

· 基础研究 ·

两种脾虚证大鼠肝脏线粒体自噬及
细胞凋亡的比较研究

陈 慧 陈 燕 王 丹 项伟玲 吕 斌 金丽琴

摘要 目的 比较脾气虚证和脾不统血证两种脾虚证模型大鼠肝脏线粒体自噬及细胞凋亡水平,探讨脾虚证发生发展过程中,肝脏细胞状态变化及可能的机制。**方法** 32 只 SD 大鼠随机分为 4 组:正常对照组(8 只)、低分子肝素钠对照组(8 只)、脾气虚组(8 只)、脾不统血组(8 只)。采用劳倦过度加饮食失节的方法复制脾气虚证大鼠模型,在脾气虚证的基础上采用低分子肝素钠诱导出血的方法构建脾不统血证大鼠模型;使用化学发光法检测大鼠肝组织三磷酸腺苷(ATP)含量;JC-1 荧光探针法检测大鼠肝组织线粒体膜电位;Western Blot 法检测各组大鼠肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、LC3 II/I 的表达水平和细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、线粒体外 Cyt-C 的表达水平;使用荧光定量法检测 PINK1、Parkin、Bcl-2、Bax mRNA 水平。**结果** 与正常对照组及低分子肝素钠组比较,两种脾虚证大鼠肝组织线粒体膜电位、ATP 含量、PINK1、Bcl-2 蛋白及 mRNA 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),线粒体外 Cyt-C 蛋白水平、Bax mRNA 水平显著升高($P < 0.01$)。与脾气虚证大鼠比较,脾不统血证大鼠肝组织线粒体膜电位、ATP 含量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),线粒体外 Cyt-C 蛋白水平、Bcl-2 蛋白及 mRNA 水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),Cleaved caspase-3 蛋白水平、Bax 蛋白及 mRNA 水平上升($P < 0.05$)。**结论** 脾虚证大鼠肝组织细胞凋亡可能机制为,线粒体过度损伤导致线粒体自噬紊乱,进一步导致了细胞凋亡,随着脾虚证的加重,肝组织细胞凋亡程度加深。

关键词 脾气虚证;脾不统血证;肝脏细胞;线粒体自噬;细胞凋亡

A Comparative Study of the Mitophagy and Apoptosis of Liver in Rats with Two Different Pi Deficiency Syndromes CHEN Hui, CHEN Yan, WANG Dan, XIANG Wei-ling, LU Bin, and JIN Li-qin
School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Zhejiang (325035)

ABSTRACT Objective To compare mitophagy and apoptosis levels in liver tissues of rats with Pi qi deficiency syndrome (PQDS) and Pi-qi failing to control blood syndrome (PQFCBS), and to explore the changes of liver cell state and its possible mechanism in the development of Pi deficiency syndrome (PDS). **Methods** Totally 32 SD rats were randomly divided into 4 groups, the normal control group, low molecule Heparin Sodium (LMHS) group, PQDS group, PQFCBS, 8 in each group. PDS mice model was duplicated by the method of excessive labor and diet disorder. PQFCBS rat model was built by low molecule Heparin Sodium induced hemorrhage on the basis of PQDS. ATP content was detected by chemiluminescence, and mitochondrial membrane potential by JC-1 fluorescent probe method. The expression levels of mitophagy regulatory proteins (PINK1, Parkin, and LC3 II/I ratio) and apoptosis related proteins (Bcl-2, Bax, Cleaved caspase-3, and cytoplasm Cyt-C) in hepatic tissue of rats were detected by Western Blot. The mRNA levels of PINK1, Parkin, Bcl-2, and Bax were detected by Real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The ATP content in the liver and liver mitochondrial membrane potential were

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(No. 2013CB531702)

作者单位:温州医科大学检验医学院,生命科学学院(浙江 325035)

通讯作者:金丽琴, Tel: 13857772722, E-mail: liqinjin@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20190419. 134

significantly lower in PQDS and PQFCBS rats than in normal and LMHS rats ($P < 0.01$). Compared with the normal group and LMHS group, the protein and mRNA levels of PINK1 and Bcl-2 in PQDS and PQFCBS significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the protein level of Cyt-C in the cytoplasm without mitochondria and the mRNA level of Bax significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the protein level of Parkin and LC3 II/I ratio significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with PQDS group, liver mitochondrial membrane potential and ATP content decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the protein level of Cyt-C in the cytoplasm without mitochondria, protein and mRNA levels of Bcl-2 significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), protein levels of Cleaved caspase-3, protein and mRNA levels of Bax significantly increased ($P < 0.05$) in the PQFCBS group. Conclusions The possible mechanism of apoptosis of liver cells in PDS rats might be as follows. Excessive damage of mitochondria caused mitophagy regulatory disorder, thus further leading to cell apoptosis. Along with the deterioration of PDS, apoptosis of liver cells became more serious.

