基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1368-03

电针对脾气虚大鼠肝组织细胞凋亡的影响

刘群英,冯雯琪,卓廉士
(重庆医科大学中医药学院针灸推拿教研室,重庆 401332)

【摘 要】目的:从组织氧化与抗氧化损伤方面,观察电针对脾气虚大鼠肝组织细胞凋亡的影响,探讨电针治疗脾虚证的机理。方法:采用饥饱失常加劳倦过度法复制脾气虚模型;采用 HE 染色法检测大鼠肝组织细胞形态的变化,比色法检测实验大鼠肝组织丙二醛(Malondial dehyde,MDA)含量和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)的活性,TUENL 法定量检测实验大鼠肝组织细胞凋亡的表达。结果:脾气虚模型组大鼠肝组织中 SOD 活力较正常对照组明显下降($P<0.01$),MDA 含量较正常对照组显著上升($P<0.01$);同时,脾气虚模型组细胞凋亡指数显著高于正常对照组($P<0.01$)。电针治疗能上调肝组织中 SOD 活力,下调 MDA 含量,降低组织细胞凋亡数。结论:电针治疗脾虚证的机理可能与抗过氧化损伤,抗组织细胞凋亡的作用有关。

【关键词】电针治疗;脾气虚证;抗氧化;抗凋亡
【中国图书分类法分类号】R245.9+7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-14

Effect on spleen-qi deficiency rats treated by electroacupuncture on apoptosis cells in liver

LIU Qun-ying, et al
(*School of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the intervention effect on expression of apportosis and related factors of apportosis in spleen-qi deficiency rats treated by electroacupuncture in tissue oxidized or anti-oxidized injury and to investigate the protective effect and mechanism on spleen-qi deficiency treated by electroacupuncture. *Methods*: The rats' syndrome models of deficiency of spleen-qi were made by the method of compound causes of disease according to the TCM 's theory of injury due to diet and overstrain. Appearance of rats were observed: tissue ultrastructural changes measured with methods of Hemtoxycin-eosin (HE). The activites of liver superoxide dismutase (SOD) and the contents of liver malondial dehyde (MDA) were determined by colorimetry. The apoptosis cells in liver tissue were tested by TdT—mediated digoxin—dUTP nick end labeling (TUNEL). *Results*: We discuss the relationships between normal and model group, on the activity of SOD and the contents of MDA in liver of spleen-qi deficiency rats. The resu1t was that MDA of model group was more than normal group ($P<0.01$) and the activity of SOD stronger of normal group ($P<0.01$). The apoptosis index was increased obviously in rat with liver injury induced by spleen-qi deficiency($P<0.01$). The resu1t was decreased that the contents of MDA and the apoptosis index in live treated by electroacupuncture. The activity of SOD was stronger of electroacupuncture group. *Conclusion*: The Mechanism of electroacupuncture to spleen-qi deficiency maybe is regarded to the effect of Anti-Oxidanted injury and Anti-apoptesis in tissue cells.

【Key words】Electroacupuncture; Syndrome of deficiency of spleen-qi; Anti-Oxidant; Anti-apoptesis

脾气虚证是指脾气不足、运化失健所表现的证候。多因饮食失调、劳累过度以及其它急慢性疾病耗伤脾气所致,是临床上最常见的证候。它可以发生在不同系统、不同器官疾病发展过程中的某一阶段,许多疾病在发生发展过程中均伴随有脾气虚证的症状。目前对脾气虚证的研究涉及到消化、免疫、造血、内分泌、循环、泌尿等 10 多个系统,研究指标多达 70 余种[1];而从细胞凋亡角度研究脾虚证,尚无系统研究,仅散见于对某些疾病的研究中。在该领域的探索可以拓宽脾虚证在细胞水平的研究,从细胞生命活动的角度解释脾虚证。本实验通过观察电针对脾气虚大鼠肝组织细胞凋亡的影响,从组织氧化与抗氧化损伤方面,探讨电针治疗脾虚证的机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验选用健康 SD 大鼠 40 只,SPF 级,雌雄各半,平均体

