

辛开苦降法对脾胃湿热证大鼠胃黏膜上皮细胞 p53、Bcl-2 蛋白的影响^{*}

郑春素, 陈锦芳

(福建中医药大学中医学院, 福建 福州 350122)

摘要: **目的** 从王氏连朴饮对胃黏膜上皮细胞 p53、Bcl-2 蛋白的作用探讨该方其对大鼠脾胃湿热证病变的作用。**方法** 60 只 SD 大鼠随机分成正常组, 生理盐水组, 奥美拉唑组, 王氏连朴饮高、中、低剂量组 6 组, 每组 10 只。除正常组外, 大鼠均按 10mL/kg 的用量腹腔注射伤寒沙门氏菌, 24 h 后按 5mL/kg 再次灌胃, 结合高脂高糖饮食及环境等复合因素法诱导复制脾胃湿热证模型, 通过胃肠黏膜病理取材确定湿热证病变, 采用免疫组化法检测并分析大鼠胃黏膜的 Bcl-2、P53 蛋白指标。**结果** 奥美拉唑组, 王氏连朴饮高、中、低剂量组和模型组 Bcl-2、P53 蛋白表达较正常组明显增加($P<0.05$); 经治疗后, 与生理盐水组相比, 奥美拉唑组、王氏连朴饮(高、中、低)剂量组 Bcl-2、P53 蛋白表达增量减少, 但王氏连朴饮低剂量组与奥美拉唑组间无显著性差异($P>0.05$), 王氏连朴饮高剂量组优于中、低剂量组及奥美拉唑组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 王氏连朴饮能改善脾胃湿热证大鼠胃黏膜上皮细胞病变, 其作用机制可能与调节 p53、Bcl-2 蛋白有关。

关键词: 辛开苦降; 湿热证; 大鼠; 蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0018-04

王氏连朴饮具有清热利湿的功效, 为辛开苦降法的代表方剂, 本研究以复合因素诱导复制大鼠脾胃湿热证模型, 通过胃肠病理取材确定胃黏膜病变程度, 检测 p53、Bcl-2 蛋白等指标, 观察王氏连朴饮治疗后的变化情况, 尝试从分子生物学角度观察脾胃湿热证的本质并揭示王氏连朴饮的相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体重(200±20)g。(购自福建中医药大学实验动物中心, 合格证: SCXK (闽) 20150002)。伤寒沙门氏菌浓度: 109CFU/mL (购自广东省微生物研究所)。AvantiTM230 型超速冷冻离心机由美国 BECKMAN 公司生产, 即用型 P53-抗体与 Bcl-2-抗体由武汉博士德生物有限工程公司提供, 酶标定量测定仪由德国 Thermo 公司生产。奥美拉唑(北京康蒂尼药业有限公司生产, 批号: 040321)规格: 20mg/片(购于福建省第二人民医院西药房)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脾胃湿热证模型的制作

造模前各组动物禁食 12h, 自由饮水。正常组大鼠以基础饲料喂养 26 d, 并生活在 20~28℃、50%~70%相对湿度环境。其余 5 组参照陈佩娟^[1]等人的脾胃湿热证造模方法, 给予高脂高糖饲料(普通饲料中混入 12%猪油, 8%蜂蜜加工而成)进行喂养, 10 d 后在温度(33±2)℃, 相对湿度 75%±5%的环境中生活, 共 7 d, 然后以鼠伤寒沙门氏菌灌胃, 剂量为 10mL/kg, 24 h 后再次灌胃, 剂量为 5mL/kg。

1.2.2 王氏连朴饮药物的制备

参照《霍乱论》原方中药物比例: 芦根 60g, 制厚朴 6g, 香豉、焦山栀各 9g, 黄连、石菖蒲、制半夏各 3g。以上药物均由福建省第二人民医院中药房提供。上述药物浸泡 20min, 入水量以覆盖药面 2cm 为度, 先武火后文火煎煮约 20min, 滤去药渣取澄清药液。煎煮 2 次后混匀并浓缩, 保存在 4℃冰箱。

