

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。

试剂:三硝基苯磺酸(美国Sigma 公司);TNBS

(Sigma);DEPC(Sigma);RT Reagents,PCR Reagents,DNA Marker(TaKaRa);Trizol(Nvitrogen);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

经腹腔麻醉大鼠,在动物解剖台上固定,解剖大鼠沿矢状线正中切开,留取距肛门以上8cm处结肠标本,沿肠系膜缘剪开肠腔,用冷生理盐水冲洗肠内容物,迅速取部分结肠组织置于 -70°C 液氮罐中,留做TLR4 mRNA,另取部分结肠组织做免疫组化。

1.5 TLR4 免疫组化检测

操作按照SP免疫组化染色试剂盒说明书进行,在光镜下细胞浆和细胞核内出现棕黄色颗粒细胞为TLR4阳性细胞。采用以下判断标准^[2]:在40倍高倍镜下选取典型视野计数100个细胞,其中阳性细胞数作为TLR4计数值,以百分率表示。

1.6 TLR4 mRNA 的测定

采用RT-PCR方法检测,取结肠组织约100mg以Trizol法提取总RNA。取总RNA $2\mu\text{g}$,于PCR仪 42°C 30min(cDNA合成), 99°C 5min(逆转录酶失活), 5°C 5min, -20°C 保存备用。PCR扩增引物:由北京塞百盛基因技术有限公司合成,RatTLR4退火温度为 55°C ,上游引物5'-GTGGGTCAAGGACCAGAAAA-3',下游引物5'-GAAACTGCCATGTCTGAGCA-3'扩增片段为526bp;RatGAPDH退火温度为 52°C ,上游引物5'-CACCATGGAGAAGGCCGGGG-3',下游引物5'-GACGGACACATTGGGGGTAG-3'扩增片段为408bp。以DNA Marker(DL2000)作为标准分子量标记,应用法国VL公司BIO-PROFIF凝胶图象分析系统对目的电泳条带进行分析,以相应的内参电泳条带作为参照,结果以两者之积分吸光度的比值表示。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计学处理,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数的比较采用单因素方差分析,用最小显著差法(LSD)作两两比较。

2 结果

2.1 各组大鼠TLR4免疫组化结果

各组大鼠结肠TLR4蛋白水平的表达分别为:空白组(13.500 ± 2.449)%,模型组(57.250 ± 4.166)%,柳氮磺胺吡啶组(37.125 ± 3.227)%,泄浊解毒方小剂量组(35.375 ± 3.623)%,泄浊解毒方大剂量组(17.625 ± 2.066)%。与空白组相比,模型组TLR4蛋白水平的表达升高,有统计学差异($P < 0.01$)。与模型组相比,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TLR4蛋白水平的表达降低,均有统计学差异($P < 0.01$)。与柳氮磺胺吡啶组相比,泄浊解毒方大剂量组TLR4蛋白水平的表达明显降低,有统

计学差异($P < 0.01$);泄浊解毒方小剂量组无统计学差异($P > 0.05$)。泄浊解毒方大剂量组TLR4蛋白水平的表达低于泄浊解毒方小剂量组,有统计学差异($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠TLR4 mRNA 的表达的比较

各组大鼠结肠TLR4 mRNA的表达分别为:空白组(0.181 ± 0.016),模型组(0.519 ± 0.043),柳氮磺胺吡啶组(0.316 ± 0.016),泄浊解毒方小剂量组(0.343 ± 0.028),泄浊解毒方大剂量组(0.149 ± 0.037)。与空白组相比,模型组TLR4 mRNA表达升高,有统计学差异($P < 0.01$)。与模型组相比,柳氮磺胺吡啶组、泄浊解毒方各组TLR4 mRNA表达均降低,有统计学差异($P < 0.01$)。与柳氮磺胺吡啶组相比,泄浊解毒方大剂量组TLR4 mRNA的表达明显降低,有统计学差异($P < 0.01$);泄浊解毒方小剂量组无统计学差异($P > 0.05$)。泄浊解毒方大剂量组TLR4蛋白水平的表达低于泄浊解毒方小剂量组,有统计学差异($P < 0.01$)。

3 讨论

Jnaeway等^[3]发现了第一个存在于人细胞表面的Toll样受体,命名为TLR4。TLR4为细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)特异性受体,具有防御革兰氏阴性菌感染的作用。LPS是革兰氏阴性菌的内毒素成分,在感染、过敏性等疾病中起重要作用。肠道菌群大部分为革兰氏阴性菌,有大量LPS位于肠腔,故TLR4的表达及功能在肠道微环境平衡的维持中起重要作用。本次研究显示,UC大鼠模型组TLR4 mRNA及TLR4蛋白表达均较空白组明显增强,提示TLR4大量表达在UC的发病中发挥一定的作用。UC可能源于肠上皮TLR4表达失控,启动天然免疫系统对肠腔内细菌产物脂多糖反应的过度激活,通过TLR4/NF- κB 通路释放多种促炎因子,产生异常的免疫炎症反应,导致溃疡性结肠炎的发病。

