

# 脾气虚大鼠肝组织三磷酸腺苷酶活性和 CaMKII 通路 CaM、CaMKII 蛋白表达的变化

成映霞<sup>1</sup>, 段永强<sup>1,2\*</sup>, 梁玉杰<sup>1,3</sup>, 杨晓轶<sup>1,3</sup>, 杜娟<sup>1</sup>, 刘靛<sup>1</sup>,  
程卫东<sup>2</sup>, 朱立鸣<sup>1</sup>, 安耀荣<sup>1</sup>, 高建德<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医学院, 中医方药创新工程重点实验室, 兰州 730020;

2. 兰州大学基础医学院中西医结合研究所, 兰州 730020;

3. 甘肃中医学院, 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730020)

**【摘要】** 目的 观察脾气虚大鼠肝组织三磷酸腺苷酶活性和 CaMKII 通路关键分子[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 以及 CaM、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达水平的变化。**方法** 受试动物随机分为4组, 即空白对照组, 脾气虚模型7 d、14 d、21 d组, 每组12只。除空白对照组外, 其余受试动物采用复合法(苦寒破气法、游泳力竭法及饥饱失常法)成功建立脾气虚证大鼠模型, 在观测各组大鼠一般生存状态和肝组织 ATP 酶活性的基础上, 采用激光共聚焦技术检测肝组织细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度, 蛋白免疫印迹技术检测肝组织 CaM、CaMK II 和 p-CaMK II 的表达变化。**结果** 与空白组比较, 脾气虚大鼠随着造模时间的延长, 一般生存状况渐差, 肝组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性均降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 肝组织[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度和 CaM、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达量显著降低( $P < 0.01$ ); 且脾气虚模型7 d、14 d、21 d组之间比较, 以脾气虚21 d组变化更为显著。**结论** 脾气虚大鼠肝组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性和[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度降低, 并且 CaMK II 信号通路关键分子 CaM、CaMK II 和 p-CaMK II 蛋白表现为低表达。

**【关键词】** 脾气虚证; 钙调蛋白; 蛋白; 肝组织; 大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0040-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.008

## Changes of adenosine triphosphatase activity and expression of CaM and CaMK II protein in CaMK II signaling pathways in the liver tissue of rats with spleen-qi deficiency

CHENG Ying-xia<sup>1</sup>, DUAN Yong-qiang<sup>1,2</sup>, LIANG Yu-jie<sup>1,3</sup>, YANG Xiao-yi<sup>1,3</sup>, DU Juan<sup>1</sup>,  
LIU Liang<sup>1</sup>, CHENG Wei-dong<sup>2</sup>, ZHU Li-ming<sup>1</sup>, AN Yao-rong<sup>1</sup>, GAO Jian-de<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of New Products Creation for Traditional Chinese Medicines of Gansu Province,

Gansu College of TCM, Lanzhou, Gansu 730020, China; 2. Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730020;

3. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology for Traditional Chinese Medicines of Gansu Province, Gansu College of TCM, Lanzhou 730020)

**【Abstract】 Objective** To investigate the changes of adenosine triphosphatase activity, expression of calmodulin (CaM), and calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) protein in CaMK II signaling pathways in the liver tissue of rats with spleen-qi deficiency. **Methods** 3-month-old SPF Wistar rats (male:female = 1:1) were randomly divided into 4 groups: normal control group, and three spleen-qi deficient model groups (observed on days 7, 14 and 21), 12 rats in

