

## 老化对人体白细胞功能的影响

王鑫 吴梧桐

(生物化学教研室)

**摘 要** 本文比较了不同年龄不同性别的人体外周血白细胞在PHA诱导下DNA和蛋白质合成的能力及 IL-2 的产生水平。结果表明, 在 30 岁至 65 岁年龄组之间, 上述三项指标均平行下降, DNA 合成下降 50%, 蛋白质合成下降 43%, IL-2 水平下降 47%; 同时发现该三项指标在两性间似无明显差异。说明在人体衰老过程中人外周血白细胞的 IL-2 产生明显下降, 这可能与老龄人群免疫功能系统功能降低有关。

**关键词** 老化; 白介素-2; 人外周血白细胞

大量实验证明, 动物随着年龄的增长免疫功能明显降低<sup>[1,2]</sup>, 尤其是丝裂原诱导的 T 淋巴细胞增殖分化的降低。白介素-2 (IL-2) 是由 T 淋巴细胞在丝裂原刺激下产生的, 它与 T 淋巴细胞表面受体相结合, 促使了 T 淋巴细胞的增殖和分化<sup>[3]</sup>。

最近我们发现, 老龄大鼠淋巴细胞 IL-2 的产生明显降低, 同时导致了 T 淋巴细胞增殖作用的下降。进一步研究表明, IL-2 水平的降低是由于老龄大鼠淋巴细胞 IL-2 mRNA 水平降低造成的<sup>[4,5]</sup>。为了进一步研究人体老化过程中 IL-2 产生和变化与 IL-2 基因表达的关系, 我们初步以不同年龄、不同性别的人群为对象, 分别测定人外周血白细胞 (WBC) 在 PHA 诱导下 DNA 和蛋白质的合成能力以及 IL-2 的产生水平。实验结果表明, 老龄人无论男性或女性, 其外周血白细胞 IL-2 的产生水平都呈下降趋势, 并与 DNA 合成、蛋白质合成以及淋巴细胞增殖变化相平行。

### 材料与 方法

#### 一、WBC 的分离

将不同性别健康人的新鲜血液分为两个年龄组, 每组 8 人。肝素抗凝并按常规法分离白

细胞, 适当洗涤后重新悬于 20% CS-RPMI 1640 培养液中, 调整细胞浓度  $2 \times 10^6$  cell/ml。

#### 二、DNA 合成的测定

将 WBC ( $5 \times 10^5$  cell/孔) 置于 96 孔培养板, 加 PHA 使最终浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ , 在  $37^\circ\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养 42 h 后加入 [ $^3\text{H}$ ]-TdR, 继续培养 6 h, 用多孔细胞收集器收集细胞, 加闪烁液进行计数。

#### 三、IL-2 的产生及活性测定

WBC ( $2.5 \times 10^6$  cell/ml) 在 PHA 刺激下 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) 培养 48 h, 离心收集上清液, 然后按改进的 Gillis 法分析 IL-2 的活性<sup>[6]</sup>。即以上清液支持依赖于 IL-2 的 CTC 的生长情况测定 IL-2 的活性。测定时将 CTC 配成  $5 \times 10^6$  cell/ml 的细胞悬液 (其中不含 IL-2) 并置于 96 孔板中, 每一孔中加入适量待测上清液, 培养 18 h 后加 [ $^3\text{H}$ ]-TdR, 继续培养 6 h, 收集细胞并加闪烁液进行计数。

#### 四、蛋白质合成的测定

将 WBC ( $1 \times 10^6$  cell/孔) 置于 96 孔培养板, 加 PHA 使其浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ , 同时加入  $7.4 \times 10^4$  Bq [ $^3\text{H}$ ]-Val, 在  $37^\circ\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的环境下培养 6 h, 加入定量的三氯醋酸, 然

后收集细胞并测定沉淀物的放射性。

## 结 果

### 一、不同年龄人体 WBC 的增殖变化

用常规的细胞计数法观察三个年龄组的 WBC 在 PHA ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 诱导下培养 48 h 后的细胞数, 结果表明其细胞数随着年龄的增长明显下降, 在 30 岁到 65 岁之间下降了近 50%, 如图 1 所示。

