

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00786

贻贝多糖对老龄 SD 大鼠抗衰老作用

周文丽,周婷婷,张建鹏,冯伟华*,焦炳华

第二军医大学基础部生物化学和分子生物学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**研究贻贝多糖对老龄大鼠抗衰老的生物效应。**方法:**建立 24 个月龄 SD 大鼠自然衰老模型,分为老年正常对照组、贻贝粉组(1 g/kg)、贻贝多糖低剂量组(200 mg/kg)、贻贝多糖高剂量组(400 mg/kg),3 个月龄大鼠 5 只为青年对照组,灌胃给药(1 次/d);观察大鼠心脏、肝脏、肾、脾的脏器指数,对其心脏、肝脏进行切片观察病理学变化,测定大鼠血清及肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)水平,测定血清主要生化指标。**结果:**与老年组相比,贻贝多糖高剂量组的心脏、肝脏病理切片 H-E 染色观察未见明显衰老性改变,其血清、肝脏中 SOD、GSH-Px 水平增高($P < 0.01$),MDA 含量降低($P < 0.01$)。**结论:**贻贝多糖具有抗衰老作用,抗氧化作用可能是其抗衰老作用的机制之一。

[关键词] 贻贝多糖;衰老;抗氧化剂

[中图分类号] Q 592 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0786-04

Anti-aging activity of *Mytilus coruscus* polysaccharide in aged SD rats

ZHOU Wen-li, ZHOU Ting-ting, ZHANG Jian-peng, FENG Wei-hua*, JIAO Bing-hua

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the anti-aging activity of *Mytilus coruscus* polysaccharide (MP) in aged rats. **Methods:** We established a 24-month natural aging rat model. Twenty model rats were divided into 4 groups, namely, the aging model group, *Mytilus coruscus* powder group (MCP 1 g/kg), high dose MP group (MP 400 mg/kg), and low dose MP group (MP 200 mg/kg). Five three-month-old rats served as young control. The *Mytilus coruscus* power solutions and MP solutions were given intragastrically on a daily basis for 90 days. The organ indices of the heart, liver, kidney, and spleen of rats were observed; the pathology of the hearts and livers was also observed. The levels of superoxidedismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and malonaldehyde (MDA) in the serum and liver were determined; and the main serum parameters were also determined. **Results:** Compared with the aging model group, the heart and liver pathology had no obvious aging changes in the high dose MP group. The serum and liver SOD, GSH-Px levels were significantly higher in the high dose MP group than those in the aging model group ($P < 0.01$); the MDA level was significantly lower than those in the aging model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The *Mytilus coruscus* polysaccharide possess anti-aging activity, and the antioxidant effect might be one of the mechanism for the anti-aging effect.

[KEY WORDS] *Mytilus coruscus* polysaccharide; aging; antioxidants

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7): 786-789]

我国已经步入老龄化国家行列,延长老年人的寿命,使老年人保持良好的健康状况显得非常重要。衰老是一种多因素、多器官参与的综合性现象,任何单一因素都无法解释其机制,目前被普遍认可的是自由基损伤学说,自由基的产生和清除的相关指标常作为衰老研究的生物标志。

贻贝是海产双壳贝类,俗称青口、海红,是我国海水养殖的主要产品之一,初步研究表明贻贝多糖

具有抗肿瘤、抗病毒和增加机体免疫能力的功效^[1-2]。本课题组通过多年的实验研究并获得纯度和活性都较高的厚壳贻贝多糖 MP-1 (polysaccharide-1 from *Mytilus coruscus*)。MP-1 是相对分子质量为 135 000 的厚壳贻贝多糖,主链为 α -1,4-葡聚糖^[1],能提高荷瘤小鼠的免疫力;有效保护细胞免于 H₂O₂ 的氧化损伤。多糖作为信息分子在受精、胚胎发育、分化,神经系统和免疫系统衡态的维持等方面

[收稿日期] 2008-11-20 **[接受日期]** 2009-04-04

[作者简介] 周文丽,硕士生. E-mail: 54578284@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870972, E-mail: fwh402@163.com

起重要作用;炎症和自身免疫疾病、衰老、癌细胞的异常增殖与转移、病原体感染和器官移植等生理和病理过程都有多糖的介导。目前贻贝多糖的抗衰老生物学活性未见报道,本研究为深入了解多糖的生物学活性及为抗衰老研究提供实验资料,同时也为开发利用海洋资源搭建技术平台。

