

通便颗粒调节慢传输型便秘大鼠结肠水通道蛋白 3, 水通道蛋白 8 表达的研究

钱海华^{1*}, 徐天舒², 曾莉³, 颜帅³, 张荣枝³

(1. 南京中医药大学附属江苏省中医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学附属鼓楼医院, 南京 210008; 3. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023)

[摘要] **目的:**观察通便颗粒对慢传输型便秘(STC)大鼠结肠水通道蛋白 3(AQP3),水通道蛋白 8(AQP8)的影响,阐明其治疗慢传输型便秘的作用机制。**方法:**选取健康 SD 大鼠 60 只,随机选取 10 只大鼠作为正常组,剩余 50 只大鼠采用复方苯乙哌啶法诱导慢传输型便秘大鼠动物模型,造模组大鼠随机分为模型组、通便颗粒低、中、高剂量组(9.3,18.7,37.3 g·kg⁻¹)、聚乙二醇散剂组(2.1 g·kg⁻¹),给药组 *ig* 给予相应剂量,正常组和模型组给予同体积生理盐水,连续给药 30 d。记录大鼠体重、24 h 大便质量,运用炭墨灌胃法检测大鼠肠道传输功能,并运用免疫组织化学技术检测结肠 AQP3,AQP8 的分布、表达及相对含量。**结果:**与正常组比较,大鼠 24 h 大便质量降低,肠管炭墨推进率降低,AQP3,AQP8 的表达增加,均具有统计学差异($P < 0.05$)。给予药物干预后,与模型组相比,治疗组各组大鼠 24 h 大便质量均有所增加,差异明显($P < 0.05$)。通便颗粒中、高剂量组、聚乙二醇散剂组肠管炭墨推进率明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组化结果显示通便颗粒中、高剂量组和聚乙二醇散剂组能不同程度减少 AQP3,AQP8 的表达,以通便颗粒高剂量组最为明显($P < 0.05$)。**结论:**通便颗粒具有明显改善便秘大鼠的排便功能,可能通过下调 AQP3,AQP8 的表达从而调节水分的吸收和分泌来治疗 STC。

[关键词] 通便颗粒;慢传输型便秘;水通道蛋白 3;水通道蛋白 8

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0180-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240180

Experimental Study of Tongbian Granules on the Regulation of AQP3 and AQP8 Expression in Colon of Rats with Slow Transit Constipation

QIAN Hai-hua^{1*}, XU Tian-shu², ZENG Li³, YAN Shuai³, ZHANG Rong-zhi³

(1. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Drum Tower Clinical Hospital Affiliated to Nanjing University, Nanjing 210008, China;

3. First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Tongbian granules on the regulation of aquaporin 3 (AQP3) and aquaporin 8 (AQP8) in rats with slow transit constipation (STC), and to clarify its possible mechanism. **Method:** A slow constipation rat mode was induced by compound phenylethyl piperidine. The 50 model rats were randomly divided into model group, low-, medium-and high-dose Tongbian granules groups (9.3, 18.7, 37.3 g·kg⁻¹), and polyethylene glycol powder group (2.1 g·kg⁻¹). The another 10 normal rats were assigned to normal control group. All rats were *ig* administered with the corresponding medicines for 30 days. The body weight, 24-hour stool weight, the carbon powder propulsion in the colon of rats were recorded and measured. The distribution and relative content of AQP3 and AQP8 in rat colon were detected. **Result:** Compared with model group, the body weight, 24-hour stool weight, the carbon powder propulsion rate in the colon were decreased in

[收稿日期] 20140728(011)

[基金项目] 江苏省中医药科技项目(LZ11042);南京中医药大学附属医院院级课题(Y12046)

[通讯作者] *钱海华,博士,主任医师,教授,从事中医药防治肛肠疾病研究,Tel:025-86617141,E-mail:haihuaqian@126.com

model group. The above indexes were improved in the Tongbian granules groups ($P < 0.05$). Immunohistochemistry results showed that the number of AQP3 and AQP8 were remarkably decreased in all dose Tongbian granules groups and polyethylene glycol powder group. Tongbian granules group of high dose had the best results ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tongbian granules has excellent curative effects in improving constipation defecation function of STC rats, which may be involved with the regulation of absorption and secretion of moisture achieved by depressing AQP3 and AQP8 in rat colon.

