

愈溃膏对大鼠体表溃疡肉芽肿组织中 bcl-2、bax 表达的影响

宫少波¹ 李湘奇² 宋爱莉³ 迟立萍¹ 宋永刚¹

(1 山东中医药高等专科学校 莱阳 265200; 2 泰山医学院临床学院 山东泰安 271000;

3 山东中医药大学附属医院 济南 250011)

摘要:目的:探讨行气活血、祛瘀生肌中药愈溃膏促进体表溃疡的愈合机制。方法:用 SPF 级 Wistar 大鼠,参照塑料环肉芽肿定量法造模,随机分为单纯疾病模型组、生肌愈皮膏组及愈溃膏小、中、大剂量五组,分别涂药干预,免疫组化法检测肉芽肿组织中 bcl-2、bax 的表达。结果:疾病模型组大鼠肉芽肿组织中的 bcl-2 的表达较低,bax 表达较高,经药物干预后,bcl-2 的表达升高,而 bax 的表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),各用药组间无显著性差异($P>0.05$)。结论:愈溃膏通过增强肉芽肿组织中 bcl-2 的表达,降低 bax 的表达,减少细胞的凋亡,加强肉芽组织的生成,达到修复溃疡的目的。

关键词:愈溃膏;体表溃疡;细胞凋亡;bcl-2;bax

中图分类号:R 285.5

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.01.067

体表溃疡(Skin ulcer)属中医“疮疡”的范畴,是外科常见病、多发病,也是外科的基础课题。慢性体表溃疡具有病程长、对外观影响大以及并发症多等特点,少数体表溃疡可多年不愈,或时愈时溃,恶性循环,晚期有发生癌变的可能,给患者本身带来许多痛苦,也给其家庭及社会带来许多问题,因此日益受到人们的重视。中医对体表溃疡的愈合一般认为是瘀去肌生,其次还有祛腐生肌、补益生肌、益气化瘀生肌^[1]。愈溃膏由丹参、川芎、乳香、没药、血竭、五倍子、珍珠等药物组成,在临床应用中取得了较好的疗效^[2]。为进一步探讨愈溃膏的促愈机制,我们对大鼠体表溃疡模型外用愈溃膏后肉芽肿组织中 bcl-2、bax 的表达进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验动物:SPF 级 Wistar 大鼠,常规方法饲养 1 周,适应环境后开始实验。药品:(1)愈溃膏:泰山医学院药学实验室提供,批号:081015,30g/盒。(2)乳膏基质:泰山医学院药学实验室提供,批号:081011,30g/盒。(3)生肌愈皮膏:国药准字 B20021045,20g/支。(4)脱毛膏(广州市卡美奥化妆品有限公司,批号:K005041302),80g/支。试剂及药盒:10%甲醛,3%水合氯醛;SABC 免疫组化染色试剂盒(SA1026)、DAB 显色试剂盒(AR1022)、bcl-2(BA0412)试剂盒、bax(BA0315)试剂盒,均购于武汉博士德生物工程有限公司。实验器材:OLYMPUS(BH-2)照像显微镜、光学显微镜、隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS)、LEICA RMZ135 切片机、5~25mL 及 50~250mL 微量移液器、剪刀、镊子等手术器械。

1.2 实验方法

1.2.1 造模方法 取 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重(150 ± 20)g,参照沈道修改良的塑料环肉

芽肿定量法造模^[3],用 3%水合氯醛按 300mg/kg 经腹腔注射麻醉,将麻醉后的大鼠俯卧于手术固定板上,脱毛霜脱去背部的体毛,碘伏局部消毒后,切开皮肤 25mm,用血管钳分离皮肤到筋膜,将消毒后的塑料环(外径 18mm,内径 16mm)埋入切口内,将塑料环于皮肤缝合 2 针固定防脱,伤口分别滴入庆大霉素,造模成功。

