

· 实验研究 ·

温燥致病机制的实验研究

丁建中¹ 龚 权¹ 张六通² 邱幸凡² 陈 刚² 张燕翔¹ 张 渊¹ 李 侃¹

(1. 长江大学医学院分子生物研究中心, 湖北省荆州市江汉路55号, 434000; 2. 湖北中医学院)

[摘 要] **目的** 研究温燥对小鼠的主要致病机制。**方法** 273只昆明种小鼠随机分为常温常湿组、常温燥组、温燥组, 每组91只, 在模拟温燥条件下造模, 第7天与第14天分别进行气道与皮肤组织病理、气道液 IgG 抗体(IgG-R)、血液流变学、细菌攻击试验、气管细胞 bcl-2、bax 基因表达的检测。**结果** 与常温常湿组相比, 温燥组气管、肺与皮肤病变明显, 肺细菌数增高, IgG-R 持续降低与血浆黏度增高($P < 0.01$), 气管细胞 bcl-2 表达下降。**结论** 温燥灼肺伤津, 致气道 IgG 抗体持续降低与“纤毛-黏液毯”局部御邪屏障受损; 津伤则生血不足, 继之血液黏度增高; 肺津宣输失司则皮肤“枯、涸、皴、揭”, 为温燥致病提供组织学基础。

[关键词] 温燥; 致病机制; 小鼠

Experimental Study on the Mechanism of Warm-dryness in Causing Diseases

DING Jian-zhong¹, GONG Quan¹, ZHANG Liu-tong², et al.

(1. Molecular Biology Research Center, Medical School of Yangtze University, Jingzhou 434000; 2. Hubei College of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the main mechanism of pathogenic warm-dryness in causing diseases to mice. **Methods** The 216 Kunming species mice were randomized into normal temperature and humidity group, normal temperature and dryness group, and warm dryness group with 72 in each. The models were made under the simulated condition of warm-dryness. On the 7th day and 14th day, the observation on pathological changes of air passage and skin tissues, IgG-R of fluid of air passage, hemorrhheology, bacteria attack experiment, and expression of bcl-2 and bax was carried out. **Results** Compared with the normal temperature and humidity group, in the warm dryness group the pathological changes of trachea, lung and skin tissues were obvious, the lung bacterial content increased, IgG-R decreased continuously, and plasma viscosity increased ($P < 0.01$), and expression of bcl-2 decreased. **Conclusion** The pathogenic warm-dryness damages the lung and consumes its body fluid, causing the IgG of fluid of air passage decreased and the resistance of “ciliary-mucus blanket” injured; the damaged body fluid gives rise to insufficient blood production, leading to the increased plasma viscosity; the failure of lung to disperse the body fluid induces the skin dried up, prepared the histological basis for the invasion of warm-dryness.

Key Words Warm-dryness; Mechanism in causing diseases; Mice

“岁金太过, 燥气流行”、“燥气先伤于华盖”、“燥胜则干”等经典理论之宏观框架, 与缺乏量化实验依据而难以明析其病因病机所形成的反差, 成为外燥研究的难点之一。近年来从气象因素、生物致病因子和机体反应性等研究六淫风、寒、湿、火(热)等病邪, 显示确有其物质基础, 有的已达分子水平^[1], 但未见外燥病机系统性实验研究报道。外燥有温燥与凉燥之分, 本文研究温燥及相兼细菌攻击对小鼠肺细菌数、呼吸道液黏多糖与 IgG 抗体(IgG-R)、血液流变学及气管细胞 bcl-2、

bax 基因表达的影响, 为阐释温燥致病机制提供资料。

1 材料

1.1 动物

无特定病原体级(SPF)昆明种小鼠273只, 体重(18 ± 1)g, 雌雄各半, 由湖北省实验动物研究中心提供, 许可证号: SCXK(鄂)2003~2005。

1.2 药品与试剂

卡唑(054K078, Sigma), D-葡萄糖醛酸内酯(2711EC, Sigma); TUNEL 试剂盒(MK1020, 2005-03), Bcl-2兔抗鼠 IgG 多抗(BA0412, 2005-03)、bax 兔抗鼠 IgG 多抗(BA0315, 2005-03)和阳性对照片(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 菌株

金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC25923,北京天坛生物制品公司)。

1.4 主要仪器

LRH-250人工智能气候箱,温度(30~65)℃±1℃,相对湿度(30%~90%)±5%,(广东医疗器械厂);XSJ-D恒温倒置显微镜(重庆显微镜厂);756MC紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);FASCO-全自动血液流变仪(重庆南方医疗设备公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

