

六味地黄生物制剂多糖对果蝇抗氧化作用的影响

丘婷, 吴思, 陈朋, 李天河, 赵越*
(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 观察六味地黄生物制剂多糖(LW-PSB 多糖)对果蝇抗氧化作用的影响。方法: 采用美国野生型黑腹果蝇为实验对象, 收集 8 h 内羽化未交配果蝇, 雌雄分开, 在温度为(25 ± 1) °C, 相对湿度为(60 ± 5)% 的人工气候箱中用培养基进行培养, 将果蝇随机分为阴性对照组(普通培养基), 阳性对照维生素 C 组(添加维生素 C 1 g·kg⁻¹ 的培养基), LW-PSB 多糖低、中、高剂量组(含不同浓度的 LW-PSB 多糖的培养基, 浓度依次为 1, 3, 9 g·kg⁻¹), 共 5 组, 每组雌、雄各 500 只。果蝇 30 d 龄时分别制成匀浆, 测定果蝇体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化物(TAOC)活性及丙二醛(MDA)含量。结果: 与阴性对照组比较, LW-PSB 多糖各剂量组能提高果蝇 SOD, CAT, GSH-Px 和 TAOC 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 降低 MDA 含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 与维生素 C 组比较, LW-PSB 多糖各剂量组能不同程度地提高 GSH-Px 和 TAOC 活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 降低 MDA 含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。结论: 六味地黄生物制剂多糖饲喂果蝇可提高果蝇体内的抗氧化能力。

[关键词] 六味地黄生物制剂多糖; 黑腹果蝇; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0215-04

Effect of Polysaccharides Extracting from Liuwei Dihuang Decoction Metabolized by Photosynthetic Bacteria on Antioxidative Ability of *Drosophila melanogaster*

QIU Ting, WU Si, CHEN Peng, LI Tian-he, ZHAO Yue*

(College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of polysaccharides extracting from Liuwei Dihuang decoction metabolized by photosynthetic bacteria (LW-PSB) on the antioxidative ability of *Drosophila melanogaster*. **Method:** Eight h eclosion unmated (*D. melanogaster*) were collected. Male and female were separated, cultivated in the artificial box with the culture medium at the temperature of (25 ± 1) °C, relative humidity for (60 ± 5)%. *D. melanogaster* were randomly divided into 5 groups: negative control group, positive control group, LW-PSB polysaccharides groups (1, 3, 9 g·kg⁻¹). Thirty-day old *D. melanogaster* were made into homogenate and the liveness of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), total antioxidant capacity (TAOC) and the malonaldehyde (MDA) content were detected. **Result:** Compared with the negative group, the antioxidase activity such as SOD, CAT, GSH-Px, TAOC of 30-day old *D. melanogaster* were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$) and the MDA content was decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). Compared with the positive group, the antioxidase activity such as GSH-Px, TAOC of 30-day old *D. melanogaster* were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.001$) and the MDA content was decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). **Conclusion:** LW-PSB polysaccharides might have a satisfactory effect on anti-oxidant.

[Key words] LW-PSB polysaccharides; *Drosophila melanogaster*; antioxidase

[收稿日期] 20120513(007)

[基金项目] 广东省自然科学基金重点项目(825022401000006)

[第一作者] 丘婷, 硕士研究生, 从事中药新剂型和新技术研究, Tel: 15017559614, E-mail: tingtingshark@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 赵越, 教授, Tel: 020-39352173, E-mail: zybmbylk688@163.com

六味地黄生物制剂^[1] (Liuwei Dihuang decoction metabolized by photosynthetic bacteria, LW-PSB) 是将优选的光合细菌作为菌种, 引入到中国传统名方六味地黄汤中进行代谢, 通过光合细菌的生物转化功能和自身营养价值的利用, 制备出新型高效的中药生物制剂。本课题组前期实验研究表明, LW-PSB 多糖含量增加^[2], 具有显著的抗衰老作用^[3], 优于传统的六味地黄汤。本实验以美国野生型黑腹果蝇为研究对象, 观察 LW-PSB 多糖对果蝇抗氧化能力的影响, 以探讨 LW-PSB 的抗衰老药效物质基础。

1 材料

1.1 仪器 紫外-可见分光光度仪(日本岛津), 人工气候箱(宁波江南仪器厂), 涡旋离心机(海门市其林贝尔仪器有限公司), 匀浆器(海门市三和建华玻塑仪器厂), 移液枪(苏州百得实验仪器), 电子天平(日本岛津)。

