

- 6 陈宗懋. 茶对人体的生理调节机能. 茶叶文摘, 1994(2): 1~9.
- 7 Bangham A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. J. Mol. Biol. 1956, 13: 238~252.
- 8 曾莹, 蒋雪淘, 曾仁杰. 卵磷脂微乳的制备与理化性质考察. 药学学报, 2000, 35(1): 52~55.
- 9 郭健新等. 环孢素脂质微粒经小鼠皮肤给药的渗透机理研究. 药理学报, 2000, 35(10): 782~785.
- 10 Cogan, U.; Shinitzky, M.; Weber, G.; Nishida, T(1973). Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid and phospholipid-cholesterol dispersions. Biochemistry, 12, 521~527.

茶多酚延缓衰老作用的分子生物机理研究

——对小鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响

陈比特 林一萍 陈玉春 福建省中医药研究院 福州 350003

摘要 采用一定浓度的茶多酚(Tea polyphenols, TP)和人参汤剂处理老年和成年小鼠;并用 ^3H -甲基掺入法测定了小鼠肝 DNA 甲基化酶的活力。结果证明 TP 和 0.2% 的人参汤剂能明显提高老年小鼠肝细胞 DNA 甲基化酶的活力,具有延缓衰老的作用,为从分子生物的角度探讨 TP 延缓衰老的机理提供客观依据。

关键词 DNA 甲基化酶 肝细胞 茶多酚 人参 延缓衰老

Abstract The Tea polyphenols (TP) and Ginseng decoction were given to the senile mice and the DNA methylating enzyme vitality tests in the liver of Grown mice and senile mice were assayed with the method of ^3H -methyl incorporation. The results showed that the TP and Ginseng decoction could obviously enhance the DNA methylating enzyme vitality in the live cell in senile mice, which showed the effect of anti-senility. It provided the objective evidence for studying the mechanism of IP for anti-senility from the viewpoint of molecular biology.

Key words DNA methylating enzyme Live cell Polyphenols Ginseng Anti-senility

DNA 甲基化作用是一种基修饰作用,可影响基因的表达。从而也必将影响细胞的分化、癌变及老化^[1]。茶在机体内是有效的抗脂质过氧化物。可延缓衰老^[2]。茶多酚(Tea polyphenols, TP)是从茶叶中提取的多酚类化合物,具有极强的抗氧化和抗含氧自由基的功能。^[3]为了研究其分子生物机理,本研究建立了 DNA 甲基化酶活力的测定方法,应用整体动物试验,观察 TP 对小鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响,并以传统中药人参作对照。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 茶多酚(TP)

含 TP> 95% 的黄色粉剂。

1.1.2 实验动物

实验小鼠为雄性昆明种,成年小鼠:3~4 个月,体重 $25 \pm 1\text{g}$;老年小鼠:12~13 个月,体重 $40 \pm 1\text{g}$,由福建医科大学动物中心提供。

1.1.3 主要的实验试剂和仪器

S-腺苷酰- ^3H -甲硫氨酸(^3H -SAM)购自 NEN 公司;刘氏小球菌(Micrococcus luteus) DNA、鲑鱼精 DNA 购自 Sigma 公司;蛋白酶 K、PMSF 购自 Merck 公司;DTT、NP-40 购自 Promega 公司。其他试剂均为国产 AR 级。FJ-2107P 液体闪烁计数器由西安 262 厂生产。高速冷冻离心机为日立 20PR-52D。

1.1.4 人参(Ginseng)

购自福建中医学院国医堂(3g 级)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

小鼠随机分成四组,每组 6 只(1)成年对照组,(2)老年对照组,(3)老年 TP 组,(4)老年人参组。

1.2.2 给药途径和剂量

TP 溶于生理盐水(40mg/kg/d)代替自来水自由饮用;人参按传统方法熬成 0.2% 的汤药供实验)代水自由饮用。对照组饮用自来水。

实验动物饲养 8 周后断头致死,取新鲜肝脏测定 DNA 甲基化酶活力。

1.2.3 小鼠肝细胞核抽提物的制备:

从 6 只小鼠取 3 克肝,在冰浴中悬浮于 $10\text{ml } 0.32\text{mol/L}$ 蔗糖、 5mmol/L MgCl_2 中,匀浆后 2000r/min 离心 15min 得肝细胞,将肝细胞悬浮于 $10\text{ml } 20\text{mol/L}$ 蔗糖、 5mol/L MgCl_2 中,并加入 NP-40 至 0.1% 终浓度。激烈震荡两次,每次 10S 钟,然后置冰浴内 20min ,离心取沉淀得细胞核。将沉淀悬浮于 $6\text{ml } 1\text{mol/L}$ 蔗糖、 1mol/L 蔗糖、 1mol/L MgCl_2 、 1mol/L PMSF 中,并向核悬液加入 NP-40 至 0.3% 的终浓度,在冰浴中匀浆,并于 $4^\circ\text{C } 18000\text{r/min}$ 离心 30min ,上清液便是核抽提物。

1.2.4 蛋白质含量的测定:按 Lowryd 的 Folin 酚法,用牛血清

表 1 茶多酚对小鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响	
组别	甲基化酶比活力 (cpm/mg 蛋白)
成年对照组	2717
老年对照组	2418
老年 TP 组	3320
老年人参组	3357

