

五子衍宗丸及其拆方对老年大鼠心脑线粒体 DNA 缺失、线粒体呼吸链酶复合体及 ATP 合成的影响^{*}

王学美 富 宏 刘庚信

内容提要 目的 研究五子衍宗丸及其拆方对线粒体 DNA 缺失、线粒体呼吸链酶复合体及三磷酸腺苷(ATP)合成的影响。方法 用聚合酶链反应(PCR)、酶动力学和生物发光技术进行检测。结果 五子衍宗丸及其拆方的枸杞子、菟丝子可减少老年大鼠脑组织线粒体 DNA 缺失($P<0.01$),提高脑线粒体呼吸链复合酶 I、IV 活力和 ATP 的合成($P<0.05$, $P<0.01$)。枸杞子、菟丝子还可减少老年大鼠心线粒体 DNA 缺失($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 五子衍宗丸、枸杞子、菟丝子对老年大鼠线粒体 DNA 的氧化损伤有保护作用。

关键词 五子衍宗丸 枸杞子 菟丝子 衰老 线粒体 DNA 呼吸链酶复合体 三磷酸腺苷

Effect of Wuzi Yanzong Pill and Its Disassembled Prescription on Mitochondrial DNA Deletion, Respiratory Chain Complexes and ATP Synthesis in Aged Rats WANG Xue-mei, FU Hong, LIU Geng-xin *Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Peking University, Beijing (100034)*

Objective: To investigate the effect of Wuzi Yanzong Pill (WZYYP) and its disassembled prescription on mitochondrial DNA deletions, respiratory chain complexes and ATP synthesis in aged rats. **Methods:** Animal experiments with polymerase chain reaction (PCR), enzyme kinetics and bioluminescence technique were conducted. **Results:** WZYYP and its disassembled prescription of Fructus Lycii and Semen Cuscutae could reduce the mitochondrial DNA deletions and raise the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I, IV and adenosine triphosphate (ATP) synthesis in aged rats' brain; Fructus Lycii and Semen Cuscutae could also reduce the mitochondrial DNA deletions in aged rats' heart ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** WZYYP, Fructus Lycii and Semen Cuscutae have protective effect on oxidative damage of mitochondrial DNA in aged rats.

Key words Wuzi Yanzong pill, Fructus Lycii, Semen Cuscutae, aging, mitochondrial DNA, respiratory chain complexes, adenosine triphosphate

五子衍宗丸为补肾益精的代表方,研究表明该方具有改善老年肾虚衰老症状、调节体内性激素水平、降低血中 LPO 含量、提高 SOD 活力等延缓衰老的作用⁽¹⁾。本研究从线粒体 DNA 损伤衰老学说入手,观察了五子衍宗丸及其拆方对老年雄性大鼠线粒体 DNA 缺失、线粒体酶复合体及三磷酸腺苷(ATP)合成量的影响,以期从基因水平探讨五子衍宗丸延缓衰老的机理。

材料与方法

1 药物及实验动物 五子衍宗丸、枸杞子和菟丝子均由北京同仁堂医药集团提供。五子衍宗丸按药典配方。实验动物为 Wistar 系雄性大鼠,由北京医科大学实验动物部提供。1 月龄大鼠 12 只为幼年组、6 月

龄大鼠 12 只为青年组、22 月龄大鼠 42 只为老年组,老年组大鼠被随机分为对照组 10 只、五子衍宗丸组 10 只、枸杞子组 11 只和菟丝子组 11 只,其中菟丝子组实验中途死亡 1 只。分别灌胃五子衍宗丸、枸杞子和菟丝子,每组给药量相当于成人每日量的 10 倍,对照组、幼年组和青年组灌胃相当体积的生理盐水。枸杞子和菟丝子组 1 倍量根据其在五子衍宗丸总量中所占的比例(约为各 35%)计算,从 22 月龄开始给药,疗程为 2 个月。断头处死大鼠,并迅速取出全脑、心脏液氮速冻, -80°C 冰箱保存。

2 聚合酶链反应(PCR)引物 由北京赛百盛生物工程公司合成。引物合成参照文献⁽²⁾。共用两对引物:L4395(5'-AGGACTTAACCAGACCCAAACACG-3', 4395-4418)和 H5164(5'-CCTTTTCTGATAGCGGG-3', 5164-5145)用于扩增野生型 mtDNA 片段,反映正常 mtDNA 含量,以此作为内参照;L7825(5'-TTTCTTCCCAAACCTTTCCT-3', 7925-7944)和

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 39800199)

