

# 基础医学院

**二○一一届博士研究生学位论文**

**“肺病及肠”病理变化及相关调控物质和ERK信号通路研究**

Study on the Related Controlling Matter and Signal Path of ERK with Pathophysiological Methods to Research the Pathological Changes from Lung to Large Intestine

**研究生姓名：**郑旭 锐

**指导教师：**杨宇教授**学科专业：**中医临床基础

**二○一一年四月**

学位论文

**“肺病及肠”病理变化及相关调控物质和ERK信号通路研究**

Study on the Related Controlling Matter and Signal Path of ERK with Pathophysiological Methods to Research the Pathological Changes from Lung to Large Intestine

郑旭锐

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 指导教师姓名： | 杨 宇 教授 | |  |
| 申请学位级别： | 博 士 | 专 业 名 称 ： | 中医临床基础 |
| 论文提交时间： | 二○一一年四月 | 论文答辩时间： | 二○一一年五月 |

**二○一一年四月**

本课题由国家重点基础研究发展计划（973 计划）项目基金资助 编号：2009CB522706

摘要

**目的**：观察肺病（过敏性哮喘）模型大鼠对大肠的影响，探讨“肺病及肠”的病理变化及相关物质基础和ERK信号通路。

**方法**：选用雄性Wistar大鼠，设空白组，肺病（过敏性哮喘）组共2组。除空白组外，肺病组采用腹部4点注射用1％卵白蛋白、氢氧化铝、生理盐水配制成的凝胶致敏剂，注射后超声雾化吸入1％OVA诱发哮喘。雾化一周后检测动物肺功能；收集支气管肺泡灌洗液及粪便检测肺肠微生态；采集动物股动脉血液检测血常规和TNF-α、IL-1含量；光镜观察肺、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠组织病理变化；电镜观察肺和结肠组织；免疫组化法检测肺、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠组织中CCK8、CGRP、SP、VIP含量；RT-PCR法检测肺、结肠组织iNOS、ERKmRNA表达变化。

**结果**：

1. 病理生理

肺功能：肺病组大鼠的呼吸频率明显增快，潮气量、每分钟通气量明显降低，与空白组比较有显著性差异（*P* <0.01）；

粪便性状、质地、干湿重量观察：肺病组大鼠大便次数减少，排便较空白组困难，粪便的外观变小，质地干硬，粒数减少、干湿重量均减轻（*P*<0.05）；

胃排空与肠推进试验：与空白组比较，肺病组大鼠胃内残留率升高（*P*<0.05），大肠炭末推进率降低（*P*<0.05）；

肺肠微生态：肺病组的肺部需氧菌、真菌明显增多，厌氧菌显著减少（*P*

<0.01）；肠道需氧菌、真菌、大肠杆菌较空白组显著增多（*P* <0.01），厌氧菌、类杆菌和双歧杆菌显著减少（*P* <0.01）；

2.病理形态

光镜、电镜观察：光镜观察结果显示造模前后大鼠肺和结肠组织出现一定程度的病理改变，而十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织无明显变化；电镜观察结果显示肺和结肠组织出现一定程度的病理改变。

3.相关调控物质

CCK8、CGRP、SP、VIP含量变化：肺病组肺组织CCK8含量减少、CGRP含量增多、SP含量增多、VIP含量减少，与空白组比较有统计学差异（*P*<0.01）；

结肠组织CCK8含量增多、CGRP含量增多、SP含量减少、VIP含量增多，与空白组比较有统计学差异（*P*<0.01或*P*<0.05）；两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃等组织中CCK8、CGRP、SP、VIP的含量比较无统计学差异（*P*> 0.05）

TNF-α、IL-1：肺病组血清TNF-α、IL-1明显升高，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01）；

iNOSmRNA表达：肺病组大鼠的肺组织、结肠组织iNOS mRNA表达升高，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01）。

ERKmRNA表达：肺病组大鼠的肺、结肠组织ERKmRNA表达升高，与空白组比较有差异（*P*<0.01或*P*<0.05）。

结论：

1. 肺在一定的病理状态下可以影响及大肠，出现大肠的病理变化。

2. 肺在一定的病理状态下可以影响及大肠，出现大肠的相关调控物质变化。

3. 肺在一定的病理状态下可以影响及大肠，出现大肠的ERKmRNA表达的变化。

4．CCK8、CGRP、SP、VIP、TNF-α、IL-1、iNOS可能是“肺病及肠”的物质基础。

**关键词**：“肺病及肠”；病理变化；相关调控物质； ERK 信号通路

Abstract

**Objective**: Observed pulmonary disease (allergic asthma) the impact of the large intestine in rats to explore the " lung and intestinal" mechanisms of pathological changes and related material basis and ERK signaling pathways.

**Methods:** Male Wistar rats were used, a blank group, lung (allergic asthma) group 2

Group. In addition to the control group, the lung disease group with 4 points abdominal injection with 1% egg albumin, aluminum hydroxide, saline gel preparation of sensitization, after injection of 1% OVA inhalation ultrasound induced asthma. Pulmonary function test animals a week after atomization; collection of bronchoalveolar lavage fluid and lung intestinal microflora stool; collecting animals and femoral artery blood test blood TNF-α, IL-1; light microscopy lung, duodenum, Jejunum, ileum, colon, rectum, stomach pathologic changes; electron microscopy of lung and colon; immunohistochemistry lung, duodenum, jejunum, ileum, colon, rectum, stomach tissue CCK8, CGRP, SP, VIP Content; RT-PCR detection of lung, colon tissue iNOS, ERK mRNA expression.

**Results**：

1. Pathophysiology

Lung functions: lung disease group were significantly increased respiratory frequency, tidal volume, minute ventilation decreased significantly compared with the control group significantly (*P* <0.01);

Stool, texture, wet and dry weight observed: lung solution will reduce the number of rats, defecation difficult than the control group, the appearance of feces smaller, dry and hard texture, grain number reduction, reducing both wet and dry weight (*P* <0.05);

Gastric emptying and intestinal propulsion test: compared with the control group, lung rats increased gastric residual rate (P <0.05), the end of the colon promote the rate of carbon reduction (*P* <0.05);

Pulmonary intestinal microflora: aerobic pulmonary tuberculosis group, fungi increased significantly, anaerobic bacteria were significantly reduced (*P*<0.01); intestinal aerobic bacteria, fungi, E. coli was significantly increased compared with the control group (*P* <0.01), And anaerobes, Bacteroides and Bifidobacterium were significantly reduced (*P* <0.01);

Morphological observations: Light microscopy showed that the modeling rat lung and colon before and after a certain pathological changes, and the duodenum,

Jejunum, ileum, rectum, no significant changes in gastric tissue; electron microscope showed that the lung and colon Pathological changes of a certain organization.

2. The relevant regulators

SP, VIP, CGRP, CCK8 content: content of lung reduction in lung tissue CCK8, CGRP levels increased, SP content increased, VIP content decreased, compared with the control group were significantly different (*P* <0.01), colon CCK8 content increased, Increased CGRP content, SP content decreased, VIP content increased, compared with the control group were significantly different (*P* <0.01 or *P* <0.05), while the two groups of duodenum, jejunum, ileum, rectum and stomach the expression of VIP No significant difference between the amount (P> 0.05)

TNF-α, IL-1: lung serum TNF-α, IL-1 significantly increased compared with the control group significantly (*P* <0.01);

INOS mRNA expression: lung tissue of rats lung and colon tissue expression of iNOS mRNA increased compared with the control group significantly (*P* <0.01).

ERK mRNA expression: pulmonary disease rats lung, colon ERK mRNA increased expression differences compared with the control group (*P* <0.01 or P

<0.05).

**Conclusion：**

1. Lung under certain pathological conditions and can affect the colon, colonic pathological changes occur.

2. Lung under certain pathological conditions and can affect the large intestine, large intestine appears related to changes in regulation of substances.

3. Lung under certain pathological conditions and can affect the colon, there ERK mRNA expression in the large intestine.

4. CCK8, CGRP, SP, VIP, TNF-α, IL-1, iNOS may be a" lung and intestine," the material basis.

**Key words**: “Lung and large intestine"; Pathophysiology; The relevant regulators;

ERK signaling pathway

目 录

[基础医学院](#_Toc686945065) 1

[摘要](#_Toc686945066) 2

[结论：](#_Toc686945067) 3

[Abstract](#_Toc686945068) 3

[2.1 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中CCK8含量变化结果](#_Toc686945069) 6

[2.2 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中CGRP含量变化结果](#_Toc686945070) 6

[2.3 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中SP含量变化结果.64](#_Toc686945071) 6

[2.4 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中VIP含量变化结果](#_Toc686945072) 6

[附录90](#_Toc686945073) 6

[英文缩略词对照表](#_Toc686945074) 6

[前言](#_Toc686945075) 11

[第一部分 大鼠肺病（过敏性哮喘）模型的建立和评价](#_Toc686945076) 11

**[1](#_Toc686945077)** [实验材料和方法](#_Toc686945077) 11

**[1.1](#_Toc686945078)** [实验动物](#_Toc686945078) 11

**[1.2](#_Toc686945079)** [药物及试剂](#_Toc686945079) 11

**[1.3](#_Toc686945080)** [实验仪器及设备](#_Toc686945080) 12

**[1.4](#_Toc686945081)** [实验用品](#_Toc686945081) 12

**[1.5](#_Toc686945082)** [肺病（过敏性哮喘）模型的制备](#_Toc686945082) 12

**[1.6](#_Toc686945083)** [肺功能观察方法](#_Toc686945083) 12

**[1.7](#_Toc686945084)** [肺部微生态检测方法](#_Toc686945084) 12

**[1.7.1](#_Toc686945085)** [培养基和转运液（稀释液）的制备](#_Toc686945085) 12

**[1.7.2](#_Toc686945086)** [菌群的培养、计数和种类鉴别方法](#_Toc686945086) 13

**[1.7.3](#_Toc686945087)** [统计分析方法](#_Toc686945087) 13

**[1.8](#_Toc686945088)** [血常规检测方法](#_Toc686945088) 13

**[1.9](#_Toc686945089)** [血清](#_Toc686945089)**[TNF-](#_Toc686945089)**[α、](#_Toc686945089)**[IL-1](#_Toc686945089)**[检测方法](#_Toc686945089) 13

**[1.10](#_Toc686945090)** [肺组织病理学改变观察方法](#_Toc686945090) 13

**[1.11](#_Toc686945091)** [肺组织](#_Toc686945091)**[CCK8](#_Toc686945091)**[、](#_Toc686945091)**[CGRP](#_Toc686945091)**[、](#_Toc686945091)**[SP](#_Toc686945091)**[、](#_Toc686945091)**[VIP](#_Toc686945091)**[含量变化检测方法](#_Toc686945091) 14

**[1.12](#_Toc686945092)** [肺组织超微结构观察方法](#_Toc686945092) 14

**[1.13](#_Toc686945093)** [数据分析与统计方法](#_Toc686945093) 14

**[2](#_Toc686945094)** [结果](#_Toc686945094) 14

**[2.1](#_Toc686945095)** [肺功能观察结果](#_Toc686945095) 14

**[2.2](#_Toc686945096)** [肺部微生态检测结果](#_Toc686945096) 15

**[2.3](#_Toc686945097)** [血常规检测结果](#_Toc686945097) 16

**[2.4](#_Toc686945098)** [血清](#_Toc686945098)**[TNF-](#_Toc686945098)**[α、](#_Toc686945098)**[IL-1](#_Toc686945098)**[含量变化结果](#_Toc686945098) 17

**[2.5](#_Toc686945099)** [肺组织病理形态改变光镜观察结果](#_Toc686945099) 17

**[2.6](#_Toc686945100)** [肺组织](#_Toc686945100)**[CCK8](#_Toc686945100)**[、](#_Toc686945100)**[CGRP](#_Toc686945100)**[、](#_Toc686945100)**[SP](#_Toc686945100)**[、](#_Toc686945100)**[VIP](#_Toc686945100)**[含量变化结果](#_Toc686945100) 17

**[2.6.1](#_Toc686945101)** [肺组织](#_Toc686945101)**[CCK8](#_Toc686945101)**[含量变化结果](#_Toc686945101) 18

**[2.6.2](#_Toc686945102)** [肺组织](#_Toc686945102)**[CGRP](#_Toc686945102)**[含量变化结果](#_Toc686945102) 18

**[2.6.3](#_Toc686945103)** [肺组织](#_Toc686945103)**[VIP](#_Toc686945103)**[含量变化结果](#_Toc686945103) 19

**[2.6.4](#_Toc686945104)** [肺组织](#_Toc686945104)**[SP](#_Toc686945104)**[含量变化结果](#_Toc686945104) 19

**[2.7](#_Toc686945105)** [肺组织病理形态改变电镜观察结果](#_Toc686945105) 20

**[3](#_Toc686945106)** [讨论](#_Toc686945106) 20

**[3.1](#_Toc686945107)** [关于模型实验动物的选择](#_Toc686945107) 20

**[3.2](#_Toc686945108)** [关于模型实验药物的选择](#_Toc686945108) 20

**[3.3](#_Toc686945109)** [关于模型药物注射部位及雾化时长的探讨](#_Toc686945109) 20

[（1）王勇生等](#_Toc686945110)[[](#_Toc686945110)[13](#_Toc686945110)[]](#_Toc686945110)[将模型组大鼠用OVA1mg，氢氧化铝200μg，溶于生理盐水1m1配成的抗原混悬液第0天和第7天腹腔内注射)致敏。第14天起，置于密闭玻璃容器内，超声雾化吸入1％OVA，每2天一次，每次30min，共雾化](#_Toc686945110) 20

[2 周；](#_Toc686945111) 20

[第二部分 "肺病及肠"的病理变化及微生](#_Toc686945112) 21

**[1](#_Toc686945113)** [材料与方法](#_Toc686945113) 21

**[1.1](#_Toc686945114)** [实验动物](#_Toc686945114) 21

**[1.2](#_Toc686945115)** [药物与试剂](#_Toc686945115) 21

**[1.3](#_Toc686945116)** [实验仪器及设备](#_Toc686945116) 21

**[1.4](#_Toc686945117)** [实验用品](#_Toc686945117) 22

**[1.5](#_Toc686945118)** [肺病（过敏性哮喘）模型的制备](#_Toc686945118) 22

**[1.6](#_Toc686945119)** [肺功能观察方法](#_Toc686945119) 22

**[1.7](#_Toc686945120)** [粪便质地性状、粪便干湿重观察方法](#_Toc686945120) 22

**[1.8](#_Toc686945121)** [胃肠功能检测方法](#_Toc686945121) 22

**[1.8.1](#_Toc686945122)** [胃排空试验方法](#_Toc686945122) 22

**[1.8.2](#_Toc686945123)** [肠推进试验方法](#_Toc686945123) 22

**[1.9](#_Toc686945124)** [肺肠微生态检测方法](#_Toc686945124) 22

**[1.9.1](#_Toc686945125)** [肺部微生态收集标本方法](#_Toc686945125) 22

**[1.9.2](#_Toc686945126)** [肠道微生态收集标本方法](#_Toc686945126) 22

**[1.10](#_Toc686945127)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织病理形态普通光镜观察方法](#_Toc686945127) 23

**[1.11](#_Toc686945128)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945128) 23

**[1.12](#_Toc686945129)** [肺、结肠病理形态电镜观察方法](#_Toc686945129) 23

**[1.12](#_Toc686945130)** [数据分析与统计方法](#_Toc686945130) 23

**[2](#_Toc686945131)** [结果](#_Toc686945131) 23

**[2.1](#_Toc686945132)** [肺功能检测结果](#_Toc686945132) 23

**[2.2](#_Toc686945133)** [粪便性状、质地、干湿重观察结果](#_Toc686945133) 23

**[2.3](#_Toc686945134)** [胃排空与肠推进试验结果](#_Toc686945134) 24

**[2.3.1](#_Toc686945135)** [胃排空试验结果](#_Toc686945135) 24

**[2.3.2](#_Toc686945136)** [肠推进实验结果](#_Toc686945136) 24

**[2.4](#_Toc686945137)** [肺、肠微生态学检测结果](#_Toc686945137) 25

**[2.4.1](#_Toc686945138)** [肺部微生态检测结果](#_Toc686945138) 25

**[2.4.2](#_Toc686945139)** [肠道微生态检测结果](#_Toc686945139) 25

**[2.5](#_Toc686945140)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃病理形态改变光镜观察结果](#_Toc686945140) 27

**[2.6](#_Toc686945141)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945141) 27

**[2.6.1](#_Toc686945142)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945142)**[SP](#_Toc686945142)**[含量变化结果](#_Toc686945142) 27

**[2.6.2](#_Toc686945143)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945143)**[VIP](#_Toc686945143)**[含量变化结果](#_Toc686945143) 29

**[2.7](#_Toc686945144)** [肺、结肠病理形态改变电镜观察结果](#_Toc686945144) 32

**[2.7.1](#_Toc686945145)** [肺组织电镜观察结果](#_Toc686945145) 32

**[2.7.2](#_Toc686945146)** [结肠组织电镜观察结果](#_Toc686945146) 32

**[3](#_Toc686945147)** [讨论](#_Toc686945147) 32

**[3.1](#_Toc686945148)** [关于“肺病及肠”相关病理变化的探讨](#_Toc686945148) 32

**[3.1.1](#_Toc686945149)** [关于中医对于“肺”的认识](#_Toc686945149) 32

**[3.1.2](#_Toc686945150)** [中医文献对“大肠”解剖定位的比较](#_Toc686945150) 32

**[3.1.3](#_Toc686945151)** [中医对“肺病及肠”的认识](#_Toc686945151) 32

**[3.1.4](#_Toc686945152)** [关于肺病影响及哪一脏腑的探讨](#_Toc686945152) 33

**[3.1.5](#_Toc686945153)** [关于“肺病及肠”理论中的“大肠”部位的探讨](#_Toc686945153) 33

**[3.1.6](#_Toc686945154)** [关于结肠特异性的探讨](#_Toc686945154) 33

**[3.2](#_Toc686945155)** [关于微生态与“肺”及“大肠”关系的探讨](#_Toc686945155) 33

**[3.2.1](#_Toc686945156)** [关于人体微生态的探讨](#_Toc686945156) 33

**[3.2.2](#_Toc686945157)** [关于“肺病及肠”的微生态研究结果探讨](#_Toc686945157) 33

[第三部分 "肺病及肠"的相关调控物质和](#_Toc686945158) 34

**[1](#_Toc686945159)** [材料与方法](#_Toc686945159) 34

**[1.1](#_Toc686945160)** [实验动物](#_Toc686945160) 34

**[1.2](#_Toc686945161)** [药物与试剂](#_Toc686945161) 34

**[1.3](#_Toc686945162)** [实验仪器与器材](#_Toc686945162) 34

**[1.4](#_Toc686945163)** [肺病（过敏性哮喘）模型的制备](#_Toc686945163) 34

**[1.5](#_Toc686945164)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织](#_Toc686945164)**[CCK8](#_Toc686945164)**[、](#_Toc686945164) 34

**[1.6](#_Toc686945165)** [血清TNF-α、](#_Toc686945165)**[IL-1ELISA](#_Toc686945165)**[检测方法](#_Toc686945165) 35

**[1.7](#_Toc686945166)** [肺、结肠肠组织](#_Toc686945166)**[iNOSmRNA](#_Toc686945166)**[和](#_Toc686945166)**[ERK mRNA](#_Toc686945166)**[表达检测方法](#_Toc686945166) 35

**[1.7.1](#_Toc686945167)****[RT-PCR](#_Toc686945167)**[法检测肺和结肠组织中](#_Toc686945167)**[iNOS](#_Toc686945167)**[和](#_Toc686945167)**[ERK mRNA](#_Toc686945167)**[表达：](#_Toc686945167) 35

**[1.7.2](#_Toc686945168)****[PCR](#_Toc686945168)**[实验结果分析方法](#_Toc686945168) 36

**[1.8](#_Toc686945169)** [数据分析与统计方法](#_Toc686945169) 36

**[2](#_Toc686945170)** [结果](#_Toc686945170) 36

**[2.1](#_Toc686945171)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945171)**[CCK8](#_Toc686945171)** 36

**[2.2](#_Toc686945172)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945172)**[CGRP](#_Toc686945172)** 37

**[2.3](#_Toc686945173)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945173)**[SP](#_Toc686945173)** 39

**[2.4](#_Toc686945174)** [肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中](#_Toc686945174) 41

**[2.5](#_Toc686945175)** [血清](#_Toc686945175)**[TNF-](#_Toc686945175)**[α、](#_Toc686945175)**[IL-1](#_Toc686945175)**[含量检测结果](#_Toc686945175) 44

**[2.6](#_Toc686945176)** [肺和结肠组织中](#_Toc686945176)**[iNOS-mRNA](#_Toc686945176)**[表达结果](#_Toc686945176) 44

**[2.7](#_Toc686945177)** [肺和结肠组织](#_Toc686945177)**[ERK-mRNA](#_Toc686945177)**[表达结果](#_Toc686945177) 45

**[3](#_Toc686945178)** [讨论](#_Toc686945178) 45

**[3.1](#_Toc686945179)** [关于“肺病及肠”相关调控物质的探讨](#_Toc686945179) 45

**[3.1.1](#_Toc686945180)** [关于](#_Toc686945180)**[P](#_Toc686945180)**[物质与“肺”、“大肠”的关系](#_Toc686945180) 45

**[3.1.2](#_Toc686945181)** [关于血管活性肠肽与“肺”、“大肠”的关系](#_Toc686945181) 45

**[3.1.3](#_Toc686945182)** [关于胆囊收缩素八肽与“肺”、“大肠”的关系](#_Toc686945182) 46

**[3.1.4](#_Toc686945183)** [关于降钙素相关基因肽与“肺”、“大肠”的关系](#_Toc686945183) 46

**[3.1.5](#_Toc686945184)** [关于肿瘤坏死因子-α、白细胞介素](#_Toc686945184)**[- l](#_Toc686945184)**[与“肺”、“大肠”的关系](#_Toc686945184) 46

**[3.1.6](#_Toc686945185)** [关于一氧化氮合酶与“肺”、“大肠”的关系](#_Toc686945185) 47

**[3.2](#_Toc686945186)** [关于](#_Toc686945186)**[ERK](#_Toc686945186)**[信号通路与“肺”、“大肠”的关系](#_Toc686945186) 47

[结](#_Toc686945187)[论](#_Toc686945187) 47

[1.关于](#_Toc686945188)**[ERK1/2](#_Toc686945188)**[和](#_Toc686945188)**[P-ERK1/2](#_Toc686945188)**[检测方法的问题：](#_Toc686945188) 47

**[2](#_Toc686945189)**[.关于肺病模型的问题](#_Toc686945189) 47

**[3](#_Toc686945190)**[.关于本实验的后续研究问题](#_Toc686945190) 47

[参考文献](#_Toc686945191) 47

[附 录](#_Toc686945192) 52

[参考文献](#_Toc686945193) 60

表格目录

表 **5** 各组大鼠肺组织中 **C** 18

表 **6** 各组大 18

表**8** 各组大鼠肺组织中**SP** 含 19

表**13** 大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织**SP**含量变化（IOD，*x*±s） 27

表**14** 大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织**VIP**含量变化（IOD，*x*±s） 30

表**15** 大 36

表**16** 大鼠肺和十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃**CGRP**含量变化（IOD，*x*±s） 37

表**13** 大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织**SP**含量变化（IOD，*x*±s） 39

表**14** 大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织**VIP**含量变化（IOD，*x*±s） 42

### [2.1 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中CCK8含量变化结果](#_bookmark92)

[..................................................................................................................................60](#_bookmark92)

### [2.2 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中CGRP含量变化结果](#_bookmark93)

[..................................................................................................................................62](#_bookmark93)

### [2.3 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中SP含量变化结果.64](#_bookmark94)

### [2.4 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中VIP含量变化结果](#_bookmark95)

[附录90](#_bookmark114)

[1附图90](#_bookmark115)

[2综述102](#_bookmark116)

# 英文缩略词对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
| AHR | Ana Hurka-Robles | 气道高反应性 |
| ALB | Serum albumin | 血清白蛋白 |
| ARDS | Acute respiratory distresssyndrome | 急性呼吸窘迫综合征 |
| BALF | Bronchoalveolar lavage fluid | 支气管肺泡灌洗液 |
| CCK8 | Cholecystokinin-8 | 胆囊收缩素八肽 |
| cDNA | Complementary DNA | 全长互补脱氧核糖核酸 |
| CFU | Colony-forming unit | 菌落形成单位 |
| CGRP | Calcitonin gene related peptide | 降钙素相关基因肽 |
| CO | carbon monoxide | 一氧化碳 |
| COPD | Chronic obstructive pulmonary diseases | 慢性阻塞性肺病 |
| DAB | [diaminobenzidine](http://suoxie.911cha.com/OHd1.html) | 增敏二氨基联苯胺 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 二乙基焦磷酰胺 |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附试验 |
| EM | Electron Microscope | 电镜 |
| EOS | eosinophil | 嗜酸性粒细胞 |
| EP | Epoxy epoxide | 环氧树脂 |
| ERK | Extracellular regulatedprotein kinases | 细胞外调节蛋白激酶 |
| Fecl3 | F e r r i c t r i c h l o r i d e | 氯化铁 |
| GSH-PX | Glutathione peroxidase | 谷胱甘肽过氧化物酶 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| HE | Hematoxylin-eosin staining | 苏木精-伊红 |
| IBD | Inflammatory Bowel Disease | 炎症性肠病 |
| IBS | Irritable Bowel Syndrome | 肠易激综合征 |
| IgA | Immunoglobulin A | 免疫球蛋白 A |
| IgE | Immunoglobulin E | 免疫球蛋白 E |
| IgG | Immunoglobulin G | 免疫球蛋白 G |
| IgM | Immunoglobulin M | 免疫球蛋白 M |
| IL-1 | Interleukin-1 | 白细胞介素-1 |
| IL-4 | Interleukin-4 | 白细胞介素-4 |
| Ly-cl | Lymphocyte chemiluminescence | 淋巴细胞化学发光 |
| IOD | Integrated option density | 累积积分光密度 |
| iNOS | Inducible nitric oxide synthase | 诱导型一氧化氮合酶 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase | 丝裂原活化蛋白激酶 |
| MC | mast cell | 肥大细胞 |
| MDA | Malondialdehyde | 丙二醛 |
| min | minute | 分钟 |
| mRNA | Messenger RNA | 信使核糖核酸 |
| NO | Nitrogen monoxide | 一氧化氮 |
| OVA | ovalbumin | 鸡卵白蛋白 |
| PAB | p-aminobenzoic acid | 对氨基苯甲酸 |
| PAB | Prealbumin | 前白蛋白 |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell | 外周血单核细胞 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PBS | Public Broadcasting Service | 磷酸缓冲液 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | 聚合酶链式反应 |
| PMN-cl | Polymorphonuclear leukocyte lymphocyte | 外周血嗜中性白细胞化学发光 |
| PMN | Polymorphonuclear leukocyte | 多形核白细胞 |
| RT-PCR | Reverse trascription PCR | 逆转录聚合酶链式反应 |
| SARS | Severe Acute Respiratory Syndromes | 严重急性呼吸综合症 |
| SOD | Superoxide Dismutase | 超氧化物歧化酶 |
| SP | streptavidin-perosidase | 链霉菌亲和素-过氧化物酶 |
| SP | Substance P | P 物质 |
| TNF-α | Tumor necrosis factor-alpha | 肿瘤坏死因子-α |
| TRF | transferrin | 转铁蛋白 |
| TXB2 | Thromboxane B2 | 血栓素 B2 |
| VIP | Vasoactine intrestinal peptide | 血管活性肠肽 |
| 6-keto-P  GF1 | 6-Ketoprostaglandin PGF1 | 6-酮前列腺 PGF1 |

