

实验研究

从肺肠上皮组织细胞变化分析肺与大肠相表里的内涵

刘 声¹ 刘晓燕² 郭霞珍²

(1 首都医科大学附属北京中医医院肿瘤科, 北京, 100029; 2 北京中医药大学基础医学院, 北京, 100029)

摘要 目的:研究并比较人胚胎发育不同时期肺与肠上皮细胞形态特征,增殖与凋亡生物学特性,以期能为肺与大肠组织发生上的同源性提供例证,并能为中医理论中肺与大肠相互关系提供参考。方法:胚胎发育不同时期肺与肠组织石蜡包埋,HE 染色,观察上皮组织及细胞形态;流式细胞术检测人胚胎不同时期肺与肠上皮细胞的增殖与凋亡,并进行分析。结果:胚胎早期(9~16 周龄),肺与肠在上皮组织及细胞形态一致,上皮细胞增殖、凋亡的生物学特性无统计学意义($P>0.05$)。胚胎中期(17~23 周)、胚胎晚期(24 周~出生)肺与肠在上皮组织及细胞形态不一致,上皮细胞增殖、凋亡的生物学特性有统计学意义($P<0.05$)。结论:胚胎早期(9~16 周龄)可以为“肺”与“空肠、回肠、结肠”同源发生提供一定的依据。另外,“肺与大肠相表里”的成体肺肠相关虽主要是功能之间的相互联属,但可能与其原始的同源性相关。

关键词 胎肺;细胞增殖;细胞凋亡

Analysis of the Connotation of Interior-exterior Relation of the Lung and Large Intestine from Changes of the Epithelial Cells

Liu Sheng¹, Liu Xiaoyan², Guo Xiaozhen²

(1 Department of Oncology, Beijing Chinese Medicine Hospital affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China;

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

Abstract Objective: To study and compare the human embryonic cell morphology characteristics, biological characteristics of proliferation and apoptosis of pulmonary and intestinal epithelial in different period of the growth, with a view to the lung and the large intestine tissue on the homology of illustration, and can provide a reference for the theory of traditional Chinese medicine in the lung and the large intestine relationship. **Methods:** Lung and intestinal tissues in different stages of the embryonic development were embedded in paraffin, HE staining, to observe the epithelial tissue and cell morphology; proliferation and apoptosis of human embryo lung and intestinal epithelial cells in different stages were detected by flow cytometry. **Results:** In the early embryonic stage (9 to 16 weeks), lung and intestinal epithelial tissue and cell morphology were consistent, no significant differences in the biological characteristics of epithelial cell proliferation and apoptosis ($P>0.05$). In medium embryonic stage (17 to 23 weeks), and late embryonic stage (24 weeks until born) epithelial tissue and cell morphology was not consistent, and there were significant differences in the biological characteristics of epithelial cell proliferation, apoptosis ($P<0.05$). **Conclusion:** Early embryonic stage (9 to 16 weeks) can provide a basis for "lung" and "the jejunum, ileum, colon" homology. In addition, the adult lung and intestine is mainly mutual affiliate between functions, but may be related to the original homology of the associated.

Key Words Fetal lung; Cell proliferation; Cell apoptosis

中图分类号:R223.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.08.026

“肺与大肠相表里”是中医脏象学中最为重要的理论之一。肺与大肠通过经络的联系,构成了脏腑阴阳表里两经的络属关系;在生理功能上紧密联系,病变上也相互影响^[1-2]。现代组织胚胎学发现肺、大肠的上皮组织均来源于原肠胚之内胚层,其中肺来自于内胚层前段;肠来自于内胚层中、后段;同时认为上皮组

织及细胞又是二者的主要功能单位,是最能代表消化道和呼吸道功能的单位,因此被作为研究的重点^[3]。本实验利用形态学和流式细胞分析技术,从上皮组织细胞形态和增殖凋亡动静两方面对人胚胎发育各个时期的“肺”与“大肠”上皮细胞进行实验观察,以期能为中医理论中肺与大肠相互关系提供借鉴与参考。另

