



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105663444 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 15

(21) 申请号 201610221499. 8

(22) 申请日 2016. 04. 11

(71) 申请人 吉林大学

地址 130000 吉林省长春市前进大街 2699 号

(72) 发明人 倪维华 王海亮

(74) 专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 栾波

(51) Int. Cl.

A61K 36/815(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

A61P 39/06(2006. 01)

A61K 31/715(2006. 01)

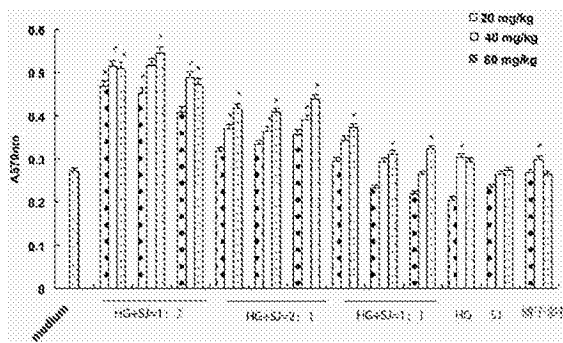
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种复方免疫增强及抗衰老剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及保健品领域,具体而言,涉及一种复方免疫增强及抗衰老剂,其组份主要包括黑果枸杞多糖和沙棘多糖,二者的重量份数比为:黑果枸杞多糖:沙棘多糖=1:2~2:1。沙棘配伍黑果枸杞对小鼠免疫增强及抗衰老活性显现出明显的配伍优势,配伍后显著提高了巨噬细胞的活性,促进T细胞的增殖;同时二者联用能显著地增强细胞抗氧能力,同时提高D-Gal 促衰老小鼠肝脏中抗氧化酶CAT和SOD总酶活力,并抑制小鼠心脏MDA和大脑MAO的升高。本申请还提供了一种复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,该方法易于操作,且提取效率高,通过本方法提取得到的黑果枸杞多糖纯度为57~59%左右、沙棘多糖纯度为71~73%左右。



1. 一种复方免疫增强及抗衰老剂,其特征在於,所述免疫增强及抗衰老剂中,主要包括黑果枸杞多糖和沙棘多糖,且二者的重量含量比为:

黑果枸杞多糖:沙棘多糖=1:2~2:1。

2. 如权利要求1所述的复方免疫增强及抗衰老剂,其特征在於,所述免疫增强及抗衰老剂中,主要包括黑果枸杞多糖和沙棘多糖,且二者的重量含量比为:

黑果枸杞多糖:沙棘多糖=1:2。

3. 权利要求1或2所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在於,包括以下步骤:

1)、将黑果枸杞和沙棘果分别烘干、研磨、过筛、超声裂解后得到黑果枸杞粉和沙棘果粉;

2)、将所述黑果枸杞粉经乙醇前处理后加热干燥,经热水浸提、减压浓缩后进行脱蛋白处理,再进行乙醇分级沉淀以及有机溶剂脱水,真空干燥后,得到沙棘多糖;

3)、将所述沙棘果粉经脱色、热水浸提、粗提、减压浓缩后进行脱蛋白处理,真空干燥得到黑果枸杞多糖;

4)、将步骤2)和3)得到的所述黑果枸杞多糖及沙棘多糖进行配伍得到既定重量含量比的复方免疫增强及抗衰老剂;

其中,步骤2)和步骤3)无先后顺序。

4. 如权利要求3所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在於,步骤1)的具体操作包括:

将黑果枸杞和沙棘果分别于50~55℃的恒温干燥箱中烘干至恒重后研磨、过70~100目筛,20~30kHz超声裂解20~30min后得到黑果枸杞粉和沙棘果粉。

5. 如权利要求3所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在於,在步骤2)中,所述乙醇前处理具体为:

将所述黑果枸杞粉按照1g黑果枸杞粉:5~6mL乙醇溶液的比例与75~80%的乙醇溶液混合,于65~75℃提取2~4次,每次35~45min。

6. 如权利要求3所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在於,在步骤3)中,所述脱色的步骤具体为:

取所述沙棘果粉溶于23~30倍于其质量的蒸馏水中,调节pH=8.5~9.5,加热搅拌至50~60℃后边搅拌边加入体积百分数为35~40%的H₂O₂至溶液变为浅黄色,搅拌保温5~8h后调pH至中性,透析后干燥。

7. 如权利要求5所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在於,在步骤3)中,所述粗提的步骤具体为:

将热水浸提后的样品配成20~25mg/mL的水溶液,离心去杂质后取上清上DEAE-52纤维素柱,依次用蒸馏水和NaHCO₃溶液洗脱,收集洗脱液既得粗提后的黑果枸杞多糖。

8. 如权利要求3所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在於:

在步骤2)中,所述热水浸提具体为85~95℃提取2~4次,每次50~70min;