前**言**

《内经》首次提出“肺与大肠相表里”理论，如《内经・灵枢・本输》中曰

“肺合大肠”，这里所说的“肺合大肠”，即“肺与大肠相表里”，这是因为《内经》认为肺与大肠之间通过经络密切联系，经云：“肺手太阴之脉，起于中焦，下络大肠，还循胃口，上膈属肺。”“大肠手阳明之脉……下入缺盆，络肺，下膈属大肠。”[《黄帝内经](http://baike.baidu.com/view/746.htm)・[素问](http://baike.baidu.com/view/676086.htm)》第八篇曰：“肺者，相傅之官，治节出焉；大肠者，传导之官，变化出焉。”这就是说，肺主气，气调则脏腑诸官听其节制，尤其是肺对大肠的调节与制约；而大肠主传导糟粕，大肠的畅通与否必然会影响肺气之宣降。“肺合大肠”是六组相合脏腑关系中的一组，是中医藏象理论中的重要内容，具有宏观性和整体性的特征。自“肺合大肠”理论在《内经》中确立以来，备受历代医家重视，综观《黄帝内经》至近代医家的多种论述，不论是经络学说还是脏腑学说，对于肺与大肠表里关系均有不同程度的认识。随着免疫学、分子生物学和细胞生物学的发展，人们对“肺与大肠相表里”的中医理论认识也日趋深入，在动物实验、临床运用中均进行了研究，取得了一定的成就，但是综观目前的基础实验研究，虽然在形态结构特征、生物物理、化学特征以及效应特异性机制等方面取得了一定的进展，但是研究不系统、深入，无突破性成果。因此，以“肺和大肠相表里”理论为切入点，研究其生物学机制，具有十分重要的意义。

鉴此，我们在对“肺与大肠表里关系的生物学机制研究”相关文献梳理和评价的基础上，提出“肺”与“大肠”在生理上相互影响和病理上相互传变的认识，应当具有一定的生物学基础。即：“肺”与“大肠”在病理上改变进程中，具有“神经－内分泌－免疫”调控网络中的共同的物质基础以及相关信号通路，在一定的条件下产生互为因果的作用机制，从而形成独特的“肺病治肠”、“肠病治肺”和“肺肠同治”效应机制。

本研究试图揭示“肺病及肠”病理变化及相关调控物质和ERK信号通路。研究内容包括3部分：1.大鼠肺病（过敏性哮喘）模型的建立和评价。2。“肺病

及肠“的病理变化及微生态学研究；3.”肺病及肠“的相关调控物质和ERK信号通路研究。

# 第一部分 大鼠肺病（过敏性哮喘）模型的建立和评价

《灵枢・本输篇》曰：“肺合大肠”，即“肺与大肠相表里”。这是中医藏象学说的重要组成部分，在中医理论体系中有其特殊的意义。阴经属脏络腑，阳经属腑络脏，构成了经脉一阴一阳，脏和腑互相属络的表里相关联系，历代和临床十分重视表里经在治疗中的运用。手太阴肺经属肺络大肠，手阳明经属大肠络肺，两经又通过各自的络脉相互联系。这样手太阴肺经和手阳明大肠经构成表里经关系，肺与大肠构成表里脏腑，从而在功能上相互联系，相互作用。肺脏的病理改变可影响到大肠，反之，大肠的病理改变也可影响到肺脏，由于“肺与大肠相表里”理论中“肺”与“大肠”生理病理上的密切联系，为了更深层次的研究二者之间相互影响的机制，本实验复制肺病（过敏性哮喘）模型，通过对模型动物肺功能；肺部微生态；血常规；血清中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-1

（IL-1）含量；肺组织病理形态以及肺组织胆囊收缩素八肽（CCK8）、降钙素相关基因肽（CGRP）、P物质（SP）、血管活性肠肽（VIP）含量的观察，对动物模型进行评价，在此基础上，进一步开展“肺病及肠”的实验研究。

## **1** 实验材料和方法

### **1.1** 实验动物

健康SPF级Wistar大鼠40只，雄性，体重180g±20g。购自成都达硕生物科技有限公司，动物合格证号：scxk(m) 2008-15。标准饲料喂养。

### **1.2** 药物及试剂

1％卵白蛋白（OVA）：sigma公司；

氢氧化铝：成都市科龙化工试剂厂，批号：20080807；

生理盐水：四川科伦药业股份有限公司，批号：H51021158；

CCK8、CGRP、SP、VIP免疫组化试剂盒：北京博奥森生物技术有限公司，货号：bs0764r，bs0077r；

兔SPKit免疫组化试剂盒：北京中衫金桥生物技术有限公司，货号：SP9001；

DAB显色试剂盒：北京中衫金桥生物技术有限公司，货号：ZLI9032；

TNF-α、IL-1ELISA 检测试剂盒：上海森雄科技实业有限公司，货号：

bs0022;

水合氯醛：青岛宇龙海藻有限公司，批号：国药准字H37022673

### **1.3** 实验仪器及设备

称重天平：ACS-3C型，广州中ft市新和基科技开发有限公司生产；超声雾化器：WH-203型，广州粤华医疗器械有限公司；

光学显微镜：Olympus BHS型显微镜，日本制造；电子显微镜：日立HT-600IV型，日本电子公司；石蜡切片机：2016型，德国Leica；

生物机能实验系统：BL-420F型，成都泰盟科技有限公司；高速离心机：LG10-24A，上海医用离心机厂；

酶标仪：MK3型，芬兰；

厌氧培养箱：DY-II 型，浙江义乌冷冻机厂；隔水式需氧培养箱：SA-25型，大连制造六厂。

### **1.4** 实验用品

一次性注射器（5ml、10ml）；一次性PE手套；

一次性乳胶手套；手术剪；

镊子；

有盖塑料离心管（10ml、5ml）；手术盘。

### **1.5** 肺病（过敏性哮喘）模型的制备

将20只大鼠购回后随机分为2组：空白组，10只、肺病组，10只。适应性饲养1周后进行肺病（过敏性哮喘）模型的制备。

肺病（过敏性哮喘）模型的制备，将OVA1 mg和氢氧化铝200mg溶于生理盐水1ml中新鲜配制成凝胶致敏剂，第0天和第7天在大鼠双侧胸部、腹股沟共

4点各皮下注射0.15ml，同时腹腔注射0.4ml共计1mL进行致敏。第14天开始将模型组大鼠置于10×10×20 cm有机玻璃盒内，超声雾化吸入1％OVA诱发哮喘（以大鼠出现烦躁、打喷嚏、咳嗽、腹肌强烈收缩、呼吸急促等典型哮喘样发作为标准），每天一次，每次30 min，共计1w。

### **1.6** 肺功能观察方法

使用生物机能实验系统检测动物肺功能（呼吸频率、潮气量、每分通气量）。大鼠在最后一次雾化后24h以10%水合氯醛麻醉后仰卧位固定于手术板上，打开胸腔暴露气管，V型切口切开，将气管插管置入并固定，观察大鼠的呼吸频率、潮气量、每分钟通气量并予以记录。

### **1.7** 肺部微生态检测方法

动物在最后一次雾化后24h收集支气管肺泡灌洗液进行肺部微生态检测。支气管肺泡灌洗液收集方法：大鼠麻醉后，取仰卧位，固定架上固定，打开胸腔，暴露气管，V型切口切开，插管，用0.02% PBS灌洗肺脏5～6次，收集灌洗液，以1500r/min离心5min，取上清液4℃保存待测。

#### **1.7.1** 培养基和转运液（稀释液）的制备

##### **1.7.1.1** 厌氧培养基：厌氧菌总数培养与计数

配方：厌氧菌分离培养基51g，0.1％维生素K1 0.1ml，兔血50ml加蒸馏水至1000ml。

制备：取厌氧菌分离培养基，加蒸馏水溶解，微火煮沸溶解后加入0.1％维生素K1, 118℃30min灭菌，冷却至55℃左右时，再加入无菌脱纤维兔血，制成平板备用。

##### **1.7.1.2** 营养血平板（需氧菌总数）

配方：牛肉浸膏10g，蛋白胨10g, NaCl 5g，琼脂25g, pH值7.4，兔血50ml

（1000ml）

制备：称取所需剂量的培养基成分置于1000ml烧瓶中，加入250ml蒸馏水；在电炉上加热沸腾至琼脂完全融化，冷却，调pH值至7.4并密闭瓶口，高压灭菌后在40～50℃时与兔血充分混匀后，将培养基倾倒入培养皿中，制成需氧菌血平板18个，备用。

##### **1.7.1.3** 沙堡弱氏培养基（真菌）

配方：蛋白胨10g，葡萄糖40g，琼脂25g, 1000ml

制备：称取所需剂量培养基成分，置于1000ml烧瓶中，加入250ml蒸馏水；高压灭菌后在溶解状态下将培养基倾倒入培养基中，制成沙氏培养平板18个，备用。

##### **1.7.1.4** 稀释液

配方：KH2PO4 4.5g, Na2HPO4 6g，吐温0.5g，琼脂1g, 1000ml

制备：称取1/4处方量的组成成分，置于1000ml烧瓶中，加入蒸馏水100ml；后置电炉上加热沸腾至琼脂完全融化后，再用量筒量取蒸馏水150ml倒入其中，制成250ml稀释液。将稀释液分别准确量取4.5ml，装入试管中，高压灭菌后备用。另外，分别量取稀释液0.9ml装入高压灭菌的试管中，作收集动物样本用。

#### **1.7.2** 菌群的培养、计数和种类鉴别方法

##### **1.7.2.1** 标本的稀释

用稀释液将样本行10倍系列稀释成不同稀释度：10-2，10-3，10-4，10-5, 10-6

的细菌样本液备用。

##### **1.7.2.2** 标本的接种培养

移液器分别取0.1-0.2ml的已稀释10倍的稀释液滴入真菌培养皿中（沙堡弱氏培养基），用无菌的L-玻璃棒将其推平，使其均匀分布于培养基表面。

用移液器吸取不同稀释度的细菌样本液各20µl，分别滴种于培养皿上，每个稀释度作3个平行样，将已接种好的培养皿分别放入37℃需氧和厌氧培养箱中培养24-72小时。操作过程中需保证无交叉污染。

##### **1.7.2.3** 细菌菌落计数及种类鉴定

菌落计数：计数培养皿表面的菌落数并X稀释倍数，用每毫升唾液中的CFU

（菌落形成单位）的对数值（lg）表示。

种类鉴定：根据细菌形态学、菌落、菌细胞和菌落形态、染色性及生化实验鉴定特征，需氧菌和真菌的鉴定参考：《临床微生物学和微生物检验》[1]。厌氧菌鉴定参考：《Bergey′s manual of systematic bacteriology》[2]。

#### **1.7.3** 统计分析方法

采用PEMS 3.0（《中国医学百科全书・医学统计学》统计软件包）统计软件，用t检验分析不同组别的统计学差异。

### **1.8** 血常规检测方法

采集动物股动脉新鲜血液10ml左右，血常规分析仪检测。

### **1.9** 血清**TNF-**α、**IL-1**检测方法

动物在最后一次雾化后24h股动脉放血，用EP管收集外周血约2ml，常温下放置30分钟待其自然凝固后用3000～4000r/min的离心机离心15min，离心后用移液枪取上清液，酶标仪检测。

（1）建立标准曲线：设标准孔8孔，每孔中各加入样品稀释液100ul，第一孔加标准品100ul，混匀后用加样器吸出100ul，移至第二孔。如此反复作对倍稀释至第六孔，最后，从第六孔中吸出100ul弃去。第七孔为空白对照，第八孔为零孔；

（2）加样：待测品孔每孔各加入待测样品100ul混匀；

（3）将反应板充分混匀后粘上封板纸置37℃20分钟；

（4）洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次，向滤纸上印干；

（5）每孔（除零孔）加第一抗体工作液50ul，置37℃60分钟；

（6）洗板：同前；

（7）每孔（除零孔）加酶标抗体工作液100ul（两滴），将反应板置37℃60

分钟；

（8）洗板：同前；

（9）每孔加入底物液A、B各一滴，置37℃避光反应15分钟；

（10）每孔加入1滴终止液混匀；

（11）在450nm处测吸光值；结果计算与判断：

（12）所有OD值都应减除零孔值后再行计算；

（13）以标准品500、250、125、62.5、31.3、15.6、0 pg/ml之OD值在双对数纸上作图，画出标准曲线。通过标本的OD值可以在标准曲线上查出其浓度。

### **1.10** 肺组织病理学改变观察方法

制片：动物在最后一次雾化后24h 用颈椎脱臼法处死后，取右肺中下叶用

10%甲醛溶液固定，常规酒精梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，制成厚度为4μm

的切片。

HE染色：石蜡切片二甲苯I脱蜡10-15min，二甲苯II脱蜡10-15min，无水乙醇5min，95%乙醇5min，80%乙醇5min，自来水冲洗lmin，蒸馏水洗lmin，苏木素染液5-15min，自来水冲洗1-5min，分化液分化数秒至数min，自来水冲洗1-3 min，返蓝液返蓝30s-lmin，自来水冲洗10-15min，蒸馏水洗10-30s，伊红液5-10 min，自来水冲洗1-2min，80%乙醇脱水30s，95%乙醇I脱水lmin，

95%乙醇II脱水1-3min，无水乙醇I脱水2-5min，无水乙醇II脱水2-5min，二甲苯I透明2-5min，二甲苯II透明2-5min，中性树胶封固。

阅片：OLYMPUS BX60光学显微镜下进观察，照相采用OLYMPUS DP70

彩色图文系统。

### **1.11** 肺组织**CCK8**、**CGRP**、**SP**、**VIP**含量变化检测方法

动物在最后一次雾化后24h用颈椎脱臼法处死，取右肺中下叶组织，10%的甲醛溶液固定，免疫组化法检测，免疫组化检测方法用SP法染色，各指标按相关试剂盒说明书步骤进行，操作程序如下：

（1）载玻片防脱片剂处理：可选择APES，捞片后置烤箱60℃60分钟，以使切片紧密粘附。

（2）切片常规脱蜡至水。

（3）30％H2O2 1份加蒸馏水10份混合，室温10分钟以灭活内源性酶，蒸

馏水洗3次。

（4）热修复抗原：将切片侵入0.01M枸橼酸盐缓冲液（PH 6.0），微波炉中高火加热至沸腾后断电，间隔10分钟后，反复1次，冷却后PBS (PH7.2-7.6)洗涤1次。

（5）滴加5％BSA封闭液，室温20分钟，甩去多余液体，不洗。

（6）滴加适当稀释的Ⅰ抗（兔）IgG，4℃过夜，PBS（PH 7.2-7.6）洗2分钟×3次，稀释度为1: 100。

（7）滴加生物素化ft羊抗兔IgG，稀释度1: 200，37℃30分钟，PBS (PH 7.2-7.6) 洗2分钟×3次。

（8）滴加试剂HRP/A-V，37℃30分钟，稀释度1: 200，PBS (PH 7.2-7.6)

洗5分钟×4次。

（9）DAB显色：使用DAB显色试剂盒，取1ml蒸馏水，加试剂盒中A、

B、C试剂各1滴，混匀后加至切片。室温显色，镜下控制反映时间，5分钟左右，蒸馏水洗涤。

（10）苏木素轻度复染，脱水，透明，封片，显微镜观察。

结果判定免疫组化染色结果以细胞浆或膜上出现棕黄色为阳性，阴性细胞核为兰色，均作半定量分析。

图象分析各组大鼠组织染色后的切片在OLYMPUS BX60光学显微镜和OLYMPUS DP70型彩色图文系统下用20或40倍物镜选取5个不同的视野进行拍照，用计算机图象分析软件（IMAGE-PRO PLUS 6.0）对拍好的照片进行半定量分析。测定其累积积分光密度（Integrated option density, IOD），对每张切片

的5个IOD求平均值进行统计分析，求平均值，代表免疫阳性反应物的含量。

### **1.12** 肺组织超微结构观察方法

动物在最后一次雾化后24h用颈椎脱臼法处死后，立即开腹取出右肺中下组织，放入3%戊二醛的固定液中预固定，1%四氧化锇再固定，丙酮逐级脱水，

Epon812包埋，半薄切片光学定位，超薄切片，醋酸铀及枸橼酸铅双重染色，日立H-600IV型透射电镜观察。

### **1.13** 数据分析与统计方法

实验数据以（*x*±s）形式表示，采用SPSS16.0统计软件包进行分析，计量资料行组间配对t检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** 肺功能观察结果

肺功能观察结果发现，肺病组大鼠除出现不同程度的烦躁、咳嗽、打喷嚏等表现外，还出现呼吸频率明显增快，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01）（见表1，图1），潮气量、每分钟通气量明显降低，与空白组比较有显著性差异

（*P*<0.01）（见表1，图2、3）。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 1** **各组大** | **鼠呼吸频** | **率、每分钟通气量、潮** | **气量测定结果比较(** | *x* | **±s)** |
| 组别 | n | 呼吸频率 | 每分钟通气量 |  | 潮气量 |
| 空白组 | 10 | 105.2±7.93 | 7.36±1.55 |  | 0.988±0.19 |
| 肺病组 | 10 | 127.5±13.3△△ | 5.51±0.81△△ |  | 0.662±0.10△△ |

注：与空白组比较，△△*P* <0.01

呼吸频率

呼吸频率

150

100

50

0

空白组

肺病组

**图 1** **各组大鼠呼吸频率测定结果比较**

每分钟通气量

每分钟通气量

10

8

6

4

2

0

空白组

肺病组

**图2** **各组大鼠每分钟通气量测定结果比较**

潮气量

潮气量

2

1.5

1

0.5

0

空白组

肺病组

**图 3** **各组大鼠潮气量测定结果比较**

### **2.2** 肺部微生态检测结果

肺部微生态检测结果发现，肺病组大鼠的支气管肺泡灌洗液中需氧菌、真菌数量增多，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），而厌氧菌则减少，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），提示肺病组大鼠出现了菌群数量上的改变，（见表2，图4）。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **表2** **各组大** | **鼠肺部微** | **生态检测结果比较(** | *x* | **±s)** |  |
| 组别 | n | 需氧菌 |  | 厌氧菌 | 真菌 |
| 空白组 | 10 | 6.86±0.87 |  | 7.75±0.42 | 9.29±0.63 |
| 肺病组 | 10 | 10.85±1.94△△ |  | 6.74±0.45△△ | 11.69±0.94△△ |

注：与空白组比较△△*P* <0.01

空白组肺病组

14

12

10

8

6

4

2

0

需氧菌

厌氧菌

真菌

**图 4** **各组大鼠肺部微生态检测结果比较**

### **2.3** 血常规检测结果

血常规检测结果显示，肺病组大鼠血液中白细胞、中性粒细胞计数明显升高，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），淋巴细胞数和中间细胞计数胞数升高，与空白组比较有差异（*P*<0.05）（见表3，图5）。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 3 各组大** | **鼠血常规** | **检测各细胞计数结** | **果 (10∧9/L，** *x* **±s** | **)** |  |
| 组别 | n | 白细胞总数 | 淋巴细胞数 | 中性粒细胞 | 中间细胞数 |
| 空白组 | 10 | 9.44±3.75 | 5.55±0.97 | 3.86±1.31 | 1.24±0.28 |
| 肺病组 | 10 | 19.07 ± 4.10 △ | 6.62±1.14△ | 7.65±1.56△△ | 1.84±0.48△ |

注：与空白组比较，△*P*<0.05，△△*P*<0.01

空白组肺病组

12

10

8

6

4

2

0

-2

淋巴细胞数

中性粒细胞

中间细胞数

**图 5** **各组大鼠血常规检测各细胞计数比较**

### **2.4** 血清**TNF-**α、**IL-1**含量变化结果

ELISA法检测大鼠血清中TNF-α、IL-1含量，结果显示肺病组大鼠血清中TNF-α、IL-1含量明显增加，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），（见表4，图6）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 4** **各组大** | **鼠血清 TNF** | **-α、IL-1 含量变化结果(ng/ml，** | *x* | **±s)** |
| 组 别 | n | TNF-α |  | IL-1 |
| 空白组 | 10 | 7.60±0.99 |  | 10.99±0.75 |
| 肺病组 | 10 | 11.78±1.17△△ |  | 15.94±0.90△△ |

注：与空白组比较，△△*P* <0.01

空白组肺病组

20

15

10

5

0

TNF-α

IL-1

**图 6** **各组大鼠血清TNF-α、IL-1含量变化结果比较**

### **2.5** 肺组织病理形态改变光镜观察结果

造模前后大鼠肺组织光镜观察（HE染色×100）：

空白组：肺组织肺泡及间质无充血、出血及炎症细胞浸润（见附录1.1-附图1）；

肺病组：肺组织出现肺泡及间质充血、出血及少量炎症细胞浸润（见附录1.1-附图2）。

### **2.6** 肺组织**CCK8**、**CGRP**、**SP**、**VIP**含量变化结果

#### **2.6.1** 肺组织**CCK8**含量变化结果

空白组：肺组织肺泡壁、血管平滑肌内有大量的阳性颗粒，染色较深，呈强阳性（见附录1.3-附图19）；

肺病组：肺组织内阳性染色较浅，呈弱阳性（见附录1.3-附图20）；

经统计，肺病组大鼠肺组织中CCK8含量与空白组比较显著减少（*P*<0.01）

（见表5，图7）。

**表 5** **各组大鼠肺组织中 C**

**CK8含量变化**

结果（IOD, x±s）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | n | CCK8 积分光密度 |
| 空白组 | 10 | 103558.42±23911.36 |
| 肺病组 | 10 | 79961.44±12577.97△△ |

注：与空白组比较，△△*P*<0.01

CCK8积分光密度

CCK8积分光密度

150000

100000

50000

0

空白组

肺病组

**图 7** **各组大鼠肺组织中CCK8含量变化**

#### **2.6.2** 肺组织**CGRP**含量变化结果

与空白组相比，肺病模型大鼠肺组织CGRP的阳性表达明显增多，主要分布在肺内血管和肺泡壁，呈棕黄色颗粒（见附录1.3-附图33、34）；

经统计，肺病组大鼠肺组织中CGRP含量比空白组显著增多（*P*<0.01）（见表6，图8）。

**表 6** **各组大**

**鼠肺组织中CGRP**

含量变化结果（IOD, x±s）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组 别 | n | CGRP 积分光密度 |
| 空白组 | 10 | 24720.64±10040.42 |
| 肺病组 | 10 | 41950.10±12600.15△△ |

注：与空白组比较，△△*P*<0.01

CGRP积分光密度

CGRP积分光密度

60000

40000

20000

0

空白组

肺病组

**图 8** **各组大鼠肺组织中CGRP含量变化比较**

#### **2.6.3** 肺组织**VIP**含量变化结果

空白组：大鼠肺组织内有较多的VI P免疫反应阳性纤维分布纤维密集，染色深，呈条束状走行，主要分布于黏膜固有层、平滑肌层和黏膜下层（附录1.3-附图47）；

肺病组：大鼠肺组织内各级气道VI P免疫反应阳性纤维却明显缺乏，染色较浅（见附录1.3-附图48）；

经统计，肺病组大鼠肺组织VIP的含量比空白组显著降低（*P*<0.01）（见表

7，图9）。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **表 7 各组大鼠肺组** | **中 VIP 含量变化结** | **果**（IOD， *x* ±s） |
| 组 别 | n | VIP 积分光密度 |
| 空白组 | 10 | 39318.30±8817.29 |
| 肺病组 | 10 | 20711.43±7334.69△△ |

**织**

注：与空白组比较，△△*P*<0.01

VIP积分光密度

VIP积分光密度

60000

40000

20000

0

空白组

肺病组

**图 9** **各组大鼠肺组织中VIP含量变化比较**

#### **2.6.4** 肺组织**SP**含量变化结果

空白组大鼠肺组织中SP染色呈阴性反应（见附录1.3-附图61）；

肺病组：大鼠肺组织支气管壁和肺泡壁SP阳性染色增加明显（见附录1.3-

附图62）；

经统计，肺病组大鼠肺组织中SP的含量比空白组显著升高（*P*<0.01）（见表

8，图10）。

**表8** **各组大鼠肺组织中SP 含**

**量变化**（IOD，

x±s)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组 别 | n | SP 积分光密度 |
| 空白组 | 10 | 51350.98±15780.76 |
| 肺病组 | 10 | 88243.93±32177.29△△ |

注：与空白组比较，△*△P*<0.01

SP积分光密度

SP积分光密度

150000

100000

50000

0

空白组

肺病组

**图 10** **各组大鼠肺组织中SP含量变化比较**

### **2.7** 肺组织病理形态改变电镜观察结果

肺组织电镜观察结果显示：

空白组：大鼠肺组织肺泡腔内清晰；Ⅰ型肺泡上皮细胞结构完整；Ⅱ型肺泡上皮细胞胞膜完整，胞内细胞器（板层小体、线粒体、内质网）清晰可见，无肿胀；肺泡隔不宽（见附录1.2-附图15）；

肺病组：大鼠肺组织肺泡结构破坏，肺泡腔狭窄；I型肺泡上皮细胞结构不清；Ⅱ型肺泡上皮细胞体积增大、胞膜不完整，胞内线粒体有肿胀、嵴清淡，内质网扩张；肺泡隔增宽（见附录1.2-附图16）。

## **3** 讨论

### **3.1** 关于模型实验动物的选择

建立肺病（过敏性哮喘）动物模型时，可用动物种类较多，但都有不足之处

[3]. 哮喘病因复杂，动物模型种类繁多，使用哮喘动物模型进行实验时，应根据

实验目的选择相应模型，使其尽量接近人类疾病。在以前人们曾经BALB／C小鼠进行研究，但由于其体积小，操作不便，气道狭小，雾化给药产生的雾滴易造成非哮喘性的气道阻力增高。豚鼠也是制备哮喘模型常用的实验动物，但与大鼠相比，大鼠哮喘模型有许多特点与人类哮喘相似，包括过敏反应由IgE介导，特

别适合于特异性抗原抗体反应的研究，激发后常常呈现速发性与迟发性双相反应迟发反应出现时间与哮喘患者出现迟发性反应时间接近。产生的气道高反应性持续时间长（可持续几天）等[4]。所以目前国内外使用大鼠作为模型越来越多，大鼠品系纯，繁殖力强，价廉易得，且易于获得哮喘分子生物学研究所需相关材料，故我们本次实验选择使用国内常用的Wistar大鼠。

### **3.2** 关于模型实验药物的选择

过敏性支气管哮喘主要由吸入变应原引起，故该模型的制备多采用变应原结合免疫佐剂系统致敏后，再经气道给予同一变应原诱发哮喘的发生。导致过敏性支气管哮喘的变应原主要有尘螨、豚草花粉、动物皮屑、蟑螂、真菌孢子、蛔虫卵等，卵白蛋白由鸡蛋中提取，属异种蛋白，有很强的免疫源性，且来源容易，价格低廉，最常应用于制备哮喘模型。

佐剂具有在局部产生炎症反应，使抗原递呈细胞充分激活，表达高水平协同刺激因子，有效产生免疫应答，防止脱敏现象的作用，并且铝制剂作为免疫佐剂易导致机体IgE产生，故同时加用氢氧化铝凝胶作为免疫佐剂。使用卵蛋白和氢氧化铝凝胶用于系统致敏和激发时，所用剂量和方法目前国内外差异较大[5- 12]，可能与所用动物种系，大小，具体致敏和激发部位，以及OVA质量有关。有资料表明，随着OVA量使用过大，则被致敏动物气道高反应性（AHR）及EOS浸润特性有减轻现象[7]。

所以我们这次实验选用的实验造模药物为OVA1mg和200mg氢氧化铝凝胶溶于1ml生理盐水的凝胶致敏剂进行致敏。

### **3.3** 关于模型药物注射部位及雾化时长的探讨

目前关于过敏性哮喘模型造模药物注射部位及雾化时长的方法主要有以下几种：

## （1）王勇生等[13]将模型组大鼠用OVA1mg，氢氧化铝200μg，溶于生理盐水1m1配成的抗原混悬液第0天和第7天腹腔内注射)致敏。第14天起，置于密闭玻璃容器内，超声雾化吸入1％OVA，每2天一次，每次30min，共雾化

## 2 周；

（2）迟磊等[6]采用模型组分别于第1天、第8天用新鲜配制的OVAlmg+氢氧化铝200mg+生理盐水lml混悬液在大鼠两腹股沟、腹、前足跖，共4点做皮下注射，每点0.2ml、同时腹腔注射0.2ml。正常对照组以生理盐水代替0VA致敏。于实验第15天，将大鼠置于20cm×20cm×15cm大小的密闭容器中，由PARI

