

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00383

## 银耳多糖抗心肌细胞凋亡作用的实验研究

曲丹<sup>1</sup>, 蔡东联<sup>1\*</sup>, 张浩<sup>2</sup>, 乔晓萍<sup>1</sup>, 何芳<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 林宁<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长海医院营养科, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**从细胞及动物整体水平研究银耳多糖(tremella polysaccharides, TP)抗心肌细胞凋亡的作用。**方法:**采用醇提法提取精制TP,气相色谱法检测TP纯度。对乳鼠心肌细胞原代培养后随机分为正常对照组(A组),凋亡对照组(B组)和TP预处理组(T组),72 h后进行形态学观察和锥虫蓝摄取率测定。采用流式细胞术检测各组心肌细胞凋亡指数。在动物体内实验中,选择清洁级ICR纯系小鼠100只,按体质量随机分为5组:阴性对照组(N组)每天腹腔注射生理盐水,其余4组每天腹腔注射120 mg/kg D-半乳糖以建立小鼠衰老模型,同时阳性对照组(C组)每日以生理盐水灌胃,L、M、H组分别以每日100、200、400 mg/kg TP灌胃。8周后处死小鼠,获取心肌标本进行组织学研究和生化检测。**结果:**培养的各组乳鼠心肌细胞锥虫蓝摄取率:B>C>A( $P<0.01$ );心肌细胞凋亡指数:B>C>A( $P<0.01$ )。动物实验中,与N组相比,阳性对照组(C组)及各TP干预组心肌均无明显病理学改变。TUNEL法检测心肌细胞凋亡指数显示:H<M<C( $P<0.05$ )。心肌组织匀浆检测结果显示:H、M组MDA和LP含量低于C组( $P<0.05$ ),且H组低于M组( $P<0.05$ );各TP干预组GSH-Px和SOD活性均高于C组( $P<0.05$ ),而H组活性最高( $P<0.05$ )。**结论:**银耳多糖能抑制氧化损伤诱导体外培养乳鼠心肌细胞凋亡的发生,对心肌细胞具有保护作用。对D-半乳糖致衰老模型小鼠心肌细胞具有抗凋亡和抗氧化作用,且这种作用具有剂量相关性。

**[关键词]** 银耳多糖;细胞凋亡;心肌细胞;抗氧化

**[中图分类号]** R 286.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0383-04

### Anti-apoptosis effect of tremella polysaccharides on cardiomyocytes

QU Dan<sup>1</sup>, CAI Dong-lian<sup>1\*</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, QIAO Xiao-ping<sup>1</sup>, HE Fang<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, LIN Ning<sup>1</sup>

1. Department of Nutrition, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the anti-apoptosis effect of tremella polysaccharides (TP) on cardiomyocytes by *in vitro* and *in vivo* experiments. **Methods:** TP was extracted by dehydrated alcohol and the TP purity was measured by gas chromatography. The cultured cardiomyocytes of the neonatal rats were randomly assigned to normal group (Group A), apoptosis-induced group (Group B) and TP-pretreatment group (Group T). The morphology and uptake rate of trypan blue were studied after 72 h. The apoptosis index of cardiomyocyte was measured by flow cytometry. In the *in vivo* study, 100 ICR mice were randomly assigned to 5 groups after paired by body weight as following: Group N (negative control group, peritoneally injected by saline daily); Group C (positive control group, peritoneally injected by D-galactose and saline daily); Group L, M, and H (peritoneally injected by D-galactose and intragastric administered with TP at 100, 200, 400 mg/day, respectively). Mice were sacrificed for histology and biochemistry studies after 8 weeks. **Results:** Data of cultured cardiomyocytes were as follows: Uptake rate of trypan blue: B>C>A ( $P<0.01$ ); apoptosis index: B>C>A ( $P<0.01$ ). In the animal studies there were no obvious difference in myocardium pathology between groups. The order of the apoptosis indices of myocardium was H<M<C ( $P<0.05$ ). Myocardium homogenate detection showed that MDA and LP in Group H, M were lower than those in group C ( $P<0.05$ ); MDA and LP in group H were lower than those in group M ( $P<0.05$ ); the activities of GSH-Px and SOD in all TP-pretreatment groups were higher than those in group C ( $P<0.05$ ), and that in group H was the highest ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** TP can suppress the apoptosis of cardiomyocytes induced by oxidative damage *in vitro*, indicating a protective effect on cardiomyocytes. Our results suggest that TP has anti-apoptosis and anti-oxidation effect on cardiomyocytes in D-galactose-induced aging mice and the effect is dose related.