[基金项目] 国家自然科学基金(81160420); 甘肃省自然科学基金(1010RJZA148); 甘肃省教育厅基金(1006-05)。

[作者简介] 成映霞(1976-), 女(汉族), 副教授, 医学硕士, E-mail: cyxgs2008@163.com。

[通讯作者] 段永强, E-mail: dyqgs2008@163.com

each group. The spleen-qi deficient rat models were generated by bitter-cold purgatives, exhaustion and fully or poorly feeding food in turn, and their general conditions and ATPase activity were evaluated. Confocal laser scanning microscopy was used to detect cellular  $[Ca^{2+}]_i$  concentrations and Western blotting was used to test CaM, CaMK II, p-CaMK II expression in liver tissue of the spleen-qi deficient rats. **Results** Compared with the normal group, general condition was poor, activities of  $Na^+ - K^+ - ATPase$  and  $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATPase$  were significantly decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), and expressions of CaM, CaMK II, and p-CaMK II in the liver tissue were decreased. A most obvious difference was observed in the spleen-qi deficient model day 21 group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Our results demonstrate that decrease of adenosine triphosphatase activities and  $[Ca^{2+}]_i$  concentration is involved in the spleen-qi deficiency, and expressions of key molecules of CaMK II signaling pathway, CaM, CaMK II and p-CaMK II proteins, are also decreased.

**[Key words]** Spleen-qi deficiency; CaM, CaMK II, p-CaMK II; Protein; Liver; Rats

中医所论“脾”的生理功能是一个综合的功能概念,不仅包括消化吸收,也包括免疫、代谢和能量转换等生理功能,因此脾虚证会涉及到消化吸收和能量代谢功能的紊乱<sup>[1-2]</sup>,譬如《脾胃论·肺之脾胃虚论》云:“脾胃之虚,怠惰嗜卧,四肢不收,时值秋燥令行,湿热少退,体重节痛,口苦舌干,食无味,大便不调,小便频数,不嗜食,食不消。”本研究基于“脾虚”可导致机体精力不足、神疲乏力的症状特点以及肝脏参与物质能量代谢的生理特性,以脾气虚证大鼠为对象,研究脾气虚大鼠肝组织 ATP 酶活性和 CaMK II 信号通路关键分子  $[Ca^{2+}]_i$  浓度以及 CaM、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达变化的规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

3 月龄 SPF 级 Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,体重 180 ~ 190 g,甘肃中医学院医学实验中心提供【SCXK(甘)2011-0001-0001011】;在本单位无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)的饲养间饲养【SYXK(甘)2011-0001-0000314】。本实验中动物处理的相关程序遵守了中国国家健康与医学研究委员会(National Institute of Health and Medical Research Council of China, NHNRC)动物道德准则并得到了甘肃中医学院动物实验伦理委员会的批准(批准号为 GSZY2012-060)。

#### 1.1.2 药物与试剂

中药均购自兰州复兴厚中药材有限责任公司。大黄、厚朴、枳实按 2:1:1 组成,以上方药分别常规煎煮、去渣滤出药液加热浓缩至每 1 mL 药液含生药 2 g,冷却后置 4 °C 冰箱备用,使用时稀释至所需浓度。

钙镁 ATP 酶试剂盒( $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATPase$ , 批号

20130328)、钠钾 ATP 酶试剂盒( $Na^+ - K^+ - ATPase$ , 批号 20130330),考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(批号 20130326,南京建成生物工程研究所);Flou-3/AM 钙离子荧光染色剂(批号 D00147366,EMD Chemicals 公司,美国);Anti-CaM antibody、Anti-CaMK II antibody、p-CaMK II antibody(批号 0002、0006, Cell Singaling 公司,美国);内参 GAPDH(批号 ZS-25778)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(批号 ZB-2301)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;磷酸酶抑制剂混合物(批号 P1260)、BSA 胎牛血清白蛋白(批号 1213G052)购自北京索莱宝生物科技有限公司;总蛋白提取试剂盒(批号 PC0020)、蛋白质定量试剂盒(BCA 法,批号 P1511)购自北京普利莱基因技术有限公司;超敏发光液(批号 090925, Bio World 公司,美国);氯仿,无水乙醇,异丙嗪,甲醇均为国产分析纯试剂。

#### 1.1.3 主要仪器

Biomate 3S 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)、Chemi DOC XRS + 凝胶成像分析系统、CFX96™ Optics Module PCR 仪、Biomate 3S 核酸蛋白测定仪、Powerpac Basic 基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、KDC-2044 低速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、VT1000S 震动切片机(德国 Leica 公司)、Fluoview FV1000 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)、Velocity 18R 高速台式低温离心机(澳大利亚 Dynamica 公司)、Hirayama HVE-50 高压灭菌器(日本 Hirayama 公司)、P70D20P-TD (W0)微波炉(中国格兰仕微波炉电器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分组与造模

