

肺肠合治法对支气管哮喘小鼠血管活性肠肽和 p38 MAPK 信号通路的影响

惠毅¹, 张新悦¹, 郑旭锐¹, 闫曙光¹, 史捷^{2*}, 李京涛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:观察中医治疗肺系疾病的常用治法肺肠合治法对支气管哮喘小鼠的治疗作用,进一步检测与哮喘发病机制密切相关的血管活性肠肽(VIP)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路相关蛋白的变化,以阐明肺肠合治法治疗支气管哮喘的作用机制。方法:将60只昆明种小鼠随机选12只作为正常组。其余小鼠通过卵清蛋白致敏复制小鼠支气管哮喘模型。分为正常组、模型组、地塞米松组(0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中药治肺组(2.73 g·kg⁻¹·d⁻¹)、肺肠合治组(6.825 g·kg⁻¹·d⁻¹)。灌胃30 d后取血清及肺组织样本。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组小鼠血清中VIP、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测各组小鼠肺组织中TNF-α、IL-6、p38 MAPK mRNA的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠肺组织中TNF-α、IL-6、p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清VIP含量明显降低($P<0.05$),TNF-α、IL-6含量明显升高($P<0.05$),肺组织TNF-α、IL-6、p38 MAPK mRNA和TNF-α、IL-6、p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,各治疗组小鼠血清VIP含量明显升高($P<0.05$),TNF-α、IL-6含量明显升高($P<0.05$),肺组织TNF-α、IL-6、p38 MAPK mRNA和TNF-α、IL-6、p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);与肺肠合治组比较,地塞米松组小鼠血清TNF-α、IL-6明显增高($P<0.05$),肺组织TNF-α、IL-6 mRNA和TNF-α、IL-6蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$),肺组织p38 MAPK、VIP mRNA和p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$),中药治肺组小鼠血清VIP、TNF-α、IL-6明显降低($P<0.05$),肺组织TNF-α、IL-6、p38 MAPK mRNA和TNF-α、IL-6、p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白相对表达量均明显升高($P<0.05$),肺组织VIP mRNA表达水平明显降低($P<0.05$)。结论:肺肠合治法可以增加内源性VIP,抑制p38 MAPK信号通路的过度活化,减少炎症因子释放,抑制肺部炎症反应,治疗支气管哮喘。

[关键词] 肺肠合治法; 血管活性肠肽; p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路; 支气管哮喘; 三拗汤; 小承气汤

[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)08-0108-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211801

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210729.1333.005.html>

[网络出版日期] 2021-07-29 16:09

Effect of Combined Therapy of Lung and Intestine on VIP and p38 MAPK Signaling Pathways in Bronchial Asthma Mice

HUI Yi¹, ZHANG Xin-yue¹, ZHENG Xu-rui¹, YAN Shu-guang¹, SHI Jie^{2*}, LI Jing-tao²

(1. College of Basic Medicine, Shaaxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China;

2. Affiliated Hospital, Shaaxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effects of the combined therapy of lung and intestine, a common treatment for pulmonary diseases in traditional Chinese medicine (TCM), on bronchial asthma mice,

[收稿日期] 2021-04-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703974);陕西中医药大学学科创新团队建设项目(2019-YL05)

[第一作者] 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,Tel:029-38185122,E-mail:drhy1982@126.com

[通信作者] *史捷,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,Tel:029-33322595,E-mail:2780067265@qq.com

and further detect the changes of vasoactive intestinal peptide (VIP) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway-related proteins which are closely related to the pathogenesis of asthma, in order to elucidate the mechanism of the combined therapy of lung and intestine in the treatment of bronchial asthma. **Method:** A total of 60 Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, dexamethasone group ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), TCM group ($2.73 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and lung-intestine treatment group ($6.825 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 12 mice in each group. All mice except the normal group were sensitized by ovalbumin to induce bronchial asthma. After 30 days of intragastric administration, serum and lung tissue samples were obtained. The content of VIP, interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum of mice in each group was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA levels of TNF- α , IL-6, and p38 MAPK in lung tissues of mice were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein levels of TNF- α , IL-6, p38 MAPK, and phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) in lung tissues of mice were assayed by Western blot (WB). **Result:** Compared with the normal group, the model group showed decreased content of serum VIP ($P<0.05$), increased content of TNF- α and IL-6 ($P<0.05$), up-regulated mRNA levels of TNF- α , IL-6, and p38 MAPK, and elevated protein levels of TNF- α , IL-6, and p-p38 MAPK/p38 MAPK in lung tissues ($P<0.05$). Compared with the model group, the treatment groups exhibited increased content of serum VIP, TNF- α , and IL-6 ($P<0.05$), down-regulated mRNA levels of TNF- α , IL-6, and p38 MAPK, and lower protein levels of TNF- α , IL-6, and p-p38 MAPK/p38 MAPK in lung tissues ($P<0.05$). As compared with the lung-intestine treatment group, the serum TNF- α and IL-6 levels in the dexamethasone group were increased ($P<0.05$), and the mRNA and protein levels of TNF- α and IL-6 in lung tissues were down-regulated ($P<0.05$), while the levels of p38 MAPK, VIP mRNA, and p-p38 MAPK/p38 MAPK protein in lung tissues were up-regulated ($P<0.05$). The serum VIP, TNF- α , and IL-6 levels in the TCM group were decreased ($P<0.05$), and the mRNA levels of TNF- α , IL-6, p38 MAPK and protein levels of TNF- α , IL-6, p-p38 MAPK/p38 MAPK in lung tissues were up-regulated ($P<0.05$), while the level of VIP mRNA in lung tissues was down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** Through increasing endogenous VIP and inhibiting the excessive activation of p38 MAPK signaling pathway, the combined therapy of lung and intestine can reduce the release of inflammatory factors, inhibit pulmonary inflammation response, and treat bronchial asthma.

