

基于VIP/cAMP/PKA/AQPs信号通路研究肺肠合治法减轻肺水肿治疗急性肺损伤的作用机制

王文霸¹, 闫曙光¹, 李京涛², 惠毅^{1*}, 史捷^{2*}

(1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] 目的:探究肺肠合治法(麻黄汤+大承气汤)减轻脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)大鼠肺水肿的作用和机制。方法:Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、肺肠合治低、中、高剂量组、地塞米松组。采用LPS(10 mg·kg⁻¹)腹腔注射复制ALI大鼠模型,造模后开始灌胃给药,正常组给予生理盐水(25 mL·kg⁻¹),肺肠合治低(5 g·kg⁻¹)、中(7.5 g·kg⁻¹)、高(10 g·kg⁻¹)剂量组分别给予(麻黄汤+大承气汤)灌胃,阳性药组给予地塞米松(5 mg·kg⁻¹),分别于LPS注射后0、8、16 h给药,共3次。给药结束后取肺组织及血清,肺组织苏木素-伊红(HE)染色,进行肺水肿评分;计算各组大鼠肺组织干/湿(D/W)质量比;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清血管活性肠肽(VIP)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠肺组织水通道蛋白1(AQP1)、水通道蛋白5(AQP5)、VIP、环磷酸腺苷(cAMP)、磷酸化蛋白激酶A(p-PKA)、蛋白激酶A(PKA)蛋白的表达量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠肺组织中VIP mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠肺损伤明显,水肿评分升高,肺组织D/W降低($P<0.01$),肺组织AQP1、AQP5、cAMP、p-PKA/PKA明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),VIP含量显著升高($P<0.01$),肺组织VIP蛋白和mRNA表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,肺肠合治组大鼠肺损伤减轻,肺组织D/W显著升高($P<0.01$),肺组织AQP1、AQP5、VIP、cAMP、p-PKA/PKA升高($P<0.05$, $P<0.01$),肺组织VIP表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:肺肠合治法能减轻急性肺损伤造成的肺组织水肿,其机制可能通过激活VIP/cAMP/PKA信号通路,进而促进水通道蛋白AQP1、AQP5的表达,增强肺组织的水液代谢有关。

[关键词] 肺肠合治; 急性肺损伤; 肺水肿; 血管活性肠肽(VIP)/环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/水通道蛋白(AQPs)信号通路; 麻黄汤; 大承气汤

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)08-0101-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211902

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210812.1353.006.html>

[网络出版日期] 2021-08-12 14:38

Mechanism of Combined Therapy of Lung and Intestine in Alleviating Pulmonary Edema in Treatment of Acute Lung Injury Based on VIP/cAMP/PKA/AQPs Signaling Pathway

WANG Wen-ba¹, YAN Shu-guang¹, LI Jing-tao², HUI Yi^{1*}, SHI Jie^{2*}

(1. College of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Affiliated Hospital, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of the combined therapy of lung and intestine (Mahuangtang + Da Chengqitang) in alleviating pulmonary edema in rats with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** Wistar rats were randomly divided into blank group, model group,

[收稿日期] 2021-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703974);陕西省自然科学基金面上项目(2021JM-473);陕西中医药大学学科创新团队建设(2019-YL05)

[第一作者] 王文霸,在读硕士,从事肺肠合治法治疗肺系疾病的实验研究,E-mail:949222779@qq.com

[通信作者] * 惠毅,博士,副教授,从事肺肠合治法治疗呼吸系统疾病的基础与临床研究,E-mail:drhy1982@126.com;

