

从溃疡性结肠炎大鼠肺组织炎性细胞因子及氧自由基表达的变化看肺与大肠相表里

闫 昕¹ 王新月² 盛益华² 朱 立² 张良登² 臧 芹²

摘要 目的 通过观察溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠肺组织中炎性细胞因子及氧自由基表达变化,探讨“肺与大肠相表里”理论及 UC 肺损伤的病理机制。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 50 只,随机选择其中 25 只采用结肠组织致敏与三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇相结合的免疫复合法复制大鼠 UC 模型(模型组),另 25 只设为正常对照组(正常组)。造模后第 2、4 周时观察大鼠肺组织病理形态学改变,ELISA 法检测肺组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)含量,比色法测定肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)活性。**结果** 造模第 2、4 周时,模型组肺组织病理均表现异常,且与正常组比较,其肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 含量均明显升高($P < 0.01$),SOD 活性显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** TNF- α 、IL-1 β 、SOD、MDA 可能是 UC 肠病及肺的共同物质基础,为“肺与大肠相表里”理论提供了一定的现代医学实验依据。

关键词 肺与大肠相表里;溃疡性结肠炎;肺损伤;炎性细胞因子;氧自由基

Exploration of the Theory of "Fei and Dachang Being Interior-Exteriorly Related" from Observing Changes of Inflammatory Cytokines and Oxygen Free Radicals in the Lung Tissue of Ulcerative Colitis Rats YAN Xin¹, WANG Xin-yue², SHENG Yi-hua², ZHU Li², ZHANG Liang-deng², and ZANG Qin² 1 College of Chinese Medicine, Hebei United University, Hebei (063000), China; 2 Department of Internal TCM, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100700), China

ABSTRACT Objective To explore the theory of "Fei and Dachang being interior-exteriorly related" and the pathogenesis of lung injury by observing changes of inflammatory cytokines and oxygen free radicals in ulcerative colitis (UC) rats. **Methods** Totally 50 healthy male Wistar rats were randomly divided into two groups, the normal control group and the model group, 25 rats in each group. The UC model was established by allergizing colon mucosa combined with TNBS-alcohol (50%) enema. Another 25 rats were recruited as the normal control group. At week 2 and 4 after modeling, the pathomorphological changes of the lung were observed. Furthermore, the contents of tumor necrosis factor α (TNF- α) and IL-1 β were determined by ELISA. The activities of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were evaluated with colorimetry. **Results** Compared with the normal control group, the pathomorphology of the lung tissue in the model group appeared abnormal at week 2 and 4. Compared with the normal control group, levels of TNF- α , IL-1 β , and MDA in the lung tissue significantly increased in the model group ($P < 0.01$) and the activities of SOD significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** TNF- α , IL-1 β , SOD, and MDA might be common material bases for the large intestine involved in lung disease of UC patients, thus providing a modern scientific basis for the theory of Fei and Dachang being interior-exteriorly related.

KEYWORDS Fei and Dachang being interior-exteriorly related; ulcerative colitis; lung injury; inflammatory cytokine; oxygen free radical

基金项目:国家“973 计划”资助项目——肺与大肠相表里脏腑相关理论基础应用研究(No. 2009CB522705)

作者单位:1.河北联合大学中医学院(河北唐山 063000);2.北京中医药大学东直门医院中医内科教研室(北京 100700)

通讯作者:王新月, Tel:010-84013361, E-mail: WXY6687@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.04.0455

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是大肠黏膜的慢性炎症和溃疡性病变, 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的一种^[1]。因其治愈难度大, 常反复发作, 甚至伴有肠外病变, 已成为严重危害人类健康的消化道疾病之一。“肺与大肠相表里”理论源于《黄帝内经》, 是中医脏腑表里相合理论的重要组成部分, 该理论在后世医家长期的临床实践中被广泛地应用并得以证实。近年国外对 IBD 肺损害的临床报道较多^[2-5], 但在我国尚未得到普遍认识。在“肺与大肠相表里”理论启发指导下, 以国家 973 项目为依托, 本课题组进行了多中心、大样本流行病学调查, 研究发现 58.6% 的 UC 患者会出现肺部症状, 气短、咳嗽症状明显; 63.3% 患者出现肺功能改变^[6,7], 证实了我国 UC 患者肺损伤的客观存在性。

