

用 DDRT-PCR 技术分析快速老化模型鼠衰老相关基因的差异表达及针刺的作用

于建春* 陆明霞* 于涛* 王舒* 刘庆忠* 指导:韩景献*

摘要 目的:研究衰老相关基因的表达差异及针刺的作用,试图从分子水平说明针刺抗衰老的机理。方法:采用 DDRT-PCR 技术,以快速老化模型鼠(SAM-P/10)为材料,针刺“人中”、“内关”和“太冲”3 穴,分析了 SAM 鼠伴加龄脑细胞基因表达的差异及针刺的作用。结果:针刺前某些基因的表达随增龄发生一定的变化,显示与衰老相关;而针刺后,其表达均受到影响,其变化均趋同于年轻组。结论:针刺不仅具有调节作用及腧穴特异性,而且可能通过这种调节作用影响衰老相关基因的表达而干扰衰老进程。

主题词 衰老/针灸效应 衰老/免疫学 @ DDRT-PCR 技术

近年来,我院采用针刺疗法在治疗老年性痴呆、延缓衰老症状方面取得较好疗效。机理研究表明,针刺可延缓衰老,提高学习及记忆力^[1],提高超氧化物歧化酶(SOD)活性,降低脂质过氧化物(LPO)含量^[2],甚至可以影响即刻早期基因 c-fos, c-jun 的表达^[3],但针刺延缓衰老的分子机理研究却很少。本研究采用 DDRT-PCR 方法^[4],以快速老化模型鼠(senescence-accelerated mouse, SAM)^[5]为材料,研究衰老相关基因的表达差异及针刺的作用,试图从分子水平说明针刺抗衰老的机理。

1 材料和方法

1.1 材料:快速老化模型鼠(SAM-P/10)由日本京都大学引进并在本院成功繁殖。试剂 RNAgents TOTAL RNA Isolation System, pGEM T-Easy Vector System, RNase-Free DNase, RNasin, Taq DNA polymerase 购自 Promega 公司、Reverse Transcriptase II GIBCO BRL 公司。引物 NNNNNN、随机引物 S₁₀₁~S₁₂₀、S₄₇₉~S₅₂₀购自 Sangon 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物的选择与分组:选取 SAM-P/10 1 月龄和 7 月龄小白鼠分为以下 4 组: SAM-P/10 1 月龄非针刺组、SAM-P/10 7 月龄非针刺组、SAM-P/10 7 月龄穴位针刺组及 SAM-P/10 7 月龄非穴位针刺组,每组选取 20 只健康雄性小白鼠。

1.2.2 穴位选择及针刺方法:根据中国针灸学会实验针灸研究会制定的“动物针灸穴位图谱”,穴位组选取“内关”(双),“人中”及“太冲”(双)。“内关”及“太冲”用捻转泻法 20 秒,“人中”用雀啄手法强刺激 10 次。非穴位组选择双腋下固定非穴位,作为对照刺激点,行平补平泻捻转手法各 20 秒。针刺组每日针 1 次,7 日停针 1 次,非针刺组进行与针刺组相同程度和时间的捉抓。两周后,各组动物断头处死,快速取大脑。

1.2.3 总体 RNA 提取和纯化:按 Total RNA Isolation System 试剂盒方法提取各组 SAM-P/10 小白鼠总体核糖核酸(RNA),并用 DNase 消化去除痕量脱氧核糖核酸(DNA)。总体 RNA 纯度以紫外分光光度计测定,其 OD₂₆₀和 OD₂₈₀比值在 1.9 以上。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳显示 28s:18s≥2:1,说明总体 RNA 完整,没有降解且较纯净,适于反转录。

