

# 甘石青黛膏对大鼠亚急性湿疹模型皮损淋巴细胞和角质形成细胞 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达变化的影响

蒋静 李元文 张丰川 蔡玲玲 聂晶 李天娇 张力元 陈雪燕 李根茂  
葛东宇

**【摘要】 目的** 观察甘石青黛膏对大鼠亚急性湿疹模型皮损淋巴细胞和角质形成细胞 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白与 Bax 蛋白表达变化的影响,探究中药外治湿疹的分子生物学依据。**方法** 造模前取大鼠正常皮肤组织,制成石蜡切片备用,造模成功后分为治疗组和模型组,治疗组采用中药甘石青黛膏干预,模型组无干预,检测三组大鼠 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达情况。**结果** 造模前大鼠 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达均呈阳性,且 Bcl-2/Bax 比率接近于 1;治疗组 Bcl-2 蛋白表达呈弱阳性,模型组 Bcl-2 蛋白表达呈强阳性,两者相比具有显著统计学差异( $P < 0.001$ );治疗组 Bax 蛋白表达呈阳性,模型组 Bax 蛋白表达呈弱阳性,两者相比具有显著统计学差异( $P < 0.001$ );治疗组与模型组 Bcl-2/Bax 比率相比具有显著统计学差异( $P < 0.001$ ),后者明显高于前者;治疗组与健康组 Bcl-2/Bax 比率相比无统计学差异( $P > 0.05$ )。**结论** 甘石青黛膏具有抑制 Bcl-2 蛋白表达,促进 Bax 蛋白表达,使细胞凋亡调控系统趋于平衡的作用。

**【关键词】** 甘石青黛膏; B 淋巴细胞瘤-2 蛋白; Bax 蛋白; 细胞凋亡; 亚急性湿疹

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.06.014

**Effects on the Bcl-2 and Bax protein expression changes of lymphocytes and keratinocyte cells from subacute eczema lesions in rats intervened by Ganshi Qingdai Cream** JIANG Jing, LI Yuan-wen, ZHANG Feng-chuan, et al. Dermatology&STD Department, Dongfang Hospital, Beijing University Of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: LI Yuan-wen, E-mail: Yuanwen1581010@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effects on the Bcl-2 and Bax protein expression changes of lymphocytes and keratinocyte cells from subacute eczema lesions in rats intervened by Ganshi Qingdai Cream, and to explore the molecular biology basis of traditional Chinese medicine external treatment of eczema. **Methods** Removing the normal skin tissue in rats before modeling, and making them into paraffin sections to use. After the success of modeling all the rats are divided into the treatment group and the model group, the treatment group is used by traditional Chinese medicine Ganshi Qingdai Cream to intervene, the model group is without intervention. Detecting the Bcl-2 and Bax protein expression in three groups of rats. **Results** The Bcl-2 and Bax protein expression of rats are positive before modeling, and the Bcl-2/Bax ratio closes to 1. In treatment group, the Bcl-2 protein expression is weakly positive, and in model group, the Bcl-2 protein expression is strongly positive, there is statistically significant difference between the two groups( $P < 0.001$ ). In treatment group, the Bax protein expression is positive, and in model group, the Bax

基金项目:北京市科技计划“十病十药”研发项目(Z131100002513013);科技促进中医药特色优势学科振兴发展主题计划(YNZJ2011-02)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院皮肤与性病科[蒋静(硕士研究生)、李元文、张丰川、蔡玲玲、聂晶(硕士研究生)、李天娇(硕士研究生)、张力元(硕士研究生)、陈雪燕(硕士研究生)];北京中医药大学基础医学院(李根茂、葛东宇)

作者简介:蒋静(1988-),2008 级七年制在读硕士研究生。研究方向:慢性皮肤病与性病。E-mail:827742699@qq.com

通讯作者:李元文(1962-),本科,教授,主任医师,博士生导师,中国性学会中医性学专业委员会主任委员,北京中医药学会皮肤性病专业委员会副主任委员。研究方向:中医皮肤性病。E-mail:Yuanwen1581010@163.com

protein expression is weakly positive, the two groups compare with statistically significant difference ( $P < 0.001$ ). There is statistically significant difference of the Bcl-2/Bax ratio between treating group compared with model group ( $P < 0.001$ ), which is higher than that of the former. There is not statistically difference of Bcl-2/Bax ratio between treating group compared with healthy group ( $P > 0.05$ ) **Conclusions** Ganshi Qingdai Cream can inhibit the Bcl-2 protein expression, promote the Bax protein expression, and make the cell apoptosis regulation system tend to balance.

