

• 实验研究 •

温燥伤肺的分子机制实验研究

丁建中^{1*} 张六通² 向光盛¹ 殷 涛² 黄江荣¹

(1. 长江大学医学院中医系, 湖北省荆州市南环路 1 号, 434023; 2. 湖北中医药大学)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672572, 81173147); 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 观察温燥对小鼠肺组织超微结构及功能与肺黏液素基因表达的影响。方法 78 只昆明种小鼠随机分为常温常湿组、常温燥组、温燥组, 每组 26 只, 采用“温度—相对湿度—风”综合条件刺激造模。造模后第 6 天、第 12 天观察各组肺呼吸膜与Ⅱ型肺泡细胞(ATⅡ)超微结构, 检测肺组织肺黏液素基因 5ac(Muc 5ac)表达, 核因子 NF- κ B、肿瘤坏死因子(TNF- α)、二棕榈酰卵磷脂(DPPC)水平。结果 与常温常湿组比较, 常温燥组第 12 天 ATⅡ 内嗜银板层小体(OMB)数量减少、线粒体(M)多呈肿胀。温燥组第 6 天Ⅰ型肺泡细胞(ATⅠ)与 ATⅡ 连接处肿胀, ATⅡ 微绒毛排列紊乱且胞内 OMB 数量减少; 第 12 天呼吸膜增厚, ATⅡ 内 OMB 明显减少, M 数量减少且明显肿胀; 常温燥组、温燥组第 6 天、第 12 天 OMB 平均面积减少, NF- κ B 活性下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), DPPC 水平下降($P < 0.01$), Muc 5ac mRNA 表达上调而 TNF- α 下降($P < 0.05$)。与常温燥组同时时间比较, 温燥组第 6 天、第 12 天 OMB 平均面积、DPPC、TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$)。结论 温燥犯肺引起 ATⅡ 能量代谢障碍与分泌肺表面活性物质功能受损, 肺呼吸膜病理状态刺激 Muc 5ac 基因表达上调, 抑制 NF- κ B 活性与降低 TNF- α 的调节作用, 进而导致肺呼吸膜增厚而影响肺通气功能。NF- κ B 活性水平、TNF- α 和 DPPC 可作为温燥伤肺分子机制的特征性指标。

[关键词] 温燥伤肺; 分子机制; 肺黏液素基因 5ac; 核因子 NF- κ B; 肿瘤坏死因子; 二棕榈酰卵磷脂

Molecular Mechanisms of Warm Dryness Damaging the Lung

DING Jianzhong¹, ZHANG Liutong², XIANG Guangsheng¹, YIN Tao², HUANG Jiangrong¹

(1. Medical School of Yangtze University, Hubei Province 434023; 2. Hubei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of warm dryness on the ultra-structure, function and mucin gene expression of the lung tissue. **Methods** Seventy eight Kunming mice were randomized into the normal temperature and humidity group, normal warm dryness group and warm dryness group, with 26 in each. The models were established with the stimulation of temperature, relative humidity and wind. On the 6th and 12th day of modeling, the ultra-structure of respiratory membrane and type Ⅱ alveolar cell (ATⅡ), the expression of lung mucin gene 5ac (Muc 5ac), and the level of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) were observed. **Results** Comparing with the normal temperature and humidity group, the number of osmiophilic multilamellar body (OMB) was reduced and mitochondria (M) showed swelling in the normal warm dryness group on the 12th day of modeling. In the warm dryness group, the junction of type Ⅰ alveolar cell (ATⅠ) and ATⅡ showed swelling and resulted in disorganized microvilli and declining OMB in ATⅡ on the 6th day of modeling. On the 12th day of modeling, membrane thickening, significantly declining of OMB in ATⅡ and declining and swelling of M were observed in the warm dryness group. The average area of OMB in ATⅡ and the activity of NF- κ B reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the level of DPPC decreased ($P < 0.01$), the expression of Muc 5ac gene increased and the expression of TNF- α decreased ($P < 0.05$) on the 6th and 12th day of modeling in the normal warm dryness group and warm dryness group. Comparing with the normal warm dryness group at the same time point, the average area of OMB and the level of DPPC and TNF- α decreased significantly in the warm dryness group on the 6th and 12th day of modeling ($P < 0.05$). **Conclusion** Warm dryness damaging the lung could result in the disorders of energy metabolism and impaired secretion of pulmonary surfactant in ATⅡ, the increasing expression of Muc 5ac gene, the decreasing activity of NF- κ B and TNF- α , thickening respiratory membrane and pulmonary dysfunction. The activity of NF- κ B, TNF- α and DPPC could be used as the characteristic indicators for molecular pathogenesis of warm dryness damaging the lung.

