

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.07.013

基于“肺肠相关”理论的溃疡性结肠炎炎症转化模型小鼠肺气血屏障损伤情况评价

徐慧妍¹, 张海妹¹, 詹心雨¹, 吴范武^{1,2}, 贾永森^{1,2}, 吴晨曦^{1,2}, 孔令玉³, 闫昕^{1,2}✉

1. 华北理工大学, 河北省唐山市曹妃甸新城渤海大道 21 号, 063210; 2. 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室; 3. 华北理工大学附属医院

[摘要] **目的** 基于“肺肠相关”理论, 动态观察评价溃疡性结肠炎(UC)炎症转化过程中小鼠肺气血屏障损伤情况。**方法** 65 只 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为正常组 25 只和模型组 40 只, 模型组采用氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠法建立小鼠 UC 炎症转化模型, 按照 5、8、11、13、15 周的取材时间, 将正常组小鼠随机分为正常 5 周、8 周、11 周、13 周、15 周组, 将模型组小鼠(10 只小鼠在第 1 循环饮用葡聚糖硫酸钠结束后死亡)随机分为模型 5 周、8 周、11 周、13 周、15 周组。实验期间, 每天观察小鼠一般状态, 每周测量小鼠体质量。在相应取材时间点, 测量各组小鼠结肠长度, HE 染色法观察小鼠肺、结肠组织病理形态, 免疫荧光法检测肺、结肠组织闭锁小带蛋白 1(ZO-1)、血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)和细胞骨架蛋白(F-actin)阳性表达, 实时荧光定量 PCR 法检测肺组织 B 细胞淋巴瘤 2(*Bcl-2*)、B 细胞淋巴瘤 2 关联 X 蛋白(*Bax*)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(*Caspase-3*) mRNA 表达, Western Blot 法检测肺组织 ZO-1、VE-cadherin 和 F-actin 蛋白水平。**结果** 与同时时间点正常组比较, 各时间点模型组小鼠一般状态较差, 体质量下降, 结肠缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型 5 周组小鼠结肠组织炎性细胞浸润明显; 模型 8 周组出现轻度异型增生; 模型 11 周组隐窝结构紊乱, 出现中重度异型增生; 模型 13 周组、15 周组出现肿瘤。肺间质病变、炎症、血管炎及纤维化等可见于 UC 炎症转化各阶段。肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 蛋白水平和 *Bcl-2* mRNA 表达在急性炎症恢复期、不典型增生期、成癌期均降低, *Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达升高; 结肠组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 蛋白水平在急性炎症恢复期、不典型增生期、成癌期均降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与模型 5 周组比较, 其余模型组小鼠肺组织 ZO-1、F-actin 蛋白水平和 *Bcl-2* mRNA 表达在不典型增生期、成癌期升高, *Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达降低; 结肠组织 ZO-1 蛋白水平在成癌期升高, VE-cadherin 蛋白水平在不典型增生期降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** UC 炎症转化模型小鼠在“炎症反应→异型增生→癌变”过程均存在肺气血屏障损伤。

[关键词] 肺肠相关; 溃疡性结肠炎; 结直肠癌; 炎症转化; 肺气血屏障; 肠黏膜屏障

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因尚未明确的以结直肠黏膜连续性、弥漫性炎症改变为特点, 以腹泻、黏液脓血便为主要症状的慢性非特异性肠道炎症性疾病^[1], 为炎症性肠病最常见的类型。根据 UC 临床表现, 可将其归属于中医学“痢疾”“肠澼”“滞下”等范畴^[2]。既往研究显示, UC 患者结直肠癌发病率比一般人群高 60%^[3]。

因此, 有效延阻结直肠“炎症转化”, 是降低结直肠癌发生的关键。本团队前期研究发现, UC 患者普遍存在肺损伤^[4-5], UC 大鼠肠黏膜屏障损伤的同时, 存在肺气血屏障结构损坏及功能障碍^[6]。本研究通过氧化偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠 UC 炎症转化模型, 系统观察“炎症反应→异型增生→癌变”各阶段肺气血屏障损伤情况, 完善 UC 炎症转化病因病机理论, 为合理选择临床干预时机及提出肺肠同治治疗方案提供实验依据。本实验方案已通过华北理工大学实验动物福利

基金项目: 国家自然科学基金(81704059); 河北省自然科学基金(H2025209023)

✉ 通讯作者: yanxin@ncst.edu.cn

伦理委员会审批（审批号 2024-SY-004）。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 65 只，6~8 周龄，体重（20±2）g，购自中国食品药品检定研究院，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2022-0002。动物饲养于华北理工大学动物实验中心，实验动物使用许可证号：SYXK（冀）2023-018，自然光照，饲养环境温度 21~26℃，相对湿度 12%~20%。