[**Key words**] Tongbian granules; slow transit constipation; aquaporin 3; aquaporin 8

慢性便秘(chronic constipation, CC)全球发病率为14%^[1],影响人们的生活质量^[2]。慢传输型便秘(STC)是慢性便秘的一种类型,主要因结肠内容物传输缓慢所致,伴排便困难以及腹胀等。因该病病因复杂,多年来专家们对慢传输型便秘发病机制研究的多集中在结肠动力紊乱、肠神经递质和胃肠道肽类激素以及结肠Cajal间质细胞等方面异常^[3],至今尚无定论。有研究显示水通道蛋白3(aquaporin 3, AQP3)和水通道蛋白8(aquaporin 8, AQP8)在大肠内的异常表达导致结肠对水分的吸收过度(或)肠液分泌减少,参与便秘的发生^[4]。本研究拟从津液代谢角度研究通便颗粒与AQP3和AQP8在慢传输型便秘中的内在联系,探讨通便颗粒防治STC的可能作用机制,为临床治疗提供依据。

1 材料

1.1 动物 健康SD大鼠60只,雌雄各半,体重在(180±20)g,由南通大学动物中心提供(清洁级)提供,合格证号SCXK(苏)2008-0010。室内温度保持在20~25℃,室内湿度维持在45%~55%,自然采光,人工光照明暗各12h,自由喂养,不限制水及饲料的供给。

1.2 药物与试剂 实验用中药饮片全部购于安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,药材经南京中医药大学陆兔林教授鉴定,符合2010年版《中国药典》的标准。通便颗粒的制备:麦冬、玄参、熟地黄、火麻仁各20g,生白术40g,杏仁、枳壳各12g,厚朴15g,瓜蒌仁20g。按人的等效量计算,根据实验需要放大药量,取400副。加水煎煮2次,第1次加水10倍量水,煎煮1h,第2次加8倍量煎煮0.5h,合并2次煎液,滤过,滤液静置24h,滤过,浓缩至相对密度为1.14~1.16(60℃)的清膏。将上述清膏加乙醇使含醇量为60%,混匀,冷藏24h,滤过。滤液回收乙醇至无醇味,并浓缩至相对密度为1.20~1.22(60℃),按1:2~3比例加入糊精等辅料适量,流化床制粒。制成颗粒40000g,干燥,包装成10g/袋。

通便颗粒给药剂量分别按照体表面积换算系数折算:人临床用量×0.018/200×1000×临床等效量的倍数。复方苯乙哌啶(常州康普药业有限公司,批号34021501),聚乙二醇散剂(重庆华森制药有限公司,批号1421117766)。活性炭、水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号30037516),DAB显色试剂盒(上海碧云天公司,批号P0202),抗AQP-3、AQP-8(英国Abcam公司,批号123393-2,143363-2)以及AQP-3二抗(辣根酶标记山羊抗兔IgG)和AQP-8二抗(上海优宁维科技有限公司,批号ab135033,ab135071)。

