

加味人参乌梅汤调控腹泻大鼠GABA能信号通路的系统效应

李珊珊¹, 赵琼^{1*}, 管志伟^{1,2}, 周鸿云^{1,2}, 刘茜玮³, 黄勤挽¹, 赵梦洁¹

(1. 成都中医药大学临床医学院/附属医院, 成都 610075; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 3. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究加味人参乌梅汤对腹泻模型大鼠结肠组织中 γ -氨基丁酸(GABA)能信号通路相关调控因子的影响,进一步揭示加味人参乌梅汤益气生津止泻的作用机制。方法:从48只SD幼龄大鼠中随机抽取12只作为正常组,其余大鼠以番泻叶泻下、劳倦力竭及饮食失宜等复合因素造模14 d。造模成功后,随机分为模型组、西药组及中药组,每组12只。正常组与模型组给予生理盐水灌胃($20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),西药组给予妈咪爱灌胃($0.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),中药组给予加味人参乌梅汤灌胃($35\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),均1次/d,连续干预7 d。每日观测记录大鼠一般情况、稀便率及腹泻指数。获取大鼠结肠标本,采用免疫组化法(IHC)检测大鼠结肠GABA蛋白积分吸光度表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B2(Akt2)、磷酸化(p-Akt)及白细胞介素-1 β (IL-1 β)的含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠PI3K、Akt2及 γ -氨基丁酸A型受体 β_2 亚基(GABRB2)mRNA和蛋白的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠一般情况明显变差,稀便率及腹泻指数差异无统计学意义,GABA蛋白表达明显升高($P<0.05$),PI3K、Akt2、p-Akt及IL-1 β 表达含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),PI3K、Akt2、GABRB2 mRNA及蛋白表达均极显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,中药组、西药组大鼠一般情况明显好转,稀便率及腹泻指数显著下调($P<0.01$),中药组、西药组PI3K、Akt2、p-Akt及IL-1 β 含量均明显下调($P<0.05$),中药组PI3K、Akt2、GABRB2 mRNA均明显下调($P<0.05$, $P<0.01$),GABA、PI3K及GABRB2蛋白表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$);西药组PI3K及Akt2 mRNA和PI3K蛋白表达均明显下降($P<0.05$)。结论:加味人参乌梅汤能通过调节腹泻大鼠结肠GABA能信号通路,减少肠上皮细胞中Cl⁻向肠腔流动,改善腹泻模型大鼠结肠水液代谢失衡状态,进而发挥其益气生津止泻效应。

[关键词] 加味人参乌梅汤; 腹泻; γ -氨基丁酸; γ -氨基丁酸A型受体 β_2 亚基; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B2

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0059-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220908

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220307.1928.008.html>

[网络出版日期] 2022-03-09 11:21

Systematic Effect of Modified Renshen Wumeitang in Regulation of GABA Signaling Pathway in Rats with Diarrhea

LI Shan-shan¹, ZHAO Qiong^{1*}, GUAN Zhi-wei^{1,2}, ZHOU Hong-yun^{1,2}, LIU Qian-wei³, HUANG Qin-wan¹, ZHAO Meng-jie¹

(1. College of Clinical Medical, Affiliated Hospital, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of modified Renshen Wumeitang (MRWT) on the related regulatory factors of the γ -aminobutyric acid (GABA) signaling pathway in colon tissues of rats with diarrhea, and reveal the mechanism of MRWT in invigorating Qi, generating fluid, and checking diarrhea.

