

参苓白术散加减方对结肠黏膜组织水通道蛋白 4、水通道蛋白 8 表达的影响

康楠 王凤云 陈婷 王晓鸽 朱恩林 唐旭东

【摘要】 目的 观察参苓白术散加减方对脾虚泄泻模型大鼠结肠黏膜组织水通道蛋白(aquaporin, AQP)4、AQP8 的表达的影响。方法 健康雄性 Wistar 大鼠 42 只随机分为正常组、模型组、高中低剂量组及西药组 6 组,采用水环境小平台站立法复合高乳糖饲料喂养的方法复制腹泻模型,模型成功后,灌胃给药 7 天,取结肠组织,通过免疫组化的方法观察结肠黏膜组织 AQP4、AQP8 的变化。结果 与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜组织 AQP4、AQP8 的表达明显降低;与模型组比较,高中低剂量组及西药组均可以提高结肠黏膜组织中 AQP4 的表达,高低剂量组和西药组可提高 AQP8 的表达,中剂量组改善不明显。结论 参苓白术散加减方可提高脾虚泄泻模型大鼠结肠黏膜组织中的 AQP4、AQP8 的表达水平,促进水分的吸收,从而达到止泻的目的。

【关键词】 泄泻; 脾虚证; 水通道蛋白 4; 水通道蛋白 8

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.06.011

The effects of modification of prescription of *Shenling Baizhu Power* on the expressions of AQP4 and AQP8 in colonic mucosa tissue KANG Nan, WANG Feng-yun, CHEN Ting, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: TANG Xu-dong, E-mail: txldy@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of modification of prescription of *Shenling Baizhu Power* on the Expressions of AQP4 and AQP8 proteins in colonic mucosa tissue. **Methods** Three week-old healthy male rats were randomly divided into six groups: control group, model group, high dose group, middle dose group, low dose group and west medicine group. The rats in the model group and treatment groups were given a high lactose diet, and were forced to stand on the multiple platforms which is full of water around to establish the type of spleen deficiency diarrhea. The medicine was given once a day for 7 days. And then, AQP4 and AQP8 expression changes in the colon mucosa tissue were observed through the method of immunohistochemistry. **Results** The expressions of AQP4 and AQP8 in the model group significantly decreased compared to that of in the control group. While compared to the model group, the expression of AQP4 in all the treatment groups were significantly increased, and the expression of AQP8 in the high and low dose groups and west medicine group were significantly increased. **Conclusion** The modification of prescription of *Shenling Baizhu Power* can antidiarrhea may via the way of increasing the expressions of AQP4 and AQP8 proteins to adjust the water absorption in colonic mucosa tissue of the rats with spleen deficiency diarrhea.

【Key words】 Diarrhea; Spleen deficiency; Aquaporin 4; Aquaporin 8

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CB531703)

作者单位:100029 北京中医药大学[康楠(博士研究生)、朱恩林(硕士研究生)];中国中医科学院西苑医院脾胃科[王凤云,陈婷(博士研究生)、王晓鸽(硕士研究生)、唐旭东]

作者简介:康楠(1988 -),女,2012 级在读博士研究生。研究方向:中医药防治消化系统疾病。E-mail:kangnan.1988@163.com

通讯作者:唐旭东(1963 -),博士,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治消化系统疾病。E-mail:txldy@sina.com.cn

脾的主要生理功能为运化水谷、运化水液,输布精微,脾虚证则表现为脾的运化、升清功能失职,致使水谷、水液不运,水湿潴留,化源不足,进而出现腹胀腹痛、食少纳呆、便溏腹泻、浮肿等一系列的症状。泄泻是脾虚证的主症,是因脾虚失运,清浊不分,水湿下注而成。脾虚证的现代研究多从胃肠道动力^[1]、胃肠激素水平^[2]、黏膜免疫^[3]、能量代

谢^[4]等方面进行探讨,为阐明脾虚证的科学内涵提供了诸多依据。而从水液代谢的角度探讨脾虚泄泻的发生机制的研究还相对较少,本研究拟从这一角度出发,选择胃肠道典型的水通道蛋白为研究对象,观察健脾经典方剂参苓白术散对脾虚泄泻模型大鼠结肠黏膜 AQP4、AQP8 的表达情况的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物