本实验突破传统研究模式, 采用结肠黏膜致敏加三硝基苯磺酸 (TNBS) - 50% 乙醇灌肠的方法复制 UC 大鼠模型, 观察 UC 大鼠肺组织病理形态学改变, 以及公认的在 UC 发病机制中起重要作用的炎性细胞因子和氧自由基在 UC 大鼠肺组织中的表达变化, 旨在进一步探寻“肺与大肠相表里”的物质基础和科学内涵, 同时揭示 UC 肺损伤发生的病理机制, 以期为临床更有效更全面地治疗 UC 及预防 UC 肠外并发症提供新思路。

材料与方法

1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体重 (200 ± 10) g [由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK (京) 2012 - 0001]; 健康雄性新西兰大耳白兔 5 只, 体重 (2.5 ± 0.5) kg [北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司, 许可证编号: SLXL (京) 2010 - 0001]。

2 主要试剂及仪器 完全弗氏佐剂 (美国 Sigma 公司); 2,4,6 - 三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS), 浓度: 1.14 g/mL (美国 Sigma 公司, 批号: 03111065); 大鼠白介素-1β (IL-1β) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) ELISA 试剂盒, 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; 大鼠超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 测试盒购自南京建成生物工程研究所; 超声破碎仪 (美国 SONICS 公司生产); Safire² 全波长荧光酶标仪 (瑞士 TECAN 集团公司生产)。

3 分组及造模方法 50 只 Wistar 大鼠适应性饲养一周后, 随机选择 25 只复制 UC 模型, 其余 25 只设为正常对照组 (正常组)。采用结肠黏膜致敏加 TNBS-

50% 乙醇灌肠的方法复制 UC 大鼠模型^[8]。健康大耳白兔空气栓塞法处死, 剖取结肠, 刮取结肠黏膜组织, 加入与肠黏膜等体积生理盐水制成组织匀浆, 4 ℃, 3 000 r/min 离心 25 min, 取上清, 少量用于双缩脲法蛋白定量, 余加入等体积完全弗氏佐剂, 制成抗原乳化液。模型组分别于第 1、15、22 天注射抗原乳化液于大鼠足趾、腹股沟等部位, 每次每只大鼠注射抗原乳化液含抗原 8 mg。TNBS 配成浓度为 120 mg/mL 溶液, 将 TNBS 溶液与 50% 乙醇按体积 1:1 混合。第 29 天时, 大鼠禁食不禁水 24 h 后, 麻醉状态下用 TNBS-50% 乙醇按 TNBS 100 mg/Kg 体重灌肠。正常组大鼠不予造模, 与模型组同步禁食、麻醉, 同步饲养观察。

4 观察指标及方法

4.1 观察 UC 模型大鼠结肠组织病理形态学改变 造模后第 3 天, 随机选取正常组和模型组大鼠各 5 只, 禁食不禁水 24 h 后, 10% 水合氯醛麻醉, 剖取肛门以上 2 ~ 10 cm 处典型病变部位的结肠组织, 甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片、染色。于光学显微镜 (10 × 10) 下观察模型组大鼠结肠组织病理改变。如镜下见病变肠黏膜有明显溃疡性表现及炎性细胞浸润, 则标志 UC 造模成功^[9]。

4.2 观察 UC 模型大鼠肺组织病理形态学改变 造模后第 2、4 周, 随机选取模型组与正常组大鼠各 10 只, 禁食不禁水 24 h 后, 10% 水合氯醛麻醉, 剖开胸部, 摘取右肺上叶, 甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片、染色。于光学显微镜 (10 × 10) 下观察各组大鼠肺组织病理改变。

4.3 观察 UC 模型大鼠肺组织中 TNF-α、IL-1β 含量表达及 SOD、MDA 活性变化 造模后第 2、4 周, 取右肺下叶组织迅速冷冻于液氮中, 分装后 -70 ℃ 冰箱保存备用。检测前取少量组织块称重 (100 mg 左右), 加 9 倍生理盐水, 超声细胞破碎仪于冰上匀浆。匀浆液 3 000 r/min 低温离心 15 min 取上清, 分装后 -80 ℃ 冰箱保存备用。双抗体夹心 ELISA 法检测大鼠肺组织匀浆中 TNF-α、IL-1β 含量, 化学比色法检测匀浆液中 SOD、MDA 活性。

