

# 五子衍宗丸对男性老年肾虚者外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及线粒体呼吸链酶复合体活力的影响\*

王学美 富 宏 刘庚信

**内容提要** 目的:研究五子衍宗丸对男性老年肾虚者外周血白细胞线粒体 DNA 缺失、线粒体呼吸链酶复合体活力的影响。方法:38 例男性老年肾虚者采用单盲法,随机分为五子衍宗丸治疗组和安慰剂对照组,服药 3 个月。分别用聚合酶链反应(PCR)和酶动力学方法检测治疗前后外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及线粒体呼吸链酶复合体的活力。结果:五子衍宗丸可提高男性老年肾虚者外周血白细胞线粒体呼吸链酶复合体 I、IV 活力,减少线粒体 DNA 缺失( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:五子衍宗丸对男性老年肾虚者白细胞线粒体 DNA 氧化损伤有保护作用。

**关键词** 五子衍宗丸 衰老 白细胞 线粒体 DNA 呼吸链酶复合体

**Effect of Wuzi Yanzong Pill on Mitochondrial DNA Deletion and Respiratory Chain Enzyme Complex Activity in Peripheral Leukocyte of Aged Male with Kidney Deficiency Syndrome** 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) on mitochondrial DNA (mtDNA) deletion and respiratory chain enzyme complex (RCZC) in peripheral blood leukocyte of aged male with Kidney Deficiency Syndrome (KDS). **Methods:** Single-blinded study was conducted in 38 aged male with KDS, who were randomly divided into 2 groups treated with WZYYP and placebo respectively for 3 months. Levels of mtDNA deletion and RCZC were determined by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme kinetics technique respectively. **Results:** WZYYP could reduce the mtDNA deletion and raise the activity of mitochondrial RCZC I, IV in peripheral blood leukocyte of aged male with KDS ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** WZYYP has protective effect on mtDNA from oxidative damage in leukocyte of aged male with KDS.

**Key words** Wuzi Yanzong Pill, aging, leukocyte, mitochondrial DNA, respiratory chain enzyme complex

近几年研究发现,补肾方药延缓衰老的作用,与其降低过氧化脂质、提高超氧化物酶的活力有关。其中补肾对自由基氧化损伤的诸多机制有待研究。补肾能否从基因水平作用于自由基对线粒体 DNA 氧化损伤尚不清楚。本研究在过去研究的基础上<sup>[1]</sup>,观察了补肾方五子衍宗丸对男性老年肾虚者外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及线粒体呼吸链酶复合体 I、IV 活力的影响,探讨补肾方对男性老年肾虚者线粒体 DNA 氧化损伤的作用。

## 资料和方法

**1 观察对象** 来自北京市西城区厂桥街道的 60~80 岁男性 248 人,经临床心、肺、肝、脾、尿液、血压、血糖等检测为正常的健康老年人,符合中华医学会

老年医学学会规定标准<sup>[2]</sup>,再结合中医虚证辨证标准<sup>[3]</sup>,选出无肾虚者 10 名,为老年健康组,平均年龄为  $(71.70 \pm 5.87)$  岁。老年肾虚组 38 例,从随机数字表中查取随机数字,奇数者为治疗组,偶数者为对照组。治疗组 19 例,平均年龄  $(69.16 \pm 4.90)$  岁;对照组 19 例,平均年龄  $(69.32 \pm 6.67)$  岁,两组年龄差异无显著性。

**2 用药方法** 采用单盲法观察,治疗组服用五子衍宗丸[五子衍宗丸药粉购自北京同仁堂医药集团,依照药典的服用量(每日服生药 9g),分装胶囊,每粒胶囊含生药 1g],1 日 3 次,每次 3 粒。对照组服用安慰剂(淀粉购自北京医药公司,分装胶囊,其外形、用量与治疗组完全一样)。两组疗程均为 3 个月。

