

· 基础研究 ·

以 AQP 表达验证“肺病及肠与泻肠清肺”
关键的“水湿”病理证据姚 锐¹ 吴昌归² 高永翔³ 杨 宇³ 赵 姜¹ 董晓静¹ 郭亮锋¹ 李 锋¹

摘要 目的 观察小承气汤对支气管炎模型大鼠肺与结肠组织水通道蛋白(aquaporin, AQP)的调节效应,探讨“肺病及肠与泻肠清肺”之“水湿”关键的可能机制。**方法** SD 大鼠 60 只,随机分为空白组、模型组、观察组,每组 20 只。模型组及观察组单纯烟熏法 70 天建模。检测大鼠肺功能、血气分析,计算结肠湿重指数,免疫组化法、Western blot 法检测大鼠肺组织 AQP₁ 蛋白与结肠组织 AQP₄ 蛋白表达。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠肺顺应性降低、气道阻力增加($P < 0.05$),肺功能降低,血气分析中 PO_2 降低、 PCO_2 升高($P < 0.05$),大鼠肺组织 AQP₁ 及结肠组织 AQP₄ 表达明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,观察组大鼠气道阻力下降,肺顺应性升高($P < 0.05$);低氧高酸状态($PO_2/PCO_2/pH$)显著改善($P < 0.05$),肺组织 AQP₁ 表达显著升高($P < 0.05$)。**结论** 肺组织 AQP₁ 和结肠组织 AQP₄ 可能是“肺病及肠”病理传变中“水湿”的链点之一,亦是“泻肠清肺”功效的新位点,属“肺与大肠相表里”的新证据。

关键词 肺与大肠相表里;肺病及肠;泻肠清肺;小承气汤;水通道蛋白

Value of AQP Expression to Explain the Significance of Water-dampness Syndrome in the Pathological Mechanism of "Disease of Lung Affecting Intestine/Purging Bowel to Clear Lung" YAO Rui¹, WU Chang-gui², GAO Yong-xiang³, YANG Yu³, ZHAO Jiang¹, DONG Xiao-jing¹, GUO Liang-feng¹, and LI Feng¹ 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an (710032); 2 Department of Respiration, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an (710032); 3 College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Xiaochengqi Decoction (XD) on the AQP expression in the lung and the colon of bronchitis rats, thus to reveal possible mechanism of the pathological transfer in the disease of lung affecting intestine as well as purging bowel to clear lung. **Methods** Totally 60 SD rats were randomly divided into the blank group, the model group, the observation group, 20 in each group. The model of bronchitis was established in the model group and the observation group for 70 days. Pulmonary function and blood gas analysis were detected. The colon wet weight index was calculated, expressions of AQP₁ in lung tissue and AQP₄ in colon tissue were also determined by immunochemistry and Western blot. **Results** Compared with the blank group, lung compliance decreased, and respiratory resistance was increased significantly, lung function decreased, PO_2 was reduced, PCO_2 was elevated in blood gas analysis in the model group ($P < 0.05$). The expressions of AQP₁ in lung tissue and AQP₄ in colon tissue obviously decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the respiratory resistance decreased, and the lung compliance were enhanced, the state of hypoxemia and hypercapnia ($PO_2/PCO_2/pH$) were also improved ($P < 0.05$), and the expression of AQP₁ in lung tissue was increased ($P < 0.05$) in the observation group. **Conclusions** AQP₁ of lung tissue and AQP₄ of colon tissue might be one of connection points involved in the pathophysiology of "disease

基金项目:973 中医药理论专项(No. 2009CB522706);国家自然科学基金资助项目(No. 81273622)

作者单位:1.第四军医大学第一附属(西京)医院中医科暨全军中医内科中心(西安 710032);2.第四军医大学第一附属(西京)医院呼吸内科(西安 710032);3.成都中医药大学基础医学院(成都 610075)

通讯作者:李 锋, Tel:02989661600, E-mail: lifeng@fmmu.edu.cn

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170327. 066

of lung affecting intestine". They might also be new targets to explain "purging bowel to clear lung". AQP might be new evidence for "interior-exterior correlation between lung and large intestine".

