

的运动神经传导速度 (MNCV) 的影响,旨在探讨益气活血通络法对糖尿病神经病变的防治作用及机理。

1 材料与方法

1.1 模型的建立

选用 8 周龄雄性健康 Wistar 大鼠,体重 220~250g。适应性饲养 1 周后,禁食 12h,将链脲佐菌素临用前用 0.1mmol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 4.2、4℃) 配成 2%浓度溶液,按剂量 50mg/kg 左下腹腔内单次注射,72h 后取尾血测血糖,凡血糖≥16.7mmol/L 作为糖尿病大鼠。适应性饲养 3d 后将糖尿病大鼠随机分为 3 组,即模型组、中药组、弥可保组,每组 10 只。并取体重、鼠龄相匹配的同批正常大鼠 10 只,用 0.1mmol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 4.2、4℃) 左下腹腔内单次注射,72h 后取尾血测血糖,血糖值在正常范围内的大鼠作为正常组大鼠。大鼠实验期间按组分笼饲养,自由进食、饮水,饲喂大鼠标准饲料。连续观察 8 周后处死。

1.2 观察指标及检测方法

①体重、血糖检测:实验结束前,称其体重,取尾静脉血测其血糖。②电生理检测:大鼠腹腔注射 20%乌拉坦 (5ml/kg),麻醉后俯卧固定,分离出右侧坐骨神经,采用 Medlab 生物信号采集处理系统测定坐骨神经 MNCV。刺激点位于坐骨结下,记录电极位于离刺激点 2cm 处,刺激量从较小开始,逐渐增强到超强刺激。神经传导速度以复合动作电位出现的潜伏期与复合动作电位传导的距离比值来表示。

2 结果

附表示,治疗 8 周后,与正常对照组相比,模型组、中药组、弥可保组动物的体重明显减轻,血糖明显升高,与正常组比较差异显著,各治疗组间无明显差异;中药组对血糖有降低作用,与模型组血糖相比差异显著。

治疗 8 周后,与正常对照组相比,模型组、中药组、弥可保组大鼠坐骨神经 MNCV 明显减慢,中药组及弥可保组均能延缓糖尿病大鼠坐骨神经 MNCV 的减慢,与糖尿病模型组相比差异显著;中药组的疗效优于弥可保,二者相比差异显著。

附表 各组大鼠体重、血糖、MNCV 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重 (g)	血糖 (mmol/L)	MNCV (m/s)
正常组	10	321.16±37.68	4.33±0.75	54.85±13.41
模型组	7	230.80±32.3 **	25.93±8.55 **	20.27±3.53 **
弥可保组	9	227.30±43.03 **	23.93±3.17	36.41±3.88 ** [#]
中药组	9	247.12±35.28 **	12.43±6.47 * [#]	43.73±4.58 * ^{#△}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$;与弥可保组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

中医认为,DPN 是由于糖尿病日久,气阴两虚、瘀血阻络所致。益气活血通络法方由黄芪、桂枝、延胡索、水蛭、地龙、麦冬、葛根、生地黄组成。具有养阴益气、活血化瘀之功。研究表明,黄芪可扩张血管,改善血行增强机体免疫力;桂枝能使皮肤血管扩张,促进血液循环,又有镇痛解痉的作用。活血化瘀药物具有改善血液流变性,降低血黏度,抑制血小板聚集,扩张微血管等作用,可改善微循环,有助于改善 DPN 的症状和体征。实验证实活血化瘀药物能显著改善不同切变率下血液表观黏度,也能降低血浆黏度,使各级血管的血液流变性普遍趋于正常。

弥可保是维生素 B12 (氰钴胺) 的衍生物,在 STZ 诱导的糖尿病大鼠早期,给予弥可保治疗可防止有髓鞘神经纤维变性和脱髓鞘。本实验结果显示,对于糖尿病大鼠的体重、血糖、坐骨神经传导速度等方面的改善,益气活血通络法优于弥可保,可能由于弥可保治疗仅针对 DNP 发病的单一因素,而中药复方能起到整体调节作用,充分发挥中医多环节、多靶点、辨证论治的优势和特色有关。本实验结果表明,益气活血通络法能有效改善糖尿病大鼠坐骨神经速度,可用于糖尿病周围神经病变的预防和治疗,值得临床推广应用,但其作用的具体机理还需要进一步探讨。

