

低分子姬松茸多糖对 D-半乳糖致衰老大鼠的保护作用

樊 丽 许景伟 李世玲 李雪岩 马立威

摘 要 **目的** 研究低分子姬松茸多糖(LMPAB)对 D-半乳糖致衰老大鼠学习记忆及抗氧化能力的影响。**方法** 50 只 SD 雄性大鼠分成对照组、衰老模型组、LMPAB 组(100、200、400mg/kg)。衰老模型组大鼠每天 1 次连续 42 天皮下注射 D-半乳糖(300mg/kg); LMPAB 组注射 D-半乳糖剂量与时间同衰老模型组,同时腹腔分别注射 LMPAB;正常对照组每天 1 次连续 42 天皮下注射等量 0.9% 氯化钠注射液。应用水迷宫实验和避暗反应实验检测大鼠的学习记忆能力。按照南京建成试剂盒方法,检测大鼠海马组织中氧化相关指标;应用细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞衰老情况;流式细胞仪检测海马神经元的凋亡情况。**结果** 与衰老模型组比较,LMPAB 高剂量组中央活动路程、站台周边活动路程及时间均明显延长($P < 0.01$)、平均速度均明显提高($P < 0.01$);潜伏期明显缩短,错误次数明显减少($P < 0.01$);海马神经元凋亡率明显减少($P < 0.01$);MDA 含量减少($P < 0.01$),SOD、CAT、GSH-PX 活性均增高($P < 0.01$),且有浓度依赖性;胞质 SA- β -Gal 阳性区域相对吸光度值降低($P < 0.01$)。**结论** LMPAB 可改善 D-半乳糖致衰老大鼠的学习记忆能力,增强脑组织总抗氧化力,并减轻衰老大鼠海马区细胞凋亡。

关键词 低分子姬松茸多糖 D-半乳糖 衰老 海马 凋亡

中图分类号 R282.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.08.025

Protective Effect of Low Molecular Weight Polysaccharide from Agaricus blazei (LMPAB) on D-galactose-induced Aging Rats. Fan Li, Xu Jingwei, Li Shiling, et al. Research Institute of Medical Science and Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang 161006, China

Abstract Objective To investigate the intervention of low molecular weight polysaccharide from Agaricus blazei (LMPAB) on the abilities of learning and memory and antioxidant in D-galactose induced aging rat. **Methods** Fifty SD male rats were divided into control group, model group and LMPAB groups (100, 200, 400 mg/kg). The rats of model group were subcutaneously injected with D-galactose (300mg/kg) qd $\times$ 42days to induce aging rats. The rats of LMPAB groups were subcutaneously injected with D-galactose at the same dose and time as the model group and the rats were also injected with different doses of LMPAB by intraperitoneal injection. The rats of normal control group were injected with the same amount of normal saline qd $\times$ 42days. The learning and memory abilities of rat were determined by Morris water maze test and dark avoidance response. The superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) activities in hippocampus of rats were measured by SOD and GSH-PX assay kits from Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute. The degree of cell aging was detected by β -galactosylase dye. Finally, flow cytometry was used to analyze apoptosis of hippocampal neuroblasts. **Results** Compared with the model group, the perimeter, time and average speed for central and platform activities of rats in high dose LMPAB group increased significantly ($P < 0.01$), whereas the latency period and number of errors decreased significantly ($P < 0.01$). Furthermore, SOD and GSH-Px activities increased obviously ($P < 0.01$), and the level of MDA, β -galactosylase dye of relative light density value and apoptosis of hippocampal neuroblasts decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** LMPAB can significantly improve the learning and memory abilities, enhance the total anti-oxidation ability of brain tissue, and reduce apoptosis in hippocampus of D-galactose induced aging rats.

