

二仙汤及其拆方对老年大鼠部分抗氧化酶活性及其基因表达水平的影响

沈小珩¹ 方肇勤² 吴敦序² 顾文聪² 宋菊敏² 廖 茜² 张伯讷^{2*}

内容提要 采用分子生物学实验技术对二仙汤及其拆方影响老年大鼠肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性及其基因表达水平的作用进行了观察。结果显示:老龄大鼠过氧化脂质(LPO)含量明显增高; SOD、CAT 活性降低; 而且酶活性降低与这类酶蛋白的基因(mRNA)表达水平减弱密切相关。用二仙汤及其拆方治疗后, 能明显降低老龄大鼠肝组织 LPO 含量; 提高 SOD 和 CAT 活性; 并观察到这些酶活性的提高又与编码相应酶蛋白的 mRNA 表达水平增强有关。提示二仙汤可在基因水平上, 通过调控、增强编码酶蛋白的基因表达水平而增强抗氧化酶活性, 减少自由基产物的作用, 从而具有延缓衰老的疗效。

关键词 二仙汤 老龄大鼠 超氧化物歧化酶 过氧化氢酶 过氧化脂质 基因表达

Effect of Er-Xian Decoction and Its Disassembled Prescription on Enzyme Activities and their Gene Expression of Antioxidant Enzymes in Aging Rat Shen Xiao-heng, Fang Zhao-qin, Wu Dun-xu, et al *The Affiliated Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai (200025)*

In order to study the mechanism of aging, this experiment adopted molecular biological techniques to observe the effect of Er-Xian decoction (EXD) and its disassembled prescription on the enzyme activities and their gene expression of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The results showed that in old rat, the amount of lipid peroxide (LPO) increased significantly; the enzyme activities such as SOD, CAT decreased significantly; and the lowering of these activities had a direct bearing on the gene expression level of their enzyme protein. After treatment by EXD and its disassembled prescription in aging rat, the amounts of LPO reduced significantly, the activities of SOD, CAT enhanced significantly. Moreover, it was observed that the increasing of these enzyme activities was related to the enhancing of their gene expression. It was suggested that EXD had the effect of anti-aging in that it could raise the activities of antioxidant enzymes and reduce the product of free radicals by means of regulating and enhancing the gene expression levels of their enzyme protein.

Key words Er-Xian decoction, aging, superoxide dismutase, catalase, gene expression, aging rat, lipid peroxide

自由基学说是当今公认的衰老学说之一。已有大量实验表明: 衰老过程抗氧化酶活性降低, 并且这类酶活性随增龄降低并与编码有关酶蛋白基因表达水平降低呈平行关系。鉴于二仙汤具有提高老龄动物抗氧化酶活性的作用, 我们进行本次实验, 以期了解二仙汤是否对抗氧化酶蛋白的基因表达有影响作用。

1. 上海第二医科大学附属瑞金医院(上海 200025); 2. 上海中医药大学; *指导

实验材料

1 实验动物 实验选用 SD 大鼠, 由上海中医药大学实验动物中心提供。分二批购入, 一批作为 24 月龄老年大鼠模型, 雌雄各半, 随机分为 4 组: 老年对照组(20 只)、滋阴泻火组(20 只)、温肾益精组(20 只)、二仙汤全方组(18 只)。另一批作为 6 月龄大鼠对照模型, 雌雄各半, 共 22 只, 于老年大鼠

18月时购入新生鼠,置于同室内饲养。

2 方药组成 (1)二仙汤:仙茅、仙灵脾、巴戟肉、当归、黄柏、知母。(2)滋阴泻火方:知母、黄柏。(3)温肾益精方:仙茅、仙灵脾、巴戟肉、当归。

3 水煎剂的制备 实验所用中药均购自上海市徐汇区中药饮片厂。药物剂量根据成人每公斤体重剂量的10倍,按常规煎法,浓度为每100 ml中含单味生药8 g。

实验方法

老年大鼠用药组,从18月龄起采用药汁掺入饮水法,分别饲喂相应方药水煎剂,雄鼠每只喂12 ml/d,雌鼠每只喂8 ml/d。老年对照组和青年对照组大鼠饲喂自来水。用药6个月后5组实验鼠同时断头处死,取肝组织标本。

观察指标:鼠肝组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性;过氧化脂质(LPO)含量;SOD、CAT、C-myc(一种原癌基因)mRNA表达水平测定,参照文献方法^[1-4]。

结 果

1 大鼠肝组织匀浆SOD、CAT活性及LPO含量 经方差分析,5组鼠肝组织匀浆SOD、CAT活性和LPO含量均数都有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表1。

