

神经有髓神经纤维排列紧密整齐、形态正常,轴突及髓鞘结构清晰,神经纤维轴突及其周围髓鞘染成紫红色、间质均匀淡染。模型组神经纤维排列稀疏、紊乱,多数轴突及髓鞘淡染;髓鞘肿胀,甚至空泡变性。治疗组亦出现模型组病变,但较之改变轻微。预防组大鼠神经纤维较正常组排列稀疏;部分髓鞘肿胀,出现空泡变性;轴突结构无明显变化,较模型组明显减轻。防治组坐骨神经纤维排列紧密,髓鞘空泡变性较轻,轴突及髓鞘结构清晰。

各组大鼠造模后 72h 结果分析:经药物干预后 72h,预防组及防治组大鼠神经纤维较造模后 24h 排列更紧密,且仅见部分髓鞘肿胀及空泡变性;而模型组大鼠神经纤维仍可见多数髓鞘肿胀及空泡变性。

2.2 电镜结果分析

各组大鼠造模后 24h 结果分析:正常组大鼠有髓神经纤维髓鞘致密均匀、结构完整,中心为轴突,其外有明暗相间的同心板层髓鞘结构,其内有排列整齐的微丝、微管,无髓神经纤维正常。模型组的有髓神经纤维髓鞘板层增厚、结构分层变性溶解,可见脱髓鞘,部分轴突萎缩、变性,有的神经微丝溶解、凝集,无髓神经纤维正常。治疗组亦可见板层增厚,部分板层分离变性,偶可见脱髓鞘。预防组大多数有髓神经纤维髓鞘板层结构正常,部分髓鞘板层增厚,轴突病变不明显,可见部分微丝溶解、凝集。防治组仅少数有髓神经纤维髓鞘出现轻微的板层增厚、分层,未出现溶解变性,微丝、微管散在。

各组大鼠造模后 72h 结果分析:模型组大鼠在造模后 72h 仍可见大多数的有髓神经纤维髓鞘板层增厚、结构分层变性溶解,脱髓鞘及部分轴突萎缩、变性;而经黄芪桂枝五物汤干预的治疗组及预防组、防治组大鼠坐骨神经纤维髓鞘致密均匀、结构完整,形态基本

同正常组。

3 讨论

古代文献对“血痹”的描述在临床表现及病机与周围神经毒性相符,因此可以将奥沙利铂导致的周围神经毒性辨证归纳为血痹范畴,气血亏虚、营卫不和、脉络瘀阻为基本病机,以益气养血、活血化瘀、调和营卫为治疗原则,选方黄芪桂枝五物汤,重用黄芪,随症加减。现代药理研究证明,黄芪桂枝五物汤具有清除自由基、改善微循环、调节免疫的作用。在本研究中,我们发现模型组主要表现为髓鞘变性,偶可见轴突变性,且随观察时间的延长这种结构改变逐渐严重;而经黄芪桂枝五物汤干预治疗后,至 72h 这种基本恢复正常,与文献报道^[2]的 5 周时间相比明显缩短了病变的持续时间。证明黄芪桂枝五物汤能减轻奥沙利铂周围神经毒性在大鼠中病理形态及超微结构的病变。本研究结果从动物模型实验角度验证了黄芪桂枝五物汤对这种髓鞘变性有确实的保护作用,为利用黄芪桂枝五物汤治疗和预防奥沙利铂周围神经毒性以及制定合理的联合化疗方案提供了基础理论依据,值得进一步研究。

参考文献

- [1] McKeage MJ, Hsu T, Screnci D, et al. Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs[J]. Br J Cancer, 2001, 85(8):1219-1225.
- [2] Hirata A, Masaki T, Motoyoshi K. Intrathecal administration of nerve growth factor delays GAP 43 expression and early phase regeneration of adult rat peripheral nerve[J]. Brain Res, 2002, 944(1-2):146-156.

