

溃疡性结肠炎大鼠肺、肠组织先天与后天免疫应答的改变及中药复方的干预作用

景 珊¹ 王新月¹ 杨 雪² 杨 舒¹ 朱 立¹ 盛益华¹ 闫 昕¹ 柴立民¹

摘要 目的 通过观察溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 大鼠模型肺、肠组织先天免疫应答与后天免疫应答的改变及中药复方的干预作用,探讨“肺与大肠相表里”的中医学理论。**方法** 70 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、从肺论治组、从肠论治组及柳氮磺胺吡啶组,正常对照组 10 只,模型组与治疗组各 15 只,除正常对照组外,其余各组大鼠均用结肠黏膜致敏联合三硝基苯磺酸加 50% 乙醇灌肠的免疫复合法制 UC 大鼠模型,进行药物 (从肺论治方、从肠论治方及柳氮磺胺吡啶) 灌胃干预,治疗后 4 周杀检取材,采用放射免疫方法检测肺、肠组织和血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-8 (IL-8) 的含量,采用 ELISA 法检测血清 MedCAM-1 含量;采用 Real time-PCR 法检测肺、肠组织中 Toll 样受体 4 (TLR4)、核转录因子- κ B (NF- κ B)、中性粒细胞移动抑制因子 (MIF)、黏膜地址素黏附分子-1 (MadCAM-1) 基因转录水平的改变。**结果** 本 UC 模型肺组织中 TNF- α 含量,TLR4 mRNA,IL-8 含量,MIF mRNA,MadCAM-1 mRNA 表达均较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,从肺论治方、从肠论治方肺组织中 TNF- α 含量,TLR4 mRNA,IL-8 含量,MIF mRNA,MadCAM-1 mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.01$);模型组肠组织中 MadCAM-1 mRNA 表达较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$),TNF- α 含量,NF- κ B mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组肺、肠组织中 MadCAM-1 mRNA 均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组血清中 TNF- α 含量较正常对照组明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,从肺论治方、从肠论治方均能明显降低血清中 TNF- α 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 本 UC 模型肠组织发生损伤的机制主要与后天免疫应答激活相关,同时伴有先天免疫应答功能降低;肺组织发生损伤的机制与先天免疫应答、后天免疫应答均相关;从肺论治、从肠论治均能明显改善肺、肠组织免疫失衡。以上说明了肺、肠组织的特殊联系,为“肺与大肠相表里”的中医学理论提供了实验依据。

关键词 溃疡性结肠炎;先天免疫应答;后天免疫应答;中医治疗;肺与大肠相表里

Changes of Inherent Immune Response and Acquired Immune Response in the Lung Tissue and the Intestinal Tissue of Ulcerative Colitis Rats and the Intervention of Chinese Compound: an Experimental Research JING Shan¹, WANG Xin-yue¹, YANG Xue², YANG Shu¹, ZHU Li¹, SHENG Yi-Hua¹, YAN Xin¹, and CHAI Li-min¹ 1 Department of Internal Gastroenterology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029), China; 2 Faculty of Internal TCM, Third Hospital Affiliated to Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450003), China

ABSTRACT Objective To explore Chinese medical theory of Fei and Dachang being interior-exteriorly correlated by observing changes of inherent immune response and acquired immune response in the lung tissue and the intestinal tissue of ulcerative colitis (UC) model rats and the intervention of Chinese compounds (CM). **Methods** Seventy rats were randomly divided into 5 groups, i.e., the normal control group ($n=10$), the model group ($n=15$), the treatment 1 group ($n=15$, treated from Fei), the treatment 2 group ($n=15$, treated from the intestine), and the Western medicine (WM) group [$n=15$,

基金项目:国家“973 计划”资助项目 (No. 2009CB522705)

作者单位:1.北京中医药大学东直门医院脾胃内科 (北京 100029);2.河南省中医学院第三附属医院中医内科教研室 (郑州 450003)

通讯作者:景 珊,现在江苏省南通市中医院脾胃内科 (江苏 226000), Tel:15052476295, E-mail:jingshan0@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.01.0063

treated with Sulfasalazine (SASP). Except those in the normal control group, the UC rat model was prepared by allergizing colon mucosa combined with TNBS-alcohol (50%) enema, and then intervened by medication (treated with CM complex prescription of treatment from lung, CM complex prescription of treatment from intestine, and SASP). After intragastric administration for 4 weeks, rats were sacrificed and samples taken. The expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) and IL-8 contents in the lung tissue, the intestinal tissue, and the serum were detected by radioimmunoassay. Serum MedCAM-1 contents were detected using ELISA. Changes of the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor κ B (NF- κ B), neutrophil migration inhibition factor (MIF), mucosal addressin cell adhesion molecule - 1 (MadCAM-1) mRNA in the lung tissue and the intestinal tissue were detected by real time PCR. Results

Compared with the normal control group, the expression levels of TNF- α , TLR4 mRNA, IL-8, MIF mRNA, and MadCAM-1 mRNA obviously increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of TNF- α , TLR4 mRNA, IL-8, MIF mRNA, and MadCAM-1 mRNA obviously decreased in the treatment 1 and 2 groups ($P < 0.01$). The expression of MadCAM-1 mRNA in the intestinal tissue was obviously higher in the model group than in the normal control group ($P < 0.01$), while the expressions of TNF- α and NF- κ B mRNA was obviously lower in the model group than in the normal control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of MadCAM-1 mRNA all significantly decreased in each treatment group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Serum TNF- α contents were higher in the model group than in the normal control group ($P < 0.05$). Compared with the model group, serum TNF- α contents could be lowered in the treatment 1 and 2 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions The main mechanisms of the intestinal injury in this UC model might be related with activation of acquired immune response, accompanied with lowered functions of inherent immune response. The main mechanisms of the lung injury in this UC model might be related acquired immune response and inherent immune response. Treatment from Fei and treatment from Dachang both could obviously improve the immunodissonance of Fei and Dachang, indicating the special relation between the lung tissue and the intestinal tissue, thus providing experimental evidence for Chinese medical theory of Fei and Dachang being interior-exteriorly correlated.