北京大学第一医院中西医结合研究所(北京 100034)

H13117(5'-AAGCCTGCTAGGATGCTTC-3', 13117-13098)用于扩增缺失型 mtDNA 片段,反映片段缺失型 mtDNA 含量。

3 主要试剂及仪器 Tag 酶、dNTP、蛋白酶 K、胰 RNA 酶、SDS、重蒸酚、丙烯酰胺、ADP、ATP、还原辅酶 I、甘露醇等购自北京华美生物工程公司,细胞色素 C 为 Sigma 公司产品,荧光素酶-荧光素购自中国科学院上海植物研究所,其他试剂均为国产分析纯。

PE-9600 型 PCR 扩增仪、Pharmacia LKNU1-trascan XL 型激光扫描仪、岛津 UV-2500 紫外分光光度计等。

4 检测方法

4.1 线粒体 DNA 缺失的检测 心、脑组织线粒体 DNA 的提取参照文献⁽³⁾以提取的心、脑组织线粒体 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,参照文献⁽²⁾。PCR 产物鉴定:PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳分离纯化,其产物送中国科学院生物研究所测序。PCR 产物定量:PCR 扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色,观察结果。用激光光密度扫描仪进行扫描,取得积分吸光度,计算缺失型 mtDNA 与野生型 mtDNA 含量的百分比。

4.2 心、脑组织线粒体复合酶 I、IV 活力测定和线粒体 ATP 的合成 分别参照伍期专和刘树森等的方法进行^(4,5)。

5 统计学方法 采用 SPSS 8.0 统计软件的方法分析。

结 果

1 五子衍宗丸及其拆方对线粒体 DNA 缺失的影响

1.1 PCR 产物鉴定 用引物 L7825(5'-TTTCTTCCCAAACCTTTCCT-3', 7925-7944)和 H13117(5'-AAGCCTGCTAGGATGCTTC-3', 13117-13098)扩增缺失型 mtDNA 片段经中国科学院生物研究所测序结果证明,为大鼠 H12897-13110 序列,证明大鼠 mtDNA 约有 5.0kb 的缺失。

表 2 各组大鼠心、脑线粒体呼吸链复合酶 I、IV 活力和线粒体 ATP 的合成量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	心线粒体				脑线粒体			
	n	复合酶 I	复合酶 IV	ATP 合成量	n	复合酶 I	复合酶 IV	ATP 合成量
幼年	12	38.48 ± 4.95	4776.90 ± 548.63 **	215.34 ± 36.78	11	15.67 ± 4.89	1367.93 ± 354.70 **	74.00 ± 15.60
青年	11	39.67 ± 7.12	3859.12 ± 703.53 **	337.53 ± 62.18 **	11	21.69 ± 5.13 *	2205.75 ± 314.02 **	152.87 ± 30.98 **
老年对照	10	35.15 ± 5.66	2347.21 ± 623.33	196.95 ± 33.26	10	14.99 ± 4.45	826.68 ± 209.54	75.40 ± 20.27
五子衍宗丸	10	37.50 ± 6.57	3509.57 ± 574.22 **	227.98 ± 31.65	10	20.79 ± 3.93 *	1232.10 ± 246.13 *	107.49 ± 21.50 *
菟丝子	10	38.13 ± 8.85	3805.34 ± 453.61 **	234.65 ± 42.42	10	16.90 ± 4.22	1222.66 ± 260.48 *	115.77 ± 20.56 **
枸杞子	11	32.37 ± 6.55	3488.38 ± 695.11 **	254.26 ± 70.14	11	20.69 ± 4.15 *	929.12 ± 207.32	105.32 ± 24.40 *

注:表中复合酶 I、复合酶 IV 单位为 nmol/(mgPr·min),ATP 合成量单位为 $\times 10^{-9}$ 万万数据

1.2 不同月龄大鼠心、脑组织 mtDNA 缺失的定量比较 见表 1 及图 1。不同月龄大鼠心、脑组织 mtDNA 均存在不同程度的片段缺失,老年对照组脑缺失 mtDNA/内参 mtDNA 较幼年组、青年组明显增高 ($P < 0.01$);其心缺失 mtDNA/内参 mtDNA 较幼年组明显增高 ($P < 0.05$),较青年组也有升高的趋势。五子衍宗丸组、菟丝子组和枸杞子组脑缺失 mtDNA/内参 mtDNA 较老年对照组明显降低 ($P < 0.01$);菟丝子组和枸杞子组其心缺失 mtDNA/内参 mtDNA 也较老年对照组明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$);五子衍宗丸组心缺失 mtDNA/内参 mtDNA 与老年对照组比较,差异无显著性。

