

· 博士之窗 ·

淋巴细胞基因表达谱揭示淫羊藿总黄酮重建
衰老免疫稳态的分子机制陈 瑜[△] 沈自尹^{△△} 陈伟华

摘要 目的 探讨淫羊藿总黄酮重建衰老免疫稳态的基因调控模式。方法 (1) 采用流式细胞技术定量分析老年组、年轻组及淫羊藿总黄酮组大鼠脾淋巴细胞凋亡百分率。(2) 采用基因芯片技术分析各组淋巴细胞基因表达谱。结果 (1) 细胞凋亡百分率: 老年组与年轻组比较, 淫羊藿总黄酮与老年组比较, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。 (2) 基因表达: 与年轻组比较, 老年组上调的基因有 116 个, 下调的基因有 215 个。与老年组比较, 淫羊藿总黄酮上调的基因有 447 个, 下调的基因有 456 个。涉及细胞凋亡、细胞增殖调控等方面。结论 (1) 以促凋亡基因表达上调、抗凋亡基因表达下调为主要特征的表达模式是衰老免疫稳态失衡的重要基因背景。(2) 淫羊藿总黄酮的作用规律在于逆转功能对立的促凋亡基因与抗凋亡基因、促增殖基因与抗增殖基因在衰老淋巴细胞中表达的异常, 重塑基因表达的良性平衡, 重建衰老免疫稳态。

关键词 免疫衰老 淋巴细胞 细胞凋亡 基因表达谱 淫羊藿总黄酮

Molecular Mechanism of Epimedium Flavonoids in Immune Homeostasis Remodeling in Aged Rats Revealed by Lymphocyte Gene Expression Profile CHEN Yu, SHEN Zi-yin, CHEN Wei-hua *Institute of Integrative Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective: To elucidate the gene regulatory pattern of Epimedium flavonoids (EF) in immune homeostasis remodeling in the aged rats. **Methods:** (1) To quantitatively analyse the apoptosis percentage of lymphocyte in spleen of aged, young and EF treated rats using flow cytometry. (2) To analyse the lymphocyte gene expression profiles of different groups using gene chips (Rat Genome U34A). **Results:** (1) Detection of lymphocyte apoptosis percentage showed that there was significant difference in comparing between aged group and young group, between EF treated group and aged group ($P < 0.01$). (2) As compared with that in the young group, in the aged group, 116 genes were up-regulated and 215 down-regulated. As compared with that in the old group, in the EF treated group, 447 genes were up-regulated and 456 down-regulated, which involved the aspects as cell apoptosis and cell proliferation regulation, etc. **Conclusion:** (1) The expression pattern characterized by up-regulation of apoptosis promoting genes expression and down-regulation of apoptosis inhibiting genes expression, is the important gene background of immuno-homeostasis imbalance in the aged. (2) The role of EF is to reverse the abnormal changes of gene expressions with opposite functions, i. e. the apoptosis promoting and inhibiting, proliferation enhancing and antagonizing genes, to reconstruct a beneficial equilibrium of gene expression and thus to further remodel the immuno-homeostasis in the aged.

Key words immunosenescence, lymphocyte, cell apoptosis, gene expression profile, Epimedium flavonoids

衰老伴随着免疫稳态的打破, 表现为免疫细胞数量减少、增殖能力下降、免疫效能降低等。免疫衰老是

老年个体感染性疾病、肿瘤、自身免疫病等患病率、死亡率增高的重要因素, 亦是老年个体寿命预后的重要参数。免疫稳态在衰老进程中的成功重建, 将有助于降低老年个体相关疾病的发病率、死亡率, 提高生存质量, 延缓衰老^[1]。

有研究表明, 淋巴细胞过度凋亡及对凋亡刺激易感性增高是衰老免疫稳态失衡的重要分子机制之

基金项目 本课题受上海市科委资助 (No. 0040190.32)

作者单位 复旦大学中西医结合研究所 (上海 200040)

