·基础研究·

甘草地上部分寡糖富集纯化及其抗衰老活性研究△

于冰莉[1]，方永晟[1]，庞昕昕[1]，郭小趁[1]，王文全[1,2*]，刘永刚[1*]

1. 北京中医药大学 中药学院，北京　102488；

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所，北京　100193

［摘要］ **目的**：制备甘草地上部分寡糖，对其进行表征及体内外抗衰老活性评价。**方法**：用水回流提取甘草地上部分，经过 AB-8 型大孔吸附树脂、DEAE-52 纤维素、Sephadex LH-20 树脂等富集纯化寡糖；通过凝胶渗透色谱法测定样品相对分子质量，薄层色谱法鉴别样品中是否含有葡萄糖和果糖，并通过 1，1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基清除实验评价其体外抗氧化能力；通过秀丽隐杆线虫氧化应激、热应激、寿命、脂褐素测定等实验评价其体内抗衰老活性。**结果**：富集纯化得到的甘草地上部分寡糖样品相对分子质量为 180~1800，不含葡萄糖和果糖。样品对 DPPH 自由基有较好的清除作用，半数抑制浓度为 0.220 2 mg·mL^{-1}。甘草地上部分寡糖能显著延长氧化应激、热应激下线虫的寿命，减少线虫体内脂褐素的沉积。**结论**：甘草地上部分提取分离纯化得到的寡糖样品具有良好的体内外抗氧化、抗衰老活性。

［关键词］ 甘草地上部分；寡糖；秀丽线虫；抗氧化活性；抗衰老活性

［中图分类号］ R284；R285　［文献标识码］ A　［文章编号］ 1673-4890（2021）11-1889-08

doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20210127005

Enrichment, Purification, and Anti-aging Activity Evaluation of Oligosaccharides in Aerial Parts of *Glycyrrhiza uralensis*

YU Bing-li[1], FANG Yong-sheng[1], PANG Xin-xin[1], GUO Xiao-chen[1], WANG Wen-quan[1,2*], LIU Yong-gang[1*]

1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488, *China*;

2. *Institute of Medicinal Plant Development*, *Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, *Beijing* 100193, *China*

[**Abstract**] **Objective**: To extract oligosaccharides from the aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., characterize them, and evaluate their anti-aging activity *in vivo* and *in vitro*. **Methods**: The aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. were extracted by water reflux, and then the oligosaccharides were enriched and purified by AB-8 macroporous adsorption resin, DEAE-52 cellulose, and Sephadex LH-20 resin. Gel permeation chromatography was adopted to determine the molecular weight of the sample, and thin-layer chromatography to differentiate whether the sample contained glucose and fructose. The *in vitro* antioxidant activity was evaluated based on the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)-scavenging ability and *in vivo* anti-aging activity by testing the survival of *Caenorhabditis elegans* under oxidative stress and heat stress and the lipofuscin content in the nematodes. **Results**: The molecular weight of the yielded oligosaccharides was in the range of 180-1800, and they did not contain glucose or fructose. The oligosaccharide sample showed high DPPH-scavenging activity, with the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.220 2 mg·mL^{-1}. The sample can significantly prolong the life span of *C. elegans* under oxidative stress and heat stress and reduce the accumulation of lipofuscin in it. **Conclusion**: The oligosaccharides from the aerial parts of *G. uralensis* have high *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-aging activity.

[**Keywords**] aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; oligosaccharide; *Caenorhabditis elegans*; antioxidant activity; anti-aging activity

△［基金项目］ 国家重点研发计划（2018YFC1706505）

*［通信作者］ 王文全，教授，研究方向：中药资源开发与利用；Tel：（010）84738334，E-mail：wwq57@126.com

刘永刚，研究员，研究方向：中药药效物质基础研究；E-mail：liuyg0228@163.com

人口老龄化已成为人们最关注的全球性社会问题之一，衰老及衰老相关疾病成为日益严重的医学问题和社会难题。氧化应激与衰老具有十分紧密的联系。关于衰老的经典学说氧化应激学说认为，衰老的根本原因是氧化性损伤，即自由基积累造成的细胞损伤[1]。通过抗氧化活性药物降低体内自由基水平是延缓机体衰老的重要途径之一。

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎[2]，具有补脾益气、清热解毒、润肺止咳、缓急止痛、调和诸药之功效[3]。我国有“十方九草”“无草不成方”之说，从古至今，甘草根及根茎广为药用，而其地上部分常作为牧草或是焚烧丢弃，造成资源浪费。研究发现，甘草地上部分提取物具有抗氧化[4-9]、抗炎[9-10]、抑菌[11-14]、抗肿瘤[15]等多种药理活性。甘草地上部分水提物中多糖类成分已有报道，且抗氧化活性良好[6]。从中药提取出的寡糖活性成分有很多，如巴戟天寡糖可能通过抗氧化减轻子宫缺血再灌注损伤[16]；人参花寡糖可恢复 *D*-半乳糖诱导的氧化损伤，提高氧化酶活力，减少丙二醛（MDA）在体内的积累[17]。而甘草地上部分寡糖的研究尚未见相关报道。