BOY高频雾化( CE, Germany)提供雾化动力，以1% 0VA( GradeⅡ)进行雾化吸入激发，每次雾化30 min，连续6 d；

（3）崔龙苹等[14]将模型组大鼠一次性腹腔注射含卵蛋白1mg 和氢氧化铝

10mg的生理盐水1m1, 2周后颈外静脉内注射卵蛋白生理盐水溶液（15 mg／k g

体重），激发哮喘发作；

（4）杜丽娟[15]等分别于第1天和第11天分五处注射第1天和第11天用生理盐水l ml、卵蛋白( OVA) 3.0 mg、氢氧化铝100 mg配置成的致敏剂，采用5点皮下注射法，即两上肢内侧各注射0.1 ml ，两下肢内侧0.2 ml，腹腔注射

0.4 ml致敏，每天一次，共两天。第14天开始将动物放入自制的密闭有机玻璃箱中(30cm×25 cm×20cm)，用1％OVA超声雾化吸入15 min诱发哮喘（以大鼠出现烦躁、打喷嚏、咳嗽、腹肌强烈收缩、呼吸急促等典型哮喘样发作为标准），以后每天1次，共3次；

（5）黄英等[12]将OVA1mg和氢氧化铝200mg溶于生理盐水1ml新鲜配制成凝胶，第1天在大鼠双侧胸部、腹股沟共4点各皮下注射0.15 ml，同时腹腔注射0.4 ml共计1ml进行致敏。对照组用20％氢氧化铝凝胶同法注射。第8天两组再以相同剂量重复致敏。第15天开始将大鼠置于10cm×10cm×20cm有机玻璃盒内，超声雾化吸入1％OVA共20min，持续7天。

在这些造模方法中，注射部位各异，有采用单纯腹腔注射的，有采用两上肢内侧各注射0.1ml，两下肢内侧0.2 ml，腹腔注射0.4 ml共5点注射，有采用颈外静脉内注射的。在雾化时间上有每2天一次，每次30mi n，共雾化2周的，也有每天雾化30 min，连续6 d的，还有每天雾化20min，持续7天的等等，

对于此模型的文献研究，我们进行了反复的比较和筛选，在第一次预实验中选用第0天和第7天腹腔注射OVA1m g和200mg氢氧化铝凝胶溶于1ml生理盐水的凝胶致敏剂致敏，之后将实验大鼠置于10cm×10cm×20cm有机玻璃箱中吸入1%OVA激发哮喘，每次20min，隔日一次，共3周的方法。在第二次的预

实验中我们采用多点注射即在大鼠双侧胸部、腹股沟共4点各皮下注射0.15ml，同时腹腔注射0.4ml共计1ml，之后将实验大鼠10cm×10cm×20cm有机玻璃箱中吸入1%OVA激发哮喘，每次30min，每日一次，共1周的方法，通过前后两次实验效果的对比发现腹腔注射和腹部多点注射相比较，后一种注射方法虽然持续时间短，但致敏效果更好。所以在此次实验中我们采用后一种注射方法，即在第

0天和第7天在大鼠双侧胸部、腹股沟共4点各皮下注射0.15ml，同时腹腔注射

0.4ml共计1ml来系统致敏。在激发途径上，采用经呼吸道多次吸入OVA激发的方法，该方法诱发哮喘与人类过敏性支气管哮喘主要由吸入变应原引起类似，有利于诱发大鼠与人类哮喘类似的迟发性哮喘反应，气道高反应持续时间更长，炎细胞浸润较其它方法有明显优点[16]。在激发时间上，我们根据2次预实验经

验采用第14天开始就将模型组大鼠置于10×10×20 cm有机玻璃盒内，超声雾化入1％OVA诱发哮喘，每天一次，每次30 min，共计1w。如此操作后表明雾化时间较以往文献研究时间短，且哮喘程度更重。

造模结束后对肺病（过敏性哮喘）模型是否成功我们通过以下途径鉴定：1. 大鼠激发后的表现；2.肺功能的观察及统计；3.肺部微生态的检测；4.血常规的检测；5.血清TNF-α、IL-1检测（ELISA法）；6.肺组织病理学观察；7.肺组织中神经肽类物质包括CCK8、CGRP、SP、VIP含量变化的观察；8.肺组织超微结构观察。

实验结果证明大鼠致敏及激发效果良好，出现典型肺病（过敏性炎症）表现：表现在1。哮喘大鼠出现烦燥不安，后安静少动，呼吸加深加快，点头呼吸，口鼻发绀、爪甲青紫等表现；2.肺病组大鼠的呼吸频率明显增快，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），潮气量、每分钟通气量明显降低，与空白组比较也有显著性差异（*P*<0.01）；3.肺泡灌洗液微生态检测结果发现，肺病组大鼠的肺泡灌洗液中需氧菌、真菌数量增多，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），而厌氧菌则减少，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），提示肺病组大鼠出现了菌群数量上的改变；4.血常规检测结果发现，肺病组大鼠血液中白细胞、中性粒细胞计数明显升高，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），淋巴细胞数和中间细胞计数胞数升高，与空白组比较有差异（*P*<0.05）；5. ELISA 法检测各组大鼠血清中TNF-α、IL-1含量变化，结果肺病组TNF-α、IL-1含量明显增多，与空白组比

较有显著性差异（*P*<0.01）；6.造模前后大鼠肺组织病理形态观察结果显示：空白组大鼠肺组织肺泡及间质无充血、出血及炎症细胞浸润，而肺病组大鼠肺组织出现肺泡及间质充血、出血及少量炎症细胞浸润；7.肺组织中神经肽类物质包括

CCK8、CGRP、SP、VIP四种神经肽的含量变化结果显示：肺病（过敏性哮喘）模型大鼠的肺组织CCK8的含量比空白组显著减少（*P*<0.01）；CGRP的含量比空白组显著增多（*P*<0.01）；SP 的含量与空白组比较显著升高（*P*<0.01）；VIP的含量比空白组显著减少（*P*<0.01）。提示这四种神经肽在肺病情况下出现了变化；8.肺组织的超微结构观察结果显示：空白组大鼠肺组织肺泡腔内清晰；Ⅰ型肺泡上皮细胞结构完整；Ⅱ型肺泡上皮细胞胞膜完整，胞内细胞器（板层小体、线粒体、内质网）清晰可见，无肿胀；肺泡隔不宽；肺病组大鼠肺组织肺泡结构破坏，肺泡腔狭窄；I型肺泡上皮细胞结构不清；Ⅱ型肺泡上皮细胞体积增大、胞膜不完整，胞内线粒体有肿胀、嵴清淡，内质网扩张；肺泡隔增宽。

综上，用卵蛋白作为致敏原，氢氧化铝作为佐剂免疫，再用卵蛋白雾化吸入激发，可复制成肺病（过敏性哮喘）大鼠模型。经肺功能的观察，肺部微生态的检测，血常规的检测，血清TNF-α、IL-1检测，肺组织病理学改变观察，肺组织中神经肽类物质包括CCK8、CGRP、SP、VIP四种神经肽的免疫组化观察，以及肺组织的超微结构观察等，似表明本实验建立的大鼠肺病（过敏性哮喘）模

型是成功和稳定的，且模型制备操作简便可行，剂量较易控制。

# 第二部分 "肺病及肠"的病理变化及微生

**态学研究**

本次实验拟选用肺病（过敏性哮喘）大鼠动物模型，观察实验动物粪便质地性状、粪便干湿重；胃肠功能；肺肠微生态；肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃等组织病理形态观察；肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃等组织中SP、VIP含量变化等病理变化和微生态学指标，初步探讨“肺病及肠”的病理变化机制及微生态学影响。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 实验动物

SPF级Wistar雄性大鼠40只，体重180 g±20g。购自成都达硕生物科技有限公司，动物合格证号：scxk (m) 2008-15。标准饲料喂养。

### **1.2** 药物与试剂

1％卵白蛋白（OVA）：sigma公司；

氢氧化铝：成都市科龙化工试剂厂，批号：20080807；

生理盐水：四川科伦药业股份有限公司，批号：H51021158；

CCK8、CGRP、SP、VIP免疫组化试剂盒：北京博奥森生物技术有限公司，货号：bs0764r，bs0077r；

兔SPKit免疫组化试剂盒：北京中衫金桥生物技术有限公司，货号：SP9001；

DAB显色试剂盒：北京中衫金桥生物技术有限公司，货号：ZLI9032；

TNF-α、IL-1ELISA检测试剂盒：上海森雄科技实业有限公司，货号：bs0022；水合氯醛：青岛宇龙海藻有限公司，批号：国药准字H37022673；

营养性半固体碳末糊的制备：参照文献[17]并作改进（取40g羧甲基纤维末，

溶于1200ml蒸馏水中，分别加入64g奶粉、32g糖、32g淀粉和12g活性炭末，

搅拌均匀，配制成黑色半固体糊状物，冰箱冷藏，用时恢复至室温）。

### **1.3** 实验仪器及设备

称重天平：ACS-3C型，广州中ft市新和基科技开发有限公司生产；超声雾化器：WH-203型，广州粤华医疗器械有限公司；

光学显微镜：Olympus BHS型显微镜，日本制造；电子显微镜：日立HT-600IV型，日本电子公司；石蜡切片机：2016型，德国Leica；

生物机能实验系统：BL-420F型，成都泰盟科技有限公司；厌氧培养箱：DY-II型，浙江义乌冷冻机厂；

隔水式需氧培养箱：SA-25型，大连制造六厂。

远红外线快速恒温干燥箱：YHG-40×45-3型，上海跃进医疗器械厂；电热恒温水浴箱：ZD-600型，杭州蓝天化验仪器厂。

### **1.4** 实验用品

一次性注射器（5ml、10ml）；一次性PE手套；

一次性乳胶手套；手术剪；

镊子；

有盖塑料离心管（10ml、5ml）；手术盘。

### **1.5** 肺病（过敏性哮喘）模型的制备

将40只大鼠购回后随机分为2组：空白组，10只、肺病组，30只。适应性饲养1周后进行肺病（过敏性哮喘）模型的制备。

肺病（过敏性哮喘）模型的制备，将OVA1 mg和氢氧化铝200 mg溶于生理盐水1ml中新鲜配制成凝胶致敏剂，第0天和第7天在大鼠双侧胸部、腹股沟

共4点各皮下注射0.15ml，同时腹腔注射0.4ml共计1mI进行致敏。。第14天开始将模型组大鼠置于10×10×20 cm有机玻璃盒内，超声雾化吸入1％OVA诱发哮喘（以大鼠出现烦躁、打喷嚏、咳嗽、腹肌强烈收缩、呼吸急促等典型哮喘样发作为标准），每天一次，每次30 min，共计1w。在最后一次雾化吸入24h后灌胃炭粉指示液。

### **1.6** 肺功能观察方法

使用生物机能实验系统检测动物呼吸功能（呼吸次数、潮气量、每分通气量等）。大鼠在最后一次雾化24h后以10%水合氯醛麻醉后仰卧位固定于手术板上，打开胸腔暴露气管，V型切口切开，将气管插管置入并固定，观察大鼠的呼吸频率、潮气量、每分钟通气量并予以记录。

### **1.7** 粪便质地性状、粪便干湿重观察方法

观察大鼠每天所排粪便的质地性状、粒数和干湿重量，并将粪便湿重称后再将其置于60℃远红外烘箱中干燥后10h后称其干重。并做记录，将7天的排便重量和数量平均后取其平均值。

### **1.8** 胃肠功能检测方法

#### **1.8.1** 胃排空试验方法

胃排空试验方法：大鼠在最后一次雾化24h后灌胃碳末糊半小时后即行颈椎脱臼法处死动物，即刻剖开腹取出胃，将其冲洗干净后用纱布拭干后称重（胃全重），再将其切开后将其中的胃内容物完全的清除后再称重（胃净重）。胃全重和胃净重的差值即为胃残留物重。

#### **1.8.2** 肠推进试验方法

肠推进试验方法：做胃排空试验的同时打开腹腔找到盲肠，剪取回盲部至肛门的肠管，置于托盘上，轻轻将大肠拉成直线，测量肠管长度为“大肠全长”，

从回盲部至炭末前沿为“炭末推进长度”，计算炭末推进率。炭末推进率% = [炭末推进距离（cm）/大肠全长（cm）]×100%。

### **1.9** 肺肠微生态检测方法

#### **1.9.1** 肺部微生态收集标本方法

大鼠在最后一次雾化24h后收集支气管肺泡灌洗液进行肺部微生态检测。支气管肺泡灌洗液收集方法：大鼠用10%的水合氯醛麻醉后，取仰卧位，固定架上固定，打开胸腔，暴露气管，V型切口切开，插管，用0.02% PBS灌洗肺脏5～

6次，收集灌洗液，以1500r/min离心5min，取上清液4℃保存待测。

#### **1.9.2** 肠道微生态收集标本方法

大鼠在最后一次雾化24h后轻轻按摩腹部促进其排便，取新鲜的粪便1粒即刻放入制备好的转移液中，做菌群的培养、计数和种类鉴别观察。

**KV培养基（类杆菌）的制备**

配方：厌氧菌分离培养基51g，0.1％维生素K1 0.1ml，注射用注射用盐酸去甲万古霉素0.04g，卡拉霉素0.8g，兔血50ml。

制备：取厌氧菌分离培养基12.75g，加蒸馏水250ml，微火煮溶解后加入0.1％维生素K1 0.025ml、卡那－万古霉素（0.2: 0.01g）制成选择厌氧培养基，并密闭烧瓶口，高压灭菌后，在40～50℃时与兔血充分混匀后，制成选择厌氧培养血平板18个。另一烧瓶中的厌氧基物则制成普通厌氧培养平板18个，备用。其余培养基和稀释液的配备见第一部分1.7。

### **1.10** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织病理形态普通光镜观察方法

大鼠在最后一次雾化24h后用颈椎脱臼法处死后，取肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃用10%甲醛溶液固定，石蜡包埋切片，HE染色，光镜下观察。HE染色方法、阅片和照相同第一部分1.10。

### **1.11** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中

**SP、VIP含量变化检测方法**

应用免疫组化法检测，采用SP法染色，按试剂盒说明书步骤进行，以细胞浆或膜上出现棕黄色为染色阳性，阴性细胞核为兰色。各组大鼠组织染色后的切片在OLYMPUS BX60光学显微镜和OLYMPUS DP70型彩色图文系统下用20或40倍物镜选取5个不同的视野进行拍照，用计算机图象分析软件（IMAGE-PRO PLUS 6.0）对拍好的照片进行半定量分析。测定其累积积分光密度（Integrated option density, IOD），对每张切片的5个IOD求平均值进行统计分析，求平均值，代表免疫阳性反应物的含量；IOD值越大，染色越强。具体操作程序（见第一部分1.11和1.12）。

### **1.12** 肺、结肠病理形态电镜观察方法

大鼠在最后一次雾化24h后用颈椎脱臼法处死，迅速取右肺中下叶及切取结肠中段约2cm的肠管，生理盐水冲去肠内容物，去除结肠黏膜表面粘附的粪便、分泌物及血液，放入3%戊二醛的固定液中预固定，后1%四氧化锇再固定，丙酮逐级脱水，Epon812包埋，半薄切片光学定位，超薄切片，醋酸铀及枸橼酸铅双重染色，透射电镜观察。

### **1.12** 数据分析与统计方法

实验数据以（*x*±s）形式表示，采用SPSS16.0统计软件包进行分析，计量资料行组间配对t检验，*P*<0.05为差异有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** 肺功能检测结果

肺功能观察结果发现，肺病组大鼠出现不同程度的烦躁、咳嗽、打喷嚏、

呼吸急促等表现，经统计，与空白组比较肺病组大鼠的呼吸频率明显增快，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01）（见表1，图1）；

肺病组大鼠潮气量、每分钟通气量明显降低，与空白组比较也有显著性差异

（*P*<0.01），（见表1，图2、3）。

### **2.2** 粪便性状、质地、干湿重观察结果

大鼠的粪便性状、质地、干湿重观察结果发现，肺病模型大鼠除出现不同程度的呼吸急促，打喷嚏，爪甲青紫等症状外，还出现不同程度的腹胀状态，倦怠蜷缩，皮毛蓬松无泽，活动减少，反应迟缓，体重减轻，摄食量减少。解便次数减少，排便较空白组困难，粪便的外观变小，质地干硬，粒数减少、干湿重量均减轻（*P*<0.05），（见表9，图11）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 9** **各组** | **大鼠粪便颗** | **粒数、湿重、干重观察** | **结果比较(** *x* **±s)** |  |
| 组别 | n | 粪便颗粒（粒） | 粪便湿重（g） | 粪便干重(g) |
| 空白组 | 10 | 55.03±7.73 | 14.12±1.92 | 9.30±1.16 |
| 肺病组 | 10 | 50.17±7.10△ | 13.04±1.46△ | 8.67±1.23△ |

注：表示与空白组比较，△*P*<0.05

空白组肺病组

70

60

50

40

30

20

10

0

粪便颗粒(粒) 粪便湿重（g） 粪便干重(g)

**图 11** **各组大鼠粪便颗粒数、湿重、干重结果比较**

### **2.3** 胃排空与肠推进试验结果

#### **2.3.1** 胃排空试验结果

胃排空试验结果发现，与空白组比较，肺病组大鼠胃内残留率升高（*P*<0.05）

（见表10，图12）。

#### **2.3.2** 肠推进实验结果

肠推进试验结果发现，与空白组比较其大肠炭末推进率降低（*P*<0.05）（见表10，图12），这两种试验方法均提示肺病组大鼠的胃肠功能出现了一定程度的改变。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **表 10** **各组大鼠** | **胃内残留率** | **、肠推进率比较(** *x* **±s)** |  |
| 组别 | n | 胃内残留率（%） | 肠推进率（%） |
| 空白组 | 10 | 37.22±8.30 | 72.74±8.30 |
| 肺病组 | 10 | 46.11±6.44△ | 62.84±10.22△ |

注：与空白组比较，△*P*<0.05

空白组肺病组

100

80

60

40

20

0

胃内残留率（%）

肠推进率（%）

**图 12** **各组大鼠胃内残留率、肠推进率比较**

### **2.4** 肺、肠微生态学检测结果

#### **2.4.1** 肺部微生态检测结果

肺部微生态检测结果发现：肺病组的肺部需氧菌、真菌明显增多，厌氧菌显著减少（*P* <0.01），真菌显著增多（*P* <0.01）（见表11，图13）。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **表11 各** | **组大鼠肺** | **部微生态检测结果比较(** | *x* | **±s)** |  |
| 组别 | n | 需氧菌 |  | 厌氧菌 | 真菌 |
| 空白组 | 10 | 6.86±0.87 |  | 7.75±0.42 | 9.29±0.63 |
| 肺病组 | 10 | 10.8±1.94△△ |  | 6.74±0.45△△ | 11.69±0.94△△ |

注：与空白组比较，△△*P*<0.01

空白组肺病组

14

12

10

8

6

4

2

0

需氧菌

厌氧菌

真菌

**图13** **各组大鼠肺部微生态检测结果比较**

#### **2.4.2** 肠道微生态检测结果

肠道微生态检测结果发现：肺病组的肠道需氧菌、真菌、大肠杆菌较空白组显著增多（*P* <0.01），而厌氧菌、类杆菌和双歧杆菌显著减少（*P* <0.01），（见表12-1, 12-2, 图14）。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **表12-1** | **各组大** | **鼠肠道微生态检测结果比较(** | *x* | **±s)** |  |
| 组别 | n | 需氧菌 |  | 厌氧菌 | 真菌 |
| 空白组 | 10 | 8.26±0.42 |  | 9.26±0.33 | 2.59±0.40 |
| 肺病组 | 10 | 10.60±0.82△△ |  | 7.26±0.28△△ | 4.39±0.43△△ |

注：与空白组比较，△△*P*<0.01

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **表** | **12-2** | **各组大鼠肠道微生态检** | **测结果比较(** *x* **±s)** |  |
| 组别 | n | 大肠杆菌 | 类杆菌 | 双岐杆菌 |
| 空白组 | 10 | 7.44±0.48 | 9.24±0.53 | 9.70±0.68 |
| 肺病组 | 10 | 8.45±0.30△△ | 8.11±0.29△△ | 8.08±0.25△△ |

注：与空白组比较，△△*P*<0.01

空白组肺病组

12

10

8

6

4

2

0

**图 14** **各组大鼠肠道微生态检测结果比较**

从肺肠菌群的检测结果可以看出，在肺病（过敏性哮喘）时，大鼠的肺部菌群与空白组比较有明显的差异（*P*<0.01），肠道菌群与空白组比较也有明显的差异（*P*<0.01），这初步提示了在肺病模型时可能影响及肠，所以出现了肠道菌群数量的改变。

### **2.5** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃病理形态改变光镜观察结果

肺组织光镜观察（HE染色×100）：

空白组：大鼠肺组织泡结构完整，肺泡腔内清晰，无出血、渗出及炎症细胞浸润（见附录1.1-附图1；

肺病组：大鼠肺组织出现肺泡及间质充血、出血及少量炎症细胞浸润（见附录1.1-附图2）。

结肠组织光镜观察（HE染色×100）：

空白组：大鼠结肠黏膜组织结构完整，肌层、浆膜均无炎细胞浸润（见附录1.1-附图3）；

肺病组：大鼠结肠黏膜下、肌层、浆膜层有少量炎细胞浸润（见附录1.1-附图4）；

而观察结果更发现与空白组比较大鼠的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织的病理组织观察无明显变化（见附录1.1-附图5-14）。

### **2.6** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中

**SP、VIP含量变化结果**

#### **2.6.1** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中**SP**含量变化结果

肺组织：空白组大鼠肺组织中SP染色呈阴性反应，而肺病组大鼠肺组织支气管壁和肺泡壁SP阳性染色增加明显，经统计，肺病组大鼠肺组织中SP的含量比空白组显著升高（*P*<0.01）（见表13，图15，附录1.3-附图61-62）；

结肠组织：空白组大鼠结肠组织中SP阳性表达主要集中于结肠黏膜下层、腺体周围，胞浆着色，间质中阳性表达较多，而肺病组大鼠结肠组织黏膜下层

SP阳性染色较淡，阳性表达减少，呈弱阳性反应，经统计，肺病组大鼠结肠组织中SP的含量比空白组有所降低（*P*<0.05）（见表13，图15，附录1.3-附图63-64）；

十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织：两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织中SP阳性表达无明显变化，经统计，肺病组的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织SP含量与空白组比较无差异（*P*> 0.05）（见表13，图15，附录1.3-附图65-74）。

**表13** **大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织SP含量变化**（IOD，*x*±s）

| 组 别 | 各脏腑组织 | n | SP 积分光密度 |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 肺组织 | 10 | 51350.98±15780.76 |
|  | 十二指肠 | 10 | 98120.23±34277.13 |
|  | 空肠 | 10 | 78015.29±35071.07 |
| 空白组 | 回肠 | 10 | 85695.15±26495.19 |
|  | 结肠 | 10 | 64931.01±1.8898.41 |
|  | 直肠 | 10 | 15396.55±10692.58 |
|  | 胃 | 10 | 18434.30±8424.84 |
|  | 肺组织 | 10 | 88243.93±32177.29△△ |
|  | 十二指肠 | 10 | 120786.91±19257.90 |
|  | 空肠 | 10 | 89041.61±21703.33 |
| 肺病组 | 回肠 | 10 | 85915.58±24031.53 |
|  | 结肠 | 10 | 47417.81±16462.40△ |
|  | 直肠 | 10 | 17388.43±16657.50 |
|  | 胃 | 10 | 24120.35±9452.23 |

注：与空白组比较，△*P*<0.05；△△*P*<0.01

空白组肺病组

150000

100000

50000

0

**图 15** **各组大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织SP含量变化比较**

#### **2.6.2** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中**VIP**含量变化结果

肺组织：空白组大鼠肺内有较多的VI P免疫反应阳性纤维分布纤维密集，

染色深，呈条束状走行，主要分布于黏膜固有层、平滑肌层和黏膜下层。肺病组大鼠肺内各级气道VI P免疫反应阳性纤维却明显缺乏，染色较浅。经统计，肺病组大鼠肺组织VIP的含量比空白组显著降低（*P*<0.01）（见表14，图16，附录1.3-附图47-48）；

结肠组织：空白组大鼠结肠组织中肌间丛与黏膜下丛可见散在的VIP棕黄色神经元和神经纤维，但分布较稀疏，数量较少，纤维及纤维元较细小，染色较淡，呈阴性反应或弱阳性反应，肺病组组大鼠肌间丛与黏膜下丛则可见VIP阳性神经元和神经纤维明显增多，互相交织成网状，染色普遍较深，呈阳性反应，有的呈强阳性。经统计，肺病组结肠组织中VIP的含量比空白组升高（*P*<0.05）

（见表14，图16，附录1.3-附图49-50）；

十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织：肺病组大鼠十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织中VIP的阳性表达无明显变化，经统计，其含量与空白组比较无差异（*P*> 0.05）（表14，图16，附录1.3-附图51-60）。

**表14** **大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织VIP含量变化**（IOD，*x*±s）

| 组 别 | 各脏腑组织 | n | VIP 积分光密度 |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 肺组织 | 10 | 39318.30±8817.29 |
|  | 十二指肠 | 10 | 67523.33±31970.86 |
|  | 空肠 | 10 | 29638.65±17650.74 |
| 空白组 | 回肠 | 10 | 49315.95±13987.73 |
|  | 结肠 | 10 | 26296.48±9497.96 |
|  | 直肠 | 10 | 25357.61±10951.65 |
|  | 胃 | 10 | 11958.32±3875.66 |
|  | 肺组织 | 10 | 20711.43±7334.69△△ |
|  | 十二指肠 | 10 | 51419.61±20691.06 |
|  | 空肠 | 10 | 28244.03±7645.62 |
| 肺病组 | 回肠 | 10 | 46348.67±11781.58 |
|  | 结肠 | 10 | 43208.16±13433.87△ |
|  | 直肠 | 10 | 24625.83±8899.80 |
|  | 胃 | 10 | 20675.80±8551.95 |

注：与空白组比较，△*P*<0.05，△△*P*<0.01

空白组肺病组

120000

100000

80000

60000

40000

20000

0

**图 16** **各组大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织VIP含量变化比较**

### **2.7** 肺、结肠病理形态改变电镜观察结果

通过造模后大鼠肺组织、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织的病理变化光镜观察和肺组织、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中SP、

VIP含量变化结果，我们又选取了其中有病理变化及有统计学意义的肺和结肠进行了肺和结肠组织的超微结构电镜观察，其观察结果如下：

#### **2.7.1** 肺组织电镜观察结果

空白组：大鼠肺组织肺泡腔内清晰；Ⅰ型肺泡上皮细胞结构完整；Ⅱ型肺泡上皮细胞胞膜完整，胞内细胞器（板层小体、线粒体、内质网）清晰可见，无肿胀；肺泡隔不宽（见附录1.2-附图15）；

肺病组：大鼠肺组织肺泡结构破坏，肺泡腔狭窄；I型肺泡上皮细胞结构不清；Ⅱ型肺泡上皮细胞体积增大、胞膜不完整，胞内线粒体有肿胀、嵴清淡，内质网扩张；肺泡隔增宽（见附录1.2-附图16）。

#### **2.7.2** 结肠组织电镜观察结果

空白组：大鼠结肠黏膜上皮表面的微绒毛排列整齐紧密，大小一致，线粒体形态规整，大致呈圆形，其内基质中等密度，线粒体无水肿（见附录1.2-附图17）；

肺病组：大鼠结肠组织则出现结肠黏膜上皮表面的微绒毛排列稀疏紊乱，长短不一，线粒体内基质清淡，内嵴头肿胀明显（见附录1.2-附图18）。

## **3** 讨论

### **3.1** 关于“肺病及肠”相关病理变化的探讨

#### **3.1.1** 关于中医对于“肺”的认识

肺位于胸腔，左右各一，上连气道，并通过口鼻与外界直接相通，肺在五脏中位置最高，居于诸脏之上，故有“华盖”之称。中医经典曾对“肺”有记载，如《素问・痿论》言：“肺者，脏之长也，为心之盖也。”《灵枢・九针篇》说：

