

形态学技术在经方研究中的应用

王 谦 李姝玉 许 红 高誉珊 张淑静 李宇航

(北京中医药大学基础医学院,北京,100029)

摘要 文章介绍了实验研究常用的医学形态学技术如石蜡切片、冰冻切片、电镜超薄切片、组织化学和细胞培养等,因具有客观、直观等技术优势,在现代医学教学和科研中占有重要地位。将形态学技术引入到经方现代研究中,对于阐释经方组方原理、探索经方治疗常见病、疑难病的机制,亦同样具有重要意义。

关键词 形态学;实验技术;经方

Applying Morphological Techniques in the Research of Classical Formula

Wang Qian, Li Shuyun, Xu Hong, Gao Yushan, Zhang Shujing, Li Yuhang

(School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract To introduce some morphological techniques commonly used in medical teaching and research, i. e. paraffin section, frozen section, electron microscopyultrathin section, histochemistry and cell culture. Due to the objectiveness and visualization of these techniques, they would play a significant role in the research of classical formula, helping to explain the principles underlying formula composition, to explore the mechanism of action, esp. for some common or obstinate diseases.

Key Words Morphology; Laboratory techniques; Classical formula

中图分类号:R289 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.01.005

形态学是研究动、植物形态的科学,在生物学中占有重要地位。医学形态学作为形态学的一个分支,是医学教学和研究中的重要组成部分。医学形态学的研究方法从最早的肉眼观察,到后来各种显微镜技术的使用,进展到微观领域,其研究结果具有客观、直观的特点,因而在多个研究领域得到了广泛应用。

“经方”一词最早见《汉书·七略·方技略》,原指治疗疾病的经验之方,目前中医界则专指《伤寒论》《金匱要略》中所载的方剂。以其立法严谨,取效卓著,而被誉为“医方之祖”,现代诠释为“经典方剂”。经过多年的临床实践证实,经方在治疗多种疾病中均有较好的疗效,因此对于经方的研究始终长盛不衰。在研究中使用现代技术方法,使得经方的研究不断现代化,对经方的现代研究亦具有很好的促进作用。

1 常用技术概要

在实验研究中常用的形态学研究技术有各种切片的制作,包括石蜡切片、冰冻切片、电镜超薄切片;细胞培养技术和组织化学技术等。

1.1 石蜡切片

1.1.1 技术特点 石蜡切片在常规制片技术中应用最为广泛。石蜡切片经过染色后可观察细胞组织的形态结构,这一技术已广泛地应用于其他许多学科领域的研究中。石蜡切片技术还可以和免疫技术结合,如常用的免疫组织化学技术。利用抗原与抗体的特异性结合原理,检测组织切片中细胞组织的多肽及蛋白质等大分子物质的定性和定位观察研究。

石蜡切片必须经过染色后才能进行观察,最常用的染色方法是 HE 染色方法。经 HE 染色后,细胞核被苏木精染成紫蓝色,多数细胞质及非细胞成分被伊红染成粉红色。为了显示某些特定的结构或成分,需要选择专门显示这些成分的染色方法进行染色,如胶原纤维染色(Masson)和糖原染色(PAS)等。实际工作中可根据实验目的的不同,选择合适的染色方法(图1)。

1.1.2 应用举例 我们团队在复制慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Diseases, COPD)大鼠模型的基础上,观察了清热解毒药物配伍桔梗对模型动物病理形态学的影响。在光镜、电镜下分别观察了不同配伍的中药对大鼠病理形态的改变,并对病理切片进行半定量分析,结果显示 COPD 模

基金项目:北京中医药大学“经方现代应用关键科学问题的基础研究”创新团队(编号:2011-CXTD-04)

作者简介:王谦,女,教授, Tel: (010)64286965, E-mail: wangqianchai@163.com

通信作者:李宇航,男,教授,博士生导师,地址:北京市北三环东路11号北京中医药大学,邮编:100029,电话:(010)64287503, E-mail: liyuhang@bucm.edu.cn

型组大鼠肺组织结构严重受损,炎细胞增多。而经过清热解毒药物配伍桔梗治疗后大鼠病理改变有改善。初步得出清热解毒药物配伍桔梗,在 COPD 的治疗过程中能够发挥增效(引经)作用,再增加甘草具有协同增效(引经)作用的结论^[1]。