1.2 试剂 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒, 批号 20110918; 丙二醛(MDA)试剂盒, 批号 20110918; 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒, 批号 20110918; 总抗氧化物(TAOC)试剂盒, 批号 20110918; 过氧化氢酶(CAT)试剂盒, 批号 20110918; 考马斯亮蓝试剂盒, 批号 20110918(均为南京建成生物工程研究所产品); 丙酮(批号 20100210), 乙醚,(批号 201007011), 丙酸,(批号 20100307), 均为天津市大茂化学试剂厂产品。

1.3 动物 美国野生型黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*), 由华南农业大学生命科学学院提供。收集 8 h 内羽化未交配果蝇, 雌雄分开, 在温度为(25 ± 1) °C, 相对湿度为(60 ± 5)% 的人工气候箱中用普通培养基进行培养, 间隔 12 h 给予光照。

2 方法

2.1 六味地黄生物制剂的制备 熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和茯苓 6 味中药以 8:4:4:3:3:3 的质量比例配药。加入 8 倍量水, 文火煎煮 1.5 h, 滤过。药渣再加 6 倍量水煎煮 1.5 h, 滤过, 合并两次滤液, 浓缩至 0.5 g·mL⁻¹ 备用。将上述六味地黄汤浓缩液经自然发酵后, 按一定比例加入光合细菌液, 于光照培养箱中培养一定时间既得。所制备的药液含生药材 0.5 g·mL⁻¹, 活菌数为 1 × 10⁹ 个/mL。

2.2 六味地黄生物制剂中多糖的提取与精制 取一定体积的六味地黄生物制剂, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液浓缩, 加入 5 倍体积的 95% 乙醇

沉淀静置 24 h。抽滤, 丙酮、石油醚、无水乙醇依次洗涤 1 ~ 2 次, 沉淀加适量蒸馏水溶解 90 °C 下溶解, 趁热过滤, 滤液再按上法与 95% 乙醇沉淀抽滤, 于 50 °C 烘干即得 LW-PSB 粗多糖粉末, 配置成质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 的 LW-PSB 粗多糖试液备用^[4]。吸取一定体积 LW-PSB 粗多糖试液, 加入 TCA-正丁醇(1:2)溶液, 振摇 30 min, 静置 1.0 h 后, 离心, 除去底部沉淀, 收集上层多糖水溶液烘干即得 LW-PSB 多糖, 多糖含量为 20.81%。

2.3 培养基的制备 水 180 mL, 白糖 13 g, 琼脂 1.3 g, 玉米粉 17 g, 酵母粉 1.4 g, 丙酸 1 mL。分别取 LW-PSB 多糖 0.1, 0.3, 0.9 g 加入到 100 g 普通培养基中, 得到 1, 3, 9 g·kg⁻¹ 的含药培养基。

2.4 实验分组 取 8 h 内孵化的果蝇, 用乙醚麻醉后将雌雄分离, 随机分为 5 组, 分别为阴性对照组(普通培养基), 阳性对照组(添加维生素 C 1 g·kg⁻¹ 的培养基), 低、中、高剂量组(含不同浓度的 LW-PSB 多糖培养基, 浓度依次为 1, 3, 9 g·kg⁻¹), 每组雌雄各 500 只, 分别放入含普通培养基的三角锥形瓶内, 在温度为(25 ± 1) °C, 相对湿度为(60 ± 5)% 的人工气候箱中进行培养, 每 3 d 更换 1 次培养基。

2.5 果蝇 SOD, CAT, GSH-Px, T-AOC 活性以及 MDA 含量的测定^[5] 果蝇 30 d 龄时分别制成匀浆, 每 40 mg 果蝇, 加入 0.5 mL 生理盐水, 在冰浴中迅速匀浆, 以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液按相应试剂盒说明书测定各组匀浆中的 SOD, CAT, GSH-Px, T-AOC 活性以及 MDA 含量。

3 结果

3.1 LW-PSB 多糖对雌性果蝇抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 与阴性对照组比较, LW-PSB 多糖低剂量组提高了雌性果蝇 SOD 和 TAOC 活性; 中剂量组提高了各氧化酶的活性降低 MDA 含量; 高剂量组提高了 GSH-Px 和 TAOC 活性降低 MDA 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与阳性对照组比较, LW-PSB 多糖高剂量组降低了雌性果蝇 MDA 含量。结果具有显著性差异($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 LW-PSB 多糖对雄性果蝇抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 与阴性对照组比较, LW-PSB 多糖低剂量组提高了雄性果蝇 GSH-Px 活性降低 MDA 含量; 中剂量组提高了各氧化酶的活性降低 MDA 含量; 高剂量组提高了 CAT, GSH-Px 和 TAOC 活性降低 MDA 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。与阳性对照组比较, LW-PSB 多糖低剂量组提高了