Keywords warm dryness damaging the lung; molecular mechanisms; lung mucin gene 5ac; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; tumor necrosis factor; dipalmitoyl phosphatidyl choline

肺呼吸膜(肺泡—毛细血管膜)主要由 I 型肺泡细胞(AT I)和 II 型肺泡细胞(AT II)组成,AT II 的重要功能是通过合成、分泌肺表面活性物质调节肺泡表面张力以使肺泡保持相对“干燥”和维护肺泡的稳定性,与中医“肺津”濡养功能相关。肺呼吸膜是承担“肺通天气”功能的重要物质基础,且气体扩散速率与肺呼吸膜的厚度呈反比。在发现外燥可致小鼠肺部炎性病变基础上^[1],本实验动态研究温燥对昆明种小鼠肺呼吸膜超微结构、肺黏液素基因 5ac (Muc 5ac)表达、核因子- κ B(NF- κ B)活性水平、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与二棕榈酰卵磷脂(DPPC)含量的综合影响及相关性,为分析温燥伤肺分子病机和筛选特异性病理指标提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

78 只无特定病原体级(SPF)昆明种小鼠,体重(17±1)g,雌雄各半,湖北省实验动物研究中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2008—2005。

1.2 主要仪器与试剂

LRH-250 人工智能气候箱,温度(30~65)℃±1℃,相对湿度(30%~90%)±3%(广东医疗器械厂);HITACHI-7500 透射电镜(日本日立公司),荧光定量 PCR 系统(SLAN, HONGSHI, 美国),SUMMIT680HPLC 系统(美国),自动酶免疫分析仪(Dade Behring BEP III, 法国)。Superscript II 逆转录试剂盒(FSK-100)与 SYBR Green realtime PCR master mix-plus(QPK212 plus, TOYOBO 公司)。抗体 Actin (Sc-1616r)与 NF- κ B (Sc-8008, 均为美国 Pierce 公司),小鼠 TNF- α 单克隆抗体 ELISA 试剂盒(0901262, 美国 R&D 公司),DPPC 标准品(097K1362, Sigma 公司),其余试剂为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 动物造模及分组 78 只小鼠采用随机数字表法分为常温常湿组、常温燥组、温燥组,每组 26 只,分批置人工气候箱内常规饲养,按模拟温燥“温度—相对湿度—风”综合条件刺激造模^[2]。处理后第 6 天、第 12 天检测以下指标,小鼠剖检前 4h 常规禁食、禁水。取材前各组小鼠均无死亡。每组随机选取 3 只行小鼠左肺中叶组织超微结构观察与 DPPC 含量检测;每组随机选取 10 只检测肺组织 Muc 5ac mRNA、NF- κ B、TNF- α 水平。

1.3.2 观察指标及检测方法 肺组织超微结构观察:用 JEDA 80ID 软件(江苏捷达公司)分析 AT II

嗜锇板层小体(OMB)与线粒体(M)的平均面积。

DPPC 含量检测:取气管肺泡灌洗液^[2],采用常规高效液相法检测。

小鼠肺 Muc 5ac mRNA 水平检测:引物由上海生工生物技术公司合成。Muc 5ac 引物序列:上游引物 5'-TCCCCTTTCCGATGTCTTTA-3', 下游引物 5'-GCCCTGCGGACAGTTGAT-3'(286bp); β -action 内参照基因引物序列:上游引物 5'-CCGT-GAAAAGATGACCCAG-3', 下游引物 5'-TAGC-CACGCTCGGTCAGG-3'(294bp);PCR 反应 40 个循环。以 β -action 为内参照基因,应用目的基因法,比较目的基因与对照基因的比值,目的基因量=2- Δ Ct,其中 Ct 是荧光达到阈值的循环数, Δ Ct=Ct 目的基因-Ct 管家基因^[3]。

