

抗衰老药物对大鼠脑 DNA 甲基化酶的影响*

白坚石¹ 何忠效¹ 吴志奎² 崔京华²

内容提要 以³H-甲基掺入法测定大鼠脑中 DNA 甲基化酶活性, 发现在长期服用神方补肾生血药后, 大鼠脑 DNA 甲基化酶比活力增高, 酶的热稳定性和对 NaCl 的耐受力略有增强, 最适 pH 改变。用 SDS-PAGE 检测酶粗提物的蛋白成分, 发现给药组电泳行为有所改变。说明神方补肾生血药改变大鼠脑 DNA 甲基化酶活性和酶学性质, 从而影响其 DNA 甲基化水平, 可能是该药物抗衰老作用的途径之一。

关键词 神方补肾生血药 抗衰老 DNA 甲基化酶

Effect of Anti-Aging Drug on DNA Methylase of Brain in Rats BAI Jian-shi, HE Zhong-xiao, WU Zhi-kui, et al *Faculty of Biology, Beijing Normal University, Beijing (100875)*

DNA methylase activity of brain in Wistar rats treated with Shenfang Bushen Shengxue Drug (SBSD) was observed using ³H-labelled methyl group of S-adenosyl-methionine incorporated into DNA. It was found that the SBSD has a marked effect on anti-aging. After SBSD treatment the specific activity of DNA methylase increased, the thermostability and salt-tolerance of it improved slightly, its optional pH changed from 7.5 to 8.0. A difference was found between the electrophoresgram of partially purified product of DNA methylase in SBSD treated rats and that in normal rats, suggesting SBSD could change the activity and characteristics of DNA methylase so as to affect the level of DNA methylation, which might be one pathway of SBSD effects on anti-aging.

Key words Shenfang Bushen Shengxue Drug, anti-aging, DNA methylase

神方补肾生血药是在中医理论指导下, 经多年临床实践总结出来的有效方剂。动物实验证明该药具有明显的提高机体生命活力, 延缓衰老的作用。经 7 家医疗单位, 百余例不同病例患者的临床应用, 证明该药对多种贫血症, 尤其是 β -地中海贫血症及早期造血障碍有很好效果。本实验室已经发现, 该药能够明显增强大鼠脑 DNA 甲基化酶活性, 影响大鼠肝脏 DNA 甲基化水平⁽¹⁾。为了深入探讨该药的作用机制, 我们选用大鼠脑组织为材料, 观察了该药对大鼠脑组织 DNA 甲基化酶的影响。

材料与方法

动物 健康 Wistar 雄性大鼠, 鼠龄为 18 个月, 体重 300~400 g, 由中国中医研究院广安门医院基础医学研究室提供。

药物 神方补肾生血药(由生地、山萸肉、龟版胶、阿胶、枸杞等中药组成), 由广安门医院制剂室提供, 每毫升浸膏含 2.88 g 生药。

主要试剂 (1)³H-S-腺苷酰-L-甲硫氨酸(³H-SAM); 美国 Amersham 公司产品。(2)NP-40、对甲基苯磺酰氟(PMSF)、刘氏小球菌 DNA (M. L. DNA)、鲑鱼鱼精 DNA (S. P. DNA)、蛋白酶 K、电泳标准蛋白, 美国 Sigma 公司产品。(3)2, 5-二苯基恶唑(PPO)、1, 4-双-(5-苯基恶唑基-2)苯(POPOP), Merk 公司产品。(4)Whatman GF/c 滤纸, 美国 Whatman 公司产品。

仪器 (1)高速冷冻离心机: SCR-20 BC 型, 日本日立公司产品。(2)超声破碎仪: B-30 型, Branson Sonic Power 公司产品。(3)液闪计数器: LS 9000 型, 美国 Beckman 公司产品。(4)电泳仪: ECPS 3000/150 型, Pharmacia 公司产品。

实验动物的处理 动物随机分成给药组及对照组, 每组 5 只。给药组灌胃给神方补肾生血药(3.927 g/kg), 每天 1 次。对照组给予等体积水灌胃。连续给药 6 个月, 断头处死, 立即取出脑组织, 用生理盐水洗除残血后, 移入 -20℃ 冰箱保存。

DNA 甲基化酶活性的测定 按文献⁽²⁾方法进行。

大鼠脑 DNA 甲基化酶的部分纯化 (1)细胞破碎; (2)去内源核酸; (3)硫酸铵沉淀, 按文献⁽¹⁾方法

*国家自然科学基金资助课题

1. 北京师范大学生物系生化教研室(北京 100875); 2. 中国中医研究院广安门医院基础医学研究室

进行。

蛋白质浓度的测定 按 Lowry 法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白绘制标准曲线。

大鼠脑 DNA 甲基化酶部分纯化产物蛋白组分的鉴定 采用 SDS-PAGE 完成, 浓缩胶为 4%, 分离胶为 10%。

结 果

1 神方补肾生血药对大鼠脑 DNA 甲基化酶活性的影响 对照组和给药组 DNA 甲基化酶的比活力分别为 $7.96 \times 10^3 \text{cpm/mg}$ 及 $2.79 \times 10^4 \text{cpm/mg}$ (3 次测定的平均值), 说明本品可提高大鼠脑 DNA 甲基化酶的活性。