1.2 主要试剂与仪器

AOM（货号：A5486-25MG）、DSS（货号：RP-RC0021）、闭锁小带蛋白 1（ZO-1）抗体（免疫荧光，货号：RA1037）、血管内皮钙黏蛋白（VE-cadherin）抗体（免疫荧光，货号：RA1083）、山羊抗兔二抗（货号：S3002-1），河北瑞帕特生物科技有限公司；山羊血清（货号：C2530-0010），上海达特希尔生物科技有限公司；细胞骨架蛋白（F-actin）抗体（免疫荧光，货号：ET1702-30），华安生物科技有限公司；ZO-1 抗体（Western Blot 实验，货号 21773-1-AP）、HRP 标记羊抗小鼠二抗（货号 SA00001-1），武汉三鹰生物技术有限公司；VE-cadherin 抗体（Western Blot 实验，货号：AF6265）、 β -肌动蛋白（ β -actin）抗体（货号：T0022），江苏亲科生物研究中心有限公司；F-actin 抗体（Western Blot 实验，货号：ab205），英国 Abcam 公司；HRP 标记羊抗兔二抗（货号：A0208），碧云天生物技术有限公司；Trizol（货号：15596-026），美国赛默飞世尔科技公司；聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（0.45 μ m，货号：IPVH00010），德国 Merck 公司；反转录预混液（货号：R223）、定量实时 PCR 检测试剂盒（货号：Q111），南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

TP1020 型组织脱水机、RM2245 型组织切片机，德国 Leica 公司；JK-FEC-6L 型生物组织包埋机，上海精学科学仪器有限公司；BX53 型荧光显微镜，日本 OLYMPUS 公司；ChemiDoc™ CXRS+System 型化学发光成像系统，美国 Bio-Rad 公司；DYCZ-40 型电转仪，北京六一仪器厂；FW606 型半干转印仪，南京爱思易生物科技有新公司；H1-16KR 型冷冻高速离心机，湖南可成仪器设备有限公司；WD-9413B 型凝胶成像分析仪、OYY-6C 型电泳仪，北京久一仪器厂；ND-100 型超微量紫外可见分光光度计，杭州米欧仪器有限公司；ViiA-7 型实时荧光定量 PCR 仪、proFlex 型 PCR 扩增仪，美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 动物分组及造模

65 只 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后，采用随机数字表法分为正常组 25 只，模型组 40 只，按照 5、8、11、13、15 周的取材时间，将正常组小鼠随机分为正常 5 周、8 周、11 周、13 周、15 周组，将模型组小鼠（10 只小鼠在第 1 循环饮用 DSS 结束后死亡）随机分为模型 5 周、8 周、11 周、13 周、15 周组，每个循环结束后正常组和模型组随机取材 5 只，第 5 个循环结束后剩余正常组 5 只、模型组 10 只，全部取材。

各模型组小鼠采用 AOM/DSS 诱导 UC 炎癌转化模型^[7-8]：单次腹腔注射 2 mg/ml 的 AOM（10 mg/kg）生理盐水溶液约 0.1 ml；7 天后，给予 2% DSS 纯净水溶液自由饮用，连续 7 天后改为正常饮水 14 天，如此 21 天为 1 个循环，进行 3 个循环。然后，第 4、5 个循环予 2% DSS 水溶液自由饮用 7 天，正常饮水 7 天，即完成造模。以 HE 染色结果判定模型复制情况：病变肠黏膜有明显溃疡性表现及炎性细胞浸润为 UC 模型复制成功^[8]；肠组织炎性细胞浸润明显，溃疡深达肌层，黏膜厚度增加，隐窝结构及杯状细胞紊乱或丧失，原有管状结构丧失且部分腺体萎缩坏死，并见异型增生为 UC 炎癌转化模型复制成功；肠组织隐窝结构破坏、极性消失，呈分支状畸形，同时见大量异型性细胞及炎性细胞浸润，病理性核分裂、核仁增大、多形性，深核染色出现为成癌模型^[9]。10 只小鼠在第 1 循环饮用 DSS 结束后死亡。

1.4 观察指标及方法

小鼠脱颈椎处死进行取材，快速剥取结肠，纵向切开，生理盐水清洗，观察结肠黏膜损伤情况。于病变典型处剪取 3~5 段 0.5 cm 的结肠组织，部分保存于 4% 多聚甲醛用于 HE 染色和免疫荧光检测，剩余组织冻存于 -80℃ 冰箱；开胸，剪下左肺组织保存于 4% 多聚甲醛，用于 HE 染色和免疫荧光检测，右肺组织冻存于 -80℃ 冰箱，用于 Western Blot 及实时荧光定量 PCR 实验。

1.4.1 一般状态 实验期间，每天观察记录小鼠精神状态、皮毛光泽度、身体活动度、大便性状变化，每周测量小鼠体质量。

1.4.2 结肠长度 测量于 5、8、11、13、15 周取材的小鼠结肠（回盲部到直肠）长度。

1.4.3 HE 染色法观察小鼠肺、结肠组织病理形态 将保存于 4% 多聚甲醛的肺、结肠组织进行常规包埋、切片（4 μ m）、烤片、60℃ 条件下脱蜡、HE 染色、脱水透明、中性树胶封片。显微镜下采

用 cellSens 软件观察各个时间点小鼠肺组织、结肠组织病理形态。

1.4.4 免疫荧光法检测小鼠肺、肠组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达 每组随机选 3 只小鼠肺、肠组织石蜡切片脱蜡至水,枸橼酸缓冲液加热修复, PBS 冲洗,山羊血清封闭 1 h,加入 ZO-1 (3 : 1000)、VE-cadherin (1 : 200)、F-actin (1 : 200) 一抗, 4 ℃ 孵育过夜,滴加山羊抗兔二抗室温孵育 1 h,使用含 DAPI 抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜拍照,使用 Image J-win32 软件统计分析相对荧光强度。