- 1 复旦大学附属上海市第五人民医院中医科(200240);
- 2 上海中医药大学附属曙光医院实验中心;
- 3 上海中医药大学附属曙光医院肿瘤科

异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期下丘脑-垂体-肾上腺轴结构和功能的变化

斯坎德尔·白克力¹ 玉苏甫·吐尔逊² 阿地里江·阿布力米提³
阿布力孜·阿卜杜扎依尔⁴ 阿不都卡德尔·库尔班⁴ 哈木拉提·吾甫尔²

维吾尔医学认为异常黑胆质是在各种内外因素的作用下,体液质平衡紊乱,体液质被燃烧,继而沉淀的最终病理产物或表现形式,是肿瘤等复杂性疾病在维吾尔医病理生理上所共有的特性^[1]。临床研究发现^[2],

异常黑胆质病证有不同程度的神经内分泌免疫功能的损害,其中丘脑-垂体-肾上腺轴(HPAA)功能紊乱的表现极为突出。恶性肿瘤中异常黑胆质型较非异常黑胆质型常见,且更加严重。HPAA 功能紊乱可能是

肿瘤、糖尿病、高血压病和哮喘等复杂性疾病的物质基础。本研究以维吾尔医学理论为指导,在建立大鼠异常黑胆质证载体动物模型的基础上用二乙基亚硝胺(DEN)诱导 11 周进一步建立异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化,采用 HE 染色光学显微镜观察下丘脑、垂体、肾上腺组织形态学的改变,透射电镜下观察其下丘脑、垂体、肾上腺细胞超微结构的变化,放射免疫法检测血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(CORT)。从 HPA 轴形态学和内分泌的改变分析异常黑胆质证对肝癌发生发展的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠 140 只,清洁级,雄性,体重(150±30) g,由新疆医科大学实验动物中心提供,许可证号: SCXK(新) 20032001。

1.2 主要仪器

RQH-350 型人工气候箱为上海精宏实验设备有限公司产品;JXDT-1 型小鼠跳台仪器为上海精宏实验设备有限公司;BS-1105 型电子天平为北京赛多利斯天平有限公司产品;JEM 100CX II 透射电镜为日本 LEIKA 公司产品。DM 2500 显微成像系统、LEICARM 2235 手动轮转式切片机为德国莱卡公司产品。BMJ-1 生物组织包埋机、TSJ-IA 自动组织脱水机、KZPJ-1A 生物组织摊烤片机为天津天利航空机电有限公司产品。低温超速离心机,美国 Beckman 公司产品。

1.3 试剂

戊二醛、二乙基亚硝胺(DEN),为 Sigma 公司产品;大鼠血清促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(CORT)放射免疫试剂盒,北京北方生物技术研究所以产品,按照试剂盒操作说明进行操作,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 方法

干寒属性饲料的制备在普通饲料中按每公斤 7:3 的比例加入相等比例的芫荽子和大麦,然后制成颗粒状干饲料,委托新疆维吾尔自治区医学试验动物中心加工。

动物分组及喂养:选取雄性 Wistar 大鼠 140 只,体重(150±30) g,稳定饲养 3 天后,分为:①实验组:按照文献^[3]建立维吾尔医学异常黑胆质证载体动物模型再分为:异常黑胆质证组 35 只,整个实验过程中均饮用灭菌食用水;异常黑胆质病证模型组 35 只(病证模型组),用灭菌食用水配制浓度 0.1mg/ml 的 DEN 溶液,

自由饮用,每天更换 1 次,连续饮用 11 周停药;②对照组:在室温下[温度(25±3) °C,相对湿度 60%~80%]用普通饲料饲养,随机饮食水,未受任何刺激,再分为:正常对照组 35 只,整个实验过程中均饮用灭菌食用水;对照肝癌组 35 只,用灭菌食用水配制浓度 0.1mg/ml 的 DEN 溶液,自由饮用,每天更换 1 次,连续饮用 11 周停药。正常对照组与模型组同样从 6:00AM 至 6:00PM 提供光线。

样品制备:各组动物分别在第 5、7、9 周麻醉状态下取血后颈椎脱臼处死 6 只并取组织标本,至 11 周后在麻醉状态下取血后颈椎脱臼处死所有动物,每组动物在同一部位取材,动物处死后,迅速取下丘脑、垂体、肾上腺等组织固定于 10%的甲醛溶液中,经 5d 固定后取材、石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜下观察。取出动物下丘脑、垂体、肾上腺等脏器,取体积小于 1mm³ 组织,用 4%戊二醛和 1%俄酸双固定,丙酮梯度脱水,Epon 812 环氧树脂包埋,超薄切片,铅铀染色。JEM 100CX II 透射电镜观察。