雄性果蝇 GSH-Px 活性,中剂量组降低 MDA 含量, 含量,具有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。见表 2。

表 1 LW-PSB 多糖对雌性果蝇抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	CAT/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	TAOC/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
阴性对照	-	33.76 ± 14.15	173.60 ± 65.92	3.41 ± 1.02	1.67 ± 0.11	0.86 ± 0.07
维生素 C	1	61.00 ± 7.21	257.11 ± 57.79	16.45 ± 6.25	2.22 ± 0.28	0.76 ± 0.09
LW-PSB 多糖	1	61.37 ± 13.22 ²⁾	201.00 ± 28.42	7.82 ± 2.32 ²⁾	2.19 ± 0.09 ³⁾	0.77 ± 0.08
	3	59.50 ± 14.19 ²⁾	263.12 ± 49.13 ¹⁾	13.63 ± 0.19 ³⁾	1.87 ± 0.05 ²⁾	0.68 ± 0.04 ²⁾
	9	53.42 ± 6.03 ¹⁾	255.11 ± 40.93 ¹⁾	8.79 ± 0.33 ³⁾	2.32 ± 0.24 ³⁾	0.63 ± 0.09 ^{2,5)}

注:与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$;与维生素 C 组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$,⁶⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

表 2 LW-PSB 多糖对雄性果蝇抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	CAT/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	TAOC/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
阴性对照	-	38.70 ± 11.95	215.61 ± 43.22	4.62 ± 1.36	1.36 ± 0.32	1.21 ± 0.13
维生素 C	1	40.90 ± 13.46	297.94 ± 25.18	10.47 ± 1.19	1.93 ± 0.94	0.87 ± 0.04
LW-PSB 多糖	1	43.43 ± 10.02	254.02 ± 16.05	27.67 ± 1.57 ^{3,6)}	1.56 ± 0.21	0.95 ± 0.12 ²⁾
	3	54.49 ± 10.49 ¹⁾	274.23 ± 14.15 ¹⁾	10.28 ± 0.49 ³⁾	1.69 ± 0.16 ²⁾	0.64 ± 0.05 ^{3,6)}
	9	40.39 ± 8.08	314.20 ± 84.50 ¹⁾	16.4 ± 6.18 ^{3,4)}	2.63 ± 0.23 ^{3,6)}	0.46 ± 0.10 ^{3,6)}

4 讨论

衰老自由基学说认为,自由基的产生和机体对自由基清除能力的动态平衡同机体的衰老有着密切的关系。随着年龄的增长,机体产生自由基和清除自由基的平衡被破坏,自由基堆积^[6]。自由基氧化能力极强,可使生物膜中不饱和脂类发生过氧化作用,形成过氧化脂质并产生大量代谢产物,加速机体衰老。但健康机体同时还存在着强大的防护机制对抗自由基的损害。机体清除自由基的能力和自由基代谢产物的含量是决定衰老速度的重要因素。

超氧化物歧化酶(SOD)歧化超氧自由基($O_2^- \cdot$),生成 O_2 和 H_2O_2 , H_2O_2 经氧化氢酶和过氧化物酶的作用得到清除^[7]。机体内 SOD 歧化 $O_2^- \cdot$ 时不断生成的 H_2O_2 可成为活性氧,随着活性氧的增加,激活过氧化氢酶(CAT),有效催化 H_2O_2 分解为 O_2 和 H_2O ^[8],使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)能清除细胞内脂质过氧化产物(ROOH)和 H_2O_2 ,保护细胞膜结构和功能免受 H_2O_2 的氧化损伤,因此 GSH-Px 活性的变化也可反映机体抗氧化能力^[9]。总抗氧化物(TAOC)是体内非酶促体系的抗氧化物质和酶促体系少数小相对分子质量抗氧化物质的总和^[10],TAOC 水平可综合反映机体的抗氧化能力。随着年龄的增长,机体内自

