

补肾、健脾、益气、活血法对衰老细胞周期基因表达的调控作用^{*}

陈方敏¹ 赵伟康¹ 徐品初¹ 黎志萍² 姚明忠¹

摘要 目的:比较补肾、健脾、益气、活血法对衰老细胞周期基因表达的调控作用。方法:采用上述 4 种不同的含药血清对衰老的人胚肺二倍体成纤维细胞 2BS 细胞株进行处理,通过细胞寿命实验、流式细胞仪、RT-PCR、Western blot 方法研究不同中药对衰老细胞周期及其相关基因(P16^{INK4}、Cyclin D1 及 PCNA)的 mRNA 转录和蛋白表达的影响。结果:补肾、益气中药对衰老细胞周期有一定的促进作用,并可下调衰老细胞增殖抑制基因 P16 和周期蛋白 Cyclin D1 的 mRNA/蛋白表达;上调细胞周期促进增殖基因 PCNA mRNA/蛋白的表达。而健脾、活血中药对细胞周期及其相关基因和蛋白表达的作用不明显。结论:补肾、益气方药对细胞周期有促进作用,其中的作用可能是通过促进 P16 途径的基因表达来实现。

关键词 补肾 益气 健脾 活血 衰老 人胚肺二倍体成纤维细胞 细胞周期相关基因调控

Comparative Study on the Regulatory Effects on Senescence Related Cell Cycle Gene Expression by TCM Principles of Tonifying Shen, Invigorating Pi Benefiting Qi, and Activating Blood Circulation CHEN Fang-min, ZHAO Wei-kang, XU Pin-chu, et al *Institute of Geriatrics, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To compare the effects of TCM therapeutic principles of tonifying Shen (TS), benefiting Qi (BQ), invigorating Pi (IP) and activating blood circulation (ABC) herbs in regulating the gene expression in senescence related cell cycle. **Methods:** Drug sera containing TCM herbs of the above-mentioned principles were used to treat the aged human diploid fibroblast cell line 2BS. The effect of TCM on the senescence related cell cycle and its related gene expression (P16^{INK4}, Cyclin D1 and PCNA) were examined by means of cell proliferative doublings, flow cytometry, RT-PCR and Western blot analysis. **Results:** TCM herbs of TS and BQ could improve the cell cycle, down-regulate the P16 and Cyclin D1 mRNA/protein expression, up-regulate PCNA mRNA/protein expression, while TCM herbs of IP and ABC showed insignificant effect on these indexes. **Conclusion:** TCM herbs of TS and BQ have effect in improving cell cycle, it may be achieved through promoting the P16 pathway of gene expression.

Key words tonifying Shen, benefiting Qi, invigorating Pi, activating blood circulation, ageing, human diploid fibroblast cell line 2BS, related gene regulation of cell cycle

综观历代文献中有关“耐老”、“不老”等方药,其治法基本属于补肾、健脾、益气、活血范畴。近代研究已表明上述 4 种方药在抗氧化、抗自由基、调节免疫功能、提高性腺功能、促进肝脏蛋白质合成等方面均有不同程度的作用^[1]。为了深入研究上述不同治法延缓衰老的分子生物学机理,我们根据中医学理论从补肾、健

脾、益气、活血经典方中分别选择出几味有代表性的中药组成小复方,以人胚肺成纤维细胞为模型,应用细胞与分子生物学技术,从细胞增殖调控角度,比较 4 种方药对衰老有关的细胞周期调控基因表达的影响,以探讨 4 种治法延缓衰老作用的异同点。实验采用中药含药血清方法进行。

^{*} 本课题为国家自然科学基金资助项目(No. 30070914)