表1示,273只昆明小鼠随机分常温常湿组、常温燥组、温燥组,每组91只,分批置人工气候箱内常规饲养。模拟温燥“温度-相对湿度-风”条件进行造模。各组小鼠在第7天与第14天进行检测前4小时禁食、禁水。

表1 各组小鼠“温度-相对湿度-风”处理条件

组别	温度(℃)	相对湿度(%)	风速(m/s)	每天风处理时间(h/d)
常温常湿组	15±2	70±2	2.5	5
常温燥组	15±2	33±2	2.5	5
温燥组	22±2	33±2	2.5	5

2.2 观察指标及检测方法

2.2.1 病理组织学观察 断颈处死小鼠,常规取气管1.5cm、右肺组织(中)(40±10)mg/只、背部皮肤(0.5cm×0.5cm)及左足垫皮肤,HE染色、镜检。

2.2.2 气道液IgG-R检测 常规气管插管,取灌洗液分离上清,按酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书检测,以包被液作空白对照,PBS pH7.4(10%小牛血清)作阴性对照。记录标本均值与阴性对照(P/N)倍数之平均值。

2.2.3 血液流变学检测 受血液流变仪对标本总量的要求,每组以9只小鼠眼球血合为1份标本进行测试,每组3份。肝素抗凝管常规取眼球血,4小时内测定血浆黏度、红细胞变形指数、红细胞刚性指数。

2.2.4 细菌攻击试验 取培养18小时的金黄色葡萄球菌,经细菌标准比浊法配成细菌悬液(1×10⁸cfu/ml),各组小鼠于第7天经鼻常规滴种金黄色葡萄球菌0.1ml/只,24小时后重复1次。接种细菌第6天无菌取小鼠右肺(40±10)mg/只,常规检测呼吸道液黏多糖(RS)、IgG-R与肺细菌数(BQ,1×10⁶cfu/g取均值)^[2]。

2.2.5 气管细胞凋亡检测 第14天取气管切片,按脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记法

(TUNEL)试剂盒程序操作。结果判断:气管上皮细胞核内棕黄色颗粒为TUNEL染色阳性。镜下随机计数200个细胞,按以下公式计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率(%) = 凋亡细胞数/200 × 100%

2.2.6 气管细胞bcl-2、bax基因表达检测 常规取气管标本切片、按试剂盒说明书操作。结果判断:气管上皮细胞浆内之棕黄色颗粒为bcl-2(或bax)表达阳性。镜下计数500个细胞,计算阳性指数(PI)。

PI = (阳性细胞数/计数细胞数) × 100%

2.3 统计学方法

采用SPSS13.0软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料之间比较用方差分析(ANOVA),显著性检验采用多个样本均数间 q 检验(Newman-Keuls法);各组第7天与第14天比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义,检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 病理组织学观察

至第14天,常温常湿组气管组织未见异常,皮肤毛球数多且毛干生长层次清晰,足垫皮肤汗腺丰富;常温燥组肺泡轻度充血;温燥组气管上皮鳞状化生与炎性细胞浸润、气管纤毛多呈灶状缺损、≥40%气管浆液腺上皮黏液腺化生,肺泡充血、水肿等较第7天严重;皮肤表皮皱缩,毛囊变短,毛乳头数减少,足垫表皮增厚,汗腺减少与皮下结缔组织增生。

3.2 温燥对小鼠IgG-R的影响

表2示,与常温常湿组相比,温燥组和常温燥组第7天与第14天IgG-R均明显降低($P < 0.01$);并且两组间比较差异亦有显著性意义($P < 0.01$)。气道IgG抗体持续降低明显与温燥伤肺致气道液分泌减少有关。

表2 各组小鼠不同时间IgG-R变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IgG-R	
		第7天	第14天
常温常湿组	9	6.01±0.74	5.68±0.64
常温燥组	9	7.54±0.94*	7.87±0.47*
温燥组	9	2.13±0.29*△	2.66±0.77*△

与常温常湿组比较,* $P < 0.01$;与常温燥组比较,△ $P < 0.01$

3.3 温燥对小鼠血液流变学的影响

表3示,与常温常湿组相比,常温燥组血浆黏度、红细胞聚集指数改变不明显($P > 0.05$);而温燥组第7天血浆黏度与第14天红细胞聚集指数明显升高($P < 0.05$),第14天常温燥组及温燥组红细胞刚性指数显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示与温燥致生血减少、进而血浆黏度增加,以及红细胞在血流中运行滞涩有关。

