

不同补肾方剂对老年前期小鼠不同脏器 细胞核体外 RNA 转录和无细胞 提取液蛋白质合成活性的影响^{*}

张 杰 崔成德 徐 琦

内容提要 目的:探讨补肾阴方左归饮和补肾阳方益肾宝对老年前期小鼠抗衰老的机制。方法:用 14 月龄雄性小白鼠为肾虚模型,观察左归饮及益肾宝对其肝、脑、肾、睾丸的细胞核体外 RNA 转录活性及无细胞提取液蛋白质合成活性的影响。结果:老年前期对照组小鼠 4 种脏器的细胞核体外 RNA 转录活性及无细胞提取液蛋白质合成活性明显低于青年组(3 月龄)小鼠。经灌服左归饮和益肾宝 2 个月后,两给药组小鼠 4 种脏器的细胞核体外 RNA 转录活性及无细胞提取液蛋白质合成活性均明显高于老年前期对照组小鼠,而两给药组间无明显差异。结论:补肾阴与补肾阳方剂均可提高老年前期肾虚小鼠的 RNA 转录活性及蛋白质合成活性。

关键词 左归饮 益肾宝 老年前期 RNA 转录 蛋白质合成

Effect of Different Prescriptions for Tonifying Kidney on RNA Transcription Activity in Isolated Nuclei and Protein Synthesis Activity in Free-Cell Extracts of the Different Organs of Presenile Mice Zhang Jie, Cui Chengde, Xu Qi Institute of Basic Theory of TCM, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100700)

Objective: To study the anti-aging mechanism of Zuoguiyin (a prescription for tonifying Kidney Yin) and Yishenbao (a prescription for tonifying Kidney Yang) in presenile mice. **Methods:** Using male, 14 months old presenile mice as a model of Kidney-Asthenea, the effects of Zuoguiyin and Yishenbao on RNA transcription activity in isolated nuclei and protein synthesis activity in free-cell extracts of the liver, brain, kidney and testes of the presenile mice were observed. **Results:** RNA transcription activity in isolated nuclei and protein synthesis activity in free-cell extracts of the four organs of the presenile mice group were distinctly lower than those of young mice group (3 months old). After above-mentioned two prescriptions were given to the presenile mice for two months, RNA transcription activity in isolated nuclei and protein synthesis activity in free-cell extracts of the four organs of the two treated groups were obviously higher than those of control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but there was no difference between two treated groups. **Conclusions:** Both Zuoguiyin and Yishenbao could promote RNA transcription activity in isolated nuclei and protein synthesis activity in free-cell extracts of Kidney-Asthenea and presenile mice.

Key words Zuoguiyin, Yishenbao, presenile mice, RNA transcription, protein synthesis

中医学认为肾为先天之本,因此,国内外学者对肾本质的研究甚多。近年来,我国学者利用现代科学技术对中医肾本质的研究已从整体、器官、组织细胞水平发展到了分子生物学水平,如何忠效等观察了补肾药物对大鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响⁽¹⁾,吴志奎等观察了补肾生血方对 β -地中海贫血基因水平的影

响⁽²⁾。为进一步探讨肾本质,应用分子生物学技术,特别是从 DNA 复制, RNA 转录及蛋白质翻译合成等分子水平对肾本质进行研究,在生命科学及中医现代化研究中是个新课题。本实验用 14 月龄小鼠作为老年前期肾虚动物模型,用补肾阴和补肾阳两个方剂对老年前期小鼠的肝、脑、肾、睾丸的细胞核体外 RNA 转录及无细胞提取液蛋白质合成活性的影响作了研究,试图从 RNA 转录和蛋白质合成两方面,探讨补肾方剂的作用和机理。

^{*} 国家中医药管理局科研基金资助课题(No. 922203)

中国中医研究院基础理论研究所(北京 100700)

材料与方法

1 药物与试剂 左归饮:由熟地 12g 山药 6g 枸杞子 6g 炙甘草 3g 茯苓 6g 山茱萸 5g 组成。益肾宝:由淫羊藿 15g 五味子 6g 枸杞子 6g 山楂 6g 生晒参 6g 当归 6g 组成。以上方药各煎煮两遍,合并煎液,浓缩为 100ml,左归饮含生药 380g/L,益肾宝为 450g/L。 ^3H -尿嘧啶核苷三磷酸(^3H -UTP)为中国科学院上海核技术开发公司产品,放射比活为 $15\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$; ^3H -亮氨酸(^3H -Leu)为中国原子能科学研究所产品,比活为 $15\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$; 尿苷三磷酸(UTP)、胞苷三磷酸(CTP)、鸟苷三磷酸(GTP)、腺苷三磷酸(ATP)为 Sigma 产品; 肌酸激酶、苯甲基磺酰氟(PMSF)为 Verva 产品。