**[收稿日期]** 2008-11-07

**[接受日期]** 2008-12-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30672733). Supported by National Natural Science Foundation of China(30672733).

**[作者简介]** 曲丹, 硕士. E-mail: dr.qudan@gmail.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873168, E-mail: nutrition1226@sohu.com

[KEY WORDS] tremella polysaccharides; apoptosis; cardiomyocyte; antioxidation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 383-386]

心肌细胞凋亡可导致心肌收缩力减弱、心功能降低等老年退行性改变。已有研究证实,通过干预心肌细胞凋亡,可以在一定程度上保护心肌功能<sup>[1]</sup>。目前,在探索中药有效成分对心肌细胞凋亡影响方面的研究正在不断深入。本单位通过前期对银耳多糖(TP)的研究证实,TP具有清除氧自由基、抗脂质过氧化的作用<sup>[2]</sup>。根据这一结果,我们又进行了细胞与动物体内实验,以探索TP的抗心肌细胞凋亡作用。

## 1 材料和方法

1.1 药品和试剂 胰蛋白酶(1:250)、过氧化氢、碘化丙啶(PI)购自Sigma公司。新生牛血清、DMEM/F12(1:1)培养基购自Hyclone公司。锥虫蓝购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。其他试剂均为国产分析纯。TP精制品为自制<sup>[3]</sup>,纯度80%,其中糖醛酸含量为13.9%。

1.2 乳鼠心肌细胞培养<sup>[4]</sup> 每次取1~2 d龄SD乳鼠20只(第二军医大学实验动物中心提供),剪取心脏后立即置入4℃预冷的D-Hank's液中。洗净残留的血液后,剪成1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块,加入10 ml 0.125%胰蛋白酶,在37℃水浴消化10 min,弃上清,再次向组织块中加入等量的0.125%胰蛋白酶,以相同方法消化至组织块为絮状时终止消化。将每次收集的上清液低温离心后收集沉淀制成细胞悬液,调整细胞密度为 $8 \times 10^5$ 个/ml。差速贴壁法纯化培养后接种至35 mm培养皿中(每只皿2 ml),于37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养。

1.3 培养心肌细胞的分组 取已培养24 h后的心肌细胞,以每只培养皿为1个标本,随机分为3组,每组6个标本:(1)正常对照组(A组):在不含处理因素的培养基中培养;(2)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导凋亡模型组(B组):在含终浓度为0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基中培养;(3)TP预处理组(T组),先在含终浓度为0.3 mmol/L(90 μg/ml)TP的培养基中预处理30 min后,再加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,使H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>终浓度为0.1 mmol/L。72 h后对各组心肌细胞分别进行形态学观察与锥虫蓝摄取率测定<sup>[5]</sup>。

1.4 流式细胞术检测各组心肌细胞凋亡指数 采

用Annexin V-FITC/PI双染法<sup>[6]</sup>对培养的心肌细胞进行染色后,利用流式细胞仪检测细胞凋亡比例。每组取2个样本(每个样本10 000个细胞),重复测定3次,采用CellQuest功能软件进行分析。

1.5 动物分组、复制模型及给药 取清洁级ICR纯系小鼠100只,雌雄各半,体质量(19±3)g,由上海西普尔-必凯公司提供。按体质量随机分为5组。N组每天腹腔注射生理盐水,C、L、M、H组每天腹腔注射D-半乳糖120 mg/kg,同时,L、M、H组分别每天灌胃100、200、400 mg/kg TP,C组灌胃生理盐水。自由进食水,室温20℃。8周后称体质量,处死小鼠,剪取心室肌进行组织学研究和生化检测。

