

补肾法延缓免疫衰老的临床与实验研究^{*}

沈自尹 郑 振 郭为民 陈伟华 应 健

内容提要 目的:观察补肾法延缓免疫衰老的临床疗效及相应的实验研究。方法:老年人 22 对(44 名)采用随机分组,双盲给药(补肾方即补肾益寿胶囊和安慰剂);实验研究则比较两个补肾方(右归饮和补肾益寿胶囊)和活血方(桃红四物汤)对老年大鼠 T 细胞凋亡及 Fas、FasL 基因表达的调控作用。结果:临床结果显示补肾组 T 细胞凋亡率比安慰剂组明显降低($P < 0.01$),FasL 基因表达亦明显降低($P < 0.05$)。动物实验显示两个补肾方组老年大鼠 T 细胞凋亡率均明显降低($P < 0.05$),FasL 基因表达亦明显降低($P < 0.01$),而活血方组均无变化。结论:补肾法对老年人与老年大鼠 T 细胞 FasL 基因的转录具有负调控作用,这是补肾法下调老年人与老年大鼠 T 细胞过度凋亡的分子机理之一。

关键词 免疫衰老 FasL 基因 补肾法 补肾方 活血方 细胞凋亡

Clinical and Experimental Study on Retardation of Immunosenescence by Kidney Tonifying Principle SHEN Zi-yin, ZHENG Zhen, GUO Wei-min, et al *Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Medical Center of Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective: To observe the clinical curative effect of Kidney tonifying method on retardation of immunosenescence and corresponding experimental study. **Methods:** A randomized double blind placebo-controlled trial was used (RCT) on 22 pairs of aged subjects to elucidate the effect of Kidney tonifying recipe on the peripheral T-lymphocyte apoptosis and the Fas/FasL gene expression in them. In rats experimental study, the effects of two kinds of Chinese recipes (Kidney tonifying recipe and blood circulation promoting recipe) on the same parameters as in clinical study as well as on cell apoptosis and gene expression regulation in old rats were also observed. **Results:** Clinical study showed that after treatment, the percentage of T-lymphocyte apoptosis and the FasL gene expression in the Kidney tonifying group of aged subjects were lower than those in the placebo group ($P < 0.01$). Animal experiment showed the same result as shown in clinical study in Kidney tonifying recipe treated rats, but not shown in those treated with blood circulation promoting recipe statistically. **Conclusion:** Kidney tonifying principle has down-regulating effect on the transcription of apoptotic gene in both aged persons and old rats, this is one of the molecular mechanisms of Kidney tonifying method in decreasing over-apoptosis in aged subjects and old rats.

Key words immunosenescence, FasL gene, Kidney tonifying principle, Kidney tonifying recipe, blood circulation promoting recipe, cell apoptosis

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⁾。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 T 细胞凋亡有助于阐明老年 T 细胞功能改变的机理⁽²⁾,此后 Ph-elouzat 以及 Aggarwal 的研究中相继证实衰老时 T 细胞呈过度凋亡^(3,4),但尚未有提出对 T 细胞凋亡的调控手段或报道。

我们从 1998 年起对健康老年人采取随机分组、双盲给药(补肾方即补肾益寿胶囊和安慰剂),比较 T 细

胞凋亡率及 Fas、FasL 基因调控的差异。又采用“以药测证”的方法比较分析了两个补肾方(右归饮和补肾益寿胶囊)和活血方(桃红四物汤)对老年大鼠 T 细胞凋亡率及 Fas、FasL 基因表达的调控作用^(5,6),旨在探讨老年肾虚 T 细胞功能减退的原理,并以此比较肾虚、血瘀与衰老的关系。

临 床 研 究

1 材料与方

1.1 临床资料 经体检及心电图、血液和生化指标等常规检查的健康老年人(60~89 岁)44 名进入实验,按性别(男 20 名,女 24 名)年龄配对后,随机分为

^{*} 本课题为国家自然科学基金资助(No.39870917)

复旦大学医学院中西医结合研究所(上海 200040)

