

灵芝多糖对老年小鼠脾细胞 DNA 多聚酶 α 活性及免疫功能的影响

雷林生* 林志彬**

(北京医科大学药理学教研室, 北京 100083, 中国)

摘要 24月龄老年小鼠脾细胞中 DNA 多聚酶 α 的活性比 3月龄小鼠明显低下。每日 ip 灵芝多糖 (GL-B) 25 和 50 mg \cdot kg⁻¹ 共 4 d, 均可明显增强老年小鼠脾细胞内 DNA 多聚酶 α 的活性, 与老年对照组相比分别增加 44.0 和 58.4%。体外实验发现, 老年小鼠脾细胞自发增殖能力和自发分泌 IL-2 的能力明显低于年轻对照组, 对同种异型抗原引起的混合淋巴细胞反应也明显减弱, 加入 GL-B (50, 100, 200 μ g \cdot ml⁻¹) 以后, 这些指标均可明显恢复。

关键词 灵芝; 多糖; 老年小鼠; DNA 多聚酶 α ; 混合淋巴细胞培养反应; 白细胞介素 2

灵芝是一类大型真菌, 我国应用灵芝属真菌作为药物已有两千余年历史, 古代医药学家均认为灵芝能治疗多种疾病, 是滋补强壮、扶正固本的珍贵药物。

灵芝 [赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.] 是常用的灵芝属真菌之一。灵芝多糖系灵芝的有效成分之一。实验证明, 灵芝多糖可恢复老年小鼠降低的免疫反应, 如恢复刀豆素 A (Con A) 诱导的老年小鼠脾淋巴细胞增殖反应, 恢复老年小鼠脾细胞产生白细胞介素 2 (IL-2) 的能力⁽²⁾; 增加老年小鼠抗绵羊红细胞抗体形成细胞 (PFC) 的数目⁽¹⁾。说明灵芝多糖具有一定的抗衰老作用。本文进一步研究了灵芝多糖 GL-B 的抗衰老作用及其机制。

材料与 方法

灵芝多糖 (GL-B), 系从灵芝 [*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.] 子实体中提取的多糖部分, 其中含 7 个多糖均一体, 分子量范围 6800~9300⁽³⁾。为浅黄色粉末, 易溶于水。体外给药完全 RPMI 1640 培养液配成 3 mg \cdot ml⁻¹, 微孔滤器过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存, 临用前用完全 RPMI 1640 培养液稀释到所需浓度。整体给药用生理盐水配成所需浓度, ip。

氟标胸腺嘧啶核苷 (³H]TdR) 851 GBq \cdot mmol⁻¹; 氟标胸腺嘧啶核苷三磷酸 (³H] dTTP) 1110 GBq \cdot mmol⁻¹ 均为中国科学院上海原子能研究所产品, 脱氧鸟嘧啶、腺嘧啶、胞嘧啶核苷三磷酸 (dGTP, dATP, dCTP); Boehringer Mannheim; 鱼精 DNA; 中国科学院上海生物化学研究所; 牛胰脱氧核糖核酸酶 I; 中国科学院东方仪器设备公司生化部; 二硫苏糖醇 (DTT); Boehringer Mannheim; RPMI 1640 培养粉; JR Scientific Inc.; 白细胞介素 2 (IL-2) 依赖株 (HT₂); 购于北京医科大学基础医学院免疫学教研室。

本文于 1993 年 1 月 19 日收到。

本研究为国家教委高校博士学科点专项科研基金资助课题 (项目编号: 8910)

* 博士研究生, 现在第一军医大学药理学教研室, 广州 510515; ** 为本文联系人

β 计数器(LS 8000 Beckman); 高速离心机(RC5C Sorvall Instrument Dupont); CO_2 培养箱(IP-41 型, Yamato 科学株式会社); 超声粉碎机(CPS-1A 型, 上海超声波仪器厂)。

C57BL/6j(H-2^b)近交系小鼠, 7~14 周龄, 体重 18 ± 2 g, 雌雄兼用。24 月龄雌性昆明种老年小鼠, 体重 65 ± 7 g, 均购自北京医科大学实验动物部。

1 混合淋巴细胞培养(MLR)