KEYWORDS ulcerative colitis; inherent immune response; acquired immune response; Chinese medical remedy; Fei and Dachang being interior-exteriorly correlated

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 与克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 同属于炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD), 均是肠道的慢性非特异性炎症性疾病, 其中 UC 是以侵及结肠黏膜且以溃疡为主的慢性非特异性炎症性肠病, 其病因和发病机制尚未完全明了, 可能与遗传、环境、饮食、心理和免疫系统失调有关。其病程常反复迁延, 并有上百种肠外表现^[1,2]。其疾病临床特征、组织病理学表现和免疫抑制剂的治疗有效性提示本病的发生与免疫系统失调相关。近年来国内外多有 UC 并发呼吸系统疾病的报道, 并把其作为 UC 肠外表现之一^[3]。UC 并发肺部病变多数应用糖皮质激素治疗且取得良好效果, 而单独用抗生素治疗无明显疗效, 说明其发病与自身免疫功能失调有关^[4-6]。中医学认为, UC 发病多为感受外邪, 加之内伤饮食、情志不调、劳倦所伤、先天禀赋不足等因素的共同作用, 湿热与积滞客于肠道, 与肠

中气血相互搏结, 大肠传导失司, 气血壅滞, 脂膜血络受损, 重则肉腐成脓而致^[7]。病程较长, 久之脾肾亏虚, 湿热积滞, 气滞血瘀; 肠中湿热、浊毒、瘀血内蕴, 循经上扰, 上熏于肺, 肺失宣降, 痰浊内生; 同时肺之功能受损, 宗气生成不足, 气血运行不畅, 反过来又加重肠中淤滞。此理论不仅解释了 UC 的肺部病变机制, 也指导着中医临床对 UC 的治疗^[8]。本实验在前期研究的基础上, 以结肠黏膜免疫致敏联合三硝基苯磺酸 (TNBS) 加乙醇灌肠的复合方法建立大鼠 UC 模型, 检测肺、肠组织中细胞因子、趋化性因子、黏附分子和细胞内信号转导分子等免疫学相关指标, 探讨 UC 大鼠模型肺损伤的固有免疫应答与适应性免疫应答发生机制, 以及中药复方从肺论治方、从肠论治方的干预机制, 为临床治疗 IBD 合并肺损伤提供实验依据, 也进一步从该角度阐明“肺与大肠相表里”中医学理论的物质基础。

材料与方法

1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 70 只, 体重 (200 ± 10) g [由北京军事医学科学院提供, 许可证号: SCXK-(军)2007-004]; 健康雄性新西兰家兔 10 只, 体重 (3 ± 0.2) kg [北京海淀兴旺动物养殖厂提供, 许可证号: SCXK(京)2006-0006]。

2 试剂及体器 水合氯醛(批号: 1698497), 完全弗氏佐剂(批号: 9007801), 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS, 1.14 g/mL, 批号: 03111065), 以上试剂均由美国 Sigma 公司提供; 肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL-8)放免试剂盒由北京康源瑞得生物技术有限公司提供; Trizol(美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596-026); 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司, 批号: 9012-36-6); M-MLV 逆转录酶(2 000U), M-MLV RT-5 $\times$ Reaction buffer 均由美国 Promega 公司提供; RNA 酶抑制剂(10 000 U), dNTPs (10 mmol/L, pH 为 7.5) 均由北京 Solarbio 公司提供; Goldview 由上海赛百盛基因技术有限公司提供; Pwer SYBR Green PCR Master Mix, P/N: 4367659, 由美国 AB Applied Biosystems 公司提供, 其他试剂为国产分析纯。

3 UC 大鼠模型的制备、分组 70 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、从肺论治组、从肠论治组及柳氮磺胺吡啶组, 正常对照组 10 只, 模型组与治疗组各 15 只, 除正常对照组外, 其余各组大鼠均用于复制 UC 模型。参考文献[9,10], 采用结肠黏膜致敏联合三硝基苯磺酸加 50% 乙醇灌肠的免疫复合法复制 UC 大鼠模型, 造模过程如下。

3.1 家兔肠黏膜抗原的制备 选用健康新西兰家兔 10 只, 以空气栓塞法处死, 剖腹取结肠, 无菌生理盐水冲洗干净, 刮取结肠黏膜组织, 加等量生理盐水, 用超声粉碎机粉碎, 制成肠黏膜组织匀浆液, 4 $^{\circ}$ C, 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 用 BCA 试剂盒进行蛋白定量^[9,10]。