“肺者，五脏六腑之盖也。”《难经・四十二难》有“肺重三斤三两，六叶两耳，凡八叶”对肺进行了细致描述。《医贯・内经十二官・形景图说》说：“喉下为肺，

两叶白莹，谓之华盖，以复诸脏，虚如蜂窠，下无透窍，故吸之则满，呼之则虚。“说明古人对肺的位置和形态结构已有较为清楚的了解。《临证指南医案・卷四》曰肺”其性恶寒、恶热、恶燥、恶湿，最畏火、风。邪著则失其清肃之令，遂痹塞不通爽矣“，故称娇脏，肺位最高，邪必先伤，肺叶娇嫩，不耐邪侵，肺为清虚之脏，不容邪气所干；故无论外感、内伤或其他脏腑病变，皆可累及于肺而为病。故《不居集》曰：“肺为娇脏，所主皮毛，最易受邪”，《理虚元鉴》曰：“肺气一伤，百病蜂起，风则喘，寒则嗽，湿则痰，火则咳，以清虚之府，纤芥不容，难护易伤故也。”

#### **3.1.2** 中医文献对“大肠”解剖定位的比较

对于“大肠”的解剖定位，古代中医文献中早有记载，《难经・四十四难》云：“大肠小肠会为阑门，下极为魄门”，即大肠为从阑门到魄门的一段。《灵枢・肠胃第三十一》指出：“小肠后附脊…，其注于回肠者…，回肠当脐…，广肠传脊，以受回肠”，《素问・奇病论》王冰注言：“大肠，广肠也。经说大肠，当言回肠也。……然大肠、回肠具与肺合，从合而命，故通曰大肠。”可见大肠包括了回肠（相当于解剖学的回肠和结肠上段）和广肠（相当于解剖学的乙状结肠和直肠）两部分。但是，中医藏象学说所指的“大肠”，更着重于指其功能。大肠的主要功能正如《素问・灵兰秘典论》中记载：“大肠者，传导之官，变化出焉”。有学者

[18]指出，对大肠“传导”功能的理解应倾向于整个肠道，即也应包括小肠的部

分功能。小肠的功能，可概括为“受盛化物”，六腑的特性是以通为顺，以降为用，而小肠位居六腑之一，故其亦有通导功能的。大肠在糟粕形成中居于主导地位，其传导功能也应包括小肠在糟粕形成中的部分作用，但仍以大肠为主。

汉代医家张仲景在《伤寒论》阳明病篇180条指出：“阳明之为病，胃家实是也”。有学者[19]认为，仲景所言“实”是指“胃家”，而“胃家”即包括肠胃；也有学者[20]指出，“胃家”，应包括胃和大肠在内，但须明确的是，指胃时都是胃虚气逆证、胃阳虚寒证，而指大肠时均指邪热内盛、燥屎阻结的腑实证。纵观

《伤寒论》全文，仲景所言“心下满”、“心下痞”等，其“心下”指的是均“胃”，而仲景所言“胃家”，应是“大肠”，且与中医藏象学说中“大肠”的所指一致，应定位于西医所指的整个肠道。

#### **3.1.3** 中医对“肺病及肠”的认识

##### **3.1.3.1** 中医对“肺”与“大肠”生理功能的认识

肺是五脏六腑之盖，通于天气，有“华盖”之称，上通于喉，开窍于鼻，与体表皮肤连接，在体合皮。古人通过直接观察法发现大肠与皮肤关系密切，二者解剖位置直接相连，解剖形态具有相关性，正如《灵枢・本脏》所述：“肺合大肠，大肠者，皮其应”，“肺应皮，皮厚者，大肠厚；皮薄者，大肠薄；皮缓，腹里大者，大肠大而长；皮急者，大肠急而短；皮滑者，大肠直；皮肉不相离，大肠结。”

《内经》认为肺“司呼吸”，“主宣降”，“通调水道”；大肠为“传导之官，变化出焉”，所以大肠的传导功能，有赖于肺气的肃降，肺气下降，大肠才能传递糟粕，大便得以通畅。肺主治节，是大肠按正常规律传导的条件；肺主宣发，是大肠得以濡润的基础；肺主肃降，是大肠传导的动力；肺主通调水道，是大肠润燥的枢纽。一旦发生病变，肺肠之病可以相互传变、累及，恶性循环。

从以上的文献记载可以看出，肺和肠之间的生理关系可以概括为：第一，肺主宣发是大肠得以濡润的基础，使大肠不致燥气太过而便秘，犹如“河道不枯，舟能行之”，大便自然畅通无阻，顺利导下；第二，肺主肃降是大肠传导功能的动力，魄门为肺气下通之门户，故可为“肺上窍开于鼻，下施于魄门”；第三，肺主通调，是大肠主燥气之条件，即肺通过促进水液代谢和维持水液平衡之作用，使大肠水分不致过多，以保证大肠的“燥化”功能；第四，发生病变时，肺与大肠可互传，即脏病及腑，腑病亦可及脏。

##### **3.1.3.2** 中医对“肺病及肠”病理变化的认识

中医认为肺和大肠之间具有一定的病理联系，肺病变可以波及大肠，导致大肠发生一定的病理变化。中医基础理论认为一是肺气失于宣发肃降，可以引起便秘。正如《[黄帝内经](http://baike.baidu.com/view/746.htm)・[素问](http://baike.baidu.com/view/676086.htm)》曰：“肺者，相傅之官，治节出焉。”肺气宣降正常则有助大肠传导有节。一方面，肺气肃降，通调气机，下助大肠传导糟粕。正如唐容川《医经精义・脏腑之官》所说：“大肠之所以能传导者，以其为肺之腑。肺气下达，故能传导。”另一方面，肺气肃降，通调津液到大肠，使大肠润而不燥，以利传导糟粕，故唐容川又说：肺气“传输大肠，通调津液，而主治节，治

节下行，则气顺而息安……大便调”。但若肺气虚而无力推动，则肺气壅遏肃降不能，可使大肠传导迟缓，而引起排便困难，正如《妇人大全良方・卷八》说：“肺主气，肺气不降，则大肠不能传送。”且若痰热闭肺，不能通调津液于大肠，则招致肠燥腑气不通，引起便秘，正如《石室秘录・卷三》说：“大便闭结者，人以为大肠燥甚，谁知是肺气燥乎？肺燥则清肃之气不能行于大肠，而肾经之水仅足自顾，又何能常流以润溪涧哉。”《疫疹一得・卷四》“肺气不能下达，则大肠不得传道之令，而大便亦结矣。”；二是表现为肺热移于大肠，导致便秘。如肺津受损，阴虚生热，下遗大肠，而便难。《血证论・脏腑病机论》曰：“肺中常有津液，润养其金，故金清火伏。若津液伤，则口渴气喘，痈痿咳嗽。水源不清，而小便涩。遗热大肠，而大便难。”；《成方切用・卷一》曰：“肺移热于大肠则下血。”肺风传肠，导致便秘。

由此可以看出中医认为肺和大肠在一定状态下有一定的关系，肺的宣发肃降功能可以在一定程度上影响大肠的生理功能，同时肺病在一定的情况下亦可以伤及大肠，出现大肠的病变。但这只是单纯的文献记载，我们需要对此进行全面的科学的研究，才能系统的揭示“肺病及肠”的病理变化。

#### **3.1.4** 关于肺病影响及哪一脏腑的探讨

根据中医关于“肺病及肠”理论的认识及记载，我们做了探索“肺病”影响到哪一脏腑的探索。这部分的研究内容包括如下几方面的内容：1.进行大鼠肺功能的检测；2.进行大鼠粪便、质地**、**干湿重观察；3.进行胃排空与肠推进试验；

4.进行肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织病理形态观察；5.进行肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中CCK8、CGRP、SP、VIP含量变化的检测。模型的制备及有关实验操作方法见第一部分1.5（肺病（过敏性哮喘））模型的制备）及1.6（肺功能观察方法）。

实验结果显示如下：1.肺功能检测结果发现：肺病组大鼠出现不同程度的烦躁、咳嗽、打喷嚏、呼吸急促等表现，经统计，与空白组比较肺病组大鼠的呼吸频率明显增快，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01）；潮气量、每分钟通气量明显降低，与空白组比较也有显著性差异（*P*<0.01）；2.大鼠粪便、质地**、**干湿重观察结果显示：肺病模型大鼠除出现不同程度的呼吸急促，打喷嚏，爪甲青紫

等症状外，还出现不同程度的腹胀状态，倦怠蜷缩，皮毛蓬松无泽，活动减少，反应迟缓，体重减轻，摄食量减少。解便次数减少，排便较空白组困难，粪便的外观变小，质地干硬，粒数减少、干湿重量均减轻（*P*<0.05）；3.胃排空与肠推进试验结果显示：与空白组比较，肺病组大鼠胃内残留率升高（*P*<0.05），其大肠炭末推进率降低（*P*<0.05），提示肺病组大鼠的胃肠功能出现了一定程度的改变；4. 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织病理形态观察结果显示：造模前后大鼠肺组织病理形态观察：空白组大鼠肺组织泡结构完整，肺泡腔内清晰，无出血、渗出及炎症细胞浸润；而肺病组大鼠肺组织出现肺泡及间质充血、出血及少量炎症细胞浸润。造模前后大鼠结肠组织光镜观察：空白组大鼠结肠黏膜组织结构完整，肌层、浆膜均无炎细胞浸润；而肺病组大鼠结肠黏膜下、肌层、浆膜层有少量炎细胞浸润。而观察结果更发现两组大鼠的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织的的病理形态观察无明显变化；5.肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中CCK8、CGRP、SP、VIP含量变化结果显示：肺病组大鼠肺组织CCK8、CGRP、SP、VIP与空白组比较有明显变化（*P*<0.01），十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织CCK8、CGRP、SP、VIP含量与空白组比较均无明显变化，而大鼠结肠组织中CCK8、CGRP、SP、VIP含量与空白组比较均有差异（*P*<0.05），提示在肺病病理模型情况下肺与大肠存在相关性，且与胃、十二直肠、空肠、回肠、直肠组织相比较，似乎结肠与肺相关性最高。

#### **3.1.5** 关于“肺病及肠”理论中的“大肠”部位的探讨

我们根据造模后大鼠肺组织、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织的病理形态观察和CCK8、CGRP、SP、VIP含量变化结果，又选取了其中有病理变化及有统计学意义的肺和结肠进行了超微结构的观察，其观察结果如下：

肺组织透射电镜观察：空白组大鼠肺组织肺泡腔内清晰；Ⅰ型肺泡上皮细胞结构完整；Ⅱ型肺泡上皮细胞胞膜完整，胞内细胞器（板层小体、线粒体、内质网）清晰可见，无肿胀；肺泡隔不宽；肺病组大鼠肺组织肺泡结构破坏，肺泡腔狭窄；I型肺泡上皮细胞结构不清；Ⅱ型肺泡上皮细胞体积增大、胞膜不完整，胞内线粒体有肿胀、嵴清淡，内质网扩张；肺泡隔增宽。

结肠组织透射电镜观察：空白组大鼠结肠黏膜上皮表面的微绒毛排列整齐紧

密，大小一致，线粒体形态规整，大致呈圆形，其内基质中等密度，线粒体无水肿；肺病组大鼠结肠组织则出现结肠黏膜上皮表面的微绒毛排列稀疏紊乱，长短不一，线粒体内基质清淡，内嵴头肿胀明显。与光镜观察及免疫组化观察结果一致。

根据以上观察结果说明肺病模型大鼠出现了结肠组织病理形态改变，这似乎说明“肺与大肠相表里”理论中“大肠”具有特异性，特指的是结肠，而不是前面文献中描述的回肠、直肠、盲肠等，这似为“肺与大肠相表里”理论提供了组织形态学实验依据。

#### **3.1.6** 关于结肠特异性的探讨

西医认为，大肠包括盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和直肠六个部分，结肠是大肠的重要组成部分，占大肠的83.3%~86.7%，而大肠疾病以肠炎、肿瘤性疾病和功能性疾病为主，肠炎、肿瘤性疾病的好发部位均在结肠，而溃疡性结肠炎、结肠癌等疾病的病因尚不明确[21]，故只能推断，结肠对大肠疾病具有一定敏感性和特异性。

西医认为结肠具有传输和储存食物残渣、提供微菌群的生长环境、消化和吸收功的生理功能，这与中医提出的大肠的“传导糟粕”和小肠的“受盛化物”功能相符合，因此，单从功能角度来看，西医所指的结肠同时具有中医“大肠”和“小肠”的功能，故“肺与大肠相表里”，可能以肺与结肠的相关性最高，本实验结果显示，与十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织相比较，结肠在病理形态学和免疫组化方面特异性最高，证实了肺与结肠的相关性最高。

本次实验从现代病理学角度出发，通过观察肺病病理模型大鼠的肺功能，胃肠功能，粪便的质地、性状、干湿重，肺、十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织病理形态学观察及这7个部位中CCK8、CGRP、SP、VIP含量变化，证实了肺病能影响到大肠，而且这个大肠特指的结肠，同时提示CCK8、CGRP、SP、VIP很可能是肺与大肠相关的共同物质基础，肺与大肠在病理情况相互的影响是通过

CCK8、CGRP、SP、VIP的相关调控实现，这也可能是“肺与大肠相表里”的病理机制之一，为“肺与大肠相表里”理论提供一定的现代医学实验依据。

### **3.2** 关于微生态与“肺”及“大肠”关系的探讨

#### **3.2.1** 关于人体微生态的探讨

人体所携带的细菌种类繁多，数量巨大。估计每个人的自身菌群细胞数超过

1014，约为人体细胞总数的10倍。它们主要分布在人体与外界相通的腔道如肠道、呼吸道和泌尿生殖道以及体表。

生理状态下的肠道微生态系统是一个复杂的细菌生态系统，肠道菌群之间相互依存、相互制约，保持着稳定的比例，并按一定顺序定植于肠壁，达到稳定的微生态平衡，对宿主具有生物屏障作用。肠道菌总量约为1014，主要分布在结肠。就每克粪便计算，其中致病性细菌如铜绿假单胞菌、变形杆菌、葡萄球菌和梭状芽孢杆菌等的量在l04左右，益生菌如乳酸杆菌、双歧杆菌等在108-10水平，而条件致病菌如肠球菌、大肠杆菌和拟杆菌等约为l06-10左右。细菌与肠黏膜或结合，或黏附，或嵌合，组成有一定规律的膜菌群形成菌膜屏障结构，能阻止病原微生物过度生长，限制其黏附于肠黏膜。一般情况下机体与正常菌群之间保持着动态的微生态平衡，而且正常菌群之间也保持着恒定的比例关系，肠道常驻菌与宿主的微空间结构形成一个相互依赖又相互作用的微生态系统。一旦这种微生态平衡受到破坏，就有可能导致机体疾病的发生[22]。

肠道微生物群是肠道和肠道免疫发展的重要刺激因素。肠道微生物群不仅能增强肠道黏膜屏障的功能，还在宿主营养吸收方面有重要作用。它们通过不断的刺激局部或全身免疫应答促进肠道黏膜相关淋巴组织的发展。小鼠研究已经显示肠道菌群促使IgG增加，并增强对食物的El服免疫耐受及形成原始的淋巴滤泡中心。有前瞻性研究发现对变应原易感的儿童早期粪便中双歧杆菌量较低，而梭杆菌含量较高。另有前瞻性研究也发现易发生变应性疾病的婴幼儿粪便中双歧杆菌的含量较低。也就是说肠道微生态变化和过敏性疾病有密切的关系。

#### **3.2.2** 关于“肺病及肠”的微生态研究结果探讨

在本次实验中首先采用成功复制大鼠肺病（过敏性哮喘），复制方法、判定模型成功的方法见第一部分（大鼠肺病（过敏性哮喘）模型的建立和评价），确

认模型成功后即进行肠道菌群检测，具体操作方法第一部分1.7肺部微生态检测

方法和第二部分1.9肺肠微生态检测方法，检测结果显示：肺病组的肺部需氧菌、真菌明显增多，厌氧菌显著减少（*P* <0.01），真菌显著增多（*P* <0.01）见表3；同时肺病组的肠道需氧菌、真菌、大肠杆菌较空白组显著增多（*P* <0.01），而厌氧菌、类杆菌和双歧杆菌显著减少（*P* <0.01），说明大鼠肺部菌群出现了一定程度的改变，而同时大鼠肠道菌群也出现了改变，此结果提示了在肺病病理模型的情况下可能影响到了肠，所以出现了肠道菌群的改变，打破了肠道原有的微生态平衡，出现了肠道的菌群失调。通过本次研究，似乎为“肺病及肠”理论提供了微生态方面的实验依据。

# 第三部分 "肺病及肠"的相关调控物质和

**ERK信号通路研究**

鉴于“肺”与“大肠”之间生理病理上的密切联系，为了探寻“肺”与“大肠”之间密切联系的相关调控物质和信号通路，我们设计了本次实验，欲选用

OVA诱发的肺病（过敏性哮喘）大鼠模型，观察实验动物肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃等组织中CCK8、CGRP、SP、VIP含量变化；血清中TNF-α、IL-1含量变化；肺和结肠组织一氧化氮合酶（iNOS）mRNA、细胞外信号调节激酶（ERK）mRNA表达变化等，初步探讨“肺病及肠”的相关调控物质和信号通路，从而为“肺病及肠”理论临床治疗提供相关实验依据。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 实验动物

健康SPF级Wistar雄性大鼠40只，体重180±20g。购自成都达硕生物科技有限公司，动物合格证号：scxk (m) 2008-15。标准饲料喂养。

### **1.2** 药物与试剂

1％卵白蛋白(OVA): sigma公司产品；

氢氧化铝：成都市科龙化工试剂厂，批号：20080807；

生理盐水：四川科伦药业股份有限公司，批号：H51021158；

CCK8、CGRP、SP、VIP免疫组化试剂盒：北京博奥森生物技术有限公司，货号：bs0764r，bs0077r；

兔SPKit免疫组化试剂盒：北京中衫金桥生物技术有限公司，货号：SP9001；

DAB显色试剂盒：北京中衫金桥生物技术有限公司，货号：ZLI9032；引物合成及探针修饰：上海生物工程有限公司；

Trizol: 美国MRC公司；

RevertAid™First Strand cDNA Synthesis Kit: 立陶宛MBI公司；

Taq DNA聚合酶、PCR反应缓冲液（10×）、MgCl2溶液（25mM）：均购自北京博大泰克（BioDev）生物基因技术有限责任公司；

dNTP：购自美国普洛麦格（Promega）公司；

DNA分子量标准：DNA Marker；

Marker I，显示条带：100、200、300、400、500、600bp，购自北京TIANGEN

公司）；

琼脂糖（电泳级）：法国BIOWEST公司产品，上海Yito企业有限公司分装；

总一氧化氮检测试剂盒：北京博奥森生物技术有限公司；

ERK检测试剂盒：北京博奥森生物技术有限公司；TNF-a检测试剂盒：上海森雄科技实业有限公司；IL-1检测试剂盒：上海森雄科技实业有限公司。

### **1.3** 实验仪器与器材

电子天平：ACS-3C型，广州新和基；石蜡切片机：德国Leica

光学显微镜：OLYMPUS BX60，日本电子公司；彩色图文系统：OLYMPUS DP70，日本电子公司；

PCR基因扩增仪：美国贝克曼；倒置显微镜：德国莱卡；

SANYO超低温冰箱：日本电子公司；酶标仪：Multiskan MK3；

P/ACEMDQ型毛细管电泳仪：美国贝克曼；

DNA测序仪：CEQ8000型，美国贝克曼。

### **1.4** 肺病（过敏性哮喘）模型的制备

将40只大鼠购回后随机分为2组：空白组，10只、肺病组，30只。适应性饲养1周后进行肺病（过敏性哮喘）模型的制备。

肺病（过敏性哮喘）模型的制备，将OVA1 mg和氢氧化铝200 mg溶于生理盐水1ml中新鲜配制成凝胶致敏剂，第0天和第7天在大鼠双侧胸部、腹股沟共4点各皮下注射0.15ml，同时腹腔注射0.4ml共计1mI进行致敏。第14天开始将模型组大鼠置于10×10×20 cm有机玻璃盒内，超声雾化吸入1％OVA诱发哮喘（以大鼠出现烦躁、打喷嚏、咳嗽、腹肌强烈收缩、呼吸急促等典型哮喘样发作为标准），每天一次，每次30 min，共计1w。

### **1.5** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织**CCK8**、

**CGRP、SP、VIP含量变化检测方法**

动物在最后一次雾化24h后用颈椎脱臼法处死，取肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃等组织，10%甲醛溶液固定，石蜡包埋切片，HE染色，光镜观察。免疫组化采用SP法染色，按试剂盒说明书步骤进行，以细胞浆或膜上出现棕黄色为染色阳性，阴性细胞核为兰色。各组大鼠组织染色后的切片在OLYMPUS BX60光学显微镜和OLYMPUS DP70型彩色图文系统下用20或40倍物镜选取5个不同的视野进行拍照，用计算机图象分析软件（IMAGE-PRO PLUS 6.0）对拍好的照片进行半定量分析。测定其累积积分光密度（Integrated option density, IOD），对每张切片的5个IOD求平均值进行统计分析，求平均值，代表免疫阳性反应物的含量；IOD值越大，染色越强。具体操作程序（见第一部分1.11和1.12）。

### **1.6** 血清TNF-α、**IL-1ELISA**检测方法

见第一部分1.9血清TNF-α、IL-1检测方法

### **1.7** 肺、结肠肠组织**iNOSmRNA**和**ERK mRNA**表达检测方法

实时荧光定量法（RT-PCR法）检测肺和肠组织中一氧化氮合酶（iNOS）和ERK mRNA表达量。动物在最后一次雾化24h后用颈椎脱臼法处死，立即取出肺和结肠组织，置于1.8ml冻存管中，液氮罐中保存备检。检测步骤如下：

#### **1.7.1** **RT-PCR**法检测肺和结肠组织中**iNOS**和**ERK mRNA**表达：

（1）解冻组织：

将组织解冻后，立刻超声或匀浆破碎细胞处理；

将EP管置于冰上片刻后，于4℃条件下12000rpm离心10分钟。取上清转移至DEPC预处理的EP管中；

室温放置5分钟使样品充分裂解，按续步骤继续进行。

（2）RNA提取

加入0.2ml氯仿，蜗旋混匀或猛烈晃动15秒，室温放置2-3分钟；

于4℃下12000rpm离心15分钟，吸取上层水相至DEPC预处理的EP管中；加入0.5ml异丙醇，颠倒数次混匀，冰上沉淀10分钟；

于4℃下12000rpm离心10分钟，弃上清，管底可见胶状RNA沉淀；加入1ml 75%乙醇，蜗旋或颠倒混匀；

于4℃下12000rpm离心5分钟，弃上清。再用离心机瞬时离心，小心吸尽液体；

开盖干燥RNA片刻，加入20µl DEPC水溶解，-80℃冻存；

对最后提取的总RNA行1％琼脂糖凝胶电泳检验。如可见28S、18S、5S三条亮度依次递减的清晰条带，泳道上无明显弥散痕迹，其中28S与18S条带亮度比值约为2: 1，则说明总RNA提取完整无降解，满足后续实验要求。

（3）凝胶电泳

在电场中，在中性pH值下带负电荷的DNA向阳极迁移，其迁移速率由下列多种因素决定：①DNA的分子大小，线状双链DNA分子迁移速率与DNA分子量对数成反比，分子越大迁移越慢；②琼脂糖浓度，DNA电泳迁移率的对数与凝胶浓度成线性关系；③DNA分子的构象，相同分子量，超螺旋DNA移动最快，而线状双链DNA移动最慢；④电源电压⑤嵌入染料的存在；

琼脂糖凝胶的配制：如1.0%，取0.4g琼脂糖加入40ml电泳缓冲液中，微波炉中火加热至沸腾，熔化的琼脂物冷却至低于60℃时加入10mg/ml溴化乙锭2.5µl（也可不把EB加入凝胶中，而是电泳后再用0.5µg/ml的EB 溶液浸泡染色），充分混匀，将温热的凝胶倒入已置好梳子的胶膜中，在室温下放置30-45min待胶体凝固后行电泳；

将DNA或RNA溶液稀释后，测定OD260/OD280比值，明确核酸含量和质量；

视浓度取3-8µl样品在适当浓度的琼脂糖胶上电泳，检测DNA或RNA的分子大小。

（4）逆转录逆转录成cDNA

提取组织或细胞中的总RNA，以其中的mRNA作为模板，采用Oligo（dT）或随机引物利用逆转录酶反转录成cDNA。

采用Fermentas公司的Revert Aid™Frist Strand cDNA Synthesis Kit, 在PCR

仪上进行扩增，条件如下：在冰上预混下列溶液：

|  |  |
| --- | --- |
| total RNA | 5µl |
| random hexamer primer (0.2µg/µl) | 1µl |
| deionized water，nuclease free | 6µl |

|  |  |
| --- | --- |
| 5×reaction buffer | 4µl |
| Ribonuclease Inhibitor (recombinant) (20u/µl) | 1µl |
| 10mM dNTP mix | 2µl |
| RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) | 1µl |

瞬时离心，70℃预处理5min，冰上冷却；再依次加入：

瞬时离心；

按照20℃10min，42℃60min，70℃10min，置于-20℃冰箱保存备用；

引物的选择：使用随机引物，体系中所有RNA分子全部充当了cDNA第一链模板，PCR引物在扩增过程中赋予所需要的特异性，用此引物合成的cDNA中96%来源于rRNA。如使用Oligo(dT)引物，仅mRNA 可被转录，由于

Poly(A+) RNA仅占总RNA的1-4%，故此种引物合成的cDNA比随机引物得到的cDNA在数量和复杂性方面均要小。使用特异性引物仅产生所需要的cDNA，导致更为特异的PCR扩增。

#### **1.7.2** **PCR**实验结果分析方法

（1）用样本的基因的Ct值减去对应的内参的Ct值，得到△Ct值；如：假设

1号样本的基因的Ct值为23，1号样本的内参的Ct值为19，则1号样本的△Ct值=23-19=4；根据△Ct值分析基因的表达情况，△Ct值越大，则样本的基因的表达越低。

（2）每一组的△Ct求平均值及其标准差；

（3）各组间进行△Ct 平均值及其标准差的比较，以对照组为参照，各组的

△Ct平均值及其标准差减去对照组的△Ct平均值及其标准差，得到△△Ct值及标准差；

（4）计算出2-△△Ct值，得到各组相对于对照组的一个倍数关系，即相对定量；

（5）统计各组间的差异性，即求取P值用△Ct即可。

### **1.8** 数据分析与统计方法

实验数据的EXCEL录入和SPSS16.0软件统计分析，计数资料卡方检验，计量组间配对t检验，以（*x*±s）形式表示。

## **2** 结果

### **2.1** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中**CCK8**

**含量变化结果**

肺组织：空白组大鼠肺组织肺泡壁、血管平滑肌内有大量的阳性颗粒，染色较深，呈强阳性，而肺病组大鼠肺组织内阳性染色较浅，呈弱阳性，经统计，肺病组大鼠肺组织中CCK8含量与空白组比较显著降低（*P*<0.01）（见表15，图17，附录1.3-附图19-20）；

结肠组织：肺病组组大鼠结肠组织黏膜层可见胞浆及胞核着色，胞核呈棕黄色至深褐色，经统计，肺病组大鼠结肠组织中CCK8 的含量比空白组显著升高

（*P*<0.01）（见表15，图17，附录1.3-附图21-22）；

十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织：两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织中CCK8阳性表达无明显变化，经统计，肺病组这5个部位的CCK8