基金项目:国家自然科学基金项目基于“肺与大肠相表里”理论的肺肠同源发生的分子生物学机制研究(编号:81273614);国家 973 重点基础研究发展计划项目“‘肺与大肠相表里’脏腑相关理论的应用基础研究”(编号:2009CB522700)

通信作者:刘声(1975—),男,讲师,博士,首都医科大学附属北京中医医院肿瘤科主治医师, E-mail:liusheng4377@163.com

外,膀胱亦发育于内胚层,且在水液代谢功能上与肺有密切联系,因此,设为对照组。

1 材料与方法

1.1 胚胎肺肠及膀胱来源 选择胎龄9周至出生前,自愿终止妊娠病例,经人工流产或水囊引产获得引产的人胚胎,置4℃冰箱存放,待制备。来自于平谷中医院,并经过伦理委员会审查。按人肺胚胎的发育过程分为腺状期(9~16周)、小管期(17~24周)和原始肺泡形成期(25周至出生)^[4]。

1.2 器官组织的处理 操作均在无菌细胞室内超净台上进行。分别用碘酒、酒精消毒胚胎胸、腹部皮肤,自脐带上方行横切口,打开胸、腹部。

1.2.1 组织及细胞形态观察 1)取出肺脏,经生理盐水洗三遍,一侧肺(实验中取左侧)横断切成厚约1 mm组织块,立即投入4%多聚甲醛溶液固定,乙醇脱水,石蜡包埋,HE染色,观察组织细胞形态。另一侧肺(右侧)备用。2)取出整肠,截取结肠前段,经生理盐水洗三遍,横断成长约0.5 cm的肠段,取其中1~2段投入4%多聚甲醛溶液固定,乙醇脱水,石蜡包埋,切片4 μm,HE染色,观察组织细胞形态。其余备用。3)膀胱组织处理同肠。

1.2.2 细胞悬液制备 取备用肺、结肠组织,刮取黏膜上皮,剪成1 mm²大小的组织块,胰酶消化,离心纯化,在加有10%小牛血清的培养液中培养,获得原代上皮细胞,制成细胞悬液,70%冷乙醇固定,PI染色,流式细胞仪检测细胞增值、凋亡,并计算增值率与凋亡指数,作为评价细胞生物学特性的依据。

1.3 统计学分析 运用数理统计软件SPSS处理。结果采用($\bar{x} \pm s$)形式表示,上皮组织免疫组化表达组间比较采用方差分析;组间增值率与凋亡指数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时期肺、肠及膀胱上皮细胞形态

2.1.1 9~16周胚胎肺、肠上皮细胞形态 肺与肠上皮均由柱状上皮细胞构成,而膀胱上皮由多层立方和扁平上皮细胞构成。

2.1.2 17~24周胚胎肺、肠及膀胱上皮组织及细胞形态 肺上皮主要由单层立方上皮细胞^[5]。肠表面覆盖单层柱状上皮,有指状绒毛突。膀胱上皮由多层立方和扁平上皮细胞构成。这一期肺的上皮组织转化为立方上皮组织,肠仍为柱状上皮组织,膀胱未变。