1.2.3 分组与给药

大鼠分笼适应性喂养 3 d 后, 60 只 SD 大鼠随机

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173180/H2704); 福建中医药大学重点学科课题(X2014095-学科)

收稿日期: 2015-09-06

作者简介: 郑春素(1979-), 女, 吉林大安人, 副教授, 主要从事温病学的理论及临床研究。

分成正常组、生理盐水组、奥美拉唑组、王氏连朴饮高、中、低剂量组 6 组,每组 10 只。正常对照组和模型组给予等容积生理盐水,西药组给予奥美拉唑浓缩液(1g/kg)灌胃;王氏连朴饮高、中、低剂量组分别按照不同浓度王氏连朴饮浓缩液(根据《中药药理研究方法学》中实验动物(按大鼠 200g 体质量计算)与人(70kg)的体表面积比转换公式,5 倍给药,王氏连朴饮高、中、低剂量组浓度为 16.2g/kg,8.1g/kg,4.1g/kg。) 10mL/kg 体质量灌胃。每日 1 次,连续灌胃 1 周。

1.2.4 标本采集

末次给药后,各组大鼠不禁水,禁食 12h,然后腹腔注射 10%水合氯醛,大鼠麻醉后,剪取胃窦、大肠、十二指肠组织适量,于 4%多聚甲酸溶液中,固定 24h 以上,脱水,浸蜡,包埋,3 μ m 切片,HE 染色。

1.2.5 Bcl-2、P53 蛋白指标检测

采用免疫组化 SABC 法检测大鼠胃黏膜 Bcl-2、P53 蛋白的表达水平,染色具体操作参照试剂说明书。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知的阳性切片做阳性对照。结果判断:细胞胞核呈棕黄色为 p53 核表达呈阳性,细胞胞膜和胞浆呈棕黄色为 Bcl-2 表达呈阳性。

1.2.6 统计学处理

所有数据用 SPSS13.0 软件处理。计数资料用百分数表示,采用秩和检验。

2 结果

2.1 胃、十二指肠、大肠黏膜组织形态变化

HE 染色后,正常对照组大鼠胃黏膜层结构完整,大肠、十二指肠柱状上皮结构完好,绒毛排列紧密。生理盐水组大鼠胃黏膜组织表现为水肿和充血等改变,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞可于黏膜下层和固有层中见到;大肠、十二指肠可见黏膜组织充血水肿,上皮脱落、坏死,炎细胞浸大量润。与生理盐水组相比,奥美拉唑组、王氏连朴饮高、中、低剂量组大鼠胃黏膜、十二指肠绒毛上皮结构均完好(见图 1)。

2.2 各组大鼠 Bcl-2、P53 蛋白的变化

生理盐水组 Bcl-2、P53 蛋白表达较正常组明显增加,差异明显,具有统计学意义($P<0.05$),与生理盐水组相比,奥美拉唑组、王氏连朴饮(高、中、低)剂量组 Bcl-2、P53 蛋白表达降低,但王氏连朴饮低剂量组与奥美拉唑组间无显著性差异($P>0.05$),王氏连朴饮高剂量组优于中低剂量组及奥美拉唑组,组间有显著性差异($P<0.05$),见表 1。