[收稿日期] 2021-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81102544,81373531,81674026)

[第一作者] 李珊珊,在读硕士,从事中医药防治儿童脾胃疾病机制研究,E-mail:619310690@qq.com

[通信作者] *赵琼,博士,研究员,从事中医药防治脾胃病证研究,E-mail:823691452@qq.com

Method: Forty-eight SD immature rats were randomly divided into a blank group ($n=12$) and an experimental group ($n=36$). The diarrhea model was induced in the experimental group by Sennae Folium combined with overstrain and improper diet for 14 days. Subsequently, the model rats were randomly divided into a model group (normal saline, $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), a western medicine group (Medilac-Vita, $0.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and a Chinese medicine group (MRWT, $35 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 12 rats in each group. The rats in the blank group received normal saline at $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, and those in the other groups were treated correspondingly, once a day for 7 days. The general condition, loose stool rate, and diarrhea index of the rats were observed daily. Immunohistochemistry was used to detect the optical density expression of GABA protein in the colon of rats. The content of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), protein kinase B2 (Akt2), phosphorylated Akt (p-Akt), and interleukin- 1β (IL- 1β) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression levels of PI3K, Akt2, and GABA type A receptor subunit β_2 (GABRB2) in the colon of rats were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed worsened general condition, The difference was not statistically significant of loose stool rate and diarrhea index, increased expression of GABA protein ($P<0.05$), elevated expression of PI3K, Akt2, p-Akt, and IL- 1β ($P<0.05$, $P<0.01$), and up-regulated PI3K, Akt2, and GABRB2 mRNA and protein expression ($P<0.01$). Compared with the model group, the western medicine group and the Chinese medicine group showed the improved general condition, decreased loose stool rate and diarrhea index ($P<0.01$), and decreased content of PI3K, Akt2, p-Akt, and IL- 1β ($P<0.05$). The Chinese medicine group displayed decreased mRNA expression of PI3K, Akt2, and GABRB2 ($P<0.05$, $P<0.01$) and down-regulated protein expression of GABA, PI3K, and GABRB2 ($P<0.05$, $P<0.01$). The western medicine group exhibited down-regulated mRNA expression of PI3K, Akt2, and protein of PI3K ($P<0.05$). **Conclusion:** MRWT can regulate the GABA signaling pathway, reduce Cl⁻ flow in intestinal epithelial cells to the intestinal lumen, and improve the imbalance of colonic fluid metabolism in the colon of diarrhea rats, thereby exerting its effects of invigorating qi, generating fluid, and checking diarrhea.

[Keywords] modified Renshen Wumeitang; diarrhea; γ -aminobutyric acid (GABA); γ -aminobutyric acid type A receptor subunit β_2 (GABRB2); phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K); protein kinase B2 (Akt2)

腹泻是儿童常见多发病,在发展中国家是导致婴幼儿死亡的主要病因之一^[1]。水液代谢失衡是腹泻病发生的基本病理改变^[2]。由于小儿“稚阳未充,稚阴未长”“阳常有余,阴常不足”的生理病理特点,在小儿慢性、迁延性腹泻或急性腹泻伴轻、中度脱水病程中,由于体液丢失易致患儿阴液亏虚、津液耗损而见伤阴耗气之证^[3-4]。结合中医理论和现代研究成果,课题组以人参乌梅汤加减所得的加味人参乌梅汤治疗气阴两伤小儿泄泻,该方源自清代吴鞠通《温病条辨》,经成都中医药大学附属医院李秀亮教授结合小儿体质特点及多年临床经验加减化裁而来,在临床及前期实验研究中,均具有良好的益气生津止泻作用^[5-6]。

γ -氨基丁酸(GABA)作为一种氨基酸神经递质,参与机体多种代谢活动。GABA、GABA受体及其代谢酶等分子统称为GABA能信号系统(GABAergic signal system)。近年来,GABA能信号

系统的表达和作用已不仅仅局限于中枢神经系统,其在外周非神经组织器官发现证实了与中枢不同的生理和病理作用^[7-8]。尤其是GABA受体在外周上皮细胞上的表达,证据均指向GABA调节上皮细胞水、电解质和黏液的分泌作用^[9]。本研究通过探讨加味人参乌梅汤对腹泻大鼠结肠GABA能信号通路相关调控因子的影响,进一步揭示加味人参乌梅汤益气生津止泻的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD幼龄大鼠48只,雌雄各半,体重(70±10)g,购自成都达硕生物科技有限公司,合格证号SCXK(川)2015-030,四川省实验动物学会伦理委员会批准文号P202004091。

