

补肾与活血复方调节老年鼠 T 细胞凋亡的对比研究*

郑 振¹ 沈自尹^{1△} 黄 辉²

内容提要 目的:研究老年肾虚 T 细胞功能减退的机理以及补肾延缓衰老的免疫学基础。方法:采用电泳、DNA 凝胶电泳及 TUNEL 标记的流式细胞检测技术,对各组大鼠抗 CD₃ 单抗激活诱导的 T 细胞凋亡进行定性、定量分析。结果:老年组激活诱导的 T 细胞凋亡百分率为 47.0%,年轻组为 22.2% ($P < 0.01$);补肾组为 31.2%,明显低于老年组 ($P < 0.05$);活血组 T 细胞凋亡百分率为 43.3%,与老年组比较无显著性差异。结论:激活诱导的 T 细胞过多凋亡是老年肾虚 T 细胞功能减退的重要机理,下调激活诱导的 T 细胞凋亡可能是补肾延缓免疫衰老的主要途径。

关键词 衰老 T 细胞凋亡 补肾复方 活血复方

Comparative Study of the Regulation of Kidney Tonic and Promoting Blood Circulation Recipe on Apoptosis in T Cells of Old Rats Zheng Zhen, Shen Ziyin, Huang Hui Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)

Objective: To investigate the mechanism responsible for the observed reduction in T cell function of the Kidney Deficiency Syndrome. **Methods:** After 18th activation with anti-CD₃ mAb, the qualitative and quantitative analysis of apoptoses in T cells were performed by using DNA gel electrophoresis, TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) and flow cytometry. **Results:** The percentage of apoptotic cells was 47.0% in the old and 22.2% in the young group ($P < 0.01$). In the Kidney tonic group, the mean percentage of apoptotic cells was 31.2%, significantly lower than that in the aged group ($P < 0.05$). The mean percentage of apoptotic cells in the promoting blood circulation group was 43.3% and no significant difference was seen in the percentages of apoptotic T cells from the promoting blood circulation group compared with the old group. **Conclusion:** Activation-induced excessive apoptosis of T cells is one of the mechanisms elucidating decreased T cell function of the Kidney Deficiency Syndrome and aging, the retardation of immune senescence by Kidney tonic recipe could be accounted for by down-regulation of activation-induced apoptosis in T cells.

Key words aging, apoptosis of T cells, Kidney tonic recipe, promoting blood circulation recipe

在肾本质研究中,我们证实了 T 细胞功能减退是老年肾虚的重要特征⁽¹⁾,但是其机理尚不清楚。最近的研究证明,T 细胞凋亡在调节细胞免疫应答、维持免疫稳态中具有重要意义,T 细胞凋亡异常将直接影响 T 细胞功能⁽²⁾。老年肾虚时 T 细胞功能减退是否与 T 细胞凋亡异常有关尚有待证明。本研究采用激活诱导细胞凋亡(activation-induced apoptosis)模型,对老年及年轻大鼠激活诱导的 T 细胞凋亡进行了定性、定量分析;并通过以药测证的方法,比较分析了补肾、活血两类复方对老年鼠 T 细胞凋亡的调节作用,旨在探讨老

年肾虚 T 细胞功能减退的机理,为从补肾途径寻找 T 细胞凋亡调节剂提供依据。

材料与方法

1 药物制备 补肾复方药物组成为附子、肉桂、熟地、山茱萸、山药、仙灵脾、茯苓、炙甘草,用量比例为 2:1:3:2:3:3:3:1;活血复方的药物组成为桃仁、红花、生地、白芍、当归、川芎,用量比例为 1.5:1:3:1.5:1.5:1.5。上述复方由上海童涵春堂药店制成浓度为 1.8g/ml 原液,灭菌后 4℃ 储存。使用前用双蒸水稀释成浓度为 3.6% (V/V) 的使用液。