在步骤3)中,所述热水浸提具体为75~85℃提取2~4次,每次50~70min。

9. 如权利要求8所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在於:

每1g黑果枸杞粉或沙棘果粉对应的热水体积为20~30mL。

10. 如权利要求3所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,其特征在于:
在步骤2)和在步骤3)中,所述脱蛋白处理的具体操作为:
多糖的水提溶液减压蒸馏浓缩后,加入其体积1/5~1/4的Sevage试剂,振荡30~60s,
离心,保留上层溶液,重复多次,直至中间层无变性蛋白质出现为止。

一种复方免疫增强及抗衰老剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及保健品领域,具体而言,涉及一种复方免疫增强及抗衰老剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 衰老是生物的必然规律,它是进行性的、多细胞普遍存在的、不可逆的功能减退状态。不同组织的细胞的衰老形式和进程不全相同,脑、生殖系统和免疫功能的衰老往往出现较早,表现较明显。有关衰老的学说很多,比如认为衰老是由于基因复制差错的积累导致的;或是机体的组织细胞在代谢过程中不断产生的自由基对生物膜结构或蛋白质、核酸等大分子进行破坏,进而损害生物体正常功能引起衰老;此外还有神经内分泌学说或端粒学说等等。

[0003] 无论是哪一种学说,都不可否认衰老是多个系统之间相互的作用导致的。近年来很多学者注意到免疫与衰老有着密切的关系。免疫系统不仅增强宿主抵抗力、防御病原体入侵,还能识别体内突变细胞,起到免疫监护作用。免疫系统的功能随年龄增长而减退,老年时不能识别体内细胞或分子的细微变化,即使能识别,也不能调动免疫反应有效地加以清除,因此恶变细胞的发生率增高。由于老年时免疫功能的衰退,老人易发免疫缺陷病,如感染、自身免疫病、癌症、脑、心、肾等重要器官的动脉硬化及神经细胞变性引起的痴呆、帕金森病等。因此有人称衰老是一种流行性免疫病。

[0004] 免疫与衰老的研究尚处在萌芽阶段。免疫系统作为研究衰老的细胞和分子变化的基础已受到越来越多学者的重视。天然药物中的草药是人类最早应用的物质,我国传统医学已越来越重视抗衰老药物的研究和应用。国内学者近年证明,在扶正中药如黄芪、人参、刺五加、猪苓、银耳及云芝中的提取物具有明显的免疫增强作用,能促进巨噬细胞吞噬功能,增强T细胞活力及抗体形成,是值得重视的防老药物。然而,我国有12807种天然中草药资源,而其中只有10%为常用,不同的中草药对机体免疫系统的影响侧重点也是不同的,仍需要深入研究利用。因此,为了提高人们的免疫力,提供新型的、效果更好的用于增强免疫功能、抗衰老的保健品是本领域亟待解决的一个技术问题。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种复方免疫增强及抗衰老剂,所述的复方免疫增强及抗衰老剂经过科学的配伍关系,具有优秀的保健效果。

[0007] 本发明的第二目的在于提供一种所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,该方法提取得到的黑果枸杞和沙棘果多糖纯度高,药效更好。

[0008] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0009] 一种复方免疫增强及抗衰老剂,所述免疫增强及抗衰老剂中,主要包括黑果枸杞多糖和沙棘多糖,且二者的重量含量比为:

[0010] 黑果枸杞多糖:沙棘多糖=1:2~2:1。

[0011] 黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)是茄科、枸杞属多棘刺灌木,多分枝;分枝斜升或横卧于地面,白色或灰白色,坚硬,常成之字形曲折,有不规则的纵条纹,小枝顶端渐尖成棘刺状,节间短缩,浆果球形,皮薄,皮熟后紫黑色,果实里面含丰富的紫红色素,极易溶于水,属天然的水溶性花色甙黄酮类。藏医用于治疗心热病、心脏病、降低胆固醇、兴奋大脑神经、增强免疫功能、防治癌症、抗衰老、美容养颜、月经不调、停经等且药效显著。民间作滋补强壮补肾,降压药用。被收载于《维吾尔药志》,《四部医典》,《晶珠本草》等藏药经典著作中。黑枸杞是天然碱性食品,具有调理人体之酸碱性的作用。

[0012] 沙棘(*Hippophae rhamnoides* L)属于胡颓子科沙棘属植物,落叶灌木或小乔木,又名沙枣、酸柳。沙棘果为黄色小浆果,其营养价值很高,含有脂肪、蛋白质、糖类、盐类和维生素,并且含量丰富。近几十年来,国内外专家研究发现沙棘果实、种子、叶、皮等各器官中含有丰富的营养及药用成分,具有多方面的功效,因而无论在食用上还是药用上沙棘都有着很高的价值。目前对沙棘多糖功能的研究主要集中在抗病毒、抑菌作用、抗氧化和降血脂作用及保肝、护肝等方面。