* 史捷,硕士,主任医师,从事中医药治疗呼吸系统疾病的基础与临床研究,E-mail:2780067265@qq.com

low-, medium-, and high-dose groups with combined therapy of lung and intestine, and positive control group. LPS ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was given (*ip*) to induce ALI in rats. After modeling, the blank group was given normal saline ($25 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), the combined therapy of lung and intestine treatment groups were given (*ig*) low- ($5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium- ($7.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose ($10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) Mahuangtang and Da Chengqitang, and the positive control group was given dexamethasone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Medications were administered 0, 8, and 16 h after LPS injection for 3 times. Then lung tissue and serum were collected after administration. The lung tissues were stained with haematoxylin-eosin (HE), and the pulmonary edema score was evaluated. The dry/wet (D/W) weight ratio of lung tissues in each group was measured, and the content of serum vasoactive intestinal peptide (VIP) in rats was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the protein levels of aquaporin-1 (AQP1), AQP5, VIP, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), phosphorylated protein kinase A (p-PKA), and PKA in lung tissues of rats in each group. The level of VIP mRNA in lung tissues of rats was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the blank group, the model group exhibited obvious lung injury, increased edema score, decreased D/W ratio ($P<0.01$), declined AQP1, AQP5, cAMP, and p-PKA/PKA in lung tissues ($P<0.05$, $P<0.01$), elevated VIP content ($P<0.01$), and up-regulated levels of VIP protein and mRNA in lung tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, combined therapy of lung and intestine treatment groups showed alleviated lung injury, increased D/W ratio ($P<0.01$), elevated AQP1, AQP5, VIP, cAMP, and p-PKA/PKA in lung tissues ($P<0.05$, $P<0.01$), and up-regulated VIP levels in lung tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** The combined therapy of lung and intestine can alleviate ALI-induced lung tissue edema, and the mechanism may be related to the activation of the VIP/cAMP/PKA signaling pathway, which further promotes the expression of AQP1 and AQP5 and enhances the water metabolism of lung tissue.

[Keywords] combined therapy of lung and intestine; acute lung injury; pulmonary edema; vasoactive intestinal peptide (VIP)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/aquaporins (AQPs) signaling pathway; Mahuangtang; Da Chengqitang

急性肺损伤(ALI)是由多种因素引起的急性感染性疾病,其诱因包括创伤、肺炎、休克和败血症^[1-2]。ALI的特征是炎症细胞浸润、炎症介质的产生和弥漫性肺部炎症,炎症损伤导致肺上皮细胞及血管内皮细胞受损、细胞通透性增加,使得大量富含蛋白成分的液体进入肺组织,形成急性非心源性肺水肿^[3]。在临床上,弥漫性炎症浸润引起肺水肿,会造成严重的通气-灌注不匹配,增加肺内分流,并降低肺顺应性,最终导致严重的缺氧,在ALI发病过程中,急性肺水肿是严重威胁患者的生命,因此改善肺水肿是ALI临床治疗的策略之一^[4]。肺肠合治法是以中医“肺与大肠相表里”的理论为基础,结合肺肠的生理功能提出的治疗肺肠系疾病的常用治法。在中医理论中肺、肠与水液的代谢密切相关,肺主通调水道,大肠主液,肺肠功能失调会影响水液代谢,出现痰、饮等病理产物,导致肺水肿、胸水、便秘、泄泻等相关疾病。因此肺肠合治法在恢复肺肠功能的基础上,有调控水液代谢的作用,那么肺肠合治是否能减轻ALI的肺水肿,其作用机

制是什么,目前尚不十分清楚。课题组在研究通肠泻下法(治肠)治疗便秘的作用机制时发现,通肠泻下法能显著的改善肠道水液代谢,其作用机制与调控血管活性肠肽(VIP)/环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/水通道蛋白3(AQP3)信号通路相关^[5]。通肠泻下法在ALI的治疗中被广泛应用,临床研究表明通肠泻下法能改善ALI患者的氧饱和指数,减少机械通气时间^[6];实验研究证实通肠泻下法可通过抑制炎症因子风暴,减轻氧化损伤,改善肠道微生态减少内毒素等作用减轻肺组织炎症治疗ALI,但其对肺水肿的作用和机制,尚无相关报道^[7-9]。因此本研究以体现治肺和治肠的麻黄汤和大承气汤联合使用作为肺肠合治方剂,以VIP/cAMP/PKA/AQPs信号通路为切入点,探讨肺肠合治法对ALI大鼠肺水肿的影响和相关作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雌性Wistar大鼠,共60只,体重(250±20)g,购于成都达硕实验动物有限公司,合格证号SCXK(川)2020-030。陕西中医药大学动物

实验伦理委员会批准号2020DW-011-09。

1.2 试剂 脂多糖(LPS,美国Sigma-Aldrich公司,批号065M8209V);地塞米松注射液(重庆市先锋动物药业有限公司,批号20200902);BCA蛋白质分析试剂盒(中国Beyotime公司,批号p0010);水通道蛋白1(AQP1)、水通道蛋白5(AQP5)、VIP、cAMP、PKA、磷酸化蛋白激酶A(p-PKA)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Affinity Biosciences公司,批号分别为AF5231、AF9927、AF6627、AF1200、AF7246、AF7746、AF0627);TRIzol(美国Ambion公司,批号15596-026);SYBR试剂盒(南京VAZYME生物有限公司,批号Q111-02);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号G1120);大鼠VIP酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技公司,批号E-EL-R1062c)。