表3 各组小鼠不同时间血液流变学变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	份数	鼠数	血浆黏度(mPa·s)		红细胞聚集指数		红细胞刚性指数	
			第7天	第14天	第7天	第14天	第7天	第14天
常温常湿组	3	27	1.09±0.05	1.15±0.18	9.33±1.11	9.36±0.41	9.36±4.16	8.24±1.29
常温燥组	3	27	1.26±0.12	1.43±0.20	11.60±1.98	10.07±0.86	12.11±4.82	10.91±0.89*
温燥组	3	27	1.46±0.11*	1.33±0.06	10.72±1.05	11.94±1.31*	9.51±0.33	13.42±2.39**

与常温常湿组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表4 温燥相兼细菌攻击对小鼠 BQ、RS 与 IgG-R 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BQ(1×10^6 cfu/g)	RS($\mu\text{g/ml}$)		IgG-R	
			第14天	细菌攻击后	第14天	细菌攻击后
常温常湿组	9	0.83±0.45	544.89±227.88	793.33±132.58	5.68±0.64	6.33±0.27
常温燥组	9	1.46±0.36	430.67±251.69	432.89±221.38	7.87±0.47*	7.30±0.36
温燥组	9	1.91±0.41	342.22±107.91	462.22±130.82*	2.66±0.77*△	2.56±0.72*△

与常温常湿组比较, * $P<0.01$; 与常温燥组比较, △ $P<0.01$

3.4 温燥相兼细菌攻击对小鼠 BQ、RS 与 IgG-R 的影响

表4示,细菌攻击后的第14天时,常温燥组、常温常湿组肺细菌数增加,温燥组气道液分泌与 IgG-R 抗体较常温燥组和常温常湿组均显著减少($P<0.01$),表明在温燥伤肺、伤津之时,相兼细菌攻击,更致气道液分泌与气道免疫防御功能严重受损,御邪失职而致肺细菌数明显增加。

3.5 温燥对小鼠气管细胞凋亡与 bcl-2、bax 基因表达影响

表5示,两组间气管细胞凋亡率较小且差异无显著性意义($P>0.05$);与常温常湿组相比,温燥组气管细胞 bcl-2 PI 显著下降($P<0.01$),提示气管细胞 bcl-2 基因表达下降与温燥伤肺致病的分子机制有关。

表5 两组小鼠气管细胞凋亡与 bcl-2、bax 基因表达比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	细胞凋亡	bcl-2	bax
常温常湿组	10	0.30	11.05±2.53	9.20±2.99
温燥组	10	0.15	4.85±3.25*	9.65±5.47

与常温常湿组比较, * $P<0.01$

4 讨论

温燥组第14天气管上皮鳞状化生与炎性细胞浸润、纤毛多呈片状缺损,肺泡充血、水肿,表明温燥伤肺、伤津,肺失其濡养而致组织细胞功能受损^[3];该组≥40%气管浆液腺上皮黏液腺化生,提示与温燥肺津生成障碍相关;皮肤毛枯、表皮皱缩、毛球数锐减以致新毛生长严重受抑,而足垫皮肤汗腺明显减少与结缔组织增生等,表明温燥伤肺、伤津与宣输失司,皮毛腠理失之濡润而真皮变薄、伴附属器萎缩症,合以卫表不固,故“燥气先伤于华盖”,本结果为燥证多伴皮肤“枯、涸、皱、揭”等提供组织学证据。

呼吸道腺体以及杯状细胞分泌的气道液内含黏蛋白(主为黏多糖和蛋白质),覆盖于黏膜表面形成黏液毯,是气道的重要保护屏障之一;RS 与气道液分泌呈正相关,其主要作用是湿润气道黏膜、保护上皮的纤毛运动^[4]。既往研究表明,早期气道黏液分泌增加,以加快气管纤毛“摆动”而驱气道之邪毒^[1];该组第14天与细菌攻击后 RS 明显减少,表明严重伤津、耗液致气道分泌功能代偿失常、甚至气道组织结构病变。IgG-R 是气道重要免疫防御成份之一。值得注意的是,温燥组在第14天与细菌攻击后 RS 显著下降时 IgG-R 仍持续降低($P<0.01$),显示温燥相兼细菌攻击,外则卫受邪郁,内则津少气虚,抗邪无力则病邪入里,细菌及其毒素可加重肺津生成障碍、气道组织损伤,以及对生物病原攻击敏感性增高,故温燥组肺细菌数是常温常湿组的2.3倍,结果提示,温燥病机之一损伤气道“纤毛—黏液毯”与抗体免疫功能有关。