[0013] 本申请通过沙棘多糖配伍黑果枸杞多糖,免疫增强及抗衰老活性显著优于单味药,表现出明显的配伍优势。

[0014] 优选的,如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂,所述免疫增强及抗衰老剂中,主要包括黑果枸杞多糖和沙棘多糖,且二者的重量含量比为:

[0015] 黑果枸杞多糖:沙棘多糖=1:2。

[0016] 如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 1)、将黑果枸杞和沙棘果分别烘干、研磨、过筛、超声裂解后得到黑果枸杞粉和沙棘果粉;

[0018] 2)、将所述黑果枸杞粉经乙醇前处理后加热干燥,经热水浸提、减压浓缩后进行脱蛋白处理,再进行乙醇分级沉淀以及有机溶剂脱水,真空干燥后,得到沙棘多糖;

[0019] 3)、将所述沙棘果粉经脱色、热水浸提、粗提、减压浓缩后进行脱蛋白处理,真空干燥得到黑果枸杞多糖;

[0020] 4)、将步骤2)和3)得到的所述黑果枸杞多糖及沙棘多糖进行配伍得到既定重量含量比的复方免疫增强及抗衰老剂;

[0021] 其中,步骤2)和步骤3)无先后顺序。

[0022] 通过本方法提取得到的黑果枸杞多糖纯度为57~59%、沙棘多糖纯度为71~73%。

[0023] 优选的,如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,步骤1)的具体操作包括:

[0024] 将黑果枸杞和沙棘果分别于50~55℃的恒温干燥箱中烘干至恒重后研磨、过70~100目筛,20~30kHz超声裂解20~30min后得到黑果枸杞粉和沙棘果粉。

[0025] 干燥可使得材料变得更酥脆,更易研磨,而超声处理可进一步破坏两种原料的细胞壁成分,是的其中的黑果枸杞多糖和沙棘果多糖在后续的处理中更容易释放出来。

[0026] 优选的,如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,在步骤2)中,所述乙醇前处理具体为:

[0027] 将所述黑果枸杞粉按照1g黑果枸杞粉:5~6mL乙醇溶液的比例与75~80%的乙醇溶液混合,于65~75℃提取2~4次,每次35~45min。

[0028] 75~80%的乙醇溶液是按照体积百分数计。

[0029] 乙醇溶液的浓度、提取温度及提取时间是经过正交实验确定的,在此条件下黑果枸杞多糖的提取量最高。

[0030] 优选的,如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,在步骤3)中,所述脱色的步骤具体为:

[0031] 取所述沙棘果粉溶于23~30倍于其质量份数的蒸馏水中,调节pH=8.5~9.5,加热搅拌至50~60℃后边搅拌边加入体积百分数为35~40%的H₂O₂至溶液变为浅黄色,搅拌保温5~8h后调pH至中性,透析后干燥。

[0032] 优选的,如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,在步骤3)中,所述粗提的步骤具体为:

[0033] 将热水浸提后的样品配成20~25mg/mL的水溶液,离心去杂质后取上清上DEAE-52纤维素柱,依次用蒸馏水和NaHCO₃溶液洗脱,收集洗脱液既得粗提后的黑果枸杞多糖。

[0034] 上清上DEAE-52纤维素柱之前,需要先用3倍柱体积的0.05mol/L的NaHCO₃溶液平衡DEAE-52纤维素柱。洗脱过程具体为:依次用蒸馏水,0.05、0.1、0.25和0.5mol/L NaHCO₃洗脱。

[0035] 优选的,如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,在步骤3)中,所述粗提的步骤具体为:

[0036] 在步骤2)中,所述热水浸提具体为85~95℃提取2~4次,每次50~70min;

[0037] 在步骤3)中,所述热水浸提具体为75~85℃提取2~4次,每次50~70min。

[0038] 进一步优选的,每1g黑果枸杞粉或沙棘果粉对应的热水体积为20~30mL。

[0039] 温度对于浸出物的作用有两方面:第一,增强细胞的透性,有利于内容物的浸出;第二,温度升高,可增加热传递动力,加速胞内物扩散,利于加快浸出过程。

[0040] 优选的,如上所述的复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,在步骤2)和在步骤3)中,所述脱蛋白处理的具体操作为:

[0041] 多糖的水提溶液减压蒸馏浓缩后,加入其体积1/5~1/4的Sevage试剂,振荡30~60s,离心,保留上层溶液,重复多次,直至中间层无变性蛋白质出现为止。