本研究对甘草地上部分进行提取，运用柱色谱技术分离纯化水提物得到寡糖类成分，借助凝胶渗透色谱、薄层色谱手段对其进行表征，通过体内、体外实验评价甘草地上部分寡糖的抗衰老、抗氧化活性，探索其中潜在抗衰老天然活性物质，为后续甘草地上部分资源综合开发利用提供参考。

1　材料

1.1　菌株、线虫品系

大肠杆菌 *Escherichia coli* OP50、野生型秀丽隐杆线虫株 N2 由中国科学院遗传与发育生物学研究所惠赠。

1.2　试药

甘草地上部分，2018 年 9 月采集于甘肃省酒泉市瓜州县河东乡，经中国医学科学院药用植物研究所王文全教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的地上部分，阴干，粉碎，备用。

无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯（天津市致远化学试剂有限公司）；吡啶、苯胺、磷酸、丙酮、硫酸、二苯胺、硝酸钠、氯化钠均为分析纯（北京化工厂）；5% 苯酚水溶液（上海源叶生物科技有限公司）；对照品 *D*-葡萄糖（纯度≥99%，批号：S21J12I138537）、*D*-果糖（纯度≥99%，批号：J31M9R62568）、维生素 C（纯度≥98%，批号：S19J6G1），均购自上海源叶生物科技有限公司；1，1-二苯基-2-三硝基苯肼[DPPH，梯希爱（上海）化成工业发展有限公司]；葡聚糖相对分子质量标准物质[重均相对分子质量（M_w）分别为 289 000、110 000、60 600、12 600、4320，批号分别为 C10025642、C10025640、C10034456、C10020386、C10020398]，购自上海麦克林生化科技有限公司；AB-8 型大孔吸附树脂（沧州宝恩吸附材料科技有限公司）；DEAE-52 型纤维素树脂（北京索莱宝科技有限公司）；Sephadex LH-20 型树脂[安玛西亚（中国）有限公司]；薄层色谱硅胶 G 板（青岛海洋化工有限公司）。

1.3　仪器

CP224C 型万分之一分析天平（奥豪斯上海仪器有限公司）；Multiskan FC 型酶标仪（赛默飞世尔科技有限公司）；BKQP-75L 型立式高压灭菌锅（济南博鑫生物技术有限公司）；UV-2600 型紫外-可见分光光度计（尤尼柯上海仪器有限公司）；SMZ745 型体视显微镜、ECLIPSE Ts2R 型荧光倒置显微镜（尼康映像仪器销售中国有限公司）；e2695 型色谱仪[色谱柱为 Ultrahydrogel TM 250（300 mm×7. 8 mm，6 μm）与 Ultrahydrogel TM Linear（300 mm×7. 8 mm，10 μm）串联]、2424 RI Detector 型示差折光检测器均购于沃特世科技有限公司。

2　方法

2.1　苯酚-硫酸法测总糖含量

2.1.1　葡萄糖标准曲线绘制　精密称取对照品 *D*-葡萄糖 10 mg，加去离子水定容于 100 mL 量瓶中，混匀，即得葡萄糖对照品溶液，质量浓度为 0. 10 mg·mL^{-1}。精密移取葡萄糖对照品溶液 0、0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7 mL 于 10 mL 量瓶中，加入去离子水补至 1. 0 mL，加入 5% 苯酚溶液 1 mL，混匀，加入浓硫酸 5 mL，振摇混匀，室温条件下静置 20 min，冰浴 15 min，在波长 487 nm 处测定其吸光度（*A*）值。以 *A* 为纵坐标，对照品溶液质量浓度（*C*）为横坐标绘制标准曲线，得回归方程。

2. 1. 2　样品溶液总糖含量测定　精密称取受试样品 10 mg，用去离子水定容于 10 mL 量瓶中，混匀。精密移取样品溶液 0. 1 mL 于 10 mL 量瓶中，加入去离子水补至 1. 0 mL，加入 5% 苯酚溶液 1 mL，混匀，再加入浓硫酸 5 mL，振摇混匀，室温条件下静置 20 min，冰浴 15 min，在波长 487 nm 处测定其 *A* 值，将 *A* 值代入回归方程计算得到其总糖含量。

2. 2　甘草地上部分寡糖的制备

取甘草地上部分，加 10 倍量去离子水，加热提取 2 次，每次连续回流 2 h，纱布滤过，合并滤液，旋蒸浓缩，真空干燥后得到水提物。

取水提物，溶于少量水中，过 AB-8 型大孔树脂柱[18]，径高比 1∶8，吸附过夜，先以 4 倍柱体积（BV）水洗除杂，再以 30% 乙醇洗脱，洗脱流速为 3 BV·h^{-1}，洗脱体积为 8 BV，得到粗糖富集物。