**【Key words】** Ganshi Qingdai Cream; B-cell lymphoma-2; Bax protein; Cell apoptosis; Subacute eczema

湿疹,是一种发生于皮肤的迟发型变态反应,临床上除了表现为红斑、丘疹、水疱、水肿、脱屑外,还可表现为斑块、肥厚、苔藓化<sup>[1]</sup>。正常皮肤长期保持相对的厚度及弹性,主要依靠皮肤各层细胞增殖与凋亡处于相对平衡状态,而中药外治亚急性湿疹皮损肥厚的首要就在于使皮肤恢复到这种平衡状态,但这种作用的分子生物学机制尚不明确,有必要对其进行探讨。目前研究表明 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 基因家族蛋白是在细胞凋亡过程中起重要作用的因子<sup>[2]</sup>,由此可以设想,甘石青黛膏是否是通过调节 Bcl-2 基因家族蛋白的表达而恢复细胞增殖和凋亡的平衡状态。根据这个设想,本课题组设计实验,采用免疫组化 SP 两步法检测 Bcl-2 基因家族中的两个重要成员 Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达,探讨甘石青黛膏治疗湿疹的分子生物学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁 SD 大鼠 40 只,4~5 周龄,雌雄各半,清洁级,体质量( $247 \pm 27$ )g,购于北京大学实验动物中心(合格证号:11400700019174)。

### 1.2 主要试剂

无水乙醇、二甲苯、蒸馏水、中性树胶、2% 戊巴比妥钠、2,4-二硝基氯苯丙酮、4% 多聚甲醛溶液、磷酸缓冲液(PBS)、柠檬酸溶液、超敏两步法检测试剂盒(PV-9001 批号:K142716D)、DAB 显色试剂盒(批号:K145213B),均购自中山金桥生物技术有限公司;兔抗 Bcl-2 多克隆抗体(批号:ab59348,购自美国 abcam 公司);兔抗 Bax 多克隆抗体(批号:1063-1,购自美国 epitomics 公司)。

### 1.3 主要仪器

生物显微镜(日本 Olympus 公司);显微摄像系统(日本 Olympus 公司);切片机(德国 Leitz 1516);Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cy-

bernetics);恒温箱(天津泰斯特仪器有限公司 型号:DH4000AB);电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司 型号:DHP-9052);恒温水浴锅(北京市医疗设备厂 型号:BS60);低温冰箱(德国 SIMENS 型号:KK23E66TI);微波炉(Galanz 型号:P70D20TP-C6(WO));移液器(芬兰 Labsystems 型号:Y13546-4027);生化培养箱(上海一恒科技有限公司 型号:LRH-150);阳离子防脱载玻片、盖玻片均购自中杉金桥生物技术有限公司;以及湿盒、修复盒、烤片盒、染色架、染色盒等设备。

### 1.4 动物造模

常规饲养 1 周后,将 40 只大鼠作为健康对照组,取下正常皮肤组织制作成石蜡切片备用。具体造模方案参考文献<sup>[3]</sup>,造模后大鼠背部皮肤出现斑疹、丘疹、水疱,局部肥厚,甚至呈苔藓化。随机分为甘石青黛膏干预组(治疗组)20 只,造模后无干预组(模型组)20 只。

### 1.5 药物制备

治疗药物:以院内制剂甘石青黛膏((98)京卫药制审字第 698 号,批准文号为:(98)京卫药制字[052]第 F-1285 号)为基本方,进行剂型改良,药物优化制成新的甘石青黛膏,药膏含有青黛、煅石膏、炉甘石、滑石等。

### 1.6 药物干预

造模成功次日,继续常规饲养之外,在治疗组剃毛区乙处,治疗组予甘石青黛膏外涂干预治疗,每次取药 0.6 g(即  $0.15 \text{ g/cm}^2$ ),轻轻按摩 10 圈,以不黏腻为度,每天涂药 2 次,疗程 2 周。2 周后次日处死大鼠,取背部剃毛区乙处皮下组织制作成石蜡切片,标记编号备用。

### 1.7 HE 染色

每组每只大鼠选取 1 张石蜡切片进行 HE 染色,具体步骤参照文献<sup>[4]</sup>,可见健康组大鼠皮肤各层结构正常,棘层均匀,无细胞间水肿及明显淋巴细胞浸润,无毛细血管扩张(如图 1);造模后大鼠皮

