

更年汤对肾阳虚围绝经期模型大鼠肾上腺皮质中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

武创新¹, 张帆², 曹俊岩², 齐帅英³, 易华娅³

1. 华亭县人民医院, 甘肃 华亭 744100
2. 贵阳中医学院第二附属医院, 贵州 贵阳 550003
3. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

[摘要] 目的: 探讨中药复方更年汤对肾阳虚型围绝经期模型大鼠肾上腺皮质中 Bax、Bcl-2 表达的影响。方法: 建立自然衰老的雌性肾阳虚型围绝经期大鼠模型, 11~12 月龄 60 只, 随机分为更年汤组、利维爱组、生理盐水组, 每组 20 只; 4 月龄 20 只作为青年组; 18 月龄 20 只作为老年组。用免疫组化法检测肾上腺皮质 Bax、Bcl-2 的表达。结果: 与生理盐数组比较, 利维爱组肾上腺皮质 Bax 表达降低、Bcl-2 的表达升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。更年汤组肾上腺皮质 Bax 阳性总积分表达低于利维爱组、生理盐水组, Bcl-2 阳性总积分表达高于利维爱组、生理盐水组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 更年汤组稍优于利维爱组。结论: 自拟更年汤能降低肾阳虚型围绝经期模型大鼠肾上腺皮质 Bax 的表达, 提高肾上腺皮质 Bcl-2 表达水平, 平衡围绝经期内分泌失调。

[关键词] 肾阳虚; 围绝经期模型; 肾上腺皮质细胞; Bax 及 Bcl-2; 更年汤; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 08-0303-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.08.133

Effect of Gengnian Tang on Bax and Bcl-2 Protein Expression of Adrenal Cortex of Perimenopause Model Rats of Kidney-yang Deficiency

WU Chuangxin, ZHANG Fan, CAO Junyan, QI Shuaiying, YI Huaya

Abstract: Objective: To discuss Chinese medicine (CM) compound Gengnian tang on Bax and Bcl-2 protein expression of adrenal cortex of perimenopause model rats of kidney-yang deficiency syndrome. Methods: Established kidney-yang deficiency female rats model of perimenopause, which was natural aging, herein, 60 cases in 11~12 months old. Divided them into Gengnian tang group, livial group and normal saline group randomly, 20 cases in each group. Take 20 cases of 4 months old as youth group, 20 cases of 18 months old as elderly group. Detected expression of Bax and Bcl-2 of adrenal cortex by immunohistochemical method. Results: Comparing normal saline group, Bax expression of adrenal cortex in livial group was reduced and Bcl-2 expression was increased, differences being significant ($P < 0.05$). Bax positive expression total scores of adrenal cortex in Gengnian tang group were lower than those in livial group and normal saline group, Bcl-2 positive expression total scores were higher than those in livial group and normal saline group, differences being significant ($P < 0.05$), which in Gengnian tang group was superior to those in livial group. Conclusion: Self-made Gengnian tang can reduce Bax expression of adrenal cortex in perimenopause model rats of kidney-yang deficiency, increase Bcl-2 expression level of adrenal cortex, and balance endocrine dyscrasia in perimenopause.

Keywords: Kidney-yang deficiency; Perimenopause model; Adrenocortical cell; Bax and Bcl-2; Self-made Gengnian tang; Animal experiment; Rats

女性进入围绝经期, 伴随卵巢功能的逐渐衰退, 分泌雌激素不足, 逐渐影响全身各系统功能。Chong Lisa 等^[1]研究发现

女性围绝经期时肾上腺的结构和功能出现变化。Dong L^[2]研究发现雌激素能够增加 Bcl-2 表达, 从而抑制细胞凋亡, 认为

[收稿日期] 2016-02-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81160491)

[作者简介] 武创新 (1984-), 男, 住院医师, 研究方向: 中医药对绝经综合症的防治。

[通讯作者] 张帆, E-mail: zhangfan816@sina.com。

是由于雌激素反应元件序列在 Bcl-2 基因增强子区的原因。阿依木古丽^[3]研究发现,雌激素在肾上腺的不同层发挥不同的作用,机理复杂。刘慧娟^[4]指出大鼠双侧卵巢被切除后,肾上腺的皮质束状带增厚,出现了细胞的增生和分泌功能的异常。在前期研究^[5-8]基础上,为了进一步探讨自拟更年期汤对肾上腺皮质的作用机制,本实验进行了自拟更年期汤对肾阳虚型大鼠肾上腺皮质各层中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的研究。