取粗糖富集物，上样 DEAE-52 纤维素柱[19]，依次以去离子水及 0. 1、0. 3、0. 5 mol·L^{-1} NaCl 梯度洗脱，洗脱体积为 4 BV，流速为 1 mL·min^{-1}，洗脱液每 5 mL 接 1 瓶，以洗脱体积为横坐标，以苯酚-硫酸法测得总糖含量为纵坐标，绘制洗脱曲线，合并糖含量高的洗脱液，透析、浓缩、干燥，得到粗糖。

取粗糖，溶于少量甲醇中，上样 Sephadex LH-20 凝胶柱[20]，甲醇洗脱，洗脱体积为 5 BV，流速为 1 mL·min^{-1}，洗脱液每 5 mL 接 1 瓶，以洗脱体积为横坐标，以苯酚-硫酸法测得总糖含量为纵坐标，绘制洗脱曲线，合并糖含量高的洗脱组分，回收溶剂，得到甘草地上部分寡糖样品。

2. 3　甘草地上部分寡糖的表征

2. 3. 1　凝胶渗透色谱法测定样品 M_w　标准曲线的制作：精密称取 M_w 为 289 000、110 000、60 600、12 600、4320 的葡聚糖对照品，配制成 1 mg·mL^{-1} 的溶液，用 0. 22 μm 的滤膜滤过除杂后进样。分析软件为 Angilent GFC；检测流动相为 0. 1 mol·L^{-1} 硝酸钠溶液，流速为 0. 6 mL·min^{-1}，柱温箱温度为 35 ℃，示差检测器温度为 40 ℃，进样量为 20 μL，时间为 45 min。

甘草地上部分寡糖测定：精密称量甘草地上部分寡糖样品，溶于去离子水中，配制成 1 mg·mL^{-1} 的溶液，用 0. 22 μm 的滤膜滤过除杂后进样。用 Angilent GFC 软件分析计算样品 M_w。

2. 3. 2　薄层色谱法鉴定样品成分　精密称量甘草地上部分寡糖样品 10 mg，溶于去离子水 10 mL 中，配制成 1 mg·mL^{-1} 的供试品溶液。精密称量对照品 *D*-葡萄糖和 *D*-果糖各 2 mg，溶于去离子水 10 mL 中，配制成 0. 2 mg·mL^{-1} 的对照品溶液。展开剂为乙酸乙酯-乙醇-吡啶-水（8∶2∶2∶1）。点样量为 5 μL。显色剂为苯胺-二苯胺溶液（取苯胺 1 mL 和二苯胺 1 g，同溶于 100 mL 丙酮中，再加 85% 磷酸水 10 mL，混匀，棕色瓶保存，现用现配），85 ℃加热 10 min。

2. 4　甘草地上部分寡糖体外抗氧化活性评价

精确称取 DPPH 5 mg，用无水乙醇溶解并定容于 50 mL 量瓶中，质量浓度为 0. 1 mg·mL^{-1}，避光保存。取 96 孔板，加入不同质量浓度（0. 05、0. 10、0. 25、0. 50、1. 00 mg·mL^{-1}）的甘草地上部分寡糖样品水溶液 100 μL，再分别加入新配制的 DPPH 溶液 100 μL，避光反应 30 min 后，用酶标仪在 517 nm 波长下测定其 *A* 值。分别以去离子水和维生素 C 作为空白和阳性对照，每个质量浓度重复 4 次。按照公式（1）计算自由基清除率。

$$\text{自由基清除率} = [1 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中，A_i 为 DPPH 100 μL 和样品溶液 100 μL 混合液的吸光度；A_j 为样品溶液 100 μL 和水 100 μL 混合液的吸光度；A_0 为 DPPH 100 μL 和水 100 μL 混合液的吸光度。

2. 5　甘草地上部分寡糖体内抗衰老活性评价

2. 5. 1　溶液配制　M9 缓冲液、NGM 培养基、LB 培养基、线虫裂解液按照常规方法配制[21]。

2. 5. 2　线虫同步化　N2 线虫饲养于涂布有大肠杆菌 *E. coli* OP50 的线虫标准培养基 NGM 中，20 ℃下培养。挑取 50 只左右产卵期成虫至 1. 5 mL 离心管中，加入线虫裂解液 1 mL。涡旋混匀 3~5 min，3000 r·min^{-1} 离心 3 min（离心半径 120 mm）；弃上清液至剩余液体 0. 1 mL，加入 M9 Buffer 1 mL 混匀；重复此步骤 2 次，最后保留液体 0. 1 mL，将液体滴加至新的线虫生长培养基（NGM）中，次日孵化出新的线虫。

2. 5. 3　氧化应激实验　将经过同步化生长至 L4 期后的 N2 线虫置于含或不含药物的 NGM 中，实验分对照组和甘草地上部分寡糖给药组（质量浓度分别为 10、20、40 μg·mL^{-1}），每板 30 条，48 h 后，把各组线虫转移到含有 0. 4% H_2O_2 的线虫 NGM 中观察，每 0. 5 h 记录线虫存活数目，直至线虫全部死