1.3 仪器 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Spectmmax plus384型酶标仪(美国Molecular Devices公司),ZEISS图像分析处理系统(德国Carl Zeiss公司),LEICA CM 1950型冰冻切片机,ST4040型全自动染色机(德国莱卡公司),Tissue-Tek TEL组织包埋机(日本Sakura公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 大鼠60只,各组动物雌雄分笼饲养,适应性喂养1周后,随机选取10只大鼠为正常组,仅饲以普通干饲料和纯净饮水;剩余50只大鼠参照文献[4],予以复方苯乙哌啶复制慢传输型便秘模型,给药剂量根据每只大鼠的体质量、饲料消耗量计算,饲料中添加复方苯乙哌啶剂量为8mg·kg⁻¹。造模期间,各组大鼠正常饮水、摄食,每隔5d称重1次,给药量随体质量变化调整,造模周期为120d。造模成功后,随机分为5组,每组10只,即模型组、通便颗粒低、中、高剂量组和聚乙二醇散剂组。按照动物与人用药量的换算系数表^[5]将通便颗粒低、中、高剂量组和聚乙二醇散剂组换算为相应的动物用药剂量,通便颗粒低、中、高剂量组和聚乙二醇散剂组给药剂量分别为9.3,18.7,37.3,2.1g·kg⁻¹,正常组和模型组给予同体积生理盐水,连续给药30d。

2.2 标本采集与处理 各组大鼠停药第1天,10%活性炭悬液2mL ig,20min后以10%水合氯醛溶液

(4.5 mL·kg⁻¹) ip, 碎冰上开腹剪取结肠, 固定于 4% 多聚甲醛。另摘取从幽门到直肠末端的全部肠管, 在松弛状态下测量肠道的全长, 以及活性炭混悬液在肠道内的推进长度。

2.3 相关指标观察与测定

2.3.1 一般情况 观察大鼠的皮毛光泽度、活动情况、精神状态、饮水量, 每 10 d 测量 1 次体质量。

2.3.2 大鼠粪便质量情况 复制模型前, 将滤纸铺垫于各饲养笼的辅料上, 收集各笼中大鼠的粪便, 称重、统计, 并比较造模后各组大鼠 24 h 的粪便质量的情况是否存在差异。

2.3.3 肠道传输功能测定 计算活性炭混悬液推进长度与肠道全长的百分比。

$$\text{炭墨推进率} = \frac{\text{墨汁推进长度 (cm)}}{\text{肠管总长度 (cm)}} \times 100\%$$

2.3.4 免疫组化测定 AQP3, AQP8 表达情况 各组标本常规脱水、包埋并切片, 上述石蜡切片常规脱蜡至水。选取结肠组织石蜡切片, 经二甲苯分别为 100%, 95%, 80%, 70% 质量分数的乙醇梯度脱蜡至水各 5 min。切片高压蒸锅法抗原修复, PBS 冲洗, 3 min × 3 次。分别加一抗 (AQP3, AQP8), 稀释比例为 1:500, 4 ℃ 过夜, PBS 冲洗 3 min × 3 次。加二抗, 37 ℃, 15 min, PBS 冲洗, 3 min × 3 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, DAB 显色, 镜下观察染色情况, 自来水终止显色。苏木素复染, 逐级脱水, 树脂封片。由单独的高级病理医师利用专业图像分析软件系统 (Image-Pro Plus) 在相同的灰度和光度的条件下, 随机在 5 个视野下 40 倍显微镜下观察 AQP3, AQP8 的数目。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较方差齐者采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 实验过程中, 未见大鼠死亡, 表明此种造模方法具有较好的安全性和可操作性。正常组大鼠体重较实验前明显加重, 活动、饮食、二便均正常。造模组大鼠在实验初期体重增长, 随实验进展, 体重增长逐渐减缓。与正常组相比, 造模组大鼠萎靡、瘦小, 皮毛枯燥无光泽、大便量少干燥, 粪便颗粒细小, 呈串珠状, 饮水量减少, 体重下降, 证明模型复制成功。

3.2 大鼠粪便质量情况 由表 1 可知, 造模后与正

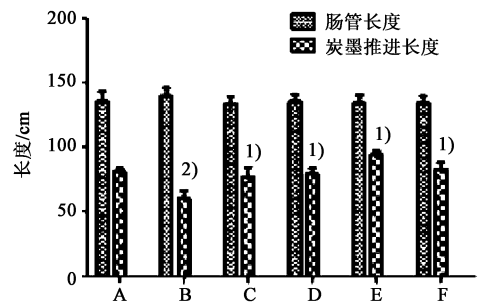
常组相比, 模型组大便的质量减轻比较明显 (*P* < 0.05)。给药后与模型组相比, 正常组及治疗组大鼠大便质量均有所增加, 差异显著 (*P* < 0.05); 但通便颗粒低、中、高剂量组和聚乙二醇散剂组之间无显著差异, 提示通便颗粒和聚乙二醇散剂可明显增加大鼠的排便量。