1.4.5 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠肺组织 B 细胞淋巴瘤 (*Bcl-2*)、B 细胞淋巴瘤 2 关联 X 蛋白 (*Bax*)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (*Caspase-3*) mRNA 表达 每组随机选 3 只小鼠肺组织 100 mg, Trizol 提取总 RNA,测定吸光度 (OD) 值,计算提取的 RNA 纯度和浓度。将总 RNA 反转录为互补的 cDNA,进行 DNA 扩增,反应条件: 50 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s, 4 ℃ 10 min, 1 个循环。扩增程序为两步法, 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火/延伸 60 s, 仪器默认程序绘制融解曲线,以 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 mRNA 相对表达量。引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司设计合成,见表 1。

表 1 小鼠肺组织 *Caspase-3*、*Bcl-2*、*Bax* 及 β -actin mRNA 引物序列

Table 1 Primer sequences for *Caspase3*, *Bcl2*, *Bax* and β -actin genes

引物	序列 (5'→3')	产物长度 /bp
<i>Caspase-3</i>	上游: TCTGACTGGAAAGCCGAAACTCT	209
	下游: AAAGGGACTGGATGAACACGAC	
<i>Bcl-2</i>	上游: AGCCACCCGTAACAATCAAG	147
	下游: CCTGTCCCTTTGTCTTCAGC	
<i>Bax</i>	上游: TTTTGCTACAGGTTTCATCCA	181
	下游: GTGTCCACGTCAGCAATCATC	
β -actin	上游: CACGATGGAGGGCCGGACTCATC	240
	下游: TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	

注: *Caspase-3*, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; *Bcl-2*, B 细胞淋巴瘤 2; *Bax*, B 细胞淋巴瘤 2 关联 X 蛋白; β -actin, β -肌动蛋白。

1.4.6 Western Blot 法检测小鼠肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 蛋白水平 每组随机选 3 只小鼠肺组织提取总蛋白,并测定浓度,归一化处理后,进行电泳,加入 SDS-PAGE 缓冲液进行电泳及转膜。将 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h。加 ZO-1 (1 : 10 000)、VE-cadherin (1 : 1000)、F-actin

(1 : 500)、 β -actin (1 : 20 000) 一抗 4 ℃ 孵育过夜,在二抗孵育液 (羊抗兔 1 : 1000,羊抗小鼠 1 : 10 000) 中常温孵育 2 h。显影,曝光,扫描图片,提取数据,最后用 Image J-win32 软件对条带灰度值进行分析,将目标蛋白灰度值除以内参 (或总蛋白) 灰度值,再除以正常组的比值均值,使正常组归一化值=1,其他组为倍数变化。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验,组内比较采用配对样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般状态比较

正常组小鼠各时间点精神状态良好,活跃好动,皮毛光泽明亮,反应敏捷,体质量稳定增加,大便呈黄褐色颗粒状。与正常组各时间点小鼠比较,模型组各时间点小鼠精神萎靡,反应迟钝,蜷缩呈弓背状,皮毛粗糙枯槁杂乱,大便稀溏,出现脓血便,体质量整体较低,2~4 周、8~9 周和 11~12 周、13~14 周为体质量下降时期,分别对应急性炎症恢复期、不典型增生期、成癌期,在急性炎症恢复期体质量下降幅度最大,小鼠状态最差,且体质量在每个循环饮用 DSS 期间下降,恢复正常饮水后间歇期内体质量逐渐上升,状态逐渐恢复。造模期间仅第 1 循环结束后死亡 10 只小鼠 (严重腹泻消瘦),其余均成模。

2.2 各组小鼠结肠长度比较

表 2 示,与各时间点正常组比较,各时间点模型组小鼠结肠长度缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组小鼠结肠长度比较

Table 2 Comparison of colon lengths among different groups of mice (cm, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	长度
正常 5 周组	5	7.03 $\pm$ 0.37
模型 5 周组	5	5.67 $\pm$ 0.47 ^{a)}
正常 8 周组	5	7.10 $\pm$ 0.29
模型 8 周组	5	5.50 $\pm$ 0.41 ^{a)}
正常 11 周组	5	7.27 $\pm$ 0.33
模型 11 周组	5	5.10 $\pm$ 0.29 ^{b)}
正常 13 周组	5	7.33 $\pm$ 0.24
模型 13 周组	5	5.07 $\pm$ 0.49 ^{b)}
正常 15 周组	5	7.47 $\pm$ 0.34
模型 15 周组	5	4.83 $\pm$ 0.24 ^{b)}

注: a) 与同时点正常组比较, $P<0.05$; b) 与同时点正常组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组小鼠不同时间点肺、结肠组织病理形态比较

图 1 示，各时间点正常组小鼠结肠组织形态结构完整，结肠黏膜上皮组织排列整齐，细胞密集，杯状、隐窝结构完整，无炎性细胞浸润。模型 5 周组小鼠结肠组织炎性细胞浸润明显；模型 8 周组小鼠结肠组织溃疡深达肌层，见轻度异型增生；模型 11 周组小鼠结肠组织杯状细胞及隐窝结构紊乱，见中重度异型增生；模型 13 周组小鼠结肠黏膜上皮脱落，腺体紊乱，隐窝结构破坏极性消失，呈分支状畸形，同时可见大量异形性细胞及炎性细胞浸润，深核染色并出现肿瘤；模型 15 周组小鼠结肠组织病理与模型 13 周组小鼠相似，出现肿瘤。