亡，重复 3 次。

2. 5. 4　热应激实验　N2 线虫分组同 **2. 5. 3** 项下。给药组线虫经不同质量浓度的甘草地上部分寡糖处理 48 h 后与对照组线虫同时置于 37 ℃培养箱中进行观察，每 2 h 观察线虫死亡情况，记录并挑出死亡个体，直至线虫全部死亡，重复 3 次。

2. 5. 5　寿命实验　N2 线虫分组同 **2. 5. 3** 项下，每组 50 条，给药后每 48 h 观察 1 次线虫的生存状态，记录死亡线虫数量并将其挑出，并更换新的含药或不含药 NGM，直至所有线虫全部死亡，实验重复 3 次。采用 Kaplan-Meier 生存分析不同质量浓度组线虫的存活率差异。

2. 5. 6　脂褐素含量测定　N2 线虫分组同 **2. 5. 3** 项下，给药处理 5 d 后，挑至滴加 M9 1 滴的 2% 琼脂片上，再滴加叠氮化钠溶液 1 滴，待虫体变直，盖上盖玻片，于倒置荧光显微镜下观察不同组线虫体内的脂褐素水平，固定曝光时间和强度，拍摄荧光图片，拍摄条件为 *E*x 385 nm、*E*m 430 nm，使用 Image J 软件统计图片中脂褐素自发荧光强度。

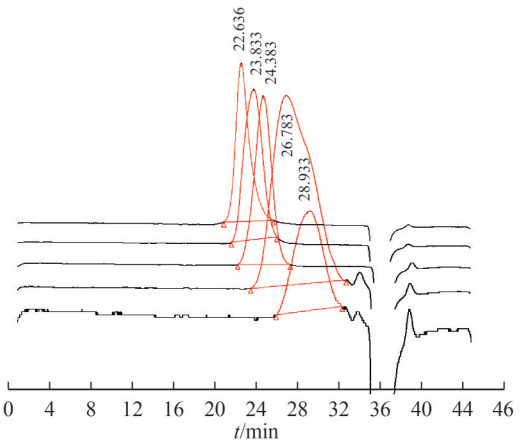
2. 5. 7　数据处理　计量资料数据以（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用 *t* 检验或方差分析，生存分析采用对数秩检验（log-rank test）。均采用 SPSS 20. 0 统计分析软件进行数据的统计学处理，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3. 1　样品 M_w 测定及薄层色谱鉴别

建立葡萄糖标准曲线为 $A=8.526\ 8C-0.045\ 6$（$r=0.996\ 9$），葡萄糖质量浓度为 0. 01~0. 07 mg·mL^{-1} 有较好的线性关系。从甘草地上部分 4 kg 中得到寡糖样品 410 mg，苯酚-硫酸法测其总糖质量分数为 81. 23%。

采用高效凝胶渗透色谱法测定已知相对分子质量的葡聚糖，记录色谱峰保留时间，结果见图 1。建立葡聚糖标准曲线：$Y=-3.464\ 6X+41.284$（$r=0.992\ 7$），X 为 lgM_w，Y 为洗脱时间。取 M_w 为 289 000 的葡聚糖标准溶液重复进样 6 次，按上述色谱条件测定，葡聚糖标准溶液出峰时间的 RSD 为 0. 040 6%，说明该仪器精密度良好。取供试品溶液 6 份，进样，按上述色谱条件测定，溶液出峰时间的 RSD 为 0. 081 5%，说明该方法重复性良好。取供试品溶液 6 份分别放置 0、1、2、4、8、10 h，进样，按上述色谱条件测定，溶液出峰时间的 RSD 为 0. 112%，说明样品稳定性良好。将样品配制成 1 mg·mL^{-1} 的供试品溶液，通过高效凝胶渗透色谱法测定，结果见图 2。样品的图谱不是对称的色谱峰，左侧可见多个肩峰，说明样品中含有多种糖类组分，将样品的洗脱时间最小肩峰值 30 min 和峰值 33. 517 min 分别代入到回归方程，计算得到样品 M_w 为 180~1800，判断为寡糖类成分。



注：由上至下分别表示 M_w 为 289 000、110 000、60 600、12 600、4320。

图 1　葡聚糖对照品的凝胶渗透色谱图

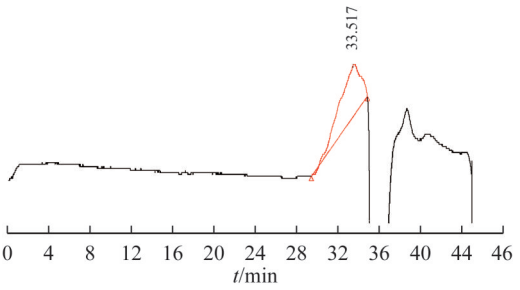


图 2　甘草地上部分寡糖样品的凝胶渗透色谱图

以 *D*-葡萄糖和 *D*-果糖为对照品，采用薄层色谱法对样品进行分析，结果见图 3。图 3 显示，样品中不含葡萄糖和果糖。

3. 2　甘草地上部分寡糖体外抗氧化活性评价

甘草地上部分寡糖样品清除 DPPH 自由基能力测定结果见图 4，不同质量浓度样品溶液对 DPPH 自由基均有清除作用，并且在实验选取的质量浓度范围内呈现明显的量效关系。样品的半数抑制浓度（IC_{50}）为 0. 220 2 mg·mL^{-1}，抗氧化活性弱于阳性对照维生素 C（0. 016 9 mg·mL^{-1}）。表明甘草地上部分寡糖样品具有一定的抗氧化活性。

