

实验研究

肾生髓理论分子基础的研究

吴志奎¹ 危巍² 何忠效² 崔京华¹

摘要 本研究用HPLC法分析了生理性肾虚老龄大鼠肝细胞DNA的甲基化水平,发现中国神方补肾生血药可明显增高其DNA甲基化水平,说明补肾生血药通过改变DNA甲基化水平,从而提高基因稳定性,维持正常基因表达,延缓衰老基因的启动。

主题词 肾(中医)/生理学 分子生物学

DNA甲基化作用是一种基因修饰作用,大量研究表明,基因活力与其DNA甲基化水平呈反相^[1,2]。DNA甲基化水平的提高可维持基因的正常表达,阻止异常基因(癌基因、衰老基因)的表达。因此,本研究从基因调控的角度揭示了中医肾生髓的分子基础,可能是由于其提高了DNA甲基化水平,从而维持基因正常表达,延缓衰老基因的启动。

1 材料和方法

1.1 实验材料:实验动物:Wistar雄性大鼠16只,24月龄,体重350~450g,购自北京中国医学科学院动物中心,动物等级为一级,由中国中医研究院广安门医院动物室饲养。

中国神方补肾生血药:主要成分为山萸肉、龟板胶、阿胶、生地等,由中国中医研究院广安门医院制剂室提供,浸膏含量2.88g生药/ml。

DNA碱基:Cytosine(胞嘧啶)、5-methylcytosine(5-甲基胞嘧啶)、Thymine(胸腺嘧啶)、Uridine(尿嘧啶)、Adenosine(腺嘌呤)、Guanine(鸟嘌呤),均为美国Sigma公司产品。

Agarose(琼脂糖):中国科学院生物物理所产品。

高效液相色谱仪(HPLC):Beckman 344M Microgradient,美国Sigma公司产品。

层析柱:Altex ultrasil 10 cx(0.46×25cm)。

1.2 实验方法:

1.2.1 实验动物及给药处理:将大鼠随机分成两组,

每组8只,自18月龄起,分组灌胃给药3.927g生药/kg体重,每天1次,每次2ml,对照组给予等量的水,连续给药6个月,断头处死,立即取出肝组织,用生理盐水洗涤,剔除结缔组织及凝血块后移入-20℃冰箱保存。

1.2.2 鼠肝DNA的抽提:取鼠肝,用生理盐水充分洗涤,加入3倍体积的Buffer A(10mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM EDTA),匀浆,加NP-40至终浓度为0.5%,反应5分钟,1500转/秒离心5分钟,去上清,核沉淀重新悬浮于3倍体积的Buffer B(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)中,加入Proteinase K到终浓度为1000μg/ml,于冰浴中轻摇半小时,于37℃保温12小时,加入等体积酚振荡,12000转/秒离心15分钟,取上层水相,同样的方法再用酚提1次,用24:1的氯仿、异戊醇抽提两次,水相转入透析袋中,在Buffer C(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 10mM NaCl)中透析到外液的O.D₂₇₀<0.05,在内液中加入RNase A到终浓度100μg/ml,37℃保温1小时再加入proteinase K到终浓度100μg/ml,37℃保温2小时。用上述方法,用等量的酚及等量的24:1的氯仿、异戊醇各抽提1次,水相转入透析袋中,在Buffer D(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM NaCl, 1mM EDTA)中透析到外液O.D₂₆₀为0,内液即为抽提好的DNA,于-20℃保存待用。

1.2.3 DNA的含量测定及纯度鉴定:将提取出的DNA于260nm和280nm测定吸光度,计算DNA的含量。算出A₂₆₀/A₂₈₀,要求此值大于或接近1.8,以确定DNA的纯度。再做Agarose电泳,以确定DNA分子的完整情况,电泳胶浓度为1%,电极缓冲液为TBE(0.089M Tris-HCl, pH 8.0, 0.089M 硼酸, 0.002MEDTA),电压50V,电泳2小时后,用0.5μg/ml的EB(溴化乙锭)染色于紫外灯下观察并照像。

1.2.4 鼠肝DNA甲基化水平的测定:将提纯了的DNA用2倍的冷乙醇沉淀后,再真空烘干,用氢氟酸(100μl HF/100mg DNA)于80℃水解80分钟,真空抽

1 中国中医研究院广安门医院,北京市宣武区北线阁5号(100053)

2 北京师范大学生物系

收稿日期:1993-10-15;修回日期:1994-11-20

干,重新溶于洗脱剂中(0.02M 的磷酸二氢铵缓冲液, pH2.3),然后于 HPLC 上测定碱基含量,洗脱剂流速为 2.5ml/分钟,检测器波长为 280nm。

2 实验结果

2.1 DNA 纯度的鉴定:用 HPLC 测定 DNA 甲基化水平时,要求从细胞中抽提出的 DNA 的纯度要高,分子量要大,分子完整,以免在酸水解后测定时会出许多干扰峰,或者由于分子量不够大丢失掉碱基而造成测定误差。由于严格控制了实验条件,从正常鼠肝中和经药物处理的鼠肝中提取的 DNA 经光密度($O_{D_{260}}$ 、 $O_{D_{280}}$)测定和 Agarose 电泳分析,其结果表明抽提出的 DNA 的纯度及分子完整度均达到了 DNA 甲基化水平测定的要求。