Key words LMPAB; D-galactose; Aging; Hippocampal neuroblasts; Apoptosis

随着人口老龄化问题日趋严峻,衰老和延缓衰老

是当今社会共同关注的问题,其中脑老化是机体衰老的重要表现。学习记忆能力下降甚至阿尔茨海默症、帕金森病等发生率呈逐年上升趋势^[1]。海马是与学习记忆相关的主要脑区,易受氧化损伤的影响,体内高氧化应激状态可导致衰老的观点得到较为广泛的认同^[2,3],因此,抗氧化可以有效防治脑衰老的发生、

基金项目:齐齐哈尔市科学技术计划项目(SFGG-201631)

作者单位:161006 齐齐哈尔医学院医药科学研究院(樊丽、李雪岩、马立威);161041 齐齐哈尔医学院附属第一医院(许景伟、李世玲)

通讯作者:许景伟,电子信箱:xjw2020@126.com

发展。姬松茸又名巴西蘑菇,是珍贵的食药兼用的真菌。富含多糖、蛋白质等营养成分,姬松茸多糖是从其子实体中分离提取的 β 型葡聚糖,低相对分子质量多糖(<50000)较高相对分子质量多糖易于进行结构修饰,具有通过结构改造提高药效的潜在价值。LMPAB具有增强免疫,抗氧化及抗肿瘤等效应,但其抗衰老的研究鲜见报道,本研究采用皮下注射D-半乳糖制造大鼠衰老模型,通过水迷宫等行为学实验,氧化相关指标及细胞凋亡的检测等,观察低分子姬松茸多糖对D-半乳糖致衰老模型大鼠的学习记忆及抗氧化的影响^[4-6]。

材料与方法

1. 实验动物:SD大鼠50只,雄性,无特定病原体(SPF)级,3月龄,体质量180~200g,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。实验动物许可证号:SYXK(黑)2016-001。饲养环境安静,自然通风,室温25℃,相对湿度45%~75%。光线正常明暗交替,自由进食,饮水。

2. 药品与试剂:LMPAB(纯度 $\geq 95\%$,批号SXJR170311-16)购自陕西金润生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione-PX GSH-PX)、丙二醛(MDA)和蛋白含量检测试剂盒购自南京建成生物公司; β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天生物技术公司;凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。

3. 仪器:FACS Calibur 流式细胞仪,购自美国BD公司;Safire 2 酶标仪,购自奥地利Tecan公司;Morris水迷宫视频跟踪系统,购自成都仪器厂;大鼠避暗仪IXeye ShuttleBox 穿梭避暗实验系统,购自成都泰盟软件技术有限公司;倒置荧光显微镜,购自德国Zeiss公司。

4. 动物分组与衰老模型建立:SPF级SD大鼠50只,雄性,3月龄,体质量180~200g。随机分为正常对照组,衰老模型组,LMPAB组(100、200、400mg/kg),每组10只。衰老模型组皮下注射D-半乳糖(300mg/kg)每天1次连用42天;LMPAB组注射D-半乳糖剂量与时间同衰老模型组,同时腹腔分别注射LMPAB;正常对照组皮下及腹腔注射等量0.9%氯化钠注射液每天1次连用42天。经水迷宫实验验证造模成功。

5. Morris水迷宫实验:Morris水迷宫是测量啮齿类动物空间学习记忆能力的经典方法。仪器主要由一直径为120cm、高50cm的圆形水池和一可移动位

置的平台组成,水池上空通过一摄像机与监视器和计算机连接。水池里水温控制在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$,平台、水、池壁均染成黑色以隐蔽平台,水中不能明显见到安全平台。水池等分为4个象限,将平台放在第3象限中间,在4个象限中点位置分别将大鼠面向水池壁放入水中。实验过程中水池及周围环境保持不变。当设定的训练时间已到或大鼠已爬到平台,计算机停止跟踪并记录下游泳轨迹和自动计算出大鼠在水池中所游过的路程、时间、速度等。实验历时4天,每天每只鼠训练4次,第5天去除平台,任选一个入水点将大鼠放入水中,记录60s。

