

甘遂半夏汤加減甘遂甘草不同給藥次數對腹水大鼠水通道蛋白-2 基因及腎凋亡的影響

張建美 許皖 鍾贛生 趙桐 范盎然 柳海艷 郭岩松 修琳琳 王思睿

【摘要】 目的 觀察不同給藥次數條件下的甘遂半夏湯加減甘遂甘草反藥組合對腹水模型大鼠腎臟水通道蛋白(aquaporin, AQP)-2 mRNA 表達及腎組織凋亡的影響。**方法** 採用 Walker-256 細胞製造癌性腹水模型,將 Wistar 大鼠按體質量隨機分為空白組、模型組、陽性對照組、全方給藥一次組、去草給藥一次組、去遂給藥一次組、去草遂給藥一次組、全方給藥二次組、去草給藥二次組、去遂給藥二次組、去草遂給藥二次組,共計 11 組。給藥一次組每天上午給藥一次,給藥二次組上午下午各給藥一次,一二次組每天給藥總量一致。腹水長成 14 天取材,摘取腎臟,液氮保存,進行 PCR 和免疫組化實驗。**結果** 甘遂半夏湯全方給藥一次組和全方給藥二次組的 AQP-2 mRNA 表達及腎組織凋亡無明顯差異。但全方組的 AQP-2 mRNA 表達及腎組織凋亡均較全方去一味或兩味反藥組

基金項目: 國家重點基礎研究發展計劃(973 計劃)(2011CB505306);北京中醫藥大學 2015 年度基本科研業務費項目(在讀研究生項目)(2015-JYB-XS033)

作者單位: 100029 北京中醫藥大學基礎醫學院[張建美(碩士研究生)、許皖(碩士研究生)、郭岩松(碩士研究生)、修琳琳(博士研究生)、王思睿(碩士研究生)],基礎醫學院方藥系(鍾贛生、柳海艷),科研實驗中心(范盎然);中國中醫藥出版社(趙桐)

作者簡介: 張建美(1986-),女,2013 級在讀碩士研究生。研究方向:中藥藥性理論研究。E-mail: kmmm20110814@163.com

通訊作者: 鍾贛生(1961-),碩士,教授,博士生導師。研究方向:中藥藥性理論研究。E-mail: zhonggansheng@sohu.com

有降低趋势。结论 含甘遂甘草反药组合的甘遂半夏汤全方给药一次组和给药二次组抑制 AQP-2 mRNA 表达和对癌性腹水造成的肾组织细胞过度凋亡的减缓作用无明显差异,且均优于全方去掉一味或两味反药组。

【关键词】 甘遂; 甘草; 反药组合; 水通道-2 信使 RNA; 肾组织凋亡

【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.05.005

Comparing the effect of *Gansui Banxia* decoction plus or reduce kansui and glycyrrhiza on AQP-2 mRNA expression and apoptosis rate of kidney tissue in ascites rats under different times ZHANG Jian-mei, XU Wan, ZHONG Gan-sheng, et al. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHONG Gan-sheng, E-mail: zhonggansheng@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To find out the effect of *Gansui Banxia* decoction plus or reduce kansui and glycyrrhiza under different times of administration on AQP-2 mRNA expression and apoptosis rate of kidney tissue in malignant ascites rats. **Methods** Walker-256 cells were used to induce the malignant ascites rat model. The Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, furosemide group, once or twice of *Gansui Banxia* decoction group, once or twice of *Gansui Banxia* decoction removed glycyrrhiza group, once or twice of *Gansui Banxia* decoction removed kansui group, once or twice of *Gansui Banxia* decoction removed glycyrrhiza and kansui group. Once group was gavaged at morning, and twice group was gavaged at morning and afternoon, which total dose was as much as the once group. After 14 days' feed, kidney was collected and kept in liquid nitrogen and then RT-PCR and immunohistochemistry experiments was conducted. **Results** The result of AQP-2 mRNA expression and apoptosis rate of kidney tissue showed no difference in once and twice *Gansui Banxia* decoction group, but showed a decreasing tendency compared to the groups removed one or two incompatible pairs. **Conclusion** Diuresis of *Gansui Banxia* decoction is better than it removed one or two incompatible pairs. *Gansui Banxia* decoction can reduce the excessive apoptosis of kidney tissue and the effect of whole prescription is better than it removed one or two incompatible pairs.