KEYWORDS Pi qi deficiency syndrome; Pi-qi failing to control blood syndrome; liver cell; mitophagy; apoptosis

中医学“脾”与线粒体关系密切,中医学理论中的脾主运化不仅仅指水谷精微在肠胃中的消化吸收,更重要的是线粒体内生物氧化代谢^[1]。脾虚证通常伴随着机体线粒体结构或功能损伤^[2]。线粒体自噬是细胞选择性清除受损、衰老线粒体的过程,对维持细胞稳态起着重要作用^[3],而当线粒体自噬机制紊乱,受损的线粒体不能及时清除,将导致活性氧上升或者细胞凋亡因子释放,从而造成细胞损伤或细胞凋亡^[4]。脾气虚证与脾不统血证是两种不同程度的脾虚证,脾不统血是在脾气虚的基础上发展而来。脾虚与线粒体结构功能损伤的关系密切^[5-7],但对于脾虚证线粒体自噬及细胞凋亡的调节机制鲜有报道。本研究探讨脾气虚证与脾不统血证模型大鼠肝脏线粒体自噬及细胞凋亡机制,并从分子生物学角度再进一步探讨脾虚发生时,机体肝细胞状态变化,为脾虚证的临床诊断提供参考。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 32 只,体重 300 ~ 350 g,7 ~ 8 周龄,由上海斯莱克动物中心提供,动物合格证号:SYXK(浙)2015-0009。所有大鼠饲养于温州医科大学实验动物中心,饲养温度 22 ~ 25 ℃,湿度 55% ~ 70%。本实验严格遵守实验动物福利和伦理原则,并通过温州医科大学实验动物伦理委员会伦理审查(No. wydw2017-0025)。

2 主要试剂和仪器 低分子肝素钠注射液(齐鲁制药有限公司,批号:6K0352C08,规格:5 000 IU/0.4mL,生理盐水稀释至 1 000 IU/mL)。三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(货号: S0026)与 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(货号:

C2006)购自碧云天生物技术研究。线粒体提取试剂盒(货号: SM0020),购自北京索莱宝科技有限公司。BCA 蛋白浓度检测试剂盒(货号:23209)由美国赛默飞公司提供。兔抗 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗 Bax 多克隆抗体、鼠抗 Cleaved caspase-3 多克隆抗体、鼠抗 Cyt-C 多克隆抗体、鼠抗 β -Tubulin 多克隆抗体由艾博抗上海贸易有限公司提供。鼠抗 PINK1 多克隆抗体、兔抗 Parkin 多克隆抗体和兔抗 LC3B 多克隆抗体由成都正能生物技术有限公司提供。RNA 逆转录试剂盒(HiScript IIQ RT SuperMix for qPCR)与荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR qPCR Master Mix)购自南京诺唯赞生物技术有限公司。所有 q-PCR 引物由杭州擎科梓熙生物技术有限公司提供。Mini-PROTEAN 小型蛋白垂直电泳仪(Bio-Rad),CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统(Bio-Rad); Evolution 200 紫外分光光度计(赛默飞公司)。

3 动物分组及脾气虚证与脾不统血证大鼠模型建立 造模方法参照参考文献[8],所有大鼠在温州医科大学实验动物中心饲养 1 周后随机分为 4 组:正常对照组(正常组,8 只)、低分子肝素钠组(8 只)、脾气虚组(8 只)、脾不统血组(8 只)。正常组与低分子肝素钠组自由饮食饮水,脾气虚组与脾不统血组每日游泳 30 min。同时禁食 2 天,饱食 1 天,每 3 天 1 个循环,持续 42 天,大鼠出现饮食减少,毛色枯槁,体重体温下降,大便溏泄等症状,造成脾气虚模型该组造模成功率为 100%。脾气虚组大鼠继续每日游泳 30 min,同时每禁食两天饱食 1 天;低分子肝素钠组与脾不统血组在脾气虚模型的基础上每日皮下注射低分子肝素钠(2 000 IU/kg)同时游泳加饱饥失常,第 72 天脾不统血组大鼠出现腹部皮下出血与便潜血,连续观察 7

