

[文章编号] 1000-2200(2010)12-1204-03

· 基础医学 ·

霍山石斛胶囊延缓果蝇衰老的观察

张 静¹, 连超群², 胡明洁¹, 张 鼎¹, 吴守伟¹

[摘要] 目的:探讨霍山石斛胶囊(dendrobium huoshenese capsule, DHC)对延缓果蝇衰老的影响作用及其机制。方法:收集羽化 8 h 内的黑腹果蝇,在普通培养基上饲喂 20 天后随机分为 4 组,分别以添加 0.000%、0.056%、0.167%、0.500% DHC 的培养基饲喂,用生存实验检测果蝇寿命;分别测定给药 10、20、30 日龄果蝇体内超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量。结果:0.056%、0.167%、0.500% DHC 能显著延长雌雄果蝇的半数死亡时间、寿命及最高寿命($P < 0.01$),给药 10、20、30 日龄时雌雄蝇体内随着霍山石斛浓度增高,SOD 活性升高、MDA 含量降低($P < 0.05$)。结论:DHC 具有抗氧化、延缓果蝇衰老的作用。

[关键词] 霍山石斛;果蝇;抗衰老;抗氧化

[中国图书资料分类法分类号] R 285.5 **[文献标识码]** A

Study on anti-aging effect of dendrobium huoshenese capsule on drosophila

ZHANG Jing¹, LIAN Chao-qun², HU Ming-jie¹, ZHANG Ding¹, WU Shou-wei¹

(1. Department of Bioscience, 2. Department of Laboratory Medicine,
Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-aging effect and mechanism of dendrobium huoshenese capsule on drosophila. **Methods:** Newly trapped and not mated drosophila melanogaster were collected within 8 hours, the drosophilas were cultured for 20 days in medium, and were randomly divided into 4 groups, each cultured with 0.000%, 0.056%, 0.167% and 0.500% concentrations of dendrobium huoshenese capsule. The drosophila's life span was detected with survival test. When the drosophilas were given varied concentrations of Dendrobium Huoshenese capsule for 10, 20, 30 days, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were measured respectively. **Results:** When the drosophilas were treated with 0.056%, 0.167%, 0.500% concentrations of dendrobium huoshenese capsule, the half died time, maximum average life span and average life span were prolonged significantly ($P < 0.01$), and SOD activity was increased remarkably ($P < 0.05$) while MDA content was decreased ($P < 0.05$) in the drosophila given the middle and high concentrations of dendrobium huoshenese capsule for 10, 20, 30 days. **Conclusions:** Dendrobium Huoshenese capsule has the anti-oxidation and anti-aging effects on drosophila.

[Key words] dendrobium huoshenese capsule; drosophila; anti-aging; antioxidant

霍山石斛为常用名贵中药材,主产于安徽霍山等地,在抗氧化、抗肿瘤、抗辐射、降血糖、降血脂、提高机体免疫力等方面有重要作用^[1]。“霍山石斛胶囊”(dendrobium huoshenese capsule, DHC)是安徽农业大学霍山石斛课题组以名贵中药霍山石斛为主要原材料,配以白参、西洋参等多种中药自行研制的一种保健药品,前期研究^[2]显示 DHC 具有降低小鼠体内脂质过氧化的程度,提高抗氧化酶活性的能力。在众多衰老理论中,自由基促进衰老已是公认的事实,因此本研究采用果蝇为动物模型,研究 DHC 对果蝇寿命的影响,并从其体内的超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量变化方面,探讨 DHC 延缓衰老作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 DHC 药液:由安徽农业大学生命科学学院霍山石斛课题组惠赠。

1.2 动物 野生型黑腹果蝇由本校生物科学系实验中心提供。收集 8 h 内羽化未交配成虫,雌雄分开,乙醚麻醉后分养于普通培养基培养,温度(25 ± 1)℃,相对湿度(60 ± 1)%。