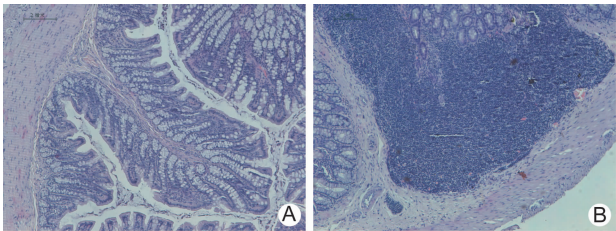
5 统计学方法 实验数据用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般状态比较 造模后第 2、4 周时正常组大鼠毛色光洁, 反应灵敏, 喜活动, 粪便呈颗粒状, 无黏液脓血便。呼吸平稳, 无气促、咳嗽表现。体

形逐渐增大。2 周时模型组大鼠大便为黏液便或稀便,形体消瘦,精神不振、反应迟钝、倦怠嗜卧、喜扎推,食量明显减少,拱背竖毛,皮毛无光泽;部分出现呼吸困难,喘鸣,其中 3 只大鼠腹部胀大明显。4 周时模型组大鼠黏液便减少,多数排出稀软便,体形稍有增大,反应性、活动度、食量、皮毛光泽度与 2 周时比较有所好转,仍有大鼠气急喘促;1 只大鼠腹部胀大。

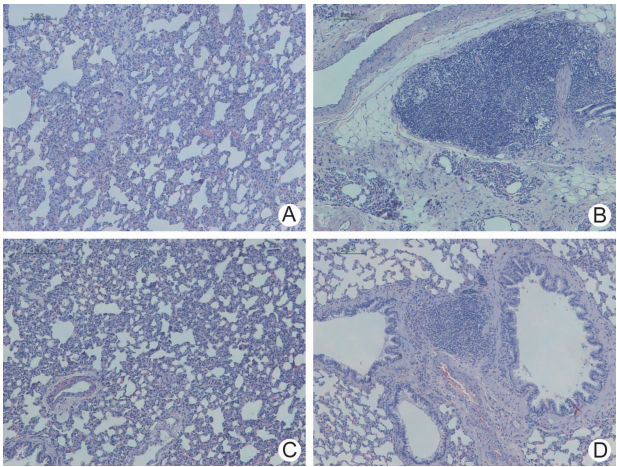
2 UC 模型大鼠肠组织病理形态学改变(图 1)造模后第 3 天,正常组大鼠结肠组织结构完整,黏膜排列整齐,腺体无萎缩,无炎性细胞浸润,肠壁无增厚。模型组大鼠见黏膜多处糜烂、点状坏死、出血,部分上皮脱落,溃疡形成,腺体结构紊乱,杯状细胞减少,黏膜下固有层局部充血、水肿,黏膜及黏膜下大量炎性细胞浸润。UC 病变典型,造模成功。



注:A 为正常组;B 为模型组
图 1 两组结肠组织病理图片 (HE 染色,10 × 10)

3 UC 模型大鼠肺组织病理形态学改变(图 2)第 2、4 周时正常组大鼠肺内结构清晰,肺泡间隔未见增厚,无水肿、炎症及纤维化表现,肺泡腔内无明显渗出(图 A、C)。第 2 周时模型组大鼠肺部病理表现为弥漫性淋巴细胞浸润,肺间质渗出增生,肺泡腔变窄。支气管、血管周围炎性细胞浸润,淋巴细胞呈灶状分布(图 B)。第 4 周时模型组肺部病理无改善,肺间质充血,大量淋巴细胞浸润,血管壁增厚,支气管壁纤维组织增生,血管、支气管外周淋巴细胞灶状浸润,部分肺组织肺泡融合形成肺大泡(图 D)。

4 各组大鼠肺组织中 TNF-α、IL-1β 含量测定结果比较(表 1) 模型组大鼠第 2、4 周时肺组织中 TNF-α、IL-1β 含量较正常组均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注:A、C 分别为正常组第 2、4 周;B、D 分别为模型组第 2、4 周

图 2 两组第 2、4 周时肺组织病理图片 (HE 染色,10 × 10)

5 各组大鼠肺组织匀浆中 SOD、MDA 表达的变化(表 1) 模型组大鼠 2 周和 4 周时肺组织中 SOD 活性较正常组均明显降低,MDA 活性明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