3.2 抗原预免疫与 TNBS 灌肠 家兔肠黏膜抗原液与等体积的完全弗氏佐剂混匀, 制成抗原乳化液。随机选择 60 只 Wistar 大鼠制作 UC 大鼠模型; 其余 10 只设为正常对照组。模型组分别于预免疫第 1、15、22 天注射抗原乳化液于足跖、腹股沟等部位, 每次注射量含抗原蛋白 8 mg/只, 第 29 天用 10% 的水合氯醛麻醉大鼠, TNBS(稀释成浓度 120 mg/mL)与 50% 乙醇 1:1 比例混合, 按 TNBS 100 mg/kg 体重进行灌肠。灌肠时用直径 2 mm、长约 10 cm 的硅胶管从肛门缓慢插入肠腔内 8 cm 左右, 快速(5 s 内)注

入混合液, 约 0.5~0.7 mL/只。

4 给药 灌肠后第 2 天, 大鼠即出现明显的浓血便, 稀便, 大鼠陆续死亡, 灌肠后 1 周给药。从肺论治组: 给予黄芪桔梗汤, 方药组成: 生黄芪 30 g 桔梗 6 g 赤白芍各 10 g 陈皮 10 g 连翘 12 g 薏苡仁 30 g 白及 10 g 炒黄芩 10 g 炒枳壳 10 g 防风 10 g 五倍子 6 g 生甘草 10 g, 由北京中医药大学第一临床医学院中药房提供, 制成免煎颗粒, 使用时 12 剂中药以纯净水稀释至 1 000 mL, 每毫升含生药 1.968 g; 从肠论治组: 采用黄芪黄连汤, 方药组成: 生黄芪 30 g 黄连 10 g 木香 6 g 赤白芍各 15 g 生甘草 6 g 三七粉 3 g 五倍子 6 g 炒白术 10 g 焦槟榔 10 g 生地榆 15 g 蒲公英 20 g 炒薏苡仁 20 g, 由北京中医药大学第一临床医学院中药房提供, 制成免煎颗粒(方法同上), 每毫升含生药 2.076 g。西药对照组: 柳氮磺胺吡啶(每粒 0.25 g, 批号: H31020450), 由上海三维制药有限公司生产, 使用时取 180 粒研碎后以纯净水溶解稀释至 700 mL, 每毫升含 0.06 g 柳氮磺胺吡啶。均按成人每公斤体重用量 8 倍灌胃给药, 正常组、模型组用相同体积的纯净水灌胃, 每日 1 次。治疗 4 周后杀检取材。

5 实验指标的测定

5.1 采用放射免疫方法检测肺、肠组织和血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素(IL)-8 含量; 采用 ELISA 法检测黏膜地址素黏附分子(MadCAM-1)含量 分别于给药 4 周, 各组大鼠禁食 24~48 h, 以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 腹主动脉取血, 留取血上清, 冷冻于液氮罐中备用。同时摘取整个肺组织, 取肛门以上 2~10 cm 结肠组织, 生理盐水冲洗后, 滤纸吸干水分, 分装于冻存管中, 冷冻于液氮罐中。使用时取出肺、肠组织, 各加 5 倍的生理盐水, 超声粉碎机匀浆, 4 $^{\circ}$ C, 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清, 存放于 1.5 mL EP 管中。各组随机选取 7 个样本, 放射免疫法检测大鼠肺、肠组织和血清中 TNF- α 、IL-8 含量的变化, 检测方法同说明书; ELISA 法检测血清中 MadCAM-1 的含量, 检测方法同说明书。

5.2 检测肺、肠组织 Toll 样受体(Toll like receptors, TLR)4、核转录因子- κ B(nuclear factor kappaB, NF- κ B)、中性粒细胞移动抑制因子(MIF)、MadCAM-1 mRNA 的表达 均采用 Real time-PCR 方法。从上述液氮冻存样品中各组随机选取 6 个样本, 各取 50~100 mg 样本, 加入 1 mL Trizol 后用超声细胞粉碎机破坏组织。使用时取 1 mL 组织的 Trizol 匀浆液加入 200 μ L 氯仿, 盖紧盖子, 剧烈摇晃 15