1 材料和方法

1.1 动物 24个月龄雄性SD大鼠20只,3个月龄5只,由上海西普尔-必凯实验动物公司[SYXK(沪)2003-0018]提供,啮齿类饲料喂养,自由饮食,分笼饲养于第二军医大学实验动物中心SPF级动物房。

1.2 分组及给药方式 24个月龄大鼠随机分成4组,每组5只,分别为老年正常对照组、贻贝粉组(1 g/kg)、贻贝多糖低剂量组(200 mg/kg)、贻贝多糖高剂量组(400 mg/kg);3个月龄大鼠5只为青年对照组。采用灌胃给药(1次/d),老年对照组和青年对照组各灌等容量生理盐水,连续90 d。

1.3 主要试剂 东海厚壳贻贝由浙江省嵊泗嵊山镇贻贝养殖基地提供,贻贝粉和贻贝多糖由本课题组制备;贻贝粉由东海厚壳贻贝去壳取肉,贻贝肉组织匀浆、热水抽提后冷冻干燥得贻贝粉。贻贝粉呈黄色粉末,水溶性好,主要成分为多糖、蛋白质、微量元素等,多糖含量为31%。贻贝多糖由贻贝粉 Sevag 法除蛋白,多次纯化后获得。贻贝多糖呈白色粉末,水溶性较好,苯酚-硫酸法测定多糖含量为95%,主要成分为MP-1。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,丙二醛(MDA)试剂盒,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供,BCA-100蛋白

定量试剂盒由上海申能博彩公司提供。

1.4 实验方法 实验大鼠末次给药的次日给予10%水合氯醛麻醉,心脏取血,断头取脑组织,取肾、心、肝、脾。4%甲醛溶液固定心、肝,送病理科进行H-E染色观察;取心、肝组织,生理盐水冲洗,液氮速冻后-70℃冰箱保存。分别取大鼠肝脏组织块约0.3 g,加冷生理盐水制成10%组织匀浆备用。

1.5 指标测定和观察 心脏、肝脏病理切片观察;测定血清主要生化指标;测定血清、肝脏组织中SOD活性,MDA含量及GSH-Px活性(SOD活性测定采用邻苯三酚自氧化法,MDA含量测定采用TBA反应比色法,GSH-Px活性测定采用DTNB法,蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定,具体操作均按试剂盒所附方法、步骤进行)。

1.6 统计学处理 采用SAS 10.0软件包建立数据库,并进行统计分析。所有资料均进行正态性检验,多组间均数进行方差齐性检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 动物一般情况 老年对照组大鼠迟钝少动,反应缓慢,缺少灵敏性,毛发枯黄;贻贝多糖组、贻贝粉组大鼠在初期烦躁不安,毛蓬乱少光泽,随后逐渐活泼好动,反应灵敏,毛发尚光滑;青年对照组大鼠明显活泼好动,反应灵敏,毛发光洁呈白色。

2.2 对重要脏器体质量指数的影响 观察心、肝脏、肾、脾的脏器指数,脏器指数即脏器与体质量之比(%)=内脏质量(g)/体质量(g)×100%。经统计分析后知,除青年组的肝脏指数比老年组高(有统计学差异, $P<0.05$)外,余各脏器指数无组间差异。见表1。

表1 SD大鼠脏器指数结果

Tab 1 Organ indices of SD rats in different groups

Group	Heart index	Liver index	Renal index	Spleen index
Aging model	0.32±0.05	2.48±0.46	0.29±0.02	0.32±0.16
MCP	0.44±0.14	2.47±0.19	0.45±0.14	0.19±0.08
MP 200 mg/kg	0.42±0.09	2.13±0.63	0.37±0.14	0.18±0.04
MP 400 mg/kg	0.37±0.06	2.47±0.21	0.32±0.03	0.21±0.05
Young control	0.39±0.03	3.61±0.46*	0.42±0.08	0.27±0.02