肺组织 NF- κ B 活性水平检测:取小鼠右肺组织约 100mg,常规行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、免疫反应、显影、定影、扫描胶片,Band Scan 凝胶图像处理系统分析目标带分子量和计算平均光密度值(OD)以表示相应核转录因子的活性。

TNF- α 水平检测:取气管肺泡灌洗液^[2],采用单克隆抗体 ELISA 试剂盒按说明书操作。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析(ANOVA),两组间比较采用 q 检验(Newman-Keuls 法)。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织超微结构观察结果

常温常湿组第 6 天、第 12 天肺泡隔、AT I 与 AT II 界限清晰,AT II 微绒毛多而规则,胞内 OMB 数量较多,M 结构典型且数量较多。常温燥组第 6 天 AT I 与 AT II 连接处较清晰,AT II 微绒毛尚规则,第 12 天则 OMB 数量减少,M 数量减少但多见肿胀。温燥组第 6 天 AT I 与 AT II 连接处肿胀,AT II 微绒毛排列紊乱,胞内 OMB 数量减少;第 12 天可见肺呼吸膜增厚,AT II 之 OMB 数量减少且部分融合成“多囊体”并脱落入肺泡腔,M 数量减少但明显肿胀。

2.2 各组小鼠 AT II OMB、M 与 DPPC 水平比较

表 1 示,与常温常湿组同时时间比较,常温燥组第 6 天、温燥组第 6 天、第 12 天 AT II OMB 平均面积显著减小($P < 0.05$),两组第 6 天 M 平均面积增加,提示早期代偿性增加能量代谢,但第 12 天明显

表 1 各组小鼠 AT II OMB、M 与 DPPC 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	OMB 平均面积(μm^2)	M 平均面积(μm^2)	DPPC(ng/ml)
常温常湿组	第 6 天	3	410.39±119.15	238.81±25.19	26.30±3.39
	第 12 天	3	378.60±109.40	299.25±116.99	25.60±1.20
常温燥组	第 6 天	3	289.28±61.42*	257.43±38.27*	25.42±4.17*
	第 12 天	3	338.72±51.24	264.23±55.41*	22.75±0.49*
温燥组	第 6 天	3	255.67±54.75*△	284.43±80.61*	21.50±0.21*△
	第 12 天	3	237.19±31.30*△	236.82±25.80*	18.90±1.34**△

注:与常温常湿组同时间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与常温燥组同时间比较,△ $P<0.05$

表 2 各组小鼠肺组织 Muc 5ac mRNA、NF-κB 与 TNF-α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	Muc 5ac mRNA	NF-κB 水平(OD)	TNF-α(pg/ml)
常温常湿组	第 6 天	10	0.98±0.13	0.39±0.05	51.77±6.85
	第 12 天	10	0.92±0.12	0.45±0.04	41.68±7.53
常温燥组	第 6 天	10	1.17±0.21	0.43±0.02	40.62±11.17*
	第 12 天	10	1.29±0.31	0.28±0.01**	40.80±7.18*
温燥组	第 6 天	10	1.23±0.13	0.25±0.03**△	33.65±16.14*△
	第 12 天	10	1.34±0.23	0.29±0.03**	24.86±8.48*△

注:与常温常湿组同时间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与常温燥组同时间比较,△ $P<0.01$

减少($P<0.05$);两组第 6 天、第 12 天 DPPC 显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与常温燥组同时间比较,温燥组第 6 天、第 12 天 OMB 平均面积、DPPC 水平显著降低($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠肺组织 Muc 5ac mRNA、NF-κB 与 TNF-α 水平比较

表 2 示,与常温常湿组同时间比较,常温燥组、温燥组第 6 天、第 12 天肺 Muc 5ac mRNA 表达升高但无统计学意义($P>0.05$),常温燥组第 12 天与温燥组第 6 天、第 12 天 NF-κB 活性水平下降($P<0.01$);常温燥组、温燥组第 6 天、第 12 天 TNF-α 水平明显下降($P<0.05$)。与常温燥组同时间比较,温燥组第 6 天 NF-κB 活性水平,第 6 天、第 12 天 TNF-α 水平显著降低($P<0.01$)。