3 周龄清洁剂级健康雄性 Wistar 大鼠 42 只,北京斯贝福实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)2011-0004。

1.2 主要药品与试剂

参苓白术散加减方浸膏干粉(每克干粉含生药量 5.64g),由中国中医科学院西苑医院药剂科提供;蒙脱石散,博福-益普生(天津)制药有限公司,3g*10袋,产品批号:F17193。AQP4 一抗(SIGMA, A5971),AQP8 一抗(LIBio, LS-C3811/29843),兔超敏二步法免疫组化检测试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司),柠檬酸盐缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司),抗利尿激素 ELISA 试剂盒(Cayman, 583951)。

1.3 仪器

Olympus bx51 显微镜;LEICA EM TP 组织包埋机;LEICA RM 2235 组织切片机;LEICA HI1220 烤片机;THERMO MK3 全自动酶标仪;Olympus Anymicro DSSTM 图像采集系统。

1.4 分组与给药

将大鼠随机分为正常组、模型组、蒙脱石散组、加减参苓白术散高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组 7 只,分别按照 10 mL/kg 给予生理盐水、蒙脱石散溶液(0.9 g/kg)、加减参苓白术散(4.6g/kg)、加减参苓白术散(2.3 g/kg)、加减参苓白术散(1.2g/kg),每天 1 次,连续灌胃 7 天。

1.5 模型建立

采用高乳糖饲料喂养叠加水环境小平台站立法^[5-7]建立脾虚泄泻大鼠模型,连续高乳糖饲料喂养幼龄 Wistar 大鼠 14 天,每天将大鼠置于特制的箱中小平台上 9 小时,平台周边注满水,大鼠在平台上可以自由活动,一旦大鼠进入睡眠状态就会因为肌肉舒张、松弛而落入水中。

1.6 取材及处理

连续灌胃给药 7 天后,4% 水合氯醛腹腔麻醉,

腹主动脉取血,离心取上清。冰上取结肠组织,至肛门向上 2 cm 开始,取远端结肠 3 cm,近端结肠 3 cm,用生理盐水将肠内容物清洗干净后,-80℃ 保存。

1.7 观测指标

观察各组大鼠腹泻率、各组大鼠血清抗利尿激素含量、结肠组织 AQP4 和 AQP8 的表达。血清抗利尿激素含量检测采用 ELISA 方法检测,根据说明书进行,基本步骤如下:配制标准品,依次梯度稀释标准品,加样,孵育,洗涤,加酶标试剂,孵育,洗涤,加工作液显色,终止显色,检测读取 OD 值,绘制标准曲线,计算相应样品浓度。AQP4 和 AQP8 的表达采用免疫组化方法检测,基本步骤如下:脱蜡、预处理组织切片,3% H₂O₂ 去离子水孵育,PBS 冲洗,一抗孵育,PBS 冲洗,二抗孵育,PBS 冲洗,DAB 显色,自来水冲洗,苏木素复染,分化,自来水冲洗,蓝化,脱水干燥,透明,封片,晾干后观察。

1.8 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以表示,各组数据先进行正态性检验,采用 Shapiro-Wilk 检验方法,方差齐性检验采用 Levene 检验方法,若数据符合正态分布且方差齐,则用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较用 LSD 法;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的界限。若数据不符合正态分布或方差不齐,则用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验),组间两两比较用 Mann-Whitney 法,由于本实验分为 6 个组,按照公式重新计算 $P = 2 \times 0.05/k(k-1) = 0.003$,故以 $P < 0.003$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 对大鼠腹泻情况的影响

模型复制成功后,大鼠腹泻率为 100%,停止造模并给予治疗 7 天后,模型组的大鼠大便腹泻程度较前有所好转,但仍有 42.86% 的大鼠存在腹泻情况,而药物干预组的大鼠,只有中剂量组的 1 只大鼠存在轻微腹泻,高低剂量组及西药组大鼠腹泻情况已消失。(腹泻率 = 腹泻动物数/该组动物总数 × 100%;干便和稀便的区分以滤纸上有无污迹为标准。)

