

滋肾清心汤对围绝经期大鼠卵巢 bcl-2 和 bax 表达影响的实验研究

雷 雯¹ 缪婷玉¹ 陈 赟² 卢 苏²

(1.南京中医药大学,江苏南京 210023; 2.江苏省中医院,江苏南京 210029)

摘 要 目的:研究中药滋肾清心汤对围绝经期大鼠卵巢 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响,探讨滋肾清心汤治疗围绝经期综合征可能的作用机制。方法:选用自然衰老的围绝经期雌性大鼠,随机分为 4 组(每组 10 只):更年期大鼠模型组(模型组)和滋肾清心汤高、中、低剂量组,另选 10 只青年雌性大鼠作为青年对照组。连续灌胃处理 4 周后,采用蛋白印迹(Western blot)及 RT-PCR 检测大鼠卵巢中 Bcl-2 和 Bax 蛋白及基因的表达。结果:与模型组相比,滋肾清心汤高剂量能显著降低卵巢组织中 Bax 蛋白的表达,显著上调 Bcl-2/Bax 的比值;滋肾清心汤各剂量均能明显降低卵巢组织中 Bax 基因表达,明显升高 Bcl-2 基因表达,从而显著上调 Bcl-2/Bax 比值,延缓卵巢颗粒细胞的凋亡。结论:滋肾清心汤通过调节围绝经期大鼠卵巢中凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 蛋白及基因的表达,上调 Bcl-2/Bax 蛋白及基因的比值,从而延缓卵巢衰老,这可能是其治疗围绝经期综合征的分子机制之一。

关键词 围绝经期综合征 滋肾清心汤 卵巢 细胞凋亡 bcl-2 bax 实验研究

中图分类号 R289.53 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)09-0071-02

围绝经期综合征是指妇女在绝经前后因为卵巢功能衰退,性激素水平波动而引起的一系列身体及精神心理症状。目前西医主要采用激素替代疗法(HRT)治疗^[1],该方法具有严格的适应证及禁忌证,大量临床研究表明激素替代疗法存在潜在的致癌危险及其他不良反应,多数患者难以接受。滋肾清心汤是在中医药理论的指导下,结合临床工作经验化裁而来,全方清心安神、滋肾养阴,临床治疗本病获得较好的疗效。本研究以卵巢细胞凋亡作为切入点,观察滋肾清心汤对初老大鼠卵巢细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 表达的影响,探索滋肾清心汤在卵巢中可能的作用位点。

1 实验材料

1.1 实验动物 SD 大鼠,12~14 月龄,40 只,体重(350±20)g,经阴道脱落细胞涂片检查,呈现出动情周期紊乱、动情间期延长,确定为围绝经期鼠。4 月龄大鼠 10 只,体重(200±20)g。大鼠均由浙江省动物实验中心提供。饲养条件:二级实验室,普通全价饲料喂养,自由饮水,室温(24±2)℃,湿度 45%~65%。大鼠适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 主要试剂 滋肾清心汤,组方:莲子心 5g,黄连 3g,钩藤 15g,炒酸枣仁 15g,浮小麦 30g,丹参 10g,干地黄 10g,山茱萸 9g。中药由江苏省中医院提供,水煎并浓缩,相当于生药 3.2g/mL,4℃冰箱中保存备用。中药剂量按人体重 60kg,5 倍系数计算。内参一抗(β-Actin)由 Immunoway 公司提供,二抗(羊抗小鼠 IgG-HRP),二抗(羊抗兔 IgG-HRP)由 Jackson 公司提供。cDNA 第一链合成试剂盒和 Taq DNA Polymerase 由 Thermo Fisher 公司提供。Regular Agarose G10 由 Biowest 公司提供。50×TAE 电泳缓冲液由 KeyGen 公司提供。

2 实验方法

2.1 分组与给药 将更年期大鼠随机分为 4 组:更年期大鼠模型组(模型组)和清心滋肾方高、中、低剂量组。另取 10 只 4 月龄大鼠作为青年对照组。清心滋肾方高、中、低剂量组分别灌服滋肾清心汤 32g/(kg·d)、16g/(kg·d)、8g/(kg·d)。每日给大鼠灌胃 1 次,连续 4 周。模型组和青年对照组给予生理盐水 10mL/(kg·d)。每日给大鼠灌胃 1 次,连续 4 周。大鼠末次给药 24h 后断头处死,快速取出双侧卵巢,经液氮速冻后于-70℃冰箱冻存,用于组织蛋白的检测。

