

水通道蛋白 mRNA 表达与肺卫失宣大鼠肺损伤的相关性及大黄的调节作用

邓时贵^{*}, 巫莉萍, 黄海定

(广州中医药大学第二附属医院, 广东省中医药科学院动物实验中心, 广州 510006)

[摘要] 目的: 观察水通道蛋白(AQP₁, AQP₅) mRNA 表达与肺卫失宣大鼠肺损伤的相关性及大黄的调节作用, 探讨肺卫失宣的物质基础及大黄的保护机制。方法: 以内毒素法建立肺卫失宣大鼠模型。60 只大鼠随机分成正常对照组、肺卫失宣模型组、造模后 5 d 组、大黄预防(大黄颗粒剂 9 g·kg⁻¹·d⁻¹, ig 连续 2 d 后造模) 组和大黄治疗(造模后 ig 大黄颗粒剂 9 g·kg⁻¹·d⁻¹ 连续 5 d) 组。取肺组织做病理学检查并采用 RT-PCR 法检测肺组织 AQP₁, AQP₅ mRNA 的表达。结果: 模型组大鼠肺组织肺水肿明显, 大黄对肺水肿具有减轻作用。与正常对照组相比, 模型组 AQP₁, AQP₅ mRNA 表达明显下降, 造模后 5 d 组 AQP₁, AQP₅ mRNA 表达明显上调; 与模型组比较, 大黄预防组和治疗组 AQP₁, AQP₅ mRNA 表达明显上调; 与造模后 5 d 组比较, 大黄预防组和治疗组 AQP₁, AQP₅ mRNA 表达明显下调, 预防组与治疗组表达无显著差异。结论: 肺卫失宣大鼠可见肺水肿病理改变, AQP₁, AQP₅ mRNA 表达异常(降低或异常高表达); 大黄对肺卫失宣大鼠肺组织 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 低表达或异常高表达有较强的改善作用, 可能是其保护肺卫失宣肺损伤的重要作用机制之一。

[关键词] 肺卫失宣; 物质基础; 肺损伤; 水通道蛋白; 大黄

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0177-04

Corelation between Expression of AQP₁, AQP₅ mRNA and Lung Injury in Rats with Lung-defensive Sluggishness Syndrome and Effect of Rhubarb on It

DENG Shi-gui^{*}, WU Li-ping, HUANG Hai-ding

(Animal Laboratory Center, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the correlation between the expression of AQP₁, AQP₅ mRNA and the lung injury in the rats with lung sluggishness syndrome and the regulative effect of rhubarb on it, to explore the material foundation of the lung defensive sluggishness syndrom and the mechanism of rhubarb in the prevention and treatment of the lung injury. **Method:** Lipopolysaccharide (LPS) was injected into SD rats to perform lung-defensive sluggishness syndrome. Sixty rats was randomly divided into 5 groups: control group, lung-defensive sluggishness group, natural recovery after 5 days group, rhubarb prevention group (9 g·kg⁻¹·d⁻¹ for 2 days before model establishment) and rhubarb treatment group(9 g·kg⁻¹·d⁻¹ for 5 days after model establishment). Physiological and pathological staining was performed and real-time PCR was used to observe the expression of AQP₁, AQP₅ mRNA in the pulmonary tissue. **Result:** The pulmonary edema could be showed obviously in the lung-defensive sluggishness model and rhubarb could alleviate it. Compared with the control group, expression of AQP₁, AQP₅ mRNA of the

[收稿日期] 2010-02-24

[基金项目] 广东省科技厅项目(83028, 2009B060300025); 广东省中医药管理局项目(2008318, 2009189); 广州中医药大学项目(08CX82)

[通讯作者] ^{*} 邓时贵, 硕士生导师, 从事中西医结合基础研究, Tel: 020-3931887, E-mail: dengshigui@yahoo.com.cn

model group was decreased, thus the natural recovery after 5 days group was elevated; no significantly difference can be seen between rhubarb prevention group and rhubarb treatment group. **Conclusion:** The pulmonary edema and abnormal expression of AQP₁, AQP₅ mRNA can be showed in lung-defensive sluggishness model and the rhubarb can inhibit them, which is one of the important mechanisms in protecting the lung injury of lung-defensive sluggishness syndrome.