含量与空白组比较无差异（*P*> 0.05），（见表15，图17，附录1.3-附图23-32）。

**表15** **大**

*x***±s)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **鼠肺、十二指肠** | **、空肠、回肠、结** | **肠、直** | **肠、胃 CCK8 含量变化（IOD，** |  |
| 组别 | 各脏腑组织 | n | CCK8 积分光密度 |  |
|  | 肺组织 | 10 | 103558.42±23911.36 |  |
|  | 十二指肠 | 10 | 115397.57±45489.53 |  |
|  | 空肠 | 10 | 78733.96±40006.84 |  |
| 空白组 | 回肠 | 10 | 106208.87±29143.07 |  |
|  | 结肠 | 10 | 25795.20±11866.08 |  |
|  | 直肠 | 10 | 30168.08±11632.44 |  |
|  | 胃 | 10 | 12187.98±9831.53 |  |
|  | 肺组织 | 10 | 79961.44±12577.97△△ |  |
|  | 十二指肠 | 10 | 106236.75±35268.78 |  |
|  | 空肠 | 10 | 78233.89±22802.25 |  |
| 肺病组 | 回肠 | 10 | 112681.95±21870.71 |  |
|  | 结肠 | 10 | 48519.56±12240.79△△ |  |
|  | 直肠 | 10 | 26198.68±7801.12 |  |
|  | 胃 | 10 | 18856.00±12466.91 |  |

注：与空白组比较，△△*P*<0.01

空白组肺病组

200000

150000

100000

50000

0

-50000

**图17** **大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃CCK8含量变化**

### **2.2** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中**CGRP**

**含量变化结果**

肺组织：与空白组相比，肺病模型大鼠肺组织CGRP的阳性表达明显增多，主要分布在肺内血管和肺泡壁，呈棕黄色颗粒，经统计，肺病组大鼠肺组织中

CGRP含量比空白组显著增多（*P*<0.01）（见表16，图18，附录1.3-附图33-34）；结肠组织：空白组大鼠的结肠组织黏膜层可见散在的棕黄色颗粒，但分布较

稀疏，染色较浅，呈阴性或弱阳性反应，而肺病组大鼠结肠组织黏膜可见较多的棕黄色颗粒，染色较深，呈阳性或强阳性反应，经统计，肺病组大鼠结肠组织中

CGRP的含量比空白组有所增多（*P*<0.05）（见表16，图17附录1.3-附图35-36）；十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织：肺病组的十二指肠、空肠、回肠、

直肠、胃组织中CGRP阳性表达无明显变化，经统计其含量与空白组比较无差异（*P*> 0.05）（见表16，图18，附录1.3-附图37-44）。

**表16** **大鼠肺和十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃CGRP含量变化**（IOD，*x*±s）

| 组 别 | 各脏腑组织 | n | CGRP 积分光密度 |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 肺组织 | 10 | 24720.64±10040.42 |
|  | 十二指肠 | 10 | 94553.33±37718.87 |
|  | 空肠 | 10 | 13370.08±12613.41 |
| 空白组 | 回肠 | 10 | 43197.39±12752.31 |
|  | 结肠 | 10 | 21326.55±12795.23 |
|  | 直肠 | 10 | 32020.78±10924.05 |
|  | 胃 | 10 | 22526.01±5441.98 |
|  | 肺组织 | 10 | 41950.10±12600.15△△ |
|  | 十二指肠 | 10 | 103136.62±26631.77 |
|  | 空肠 | 10 | 25972.10±13600.05 |
| 肺病组 | 回肠 | 10 | 54378.03±11290.07 |
|  | 结肠 | 10 | 38059.82±11942.47△ |
|  | 直肠 | 10 | 35165.46±11931.55 |
|  | 胃 | 10 | 27712.35±6486.94 |

注：与空白组比较，△*P*<0.05；△△*P*<0.01

空白组肺病组

140000

120000

100000

80000

60000

40000

20000

0

**图 18** **大鼠肺和十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃CGRP含量变化**

### **2.3** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中**SP**

**含量变化结果**

肺组织：空白组大鼠肺组织中SP染色呈阴性反应，而肺病组大鼠肺组织支气管壁和肺泡壁SP阳性染色增加明显，经统计，肺病组大鼠肺组织中SP的含量比空白组显著增多（*P*<0.01）（见表13，图15，附录1.3-附图61-62）；

结肠组织：空白组大鼠结肠组织中SP阳性表达主要集中于结肠黏膜下层、腺体周围，胞浆着色，间质中阳性表达较多，而肺病组大鼠结肠组织黏膜下层

SP阳性染色较淡，阳性表达减少，呈弱阳性反应，经统计，肺病组大鼠结肠组织中SP的含量比空白组有所减少（*P*<0.05）（见表13，图15，附录1.3-附图63-64）；

十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织：两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织中SP阳性表达无明显变化，经统计，肺病组的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织SP含量与空白组比较无差异（*P*> 0.05）（见表13，图15，附录1.3-附图65-74）。

**表13** **大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织SP含量变化**（IOD，*x*±s）

| 组 别 | 各脏腑组织 | n | SP 积分光密度 |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 肺组织 | 10 | 51350.98±15780.76 |
|  | 十二指肠 | 10 | 98120.23±34277.13 |
|  | 空肠 | 10 | 78015.29±35071.07 |
| 空白组 | 回肠 | 10 | 85695.15±26495.19 |
|  | 结肠 | 10 | 64931.01±1.8898.41 |
|  | 直肠 | 10 | 15396.55±10692.58 |
|  | 胃 | 10 | 18434.30±8424.84 |
|  | 肺组织 | 10 | 88243.93±32177.29△△ |
|  | 十二指肠 | 10 | 120786.91±19257.90 |
|  | 空肠 | 10 | 89041.61±21703.33 |
| 肺病组 | 回肠 | 10 | 85915.58±24031.53 |
|  | 结肠 | 10 | 47417.81±16462.40△ |
|  | 直肠 | 10 | 17388.43±16657.50 |
|  | 胃 | 10 | 24120.35±9452.23 |

注：与空白组比较，△*P*<0.05；△△*P*<0.01

空白组肺病组

150000

100000

50000

0

**图 15** **各组大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织SP含量变化**

### **2.4** 肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织中

**VIP含量变化结果**

肺组织：空白组大鼠肺内有较多的VI P免疫反应阳性纤维分布纤维密集，染色深，呈条束状走行，主要分布于黏膜固有层、平滑肌层和黏膜下层。肺病组大鼠肺内各级气道VI P免疫反应阳性纤维却明显缺乏，染色较浅。经统计，肺病组大鼠肺组织VIP的含量比空白组显著减少（*P*<0.01）（见表14，图16，附录1.3-附图47-48）；

结肠组织：空白组大鼠结肠组织中肌间丛与黏膜下丛可见散在的VIP棕黄色神经元和神经纤维，但分布较稀疏，数量较少，纤维及纤维元较细小，染色较淡，呈阴性反应或弱阳性反应，肺病组大鼠肌间丛与黏膜下丛则可见VIP阳性神经元和神经纤维明显增多，互相交织成网状，染色普遍较深，呈阳性反应，有的呈强阳性。经统计，肺病组结肠组织中VIP的含量比空白组增多（*P*<0.05）（见表14，图16，附录1.3-附图49-50）；

十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织：肺病组大鼠十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃组织中VIP的阳性表达无明显变化，经统计，其含量与空白组比较无差异（*P*> 0.05）（见表14，图16，附录1.3-附图51-60）。

**表14** **大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织VIP含量变化**（IOD，*x*±s）

| 组 别 | 各脏腑组织 | n | VIP 积分光密度 |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 肺组织 | 10 | 39318.30±8817.29 |
|  | 十二指肠 | 10 | 67523.33±31970.86 |
|  | 空肠 | 10 | 29638.65±17650.74 |
| 空白组 | 回肠 | 10 | 49315.95±13987.73 |
|  | 结肠 | 10 | 26296.48±9497.96 |
|  | 直肠 | 10 | 25357.61±10951.65 |
|  | 胃 | 10 | 11958.32±3875.66 |
|  | 肺组织 | 10 | 20711.43±7334.69△△ |
|  | 十二指肠 | 10 | 51419.61±20691.06 |
|  | 空肠 | 10 | 28244.03±7645.62 |
| 肺病组 | 回肠 | 10 | 46348.67±11781.58 |
|  | 结肠 | 10 | 43208.16±13433.87△ |
|  | 直肠 | 10 | 24625.83±8899.80 |
|  | 胃 | 10 | 20675.80±8551.95 |

注：与空白组比较，△*P*<0.05，△△*P*<0.01

空白组肺病组

120000

100000

80000

60000

40000

20000

0

**图 16** **各组大鼠肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织VIP含量变化**

### **2.5** 血清**TNF-**α、**IL-1**含量检测结果

ELISA法检测各组大鼠血清TNF-α、IL-1含量，结果显示肺病组大鼠血清中TNF-α、IL-1含量明显增多，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01）（见表4，

图6）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 4** **各组大** | **鼠血清 TNF** | **-α、IL-1 含量检测结果(** | *x* | **±s)** |
| 组 别 | n | TNF-α |  | IL-1 |
| 空白组 | 10 | 7.60±0.99 |  | 10.99±0.75 |
| 肺病组 | 10 | 11.78±1.17△△ |  | 15.94±0.90△△ |

注：与空白组比较，△△*P* <0.01

空白组肺病组

20

15

10

5

0

TNF-α

IL-1

**图 6** **各组大鼠血清TNF-α、IL-1含量检测结果比较**

### **2.6** 肺和结肠组织中**iNOS-mRNA**表达结果

RT-PCR检测结果发现，肺病组大鼠的肺组织中iNOS mRNA表达量较空白组显著升高（*P*<0.01），同时，模型组大鼠结肠组织iNOS mRNA表达量也显著升高（*P*<0.01），（见表17，图19）。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **17 大鼠肺和结肠组织中 iNOS-m** | **RNA 表** | **达（** *x* **±s）** |
| 组 别 | n | iNOS（△Ct） |
| 肺组织 | 10 | 9.26±0.35 |
| 空白组 |  |  |
| 结肠组织 | 10 | 8.92±0.63 |
| 肺组织 | 10 | 8.36±0.24△△ |
| 肺病组 |  |  |
| 结肠组织 | 10 | 7.93±0.65△△ |

**表**

注：与空白组比较，△△*P*<0.01；△Ct数值越低，其mRNA表达量越高

空白组肺病组

12

10

8

6

4

2

0

肺

结肠

**图 19** **大鼠肺和结肠组织中iNOS-mRNA表达**

### **2.7** 肺和结肠组织**ERK-mRNA**表达结果

RT-PCR法检测结果发现，肺病组大鼠的肺组织中ERKmRNA表达量较空白组显著升高（*P*<0.01），同时，模型组大鼠结肠组织ERKmRNA表达量也有所升高（*P*<0.05），（见表18，图20）。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **表 18 大鼠肺和结肠组织中 ER** | **K-mR** | **A 表达（** *x* **±s）** |
| 组 别 | n | ERK（△Ct） |
| 肺组织 | 10 | 6.44±0.38 |
| 空白组 |  |  |
| 结肠组织 | 10 | 7.43±0.52 |
| 肺组织 | 10 | 5.73±0.23△△ |
| 肺病组 |  |  |
| 结肠组织 | 10 | 6.92±0.43△ |

**N**

注：与空白组比较，△*P*<0.05；△△*P*<0.01；△Ct数值越低，其mRNA表达量越高

空白组肺病组

10

8

6

4

2

0

肺

结肠

**图 20** **大鼠肺和结肠组织中ERK-mRNA表达比较**

## **3** 讨论

### **3.1** 关于“肺病及肠”相关调控物质的探讨

#### **3.1.1** 关于**P**物质与“肺”、“大肠”的关系

P物质（substance P, SP）世界上发现最早的神经肽，是VON Euler和Gaddum于1931年在马肠中提取乙酰胆碱时发现，因当时不知道其化学性质，故取名P物质。SP是由11个氨基酸残基组成的多肽，相对分子质量2698。肽分子的C末端是甘氨酸-亮氨酸-甲硫氨酸-NH2三肽结构[23]。SP广泛分布于脑、脊髓、外周神经系统及肠神经系统中，主要在体内作为神经递质发挥作用。在肠道从近端小肠到全结肠肠神经系统肌间神经丛及黏膜下神经丛内均含有SP的神经、神经纤维，肠道某些内分泌细胞亦可分泌SP[24-25]。经免疫组化技术发现SP免疫活性纤维在各种免疫器官及外周组织均可见到，常分布于血管壁及血管旁，肠黏膜固有淋巴组织也有SP的神经纤维，固有层肥大细胞(mast cell, MC)中60％与SP神经纤维相邻。

SP的生理作用主要是能以神经内分泌的方式作用于各种免疫细胞，参与免疫调节，促进免疫功能[26]；对生殖内分泌具有一定的影响作用；对消化系统，SP可明显引起肠运动增强，胆囊收缩，胰液分泌量增加，刺激唾液分泌，具有催涎作用；对呼吸系统，SP神经元参与氧不足的换气发动，使呼吸道平滑肌紧张性加强，致支气管痉挛、肺内水肿。因此，SP在哮喘、IBD、关节炎、便秘及其他许多免疫性疾病过程中发挥了重要作用。

在过敏性疾病发生时，许多物质包括过敏原、组胺、白三烯、前列腺素都可以刺激周围的神经末梢释放神经肽[27]。SP不仅是一种神经递质，而且可以作为调节因子参与过敏反应的病理生理过程。气道炎症是哮喘的基本病理变化，其主要病理机制是体内多种炎性细胞及其分泌的炎性介质或细胞因子的相互作用造成气道炎症，促发气道高反应性和通气功能障碍。炎细胞浸润可导致细小支气管局部黏膜上皮脱落、黏膜下水肿，支气管壁平滑肌破坏，管腔内粘液栓形成；在损伤的同时，修复机制启动，因而可见细小支气管壁平滑肌增厚，管腔狭窄等病

理改变。SP是气道非肾上腺能和非胆碱能(NANC)神经系统释放的神经递质，为某些免疫细胞的产物，在哮喘发病机制中作用突出[28]。在哮喘患者的气道中，SP可以引起气道典型的改变，包括支气管收缩、粘液分泌增加、乙酰胆碱神经传递加快、血管扩张、血浆外渗。哮喘患者对SP和NKA有高敏感性，在皮肤病菌培养基中，培育遗传性哮喘患者的支气管血浆，其SP和NKA的致敏和致收缩效应明显增强。

SP在便秘的发生过程中也具有重要的作用[29-32]，8O%便秘患者结肠平滑肌中缺乏SP。有研究表明[33-36]SP为胃肠感觉和运动神经元的兴奋性递质，它有强烈促进消化道平滑肌收缩，刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质，促进胃肠蠕动作用。研究也表明[37]SP是由胃肠道固有神经或外来神经释放，存在于胃肠道黏膜神经丛、肌间神经丛，是调节肠道作用最强的兴奋性肽能神经递质，能抑制肠道黏膜分泌，刺激肠道运动，可直接作用大肠纵行肌环行肌引起收缩，增加结肠收缩和运动。

从以上的文献记载可以看出，SP在肺病（过敏性哮喘）和肠病（便秘）均时会出现含量的变化，表现为肺病（过敏性哮喘）时由于气道炎症的变化，导致

SP病理性增多，引起气道典型的改变，包括支气管收缩、粘液分泌增加、乙酰胆碱神经传递加快、血管扩张、血浆外渗等。

从实验结果我们也可以看出，在肺病（过敏性哮喘）情况下，大鼠肺组织

SP含量增多，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），与文献研究一致，表明肺病（过敏性哮喘）模型是成功的。而当肺病发生时，肺病组的肺组织SP含量增多，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），而且结肠组织的SP含量减少，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.05），但是两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠等组织中SP含量与空白组比较无统计学差异（*P*> 0.05），这说明了在肺病时由于肺影响及了大肠，出现了大鼠大肠组织SP含量也出现了一定程度的改变，此提示

SP可能是“肺病及肠”相联系的共同物质基础，肺在某种病理情况下影响到大肠可能是通过SP的相关调控实现的，这为“肺病及肠”理论提供了神经递质学

SP方面的实验依据。

#### **3.1.2** 关于血管活性肠肽与“肺”、“大肠”的关系

血管活性肠肽(Vasoactive Intestinal Peptide, VIP)是1970年英国学者Said和Mutt从猪的上部小肠中分离出的一种活性多肽[38]。因其有明显的扩血管作用而命名为VIP，属于胰泌素—胰高血糖素家族。

VIP是一种高碱性二十八碳多肽，呈单链线性结构，已被化学合成[39]。VIP的主要活性成分为VIP7-28，是一种代谢不稳定多肽，在哺乳动物高度保守。VIP在体内分布十分广泛，只是在不同部位，其浓度有所区别。VIP在胃肠道中含量最高，主要分布于黏膜固有层和肌层神经纤维。在中枢神经和外周神经末梢的周围含量最高，在外周血中的含量最低。在肺内分布量也很多，在机体绝大多数的淋巴器官均发现分泌VIP的神经纤维，许多免疫活性细胞也可产生少量的VIP，如肥大细胞、嗜酸性细胞等[40]。

VIP是已知的肺组织和鼻黏膜中最丰富的神经多肽之一。肺内VIP主要存在于神经和神经节细胞内，胆碱能神经为主并与乙酰胆碱共避质，肺内VIP能神经纤维广泛分布于呼吸道和肺血管，以鼻黏膜、上呼吸道和近端气道最为丰富，并随着气道逐级分枝而趋减步，达细支气管时几乎消失[41] 。

在哮喘发作的病理情形下，VIP能发挥神经源性支气管舒张作用，可拮抗

PGF2、血管舒缓素、组胺等介质的支气管收缩作用，同时参与调节肥大细胞组织胺释放过程。然而哮喘的慢性炎症破坏VIP能神经[42]，使VIP的合成及释放减少，使其对气道扩张效应和抗炎作用的程度减弱，对胆碱能神经的“制动”机制受限，

Ach气道收缩则增强。尸体解剖发现，重度哮喘病人两肺VIP免疫反应神经显著减少[43]，哮喘病人血浆VIP也明显低于正常且缓解期血浆VIP降低与其气道高反应性之间呈负相关性[44]，提示哮喘发作及气道高反应性均与VIP含量减少有关。有人发现在哮喘病人血浆中存在VIP抗体[45]。由肥大细胞所释放的类胰蛋白酶可使VIP降解失活并逆转VIP产生的气道扩张作用，已知该酶在哮喘病人气道中是升高的[46]。有人发现哮喘病人血浆VIP含量降低与气道阻力呈负相关，提示i-NANc功能低下与哮喘发病及气道高反应性有关。这种i-NANC反应减弱可能是由于来自气道炎症细胞的酶或氧自由基释放破坏所致。

VIP在胃肠道主要参与大小肠的舒张，抑制胃酸及胃泌素分泌，促进胰腺的水分及碳酸氢盐分泌，并可刺激大小肠分泌肠液。VIP可以松弛胃肠道平滑肌、

抑制结肠和直肠的紧张性。国外相关研究[47]认为VIP与肠易激综合征(IBS)患者的腹痛、腹泻、便秘等症状关系密切，便秘型IBS(C-IBS)患者肠黏膜中VIP升高，从而造成了肠道动力抑制性背景，以致蠕动性收缩不易发生，引起便秘。因此，VIP水平增高可以松弛胃肠道平滑肌、抑制结肠和直肠的紧张性，以致蠕动性收缩不易发生，导致便秘。

从以上的文献记载可以看出，VIP在肺病（过敏性哮喘）和肠病（便秘）均时会出现含量的变化，表现为肺病（过敏性哮喘）时慢性炎症破坏VIP能神经，使VIP的合成及释放减少，使其对气道扩张效应和抗炎作用的程度减弱，对胆碱能神经的“制动”机制受限，Ach气道收缩则增强。

从实验结果我们也可以看出，在肺病（过敏性哮喘）情况下，大鼠肺组织

VIP含量减少，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），与文献研究一致，表明肺病（过敏性哮喘）模型是成功的。而当肺病发生时，肺病组的肺组织VIP含量减少，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），而且结肠组织的VIP含量增多，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.05），但是两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠等组织中VIP的表达量与空白组比较无统计学差异（*P*> 0.05）这说明了在肺病发生时，由于“肺病”影响及了“大肠”，出现了大鼠“大肠”VIP含量增多，病理性增多的VIP参与了大肠的舒张，抑制胃酸及胃泌素分泌，促进胰腺的水分及碳酸氢盐分泌，并刺激大肠分泌肠液。同时松弛胃肠道平滑肌、抑制了大肠的紧张性，以致蠕动性收缩不易发生，导致了肠病（便秘）。此提示VIP可能是“肺病及肠”相联系的共同物质基础，肺在某种病理情况下影响到大肠可能是通过

VIP的相关调控实现的，这为“肺病及肠”理论提供了神经递质学VIP方面的实验依据。

#### **3.1.3** 关于胆囊收缩素八肽与“肺”、“大肠”的关系

胆囊收缩素( cholecystokinin, CCK)是 Ivy和oldberg在1928年最先从狗的胃肠黏膜发现的。

CCK作为胃肠激素和神经肽，广泛分布于消化系统、中枢及外周神经系统、外周血液等组织器官中，具有种属和组织特异性[48]。在中枢神经系统中CCK60％～70％以CCK-8形式存在。而肠道中CCK以大分子形式为主，肠道中的

CCK98％存在于黏膜层，以CCK-33为主要形式。组织和血液中最丰富的CCK是CCK-38、CCK-33、CCK-22和CCK-8。

CCK-8是胆囊收缩素(CCK)羧基端的8肽，来源于115个氨基酸残基组成的

CCK前体。CCK-8是CCK发挥生理及药理作用的8肽活性部位，研究表明CCK8对肺有保护作用。CCK-8在大鼠肺组织的表达部位局限于呼吸道及血管平滑肌，可能参与调节呼吸道及血管的收缩功能。

CCK8主要生理作用是使胆囊、胃肠平滑肌兴奋和收缩。有研究发现静脉注射CCK8可引起结肠运动增强，诱发IBS患者腹痛，推测原因可能是静脉注射CCK8降低了IBS病人内脏痛觉感受器的阈值或拮抗内源性鸦片物的镇痛作用，使IBS出现腹痛，Willims等[49]做进一步研究发现注射CCK8后IBS患者结肠在移行性收缩时腔内压力高于正常对照组，最高可达300mg或更高。此时与IBS患者发生腹痛及肠蠕动增快的时间相符。同时作用在离体肌条的研究中肯定了CCK8可以促进结肠肌条的收缩，而这种收缩主要是与CCK-A受体结合，通过肠道神经系统调控的。另外目前有临床实验表明CCK- A受体拮抗剂Loxiglumide可以缩短食物胃结肠通过时间，增强肠运动，用于治疗便秘人有效[50]。所有这些都提示

CCK参与了IBS的发病。

综上所述，CCK8对于肺主要是起保护作用，在哮喘发生时，由于慢性炎症的侵袭，导致CCK8病理性减少，在本实验中，我们采用免疫组化的方法检测到肺病（过敏性哮喘）模型大鼠的肺组织CCK8的含量比空白组显著减少（*P*<0.01）；同时，肺病组大鼠的结肠组织中CCK8 含量比空白组显著增多（*P*<0.01）。而两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠等组织中CCK8的含量与空白组比较无统计学差异（*P*> 0.05），这说明了在肺病{过敏性哮喘}的病理状态下由于肺病影响及大肠，出现了大肠的病变，而肺与其他组织没有明显影响关系。

#### **3.1.4** 关于降钙素相关基因肽与“肺”、“大肠”的关系

降钙素基因相关肽(CGRP)是一种感觉神经肽，它含有37个氨基酸，与SP共同存在于C纤维传入神经末梢，广泛分布于心血管、呼吸、消化和内分泌系统中，具有舒张脑血管，调节肠道免疫等功能，是神经一免疫系统相互调节的重要介质之一。

CGRP是肺内感觉神经末梢和神经内分泌细胞分泌的一种重要生物活性肽，参与呼吸道生理和病理生理机制，分为α-CGRP和β-CGRP两种亚型，其主要功能是引起气道血管舒张。有研究表明CGRP还具有强烈的收缩支气管作用[51]。另外CGRP可诱导嗜酸性粒细胞的产生，从而促进T细胞粘附和与纤维蛋白的结合，具有促炎作用；CGRP还具有抗炎作用，它阻止巨噬细胞的分泌及其激活T细胞的功能。有试验表明哮喘发作期患者血浆CGRP水平显著高于正常组、慢支组及哮喘稳定期组[52]。

CGRP主要是降钙素基因在神经组织的表达产物，是以神经分泌为主要方式，是迄今为止作用最强的内源性血管舒张物质，能增加胃肠道血流量，保护胃黏膜，维护胃肠道完整性[53]。CGRP对大部分胃肠道运动都有抑制作用，主要是对肌肉的直接作用，但是CGRP引起的肌肉松弛作用比其收缩作用大1O倍[54]。CGRP还有促进胃肠生长抑素的释放而抑制胃酸分泌，而生长抑素对消化道的生物作用均为抑制作用，可抑制多种消化道多肽激素的分泌抑制胃肠的蠕动以及抑制肠道对葡萄糖、木糖、氨基酸、脂肪及钙离子的吸收。正因为降钙素基因相关肽对胃肠道运动起抑制作用，其肌肉松弛作用要比其收缩作用强，所以其与VIP一样在体内分布的越多，则胃肠功能活动所受到的抑制也就越强。动物实验研究表明，CGRP可引起胃底纵行肌、胃窦部环行肌松弛，胃内压下降，进而引起胃排空延迟，与便秘的发生有密切关系。离体器官试验表明，CGRP可抑制电刺激神经引起的鼠胃平滑肌肉的收缩。临床研究表明，CGRP能抑制结肠纵、环行肌的自主收缩，抑制直肠纵行肌、肛门内括约肌的收缩[55]。

在本次实验中，肺病（过敏性哮喘）大鼠肺组织中CGRP阳性细胞数量明显多于对照组（P<0.01），提示肺病发作期非肾上腺素非胆碱能（NSNC）神经兴奋性增高，释放CGRP明显增多，也可能CGRP由神经末梢及神经内分泌细胞附近经受损内皮细胞和上皮细胞大量迁移至血液和平滑肌中，引起支气管炎症性损伤明显加重，导致气道阻力增加，肺病发作进一步加重。以上结果表明CGRP在哮喘的发病过程中可能起重要作用。

实验结果同样显示了大鼠结肠组织中CGRP含量增多，与空白组比较有差异

（*P*<0.05）, 而两组的十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃等组织中CGRP含量与空白组比较无统计学差异（*P*> 0.05），此结果似提示在肺病（过敏性哮喘）发

生时，由于肺病影响到了肠，出现了大鼠大肠CGRP的病理性增多，导致大鼠胃底纵行肌、胃窦部环行肌松弛，胃内压下降，进而引起胃排空延迟，胃内残留量增多，与空白组比较差异有统计学意义（*P*<0.05），而同时也抑制了大鼠结肠纵、环行肌的自主收缩，抑制直肠纵行肌、肛门内括约肌的收缩，出现了肠病（便秘）的表现。而肺与十二指肠、空肠、回肠、直肠、胃等脏腑无明显影响关系，由此推测CRRP可能是肺和大肠之间互相影响的物质基础之一。

#### **3.1.5** 关于肿瘤坏死因子-α、白细胞介素**- l**与“肺”、“大肠”的关系

TNF-α由单核细胞、巨噬细胞分泌，是一种可由多种细胞产生的具有广泛生物学活性的前炎症细胞因子，是肺病（哮喘）发病过程中的重要因素，它能诱导血管内皮细胞表达粘附分子，促进炎症细胞的浸润与活化，并可刺激血小板活化因子、前列腺素、白三烯等炎症介质合成，从而导致气道高反应性[56]。TNF-α水平增高、降低均与肺病（哮喘）发作密切相关，其参与了哮喘的发病机制，有望作为一种有价值的反应哮喘患者气道炎症反应的指标应用于临床[57]。出口梗阻性便秘可导致大鼠血清TNF-α水平显著升高，而解除梗阻后随之显著下降，其机理是通过内毒素的释放刺激以TNF-α为代表的各种炎症因子的释放，引起全身炎症反应进而导致机体组织细胞的损伤[58]。