1.2 药物

1.2.1 药物制备 30%番泻叶标准煎液:番泻叶(四川省新荷花中药饮片股份有限公司,批号1711080)300g浸入1000mL纯净水中,充分搅拌

后浸泡30 min,武火煮沸文火煎煮15 min,以4层200目滤布过滤后,量取溶剂,加RO纯水定容为1 000 mL,除菌,标记并保存至4 °C冰箱备用。加味人参乌梅汤标准煎液:生晒参、乌梅各8 g,净山楂、怀山药、茯苓、广藿香、石榴皮、炒莲子各5 g,炙甘草3 g,炮姜1 g,共50 g(四川省新荷花中药饮片股份有限公司提供,批号分别为1810040、1811046、1901104、1901141、1709044、1811031、1903014、181102、1809074、1901053)。全方加纯水煎煮2次,先后加10倍量(500 mL)及8倍量(400 mL)各煎煮1 h,200目滤布过滤,合并滤液,减压浓缩至含生药 $1.74\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 煎液,除菌后保存至4 °C冰箱备用。妈咪爱(北京韩美药品有限公司,批号S20020037),规格1 g/袋,存放于4 °C冰箱,RO纯水40 mL加热至30 °C,加入妈咪爱1.4 g,当日配当日用。

1.2.2 药物质控 以上药品及中药煎液均由成都中医药大学药剂教研室黄勤挽副教授鉴定。

1.3 试剂 GABA抗体(美国Abcam公司,批号ab86186),山羊抗兔/鼠工作液、浓缩型DAB试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,批号分别为SP-9001/9002、K135925C),大鼠磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、Akt2、白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号分别为ml003142-2、ml238004-2、ml260371-2、ml003057-2), Animal Total RNA Isolation Kit/RT Easy™ II/(成都福际生物技术有限公司,批号分别为RE-03011、RT-01023), Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix(美国Bio-Rad公司,批号1725274), Akt2、PI3K、GABAA型受体 β_2 亚型GABRB2、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G H&L(英国Abcam公司,批号分别为ab179463、ab151549、ab156000、ab49900、ab205718)。

1.4 仪器 2016型转轮式切片机(德国徕卡公司), CFX Manager™ Software 3.1型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪/PCR分析软件、MINI-P4/MT-BLOT MOD/PP BAS型垂直电泳转印系统(美国Bio-Rad公司), Nano Photometer N50 Touch型超微量紫外分光光度计(德国Implen公司), A300型基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司), Champ Chemi 610型全自动化学发光凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司), MULTISKAN GO型全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司),

Multiskan Mk3型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher公司), Image-Pro Plus 6.0图像分析软件(美国Media Cybernetics公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 将48只SD大鼠雌雄各半,分笼适应性喂养2 d,随机抽取12只作为正常组,其余36只参照文献[10],采用番泻叶泻下、劳倦力竭及饮食失常复合选模方法制作气阴两虚型腹泻模型。具体流程:每日记录大鼠基本数据(肛温、体质量等)后,以30%番泻叶标准煎液灌胃,30 min后游泳至力竭(按大鼠当日体质量的5%剪取保险丝,缠绕于大鼠尾根部后,置于40 cm水深,30 °C水温的水箱中游泳,直至大鼠鼻尖浸没水下5 s,记录时间)。捞出大鼠后,立即擦干皮毛水分。以上流程均1次/d,连续14 d。造模期间,正常组大鼠常规喂养,其余3组隔日禁食不禁水。参考文献[10]方法评估造模成功后,采用分层随机化方法将模型鼠随机分为模型组、西药组及中药组,每组12只,雌雄各6只,分笼喂养。

2.2 给药方法 造模成功后,正常组及模型组以生理盐水灌胃($20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),西药组给予妈咪爱灌胃($0.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),中药组给予加味人参乌梅汤($1.74\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)灌胃($35\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),均1次/d,连续7 d。以上用药剂量的确定均基于本课题组前期研究结果^[11-12]。