**3 观察指标及检测方法** 服药前后各取血 10ml (肝素抗凝)进行外周血白细胞线粒体复合酶 I、IV 活力测定,取血 0.5ml (EDTA 抗凝)进行白细胞线粒体 DNA 缺失的检测。外周血白细胞线粒体复合酶活力

\* 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)

测定采用酶动力学方法。外周血白细胞线粒体提取参照文献<sup>(4)</sup>,分离白细胞,在冰浴中超声破碎,低温高速离心,提取线粒体,参照伍期专方法<sup>(5)</sup>进行测定。白细胞线粒体 DNA 缺失采用聚合酶链反应(PCR)方法,其线粒体 DNA 提取采用玻璃奶吸附法<sup>(6)</sup>。PCR 引物由北京赛百盛生物工程公司合成。参照文献<sup>(7)</sup>自行设计:18171(5'-TGCTCTGAAATCTGTGGAGC-3'8171-8190)和 H8403(5'-ATTATGGTGGGCCATACG-GTAGTA-3'8403-8378)用于扩增野生型 mtDNA 片段,反映正常 mtDNA 含量,以此作为内参照;18148(5'-ACCGGGGGTATACTACGGTC-3'8148-8169)H13811(5'-GCGAGGGCTGTGAGTTTTAG-3'13811-13792)用于扩增缺失型 mtDNA 片段,反映片断缺失型 mtDNA 含量。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min,一个循环;94℃ 变性 1min,56℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min 30 个循环;72℃ 延伸 10min。PCR 产物经特异性酶切位点 XbaI 限制性内切酶酶切(识别序列为 T▼CTAGA)来证明。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 实验试剂 Tag 酶、dNTP、蛋白酶 K、胰 RNA 酶、SDS、重蒸酚、丙烯酰胺、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 原装,其他试剂均为国产分析纯。仪器为 PE-9600 型 PCR 扩增仪、Pharmacia LKNUltrascan XL 型激光扫描仪、岛津 UV-2500 紫外分光光度计等。

5 统计学方法 采用 SPSS 8.0 统计软件的  $t$  检验及配对  $t$  检验。

## 结 果

1 老年肾虚组与老年健康组外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及其线粒体复合酶 I、IV 活力的变化。

1.1 PCR 产物鉴定 PCR 产物经 XbaI 限制性内切酶酶切(识别序列为 T▼CTAGA),证明人白细胞线粒体 DNA 约有 5.0kb 的缺失,见图 1。

1.2 老年肾虚组与老年健康组外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及其线粒体复合酶 I、IV 活力的比较见表 1。老年肾虚组外周血白细胞缺失 mtDNA/内参 mtDNA 较老年健康组增高,其线粒体复合酶 I、IV 活力较老年健康组降低,两组比较,差异有显著性( $P < 0.01$ )。

2 五子衍宗丸对老年肾虚外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及其线粒体复合酶 I、IV 活力的影响 见表 2。治疗前两组白细胞线粒体 DNA 缺失及其线粒体复合酶 I、IV 活力差异无显著性( $P > 0.05$ )。治疗后,治疗组白细胞缺失 mtDNA/内参 mtDNA 较治疗前明显降低( $P < 0.01$ ),白细胞线粒体复合酶 I、IV 活力均较治疗前明显升高( $P < 0.01, P < 0.05$ )。对照组与治疗前比较各项指标的变化差异无显著性( $P > 0.05$ )。白细胞 mtDNA 缺失及线粒体复合酶 I 治疗前与治疗后的差值,治疗组与对照组比较差异均有显著性( $P < 0.01$ )。老年健康组及服药各组白细胞线粒体 DNA 缺失比较,见图 2。