天后大鼠出血症未出现恢复,即造成脾不统血模型,该组造模成功率为 75%。模型成功后,乙醚麻醉脊椎脱臼处死所有大鼠,取大鼠肝脏组织,液氮速冻,置于-80℃保存待用。

4 大鼠肝组织线粒体分离 采用线粒体提取试剂盒分离大鼠肝组织线粒体与胞浆,得到的线粒体用于线粒体膜电位检测,分离线粒体后得到的胞浆用于后续胞浆 Cyt-C 蛋白测定。主要内容为:200 mg 肝组织 PBS 冲洗后剪碎,放入玻璃匀浆器,加 1.0 mL Lysis Buffer 冰浴上研磨。组织匀浆物 4℃,1 000 ×g 离心 5 min,取上清,该步骤重复 1 次。4℃,12 000 ×g 离心 10 min,上清为胞浆成分,沉淀为线粒体。

5 大鼠肝组织线粒体膜电位检测 取分离好的肝组织线粒体,液氮反复冻融破碎使线粒体膜破裂,使用 BCA 法检测线粒体蛋白浓度。向剩下的线粒体样品中加 PBS 调至蛋白浓度为 0.5 mg/mL。使用线粒体膜电位检测试剂盒测定大鼠肝组织线粒体膜电位。当细胞状态正常时,JC-1 荧光探针进入线粒体基质形成聚合物,显示红色荧光;线粒体膜电位下降时,JC-1 荧光探针不能进入线粒体基质,显示绿色荧光。红绿荧光比值表示各组肝组织线粒体膜电位变化。

6 ATP 含量检测 采用 ATP 检测试剂盒测定实验大鼠肝组织 ATP 含量,操作步骤严格按照说明书进行。100 mg 组织加入 1 mL 组织裂解液,用玻璃匀浆器冰上研磨。裂解后 4℃,1 2000 ×g 离心 10 min,取上清。使用 ATP 检测工作液检测样品相对光单位值(relative light units,RLU),当萤火虫荧光素酶和荧光素过量时,在一定范围内荧光的产生和 ATP 浓度成正比,根据标准曲线计算样品中 ATP 浓度。

7 肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ及细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、Cyt-C 检测 正常组、低分子肝素钠组、脾气虚组、脾不统血组每组随机选取 6 个肝组织(或去线粒体胞浆)样本。采用 Western Blot 法检测各组大鼠肝组织(或去线粒体胞浆)样本中对应蛋白含量。计算 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比值以反应自噬体数量。

8 肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin 和细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 水平检测

8.1 总 RNA 提取及逆转录 正常组、低分子肝素钠组、脾气虚组、脾不统血组每组随机选取 6 个肝组织样本。使用酚-氯仿一步法提取肝组织总 RNA,用 RNA 逆转录试剂盒进行逆转录得到 cDNA。

8.2 引物合成 使用 primer-3 设计引物序列,所有 q-PCR 引物由杭州擎科梓熙生物技术有限公司

合成。各基因引物序列见表 1。

表 1 各基因逆转录引物序列及引物长度

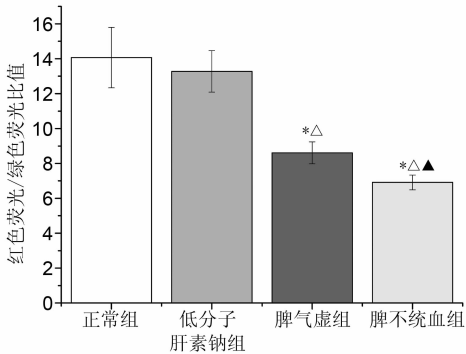
基因	引物序列 5'-3'	引物长度(bp)
GAPDH	上游 CAAGTTC AACGGC ACAGTCA	20
	下游 CCCCATTGATGTTAGCGGG	20
Bcl-2	上游 AGGATTGTGGCCTTCTTTGA	20
	下游 CAGATGCCGGTTCAGGTA CT	20
Bax	上游 GCTGGACACTGGACTTCCTC	20
	下游 ACTCCAGCCACAAAGATGGT	20
PINK1	上游 CCAAACACCTTGGCCTTCTA	20
	下游 TGCCGAGATATTCACATCA	20
Parkin	上游 ACACCCAACCTCAGACAAGG	20
	下游 GACCAAGACAGGGTTCCTGA	20