2.1.3 25周后胚胎肺、肠及膀胱上皮组织及细胞形态 肺:肺实质内细胞呈扁平,邓锦波^[6]等电镜下观察认为I型和II型扁平上皮细胞,肠表面覆盖单层柱

状上皮,有指状绒毛突。膀胱仍由上皮由多层立方和扁平上皮细胞构成。这一期肺的上皮组织转化为I型和II型扁平上皮,肠仍为柱状上皮,膀胱未变。

2.2 不同时期肺、肠及膀胱上皮细胞增值、凋亡检测

第一期肺与空肠、回肠、结肠、膀胱出现明显的增值峰,而直肠增值峰较之不明显;G1前凋亡峰肺、空肠、回肠、结肠均不明显,膀胱明显增高,直肠次之。

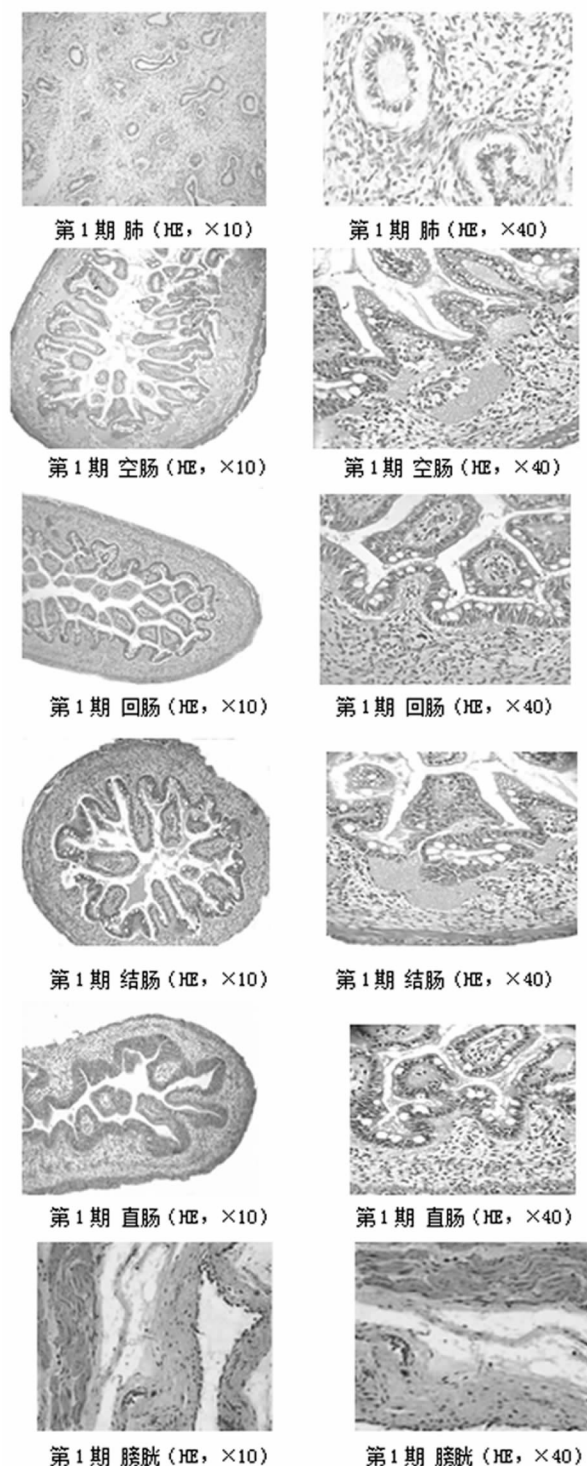


图1 第一期各器官组织形态(HE)

1) 第一期肺与空肠、回肠、结肠上皮组织细胞增殖凋亡水平差异无统计学意义;与直肠、膀胱存在的差异有统计学意义。如表 1、图 1 所示。

2) 第二期空肠、回肠、结肠、膀胱出现明显的增殖峰,而肺增殖峰较之不明显;G1 前凋亡峰肺、空肠、回肠、结肠均不明显,膀胱明显增高,直肠次之。第二期肺与空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱上皮组织细胞增殖水平有统计学意义。如表 2、图 2 所示。

