

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 $^{\circ}$ C 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,20min;⑥SABC (ABCkit) 20 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C,20min;⑦DAB 显色 10~20min;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
TCTTACTGGTCTTTTTATCCTGTCAATCTTGTGCCAAT
CCATTTCTGTATGCGATCTTCACGAAGGCGTTTCAGAGAG
ATTTCTTCTGCTGCTGAGCCGATTCGGCTGCTGTAAACG
CCGGGCGGAGCTTTACAGAAGGAAGGAATTTCTGCATA
TACTTCCAAC TGCAAAAATGGCTTCCCAGGAGCAAGTAA
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

机选取造模组大鼠各 1 只，断颈处死，取右肺中叶组织，常规制作病理切片，光镜下观察，若慢性支气管炎支已形成，证明造模成功。

2.2 动物分组

造模成功后，将 SD 大鼠随机分为 6 组，每组 8 只。①正常对照组：每日灌服生理盐水 10ml/kg；②模型自愈组：不做任何处理，常规饲养；③可待因组：每日灌服 0.5mg/ml 的磷酸可待因(7mg/kg)；④复方白毛夏枯草高剂量组（高剂量组）：每日灌服 1g/ml 的复方白毛夏枯草水煎液(14g/kg，相当于成人等效剂量的 2 倍)；⑤复方白毛夏枯草中剂量组（中剂量组）：灌服 0.5g/ml 的复方白毛夏枯草水煎液（7g/kg，相当于成人等效剂量）；⑥复方白毛夏枯草低剂量组（低剂量组）：灌服 0.25g/ml 的复方白毛夏枯草水煎液（3.5g/kg，相当于成人等效剂量的 1/2）。各组动物均于造模结束后第 2 天起开始连续灌胃 20 天，每日 2 次。所有动物常规饲养。

2.3 标本制备及处理

灌药结束后第 2 天，断颈处死，固定于操作台，沿正中线剖开大鼠胸部，暴露出肺脏，用止血钳夹住右主支气管后，在气管环状软骨处剪一“V”行小切口，将静脉套管针套管插入左

主支气管，用 10ml Hanks 液分 3 次灌洗，总回收率 60%~80%，灌洗液离心(1500r/min，离心 10 min)，弃上清液。细胞用 Hanks 洗涤后加液至 1ml，作白细胞计数，瑞氏染色，每张图片计数 100 个细胞，行细胞分类计数。

灌洗完毕后，弃左肺，取右肺中叶同一部位取约 1cm×1cm×0.5cm 大小肺组织连同部分支气管，常规制作病理切片。HE 染色切片中，根据炎症和上皮脱落程度将炎症分为“一、+、++、+++”4 级。“一”即未见明显炎症细胞浸润；“+”为少量炎症细胞浸润，气管结构完整；“++”为见大量炎症细胞浸润，并可出现管壁破坏及(或)上皮脱落；“+++”介于“+”和“+++”之间。

3 结果

3.1 各组大鼠支气管肺泡灌洗液（BALF）白细胞总数和细胞分类计数

表 1 示，与正常对照组比较，模型组各类细胞均明显升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，高、中、低剂量组各类细胞计数均降低 ($P<0.05$)，但以高、中剂量组比低剂量组降低更明显 ($P<0.01$)。

表1 各组大鼠BALF细胞计数和细胞分类计数结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	白细胞 ($\times 10^6/L$)	中性粒细胞(%)	单核巨噬细胞 (%)	淋巴细胞(%)
正常对照组	8	0.88±0.13	4.13±0.99	16.00±2.93	21.38±3.93
模型自愈组	8	3.04±0.49*	18.25±2.12*	42.88±3.30*	39.50±1.6*
低剂量组	8	2.23±0.28 [△]	10.88±1.55 [△]	35.50±2.98 [△]	36.38±3.7 ^{△▲}
中剂量组	8	1.30±0.13 ^{△▲}	6.25±1.17 ^{△▲}	24.13±2.95 ^{△▲}	29.75±1.6 ^{△▲}
高剂量组	8	1.33±0.26 ^{△▲}	6.50±1.20 ^{△▲}	22.13±3.48 ^{△▲}	29.25±2.71 ^{△▲}
可待因组	8	1.43±0.30 [△]	6.75±1.49 [△]	23.00±3.30 [△]	30.88±2.70 [△]

