

淫羊藿总黄酮延缓衰老的研究

□沈自尹* (复旦大学附属华山医院 上海 200040)

摘要:目的:淫羊藿总黄酮(EF)延缓人胚肺二倍体成纤维细胞衰老及神经内分泌、免疫衰老的机制。方法:采用含EF的血清对人二倍体成纤维细胞2BS细胞株进行处理,观察2BS细胞寿命;采用荧光实时定量PCR法检测p16基因mRNA的表达;ELISA法检测细胞总视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)和磷酸化Rb蛋白的含量;TRAP-Hyb单管一步法检测细胞端粒酶活性;端粒限制性片段(TRF) Southern blot法检测2BS细胞端粒长度变化。采用基因芯片技术,检测下丘脑、垂体、肾上腺、脾脏淋巴细胞的基因表达谱。结果:EF能够延长2BS细胞的传代寿命;下调2BS细胞p16基因mRNA的表达;增加磷酸化Rb蛋白的含量;延缓衰老细胞端粒长度的缩短,并未激活细胞端粒酶活性;EF上调HPAT轴多种神经递质、激素、细胞因子或其受体表达。结论:淫羊藿总黄酮通过抑制p16基因表达,促进磷酸化Rb蛋白的产生,从而延缓衰老细胞端粒长度的缩短,发挥延缓细胞衰老的作用。EF能上调神经递质受体的表达并通过NEI网络的下行通路激活神经内分泌和免疫系统;通过下调促凋亡、抗增殖基因,上调抗凋亡、促增殖基因的表达,重塑淋巴细胞基因表达的平衡,延缓免疫衰老。

关键词:淫羊藿 淫羊藿总黄酮 细胞衰老 细胞寿命 端粒长度 基因表达谱 免疫衰老 神经内分泌免疫

我们长期研究表明^[1],肾虚与衰老具有相同的神经内分泌免疫(NEI)网络功能低下,而含有淫羊藿的温补肾阳类复方可以提高NEI网络功能;而且在延缓衰老方面淫羊藿总黄酮(EF)可以代表温肾复方。我们主要从两个方面探索EF延缓衰老的机制:鉴于衰老始于细胞衰老,采用国际公认的细胞衰老模型研究

EF延缓细胞衰老的调控机制和作用环节,我们发现:含EF血清可明显延长人二倍体成纤维细胞的传代寿命,其延缓细胞衰老主要是通过p16-pRb途径延缓衰老细胞端粒的缩短,可能是药物有效调节端粒长度实验的首次报道。另一方面,摘取下丘脑-垂体-肾上腺-淋巴细胞(HPAT)轴,利用基因芯片技术,研究EF延缓神经内分泌免疫衰老的机制。

收稿日期:2005-01-03

修回日期:2005-02-09

* 联系人:沈自尹,本刊顾问,中国科学院院士,从事中西医结合肾本质研究, Tel: 021-62490934, E-mail: hjhzyj@yahoo.com.cn.

12 [World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

一、材料与方 法

1. 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 $250\text{g} \pm 12.5\text{g}$ (复旦大学医学院动植物科学部提供)。

2. 药 物

辽宁产朝鲜淫羊藿, 由上海市医药工业研究院中药室提取 EF, 实验时以蒸馏水配制成为 $1.5\text{g}/100\text{ml}$ 。

3. 试剂和仪器

SYBR GREEN Real Time PCR Protocol 试剂盒 (美国 PE 公司)。总 Rb 及磷酸化 Rb 蛋白 ELISA 检测试剂盒 (美国 Biosource 公司)。端粒酶活性检测试剂盒 (华美生物工程公司)。Rat Genome U34A Array (美国 Affymetrix 公司)。

4. 含药血清制备

大鼠随机分为空白对照组和用药组。用药组 EF 按 $0.06\text{g}/\text{kg BW}/\text{d}$ 灌胃; 每天上午、下午各 1 次, 连续 3d。第 3d 末次给药 1h 后, 麻醉, 采血, 分离血清, 过滤, 分装, 临用时 56°C 灭活 30min。

5. 细胞寿命实验

2BS 细胞常规培养, 用 MEM 培养基。分组为: 空白血清对照组、含药血清对照组、年轻组, 当细胞传代连续 4 周后不能够融合长满, 则记为最后一代。以 30 代细胞为年轻组细胞, 50 代为老年细胞。

6. 实时定量 PCR 检测 p16 基因 mRNA 表达

提取细胞总 RNA, 引物序列: 上游引物 GCT-GATGCTACTGAGGAGCCA, 下游引物 CCATCATCAT-GACCTGGTCTTCT, 采用 SYBR GREEN Real Time PCR Protocol, 在 GeneAmp 5700 Sequence Detection System 进行扩增。

