

Hp(+)者 7 例, Hp 清除率为 82.5%: 治疗组 Hp 清除率明显低于对照组, 两组比较有显著性差异 (P<0.05)。见表 2。

表 2 两组治疗后 Hp 清除率比较[例(%)]

组别	n	Hp(-)	Hp(+)
治疗组	40	37(92.5)*	3(7.5)*
对照组	40	33(82.5)	7(17.5)

注: 与对照组比较, *P<0.05。

2.3 两组安全性比较 两组患者治疗前后血常规、肝功能、肾功能比较, 均无显著性差异, 用药期间未见明显不良反应出现。

3 讨论

胃溃疡是临床常见疾病, 现代医学研究证明, 幽门螺旋杆菌和非甾体抗炎药是损害胃、十二指肠黏膜屏障从而导致消化性溃疡发病的最常见病因, 同时遗传因素、环境因素以及其他疾病也会影响胃溃疡的发病。兰索拉唑是一种高效抑制胃酸分泌的新型质子泵抑制剂, 抑酸作用强, 从而阻止胃酸对胃黏膜的损伤。同时, 该品对 Hp 也有抑制作用。阿莫西林 + 甲硝唑通过杀死 Hp, 从而减少 Hp 对胃黏膜的破坏。有报道显示^[2]: 标准三联疗法与四联疗法对 Hp 的根除率正在不断下降, 一线方案标准三联疗法的 Hp 根除率已降至 70%左右, 二线方案四联疗法

为 80%左右。

健胃愈疡片主要适用于肝郁脾虚、肝胃不和型消化性溃疡活动期, 其主要成分为白芨、白芍、柴胡、党参、甘草、青黛、延胡索、珍珠层粉。动物实验^[3]表明健胃愈疡片通过减轻侵袭因素对胃黏膜的攻击作用、抑制胃酸分泌、加强小肠蠕动、抵抗疼痛等从多个环节对抗胃溃疡的发生而发挥抗溃疡作用。健胃愈疡片^[4]可以显著提高氨基己糖、磷脂含量, 它可以通过下调 IL-1 的表达, 影响胃黏膜氨基己糖及磷脂含量, 通过影响胃黏膜疏水性来影响溃疡愈合质量和促进溃疡愈合, 这可能是其促进溃疡愈合及其抗复发的机制之一。综上所述, 健胃愈疡片联合三联疗法治疗 Hp 阳性胃溃疡能明显提高患者临床疗效, 改善临床症状, 且能清除 Hp 等黏膜攻击因子, 有利于溃疡愈合, 值得临床推广应用。

参考文献

[1]中华医学会.临床诊疗指南-消化系统疾病分册[M].北京:人民卫生出版社,2011.32-33

[2]张莉,吴琦玮.三联及四联疗法根除 Hp 感染的临床疗效及效价比分析[J].山东医药,2009,49(37):74-75

[3]袁林,颜天华,王秋娟,等.健胃愈疡片对实验性胃溃疡的影响[J].中草药,2009,40(4):614-617

[4]黄国栋,黄媛华,赵俊,等.健胃愈疡片干预 PU 黏膜 IL-1 的表达及其抗 PU 复发的机理探讨[J].中成药,2009,31(9):1325-1328

(收稿日期: 2016-01-18)

膝骨关节炎不同证型软骨细胞在 t-RNA 中的表达 *

郑素明¹ 关俊辉²

(1 广州中医药大学第三附属医院 广东广州 510240; 2 广东省广州市中医医院 广州 510130)

摘要:目的:研究膝骨关节炎不同证型软骨细胞在 t-RNA 中的表达情况。方法:选取股骨头坏死患者 30 例,按照脾肾两虚型以及肝肾亏虚型进行辨证分型和分组 (各 15 例)。以实验室培养不同证型的软骨细胞作为研究方法,并对不同证型软骨细胞中 t-RNA 的表现形式进行观察,通过染色观察后,对软骨组织的表达形式进行研究分析。结果:肝肾亏虚型组中 MMP-1/-13RNA 在目标基因的表达方面均明显低于脾肾两虚型组,这表明在基因表达方面两种证型之间存在明显的差异。软骨组织细胞的外在形态由 t-RNA 的转录情况决定,在递变性的不同证型研究中,软骨组织的退化主要的原因取决于软骨组织中 t-RNA 的转录效果。结论:治疗膝骨关节炎的临床症状,并改善患者的生活质量,应当从神经递质以及细胞增生激素来进行局部控制,并以此来抑制或者促进 t-RNA 的转录,只有如此才能够有效地控制关节组织的退化进度。在改善人体的基本环境后,对人体的组织成长基本情况会有优化作用。在现代临床治疗膝骨关节炎的临床治疗中,应当从人体软骨组织入手,并以此来作为研究的根本,从细胞核中 m-RNA 和 t-RNA 的转录作为研究的根本进行临床试验的研究分析,必然可以在临床检验研究中得出更直接的证据。