6. 避暗反应实验:实验前先将大鼠放入避暗仪反应箱中训练5min,正式测试开始时将大鼠背对洞口放入明室,大鼠进入暗室则受到交流电电击,避暗仪自动记录5min内大鼠进入暗室的次数(即错误次数)和首次进入暗室前在明室的停留时间(即避暗潜伏期)。共测试7天,记录5min内错误次数和避暗潜伏期,将每只大鼠7次结果的均值进行统计分析。

7. 海马神经细胞凋亡检测:制备单细胞悬液,用冷的PBS洗涤细胞,用1ml 1×的Binding Buffer悬浮细胞,300×g离心10min,弃上清,调整细胞密度为 1×10^6 个/毫升,每管加入100 μl 细胞。再向管中加入5 μl AnnexinV-FITC。室温,避光,轻轻地混匀,10min。加入5 μl PI,室温,避光,孵育5min。加入PBS至500 μl ,轻轻混匀。在1h内用流式细胞仪检测。

8. 脑组织氧化指标的测定:大鼠行为学实验结束后24h,将各组大鼠脱臼处死,迅速取左侧大脑组织置于冰上,制成10%组织匀浆,按照试剂盒说明书测定脑组织SOD、GSH-PX活力和MDA的含量。

9. SA- β -gal染色:每组随机选取5只大鼠,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,按文献[5]的方法进行脑组织切片的制备。常规方法进行脱蜡和水化处理切片,加入适当的固定液15min,用PBS洗涤3次,每次不少于5min,吸弃PBS,加入适当的染色工作液,37℃过夜,显微镜下观察。

10. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LMPAB对大鼠学习记忆能力的影响:与对照组比较,模型组大鼠在中央活动路程,站台周边路程

及站台周边时间明显减少,平均速度明显降低($P < 0.01$),逃避潜伏期明显缩短,错误次数明显增多($P < 0.01$);与模型组比较,LMPAB 高剂量组,中央

活动路程,站台周边路程及站台周边时间明显增多,平均速度明显增快($P < 0.01$),逃避潜伏期明显延长,错误次数明显减少($P < 0.01$),详见图 1、表 1。

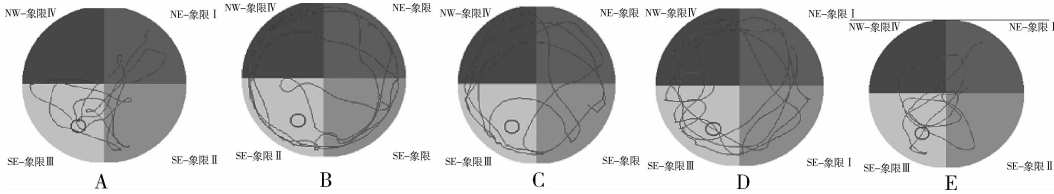


图 1 各组大鼠空间探索实验轨迹
A. 正常对照组;B. 模型组;C. LMPAB 低剂量组;D. LMPAB 中剂量组;E 为 LMPAB 高剂量组

表 1 空间探索实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	中央活动路程 (cm)	站台周边路程 (cm)	站台周边时间 (s)	平均速度 (cm/s)
正常对照组	—	489.55 ± 74.55	1185.64 ± 56.50	51.22 ± 2.41	32.13 ± 1.04
模型组	—	49.54 ± 21.10 **	347.27 ± 90.31 **	32.80 ± 3.59 **	13.40 ± 4.65 **
LMPAB 低剂量组	100	104.98 ± 34.54 **	477.06 ± 51.40 **	37.00 ± 0.94 **	19.13 ± 2.15 ** #
LMPAB 中剂量组	200	237.34 ± 35.73 ***	765.47 ± 38.49 ***	43.45 ± 2.79 ***	23.77 ± 1.21 *** #
LMPAB 高剂量组	400	374.55 ± 56.24 ##	1071.36 ± 47.51 ##	45.68 ± 2.60 ##	29.32 ± 2.11 ##

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2. 海马神经细胞凋亡检测结果:与对照组比较,模型组大鼠海马神经元细胞凋亡率明显增高($P <$