8.3 荧光定量 参照荧光定量 PCR 试剂盒说明书配制荧光定量 PCR 体系并设定反应条件。使用 CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应,反应条件如下:95℃预变性 1 min;95℃ 10 s,58℃ 30 s,反复 39 个循环;95℃ 5 s 后结束程序。计算各样本 RNA 的相对含量。公式为, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (实验组样品) - ΔCt (对照组样品); ΔCt (实验组样品/对照组样品) = Ct (目的基因) - Ct (内参基因);结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

9 统计学方法 使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单向方差分析,两组间比较采用 LSD 方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠线粒体膜电位水平比较(图 1) 与正常组与低分子肝素钠组比较,脾气虚组与脾不统血组大鼠肝脏线粒体膜电位显著降低($P < 0.01$);与脾气虚组比较,脾不统血组大鼠肝脏线粒体膜电位显著降低($P < 0.01$)。



注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与低分子肝素钠组比较,Δ $P < 0.01$;与脾气虚组比较,▲ $P < 0.01$; $n = 6$

图 1 各组大鼠肝组织线粒体膜电位水平比较

2 各组大鼠肝组织 ATP 含量比较(表 2) 与正常组、低分子肝素钠组比较,脾气虚组与脾不统血组大鼠肝组织 ATP 水平显著降低($P < 0.01$);与脾气虚组比较,脾不统血组大鼠肝 ATP 水平显著降低($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肝组织 ATP 含量比较 (nmol/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ATP 含量
正常	6	1.13 $\pm$ 0.19
低分子肝素钠	6	0.97 $\pm$ 0.14
脾气虚	6	0.67 $\pm$ 0.15 [*] Δ
脾不统血	6	0.50 $\pm$ 0.07 [*] $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.01$;与低分子肝素钠组比较, $\Delta P < 0.01$;与脾气虚组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

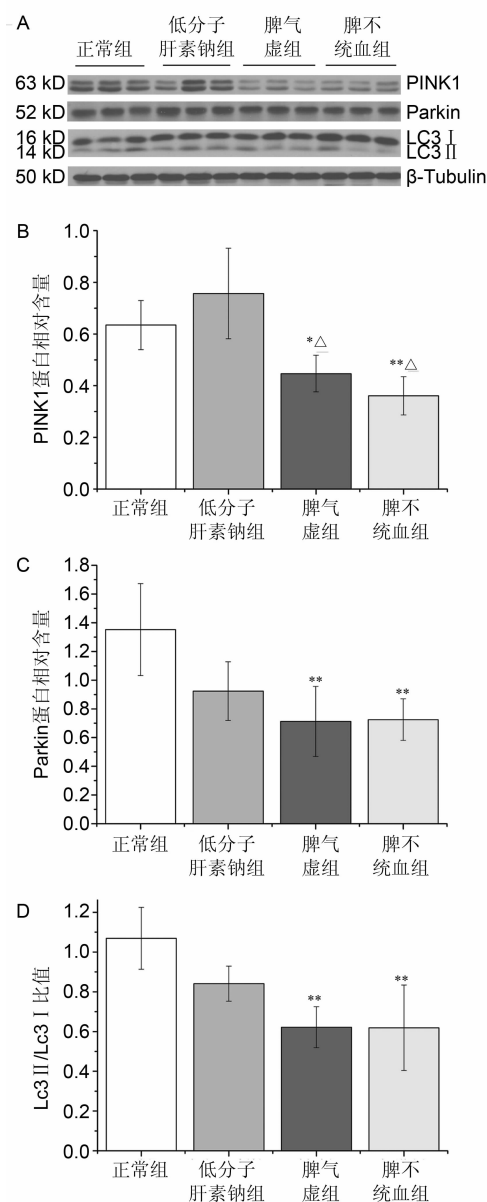
3 各组大鼠肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin 表达量及 LC3 II/I 比值比较(图 2) 与正常组比较,脾气虚组与脾不统血组大鼠肝组织 PINK1 与 Parkin 表达量、LC3 II/I 比值显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与低分子肝素钠组比较,脾气虚组与脾不统血组大鼠肝组织 PINK1 表达量显著降低($P < 0.05$),Parkin 表达量及 LC3 II/I 比值差异无统计学意义($P > 0.05$);脾气虚组与脾不统血组大鼠肝组织 Parkin 表达量比较及 LC3 II/I 比值差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组大鼠肝组织细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase-3 表达量比较(图 3) 与正常组比较,脾气虚组与脾不统血组大鼠肝组织 Bcl-2、Bcl-2/Bax 比值显著下降($P < 0.01$),Bax 及 Cleaved caspase-3 蛋白水平显著升高($P < 0.01$)。与低分子肝素钠组比较,脾气虚组与脾不统血组大鼠肝组织 Bcl-2 蛋白水平显著下降($P < 0.01$),脾不统血组 Bax、Cleaved caspase-3 蛋白水平显著升高($P < 0.01$),Bcl-2/Bax 比值显著降低($P < 0.01$)。与脾气虚组比较,脾不统血组大鼠 Bcl-2 蛋白水平及 Bcl-2/Bax 比值显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bax、Cleaved caspase-3 蛋白水平显著升高($P < 0.05$)。