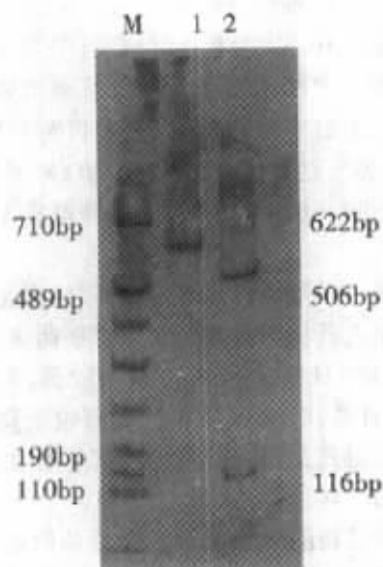


图 1 PCR 产物酶电泳图

注:M为分子量标准,1、2分别为酶切前后产物

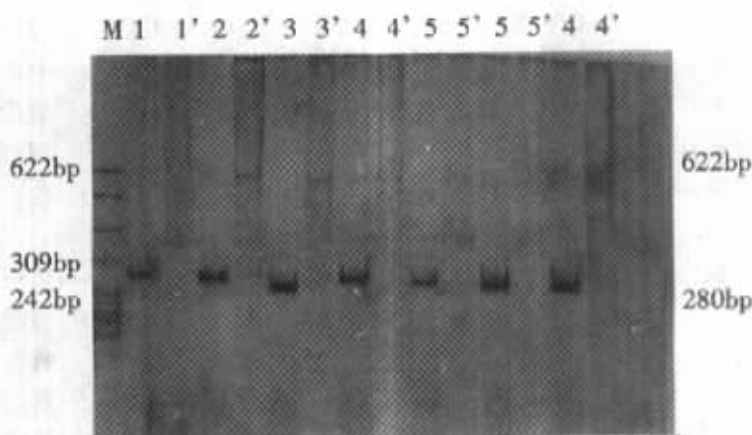


图 2 各组白细胞线粒体 DNA 缺失 PCR 电泳图

注:1、2、3、4、5分别为老年健康组,对照组治疗前、后,治疗组治疗前、后野生 mtDNA;1'、2'、3'、4'、5'分别为老年健康组,对照组治疗前、后,治疗组治疗前、后缺失 mtDNA;M为DNA分子量标准

表 1 老年肾虚与老年健康组外周血白细胞缺失 mtDNA/内参 mtDNA 及其线粒体复合酶 I、IV 活力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 例数 | 缺失 mtDNA/内参 mtDNA (%) | 复合酶 I                                         | 复合酶 IV      |
|------|----|-----------------------|-----------------------------------------------|-------------|
|      |    |                       | (nmol·mgpr <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ) |             |
| 老年健康 | 10 | 2.19±0.82             | 54.27±12.19                                   | 33.85±8.16  |
| 老年肾虚 | 38 | 7.31±4.75*            | 38.61±8.77*                                   | 23.18±6.42* |

注:与老年健康组比较,\* $P<0.01$

表 2 两组治疗前后外周血白细胞缺失 mtDNA/内参 mtDNA 及其线粒体复合酶 I、IV 活力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别例数  |    | 缺失 mtDNA/内参 mtDNA (%)  | 复合酶 I                                         | 复合酶 IV      |
|-------|----|------------------------|-----------------------------------------------|-------------|
|       |    |                        | (nmol·mgpr <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ) |             |
| 治疗 19 | 疗前 | 7.64±3.42              | 37.53±9.96                                    | 22.83±6.70  |
|       | 疗后 | 4.17±3.07**            | 46.75±10.76**                                 | 28.76±8.30* |
|       | 差值 | 3.48±2.53 <sup>△</sup> | 9.21±9.18 <sup>△</sup>                        | 5.93±11.10  |
| 对照 19 | 疗前 | 6.99±5.88              | 39.76±7.43                                    | 23.55±6.28  |
|       | 疗后 | 6.11±4.08              | 41.27±7.88                                    | 24.38±8.63  |
|       | 差值 | 0.87±2.13              | 1.51±4.19                                     | 0.82±4.07   |

注:与本组疗前比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与对照组差值比较,<sup>△</sup> $P<0.01$