[Keywords] combined therapy of lung and intestine; vasoactive intestinal peptide; p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway; bronchial asthma ; Sanaotang; Xiao Chengqitang

支气管哮喘是由多种免疫细胞参与的气道慢性炎症性疾病,气道免疫炎症贯穿始终。因此,控制免疫炎症反应是目前该病治疗中的关键^[1]。研究表明多种免疫细胞参与了气道炎症反应进程,由于免疫细胞的过度、持续活化,释放过量炎症因子,损伤气道上皮,导致了炎症反应持续性进展,并最终引发气道高反应性、气道重塑,导致哮喘反复发作,因此抑制免疫细胞的过度、持续性活化是治疗支气管哮喘的有效方法之一^[2]。免疫细胞活化过程受到多个信号通路的影响,其中 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路参与了巨噬细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)等免疫细胞的激活过程,与气道炎症、支气管哮喘的关系密切^[3-4],研究表明 p38 MAPK 信号通路的过度激活与炎症因子释放、气道上皮损伤、支气管哮喘的发生、发展密切相

关^[5-7]。因此抑制 p38 MAPK 信号通路的过度激活,是调控免疫炎症,治疗支气管哮喘的途径之一^[8]。

肺肠合治法是中医学特色治法之一,发源于“肺合大肠”理论,被广泛应用于新冠肺炎、干燥综合征、过敏性哮喘、急性呼吸窘迫综合征、脓毒血症等与肺肠功能失常密切相关的疾病,研究表明,肺肠合治法具有调节肠道菌群失调、调控免疫失衡、抑制炎症反应等作用^[9-13]。在支气管哮喘的治疗中,肺肠合治法临床疗效显著,但其机制尚不完全清楚^[14-15]。课题组前期研究证实肺肠合治法可以上调支气管哮喘大鼠模型肺组织血管活性肠肽(VIP)的表达,抑制气道炎症^[16]。VIP是由非肾上腺能非胆碱能抑制性神经末梢释放的神经递质之一,其受体在肺和肠组织内广泛分布。有研究证实VIP是肺与大肠之间相互联系的物质基础之一,在肠病动物

模型中,肠组织VIP表达变化的同时肺组织VIP表达随之变化,在肺病动物模型中,肺组织VIP表达变化的同时肠组织VIP表达随之变化,而心、肝、脾、肾组织VIP并没有随之变化的趋势^[17]。在肺组织内VIP除能扩张血管外,还具有舒张气道平滑肌、抑制肺泡巨噬细胞吞噬和T淋巴细胞增殖、减少肺炎性介质释放、促进气道上皮的损伤修复等功能,是维持肺组织生理功能和防治肺系疾病的重要物质^[18-19]。VIP对多种免疫细胞的活化有显著的调控作用,具有调控肺内炎症反应,保护肺实质细胞免受炎症损伤的作用^[20]。为进一步揭示肺肠合治法治疗支气管哮喘的作用机制,课题组以三拗汤合小承气汤为肺肠合治方剂,开展了肺肠合治法对支气管哮喘小鼠内源性VIP和p38 MAPK信号通路影响的实验研究,为肺肠合治法治疗支气管哮喘的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性昆明种小鼠60只,体重25~30 g,购于西安交通大学医学部实验动物中心。合格证号SCXK(陕)2017-003。饲养温度为20~25℃,湿度为40%~60%,自由饮水、摄食,饲养于陕西省中药资源产业化协同创新中心SPF级动物房。动物实验已通过陕西中医药大学动物伦理委员会批准,批准编号(2019)陕西中医药大学动物伦理审字第(086)号。

1.2 药物制备 所有药材均购于陕西兴盛德中药饮片有限公司(GMP认证企业),中药治肺组选用三拗汤,由麻黄9 g(批号20200501)、杏仁6 g(批号20200201)、甘草3 g(批号20200301)组成;肺肠合治组选用三拗汤合小承气汤,由麻黄9 g(批号20200501)、杏仁6 g(批号20200201)、甘草3 g(批号20200301)、大黄12 g(批号20200101)、枳实6 g(批号20200101)、厚朴9 g(批号20200301)组成。水没过药材浸泡20 min,煮开后持续30 min,过滤药液,再次加水,煮开30 min,滤出药液,将2次药液混合,用纱布过滤,依据药物总质量和小鼠胃容量,采用常压蒸发法浓缩为0.5 g·mL⁻¹,储存于4℃冰箱,临用前水浴加热。

