

薯蓣丸对创伤应激小鼠肝细胞 HSP₇₀ 及其抗体表达的影响[※]

□ 李云海 张雪荣 叶太生 郭玮 陈国权

(湖北中医学院 湖北 武汉 430061)

摘要 目的：本课题旨在探讨薯蓣丸对机体免疫功能影响的机理，为开发薯蓣丸作为创伤应激治疗药物提供客观依据。方法：通过采用免疫组化方法观察薯蓣丸对创伤应激小鼠肝 HSP₇₀ 及其抗体表达的影响，揭示薯蓣丸的免疫作用机制。结果：小鼠肝细胞的 HSP₇₀ 及其抗体表达强度呈如下趋势，薯蓣丸加应激组 > 应激对照组 > 正常对照组 ($P < 0.05$)。结论：薯蓣丸干预使 HSP₇₀ 及其抗体表达更进一步加强，可能是薯蓣丸抗应激免疫抑制的机理之一。

关键词 薯蓣丸 应激 免疫学

应激是机体受到各种强烈因素（应激原）刺激时出现的一系列神经内分泌反应，以及由此引起的机能和代谢改变。它属于人体的自卫性反应，可以缓解或拮抗各种侵袭时对机体的伤害，而强烈的应激则对机体是有害的。在应激状态下，热休克蛋白 70（HSP₇₀）的合成显著增加，对应激导致的机体损伤起保护作用，并增强细胞免疫功能。本实验研究了中医传统名方薯蓣丸干预截肢应激介导的免疫抑制中肝细胞 HSP₇₀ 及其抗体表达的变化，报告如下：

※基金项目 湖北省科技攻关计划课题（No: 2001AA301C25）

1 实验材料

1.1 **动物** 健康 Balb/c 小鼠 60 只，质量 $20\text{g} \pm 2\text{g}$ ，雌雄各半。由卫生部武汉生物制品研究所实验动物中心提供。

1.2 **主要试剂** HSP₇₀ 一抗由武汉博士德公司提供；S-P 超敏试剂盒（Kit-9710）由福州迈新生物技术开发有限公司提供。纯化的 HSP₇₀（用含人 HSP₇₀ cDNA 的 pET 载体系统表达并纯化）、酪蛋白（Casein 封闭用蛋白质，Sigma 产品）、辣根过氧化物酶（HRP）标记羊抗人 IgG 抗体（武汉博士德生物工程公司）、

3, 3, 5, 5 四甲基联苯胺 (TMB, Sigma 产品)。

1.3 主要仪器与设备 恒温水浴箱、酶标仪 (Bio-Rad)、96 孔酶标板 (由华中科技大学同济医学院免疫实验室提供)。

2 实验方法

2.1 应激模型 末次用药 1~1.5 小时后, 小鼠右后肢行截肢术, 造模时用 4 号医用缝合线于小鼠右后肢膝关节上端约 0.5cm 处结扎, 然后用手术剪于膝关节处截去右后肢, 酒精棉球消毒断端, 不包扎。术中及术后基本无出血, 术后仍按常规摄取食水, 术后无感染及死亡。

2.2 药物制备 薯蓣丸 (汤) 按原方比例配药 (购于湖北省中医院药剂科), 加水煎煮两次后烱化阿胶, 用旋转蒸发仪浓缩去渣后, 分为每毫升含生药 2.88 克、1.44 克、0.72 克的药液 (即 2.88g/ml、1.44g/ml、0.72g/ml), 灭菌后 4℃ 保存。

2.3 动物及分组给药 将 Balb/c 小鼠均随机分为正常对照组、应激对照组、应激加薯蓣丸组, 每组 20 只。正常对照组与应激对照组每日灌服 0.5ml 生理盐水, 应激加薯蓣丸组每日灌服含生药浓度 1.44g/ml 的药液 0.5ml, 连服七天后造模, 经常规喂养 16 小时后, 在各组分别取材 10 只。72 小时后取材剩余的 30 只小鼠。