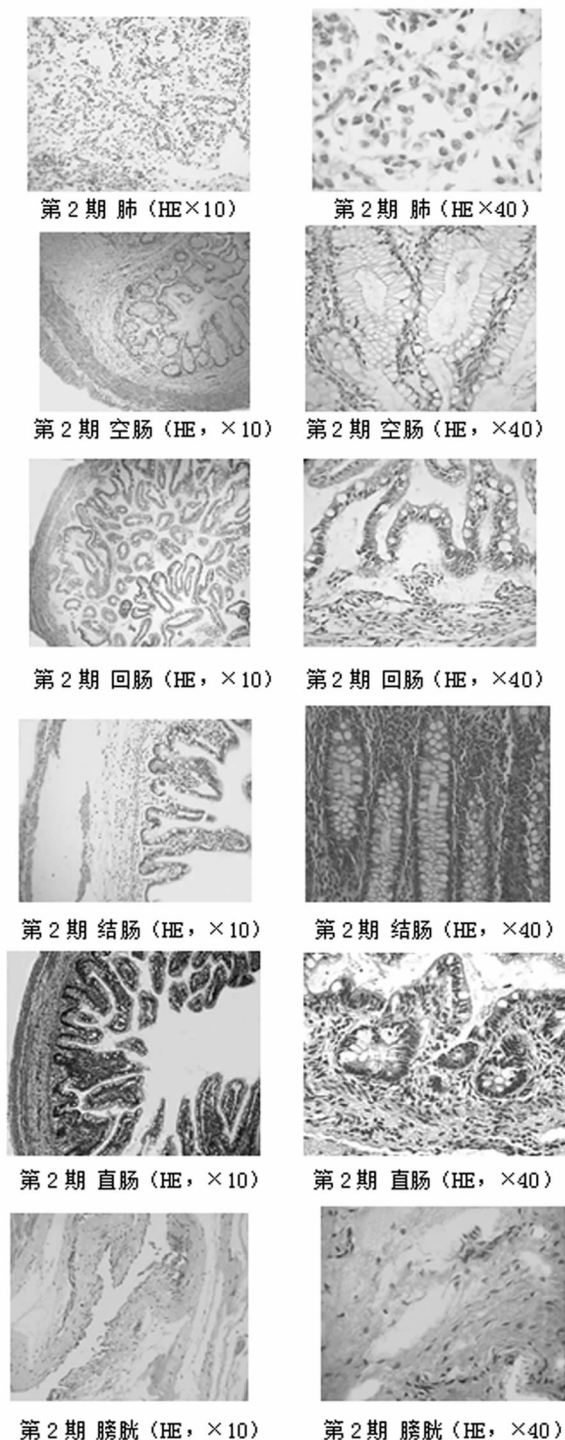


图 2 第二期各器官组织形态 (HE)

3) 第三期空肠、回肠、结肠、膀胱出现明显的增殖峰,而肺增殖峰较之不明显;G1 前凋亡峰膀胱仍明显较高,肺、空肠、回肠、结肠直肠次之。第三期肺与空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱上皮组织细胞增殖凋亡水平差异具有统计学意义。如表 3、图 3 所示。

