

脾阳虚动物模型的生物学标志研究[△]

孙伟越*,袁琛皓,董广通,王欣,郭炜[△](1.山东中医药大学基础医学院,济南 250355)

中图分类号 R256.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4502-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.29

摘要 目的:总结脾阳虚动物模型的生物学标志,为科研及临床相关工作者提供参考。方法:对近10年有关脾阳虚动物模型生物学标志的文献进行整理,寻找可作为脾阳虚动物模型生物学标志的参考指标。结果:已发现的脾阳虚动物模型的生物学标志主要包括脏器系数、肠道菌群数量、淋巴细胞转化率、睾酮、集落刺激因子、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、肽转运载体1、水通道蛋白3、抗凋亡基因、促凋亡基因、下丘脑胶质原纤维酸性蛋白和Ⅲ型补体受体抗体等。结论:上述生物学标志物可用于衡量中医证型造模是否成功,可把各种中医症状与客观实验指标联系起来,使中医实验研究更加科学严谨、有章可循。

关键词 脾阳虚;动物模型;生物学标志;脏器系数;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素 1β

脾阳虚是中医学的证候名称之一。脾阳虚多由饮食、情志、劳倦等因素引起,患者临床表现为食欲不振、四肢逆冷、大便溏泄、恶寒喜温、脉象迟缓等特征。脾阳虚证型是中医证候动物模型的重要组成部分之一,由于造模思路与方法的不同,对于脾阳虚动物造模成功与否的判断标准也并不一致。在过去的10年中,随着中医证候学的实验研究不断深入,脾阳虚动物模型的生物学标志研究也呈现出多样化的趋势,亟待整理和规范。随着科学技术的不断进步,生物学标志的检测越来越受到人们的重视,在临床脾阳虚证的诊疗中也得到了广泛的应用。本文对近10年脾阳虚动物模型的生物学标志研究进展作一综述。

1 脏器系数(Organ coefficient)

脏器系数是指实验动物某脏器的质量与其体质量的比值,一般情况下各脏器与体质量的比值恒定在一定范围内。若脏器受损或受到多因素影响后脏器质量可能发生改变,脏器系数增大,表示脏器充血、水肿或增生肥大等;脏器系数减小,表示脏器发生了萎缩或其他退行性改变。余望怡等^[1]在造模评估中发现,脾阳虚模型小鼠的胸腺指数和脾指数明显降低,提示胸腺与脾的脏器系数可作为脾阳虚动物模型的生物学标志。

2 肠道菌群数量(Number of intestinal microflora)

健康机体的胃肠道内存在以双歧杆菌、乳酸杆菌等各种细菌组成的庞大生物种群,同脾胃系统协作完成各项功能。肠道菌群的生物学功能包括维持肠道的正常结构和生理功能、拮抗病原微生物的定植、感染和刺激/调控人体的免疫功能。脾阳虚症状表现为消化吸收功能紊乱,与肠道菌群失调有直接关系^[2]。丁维俊等^[3]通过实验发现,灌胃大黄造模后的小鼠体内肠道厌氧菌群中,双歧杆菌、乳杆菌、类杆菌的平均数量均显著下降,而肠道需氧菌中大肠杆菌数量显著上升,提

示脾阳虚症状表现可能与该类菌群数量变化有关。

3 淋巴细胞转化率(LTT)

T淋巴细胞可在各种因素刺激下,转化成体积较大的淋巴母细胞,淋巴母细胞可以进一步分化,从而起到免疫作用。因此,T淋巴细胞转化为淋巴母细胞的数量,即LTT可以用来评估机体的免疫能力,LTT降低提示细胞免疫能力降低或免疫缺陷。余望怡等^[1]的实验发现,脾阳虚模型小鼠的LTT较正常小鼠明显下降,提示抵抗力降低与中医阳虚证的体征相符,可作为脾阳虚的生物学标志。

4 睾酮(Testosterone)

睾酮是一种类固醇荷尔蒙,由睾丸间质细胞分泌,与机体运动的关系十分密切,它的作用是维持肌肉强度和体能,同时还可能影响多个系统功能,包括血生成、体内钙平衡、骨矿化作用、脂代谢、糖代谢等。睾酮水平下降,可降低机体运动能力^[4]。余望怡等^[1]的研究显示,灌胃大黄造模后的小鼠血浆中睾酮含量明显降低,这与脾阳虚动物模型表现出的倦怠乏力等症状相符合。

5 集落刺激因子(CSFs)

