

# 补肾生血药对衰老小鼠 Bcl-2 mRNA 表达的影响

陈智松<sup>1</sup> 吴志奎<sup>1</sup> 蔡辉国<sup>2</sup> 徐 晶<sup>2</sup> 陈玉英<sup>1</sup> 吕鑫霞<sup>1</sup>

**主题词** 补肾药/药理学 衰老/药物作用

“肾生骨髓”是中医肾生理功能的重要组成部分。因此,肾生髓理论的现代研究在肾本质研究中占有重要的地位。我们实验室自 20 世纪 70 年代末以来一直致力于肾生髓理论的现代研究,研究的重要成果之一是补肾生血药的研制成功。该药由熟地黄、何首乌、山茱萸、枸杞子、阿胶等 11 味中药组成,具有滋阴补肾,益髓生血等功能。20 多年来,我们通过对补肾生血药的药效机理的研究,来阐述中医经典理论肾生髓的现代内涵。基因是决定生命结构和功能的最根本物质,与作为“先天之本”、“主生殖、生长发育、生髓等”的中医肾的概念可能存在着某些必然的联系。Bcl-2 基因(B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因)是最初发现的与细胞凋亡相关的原癌基因,其表达产物 Bcl-2 主要作用是抑制细胞凋亡。本课题采用老年小鼠和目前应用较成熟的 D-半乳糖致衰老小鼠模型,通过观察补肾生血药对其骨髓有核细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响,来探讨肾生髓的本质相关基因。

## 1 实验材料

1.1 动物:(1)老年小鼠:昆明种雄性,购自中国医学科学院动物中心,12 月龄,体重 50±1g。将小鼠在本院二级实验动物中心饲养至 15 个月,此年龄的小鼠为老年小鼠,青年对照小鼠为 2 月龄。(2)建立 D-半乳糖致衰老模型所用的小鼠:昆明种雄性,购自中国医学科学院动物中心,2 月龄,体重 30±1g。

1.2 药物及试剂:(1)药物:补肾生血药由熟地黄 15g,何首乌 12g,山茱萸 10g,枸杞子 10g,阿胶 10g 等 11 味中药组成,由本院中药房提供。该方水煎 2 次,合并滤液,浓缩至适量(含生药 1.7g/ml)。(2)主要试剂及配制:酵母转运 RNA(tRNA),Amersham 公司;焦碳酸二乙酯(DEPC),Armerseo 公司;十二烷基肌酸钠、溴化乙锭(EB),美国 Sigma 公司;β-巯基乙醇,Fluka 公司;异硫氰酸胍、耐热性 DNA 聚合酶(Taq)、

二硫代苏糖醇(DTT),Promega 公司;逆转录缓冲液(RTbuffer)、鼠逆转录酶(MMLV)、寡聚核糖脱氧胸苷酸(Oligo dT)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、乙酰化小牛血清白蛋白(BSA),Gibco 公司;4 种脱氧核糖核苷酸(dNTP)、丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis),上海生工生物工程公司;N,N,N,N-四甲基乙烯基二胺(TEMED),美国 BRL 公司;过硫酸胺(APS),Bio-Rad 公司;α32P-(dATP+dCTP),北京福瑞生物工程公司;pBR322/HinfI,中国协和医科大学科学技术开发公司。10. SSCP 电泳缓冲液:150g Tris,11.6g EDTA 使之在水中溶解,再加入 140g 硼酸,待全部溶解后用 Tris 或硼酸调 pH7.6,定溶至 2000ml,灭菌备用。5. TBE 电泳缓冲液:54g Tris,27.5g 硼酸,20ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0),加水定溶至 1000ml,消毒备用。37% Acr-Bis(36:1):36g 丙烯酰胺,1g 甲叉双丙烯酰胺加水至 100ml,棕色瓶中,4℃保存备用。水-饱和酚:重蒸酚含 0.1%8-羟基喹啉,用 HCl 调至 pH7.0,水覆盖于酚上面,避光,4℃保存备用。1.25%过硫酸胺的贮备液:0.5g APS 加水溶至 40ml,棕色瓶中,4℃可在 1 周内使用。4mol/L 细胞裂解液(GTC):柠檬酸三钠 1.47g,十二烷基肌酸钠 5g,异硫氰酸胍 94.4g,加 DEPC-水溶至 200ml,用时加 0.07%巯基乙醇。DEPC-H<sub>2</sub>O(1:1000):1000ml 水加入 1ml DEPC,置于 37℃,2 周内使用。5%TEMED:5ml TEMED 用水溶至 100ml。PCR 缓冲液:Tris(pH8.0)100mmol/L, KCl 500mmol/L, Triton-X-100 1%,明胶 0.1%。(11)BSA 使用液:5mg 乙酰化 BSA 加水至 1ml,-20℃保存备用。