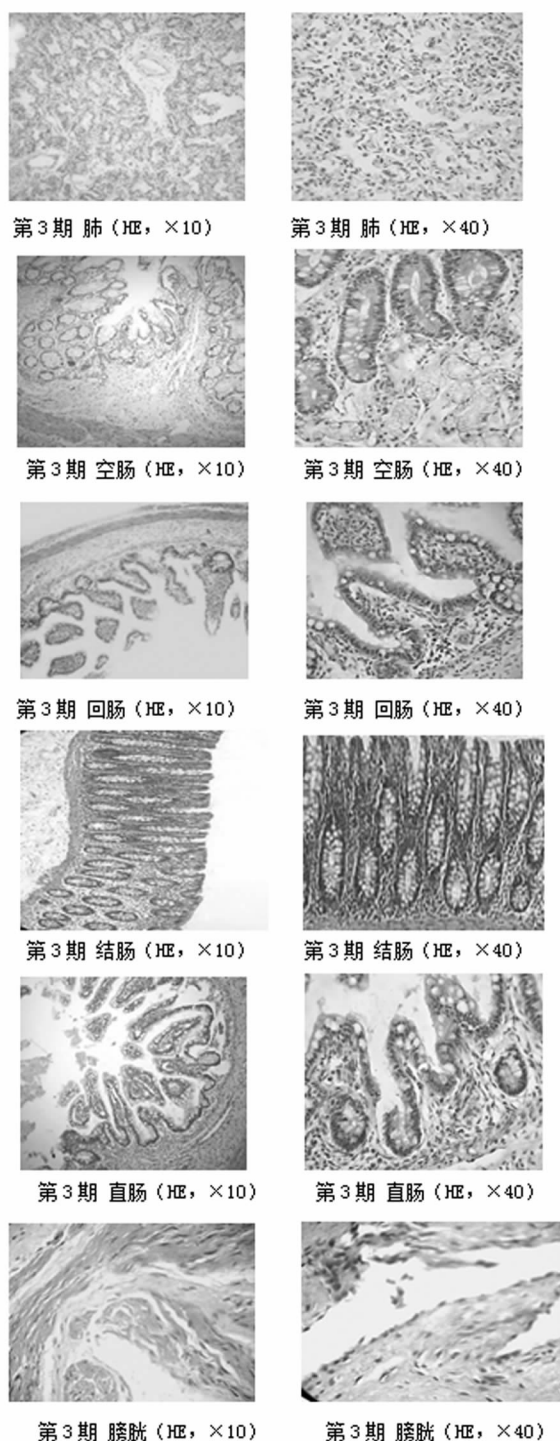


图 3 第三期各器官组织形态 (HE)

3 讨论

细胞的凋亡和增殖活动在器官形态发生中都是必不可少的重要组成部分。细胞的凋亡与增殖行为在胚

胎器官的发育过程中广泛存在^[6-7],细胞分裂增殖和细胞凋亡之间的动态平衡,可维持组织细胞群落的稳定,以及维持机体的正常发育和自身稳定。细胞增殖是细胞新生的过程,细胞凋亡则是细胞正常退化、死亡的过程。这种看来截然相反的两个行为,在胚胎器官发育过程中却同时存在,并且增殖活跃的同时出现凋亡的活跃,反之亦然。它们相互影响,相互制约,很好地维持着动态的平衡,精细地调控着器官发育,在保证胚胎器官形态的正常发生、发展及初步形成三阶段中起着十分重要的作用。

表 1 第一期各器官增殖与凋亡指数($\bar{x} \pm s$)		
器官	增殖	凋亡
肺	30.80 $\pm$ 3.06	4.98 $\pm$ 2.69
空肠	33.42 $\pm$ 1.87	5.06 $\pm$ 2.04
回肠	32.19 $\pm$ 2.53	5.38 $\pm$ 2.40
结肠	32.79 $\pm$ 3.06	5.21 $\pm$ 1.91
直肠	16.42 $\pm$ 0.57 *	12.2 $\pm$ 0.62 *
膀胱	24.33 $\pm$ 1.87 *	22.2 $\pm$ 2.08 *

注:与肺相比,* $P < 0.05$,有统计学意义。

表 2 第二期各器官增殖与凋亡指数($\bar{x} \pm s$)		
器官	增殖	凋亡
肺	21.15 $\pm$ 1.85	4.98 $\pm$ 2.69
空肠	36.33 $\pm$ 6.38 *	5.06 $\pm$ 2.04 *
回肠	39.5 $\pm$ 14.31 *	5.38 $\pm$ 2.40 *
结肠	41.6 $\pm$ 12.81 *	5.21 $\pm$ 1.91 *
直肠	30.42 $\pm$ 0.96 *	12.23 $\pm$ 0.62 *
膀胱	33.42 $\pm$ 3.08 *	50.80 $\pm$ 4.62 *

