

# 茵陈术附汤对阴黄证大鼠肝细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

张建军<sup>1</sup>, 何敢想<sup>2</sup>, 张赤志<sup>1</sup>

(1 湖北省中医院肝病研究所, 湖北 武汉 430061; 2 湖北省中医院血管外科, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的 观察阴黄证大鼠肝细胞凋亡和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达以及茵陈术附汤对其的影响。方法 48 只大鼠随机分为 4 组: 正常对照组, 阴黄模型组, 阳黄对照组, 茵陈术附汤组。采用 TUNEL 和免疫组化法检测大鼠肝细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达。结果 阴黄证大鼠肝细胞凋亡程度明显高于阳黄及正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 茵陈术附汤组肝组织 Bcl-2 蛋白表达明显高于阴黄模型组 ( $P < 0.05$ ), 且其 Bax 蛋白表达明显低于阴黄模型组 ( $P < 0.05$ )。结论 茵陈术附汤通过促进 Bcl-2 表达和抑制 Bax 表达阻断阴黄证大鼠肝细胞凋亡, 可能是其治疗阴黄证的机制之一。

[关键词] 阴黄证; 茵陈术附汤; 肝细胞; 细胞凋亡; 基因表达

[中图分类号] R256.4 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2003)02-0116-03

## Hepatocyte apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in Yin-jaundice rats

ZHANG Jian-Jun<sup>1</sup>, HE Gan-Xiang<sup>2</sup>, ZHANG Chi-Zhi<sup>1</sup>

(1 . Institute of Liver Diseases, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei Province 430061, China; 2 . Surgical Department, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei Province 430061, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effects of Yinchen Shufu Decoction on hepatocyte apoptosis and the expression of its apoptosis-regulating gene Bcl-2 and Bax in Yin-jaundice rats . **Methods** Forty-eight rats were divided randomly into 4 groups: the normal control group, Yin-jaundice model group, Yang-jaundice model group, Yinchen Shufu Decoction treatment group . The TUNEL assay and the immunohistochemistry assay were used to detect the apoptosis of hepatocytes and the expression of Bcl-2 and Bax in hepatocytes respectively . **Results** The rate of apoptosis cells in Yin-jaundice model group was higher significantly than that in Yang-jaundice model group and normal control group ( $P < 0.01$ ), the expression of Bcl-2 in Yinchen Shufu Decoction treatment group was higher significantly than that in Yin-jaundice model group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), and the expression of Bax in it was lower significantly than that in Yin-jaundice model group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) . **Conclusion** Yinchen Shufu Decoction can prevent hepatocyte apoptosis perhaps by up-regulating the expression of Bcl-2 and down-regulating the expression of Bax . It is one of the mechanisms of its treatment on Yin-jaundice .

[KEY WORDS] Yin-jaundice; Yinchen Shufu Decoction; hepatocyte; apoptosis; gene expressing

[J Chin Integ Med 2003, 1(2):116-118]

阴黄证病位在肝。胆汁为肝之余气所成, 虚寒内生, 寒滞血瘀, 肝失疏泄, 肝胆之络不通, 胆汁外溢便发阴黄之证。阴黄证与肝细胞的功能异常密切相关, 而肝细胞功能的异常常伴随肝细胞的死亡, 而肝细胞死亡是各种肝脏疾病中最常见的现象, 其方式有二: 凋亡和坏死。细胞凋亡由细胞内基因调控。本实验从阴黄证大鼠肝细胞凋亡, 凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达及茵陈术附汤对其的影响, 探索茵陈术附汤治疗阴黄证的可能机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar 大鼠 48 只, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20)g; 大鼠及饲料, 均购自湖北省医学实验动

物中心(医动发证号: 20020226)。

1.1.2 药物 茵陈术附汤浸膏(茵陈蒿、白术、附片、干姜、炙甘草、肉桂, 比例为 3 2 2 1 2 1)、生大黄煎液(浓度 400%)均由湖北中医学院附院药剂科李启兰主任药师协助制备。- 萘异硫氰酸酯(ANIT)购自 Sigma 公司(产品编号 N9883, 纯度 > 95%), 临用前用色拉油(武汉中昌公司产品)配成 2% 的 ANIT 溶液。

1.1.3 试剂 原位细胞凋亡检测试剂盒(产品编号: MK1020)、Bcl-2 兔 IgG 多抗(编号 BA0412)、

[基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目(2001ABB175)  
[作者简介] 张建军(1964-), 男(侗族), 博士, 副主任医师 . E-mail: zjj7883@public .wh .hb .cn