2.4 取材 (1) 分别将动物断椎处死, 迅速切取肝脏右上叶, 将标本放入 4% 甲醛中 24 小时, 制备蜡块, 6μml 连续切片, 每只小鼠取 3 片做 HSP₇₀ 免疫组化染色。(2) 血样的采集: 小鼠眼眶取血 2ml, 肝素抗凝静置 2 小时或离心取血浆; 或不抗凝, 室温静置 2 小时后取血清。

2.5 检测方法

2.5.1 肝细胞 HSP₇₀ 表达的影响 采用免疫组化 SP 法染色, 严格按照说明书步骤操作, 一抗为博士德公司 (1:200), 二抗为福州迈新生物技术开发有限公司提供的生物素标记的超敏试剂盒 (Kit-9710)。阴性对照: 以 PBS 液置换 HSP₇₀ 单抗。

2.5.2 血浆抗 HSP₇₀ 抗体滴度测定 (1) 用 PH9.6 的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液稀释纯化的 HSP₇₀ 至终浓度 5μg/ml, 于酶标板每孔中加入 50μl, 37℃ 温育 30 分

钟后, 放置 4℃ 过夜; (2) 倒掉每孔液体, 用 0.025mol/L TBS (Tris 缓冲盐溶液) 洗板 2 次, 加入 100μl 封闭液 (0.25% Casein 0.02% NaN₃ TBS), 37℃ 温育 1 小时; (3) 倒空每孔液体, 用洗板液 (0.5% Tween 20 TBS) 洗板 3 次, 血浆按 1:10、1:20、1:40、1:80 用封闭液稀释, 每孔 100μl, 并同时用封闭液作阴性对照, 37℃ 温育 2 小时; (4) 洗板液洗板 3 次, 加入 0.25% Casein TBS 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体 (1:1000), 37℃ 温育 1 小时; (5) 洗板 5 次, 每孔加入 100μl TMB 显色液 (10mg/ml TMB 储备液 (TMB 溶于二甲基亚砜), 用柠檬酸缓冲液稀释成 0.1mg/ml, 临用前每 ml 加入 0.75% H₂O 23.2μl), 37℃ 显色 10 分钟, 每孔加入 100μl 1mol/L H₂SO₄ 终止反应; (6) 450nm 波长下, 用酶标仪测定每孔吸光度, 减去阴性对照值后, 其值大于 0.2 为阳性。

2.6 统计学方法 统计资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 *t* 检验, 全部数据输入计算机用 SPSS10.0 for windows 软件进行处理。

3 结果

3.1 肝细胞 HSP₇₀ 的表达情况 (见表 1)

表 1 薯蓣丸 (汤) 对小鼠肝脏 HSP₇₀ 的表达影响的灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均灰度值	
		16h	72h
正常对照组	10	149.1 ± 4.262	151.5 ± 4.431
应激对照组	10	141.6 ± 5.683*	143.2 ± 6.718*
应激加薯蓣丸组	10	135.5 ± 6.691**	137.4 ± 6.350**

注: 与正常对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。

3.2 小鼠血浆不同稀释度 HSP₇₀ 抗体的表达情况 (见表 2)

表 2 各组小鼠血浆不同稀释度 HSP₇₀ 抗体阳性率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	1:10	1:20	1:40	1:80
正常对照组	10	10	0	0	
应激对照组	10	40*	30*	0	0
应激加薯蓣丸组	10	60**	40**	10*	0

注: 与正常对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

4 讨 论

20世纪60年代初发现细胞对环境温度升高所产生的热休克反应(Heat shock response, HSR)是热休克蛋白(Heat shock Proteins, HSP)的合成。其中HSP₇₀基因家族是HSP中最为丰富的一种,尤其是HSP₇₀在应激中的表达。近年来,从基础分子生物学方法到治疗应用,HSP研究涉及多个水平,但是现代医学对应激的研究偏重于基础理论的探讨,对如何减少和缓解应激对机体的不利的影响,报道甚少。