2.2 对大鼠血清抗利尿激素含量的影响

高中低剂量组、蒙脱石散组、模型组、正常组血清抗利尿激素含量进行正态性检验,符合正态分

布,但方差不齐($P=0.009 < 0.05$),故采用非参数检验(Kruskal-Wallis),组间有显著性差异($P=0.008 < 0.05$),组间两两比较用Mann-Whitney法。与正常组比较,模型组大鼠血清抗利尿激素的含量明显降低,有统计学意义($P=0.002 < 0.003$);与模型组比较,加减参苓白术散高剂量组的大鼠血清抗利尿激素的含量明显升高,有统计学差异($P=0.002 < 0.003$)。见表1。

表1 加减参苓白术散对大鼠血清抗利尿激素含量的影响($n=6$)

组别	剂量	抗利尿激素 (pg/mL)
高剂量组	4.6g/kg	513.33 ± 26.34 ^a
中剂量组	2.3g/kg	404.92 ± 41.76 ^b
低剂量组	1.2g/kg	517.83 ± 107.16
蒙脱石散组	0.9g/kg	450.75 ± 145.12
模型组	/	374.50 ± 51.59 ^b
正常组	/	490.33 ± 37.96 ^a

注:与模型组比较^a $P < 0.003$,与正常组比较^b $P < 0.003$ 。

2.3 对结肠黏膜组织 AQP4 表达的影响

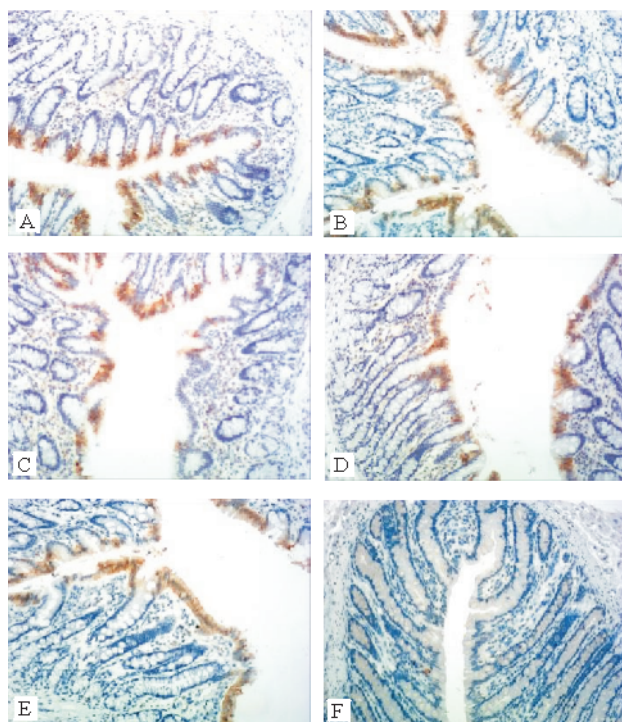
与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜组织 AQP4 的表达明显降低;与模型组比较,高中低剂量组及西药组均可以提高结肠黏膜组织中 AQP4 的表达。见图1。

2.4 对结肠黏膜组织 AQP8 表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜组织 AQP8 的表达明显降低;与模型组比较,高低剂量组和西药组可提高 AQP8 的表达,中剂量组改善不明显。见图2。