Bax 兔 IgG 多抗(编号 BA0315)、盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色试剂(编号 ED1022)、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(编号 SA1022)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.4 主要仪器设备 倒置显微镜和显微摄像装置(IMT-2B 型,日本 Olympus 公司生产),HH-M21-600 型电热恒温水浴箱(上海跃进医疗器械厂生产),HPIAS-1000 计算机图像分析系统(华中科技大学同济医学院)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模及给药方法 将大鼠随机分为 4 组:A 组,正常对照组;B 组,阴黄证模型组;C 组,阳黄证对照组;D 组,阴黄证模型加茵陈术附汤组。每组大鼠 12 只,雌雄各半。造模参照张赤志方法<sup>[1]</sup>。除 A、C 两组灌服等量 0.85% 氯化钠液,B、D 组每鼠按 50 ml · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 400% 生大黄浓煎液灌胃,1 次/d,连续 15 d,除 B 组继续大黄液灌胃外,D 组则给予茵陈术附汤 10 ml · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 灌胃,连续至第 19 天。除 A 组外,每鼠予 2% ANIT 色拉油溶液按 6 ml · kg<sup>-1</sup> · 只<sup>-1</sup> 灌胃 1 次,至造模第 22 天处死所有动物,取同一部位肝脏,置于 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片,置于预先用多聚赖氨酸处理的玻片上。

1.2.2 TUNEL 法肝细胞凋亡检测 各组肝脏标本石蜡切片常规脱蜡、水化,再以原位细胞凋亡试剂检测,严格按说明书操作。肝细胞凋亡结果判定:无细胞核棕黄色或棕褐色染色为阴性,细胞(核)显棕黄色或棕褐色为阳性。HPIAS-1000 型全自动医学彩色图像分析:每张玻片随机观察 10 个高倍视野(LM × 200 倍),计数阳性细胞面积总和占参考面积的比值作为细胞凋亡率。

1.2.3 免疫组化法检测肝细胞 Bcl-2、Bax 表达 各组石蜡切片,水化,继以免疫组化试剂盒检测,按说明书进行。肝细胞 Bcl-2、Bax 免疫组化染色判断:无肝细胞质染色为阴性细胞,细胞质染色为棕黄色为阳性细胞。HPIAS-1000 型全自动医学彩色图像分析:每张玻片观察 5 个高倍视野(LM × 200 倍),计数阳性细胞面积总和占参考面积比值作为 Bcl-2、Bax 阳性细胞率。

1.3 统计学处理方法 用 SPSS 10.0 统计软件作方差分析。

2 结果

2.1 肝细胞凋亡检测 光学显微镜下观察,各组大鼠肝细胞中均可检测到凋亡细胞,凋亡细胞核显棕黄(褐)染色,部分细胞核破裂,或呈梅花状,凋亡肝

细胞散在分布于肝实质中,小叶居多,主要位于点状或灶状坏死区周围。各组肝细胞凋亡率见表 1(各组例数为最终染色成功数)。

2.2 肝组织 Bcl-2、Bax 表达 Bcl-2、Bax 阳性细胞均为胞浆棕黄色,正常组大鼠少见阳性细胞,各实验组大鼠阳性细胞呈弥漫性或灶性或散在分布于小叶点状或灶状坏死区周围。各组大鼠肝组织 Bcl-2、Bax 阳性细胞率比较见表 1。

表 1 各组大鼠肝细胞凋亡率及肝组织 Bcl-2、Bax 阳性细胞率比较 (x ± s, %)

组别	n	凋亡率	Bcl-2 阳性细胞率	Bax 阳性细胞率
A	7	03.15 ± 01.24	04.59 ± 1.27	15.47 ± 6.57
B	6	38.69 ± 11.44**	18.80 ± 7.24**	37.40 ± 8.75**
C	5	31.75 ± 10.96**	10.89 ± 4.42**	29.60 ± 5.47**
D	6	28.75 ± 12.54	26.95 ± 5.14	25.80 ± 7.22

注:与 A 组比较,\*\* P < 0.01;与 B 组比较, P < 0.05;与 C 组比较, P < 0.05

3 讨论

凋亡是英国学者 Kerr 1972 年提出的一个概念,是受多基因调控的细胞主动死亡过程。凋亡对一些肝脏疾病如病毒性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肝癌的发生、发展起着相当重要的作用<sup>[2,3]</sup>。凋亡的发生受基因调控。bcl-2 基因家族具有促凋亡和抗凋亡的作用。促凋亡和抗凋亡基因水平决定细胞是否发生凋亡。bcl-2 是目前公认的细胞凋亡抑制基因,大量研究资料表明 bcl-2 可延长细胞存活期,抑制各种因素对细胞凋亡的诱导<sup>[4]</sup>。Bax 可与 Bcl-2 蛋白形成异二聚体使之失活,Bax 表达增强可形成同二聚体,加速细胞凋亡<sup>[5,6]</sup>。Bcl-2 与 Bax 的比例影响凋亡信号的传导。

近几年来,在细胞凋亡及调控基因表达方面进行中医证的研究较少见,而中药对肝细胞凋亡或 bcl-2 家族影响的报道日渐增多。我们研究阴黄证大鼠肝细胞凋亡状况及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的变化,并观察了茵陈术附汤的治疗效应。实验结果显示,阴黄证模型组肝细胞凋亡明显高于正常对照组,其 Bcl-2 蛋白的表达下调,而 Bax 蛋白表达明显升高。茵陈术附汤组的细胞凋亡率、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达与阴黄证模型组有显著差异,可能是其治疗阴黄证的机制之一。同时,在细胞凋亡率方面,阳黄证大鼠与正常对照组比较有显著差异,但较阴黄证模型组要低;在 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达上,阴黄证模型组明显高于阳黄证组(P < 0.05),表明阴

黄证模型组大鼠肝细胞凋亡状况高于阳黄证对照组,可能与其致病因素的复杂性有关。

[参考文献]

1 张赤志,曾浩,程良斌.阴黄证动物模型的建立及其意义[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(7):43-44.

