

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)08-0700-03

双歧杆菌脂磷壁酸对衰老小鼠肝脏与骨髓的影响

王 跃, 付玉荣, 陈淑惠, 刘明方 (重庆医科大学临床微生物学教研室, 重庆 400016)

Effect of lipoteichoic acid of bifidobacterium on liver and bone marrow of aging mice

WANG Yue, FU Yu-Rong, CHEN Shu-Hui, LIU Ming-Fang

Department of Clinical Microbiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China

【Abstract】 AIM: To study the effect of lipoteichoic acid (LTA) of bifidobacterium on liver and bone marrow in aging mice and to explore its mechanism. **METHODS:** Aging mice were induced by sc D-galactose and LTA was simultaneously given ip to them daily, and for 40 days. The body mass, liver index, liver morphology, the expression of p16, c-fos protein and micronucleus frequency in the bone marrow were tested by Gimesa staining, SABC technique of immunohistochemistry and other methods. **RESULTS:** Compared with those in the young control group, the body mass and the expression of c-fos protein in liver noticeably reduced in aging model mice ($P < 0.05$) while the expression of p16 protein in liver and micronucleus frequency in the bone marrow remarkably increased ($P < 0.05$). After administrating LTA to aging model mice, all the above mentioned changes were reversed ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** LTA of bifidobacterium has an effect of deferring senescence of liver and bone marrow in aging model mice.

【Keywords】 bifidobacterium, lipoteichoic acid, aging

【摘要】 目的: 通过研究双歧杆菌表面分子脂磷壁酸(LTA)对衰老小鼠肝脏形态、p16蛋白、c-Fos蛋白表达及骨髓细胞微核率的影响, 探讨双歧杆菌抗衰老的分子机制。方法: 雄性昆明系小鼠, 随机分组, 在建立D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的同时, 每日ip双歧杆菌LTA。40 d后, 采用免疫组化SABC法、Gimesa染色和其他方法检测小鼠体质量、肝脏指数、形态、p16蛋白、c-Fos蛋白及骨髓红细胞微核率的变化。结果: 与青年对照组小鼠相比, 衰老模型组小鼠体质量、肝脏c-Fos蛋白表达明显降低($P < 0.05$), p16蛋白表达及骨髓红细胞微核率显著增高($P < 0.05$)。给予双歧杆菌LTA, 衰老模型小鼠体质量与肝脏c-Fos蛋白水平明显增高($P < 0.05$), 而p16蛋白水平及骨髓红细胞微核率显著降低($P < 0.05$), 并且肝脏组织形态结构也得到了明显改善。结论: LTA可延缓肝脏与骨髓衰老, 抑制染色体畸变, 上调c-fos, 下调p16表达。

收稿日期 2004-11-31; 修回日期 2005-02-21

通讯作者: 付玉荣. Tel. (023) 68485184 Email. yizhengjun@sohu.com

作者简介: 王 跃(1958-), 女(汉族) 四川省绵阳市人. 硕士, 副教授, 主任. Tel. (023) 68485184 Email. cqrx 0439@cta. cq. cn

【关键词】二裂菌属, 脂磷壁酸, 衰老

【中图分类号】R339.38

【文献标识码】A

0 引言

双歧杆菌具有抗感染、抗肿瘤和免疫增强等功能。随年龄增长, 其黏附力逐渐下降, 数量与活力也随之降低^[1], 与衰老密切相关。脂磷壁酸(lipoteichoic acids, LTA)是双歧杆菌细胞壁中的主要成分, 具有免疫增强、抗肿瘤等多种作用。我们采用D-半乳糖衰老小鼠模型, 用双歧杆菌LTA处理后, 观察LTA对衰老小鼠肝脏与骨髓多染红细胞微核率的影响如下。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种雄性小鼠, 45只, 6~8 wk龄, 体质量20~22 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。LTA由本室从两歧双歧杆菌86321中提取与纯化。将小鼠随机分为3组: ①衰老模型组(13只): 1次/d定时项背部sc D-半乳糖0.15 mg/g, 同时ip无菌生理盐水0.3 mL; ②LTA处理组(16只): 每日D-半乳糖造模的同时, ip LTA 100 μg; ③青年对照组(16只): 1次/d定时项背部sc和ip与衰老模型组等体积的无菌生理盐水。每天记录小鼠毛发、体态与活动情况。连续处理40 d后称体质量, 断颈处死, 取出肝脏, 用滤纸吸干残血后称质量, 以相应质量计算出脏器指数。肝脏指数 = 肝脏质量(mg)/体质量(g)。免疫组化试剂p16 mAb, HIGH-SABC试剂盒, DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司, 免疫组化试剂c-fos mAb购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 肝脏组织学与免疫组织化学染色 肝组织石蜡切片厚5 μm, HE染色观察肝脏组织形态结构, 免疫组化染色(p16, c-Fos) SABC法, DAB显色, 用Td2000图像分析系统分析单位视野下阳性区域面积。