补肾益寿组和安慰剂组。另外选取 30 名 18~30 岁健康年轻人,男女各 15 名作为对照组(简称青年组)。

1.2 药物 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,每粒含生药 9g,由四川涪陵太极集团提供。安慰剂胶囊与补肾益寿胶囊在外观上无任何差别,所用胶囊编为 1 号药和 2 号药,每次 0.6g,每日 3 次,连服 3 个月。直至实验全部结束,统计出结果才揭盲。

1.3 细胞制备及激活 采用肝素抗凝,用 Ficoll 密度梯度离心法分离出单个核细胞,淘洗法制备 T 细胞,调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$,在 6 孔培养板(NUCLON,Denmark)中用含 10% 胎牛血清(Gibco 产品,USA) $25\text{ng}/\text{ml}$ 抗 CD_3 单抗(Pharmingen 产品) $20\text{u}/\text{ml}$ 重组白介素-2(rIL-2,上海华新生物公司产品)的 RPMI 1640(Gibco 产品)培养基,于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 48h,离心收集细胞,重悬于含胎牛血清和 rIL-2 的 RPMI 1640 培养基,在培养的第 6 天,加入抗 Fas 单抗(Pharmingen 产品),其终浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,培养 16h。

1.4 TUNEL 标记的流式细胞术检测 离心收集细胞,用 4% 多聚甲醛(Sigma 产品)固定 60min,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。用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson, USA)参照对照计算出凋亡细胞百分率(%)。

1.5 细胞总 RNA 的提取 参照 TRIzol Reagent(Gibco)说明书,每组取 1×10^7 个细胞,采用 1ml TRIzol Reagent 裂解,然后加 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 $20\mu\text{l}$ 无 RNA 酶水中, -80°C 储存,取 $1\mu\text{l}$ 稀释至 $100\mu\text{l}$,测 A_{260} 和 A_{280} 。另取 $2\mu\text{l}$ 作电泳分析。本次 RNA 样品 $A_{260/280}$ 为 1.7~1.9。

1.6 引物设计、合成 设计的引物序列如下:
Fas 上游引物 5'TGA AGG ACA TGG CTT AGA AGT G 3'
Fas 下游引物 5'GGT GCA AGG GTC ACA GTG TT 3'
Fas 探针 5'(FAM)AAA CTG CAC CCG GAC CCA GAA TAC C(TAMRA)3'
FasL 上游引物 5'GCA GCC CTT CAA TTA CCC AT 3'
FasL 下游引物 5'CAG AGG TTG GAC AGG GAA GAA 3'
FasL 探针 :5'(FAM) TCC CCA GAT CTA CTG GGT GGA CAG C(TAMRA)3'
GAPDH(为内参照基因)上游引物 :5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'
GAPDH 下游引物 5'GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC 3'
GAPDH 探针 :5'(FAM) CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC

(TAMRA)3'

使用美国 PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪合成引物。超纯水稀释引物,配成引物储备液浓度为 $50\text{pmol}/\mu\text{l}$ 。

1.7 逆转录反应及标准 PCR 检测 逆转录反应在 9600PCR 仪上进行。标准 PCR 反应条件如下:
 95°C ,5min,加入 Taq 酶, 93°C 30s; 58°C 45s; 72°C 1min,30 个循环后, 72°C 5min。取 PCR 产物 $10\mu\text{l}$,于 1.5% 琼脂糖凝胶, $10\text{V}/\text{cm}$ 凝胶的电压条件下电泳。

1.8 荧光实时定量 PCR 检测 PCR 反应采用 TaqMan Gold PCR 试剂在先进的 5700 荧光实时定量 PCR 仪(Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)上进行,使用 Sequence Detection System 软件分析各检测样本的 Ct (Threshold cycle)值。 Ct 值的变化随模板浓度的增大而减小,因此 Ct 值越大,则表示其 mRNA 表达水平越低,反之亦然。