我们经过长期观察,提出UC“浊毒”致病理论:浊毒既是一种对机体造成严重损害的致病因素,同时也是多种原因导致脏腑功能紊乱、气血运行失常,代谢产物不能及时正常排出,蕴积体内而化生的病理产物。浊毒壅滞气血,肠道脂膜血络受损,血败肉腐,壅滞成脓,肠道传导失司形成本病。泄浊解毒方中鱼腥草、车前子散热毒除湿浊为君;红藤、败酱草、半夏、黄连、黄芩清热利湿、祛瘀解毒为臣;葛根止泻升阳,薏苡仁健脾利湿、清热排脓共为佐药;木香理气止痛为使药。诸药合用化湿浊,解瘀毒,共奏泄浊升清、解毒祛瘀之功。经泄浊解毒方治疗后,TLR4 mRNA及TLR4蛋白水平的

表达明显低于模型组,说明泄浊解毒方可能通过降低 TLR4 mRNA 转录水平,调控 TLR4 蛋白的表达量,发挥抑制 TLR4 合成的作用,使 TLR4 在蛋白水平的表达减少,进而抑制免疫系统的过度激活,阻断 TLR4/NF- κ B 信号通路的转导,减少促炎因子的释放,抑制肠道过度亢进的免疫炎症反应。TLR4 在炎症性疾病的发生发展中起着重要作用,作为炎症反应链的启动蛋白,从源头为 UC 发病机制的研究提供了新的方向,可作为继续深入研究的切入点之一。

参考文献

[1]江学良.复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型[J].青海医学

院学报,1999,20(4):1-3.

[2]范值,段曾云,庄雄,等.乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 NF- κ B⁶⁵ 的影响[J].世界华人消化杂志,2008,16(8):896-899.

[3]Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388 (6640):394-397.

基金项目:国家中医药管理局重点研究室资助项目(ZD200812-12)

1 河北省中医院(050011);

2 河北医科大学研究生学院

脉平片对动脉粥样硬化模型家兔血脂及易损斑块的影响

阎 露*

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一组称为动脉硬化的血管病中常见而最重要的一种。损伤学说认为各种因素对动脉内皮的损伤,导致动脉壁的慢性炎症反应,逐渐形成粥样斑块^[1]。本次实验旨在前期实验基础上,深入研究脉平片调脂及稳定易损斑块的药理学基础,进一步为临床安全合理用药提供实验依据。

1 实验材料

1.1 动物

健康日本大耳家兔,雄性,体重(2.2±0.5)kg。普通饲料适应性喂养。

1.2 药物与试剂

脉平片(甘肃独一味生物制药股份有限公司生产),临用前用生理盐水配制成一定浓度脉平片水溶液;斑点蝥蛇毒(CRVV):广州蛇毒研究所;组胺:美国 Sigma 公司。高脂饲料:4%胆固醇,10%猪油,0.2%甲基硫氧嘧啶,86%~89%基础饲料。

1.3 仪器

Philip Sonos7500 型超声显像仪:飞利浦公司生产,线阵探头频率为 4~10MHz。

2 方法

2.1 建立兔 AS 模型^[2]

健康日本大耳家兔 55 只,预先在实验条件下用普通饲料喂养,观察 7 日,耳中动脉取血,离出血清,分别测定各项血脂指标的正常值,不合格家兔弃掉。筛选符合实验要求的 40 只日本大耳白家兔给予球囊损伤腹主动脉+高脂饲料喂养 10 周。耳缘静脉注射 3%戊巴

比妥钠 30mg/kg 麻醉成功后,穿刺右股动脉,将内径 3.5mm、长 15mm 的球囊导管送入降主动脉约 20cm,8 个大气压充盈球囊后回拉至髂动脉,反复回拉 3 次以造成内膜损伤。

2.2 药物干预

将已建立 AS 模型家兔随机分为 4 组,即空白对照组、自行恢复组、脉平片组、通心络组,每组 10 只。空白对照组和自行恢复组给予普通饲料,脉平片组给予高脂饲料+脉平片 1.2g/kg,通心络组给予高脂饲料+通心络胶囊 1.2g/kg,4 组家兔自由饮水,连续 12 周。

2.3 药物触发

12 周成模后参考 Constantinides 等人的方法对实验兔进行药物触发^[3],即中国斑点蝥蛇毒(CRVV) 0.15/mg/kg 腹膜下注射,30min 后耳缘静脉注射组胺 0.02mg/kg,于处死动物前 24h 和 48h 分别予两次药物触发斑块破裂。末次触发 24h 后处死所有家兔,进行相关药理学研究。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 脉平片对血脂的影响 所有 AS 模型家兔处死前禁食 12h,经耳缘静脉取血,采用标准酶学法检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。

2.4.2 脉平片对 AS 模型家兔斑块易损性的体表超声检查 于药物触发后开始 AS 家兔腹主动脉体表超声检查,测量腹主动脉内中膜厚度(IMT)、内膜回声强度(AⅠ-Ⅰ)、外膜回声强度(AⅡ-A),应用公式 A