5 各组大鼠肝组织去线粒体胞浆中 Cyt-C 蛋白水平比较(图 4) 与正常组、低分子肝素钠组比较,脾气虚组与脾不统血组 Cyt-C 蛋白水平均显著升高($P < 0.01$);与脾气虚组比较,脾不统血组 Cyt-C 蛋白水平显著升高($P < 0.01$)。

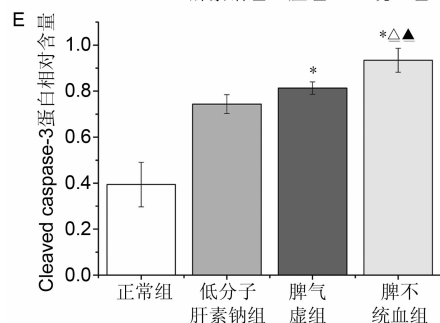
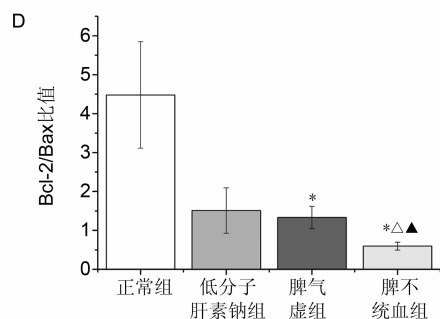
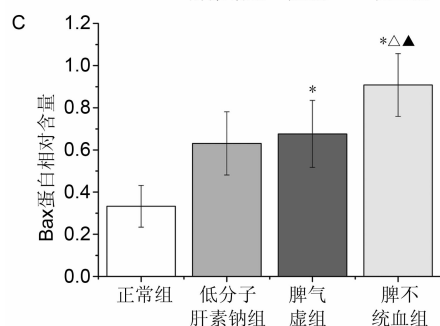
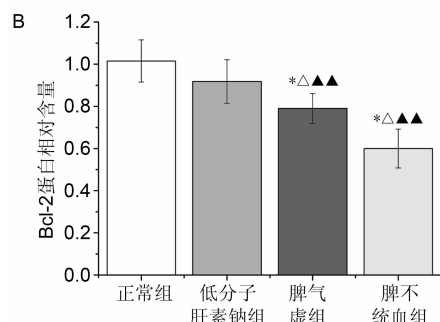
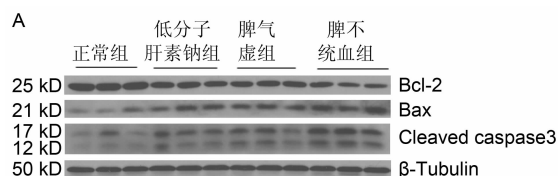
6 各组大鼠肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin 及细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 水平比较(表 3) 与正常组比较,脾气虚组与脾

不统血组大鼠肝组织 PINK1 与 Bcl-2 mRNA 水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bax mRNA 水平显著升高($P < 0.01$),低分子肝素钠组均无显著变化($P > 0.05$);与低分子肝素钠组比较,脾气虚组与脾不统血组 PINK1 与 Bcl-2 mRNA 水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bax mRNA 水平显著升高($P < 0.01$);与脾气虚组比较,脾不统血组 Bcl-2 mRNA 水平均显著降低($P < 0.01$),Bax mRNA 水平显著升



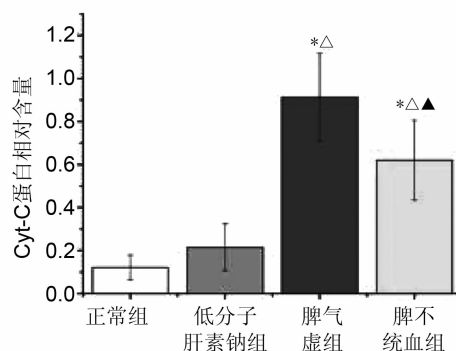
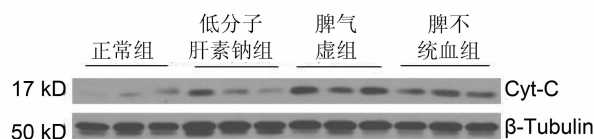
注:A 为大鼠肝组织 PINK1、Parkin 蛋白印迹; B 为各组大鼠 PINK1 表达量;C 为各组大鼠 Parkin 表达量;D 为各组大鼠 LC3 II/I 比值;与正常组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与低分子肝素钠组比较, $\Delta P < 0.05$; $n = 6$