1.3 药物 地塞米松注射液(重庆市先锋动物药业有限公司,批号20200902),所有中药材购于(陕西兴盛德药业有限责任公司GMP生产企业)肺肠合治选用麻黄汤合大承气汤,药物剂量和组成:麻黄9g(批号20200501)、桂枝6g(批号20200301)、杏仁9g(批号20200201)、甘草3g(批号20200301)、大黄12g(批号20200101)、芒硝9g(批号20200501)、枳实12g(批号20200101)、厚朴24g(批号20200301)组成。药物加水没过药材浸泡20min,煮开后持续30min,过滤药液,再次加水,煮开30min,滤出药液,2次药液混合,纱布过滤,常压蒸发法浓缩为含生药质量浓度 $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

1.4 仪器 MLS-3750型全自动高压灭菌器(日本三洋公司);RM 2016型病理切片机(德国Leica公司);JK-6型组织摊烤片机、JT-12J型脱水机(武汉俊杰公司);C2500-R-230V型微型高速离心机(美国Labnet公司)FlexStation 3型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);JY300型水平电转仪(北京君意东方电泳设备有限公司);BX53型显微镜(日本Olympus公司);QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Applied Biosystems公司)。

2 方法

2.1 动物造模分组及给药 雌性Wistar大鼠共60只,使用随机分组法分为正常组、模型组、肺肠合治低($5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中($7.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高($10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组,地塞米松组($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),共6组,每组10只,给药剂量根据大鼠与人给药剂量比值6.25:1,以成人60kg体质量等倍剂量换算为肺肠合治低剂量组。

正常组给予生理盐水腹腔注射,其余各组以 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ LPS腹腔注射1次^[10],LPS诱导的ALI模型与人的ALI相似,会触发过量的炎症介质的分泌,从而造成肺组织的持续性损伤,约造模后2h大鼠逐渐出现高热,呼吸急促等表现即为模型复制成功^[11]。成功造模后,正常组、模型组采用生理盐水灌胃;肺肠合治各组给予对应剂量中药灌胃,地塞米松组采用地塞米松溶液灌胃,分别于LPS注射后0、8、16h给药,共3次。

2.2 肺组织HE染色 将4%多聚甲醛固定的肺组织脱水,透明,石蜡包埋,石蜡切片($2\mu\text{m}$),脱蜡,乙醇梯度复水;按照试剂盒说明对各组肺组织进行HE染色,光镜下观察肺组织病理变化,对染色切片进行炎性评分。光镜下观察肺组织病理变化,每个标本根据肺间质水肿、肺泡水肿,按程度无、轻、中、重,分别计0、1、2、3分对染色切片进行水肿程度评分^[12]。

2.3 肺干质量(D)/湿质量(W)比测量 收集右肺下叶组织,滤纸吸干肺组织表面水份,称量W,后肺组织在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥48h,称量D。干肺质量与湿肺质量的比值为D/W,以评估肺水肿程度。