1 长春中医药大学方剂教研室 (130117);

2 延边大学医学部留学生处

丁香降气方对混合反流性食管炎家兔下食管括约肌钙通道调控机制研究

朱生樑* 马淑颖* 王宏伟* 王晓素* 程艳梅*

反流性食管炎 (Reflux Esophagitis) 是临床常见的上消化道动力障碍性疾病。据北京、上海两地流行病学调查显示反流性食管炎的发病率为 1.92%^[1],其中酸和胆汁混合反流占 63.3%^[2]。丁香降气方在我院胃食管反流病中医特色专科应用多年,前期研究显示良好的临床疗效,临床症状总有效率达 92%,内镜下黏膜炎症改善总有效率达 80%^[3]。本实验通过研究丁香降气方对家兔下食管括约肌 (lower Esophageal Sphincter, LES) 环行肌钙通道的调控,从动力学角度探讨其治疗混合反流性食管炎作用机制,为临床提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

新西兰兔 48 只,健康雄性,体重 2.0~4.0kg,由上海中医药

大学实验动物中心提供,随机分为正常组、模型组、中药组各 16 只。

1.2 试剂及药物

1.2.1 试剂 盐酸购于国药集团化学试剂有限公司,猪胆汁由上海五丰上食食品有限公司提供,速眠新注射液购于军事医学科学院军事兽医研究所, ACh、nifedipine、2-APB、U-73122、TG (thapsigargin)、DMSO 等均购自 Sigma 公司。NaCl、KCl、MgSO₄、NaH₂PO₄、NaHCO₃、CaCl₂、Glucose 均购于国药集团化学试剂有限公司。Krebs 液 (in mM): 115 NaCl, 4.6 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 22 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 11 glucose, pH (7.4±0.05), 每次实验前新鲜配制 2L。

1.2.2 主要药物 丁香降气方 (丁香、赭石、柴胡、枳壳、川

黄连、吴茱萸、焦栀子、川楝子、延胡索、没药、太子参、甘草)由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药房提供中药颗粒配制而成, 含生药量0.53g/ml。分装置冰箱中4℃保存, 使用前混匀。

1.3 仪器 IBM-300GL微型电子计算机(IBM公司), ML740型Powerlab/4SP四通道高速记录仪、ML110型桥式放大器、MLT0202/D型张力换能器(Australia AD instruments), 501C型超级恒温水浴锅(上海实验仪器厂), 自制离体张力测定灌流系统(上海中医药大学中药药理实验室)。

2 方法

2.1 造模方法

参照国内外文献^[4-5], 通过酸和胆汁混合灌注制备家兔混合反流性食管炎模型: 灌注前家兔禁食12h, 自由饮水; 家兔用速眠新注射液(0.2 ml/kg)肌肉注射麻醉后固定于兔台上, 用特制开口器横插兔口内; 操作者手持涂有润滑剂的胃管前端, 将胃管自开口器小孔插入食管至LES上方约5cm处固定; 胃管外端先接一次性输液连接管, 再与输液瓶连接, 用0.1mol/L HCl 30ml(滴速0.5ml/min)和5%猪胆汁30ml(滴速0.5ml/min)灌注60min, 每日1次, 连续灌注7天。

2.2 治疗方法

中药组家兔于每次造模灌注结束即灌服中药, 给药剂量按成人70kg体重、家兔1.5kg体重的体表面积折算等效剂量, 每次按10ml/1kg体重进行灌胃, 每日1次, 连续10天; 模型组于每次造模灌注结束即以等量生理盐水灌胃, 每日1次, 连续10天; 正常组家兔以等量生理盐水灌胃, 每日1次, 连续10天。