作者介绍:刘群英(1970-),女,硕士,
研究方向:针灸治病机制的研究。
通讯作者:卓廉士,男,教授,E-mail:zhuo1828@sina.com。

重（200 ± 20）g。由重庆医科大学实验动物中心提供。动物使用许可证：SCXK（渝）2007-0001，环境许可证：XYXK（渝）2007-0001。所有实验动物提前 1 周购入，5 只/笼，室温（22 ± 2）℃，于安静环境下分笼饲养。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠（分析纯，北京化学试剂公司），多聚甲醛（分析纯，北京化学试剂公司），SOD 试剂盒、MDA 试剂盒（南京建成生物工程研究所），游泳水槽（自制，宽 60 cm，长 100 cm，高 60 cm），0.35 mm × 25 mm“华佗牌”一次性针灸针、华佗牌 SDZ-Ⅱ型电针仪（苏州医疗用品厂），台式离心机（北京医疗仪器维修厂），光学显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.3 动物病理模型复制方法与干预措施

病理模型复制采用傅湘琦[2]等劳倦过度和饮食失节法改良，将每日跑步 10 h 改为游泳力竭。即：单日喂食，20 g/ 只，自由饮水，游泳至力竭；双日禁食，自由饮水，游泳至力竭，造模 30 d。

模型复制结束，符合标准者随机分为模型对照组，电针治疗组，另未造模动物为正常对照组。电针治疗组：依据《实验针灸学》[3]大鼠针灸穴位定位方法，取双侧“脾俞”和“足三里”穴。“脾俞”直刺入 0.6 cm，“足三里”直刺入 0.7 cm。电针参数为频率 1.5 Hz，强度 2 mA，疏密波，以动物安静、不撕咬、肢体轻轻颤动为宜。将大鼠装入自制的大鼠固定器中，每日“治疗”1 次，每次 15 min；左右侧穴间日轮换。正常对照组和模型组大鼠，装入大鼠固定器中固定 15 min，与治疗组同步。

本实验脾气虚证诊断标准，依据 2002 年卫生部颁布《中药新药临床研究指导原则》[4] 中治疗脾虚证的临床研究指导原则。

1.4 肝组织形态学变化

取肝左叶固定于 4%中性甲醛溶液中，乙醇梯度脱水，二甲苯透明、浸蜡包埋，4 μm 厚度连续切片用于 HE 组织学观察。切片常规用二甲苯脱蜡，经各级乙醇至水洗，苏木素染色 5 min，盐酸乙醇分化 30 s（提插数下），自来水浸泡 15 min，置伊红液 2 min，常规脱水，透明，封片，镜下观察。

1.5 实验大鼠肝组织丙二醛（Malondial dehyde，MDA）含量和超氧化物歧化（Superoxide dismutase，SOD）活性检测

严格按照试剂盒说明书操作

1.6 TUNEL 法检测大鼠肝组织细胞凋亡的表达

切片常规脱蜡入水（脱蜡务必干净）。新鲜配制 3%H_2O_2，室温处理 10 min。蒸馏水洗涤 2 min × 3 次。标本片加 0.01 mol/L TBS1：200 新鲜稀释 Proteinase K，37℃消化 15 min，0.01 mol/L TBS 洗 2 min × 3 次。标本片加标记缓冲液（Labeling Buffer）20 μl/ 片，置于湿盒中，37℃标记 2 h。0.01 mol/L TBS 洗 2 min × 3 次。加封闭液 50 μl/ 片，室温 30 min。用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体，混匀后，50 μl/ 片加至标本片上，37℃反应 30 min。0.01 mol/L TBS 洗 2 min × 3 次。用抗体稀释液 1:100 稀释 SABC 加至切片，37℃反应 30 min。0.01 mol/L TBS 洗 5 min × 4 次。DAB 显色。苏木素轻染。脱水，透明，封片。高倍镜下随机选取 5 个视野，以 100 个细胞中的阳性细胞数作为凋亡指数（AI%），取其均值作为该片的代表值。

1.7 统计学方法

采用统计软件 SPSS11.5 进行统计分析，结果以均值数标准差表示，组间差异采用单因素方差分析，以 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 造模不同时间各组大鼠肝组织形态学比较

光镜下：正常对照组肝脏，肝细胞排列整齐，细胞较大，核圆居中，胞质丰富，无变性坏死，无炎细胞浸润。模型组肝脏：肝窦腔变大，窦腔内存在炎细胞，胞质减少，肝细胞稍密集，体积小于正常肝，双核细胞增多，有变性细胞存在（见图 1）。

