

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.12.017

实验研究

桑杏汤对温燥模型小鼠肺呼吸膜超微结构、表面活性物质及炎性细胞因子的影响

丁建中¹, 倪圣^{2*}, 张六通³, 黄江荣¹, 肖长义⁴

(1. 长江大学医学院, 湖北省荆州市南环路 1 号, 434023; 2. 长江大学附属荆州临床医学院; 3. 湖北中医药大学; 4. 三峡大学)

摘要 目的 探讨桑杏汤“生津润燥”的可能分子机制。方法 110 只小鼠随机分为常温常湿组、温燥模型组、温燥阴性治疗组和桑杏汤低、高剂量组, 每组 22 只。采用“温度-相对湿度-风”综合条件建立温燥小鼠模型。造模 6 天后桑杏汤低、高剂量组分别给予桑杏汤 0.009、0.018 g/(kg·d) 灌胃, 常温常湿组、温燥阴性治疗组用等量无菌生理盐水灌胃, 连续 6 天。观察各组小鼠气道与肺组织学变化并观察左肺中叶超微结构, 检测肺组织水通道蛋白 5 (AQP5) mRNA 和蛋白表达水平及气管肺泡灌洗液中黏多糖、无机磷、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 ($\alpha 1$ -AT)、白细胞介素 10 (IL-10) 和血小板活化因子 (PAF) 水平。结果 与常温常湿组比较, 温燥模型组小鼠气管及肺组织病理及超微组织均出现损伤, 呼吸膜增厚, 肺泡灌洗液黏多糖、无机磷、IL-10 水平降低, PAF 水平增高, AQP5 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与温燥模型组比较, 桑杏汤低剂量组小鼠气管上皮化生、纤毛缺损与黏膜腺体化生减轻, 呼吸膜平均厚度降低, 肺泡灌洗液黏多糖、无机磷、 $\alpha 1$ -AT、IL-10 水平增高但 NE、PAF 水平下降, 肺组织 AQP5 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 桑杏汤“生津”可能与增加气道液和肺泡表面活性物质分泌、上调 AQP5 基因表达相关, “润燥”可能是抑制炎性细胞因子“级联反应”, 以改善气道病理损伤。

关键词 温燥; 桑杏汤; 生津润燥; 呼吸膜; 表面活性物质; 炎性细胞因子

《温病条辨》曰“秋感燥气, 右脉数大, 伤手太阴气分者, 桑杏汤主之”, 方中桑叶、豆豉宣肺散邪; 杏仁宣肺止咳降气; 沙参、贝母、梨皮润肺止咳; 栀子清泄胸膈之热, 在治疗呼吸系统疾病方面取得良效^[1]。前期研究结果显示, 桑杏汤水提取液可增加温燥小鼠模型气道液与抗体水平、减轻气道上皮炎症与腺体肿胀^[2]。本研究动态观察桑杏汤对温燥小鼠呼吸膜超微结构、肺表面活性物质、气管肺灌洗液中中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 ($\alpha 1$ -AT)、血小板活化因子 (PAF)、白细胞介素 10 (IL-10) 水平和水通道蛋白 5 (AQP5) 基因表达的影响, 以探讨桑杏汤“生津润燥”的可能分子机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级昆明种小鼠 110 只, 4~5 周龄, 体重 (17 ± 1) g, 雌雄各半, 湖北省实验动物研究中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (鄂) 2008-2005。

1.2 药物

桑杏汤: 桑叶 9 g, 苦杏仁 9 g, 沙参 15 g, 浙贝母 12 g, 豆豉 6 g, 栀子皮 12 g, 梨皮 12 g, 湖北清大中药饮片有限责任公司提供。1 剂加 3 倍水浸泡 2 h 后微火煎至 100 ml, 重复 3 次, 将 3 次煎液过滤混匀、水浴浓缩至 200 ml, 其生药量为 0.36 g/L。

1.3 主要仪器与试剂

LRH-250 人工智能气候箱 (广东医疗器械厂); 7500 透射电镜 (日本日立公司); BEP III 自

基金项目: 国家自然科学基金 (81173147)