关键词:膝骨关节炎;软骨细胞;t-RNA;基因表达

中图分类号:R684.3

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.02.013

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)属于一种慢性炎症性骨科疾病,致病机理较多,其中包括了工作环境、遗传以及体内抗原特性,对人体的日常生活会产生较大的影响^[1]。KOA 的主要并发症就有关节肿胀、压痛等,并出现伴随性关节疼痛,且软骨

组织细胞会逐渐退化,进而引起人体的骨质畸形^[2]。在对其进行研究的过程中,以核糖核酸的转录表达形式进行分析研究。现报告如下:

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择我院 2013 年 6 月~2014 年 6

* 基金项目:广东省科技计划项目(编号:2011B031800330)

月就治疗的中老年膝关节炎患者 30 例的软骨组织标本,符合 WHO 对膝关节炎患者的纳入标准,按照脾肾两虚型以及肝肾亏虚型进行辨证分型和分组(各 15 例)。年龄 45~70 岁,平均(51.6±7.2)岁,术前未接受任何药物治疗,并签署了治疗知情同意书。排除创伤性膝关节炎、类风湿性关节炎以及其他性质的关节炎,及严重器官疾病患者。对患者的软骨组织进行选取后,可进行分析。

1.2 主要试剂及仪器 实验试剂:Trizol(日本 Takara 公司),RT-PCR 试剂(德国 DBI 公司),DEPC(美国 Sigma 公司),RNasin(美国 Promega 公司),逆转录试剂盒(德国 DBI 公司)。实验仪器:SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州净化设备公司),UV-1206 分光光度计(日本 SHIMODZU 公司),SCR20B 冷冻离心机(日本 HITACHI 公司),Z323K 台式低温高速离心机(德国 HERMLE 公司),TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂),Mini-6K 水平离心机(上海安亭科学仪器厂),GDS7600 水平式电泳仪(北京东方仪器厂),DF-23B 凝胶扫描系统(英国 UVP 公司),BS210S 电子天平(日本 Satorius 公司),-80℃超低温保存箱(海尔集团),ABI9700PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),Real time PCR 仪(美国 Agilent 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Real time PCR 检测 MMP1、MMP13 mRNA 的表达变化 取适量组织,在液氮中充分研磨,加入 1 ml Trizol,震荡混匀室温放置 5 min;加入 0.2 ml 氯仿,剧烈震荡 15 s,静置 3 min;4℃12 000 rpm 离心 10 min,把上层水相转移到新的管中;加入等体积异丙醇,混匀,静置 20 min;4℃12 000 rpm 离心 10 min,去上清;用 1 ml 75%DEPC 酒精洗涤沉淀;4℃12 000 rpm 离心 5 min,弃去液体;室温晾干后,加入 30 μl DEPC 处理过的 ddH₂O 水,溶解 RNA,-80℃冻存备用。

1.3.2 去基因组 使用 RNase-free 的 DNase·I(Promega),按 RNA 20 μl, DNase I 20 μl, 10 x buffer 10 μl, RNase inhibitor 0.5 μl, H₂O(RNase free) 49.5 μl 配置反应液 100 μl, 37℃消化 30 min, 65℃灭活 10 min。然后加入等体积的苯酚,上下颠倒混匀后 10 000 rpm 离心 5 min,取上清;加入等体积的氯仿,上下颠倒混匀后 10 000 rpm 离心 10 min,取上清;加入等体积异丙醇,轻柔地充分混匀,-20℃静置 15 min;4℃下,10 000 g 离心 10 min,收集 RNA 沉淀,去上清;用 75%乙醇洗涤两次,超净台风