由基含量增加,多种不饱和脂肪酸在自由基的攻击下形成脂质过氧化产物及其降解产物丙二醛(MDA)^[11]。MDA 含量能客观地反映机体自由基水平,因此它既是评价衰老的重要指标,又可间接反映细胞损伤程度。

本实验研究表明,LW-PSB 多糖可提高果蝇体内 SOD, CAT, GSH-Px 和 TAOC 活性,降低 MDA 含量。表明 LW-PSB 多糖抗氧化作用是通过提高体内抗氧化酶活性和降低自由基代谢产物而实现的,但其作用雌雄有别,可能是由于雌性果蝇与雄性果蝇对受试药物的敏感性不同而造成的。综上所述,LW-PSB 多糖可能为 LW-PSB 抗衰老作用的物质基础之一,其具体的药效物质基础有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵越.六味地黄汤的中药生物制剂及制备方法[P].中国专利:ZL2006 10123868.6,2010-09-08.
- [2] 杨苑芬,曾长青,冯俊卿,等.六味地黄汤经光合细菌作用后多糖含量的变化[J].广东药学院学报,2006,22(3):263.
- [3] 臧建伟,胡旭光,唐春萍,等.六味地黄汤生物制剂的抗衰老作用[J].中草药,2007,38(1):99.
- [4] 吴思,丘婷,陈朋,等.六味地黄生物制剂中多糖脱蛋白方法对比[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):56.

毛鸡骨草含药血清体外抗乙型肝炎病毒作用的研究

陈晓白*, 王晓平, 赵仕花

(玉林师范学院生命科学与技术学院, 广西 玉林 537000)

[摘要] 目的:观察毛鸡骨草(*Abrus mollis*)含药血清体外抗乙型肝炎病毒(HBV)的作用。方法:采取中药血清药理实验方法,以 HepG2. 2. 15 细胞为研究模型,将毛鸡骨草含药血清加入 HepG2. 2. 15 细胞培养液中培养,分别在 72 h 和 144 h 收集细胞培养上清液,采用酶联免疫吸附实验法(ELISA 法)和荧光定量 PCR(FQ-PCR)法检测毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞株表达的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和 HBV DNA 复制的影响。结果:毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg 的表达和 HBV DNA 复制都有不同程度的抑制,以给药剂量为 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的毛鸡骨草含药血清组作用 144 h 对 HBsAg 的抑制率和对 HBV DNA 复制的抑制率最明显,抑制率分别为 34.4% 和 41.7%。结论:毛鸡骨草在体外有一定的抗 HBV 作用。

[关键词] 毛鸡骨草含药血清; HepG2. 2. 15 细胞; 乙型肝炎病毒

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0218-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120921.1555.008.html>

[网络出版时间] 2012-09-26 15:55

Inhibitory Effect of Serum Containing *Abrus mollis* on Hepatitis B Virus *in vitro*

CHEN Xiao-bai*, WANG Xiao-ping, ZHAO Shi-hua

(College of Life Science and Technology, Yulin Normal University, Yulin 537000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitive effect of the serum containing *Abrus mollis* on hepatitis B

[收稿日期] 20120620(016)

[基金项目] 广西教育厅科研项目(200710MS052);广西玉林市科技局项目(玉市科攻 0881038)

[通讯作者] * 陈晓白,副教授,从事药理学教学与科研工作, E-mail: ylsy1016@163.com

- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 834.
- [6] 杜红岩, 娄丽杰, 傅建敏, 等. 杜仲雄花茶对 D-半乳糖衰老模型小鼠 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响[J]. 中成药, 2011, 33(2):331.
- [7] de Oliveira E Silva A M, Vidal-Novoa A, Batista-Gonzalez A E, et al. In vivo and *in vitro* antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux [J]. Redox Rep, 2012, 17(2):47.
- [8] Tong T K, Lin H, Lippi G, et al. Serum oxidant and antioxidant status in adolescents undergoing professional endurance sports training[J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 4(17):239.
- [9] Jian H X, Dai M X, Dai X C, et al. Polysaccharides from the medicinal mushroom *cordyceps taii* show antioxidant and immunoenhancing activities in a D-galactose-induced aging mouse model[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 3(29):1.
- [10] Ke C, Sun L, Qiao D, et al. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(10):2670.
- [11] Esrefoglu M, Iraz M, Ates B, et al. Melatonin and CAPE are able to prevent the liver from oxidative damage in rats: an ultrastructural and biochemical study. [J]. Ultrastruct Pathol, 2012, 36(3):171.

[责任编辑 聂淑琴]