CSFs能高效刺激骨髓的造血功能,形成细胞集落。现代医学认为,CSFs用于造血干细胞移植,可促进移植后骨髓造血功能的重建^[5]。李星等^[6]在实验中发现,运用利水平注射液造成的脾阳虚模型小鼠体内脾条件培养液(SCM)和肺条件培养液(LCM)中的CSFs水平均显著低于正常小鼠。

6 肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)- 1β

TNF- α 是血清内具有杀伤或抑制肿瘤细胞作用的物质,主要由活化的巨噬细胞产生,可导致肿瘤出血性坏死。适量的TNF- α 在宿主抵抗微生物入侵和抑制肿瘤产生的防御系统中起着重要作用。IL是在免疫细胞间相互作用的一种淋巴因子,具有参与造血和免疫调节的功能。IL-1是一种重要的炎性细胞因子,包括IL- 1α 和IL- 1β 两种存在形式^[7]。张芸^[8]的研究发现,用番泻叶灌胃造模的脾阳虚大鼠的血清内,TNF- α 和IL- 1β 含量均显著高于正常大鼠。TNF- α 和IL- 1β 都是具有明显致痛和调节胃肠功能作用的生物学效应物质^[9],二者在血清中含量的升高与脾阳虚导致的腹痛症状高度相关。

7 肽转运载体(PepT)1

小肠上皮细胞上的PepT1是蛋白质降解产物二肽、三肽转

[△] 基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(No.201310441090)

* 本科生。研究方向:方剂临床疗效及客观化。电话:0531-68617981

通信作者:讲师,博士。研究方向:方剂临床疗效及客观化。E-mail:gw1946@126.com

运的主要载体,其是通过PepT₁与刷状缘端钠泵中氢离子协同转运完成二肽、三肽的逆浓度吸收。研究表明,PepT₁的信使RNA和蛋白质主要表达在小肠和肾的上皮细胞中^[10],其功能表达对衡量机体的蛋白质吸收能力有重要意义^[11]。郭文峰等^[12]利用β-内酰胺类抗菌药物在肠道内的吸收机制与二肽一样的原理,观察了PepT₁的转运功能。结果发现,利血平和劳倦泄泻法造模的脾阳虚大鼠血清内头抱氨苄含量明显上升,表明脾阳虚证模型大鼠小肠黏膜肽转运载体PepT₁对二肽转运功能增强。提示PepT₁的表达强度可作为脾阳虚证生物模型的生物学参考。

8 水通道蛋白(AQP)3

AQP是一类特异性主动转运机体内水的蛋白,其一级结构由两个分别位于肽链两侧的重叠部分构成,普遍存在于各种生物体内。其中,与消化系统有关的亚型主要有:广泛分布在消化器官的AQP3、分布于胃壁细胞的AQP4以及肠腔内的AQP10;另外,AQP1和AQP5也与消化器官的水吸收有关。AQP3的低表达可导致与脾阳虚模型相同的泄泻表现^[13]。江月斐等^[14]的研究发现,脾阳虚模型大鼠在胃体、回肠和结肠处的AQP3表达水平均显著低于正常大鼠。提示AQP3可以作为脾阳虚动物模型的生物学标志物。

9 抗凋亡基因(Bcl-2)和促凋亡基因(Bax)

Bcl-2和Bax两种基因的表达存在着竞争关系。Bcl-2高表达抑制凋亡,Bax高表达则促进凋亡。目前对脾阳虚证的研究表明,脾阳虚可导致抗氧化酶活性下降,造成氧自由基蓄积,从而引起细胞和组织损伤^[15]。蒋鹤飞等^[16]的研究表明,劳倦和苦寒泻下综合造模的脾阳虚大鼠,其下丘脑组织中Bcl-2的表达明显减弱,而Bax的表达则增强数倍,表现出促进细胞凋亡的倾向,提示Bcl-2和Bax表达的变化与脾阳虚症状有关。

10 下丘脑胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和Ⅲ型补体受体(OX42)抗体

中枢神经系统中的神经胶质细胞主要由星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞组成。在正常情况下,星形胶质细胞和小胶质细胞不处于激活状态,小胶质细胞的分支状突起可感知周围环境的变化,星形胶质细胞对神经元起支持、保护和营养作用。在损伤或疾病状态下,小胶质细胞和星形胶质细胞会被激活,参与多种病理变化。被激活的小胶质细胞具有吞噬功能,外观也会产生明显变化^[17]。王慧等^[18]通过观察星形胶质细胞标志物GFAP和小胶质细胞的特异性标记物OX42的表达,观察了神经胶质细胞在脾阳虚证中的变化,结果发现,脾阳虚模型大鼠下丘脑GFAP与OX42表达增强,与正常大鼠相比有显著性差异,说明胶质细胞的激活可能是脾阳虚证模型形成的神经机制之一。