1.3 果蝇培养基 普通培养基成分^[3]:水 150 ml,琼脂 1.5 g,蔗糖 13 g,玉米粉 17 g,酵母膏 1.4 g,丙酸 1 ml。给药培养基制备:霍山石斛胶囊按人体推荐用量 4.5 ~ 5.5 g/d 推算设计中浓度,中浓度 = (人体推荐量/3 000) × 100%,以 3 倍的浓度梯度设计低、高浓度,在基本培养基基础上,加入 DHC 粉,分别配制含 DHC 0.000%、0.056%、0.167%、

[收稿日期] 2010-06-22

[基金项目] 安徽省教育厅高校青年教师资助项目(2006jq1174);蚌埠医学院科研基金资助项目(BY0514)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 生物科学系, 2. 医学检验系, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 张 静(1979-),女,回族,硕士,讲师。

[通讯作者] 吴守伟,硕士,副教授。

0.500% 的培养基,搅拌均匀后立即分装于洁净的培养管中,每管培养基厚度约 2.0 cm。

1.4 试剂 SOD 试剂盒、MDA 测定试剂盒(批号:20100113)由南京建成试剂公司提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.5 实验方法

1.5.1 果蝇生存实验 取 20 日龄的果蝇在乙醚麻醉下雌雄分开并随机分为 4 组,依次为空白对照组, DHC 低(0.056%)、中(0.167%)、高(0.500%)浓度给药组。空白对照组饲喂普通培养基;给药组果蝇分别饲养于添加了浓度为 0.056%、0.167%、0.500% DHC 的培养基中。每组雌雄果蝇各有 200 只,每个培养管 20 只果蝇。置于温度为 25 ℃,相对湿度为 60% 的培养箱中观察培养,每 4 天更换 1 次培养基。每 24 h 定时记录各组果蝇存活数和死亡数,过度麻醉或培养基粘住等人为因素造成死亡者不计算在内,直到果蝇全部死亡为止。计算各组果蝇平均寿命、半数死亡时间和最高寿命。全部果蝇存活天数的均数为平均寿命,每组中半数果蝇死亡天数的算术平均数为该组的半数死亡时间,每组最后 10 只死亡果蝇的生存天数均值为最高寿命。延寿率 = [(给药组平均寿命 - 对照组平均寿命) / 对

照组平均寿命 × 100%]^[4]。

1.5.2 果蝇体内 SOD 活性和 MDA 含量的测定 取 20 日龄的果蝇,随机分为 4 组,各组药物浓度同果蝇生存实验,每组雌雄各 200 只,分别放入培养管中饲养,每 4 天更换 1 次培养基。每组雌雄果蝇各取 40 mg,在冰浴中迅速制成匀浆,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液按试剂盒说明书分别检测给药 10、20、30 日龄各组单位重量果蝇 SOD 活性及 MDA 的含量。重复 3 次。

1.6 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 DHC 对果蝇寿命的影响 各给药组饲喂 DHC 后,雌雄果蝇的半数死亡时间、平均寿命和平均最高寿命均较对照组延长, DHC 0.056%、0.167%、0.500% 浓度给药组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。0.167%、0.500% 浓度可分别延长雌果蝇半数死亡时间 6.92、6.23 天($P < 0.01$),可分别延长雄果蝇半数死亡时间 7.13、6.38 天($P < 0.01$)。0.167%、0.500% 浓度对雌果蝇的延寿率分别为 28.52%、24.57% ($P < 0.01$),对雄果蝇的延寿率分别为 20.50%、20.03% ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 不同剂量 DHC 对果蝇半数死亡时间、平均寿命和平均最高寿命影响的比较 ($n_i = 200; \bar{x} \pm s; d$)