2 动物及分组 取 14 月龄昆明种雄性小白鼠,体重 54~65g,购自北京生物制品研究所。实验动物分为 3 组,对照组、左归饮组、益肾宝组,每组 14 只(由于灌胃中间有小鼠死亡及实验中样品操作失误,以结果报道只数为准),从 14 月龄起开始灌胃给药,每天每只 0.5ml,连灌药 5 天,停药 2 天,共灌服 2 个月。对照组以水代之。16 月龄时处死(同时另处死一组 3 月龄昆明种雄性小鼠,为青年组),取肝、脑、睾丸、肾组织。

3 实验方法

3.1 细胞核制备及细胞核 RNA 转录活性的测定 参照 Marzluff 的方法^[3]并加以改进。小鼠断头处死,立即取出肝、脑、睾丸、肾,放入冰冷的 0.14mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl pH8.0 的溶液中,洗两次。各取肝及肾约 200mg,置表面皿上剪碎,加入 4ml 缓冲液 I (0.88mol/L 蔗糖, 3.0mmol/L CaCl_2 , 2.0mmol/L MgAc_2 , 0.1mmol/L EDTA, 1.0mmol/L DTT, 0.1mmol/L PMSF, 10mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 制备匀浆。睾丸及脑组织可直接加入缓冲液 I,用玻璃匀浆器手动匀浆 8~10 次。用 120 目尼龙筛过滤匀浆液。滤液 800r/min ,离心 10min。沉淀用缓冲液 I 洗两次。核沉淀加入适量贮存缓冲液 (25% 甘油, 5.0mmol/L MgAc_2 , 0.1mmol/L EDTA, 5.0mmol/L DTT, 50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 制成核悬液,用二苯胺法测定核悬液 DNA 浓度^[4],将核悬液 DNA 控制在 1g/L 左右,显微镜检查,此时核应完整,纯度较高,以上操作需在低温或冰浴中进行。细胞核体外 RNA 转录活性测定用 eppendorf 管,加 $25\mu\text{l}$ 溶液 A (2mmol/L ATP、CTP、GTP, 0.4mmol/L UTP, 12.5mCi/L ^3H -UTP), $20\mu\text{l}$ 溶液 B (0.6mmol/L KCl,

12.5mmol/L MgAc_2), 蒸馏水 $5\mu\text{l}$, 最后加 $50\mu\text{l}$ 核悬液,混匀, 35°C 水浴保温振荡 30min,加预冷的 5% TCA - 10mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 终止反应。冰浴中静置 10min,用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜抽滤, 5% TCA - 10mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 洗 3 次,每次 3ml,然后用 95% 乙醇 2ml 洗 1 次,室温干燥,浸入 5ml 0.5% PPO- 0.03% POPOP 甲苯闪烁液中,用液闪计数器测 cpm。细胞核体外转录活性以 ^3H -UMP 掺入 RNA cpm/mg DNA 表示。

3.2 无细胞提取液蛋白质合成活性测定 参照 McDowell 方法加以改进^[5]。按照 RNA 转录法取出小鼠 4 种脏器,每种组织称取 100mg,剪碎,加入匀浆缓冲液 (30mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 80mmol/L KCl, 3mmol/L MgAc_2 , 10mmol/L DTT) 1ml,用玻璃匀浆器手动匀浆 8~10 次。匀浆液用冷冻台式离心机 8000r/min ,离心 4min,取上清液用于测定蛋白质合成。用紫外线吸收法测上清液蛋白质浓度^[4]。无细胞提取液蛋白质合成活性测定用 eppendorf 管,加入 $50\mu\text{l}$ 蛋白质合成反应液 (2mmol/L 磷酸肌酸, 0.2g/L 肌酸激酶, 2mmol/L ATP, 0.4mmol/L GTP, 1.0mmol/L 亚精胺, 0.4mmol/L 除亮氨酸以外的其余 19 种氨基酸, ^3H -Leu 10mCi/L), 然后加入细胞质上清液 $50\mu\text{l}$,混匀, 35°C 水浴保温 50min,加预冷的 5% TCA- 10mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 终止反应。冰浴中静置 10min。用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜抽滤, 5% TCA- 10mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 洗 3 次,每次 3ml,然后用 95% 乙醇 2ml 洗 1 次,室温干燥,浸入 5ml 0.5% PPO- 0.03% POPOP 甲苯闪烁液中,用液闪计数器测 cpm。蛋白质合成活性以 ^3H -Leu 掺入蛋白质 cpm/mg 蛋白质表示。

结 果

1 4 组小鼠不同脏器细胞核体外 RNA 转录活性的测定结果 见表 1。青年组、益肾宝组、左归饮组小鼠 4 种脏器细胞核体外 RNA 转录活性明显高于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且益肾宝组、左归饮组接近青年组小鼠,说明补肾药物益肾宝与左归饮均具有增强老年前期小鼠细胞核体外 RNA 转录活性的作用。

2 4 组小鼠不同脏器无细胞提取液蛋白质合成活性测定结果 见表 2。青年组、益肾宝组、左归饮组小鼠 4 种脏器无细胞提取液蛋白质合成活性明显高于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且益肾宝组、左归饮组接近青年组小鼠,说明补肾药物益肾宝与左归饮均具有增强老年前期小鼠蛋白质合成的作用。

