

# 加味人参乌梅汤对腹泻大鼠 AQP4 及其相关调控因子的影响

赵琼<sup>1</sup>, 黄勤挽<sup>2</sup>, 代渊<sup>3</sup>, 杨金蓉<sup>3</sup>, 徐世军<sup>2\*</sup>, 赵兴<sup>1</sup>, 任士庞<sup>1</sup>, 周鸿云<sup>1</sup>

(1. 成都中医药大学 临床医学院/附属医院, 成都 610075;

2. 成都中医药大学 药学院, 成都 610075; 3. 成都中医药大学 基础医学院, 成都 610075)

**[摘要]** **目的:**探讨加味人参乌梅汤酸甘化阴对腹泻模型大鼠水通道蛋白4(AQP4)及相关调控因子钠钾三磷酸腺苷酶( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), 蛋白激酶C(PKC)的影响,以揭示加味人参乌梅汤酸甘化阴生津止泻效应的作用机制。**方法:**将50只SD幼龄大鼠随机分为空白组、模型组、宝儿康糖浆组、思密达组、加味人参乌梅汤组,每组10只。空白组常规喂养,其余各组采用苦寒中药泻下、游泳力竭法、饥饿多因素复合作为腹泻模型,连续造模21d。造模成功后,空白组和模型组予生理盐水 $ig(20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1})$ ,其余各组分别给予加味人参乌梅汤 $ig(17.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$ ,思密达 $ig(4.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$ ,宝儿康糖浆 $ig(3.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$ ,均1次/d,连续7d。采用qRT-PCR等技术和方法,检测加味人参乌梅汤对幼龄腹泻模型大鼠结肠AQP4,ATPase,PKC基因表达水平。**结果:**与空白组相比,模型组大鼠结肠组织中AQP4,ATPase和PKC基因表达均显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,加味人参乌梅汤组大鼠结肠组织中AQP4,ATPase和PKC基因表达显著提高( $P < 0.01$ )。**结论:**加味人参乌梅汤可以通过调节AQP4及相关调控因子 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,PKC基因的表达水平来达到生津止泻的作用效应。

**[关键词]** 加味人参乌梅汤; 酸甘化阴; 腹泻; 水通道蛋白4; 钠钾三磷酸腺苷酶; 蛋白激酶C

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0099-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070099

**Effects of Modified Renshen Wumei Decoction on Gene Expression of AQP4, and Related Regulatory Factors in Diarrhea Model Rats** ZHAO Qiong<sup>1</sup>, HUANG Qin-wan<sup>2</sup>, DAI Yuan<sup>3</sup>, YANG Jin-rong<sup>3</sup>, XU Shi-jun<sup>2\*</sup>, ZHAO Xing<sup>1</sup>, REN Shi-pang<sup>1</sup>, ZHOU Hong-yun<sup>1</sup> (1. College of Clinical Medical/Affiliated Hospital, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China; 2. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; 3. College of Basic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of modified Renshen Wumei decoction on aquaporins-4 (AQP4) and related regulatory factors like potassium sodium adenosine triphosphate enzyme ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), protein kinase C (PKC). **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into control group, model group, Baoerkang group, smecta group and modified Renshen Wumei decoction group. The model was established by multi-factors which includes the cold diarrhea medicine, swimming exhaustive method and hungry. After the modeling, control group and model group were given normal saline  $ig(20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1})$ , the rest of the groups were respectively given Renshen Wumei decoction  $ig(17.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$ , Smecta  $ig(4.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$ , Baoerkang  $ig(3.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$ , once daily for 7 days. qRT-PCR etc techniques and methods were used to detect the gene expression level of colon AQP4, ATPase and PKC. **Result:** Compared with the control group, the gene expression of AQP4, ATPase and PKC in colon tissues of model rats were significantly lower ( $P < 0.01$ ); compared with the model group, modified Renshen Wumei decoction could significantly improve the gene expression level of AQP4, ATPase and PKC in the colon tissues ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Modified Renshen Wumei decoction can achieve

**[收稿日期]** 20140914(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373531,81102544);教育部博士点基金项目(20135132120014)

**[第一作者]** 赵琼,博士,研究员,从事小儿脾胃病证防治研究,Tel:13688184453,E-mail:zhaqiong@126.com

**[通讯作者]** \*徐世军,博士,教授,从事中药药理学研究,Tel:13111898478,E-mail:docxu@126.com

engendering liquid and anti-diarrhea effect through adjusting gene expression levels of AQP4 and related regulatory factors  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, PKC.