图 2 各组肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin 表达量及 LC3 I/II 比值比较



注:A 为小鼠肝组织 Bcl-2 及 Bax 蛋白印迹;B 为各组小鼠 Bcl-2 表达量;C 为各组小鼠 Bax 表达量;D 为各组小鼠 Bcl-2 与 Bax 比值;E 为各组小鼠 Cleaved caspase-3 表达量;与正常组比较, * $P < 0.01$;与低分子肝素钠组比较, $\Delta P < 0.01$;与脾气虚组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; $n = 6$

图3 各组肝组织细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 表达量比较



注:A 为小鼠肝组织线粒体外 Cyt-C 蛋白印迹;B 为各组小鼠去线粒体胞浆中 Cyt-C 相对水平;与正常组比较, * $P < 0.01$;与低分子肝素钠组比较, $\Delta P < 0.01$;与脾气虚组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; $n = 6$

图4 各组小鼠肝组织去线粒体胞浆中 Cyt-C 水平比较

高($P < 0.05$), PINK1 mRNA 水平无显著变化($P > 0.05$);各组小鼠肝组织 Parkin mRNA 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

本研究采用饮食失节加力竭游泳的方法构建脾气虚大鼠模型,大鼠出现食欲下降、形体消瘦、神疲、大便稀溏等症状,说明脾气虚模型成功^[9]。脾不统血证通常是由于久病脾气亏损或者劳累过度导致脾气虚弱,脾统摄血液的功能损伤,血液不能够在体内正常的运行,因此出现便血、尿血、鼻出血等缓慢出血现象。目前,脾不统血证的造模方法主要以模拟中医传统病因法结合西医病因病理法为主,使大鼠通过游泳等方法劳倦过度,并用番泻叶水蛭粉、阿司匹林等溶灌胃,使大鼠出现腹泻、肠道出血等症状^[8,10],但是该造模方法重复性、稳定性较差,易出现大鼠死亡等不良反应。本研究在过度劳倦加饮食失节构成的脾气虚模型的基础上,用低分子肝素钠皮下注射的方法诱导大鼠多处出血,构成脾不统血模型。已有文献报道该造模方法稳定,且模型动物死亡率低,因此更适用于脾不统血证的动物研究^[8]。

线粒体是细胞的“动力工厂”,它为机体生命活动和生化反应提供了大部分必须的能量。线粒体的功能特征与中医学的脾有许多相似之处,临床研究发现,在脾虚患者的胃黏膜上,线粒体的结构和数量发生了显

表 3 各组大鼠肝组织 Bcl-2、Bax、PINK1 及 Parkin mRNA 相对表达水平比较 (2^{-ΔΔCt}, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2	Bax	PINK1	Parkin
正常	6	1.024 ± 0.052	1.161 ± 0.137	1.036 ± 0.075	1.058 ± 0.178
低分子肝素钠	6	1.080 ± 0.196	1.112 ± 0.088	0.911 ± 0.153	1.162 ± 0.166
脾气虚	6	0.693 ± 0.028* ΔΔ	1.648 ± 0.121** ΔΔ	0.623 ± 0.092* Δ	1.262 ± 0.254
脾不统血	6	0.481 ± 0.053* ΔΔ▲	1.975 ± 0.179* ΔΔ▲	0.510 ± 0.134* ΔΔ	1.286 ± 0.184

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与低分子肝素钠组比较,ΔP<0.05,ΔΔP<0.01;与脾气虚组比较,▲P<0.05

著变化^[11]。线粒体对体内和体外的环境非常敏感,实验研究发现,在脾虚动物胃、肠、肝脏、心肌、骨骼肌细胞中均发现线粒体结构损伤和功能紊乱^[12-14]。线粒体膜电位与组织 ATP 水平可反映线粒体结构功能是否异常。本研究检测了脾气虚证与脾不统血证大鼠肝脏线粒体膜电位与肝组织 ATP 水平,发现脾气虚与脾不统血大鼠肝脏线粒体膜电位与肝组织 ATP 水平较正常组及低分子肝素钠组显著下降($P<0.01$),而脾不统血大鼠肝脏线粒体膜电位与肝组织 ATP 水平均低于脾气虚大鼠($P<0.05$, $P<0.01$),结果表明脾气虚证与脾不统血证大鼠均发生线粒体功能损伤,脾不统血证大鼠肝组织线粒体损伤程度高于脾气虚证大鼠。