1.3 试剂 地塞米松(广东三才石岐制药有限公司,批号H44024276),卵蛋白(OVA,美国Sigma公司,批号PA5503-10G),苏木素-伊红(HE)、AB-PAS、马松(Masson)染色试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为G1120、G1285、G1345-50、

BA1054),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司,批号SEA133Mu),IL-6、VIP ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为E-EL-M0044c、E-EL-R1062c),PMSF(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号P105539),磷酸酶抑制剂、RIPA裂解液、BCA试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为S1873、P0012B、P0010、P0012AC),Tris(德国Biofrox公司,批号1115GR500),TRIzol试剂(美国Aidlab公司,批号252250AX),内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(杭州贤至生物有限公司,批号BA2913),白细胞介素-6(IL-6)、磷酸化(p)-p38 MAPK、p38 MAPK一抗(美国CST公司,批号分别为#12912、#4511T、#9212),TNF- α 一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号17590-1-AP),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
β -actin	上游 5'-ACTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'	229
	下游 5'-TACATGGCTGGGGTGTGA-3'	
IL-6	上游 5'-CACAGAGGATACCACTCCCAACAGA-3'	124
	下游 5'-ACAATCAGAATTGCCATTGCACAAC-3'	
TNF- α	上游 5'-AGCACAGAAAGCATGATCCG-3'	212
	下游 5'-CTGATGAGAGGGAGGCCATT-3'	
p38MAPK	上游 5'-GATACAAAGACGGGGCATCG-3'	225
	下游 5'-CACGATGTTGTTTCAGGTCCG-3'	
VIP	上游 5'-AGCCTCAGTTCCTGGCGATCC-3'	175
	下游 5'-GCAGCCTGTCATCCAACCTCAC-3'	

1.4 仪器 KD-TS3A型组织脱水机、TB-718E型生物组织自动包埋机(湖北泰维科技实业有限公司),RM2235型石蜡切片机(德国徕卡公司),SPX-150BⅢ型生化培养箱(天津泰斯特仪器有限公司),TDZ4-WS型低速台式离心机(湘仪离心机仪器有限公司),ELX808型酶标仪(美国BioTek公司),SLK-03000-S型圆周摇床(美国赛洛捷克公司),ZY5型水平电泳-转膜仪(北京君意东方电泳设备有限公司),EDC-810型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)系统(东胜创新生物科技有限公司),NanoDrop2000型分光光度计(美国Thermo

Scientific公司), Aquapro型超级纯水仪(美国艾科浦公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 60只昆明种小鼠随机数字法分为5组,每组各12只,分别为正常组、模型组、地塞米松组、中药治肺组、肺肠合治组。小鼠支气管哮喘模型采用OVA雾化吸入法^[21],除正常组用生理盐水外,其余各组每只小鼠按卵蛋白50 μg+氢氧化铝1 mg+生理盐水0.2 mL,分别在实验第1、15天腹腔注射致敏,于第22天将小鼠置于密闭容器中雾化(雾化液均为2.5% OVA溶液),每周3次,每次30 min,小鼠出现点头呼吸、口唇发紫、站立不稳,呼吸声音急促,有明显鼻鸣音等表现提示模型复制成功;于第1次雾化后开始灌胃给药,正常组和模型组采用生理盐水灌胃,地塞米松组给予地塞米松灌胃,正常组(25 mL·kg⁻¹·d⁻¹)、模型组(25 mL·kg⁻¹·d⁻¹)、地塞米松组(0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中药治肺组(2.73 g·kg⁻¹·d⁻¹)、肺肠合治组(6.825 g·kg⁻¹·d⁻¹)。药物剂量根据小鼠与人给药剂量比值9.1:1,按照成人60 kg体质量等倍剂量换算,灌胃体积均为25 mL·kg⁻¹。

2.2 标本采集 给药30 d后,小鼠腹腔注射10%水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm,下同),分离血清,-80 °C低温冰箱保存;取肺组织,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,部分保存于多聚甲醛固定液中用于病理切片的制作,余组织置于微型离心管内,-80 °C冰箱保存。

2.3 各染色法观察肺组织病理学变化 取肺组织,4%多聚甲醛固定24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯溶液透明,石蜡包埋,切片。HE染色观察肺组织病理形态学变化;AB-PAS染色观察肺组织杯状细胞形态和黏液分泌情况;Masson染色检测肺组织胶原沉积与肌纤维增生情况。