[0042] 所述Sevage试剂的配方为,按体积份数计,氯仿:正丁醇=5:1。

[0043] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0044] 1)、沙棘配伍黑果枸杞对小鼠免疫增强及抗衰老活性显著优单味药,现出明显的配伍优势,配伍后显著提高了巨噬细胞的活性,促进T细胞的增殖;同时二者联用能显著地增强细胞抗氧能力,同时提高D-Gal促衰老小鼠肝脏中抗氧化酶CAT和SOD总酶活力,并抑制小鼠心脏MDA和大脑MAO(单胺氧化酶)的升高。

[0045] 2)、沙棘多糖和黑果枸杞多糖的提取方法易于操作,且提取效率高,通过本方法提取得到的黑果枸杞多糖纯度为57~59%左右、沙棘多糖纯度为71~73%左右。

附图说明

[0046] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,以下将对实施例或现

有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0047] 图1为体外MTS法检测HS对于T细胞增殖能力的影响, *:P<0.05, **:P<0.01;

[0048] 图2为不同浓度的HGSJ对巨噬细胞分泌NO的应用, **:P<0.01;

[0049] 图3为HGSJ对报告基因ARE的激活作用;

[0050] 图4为HGSJ延缓D-gal促衰老模型小鼠的衰老进程。

具体实施方式

[0051] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0052] 实施例1

[0053] 一种复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,包括以下步骤:

[0054] 取市售的黑果枸杞多糖和沙棘多糖,根据说明书中黑果枸杞多糖和沙棘多糖的纯度进行配伍;按有效含量计,配伍所得的混合物中二者的重量含量比为,黑果枸杞多糖:沙棘多糖=1:1。

[0055] 实施例2

[0056] 一种复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,包括以下步骤:

[0057] 1)、将黑果枸杞和沙棘果分别于50℃的恒温干燥箱中烘干至恒重后研磨、过70目筛,30kHz超声裂解20min后得到黑果枸杞粉和沙棘果粉。

[0058] 2)、取所述沙棘果粉溶于23倍于其质量份数的蒸馏水中,调节pH至8.5,加热搅拌至50℃后边搅拌边加入体积百分数为40%的H₂O₂至溶液变为浅黄色,搅拌保温8h后调pH至中性,透析后干燥。

[0059] 将上步干燥所得粉末用75℃的热水浸提4次,每次70min;每1g沙棘果粉对应的热水体积为30mL。

[0060] 将热水浸提后的样品配成20mg/mL的水溶液,离心去杂质后取上清上DEAE-52纤维素柱,依次用蒸馏水和NaHCO₃溶液洗脱,收集洗脱液既得粗提后的黑果枸杞多糖。减压浓缩后加入浓缩液体积1/5的Sevage试剂,剧烈振荡30s,离心,保留上层溶液,重复多次,直至中间层无变性蛋白质出现为止。随后真空干燥得到黑果枸杞多糖。

[0061] 3)、将所述黑果枸杞粉按照1g黑果枸杞粉:5mL乙醇溶液的比例与80%的乙醇溶液混合,于65℃提取4次,每次45min。合并提取液加热蒸干,将得到的粉末用85℃的热水浸提4次,每次70min;每1g黑果枸杞粉对应的热水体积为20mL;

[0062] 将浸提液减压浓缩后,加入浓缩液体积1/5的Sevage试剂,剧烈振荡30s,离心,保留上层溶液,重复多次,直至中间层无变性蛋白质出现为止。乙醇分级沉淀并有机溶剂脱水后真空干燥得到沙棘多糖。

[0063] 4)、测定步骤3)和2)得到的所述黑果枸杞多糖及沙棘多糖的纯度,再根据其纯度按既定的重量份数进行配伍即得;

[0064] 按有效含量计,二者的重量含量比为,黑果枸杞多糖:沙棘多糖=2:1。

[0065] 实施例3

[0066] 一种复方免疫增强及抗衰老剂的制备方法,包括以下步骤:

[0067] 1)、将黑果枸杞和沙棘果分别于55℃的恒温干燥箱中烘干至恒重后研磨、过100目筛,30kHz超声裂解30min后得到黑果枸杞粉和沙棘果粉;

[0068] 2)、将所述黑果枸杞粉按照1g黑果枸杞粉:6mL乙醇溶液的比例与75%的乙醇溶液混合,于75℃提取2次,每次35min。合并提取液加热蒸干,将得到的粉末用95℃的热水浸提2次,每次50min;每1g黑果枸杞粉对应的热水体积为30mL。

[0069] 将浸提液减压浓缩后,加入浓缩液体积1/4的Sevage试剂,剧烈振荡60s,离心,保留上层溶液,重复多次,直至中间层无变性蛋白质出现为止。乙醇分级沉淀并有机溶剂脱水后真空干燥得到沙棘多糖。