注:与肺相比,* $P < 0.05$,有统计学意义。

表 3 第三期各器官增殖与凋亡指数($\bar{x} \pm s$)		
器官	增殖	凋亡
肺	24.71 $\pm$ 1.83	27.08 $\pm$ 6.64
空肠	26.30 $\pm$ 1.10 *	18.13 $\pm$ 2.99 *
回肠	20.62 $\pm$ 1.59 *	16.71 $\pm$ 2.95 *
结肠	20.03 $\pm$ 1.80 *	17.38 $\pm$ 3.25 *
直肠	20.24 $\pm$ 1.83 *	17.53 $\pm$ 4.55 *
膀胱	20.34 $\pm$ 1.85 *	56.17 $\pm$ 2.12 *

注:与肺相比,* $P < 0.05$,有统计学意义。

另外,胚胎发育过程发生的细胞增殖与凋亡,并不是随机出现的,而是发生在胚胎发育过程特定部位和特定时间,并有着严格的时空程序的^[8-9],9~16周是胚胎肺与大肠由胚芽发展为器官雏形的关键时期,可以定义为两器官的发生时期。喉气管憩室在反复分支的同时,支气管树呼吸部发育,由柱状上皮形成管壁厚而管腔狭窄的上皮性支气管树。与此同时,各肠段雏

形基本出现,内衬由单层柱状上皮构成的肠黏膜^[10]。因此,通过对比胚胎发育早期肺与大肠的主要功能细胞-上皮细胞的增殖与凋亡,可以明确胚胎肺与大肠发生时相上的同一性;并加上对比两器官发育早期上皮组织细胞形态特征,以期能为肺与大肠组织发生上的同源性提供例证,并能为中医理论中肺与大肠相互关系提供借鉴与参考;为现代研究手段运用于中医学研究提供思路;探索一条从组织发生学角度对脏象本质进行认识的重要途径。

本实验结果表明:胚胎早期(9~16周胎龄)，“肺”与“空肠、回肠、结肠”在上皮组织及细胞形态一致,上皮细胞增殖、凋亡的生物学特性差异无统计学意义($P > 0.05$)；胚胎中期(17~23周)、胚胎晚期(24周至出生)“肺”与“肠”上皮组织及细胞形态不一致,上皮细胞增殖、凋亡的生物学特性有统计学意义($P < 0.05$)。

综合以上可以看出,从组织形态与增殖凋亡的细胞生物学特性层面分析,胚胎发育早期肺与肠在组织发生学上无差异。因此,胚胎早期的“无差异”可以为“肺”与“空肠、回肠、结肠”同源发生提供一定的依据。另外,“肺与大肠相表里”的成体肺肠相关虽主要是功能之间的相互联属,但可能与其原始的同源性相关。

参考文献

[1]王仲霞,刘汶.“肺与大肠相表里”的理论及临床研究进展[J].北京中医,2006,7(25):438-440.

[2]周东浩,张蕾,周明爱.肺与大肠相表里今释[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(8):567-571.

[3]韩国栋.“肺与大肠相表里”理论中西医结合研究进展[J].天津中医,1995(4):45-47.

[4]陈钊,杜江,封志纯.不同胎龄人胚肺支气管肺泡灌洗液表面活性物质蛋白A_D的变化[J].实用儿科杂志,2005,20(10):978-980.

[5]Crisera CA, Maldonado TS, Longaker MT, et al. Defective fibroblast growth factor signaling allows for nonbranching growth of the respiratory derived fistula tract in esophageal atresia with tracheo-esophageal fistula[J]. J Pediatr Surg,2000,35(10):1421-1425.

[6]邓锦波,程建华.人胚胎肺发生的光镜和电镜观察[J].江西医学院学报,1993,33(2):13-17.

[7]曾小川,汪维伟.小鼠胚胎十二指肠上皮的体视学研究[J].世界华人消化杂志,2000,8(5):542-545.

[8]成军.程序性细胞死亡与疾病[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:9-11.

[9]刘斌,高英茂.人体胚胎学[M].北京:人民卫生出版社,1995:272-274.

[10]邓锦波,程建华.人胚胎肺发生的光镜和电镜观察[J].江西医学院学报,1993,33(2):13-17.