2.3 标本采集 药物干预7 d后,停食不停水24 h,每组随机抽取6只大鼠,以7%水合氯醛($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,按无菌操作方法,剪开腹腔充分暴露结肠组织,剪取肛门上4~10 cm范围内结肠组织,生理盐水漂洗后分剪为6份1 cm长的标本,4份存入10%中性甲醛固定,2份加入RNA保护液,所有标本置于-80 °C冰箱保存,用于指标检测。

2.4 指标检测

2.4.1 免疫组化法检测大鼠结肠GABA蛋白积分吸光度IA表达 将结肠标本经脱水、包埋、切片、染色、水洗、冷却,先后滴加山羊血清封闭液、一抗(1:200)、二抗,反应完成后磷酸盐缓冲液(PBS)水洗,按DAB显色试剂盒滴至切片,室温显色,蒸馏水洗涤,苏木素轻染,最后脱水、封片,在显微系统下采集图像,用软件Image Pro Plus 6.0测定并计算平均光密度。

2.4.2 ELISA检测大鼠结肠PI3K、Akt2、p-Akt及IL-1 β 的含量 结肠标本冲洗4 °C, $7\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径9 cm)后收集上清液,提取总蛋

白,采用BCA法测定总蛋白浓度。按照ELISA试剂盒说明书进行检测。

2.4.3 Real-time PCR检测大鼠结肠PI3K、Akt2、GABRB2 mRNA的表达 采用Animal Total RNA Isolation Kit试剂盒提取各组结肠组织总RNA,纯化后置于PCR仪上进行逆转录。设计引物,进行Real-time PCR反应(反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性5 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,采集荧光。45个循环)。以β-actin为内参基因,2^{-ΔΔCt}法计算mRNA相对表达。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Sequence primers

引物	序列5'-3'	长度/bp
PI3K	上游GCAACCGAAACAAAGCCGAGAAC	112
	下游TCGCCATCTACCACTACAGAGCAG	
Akt2	上游GCTGGCTGGACTGCTCAAGAAG	99
	下游TTGATGCTGAGGAAGAACCGATGC	
GABRB2	上游AATGCTTGCCTATGATGCCTCCAG	150
	下游TCGGGGATGGTGATTTTCAGTTGG	
β-actin	上游GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	165
	下游GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	

2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠PI3K、Akt2、GABRB2蛋白表达 结肠标本解冻匀浆(约0.1 g)后,加冰冷的RIPA裂解液1 mL(1% TritonX100, 10% SDS, 0.15 mmol·L⁻¹ NaCl, 15.4 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.5% 脱氧胆酸, 1 mmol·L⁻¹ 原钒酸钠和RocheMiniEDTA-Free蛋白酶抑制剂;pH 8.0);超声波破坏细胞结构,4℃、1万r·min⁻¹离心15 min(离心半径9 cm)后取上清液,加入含有4×Laemmli的样品缓冲液,变性(98℃,10 min),电泳、转PVDF膜后封闭,加一抗PI3K(1:1 000)、Akt2(1:2 000)、GABRB2(1:5 000)、β-actin(1:1万)及二抗(1:2 000),用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析,结果以目的蛋白相对表达量表示。

2.5 统计学方法 采用GraphPad Prism 9.0软件统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若数据符合正态分布,方差齐,采用单因素方差分析,组间比较用最小显著性差异法(LSD);若数据不符合正态分布,方差不齐,组间比较用Mann-Whitney法,以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对腹泻大鼠一般情况的影响 正常组大鼠生

长发育正常,实验过程中无异常表现。造模14 d后大鼠腹泻明显,肛周污秽,精神倦怠、毛色晦暗结穗、爪甲耳轮干枯、易激惹,抓捕抵抗减弱,扎堆蜷缩,体质量增长较正常组明显减慢。药物干预7 d后,模型组上述情况加重,西药组与中药组大鼠腹泻轻微,毛色光亮,肛周轻污,活动灵活,抓捕抵抗较正常组稍弱,体质量增长较前明显加快,两组差异无统计学意义。

