

过敏性哮喘大鼠模型结肠和肺组织 CCK-8、CGRP、SP 及 VIP 变化观察

郑秀丽 杨 宇 王宝家 唐洪屈 郑旭锐 叶建红

摘要 **目的** 观察过敏性哮喘大鼠模型消化系统各组织八肽胆囊收缩素(cholecystokinin octapeptide, CCK-8)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)、P 物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)变化。**方法** 以 1% 卵清蛋白复制肺病(过敏性哮喘)大鼠模型,观察其对从胃至直肠整个消化系统的 6 个主要部位(胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠和直肠)的病理形态和相关调控物质 CCK-8、CGRP、SP、VIP 的影响。**结果** 模型大鼠肺和结肠组织病理形态同步改变,而胃、十二指肠、空肠、回肠、直肠无明显变化。模型大鼠肺组织和结肠组织 CCK-8 ($79\ 961.4 \pm 12\ 577.9, 48\ 519.5 \pm 12\ 240.7$)、CGRP ($41\ 950.1 \pm 12\ 600.1, 38\ 059.8 \pm 11\ 942.4$)、SP ($88\ 243.9 \pm 32\ 177.2, 47\ 417.8 \pm 16\ 462.4$)、VIP ($20\ 711.4 \pm 7\ 334.6, 43\ 208.1 \pm 13\ 433.8$) 均出现显著变化($P < 0.05, P < 0.01$),而胃、十二指肠、空肠、回肠和直肠的上述物质无显著变化($P > 0.05$)。**结论** 肺病可影响到结肠,引起结肠组织出现病理改变和相关调控物质(CCK-8、CGRP、SP、VIP)发生改变;而对胃、十二指肠、空肠、回肠和直肠的影响不显著。

关键词 肺与大肠相表里;过敏性哮喘;结肠;肺病

Changes of CCK-8, CGRP, SP, and VIP in the Colon and the Lung Tissue of Allergic Asthma Model Rats: an Experimental Observation ZHENG Xiu-li, YANG Yu, WANG Bao-jia, TANG Hong-qu, ZHENG Xu-rui, and YE Jian-hong Department of Warm Diseases, College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075), China

ABSTRACT **Objective** To observe changes of cholecystokinin octapeptide (CCK-8), calcitonin gene related peptide (CGRP), substance P (SP), and vasoactive intestinal peptide (VIP) in each tissue of the digestive system of allergic asthma (AA) model rats. **Methods** The pulmonary disease (AA) rat model was duplicated by 1% ovalbumin. Its effect on the pathological morphology of the six main parts of the digestive system (stomach, duodenum, jejunum, ileum, colon and rectum) and related regulating factors such as CCK8, CGRP, SP, and VIP were observed. **Results** The pathological morphology of the lung was synchronously changed as that of the colon of model rats. But there was no obvious change in the stomach, duodenum, jejunum, ileum, or rectum. Significant changes occurred in CCK8 ($79\ 961.4 \pm 12\ 577.9, 48\ 519.5 \pm 12\ 240.7$), CGRP ($41\ 950.1 \pm 12\ 600.1, 38\ 059.8 \pm 11\ 942.4$), and SP ($88\ 243.9 \pm 32\ 177.2, 47\ 417.8 \pm 16\ 462.4$), and VIP ($20\ 711.4 \pm 7\ 334.6, 43\ 208.1 \pm 13\ 433.8$) of the lung tissue and the colon tissue of model rats ($P < 0.05, P < 0.01$). But there was no significant change in the aforesaid substances of the stomach, duodenum, jejunum, ileum and rectum ($P > 0.05$). **Conclusions** Pulmonary disease might affect the colon, inducing pathological changes of the colon tissue and changes of related regulating factors such as CCK8, CGRP, SP, and VIP. It showed no significant effect on the stomach, duodenum, jejunum, ileum and rectum.