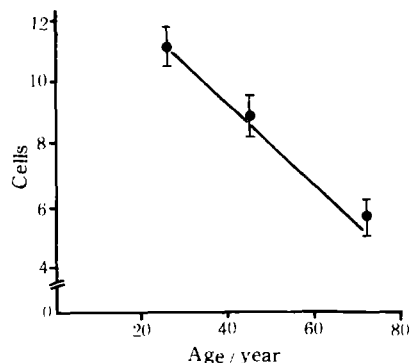


Fig 1. Change of WBC proliferation with age

### 二、不同年龄及不同性别人体 WBC DNA 合成和 IL-2 产生水平的改变

为确定 PHA 诱导的 WBC DNA 合成和 IL-2 产生水平的最适剂量和最佳反应时间, 实验观察了 WBC 合成 DNA 和产生 IL-2 的剂量反应曲线和时间动态曲线(见图 2, 3)。

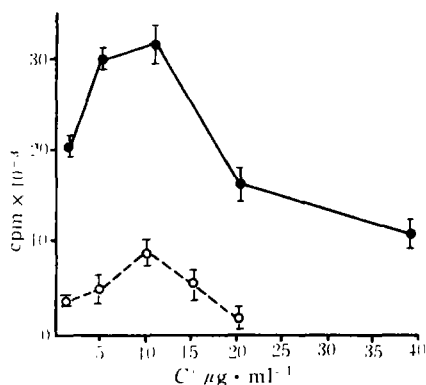


Fig 2. Effect of PHA concentration on DNA synthesis and IL-2 production in WBC

●—● DNA synthesis; ○—○ IL-2 production

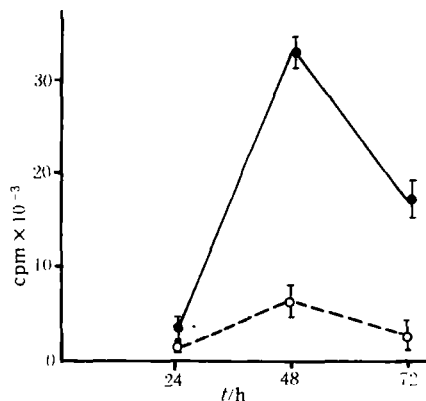


Fig 3. Time course of DNA synthesis and IL-2 production of WBC with PHA stimulation

●—● DNA synthesis; ○—○ IL-2 production

结果表明, PHA 诱导 WBC 合成 DNA 和产生 IL-2 的最适剂量均在  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  左右; 最佳时间均为 48 h。为进一步分析老化过程中不同性别人体 WBC 产生 IL-2 和合成 DNA 的动态变化, 在最适剂量 PHA ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 刺激下, 于最佳时间 (48h) 比较了不同性别的小于 30 和大于 65 岁年龄组人体 WBC 产生 IL-2 和 DNA 合成的变化。(见表 1, 2)。

Tab 1. IL-2 Production by PHA-induced human WBC of different ages and sexes

$^3\text{H}$ -Thymidine incorporation by cloned T cells						
Age	Sex	No.	PHA-stimulated, CPM $\pm$ SE	Control, CPM $\pm$ SE	Index	Change, %
30	men	8	8065 $\pm$ 524	519 $\pm$ 20.8	15.5	100
	women	8	9915 $\pm$ 655	534 $\pm$ 26.5	18.5	100
65	men	8	3861 $\pm$ 214	417 $\pm$ 51.8	8.2	52.9
	women	8	4230 $\pm$ 303	522 $\pm$ 62.6	8.1	44

Index =  $\text{CPM}_{\text{stim}} / \text{CPM}_{\text{control}}$

Tab 2. Effect of age and sex on DNA synthesis in human WBC stimulated with PHA

Age	Sex	No.	Stimulated cultures, CPM $\pm$ SE	Control, CPM $\pm$ SE	Index	Change, %
30	men	8	40001 $\pm$ 1431	2640 $\pm$ 124	15.2	100
	women	8	83903 $\pm$ 3880	4220 $\pm$ 201	19.9	100
65	men	8	17233 $\pm$ 844	2266 $\pm$ 101	7.6	50.2
	women	8	33881 $\pm$ 1661	4214 $\pm$ 212	8.0	40.2

