

• 实验研究 •

外燥伤肺的生物学指标研究

张六通¹ 丁建中^{2*} 肖长义³ 王明明¹ 殷 涛¹ 黎家华³

(1. 湖北中医药大学基础医学部, 湖北省武汉市昙华林特 1 号, 430061;

2. 长江大学医学院; 3. 三峡大学医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672572); 湖北省自然科学基金资助项目(2009CDB289)

* 通讯作者: dingjianzhong@yangtzeu.edu.cn, (0716)8062631

[摘要] 目的 研究外燥伤肺的生物学指标及其意义。方法 将 99 只 SPF 级昆明种小鼠随机分为常温常湿组、温燥组、凉燥组, 每组 33 只。各组按文献“温度—相对湿度—风”条件进行造模, 于处理后第 6、12、18 天行气管、肺组织病理与肺泡 II 型细胞(AT II)超微结构观察, 检测气道液黏多糖(RM)与二棕榈酰卵磷脂(DPPC)含量。结果 与常温常湿组比较, 温燥组、凉燥组第 6~18 天气管上皮鳞状化生、纤毛缺损, 气管黏液腺化生伴黏膜下炎症细胞浸润, 肺泡瘀血; 电镜观察显示温燥组、凉燥组 AT II 微绒毛减少; 两组以第 12 天 RM 下降明显($P < 0.05$), 第 6~18 天 DPPC 含量持续下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 外燥伤肺致气道病理与肺呼吸膜 AT II 之超微结构异常可作为研究外燥伤肺病机的基本组织病理学指标, 检测 RM 与 DPPC 可作为外燥伤肺津病机的功能性生物学指标。

[关键词] 外燥; 气管; 肺; 病理; 超微结构; 小鼠

Biological Indices and Their Significance of External Dryness Injuring the Lung

ZHANG Liutong¹, DING Jianzhong², XIAO Changyi³, WANG Mingming¹, YIN Tao¹, LI Jiahua³

(1. Department of Basic Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061; 2. Medical School of Yangtze University; 3. Medical School of China Three Gorges University)

ABSTRACT Objective To study the biological indices and their significance of external dryness injuring the lung. **Methods** Totally 99 SPF Kunming mice were randomized into normal temperature and humidity group, warm-dryness group, and cool-dryness group with 33 in each. The models were made under the simulated condition of “temperature-relative humidity-wind” based on literature. On the 6th, 12th, and 18th day after treatment, the pathological changes of the trachea, lung, and the ultrastructure of type II alveolar cell (AT II) were observed, and the levels of respiratory mucopolysaccharide (RM) and dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) were detected. **Results** Compared with the normal temperature and humidity group, squamous metaplasia and ciliated defect of tracheal epithelia, tracheal mucous metaplasia accompanied with infiltration of inflammatory cells, pulmonary alveolar congestion, and pulmonary emphysema were showed on the 6th and 18th day in the warm-dryness group and cool-dryness group. The electron microscopy observation showed that in the warm-dryness group and cool-dryness group there was reduction of AT II microvilli. The reduction of RM in both groups was significant on the 12th day ($P < 0.05$), and the content of DPPC was continuously decreased from the 6th day to the 18th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The tracheal pathological changes and ultrastructural abnormality of pulmonary respiratory mucosa AT II caused by external dryness can be taken as the basic histopathological indices of external dryness injuring the lung, and the detection of RM and DPPC can be taken as its functional biological indices.

Key Words external dryness; trachea; lung; pathology; ultrastructure; mice

气道与肺呼吸膜的正常组织结构是机体进行“肺通天气”的重要组织学基础,“秋燥伤肺”、“燥气先伤于华盖”经典理论的实质仍然是诸多致病因素与体内微观物质相互作用的异常表现形式。为此,我们在模拟外燥之温燥与凉燥的“温度—湿度”空间量化指标基础上^[1],研究外燥影响小鼠气管、肺组织病理与肺泡超微结构改变,以及与气管腺体与肺泡

II 型细胞(type II alveolar cell, AT II)分泌功能的相关性,阐释作为研究外燥病机病理性和功能性指标的意义。

1 材料与方法

1.1 动物

无特定病原体(SPF)级昆明种小鼠 99 只,体重(17±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)2008—2005。

1.2 仪器与试剂

Hitachi-7500 透射电镜(日本),LRH-250 人工智能气候箱(广东医疗器械厂),戴安 SUMMIT680 高效液相色谱仪(美国,Chromleon 分析软件)。二棕榈酰卵磷脂(Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline, DPPC)标准品(097K1362, Sigma 公司),甲醇、乙腈等为色谱级;唑啉(054K078, Sigma 公司)、D-葡萄糖醛酸内酯(2711EC, Sigma 公司)。

1.3 动物造模及分组

99 只小鼠按随机数字表法分为常温常湿组、温燥组和凉燥组,每组 33 只,分批置人工气候箱内常规饲养。按文献[1]模拟外燥“温度—相对湿度—风”综合条件进行造模。各组小鼠在第 6 天、第 12 天、第 18 天进行相关检测,检测前 4h 常规禁食、禁水。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 病理组织学观察 断颈处死小鼠,取小鼠气管 1.5cm、右肺组织(中)(40 ± 10)mg;常规石蜡切片、HE 染色与光镜观察。