【Keywords】 Kansui; Glycyrrhiza; Anti herb combination; Aquaporin-2 mRNA; Apoptosis of kidney tissue

甘遂半夏汤首载于东汉张仲景的《金匮要略》^[1]:“病者脉伏,其人欲自利,利反快,虽利心下续坚满,此为留饮欲去故也,甘遂半夏汤主之。”现代医家主要将其应用于渗出性胸膜炎、肝硬化腹水等症^[2]。但由于甘遂半夏汤组方中包含甘遂甘草两味中药,属中药配伍禁忌中相反药物配伍,医家在临床使用过程中多有忌惮,大大限制了其使用。然而近年大量科研工作者的实验表明,甘遂甘草反药组合的使用并不是完全禁忌的,而是受不同条件限制的^[3-4]。为此,笔者以癌性腹水大鼠为模型,进行了甘遂半夏汤加减甘遂甘草反药组合对大鼠肾脏水通道蛋白(aquaporin, AQP)-2 mRNA 表达及肾组织凋亡影响的实验研究,以探讨给药次数是否会影响甘遂甘草配伍后产生的毒性和药效,以及该影响是否与反药组合相关。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠,体质量(200±20)g, SPF 级。

动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号为 SCXK(京)2006-0009。

1.2 实验药物

醋甘遂为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根醋制而成,由安徽丰原铜陵中药饮片厂(120301)提供;炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎蜜制而成,由安徽丰原铜陵中药饮片厂(120201)提供。法半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb) Breit. 的块茎,经甘草和生石灰炮制而成,由安徽丰原铜陵中药饮片厂(100701)提供;白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根,自行浸泡、切片、烘干备至实验所需饮片,由磐安科信中药材生产力促进中心提供;呋塞米由江苏安邦艾普森药业有限公司提供(H32021428)提供。

1.3 药物制备

阳性药(呋塞米):给药浓度为 4.2 g/kg。药液制备为 0.42 g/mL。

甘遂半夏汤处方:醋甘遂 1 g/kg(研末),炙甘草 15 g/kg,法半夏 0.9 g/kg,白芍 1.5 g/kg,蜂蜜 1.5 g/kg。(此剂量为课题前期结果,醋甘遂与炙甘草按照 1:15 比例配伍时,具有一定的肝损伤)

甘遂半夏汤全方药液的制备:将炙甘草、法半夏、白芍加入 10 倍量水浸泡 1 小时,大火煮沸后小火煎煮 1 小时,将药液倒出。再加入 8 倍量水煎煮,大火沸腾后小火煎煮 1 小时。将两次煎煮的药液合并,加入蜂蜜,放置于水浴锅上浓缩至 1.89 g/mL,临用时按比例加入醋甘遂粉末,加水至 1.99 g/mL。

甘遂半夏汤去炙甘草药液的制备:将法半夏、白芍按照全方的煎煮方法浓缩至 0.78 g/mL,临用时按比例加入醋甘遂粉末,加水至 0.49 g/mL。

甘遂半夏汤去醋甘遂药液的制备:将炙甘草、法半夏、白芍按照全方的煎煮方法浓缩至 1.89 g/mL。

甘遂半夏汤去炙甘草醋甘遂药液的制备:将法半夏、白芍按照全方的煎煮方法浓缩至 0.39 g/mL。

1.4 试剂

PCR 实验试剂:DEPC 处理水(北京索来宝科技有限公司,生产批号:20140822);Trizol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司,生产批号:66014);Gold View 核酸染料(北京索来宝科技有限公司,生产批号:20140510);RNA 逆转录试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,生产批号:00169216];OligdT [生工生物工程(上海)股份有限公司,生产批号:1093021];2×tag mix(北京索来宝科技有限公司,生产批号:20140901);Marker I DNA Ladder(北京索来宝科技有限公司,生产批号:20140402);6×DNAlading Buffer(北京索来宝科技有限公司,生产批号:20141021);Agarose 琼脂糖(伯齐科技有限公司,生产批号:111860);三氯甲烷(北京化工厂,生产批号:20140312);异丙醇(北京化工厂,生产批号:20140417);无水乙醇(北京化工厂,生产批号:20140409)。

