

“通利大肠”对 COPD 模型大鼠肺组织 SP、VIP 含量的影响

张天宇 张金超 刘 妙 吴若菡 张淑静 高誉珊 郑丰杰 许 红 李宇航

(北京中医药大学基础医学院, 北京, 100029; 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, 北京, 100029)

摘要 目的: 观察“通利大肠”对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠肺组织 P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)含量的影响, 从神经肽角度探讨 COPD“从肠论治”的效应机制。方法: 采用熏烟联合气管注射脂多糖复制 COPD 大鼠模型。50 只雄性大 Wistar 鼠随机分为正常组、模型组、治肠组、治肺组、肺肠同治组。正常组和模型组均灌胃给予生理盐水, 治肠组、治肺组、肺肠同治组分别用治肠药(生大黄)、治肺药(生石膏、苦杏仁、瓜蒌皮)、肺肠同治药(生大黄、生石膏、苦杏仁、瓜蒌皮)灌胃, 连续 7 d。用免疫组织化学法和酶联免疫吸附法检测肺组织中 SP、VIP 含量。结果: 免疫组化结果显示, 与正常组相比, 模型组大鼠肺组织 SP 表达较强, 而治肠组、治肺组、肺肠同治组表达较弱; VIP 在正常大鼠支气管上皮表达较强, 模型组表达明显减弱, 各治疗组 VIP 表达明显增强。酶联免疫吸附法结果显示, 与正常组相比, SP 在模型组肺组织中含量明显升高, VIP 含量明显降低($P < 0.01$); 与模型组相比, 治肠组、治肺组、肺肠同治组肺组织 SP 含量均明显降低, VIP 含量明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与治肺组相比, 肺肠同治组肺组织 SP 含量明显降低($P < 0.05$)。结论: 通利大肠或治肺基础上增加通利大肠, 可调节 COPD 模型大鼠肺组织神经肽 SP、VIP 的含量, 这可能是 COPD“从肠论治”的效应机制之一。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; 神经肽; 从肠论治

Effect of Relaxing Large Intestine Therapy on Contents of SP and VIP in Lung Tissues of Rat Models with Chronic Obstructive Pulmonary Diseases

Zhang Tianyu, Zhang Jinchao, Liu Miao, Wu Ruohan, Zhang Shujing, Gao Yushan, Zheng Fengjie, Xu Hong, Li Yuhang

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

Abstract Objective: To observe the influence of relaxing large intestine therapy on contents of substance P (SP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat model with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and explore the effective mechanism of treating COPD based on relaxing the large intestine from the aspect of neuropeptide. **Methods:** Rats model of COPD were established through intratracheal injection of LPS combined with cigarette smoking. Fifty Wistar rats were randomly divided in to normal group, model group, intestine group, lung group and lung-intestine group. The normal group and model group were intragastrically given normal saline solution and other groups were treated with corresponding decoction intragastrically for 7 days. The content of SP and VIP were detected by immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Immunohistochemistry results showed that compared with control group, SP in lung tissue of model group was abundantly expressed while in lung group and intestine group and lung-intestine group were weakly expressed. VIP in bronchial epithelium of control group was expressed broadly while model group were lower. After treatment, VIP was increased significantly in trial groups. Enzyme-linked immunosorbent assay showed that compared with control group, SP was increased in lung tissue in model group while VIP were decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, SP was lower in lung group, intestine group and lung-intestine group. VIP was increased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with lung group, SP was reduced significantly in lung-intestine group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of SP and VIP were regulated by the therapy of relaxing the large intestine or relaxing the large intestine on the base of treating lung disease. This may be one of the mechanisms of why treating from intestine is effective on COPD.

Key Words Chronic obstructive pulmonary diseases; Neuropeptide; Treatment based on large intestine

中图分类号: R256.1; R332 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.003

慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)是一种具有气流受限特征的疾病, 气流受限不完全可逆、呈进行性发展, 与肺部对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关^[1]。临床和

实验研究均发现, 慢性阻塞性肺疾病和哮喘急性发作时患者血液、诱导痰中 P 物质、血管活性肠肽等神经肽的含量、肺组织中其免疫阳性纤维的表达均存在明显异常^[2-3], 应用神经肽受体拮抗剂可有效降低气道反