48 只 SPF 级 Wistar 大鼠适应性饲养一周后,受试动物按体重从小到大编号,采用随机数字表法分为正常对照组、脾虚模型组(7 d、14 d、21 d),每组

12 只,雌雄各半分笼饲养。脾气虚证模型参考文献<sup>[3-4]</sup>:以苦寒破气法(大黄、枳实、厚朴)、游泳力竭法及饥饱失常法三因素复合法复制脾气虚证模型:(1)苦寒破气法:造模组大鼠每日上午按 7.5 g/(kg·d)大黄枳实厚朴制剂液灌胃,每日 1 次;(2)游泳力竭法:每日下午 2:00 使大鼠负重游泳,于大鼠尾部缠绕重量为该大鼠体重 10% 的保险丝,放入水深 50 cm、水温 20℃ 的水槽中游泳,并记录大鼠游泳耐力时间,以游泳力竭(即大鼠鼻尖没入水面 10 s)为度,每日 1 次。(3)饥饱失常法:每日上午 8:00 给予定量饲料,下午 8:00 撤去饲料并称量剩余量,隔日再给予定量饲料,自由饮水。造模期间,正常对照组大鼠每日上午按 1 mL/100 g 体重灌服生理盐水,并给予抓捏刺激,每日上午、下午各 1 次,每次定时给予定量饲料称量剩余量,自由饮水。

### 1.2.2 标本采集

造模时分别于第 7、14、21 天取材并制备待检样本。各组大鼠于末次灌胃给药后,禁食不禁水 24 h,乌拉坦(1 g/kg)麻醉采血后断头处死并制备待检标本。肝组织的收集:动物处死后,迅速将肝组织截取于激光共聚焦检测备用,另一部分肝组织置于用 DEPC 处理过的冻存管中,于 -80℃ 冷冻保存检测 CaM、CaMK II 相关蛋白表达备用。

### 1.2.3 各组大鼠肝组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性测定

大鼠麻醉采血后迅速处死,低温条件下快速取肝组织,以冰冷的生理盐水冲洗,滤纸吸干,准确称重后置于匀浆器中用 9 倍生理盐水匀浆(匀浆器的末端置于放冰块的冷水中),制成 1% 的肝组织匀浆液,后以 3500 r/min 离心 10 min,取上清液,同时用考马斯亮蓝法做蛋白定量,其余上清液置 4℃ 冰箱保存备用,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性测定按照试剂盒操作步骤进行。

### 1.2.4 激光共聚焦显微镜检测肝细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度

将一部分肝组织快速冷冻后固定于盛有培养液的振荡切片后机固定切片,切片厚度约 200 μm,将切片用专用毛刷小心移入培养皿中,用 PBS 液冲洗肝组织切片 2 遍,加入 10 μmol/L 染料液 1 mL,置于 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 孵箱里避光温育 30 min。再将染色后的组织切片用 PBS 液冲洗三遍,加入 1 mL 含小牛血清的 DMEM 培养液后置于 20 倍光学显微镜观察区域及层面,用激光共聚焦显微镜观察 Flou-3AM 染色的组织细胞的某一层面的荧光图像;启动激光共聚焦显微

镜,选择 488 nm 氩离子激光采集[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 荧光图像并连续拍摄图片后进行扫描分析。