($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

* $P<0.05$ vs the aging model group

2.3 SD大鼠心、肝形态学变化 老年对照组中心脏局部小灶性心肌萎缩伴少量纤维组织增生,肝脏中央静脉周围肝细胞中度脂肪变性,而贻贝多糖、贻贝粉、青年组除贻贝多糖低剂量组出现轻度脂肪变性外,心脏、肝脏均正常,未见特殊变化。

2.4 血清主要生化指标测定 经统计分析后,血糖

(Glu)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌苷(CRE)、胆固醇(CH)生化指标中,贻贝粉和贻贝多糖组与青年、老年对照组相比无统计学差异;贻贝粉组的三酰甘油(TG)水平较老年对照组、贻贝多糖高剂量组、青年组低,有统计学差异(均 $P<0.05$)。见表2。

表 2 各组大鼠血清主要生化指标的测定结果

Tab 2 Biochemistry parameters in rats of different groups

(n=3, $\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Glu	ALT	AST	BUN	CRE	TG	CH
	$c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$z_B / (\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	$z_B / (\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$
Aging model	5.3±1.3	52.3±9.2	165.1±31.2	299.1±54.8	3.3±0.3	1495.5±290.3	1015.7±103.8
MCP	5.8±0.4	68.2±18.2	142.0±34.5	208.0±54.8	5.6±1.4	692.6±155.1*	821.4±363.6
MP 200 mg/kg	5.0±0.2	62.5±18.1	176.3±30.4	392.9±53.1	3.1±0.2	754.1±106.1	873.9±102.4
MP 400 mg/kg	5.2±0.5	47.0±7.2	242.6±115.8	208.7±65.9	4.0±0.5	1391.5±244.8	801.2±122.1
Young control	5.4±0.2	49.9±11.6	133.7±16.0	376.4±64.1	3.3±0.9	1685.2±267.3	1115.6±462.0

* $P < 0.05$ vs aging model group, MP 400 mg/kg group, or young control group

2.5 大鼠血清中 SOD、MDA、GSH-Px 测定

2.5.1 SOD 结果显示贻贝多糖高剂量组 SOD 活性较老年对照组 ($P < 0.01$)、贻贝多糖低剂量组 ($P < 0.05$) 增高,与青年组无统计学差异 ($P >$

0.05); 贻贝粉组 SOD 活性比老年对照组高 ($P < 0.01$),比青年组的 SOD 活性低 ($P < 0.05$),与贻贝多糖组无差异。见表 3。

表 3 各组大鼠血清和肝脏组织中 SOD、MDA、GSH-Px 酶活力的测定结果

Tab 3 SOD and GSH-Px levels and MDA contents in serum and liver of SD rats

(n=3, $\bar{x} \pm s, \%$)

Group	SOD		GSH-Px		MDA	
	Serum	Liver	Serum	Liver	Serum	Liver
	$z_B / (\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$	$z_B / (\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$	$z_B / (\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$	$z_B / (\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$	$c_B / (\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1})$	$c_B / (\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1})$
Aging model	107.04±24.03	183.18±24.14	728.28±96.10	89.06±9.67	10.53±1.96	5.51±1.44
MCP	138.41±10.73* Δ 281.18±33.52	782.76±78.15	94.25±8.35** Δ	7.94±0.92**	3.64±1.25	
MP 200 mg/kg	135.62±13.74	257.26±28.94	798.28±96.03	94.02±7.96**	8.75±1.5**	4.24±0.62
MP 400 mg/kg	157.51±17.60** Δ 303.91±24.85**	935.17±140.25** Δ 103.51±6.37** Δ #	7.29±0.96**	3.17±1.11** Δ Δ Δ		
Young control	167.92±9.31	328.79±37.11**	943.45±95.49	108.98±7.67	6.94±0.54	2.61±0.49

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs aging model group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs young control group; $\Delta P < 0.05$ vs 200 mg/kg MP group; # $P < 0.05$ vs MCP group

2.5.2 GSH-Px 结果显示贻贝多糖高剂量组 GSH-Px 活性比老年对照组增高 ($P < 0.01$),比贻贝多糖低剂量组高 ($P < 0.05$),与青年组相比无统计学差异; 贻贝粉组 GSH-Px 活性与老年对照组无差异。见表 3。