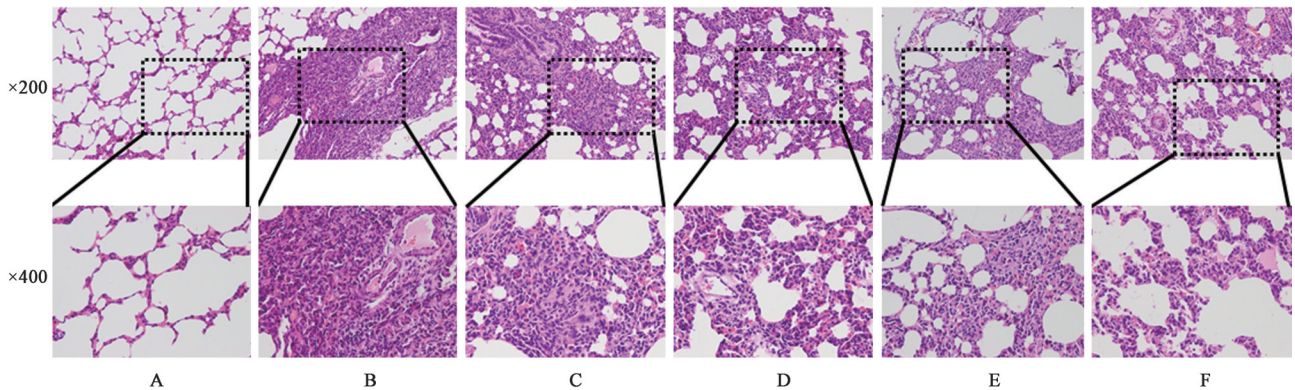
2.4 ELISA检测大鼠血清VIP含量 大鼠心脏采血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min(离心半径10cm,下同),收集血清,按说明书要求和步骤测定血清中VIP含量。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肺组织AQP1、AQP5、VIP、cAMP、p-PKA、PKA蛋白表达 取肺组织,加入裂解液机械研磨, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min,提取总蛋白,测量蛋白质浓度后,根据浓度确定上样量,依次进行电泳、转膜、封闭。用AQP1、AQP5、VIP、cAMP、p-PKA、PKA(1:1 000)特异性抗体在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。次日用PBST洗涤后,在室温下用辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗(1:5 000),培养1h。用Image J凝胶分析软件定量条带强度。

2.6 Real-time PCR检测肺组织VIP mRNA的表达水平 TRIzol法提取各组肺组织RNA,计算RNA的纯度和浓度;RNA和逆转录试剂于冰上融化并离心,按逆转录试剂盒说明书进行逆转录操作;Real-time PCR检测,反应体系:上游引物($10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.4\mu\text{L}$,下游引物($10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.4\mu\text{L}$,SYBR $10\mu\text{L}$,ROX Reference Dye II $0.4\mu\text{L}$, H_2O $4.8\mu\text{L}$,cDNA $4\mu\text{L}$ 。反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性10min,1个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性15s,40个循环; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火延伸60s,40个循环。引物序列:VIP(211bp)上游5'-

ATCCAGAAGCAAGCCTCAGT-3', 下游 5'-ATAGG GCGTGTCAATTCTCCG-3', β -actin(240 bp): 上游 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3', 下游 5'-AAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3', 由北京擎科生物有限公司合成。

2.7 统计学处理 采用SPSS 19.0进行统计分析, 所有定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组之间的比较采用单因素方差分析, 而多重比较采用最小显著性差异法(LSD), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 肺肠合治低剂量组;D. 肺肠合治中剂量组;E. 肺肠合治高剂量组;F. 地塞米松组(图2-图4同)

图1 肺肠合治法对ALI大鼠肺病理组织学影响(HE)

Fig. 1 Effect of combined therapy of lung and intestine on lung histopathology of ALI rats (HE)

3.2 对ALI大鼠肺组织肉眼观察及D/W水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肺组织体积增大, 水肿, 肺组织D/W降低($P < 0.01$), 水肿评分升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 肺肠合治各组与地塞米松组肺组织体积减小, 水肿评分降低, D/W升高($P < 0.01$); 与地塞米松组比较, 肺肠合治低剂量组大鼠肺组织水肿评分升高, D/W降低($P < 0.01$), 中高剂量组差异无统计学意义。见表1、图2。

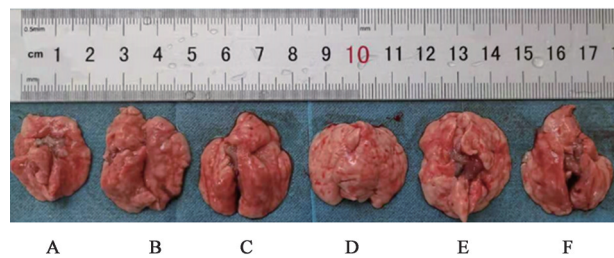


图2 肺肠合治法对ALI大鼠肺组织表现变化的影响

Fig. 2 Effects of combined therapy of lung and intestine on apparent changes of lung tissue in ALI rats

3.3 对ALI大鼠血清VIP含量和肺组织VIP mRNA相对表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清VIP含量和肺组织VIP mRNA相对表达显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 肺肠合治各组与地塞