[Key words] lung-defensive sluggishness; material foundation; lung injury; AQP₁, AQP₅ mRNA; rhubarb

温病的致病因素为外感温邪,从现代医学角度讲,这些所谓的“温邪”实际上包含了许多致病微生物及其毒素,内毒素是中医温毒之邪的重要因素之一^[1,2]。祖国医学认为:“温邪上受,首先犯肺”,因此,温病引起肺卫失宣所致不同程度的肺损伤有可能贯穿于温病卫气营血的传变过程中^[3]。而水通道蛋白 AQP₁ 和 AQP₅ 的差异性表达是反映肺损伤肺内微环境改变的一个重要指标^[4]。大黄具有通便泻火,清热解毒,凉血化瘀之功^[5],根据“肺与大肠相表里”的中医基础理论临床上广泛使用。因此,我们采用内毒素作为攻毒因素,建立肺卫失宣大鼠模型,从 AQPs 角度探讨肺卫失宣的物质基础,并观察大黄对肺卫失宣肺损伤的保护机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 160 ~ 220 g, SPF 级,动物合格证号 0045632,0046522,广东省医学实验动物中心提供。

1.2 试剂及仪器 内毒素(LPS) 10 mg/支, Sigma 产品,批号 L2880;大黄颗粒剂 1 g/包(相当于饮片 3 g),江阴天江药业有限公司,批号 0903085;TRIpure Reagent,北京百泰克生物技术有限公司,批号 RP1001;Prime Script™ RT reagent Kit,日本 TaKaRa 公司,批号 DRR037S;SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,日本 TaKaRa 公司,批号 DRR041A;大鼠 AQP₁, AQP₅ 引物序列 AQP₁:上 5'-TTA GCC ATT GTC CAG GCA GAA AC-3';下 5'-ATT GGG TCA AGC TCA GCA GTCA-3';AQP₅:上 5'-TGT GAC AGA CAA GCC AAT GGA TAAG-3';下 5'-GGG TAA CCT GGC CGT CAA TG-3';-actin:上 5'-ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG-3';下 5'-TGG ATG CCA CAG GAT TCC AT-3',由日本 TaKaRa 公司设计合成。Real-Time PCR 仪,ABI PRISM7500。

2 方法

2.1 造模及分组 60 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、造模后 5 d 组、大黄预防组和大黄治疗

组,每组 8 只。除对照组尾 iv 注射用水 3 mL·kg⁻¹ 外,其余动物参照文献造模方法^[1-2,4],iv LPS 12 mg·kg⁻¹ (3 mL·kg⁻¹) 建立肺卫失宣模型。模型组 8 h 后处死大鼠采集标本。造模后 5 d 组 iv LPS 后即刻 ig 蒸馏水 3 mL·kg⁻¹,此后 1 次/d,连续 5 d,末次给水后 8 h 处死采集标本。大黄预防组 ig 大黄颗粒剂 9 g·kg⁻¹,1 次/d,连续 2 d,末次给药 2 h 后 iv LPS,8 h 后处死采集标本;大黄治疗组则在尾部 iv LPS 后,即刻 ig 大黄颗粒剂 9 g·kg⁻¹,此后 1 次/d,连续 5 d,末次给药后 2 h 处死大鼠采集标本。所有标本置 -80 °C 冷冻保存备用。

2.2 检测指标

2.2.1 肺组织病理形态观察及评分^[6] 取左肺置 4% 多聚甲醛中固定 48 h,常规制片,切片厚 5 μm,HE 染色,光学显微镜下观察。并随机抽取 4 个标本由同一位病理医生根据肺间质水肿、肺泡水肿、炎细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张改变,按程度无、轻、中、重、分别计 0, 1, 2, 3 分,累计总分,行统计学处理。

2.2.2 肺组织 AQP₁, AQP₅ mRNA 表达的检测 采用 TRIpure Reagent 试剂,参照说明书提取总 RNA,经紫外分光光度计,琼脂糖电泳检测 RNA 的纯度和完整性后,取 1 μg RNA 按 Prime Script™ RT reagent Kit 说明书逆转录合成 cDNA,其中 2.5 μL cDNA 为模板扩增,肌动蛋白 -actin 为内参照,参照 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书建立 20 μL 反应体系,利用 RT-PCR 仪扩增,检测 AQP₁, AQP₅ 目标基因与内标基因 -actin 表达的荧光强度,以 2^{-C_t} (t) 法计算目标基因与内标基因荧光的比值,相对定量比较各处理因素对目标基因表达的影响。

2.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 PEMS 3.0 for Windows Package for encyclopaedia of medical statistics 统计软件(四川大学华西公共卫生学院卫生统计学教研室研制)对各组数据进行多个样本比较及两两比较的秩和检验。

3 结果

3.1 动物整体状态 模型组大鼠出现精神萎靡,毛发无光泽,伴有紫绀,呼吸浅促,点头样呼吸,眼结膜充血,对外界刺激反应迟钝。自然恢复 5 d 组大鼠症状明显加重,而大黄预防组和治疗组动物整体症状虽有减轻,但作用不明显,可能与大黄的泻下作用有关。

