

· 实验研究 ·

淫羊藿总黄酮保护衰老细胞端粒长度缩短
的实验研究

胡作为 沈自尹 黄建华

摘要 目的 探讨淫羊藿总黄酮(EF)延缓人胚肺二倍体成纤维细胞衰老以及保护端粒缩短的作用机制。**方法** 采用含 EF 的血清对人二倍体成纤维细胞 2BS 细胞株进行处理,观察 2BS 细胞寿命;采用荧光实时定量 PCR 法检测 p16 基因 mRNA 的表达;ELISA 法检测细胞视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)蛋白和磷酸化 Rb 蛋白的含量;TRAP-Hyb 单管一步法检测细胞端粒酶活性;端粒限制性片段(TRF)Southern blot 法检测 2BS 细胞端粒长度变化。**结果** 淫羊藿总黄酮能够延长 2BS 细胞的传代寿命;下调 2BS 细胞 p16 基因 mRNA 的表达;增加磷酸化 Rb 蛋白的含量;延缓衰老细胞端粒长度的缩短,而不是激活细胞端粒酶活性。**结论** 2BS 细胞衰老时,p16 基因 mRNA 的表达增加,磷酸化 Rb 蛋白含量减少,细胞端粒长度缩短;淫羊藿总黄酮可能通过抑制 p16 基因表达,促进磷酸化 Rb 蛋白的产生,从而延缓衰老细胞端粒长度的缩短,具有延缓细胞衰老的作用,而不是通过激活细胞端粒酶的活性。

关键词 淫羊藿总黄酮;衰老;人胚肺二倍体成纤维细胞;p16;视网膜母细胞瘤;端粒长度;端粒酶

Experimental Study on Effect of Epimedium Flavonoids in Protecting Telomere Length of Senescence Cells HU Zuo-wei, SHEN Zi-yin, HUANG Jian-hua *Institute of Integrative Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective To investigate the mechanism of senescence delay of human diploid fibroblast (2BS) and protecting telomere length by epimedium flavonoids (EF). **Methods** The drug sera of EF were used to treat the 2BS. The population doublings of 2BS cells were observed, the mRNA expression of p16 gene were determined by fluorescence real-time quantitative RT-PCR, the telomerase activation of 2BS cells were determined by TRAP-Hyb, the total retinoblastoma (Rb) and phosphorylated Rb protein content were detected by ELISA, the telomere length of 2BS cells were determined by telomere restriction fragment (TRF) Southern blot assay. **Results** EF could significantly extend the population doublings of 2BS cells, the expression of p16 mRNA was decreased and the content of phosphorylated Rb protein were increased by EF. The telomere lengthening of 2BS cells were improved by EF, but the telomerase was not activated. **Conclusion** In senescence human fibroblasts 2BS cells, p16 gene mRNA expression increased, content of phosphorylated Rb protein decreased and the telomere length of 2BS shortened, EF might delay the aging of cells through inhibiting the p16 gene expression, promoting the production of phosphorylated Rb protein and to protect the length of telomere, but not activating the telomerase.

Key words Epimedium flavonoids, senescence; human diploid fibroblast; p16; retinoblastoma; telomere length; telomerase

人体细胞端粒长度随年龄增加而缩短,端粒长度

是人类细胞特异性的衰老生物学标志,而有关端粒的重建,即延缓端粒的缩短,则成为延缓细胞衰老的根本目的。我们长期研究表明^[1-4],肾虚与衰老具有相同的神经—内分泌—免疫(neuro-endocrino-immune, NEI)网络功能低下,而含有淫羊藿的温补肾阳类复方可以提高 NEI 网络功能;而且在延缓衰老方面淫羊藿

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30271666)

作者单位:复旦大学华山医院中西医结合研究所(上海 200040)

通讯作者:沈自尹, Tel: 021 - 62490934, E-mail: ziyinshen@21cn.

com

总黄酮(epimedium flavonoids,EF)可以代表温肾复方。因此我们采用国际上公认的细胞衰老模型,探讨 EF 延缓衰老的分子机制及调控环节。

材料与方法

1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,体重 (250.0±12.5)g,由复旦大学医学院动植物科学部提供。

