

王氏连朴饮对脾胃湿热证模型大鼠胃黏膜 P53、Bcl-2 和 COX-2 蛋白表达的影响

黄 琴¹, 王 晶², 王和生¹, 王俊霞¹, 冯 康², 谭 芸¹(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院 2011 级硕士研究生, 贵州 贵阳 550002)

摘要: **目的** 观察王氏连朴饮对脾胃湿热证模型大鼠胃黏膜增殖与凋亡相关 P53、Bcl-2 和 COX-2 蛋白表达的影响, 探讨该方治疗脾胃湿热证获效的可能作用机制。**方法** 取 SD 大鼠 50 只, 随机分为正常对照组, 模型组, 王氏连朴饮高、中、低剂量组(1.94, 0.97, 0.48 g·mL⁻¹), 共 5 组, 每组 10 只。除正常组饲以普通饲料外, 其余 4 组均以湿热环境加高脂高糖饮食和白酒综合法复制脾胃湿热证模型, 连续灌胃给药 7 d, 观察该方对模型大鼠胃黏膜 P53、Bcl-2 及 COX-2 蛋白表达的影响。**结果** 本实验 P53、Bcl-2、COX-2 基因蛋白表达定位于胞质, 模型组大鼠表达明显升高, 与正常对照组比较, 有显著性差异($P < 0.01$)。王氏连朴饮高、中、低剂量组 P53、Bcl-2 及 COX-2 蛋白表达有一定程度下调, 与模型组比较, 具有显著性差异($P < 0.01$), 尤以中剂量组作用最明显。**结论** 王氏连朴饮可能通过下调脾胃湿热模型大鼠胃黏膜 P53、Bcl-2 及 COX-2 蛋白水平的表达, 在一定程度上调节其胃黏膜细胞增殖与凋亡的失衡, 进而达到对胃黏膜损伤的修复作用。

关键词: 王氏连朴饮; 脾胃湿热证; P53; Bcl-2; COX-2; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0694-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.011

Effect of Wang's Lian Pu Decoction on Protein Expression of P53, Bcl-2 and COX-2 in Gastric Mucosa of Rat Model with Splenogastric Damp-heat Syndrome

HUANG Qin¹, WANG Jing², WANG Hesheng¹, WANG Junxia¹, FENG Kang², TAN Yun¹(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002 Guizhou, China; 2. Postgraduate Candidate in 2011, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002 Guizhou, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Wang's Lian Pu Decoction(WLPD) on protein expression of proliferation and apoptosis correlated P53, Bcl-2, COX-2 genes in gastric mucosa of rat model with splenogastric damp-heat syndrome(SDHS), and to explore its possible therapeutic mechanism for SDHS. **Methods** Fifty Sprague Dawley rats were evenly divided into normal control group, model group, and high-, middle- and low-dosage WLPD groups (1.94, 0.97, 0.48 g·mL⁻¹). SDHS rat model was established by the combined method of damp-heat environment and feeding with high fat and sugar diet and wine. The intervention with gastric gavage of WLPD was given simultaneously together with the modeling. The treatment lasted 7 days, and the effects of WLPD on protein expression levels of P53, Bcl-2 and COX-2 genes were observed. **Results** The protein expression of p53, Bcl-2 and COX-2 genes was localized in cytoplasm and their expression levels were significantly increased in the model group as compared to normal control group($P < 0.01$). High-, middle- and low-dosage WLPD showed an effect on down-regulating the protein expression of P53, Bcl-2 and COX-2 genes to certain extent, and the middle-dose had the strongest effect, the difference being significant compared with the model group($P < 0.01$). **Conclusion** WLPD may down-regulate the protein expression of P53, Bcl-2 and COX-2 genes in gastric mucosa of SDHS rats, correct the imbalance of the proliferation and apoptosis of gastric mucosa cells, thus has protective effect on the gastric mucosa.