KEYWORDS Fei and Dachang being interior-exteriorly related; allergic asthma; colon; lung disease

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)

作者单位:成都中医药大学基础医学院温病学教研室(成都 610075)

通讯作者:杨 宇, Tel:13880310286, E-mail: yang6666yu@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 12. 1668

“肺与大肠相表里”是中医脏腑理论的重要内容之一,肺与大肠在生理上相互影响,在病理上相互传变,在治疗上相互作用,体现中医脏象学说从整体功能状态把握和认识人体生命活动的特色。课题组前期研究已表明,肺与大肠无论在生理功能上还是病理形态上,无论在菌群变化上还是相关物质变化上都密切相关^[1-7]。本实验通过建立肺病(过敏性哮喘)动物模型,观察其对从饮食入胃开始至最后化为糟粕排出体外的整个消化过程的重要参与器官(胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠和直肠)的影响,分别对各部位的病理形态和相关调控物质进行比较,探讨“肺病”对肠的影响。

材料与方法

1 实验动物 7 周龄 Wistar 大鼠 20 只,SPF 级,雄性,体重(180±20)g。购自成都达硕生物科技有限公司,动物合格证号:SCXK(m)2008-15。饲养于成都中医药大学基础医学院动物房,适应性饲养 1 周。

2 药物 1% 卵清蛋白(ovalbumin, OVA, Sigma 产品);氢氧化铝(成都市科龙化工试剂厂,批号:20080807)。

3 试剂及仪器设备 八肽胆囊收缩素(cholecystokinin octapeptide, CCK-8)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)、P 物质(substance P, SP)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);兔 SPKit (一抗为兔来源的免疫组化试剂盒,北京中衫金桥生物技术有限公司);二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(北京中衫金桥生物技术有限公司);称重天平(ACS-3C 型,广州中山市新和基科技开发有限公司生产);超声雾化器(WH-203 型,广州粤华医疗器械有限公司);石蜡切片机(2016,德国 Leica 切片机);光学显微镜(Olympus BHS 型显微镜,日本);电子显微镜(日立 HT-600IV 型,日本)。

4 模型制备及分组 将 20 只大鼠随机分为空白对照组(对照组)和过敏性哮喘模型组(肺病组),每组 10 只。过敏性哮喘模型制备方法参考文献[5],将 OVA 1 mg 和氢氧化铝 200 mg 溶于生理盐水 1 mL 中配制成凝胶致敏剂,于造模第 1 天、第 7 天分别在大鼠双侧胸部、双侧腹股沟皮下注射 0.15 mL,并腹腔注射 0.4 mL。造模第 14 天开始将大鼠置于有机玻璃盒内,超声雾化吸入 1% OVA 诱发哮喘(以大鼠出现烦躁、打喷嚏、咳嗽、腹肌强烈收缩、呼吸急促等典型哮喘样发作为标准),每天 1 次,每次 30 min,连续 1 周。对照组于相同时间点注射和雾化等量生理盐水。

5 检测指标及方法 造模结束后,颈椎脱臼法处死大鼠,剖开胸腹,取肺、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠组织,4% 甲醛固定,常规酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成厚度为 4 μm 切片,HE 染色后行普通光镜观察。免疫组化法检测各部位 CCK-8、CGRP、SP、VIP,具体操作方法参见试剂盒说明书。

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据不满足正态分布采用非参数检验,均数比较方差齐性后,采用单因素方差分析,若方差不齐,采用 Tamhane's T2 进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