表 1 通便颗粒对慢传输型便秘大鼠 24 h 粪便质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模后质量 /g	给药后质量 /g
正常	-	6.53 ± 0.24	6.47 ± 0.14
模型	-	5.48 ± 0.61 ¹⁾	5.62 ± 0.55 ¹⁾
通便颗粒	9.3	5.55 ± 0.50	6.30 ± 0.17
	18.7	5.65 ± 0.46	6.25 ± 0.18 ²⁾
	37.3	5.54 ± 0.42	6.31 ± 0.23 ²⁾
聚乙二醇散剂	2.1	5.62 ± 0.51	6.29 ± 0.21 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05; 与模型组相比²⁾ *P* < 0.05 (图 1 同)。

3.3 肠道传输功能炭墨推进长度测定 由图 1 可知, 六组肠管总长度比较, 差异无统计学意义。与正常组比较, 模型组大鼠炭墨推进长度短, 差异显著 (*P* < 0.05); 与模型组比较, 通便颗粒组和聚乙二醇散剂组肠管炭墨推进长度不同程度改善, 以通便颗粒中、高剂量组明显增长 (*P* < 0.05)。



A. 正常组; B. 模型组; C. 通便颗粒 9.3 g·kg⁻¹ 组;
D. 通便颗粒 18.7 g·kg⁻¹ 组; E. 通便颗粒 37.3 g·kg⁻¹ 组;
F. 聚乙二醇散 2.1 g·kg⁻¹ 组 (图 2~3 同)

图 1 通便颗粒对慢传输型便秘大鼠肠管炭墨推进的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3.4 对各组大鼠结肠组织 AQP3, AQP8 表达影响 从图 2 可知, 所有切片中均可见多少不等的呈圆形或椭圆形 AQP3 阳性表达细胞, 呈黄色或棕黄色颗粒, 主要位于结肠黏膜顶部的绒毛上皮细胞, 其着色以细胞膜的基底及腔面为主, 杯状细胞少见, 在着色量及程度上, 模型组高于其他各组。由图 3 可知, 与 AQP3 相同, AQP8 在模型组表达明显, 阳性

部位主要集中在结肠黏膜层上皮细胞的顶膜,正常组表达次之,而通便颗粒组和聚乙二醇散剂组表达减少,以局灶表达为主,偶见于固有层中细胞核周围。从表2看出,与模型组相比,通便颗粒低、中剂量组和聚乙二醇散剂组能不同程度减少AQP3,AQP8的数目($P < 0.05$),而通便颗粒高剂量组最有显著性差异($P < 0.01$)。表明通便颗粒组和聚乙二醇散剂组均能抑制AQP3,AQP8表达,减轻便秘程度,尤其以通便颗粒高剂量组明显。

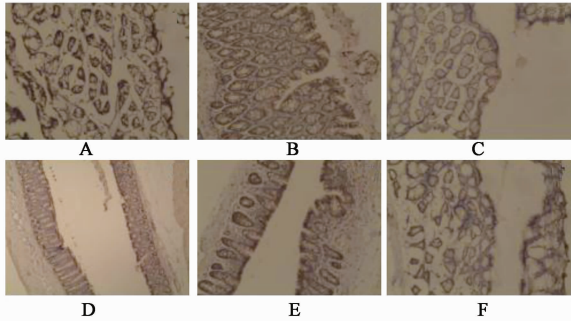


图2 通便颗粒对慢传输型便秘大鼠AQP3的影响(DAB, ×400)