应,提高肺功能,改善肺通气功能障碍^[4-5]。

通腑泻下法是“肺与大肠相表里”理论指导下“从肠论治”肺病的中医临床常用治疗方法之一,不但可以有效改善肠道功能,同时亦可明显改善呼吸困难和气体交换功能^[6]。本课题组前期研究表明,“通利大肠”或治肺基础上增加通利大肠,可增加对气管注射脂多糖加熏烟致 COPD 模型大鼠肺功能和血气的改善程度^[7],本研究旨在通过观察宣白承气汤拆方对 COPD 模型大鼠肺组织 SP、VIP 含量的影响,从神经肽分泌角度探讨从肠论治 COPD 的效应机制。

1 材料与方法

1.1 药物制备 采用清·吴鞠通《温病条辨·卷二》宣白承气汤(生石膏五钱、生大黄三钱、杏仁粉二钱、瓜蒌皮一钱五分),根据药物功效与归经将其拆分为三组,即治肺组(生石膏 15 g,苦杏仁 6 g,瓜蒌皮 4.5 g)、治肠组(生大黄 9 g)、肺肠同治组(生石膏 15 g,苦杏仁 6 g,瓜蒌皮 4.5 g,大黄 9 g)。中药饮片购自北京同仁堂药店,经北京中医药大学中医药基础理论与关键技术研究鉴定均为正品。依照人单位体重生药量求得大鼠单位体重生药量,并扩大 10 倍。各组药物分别以蒸馏水煎煮 30 min,提取 2 次,再合并煎液,并将所得药液用双层纱布过滤,水浴加热蒸发浓缩,贮于冰箱中备用。

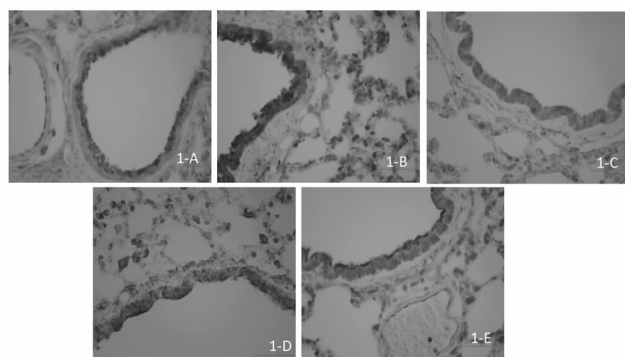
1.2 动物与分组 清洁级健康 Wistar 雄性大鼠,50 只,体重(200 ± 20) g,购于北京维通利华实验动物公司,合格证号 SCXK(京)2009-0011。动物适应性饲养 7 d 后,采用随机数字表法分为对照组、模型组、治肠组、治肺组和肺肠同治组,每组 10 只。第 22~28 d,各给药组每天 1 次灌胃给与相应中药,正常组及模型组给予等量自来水灌胃。各组于末次给药后,禁食 12 h 后,处死取材。

1.3 模型制备 参照文献^[8]采用气管注射脂多糖加熏香烟方法复制 COPD 大鼠模型,即在第 1 d 和第 14 d,用 1% 的戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,仰卧位固定于大鼠固定板,暴露声门,将 18 号静脉套管针快速插入气管,拔出针芯,用 1 mL 注射器注入溶于生理盐水的 LPS200 μL(1 mg/mL),然后将大鼠固定板直立旋转,使 LPS 能够均匀分布于两肺。正常组注入生理盐水。第 2~28 d(第 14 d 除外)将大鼠置入 60 cm × 50 cm × 40 cm 熏吸箱内,注入大前门牌过滤嘴香烟烟雾,浓度约 5%,每天上午、下午各 1 h。

1.4 仪器与试剂 动物熏烟箱(60 cm × 50 cm × 40 cm),自制。18 号静脉套管针(马来西亚制造)。脂多糖(LPS, Sigma 公司);大前门牌香烟(上海烟草公司,

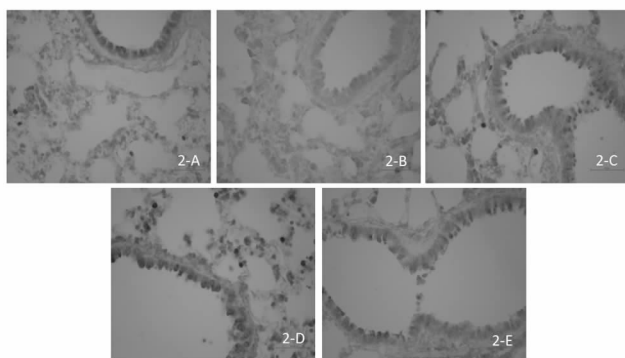
烤烟型,焦油量 12 mg,烟气烟碱量 0.9 mg,烟气一氧化碳量 14 mg)。TECAN 全波长酶标仪(Thermo, Multiskan MK3)。