表 1 各组小鼠不同脏器细胞核体外 RNA 转录活性测定值比较 (10^3 cpm/mg DNA, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	肝	脑	睾丸	肾
对 照	12	25.9 ± 4.9	39.5 ± 6.1	24.1 ± 7.3	29.7 ± 8.9
青 年	11	43.6 ± 8.6**	53.5 ± 11.3**	35.6 ± 9.3**	42.8 ± 7.2**
益肾宝	12	39.6 ± 8.2**	50.2 ± 8.8**	33.7 ± 7.7**	39.4 ± 8.2*
左归饮	10	37.4 ± 6.2**	49.2 ± 6.2**	30.2 ± 5.9*	37.2 ± 5.1*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 各组小鼠不同脏器无细胞提取液蛋白质合成活性测定值比较 (10^4 cpm/mg pro, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	肝	脑	睾丸	肾
对 照	12	2.77 ± 0.74	8.53 ± 1.75	6.62 ± 1.70	5.69 ± 1.67
青 年	11	3.77 ± 0.80**	10.97 ± 1.91**	8.87 ± 1.68**	7.82 ± 1.90**
益肾宝	11	3.60 ± 0.73*	10.63 ± 1.66**	8.47 ± 2.18*	7.41 ± 1.42*
左归饮	11	3.68 ± 0.81*	10.29 ± 2.17*	8.78 ± 2.03*	7.43 ± 1.47*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

《素问·上古天真论》中阐述了女子以七,男子以八为基数递增的生长壮老过程,而其中的关键因素即肾中精气的盛衰。一般来说,衰老的表现多与肾精亏损的表现相一致,所以历代医家多用补肾为主的方药来延年益寿。本实验采用 14 月龄小鼠(老年前期)给药,16 月龄时宰杀,是考虑到 14 月龄小鼠(老年前期)刚开始肾衰症状时给药,补肾药物才能较好发挥其在机体内环境中纠偏的作用,而如果用更老的小鼠,其机体因完全衰老而不可逆转,则任何药物也不可能起作用了。

中医学认为,肾为先天之本,肾藏精,其精气是构成人体和促进人体生长发育的基本物质,肾所藏之先天之精是受之于父母的生殖之精,它是与生俱来的,是构成胚胎发育的原始物质。从现代分子生物学角度来看,胚胎的发育成长过程就是遗传物质 DNA 不断地自我复制,并以 DNA 为指导的 RNA 转录及蛋白质翻译合成。已有大量文献报道,大鼠肝细胞蛋白质和 RNA 合成降低是老年动物的主要变化之一,大鼠肝细胞核 RNA 合成从 4~6 月龄是增加的,然后从 6~13 月龄呈下降趋势^[6]。青年小鼠处于生长发育阶段,其肾气旺盛,而其代谢也处于旺盛阶段,因此 DNA 复制、RNA 转录与蛋白质合成活性水平都较高,而衰老及肾虚动物则相反。本实验证明,老年肾虚小鼠的细胞核体外 RNA 转录及无细胞提取液蛋白质合成活性均低于青年小鼠,两组之间有显著性差异,经灌服两种补肾药物后,老年肾虚动物的 RNA 转录活性及蛋白质合成活性均有很大幅度提高,与对照组比较有显著性差

异,而两给药组间无显著性差异。左归饮与益肾宝同为补肾药物,只是左归饮偏补肾阴,而益肾宝偏补肾阳,但实验结果表明,它们在促进 RNA 转录及蛋白质合成的功能上是相同的,是否所有补肾方剂中药都有促进老年肾虚动物的 RNA 转录及蛋白质合成活性的作用,还有待于进一步研究。另外,这两种方剂在 RNA 转录及蛋白质合成中的哪些调控机制方面起了作用,它更多的转录和翻译了何种基因和蛋白质,也有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. 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.
2. 吴志奎,蔡辉国,陈佩贞,等. 补肾生血方对 β -地中海贫血基因水平的影响. 中医杂志 1997;38(2):91—93.
3. Marzluff WF, Huang RC. Transcription of RAN in isolated nuclei in: Hames BD, Higgins SJ, eds. Transcription and Translation, a practical approach, Oxford, Washington DC: IRL press, 1984:89—93.
4. 李建武,肖能愿,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法. 北京:北京大学出版社,1994:260—263,171—173.
5. McDowell MJ, Joklik WK, Komaroff LV. Translation of reovirus messenger RNAs synthesized in vitro into reovirus polypeptides by several mammalian cell-free extracts. Proc Nat Acad Sci USA 1972;69(9):2649—2653.
6. Bolla R, Denckla WD. Effect of hypophysectomy on liver nuclear ribonucleic acid synthesis in aging rats. Biochem J 1979;16:669—674.

(收稿:1998-02-04 修回:1998-05-13)