2 神方补肾生血药对大鼠脑 DNA 甲基化酶酶学性质的影响

2.1 对酶热稳定性的影响 将酶样品分别在 4°C 、 16°C 、 30°C 、 37°C 和 60°C 保温 1 h 后, 测定酶活性。结果表明, 随温度升高, 对照组和给药组的酶活性都明显降低, 但给药组降低程度要明显小于对照组, 即给药组酶活性要高于对照组, 说明药物处理导致酶的热稳定性增强。

2.2 对最适 pH 的影响 在 20mmol/L Tris-HCl 缓冲体系中测定酶反应的最适 pH, 反应时间为 30 min, pH 范围为 6.5~8.5。结果表明, 大鼠脑 DNA 甲基化酶活性与反应体系 pH 呈典型的“钟罩型曲线”, 但对照组酶反应的最适 pH 为 7.5, 而给药组 pH 为 8.0, 可见药物处理改变了酶反应的最适 pH。

2.3 对表观最适反应温度的影响 在 $4 \sim 50^\circ\text{C}$ 范围内, 分别于不同温度测定酶活性, 反应时间定为 15 min。结果表明, 对照组和给药组大鼠脑 DNA 甲基化酶的表观最适反应温度均为 $37 \sim 40^\circ\text{C}$, 但在温度超过 40°C 后, 对照组酶活性降低程度明显大于给药组, 这与药物对酶热稳定性影响的趋势相近。

2.4 对 NaCl 敏感性的影响 NaCl 浓度范围为 $20 \sim 300 \text{mmol/L}$, 其他反应条件均同于标准反应条件。结果表明, NaCl 浓度增加, DNA 甲基化酶活力随之降低, 但对照组和给药组酶活力的降低程度略有差别, 即给药组酶活性降低程度稍小于对照组, 说明药物处理提高了大鼠脑 DNA 甲基化酶对 NaCl 的耐受力。

3 神方补肾生血药对大鼠脑 DNA 甲基化酶部分纯化产物亚基成分的影响 采用 SDS-PAGE (10%) 鉴定了对照组和给药组 DNA 甲基化酶部分纯化产物的蛋白成分。从电泳图谱可以看出, 对照组和给药组的亚基成分基本相同, 即谱带数目基本一致, 但有

些区带的迁移率有明显差别, 表现在给药组的两条位于 100 KD 的谱带和两条位于 66 KD 的谱带之间距离明显增大。另外, 给药组大于 100 KD 的谱带的染色程度强于对照组, 也可以说, 蛋白含量要略多于对照组。

讨 论

从实验结果可以看出, 在长期服用神方补肾生血药后大鼠脑 DNA 甲基化酶活性增高, 符合本实验室关于神方补肾生血药对大鼠肝 DNA 甲基化酶影响的结果⁽¹⁾。已有大量实验表明, DNA 甲基化酶活性随衰老而下降⁽³⁾。有文献报道⁽⁴⁾, 细胞不死性的获得与 DNA 从头甲基化酶活性及细胞中 DNA 甲基化酶高活性密切相关。因此, 神方补肾生血药使 DNA 甲基化酶活性升高, 可能是使动物延缓衰老的原因之一。本研究发现, 药物处理后大鼠脑 DNA 甲基化酶的最适 pH 较对照组要偏碱性, 而大鼠肝脏 DNA 甲基化酶却没有这种变化。考虑到脑细胞与肝细胞在增殖和分化能力上的差异, 这种组织差异性是可以理解的。另外, 这个结果反映出大鼠脑 DNA 甲基化酶的理化性质可能发生一些变化, 至少酶所带的净电荷量有所改变。由此推测, 酶的空间构象可能也发生变化, 从而使得酶分子转移甲基的能力提高, 表现出更高的活性。至于药物处理后, 大鼠脑 DNA 甲基化酶粗提物的一些亚基的电泳行为有所改变, 其原因正在进一步探讨中。

中医认为肾是五脏六腑之根。神方补肾生血药就是根据中医肾生髓的理论在多年临床实践基础上研制的。本研究发现, 生理性肾虚的老龄大鼠, 经神方补肾生血药喂养 6 个月后, 大鼠脑 DNA 甲基化酶活性明显增高, 一些酶学性质也明显变化。这就为从基因表达与调控的角度深入阐述中医肾生髓的分子基础提供了进一步的客观依据。

参 考 文 献

- 何忠效, 危 巍, 白坚石, 等. 抗衰老药物对大鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响. 中国中西医结合杂志 1994; 14(6): 354—356.
- 何忠效, Hoover K, Poirier LA. 3-脱氧腺苷(3DAA)在体内对鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响. 科学通报 1985; 21: 1660—1663.
- 何忠效, 王治平, 王秀奇, 等. DNA 甲基化作用与鼠肝细胞的老化. 生物化学杂志 1994; 10(1): 16—20.
- Amtmann E. Reversion of bovine papillomavirus-induced transformation and immortalization by a xanthate compound. Exp. Cell. Res. 1985; 161: 541—546.

(收稿: 1995—06—23 修回: 1996—01—25)