### 1.2.5 蛋白免疫印迹检测肝组织中 CaM、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达

各组分别于造模 7、12d 及 21d 结束后麻醉处死并截取肝组织。用蛋白提取试剂盒(磷酸化蛋白检测加入磷酸酶抑制剂)提取组织蛋白。BCA 试剂盒进行蛋白定量,以 20 μg/道上样进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜后,用 5% 牛血清白蛋白封闭后分别加入一抗:①GAPDH 一抗溶液配制(1:700);牛奶封闭液 7 mL,GAPDH 一抗 10 μL;②CamK II 一抗溶液配制(1:10,000);封闭液 10 mL,CamK II 一抗 1 μL;③Cam 一抗溶液配制(1:500);封闭液 5 mL,Cam 一抗 1 μL;④P-CamK II 一抗溶液配制(1:800);封闭液 5 mL,P-CamK II 一抗 1 μL。4℃ 摇床过夜,洗涤后加入 HRP 标记羊抗兔二抗,二抗溶液配制:辣根酶标记山羊抗兔(1:7500);山羊抗兔二抗 2 μL,牛奶封闭液 15 mL;室温孵育 1 h,采用化学发光底物进行化学发光,暗室曝光,显影定影后用 Bio-Rad Quantity One 图像分析软件进行扫描分析。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件处理,实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间样本均数差异的比较选用 *F* 检验,在 *F* 检验有显著性时,再用 *q* 检验进行两两比较,*P* < 0.05 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般生存情况

空白对照组大鼠始终表现为反应灵敏、活动及饮食正常、被毛浓密柔顺而有光泽、粪便呈棕褐色颗粒状。脾虚模型各组大鼠多数在第 5 天即开始出现倦卧、被毛稀疏干枯;第 7 天后出现怠动少食、肛周污秽,甚至动作迟缓;第 14 天后出现怠动少食、消瘦弓背、肛周污秽、部分动物出现脱肛、动作迟缓,并逐渐出现体重减轻、大便稀软呈橘黄色,而且随着造模时间的延长上述症状表现突出;尤其在脾虚 21 d 组中,随着造模时间的延长,大鼠生存能力明显下降,表现为怠动少食、消瘦弓背、毛发枯槁疏散、肛周污秽、部分大鼠眯眼蜷缩,反应迟钝,体重增长明显减缓。

### 2.2 脾虚各组大鼠肝组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性的比较

表 1 结果表明:与空白组比较,脾虚 7 d、14 d 组大鼠肝组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 有降低趋势,但组间差异无

显著性( $P > 0.05$ ),模型 21 d 组大鼠肝组织  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活性下降显著,组间差异有显著性( $P < 0.05$ );而脾虚模型 7 d 组大鼠肝组织  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  活性有降低下降趋势,但组间差异无显著性( $P > 0.05$ ),脾

虚模型 14 d、21 d 组大鼠肝组织  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  活性显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且以脾虚 21 d 组间  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  活性下降更为明显,与脾虚 7 d 组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。

表 1 脾虚各组大鼠肝组织  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  和  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  活性的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Comparison of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  activities in the liver tissue among the groups

组别 Groups	动物数/n Number of rats	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ U/mg prot	$\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ U/mg prot
空白组 Normal control	10	3.08 ± 0.52	0.74 ± 0.07
脾虚证 7 d 组 Modeling, d7	10	2.91 ± 0.64	0.71 ± 0.09
脾虚证 14 d 组 Modeling, d14	9	2.59 ± 0.80	0.62 ± 0.09*
脾虚证 21 d 组 Modeling, d21	8	2.37 ± 0.75*	0.59 ± 0.08** <sup>△</sup>

注:与空白组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与脾虚 7 d 组比较<sup>△</sup>  $P < 0.05$ 。

Note. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. the normal control group. <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , vs. modeling group at day 7.

### 2.3 脾虚各组大鼠肝 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度的比较

表 2,图 1 结果表明:与空白组比较,脾虚模型 7 d 组、14 d 大鼠肝组织  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度显著降低,但组间差异无显著性( $P > 0.05$ ),模型 21 d 组大鼠肝组织  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度显著降低,组间差异有显著性( $P < 0.05$ ),但模型各组间比较无显著性( $P > 0.05$ ) (因操作不当,灌胃导致脾虚 14 d、21 d 组各死亡 1、2 只)。

表 2 脾虚各组大鼠肝组织  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度的比较( $\bar{x} \pm s$ )