结果表明, 老化过程中 WBC 产生 IL-2

的能力明显下降, 在 30 岁到 65 岁之间, WBC 产生的 IL-2 水平均降低了 50%。WBC DNA 合成下降了近 60%, 其中男性下降了 50%, 女性下降了 59.8%。

三、不同年龄及不同性别人体 WBC 蛋白质合成的改变

在分析 WBC DNA 合成和 IL-2 产生水平的同时, 我们还发现人体 WBC 蛋白质合成也随年龄的增加而明显下降, 见表 3。

Tab 3. Effect of age and sex on protein synthesis in human WBC stimulated with PHA

<sup>3</sup> H-Valine incorporation						
Age	Sex	No.	Stimulated cultures, CPM $\pm$ SE	Control, CPM $\pm$ SE	Index	Change, %
30	men	8	12217 $\pm$ 654	1012 $\pm$ 43.9	11.9	100
	women	8	13582 $\pm$ 641	1037 $\pm$ 13.1	13.1	100
65	men	8	6878 $\pm$ 426.1	1010 $\pm$ 40.8	6.8	57
	women	8	6790 $\pm$ 454.2	996 $\pm$ 43.8	6.8	51.9

结果表明, 由 30 岁到 65 岁, WBC 的蛋白质合成下降了近 50%。其中男性下降 43%, 女性下降了 48.1%。

通过对不同年龄和不同性别人体 WBC DNA 合成, IL-2 产生以及蛋白质合成的实验观察, 发现在老化过程中这些参数都明显下降, 而且变化动态基本相平行, 见图 4。

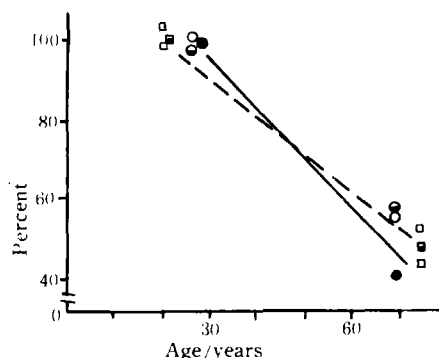


Fig 4. The effect of age on DNA synthesis, IL-2 production and protein synthesis

men      women  
 ●—●    ■—■    DNA synthesis  
 ●—●    ■—■    IL-2 production  
 ○—○    □—□    Protein synthesis

## 讨 论

实验表明, 无论性别如何, 随着年龄的增加, 其 WBC 的 DNA 和蛋白质合成以及 IL-2 的产生均呈平行下降趋势, 并与 WBC 的增殖变化相一致, 这说明随着年龄的增长, WBC 在细胞水平和分子水平上都表现出对丝裂原的增殖应答明显降低, 而且和 IL-2 产量的减少密切相关; 这与以大鼠为研究对象得出的结论完全一致<sup>[4,5]</sup>。已有许多证据表明, 不论是对于人类还是实验动物, IL-2 的产量会因老化大量减少<sup>[7-9]</sup>, 而且与 IL-2 基因表达的下降密切相关<sup>[4,5]</sup>。因此推断, IL-2 基因表达的下降是老化过程中淋巴细胞有丝分裂下降的关键因素, 很可能是淋巴细胞老化进程的重要标志, 是老化机体免疫功能减退的重要分子基础。根据这一机理, 拟设想以 IL-2 的产生及其基因表达作为研究抗衰老药物的有关指标。本实验室正以此来筛选具有恢复 IL-2 基因表达功能的抗衰老药物, 并已取得初步结果<sup>[10]</sup>。

因为女性平均寿命高于男性, 实验试图从免疫学角度对这一现象予以探讨。初步结果表明, 两性间在老年期其 WBC 的 DNA 和蛋白质合成以及 IL-2 的产量方面似乎无明显差别。

## 参 考 文 献

- 1 Makinodan T. Mechanism of senescence of immune response *Fed Proc* 1978; 37: 1239-42
- 2 Krogsrud RL and Perkins EH. Age-related change in T cell function. *J Immunol* 1977; 118: 1607-10
- 3 Robb RJ. T cell grow factor receptors. *J Exp Med* 1981; 154: 1455-8
- 4 吴梧桐, Cheung H T, Richardson A, et al. 老化过程中 IL-2 基因表达的改变. *生物化学与生物物理学报* 1988; 20(1): 21-7
- 5 Wu WT, Cheung HT. The effect of aging on the expression of interleukin 2 messenger ribonuclei acid. *Cellular Immunol* 1986; 100: 224-7
- 6 Cheung HT, Richardson A. Mechanism of the age-related decline in lymphocyte proliferation: Role of IL-2 production and protein synthesis. *Exp Gerontol* 1983; 18: 451-60
- 7 Chang MP, and Makinodan T. Role of T cells and adher-