1.6 心肌组织学研究 常规H-E染色后,于光镜下观察心肌病理改变,采用TUNEL法检测标本中发生凋亡的细胞并计算凋亡指数(AI)。

1.7 心肌生化检测 取心肌组织在预冷的0.9%生理盐水中漂洗,去除血液,将组织制备成10%匀浆液,离心后取上清。考马斯亮蓝法进行蛋白定量。按试剂盒说明书分别进行各组组织超氧化物歧化酶(SOD)、GSH-Px、丙二醛(MDA)、脂褐质(LP)的检测,经紫外分光光度计测定并与标准曲线相比后计算结果。

1.8 统计学处理 实验原始数据以SPSS 11.0软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)或Kruskal-Wallis H检验,两两比较用LSD检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

2.1 各组心肌细胞形态学观察 倒置显微镜下观察各组细胞形态和搏动情况,可见A组心肌细胞互相连接成片,细胞之间境界不清,胞质内颗粒较少。细胞之间保持同步搏动,搏动频率为80~100次/min。B组有较多细胞胞体固缩,体积明显较正常细胞变小,且有所变形,部分细胞已与周围细胞脱落,胞质内出现粗大颗粒,透明度降低,仅见少许单个心肌细胞搏动,频率40~60次/min。T组多数细胞形态基本正常,一些细胞仍能互相连接成片,胞体固缩不明显,脱落细胞也较少,胞质中颗粒较B组少。多数细胞仍能保持同步搏动,频率为50~70次/min。

2.2 各组心肌细胞的锥虫蓝摄取率 B组的锥虫蓝摄取率高于A组[(38.96±4.03)% vs (11.79±3.22)%, $P < 0.01$ ],T组锥虫蓝摄取率[(24.46±

3.42%)]低于B组,但高于A组( $P<0.01$ )。

2.3 流式细胞术检测心肌细胞凋亡指数 由于凋亡细胞DNA发生降解,细胞内的DNA含量减低,在流式细胞术测定的细胞DNA含量直方图中G<sub>1</sub>峰前可出现亚二倍体峰,即所谓凋亡峰。采用Multi-cycle软件分析凋亡细胞分布峰所占面积比并计算凋亡指数。B组细胞凋亡指数高于A组[(43.56±4.31)% vs (13.98±2.86)%,  $P<0.01$ ];T组的细胞凋亡指数[(19.4±3.80)%]低于B组但高于A组( $P<0.01$ )。

2.4 心肌组织学检查 体内实验结束后,对获取的各组小鼠心室肌标本行常规H-E染色,与正常组小鼠(N组)相比,其余各组心肌均无明显病理改变。图1所示为TUNEL荧光染色后C组和H组的典型样本,C组凋亡阳性细胞数(绿色荧光标记)明显多于H组。N组心肌细胞凋亡指数[(4.68±0.20)%]低于其余各组( $P<0.05$ );M、H组细胞凋亡指数均低于C组[(5.35±0.52)%和(5.07±0.25)% vs (7.36±0.87)%,  $P<0.05$ ],其中H组最低( $P<0.05$ )。L组心肌细胞凋亡指数为(7.29±1.03)%。

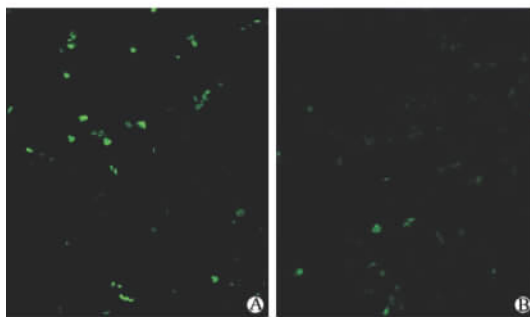


图1 TUNEL法免疫荧光检测凋亡心肌细胞

Fig 1 Immunofluorescence detection of apoptotic cardiomyocytes by TUNEL

A: Positive control group(group C); B: 400 mg/kg TP group(group H). Original magnification: ×400