[△] 博士生, ^{△△} 导师

通讯作者 沈自尹, Tel: 021-62489999 转 6311, Fax: 021-62490934,

E-mail: zysher@hotmail.com

一^[2]。细胞凋亡参与了免疫衰老进程中淋巴细胞数量的减少、增殖能力的下降及免疫效能的减低等,因此针对细胞凋亡进行的有效干预将有助于衰老免疫稳态的重建。故本研究拟对老年大鼠淋巴细胞即刻凋亡(spontaneous apoptosis)进行定量分析,并采用高通量的基因芯片技术分析其基因表达谱。同时进一步观察淫羊藿总黄酮(epimedium flavonoids, EF)对淋巴细胞凋亡及其基因表达谱的影响,目的是了解淫羊藿总黄酮重建衰老免疫稳态的基因调控模式,以阐明淫羊藿总黄酮重建衰老免疫稳态的分子机制。

材料与方法

1 动物分组 实验用清洁级 SD 大鼠 30 只由复旦大学动植物科学部提供,23 月龄,雌雄各半,随机分为两组,即老年对照组、淫羊藿总黄酮组,每组 15 只。淫羊藿总黄酮组给予 EF 灌胃,老年对照组同时给予蒸馏水灌胃,灌胃时间为 3 个月。另设 4 月龄 SD 大鼠 7 只作为年轻对照组。所有动物乙醚麻醉,无菌取脾,分离脾脏淋巴细胞。

2 药物制备 采用辽宁产朝鲜淫羊藿(Epimedium Kereanum Nakai),由上海市医药工业研究院中药室提取淫羊藿总黄酮,实验时用蒸馏水配制为 3g/100ml 的溶液,根据每天 0.06g/kg 体重灌胃。

3 试剂 淋巴细胞分离液为 Lympholyte-Rat (CL5045, CEDARLANE, CANADA);细胞凋亡检测试剂盒 Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Bioscience, USA);基因表达检测所需试剂:TRIzol Reagent (GIBCO BRL, Lifetechnologies, USA);Rneasy Mini Kit (Qiagen, Germany);采用 Gene Chip T7-oligo (dT) promoter primer Kit 及 Superscript II RT 合成 cDNA 第一链;采用 Enzo BioArray HighYield RNA Transcrip Labeling Kit3 (Affymetrix, USA)合成生物素标记的 cRNA;采用 Genechip Sample Cleanup Module 纯化生物素标记的 cRNA;采用 Test3 Array(Affymetrix)进行预实验,以确定 Biotin-labeled cRNA 质量。Test Chip 检测之后,采用 Rat Genome U34A Array (Affymetrix)对各组 cRNA 样品进行检测。

4 细胞凋亡百分率检测 采用流式细胞仪, PBS 洗涤淋巴细胞 2 次,以 $1 \times \text{binding buffer}$ 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,取 100 μl 样品,加入 5 μl Annexin V 和 5 μl PI,轻微混匀细胞,25℃ 暗室孵育 15min,每份样品中加入 400 μl $1 \times \text{binding buffer}$,流式细胞仪检测分析 Annexin V(+)PI(-)的细胞百分率。

5 淋巴细胞基因表达谱检测 采用基因芯片检

测并比较分析老年对照组和年轻对照组、淫羊藿总黄酮组和老年对照组差异表达的基因。具体方法如下:细胞内总 RNA 抽提、纯化、鉴定及定量之后,合成 cDNA 第一链、第二链。双链 cDNA 产物纯化后,采用 Enzo BioArray highyield RNA transcrip labeling kit3 合成生物素标记的 cRNA。进一步对 cRNA 产物进行定量和鉴定后,进行 cRNA 产物的片断化,片断化后的 cRNA 即可用于杂交。杂交反应在 hybridization Oven640(Affymetrix)中进行。进一步洗涤及染色,反应在 fluidics station 400 (Affymetrix)中进行,采用 washing buffer A、washing buffer B 进行洗涤;采用 Streptavidin phycoerythrin stain solution 进行染色。采用 scanner (Affymetrix)进行扫描,扫描过程在 Affymetrix Microarray Suite5.0 的控制下进行。

6 数据处理

6.1 凋亡细胞百分率采用均数 \pm 标准差表示,用 SPSS 11.0 for windows 软件包, t 检验进行统计学处理。

6.2 基因芯片检测数据采用 affymetrix microarray suite 5.0 软件分析。数据分析采用 Statistical Algorithm。在对单个样本表达分析的前提下,即根据 $P < 0.04$ 为显现, $0.04 \sim 0.06$ 为临界, > 0.06 为缺失,进一步进行两组间比较,根据 signal log ratioaa (SLR) 判断。SLR > 1 (即表达倍数 $> 2 - 1$) 为表达上调,有统计学意义;SLR < -1 (即表达倍数 $< 2 - 1$) 为表达下调,有统计学意义。