附表 鼠肝 DNA 各碱基的 T_R 值

碱基	正常组		给药组	
	T_R 值	积分面积	T_R 值	积分面积
T	1.68	14.55	1.67	15.24
G	2.42	24.50	2.43	23.54
C	2.90	33.44	2.90	33.97
A	4.01	25.54	4.02	25.10
5-mc	5.36	1.97	5.33	2.15

2.2 鼠肝 DNA 甲基化水平的测定:用 HPLC 对生理性肾虚的老龄给药组大鼠和老龄对照组大鼠鼠肝细胞内 DNA 进行了碱基含量分析,从所测得的层析图谱中列出碱基 C 及 5mc 的积分面积、各碱基的滞留时间(Retention time)及 5mc/(c+5mc)的比值,后者可直接反映出 DNA 甲基化水平。从附表数据测算,正常组和给药组的 DNA 甲基化水平分别为 5.56 和 5.95,表明长期服用中国神方补肾生血药的老龄大鼠的鼠肝 DNA 甲基化水平比老龄对照组大鼠鼠肝 DNA 甲基化水平明显增高。

3 讨论

以往采用多种动物模型的相互验证,通过对中国神方补肾生血药作用机理的研究,阐述了中医肾藏精、精生髓、髓生血理论的客观性^[3],本文对其作用的分子基础作了深入探讨。实验所采用的水解 DNA 的方法,可确保 DNA 中的 5-甲基胞嘧啶(5mc)不被破坏。尿嘧啶(u)在本实验条件下的滞留时间(T_R 值)为 1.36 分钟,而本实验 HPLC 检测 DNA 各碱基的结果表明无尿嘧啶存在,也即本实验所测碱基成分仅为 DNA 的水解产物,完全排出了 RNA 的干扰,同时 Agarose 电泳也给出了证明。

从结果中可以发现,给药组鼠肝 DNA 甲基化水平比正常衰老的老龄对照组为高。大量事实表明^[4-9],在衰老过程中,基因组 DNA 甲基化的总体水平呈下降趋势。当然,衰老过程中基因组广泛的不充分,甲基化并不排除 DNA 上某些位点甲基化水平的其他变化。但衰老过程中的低甲基化水平,却使基因的调控能力下降,使某些基因异常表达或过度表达^[10,11],因此,中国神方补肾生血药的抗老化作用,可能与它能使同一生长过程中服药鼠肝 DNA 甲基化水平提高有一定关系。

4 参考文献

- Doerfler W. Annu Rev Biochem 1983;52:93.
- Busslinger M, et al. Cell 1983;34:197.
- 吴志奎,等. 抗衰老科学技术通讯 1991;2(1):80.
- Wilson V L, et al. J Biol Chem 1987;262:9948.
- 何忠效,等. 待发表.
- Fairweather D S, et al. Exp Cell Res 1987;169:153.
- Wilson V L, et al. Science 1983;220:1055.
- Holliday R. Phil Jrans R Soc. London B 1990;326:329.
- Fairweather D S, et al. Clin Sci 1989;78(Suppl. 20):12.
- Ono T, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1978;75:4431.
- Mays-Hoopers L L. Mol Cell Biol 1983;3:1371.

国家自然科学基金资助项目

· 书 讯 ·

●《实用专病方临床大全》为了适应当前“办好一个专科、救活一所医院”的急需,满足全国数万家中、西医院和各科医生的迫切要求,原卫生部副部长、中国中医药学会副会长胡明教授亲自出任总编,国内 10 余家高等医疗科研单位的 68 位专家教授执笔编著的大型权威性实用工具书,收近 2000 位当代名医祖传或毕生经验创制的高效专病方 5668 首,分治中、西医内、外、妇、儿、皮肤、骨伤、五官、男科及其他病症共 586 种。所选专方全部是观察病人 30 例以上,疗效 95% 以上的专病方,并以病为纲,以病统方,每方按方名、组成、功能、适应症、疗效、注意事项、来源、评按 8 栏编写。其特点为独特、资料详实、内容新颖。突出专方,重在高效、编排科学,重在实用、极易查找。一方一按语,详述方义、药理、用方要点,给读者选用提供了宝贵依据,对药物开发有重要的价值。每册 64.40 元。

●《中医药专利大全》本书重点介绍了中医药专利的申请、审查,以及保护等内容,详细描述了中医药专利的申请手续、法律申请文件、检索查新方法、专利授权的基本条件以及审查流程等。读者可按该书介绍的步骤去申请专利,并对如何获得专利权得其要旨。本书汇集了 1985 年以来中国专利局公开的有关中医药方面的专利申请,便于了解目前中医药专利概况,并利于检索。每册 51.70 元。