1.2.2 骨髓多染红细胞微核率测定 取小鼠股骨骨髓涂片, 甲醇固定10 min, Giemsa染色。高倍镜下选取染色良好, 完整清晰的嗜多染红细胞群。在油镜下观察微核的出现率: 每只小鼠镜检1000个骨髓嗜多染红细胞, 微核的出现率以‰表示。微核的判断标准: 直径为主核的1/3~1/16, 没有光的折射, 与主核之间没有核物质相连, 可以和主核有边界的重叠, 但

能看清各自的核膜。

统计学处理:采用 SAS 8.1 统计软件进行单因素方差分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

青年小鼠毛发光亮、浓密、活泼好动、皮肤富有弹性。给药 1.5 wk 后衰老模型组小鼠出现衰老症状:

四肢无力、少动、行动迟缓、不喜争斗、喜蜷缩,毛色发黄、尤其是腹部毛发逐渐变得无光泽、稀疏并渐有掉毛,饮水量逐渐减少,皮肤松弛、弹性下降。

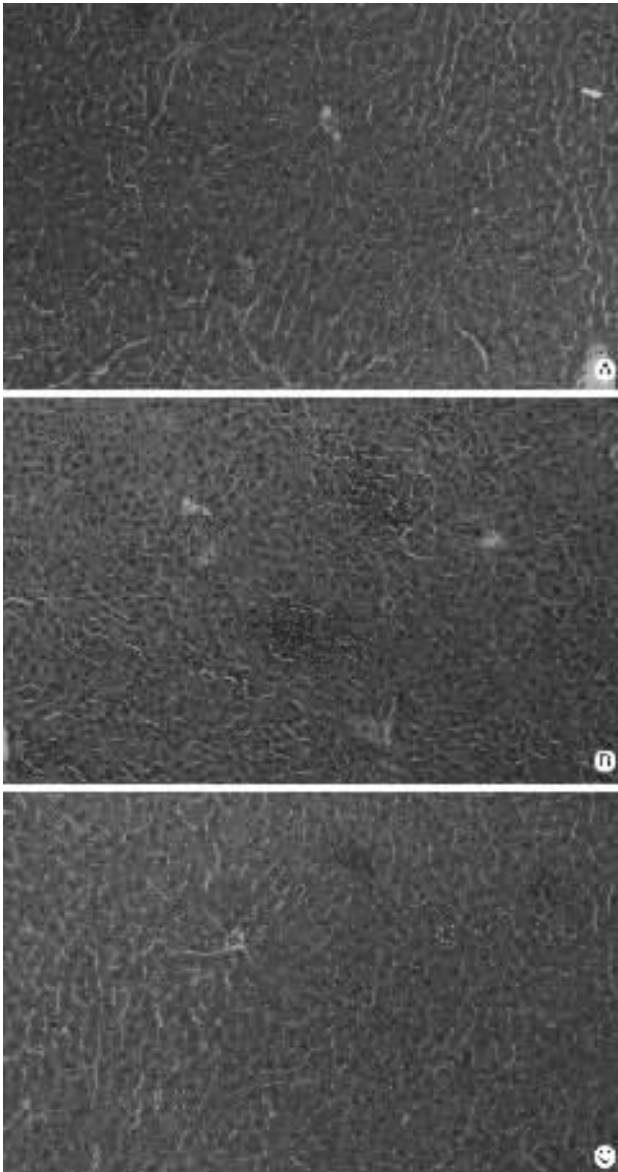
2.1 体质量与肝脏指数 衰老模型组小鼠体质量降低 ($P < 0.05$),肝脏指数没有明显差异,用双歧杆菌 LTA 处理衰老模型组小鼠后,体质量显著增加 ($P < 0.05$),肝脏指数没有明显差异 (Tab 1)。