Keywords: Wang's Lian Pu Decoction; Splenogastric damp-heat syndrome; P53; Bcl-2; COX-2; Rats

收稿日期: 2014-07-29

作者简介: 黄琴, 女, 教授, 研究方向: 温病的辨证论治。Email: jczlqh@126.com。

基金项目: 贵州省科技厅-贵阳中医学院联合基金资助项目(黔科合中药字[2012]LKZ7023)。

王氏连朴饮出自于王士雄《霍乱论》，具有辛开苦降、燥湿泄热之功，是治疗温病湿热并重、困阻中焦的经典有效名方。本文研究该方对脾胃湿热证模型大鼠胃黏膜 P53、Bcl-2 及 COX-2 蛋白表达的影响，以探讨其治疗脾胃湿热证获效的作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠，雌雄各半，体质量(200±20)g，购于重庆第三军医大学实验动物中心，动物合格证号：0003172。

1.2 试剂及仪器 兔抗人 P53、Bcl-2 及 COX-2 多克隆抗体，均为武汉博士德生物工程有限公司产品，批号分别为 BA0521，BA0414 和 BA3708；YB-6LF 石蜡包埋机，孝感亚光医用电子技术有限公司；LEICA RM2135 切片机，上海宝曼生物科技有限公司；BX-41 显微镜，日本奥林巴斯公司。

1.3 药物制备 王氏连朴饮按照《霍乱论》原方组成比例配制，制厚朴 6 g、川连 3 g、石菖蒲 3 g、制半夏 3 g、香豉(炒)9 g、焦山栀 9 g、芦根 60 g，药材购自贵阳中医学院第一附属医院中药房。将药物浸泡 30 min 后加 8 倍量水，煎煮 3 次并将药汁混合后浓缩至浸膏并干燥，每克干膏含 0.078 g 生药，高压灭菌后保存于 4 ℃冰箱备用。

1.4 分组、模型复制^[1]及给药 取 SD 大鼠 50 只，随机分为正常对照组，模型组，王氏连朴饮高、中、低剂量组(1.94，0.97，0.48 g·mL⁻¹)，每组 10 只。大鼠常规适应性饲养 3 d 后，除正常组饲以普通饲料外，其余各组大鼠均给予高脂高糖饮食，即在普通喂养的基础上，加入 200 g·L⁻¹ 蜂蜜水自由饮用，隔天按大鼠体质量灌服油脂 10 g·kg⁻¹，另 1 天灌服 10 mL·kg⁻¹ 白酒(酒精度 55°)，共 10 d。然后，放入(32±2)℃、相对湿度 95 % 的人工气候箱中，共 5 d。当大鼠出现食量减少、体质量减轻、精神萎靡、嗜卧懒动、毛发疏松粗糙且晦暗无光泽、大便时干时溏、肛温稍有增加时则提示模型复制成功。成模后，王氏连朴饮组按照 1 mL·kg⁻¹ 的剂量灌胃给药，正常对照组与模型组给予等量纯净水灌服，连续 7 d，每天 1 次。

1.5 标本采集 7 d 后，以 1 % 氯胺酮(14 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠，四肢固定并剪开腹腔行腹主动脉插管，剪开下腔静脉并灌注生理盐水至无血液流出时，再灌注 3 % 多聚甲醛直至大鼠上身完全变硬。分离胃组织，用 PBS 液冲洗，放入 4 % 多聚甲醛-磷酸盐

缓冲液内固定 12 h，脱水透明包埋切片供检查用。

1.6 指标检测和结果判断 采用 SP 免疫组织化学方法检测 P53、Bcl-2 及 COX-2 蛋白水平的表达，具体实验步骤按照试剂盒说明书操作。每切片随机选择 4 个高倍镜视野，计算 100 个细胞中的阳性数，均位于胞质，取平均数作为显色指数。