1 材料与方法

1.1 实验药品 注射用氢化可的松:规格:50 mg/支,湖北人民制药有限公司,批准文号:国药准字号:H20058653。自拟更年期汤(来源于张帆教授临床经验总结):熟地黄、山药、枣皮、仙茅、淫羊藿、巴戟天、女贞子、旱莲草、桑寄生各 12 g,当归 10 g,桂枝、独活、防风各 9 g,细辛 3 g,炙甘草 6 g。生药材均由北京同仁堂大药房提供。于贵阳中医学院中心实验室煎制,药液在 4℃ 冰箱保存备用。利维爱:规格:2.5 mg/片,南京欧加农制药有限公司生产,批准文号:国药准字号:H20051085。0.9%氯化钠注射液(生理盐水):规格:250 mL/2.25 g,贵州省科伦药业有限公司生产,批准文号:国药准字号:H20033939。一抗均为鼠单克隆抗体,为北京博奥生物有限公司产品。SP 试剂盒由天津市灏洋生物制品科技有限责任公司提供。

1.2 动物分组及处理 选用雌性 SD 大鼠:11~12 月龄 60 只(体重 280~300 g),随机分为更年期汤组、利维爱组、生理盐水组,每组 20 只;4 月龄 20 只(体重 180~200 g)作为青年组;18 月龄 20 只(体重 420~450 g)作为老年组。以上动物均由重庆市中药研究院动物室提供[许可证号:scxk(渝)2012-0003],微生物控制等级为 级。

本实验采用自然老化型围绝经期模型。适应性喂养 1 周后,选取 11~12 月龄大鼠逐只进行阴道脱落细胞涂片、苏木精-伊红染色(HE 染色)。每天于 9:30 由专人取片 1 次,连续观察 3 个动情期(15 天),观察到底层细胞均在 50% 以上,涂片呈现为动情周期紊乱、动情间期延长为围绝经期模型成功^[6-7]。

围绝经期模型成功后,每天常规消毒后左右交替于模型大鼠臀部肌肉丰厚的部位注射氢化可的松 0.5 mL/100 g(相当于氢化可的松 25 mg/kg),连续肌注 9 天,并同时予青年组和老年组肌注等量生理盐水。见动物出现持续性萎靡不振,反应迟钝,扎堆,拱背少动,毛不光洁,竖毛时则认为肾阳虚型模型造模成功。根据脏腑辨证的标准,肌注氢化可的松造成实验动物的反应与中医肾阳虚证的临床表现相符合,提示成功造模肾阳虚型围绝经期大鼠^[7]。实验过程中统计各组的动物死亡数,更年期汤组 4 只,利维爱组 6 只,生理盐水组、老年组、青年组分别为 7 只。

1.3 主要实验仪器 生物显微图像分析仪(5.30-06064),摄影生物显微镜(XSZ-HS3),电热鼓风干燥箱(GZX-9030),4℃

冰箱(Sc-Z19A)青岛海尔集团,Anke TGL-16G 高速离心机(北京时代北利公司);L600 台式低速自动离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);由贵阳中医学院中心实验室提供。

1.4 标本采集及组织切片 最后一次灌服药物后,各组大鼠用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,经主动脉灌注固定,剖取肾上腺组织,在相同固定液中固定,后浸入 20% 蔗糖 PB 液直至组织沉淀,切片连续切片,厚约 35 μm。

1.5 免疫组化 SP 法检测 Bax、Bcl-2 表达 所有肾上腺标本均在相同条件下进行。操作程序按 SP 试剂盒说明书进行。染色阳性细胞为细胞浆出现棕黄色颗粒。分别计数肾上腺皮质组阳性细胞数。按阳性细胞所占百分比及染色强度两者结合分析判断^[9-11]。阳性细胞所占百分比,即阳性细胞数≤25% 为(+),25%~50% 为(++),>50% 为(+++),无阳性细胞(-);染色强度:浅黄色为(+),棕黄色(++),棕褐色(+++),未着色细胞为(-)。为了统计方便予以半定量计分:(-)为 0 分,(+)为 1 分,(++)为 2 分,(+++为 3 分。每张切片至少观察 3 个视野。