3.2 大黄对肺卫失宣大鼠肺组织病理改变的影响

3.2.1 肺组织大体观察 肉眼可见,模型组肺表面有出血点及瘀血斑,肿胀明显;造模后 5 d 组肺组织肿胀及表面出血点明显加重;大黄预防组和治疗组肺组织亦可见肿胀及散在出血点,但较模型组及造模后 5 d 组轻,正常组肺组织未见上述异常表现。

3.2.2 肺病理组织改变及评分 见图 1。正常组肺间质无增宽,肺泡结构清晰,肺泡腔内无渗出;模

型组肺间质增宽,肺泡已失正常组织结构,部分肺泡腔变窄,腔内可见中性粒细胞浸润及红细胞渗出,符合肺水肿的病理表现;造模后 5 d 组肺间质明显增宽,肺泡已失正常组织结构,大量肺泡腔变窄,腔内可见中性粒细胞浸润及红细胞渗出,较模型组严重;大黄预防组肺间质增宽,肺泡内有中性粒细胞浸润,部分肺泡腔变窄,但较模型组减轻,而大黄治疗组肺间质较正常组增宽,部分肺泡腔变窄,内有中性粒细胞浸润,未见红细胞渗出,较模型组减轻。由表 1 可见:模型组和造模后 5 d 组病理评分高于正常对照组 ($P < 0.01$);大黄预防组和治疗组病理评分低于模型组 ($P < 0.01$),但高于正常组,提示肺卫失宣大鼠肺组织肺水肿明显,并随注射内毒素后时间的延长肺水肿越明显。大黄对肺卫失宣所引起的肺水肿有减轻作用。

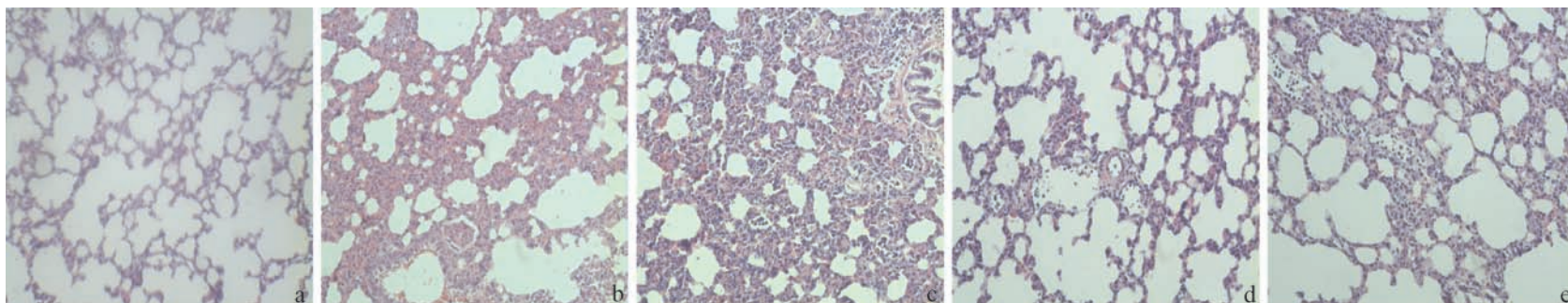


图 1 肺组织病理变化(HE 染色)

a 正常对照组;b. 模型组;c. 造模后 5 d 组;d. 大黄预防组;e. 大黄治疗组

表 1 各组大鼠肺组织病理评分(均±s, n=4)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	肺病理损伤评分
正常对照	-	0.08 ±0.08 ¹⁾
模型	-	1.60 ±0.31
造模后 5 d	-	2.33 ±0.13 ¹⁾
大黄预防	9.0	0.45 ±0.11 ^{1,2)}
大黄治疗	9.0	0.45 ±0.21 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与造模后 5 d 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 大黄对肺卫失宣大鼠肺组织 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达的影响 见表 2。与正常对照组比较,模型组 AQP₁ mRNA 表达呈下降趋势,而 AQP₅ mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$);造模后 5 d 组 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达水平却异常升高,与正常对照组比较差异有显著意义;与模型组比较,大黄预防组、AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达显著提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),治疗组 AQP₅ mRNA 显著提高 ($P < 0.01$);与造模后 5 d 组相比,预防组和治疗组 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达呈明显下调作用,而与正常组无明显差异。大黄预防组与大黄治疗组对 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达未见明显差异。结果提示,肺卫失宣大鼠 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达异常(降低或异常高表

达),注射内毒素 8 h 后 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达抑制,而注射内毒素后造模后 5 d 则表现为异常高表达。大黄对肺卫失宣大鼠 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 的异常表达均有较强的改善作用。