2 药物 辽宁产朝鲜淫羊藿,由上海市医药工业研究院中药室提取 EF,实验时以蒸馏水配制为 1.5g/100ml。

3 试剂和仪器 Trizol Reagent 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品。SYBR GREEN Real Time PCR Protocol 试剂盒为美国 PE 公司产品。总 Rb 及磷酸化 Rb 蛋白 ELISA 检测试剂盒为美国 Biosource 公司产品。端粒酶活性检测试剂盒购自华美生物工程公司。GeneAmp 5700 Sequence Detection System 实时定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

4 实验方法

4.1 含药血清制备 大鼠随机分为空白对照组和用药组。用药组 EF 按每天 0.06g/kg 体重灌胃;每天上午、下午各 1 次,连续 3 天。灌胃给药第 3 天末次给药 1h 后,麻醉,无菌心脏采血,无菌分离血清,过滤,分装,置于-20℃ 冰箱保存备用。临用时 56℃ 灭活 30min,以 10%加入培养基中。空白组以生理盐水代替 EF 制备血清。

4.2 细胞寿命实验 常规培养,用 MEM 培养基。2BS 人胚肺二倍体成纤维细胞株(北京生物制品研究所提供)分组为:空白血清组(KB 组)、含药血清对照组(EF 组),年轻组(ZH 组)。EF 组在培养基中补充 10%含药血清,待细胞长满(铺满单层)时以 1:2 比例进行传代,并记为一代。空白组以空白血清代替含药血清。当细胞传代连续 4 周后不能够融合长满,则记为最后一代。本实验以 30 代细胞为年轻细胞,50 代为老年细胞。

4.3 实时定量 PCR 检测 p16 基因 mRNA 表达 按 Trizol Reagent 试剂盒说明提取细胞总 RNA,测 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.7~1.9。引物序列:上游引物 GCT-GATGCTACTGAGGAGCCA,下游引物 CCATCAT-CATGACCTGGTCTTCT,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。阳性标准模板的制备:取逆转录反应产物 cDNA 5μl,加入上下游引物、TaqDNA 多聚酶、dNTPs、DMSO 等,在 9600PCR 仪上进行。荧光实时定量 PCR 测定:采用

SYBR GREEN Real Time PCR Protocol,同时将定量模板梯度稀释,做标准曲线,在 GeneAmp 5700 Sequence Detection System 进行扩增。反应结束后将样本与标准曲线对比得到 p16 基因 mRNA 表达的拷贝数。

4.4 ELISA 法检测总 Rb 和磷酸化 Rb 的含量 抽提蛋白:收集细胞;细胞裂解液溶解细胞,置冰上 30min,离心;转移至离心管中,4℃ 13 000r/min,离心 10min。ELISA 检测:按试剂盒说明书操作。

4.5 端粒酶活性检测 主要分细胞端粒酶的提取,端粒重复序列扩增和产物杂交检测 3 个步骤,具体操作按端粒酶活性检测试剂盒说明书操作。

4.6 端粒限制性片段(TRF)Southern blot 法检测 2BS 细胞端粒长度 收集 1×10⁶ 个细胞,抽提基因组 DNA,A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.9 左右。限制性酶切、消化基因组 DNA:基因组 DNA15μl,H₂O 65μl,10×NEB buffer II 10μl,RsaI 5μl,HinfI 5μl,RNase A(10mg/ml)0.02μl,37℃ 消化过夜,用 0.25mol/L HCl 过夜预处理胶盒、瓷盘和梳子,在 20cm×20cm 0.7%琼脂糖凝胶中点 3μg 已消化的 DNA 样品,电泳,紫外灯下观察并拍照。凝胶在 0.25mol/L HCl 中脱嘌呤 30min,在 1.5mol/L NaCl,0.5mol/L NaOH 中浸泡各 30min,在 1mol/L Tris 7.4,1.5mol/L NaCl 中浸泡各 30min,轻轻摇动。Southern 转移过夜。从凝胶上取出滤膜,用 Saran Wrap 包好,在紫外交联仪中交联固定。取出滤膜,在盛水的瓷盘中漂洗。将滤膜放在杂交管中,加入 50ml 预杂交液,密封。放入杂交炉中,60℃ 封闭 0.5h。将所有纯化后的探针加热至 100℃ 10min,立即插入冰水中,然后加入杂交管 5ml 杂交液,60℃ 孵育过夜。从杂交管中取出滤膜,在 60℃ 预热的 wash solution (0.5×SSC+0.5%SDS)中漂洗,15min×3 次。盖葛计数器进行探测端粒信号。用 Saran Wrap 包住滤膜,磷屏曝光过夜,磷屏扫描成像仪成像。