[0070] 3)、取所述沙棘果粉溶于30倍于其质量份数的蒸馏水中,调节pH至9.5,加热搅拌至60℃后边搅拌边加入体积百分数为35%的H₂O₂至溶液变为浅黄色,搅拌保温5h后调pH至中性,透析后干燥。

[0071] 将上步干燥所得粉末用85℃的热水浸提2次,每次50min;每1g沙棘果粉对应的热水体积为20mL。

[0072] 将热水浸提后的样品配成25mg/mL的水溶液,离心去杂质后取上清上DEAE-52纤维素柱,上样前需要先用3倍柱体积的0.05mol/L的NaHCO₃溶液平衡DEAE-52纤维素柱。依次用蒸馏水,0.05、0.1、0.25和0.5mol/L NaHCO₃洗脱,收集洗脱液既得粗提后的黑果枸杞多糖。减压浓缩后加入浓缩液体积1/4的Sevage试剂,剧烈振荡60s,离心,保留上层溶液,重复多次,直至中间层无变性蛋白质出现为止。随后真空干燥得到黑果枸杞多糖。

[0073] 4)、测定步骤2)和3)得到的所述黑果枸杞多糖及沙棘多糖的纯度,再根据其纯度按既定的重量份数进行配伍即得;

[0074] 按有效含量计,二者的重量含量比为,黑果枸杞多糖:沙棘多糖=1:2,最终产品中还加入了占黑果枸杞多糖和沙棘多糖混合物重量份数一半的甘草。

[0075] 实验例1

[0076] 利用苯酚-硫酸法进行多糖含量测定,根据吸光度值确定枸杞多糖及沙棘多糖纯度,如表1所示:

[0077] 表1 各实施例黑果枸杞多糖及沙棘多糖纯度

[0078]

| 项目 | 黑果枸杞多糖 | 沙棘多糖 |
|------|--------|--------|
| 实施例1 | 52.19% | 60.33% |
| 实施例2 | 58.64% | 71.54% |
| 实施例3 | 59.15% | 72.26% |

[0079] 从上表可知,实施例2和3所制成的多糖的制剂,其纯度高于市售产品(实施例1)。

[0080] 实验例2 黑果枸杞+沙棘配伍对小鼠免疫功能的影响

[0081] 1、黑果枸杞+沙棘配伍促进辅助性T细胞(Th细胞)增殖

[0082] 实验动物:健康雌性或雄性小鼠,体重18~22g,4周龄。由北京维通利华实验动物有限公司提供,动物合格证号【SCXK(京)2012-0001】。

[0083] a.实验动物连续灌胃给药10天,剂量如下表:

| 组别 | 比例 | 剂量 | 体积 |
|-------------------|----------------|--------------------------------------|-------|
| 生理盐水对照组 | -- | -- | 0.2mL |
| 黑果枸杞+沙棘 (HG+SJ) | 实施例 1 (1:1) | 低 20 mg/kg 中 40mg/kg 高 60mg/kg | 0.2mL |
| [0084] 黑果枸杞+沙棘 | 实施例 2 (2:1) | 低 20 mg/kg 中 40mg/kg 高 60mg/kg | 0.2mL |
| 黑果枸杞+沙棘 | 实施例 3 (1:2) | 低 20 mg/kg 中 40mg/kg 高 60mg/kg | 0.2mL |
| 橘子多糖 (PGA) 作为阳性对照 | -- | 高 60mg/kg | 0.2mL |

[0085] b. 第11天, 无菌分离小鼠脾脏细胞后, 用70%Percoll密度梯度离心, 获取单个核细胞悬液;

[0086] c. 加入抗CD4+T荧光标记抗体, 经过流式细胞仪分选获得单个CD4+T细胞;

[0087] d. 96孔细胞培养平板, 5×10^6 /mL接种;

[0088] e. 培养箱培养48h后, WST法检测细胞增殖情况。

[0089] 将不同浓度的黑果枸杞+沙棘(HG+SJ)刺激CD4+T淋巴细胞48h, 检测其刺激情况。实验结果如图1所示。与阴性对照组以及阳性对照组相比, HG+SJ各配伍比例的高中低剂量(20mg/kg、40mg/kg和60mg/kg)均可促进小鼠脾脏单个核细胞增殖并具有统计学意义。其中HG+SJ=1:2的40mg/kg组的效果最佳, 同时HG+SJ的增殖效果优于黑果枸杞或沙棘单独使用。结果提示HGSJ可协同促进CD4+T细胞增殖, 并且最佳配伍比例为黑果枸杞:沙棘=1:2, 且最佳浓度为40mg/kg。将黑果枸杞:沙棘=1:2命名为HGSJ。

[0090] 2、黑果枸杞+沙棘(HG+SJ)配伍促进巨噬细胞活性

[0091] 进一步, 为确定HG+SJ=1:2(HGSJ)的免疫增强效果, 研究分析了该比例及浓度下对于小鼠巨噬细胞分泌NO的影响。

[0092] 步骤:

[0093] a. 无菌分离上述给药方式处理后的小鼠腹腔巨噬细胞, 收集至试管后加入PBS, 离心洗2次;

[0094] b. 6孔细胞培养平板, 1×10^6 /mL接种;

[0095] c. 体外再次刺激加入不同浓度的HGSJ;

[0096] c. 巨噬细胞培养48h后, 收集培养上清;

[0097] d. Griess reagent方法检测巨噬细胞分泌NO的含量;

[0098] e. A540检测光吸收值。

[0099] 结果: 为了观察HGSJ是否能够刺激巨噬细胞分泌NO, 本申请使用HGSJ 40mg/kg剂量灌胃小鼠, 10天后分离获得小鼠腹腔巨噬细胞, 在体外再次刺激小鼠腹腔巨噬细胞, 通过检测细胞培养上清中NO分泌水平, 分析探讨HGSJ对巨噬细胞吞噬功能的影响。结果如图2所述, 显示HGSJ能够显著刺激巨噬细胞分泌NO, 并呈浓度依赖性。

[0100] 实验例3 黑果枸杞配伍沙棘(HGSJ)抗衰老

[0101] 1、ARE报告基因稳定细胞系分析黑果枸杞配伍沙棘(HGSJ)抗衰老活性

[0102] ①建立HEK293-ARE报告基因稳定细胞系。pGL4-ARE-luci上带有一个Hygromycin抗性基因,可利用Hygromycin培养基筛选出稳定表达ARE报告基因的细胞株,再利用氧化刺激,挑选ARE报告基因灵敏的细胞株,作为后续实验材料。

[0103] ②设定3个浓度梯度(1 μ g/mL,10 μ g/mL,30 μ g/mL),分析待测沙棘多糖组分的抗氧化活性变化趋势。

[0104] ARE-luciferase报告基因共转染HEK-293细胞后分别用0 μ g/mL,5 μ g/mL,10 μ g/mL HGSJ处理转染的细胞24h,再检测荧光素酶相对活力。每组独立平行试验3次(n=3),与0 μ g/mL对照组比较,*表示显著差异,p<0.05。

[0105] 结果:研究表明,机体的免疫增强与抗氧化衰老作用密不可分,基于前述研究背景和存在的问题,研究继续探讨黑果枸杞配伍沙棘=1:2(HGSJ)的抗衰老活性。结果表明随着HGSJ浓度的升高,ARE报告基因的表达水平也相应升高(图3),二者配伍后呈现的非常好的抗氧化活性,提示其可能具有抗衰老效果。

[0106] 2、HGSJ对D-Gal诱导的促衰老小鼠的影响

[0107] 方法:

[0108] A.分组及给药:4月龄KM小鼠,每组雌雄各10只(n=20)。

[0109] 组别1:对照组小鼠,灌胃NS,颈部皮下注射NS;

[0110] 组别2:促衰老组,灌胃NS,颈部皮下注射300mg/kg D-半乳糖;

[0111] 组别3:HGSJ高剂量组,灌胃300mg/kg HGSJ,颈部皮下注射300mg/kg D-半乳糖;

[0112] 组别4:HGSJ低剂量组,100mg/kg HGSJ灌胃促衰老小鼠,颈部皮下注射300mg/kg D-半乳糖;

[0113] 每日给药,持续给药7周后处死。

[0114] B.7天后,处死小鼠,分离其大脑及肝脏器官,捣碎后分离细胞培养上清。

[0115] C.使用SOD/CAT/MAO/MDA试剂盒分析其含量

[0116] A和B分别表示HGSJ对促衰老小鼠肝脏SOD和CAT影响,C表示沙棘多糖对促衰老小鼠大脑的MDA影响效果,D表示HGSJ促衰老小鼠心脏MAO的影响。*表示有显著差异,p<0.05,**表示有极显著差异p<0.01。

[0117] 结果:显示喂食HGSJ能显著地增强D-Gal促衰老小鼠肝脏中抗氧化酶CAT和SOD总酶活力,抑制小鼠心脏MDA和大脑MAO(单胺氧化酶)的升高(图4)。以上结果提示HGSJ具有显著抗衰老活性。