肤组织角化不全、角化过度,棘层增厚,棘细胞内水肿,真皮浅层毛细血管轻度扩展及周围轻度淋巴细胞浸润(如图 1)。

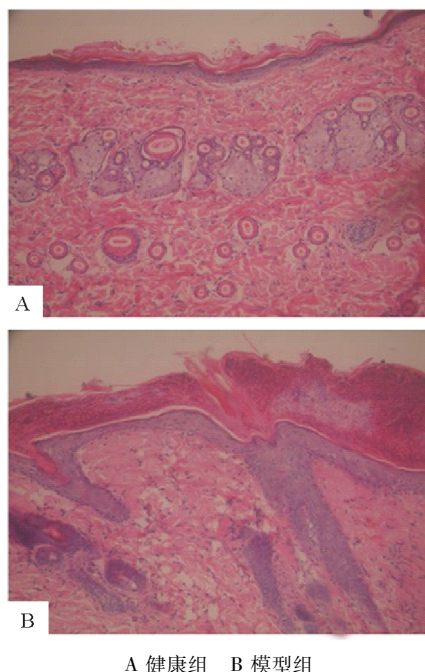


图 1 大鼠皮肤组织病理(HE 染色  $\times 400$ )

## 1.8 皮肤 Bcl-2 与 Bax 免疫组化染色

每组每只大鼠选取 1 张石蜡切片进行免疫组化染色,按照超敏两步法试剂盒说明书进行操作,一抗分别为兔抗 Bcl-2 多克隆抗体(浓度 1:50)、兔抗 Bax 多克隆抗体(浓度 1:50)。

## 1.9 结果观察

(1)照相:用 Olympus 显微摄像系统在每张切片选择 5 个视野进行拍照,所有照片保证在同样的显微镜环境和拍摄条件下拍摄;(2)图像分析:用 Image-plus pro 6.0 图像分析软件对每张照片进行分析,计算阳性物质表达区域平均光密度值(OD),值越高,蛋白表达越强。

## 1.10 统计学分析

数据采用 SPSS 20.0 统计软件处理,计量资料均以  $(\bar{x} \pm s)$  表示。各组 Bcl-2 及 Bax 蛋白平均光密度值(OD)经正态检验, $P$  值均  $> 0.05$ ,即符合正态分布;再进行方差齐性检验, $P$  值  $> 0.05$ ,即具备方差齐性,故多组间平均光密度值的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 Bcl-2 蛋白表达结果

经染色后,Bcl-2 蛋白表达位于角质形成细胞与

淋巴细胞胞浆,呈棕黄色颗粒。在实验中,健康组 Bcl-2 蛋白表达呈阳性(如图 2:角质形成细胞与淋巴细胞核膜完整,无碎裂,细胞质中含有棕黄色颗粒),模型组 Bcl-2 蛋白表达呈强阳性(如图 2:可见大量角质形成细胞与淋巴细胞,个别碎裂,含有较多棕黄色颗粒),治疗组 Bcl-2 蛋白表达呈弱阳性(如图 2:角质形成细胞与淋巴细胞减少,胞浆中含有的棕黄色颗粒减少)。

每组平均光密度值经正态性检验, $P$  值均  $> 0.05$ ,均符合正态分布。方差齐性检验, $P$  值  $> 0.05$ ,满足了方差齐性条件。经单因素方差分析  $F = 42.83, P < 0.001$ ,说明至少有两组平均光密度值是不同的,健康组与模型组比较有显著统计学差异( $P < 0.001$ ),模型组与治疗组比较有显著统计学差异( $P < 0.001$ );健康组与治疗组比较有显著统计学差异( $P < 0.001$ )。Bcl-2 蛋白表达统计结果如表 1。

## 2.2 Bax 蛋白表达结果

经染色后,Bax 蛋白表达位于角质形成细胞与淋巴细胞胞浆与胞膜,呈棕黄色颗粒。在实验中,健康组 Bax 蛋白表达呈阳性(如图 3:角质形成细胞与淋巴细胞核膜完整,无碎裂,可见细胞中含有棕黄色颗粒);模型组 Bax 蛋白表达呈弱阳性(如图 3:可见大量角质形成细胞与淋巴细胞,个别碎裂,含有的棕黄色颗粒减少);治疗组 Bax 蛋白表达呈阳性(如图 3:角质形成细胞与淋巴细胞减少,核膜完整,含有棕黄色颗粒显著增多)。

每组平均光密度值经正态性检验, $P$  值均  $> 0.05$ ,均符合正态分布。方差齐性检验, $P$  值  $= 0.366 > 0.05$ ,满足了方差齐性条件。经单因素方差分析  $F = 59.148, P < 0.001$ ,说明至少有两组平均光密度值是不同的,健康组与模型组比较有显著统计学差异( $P < 0.001$ ),模型组与治疗组比较有显著统计学差异( $P < 0.001$ );健康组与治疗组比较无统计学差异( $P = 0.7 > 0.05$ )。Bax 蛋白表达统计结果如表 1。