2.3 LES环行肌条制备方法

实验前家兔禁食12h, 自由饮水; 以速眠新注射液(0.2ml/kg体重)肌肉注射麻醉, 仰卧固定于兔台上; 备皮后迅速沿正中线作一纵向切口, 打开胸腔, 在胃贲门与食管相连处有一呈壶腹状膨大且黏膜增厚, 肌纤维呈环形排列的节段, 该节段即为LES, 先以手术剪自胃食管连接处向上3cm处剪断, 再沿胃食管连接处剪断食管; 取得标本后立即放入通有持续供给恒速混合气体(95%O₂+5%CO₂), pH(7.4±0.05)的Krebs液中; 用眼科剪去掉标本周围的筋膜并且将其拉伸至自然长度, 然后沿胃大弯侧曲度纵向剖开; 用精细镊将黏膜进行锐剥离; 沿环行肌方向将LES剪成2mm×10mm肌条。

2.4 LES环行肌张力测定方法

用手术线系于肌条两端; 并将肌条置于容量为10ml、温度为37℃的离体器官浴槽中, 肌条一端连于浴槽底部金属挂钩上, 另一端连接张力换能器; 以95%O₂+5%CO₂充分饱和的Krebs液持续恒速灌流, 基础张力调至1g, 每20min换液1次, 平衡1h后开始实验; 收缩张力信号经张力换能器由桥式放大器传输到Powerlab系统相连的计算机上, 直接采用Powerlab系统及Chart5.0软件进行数据记录分析; 所有实验结束后, 取下肌条放入专门盒内阴干并称重。

2.5 观测指标

记录各组家兔LES环行肌分别用nifedipine阻断电压操纵性L型钙通道、U-73122抑制PLC、2-APB阻断IP₃R、TG抑制肌质网Ca²⁺-ATPase前后的肌张力, 并分别比较通道阻断前、阻断后各组LES环行肌钙释放相和钙内流相张力幅度的差异。张力值以tone(g)/weight(g)来表示其单位。

2.6 统计学方法

采用SPSS11.5统计软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, N表示肌条数。计量资料若呈正态分布且符合方差齐性, 采用单因素方差分析; 若非正态分布或方差不齐, 采用非参数检验。

3 结果

3.1 电压操纵性钙通道阻断前后三组LES环行肌张力比较

表1示, 正常组、中药组LES环行肌钙释放相、内流相张力均高于模型组($P<0.05$), 而正常组与中药组LES环行肌钙释放相、内流相张力相比无统计学差异($P>0.05$)。

3.2 受体操纵性钙通道阻断前后三组LES环行肌张力比较

3.2.1 抑制PLC前后三组LES环行肌张力比较

表2示, 正常组LES环行肌钙释放相、内流相张力明显高于模型组($P<0.01$), 中药组LES环行肌钙释放相、内流相张力高于模型组($P<0.05$), 正常组LES环行肌钙释放相、内流相张力与中药组相比无统计学差异($P>0.05$)。

3.2.2 阻断IP₃R前后三组LES环行肌张力比较

表3示, 正常组、中药组LES环行肌钙释放相、内流相平均张力高于模型组, 但三组间张力幅度无统计学差异($P>0.05$)。

3.3 肌质网Ca²⁺-ATPase抑制前后三组LES环行肌张力比较

表4示, 正常组LES环行肌钙释放相、内流相张力高于模型组($P<0.05$); 中药组LES环行肌钙释放相、内流相平均张力高于模型组, 但两组间无统计学差异($P>0.05$); 正常组与中药组比较无统计学差异($P>0.05$)。

表1 3组兔 nifedipine 阻断 L 型钙通道前后 LES 环行肌张力比较 (g/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	阻断前张力幅度		阻断后张力幅度	
		钙释放相	钙内流相	钙释放相	钙内流相
正常组	6	38.3±5.0*	31.2±4.3*	20.1±1.6*	12.4±2.2*
模型组	8	18.8±3.9	13.5±2.5	11.0±2.5	6.9±1.3
中药组	7	34.0±1.6*	24.7±1.1*	18.4±2.1*	12.3±1.4*