[0118] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

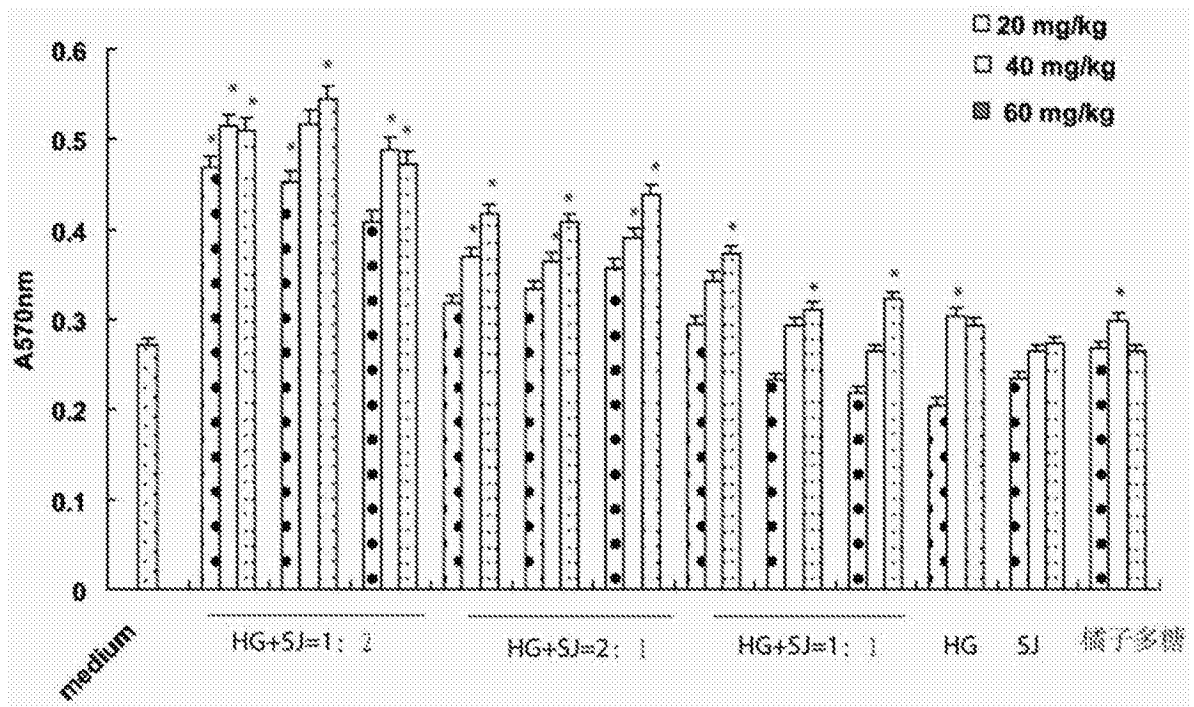


图1