0.01);与模型组比较,LMPAB 高剂量组海马神经元细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$),详见图 2、表 1。

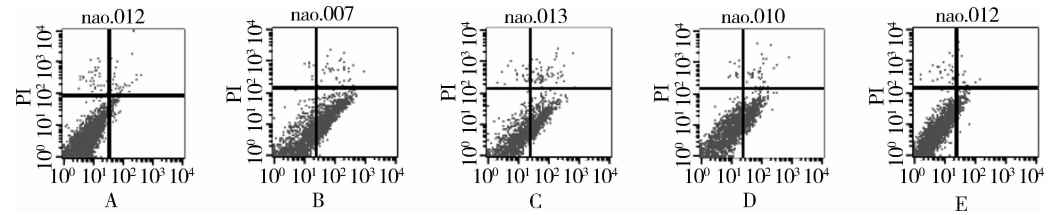


图 2 各种大鼠海马神经元凋亡实验结果
A. 正常对照组;B. 模型组;C. LMPAB 低剂量组;D. LMPAB 中剂量组;E. LMPAB 高剂量组

3. MDA 含量、SOD、GSH - PX 活性测定:与对照组比较,模型组 MDA 含量明显增多($P < 0.01$),SOD、CAT、GSH - PX 活性显著下降($P < 0.01$),与模型组比较,LMPAB 组 MDA 含量减少($P < 0.01$),

SOD、CAT、GSH - PX 活性均增高($P < 0.01$),且有浓度依赖性,尤其是 LMPAB 高剂量组与模型组比较,差异有统计学意义,详见表 2。

表 2 避暗反应及细胞凋亡实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (s)	错误次数	细胞凋亡率 (%)
正常对照组	—	263.23 ± 17.02	0.57 ± 0.79	5.97 ± 1.06
模型组	—	105.54 ± 10.39 **	3.71 ± 1.80 **	43.35 ± 3.53 **
LMPAB 低剂量组	100	120.61 ± 15.50 ***	2.43 ± 0.98 **	37.95 ± 1.40 **
LMPAB 中剂量组	200	190.07 ± 14.77 ***	1.29 ± 0.76 **	24.88 ± 1.34 ***
LMPAB 高剂量组	400	235.60 ± 16.06 **	0.71 ± 0.48 **	7.32 ± 1.32 **

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4. 各组脑组织切片 SA - β - gal 染色结果:衰老

细胞胞质被染成蓝色,SA - β - gal 阳性区域强度用

相对吸光度值表示,与对照组比较,模型组相对吸光度值显著增高,与模型组比较,LMPAB 组相对吸光度

值明显降低,且有剂量依赖性,随剂量的增大相对吸光度值降低,详见图 3、图 4。

表 3 各组大鼠海马区 MDA 含量及 SOD、GSH - PX 活性 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	GSH - PX (U/mg)
正常对照组	-	1.57 ± 0.24	257.89 ± 20.05	32.23 ± 2.99
模型组	-	3.55 ± 0.35 **	100.19 ± 7.66 **	9.40 ± 1.27 **
LMPAB 低剂量组	100	2.93 ± 0.52 **	118.83 ± 16.99 **	11.71 ± 1.67 **
LMPAB 中剂量组	200	2.41 ± 0.35 **	206.22 ± 6.51 **	17.54 ± 1.78 **
LMPAB 高剂量组	400	2.02 ± 0.19 #	230.76 ± 13.92 #	28.08 ± 4.32 #

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

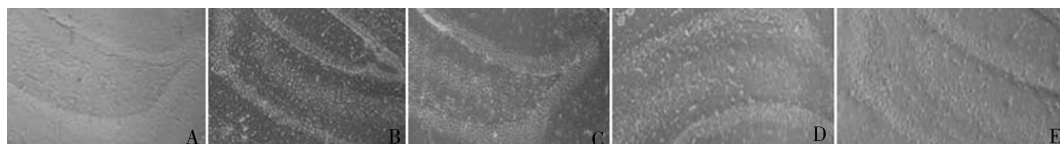


图 3 LMPAB 对衰老大鼠海马区 SA - β - gal 染色的影响 (×200)

