

# 灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏 Bcl-2, Bax 表达的影响

雷萍, 马贤德, 关洪全\*  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:探讨灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的影响。方法:健康雄性清洁级昆明种小鼠 48 只随机分为 6 组,即空白组、脾虚组、阳性药组(香菇多糖,  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、灰树花提取物低、中、高剂量组(5, 10, 20  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组 8 只。采用番泻叶-劳倦过度复合因素法造模 14 d, 之后灰树花提取物和香菇多糖溶液滤菌后 ip 10 d, 第 11 天处死动物。免疫组化法观察脾脏凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 的表达, 并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定脾细胞凋亡相关基因 Bcl-2, Bax mRNA 的表达情况。结果:给予灰树花提取物后, Bcl-2 阳性产物平均灰度值比脾虚组明显降低( $P < 0.01$ ), Bax 阳性产物平均灰度值比脾虚组明显升高( $P < 0.01$ )。给予灰树花提取物后, Bcl-2 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ ), Bax mRNA 表达显著降低( $P < 0.01$ )。结论:灰树花提取物可以通过促进 Bcl-2 蛋白与 mRNA 的表达、抑制 Bax 蛋白与 mRNA 的表达, 提高 Bcl-2/Bax 的比值, 可以通过影响线粒体途径来抑制脾淋巴细胞凋亡的发生。

**[关键词]** 灰树花提取物; 脾虚; Bcl-2; Bax; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0182-03

## Effects of Extract of Grifola Frondosa on Bcl-2 and Bax in Spleen of Spleen Deficiency Mice

LEI Ping, MA Xian-de, GUAN Hong-quan\*  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of extract of grifola frondosa on Bcl-2 and Bax in spleen of spleen deficiency mouse. **Method:** Forty-eight KM mice were divided into 6 groups: normal group, spleen deficiency group, lentinan group ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), three groups of extract of grifola frondosa (5, 10, 20  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), ip ten days. Explore the expression of Bcl-2 and Bax in spleen of spleen deficiency mice by SP immunohistochemistry staining and RT-PCR. **Result:** The expression of Bcl-2 decreased, and the expression of Bax increased in spleen deficiency group. After given the extract of grifola frondosa, the expression of Bcl-2 increased significantly ( $P < 0.01$ ), and the expression of Bax decreased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The extract of grifola frondosa could maintain the immunologic function by upregulating the expression of Bcl-2 and downregulating the expression of Bax in spleen of spleen deficiency mice.

**[Key words]** grifola frondosa extract; spleen deficiency; Bcl-2; Bax; apoptosis

有关研究显示,脾虚的本质与免疫功能低下有密切关系<sup>[1]</sup>。目前从免疫学的角度对脾虚证的研究较为广泛,从非特异性免疫、细胞免疫、体液免疫,从分子水平到基因水平,对其免疫学本质进行了全面系统的研究,但脾虚与细胞凋亡关系的报道较为

少见<sup>[2]</sup>。灰树花又名栗蘑、贝叶多孔菌,日本称之为“舞茸”。分类学上属担子菌纲,多孔菌科,是一种药食两用的珍稀食用菌。灰树花提取物是从灰树花的子实体中分离得到,主要成分为真菌多糖,近年的研究表明其具有增强免疫功能、抑制肿瘤、抗 HIV、稳定血压、降低血糖、改善脂肪代谢等广泛的生理活性<sup>[3]</sup>。为深入了解脾虚的本质以及进一步开发治疗脾虚证的天然产物,本研究观察了灰树花提取物对脾虚小鼠脾细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。

**[收稿日期]** 20101220(004)

**[第一作者]** 雷萍,讲师,博士,从事天然产物的免疫调节研究

**[通讯作者]** \*关洪全,教授,博士生导师,从事虚证免疫研究,  
E-mail: hongquanguan@sina.com

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性清洁级昆明种小鼠 48 只(辽宁中医药大学实验动物中心),体重(20 ± 2)g,动物许可证号 SCXK(辽)2008-0005。

**1.2 药物** 灰树花提取物(浙江方格药业,多糖纯度 45%;香菇菌多糖片(lentinan 福建闽东力捷迅药业有限公司,批号 091201)。

**1.3 试剂** 过氧化物酶标记的 SP 试剂盒(批号 990980),兔抗 Bcl-2 和 Bax 多克隆抗体(批号 019081,361105),DAB 显色试剂盒(批号 990799),抗原修复液(批号 C-0011),均购自北京博奥森生物科技有限公司;Trizol Reagent(美国 Invitrogen Life Technologies 公司);DNA Marker(北京普博欣生物科技有限责任公司);RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司, RNA PCR kit (AMV) Ver. 3.0 批号 DRR019A);引物序列(由北京三博远志生物技术有限公司合成);琼脂糖(Biowest 公司);Genefinder(天泽基因有限公司)。