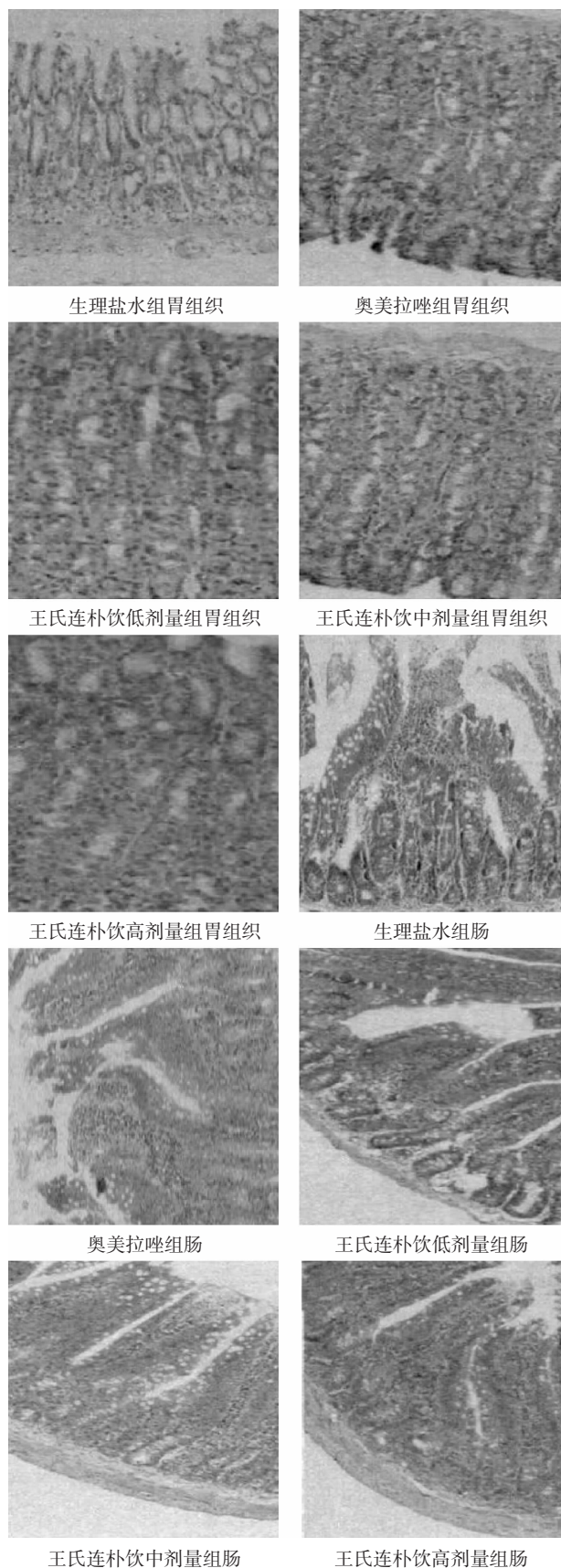


图 1 胃、十二指肠的组织学观察($\times 200$)

表 1 各组大鼠 Bcl-2、P53 蛋白的变化

组别	n	P53 表达					Bcl-2 表达				
		-	+	++	+++	百分比/%	-	+	++	+++	百分比/%
正常组	10	9	1	0	0	30.12	8	2	0	0	27.82
生理盐水组	10	4	1	5	0	55.91	5	1	2	2	55.65
奥美拉唑组	10	6	2	1	0	41.81 [△]	6	1	3	0	38.79 [△]
中药低剂量组	10	6	2	1	0	43.79 [△]	6	1	3	0	38.53 [△]
中药中剂量组	10	6	2	2	0	39.62 [*]	7	1	2	0	37.32 [△]
中药高剂量组	10	7	2	1	0	33.57 ^{△*#}	8	1	1	0	34.56 ^{△*#}

注：与正常组比较，[△] $P<0.05$ ，与西药组比较，^{*} $P<0.05$ ，与低、中剂量组比较，[#] $P<0.05$ ；
阳性细胞数比例 $\leq 25\%$ 为阴性；25%~50%为+；50%~75%为++；>75%为+++。

3 讨论

脾胃湿热证在临床中极为常见，既可由从外感受湿热之邪所致，也可因脾胃虚弱或过食肥甘厚味、辛辣刺激之物，致使湿热内蕴中焦而成，病势缠绵，病程较长，难以速愈。无论从理论还是临床中，辛开苦降法对脾胃湿热证的治疗作用已经得到了共识。王氏连朴饮出自王孟英的《霍乱论》，全方寒温互用，为辛开苦降的代表方，治疗脾胃湿热证具有较好的效果。