5 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 t 检验,由 SPSS 11.0 统计软件处理。

结 果

1 含 EF 血清对 2BS 细胞传代次数的影响 见表 1。EF 处理 2BS 细胞,其传代次数比空白血清组明显增加,差异有显著性(P<0.01)。

表 1 EF 对 2BS 细胞传代次数的影响 (次, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	2BS 细胞传代次数
KB	6	53.83±0.40
EF	6	64.50±0.80*

注:与 KB 组比较,* P<0.01

2 含 EF 血清对 2BS 细胞 p16 mRNA 表达的影响 见表 2。KB 组与 ZH 组比较 2BS 细胞 p16 mRNA 表达明显增加,差异有显著性($P<0.01$)。EF 组与 KB 组比较,p16 mRNA 表达明显降低,差异有显著性($P<0.01$)。

表 2 EF 对 2BS 细胞 p16 mRNA 表达的影响 (平均拷贝数, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	2BS 细胞 p16mRNA 表达
ZH	6	$6.64 \times 10^4 \pm 2.65 \times 10^4$
KB	6	$13.00 \times 10^4 \pm 19.80 \times 10^4^*$
EF	6	$9.61 \times 10^4 \pm 1.40 \times 10^4^\Delta$

注:与 ZH 组比较,* $P<0.01$;与 KB 组比较, $^\Delta P<0.01$;表 3,4 同

3 含 EF 血清对 2BS 细胞磷酸化 Rb 含量的影响 见表 3。ZH 组 2BS 细胞的磷酸化 Rb 蛋白含量明显高于 KB 组,差异有显著性($P<0.01$);EF 组 2BS 细胞的磷酸化 Rb 蛋白水平明显高于 KB 组,差异亦有显著性($P<0.01$)。

表 3 EF 对 2BS 细胞磷酸化 Rb 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	2BS 细胞磷酸化 Rb 含量(U/ml)
ZH	6	8.63 ± 2.16
KB	6	$2.03 \pm 0.32^*$
EF	6	$3.20 \pm 0.72^\Delta$

4 含 EF 血清对 2BS 细胞端粒酶活性的影响 本实验采用 TRAP-Hyb 单管一步法检测 2BS 细胞的端粒酶活性,结果显示 ZH 组和 KB 组的细胞没有检测到端粒酶活性,EF 组也没有激活端粒酶活性。

5 含 EF 血清对 2BS 细胞端粒长度的影响 见表 4、图 1。KB 组与 ZH 组比较,2BS 细胞的端粒长度明显缩短,差异有显著性($P<0.01$);EF 组与 KB 组比较,2BS 细胞端粒长度明显延长,差异亦有显著性($P<0.01$)。

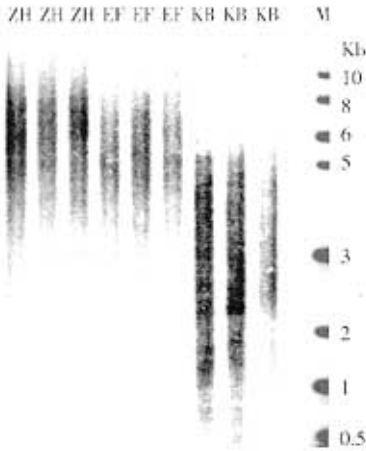


图 1 含淫羊藿总黄酮血清对 2BS 细胞端粒长度的影响 注:ZH: 年轻组;EF: 含药血清对照组;KB: 空白血清对照组;M: 分子量标示

表 4 含 EF 血清对 2BS 细胞端粒长度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	2BS 细胞端粒长度(Kb)
ZH	6	6.55 ± 0.05
KB	6	$2.96 \pm 0.13^*$
EF	6	$5.93 \pm 0.05^\Delta$

讨 论

细胞是机体的基本组成单位,机体的衰老始于细胞衰老。细胞和生物体一样,有一定的寿命,正常人的二倍体成纤维细胞在体外培养条件下,经历有限的分裂次数,进入一种不可逆的增殖停滞状态,因此 2BS 细胞是国际公认的人类细胞衰老模型,同时其寿命试验亦是细胞水平上抗衰老研究所必须。