s, 室温孵育 5 min, 4 ℃ 12 000 ×g 离心 15 min, 取上清液加至 400 μL 预冷异丙醇的新 EP 管内, -20 ℃ 孵育样品 30 min, 4 ℃ 10 000 ×g 离心 10 min, 弃上清液; 加入 75% 冷乙醇 1 mL, 4 ℃ 7 500 r/min 离心 5 min, 弃乙醇; 再次加入 75% 冷乙醇 1 mL, 4 ℃ 7 500 r/min 离心 5 min, 弃乙醇, 每次尽量吸干试管中残余液体, 空气或真空干燥 5 ~ 10 min; 加 50 μL DEPC 处理水溶解。紫外分光光度计检测 RNA 230、260、280 nm 处的吸光度, RNA 浓度计算方法: RNA 浓度(μg/μL) = OD₂₆₀ × 40 × 稀释倍数 × 1%。测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8 ~ 2.0 之间, OD₂₆₀/OD₂₃₀ > 2, 表明 RNA 的纯度较高, 无 DNA 及蛋白质污染。逆转录反应体系及条件: RNA 产物: 8 μg; Oligo dT: 2 μL; 5 × M-MLV 反转录酶缓冲液: 10 μL; dNTPs: 2 μL; RNase 抑制剂: 2 μL; DEPC H₂O: 补充至 50 μL; 离心混匀, 反应条件: 42 ℃ 1 h, 99 ℃ 5 min, 4 ℃ 保存。PCR 引物由 Primer 软件设计而成, 设 GAPDH 为内参对照, 引物序列与 RNA 产物如下: TLR4 (116 bp): 上游引物: 5'-CTTTCAGGGAATTAGGCTCC-3', 下游引物: 5'-CCAAGATCAACCGATGGAC-3'; NF-κB (167 bp): 上游引物: 5'-ATCTGTTTCCCTCATCTT-3', 下游引物: 5'-GTGCGTCTTAGTGGTATCTG-3'; MIF (178 bp): 上游引物: 5'-TCTCCGCCACCATGCCTATG-3', 下游引物: 5'-GGGTCGCTCGTGCCACTAAA-3'; MadCAM-1 (81 bp): 上游引物: 5'-CCGAAATCCAC-CAGAACC-3', 下游引物: 5'-TCCAATGCACCGTCACTC-3'; GAPDH (195 bp): 上游引物: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGG-3', 下游引物: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'。Real time-PCR 反应体系: cDNA 稀释 3 倍, 50 ~ 150 μL, 以减少上样误差; 稀释后的 cDNA: 3 μL; 2 × SYBR Green PCR Master Mix: 10 μL; 上游引物: 0.5 μL; 下游引物: 0.5 μL; 补充 ddH₂O 至 20 μL。Real time-PCR 反应条件: TLR4、NF-κB (95 ℃ 10 min, 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 20 s) 40 个循环; MIF (95 ℃ 10 min, 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 20 s) 40 个循环; MadCAM-1、GAPDH (95 ℃ 10 min, 95 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 20 s) 40 个循环。计算样品中 cDNA 相对含量: 应用 MxPro-Mx3000p 软件分析各个样品的 Ct 值, 根据 Ct 值计算样品中 cDNA 的相对含量。ΔCt = 各组目的基因的 Ct 值 - 内参 GAPDH Ct 值; ΔΔCt = 各组 ΔCt 值 - 正常组 ΔCt 值的均值, 所有样品中 cDNA 的相对含量 = 2^{-ΔΔCt}。

6 统计学方法 所有实验数据应用 SPSS 13.0 专业统计软件包进行单因素方差分析检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐则采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况 造模前各组大鼠毛色光洁, 活泼好动, 粪便成颗粒状, 无黏液脓血。造模后, 注射抗原乳化液加弗式佐剂后, 大鼠腹股沟注射部位形成结节, 足部瘀肿灼热, 少数注射部位出现化脓。大鼠精神不振、反应迟钝、倦怠少动, 毛色欠佳。模型组死亡 5 只, 治疗组各死亡 4 只, 死亡率 37.1%, 主要发生在 TNBS 灌肠后 1 周内, 灌肠后第 2 天即发生脓血便。

2 各组大鼠肺组织中 TNF-α 含量比较(表 1) 与正常对照组比较, 模型组肺组织中 TNF-α 明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 从肺论治组、从肠论治组肺组织中 TNF-α 明显降低 ($P < 0.01$), 柳氮磺胺吡啶组肺组织中 TNF-α 与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与柳氮磺胺吡啶组比较, 从肺论治组肺组织中 TNF-α 明显降低 ($P < 0.01$)。与正常对照组比较, 模型组肠组织中 TNF-α 明显降低 ($P < 0.05$), 各治疗组肠组织中 TNF-α 与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组血清中 TNF-α 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型比较, 从肺论治、从肠论治组血清中 TNF-α 含量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 各组大鼠肺、肠组织中 TLR4 mRNA 及 NF-κB mRNA 表达比较(表 1) 与正常对照组比较, 模型组肺组织中 TLR4 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组肺组织中 TLR4 mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与正常对照组比较, 模型组肠组织中 TLR4 mRNA 表达水平有下降趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 从肺论治组、从肠论治组肠组织中 TLR4 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组肺组织中 NF-κB mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 模型组肠组织中 NF-κB mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 柳氮磺胺吡啶组肺组织及肠组织中 NF-κB mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 从肺论治组及从肠论治组肺、肠组织中 NF-κB mRNA 与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠肺、肠组织及血清中 TNF-α、IL-8 含量及 TLR4 mRNA、NF-κB mRNA、MIF mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)						
组别		TNF-α (ng/mL)	IL-8 (ng/mL)	TLR4 mRNA	NF-κB mRNA	MIF mRNA
正常对照	肺组织	9.494 ± 1.362 (7)	1.551 ± 0.194 (7)	1.050 ± 0.326 (6)	0.897 ± 0.140 (6)	1.077 ± 0.185 (6)
	肠组织	21.390 ± 1.935 (7)	1.983 ± 0.243 (7)	1.087 ± 0.286 (6)	1.041 ± 0.099 (6)	0.962 ± 0.355 (6)
	血清	4.178 ± 0.596 (7)	0.761 ± 0.180 (7)	—	—	—
模型	肺组织	17.436 ± 2.287 (7) **	1.999 ± 0.280 (7) **	2.381 ± 0.354 (6) **	0.890 ± 0.187 (6)	2.368 ± 0.435 (6) **
	肠组织	18.860 ± 1.314 (7) *	1.866 ± 0.199 (7)	1.008 ± 0.219 (6)	0.412 ± 0.101 (6) **	0.853 ± 0.206 (6)
	血清	5.162 ± 0.452 (7) **	0.758 ± 0.230 (7)	—	—	—
从肺论治	肺组织	11.243 ± 2.881 (7) $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle$	1.561 ± 0.183 (7) $\Delta\Delta$	1.933 ± 0.166 (6) $\Delta\Delta$	0.734 ± 0.147 (6)	0.955 ± 0.312 (6) $\Delta\Delta$
	肠组织	18.496 ± 3.507 (7)	1.839 ± 0.129 (7)	1.454 ± 0.201 (6) Δ	0.522 ± 0.190 (6) $\blacktriangle\blacktriangle$	1.334 ± 0.275 (6) $\Delta\Delta$
	血清	4.360 ± 0.427 (7) Δ	1.066 ± 0.176 (7) Δ	—	—	—
从肠论治	肺组织	13.154 ± 3.110 (7) $\Delta\Delta$	1.487 ± 0.290 (7) $\Delta\Delta$	1.906 ± 0.397 (6) Δ	0.806 ± 0.175 (6) $\blacktriangle$	1.019 ± 0.195 (6) $\Delta\Delta$
	肠组织	18.242 ± 2.157 (7)	2.029 ± 0.234 (7) $\blacktriangle\blacktriangle$	1.447 ± 0.206 (6) Δ	0.368 ± 0.119 (6)	0.862 ± 0.180 (6)
	血清	4.092 ± 0.645 (7) $\Delta\Delta$	0.974 ± 0.161 (7)	—	—	—
柳氮磺吡啶	肺组织	15.730 ± 2.672 (7)	1.551 ± 0.159 (7) $\Delta\Delta$	1.913 ± 0.372 (6) Δ	0.591 ± 0.137 (6) $\Delta\Delta$	0.703 ± 0.259 (6) $\Delta\Delta$
	肠组织	18.100 ± 1.371 (7)	1.637 ± 0.085 (7) Δ	1.289 ± 0.330 (6)	0.256 ± 0.077 (6) Δ	0.583 ± 0.208 (6)
	血清	4.460 ± 0.783 (7)	0.965 ± 0.295 (7)	—	—	—