1.6 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间样本均数比较采用单因素方差分析。

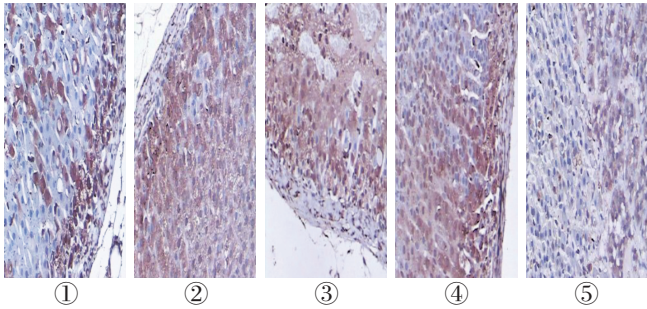
2 结果

2.1 各组大鼠肾上腺皮质 Bax、Bcl-2 阳性表达结果比较 见图 1 和图 2。生理盐水组肾上腺皮质区 Bax 为中度阳性表达(++),呈棕黄色,Bcl-2 为弱阳性表达(+),为浅黄色。更年期汤组皮质区 Bax 为弱阳性表达(+),为浅黄色,Bcl-2 为强阳性表达(+++),棕褐色,利维爱组阳性表达与更年期汤组相似。青年组大鼠肾上腺皮质区 Bax 为弱阳性表达(+),为浅黄色,Bcl-2 为强阳性表达(+++),棕褐色。老年组肾上腺皮质区 Bax 为强阳性表达(+++),棕褐色,Bcl-2 为弱阳性表达(+),为浅黄色。与生理盐水组比较,更年期汤组 Bax 阳性表达总体降低、Bcl-2 总体阳性表达升高。

2.2 各组大鼠肾上腺皮质 Bax、Bcl-2 阳性表达比较 见表 1。对 5 组大鼠肾上腺皮质 Bax、Bcl-2 的阳性表达进行统计。更年期汤组肾上腺皮质 Bax 阳性总积分表达低于利维爱组、生理盐水组,Bcl-2 阳性总积分表达高于利维爱组及生理盐水组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与生理盐水组比较,利维爱组肾上腺皮质 Bax 表达降低、Bcl-2 的表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

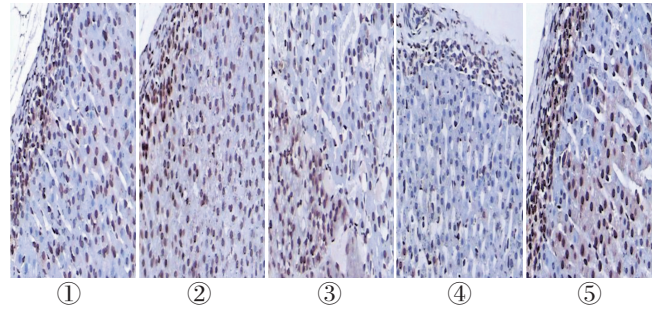
3 讨论

细胞凋亡是细胞在其生长、发育过程中的生理现象,具有特殊的形态学和生化特征,不会引起明显的炎症反应。它是机体为保持自身组织稳定、平衡自身细胞进行的增殖和死亡,是一种细胞的主动性死亡过程,由基因控制。它的生物学意义是在发育过程中参与免疫系统细胞的发育和克隆选择,清除发育不正常、已完成任务、多余无用以及有害的细胞。妇女七七之年,肾气衰,天癸竭,精血虚,气血弱,冲任不顾,脏腑功能



①更年期汤组；②利维爱组；③生理盐水组；④老年组；⑤青年组

图1 各组大鼠肾上腺皮质 Bax 的阳性表达 (100×)



①更年期汤组；②利维爱组；③生理盐水组；④老年组；⑤青年组

图2 各组大鼠肾上腺皮质 Bcl-2 的阳性表达 (100×)

