

精元康胶囊对化疗致骨髓抑制小鼠骨髓细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达水平的影响

蒋立峰¹, 蒋士卿^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 通过观察精元康胶囊对骨髓细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达水平的影响, 以深入探讨该药的作用机制。方法: 实时荧光定量 PCR 检测骨髓抑制模型小鼠骨髓细胞表达 Bcl-2, Bax mRNA 的情况。结果: Bcl-2 mRNA 的表达水平精元康胶囊组最高, Bax mRNA 的表达水平精元康胶囊组最低, 与模型组比较有显著差异, 与空白组比较无明显差异。结论: 精元康胶囊能升高抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 同时降低促凋亡基因 Bax 的表达, 对骨髓细胞凋亡相关通路产生影响, 可能是精元康胶囊对化疗致骨髓抑制影响的重要机制。

[关键词] 精元康胶囊; 骨髓抑制; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0216-04

Effect of Jingyuankang Capsule on Expression of Bcl-2, Bax mRNA in Bone Marrow Cells of Model Mice of Chemotherapy-induced Myelosuppression

JIANG Li-feng¹, JIANG Shi-qing^{2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Henan University of Tradition Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jingyuankang capsule on the expression of Bcl-2, Bax mRNA

[收稿日期] 2011-03-04

[基金项目] 国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA719A09-0203); 河南省自然科学基金项目(2010A360007)

[第一作者] 蒋立峰, 医学硕士, 中医师, 在读博士研究生, 从事肿瘤的临床及研究工作, Tel: 13951720716, E-mail: Jlf_@126.com

[通讯作者] * 蒋士卿, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 从事肿瘤的临床、教学及科学研究工作, Tel: 13607640006, E-mail: jiangshiqing66@126.com

- [2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 8491.
- [3] Li-Weber M, Laur O, Hekele A, et al. A regulatory element in the CD95 (APO-Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation [J]. Eur J Immunol, 1998, 28(8): 2373.
- [4] Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, et al. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain [J]. Neurosci Lett, 1999, 274(1): 45.
- [5] Nakajima T, Iwabuchi S, Miyazaki H, et al. Preconditioning prevents ischemia-induced neuronal death through persistent Akt activation in the Penumbra region of the rat brain [J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(5): 521.
- [6] 李雪梅, 魏欣冰, 张岫美, 等. 乙酰葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的脑组织及血清 NO 和 NOS 的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(11): 829.
- [7] 李雪梅, 魏欣冰, 张岫美, 等. 乙酰葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后一氧化氮和内皮素生成的影响 [J]. 山东大学学报·医学版, 2005, 43(12): 1173.

[责任编辑 何伟]

in bone marrow cells of model mice of chemotherapy-induced myelosuppression and make a further study of the mechanism of the medicine. **Method:** Measuring the expression of Bcl-2, Bax mRNA in bone marrow cells of model mice of myelosuppression with real-time fluorescence quantitative PCR. **Result:** The Jingyuankang group had the highest expression of Bcl-2 mRNA and lowest expression of Bax mRNA, compared with the model group, the difference was significant, while compared with the control group, there was no significant differences. **Conclusion:** These results confirmed preliminarily that Jingyuankang capsule could increase the expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2 and decrease the expression of proapoptotic gene Bax, through affecting the apoptosis-related pathway to prevent the blood cells from apoptosis caused by chemotherapy, this may be an important mechanism. of Jingyuankang capsule treating the chemotherapy-induced myelosuppression.

[**Key words**] Jingyuankang capsule; myelosuppression; cell apoptosis

近些年来对各种肿瘤治疗采用联合用药方式治疗(combined modality therapy, CMT)的趋势越来越明显。CMT 计划可增强肿瘤局部控制率,但较单一治疗措施发生骨髓抑制危险性更大。现在 CMT 计划在多种肿瘤的治疗中已广泛使用,而结果是骨髓抑制越来越常见。中医药在化疗致骨髓抑制治疗方面具有较好的疗效,这源于中医独特的理论体系和辨证思维方式。根据中医“肾主骨,生髓”,脾为后天之本,气血生化之源的理论,精元康胶囊由人参、黄芪、女贞子、怀山药、熟地黄、砂仁、淫羊藿、当归等中药组成,具有益气养阴、健脾补肾等功能,用于治疗化疗致骨髓抑制的效果良好。本研究选取该药对骨髓细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达水平的影响,以深入研究、探讨该药的作用机制。