2.2 电针对大鼠肝组织 MDA 含量和 SOD 活性的影响

本实验大鼠死亡 4 只，排除不符合标准的，入统计分析的动物数为每组 11 只。由表 1 可知，造模可增加大鼠肝组织 MDA 含量，减低 SOD 活性。经电针“治疗”后，大鼠肝组织 MDA 含量下降，SOD 活性增强，基本恢复正常（见表 1）。

表 1 实验大鼠肝组织 MDA 含量和 SOD 活性变化比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/ mgprot)
正常对照组	7.64 ± 0.51	68.93 ± 6.11
脾虚模型组	13.17 ± 2.93*	59.84 ± 4.31*
电针治疗组	9.12 ± 2.26▼	66.69 ± 3.05▼

注：*$P<0.01$ 与正常组比较，▼$P<0.01$ 与模型组比较

2.3 电针对大鼠肝组织细胞凋亡的影响（TUNEL 法检测结果）

脾气虚模型组细胞凋亡指数显著高于正常对照组（$P<0.01$）。电针组与模型组比较，电针组细胞凋亡指数低于模型组（$P<0.01$）。差异有显著统计学意义（见表 2）。

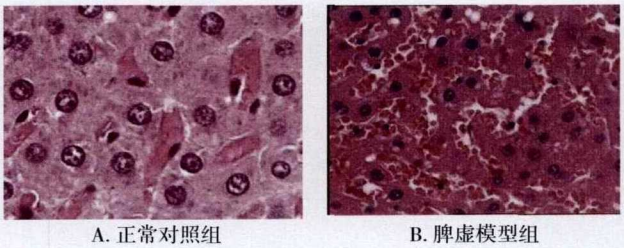
表 2 电针对实验大鼠肝组织细胞凋亡的影响(AI%)

组别	AI%
正常对照组	0.36 ± 0.12
脾虚模型组	15.73 ± 2.04*
电针治疗组	2.58 ± 1.61▼

注：*$P<0.01$ 与正常组比较，▼$P<0.01$ 与模型组比较

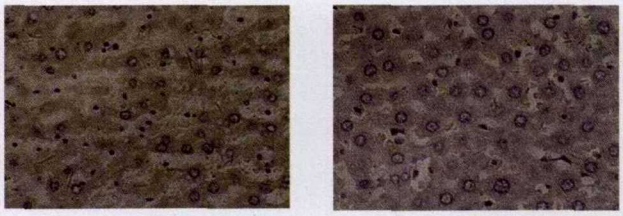
3 讨 论

《素问·脏气法时论》云“脾病者，……虚则腹满肠鸣，飧泄食不化。取其经，太阴、阳明、少阴血者。”故针灸治疗脾虚证可取足太阴脾经、足阳明胃经和相应的背俞穴针刺治疗。本实验选取阳明胃经的足三里穴和脾之背俞穴脾俞。足阳明胃经属胃络脾，为多气多血之经，从头至脚，纵贯全身，有补



A. 正常对照组　　B. 脾虚模型组

图 1　正常组和模型组大鼠肝组织细胞 HE 染色（×40）



A. 脾虚模型组　　B. 电针治疗组

图 2　电针组和模型组大鼠肝组织细胞凋亡表达（×40）

益气血之功。足三里穴五行属土，于脾胃相应，为胃的“下合穴”，“合主内府”，专司胃府病证。脾俞为脾脏之气输注于背部的的腧穴，主治脾胃肠腑病症，为消化系统疾病常用穴位，具有健脾和胃，利湿升清之功。二穴合用，益气健脾，补益气血，增强抵抗力，改善脾气虚证虚弱的症状。

《脾胃论·卷上·脾胃虚实传变论》曰“阴精所奉，调脾胃既和，谷气上升”，认为脾胃内伤之所以发病，主要病机是脾胃气机失调，升降失司。肝主疏泄，在气机的升降中起协调作用。肝的疏泄功能正常，全身气机疏通畅达，有助于脾升胃降和二者之间的协调。肝与脾在五行中属相克关系，若肝气虚，肝气不足则肝之升发不及，疏泄失常，复又影响脾胃之功能。故观察肝之形态功能的变化，可知脾胃内伤发病之机。

