

银耳多糖对实验性衰老小鼠的保护作用

李 燕, 蔡东联, 胡同杰, 陈小莉 (第二军医大学长海医院营养科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察银耳多糖对D-半乳糖所致衰老小鼠的作用。方法: 40只雄性ICR小鼠, 随机分为5组, 正常对照组腹腔注射生理盐水, 其余4组每天腹腔注射D-半乳糖120mg/kg, 连续60d, 建立亚急性衰老模型。同时在这4组中, 衰老对照组灌胃生理盐水, 其余3组每天分别灌胃800、400和200mg/kg银耳多糖。实验结束后, 比色法检测各组小鼠心、脑中氧化性指标丙二醛(MDA)与脂褐质(LP)的含量, 抗氧化酶SOD与GSH-Px的活性以及小鼠皮肤中羟脯氨酸含量, 免疫组化法检测肾脏中细胞周期调节因子P21的表达情况, MTT法检测ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖转化。结果: 各银耳多糖干预组SOD及GSH-Px高于衰老对照组, 而MDA及LP低于衰老对照组, 并均有显著性差异($P < 0.05$); 银耳多糖能明显促进ConA诱导的小鼠淋巴细胞增殖转化; 各银耳多糖干预组肾脏P21的表达量比衰老对照组低($P < 0.05$), 而皮肤羟脯氨酸含量比衰老对照组高($P < 0.05$)。结论: 银耳多糖对D-半乳糖所致的衰老有一定的改善作用。

[关键词] 银耳多糖; D-半乳糖; 衰老; 小鼠

[中图分类号] R 339.38 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2004)10-1104-04

Protective effect of tremella polysaccharides on experimental aging mouse model

LI Yan, CA IDong-Lian, HU Tong-Jie, CHEN Xiao-Li (Department of Clinical Nutrition, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the protective effect of tremella polysaccharides (TP) on mouse aging model induced by D-galactose. **Methods:** Forty male ICR mice were divided into 5 groups (Group A: treated with 800 mg/kg TP; Group B: treated by 400 mg/kg TP; Group C: treated by 200 mg/kg TP; Group D: aging control; Group E: normal control). Except for Group E, other groups were injected with D-galactose [120 mg/(kg · d)] for 60 d to establish subacute aging model. Group A, B and C were treated with 800, 400 and 200 mg/kg TP respectively via intragastric (i.g.) administration. Sixty days later, the spleen, heart, kidney and brain were collected to determine MDA, LP, SOD, GSH-Px and contents of hydroxyproline by colorimetry. Expression of P21 in the kidney were detected by immunohistochemical technique. Proliferation and transformation of spleen lymphocytes induced by ConA were determined by MTT method. **Results:** Antioxidants SOD and GSH-Px activity of TP treated groups were higher than aging control group ($P < 0.05$); MDA and LP of TP treated groups were also lower than those of aging control group ($P < 0.05$). TP obviously promoted the lymphocytes to proliferate induced by ConA *in vitro*. Furthermore, in TP treated groups, the kidney expression of cell cycle regulator P21 were lower and hydroxyproline contents in the skin were higher than those in Group D ($P < 0.05$). **Conclusion:** It is suggested that TP can prevent aging of mice induced by D-galactose.

[KEY WORDS] tremella polysaccharides; D-galactose; aging; mice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1104-1107]

* 银耳是高等真菌, 属于有隔担子菌亚纲银耳科。银耳多糖(tremella polysaccharides, TP)是银耳中有活性作用的成分, 有多种药理作用, 如调节人体免疫功能、抗肿瘤、抗辐射及抗衰老作用^[1]。近年来, 人们对抗衰老的研究不断深入, 但据目前资料, 国内仅有少量文献报道^[1]TP能明显降低小鼠心肌组织脂褐质含量, 增加其脑和肝组织中SOD的活性, 延长果蝇寿命, 但尚未对TP的抗衰老作用机制深入探讨。

为进一步阐述TP的抗衰老作用机制, 本研究建立了衰老小鼠模型, 并用TP干预, 以观察TP对各衰老相关指标的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂 D-半乳糖为Sigma公司产品, P21抗体及免疫组化试剂盒都为DAKO公司产品, 丙二醛(MDA)、脂褐质(LP)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、羟脯氨酸检测试剂盒以及蛋白定量试剂盒都是南京建成生物制品研究所产品, RPM I 1640为