1.3 主要仪器:PCR 仪,90AD 型,中国科学院遗传研究所;激光光密度扫描仪,LKB 2400 型,Pharmacia 公司;紫外分析仪,ZF 型,上海康华生化仪器制造厂;真空干燥机,583 型,Bio-Rad 公司。

## 2 方法

### 2.1 实验方法

2.1.1 老年小鼠分组和给药方法:分为青年对照、老年对照、补肾生血药小剂量和大剂量 4 组。补肾生血药小剂量组小鼠每天灌胃 0.5ml 提取液(含生药 8.5g/kg,相当于人用量 5 倍),补肾生血药大剂量组小鼠每

基金项目:国家中医药管理局资助课题(95B102)

1 中国中医研究院广安门医院分子生物学研究室,北京市宣武区北线阁 5 号(100053)

2 中国医学科学院血液学研究所实验血液学国家重点实验室

收稿日期:2001-08-29;修回日期:2001-11-03

天灌胃 0.5ml 提取液(含生药 17g/kg, 相当于人用量 10 倍), 给药时间均为 2 个月, 对照组给予等体积蒸馏水。

2.1.2 D-半乳糖致衰老小鼠模型建立<sup>[1]</sup>、分组和给药方法: 将上述 2 月龄昆明种雄性小鼠分为正常对照组和造模组, 造模组于项背部皮下按  $120\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的剂量注射 D-半乳糖, 连续 30 天, 正常对照组注射等体积灭菌生理盐水。造模完成后将造模组小鼠分为模型组、补肾生血药小剂量组和大剂量组。补肾生血药小剂量组小鼠每天灌胃 0.5ml 提取液(含生药 8.5g/kg, 相当于人用量 5 倍), 大剂量组小鼠每天灌胃 0.5ml 提取液(含生药 17g/kg, 相当于人用量 10 倍), 给药时间均为 1 个月, 模型组、正常对照组小鼠给予等体积蒸馏水。

2.1.3 Bcl-2 mRNA 表达水平的测定: 采用半定量 RT-PCR 法, 提取小鼠骨髓有核细胞总 RNA, 立即逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 加入两对人工合成待扩增基因片段的引物(目的基因 Bcl-2 和参照基因  $\beta$ -actin)和同位素等, 进行 PCR 扩增, 扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射自显影后经激光光密度仪扫描, 计算出 Bcl-2 基因与  $\beta$ -actin 基因扩增量的比值, 以此反映 Bcl-2 mRNA 表达水平。(1)RT-PCR 引物的设计: 小鼠 Bcl-2 基因片段扩增的引物序列为: 5 端 5'-GACTTCTCTCGTCGCTACCGTC, 3 端 5'-ACATGCACCTACCCAGCCTCCGTTATC, 扩增片段长度 296bp;  $\beta$ -actin 基因片段扩增的引物序列为 5 端 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC, 3 端 5'-GCGAAATCGTGCGTGACATC, 长度为 265bp。上述引物由上海生工生物工程公司合成。(2)骨髓细胞总 RNA 提取: ①拉椎处死小鼠, 无菌条件下取出小鼠后双侧股骨, 用 5 号针头将骨髓冲入 1.5ml eppendorf 管中, 生理盐水洗 3 次, 3500r/min 离心 10 分钟。加 6 倍体积 4mol/L GTC, 剧烈震荡 5 分钟以充分裂解细胞。②取 0.4ml GTC 溶胞液于 1.5ml 塑料离心管中, 依次加入 1 $\mu$ l 10mg/ml 酵母 tRNA, 40 $\mu$ l 2mol/L NaAc, 400 $\mu$ l 水饱和酚, 80 $\mu$ l 氯仿/异戊醇(49:1), 边加边剧烈震荡 10 分钟, 在冰浴中静置 20 分钟后, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10000r/min 离心 20 分钟。③取出上层加到另一离心管中, 加入 400 $\mu$ l 预冷的异戊醇, 混合后于 -20 $^{\circ}\text{C}$  放置 4 小时。4 $^{\circ}\text{C}$ , 12000r/min 离心 20 分钟。④小心吸出上清液, 向沉淀中加入 0.3ml 4mol/L GTC、10 $\mu$ l 1mol/L HAC 及 0.3ml 预冷无水乙醇, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$  放置过夜。⑤于 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12000r/min 离心 15 分钟, 然后用预冷的 80%乙醇洗 1 次。小心吸出乙醇, 风干沉淀物。⑥用