2.5.3 MDA 结果显示贻贝多糖高剂量组 MDA 含量比老年对照组低 ($P < 0.01$),与贻贝粉组、贻贝多糖低剂量组、青年组无统计学差异; 贻贝粉组 MDA 含量比老年对照组低 ($P < 0.01$),与青年组、贻贝多糖组均无差异。见表 3。

2.6 大鼠肝脏组织中 SOD、MPA、GSH-Px 测定

2.6.1 SOD 结果显示贻贝多糖高剂量组 SOD 活性较老年对照组增高 ($P < 0.01$),与贻贝粉组、贻贝多糖低剂量组比较有统计学差异 ($P < 0.05$); 贻贝粉组 SOD 活性与老年对照组相比无显著差异。见表 3。

2.6.2 GSH-Px 结果显示贻贝多糖高剂量组 GSH-Px 活性比老年对照组 ($P < 0.01$)、贻贝粉组、贻贝多糖低剂量组增高 ($P < 0.05$),与青年组无统计学差异; 贻贝粉组 GSH-Px 活性比老年对照组高 ($P < 0.01$),

比青年组低 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.6.3 MDA 结果显示贻贝多糖高剂量组 MDA 含量比老年对照组、贻贝多糖低剂量组低 ($P < 0.05$),比青年组高 ($P < 0.01$); 贻贝粉组 MDA 含量与老年对照组相比无差异。见表 3。

3 讨论

近年来在分子生物学和细胞生物学迅速发展和推动下,衰老的研究已取得了重大的进展,并提出了有关衰老的若干学说,关于衰老的机制主要有以下学说: 自由基损伤学说^[3]、遗传突变学说^[4]、端粒丢失学说^[5]、线粒体丢失学说^[6]、衰老的网络学说^[7]等。目前被普遍认可的是自由基损伤和端粒丢失学说,近年来非酶糖基化学说等也取得很大进展。随着自由基生物学的发展,在此基础上提出了很多新理论和假说,如近年提出的自由基氧化-非酶糖基化衰老学说等^[8-9]。

衰老学说中最有影响力的学说就是 1956 年美国学者 Harman 提出的自由基损伤学说^[3]。自由基是人体正常的代谢产物,正常情况下人体内的自由

基处于不断的产生与消除的动态平衡中,一旦数量过多会引起生物大分子如脂质、蛋白质、核酸的损伤。因此自由基的产生和清除的相关指标常作为衰老研究的生物标志。

本实验从抗氧化方面探讨了贻贝多糖可能的抗衰老机制,心脏和肝脏切片 H-E 染色结果显示老年对照组中心脏局部小灶性心肌萎缩伴少量纤维组织增生,肝脏中央静脉周围肝细胞中度脂肪变性,而贻贝多糖、贻贝粉、青年组除贻贝多糖低剂量组出现轻度脂肪变性外,心脏、肝脏均正常,未见特殊变化,初步提示贻贝多糖可以延缓大鼠重要脏器的衰老进程。

贻贝多糖高剂量组能提高老龄大鼠血清、肝脏中 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低 MDA 的含量,与老年组相比差异显著,与青年组相比无明显差异,结果提示贻贝多糖在此剂量下对老年 SD 大鼠具有较明显的抗衰老作用。

贻贝粉亦提高老龄大鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低 MDA 的含量,但肝脏组织中 SOD、GSH-Px 的活性和 MDA 含量与老年组相比均无显著性差异,其抗衰老效应不似贻贝多糖肯定;从此实验中发现有降低三酰甘油的趋势,因为贻贝粉所含组分较多,其延缓衰老及降低三酰甘油的作用亦可能与其中所含的糖蛋白、脂类或者某些微量元素有关,还将进一步实验研究以明确其确切作用及机制。

除青年组的肝脏指数比老年组高,心脏指数、肾脏指数、脾指数指标间无组间差异,说明贻贝多糖和贻贝粉未造成器官的肥大或者萎缩,间接提示可能无脏器毒性。血清主要生化指标统计提示,贻贝多糖和贻贝粉在此剂量下无心肝肝肾毒性,对血糖也无明显影响。