2.4 ELISA检测血清VIP、TNF-α、IL-6含量 取血清,按试剂盒说明操作方法检测血清中各样本吸光度,根据标准曲线计算各组VIP、TNF-α、IL-6浓度。

2.5 Real-time PCR检测 各组TNF-α、IL-6、p38 MAPK mRNA表达水平 取肺组织,加入组织裂解液制成组织匀浆,使用TRIzol法提取总RNA,并测定浓度。按照反转录试剂盒说明书方法合成cDNA。进行Real-time PCR反应,设定反应体系为20 μL,PCR扩增程序:90 °C循环预变性30 s,95 °C变性5 s,60 °C退火延伸34 s;共设定40个循环。相对定量法计算各指标mRNA的2^{-ΔΔC_t}值。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 各组细胞内TNF-α、IL-6、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达 提取肺组织总蛋白,测定蛋白浓度,变性,BCA法进行蛋白定量算出上样量;转膜,室温摇床封闭2 h;分别加入GAPDH一抗(1:1 000)、IL-6一抗(1:1 000)、p-p38 MAPK一抗(1:1 000)、TNF-α一抗(1:600)、p38 MAPK一抗(1:1 000),4 °C过夜,用TBST洗去多余一抗,加入羊抗兔二抗(1:5 000),37 °C摇床孵育2 h, TBST洗去多余二抗,显影并扫描胶片,Image J图像分析灰度值,以GAPDH作为内参计算蛋白相对表达量。

2.7 统计学方法 采用SPSS 18.0软件进行统计分析,使用GraphPadPrism 17.0软件作图,计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用TUKEY检验。若方差不齐,则作非参数Kruskal Wallis检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

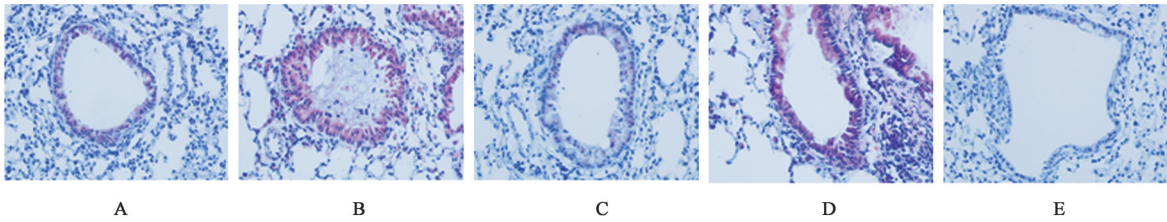
3 结果

3.1 对支气管哮喘小鼠一般情况的影响 正常组小鼠毛色光亮,食量正常,行动敏捷。模型组小鼠毛色暗淡,食量减少。雾化激发时,与正常组比较,其余各组小鼠均出现不同程度的躁动不安或安静少动,喜扎堆,呼吸加深、加快,口唇紫绀,频繁抓口鼻及四肢,点头样呼吸,弓背,前肢缩抬,鼻煽,抽搐,腹肌明显收缩等哮喘发作症状。正常组小鼠无上述表现。

3.2 对支气管哮喘小鼠肺组织形态学的影响 正常组小鼠肺组织结构完整,未见明显炎细胞浸润和聚集,管腔内无脱落细胞,管壁光滑,肺泡结构完整;模型组小鼠肺组织发生结构改变,可见明显的气道增厚,气道内分泌物增多,气管、血管周围有大量炎细胞浸润,管腔内有大量脱落细胞,管壁不完整,肺泡结构破坏;各治组小鼠肺组织结构出现不同程度的修复,气道周围炎性细胞浸润和聚集明显缓解,地塞米松组和肺肠合治组更明显。见图1。

3.3 对支气管哮喘小鼠支气管黏膜杯状细胞形态、数量和黏液分泌的影响 正常组气道上皮未见明显杯状细胞化生,管腔内无黏液;模型组气道上皮杯状细胞化生增多,管腔内黏液高分泌,黏液层明显增厚;各治疗组气道上皮杯状细胞化生及黏液分泌较模型组均见不同程度减轻,其中地塞米松组和肺肠合治组尤为显著。见图2。

3.4 对支气管哮喘小鼠支气管上皮下胶原沉积与肌纤维增生的影响 正常组气道上皮下及气道周



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 地塞米松组;D. 中药治肺组;E. 肺肠合治组(图2和图3同)

图1 肺肠合治法对支气管哮喘小鼠肺组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of combined therapy of lung and intestine on lung histomorphology in bronchial asthma mice (HE, ×400)

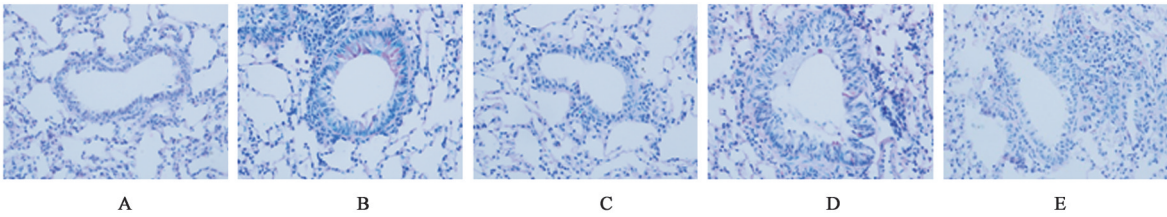


图2 肺肠合治法对支气管哮喘小鼠支气管黏膜杯状细胞形态和数量的影响(AB-PAS, ×400)