结 果

1 淫羊藿总黄酮对老年大鼠淋巴细胞细胞凋亡的影响 见表 1。老年对照组脾淋巴细胞凋亡百分率显著高于年轻对照组,提示老年大鼠体内淋巴细胞存在过度凋亡,淫羊藿总黄酮组与老年对照组比较显著降低,提示淫羊藿总黄酮可显著干预老年大鼠免疫稳态失衡的重要机制即淋巴细胞过度凋亡,具有老年大鼠重建免疫稳态的作用。

表 1 各组大鼠脾淋巴细胞凋亡百分率比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞凋亡百分率
年轻对照	7	10.91 \pm 6.70*
老年对照	7	25.81 \pm 9.11
淫羊藿总黄酮	7	11.95 \pm 4.38*

注:与老年对照组比较,* $P < 0.01$

2 3 组大鼠淋巴细胞基因表达谱比较 老年对照组与年轻对照组比较,表达上调的基因有 116 个,表达下调的基因有 215 个。老年大鼠淋巴细胞特征性的基因表达模式有以下特点 (1) 具有促进细胞凋亡作用

的基因表达显著上调,如:参与细胞凋亡发生中心控制和效应环节的 caspase1、caspase3; calpain II、dnase γ 、PKC delta、Bnip31、p47 等,具有抗凋亡作用的基因如 Cathepsin B、Mtal 等表达显著下调。(2)具有抗增殖作用的基因表达显著上调,如 Rb、anti-proliferative factor (BTG1) 等。具有促进细胞增殖作用的基因表达显著下调,如 c-myc、c-fos、v-jun、A-raf; Rgc32、CyclinB1、Cyclin G-associated kinase 等。(3)参与淋巴细胞活化增殖及免疫反应等基本信号通路的组成元件中,多个重要信号分子的表达显著下调,如酶关联受体信号途径重要信号分子 Serine/Threonine protein kinase、cAMP dependent protein kinase、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase2、spleen tyrosine kinase、inositol trisphosphate receptor subtype3 (IP3R)、RAC protein kinase gamma、guanine cyclase、protein-tyrosine-phosphatase 等。(4)免疫细胞效应及功能的基本调节因子表达异常,如 MHC I 类抗原表达显著上调,MHC II 类抗原表达显著下调;IFN- γ 及 CD24 表达显著下调等。

3 淫羊藿总黄酮对老年大鼠淋巴细胞基因表达的影响 淫羊藿总黄酮干预后的老年大鼠淋巴细胞基因表达谱与老年对照组比较,表达上调的有 447 个,表达下调的基因有 456 个,淫羊藿总黄酮调控老年大鼠淋巴细胞基因的作用模式有如下特点 (1)显著下调促凋亡基因的转录的同时显著上调抗凋亡基因的转录。如具有促进细胞凋亡作用的基因 caspase1、caspase2、caspase3、caspase6、calpains cathepsin H、cathepsin S、dnase γ 、PKCdelta 等在淫羊藿总黄酮组的表达显著下调。与此同时,Cathepsin B、Mtal、NF-kappa B、Notch 等具有抗凋亡作用的基因表达显著上调。(2)淫羊藿总黄酮可调节细胞增殖相关基因的表达,具体表现在:显著上调促进细胞生存及增殖的 c-jun、PCNA、A-raf; Rgc32、CyclinG-associated kinase 等基因的转录,同时显著下调抗增殖的 Rb 等基因的转录。(3)淫羊藿总黄酮显著上调淋巴细胞活化及免疫效应相关的基本信号传导组成元件中多个信号分子的表达,如 Serine/Threonine protein kinase、Serine/Threonine protein kinase (pim3) Serine/Threonine protein kinase (tp12); cAMP dependent protein kinase、PI3K、inositol trisphosphate receptor subtype3 (IP3R) PI3K Receptor、protein-tyrosine-phosphatase、protein kinase C-eta、protein kinase 等基因的转录在淫羊藿总黄酮显著上调。(4)淫羊藿总黄酮显著上调免疫细胞效应及功能的基本调节因子的表达,如淫羊藿总黄酮显著上调 CD2、CD3、CD5、TCR、IL-2、IL-2R (CD25) CD28、CTLA4 等基因