图 2 示，各时间点正常组小鼠肺泡结构完整、间隔正常，肺间质无水肿，无明显炎性细胞渗出。各时间点模型组小鼠肺泡组织结构破坏严重，肺泡

间隔增宽，肺泡腔融合，肺间质炎性细胞浸润和聚集，间质充血水肿、微血管炎及纤维化明显。

2.4 各组小鼠肺、结肠组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达比较

2.4.1 各组小鼠肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达比较 表 3 示，与同时间点正常组比较，模型 5 周、13 周、15 周组 ZO-1 阳性表达降低，模型 8 周、13 周组 VE-cadherin 阳性表达降低，模型 5 周、8 周、11 周、15 周组 F-actin 阳性表达降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)；与模型 5 周组比较，其余时间点模型组 ZO-1、F-actin 阳性表达升高 ($P<0.01$)，其余各时间点模型组 VE-cadherin 阳性表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达免疫荧光染色图见附图 1、附图 2、附图 3 (请扫描本文二维码获取)。

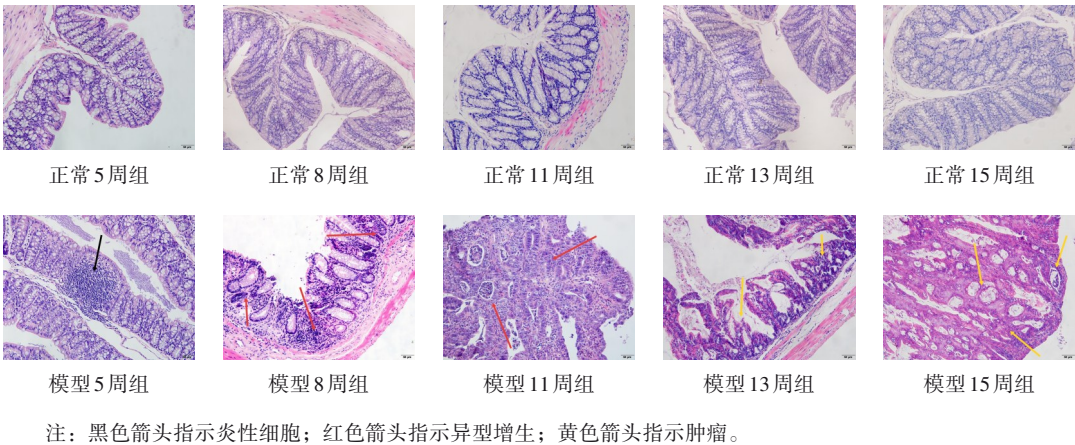


图 1 各组小鼠结肠组织病理形态比较 (HE 染色, ×200)

Figure 1 Comparison of the pathological morphology of the colon tissues in each group of mice (HE staining, ×200)

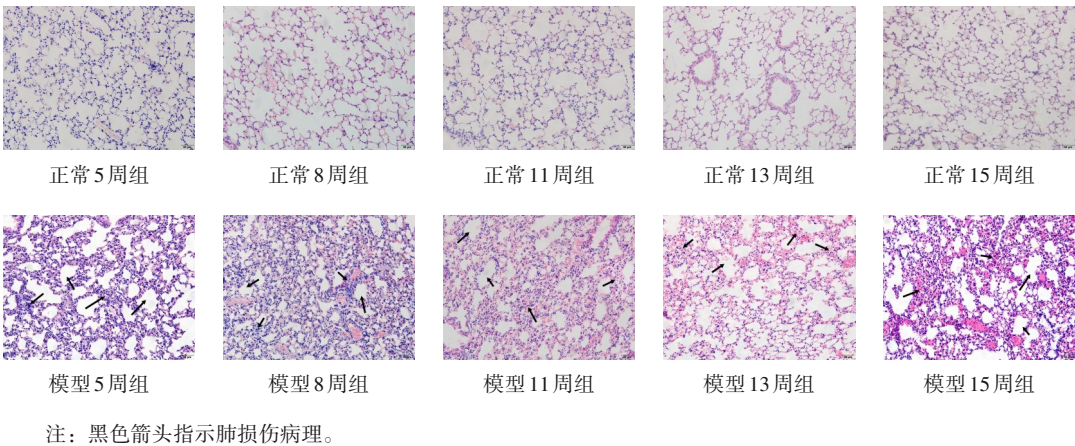


图 2 各组小鼠肺组织病理形态比较 (HE 染色, ×200)

Figure 2 Comparison of the pathological morphology of the lung tissues in each group of mice (HE staining, ×200)

表3 各组小鼠肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达比较

Table 3 Comparison of the positive expression of ZO-1, VE-cadherin and F-actin in the lung tissues of each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZO-1	VE-cadherin	F-actin
正常5周组	3	1.05±0.06	1.21±0.13	1.08±0.15
模型5周组	3	0.39±0.18 ^{a)}	0.68±0.13	0.34±0.09 ^{b)}
正常8周组	3	1.07±0.05	1.08±0.03	1.07±0.13
模型8周组	3	0.76±0.15 ^{c)}	0.81±0.08 ^{a)}	0.74±0.08 ^{a) c)}
正常11周组	3	1.04±0.11	1.07±0.11	1.04±0.07
模型11周组	3	0.81±0.05 ^{c)}	0.78±0.12	0.73±0.04 ^{b) c)}
正常13周组	3	1.10±0.03	1.15±0.03	1.12±0.15
模型13周组	3	0.69±0.03 ^{b) c)}	0.69±0.03 ^{b)}	0.74±0.15 ^{c)}
正常15周组	3	0.95±0.05	1.11±0.17	1.13±0.10
模型15周组	3	0.70±0.09 ^{a) c)}	0.50±0.13	0.68±0.17 ^{a) c)}

