

● 论著 ●

TGF- β 1 与溃疡性结肠炎的相关性研究*

胥靖域 顾三元 王菊 王宝家 唐红屈

(成都中医药大学 四川成都 610075)

摘要:目的:通过研究转化生长因子- β 1(Transforming Growth Factor- β 1,TGF- β 1)在溃疡性结肠炎大鼠模型中的表达情况,探索 TGF- β 1 在溃疡性结肠炎发病过程中的作用。方法:70 只 SD 大鼠按体重随机分为空白对照组 30 只和模型组 40 只,RNBS 灌肠法复制大鼠溃疡性结肠炎模型,分别在第 8、29、50 天每组处死 10 只大鼠,取结肠组织,采用 HE 染色,光镜下观察组织形态学的变化,免疫组化测定结肠组织 TGF- β 1 的表达。结果:光镜下模型组大鼠结肠黏膜上皮细胞萎缩、脱落,组织结构破坏不完整,黏膜上皮炎症细胞浸润,部分可见黏膜表面糜烂、小溃疡形成,纤维结缔组织增生。模型组大鼠结肠组织 TGF- β 1 表达在第 8、29、50 天均明显高于空白对照组($P<0.05$)。结论:转化生长因子- β 1 在溃疡性结肠炎的发生发展过程中起着重要的作用,TGF- β 1 的表达与疾病的严重程度密切相关。

关键词:TGF- β 1;HE 染色;溃疡性结肠炎

Abstract: Objective: To explore the function of Transforming Growth Factor - β 1 (TGF- β 1) on ulcerative colitis in rats model, researching the expression of TGF- β 1 of ulcerative colitis rats model. Methods: To replicate ulcerative colitis model of rats which were randomly divided into blank control group and model group according to the weight. There were 30 rats in blank group and 40 rats in model group. We executed 10 rats each time to get the colon respectively on the 8th, 29th, 50th day in each group, using HE staining and light microscope to observe histomorphology change, immunohistochemical determination of colon tissue, expression of TGF- β 1, and carries on the quantitative analysis using image analyzer. Results: The TGF- β 1 of the model group on the 8th, 29th, 50th day were significantly higher than that of control group. And most of colon tissue had obvious deformation and necrosis. Conclusion: TGF- β 1 takes important function in the onset and development of ulcerative colitis. It is closely related with the severity of disease and can provide more scientific basis for the diagnosis and treatment of ulcerative colitis.

Key words: TGF- β 1; HE staining; Ulcerative colitis

中图分类号: R574.62

文献标识码: B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2013.07.001

溃疡性结肠炎(UC)是一种病因复杂、病程较长、复发率很高的直肠和结肠慢性特异性疾病。在我国,这种病的发病率有着逐年上升的趋势,其临床的表现也是多种多样,主要表现为腹泻或伴有黏液性脓血便,部分可见大量鲜血便,目前该病的病因及发病机制尚不完全清楚,也无有效的治疗手段,患病率和死亡率有逐年升高的趋势,故成为国内外学者研究的热点之一。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)最早由 Roberts 等^[1]从小鼠的肉瘤细胞中分离得到,是由二硫键相连形成的一种同源二聚体多肽分子,分子量 25 kDa。TGF- β 是生长因子超家族中具有免疫负调控功能的一大类细胞因子家族。现已知,几乎体内所有的细胞均可分泌 TGF- β 并对 TGF- β 产生反应^[2]; TGF- β 超家族成员可调节多种细胞功能,包括细胞的生长、黏附、迁移、分化和凋亡,并在调节炎症反应、伤口愈合、免疫稳态及免疫耐受中发挥重要作用^[3]。其广泛分布在肠道中,可由肠上皮细胞、成纤维细胞及免疫 T 细胞等细胞合成和分泌,属于多肽类调节蛋白,其中的 TGF- β 1 所占比例最高,活性最强,功能最多,被广泛运用于临床和实验研究中,不仅能够抑制上皮细胞的生长,而且能够促进细胞的凋亡,在多种疾病的发生、发展中都起着重要的作用。本研究通过动物实验探讨