注: 与模型组比较, * $P<0.05$

表2 3组兔 U-73122 抑制 PLC 前后 LES 环行肌张力比较 (g/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	抑制前张力幅度		抑制后张力幅度	
		钙释放相	钙内流相	钙释放相	钙内流相
正常组	7	26.3±4.0**	23.0±3.9**	32.6±4.7**	28.1±4.1*
模型组	6	11.9±2.0	7.7±1.4	13.3±2.3	10.8±1.4
中药组	8	22.6±3.2*	17.3±2.4*	23.7±2.7*	18.6±1.9*

注: 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 3 3 组兔 2-APB 阻断 IP₃R 前后 LES 环行肌张力比较 (g/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	阻断前张力幅度		阻断后张力幅度	
		钙释放相	钙内流相	钙释放相	钙内流相
正常组	7	30.9±6.1	21.8±2.6	34.3±6.3	26.8±2.7
模型组	8	23.6±2.3	16.8±2.3	29.9±3.1	20.7±2.4
中药组	7	27.0±2.3	19.7±2.2	33.4±3.8	24.0±2.8

表 4 3 组兔 TG 抑制肌质网 Ca²⁺-ATPase 前后 LES 环行肌张力比较 (g/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	抑制前张力幅度		抑制后张力幅度	
		钙释放相	钙内流相	钙释放相	钙内流相
正常组	6	26.0±4.6*	23.2±4.2*	19.8±3.4*	18.1±2.7*
模型组	6	13.8±2.4	12.8±1.8	10.5±2.6	10.4±1.7
中药组	8	20.4±2.3	19.1±3.2	14.9±2.4	13.8±2.5

注：与模型组比较，**P*<0.05

4 讨论

混合反流性食管炎发病机制主要包括两方面因素：抗反流防御机制下降和反流物对食管黏膜的攻击作用增强。其中最主要的机制是一过性下食管括约肌松弛 (TLESR) [6]，造成胃、十二指肠内容物突破下食管括约肌屏障，反流到食管，引起食管黏膜损伤。而Ca²⁺通道功能障碍所致的LES平滑肌张力改变可能是一过性下食管括约肌松弛的重要因素[7]，Murthy等[8]通过动物实验也证实LES收缩及张力的维持与细胞内Ca²⁺密切相关。而胞内Ca²⁺的变化则又依赖于Ca²⁺跨膜转运、胞内肌质网钙库释放及再摄取Ca²⁺等过程的动态平衡。韩勇等[9]研究显示，酸灌注使家兔LES平滑肌Ca²⁺浓度明显降低，影响家兔LES平滑肌对ACh作用的反应，LES的功能障碍可能与酸侵害造成了平滑肌细胞内钙离子的贮存与释放功能损伤及信号转导途径的改变有关。

Jason^[10]等研究了人类食管平滑肌上的电压操纵性L型钙离子通道，证实其在维持LES平滑肌张力上发挥关键作用。本次实验我们用nifedipine阻断LES环行肌L型钙离子通道，各组肌条钙释放相、内流相肌张力均下降，显示L型钙通道参与了LES张力的调控。通道阻断前后模型组双相张力与正常组相比均显著下降 (*P*<0.05)，显示酸和胆汁混合灌注损伤可能造成了LES环行肌L型钙离子通道功能异常，钙离子内流障碍，破坏了钙内流与释放的平衡，从而引起钙释放障碍，LES环行肌细胞内Ca²⁺浓度降低，张力显著下降；中药组与模型组相比双相张力显著提高 (*P*<0.05)，并且与正常组相比无统计学差异 (*P*>0.05)，显示丁香降气方可能通过改善LES环行肌L型钙通道功能状态，促进钙离子内流及释放，提高LES环行肌张力。