11 其他

有研究表明,辅助性T细胞类细胞因子表达抑制^[19]、脾细胞膜蛋白激酶C(PKC)活性明显降低、细胞浆PKC活性明显增高、肝细胞膜及细胞浆PKC活性增高等指标^[20]均可作为脾阳虚动物模型的生物学标志,供各类实验研究参考。

12 展望

随着中医药实验研究的不断发展,其对中医证候动物模型的标准化、规范化要求也越来越高。这就需要相关学者尽快探索出能够衡量中医证型造模是否成功的生物学标志物,将各种中医症状与客观实验指标联系起来,使中医实验研究更加科学严谨、有章可循。

参考文献

- [1] 余望贻,卓晖,孟琼.补中益气丸脾肾相关性实验研究[J].中国医药指南,2008,6(21):25.
- [2] 管远志.肠道菌群及其生物学意义[J].临床儿科杂志,2009,27(11):1 095.
- [3] 丁维俊,周邦靖,翟慕东,等.参苓白术散对小鼠脾虚模型肠道菌群的影响[J].北京中医药大学学报,2006,29(8):530.
- [4] 饶晶晶,赵军宁,吴建容,等.运动性低血睾酮及中医药防治方法的研究综述[J].四川中医,2007,25(8):39.
- [5] 杨健良,石远凯,何小慧,等.重组人粒细胞集落刺激因子促进自体造血干细胞移植后造血功能恢复的临床研究[J].癌症,2003,22(8):8.
- [6] 李星,张一帆,朱亨昭,等.健脾益肾汤对脾(阳)气虚证小鼠骨髓粒系/单核系细胞造血功能的影响[J].中国中医药科技,2011,18(4):302.
- [7] 吴兴临,金群华,陈志容,等.依那西普抑制肿瘤坏死因子研究进展[J].国际骨科杂志,2006,27(4):194.
- [8] 张芸.附子粳米汤对脾阳虚模型大鼠血中白介素1β、肿瘤坏死因子α的影响[J].贵阳中医学院学报,2009,31(3):78.
- [9] 赵太茂,刘淼,赵文,等.TNF-α、IL-8在腰椎间盘突出症中致病作用的研究[J].颈椎腰痛杂志,2010,31(3).
- [10] 甘潇,张华,王雄清.小肽转运蛋白PepT₁的研究进展[J].绵阳师范学院学报,2013,32(5):55.
- [11] Daniel H, Kottra G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology[J]. *Pflügers Archiv*,2004,447(5):610.
- [12] 郭文峰,羊燕群,高小玲,等.脾阳虚大鼠肽转运载体蛋白表达及转运功能的改变[J].时珍国医国药,2010,21(10):2 665.
- [13] 蒲春霞.水通道蛋白研究进展[J].成都大学学报:自然科学版,2010,29(2):104.
- [14] 江月斐,李奕祺,吕冠华,等.苓桂术甘汤对脾阳虚泄泻大鼠水通道蛋白3表达的影响[J].福建中医学院学报,2009,19(1):3.
- [15] Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, Lerma-Díaz JM, et al. Pentoxifylline and the proteasome inhibitor MG132 induce apoptosis in human leukemia U937 cells through a decrease in the expression of Bcl-2 and Bcl-XL and phosphorylation of p65[J]. *J Biomed sci*,2013,20(1):13.
- [16] 蒋鹤飞,武静,陈继婷,等.Bcl-2和Bax在脾阳虚大鼠下丘脑组织中的表达和大建中汤的干预作用[J].时珍国医国药,2012,23(11):2 716.
- [17] 高永静,纪如荣.星形胶质细胞调节慢性疼痛的分子机制[J].中国疼痛医学杂志,2013,19(9):545.
- [18] 王慧,武静,陈继婷.脾阳虚大鼠下丘脑星形胶质细胞GFAP和小胶质细胞OX42的表达及大建中汤的干预作用[J].时珍国医国药,2013,24(2):304.
- [19] 姚成芳,蔡生业,王丽,等.阴虚与阳虚动物模型中Th1/Th2类细胞因子表达的差异性[J].山东中医杂志,2004,23(3):166.
- [20] 卢文丽,方肇勤.阳虚证动物模型诊断指标与评析[J].上海中医药杂志,2005,39(4):42.

(收稿日期:2014-02-11 修回日期:2014-04-23)