7. ELISA 法检测总 Rb 和磷酸化 Rb 的含量

抽提蛋白, ELISA 检测按试剂盒说明书操作。

8. 端粒酶活性检测

按端粒酶活性检测试剂盒说明书操作。

9. 端粒限制性片段 (TRF) Southern blot 法检测 2BS 细胞端粒长度

收集 1×10^6 个细胞, 抽提基因组 DNA, 限制性

酶切、消化基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶脱嘌呤 30min, Southern 转移过夜, 紫外交联仪中交联固定, 预杂交、杂交, 磷屏扫描成像仪成像。

10. 基因表达谱检测

23 月龄 SD 大鼠随机分为 2 组: 老年对照组、EF 组。另取 7 只 4 月龄 SD 大鼠作为年轻对照组。EF 组给予 EF, 按 $0.06\text{g}/\text{kgBW}/\text{d}$ 灌胃; 老年对照组给予蒸馏水灌胃, 时间 3 个月。取下丘脑、垂体、肾上腺、脾脏并制备脾淋巴细胞悬液, 细胞内总 RNA 抽提, 纯化, 合成 cDNA 第一链、第二链。双链 cDNA 产物纯化后合成生物素标记的 cRNA, cRNA 产物片段化, 片段化的 cRNA 即可用于杂交, 洗涤, 染色, 对芯片进行扫描。数据采用 Affymetrix Microarray suite 5.0 软件分析。表达倍数 ≥ 2 倍为表达上调, 表达倍数 ≤ 2 倍为表达下调, 有统计学意义。

二、结 果

1. 含 EF 血清对 2BS 细胞传代次数的影响

EF 组其传代次数为 64.50 ± 0.80 , $n = 6$, 比空白血清组 (53.83 ± 0.40 , $n = 6$) 明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2. 含 EF 血清对 2BS 细胞 p16 mRNA 表达的影响

空白血清组 p16 mRNA 拷贝数为 $13.00 \times 10^4 \pm 19.80 \times 10^4$, $n = 6$, 与年轻组 ($6.64 \times 10^4 \pm 2.65 \times 10^4$, $n = 6$) 比较 p16 mRNA 表达明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。EF 组 ($9.61 \times 10^4 \pm 1.40 \times 10^4$) 与空白血清组比较 p16 mRNA 表达明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

3. 含 EF 血清对 2BS 细胞磷酸化 Rb 含量的影响

年轻组 2BS 细胞的磷酸化 Rb 蛋白含量为 8.63 ± 2.16 , $n = 6$, 明显高于老年组 (2.03 ± 0.32 , $n = 6$), 差异有显著性 ($P < 0.01$); EF 组 (3.20 ± 0.72 , $n = 6$) 明显高于老年组, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

4. 含 EF 血清对 2BS 细胞端粒酶活性的影响

结果显示年轻组、空白血清组、EF 组的细胞均没有检测到端粒酶活性。

5. 含 EF 血清对 2BS 细胞端粒长度的影响

空白血清组的端粒长度为 2.96 ± 0.13 , $n = 6$, 与年轻组 (6.55 ± 0.05) 比较, 端粒长度明显缩短, 差异有显著性 ($P < 0.01$); EF 组 (5.93 ± 0.05 , $n = 6$) 与老年组比较, 2BS 细胞端粒长度明显延长, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

6. 基因芯片结果

老年大鼠与年轻大鼠比较下丘脑显示 ①多种神经递质或其受体低表达, 如 γ 氨基丁酸 A 受体等 ②生长激素低表达。垂体显示: ①多种促性腺激素及垂体本身分泌的激素或其受体低表达, 包括卵泡刺激素、黄体生成素、促性腺激素释放激素等。②与细胞生长相关的多种生长因子或受体低表达。肾上腺 PRL R、IGFBP₃ 下调。淋巴细胞显示: ①促凋亡基因 Caspase1、Dnase γ 等表达显著上调, 抗凋亡基因 Cathepsin B、MTA1 显著下调。②抗增殖基因 Rb 等表达显著上调, 促增殖基因显著下调, 包括 c-myc、c-fos、v-jun 等癌基因, CyclinB1 等参与细胞周期调控的基因。EF 作用后, 对老年大鼠 HPA 轴基因, 包括多种神经递质受体、促性激素多肽、生长激素表达明显上调, 并有生长抑素 (SS) 在下丘脑及肾上腺下调。EF 作用后, 上调抗凋亡基因的同时下调促凋亡基因的表达; 上调促增殖基因的同时下调抗增殖基因的表达; 神经肽 Y 表达显著上调。