3 讨论

多功能细胞 AT II 具有合成和分泌肺表面活性物质、维持肺泡内外液体平衡和参与局部免疫调节作用,在细胞损伤修复过程中 AT II 可以分化为 I 型细胞^[4]。开放性的气道易受微生物、尘埃、毒性气体侵袭,血液中毒素与炎性介质等可滞留在肺泡毛细血管床并造成 AT II 损伤和功能改变。“肺通天气”且司“输布津液”之职,但燥邪清冷肃降且易伤“华盖”,在温燥可致小鼠气道与肺泡瘀血水肿等病变基础上,超微病理观察显示,常温燥组、温燥组肺呼吸膜增厚与微绒毛减少,AT I 与 AT II 连接处肿胀伴间质胶原纤维沉积;提供 AT II 能量的“动力工

厂”M 肿胀而其平均面积增大,提示温燥早期为缓冲“燥邪”影响代偿性能量增加,但随处理时间的延长则出现 AT II 能量供应障碍,同期 OMB 平均面积减少与功能受损,必然导致作为肺表面活性物质重要组分的 DPPC 含量下降而失有效调节肺泡表面张力之功,提示与濡养肺组织的“肺津”生成障碍相关。

已发现 21 种黏蛋白基因(Muc)编码高度糖基化的大分子黏蛋白,主要由气道杯状细胞 Muc 5ac 分泌的黏蛋白 5ac(Muc 5ac)具有保护和润滑气道、吸附粉尘异物、运输细胞产物等功能^[5]。文献报道,在致敏源致敏和暴露于致敏源时,小鼠气道表面上皮细胞的 Muc 5ac mRNA 表达上调^[6],表达增高的 Muc 5ac mRNA 及其蛋白也是致敏源诱导的杯状细胞所分泌^[7]。本研究结果显示,温燥犯肺可使肺组织 Muc 5ac 基因表达增高并导致气道高分泌的黏液,可加重呼吸道气流阻塞与痰量增多,黏液潴留易诱发细菌感染,局部大量聚集的黏性 Muc 5ac 与炎性细胞和非细胞成分等炎性介质聚集于肺泡外间质而致肺水肿、肺瘀血等,具有黏液高分泌的气道炎症疾病的重要病理特征,为外燥之“干咳少痰,可痰液胶黏难咳”之症提供实验证据。存在于多种组织细胞的 NF-κB 被激活后,通过调控多种基因的表达,在感染、炎症反应、细胞凋亡、细胞因子诱导的基因表达中起关键性调控作用。主要由活化的单核-巨噬细胞和 T 细胞等产生的 TNF-α 可刺激血管内皮

细胞表达黏附分子、刺激单核—巨噬细胞分泌趋化因子等,是启动抗菌炎症反应的重要细胞因子之一。温燥组 NF- κ B 活性水平与 TNF- α 持续下降而失去固有免疫反应和诱导适应性免疫的免疫调节作用,表明与温燥致肺部炎性反应相关。

本实验结果提示,温燥伤肺的分子机制是温燥袭肺,致 AT II 之 M 代谢障碍和 OMB 超微结构受损,导致 AT II 合成与分泌 DPPC 减少而使肺表面活性物质含量下降,受邪部位津液骤伤而无以泽肺与调节肺泡表面张力之功;肺组织炎性病理状态刺激肺 Muc 5ac 基因表达上调,具有气道炎症疾病的重要病理特征的高分泌的黏液可影响肺泡通气,肺泡黏液滞留易诱发细菌感染产与加重损害局部防御功能,而肺组织炎性病理信号可显著抑制 NF- κ B 与 TNF- α 等重要免疫分子的活性而减弱调节肺部免疫病理反应之功,以致损害肺呼吸膜与加重气道炎症而损伤“肺通天气”之功。

