

ARDS“肺肠同病”的病理特征与通腑泻肺中药作用机制的实验研究

刘恩顺¹ 孙增涛¹ 苏景深¹ 杨英伟² 李 建² 李美凤²

(1 天津中医药大学第二附属医院, 天津, 300150; 2 天津中医药大学, 天津, 300193)

摘要 目的:在“肺与大肠相表里”理论指导下,观察 ARDS“肺肠同病”的病理特征及通腑泻肺中药的作用机制,为“肺肠同病”的临床治疗提供实验依据。方法:健康 wistar 大鼠 30 只,随机分为 3 组,正常组、模型组和治疗组,采用尾静脉注射油酸加内毒素方法造成 ARDS 模型,治疗组给予通腑泻肺中药,于实验第 7 天检测分析各组大鼠肺功能、肺脏局部及全身炎症因子、肠黏膜屏障功能及肺肠组织黏膜免疫等指标。结果:1)与正常组比较,模型组大鼠肺顺应性显著降低、吸气和呼气阻力显著升高($P < 0.01$),治疗后肺顺应性、吸气阻力有所改善。2)模型组大鼠血浆 D-乳酸、DAO 含量较正常组明显升高($P < 0.01$)。治疗后二者含量显著降低($P < 0.01$)。3)模型组大鼠血清及 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 含量较正常组均明显升高($P < 0.01$)。治疗后血清 TNF- α 、IL-1 β 含量明显降低($P < 0.01$),BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量明显降低($P < 0.01$)。4)模型组大鼠肺与肠组织 SIgA 含量较正常组明显升高($P < 0.01$),治疗后显著降低($P < 0.05$)。结论:1)肺通气功能障碍、肠黏膜屏障功能受损、全身及肺脏局部炎症反应水平明显升高、肺肠组织黏膜免疫的同步反应是 ARDS“肺肠同病”的主要病理特征;2)通腑泻肺中药具有肯定的疗效,其作用机制在于改善肺通气和肠黏膜屏障功能、调节炎症因子表达及肺肠黏膜免疫应答。

关键词 ARDS;肺肠同病;病理特征;通腑泻肺;作用机制

Experimental Study on the Pathological Features of ARDS “Lung and Large Intestine Concurrent Disease” and the Mechanism of Tongfu Xiefei Herbs

Liu Enshun¹, Sun Zengtao¹, Su Jing shen¹, Yang Yingwei², Li Jian², Li Meifeng²

(1 Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China; 2 Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract Objective: According to the interior-exteriorly related theory of lung and the large intestine, to observe the pathological features of ARDS lung and large intestine concurrent disease, and investigate the mechanism of Tongfu Xiefei herbs in ARDS rats, then provide experimental basis for clinical treatment. **Methods:** Thirty healthy Wistar rats were randomly divided into 3 groups, control group, model group, and treatment group. The ARDS rats were established by intravenous injecting oleic acid plus endotoxin in caudal vein, and rats in treatment group were treated with Tongfu Xiefei herbs. The lung function, inflammatory cytokines in the lung and serum, intestinal barrier function and the indicators of lung and intestinal mucosal immunity in each group were observed after 7 days. **Results:** 1) Compared with control group, the lung compliance of model group was obviously decreased; the aspiratory and expiratory resistance were obviously increased ($P < 0.01$). The lung function of treatment group improved. 2) The D-Lactate, DAO of model group were significantly increased than those of control group ($P < 0.01$). Both of them decreased significantly after treatment ($P < 0.01$). 3) The TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 in BALF and serum of model group were obviously increased than those of control group ($P < 0.01$). After treatment, TNF- α , IL-1 β in serum were significantly decreased ($P < 0.01$). TNF- α , IL-1 β and IL-6 in BALF were significantly decreased ($P < 0.01$). 4) The SIgA expression in lung and large intestine of model group were obviously increased than those of control group ($P < 0.01$), and it significantly decreased after treatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** 1) The pathological features of ARDS is lung and large intestine concurrent disease, which mainly include ventilation dysfunction, intestine barrier functional disturbance, the body's and lung's inflammation levels significant increase and the synchronous response in lung and intestinal mucosal immune. 2) Tongfu Xiefei herbs shows positive curative effect, for they could improve the pulmonary ventilation and intestinal barrier function, regulate inflammatory cytokines expression and lung and intestinal mucosal immune response.