1 材料

1.1 动物 6 周龄清洁级雄性 C57 小鼠 60 只,体重 18 ~ 22 g,由扬州大学比较医学中心提供,许可证号 SCXK(苏)2007-0001。

1.2 药物 精元康胶囊,河南省中医药研究院制剂室提供,批号 20100422;利可君片,江苏吉贝尔药业有限公司,批号 090702。注射用环磷酰胺 (CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 10042321,贞芪扶正胶囊,甘肃新兰药业有限公司,批号 100327。

1.3 试剂和仪器 Trizol、逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购于大连宝生物工程有限公司,PCR 枪头和离心管均为一次性无 RNA 酶产品,其他试剂均为分析纯,购自南京化学试剂公司,高速冷冻离心机 (5810R Eppendorf),DNA 荧光定量分析仪 (LightCycle Roche 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 将 60 只 C57 小鼠随机均分为 5

组:空白组,模型组,西药对照组,中药对照组,精元康胶囊组,每组 12 只。前 3 d 每日上午注射环磷酰胺 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (空白组注射等量生理盐水),下午空白组、模型组 $\text{ig} 0.5\% \text{ CMC-Na } 20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,西药对照组 ig 利可君 $32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,中药对照组 ig 贞芪扶正胶囊 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,精元康胶囊组 ig 精元康胶囊混悬液 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。3 d 后,下午 ig 不同药物,再连续 ig 4 d。

2.2 标本制备 小鼠均在末次给药 24 h 后处死,取出股骨,常规制作骨髓单细胞悬液,离心去上清,放入 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备检。

2.3 总 RNA 提取 参照试剂说明,每组样本细胞加入 Trizol 经氯仿、异丙醇提取总 RNA。Eppendorf 蛋白核酸测定仪及电泳分析 RNA 的量和纯度。所用 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 2.0,电泳均可见 18S 和 28S 条带。

2.4 引物设计、合成 根据 GenBank 发布序列进行引物设计,由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	Sense primer	Antisense primer
Bcl-2	5'-GACCTCTGTTT-GATTCTCCTG-3'	5'-TGTGTGTGTGTGT-TCTGCTTTA-3'
Bax	5'-GAGATGAACTGGA-CAGCAATATG-3'	5'-CTAGCAAAG-TAGAAGAGGGCAAC-3'
β -actin	5'-GAGAAGATTG-GCACCACAC-3'	5'-GAGGCATACAGGGA-CAACAC-3'

2.5 逆转录 参照逆转录试剂盒操作说明进行 RNA 的逆转录反应,见表 2。

上述 RT 反应液配好后,在 Eppendorf PCR 仪上进行逆转录反应,条件为: $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min (逆转录反应)、 $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s (逆转录酶的失活反应)。

表 2 逆转录反应反应体系

试剂	使用量 /μL	终浓度 /pmol·L ⁻¹
5 × PrimeScript® Buffer(for Real Time)	2	1 ×
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	0.5	
Oligo dT Primer(50 mmol·L ⁻¹) ₁	0.5	25
Random 6 mers(100 mmol·L ⁻¹) ₁	0.5	50
Total RNA	2.0	
RNase Free dH ₂ O	up to 10	

2.6 实时荧光定量 PCR 检测 参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书进行实时 PCR 反应。见表 3。

表 3 实时荧光定量 PCR 反应体系

试剂	使用量 /μL	终浓度 /μmol·L ⁻¹
SYBR® Premix Ex Taq™ II(2 ×)	10.0	1 ×
PCR Forward Primer(10 μmol·L ⁻¹)	0.8	0.4
PCR Reverse Primer(10 μmol·L ⁻¹)	0.8	0.4
DNA 模板	2.0	
dH ₂ O(灭菌蒸馏水)	6.4	
Total	20.0	

上述 PCR 反应液配好后,放入 LightCycle 实时荧光定量分析仪中,进行三步法 PCR 扩增反应:95 ℃ 5 s 变性,55 ℃ ~60 ℃ 10 s 退火,72 ℃ 15 s 延伸,45 个循环。

