

不同清热中药对干燥综合征小鼠颌下腺 水分子转运功能的调控作用

郝桂锋^{1*}, 温成平², 李涯松¹

(1. 浙江省人民医院, 杭州 310014; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

[摘要] **目的:**探讨不同清热中药对干燥综合征(SS)模型鼠颌下腺水分子转运功能的干预作用。**方法:**利用 C57 小鼠建立 SS 动物模型,共设立 12 组,即白花蛇舌草组 4.51 g·kg⁻¹,紫草组 4.51 g·kg⁻¹,青蒿组 4.51 g·kg⁻¹,蒲公英组 4.51 g·kg⁻¹,大青叶组 4.51 g·kg⁻¹,板蓝根组 2.25 g·kg⁻¹,半枝莲组 2.72 g·kg⁻¹,玄参组 2.25 g·kg⁻¹,积雪草组 2.25 g·kg⁻¹,七叶一枝花组 2.25 g·kg⁻¹。各组小鼠于造模第 14 天开始 ig 给予相应药物,正常组、模型组均 ig 生理盐水 20 mL·kg⁻¹,每日 1 次,连续 4 周,并于造模前以及造模后 2,4,6 周固定时间测量小鼠饮水量、唾液流量以及检测各组小鼠水通道蛋白 5(aquaporins 5, AQP5)表达。**结果:**与正常组比较,模型组饮水量增加,在第 4,6 周差异均有显著统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组小鼠从治疗 2 周后小鼠饮水量均有减少,第 4 周时白花蛇舌草组、青蒿组、大青叶组、半枝莲组与模型组相比差异显著($P < 0.05$),第 6 周时蛇舌草组、青蒿组、蒲公英组、板蓝根组、半枝莲组、玄参组、大青叶组、积雪草组与模型组比降低,差异显著($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组唾液流量降低,在第 4,6 周时差异显著($P < 0.05$);唾液流量在第 4 周时板蓝根组、青蒿组、大青叶组、半枝莲组、积雪草组与模型组相比差异显著($P < 0.05$),第 6 周时各治疗组与模型组比较,增加都比较明显($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组 AQP5 积分吸光度差异有显著统计学意义($P < 0.05$);各治疗组 AQP5 积分吸光度与模型组相比,各治疗组均有不同程度的提高,其中以青蒿组(76.2 ± 8.1),大青叶组(77.1 ± 6.6),半枝莲组(65.4 ± 9.5)与模型组(41.9 ± 3.9)差异明显($P < 0.05$)。**结论:**青蒿、大青叶、半枝莲可以通过对 SS 小鼠降低饮水量、增加唾液流量以及颌下腺 AQP5 的影响发挥对其颌下腺水分子转运功能的治疗作用。

[关键词] 干燥综合征; 清热药; 唾液流量; 水通道蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0178-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020178

Regulation of Water Molecules Transport Function of Salivary Gland in Sjögren's Syndrome Treated by Chinese Medical Herbs HAO Gui-feng^{1*}, WEN Cheng-ping², LI Ya-song¹ (1. People's Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310014, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effectiveness of water molecules transportation of salivary gland in Sjögren's syndrome mice treated by different Chinese medical herbs. **Method:** The model of Sjögren's syndrome was made. The experiment was divided into normal group and model group, namely Spreading Hedyotis Herb group, Arnebiae radix group, Artemisiae Annuae Herba group, Taraxaci Herba group, Isatidis Folium group, Isatidis Radix group, Scutellariae Barbatae Herba group, Scrophulariae Radix group, Centellae Herba group, Rhizoma Paridis group. The mice were given drugs and normal saline from fourteenth day, once daily, for 4 weeks; the average water intake and salivary secretory were observed. **Result:** Compared with the normal group, the increased amount of water intake of the model group was significant ($P < 0.05$). After treatment, compared with the model group, the amount of water intake of the treatment group reduced from 2 weeks the difference between the model group and spreading hedyotis herb group, artemisiae annuae herba group, isatidis folium group, scutellariae barbatae herba group was remarkable ($P < 0.05$) after four weeks. At sixth week, the amount of water intake was reduced compared with the model group, in Spreading Hedyotis Herb group, Artemisiae Annuae Herba group, Taraxaci Herba group, Isatidis Folium group, Isatidis Radix group, Scutellariae Barbatae Herba