3 结果

3.1 对ALI大鼠肺组织病理变化的影响 正常组大鼠肺组织结构整, 肺泡与气道周围间隙未见明显中性粒细胞(炎性细胞)浸润, 气道管壁完整; 模型组大鼠肺组织有明显病理改变, 出现肺间质增厚与肺泡水肿, 同时有气道出血与炎性细胞浸润等改变; 肺肠合治中、高剂量组与地塞米松组对气道病理性改变有较为明显抑制, 而低剂量组仍然可以见到较为严重的气道炎症。见图1。

表1 肺肠合治法对ALI大鼠肺组织水肿和D/W的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of combined therapy of lung and intestine on lung tissue edema score and dry-wet weight ratio in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	水肿评分/分	D/W
正常组		0	0.231 \pm 0.008
模型组		5.32 \pm 0.61 ²⁾	0.184 \pm 0.007 ²⁾
肺肠合治低剂量组	5	4.10 \pm 0.52 ^{4,6)}	0.209 \pm 0.006 ^{4,6)}
肺肠合治中剂量组	7.5	2.90 \pm 0.74 ⁴⁾	0.218 \pm 0.007 ⁴⁾
肺肠合治高剂量组	10	2.75 \pm 0.92 ⁴⁾	0.221 \pm 0.009 ⁴⁾
地塞米松组	0.005	2.53 \pm 0.84 ⁴⁾	0.222 \pm 0.018 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与地塞米松组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表2-表4同)

米松组大鼠血清VIP含量和肺组织VIP mRNA相对表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肺肠合治各组VIP含量和肺组织VIP mRNA相对表达的升高水平与给药剂量呈剂量依赖性; 与地塞米松组比较, 肺肠合治各组大鼠血清VIP含量和肺组织VIP mRNA相对表达降低($P < 0.01$)。见表2。

3.4 对ALI大鼠肺组织VIP、cAMP、p-PKA、PKA蛋白表达影响 与正常组比较, 模型组大鼠肺组织

表2 肺肠合治法对ALI大鼠血清VIP含量和肺组织VIP mRNA水平影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of combined therapy of lung and intestine on serum VIP content and lung mRNA level of VIP in ALI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VIP/ng·L ⁻¹	VIP mRNA
正常组		39.49±5.80	1.001±0.045
模型组		67.01±7.92 ²⁾	1.536±0.100 ²⁾
肺肠合治低剂量组	5	83.62±6.07 ^{3,6)}	1.826±0.114 ^{3,6)}
肺肠合治中剂量组	7.5	108.93±4.94 ^{4,6)}	2.662±0.108 ^{4,6)}
肺肠合治高剂量组	10	135.30±5.40 ^{4,6)}	3.239±0.205 ^{4,6)}
地塞米松组	0.005	160.01±11.65 ⁴⁾	3.868±0.227 ⁴⁾

VIP表达明显升高($P<0.05$), cAMP、p-PKA/PKA蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,肺肠合治各组与地塞米松组大鼠肺组织VIP、cAMP、p-PKA/PKA蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$),肺肠合治各组大鼠肺组织VIP、cAMP、

p-PKA/PKA蛋白表达升高程度与给药剂量呈剂量依赖性;与地塞米松组比较,肺肠合治低剂量组大鼠肺组织VIP、cAMP、p-PKA/PKA蛋白表达显著降低($P<0.01$),中、高剂量组差异无统计学意义。见表3、图3。

表3 肺肠合治法对ALI大鼠肺组织VIP、cAMP、p-PKA、PKA蛋白表达影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of combined therapy of lung and intestine on VIP, cAMP, p-PKA, PKA levels in lung tissue of ALI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VIP/ β -actin	cAMP/ β -actin	p-PKA/PKA
正常组		0.184±0.072	0.705±0.130	0.768±0.076
模型组		0.389±0.014 ¹⁾	0.378±0.059 ¹⁾	0.372±0.066 ²⁾
肺肠合治低剂量组	5	0.433±0.028 ^{3,6)}	0.480±0.068 ⁶⁾	0.440±0.050 ⁶⁾
肺肠合治中剂量组	7.5	0.568±0.090 ³⁾	0.560±0.090 ³⁾	0.507±0.062 ³⁾
肺肠合治高剂量组	10	0.632±0.118 ⁴⁾	0.597±0.083 ³⁾	0.614±0.077 ³⁾
地塞米松组	0.005	0.718±0.132 ⁴⁾	0.644±0.094 ³⁾	0.697±0.041 ³⁾