表1 各组大鼠肾上腺皮质 Bax、Bcl-2 阳性表达结果比较

组别	样本数	Bax				积分	Bcl-2				积分
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
更年期汤组	16	5	39	4	0	47 ^{①②}	0	18	15	15	93 ^{①②}
利维爱组	14	5	23	7	7	58 ^①	0	25	7	10	69 ^①
生理盐水组	13	0	19	9	11	70	2	28	5	4	50
青年组	13	8	20	10	1	43	1	9	12	17	84
老年组	13	0	16	8	15	77	3	25	7	4	51

与生理盐水组比较，①P < 0.05；与利维爱组比较，②P < 0.05

异常，肾阴阳失调。研究提示，切除大鼠卵巢后发现肾上腺皮质及束状带厚度出现萎缩性变化，其中束状带细胞失去平行排列及与被膜垂直的结构而交织成网状^[12]。网状带由于细胞的代偿性肥大而增厚。

Bcl-2 存在于细胞内膜和胞液中，可以阻止或延缓细胞发生凋亡，并为细胞的存活创造有利的条件，相对分子量为 26×10^3 。这种基因正常位于第 18 对染色体，由于染色体 7 (14; 18) 转位，Bcl-2 蛋白水平增高，与其相关的许多潜在性的对抗性基因决定其抑制凋亡的相互作用。Bax 为 Bcl-2 的抑制剂，而 Bcl-2 作为 Bax 的调节剂，而 Bax 过量表达可抑制与其约有 21% 同源性的 Bcl-2 功能而促进细胞凋亡，2 者对细胞凋亡起到相互调节，在调节相关细胞生存和死亡中发挥了重要作用。

本研究采用免疫组织化学方法检测自拟更年期汤对肾阳虚型围绝经期模型大鼠肾上腺皮质细胞凋亡抑制基因和促进基因 Bcl-2 与 Bax 的表达，结果提示，自拟更年期汤组肾上腺皮质区细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 表达较生理盐水组增强 ($P < 0.05$)；而细胞凋亡促进基因 Bax 的表达较生理盐水组明显降低 ($P < 0.05$)。Oltvai ZN 及郑德先均在其研究中发现，当细胞中 Bax 蛋白高表达时形成的同源二聚体加速细胞凋亡，而当 Bcl-2 蛋白增多形成 Bcl-2/Bax 异二聚体抑制了细胞凋亡^[7]。Bcl-2 与 Bax 在细胞中的比例决定了细胞是否接受诱导凋亡的信号。因此，推测在围绝经期以前阶段肾上腺皮质细胞中 Bax 表达高于 Bcl-2，以维持细胞正常发生凋亡，维护自我平衡，而当

Bcl-2 与 Bax 之间的平衡在围绝经期发生改变，就可能导致细胞凋亡调控机制的改变。

本研究发现，自拟更年期汤能增强肾阳虚型围绝经期模型大鼠的皮质细胞中 Bcl-2 的表达，降低 Bax 的表达，提示自拟更年期汤对皮质细胞 Bcl-2/Bax 抑制细胞凋亡的作用增强，使皮质细胞凋亡数减少，保持细胞正常增殖数目，表明 Bcl-2/Bax 在肾阳虚型围绝经期过程中发挥着重要作用。细胞凋亡促进基因 Bax 过度表达和细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 的不足表达可能是围绝经期肾上腺发生病理变化的机理之一，但有待于下一步的深入系统地探究。自拟更年期汤组方以“补肾温阳、祛风散寒”为特点^[7]，由二仙汤、二至丸和独活寄生汤化裁而成。在治疗绝经前后诸症中继承传统补肾之法，结合通络祛邪的长处，秉持因地制宜的理念。全方用药滋补肾阳，温通经脉，祛风胜湿散寒，缓解围绝经期症状。可以通过抑制细胞凋亡促进基因 Bax 的表达或促进细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达来达到治疗肾阳虚型绝经前后诸证的目的，为临床治疗肾阳虚型绝经前后诸证提供了新的途径。

[参考文献]

[1] Chong Lisa, McDonald Heather, Strauss Evelyn. Deconstructing aging [J]. Science, 2004, 305 (5689): 1419-1426.
 [2] Dong L, Wang W, Wang F, et al. Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by