1.9 统计学方法 组间比较采用 t 检验。
2 结果

2.1 补肾益寿方对老年人 T 细胞凋亡的影响 见表 1。补肾益寿组和安慰剂组服药前 T 细胞凋亡率均显著高于青年组($P<0.01$)。补肾益寿组和安慰剂组服药前 T 细胞凋亡率差异无显著性;补肾益寿组服药后与服药前比较,T 细胞凋亡率显著降低($P<0.01$),而安慰剂组服药前后其 T 细胞凋亡率无显著改变。

我们在流式细胞术检测中比较了碘化丙啶(PI)染色和 TUNEL(末端)标记法,前者属传统的生化反应,后者属分子生物学研究,发现 TUNEL 标记法检测 T 细胞凋亡率有较高的敏感性。

表 1 3 组 T 细胞凋亡测定结果比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后
安慰剂	22	$26.07 \pm 10.42^*$	25.21 ± 10.39
补肾益寿	22	$27.03 \pm 10.05^*$	$19.56 \pm 7.70^\Delta$
青年	30	18.90 ± 5.29	—

注 :与青年组比较,* $P<0.01$;与本组治疗前比较, $^\Delta P<0.01$

2.2 补肾益寿方对老年人 T 细胞 Fas、FasL 基因 mRNA 水平的影响 见表 2。补肾益寿组和安慰剂组服药前 T 细胞 Fas 基因的 mRNA 水平均显著高于青年组($P<0.05$)。服用药物和安慰剂对 T 细胞 Fas 基因的转录均无显著影响。

补肾益寿组和安慰剂组服药前 T 细胞 FasL 基因的 mRNA 水平均显著高于青年组($P<0.01$)。补肾益寿组和安慰剂组服药前 T 细胞 FasL 基因的 mRNA 水平差异无显著性;补肾益寿组服药后与服药前相比其 T 细胞 FasL 基因的 mRNA 水平显著降低($P<0.05$),而安慰剂组服药前后 T 细胞 FasL 基因的 mR-

NA 水平无显著改变。说明补肾益寿方下调老年人原已升高的 FasL 基因 mRNA 水平,从而降低了 T 细胞凋亡率。

表 2 补肾益寿胶囊对老年人 T 细胞 Fas、FasL 基因 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Fas/GAPDH	FasL/GAPDH
安慰剂	22 治疗前	1.289 ± 0.091 *	1.328 ± 0.113 **
	治疗后	1.295 ± 0.070	1.333 ± 0.072
补肾益寿	22 治疗前	1.300 ± 0.053 *	1.320 ± 0.074 **
	治疗后	1.036 ± 0.057	1.388 ± 0.110 [△]
青年	30	1.348 ± 0.091	1.402 ± 0.113

注:与青年组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与本组治疗前比较,[△] $P < 0.05$ GAPDH 为内参照基因

实验研究

1 材料与方法

1.1 药物 经典补肾复方(右归饮)组成:附子、肉桂、熟地、山茱萸、山药、仙灵脾、茯苓、甘草。自拟补肾复方(补肾益寿胶囊)组成:制首乌、黄精、枸杞子、仙灵脾、人参、灵芝等。经典活血复方(桃红四物汤)组成:桃仁、红花、生地、白芍、当归、川芎。右归饮和桃红四物汤分别水煎醇提,过滤取上清,调药物浓度至 200%,高压灭菌备用。补肾益寿胶囊由四川涪陵太极集团提供,用双蒸水制成浓度为 1.8g/ml 原液,使用前稀释成浓度为 3.6%(v/v)的使用液。

1.2 动物及分组 18 月龄雄性 SD 大鼠 40 只,随机分老年对照组、右归饮组、补肾益寿组、桃红四物组,每组 10 只;药物组每日按 10g/kg 体重口服相应药物(自由饮用),连续 6 个月,老年对照组常规喂养。本次实验以 24 月龄作为老年鼠,另设 5 月龄年轻对照组(10 只)。