注：与正常对照组比较，* $P<0.01$ ；与模型自愈组比较， Δ $P<0.01$ ； $\Delta\Delta$ $P<0.05$ ；与低剂量组比较， $\Delta\Delta$ $P<0.01$

3.2 肺组织病理学变化及炎症细胞浸润情况

正常对照组可见细支气管黏膜上皮完整，细胞排列整齐，细支气管壁及肺泡无明显病理形态学改变，支气管管壁无充血和炎症细胞浸润。模型自愈组可见细支气管管腔增大，管壁大量纤维组织增生，肌层明显增厚，出现较多上皮细胞坏死脱落，周围可见大量炎性细胞浸润（杯状细胞、淋巴细胞、浆细胞），其中以淋巴细胞浸润为主及出血，管腔内分泌物较多。肺泡上皮细胞部分坏死脱落，肺泡间隔明显增宽，伴有慢性炎症细胞及少量中性粒细胞浸润。高、中剂量组和可待因组可见细支气管黏膜上皮基本完整，无出血。支气管管腔无明显扩张，管壁肌层无明显增厚，偶见少量纤维组织及少量淋巴细胞浸润，管腔内分泌物减少。低剂量组可见细支气管黏膜部分上皮细胞坏死、脱落。支气管管壁大量纤维组织增生，伴有较多的炎性细胞浸润，管壁明显增厚。

表2 各组大鼠支气管炎炎症浸润的情况

组别	鼠数	等级			
		—	+	++	+++
正常对照组	8	7	1	0	0
模型自愈组	8	0	0	3	5
低剂量组	8	0	0	4	4
中剂量组	8	0	6	2	0
高剂量组	8	3	5	0	0
可待因组	8	3	4	1	0
合计	48	13	16	10	9

表 2 示，正常对照组与模型自愈组比较，两者炎症程度不同，显示模型自愈组炎症较重；与模型自愈组比较，低剂量组其治疗炎症疗效不佳，而高剂量、中剂量、可待因组均有改善支气管炎的作用，显示高剂量、可待因组疗效较好，中剂量组

次之；但与中剂量组比较，高剂量、可待因组与之疗效相同；与低剂量组比较，高剂量、中剂量、可待因组与之疗效不同，比较显示后三者疗效好于低剂量组。

4 讨论

中医学认为，慢性支气管炎的发生和发展为外邪和内伤合而为病,导致出现痰湿内阻、瘀血凝滞与肺气肺阴亏虚、脾肾气虚等兼杂的病理状态。本方由白毛夏枯草、麦冬等药物组成，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。现代药理研究结果表明，白毛夏枯草具有止咳、祛痰、平喘、抗炎、抗病毒作用，麦冬具有抑制呼吸道平滑肌过敏性收缩、增强免疫力，而得到止咳作用。两药物联用，使得此复方制剂具有清热解毒、润肺止咳化痰、增强机体免疫力等药理作用，从而达到标本兼治之效，体现了中医学与现代药理研究的有机结合。

结果显示，与模型自愈组相比较，治疗各组均能降低BALF 中白细胞总数及各炎细胞分类计数($P<0.01$)；与低剂量组比较，高剂量、中剂量、可待因组有明显降低BALF中白胞总数及各炎细胞分类计数($P<0.01$)。各治疗组与模型自愈组比较，除低剂量组外，各组均能降低炎细胞的浸润程度，其中以高剂量、中剂量、可待因组疗效最佳。综上所述，复方白毛夏枯草对慢性支气管炎大鼠模型具有较明显的抗炎作用，且呈剂量依赖性，这可能是该方用于治疗上呼吸道感染后继发慢性支气管炎的重要机制。

基金项目：贵州省中医药管理局资助课题（黔中医药发[2007]35 号第 41 项）

- 1 贵阳医学院 2006 级研究生（550002）；
- 2 贵阳医学院