注：表中数据为 3 次测定的平均值。

白蛋白作标准曲线。

1.2.5 DNA 甲基化酶的测定：在 0.1ml 反应混合液中含有 20mol/ml Tris, PH7. 6; 0.1mol/ml DTT; 5mMEDTA; 9μmol/ml H-SAM(4μCi); 5μg 单链 Micrococcus Luteus DNA 及 200μg 的酶蛋白。37℃ 保温 30min 后,置冰浴中停止反应。加入 2.5μg 蛋白酶 K 和 10μl 10% SDS,并于 60℃ 水浴保温 10min,加入 1ml 碱液 (含 mol/ml NaOH; 50mol/ml EDTA; 50mol/ml Na₃PO₄; 50mol/ml 焦硫酸钠),于沸水浴中保温 10min 后加入冰浴,加入 200μg 鲑鱼精 DNA 作为载体 DNA,再用 4ml 2N 盐酸沉淀 DNA,在冰浴中保持 20min 后,以 GF/C 滤纸收集沉淀,并用 5ml 10mmol/ml 盐酸洗两次,用 95% 乙醇洗一次。在红外灯下烤干滤纸片,并用 3ml 甲苯闪烁液于 FJ-2107P 液体闪烁计数器中测定其放射性。

一个 DNA 甲基化酶活力单位被定义为：在标准检验条件下,每小时催化一个 Picomole 甲基插入到单链 Micrococcus Luteus DNA 上所需的酶量。以比活力 (cpm/mg 蛋白) 表示。

2 结果与分析

茶多酚以地小鼠肝 DNA 甲基化酶活力的影响见表 1。
从表中可见,老龄小鼠肝 DNA 甲基化酶比活力低于成年小鼠,给药组小鼠饮用本实验浓度的 TP 和 2% 人参 8 周后,肝 DNA 甲基化酶比活力均高于正常对照组。说明 TP 能明显提高小鼠肝 DNA 甲基化酶活力,其作用和传统的抗衰老中药人参相似。

DNA 甲基化作用是在 DNA 甲基化酶的作用下,从 S-腺苷酰甲硫氨酸 (S-Adenosylmethionine, 简称 SAM) 上转移甲基到 DNA 分子中胞嘧啶残基 5 位碳原子上,形成 5-甲基胞嘧啶。在生物生长、衰老过程中,DNA 不断受到外界损伤,如自发或诱导异常碱基的出现^[4],使 DNA 甲基化酶不能识别并作用于原来正常的甲基化位点;末端游离的断裂 DNA 出现导致其与 DNA 甲基化酶结合,进而影响正常甲基化部位该酶的效能。因此引起 DNA 甲基化酶活力的下降。

大量的研究表明,茶叶及其提取具有明显的抗氧化、消除自由基、抗肿瘤、抗病毒等多种生理活性,具有延缓衰老的作用。人参为我国传统的延年抗衰方剂,配伍中含人参者不胜枚举。长期的临床实践证明,人参确实有一定的延缓衰老作用。它可以调节、改善老年人内分泌、免疫和代谢功能。提高老年人智能、延缓衰老症状,同时用于治疗一些老年性疾病^[5]。

在本实验中,小鼠服用一定浓度的 TP、人参后,可能改变 DNA 甲基化酶空间构象,使它更容易向正常的甲基化位点转移甲基,从而提高了 DNA 甲基化酶的活力。

本实验的结果为进一步从分子生物的角度探讨 TP 延缓衰老的机理提供科学依据。

参考文献

1 Giulio L Canfoni, Aharon Razin. Biochemistry and Biology of DNA Methylation, Alan R. Liss Inc, New York, 1985.

2 林一萍等. 茉莉花茶的抗脂质过氧化作用及对果蝇寿命的影响[J]. 福建茶叶, 1986(4): 26 ~ 27

3 林一萍等. 人参、茶多酚等在体外抗氧自由基的分析[J]. 福建中医学院学报, 1995 5(3): 27.

4 Wilson, VL. Inhibition of DNA Methylation by Chemical Carcinogens in vitro. Cell 1983; 32: 239.

5 陈可冀. 抗衰老中药学. 中国古籍出版社出版, 1989. 198.

茶多酚诱导癌细胞凋亡结果的几种快速检测方法比较

郭 峰 张军 同济大学医学院生物教研室 上海 200331

摘 要 比较几种常规染色方法在茶多酚体外诱导 EJ 细胞的凋亡检测的效果。以同剂量茶多酚诱导膀胱癌 EJ 细胞凋亡,用琼脂糖凝胶电泳的方法确认细胞凋亡,比较苏木精、台盼兰、吉姆萨染色方法在光学显微镜下细胞凋亡形态的检测效果。结果表明,经苏木精、台盼兰、吉姆萨染色方法染色的标本均可在显微镜下找到凋亡细胞形态,而以苏木精染色方法处理的标本染色效果最好。结论是用苏木精染色方法加琼脂糖凝胶电泳是检测茶多酚诱导的膀胱癌 EJ 细胞凋亡的最佳方法。

关键词 茶多酚 苏木精染色 膀胱癌细胞 细胞凋亡

Abstract In this paper, we compared the hematoxylin-eosin staining method, typan blue staining and giemsa staininmsthods to detectin vitro the EJ cell apoptosis induced by tea polyphenols. DNA gel electrophoresis method was