

• 实验研究 •

补肾、活血复方对老年大鼠 T 细胞凋亡
相关基因 Fas、FasL 转录的影响*郑 振¹ 沈自尹¹ 郑仲承² 严明达² 徐蔚晶² 黄 辉³

内容提要 目的:探讨补肾复方下调老年大鼠 T 细胞凋亡的分子机理。方法:采用 RNA 酶保护技术,测定各组 Fas、FasL 基因的 mRNA 水平,并以 GAPDH 为内对照基因,对各组 Fas、FasL 基因的转录进行半定量分析。结果:老年对照组 Fas/GAPDH、FasL/GAPDH 的积分光密度值分别为 0.81 ± 0.17 、 0.84 ± 0.12 ;年轻对照组分别为 0.36 ± 0.16 、 0.26 ± 0.12 。两组比较差异有显著性。活血复方组 Fas/GAPDH、FasL/GAPDH 的积分光密度值分别为 0.99 ± 0.36 、 0.94 ± 0.33 ,与老年对照组比较,差异无显著性($P > 0.05$);两个补肾组 Fas/GAPDH 为 0.78 ± 0.11 和 0.78 ± 0.20 ,与老年对照组比较差异无显著性($P > 0.05$);而两个补肾组 FasL/GAPDH 的积分光密度值为 0.71 ± 0.21 和 0.68 ± 0.15 ,低于老年对照组($P < 0.01$)。结论:补肾复方对 T 细胞 FasL 基因的转录具有一定的负调控作用,这是补肾复方下调老年大鼠 T 细胞过度凋亡的分子机理之一。

关键词 免疫衰老 Fas 基因 FasL 基因 基因转录 补肾复方 活血复方 细胞凋亡

Effect of Kidney Tonifying and Circulation Promoting Compound on Transcription of T-Cell Apoptosis Related Fas and FasL Genes in Aged Rats ZHENG Zhen, SHEN Ziyin, ZHENG Zhongcheng, et al. *Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

Objective: To probe the molecular mechanism for down-regulation of T-cell apoptosis by Kidney tonifying compound (KTC) in aged rats. **Methods:** GAPDH was used as an internal control gene, and semi-quantitative analysis of the transcription of Fas and FasL genes was performed by using RNase protection assay. **Results:** The Fas/GAPDH and FasL/GAPDH optical density (OD) ratios was 0.81 ± 0.17 and 0.84 ± 0.12 in the aged control group, and 0.36 ± 0.16 and 0.26 ± 0.12 in the young control group, the difference between the two groups was significant. In the circulation promoting group, the parameters were 0.99 ± 0.36 and 0.94 ± 0.33 which were not significantly different as compared with those in the aged control group ($P > 0.05$). In the two Kidney tonifying groups, the Fas/GAPDH OD ratio was 0.78 ± 0.11 and 0.78 ± 0.20 , respectively, and no significant difference was observed as compared with those in the aged control group. However the FasL/GAPDH OD ratios in the two kidney tonifying group were 0.71 ± 0.21 and 0.68 ± 0.15 , which were lower than those in the aged control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The negative regulation of FasL gene expression may be one of the molecular mechanisms of KTC in down-regulating excessive apoptosis of T-cell in aged rats.

Key words immunosenescence, Fas gene, FasL gene, gene transcription, Chinese recipe for Kidney tonifying, Chinese recipe for circulation promoting, apoptosis

激活诱导的 T 细胞凋亡具有重要的免疫调节作

用,这种细胞凋亡本身又受到一些基因表达的严密调控。Fas 和 FasL 是介导激活诱导 T 细胞凋亡的两个关键基因,其过高或过低表达均可直接导致 T 细胞凋亡异常^[1]。我们曾报道补肾复方可以下调老年大鼠激活诱导的 T 细胞过度凋亡^[2,3],这是否与调节 Fas 和

* 本课题为国家自然科学基金资助(No.39870917)

1. 上海医科大学中西医结合研究所(上海 200040); 2. 中国科学院上海生物化学研究所; 3. 上海医科大学免疫学教研室

FasL 基因的表达有关尚不清楚。本研究采用 RNA 酶保护技术,分析补肾、活血复方对 Fas 和 FasL 基因转录的影响,旨在探讨补肾复方下调老年 T 细胞凋亡的基因原理。

材料与方法

1 药物制备 补肾复方(右归饮)药物组成为附子、肉桂、熟地、山茱萸、淮山药、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。补肾益寿胶囊由制首乌、黄精、人参、枸杞子、仙灵脾、灵芝等组成,由四川涪陵太极集团提供,每克含生药 11.3g,用双蒸水制成浓度为 0.12g/ml 原液,灭菌后 4℃ 储存。使用前用双蒸水稀释成浓度为 7.5%(V/V)的使用液。