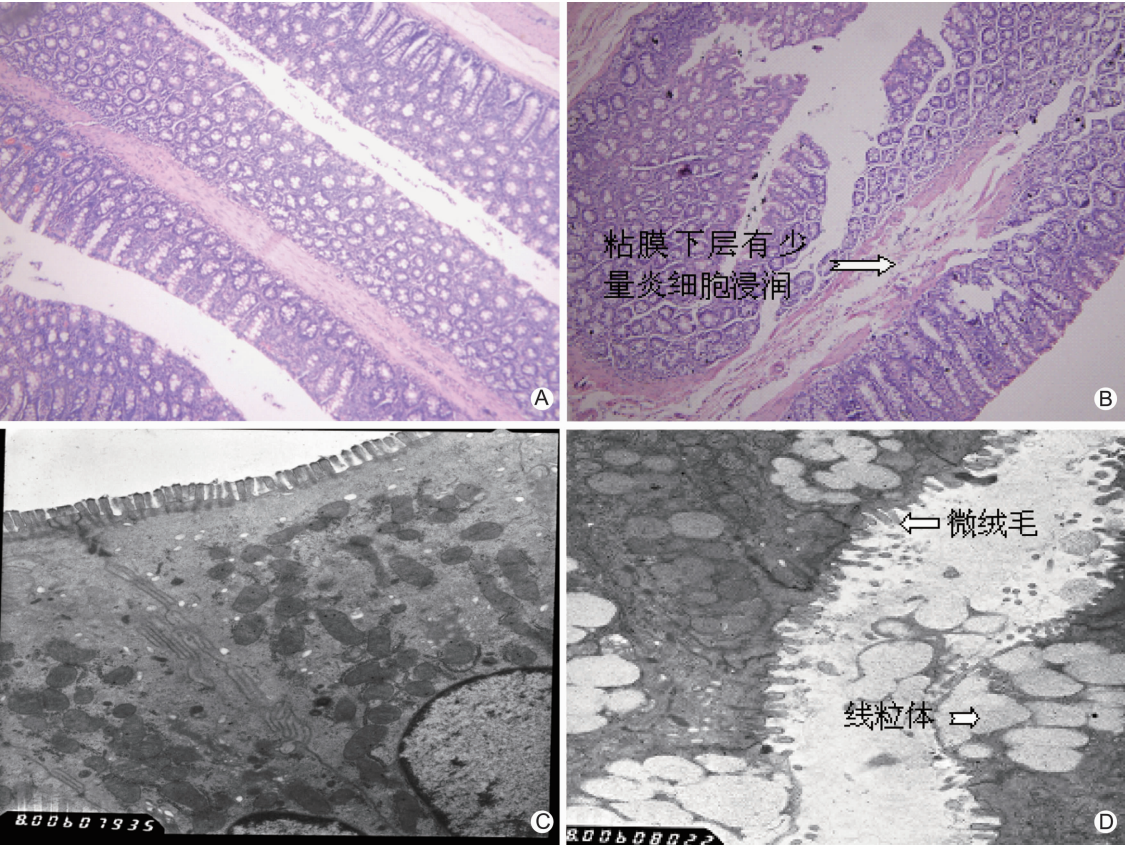
1 两组一般状态比较 肺病组大鼠造模后出现不同程度的烦躁、呼吸急促、喷嚏,甚至爪甲青紫等表现外,还出现不同程度的腹胀状态,倦怠蜷缩,皮毛蓬松无泽,活动减少,反应迟缓,体重减轻,摄食量减少,排便次数减少,粪便颗粒变小,质地干硬等。对照组无以上变化。

2 两组病理结果比较(图 1) 光镜结果显示,肺病组大鼠结肠组织出现结肠黏膜下、肌层、浆膜层有少量炎细胞浸润。而十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织的病理组织观察无明显变化。电镜结果显示,肺病组大鼠结肠组织出现结肠黏膜上皮表面的微绒毛排列稀疏紊乱,长短不一,线粒体内基质清淡,内嵴头肿胀明显。可见,肺病模型的结肠组织出现一定程度的病理改变。而胃、十二指肠、空肠、回肠、直肠无明显病理改变。

3 两组大鼠各组织 CCK-8、CGRP、SP、VIP 含量比较(表 1) 与对照组比较,肺病组大鼠肺组织 CCK-8、VIP 降低($P < 0.01$),CGRP、SP 升高($P < 0.01$);结肠组织 CCK-8、CGRP、VIP 升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),SP 降低($P < 0.05$)。

讨 论

中医理论中的“大肠”属六腑之一。饮食从进入人体到排出体外,要通过七道关隘,这七道关隘,《难经》称之为“七冲门”。如《难经·四十四难》说:“七冲门何在?唇为飞门,齿为户门,会厌为吸门,胃为贲门,太仓下口为幽门,大肠小肠会为阑门,下极为魄门,故曰七冲门也”^[8]。“大肠”上接阑门,与小肠相通,下连魄门(肛门),其上段为“回肠”,下段为“广肠”,末端外口为肛门。可见,中医理论中的大肠主要指的是现代医学中的结肠。



