

· 博士之窗 ·

补肾、活血类复方对老年大鼠 T 细胞凋亡 相关基因表达调控模式的比较研究 *

郭为民[△] 沈自尹[▲] 陈 瑜 陈伟华 应 健

内容提要 目的 探讨两个补肾复方(右归饮和补肾益寿胶囊)及活血复方下调老年大鼠 T 细胞凋亡的基因调控模式。方法 用 TUNEL 标记的流式细胞检测和荧光实时定量 RT-PCR 技术,研究老年大鼠和年轻大鼠 T 淋巴细胞抗凋亡和促凋亡基因(Fas、FasL、Bcl-2、Bax、TNFR₁、TNFR₂)的表达以及凋亡级联反应中半胱氨酸蛋白酶(如 Caspase8 和 Caspase3)活性的差异,及比较两个补肾复方和活血复方对老年大鼠 T 细胞抗凋亡和促凋亡基因表达的调控以及对 Caspase 活性的影响。结果 两个补肾复方均能够有效地降低老年大鼠 T 细胞的过度凋亡,下调 FasL 及 TNFR₁ 基因的转录和 Caspase8 及 Caspase3 的活性。而活血复方对于 T 细胞的过度凋亡无显著作用。结论 激活诱导的 T 细胞过量凋亡与肾虚密切相关,两个补肾复方均可下调促凋亡基因 FasL 和 TNFR₁ 的转录,从而抑制老年大鼠过度的 T 细胞凋亡,是补肾法所特有的对老年 T 细胞凋亡相关基因的调控模式。

关键词 补肾复方 活血复方 老年大鼠 激活诱导 T 细胞凋亡 凋亡相关基因

Comparative Study on Regulation Patterns of Compound Prescriptions for Kidney Tonifying and for Blood Circulation Activating on T-cell Apoptosis Related Gene Expression in Aged Rats GUO Wei-min, SHEN Zi-yin, CHEN Yu, et al *Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Medical Center of Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective : To investigate the regulation pattern of the two compound prescriptions for Kidney tonifying, Yougui Yin and Bushen Yishou capsule, in down-regulating T-cell apoptosis gene expression in aged rats. **Methods :** Expressions of T-cell apoptosis promoting and inhibiting genes, including Fas, FasL, Bcl-2, Bax, TNFR₁ and TNFR₂, as well as activity of cysteine proteinase in cascade connection, such as Caspase 8 and Caspase 3 were determined by TUNEL labeled flow cytometry and fluorescence real-time quantitative RT-PCR technique. The difference between old and young rats was compared, and the different regulation patterns of the two compound prescriptions for Kidney tonifying and their effects on Caspase activity were compared with those of compound prescription for blood circulation activating. **Results :** The two compound prescriptions for Kidney tonifying could effectively lower T-cell over-apoptosis in old rats, down-regulate FasL and TNFR₁ gene transcription, and decrease the activity of Caspase 8 and Caspase 3, while the compound prescription for blood circulation activating showed insignificant effect on T-cell over-apoptosis. **Conclusion :** Kidney-deficiency is closely related to the T-cell over-apoptosis. The T-cell over-apoptosis in old rats could be effectively improved by the two compound prescription for Kidney tonifying through down-regulating the apoptosis promoting genes FasL and TNFR₁ transcription. That is the unique regulation pattern of Kidney tonifying principle to T-cell apoptosis related gene in old rats.

Key words compound prescription for Kidney tonifying, compound prescription for blood circulation activating, old rat, activation inducing T-cell apoptosis, apoptosis related gene

目前,免疫衰老与 T 细胞凋亡关系的研究已深入到

基因水平。1998 年美国 Aggarwal 等⁽¹⁾首次报道了免疫衰老时 T 细胞凋亡与 Fas、FasL、Bcl-2 等基因表达调控的改变密切相关。我们最近的工作观察到补肾复方能下调老年大鼠激活诱导的 T 细胞过度凋亡⁽²⁾,并对老年大鼠 T 细胞 FasL 基因的转录具有负调控效应⁽³⁾。因此,本

* 国家自然科学基金资助课题(No.30070907)

复旦大学医学院中西医结合研究所(上海 200040)