三、讨论

1. EF 保护衰老细胞端粒长度缩短, 延缓细胞衰老

细胞是机体的基本组成单位, 机体的衰老始于细胞衰老。2BS 细胞是国际公认的人类细胞衰老模型, 同时其寿命试验亦是细胞水平上抗衰老研究所必须。端粒是真核细胞染色体末端的特殊结构, 端粒的功能是完成染色体末端的复制, 起着保护染色体末端的作用。人体细胞端粒长度随年龄增加而缩短, 端粒长度是人类细胞特异性的衰老生物学标志。

影响端粒长度可以通过 p16 基因或端粒酶的途径。p16 基因是一种重要的抑癌基因, 也是控制衰老进程的主导基因, p16 基因的激活通过降低 pRb 蛋白磷酸化水平, 来缩短端粒长度, 加速衰老进程。端粒酶位于端粒末端, 其功能是合成端粒中重复 DNA

序列加到端粒末端而维持端粒的长度, 以抵消端粒随细胞分裂的不断缩短, 可能延缓衰老进程。但大多数正常体细胞不表达端粒酶活性, 而且端粒酶的激活有导致细胞永生化和癌变的可能。童坦君等报道^[3]将 p16 基因的重组载体导入成纤维细胞, 使得 p16 高表达, 结果细胞衰老加快; 但将其反义重组载体导入细胞后, 抑制了 p16 的表达, 提高了 pRb 蛋白的活性, 而非激活端粒酶起作用, 这样就不至于发生细胞永生化和癌变的可能。结果与衰老相关的端粒缩短减慢, 衰老速度减慢, 细胞寿命延长。

本研究采用 EF 进行的寿命试验, 使 2BS 细胞的传代次数由 53 代延长至 64 代, 效果明显。与此同时, 观察到 EF 亦是抑制了 p16 基因表达, 提高 pRb 蛋白的活性, 而非激活端粒酶的活性, 由此保护了衰老时端粒长度的自然缩短。这比对单基因进行重组改造而获得长寿的方法远为生理而安全^[4]。迄今尚未见有中药有效成分调节端粒长度的报道。

2. EF 延缓神经内分泌免疫衰老

(1) 在老年大鼠和青年大鼠之间的比较, 可见老年大鼠在 HPAT 轴各层次上与生长、发育、衰老相关的基因如神经递质和神经肽、GH、促性腺激素以及淋巴细胞抗凋亡、促增殖、参与免疫效应信号通路分子均呈低表达 (差异表达两倍以上), 反映了老年大鼠 HPAT 轴上的基因表达谱是以衰退的表现为主。

(2) EF 在下丘脑, 除了有如此众多的 Da D1R、Da D2R、 $\alpha 1$ ER、GABA-AR、Glu R、5-HT1 R 神经递质受体, 还有 GH 显著上调, 已知 GH 是受这 6 种神经递质的调节^[5-6], 多种神经递质的共同释放可起协同作用。以此为启动因素激发 GH 以及垂体肾上腺皮质轴上各种激素或因子的上调。在垂体, 可见促性腺激素和性激素以及和 GH 相关 PRL R、IGFBP5 显著上调, SS 显著下调, 在肾上腺也有性激素的显著上调。在淋巴细胞可见 NPY 显著上调, 其功能可促进淋巴细胞的增殖与抗凋亡^[7], 而作为细胞增殖、细胞凋亡的上游因子 TGF β ^[8] 显著上调, 可能由此诱导一系列免疫效应及调节因子上调, 在下调促凋亡基因的同时, 上调抗凋亡基因, 在下调抗增殖 Rb 基因的同时上调促增殖基因。结合我们曾

发现 EF 对皮质酮大鼠显著下调 T 淋巴细胞凋亡率的同时,下调促凋亡基因 FasL、TNFR1,上调抗凋亡基因 Bcl-2,并显著降低凋亡相关酶 Caspase8、Caspase3 的活性,从而重塑基因的平衡。这样就体现出 EF 之所以能延缓免疫衰老,在于其重建衰老免疫稳态的分子机制。

(3) Basedovsky 提出的 NEI 网络里,神经内分泌能调控免疫(下行通路模式),免疫亦能调控神经内分泌(上行通路模式),三者形成完整的双向调节网络,这个网络对维持机体防御功能和内环境稳定具有重要意义。从 EF 可在下丘脑激活众多神经递质和神经肽,而未见作为启动上行通路最重要的细胞因子,如 IL-1、IL-6、IFN γ 、TNF α 的出现,在淋巴系统却可见到神经肽 NPY 被激活,都说明 EF 是通过下行通路这一模式而激活免疫系统,其中众多神经递质的启动可能是关键基因。