受体操纵性钙通道 (ROCC) 也是LES平滑肌上的重要通道。本次实验中分别用U-73122 (PLC抑制剂)、2-APB (IP₃R阻断剂) 阻断ROCC，抑制IP₃敏感的SR钙库释放Ca²⁺，结果各组LES环行肌张力增高，显示ROCC参与了LES环行肌张力调控。与文献不同的是各组肌张力并没有下降，这可能是因为两药仅抑制了IP₃诱导的钙释放，而未阻断电压操纵性钙通道，研究^[11]表明，当电压操纵性钙通道开放时，存在钙离子内流，钙离子与雷诺定受体 (RyR) 钙结合位点结合，触发RyR敏感的SR钙释放通道以钙诱导钙释放 (CICR) 的方式活化，释放Ca²⁺，这种RyR代偿机制使胞内Ca²⁺浓度增加，故而张力增加；而且Sanders等^[12]研究也发现2-APB仅阻断IP₃R，对RyR并没有影响，当其浓度>90μM时可引起钙库Ca²⁺释放和游离Ca²⁺的升高。本实验结果显示，酸和胆汁混合灌注可能影响了IP₃R、RyR功能状态，肌质网

钙释放通道功能障碍，钙释放、钙内流均出现异常，胞内Ca²⁺浓度降低，双相张力下降；丁香降气方可能通过改善肌质网钙释放通道功能状态，增加钙离子浓度，提高LES环行肌张力。

肌内质网Ca²⁺-ATPase (SERCA) 是胞内钙库摄取Ca²⁺、钙库再充盈的通道，在维持平滑肌细胞内钙稳态、调控收缩、信号转导等方面发挥着关键作用。TG是肌质网Ca²⁺-ATPase特异性抑制剂，本次实验我们用TG抑制SERCA摄取钙离子，通过非特异性钙漏流，迅速耗竭SR钙库，抑制了ACh引起的LES环行肌收缩反应，各组LES环行肌双相张力明显下降，证实了SR钙释放对LES环行肌张力的重要性，抑制钙摄取，会导致钙库释放的异常。

混合反流性食管炎属于中医“吞酸”、“吐酸”、“嘈杂”、“胃脘痛”、“食管瘁”等范畴。肝失疏泄，气机郁滞，胃失和降是主要病机，痰湿浊邪为其病理产物。疏肝利胆、通降和胃为基本治则，拟丁香降气方治疗本病。方中丁香、赭石镇逆下气、和胃降浊，共为君药；柴胡、枳壳疏肝解郁、理气宽中，两药伍用升降相因，复脾气升清、胃腑降浊，共为臣药；川黄连、吴茱萸、焦栀子清降肝胃郁火、制酸和胃，延胡索、川楝子、炙没药活血行气、止痛生肌，共为佐药；太子参、甘草养胃和胃、调和诸药，共为使药；诸药协同，清升浊降，脏腑和合。现代药理研究表明，丁香能抗炎，保肝利胆；代赭石所含镁离子有促进胃肠动力作用，铝离子有保护黏膜作用；柴胡能抗炎，促进内脏平滑肌收缩，修复黏膜；枳壳能调节胃肠道平滑肌；黄连有抑制胃酸，抗炎，利胆之效；吴茱萸能抑酸，镇痛镇吐，抗炎；焦栀子具有保肝利胆，促进胆汁排泄，镇痛，抗炎，减少胃液分泌，降低总酸度等作用；川楝子兴奋胃肠道平滑肌，使其张力和收缩力增加；延胡索可以镇痛，减少胃液分泌、降低胃酸和胃蛋白酶含量；没药镇痛，保护黏膜。全方组方合理，故获佳效。

综上所述，本次实验表明酸和胆汁混合反流性食管炎模型家兔LES环行肌张力下降，可能与钙通道功能障碍有关；丁香降气方可能通过调控钙通道、提高LES环行肌张力、改善LES平滑肌功能来发挥对混合反流性食管炎的治疗作用。

参考文献

[1]潘国宗, 许国铭, 郭慧平, 等.北京、上海胃食管反流症状的流行病学观察[J].中华消化杂志, 1999, 19(4): 223-226.
[2]王雯, 许国铭, 李兆申等.胆汁反流检测在胃食管反流病诊断中的意义[J].中华内科杂志, 1999, 38 (4): 242-244.
[3]朱生樑, 马淑颖, 王晓素, 等.丁香降气方治疗反流性食管炎

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