表 2 大黄对肺卫失宣大鼠肺组织 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 表达的影响(均±s, n=8)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	AQP ₁ / -actin	AQP ₅ / -actin
正常对照	-	0.909 ±0.269	1.372 ±0.490 ²⁾
模型	-	0.639 ±0.555	0.308 ±0.128
造模后 5 d	-	2.945 ±1.066 ²⁾	5.020 ±2.461 ²⁾
大黄预防	9.0	1.531 ±1.012 ^{1,3)}	1.739 ±1.044 ^{2,3)}
大黄治疗	9.0	1.044 ±0.676 ³⁾	2.273 ±1.527 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与造模后 5 d 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

肺卫证属于中医温病学理论体系,其主要病理变化为肺卫失宣。“温邪上受,首先犯肺”,因此在肺卫证中肺是最早受累靶器官,表现为肺水肿、肺损伤^[7]。祖国医学认为肺为“水之上源”、具有“通调水道”之功能,在某种程度上暗示了其物质基础与现代医学肺水代谢功能的相关性^[3,8]。AQPs 具有增加

细胞膜水通透性的功能,可以提供快速液体转运和吸收的途径。其中, AQP₁, AQP₅ 与肺损伤的关系最为密切,可能是肺卫失宣的重要物质基础之一,亦是反映肺水肿肺内微环境异常的重要指标^[4]。越来越多医家力主温病初期治法即以清泄里热、导邪外出为主,讲究通腑泻下法在“肺与肠道”功能障碍中的具体应用如大承气汤、大黄等^[9]。因此,本文从水通道蛋白基因表达探讨中医肺卫失宣肺内微环境的改变以及大黄对肺损伤的保护作用,旨在以现代医学术语阐明中医肺卫证物质基础。

肺损伤以肺泡毛细血管膜损伤为基础,渗透性肺水肿和微肺不张为特征,我们用 LPS 作为致毒因素造成肺卫失宣模型,并且通过大鼠症状表现,肺组织大体观察、肺组织病理检查、肺湿/干质量比值及血氧分压的变化,充分表明 LPS 肺卫失宣大鼠具有肺水肿的病理改变^[4]。而 AQP_s 基因表达异常进一步证明中医肺卫失宣肺内微环境紊乱的存在,并可能诱发机体一系列的病理生理改变。根据“肺与大肠相表里”的中医基础理论,我们选择中医传统常用中药具有清热凉血解毒之功的大黄作为实验工具药,探讨其纠正肺卫失宣肺内微环境紊乱的作用。肺卫失宣模型组 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 的表达下调,导致肺泡毛细血管间水转运障碍,肺间质和肺泡腔水肿产生;而造模后 5 d 组因 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 的异常高表达,诱导了血管内皮细胞对水的通透性增加,水份外渗至肺间质和肺泡从而加重肺水肿。相对于模型组来说,不管是预防还是治疗给药,大黄通过上调 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 的表达,增强机体肺泡水清除率而减轻肺泡和间质水肿;与造模后 5 d 组相比,大黄可抑制 AQP₁ 和 AQP₅ mRNA 的异常高

表达,使其接近正常水平以恢复血管内皮细胞正常的通透性。由此我们推测,大黄对肺卫失宣所致的肺水肿具有双向调节作用,可能是其保护肺卫失宣肺损伤的重要作用机制之一。大黄对内毒素诱导肺卫失宣大鼠大肠水通道蛋白基因表达是否也有类似的作用^[10],我们将在后续的研究中加以探讨。

[参考文献]

- [1] 杨进. 中医温病动物模型的研制[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(1): 61.
- [2] 周育平. 肺炎双球菌复制家兔温病发热模型的研究[J]. 北京中医, 2007, 26(8): 536.
- [3] 巫莉萍, 黄海定, 邓时贵. 肺卫失宣(肺卫证)的物质基础研究[J]. 中医杂志, 2009, 50(8): 677.
- [4] Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP₁ and AQP₅ in acute injured lung in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(7): 963.
- [5] 范妙璇, 赵海誉, 王一涛. 中药大黄现代药理学研究与中西医结合的应用[J]. 中国医药指南, 2009(8): 41.
- [6] SUN D, ZHAO M. Protective effect of interleukin-1 receptor antagonist on oleic acid-induced lung injury[J]. Chin Med(Engl), 1996, 109(7): 522.
- [7] 赵国荣. 肺卫理论与肺相关生物活性物质及全身炎症反应炎症综合征[J]. 中医杂志, 2004, 45(3): 165.
- [8] 潘晓明, 段晓慧. 肺的非呼吸功能与中医肺脏相关性探析[J]. 甘肃中医, 1993, 6(3): 1.
- [9] 杨胜兰, 王鹏, 李道本, 等. 通腑法对大鼠肠源性肺损伤保护作用机制的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(3): 154.
- [10] 鲍军强, 李锋, 张文生, 等. 大黄总蒽醌对大鼠远端结肠 AQP₂ 表达的调节效应[J]. 中国中药杂志, 2002, 33(14): 1732.

[责任编辑 何伟]