表1 各组不同性别大鼠肝组织匀浆SOD、CAT活性和LPO含量比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	n	LPO ($\mu\text{mol/g}$ 组织)	SOD (u/mg)	CAT (u/mg)
青年雄	11	1.05 $\pm$ 0.18**	626.66 $\pm$ 54.97**	73.66 $\pm$ 8.40**
雌	11	1.09 $\pm$ 0.16**	612.09 $\pm$ 54.13**	71.72 $\pm$ 7.67**
老年雄	10	1.41 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$	487.31 $\pm$ 57.97 $\Delta\Delta$	50.09 $\pm$ 10.14 $\Delta\Delta$
雌	10	1.42 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	496.20 $\pm$ 43.19 $\Delta\Delta$	48.20 $\pm$ 10.81 $\Delta\Delta$
滋阴雄	10	1.19 $\pm$ 0.17*	551.10 $\pm$ 47.96** $\Delta\Delta$	63.06 $\pm$ 7.37** Δ
雌	10	1.21 $\pm$ 0.16*	566.53 $\pm$ 42.14**	61.95 $\pm$ 6.77** Δ
温肾雄	10	1.24 $\pm$ 0.17*	535.83 $\pm$ 52.36 $\Delta\Delta$	60.31 $\pm$ 6.71** Δ
雌	10	1.22 $\pm$ 0.18**	544.70 $\pm$ 43.92* Δ	58.27 $\pm$ 7.31** $\Delta\Delta$
全方雄	9	1.12 $\pm$ 0.17**	570.00 $\pm$ 56.39** Δ	67.48 $\pm$ 6.03**
雌	9	1.14 $\pm$ 0.15**	585.40 $\pm$ 63.16**	66.31 $\pm$ 5.33**

注:与老年组同性别比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与青年组同性别比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 大鼠肝组织匀浆mRNA表达水平 5组大鼠肝组织匀浆mRNA杂交后,激光扫描相关区域密度均数比较,SOD、CAT均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。C-myc因扫描膜片数仅为4张,统计学分析无显著差异($P > 0.05$)。各组密度均数经方差分析,结果见表2。

表2 5组大鼠肝组织匀浆mRNA杂交后激光扫描相关区域密度均数比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	激光扫描相关区域密度		
	SOD(7)	CAT(8)	C-myc(4)
青年	2.51 $\pm$ 0.33**	2.14 $\pm$ 0.37**	1.31 $\pm$ 0.55
老年	1.29 $\pm$ 0.51 $\Delta\Delta$	0.84 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	0.64 $\pm$ 0.16
滋阴	1.86 $\pm$ 0.40* Δ	1.62 $\pm$ 0.47* Δ	1.11 $\pm$ 0.13
温肾	1.83 $\pm$ 0.47* Δ	1.43 $\pm$ 0.47** $\Delta\Delta$	0.98 $\pm$ 0.20
全方	2.12 $\pm$ 0.17**	1.77 $\pm$ 0.44**	1.22 $\pm$ 0.22

注:与老年组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与青年组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;()内为激光扫描的X光膜片数

3 酶活性与其相对应的mRNA表达水平相关分析 两种酶活性与酶蛋白mRNA分子杂交相关区域激光扫描密度均数相关系数显著性检验示:SOD相关系数 $r=0.83$, $P < 0.01$,CAT相关系数 $r=0.79$, $P < 0.01$ 。表明两种酶的两个数据存在显著的相关性。根据直线方程(SOD: $y=401.05 \pm 78.21x$;CAT: $y=35.26 \pm 16.27x$)列出散点图示:所有数据均靠近直线,呈正相关趋势,即酶活性升高与其mRNA表达水平升高呈平行关系。

讨 论

自由基学说在衰老的分子水平的研究中,是极为活跃的领域,自由基反应是引起一些疾病和衰老的内在重要根源之一,国内外已做大量的实验。实验证明:数种抗氧化酶,包括SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性随年龄增高而降低,并一致认为这类酶活性随增龄性降低,导致降低超氧化的损伤反应能力并促进衰老的过程。近年来,重组DNA技术延伸了抗氧化酶系的研究。已有实验表明:抗氧化酶活性随增龄过程降低,与编码这类酶的酶蛋白mRNA表达水平降低呈平行关系^[5-7]。

目前我国中医界对中医药与自由基的研究在老年病上较为重视,并在实验研究及临床上取得一些可喜的进展。这些科研进展给我们展示了天然抗衰老药物在提高抗氧化酶活性方面有极大的优势。

二仙汤是张伯讷教授50年代创制的方剂。近年来,已对二仙汤作用机理进行了一系列的实验研究,证明二仙汤及其拆方对老年大鼠性腺轴功能有调节作用;并能提高老年鼠肝、脑、心组织SOD酶活性,降低肝、脑、心组织LPO含量^[8];且能延长果蝇寿