端粒是真核细胞染色体末端的特殊结构,在正常细胞分裂过程中,端粒自然逐渐缩短,当端粒缩短到一定的极限,细胞不再分裂,也不能传代,细胞走向衰老、死亡。端粒的功能是完成染色体末端的复制,起着保护染色体末端的作用。人体细胞端粒长度随年龄增加而缩短,因此端粒长度是人类细胞特异性的衰老生物学标志。

影响端粒长度可以通过 p16 基因或端粒酶的途径。p16 基因是一种重要的抑癌基因,也是控制衰老进程的主导基因,p16 基因的激活通过降低 pRb 蛋白磷酸化水平,来缩短端粒长度,加速衰老进程。端粒酶位于端粒末端,其功能是合成端粒中重复 DNA 序列加到端粒末端而维持端粒的长度,以抵消端粒随细胞分裂的不断缩短,可能延缓衰老进程。但大多数正常体细胞不表达端粒酶活性,而且端粒酶的激活有导致细胞永生化和癌变的可能。

童坦君等^[5,6]报道将 p16 基因的重组载体导入成纤维细胞,使得 p16 高表达,结果细胞衰老加快;但将其反义重组载体导入细胞后,抑制了 p16 的表达,提高了 pRb 蛋白的活性,而非激活端粒酶起作用,这样就不至于发生细胞永生化和癌变的可能。结果与衰老相关的端粒缩短减慢,衰老速度减慢,细胞寿命延长。

中医学认为肾藏精,肾中精气之盛衰决定着机体的生长发育和衰老。李时珍曰:“淫羊藿味甘气香,性温不寒,能益精气,乃手足阳明三焦命门药也”。我们多年研究证明肾虚与衰老具有相同的 NEI 网络功能低下^[7],而 EF 在衰老时 T 细胞过度凋亡及其基因调控过程中,可以代表补肾复方保护 NEI 网络功能^[4]。本研究采用 EF 进行的寿命试验,使 2BS 细胞的传代次数由 53 代延长至 64 代,效果明显。与此同时,观察到 EF 亦是抑制了 p16 基因表达,提高 pRb 蛋白的活性,而非激活端粒酶的活性,由此保护了衰老时端粒长

度的自然缩短。这比对单基因进行重组改造而获得长寿的方法远为生理而安全^[8]。迄今尚未见有中药有效成分调节端粒长度的报道。

我们采用基因芯片技术^[9],分别比较 EF、补肾及活血复方对老年大鼠 HPAT 轴基因表达谱的影响,结果显示 EF 是通过 NEI 网络下行通路这一模式而激活免疫系统,从而延缓免疫衰老。本研究从端粒、端粒酶、p16 基因与衰老的关系这一角度进一步阐明 EF 延缓衰老的作用机制。

参 考 文 献

- 1 沈自尹,郑 振,郭为民,等.补肾法延缓免疫衰老的临床和实验研究.中国中西医结合杂志 2002;22(3):178—181.
Shen ZY, Zheng Z, Guo WM, et al. Clinical and experimental study on retardation of immunosenescence by kidney tonifying principle. Chin J Integr Tradit West Med 2002;22(3):178—181.
- 2 沈自尹,王文健,张新民,等.补肾药改善老年肾上腺皮质功能的临床与实验研究.中国中西医结合杂志 1989;9(9):518—521.
Shen ZY, Wang WJ, Zhang XM, et al. Therapeutic research of the kidney-tonifying herbs on the aged adrenocortical function. Chin J Integr Tradit West Med 1989;9(9):518—521.
- 3 沈自尹,张玲娟,蔡定芳,等.淫羊藿总黄酮和多糖对大鼠垂体-肾上腺-免疫网络作用的研究.中国中西医结合杂志(增刊)1998;18(6):238—240.
Shen ZY, Zhang LJ, Cai DF, et al. Study of effects on rats' pituitary-adrenal-immune network by Flavonoids and saccharide extracted from Epimedium Flavonoids. Chin J Integr Tradit West Med (Suppl) 1998;18(6):238—240.
- 4 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 2002;18(3):187—190.
Shen ZY, Chen Y. Comparative study of EF and kidney-tonifying recipes on regulatory effect on T lymphocytes apoptosis genes in corticosterone-treated rats. Chin J Immunol 2002;18(3):187—190.
- 5 Jiang MD, Zong YZ, Tan JT. Senescence delay of human diploid fibroblast induced by anti-sense p16INK4 α expression. J Biol Chem 2001;276:48325—48331.
- 6 Wei W, Jun FW, Zong YZ, et al. Characterization of regulatory elements on the promoter region of p16INK4 α that contribute to overexpression of p16 in senescent fibroblasts. J Biol Chem 2001;276:48655—48661.
- 7 沈自尹.有关证与神经内分泌免疫网络的研究.中医药学刊 2003;21(1):10—14.
Shen ZY. Study on Syndrome and neuro-endocrino-immune network. J Tradit Chin Med 2003;21(1):10—14.
- 8 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 Malpractice of single factor in intervening longevity and cancer. Chin J Integr Tradit West Med 2003;23(4):302—303.
- 9 沈自尹,陈 瑜,黄建华,等.EF 延缓 HPAT 轴衰老的基因表达谱研究.中国免疫学杂志 2004;20(1):59—62.
Shen ZY, Chen Y, Huang JH, et al. The gene expression profile in hypothalamus-pituitary-adrenal-thymus from EF-treated old rats. Chin J Immunol 2004;20(1):59—62.

