

实验研究

李永康膏滋对小鼠胸腺端粒酶活性等免疫功能的影响

杨善民* 颜江华* 臧思琴* 陈 福* 张长弓* 王天叫* 曾 定*

摘要 通过臭氧(O₃)致小鼠衰老模型,对各组抗衰老实验小鼠的生理和免疫功能进行检测,采用端粒重复序列分析(TRAP)方法检测衰老小鼠胸腺组织的端粒酶活性。李永康膏滋能使衰老小鼠爬绳、游泳和抗冻能力增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清总 IgG 浓度提高($P<0.01$),脚掌发疱增重明显($P<0.01$),胸腺指数增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);并使衰老小鼠胸腺端粒酶活性增强。表明李氏膏滋有延缓臭氧致小鼠衰老的作用,提高衰老小鼠体液和细胞免疫功能。使衰老小鼠胸腺端粒酶活性增强可能与该器官富含活化的淋巴细胞有关。

主题词 胸腺/酶学 酶类/代谢 @ 李永康膏滋

随着人类文明的发展和生活水平的提高,人衰老问题成为当今社会和自然科学探索、研究的重点。1956年 Harman 提出自由基学说,认为人衰老是由于细胞代谢过程中自由基产物堆积,并产生有害的作用;在各种病理变化过程中,自由基的产生和难以清除是导致细胞损伤的重要原因^[1]。这个学说得到许多实验研究的支持,并且有了成功的臭氧致衰老实验动物模型^[2]。体外研究已发现端粒酶缺乏时,体细胞不断分裂导致的端粒缩短与细胞衰老密切相关^[3,4],实验动物衰老器官组织端粒酶活性的研究尚未见报道。我们采用臭氧(O₃)致小鼠衰老模型,研究中药李永康膏滋对衰老小鼠生理、免疫功能和胸腺端粒酶的影响,探讨李氏膏滋延缓衰老的作用和机理。

1 材料

1.1 仪器:PCR 扩增仪(PTC-100 MJ Research Inc),高速冻离心机(日立 20PR-52D),台式离心机(上海医疗仪器六厂 TGL-16),组织匀浆机(深圳市沙头角国华仪器厂),酶标仪(Bio-Rad 450),微型混合器(上海沪西仪器厂 H-1 型),电泳仪和电泳槽等。

1.2 试剂:N-双(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-(乙磺酸)(HEPES)、二巯基苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷

(Tris)、乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、β 巯基乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)、聚丙烯酰胺、亚甲双聚丙烯酰胺、3-[3-cholami dopropyl) dimethylammonio] - fonate (CHAPs)、耐热 DNA 多聚酶(Taq)、四种脱氧核苷混合物(dNTP)和 T4g32 蛋白均为 Sigma 公司产品。李永康膏滋(武汉市永康中医研究所提供,批号:96001),维生素 E 胶囊(厦门鱼肝油厂,批号:96024)。引物序列:Ts 为 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3',CX 为 5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTA-3' (上海生工生物工程有限公司),α-³²p dATP(北京亚辉生物医学工程公司)。

1.3 实验动物:清洁 1 级、4~5 周龄 BAL B/C 小鼠,体重 18~20g,厦门大学抗癌研究中心医学实验动物室提供。

2 实验方法

2.1 O₃ 致小鼠衰老模型的建立:参照文献[2]进行。简述如下:自制木质臭氧柜(1.23m³),内装 30W 紫外灯 1 支,24 小时照射约产生 1.9mg/m³ 的 O₃ 浓度,小鼠在 O₃ 环境中生活。臭氧柜设于清洁 1 级小鼠房内,按常规标准进食、进水,每日取出灌药 2 次,共 4 周。

2.2 抗衰老试验方案:衰老模型组(模型组)、李氏膏滋(膏滋)Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组、维生素 E 组饲养条件和给药剂量见表 1。其中每组各取 8 只摘取部分胸腺作端粒酶活性检测(膏滋组除外)。实验重复两次。