A. 正常对照组; B. 模型组; C. LMPAB 低剂量组; D. LMPAB 中剂量组; E. LMPAB 高剂量组

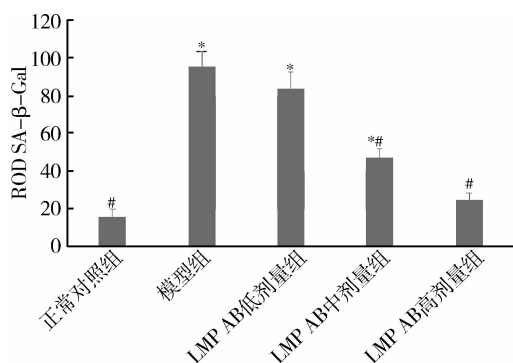


图 4 LMPAB 对衰老模型大鼠海马 SA - β - gal 的比较

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$

讨 论

多糖具有提高免疫力、抗氧化、抗肿瘤等功效,已成为国内外研究热点^[7~9]。与衰老相关的疾病如冠心病、糖尿病、阿尔茨海默病及帕金森病等发生率呈逐年上升趋势。衰老的主要表现为学习记忆能力下降,海马是与之密切相关的脑区^[10]。D - gal 衰老模型大鼠是研究抗衰老、改善学习记忆能力的经典的动物模型^[11]。

本研究通过大鼠行为学实验发现低分子姬松茸多糖能够改善衰老模型大鼠的学习记忆能力。Morris 水迷宫实验显示,与模型组比较,LMPAB 高剂量组明显提高了中央活动区及平台周围的活动路程,延长了平台周围活动时间,提高了平均速度。避暗反应实验显示,LMPAB 高剂量组明显延长了潜伏期,减少了错误次数。

前期研究发现,D - gal 致衰老模型大鼠神经元结构具有细胞凋亡的形态特征,核膜出现分叶状凹陷,核质浓缩,边集等,提示细胞凋亡可能参与衰老的病变过程。本研究发现,与模型组比较,LMPAB 高剂量组凋亡率明显降低,提示 LMPAB 具有减少神经元细胞凋亡的功能。

正常情况下,机体的氧化与抗氧化能力是处于动态平衡的,D - gal 的氧化机制是氧自由基(超氧阴离子、过氧化氢)在体内累积过量,使细胞膜脂质过氧化,产生过量的 MDA,其含量的高低可以间接地反映细胞受损害的程度,使得抗氧化酶 SOD、GSH - PX 活性降低,SOD 可以使体内超氧阴离子歧化生成过氧化氢,以减少自由基对细胞的损伤;GSH - PX 是机体内广泛存在的重要的催化过氧化氢分解的酶,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。本研究显示,与模型组比较,LMPAB 高剂量组 SOD、GSH - PX 活性明显升高,MDA 含量明显降低,提示 LMPAB 能够有效清除 D - gal 诱发的氧自由基继而减轻对大鼠海马组织的氧化损伤。

衰老模型组脑切片 SA - β - gal 染色相对光密度值较正常组显著增加,表明衰老细胞明显增多,LMPAB 组尤其高剂量脑切片 SA - β - gal 染色相对吸光度值较模型组明显降低,提示 LMPAB 能够明显改善衰老状态^[12]。