1.2.4 差异显示分析:逆转录和多聚酶链式反应(PCR)扩增参考 HaagE^[4]的方法进行。首先取 5μg 总体 RNA 进行反转录,加入 1pmol 六碱基简并引物(NNNNNN),70℃变性 5 分钟,置冰上冷却 2 分钟,然后依次加入 1mmol/L d NTP, 200U 逆转录酶、1 倍反应缓冲液和 20U RNasin,总反应体系为 20μl,42℃保温 1 小时。反应结束后于 75℃加热 10 分钟以终止反应,然后进行 PCR 扩增,应用两种随机引物随机进行扩增。取 1μl 逆转录产物,分别入 200μmol/L d NTP, 1μmol/L 随机引物,1 倍 PCR 反应缓冲液和 1U Taq DNA polymerase,总反应体系为 25μl。最后加入 20μl 轻矿物油覆盖。PCR 扩增采取双温扩增^[6]。其条件是:第 1 循环变性、退火、延伸温度分别是 94℃、37℃、72℃,时间均为 5 分钟;第 2 和第 3 循环变性、退火、延伸温度分别是 94℃、37℃、72℃,时间均为 1 分钟;最后 40 个循环变性、退火、延伸温度分别是 94℃、50℃、72℃,时间分别为 30 秒、1 分钟和 1 分钟,最后在 72℃延伸 7 分钟。扩增产物在 6%聚丙烯酰胺凝胶上分离后进行银染^[7]。

1.2.5 差示带的回收及再扩增:银染后直接从凝胶上寻找差示带并切下,置于 1.5ml 的 Eppendorf 管中,加入 20μl 灭菌水,煮沸 5 分钟。待冷却后,离心取上清,取 2μl 作模板进行再扩增。PCR 参数为 94℃,变性 30

基金项目:天津市科技发展计划重点资助项目(993113511)

* 天津中医学院第一附属医院老年病研究室,天津市南开区鞍山西道 314 号(300193)

收稿日期:2001-01-09;修回日期:2001-04-02

秒, 50℃退火 1 分钟, 72℃, 延伸 1 分钟, 共 35 个循环。其他条件与差别显示完全一致。

1.2.6 克隆及测序: 将回收的目的带用 Promega 公司 pGEM T-Easy 载体克隆, 测序由 TaKaRa 公司完成。从基因库中查找同源序列。

2 结果

PCR 扩增时, 每次采用一对引物随机组合进行, 已筛选了 40 个引物, 大多数引物都能扩增出差示带, 其中有些差示带有明显的规律性, 与衰老相关, 并受针刺影响。如分别采用引物 S₁₀₅、S₁₀₆ (5' AGTCGTCCC 3', 5' ACGCATCGCA 3') 和 S₄₈₁、S₄₈₂ (5' GGGACGATGGG 3', 5' TCTGTCTGGTC 3') 扩增, 可见规律性变化的差示带均与衰老相关。但采用引物 S₁₀₅、S₁₀₆ 的差示带伴加龄增多, 而采用引物 S₄₈₁、S₄₈₂ 则正相反。而针刺“人中”、“内关”和“太冲”3 穴后, 两条差示带都发生了明显的变化, 或减少或增多, 均趋同于年轻组; 而非穴组均没有明显的变化。通过数字化凝胶成像分析仪分析差示带, 显出相同的变化规律。有趣的是, 用其它引物同样扩增出与上述分子量及变化规律相似的差示带。说明针刺穴位对不同的衰老相关基因具有良性调节作用并因此影响其表达(图略)。

对采用引物 S₄₈₁、S₄₈₂ 扩增出的差示带洗脱后克隆, 并进行了测序, 其核苷酸序列如下: AGTAGGGC ACTGCATTAA CAATAGCCAG AGCTCCAGAA AGAGAAATCA GGTACTTGAC AAATGTCTCC ACAATCACTG GCAGATCTAT GCTTAGAAAG TTGAAACGTG GGATGAACT TGTAATGCTC ACTGTGTAGT GAAGATGCAG TGGGTGAAAT ACTA。共 162bp, 在基因库中未找到同源序列, 说明该片段可能是一新基因。