[收稿日期] 20140518 (006)

[通讯作者] * 郝桂锋, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治风湿病防治临床与基础研究, Tel: 13867478480, E-mail: dochgf@sina.com

group, Scrophulariae Radix group, Centellae Herba group. Compared with the normal group, the salivary flow of the model group reduced significantly ($P < 0.05$) after treated two and four weeks. The salivary flow of model group and Artemisiae Annuae Herba group, Isatidis Folium group, Isatidis Radix group, Scutellariae Barbatae Herba group, Centellae Herba group was remarkably different ($P < 0.05$) at fourth, sixth weeks, all the treatment group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the expression of AQP5 reduced significantly ($P < 0.05$) and the AQP5 of all treatment groups was improved after treatment compared with the model group, and Artemisiae Annuae Herba group, Isatidis Folium group, Scutellaria Barbata group were improved significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** The different Chinese medical herbs with heat clearing-detoxication are effective in reducing average water quantity, improving salivary flow and AQP5 of the Sjögren's syndrome mice.

[Key words] Sjögren's syndrome; heat clearing-detoxication; salivary flow; aquaporins

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种慢性自身免疫性疾病,主要侵犯泪腺、唾液腺等外分泌腺,严重时累及呼吸、泌尿、神经、血管等多系统病变,现代医学对本病尚未有理想的疗法。中医药治疗 SS 有较好的疗效^[1],在改善临床症状和调节人体免疫功能方面有一定的作用。中医学认为,阴亏是本病之本,燥毒、血瘀为本病之标,并认为清热解毒是治疗 SS 的大法之一,在临床上应用清热中药治疗 SS 也取得了一定的疗效。水通道蛋白即水孔蛋白(aquaporins, AQP)是一类广泛存在于真核和原核生物细胞膜上高效性、特异性转运水的膜通道蛋白;AQP5 构成唾液腺唾液分泌的通道,是 AQPs 亚型之一,参与水转运、腺体分泌,对唾液分泌起着重要作用^[2]。目前尚未有关于单用清热中药对 SS 治疗或对 SS 水分子转运方面的报道,本研究将从实验的角度观察清热中药对 SS 外分泌腺水分子转运功能的影响,为临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 C57 小鼠 108 只,雌性,12 周龄,体重(18 ± 2.0) g,合格证号 SCXK(沪)2008-0016,上海西浦尔-必凯实验动物有限公司,饲养于浙江中医药大学实验动物中心。

1.2 试剂 毒覃碱受体 3 抗原表位多肽 N49(M3 多肽 N49,上海蕴博生物技术有限公司),吸附无细胞百白破疫苗(杭州市疾控中心提供,批号 050M8729),弗氏完全佐剂(CFA,美国 Sigma 公司),白花蛇舌草、紫草、青蒿、蒲公英、大青叶、板蓝根、半枝莲、玄参、积雪草、七叶一枝花等中药,购自浙江中医药大学门诊部。AQP5 抗体(河北博海生物工程开发有限公司,批号 RS-1661R)。

1.3 仪器 M39849 型组织切片机, BM I-III 型组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司), CH902 型切片