TGF- β 1 与溃疡性结肠炎的相关性。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 70 只 SD 雄性大鼠 SPF 级,体重(200 \pm 20)g,均购自成都达硕生物科技有限公司[动物的合格证号:scxk(川)2008-24],各组均给予普通饲料进行喂养,观察一般状态。

1.1.2 试剂与药品 三硝基苯磺酸(TNBS)、水合氯醛:江苏省昆山市石黄浦年沙助剂厂,批号:090129;生理盐水:四川科伦药业股份有限公司,批号:国药(准)字 H51021158;无水乙醇等。

1.1.3 实验仪器与设备 ACS-3C 型电子天平(广州)、称重天平、电动玻璃匀浆机、-85℃冰箱、高速低温离心机、Thermo Finn pipette 移液器、远红外快速恒温干燥箱、酶标定量测定仪等。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型制作及分组 取体重 180~220 g 健康 SD 大鼠,雄性,共 70 只。按体重随机分成空白对照(30 只)、模型组(40 只)(注:由于炎症性肠炎模型在造模过程中容易出现动物死亡的情况,故模型组 40 只,空白组 30 只),所有大鼠常规适应性饲养 1 周后,模型组构建 TNBS 诱导溃疡性结肠炎模型:大鼠以 2.4%水合氯 0.8~1.0 mL/100 g 腹腔注射麻醉后,在石蜡油润滑下,经肠道轻柔插

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划("973"计划)资助项目
(NO:2009CB522706)

• 2 •

入输液管至距肛 8 cm 处,将 100 mg/kg TNBS 加入等体积 50%乙醇,注入大鼠结肠,然后注入约 0.5 mL 空气,将大鼠头向下倾斜 45° 放置 1 min,然后保持平躺自然清醒。空白对照组大鼠按上述方法给予等量生理盐水灌肠。造模 3 d 后从模型组随机抽取 2 只大鼠,取结肠组织,做普通光镜下病理形态学观察,确定模型是否复制成功。于首次造模后每 7 天按上述方法和剂量对模型组大鼠重复给药,持续至第 7 周;空白对照组大鼠按上述方法给予等量生理盐水灌肠。分别在造模第 8、29、50 天随机抽取空白对照组和模型组大鼠各 10 只,取标本测定相应指标。

1.2.2 电镜观察大鼠肠组织病理学的改变 在造模第 8、29、50 天分别随机抽取空白对照组和模型组大鼠各 10 只,取结肠组织,FAA 液固定 48 h,逐级酒精脱水,二甲苯透明、浸腊,石蜡包埋,常规切片 4 μm ,HE 染色。在 Mias-2000 图形分析系统(四川大学图像图形研究所)下定量观察肠病状态结肠组织的病理变化。

1.2.3 电镜观察大鼠肠组织超微结构变化 采用日立 H7650 型透射电镜,由华西医院一位电镜室专家进行双盲读片,主要观察结肠组织细胞超微结构(包括各种细胞器形态、数量,细胞内容物含量、分布等),结肠绒毛形态、数量、结构,细胞间连接,炎细胞浸润情况等。

1.2.4 免疫组化测定结肠组织 TGF- β 1 免疫组化的染色步骤为:石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,10%正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,滴加稀释的一抗(稀释倍数 1:100),PBS 冲洗,滴加生物素标记二抗工作液,PBS 冲洗,DAB 显色剂显色,自来水充分冲洗,复染,封片。免疫组化实验步骤按试剂盒说明书进行,采用生物学图像分析测量切片 TGF- β 1 的平均灰度值。

1.3 数据分析与统计方法 所有指标采用 SPSS19.0 统计软件进行处理,结果用均数 \pm 标准差($\bar{X}\pm S$)表示,各组间比较用 t 检验,两变量的相关采用直线相关法分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 结肠组织肉眼及光镜观察结果 肉眼观察造模后第 8 天胃肠组织未见明显异常变化,第 29 天肉眼观察模型组大鼠部分肠组织有胀气,剖开后部分肠黏膜可见小结节,第 50 天肉眼观察部分肠组织胀气,肠黏膜见较多结节。光镜观察可见造模第 8 天后 2 只大鼠出现少部分结肠组织病变,局限性病