3. 衰老是多种因素引起功能减退的综合过程,因此产生多种衰老原因的学说。其实各种学说并不是孤立的,而有其内在联系

神经内分泌系统几乎控制体内每一种组织的代谢活动,衰老时神经内分泌功能下降,导致器官组织处于分解大于合成的代谢状态。Clark^[9]提出由 GH、PRL、IGFs 这 3 个主要的合成代谢激素扮演了整合人体的生长、保养、修复及免疫功能。本实验可见 EF 促使老年大鼠 GH、PRL、IGFs 显著上调,这意味着 EF 对老年大鼠可促进合成代谢,表现出可延缓代谢上的衰老。

老年大鼠还可见 GnRH、FSH、LH 及性激素显著下调,其中 GnRH^[6] 是 NEI 网络中一种强有力的信息传递因子,除了刺激 FSH、LH 的释放,刺激性腺分泌性激素,还以淋巴细胞为靶器官提高免疫机能,EF 使 GnRH、FSH、LH 及性激素显著上调。由于 GH、PRL 属于免疫增强类神经激素,亦都能促进淋巴系统功能,可见 EF 在 HPAT 轴上延缓多种衰老表现的交叉并综合的机制。

4. 衰老时控制机体的整合功能明显减退

随着增龄性变化,NEI 网络出现进行性损害,其中最早出现并明显受损当属下丘脑-垂体-生长激

素轴和下丘脑-垂体-性腺轴,还有就是淋巴系统中掌管细胞凋亡和细胞增殖的基因。

本实验不但证实了衰老时 HPAT 轴的这 3 个方面明显受损,EF 都能加以改善,而且从 EF 能广泛而有效调动的基因群中可以分辨除了作为启动的众多神经递质和神经肽,还有如 GH、IGFs、GnRH、TGF β 、NF κ B 等关键基因,为阐明 EF 延缓衰老的分子机理提供科学依据。

参考文献

- 1 沈自尹,张玲娟,蔡定芳等.中国中西医结合杂志(理论特辑),1998;18(6):238.
- 2 Jiangming D, Zongyu Z, Tanjun T. J Biol Chem, 2001, 276: 48325 ~ 48331.
- 3 Wei W, Junfeng W, Zongyu Z, et al. J Biol Chem, 2001, 276: 48655 ~ 48661.
- 4 沈自尹.中国中西医结合杂志,2003,23(4):302 ~ 303.
- 5 史轶繁.协和内分泌和代谢学[M].北京:科学出版社,1999:126 ~ 130, 634.
- 6 谢启文.现代神经内分泌学[M].上海:上海医科大学出版社,1999:50 ~ 53, 163 ~ 165, 397 ~ 398.
- 7 Bedoui, Kuhlmann S. J Neuroimmunol. 2001, Jul 2; 117(1-2): 125 ~ 32.
- 8 陈和华,宋建国.生命科学,2002;15(1):12 ~ 17.
- 9 Clark R G. Endocr Rev, 1997;18(2):157 ~ 179.

(责任编辑:刘维杰 许有玲 张志华)

日本将加强未知传染病预测研究

日本东京大学和国立传染病研究所等单位组成联合研究小组,研究禽流感等传染病的扩散方法以及如何加强危险管理体制等问题。据《日刊工业新闻》2004年6月23日报道,研究小组联合攻关的目的是从分子生物学、基因组科学、免疫学等多角度查明一些病原体跨物种传播的机理,找出各种传染病的共同之处,建立有关预防传染病系统知识和预测未知传染病扩散的模型,确立危机管理的方法并力争在5年后应用于实际。

研究小组以东京大学医学研究所为中心,除国立传染病研究所、国立国际医疗中心外,农业技术研究机构、北海道大学、东北大学、熊本大学和麒麟啤酒公司的研究人员也将参与研究。该小组还计划与中国科学院和中国医学科学院联合研究。5年研究经费计划为15亿日元,日本文部科学省已经决定用科学技术振兴调整费支付。

(文摘)

ENGLISH ABSTRACTS

Report on Implementation of Outline of Development in Modernization of Traditional Chinese Medicine (2002 – 2010)

Zou Jianqiang and Zhang Zhaofeng (Ministry of Science and Technology, Beijing 100962)

Cheng Feng (Institute of Medical Plants, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094)

On the basis of Summarizing the investigation reports on the implementation of the “Outline of Development in Modernization of Traditional Chinese Medicine”, which come from departments concerned under the State Council and 31 provinces and municipalities of China, this article introduces in a conclusive way the results in the implementation of the outline in the last two years. It may provide departments and regions concerned with some experience for reference in their guidance of promoting the modernization of traditional Chinese medicine and may have due practical significance.

