

针刺对快速老化鼠脑、肝细胞核活性基因的影响

温廷益¹ 韩景献¹ 李 平¹ 王 舒¹ 石学敏¹ 邢来君²

摘要 目的:探讨针刺的分子生物学作用机理。方法:采用不同月龄快速老化模型鼠(SAM)为研究对象,以“调神益智,平肝通络”为治疗原则,取人中、内关、太冲为主穴,对8月龄的SAM P8进行针刺治疗,以正常老化的SAM R1作增龄性对照,以非针刺SAM P8作对照,用DNA酶I作活性基因探针观察脑、肝细胞核活性基因变化情况。结果:与非针刺组比较,针刺使8月龄的SAM P8脑、肝细胞核活性基因数增加,基因转录水平提高。结论:证实针刺能在细胞核活性基因转录水平上起作用。

主题词 细胞衰老/针灸效应 脑/针灸效应 肝细胞/针灸效应

真核生物的信息流按DNA→mRNA→蛋白质这一方式流动,其中DNA转录为mRNA是信息流中重要的一环。已知生物衰老时转录活性下降^[1],其原因可能与染色质组分变化,DNA构象改变,特别是活性基因数减少等诸多因素有关^[2]。本文以快速老化模型鼠(SAM) P8作为研究对象,以正常老化的SAM R1作增龄性对照,以非针刺的SAM P8作对照。以DNA酶I作活性基因探针酶解DNA,用DNA酶II酶解DNA为对照,并且采用可增殖的肝组织作为非增殖脑组织的研究材料对照,观察老化鼠脑、肝细胞核活性基因的变化及针刺对其的影响,以探讨针刺在基因转录水平的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型: SAM (Senescence Accelerated Mouse) 是日本京都大学竹田俊男教授1971年开发的一种自然快速老化动物模型,其祖先为AKR/J小白鼠,分为R和P两个系统。R系统为正常老化,P系统为快速老化,其特点为P系统在成长期过后出现快速的与人类极为相似的老化及老化诸病态^[3,4],平均寿命为358天。R系统作为P系统的对照组,表现为匀速老化,平均寿命为526天^[5,6]。

1.2 动物的选择与分组:选择2月龄和8月龄的SAM P8、SAM R1,随机分成2月龄的SAM R1组、SAM P8组和8月龄的SAM R1组、SAM P8针刺组,

SAM P8非针刺组。每组20只,雌雄各半。

1.3 方法

1.3.1 针刺穴位及方法:按照华兴邦等制定的《动物针灸穴位图谱》选取内关、人中、太冲穴。人中穴用雀啄手法10次,内关穴用捻转泻法20秒,太冲穴用捻转泻法20秒,每日针刺1次,共持续半个月。

1.3.2 酶和化学试剂:DNA酶I和DNA酶II(美国Promega公司产品),蛋白酶K(美国Sigma公司产品),RNA酶(美国Promega公司产品),苯甲基磺酰氟(PMSF,美国Sigma公司产品),其余试剂为电泳纯和国产分析纯。

1.3.3 鼠脑、肝细胞核的制备:采用蔗糖水溶液法制备并纯化细胞核^[7]。

1.3.4 DNA酶消化体系:DNA酶I消化体系参照文献^[8]方法;DNA酶II消化体系参照文献^[9]方法。

1.3.5 DNA的提取:细胞核用DNA酶I或DNA酶II进行消化,在不同的消化时间,取出一定量的消化液,按常规方法提取DNA,进行真空干燥后待用。

1.3.6 DNA的聚丙烯酰胺电泳:制备5%的聚丙烯酰胺电泳胶板,用λDNA经EcoRI和Hind III共同消化的酶切DNA片段作标记,电泳各种DNA样品。终止后胶板经EB染色后置紫外透射反射仪下观察、摄影、测定电泳迁移率。

2 实验结果

2.1 不同月龄鼠脑细胞核DNA酶I酶解电泳结果:随消化时间的延长DNA逐渐被水解成较小片段。在同一消化时间内所产生的DNA片段SAM P8的8月龄大于2月龄,而SAM R1的8月龄与2月龄相比DNA片段大小无明显差异。提示随增龄SAM P8脑细胞核的活性基因数减少,转录水平下降,而8月龄的SAM R1的活性基因数没有明显减少,转录水平仍保持较高水平。

2.2 不同月龄鼠肝细胞核DNA酶I酶解电泳结果:在同一消化时间内,8月龄SAM P8产生的DNA片段大于2月龄SAM P8产生的DNA片段,而8月龄的SAM R1与2月龄的SAM R1产生的DNA片段大小差异不太明显。提示随着增龄SAM P8肝细胞核的活性基因数减少,转录水平下降,而8月龄的SAM R1的活性基因数没有明显减少,转录水平仍然很高。

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39570884),国家中医药管理局重点资助课题(95B005)

1 天津中医学院第一附属医院,天津市南开区鞍山西道314号(300193)

2 南开大学生命科学院

收稿日期:2001-03-15;修回日期:2001-04-20

2.3 针刺组脑细胞核的 DNA 酶 I 酶解电泳结果:在同一消化时间内针刺组 SAM P8 的 DNA 片段明显小于非针刺组同月龄 SAM P8 的 DNA 片段。提示针刺可使 SAM P8 活性基因数明显增多,转录水平提高。

2.4 针刺组肝细胞核的 DNA 酶 I 酶解电泳结果:在同一消化时间内,SAM P8 针刺组的 DNA 片段明显小于同月龄非针刺组的 DNA 片段。同样提示针刺可使 SAM P8 肝细胞核活性基因数明显增多,转录水平提高。