3.2 对组腹泻大鼠稀便率及腹泻指数的影响 与造模14 d组比较,模型组大鼠稀便率、腹泻指数均差异无统计学意义,提示造模成功且模型稳定;与模型组比较,中药组、西药组的稀便率、腹泻指数显著降低(P<0.01),提示两组有显著的止泻作用且疗效相当。见表2。

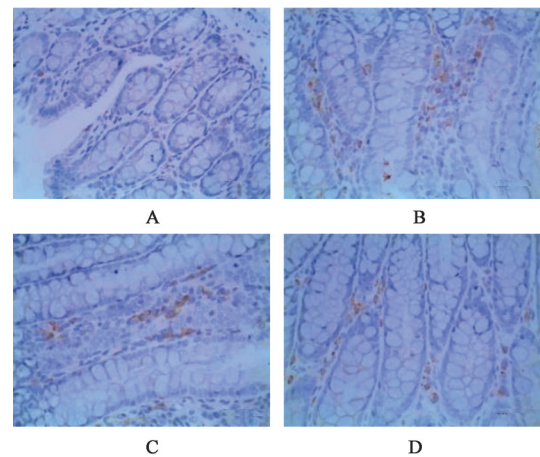
表2 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠稀便率及腹泻指数的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

Table 2 Effect of modified Renshen Wumeitang (MRWT) on loose stool rate and diarrhea index of diarrhea rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	稀便率/%	腹泻指数
造模14 d组		90.00±1.19	2.01±0.31
模型组		89.90±5.64	2.12±0.48
西药组	0.7	38.26±3.61 ¹⁾	0.86±0.15 ¹⁾
中药组	35	33.39±2.31 ²⁾	0.74±0.14 ²⁾

注:与造模14 d组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01

3.3 对腹泻大鼠结肠组织GABA蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织GABA蛋白表达明显上调(P<0.05),与模型组比较,中药组GABA蛋白明显下调(P<0.05)。见图1和表3。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 西药组;D. 中药组(图2同)

图1 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠结肠组织GABA蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 1 Effect of MRWT on expression of GABA protein in colon tissue of diarrhea rats (IHC, ×400)

表3 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠结肠组织GABA蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of MRWT on GABA protein expression in colon of diarrhea rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GABA
正常组		0.20±0.01
模型组		0.24±0.01 ¹⁾
西药组	0.7	0.21±0.01
中药组	35	0.20±0.01 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05

3.4 对腹泻大鼠结肠组织PI3K、Akt2、p-Akt及IL-1β表达的影响

表4 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠结肠组织PI3K、Akt2、p-Akt及IL-1β表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of MRWT on PI3K, Akt2, p-Akt and IL-1β in colon tissue of diarrhea rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/ng·g ⁻¹	Akt2/ng·g ⁻¹	p-Akt/nmol·g ⁻¹	IL-1β/ng·g ⁻¹
正常组		5.15±0.95	37.53±14.12	43.77±11.95	0.43±0.23
模型组		9.00±0.70 ²⁾	60.53±1.64 ¹⁾	90.18±8.14 ²⁾	2.25±0.69 ²⁾
西药组	0.7	6.72±0.88 ³⁾	39.95±5.88 ³⁾	54.60±12.23 ³⁾	1.04±0.53 ³⁾
中药组	35	6.68±0.95 ³⁾	39.74±7.87 ³⁾	44.76±27.47 ³⁾	0.96±0.58 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05

表5 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠结肠组织PI3K、Akt2、GABRB2 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of MRWT on PI3K, Akt2, GABRB2 mRNA in colon tissue of diarrhea rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	Akt2	GABRB2
正常组		1.22±0.24	0.85±0.15	0.82±0.47
模型组		5.01±1.56 ¹⁾	2.40±0.52 ¹⁾	3.10±0.48 ¹⁾
西药组	0.7	2.36±0.80	1.50±0.10 ²⁾	2.03±0.54 ²⁾
中药组	35	1.39±0.44 ³⁾	1.07±0.10 ³⁾	1.56±0.33 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表6同)