祖国医学立足于整体观,认为机体的内部是个统一的整体,同时,这个整体与外在环境又有密切的关系。机体的内在机能一方面需要外在的变化帮助其机能活动;另一方面如外在变化不利机能活动时,体内却能相应地发生种种活动与之适应。因此中医十分注重对机体机能的调节作用,特别是中医复方更充分体现了这种整体观的精神。中医复方用于防治应激性免疫抑制,维护机体正常功能状态有其独特的优势,从而显示出中医药在免疫调节领域中具有重要的研究价值及广阔的应用前景。

薯蓣丸出自《金匱要略·血痹虚劳病脉证治》篇,即“虚劳诸不足,风气百疾,薯蓣丸主之”。该方以薯蓣、当归、干地黄、甘草、人参、川芎、芍药、白术、茯苓、阿胶、大枣等扶正药为主,兼用桂枝、柴胡、防风达三阳之表以疏风祛邪,杏仁、桔梗、白藜理气开郁兼顾祛邪。可谓邪正兼顾,防治兼备,补中寓散,临床应用十分广泛。据报道该方对机体造血系统、细胞与体液免疫功能均有显著的调整功能^[1],并有较广泛的药理作用^[2]。为更深入、系统探讨中医药缓解应激、调节免疫功能的作用机理,本课题采用截肢造模方法,研究了薯蓣丸干预截肢应激介导的免疫抑制中HSP₇₀及其抗体的变化。结果表明,应激对照组的HSP₇₀及其抗体被强烈诱导表达。小鼠肝脏HSP₇₀在16小时表达强于72小时后的表达,与肝脏HSP₇₀在约12小时达到高峰情况相符^[3],其中薯

蓣丸(汤)加应激组的HSP₇₀阳性表达最强。另外,各组小鼠血浆不同稀释度HSP₇₀抗体阳性率也表明,薯蓣丸(汤)加应激组HSP₇₀抗体阳性率表达亦表现为最强,显示截肢应激导致了HSP₇₀及其抗体水平的提高,而薯蓣丸(汤)则增加了表达趋势,其HSP₇₀及其抗体水平表达的反应程度也有提高。在应激对照组,由于动物处于截肢的应激状态,因此对自身的细胞造成了损伤,这一损伤使细胞内蛋白质变性、聚集、错折叠等大大增多,通过一系列机制^[4]使应激对照组的HSP₇₀表达量大于正常对照组。应激加薯蓣丸组的细胞内HSP₇₀表达的诱导因素则为截肢创伤与薯蓣丸(汤)药理作用的综合,因而HSP₇₀的表达量就更大。由此可见,截肢创伤可作为独立因素使肝细胞中HSP₇₀表达增强,而薯蓣丸(汤)加创伤应激则使HSP₇₀表达更进一步加强。有研究结果表明,由于应激对照组机体所受损伤更重,HSP₇₀的高强度表达作为评价组织细胞所处危险性的生物标志则有着重要的意义^[5]。所以薯蓣丸的免疫调节作用机制之一可能在于HSP₇₀的表达变化,这构成了与细胞损害的修复及免疫系统调节的联系,虽然作用是非特性的,但这一免疫分子的变化在应激中发挥着重要作用,薯蓣丸可明显升高其含量,可以考虑薯蓣丸作为抗应激损害的辅助用药。

参 考 文 献

- [1] 于超,王宇. 薯蓣科药用植物的研究进展[J]. 医药导报. 2002, 21(增刊): 12-15.
- [2] 谭子虎,吕继端. 加减薯蓣丸对D-半乳糖致大鼠衰老作用的影响[J]. 中华老年医学杂志. 1995, 14(5): 268-269.
- [3] 张北奇,苗智慧. 不同应激刺激后大鼠心脏、肝脏热休克蛋白(HSP₇₀)的产生规律[J]. 河北医药, 2003, 25(8): 563-564.
- [4] 邱仞之. 环境高温与热损伤[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 100-102.
- [5] Flanagan S W, Ryan A J, Gisolfi C V, et al. Tissue-specific HSP₇₀ response in animal under going heats stress [J]. Am J Physical, 1995, 268: R28-R3232.