2.3 生理功能和体能测定:体温测量:用肛门温度计插入肛门,3 分钟后读数。

爬绳时间:将小鼠放在垂直悬挂的细绳上,任其自

表 1 各组饲养条件及给药剂量

组 别	鼠数	饲养条件	给药处理(只/天)
正常组	26	层流架内	生理盐水 2ml
模型组	18	O ₃ 箱内 20 天	生理盐水 2ml
膏滋Ⅰ组	18	O ₃ 箱和层流架各 10 天	李永康膏滋 50mg
膏滋Ⅱ组	18	O ₃ 箱内 20 天	李永康膏滋 50mg
膏滋Ⅲ组	18	O ₃ 箱内 20 天	李永康膏滋 250mg
维生素 E 组	18	O ₃ 箱内 20 天	维生素 E 5mg

基金项目:教育部厦门大学细胞生物学和肿瘤细胞工程重点实验室开放研究基金资助

* 厦门大学抗癌研究中心细胞生物研究室,肿瘤细胞工程实验室,厦门市大学路 182 号(361005)

收稿日期:1999-08-19

表 2 各组小鼠生理功能和体能指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	体温(℃)	爬绳时间(秒)	冻僵时间(秒)	游泳时间(秒)
正常组	26	37.80±0.34	92±12	1443±185	488±67
模型组	18	37.38±0.26 [△]	37±8 [△]	675±67 [△]	341±57 [△]
膏滋 I 组	18	37.54±0.36	56±9**	1070±148**	415±86*
膏滋 II 组	18	37.80±0.42*	56±8**	775±87**	406±78*
膏滋 III 组	18	37.56±0.25	84±8**	796±58**	402±45*
维生素 E 组	18	37.46±0.32	48±12*	1149±134**	411±78*

与正常组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 李氏膏滋对衰老小鼠免疫器官和免疫功能的影响

组 别	鼠数	胸腺指数	脾脏指数	脚掌发疱增生(g)	血 IgG 浓度沉淀(mm)
正常组	26	1.12±0.16	2.26±0.48	0.201±0.02	9.5±1.1
模型组	18	0.68±0.09 ^{△△}	2.05±0.45 [△]	0.157±0.021 ^{△△}	9.0±1.2 [△]
膏滋 I 组	18	0.83±0.15*	2.14±0.34	0.178±0.018**	12.0±1.4*
膏滋 II 组	18	0.80±0.19*	2.24±0.27*	0.210±0.019**	11.0±1.4**
膏滋 III 组	18	0.81±0.11*	2.03±0.37	0.196±0.023**	11.0±1.3**
维生素 E 组	18	1.04±0.23**	2.01±0.45	0.208±0.025**	11.0±1.2**

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

由不停爬动,记录疲劳后跌落的时间。

抗冻试验:小鼠先在 4℃水中游泳 2 分钟,然后移入 -8℃冰柜中,观测其完全冻僵的时间。

游泳时间:用一直径 55cm 盆盛满水,水温保持 20℃左右,小鼠放入水中让其自由游动,观察其沉没 3 次,记录第 3 次沉没的时间。

2.4 免疫功能测定指标:胸腺指数和脾脏指数测定:给药终止时小鼠胸腺或脾脏重量与体重之比。脏器指数=脏器重量(mg)/体重(g)。脚掌发疱增重试验:参照文献[2]进行。血清免疫球蛋白 IgG 含量测定:采用单向免疫扩散法,测定沉淀环直径。

2.5 端粒酶活性检测:参照 Kim 等^[4]的端粒重复序列分析(TRAP)方法进行。

3 结果

3.1 对衰老小鼠生理功能和体能的影响:模型组小鼠比正常组鼠体温、爬绳和游泳能力以及抗冻能力均明显下降(P 均 < 0.01),说明该臭氧衰老模型的有效性、可靠性和可重复性。爬绳时间、冻僵时间、游泳时间各给药组较模型组均有显著的提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明延寿膏具有明显延缓臭氧导致小鼠衰老的作用,其效果与维生素 E 相似。但体温的升高仅膏滋 I 组与模型组比较差异显著($P < 0.05$)。见表 2。