2.5 心肌组织生化检测 TP对各组小鼠心肌组织匀浆的氧化性指标(MDA、LP、SOD、GSH-Px)的影响结果如表1所示。可见H、M组MDA含量低于C组( $P<0.05$ ),H组低于M组( $P<0.05$ );H、M组LP含量低于C组( $P<0.05$ ),其中H组最低( $P<0.05$ );各TP干预组GSH-Px和SOD活性均高于C组( $P<0.05$ ),其中H组活性最高( $P<0.05$ )。

表1 TP对各组心肌组织匀浆抗氧化作用的效果

Tab 1 Effects of TP on anti-oxidation in tissue homogenate of heart in all groups

( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

Group	MDA $m_B/nmol \cdot mg^{-1}$	LP $w_B/\mu g \cdot g^{-1}$	GSH-Px $U \cdot g^{-1}$	SOD $U \cdot mg^{-1}$
H	8.82±1.78* $\blacktriangle$	58.92±1.54* $\triangle\blacktriangle$	73.14±1.81* $\triangle\blacktriangle$	190.12±10.82* $\triangle\blacktriangle$
M	10.24±1.32* $\triangle$	65.43±1.98* $\triangle$	71.12±1.79* $\triangle$	187.71±9.54* $\triangle$
L	12.20±1.19	68.71±1.87	66.39±1.23*	166.43±12.34*
C	12.58±1.83	79.58±2.06	58.93±1.65	126.73±10.21
N	7.12±1.23*	55.46±1.68*	78.53±2.17*	195.25±8.16*

\*  $P<0.05$  vs group C;  $\triangle$   $P<0.05$  vs group L;  $\blacktriangle$   $P<0.05$  vs group M

### 3 讨论

细胞凋亡是多细胞有机体为保持自身组织稳定、调控自身细胞的增殖和死亡之间的平衡、由基因控制的细胞主动性死亡过程<sup>[7]</sup>。对细胞凋亡与机体衰老的关系研究表明:细胞凋亡特别是具有重要功能的细胞如心肌细胞绝对数量的减少,导致了心室肌组织和心脏功能发生老年退行性改变<sup>[8-9]</sup>。

同时人们也发现,通过干预心肌细胞凋亡,能够在一定程度上保护心肌功能<sup>[1]</sup>。因此,人们在药物干预心肌细胞凋亡的研究方面产生了浓厚兴趣。目前,中药与心肌细胞凋亡相关性的研究正受到普遍关注,并取得了一些可喜的成果,尤其在探索中药有

效成分对心肌细胞凋亡影响方面的研究正在不断深入。本单位对银耳多糖的实验研究证实,银耳多糖具有清除氧自由基、抗脂质过氧化的作用<sup>[2]</sup>。这一结果提示我们,银耳多糖可能具有抗心肌细胞凋亡的作用。

本研究采用细胞凋亡指数来评价细胞凋亡情况。体外培养的心肌细胞用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导建立细胞凋亡模型后,其凋亡指数较正常培养的心肌细胞显著升高;而经过银耳多糖预处理后,再用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导,心肌细胞的凋亡指数较凋亡模型组降低,这说明体外培养的条件下,银耳多糖具有一定抗心肌细胞凋亡作用。预处理时选择的银耳多糖浓度是根据我们预实验的结果确定的,用含该浓度TP的培养基既有

明显的抗凋亡作用,同时又不会显著改变培养基的渗透压,从而最大限度地保护了细胞生长状态。

体外培养心肌细胞的实验结果表明,正常培养的心肌细胞也有一定的凋亡发生率,我们推测可能与以下因素有关:(1)活体心肌组织中凋亡细胞一旦形成,则很快被附近的吞噬细胞清除,因此,在正常的活体心肌组织中凋亡指数较低,而在体外培养过程中,凋亡细胞无法被清除,从而被保留下来,这可能是造成体外培养心肌细胞较正常活体心肌组织中的细胞凋亡指数升高的主要原因;(2)体外在无血清条件下培养的心肌细胞,生长因子的缺乏或改变,可能诱导部分细胞发生凋亡;(3)在细胞培养实验操作,以及流式细胞仪标本制作过程中,由于物理、化学因素的刺激,也会造成少量细胞发生凋亡。

