

· 博士之窗 ·

枸杞子、淫羊藿对衰老 - 年轻 2BS 融合细胞 DNA 合成的影响 *

吴白燕¹ 邹俊华¹ 孟书聪¹ 郑 振² *RZ A*

摘要 目的:研究枸杞子、淫羊藿水提液对衰老 - 年轻 2BS 融合细胞 DNA 合成的影响。方法:以人胚肺二倍体成纤维细胞国内标准株 2BS 为衰老模型,用细胞脱核和细胞融合技术,观察枸杞子、淫羊藿对衰老 - 年轻 2BS 融合细胞的 DNA 合成的影响。结果:2BS 细胞分别在含 0.025(V/V)枸杞子、淫羊藿水提液的 DMEM 培养液中,可连续培养至 61.0 ± 2.9 、 56.0 ± 2.6 代,对照组为 49.0 ± 2.6 代($P < 0.01$);衰老的 2BS 细胞分别用枸杞子、淫羊藿水提液处理 2h 后,进行细胞脱核并与年轻 2BS 细胞融合,其 [³H]TdR 掺入百分率明显高于对照组($P < 0.01$)。结论:枸杞子、淫羊藿均能促进衰老 - 年轻 2BS 融合细胞的 DNA 的合成速率,延长 2BS 细胞寿命。

关键词 枸杞子 淫羊藿 细胞衰老 人胚肺二倍体成纤维细胞 DNA 合成

Effect of Wolfberry Fruit and Epimedium on DNA Synthesis of the Aging-Youth 2BS Fusion Cells WU Bai-yan, ZOU Jun-hua, MENG Shu-cong, et al *Department of Cell Biology and Genetics, Medical College, Peking University, Beijing (100083)*

Objective: To study the effect of water extracts of Wolfberry fruit (WB) and Epimedium (EM) on DNA synthesis of the aging-youth 2BS fusion cells. **Methods:** Human embryonic lung diploid fibroblasts 2BS national standard strain, were used as an aging model. Cell denucleation and cell fusion techniques were applied to observe the effect of WB and EM on DNA synthesis of 2BS fusion cells. **Results:** In the 0.025 (V/V) WB or EM water extract containing media, 2BS cells could be continuously cultured for 61.0 ± 2.9 passages and 56.0 ± 2.6 passages respectively, while in the control group it was only 49.0 ± 2.6 passages ($P < 0.01$). After treatment with WB and EM separately for 2 hrs, the aging 2BS cells were denucleated and fused with young 2BS cells. The [³H]TdR incorporation percentage in these treated cells was significantly higher than that in the untreated control cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** Both WB and EM can accelerate the DNA synthesis rate of the aging-youth 2BS fusion cells and prolong the life span of 2BS cells.

Key words Wolfberry fruit, Epimedium, aging of cell, human embryonic lung diploid fibroblast, DNA synthesis

枸杞子、淫羊藿是传统的补肾中药,现代研究表明,枸杞子、淫羊藿具有性激素样作用,能调节人体免疫功能^[1],因而常用于临床抗衰老。我们曾报道枸杞子、淫羊藿可以延缓 2BS 细胞的衰老,诱导衰老 2BS 细胞 c-fos 基因的转录^[2]。为了进一步阐明枸杞子、淫羊藿抗衰老的细胞和分子基础,本研究以人胚肺二倍

体成纤维细胞国内标准株 2BS 为衰老模型,采用细胞脱核和细胞融合技术,观察枸杞子、淫羊藿对衰老 - 年轻 2BS 融合细胞的 DNA 合成的影响。旨在探讨枸杞子、淫羊藿延缓细胞衰老的机制。

材料与方法

1 人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS)及 DMEM 培养液 购自卫生部北京生物制品研究所,2BS 细胞培养参照文献^[2]。本次实验中,2BS 细胞脱核及仙台病毒诱导的细胞融合,50 代龄为衰老细胞,20 代龄为年轻细胞。

* 国家自然科学基金资助项目(No.39800199)

1. 北京大学医学部细胞生物学与遗传学系(北京 100083);2. 复旦大学华山医院

通讯作者:吴白燕, Tel: 010 - 82801696, E-mail: baiyanwu@public.

fhnet.cn.net

2 枸杞子、淫羊藿水提取液 由北京中药五厂药研室提供,终浓度为 2g/ml。

3 药品和试剂 细胞松弛素 B、秋水仙素、Giemsa 染液均为 Sigma 公司产品; [^3H] TdR、[^3H] Leucine 购自中国科学院北京电子能研究所。

4 实验方法

4.1 衰老细胞标记 细胞核用 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] TdR 标记 48h, 细胞质用 5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] Leucine 标记 24h。融合产物的标志为: 单个无标记或轻标记细胞核, 细胞质呈轻标记; 单个重标记核或轻标记核, 细胞质呈轻标记。本次衰老细胞为 50 代龄。