血清 ACTH 和 CORT 含量的测定:各组大鼠在麻醉状态下眼静脉采血,4°C 离心分离血清,分离血清放置在 -80°C 保存待测。采用大鼠 ACTH、CORT、放射免疫试剂盒进行测定。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件统计包处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用方差分析。

2 结果

2.1 光学显微镜观察下丘脑、垂体、肾上腺组织形态学的变化

下丘脑:正常对照组个别标本中有轻微的星形胶质细胞水肿,间质血管无异常;对照肝癌组星形胶质细胞轻度肿胀、增生,中度间质血管扩张;异常黑胆质证组可见星形胶质细胞轻度水肿、增殖,轻度间质血管扩张;病证模型组星形胶质细胞中、重度水肿、增殖,重度间质血管扩张。

垂体:正常对照组远侧部垂体细胞分布均匀,数量正常,间质血管无异常;对照肝癌组远侧部细胞轻度增殖;异常黑胆质证组远侧部垂体嗜酸性细胞数量较多,嫌色细胞数量少,细胞轻微增殖;病证模型组远侧部垂体嗜碱性细胞数量较多,细胞重度增殖。

肾上腺:正常对照组皮质髓质界限清楚,髓质细胞排列成团、成索,球状带、束状带、网状带细胞排列均匀;对照肝癌组皮质水肿,髓质轻度增生,网状带轻度增生;异常黑胆质证组皮质增生,细胞密度增高,网状

带中度增生,髓质重度增生;病证模型组皮质增生变厚,网状带增生,细胞轻度异形,部分区域成巢状或团块状。

2.2 透射电镜观察其下丘脑、垂体、肾上腺细胞超微结构的变化

下丘脑:正常对照组胶质细胞结构基本正常,细胞圆,异染色质多成团块,胞质基质、细胞器分布均匀;神经元结构正常,神经元核仁居中,胞核大而圆,常染色质多,胞质基质密度均匀一致无空泡结构,细胞器多,核糖体和内质网较丰富,可见少量的溶酶体和高尔基复合体,线粒体基质密度均匀,核仁清晰居中,核膜完整;神经细胞突触多,突触前部有明显的分泌小泡。对照肝癌组胶质细胞轻微水肿,核圆,染色质较粗,细胞基质密度降低,细胞器排列松散,线粒体畸形,核糖体和内质网略减少,可见少量的溶酶体;神经元细胞核胞核大,核基质密度降低并出现空泡,核形规则,可见异染色质。异常黑胆质证组胶质细胞轻度水肿,核圆,染色质粗,细胞基质密度降低,有明显的空泡结构,细胞器排列松散,线粒体空泡变,核糖体和内质网减少,可见少量的溶酶体;神经元细胞核胞核大,核仁边集,核基质密度降低并出现空泡,核形轻微不规则,异染色质较多。突触前膜基质密度降低,神经递质小泡减少。病证模型组胶质细胞核周隙增宽,细胞基质密度降低,有明显的空泡结构,细胞器排列松散,线粒体空泡变,内质网普遍扩张,可见脂褐素(老化);神经元核形不规则,线粒体基质密度明显降低,排列松散,神经元纤维排列紊乱。

垂体:正常对照组垂体分泌细胞胞质密度均匀一致无空泡结构,可见大小不等的分泌颗粒,核糖体和内质网较丰富,线粒体基质密度均匀,胞核大而圆,染色质分布均匀,核仁清晰居中,核膜完整;对照肝癌组:垂体分泌细胞内大小不等内分泌颗粒,核糖体和内质网较丰富,内质网轻微扩张、线粒体嵴断裂、基质空泡化,异染色质增多;异常黑胆质证组:垂体分泌细胞内大小不等内分泌颗粒,内质网轻微扩张、线粒体嵴断裂、基质空泡化、细胞核变形、核异染色质成团块并有边集现象;病证模型组:垂体分泌细胞胞质密度降低、可见线粒体空泡变,细胞内分泌颗粒较多,内质网普遍扩张,异染色质多成团块、边集。

