

补脾方药对大鼠脾细胞中 PKC,Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

冯晓帆,张立德*
(辽宁中医药大学,沈阳 110032)

[摘要] 目的:通过观测大鼠脾细胞中蛋白激酶 C(PKC),B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)和 Bax 蛋白表达来探讨补脾方药对脾虚证的作用机制。方法:无特定病原体(SPF)大鼠采用复合方法制成脾虚模型后分别以 3 种不同配伍补脾方药灌胃 3 周。采用免疫组化法测定脾细胞中 PKC,Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。结果:模型组与对照组比较,Bcl-2 表达减少而 Bax 表达增加;中药组与模型组比较,Bcl- 2 表达增加而 Bax 表达减少;中药用药组与脾虚模型组比较,PKC 表达减少($P<0.05$),匀有统计学意义。结论:补脾方药治疗脾虚证的作用机制可能与提高脾细胞中 Bcl-2 表达,降低 Bax 和 PKC 表达有关。

[关键词] 脾虚;脾;蛋白激酶 C;B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因;Bax

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0206-03

Effect of Prescriptions of Reinforcing Spleen on PKC, Bcl-2 and Bax Protein Expression in Spleen in Rats

FENG Xiao-fan, ZHANG Li-de*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang110032, China)

[Abstract] **Objective:**To explore the change of the expression of apoptotic regulatory protein PKC, Bcl-2 and Bax in spleens of spleen deficiency rats. **Method:**Sixty SPF rats were divided equally into five groups. Expression of Bcl-2 and Bax in spleens was studied by immunohistochemistry method. **Result:** Compared to the control group, the expression of Bcl-2 was markedly lower in the model group. Compared to the model group, the level of Bcl-2 was significantly increased while levels of Bax and PKC was significantly decreased. **Conclusion:** Effect mechanism of Spleen-Invigorating recipe on spleen deficiency may be related to the increased of Bcl-2 as well as the decese of Bax and PKC.

[Key words] spleen deficiency;spleen; PKC;Bcl-2;Bax

脾虚证是一种全身性的病理状态。本文旨在说明补脾方药治疗脾虚证后脾细胞中蛋白激酶 C (PKC)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)和 Bax 蛋白表达,有助于阐明补脾方药的作用机制。

1 材料

健康 Wistar 大鼠 60 只,雄雌各半,体重(200 ± 20) g,级别:无特定病原体(SPF),动物许可证号为

SCXK-(军)2007-004,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。所有动物于购入后雌雄分笼适应性饲养 1 周,每笼 5 只,自由饮水,饲大鼠维持饲料,执行标准 GB14924. 3-2001,由中国医学科学院实验动物研究所提供。保持饲养环境安静。

人参、茯苓、甘草、白术等中药依古方药量购于辽宁中医药大学附属医院药房,经辽宁省中医院药毒代检测中心贾东教授鉴定为正品。按传统方法煎煮并浓缩为 100% 药液。蛋白激酶 C 抗体(anti-phospho-PKC)(批号 2505R);Bcl-2 抗体(批号 0032R);Bax 抗体(批号 0127R)均购自北京博奥森生物科技有限公司。Sp 试剂盒(批号 9004R)、DAB 显色试剂盒(8105R)、抗体稀释液、抗原修复液均购

[收稿日期] 20101122(002)
[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20102150)
[第一作者] 冯晓帆,讲师,博士研究生,研究方向:天然药物受体及受体后信号转导,Tel:024-31207093,E-mail: taxi1977@126.com
[通讯作者] * 张立德,教授,博导,Tel:024-31207288

自北京博奥森生物科技有限公司。

F₁ 型微量移液器(美国热电公司生产);HH·B11·500 型电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);LEICA300 型脱水机(德国徕卡公司);EG1150 型石蜡包埋机(德国徕卡公司);LEICA RM2235 型切片机(德国徕卡公司);CHA 型生物显微镜(日本 OLYMPUS 公司);OLYMPUS BX41 型数码显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