3.2 对衰老小鼠免疫器官和免疫功能的影响:模型组小鼠胸腺指数、脾脏指数、脚掌发疱增重、血清 IgG 浓度值均比正常组小鼠明显下降。给药各组均能防止胸腺萎缩,使血清 IgG 浓度升高,脚掌发疱增重能力增强,但对脾脏指数的影响不明显。见表 3。

3.3 对衰老小鼠端粒酶活性的影响:在 50 μ i TRAP 反应系统中当模板为 6 μ g(蛋白)时,人胃癌 MGC-803 细胞端粒酶阳性,经核糖核酸酶(RNA)处理后阴性;正常组、模型组、膏滋 I、II、III 组或维生素 E 组小鼠胸腺端粒酶亦均阳性。但当模板为 0.6 μ g(蛋白)时,膏滋各组胸腺组织端粒酶活性比模型组小鼠均强,各组表现为间隔 6 个碱基的阳性带增多,并随着给药剂量增大而活性略有增强。维生素 E 组小鼠胸腺组织端粒酶活性亦比模型组小鼠强。图略。

4 讨论

直至目前为止,高等动物衰老的确切机理尚未明了。从表 2 结果看,BALB/C 小鼠衰老模型组比正常组爬绳、游泳以及抗冻能力均明显下降;表 3 示,正常小鼠胸腺比臭氧衰老者更重,其胸腺指数之比有显著意义($P < 0.01$),提示臭氧致小鼠衰老影响了胸腺的结构。实验用的纯种 BALB/C 小鼠鼠龄严格控制、来源明确,饲养条件和质量符合卫生部颁发的标准,说明该臭氧衰老模型的有效、可靠和具有代表性。臭氧产生的自由基能导致小鼠产生衰老的体征和免疫功能指标改变,其结果与老龄大鼠或小鼠的体征和生化指标的改变相似,与中医学衰老的临床表现相符^[2]。

李氏膏滋是武汉永康中医研究所生产的一种抗衰老营养保健品(滇卫食准字 1997 第 016 号),主要由党参、山茱萸和续断等传统中药组成。我们采用臭氧模型小鼠,在不同剂量李氏膏滋或维生素 E 喂养后,发现小鼠的爬绳、游泳和抗冻能力都有明显改善($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),显示了李氏膏滋或维生素 E 具有抗臭

氧对小鼠生理功能的损伤作用。在不同剂量李氏膏滋喂养后,衰老小鼠胸腺脏器指数比对照组有明显提高($P<0.05$),萎缩的胸腺明显受到保护。此外,血清总IgG浓度显著提高($P<0.01$)、脚掌发疱增生显著增多($P<0.01$),提示衰老小鼠在李氏膏滋处理后除了对胸腺组织结构有影响外还对体液免疫功能有影响。业已证明胸腺是促使T细胞分化成熟的重要器官,其中的网状上皮细胞可产生多种胸腺激素。血清胸腺激素水平如同胸腺的重量一样随年龄而变化,在青春期维持在较高水平,以后随个体衰老,胸腺萎缩重量逐渐下降,衰老大鼠的胸腺组织被脂肪和结缔组织所代替,淋巴细胞显著减少^[5]。

为研究李氏膏滋抗衰老作用机理,探讨分子水平的变化,我们采用传统TRAP法研究正常、衰老、饲喂维生素E和饲喂李氏膏滋衰老小鼠各组胸腺端粒酶的变化。正常的纯种BALB/C小鼠胸腺组织端粒酶阳性,小鼠衰老时端粒酶活性减弱,李氏膏滋和维生素E都能使衰老小鼠胸腺组织端粒酶活性增强,其原因尚未明了。成年人胸腺与老年人缩小的胸腺的差别与进入胸腺内的T淋巴细胞多寡有关。已证明T淋巴细胞有微量端粒酶活性,而活化的T淋巴细胞则端粒酶活性明显提高^[5],推测李氏膏滋处理后衰老小鼠胸腺端粒酶活性提高与胸腺内富含活化的T淋巴细胞有关。在生物体内,组织端粒酶活性调节的机理知之甚少。大鼠睾丸去势后前列腺上皮端粒酶活性可能受睾丸酮水平的调节^[6]。月经周期中的子宫内膜端粒酶活性受雌