- ent cells in age-related decline in murine interleukin 2 production *J Immunol* 1982; 129: 2426-30
- 8 Thoman ML and Weigle WO. Cell-mediated immunity in aged mice: An underlying lesion in IL-2 synthesis *J Immunol* 1982; 128: 2358-62
- 9 Thoman M L and Weigle WO. Lymphokines and Aging: Interleukin-2 production and activity in aged animals. *J Immunol* 1981; 127: 2102-8
- 10 吴梧桐, 高向东. 当归及其成分阿魏酸对小鼠脾淋巴细胞的作用. 中国药科大学学报 1989; 20(4): 219-22

## Effect of Aging on the Function of Human White Blood Cell

Wang Xin, Wu Wutong

Department of Biochemistry

We reported that the expression of IL-2 gene in rat decreased distinctly with aging. In these further studies, DNA and protein synthesis and IL-2 production of WBC from human peripheral blood of different ages and different sexes were determined by PHA stimulation. The results demonstrated that DNA, protein synthesis, and IL-2 production declined simultaneously in the age group of sixty five years in contrast with the age group of thirty years. All three parameters decreased by 50%, 43% and 48% respectively in men and 59.8%, 48.1% and 56% in women, but no difference was found between old men and old women. The results demonstrated that the IL-2 production from human peripheral WBC declined drastically with aging. The lowered production of IL-2 contributed to the overall decline in T cell proliferation by mitogenic stimulation. Therefore, the decline of IL-2 production appears to be the cause of the age-related decline in immune function of old people.

**Key words** Aging; Interleukin 2; Human white blood cell

## 粉防己地上部分的化学成分研究

司端运 导师: 赵守训

(中草药化学教研室)

为全面了解中药防己的化学成分, 我们继续从粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 植物地上部分中得到一个单体。鉴定为防己双黄酮甲 (stephaniaflavone A)、防己双黄酮乙 (stephaniaflavone B)、 $\beta$ -谷甾醇和正三十五烷、防己醌碱 (stephadione)、紫堇醌碱 (corydione)、南天竹啡碱 (nantenine)、氧化南天竹啡碱 (oxonantenine)、无根藤新碱 (cassaythicine)、无根藤米里丁 (cassameridine) 和粉防己碱 (tetrandrine)。其中除  $\beta$ -谷甾醇和粉防己碱外均属首次自该植物中得到, 防己醌碱为新的 4,5-二氧阿朴啡类化合物, 防己双黄酮甲和防己双黄酮乙为具有新结构类型的双黄酮类化合物, 这也是首次在防己科植物中发现双黄酮。

我们广泛地研读了有关文献, 对测定双黄酮类化合物的化学结构时曾使用过的化学沟通反应、全合成以及各种光谱方法进行了总结; 还综述了 1990 年前所发现的全部 4,5-二氧阿朴啡类化合物的植物来源、生物合成途径、物理化学性质及人工合成方法, 并总结出了该类化合物的光谱特征与规律。 (全文待发表)

## 头花千金藤块根的化学成分研究

邓京振 导师: 赵守训

(中草药化学教研室)

头花千金藤系防己科千金藤属植物 *Stephania cepharantha* Hayata, 其块根为民间常用草药, 俗称“白药”。其化学成分研究始于 1938 年, 从中分离得到了多种生物碱, 但我国大陆产头花千金藤的化学成分研究则未见报道。我们对江西头花千金藤的块根进行了初步化学成分研究, 从中分离得到七种生物碱, 通过理化性质、光谱分析和化学方法鉴定了其中五种, 分别为 isocorydine(I), cycleanine(II), cepharanthine(III), berbamine(IV) 和 (V)。V 为新化合物, 命名为头花藤啡碱 A (Cepharanmorphine A)。 (全文待发表)