**[Key words]** modified Renshen Wumei decoction; sour and sweet herbs to nourish Yin; diarrhea; aquaporin-4; potassium sodium adenosine triphosphate enzyme; protein kinase C

酸甘化阴法是中医学重要的治则治法,人参乌梅汤是酸甘化阴法的代表方剂,该方(法)在祖国医学理论体系和临床实践中占有极其重要的地位。既往研究发现,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虚亏、津液耗损而见伤阴耗气之证;以酸甘化阴之代表方人参乌梅汤加味治疗气阴两虚型小儿腹泻病,经前期临床和实验研究表明,该方(法)有较好的生津止泻疗效。为进一步揭示加味人参乌梅汤酸甘化阴生津止泻效应的作用机制,研究以小儿腹泻病为载体,探讨加味人参乌梅汤酸甘化阴对腹泻模型大鼠水通道蛋白4(Aquaporins 4, AQP4)及相关调控因子钠钾三磷酸腺苷酶(sodium/potassium-ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase),蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的影响,为充分发挥中医药传统治则治法及方药的临床优势提供更丰富的科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 幼龄大鼠 50 只, SPF 级, 体重  $80 \pm 10$  g, 雌雄各半。成都达硕生物科技有限公司提供, 合格证号 SCXK(川)2013-0024。

**1.2 药物** 加味人参乌梅汤(由生晒参、乌梅、山楂、山药、石榴皮、广藿香、茯苓、莲子、炮姜、炙甘草组成), 15% 番泻叶液(均由成都中医药大学药剂教研室提供和鉴定), 思密达(博福-益普生制药有限公司, 批号 70504), 宝儿康糖浆(李时珍医药有限公司, 批号 201303004)。

**1.3 试剂和仪器** Takara RNAiso Reagent(Takara 公司, 批号 B101A), RT-reagent(Takara 公司, 批号 BK303), SYBR PremixEx Taq<sup>TM</sup>(Takara 公司, 批号 DRR041A), Real-time PCR core kit(Takara 公司, 批号 DR100A)。ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), P<sub>x</sub>2 型 PCR 仪(德国 Thermo Hybaid 公司), Versa Doc 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), CARY 50 型紫外分光光度计(澳大利亚 Varian 公司), Centrifuge 5804R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), TMW-20 型紫外透射仪(美国 Gene 公司), Polystat 型冷冻循环水浴, CC1-K6 型油浴 K 系列(德国 HUBER 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 加味人参乌梅汤制备: 分别取生晒参 8 g, 乌梅 8 g, 山楂 5 g, 山药 5 g, 石榴皮 5 g, 广藿香 5 g, 茯苓 5 g, 莲子 5 g, 炮姜 1 g, 炙甘草 3 g, 全方 50 g 加纯净水煎煮 2 次, 第 1 次加 10 倍量(500 mL), 煎煮 1 h; 第 2 次加 8 倍量(400 mL), 煎煮 1 h, 200 目滤布滤过, 合并滤液, 滤液减压浓缩至 0.58, 1.17 g 生药/mL, 作为供试品药液, 大鼠灌胃体积为 30 mL·kg<sup>-1</sup>。15% 番泻叶液制备: 取番泻叶 150 g 浸入 100 °C 1 200 mL 纯净水, 超声提取 30 min, 200 目滤布滤过, 滤取滤液 1 000 mL。以上药物灭菌, 贮存于 4 °C 冰箱内备用。

**2.2 动物分组和造模** 大鼠随机分为空白组、模型组、宝儿康糖浆组、思密达组、加味人参乌梅汤组共 5 组, 每组 10 只。

参照文献[1-3]方法, 采用苦寒中药泻下、游泳力竭法、饥饿多因素复合制作腹泻模型。除空白组外, 其余大鼠每日 1 次性 *ig* 给予 15% 的番泻叶煎液, 控制饮食并负重游泳力竭为度。参照文献[1, 3]判定腹泻模型造模成功后, 在造模 21 d 开始给药干预。空白组和模型组予生理盐水 *ig*(20 mL·kg<sup>-1</sup>), 其余各组分别给予加味人参乌梅汤 *ig*(17.5 g·kg<sup>-1</sup>), 思密达 *ig*(4.2 g·kg<sup>-1</sup>), 宝儿康糖浆 *ig*(3.5 g·kg<sup>-1</sup>), 均 1 次/d, 连续给药 7 d。处理大鼠, 作相关检测。