线粒体自噬是细胞选择性清除受损、衰老线粒体的过程,当线粒体自噬机制紊乱,受损的线粒体不能及时清除,将导致活性氧上升或者细胞凋亡因子释放,从而造成细胞损伤或细胞凋亡^[4]。在 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬机制中,当线粒体受损时,线粒体膜电位下降,PINK1 蛋白在线粒体外膜聚集,激活 Parkin 蛋白从而启动线粒体自噬^[3]。LC3II 是线粒体自噬特异性信号蛋白,LC3I 与 PE 泛素样结合形成 LC3II^[15],LC3II/ I 水平能够反映自噬体的数量。当线粒体损伤严重,线粒体无法通过自噬维持细胞内稳态,自噬机制发生紊乱,导致细胞色素 C 等细胞凋亡因子释放到线粒体外,从而发生细胞凋亡。本研究检测了大鼠肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、LC3II/I,结果发现脾气虚与脾不统血大鼠肝组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin 蛋白水平下降,LC3II/I 比值下降,PINK1 mRNA 水平较正常组显著下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,脾气虚证与脾不统血证大鼠线粒体自噬均发生紊乱。

抗凋亡蛋白 Bcl-2 及促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 均为 Bcl-2 家族成员,正常状态下 Bax 与 Bak 在胞质层和线粒体外膜之间以不同频率穿梭^[16,17],抗凋亡因子 Bcl-2 通过改变其构象与促凋亡因子 Bax 结合,进而抑制细胞凋亡^[18,19];Bax 和 Bak 被激活并在线粒体外膜积累,调节细胞外膜通透性,导致细胞色素 C 等促凋亡因子释放^[20],进而激活 caspase 蛋白导致凋亡发生^[21]。因此 Bcl-2/Bax 蛋白比值决定了细胞的生存和死亡^[22],而 caspase-3 被认为是判断细胞凋亡严重性

的可靠指标之一^[23],Cleaved caspase-3 是 caspase-3 的活化形式。本实验也检测了大鼠肝组织细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白水平,去线粒体胞质中 Cyt-C 蛋白水平,以及 Bcl-2、Bax mRNA 水平。结果发现,脾气虚与脾不统血大鼠肝组织中 Bcl-2 蛋白与 mRNA 水平下降,且脾不统血大鼠肝组织 Bcl-2 蛋白与 mRNA 水平低于脾气虚大鼠($P<0.05$, $P<0.01$);脾气虚与脾不统血大鼠肝组织中 Bax 蛋白与 mRNA 水平升高,且脾不统血大鼠肝组织 Bax 蛋白与 mRNA 水平显著高于脾气虚大鼠($P<0.05$, $P<0.01$);脾气虚与脾不统血大鼠肝组织 Cleaved caspase-3 蛋白水平以及去线粒体胞质中 Cyt-C 蛋白水平均较正常组升高($P<0.01$);与脾气虚组比较,脾不统血大鼠肝组织 Cleaved caspase-3 蛋白水平升高,但 Cyt-C 蛋白水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),这可能是由于脾不统血状态下大鼠线粒体数量大量减少。因此,本研究结果表明,脾气虚证与脾不统血证加重了大鼠肝组织细胞凋亡,且脾不统血大鼠肝组织细胞凋亡状况较脾气虚更加严重。

本研究通过分析脾气虚证与脾不统血证大鼠肝组织 ATP 含量、线粒体膜电位、线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、LC3 及细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白,以及肝组织去线粒体胞浆中 Cyt-C 蛋白水平变化,初步探讨了脾气虚证与脾不统血证大鼠肝组织线粒体自噬及细胞凋亡的可能机制,并对该两种脾虚证进行了比较。大鼠肝组织 ATP 含量与线粒体膜电位结果表明,脾气虚证与脾不统血证大鼠肝组织线粒体出现损伤,而脾不统血大鼠线粒体损伤程度较脾气虚大鼠更为严重;线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、LC3 蛋白(mRNA)结果表明,脾气虚证与脾不统血证大鼠肝组织线粒体自噬紊乱;肝组织细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 的蛋白(mRNA)水平与肝组织去线粒体胞浆中 Cyt-C 蛋白水平测定结果表明,脾气虚证与脾不统血证大鼠肝组织出现细胞凋亡,且脾不统血大鼠肝组织细胞凋亡状况较脾气虚更加严重。因此,脾虚证大鼠肝组织细胞凋亡可能机制为,线粒体损伤过度导致线粒体自噬紊乱,进一步导致了细胞凋亡,随着脾