肾脏凋亡检测试剂:1MTris-HCl 缓冲液(Ph=7.5)(北京索来宝科技有限公司,生产批号:20140403);蛋白酶 K(北京中山金桥生物技术有限公司,生产批号:14374846);3% 双氧水(北京中山金桥生物技术有限公司,生产批号:131023);二甲苯(北京益利精细化学品有限公司,生产批号:1208122)。

1.5 造模与给药方法

将冻存于-70℃冰箱中的 Walker-256 细胞于 37℃水浴中复苏,分为 0.5 mL、0.8 mL、1 mL 的不同剂量注入大鼠体内,大鼠长出腹水后抽取其腹水以每只 1 mL 的剂量注入健康大鼠体内进行二次传代,二次传代的大鼠长出腹水后,选取黄色澄清腹水进行细胞计数,生理盐水稀释至 1.68×10^6 个细胞/mL,注入正式实验的大鼠体内,每只注射 1 mL。

1.6 分组

将大鼠按体质量进行随机分组,组别为空白组、模型组、阳性对照组、甘遂半夏汤全方给药一次组(简称全方一次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草给药一次组(简称去草一次组)、甘遂半夏汤全方去醋甘遂给药一次组(简称去遂一次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草醋甘遂给药一次组(简称去草遂一次组)、甘遂半夏汤全方给药二次组(简称全方二次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草给药二次组(简称去草二次组)、甘遂半夏汤全方去醋甘遂给药二次组(简称去遂二次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草醋甘遂给药二次组(简称去草遂二次组),共计 11 组。

每组 20 只大鼠,各组于造模后第二天开始灌胃。空白组、模型组分别 1 mL/100 g 每天一次给予生理盐水灌胃。给药一次组及阳性药组按 1 mL/100 g 每天一次灌胃,给药二次组上午下午按照每次 0.5 mL/100 g 每天两次灌胃。

1.7 样本取材与指标检测

给药 14 天取材。所有大鼠在取材前一天晚上 8 点禁食不禁水,禁食 12 小时,次日取材前 1 小时灌胃一次,之后 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,迅速取出一侧肾脏,选取同一部位肾组织约黄豆大小一块,置于冻存管中,液氮冻存。取另一侧肾脏放入 10% 甲醛溶液中固定,待检测相关指标。每组选取 8 个组织样本进行 RT-PCR 检测,选取 3 个组织样本进行肾脏免疫组化凋亡检测。

1.7.1 肾脏 AQP-2 mRNA 指标检测 RT-PCR 法对肾脏 AQP-2 mRNA 表达进行检测。

(1)PCR 引物合成:AQP 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,具体碱基序列如表 1 所示。

(2)cDNA 扩增:取各组 RT 反应产物配制 PCR

表 1 PCR 引物信息

Primer 名称	序列(5' to 3')	碱基数	产物长度	退火温度
AQP-2	FW: TTGCAGGAACCAGACACTTG	20	174bp	55℃
	RV: GCGGAGACGAGCACTTT	17		
GAPDH	FW: TTCACCACCATGGAGAAGGC	20	430 bp	55℃
	RV: TTTCTCCAGGCGGCATGTCA	20		

扩增反应液,成分组成如下:GAPDH Forward Primer 0.25 μL, GAPDH Reverse Primer 0.25 μL, AQP-2 Forward Primer 0.4 μL, AQP-2 Reverse Primer 0.4 μL,2x tag mix 10 μL,CDNA 2 μL,dH₂O 6.7μL。

反应条件:

Stage 1:预变性——94℃:3 分钟

Stage 2:PCR 反应——(Reps: 32) 94℃:30 秒→59℃:30 秒→72℃:1 分钟→72℃延伸 8 分钟

(3) 数据采集:1.2% 琼脂糖凝胶电泳。以 GAPDH 作为内标,计算公式如下:RNA 含量=目的基因/GAPDH

1.7.2 肾脏免疫组化凋亡检测 Tunnell 法检测肾脏细胞凋亡,操作按说明。光镜拍照,Image-Pro Plus 6.0 软件进行细胞计数。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表述,多组比较采用单因素方差分析。AQP-2 mRNA 表达结果方差齐,多重比较采用 LSD 检验;肾组织凋亡结果方差不齐,多重比较采用 Dunnett T3 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同给药次数条件下的甘遂半夏汤加减甘遂甘草反药组合对腹水大鼠肾脏 AQP-2 mRNA 表达的影响