表 1 LTA 对小鼠体质量、肝脏指数 c-Fos p16 表达和 MNF 数的影响

Tab 1 Effect of LTA on bodymass (mB), liver index, c-Fos, p16 expression and MNF of mice

Group	n	mB/g	liver index (mg/g)	c-Fos	p16	MNF (%)
Aging model	13	30.4 ± 2.0	60 ± 8	21 ± 5	19.5 ± 6.4	5.0 ± 1.8
LTA treated	16	31.7 ± 1.4 ^a	57 ± 6	32 ± 7 ^a	9.2 ± 4.4 ^a	2.8 ± 1.7 ^a
Young control	16	32.4 ± 1.8 ^a	58 ± 5	39 ± 9 ^a	3.8 ± 1.6 ^a	3.8 ± 1.6 ^a

^a $P < 0.05$ vs aging model.



A: Young control B: Aging model C: LTA.

Fig 1 Liver morphology of mice in different groups HE × 100
图 1 各组小鼠肝脏组织形态结构

2.2 肝脏组织形态结构 青年对照组小鼠肝小叶细胞形态正常 (Fig 1A); 模型衰老组肝细胞浊肿,有大量中性粒细胞浸润,中央静脉扩张,库氏细胞轻度增生 (Fig 1B); LTA 处理组肝脏组织形态结构基本正常 (Fig 1C)。

2.3 肝脏 c-Fos p16 蛋白表达 衰老模型组小鼠肝脏 c-Fos 蛋白表达减少 ($P < 0.05$),用双歧杆菌 LTA 处理衰老模型组小鼠后, c-fos 蛋白明显增加 ($P < 0.05$)。青年对照组小鼠肝脏几乎没有 p16 蛋白表达; 衰老模型组 p16 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$); 衰老模型组小鼠用 LTA 处理后下降 ($P < 0.05$, Tab 1)。

2.4 骨髓多染红细胞微核率 微核圆形,边缘光滑整齐,多数微核化细胞仅含有一个核。与青年对照组相比,衰老模型组骨髓多染红细胞的微核率增多 ($P < 0.05$); 注射双歧杆菌 LTA 能显著降低衰老小鼠骨髓多染红细胞的微核率 ($P < 0.05$, Tab 1)。

3 讨论

肝脏在与衰老有关的多个环节中发挥重要作用。我们发现,与青年对照组相比,衰老模型组小鼠肝小叶细胞形态异常,有大量炎症细胞浸润,而双歧杆菌 LTA 能明显地改善这些变化。c-fos 引发 DNA 合成和细胞分裂中起重要作用。本结果显示,衰老模型组肝脏 c-Fos 蛋白表达比青年对照组小鼠显著下降,而双歧杆菌 LTA 能明显提高 c-Fos 蛋白在肝脏的表达。p16 基因对细胞的增殖分裂起负调控作用^[2],是细胞衰老的主导基因。我们发现,衰老模型组小鼠与青年对照组相比,肝脏 p16 蛋白表达显著上升,用双歧杆菌 LTA 处理后明显降低。自由基对细胞的作用呈剂量和时间效应关系^[3,4],过多的自由基可引起 DNA 氧化损伤,与衰老密切相关,微核是其敏感指标。本结果表

明,双歧杆菌 LTA 可降低衰老模型组小鼠骨髓嗜多染红细胞微核数,有效地抑制染色体畸变,从而可使基因表达正常进行. 本实验支持双歧杆菌具有抗衰老作用,并初步揭示了其抗衰老可能的分子机制.

【参考文献】

[1] He F, Ouwehand AC, Isolauri E *et al.* Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors[J]. *Curr Microbiol* 2001 43(3) 351-354.

[2] 金向阳, 金明, 王中琨, 等. 转染野生型 MTS1 基因的膀胱癌细胞中 p16 蛋白的可控表达及意义[J]. 第四军医大学学报, 2000; 21(11) 1330-1332.

Jin XY, Jin M, Wang ZK *et al.* Controlled expression and significance

of p16 protein in bladder carcinoma cells transfected wild type MTS1 [J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2000 21(11) 1330-1332.

[3] 张荣庆, 程何祥, 马颖艳, 等. 卡普托利对外源性羟自由基诱导心肌细胞凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 2001; 22(21): 1969-1972.

Zhang RQ, Cheng HX, Ma YY *et al.* Effect of captopril on apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes induced by exogenous hydroxyl free radical [J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2001 22(21) 1969-1972.