* 通讯作者: 2273878150@qq.com, (0716) 8067630

动酶免疫分析仪 (德国 Dade Behring Marburg 公司); MASTER-K30H 程控仪 (韩国 Best 机电有限公司); JD801D 图像分析软件 (江苏捷达公司); AlphaEase Fc 图像分析软件 (美国 Nature Gene 公司)。AQP5 Superscript II 逆转录试剂盒 (批号: FSK-100) 与 SYBR Green realtime PCR master mix-plus (批号: QPK212plus) 均为 TOYOBO 公司产品; 抗体 β -Actin (批号: Sc-4616r, 美国 Pierce 公司); NE (批号: 201310)、 α 1-AT (批号: 201310)、PAF (批号: 20204) 单克隆抗体试剂盒均为 IBL-America 公司产品; IL-10 (批号: 1201267) 单克隆抗体试剂盒购于美国 R&D 公司; 无机磷测定试剂盒 (批号: 20131114) 购于南京建成生物试剂公司; 唑啉 (批号: 054K0578) 与 D-葡萄糖醛酸内酯 (批号: 12711EC) 购于 Sigma 公司。

1.4 动物分组及处理方法

110 只小鼠采用随机数字表法分为常温常湿组、温燥模型组、温燥阴性治疗组和桑杏汤低、高剂量组, 每组 22 只。分批置入人工气候箱内、常规饲养, 模拟“温度-相对湿度-风”综合条件刺激造模^[9]: (15 ± 1) °C、相对湿度 ($70\% \pm 5\%$) 为常温常湿环境, (22 ± 2) °C、相对湿度 ($30\% \pm 5\%$) 为温燥环境; MASTER-K30H 程控仪控制箱内风速为 2.5 m/s; 设定箱内照明强度为 2000 流明, 照明时间设为每 24 h 内照明 14 h 与关闭 10 h 循环进行。造模 6 天后桑杏汤低、高剂量组分别给予桑杏汤 0.009、0.018 g/(kg·d) 灌胃, 常温常湿组、温燥阴性治疗组用等量无菌生理盐水灌胃。各组灌胃均每天 1 次, 连续 6 天。

1.5 观察指标及方法

6 天后小鼠剖检前 4 h 常规禁食、禁水。1) 每组采用随机数字表法选取 2 只行气管和肺组织学观察, 常规 HE 染色、光镜观察。2) 取 4 只行小鼠左肺中叶组织超微结构观察, 用 JD801D 图像分析软件测量呼吸膜平均厚度。3) 取 8 只检测肺组织 AQP5 mRNA 和蛋白表达水平。肺组织 AQP5 mRNA 水平检测采用荧光实时 PCR 方法, 用 Oligo 6.0 软件按检索 NCBI 基因序列设计扩增模板引物 (上海生工生物技术公司); 上游引物: 5'-GGCTG-CAATCCTCTACTTCTAC-3', 下游引物: 5'-TTCT-TCCGCTCCTCTCTATGA-3' (127bp); 内参照基因 β -actin 引物序列: 上游引物: 5'-CCGT-GAAAAGATGACCCAG-3', 下游引物: 5'-TAGC-CACGCTCGGTCAGG-3' (191bp)。RT-PCR 反应 40

个循环。以 β -actin Ct 值标化 AQP5 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 AQP5 mRNA 表达水平^[9]。肺组织 AQP5 蛋白水平检测采用 Western blotting 方法, 应用 AlphaEase Fc 图像分析软件进行密度分析并计算灰度值, 所得结果为目的蛋白相对含量。4) 另取 8 只检测支气管肺泡灌洗液中 NE、 α 1-AT、PAF、IL-10 水平, 采用 ELISA 方法进行。5) 气道液黏多糖、无机磷水平检测: 取气管肺泡灌洗液用唑啉比色法测定^[9], 具体按试剂盒说明书步骤操作。

1.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行数据处理, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用方差分析, 两组间比较采用 q 检验 (Newman-Keuls 法)。