Fig. 2 Effect of combined therapy of lung and intestine on morphology and number of goblet cells of bronchial mucosa in bronchial asthma mice (AB-PAS, ×400)

围未见明显胶原纤维沉积;模型组气道上皮下及气道周围大量胶原纤维沉积,中大气道平滑肌增厚,

各治疗组可见不同程度胶原纤维沉积,但其中地塞米松组和肺肠合治组纤维沉积显著减少。见图3。

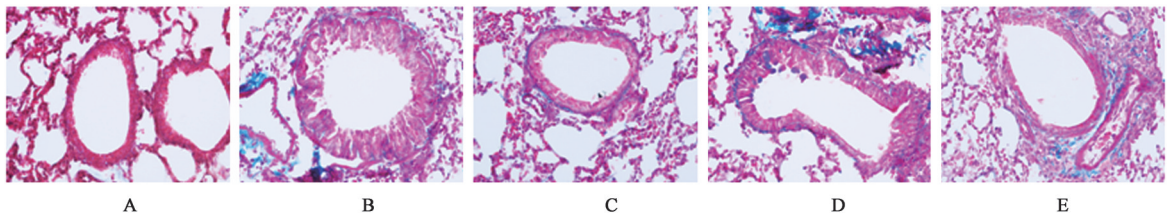


图3 肺肠合治法对支气管哮喘小鼠支气管上皮下胶原沉积与肌纤维增生的影响(Masson, ×400)

Fig. 3 Effect of combined therapy of lung and intestine on collagen deposition and muscle fiber hyperplasia in bronchial asthma mice under bronchial epithelium (Masson, ×400)

3.5 对支气管哮喘小鼠血清VIP、TNF- α 、IL-6含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清VIP含量明显降低($P<0.05$),TNF- α 、IL-6含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,中药治肺组和肺肠合治组小鼠血清VIP含量均有不同程度增高($P<0.05$),地塞

米松组、中药治肺组和肺肠合治组小鼠血清TNF- α 、IL-6含量均明显降低($P<0.05$),与肺肠合治组比较,地塞米松组TNF- α 、IL-6含量升高($P<0.05$),中药治肺组VIP、TNF- α 、IL-6降低,差异有明显统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 肺肠合治法对支气管哮喘小鼠血清VIP、TNF- α 、IL-6含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of combined therapy of lung and intestine on serum VIP, TNF- α and IL-6 levels in bronchial asthma mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	VIP/U·mL ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
正常组		375.36±7.34	52.56±13.43	68.81±19.84
模型组		267.03±39.87 ¹⁾	279.21±17.46 ¹⁾	324.32±27.52 ¹⁾
地塞米松组	0.5	309.63±36.01 ³⁾	105.00±20.32 ^{2,3)}	136.13±23.26 ^{2,3)}
中药治肺组	2 730	348.67±21.54 ²⁾	207.54±18.79 ^{2,3)}	225.31±26.16 ^{2,3)}
肺肠合治组	6 825	393.64±19.52 ²⁾	155.34±19.46 ²⁾	186.10±25.31 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与肺肠合治组比较³⁾ $P<0.05$ (表3和表4同)

3.6 对支气管哮喘小鼠肺组织TNF- α 、IL-6、p38 MAPK mRNA表达的影响 与正常组比较,模

型组TNF- α 、IL-6、p38 MAPK mRNA表达水平增高,VIP mRNA表达水平降低($P<0.05$);与模型组比

较,各治疗组 TNF- α 、IL-6、p38 MAPK mRNA 的表达水平均有不同程度的降低, VIP mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$);与肺肠合治组比较,地塞米松组 TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达水平明显降低 ($P<0.05$),

p38 MAPK、VIP mRNA 表达水平显著升高,中药治肺组 TNF- α 、IL-6、p38 MAPK mRNA 的表达水平明显升高 ($P<0.05$), VIP mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见表3。

表3 肺肠合治法对支气管哮喘小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6、p38 MAPK、VIP mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of combined therapy of lung and intestine on relative expression levels of TNF- α , IL-6, p38 MAPK, and VIP mRNA in lung tissue of bronchial asthma mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

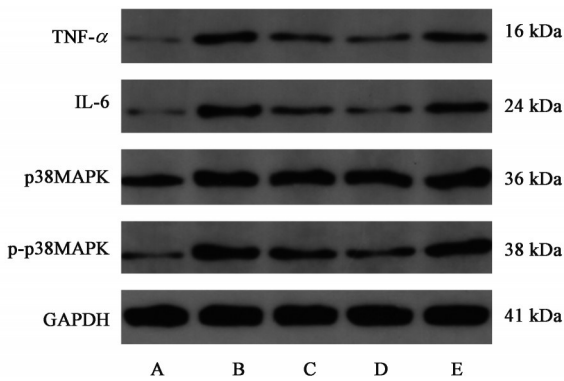
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	p38 MAPK	VIP
正常组		1.02±0.05	0.98±0.04	0.98±0.03	1.01±0.12
模型组		18.62±0.44 ¹⁾	26.00±1.52 ¹⁾	13.55±1.61 ¹⁾	0.38±0.06 ¹⁾
地塞米松组	0.5	0.31±0.02 ^{2,3)}	2.66±0.39 ^{2,3)}	7.25±1.07 ^{2,3)}	3.30±0.21 ^{2,3)}
中药治肺组	2 730	12.19±1.80 ^{2,3)}	18.56±0.81 ^{2,3)}	1.41±0.18 ^{2,3)}	2.99±0.33 ^{2,3)}
肺肠合治组	6 825	3.62±1.15 ²⁾	9.08±1.47 ²⁾	0.29±0.07 ²⁾	6.84±0.12 ²⁾