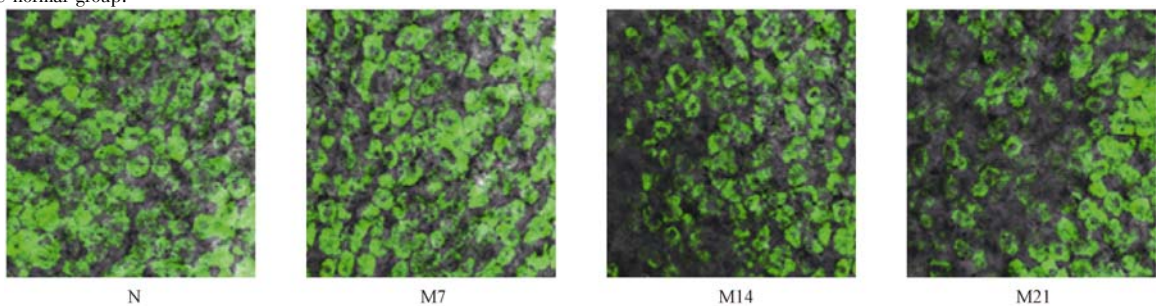
Tab.2 Comparison of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  concentrations in liver tissue among the groups

组别 Groups	动物数/n Number of rats	肝 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (荧光值) Fluorescence value of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentrations in liver
空白组 Normal control	10	35.03 ± 2.495
脾虚证 7 d 组 Modeling, d7	10	34.07 ± 2.245
脾虚证 14 d 组 Modeling, d14	9	35.94 ± 2.188
脾虚证 21 d 组 Modeling, d21	8	32.63 ± 2.235*

注:与空白组比较 \*  $P < 0.05$ 。 Note. \*  $P < 0.05$ , compared with the normal group.

### 2.4 脾虚各组大鼠肝组织 CaM、CaMK II 和 p-CaMK II 蛋白表达比较

表 3,图 2 结果表明:与空白组比较,脾虚模型 7 d、14 d 组大鼠肝组织 CaM 蛋白表达量有下降趋势,但组间差异均无显著性( $P > 0.05$ ),脾虚 21 d 组大鼠肝组织蛋白表达量有下降趋势( $P < 0.01$ ),且与脾虚 7 d 组比较,组间差异均有显著性( $P < 0.05$ );脾虚模型 7 d 组大鼠肝组织 CaMK II 蛋白表达量有下降趋势,但组间差异均无显著性( $P > 0.05$ ),脾虚 14 d、21 d 组大鼠肝组织 CaMK II 蛋白表达量显著下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且与脾虚 7 d 组比较,脾虚 21 d 组 CaMK II 蛋白表达量下降更为显著,组间差异均有显著性( $P < 0.05$ );而脾虚模型 7 d、14 d 组大鼠肝组织 p-CaMK II 蛋白表达量有下降趋势,但组间差异均无显著性( $P > 0.05$ ),脾虚 21 d 组大鼠肝组织 p-CaMK II 蛋白表达量显著下降,组间差异均有显著性( $P < 0.05$ )。



注: N:空白组; M7:脾虚证 7 d 组; M14:脾虚证 14 d 组; M21:脾虚证 21 d 组。

图 1 脾气虚各组大鼠肝组织  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度荧光图

Note. N: Normal control group; M7: Modeling group at d7; M14: Modeling group at d14; M21: Modeling group at d21.

Fig.1 Photofluorogram of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  concentrations in liver tissue of the spleen-qi deficiency rats

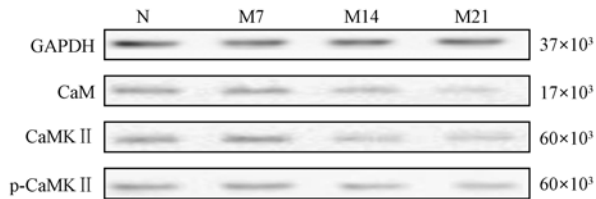
表 3 脾虚各组大鼠肝组织 CaM、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Comparison of the expression of CaM, CaMK II and p-CaMK II protein in liver tissue among the groups

组别 Groups	CaM(灰度值) Gray scale of CaM	CaMK II(灰度值) Gray scale of CaMK II	p-CaMK II(灰度值) Gray scale of p-CaMK II
空白组 Normal control	0.23 ± 0.033	0.26 ± 0.031	0.24 ± 0.022
脾虚证 7 d 组 Modeling, d7	0.23 ± 0.026	0.25 ± 0.023	0.24 ± 0.033
脾虚证 14 d 组 Modeling, d14	0.22 ± 0.016	0.23 ± 0.025 *	0.22 ± 0.032
脾虚证 21 d 组 Modeling, d21	0.20 ± 0.023 ** $\Delta$	0.22 ± 0.027 ** $\Delta$	0.21 ± 0.025 *

注:与空白组比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与脾虚 7d 组比较 $\Delta P < 0.05$ 。

Note. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs. the normal control group.  $\Delta P < 0.05$ , vs. modeling group at day 7.