1.3 细胞制备及激活 用 Ficoll 密度梯度离心法分离出大鼠脾单个核细胞,淘洗法制备 T 细胞,于预先包被了抗 CD₃ 单抗的 24 孔培养板中,用含 10% 胎牛血清、20U/ml rIL-2 的 RPMI 1640 培养基,在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 18h。

1.4 TUNEL 标记的流式细胞术检测 参见临床研究 1.4。

1.5 细胞总 RNA 的提取 参见临床研究 1.5。

1.6 引物合成 Fas、FasL、GAPDH 引物及 PCR RT-PCR 引物由 GIBCOBRL 公司合成。引物序列为:
Fas3' CTCTGGATCCTGATACCACTGGAGCAG
Fas5' CTCGAATTCCTCTCTGTGACACTGTTATC
FasL3' CTCTGGATCCCAAGACTGACCCCGGAAGTA
FasL5' CTCGAATTCTGCCTCCACTAAGCCCTCTA
GAPDH3' CTCTGGATCCCCTGCTTCACCACTTCT-TG
GAPDH5' CTCGAACCATCACCATCTTCCA-GGAG

PCR 反应采用 9600 型热循环仪,每管 PCR 产物均以电泳鉴定。

1.7 PCR 产物的克隆、测序及转录 克隆参照分子克隆实验指南,用四色荧光 DNA 自动测序法测定 DNA 序列,体外转录参照 DIG Northern Starter Kit 说明书进行。

1.8 RNA 酶保护 参照文献^[7]及 DIG Northern Starter Kit (Boehringer Mannheim GmbH)说明书进行。

1.9 统计学方法 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 补肾、活血复方对 T 细胞凋亡的影响 见表 3。与年轻组相比,老年对照组 T 细胞凋亡率明显增高($P < 0.01$),提示老年期 T 细胞处于过度凋亡状态;与老年对照组比较,右归饮组和补肾益寿胶囊组 T 细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$),桃红四物组 T 细胞凋亡率差异无显著性,提示老年期 T 细胞过度凋亡与肾虚相关。

表 3 补肾、活血复方对老年大鼠 T 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm Sp$)

组别	n	T 细胞凋亡率
年轻	10	22.17 ± 0.58
老年对照	10	47.00 ± 0.70 *
右归饮	10	31.24 ± 0.49 [△]
补肾益寿	10	37.19 ± 0.46 [△]
桃红四物	7	43.40 ± 0.49

注:与年轻组比较,* $P < 0.01$;与老年对照组比较,[△] $P < 0.05$

2.2 补肾、活血复方对 Fas、FasL 基因的表达式的影响 见表 4。与年轻组比较,老年对照组 Fas/GAPDH、FasL/GAPDH 比值(GAPDH 为内参照基因)均明显增高($P < 0.01$);与老年对照组比较两个补肾组 FasL/GAPDH 比值差异均有显著性($P < 0.01$);桃红四物组 FasL/GAPDH 比值差异无显著性($P > 0.05$)。提示只有补肾复方具有下调 FasL 基因转录的作用。

表 4 补肾、活血复方对老年大鼠 Fas、FasL 基因表达的影响 (比值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas/GAPDH	FasL/GAPDH
年轻	10	0.36 ± 0.16	0.26 ± 0.12
老年对照	10	0.81 ± 0.17 *	0.84 ± 0.12
右归饮	10	0.78 ± 0.11	0.71 ± 0.21 [△]
补肾益寿	10	0.78 ± 0.20	0.68 ± 0.15 [△]
桃红四物	7	0.99 ± 0.36	0.94 ± 0.15

注:与年轻组比较,* $P < 0.01$;与老年对照组比较,[△] $P < 0.01$

讨论

有关衰老机理的学说不下数十种,自 1964 年 Blu-

menthat 等提出免疫衰老学说以来,人们特别关注于 T 细胞凋亡和衰老的关系。由于细胞适当的凋亡是维持机体稳态的重要手段,近年发现老年期 T 细胞过度凋亡是免疫功能下降而致病的常见原因,故而通过调节 T 细胞凋亡而延缓免疫衰老正成为一种新的抗衰老策略。