现代研究证实胃黏膜结构的完整性主要是由胃黏膜上皮细胞增殖、凋亡的平衡维持^[2-5]。胃黏膜上皮细胞过度凋亡参与了胃黏膜损伤的发生过程。细胞凋亡是一个受基因调控的细胞主动死亡过程，涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用。现代学者通过对胃肠道黏膜上皮细胞凋亡机制的深入研究，发现胃肠道上皮细胞丢失的主要途径为细胞凋亡；胃肠道上皮细胞凋亡与胃肠疾病的发生关系密切；细胞凋亡的调控主要有抑制细胞凋亡、促细胞凋亡、协助细胞凋亡三种基因^[6-8]。脾胃湿热证与消化系统疾病关系最为密切^[9-15]，本研究表明模型组 Bcl-2、P53 蛋白表达明显增加，说明脾胃湿热证的病变过程中细胞凋亡起了一定的作用，奥美拉唑组及王氏连朴饮各剂量组治疗后均较治疗前 Bcl-2、P53 蛋白表达下降，说明药物对脾胃湿热证的改善机制可能通过影响细胞凋亡途径发挥作用，王氏连朴饮高剂量组的 Bcl-2、P53 蛋白表达与正常组无显著差异，与王氏连朴饮中、低剂量相比，有显著差异，说明王氏连朴饮对脾胃湿热证的作用更加突出，从分子生物学角度探讨辛开苦降法治疗脾

胃湿热证的的作用机制有助于更好地研究治疗脾胃湿热证的药物。

参考文献：

[1] 陈佩婵,谭永振. 三仁汤对脾胃湿热证、湿偏重证大鼠胃窦 P 物质、生长抑素的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008,28(2):22-24.

[2] 刘路路,吴秀艳,王天芳,等. 脾胃湿热证诊断标准的研究 [J]. 中医杂志,2015,14(2):1247-1251.

[3] 胡玲,劳绍贤,邝枣园,等. 对幽门螺旋杆菌相关胃病脾胃湿热证发生机制的思考 [J]. 中西医结合学报, 2008,6(6):567.

[4] 吴晋兰,朱飞叶,詹岳峰,等. 慢性胃炎不同证候与细胞凋亡调控基因蛋白的相关性研究 [J]. 中国中医药科技, 2010,17(5):379-380.

[5] 陈佩婵,文小敏,谭永振,等. 三仁汤对脾胃湿热证、湿偏重证大鼠胃窦 P 物质、生长抑素的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2008,28(2):22-24.

[6] 李方,钟兴美. 辛开苦降法治疗脾胃湿热型慢性胃炎 60 例[J]. 新中医,2007,39(6):61.

[7] Mosmann TR,Cherwinski H,Bond MW,et al. Two types of murine helper Tcell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein [J]. Immunol, 2005,175(1):5-14.

[8] 郭彦清,姚树坤,范海燕,等. 清热化湿方药对以消化不良为主要表现的脾胃湿热证患者血清胃肠激素及细胞因子的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(1):63-66.

[9] 廖圣银,曾俊,王爱瑶,等. 慢性胃炎脾胃湿热证大鼠胃黏膜蛋白质组与三仁汤治疗的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志,2013,10(1):76-80.

[10] 陈娟,葛振华,张一帆,等. 脾胃湿热证大鼠胃黏膜促胃液素及生长抑素和 5-羟色胺细胞的相关性研究 [J]. 中国中西医结合杂志,2009,2(5):8-10.

[11] 陈苇晶,胡玲,张婷,等. 从气机失调论治脾胃湿热证[J]. 新中医,2015,10(1):3-6.