注:N:空白组;M7:脾虚证 7d 组;M14:脾虚证 14 d 组;M21:脾虚证 21 d 组。

图 2 脾虚各组大鼠肝组织 CaM、CaMK II、p-CaMK II 蛋白印迹表达图

Note. N: Normal control group; M7: Modeling group at d7; M14: Modeling group at d14; M21: Modeling group at d21.

Fig. 2 CaM, CaMK II and p-CaMK II protein imprinting figure in liver tissue of the rats with spleen-qi deficiency

### 3 讨论

中医临床中脾虚证典型症状以纳呆少食,肢体倦怠,神疲乏力,少言懒语,形体消瘦,严重脾虚症存在上述主症之外,还可伴见腹痛绵绵,喜温喜按,形寒气怯,四肢不温,面目无华或浮肿,舌淡胖大苔白滑等等。因为中医认为“脾主运化”为气血生化源,为机体各组织提供营养和能量,而严重脾虚则会导致气血不足,五脏失养而导致各种生理功能障碍。而肝脏作为人体最大的代谢器官,与消化、吸收密切相关并为机体提供物质和能量,有研究表明<sup>[2]</sup>脾虚证涉及多个系统和器官的功能障碍,因此本研究的主要目的是观察与物质、能量代谢密切相关的肝脏组织中的三磷酸腺苷酶活性和 CaMK II 通路关键分子[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>以及 CaM、CaMK II、p-CaMK II 蛋白在脾气虚证病程中的表达变化规律。

三磷酸腺苷酶(Adenosine triphosphatase, ATPase)又称腺嘌呤核苷三磷酸,是机体维持生命活动和器官组织细胞发挥生理功能所需能量的直接来源,亦是维持组织细胞基本结构和生理功能的金属酶。其中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 是细胞膜主动转运中的重要离子泵,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 的活性越高,体内能

量消耗和产热过程也越强;而 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 酶是细胞膜上另一种重要的酶,参与糖的转运等多种能量代谢过程,是衡量线粒体功能和能量代谢水平的一个重要的指标<sup>[5]</sup>。本研究结果显示:与空白组比较,脾虚 7 d、14 d 组大鼠肝组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 有降低趋势,但组间差异无显著性,模型 21 d 组大鼠肝组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性下降显著,组间差异有显著性;而脾虚模型 7 d 组大鼠肝组织 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性有降低下降趋势,但组间差异无显著性,脾虚模型 14 d、21 d 组大鼠肝组织 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性显著降低,且以脾虚 21 d 组间 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性下降更为明显,与脾虚 7 d 组比较差异有显著性,说明随着造模时间的延长,脾虚大鼠肝组织细胞中维持细胞基本结构和功能稳态的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性有降低趋势,进而可影响其生理功能。

在 Ca<sup>2+</sup>/CaM 细胞信号通路中,CaM 作为细胞内 Ca<sup>2+</sup>受体可与 Ca<sup>2+</sup>可逆性结合,进一步可激活下游 Ca<sup>2+</sup>-CaM 依赖的蛋白激酶——CaMK II 而发挥生物学作用,而且 CaM 牵连许多细胞内生理过程<sup>[6-7]</sup>,包括调节细胞各种酶的活性;调节肌肉收缩和舒张;调节神经系统功能,包括神经递质的合成与释放、突触传递、轴浆运输及脑内蛋白质的磷酸化;参与刺激分泌耦联及调节糖代谢等等。本研究结果显示:与空白组比较,脾虚模型 7 d、14 d 组大鼠肝组织 CaM 蛋白表达量有下降趋势,但组间差异均无显著性,脾虚 21 d 组大鼠肝组织蛋白表达量有下降趋势,且与脾虚 7 d 组比较,组间差异均有显著性;脾虚模型 7 d 组大鼠肝组织 CaMK II 蛋白表达量有下降趋势,但组间差异均无显著性,脾虚 14 d、21 d 组大鼠肝组织 CaMK II 蛋白表达量显著下降,且与脾虚 7 d 组比较,脾虚 21 d 组 CaMK II 蛋白表达量下降更为显著,组间差异均有显著性;而脾虚模型 7 d、14 d 组大鼠肝组织 p-CaMK II 蛋白表达量有下降趋势,但组间差异均无显著性,脾虚 21 d 组大鼠肝组