* [基金项目] 上海市科委发展基金(024119048).
[作者简介] 李燕(1976-), 女(汉族), 博士, 住院医师
E-mail: xlfy888@sina.com

Gibco 公司产品, MTT、DM SO 为上海生工生物工程股份有限公司产品, 其他化学试剂都为国产分析纯试剂。TP 由福建三明菌草研究所林树钱研究员惠赠, 提取方法如下: 将银耳孢子经沸水浸泡提取, 三氯醋酸-正丁醇除蛋白, 活性炭脱色, 透析膜透析, 乙醇沉淀, 得 TP 半精品, 再经溴化十六烷基三甲铵 (CTAB) 络合法进一步精制, 得 TP 精品干粉, 经气相色谱法测定, 此精品含糖量达 80% 左右, 其中糖醛酸含量为 13.38%^[2]。将此 TP 精品用生理盐水分别稀释成所需浓度 (10 和 20 mg/ml), 贮存于 4 ℃, 备用。

1.2 小鼠分组、复制模型及给药 清洁级 ICR 纯系雄性小鼠, 体质量 (19 ± 2) g, 由上海西普尔-必凯公司提供。小鼠 40 只, 随机分为 5 组, 每组 8 只。正常对照组小鼠腹腔注射生理盐水, 其余 4 组每天按 120 mg/kg 腹腔注射 D-半乳糖连续注射 60 d 建立衰老模型。同时, 在这 4 组中, 衰老对照小鼠灌胃生理盐水, 其余 3 组分别每天灌胃 800、400 和 200 mg/kg TP, 连续 60 d。末次给药后, 称体质量, 处死小鼠, 无菌取血样, 并取心、脑、肾等器官, 分别检测指标。

1.3 小鼠心、脑组织中 SOD、MDA、LP、GSH-Px 的检测 取心、脑组织在预冷的 0.9% 生理盐水中漂洗, 除去血液, 并用生理盐水将组织制备成 10% 匀浆液, 离心后取上清。先用考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 再按试剂盒说明书分别测定各组的 SOD、MDA、GSH-Px、LP 含量。

1.4 免疫组化法检测小鼠肾组织 P21 的表达 取肾组织, 甲醛固定, 乙醇脱水, 石蜡包埋后, 做病理切片, 免疫组化染色。P21 蛋白染色需用柠檬酸盐缓冲液微波加热修复抗原 8 min, P21 抗体稀释 1:50, 最后显色, 苏木精复染, 用 PBS 液取代一抗作阴性

对照。根据阳性细胞所占比例, 半定量分为 + (1% ~ 24%)、++ (25% ~ 49%)、+++ (50%) 等 3 个等级。

1.5 小鼠脾淋巴细胞增殖转化的检测 在超净台中无菌取小鼠脾, 按常规方法制成无菌脾细胞悬液, 并用 0.6% 锥虫计数活细胞, 再用 RPM I 1640 培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。于 96 孔培养板中, 依次加入脾细胞悬液 100 μl , 含 ConA 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RPM I 1640 培养液 100 μl , 置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 轻轻吸弃上清 50 μl , 加入 MTT 溶液 50 μl , 振荡 1 min, 置培养箱中反应 4 h, 吸弃上清, 每孔加入 DM SO 溶解液 100 μl , 振荡 30 s, 酶标仪 590 nm 波长处读取光密度 (D_{590}) 值。

1.6 小鼠皮肤羟脯氨酸含量测定 在末次给药造模干预后 24 h, 分别取各组小鼠背部皮肤约 1 cm^2 , 去毛及脂肪, 用 1:1 丙酮-乙醚脱脂, 切碎晾干, 精密称取 20 mg, 用试剂盒进行羟脯氨酸含量的测定。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经等方差分析进行 *t* 检验等统计学处理。