的表达。

因此,淫羊藿总黄酮在上调抗凋亡基因转录的同时下调促凋亡基因的转录;在上调促增殖基因转录的同时下调抗增殖基因的转录;上调促进淋巴细胞活化信号传导、免疫效应调控等基因的转录。

讨 论

老年大鼠脾淋巴细胞基因表达谱呈现这样的特征:促凋亡基因表达上调的同时抗凋亡基因表达下调;促增殖基因表达下调的同时抗增殖基因表达上调;多个促进细胞活化增殖信号传导、促进免疫应答的基因表达显著下调。衰老淋巴细胞基因表达的总体趋势是促进凋亡、抑制增殖。这一研究结论与我们以往的研究结论相一致^[3-5]。

淫羊藿总黄酮显著降低老年大鼠淋巴细胞的过度凋亡。淫羊藿总黄酮的作用涉及细胞凋亡、细胞增殖、信号传导、免疫效应等多组功能基因群,而对促凋亡和抗凋亡相关基因群表达的协同调控作用尤为突出。以 Caspase 家族与 NF-kappaB 为例,Caspase 家族各成员的动员,是细胞凋亡的关键环节即中心效应及控制环节,被喻为细胞凋亡的“发动机”^[6]。相反,Caspase 家族促凋亡级联效应受到另一重要功能基因 NF- κ B 的有力对抗和制约。NF- κ B 是调控一系列与免疫细胞增殖、分化及免疫功能有关基因表达的重要转录因子^[7]。因此,在细胞凋亡的启动阶段,NF- κ B 诱导的迅速的细胞防御机制对于阻断细胞死亡信号传导是必要的。可喜的是,淫羊藿总黄酮在下调细胞凋亡关键的执行蛋白酶 caspase1、caspase2、caspase3、caspase6 基础表达的同时,显著上调了抗凋亡关键转录因子 NF- κ B 的转录,体现出协同调节功能相反的抗凋亡基因及促凋亡基因表达的作用模式,最终体现出抗凋亡的效应。

我们曾采用皮质酮大鼠激活诱导的 T 细胞凋亡模型研究了淫羊藿总黄酮调控细胞因子及相关基因表达的分子机制^[8],结果表明淫羊藿总黄酮显著下调激活诱导的 T 细胞过度凋亡,同时上调抗凋亡基因 bcl-2 等的转录,下调促凋亡基因 FasL、TNFR1 等的转录,显著降低 Caspase8、Caspase3 的活性。显示出淫羊藿总黄酮调控凋亡相关基因表达的作用特点。本研究进一步采用全基因组分析的基因芯片技术观察到老年大鼠淋巴细胞增殖与凋亡基因表达失衡,而淫羊藿总黄酮恰是在老年大鼠基因表达谱的基础上,表现为逆转了功能对立的各个增殖与凋亡调控基因的表达,从而重塑基因表达的平衡,体现出淫羊藿总黄酮重建衰老免疫稳态的分子机制及作用规律。同时淫羊藿总黄酮所

具有的多基因调控优势可避免单个基因强行干预延缓衰老所存在的弊端^[9]。因此,我们这一研究是从多基因研究到基因表达谱的延伸,不仅丰富了对药物作用机制的认识,同时为今后的研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- 1 Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, et al. Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunol Today* 1995;16(9):420—422.
- 2 Schindowski K, Leutner G, Muller H, et al. Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging* 2000;21:661—670.
- 3 郑 振, 沈自尹, 黄 辉, 等. 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.
Zhen Z, Shen ZY, Huang H, et al. Comparative study of Supplementing Shen and Activating Blood Recipes in regulating T cell apoptosis of aged rats. *Chin J Integr Tradit West Med* 1999;19(10):610—612.
- 4 郭为民, 沈自尹, 陈 瑜, 等. 补肾活血复方对老年大鼠 T 细胞凋亡相关基因表达调控模式的比较研究. *中国中西医结合杂志* 2002;22(3):39.
Guo WM, Shen ZY, Chen Y, et al. Comparative study of regulating and controlling patterns of Compound Supplementing Shen and Activating Blood Recipe on T cell apoptosis related

gene expression in aged rats. *Chin J Integr Tradit West Med* 2002;22(3):39.