干;加入 15~40 μl DEPC 水溶解沉淀。

1.3.3 逆转录 以 2 μg 总 RNA 为模板,按照 Bestar qPCR RT Kit 说明书配制逆转录反应体系,总体积为 20 μl,合成 cDNA 第一链。首先按照 RNA2.0 μg, DEPC H₂O 配制反应液 10 μl;然后 65℃, 5 min,冰上急冷;再按上述反应液 10 μl, 5xRT Buffer RT 4 μl, Enzyme Mix 1 μl, Primer Mix 1 μl, DEPC H₂O 4 μl 配制反应液 20 μl;37℃, 60 min;98℃, 10 min,合成 cDNA 第一链,并收集备用。

1.3.4 PCR 检测 Real time PCR 扩增的反应体系为 20 μl(DBI Bestar SybrGreen qPCRmasterMix),反应体系按照 Bestar SybrGreen qPCRmasterMix 10 μl, PCR Forward Primer(10 μM)0.5 μl, PCR Reverse Primer(10 μM)0.5 μl, cDNA 1 μl, ddH₂O 8 μl 模板配制 20 μl;PCR 反应条件:94℃2 min, 94℃20 s, 58℃20 s, 72℃20 s, 40 循环。融解曲线分析:温度 62~95℃。每个样本重复 3 次,用 Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 进行荧光定量 PCR 实验。

1.4 数据处理 实验按照 2- $\Delta\Delta$ Ct 方法处理数据。其中, Δ Ct=(目的基因 Ct-内参 Ct)的平均值±标准偏差; $\Delta\Delta$ Ct=(待测样品中目的基因 Δ Ct-参照样中目的基因 Δ Ct)的平均值±标准偏差(若无参照样则选择 Ct 最大的样品为参照进行计算)。

2 结果

2.1 两组 rt-PCR 中 MMP1 的 Δ Ct 值比较 两组情况比较,经统计学处理,结果判定当 $P=0.018<0.05$ 认为方差不齐。选用 Wilcoxon 秩和检验:Wilcoxon $w=1035.00$, $Z=-8.171$, $P<0.001$, 故差异明显。

表 1 两组 rt-PCR 中 MMP1 的 Δ Ct 值及组间比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	rt-PCR 中 MMP1 的 Δ Ct 值
肝肾亏虚型	15	3.2993±0.42186
脾肾两虚型	15	1.2038±0.57784

2.2 两组 rt-PCR 中 MMP13 的 Δ Ct 值比较 两组情况比较,经统计学处理,结果判定当 $P=0.01<0.05$ 认为方差不齐。选用 Wilcoxon 秩和检验:Wilcoxon $w=1035.00$, $Z=-8.171$, $P<0.001$, 故差异明显。

表 2 两组 rt-PCR 中 MMP13 的 Δ Ct 值及组间比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	rt-PCR 中 MMP13 的 Δ Ct 值
肝肾亏虚型	15	3.9147±1.14625
脾肾两虚型	15	1.2911±0.48166

根据本实验研究,在实时 PCR(real time PCR)检测组间 Δ Ct 值的差异存在明显异常,Ct 值指的就是扩增曲线达到阈值时的循环圈数,而对于循环圈

数而言,次数越大表明该基因的表达程度越低。经统计学统计,肝肾亏虚型组中 MMP-1/-13RNA 在目标基因的表达方面均明显小于脾肾两虚型组。对软骨组织细胞培养结果中的表现现象研究,在培养了 24 h 左右期间的组织细胞中,可清晰地看到核仁,其中部分软骨组织细胞出现群集生长,而初代软骨组织在培养到 5 d 后,细胞呈现多边形态,并排列紧密。对于不同证型软骨组织细胞 m-RNA 表达水平的分析中,从外源性的浓度分析,可得出 t-RNA 细胞的表现形式,经对比后,外源性浓度出现增加趋势,和细胞内 t-RNA 的表达有着直接关系。如果在临床治疗中,能够有效的抑制 t-RNA 表达,则可以有效的抑制 KOA 导致的软骨组织退化。

3 讨论

KOA 属于常见的软骨组织退化导致的疾病,此处的组织细胞自身并没有充足的血液供给,并无神经分布,而作为承重的主要组织材料,在承受冲击力的同时,是保护人体的最主要构成组织^[3-4]。在进行形态的表达中,组织细胞通过自身细胞中的基因表达来完成细胞分化,并以此来促进机体的成长。但是伴随着年龄的增长,人体各机能的退化,都会直接地影响到自身机体的各项组织表达形式。近年来大量研究发现,MMP-1、MMP-13 参与了 KOA 的发病,在其发病机制中起重要作用^[5-6]。