3.6 对腹泻大鼠结肠组织PI3K、Akt2、GABRB2蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组PI3K、Akt2、GABRB2蛋白表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,中药组PI3K、GABRB2蛋白表达显著下降(P<0.01),西药组PI3K蛋白表达明显下调(P<0.05);与西药组比较,中药组PI3K及GABRB2下调更明显。见图2和表6。

4 讨论

腹泻病的病理机制十分复杂,可概括为水电解质流失、营养吸收障碍、肠道菌群紊乱及肠黏膜屏障损害等,其中水电解质的分泌吸收失衡是形成腹泻的重要病理基础^[13-14]。由此形成的不同程度脱水

Akt2、p-Akt及IL-1β含量均明显升高(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,中、西药组PI3K、Akt2、p-Akt及IL-1β含量均明显下调(P<0.05),且两组之间比较差异无统计学意义。见表4。

3.5 对腹泻大鼠结肠组织PI3K、Akt2、GABRB2 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组PI3K、Akt2、GABRB2 mRNA表达均显著升高(P<0.01);与模型组比较,中药组PI3K、Akt2及GABRB2 mRNA表达明显下降(P<0.05, P<0.01),西药组PI3K、Akt2 mRNA表达明显下降(P<0.05);与西药组比较,中药组PI3K、Akt2及GABRB2 mRNA表达差异无统计学意义。见表5。

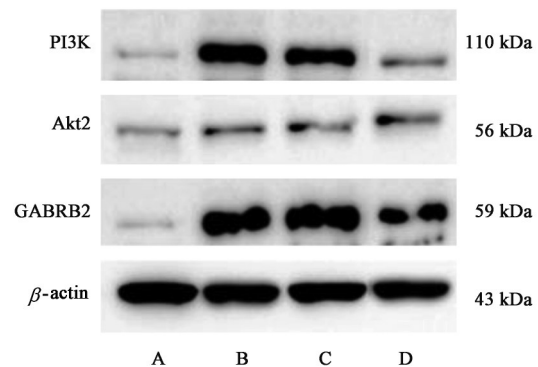


图2 各组大鼠结肠组织PI3K、Akt2、GABRB2蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of PI3K, Akt2 and GABRB2 protein expressions in colon tissues of rats in each group

表6 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠结肠组织PI3K、Akt2、GABRB2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of MRWT on expression of PI3K, Akt2 and GABRB2 protein in colon tissue of diarrhea rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/ β-actin	Akt2/ β-actin	GABRB2/ β-actin
正常组		1.00±0.06	1.07±0.07	1.04±0.10
模型组		7.01±0.42 ¹⁾	1.87±0.13 ¹⁾	8.95±0.44 ¹⁾
西药组	0.7	5.97±0.46 ²⁾	1.60±0.09	8.53±0.58
中药组	35	2.58±0.17 ³⁾	1.68±0.17	6.53±0.42 ³⁾

及营养吸收障碍使机体气耗津伤,形成气阴两虚证^[15]。人参乌梅汤是治疗气阴两伤型腹泻病的典

型代表之一,加味人参乌梅汤在其基础上去木瓜加茯苓、藿香、山楂、石榴皮、炮姜,组方精妙,更适用于小儿泄泻气津耗伤之证。方中人参、乌梅为酸甘化阴之主药^[16],甘温益气、涩肠生津,共奏益气敛阴止泻之功,切中气阴两伤之病机要点;石榴皮、净山楂加强酸涩之功,山药、茯苓、莲子加强甘缓健脾之力,与藿香炮姜甘草合用甘温醒脾,使中焦收涩无过,共奏益气养阴、运脾生津、醒脾止泻之功。此前课题组已通过研究表明加味人参乌梅汤能够通过调节腹泻模型大鼠的肠道代谢及肠道基因表达起到益气生津止泻的作用^[17-18]。