灶,肠壁上皮细胞变性、坏死,伴有炎症细胞浸润,部分表现可见灶性糜烂,肠壁残存上皮细胞,第 29 天后 7 只大鼠结肠组织出现病理改变,主要表现为多处小灶性浅表性糜烂,局部灶性上皮细胞变性、坏死,出现慢性炎细胞浸润,第 50 天后结肠组织全部出现病理改变,上皮细胞出现缺损,腺细胞排列紊乱,主要表现为多小灶性糜烂,伴有隐窝小脓肿,部分灶性上皮细胞变性坏死,小灶性糜烂,组织内纤维结构紊乱。

2.2 结肠组织电镜观察结果 电镜下模型组大鼠结肠组织黏膜上皮表面的微绒毛排列散乱,长短粗细不一致,上皮细胞间连接松散,细胞间隙增宽,胞浆分布不均,细胞核异形分裂、溶解,线粒体肿胀、部分嵴消失、空泡样变,内质网扩张,腺体萎缩,杯状细胞减少,固有层间隙胶原纤维增生,见成纤维母细胞,大量炎细胞浸润。空白组大鼠结肠组织细胞排列整齐,上皮完整,线粒体无肿胀,细胞增生不明显。

2.3 模型组与空白组大鼠结肠组织中 TGF- β 1 的比较 模型组大鼠结肠组织 TGF- β 1 表达在第 8、29、50 天较空白组明显升高($P<0.05$)。见表 1。结果显示转化生长因子 - β 1 在溃疡性结肠炎的发生、发展过程中起着重要的作用,并且 TGF- β 1 的表达与疾病的严重程度密切相关,为溃疡性结肠炎的早期诊断和治疗提供了更加科学的依据。

表 1 肠组织转化生长因子表达结果比较 ($\bar{X}\pm S$) IOD

组别	n	第 8 天	第 29 天	第 50 天
空白组	10	19152.21 \pm 6486.72	17237.25 \pm 5393.40	16757.23 \pm 3563.12
模型组	10	25491.80 \pm 4214.44 ^a	25096.65 \pm 4532.32 ^a	26007.08 \pm 4398.36 ^a

注:与空白组比较,^a $P<0.05$ 、[▲] $P<0.01$ 。

3 讨论

目前对于溃疡性结肠炎的发病机制仍在不断地探索中,国内和国外的学者也做出了不懈地努力,大多数的研究认为这是由内因和外因共同作用才导致溃疡性结肠炎,主要为以下三个因素:基因因素、机体不适当的免疫反应、环境影响,这是一种单基因或多基因的疾病。环境中的某些触发因子可能会引起一系列的反应最后导致该病的发生,从而激活人体的免疫系统,免疫系统对病原物进行清除,这即是炎症的开始。过度的炎症反应或者是机体的免疫系统进行反复攻击继而破坏结肠黏膜并引起溃疡性结肠炎的相关症状。目前对于溃疡性结肠炎的早期诊断治疗方法很有限。

TGF- β 1 是一种多功能细胞因子,在多种细胞和组织中参与控制细胞周期,调节细胞生长发育、细胞分化、基质形成、化学趋化性、免疫功能及介导

推拿结合耳穴压贴治疗青少年假性近视的临床观察

陈松 齐凤军 刘建民 樊云 刘溪泉

(湖北中医药大学推拿教研室 武汉 430061)

摘要:目的:探讨推拿结合耳穴压贴治疗假性近视的临床疗效。方法:对 68 例(患眼 110 只)青少年假性近视眼患者采用推拿结合耳穴压贴疗法,以远视力作为观测指标,观察其疗效并统计结果。结果:经治疗 4 周后,治疗总有效率为 90.9%。其治疗效果与年龄、病情严重程度相关,年龄越小、程度越轻,其治疗效果越好。结论:推拿结合耳穴压贴是治疗青少年假性近视的有效方法。

关键词:推拿;耳穴;青少年假性近视

Abstract: Objective: To observe the effects of massage treatment and auricular plaster therapy for treatment adolescent pseudomyopia. Methods: The 68 cases of adolescent pseudomyopia patients were treated by the massage treatment and auricular plaster therapy with 110 eyes. Results: After 4 weeks, There were 100 eyes cured, cure rate was 90.9%. Conclusion: The effect is related to age, disease severity. the smaller age and the lighter degree, the better results.

