

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.14.019

卫气虚模型大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 表达的季节性变化规律

刘 湘^{1,2}, 王亚利^{*}, 张明泉³, 李博林¹, 闫翠环¹, 王鑫国³, 吴园园¹, 贾 琳¹, 师旭亮³

(1. 河北医科大学中西医结合学院, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050017; 2. 河北省中医院; 3. 河北中医学院)

摘要 目的 探讨卫气虚模型大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 表达的季节性变化规律。方法 分别在春分、夏至、秋分、冬至前 1 周将 20 只 SD 大鼠随机分为正常对照组和模型组各 10 只, 正常对照组大鼠常规饲养, 模型组大鼠采用疲劳联合寒热交替法制作大鼠卫气虚证模型。1 周后采用 RT-PCR 法检测各节气大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 表达。结果 与正常对照组比较, 模型组各节气钟基因 Clock 表达均降低 ($P < 0.05$)。与本组春分比较, 正常对照组、模型组夏至、秋分、冬至钟基因 Clock 表达均降低 ($P < 0.05$); 与本组夏至、秋分比较, 正常对照组、模型组冬至钟基因 Clock 表达降低 ($P < 0.05$); 而夏至与秋分比较, 正常对照组、模型组钟基因 Clock 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 卫气虚模型大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 表达存在春分高、冬至低的季节性节律变化, 且与正常大鼠变化节律一致。

关键词 卫气虚; 钟基因; 季节性节律; 淋巴细胞

卫气学说是中医学重要基本理论之一, 卫气的卫外功能与西医学的免疫功能有密切关系^[1]。本课题组前期研究表明, 季节变化对机体免疫功能有重要影响, 而淋巴细胞免疫功能的季节性变化与肺卫防御理论的认识一致, 都存在着季节性节律变化^[2]。在自然界中, 从单细胞到高等动植物以及人类的所有生命活动均存在着按照一定规律运行、周期性的生命活动现象, 称为生物节律^[3]。而生物体中存在一个由时间控制的系统, 称为生物钟系统。生物钟系统是由生物钟基因调控, 其中钟基因 Clock 担当了关键角色^[4]。我们从卫气虚大鼠和正常大鼠淋巴细胞钟基因 Clock 在一年中不同节气的表达来探讨卫气季节性节律, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 80 只, SPF 级, 体重 160 ~ 200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 主要仪器及试剂

756MC 型紫外可见分光光度计 (上海精密科

学仪器有限公司); PE9600 型 PCR 扩增仪 (美国 PE 公司); 电泳仪及电泳槽 (北京六一仪器厂); UA-254 紫外透射仪 (北京鼎国昌盛生物公司); MDF-382E 型超低温保存箱 (日本 SANYO 公司); HM-200 型电子天平 (日本 AND 公司); 1-15K 型高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); 79-1 型磁力搅拌器 (江苏金坛环宇科学仪器厂)。焦碳酸二乙酯 (美国 Amresco 公司, 批号: E174); 总 RNA 提取试剂 (Takara 公司, 批号: 9108); 脱氧核糖核酸酶 (Takara 公司, 批号: 2270A); cDNA 合成试剂盒 (Takara 公司, 批号: 62120A); PCR 反应体系 (Takara 公司, 批号: R004A)。

1.3 实验分组

依据季节分为春分、夏至、秋分、冬至 4 个节气, 每个节气大鼠 20 只。在每个节气前 2 周, 将 20 只大鼠适应性饲养 1 周, 然后再按随机数字表法分为正常对照组 10 只、模型组 10 只。正常对照组大鼠常规饲养, 模型组大鼠制备卫气虚模型。

1.4 造模方法

采用疲劳联合寒热交替法造模^[5]。具体方法: 大鼠首先在 20℃ 左右常温水里游泳 30 min, 然后取出, 放入 (25 ± 1)℃ 常规饲养室安置, 0.5 h 后将大鼠放入 (40 ± 1)℃ 恒温箱中 15 min, 0.5 h 后放

基金项目: 国家自然科学基金 (81273609)

* 通讯作者: wang1955@163.com, (0311) 86261276

入 -20°C 的冰箱中进行寒冷刺激 20 min, 以上过程每日 1 次, 连续 1 周。造模成功标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[9] 的卫气虚证辨证标准拟定, 症状学改变: 大鼠蜷缩、扎堆、发抖, 背毛凌乱, 汗出明显, 咳嗽, 痰鸣音明显, 不活跃, 有鼻分泌物、搔痒、轻度腹泻等; 血常规检测白细胞数增多。