细胞凋亡是细胞内在的调节机体生长、发育及维持机体细胞平衡的重要生理机制，氧化应激、钙稳态失调等均可通过基因表达的改变，调控细胞凋亡[5]。在正常情况下，氧自由基与抗氧化防御系统处于相对的平衡状态；当机体抗氧化防御系统受到破坏，可造成细胞结构和功能的破坏[6]。当细胞内 ROS 生成增加、清除 ROS 能力下降和抗氧化能力减弱时可致细胞凋亡。如辛伐他汀改变 K562 细胞内氧化还原状态，可诱导 K562 细胞凋亡[7]。H_2O_2 以时间依赖方式诱导 ATⅡ细胞凋亡，对氧化应激状态下的细胞可能起到保护作用[8]。

氧自由基对组织的损伤作用与细胞膜的血流有关。在充足的血液和氧供应下，正常的组织细胞线粒体内进行着有氧氧化过程。脾胃气虚，水谷精微来源不足，气血生化乏源，气不足则血也不足，组织处于缺氧状态，能量代谢发生障碍，细胞色素氧化酶无力将氧还原成水，氧原子便会被夺去 1 个电子，由无害的氧变成具有杀伤力的活性氧自由基。脾气虚时，机体气血不足引起正气不足，机体抗氧化防御系统下降，导致清除有害氧化物自由基的能力降低，氧化反应和抗氧化防御系统下降，细胞结构和功能破坏，导致脾气虚机体组织细胞损伤。

SOD 是自由基的清除防御系统最重要的标志酶之一，是氧自由基的专一清除剂。SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。MDA 是脂类过氧化的终产物之一，MDA 含量高低反映氧自由基水平和过氧化反应的强度和速率，是了解自由基导致机体组织细胞损伤程度的重要指标。SOD 和 MDA 为检测肝细胞氧化反应的特征指标，在肝细胞受到损伤时，有些被称为死亡因子的细胞因子被激活，如 Fas l/Fas 抗体，通过与靶细胞上的受体结合，引起凋亡的发生[9]。

本实验研究中，模型组大鼠肝组织中 MDA 含量增加，提示大鼠机体内过氧化反应增强，反映机体组织细胞损伤的程度，同时反映了肝中氧自由基水平的升高。机体内过多的氧自由基可能诱导细胞凋亡。模型组大鼠肝组织中 SOD 活性降低，反映了机体清除氧自由基的能力降低，抗氧化反应下降。实验结果表明，在脾气虚模型的复制过程中，造模因素通过破坏机体的过氧化与抗氧化平衡，导致组织细胞损伤。经电针“治疗”后，大鼠肝组织中 SOD 活性增强，MDA 含量降低，反映机体清除氧自由基能力增加，阻止由自由基引发的脂质过氧化作用增强。

电针治疗脾气虚的机理可能是增强体内 SOD 活性，降低 MDA 含量，阻止由自由基引发的脂质过氧化作用，阻止组织细胞凋亡的产生，使损伤的组织得以自我修复。即：电针治疗可能与促使机体抗氧化酶活性增强，调整机体过氧化与抗氧化平衡有关。

参 考 文 献

[1] 吴苏冬，周冬枝.脾虚证本质的研究现状[J].陕西中医函授，2002，1：31-33.

[2] 傅湘琦.劳倦与饥饱塑造大白鼠脾气虚证模型的形态学研究[J].胃肠粘膜变化的扫描电镜观察[J].江苏中医药，1990，6：39.

[3] 李忠仁.实验针灸学[M].北京：中国中医药出版社，2003.327-329.

[4] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则 [M].北京：中国医药科技出版社，2002.

[5] 胡　野，凌志强，单小云.细胞凋亡的分子医学[M] .北京：军事医学科学出版社，200.122-143.

[6] 郑荣梁，黄中洋.自由基与衰老[M].见：张洪泉，余文新.中华抗衰老医药学.北京：科学出版社，2000.91-97.

[7] 黄文芳，杨永长.辛伐他汀通过氧化应激诱导 K562 细胞凋亡[J].重庆医科大学学报，2009，34(7)：892-895.

[8] 符跃强，许　峰，卢仲毅，等.氧化应激对肺泡Ⅱ型上皮细胞的损伤作用及 JNK 信号转导机制[J].重庆医科大学学报，2007，32(11)：1150-1153.

[9] 黄泰康，王米渠.中医分子生物学－分子中医学[M].北京：中国医药科技出版社，2003.

（责任编辑：冉明会）