UC 是病因不明的一种慢性非特异性肠道炎症。目前,UC 的病因及发病机制尚未完全明确,现代医学认为与免疫、遗传、环境、感染及精神因素等有关,其中免疫因素在 UC 中的重要作用已得到公认。根据 UC 临床表现以及发作期、缓解期反复交替出现最为常见的发病特点,中医学将其归属于痢疾之“休息痢”范畴。王新月教授通过对 UC 多年的临床和实验研究,创新性地提出 UC“毒损肠络”病机说,认为本病多是在正气不足、脾胃虚弱,免疫功能低下的基础上,脾虚失于健运,湿邪内生,湿郁化热,湿热之邪与气血相搏结,肠道传导失司,气滞血凝,肠络受伤;湿、热、瘀、虚互结,郁而化毒,血败肉腐成脓,内溃成疡;湿、热、瘀毒蕴积肠道,相干为害,气不布津,血不养络,肠络受损,肠黏膜屏障损伤,导致炎症反应及异常的免疫功能亢进,此乃 UC 发生、发展及反复发作的病机关键所在。

表 1 各组大鼠肺组织匀浆中 TNF-α、IL-1β、SOD、MDA 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)	SOD (U/mg pro)	MDA (nmol/mg pro)
正常	8	第 2 周	1 466.38 ± 221.09	2 000.38 ± 259.87	56.00 ± 9.65	6.01 ± 1.32
		第 4 周	1 177.08 ± 152.51	2 055.84 ± 350.81	59.31 ± 7.71	6.27 ± 1.15
模型	8	第 2 周	2 049.67 ± 106.42 **	3 242.04 ± 1012.38 **	44.13 ± 7.68 *	9.82 ± 1.87 **
		第 4 周	1 680.04 ± 305.08 **	2 713.36 ± 500.94 **	41.10 ± 9.02 **	10.11 ± 2.87 **

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

然而,肺主一身之气,宣发肃降主行水,朝百脉、主治节,与大肠相表里,UC 湿热瘀毒交阻,上攻于肺,日久势必损伤肺脾之气,影响肺的正常生理功能。同时,肺对气血水的调节对 UC 的发生、发展具有重要意义,肺损伤对气血水调节失常,会加重 UC 病情,使得 UC 反复发作,缠绵难愈。本课题组临床研究亦已证实,确有 50% ~ 60% 的 UC 患者存在肺功能的下降及肺结构的损伤,证候主要表现为肺气不足、肺气郁滞、肺失宣降等^[10]。因此,探寻肺肠相关的共同物质基础,对明确“肺与大肠相表里”理论的现代医学本质、完善藏象理论、进一步提高临床疗效具有重要意义。

细胞因子是由免疫细胞(淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等)和某些非免疫细胞(如血管内皮细胞、表皮细胞、成纤维细胞等)经刺激而合成、分泌的一类具有广泛生物活性的小分子蛋白质,作为细胞间信号传递分子,主要调节免疫应答、参与免疫细胞分化发育、介导炎症反应、刺激造血功能并参与组织修复等。对于 UC 患者,细胞因子作用于炎症介质,介导结肠黏膜的病理性损伤,在 UC 发病的机制中起重要作用。IL-1、TNF 等促炎症细胞因子是公认能介导 UC 发病的细胞因子,并且这些炎症因子已被证实介导外周气道疾病中具有重要作用,可使肺毛细血管基底膜增宽,产生高凝状态,肺血管量减少,最终导致小气道阻塞性疾病^[11]。本实验结果显示,UC 大鼠第 2、4 周时肺组织匀浆中 IL-1 β 、TNF- α 含量均明显升高($P < 0.01$),提示 TNF- α 、IL-1 β 可能是肺与大肠相关的共同物质基础,肺与大肠在病理情况相互的影响可能是通过 TNF- α 、IL-1 β 的相关调控实现的。

氧自由基(oxygen free radical, OFR)是一类只有高度化学反应活性的含氧基团,主要包括超氧阴离子自由基(O_2^-)和羟自由基(OH)等。同时,大量研究证实^[12-14],UC 时普遍存在 OFR 代谢异常。UC 发病时,肠黏膜通透性增大,肠黏膜中大量巨噬细胞耗氧量增加,通过一系列反应,产生大量 O_2^- 、OH 及脂质过氧化物(ROO^-),损伤肠黏膜^[15]。而 UC 产生的 OFR 已被证实能通过损伤核酸、蛋白质和攻击脂质膜等对肺部组织、细胞结构产生攻击和破坏作用,导致肺部毛细血管内皮细胞、肺泡上皮细胞、基底膜细胞的膜脂质损伤、破坏,引起肺部炎症损伤^[16]。氧化—抗氧化平衡系统中最具有代表性和重要意义的是 SOD 和 MDA。SOD 是存在于生物体内重要的抗氧化酶,能有效地催化超氧化自由基分解为 H_2O 和氧分子,从而抑制肠组织中的脂质过氧化反应,稳定细胞膜。SOD 活力的高低间接反应了机体清除 OFR 的能力。MDA