Key Words ARDS; Lung and Large Intestine ;Pathological features; Tongfu Xiefei; Mechanism

中图分类号:R221;R256.1;R332 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.005

急性呼吸窘迫综合征 (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) 是指由心源性以外的各种肺内外致病因素导致的急性进行性缺氧性呼吸衰竭^[1]。ARDS 的临床表现为进行性呼吸困难、紫绀、气促、喘憋等肺气壅遏的症状,往往同时伴有便秘、腹胀等腑气不通,大肠失于传导的病理变化。因此,“肺病及肠”“肺肠同病”是从中医视角观察 ARDS 的常见结论,通腑泻肺是中医常用的有效治法并为临床研究初步证实^[2-3]。

ARDS 作为多脏腑参与的复杂性疾病,其“肺肠同病”的宏观临床表现必然存在多途径复杂病理关联的物质基础,中药干预也相应存在多靶点的综合作用机制。因此,本研究在“肺与大肠相表里”理论指导下,以肺肠功能、炎症反应和黏膜免疫为切入点开展实验研究,观察 ARDS“肺肠同病”的病理特征及通腑泻肺中药的作用机制,为临床治疗提供实验依据,现汇报如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 wistar 大鼠 30 只,雄性、体重 (200 ± 20) g,购自天津市山川红实验动物科技有限公司 (许可证号:SCXk (津) 2009 - 0001),购入后置天津中医药大学动物实验中心常规饲养。

1.2 药物及试剂 通腑泻肺方 (葶苈子、桑白皮、大黄、枳实、厚朴) 中药颗粒剂,购自天津中医药大学第一附属医院药房。生药剂量比例按照参考文献^[4]换算,依照人体单位体重生药量求得大鼠单位体重生药量。用蒸馏水配置通腑泻肺方 (生药浓度 1.08 g/mL),4℃ 冰箱保存备用。油酸 (分析纯) 来自天津运盛化学品有限公司;大肠杆菌内毒素脂多糖 (编号: L2880 血清型 055: B5), TNF - α ELISA 试剂盒 (批号: BP - E09117R); IL - 1β ELISA 试剂盒 (批号: BP - E09125R); IL - 6 ELISA 试剂盒 (批号: BP - E09726R); IL - 10 ELISA 试剂盒 (批号: BP - E09918R); 大鼠 SIgA ELISA 试剂盒 (批号: P - E09107R) 均为美国 SIGMA 公司产品。

1.3 模型建立 动物购入后适应性饲养 1 周,参照文献^[5]的造模方法并加以改进。将大鼠置于大鼠固定器,固定躯干及四肢,暴露尾部。正常对照组大鼠于左侧尾静脉注射生理盐水 0.12 mL/kg,2 h 后于右侧尾静脉再次注射生理盐水 1 mL/kg;其他各组于左侧尾静脉注射油酸 0.12 mL/kg,间隔 2 h 后选右侧尾静脉注射内毒素 1 mg/kg 复制 ARDS 模型。常规消毒,自由摄食饮水,注意保暖。

1.4 动物分组和给药方法 将大鼠按体重随机分为 3 组:对照组、模型组、治疗组,每组 10 只。对照组与

模型组在造模完成后即用生理盐水灌服,每次 0.01 mL/g。

治疗组在造模完成后给予通腑泻肺中药灌胃,每次 0.01 mL/g,1 次/d。

1.5 标本采样和制备 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔麻醉,仰卧固定。乙醇消毒后,打开胸腹腔,行支气管肺泡灌洗,回收约 2 ~ 3 mL 液体,1200 r/min、4℃,离心 10 min,取上清,-20℃ 分装保存。分离腹主动脉,取血 4 mL,分别置于肝素抗凝管及真空采血管中各 2 mL,于 4℃ 下以 3 000 r/min 离心 10 min,分离得到血清和血浆,-20℃ 分装保存。腹主动脉取血后处死动物,冰上迅速取肺、肠组织,统一取右肺下叶置于中性甲醛中固定;取左肺放入无菌低温冻存管,于液氮中速冻,转存到 -80℃ 冰箱保存。统一截取距幽门下 15 cm 处及回盲部肠组织。分别将其中一半置于中性甲醛中固定,另一半放入无菌低温冻存管,于液氮中速冻,转存到 -80℃ 冰箱保存。