材料与方法

1. 上海中医药大学老年医学研究所(上海 200032); 2. 上海中医药大学大学生化教研室

通讯作者 陈方敏 Tel: 021-54231346 E-mail: fangmin-chen@hotmail.com

万方数据

1 药物组成 补肾方药由熟地、何首乌、肉苁蓉组成(取自《圣济总录》地精丸);健脾方药由白术、淮山药、扁豆组成(取自参苓白术散);益气方药由党参、黄

芪、炙甘草组成(取自《时氏医道》保元汤)活血方药由川芎、当归、赤芍组成(取自经方四物汤),中药制剂采用水提醇沉法进行。

2 含药血清制备 健康雄性 SD 大鼠 50 只,由上海中医药大学实验动物中心提供。随机分为补肾、益气、健脾、活血和空白组,各给药组按照成人每日药量 30 倍计算,空白组喂生理盐水,均灌胃给药,连续 3 天,第 4 天上午末次给药 40min 后,乌拉坦腹腔注射麻醉,在严格无菌条件下腹主动脉取血,室温静置 1h,2 500r/min 离心 15min,分离血清,过滤除菌,密封,-80℃冰箱保存,临用时 56℃灭活 30min。

3 细胞培养 2BS 人胚肺成纤维细胞株,引自北京生物制品研究所。用 MEM 培养基,补充 10%小牛血清,青霉素 100U/ml,链霉素 100μg/ml,L-谷氨酰胺 200μg/ml,37℃、5% CO₂ 孵育箱培养,细胞长满时以 1:2 比例进行传代。

4 细胞分组 人胚肺 2BS 成纤维细胞株传代至 40 代以上,即认为其已达到衰老。本实验检测的细胞均为 40 代以上的衰老细胞。细胞分组为:空白组、血清对照组(简称正常组)、补肾组、健脾组、益气组、活血组、阳性药组。空白组未作任何处理,正常组采用未给药大鼠的血清进行培养,以排除鼠血清对细胞的影响,阳性对照药采用维生素 E100μg/ml。4 个给药组分别采用相应的含药血清。

5 细胞群体倍增数测定 按文献^[2]方法测定细胞寿命,即细胞常规培养,各给药组给 10%的含相应药物血清,阳性药组给维生素 E100μg/ml。各组细胞长满时,以 1:2 的比例进行传代,并记为一代。随着细胞代龄的增高,传代间隔时间逐渐延长,当细胞传代后连续 4 周不能够融合,则认为细胞已达寿限。

6 细胞周期测定 细胞接种于 25ml 培养瓶中,待细胞贴壁,用含 0.5% 小牛血清的培养基处理 48h,使细胞同步化后,分别用药物处理 72h,收集细胞,在流式细胞仪上检测。

7 RT-PCR 法^[3] 分组经药物处理的细胞,常规消化收集,按照 Trizol 试剂盒(美国 GIBCO 公司产品)按说明书一步法抽提总 RNA。RT-PCR 扩增参考《PCR 实用技术实验指南》方法略作修改,采用两步法进行。逆转录 cDNA 第一链合成,采用 M-MLV 酶进行逆转录。RT-PCR 引物设计如下:P16(460bp)

sense 5'-GGAGCAGCATGGAGCCTTC-3'
antisense:5'-TCAATCGGGATGTCTGAGG-3' CyclinD1(887bp)

sense 5'-ATGGACACACCAGCTCCTGTG-3'

antisense:5'-TCAGATGTCCACGTCCCGCA-3' PCNA(785bp)

sense 5'-GCCACTCCGCCACCATGTT-3'
antisense:5'-CTAAGATCCTTCTTCATCCTC-3' β-actin(378bp)

sense 5'-CCAGCCATGTACGTTGCTATCCAG-3'
antisense 5'-GGAACCGCTCATTGCCAATGGTGA-3'
PCR 扩增反应体系总体积 50μl,扩增程序为:95℃×30s→(变性 94℃×30s→退火 55℃×1min→延伸 72℃×2min)×30s 循环→72℃×5min→4℃保存。根据目的片段的长短,以及引物的 T_m 值进行设置退火温度及延伸时间。PCR 产物电泳鉴定电泳,紫外灯下观察,图像分析系统扫描。