KEYWORDS interior-exterior correlation between lung and large intestine; disease of lung affecting intestine; purging bowel to clear lung; Xiaochengqi Decoction; aquaporin

“肺与大肠相表里”中医学理论指导临床肺病与肠病辨治,肺气“宣降不及”则大肠“传导失职”出现“肺病及肠”病证改变,而“病在脏则治其腑”,腑通则上壅之痰得泻,则邪出病愈。本实验以水通道蛋白(aquaporin, AQP)表达为证据,对“肺病及肠”传变病理与以小承气汤“泻肠清肺”药理的双重比照观察,验证“肺病及肠”病理传变中“水湿”的可能生物学基础,冀以诠释“肺与大肠相表里”的部分本质。

材料与方法

1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠(4 周龄)60 只,体重(180 ± 30)g,第四军医大学实验动物中心提供,合格证号:SCSK(军)-2013004x。经第四军医大学实验中心伦理检验,伦理学批号:20150403。

2 药物 小承气汤组方为大黄(酒洗)12 g 厚朴(去皮姜制)6 g 枳实(炙)9 g;工艺:上述处方扩大 120 倍,总量 3 240 g,将药材浸泡 30 min,加 10 倍水量煎煮 1 h 滤过,残渣加 8 倍水量煎煮 0.5 h,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.12 (50 ~ 60 ℃),喷雾干燥,得成品 403 g,提取率约 12.4%,每克相当于 8.04 g 生药。

3 试剂及仪器 市售金丝猴香烟(20 根/包),焦油含量 12 mg;兔抗鼠 AQP₁、AQP₄ 多克隆抗体购买于美国 Santa Cruz 公司;自制熏烟熏箱(100 cm × 70 cm × 600 cm),根据钢丝笼大小确定,顶部对角留通气孔(2 cm × 3 cm)2 个。

4 模型制备、分组与药物干预 采用烟熏法复制支气管炎模型^[1]。将 60 只大鼠按随机数字法分为空白组、模型组、观察组,每组 20 只,适应性饲养 1 周。将模型组与观察组大鼠置于熏烟室中,香烟每份 8 支,点燃后分别放置于自制烟槽上,15 min 后放置第二批香烟,再 15 min 后放置第三批香烟,每次烟熏 50 min,每天 3 次(9:00 Am、14:00 Pm、18:00 Pm),造模的同时,观察组大鼠给予小承气汤灌胃,2 mL/只(含生药 0.675 g/mL),相当于成人用量 10 倍,每天 1 次。所有大鼠均造模成功。空白组置于无烟环境中饲养。共 70 天。

5 观察指标方法

5.1 肺功能测定 造模后空白组、模型组、观察组大鼠各取 10 只,以 2.4% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,

大鼠仰卧位固定于手术板上,打开胸腔暴露气管,切开约 1 cm 切口,将气管插管置入并固定,用小动物肺功能仪测定潮气量、气道流速、跨肺压。气道阻力[cmH₂O/(L/S)] = 跨肺压(cmH₂O)/气道流速(L/S),肺顺应性(L/cmH₂O) = 潮气量(L)/跨肺压(cmH₂O)。

5.2 血气分析 另取空白组、模型组、观察组大鼠各 10 只,水合氯醛腹腔注射麻醉,打开腹腔,自腹主动脉抽取 0.5 mL 动脉血迅速进行血气分析,包括 PH、CO₂ 分压(PCO₂)、血氧分压(PO₂)。同时留取肺与大肠组织备用。

5.3 结肠湿重指数检测 麻醉后迅速用手术器械剪开大鼠腹腔找到结肠,钝性分离肠系膜及结肠周围脂肪组织,沿肠系膜壁纵行剖开,用冰生理盐水冲洗干净,留取结肠标本。结肠湿重指数(g/kg) = 结肠湿重(g)/体重(kg)^[2]。

5.4 AQP₁、AQP₄ 蛋白测定 留取肺与大肠组织,称重后迅速将一部分组织放入 4% 多聚甲醛中固定,进行免疫组化染色;另一部分组织匀浆后 Western blot 法测肺组织 AQP₁、结肠组织 AQP₄ 蛋白表达,应用 Image-Pro Plus 图像分析软件进行电泳条带的平均灰度值测定。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况比较 空白组大鼠精神状态好,毛色光泽、排便正常;模型组大鼠出现咳嗽、精神萎靡、蜷伏不动、毛发卷曲、消瘦、便溏;其中 2 只大鼠喘鸣明显;观察组大鼠体征减轻,便溏加重,精神较佳,无喘鸣。