性激素水平调控^[7],李氏膏滋或维生素E如何影响胸腺端粒酶活性有待进一步研究。我们先前曾研究李氏膏滋对臭氧模型小鼠清除氧自由基能力,显示李氏膏滋对脑组织单胺氧化酶-B活性有明显的抑制作用($P<0.01$);可以降低红细胞膜的荧光偏振度,其降低幅度大于维生素E($P<0.01$)。此外,还可以提高血清脱氢表雄酮(DHEA)的水平,与维生素E效果相当(另文总结,资料略),提示李氏膏滋有明显抗小鼠衰老(臭氧模型)功能,并提高体液和细胞免疫功能。

参考文献

- 1 王永雁,肖德桢.人类衰老的发生机理.见:王永雁,田清淦,马瑾瑜主编.人类衰老学.上海:上海医科大学出版社,1995,154-184.
- 2 郭肇铮,卢咏才.臭氧引发自由基反应、脂质过氧化致小鼠衰老模型的建立及白何首乌延缓衰老作用.见:陈奇主编.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1993,931-934.
- 3 Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21):10114-10118.
- 4 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994; 266(5193):2011-2015.
- 5 钱玉昆,张国玺.衰老免疫学研究.见:邝安堃总主编,陈可冀主编.老年医学在中国.长沙:湖南科学技术出版社,1989,116-120.
- 6 Wright W, Shay JW. Time, telomerase and tumours: Is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol*, 1995, 5:293-296.
- 7 Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65:337-365.

中国中医研究院培训中心 2000 年招生通知

中国中医研究院是中国中医药研究和医疗教学的重要基地,本中心依托中国中医研究院科研医疗教学的优势,集国内大批中医药界名老中医药专家教授,雄厚的师资力量和他们丰富的临床技能知识和办学经验,为国内外广大医务工作者提供一个学习交流的机会,本中心真诚欢迎中医药界同行朋友来中心学习进修。现将 2000 年招生计划安排如下。

1. 任志远中国传统针灸刀(即小刀)疗法;薛立功古代圆针疗法的现代临床应用专题研修班,10月10日~10月19日,11月30日~12月6日。2. 高级中医临床应用进修班:9月15日~9月24日。3. 继承名老中医经验专题研修班:9月25日~10月8日(1,2日休息)。4. 高级中医肛肠病诊疗技术进修班:10月10日~10月19日,12月16日~12月25日。5. 高级针灸临床应用进修班:10月20日~11月1日。6. 高级推拿按摩进修班:10月20日~11月1日。7. 高级中西医结合治疗骨折与肢体畸形矫正经验研修班:11月3日~11月12日。8. 中西医结合疼痛疗法专题进修班:11月14日~11月20日。9. 中西医结合肿瘤综合疗法专题进修班:11月30日~12月6日。10. 中西医结合(外科)皮肤病、性病诊疗技术进修班,12月8日~12月14日。

以上各班于开班前一日报名,上课地址:中国中医研究院培训中心第一、第二教室(内设冷暖空调)。高级中医肛肠病诊疗技术进修班学费 800 元,其他各班学费 680 元,报名费 10 元,学习结业颁发中英文对照钢印结业证书和继续教育学分证明。食宿统一安排,费用自理,请备 2 寸免冠照片 2 张,请于开学前一周电话联系。地址:北京东直门内北新仓 18 号中国中医研究院培训中心,邮编:100700,联系人:狄福金,电话:(010)64062096,64028399,传真:(010)64062096。

京教社广字(东城)2000065号 (广告编号:200009-13)