值得注意的是,温燥伤肺之时,NF- κ B 活性水平、TNF- α 和 DPPC 三种量化指标具有客观性、相关性、可重复性、可用常规仪器检测和易于质量控制等特点,并在“组织—细胞—分子”层次反应物质结构及功能变化的相关性,而为研究温燥伤肺分子病机的特征性指标提供重要基础资料^[8]。

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[J].中医杂志,2006,47(8):607-609.
- [2] 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.
- [3] 向少伟,王小琴,唐庆.肾安提取液对糖尿病小鼠肾脏 TGF- β 1 表达的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(8):1828-1833.
- [4] Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology[M]. 10th ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2003:365.
- [5] 钟相根,李宇航,祝小惠.慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌机制及中药干预作用[J].中华中医药杂志,2011,26(8):1686-1689.
- [6] Alimam MZ, Piazza FM, Selby DM, et al. Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression as a marker of goblet cell metaplasia in murine airways[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(3):253-260.
- [7] Shahzeidi S, Aujla PK, Nickola TJ, et al. Temporal analysis of goblet cells and mucin gene expression in murine models of allergic asthma[J]. Exp Lung Res, 2003, 29(8):549-554.
- [8] 李家星,林凌,宋俊生,等.中医证候定量诊断的研究现状与思路概述[J].中医杂志,2010,51(10):950-952.

(收稿日期:2011-10-09;修回日期:2012-03-15)

[编辑:侯建春]

第二届岐黄男科论坛暨全国中西医治疗男科疾病临床经验研修班征文通知

第二届岐黄男科论坛暨全国中西医治疗男科疾病临床经验研修班拟于 2012 年 8 月 31 日至 9 月 2 日在北京召开。本次论坛由中华中医药学会、中医杂志社主办,中华中医药学会外科分会、中国性学会中医性学专业委员会、北京东方中医药培训中心协办、北京中医药学会男科专业委员会、北京东方岐黄科技服务中心承办。

本次论坛延续首届岐黄男科论坛的主题思想:提升男性健康水平,规范男科疾病诊疗为目的,为广大医务工作者学习交流临床经验搭建平台、共同探讨,促进中西医男科领域的发展与进步。论坛将充分发挥主办单位的桥梁及纽带作用,整合专家资源,扩展会议内容,涉及男科学学科建设与发展、男科心理学、男科疾病临床诊疗心得、ED、名老中医学术经验思想,男性不育、早泄,前列腺疾病研究,学术论文写作与发表等多个方面。此次会议授予国家 I 类继续教育学分 10 分(项目编号:2012330213040)。论坛由著名中医外科、男科专家、中华中医药学会外科分会主委李曰庆教授任大会主席、中华中医药学会男科分会副主委李海松教授任大会执行主席,届时将邀请相关单位领导及著名专家学者(拟请北京中医药大学王琦教授、贾玉森教授、北京大学第三医院姜辉教授、中国中医科学院广安门医院张亚强教授、北京协和医院李宏军教授、北京大学第一医院贺占举教授、张志超教授,卫生部中日友好医院王传航教授、解放军总医院何学西教授、云南省中医医院秦国政教授等)出席并传授临床诊疗经验。

会议征文:1. 男科学学科建设与发展;2. 男科疾病临床诊疗心得;3. 前列腺疾病研究;4. 中西医治疗男科疾病临床经验;5. 中西医治疗不孕不育症经验;6. 名老中医临床经验体会;7. ED 的个性化治疗等。会议将编辑优秀论文集。论文符合条件者将推荐给《亚洲男科学杂志》《中医杂志》《中华泌尿外科杂志》《中国中医药信息杂志》、《中国男科学杂志》《中国性科学杂志》《中国实验方剂学杂志》等期刊。

投稿邮箱:huangzb1234@126.com。征稿截止日期:2012 年 8 月 10 日。注:欢迎相关医务工作者提前注册、未提交论文者也可参加论坛。注册费用:1000 元/人(含餐费、注册费、资料费、会场租用费等)统一安排住宿,费用自理。联系人:张博(010)64014411-3006,王彬(010)84015611,丛杰(010)82900312。短信报名:13910162425,13366529405,传真:010-59451680。联系地址:北京市东直门内南小街 16 号中医杂志社 133 室会务组,邮编:100700。