2 方法

2.1 分组 将 60 只大鼠分为 5 组:正常对照组、脾虚模型组、归脾汤用药组、四君子汤用药组、六君子汤用药组。每组雄雌各半。归脾汤组成:人参 6 g,白术 9 g,黄芪 15 g,当归 6 g,甘草 5 g,茯苓 9 g,远志 6 g,酸枣仁 9 g,木香 5 g,龙眼 9 g;四君子汤组成:人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g;;六君子汤组成:人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g,陈皮 3 g,半夏 4.5 g。

2.2 造模 正常组动物不施加任何刺激,自然饲养,饮食不限。其他各组采用过度劳倦加饮食失节复合造模法^[1]:单日下午 3:00 游泳 10 min,水温(24±1)℃,饲甘兰,双日猪油灌胃,并给予饲料,饮水不限,造模 3 周。脾虚模型成功后给用药组分别进行中药灌胃,0.02 mL·g⁻¹,1 次/d。正常组和模型组给予生理盐水灌胃,用量与用药组相当,共 2 周。于第 5 周末禁食 12 h,处死后于冰袋上迅速摘取完整脾脏固定。

2.3 动物模型标准 精神倦怠,少动,嗜卧,弓背,聚堆;眯眼,毛色暗淡无光,甚至稀少;软便,便溏;进食量减少,体重增长变慢或体重下降,肛温不变或降低,出现以上症状者即为脾虚造模成功。

2.4 指标检测 脾细胞中 PKC,Bcl-2 和 Bax 蛋白表达按试剂盒说明书提供的方法。常规石蜡切片,置于带多聚赖氨酸的玻片上脱蜡至水。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min 后高温下抗原修复。3% H₂O₂ 去离子水孵育 10~15 min,以消除内源性过氧化物酶活性。滴加封闭用正常山羊血清工作液室温孵育 10~15 min,倾去,勿洗。分别滴加适当比例稀释的 PKC 抗体、Bcl-2 或 Bax 抗体(一抗),阴性对照片一抗用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 代替,37℃ 孵育 2~3 h。PBS 冲洗。滴加生物素标记二抗工作液,室温孵育 10~15 min。PBS 冲洗。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液。DAB 显色,并在本底较浅且达到适当显

色强度时以自来水充分冲洗终止显色反应。苏木素轻度复染、脱水、二甲苯透明。用中性树胶封片。在 400 倍光镜下分别观察 PKC,Bcl-2,Bax 蛋白表达。阳性细胞胞浆内可见有黄褐色颗粒。阳性率以计算机显微图像分析系统测定的灰度值(A)来表示:切片染色后,选择染色良好区域,应用 Leica Q550CW 图象采集和分析系统,每只大鼠组织观察 3 张切片,每张切片在显微镜下(40×)选取 5 个不重叠视野,测定单位面积阳性细胞表达的灰度平均值作为其表达情况,灰度值越高表达越弱。

2.5 统计方法 各组指标数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,检验方法 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

据文献,Bcl-2 基因主要定位于细胞核表达,Bax 基因主要定位于细胞膜和细胞质表达,为黄褐色颗粒。阴性对照结果未见上述颗粒^[2]。

光镜下观察脾细胞中凋亡抑制基因 Bcl-2,Bax 表达变化,空白对照组 Bcl-2 阳性产物较多且颜色深染。脾虚模型组中 Bcl-2 阳性产物较空白对照组显著减少,染色浅。中药用药组中 Bcl-2 阳性产物比脾虚模型组明显增加,颜色深染。空白对照组 Bax 阳性产物相对较少,染色较浅。中药用药组阳性细胞数量较脾虚模型组显著减少分布也较局限。空白对照组 PKC 阳性细胞数量很少,染色也较浅。脾虚模型组 PKC 表达较空白对照组明显增多,颜色深且分布广泛。中药用药组阳性细胞数量较脾虚模型组明显减少,但没有恢复到空白对照组的水平。

各中药用药组与脾虚模型组比较,Bcl-2 表达增加而 Bax 表达减少,并且有统计学意义($P < 0.05$)。各中药用药组与脾虚模型组比较,PKC 表达减少,有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠脾细胞 PKC,Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s,n=10$)