温燥灼肺伤津,因“津血同源”之故,津少必致生血不足,不仅渗入脉之津液不足,更则脉外之津反入脉内,继之血液黏度升高,故全血浆黏度、红细胞聚集指数与红细胞刚性指数增高,提示温燥伤肺、伤津之时,可诱血行滞涩而为病^[4],与其病机相关值得研究。

温燥组气管 bcl-2 阳性细胞多见于气管纤毛缺损或鳞状上皮化生处。bcl-2 属于低丰度表达基因,仅在增生活跃细胞明显转录,编码的 bcl-2 蛋白是一种膜结合蛋白,定位于线粒体、内质网及核膜上,通过抑制细胞内质网中钙离子释放、调节抗氧化途径、直接或间接与细胞信号传递蛋白(如 p53 蛋白)作用等调节细胞生长。结合同期病理学观察,提示温燥组气管细胞 bcl-2 基因表达降低可能与温燥致病机制相关。常温常湿组与温燥组气管细胞凋亡率均较低(≤0.3%),是否与气

(下转第1032页)

度:趾(指)红肿疼痛难以忍受。(3)遇热痛甚:①轻度:遇热疼痛稍加重或热甚疼痛始加重。②中度:遇热疼痛加重可忍。③重度:遇热疼痛加重不可忍或稍遇热即疼痛加重。

2.2 虚证类

2.2.1 络气虚滞证:(1)乏力:①轻度:劳则即乏力。②中度:动则即乏力。③重度:不动亦乏力。(2)神疲:①轻度:精神欠佳。②中度:精神不振,勉强坚持日常工作。③重度:精神萎靡,不能坚持日常活动。(3)气短:①轻度:活动后气短,气息浅稍短。②中度:稍动则感气短,气息短促。③重度:不动即感气短,气息浅而短促。(4)懒言:①轻度:不喜多言,不问不答。②中度:懒于言语,多问少答。③重度:不欲言语,偶语。(5)自汗:①轻度:活动后微汗出。②中度:不活动即皮肤微潮,稍动则汗出。③重度:平素即汗出,动则汗出如水渍状。(6)面色淡白:①轻度:略显淡白。②中度:明显淡白,略有光泽。③重度:苍白,没有光泽。(7)心胸隐痛:①轻度:隐痛偶尔发作。②中度:隐痛时作。③重度:隐痛经常发作。(8)疼痛绵绵:①轻度:偶有隐隐疼痛。②中度:有时隐隐疼痛。③重度:隐痛较明显或绵绵不休。(9)疮口经久不愈:①轻度:疮口不愈超过2月。②中度:疮口不愈超过3月。③重度:疮口不愈超过6月。(10)肤色苍白或苍黄:①轻度:皮肤略显苍白或苍黄,接近正常肤色。②中度:皮肤苍白或苍黄。③重度:肤色渐暗。(10)心悸分级1.1。

2.2.2 阴虚证:(1)五心烦热:①轻度:心中微烦,手足心微热,或为偶发,细察方得。②中度:心烦较甚,手足心发热,或有面热、口渴等症。③重度:心神烦躁,手足心发烫。(2)潮热盗汗:①轻度:入暮微热,寐中出汗,醒则汗止,汗量不多,或为偶见。②中度:入暮发热,寐中出汗,醒则汗止,汗量较多,或为屡见。③重度:入暮发热,寐中出汗,醒则汗止,汗量极多,湿透衣被。(3)目涩:①轻度:偶尔干涩,可自行缓解,不影响视力。②中度:间断性干涩,轻微影响视力。③重度:经常干涩,严重影响视力。(4)口干:①轻度:轻微口干咽燥。②中度:口干咽燥,饮水可缓解。③重度:口干咽燥欲饮水,饮而不解。(5)颧红:①轻度:颧面较常人略红,似有热象,细察方得。②中度:颧红明显,如朝霞色,稍察方得。③重度:颧赤如火,热象明显,一望可知。(6)面色潮红:①轻度:面微红。②中度:面红明显。③重度:面红如妆。