2 结果

2.1 各组小鼠气管及肺组织病理与超微结构观察

常温常湿组气管上皮、纤毛、黏膜下腺体、肺泡无异常, 呼吸膜清晰且各层结构致密, II 型肺泡细胞内嗜碱性板层小体与线粒体数量较多。温燥模型组气管上皮鳞状化生与纤毛片状缺损明显, 20%~40% 气管腺体黏液腺化生伴炎性细胞浸润; 细支气管上皮细胞与 Caral 细胞肿胀, 肺泡淤血、水肿明显, 肺间质增宽伴炎性细胞浸润; 电镜观察显示, II 型肺泡细胞与 I 型肺泡细胞连接处肿胀, 肺泡隔胶原纤维增生、肺泡毛细血管内皮细胞肿胀与肺呼吸膜增宽, II 型肺泡细胞微绒毛减少且排列紊乱, 细胞内嗜碱性板层小体数量减少、线粒体数量减少且多呈“条状面包样”肿胀。温燥阴性治疗组病理变化与温燥模型组相似。与温燥模型组和温燥阴性治疗组比较, 桑杏汤高、低剂量组气管上皮化生与纤毛缺损减少, 约 15% 浆液腺上皮黏液腺化生; 肺泡淤血、水肿病灶减少; 超微结构观察显示 I 型肺泡细胞基膜与毛细血管基膜组织间隙、呼吸膜肿胀明显减轻; II 型肺泡细胞内嗜碱性板层小体数量增多且线粒体肿胀减少。

2.2 各组小鼠肺组织 AQP5 mRNA 及蛋白表达比较

表 1 示, 与常温常湿组比较, 温燥模型组和温燥阴性治疗组 AQP5 mRNA 与蛋白水平下降 ($P < 0.05$); 与温燥模型组比较, 桑杏汤低剂量组 AQP5 mRNA 与蛋白质水平升高 ($P < 0.05$), 与常温常湿组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而桑杏汤高剂量组 AQP5 mRNA 低于常温常湿组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织 AQP5 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AQP5 mRNA	AQP5 蛋白
常温常湿组	8	1	0.82 ± 0.33
温燥模型组	8	0.53 ± 0.22*	0.30 ± 0.10*
温燥阴性治疗组	8	0.49 ± 0.17*	0.31 ± 0.09*
桑杏汤低剂量组	8	0.83 ± 0.11 [△]	0.62 ± 0.45 [△]
桑杏汤高剂量组	8	0.66 ± 0.15*	0.36 ± 0.18

注: 与常温常湿组比较, * $P < 0.05$; 与温燥模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组小鼠呼吸膜平均厚度及肺泡灌洗液无机磷、黏多糖水平比较

表 2 示, 与常温常湿组比较, 温燥模型组呼吸膜平均厚度增加, 黏多糖、无机磷水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 温燥阴性治疗组呼吸膜平均厚度亦高于常温常湿组, 无机磷水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与温燥模型组比较, 桑杏汤低剂量组呼吸膜平均厚度降低, 黏多糖、无机磷水平升高 ($P < 0.05$), 而桑杏汤高剂量仅呼吸膜平均厚度低于温燥模型组 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠肺泡灌洗液中炎性细胞因子水平比较

表 3 示, 与常温常湿组比较, 温燥模型组、温燥阴性治疗组 PAF 水平升高, IL-10 水平明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), NE 与 a1-AT 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与温燥模型组和温燥阴性治疗组比较, 桑杏汤低剂量组 NE、PAF 水平下降, IL-10 升高 ($P < 0.05$)。桑杏汤高剂量组 IL-10 水平高于温燥阴性治疗组 ($P < 0.05$)。桑杏汤低剂量组 PAF 低于桑杏汤高剂量组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠呼吸膜平均厚度及肺泡灌洗液黏多糖、无机磷水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	呼吸膜平均厚度 (nm)	黏多糖 (mg/ml)	无机磷 (mmol/L)
常温常湿组	222.50 ± 48.74 (4)	0.30 ± 0.05 (8)	0.34 ± 0.03 (8)
温燥模型组	489.88 ± 59.86** (4)	0.23 ± 0.04* (8)	0.23 ± 0.03* (8)
温燥阴性治疗组	477.65 ± 45.75** (4)	0.25 ± 0.02 (8)	0.22 ± 0.02* (8)
桑杏汤低剂量组	313.75 ± 67.24* [△] (4)	0.29 ± 0.03 [△] (8)	0.28 ± 0.02 [△] (8)
桑杏汤高剂量组	298.14 ± 36.78* [△] (4)	0.26 ± 0.05 (8)	0.25 ± 0.05 (8)