无菌取出老年或年轻昆明种小鼠脾脏置盛有 Hank's 液的平皿中, 用两块厚载玻片轻轻捻碎, 转移至 20 ml 试管中, 用吸管充分吹打, 经两层尼龙布过滤除去大块组织, 得到单个细胞悬液。细胞再用 Hank's 液洗两遍(每次离心 3 min, 1500 r/min, 4℃)后, 镜下计数两次, 取平均值。然后用完全 RPMI 1640 培养液配成 $8 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的细胞悬液, 作为反应细胞。同样方法制备 C57BL/6j(H-2^b)小鼠脾细胞悬液, 用丝裂霉素 C(终浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)处理, 37℃温孵 30 min, Hank's 液洗 3 次后, 用完全 RPMI 1640 培养液配成 8×10^6 , 作为刺激细胞。用两种细胞 1:1 混合后, 用电磁搅拌机边搅拌边加入 96 孔板, 每孔 100 μl 。另加待测药品或其它试剂, 使总体积为 200 μl , 对照组用 RPMI 1640 培养液代替。在 37℃含有 5% CO_2 的培养箱中培养 3 d。终止培养前 6 h 每孔加入 [³H]TdR 20 μl (1.48×10^4 Bq)。然后用自动细胞收集器将细胞收集到 49 型玻璃纤维滤纸上, 蒸馏水洗 10 遍, 80℃烘干或室温凉干后放入盛有 5 ml 闪烁液闪烁瓶中进行 β 计数, 放射性强度经标准 [³H]正十六烷校正后用 dpm 表示。

2 DNA 多聚酶 α 活性测定

酶的制备 取小鼠在体脾细胞 1×10^7 个离心(2000 r/min, 5 min, 4℃)沉淀于 1 ml 塑料离心管底部, 弃上清, -20℃冻存 1~2 d 后解冻。每管细胞加入 0.5 ml 冰浴 Tris/HCl 缓冲液⁽⁴⁾ ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.8), 内含 EGTA ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、二硫苏糖醇(DTT, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 MgCl_2 ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。冰浴下超声粉碎 5 s, 离心(40000 g , 0~4℃) 1 h 后取上清待测。

模板活化 根据文献方法⁽⁵⁾略加改动。反应液中含有 Tris/HCl ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)、 MgCl_2 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 CaCl_2 ($0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、鱼精 DNA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、牛胰脱氧核糖核酸酶 I $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。37℃水浴 25 min 后, 每 ml 反应液中加入 EGTA ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.25 ml 终止反应, 立即 60℃水浴灭活牛胰脱氧核糖核酸酶 I 10 min, 分装、-20℃冻存, 半年内活性不变。经此法处理后, 模板活性增加 5 倍以上。

DNA 多聚酶 α 活性测定 按照文献方法⁽⁴⁾略加改动。反应总体积为 300 μl 。内含 Tris/HCl ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0)、活化 DNA 40 μg (25 μl)、dATP、dCTP、dGTP 各为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 MgCl_2 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、DTT ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、[³H] TTP 9.25×10^3 Bq、待测样品 50 μl 。37℃水浴反应 20 min, 立即加入冷三氯醋酸 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、内含 1% 焦磷酸) 2 ml 终止反应, 将酸不溶物收集到 49 型玻璃纤维滤纸上, 三氯醋酸 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、内含 1% 焦磷酸) 15 ml 洗 3 遍, 最后用 2 ml 95% 乙醇抽干, 80℃烘干或室温凉干后放入含有 5 ml 闪烁液的闪烁瓶中进行 β 计数。

酶活性用 U 表示: 1 U 酶活性规定为 37℃, 1 h, 催化 1 $\mu\text{mol/L}$ TMP 参入 DNA 中的酶活力。

3 IL-2 活性测定

HT₂ 细胞的传代培养 HT₂ 细胞株用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液加 IL-2 标准品 5~10 U $\cdot \text{ml}^{-1}$ 。于 5% CO_2 培养箱 37℃培养, 每星期传 2~3 次。

IL-2 活性测定 取传代培养的 HT₂ 细胞, 用 Hank's 液洗涤 3 次, 然后用培养液将细胞浓度调整到 $1 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$, 取 0.1 ml 加到 96 孔板中, 再加经系列倍比稀释的样品 0.1 ml, 在 CO_2 培养箱中培养 24 h, 终止前 6 h 每孔加 [³H] TdR 20 μl (1.48×10^4 Bq)。以下处理同混合淋巴细

胞培养方法。IL-2 的活性用 dpm 表示。

4 统计处理

所有结果的显著性差异均采用成组资料 t 检验进行处理。

结 果

1 增龄对小鼠细胞中 DNA 多聚酶 α 活性的影响

24 月龄老年小鼠及 3 月龄年轻小鼠脾细胞中 DNA 多聚酶 α 的活性分别为 12.29 ± 0.73 和 19.07 ± 3.39 ($U/1 \times 10^{10}$ 脾细胞), 即 24 月龄老年小鼠的酶活性较 3 月龄小鼠降低 35.6%, 两者有显著差异 ($P < 0.001$)。