1.6 指标观测 观察各组大鼠一般状态;测定各组大鼠肺功能 (北京贝兰博科技有限公司,实验小动物肺功能测定仪);ELISA 法检测血浆 D - 乳酸、DAO,血清及 BALF 中 TNF - α、IL - 1β、IL - 6、IL - 10;肺、肠组织 SIgA 含量,操作严格按说明书进行。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包,各项指标以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料进行 ANOVA 单因素方差分析,LSD 法作两两比较;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 一般状态观察 正常组大鼠活泼好动,皮毛光泽发亮,呼吸平稳,抓取时能迅速逃避。模型组大鼠在注入 OA 后 30 min 起,出现精神不振,行动迟缓,对刺激反应差,皮毛枯槁,无光泽,多见皮毛倒立,蜷缩成团状;随时间延长,大鼠出现呼吸急促、呼吸困难,部分大鼠出现紫绀,血性泡沫样液体从鼻腔溢出,大便干结,部分有血尿。治疗组大鼠精神及呼吸困难均好于模型组,能饮水,多数有黑色稀便、极臭,未见血尿,但亦行动迟缓,对刺激反应不灵敏,皮毛无光泽,却较少出现皮毛倒立。

2.2 肺功能测定情况 模型组大鼠与空白组相比较,顺应性 (C_{dyn}) 降低,吸气阻力 (R_i)、呼气阻力 (R_e) 均增高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),表明大鼠肺功能在造模成功后出现显著的损伤,在单位压力改变时,肺容积减小,呼吸时气流受限。与模型组相比,治疗组大鼠 C_{dyn} 增高、R_i 降低,但差异无统计学意义。表明经治疗大鼠肺功能损伤有向愈趋势,肺顺应性和气流

受限得到部分改善,见图 1。

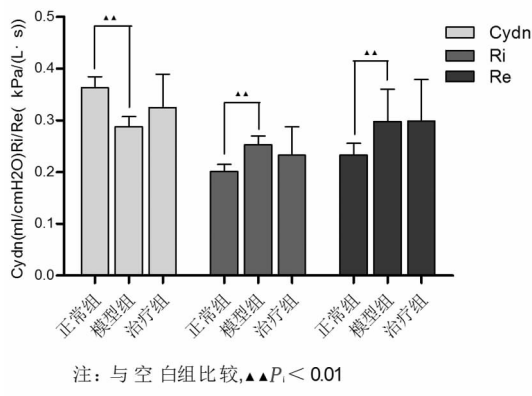


图 1 各组大鼠肺功能检测结果

2.3 血清及支气管肺泡灌洗液中炎症因子表达情况

2.3.1 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 表达情况

与正常组相比,模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 含量均明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,治疗组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量明显降低($P < 0.01$), IL-6、IL-10 含量无明显改善($P > 0.05$),图 2。

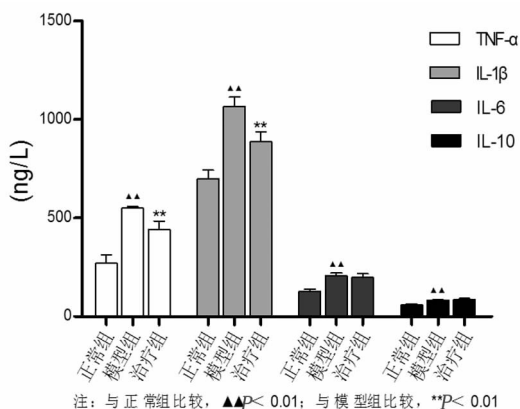


图 2 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 检测结果

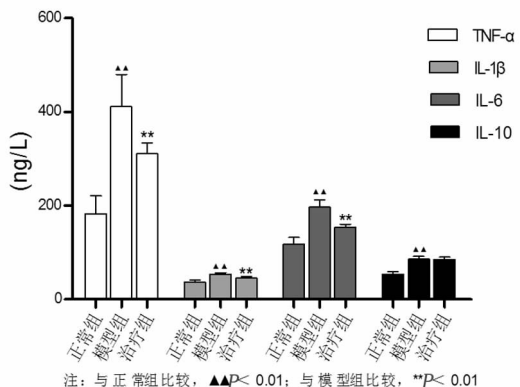


图 3 大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 检测结果

2.3.2 支气管肺泡灌洗液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 表达情况 与正常组相比,模型组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 含量均明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,治疗组大鼠 BALF 中 TNF- α 、

IL-1 β 、IL-6 含量明显降低($P < 0.01$), IL-10 含量无明显降低($P > 0.05$),见图 3。

2.4 肠屏障功能情况 与正常组相比,模型组大鼠血浆 D-乳酸、DAO 含量明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,治疗组血浆 D-乳酸、DAO 含量明显降低($P < 0.01$),见图 4。