**2.3 qRT-PCR 检测肠组织中 AQP4, ATPase 和 PKC 基因表达** 根据 GenBank 中大鼠 18SrRNA 以及 AQP4, ATPase, PKC 基因序列, 使用 DNASTar 软件的 MegAlign 功能, 分别找出各基因的保守区域, 并采用 Primer Premier 5.0 软件设计其引物。引物均由大连宝生物工程有限公司合成。引物序列如下: AQP4: 上游引物 5'-GTGGTACTCCCAATC-CT-3', 下游引物 5'-GGTCCTCATCTCCCTCTG-3'; ATPase: 上游引物 5'-CAGGTGTTGAGGAGT-GG-3', 下游引物 5'-GCTTTCAGTGTGCTAATGT-3'; PKC: 上游引物 5'-GCCGTCCACCTGTTT-CC-3', 下游引物 5'-AGGCCCTGCTTCCAAT-3'; 18S rRNA: 上游引物 5'-GACTCAACACGGGAAACCT-CA-3', 下游引物 5'-CAGACAAATCGCTCCACCAA-3'。采用 TaKaRa RNAiso Reagent 试剂盒, 提取各组肠组织的总 RNA,

然后用 TaKaRa RT Reagents 逆转录试剂盒将其逆转录成 cDNA。以 18S rRNA 作为内参基因,在 ABI 7300 real-time PCR 仪上进行 PCR 反应,反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 经 95 °C 变性 15 s, AQP4 (55 °C)/ATPase (58 °C)/PKC (57 °C)/rRNA (58 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。以模型组为对照,通过软件自动计算出其他各组目的基因相对于模型组的表达情况。

**2.4 统计学处理** 应用 SPSS 16.0 统计软件分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,并对各组数据进行单因素方差分析。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对腹泻模型大鼠 AQP4, ATPase 基因表达的影响** 模型组 AQP4, ATPase 基因表达水平与空白组比较均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 加味人参乌梅汤 AQP4, ATPase 基因表达水平显著提高, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。提示模型组 AQP4, ATPase 基因显著低表达, 加味人参乌梅汤治疗后可以上调 AQP4, ATPase 基因表达, 促进其表达水平恢复正常。见表 1。

表 1 加味人参乌梅汤对腹泻模型大鼠 AQP4, ATPase 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Modified Renshen Wumei decoction effects on AQP4, ATPase mRNA expression in rats with diarrhea ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	AQP4/倍	ATPase/倍
空白	-	66.2 ± 38.4 <sup>1)</sup>	42.3 ± 12.2 <sup>1)</sup>
模型	-	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
宝儿康糖浆 <sup>2)</sup>	3.5	16.8 ± 7.3 <sup>1)</sup>	10.8 ± 4.6 <sup>1)</sup>
思密达	4.2	54.2 ± 24.9 <sup>1)</sup>	22.4 ± 8.2 <sup>1)</sup>
加味人参乌梅汤	17.5	49.1 ± 21.4 <sup>1)</sup>	28.6 ± 6.2 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>2)</sup> 宝儿康糖浆剂量单位为“mL·kg<sup>-1</sup>”(表 2 同)。

**3.2 对腹泻模型大鼠 PKC 基因表达的影响** 模型组 PKC 基因表达水平与空白组比较显著降低 ( $P < 0.01$ ); 加味人参乌梅汤组 PKC 表达水平显著提高, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。提示模型组 PKC 基因显著低表达, 加味人参乌梅汤治疗后可以上调 PKC 基因表达, 促进其表达水平恢复正常。见表 2。

### 4 讨论

人参乌梅汤(《温病条辨》)系用于治疗久痢伤及脾胃阴液“口渴舌干”之证。儿科医家肖正安认

表 2 加味人参乌梅汤对腹泻模型大鼠 PKC 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Modified Renshen Wumei decoction effects on PKC gene expression in rats with diarrhea ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PKC/倍
空白	-	36.8 ± 12.6 <sup>1)</sup>
模型	-	1.0 ± 0.0
宝儿康糖浆 <sup>2)</sup>	3.5	16.4 ± 5.8 <sup>1)</sup>
思密达	4.2	42.1 ± 13.2 <sup>1)</sup>
加味人参乌梅汤	17.5	9.6 ± 2.5 <sup>1)</sup>

为,本方尤宜于小儿,特别是久泄伤阴或其他原因而致小儿脾胃肝等脏阴虚者都可加减应用。课题组临床以酸甘化阴、实脾养胃之代表方人参乌梅汤加味治疗气阴两虚型腹泻取得良好疗效<sup>[4-5]</sup>。该方是在人参乌梅汤原方基础上,去木瓜,加山楂、石榴皮、广藿香、炮姜组成。方中人参益气,乌梅涩肠生津止渴,山药、莲子甘缓健脾。去木瓜加山楂、石榴皮以加强酸甘化阴、涩肠止泻之功;加广藿香、茯苓,重在理脾醒脾,健脾止泻;一味炮姜,旨在“阴中求阳”温运脾土,加强运脾作用。诸药合用,共奏益气养阴、运脾生津止泻之功。经课题组前期实验研究证实该方具有良好的生津止泻效应<sup>[6-7]</sup>。