织 p-CaMK II 蛋白表达量显著下降,组间差异均有显著性,笔者分析其发生机制可能与在脾虚造模过程中,多因素造模法可引起的大鼠摄食量减少,物质代谢降低以及便秘增多(脾虚腹泻),导致血钙浓度下降,从而使组织细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度下降,并影响下游关键分子 CaM、CaMK II 的表达以及 p-CaMK II 的活化,提示本实验条件下的脾气虚证大鼠模型肝组织  $Na^+-K^+-ATPase$ 、 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase$  活性和  $[Ca^{2+}]_i$  浓度降低,并且 CaMK II 信号通路关键分子 CaM、CaMK II 和 p-CaMK II 蛋白表现为低表达,其是否与临床真实环境中的脾气虚证的变化一致值得深入研究。

#### 参 考 文 献

[ 1 ] Xiong B, Qian H. Effects of Sijunzi decoction and Yupingfeng powder on expression of janus kinase-signal transducer and activator of transcription signal pathway in the brain of spleen-deficiency model rats [J]. J Trad Chin Med, 2013, 33(1): 78-84

- [ 2 ] 马捷,李峰,宋月晗,等.脾虚证现代研究与思考[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(11):41-43.
- [ 3 ] 陈小野,邹世洁,张智.大鼠长期脾虚造模的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,1995,1(1):37-41.
- [ 4 ] 钱泽南,钱会南.脾虚大鼠脑内 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  的变化以及益气扶正中药干预研究[J].辽宁中医杂志,2012,39(10):2078-2079.
- [ 5 ] 卡尔森著,张增明译.生物化学精华[M].上海:上海科学普及出版社,1989:88.
- [ 6 ] Corcoran EE, Means AR. Defining  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation [J]. J Biol Chem, 2001, 276(4):2975-2978.
- [ 7 ] Soderling TR, Chang B, Brickey D. Cellular signaling through multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase [J]. Biol Chem, 2001, 276(5):3719-3722.

[收稿日期] 2014-09-01

## 《中国实验动物学报》审理费和版面费调整通知

根据中央有关报刊出版单位体制改革的总体部署和要求,落实报刊编辑部体制改革的精神,实现报刊业转型和升级,增强报刊出版传播能力,推动报刊业又好又快发展。同时也为了方便作者快捷的实现投稿,《中国实验动物学报》将从 2015 年起免去作者在投稿同时缴纳的 100 元审理费,但授权书仍需下载我刊模板,扫描或拍照后上传。版面费将调整为文字、表格 500 元/版,彩图仍为 1000 元/版。

支付方式仍然采用以下两种方式:

#### 一、邮局汇款

邮局汇款地址:北京市朝阳区潘家园南里 5 号

邮编:100021

收款人姓名:《中国实验动物学报》编辑部收(不要写编辑姓名)

附言:稿件编号

#### 二、银行汇款

银行汇款或网银转账请汇:

开户银行:中国农业银行潘家园分理处

帐号:11220201040003764

开户名:中国实验动物学会

附言:稿件编号

当您向邮局汇款后,请您登陆我们的网站,把您的汇款时间、汇款单号(通过网银转账务必将转账成功流水号)发票单位、收发票地址等信息登记提交。

发票说明:《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》是由中国实验动物学会主办,并使用中国实验动物学会发票专用章开具发票。

自 2015 年 1 月 1 日以后新投稿件的审理费和版面费将按新标准执行。

《中国实验动物学报》编辑部