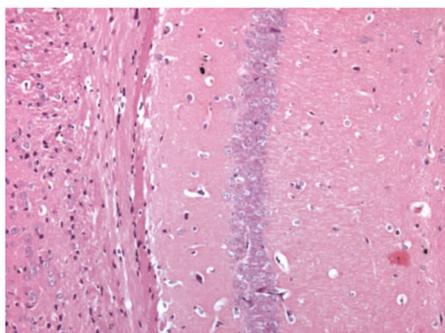


图1 脑组织(HE染色,×10)

半夏泻心汤出自《伤寒论》,我们团队对该方进行了拆方研究。首先制备了大鼠慢性胃溃疡模型,检测半夏泻心汤及其拆方对溃疡灶肉芽组织及溃疡灶表面黏膜厚度的影响。结果提示半夏泻心汤及其拆方能够促进溃疡灶肉芽组织的良好生长,促进溃疡灶表面黏膜的生长覆盖,从而达到促进溃疡愈合、降低愈合后溃疡复发的治疗作用,全方组则表现出最佳效果,不仅印证了张仲景组方用药的合理性和科学性,也为进一步认识中医“辛开、苦降、甘补法”的作用机制提供了一定的实验依据^[2]。

1.2 冰冻切片

1.2.1 技术特点 冰冻切片是将新鲜组织快速冷冻后再进行切片。制片周期较石蜡切片短,可用于组织结构的快速观察,也可用于一些不适于石蜡切片制备的组织的观察,如脂肪组织。冰冻切片也可以进行各种染色(图2)。石蜡切片和冰冻切片均可用光学显微镜进行观察。

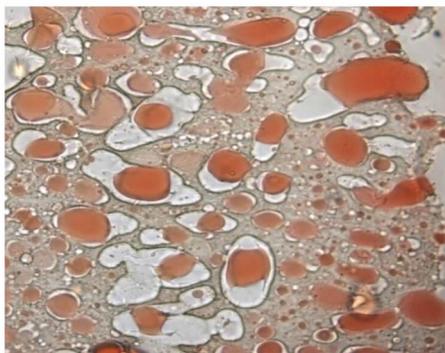


图2 肝脂肪变性(冰冻切片,油红O染色,×40)

1.2.2 应用举例 团队对糖尿病并发症有专门的研究。KKAy小鼠是一种自发糖尿病模型小鼠,利用小鼠观察了中药对糖尿病并发症的治疗作用。HE

染色的石蜡切片显示糖尿病小鼠肝脏结构紊乱,肝细胞胞浆有明显空泡,肝细胞有脂肪变性。进而利用冰冻切片进行油红O染色,明确空泡内确为脂肪。研究结果显示能改善糖尿病小鼠肝脏结构,对糖尿病造成的肝脏损害具有一定的保护作用^[3]。

1.3 电镜超薄切片

1.3.1 技术特点 光学显微镜可观察细胞的结构,电子显微镜则能观察亚细胞结构。常用的有透射电镜和扫描电镜技术,前者用于观察细胞内的超微结构,如线粒体、内质网等;后者用于观察样本表面的变化,如支气管的微绒毛(图3)。超薄电镜切片需要使用电子显微镜进行观察。

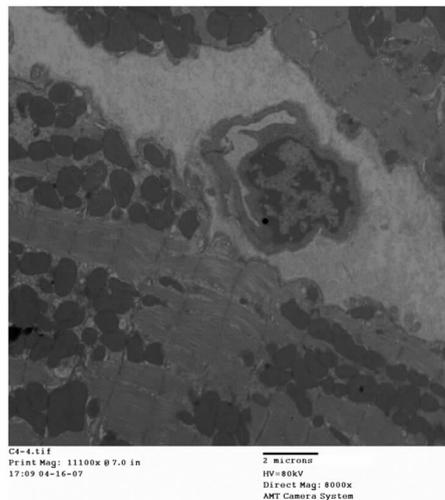


图3 心肌细胞(TEM,×8000)