2.7 统计学处理 采用比较 2^{-ΔΔCt}法分析骨髓细胞表达 Bcl-2, Bax mRNA 的含量:即以管家基因 β-actin 作为内参基因相对定量,以空白组小鼠作为对照组,计算各组小鼠 Bcl-2, Bax mRNA 的 ΔΔCt 值。ΔΔCt = 实验组(Ct 目的基因 - Ct 管家基因) - 对照组(Ct 目的基因 - Ct 管家基因),以 ΔΔCt 值为定量结果进行统计分析,则目的基因的量 = 2^{-ΔΔCt}。参照基因表达谱芯片分析,当目的基因表达 ≥2 倍,认为该基因表达增高,若 ≤0.5 倍认为基因表达降低。

3 结果

精元康胶囊对模型小鼠骨髓细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响。比较各组 2^{-ΔΔCt}值显示:骨髓细胞凋亡相关基因 Bcl-2, Bax mRNA 表达水平组间存在差异。模型组与空白组比较, Bcl-2 mRNA 的表达 ≤1/2 倍,基因表达降低, Bax mRNA 的表达 ≥2

倍,基因表达增高,均有显著性差异;与模型组比较,西药对照组,中药对照组,精元康胶囊组 Bcl-2 mRNA 的表达 ≥2 倍,基因表达增高, Bax mRNA 表达 ≤1/2 倍,基因表达降低,有显著性差异。西药对照组,中药对照组,精元康胶囊组 3 组之间比较, Bax mRNA 的表达水平精元康胶囊组 < 西药对照组 < 中药对照组,但无显著性差异; Bcl-2 mRNA 的表达水平精元康胶囊组 > 中药对照组 > 西药对照组,精元康胶囊组与中药对照组及西药对照组比较, Bcl-2 mRNA 的表达 ≥2 倍,基因表达增高,均有显著性差异(表 4)。

表 4 小鼠骨髓细胞凋亡相关基因 Bcl-2, Bax mRNA 的表达($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	2 ^{-ΔΔCt}	
		Bcl-2	Bax
空白	-	1 ¹⁾	1 ¹⁾
模型	-	0.18 ± 0.07	3.56 ± 1.38
利可君	3.2 × 10 ⁻³	0.39 ± 0.15 ¹⁾	1.43 ± 0.83 ¹⁾
贞芪扶正胶囊	3	0.42 ± 0.09 ¹⁾	1.60 ± 0.57 ¹⁾
精元康胶囊	4	0.86 ± 0.17 ^{1,2,3)}	1.32 ± 0.35 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.01;与利可君组比较²⁾P < 0.01;与中药对照组比较³⁾P < 0.01。

4 讨论

化疗药物容易引发骨髓造血细胞凋亡,进而影响造血细胞的正常发育成熟和造血系统的稳定。对骨髓细胞凋亡相关基因变化的观察是研究细胞凋亡的重要指标。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主有序的死亡,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用。随着对凋亡的认识逐渐深入,对凋亡发生的分子机制的了解也越来越透彻。研究凋亡可能的通路、调控及相互关系,对进一步认识和治疗凋亡相关疾病有重要意义。细胞凋亡存在三条通路:死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路,三条通路间是相互密切关联的,它们构成一个复杂的网络对凋亡进行精细的调控。长期以来,线粒体在细胞凋亡中的作用一直被人们忽视。随着细胞凋亡研究的深入,发现某些和凋亡有关的基因产物(蛋白质或酶)均可定位于线粒体。细胞线粒体凋亡通路就是通过释放与凋亡相关的蛋白,如 Cyt C, Smac/DIABLO 蛋白以及凋亡诱导因子(AIF)等激活 caspase,促进凋亡。Bcl-2 家族是线粒体上的一类跨膜蛋白,它们的结合状态将调节 Cyt C, Smac/DIABLO 蛋白以及 AIF 等的释放调控凋亡。Bcl-2, Bcl-xL 等可通过阻止线

粒体释放前凋亡因子细胞色素 C (Cyt C) 来阻断凋亡,而 Bax, Bak, Bid 等则可插入线粒体外膜形成通道,释放凋亡活性物质促进凋亡。现已发现 Bcl-2, Bcl-xL, Bax 等在平面脂双层中能形成孔道,在脂质体中, Bax 能发生寡聚化,形成具有高传导性的通道,并且激活细胞色素 C 的释放^[1]。此外,还发现 Bax 可降低磷脂双层的稳定性,而 Bcl-2 则不能,提示促凋亡蛋白可能通过直接降低线粒体外膜稳定性促进 Cyt C 释放^[2]。Ghribi 等发现 Bcl-2/Bax 的比值是决定 Cyt C 释放和 caspase 的激活的关键^[3]。此外研究还发现 Bcl-2 除了是细胞线粒体凋亡通路的主要调控因子,还可通过抑制 tBid 的凋亡活性参与细胞死亡受体通路的调控^[4]。