[△]博士后 [▲]导师
万方数据

实验通过研究补肾复方对老年大鼠 T 淋巴细胞抗凋亡和促凋亡基因(Fas、FasL、Bcl-2、Bax、TNFR₁、TNFR₂)表达的调控以及对凋亡级联反应中半胱氨酸蛋白酶(如 Cas-pase)活性的影响,进一步了解补肾复方下调老年大鼠 T 细胞凋亡的调控模式,从而进一步阐明中药抗衰老的作用机制。

材料与方法

1 药物制备 右归饮(补肾复方)药物组成: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: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。上述中药复方由上海童涵春堂药店制成浓度为 1.8g/ml 的原液,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(补肾复方)由制首乌、黄精、人参、枸杞子、仙灵脾、灵芝等组成,四川涪陵太极集团提供,每 0.3 克含生药 9g,用双蒸水制成浓度为 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 动物及分组 15 月龄 Wistar 大鼠 40 只,雌雄各半,由复旦大学医学院实验动物部提供,于清洁级动物房喂养至 18 月龄,再随机分为老年对照组、右归饮组、补肾益寿胶囊组、活血组,每组 10 只。各药物组每日按体重口服相应药物,具体给药剂量见参考文献⁽²⁾,连续 6 个月。本次实验中以 24 月龄大鼠作为老年大鼠,另设年轻组(5 月龄大鼠)10 只。老年对照组及年轻组常规喂养。

3 测定指标及方法

- 3.1 细胞制备及激活 见参考文献⁽²⁾方法。
- 3.2 TUNEL 标记的流式细胞术检测 见参考文献⁽²⁾方法。
- 3.3 细胞总 RNA 的提取 见参考文献⁽³⁾方法。
- 3.4 引物设计、合成 在 GenBank 中找出大鼠(Rattus norvegicus)的 Fas(APO-1/CD95)、FasL、TNFR₁/TNFR₂、Bax、GAPDH 的基因序列,使用 Primer Express 软件(Version 1.0 , Perkin-Elmer Applied Biosystems)设计引物。设计的引物序列如下:
Rat Fas Forward 5'GTACACGGACAGGAAA-CACT3'
Rat Fas Reverse 5'CACTGCACTTGCTATTCTG3'
Rat FasL Forward 5'CTCCACTAAGCCCTCTAAAG3'
Rat FasL Reverse 5'AAGGCTGTGTTGTTGTAAGT3'

- Rat GAPDH Forward 5'CATCAACGACCCCTTCATTG3'
- Rat GAPDH Reverse 5'GAAGATGGTGATGGGTTTCC3'
- Rat Bax Forward 5'GGTTTCATCCAGGATCGAGCA3'
- Rat Bax Reverse 5'CGTCAGCAATCATCCTCTGCA3'
- Rat Bcl2 Forward 5'TGGACAACATCGCTCTGTGGA3'
- Rat Bcl2 Reverse 5'TCAAACAGAGGTCGCATGCTG3'
- Rat TNFR₁ Forward 5'GCACCAAGTGCCACAAAGG-AA3'
- Rat TNFR₁ Reverse 5'TGCCAAGCTGTAAAGGTGCCT3'
- Rat TNFR₂ Forward 5'CAACCCCATCATTTGAACCAA3'
- Rat TNFR₂ Reverse 5'TCGCCAGTCCTAACATCAGCA3'

引物由上海生物工程公司使用美国 PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪合成引物。

3.5 逆转录反应及标准 PCR 检测引物设计与合成的质量 逆转录反应及标准 PCR 均在 9600 PCR 仪(Perkin-Elmer Applied Biosystems , USA)上进行。PCR 反应结束后,取 PCR 产物 10μl 进行电泳鉴定,于 1.5% 琼脂糖凝胶,10V/cm 凝胶的电压下电泳。

3.6 实时定量 PCR 检测 T 细胞凋亡相关基因的表达 PCR 反应采用 SYBR Green PCR 试剂,在 5700 实时定量 PCR 仪(Perkin-Elmer Applied Biosystems , USA)上进行 PCR 反应,并使用 Sequence Detection System 软件分析 PCR 过程各检测样本的 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。

3.7 Caspase 活性的检测 按照 Caspase 活性检测试剂盒(Clontech)使用说明书,检测 Caspase 8 和 Caspase 3 的活性。

4 统计学处理 组间比较采用 t 检验。

结 果

1 各组大鼠 T 细胞凋亡百分率测定结果 见表 1。老年对照组 T 细胞凋亡率显著高于年轻组(P < 0.01),右归饮组、补肾益寿胶囊组 T 细胞凋亡率与老年对照组比较均显著下降(P < 0.05 和 P < 0.01);活血组与老年对照组比较差异无显著性。