**1.4 仪器** LEICA 300 型脱水机,EG1150 型石蜡包埋机,LEICA RM2235 型切片机(均为德国 Leica 公司);BX41 型数码显微镜(日本 Olympus 公司);Mycycler 梯度 PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司);UV300 紫外分光光度计(英国 UV-visible Spectrometer 公司);PowerPac200 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);5500 型凝胶电泳成像分析系统(美国 Alphainnotech chemi Imager 公司);DYY31D 型水平电泳槽(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备** 健康雄性清洁级昆明种小鼠

48 只随机分为 6 组,即空白组、脾虚组、阳性药组(香菇多糖,2 mg·kg<sup>-1</sup>)、灰树花提取物低、中、高剂量组(5,10,20 mg·kg<sup>-1</sup>,以下简称为灰低组、灰中组、灰高组),每组 8 只。采用文献[4]番泻叶-劳倦过度复合因素造模法,每只小鼠每日 ig 100% 番泻叶水煎剂 0.5 mL,并游泳;以身体下沉为度。14 d 后,造模小鼠出现体重下降,粪便不正常(时软,时溏,时干),食少纳呆,毛色枯槁,蜷缩聚堆、反应迟钝甚至胆怯状态等表现,说明脾虚造模成功。之后阳性药组给予香菇多糖,实验各组按不同剂量灰树花提取物滤菌后 ip 10 d,第 11 天处死动物。

**2.2 免疫组化方法** 第 11 天处死动物取脾脏,立即于 4% 多聚甲醛(pH 7.4)中固定,4 ℃ 保存。组织石蜡切片的按常规方法制作:分为 10 个步骤:取材、固定、洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色、封固。免疫组化 SP 染色方法按照试剂盒说明进行,一抗 Bcl-2 和 Bax 工作浓度为 1:100,同时设阴性对照组(PBS 代替一抗),用 DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片。切片染色后,选择染色良好区域,应用 Leica Q550CW 图像采集和分析系统,每只小鼠观察 3 张切片,每张切片在显微镜下(400 倍)选取 5 个互不重叠的视野,以单位面积阳性细胞表达的平均灰度值作为其表达情况,此系统将白色灰度值设定为 255,将黑色灰度值设定为 0,故灰度值越高,表达越弱,即灰度值与表达量成反比关系<sup>[31]</sup>。

**2.3 RT-PCR 方法** 第 11 天处死动物后取各组小鼠脾脏,置于 Trizol 中, -80 ℃ 冻存待测。引物的设计见表 1。

表 1 RT-PCR 引物

| 名称             | 引物序列   | 扩增片段/bp |
|----------------|--|---------|
| $\beta$ -actin | 上游 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC -3'<br>下游 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT -3' | 240     |
| Bcl-2          | 上游 5'-GGA ACT CTT CAG GGA TGG GG -3'<br>下游 5'-GGA GAA ATC AAA CAG AGG TCG C -3'        | 235     |
| Bax            | 上游 5'-ATC CAG GAT CGA GCA GGG AG -3'<br>下游 5'-GCA AAG TAG AAG AGG GCA ACC A -3'        | 260     |

退火温度均为 59 ℃,  $\beta$ -actin 30 个循环, Bcl-2 和 Bax 均为 35 个循环。取 5  $\mu$ L 扩增产物与 1  $\mu$ L 预染液混合后上样。用恒压 250 V 电泳 25 min。采用 Gelpro32 凝胶成像分析软件进行图像分析,记录每条 DNA 扩增条带的灰度值,将每一个目的 DNA 扩增片段的灰度值与相应内参  $\beta$ -actin 扩增片段的

灰度值之比作为每一个目的基因 mRNA 的半定量指标。

**2.4 统计方法** 用 SPSS 17.0 统计软件,各组平均灰度值均以  $\bar{x} \pm s$  表示,先进行方差齐性检验,再用单因素方差分析进行统计,组间采用两两比较 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 免疫组化** 脾虚组 Bcl-2 阳性产物平均灰度值(平均灰度值与表达量成反比)明显高于空白组 ( $P < 0.01$ ), 给予阳性对照药物香菇多糖和低、中、高剂量的灰树花提取物后, Bcl-2 阳性产物平均灰度值比脾虚组明显降低 ( $P < 0.01$ )。脾虚组 Bax 阳性产物平均灰度值明显低于空白组 ( $P < 0.01$ ), 给予阳性对照药物香菇多糖和低、中、高剂量的灰树花提取物后, Bax 阳性产物平均灰度值比脾虚组明显升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏 Bcl-2 和 Bax 平均灰度值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别     | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | Bcl-2                          | Bax                           |
|--------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 空白     | -                          | 85.42 ± 5.66 <sup>2)</sup>     | 196.17 ± 6.49 <sup>2)</sup>   |
| 脾虚模型   | -                          | 184.89 ± 6.49 <sup>1)</sup>    | 95.28 ± 5.83 <sup>1)</sup>    |
| 香菇多糖   | 2                          | 114.40 ± 3.70 <sup>1,2)</sup>  | 125.69 ± 3.70 <sup>1,2)</sup> |
| 灰树花提取物 | 5                          | 162.35 ± 11.00 <sup>1,2)</sup> | 124.98 ± 2.86 <sup>1,2)</sup> |
|        | 10                         | 113.73 ± 5.80 <sup>1,2)</sup>  | 175.00 ± 9.99 <sup>1,2)</sup> |
|        | 20                         | 139.66 ± 3.41 <sup>1,2)</sup>  | 149.72 ± 2.80 <sup>1,2)</sup> |