2 张定凤.从肝细胞凋亡探索病毒性肝炎的发病机理[J].中华肝脏病杂志,1999,7(2):65-66.

3 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, et al. DNA-based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without

activation of C-myc[J]. World J Gastroenterol, 2000, 6(2):239-243.

4 姜泊.细胞凋亡基础与临床[M].北京:人民军医出版社,1999 20.

5 Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, et al. Controlled death(apoptosis) of normal and putative pre-neoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters[J]. Carcinogenesis, 1984, 5(4):453-458.

6 朱国萍,姜阳,徐冲. Bcl-2 蛋白家族与细胞凋亡[J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(1):20-23.

[收稿日期] 2003-02-17 [本文编辑] 苏永华

(上接第 85 页)

5.2 “多食易饥”的冠心病案

患者李某,男,53 岁。病案号:1089405。因心悸、胸闷憋气反复发作 10 余年,于 2002 年 10 月 10 日以“冠心病”收住院。

患者于 10 余年前开始出现心悸,甚则伴胸痛、胸闷憋气,ECG 发现频发房性早搏,长期服用胺碘酮。10 年前患下壁心肌梗死,之后胸痛、胸闷憋气、心悸时有发作,活动后加重,经休息、用硝酸甘油后可迅速缓解。5 年前心肌核素扫描示:静息状态下左室后部、下壁局部心肌灌注不良。1 年半前冠脉造影示:左主干狭窄 50% ~ 70%,右冠脉多处狭窄大于 75%,患者拒绝冠脉介入治疗和冠脉搭桥手术。

入院时情况:时有胸痛、胸闷憋气、心悸,劳累和休息时均有发作,含服速效救心丸 3~5 min 缓解,一般体力活动不受限制,夜间偶发阵发性呼吸困难,坐起后缓解,多食易饥,大便次数增多,日行 7~8 次,色黄质软,无脓血,无腹痛,睡眠不佳,舌质紫暗,舌下瘀斑,苔黄腻干,脉弦滑数。

既往有脂肪肝、慢性结肠炎病史 10 余年,高胰岛素血症 5 年,腔隙性脑梗塞 1 年,甲状腺腺瘤术后 3 年。

查:BP 120/80 mmHg,形体肥胖,双肺(-),HR 75 次/min,律不齐,早搏 5~6 次/min。ECG 示交界性早搏伴室内差异性传导,超声心动图示左房稍大,B 超示轻度脂肪肝。肝功能:ALT 96 U/L,总胆固醇 6.37 mmol/L,空腹血糖 5.28 mmol/L,LDL-C 4.06 mmol/L, Apo-B 1.13 g/L, Fib、PT 正常, TSH 5.29 mU/L。

诊断:(1)冠心病不稳定心绞痛,(2)慢性结肠

炎,(3)脂肪肝,(4)高胰岛素血症,(5)腔隙性脑梗塞,(6)甲状腺腺瘤术后。

辨证:胃神火盛,食积化热,灼伤血脉,心脉闭阻。

治疗:入院后患者在原有西药治疗的基础上,每日静脉点滴大蒜素 60 mg+0.9% 氯化钠 500 ml,活血通脉。服用黄连 10 g、丹皮 12 g、当归 20 g、升麻 10 g、生地 50 g、熟地 50 g、石菖蒲 15 g、生山楂 10 g、神曲 10 g、赤芍 20 g、白芍 30 g、乌梅炭 10 g、赤石脂 30 g、仙鹤草 50 g,1 剂/d,水煎服。3 剂后症状显著好转,5 剂后胸痛、胸闷、心悸诸症若失,饮食减少,大便 2~3 次/d,体重减轻,舌脉渐趋正常,ECG 示早搏消失。上方剂量减半继服 10 d,病情无反复,带药出院。

按语:患者除瘀热闭阻心脉所致的胸痹症状外,最突出的表现为“多食易饥”,是胃神器俱盛的表现,属传统中医的胃火炽盛。因此以清胃散为基本方,重用黄连、丹皮、生地、熟地抑胃之神器俱盛,用生山楂、神曲、升麻、白芍、当归、石菖蒲、赤芍消积热、和血脉,乌梅炭、赤石脂、仙鹤草固肠止泄。不专治心而重抑胃之神器俱旺,胃肠与心脏病变均得以迅速控制。

6 结 语

以上是作者对“神器分治理论”的简要介绍,可作为一般指导,实际临床中还需要进一步细化,明确不同脏器组织之神的特异性调神药物和不同脏器组织病变的特异性调节药物,完善“神器分治理论”,提高临床诊治水平。文中不妥之处,还望同仁指教。

[收稿日期] 2003-02-27 [本文编辑] 苏永华