2 各组肺功能检测比较(表 1) 与空白组比较,模型组大鼠气道阻力增加、肺顺应性降低($P < 0.05$)。观察组气道阻力及肺顺应性较模型组均明显改善($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠肺功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	气道阻力 [cmH ₂ O/(L/s)]	肺顺应性 (L/cm H ₂ O)
空白	10	1.54 ± 0.16	0.43 ± 0.06
模型	10	2.14 ± 0.23*	0.25 ± 0.13*
观察	10	1.68 ± 0.35 ^Δ	0.34 ± 0.08 ^Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$;表 2 同

3 各组血气分析结果比较(表 2) 与空白组比较,模型组 PCO_2 水平升高, PO_2 水平下降($P < 0.05$)。而观察组 PCO_2 水平较模型组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 小承气汤对慢支模型大鼠血气的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	pH	PCO_2	PO_2
			(mmHg)	
空白	10	7.40 ± 0.05	43.66 ± 2.22	99.34 ± 3.05
模型	10	7.28 ± 0.10	$53.64 \pm 10.32^*$	$85.90 \pm 20.49^*$
观察	10	7.36 ± 0.03	$45.60 \pm 3.55^\Delta$	89.94 ± 11.97

4 各组结肠湿重指数比较 与空白组 [3.32 ± 0.21 g/kg] 比较,模型组大鼠结肠肉眼观察肿胀、结肠湿重指数 [4.36 ± 0.53 g/kg] 升高($P < 0.05$)。而观察组大鼠结肠湿重指数 [3.78 ± 0.35 g/kg] 较模型组降低($P < 0.05$)。

5 肺组织 AQP₁ 与结肠组织 AQP₄ 蛋白表达

5.1 各组肺组织 AQP₁ 及结肠组织 AQP₄ 免疫组化表达比较(图 1、2) 模型组大鼠肺组织 AQP₁ 表达为

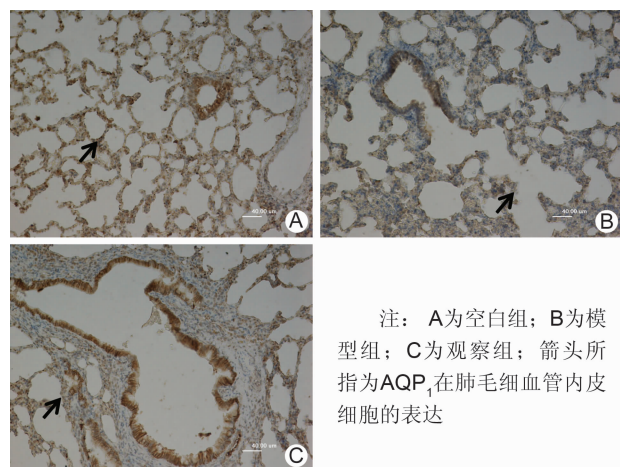


图 1 肺组织 AQP₁ 表达 (免疫组化, $\times 400$)

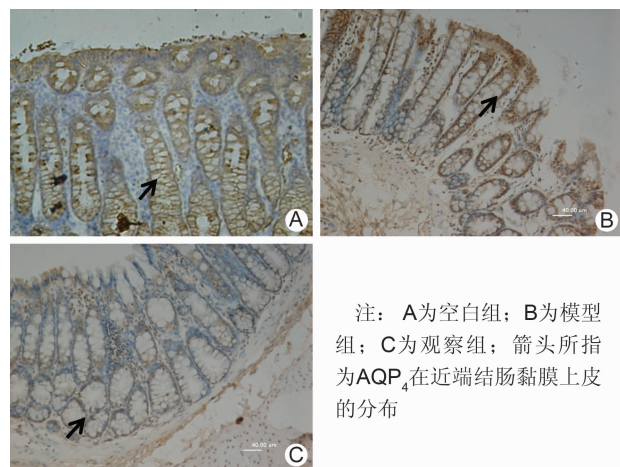
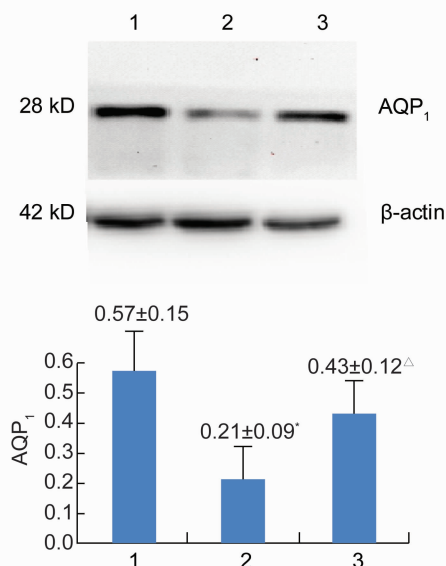