与空白组比较,模型组、阳性药组、去草一次组、去遂一次组、去遂二次组、去草遂一次组、去草遂二次组肾脏 AQP-2 mRNA 表达量升高,具有统计学差异($P<0.01$);而与模型组比较,全方一次组、去草一次组表达量降低,具有统计学差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$),全方二次组表达量具有降低趋势,但不具有统计学差异($P>0.05$);与全方一次组比较,去遂一次组、去草遂一次组表达量升高,具有统计学差异($P<0.05$);与全方二次组比较,去草二次组、去遂二次组、去草遂二次组表达量具有升高趋势,但不具有统计学差异($P>0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 各组大鼠 AQP-2 mRNA 表达的结果($\bar{x}\pm s$)

分组	n	AQP-2 mRNA
空白组	6	0.57±0.02
模型组	6	0.7±0.01
阳性药组	8	0.73±0.03
全方一次组	8	0.58±0.08
去草一次组	8	0.53±0.03
去遂一次组	8	0.73±0.02
去草遂一次组	8	0.75±0.08
全方二次组	8	0.61±0.1
去草二次组	8	0.7±0.02
去遂二次组	8	0.69±0.02
去草遂二次组	8	0.66±0.04

注:每组选取 8 个样本进行 RT-PCR 检测。在后期数据分析中,空白组及模型组不符合正态分布,每组分别有两个数据被剔除。

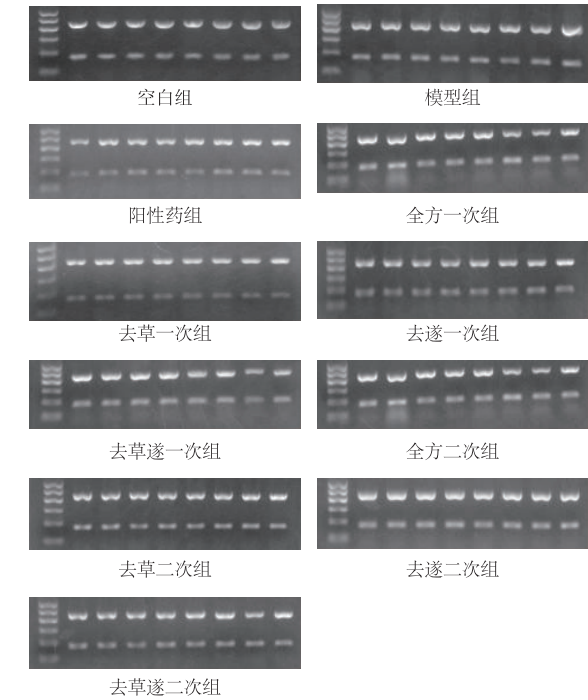


图 1 各组大鼠肾脏 AQP-2 mRNA 电泳结果

2.2 不同给药次数条件下的甘遂半夏汤加减甘遂甘草反药组合对腹水大鼠肾组织凋亡的影响

与空白组相比较,模型组、阳性药组、去草一次组、去遂一次组、去草遂一次组、去草遂二次组大鼠肾组织凋亡增加,具有统计学差异($P<0.01$);其余

各给药组凋亡具有增加趋势,但不具有统计学差异($P>0.05$)。与模型组比较,阳性药组、全方一次组、去遂一次组、去草遂一次组、全方二次组、去草遂二次组凋亡减轻,具有统计学差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与全方一次组比较,去遂一次组、去草遂一次组凋亡增加,具有统计学差异($P<0.01$);去草一次组凋亡具有增加趋势,但不具有统计学差异($P>0.05$)。与全方二次组比较,去草遂二次组凋亡增加,具有统计学差异($P<0.01$);去草二次组凋亡具有增加趋势,但不具有统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 大鼠肾组织凋亡的结果($\bar{x}\pm s$)

分组	n	肾组织凋亡(平均光密度值)
空白组	3	0.112±0.021
模型组	3	0.231±0.026
阳性药组	3	0.192±0.027
全方一次组	3	0.129±0.028
去草一次组	3	0.19±0.067
去遂一次组	3	0.191±0.008
去草遂一次组	3	0.204±0.012
全方二次组	3	0.151±0.057
去草二次组	3	0.197±0.075
去遂二次组	3	0.156±0.069
去草遂二次组	3	0.268±0.096