图 3　*D*-葡萄糖、*D*-果糖、样品的薄层色谱图

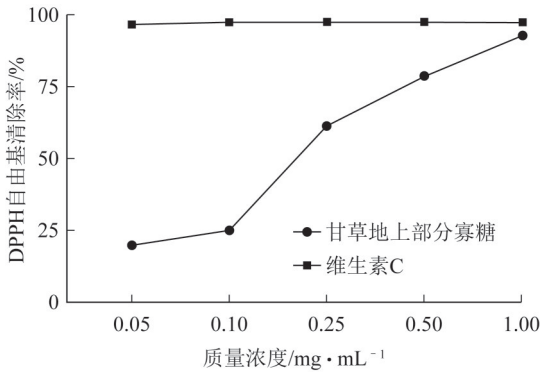
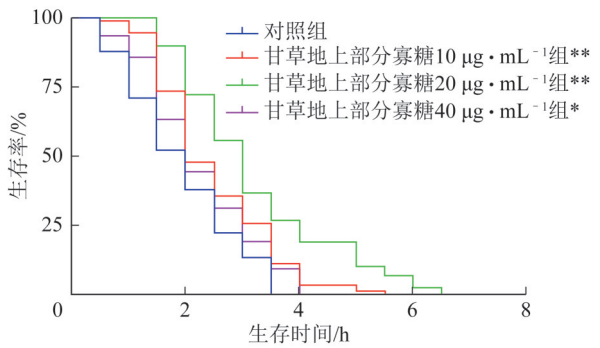


图 4　甘草地上部分寡糖样品与维生素 C 清除 DPPH 自由基的作用

3. 3　甘草地上部分寡糖体内抗氧化应激及热应激活性评价

各组线虫在 H_2O_2 应激环境中培养的生存曲线见图 5。与对照组比较，甘草地上部分寡糖 10、20、40 μg·mL^{-1}组线虫生存曲线均明显右移。在氧化应激条件下，各质量浓度样品组线虫存活率明显提高，与对照组比较，甘草地上部分寡糖 10、20、40 μg·mL^{-1}组线虫存活率差异均有统计学意义（P<0. 05，P<0. 01）。甘草地上部分寡糖 20 μg·mL^{-1}对线虫寿命延长作用最强，抗氧化应激能力最强。

线虫在 37 ℃环境中培养的生存曲线见图 6。与对照组比较，甘草地上部分寡糖 10、20、40 μg·mL^{-1}组线虫生存曲线均明显右移。在热应激条件下各质量浓度样品组线虫存活率均明显提高，且差异有统计学意义（P<0. 01）。甘草地上部分寡糖 20 μg·mL^{-1}组线虫寿命延长作用最强，抗热应激能力最强。



注：与对照组比较，*P<0. 05，**P<0. 01；图 6、9 同。

图 5　氧化应激下甘草地上部分寡糖对线虫寿命的影响

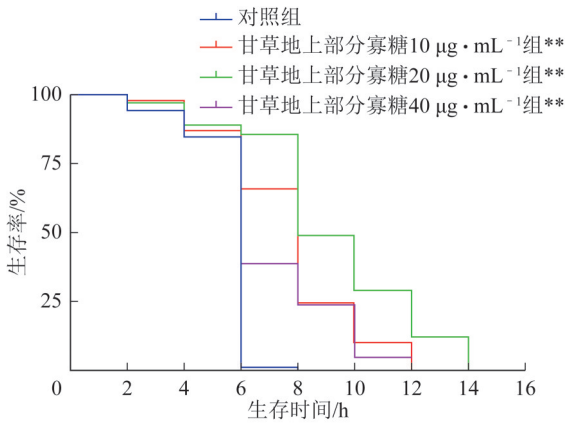


图 6　热应激下甘草地上部分寡糖对线虫寿命的影响

3. 4　甘草地上部分寡糖对延缓线虫衰老的影响

如图 7 和表 1 所示，甘草地上部分寡糖各质量浓度组线虫生存曲线与对照组比较没有发生明显的偏移。甘草地上部分寡糖 20、40 μg·mL^{-1}组线虫平均寿命均高于对照组，但差异无统计学意义。甘草地上部分寡糖 20 μg·mL^{-1}组线虫最长寿命高于对照组，但差异无统计学意义。说明甘草地上部分寡糖对线虫寿命没有显著的延长作用。

