 [*]	1.12 ± 0.17 [*]
玛咖	5.0	396.3 ± 43.3	392.0 ± 28.7 [*]	6.10 ± 0.39 [*]	60.0 ± 1.1 [*]	7.34 ± 0.76	2.18 ± 0.29
	2.5	426.6 ± 44.0 [*]	369.9 ± 27.2 [*]	5.60 ± 0.13 [*]	51.4 ± 1.6	7.05 ± 0.67 [*]	1.92 ± 0.12 [*]
	1.0	364.4 ± 22.7	341.4 ± 37.1	5.44 ± 0.07 [*]	52.4 ± 1.4	7.26 ± 0.46	2.21 ± 0.26
灵芝多糖	1.0	427.1 ± 32.4 [*]	312.0 ± 37.5	5.50 ± 0.07 [*]	53.3 ± 2.5	6.89 ± 0.79 [*]	2.03 ± 0.24

与老龄对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs aging control group

能显著提高小鼠血清和肝脏中的 SOD 活性, 提高心脏和肝脏中 GSH-Px 活性, 但对血清中 GSH-Px 活性影响不显著 (数据未列出), 玛咖中剂量组可显著降低血清和肝脏中的 MDA 水平, 而大剂量和小剂量组虽有降低趋势, 但与老龄对照组相比, 差异无显著性。灵芝多糖能显著提高血清中的 SOD 活性, 心脏中的 GSH-Px 活性, 降低血清中的 MDA 水平。

3.2 玛咖醇提取物对衰老小鼠皮肤羟脯氨酸水平的影响: 结果见表 2。青年对照组小鼠皮肤羟脯氨酸水平明显高于老龄对照组, 玛咖高、中、低剂量组及灵芝多糖组显著提高皮肤羟脯氨酸的水平, 与老龄对照组相比差异显著 ($P < 0.05$, 0.01), 尤以玛咖小剂量组和灵芝多糖组效果显著。

表 2 玛咖醇提取物对老龄小鼠皮肤羟脯氨酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of Maca ethanol extract on skin hydroxyproline level in aging mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量/(g · kg ⁻¹)	羟脯氨酸/(μg · mg ⁻¹)
老龄对照	-	60.92 ± 4.44
青年对照	-	71.85 ± 1.66**
玛咖	5.0	67.48 ± 2.69**
	2.5	64.82 ± 3.48*
	1.0	73.37 ± 1.59**
灵芝多糖	1.0	74.12 ± 4.27**

与老龄对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs aging control group

3.3 玛咖醇提取物对淋巴细胞转化及免疫器官脏器指数的影响: 结果见表 3。与对照组相比, 玛咖大、小剂量组及灵芝多糖组均能显著提高 PHA 刺激引起的淋巴细胞转化率 ($P < 0.01$), 而玛咖组和灵芝多糖组胸腺和脾指数与对照组相比, 有增加趋势, 但

表 3 玛咖醇提取物对正常小鼠淋巴细胞转化及免疫器官脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of Maca ethanol extract on lymphocyte transformation and indexes of immune organs in normal mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量/(g · kg ⁻¹)	淋转率/%	胸腺指数/(mg · g ⁻¹)	脾指数/(mg · g ⁻¹)
对照	-	33.5 ± 5.6	3.05 ± 1.10	3.30 ± 0.66
玛咖	5.0	47.9 ± 11.2**	3.57 ± 1.23	3.46 ± 0.87
	2.5	41.6 ± 11.9	3.73 ± 1.12	3.86 ± 0.97
	1.0	45.3 ± 12.3**	3.11 ± 0.81	3.32 ± 0.84
灵芝多糖	1.0	50.6 ± 13.9**	3.21 ± 1.22	3.85 ± 0.99

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

无显著性差异 ($P > 0.05$)。说明玛咖具有增强细胞免疫的功能, 但对免疫器官脏器指数的作用不明显。

4 讨论

衰老是一个比较复杂的过程。目前, 对于衰老的机制有多种不同的学说, 其中自由基学说是较为成熟的理论。正常情况下, 自由基的产生和消除处于一个平衡状态, 当机体衰老时, 清除自由基的能力减弱, 过剩的自由基将引发一系列生物学毒性反应。组织器官的结构和功能逐步紊乱, 整个机体呈现出衰老特征^[4]。SOD 和 GSH-Px 是机体酶防御体系中清除自由基或活性氧的抗氧化酶。SOD 能清除超氧化物阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$), 保护细胞免受损伤; GSH-Px 特异的催化还原性谷胱甘肽 (GSH) 对过氧化氢的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。此外, 随着机体年龄的增长, 皮肤胶原蛋白交联度增加, 溶解度降低, 皮肤组织中羟脯氨酸水平下降, 伴随着皮肤通透性降低, 皱纹增多^[5], 因此, 皮肤羟脯氨酸水平可反映机体皮肤的衰老程度。衰老还与机体免疫功能的降低密切相关, 尤其表现为细胞免疫功能下降。

本实验结果表明, 玛咖醇提取物能增强老龄小鼠血清、肝脏 SOD 活性, 以及脏器中的 GSH-Px 活性, 降低血清及肝脏中的 MDA 水平, 提高皮肤羟脯氨酸的水平, 增加正常小鼠淋巴细胞转化率, 提示玛咖具有一定的抗衰老作用, 作用机制可能与提高抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性, 清除过氧化脂质, 改善皮肤代谢, 增强机体细胞免疫功能有关。其对体液免疫以及衰老动物免疫功能作用如何有待进一步研究。

References

- [1] Dini A, Migliuolo G, Ratrelli L, et al. Chemical Coruposition of *Lepidium meyenii* [J]. *Food Chem*, 1994, 49: 347-349.
- [2] Sandoval M, Okunama N N, Angeles F M, et al. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*) [J]. *Food Chem*, 2002, 79: 207-213.
- [3] Xu Z Q, Gao X L. Method improvement of measuring hydroxyproline in tissues [J]. *J Prev Med Chin PLA* (解放军预防医学杂志), 1990, 8(1): 40-42.
- [4] Sun C P, Zhang J Z, Duan S J. *Introduction of Free Radical Biology* (自由基生物学导论) [M]. Hefei: Chinese University of Science and Technology Press, 1999.
- [5] Jin Z L. *Principle and Methods of Evaluating Functional Food* (功能食品的评价原理与方法) [M]. Beijing: Beijing University Press, 1995.