注:A、B 为光镜结果(HE, ×100) ;C、D 为电镜结果(EM, ×8000) ;A、C 为对照组;B、D 为肺病组

图 1 两组大鼠结肠组织病理结果

表 1 两组大鼠各组织 CCK-8、CGRP、SP、VIP 含量比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	部位	n	CCK-8	CGRP	SP	VIP
对照	肺	10	103 558.4 ±23 911.3	24 720.6 ±10 040.4	51 350.9 ±15 780.7	39 318.3 ±8 817.2
	胃	10	12 187.9 ±9 831.5	22 526.0 ±5 441.9	18 434.3 ±8 424.8	11 958.3 ±3 875.6
	十二指肠	10	115 397.5 ±45 489.5	94 553.3 ±37 718.8	98 120.2 ±34 277.1	67 523.3 ±31 970.8
	空肠	10	78 733.9 ±40 006.8	13 370.0 ±12 613.4	78 015.2 ±35 071.0	29 638.6 ±17 650.7
	回肠	10	106 208.8 ±29 143.0	43 197.3 ±12 752.3	85 695.1 ±26 495.1	49 315.9 ±13 987.7
	结肠	10	25 795.2 ±11 866.0	21 326.5 ±12 795.2	64 931.0 ±18 898.4	26 296.4 ±9 497.9
	直肠	10	30 168.0 ±11 632.4	32 020.7 ±10 924.0	15 396.5 ±10 692.5	25 357.6 ±10 951.6
肺病	肺	10	79 961.4 ±12 577.9 **	41 950.1 ±12 600.1 **	88 243.9 ±32 177.2 **	20 711.4 ±7 334.6 **
	胃	10	18 856.0 ±12 466.9	27 712.3 ±6 486.9	24 120.3 ±9 452.2	20 675.8 ±8 551.9
	十二指肠	10	106 236.7 ±35 268.7	103 136.6 ±26 631.7	120 786.9 ±19 257.9	51 419.6 ±20 691.0
	空肠	10	78 233.8 ±22 802.2	25 972.1 ±13 600.0	89 041.6 ±21 703.3	28 244.0 ±7 645.6
	回肠	10	112 681.9 ±21 870.7	54 378.0 ±11 290.0	85 915.5 ±24 031.5	46 348.6 ±11 781.5
	结肠	10	48 519.5 ±12 240.7 **	38 059.8 ±11 942.4 *	47 417.8 ±16 462.4 *	43 208.1 ±13 433.8 *
	直肠	10	26 198.8 ±7 801.1	35 165.4 ±11 931.5	17 388.4 ±16 657.5	24 625.8 ±8 899.8

注:与对照组同部位比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

《素问·灵兰秘典论》:“大肠者,传道之官,变化出焉。”王冰注:“传道,谓传不洁之道。变化,谓变化物之形”^[9],可见,大肠的主要功能是传化糟粕。大肠接受经过小肠泌别清浊后所剩下的食物残渣,再吸收其中多余的水液,形成粪便,经肛门而排出体外。大肠具有“传”和“化”两方面的作用。“传”即传导,接上传

下之意。“化”即变化,将糟粕化为粪便。

现代医学认为,结肠具有传输和贮存食物残渣的作用。结肠的收缩有三种类型:逆蠕动、节断性收缩和集团运动,后者可使结肠内容物向肛门方向推进^[10]。同时,结肠亦具有提供微菌群的生长环境、消化和吸收功能。结肠的吸收功能主要是吸收水分和电解质,并

能调节电解质的浓度。部分脂肪水解产物亦可被结肠,尤其是升结肠的吸收细胞吸收。结肠的消化功能主要是指细菌的消化作用。此外,结肠黏膜内还有杯状细胞,可分泌碱性液体,保护结肠黏膜,润滑大便,以帮助排便。

胆囊收缩素(CCK)是一种由胃肠道黏膜 I 细胞分泌的多肽激素,以羧基端酰胺化的 CCK-8 和 CCK-58 为主要形式,对胃肠运动具有重要影响,可刺激胰腺分泌和胆囊收缩,增强小肠和结肠运动,抑制胃排空等。CCK-8 还可能通过参与调节呼吸道及血管的收缩功能而对肺起到保护作用^[11]。SP 和 CGRP 均是非肾上腺能非胆碱能兴奋性神经释放的神经肽,二者皆可导致实验动物气道平滑肌收缩,黏膜下腺体分泌增多,微血管渗漏及炎性浸润,在哮喘的发病中起重要作用^[12],SP、CGRP 介导的神经源性气道炎症可能参与小儿哮喘的发病过程^[13]。其中,SP 是一种主要的具有促炎症作用的神经肽,导致气道平滑肌收缩,黏液分泌增加,血管扩张、通透性增加,炎性细胞在气道周围浸润等^[14]。CGRP 是肺内感觉神经末梢和神经内分泌细胞分泌的一种重要生物活性肽,参与呼吸道生理和病理生理机制,其主要功能是引起气道血管舒张^[15]。VIP 是非肾上腺能非胆碱能抑制性神经的神经递质之一,具有较强的抑制炎症介质的释放和抗损伤作用,参与调节免疫反应。VIP 的减少可使支气管收缩,血管通透性增加,抗炎抗损伤作用减弱,促进炎症介质的释放,从而加重哮喘^[12]。