注: () 内为鼠数; 与常温常湿组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与温燥模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组小鼠肺泡灌洗液中炎性细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NE (μg/ml)	a1-AT (ng/ml)	PAF (ng/ml)	IL-10 (pg/ml)
常温常湿组	8	8.80 ± 2.31	148.25 ± 15.57	1507.50 ± 108.43	161.06 ± 10.22
温燥模型组	8	10.60 ± 1.84	132.13 ± 17.73	1893.75 ± 165.47*	140.43 ± 7.98**
温燥阴性治疗组	8	10.17 ± 0.94	137.15 ± 14.66	1844.13 ± 65.43*	137.62 ± 6.14**
桑杏汤低剂量组	8	9.21 ± 1.24 [△] [▲]	146.25 ± 17.45	1691.25 ± 100.83 [△] [▲]	151.31 ± 17.01 [△] [▲]
桑杏汤高剂量组	8	9.87 ± 0.64	117.25 ± 38.22	1841.25 ± 227.94* [#]	148.60 ± 9.59 [▲]

注: NE, 中性粒细胞弹性蛋白酶; a1-AT, a1-抗胰蛋白酶; PAF, 血小板活化因子; IL-10, 白细胞介素 10; 与常温常湿组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与温燥模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与温燥阴性治疗组比较, $\Delta P < 0.05$; 与桑杏汤高剂量组比较, $\#P < 0.05$

3 讨论

肺司呼吸、主宣发肃降。由气道黏膜上皮和腺体细胞分泌的黏蛋白、水、电解质等组成的气道黏液的主要作用是湿润气道黏膜、保护上皮的纤毛运动和维持“纤毛-黏液毯”御邪屏障。厚度约 0.2 ~ 1.0 μm 的呼吸膜是“肺通天气”的重要物质基础, 由 II 型肺泡细胞分泌的表面活性物质是复杂的磷脂蛋白混合物, 主要作用是调节肺泡表面张力、维护肺泡的稳定性、阻止肺泡毛细血管中液体向肺泡内渗入并使肺泡得以保持相对“干燥”状态^[4], 因此气道液、表面活性物质与“肺津”濡养功能相关。前期研究证实, 温燥之邪可降低气道空气湿度并加快水分蒸发, 引受邪部位津液骤伤且无以润泽, 津液输布失司则气道“燥胜则干”^[5]。本研究结果显示, 温燥模型组气管肺泡灌洗液中无机磷水平下降, 提示 II 型肺泡细胞分泌表面活性物质功能障碍; AQP5 mRNA 表达下调提示肺泡间水液转运失衡; 炎性细胞因子 NE、PAF 升高与抗炎细胞因子 a1-AT、IL-10 下降, 同时呼吸膜平均厚度明显高于常温常湿组, 表明局部免疫病理反应与呼吸膜超微结构改变有关。

桑杏汤低剂量组小鼠黏多糖水平上升提示气道液分泌增加, 与桑杏汤所含皂苷成分刺激胃黏膜感受器而反射性引起迷走神经中枢兴奋以增加气道液分泌有关^[6]。桑杏汤低剂量组小鼠气管上皮化生与纤毛缺损减少与黏膜腺体浆液腺上皮黏液腺化生减轻; 超微结构显示 II 型肺泡细胞嗜银性板层小体数量增多、线粒体肿胀减轻等显示改善 II 型肺泡细

胞能量代谢; 同期气管肺泡灌洗液中无机磷水平增高, 与南沙参所含磷脂可促进表面活性物质合成相关^[1], 能有效调节肺泡表面张力、减轻 I 型肺泡细胞基膜与毛细血管基膜间隙水肿及濡润肺泡, 故呼吸膜平均厚度减少表明病理性水肿减轻较, 与黄酮类能清除氧自由基、抗炎、解痉作用有关^[2]。

桑杏汤“生津”的可能主要机制与刺激气道液分泌和 II 型肺泡细胞合成表面活性物质以湿润气道和濡泽呼吸膜局部微环境相关, 组织学证据是小鼠气管上皮化生与纤毛缺损减少、黏膜腺体浆液腺上皮黏液腺化生与呼吸膜水肿减轻; 桑杏汤“润燥”的可能主要机制是在促进“生津”以改善气道、肺部微环境的基础上, 通过平衡或调节以 NE、PAF 为中心的失控性炎症细胞因子级联反应对呼吸膜和肺组织的免疫病理损伤^[3], 上调 AQP5 基因表达以调节肺泡液细胞间转运功能, 共奏改善肺津输布、濡润气道、减轻呼吸膜与气道炎性病理之良效。