1.7 统计学处理方法 采用 SPSS 21.0 软件对实验结果进行分析，采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 正常对照组大鼠精神状态、活动度、反应性均较好，体质量增加，毛发光泽，大小便正常；模型组大鼠表现为食量减少，体重减轻，精神萎靡，嗜卧懒动，毛发疏松粗糙且晦暗无光泽，大便溏结不调，肛温稍增加。王氏连朴饮各组在治疗后，上述症状、体征均得以明显改善，精神状态、活动度、反应性恢复良好，毛发尚光泽，体质量略增，大小便正常，尤以中剂量组效果最为明显。

2.2 对相关基因蛋白表达的影响 胃黏膜 P53、Bcl-2 及 COX-2 各基因蛋白的表达均位于胞质，模型组大鼠表达明显升高，与正常对照组比较，有显著性差异(*P*<0.01)；王氏连朴饮各剂量组均能下调胃黏膜 P53、Bcl-2 及 COX-2 的表达，与模型组比较，均有显著性差异(*P*<0.01)，其中，以王氏连朴饮中剂量组效果最为明显，见表 1 和图 1。

表 1 王氏连朴饮对脾胃湿热证模型大鼠胃黏膜 P53、Bcl-2、COX-2 表达的影响($\bar{x}\pm s$ ，*n*=10)

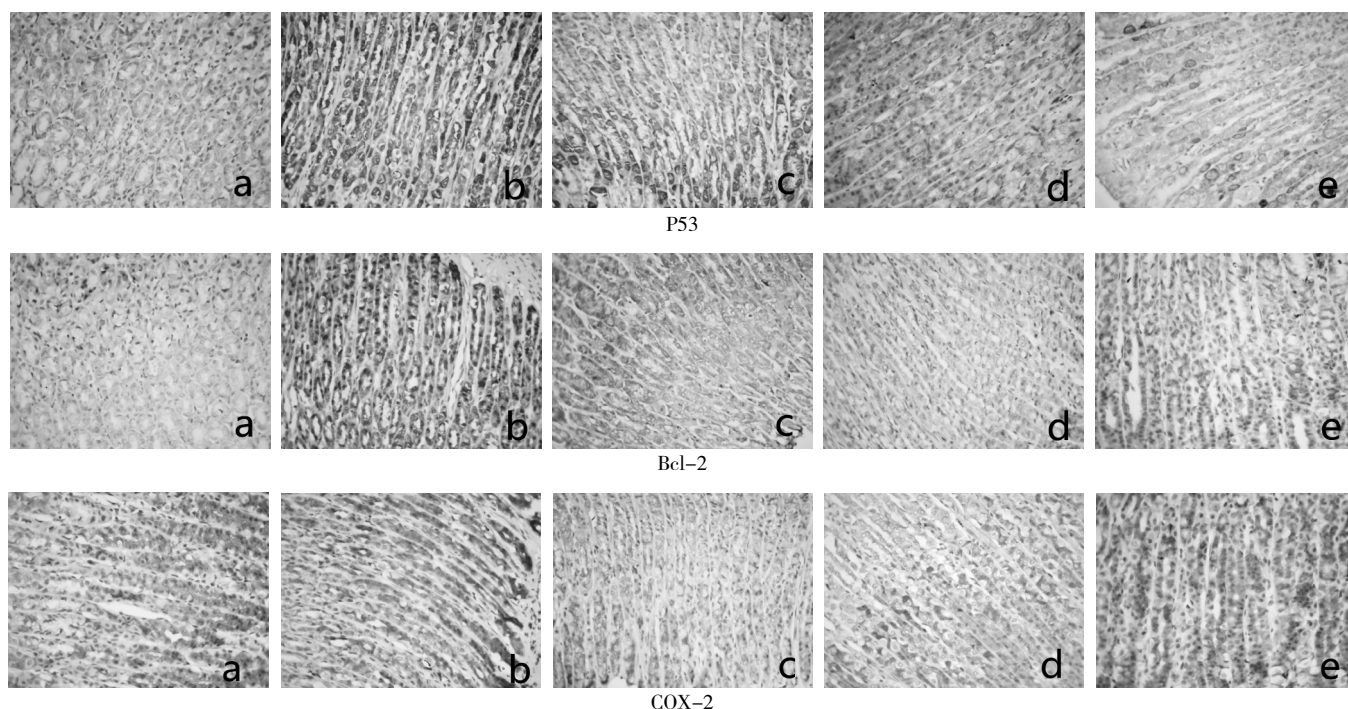
Table 1 Expression scores of P53、Bcl-2 and COX-2 in gastric mucosal of splenogastric damp-heat syndrome rats in different groups