2 各组大鼠 T 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达测

表 1 各组大鼠 T 细胞凋亡测定结果比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	T 细胞凋亡
年轻	10	34.0 ± 8.2
老年对照	8	48.8 ± 9.9*
右归饮	10	41.1 ± 4.7 [△]
补肾益寿	10	38.6 ± 2.5 ^{△△}
活血	10	42.3 ± 6.8

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

表 2 各组大鼠 T 细胞促凋亡基因、抗凋亡基因的 mRNA 水平测定结果比较 (Ct 值 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas/GAPDH	FasL/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	TNFR ₁ /GAPDH	TNFR ₂ /GAPDH
年轻	10	1.376 ± 0.043	1.385 ± 0.061	1.190 ± 0.053	1.279 ± 0.049	1.423 ± 0.060	1.259 ± 0.039
老年对照	8	1.324 ± 0.053 *	1.318 ± 0.031 **	1.252 ± 0.057 *	1.268 ± 0.064	1.328 ± 0.060 **	1.318 ± 0.089 *
右归饮	10	1.351 ± 0.029	1.379 ± 0.069 [△]	1.236 ± 0.025	1.267 ± 0.036	1.386 ± 0.047 [△]	1.279 ± 0.033
补肾益寿	10	1.363 ± 0.048	1.366 ± 0.057 [△]	1.226 ± 0.043	1.267 ± 0.052	1.404 ± 0.068 [△]	1.297 ± 0.056
活血	10	1.342 ± 0.041	1.343 ± 0.060	1.216 ± 0.041	1.252 ± 0.053	1.387 ± 0.050 [△]	1.286 ± 0.040

注:与年轻组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与老年对照组比较,[△] $P < 0.05$;GAPDH 为内参照基因

定结果比较 见表 2。与年轻组比较,老年对照组大鼠促凋亡的 Fas、FasL、TNFR₁ 基因的转录水平均高于年轻组大鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Bax 基因未见显著变化,而抗凋亡的 Bcl-2、TNFR₂ 基因的转录水平则低于年轻组大鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)提示老年大鼠 T 细胞过度凋亡与促凋亡基因的高表达以及抗凋亡基因的低表达相关。从两个补肾方(右归饮与补肾益寿胶囊)及活血方与老年对照组的比较中,可见两个补肾方都可下调促凋亡的 FasL、TNFR₁ 基因的表达,活血方仅表现能下调促凋亡的 TNFR₁ 基因表达。

3 各组大鼠 T 细胞 Caspase 8、Caspase 3 活性测定结果比较 见表 3。与年轻组比较,老年对照组大鼠 T 细胞凋亡级联反应中的 Caspase 8 和 Caspase 3 均被激活。从两个补肾方(右归饮与补肾益寿胶囊)及活血方与老年对照组的比较中,可见两个补肾方均可削弱 Caspase 8 和 Caspase 3 的活性,活血方对 Caspase 8 和 Caspase 3 的活性无干预作用。

表 3 各组大鼠 T 细胞 Caspase 8、Caspase 3 活性测定结果比较 (OD 值 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase 8	Caspase 3
年轻	6	0.391 ± 0.112	0.444 ± 0.071
老年对照	6	0.668 ± 0.137 *	0.591 ± 0.047 *
右归饮	6	0.449 ± 0.054 [△]	0.472 ± 0.081 [△]
补肾益寿	6	0.424 ± 0.114 [△]	0.478 ± 0.081 [△]
活血	6	0.529 ± 0.091	0.502 ± 0.082

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

讨 论

凋亡是一种受基因调控的程序性细胞死亡过程。程序性细胞死亡过程为遗传决定的复杂分子过程,包括 3 个基本时相,即启动诱导相、效应相和清除降解相⁽⁴⁾。启动相是接受了体内外指令性凋亡信息分子或信号如 NO、TNF α 、CD₃ 等的触发诱导,效应相则是很多促凋亡和抗凋亡基因处于相互促进、相互制约的形式,组成一个完整的细胞凋亡机制网络系统保持动态平衡,一旦失去平衡则进入清除降解相。Caspase 家族在凋亡机制网络中居中心地位⁽⁵⁾,以 Fas、FasL 介导的凋亡为例,Caspase8 是级联反应的启动酶,被激活后形成诱导死亡信号复合体(death-inducing signalling com-

plex),作用于级联反应的效应酶 Caspase3,也就是最后的执行者,由此激活核酸内切酶,使 DNA 降解,从 50kb 的大片段碎裂到 180~200bp 的寡聚体这样的小片段,导致了凋亡。