1.5 观察指标及方法

在相应的节气当天, 大鼠断头取血 (肝素抗凝), 在 4°C 3000 r/min 条件下离心 10 min, 将上清液取出后吸取中间层淋巴细胞, 置于 -80°C 冻存。采用 RT-PCR 法检测外周血淋巴细胞钟基因 Clock 表达。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计处理, 计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

表 1 示, 与同节气正常对照组比较, 模型组大鼠钟基因 Clock 表达均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与本组春分比较, 正常对照组、模型组夏至、秋分、冬至钟基因 Clock 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与本组夏至、秋分比较, 正常对照组、模型组冬至钟基因 Clock 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而夏至、秋分钟基因 Clock 表达两组组内比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各节气卫气虚模型与正常对照组大鼠钟基因 Clock 表达比较 $(\bar{x} \pm s)$

节气	鼠数	正常对照组	模型组
春分	10	$0.713 \pm 0.024^{\#}$	0.500 ± 0.024
夏至	10	$0.650 \pm 0.033^{* \#}$	$0.434 \pm 0.032^{*}$
秋分	10	$0.640 \pm 0.019^{* \#}$	$0.430 \pm 0.024^{*}$
冬至	10	$0.578 \pm 0.033^{* \Delta \#}$	$0.341 \pm 0.037^{* \Delta \Delta}$

注: 与本组春分比较, $^{*} P < 0.05$; 与本组夏至比较, $\Delta P < 0.05$; 与本组秋分比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组同节气比较, $\# P < 0.05$

3 讨论

卫气具有保护机体不受外邪侵袭的作用, 是人体卫外功能的第一道屏障。西医的淋巴细胞在免疫应答过程中发挥着核心作用, 体现了卫气的防御功能, 故淋巴细胞可能与卫气存在一定联系。卫气除具有护卫的特点外, 还有其运行节律。《灵枢·卫气行》言“卫气之在于身也, 上下往来不以期,

候气而刺之奈何? 伯高曰: 分有多少, 日有长短, 春秋冬夏, 各有分理, 然后常以平旦为纪, 以夜尽为始”, 此正所谓年有四季, 昼夜长短变化, 卫气亦随之而波动, 从而呈现出一年不同季节的节律性变化^[9]。我们前期研究已证明, 人外周血 T 淋巴细胞 $\text{CD}3^{+}$ 、 $\text{CD}4^{+}$ 、 $\text{CD}4^{+}/\text{CD}8^{+}$ 值夏季高于冬季^[9], 且淋巴细胞免疫功能存在季节性变化^[9], 人体免疫功能存在春夏高、秋冬低的趋势^[9], 推测淋巴细胞免疫功能是肺卫防御机制之一。

机体的生理功能、生化代谢、行为改变等均表现为较恒定的节律变化, 以维持生物体内环境的周期性振荡与稳态。生物钟分子由若干基因组成, 能够起到主持、输出生物体节律的基因称为钟基因, 这些基因发生突变或缺陷时可引起生物节律异常, 在这些基因中钟基因 Clock 是其核心组分之一^[10]。钟基因 Clock 的表达或抑制对生物体的节律变化有重要作用。有研究表明, 在正常的昼夜交替下, 钟基因 Clock 的表达维持 23.3 ~ 23.8 h 的周期, 人为增加钟基因 Clock mRNA 的量, 可使小鼠昼夜节律加快, 反之该基因的突变会使小鼠丧失昼夜节律^[11]。

本研究结果表明, 随着一年四季的变化, 正常对照组大鼠、模型组大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 表达呈现春分表达高于其他三个节气 ($P < 0.05$), 而两组大鼠钟基因 Clock 在冬至的表达低于其他三个节气 ($P < 0.05$)。在四个节气中卫气虚大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 的表达明显低于正常大鼠 ($P < 0.05$)。此外, 卫气虚大鼠与正常大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 表达的波动呈现一致性。综上所述我们推断, 正常大鼠与卫气虚大鼠血淋巴细胞钟基因 Clock 表达存在季节性节律变化, 且两者的表达存在相关性。春季钟基因 Clock 表达最高, 而冬季表达最低, 这与人体的免疫功能年节律相一致。中医理论认为, 春属木, 应升发之气, 此季节阳气升发旺盛, 故此人体卫气亦随之有升发之性; 冬属水, 主蛰伏之性, 此季节阳气收敛闭藏, 故人体卫气亦转为内敛。因此, 春季人体免疫功能升高, 血淋巴细胞钟基因 Clock 表达明显升高, 而冬季人体免疫功能减低, 钟基因 Clock 表达亦随之降低。