1.3.2 应用举例 我们团队研究了黄芪注射液和葛根素注射液对2型糖尿病小鼠肾脏病理改变的影响,在早期光镜仅观察到肾小球体积增大,肾小管上皮细胞有明显空泡,未见其他改变。但通过电镜观察,发现肾小球基底膜有局灶性增厚,系膜基质、系膜细胞增多,间质细胞增生。说明在早期已经出现了轻微的硬化性改变,且中药可以减轻这些病理损害^[4]。

利用电镜技术,我们还观察了中药对糖尿病模型小鼠脑微血管病变的影响,通过电镜观察,显示模型组小鼠神经细胞核染色质疏松,线粒体肿胀,粗面内质网缩小,核糖体减少,经过中药治疗后上述改变减轻。说明中药改善2型糖尿病动物模型KKAy小鼠脑微血管病变^[5]。

1.4 组织化学技术

1.4.1 技术特点 组织化学是运用物理学、化学、免疫学、分子生物学等原理与技术,对组织与细胞的化学成分、化学反应及其变化规律进行定性、定位和定量研究的科学,是介于这些学科之间的一门边缘

科学。其中在实际工作中较常用的是免疫组织化学技术(图4)。

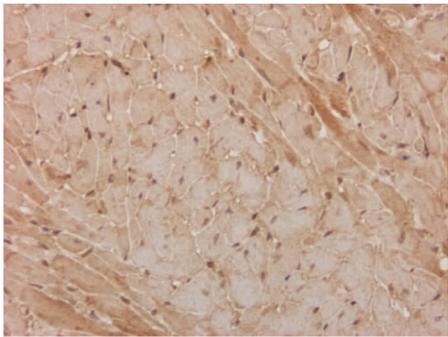


图4 心脏(免疫组化, ×20)

1.4.2 应用举例 团队在复制大鼠慢性胃溃疡模型的基础上,通过免疫组化的方法检测增殖细胞核抗原(PCNA),对半夏泻心汤进行拆方研究。结果表明,半夏泻心汤及其拆方各组均有不同程度的调节胃黏膜细胞增殖作用。拆方各组中,部分药组之间呈协同的作用趋势,部分药组之间呈制约趋势。综合评价其总体疗效,以全方组最佳,从而印证了仲景组方的合理性和科学性^[6]。

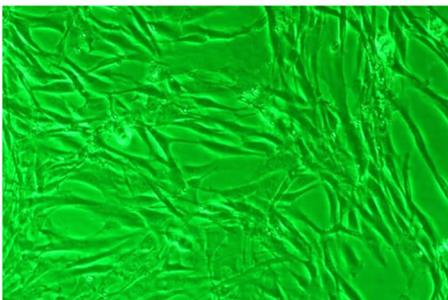


图5 体外培养的大鼠系膜细胞 ×10

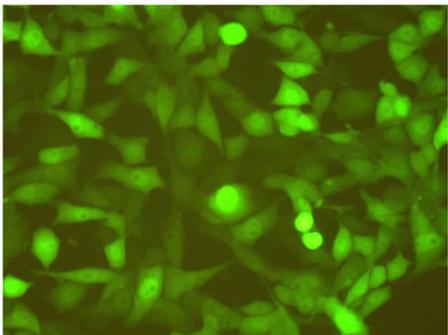


图6 慢病毒载体感染小鼠 NIH3T3 细胞 ×20

1.5 细胞培养技术

1.5.1 技术特点 从组织中获取细胞并使其在体外生长称为原代培养。也可购买细胞株直接进行体外培养。培养的细胞是进行各种医学实验的良好材料。由于细胞种类单一,可用于观察特定细胞对刺激因素的反应,也可进行较深入的机制研究。但由于是体外培养,细胞的反应与体内存在一定的差异

(图5,图6)。

1.5.2 应用举例 我们团队体外培养了人肾小管上皮细胞,并在此基础上研究中药对肾小管上皮细胞转分化的影响。发现转化生长因子(TGF-β1)可诱导体外培养的人肾小管上皮细胞发生转分化,中药可以阻断或逆转上皮细胞的转分化^[7]。我们还研究了中药对人近曲小管上皮细胞细胞增殖的影响,以及对高糖诱导后细胞内 GRP78 表达的影响。结果显示,葛根素可促进细胞增殖,并且可通过增加内质网伴侣蛋白 GRP78 的表达量,以促进蛋白质正确折叠,来恢复细胞的稳态,从而减轻糖尿病时肾脏的结构损伤^[8]。