4.2 灭活仙台病毒液的制备 取新鲜受精鸡卵, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 10 天。在无茵条件下注入 0.2ml 病毒液至尿囊腔。石蜡封口, 继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。抽取尿囊液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 400r/min 离心 10min, 取上清, 用 15W 灭茵用紫外灯距离 20cm 照射 10min。灭活后的病毒液于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

4.3 2BS 细胞脱核 参照文献^[3]。将 8×10^2 衰老细胞/ml 的细胞悬液接种于 22mm² 聚苯乙烯圆板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48h, 将圆板细胞面朝下, 置入脱核离心管中。每管加入 DMEM 培养液 15ml, 细胞松弛素 B 10 $\mu\text{g/ml}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 13000r/min 离心 30min, 取出细胞培养板, DMEM 培养液洗两遍, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恢复培养 1h。

4.4 仙台病毒诱导的细胞融合 在衰老细胞培养皿中加入灭活的仙台病毒(0.5ml 病毒液/22mm² 细胞培养板), 置 4 $^{\circ}\text{C}$, 15min; 加入去血清培养 72h 的年轻 2BS 细胞。置 4 $^{\circ}\text{C}$, 15min 后, 转至 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1.5h。用 DMEM 培养液洗两遍后, 用新鲜 DMEM 培养液 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2h。

4.5 光学显微镜放射自显影 融合细胞用 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] TdR 脉冲标记, Carnoy's 液固定 20min, PBS 洗两遍, 凉干, 于乳胶涂布箱内(箱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 、乳胶溶化水浴 4 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 90%、晾干箱温度 4 $^{\circ}\text{C}$) 平衡温度。恒温后在 1:1 稀释的核 4 乳胶中按浸膜法涂布乳胶。于凉干箱内干燥 4h 以上, 双层黑纸包裹暗盒于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中曝光 14 天, 显影、定影后, 用 Giemsa 染色, 封片后于显微镜观察。

4.6 融合细胞的鉴别 衰老-年轻 2BS 融合细胞的鉴别标准为: (1) 细胞质被 [^3H] Leucine 所标记; (2) 必须含有一个被 [^3H] TdR 轻标记的细胞核。

5 统计学方法 数据分别采用 t 检验和 χ^2 分析。

结 果

1 枸杞子、淫羊藿对 2BS 细胞寿命的影响 见

表 1。正常 24 代龄的 2BS 细胞, 分别在含 15% 小牛血清、0.025% 枸杞子、淫羊藿药物培养基中连续培养至第 III 相。继续培养 1 个月, 细胞未能汇合而终止培养。如表 1 所示, 枸杞子、淫羊藿均可有限地延长体外培养的 2BS 细胞的寿命。

表 1 枸杞子、淫羊藿对 2BS 细胞寿命的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	代龄
对照	6	49.0 $\pm$ 2.5
枸杞子	6	61.0 $\pm$ 2.9*
淫羊藿	6	56.0 $\pm$ 2.6*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

2 枸杞子、淫羊藿对衰老-年轻 2BS 融合细胞 DNA 合成的影响 见表 2。衰老的 2BS 细胞在脱核前分别用 0.025% 枸杞子、淫羊藿处理 2h, 然后进行脱核并与去血清培养 72h 的年轻 2BS 细胞融合。对于年轻细胞, 枸杞子、淫羊藿组 [^3H] TdR 掺入百分率与对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 在衰老-年轻融合细胞中, 对照组的 [^3H] TdR 掺入百分率明显降低 ($P < 0.01$); 枸杞子、淫羊藿组 [^3H] TdR 掺入百分率均高于对照组 ($P < 0.01$), 其差异有显著性。提示枸杞子、淫羊藿能促进融合细胞 DNA 合成。

表 2 枸杞子、淫羊藿对衰老-年轻融合

细胞 DNA 合成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	[^3H] TdR 掺入百分率(%)	
		年轻细胞	衰老-年轻融合细胞
对照	100	54	26
枸杞子	100	53	52*
淫羊藿	100	66	60*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

讨 论

Noorwood TH^[3] 以及 Yanishevsky RM^[4] 发现, 当衰老的与年轻的人二倍体成纤维细胞(human diploid fibroblast, HDF)融合后, 杂核细胞(heterokaryon)的两种细胞核都不能启动 DNA 合成。此后, 用衰老 HDF 与一些永生细胞融合后, 融合细胞的 DNA 合成也受到抑制。Drescher-Lincoln CK^[5] 等进一步用衰老 HDF 的胞质与年轻细胞融合, 结果也证实了这种 DNA 合成抑制现象, 但如果阻断衰老 HDF 的蛋白质与 RNA 合成后, 这种 DNA 合成抑制现象可以被消除。这些细胞遗传学研究资料揭示了细胞衰老的另一途径, 即细胞衰老并不仅仅因为一些对细胞增殖具有正调控的基因关闭, 而且衰老的 HDF 还可以产生一些对细胞增殖具有负调控的因子。同时还证明细胞衰老的表型是显性的。