注: ZO-1, 闭锁小带蛋白-1; VE-cadherin, 血管内皮钙黏蛋白; F-actin, 细胞骨架蛋白。

a) 与同时时间点正常组比较, $P<0.05$; b) 与同时时间点正常组比较, $P<0.01$; c) 与模型5周组比较, $P<0.01$ 。

2.4.2 各组小鼠结肠组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达比较 表4示, 与同时时间点正常组比较, 模型8周、11周、15周组 ZO-1 阳性表达降低, 各时间点模型组 VE-cadherin 阳性表达降低, 模型8周、11周、13周组 F-actin 阳性表达降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与模型5周组比较, 模型13周

表4 各组小鼠结肠组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达比较

Table 4 Comparison of positive expression of ZO-1, VE-cadherin and F-actin in the colonic tissues of each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZO-1	VE-cadherin	F-actin
正常5周组	3	1.10±0.19	1.09±0.08	1.11±0.07
模型5周组	3	0.53±0.21	0.83±0.05 ^{b)}	0.64±0.18
正常8周组	3	1.03±0.09	1.07±0.02	1.06±0.03
模型8周组	3	0.65±0.05 ^{a)}	0.45±0.03 ^{a) c)}	0.77±0.10 ^{b)}
正常11周组	3	1.12±0.06	1.61±0.17	1.06±0.06
模型11周组	3	0.72±0.04 ^{b)}	0.90±0.25 ^{a)}	0.67±0.05 ^{b)}
正常13周组	3	1.37±0.06	1.07±0.07	1.09±0.10
模型13周组	3	0.76±0.10 ^{c)}	0.37±0.12 ^{a)}	0.83±0.08 ^{b)}
正常15周组	3	1.06±0.00	1.13±0.13	1.08±0.15
模型15周组	3	0.67±0.11 ^{b)}	0.52±0.14 ^{a)}	0.48±1.12

注: ZO-1, 闭锁小带蛋白-1; VE-cadherin, 血管内皮钙黏蛋白; F-actin, 细胞骨架蛋白。

a) 与同时时间点正常组比较, $P<0.01$; b) 与同时时间点正常组比较, $P<0.05$; c) 与模型5周组比较, $P<0.05$ 。

组 ZO-1 阳性表达升高, 模型8周组 VE-cadherin 阳性表达降低 ($P<0.05$), 其余各时间点模型组 F-actin 阳性表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠结肠组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 阳性表达免疫荧光染色图见附图4、附图5、附图6 (请扫描本文二维码获取)。

2.5 各组小鼠肺组织 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达比较

表5示, 与同时时间点正常组比较, 各时间点模型组小鼠肺组织 *Bcl-2* mRNA 表达降低, *Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达升高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与模型5周组比较, 其余各时间点模型组 *Bcl-2* mRNA 表达升高, 模型8周、13周组 *Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

表5 各组小鼠肺组织 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达比较
Table 5 Comparison of *Bcl-2*, *Bax* and *Caspase-3* mRNA expressions in lung tissues of each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>	<i>Caspase-3</i>
正常5周组	3	1.07±0.18	1.02±0.26	0.96±0.19
模型5周组	3	0.19±0.03 ^{a)}	4.09±0.42 ^{a)}	2.91±0.79 ^{b)}
正常8周组	3	1.07±0.17	1.23±0.17	1.03±0.31
模型8周组	3	0.61±0.06 ^{b) c)}	2.00±0.36 ^{b) c)}	1.88±0.40 ^{b) d)}
正常11周组	3	0.95±0.17	1.15±0.23	1.23±0.20
模型11周组	3	0.29±0.03 ^{a) d)}	3.66±0.54 ^{a)}	2.26±0.51 ^{b)}
正常13周组	3	1.08±0.19	0.97±0.16	0.95±0.13
模型13周组	3	0.59±0.05 ^{b) c)}	2.06±0.30 ^{b) c)}	1.59±0.22 ^{b) d)}
正常15周组	3	1.07±0.22	1.03±1.14	1.08±0.36
模型15周组	3	0.30±0.04 ^{a) d)}	3.53±0.43 ^{a)}	2.40±0.61 ^{b)}

注: *Bcl-2*, B细胞淋巴瘤2; *Bax*, B细胞淋巴瘤2关联X蛋白; *Caspase-3*, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3。

a) 与同时时间点正常组比较, $P<0.01$; b) 与同时时间点正常组比较, $P<0.05$; c) 与模型5周组比较, $P<0.01$; d) 与模型5周组比较, $P<0.05$ 。

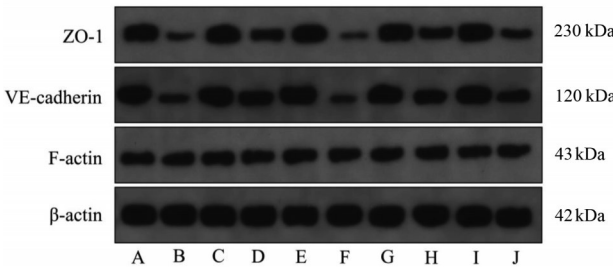
2.6 各组小鼠肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 蛋白水平比较