漂烘温控仪(安徽电子科学研究所)。

2 方法

2.1 分组及造模方法 分组:将小鼠随机分为 12 个大组,每组 9 只,即 10 个中药治疗组和模型组、正常组各 1 组。抗原制备:将 M3 多肽 N49 用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.2 的 PBS 溶液稀释成 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,再分别与同体积的完全弗氏佐剂冰浴中充分乳化,即配制成为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 M3 多肽 N49 诱导制剂。造模:采用以上制备好的抗原多次免疫 c57 小鼠的方法^[3]制备 SS 动物模型,并用两种方法加强免疫即(1)在初次免疫后的第 14, 28, 42 天分别用相同剂量和浓度的免疫原足垫以及背部皮下多点注射;(2)各组小鼠在第 7, 14 天用百白破疫苗(死菌体密度为 1.1×10^{11} 个/mL)每只 0.2 mL,背部皮下注射。并根据小鼠的表现判断造模情况。

2.2 药物干预 根据人的常规剂量^[4]换算出各组小鼠的药物剂量,分别为:白花蛇舌草、紫草、青蒿、蒲公英、大青叶 $4.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,板蓝根、玄参、积雪草、七叶一枝花 $2.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,半枝莲 $2.73 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;水煎后浓缩药液;模型组、正常组生理盐水 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃。各组小鼠于第 14 天开始给予相应药物以及生理盐水灌胃,每日 1 次,每次按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 4 周;并于造模前以及造模后 2, 4, 6 周测量小鼠体重、每只小鼠日饮水量、每只小鼠相应时间 5 min 的唾液流量以及计算各组小鼠颌下腺指数;唾液流量测量:用湿重法测量,即将干燥无菌的脱脂棉球(5~8 mg)用弯镊子将其置于小鼠口颊内,5 min 后取出湿棉球,电子天平上称重,唾液分泌量(mg) = 棉球湿重 - 棉球干重。

2.3 AQP5 测定^[5] 采用免疫组化 SP 法测定 AQP5 的定位表达,具体步骤为:①腊块组织切片;②脱蜡、入水;③按次序在切片上滴加抗原修复液、

正常山羊血清封闭液、第一抗体、生物素化第二抗体 (IgG)、辣根酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP); ④DAB 显色; ⑤苏木素复染细胞核、中性树脂封片。采用化学发光剂发光并观察结果, 采用 Quantity One 4.6.2 图像分析系统对所得区带的积分吸光度 IA 进行扫描分析。

2.4 统计方法 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用统计软件 SPSS 16.0 统计处理, 采用方差分析及独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠造模情况 造模小鼠共死亡 9 只, 分别是白花蛇舌草组、青蒿组、大青叶组、板蓝根组、玄参组、七叶一枝花组、蒲公英组各死亡 1 只, 积雪草组死亡 2 只; 造模后各组小鼠均可见疲劳少动、毛发干枯、性情烦躁或精神不佳、口渴欲饮等现象, 尚有一部分小鼠出现毛发脱落成片、消瘦、目睛泛红等情况。

3.2 对 SS 小鼠饮水量、唾液流量、AQP5 表达的影响 治疗 2 周后治疗组小鼠饮水量均有减少; 第 4 周时白花蛇舌草组、青蒿组、大青叶组、半枝莲组与模型组相比饮水量差异比较显著 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组、蒲公英组、板蓝根组、玄参组差异有显著意义 ($P < 0.05$); 第 6 周时白花蛇舌草组、青蒿组、蒲公英组、板蓝根组、半枝莲组、玄参组、大青叶组、积雪草组与模型组比较, 差异均比较显著 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型、紫草、七叶一枝花组差异有显著意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 SS 小鼠不同时间饮水量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of amount of water intake of each group in different time ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	饮水量/mL		
			0 周	4 周	6 周
正常	9	-	3.97 ± 0.42	4.08 ± 0.56	4.02 ± 0.44
模型	9	-	3.92 ± 0.33	5.23 ± 0.2 ²⁾	5.55 ± 0.26 ²⁾
白花蛇舌草	8	4.51	3.89 ± 0.48	4.01 ± 0.50 ¹⁾	3.82 ± 0.55 ¹⁾
紫草	9	4.51	4.09 ± 0.49	4.87 ± 0	5.11 ± 0.62 ²⁾
青蒿	8	4.51	3.45 ± 0.43	4.39 ± 0.54 ¹⁾	3.85 ± 0.48 ¹⁾
蒲公英	8	4.51	4.12 ± 0.34	5.16 ± 0.2 ²⁾	4.00 ± 0.34 ¹⁾
大青叶	8	4.51	4.18 ± 0.28	4.10 ± 0.1 ¹⁾	3.88 ± 0.49 ¹⁾
板蓝根	8	2.25	4.40 ± 0.41	5.11 ± 0.2 ²⁾	4.24 ± 0.41 ¹⁾
半枝莲	9	2.73	4.00 ± 0.36	4.00 ± 0.1 ¹⁾	3.42 ± 0.42 ¹⁾
玄参	8	2.25	3.97 ± 0.53	5.01 ± 0.2 ²⁾	4.20 ± 0.56 ¹⁾
积雪草	7	2.25	3.87 ± 0.55	4.52 ± 0.65	4.45 ± 0.56 ¹⁾
七叶一枝花	8	2.25	4.31 ± 0.57	4.66 ± 0	4.84 ± 0.61 ²⁾