## 2.3 Bcl-2/Bax 比率结果

每组 Bcl-2/Bax 平均光密度值比率经正态性检验, $P$  值均  $> 0.05$ ,均符合正态分布。方差齐性检验, $P$  值  $= 0.215 > 0.05$ ,满足了方差齐性条件。经单因素方差分析  $F = 67.04, P < 0.001$ ,说明至少有两组平均光密度值比率是不同的。健康组与模型组比较有显著统计学差异( $P < 0.001$ ),模型组显著高于健康组;模型组与治疗组比较有显著统计学差

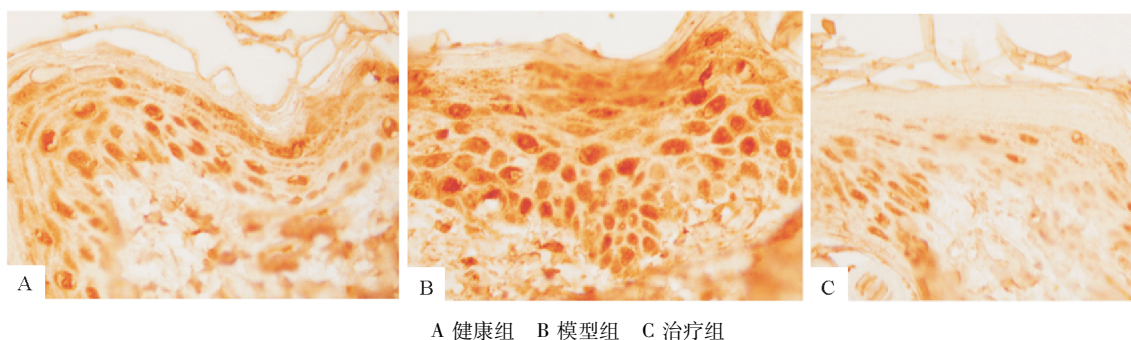


图2 大鼠皮肤 Bcl-2 蛋白表达(免疫组化染色  $\times 1000$ )

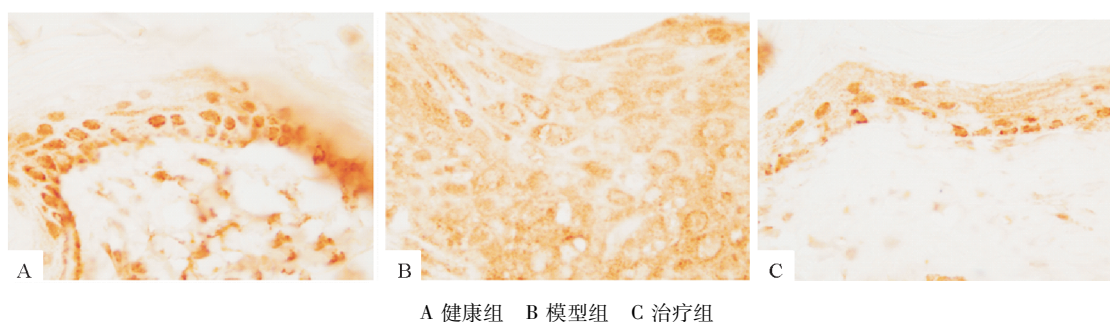


图3 大鼠皮肤 Bax 蛋白表达(免疫组化染色  $\times 1000$ )

异( $P < 0.001$ ),模型组显著高于治疗组;健康组与治疗组比较无统计学差异( $P = 0.451 > 0.05$ )。Bcl-2/Bax 比率结果如表 1。

表 1 三组大鼠皮肤 Bcl-2、Bax 平均光密度及其比率均值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
健康组	$0.0474 \pm 0.0042$	$0.0545 \pm 0.0093$	$0.887 \pm 0.038$
模型组	$0.093 \pm 0.0298$	$0.0197 \pm 0.0086$	$5.831 \pm 0.745$
治疗组	$0.0216 \pm 0.0092$	$0.0528 \pm 0.013$	$0.438 \pm 0.667$