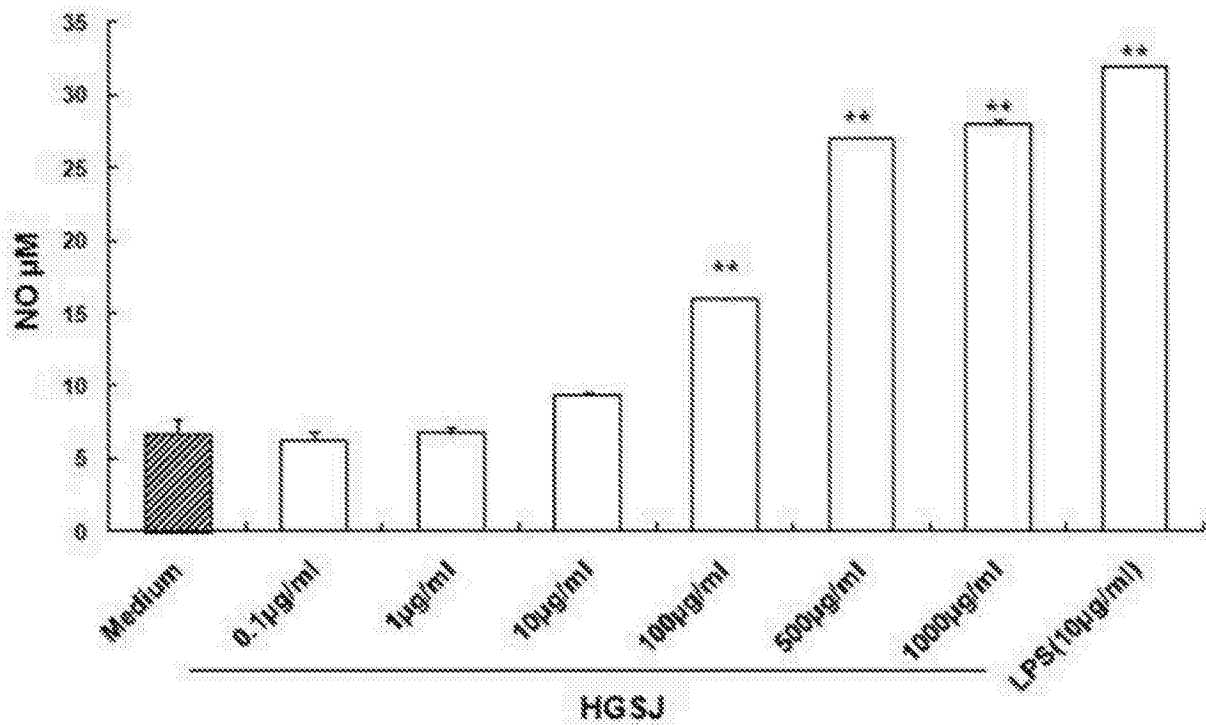


图2

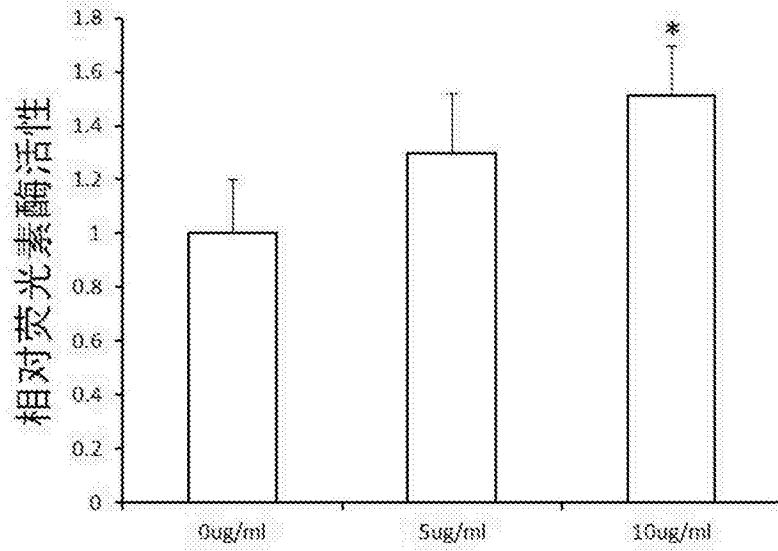


图3

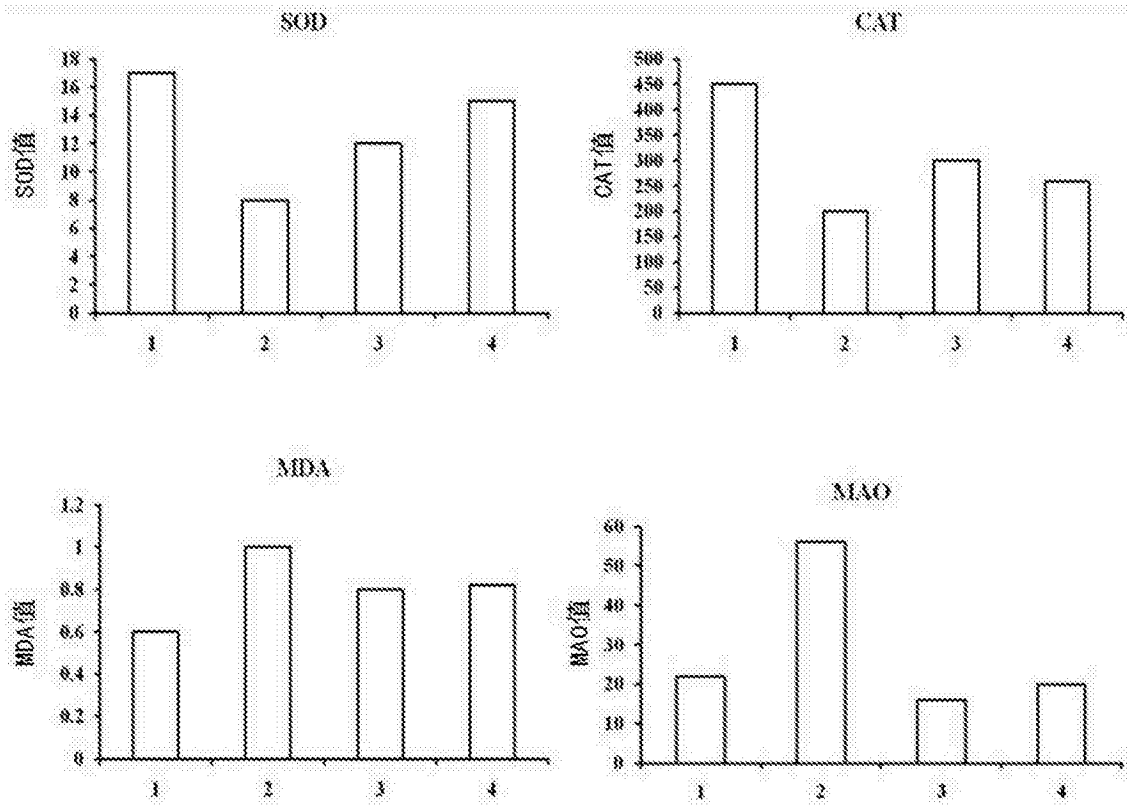


图4