为了研究 TP 在体内的抗心肌细胞凋亡作用,我们用 TP 对衰老模型小鼠进行干预。由于 D-半乳糖可以诱导小鼠体内脂质过氧化应激反应增加<sup>[10]</sup>,导致心肌细胞发生凋亡,因此选用 D-半乳糖致衰老模型小鼠作为研究对象,结果提示 TP 在体内具有一定抗氧化损伤作用,从而发挥其抗心肌细胞凋亡的作用。

体内代谢或外源性因素产生的自由基均被证实可诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>,而氧自由基引起组织损伤往往由抗氧化系统功能减弱而导致。机体的氧自由基清除系统主要为抗氧化酶,包括 SOD 和 GSH-Px 等,而这些抗氧化酶的活性能够反映机体的抗氧化能力。因此,这些酶的活力降低即提示机体抗氧化系统清除体内自由基功能下降,自由基水平升高,导致细胞凋亡增加,这其中也包括心肌细胞。而心肌细胞的凋亡增加,引起心功能下降,发生心脏退行性疾病<sup>[8]</sup>。

MDA 和 LP 是氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸而形成的脂质过氧化物,当其含量增加时反映机体内细胞受自由基攻击后发生的氧化损伤加重,最终引起细胞凋亡率增加。本实验中,通过 D-半乳糖注射建立衰老小鼠模型后使用 TP 灌胃,结果发现,与凋亡对照组相比,采用 TP 灌胃后的衰老小鼠心肌的 MDA 与 LP 含量均低于生理盐水灌胃的对照组,而其 GSH-Px 与 SOD 活性高于对照组,并且这种抗氧化作用与 TP 剂量呈一定的量效关系。这一结果也提示了 TP 抗氧化与抗衰老作用的可能机制,即通过提高机体 SOD、GSH-Px 等抗氧化

酶的活力,从而促进机体内自由基的清除,减轻脂质过氧化发生,而起到保护生物膜的作用。

由于心肌细胞凋亡是导致心功能降低以及机体衰老的重要原因,因此 TP 对机体的衰老可能具有间接的延缓作用,但这一结论在本实验中尚不明确,仍有待于进一步的研究证实。

## [参考文献]

- [1] Yang D S, Kumar A, Stavrides P, Peterson J, Peterhoff C M, Pawlik M, et al. Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice: a model of Alzheimer's disease[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173:665-681.
- [2] 李燕,刘晓丽,裴素萍,施尧,蔡东联. 银耳多糖对实验性衰老模型小鼠免疫功能的影响[J]. *中国临床营养杂志*, 2005, 13: 228-231.
- [3] Zhu H, Sun S J. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract[J]. *Curr Microbiol*, 2008, 57:418-422.
- [4] Au K W, Kou C Y, Woo A Y, Chim S S, Fung K P, Cheng C H, et al. Calcyclin binding protein promotes DNA synthesis and differentiation in rat neonatal cardiomyocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98:555-566.
- [5] Rohr S, Scholly D M, Kléber A G. Patterned growth of neonatal rat heart cells in culture. Morphological and electrophysiological characterization[J]. *Circ Res*, 1991, 68:114-130.
- [6] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 184:39-51.
- [7] Pietsch E C, Sykes S M, McMahon S B, Murphy M E. The p53 family and programmed cell death[J]. *Oncogene*, 2008, 27:6507-6521.
- [8] Sabbah H N, Sharov V G, Goldstein S. Programmed cell death in the progression of heart failure[J]. *Ann Med*, 1998, 30 (Suppl 1):33-38.
- [9] Nishida K, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease[J]. *Circ Res*, 2008, 103:343-351.
- [10] Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, et al. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice; protective effects of R-alpha-lipoic acid[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84:647-654.
- [11] Inoue M, Sato E F, Nishikawa M, Hiramoto K, Kashiwagi A, Utsumi K. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis[J]. *Redox Rep*, 2004, 9:237-247.

[本文编辑] 贾泽军