Impact of Sangxing Decoction (桑杏汤) on Ultra Microstructure, Surface Active Substance and Inflammatory Cytokines of Pulmonary Respiratory Membrane of Mice Model of Warm Dryness

DING Jianzhong¹, NI Sheng², ZHANG Liutong³, HUANG Jiangrong¹, XIAO Changyi⁴

(1. Medical School of Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023; 2. Jingzhou Clinical Medical School Affiliated to Yangtze University; 3. Hubei University of Chinese Medicine; 4. China Three Gorges University)

ABSTRACT Objective To explore the possible molecular mechanism of *Sangxing Decoction* in “promoting production of fluid and moistening dryness”. **Methods** One hundred and ten mice were randomized into the normal temperature and humidity group, the warm dryness model group, the warm dryness negative treatment group, and the low and high dose *Sangxing Decoction* groups, with 22 mice in each group. Warm dryness mice were modeled by synthetic condition of “temperature-relative humidity-wind”. After mice were modeled for 6 days, the low and high dose *Sangxing Decoction* groups were given *Sangxing Decoction* 0.009, or 0.018 g/(kg · d) by gavage, respectively, and the normal temperature and humidity group and the warm dryness negative treatment group were given equivalent sterile normal saline by gavage, all once daily for 6 days. Changes of mice’s airway and lung histology in each group were examined. Ultra microstructure of middle lobe of left lung was observed. The expressions of aquaporin 5 (AQP5) mRNA and proteins in lung tissue, and the levels of mucoitin, inorganic phosphorus, neutrophil elastase (NE), α 1-antitrypsin (α 1-AT), interleukin 10 (IL-10) and platelet activating factors (PAF) in bronchoalveolar lavage fluid were detected. **Results** Compared with the normal temperature and humidity group, there were pathological and ultrastructural damage in trachea and lung tissue of mice in the warm dryness model group. The respiratory membrane thickened. The levels of mucoitin, inorganic phosphorus and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid decreased. PAF increased. The expressions of AQP5 mRNA and proteins decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the warm dryness model group, mice’s tracheal metaplasia, cilium defect and mucous membrane gland metaplasia in the low dose *Sangxing Decoction* group were improved. Average thickness of respiratory membrane decreased. The levels of mucoitin, inorganic phosphorus, α 1-AT and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid increased; while the levels of NE and PAF decreased. The expressions of AQP5 mRNA and proteins in lung tissue increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Sangxing Decoction* “promoting production of fluid” might relate to increasing the secretion of airway fluid and alveolar surfactant, as well as up-regulating the gene expression of AQP5. “Moistening dryness” might be inhibiting the “cascade” of inflammatory cytokines. Thus airway pathological injury might be improved.

Keywords warm dryness; *Sangxing Decoction*; promoting production of fluid and moistening dryness; respiratory membrane; surface active substance; inflammatory cytokines

参考文献

- [1] 赵勤,汪海飏,高振,等. 桑杏汤(散)及其加减方治疗呼吸系统疾病疗效的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 254-258.
- [2] 丁建中,龚权,张六通,等. 桑杏汤对温燥小鼠气管纤毛运动与呼吸道液及免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(5): 4-5.
- [3] 丁建中,张六通,向光盛,等. 外燥伤肺分子机制的实验研究[J]. 中医杂志, 2012, 53(11): 952-955.
- [4] 周衍椒,张如镜. 生理学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 195-204.
- [5] 丁建中,张六通,龚权,等. 温燥致病机制的实验研究[J]. 中医杂志, 2007, 48(11): 1024-1026.
- [6] 梅喜全. 现代中药药理手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 590-593.
- [7] 许益民,陈建楼,王永珍,等. 南、北沙参磷脂成分的分析[J]. 中国药理学杂志, 1990, 25(6): 330-332.
- [8] 王晓静,王元书,邱进. 桑叶化学成分的研究[J]. 食品与药品, 2007, 9(9): 1-3.
- [9] 龚非力. 医学免疫学[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2012: 131-139.

(收稿日期: 2015-09-24; 修回日期: 2016-01-14)

编辑: 邓 媛