2 五子衍宗丸及其拆方对心、脑线粒体呼吸链复合酶 I、IV 活力和线粒体 ATP 的合成量的影响 见表 2。老年对照组心、脑线粒体呼吸链复合酶 IV 活力、ATP 合成量和脑复合酶 I 活力均较青年组明显降低,其心肌复合酶 IV 活力也较幼年组明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);五子衍宗丸、菟丝子组和枸杞子组心肌复合酶 IV 活力和脑 ATP 合成量较老年对照组明显升高,五子衍宗丸组脑复合酶 I、IV,菟丝子组脑复合酶 IV 及枸杞子组脑复合酶 I 均较老年对照组明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

讨 论

近年来,国际医学界对线粒体 DNA 氧化损伤与衰老关系的研究十分活跃,认为线粒体 DNA 损伤是

表 1 各组大鼠心、脑组织缺失 mtDNA/内参 mtDNA 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	心缺失 mtDNA/内参 mtDNA	脑缺失 mtDNA/内参 mtDNA
幼年	0.77 ± 1.16 (11) *	1.37 ± 0.82 (12) **
青年	1.54 ± 1.17 (12)	1.05 ± 1.12 (12) **
老年对照	2.09 ± 1.62 (10)	3.61 ± 2.56 (10)
五子衍宗丸	2.02 ± 1.21 (10)	1.35 ± 0.52 (10) *
菟丝子	0.33 ± 0.26 (10) **	0.43 ± 0.27 (9) **
枸杞子	0.60 ± 0.53 (10) *	0.42 ± 0.39 (10) **

