



本文经编委遴选,英文版将通过 ScienceDirect 全球发行。

艾灸对亚急性衰老大鼠肝组织羰基毒化及 p19ARF、p53 mRNA 表达的影响*

□马晓芃 莫文权 (上海市针灸经络研究所 上海 200030)

赵琛 (上海中医药大学 上海 201203)

吴焕淦** 周次利 张淑静 崔云华 谭琳莹 刘慧荣

(上海市针灸经络研究所 上海 200030)

摘要:目的:研究温和灸对亚急性衰老大鼠肝组织羰基毒化及 p19ARF、p53 mRNA 表达的影响。方法:SD 大鼠随机分为正常组、模型组、艾灸治疗组和维生素 E 治疗组。连续大剂量腹腔注射 D-半乳糖制备亚急性衰老大鼠模型,艾灸治疗组采用温和灸“肾俞”穴进行治疗。采用生物化学比色法检测各组大鼠肝组织蛋白质羰基含量,应用荧光定量 PCR 技术检测大鼠肝组织 p19ARF、p53 mRNA 的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠肝组织蛋白质羰基含量显著升高 ($P<0.01$),p19ARF、p53 mRNA 表达均显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,艾灸治疗组、维生素 E 治疗组肝组织蛋白质羰基含量显著下降 ($P<0.01$, $P<0.05$),p19ARF、p53 mRNA 表达均显著降低 ($P<0.01$, $P<0.05$)。结论:温和灸“肾俞”穴能降低亚急性衰老大鼠肝组织蛋白质羰基含量,下调肝组织 p19ARF、p53 mRNA 的表达。

关键词:艾灸 衰老 羰基毒化 p19ARF p53

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.06.009

衰老是生物体在其生命的后期阶段所进行的全身性、多方面、十分复杂、循序渐进的退化过程。通常所讲的衰老是指生物体在其生命过程中,生长发育到达成熟期以后,随着年龄的增长,生物体在形态结构和生理功能方面出现的一系列慢性、进行性、退化性的变化^[1]。艾灸具有疏通经络、温补肾阳、延年益寿的作用,在延缓衰老方面具有独特

的优势,历来被认为是养生保健、延缓衰老的重要方法。越来越多的研究表明羰基毒化反应造成的蛋白质等生物大分子物质的损伤在衰老的发生中具有重要的作用和意义^[2-4]。蛋白质羰基化已被广泛地用作衡量氧化损伤和导致相关的蛋白质功能异常的重要标准^[5]。另外,p19ARF/p53/p21Cip1 途径是公认的细胞衰老信号转导途径之一,这一途径中的关键调节因子发生突变,细胞将发生早老或绕过衰老程序继续增殖。本研究采用 D-半乳糖制

收稿日期: 2010-09-30

修回日期: 2010-12-07

* 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2009CB522900):灸法作用的基本原理与应用规律研究,负责人:吴焕淦;国家自然科学基金项目(30701124):艾灸延缓衰老大鼠组织羰基毒化反应的 P19ARF/P53/P21Cip1 信号调控机制,负责人:赵琛。

** 通讯作者:吴焕淦,本刊编委,教授,博士生导师,上海市针灸经络研究所常务副所长,国家中医药管理局针灸免疫三级实验室主任,主要研究方向:针灸作用原理与应用规律研究,E-mail: wuhuangan@126.com。

备亚急性衰老大鼠模型,观察温和灸“肾俞”穴对亚急性衰老大鼠肝组织羰基化含量及 p19ARF、p53 mRNA 表达的影响,探讨艾灸延缓衰老的可能机制。

一、材料与方法

1. 实验动物

由上海中医药大学实验动物中心提供的 2 月龄雄性(♂)清洁级 SD(Sprague-Dawley)大鼠共 48 只(动物合格证 SCXK(沪)20030-002),体重 160 ± 20 g。适应性饲养 1 周,按体重随机分为正常组、模型组、艾灸治疗组和维生素 E 治疗组,每组 12 只。