2 动物分组 14 月龄雄性 SD 大鼠由上海医科大学实验动物部提供。于恒温(26℃),光照与黑暗时间每 12h 交替的条件下,采用标准饲料喂养至 18 月

* 国家自然科学基金资助(No. 39870917)

1. 上海医科大学华山医院(上海 200040); 2. 上海医科大学免疫学教研室

△ 导师

龄,再随机分为老年对照组 10 只,补肾组 10 只,活血组 10 只。药物组每日按 10g/kg 体重口服相应药物,连续 6 个月;对照组常规喂养。本次实验中以 24 月龄大鼠作为老年鼠,另设年轻对照组(5 月龄)10 只。

3 细胞制备及激活 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离出大鼠脾单个核细胞,参照 Severson^[4]法制备 T 细胞,调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$,于预先包被了抗 CD₃ 单抗(G4.18, Pharmingen, USA)的 24 孔培养板(NUCLON, Denmark)中,用含 10% 胎牛血清(Sigma, USA), 20u/ml IL-2(上海华新生物公司)的 RPMI 1640(GIBCO, USA)培养基,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 18h。

4 细胞形态学检测 常规制备电镜标本,于透射电镜(DEX-100B, Japan)下观察细胞形态并拍照。

5 细胞凋亡的 DNA 检测 参照细胞凋亡 DNA-Ladder 检测试剂盒(Boehringer Mannheim, Germany)说明书抽提 DNA。按每泳道 2μg DNA,加样于 1.5% 琼脂糖凝胶(华美生物公司)中,于 10V/cm 凝胶的电压降下,电泳 1.5h。紫外投射仪上观察并拍照。

6 TUNEL 标记的流式细胞术检测 常规离心收集各组细胞,4% 多聚甲醛(Sigman, USA)固定 30min,按照细胞凋亡检测试剂盒(Boehringer Mannheim, Germany)说明书进行 TUNEL 标记,另设阴性对照组,用不含末端转移酶的单纯标记液标记。用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson,

USA)参照阴性对照计算出凋亡细胞百分率。分析采样软件为 CELLQUEST。

7 统计学处理 组间比较采用方差分析。

结 果

1 细胞形态学检测 对照组在电镜下可检出正常 T 细胞,染色质分布均匀(图 1a),并可检出凋亡细胞,染色质固缩,凝聚在核膜周边成新月状(图 1b)。其他各组也可在电镜下检出数量不等的凋亡细胞,提示抗 CD₃ 单抗对各组均可诱导出 T 细胞凋亡。