注:与正常对照组同组织/血清比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同组织/血清比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与柳氮磺吡啶组同组织/血清比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;()内数据为样本数

4 各组大鼠肺、肠组织及血清中 IL-8 含量比较 (表 1) 与正常对照组比较,模型组肺组织中 IL-8 含量明显升高($P < 0.01$),肠组织及血清中 IL-8 含量无明显改变($P > 0.05$);与模型组比较,各治疗组肺组织中 IL-8 含量均明显降低($P < 0.01$),柳氮磺吡啶组肠组织中 IL-8 含量明显降低($P < 0.05$),从肺论治组血清中 IL-8 含量明显升高($P < 0.05$)。

5 各组大鼠肺、肠组织中 MIF mRNA 表达比较 (表 1) 与正常对照组比较,模型组肺组织中 MIF mRNA 表达水平明显升高($P < 0.01$),肠组织中 MIF mRNA 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,各治疗组肺组织中 MIF mRNA 表达均明显降低($P < 0.01$),从肺论治组肠组织中 MIF mRNA 表达水平明显升高($P < 0.01$)。

6 各组大鼠肺、肠组织 MadCAM-1 mRNA 和血清中 MadCAM-1 蛋白表达状况 (表 2) 与正常对照组比较,模型组肺组织中 MadCAM-1 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.01$),与模型组比较,各治疗组肺组织中 MadCAM-1 mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.01$);以从肺论治组最为明显。与正常对照组比较,模型组肠组织中 MadCAM-1 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组肠组织中 MadCAM-1 mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.01$),其中从肺论治组最为显著。与正常对照组比较,模型组血清中 MadCAM-1 蛋白含量没有显著性差异($P > 0.05$);与模型组比较,各治疗组血清中 MadCAM-1 蛋白含量均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠肺、肠组织中 MadCAM-1 mRNA 和血清中 MadCAM-1 蛋白表达状况 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	MadCAM-1 mRNA		MadCAM-1 (pg/mL)
	肺组织	肠组织	血清
正常对照	1.137 ± 0.176 (6)	0.959 ± 0.330 (6)	12.526 ± 2.556 (7)
模型	2.200 ± 0.347 (6) **	2.315 ± 0.250 (6) **	13.740 ± 2.793 (7)
柳氮磺吡啶	1.550 ± 0.122 (6) $\Delta\Delta$	1.462 ± 0.279 (6) $\Delta\Delta$	17.261 ± 2.758 (7) Δ
从肺论治	1.082 ± 0.226 (6) $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle$	1.056 ± 0.124 (6) $\Delta\Delta\blacktriangle$	17.755 ± 2.947 (7) Δ
从肠论治	1.1448 ± 0.317 (6) $\Delta\Delta$	1.404 ± 0.236 (6) $\Delta\Delta$	18.489 ± 2.424 (7) $\Delta\Delta$

注:与正常对照组同组织/血清比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同组织/血清比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与柳氮磺吡啶组同组织/血清比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;()内数据为样本数