兔抗 SP 抗体(2853711,博士德)、兔抗 VIP 抗体(Y-07B11B,博士德);迈新试剂-即用型免疫组化超敏试剂盒(1208319706,福州迈新生物技术开发有限公司);4% 多聚甲醛溶液、0.1 mol/L 磷酸缓冲液、二甲苯、石蜡、无水乙醇、柠檬酸抗原修复液、DAB、中性树脂等;大鼠 P 物质 ELISA 试剂盒(M27039504, Cusabio),血管活性肠肽 ELISA 试剂盒(M27039505, Cusabio)。



A 正常组、B 模型组、C 治肠组、D 治肺组、E 肺肠同治组

图 1 肺组织 SP 免疫组化染色 × 40



A 正常组、B 模型组、C 治肠组、D 治肺组、E 肺肠同治组

图 2 肺组织 VIP 免疫组化染色 × 40

1.5 样品处理及检测 腹主动脉取血处死,冰上打开胸、腹腔,分离取材肺脏组织,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,脱蜡,PBS 洗 5 min × 3 次,微波抗原修复 10 min,PBS 洗 5 min × 3 次,加封闭血清室温孵育 15 min,加一抗(SP 抗体、VIP 抗体)4℃ 过夜,PBS 洗 5 min × 3 次,加二抗 37℃ 孵育 20 min,PBS 洗 5 min × 3 次,加三抗 37℃ 孵育 20 min,PBS 洗 5 min × 3 次,DAB 显色剂显色,冲洗,脱水,中性树脂封片。

腹主动脉取血处死,冰上打开胸、腹腔,分离取材肺脏组织,液氮速冻,移植 -80℃ 冰箱保存。应用 Cusabio 公司的生产的 ELISA 试剂盒,检测肺组织匀浆中

SP 及 VIP 含量,严格按试剂盒说明书进行。

1.6 统计方法 数据以均数 $\pm$ 标准差表示,并采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,多组样本均数比较采用单因素方差分析(One - Way ANOVA);两两比较方差齐者采用 LSD(Least - Significant Difference)检验,方差不齐者采用 Dunnett' T3 检验,两组之间的比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织中 SP、VIP 免疫组化分析 如图 1、图 2 所示:SP 在正常大鼠肺支气管上皮、肺间质中可见表达,模型组较正常组表达增强,与模型组相比,治肠组、肺肠同治组 SP 表达减弱。VIP 在正常大鼠支气管上皮表达较强,模型组表达明显减弱,各治疗组 VIP 表达明显增强。

2.2 肺组织中 SP 及 VIP 含量比较 如表 1 所示:与正常组相比,模型组肺(1.49 $\pm$ 0.37 vs 0.78 $\pm$ 0.07)中 SP 含量明显升高,模型组肺 VIP 含量(1.06 $\pm$ 0.30 vs 0.51 $\pm$ 0.20)明显降低。与模型组相比,治肠组、治肺组、肺肠同治组肺组织 SP 含量均明显降低,VIP 含量均明显升高。与治肺组相比,肺肠同治组肺组织 SP 含量明显降低。

表 1 各组大鼠肺组织匀浆 SP、VIP 含量分析(mean $\pm$ SD)

组别	鼠数	SP(pg/ μ g)	VIP(pg/ μ g)
正常组	6	0.78 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.30
模型组	7	1.49 $\pm$ 0.37 **	0.51 $\pm$ 0.20 **
治肠组	8	0.78 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$	0.91 $\pm$ 0.42 Δ
治肺组	6	1.01 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	0.89 $\pm$ 0.29 Δ
肺肠同治组	6	0.71 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta\Delta$	1.01 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$

注:与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与治肺组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

在“肺与大肠相表里”理论指导下,借助肺与大肠之间特殊联系,中医药采用“肺病治肠法”在哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺炎、急性呼吸窘迫综合征等肺病的防治中常可获出人意料之临床疗效^[6,9],其效应机制与黏膜免疫、微生态、淋巴循环、内分泌等有关^[10-11]。本课题组既往研究也表明“通利大肠”可改善 COPD 大鼠肺组织的病理形态和肺功能,增强抑制 COPD 大鼠气道黏液高分泌的作用,促进 SIgA 分泌,增强呼吸道和肠道黏膜免疫功能,从而进一步改善气道通气及肺功能^[12-13]。