2.5 不同月龄鼠脑、肝细胞核的 DNA 酶 II 酶解电泳结果,随消化时间的延长,DNA 逐渐被水解成小片段,在同一消化时间内 DNA 片段大小无月龄的差异。说明 DNA 酶 II 的酶解作用对核苷酸序列无特异性,可用作 DNA 酶 I 酶解作用的对照。

3 讨论

3.1 SAM P8 和 SAM R1 脑肝细胞核活性基因数的增龄性变化及意义:真核生物中几乎所有 DNA 都与组蛋白结合,因而限制了基因活性。有转录活性并产生效应的基因仅占真核生物基因的 10%~20%,称为活性基因。DNA 酶 I 是一种核酸内切酶,水解单链或双链 DNA 使之成为具有 5' 磷酸末端的单核苷酸或寡核苷酸的混合物,真核生物细胞基因组中的转录活性区域对 DNA 酶 I 消化非常敏感。DNA 酶 I 能辨认染色质中转录活性基因周围的某些特征性结构,优先水解活性基因。DNA 酶 I 敏感的染色质区域,其结构比较疏松,但裸露的 DNA 不一定是 DNA 酶 I 高敏感部位,DNA 酶 I 高敏感部位的形成可能与 DNA 和两种高迁移率非组蛋白的 HMG14 与 HMG17 的结合有关^[10]。DNA 酶 II 作用的特点是消化组成染色体的基本组成单位即核小体,其酶解作用对核苷酸序列无特异性,故可用它作 DNA 酶 I 酶解作用的对照。

从实验结果可知,随增龄 SAM P8 经 DNA 酶 I 消化的片段增大,说明其活性基因数减少,即染色质上可供转录的活性染色质区域减少,导致染色体的模板活性降低,转录活性下降。而 SAM R1 经 DNA 酶 I 消化的片段各月龄无显著差异,说明在 8 月龄时,SAM R1 活性基因数没有减少,转录水平仍然很高。即 SAM R1 的平均寿命为 526 天,8 月龄时还处于青壮年时期,未出现老化现象,而 SAM P8 在 4~6 月龄后即进入快速老化阶段,因此活性基因数减少非常明显,转录水平显著下降。

3.2 针灸治疗及选穴依据:在中医学的古代文献中无“老年性痴呆”病名,但在“呆病”、“癫证”、“健忘”等证的描述中可以看出中医学对本病早有独特的认识,《医

宗金鉴》将其归为“神病”范畴。关于本病的病因病机,《内经》中曰:“脑为髓之海”,“髓海不足,则脑转耳鸣,胫酸眩冒,目无所见,懈怠安卧。”王清任也指出:“高年无记性者脑髓渐空。”《素问·上古天真论》中指出:“七八肝气衰,筋不能动;八八天癸竭,精少,肾藏衰,形体皆极,则齿发去。”因此,老年人存在肝肾不足,肝阳偏亢的生理病理特点。我们根据本病的病位在脑,结合老年人的生理病理特点,提出了“调神益智,平肝通络”的治疗法则,取人中、内关、太冲为主穴治疗本病,人中为督脉、手足阳明之会,督脉起于胞中,上行脑达巅,刺之具有醒神益智之功;内关为八脉交会穴之一,通于阴维,属厥阴心包经之络穴,有养心安神,疏通气血之功;太冲为足厥阴原穴,两者相配具有平肝通络作用。我们通过 300 例患者的临床疗效观察,该针法可改善老年期痴呆患者临床症状和体征,提高其智能积分水平,临床好转率达 89.3%。本研究以快速老化鼠为对象,对与老化密切相关的细胞核活性基因进行探讨。结果证实,针刺后的快速老化鼠脑、肝细胞核活性基因数明显增多,说明细胞核转录水平显著增高,提示提高活性基因转录水平使脑、肝细胞的生理功能改善是临床针刺作用环节之一。

参考文献

- 1 张宗玉,祝欢,南新升.老年大鼠肝细胞核与核染色质对 DNA 酶 I 消化敏感性的研究.老年学杂志,1989,9(3):158-160.
- 2 张宗玉,李东.老年鼠肝、脑细胞核活性基因的变化.中华老年医学杂志,1994,13(2):111-113.
- 3 Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. J Am Geriatr Soc. 1991,39(9):911-919.
- 4 韩景献,李平,刘庆忠,等.针刺对快速老化痴呆模型小白鼠行为学影响的实验研究.中医杂志,1998,39(4):239-241.
- 5 Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, et. al. Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). Exp Gerontol. 1997,32(1-2):117-127.
- 6 Han Jingxian, Hosokawa M, Umezawa M, et. al. Age-related changes in blood pressure in the senescence-accelerated mouse (SAM): aged SAMP1 mice manifest hypertensive vascular disease. Lab Anim Sci, 1998,48(3):256-263.
- 7 张宗玉,许远欣,曹西南,等.老年大鼠与断奶大鼠脑细胞核染色质的非组蛋白.生物化学杂志,1985,1(5,6):33-39.
- 8 Schonberg S, Patterson D, Puck TT. Resistance of Chinese hamster ovary cell chromatin to endonuclease digestion. I. Reversal by cAMP. Exp Cell Res, 1983,145(1):57-62.
- 9 Altenburger W, Horz W, Zachau HG. Nuclease cleavage of chromatin at 100-nucleotide pair intervals. Nature, 1976, 264(5586):517-522.
- 10 邱平,易禄康.大鼠老化过程大脑皮层细胞核、染色质转录研究.生物化学杂志,1990,6(4):339-342.