- 5 陈 瑜, 沈自尹, 郭为民. 老年大鼠 T 细胞凋亡相关基因表达模式的研究. *中国老年学杂志* 2002;22(9):382—384.
Chen Y, Shen ZY, Guo WM. Study on the expressing pattern of T cell apoptosis related gene in aged rats. *Chin J Gerontol* 2002;22(9):382—384.
- 6 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Sci* 1998;281(5381):1312—1316.
- 7 Wang CY, Mayo MW, Koneluk RG. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Sci* 1998;11;281(5383):1680—1683.
- 8 沈自尹, 陈 瑜. 淫羊藿总黄酮与补肾复方对皮质酮大鼠 T 细胞凋亡相关基因群调控的对比研究. *中国免疫学杂志* 2003;18(3):187—190.
Shen ZY, Chen Y. Comparative study of total flavone of Herba Epimedii and Supplementing Shen Recipe in regulating and controlling T cell apoptosis related gene groups in corticosterone treated rats. *Chin J Immunol* 2003;18(3):187—190.
- 9 沈自尹. 从单基因干预长寿和癌症的弊端说起. *中国中西医结合杂志* 2003;23(4):302—303.
Shen ZY. Talking from the disadvantages of intervention of the longevity and cancer by monogene. *Chin J Integr Tradit West Med* 2003;23(4):302—303.

(收稿 2003-06-02 修回 2003-10-10)

· 消 息 ·

中西医结合医疗之进展与前景专题研讨会于 2003 年 11 月 7 日在台北“国际会议中心”成功举办,这是台湾历史上第一次将中西医结合纳入作为台湾主流医学的医学周的活动中。

参加医学周中西医结合活动的学者,有来自台湾最著名的台大医学院前院长扬思标教授、现任院长“中央研究院”院士陈立信教授、台大医院院长戴东原教授、台湾中西整合医学会秀传医疗体系黄明和董事长、台湾中西整合医学会秘书长李春兴博士、台湾“中国医药大学”校长叶纯甫教授、台湾“中国医药大学”教授中医师公会联合会理事长林昭庚教授、台湾“中国医药大学”中医学学院院长蔡辅仁教授、台湾针灸医学会张永贤理事长等,并特邀大陆中国科学院院士、中国中西医结合学会会长陈可冀教授、中国中西医结合学会副会长兼秘书长陈士奎教授、北京医院中西医结合专家李文瑞教授、中国中西医结合杂志社常务副总编陈维养教授及中国中医研究院西苑医院张京春副主任医师等,美国加州洛杉矶分院东西方医学中心许家杰教授、日本北里东洋医学综合研究所所长花轮寿彦教授、台湾秀传纪念医院梁永昌副院长等参加。

陈可冀教授全面阐述了中国老年学研究的重大问题和对策,陈士奎教授详细地介绍了中国大陆中西医结合的现状。李文瑞教授讲述了糖尿病中西医结合的研究进展。张京春副主任医师介绍急性心肌梗死的治疗进展。许家杰教授介绍了目前美国中西医结合教育现状,花轮寿彦教授对日本中医药现状也作了深入地评述,梁永昌副院长饶有兴趣地谈到了近期台湾医学界访问美国医学界的见闻和感想。

会议产生了极大的轰动,为进一步扩大影响,11 月 9 日在台南奇美医学中心由台湾中西整合医学会组织了第二场报告会。并听取了台南市立医院中医部主任关于目前临床教学科研报告。

各地专家学者聚集一堂,交流各自在中西医结合领域的学术成果,分析目前台湾中西医结合现状,探讨如何借鉴大陆较为成熟的中西医结合经验及梯队建设,为进一步完善台湾中西整合医学教学、科研、医疗体系共商对策。两岸学者一致认为需要加强两岸学者的沟通交流。中国中西医结合学会与台湾中西整合医学会决定从明年开始将每年在两地交替召开一次海峡两岸的研讨会,为弘扬中医药这一华夏子孙的共同遗产作贡献。