2. 主要试剂与仪器

D-半乳糖 (Amresco 公司);蛋白质羰基测试盒((南京建成生物工程研究所);紫外线核酸蛋白分析仪 (美国伯乐有限公司);低温高速离心机(Herus);ABI-7500 型 Real-time 检测仪(美国应用生物系统公司);生物安全柜 TYPE B2(美国 Sigma 公司);FQ-PCR 试剂盒(上海达为生物科技有限公司);焦碳酸二乙酯(上海生物工程技术公司);TRIZOLTM(联合生物集团公司);氯仿(HPLC 级,上海试剂一厂);异丙醇(HPLC 级,苏州振亚化工厂)。

3. 造模方法

SD 大鼠适应性饲养 1 周后,按 5% D-半乳糖 $500\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射,连续注射 8 周造成亚急性衰老大鼠模型^[6-9]。

4. 分组与处理

(1) 正常组。

正常情况下饲养 9 周。造模阶段给予等剂量的生理盐水腹腔注射。

(2) 模型组。

适应性饲养 1 周后,按 5% D-半乳糖 $500\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射,连续注射 8 周造成亚急性衰老大鼠模型。

(3) 艾灸治疗组。

大鼠造模的同时,温和灸单侧“肾俞”穴,每日 1 次,两侧穴位交替使用,每次 5 min,6d 为 1 疗程,每个疗程结束后,休息 1d,进行下 1 个疗程,共灸治 8 个疗程。

(4) 维生素 E 治疗组。

大鼠造模的同时,采用 0.4% 维生素 E 乳悬液 $25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,每日 1 次,疗程同艾灸治疗组^[10-11]。

5. 指标检测

(1) 大鼠肝组织蛋白质羰基含量检测。

制备肝组织匀浆,采用生物化学比色法测定肝组织蛋白质羰基含量。

(2) 大鼠肝组织 p19ARF、p53 mRNA 表达的检测。

采用荧光定量 PCR 法。P19ARF 上游引物序列为 5'-ACCCCAAGTGAGGGTTTTCT-3',下游引物序列为 5'-GATCCTCTCTGGCCTCAACA-3',探针序列为 5'-CCTGGGATCTCGCGACCCAGGT-3';P53 上游引物序列为 5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3',下游引物序列为 5'-CTTCGGGTAGCTGGAGTGAG-3',探针序列为 5'-cagcagggtcactccagcta-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3',下游引物序列为 5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3',探针序列为 5'-CATCTGGGCTACACTAGGACCA-3'。抽提肝组织总 RNA;逆转录 cDNA;将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,扩增体系为 5×PCR buffer 10μL,上游引物 F 0.5μL,下游引物 R 0.5μL, dNTPs 0.5μL, TaqMan 荧光探针 0.5μL, Taq 酶 1μL, ddH₂O 32μL, cDNA 模板 5μL。总体积 50μL;扩增条件为①50℃, 2min;②95℃, 5min;③95℃, 15s;60℃, 45s;40Cycle。;反应结束后直接读取数据,数据采用仪器自带软件分析(ABI Prism 7500 SDS Software)。目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$, ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参基因(GAPDH)Ct 值。

6. 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理。对数据作正态分布检验,当计量资料符合正态分布时采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;当计量资料为偏态分布时采用中位数和四分位数来表示。若资料服从正态分布,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时采用最小显著差法(Least significant difference, LSD)比较组间差异性,方差不齐时用 Games-Howell 比较组间差异性,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。若资料不服从正态分布,采用秩和检验。

二、结果

1. 艾灸对各组大鼠肝组织蛋白质羰基含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织蛋白质羰基含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,艾灸治疗组、维生素 E 治疗组大鼠肝组织蛋白质羰基含量均降低,其中尤以艾灸治疗组的效果显著,接近正常组

水平。见表 1。

2. 各组大鼠肝组织 p19ARFmRNA 的表达

经统计分析, 各组大鼠肝组织 p19ARFmRNA 数据总体呈非正态分布, 故用非参数检验, 经秩和检验各组差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组 p19ARFmRNA 表达量明显高于正常组 ($P<0.01$); 与模型组比较, 艾灸治疗组、维生素 E 治疗组的 p19ARFmRNA 表达量明显低于模型组 ($P<0.01$, $P<0.05$); 艾灸治疗组与维生素 E 治疗组比较差异无统计学意义。见表 2 和图 1。