分组	Bcl-2	Bax	PKC
正常对照	81.18 ± 7.47	134.52 ± 6.82	118.00 ± 10.81
脾虚模型	109.98 ± 8.63 ¹⁾	91.89 ± 8.52 ¹⁾	87.67 ± 3.04 ¹⁾
归脾汤	99.02 ± 7.40	112.97 ± 6.57 ²⁾	105.75 ± 9.45 ²⁾
四君子汤	96.84 ± 8.70 ²⁾	112.00 ± 7.62 ²⁾	105.79 ± 9.79 ²⁾
六君子汤	97.61 ± 6.87 ²⁾	113.58 ± 9.98 ²⁾	108.36 ± 10.63 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与脾虚模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

脾位于人体中焦,膈膜之下,与心通过经络相通。主运化、升清、统摄血液、受纳及腐熟水谷。人自身生命活动的持续和气血津液的生化,皆有赖于脾。研究发现,通过复合方法复制出脾虚大鼠模型,造模成功后大鼠出现精神萎靡、少动、食少、体重减轻、便溏等表现,酶的组织化学定量分析结果显示,脾虚大鼠代谢水平相应减弱,符合脾虚证特征。归脾汤、四君子汤、六君子汤是补脾的代表方剂,但其治疗脾虚证的机制未完全揭示。

有研究显示脾脏免疫功能的变化与免疫细胞凋亡密切相关。基因对细胞凋亡的调控过程十分复杂。Bcl-2 是目前发现的抗凋亡作用较强的基因之一,其抗凋亡的机制是通过形成 Bcl-2/Bcl-2 同源二聚体或者是形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体的方式来抑制细胞凋亡。而 Bax 具有促进细胞凋亡的作用。当 Bax 同源二聚体形成时,能够诱导细胞凋亡。随着 Bcl-2 表达量上升,Bax 二聚体分开,与 Bcl-2 形成稳定的 Bcl-2/Bax 异源二聚体和 Bcl-2/Bcl-2 同源二聚体时,能够降低 Bax 二聚体诱导细胞凋亡的作用。^[3]本实验运用免疫组化法检测大鼠脾脏中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达来探讨补脾方药对脾脏的保护功能及其作用机制。结果显示,中药用药组脾细胞 Bcl-2/Bax 比率明显比脾虚模型组的增加,与脾虚模型组比较有非常显著的统计学意义 ($P < 0.05$)。补脾方药可能是通过促进 Bcl-2 基因表达,抑制 Bax 基因的表达,使形成的 Bax 同源二聚体分离来治疗脾虚

证的。

受体及受体后信号转导调控着细胞的功能,与其生长、代谢等生命活动有直接关系。第二信使 Ca、二酰甘油和磷脂酰丝氨酸刺激所激活的蛋白激酶称为蛋白激酶 C (PKC)。PKC 在多种组织、器官和细胞中广泛分布,细胞中 PKC 主要存在于细胞质中^[4],本研究结果表明,补脾方中药对脾虚大鼠脾细胞中 PKC 活性的影响,可能是通过调节脾细胞中 PKC 活性来实现的。PKC 在许多生物学过程中起着十分重要的调控作用。有研究表明,PKC 对细胞凋亡有一定的调控作用^[4]。PKC 的活性是否与 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达具有相关性,有待进一步实验证实。这可能是补脾方药有效保护机体免疫功能的机制之一。

[参考文献]

- [1] 吕爱平,李德新,刘春明,等. 脾虚三证模型大鼠脂质过氧化损伤的比较[J]. 中国中西医结合消化杂志,2001,9(2):74.
- [2] 吴晓勇,李冬云,岳明,等. 益髓颗粒影响 ITP 小鼠脾淋巴细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的研究[J]. 实用中医内科杂志,2010,24(5):3.
- [3] 杨春桥,李国庆,刘玉龙,等. 铁皮枫斛颗粒对辐射诱导的小鼠脾脏淋巴细胞凋亡影响的实验研究[J]. 中国血液流变学杂志,2009,19(3):361.
- [4] 藏梦维. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶[J]. 基础医学与临床,1996,16(2):6.

[责任编辑 邹晓翠]