表6示, 与同时时间点正常组比较, 模型5周组小鼠肺组织 ZO-1 蛋白水平降低, 模型5周、8周、11周、13周组小鼠肺组织 VE-cadherin 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 各时间点模型组小鼠肺组织 F-actin 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。其余各时间点模型组小鼠肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠肺组织 ZO-1、VE-cadherin、F-actin 蛋白电泳图见图3。

表6 各组小鼠肺组织ZO-1、VE-cadherin、F-actin蛋白水平比较

Table 6 Comparison of ZO-1, VE-cadherin and F-actin protein levels in the lung tissues of each group of mice ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	ZO-1	VE-cadherin	F-actin
正常5周组	3	1.00±0.26	1.00±0.14	1.00±0.30
模型5周组	3	0.35±0.14 ^{a)}	0.49±0.18 ^{a)}	0.86±0.22
正常8周组	3	1.00±0.21	1.00±0.06	1.00±0.23
模型8周组	3	0.69±0.02	0.63±0.16 ^{a)}	0.95±0.23
正常11周组	3	1.00±0.25	1.00±0.08	1.00±0.22
模型11周组	3	0.41±0.24	0.43±0.17 ^{a)}	1.00±0.19
正常13周组	3	1.00±0.44	1.00±0.10	1.00±0.28
模型13周组	3	0.59±0.21	0.62±0.05 ^{b)}	0.91±0.19
正常15周组	3	1.00±0.32	1.00±0.14	1.00±0.25
模型15周组	3	0.60±0.18	0.66±0.24	0.95±0.11

注：ZO-1，闭锁小带蛋白-1；F-actin，细胞骨架蛋白；VE-cadherin，血管内皮钙黏蛋白。
a) 与同时时间点正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与同时时间点正常组比较， $P<0.01$ 。



注：ZO-1，闭锁小带蛋白-1；VE-cadherin，血管内皮钙黏蛋白；F-actin，细胞骨架蛋白。A，正常5周组；B，模型5周组；C，正常8周组；D，模型8周组；E，正常11周组；F，模型11周组；G，正常13周组；H，模型13周组；I，正常15周组；J，模型15周组。

图3 各组小鼠肺组织ZO-1、VE-cadherin、F-actin蛋白电泳图
Figure 3 Electrophoresis image of ZO-1, VE-cadherin and F-actin proteins in the lung tissues of each group of mice

3 讨论

《灵枢·本输》云：“肺合大肠，大肠者，传道之腑。”肺与大肠在经络上相互络属，在气机宣降和津液输布功能中相互协调、制约，共同调节维护机体的正常生理功能，病理上亦相互影响。现代研究进一步从组织胚胎、黏膜免疫、神经体液、肠道菌群、信号通路转导等微观角度诠释了中医“肺肠相关”理论的科学内涵^[10]。UC患者普遍存在肺损伤，但其肺部病变起病隐匿、临床表现特异性低，极易被忽视，且在多种因素诱发的肺损伤病理改变过程中，肺气血屏障功能障碍居于核心关键地位^[11]，故从“肺肠相关”理论出发，以肺气血屏障为切入点，寻找UC炎癌转化的生物学机制，有

利于整体全面地把握其病因病机，为临床防治提供依据。

肺气血屏障是肺泡与肺毛细血管紧密相连的组织结构，其完整性对于肺气体交换、防止血液中物质返流入间质和肺泡腔等至关重要^[12]。肺气血屏障结构稳态维持的关键是依靠肺泡上皮细胞和微血管内皮细胞及细胞间连接复合体结构^[13]。构成屏障连接的蛋白主要有闭锁蛋白、闭合蛋白、连接黏附分子、细胞骨架蛋白等跨膜蛋白及闭锁小带等30多种胞内蛋白。ZO-1是屏障关键的紧密连接蛋白^[14]，与闭锁蛋白、闭合蛋白1相互作用而影响细胞之间的紧密连接，调节屏障功能，其表达减少或结构损伤会引起屏障功能障碍，导致通透性增加^[15]。F-actin具有调节屏障血管内皮细胞通透性的作用，是细胞骨架的关键组分^[16-17]，其通过与紧密连接蛋白相连而维持屏障稳定性^[18]。VE-cadherin是细胞黏附机制的主要组成部分，在维持内皮连接的屏障功能的完整性和可塑性以及调节炎症诱导的血管通透性方面具有重要作用^[19-20]，在紧密连接蛋白的合成方面也发挥一定作用^[21]。抗凋亡基因*Bcl-2*和其基因家族促凋亡成员*Bax*是线粒体凋亡的两个关键调节因子和主要调节剂^[22-23]，参与了细胞凋亡的调控。*Caspase-3*作为凋亡机制的关键组成部分，通过与*Bax*和*Bcl-2*的相互作用而影响细胞凋亡。有研究证实，肺组织损伤及炎症程度与细胞凋亡密切相关^[24-25]，细胞凋亡参与肺损伤过程，影响内环境稳定^[26-27]，肺损伤发生时*Bax*激活，*Bcl-2*表达被抑制，活化的*Bax*使凋亡执行蛋白升高，加速了肺泡毛细血管内皮凋亡^[28]，使肺气血屏障被破坏。本实验结果显示，UC炎癌转化模型小鼠结肠“炎性反应→异型增生→癌变”过程肠黏膜损伤同时，肺组织ZO-1、VE-cadherin、F-actin蛋白水平和*Bcl-2* mRNA表达均有不同程度的降低，*Bax*和*Caspase-3* mRNA表达升高，肺气血屏障结构损伤明显。