3. 各组大鼠肝组织 p53 mRNA 表达的测定

经统计分析, 各组大鼠肝组织 p53mRNA 数据总体呈非正态分布, 故用非参数检验, 经秩和检验各组差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组的 p53mRNA 表达量显著高于正常组 ($P<0.01$), 艾灸治疗组的 p53mRNA 表达量高于正常组 ($P<0.05$); 与模型组比较, 艾灸治疗组、维生素 E 治疗组的 p53 mRNA 表达显著低于模型组 ($P<0.01$, $P<0.05$); 艾灸治疗组与维生素 E 治疗组比较差异无统计学意义。见表 3 和图 2。

三、讨 论

羰基毒化反应造成蛋白质等生物大分子物质的损伤在衰老的发生中具有重要作用^[12]。老龄动物体内羰基化蛋白含量显著增加, 最高可达蛋白含量的 40%~50%。由于蛋白水解酶的羰基化使机体清除氧化蛋白的能力下降, 导致氧化蛋白在机体的积聚, 加速了细胞与机体的衰老。对大鼠 D-半乳糖衰老模型的研究表明, 在 D-半乳糖造模过程中模型大鼠蛋白质羰基含量较正常大鼠显著增高, 说明 D-半乳糖致大鼠衰老可能通过羰基毒化机制致使大鼠体内蛋白质功能丧失, 进而引起一系列的衰老改变^[13]。虽然衰老的发生发展的机制尚不十分清楚, 但羰基毒化作用在衰老及延缓衰老中均具有重要的作用^[14], 是机体衰老发生发展的关键环节之一。本实验的研究结果发现, D-半乳糖衰老模型大鼠肝组织羰基化蛋白含量较正常大鼠显著增高, 与国内外学者的研究结果一致^[15-17], 表明温和灸和维生素 E 治疗可以不同程度地降低大鼠肝组织蛋白质羰基含量, 有助于减轻羰基毒化对机体的损伤, 延缓衰老。

迄今为止, p19ARF/ p53/ p21Cip1 途径是比较公认的细胞衰老信号转导途径之一。当这一途径中的关键调节因子发生突变, 细胞将发生早老或绕过衰老程序继续增殖, 而后者可进一步导致肿瘤的发生^[18-19]。处于此衰老诱导途径核心位置的是几个抑癌基因的产物, 包括 p19ARF、p53 抑癌蛋白。p19ARF 蛋白是一种核蛋白, 位于亚核区, 由 169 个氨基酸组成, 可表达于各种组织器官, 但表达量存在着组织特异性和细胞周期依赖性。p19ARF 表达水平很低, 正常组织几乎检测不到。在一些癌基因如 c-myc^[20]、E2F1^[21]、H-ras^[22]等作用下, p19ARF 与 MDM2 结合诱导 p53, 加速 MDM2 降解, 恢复和稳定细胞 p53 水平, 增强 p53 在 G1-S 和 G2-M 的限制点效应, 最终使细胞阻滞于 G1

表 1 各组大鼠肝组织蛋白质羰基含量($n=12$, $\bar{x}\pm s$, nmol/mgprot)

组别	肝组织羰基化蛋白含量
正常组	3.57±1.04
模型组	6.65±1.29**
艾灸治疗组	4.51±2.26##
维生素 E 治疗组	5.07±2.27**

注: 与正常组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠 p19ARFmRNA 表达结果[M(Q25, Q75), $n=12$]

组别	p19ARFmRNA(%)
正常组	0.701(0.425, 1.018)
模型组	2.703(1.191, 8.565)**
艾灸组	0.795(0.727, 1.105)▲▲
维生素 E 组	1.148(0.533, 1.977)▲