图 2 结肠组织 AQP₄ 表达 (免疫组化, $\times 400$)

(19.15 ± 5.32), 与空白组比较(40.17 ± 6.34) 明显减低;与模型组比较,观察组 AQP₁ 表达 (32.56 ± 8.23) 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组大鼠结肠组织 AQP₄ 表达为 (29.35 ± 4.25), 与空白组比较(37.10 ± 5.41) 减低;与模型组比较,观察组 (15.21 ± 4.56) 明显减低。

5.2 各组肺组织 AQP₁ 及结肠组织 AQP₄ Western blot 表达比较(图 3、4) 与空白组比较,模型组大鼠肺组织 AQP₁ 表达降低,而观察组较模型组升高($P < 0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 AQP₄ 蛋白表达降低($P < 0.05$)。



注:1 为空白组;2 为模型组;3 为观察组;与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$; 图 4 同

图 3 各组肺组织 AQP₁ 表达比较

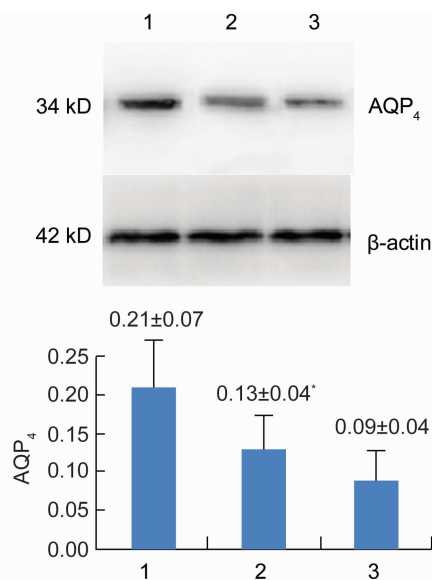


图 4 各组结肠组织 AQP₄ 表达比较

讨 论

《素问·咳论》载“……肺咳不已,则大肠受之”^[3],即肺病宣降失职,累及大肠致其传导障碍,使水与糟粕俱下而见腹泻。笔者以烟熏制备支气管炎大鼠模型,全部动物出现咳嗽,其中 2 只大鼠肺喘鸣显著;伴见精神萎靡、蜷伏不动、毛发卷曲、消瘦,同时兼见便溏症状;吻合中医学“肺病及肠”病证特点。

肺与结肠胚胎发育密切相关,肺和气管由肠的前肠发育而来,呼吸道上皮和腺体由原肠内胚层分化而成^[4],肺与结肠均为腔性脏器;肺泡为肺的基本结构,肺泡腔内含 O₂ 与 CO₂, 备以气体交换;结肠属管道结构,管腔内含气体、水和残渣,结肠与中医大肠相对应。研究证实:肠道内气体经肠壁血循环吸收再由肺排出,经肺排肠内气量较肛门排量高 20 倍^[5];肺炎、支气管炎、哮喘等病变导致肺排气功能异常,肠气排泄亦随之障碍,可见腹胀腹泻;“泻下通便”增排肠内积气、肠道气压下降,不仅利于肠道功能恢复、且可减轻肺排气负担,间接改善肺组织微循环与换气功能、消除肺组织炎性病灶^[6]。本实验中血气分析显示:低氧血症(PO₂降低)和高碳酸血症(PCO₂升高、pH 降低),同时伴结肠水肿、结肠组织湿重指数升高,提示肺病变时,伴随结肠病理出现,为中医学“肺病及肠”提供了部分生物学证据。

依据中医学扶正祛邪理论,脏病实证时当泻其腑,脏病虚证时当补其脏;笔者制备的支气管炎大鼠模型,尽管属肺部慢性病变,但肺部仍有“咳、痰、喘”实证表现,当以通因通用之法选小承气汤“重”泻腑。本实验结果显示:小承气汤组大鼠便溏加重,结肠湿重指数下降,明显改善低氧与高碳酸血症状态,验证了“通腑即泻肠”所具的清肺效应,为“肺病治肠”提供了实验依据。至于肺虚证,当以健脾法选健脾补肺方药治之,应属肺病虚实辨治的另一研究,有待今后再行探索。