(7)眩晕:①轻度:头晕眼花,时作时止。②中度:视物旋转,行走不利。③重度:眩晕欲扑,不能站立。(8)失眠:①轻度:睡眠易醒,或睡而不实,每日睡眠4~5小时,不影响工作。②中度:每日睡眠小于4小时,但尚能坚持正常工作。③重度:彻夜不眠,难以坚持正常工作。(9)多梦:①轻度:有梦,或数日一见。②中度:梦多,或每日有梦。③重度:睡即有梦,且多乱梦。(10)腰膝酸软:①轻度:腰膝酸软轻微,不影响正常工作。②中度:腰膝酸软较重,对工作略有影响。③重度:腰膝酸软,影响工作生活,难以坚持。(11)疮面干黑:①轻度:疮面干燥褐紫。②中度:疮面暗黑。③重度:疮面干黑如漆。

2.2.3 阳虚证(含亡阳) (1)肢冷:①轻度:自不觉冷,摸之腕、踝关节以下有冷感。②中度:自觉手足发冷,按之腕、踝关节上下有冷感。③重度:自觉手足如冰,按之肘、膝关节以下厥冷明显。(2)畏寒:①轻度:轻度畏寒。②中度:畏寒较重,得温可解。③重度:重度畏寒,得温不解。(3)冷汗:①轻度:时有少量冷汗。②中度:汗出较多,局部湿透衣服。③重度:冷汗淋漓,汗出不断。(4)面色㿖白:①轻度:面色略淡而浮,肤色较薄有光,细察方得。②中度:面色苍白而浮,皮肤薄而有光,稍察即得。③重度:面色极度苍白,皮肤薄而光亮,状如白蜡,一望而知。(5)神志模糊:①轻度:淡漠倦睡,注意力不集中,思维欠清晰,呼之能应。②中度:神志淡漠,思维不清晰,呼之反应减弱。③重度:神志不清,呼之不应。(6)遇寒痛甚:①轻度:遇寒疼痛稍加重或遇寒甚疼痛始加重。②中度:遇寒疼痛加重可忍。③重度:遇寒疼痛加重不可忍或稍遇寒疼痛即加重。(7)疮面淡红不鲜:①轻度:疮面淡暗不鲜。②中度:疮面淡红不鲜。③重度:疮面淡白不鲜。(8)面浮肢肿:①轻度:下肢或面目稍浮肿,按之微凹。②中度:面目四肢浮肿,按之凹陷能起。③重度:全身明显浮肿,按之没指,凹陷不起。(9)小便清长:①轻度:尿色偏淡,略淡于浅黄色,24小时尿量2000~2200ml之间。②中度:尿清,似无黄色可见,24小时尿量2200~2500ml之间。③重度:尿清如水,全无黄色,24小时尿量2500ml以上。(10)便溏:①轻度:大便不成形,每日3~4次。②中度:大便稀溏,每日5~10次。③重度:大便如水样,每日10次以上。

(收稿日期:2007-03-14)

(上接第1026页)

管细胞凋亡的快速动力学或免疫细胞对凋亡细胞的及时清除有关而值得研究。

表1模拟温燥之“温度-湿度”量化空间指标可致小鼠气道为主的组织学病变,为建立温燥小鼠动物模型提供组织细胞学基础。结果表明,温燥的主要病机可能是:燥伤华盖,灼津耗液,合以宣输失司,皮毛腠理失养而致卫表不固,“燥气先伤于华盖”;肺津生成锐减诱之生血匮乏源与血粘涩行,加之气道“纤毛-黏液毯”生物防御屏障与抗体免疫功能受损及对生物病原攻击敏感性增加等综合因素致病。气道液IgG抗体持续降低与气管细胞bcl-2基因表达下调在温燥致病机制中的作

用值得进一步研究。

参考文献

[1]丁建中,张六通,邱幸凡,等.外燥对小鼠气管上皮纤毛运动与呼吸道液分泌的影响.中医杂志,2006,48(8):607~609.
[2]许许,许燕萍,黄庆华.细胞感染对大鼠呼吸道上皮细胞紧密连接蛋白的影响.中华结核和呼吸杂志,2002,25(5):306~307.
[3]汤毅.伤津证与生津法初探.中医杂志,2005,46(8):628~629.
[4]陈灏珠主编.实用内科学.下册.11版.北京:人民卫生出版社,2001:1559~1561.

(收稿日期:2006-09-28;修回日期:2006-11-28)