本研究采用目前国际上广泛运用的抗 CD₃ 单抗激活诱导细胞凋亡的研究模型,还使用荧光实时定量 RT-PCR 代替常规 RT-PCR,通过分析各待测标本的 Ct 值的变化进行定量。此次观察到两个补肾复方均能下调老年大鼠促凋亡 FasL 基因的表达,而 Fas 基因未见变化,这一事实重复了我们以前的结果^(2,3)。

FasL 是 II 型膜蛋白,属于肿瘤坏死因子家族,是一种“死亡因子”。FasL 与 Fas 的结合可诱导表达 Fas 的细胞死亡,FasL 与 TNFR₁ 具有一同源结构域(现已定义为死亡域)⁽⁶⁾,此次观察到用抗 CD₃ 单抗为诱导物,两个补肾复方并未上调抗凋亡基因的表达,而是通过下调促凋亡的 FasL 及 TNFR₁ 基因表达,同时抑制清除降解相的蛋白水解酶 Caspase 8 与 Caspase 3 的活性,形成了补肾法所特有的 T 细胞凋亡基因调控模式。

至于促凋亡基因 FasL 与 TNFR₁ 之间的关系,有人设计了小鼠体外 T 细胞凋亡 FasL 与 TNFR₁ “时间差”的动力学实验中,观察到 TNFR 引起的死亡比 Fas 引起的死亡推迟了 24h 左右⁽⁷⁾,提示在本研究中,影响促凋亡的过程仍以 FasL 为主导。

尽管活血复方也可下调 TNFR₁ 的转录水平,但是对于老年大鼠 T 细胞的过度凋亡无明显改善。以药证本是验证中医学理论的强有力手段,因此,本研究进一步证明在老年大鼠采用激活诱导的 T 细胞过度凋亡与肾虚密切相关,也就是说衰老是生理性肾虚。补肾复方下调促凋亡基因 FasL 与 TNFR₁ 的转录从而下调老年时过度的 T 细胞凋亡是补肾法所特有的调控模式,也是补肾延缓免疫衰老的重要途径。

参 考 文 献

- 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.
- 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 ,郑仲承 ,等. 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. 中国中西医结合杂志 2000 20(11):839—841.

4. Peter ME , Heufllder AE , Hengartner MO. Advances in apoptosis research. Proc Natl Acad Sci USA 1997 94:12736—12737.

5. Thornberry NA , Lagebnik Y. Caspases : enemies within.

Science 1998 281:1312—1316.

6. Kiston J. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. Nature 1996 384:372—375.

7. Li Xin-zheng , Fish G , Miller RE , et al. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. Nature 1995 377:348—361.

(收稿 2001 - 10 - 08 修回 2001 - 11 - 18)

山绿茶降压片与卡托普利逆转高血压左室肥厚的疗效比较

惠元诚¹ 束志勤²

1998 年 4 月 ~ 2000 年 3 月 ,我们用山绿茶降压片与卡托普利逆转高血压左室肥厚(LVH) ,并进行疗效比较 ,报道如下。

临床资料

1 病例选择 参照 1978 年 WHO 的高血压病诊断标准 ,选择 (1) 坐位收缩压(SBP) ≥ 160mmHg 和(或) 坐位舒张压(DBP) ≥ 95mmHg 的原发性高血压患者 (2) 左室重量指数(LVMI) 男 > 125g/m² , 女 > 120g/m² (张维忠 , 等 . 中国高血压病杂志 1993 (1):5—8) 。排除 (1) 继发性高血压 (2) 严重的心、肝、肾疾患 (3) 对血管紧张素转换酶(ACE) 抑制剂和噻嗪类利尿剂有禁忌症者 (4) 服 ACE 抑制剂超过 8 周者。

2 一般资料 33 例按随机数字表法分成两组。治疗组 17 例 ,男 12 例 ,女 5 例 ,年龄 54 ~ 73 岁 ,平均 (67.2 ± 11.0) 岁 ,病程 (15.3 ± 3.9) 年。对照组 16 例 ,男 12 例 ,女 4 例 ;年龄 57 ~ 74 岁 ,平均 (68.1 ± 10.8) 岁 ,病程 (16.4 ± 4.7) 年。两组资料比较差异无显著性 (P > 0.05) ,具有可比性。