IL- l由活化的单核-巨噬细胞产生，存在形式以IL-1α和IL-1β为主。IL-

lβ是作用较强的炎性细胞因子，其在哮喘发病机制中参与了淋巴细胞激活、嗜酸粒细胞浸润[59]。贾玉萍等[60]观察哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎细胞IL- lβmRNA的表达情况，证实IL- 1在肺病（哮喘）发病中有一定作用。亦有研究表明，哮喘患者体内IL- 1合成增加与病情程度相关。IL- 1通过对T、B细胞的活化作用，分泌IgE，作用于嗜酸粒细胞使其释放白三烯B4、嗜酸细胞过氧化物酶等介质，增加气道阻力形成气道高反应性[61]。

综上所述，TNF-α、IL-1与肺病（哮喘）、肠病（便秘）的发生均有密切关系，因此可假设TNF-α、IL-1是肺与大肠共同的物质基础，肺与大肠在病理情况相互的影响可能是通过TNF-α、IL-1的相关调控实现的，TNF-α、IL-1亦可能是支持“肺与大肠相表里”理论的现代医学实验依据之一，因此通过设计本实验来进行验证。

实验结果显示：肺病组大鼠血清TNF-α、IL-1含量与正常对照组比较，均呈显著性差异（*P*<0.01），证实TNF-α、IL-1与肺病、肠病的发生均存在密切关系。

本次实验从现代系统生物学角度出发，通过观察大鼠肺病病理模型血清TNF-α、IL-1含量变化，证实TNF-α、IL-1很可能是肺与大肠相关的共同物质基础，肺病影响及大肠很可能是通过TNF-α、IL-1的相关调控实现的。

#### **3.1.6** 关于一氧化氮合酶与“肺”、“大肠”的关系

NO是生物体内一种结构简单的双原子自由基。它可参与体内多种生理和病理反应过程。NO是由NOS作用下合成的。NOS是NO合成过程中的关键酶，由于NO性质活泼，半衰期短，因此现在许多关于NO的研究都集中在NOS的研究上。

在正常生理状态下，cNOS诱导产生低浓度的NO对气道平滑肌具有直接的舒张作用，气道非肾上腺能、非胆碱能神经系统以NO为介质亦可增强支气管扩张。但在哮喘状态下，过敏原及IFN一7、IL-1、TNF-a等细胞因子诱导肺泡巨噬细胞、支气管上皮细胞中iNOS表达增加，由iNOS诱导产生大量的NO，高浓度的NO扩张支气管黏膜血管，增强毛细血管渗出，导致气道黏膜水肿，加重气道阻塞，损伤气道组织，加重炎症反应，引起气道高反应性而导致和加重哮喘发病。

目前研究发现，肠神经系统（ENS）异常与结肠动力障碍有关。肠血管活性肽(VIP)和一氧化氮(NO)作为ENS中主要的抑制性神经递质，在释放和松弛平滑肌两方面具有协同作用。NOS是催化NO合成的唯一的关键酶，其活性变化直接影响NO的生成量及其生物学效应。NOS广泛存在于胃肠道黏膜中，其原生型NOS在生理状态下发挥作用，使组织缓慢释放NO，维持NO的正常需要量，起信息传递的作用；诱生型NOS在内毒素和某些细胞因子刺激下产生，由于NOS水平增高，导致了内源性NO合成增多，使肠运动减弱。VIP水平的增高，使肠运动进一步抑制，从而产生便秘；VIP对消化道平滑肌的舒张作用，是通过直接作用于肠道平滑肌上的IP受体或通过影响NO的释放来实现的。二者使平滑肌细胞内cAMP、cGMP水平增高，从而引起平滑肌超极化，平滑肌舒张，肠运动减慢。

本实验通过RT-PCR法检测发现，肺病组大鼠的肺组织中iNOS mRNA表达量较空白组显著升高（*P*<0.01），同时，肺病组大鼠结肠组织iNOS mRNA表达

量也显著升高（*P*<0.01）。

此结果提示在肺病（过敏性哮喘）情况下，过敏原及IL-1、TNF-α等细胞因子诱导肺泡巨噬细胞、支气管上皮细胞中iNOS表达增加，由iNOS诱导产生大量的NO，高浓度的NO扩张支气管黏膜血管，增强毛细血管渗出，导致气道黏膜水肿，加重气道阻塞，损伤气道组织，加重炎症反应，引起气道高反应性而导致和加重肺病（过敏性哮喘）发病，所以肺组织iNOS mRNA表达量升高，而结肠组织iNOS mRNA表达量也升高；提示在肺病模型情况下，肺和结肠在iNOS mRNA表达有一定联系。由此推测可能在肺病（过敏性哮喘）的病理情况下，由于肺病影响及大肠，导致大肠中NOS的病理性升高，又由于NOS水平增高，导致了内源性NO合成增多，使肠运动减弱，从而使大鼠出现了肠病的表现，这也为“肺病及肠”理论提供了NOS调控因子方面的实验依据。

### **3.2** 关于**ERK**信号通路与“肺”、“大肠”的关系

细胞具有极其复杂的生命活动，这些生命活动都必须受到严格的调控，作为一个开放系统，它不单单要与外界环境进行信息交流，还要在细胞间进行信息传递。于是在长期的进化发展和自然选择的过程中逐步建立起一个复杂的信号转导网络，它是由不同的信号传递通路通过相互联系和作用而形成的，即不同的信号转导通路间存在着“cross-talking”。在信号网络中丝裂原活化蛋白激酶

（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号传递途径起着极为重要的作用，控制着细胞多种生理过程，如细胞生长、发育、分裂、死亡等。细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase, ERK）是MAPK家族的一员，是80年代末期发现的一类丝/苏氨酸蛋白激酶，是传递丝裂原信号的信号转导蛋白。它正常定位于胞浆，当激活后转位至胞核，调节转录因子活性，产生细胞效应。经人工克隆和序列测定分析，已知ERK家族有5个亚族，包括ERK1ERK5。

ERK1和ERK2途径是ERK家族中研究最彻底的，它们表达广泛，涉及调节在不同细胞内包括减数分裂、有丝分裂、有丝分裂后期的功能等一系列生理过程。

ERK信号通路是把细胞外信号转导到核内调控基因表达的重要细胞内信号分子，是不同促增殖因子调控的共同通路[62]，参与多种细胞的增殖、分化[63, 64]。ERK是该通道中的关键酶，已发现它在气道平滑肌上广泛分布并主要以ERK1、ERK2

（ERK1/2）2种亚型存在。已有研究显示ERK通道参与哮喘发病机制过程，并涉及哮喘气道慢性炎症、气道高反应性等多个方面[65, 66]。而本研究则进一步显示，肺病（过敏性哮喘）状态下大鼠肺组织ERKmRNA表达升高，与空白组比较有显著性差异（*P*<0.01），说明ERK加重了肺病（过敏性哮喘）的炎症反应，导致了肺病大鼠肺组织中ERKmRNA的表达升高，而实验同时也发现，肺病（过敏性哮喘）大鼠结肠组织ERKmRNA表达同样升高，与空白组比较有差异（*P*<0.05），此结果似乎提示了肺病（过敏性哮喘）状态下由于肺病影响及大肠，所以当E肺部炎症，导致肺部出现ERKmRNA异常表达时，结肠的ERKmRNA表达也受到了一定的影响，出现了表达量的升高，因此，这似为“肺病及肠”理论从ERK信号通路的机制研究上提供了一定的实验依据。

结 **论**

综以上3部分所述，在肺病（过敏性哮喘）的病理模型状态下，模型组大鼠出现了相关调控因子如相关神经肽类SP、VIP、CGRP、CCK8，相关炎症因子如TNF-α、IL-1的含量变化和iNOSmRNA以及ERKmRNA表达的变化，这些变化均表明了肺在一定的病理条件下可以影响及大肠，出现大肠的相关病理变化，我们本次实验从病理生理学、神经递质学、相关炎症因子以及ERK信号通路方面进行了研究，研究结果初步表明了肺病可以及肠，也就是说肺在一定的病理状态下可以影响及大肠。本次实验似为中医脏象学说“肺与大肠相表里”理论中的“肺病及肠”理论提供了相关实验依据。

**问题与展望**

## 1.关于**ERK1/2**和**P-ERK1/2**检测方法的问题：

ERK1/2为细胞外信号调节激酶，又称为p44/p42丝裂原活化蛋白激酶，通过级联的磷酸化而活化为P-ERK1/2, ERK可以使用RT-PCR法和Western blot法两种方法检测，而P-ERK只能通过Western blot法检测，ERK1/2信号通路中的ERK和P-ERK原本计划采用Western blot法检测的，但是由于Western blot法检测的难度较高，存在肠道很容易受粪便污染同时也很容易受实验条件各方面影响的问题，预测检测结果可能会不理想，为了不使预期的ERK信号通路实验方案失败，我们在用Western blot法检测P-ERK和ERK的同时还采用了RT-PCR法检测

ERK，实验结果发现Western blot法检测确实像之前担心的那样没有完全成功，原因可能是肠道的标本受到了粪便的污染，而未能检测出，而RT-PCR法检测的

ERK很成功，所以此次实验是通过ERK在肺和结肠组织中的基因表达变化反映了此信号通路，如果条件可行的话可以考虑在后续的研究中再检测P-ERK1/2，以做到尽善尽美。

## **2**.关于肺病模型的问题

本次实验中我们采用凝胶致敏剂（将OVA1 mg和氢氧化铝200mg溶于生理盐水1ml中新鲜配制成）致敏以及用1%OVA激发的方法成功复制了过敏性哮喘模型，依此模型做为本次实验的肺病模型。我们采用这个模型的依据是源于中医基础理论中“肺”的主要生理功能是主气、司呼吸，这种研究方法是“肺病及肠”模型研究中的方法之一，通过本次过敏性哮喘的肺病模型我们探讨了“肺病”影响及“大肠”的生理病理学基础、微生态学以及相关调控物质和ERK信号通路的研究，本次实验结果初步发现在肺病（过敏性哮喘）发生时肺影响及大肠，出现了大肠病理组织形态学改变，微生态学改变，相关调控物质以及ERKmRNA表达的改变。但是在今后的研究方向中，我们还可以采用其他的方法复制肺病模型，这样就可以从“肺”发生疾病的的其它类型探讨“肺病及肠”的病理机制及相关影响物质基础。

## **3**.关于本实验的后续研究问题

本次实验通过肺病（过敏性哮喘）模型观察对于肠道的影响，这个肠道包括

了十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠，通过成功建立模型后观察模型到底是对于肠道的那部分产生影响，而如果产生了影响又有什么样的物质基础。实验结果证明了肺病（过敏性哮喘）模型对于结肠产生了明显的影响，而对肠的其他部位未产生明显的影响。这部分的研究显然是用实验的方法初步证实了“肺病及肠”理论，但只是单纯的中医基础理论的验证，如果在后续的研究中能够加入有效的中药方剂治疗，这就可以有效的发掘有关于“肺病及肠”理论的中医中药及方剂，为临床上“肠病治肺”提供科学、有效的实验依据，这似为本实验的后续研究提供了相关研究思路。

参考文献

[1] 张卓然主编． 临床微生物学和微生物检验[Ｍ]． 北京: 人民卫生出版社． 2006: 11. [2] Garrity, George M. (Ed.)． Bergey's Manual of Systematic Bacteriology． Originally published by Williams & Wilkins, 1984．2nd ed. 2005, LXXXII, 2816 p. 996 illus. 3-volume-set.

[3] Biee DE, Seagrave JC, Green FH． Aninal model of asthma: potential useful-l lness for study health effects of inhaled particle s[J]． Inhalation Toxicolog y, 2000, 12 (9 ): 809-826．

[4] 曾泽戎, 崔德健, 梁廷杰, 等. 哮喘豚鼠模型细支气管和肺组织的病理学研究. 中华内科杂志, 2001, 40: 158-161.

[5] Deng YM, Xie QM, Chen JQ, et a1． Coincidential increase of leukotriene B4 between cerebral codex and lung tissue of seneitized Ras[J]. Acta pharmacol sin, 2003, 24 ( 10 ): 1039 - 1044 ．

[6] 迟磊, 符州, 戴继宏, 等． 过敏性哮喘大鼠模型的建立[J]． 重庆医学, 2003, 32 ( 4 ): 429-431 ．

[7] Sakai K, Yokoyama A, Kohno N． Effect of differen t sensitizing doses of antigen in a murine model of atopie asthma [J]． Clin Ex pimmunol 1999, l18: 9-15．

[8] Vanacker NJ, P almans E, Kips JC, et． Fluticasone inhabitis but dose not reverse allergen induced struetual airway changes [J]． Am J Respir Cfit care Med, 2001, 163 ( 3 ): 674-679 ．

[9] 罗凤鸣, 王曾礼, 刘小菁, 等． 大鼠哮喘模型Clara细胞及其分泌蛋白的表达[J]． 中华内科杂志, 2003, 42 (7 ): 466-469 ．

[10] 吕国平, 崔德健, 郭英江, 等． 介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法[J]． 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18 ( 6 ) : 377- 378 ． [11] 苗会, 薛全福, 庄逢源, 等． 哮喘大鼠动物模型的制备[J]． 基础医学与临床, 1998, 18 (1 ): 72-78．

[12] 黄英, 张雷, 刘国祥. Wistar大鼠支气管哮喘模型的建立[J]. 中华名医论坛, 2003, 11: 58-59.

[13] 王勇生, 桂淑玉, 李永怀. 过敏性哮喘大鼠模型的建立及地塞米松对其的影响[J]. 中国医药导报, 2007, 4（22）: 39-41.

[14] 崔龙苹, 杨永清, 陈汉平, 等. 过敏性哮喘大鼠模型的制备[J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(2): 69-71.

[15] 杜丽娟, 李风森, 刘慧芳. 哮喘大鼠气道、大肠黏膜中CD4 +、CD8 +淋巴细胞变化研究. 中华实用中西医杂志, 2008, 21（13）: 1117-1118.

[16] Zhang Y, Lama WJ E, Albert, et a1． Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergicpulmonary response[J] ． Am J Respir Cfit Care Med ． 1997, 155: 661- 669 ．

[17] 李佃贵戎士玲张江华, 等. 糖尿病大鼠胃肠功能障碍与胃动素、胆囊收缩素、生长激素相关性研究. 中国糖尿病杂志, 2008（16）9: 571-572.

[18] 王志强, 岳惠. 阳明病篇条文编次试探“胃家实”的含义考释[J]. 中医药学刊. 2005, 23(1）: 143-145.

[19] 严兴科, 王宇, 张广全等. 肺与大肠相表里理论与研究进展[J]. 陕西中医. 2003, 24（4）: 378-340.

[20] 关新军. 胃家实辨析[J]. 南京中医药大学学报. 2003, 19（1）: 8-10.

[21] 徐蓉娟. 内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 197-203.

[22] 陈海龙． 肠道屏障功能障碍． 见李永渝主编． 实用消化病理生理学[ M]． 上海: 同济大学出版社, 2003: 52 - 65 ．

[23] 萧树东, 江绍基. 胃肠病学[M]． 上海: 上海科学技术出版社． 2001: 48-100 ．

[24] 许国铭, 李石． 现代消化病学[M]． 北京: 人民军医出版社． 1999: 116-271 ．

[25] FumesJB, KunzeWA, ClercN, eta1． Nutrient tastingandsignaling mechanismsinthegutII． Theintestineasasensoryorgan: neural, endocrin e, andimmuneresponse s[J]． Physiol, 1999, 277 (11): 922-928． [26] VanHagenPM, HoflandLJ, TenBokumA M． Neuropeptidesandtheir receptorsinthei mmunesystem[ J]． AnnMe d, 1999, 31 ( Suppl 2 ): 15- 22． [27] Terencem0, Conner． JosephO, et al. The role of substance P in inflamma tory disease [J] ． J Cell Physiol, 2004, 20l (2 ) : 167-180.

[28] 许建中, 吴银根, 李明华. 中西医结合哮喘病[M ]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 35 - 39 .

[29] Sjolund K, Fasth S, Ekma n R, Hulten L, Jiborn H, Nordgrens, Sundler F． Neuropeptides in idiopathic chronic constipation(slow transit constipation )． Neurogastroenterol Motil 1997, 9: 143-150.

[30] 刘诗, 高再荣, 钱伟, 等． 慢性便秘患者直肠P物质和血管活性肠肽含量的变化[J]． 中华内科杂志2001; 40: 608.

[31] 潘仁智, 王业皇, 张苏闽． 便秘患者血清N0检测及其临床意义的初步探讨． 右江民族医学院学报, 2004, 26: 368.

[32] 赵子剑, 硝菔通结口服液对便秘大鼠肠神经递质SP、VIP含量的影响[J]. ft西中医, 2007, 23(1): 70-71

[33] 王倩, 范文涛, 周永学. 硝菔通结颗粒对老年便秘大鼠肠组织P物质、血管活性肠肽含量的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2007, 3（30）: 38-39.

[34] Morise K, Furusa wa A, Yamamoto H． Role of gut hormones in irritable bowel syndrome [J] ． Nippon Rinshon, 1992, 50(11): 2697-2702．

[35] Simren M, Abrahamsson H, Bjornsson ES ． An exaggerated sensory com- ponent of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndro- me ． Gut, 2001, 48 (1): 20-27 ．

[36] 桂先勇, 柯美云, 潘国宗, 等． 肠易激综合征的结肠动力及胃肠激素变化[J]． 中华消化杂志, 1994, 14 (增刊): 50-53 ．

Gui XY, Ke MY, Pan GZ, et a1．Changes of colon motil ity and neuro peptides in irritable bowel syndrome [J] ．Zhong hua Xiao hu a Za z hi ( Natal Med J China ), 1994, 14( Supplement ): 50-53 ．

[37] Wedel 1 Roblick ujott. Eggers R. Schiedeck TH, Kr a mme r HJ, Bruch H．oligoneuronal hypog ang Honosis in patients with idiopathic slow．transit constipation．Dis Colon Retum 2002; 45: 54-62.

[38] Said SI．et Hl Science, 1970, 169: 1217-1218. [39] Bodanszky M．et al. JAm Chem Soc．1974, 96: 4973.

[40]喻召才，丁杰，樊代明．血管活性肠肽与神经免疫调节[J]．国外医学免疫学分册，1999，22(2)：99-102．

[41] Lundbery JM．et al. Pepfides, 1984, 5: 593-606. [42]Dames PJ, N Engl J Med, 1989, 321: 1124.

[43] Meinz-Erian P, et al. Science．1985, 339: 1407-1409.

[44]刘翱，等．中华内科杂志，1993, 32: 155-166. [45] Pauls, et al. J Neurmmunal，1989, 23: 133-142

[46] Tam EK, et al. Am J Repair Cell Mul Biul, 1990:27-32.

[47]马晓松，樊雪萍，陈忠，等．白术对动物胃肠运动的作用及其机制的探讨[J]．中华消化杂志，1996, 16(5)：261 ．

[48] Liddle RA． Cholecystokinin : its role in health and disease [J]． CurrOpin Endacrinol Diabetes, 2003, 10(1)：50-54．

[49] Chey WY, Jin HO, Lee MH et a1．Colonic motility abormality in patients with irritable bowel syndrome exhi biting abdominal pain and diarrhea． Am J Gastroenterology [J], 2001, 96(5)： 1499-506.

[50] Robin D． Rothstein． Irritable bowel syndrome． Adv Gastroente rol, 2000, 84: 1247-57.

[51] Springer J, Geppetti, Fischer et a1 ．Calcitonin generelated peptide as infla mmatory mediaor ．Pulm Pharmacol Ther, 2003, 16(3)：121.

[52]刘燕燕，李强，刘忠令，等．降钙素基因相关肽与哮喘的关系[J]．中国现代医学杂志，2000, 10(2)：22

[53]金惠铭，王建枝. 病理生理学[M]. 第6版，北京：人民卫生出版社，2006, 2: 18 9.

[54]江苏新医学院，中药大辞典[M]. 上海：上海科学技术出版社，1985, 10: 35.

[55]李启祥，侯晓华．降钙素基因相关肽与胃肠运动的调节．国外医学消化系疾病分册[M]，2000, 20 (1)：20-23 ．

[56]刘晓湘，方秀斌. TNF-α与支气管哮喘[J].解剖科学进展，2001，7（4）：344-347

[57]曹岩，黄颖，钟莉莉等.老年支气管哮喘患者血清中白细胞介素及肿瘤坏死因子的检测及意义[J].2009，13（2）：197-199

[58]吴先哲，杨胜兰. 出口梗阻性便秘对大鼠血浆ET及血清TNF-α含量的影响[J].2004,10

（1）：11-13

[59]李丽，孔灵菲，王亚婷等.神经生长因子对哮喘豚鼠支气管肺泡灌洗液中IL- lβ及IL-

4的影响[J].2008，11(5)：757-759

[60]贾玉萍，林江涛，高春梅等. IL-lβ基因在哮喘大鼠肺泡灌洗液炎细胞中的表达[J].2004，13（18）：2403~2404

[61]周均华，寿小群，边波萍.哮喘患儿血清中IL-1、IL-2、IL-6的动态变化及意义[J].2008，

10(6)：814~815

[62] Force T, Bonventre JV．Growth factors and mi togen-acti- vated protein kinases [J] ．Hypertension, 1998, 31 ( Pt2 ): 1 52-161 ．

[63]刘忠，李闪，朱建华，等．不同年龄高血压大鼠血管平滑肌中ERK和MKP-1的表达[J]．中国病理生理杂志，2006，22 ( 3 )：468-471 ．

[64]尹风荣，张晓岚．奥曲肽抑制骨桥蛋白刺激的肝星状细胞增殖[ J]．中国病理生理杂志，2006, 22(9)：1848-l849．

[65] Duan W, Chart JH, Wong CH, et a1．Anti -inflammatory effects of mitogen- activated protein kinase kinase inhibit-tor U0126 in an asthma mouse model [J]．J Immunol, 2004, 172 ( 11 )：7053-7059 ．

[66] Zhang Y, Adner M, Cardell L ．Interleukin-1 beta attenuates endothelin B receptor-mediated airway contractions in a murine in vitro model of asthma: roles of endothelin converting enzyme and mitogen-activated protein kinase pathway s [J]．lin Exp Allergy, 2004, 34(9) ：1480-1487．

致**谢**

三年时光，瞬息而逝。回首往昔，不禁感慨万千。

在恩师杨宇教授的悉心指导和亲切关怀下，终于完成了本研究及博士学位论文。这其中浸透着恩师大量的心血和汗水，恩师严谨的治学风范、求实的治学态度、丰富的教学经验、敏锐的洞察力和超常的工作能力，深深感染和激励着我，他的人格魅力和严谨的治学态度影响着我，感染着我，将在我未来的从教道路上不断鞭策我的动力和立志达到的目标。三年来，在生活、学习和工作中，恩师无微不至的关怀令我终生难忘，在此谨向恩师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

感谢冯全生教授、乔胃娟老师、郑秀丽老师以及温病教研室的每一位老师；感谢基础医学院高永翔院长、张三印老师、刘渊老师对本课题的指点，帮助我完善了课题设计，开拓了思路；感谢丁维俊老师，帮助我们顺利完成微生态检测，谨向各位老师致以诚挚的谢意。本实验的顺利完成，还得益于叶建红、朱素有、张显明、冯贤荣、周新颖、刘旺华、袁建、惠毅、闫曙光同学的鼎力相助，特此感谢。

感谢基础医学院实验室的老师，他们的热心帮助与指导使我顺利完成了动物实验部分，为我节省了很多时间。

感谢家人三年来的默默支持！

感谢舍友赵菊花、周滢三年来的精神支持！感谢所有关心我的同学、朋友！谢谢你们！

感谢研究生院全体老师！

感谢成都中医药大学对我的培养！

**在读期间公开发表的学术论文、专著及科研成果**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 成果（论文、专著、获奖项目）名称 | 成果鉴定、颁奖部门及奖励类别、等级或发表刊物与出版单位、时间 | 本人署名次序 |
| 1 | 从肺肠微生态变化研究肺与大肠的相  关性 | 《中医杂志》 | 第一位 |
| 2 | "肺病”模型大鼠肺、肠 SP、VIP 含  量变化的相关性研究 | 《辽宁中医杂志》 | 第一位 |
| 3 | 从“肺病”模型大鼠肠道形态学改变  探讨“肺与大肠相表里” | 《时珍国医国药》 | 第一位 |
| 4 | "肺肠合病”大鼠动物模型建立初探 | 《辽宁中医杂志》  2011 年第 2 期 | 第一位 |
| 5 | 多种教学法在《温病学》教学中的使  用 | 《陕西中医学院学报》  2010 年 6 月 | 第一位 |
| 6 | 浅谈温病的下法 | 《黑龙江中医药》 | 第一位 |
| 7 | 浅谈温病的滋阴法 | 《河南中医》 | 第一位 |
| 8 | 《温病学笔记图解》 | 化学工业出版社  2010.2 出版 | 主编 |
| 9 | «温病条辨» | 贵州教育出版社  2010.4 出版 | 编委 |
| 10 | 《中华大典・ 医学分典・温病部》 | 巴蜀书社 | 编委 |
| 11 | "肺与大肠相表里”脏腑相关理论的应用基础研究 | 国家重点基础研究发展计划（973  计划），项目编号：2009CB522706 | 参加 |

**声明**

博士学位论文“ 肺病及肠”的病理变化及相关调控物质和 ERK

信号通路的研究是本人在成都中医药大学攻读博士学位期间在导师

指导下完成的，该论文涉及的有关知识产权归成都中医药大学所有。 有关该学位论文成果的开发、转让、论文发表等，均需征得导师和成都中医药大学同意。

**博士生签名：导师签名 ：**

**2011年4月20 日**

附 录

**1****附图**

**1.1肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织病理形态改变普通光镜照片（HE染色，×100）**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图1 空白组肺组织（HE，×100） | 附图2 肺病组肺组织（HE×100） |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图3 空白组结肠组织（HE，×100） | 附图4 肺病组结肠组织（HE×100） |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图5 空白组十二指肠组织（HE，×100） | 附图6 肺病组十二指肠组织（HE×100） |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图7 空白组空肠组织（HE，×100） | 附图8 肺病组空肠组织（HE×100） |
|  |  |
| 附图9 空白组回肠组织（HE，×100） | 附图10 肺病组回肠组织（HE×100） |
|  |  |
| 附图11 空白组直肠组织（HE，×100） | 附图12 肺病组直肠组织（HE×100） |
|  |  |
| 附图13 空白组胃组织（HE，×100） | 附图14 肺病组胃组织（HE×100） |

**1.2肺、结肠组织病理形态改变电镜照片（EM, ×10000, ×8000）**



|  |  |
| --- | --- |
| 附图15 空白组肺组织（EM×12000） | 附图16 肺病组肺组织（EM×12000） |



|  |  |
| --- | --- |
| 附图17 空白组结肠组织（EM×8000） | 附图18 肺病组结肠组织（EM×8000） |

**1.3肺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胃组织CCK8、CGRP、**

**SP、VIP含量免疫组化照片（SP法，×200）**

**1.3.1 CCK8:**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图19 空白组肺组织（×200） | 附图20 肺病组肺组织（×200） |
|  |  |
| 附图21 空白组结肠组织（×200） | 附图22 肺病组结肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图23 空白组十二指肠组织（×200） | 附图24 肺病组十二指肠组织（×200） |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图25 空白组空肠组织（×200） | 附图25 肺病组空肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图27 空白组回肠组织（×200） | 附图28 肺病组回肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图29 空白组直肠组织（×200） | 附图30 肺病组直肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图31 空白组胃组织（×200） | 附图32 肺病组胃组织（×200） |