2 动物分组、T 细胞分离纯化及激活 40 只老年大鼠(24 月龄)随机分为老年对照组 10 只;补肾复方组 10 只;补肾益寿胶囊组 10 只;活血复方组 10 只。另设年轻对照组(5 月龄)10 只。参照文献^[2]分离纯化 T 细胞,在预先包被了抗 CD3 单抗的 6 孔培养板中,常规培养 18h。

3 细胞总 RNA 的提取 参照 TRIzolTM Reagent (Total mRNA Isolation Reagent GIBCO BRL, USA) 说明书,每组取 1×10^7 个细胞,采用 1ml TRIzolTM Reagent 裂解后,加 0.2ml 氯仿离心分相,取水相,用 0.5ml 异丙醇沉淀,弃去上清,RNA 沉淀用 75%乙醇洗后,重溶于 20μl 无 RNA 酶水中, -20℃ 储存。取 1μl 稀释至 100μl 测 A_{260} 和 A_{280} 。另取 2μl 作电泳分析。本次 RNA 样品 $A_{260/280}$ 为 1.6~1.8。电泳后,EB 染色可见 5S、18S、28S 条带。

4 RT-PCR 扩增 mRNA

4.1 cDNA 第一链的合成 参照 THERMALSCRIPTM RT-PCR System Field Test Kit (GIBCO BRL, USA Cat. No. FT000-006) 说明书进行。

4.2 Fas、FasL、GAPDH 引物及 PCR RT-PCR 引物由 GIBCO BRL 公司(USA)合成。引物序列为: Fas3' CTCGGATCCTGATACCAGCACTGGAGCAG; Fas5' CTCGAATTCCTCTCTGTGACACTGTTATC; FasL3' CTCGGATCCCAAGACTGACCCCGGAAGTA; FasL5' CTCGAATTCTGCCTCCACTAAGCCCTCTA; GAPDH3' CTCGGATCCCCTGCTTCACCACCTTCTT

G;GAPDH5' CTCGAACCATCACCATCTTCCAGGAG。PCR 反应采用 9600 型热循环仪(Perkin-Elmer Cetus)。循环条件:94℃ 热启动 2min,加入 Taq 酶。94℃ 30s;58℃ 30s;72℃ 1min。30 个循环后,72℃ 5min。

4.3 PCR 产物的电泳鉴定 每管 PCR 产物取 10μl,于 1.5% 琼脂糖凝胶,10V/cm 凝胶的电压降下电泳。

5 PCR 产物的克隆、测序及体外转录

5.1 PCR 产物的克隆 参照分子克隆实验指南^[4],将质粒载体及 PCR 产物酶切后,进行体外重组。将重组质粒导入感受态细胞(JM109)。碱裂解法小量制备重组质粒,双酶切鉴定。挑选阳性克隆,扩增后用碱裂解法大量制备重组 DNA,并用聚乙二醇沉淀法纯化,测量 OD_{260} ,计算质粒 DNA 的浓度,保存于 -20℃ 备用。

5.2 DNA 测序 采用四色荧光 DNA 自动测序法测定 DNA 序列。

5.3 体外转录及 DIG-RNA 标记效率的半定量测定 参照 DIG Northern Starter Kit (Boehringer Mannheim GmbH) 说明书进行。

6 RNA 酶保护 参照文献^[5]及 DIG Northern Starter Kit (Boehringer Mannheim GmbH) 说明书进行。

7 统计学处理 两组均数之间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 老年和年轻大鼠 Fas、FasL 基因的表达 见表 1。老年组大鼠 Fas、FasL mRNA 杂交信号光密度值均高于年轻组大鼠,采用 GAPDH 校正后,老年组 Fas/GAPDH、FasL/GAPDH 比值分别为 0.81 和 0.84,年轻组大鼠分别为 0.36 和 0.26,组间差异具有显著性 ($P < 0.01$)。表明经 anti-CD3 mAb 刺激后,老年大鼠 Fas、FasL 基因的转录水平高于年轻大鼠。提示老年大鼠 T 细胞的过量凋亡与 Fas、FasL 基因的高表达相关。

2 补肾、活血复方对 Fas、FasL 基因表达的影响 见表 1。补肾复方组 Fas/GAPDH 比值为 0.78,补肾益寿胶囊组为 0.78,老年组为 0.81,组间差异无显著性。两个补肾复方组 FasL/GAPDH 比值分别为 0.71、0.68,与老年组(0.84)比较,差异均具有显著性 ($P < 0.01$)。活血复方组 Fas/GAPDH 和 FasL/GAPDH 的比值分别为 0.99、0.94,与老年组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。提示只有补肾复方具有下调 FasL 基因转录的作用。

表 1 各组大鼠 Fas、FasL 基因表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas / GAPDH	FasL / GAPDH
年轻	10	0.36 ± 0.16	0.26 ± 0.12
老年	10	0.81 ± 0.17 [*]	0.84 ± 0.12 [*]
活血复方	7	0.99 ± 0.36	0.94 ± 0.33
补肾复方	10	0.78 ± 0.11	0.71 ± 0.21 [△]
补肾益寿胶囊	10	0.78 ± 0.20	0.68 ± 0.15 [△]