讨 论

TLRs 是病原相关分子模式 (PAMPs) 家族成员,在机体对各种病原体的产生固有免疫应答及随后的适应性免疫应答中发挥着重要作用。TLR 4 是肠道黏膜固有免疫系统识别肠腔内的模式识别受体,与配体脂多糖 (LPS) 结合后,激活核转录因子 NF-κB,促进单核细胞分泌细胞因子^[11]。研究发现,UC 患者结肠黏膜上皮细胞及固有层细胞大量表达 TLR4^[11,12]。NF-κB 的活化可激活众多 IBD 发病相关分子的表达,包括炎性因子 (IL-1B、TNF、IL-6、8、ICAM-1 及其他活化因子与黏附分子)、共刺激分子 [CD40、CD80、CD86 和诱导性 T 细胞辅助刺激分子 (ICOS)]^[13]。升高的炎性因子可以直接损伤肠黏膜或者募集诱导 TLR4 阳性巨噬细胞聚集到炎症黏膜,同时肠腔内的抗原物质透过破坏的黏膜屏障直接进入上皮细胞,进一步加剧了炎症反应^[12]。另外,阻滞 NF-κB 可使实验性结肠炎减轻,提示其促炎作用^[14]。但又有研究显

示 NF- κ B 通过发挥黏膜保护作用,维持了肠黏膜上皮的内环境稳态。比如体内肠黏膜内皮细胞的 NF- κ B 激活失败会导致辐射诱导的上皮细胞凋亡显著增加^[15]。通过 MyD88 靶向基因缺失间接阻滞肠上皮细胞 NF- κ B 的活化,使得 DSS 诱导的结肠炎小鼠症状加重^[16]。IL-8 是一种强有力的中性粒细胞趋化因子和活化因子,炎症反应时,主要由单核巨噬细胞、内皮细胞、表皮细胞及 T 细胞在 IL-1、TNF- α 和 LPS 的刺激下产生,主要通过趋化、激活中性粒细胞而导致组织损伤,对嗜碱性粒细胞和 T 细胞也有一定的趋化作用。研究发现,活动期 UC 患者 IL-8 mRNA 转录水平明显高于非活动期 UC 患者和正常对照组^[17]。UC 患者肠黏膜组织中 IL-8 mRNA 的水平及其组织培养液中 IL-8 水平均显著升高,且与肠黏膜组织镜检炎症严重程度相关^[18]。TNF- α 主要由 LPS 激活的单核巨噬细胞产生,在炎症反应中,促进中性粒细胞聚集与活化、促进内皮细胞黏附分子表达和引起凝血酶原效应等,促进机体炎症反应的启动和发生。TNF- α 能促进肠上皮细胞分泌和 IL-8 表达,诱导结肠上皮细胞凋亡,促进 UC 发生^[19]。UC 患者血液、肠组织及粪便中 TNF- α 水平明显增高^[20]。但有研究发现 TNF- α 基因敲除小鼠制作的葡聚糖硫酸钠(DSS)模型表现出比野生型小鼠更严重的结肠炎,干扰素- γ (IFN- γ)和诱导性一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 的表达明显升高^[21]。体外研究也证实,小剂量的 TNF- α 可以促进创伤模型肠上皮细胞的迁移和肠黏膜损伤的修复,而大剂量的 TNF- α 则起抑制作用,故认为 TNF- α 在肠黏膜损伤和修复的过程中起到双重作用^[22]。MIF 是一种主要的前炎症因子,垂体前叶和外周血单核/巨噬细胞是其来源^[23]。MIF 参与多种病理生理过程,如抑制活化的巨噬细胞游走、激活淋巴细胞、杀伤肿瘤细胞、诱导巨噬细胞等分泌多种促炎因子、以及抑制糖皮质激素的抗炎作用等^[24],是先天性免疫和获得性免疫的重要调节因子。在 UC 患者中, MIF 可能是通过促进巨噬细胞在局部肠黏膜浸润、以及诱导巨噬细胞产生 IL-8 而诱导 UC 肠黏膜损害^[23]。MadCAM-1 是一种选择性表达于肠道黏膜及其相关淋巴组织血管内皮细胞表面的黏附分子,主要介导淋巴细胞向正常黏膜组织的选择性归巢,整合素家族成员 $\alpha 4\beta 7$ 为其受体,高表达于 CD8⁺ T 细胞的杀伤性 T 细胞(TK1),二者相互作用参与免疫应答中的 T 淋巴细胞归巢^[25]。IBD 患者的炎症结肠部位血管内皮细胞 MadCAM-1 表达上调,活性氧及炎症因子 IL-1、TNF- α 可诱导 MadCAM-1 表达于淋巴管上,通过介导淋巴细胞聚集于肠道组织并产生

黏膜损伤,在 IBD 的发展中发挥着重要作用^[26]。半抗原诱导结肠炎小鼠^[27]或 IL-2 基因敲除结肠炎小鼠^[28]的结肠固有层小静脉上 MadCAM-1 表达水平明显升高,恶唑酮^[29]、TNBS 和 DSS^[30]诱导小鼠结肠炎模型的结肠黏膜固有层和黏膜下层血管 MadCAM-1 表达也增加。Shigematsu T 等^[31]应用抗 MadCAM-1 单克隆抗体对小鼠实验性结肠炎进行预处理,能够显著减少肠黏膜上淋巴细胞向内皮细胞的黏附。 $\alpha 4$ 整合素拮抗剂能够明显阻滞 IL-10 缺陷小鼠肠炎模型疾病的进展^[32]。因而通过阻滞 $\alpha 4\beta 7$ 和 MAdCAM-1 可能会成为治疗 IBD 的一种有效方法^[33]。