**1.3.2 CGRP：**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图33 空白组肺组织（×200） | 附图34 肺病组肺组织（×200） |
|  |  |
| 附图35 空白组结肠组织（×200） | 附图36 肺病组结肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图37 空白组十二指肠组织（×200） | 附图38 肺病组十二指肠组织（×200） |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图39 空白组空肠组织（×200） | 附图40 肺病组空肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图41 空白组回肠组织（×200） | 附图42 肺病组回肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图43 空白组直肠组织（×200） | 附图44 肺病组直肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图45 空白组胃组织（×200） | 附图46 肺病组胃组织（×200） |

**1.3.3 VIP：**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图47 空白组肺组织（×200） | 附图48 肺病组肺组织（×200） |
|  |  |
| 附图49 空白组结肠组织（×200） | 附图50 肺病组结肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图51 空白组十二指肠组织（×200） | 附图52 肺病组十二指肠组织（×200） |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图53 空白组空肠组织（×200） | 附图54 肺病组空肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图55 空白组回肠组织（×200） | 附图56 肺病组回肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图57 空白组直肠组织（×200） | 附图58 肺病组直肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图59 空白组胃组织（×200） | 附图60 肺病组胃组织（×200） |

**1.3.4 SP：**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图61 空白组肺组织（×200） | 附 62：肺病组肺组织（×200） |
|  |  |
| 附图63 空白组结肠组织（×200） | 附图64 肺病组结肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图65 空白组十二指肠组织（×200） | 附图66 肺病组十二指肠组织（×200） |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 附图67 空白组空肠组织（×200） | 附图68 肺病组空肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图69 空白组回肠组织（×200） | 附图70 肺病组回肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图71 空白组直肠组织（×200） | 附图72 肺病组直肠组织（×200） |
|  |  |
| 附图73 空白组胃组织（×200） | 附图74 肺病组胃组织（×200） |

**1.4肺、结肠iNOSmRNA、ERKmRNA表达(RT-PCR法)**

 

附图 75 iNOSmRNA 附图66 ERKmRNA

**2****综述**

**2.1****“肺与大肠相表里”的现代研究现状**

**2.1.1现代机理探讨**

**2.1.1.1从胚胎发育的角度看**

肺器官由肠的前肠发展而来，呼吸道上皮和腺体由原肠内胚层分化而成[1]。肺、气管与肠的结构来源是相同的，这可能成为“肺与大肠相表里”这一理论的结构基础。

**2.1..1.2从气体排泄途径看**

胃肠道内气体主要依靠肠壁血液循环吸收，由肺部排出。肠内气体经肠壁血液循环吸收再由肺部排出的量较由肛门排泄的量高出20多倍[2]，常人由小肠每小时吸收CO22500ml及其他气体1300ml。如肺部排泄气体功能因肺炎或支气管哮喘等病变而发生障碍时，胃肠道气体的排泄也受到影响，因而引起腹胀。此时若泻下通里、排便并排出气体，使肠道气压下降，不但对肠道组织和功能恢复有利，而且可减轻肺部排泄气机的负担，间接改善微循环和肺功能，促进病灶清除[3]。

**2.1.1.3从内分泌物质的影响看**

肠道是人体最大、最复杂的内分泌器官。现在发现由肠道分泌的物质有许多新的作用，有些物质可对肺产生影响。如由回肠结肠的H细胞分泌的血管活性肠肽(VIP)能刺激呼吸和松弛气管，诱发肺通气过度。胆囊收缩素(CCK)具有调节肝肠运动及胆囊收缩、保护胃黏膜的作用，有人发现外源性CCK对SD大鼠内毒素血症的肺动脉高压有明显的减轻作用，改善由此引起的呼吸功能障碍，并能延长内毒素血症动物的存活时间，故认为CCK是肺组织的一种较理想的保护因子[4]。现代研究已证实肺不单是一个呼吸器官，也是一个内分泌器官，其合成的血

管活性肠肽(VIP)可影响肠中血管舒张并参与哮喘的发生，并且哮喘的发作及气道的反应性均与VIP含量减少有关，VIP含量降低与气道阻力呈负相关[5]。

**2.1.1.4从肠源性内毒素的作用看**

大肠的实热积滞等病态可致肠腔内的细菌与毒素大量繁殖增加并吸收入血，通过肠源性内毒素导致损害。有报道表明，以大剂量内毒素静脉注射于大鼠时，可引起急性肺损伤[6]。从解剖生理学角度看，肠源性内毒素经下腔静脉回到右心

房，并经肺动脉和毛细血管首先到达肺脏，而后才经左心房和动脉及毛细血管灌流到其他脏器，所以肺脏受内毒素的影响较大[7]。

**2.1.1.5从公共黏膜免疫系统来看**

胃肠道和呼吸道的黏膜两者都是组成公共黏膜免疫系统的一部分，当一处黏膜发生病变时，可以通过黏膜免疫的途径影响到另一处[8]，即肠道相关淋巴样组织(GALT)与支气管相关淋巴样组织(BALT)以及其他部位黏膜的淋巴样组织共同形成一个相对独立的免疫应答网络，共同调节人体几百平方米黏膜的免疫应答。肺与大肠表里就是通过黏膜免疫细胞的迁徙而使公共黏膜免疫系统中和外界接触最多，黏膜面积最大的消化和呼吸道黏膜在免疫过程中生理上相互联系，病理上彼此传变。周东浩等[16]认为肺与大肠相联系的机理，实质是免疫调节网络，胃肠道和呼吸道的黏膜都是公共黏膜免疫系统的一部分，可相互传变，这种黏膜免疫的物质基础是分泌型IgA。杨胜兰[10]实验表明肠源性肺损伤大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化随着肺损害程度的加重而增高，通腑法明显降低其含量(P<0.05)。朱义用等[11]检测大鼠腹腔感染模型，结果显示：肺毛细血管通透性、肺湿/干质量比值、BALF的中性粒细胞百分率、肺组织的内毒素和TNF-α逐渐增加，时间越长越明显，而大黄可防止内毒素进入肺组织，抑制肺内中性粒细胞的积聚和TNF-α释放，减轻肺的炎性反应。高国林等[12]提出细胞凋亡和相关基因表达异常可能是肺损伤的发病机制之一。

**2.1.2实验研究**

实验方法在医学研究中常表现为两种形式：临床试验—人体试验和动物实验

—模型试验。模型试验，是以模型为主要成分的实验形式，它是科学研究中类比法的应用，是实验研究的一种特殊形式。在实验研究中，动物模型是整个实验过程的平台，是实验设计的关键，“是作为研究人员的主体和认识对象的客体两者之间的一种特殊中介，既是认识客体的工具，又是被研究的对象。”动物模型在承担“认识客体的工具”作用之前，应对其进行更深刻的研究。同样，对“肺合大肠”理论进行动物实验，动物模型的选择在很大程度上影响着动物实验的成败。中医基础理论的实验研究肇始于上世纪五十年代，由于起步晚，动物模型的制作经验较少，故对其造模方法的研究尤其重要。而“肺合大肠”理论的实验研究起始于上世纪八十年代，其动物模型主要以机械损伤或机械梗阻方法而建立，模拟

临床燥屎内结、阻塞大肠、腑气不通引起肺气上逆的病理过程。肺与大肠相表里理论的实验研究，有关“肺与大肠相表里”的研究和报导很多，其中动物模型经历了王今达的肠系膜上动脉结扎模型，冯学瑞的直肠全结扎模型，韩国栋的体外直肠半结扎模型，天津南开医院的次碳酸秘过度收敛模型以及韩国栋的内毒素模型5个阶段，以这些模型为研究对象，通过对大承气汤等方通腑作用机制的研究，从而探讨了肺与大肠相表里的本质。

天津市第一中心医院急性三衰抢救研究室[13]在多年的临床实践中发现，有许多严重肠道异常的病人，常伴发急性呼吸衰竭，特别是伴发成人型呼吸窘迫综合征( ARDS)。为了揭示两者的关系，阐明祖国医学理论肺与大肠相表里学说的本质，他们选用钳夹肠系膜上动脉的方法制造动物模型。实验结果表明，钳夹肠系膜上动脉组的全部家兔均出现严重的肺损害，而肺脏以外的组织，包括心脏、肝脏、胰腺、肾上腺及肾脏均无肉眼及镜下的异常，非钳夹肠系膜上动脉组的全部家兔均无肺脏损害。实验同时发现，钳夹肠系膜上动脉以前血液中无内毒素存在，钳夹后90min即可出现内毒素血症。因此作者认为肺脏损害与肠源性内毒血症和肠道血液循环障碍有关，提出了中医肺与大肠相袁里学说本质的一个组成部份，在一定程度上应考虑所谓的“热毒”、“瘀血”的观点。在上述实验的基础上，他们又给动物模型使用具有清热解毒、活血化瘀作用的Ⅵ号方药，发现对肺脏损害有显著的防治作用。张余森[14]亦有用类似的方法制作动物模型获得成功的报道。天津中医学院冯学瑞等人[15]通过半结扎直肠或小肠造成肠道郁滞或燥结的动物模型。结果发现动物小肠或大肠胀气。粪食燥结和食糜郁滞，同时伴发肺脏明显的病理变化，肺泡吞噬细胞死亡率增高，而其它脏器未见异常。对照组亦未见肺脏改变，证明了祖国医学肺与太肠相表里理论的科学性。韩国栋等[16]对冯氏动物模型做了改进，通过体外结扎造成直肠下狭窄。使大肠燥屎内蕴而形成实热郁滞。表现为肺充血、出血，I、I型肺泡上皮和巨噬细胞肿胀、坏死，而其它脏腑未见明显异常，给予中医通腑泄热的大承气汤后，可促进肺损害修复。使上述改变明显趋向好转，为中医肺与大肠相表里理论提供了佐证。田在善[17]的设计更为合理，采用连续经口投予大剂量次碳酸铋于大鼠造成大便秘结、直肠扩张的方法，旨在使模型更接近于临床因燥屎内结阻塞大肠、腑气不通引起肺气上逆的病理过程。实验结果表明：除显示动物大小肠胀气、粪食燥结和食糜郁滞，同时

伴发肺脏明显的病理变化，表现为肺充血出血，ⅠⅡ型肺泡上皮和巨噬细胞肿胀、变形、结构变异和坏死，肺泡巨噬细胞死亡率增高，而其他脏器未见明显异常。薛芳等[18]则先造成家兔的呼吸窘迫症，然后予大承气泻大肠，证明对肺有保护作用。表现在避免了RCD2值的下降与肺系数（肺重，体重）的异常升高及病理上的改善。李风森氏[19]创造用短毛豚鼠实验，分为哮喘模型组和正常组，分别检测肺、大肠、心组织匀浆中过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)，发现在正常组中肺与大肠匀浆中以上三项指标有相关性，而在哮喘时这三项指标又无相关性。另外，肺与心、大肠与心在任何情况下皆无相性。说明肺与大肠在生理、病理情况下有密切关系，且有一定的物质基础。王月兰等[20]采用静注FecL3复制家兔肺心病模型，静注后病理学改变发现模型组家兔心脏有明显改变占56.3％，肺脏有明显病理改变达90％以上，模型组家兔回、结、盲肠电与正常家兔相比，频率显著增快，幅值明显下降，肠电节律紊乱。因此作者认为此模型对探讨肺与大肠的关系是可行的。实验中还观察到静注对肠电影响比心电小，模型形成后，肠电频率明显增快，幅值明显降低，节律紊乱，表明大肠电活动的异常改变主要由肺脏病理改变引起，表明肺与大肠有相关性。冯维斌[21]实验发现，在肺心病急性加重期，随着病情加重，腹胀、便秘发生率显著增加，说明呼吸功能越差，肺气虚越严重，越易发生肠道功能紊乱。张云松[22]用解毒通腑法治疗温病气分发热，动物实验表明，服用加味凉膈散可起到退热、消炎的作用，并能抑制组织细胞的坏死，改变血液流变指标。还有学者通过实验发现[23-24]肠缺血或再灌注后，除肠道病理改变外，远隔部位的肺脏也有水肿、炎症、通气功能的异常以及微血管紊乱、渗透性增大等病理改变出现，并且肺是最早受损的器官之一。张小虎等[25]采用卵蛋白致豚鼠过敏性哮喘的方法造模，造模后观察各组豚鼠小肠墨汁推进率，放免法检测各组豚鼠小肠组织匀浆中SP、VIP含量，光镜下定性观测及半定量分析豚鼠小肠SP、VIP神经元、神经纤维的表达情况。结果发现：与对照组相比，哮喘组豚鼠小肠推进率明显下降( P <0.05 )、小肠组织匀浆中VIP含量显著升高(P<0.05)，SP含量明显降低（ P

<0.05）, SP神经元及神经纤维表达明显减弱(P<0.05 ), VIP神经元及神经纤维表达明显增强（P <0.05）。因此作者认为“肺与大肠相表里”的功能主要由肺气的肃降运动体现和完成，二者有密切相关性，提示中医治疗哮喘、肺气肿等以肺失

肃降为主要病理表现的疾病时，在常规肃肺降气法基础上，如患者伴有便秘、大便干结等症状，可在辨证论治基础上，考虑辅助使用通里攻下、润肠通便、益气润肠、顺气行滞等法加强疗效，可选用方药有大小承气汤、增液承气汤、麻子仁丸、黄芪汤、六磨汤等。

**2.1.3临床应用研究**

实验研究，从肠→肺，肺→肠两种途径证明了肺与大肠相表里的正确性，临床上肺部疾病和肠道疾病常可相互影响，这一现象已被广大医务工作者所重视。他们根据肺与大肠相表里理论制定了相应的治法，大体可归纳为肺病治肠、肠病治肺、肺肠并治三种：

**2.1.3.1肺病治肠**

吴国水[26]运用下法治疗急性上呼吸道感染后慢性咳嗽，慢性支气管炎伴肺部感染及肺炎、肺癌、肺结核致胸腔积液，支气管扩张及肺结核致咯血均取得显著效果。黄礼明[27]治疗痰浊壅肺型患者，虽无明显阳明腑实表现，但配用大黄通腑泻浊，收效甚良。苏惠萍[28]采用通腑法治疗哮喘发作期。苏氏认为哮喘发作期因肺失肃降，影响大肠传导功能导致腑气不通；肠腑壅实又导致阳明浊气上冲，进而影响肺的肃降使哮喘加重，故治疗采用通腑法。腑气得通，气机逆乱得以缓解，痰饮积滞得以降泻，有利于肺之宣肃功能恢复。李雪芩[29]用通里攻下法配合化痰活血治疗肺源性心脏病（肺心病）呼吸衰竭，并指出肺心病急性发作期一旦出现腹胀、纳呆或便秘症状，即行攻下法治疗，可预防呼吸衰竭的发生。肖阳娥[30]以增液承气汤加减，单纯采用滋阴增液、泻热通便法治疗慢性呼吸衰竭。张瑞利[31]报道使用加减宣白承气汤治疗急性肺部感染，其认为肺与大肠相表里，皆以通降为顺，选用宣白承气汤，立意于肃肺通腑，导痰热下行。谢邦军[32]以加味宣白承气汤直肠滴注治疗痰热腑实型肺性脑病。直肠给药，通过经脉上输于肺，肺朝百脉，而将药物运送到全身，使腑气通而肺气肃、心窍开、痰热自除。张石义[33]选用加味己椒苈黄汤治疗支气管哮喘急性发作，可明显降低异常增高的白细胞，并能改善气道通气状态。林群莲[34]治疗肺心病发作期，用麻杏石甘汤、小青龙汤、麦味地黄汤和增液汤加减配合西药对症治疗，结果全部病例有效，显效15例，

好转4例。李晓君[35]认为通下大肠可泻肺热、逐痰饮、降气止咳平喘，可用于治疗各种肺炎、支气管哮喘、肺脓肿，抢救肺性脑病、呼吸窘迫综合症。刘刚[36]

观察到肺气肿患者当下利或便秘时气喘即发作。他认为肺与大肠相表里，大肠有疾可影响到肺的肃降，无论便秘或下利均可成为发作的诱因，而气喘能否减轻也取决于大便是否正常，治疗中关键在于一个“通”字，并有验案为例。张元兵[37]根据“肺与大肠相表里”理论和“痰瘀伏肺、气道壅塞”的学术思想，采用“涤痰行瘀、利气除壅、通腑平喘”法治疗30例慢性阻塞性肺部疾病急性发作期患者，结果治疗组总有效率为90.0%，优于对照组的76.7%。关瑞锋[38]用通利大肠、清泄大肠的方法治疗肺源性心脏病急性发作期痰热壅肺型的患者，疗效显著。贺真[39]用加味己椒苈黄汤治疗胸腔积液，也体现了通腑利水法对肺部痰饮病的治疗。胡克明，赵光明等以承气汤等加减治疗肺病，均取得显著疗效[40-41]。翁惠英[42]探讨了慢性阻塞性肺病(COPD)机械通气患者肠内营养支持的作用，以46例患者

分为2组，实验组予以肠内营养4周，对照组给予一定量的糖、脂肪和氨基酸等常

规输液，两组病例所给的电解质和维生素含量均相同。每周2次测定所有患者的血清白蛋白(ALB)，前白蛋白(PAB)，转铁蛋白(TRF)，IgA、IgG、IgM及一次脱机成功率。结果显示，治疗2周末，实验组PAB、TRF及IgA、IgG、IgM均显著高于对照组(P<0.05)，治疗4周末，实验组所有指标均显著高于对照组（P<0.05）。宋传荣[43]运用通腑法治疗慢性支气管炎取得了较好的疗效。吕建民[44]泻下涤痰治慢性支气管炎，泻下泄热治大叶性肺炎，泻下逐水法治疗渗出性胸膜炎均取得了良好的疗效。崔红生[45]升降散加减治疗支气管哮喘急性发作期临床观察，结果：临控16例，显效24例，好转18例，无效6例，总有效率90.63，主症、血气分析、肺功能、外周血EOS计数本组治疗前后比较均有显著性差异（P<0.01）。陈超等[46]运用通腑法，或在辨证治疗的方药中加入宣肺通腑之剂治疗乳蛾、肺炎喘嗽、哮喘、便秘等，效果良好。傅氏等[47]治疗咳嗽（肺热壅盛，大便燥结）时采用清肺火与泻阳明大肠火同用，治肺胀（气阴两虚，大肠便秘）在益气养阴、补肺纳肾基础上又加入润肠通便之品，治喘证（肺气不足，大肠虚秘）时每用益气润肠之法，辨证论治，效果理想。丘氏[48]用同样方法治疗肺胀“釜底抽薪”，每获良效。薛氏[49]则除在治咳治喘应用通腑畅腑法外，另僻蹊径清肺泻肠，治疗痤疮。张氏[50]用治牛皮癣，除肺热，利大肠，使邪从下出，常于辨证基础上加用生熟大黄各10g，不畏腹痛、便溏，每获效验。陈守宏等[51]综述肺肠临床时，取“肺朝百脉”之意，以加味宣白承气汤直肠滴注治疗痰热腑实型肺性脑病有效。二位皆

取肺合皮毛之意。仝小林[52]等在治疗SARS时强调通腑泻肺，下不厌早。申建[53]探讨肺与大肠相表里理论在慢性肺心病治疗中的运用，将慢性肺心病急性发作期

90例患者随机分为西药组、中西医组、大黄组各30例，得出肺病治肠在慢性肺心病急性作期运用的疗效明显的结论。周慧生[54]善于运用活血通腑法治疗发作期哮喘，疗效显著。

**2.1.3.2肠病治肺**

陈培琼[55]认为肺之肃降与大肠传导息息相关，肺为水之上源，水液代谢有赖于肾的气化，采用宣肺降气、益肾通便法治疗老年性便秘。陈剑屏[56]观察到习惯性便秘好发于机关干部、知识分子及大中专学生，认为长期伏案久坐之人肺活量小，肺气易郁滞，宣肃功能必然不利，因此开宣肺气，使肺气得以宣发肃降，才能维持大肠腑气的通降功能，保持大便得以顺利排出，采用宣肺理气法治疗习惯性便秘，取得满意的疗效。刘小雨[57]从肺论治顽固性消化性溃疡，经临床应用百苏愈疡汤加减治疗，腹胀、腹泻症状显著改善。张小军[58]在临床上体会到慢性肠炎与肺失宣肃关系密切。认为肺失宣肃不能通调水道、水湿内停困脾、脾失健运，水湿相杂而致泄泻，辨证分为肺气不宣、肺失肃降、痰湿犯肺等型，治疗采用宣肺肃降、解郁化痰法，效果颇佳。魏占美[59]认为习惯性便秘是由于大肠气机不利，而肺气的宣发肃降直接关系到大肠的排浊功能，可从调理肺部气机入手调整大肠气机，用此法治疗习惯性便秘也获良效。郭玉琴[60]认为习惯性便秘是由于气机郁滞，大肠蠕动缓慢而引起。可从调理肺部气机入手调整大肠气机，使肺气的宣肃功能得以恢复，大肠的排浊功能才能恢复正常。即中医的提壶揭盖法，利用这一方法治疗习惯性便秘临床获得良效。老年习惯性便秘则是因肺气虚。费氏[61]用于咳嗽迁延，大便失禁。认为肺气耗散太过，失于治节，即《内经》“肺咳不已，则大肠受之，大肠咳状，咳而遗失”。二例可谓肠病治肺之经典。王仲霞[62]综述老年性习惯性便秘，顽固性消化性溃疡、慢性肠炎，采取宣肺以调畅气机之法均有良效。贾氏等[63]综述治疗急性胃肠炎、消化性溃疡急性穿孔、牙痛分别取肺经穴位尺泽针刺，均取得明显疗效，对于牙痛甚至比合谷诸穴高效迅速。66.7％，明显高于对照组的33.3％。

2.3.3肺肠合治

杜怀棠[64]运用宣白承气汤启闭宣壅治疗肺炎高热兼有便秘的患者，采用宣上

通下的治法，宣通肺气，腑气下行；反之腑气通畅，又利于肺气之宣，有釜底抽薪之效。易向明[65]观察了101例哮喘发作期患者，其中泄泻下利型占30.69%,大便干结型占39.6%，故主张治疗上不能单纯治肺，应肺肠并治。胸外科部分患者开胸术后常出现胸闷、发热、腹胀、大便干结等症，吴承燕[66]治疗时在清热解毒、活血化瘀的基础上，并用通里攻下之法，使肺部实热从大便而下，改善大肠功能及肺部气血瘀滞，有利于肺部感染的控制和损伤的修复。游文华[67]认为痰热阻肺的实喘，因肃降失司往往下累大肠造成肠壅便秘，传导不畅而宿垢不去，积热内充而产生腹胀，热浊不降反而循经上犯，形成恶性循环互为因果，因此应肺肠同治，从热郁痰阻与传导失司的病变论证了肺与大肠在病理上的关系。李辛夷[68]认为气不通则邪无去处，因而只解表宣肺化痰而不通腑气则痰热之邪无处排泄，只有双管齐下才能达到治疗的目的，以宣肺通腑法治疗毛细支气管炎例疗效明显。宋勉等[69]对支气管哮喘急性发作期的部分患者，在中、西药的治疗疗效不满意的情况下，改用肺肠同治法治疗，加用适量大黄，病情很快得到缓解。杨胜兰[70]采用肺肠并治法治疗小儿外感咳嗽，将60例外感咳嗽患儿随机等分为治疗组与

对照组各30例。治疗组采用肺肠并治法，证实该法治疗各证型小儿外感咳嗽的有效控制率为66.7％，明显高于对照组的33.3％。任继学[71]主张用宣肺温润之法治疗老年习惯性便秘。

**2.2****“肺病及肠”的现代研究现状**

**2.2.1“肺病及肠”现代机理探讨**

中医基础理论认为“肺者，相傅之官，治节出焉。”肺气宣降正常则有助大肠传导有节。一方面，肺气肃降，通调气机，下助大肠传导糟粕。正如唐容川《医经精义・脏腑之官》所说：“大肠之所以能传导者，以其为肺之腑。肺气下达，故能传导。”另一方面，肺气肃降，通调津液到大肠，使大肠润而不燥，以利传导糟粕，故唐容川又说：肺气“传输大肠，通调津液，而主制节，制节下行，则气顺而息安……大便调”。若肺气虚而无力推动，则肺气壅遏肃降不能，可使大肠传导迟缓，而引起排便困难，正如《妇人大全良方・卷八》说：“肺主气，肺气不降，则大肠不能传送。”若痰热闭肺，不能通调津液于大肠，则招致肠燥腑气不通，引起便秘，正如《石室秘录・卷三》说：“大便闭结者，人以为大肠燥甚，谁知是肺气燥乎？肺燥则清肃之气不能行于大肠，而肾经之水仅足自顾，又何能

尝流以润溪涧哉。“若肺热移于大肠而使大肠传导功能失职，则可引起泻利，故

《医经精义・卷上》说：“大肠痢证，发于秋金之时，亦是肺金遗热于大肠。”现代医学研究发现：当肺部病变时，炎症渗出物或分泌物阻塞小气道，肺内

通气换气功能障碍时，血液中气体分压升高，肠管气体吸收障碍，致肠道充气，机能紊乱。如肠蠕动增强，分泌增多，则腹痛便溏，则为“肠热下痢”；若蠕动减弱，分泌减少，吸收增加，则便秘腹胀，此为“腑实热结”，所谓“脏不容邪还之于腑”。当肠腔内和血液的气压进一步升高，气血必向压力较低处弥散，进入疏松的黏膜下层形成气泡，并引起部分黏膜脱落形成溃疡，同时也加重了肺通气换气负担，促使肺部病变加剧。揭示了“浊阴归地，清阳升天”的科学性。肺部病变还可以通过内分泌激素的变化影响大肠，如甲状腺对肺与大肠均有调节作用，当某些肺部疾病时可产生低三碘甲状腺氨酸(T3)综合征，使肠道蠕动减弱，分泌减少致使腹胀便秘。神经、体液、激素等对肺与大肠均有调节作用，从而使肺与大肠在生理上相互关联。就神经调节而言，肺部组织、支气管的分泌、收缩功能和肠道的分泌、收缩功能都受到迷走神经调节，且肺呼吸活动和肠道的收缩功能都受到大脑皮层和扣带回区的调节控制。就体液调节而言，肠道内气体依靠肠壁血液循环吸收再由肺部排出的量较由肛门排泄的量高出20多倍。就内分泌激素调节而言吗，新近研究发现肺肌的活动调节对肺呼吸功能和肠道收缩功能也有一定作用。

**2.2.2实验研究现状**

哈木拉提等[72]采用生物化学发光法，观察哮喘豚鼠动物模型外周血淋巴细胞化学发光强度( Ly - cl)和中性粒细胞化学发光强度( PMN- Cl )，同时分别检测肺和大肠组织中超氧化物歧化酶( SOD)、谷胱甘酞过氧化物酶( GSH-Px )活性和丙二醛(MDA)浓度，并对肺与大肠的相关指标进行分析。结果表明，哮喘组动物外周血Ly-cl和PMN-cl明显高于正常组（分别为P<0.05和P<0.01），其肺和大肠组织中SOD、GSH、Px活性明显低于正常组，MDA明显高于正常组（均P<0.01）；哮喘组动物肺与大肠组织的MDA之间存在相关关系。刘福成等[73]采用油酸复制大鼠呼吸窘迫症模型，研究发现大鼠尿液排出减少，并有少量球状粪便排出，予以大承气汤后大鼠的氧分压（PaO2）升高，肺体积减少，并改善了肺水肿和肺出血等病变，这也证明了肺与大肠存在的相关性。李建生等[74]研究老年