Key Words: modernization of traditional Chinese medicine, investigation, summing – up, report

Systematic Thinking on Study of New Drugs of Traditional Chinese Medicine

Zhang Tiejun and Wang Wenyan (Tianjin Institute of Materia Medica, Tianjin 300193)

The selection of research subjects and the design of scientific research on the subjects are two of key links in the study of new drugs, and they are even more important in the study of new drugs in traditional Chinese medicine since such a study faces a complicated system of multi – division and multiplicity. This article systematically analyzes the marketing factors of Chinese medicine and its relevant products in health care; proposes principles and ideas for the selection of research subjects in TCM; and advances the systematic thinking concerning the design of scientific research and the implementation of experiments of new drugs in TCM in accordance with the diversity, complexity and variability of such links as the origin, collection, processing and preparation of medicinal materials; the formulation of prescriptions; and the assessment of the preparations, effectiveness and safety of drugs, which are referred to in the study of Chinese medicine, as well as the close relationship among them.

Key Words: new drugs of traditional Chinese medicine, selection of research subject, market, research, systematic thinking

Study on Mechanisms in Delay of Human Aging by Epimedium Flavonoids

Sen Ziyin (huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040)

Objective: To investigate the mechanisms of delaying the aging of diploid fibroblasts of human embryos and lungs

{ World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica } 133

and neuroendocrine and immunity by epimedium flavonoids (EF). Method: To handle the 2BS cells of diploid fibroblasts of humans by serum with EF and observe the life of 2BS; to detect the expression of mRNA of p16 gene by the method of fluorescent real-time quantitative PCR; to determine the content of the retinoblastoma protein and the phosphorylase Rb protein of cells by ELISA method; to test the activity of telomerase of cells by the method of single-tube and one-step TRAP-Hyb; to measure the change of the length of telomere of 2BS cells by the Southern blot method of telomere restriction fragment; and to detect the gene expression profile of hypothalamus, pituitary, adrenal, spleen lymphocytes of rats by the technology of gene chips. Result: EF can be able to increase the generation life of 2BS cells, decrease the expression of mRNA of gene p16 of 2BS cells, heighten the content of phosphorylase Rb protein, and delay the reduction of the length of aging telomere cells without activating the activity of the telomerase of cells and upgrade various neurotransmitters, hormones and cell factors as well as the expression of the receptors in HPAT axis of old rats. Conclusion: By the way of restricting the expression of p16 gene and urging the production of phosphorylase Rb protein to retard the reduction of telomere length of aged cells, EF is able to play the role of delaying the aging of cells. It can also be able to upgrade the expression of the receptors of neurotransmitters and activate neuro-endocrines and immune system by the down-pathway in NE1 network, and re-establish the balance of the gene expression of lymphocytes and delay the immune aging of cells by the expression of reducing the genes of pro-apoptosis but anti-proliferation and upgrading the genes of anti-apoptosis but pro-proliferation of cells.

Key Words: epimedium brevicornum, epimedium flavonoids, cell aging, telomere length, gene expression profile, immune aging, immunity of neuro-endocrine.

Study of Relevant Genes Inducing Blood-stasis Diseases of Coronary Heart Disease

Wang Jia and Yang Baolin (Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091)

Jiang Yan (Tianjin Tianshili Group, Tianjin 300402)

Objective: To search for relevant genes linking to the blood-stasis diseases of coronary heart disease one by one. Method To Choose 40 cases and divide them into groups of coronary heart disease, non-blood-stasis diseases of coronary heart disease, blood-stasis diseases of non-coronary heart disease and healthy people, according to diagnostic criteria, and obtain their differential strips by the display of the difference of peripheral blood mRNA, their positive proof by Reverse Northern Method and the sequence of their clones and analyze their bio-information. Result: 28 sequences of gene fragments with real difference are caught, of which 3 (b13, 49b and 23b) are 100% homologous with human genes; 2 (b12 and 36a), 99%; and 2 (25b and 36a), 98% through comparison and analysis in NCBI human genomic database, among which b13 is of the member No. 1 of the family of activated signals which assumes on the surface of T. B cells, takes effects in the inflammation of multiple systems, fosters the secretion of cell factors of Th2 type and are highly expressed in the group of blood-stasis diseases, and 23b is of relevant transcription factor No. 1, which participates in the transcription process of apoptosis regulation gene BC12 and is remarkably expressed in the group of blood-stasis