鉴于此，肠黏膜损伤合并肺气血屏障结构损伤和功能障碍可能是UC炎癌转化的重要病理因素。中医理论认为，肠中气滞，气不行血则致血滞，气不行津则致水湿内停，郁久化为湿热瘀毒损伤肠络，正虚湿热瘀毒积久损伤肠络致UC反复发作^[2]。肺肠相关，经络相连，且肺为娇脏，易受邪侵，肠毒上攻损肺则影响肺之宣发肃降。肺主气、通调水道、助心行血，与血液、津液运行输布密不可分。若肺失宣降，正虚邪盛，导致机体气血津液运行失常，湿热瘀结更甚，加重肠道湿热气血郁

滞,使得UC缠绵难愈,日久变生癌毒,故我们提出UC炎癌转化之“湿热瘀毒损伤肠络,毒邪上攻损肺,正虚癌毒内生”中医病机假说,后续将进行深入研究。针对靶点探寻能够同时修复UC肺肠屏障损伤、截断炎癌转化的肺肠同治治疗方案,可能为结直肠癌患者带来收益。本研究仅通过动物实验初步证实肺气血屏障损伤存在于UC“炎癌转化”全过程,后续将对肺屏障损伤机制及其在结肠癌变中的作用进行深入研究,并结合临床研究观察评价UC结肠不同程度不典型增生及癌变患者肺屏障损伤情况,挖掘肺肠同治有效处方,以提高结直肠癌防治效果。

参考文献

- [1]王绪臻. 现代实用临床内科学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2022:179.
- [2]中华中医药学会《溃疡性结肠炎中医诊疗指南》项目组. 溃疡性结肠炎中医诊疗指南(2023)[J]. 中医杂志, 2024, 65(7): 763-768.
- [3]林嘉敏, 吴夏慧, 罗毅. 结直肠癌的炎癌转化研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2021, 28(3): 378-381.
- [4]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.
- [5]TANG ZP, WU JW, DAI YC, et al. Relationship between ulcerative colitis and lung injuries [J]. Chin Med Sci J, 2015, 30(2): 65-69.
- [6]YAN X, LU QG, ZENG L, et al. Synergistic protection of astragalus polysaccharides and matrine against ulcerative colitis and associated lung injury in rats [J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(1): 55-69.
- [7]ANGELOU A, ANDREATOS N, ANTONIOU E, et al. A novel modification of the AOM/DSS model for inducing intestinal adenomas in mice[J]. Anticancer Res, 2018, 38(6): 3467-3470.
- [8]PARANG B, BARRETT CW, WILLIAMS CS. AOM/DSS model of colitis-associated cancer[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1422: 297-307. doi: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26.
- [9]冯建华, 柳向军, 黄宇君, 等. 两种小鼠结直肠癌动物模型的特点比较与应用[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(2): 91-99.
- [10]周鹏飞, 陆金根, 姚一博, 等. 基于“肺与大肠互为表里”探析肺肠传变[J]. 世界中医药, 2024, 19(19): 2967-2972.
- [11]杨爽, 秦泓林, 李逸轩, 等. 中药防治肺气血屏障功能障碍的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(15): 5075-5087.
- [12]GILLICH A, ZHANG F, FARMER CG, et al. Capillary cell-type specialization in the alveolus [J]. Nature, 2020, 586(7831): 785-789.
- [13]YUKSEL H, TURKELI A. Airway epithelial barrier dysfunction in the pathogenesis and prognosis of respiratory tract diseases in childhood and adulthood [J]. Tissue Barriers, 2017, 5(4): e1367458.
- [14]LIU YH, WU JZ, TAN LY, et al. (-)-Syringaresinol attenuates ulcerative colitis by improving intestinal epithelial barrier function and inhibiting inflammatory responses [J]. Phytomedicine, 2024, 124: 155292. doi: 10.1016/j.phymed. 2023. 155292.
- [15]CHEN L, LI L, HAN Y, et al. Tong-fu-li-Fei decoction exerts a protective effect on intestinal barrier of sepsis in rats through upregulating ZO-1/occludin/claudin-1 expression [J]. J Pharmacol Sci, 2020, 143(2): 89-96.
- [16]SHAKHOV AS, DUGINA VB, ALIEVA IB. Structural features of actin cytoskeleton required for endotheliocyte barrier function [J]. Biochemistry (Mosc), 2019, 84(4): 358-369.
- [17]KUWAHARA M. Role of $[Ca^{2+}]_i$ and F-actin on mesothelial barrier function [J]. Front Physiol, 2014, 5: 232. doi: 10.3389/fphys. 2014. 00232.
- [18]TERRY S, NIE M, MATTER K, et al. Rho signaling and tight junction functions [J]. Physiology (Bethesda), 2010, 25(1): 16-26.
- [19]LAI Y, HUANG YB. Mechanisms of mechanical force induced pulmonary vascular endothelial hyperpermeability [J]. Front Physiol, 2021, 12: 714064. doi: org/10.3389/fphys. 2021. 714064.
- [20]WILKENS M, HOLTERMANN L, STAHL AK, et al. Ubiquitination of VE-cadherin regulates inflammation-induced vascular permeability in vivo [J]. EMBO Rep, 2024, 25(9): 4013-4032.
- [21]陈大光, 曹晖, 李令, 等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织机械屏障及细胞因子的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(4): 67-71.
- [22]RAHMANI M, NKWOCHA J, HAWKINS E, et al. Cotargeting BCL-2 and PI3K induces BAX-dependent mitochondrial apoptosis in AML cells [J]. Cancer Res, 2018, 78(11): 3075-3086.
- [23]SANAIEI M, KAVOOSI F. Effect of valproic acid on the class I histone deacetylase 1, 2 and 3, tumor suppressor genes p21WAF1/CIP1 and p53, and intrinsic mitochondrial apoptotic pathway, pro- (Bax, bak, and bim) and anti- (Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) apoptotic genes expression, cell viability, and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma HepG2 cell line [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2021, 22(S1): 89-95.
- [24]赵倩, 曹静, 李明霞. 热休克蛋白 70 调控 Bcl-2/Bax 对