8 Western blotting 法蛋白条带测定 参照《分子克隆实验指南》^[4]进行操作。将药物血清处理过的细胞,加单去污细胞裂解液(RIPA)冰浴 40min。将细胞刮下,4℃,12 000g/min,离心 5min,取上清,Lowry 法测定蛋白含量,-20℃冰箱保存,临用时,各组蛋白各取 30μg 上样,进行 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹反应,最后采用 Supersignal ECL 发光剂荧光显色,X 光胶片曝光,观察蛋白条带。

9 统计学方法 RT-PCR、Western-blot 结果采用电脑扫描。所有数据采用方差分析及 q 检验,经 SPSS 9.0 统计软件进行处理。

结 果

1 4 种中药复方对细胞传代代龄的影响 见表 1。与正常组比较,阳性药组、补肾组、益气组传代次数增加(P<0.05),而健脾和活血药作用不明显。提示补肾药、益气药与维生素 E 能够延长衰老细胞的寿限。

表 1 各组细胞传代代龄比较(代 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	代龄
空白	6	44.8±0.8
正常	6	45.5±0.6
阳性药	6	47.6±1.0*
补肾	6	50.8±1.9*
益气	6	48.2±2.3*
健脾	6	45.1±1.5
活血	6	45.3±1.0

注:与正常组比较,*P<0.01

2 4 种中药复方对细胞周期的影响 见表 2。流式细胞仪检测结果表明,与正常组比较,补肾、益气两组表现为 G₀/G₁ 期细胞减少,S+G₂/M 期细胞增加,显示其有促进衰老细胞增殖的作用,而健脾、活血两组表现不明显。

表 2 各组衰老细胞周期结果比较 (%)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S + G ₂ /M 期
空白	86.93	13.07
正常	88.95	11.05
阳性药	88.32	11.68
补肾	74.38	25.62
益气	77.94	22.06
健脾	89.30	10.70
活血	88.95	11.05

3 4 种中药复方对衰老相关细胞周期调控基因 mRNA 表达的影响 见图 1、2、3。RT-PCR 表达显示 :与正常组比较 ,补肾、益气组 P16 基因 mRNA 表达明显下调 ;补肾组 Cyclin D1mRNA 明显下调 ;PCNA 基因 mRNA 以补肾组、益气组上调最明显。

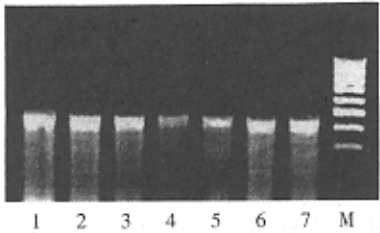


图 1 P16 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

注 M 分子量标准 ;1. 空白组 2. 正常组 3. 阳性药组 4. 补肾组 5. 益气组 6. 健脾组 7. 活血组 ;图 2、3 同

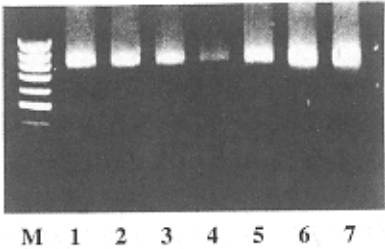


图 2 Cyclin D1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

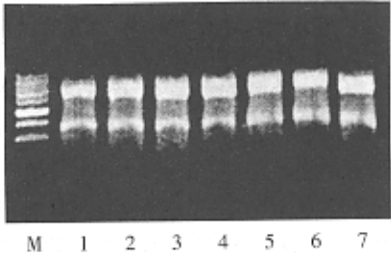


图 3 PCNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

4 4 种复方中药对衰老相关的细胞周期调控基因蛋白表达的影响 见图 4。蛋白印迹条带显示 ,与正常组比较 ,补肾组和阳性药组 P16 蛋白表达明显下调 ;各用药组 Cyclin D1 均有不同程度的下降 ,但以补肾组、益气组最明显 ;PCNA 蛋白条带则以补肾组上调最明显。万方数据