GABA能信号系统是中枢神经系统中主要的抑制性神经通路,广泛分布于大脑和脊髓,是维持兴奋性和抑制性神经元平衡的关键因素,在大脑功能、神经活动、信息处理及机体免疫等方面具有重要作用^[19-20]。近来研究表明GABA能信号通路系统在肠道中同样具有广泛表达,GABA和GABA受体在肠道中能够与其他神经递质协同合作维持肠道稳态、参与肠道神经调节、控制肠道的分泌及运动、影响肠道免疫及炎症反应等^[21-22]。研究表明,在中枢神经系统中GABA能够调节脑神经元中的Cl⁻通道,形成抑制性电位^[23]。在肠道组织中,GABA是由肠上皮细胞内的谷氨酸脱羧酶(GAD65/67)合成,通过自分泌或旁分泌的形式激活自身或邻近上皮细胞膜上的GABA_A受体(GABA_AR)Cl⁻通道,引起上皮细胞内的Cl⁻外流,带动水、电解质从肠腔基底侧向肠腔内流动,而GABA_AR激活后大肠平滑肌也会出现收缩抑制^[10,24]。研究表明,GABA能信号系统在腹泻发病过程中的表达上调由PI3K/Akt/GABA_AR信号通路介导完成^[25]。SERANTES等^[26]研究指出,IL-1 β 通过PI3K/Akt信号通路增加神经元细胞膜上GABA_AR的表达,进而调控上皮细胞黏液的分泌作用。体外实验表明,用外源性IL-13刺激小肠上皮细胞株,发现Akt磷酸化水平升高,并且GABA_AR的表达水平也相应升高,提示白细胞介素介导的PI3K/Akt信号通路很可能是GABA_AR细胞膜上表达增多的上游通路。PI3K被激活后在肠细胞膜上生成3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇,并作为第二信使结合Akt、p-Akt,从而激活GABA_AR,在Cl⁻转运中发挥重要的调节作用^[27]。

基于GABA能信号系统在外周非神经组织中不同于中枢神经的生理和病理作用,本研究以加味人参乌梅汤对腹泻模型大鼠进行干预,结果显示,正常大鼠结肠组织中有大量PI3K、Akt2、GABA蛋

白表达,提示GABA能信号系统广泛存在于大鼠结肠组织,与文献报道结论一致。与正常组比较,模型组大鼠PI3K、Akt2、p-Akt、GABRB2蛋白表达均显著上升,提示腹泻模型大鼠结肠组织中GABA能信号系统相关调控因子与腹泻病具有高度相关性。与模型组比较,中药组及西药组GABA能信号系统相关调控因子基因及蛋白表达均有不同程度降低,说明加味人参乌梅汤能够减少GABA能信号通路相关蛋白表达。中药组与西药组比较,差异无统计学意义。综上所述,腹泻发生时GABA能信号系统呈高表达状态,PI3K、Akt2及GABRB2等相关因子表达的升高与腹泻密切相关。加味人参乌梅汤对GABA能信号系统具有抑制作用,其发挥生津止泻作用可能是通过下调PI3K、Akt2及GABRB2的表达、减少Cl⁻向肠腔的流动、调节肠道水液代谢来实现的。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LI Z, KIM R, VOLLMER S, et al. Factors associated with child stunting, wasting, and underweight in 35 low- and middle-income countries [J]. *JAMA Network Open*, 2020, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.3386.
- [2] 张薇,葛文静,王慧森,等. 痛泻要方加减引经药防风对肠易激综合征大鼠水液代谢和5-HT系统的调控作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(11):56-62.
- [3] 陈炜. 加味人参乌梅汤酸甘化阴的“性味—药效—化学内涵”相关性研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2015.
- [4] 陈洁,叶礼燕. 儿童腹泻病诊断治疗原则的专家共识[J]. *中华儿科杂志*, 2009(8):634-636.
- [5] 刘彬媛. 酸甘化阴法治疗小儿气阴两虚型腹泻60例临床观察[D]. 成都:成都中医药大学, 2012.
- [6] 赵琼,黄勤挽,代渊,等. 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠AQP4及其相关调控因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(7):99-102.
- [7] ZHANG W, XIONG B R, ZHANG L Q, et al. The role of the GABAergic system in diseases of the central nervous system[J]. *Neuroscience*, 2021, 470:88-99.
- [8] HOU X, RONG C, WANG F, et al. GABAergic system in stress: Implications of gabaergic neuron subpopulations and the gut-vagus-brain pathway [J]. *Neural Plast*, 2020, doi:10.1155/2020/8858415.
- [9] MA X, SUN Q, SUN X, et al. Activation of GABA_A receptors in colon epithelium exacerbates acute colitis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:987.