- 缺氧性肺高压新生大鼠肺血管内皮细胞凋亡及肺动脉压力的作用[J]. 新疆医科大学学报, 2021, 44(9): 981-988.
- [25]陈雅静, 许磊, 郭东风, 等. HSP70 调控 Bcl-2 表达抑制脓毒症大鼠肺血管内皮细胞损伤的机制研究[J]. 解剖学研究, 2020, 42(3): 258-261, 267.
- [26]李桐. PI3K/Akt 信号通路介导的围术期肺损伤机制研究及临床相关研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [27]邓旺, 王导新, 邓嘉, 等. PI3K/Akt 信号通路上调急性肺损伤大鼠肺泡上皮钠通道表达[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(9): 1004-1008.
- [28]王涛, 刘宏祥, 王颖, 等. 清热化痰解毒方对卒中相关性肺炎大鼠 Akt/JNK3/Caspase-3 和 NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 42-48.

Evaluation of Pulmonary Air-Blood Barrier Damage in Ulcerative Colitis Inflammatory Cancer Transformation Model Mice: Based on the "Lung-Intestine Correlation" Theory

XU Huiyan¹, ZHANG Haimei¹, ZHAN Xinyu¹, WU Fanwu^{1,2}, JIA Yongsen^{1,2}, WU Chenxi^{1,2}, KONG Lingyu³, YAN Xin^{1,2}

1. North China University of Science and Technology, Tangshan, 063210; 2. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Diabetes and Its Complications; 3. Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology

ABSTRACT Objective To dynamically observe and evaluate the damage to the pulmonary air-blood barrier in mice during the inflammatory cancer transformation process of ulcerative colitis (UC) based on the "lung-intestine correlation" theory. **Methods** Sixty-five C57BL/6 mice were divided into a normal group (n=25) and a model group (n=40) using a random number table. Azoxymethane/dextran sodium sulfate (DSS) method was used to establish a mouse model of UC inflammation cancer transformation in the modeling group. According to the tissue collection time points at 5, 8, 11, 13, and 15 weeks, the normal group mice were randomly divided into the normal 5w, 8w, 11w, 13w, and 15w groups. The model group mice, 10 mice of which died after the first cycle of DSS administration, were randomly divided into model 5w, 8w, 11w, 13w, and 15w groups. During the experiment, the general condition of the mice was observed daily, and their body weight was measured weekly. At the corresponding tissue collection time points, the colon length of each group was measured. Histopathology of mouse lung and colon tissues was examined using HE staining. Immunofluorescence was used to detect changes in the positive expression of tight junction protein (ZO-1), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), and cytoskeletal protein (F-actin) in lung and colon tissues. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of apoptosis regulatory proteins B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*), BCL2-associated X protein (*Bax*), and Cysteine aspartic acid protease-3 (*Caspase-3*) in lung tissues. Western Blot was employed to measure protein levels of ZO-1, VE-cadherin, and F-actin in lung tissues. **Results** Compared to the normal group at the same time point, the mice in the model group at each time point generally had poorer conditions, with weight loss and shortened colon length ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the model 5w group, there was significant inflammatory cell infiltration in the colon tissue; in the model 8w group, there was mild atypical hyperplasia; in the model 11w group, the crypt structure was disordered, and moderate to severe atypical hyperplasia occurred; in the model 13w and 15w groups, tumors appeared. Pulmonary interstitial lesions, inflammation, vasculitis, and fibrosis were observed at all stages of UC inflammation cancer transformation. The protein levels of ZO-1, VE-cadherin, and F-actin, as well as *Bcl-2* mRNA expression in lung tissue decreased during the acute inflammatory recovery period, atypical hyperplasia period, and canceration period, while the expressions of *Bax* and *Caspase-3* mRNA increased; the expressions of ZO-1, VE-cadherin, and F-actin proteins in colon tissue decreased during the acute inflammatory recovery period, atypical hyperplasia period, and canceration period ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared to the model 5w group, the ZO-1 and F-actin protein levels and *Bcl-2* mRNA expression in lung tissue in the other model groups increased in the atypical hyperplasia period and canceration period, while the expressions of *Bax* and *Caspase-3* mRNA decreased; the expression of ZO-1 protein in colon tissue increased in the canceration period, and the expression of VE-cadherin protein decreased in the atypical hyperplasia period ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** In the process of "inflammatory response-atypical hyperplasia-carcinogenesis" in UC inflammatory cancer transformation mice, there were damage to air-blood barrier.

Keywords lung-intestine correlation; ulcerative colitis; colorectal cancer; inflammatory cancer transformation; pulmonary air-blood barrier; intestinal mucosal barrier

(收稿日期: 2025-09-01; 修回日期: 2025-12-07)

[编辑: 贾维娜]