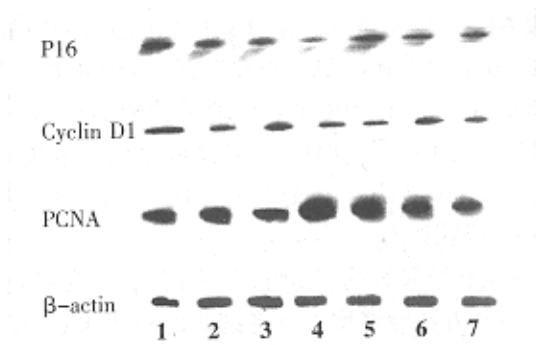


图 4 P16、Cyclin D1、PCNA 蛋白印记表达

注 从左到右依次为 1. 空白组 2. 正常组 3. 阳性药组 ; 4. 补肾组 5. 益气组 6. 健脾组 7. 活血组 ;印迹的大小表示蛋白表达量的多少 ,其中 β -actin 为内参照

讨 论

正常人类的细胞 ,在体外组织培养的序列传代过程中 ,逐渐丧失其增殖传代的能力 ,最终达到一种不可逆的增殖停滞状态。这一现象是由 Hayflick 及其同事在 1961 年研究人类二倍体成纤维细胞时最早报道的^[5]。这种增殖停滞状态细胞 ,可保持代谢活力的稳定状态 ,并能够维持数月甚至数年。这种似乎是无限期的增殖停滞状态被命名为衰老(senescence) ,而细胞达到衰老状态时的传代次数称为寿限。衰老是由细胞所经历的传代次数决定的 ,而与时间无关。一般来讲 ,人类胚胎的成纤维细胞在达到衰老时 ,能够复制 50 代左右(population doublings , PDs) ,由于这种衰老是由分裂传代而达到的 ,故将这一过程命名为复制衰老(replicative senescence)。细胞周期停滞是细胞衰老的一个关键特征^[6、7] ,研究发现衰老细胞的 DNA 含量与 G₁ 期细胞的 DNA 含量相同 ,因此认为衰老细胞停滞于 G₁ 期 ,不能顺利进入 S 期。生长停滞状态可分为可逆与不可逆两种。而细胞衰老是一种不可逆的生长停滞。细胞周期 G₁ 期的关卡是衰老的关键调控点。

近年来对细胞周期的研究取得了许多突破性的进展 ,发现并确立了细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase , CDK)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin dependent kinase inhibitor , CKI)在真核生物细胞周期调控中的重要作用^[8、9]。细胞能够顺利进行细胞周期主要是由 CDKs 的激活所介导的。CDKs 主要通过周期 Cyclin 相结合形成复合物而被激活。不同的 Cyclin-CDK 调控细胞周期不同时相之间的转换 ,其中 Cyclin 周期性积累与分解对细胞周期进程起着关键性作用。衰老

细胞周期不可逆的停滞于 G_1 期, G_1 期周期依赖性蛋白激酶-周期素复合物 CyclinE-CDK2, CyclinD1-CDK4/6 活力受到抑制。研究发现, 两种衰老细胞 G_1 期 CDK 抑制因子 P16 和 P21 的表达明显增高。年轻细胞中导入 P21^{CIP1}、P16^{INK4} 基因可出现衰老表现型, 因而 McConnell 认为 P21^{CIP1} 和 P16^{INK4} 是细胞寿命的关键调控基因^[10]。