方 法

1 治疗方法 治疗组用山绿茶降压片(每片含生药 1.8g ,桂林永福制药厂生产) 每次 2 片 ,每天 3 次口服 ,2 周后血压 > 170/100mmHg 者 (10 例) 剂量加倍 ,4 周后血压 > 160/95mmHg 者 (13 例) 加氢氯噻嗪每天 12.5 ~ 25mg。对照组用卡托普利 (常州制药厂生产) 每次 12.5 ~ 25mg ,每天 2 ~ 3 次口服。如血压同上 2 周后剂量加倍 (10 例) ,4 周后加氢氯噻嗪每天 12.5 ~

25mg (9 例) 。两组疗程均为 6 个月。治疗期内不加用其他降压药物。

2 测定方法 治疗前 2 周停用降压药 ,给予安慰剂。清洗期末非同日测量 3 次血压 ,每次测量 3 次 ,取平均值作为基础血压。血压测量用校正的水银柱式血压计。测血压前即刻测量心率(HR) 。用彩色多普勒超声仪(Apogee800、ATL HDI - 3000、SD - 8000) 由专人负责(按照美国超声心动图学会(ASE) 推荐方法) 测量舒张末期室间隔厚度(IVST) ,舒张末期左室壁厚度(LVPW) ,舒张末期左室内径(LVDd) ,取 3 个心动周期的均值。根据 Devereux 校正公式计算左室重量(LVM) 。每月随访 1 次血压和心率 ,询问不良反应。6 个月后复查超声心动图。治疗前后查肝、肾功能 ,空腹血糖 ,血电解质。统计学方法 :采用 t 检验。

结 果

1 两组患者治疗前后血压、心率及 LVH 逆转情况 见表 1。6 个月后 ,两组 SBP 和 DBP 比治疗前均有明显下降 (P < 0.01) 。治疗组 LVH 各项指标治疗后与治疗前比较差异无显著性。对照组 LVMI 治疗后与治疗前比较差异有显著性 (P < 0.05) 。两组 HR 治疗前后比较差异均无显著性。

2 不良反应 治疗组服药期间有 2 例出现低钾血症(与口服氢氯噻嗪有关) ,余未见明显不良反应。对照组干咳 5 例 , 心肌酶一过性升高 1 例。

表 1 两组患者治疗前后血压、HR 和左室肥厚指标测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数		SBP	DBP	HR	IVST	LVPW	LVDd	LVMI
			(mmHg)		(次 / min)	(mm)		(g / m ²)	
治疗	17	治疗前	171.2 ± 8.3	104.5 ± 3.5	78.0 ± 9.2	12.9 ± 1.2	12.4 ± 1.1	47.2 ± 3.5	132.7 ± 21.4
		治疗后	153.1 ± 8.5 **	93.9 ± 4.4 **	80.9 ± 10.2	12.3 ± 1.0	12.2 ± 0.9	47.3 ± 3.3	127.1 ± 15.8
对照	16	治疗前	172.4 ± 9.1	105.6 ± 4.8	79.0 ± 10.9	13.1 ± 1.3	12.5 ± 1.0	47.4 ± 3.7	135.4 ± 23.3
		治疗后	151.2 ± 7.3 **	92.4 ± 3.5 **	77.8 ± 11.5	12.1 ± 1.1	11.9 ± 0.7	47.1 ± 3.4	122.2 ± 17.1 *

注 :与本组治疗前比较 , * P < 0.05 , ** P < 0.01

讨 论 山绿茶(*Ilex Hainanensis* Merr.)系冬青科冬青属植物 ,其叶片提取物含黄酮、三萜、酚类、鞣酸及山绿茶甙等成分 ,由提取物制成的山绿茶降压片有降压作用。本研究结果初步认为山绿茶降压片可延缓 LVH 进展 ,但逆转 LVH 的作用尚

未证实。推测原因如下 (1) LVH 逆转需要 6 ~ 8 个月以上治疗 ,本研究仅观察 6 个月 ,可能观察时间不够长。(2) 可能与山绿茶降压作用机制有关。高血压病干预治疗时 ,无合并症患者重点在于把血压控制到理想的目标血压。山绿茶降压片因其服用安全 ,副作用少 ,有临床应用价值。