神经肽作为一种内源性活性物质,既存在于神经组织,也在肺、肠等外周组织和器官中广泛表达。研究发现:P 物质(SP)既与哮喘、慢性阻塞性肺疾病的气道

炎症和气道高反应性形成密切相关^[14],同时也能肠道黏液分泌、刺激肠道运动^[15]。VIP 在胃肠道中含量最高,通过与受体 VPAC1、VPAC2 相结合,参与肠道舒张,液体分泌等作用^[16],同时也在肺内广泛分泌,发挥支气管舒张、肥大细胞组织胺释放调节等作用^[17]。

本研究发现,气管滴注脂多糖加熏香烟制备的 COPD 大鼠模型肺组织中神经肽 SP、VIP 均存在异常分泌,表现为 SP 含量增加、VIP 含量减少,提示神经肽 SP、VIP 的分泌参与了 COPD 的病理过程。与模型组相比,用生大黄从肠干预后,对肺组织中 SP、VIP 的分泌具有显著调节作用,表现为 SP 含量的降低和 VIP 含量的升高,提示通利大肠有助于调节肺神经肽分泌,进而改善气道黏液高分泌状态和气道平滑肌收缩引起的管腔狭窄;与治肺组相比,在治肺基础上增加通利大肠可进一步减少 SP 在肺组织中的表达,VIP 的含量亦有增加趋势。因此,通利大肠或在治肺基础上增加通利大肠,均能增强抑制 COPD 模型大鼠肺组织 SP 分泌、增加 VIP 分泌作用,从而进一步改善气道通气障碍,提示神经肽分泌调节可能是 COPD 从肠论治效应产生的作用环节之一,其调控机制有待进一步研究。

致谢:感谢北京中医药大学病理教研室王谦教授在本文形态学方面给予的指导。

参考文献

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung disease. Gold strategy of the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Revised 2013 (online).
- [2] Vatrella A, Montagnani S, Calabrese C, et al. Neuropeptide expression in the airways of COPD patients and smokers with normal lung function[J]. Journal of biological regulators and homeostatic agents, 2009, 24(4): 425 - 432.
- [3] Lee S Y, Kim M K, Shin C, et al. Substance P - immunoreactive nerves in endobronchial biopsies in cough - variant asthma and classic asthma[J]. Respiration, 2003, 70(1): 49 - 53.
- [4] Groneberg D A, Rabe K F, Fischer A. Novel concepts of neuropeptide - based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors[J]. European journal of pharmacology, 2006, 533(1): 182 - 194.
- [5] Ramalho R, Soares R, Couto N, et al. Tachykinin receptors antagonism for asthma: a systematic review[J]. BMC pulmonary medicine, 2011, 11(1): 41.
- [6] Ruohan Wu, Fengjie Zheng, Yuhang Li, Yan Sun, Miao Liu, Tan Wang, and Jinchao Zhang. Modified Dachengqi Decoction Combined with Conventional Treatment for Treating Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review Based on Randomized Controlled Trials[J]. Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2013, Article ID 323715, 8 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/323715>.

(下接第 414 页)

道阻力是评价呼吸生理的重要指标,可以客观反映肺损伤情况^[6]。

紧密连接是肠黏膜机械屏障中肠上皮细胞间最重要的连接方式,生理情况下只允许小分子物质通过,在维护肠屏障功能中起着举足轻重的作用^[7]。occludin 蛋白是紧密连接的整膜蛋白,其表达水平的检测不仅可以反映肠道屏障的破坏和恢复的程度^[8]。SIgA 是肠道含量最丰富的免疫球蛋白,其变化直接反映着肠道黏膜免疫屏障的状态^[9]。

ALI/ARDS 起病急骤,发展迅猛,在短时间内对机体造成严重的损害,因此在早期的呼吸支持等积极治疗之后,应进行长期全面的干预^[10]。近年来国内对本病中医发病机制也进行了大量研究,有学者指出 ALI/ARDS 的临床表现与阳明腑实喘满证相似^[11]。本课题组在探讨“肺与大肠相表里”理论过程中提出,ARDS 证候学突出体现了中医“肺肠相关”的特点,“脏病治腑”“通腑泻肺”是中医常用的有效治法。此次实验所选用的通腑泻肺方中,葶苈子、桑白皮泻肺平喘、行水消肿,大黄、枳实、厚朴轻下热结,通腑除满。诸药同用可宣降肺气、畅通腑气、水湿、热结得消、喘促可止。

我们采用油酸和内毒素两次打击方法建立了 ALI/ARDS 大鼠模型。结果显示,模型组大鼠顺应性下降、气道阻力增加,表现出肺部的损伤和气流受限。这种改变接近临床 ALI/ARDS 患者肺功能的变化,从这个角度说明此次造模成功。模型大鼠除了存在肺通气功能障碍外,肠组织的 occludin 蛋白表达较正常大鼠显著减少,而 SIgA 分泌明显升高,说明 ARDS 大鼠