中医学亦认为衰老是由多种原因所致《素问·上古天真论》中以女子七、男子八为基数递进的生长、发育、壮盛、衰老,反映肾气盛衰曲线,是中医历代对衰老原理有代表性的看法。自古至今亦有主张瘀血是衰老的原因,因此在动物实验中设立两个不同的补肾复方组,另以活血化瘀复方组进行比较。

本研究首先观察到老年人和老年大鼠 T 细胞凋亡率都明显高于年轻人和年轻大鼠($P < 0.01$),说明老年期 T 细胞的确处于过度凋亡的状态。T 细胞凋亡受到细胞内基因表达的严密控制,导致 T 细胞“自杀”的杀手基因(killer gene)为 Fas、FasL 基因,其中 FasL 为主导,与其受体 Fas 结合而启动凋亡途径,故被称为死亡因子(death factor)。本研究亦证实了老年鼠和老年人在 T 细胞过度凋亡的同时,伴有 Fas、FasL 基因高表达,与老年 T 细胞过度凋亡的研究结论相一致。

为观察补肾药对老年期 T 细胞凋亡的影响,临床研究采用双盲、安慰剂对照的方法,结果老年人服用补肾益寿胶囊组 T 细胞凋亡率显著下降($P < 0.01$),相应见到 FasL 基因 mRNA 表达下调($P < 0.01$),而安慰剂组均无变化。实验研究采用两个补肾复方组与老年对照组相比,T 细胞凋亡率都明显降低($P < 0.01$),相应见到 FasL 基因 mRNA 水平均低于老年对照组($P < 0.01$),而活血组与老年对照组相比,均无变化。

这样,老年人与老年鼠都呈现为相同的规律,即补肾法使 FasL 基因高表达下调,从而调控老年人或老年鼠 T 细胞不至于过度凋亡。

中医学着重于从证效关系来判断辨证的正确性,两个不同的补肾复方都可延缓老年 T 细胞凋亡,表明是补肾法干预了衰老的进程,并证明衰老是生理性肾虚。从本研究采用补肾与活血(以药测证)的角度来推测衰老的本质,符合于《内经》所说肾虚是衰老的根本原因。

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. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. Science 1996; 273: 571—573.
3. 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.
4. 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; 160(4): 1627—1637.
5. 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.
6. 郑振, 沈自尹, 郑仲承, 等. 补肾与活血复方对老年鼠 T 细胞凋亡相关基因 Fas、FasL 转录的影响. 中国中西医结合杂志 2000; 20(11): 839—841.
7. 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.

(收稿 2001-10-08 修回 2001-11-18)

第九次全国中西医结合肿瘤学术研讨会征文通知

根据中国中西医结合学会 2002 年学术活动计划安排,定于 2002 年 10 月在北京召开第九次全国中西医结合肿瘤学术研讨会,届时并进行肿瘤专业委员会换届改选,现将有关征文事宜通知如下。

1 征文内容 (1)新世纪中西医结合肿瘤研究及发展方向进行相关论证 (2)中医药防治肿瘤实验研究、临床研究 (3)中西医结合防治肿瘤疗效评价、新方法、新药物及新进展 (4)中西医结合防治肿瘤放、化疗反应的研究 (5)其他防治肿瘤有效单方、验方、土方等。

2 征文要求 (1)来稿应实事求是,科学性强,并附单位介绍信或单位盖章 (2)寄全文(4000 字以内)1 份,摘要(800 字)1 份,摘要应以目的、方法、结果、结论顺序表达,无摘要者恕不录用,附软盘一张 (3)来稿务必写清作者、单位、邮编,字迹工整,请自留底稿,来稿一律不退 (4)截稿日期 2002 年 7 月 31 日(以邮戳为准)。

3 征文送交地点 100700 北京市东直门内北新仓 18 号中国中西医结合学会 施克明收,或 100053 北京市宣武区北线阁 5 号中国中医研究院广安门医院肿瘤科 花宝金收,信封上请注明“肿瘤会议征文”,E-mail: huabao.jin@sohu.com