- 17beta- estradiol in breast cancer cells[J]. J Biol Chem , 1999 , 274(45) : 32099- 32107.
- [3] 阿依木古丽, 蔡勇, 范光丽, 等. 雌激素对大鼠肾上腺皮质中 Bax、Bcl- 2 表达的影响[J]. 动物学杂志, 2006 , 41(3) : 114- 117.
- [4] 刘慧娟, 贾德永, 刘凯, 等. 去卵巢对大鼠肾上腺皮质网状带结构的影响[J]. 新乡医学院学报, 2005 , 22(4) : 313- 317.
- [5] 张帆, 马卫东. 自拟更年期汤治疗肾阳虚型绝经前后诸证 35 例[J]. 辽宁中医杂志, 2008 , 35(9) : 1360- 1362.
- [6] 张帆, 侯聪. 更年期汤对围绝经期模型大鼠 E₂、LH、FSH、GnRH 的干预作用研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012 , 39(9) : 1850- 1854.
- [7] 曾灵, 张帆. 自拟更年期汤对围绝经期模型大鼠雌激素受体及细胞凋亡相关因子的影响和作用机理研究[D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2013.
- [8] 侯聪, 张帆. 张帆治疗肾阳虚型围绝经期综合征经验[J]. 辽宁中医杂志, 2011 , 38(8) : 1504- 1505.
- [9] 邢传平, 刘斌, 董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法[J]. 中华病理学杂志, 2001 , 30(4) : 318.
- [10] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准[J]. 中国癌症杂志, 1996(6) : 229- 231.
- [11] 于萍, 步宏, 王华, 等. 免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究[J]. 生物医学工程杂志, 2003 , 20(2) : 288- 290.
- [12] 沈晓明, 杜元灏, 李谈. 调神益智针法对更年期大鼠雌激素分泌器官的干预作用[J]. 中医药学刊, 2002 , 20(3) : 336- 355.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

针灸配合中药干预输卵管炎性阻塞性不孕症 sICAM-1 蛋白表达的研究

彭志华, 韩霞, 杨丽霞, 徐娟, 谢宇锋, 金素芳

深圳市福田区中医院, 广东 深圳 518034

[摘要] 目的: 观察针灸配合中药对输卵管阻塞炎性不孕症 sICAM-1 蛋白表达的影响。方法: 选取 Wistar 雌性大鼠 68 只, 将其随机分成空白对照组、模型组、通孕方组、针灸组、通孕方加针灸组和头孢呋辛加甲硝唑组共 6 组, 造模成功后连续治疗 30 天, 然后采用免疫组化方法检测各组大鼠输卵管 sICAM-1 蛋白的表达。结果: 与空白组比较, 造模后各组大鼠 sICAM-1 蛋白表达阳性细胞计数均增高, 且差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 通孕方加针灸组 sICAM-1 蛋白表达阳性细胞计数较其他对照组降低, 且差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 针灸联合中药治疗输卵管炎性阻塞性不孕症可抑制 sICAM-1 蛋白的表达, 促进炎症吸收与消散, 为临床上针灸配合中药治疗输卵管阻塞炎性不孕症提供了实验理论依据。

[关键词] 输卵管炎性阻塞性不孕症; 针灸; 通孕方; sICAM-1 蛋白; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2016)08-0306-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.08.134

Study of Acupuncture Therapy Combined with Chinese Medicine Intervening sICAM-1 Protein Expression of Salpingemphraxis Inflammatory Infertility

PENG Zhihua, HAN Xia, YANG Lixia, XU Juan, XIE Yufeng, JIN Sufang

Abstract: Objective: To observe effect of acupuncture therapy combined with Chinese medicine(CM) on soluble intercellular cell adhesion molecule(sICAM-1) protein expression of salpingemphraxis inflammatory infertility. Methods: Selected 68 cases of Wistar female rats and divided them into blank group, model group, Tongyun fang group, acupuncture group, Tongyun fang+ acupuncture group, cefuroxime + metronidazole group randomly, total 6 groups. Continues treat for 30d after molding successfully, then detected sICAM-1 protein expression of rats' oviduct in every group by immunohistochemical

[收稿日期] 2016-03-28

[基金项目] 广东省中医药局科研项目 (20131035); 深圳市科技计划基础研究项目 (JCYJ20140414145007219)

[作者简介] 彭志华 (1976-), 女, 医学硕士, 主治医师, 主要从事针灸临床工作。

[通讯作者] 韩霞, E-mail: 957848451@qq.com。