

苍术炒焦前后对湿阻中焦模型大鼠 AQP2, AQP3 含量的影响

付伟¹, 孙雄杰¹, 李水清^{1*}, 刘艳菊¹, 陈祥胜¹, 杨建锐²

(1. 湖北中医药大学 药学院, 湖北省中药炮制工程技术研究中心, 武汉 430065;

2. 华中科技大学 同济医学院 附属同济医院, 武汉 430030)

[摘要] **目的:**探讨苍术炒焦前后对湿阻中焦模型大鼠水通道蛋白 2(AQP2)和 AQP3 含量的影响,为苍术炒焦机制研究提供参考。**方法:**将动物分成空白组,湿阻中焦模型组,生苍术高、中、低剂量组(3 459.2, 1 729.6, 864.8 mg·kg⁻¹)及焦苍术高、中、低剂量组(剂量同生品)和香砂胃苓丸阳性组(1 729.6 mg·kg⁻¹),连续灌胃给药 7 d。利用紫外分光光度法和酶联免疫法分别检测给药前后大鼠尿液中 AQP2 含量和结肠黏膜中 AQP3 含量。**结果:**与空白组比较,模型组尿液中 AQP2 含量增加,结肠黏膜中 AQP3 含量降低,两者间的差异均具有极显著性意义。与模型组比较,各给药组大鼠尿液中 AQP2 含量均降低,且生品组 AQP2 含量较焦品组低;结肠黏膜中 AQP3 含量均增加,且焦品组含量高于生品组。**结论:**苍术的生品与焦品均有祛湿止泻作用,生苍术祛湿作用强于焦品,焦苍术止泻作用强于生品。

[关键词] 苍术;炒焦;水通道蛋白;湿阻中焦;香砂胃苓丸

[中图分类号] R945;R284.1;R283;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0019-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190019

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1042.010.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 10:42

Effects of Atractylodis Rhizoma Before and After Being Deep-fried on Contents of Aquaporin 2 and Aquaporin 3 in Model Rats with Syndrome of Damp Retention in Middle-jiao

FU Wei¹, SUN Xiong-jie¹, LI Shui-qing^{1*}, LIU Yan-ju¹, CHEN Xiang-sheng¹, YANG Jian-kun²

(1. Hubei Province Engineering Research Center of Chinese Materia Medica Processing, Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of Atractylodis Rhizoma before and after being deep-fried on contents of aquaporin 2 (AQP2) and AQP3 in model rats with syndrome of damp retention in middle-jiao and provide an reference for mechanism research of Atractylodis Rhizoma before and after being deep-fried. **Method:** Animals were divided into the blank group, the damp retention in middle-jiao model group, the high, middle and low dose (3 459.2, 1 729.6, 864.8 mg·kg⁻¹) group of raw products of Atractylodis Rhizoma, the high, middle and low dose (3 459.2, 1 729.6, 864.8 mg·kg⁻¹) group of deep-fried products of Atractylodis Rhizoma, Xiangsha Weiling pills positive group (1 729.6 mg·kg⁻¹), and rats were intragastric administration for seven days. Contents of AQP2 in urine and AQP3 in colonic mucosa were detected by UV and euzymelinked immunosorbent assay respectively before and after administration. **Result:** Compared with the blank group, AQP2

[收稿日期] 20160108(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81541080);国家科技部科技基础性专项(2014FY111100-2)

[第一作者] 付伟,在读硕士,从事中药炮制学研究,Tel:15907128023,E-mail:1515232799@qq.com

[通讯作者] *李水清,博士,教授,硕士生导师,从事中药炮制学研究,Tel:027-68890231,E-mail:lyj1965954@sohu.com

content increased and AQP3 content lowered in the model group; difference between these two groups were statistically significant. Compared with the model group, AQP2 content in administration group were declined and this index in raw products was lower than those of deep-fried group; the content of AQP3 in colonic mucosa rose dramatically and the deep-fried group was higher than that of raw product group. **Conclusion:** Both of raw and deep-fried products have effects of clearing damp and antidiarrheal. Function of raw products is stronger than deep-fried products in terms of clearing damp effect. However, in the aspect of antidiarrhoea, the role of deep-fried products is stronger than raw products.

[Key words] *Atractylodes Rhizoma*; deep-fried; aquaporin; damp retention in middle-jiao; Xiangsha Weiling pills

苍术具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的功效^[1]。生苍术温燥而辛烈,燥湿、祛风、散寒能力强,用于治疗风湿痹痛、风寒感冒、湿温发热等;苍术炒焦后辛燥之性大减,以固肠止泻为主,用于脾虚泄泻、久痢等^[2]。目前关于焦苍术的研究较少,仅见其所含挥发油成分分析^[3]及炮制工艺^[4]研究,关于生苍术和焦苍术止泻作用药效对比研究及作用机制研究尚未见报道。本实验以苍术生品和炒焦品为研究对象,选择与“湿”邪相关的水通道蛋白 2(AQP2)和与止泻相关的 AQP3 为评价指标,采用紫外分光光度法和酶联免疫法测定给药前后大鼠尿液和结肠黏膜中相关 AQP 的含量,比较 2 种苍术饮片燥湿止泻作用指标的差异,为苍术炒焦机制研究奠定基础,为相关饮片的临床合理使用提供实验依据。