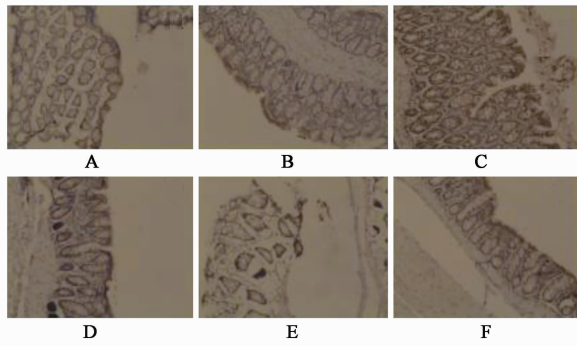


图3 通便颗粒对慢传输型便秘大鼠AQP8的影响(DAB, ×400)

表2 通便颗粒对慢传输型便秘大鼠AQP3,AQP8表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AQP3	AQP8
正常	-	74.25 ± 24.89	56.08 ± 18.98
模型	-	87.59 ± 24.93 ¹⁾	71.75 ± 16.87 ¹⁾
通便颗粒	9.3	69.35 ± 20.68 ²⁾	40.08 ± 15.66 ²⁾
	18.7	62.77 ± 22.91 ²⁾	37.50 ± 18.62 ²⁾
	37.3	53.03 ± 21.07 ³⁾	25.00 ± 13.52 ³⁾
聚乙二醇散剂	2.08	68.50 ± 24.79 ²⁾	39.44 ± 15.73 ²⁾

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

4 讨论

慢传输型便秘(STC)的发病是多途径、多因素、

复杂多变的过程,大肠的主要功能是吸收食物残渣中的水分和盐类,同时分泌一定量的黏液,保护润滑肠道。一般情况下大肠可以吸收肠内容物中80%的水、90%的Na⁺和Cl⁻,属于被动转运过程,各种溶质的主动吸收所产生的渗透压是水分吸收的主要动力;水通道蛋白是快速转运水分子及小分子溶质通过细胞膜的特殊通道,具有多种不同亚型,消化上皮细胞内至少存在6种AQPs表达,其中AQP3,AQP4,AQP8,AQP9在结肠有表达^[6],提示经细胞途径的水分转运机制可能具有重要的意义。这与国内袁维堂等^[4]通过研究比较便秘患者与正常人结肠黏膜AQPs的表达结果相一致。

本研究证实造模后大鼠体重增长逐渐减缓,出现典型的便秘特点:大鼠萎靡、瘦小、皮毛枯燥无光泽、大便量少干燥、饮食量减少,大鼠的肠道传输功能减慢,与临床STC患者具有相同的临床症状。表明采用复方苯乙哌啶复制慢传输型便秘模型操作简便,稳定性好。所有造模成功的大鼠经药物干预后,选用公认的炭指示剂判定通便颗粒对大鼠肠道运动的影响情况,结果表明通便颗粒可显著改善大鼠肠蠕动作用,提高肠内炭墨推进率,并呈量效依赖关系。这可能与通便颗粒中白术,厚朴及枳壳3味中药有关,相关药理实验已表明白术对胃肠有双向调节作用,水煎液灌胃具有明显促进大鼠肠管炭墨推进的作用^[7]。枳壳和厚朴可以兴奋在体的平滑肌和离体肠管;除此之外,枳壳提取物和厚朴碱对肠管的自主运动均有不同程度的增强作用^[8]。

AQPs在结肠的异常表达从而导致结肠对水液的过度吸收或抑制肠液的分泌,这可能在导致便秘发生的主要原因。AQP8表达于结肠黏膜吸收上皮细胞,参与结肠对水分的重吸收,在结肠水转运过程中发挥着关键性作用^[9]。多项研究发现AQP8在长期腹泻患者的结肠上表达降低,结肠AQP8 mRNA表达与粪便含水量负相关,证实AQP8在结肠水分重吸收过程中起着重要作用^[10-11]。