讨 论

衰老是一种复杂的病理生理现象,主要表现为机体各种功能的下降。线粒体是细胞内能量合成的主要场所,对维持细胞正常生理功能起着重要作用。近年研究表明,线粒体不仅作为体内的“能量加工厂”,而且还是产生体内活性氧的主要场所。由于线粒体 DNA(mtDNA)附着在线粒体内膜上,这个地方正好是细胞中产生活性氧和脂质过氧化的主要部位,极易受到活性氧的攻击,再加上 mtDNA 与细胞核 DNA 不同,没有组织蛋白或其他结合蛋白来保护,使它的损伤产物 8-OH dg 的含量比核 DNA 高 80~200 倍<sup>(8)</sup>。此外,线粒体缺乏校读机制(proof-reading machinery),当 mtDNA 复制时不能发现 DNA 的损伤,对已经损伤的 DNA 缺乏修复功能,这样使得 mtDNA 的自由基性损伤非常严重,由此产生的 DNA 突变率比核 DNA 大 16 倍,即 mtDNA 随着年龄老化发生大片段丢失。经常发生丢失的范围是第 7776~16084bp 之间,这个范围正好位于 mtDNA 的重链区,这是许多重要基因的编码区,如与电子传递链有关的还原型辅酶 I(NADH)去氢酶、细胞色素氧化酶等的基因,以及与能量代谢有关的 ATP 酶的基因编码都在这个区域,这样就造成有缺陷的呼吸链,使细胞所需能量不足,即可表现出衰老的症状。因此 mtDNA 氧化损伤与衰老的关系成为近年来老年医学界研究的热点。魏耀辉等测定了从婴儿到 89 岁高龄中国人肌肉、肝和睾丸 mtDNA 中 4977bp 和 7436bp 两段丢失情况,结果表明发生丢失例数比率大体上是随龄增多,尤其是 4977bp mtDNA 丢失的数量占正常 mtDNA 数量的百分率在 3 种器官中都明显随

龄增大<sup>(8,9)</sup>。

近年来国内学者从衰老的自由基分子理论,初步证明了自由基产物过氧化脂质的升高及超氧化物歧化酶活力的降低可能是肾虚衰老的物质基础,补肾药物可降低过氧化脂质的含量,升高超氧化物歧化酶的活力,具有抗氧化的作用。但探讨肾虚与线粒体 DNA 氧化损伤及补肾对线粒体 DNA 影响的研究未见报道。本研究结果发现男性老年肾虚者外周血白细胞缺失 mtDNA/内参 mtDNA 较健康老年人明显增高,线粒体复合酶 I、IV 活力较健康老年人明显降低,提示 mtDNA 的氧化损伤可能是肾虚衰老的物质基础之一。五子衍宗丸可提高男性老年肾虚者白细胞线粒体呼吸链酶复合体 I、IV 活力,减少线粒体 DNA 缺失。说明补肾方药可减少自由基对 mtDNA 的氧化损伤,从而使其参与编码的复合体酶的亚单位的合成修复,减少有缺陷的呼吸链,增加细胞所需的能量,达到维持细胞的正常生理,起到延缓衰老的作用。目前,抗衰老的西药作用机制多为单一,且有一定的副作用,对线粒体有直接保护作用的药物还未见报道,而中药的作用是多环节的,本研究以线粒体为主要靶目标,其结果无疑也具有重要的实践价值。

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. 吕维善,宗 启,陈家驹,等.我国四省四市健康老年人五项生理参考值的调查.中华老年医学杂志 1985;4(4):214—222.
3. 沈自尹,王文健整理.中医虚证辨证参考标准.中西医结合杂志 1986;11(11):598.
4. Martin MA, Molina JM, Jimenez FJ, et al. Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from untreated Parkinson's disease patients. Neurology 1996;46:1343—1346.
5. 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.
6. 卢圣栋.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社,1993:103—104.
7. 吴小晶,吴丽娟,夏舒萌.线粒体 DNA 相对含量及基因缺失与衰老关系初探.中华老年医学杂志 1999;18(1):38—41.
8. 张洪泉,余文新.中华抗衰老医药学.北京:科学出版社,2000:95—99.
9. 陈永红,杜冠华.线粒体与衰老.中国药理学通报 2000;16(5):485—488.