本实验研究结果显示,在以过敏性哮喘为模型的肺病状态下,肺组织、结肠组织的病理形态和相关调控物质 CCK-8、CGRP、SP、VIP 均同步发生了变化,表明肺病可影响到结肠,引起结肠的病理形态和相关调控物质发生改变。

同时,研究结果还显示,肺病状态下,肺病组模型动物在结肠组织发生明显改变的同时,胃、十二直肠、空肠、回肠、直肠组织均无明显病理改变;肺病可影响结肠中相关调控物质 CCK-8、CGRP、SP、VIP 的改变,而对胃、十二直肠、空肠、回肠、直肠组织中的同一调控物质无明显影响。此结果提示,肺病对结肠的影响可能具有一定的特异性。

综上,“肺病及肠”可能主要影响的是结肠,引起其出现组织形态学的改变和功能的变化。“肺病及肠”的部分机制可能在于引起了肺与结肠之间的共有相关调控物质出现了同步改变。但关于肺与结肠之间

的特异相关性及其机制尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 郑秀丽,杨宇,唐洪屈,等. 从肺与大肠的特异相关性探讨“肺与大肠相表里”[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1492 - 1495.
- [2] 惠毅,杨宇,张显明,等. 从“肺肠合病”模型大鼠血清 TNF- α 、IL-1 含量变化探讨“肺与大肠相表里”[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(1): 153 - 154.
- [3] 朱素有,杨宇,冯贤荣,等. “肺肠合病”模型大鼠肺肠血管活性肠肽与 P 物质表达的相关性研究[J]. 吉林中医药, 2011, 31(6): 592 - 593.
- [4] 朱素有,冯贤荣,张显明,等. “肺肠合病”模型大鼠胃肠组织血管活性肠肽含量变化探讨[J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(9): 6 - 7.
- [5] 郑旭锐,杨宇,郑秀丽,等. 从肺肠微生态变化研究肺与大肠的相关性[J]. 中医杂志, 2011, 52(10): 865 - 867.
- [6] 叶建红,杨宇,郑旭锐,等. 肠病及肺的微生态学研究[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(3): 54 - 56.
- [7] 冯贤荣,杨宇,张显明,等. “肺肠合病”模型大鼠肺、肠 CGRP 与 CCK-8 表达的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(10): 2091 - 2092.
- [8] 苏新民. 七冲门的英译问题[J]. 江苏中医药, 2012, 44(6): 67 - 68.
- [9] 吴敦序主编. 中医基础理论[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2000:73 - 75.
- [10] 姚泰主编. 生理学[M]. 第 5 版.北京:人民卫生出版社, 2000:199 - 202.
- [11] 张显明,冯贤荣,朱素有,等. “肺病”模型大鼠肺与结肠组织中 CGRP、CCK-8 表达变化的探讨[J]. 广西中医药, 2011, 34(2): 60 - 61.
- [12] 谷玲,魏兵,王鸾升. 哮喘患儿血浆 SP、CGRP、VIP 放射免疫分析的临床意义[J]. 中华核医学杂志, 1999, 19(2): 20.
- [13] 徐传伟,郭山春,郑振文,等. γ -氨基丁酸治疗对哮喘患儿血浆 P 物质和降钙素基因相关肽含量的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(2): 102 - 104.
- [14] 吕正梅,贾友苏,贾雪梅,等. 哮喘大鼠肺内 SP 阳性纤维的变化和 Fos 蛋白表达的形态学研究[J]. 神经解剖学杂志, 2005, 2(5): 526 - 530.
- [15] 郑旭锐,杨宇,叶建红,等. 从肺肠病理模型 CCK8、CGRP、SP、VIP 表达探讨“肺与大肠相表里”[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2226 - 2228.

(收稿:2012-12-09 修回:2013-08-09)