2 DNA 凝胶电泳 4 组细胞均可检出细胞凋亡的 DNA 梯形图谱(图 2),表明抗 CD₃ 单抗激活诱导 18h,各组均出现细胞凋亡特征性的基因组 DNA 断裂,与电镜结果相符。

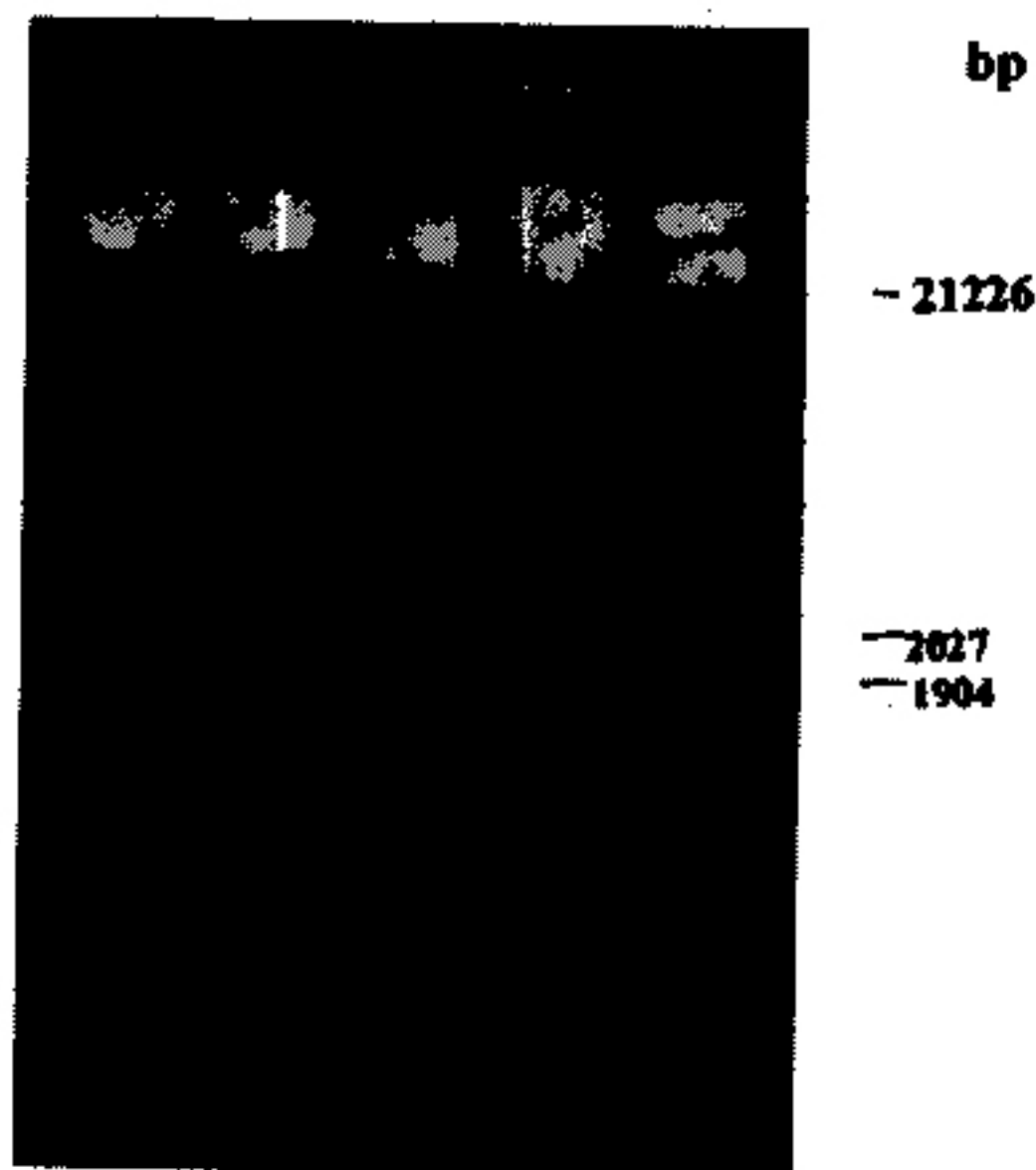
3 补肾、活血复方对 T 细胞凋亡的影响 经抗 CD₃ 单抗激活诱导 18h,4 组均可通过流式细胞术检测出 TUNEL 标记的凋亡细胞(图略)。老年对照组与年轻组相比,凋亡细胞百分数明显增高,组间比较具有显著性差异($P < 0.01$),提示老年期 T 细胞对抗 CD₃ 单抗激活诱导细胞凋亡的敏感性增高;补肾组凋亡细胞百分数虽然高于年轻组,但与老年对照组比较,凋亡细胞百分数明显降低($P < 0.05$);活血组凋亡细胞百分数与老年对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。提示这种激活诱导的 T 细胞过量凋亡与肾虚有关(表 1)。



a. 正常 T 细胞; b. 凋亡的 T 细胞,染色质凝聚成新月状

图 1 细胞凋亡的形态学表现

1 2 3 4 M



1. 活血组;2. 补肾组;3. 老年组;4. 年轻组
M. Lambda DNA EcoR I/Hind III 分子量标志

图 2 细胞凋亡 DNA 凝胶电泳图谱

表 1 4 组大鼠激活诱导 T 细胞凋亡的百分率比较 (%)