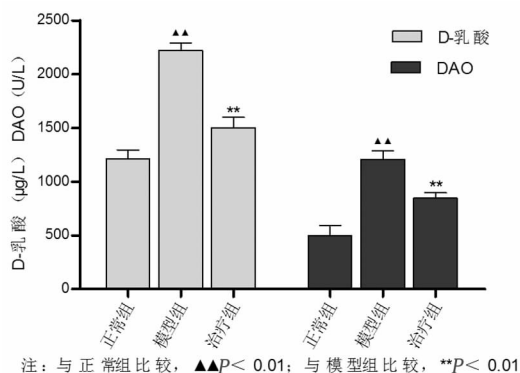


图 4 ARDS 大鼠血浆 D-乳酸、DAO 检测结果

2.5 肺肠组织免疫应答情况 与正常组比较,模型组肺与肠组织 SIgA 明显升高($P < 0.01$),与模型组比较,治疗组肺与肠组织 SIgA 显著降低($P < 0.05$),见图 5。

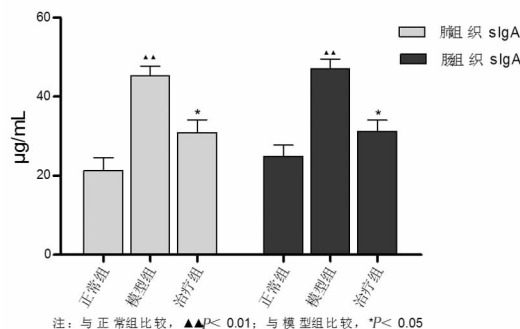


图 5 大鼠肺肠组织 SIgA 检测结果

3 讨论

整体观是强调内外环境统一性,机体自身整体性的思想^[6],是中医认识疾病的方法论。我们在前期 ALI/ARDS 证候学研究发现,本病临床症状复杂,表现出了多脏腑受累的证候特征,证实了肺肠相关在 ALI/ARDS 证候表现中的客观存在,同时得到了肺肠相关是导致该病病情蔓延,出现多脏腑同病,病情复杂难治的关键因素的部分证据^[7-10]。ALI/ARDS 作为多脏腑参与的复杂性疾病^[11-12],其“肺肠同病”的宏观临床表现必然存在多途径复杂病理关联的物质基础,中药干预也必然相应存在多靶点的综合作用机制。

研究结果显示,复制 ARDS 模型成功后,大鼠肺顺应性显著降低、吸气和呼气阻力显著升高,血浆 D-乳酸、DAO、血清及 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 含量明显升高,肺与肠组织 SIgA 含量同步升高,从 (下接第 421 页)

同步增多或同步减少,或在肠减少而在肺增多,或在肠增多而在肺减少的相关变化,提示肺、肠微生物菌群的变化可能是“肠病及肺”的途径和表现形式之一。

肠道微生物定植抗力是指肠道内源性专性厌氧菌抑制消化道中主要属需氧菌的潜在致病菌群数量的能力,1971 年由荷兰微生物学家 Van der waaij 教授提出^[9]。吴仲文和李兰娟等^[10-11]研究认为,粪便中双歧杆菌与肠杆菌的数量比值(B/E 值)可作为肠道微生物定植抗力指标应用于临床。B/E 值大于 1 表示肠道定植抗力正常,B/E 值小于等于 1 表示肠道定植抗力降低。本研究结果显示,模型第 8 天大鼠肠道微生物定植抗力(B/E 值)显著下降,模型第 29 天 B/E 值逐渐恢复至正常状态,模型第 50 天 B/E 值略呈下降趋势。提示肠病(UC)发病可直接导致肠道微生物定植抗力(B/E 值)下降,引起严重的肠道菌群失调或紊乱,病程中肠道微生态可呈现自我恢复平衡的能力,肠道定植抗力趋于正常,由于病灶不除,随着疾病时间延长,肠道定植抗力亦无法维持趋于正常的状态,定植抗力下降。

本研究初步发现 UC 大鼠出现肠道微生态改变,可伴随出现呼吸道微生态的同步变化。今后研究尚可借助新一代 454 高通量测序技术等分子生物学方法,更准确地鉴定菌群,通过样品细菌总基因组 DNA 的提取及其 DNA 基因测序技术,更深入地探讨“肠病及肺”病理传变过程中呼吸道和肠道特异相关功能菌的