2.2 Western blot 法检测卵巢中 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达 提取大鼠卵巢总蛋白,进行 SDS-PAGE 转膜,用质量浓度为 30g/L(0.03g/mL)的牛血清白蛋白(BSA)37℃封闭 1h,再分别用 Bcl-2、Bax 和 β-actin 兔抗鼠多克隆抗体(1:400)37℃孵育 1h。TBST 洗膜 10min×3 次,TBS 洗膜 10min。最后用 ALP 标记的山羊抗兔 IgG (1:500)37℃孵育 1h。TBST 洗膜 10min×3 次,TBS 洗膜 10min。NBT/BCIP 显色。以 β-actin 作为内参照。

2.3 RT-PCR 方法检测卵巢中 Bcl-2、Bax 的基因 取卵巢组织进行 RNA 提取,提取后进行 RNA 浓度和纯度的鉴定,经鉴定符合实验要求后,进行 cDNA 第一链合成(20μL 体系),然后进行 PCR 实验。取灭过菌且无核酸酶的 0.2mL 离心管,在冰上依次加入如下组分:10×Taq Buffer 5μL;MgCl₂ (25mmol/L)4μL;dNTPs (10mmol/L)1μL;引物 I (10μmol/L)1μL;引物 II (10μmol/L)1μL;cDNA 1μL;Taq DNA Polymerase 0.5μL;灭菌双蒸水至总体积 50μL。第一阶段:95℃、5min 预变性;第二阶段:95℃、40s,56℃、40s,72℃、45s,32 个循环,退火、变性、延伸;第三阶段:72℃、10min 最终延伸。引物序列及 PCR 产物大小见表 1。

表1 引物序列及 PCR 产物大小

基因	序列
Rat-GAPDH Sense primer	5-TGCCACTCAGAAGACTGTGG -3
Rat-GAPDH Antisense primer	5-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3
Rat-BaxSense primer	5-GATCGAGCAGAGAGGATGGC-3
Rat-BaxAntisense primer	5-GGGTCCCCAAGTAGGAGAGG-3
Rat-Cyto-c Sense primer	5-AGAAGGGAGAAAGGGCAGAC-3
Rat-Cyto-c Antisense primer	5-CCGTCCTGCTGTTTAGCATT-3
Rat-Bcl-2 Sense primer	5-CGACTTTGCAGAGATGTCCA-3
Rat-Bcl-2 Antisense primer	5-CTCACTTGTGCCCCAGGTAT-3

3 实验结果

3.1 各组大鼠卵巢组织中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达 治疗后滋肾清心方各组均可升高围绝经期大鼠卵巢中的 Bcl-2 蛋白,与青年对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);降低 Bax 蛋白,与青年对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);升高 Bcl-2/Bax 蛋白的比值,与青年对照组比较中、低剂量组具有显著性差异($P<0.01$),高剂量组未见差异性($P>0.05$)。见表 2。

表2 各组大鼠卵巢组织中 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
青年对照组	10	0.4033±0.0581**	1.0100±0.3523	2.3504±0.9792**
模型组	10	1.0333±0.1812▲▲	0.5167±0.1906	0.4629±0.1980▲▲
滋肾清心汤低剂量组	10	0.9133±0.1317	0.5933±0.2282	0.6105±0.2620▲▲
滋肾清心汤中剂量组	10	0.7433±0.1785	0.7267±0.3187	0.9057±0.3589▲▲
滋肾清心汤高剂量组	10	0.5633±0.2255*	0.8867±0.3497	1.5153±0.4794*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与青年对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

3.2 各组大鼠卵巢组织中 Bcl-2 及 Bax 基因的表达 见表 3。

表3 各组大鼠卵巢组织中 Bcl-2 及 Bax 基因表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	bax	bcl-2	Bcl-2/Bax
青年对照组	10	0.9990±0.1590**	0.9994±0.0031*	1.0005±0.0170**
模型组	10	8.8051±0.7887	0.1526±0.0297	0.01712±0.0020
滋肾清心汤低剂量组	10	6.4810±0.6566**▲▲	0.2803±0.0216*▲	0.0436±0.0063**▲▲
滋肾清心汤中剂量组	10	4.7383±0.5839**▲▲	0.4732±0.0164*▲	0.1009±0.0131**▲▲
滋肾清心汤高剂量组	10	2.5693±0.3544**▲▲	0.6444±0.0045*▲	0.2543±0.0384**▲▲

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与青年对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