3 讨论

SAM 鼠是自然发生的快速老化模型小白鼠, 其 P/10 品系除具有一般的老化特征外, 还存在明显的学习记忆障碍, 认知功能减退以及明显的脑萎缩特征, 与老年性痴呆的临床表现十分相似, 是研究脑老化的理想材料。在临床中, 我们针刺内关、人中、太冲等穴位治疗老年性痴呆取得了较好的疗效。其中人中为督脉要穴, “督脉者, 起于下极之输, 并于脊里, 上至风府, 入属于脑”, “脑为元神之府”, 针刺之可醒脑调神, 启智开窍。内关为心包经之络穴, 心包为心之外围。心藏神, 故针刺内关可调心神、通血脉。太冲穴为肝经原穴, 具有疏肝理气、调畅情志之功。以上诸穴均采用泻法。邪气(如瘀血、痰浊)在老年性痴呆的发病中占有很重要

的地位, 而泻可祛邪, 邪去则正安, 泻即为补, 非独补法也。通过观察, 我们发现泻法较补法的疗效更好。故本实验选取“内关”、“人中”、“太冲”作为针刺穴位。我们发现, 针刺 1 周后, 针刺组体毛脱落减少并恢复光泽, 活动力增强, 甚至须在笼中追捉, 明显地改善了其老化症状。以往的行为学实验证明, 针刺可明显改善其认知力, 记忆力等行为学特征^[1]。而非穴组和 7 月龄组则变化不明显, 说明针刺对延缓衰老, 改变老化症状有一定的作用。

实验结果显示, 针刺可对一组或一群基因的表达起调节作用, 而不是仅仅对某一种基因起作用, 说明针刺的作用是一种整体性作用。而针刺对衰老时高表达基因的抑制, 对低表达基因的促进, 说明针刺可以调节多种基因的表达, 是其良性调节作用在分子水平的体现, 证明针刺的根本作用是调节作用。针刺抗衰老可能是通过调整衰老状态下基因表达的异常而起作用。

实验结果还显示, 针刺影响的是 cDNA 量, 说明针刺抗衰老作用很可能是通过调控基因的转录或信使核糖核酸(mRNA)的半衰期或两者兼有来实现的。有资料显示^[8], 半衰期对 mRNA 的稳定性起着更重要的作用。而影响 mRNA 半衰期的因素, 既有 mRNA 分子本身的序列元件, 如 5' 帽结构, 5' 非翻译区(5' UTR), 编码区, 3' 非翻译区(3' UTR) 和 poly(A) 尾; 又有 mRNA 之外的因素, 如核酸酶、结合蛋白等; 还有细胞外因素如激素、病毒等。具体主要通过哪一种途径, 有待于进一步研究。

参考文献

- 1 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.
- 2 高汉义, 阎乐法, 刘百波, 等. 针灸治疗老年血管性痴呆的临床研究. 中医杂志, 1999, 40(8): 471-473.
- 3 崔霞, 韩济生. 电针刺激下即刻早期基因和前脑啡肽基因在中枢神经系统中的表达及定位研究. 生理科学进展, 1995, 26(3): 230-232.
- 4 Haag E, Raman V. Effects of primer choice and source of Taq DNA polymerase on the banding patterns of differential display RT-PCR. Biotechniques, 1994, 17(2): 226-228.
- 5 韩景献. 日本快速老化模型鼠(SAM)老化诸特征. 实验动物科学与管理, 1995, 12(4): 21-29.
- 6 Zhao S, Ooi SL, Pardee AB. New primer strategy improves precision of differential display. Biotechniques, 1995, 18(5): 842-846, 848, 850.
- 7 Blum H, Beier H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 1987, 8: 93-99.
- 8 钟珍萍, 吴乃虎. 真核生物 mRNA 稳定性的分子机制. 生物工程进展, 1997, 17(3): 34-38.