作用机制。

参考文献

- [1] 朱立,王新月,杨雪,等.从溃疡性结肠炎大鼠肺损伤看“肺与大肠相表里”的特异性[J].中国中西医结合杂志,2013,33(3):346-350.
- [2] 盛益华,王新月,闫昕,等.从溃疡性结肠炎大鼠肺损伤细胞凋亡机制探讨“肺与大肠相表里”[J].世界华人消化杂志,2013,21(13):1171-1172.
- [3] 陈小兵,杨宇,唐宇娇,等.“肠病及肺”动物模型的建立研究思路探讨[J].云南中医中药杂志,2012,33(2):7-9.
- [4] 杨瞿嘉.基于肠病模型大鼠病理改变及相关炎症因子的变化探讨“肠病及肺”病理传变机制[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [5] 陈小兵.从“肠病”大鼠模型肺与结肠组织的病理形态及其 VIP、SP、CGRP 的表达探讨“肠病及肺”的分子机制[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [6] 刘力,张欢.肠道菌群失调与溃疡性结肠炎[J].现代中医药,2010,30(2):45-47.
- [7] 牛敏,杜艳,缪应雷.溃疡性结肠炎患者肠道菌群分布的研究现状[J].微生物学免疫学进展,2012,40(6):68-70.
- [8] 徐佰国,王英凯,王策,等.肠道菌群与溃疡性结肠炎[J].中国老年学杂志,2012,32(12):2665-2667.
- [9] Van der Waaij, D., J. M. Berghuis, J. E. C. Lekkerkerk - vander Wees. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic - treated mice[J]. J. Hyg, 1971, 69:405.
- [10] 吴仲文,李兰娟,马伟杭,等.肠道微生物定植抗力的新指标—B/E 值[J].浙江预防医学,2000,12(7):4-5.
- [11] 李兰娟.感染微生物生态学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2012:11-12,31-32,42-43,84.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 417 页)

肺肠功能、炎症反应及黏膜免疫等多角度证实了肺通气功能障碍、肠黏膜屏障功能受损、全身及肺脏局部炎症反应水平明显升高、肺肠组织黏膜免疫的同步反应是 ARDS“肺肠同病”的主要病理特征。

研究数据显示,通腑泻肺中药具有多途径、多靶点的疗效机制,通过改善肺通气和肠屏障功能,减低全身及局部炎症反应水平,调节肺肠黏膜免疫应答等实现患病机体的整体调节,同时也为后续深入研究“肺与大肠相表里”理论提供了思路和线索。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊断标准(草案)[J].中华结核和呼吸杂志,2000,23(4):203.
- [2] 李文放,陈杰,杨兴易,等.大黄对急性呼吸窘迫综合征患者的临床疗效[J].中国急救医学,2003,23(2):102.
- [3] 耿耘,马超英.中西医结合治疗呼吸窘迫综合征临床观察[J].江西中医学院学报,1997,9(1):4-5.
- [4] 柯雪帆,赵章忠,张玉萍,等.《伤寒论》和《金匱要略》中的药物剂量

问题[J].中国中药杂志,1983,8(12):36-38.

- [5] 张青,毛宝龄.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.
- [6] 张登本.中医学基础[M].北京:中国中医药出版社,2003:6-9.
- [7] 刘恩顺,孙增涛,苏景深,等.浅析肺肠相关与 ALI/ARDS 证候演变—附 127 例调查资料分析[J].辽宁中医杂志,2013,40(4):638-639.
- [8] 孟苗苗,付敏,郑莉,刘恩顺,孙增涛. ALI/ARDS 脏腑证候分布及肺肠相关特征的初步调查[J].天津中医药大学学报,2011,04:215-217.
- [9] 郑莉,刘恩顺,赵燕红.127 例 ALI/ARDS 患者肺与大肠证候的 Logistic 回归分析[J].中国中医急症,2013,01:8-9,16.
- [10] 刘恩顺,孙增涛,苏景深,封继宏,王强.浅析肺肠相关与 ALI/ARDS 证候演变——附 127 例调查资料分析[J].辽宁中医杂志,2013,04:638-639.
- [11] 陈岩,白雪松,隋吉峰,张东伟,林萍.聚类分析研究急性呼吸窘迫综合征证候规律[J].辽宁中医药大学学报,2013,11:13-14.
- [12] 栗艳茹. ARDS 的中医证候要素与临床分期的相关性研究[D].济南:山东中医药大学,2012.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)