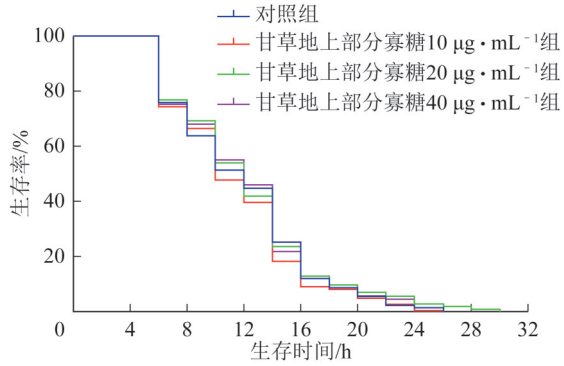


图 7　甘草地上部分寡糖对线虫寿命的影响

表 1　甘草地上部分寡糖对线虫寿命的影响（$\bar{x}\pm s$, n=150）

组别	质量浓度/μg·mL^{-1}	平均寿命/d	最长寿命/d
对照		11.802±0.220	26
甘草地上部分寡糖	10	11.460±0.212	26
	20	12.089±0.237	30
	40	12.010±0.228	26

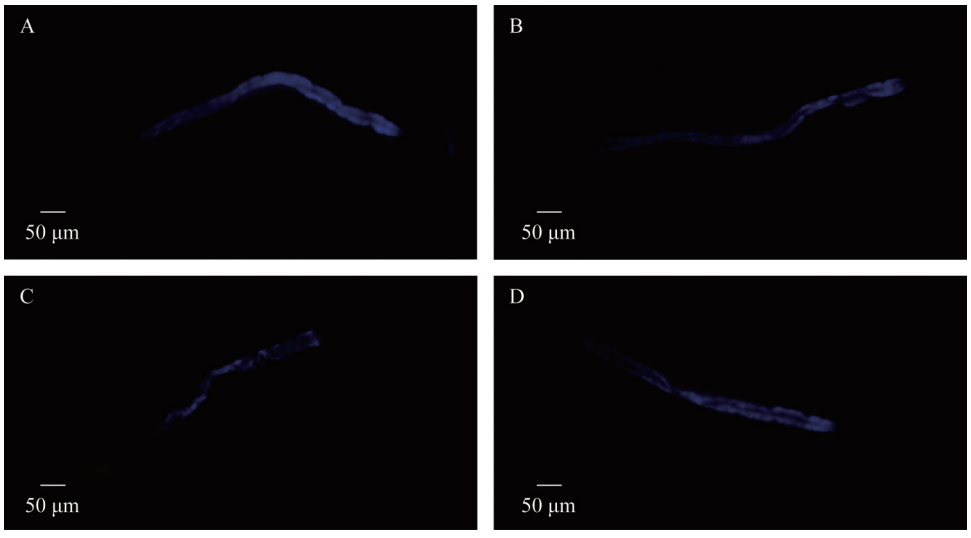
在荧光显微镜下可见线虫体内脂褐素自发蓝色荧光。随着线虫寿命的增加，脂褐素含量逐渐增多。给药 5 d后，甘草地上部分寡糖 10、20、40 μg·mL^{-1}组线虫体内脂褐素荧光强度均明显降低，较对照组分别降低了 23. 8%、33. 8%、23. 4%，差异有统计学意义（P<0. 01）。甘草地上部分寡糖 20 μg·mL^{-1}组线虫体内脂褐素荧光强度最低，对线虫体内脂褐素沉积减缓作用最强，见图 8~9。

4　讨论

现代药理研究表明，甘草主要的抗氧化活性成分为黄酮类，包括甘草总黄酮[22]、查耳酮[23]、甘草苷[24]、异甘草素[25]等，同时甘草中三萜[26]和多糖[27-29]等成分也有一定的抗氧化作用。甘草水提液对具有细胞损伤作用的超氧阴离子自由基和羟基自由基均有明显的清除作用，并能抑制羟基自由基诱发的膜脂质反应，发挥一定的抗衰老作用[30]。甘草苷可以改善 *D*-半乳糖所致衰老大鼠的学习记忆能力，减缓衰老引起的氧化损伤，提高脑内的抗氧化能力[31]。甘草水提物对 *D*-半乳糖致衰老的大鼠具有肝保护、抗氧化和抗衰老作用[32]。

中药多糖来源广泛，具有调节免疫力、抗氧化、抗衰老、抗病毒、抗肿瘤、调血脂、降血糖等多种生物活性，尤其在抗衰老方面有明显的优势，其抗衰老作用机制一直是中药多糖生物活性研究中的热点之一。当归多糖[33]、枸杞多糖[34]、肉苁蓉多糖[35]、海带多糖[36]、黄芪多糖[37]、锁阳多糖[38]、黄精多糖[39]、平贝母多糖[40]、女贞子多糖[41]、马齿苋多糖[42]等中药多糖均可通过抗脂质过氧化和清除自由基，调节端粒酶活性和机体的糖、脂质代谢，以及神经-内分泌功能等多种途径来发挥抗衰老作用。壳寡糖作为壳聚糖降解后的衍生物，能有效清除羟基自由基和超氧阴离子自由基，具有较强的抗氧化活性[43]。系列褐藻胶寡糖通过清除活性氧自由基，来发挥抗氧化作用[44]。琼胶寡糖具有较强且广泛的抗氧化能力，对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基均存在较强的清除作用[45]。