1.4.2 AT II 超微结构观察 各组随机取 3 只小鼠经乙醚麻醉,经气管插管向肺内注入 2% 戊二醛 1.0ml 固定 1h 后,取左肺中叶组织制成 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 2\text{cm}$ 组织块,常规切片、醋酸铀染色与透射电镜拍片。用 JEDA80ID 图像软件(江苏捷达公司)分析各组 AT II 之嗜钨性板层小体(Osmiophilic Multilamellar Body, OMB)与线粒体(Mitochondrion, M)的“平均面积”。

1.4.3 气道液黏多糖(Respiratory mucopolysaccharide, RM)测定 唑啉比色法^[1]。

1.4.4 气管肺泡灌洗液 DPPC 含量检测 常规高

效液相法。取 4ml 气管肺泡灌洗液,离心取上清液加入氯仿、甲醇、水(3:2:1)5ml 振摇、离心、洗涤后 40℃ 水浴并氮气吹干,加入 0.02ml 氯仿、甲醇(2:1)溶解,−20℃ 保存备检,色谱条件:流动相为乙腈、甲醇、85% 磷酸(50:6:1),流速 1.8ml/min, DAD 检测器波长为 205nm、20℃;依据峰面积与标准品对比计算样品含量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,计数资料的组间比较采用卡方检验。

2 结果

2.1 气管、肺组织病理观察

光镜下显示,常温常湿组第 6—18 天气管上皮细胞与纤毛、气管腺体与肺泡无异常。温燥组第 6—18 天气管上皮鳞状化生、纤毛呈灶状缺损,气管黏膜炎性细胞浸润, $\geq 40\%$ 气管浆液腺上皮黏液腺化生;肺泡瘀血、水肿,肺泡膜增厚。凉燥组第 6—18 天气管上皮鳞状化生、纤毛多呈片状缺损, $\leq 20\%$ 气管浆液腺上皮黏液腺化生,肺部瘀血明显,以第 12 天为重。

2.2 各组小鼠 AT II 超微结构比较

电镜观察显示,常温常湿组第 6—18 天 AT II 与肺泡 I 型细胞连接清晰,AT II 微绒毛多而规则,OMB 与 M 数量较多;温燥组肺泡隔增宽伴“空泡”现象,AT II 微绒毛减少。凉燥组第 6 天改变较轻,但第 12—18 天 AT II 肺泡隔明显增厚。表 1 示,温燥组、凉燥组第 6—18 天 AT II 之 OMB“平均面积”持续减少,以第 6—12 天为重($P < 0.05$),提示其合成肺表面活性物质的细胞器结构受损;凉燥组 M 第 6 天增加($P < 0.05$),第 12—18 天持续减少,提示

表 1 各组小鼠 AT II OMB 与 M 不同时间平均面积比较(μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OMB			M		
		第 6 天	第 12 天	第 18 天	第 6 天	第 12 天	第 18 天
常温常湿组	3	410.39±119.15	378.60±109.40	377.35±175.22	238.81±25.19	299.25±116.99	337.25±68.69
温燥组	3	255.67±54.75*	237.19±31.30*	278.88±78.98	284.43±80.61	236.82±25.80	331.85±84.83
凉燥组	3	273.96±53.55*	276.50±67.85	253.69±73.06	343.57±51.38*	237.52±46.59	247.96±35.81

注:与常温常湿组比较, * $P < 0.05$

表 2 各组对小鼠支气管肺灌洗液 RM 与 DPPC 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RM($\mu\text{g/ml}$)			鼠数	DPPC(ng/ml)		
		第 6 天	第 12 天	第 18 天		第 6 天	第 12 天	第 18 天
常温常湿组	8	320.00±79.45	290.25±59.79	244.25±54.86	4	26.30±3.39	25.60±1.20	23.60±1.34
温燥组	8	405.88±103.36	230.63±37.65*	206.00±58.26▲	4	21.30±0.63	18.90±0.91**	17.10±0.42*
凉燥组	8	309.00±32.83	211.88±10.33*	275.00±32.07	4	21.50±0.21	18.30±1.34**	18.50±1.55*

注:与常温常湿组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与凉燥组比较, ▲ $P < 0.01$

AT II 的能量代谢障碍有其物质基础。

2.3 各组小鼠 RM 与 DPPC 含量比较

表 2 示,与常温常湿组比较,温燥组第 6 天 RM 增高、第 12—18 天下降;凉燥组第 6—12 天 RM 减少,第 18 天升高但无统计学意义,两组均以第 12 天最为下降($P<0.05$),显示气道分泌功能障碍。温燥组、凉燥组第 6—18 天 DPPC 含量持续下降,以第 12—18 天明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明 AT II 分泌肺表面活性物质的功能持续受损。

