

50例临床观察[J].2005, 39(1): 19-20.

[4]韩勇, 赵振元, 王云杰, 等.兔实验性食管炎模型的建立与评价[J].第四军医大学学报, 1999, 20(2): 152-154.

[5] Yan LI, John M, Susan ELLIS, et al. A Novel External Esophageal Perfusion Model for Reflux Esophageal Injury[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2006, 51(3): 527-532.

[6] Hol10way RH. The anti-reflux barrier and mechanisms of gastroesophageal reflux[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2000, 14: 681-699.

[7]韩勇, 王云杰, 刘琨. NO在兔实验性反流性食管炎发病机制中的作用[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(12): 1089-1091.

[8] Murthy KS, Gdder JR, Makh10ufgM. Receptor coupled protein mediate contraction and Ca^{2+} mobilization in isolated intestinal muscle cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1992, 260(1):

90-97.

[9]韩勇, 徐晖, 王云杰, 等.酸损伤对兔食管下括约肌形态及功能的影响[J].第四军医大学学报, 2000, 21(8): 979-982.

[10] Jason R, Kovac, Haroldg, et al. Functional and molecular analysis of L-type calcium channels in human esophagus and lower esophageal sphincter smooth muscle[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289: g998-G1006.

[11] 李和旺, 王亮, 韩启德. 细胞内贮存钙释放机制[J]. 生理科学进展, 1995, 26(3): 209-212.

[12] Sanders KM. Signal transduction in smooth muscle invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles[J]. J Appl Physiol, 2001, 91(3): 1438-1449.

基金项目: 上海市科委自然科学基金资助(06ZR14157)

* 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院消化科(200437)

卵泡刺激素受体及黄体生成素受体在大鼠肾脏组织中的表达

张哲¹ 郑清莲²

卵泡刺激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)和黄体生成素受体(Luteinizing hormone receptor, LHR)是一种具有7个跨膜结构的G蛋白耦联受体,两者主要分布于性腺组织,即分布于睾丸间质细胞、卵巢颗粒细胞和黄体细胞。在非生殖系统内可存在于输卵管上皮、子宫颈、肾上腺、大脑皮质、前列腺、正常乳腺表皮细胞、胎盘、脂肪、骨组织、平滑肌细胞、胃的壁细胞、胰腺、颌下腺、某些恶性肿瘤细胞表面,如胃癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌等。那么肾脏组织中是否表达FSHR、LHR呢?目前国内外研究尚未见报道,故本实验对该问题进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年清洁级SD雌性大鼠,体重为200~220g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。RNAfast200购自广州捷捷生物有限公司;逆转录试剂盒购自Fermentas公司;RT-PCR反应体系购自广州东盛生物科技有限公司;一抗兔抗FSHR、LHR产自美国Zymed公司;生物素化羊抗兔IgG、ABCKit、DAB显色试剂盒为武汉博士德公司产品;Quantityone分析软件凝胶分析系统产自美国Bio-Rad公司;PCR扩增仪和3700测序仪为美国Applied Biosystems公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测FSHR、LHR mRNA表达水平 引物:根据已知的FSHR、LHR mRNA序列设计并合成扩增引物。FSHR PCR扩增产物115bp,上游引物:5'-GCCTTGCTCCTGGTCTCCTTG-3',下游引物:5'-TCTCTGTACCTTGCTGTCTTGG-3'。LHR PCR扩增产物460bp,上游引物:5'-CGTCGTCATCTGTGCTTGCTAC-3',下游引物:5'-TCTCGGTGGTATGGGCTGTTG-3'。选用actin作内参照,PCR扩增产物146bp,上游引物:5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3',下游引物:5'-TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG-3'。以上引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。

总RNA的提取:用fast法提取组织RNA。实验步骤:将

肾脏组织、卵巢组织、脾脏组织剪切成小块后放入平皿(置冰袋上预冷)中的钢网上,加入DEPC处理的生理盐水(约1ml/30mg组织),用研磨棒将组织研磨挤压过钢网,收集过网悬液,取100μl放入Eppendorf管中。处理好的样本中,加入RA2液500μl,充分颠倒混匀1min。将样本裂解物倒入内套管,离心1min。弃去外套管中液体,内套管中加入500μl洗液,离心1min。再重复此过程一次。取出内套管,弃去外套管中液体,仍然套回内套管,不加洗液,离心1min。将内套管移入新的Eppendorf管中,在膜中央加入洗脱液30μl,室温静置1min,离心1min,获得总RNA。