随着人口老龄化,抗衰老医学的重要性日益增加,抗衰老已成为国内外关注的很重要的研究领域。氧自由基可诱发炎症、免疫失调、恶性肿瘤等多种疾病,亦是导致肝、肾缺血性损伤及心脑血管组织缺血-再灌注损伤的关键因素,亦与衰老密切相关。开发和研制高效的抗衰老剂及自由基清除剂,对延缓人体衰老和防治与自由基有关的多种疾病有重大价值。维生素 E 是国内外公认的自由基清除剂和抗衰老剂,然其药效尚欠佳。多糖作为信息分子在受精、胚胎发育、分化,神经系统和免疫系统平衡的维持等方面起重要作用;从动植物有效成分中寻求高效低毒的自由基清除剂和抗衰老剂是发展和开发新药的重要途径。目前已经有研究表明黄芪多糖^[10]、枸杞多糖^[11]、女贞子多糖与菟丝子多糖^[12]、紫菜多糖^[13]等多糖具有抗衰老的作用^[14],主要通过提高抗氧化能

力发挥抗衰老作用。

本课题组多年来对海洋贻贝多糖,从分离纯化、结构测定及活性分析等方面进行了较系统的研究,前期结果显示贻贝多糖具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫功能的作用,目前通过实验初步发现贻贝多糖具有抗衰老的活性,抗氧化作用可能是其抗衰老作用的机制之一。我们将深入研究多糖抗衰老的作用和机制,为开发利用海洋资源开辟新的药用途径。

[参考文献]

- [1] Xu H, Guo T, Guo Y, Zhang J, Li Y, Feng W, et al. Characterization and protection on acute liver injury of a polysaccharide MP-I from *Mytilus coruscus* [J]. *Glycobiology*, 2008, 18: 97-103.
- [2] 徐红丽, 郭婷婷, 郭一锋, 张建鹏, 冯伟华, 焦炳华. 贻贝多糖 MP-I 的分离纯化及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 998-1001.
- [3] Xu H L, Guo T T, Guo Y F, Zhang J P, Feng W H, Jiao B H. Isolation and purification of water-soluble polysaccharide MP-I from *Mytilus coruscus* and study on its *in vitro* anti-tumor activity [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27: 998-1001.
- [3] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. *J Gerontol*, 1956, 11: 298-300.
- [4] Imam S Z, Karahalil B, Hogue B A, Souza-Pinto N C, Bohr V A. Mitochondrial and nuclear DNA-repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an age-dependent manner [J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27: 1129-1136.
- [5] Zhang P, Dilley C, Mattson M P. DNA damage responses in neural cells: focus on the telomere [J]. *Neuroscience*, 2007, 145: 1439-1448.
- [6] Shawi M, Autexier C. Telomerase, senescence and ageing [J]. *Mechan Aging Devel*, 2008, 129: 3-10.
- [7] Li L, Pischetsrieder M, St Leger R J, Wang C. Associated links among mtDNA glycation, oxidative stress and colony sectorization in *Metarhizium anisopliae* [J]. *Fung Genet Biol*, 2008, 45: 1300-1306.
- [8] Thornalley P. Glycation and the enzymatic defence against glycation in the ageing process [J]. *Compar Biochem Physiol A Mole Integr Physiol*, 2007, 146: S57.
- [9] Yoshimaru T, Suzuki Y, Inoue T, Nishida S, Ra C. Extracellular superoxide released from mitochondria mediates mast cell death by advanced glycation end products [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783: 2332-2343.
- [10] 赵莲芳, 郑玉淑, 朴惠顺, 张善玉. 黄芪多糖及人参总皂苷对衰老小鼠的抗衰老作用 [J]. 延边大学医学学报, 2006, 29: 249-251.
- [11] 师伯省, 李灵霞. 枸杞多糖抗衰老作用的研究 [J]. 中国新医学论坛, 2008, 8: 19-21.
- [12] 蔡曦光, 张振明, 许爱霞, 孟勇, 葛斌, 宋秀荣, 等. 女贞子多糖与菟丝子多糖清除氧自由基及抗衰老协同作用实验研究 [J]. 医学研究杂志, 2007, 36: 74-75.
- [13] Zhao T, Zhang Q, Qi H, Liu X, Li Z. Extension of life span and improvement of vitality of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with different molecular weight polysaccharides from *Porphyra haitanensis* [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 57: 67-72.
- [14] Gesztes J, Silva L, Costa A, Robert L. Fucose- and rhamnase-rich oligosaccharides and polysaccharides as an effective antiaging active [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2005, 52: 29.