2 对老年小鼠脾细胞 DNA 多聚酶 α 活性的增强作用

每日 ip GL-B 共 4 日, 第 5 日处死动物分离脾细胞, 测定其 DNA 多聚酶 α 的活性。结果发现, GL-B25 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 都可明显增加老年小鼠脾细胞中 DNA 多聚酶 α 的活性, 与老年对照组比分别增加 44.0 和 58.4% (表 1)。

Tab 1 Effect of ip GL-B on DNA polymerase α activity of splenocytes in aged mice. ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Groups	Age (months)	Dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	DNA polymerase α Activity ($U/1 \times 10^{10}$ cells)
Young control	3	saline $\times 4$	16.29 ± 3.18
Old control	24	saline $\times 4$	$9.23 \pm 2.42^{++}$
Old+GL-B	24	25 $\times 4$	$13.30 \pm 2.99^*$
Old+GL-B	24	50 $\times 4$	$14.62 \pm 3.62^*$

$^{++}P < 0.01$ vs young control, $^*P < 0.05$ vs old control.

3 对老年小鼠同种异型抗原刺激的 MLR 的增强作用

老年小鼠由同种异型抗原刺激的 MLR 能力明显低于年轻对照鼠。加入不同浓度的 GL-B 以后, 这种反应能力明显提高。在 $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的浓度时, 其反应能力接近年轻对照鼠 (表 2)。

Tab 2 Effect of ip GL-B on [^3H] TdR-uptake by alloantigen stimulated splenocytes of aged mice *in vitro*. ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Groups	Age (months)	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	[^3H] TdR Uptake (dpm)
Young control	3	—	45420 ± 2149
Old control	24	—	$29408 \pm 3761^{++}$
Old+GL-B	24	50	34765 ± 4549
Old+GL-B	24	100	$36102 \pm 2604^*$
Old+GL-B	24	200	$40184 \pm 4184^{**}$

$^{++}P < 0.01$ vs young control, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs old control.

4 对老年小鼠脾细胞自发增殖的影响

脾细胞配成 $8 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, 96 孔板内, 每孔 100 μl , 另加不同浓度的 GL-B, 培养 3 天后, 用 [^3H] TdR 参入法测定细胞增殖强度。老年鼠脾细胞自发增殖能力明显低于年轻对照组, GL-B 浓度为 50, 100 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时均可使这种低下的增殖能力恢复, 且具有浓度依赖关系(表 3)。

Tab 3 Effect of GL-B on [^3H] TdR uptake by unfractionated splenocytes of aged mice *in vitro*. ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	[^3H] TdR Uptake (dpm)
Young control	—	24784 \pm 4647
Old control	—	18020 \pm 3384 ⁺
Old+GL-B	50	22145 \pm 2682*
Old+GL-B	100	24878 \pm 3747**
Old+GL-B	200	26356 \pm 2392**

⁺ $P < 0.05$ vs young control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs old control.

5 对老年小鼠脾细胞自发分泌 IL-2 的影响

脾细胞配成 $8 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, 96 孔板内, 每孔 100 μl , 另加不同浓度的 GL-B, 培养 24 h 后取上清, 用 IL-2 依赖株 (HT₂) 检测 IL-2 的活性。老年小鼠脾细胞自发分泌 IL-2 的能力较年轻对照组小鼠降低 30.6%。GL-B (50, 100, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 随浓度的增加可逐渐恢复老年鼠脾细胞分泌 IL-2 的能力, 且具有浓度依赖关系(表 4)。

Tab 4 Effect of GL-B on IL-2 production by unfractionated splenocytes of aged mice *in vitro*. Activity of IL-2 was assessed by IL-2 dependent cell line (HT₂) with a dilution of 1 : 2. Supernatants containing IL-2 were pooled after 24 h incubation. ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Age (months)	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	IL-2 activity (dpm)
Young control	3	—	8335 \pm 1359
Old control	24	—	5785 \pm 988 ⁺
Old+GL-B	24	50	7281 \pm 1219*
Old+GL-B	24	100	8150 \pm 1008**
Old+GL-B	24	200	9007 \pm 1042**

⁺ $P < 0.05$ vs young control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs old control.

讨 论

伴随增龄而出现的免疫功能障碍, 是衰老的重要表现之一。老年动物免疫功能障碍包括体液免疫和细胞免疫两方面。体液免疫表现为抗体产生能力下降, 抗体形成细胞减少^(6,7)。细胞免疫表现为淋巴细胞对 PHA 和 Con A 的反应低下^(8,11)。同种异型混合淋巴细胞培养反应减弱⁽⁹⁾ 以及自身混合淋巴细胞培养反应降低⁽¹⁰⁾。进一步研究发现老年动物免疫功能低下的主要原因