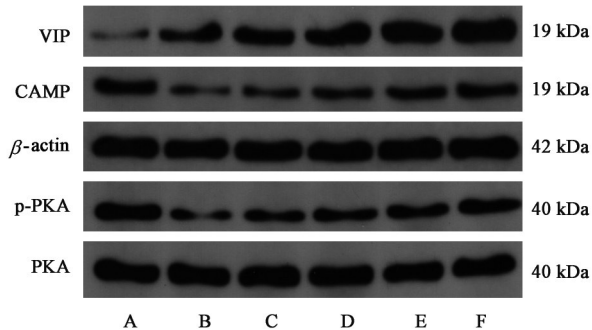


图3 各组大鼠肺组织VIP、cAMP、p-PKA、PKA蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of VIP, cAMP, p-PKA, PKA proteins expression in lung tissue of each group rats

3.5 对ALI大鼠大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,肺肠合治各组与地塞米松大鼠肺组织组AQP1、AQP5蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$),肺肠合治各组大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白表达升高程度与给药剂量呈剂量依赖性;与地塞米松组比较,肺肠合治低剂量组大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白表达显著降低($P<0.01$),中、高剂量组差异无统计学意义。

义。见图4、表4。

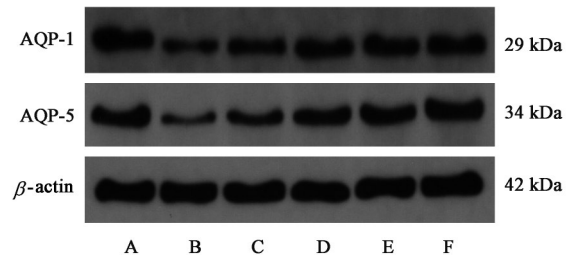


图4 各组大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of AQP1, AQP5 proteins expression in lung tissue of each group rats

4 讨论

炎性渗出引发肺泡与间质水肿是ALI的重要病理环节,因此抗炎、减轻肺水肿是ALI治疗中的重要策略^[13]。VIP是由神经元、内皮细胞、上皮细胞和许多组织产生的免疫细胞所分泌,是一种免疫活性神经肽,具有神经通讯、抗炎与免疫调节等多种功能^[14]。在ALI的治疗研究中,VIP不但能抑制肺组织炎症,还能改善肺水肿,被认为是潜在的治疗靶点之一^[15]。本次实验研究结果证实,在ALI发病过

表4 肺肠合治法对ALI大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白表达影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of combined therapy of lung and intestine on AQP1, AQP5 levels in lung tissue of ALI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP1/ β -actin	AQP5/ β -actin
正常组		0.774±0.076	0.607±0.044
模型组		0.411±0.010 ²⁾	0.308±0.060 ²⁾
肺肠合治低剂量组	5	0.497±0.066 ^{3,6)}	0.354±0.066 ^{3,6)}
肺肠合治中剂量组	7.5	0.567±0.080 ³⁾	0.431±0.039 ³⁾
肺肠合治高剂量组	10	0.617±0.092 ⁴⁾	0.481±0.024 ⁴⁾
地塞米松组	0.005	0.675±0.082 ⁴⁾	0.563±0.029 ⁴⁾

程中,肺组织VIP水平会应激性升高,肺肠合治法能进一步提高肺组织VIP水平。分泌VIP的神经、细胞广泛分布于肠道,通肠泻下法(治肠)能促进肠组织VIP的表达^[16],肺肠合治法是否能促进肠道分泌的VIP进入肺组织,血清VIP检测发现,在ALI发病时,大鼠血清VIP会应激性升高,肺肠合治法能进一步升高血清VIP水平。课题组在肺肠合治法治疗支气管哮喘的前期研究中发现,肺肠合治能提高支气管哮喘小鼠血清VIP水平,其作用优于单纯治肺组^[12]。结合本次实验结果可以推断通肠泻下法可能通过刺激肠神经、细胞VIP的分泌,升高血液中的VIP水平,通过血液循环进入肺组织,发挥从肠治肺的作用。VIP的升高与肺水肿之间有着怎样的联系,研究表明,VIP作为一种免疫神经肽,可以与G蛋白偶联跨膜受体结合,激活腺苷酸环化酶(ACs)从而促进cAMP释放,cAMP是组织细胞维持生理功能的重要物质,PKA是cAMP的主要目标蛋白之一,cAMP可以与PKA的调节亚基结合,从而促使PKA磷酸化,形成完整的VIP/cAMP/PKA活化通路^[18-19],与组织细胞水液代谢密切的AQP是该通路的下游主要靶蛋白之一。VIP/cAMP/PKA/AQPs在组织细胞水液代谢的调控中发挥着重要的作用,由此可知,VIP可通过cAMP/PKA调控AQPs的表达,从而影响肺组织细胞的水液代谢,改善肺水肿。