3.7 对支气管哮喘小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 TNF- α 、IL-6、p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对含量均明显增高 ($P<0.05$);与模型组比较,各治疗组 TNF- α 、IL-6、p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对含量均有不同程度的降低 ($P<0.05$);与肺肠合治组比较,地塞米松组 TNF- α 、IL-6 蛋白相对含量显著降低 ($P<0.05$), p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对含量显著升高 ($P<0.05$),中药治肺组 TNF- α 、IL-6、p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对含量显著升高 ($P<0.05$)。见图4、表4。

表4 肺肠合治法对支气管哮喘小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6、p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of combined therapy of lung and intestine on expression of TNF- α , IL-6, p-p38 MAPK/p38 MAPK in lung tissue of bronchial asthma mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNF- α /GAPDH	IL-6 /GAPDH	p-p38 MAPK /p38 MAPK
正常组		0.08±0.01	0.07±0.01	0.59±0.02
模型组		0.44±0.09 ¹⁾	0.52±0.08 ¹⁾	1.12±0.09 ¹⁾
中药治肺组	2 730	0.22±0.04 ^{2,3)}	0.26±0.07 ^{2,3)}	0.86±0.06 ^{2,3)}
肺肠合治组	6 825	0.12±0.04 ²⁾	0.19±0.08 ²⁾	0.65±0.09 ²⁾
地塞米松组	0.5	0.31±0.01 ^{2,3)}	0.40±0.06 ^{2,3)}	1.06±0.12 ^{2,3)}



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 肺肠合治组; D. 中药治肺组; E. 地塞米松组

图4 各组小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6、p-p38 MAPK、p38 MAPK 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of TNF- α , IL-6, p-p38 MAPK and p38 MAPK protein expression in mice

4 讨论

肺肠合治法发源于肺合大肠理论,《黄帝内经·灵枢·本输》有云:“肺合大肠,心合小肠,肝合胆,脾合胃,肾合膀胱。”肺与大肠在生理上相互联系、病

理上相互影响,治疗上相互为用,构成“肺合大肠”理论的基础。在生理上肺居上焦,肺气肃降有利于大肠的传导从而保持腑气通畅;大肠居下焦,其通降正常则有利于肺气的肃降,使呼吸保持顺畅平稳。在病理上,肺与大肠相互影响,互为因果,肺气肃降失常则影响大肠的通降,导致腑气不利,肺的通调水道功能失常则津液不能输布于下,大肠失润,可出现便秘、大便干结等症。反之,大肠传导功能失常,则会影响肺气的肃降,气逆于上,表现为胸闷、咳嗽、呼吸困难等。虽然中医理论中的肺与大肠是功能概念,与解剖学中的肺与大肠不尽相同,但其功能中包含了现代医学中肺与大肠的功能,因此,“肺合大肠”理论被广泛用于肺、肠相关疾病的临床治疗中,根据具体病机采取肺病治肠、肠病治肺、肺肠合治等治法。如吴鞠通《温病条辨·中焦篇》曰:“喘促不宁,痰涎壅滞,右寸实大,肺气不降者,宣白承气汤主之。”论述了从肠论治肺病的思想,体现肺肠合治。本次研究采用肺肠合治法治疗支气管哮喘,方药选择治肺方(三拗汤)和治肠方

(小承气汤)联合使用,主要针对肺失宣降,肠腑通降失常的哮喘急性加重期,亦可用于肺热腑实的哮喘,以咳嗽、气喘、胸闷同时伴便秘、腹胀为主,上可宣降肺气,下可通降肠腑,三拗汤和小承气汤合用,止咳平喘的同时通下行气以助肺气肃降,调畅肺部气机而哮喘症状得以缓,充分体现了肺肠合治思想。三拗汤出自《太平惠民和剂局方》,系由《伤寒论》麻黄汤去桂枝组成,方中麻黄散寒发汗,宣肺平喘,杏仁宣降肺气,止咳化痰,甘草清热解痉,同麻、杏配伍以利气祛痰,三药同用,宣肺利气,止咳平喘。小承气汤出自《伤寒论》,是具有代表性的治肠方,属于泻下法的范畴,主治阳明腑实证。小承气汤中使用大黄泻热通便、厚朴行气散结、枳实破气消痞,三药合用轻下热结,通肠利腑。