DHC (%)	半数死亡时间		平均寿命		平均最高寿命	
	雌	雄	雌	雄	雌	雄
0.000	50.33 ± 1.11	45.05 ± 1.08	52.66 ± 3.65	45.36 ± 2.05	77.69 ± 2.47	68.30 ± 1.70
0.056	53.12 ± 1.53**	47.10 ± 1.61**	58.09 ± 2.91**	50.17 ± 2.50**	88.68 ± 1.68**	71.23 ± 2.69**
0.167	57.25 ± 1.85**	52.18 ± 2.29**	67.68 ± 4.11**	54.66 ± 2.89**	91.56 ± 4.19**	75.45 ± 2.17**
0.500	56.56 ± 2.03**	51.43 ± 2.19**	65.60 ± 4.17**	54.45 ± 2.72**	92.36 ± 4.26**	77.54 ± 1.81**
<i>F</i>	742.75	680.55	683.92	587.15	822.88	762.25
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	2.779	3.450	14.018	6.551	11.157	4.528

q 检验:与 0.000% DHC 组比较 ** $P < 0.01$

2.2 DHC 对果蝇体内 SOD 活性的影响 结果显示,同一时间的果蝇体内总 SOD 活性随着培养基中 DHC 含量增加而递增,0.167%、0.500% DHC 组与

0.000% DHC 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 2)。

表 2 DHC 对雌、雄果蝇总 SOD 活性影响 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s; \mu\text{U/L}$)

DHC (%)	雌蝇			雄蝇		
	10 天	20 天	30 天	10 天	20 天	30 天
0.000	316.05 ± 8.91	326.26 ± 10.35	319.71 ± 10.08	357.71 ± 7.98	351.05 ± 8.39	343.71 ± 9.72
0.056	323.91 ± 11.28*	347.18 ± 10.99*	329.91 ± 11.23	377.58 ± 11.35*	381.91 ± 10.00**	373.25 ± 8.68**
0.167	346.77 ± 4.52**	368.80 ± 7.90**	356.77 ± 9.79**	380.77 ± 7.95*	381.77 ± 9.84**	377.44 ± 12.30**
0.500	347.40 ± 10.79*	357.40 ± 14.27*	357.74 ± 13.70*	391.40 ± 7.59**	384.74 ± 8.42**	382.07 ± 7.09**
<i>F</i>	8.92	7.93	8.65	7.58	9.01	9.69
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	85.870	123.486	127.813	78.328	84.529	92.845

q 检验:与 0.000% DHC 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 DHC 对果蝇体内 MDA 含量的影响 结果显示,同一时间的果蝇体内 MDA 含量随着培养基中 DHC 含量增加而下降。0.167%、0.500% DHC 组

与 0.000% DHC 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)(见表 3)。

表 3 DHC 对雌、雄果蝇 MDA 含量的影响($n_i = 3; \bar{x} \pm s; \mu\text{mol/L}$)

DHC (%)	雌蝇			雄蝇		
	10 天	20 天	30 天	10 天	20 天	30 天
0.000	1.78 ± 0.15	1.88 ± 0.15	1.91 ± 0.15	1.57 ± 0.12	1.85 ± 0.16	1.91 ± 0.18
0.056	1.43 ± 0.06**	1.66 ± 0.12	1.78 ± 0.09	1.36 ± 0.11*	1.63 ± 0.12	1.81 ± 0.12
0.167	1.28 ± 0.08**	1.41 ± 0.10**	1.43 ± 0.10**	1.21 ± 0.08*	1.35 ± 0.09**	1.45 ± 0.11**
0.500	1.29 ± 0.09**	1.39 ± 0.10**	1.56 ± 0.08**	1.23 ± 0.10**	1.32 ± 0.10**	1.40 ± 0.10**
F	13	11.34	11.86	7.67	12.99	11.35
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.010	0.014	0.012	0.011	0.015	0.017