是 OFR 触发细胞膜上的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的产物,其水平的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。本研究结果显示,UC 大鼠第 2、4 周时肺组织匀浆中 SOD 活力均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),MDA 含量显著升高($P < 0.01$),提示 UC 大鼠肺组织清除氧自由基的能力下降,对肺组织细胞的保护减弱,同时脂质过氧化程度加强,进一步加剧对肺组织细胞的损伤程度,这是导致结肠炎症、溃疡及肺损伤发生的重要机制之一。

UC 大鼠肺组织病理切片观察到大量淋巴细胞浸润、肺间质增生、肺间质渗出增生,说明 UC 湿热瘀毒上扰,肺气不利,为“肺与大肠相表里”提供了病理学依据。可以认为,上述炎性细胞因子及氧自由基导致肠黏膜损伤从而引起的全身异常免疫反应是 UC“毒损肠络”的生物学基础,同时又是 UC 肺损伤发生的物质基础,为“肺与大肠相表里”理论提供一定的现代医学实验依据。

参 考 文 献

- [1] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗指南(草案)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(1): 61-65.
- [2] Yilmaz A, Yilmaz Demirci N, Hosgün D, et al. Pulmonary involvement in inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(39): 4952-4957.
- [3] Garamszegi M. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel diseases and their management[J]. Orv Hetil, 2011, 152(17): 663-671.
- [4] Tzanakis NE, Tsiligianni IG, Sifakas NM. Pulmonary involvement and allergic disorders in inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(3): 299-305.
- [5] Ozyilmaz E, Yildirim B, Erbas G, et al. Value of fractional exhaled nitric oxide (FENO) for the diagnosis of pulmonary involvement due to inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(4): 670-676.
- [6] 张雯,王新月,孙慧怡,等. 溃疡性结肠炎肺功能损伤特点[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(3): 213-216.
- [7] 孙慧怡,王新月,吴健,等. 溃疡性结肠炎肺功能损害和肺与大肠的表里关联性[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(5): 591-594.
- [8] 景珊,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): 1367-1369.

- [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, 4, 11 (2): 70-71.
- [10] 王新月,孙慧怡.基于肺与大肠相表里理论探讨从肺论治溃疡性结肠炎[J].北京中医药大学学报, 2011, 34 (3): 153-155.
- [11] 黄国平.2 型糖尿病患者肺功能改变及其相关因素研究[J].全科医学临床与教育, 2009, 7(2): 111.
- [12] Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(8): 311-322.
- [13] 周燕红,于皆平,何小飞.大鼠溃疡性结肠炎超氧化物歧化酶和丙二醛的变化[J].咸宁学院学报(医学版), 2003, 17(6): 391-392.
- [14] 陈昱,汤斌,祝斌,等.溃疡性结肠炎患者血清一氧化氮检测及意义[J].中国医师杂志, 2002, 4 (10): 1073:1074.
- [15] 安丽婷.美沙拉嗪颗粒联合培菲康对溃疡性结肠炎患者细胞因子和氧自由基指标的影响[D].太原:山西医科大学, 2011.
- [16] 刘慧,李文朴.呼吸系统氧化与抗氧化作用机制的研究进展[J].中国现代医学杂志, 2008, 18(8): 1075-1080.

(收稿:2013-01-12 修回:2013-11-06)

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2014 年《Chinese Journal of Integrative Medicine》

(中国结合医学杂志,英文版)

《Chinese Journal of Integrative Medicine》(中国结合医学杂志,英文版)是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊,旨在促进结合医学及替代医学的国际交流,及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录,如:Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/MEDLINE、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Media (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录。根据 2013 年 6 月底汤姆森公司公布的 2012 年期刊引证报告,本刊 SCI 影响因子为 1.059。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约,正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

《Chinese Journal of Integrative Medicine》为大 16 开本,铜版纸印刷,彩色插图,2011 年改为月刊,80 页,国内定价为 40.00 元/期,全年定价:480.00 元。国际标准刊号:ISSN 1672-0415,国内统一刊号:CN 11-4928/R,国内邮发代号:82-825,海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827,62876547,62876548;传真:010-62874291;E-mail:cjim_en@cjim.cn;网址: <http://www.cjim.cn>。