30 $\mu$ l RNasin 水(40U/ $\mu$ l)溶解 RNA 沉淀。立即进行逆转录(RT)反应。(3)RT 反应: 反应在 0.5ml 硅化塑料离心管进行。RT 反应配方: 5. RT buffer 6 $\mu$ l, Oligo dT 2 $\mu$ l, DTT 2 $\mu$ l, dNTP 3 $\mu$ l, 乙酰化 BSA 1 $\mu$ l, RNasin 1 $\mu$ l, MMLV-RT 1 $\mu$ l, RNA 提取物 12 $\mu$ l。充分混合于 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1 小时, 合成 cDNA, 然后于 95 $^{\circ}\text{C}$  加热 5 分钟, 终止反应。(4)PCR 扩增: 反应在 0.5ml eppendorf 管进行, 按下列配方依次加入试剂, RT-PCR 配方为: cDNA 2 $\mu$ l, 10. Rt buffer 2 $\mu$ l,  $\text{MgCl}_2$  1.2 $\mu$ l,  $\text{H}_2\text{O}$  9 $\mu$ l, dNTP 2 $\mu$ l, c-mcy 引物上、下游各 2 $\mu$ l,  $\beta$ -actin 引物上、下游各 2 $\mu$ l, 乙酰化 BSA 0.4 $\mu$ l, Taq 酶 1U,  $\alpha$ -32p-dATP/dCTP 0.5UCi。再向每管中加入 1 滴石蜡油, 于 94 $^{\circ}\text{C}$  槽保温 3 分钟后直接进入循环。94 $^{\circ}\text{C}$  变性 50 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 45 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 秒, 36 个循环后于 72 $^{\circ}\text{C}$  再延伸 8 分钟。(5)琼脂糖电泳初步检查 PCR 扩增产物: 用 2%的琼脂糖, EP(0.5 $\mu$ g/ml)染色法检测, 电压 80V, 电泳时间 30 分钟, 扩增产物在紫外灯下呈红棕色荧光带。(6)聚丙烯酰胺凝胶电泳、放射自显影和激光光密度仪扫描: 采用中型垂直平板电泳槽, 用 10%PAGE (10. SSCP buffer 3.2ml, 36% Acr 1%Bis 8.65ml, 5%TEMED 0.6ml,  $\text{H}_2\text{O}$  18.35ml, 1.25%APS 1.2ml)分离扩增产物, 电极液为 0.5 $\cdot$ SSCP, 电压 160V, 电泳时间约 13 小时, 凝胶在 80 $^{\circ}\text{C}$  真空干燥, 干燥的凝胶与 X 线胶片压在一起, -20 $^{\circ}\text{C}$  曝光 3 天, 取出 X 线胶片, 进行显影、定影。采用 LKB2400Gel/Scan XL 激光光密度仪扫描各电泳泳带的光密度值。计算同一个样品 Bcl-2/ $\beta$ -actin 的值(AU $\cdot$ mm)。

2.2 统计学方法: 采用 *t* 检验。

### 3 结果

3.1 补肾生血药对老年小鼠骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响: 老年小鼠给药组和对照组骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达量, 可以看到老年小鼠骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达量与内参照基因  $\beta$ -actin mRNA 表达量的百分比值为  $46.49 \pm 5.26\%$ , 青年小鼠为  $102.86 \pm 10.19\%$ , 老年小鼠骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达明显降低( $P < 0.01$ )。给予补肾生血药小剂量、大剂量后, 老年小鼠骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达量百分比由  $46.49 \pm 5.26\%$  分别上升到  $56.7 \pm 9.91\%$ 、 $57.42 \pm 7.51\%$ , 转录水平明显提高, 经统计学处理差异有显著性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

3.2 补肾生血药对 D-半乳糖致衰老小鼠骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响: D-半乳糖致衰老小鼠给药组和对照组骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达量, 可以

看到正常对照小鼠骨髓细胞 Bcl-2 基因与内参照基因  $\beta$ -actin mRNA 表达量百分比值为  $108.44 \pm 7.15\%$ , 模型组小鼠为  $68.68 \pm 8.90\%$ , 明显降低 ( $P < 0.01$ )。给予补肾生血药小剂量、大剂量后, D-半乳糖致衰老小鼠骨髓细胞 Bcl-2 mRNA 表达量百分比由  $68.68 \pm 8.96\%$  分别上升到  $91.51 \pm 10.87\%$  和  $89.68 \pm 11.64\%$ , 转录水平明显提高, 统计学处理差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