组别	n	p + Sp
年轻	10	22.17 ± 0.58
老年	10	47.00 ± 0.70 *
补肾	10	31.20 ± 0.65 [△]
活血	7	43.40 ± 0.49

注:与年轻组比较, * P < 0.01;与老年组比较, [△] P < 0.05

讨 论

由 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)所介导的细胞凋亡称为激活诱导的细胞凋亡。1996 年,美国免疫衰老研究权威 Miller 指出,研究衰老时激活诱导的细胞凋亡有助于阐明老年 T 细胞功能改变的机理⁽³⁾,此后 Phelouzat 以及 Aggarwal 的研究相继证实了衰老对激活诱导的 T 细胞凋亡的影响^(5,6),这些工作代表了国际上免疫衰老研究的最新趋势,同时也为从 T 细胞凋亡的角度研究肾虚证提供了一个重要的切入点。

本研究采用抗 CD₃ 单抗作为 T 细胞激活剂,以模拟体内由抗原激活的 T 细胞凋亡过程;同时实验体系中添加了外源性 IL-2,排除了由 IL-2 缺失所触发的“饥饿性”细胞凋亡。研究发现,经抗 CD₃ 单抗激活培养 18h,老年对照组 T 细胞凋亡比例明显高于年轻组,两组数据的分布并无重叠,证实激活诱导的 T 细胞凋

亡具有“增龄性”改变的特点,与最近国外相关的研究结果相符^(5,6),表明老年 T 细胞功能减退与激活诱导的 T 细胞过量凋亡有关。

在此基础上,我们比较分析了补肾、活血两类复方对老年大鼠抗 CD₃ 单抗诱导 T 细胞凋亡的干预作用。在实验过程中,活血复方组有 2 只大鼠死亡,1 只患肿瘤退出实验,只有 7 只大鼠获得完整的细胞凋亡资料。研究发现,长期使用活血复方后,抗 CD₃ 单抗诱导 T 细胞凋亡的百分率仍高达 43.4%,而补肾复方组这种 T 细胞凋亡比例则明显降低,表明只有补肾复方可以下调老年大鼠激活诱导的 T 细胞凋亡,活血复方则无此效应。鉴于以药测证是验证中医理论的强有力手段,因此,本次研究提示,尽管血瘀也是衰老的重要因素之一,但激活诱导的 T 细胞过量凋亡主要与肾虚密切相关。这一结果为肾虚→老年期激活诱导 T 细胞过量凋亡→T 细胞功能减退这一假设提供了实验依据,同时部分解释了临床补肾延缓衰老的免疫学机制。

细胞凋亡是一个受多因素影响的动态过程,多参数综合分析是目前确认细胞凋亡发生的最可靠的方法。本研究采用电镜、DNA 凝胶电泳、流式细胞术及 TUNEL 标记技术,从形态学、生化及分子生物学不同角度,首次证明了长期使用补肾复方,可以降低老年大鼠 T 细胞激活诱导的凋亡。这一结果不仅提示下调激活诱导的 T 细胞过量凋亡是补肾延缓衰老的免疫学机制之一,也为进一步从补肾途径筛选 T 细胞凋亡调节剂提供了实验依据。

参 考 文 献

1. 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究. 中国中西医结合杂志 1997; 17(1):51—54.
2. Parijs LV, Abbas AK. Homeostasis and Self-Tolerance in the immune System: Turning Lymphocytes off. Science 1998;280 (10):243—248.
3. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. Science 1996;273:571—573.
4. Severson CD, Burg DL, Lafrenz DE, et al. An alternative method of panning for rat B lymphocytes. Immunology Letter 1987;(15):291—295.
5. Phelouzat MA, Arbogast A, Laforge T, et al. Excessive apoptosis of mature T lymphocytes is a characteristic feature of human immune senescence. Mech Ageing Dev 1997;88:25—38.
6. Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas Ligand, Bcl-2, and Bax. J Immunol 1998;2:112—124.

(收稿:1999-06-01 修回:1999-07-12)