肾上腺:正常对照组腺上皮细胞界限清楚、核形态完整、结构清晰、染色质均匀一致、细胞器结构正常;对照肝癌组肾上腺腺上皮细胞,细胞内含有少量高密度的圆形线粒体、嵴稀疏、线粒体周围间隙略窄;异常黑

胆质证组:肾上腺上皮细胞,脂滴增多、脂滴呈空泡状。细胞内含有大量密度较高的圆形线粒体、嵴为管状、线粒体周围有明显的间隙;病证模型组肾上腺腺上皮细胞线粒体水肿,周围间隙明显,核周隙增宽,线粒体嵴稀疏且呈管状,内质网普遍扩张。

2.3 各组大鼠血清 ACTH 和 CORT 含量的比较

表 1 示,与正常对照组相比,对照肝癌组、异常黑胆质证组和病证模型组的 ACTH、CORT 均高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且异常黑胆质证组、病证模型组与对照肝癌组比较均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 异常黑胆质载体肝癌动物模型血浆 ACTH 和 CORT 含量的变化($\text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	ACTH	CORT
正常对照组	10	2.60 ± 2.40	4.93 ± 1.49
对照肝癌组	16	$12.28 \pm 9.96^{**}$	$11.51 \pm 6.23^{***}$
异常黑胆质证组	10	$30.69 \pm 9.05^{**\triangle\triangle}$	$8.80 \pm 1.81^{*}$
病证模型组	8	$21.06 \pm 9.09^{**\triangle\triangle}$	$9.28 \pm 3.17^{*}$

注:与正常对照组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与对照肝癌组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$

3 讨论

在维吾尔医学理论中,正常黑胆质的主要生理功能是参与感觉、情绪、思维、记忆等神经系统活动。研究发现^[4],异常黑胆质症患者出现体形消瘦、情绪焦虑、易怒易惊、健忘失眠等症状与HPAA 功能失调引起的认知、行为、感情等脑功能紊乱症状相一致。在维医恶性肿瘤的分型中异常黑胆质型最为常见,异常黑胆质型肿瘤患者的内分泌免疫网络紊乱,而且比非异常黑胆质型肿瘤严重。本研究的光镜和电镜结果表明,对照肝癌组、异常黑胆质证组和病证模型组与正常对照组比较,下丘脑、垂体、肾上腺均有不同程度的改变,其中病证模型组较对照肝癌组的改变更显著,异常黑胆质证组与对照组相比也有一定的差异,病证模型组相对于异常黑胆质证组其HPAA 组织形态学改变加重。由此表明,异常黑胆质证模型中的动物本质上是处于间断应激状态,应激时通过激素和细胞因子可能影响HPAA 的组织细胞结构而引起其功能的紊乱,异常黑胆质体液也通过影响机体HPAA 的结构和功能促进肝癌的发生、发展;反过来,肝癌又使HPAA 的功能紊乱加重异常黑胆质证,形成恶性循环。由于HPAA 的活性最终由血中的ACTH 和CORT 的水平评价,因此,异常黑胆质体液作为慢性应激刺激源可能在垂体水平抑制HPAA 的活性,同时肝癌与异常黑胆质叠加

后可能会进一步抑制HPAA 的活性。

本研究结果表明,异常黑胆质证能促进大鼠诱发肝癌的发生、发展,反过来,肝癌的发生又通过促进HPAA 功能的紊乱加重异常黑胆质证,因此HPAA 功能紊乱可能是使异常黑胆质生成及其导致复杂性疾病的根本所在。异常黑胆质体液促进大鼠肝癌的发生和发展,其机制可能与HPAA 的形态学改变和功能紊乱有关,表现为反映HPAA 功能的激素ACTH 和CORT 水平的变化。

参考文献

[1]哈木拉提·吾甫尔·维吾尔医气质、体液论及其现代研究[M]·乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2003:34-37.
[2]张莉,哈木拉提·吾甫尔,战秀华,等.恶性肿瘤患者神经-

内分泌-免疫网络有关指标的紊乱及其临床意义[J].中国免疫学杂志,2008,24(1):65-70.