笔者前期研究已发现此 UC 大鼠模型肠组织发生损伤的同时亦发生肺组织损伤^[34],且肺损伤发生的同时肝肾组织未发生明显损伤^[35],说明肺肠组织之间存在不同于其他组织的特殊联系。本实验选取导师王新月治疗 UC 经验方从肺论治方——黄芪桔梗汤、从肠论治方——黄芪黄连汤为实验用药,其中黄芪桔梗汤由生黄芪,桔梗,赤芍,炒黄芩,炒枳壳等组成,方中生黄芪补气,桔梗宣肺祛痰,陈皮理气健脾、燥湿化痰,连翘解毒消痈,薏苡仁健脾清热排脓,炒黄芩清热燥湿、泻火解毒、凉血止血,五倍子敛肺降火、涩肠止泻、止血,以上诸药均归肺经;白芍养血柔肝缓急止痛,归肝、脾经;赤芍清热凉血活血,归肝经;白及收敛止血、消肿生肌,归脾、胃、肝经;炒枳壳行气宽中除胀,归脾、胃、大肠经;防风胜湿止泻,归膀胱、肝、脾经;生甘草调和诸药。综观全方,归于肺经的中药占较大比重,具有益气补中,宣肺化痰,清热解毒,缓急止痛,涩肠止泻,凉血止血等功效,主要通过从肺论治、扶正祛邪使肠中热毒得解。黄芪黄连汤由生黄芪,黄连,木香,赤芍各,三七粉,炒白术,生地榆等组成。其中生黄芪补气,归脾、肺经;黄连清热燥湿泻火解毒,木香行气止痛,焦槟榔消积行气,生地榆凉血止血解毒,五倍子敛肺降火、涩肠止泻、止血,以上诸药均归大肠经;赤芍养血活血,柔肝缓急止痛,与木香相配取芍药汤调气和血之意,蒲公英解毒消痈,三七粉化瘀止血,以上 4 味药均归肝经;炒薏苡仁利水渗湿、健脾除痹、清热排脓,归脾、胃、肺经;炒白术补气健脾,归脾、胃经;生甘草调和诸药。综观全方,以归于大肠经的中药最为多,其次为归于肝经的中药,通过行气化瘀解毒,益气活血治疗 UC。本研究结果显示模型组肺组织中 TLR4 mRNA、TNF- α 、IL-8、MIF mRNA、MadCAM-1 mRNA 表达增多,从肺论治、从肠论治、及柳氮磺胺吡啶均能明显降低其表达,且从肺论治方对 TLR4 mRNA、TNF- α 、MIF mRNA、MadCAM-1 mRNA 的降低作用较从肠

论治方更强,说明中性粒细胞、淋巴细胞均在肺组织中表达增加,也说明先天免疫应答后天免疫应答均参与肺组织的损伤,从肺论治方对缓解肺部炎症更有优势。模型组肠组织中 TLR4 mRNA、IL-8、MIF mRNA 表达未发生明显变化,说明先天免疫应答不是肠组织的损伤主要原因,从肺论治组肠组织中 MIF mRNA 升高,联系其能够降低肺组织 MIF 基因转录,可能是把肺组织中的炎症反应转移至肠组织中所致。模型组肠组织中 NF- κ B mRNA、TNF- α 表达水平较正常组明显降低,可能与凋亡基因和负反馈机制的激活有关。模型组肠组织中 MadCAM-1 mRNA 较正常组明显升高,从肺论治组、从肠论治组及柳氮磺胺吡啶均能明显降低肠组织中 MadCAM-1 mRNA 表达,说明肠损伤的发病机制与 MadCAM-1 介导淋巴细胞向肠黏膜定向归巢有关,也说明适应性免疫应答在本 UC 模型肠组织损伤中发挥作用。模型组血清中 TNF- α 表达升高可能是因为肺组织中 TNF- α 表达升高影响较多。模型组血清中 IL-8 表达未发生明显变化,说明其对中性粒细胞的趋化作用主要局限于肺组织;从肺论治组治疗后血清中 IL-8 含量反而明显升高,说明治疗在直接降低肺炎炎症反应的同时,也使部分 IL-8 转移到血清以间接降低炎症反应。模型组血清中 MadCAM-1 含量与正常组比较未见明显升高,联系肺、肠组织中 MadCAM-1 mRNA 转录水平均明显升高,可能由于此时的淋巴细胞主要由外周向特异性组织归巢。西药组、从肺论治组、从肠论治组血清中 MadCAM-1 含量均较模型组明显升高,联系其肺、肠组织中 MadCAM-1 mRNA 表达水平明显降低,可能是由于各治疗组能减少淋巴细胞向肺、肠组织归巢,增加淋巴细胞向外周血与其他组织归巢所致。