综上所述,LMPAB 能有效预防因衰老而产生的氧化损伤,改善神经退行性病变及学习记忆能力,为

开发预防衰老及神经退行性变、提高学习记忆能力的药物提供了理论基础,其相关机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Reichel JM, Bedenk BT, Czisch M, *et al.* Age-related cognitive decline coincides with accelerated volume loss of the dorsal but not ventral hippocampus in mice[J]. *Hippocampus*, 2017, 27: 28-35
- 2 Kang HT, Park JT, Choi K, *et al.* Chemical screening identifies ROCK as a target for recovering mitochondrial function in Hutchinson-Gilford progeria syndrome[J]. *Aging Cell*, 2017, 16(3): 541-550
- 3 Zhang LB, Huang SH, Ma GL, *et al.* The effect of oxidative stress to aging mice induced by D-galactose[J]. *Chin J Gerontol*, 2010, 30(11): 1527-1529
- 4 崔立然,王桂梅,孙立东,等. 低分子量姬松茸多糖的免疫活性研究[J]. *中医药信息*, 2013, 3(2): 10-13
- 5 董海影,张春,韩翠翠,等. 低分子量姬松茸多糖对树突细胞 Th1 型免疫反应的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(3): 685
- 6 王丽娟,张彦青,王勇,等. 姬松茸多糖增强免疫作用及急性毒性

- 研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(13): 258-261
- 7 李志涛,赵娟娟,王敏. 复合食用菌多糖的免疫活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 5: 39-42
 - 8 张志超,吴迷,田笑,等. 四种食用菌复合多糖体外协同抗氧化活性研究[J]. *湖北农业科学*, 2018, 3: 78-80
 - 9 杨丹,任谓明,王艳红,等. 复合多糖药理活性研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50(3): 94-97
 - 10 任晨斌,伍大华,张发友,等. 滋肾活血方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马形态学的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(10): 1082-1085
 - 11 Yu Y, Bai F, Wang W, *et al.* Fibroblast brain against D-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 133: 122-131
 - 12 杨孟恺,易诚青. D-半乳糖诱导间充质干细胞衰老的研究[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(7): 31-36

(收稿日期:2018-11-14)

(修回日期:2018-12-10)

阿加曲班治疗恶性肿瘤化疗患者 PICC 置管术后静脉血栓形成的临床观察

张美君 赵 钢 于文慧 高 原

摘 要 目的 观察阿加曲班治疗恶性肿瘤化疗患者 PICC 置管术后静脉血栓形成的临床疗效。**方法** 观察 60 例恶性肿瘤患者 PICC 置管术后静脉血栓形成的患者,随机分为治疗组和对照组,每组 30 例,治疗组采用阿加曲班静脉滴注,对照组采用依诺肝素钠皮下注射,疗程为 1 周,观察临床疗效,比较治疗前后凝血酶原时间、D-二聚体、活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、血小板、纤维蛋白原、上肢周径差的变化情况。**结果** 治疗组和对照组的一般情况,年龄、性别、病程、肿瘤分类、置管形成时间、Caprini 评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组总有效率分别为 93.33% 和 90.00%;组间临床疗效比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。组间治疗后,在改善 D-二聚体、血小板计数方面,治疗组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),两组治疗后凝血酶时间、部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、上肢周径差比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。组内比较,治疗组治疗前后 APTT、PT、DD 比较,差异有统计学意义($P<0.05$),治疗组治疗前后 TT、PLT 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),对照组治疗前后 PT、DD、TT、PLT 比较,差异有统计学意义($P<0.05$),对照组治疗前后 APTT 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 阿加曲班治疗恶性肿瘤化疗患者 PICC 术后静脉血栓形成具有有效性、安全性,相比依诺肝素钠可减少出血等不良反应,促进疾病的恢复。

关键词 肿瘤患者 PICC 置管术后 静脉血栓形成 阿加曲班

中图分类号 R619

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.08.026

Clinical Observation of Venous Thrombosis after PICC Catheterization in Patients with Malignant Tumor Treated by Argatroban. Zhang Meijun, Zhao Gang, Yu Wenhui, *et al.* Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang 150040, China

Abstract Objective To observe the clinical effect of argatroban on venous thrombosis after PICC in patients with malignant tumor

基金项目:黑龙江省哈尔滨市科技储备项目(CB2014033230)

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学(张美君、高原);150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学附属第一医院周围血管病科(赵钢、于文慧)

通讯作者:赵钢,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:zg1120@126.com