本实验结果表明, 与老龄加血清组(正常组)比较, 补肾、益气方药能够增加衰老细胞的传代次数, 流式细胞仪测试显示, 补肾、益气方药对细胞进入 S 期有明显的促进作用, 表明该两种方药对衰老细胞周期有促进作用。从基因 mRNA 表达和蛋白表达的角度来看, 补肾、益气中药对于增殖抑制基因 P16、CyclinD1 的 mRNA 和蛋白的表达有下调作用, 而对增殖促进基因 PCNA 的表达有上调作用, 提示补肾、益气中药对细胞的增殖活力与细胞周期有促进作用, 该作用可能是通过抑制 P16 表达, 从而提高了周期蛋白, 即周期蛋白依赖性蛋白激酶(Cyclin-CDK)复合物的活性, 进一步增加了视网膜神经母细胞瘤蛋白 pRb 的磷酸化, 引起了细胞增殖相关的一系列基因的表达, 最终推迟了细胞的寿命, 而从本实验的结果来看健脾、活血中药对上述基因表达的作用不甚明显, 推测其延缓衰老作用可能主要通过其他环节而实现, 其具体作用机制有待于进一步探讨。

参 考 文 献

1 赵伟康, 林水森, 陈沙维, 等. 补肾健脾益气 and 血方药延缓衰

老作用的比较研究. 上海中医药大学学报 1999 ;13(4):39.

- 2 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养. 北京: 世界图书出版公司, 1996: 176—190.
- 3 CW 迪芬巴赫著. PCR 技术实验指南. 北京: 科学技术出版社, 1998: 201—208.
- 4 J 萨姆布鲁克著. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学技术出版社, 1992: 867—897.
- 5 Hayflick L, Morhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961 25:585—621.
- 6 Alcorta DA, Xiong Y. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ;93: 13742—13747.
- 7 Stein GH, Beeson M. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. Science 1990 249:666—669.
- 8 Lew DJ, Kornbluth S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. Curr Opin Cell Biol 1996 8:795—804.
- 9 Sclafni RA. Cyclin dependent kinase activating kinases. Curr Opin Cell Biol 1996 8:788—794.
- 10 Cristofalo JC. Age-dependent modification of gene expression in human fibroblasts. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression 1998 8(1):43.

(收稿 2002-11-11 修回 2003-08-26)

《中药新药与临床药理》杂志 2004 年征订启事

《中药新药与临床药理》杂志是由国家食品药品监督管理局主管, 广州中医药大学主办的一份学术性杂志, 是中药新药开发和中药临床药理研究的核心刊物, 为中国科技论文统计源期刊。主要栏目有: 论坛、专题报道、专家笔谈、临床研究、临床用药、药效及毒理学研究、质量分析研究、工艺研究、中药现代化、中药指纹图谱研究、不良反应与合理用药、新药介绍、新技术与新方法、讲座、学术探讨、综述、论著摘要、药政法规、企业之窗、信息、书评、国外药事、简讯等。

本刊为双月刊, 逢单月 25 日出版, 每册订价 10 元, 全年 60 元, 邮发代号: 46-210。标准刊号 ISSN 1003-9783, CN44-1308/R, 国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱, 本刊代号 4647BM)。开户银行: 中国农业银行广州市景泰办事处, 帐号: 44-067501040000058, 帐户: 中药新药与临床药理编辑部。

编辑部地址: 510405 广州市机场路 12 号大院《中药新药与临床药理》编辑部。电话: 020-36585483, 36585613, 86552367

E-mail: zz@adr.com.cn, zyxylc@pub.guangzhou.gd.cn

万方数据

《中国中西医结合急救杂志》2004 年征订启事

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性杂志(为中国中西医结合学会系列杂志之一, 由《中西医结合实用临床急救》杂志更名)。

本刊为双月刊, 64 页, 国际通用 16 开大版本, 80 克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2004 年的订阅手续, 邮发代号: 46-93, 定价: 6.9 元/期, 全年 41.4 元。订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误, 请将刊物寄回编辑部调换, 我们将负责免费邮寄新刊。

《中国中西医结合急救杂志》已被国际著名检索系统——俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VINITI)列为来源期刊, 并且已经进入“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、“em120.com 危重病急救在线”和国家中医药管理局“中国传统医药信息网”。网址为 <http://www.Medicine.China.com>。

地址: 天津市和平区睦南道 122 号天和医院内; 邮编: 300050。