逆转录合成cDNA 逆转录反应体系(总体积为20μl)及条件:取RNA 8μl,加random hexamer primer 1μl, DEPC-treated water 3μl,放入PCR仪,70℃,5min,取出后,放在冰上骤冷,加5X reaction buffer 4μl, dNTP mix 2μl, Ribonuclease inhibitor 1μl,放入PCR仪,25℃,5min。取出后,放在冰上骤冷,RevertiAid M-MuLV Reverse Transcriptase 1μl,放入PCR仪,25℃,10min,42℃,60min,70℃,10min。取出后放置-20℃冰箱保存。

PCR扩增:扩增体系(总体积为25μl):2X PCR TapMix 12μl,模版5μl,上下游引物各1μl,灭菌注射用水6μl。FSHR反应条件:预变性94℃ 3min,扩增条件94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 30s,35个循环,末次延伸72℃ 10min。LHR反应条件:预变性94℃ 3min,扩增条件94℃ 30s,65℃ 30s,72℃ 30s,35个循环,末次延伸72℃ 10min。取6μl PCR产物经2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色,在紫外灯下观察并照相。

统计学处理:用美国Bio-Rad凝胶图像分析系统中Bandscan 5.0软件测定PCR产物的灰度值,并与各自内参相比。用SPSS 12.0进行统计学处理,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验。

1.2.2 PCR产物的测序技术 PCR产物纯化,采用酒精/NaAC纯化方法如下:①每20μl PCR产物中加入2μl 3M NaAC、2μl 125mM EDTA、50μl 100%酒精,混匀;②台式离心机12000rpm 4℃离心30min,用枪吸尽上清液;③加入80μl 75%酒精,12000rpm 4℃离心25min,用枪吸尽上清液,重75%酒精洗涤1次;④

使酒精在室温挥发干净。

测序反应条件:成分 BigDye(2.5x) 8 μ l,引物(10 μ mol/L) 1 μ l,灭菌去离子水 11 μ l,总体积 20 μ l。反应条件 96 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ (96 $^{\circ}$ C 10 $\rightarrow$ 50 $^{\circ}$ C 5 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 4min)x35 个循环 $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 保温。

测序产物电泳:电泳前进行产物纯化,采用酒精/NaAC 纯化方法。在 PCR 仪上变性:94 $^{\circ}$ C 5min, 4 $^{\circ}$ C 10min 后,上机电泳。仪器自动灌胶至毛细管,1KV 预电泳 5min,按编程自动进样,再预电泳(1KV, 25min),在 7.5KV 下电泳 2h。每个样品电泳总时间为 2.5h。电泳结束后仪器自动分析出彩色测序图谱。

1.2.3 FSHR、LHR 的免疫组织化学 SABC 法 SD 大鼠术前晚禁食不禁水,10%的水合氯醛溶液按 0.3ml/kg 大鼠体重腹腔注射麻醉,取出肾脏组织立即放入 4%多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 浸渍固定 24h,用石蜡包埋后将组织蜡块切成 4mm 的切片,并将切片贴附于 APES 处理过的载玻片上,烘干备用。FSHR 免疫组化 ABC 染色程序:①将切片进行二甲苯脱蜡,先后各 10min,无水乙醇 5min,30g/L 甲醇-H₂O₂ 室温 20min;②5% BSA 室温作用 25min;③EDTA, pH 8.0 或 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液进行热修复抗原;④一抗兔抗 FSHR(1:100),4 $^{\circ}$ C 孵育 72~96 h;⑤生物素化羊抗兔 IgG,20~36 $^{\circ}$ C,20 min;⑥SABC (ABCKit) 20 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C,20min;⑦DAB 显色 10~20 min;⑧苏木素复染、脱水、透明、封片,显微镜观察。每次染色时均同时以 PBS 液替代一抗作阴性对照。LHR 免疫组化 ABC 染色程序:除第④步为一抗兔抗 LHR(1:100),4 $^{\circ}$ C 孵育 72~96 h 外,其余步骤同 FSHR 免疫组化 ABC 染色程序。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

如图 1、2 所示(图略),FSHR、LHR 为胞浆表达,呈棕黄色颗粒状或泥沙状,主要在肾髓质及皮、髓交界处的肾小管、远曲小管、集合管细胞表达,髓质间质细胞也有少量表达,肾小球无明显阳性表达。

2.2 RT-PCR 结果

将肾脏、卵巢和脾脏 FSHR、LHR 的 PCR 产物同时进行电泳,结果在肾脏组织中出现了与卵巢同样清晰的条带,分别为 115bp、460bp;而在脾脏中,则未见任何条带(图略)。且大鼠肾脏与卵巢组织中 FSHRmRNA 及 LHRmRNA 的表达量相当。同时测序结果显示,与大鼠卵巢 FSHR 和 LHR 有 99%的同源性。