1.2.2 分组及给药方法 造模后的 SPF 级 Wistar 大鼠,按随机数字表随机分为五组,每组 30 只,分别编号、称重、干预治疗。单纯疾病模型组(A组):大鼠伤口内涂抹软膏基质 0.3g,1 次/d。生肌愈皮膏组(B组):大鼠伤口内涂抹生肌愈皮膏 0.3g,1 次/d。愈溃膏小剂量组(C组):大鼠伤口内涂抹小剂量(6.18g/g 生药量)愈溃膏 0.3g,1 次/d。愈溃膏中剂量组(D组):大鼠伤口内涂抹中剂量(5 倍量)愈溃膏 0.3g,1 次/d。愈溃膏大剂量组(E组):大鼠伤口内涂抹大剂量(10 倍量)愈溃膏 0.3g,1 次/d。

1.3 实验步骤 以上五组动物分别造模及涂药 11d 后,用 3%水合氯醛按 300mg/kg 经腹腔注射麻醉,颈动脉放血处死动物,取出塑料环和肉芽肿,称重后,用 10%福尔马林充分固定 24h,大体标本取材,放入 LEICA ASP300 全封闭脱水机内脱水,透明,浸蜡,LEICA EG1160 自动包埋机内包埋。每组组织蜡块在 LEICA RMZ135 切片机上连续切片 8 张,分别行 HE 染色,bcl-2、bax 免疫组织化学染色。

1.4 免疫组化方法 (1)经粘片剂 APES 防脱片处理的切片脱蜡至水洗,捞片后置烤箱 58~60℃烤片 2h 使切片紧密粘附。(2)3%双氧水,室温 5~10min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。(3)微波热修复抗原:将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0),微波炉快速加热至沸腾,保持 5~10min,冷却后 PBS(pH7.2~7.6)洗涤 1~2 次。(4)滴加 5%BSA 封闭液,

室温 20min。甩去多余液体,不洗。(5)滴加 1:100 适当稀释的一抗 (小鼠 IgG),4℃冰箱过夜。PBS (pH 7.2~7.6)洗 2min× 3 次。(6)滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温 20min。PBS 洗 2min× 3 次。(7)滴加试剂 SABC,室温 20min。PBS (pH7.2~7.6)洗 5min× 4 次。(8)DAB 显色: 室温镜下控制反应时间, 一般 5~30min。蒸馏水洗涤。(9)苏木素轻度复染。脱水,透明,封片。显微镜观察。

1.5 实验结果评定 由 2 名病理医师在不知道任何资料的情况下进行评估,每张切片至少观察 3 个视野,阳性细胞胞浆着色呈棕褐色。阴性表达(-): 未见棕褐色染色的细胞;低表达(+): 每高倍视野阳性细胞数 <20%;中表达(++): 每高倍视野阳性细胞数 20%~50%;高表达(+++): 每高倍视野阳性细胞数 >50%。

1.6 统计学方法 先采用方差齐性检验,再用两两 q 检验进行组间差异的比较, 计数资料用 χ^2 检验,等级资料用 CMH 卡方检验,采用 SPSS17.0 版统计软件进行分析。检验标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

对大鼠肉芽肿组织中 bcl-2、bax 表达水平对照见表 1。疾病模型组大鼠肉芽肿组织中的 bcl-2 的表达较低,bax 表达较高,经药物干预后,bcl-2 的表达升高而 bax 的表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),各组药物之间无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 1 大鼠肉芽肿组织内 bcl-2、bax 表达水平对照 例

组别	n	bcl-2			bax		
		-	+	++	-	+	++
A 组	30	15	9	6	7	12	11
B 组	30	6	11	13 [▲]	15	11	4 [▲]
C 组	30	7	9	14 [▲]	14	13	3 [▲]
D 组	30	5	10	15 [▲]	16	11	3 [▲]
E 组	30	3	11	16 ^{▲▲}	19	9	2 ^{▲▲}

注:与 A 组比: [▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。Bcl-2: (B 组 VS A 组, $\chi^2=6.64$; C 组 VS A 组, $\chi^2=6.11$; D 组 VS A 组, $\chi^2=8.91$; E 组 VS A 组, $\chi^2=12.754$; bax: (B 组 VS A 组, $\chi^2=6.22$; C 组 VS A 组, $\chi^2=6.94$; D 组 VS A 组, $\chi^2=8.14$; E 组 VS A 组, $\chi^2=12.20$)。