注: 与相应时间的模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与相应时间的正常组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

唾液流量在第 4 周时板蓝根组、青蒿组、大青叶组、半枝莲组、积雪草组与模型组相比差异比较显著 ($P < 0.05$), 与正常组比较, 模型组, 白花蛇舌草组、紫草组、玄参组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 第 6 周时各治疗组与模型组比较, 增加都比较明显 ($P < 0.05$), 正常组与模型、蒲公英、板蓝根、玄参组比较, 差异较明显, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 SS 小鼠唾液流量、AQP5 表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of salivary secretory and expression of AQP5 of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	唾液流量/mg			AQP5/IA
			0 周	4 周	6 周	
正常	9	-	28.01 ± 1.52	27.91 ± 2.01	28.21 ± 1.94	82.4 ± 4.3
模型	9	-	26.11 ± 1.48	20.56 ± 1.26 ²⁾	17.00 ± 1.33 ²⁾	41.9 ± 3.9 ²⁾
白花蛇舌草	8	4.51	28.75 ± 0.67	20.38 ± 1.38 ²⁾	26.00 ± 3.04 ¹⁾	51.3 ± 4.2 ²⁾
紫草	9	4.51	24.33 ± 2.83	22.89 ± 2.11 ²⁾	25.67 ± 1.75 ¹⁾	49.9 ± 4.6 ²⁾
青蒿	8	4.51	28.25 ± 1.86	30.25 ± 1.24 ¹⁾	26.75 ± 1.39 ¹⁾	76.2 ± 8.1 ¹⁾
蒲公英	8	4.51	24.50 ± 3.09	23.38 ± 1.31	21.50 ± 1.64 ^{1,2)}	55.6 ± 4.9
大青叶	8	4.51	30.75 ± 3.05	28.00 ± 1.09 ¹⁾	26.50 ± 1.12 ¹⁾	77.1 ± 6.6 ¹⁾
板蓝根	8	2.25	25.00 ± 2.34	25.63 ± 2.10 ¹⁾	21.00 ± 1.36 ^{1,2)}	47.8 ± 5.0 ²⁾
半枝莲	9	2.73	29.33 ± 1.89	25.22 ± 2.27 ¹⁾	25.67 ± 1.47 ¹⁾	65.4 ± 9.5 ¹⁾
玄参	8	2.25	24.13 ± 1.51	22.63 ± 1.60 ²⁾	22.50 ± 1.18 ^{1,2)}	58.4 ± 11.1
积雪草	7	2.25	26.861 ± 3.62	24.00 ± 0.76 ¹⁾	24.43 ± 1.39 ¹⁾	58.7 ± 7.8
七叶一枝花	8	2.25	27.75 ± 2.14	23.38 ± 1.74	25.25 ± 1.98 ¹⁾	57.2 ± 4.7

注: 与相应时间的模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与相应时间的正常组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