虚证的加重,肝组织细胞凋亡程度加深。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 游艳婷,金丽琴. 中医脾虚证与线粒体的相关性[J]. 温州医科大学学报, 2015, 45(10): 774-778.
- [2] 刘友章,王昌俊,周俊亮,等. 四君子汤修复脾虚大鼠线粒体细胞色素氧化酶的作用及机制[J]. 中国组织工程研究, 2006, 10(35): 118-122.
- [3] 吴优,卢中秋,姚咏明. 线粒体自噬中 pink1-parkin 途径调控机制的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(3): 186-188.
- [4] 刘涓涓,王志舒,谭晓荣. 线粒体自噬与人类疾病[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(5): 466-472.
- [5] 刘文俊,陈伟仁,宋囡,等. 脾气虚模型大鼠海马与下丘脑神经元线粒体分裂因子和线粒体分裂蛋白 1 的表达[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 76-80.
- [6] 于漫,王彩霞,刘俊兰,等. 脾气虚证模型大鼠能量代谢异常及脂质过氧化损伤机理的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(7): 30-33.
- [7] 马丹,刘文俊,于化新,等. 脾气虚大鼠海马神经元线粒体呼吸链功能及 Lon 蛋白酶表达变化及意义[J]. 山东医药, 2018, 58(26): 35-37.
- [8] 游艳婷,吕斌,曲小虎,等. 劳倦与饮食失节加低分子肝素钠法复制大鼠脾不统血证模型的研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(8): 1883-1886.
- [9] 张全旺,李光月,任艳萍,等. 两种脾虚证模型对小鼠骨骼肌形态和功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(1): 71-75.
- [10] 黄雪琪,陈家旭,林海,等. 益气止血方对脾不统血证动物模型的治疗作用[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(3): 40-42.
- [11] 刘友章,宋雅芳,劳绍贤,等. 胃脘痛患者胃黏膜超微结构研究及中医“脾-线粒体相关”理论探讨[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(12): 2439-2442.
- [12] Liu YZ, Wang CJ, Liu J, et al. Si-Jun-Zi Decoction repairs mitochondrial damage of cells of liver, myocardium, gastric mucosa and skeletal muscle in rats with spleen asthenia[J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10(39): 170-173.
- [13] Liu J, Qu CJ. Contrast study on ultrastructure changes of mitochondrium in mice[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2001, 19(4): 378-379.
- [14] Dong YQ, Li Y, Sun YF, et al. Bufei Jianpi Granules improve skeletal muscle and mitochondrial dysfunction in rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. BMC Complement Alternat Med, 2015, 15(1): 51-59.
- [15] 肖杨,吴青青,吕薇,等. 自噬在结构性心脏疾病中的作用及机制[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(33): 2635-2637.
- [16] Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol[J]. Cell, 2011, 145(1): 104-116.
- [17] Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, et al. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak[J]. EMBO, 2015, 34(1): 67-80.
- [18] Wan KF, Chan SL, Sukumaran SK, et al. Chelerythrin induces apoptosis through a Bax/Bak-independent mitochondrial mechanism[J]. Biol Chem, 2008, 283(13): 8423-8433.
- [19] Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, et al. Bcl-2 change conformation to inhibit Bax oligomerization[J]. EMBO, 2006, 25(11): 2287-2296.
- [20] Lovell JF, Billen LP. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax[J]. Cell, 2008, 135(6): 1074-1084.
- [21] 朱玉山,卢铁元,王蕊,等. Bcl-2 家族蛋白调控线粒体膜通透性和细胞色素 C 释放的新机制[J]. 生命科学, 2011, 23(11): 1076-1080.
- [22] 吴祖波,彭华,白燕,等. GYY4137 通过 Bcl-2/Bax/Cleaved caspase-3 信号通路改善柯萨奇病毒 B3 引起的大鼠乳鼠心肌细胞凋亡[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2014, 43(4): 371-375.
- [23] 黄瑞健,李萌,孙培吾. 生长激素对大鼠心肌缺血/再灌注后心肌细胞凋亡及凋亡相关基因 Caspase-3 Cleaved caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国急救医学, 2008, 28(6): 420-422.

(收稿: 2018-04-20 在线: 2019-05-29)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