注:与老年对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;下同 () 内为鼠数

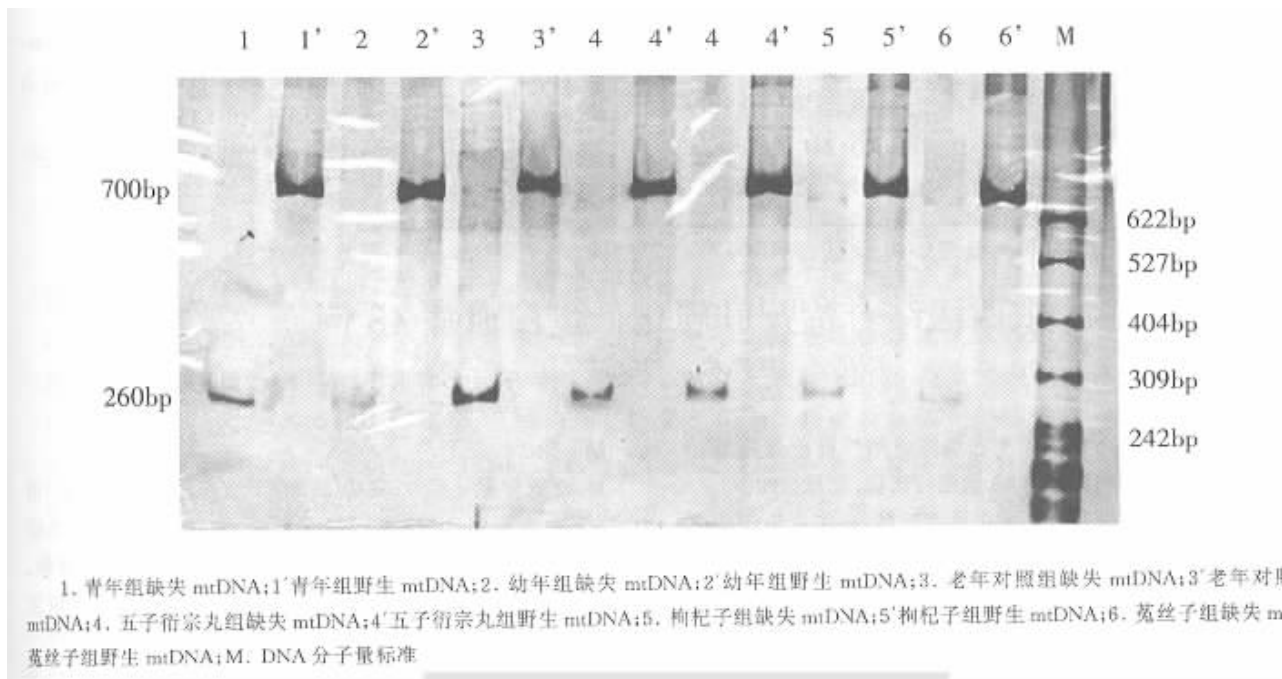


图 1 各组心肌 mtDNA 缺失 PCR 扩增产物电泳

细胞衰老和死亡的分子基础。这主要是由于线粒体 DNA (mtDNA) 是核外遗传物质, 在细胞能量代谢中有十分重要的作用。在线粒体氧化磷酸化过程中, 大约有 1%~4% 的摄入氧转化为氧自由基。氧自由基电子传递系统溢出, 最易损伤 mtDNA, 其易损程度是核 DNA 的 16 倍以上, 可引起 mtDNA 发生片段缺失。由于 mtDNA 参与编码氧化呼吸链组成成分的多个蛋白质亚单位, 如复合酶 I 的 7 个亚单位、复合酶 IV 的 3 个亚单位和复合酶 V (ATPase) 的 2 个亚单位等, 因此 mtDNA 损伤后可引起呼吸链有关蛋白质亚单位的合成障碍, 形成有缺陷的呼吸链, 特别是有正常功能的线粒体数减少, ATP 合成量下降, 细胞所需能量不足, 从而发生一系列衰老表现, 尤其是心、脑等以 ATP 为主要能源的代谢旺盛器官, 首先表现衰老⁽⁶⁾。

本研究结果表明, 随着增龄老年大鼠心、脑 mtDNA 片段丢失均较青幼年大鼠有不同程度的增多, 心脑呼吸链复合酶 IV 活力、线粒体 ATP 的合成量和脑复合酶 I 活力较青年组明显降低, 此结果与文献报道一致^(2,7)。由此推测, mtDNA 片段丢失和呼吸链复合酶活力的降低, 可能开始于青年以后, 这将对实施防治衰老的时间和抗衰老药物的科学评估, 具有重要的参考价值。

众所周知, 补肾方药清除自由基、提高抗氧化酶活力的研究虽有报道, 但补肾药能否作用于核外遗传物质 mtDNA, 进而影响线粒体呼吸链复合酶活力、线粒体 ATP 的合成量, 还有待于探讨。本实验结果表明, 复方五子衍宗丸及其拆方菟丝子、枸杞子均可明显减

少老年大鼠脑 mtDNA 缺失率, 提高脑呼吸链复合酶活力、ATP 合成量, 提高心呼吸链复合酶 IV 活力, 说明补肾方药对 mtDNA 有保护作用, 此结果在基因水平上, 提供了补肾方药抗衰老的作用机理。

五子衍宗丸是补肾益精的代表方, 菟丝子、枸杞子均是方中主药, 均有补肾之功效, 其药量各占复方总药量的 35%。本实验结果表明, 五子衍宗丸及其拆方菟丝子、枸杞子组对老年大鼠脑 mtDNA 缺失率、呼吸链复合酶活力和 ATP 合成量的影响, 无明显差异, 五子衍宗丸组未见明显优于单味药组。相反菟丝子、枸杞子对心肌 mtDNA 缺失的影响, 却明显优于五子衍宗丸。说明菟丝子、枸杞子对老年大鼠 mtDNA 氧化损伤的保护作用要强于五子衍宗丸, 这样, 可否认单味药菟丝子、枸杞子可取代复方五子衍宗丸, 还有待于今后从临床和实验两方面, 进行更系统、更严格的配伍机制的研究。

参 考 文 献

1. 王学美, 谢竹藩, 彭先忠, 等. 五子衍宗液延缓衰老的临床研究. 中国中西医结合杂志 1992; 12(1): 23—25.
2. Charles R Filburn, Wade Edris, Michio Tamatani, et al. Mitochondrial electron transport chain activities and DNA deletion in regions of the rat brain. Mechanisms of Aging and Development 1996; 87: 35—46.
3. 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 30—31.

4. 伍期专, 陈 燕, 陈清棠. 线粒体肌病患者的线粒体呼吸及呼吸链酶复合体活力测定. 中华神经精神科杂志 1993 ;26(5): 262—264.
5. 刘树森, 魏影允. 鼠肝线粒体内膜 H-ATP 酶 ATP 合成反应动力学. 生物化学与生物物理学报 1987 ;19(3):241—251.
6. 童坦君, 张宗玉. 医学老年学. 北京 :人民卫生出版社 ,1995:

142—150.

7. Gkeizo Torii , Satoru Sugiyama , Kenzo Takagi , et al. Age-related decrease in respiratory muscle mitochondrial function in rats. Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ;6:88—92.

(收稿 2000-08-01 修回 2001-02-28)