Key words: Massage treatment; Auricular plaster therapy; Adolescent pseudomyopia

中图分类号:R245.9

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2013.07.002

假性近视又称调节性近视,临床表现为视远物模糊,视力低于正常值,经休息调理和使用麻痹剂松弛调节后,视力可达到正常值者,排除眼部器质性病变和药物影响造成的近视^[1],属于中医“能近怯远症、近视”范畴。假性近视在青少年中常见,且其发病率有逐年增高的趋势。全国学生体质健康调研表明^[2-3]:近 20 年来,我国青少年学生近视发病率不断攀高,其中 2005 年高三学生的视力不良率达 85.7%,近视占视力不良的 98%以上。而视力不良率上升最快时期在 13~16 岁年龄段,此时如假性近视的发生率未能得到有效控制,一旦眼睛的解剖结构发生变化,如眼轴变长,视力将不可逆转。笔者 2012 年 6 月~2013 年 5 月于湖北中医药大学附属门诊部收治青少年假性近视患者 68 例,患眼 110 只,取得满意疗效。现报道如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料 本组 68 例均为门诊患者,其中男性 29 例,女性 39 例,年龄 7~15 岁,平均 12.5 岁,病程 3 个月~5 年。治疗前裸眼视力 4.6 以下者 51 眼,4.6 以上者 59 眼。

1.2 诊断标准 根据中华医学会眼科分会 1985

细胞凋亡,随着研究的不断深入,越来越多的学者已经认识到 TGF- β 在整个溃疡性结肠炎的形成和发生过程中居于中心的位置。TGF- β 受到炎症因子的刺激,与肠纤维化有着协同的作用,TGF- β 对于肠道纤维化的直接作用就是激活了间质细胞,增强其分泌胶原,增值和聚集的功能,TGF- β 表皮生长因子的失衡会导致 TGF- β 1 的大量的表达,导致了结肠的上皮损伤与异常的修复,肌成纤维细胞增生及基膜下纤维化,最终会造成溃疡性结肠炎的发生。

本研究初步证实:TGF- β 1 与溃疡性结肠炎的

年眼屈光学组全国第一届眼屈光学术交流会议制定的真、假性近视与混合性近视定义与分类标准确定^[4]:即患者远视力低于正常,近视力正常,使用阿托品麻痹睫状肌后,近视消失,呈现正视或轻度远视为假性近视;近视屈光度数未降低或降低度数小于 0.50 D 者为真性近视;近视屈光度明显降低(\geq 0.50 D),但未恢复为正视者为混合性近视。纳入标准:(1)符合上述诊断的假性近视(远视力 $<$ 5.00 D,近视力正常);(2)年龄 7~15 岁;(3)能够坚持治疗 2 个疗程的患者作为观察对象。排除标准:(1)不符合诊断标准;(2)有散光且散光 $>$ 0.50 D 者;(3)同期采用其他疗法或未按规定时间治疗以至影响疗效判断者;(4)严格排除眼压过低、眼内肿瘤、青光眼、葡萄膜炎、视网膜色素变性、视网膜脱离等影响视网膜功能的近视眼患者,排除恶性高度近视、病理性近视及全身其他严重器质性病变者。

1.3 治疗方法

1.3.1 耳穴贴压 主穴:屏间前(TG21)、额(AT1)、眼(CO5)、神门(TF4)、枕(AT3)、颈(AH13);配穴:心(CO15)、脾(CO13)、肝(CO12)、肾(CO10)、胃(CO4)。

操作原则:每次治疗时主穴必选,同时依中医辨证发生、形成有一定的相关性,为进一步探讨 TGF- β 1 导致溃疡性结肠炎的机制提供了部分实验研究依据。

参考文献

- [1]Roberts AB,Lamb LC,Newton DL,et al.Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction [J].Proc Natl Acad Sci USA,1980,77(6):3 494-3 498
- [2]Taylor AW.Review of the activation of TGF - β in immunity[J].J Leukoc Biol,2009,85(1):29-33
- [3]秦庆华,姚咏明.转化生长因子 β 信号通路研究进展[J].医学研究杂志,2012,41(10):5-9

(收稿日期:2013-05-31)