研究发现,当归补血汤能促进骨髓有核细胞抗凋亡作用基因 Bcl-2 和促细胞增殖基因 cmyc mRNA 表达显著增加,从而推断当归补血汤能够促进骨髓细胞增殖并抑制其凋亡^[5]。还有研究表明:四物汤配方颗粒可诱导 Bcl-2 mRNA 的表达上调, Bax mRNA 表达下调。通过共同调节 Bcl-2 和 Bax 基因而保护骨髓细胞免受放、化疗引起的细胞凋亡^[6]。陈永锋^[7]等研究发现:由人参、淫羊藿、鹿茸等多味药材组成的复方制剂维肝力,通过提高 Bcl-2 在骨髓细胞中的表达,降低 Bax 的表达水平,从而发挥抑制细胞凋亡的作用,防止骨髓造血细胞凋亡,促进骨髓造血恢复。

精元康胶囊由人参、黄芪、女贞子、怀山药、熟地黄、砂仁、淫羊藿、当归等中药组成,方中人参、黄芪大补元气,女贞子滋阴生精,补肾养肝,怀山药、熟地黄健脾补肾,砂仁理气化湿,淫羊藿温阳滋肾以固本,当归补血活血。诸药合用,共奏益气养阴、健脾补肾、理气化湿、活血通络之功。实验研究和临床观察表明:精元康胶囊具有抗骨髓细胞凋亡作用,能有效改善化疗致骨髓抑制的临床症状。精元康胶囊配合化疗临床治疗 32 例非小细胞肺癌患者,且与 32 例单纯化疗病人对照观察疗效发现:较之单纯化疗,精元康胶囊能明显改善化疗患者临床症状、提高患者生活质量,尤其是在减轻化疗后骨髓抑制方面疗效显著^[8-9]。

本实验通过实时荧光定量 PCR 检测了骨髓抑

制模型小鼠骨髓细胞表达 Bcl-2, Bax mRNA 的情况。实验证实,精元康胶囊可明显升高抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,同时降低促凋亡基因 Bax 的表达,对骨髓细胞凋亡相关线粒体通路产生影响,从而防止造血细胞因化疗药物引起的细胞凋亡。以上作用可能是精元康胶囊对化疗致骨髓抑制影响的重要机制。本研究属于初步从细胞凋亡通路方面探讨骨髓细胞凋亡的相关机制,细胞凋亡发生的具体过程非常复杂,除了以上这些基因蛋白在细胞凋亡过程中起到非常重要的作用外,还有许多基因蛋白在凋亡中也起着很重要的作用。因此,许多细节问题的阐明还有待于今后的进一步研究。

[参考文献]

- [1] Schendel S L, Xie Z H, Montal M O, et al. Channel formation by Antiapoptotic protein Bcl-2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 13: 1899.
- [2] Brenner C, Cadiou H, Vieira H L, et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator[J]. Oncogene, 2000, 19(3): 329.
- [3] Korsmeyer S J, Yin X M, Oltval Z N, et al. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1271(1): 63.
- [4] Li H, Zhu H, Xu C J, et al. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis[J]. Cell, 1998, 94(4): 491.
- [5] 杨岚, 张力华, 周毅. 当归补血汤对骨髓抑制小鼠骨髓细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(3): 538.
- [6] 陈志伟, 许惠玉, 刘曾敏, 等. 四物汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠造血功能调控的实验研究[J]. 中国职业医学, 2008, 35(3): 207.
- [7] 陈永锋, 祝彼得, 张新胜, 等. 维肝力对贫血小鼠骨髓有核细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中药材, 2006, 29(10): 1059.
- [8] 蒋士卿, 王红玲. 精元康胶囊对骨髓抑制小鼠骨髓有核细胞表达抗凋亡蛋白的影响[J]. 中医学报, 2009, 24(6): 8.
- [9] 蒋士卿, 王红玲. 精元康胶囊联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌临床研究[J]. 中医学报, 2010, 25(3): 385.

[责任编辑 何伟]