VIP是由非肾上腺能非胆碱能抑制性神经释放的神经递质,由于VIP受体和非肾上腺能非胆碱能抑制性神经在肺组织内分布广泛,其生物学效应也越来越受到重视^[22]。研究表明VIP在肺组织内具有舒张气管平滑肌,缓解气道痉挛,抑制气道高反应性,调控毛细血管通透性,改善肺组织水肿,调节固有免疫和获得性免疫,抗炎、抗过敏反应等多种生物学作用,因此VIP也被认为是治疗支气管哮喘的潜在药物^[23-24]。但外源性VIP进入肺组织后,酶促降解反应导致其半衰期极短,生物利用度降低,不能发挥其全部作用^[25],因此提高内源性VIP的分泌,是促进其功能发挥的有效途径之一。本次研究表明,肺肠合治法能有效提高血清VIP含量,升高肺组织内VIP mRNA相对表达,具有显著的促进内源性VIP分泌的作用,且强于中药治肺组,究其原因可能是非肾上腺能非胆碱能抑制性神经不仅分布于肺组织,还在胃肠道广泛分布,肺肠合治法中包含有通腑泻下法,课题组前期在研究通腑泻下法的作用机制时发现,通腑泻下能有效促进肠道内VIP的释放入血和表达,从而促进肠道蠕动和水液代谢,进而发挥通便作用^[26]。肺肠合治法在促进肺组织释放VIP分泌的同时,也促进了肠道内VIP释放,通过血液循环进入肺组织,从而有效提高内源性VIP的供给,这一结果表明VIP可能是从肠治肺的物质基础之一。

p38 MAPK信号通路参与了免疫细胞活化并对免疫细胞中炎症因子的转录合成和大量释放起着重要作用,p38 MAPK蛋白的磷酸化是刺激众多免疫细胞产生并释放炎症相关细胞因子的先决条件^[27]。p38 MAPK信号通路是MAPK家族信号通

路中的重要一员,参与了炎症、应激反应及细胞的存活、分化和凋亡等过程,是免疫细胞发挥多种生物效应的信号中转站^[28-29]。p38 MAPK信号通路的激活是相对保守的三级磷酸化酶促级联反应过程,包括3个不同层次的激酶:MAPKKK、MKK3/6(MAPKK)和p38 MAPK(MAPK),他们构成了一个连续的蛋白激酶反应链,通过信号的层层传递,最终使p-p38 MAPK活化,而p-p38 MAPK可导致超过60种不同的底物蛋白磷酸化,并最终促进致炎因子TNF- α 、IL-6等的释放从而发挥生物学效应^[30],通过p-p38 MAPK和p38 MAPK的比值,就能反映出p38 MAPK信号通路的活化程度。因此,减少p38 MAPK信号通路的过度激活可以抑制免疫细胞活化及炎症因子的合成和释放,针对p38 MAPK信号通路抑制剂的研究也成为肺系疾病治疗中的热点^[31]。本研究结果也证实,肺肠合治法能抑制p38 MAPK信号通路的过度激活,抑制p38 MAPK的磷酸化进而减少免疫细胞中炎症因子TNF- α 及IL-6的合成和释放。

综上所述,肺肠合治法能增加内源性VIP的合成和分泌,抑制p38 MAPK信号通路的过度激活,抑制免疫细胞的过度活化,减少炎症因子TNF- α 及IL-6的表达,减轻肺部炎症,改善气道高反应性及气道重塑,治疗支气管哮喘,其作用优于单纯的治肺组。这一结果为阐明肺肠合治法治疗哮喘的作用机制和治法内涵提供了一定的实验依据。本次研究主要从治法的角度探索肺肠合治法治疗哮喘的作用机制,故方药选择了具有代表性的三拗汤和小承气汤,研究结果提示其抗炎的作用优于单纯治肺法。而在哮喘的发病过程中,炎症反应加剧主要在疾病初期和急性发作期及以肺热腑实为主的实证阶段,故肺肠合治法可能主要适用于以上证候和阶段。然而炎症只是哮喘发病机制中的一个方面,气道高反应性,气道重塑等多重因素均可影响疾病的发展,其临床证候也有寒热虚实之不同,治法、选方、用药多样,肺肠合治法是否能改善气道高反应性,气道重塑,在不同的证候中,是否肺肠合治法也能发挥其治疗作用及体现肺肠合治法药物的更加优化,还需要进一步的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] DJUKANOVIC R. Airway inflammation in asthma and its consequences: Implications for treatment in