[12] 章源. 陈意治疗脾胃湿热证经验 [J]. 浙江中医杂志, 2014,3(2):83-84.

[13] 刘容, 司晓莉. 葛根芩连汤对脾胃湿热证大鼠治疗作用研究[J]. 南京中医药大学学报,2014,8(3):287-290.

[14] 史文斌,沈洪. 历代脾胃湿热证研究概述[J]. 山东中医药大学学报,2013,3(3):519-520.

[15] 王翰, 陈勇毅. 清脾胃湿热证治法探要 [J]. 浙江中医杂志,2013,7(8):556-557.

(编辑:杨阳)

Xinkaikujiang Method of Rats with Spleen Stomach Damp Heat Syndrome Effect of p53 and Bcl-2 Protein in Gastric Epithelial Cells

ZHENG Chunsu, CHEN Jinfang

(College of Traditional Chinese Medicine, Fujian Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: **Objective** Investigate the effect of rat spleen stomach damp heat syndrome lesions from Wang's lianpu drink effect on epithelial cells of the gastric mucosa p53, bcl-2 protein. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, normal saline group, omeprazole group, Wang's lianpu drink high, medium and low dose group 6 groups with 10 rats in each group. In addition to the normal group, the rats by intraperitoneal injection of the dosage of the 10 mL/kg, salmonella typhi, according to 5 mL/kg again after 24 hours to fill the stomach, combined with high fat and sugar diet and environment were induced copy taste hot and humid card model, such as composite factor determined by hot and humid card lesions, gastric mucosa pathological materials adopt normal chemical method to detect and analyze the rat gastric mucosa of the Bcl-2 P53 protein target. **Results** Omeprazole group, wang's Lianpu drink high, medium and low dose group and model group the Bcl-2, P53 protein expression significantly increased in the normal group ($P < 0.05$). After treatment, compared with normal saline group, omeprazole group, wang's Lianpu drink (high, medium and low dose group of the Bcl-2, P53 protein expression incremental reduction, but wang's Lianpu drink between low dose group and omeprazole group there was no significant difference ($P > 0.05$), wang's Lianpu drink high dose group is better than that of middle and low dose group and omeprazole group, difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Wang's Lianpu drink can improve the spleen and stomach damp heat syndrome of gastric mucosal epithelial lesions, its mechanism may be related to the regulation of p53 and Bcl-2 proteins.

KEY WORDS: letter of xinkaikujiang; damp-heat syndrome; rat; protein



(原文见第 12 页)

Study the Effect of Alcohol Extract of Fibrous Root Part of *Bletilla striata* on Apoptosis of Lung Adenocarcinoma Cancer Cell Line of A549

JIANG Ruibin, HUANG Jingjing, LI Haoyu, PAN Ping, JIANG Fusheng, QIAN Chaodong, DING Zhishan[△]
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the inhibition of Alcohol extract of fibrous root part of *Bletilla striata* (AEFB) on proliferation and metastasis ability of A549 cells and to study their preliminary mechanism further. **Methods** MTs, Hoechst-PI staining and Flow cytometry were used to study the effects of proliferation, apoptosis by AEFB. The effect of AEFB on A549 cell migration in two dimensions, the influence of AEFB on the expression of bcl-2, bax, and ICAM-1 gene in A549 cell was evaluated by RT-PCR. **Results** We found that AEFB not only can inhibit the growth of A549 cell but also induce the cell apoptosis in dose and time dependent manner. With the increase of AEFB concentration, the expression of bcl-2, ICAM-1 gene were down-regulated and the expression of bax gene were up-regulated. **Conclusion** AEFB could inhibit the growth of A549 significantly, and has a significant role in promoting tumor cell apoptosis, and inhibit tumor cell migration. The mechanism may be related to decrease of bcl-2, ICAM-1 gene expression and increase bax gene expression.

KEY WORDS: alcohol extract of fibrous root part of *Bletilla striata*; cell apoptosis; tumor cell; migration