的肠屏障功能同时受到损伤。经通腑泻肺方治疗后,治疗组肺功能的各项指标均有改善,肠屏障中 occludin 蛋白、SIgA 含量也显著改善,表明中医“肺肠同治”可减缓 ALI/ARDS 模型大鼠肺功能的下降,缓解肠屏障功能损伤情况,研究结论为深入开展“肺与大肠相表里”理论的临床研究提供了依据。

参考文献

- [1] 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006)[J]. 中国实用外科杂志,2007,27(01):1-6.
- [2] 刘刚,王强,王育红. 肠屏障功能与多器官功能障碍综合征[J]. 海军总医院学报,2008,21(02):32-38.
- [3] 刘恩顺,孙增涛,苏景深,等. 基于肺肠相关的 ARDS 研究思路探讨[J]. 天津中医药大学学报,2011,30(01):4-5.
- [4] 张青,毛宝龄,钱桂生,等. 油酸和内毒素两次打击大鼠急性肺损伤动物模型研究[J]. 第三军医大学学报,2000,22(6):603-604.
- [5] 柯雪帆,赵章忠,张玉萍,等. 《伤寒论》和《金匮要略》中的药物剂量问题[J]. 上海中医药杂志,1983,1983,8(12):36-38.
- [6] 俞森洋. 现代机械通气的监护及临床应[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2002. 398-432.
- [7] 秦环龙,高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(04):21-25.
- [8] 张宇飞,嵇武,黎介寿. Occludin 蛋白调控机制及临床意义的研究进展[J]. 肠外与肠内营养,2010,17(03):175-178.
- [9] 胡正强,江咏梅. SIgA 基础与临床研究进展[J]. 免疫学杂志,2003,51:75-78.
- [10] 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的诊断与治疗[J]. 解放军医学杂志,2009,34(04):371-373.
- [11] 薛芳. 急性呼吸窘迫综合征与阳明腑实喘满证[J]. 辽宁中医杂志,1982,12(04):10-11.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 411 页)

- [7] 李宇航,钟相根,贾旭,等. “通利大肠”对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能及血气的影响[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(7):452-455.
- [8] LI Yu-hang#, ZHENG Feng-jie, HUANG Ying, ZHONG Xiang-gen, and GUO Ming-zhang. Synergistic Anti-inflammatory Effect of Radix Platycodon in Combination With Herbs for Cleaning-heat and Detoxification and Its Mechanism[J]. Chin J Integr Med, 2013 Jan; 19(1):29-35.
- [9] 邵峦,王健,邓勇. “肺与大肠相表里”随机对照试验文献质量评价[J]. 安徽中医学院学报,2011,30(2):16-19.
- [10] ZHENG X, YANG Y, ZHENG X, et al. Correlation between the lung and large intestine from the micro-ecological changes of lung and intestinal flora[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 10:024.
- [11] 刘元,王新月. 从“肺与大肠相表里”理论谈 COPD 和 IBD 病理过程的肺肠紊乱[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(10):886-893.
- [12] 钟相根,李宇航,祝小惠,等. “通利大肠”对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠 SIgA 含量的影响[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(8):1670-1671.

- [13] 钟相根,李宇航,祝小惠,等. 慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌机制及中医药干预作用[J]. 中华中医药杂志,2011,26(8):1686-1689.
- [14] L Xiao, ZX Wu. Substance p regulates environmental tobacco smoke-enhanced tracheal smooth muscle responsiveness in mice[J]. J Allergy (Cairo), January 1, 2012, 2012:423612.
- [15] Engel MA, Becker C, Reeh PW, Neurath MF. Role of sensory neurons in colitis; increasing evidence for a neuroimmune link in the gut[J]. Inflamm bowel diseases, 2011, 17(4):1030-1033.
- [16] C Abad, R Gomariz, J Waschek, J Leceta, C Martinez, Y Juarranz, and A Arranz. VIP in Inflammatory Bowel disease: state of the art[J]. EndocrMetab Immune Disord Drug Targets, June 11, 2012.
- [17] S Misaka, Y Aoki, S Karaki, A Kuwahara, T Mizumoto, S Onoue, and S Yamada. Inhalable powder formulation of a stabilized vasoactive intestinal peptide (VIP) derivative; anti-inflammatory effect in experimental asthmatic rats[J]. Peptides, Jan 2010, 31(1):72-78.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)