2 结果

2.1 TP 对各组小鼠组织匀浆的抗氧化作用的效果 由表 1 可见, 正常对照组及各 TP 干预组组织匀浆中 MDA 与 LP 含量低于衰老对照组 ($P < 0.05$), 而正常对照组及各 TP 干预组组织匀浆中 GSH-Px 与 SOD 活性高于衰老对照组 ($P < 0.05$)。同时, 800、400 mg/kg TP 干预组的 MDA 与 LP 含量低于 200 mg/kg TP 干预组, 而其 GSH-Px 与 SOD 活性高于 200 mg/kg TP 干预组 ($P < 0.05$), 各 TP 干预组的 MDA 与 LP 含量及 GSH-Px 与 SOD 活性与 TP 的剂量呈一定的量效关系。

表 1 TP 对各组心脑组织匀浆的抗氧化作用的效果

Tab 1 Effects of TP on antioxidants in tissue homogenate of heart and brain

($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Group	MDA ($\text{mB}/\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	LP ($\text{wB}/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{zB}/\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	SOD ($\text{zB}/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
TP 800 mg/kg	7.82 ± 0.78*	58.92 ± 1.54*	78.14 ± 3.21*	200.12 ± 10.82*
400 mg/kg	8.24 ± 0.82*	65.43 ± 1.98*	75.12 ± 3.09*	198.71 ± 9.54*
200 mg/kg	12.20 ± 0.19*	68.71 ± 0.87*	70.39 ± 1.23*	156.43 ± 12.34*
Aging control	15.58 ± 1.43	79.58 ± 2.56	58.93 ± 4.15	126.73 ± 10.21
Normal control	9.12 ± 1.23*	65.43 ± 1.68*	68.53 ± 6.17*	195.25 ± 8.16*

* $P < 0.05$ vs aging control group; $P < 0.05$ vs 200 mg/kg TP group

2.2 TP 对各组小鼠肾组织的 P21 表达情况的影响 经免疫组化染色 (图 1) 后, 光镜下可见 P21 蛋

白主要定位于细胞质中, 呈粗大的棕黄色颗粒状, 部分细胞核质同时 P21 蛋白染色阳性。以上各组 P21

的免疫组化染色表明:衰老对照组 P21 高表达,主要在肾小管中,呈强阳性(卅),正常对照组 P21 表

达呈阴性(-),各 TP 组与衰老对照组相比 P21 的表达明显降低。

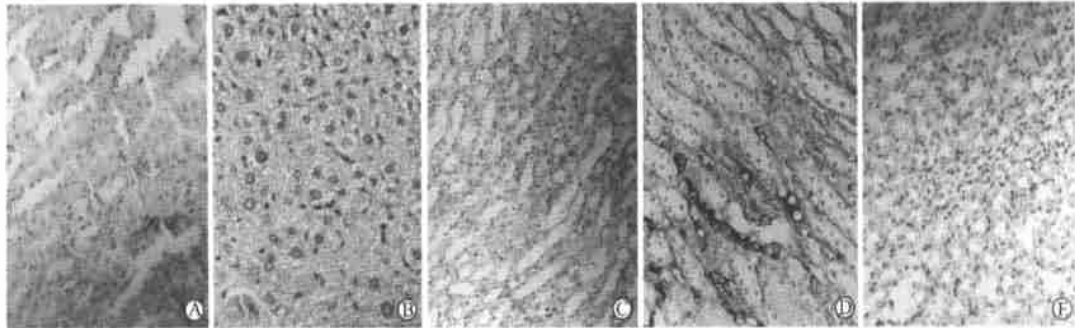


图1 TP对衰老小鼠肾组织P21表达的影响

Fig 1 Effect of tremella polysaccharide on P21 expression in renal tissue of aged mouse ($\times 200$)

A: 800 mg/kg TP; B: 400 mg/kg TP; C: 200 mg/kg TP; D: Aging control; E: Normal control

2.3 TP对小鼠淋巴细胞增殖转化的影响 经MTT法测定的各组小鼠淋巴细胞增殖转化的 D_{590} 800 mg/kg TP组为 0.367 ± 0.014 , 400 mg/kg TP组为 0.279 ± 0.012 , 200 mg/kg TP组为 0.245 ± 0.013 , 衰老对照组为 0.189 ± 0.008 , 正常对照组为 0.415 ± 0.014 , 由此可见, D -半乳糖可致小鼠淋巴细胞增殖转化效应降低($P < 0.05$),而TP可显著拮抗 D -半乳糖所致小鼠淋巴细胞增殖转化效应的降低($P < 0.05$),800、400、200 mg/kg TP干预组可使小鼠淋巴增殖转化率比 D -半乳糖衰老模型组升高分别为94.18%、47.62%和29.63%。