注:与空白组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , 与脾虚组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 RT-PCR** 与空白组比较,脾虚组小鼠脾脏 Bcl-2 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), Bax mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 与脾虚组相比较,脾虚小鼠给予阳性对照药物和低、中、高剂量灰树花提取物后, Bcl-2 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), Bax mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏 Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别     | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | Bcl-2                       | Bax                         |
|--------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白     | -                          | 0.30 ± 0.02 <sup>4)</sup>   | 0.46 ± 0.03 <sup>3)</sup>   |
| 脾虚模型   | -                          | 0.20 ± 0.02 <sup>2)</sup>   | 0.50 ± 0.02 <sup>1)</sup>   |
| 香菇多糖   | 2                          | 0.49 ± 0.04 <sup>2,4)</sup> | 0.33 ± 0.03 <sup>2,4)</sup> |
| 灰树花提取物 | 5                          | 0.44 ± 0.03 <sup>2,4)</sup> | 0.45 ± 0.03 <sup>3)</sup>   |
|        | 10                         | 0.43 ± 0.05 <sup>2,4)</sup> | 0.41 ± 0.03 <sup>2,4)</sup> |
|        | 20                         | 0.56 ± 0.06 <sup>2,4)</sup> | 0.39 ± 0.06 <sup>2,4)</sup> |

注:与空白组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与脾虚组相比<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

Bcl-2 是 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) 的缩写,是研究最早的凋亡相关基因。其主要分布在线粒体外膜的浆膜面、核膜

和内质网的表面,对于稳定线粒体膜有着十分重要的作用。Bcl-2 基因家族是最主要的线粒体途径的凋亡调控基因。目前,至少发现有 15 种 Bcl-2 家族成员,包括抑制和促进细胞凋亡的两大类蛋白,它们的作用不尽相同:属于凋亡抑制蛋白的有 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Brag-1, Mel-1 等;属于诱导凋亡的蛋白有 Bax, Bcl-xs, Bad, Bak, Bid, Blk 等。这两类蛋白的作用相互拮抗,如 Bcl-2 可以与促凋亡基因 Bax 拮抗,抑制细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质,阻止细胞质中细胞色素 C 对 caspase 蛋白酶的激活,从而抑制细胞的凋亡;Bcl-2 蛋白还可以作用于线粒体通透转运孔 (permeability transition pore, PT) 的有关蛋白,从而阻止 PT 孔的开放,以维持线粒体的跨膜电位<sup>[5]</sup>。Bcl-2 与 Bax 的比值能提示是否发生凋亡,二者比例升高时能促进细胞存活,二者比例降低时能促进细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

本实验对脾脏中 Bcl-2 与 Bax 蛋白和 mRNA 的表达进行测定,结果表明,脾虚时小鼠脾脏中 Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达减少, Bax 蛋白和 mRNA 表达增多。给予灰树花提取物后,脾脏 Bcl-2 表达量显著回升, Bax 表达量显著回降,表明灰树花提取物可以通过线粒体途径调节 Bcl-2 与 Bax 的比例,抑制脾脏细胞凋亡,从而维持脾脏的正常免疫功能。本研究结果有利于进一步阐明脾虚的本质以及为临床治疗脾虚证提供一定的实验依据。

### [参考文献]

- [1] 杨舒,钱会南. 中医脾虚证的免疫机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(9): 1433.
- [2] 易杰,姜春梅,刘延梅. 脾虚证的分子生物学研究[J]. 辽宁中医学院学报, 2002, 4(2): 99.
- [3] 李海花. 灰树花活性多糖的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(2): 365.
- [4] 曲长江,刘劲,林庶如,等. 不同造模方法脾虚小鼠免疫学改变的比较研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(4): 46.
- [5] 张铁峰. Fas, caspases-3, Bcl-2 在骨关节炎软骨中的表达和意义[D]. 沈阳:中国医科大学, 2007: 25.
- [6] Schäubitz W R, Sommer C, Zoder W, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia[J]. Shock, 2000, 31(9): 2212.

[责任编辑 聂淑琴]