2 应用体会

以上这些基本的形态学技术可以与经方的研究紧密结合起来,为经方的实验研究提供可靠的技术保障。在以下几方面,形态学技术都可以为经方的研究提供技术保障。

2.1 形态学技术可以客观判定疾病模型的成功与否 由于经方是在临床实践中形成的经典方剂,治疗的对象是各种疾病。因此,复制多种疾病的动物模型,并在此基础上研究经方的治疗效果是经方研究中的基础工作。动物的疾病模型复制是否具备与人类疾病相似的改变,直接决定了后续的研究是否能继续,而很多动物的疾病模型病变的判断需要依赖形态学技术,在一些疾病中,形态学改变对于疾病的诊断起关键作用。如真武汤、五苓散、猪苓汤等均可用于治疗糖尿病肾病,若在经方的研究中结合形态学技术则能更客观,研究结果也更容易被接受^[9]。糖尿病肾病的主要形态学表现为早期肾小球肥大,晚期为肾间质和肾小球纤维化。我们以往的研究发现,2型糖尿病肾病 KKAy 小鼠具有典型的糖尿病肾病的形态改变,黄芪可减轻该小鼠的肾脏病理损害,明确其对糖尿病肾病有治疗作用^[3,10]。

2.2 形态学技术可用于经方治疗疾病的机理研究

在实验研究中,除了观察经方对多种疾病的治疗效果,更重要的是揭示其作用机制和作用环节,进而指导今后的中医临床。我们团队研究了 TGF-β1 信号通路在糖尿病肾病发病中的作用及其中药的作用位点。由于在一个器官中有多种组织,仅通过分子生物学手段研究某些因子的表达情况,只能说明在器官中的平均表达水平,无法确定其在某一特定细胞或组织中的表达。如能将形态学技术与分子生物学技术结合起来,既能确定某一种因子的表达高低,又能将这种表达的改变定位,对于治疗的作用机理

的研究具有重要意义。我们曾将免疫组织化学技术与临床生化指标检测、分子生物学技术结合起来,不但能说明中药的治疗效果,还能进行机制研究^[11]。

除了进行在体实验,还可以在体外培养细胞,利用细胞培养技术进行较深入的机制研究。我们团队发现中药对糖尿病肾病小鼠早期肾脏的内质网应激反应有一定的影响,为了确定中药是否对肾小管上皮细胞的内质网应激有同样的作用,就利用体外培养的肾小管上皮细胞—HK-2 细胞,经过高糖刺激后,观察中药对该细胞内质网应激的影响。发现高糖确实能诱导 HK-2 细胞产生内质网应激,中药对过度的内质网应激有一定的抑制作用^[8]。

2.3 形态学技术可用于经方的配伍研究 通过拆方研究,确定最佳的配伍比例,可以为临床医生提供可靠的实验依据。有实验通过复制临床关节炎疾病的大鼠模型,比较了大鼠造模前后不同配伍比例的芍药甘草汤的治疗效果,发现芍药甘草 1:1 配伍时的止痛作用起效明显早于其他配伍比例,证实了芍药甘草汤原方配伍应用的科学性和合理性。同时应用了免疫组织化学的方法发现 TRPV1(瞬时受体电位通道香草醛亚型-1, transient receptor potential vanilloid type-1)通道蛋白的表达可能是芍药甘草汤临床上发挥止痛作用的分子机制之一,同时也表明干预该靶点可能是芍药甘草汤中芍药和甘草 1:1 配伍止痛效应最大化的分子基础^[12]。

为研究半夏泻心汤的配伍规律,将该方拆成辛开药(半夏、干姜, X)组,苦降药(黄芩、黄连, K)组,甘补组(人参、炙甘草、大枣, G)组,并进行交叉组合成 XK、XG、KG 组,及全方组(Q)。复制大鼠慢性胃溃疡模型后,分别给予上述各组药物治疗,比较各组大鼠血清胃泌素的水平。结果表明 X、K、G、KG 组药物对胃泌素无明显影响;XK、XG 组药物对胃泌素有明显影响,其中 XG 组的作用与 Q 组相近。上述结果提示:不同辛味药物之间的配伍,直接影响其生物效应^[13]。这一实验结果为性味配伍理论提供了实验支持依据。