注:与年轻组比较,^{*} $P < 0.01$;与老年组比较,[△] $P < 0.01$

讨 论

Fas/APO-1 是一种 I 型膜蛋白,属于肿瘤坏死因子和神经生长因子受体家族。FasL 为 Fas 的天然配基,是迄今所克隆鉴定的重要“死亡因子”之一。Fas 在多种细胞表面均有表达,而 FasL 基因则主要表达于激活的 T 细胞。FasL 的表达产物有膜结合型和分泌型两种,可与自身和其他靶细胞膜表面的 Fas 交联而启动 T 细胞凋亡程序。衰老时 T 细胞出现过量凋亡已有较多的报道^[2,6],问题在于这种过量凋亡是否与 Fas、FasL 基因的异常表达有关。本次研究针对基因表达调控的关键环节——转录的调控,对各组 Fas、FasL 的 mRNA 进行了定量分析。研究发现,采用 anti-CD3 mAb 激活 18h,老年大鼠脾 T 细胞 Fas、FasL 基因的 mRNA 水平明显高于年轻大鼠。表明,老年及年轻大鼠脾 T 细胞 Fas、FasL 基因的转录调控存在差异,在 anti-CD3 mAb 诱导下,老年期大鼠 Fas、FasL 基因的转录水平上调。最近,Aggarwal 等也报道了老年人 Fas、FasL 基因的高表达^[7],但是作者采用的是对 PCR 产物进行液闪定量分析的技术。本次研究则采用了 RNA 酶保护技术,由于使用 RNA 探针,并经过 RNA 酶的充分消化,其敏感性和特异性均较高。因此,本次研究结果表明,衰老导致的 T 细胞过度凋亡与 Fas、FasL 基因的高表达密切相关。

进一步分析补肾、活血两类复方的效应发现,活血复方组 Fas、FasL 基因的 mRNA 水平与老年组比较差异无显著性,表明老年大鼠 Fas、FasL 基因的高表达均不能被活血复方下调。而 Fas、FasL 基因对补肾复方则有不同的反应:两个补肾复方组的 Fas 基因 mRNA 水平与老年组差异无显著性,但 FasL 基因的 mRNA 水平均低于老年组。因此,老年大鼠 FasL 基因的高表达可在一定程度上被补肾复方下调。鉴于在体内 Fas、FasL 介导的 T 细胞凋亡过程中,FasL 是传递死亡信息的重要分子;同时,本次研究中各组 T 细胞与

既往研究细胞凋亡时的 T 细胞同步取自相同的个体;因此,本次结果表明,对 FasL 基因转录的负调控作用,是补肾复方下调老年大鼠 T 细胞过度凋亡的分子机理之一。此外,我们曾报道补肾、活血两类复方对老年大鼠 T 细胞凋亡的效应不同,本次研究则发现,两个补肾复方对老年大鼠 FasL 基因均有一定的负调控效应,而活血复方则不能。这一结果不仅从基因水平上为这两类复方功效的差异提供了解释,也进一步为肾虚与老年 T 细胞过度凋亡相关的推断提供了依据。

我们也注意到,本次研究中,老年大鼠 Fas、FasL 基因表达同步增高,而补肾复方并不能同步下调这两个基因的转录。提示 Fas、FasL 这两个基因的转录对补肾复方的反应不同。本次研究尚未对这种差异的本质进行深入探讨,但有资料表明,Fas 与 FasL 基因的转录调控机制和信号传导途径可能不同^[8]。因此,进一步分析补肾复方对这两个基因的转录调控元件和信号分子功能的影响,将是十分有意义的课题。

参 考 文 献

1. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, et al. Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;17: 331—367.
2. 郑振,沈自尹,黄辉.补肾与活血复方调节老年鼠 T 细胞凋亡的对比研究. *中国中西医结合杂志* 1999;19(10): 610—612.
3. 郑振,沈自尹,黄辉.补肾复方下调老年大鼠激活诱导的 T 细胞凋亡. *上海医科大学学报* 2000;27(1): 35—38.
4. 金冬雁等译.分子克隆实验指南.第 2 版.北京:科学技术出版社,1995: 1—55.
5. Zhan JH, Fahimi HD, Voelkl A. Sensitive nonradioactive dot blot/ribonuclease protection assay for quantitative determination of mRNA. *Bio Techniques* 1997;22(3): 500—505.
6. 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.
7. Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), FasLigand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol* 1998;160(4): 1627—1637.
8. Shi YF, Bissonnette RP, Glynn JM, et al. Inhibition of activation-induced apoptosis in T cell hybridomas by antisense oligodeoxynucleotides corresponding to c-myc. *Science* 1992;257: 1788—1789.

(收稿:2000-06-30 修回:2000-08-02)