2.4 TP对小鼠皮肤羟脯氨酸含量的影响 各组小鼠皮肤的羟脯氨酸的含量别为800 mg/kg TP组(12.8 ± 0.1) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 400 mg/kg TP组为(11.5 ± 0.4) $\mu\text{g}/\text{mg}$; 200 mg/kg TP组为(10.4 ± 0.5) $\mu\text{g}/\text{mg}$; 衰老对照组为(7.8 ± 0.3) $\mu\text{g}/\text{mg}$; 正常对照组为(14.7 ± 0.2) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。由此可见,各组衰老小鼠皮肤羟脯氨酸含量都显著低于正常对照组($P < 0.05$),TP干预组小鼠皮肤中的羟脯氨酸含量高于衰老对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

D -半乳糖致衰老模型是利用 D -半乳糖在体内被还原成半乳糖醇后,不能被细胞进一步代谢,而堆积在细胞内,导致细胞肿胀,代谢紊乱,从而反映了机体自然衰老时的病理变化。TP在体内抗衰老的作用机制可以用TP银耳多糖干预 D -半乳糖致衰老模型来反映。本实验的衰老相关性指标均能较好地反映出机体衰老时的退行性变化特征^[3]。

自由基衰老学说认为:衰老是由生命周期中代谢产生的活性氧成分造成的积累损伤引起的^[4-6]。

支持该理论的证据是抗氧化的转基因动物实验:过量表达SOD和过氧化氢酶的转基因果蝇比对照组寿命延长34%^[7];转基因果蝇的成体神经元中表达人的SOD能使其寿命延长40%^[8]。在本实验中以MDA、LP、SOD及GSH-Px的测定来研究TP的抗衰老作用是否与抗氧化有关。MDA和LP都是随年龄的增加而不断积累,而SOD和GSH-Px是体内抗氧化的酶类。实验结果表明:TP可以通过增加器官内的SOD和GSH-Px,降低MDA和LP达到抗氧化、抗衰老的目的。

最新资料显示,衰老与细胞增殖受抑有关,与细胞增殖有关的细胞周期负调控因子P21蛋白的表达量增高可导致细胞衰老^[9]。P21基因通过其蛋白表达产物P21蛋白直接与CDK或cyclin-CDK复合物结合,抑制酶的活性,使组蛋白H₁、Rb蛋白发生磷酸化,使细胞停滞于G₁期,实现对细胞周期的负调控作用^[9-11],从而抑制细胞的增殖,正常细胞增殖受抑就意味着衰老发生^[12]。本实验结果表明TP能使衰老小鼠体内的P21蛋白表达降低。

Macip等^[11]将氧化过程副产物活性氧(ROS)加入人正常细胞中,发现P21的表达水平相应增加,而如用ROS抑制剂N-乙酰-L-半胱氨酸作用于细胞,就可以挽救由P21引起的细胞衰老,同时发现ROS对P16所致细胞衰老无作用。Chen等^[13]发现用H₂O₂作用于人正常细胞,细胞中出现高表达的P21和P53,使细胞在G₁期被阻断,而趋向于衰老。可见P21引起的衰老与氧化衰老有一定的联系。这与本实验中发现TP既可抗氧化又可降低P21的表达从而抗衰老是一致的。

机体衰老的另一特征是免疫功能低下,尤其是淋巴细胞免疫功能低下,本实验观察到TP能显著

对抗D-半乳糖所致的小鼠对ConA诱导的淋巴细胞转化的抑制作用,表明TP能增强衰老小鼠的淋巴细胞免疫功能。

羟脯氨酸是胶原蛋白的组成部分,由脯氨酸羟化而来的,在胶原蛋白中占13.4%。大多分布在皮肤、肌腱、软骨、血管等处,人体在衰老过程中,由于氧气供应不足,影响脯氨酸羟化过程,因而造成皮肤羟脯氨酸含量低下。本实验观察到TP可使小鼠体内羟脯氨酸含量相对增加,从而有助于恢复衰老小鼠皮肤的弹性。

[参考文献]