综上所述, 本研究从大鼠血淋巴细胞生物钟基因 Clock 季节性节律表达探讨卫气及卫气虚的季节变化规律, 从基因角度证明淋巴细胞免疫功能与卫气运行具有相关性, 且存在季节性节律变化。

参考文献

- [1] 王洪琦, 李建国, 马晶, 等. 卫气虚弱与机体免疫机制相关性研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(12): 32-33.
- [2] 卢志刚, 王亚利, 张明泉, 等. 冬夏季节变化对健康人外周血免疫淋巴细胞的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(2): 106-109.
- [3] Halberg F, Cornelissen G, Otsuka K, et al. Essays on chronomics spawned by transdisciplinary chronobiology [J]. Neuroendocrinol Lett, 2001, 22(5): 359-384.
- [4] Yan L, Miyake S, Okamura H. Distribution and circadian expression of dbp in SCN and extra-SCN areas in the mouse brain [J]. Neurosci Res, 2000, 59(2): 291-295.
- [5] 洪肖娟, 吴曦, 冉茜. 慢性疲劳综合症动物模型制作与检测 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(4): 737-739.
- [6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 390.
- [7] 吴弥漫. 《内经》卫气学说的整理及研究 [J]. 北京中医药大学学报, 1992, 15(2): 17-19.
- [8] 卢志刚, 王亚利, 张明泉, 等. 季节变化对健康人免疫功能的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(13): 1209-1211.
- [9] 师旭亮, 王亚利, 张明泉, 等. 从“天人相应”探讨季节变化对健康人外周血干扰素 γ 和白细胞介素 10 的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(7): 573-575.
- [10] Eames DJ, Liang FD, Ratcliff M, et al. Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines [J]. Science, 1999, 283(5402): 693-695.
- [11] Herzog ED, Takahashi JS, Block GD. Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons [J]. Nat Neurosci, 1998, 1(8): 708-713.

Seasonal Change of Clock Gene Expression in Blood Lymphocytes in Rats Model with Defensive-qi Deficiency
 LIU Xiang^{1,2}, WANG Yali¹, ZHANG Mingquan³, LI Bolin¹, YAN Cuihuan¹, WANG Xinguo³, WU Yuanyuan¹, JIA Lin¹, SHI Xuliang³

(1. Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Hebei Province, 050017; 2. Traditional Chinese Medicine Hospital of Hebei Province; 3. Hebei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the seasonal change of Clock gene expression in blood lymphocytes in rats model with defensive-qi deficiency. **Methods** Twenty Sprague Dawley rats were randomly and equally assigned into control and model groups one week before spring equinox, summer solstice, autumnal equinox and winter solstice. Rats in control group were fed routinely, while those in model group were dealt with methods combining fatigue with alternate cold and heat stimulation to establish defensive-qi deficiency model. Clock gene expressions in blood lymphocytes in rats of both groups were measured one week later in each solar term by RT-PCR. **Results** Expressions of Clock gene were significantly decreased in model group than those in control group in each corresponding solar term ($P < 0.05$). Compared within the same group, Clock gene expressions were significantly lower in summer solstice, autumnal equinox and winter solstice than that in spring solstice ($P < 0.05$). It was significantly lower in winter solstice than those in summer solstice and autumnal equinox ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in Clock gene expression between summer solstice and autumnal equinox ($P > 0.05$). **Conclusion** Clock gene expression in blood lymphocytes in rats with defensive-qi deficiency exhibits seasonal changes including higher in spring equinox and lower in winter solstice. These changes are in accordance with those in normal rats.

Keywords defensive-qi deficiency; Clock gene; seasonal change; lymphocyte

(收稿日期: 2015-02-03; 修回日期: 2015-04-08)

编辑: 邓 媛