AQPs是分布于细胞膜上控制水分子的跨膜转运的受体蛋白家族,目前已知的AQPs有13种(AQP0~AQP12),肺中主要有6种AQPs,分别是AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP8、AQP9^[20]。其中AQP1和AQP5被证实与ALI肺水肿密切相关^[21-22]。AQP1多分布在呼吸道旁毛细血管,淋巴管以及间皮细胞上,主要参与肺间质内水液的重吸收;AQP5在肺泡和气道中高表达,与肺泡上皮细胞水分子的跨膜转运关系密切,主要参与肺泡腔内液体的重吸

收^[23]。AQP1、AQP5皆高度依赖磷酸化PKA调节途径,p-PKA通过与AQP蛋白中的磷酸化点位结合,从而调节AQP1、AQP5,影响水液运输和细胞的胞吞胞吐功能^[24]。而VIP/cAMP又是p-PKA的活化剂,他们会增加AQP1、AQP5的水液转运能力,增强淋巴与静脉系统回流吸收,从而减轻肺间质与肺泡水肿^[25]。因此,VIP/cAMP/PKA通路的激活可以促进AQP1、AQP5活化表达。本次研究结果提示,在ALI发生发展过程中,模型组大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白的表达显著降低,水液代谢失常,肺干/湿重比降低,肺组织含水量升高,肉眼可见肺组织体积显著增大,HE染色出现肺间质增厚,肺泡腔狭小的肺水肿病理表现。肺肠合治法治疗后,各组大鼠肺组织AQP1、AQP5蛋白的表达均较模型组明显升高,VIP/cAMP/PKA信号通路各蛋白均处于高表达状态,与此同时肺组织干/湿比重较模型组升高,肺组织含水量降低,HE染色和肺水肿程度评分也证实,肺肠合治法能显著改善ALI大鼠的肺泡和间质水肿,且药效作用与给药剂量成正比。这一结果也进一步表明,AQPs可能是实现肺主通调水道,大肠主液功能的物质基础之一,VIP/cAMP/PKA信号通路可能是肺与大肠相表里的“媒介”之一。

综上所述,肺肠合治法是中医治疗急性肺损伤的常用治法之一,已有研究证实单纯应用体现泻下法的中药大黄能通过促进AQP1、AQP5的表达,进而改善肺水肿^[21-22],从单味药的角度对通肠法进行了验证。本次研究在肺肠合治法的指导下,选择了与恢复肺肠功能密切相关的(麻黄汤+大承气汤)组成复合方剂,从治法的角度证实肺肠合治法能减轻ALI大鼠肺组织水肿,治疗ALI,机制与上调VIP/cAMP/PKA通路促进AQP1、AQP5表达,促进肺组织水液代谢有关,这为阐明中医肺肠合治法的科学内涵提供了一定的实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] RANIERI V M, RUBENFELD G D, THOMPSON B T, et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin Definition [J]. JAMA, 2012, 307 (23): 2526-2533.
[2] GUPTA N, SU X, POPOV B, et al. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. J Immunol, 2007, 179(3):1855-1863.