总之,本研究提示本 UC 模型肠组织发生损伤的机制主要与后天免疫应答激活相关,主要是 MadCAM-1 mRNA 表达升高,介导淋巴细胞归巢与局部肠组织引起组织损伤,同时伴有先天免疫应答功能降低,如 TNF- α 、NF- κ B mRNA 表达下降。肺组织发生损伤的机制与先天免疫应答、后天免疫应答均相关,如先天免疫应答中的 TNF- α 、TLR4 mRNA、IL-8、MIF mRNA 表达升高,后天免疫应答中的 MadCAM-1 升高,说明淋巴细胞与巨噬细胞、中性粒细胞共同参与肺组织损伤,从肺论治、从肠论治均能明显减轻肺、肠组织炎症反应。肺肠组织共同为黏膜免疫应答的一部分,以上研究发现其免疫应答机制并不完全一致,说明 UC 引起肺损伤的并不是局部炎症反应对整体的影响,而是存在组织特异性,从而为“肺与大肠相表里”中医学理论的提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 蒋晓芸,戎兰,孙大裕.炎症性肠病的肠外表现[J].胃肠病学和肝病学杂志,2006,15(4):150-159.
- [2] Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management [J]. *Ann Med*, 2010, 42(2): 97-114.
- [3] Camus P, Colby TV. The lung in inflammatory bowel disease[J]. *Eur Respir J*, 2000, 15(1): 5-10.
- [4] Eaton TE, Lambie N, Wells AV. Bronchiectasis following colectomy for Crohn's disease[J]. *Thorax*, 1998, 53(7): 529-531.
- [5] Forrest JA, Shearman DJ. Pulmonary vasculitis and ulcerative colitis[J]. *Dig Dis*, 1975, 20(5): 482-486.
- [6] Sargent D, Sessions JT, Fairman RP. Pulmonary vasculitis complicating ulcerative colitis [J]. *Southern Med J*, 1985, 78(5): 624-625.
- [7] 王新月,田德禄.溃疡性结肠炎病因病理特点与中医辨治思路对策[J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(8): 554-556.
- [8] 张虹玺,李彦龙,田振国.“脏腑同治”溃疡性结肠炎的临床研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009, 11(5): 128-129.
- [9] 宫健伟,苑述刚,阮时宝.对免疫方法制作溃疡性结肠炎动物模型的探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2005, 11(2): 70-71.
- [10] 段征,汪维伟,姜蓉.两种溃疡性结肠炎大鼠模型比较[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(1): 66-68.
- [11] de Paiva NM, Ayrisono ML, Milanski M, et al. Differential expression of TLR2, TLR4 and JNK in mucosa of ileal pouches for ulcerative colitis. Is there a role for bacterial antigen pathway in asymptomatic patients [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2011, 4(3): 179-186.
- [12] Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12): 7010-7017.
- [13] Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006, 3(7): 390-407.
- [14] Schlaak JF, Barreiros AP, Pettersson S, et al. Antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogate fulminant septic shock induced by *S. typhimurium* in mice

- [J]. Scand J Immunol, 2001, 54(4): 396-403.
- [15] Egan LJ, Eckmann L, Greten FR, et al. KappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8): 2452-2457.
- [16] Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis[J]. Immunity, 2006, 25(2): 319-329.
- [17] Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, et al. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease [J]. Int J Molec Med, 2003, 11(2): 175-179.
- [18] Imada A, Ina K, Shimada M, et al. Coordinate up-regulation of interleukin-8 and growth related gene product-alpha is present in the colonic mucosa of inflammatory bowel[J]. Scand J Gastroenterol, 2001, 36(8): 854-864.
- [19] Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumor necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumors[J]. Lancet Oncol, 2003, 4(9): 565-573.
- [20] Akazawa A, Sakaida I, Higaki S, et al. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease, particularly in patient with disease in the inactive phase [J]. J Gastroenterol, 2002, 37(5): 345-353.
- [21] Naito Y, Takagi T, Handa O, et al. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor alpha deficient mice[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(5): 560-569.
- [22] 郑萍,靖大道主编. 炎症性肠病[M]. 西安:第四军医大学出版社, 2008:106-109.
- [23] 张启芳,唐国都. 巨噬细胞移动抑制因子与消化系炎症性疾病[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(5): 720-723.
- [24] 黄超,邓长生. 大鼠溃疡性结肠炎模型肠组织中的 MIF 表达和 NF- κ B 的激活[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(6): 621-625.
- [25] Andrew DP, Berlin C, Honda S, et al. Distinct but overlapping epitope are involved in $\alpha 4\beta 7$ mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, mucosal addressin-1, fibronectin, and lymphocyte aggregation [J]. J Immunol, 1994, 153(9): 3847-3861.
- [26] Tanida S, Mizoshita T, Mizushima T, et al. Involvement of oxidative stress and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in inflammatory bowel disease [J]. J Clin Biochem Nutr, 2011, 48(2): 112-116.
- [27] Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins $\alpha 4\beta 7$ and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined [J]. Immunity, 1995, 3(1): 99-108.
- [28] Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, et al. $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1 [J]. Cell, 1993, 74(1): 185-195.
- [29] 张丽航,欧阳钦. MAdCAM-1 及 NF- κ B 在小鼠恶唑酮结肠炎中的表达及一氧化氮供体的干预作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(6): 596-601.
- [30] 张亚利,唐志肠. 黏膜地址素细胞黏附分子与溃疡性结肠炎 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(10): 1126-1129.
- [31] Shigematsu T, Specian RD, Wolf RE, et al. MAdCAM-1 mediates lymphocyte endothelial cell adhesion in a murine model of chronic colitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(5): G1309-G1315.
- [32] Sugiura T, Kageyama S, Andou A, et al. Oral treatment with a novel small molecule $\alpha 4$ integrin antagonist, AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice [J]. J Crohn's Colitis, 2013, 7(11): e533-e542.
- [33] Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases [J]. Mucosal Immunol, 2014, 7(1): 6-19.
- [34] 景姗,王新月,朱立,等. 从两种溃疡性结肠炎大鼠模型谈肺与大肠相表里 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(6): 1367-1368.
- [35] Liu Y, Wang XY, Yang X, et al. Lung and intestine: a specific link in an ulcerative colitis in a rat model [J]. Gastroenterol Res Pract, Volume 2013 Article ID. 124530, 13 pages.

(收稿:2013-02-01 修回:2013-11-22)