Yuan W T等^[12]研究表明,AQP3在功能性便秘患者升结肠上表达升高,而AQP9在降结肠表达下降,提示AQP3,AQP9在便秘的发生发展过程中作用明显。本实验进一步通过免疫组化对大鼠结肠AQP3,AQP8蛋白进行定性定量观察,发现各组AQP3,AQP8蛋白表达强弱不同。模型组和正常组在着色量及程度上,均高于其他组,而药物干预后通便颗粒组和聚乙二醇散剂组均能不同程度减少AQP3,AQP8的数目。由此可推测AQP3,AQP8参

与结肠水分的吸收,明确水通道蛋白 3,8 在大肠津液代谢中扮演重要作用。通便颗粒高剂量组干预下 AQP3, AQP8 的修复最低,说明通便颗粒高剂量组延缓肠腔内水分快速吸收入血,为改善肠腔内分泌环境提供物质基础。由此可推断通便颗粒高剂量组可能通过降低 AQP3, AQP8 的数目,抑制 AQP3, AQP8 在结肠上的表达,从而减少肠道对水分的吸收,增加粪便含水量,调节水分转运来治疗 STC 的症状。

通便汤是江苏省中医院全国首批名老中医朱秉宜教授的经验方,前期临床研究^[13]证明疗效显著。但患者多因条件所限或者煎煮草药不便,常放弃汤剂治疗,对 STC 的治疗和恢复造成困难。通便颗粒勿需煎煮,服药时用温开水冲调即可。既保持汤剂吸收快、显效迅速等优点,又克服汤剂需要临时煎煮、耗时耗能、时间长易酸败变质等缺点,并且携带方便。本研究仅从大肠主津的蛋白水平探讨通便颗粒治疗 STC 的机制,后续实验拟从分子动力学和晶体学方面明确通便颗粒调节水通道蛋白开闭的靶点,全面揭示通便颗粒治疗便秘的可靠科学依据,为新药研发提供理论和实验依据。

[参考文献]

[1] Suares N C, Ford A C. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(9):1582.

[2] Sun S X, Dibonaventura M, Purayidathil F W, et al. Impact of chronic constipation on health-related quality of life, work productivity, and healthcare resource use: an analysis of the national health and wellness survey [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(9):2688.

[3] Li Z, Zheng H, Li G B, et al. Alterations of Cajal cells in the colon of slow transit constipation rats [J]. *Chin J*

Gastrointestinal Surg, 2013, 16(8):777.

[4] Zhi H, Yuan W T. Expression of aquaporin 3, 4, and 8 in colonic mucosa of rat models with slow transit constipation [J]. *Chin J Gastrointestinal Surg*, 2011, 14(6):459.

[5] 李仪奎. 中药药理实验方法 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:206.

[6] Benga G. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future [J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(2):112.

[7] 卢敏, 郑晨果, 金纯. 复方白术汤对慢传输型便秘大鼠肠道肌间神经丛内 NOS 的影响 [J]. *北京中医药*, 2009, 28(1):58.

[8] 王现象, 张静泽, 陈虹, 等. 中药枳壳提取物对大鼠不同肠段平滑肌运动功能的影响 [J]. *武警后勤学院学报:医学版*, 2013, 22(8):679.

[9] Fischer H, Stenling R, Rubio C, et al. Differential expression of aquaporin 8 in human colonic epithelial cells and colorectal tumors [J]. *BMC Physiol*, 2001, 1:1.

[10] 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.

[11] Yamamoto T, Kuramoto H, Kadowaki M. Downregulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy [J]. *Life Sci*, 2007, 81(2):115.

[12] Yuan W T, Yang H F, Zhang Z Y, et al. Expression and significance of aquaporin 3 and aquaporin 9 in colonic mucosa of patients with functional constipation [J]. *Chin J Gastrointestinal Surg*, 2008, 11(1):57.

[13] 颜帅, 曾莉, 钱海华. 养阴润肠汤治疗慢传输型便秘 54 例 [J]. *南京中医药大学学报*, 2013, 29(4):335.

[责任编辑 周冰冰]