3 讨论

气道黏膜腺体与杯状细胞分泌的气道液主要成分为黏多糖和蛋白质,可覆盖于气管黏膜表面参与形成“纤毛—黏液毯”局部御邪屏障,以行湿润气道黏膜、保护上皮纤毛运动之功,故检测黏多糖可作为监测气道腺体分泌功能的量化指标。“肺通天气”,然燥邪清肃肃降,肃杀收引,“燥在上,必乘肺经”而“先伤于华盖”。“燥微则物畅其机,燥甚则物即干萎。”温燥组、凉燥组第 6—18 天气管上皮鳞状化生与炎性细胞浸润、纤毛缺损,尤其是温燥组、凉燥组 20%~40% 气管浆液腺上皮黏液腺化生,表明外燥致气道病变的病理学特点。在此基础上,导致温燥组、凉燥组之 RM 持续下降且均以第 12 天为重,证实外燥确可致气道腺体病变与分泌功能下降^[1-2],并随病程的延长而加重,气道组织细胞失之濡养则减弱气道“纤毛—黏液毯”御邪屏障之功,证实外燥伤肺的特点是先引起气道组织细胞结构病变,随之造成气道分泌功能下降,并确有其物质基础。

由六层结构组成的、总厚度不到 $1\mu\text{m}$ 的肺呼吸膜(肺泡—毛细血管膜),主要由肺泡 I 型细胞和 AT II 组成,正常成人每侧肺约有 3 亿个肺泡,是完成“肺通天气”功能的重要组织学基础。空气中病原体、尘埃、有毒气体经开放的气道易造成 AT II 损伤及功能改变,导致肺呼吸膜增厚而影响肺通气功能。1954 年 Mackin 首次报道 AT II 合成并将储存于 OMB 中的磷脂和蛋白排至肺泡表面以形成肺表面活性物质膜,其组成成分以 DPPC 为主^[3],其功能是降低肺泡气液界面的表面张力以维护肺泡的稳定性和通气功能,与中医“肺津”濡养之功相关,故检测 DPPC 含量变化可作为监测 AT II 功能的量化指标。超微结构观察证实,温燥组、凉燥组第 6—18 天分泌肺表面活性物质的 AT II 之 OMB 与提供“能量”的 M“平均面积”持续下降,表明 AT II 胞内有“动力工厂”之称的 M 能量代谢障碍;因为 AT II 分泌的肺

表面活性物质的主要成分是 DPPC,所以 AT II 分泌功能障碍则表现为 DPPC 含量持续下降,继之肺失濡养而致肺泡瘀血、肺间质炎性细胞浸润和肺泡膜增厚并影响通气功能,明显与肺部病理改变相关。本结果为精细阐释外燥伤肺、耗津病机提供超微结构证据。

与气道液分泌呈正比的 RM 参与维护“纤毛—黏液毯”御邪屏障之功,组成肺呼吸膜之一的 AT II 分泌的 DPPC 既是肺表面活性物质的重要组分,又是 AT II 具有肺表达特异性的标志性成分之一,与濡润之功相关,故 RM 与 DPPC 可视为“肺津”相关成分。本结果显示,温燥组、凉燥组第 6—18 天 RM 与 DPPC 呈平行下降,并与气道、肺之病理改变相关,表明气管纤毛、腺体病变与肺呼吸膜之 AT II 的 OMB 与 M 结构改变可作为外燥伤肺病机的典型组织病理学指标;气道腺体分泌的 RM 与 AT II 分泌的 DPPC 可作为研究外燥伤肺津病机的功能性指标,也为研究生津润燥方药机制提供量化检测方法。

“秋伤于燥”、“燥气先伤于华盖”、“燥胜则干”等中医理论均指出燥邪特点其形成与时令有关^[4]。寻找病理组织学证据仍是研究中医六淫病因病机的重要方法之一。课题组前期结合免疫学、分子生物学、组织病理学等多学科理论与技术,模拟六淫燥邪之温燥与凉燥的“温度—湿度—风”量化空间指标,以反映外燥对“肺系”病理和生理功能影响相关指标为切入点,并得到组织细胞学实验证据支持^[1-2]。为了克服采用单一品系动物研究的不足,选用不同品系小鼠对上述指标的稳定性与重复性进行比较性研究^[5],以建立研究外燥病机的宏观理论框架提供特异性病理指标,值得引起关注。

参考文献

- [1] 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—1026,1032.
- [2] 丁建中,胡利群,张六通,等. 外燥对小鼠气道“纤毛—黏液毯”御邪屏障影响的实验研究[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(1):20—22,40.
- [3] Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology[M]. Tenth Edition. New York: McGraw-Hill Companies,2003:365.
- [4] 袁卫玲,马淑珍,郭霞珍. 肺脏功能季节性变化的特点探讨[J]. 中医杂志,2010,51(5):395—396.
- [5] 过伟峰,吴勉华,周仲瑛,等. 论“病机证素”[J]. 中医杂志,2010,51(5):389—391.

(收稿日期:2011-02-11;修回日期:2011-05-11)

[编辑:行之]