q 检验:与 0.000% DHC 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

人的衰老是一个复杂的生物学现象,寿命是衡量衰老的一个指标。在延缓衰老实验^[5]中,果蝇具有与人类相似的生存、发育、衰老阶段。并且果蝇自然生命周期较短,在 25 °C 适宜环境下,从卵、幼虫、蛹到成虫不过 10 天,成虫自然寿命也只有 50 ~ 60 天;而且果蝇体形小,可以用较多样本做实验,从而缩小了抽样误差,因而果蝇常被用于衰老实验研究^[6-7]。果蝇生存实验的评价指标有最高寿命、平均寿命和半数死亡时间 3 种。如果任一剂量组(或二组、三组)的任一性别(或两性)的最高寿命和(或)平均寿命显著长于对照组,即可判定实验样品对果蝇有延缓衰老功能^[8]。本次实验结果显示 0.056%、0.167%、0.500% DHC 组对雌雄果蝇的半数死亡时间、平均寿命和平均最高寿命的延长有统计学意义,这说明一定剂量的 DHC 对果蝇有延缓衰老的功能。且 DHC 0.500% 高剂量组对果蝇半数死亡时间和平均寿命的延长效果略低于 0.167% 中剂量组,这可能是 DHC 在延缓衰老作用上有一定的剂量范围。

Harman 于 1965 年首先提出生物体在细胞正常代谢中所产生的自由基,如果过量就会造成 DNA 和其他大分子损伤,导致退衰性疾病、恶性损伤及细胞死亡,最终使生物体衰老死亡。从衰老自由基学说出发,提高人体 SOD 活性,降低过氧化脂质含量可以消除自由基对机体的老化作用。DHC 富含多糖、生物碱、微量元素、氨基酸以及其他活性成分,具有一系列复杂的、多方面的生理活性。其中 DHC 多糖以及石斛中所含的非醌类、联苜类和苋酮类化合物具有清除活性氧的作用^[2,9]。DHC 抗氧化作用已有报道^[10-11],证实 DHC 多糖对超氧阴离子自由基和

羟基自由基具有不同程度的清除作用,同时对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系也有显著的抑制作用。本研究显示,0.167%、0.500% DHC 在给药 10、20、30 天后,显著提高雌雄果蝇体内 SOD 的活性,减少自由基引起的脂质过氧化反应,使 MDA 含量显著降低,从而延缓衰老。

本研究结果显示,DHC 可能是通过提高生物体内 SOD 等抗氧化酶的活性,降低过氧化脂质分解的最终产物 MDA 的含量而起到延缓衰老的作用。由于衰老是个复杂的过程,DHC 延缓衰老的作用机制还有待于进一步实验和临床研究。

[参 考 文 献]

- [1] 林萍,毕志明,徐红. 石斛属植物药理活性研究进展[J]. 中草药,2003,34(11):19-22.
- [2] 陈凤芹,黄德武,何苗,等. 霍山石斛胶囊抗过氧化作用的研究[J]. 动物医学进展,2007,28(10):54-58.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:1466-1468.
- [4] 张洪泉,余文新. 中华抗衰老医药学[M]北京:科学出版社,2000:4.
- [5] 刘祖洞. 遗传学实验[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,1991:63-64.
- [6] Deepak B, Michael JA, John T, et al. Doxycycline-regulated *Drosophila melanogaster*[J]. Mechanisms Ageing Development, 2004(25):651-663.
- [7] Ferkovich SM, Shapiro JP. Increased egg-aying in *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anochoridae) fed artificial diet supplemented with embryonic cell line[J]. Biological Control, 2004,31(1):11-15.
- [8] 于守洋,崔洪斌. 中国保健食品的进展[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:962-964.
- [9] Xu H, Liu J, Wang ZT, et al. The scavenging of reactive oxygen species by crude drugs and cultured tissues of five species of *Dendrobium Sw*[J]. J Plant Res Environ, 2001,10(2):35-37.
- [10] 郝杰,查学强,鲍素华,等. 霍山石斛不同分子量多糖体外抗氧化研究[J]. 食品科学,2009,30(15):94-98.
- [11] 查学强,王军辉,潘利华,等. 石斛多糖体外抗氧化活性的研究[J]. 食品科学,2007,28(10):90-93.