- children and adults[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109(6 Suppl):S539-S548.
- [2] DECKERS J, BRANCO MADEIRA F, HAMMAD H. Innate immune cells in asthma[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(11):540-547.
- [3] 李丹丹. p38丝裂原活化蛋白激酶在肺部疾病中的研究进展[J]. *复旦学报:医学版*, 2018, 45(3):413-417.
- [4] 梁丽, 马佳韵, 申海霁, 等. p38 MAPK抑制剂对激素抵抗型哮喘患者肺泡巨噬细胞炎症因子的作用[J]. *临床肺科杂志*, 2019, 24(1):22-26.
- [5] 徐凤, 肖韩艳, 周淑芬, 等. 柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及ERK/p38MAPK信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2):104-109.
- [6] 刘蕊蕊, 王永安, 钟大玲, 等. 大承气汤对过敏性哮喘小鼠肺部炎症及MAPK信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9):1-5.
- [7] 王艳军, 王明科, 王晓花, 等. p38 MAPK通路在脂多糖致呼吸道上皮损伤中的作用[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(22):4390-4392, 4400.
- [8] 李锋, 周新. p38丝裂原活化蛋白激酶与慢性气道疾病[J]. *中华哮喘杂志:电子版*, 2010, 4(4):291-294.
- [9] 王璐, 张伟. 基于“肺合大肠”理论论述哮喘慢阻肺重叠(ACO)的肺肠同治[J]. *天津中医药大学学报*, 2019, 38(6):541-543.
- [10] 李成荫, 平凡, 朱丰林, 等. 肺肠合治法治疗干燥综合征探讨[J]. *中医杂志*, 2015, 56(2):174-175.
- [11] 王遥, 谢春光, 由凤鸣, 等. “肺肠合治”论治新冠肺炎[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(2):58-61.
- [12] 谭程, 张昶, 高丹, 等. 从肺肠论治针刺对支气管哮喘患者生命质量的影响[J]. *中国针灸*, 2012, 32(8):673-677.
- [13] 寇育乐, 王文霸, 闫曙光, 等. 基于NF- κ B/NLRP3信号通路和肺泡巨噬细胞活化研究肺肠合治法抑制炎症反应治疗急性肺损伤的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(1):151-158.
- [14] 刘兴隆, 张珑琼, 付雯, 等. “肺肠合治”法对肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠呼吸功能、肠菌群及相关免疫因子的影响研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(8):1748-1752.
- [15] 黄晓婷, 熊旭东. “肺与大肠相表里”在社区获得性肺炎治疗中的应用[J]. *中医药临床杂志*, 2017, 29(6):827-831.
- [16] 惠毅, 闫曙光, 郑旭锐, 等. 肺肠合治法对支气管哮喘大鼠肺组织VIP、AQP3表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(2):295-298.
- [17] 郑旭锐, 杨宇, 叶建红, 等. 从肺肠病理模型CCK8、CGRP、SP、VIP表达探讨“肺与大肠相表里”[J]. *中成药*, 2012, 34(11):2226-2229.
- [18] TREMPOLEC N, DAVE-COLL N, NEBREDA A R. SnapShot: p38 MAPK substrates[J]. *Cell*, 2013, 152(4):924-924.
- [19] SIM Y S, KIM S Y, KIM E J, et al. Impaired expression of MAPK is associated with the downregulation of TNF- α , IL-6, and IL-10 in mycobacterium abscessus lung disease[J]. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2012, 72(3):275-283.
- [20] RAN W Z, DONG L, TANG C Y, et al. Vasoactive intestinal peptide suppresses macrophage-mediated inflammation by downregulating interleukin-17A expression via PKA- and PKC-dependent pathways[J]. *Int J Exp Pathol*, 2015, 96(4):269-275.
- [21] 杨飞, 惠毅, 闫曙光, 等. 卵蛋白加氢氧化铝致敏建立哮喘大鼠模型研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(15):1600-1602, 1622.
- [22] GRONEBERG D A, RABE K F, FISCHER A. Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: Vasoactive intestinal polypeptide and its receptors[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 533(1/3):182-194.
- [23] ONOUE S, YAMADA S, YAJIMA T. Bioactive analogues and drug delivery systems of vasoactive intestinal peptide (VIP) for the treatment of asthma/COPD[J]. *Peptides*, 2007, 28(9):1640-1650.
- [24] GRONEBERG D A, SPRINGER J, FISCHER A. Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2001, 14(5):391-401.
- [25] 黄洁, 冯恩志, 杨生岳. 神经肽类物质与哮喘、慢性阻塞性肺疾病气道炎症的研究进展[J]. *临床肺科杂志*, 2017, 22(1):162-164.
- [26] 周永学, 王郁金, 闫曙光, 等. 硝酸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.
- [27] LU J, YANG Z, JIANG J, et al. Regulative effect of P38MAPK on release of TNF α and NO from alveolar macrophages under endotoxin stimulation[J]. *Chin J Traumatol*, 2001, 4(2):75-77.
- [28] 张瑶, 朱振刚. 基于p38 MAPK信号通路中药治疗支气管哮喘的研究进展[J]. *云南中医学院学报*, 2019, 42(4):94-98.
- [29] 占敏霞, 杜伟, 李恒华, 等. 双氢青蒿素与火把花配伍对迟发型超敏反应模型小鼠p-p38 MAPK及ICAM-1表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(22):5561-5566.
- [30] 江丹, 汪何, 姚楠, 等. 基于TGF- β 1/p38MAPK通路探讨益气升清方对糖尿病大鼠肾组织的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(16):2381-2386.
- [31] 林飞, 王甜甜, 何义. p38 MAPK信号通路在急性肺损伤中作用的研究进展[J]. *重庆医学*, 2017, 46(35):5023-5025.

[责任编辑 周冰冰]