(收稿:2004-08-04 修回:2004-09-02)

《冉雪峰医著全集》(3 卷)

定价 360.00 优惠价 280.00

冉雪峰先生,六世医传,早在 20 世纪 30 年代,医坛已有“南冉北张”(南冉:冉雪峰,北张:张锡纯)之誉。冉先生七十年如一日,潜心中医学,于近世中医学界,影响深远。本书由其子冉先德率同门下高足,合数十人之力,费时 3 年,将冉先生的全部遗著加以整理,精心订正,仔细核对,完成此书。全书约 300 万余言,纳《内经》、《方药》、《临证》3 册。

《秦伯未医学名著全书》

定价 158.00 优惠价 136.00

理论高深 说理透彻 临床实用 思路开阔

上 篇 增补《谦斋医学讲稿》(新增 37 篇)

中 篇 谦斋专著汇编 《治疗格律》

《中医入门》、《中医临证备要》、《内经类证》

《清代名医医案精华》、《金匱要略杂病浅说》

《清代名医医话精华》、《内经知要浅解》

下 篇 谦斋医案荟萃 内科、妇科、儿科、方药

《谢海洲医学文集》

定价 96.00 元 优惠价:80.00 元

全书共分八篇,其中“医药丛谈篇”包括医学从论、方药漫谈等;“专病论治篇”包括脑髓病论治和神志病、痹证及杂证论治;“医案医话”篇收录 56 种病证医案和 32 则医话;“方药纵横篇”包括中药选注、良方选注、常用中成药及自选良方四大部分。涉及医药领域的各个方面,全面反映谢老深邃的医药理论、丰富的临床经验、独特的学术见解和曲折的从医轨迹。

四十余年研究成果大总结 数十位学科带头人联手笔 《中国中西医结合临床全书》

定价 480.00 元 优惠价:288.00 元

上下两卷 16 开豪华精装 700 万字 3000 余页

顾问 崔月犁 董建华 陈可冀 尚天裕 高辉远 名誉主编 陈敏章 主编 李思

我国中西医结合全科临床经典权威巨著,全书包括临床十一个学科(内、外、妇、儿、骨伤、皮肤、五官等)近千种病症,每病按概述、病因病理、临床表现、实验室及其他检查、并发症、诊断与鉴别诊断、中医辨证、西医治疗、中医治疗、中西医结合治疗、预防护理等项详述,有的还专列中西医结合研究一项,内容宏富、资料翔实、兼收并蓄、实事求是,是迄今为止较为系统、全面、权威的中西医结合临床专著。该书问世后,好评如潮,连年畅销。

感经典震撼·悟千年医理

中医四大经典示范教学 VCD

每门课程 1500 元 优惠价 1050 元 全套 4000 元

伤寒论(70 盘) 金匱要略(80 盘)

内 经(77 盘) 温病学(72 盘)

北京中医药大学等七所院校相关学科带头人主讲,配有中文字幕,课堂学术氛围浓厚,闪光点频频迸发,看光盘如身临其境,亲聆听知名教授、名师妙趣横生的讲授。

邮购办法:免费邮寄,汇款地址:北京 39 支局三想医药书店(北京五棵松·解放军医学图书馆内)。邮编:100039; 联系人:张 岩; 咨询电话:(010)68234503、68234504(传真);66931860,备有书店详细书目(万余种医学图书可供选购),函索即寄。