AQP4 是水通道蛋白家族成员之一,在胃肠道细胞有广泛的表达,其功能障碍是多种水液代谢障碍疾病的中心环节。小儿腹泻病是一种水液代谢失常性疾病,与 AQP 有着密切的关系。研究表明 AQP4 在肠道的异常表达导致结肠对水分的吸收和分泌紊乱参与了腹泻的发生<sup>[8-9]</sup>。近年来,在中医药领域已开展了系列腹泻病与 AQP 相关性的研究并取得重要进展<sup>[10-12]</sup>。而 AQP 功能的正常发挥又与 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 的活性水平呈正相关;在结肠 ATPase 功能的异常导致 Na<sup>+</sup> 吸收异常是疾病条件下体液额外丢失的关键;腹泻患儿表现为程度不一的胃肠组织能量代谢紊乱和水电解质平衡失调,因此 ATPase 的短失与小儿腹泻病的发生密切相关。此外,PKC 通过磷酸化的方式在转录水平对 AQP4 基因进行调节;改变在细胞内信号传导途径上起重要作用的 PKC 活性,可以明显改变细胞内的 AQP4 表达水平<sup>[13-14]</sup>。由此可见,Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, PKC 在 AQP4 跨膜水转运调控中发挥了重要作用,是影响 AQP4 表达的重要调控因子。

本研究结果显示,模型组结肠组织中 AQP4, ATPase, PKC 基因表达量显著低于空白组,与模型组比较加味人参乌梅汤可以显著提高结肠组织中

AQP4, ATPase, PKC 表达水平。由此可以看出,本次研究结果与文献报道一致:AQP4 是结肠水分重吸收的重要蛋白质之一,结肠 AQP4 基因下调,导致结肠对肠腔内水分的吸收减少,大便含水量增加,这可能是腹泻病发生机制之一。而 AQP4 的关键调控因子 ATPase, PKC 基因表达显著下调,影响 AQP4 的基因表达,亦可致腹泻发生;加味人参乌梅汤可以使 AQP4, ATPase, PKC 异常下调的基因上调,从而改善腹泻症状,这可能是其加味人参乌梅汤酸甘化阴、益气生津止泻效应的分子机制之一。

#### [参考文献]

[1] 梁莉婕,焦立波,高明. 建立动物腹泻模型的常用药物及方法的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(8):1687-1689.

[2] 刘洋,向丽华,孙刚,等. 五苓散对腹泻模型大鼠结肠 AQP4 及 AQP4mRNA 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(5):547-549.

[3] 宋红,郑小伟,王颖. 多因素复合建立脾气虚证大鼠模型及以方测证研究[J]. 浙江中医杂志, 2008, 43(3):136-138.

[4] 李陈. 李秀亮教授治疗小儿脾虚泄泻的经验[J]. 四川中医, 2002, 20(9):5-6.

[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, 2013.

[6] 刘蓉,赵琼,徐世军. 基于酸甘化阴理论的人参乌梅

汤抑制小鼠胃肠运动作用研究[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(4):42-44.

[7] 赵琼,徐世军,李秀亮,等. 加味人参乌梅汤对 Caco-2 细胞脱水模型 AQP4 基因表达的影响[J]. 中药与临床, 2010, 1(3):36-38.

[8] 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]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(12):1225-1227.

[9] 宋丽军,赵文昌,谭晓梅,等. 葛根芩连方对 Wa 株轮状病毒感染乳鼠结肠上皮 AQP4 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5):514-518.

[10] 周次利,吴璐一,吴蓓玲,等. 艾灸及其生成物对腹泻型肠易激综合症模型大鼠内脏痛和结肠水液代谢的影响[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2014, 16(6):1261-1267.

[11] 薛晓倩,黄学宽,高宁,等. 藿香正气液对湿阻证大鼠结肠黏膜水通道蛋白 4 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19):165-169.

[12] 唐汉庆,韦祎,李晓华,等. 附子理中汤对脾阳虚大鼠 AQP4 的影响及其止泻机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12):222-225.

[13] 陈继兰,张慧慧,黄秀深,等. 平胃散对湿阻中焦证模型大鼠结肠 PLC-IP3/DG-CaM/PKC 信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7):1769-1771.

[14] 郭鹏. 异丙酚通过 PKC 途径抑制氯化铵处理的大鼠脑星形胶质细胞 AQP-4 表达上调[D]. 杭州:浙江大学, 2011.

[责任编辑 聂淑琴]