- [1] 杨世海,尹春梅,缪双红. 银耳多糖及其药理作用的研究进展[J]. 中草药, 1993, 24(3): 153-157.
- [2] 吴梧桐,陈琼华,徐碧如,等. 银耳孢子多糖的分离和分析[J]. 真菌学报, 1982, 1(2): 119-124.
- [3] 张石宁,陈明,肖红,等. D-半乳糖致衰老模型的研究[J]. 临床精神医学杂志, 1998, 8(6): 327-328.
Zhang SN, Chen M, Xiao H, et al. Evaluation of the model of the aging caused by D-galactose [J]. *Linchuang Jingshen Yixue Zazhi (J Clin Psychol)*, 1998, 8(6): 327-328.
- [4] Melov S. Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 959: 330-340.
- [5] Leutner S, Eckert A, Muller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain [J]. *J Neural Transm*, 2001, 108(8-9): 955-967.
- [6] Haman D. The aging process [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(11): 7124-7128.
- [7] Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 1994, 263(5150): 1128-1130.
- [8] Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, et al. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(2): 171-174.
- [9] Kagawa S, Fujiwara T, Kadowaki Y, et al. Overexpression of the p21^{sdil} gene induces senescence-like state in human cancer cells: implication for senescence-directed molecular therapy for cancer [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(8): 765-772.
- [10] Halevy O, Novitsch BG, Spicer DB, et al. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle cell with induction of p21 by MyoD [J]. *Science*, 1995, 267(5200): 1018-1021.
- [11] Macip S, Igarashi M, Fang L, et al. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence [J]. *EMBO J*, 2002, 21(9): 2180-2188.
- [12] Chang BD, Watanabe K, Broude EV, et al. Effects of p21^{Waf1/Cip1/Sd1} on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(8): 4291-4296.
- [13] Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, et al. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescence-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication [J]. *Biochem J*, 1998, 332(Pt 1): 43-50.

[收稿日期] 2004-02-15

[修回日期] 2004-06-20

[本文编辑] 曹静

· 个案报告 ·

胺碘酮并低血钾致尖端扭转性室速二例报告

Torsade de pointes caused by amiodarone and hypokalemia: a report of 2 cases

郝守艳¹, 陈少萍², 王燕娟¹

(1. 吉林省通化钢铁集团公司职工医院心内科, 通化 134003; 2. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433)

[关键词] 尖端扭转性室速; 胺碘酮

[中图分类号] R 972.2; R 541.71

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)10-1107-01

*** 1 临床资料** 例1,女,69岁,因胸闷、胸痛3年余,水肿1周入院。1年前冠状动脉造影示3支血管病变,行冠脉旁路移植(MA-LAD, AO-SVG-PDA, AO-SV-LCX)术。术后恢复良好。既往高血压病史30年。查体:心界向两侧扩大;心率66次/min,心律不齐,可闻及早搏10次/min,心尖部可闻及2/6级收缩期杂音;双下肢轻度水肿。心电图检查:房扑,频发多源室早。心脏彩超提示:二尖瓣中量反流,右房及右室大。动态心电图提示:房扑,频发室早时呈成对出现。入院当天予螺内酯20mg,氢氯噻嗪25mg,每日2次,胺碘酮200mg,每日3次,口服。5d后胺碘酮改为200mg,每日1次。第6天复查血生化正常,心电图测QTc为0.45s,第10天下午心电图监护示尖端扭转性室速、室颤,经静推肾上腺素、利多卡

因,持续心脏按压,电复律等抢救,40min后患者意识恢复。心电图监护示窦性心律。急查血钾为2.1mmol/L,心电图测QTc为0.50s,立即停用胺碘酮,补钾对症治疗,患者未再发作室速。

例2,女,63岁,因胸闷、心慌1年余,加重1周入院。1年前心脏彩超提示:二尖瓣后叶脱垂伴大量反流。查体:心率68次/min,心律不齐,可闻及早搏7次/min。心尖部可闻及喀喇音及4/6级收缩期杂音。心电图检查:窦性心律,多发室早。心脏彩超提示:二尖瓣后叶脱垂伴大量反流,左室肌顺应

(下转第1110页)

* [作者简介] 郝守艳(1973-),女(汉族),主治医师