本研究通过提取甘草地上部分，得到的水提物经过 AB-8 型大孔吸附树脂、DEAE-52 纤维素、Sephadex LH-20 树脂等柱色谱进行富集纯化，得到甘草地上部分寡糖，质量分数为 81. 23%，说明该方法可以有效去除水提物中的蛋白质和色素，适宜于甘草地上部分寡糖的纯化。经凝胶渗透色谱法检测，样品 M_w 为 180~1800，且薄层色谱鉴别显示样品不含葡萄糖和果糖，可判断样品为甘草地上部分寡糖类成分。其单糖组成及分子结构信息尚待进一步研究。样品对 DPPH 自由基有较好的清除作用，能显著延长氧化应激、热应激下线虫寿命，减少线虫体内脂



注：A. 对照组；B. 甘草地上部分寡糖 10 μg·mL^{-1}组；C. 甘草地上部分寡糖 20 μg·mL^{-1}组；D. 甘草地上部分寡糖 40 μg·mL^{-1}组。

图 8　给药 5 d 后各组线虫体内脂褐素荧光图（40×）

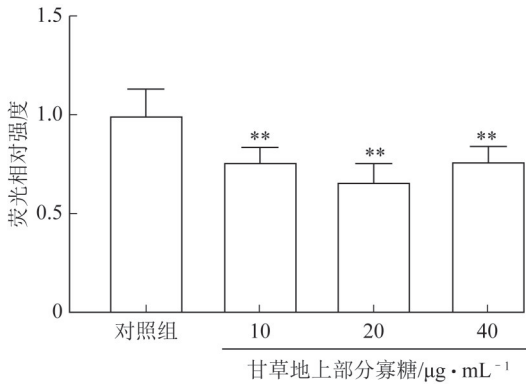


图 9　给药 5 d 后甘草地上部分寡糖对线虫脂褐素沉积的影响

($\bar{x}\pm s$, n=30)

褐素沉积，具有良好的抗氧化损伤及抗衰老活性。说明甘草地上部分寡糖对秀丽隐杆线虫的氧化损伤和衰老具有一定的保护作用，在抗衰老方面具有一定的潜在药用价值，但其作用机制有待深入研究。本研究为甘草地上部分寡糖在抗氧化、抗衰老方面的进一步研究及相关食品、药品、保健食品等产品的开发提供了一定的理论依据，为天然产物的体外抗氧化、体内抗衰老活性评价的探究提供了一定的方法指导。

参考文献

[1] HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. J Gerontol, 1956, 11(3): 298-300.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 86-87.

[3] 李铁民, 梁再赋. 甘草提取物及其衍生物的抗病毒研究现状[J]. 中草药, 1994, 25(12): 655-658.

[4] 康雪芳, 李红丽, 王文全, 等. 甘草地上部分脂溶性总黄酮抗氧化活性研究[J]. 环球中医药, 2016, 9(5): 567-570.

[5] 汪一飞, 左小博, 刘相真, 等. 不同品种甘草叶的化学组分比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(5): 2075-2080.

[6] 林恋竹, 焦铭. 光果甘草叶中性多糖结构表征及抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(1): 106-110.

[7] BIONDI D M, ROCCO C, RUBERTO G. New dihydrostilbene derivatives from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* and evaluation of their antioxidant activity[J]. J Nat Prod, 2003, 66(4): 477-480.

[8] 董怡. 光果甘草叶黄酮的分离纯化、活性研究及应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.

[9] SIRACUSA L, SAIJA A, CRISTANI M, et al. Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves—Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity [J]. Fitoterapia, 2011, 82(4): 546-556.

[10] 邓引梅. 胀果甘草叶总黄酮提取工艺及治疗前列腺炎的物质基础研究[D]. 武汉: 中南民族大学, 2008.

[11] IRANI M, SARMADI M, BERNARD F, et al. Leaves antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra* L[J]. Iran J Pharm Res, 2010, 9(4): 425-428.

[12] FUKUI H, GOTO K, TABATA M. Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1988, 36(10): 4174-4176.

[13] HAYASHI H, YASUMA M, HIRAOKA N, et al. Flavonoid variation in the leaves of *Glycyrrhiza glabra*[J]. Phytochemistry, 1996, 42(3): 701-704.

[14] ZHOU B, WAN C X. Phenolic constituents from the aerial parts of *Glycyrrhiza* inflata and their antibacterial activities [J]. J Asian Nat Prod Res, 2015, 17(3): 256-261.

[15] 董菁, 王秀梅, 杨棉华, 等. 甘草叶中黄酮成分体外诱生细胞毒因子的实验研究[J]. 汕头大学医学院学报, 1994(2): 9-11.