3 讨论

细胞凋亡最早由 Kerr 等根据形态表现而命名^[4]。它是细胞死亡方式之一,是具有特殊形态改变的程序性死亡方式,是积极主动的具有一定程序的生理过程。细胞凋亡是一种重要的生物学现象,存在于机体生长发育的各个阶段,对组织生长有重要影响。体表溃疡修复的整个过程均有凋亡机制参与,特别是上皮细胞与成纤维细胞在组织修复中增殖与凋亡之间的平衡决定和影响着溃疡修复的进程、结局和预后^[5,6]。体表溃疡愈合过程中细胞凋亡时的

形态学及生化变化主要受 bcl-2 家族的调控。bcl-2 家族是凋亡分子家族中重要的成员,分为抗凋亡和促凋亡两类,前者有 bcl-2、bcl-XL,后者有 bid、bax、bad、bcl-Xs 等^[7,8]。bcl-2 是抗凋亡基因,可阻止许多因素诱发的细胞凋亡;而 bax 是促凋亡基因,二者的比例是决定细胞是否发生凋亡的重要调控因素。如 bax 过度表达,bax 蛋白形成同源二聚体,促进细胞凋亡;如 bcl-2 过度表达,与 bax 蛋白形成异源二聚体,抑制细胞凋亡^[9]。在难愈性体表溃疡组织中,bcl-2 蛋白表达降低的同时,bax 表达增强,由此引起细胞凋亡增多、创面延迟愈合^[10-13]。

在本实验中我们应用免疫组化方法检测了在组织细胞凋亡活动中起重要作用的 bcl-2 蛋白和 bax 蛋白在慢性溃疡愈合过程中的表达变化,从中得到细胞凋亡和增殖的调控参与了慢性创面愈合的过程。实验结果显示,疾病模型组大鼠肉芽肿组织中的 bcl-2 的表达较低,bax 表达较高,经药物干预后,bcl-2 的表达升高而 bax 的表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而凋亡细胞明显减少,说明愈溃膏可减少细胞的凋亡。其作用机制是通过提高肉芽肿组织中 bcl-2 的表达而降低 bax 的表达,减少细胞凋亡,加强肉芽组织的生成达到修复溃疡的目的。

参考文献

[1]邢捷,阙华发,唐汉钧.中医药促进皮肤溃疡创面肉芽组织生长的实验研究近况[J].中西医结合学报,2008,6(10):1 080-1 085
[2]宫少波,王勇,刘翔,等.愈溃膏治疗体表溃疡的临床观察[J].实用中西医结合临床,2008,8(5):28-29
[3]沈道修,顾月芳,任晓英,等.一种研究中西药抗炎作用的塑料环肉芽肿定量法[J].中国中西医结合杂志,1983,3(1):49
[4]Kerr JFR, Wyllie AH, Gurrie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257
[5]Edwards M, Jones D. Programmed cell death in human acute cutaneous wounds[J]. J Cutan Pathol, 2001, 28: 151-155
[6]Tuan TL, Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation[J]. Mol Med Today, 1998, 4: 19-24
[7]Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281: 1 322-1 326
[8]Desmouliere A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis[J]. Cell Biol Int, 1995, 19: 471-476
[9]林毅,蔡炳勤.外科专病·中医临床诊治[M].北京:人民卫生出版社, 2000.76
[10]杨银辉,付小兵,李全岳,等. bcl-2 在增生性瘢痕和溃疡中的表达特征与意义[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(4): 302-303
[11]付小兵,蒋礼先,孙同柱,等. 3 种皮肤慢性溃疡发生与细胞凋亡关系的研究(临床)[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(5): 361-362
[12]陈伟,付小兵,孙同柱,等. 皮肤溃疡伤口中 Bax 和 Bcl-2 蛋白含量的变化及其与溃疡发生的关系 [J]. 中国临床康复, 2001, 5(12): 54-55
[13]王春丽,唐汉钧. 细胞凋亡与创面愈合[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(8): 638-640