是由于 IL-2 的合成及分泌的减少,从而导致一系列的免疫功能低下现象,外源补充 IL-2 后可恢复这些免疫功能^(11,12)。本文首次发现,老年小鼠脾细胞中 DNA 多聚酶 α 的活性比年轻小鼠明显低下,从而说明脾细胞内 DNA 多聚酶 α 活性的降低是引起衰老的又一重要因素。

关于灵芝延年益寿的传说很多,但对其延年益寿的机制却知道很少。夏冬等⁽¹⁾证明灵芝多糖可以恢复老年小鼠脾细胞对 Con A 的敏感性;增加老年小鼠抗 SRBC 的 PFC 数目。马莉等⁽²⁾亦发现,灵芝多糖可以恢复老年小鼠脾细胞产生 IL-2 的能力。本文结果指出,小鼠脾细胞自发增殖能力和自发分泌 IL-2 的能力比年轻对照组明显降低,对同种异型抗原引起的免疫反应也明显减弱。加入 GL-B 以后,这些指标都有明显的恢复。尤其在整体情况下可以明显恢复老年小鼠脾细胞 DNA 多聚酶 α 的活性。

老年机体免疫功能低下,容易遭受病原体的侵袭,引起疾病。GL-B 可以不同程度地恢复老年机体的免疫力,进而增强对病原体的抵抗能力,避免患病。因此,我们认为 GL-B 促进老年机体免疫细胞 DNA 多聚酶 α 的活性,继而促进细胞增殖分裂,导致 IL-2 合成、分泌增加可能是灵芝抗衰老的机制之一。

致谢 北京医科大学药学院中药研究室李荣芷、何云庆教授提供 GL-B。

参 考 文 献

- 1 Xia D, et al. Effects of *Ganoderma* polysaccharides on immune function in mice. *J Beijing Med Univ* 1989;21: 533.
- 2 Ma L, et al. Effects of *Ganoderma* polysaccharides on IL-2 production by mouse splenocytes *in vitro*. *Ibid* 1991;23: 412.
- 3 李荣芷,何云庆.灵芝抗衰老机理与活性成分灵芝多糖的化学与构效关系. *北京医科大学学报* 1991;23: 473.
- 4 Edwards DP, et al. Effects of estrogen and antiestrogen on DNA polymerase in human breast cancer. *Cancer Res* 1980;40: 1722.
- 5 Baril E, et al. Action of pancreatic DNase; requirement for activation of DNA as a template-primer for DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 1977;4: 2641.
- 6 Segre M, et al. Humoral immunity in aged mice. I. Age-related decline in the secondary response to DNP of spleen cells propagated in diffusion chambers. *J Immunol* 1976;116: 73.
- 7 Heidrick M L, et al. Presence of impairment of humoral immunity in nonadherent spleen cells of old mice. *Ibid* 1973;111: 1502.
- 8 Hori Y, et al. Decline in phytohemagglutinin responsiveness of spleen cells from aging mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;144: 48.
- 9 Konen TG, Decline in mixed lymphocyte reactivity of spleen cells from aged mice of long-lived strain. *J Immunol* 1973;110: 1216.
- 10 Moody CE, et al. Lymphocyte transformation induced by autologous cells. X I. The effect of age on the autologous mixed lymphocyte reaction. *Immunology* 1981;44: 431.
- 11 Thoman ML, et al. Cell-mediated immunity in aged mice; an underlying lesion in IL-2 synthesis. *J Immunol* 1982;128: 2358.
- 12 Ershler WB, et al. Interleukin-2 and aging; Decreased interleukin-2 production in healthy older people does not correlate with reduced helper cell numbers or antibody response to influenza vaccine and is not corrected *in vitro* by thymosin 1. *Immunopharmacol* 1985;10: 11.

EFFECTS OF GANODERMA POLYSACCHARIDES ON THE ACTIVITY OF DNA POLYMERASE α OF SPLENCYTES AND IMMUNE FUNCTION IN AGED MICE

LS Lei and ZB Lin

(Department of Pharmacology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT The activity of DNA polymerase α in splenocytes of 24-month-old mice was about 35.6% lower than that of 3-month-old mice. Aged mice were intraperitoneally administered *Ganoderma* polysaccharides (GL-B) once a day for 4 days and then the activity of the enzyme was assessed. The results showed that GL-B at doses of 25 and 50 mg/kg⁻¹ enhanced the activity of the enzyme in aged mouse splenocytes by 44.0 and 58.8% respectively. In addition, the mixed lymphocyte response to alloantigen, automatic proliferation and IL-2 production of splenocytes in aged mice declined as compared with that in young adult mice. GL-B (50, 100, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) was found to restore those parameters to the levels of that of young mice *in vitro*.

Key words *Ganoderma lucidum*; Polysaccharide; Aged mice; DNA polymerase α ; Mixed lymphocyte response (MLR); Interleukin-2 (IL-2)