[16] 程亮星. 巴戟天寡糖对大鼠子宫缺血再灌注损伤的抗氧化作用[J]. 中医研究, 2018, 31(7): 68-70.

[17] 马林, 焦丽丽, 张晓瑜, 等. 人参花寡糖抗衰老作用研究[J]. 吉林农业, 2016(21): 78.

[18] 渠婷. 金钗石斛低聚糖的分离、结构鉴定及其功能性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.

[19] 原超. 大枣低聚糖的提取分离研究[D]. 太原: 山西大学, 2012.

[20] 曾凤彩. 酶解玉米麸皮制备阿魏酰低聚糖及抗氧化性质的研究[D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学, 2012.

[21] 庞林海, 杜爱芳, 李孝军, 等. 秀丽隐杆线虫培养特性与保存方法研究[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(1): 34-36.

[22] 木合布力·阿布力孜, 毛新民, 热娜·卡斯木, 等. 新疆光果甘草黄酮类成分的抗氧化活性[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(21): 1617-1620.

[23] 井元知子. 新疆甘草成分的抗氧化作用[J]. 国外医学(中医中药分册), 1997, 19(5): 58.

[24] 陈晶晶, 李向进. 甘草苷对H_2O_2所致SH-EP1细胞株氧化应激损伤中细胞活力值及细胞中线粒体凋亡分子、抗氧化分子含量的影响[J]. 中医药信息, 2018, 35(3): 36-39.

[25] 季玮, 李长栋, 荔志云, 等. 异甘草素对PC12细胞缺氧前后LDH和SOD活性的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2016, 15(2): 132-135.

[26] SOLOMON S D, CLAGGETT B, MCMURRAY J J V, et al. Combined neprilysin and renin-angiotensin system inhibition in heart failure with reduced ejection fraction: A

Meta-analysis[J]. Eur J Heart Fail, 2016, 18(10): 1238-1243.
[27] 丛媛媛,热娜·卡斯木,帕丽达·阿不力孜,等. 新疆胀果甘草多糖的提取及其体外抗氧化活性[J]. 中药材, 2009,32(9):1435-1438.
[28] 乌兰其其格,宋学军,段雪琴,等. 甘草多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2019,35(6):36-38.
[29] 衣蕾,史钰,刘广,等. 甘草多糖对鸡体内抗氧化活性的研究[J]. 畜牧与兽医,2019,51(2):110-113.
[30] 边晓丽,王晓理,李金娜,等. 6种抗衰老中药清除氧自由基和抗脂质过氧化作用的测定[J]. 西北药学杂志, 2001,16(2):68-69.
[31] 孙国庆,罗正里. 甘草苷对衰老模型大鼠的抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志,2014,34(7):1895-1896.
[32] 赵凡凡,李肖,高丽,等. 甘草水提物干预*D*-半乳糖致衰老大鼠的肝脏代谢组学研究[J]. 中草药,2017,48(17):3545-3553.
[33] 徐露,董志. 当归多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 激光杂志,2008,29(4):89-90.
[34] 封利,庄晓燕,杨学东,等. 枸杞多糖对*D*-半乳糖致衰老小鼠肾脏的保护作用的研究[J]. 数理医药学杂志, 2006,19(3):234-236.
[35] 孙云,王德俊,祝瑾,等. 肉苁蓉多糖对衰老小鼠肺蛋白含量与抗氧化功能关系的影响[J]. 中国药理学通报,2001,17(1):101-103.
[36] 孔鹏,姚翠鸾,齐丽薇,等. 海带多糖的抗衰老作用及其机理的研究[J]. 河北农业大学学报,2007,30(4):63-66.
[37] 朱贵明,江旭东,王迪迪,等. 黄芪多糖对衰老HDF细胞染色体末端限制性片段长度的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(8):1635-1637.
[38] 马丽杰,陈贵林,聂丽莎,等. 锁阳多糖对*D*-半乳糖衰老小鼠血细胞和脑细胞染色体端粒长度的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(10):1257-1260.
[39] 李友元,成威,邓洪波,等. 黄精多糖对App转基因小鼠大脑及性腺组织端粒酶活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2008,27(11):844-846.
[40] LIU C, CHANG J, ZHANG L, et al. Purification and antioxidant activity of a polysaccharide from bulbs of *Fritillaria ussuriensis* Maxim [J]. Int J Biol Macromol, 2012,50(4):1075-1080.
[41] 张振明,葛斌,许爱霞,等. 女贞子多糖的抗衰老作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2006,20(2):108-111.
[42] YOUGUO C, ZONGJI S, XIAOPING C. Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2009, 45(5):448-452.
[43] KIM K W, THOMAS R L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights[J]. Food Chem, 2007,101(1):308-313.
[44] 胡婷. 系列褐藻胶寡糖的制备及其抗氧化相关生物学活性(拮抗酒精性肝损伤及防治帕金森症)研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2014.
[45] 海新,梁家铭,李蓉,等. 琼胶寡糖的抗氧化活性研究[J]. 广州化工,2018,46(20):66-68.

(收稿日期: 2021-01-27　编辑: 田苗)