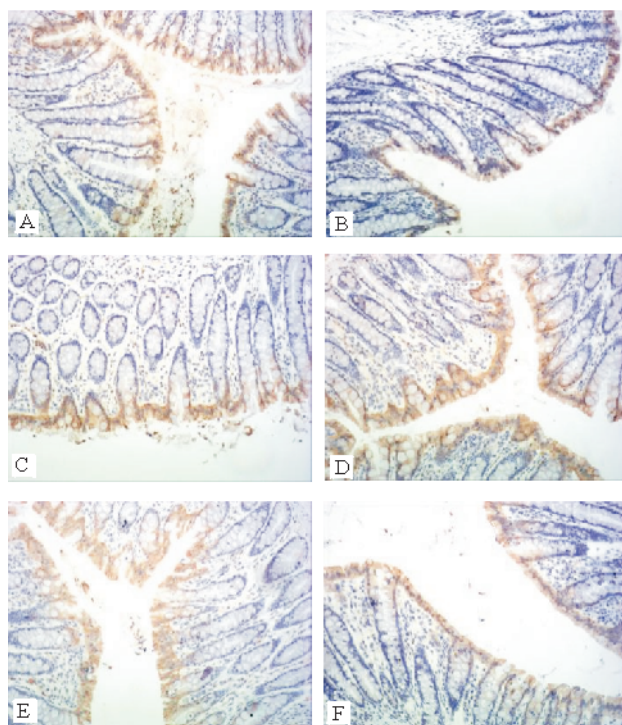
3 讨论

腹泻的发生,可因肠腔内渗透压升高、水电解质分泌过度、炎性渗出增多及肠蠕动加快,而最终的状态都是肠腔内的液体量增多。脾虚泄泻为虚证,大便性状多为水样便或者溏薄如酱,且夹有未消化的食物。脾虚泄泻发生时大便中的水分的含量必然是明显增加的,水分的吸收与分泌可以分为细胞旁途径和跨细胞途径,无论哪种途径都是依靠细胞膜两侧的渗透压差来驱动的。其中细胞旁途径,水分主要是通过细胞间隙进行转运;跨细胞途径水分则需要特定的通道进出细胞,即水通道



注:A 高剂量组;B 中剂量组;C 低剂量组;D 西药组;E 正常组;F 模型组

图1 加减参苓白术散对结肠黏膜组织 AQP4 表达的影响($\times 200$)



注:A 高剂量组;B 中剂量组;C 低剂量组;D 西药组;E 正常组;F 模型组

图2 加减参苓白术散对结肠黏膜组织 AQP8 表达的影响($\times 200$)

蛋白^[8]。

水通道蛋白是由 Agre 等^[9]在 1992 年发现的,和经典的离子通道有些不同,水通道蛋白不存在开放和关闭的功能状态,也不受温度和脂质膜成分的影响,只要有渗透压梯度就有水分子顺渗透压梯度通过水孔通道^[10]。根据对水和其他溶质的通透性,水通道蛋白又分成了水通道和水甘油通道,水通道只对水有通透性,水甘油通道还对其他小分子如甘油等同样具有通透性,AQP4 和 AQP8 属于前者。AQP4 定位在细胞的基底膜^[11],有高度快速转运水的能力,是其他水通道蛋白通透性的 3~4 倍^[12]。AQP8 定位在细胞的顶膜下的细胞质内^[13],且研究发现 AQP4、AQP8 的表达从结肠隐窝到表面逐渐增加,对水的渗透性也逐渐升高^[14]。很多研究表明,AQP4、AQP8 参与了肠道对水分的吸收过程^[15-17],在诸多疾病^[18-20]的发生过程中也起到了重要的作用,比如说霍乱引起的腹泻、肠易激综合征、克罗恩病等。

本研究中以高乳糖饲料喂养法叠加小平台站立复制脾虚泄泻模型,大鼠被迫劳倦过度且饮食不节,造成脾虚,引起腹泻。造模成功后再给予经典的健脾方剂参苓白术散的加减方进行治疗,并以蒙脱石散做为对照药物。实验结果表明,与正常组相比,模型组大鼠的 AQP4 和 AQP8 在结肠黏膜组织上皮细胞的表达均降低,这说明 AQP4、AQP8 的表达降低可能与腹泻的发生有关。与参苓白术散高中低剂量组及西药组比较,给予干预后腹泻明显减轻的同时 AQP4、AQP8 的表达也都上升,这进一步证明了腹泻发生与 AQP4、AQP8 的表达降低有关,健脾方剂参苓白术散加减方可能可以通过上调 AQP4、AQP8 的表达,促进水分吸收,进而发挥其止泻的作用,疗效与西药蒙脱石散相当。本研究小组拟在下一步的工作中,添加“急性感染性腹泻(非脾虚)组”以及“非健脾中药组”进行模型及药物反证,针对“AQP4、AQP8 是否为脾虚泄泻发生的分子生物学基础之一”的问题做进一步研究。