注: 与正常组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ 。

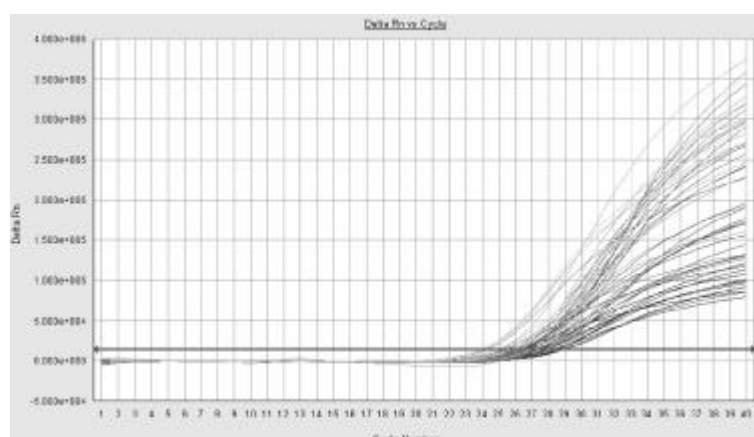


图 1 p19ARF(mRNA)基因 PCR 扩增动力学曲线

表3 各组大鼠 p53mRNA 表达结果[M(Q25,Q75),n=12]

组别	p53mRNA(%)
正常组	0.567(0.396,0.801)
模型组	3.694(3.271,4.809)**
艾灸组	1.698(1.123,2.121)*▲▲
维生素E组	1.705(0.655,3.172)▲

注:与正常组比较: ** $P<0.01$, * $P<0.05$;与模型组比较: ▲▲ $P<0.01$, ▲ $P<0.05$ 。

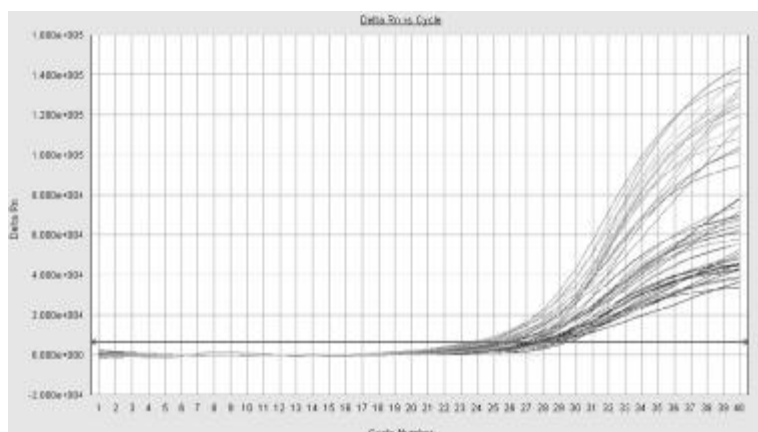


图2 p53(mRNA)基因 PCR 扩增动力学曲线

和 G2 期。p53 基因与人类和某些动物衰老的加速有关。有学者认为,抑制肿瘤可能会加速衰老是由于基因之间的相互影响,即在 p53 抑制肿瘤时,也会使组织和器官中的干细胞停止分裂或凋亡,这样在干细胞数量有限的条件下,干细胞很快被用完,导致的结果是易于衰老。p53 蛋白在 1/2 以上的人类肿瘤中失活,在衰老的细胞中其活性增高^[23-24]。当 p53 被激活后会结合到许多下游目标基因的特殊序列上并增强这些靶基因的表达,后者表达的许多产物与调控细胞生长有关,包括细胞周期停滞、细胞凋亡和血管形成的抑制等。本实验的研究结果发现,D-半乳糖衰老模型大鼠肝组织 p19ARF、p53 mRNA 表达显著升高,温和灸“肾俞”穴能够降低 D-半乳糖衰老模型大鼠肝组织的 p19ARF、p53 mRNA 的表达,该作用可能是温和灸“肾俞”穴延缓衰老的重要机制。衰老是一个极其复杂的多因素、多环节、多途径的生理病理过程,本研究仅在艾灸对大鼠肝组织羰基毒化及 P19ARF、P53 mRNA 表达的影响方面作了初步的探讨,还有待于进一步的深入研究。

参考文献

1 张洪泉,余文新. 中华抗衰老医药学. 北京:科学出版社,2000:88.