Bcl-2 基因是 20 世纪 80 年代初通过对某些 B 细胞淋巴瘤患者中发生的染色体易位现象所作的研究而发现的 1 个人体正常基因<sup>[2,3]</sup>, 其表达产物 Bcl-2 蛋白存在于 B、T 淋巴细胞、造血祖细胞、神经细胞、上皮细胞及多种癌细胞株中<sup>[4,5]</sup>, 能抑制细胞程序性死亡, 作用机制与 Bcl-2 的细胞内抗氧化作用及抑制钙离子的跨膜运动有关<sup>[6,7]</sup>, Bcl-2 基因是公认的人体细胞长寿基因, 实验表明 Bcl-2 的过量表达能使多种造血细胞在去除生长因子后寿命增长<sup>[8,9]</sup>。Aggarwal 等<sup>[10]</sup>发现老年个体 Bcl-2 表达较正常人为低, 并有统计学意义, 本实验得到类似结果: 在老年生理性肾虚小鼠和 D-半乳糖致衰老小鼠这两种动物模型中, 骨髓细胞 Bcl-2 基因转录水平明显低于青年(正常)小鼠, 而给予补肾生血药后则明显提高, 提示补肾生血药的作用机制之一可能是通过促进 Bcl-2 基因表达, 抑制骨髓细胞凋亡, 延长细胞寿命, 导致骨髓造血细胞数目增加, 结果造血功能旺盛, 髓海充盈。自 20 世纪 90 年代以来, 国外有学者进行了 Bcl-2 基因剔除工作, 发现这种缺乏 Bcl-2 基因的小鼠会出现发育不良、形体小、寿命缩短、毛发变浅、软骨发育异常、外耳变小、多囊肾、生殖能力下降、免疫力下降、消化道上皮异常等症状<sup>[10-13]</sup>, 这些症状与中医肾虚证的表现相吻合。国内学者<sup>[14]</sup>据此提出了 Bcl-2 基因可能是中医肾本质相关基因的假设。结合国内外的工作和本文的研究结果, 我们认为 Bcl-2 基因是肾生髓本质相关基因之一。

#### 参考文献

- 1 王中林, 胡葵, 徐恒泽, 等. 艾灸对 D-半乳糖致小鼠衰老模型特定脑区突出蛋白合成能力的影响. 实用老年医学(抗衰老特集), 1997, 11: 23.
- 2 Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, et al. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. N Eng J Med, 1982, 307(20): 1231-1236.
- 3 Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Science, 1984, 226(4678): 1097-1099.
- 4 Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, et al. Bcl-2 protein is

- topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(16): 6961-6965.
- 5 Reed JC, Tsujimoto Y, Alpers JD, et al. Regulation of Bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. Science, 1987, 236(4806): 1295-1299.
  - 6 Zamzami N, Brenner C, Marzo I, et al. Subcellular and submitochondrial mode of Bcl-2-like oncoproteins. Oncogene, 1998, 16(17): 2265-2282.
  - 7 Reynolds JE, Eastman A. Intracellular calcium stores are not required for Bcl-2-mediated protection from apoptosis. J Biol Chem, 1996, 271(44): 27739-27743.
  - 8 Brozillo GV, Endo K, Tsujimoto Y. Bcl-2 confers growth and survival advantage to interleukin 7-dependent early pre-B cells which become factor independent by a multistep process in culture. Oncogene, 1992, 7(5): 869-876.
  - 9 Nunez G, London L, Hockenbery D, et al. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. J Immunol, 1990, 144(9): 3602-3610.
  - 10 Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, et al. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. Cell, 1993, 75(2): 229-240.
  - 11 Nakayama K, Negishi I, Kuida K, et al. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice; occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(9): 3700-3704.
  - 12 Kamada S, Shimono A, Shinto Y, et al. Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. Cancer Res, 1995, 55(2): 354-359.
  - 13 Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, et al. Ablation of Bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology, 1995, 136(8): 3665-3668.
  - 14 张登海, 钟慈声, 孙安阳主编. 一氧化氮的生物学. 上海: 上海医科大学出版社, 1997: 119-131.

## • 征 文 •

由中华中医药学会中医各家学说专业委员会主办、中医杂志社承办、河南中医学院承办的“第五届全国中医各家学说理论暨临床应用学术研讨会”拟定于 2002 年 10 月在厦门召开。

征文内容: 历代医家学术思想、学术贡献的探讨; 历代医家临床经验探讨及其方药的发展应用; 中医学流派形成、演变与发展的探讨; 历代医家不同学说的研究; 中医各家学说教学理论的研究; 历代方药的实验研究、新药开发及剂型改革; 中医及中西医结合防治专科专病的理论研究、临床研究; 名老中医学术思想及经验总结。文稿限 2000 字以内, 请自留底稿, 务必写明作者姓名、职称、工作单位、通讯地址、邮编等。论文由中华中医药学会组织专家评审, 每篇论文需交审稿费 20 元, 版面费 200 元, 录用论文发会议正式邀请通知书。未录用论文版面费将全部退回。与会代表由中华中医药学会颁发论文证书并授予继续教育学分。请在信封右下角注明“各家会”字样。

文稿及汇款请于 2002 年 7 月 10 日前寄至河南省郑州市金水路 1 号河南中医学院基础部办公室高天旭收, 邮编: 450008, 电话: (0371) 5680237, 5934070, 传真: (0371) 5962406

E-mail: jichubu80@sohu.com