- [10] 黄晶晶,陈炜,赵琼,等. 腹泻病气阴两虚证病证结合模型构建及以方测证研究[J]. 成都中医药大学学报,2016,39(1):34-38
- [11] 管志伟,赵琼,赵中和,等. 番泻叶致幼龄大鼠腹泻模型量-时-效关系研究[J]. 时珍国医国药,2021,32(8):1806-1809.
- [12] 赵琼. 小儿腹泻症-证-方药规律及其气阴两虚证的生物学基础研究[D]. 成都:成都中医药大学,2010.
- [13] MONASTERIO C, HARTL C, HASSELBLATT P. Acute and chronic diarrhea: A roadmap to differential diagnosis and therapy [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2020,145(18):1325-1336.
- [14] 宋棠,彭晓洪. 中医药治疗其他急性感染性腹泻的临床研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2021,21(23):169-172.
- [15] 周鸿雲,陈炜,赵琼,等. 浅析吴鞠通之酸甘化阴法的运用[J/OL]. 辽宁中医杂志:1-8[2022-03-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20211119.2000.014.html>.
- [16] 刘萍. 酸甘化阴配伍临证应用规律探讨[J]. 中医杂志. 2019,60(11):986-987,990.
- [17] GUAN Z, ZHAO Q, HUANG Q, et al. Modified renshen wumei decoction alleviates intestinal barrier destruction in rats with diarrhea [J]. J Microbiol Biotechnol,2021,31(9):1295-1304.
- [18] 周鸿雲. 基于“五味合化”理论研究人参乌梅汤加味及其性味拆方对腹泻模型大鼠结肠差异基因表达的影响[D]. 成都:成都中医药大学,2019.
- [19] ZHANG W, XIONG B R, ZHANG L Q, et al. The role of the GABAergic system in diseases of the central nervous system[J]. Neuroscience,2021,470:88-99.
- [20] TANG X, JAENISCH R, SUR M. The role of GABAergic signalling in neurodevelopmental disorders [J]. Nat Rev Neurosci,2021,22(5):290-307.
- [21] AUTERI M, ZIZZO M G, SERIO R. The GABAergic system and the gastrointestinal physiopathology [J]. Curr Pharm Des,2015,21(34):4996-5016.
- [22] NGO D H, VO T S. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid [J]. Molecules,2019,24(15):2678.
- [23] 刘晓萌,李峰,马捷,等. 四逆散含药血清对大鼠皮层神经元GABAA受体介导Cl⁻电流的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):202-205.
- [24] LIU S, ZHENG L, NEITZEL K, et al. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ symporter contributes to γ -aminobutyric acid-evoked excitation in rat enteric neurons [J]. Acta physiologica Sinica,2020,72(3):263-273.
- [25] 鲁兵,余万桂,吴国栋. 溃疡性结肠炎大鼠结肠中GABA的变化及其受体的表达[J]. 长江大学学报:自然科学版,2014,11(33):125-128,5.
- [26] SERANTES R, ARNALICH F, FIGUEROA M, et al. Interleukin-1beta enhances GABAA receptor cell-surface expression by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: Relevance to sepsis-associated encephalopathy [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (21) : 14632-14643.
- [27] 李妍. 肠上皮 γ -氨基丁酸能信号通路调节小肠液分泌及其作用机制[D]. 济南:山东大学,2014.

[责任编辑 周冰冰]