[3]张有辉,哈木拉提·吾甫尔,玉苏甫·吐尔逊,等.异常黑胆质证载体大鼠模型的建立及其免疫、内分泌紊乱状态的研究[J].新疆医科大学报,2010,33(6):596-600.
[4]胡汉华,哈木拉提·吾甫尔,努尔买买提,等.异常黑胆质载体动物模型的下丘脑-垂体-肾上腺轴组织超微结构的改变[J].中国中医基础医学杂志,2007,13(11):872-829.

基金项目:国家杰出青年科学基金项目(30525023)

- 1 新疆医科大学基础医学院(830011);
- 2 新疆医科大学维吾尔医药系;
- 3 新疆医科大学国际教育学院;
- 4 新疆医科大学药学院

泄浊解毒方对溃疡性结肠炎大鼠TLR4 基因及蛋白表达的影响

刘建平¹ 荣英蕊² 郎晓猛² 周宏伟²

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis,UC)是以腹痛、腹泻、黏液脓血便以及里急后重为主要症状,以结肠黏膜炎症和溃疡形成为主要病理特点的一种肠道疾病。我们在多年治疗溃疡性结肠炎的临床实践中,总结出“泄浊升清,解毒祛瘀”之泄浊解毒方,临床疗效肯定。现复制UC 大鼠模型,观察泄浊解毒方对UC 大鼠结肠Toll 样受体4(TLR4)蛋白及基因表达的影响,以期深入探讨本方治疗UC 可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级Wistar 大鼠45 只,体重220~250g,雄性,动物等级:一级。由河北医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:905013。

1.2 实验药物与试剂

药物:泄浊解毒方(鱼腥草、红藤、败酱草、半夏、黄连、黄芩、葛根、薏苡仁、车前子、木香)为中药复方,每毫升含生药2.0g,由河北省中医院制剂室提供,4℃冰箱保存备用。泄浊解毒方小剂量组、大剂量组分别按10.0g/kg、20.0g/kg 灌胃给药,约相当于临床成人日用量的7 倍、14 倍,柳氮磺胺吡啶片(sulfasalazine tablets,SASP),规格:250mg/片,上海三维制药有限公司生产,批号:200807C04。将片剂溶于蒸馏水中,按0.3g/kg 体重灌胃给药。

(Sigma); DEPC (Sigma); RT Reagents, PCR Reagents, DNA Marker (TaKaRa); Trizol (Nvirogen);一抗TLR4(北京博奥森生物工程开发有限公司);SP 免疫组化染色试剂盒(北京博奥森生物工程开发有限公司);DAB 染色试剂盒(北京博奥森生物工程开发有限公司)。

1.3 造模及给药

随机抽取8 只大鼠作为空白组,其余大鼠参照江学良等^[1]复制溃疡性结肠炎动物模型:大鼠适应性饲养1 周,禁食不禁水24h,乙醚麻醉后置于仰卧位,四肢固定于鼠台上,将直径约2mm 的硅胶管插入大鼠肛门至结肠约8cm 处,推入含TNBS 100mg/kg 的30%乙醇溶液,捏紧肛门保留15min 左右,清醒后自由饮食。3 天后,随机抽取5 只造模大鼠处死,取其结肠标本,病理检查确认有充血、水肿及典型溃疡形成等一系列病理变化即为造模成功。将剩余造模大鼠随机分为模型组、柳氮磺胺吡啶组、泄浊解毒方小剂量组、泄浊解毒方大剂量组4 组,每组8 只。造模后第4 天,空白组、模型组每天予生理盐水10ml/kg 灌胃;柳氮磺胺吡啶组、泄浊解毒方小剂量组、泄浊解毒方大剂量组分别给予柳氮磺胺吡啶液0.3g/kg、泄浊解毒方水煎剂10.0g/kg、泄浊解毒方水煎剂20.0g/kg 灌胃,每日1 次,连续2 周。

1.4 标本留取

试剂:三硝基苯磺酸(美国Sigma 公司);TNBS