另外,本研究还检测了各组大鼠血清中抗利尿激素的含量,结果表明与正常组比较,模型组大鼠血清抗利尿激素的含量显著降低($P < 0.01$),与模型组比较,高剂量组抗利尿激素含量明显上调($P < 0.01$)。抗利尿激素是机体调节水液代谢的重要激素,主要作用于远曲小管和集合管,提高对水的通透性,促进水的吸收。目前研究发现其受体分布于

血管平滑肌、远曲小管、集合管、垂体及胰腺^[21],以及某些肿瘤细胞上也有抗利尿激素受体的表达^[22],尚未发现肠道上皮细胞有抗利尿激素受体的表达。脾虚腹泻大鼠血清抗利尿激素含量降低,这是否与脾虚证有关,或者与肠道 AQP8 的表达变化是否有关,尚待进一步的探讨。

参 考 文 献

- [1] 孟旸,曲瑞瑶,李梦燕,等. 实验性脾虚证结肠动力及胃肠肽和一氧化氮合酶改变[J]. 世界华人消化杂志,2000,8(8):933-935.
- [2] 张仲林,臧志和,钟玲,等. 六君子汤对脾虚证大鼠胃肠激素影响的实验研究[J]. 中成药,2010,32(4):659-661.
- [3] 赵荣华,谢鸣,李聪,等. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠的免疫功能变化[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(12):821-824.
- [4] 杨泽民,陈蔚文. 脾虚证与物质能量代谢紊乱相关性研究进展[J]. 广州中医药大学学报,2012,29(3):332-336.
- [5] 白世敬,李峰,唐旭东,等. 功能性腹泻脾虚证动物模型制作方法[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(1):86-88.
- [6] Wanjihia V W, Ohminami H, Taketani Y, et al. Induction of the hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 gene in offspring after isocaloric administration of high fat sucrose diet during gestation[J]. J Clin Biochem Nutr, 2013, 53(3):150-157.
- [7] Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat[J]. Physiol Behav, 2000, 68(3):309-316.
- [8] Fischberg J. Fluid transport across leaky epithelia: central role of the tight junction and supporting role of aquaporins[J]. Physiol Rev, 2010, 90(4):1271-1290.
- [9] Zeidel M L, Ambudkar S V, Smith B L, et al. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein[J]. Biochemistry, 1992, 31(33):7436-7440.
- [10] Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, et al. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein[J]. Science, 1992, 256(5055):385-387.
- [11] Wang K S, Ma T, Filiz F, et al. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(2):G463-G470.
- [12] Yang B, Verkman A S. Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes [J]. J Biol Chem, 1997, 272(26):16140-16146.
- [13] Elkjaer M L, Nejsum L N, Gresz V, et al. Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 281(6):F1047-F1057.
- [14] Yang B, Song Y, Zhao D, et al. Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(5):C1161-C1170.

- [15] Laforenza U, Cova E, Gastaldi G, et al. Aquaporin-8 is involved in water transport in isolated superficial colonocytes from rat proximal colon[J]. *J Nutr*, 2005, 135(10):2329-2336.
- [16] Hamabata T, Liu C, Takeda Y. Positive and negative regulation of water channel aquaporins in human small intestine by cholera toxin[J]. *Microb Pathog*, 2002, 32(6):273-277.
- [17] Wang K S, Ma T, Filiz F, et al. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(2):G463-G470.
- [18] Zahn A, Moehle C, Langmann T, et al. Aquaporin-8 expression is reduced in ileum and induced in colon of patients with ulcerative colitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(11):1687-1695.
- [19] 王晓玲, 王俊平. 腹泻大鼠结肠水通道蛋白 8 表达的研究[J]. *中国药物与临床*, 2008, 8(4):295-297.
- [20] 李立胜, 王俊平. 洛哌丁胺对腹泻模型大鼠结肠水通道蛋白 4 表达的影响[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2013, 22(12):1225-1227.
- [21] Koshimizu T A, Nakamura K, Egashira N, et al. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems[J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(4):1813-1864.
- [22] 杨佳. 血管加压素受体 V₂、V₃ 在 ACTH 分泌性肿瘤上的表达及功能[D]. 上海: 复旦大学, 2013.

(收稿日期:2015-01-28)

(本文编辑:董历华)