FSHR 产物测序图谱:

GCCTTGCTCCTGGTCTCCTTGCTGGCATTGTTGGGCACGG

GATCTGGATGTCATCACTGGCTGTGTC

ATTGCTCTAATAGGGTCTTTCTCTGCCAAGACAGCAAGGT
GACAGAGA

LHR 产物测序图谱:

CGTCGTCATCTGTGCTTGCTGCATTAGGATCTACTTTGCA
GTTCAAAATCCAGAGCTGACAGCTCCTAAGAAGGACACA
AAAATTGCTAAGAAGATGGCCATCCTCATCTTCACAGACT
TCACGTGCATGGCGCCCATCTCTTTCTTGCCATCTCGGCT
GCCTTCAAAGTGCCCTTATCACTGTACCAACTCGAAAA
TCTTACTGGTCTTTTTATCCTGTCAATTCTGTGCCAAT
CCATTTCTGTATGCGATCTTCACGAAGGCGTTTCAGAGAG
ATTTCTTCTGCTGCTGAGCCGATTCGGCTGCTGTAAACG
CCGGGCGGAGCTTTACAGAAGGAAGGAATTTCTGCATA
TACTTCCAACGTCAAAAAATGGCTTCCCAGGAGCAAGTAA
GCCGTCCCAGGCTACCCTGAAGTTGTCCACAGTGCACGTG
CAACAGCCCATACCACCGAGA

3 讨论

垂体分泌的糖蛋白激素,如卵泡刺激素、黄体生成素,是下丘脑—垂体—内分泌轴中的关键信号分子,这些糖蛋白激素主要通过结合其特异性受体介导信号传导而发挥生物学意义。一直以来,普遍认为FSHR、LHR仅存在于特异的性腺的靶器官和组织,近年来研究发现其可存在于性腺外组织。

“肾主生殖”是中医藏象学说对人体生殖功能生理病理的基本认识。近年来研究表明,中医学肾与现代医学所论述的内分泌功能、免疫功能、生殖功能、遗传功能等密切相关,“肾主骨”、“肾开窍于耳”、“肾通于冬气”均具有物质基础。那么,“肾主生殖”理论的实质内涵是什么呢?如何从现代医学角度阐明这一理论,同时促使中医理论的客观化以及中医学在自然科学界立足和得到世界范围内的认可,这是我们研究的意义所在。

本实验应用免疫组化和 RT-PCR 法,首次在大鼠肾脏组织内发现 FSHR、LHR,并通过序列测序,发现 FSHR、LHR 的基因序列与大鼠卵巢组织完全一致,对于其存在原因和作用机理,我们推测肾脏极有可能参与和调控性激素的合成和代谢过程,或者 FSHR、LHR 也可能对肾脏组织的某些功能起调节作用。但这些仅仅只是推测,亟待于我们进一步的实验研究去证实。

1 西安交通大学医学院 2006 级研究生(710061);

2 西安交通大学第一附属医院中医科

复方白毛夏枯草对慢性支气管炎抗炎作用的实验研究

李海峰¹ 王文佳¹ 王昆² 颜碧珍² 田维毅²

复方白毛夏枯草是贵州省少数民族用于治疗上呼吸道感染的验方,尤其对上呼吸道感染后继发的慢性支气管炎临床疗效显著。为了探讨其作用机理,我们采用烟熏法加气管内注射脂多糖复制慢性支气管炎大鼠模型,对该方抗炎作用进行实验研究。

1 材料

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 53 只,体重(220 $\pm$ 20)g,购自重庆腾鑫生物技术有限公司。动物合格证号:scxk(渝)2007-0001。主要仪器与试剂:低速大容量离心机(型号:DL-5,上海安亭科仪厂生产);脂多糖(LPS),美国 Sigma 公司产品。药物:复方白毛夏枯草由白毛夏枯草和麦冬等药物组成,各药物均购自北

京同仁堂贵阳药店,常规制备水煎剂,并调整为高、中、低(分别相当于生药 1g/ml、0.5g/ml、0.25g/ml)3 个浓度备用。可待因由青海制药厂有限公司生产(批号:20070705)。

2 方法

2.1 动物造模

将造模组大鼠分别于实验第 1、14 天用 1%戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉后,仰卧、固定,拉出舌体,暴露气门,将静脉导管针套管插入气管,快速注入脂多糖 200 μ g/200 μ l;同时,于第 2~28 天(第 14 天除外)在自制的 1m³的烟室中,用刨花、锯末、烟叶各 30g 及硫磺 5g 混匀,点燃熏烟,每日 2 次,每次 1h,持续 28 天。正常对照组置于无烟环境中饲养。第 29 天时,随