各治疗组 AQP5 与模型组比较,各治疗组均有不同程度的提高,其中以青蒿组、大青叶组、半枝莲组与模型组差异明显($P < 0.05$),3组之间无明显差异;与正常组比较,模型、白花蛇舌草、紫草、板蓝根组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

4 讨论

SS 是一种以口、眼干燥、腮腺肿大、皮肤干燥无华、脱发、消瘦等为主要临床表现的慢性自身免疫性疾病。其发病机制目前认为是在多种因素作用下,机体的细胞及体液免疫功能异常,产生大量炎症因子以及多种自身抗体,除直接损伤唾液腺等外分泌腺体外,还可阻断乙酰胆碱能神经信号的有效传递,造成水分子转运障碍、涎腺分泌减少,产生口干、眼干等临床症状。

在介导 SS 唾液腺腺体水分子转运中水通道蛋白(aquaporins, AQPs)发挥重要的作用。AQPs 中最早被确定分布在唾液腺腺泡细胞的是 AQP5,分布于腺泡腔的顶膜、侧膜、闰管和导管上皮细胞中,并参与水转运、腺体分泌;AQP5 可促进由于渗透压改变引起的水的快速转运,对唾液分泌起着重要作用^[6]。Kontinen 等^[7]发现 AQP5 在 SS 模型小鼠的涎腺上表达减少或消失;通过对干燥综合征患者研究亦证明,AQP5 在唾液腺的表达量减少,导致水分转运失代偿,从而引起唾液量分泌减少。

目前,现代医学尚未找到理想的针对 SS 的治疗方法。中医药对 SS 有较好的疗效。中医学认为,素体阴亏、燥毒、血瘀是 SS 的病因,它们又相互影响;在临床上主要表现为口眼干燥、发热、目赤、咽喉肿痛、腮部肿胀等,因此,清热解毒是其治法之一。现代研究认为清热药具有免疫调节、抗炎、镇痛、抑菌、杀菌、抗病毒等作用,并且对 SS 有较好的疗效^[8],这些常用的清热药可能通过改善 SS 腺体的水分子

转运功能发挥较好的疗效。

通过本研究可以看出,各清热中药对 SS 小鼠 AQP5 表达、唾液流量、饮水量均有不同程度的改善,部分药物疗效比较明显。以上结果显示清热中药可以通过改善小鼠颌下腺 AQP5 表达来改善 SS 水分子转运功能,并减少小鼠饮水量减少、增加唾液流量的分泌,这可能与清热血毒药物免疫调节、抗炎、抗病毒等作用有关。

[参考文献]

- [1] 陈秀芳,范永升.干燥综合征的中医药研究进展[J]. 中医药导报,2011,17(3):115-117.
- [2] 张景熙,李强,刘忠令. AQP5 的结构功能及其调节[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册,2003,23(6):599-601.
- [3] 邹新乐,李想,徐凯彪,等.毒蕈碱受体3抗原表位多肽诱导干燥综合征动物模型的研究[J]. 现代免疫学,2009,29(1):25-29.
- [4] 苗明三.实验动物和动物实验技术[M].北京:中国中医药出版社,1997:142.
- [5] 王蕾,李秀秀,董会,等.苯肾上腺素对颌下腺放射损伤后 AQP5 表达的影响[J]. 现代口腔医学杂志,2014,18(3):129-133.
- [6] 黄翠平,周京国.水通道蛋白-5 及其信号通路在原发性干燥综合征发病中的作用[J]. 中华临床医师杂志,2013,7(1):4036-4038.
- [7] Konttinen Y T, Tensing E K, Laine M, et al. Abnormal distribution of aquaporin-5 in salivary glands in the NOD mouse model for Sjögren's syndrome[J]. J Rheumatol, 2005,32:1071-1075.
- [8] 郝桂锋,温成平,李涯松.清热解毒法对干燥综合征干预的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2012,30(9):2125-2127.

[责任编辑 聂淑琴]