[4] 雷建军, 海春旭, 曹云新. 低浓度 H₂O₂ 对 HL-60 细胞增殖的影响[J]. 第四军医大学学报, 2001 22(12) 1089-1091.

Lei JJ, Hai CX, Cao YX. Effect of low concentration hydrogen peroxide on proliferation of human leukemic cells *in vitro* [J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2001 22(12) 1089-1091.

编辑 何扬举

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)08-0702-01

宫颈分泌物 153 例支原体培养及药敏分析

赵喜元¹, 赵振营², 林佩妆¹, 韩远欢¹, 刁文铭¹ (广东省中山市坦洲医院: ¹检验科, ²外科, 广东 中山 528467)

【关键词】支原体培养, 药敏, 宫颈分泌物
【中图分类号】R691.3 【文献标识码】B

1 临床资料 2003-01/2004-09 我院妇科门诊生殖道感染患者 153 例, 年龄 18~42(平均 28.6)岁, 病程 0.5~12(平均 2.0)mo. 采用珠海黑马生物有限公司生产的支原体培养、鉴定、药敏一体化试剂盒, 可检测支原体对 9 种常用药品敏感性. 试剂盒含有液体培养基, 24 孔培养鉴定药敏微孔, 分设 A、B 两类, A1 为空白孔, A2 为解脲脲原体鉴定孔, A3 为解脲脲原体计数孔, B1 为解脲脲原体/人型支原体生长孔, B2 为人型支原体鉴定孔, B3 为人型支原体计数孔, A4~A12 为高浓度药物孔, B4~B12 为低浓度药物孔, 9 种抗生素包括大环内脂类抗生素、喹诺酮类抗生素、四环素类抗生素及林可霉素类抗生素. 用无菌拭子插入宫颈管 1~2 cm 旋转数周取分泌物, 从液体培养基中吸取 100 μL 加入反应板空白孔, 将宫颈分泌物拭子插入液体培养基中, 在瓶壁挤压旋转数次, 充分混匀接种标本后的培养基, 取 100 μL 加入反应板的各孔中(除 A1 孔), 各孔滴加 1~2 滴无菌液体石蜡, 置 35~37℃ 培养箱, 在 24~48 h 观察结果. 空白孔颜色不变说明整个试验无污染, 阳性生长孔颜色变红或颜色不变可判断有支原体或无支原体

感染. 试验孔根据上下每一组颜色的变化情况可确定是解脲支原体或人型支原体或两者混合感染, 浓度是否 ≥ 10⁴, 并可判断各支原体对 9 种抗生素的敏感性情况. 从 153 例宫颈分泌物标本中检出支原体阳性 102 例, 阳性率为 66.7%, 其中单独解脲脲原体感染 81 例, 占支原体感染 79.4%(表 1). 单独人型支原体感染 7 例, 占支原体感染 6.9%, 解脲脲原体和人型支原体混合感染 14 例, 占支原体感染 13.7%.

表 1 宫颈分泌物支原体阳性 102 例药敏试验结果

药物	敏感	中敏	耐药	敏感率(%)
罗红霉素	25	43	34	66.7
阿奇霉素	19	62	21	79.4
左旋氧氟沙星	62	34	6	94.1
交沙霉素	99	2	1	99.0
司帕沙星	74	22	6	94.1
强力霉素	74	9	19	81.4
美满霉素	80	3	19	81.4
氧氟沙星	22	71	9	91.2
克林霉素	6	31	65	36.3

2 讨论 四环素及红霉素曾被认为是治疗支原体感染的首选抗生素. 现有资料显示, 支原体对四环素、红霉素的耐药率已达到 50% 以上^[1]. 本试验结果表明, 交沙霉素、左旋氧氟沙星和司帕沙星在体外药敏试验中表现出较强的抗菌活性, 它们的敏感率分别为 99.0%、94.1% 和 94.1%, 提示交沙霉素、左旋氧氟沙星和司帕沙星可作为本地区治疗支原体感染的首选抗生素.

【参考文献】

[1] 程力明, 梁流亚, 徐孝伦. 550 例支原体药敏结果分析[J]. 中国微生物学杂志, 2002 14: 105.

收稿日期 2004-12-20; 修回日期 2005-01-17
作者简介 赵喜元(1971-), 女(汉族), 广东省中山市人. 本科, 主管检验师. Tel. (0760) 6657913 Email. huicuzxy@yahoo.com.cn

编辑 潘伯荣