### 3 讨论

皮肤要长期保持相对稳定的厚度及弹性,主要是皮肤各层细胞增殖与凋亡处于相对平衡状态,而湿疹发病机制中皮肤角质形成细胞的增殖、T 淋巴细胞的浸润则将这种平衡状态打破<sup>[5]</sup>。有学者研究认为,Bcl-2 基因家族参与了湿疹淋巴细胞和角质形成细胞凋亡过程的调控<sup>[6]</sup>。Bcl-2 基因家族中两个重要成员 Bcl-2 和 Bax 是细胞凋亡调控系统重要部分,Bcl-2 蛋白主要通过稳定细胞线粒体膜,抑制细胞凋亡<sup>[7]</sup>;Bax 蛋白是一种胞液蛋白,进入细胞线粒体膜诱导细胞凋亡<sup>[8]</sup>。Bax 蛋白可与 Bcl-2 蛋白

形成异源二聚体或自身形成同源二聚体,当 Bax 蛋白表达占优势时,细胞对凋亡信号的反应增强,细胞凋亡增多;当 Bcl-2 蛋白表达占优势时,它与 Bax 蛋白形成异源二聚体,凋亡被抑制,因此,Bcl-2 和 Bax 的比值可决定细胞的命运<sup>[9]</sup>。中药外治湿疹,皮损变薄,直至恢复正常,可能与中药外治干预治疗,促进 Bcl-2 和 Bax 细胞调控系统恢复正常,从而使皮肤表皮细胞的增殖和凋亡恢复平衡有关。

因此,为了进一步验证上述理论,探究中药外治湿疹的分子生物学依据,本课题应用甘石青黛膏干预治疗大鼠亚急性湿疹模型,并与健康组、模型组进行对比。在本实验研究中,健康组 Bcl-2/Bax 比率接近于 1,两者含量接近,说明此时细胞凋亡调控系统处于相对平衡状态,皮肤细胞进行正常的凋亡;在模型组中,Bcl-2 蛋白含量及 Bcl-2/Bax 比率相比健康组显著升高,Bax 蛋白含量降低,说明此时细胞凋亡处于抑制状态,细胞大量增殖,皮损增生肥厚;在甘石青黛膏干预治疗组中,Bcl-2 蛋白含量与 Bcl-2/Bax 比率相比模型组显著降低,Bax 蛋白含量升高,Bcl-2/Bax 比率及 Bax 蛋白含量与健康组相比无统计学差异,说明此时细胞凋亡调控系统正趋于平衡,细胞大量凋亡。

中药复方甘石青黛膏具有清火热、散瘀结、祛风痒的作用,可有效控制斑疹、丘疹、水疱、水肿、肥

厚等。通过本实验研究甘石青黛膏干预大鼠亚急性湿疹模型,对比三组大鼠,运用免疫组化方法检测大鼠皮肤淋巴细胞和角质形成细胞 Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达。结果表明甘石青黛膏可有效抑制 Bcl-2 蛋白表达,促进 Bax 蛋白表达,使 Bcl-2 与 Bax 细胞凋亡调控系统恢复平衡,二者共同作用调控细胞凋亡,使皮肤变薄,恢复正常。该实验结果表明可能为甘石青黛膏治疗湿疹的机制之一。

### 参 考 文 献

- [1] 赵辨.临床皮肤病学[M].3 版.南京:江苏科学技术出版社,2001:604.
- [2] 王卫东. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393-396.
- [3] 李红芬,郑肇巽,马品耀,等. HE 染色原理和试剂配制及染色过程中的若干问题的探讨[J]. 医学信息,2011,24(4):1985-1986.

- [4] 孙占学,赵丽娟,张丰川,等. 甘石青黛膏对大鼠亚急性湿疹模型皮损的影响[J]. 环球中医药,2013,6(3):162-164.
- [5] 朱学骏,涂平. 皮肤病的组织病理诊断[M]. 2 版. 北京:北京医科大学出版社,2001:57-65.
- [6] 祝青,刁庆春,白晋,等. 聚焦超声对慢性湿疹模型豚鼠皮肤淋巴细胞和角质形成细胞凋亡的影响[J]. 中国医学影像技术,2008,24(2):167-169.
- [7] Adams Jerry M, Cory Suzanne. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival[J]. Science, 199, 281(5381):1322-1326.
- [8] Smaili SS, Hsu YT, Sanders KM, et al. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential[J]. Cell Death Differ, 2001, 8(9):909-920.
- [9] Nishi Tatsuro, Takahashi Megumi, Ito Hiroshi, et al. Participation of Bcl-2/Bax-[alpha] in glutamate-induced apoptosis of human glioblastoma cells[J]. Journal of Neurooncology, 1999, 44(2):109-117.

(收稿日期:2014-10-27)

(本文编辑:蒲晓田)