3 讨论

以往对于“十八反”的探讨多在生理状态下集中在单纯的反药药对上,而本实验以含有反药组合的复方为基础,在特定病理模型的基础上进行研究。甘遂半夏汤为治疗腹水的经典名方,本实验选取与甘遂半夏汤逐水作用密切相关的肾脏指标 AQP-2 基因表达及肾脏细胞凋亡为研究对象,从一定程度上反映出甘遂甘草反药组合对甘遂半夏汤治疗腹水作用的影响。

水通道蛋白(aquaporin, AQP),又称水蛋白,它是一组与水通透相关的细胞膜转运蛋白。其中 AQP-2 是加压素依赖性水通道蛋白,主要位于肾集合管主细胞管腔侧及其附近的囊泡内,用以调节肾脏集合管对水通透性,在调节肾脏水平衡中起到了重要作用^[5]。它可使水液的重吸收增加,尿量减少,尿液浓缩。研究表明,AQP-2 数量受抗利尿激素的调节,当激素水平降低时,主细胞管腔膜出现胞吞作用,形成含 AQP-2 的囊泡迁移到管腔膜下的胞

浆内,导致 AQP-2 数量相应地减少^[6]。另有临床报道,肝硬化腹水患者尿液 AQP-2 含量明显高于无腹水患者^[7]。本实验结果显示,与空白组比较,模型组及多个给药组 AQP-2 mRNA 表达升高,提示 walker-256 恶性腹水模型可能影响 AQP-2 mRNA 表达,使肾集合管对水重吸收增强,尿量减少,导致腹水的进一步发展,此结果与临床报道中 AQP-2 变化趋势一致。与模型组比较,全方一次组和全方二次组 AQP-2 mRNA 表达降低,提示甘遂半夏汤可以抑制集合管对水的重吸收,增加尿量,从而减缓恶性腹水的进一步发展,但给药次数对这种减缓作用无影响,且全方组的作用优于全方去掉一味或两味反药组。

细胞凋亡是机体为维持内环境稳定,细胞自主有序的死亡,此过程是由基因控制的。细胞凋亡与被动的细胞坏死不同,它是一个主动过程,并涉及基因的激活、表达以及调控等一系列作用。它是机体为了更好地适应环境而主动争取的一种死亡过程^[8]。本实验结果显示,与空白组比较,模型组及各个给药组平均光密度值升高,说明 walker-256 癌性腹水模型对大鼠肾组织造成了损伤。与模型组比较,全方一次组和全方二次组平均光密度值降低,说明甘遂半夏汤具有减缓癌性腹水造成的肾组织细胞过度凋亡的作用。但给药次数未对这种减缓作用造成影响,且全方的作用优于全方去掉一味或两味反药组。

参 考 文 献

- [1] 范永升. 金匱要略[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:160.
- [2] 赵桐,钟赣生,张建美,等. 含甘遂-甘草反药组合的甘遂半夏汤临床用药分析[J]. 中国临床医生杂志,2014,(12):89-91.
- [3] 张建美,许皖,钟赣生,等. 甘遂甘草反药组合宜忌条件的实验研究回顾与评价[J]. 环球中医药,2015,8(9):25-30.
- [4] 张建美,许皖,钟赣生,等. 大戟甘草反药组合宜忌条件的实验研究回顾与评价[J]. 环球中医药,2015,8(9):38-42.
- [5] 唐庆娟. 水通道蛋白家族成员 AQP2 的研究进展[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册),2001,21(3):238-240.
- [6] 刘彦华,才丽平. 肾脏 AQP2 表达及穿梭调节的分子机制[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册),2004,24(5):463-466.
- [7] 王建华. 肝硬化腹水患者血浆 AVP 和尿 AQP2 的检测及临床意义[J]. 临床合理用药杂志,2013,6(17):155.
- [8] 李超,伏圣博,刘华玲,等. 细胞凋亡研究进展[J]. 世界科技研究与发展,2007,29(3):45-53.

(收稿日期:2016-01-05)

(本文编辑:蒲晓田)