肺炎的小肠损伤病理生理特点，复制肺炎双球菌肺炎大鼠动物模型，分为对照组、模型组、中药复方毒素清（人参、瓜萎、生地黄、鱼腥草、白头翁、丹参等）高、低剂量组、头孢氨苄组。主要观察肺脏和小肠组织含水量，小肠组织前列腺素代谢产物6-酮-前列腺素F1α（6-keto-PGF1α）和血栓素B2 ( TXB2 )含量、一氧化氮( NO)和MDA含量及SOD活性。结果显示，肺炎的肺组织损伤明显，肺脏和小肠组织含水量增高。模型组小肠组织6-keto-PGF1α含量、SOD活性的降低和TXB2、NO、MDA含量的增高较对照组显著。另有研究发现，大承气汤对大鼠或家兔实验性肺损害具有保护和促修复作用[75-77]。薛芳等[18]则先造成家兔的呼吸窘迫症，然后予大承气汤泻大肠，证明对肺有保护作用。表现RCD2值的下降与肺系数（肺重，体重）的异常升高及病理上的改善。李风森氏[19]创造用短毛豚鼠实验，分为哮喘模型组和正常组，分别检测肺、大肠、心组织匀浆中过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶( GSH-Px )、丙二醛( MA)，发现在正常组中肺与大肠匀浆中以上三项指标有相关性，而在哮喘时这三项指标又无相关性。另外，肺与心、大肠与心在任何情况下皆无相关性。蒋学武等[78]根据临床儿科的肠绞窄性缺血的大多数病理情况，应用健康SD大鼠进行动物实验观察，发现肠绞窄缺血虽时间不同(30min和60 min)，但松解绞窄后的期间，肺透性均出现一系列的变化，其中受累时间长者，松解绞窄后肺透性变化更大。同时观察到肺的病理改变主要为组织充血水肿、炎性细胞浸润、肺泡不张，严重程度与绞窄性缺血时间成正相关。

**2.2.3临床研究现状**

**2.2.3.1临床症状研究现状**

曾祥国[79]102例尸检研究表明，肺淤血水肿，肺泡壁断裂形成气肿，支气管黏膜杯状细胞及粘液腺数量减少，杯状细胞内糖蛋白和粘蛋白含量降低等肺部病理改变时，常常与肠道充血水肿，大肠腺杯状细胞减少，糖蛋白和粘蛋白含量降低等病理改变同时存在。而单纯支气管肺炎患者，不只在支气管黏膜的杯状和粘液腺内引起粘多糖的改变，而且在大肠腺内，粘多糖均由正常的硫酸性转变为非硫酸性，与肠炎组改变相似。另有研究表明[80]胃肠道内气体，主要依靠肠壁血液循环吸收，由肺部排出，正常情况下经此途径排出的气体较由肛门排出的气体多

20倍。如肺部排泄气体功能因肺炎或支气管哮喘等病变而发生障碍时，胃肠道

气体的排泄亦受到影响，因而引起腹胀。还有学者提出[2]当肺部炎性渗出物严重充塞肺泡腔时，血液中气体不易从肺排出，使其气体分压增高。此时，血液中溶解的气体和肠道内鼓胀着的气体必将向压力较低的肠道黏膜下层弥散，并可形成肠道气泡。而当哮喘[81-82]和肺部结节性肉瘤变[83]时，不仅出现气道炎症、支气管渗透性改变或通气功能障碍，而且消化道也会有轻度炎症和黏膜渗透性增大的病变发生。冯有为[84]研究发现急性哮喘病人血浆胃动素水平明显降低，而心衰组与非胃肠对照组无此变化，说明哮喘患者存在胃肠动力障碍，证明了呼吸系统与消化系统疾病之间有内在联系。陈永光[85]在对肺气虚患者进行胃肠道钡餐透视观察胃肠运动功能时，发现肺气虚患者小肠排空时间延长。冯维斌等[21]发现在肺心病急性加重期，往往伴有腹胀、纳呆、便秘等严重肠道疾病，甚至出现肠梗阻，这说明了肺脏功能越差就越容易出现肠道功能的紊乱。张元兵[37]观察到60例慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性发作期病人86.7%有大便异常表现。

大肠病亦可治肺，或治大肠病并治肺，主要是针对肺失宣降致大肠传导失常之腹满便秘或腹痛便溏等证。如《寓意草》记载对肺热而致腹泻“今以润肺之药润其肠而源流俱清，寒热咳嗽泄泻一齐俱止矣”。现代临床也对肠病治肺法得到了验证。

**2.2.3.2根据“肺病及肠”确立的肠病治肺法研究现状**

**2.2.3.2.1根据肺热移肠确立的治法**

风寒入肺可令人咳，手太阴肺既络阳明大肠，又与大肠相表里，如肺咳不已，往往大肠受之，因此临床上很多证属肺热的外感表证，除有咳嗽、咯痰、发热、恶寒等肺部感染症状外，还常会因邪热下注大肠，致腑气不通，而出现腹胀、便秘等大肠实热证。对于此类患者，在宣肺清热的同时，宜加入大黄、枳壳厚朴等通腑泻热之品，甚则直接采用吴鞠通的宣白承气汤为主方治疗，使腑气通畅，肺热从大肠下泄，肺之肃降功能即可恢复正常。如闫力等[86]及郎立和等[87]分别采用宣白承气汤加味治疗慢性支气管炎急性发作及急性气管炎，宣肺通腑，脏腑同治，气机升降恢复正常，咳嗽、喘促、便秘诸症得以消除。曾兆麟等[88]提出对于出现呼吸困难及呼吸窘迫综合症的患者，可采用通腑泄热之法泄肺热、下痰壅，认为大承气汤能促进肺Ⅱ型细胞的增生作用，对改善肺通气功能具有重要意义。李志军等[89]治疗急性肺损伤造成的多器官功能障碍综合征应用单味大黄或大承气汤

荡涤肠腑，泄热通下，对该病症见腹痛拒按、高热气促、神昏谵语，甚则惊厥发狂之阳明实热证者，单味大黄可用至50g左右。而大承气汤通里攻下法对肠源性内毒素血症具有减毒作用，因其可荡涤肠道，使实邪积滞排出，改善肠、肺等脏器的血流灌注，使肠蠕动及呼吸功能得以恢复，减少了内毒素移位，从而显著减轻了肺损伤。临床上还可见肺热移肠的另一种表现形式，如身热，咳嗽，下利色黄热臭，肛门灼热，腹不硬痛，苔黄，脉数。此下利为热迫下注所致，可予葛根芩连汤通因通用，苦寒清热止利。肠热清，下利自止；肺热撤，咳喘自除。如阎艳丽等[90]采用该法治疗邪热熏蒸于肺之咳喘，颇具心得，认为芩连为君，不必细述，配伍葛根，不仅外解肌热，鼓舞肠胃清阳上升而止利，且能升津舒经，滋养筋脉，缓和支气管平滑肌痉挛而止喘。近年杨进[91]提出葛根芩连汤亦适用于

SRAS等重症肺炎的治疗。柴守方[92]认为长期便秘多为气阴两虚，热结相兼之虚中夹实。且脾主运化，脾虚运化无权，传送无力，往往是导致便秘的主要原因，又认为肺与大肠相表里，便秘与肺的关系密切，当塞因塞用，以补开塞，自拟补脾宣肺汤以补脾生血，宣肺通便治疗便秘，收到很好的临床疗效。曾清泉[93]认为从经脉上看，肺与大肠之间存在络属关系，肺系疾病常可通过经络传导导致肛肠疾病。肺经之热下迫大肠导致痣核脱出，肛门疼痛之证，治疗时可采用下病取上，肠病治肺之法，遂以清肺立法，用麻杏石甘汤辛凉泄肺为主，辅以升麻、黄芪益气升提，佐以白芍、甘草缓急止痛，火麻仁润肠通使。诸药合用则使肺气通调，肠络顺畅，痔核脱出渐收，肛门疼痛亦除。

**2.2.3.2.2肺虚致肠腑失职确立的治法**

肺病日久，迁延不愈，则肺气亏虚，肺阴亦耗伤，肺失肃降。肺合大肠，肺气亏虚，大肠传导无力；肺阴不足，肺之宣发功能失职，不能布散津液以濡润大肠，肠腑津枯，传导不利。此时不可一味攻下，防止伤正，导致气更虚，阴更竭。气虚者补肺气，以助大肠传导之功；阴虚者滋肺阴，以布津濡养肠腑。临床应根据患者的具体情况，适当加入理气健脾之茯苓、瓜蒌皮、木香、砂仁等，或辅以润肠之胡麻仁、瓜蒌仁、郁李仁等，大肠通畅，腑气通则肺气宣肃功能正常。赵富宝[94]曾应用香砂承气汤加减治疗肺心病失代偿期胃肠功能衰竭，取得满意疗效。慢性肺源性心脏病缠绵难愈，肺热灼津，久病更加重耗气伤津，肠腑失养，传导失司，胃肠功能衰竭，大便秘结，腑气不通，香砂承气汤加茯苓、神曲等健

脾行气、通腑泄热，培土生金，肺病自除。肖阳娥等[95]将增液承气汤加减运用于慢性呼吸衰竭的救治中，取得较好疗效。慢性呼吸衰竭是慢性阻塞性肺病常见的并发症，大多因肺部感染而诱发，属久病气虚生痰，痰湿阻肺，或痰迷心窍范畴，辨证属本虚标实之证，常规治疗多清肺祛痰，开窍安神等，但起效缓慢。中医认为大肠为传导之官，以通为用，以降为顺，肺主气，司呼吸，主肃降，有助大肠向下传导，且能布散津液，濡润大肠。反过来，大肠不通则肺气不降，而出现喘咳胸满，肖氏等选取的病例均有慢性肺脏疾病，且有便秘及大便干结证候，这也是中医理论“肺与大肠相表里”的临床体现。故采用短期内泻大便的方法，清除肠内积滞，泻下后浊气下降，清气上升，有形之痰随咳而出，无形之痰随便而排，通便后腹压下降，腹肌活动加强，肺通气随之改善，呼吸衰竭症状得到缓解。增液承气汤为攻补兼施的缓泻剂，对老年体弱患者起到了扶正驱邪的作用。肖氏认为在慢性呼吸衰竭的抢救过程中短期使用增液承气汤可迅速缓解病情，争取抢救时间，提高抢救成功率，优于单纯西医和传统的清肺祛痰法。曾清泉[93]认为直肠脱垂有虚实之分，且以虚者居多，而虚证一般均责之于脾胃之虚，中气下陷。但肺气亏虚更是直肠脱垂的主要病机所在。肺气耗伤可致大脑气虚，又可损及于脾，终导致肺脾气虚，大肠不固，形成脱肛。所以他主张治疗上重在补肺气，辅以健脾气，使肺脾之气得以充盛，则虚陷之脱垂可愈。另外，他认为虚证便血为便血经久，伤及正气，气失统摄，肺气虚损，可累及于脾，导致肺脾气虚，摄血失权。而肺气之虚损，因表里关系，又可导致大肠气机逆乱，血不循经而便血。因此治疗上就不可单用凉血止血之品，而是从肺论治，以敛肺为主，辅以健脾，佐以凉血，则可达到良好的止血效果。

**2.2.3.2.3肺失宣降致肠腑失职确立的治法**

如张小军[58]在临床上体会到慢性肠炎与肺失宣肃关系密切。认为肺失宣肃不能通调水道，水湿内停困脾，脾失健运，水湿相杂而致泄泻，辨证分为肺气不宣、肺失肃降、痰湿犯肺等型，治疗采用宣肺肃降、解郁化痰法，效果颇佳。陈剑屏

[56]观察到习惯性便秘好发于机关干部、知识分子及大中专学生，认为长期伏案久

坐之人肺活量小，肺气易郁滞，宣肃功能必然不利，因此开宣肺气，使肺气得以宣发肃降，才能维持大肠腑气的通降功能，保持大便得以顺利排出，采用宣肺理气法治疗习惯性便秘，取得满意的疗效。魏占美[59]认为习惯性便秘是由于大肠气

机不利，而肺气的宣发肃降直接关系到大肠的排浊功能，可从调理肺部气机入手调整大肠气机，用此法治疗习惯性便秘也获良效。郭玉琴[60]认为习惯性便秘是由于气机郁滞，大肠蠕动缓慢而引起。可从调理肺部气机入手调整大肠气机，使肺气的宣肃功能得以恢复，大肠的排浊功能才能恢复正常，即中医的提壶揭盖法，利用这一方法治疗习惯性便秘临床获得良效。

**2.2.3.2.4根据肺病及肠理论确立的肺肠并治法**

根据肺病及肠的理论确立的治法不仅有肠病治肺法还有肺肠并治法，这些肺肠并治法见于如下的学者研究，如伍忡[96]用清肺化痰、泻热通便治疗痰热内蕴所致便秘，选用桑白皮汤加大黄、葶苈子等通便泻热之剂。张珍玉[97]认为老年性习惯性便秘，多肺气不足，肠道津亏，临床应补益肺气兼生津而助大肠传导，而不宜过用大黄及利气之品。牛治君[98]遵循“诸气者，皆属于肺”的理论，制定补气生血，宣肺通便的治疗原则，自拟补气宣肺汤治疗功能性便秘。陈培琼[55]认为便秘病位在大肠，系大肠传导功能失常所致，与肺睥肾关系密切。肺之肃降与大肠传导息息相关，肺为水之上源，水液代谢有赖于肾的气化，采用宣肺降气、益肾通便法治疗老年性便秘。刘小雨[57]根据此理论，从肺论治顽固性消化性溃疡，临床应用百苏愈疡汤加减，腹胀、腹泻症状显著改善。张元兵[37]根据“肺与大肠相表里”理论和“痰瘀伏肺、气道壅塞”的学术思想，采用“涤痰行瘀、利气除壅、通腑平喘”法治疗30例慢性阻塞性肺部疾病急性发作期患者，结果治疗组总有效率为90.0%，优于对照组的76.7%。傅氏等[47]治疗咳嗽（肺热壅盛，大便燥结）时采用清肺火与泻阳明大肠火同用，治肺胀（气阴两虚，大肠便秘）在益气养阴、补肺纳肾基础上又加入润肠通便之品，治喘证（肺气不足，大肠虚秘）时每用益气润肠之法，辨证论治，效果理想。

综上所述，“肺与大肠相表里”的理论已经得到充分的肯定，并被广泛地应用于临床。无论是肺肠同治、肺病治肠、肠病治肺都取得显著疗效，该理论对指导临床应用有很大意义。资料显示，实验研究方面仅着重从病理表现来观察二者关系，研究单一，且以腑病传脏为多，脏病传腑较少。如能以中医理论内涵为指导，从肺与大肠之间的功能影响等方面多做些研究或许能有新的发现。现代机理研究，虽然已经到了分子水平，且氧自由基和一些免疫细胞分子被认为参与了肠缺血再灌注损伤造成的肺损害的过程，但肺与大肠相关性的物质基础还不明确，

研究也仅限于肠对肺的影响，还有待进行多方面研究。

参考文献

[1]周吕.胃肠生理学[M].北京：科学技术出版社，1991.726-727.

[2]匡调元.中医病理研究[M].上海科学技术出版社，1980.145.

[3]江锡权.略论喘证的肺与大肠同治法[J].新中医，1983，(5)：11

[4]谷振勇.过氧亚硝基阴离子介导内毒素致肺血管损伤及胆囊收素的保护作用[J].生理科学进展，2001，32(2):135-137.

[5]刘进.血管活性肠肽与呼吸系统.国外医学・呼吸系统分册，1995, 15(1):27.

[6]严仪昭，陈祥银，西品香.内毒素引起的急性肺损伤的实验研究[J].中华结核及呼吸系统疾病杂志，1984, 8(1):7.

[7]韩国栋.“肺与大肠相表里”理论中西医结合研究进展[J].天津中医1995, 12(4):45.

[8]靳文学，杨宇.从黏膜免疫系统看“肺与大肠相表里”[J].四川中医2005, 23(12):1-3.

[9]周东浩，张蕾，周明爱.肺与大肠相表里今释[J].中国中医基础医学杂志，2003, 9(8):567.

[10]杨胜兰，王鹏.大承气汤对肠源性肺损伤大鼠肺组织抗氧化保护作用的研究[J].湖北中医学院学报，2003, 5(3):21.

[11]朱义用，景炳文，娄永华.大黄对肠源性感染致早期肺损伤防治作用的机制探讨[J].中国中西医结合急救杂志，2004, 11(1):53.

[12]高国林，李彦敏，安会波，等.大鼠肠缺血再灌注损伤中Fas表达与肺损伤[J].中华儿科杂志，2003, 41(10):773.

[13]王今达，等.祖国医学“肺与大肠相表里”学说的临床意义及其本质的探讨[J].中西医结合杂志，1982, 2(2):77

[14]张余森．中兽医医药杂志，1987，(2)：1

[15]冯学瑞，等.“肺与大肠相表里”的实验研究[J].天津中医,1988，(4)：16

[16]韩国栋，等.对“肺与大肠相表里”理论的实验研究[J].中医杂志，1990，(2):48

[17]田在善，等.大承气汤对便秘大鼠肺泡巨噬细胞活力的影响.“肺与大肠相表里”的实验研究[J].天津中医，1992，(4):19

[18]薛芳，崔志永，李宏森．大承气汤治疗家兔呼吸窘迫综合征的研究[J]．中西医结合杂志，1988, 8(5)：285 ．

[19]李风森．氧化一抗氧化与哮喘及肺与大肠关系的研究．上海中医药大学94硕士研究生论文集，1994 ．

[20]王月兰，龙迪和，何璐，等. 肺与大肠相表里动物实验模型建立的探讨[J].内蒙古中医药，2008，5: 40-41

[21]冯维斌，刘伟胜．通里攻下法在肺心病急性呼吸衰竭的应用[J]．中国中医急症，1998，7(4)：180 ．

[22]张云松，张鸿彩．解毒通腑法治疗温病气分发热的研究[J]．ft东中医药大学学报，1998, 22( 2 )：118 ．

[23]陈揭晓，吴新民，刘毓和，等．亚甲蓝对家兔肠缺血再灌注后肺损伤的保护作用[J]．中国热带医学，2005, 5(1)：35 ．

[24]段国贤，景有伶，赵春秀，等．黄芪和硫酸锌对肠缺血一再灌注致肺损伤的防治作用

[J]．天津医药，2005，33(1)：37 ．

[25]张小虎，古继红，区永欣，等，肺主肃降与“肺与大肠相表里”相关性的实验研究及其应用探讨[J]，中华中医药学刊，2008，26（9）2059-2062

[26]吴国水.下法在肺疾患中的运用及体会[J].河北中西医结合杂志，1999, 8(6):942.

[27]黄礼明.下法在慢性肺原性心脏病治疗中的运用体会[J].实用中医药杂志，2002, 18(7):54.

[28]苏惠萍.通脏法治疗哮喘发作期的临床应用[J].北京中医药大学学报，1995, 18(5):64

[29]李雪芩.通下法治疗肺源性心脏病急性发作期呼吸衰竭36例[J].中国中西医结合急救杂志，1999, 11(6):498.

[30]肖阳娥，黄晓川.增液承气汤加减治疗40例慢性呼吸衰竭临床观察[J].新中医，1997，

29(3): 18.

[31]张瑞利.加减宣自承气汤治疗急性肺部感染150例[J].浙江中医杂志，1997，32(6)：252.

[32]谢邦军.加味宣白承气汤直肠滴注治疗痰热腑实型肺性脑病20例[J].中医外治杂志，1997, 6(3):16.

[33]张石义.加味己椒苈黄汤治疗支气管哮喘急性发作50例[J]. ft东中医学院学报，1995，

19(4):235.

[34]林群莲，黄发盛.通腑法治疗肺心病急性发作期[J].中西医结合杂志，1996, 9(10):621.

[35]李晓君.通腑安脏的理论探讨[J].辽宁中医杂志，1987，(6)：23

[36]刘刚.通因通用法治疗重症肺气肿[J].四川中医，1995, 13(6):23.

[37]张元兵，洪广祥.“肺与大肠相表里”理论在慢性阻塞性肺疾病急性发作期的应用[J]. 江西中医药，2000, 31(3):15.

[38]关瑞锋.从肺与大肠相表里谈痰热壅肺型肺心病的辨证施护[J].牡丹江医学院学报，2003, 24(6):49.

[39]贺真.己椒苈黄汤加味治疗胸腔积液15例[J].江西中医药，1996, 27(2):26.

[40]胡克明.风温肺热病100例临床分析[J].浙江中医学院学报，1995，19（3）：12.

[41]赵光明.桃仁承气汤临床运用举隅[J].四川中医，1995，(2)：30.

[42]翁惠英.慢性阻塞性肺病机械通气患者肠内营养的价值及护理[J].实用护理杂志，2002, 18(5):3-4.

[43]宋传荣.运用通腑法治疗慢性支气管炎的体会[J].现代中医药，2005, 2:14-15

[44]吕建民. 泻下法治疗肺部疾病[J].新中医，2007，39（2）：14-15

[45]崔红生. 升降散加减治疗支气管哮喘急性发作期临床观察[J].中华实用中西医杂志，2001, 1（14）：69

[46]陈超，汪受传.“肺与大肠相表里”理论在儿科临证中的应用[J].中医药学报，2006，34（6）：43-44

[47]傅理均，倪建江．浅谈通便在肺系痛证中的应用[J]. 江西中医药，2007, 38 ( 4 )： l6-l7 ．

[48]丘梅清．“肺与大肠相表里”的理论在肺胀治疗中的应用[J]．黑龙江中医药，1997，(5)：9-10 ．

[49]薛西林．肺与大肠相表里的临床应用[J]．安徽中医临床杂，2OOl，13( 3 )：232 ．

[50]张林峰．“肺与大肠相表里”运用举隅[J]．河北中医，1994，16(1)：19 -20 ．

[51]陈守宏，陈艳，阮琳．“肺与大肠相表里”研究概况[J]．中医药研究，2OOl，17 ( 3 )：53-54 ．

[52]仝小林，许树强．SARS中医治疗与研究[ M]．石家庄：河北教育出版社，2003: 10 ．

[53]申建．“肺与大肠相表里”在慢性肺心病治疗中的运用[J]．中华实用中西医杂志，2006, 19(9)：1031-1032．

[54]周慧生．活血通腑法治疗哮喘发作期体会[J]．吉林中医药，2004，(8)：l0-ll．

[55]陈培琼.从肺肾论治老年性便秘71例[J].广东医学，1999, 20(3):8.

[56]陈剑屏.宣肺理气治便秘[J].上海中医药杂志，1996，(6):41

[57]刘小雨.从肺论治顽固性消化溃疡92例[J].湖南中医药导报，1999, 5(3):17.

[58]张小军.慢性肠炎从肺论治.陕西中医[J]，1996, 17(7):336

[59]魏占美.理肺汤治疗习惯性便秘26例[J].四川中医，1997, 15(10):23

[60]郭玉琴. “肺与大肠相表里”的理论联系与临床应用[J].辽宁中医药大学学报，2008, 1:17-18

[61]费赛源．肺与大肠相表里在临床治疗中的应用[J]．新疆中医药，2003, 21（2） ：

357 ．

[62]王仲霞，刘波．“肺与大肠相表里”的理论及临床研究进展[J]．北京中医，2006, 25( 7 )：438-440．

[63]贾君君，陈旭，解秸萍．“肺与大肠相表里”的现代研究概况[J]．中医药学报，2006，34(3)：23-25 ．

[64]杜怀棠.下法的临床应用与体会.上海中医药杂志[J]，1990, 31(5):5.

[65]易向明.哮喘发作伴大便异常的观察与临床意义[J].四川中医，1995, 6(3):7.

[66]吴承燕.肃肺通下法治疗开胸术后并发症的体会[J].中医研究，1996, 9(1):37.

[67]游文华.谈肺与大肠表里相关的临床体会[J].新中医，1990, 22(3):18.

[68]李辛夷.肺与大肠同治治疗毛细支气管炎60例疗效观察[J].云南中医中药杂志，2005，

26(6):8-9.

[69]宋勉，王亚梅.肺肠同治法在治疗支气管哮喘急性发作期的运用[J].光明中医，2005, 20(l): 5.

[70]杨胜兰，李道本，陈瑞.肺肠并治法治疗小儿外感咳嗽30例[J].中国中西医结合消化杂志，

2004, 12(6)：360.

[71]张仲起，任喜洁，韦倩，等．理论有新见证治创新法—师从任继学教授诊治老年便秘体会[J]．吉林中医药，2008, 28(7)：482-483．

[72]哈木拉提，阿不都艾尼，阿不都热依木，等．氧化抗氧化与哮喘及维吾尔医“肺肠同治论”关系的研究[J]．中国民族医药杂志，2001，6 (1 )：34-36 ．

[72]刘福成，薛芳，崔志永，等．大承气汤治疗严重创伤呼吸窘迫综合征的实验与临床研究

[J]．中国中西医结合杂志，1992, 12 ( 9 )：541 ．

[73]李建生，马利军，李素云，等．毒素清对肺炎老龄大鼠小肠组织自由基和前列腺代谢的影响[J]．辽宁中医杂志，2003, 30 (1)：3-6．

[74]田在善，沈长虹，李东华，等．大承气汤对内毒索引致肺损伤保护作用的实验研究[J]．中国实验方剂学杂志，1997, 3 (1 )：2 -15 ．

[76]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 )：154-156．

[77]韩国栋，冯学瑞，郝泗城，等．大承气汤对实验性肺损害促修复作用的观察[J]．中国医药学报，1994, 9 (5 )：15 -17 ．

[78]蒋学武，胡廷泽，赖亚曼，等．小儿绞窄性肠缺血术后低氧血症的临床及实验研究[J]．中国现代医学杂志，2002, 12 (15 )：27-29．

[79]曾祥国．从粘液组织化学试论肺与大肠阴阳表里关系[J]．四川医学，1982, 43 ( 3 )：129-132

[80]张经济，连至诚，许冠逊，等．编．消化道生理及病理生理学基础与临床[M]．广东：广东科技出版社，1997: 1420

[81] Wallaert B, Desreuma ux P, Copinmc, et a1．Immunoreactivity for IL- 3 and

5 and GM-CSF of intestineal mucosa in bronchial asthma．JExp Med, 1995, 182(8)：1897-1904

[82] Benard A, Cl ancy RL, Percy DYE. et a1．Increased intestinal pe- rmeability in bronchia asthma．J Allergy Clin Immunol, 1996, 97 (6) l1173-1178

[83] Wallaert B, Colorebel J F, Adenis A, et al．Increasedintes tinal permeability inactive pulmon arysarcoidosis．Am Rev Respir Dis, 1992, 145(6)：1440-1445

[84]冯有为，林红伍．支气管哮喘患者血浆胃动素及胃泌素水平观察[J]．天津中医，2 000, 17(2)：18-19

[85]陈永光．慢性支气管炎虚症患者胃肠功能的x线观察[ J]．中国中西医结合杂志，1983，

3 ( 4 ): 225

[86]闫力，宫晓燕．宣白承气汤治疗慢性支气管炎急性发作3 0例[J]．长春中医药大学学报，2007，(23)：4

[87]郎立和，李立胜．宣白承气加味治疗急性气管炎45例[J]．河南中医，2005，(9)：9

[88]曾兆麟，李玉梅．从中医肺与大肠相表里理论探索难治性非典型性肺炎( SARS)治疗的新思路[J]．上海中医药杂志，2003，(37)：5

[ 89]李志军，李银平，王今达．肺与大肠相表里学说与多器官功能障碍综合征[J]．中国中西医结合急救杂志，2004，(1)：3

[90]阎艳丽，刘泽英．谈葛根芩连汤治喘[J]. 四川中医，1992，(2)：35

[91]杨进．从温病学角度认识传染性非典型肺炎[J]．江苏中医药，2003，(24)： 6

[92]柴守方.补脾宣肺汤治疗便秘68例[J].河南中医，2004，24（6）：42-43

[93]曾清泉.从肺论治肛肠疾病举隅[J].四川中医，2001，19（12）：65

[94]赵富宝．香砂承气汤治疗肺心病失代偿期胃肠功能衰竭82例[J]．中医杂志，1 999，(4O): 6

[95]肖阳娥，黄晓川，卿敬军，等．增液承气汤加减在慢性呼吸衰竭救治中的应用[J]．广西医学，1995(9)：2

[96]伍忡. 便秘治疗二十四法[J].上海中医药杂志，1994，(2)：25．

[97]张珍玉. 下法的临床应用与体会[J].中医杂志，1990, 31(5)：4

[98]牛治君. 补气宣肺汤治疗功能性便秘6 8例报告[J]．北京中医，1991，(5)：18