- Umstead TM, Freeman WM, Chinchilli VM, et al. Age-related changes in the expression and oxidation of bronchoalveolar lavage proteins in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(1):14-19.
- Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(4):443-452.
- Margetis PI, Antonelou MH, Petropoulos IK, et al. Increased protein carbonylation of red blood cell membrane in diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol*, 2009, 87(1):76-82.
- Le-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. Protein carbonyl groups as bio-markers of oxidative stress. *Chimica Acta*, 2003, 329:23-38.
- 朱亚珍, D-半乳糖致衰老动物模型的建立及其检测方法. *复旦学报(医学版)*, 2007, 34(4):617-619.
- 崔美芝,刘浩,李春艳. 衰老动物模型的建立及评价. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(2):118-120.
- Chen CF, Lang SY, Zuo PP, et al. Effects of D-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats. *PNEC*, 2006, 31(7):805.
- Kong WJ, Wang Y, Wang Q, et al. The relation between D-galactose injection and mitochondrial DNA 4834 bp deletion mutation. *Exp Gerontol*, 2006, 41(6):628.
- 曹湘博,西月,王艳春,等. 维生素 E 对 D-半乳糖亚急性中毒拟衰老模型鼠氧自由基及相关生化指标的影响. *中国老年学杂志*, 2007, 27(14):335-336.
- 李野,洪英杰,朱慧明,等. 电针对亚急性衰老大鼠肝与血清 SOD、MDA、T-AOC 的影响. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(7):132-134.
- Feng J, Navratil M, Thompson LV, et al. Principal component analysis reveals age-related and muscle-type-related differences in protein carbonyl profiles of muscle mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008, 63(12):1277-1288.
- Wang X, Liao Y, Li G, et al. A comparative study of artificial ceroid/lipofuscin from different tissue materials of rats. *Exp Aging Res*, 2008, 34(3):282-295.
- 李国林,印大中. 蛋白质羰基化与衰老. *中国老年学杂志*, 2008, 10(28):2070-2073.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulatin aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(9):790-796.
- Das N, Levine RL, Orr WC, et al. Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J*, 2001, 360:209-216.
- 刘晓波,李卫东,唐惠琼,等. D-半乳糖衰老模型大鼠的羰基化机理初步探讨. *中国实验动物学杂志*, 2002, 2(3):456-458.
- Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2):429-440.
- Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, et al. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(6):705-709.
- Sarkar D, Fisher PB. Regulation of Myc function by ARF: Check-point for Myc-Induced Oncogenesis. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(6):693-695.

- 21 Russell JL, Weakes RL, Berton TR, et al. E2F1 suppresses skin carcinogenesis via the ARF-p53 pathway. *Oncogene*, 2006, 25 (6):867~876.
- 22 Floyd HS, Jennings-Gee JE, Kock ND, et al. Genetic and epigeneticalterations in lung tumors from bitransgenic Ki-rasG12C expressing mice. *Mol Carcinog*, 2006, 45(7):506~517.
- 23 Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem*, 2001, 268(10):2784~2791.
- 24 Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*, 2004, 5(1):1~10.

Effect of Moxibustion on Carbonyl Stress and Expression of p19ARF and p53 mRNA in the Liver of Subacute Senile Rats

Ma Xiaopeng¹, Mo Wenquan¹, Zhao Chen², Wu Huang¹, Zhou Cili¹, Zhang Shujing¹, Cui Yunhua¹,
Tan Linying¹, Liu Huirong¹

(1. Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, Shanghai 200030, China;

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: This work aimed to study the effect of warming moxibustion on carbonyl stress and expression of p19ARF and p53 mRNA in the liver of subacute senile rats. SD rats were randomly divided into the normal group, model group, moxibustion treatment group and vitamin E treatment group. Subacute senile rats were prepared via continuous high-dose intraperitoneal injection of D-galactose. Moxibustion was performed at "Shenshu" points for the moxibustion treatment group. Protein carbonyl contents in livers were detected by biochemical chromatometry. p19ARF and p53 mRNA expressions in livers were detected by fluorescence quantitative PCR. Compared with normal rats, the model group showed significantly higher protein carbonyl contents, p19ARF and p53 mRNA expressions ($P < 0.01$). Compared with the model group, the moxibustion treatment group and vitamin E treatment group showed significantly decreased protein carbonyl contents, p19ARF and p53 mRNA expressions ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The results show that moxibustion at "Shenshu" points may reduce protein carbonyl contents, p19ARF and p53 mRNA expressions in the liver of subacute senile rats.

Keywords: Moxibustion, Aging, The carbonyl stress, p19ARF, p53

(责任编辑:张志华 李沙沙, 责任译审:张立巍)