我们通过液闪测定 [^3H] TdR 掺入 DNA 实验发

现,枸杞子、淫羊藿均能促进衰老-年轻 2BS 融合细胞的 DNA 的合成速率^[2]。同时,对于衰老的 2BS 细胞,枸杞子也具有明显的促进作用。由于细胞的 DNA 的合成受到许多正、负调控因子的影响,因此,我们进一步采用衰老 HDF 细胞的脱核及仙台病毒细胞融合技术,研究枸杞子、淫羊藿对衰老-年轻 2BS 融合细胞的 DNA 的影响,发现衰老-年轻 2BS 融合细胞用枸杞子、淫羊藿预先处理之后,其 [³H] TdR 掺入百分率均高于对照组,这表明枸杞子、淫羊藿延长 2BS 细胞生命期的原因之一可能就在于拮抗一些生长抑制因子的功能。但其具体作用环节尚有待进一步研究。

从细胞遗传学到分子遗传学这一研究途径,揭示了细胞衰老的一些本质特征,一些重要的生长抑制因子的分离、纯化及其基因的克隆也取得了重大的进展,但我们的实验中,仍然采用整体细胞融合的方法,来间接研究枸杞子、淫羊藿对生长负调控因子的拮抗作用,这主要是因为,迄今有关生长抑制基因与衰老相关的直接证据来自酵母,尚缺乏来自 HDF 细胞的研究资料,一些可能的生长抑制因子,如 SD1~3 系列,其功能以及与其他生长相关基因的产物之间的相互作用,尚有待深入研究。因此,我们现阶段研究为进一步从生长负调控角度探讨枸杞子、淫羊藿抗衰老效应提供了理论依据。

此外,衰老 HDF 细胞的脱核及其仙台病毒细胞融合实验在国内尚未见研究报道。我们在实验体系中,首先参照有关文献^[3],自行设计了一套 HDF 脱核装置。同时,在实验过程中结合国内实际情况,对细胞标记技术进行了改良,即采用 [³H] Leucine 及 [³H] TdR

对衰老 HDF 的细胞核、细胞质分别进行标记。结果表明:(1)我们设计制作的 HDF 脱核装置稳定可靠,操作简单,本次实验中脱核效率 90%,与国内外有关报道^[3]接近。(2)国内早期对融合产物的鉴别主要依据形态学标志,操作繁琐,且误差较大,此后采用 [³H] Leucine 及乳胶珠(Laten bead)标记技术,使目标细胞的鉴别较为准确。但乳胶珠购置较为困难,因此我们改用衰老 HDF 胞质及细胞核双标记方法,同样可以使目标细胞的标志十分简明,易于鉴别。不足之处在于增加了同位素使用次数,但在目前仍然是一种可行的替代方法。

参 考 文 献

- 1 许青媛.常用老年保健中药.北京:人民卫生出版社,1986:148.
- 2 郑振,谢竹藩,刘裕,等.枸杞子、淫羊藿延缓细胞衰老的研究.中国中西医结合杂志 1999;19(增刊):30—31.
- 3 Noorwood TH, Pendergrass WA, Sprague CA. Dominance of the senescent phenotype in heterokaryons between replicative and post-replicative human fibroblast-like cells. Proc Natl Acad Sci USA 1974;71:2231—2235.
- 4 Yanishevsky RM, Stein GH. Ongoing DNA synthesis continues in young human diploid cells (HDC) fused to senescent HDC, but entry into sphase is inhibited. Exp Cell Res 1980;126:469.
- 5 Drescher Lincoln CK, Smith JR. Inhibition of DNA synthesis in senescent-proliferating human cybrids is mediated by endogenous protein. Exp Cell Res 1984;153:208—217.

(收稿:2003-03-21 修回:2003-05-28)

2002 年《中国中西医结合杂志》优秀论文评选揭晓

本刊自 1992 年起设立“中国中西医结合优秀论文 505 奖励基金”,每年进行一次评选活动[详见本刊 1992;12(6):321]。2002 年度优秀论文评选活动现已结束,经全国 20 位专家评选和审阅,评选出一、二、三等奖论文各 1 篇,本社将对其颁发获奖证书及奖金(分别为 3000、2000、1000 元),以资鼓励。现颁布如下:

一等奖 血府逐瘀浓缩丸抗血小板活化的临床疗效与体外血清药理作用的相关性研究,2002;22(4):270,中国中医研究院西苑医院,雷燕等。

二等奖 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠单胺类神经递质影响的比较研究,2002;22(12):925,广州中医药大学中医基础理论教研室,严灿等。

三等奖 隐丹参酮诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究,2002;22(12):921,中山医科大学病理生理教研室,夏文杰等。

(本刊讯)