MMP 家族(MMPs)广泛存在于各种结缔组织中,是一类 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 依赖的重要蛋白水解酶家族,在细胞外基质(ECM)的生理和病理降解过程中起重要作用,可有效降解软骨中细胞外基质,它的异常增高可能是导致 ECM 合成与降解失衡的重要原因。其中 MMP-1 和 MMP-13 具有强烈降解 Coll- II 和蛋白多糖的作用。MMP-1 主要由成纤维细胞分泌,可切割 I、II、III、VIII、X 型胶原及明胶。MMP-1 的活性增强对于软骨基质的降解起着关键性的作用;MMP-13 可对各种胶原进行有效降解,其降解 II 型胶原纤维的能力是其他胶原酶的 10~30 倍,而且其他许多 MMPs 亚型对 II 型胶原的降解需要通过 MMP-13 起作用。MMP-13 是已知最有效的 II 型胶原降解酶,可分解胶原三螺旋结构^[7]。

KOA 是在人体老化过程中所表现出来的一种常见骨质病症。在对这一类患者进行治疗的过程中,通过注射刺激性药物,以及消炎性药物来抑制关节炎的并发,很难从根本上缓解患者的机体病状,仅

仅是在生活质量上得到了一定的改善。在本次的临床调研研究中,我们发现肝肾亏虚型组中 MMP-1/-13RNA 在目标基因的表达方面均明显小于脾肾两虚组。这表明在基因表达方面两种证型之间存在明显的差异。通过分析不同证型软骨组织细胞在 t-RNA 中的表达效果,了解到对于软骨组织细胞分化的表达,需要通过相关 RNA 的有机结合,才能够促进细胞的分化。在此阶段中,抑制软骨组织分化的细胞基液,还需要进行进一步的研究分析,并以此来促进现代临床治疗膝骨关节炎的疗效。由于机体促进 t-RNA 表达的酶活性降低,进而导致分化的细胞因子减少,导致了膝关节内骨赘的产生,从而引发软骨组织退化。这一机理,对研究膝骨关节炎的临床治疗研究方法,有着举足轻重的效用,因此在今后的研究中,应当以此作为主要的研究方向进行研究。

综上所述,治疗膝骨关节炎的临床症状,并改善患者的生活质量,应当从神经递质以及细胞增生激素来进行局部控制,并以此来抑制或者促进 t-RNA 的转录,只有如此才能够有效地控制关节组织的退化进度。在改善人体的基本环境后,对人体的组织成长基本情况,会有优化作用。在现代临床治疗膝骨关节炎中,应当从人体软骨组织入手,并以此来作为研究的根本,从细胞核中 m-RNA 和 t-RNA 的转录作为研究的根本进行临床试验的研究分析,必然可以在临床检验研究中得出更直接的证据。

参考文献

- [1]杜清峰,王英振,张海宁,等.慢病毒介导的 Aggrecanase-1 shRNA 转染体外培养的类风湿关节炎患者软骨细胞的研究[J].中华风湿病学杂志,2015,19(1):36-41
- [2]Chen J,Chu Y,Cao J,et al.T-2 toxin induces apoptosis, and selenium partly blocks, T-2 toxin induced apoptosis in chondrocytes through modulation of the Bax/Bcl-2 ratio [J].Food Chem Toxicol,2006,44(4):567-573
- [3]胡洪亮,曹谊林,刘阳,等.小鼠 FasL 基因的克隆和在软骨细胞中表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2003,19(4):326-328,337
- [4]张媛,何延辉,王炳南,等.中药接骨方对骨折愈合过程中骨粘连蛋白使核糖核酸表达的调控[J].中医正骨,2012,24(9):11-14
- [5]贺占坤,沈杰威.MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 评价膝关节炎的临床研究[J].重庆医学,2013,42(32):3872-3874
- [6]Jokar M,Mirfeizi Z,Keyvanpajouh K.The effect of hydroxychloroquine on symptoms of knee osteoarthritis: a double-blind randomized controlled clinical trial[J].Iran J Med Sci,2013,38(3):221-226
- [7]Hamamura K,Zhang P,Zhao L,et al.Knee loading reduces MMP-13 activity in the mouse cartilage [J].BMC Musculoskelet Disord, 2013,14:312

(收稿日期: 2015-10-17)