2.4 形态学技术可用于经方及中医基本理论的研究 我们团队在复制大鼠 COPD 模型的基础上,观察了宣肺中药对其的影响,发现应用宣肺中药从肺论治 COPD,肺组织病理改变减轻的同时伴见肠组织病理改变呈改善趋势,从侧面印证了中医“肺合大肠”脏腑相关理论,肺-肠之间存在着一定的相关性及互动调节现象。该项研究即使用了形态学技术,首先证实了模型大鼠具备了 COPD 的基本病理变化

和宣肺中药对此病理改变有减轻作用,进而利用分子生物学技术证实宣肺中药提高了肠组织 IFN- γ 、降低了 IL-10mRNA 的表达,一定程度上证实了肺-肠之间存在着一定的特异性互动效应机制,为探讨“肺合大肠”中医脏腑相关理论奠定基础^[14]。

以上仅列举了一些在经方研究中用到的形态学技术,在今后的工作中,可以在更多领域使用形态学技术,形态学技术本身也随着科技的发展不断丰富。古老经方的研究与不断发展的形态学技术相结合,可以从不同角度和侧面阐释经方的组方理念,总结其治疗原则,让更多的学者掌握经方的科学内涵,以更方便临床医生在实践使用经方。

参考文献

- [1] 李宇航, 黄颖, 郭明章, 等. 清热解暑药物配伍桔梗对 COPD 大鼠模型病理形态的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(12): 819-822.
- [2] 李宇航, 李澎涛, 王庆国, 等. 半夏泻心汤及其拆方对慢性胃溃疡大鼠溃疡灶形态变化的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(1): 16-20.
- [3] 王谦, 贾德贤, 姜金丽, 等. 2 型糖尿病动物模型 KKAY 小鼠肝、肾的病变[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(4): 241-243.
- [4] 许红, 尤海燕, 李姝玉, 等. 葛根素注射液对 2 型糖尿病动物模型 KKAY 小鼠肾损伤病理改变的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(3): 180-183.
- [5] 李姝玉, 柴新楼, 吴莹, 等. 黄芪注射液对 2 型糖尿病动物模型 KKAY 小鼠脑血管病变的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(29): 5657-5660.
- [6] 李宇航, 王庆国, 牛欣, 等. 半夏泻心汤及其拆方对慢性胃溃疡大鼠胃粘膜细胞增殖活性的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(3): 30-32.
- [7] 李玉杰, 来媛媛, 李姝玉, 等. 黄芪注射液对肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(2): 109-111.
- [8] 聂彦娜, 李姝玉, 崔蕾, 等. 葛根素注射液对高糖诱导的 HK-2 细胞 GRP78 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(1): 39-42.
- [9] 吴传云, 管仕伟, 周雪梅. 《伤寒论》和《金匮要略》对糖尿病肾病的辨治指导[J]. 中医临床杂志, 2014, 26(6): 629-630.
- [10] 李姝玉, 柴欣楼, 吴莹, 等. 黄芪注射液对 II 型糖尿病动物模型 KKAY 小鼠肾损伤病理改变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 18(18): 190-193.
- [11] 易月娥, 聂彦娜, 李姝玉, 等. 葛根素注射液对糖尿病 KKAY 小鼠肾小管上皮细胞的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(12): 2263-2267.
- [12] 李从越, 隋峰, 霍海如, 等. TRPV1 通道蛋白介导的芍药甘草汤止痛配伍机制研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 2-4.
- [13] 赵琰, 李宇航, 王庆国, 等. 半夏泻心汤不同性味拆方对胃溃疡大鼠血清胃泌素的影响[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(10): 45-47.
- [14] 郑丰杰, 李宇航, 许红, 等. 慢性阻塞性肺疾病模型大鼠多脏器病理改变及宣肺中药的干预作用[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(9): 591-594.