- [3] TAO L, CAO F, XU G, et al. Mogroside III E attenuates LPS-induced acute lung injury in mice partly through regulation of the TLR4/MAPK/NF- κ B Axis via AMPK activation[J]. *Phytother Res*, 2017, 31(7):1097-1106.
- [4] MOKRA D, KOSUTOVA P. Biomarkers in acute lung injury[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2015, 209:52-58.
- [5] 周永学,王郁金,闫曙光,等. 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中VIP-cAMP-PKA-AQP3信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24):99-104.
- [6] 陈国杰,韩慧娟,崔红,等. 调胃承气汤治疗百草枯中毒致急性肺损伤的临床疗效及对免疫功能的影响研究[J]. *临床急诊杂志*, 2019, 20(12):951-955.
- [7] 钟曦,彭文宏,刘红燕,等. 通腑泻肺颗粒调控MLCK-pMLC通路影响急性肺损伤小鼠肺屏障功能的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(2):129-134.
- [8] 刘美秀,冯高华,严正平,等. 宣肺通腑方加减对肠缺血/再灌注肺损伤导致的急性肺损伤大鼠抗炎、抗氧化作用[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(3):441-444,452.
- [9] 陆俊,刘建琴,姜朝丽,等. 柴黄清胰活血颗粒对重症急性胰腺炎模型大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(8):1085-1092.
- [10] 宗绍波,孙兰,吕耀中,等. 金振口服液对LPS致急性肺损伤模型小鼠NF- κ B,MAPK信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(9):155-159.
- [11] SHEN W, GAN J, XU S, et al. Penethylidene hydrochloride attenuates LPS-induced acute lung injury involvement of NF-kappaB pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(4):296-302.
- [12] MA C, DONG L, LI M, et al. Qidonghuoxue decoction ameliorates pulmonary edema in acute lung injury mice through the upregulation of epithelial sodium channel and Aquaporin-1[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, doi: 10.1155/2020/2492304.
- [13] RANIERI V M, RUBENFELD G D, THOMPSON B T, et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin Definition [J]. *JAMA*, 2012, 307(23):2526-2533.
- [14] SUN X, GUO C, ZHAO F, et al. Vasoactive intestinal peptide stabilizes intestinal immune homeostasis through maintaining interleukin-10 expression in regulatory B cells[J]. *Theranostics*, 2019, 9(10):2800-2811.
- [15] FRYE B C, MEISS F, VON BUBNOFF D, et al. Vasoactive intestinal peptide in checkpoint inhibitor-induced pneumonitis [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(26):2573-2574.
- [16] 周永学,王郁金,闫曙光,等. 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中VIP-cAMP-PKA-AQP3信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24):99-104.
- [17] 张新悦. 基于肺泡巨噬细胞活化探讨肺肠合治法治疗支气管哮喘小鼠的作用机制[D]. 西安:陕西中医药大学, 2020.
- [18] PEARCE L R, KOMANDER D, ALESSI D R. The nuts and bolts of AGC protein kinases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(1):9-22.
- [19] GANCEDO J M. Biological roles of cAMP: Variations on a theme in the different kingdoms of life [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2013, 88(3):645-668.
- [20] TAN J, GAO C, WANG C, et al. Expression of Aquaporin-1 and Aquaporin-5 in a rat model of high-altitude pulmonary edema and the effect of hyperbaric oxygen exposure [J]. *Dose Response*, 2020, 18(4):1559325820970821.
- [21] 岳胜,朱平,岳磊,等. 急性肺损伤大鼠呼吸膜AQP1和AQP5的表达[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(8):70-74,90.
- [22] XU J, HUANG B, WANG Y, et al. Emodin ameliorates acute lung injury induced by severe acute pancreatitis through the up-regulated expressions of AQP1 and AQP5 in lung [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(11):1071-1079.
- [23] 曾伟,孙昊鑫,马广强,等. 二冬膏对LPS致急性肺损伤大鼠肺组织TNF- α 、IL-6及AQP-1、AQP-5的影响[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(6):10-13.
- [24] LIU C, SHEN H, SUN C Z, et al. Dobutamine up-regulates Aquaporin 5 expression in septic pulmonary edema model *in vitro* via cAMP-PKA/CREB signaling pathway[J]. *Nanosci Nanotechnol Lett*, 2018, 10(2):274-282.
- [25] NESVEROVA V, TÖRNROTH-HORSEFIELD S. Phosphorylation-dependent regulation of mammalian aquaporins [J]. *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8020082.
- [26] 李孝全,莫静欣. 中药大黄对重症急性胰腺炎肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞凋亡的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(15):1839-1843.
- [27] 李华,徐鹏,王黎. 大黄素对急性有机磷农药中毒致肺损伤大鼠肺组织Nrf-2/ARE信号通路的影响[J]. *临床肺科杂志*, 2020, 25(5):680-684.

[责任编辑 周冰冰]