●《杂病源流犀烛》本书为清代名医沈金鳌所著。三十卷,内容以介绍杂病为主,包括脏腑病、奇经八脉病、六淫病、内伤外感病、面部病、身形病,每门分若干

病症,每病各著源流,详述病症原委,悉其源证,考其主治,因病用方,理法方药甚为契合。为影响最广、流传久远的有关杂病的杰出古医籍。由于以前所出版的本书为繁体字竖排,且三十多年未再看到,使读者不易。此次以简体字横排,据原刻本精校而成。每册 51.70 元。

●《常见病的中医治疗》该书以临床常见疾病为纲,以辨证论治为法,详细地论述了临床各科常见疾病的中医治疗,并对功效近似的中成药方对比分析,说明其各自和作用特点。适用于中医临床工作者,尤其适于基层医生的使用,还可作为家庭用药参考。全书 60 万字,每册 28.50 元。

●《中药别名词典》搜集多种古籍及日本汉方药书之中药别名,全书共收录常用中药正名 5500 余种,别名 27000 之多。本书以正名(即现行通用名称)为序,分列条目。正名之下,列“别名”。各别名按时代顺序排列。力求注明出处,鉴于中日文化交流源远流长,并有部分医药典籍仅见于东瀛之事实,故亦将日本汉方药之名称收录,其异于我国医药典籍者,并注明出处。为了便于鉴别与临床应用,在“别名”之下,简略介绍药物之植物科属、药用部分,以及临床应用范围(主治疾病和证)、用法和临证参考剂量。每册 91.00 元。

以上书价已含邮资,欲购者请汇款至北京东直门内北新仓 18 号中医杂志社科技服务中心刘振海收,邮编:100700。请在汇款单附言栏写清购书名称、册数及邮编。

ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

Clinical Observation on Active Rheumatoid Arthritis Treated with Qing—Bi Mixture.

Deng Zhaozhi, Chen Wei

Thirty cases in the treated group showed a total effective rate of 90%, while that of 20 cases treated with Indomethacin mixture for control was 65%. Comparison on main symptoms and signs between the 2 groups revealed that for the degree of mitigation, the treated group was better, including swelling index of the joints 20meter walking speed, the difference between them being significant. In terms of lab indices, in the treated group the mitigation of ESR, RF, CRP, IgA, IgM, OKT₄, OKT₈, OKT₄/OKT₈ were all better after treatment, that of the controlled group, all but IgA showed no obvious mitigation, again, the difference being significant. In terms of sideeffect, the Mixture yielded less adverse effect.

Authors' address: Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangzhou.

Key words: Arthritis, rheumatoid/TCM therapy @ Qing—bi Mixture

(Original article on page 93)

Influence of Huoxue Huayu (Blood—activation Stasis—removal) Decoction on Blood Picture and Hemorrheology in Patients of Naso—pharyngeal Carcinoma Receiving Radiotherapy.

Hu Peili, Huang Huowen, Zhang Pei

70 cases were randomly divided into treated group and controlled group treated with Huoxue Huayu and non—Huoxue Haoyu drugs respectively. Both groups were observed for their purplish tongue during radiotherapy and hemorrheology before and after radiotherapy. Results showed that, when compared with the controlled group, the rate of purplish tongue was much lower, with much delay of its occurrence in the treated group. However, it made no difference between the 2 groups in hemorrheology.

Authors' address: Oncology Hospital, Zhongshan Medical University, Guangzhou 510060.

Key words: Nasopharyngeal Carcinoma/radiotherapy tongue diagnosis @ Huoxue Huayu Decoction

(Original article on page 104)

Molecular Studies on TCM Theory of "Kidney Generating Marrow"

Wu Zhikui, Wei Wei, He Zhongxiao, et al

The level of methylation of DNA in liver cells of senile rats with physiological hypofunction of the kidney was analyzed by HPLC method. It was found that kidney—tonics and blood—tonics markedly increased the methylation level of DNA, thus, elevated the gene stability, and maintained the normal gene expression, delayed the starting of senile gene.

Authors' address: Guanganmen Hospital, China Academy of TCM, Beijing 100053

Key words: Kidney (TCM)/physiology, Molecular biology

(Original article on page 109)

Influence of Moxibustion in Different Qualities and Quantities on Metabolism of Central and Peripheral 5—HT in Rat of Experimental Yang—Deficiency.

Zhang Jingying, Liu Nongyu, Zhang Rui, et. al.

By adopting fluorescence testing method, we observed the contents of central and peripheral 5—HT, nerve transmitter and its metabolites in reserpinized hyposplenic function rats by different qualities and quantities of moxibustion. Results showed that in experimental hyposplenic function rats, there was a marked lowering of contents of central and peripheral 5—HT ($P < 0.05$). Moxibustion on Zusanli point greatly increased its contents. When strong stimulus was administered, 5—HT contents in cerebral cortex markedly increased ($P < 0.05$), while weak stimulus markedly increased that in peripheral blood ($P < 0.05$). Stimulation with cigarette didn't yield such results, suggesting the superior action of moxibustion to cigarette. The strength of action was related to the amount and intensity of stimulation.

Authors' address: Department of Acu—moxibustion, Nanjing College of TCM, Nanjing 2100029

Key words: Yang—deficiency/Acu—moxibustion therapy serotonin/metabolism, point/Zusanli

(Original article on page 111)