在肺中表达 AQP_{1/3/4/5/8/9} 6 个亚型,其中 AQP₁ 表达于肺支气管周围血管与毛细血管内皮细胞、气道黏膜上皮细胞等,能清除支气管和微血管周围组织淤积之“水”,研究发现缺乏 AQP₁ 的肺泡毛细血管间水渗透力下降 90%^[7]。在结肠表达 AQP_{2/4} 2 个亚型,其中 AQP₄ 表达于结肠近端(升结肠)上皮细胞且高于远端(降结肠),与结肠水吸收有关,与便秘亦相关^[8]。本研究发现:烟熏支气管炎模型组大鼠肺组织 AQP₁ 表达明显下降,肺间质组织水肿,大鼠出现咳嗽、喘息;而结肠组织 AQP₄ 表达亦下降,结肠水吸收减少,大鼠出现便溏;可见肺病变(支气管炎)时,肺与结肠组织的 AQP₁ 与 AQP₄ 调节异常相伴随,以致肺肠组织水转运力下降

而见相应症状,提示 AQP 可能中医学“肺与大肠相表里”理论之“肺病及肠”病证的“水湿”病理链点。

以往研究证实:丹参通过上调肺组织微血管内皮细胞 AQP₁ 发挥肺损伤时的保护效应^[9],大黄蓼醌衍生物有效调节大鼠结肠上皮细胞 AQP₄ 表达^[10]。本实验显示:小承气汤下调结肠组织 AQP₄ 表达,大鼠腹泻加剧;同时,又上调了肺组织 AQP₁ 表达,大鼠“咳喘”缓解;初步验证了小承气汤“泻肠水”以“清肺痰湿”效应的关联性;反证了肺组织 AQP₁ 和结肠组织 AQP₄ 可能是“泻肠清肺”祛除“水湿”的关键位点。小承气汤作用于 AQP 的有效成分有哪些?笔者能确认的是大黄,厚朴和枳实的药效如何界定,有待下一步研究揭示。

通过以上证据,可见肺微血管内皮细胞(里)膜 AQP₁ 和结肠上皮细胞(表)膜 AQP₄ 可能是“肺病及肠”病理传变中“水湿”的“表里”关键位点,亦是“泻肠清肺”的新位点,AQP 可能是肺与大肠相表里的生理与病理学证据之一。

参 考 文 献

- [1] 惠毅,杨宇,唐洪屈,等.从肺病模型大鼠胃肠动力学角度探讨“肺病及肠”病理传变机制[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(1):50-51.
- [2] 马建华,郑绘霞,赵玉泽,等.肠必清栓对溃疡性结肠炎模型大鼠治疗作用的实验研究[J].中国药物与临床,2010,2(10):150-153.
- [3] 姚春鹏.黄帝内经(上册)[M].北京:中华书局,2010:326.
- [4] 周吕主编.胃肠生理学[M].北京:北京科学技术出版社,1991:726-727.
- [5] 孙明祎,王希利,陈海铭.肺与大肠相表里解析[J].实用中医内科杂志,2011,25(6):100-101.
- [6] 陈小会,敖素华,杨峰.通腑泻下法在治疗慢性阻塞性肺疾病呼吸衰竭中的运用[J].湖南中医杂志,2015,31(3):164-166.
- [7] Verkman AS, Yang B, Song Y, et al. Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice[J]. Exp Physiol, 2000, 85: 233-241.
- [8] 方圆之,高杰.白芍的通便作用及其对便秘小鼠结肠 AQP4 表达的影响[J].山东中医杂志,2017,36(1):62-65.
- [9] 李敏,李锋,胡波,等.丹参对大鼠急性肺损伤的保护作用[J].中药材,2007,30(4):442-444.
- [10] 张文生,李锋,鲍军强,等.大黄蓼醌衍生物对大鼠结肠及 LoVo 细胞水通道蛋白 4 表达的调节效应[J].中国中西医结合杂志,2008,28(9):818-823.

(收稿:2015-10-08 修回:2017-03-08)

责任编辑:汤 静

英文责编:张晶晶