4 讨论

围绝经期综合征是妇女绝经前后出现性激素波动或减少所致的一系列身体及精神心理症状。现代医学认为妇女进入围绝经期后,卵巢功能衰退,分泌的雌激素减少,卵泡期延长,卵泡逐渐停止发育。由于雌激素分泌减少,对垂体的负反馈减弱,破坏了下丘脑—垂体—卵巢轴的平衡,产生下丘脑和垂体功能亢进的现象^[2]。这些内分泌环境的变化导致脑内β-内啡肽和 5-羟色胺水平异常,一氧化氮、内皮素的异常,CD3+、CD4+减少、CD8+增加等,从而出现精神情绪变化失调,交感神经系统、体温调节中枢不稳定,血管舒缩平衡失调,免疫功能降低等一系列临床症状。

目前研究认为是颗粒细胞的凋亡触发卵泡闭锁^[3]。更年期妇女卵泡及颗粒细胞的急剧减少,产生的雌激素及促性腺激素受体减少,从而出现卵巢功能的减退。目前已经阐明的凋亡信号传导途径主要有两条:一条是细胞表面死亡受体途径,另一条是线粒体途径,这两条途径最终都汇集为 Caspases

家族蛋白酶的级联反应过程^[4]。Bcl-2 和 Bax 在线粒体应激诱导的细胞凋亡中起关键作用。Bcl-2 及 Bax 同属于 Bcl-2 基因家族,Bcl-2 能抑制细胞凋亡,Bax 能促进细胞凋亡,Bax 与 bcl-2 形成异二聚体复合物,维持促凋亡基因在细胞内的定位分布,使细胞不进入凋亡程序^[5]。但当 Bax 蛋白超表达时,Bax/Bax 同源二聚体的数量明显升高,细胞对死亡信号的反应性增强,启动凋亡;当 Bcl-2 表达增高时,Bax/Bax 二聚体解离,生成稳定的 Bcl-2/Bax 异源二聚体,对抗 Bax 的诱导凋亡作用^[6]。已有研究表明,一切促进或抑制细胞凋亡的作用,都可归结成 Bcl-2/Bax 比值的变化^[7]。

为更确切地了解滋肾清心汤治疗围绝经期综合征的作用位点,我们对 Bcl-2、Bax 同时进行了基因和蛋白的检测。结果表明,滋肾清心汤能够促进围绝经期大鼠卵巢组织中 Bcl-2 的表达,抑制卵巢颗粒细胞凋亡,并能抑制 Bax 诱导卵巢颗粒细胞凋亡的作用,从而延缓卵巢衰老,这可能是其治疗围绝经期综合征的作用机制之一。

本实验中采用 RT-PCR 与 Western blot 检测,对基因的调节作用较蛋白质显著。其原因可能是,在细胞内,蛋白质是决定细胞基因表型及对外信息发生的反应性,蛋白质水平的表达不仅取决于基因转录的速率,也与 mRNA 的出核过程、细胞浆定位、转录物的稳定性、mRNA 翻译调节及蛋白质的降解密切相关,蛋白质的生物活性及功能主要通过翻译后加工、磷酸化及蛋白酶的水解而发生^[8],基因转录的 mRNA 水平并不能完全可靠地代替其相应蛋白质的水平。

5 参考文献

- [1] Shuster LT,Rhodes DJ,Gostout BS,et al.Premature menopause or early menopause:long-term health consequences.Maturitas,2010,65(2):161
- [2] 司徒仪.中西医结合妇产科学.北京:科学出版社,2003:189
- [3] 秦佳佳.中成药坤宁安调控围绝经期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡因子 Bcl-2 mRNA 表达的特点.中国临床康复,2006,10(19):149
- [4] Riedl S J,Shi Y.Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.Nature Reviews Molecular Cell Biology,2004,5(11):897
- [5] Kawatani M,Imoto M.Deletion of the BH1 domain of Bcl-2 accelerates apoptosis by acting in a dominant negative fashion. Journal of Biological Chemistry,2003,278(22):19732
- [6] Tsukahara S,Yamamoto S,Shwe T T W,et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice. Neuroimmunomodulation,2006,13(2):63
- [7] Sprick M R,Walczak H.The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis.Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research,2004,1644(2):125
- [8] Gygi S P,Rochon Y,Franza B R,et al.Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.Molecular and cellular biology,1999,19(3):1720

第一作者:雷雯(1987-),女,硕士研究生,中医妇科学专业。

通讯作者:卢苏,lusu0926@sina.com

收稿日期:2014-03-20

编辑:吴宁