组别	剂量/g·kg ⁻¹	P53	Bcl-2	COX-2
正常对照组	-	0.114±0.008	0.132±0.007	0.131±0.011
模型组	-	0.283±0.007 [#]	0.295±0.204 [#]	0.255±0.017 [#]
王氏连朴饮高剂量组	1.94	0.181±0.012 ^{**}	0.171±0.008 ^{**}	0.153±0.011 ^{**}
王氏连朴饮中剂量组	0.97	0.142±0.005 ^{**}	0.130±0.007 ^{**}	0.149±0.014 ^{**}
王氏连朴饮低剂量组	0.48	0.146±0.008 ^{**}	0.142±0.007 ^{**}	0.178±0.016 ^{**}

注：与正常对照组比较，[#]*P*<0.01；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。

3 讨论

脾胃湿热证与胃病胃黏膜病理改变之间存在着密切联系，研究表明^[2-4]，脾胃湿热证胃黏膜炎症病变明显，部分脾胃湿热证慢性胃炎患者胃黏膜存在不同程度糜烂，尤以渗出为主炎症急性和亚急性期关系更



a.正常对照组; b.模型组; c. 王氏连朴饮高剂量组; d. 王氏连朴饮中剂量组; e. 王氏连朴饮低剂量组

图1 各组大鼠胃黏膜 P53、Bcl-2、COX-2 蛋白表达情况(SP, 200 ×)

Figure 1 Expression of P53, Bcl-2 and COX-2 protein in gastric mucosal of splenogastric damp-heat syndrome rats in different groups

为密切^[3-4]。

脾胃湿热证以脾胃功能病变为主要特点,脾胃功能正常有赖于胃黏膜上皮细胞增殖和凋亡的动态平衡,失衡则可能引发病变。细胞凋亡是一个受基因调控的主动过程, P53、Bcl-2 是增殖与凋亡相关的重要调节因子^[5]; COX-2 则由炎症、组织损伤等病理反应诱导产生,在正常胃黏膜几乎不表达,但随着胃黏膜炎症程度的增加其表达也增强, COX-2 过度表达可影响细胞的生长、增殖与分化,并抑制细胞的凋亡。

本实验结果显示,脾胃湿热证模型大鼠胃黏膜 P53、Bcl-2 及 COX-2 表达均明显增强,经王氏连朴饮治疗后,不仅模型大鼠一般情况得以明显改善,且其胃黏膜 P53、Bcl-2 和 COX-2 蛋白的表达也得以一定程度降低,尤以临床等效量的中剂量效果最为明显,初步提示本方可能通过下调增殖与凋亡相关

P53、Bcl-2 及 COX-2 基因蛋白的表达,一定程度上调节脾胃湿热证大鼠胃黏膜上皮细胞增殖与凋亡的平衡,从而对胃黏膜的炎症与损伤起保护作用。

参考文献:

- [1] 吕冠华, 劳绍贤. 脾胃湿热证动物模型的建立与评价[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(3): 231-234.
- [2] 孙继铭. 王氏连朴饮加味治疗脾胃湿热型慢性胃炎临床研究[J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(6): 517-518.
- [3] 杨春波, 黄可成, 肖可成, 等. 脾胃湿热证临床研究 -400 例资料分析[J]. 中医杂志, 1994, 35(7): 425-477.
- [4] 危北海. 宏观辨证与微观辨证的结合研究[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(5): 301.
- [5] 周桔, 罗荣保, 汤长发, 等. Bcl-2 蛋白家族和 p53 基因在细胞凋亡中的调控效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(10): 1950-1952.

(编辑: 宋威)