1 材料

CR21G II 型高速离心机(日本日立公司),UV-1800 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。苍术饮片购自武汉刘天保药业股份有限公司,产地湖北英山,经湖北中医药大学张秀桥教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 的干燥根茎;香砂胃苓丸(修正药业集团通化通药制药股份有限公司,批号 Z22025577),牛血清白蛋白对照品(博士德生物工程有限公司,批号 BW3627-1),考马斯亮蓝溶液(自制,按 2015 年版《中国药典》通则中的方法配制^[5]),水为双蒸水,试剂均为分析纯。

SD 大鼠 90 只,体重(200 ± 20) g,雌雄各半,由湖北省实验动物研究中心提供,合格证号 SCXK(鄂)2015-0018。

2 方法与结果

2.1 药液的制备与剂量

2.1.1 剂量换算方法^[6] 2015 年版《中国药典》记载苍术的临床处方剂量为 3 ~ 9 g,设定成人剂量为 9 g,成人标准体重以 60 kg 计,成人每天的使用剂量 150 mg·kg⁻¹,大鼠按 200 g 计,将成人剂量换算成大

鼠的用药剂量 864.8 mg·kg⁻¹。以每只大鼠标准体重 200 g 换算,得每只大鼠每天给药量约 173 mg。

2.1.2 药液的制备^[4] 取适量生苍术,分别加 8,6 倍量水煎煮 2 次,每次 30 min,脱脂棉滤过,合并滤液,浓缩至 0.692 g·mL⁻¹(以生药量计算,下同),得苍术生品高剂量组药液。按比例分别稀释成 0.346,0.173 g·mL⁻¹,得苍术生品中、低剂量组药液。按与生品相同方法制备相同质量浓度的苍术焦品高、中、低剂量组药液。将香砂胃苓丸碾碎,取适量药粉,加水制成 0.865 g·mL⁻¹混悬液。

2.2 分组与造模

2.2.1 湿阻中焦模型大鼠的制备^[7] 连续造模 7 d,每天定时将老鼠放到水深 25 cm,水温 25 °C 的水桶中游泳 15 min,游泳结束后立即按 25 mL·kg⁻¹的剂量于第 1,3,5,7 天给予液态猪油灌胃,第 2,4,6 天给予 30% 蜂蜜灌胃,把大鼠安置在装有垫料 200 g(用 1 L 水浇湿)的大鼠笼中饲养,并用保鲜膜覆盖。正常饲喂,自由饮水。大鼠经造模后,出现少尿、厌油腻、呆滞、大便稀而黏稠、竖毛、毛色发黄等症状,提示造模成功。

2.2.2 分组 取 SD 大鼠 90 只,随机分为生品高、中、低剂量组,焦品高、中、低剂量组,阳性组,模型组及空白组,每组 10 只,雌雄各半。除空白组外,其他各组均按湿阻中焦模型大鼠的制备方法造模,结束造模后次日开始灌胃给药,生品高、中、低剂量组,焦品高、中、低剂量组和阳性组分别给予相应药液灌胃,模型组、空白组给予 0.9% 生理盐水灌胃,连续用药 7 d。正常环境下饲养,动物房内保持温度 25 °C,自由饮食、饮水,垫料每天更换。

2.3 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件包进行数据的统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,资料间的比较采用 2 个样本 *t* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2.4 评价指标的检测

2.4.1 大鼠尿液中 AQP2 的含量测定 取大鼠代谢笼收集尿液,模型组造模 7 d 后次日 12 h 收集尿液 1 次,空白组饲养 7 d 后收集次日尿量 1 次,其他各给药组在给药 7 d 后收集尿液 1 次。尿液离心 $5 \text{ min}(3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}, 4\ ^\circ\text{C})$,取上清液,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存待用。采用考马斯亮蓝法^[8],用牛血清白蛋白对照品制作标准曲线,以牛血清白蛋白对照品质量为横坐标,于 595 nm 处吸光度 A 为纵坐标,得 AQP2 回归方程 $Y = 3.302X + 0.102 (r = 0.999\ 1)$,线性范围 $0.05 \sim 0.4 \text{ mg}$ 。取适量尿液,于 595 nm 处测定 A ,计算尿液中 AQP2 含量,记录并处理数据,见表 1。结果与空白组相比,生品低剂量组尿液中 AQP2 含量接近空白组,这 2 组间无显著性差异,其余各组均显著高于空白组,提示生品低剂量利尿作用最好,燥湿作用最强。与模型组相比,各给药组大鼠尿液中 AQP2 含量均有下降,且生品组降低幅度大于焦品组;焦品低、中剂量组不具显著性差异,其余各给药组差异显著,提示各给药组均有祛湿作用,但生品作用强于焦品。该结果与苍术炒焦后燥性缓和的炮制作用相吻合。

表 1 各组别大鼠尿液中 AQP2 和结肠黏膜中 AQP3 的含量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Determination of AQP2 in urine and AQP3 in colonic mucosa on each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AQP2 /mg	AQP3 /mg
空白	-	0.069 6 ± 0.017 4	4.434 ± 0.199
模型	-	0.284 0 ± 0.029 8 ²⁾	3.434 ± 0.199 ²⁾
阳性	1 729.6	0.132 5 ± 0.043 6 ^{2,3)}	4.790 ± 0.392 ³⁾
生品	864.8	0.069 1 ± 0.041 0 ³⁾	4.005 ± 0.362 ^{1,3)}
	1 729.6	0.154 2 ± 0.033 5 ^{2,3)}	5.105 ± 0.204 ^{2,3)}
	3 459.2	0.168 8 ± 0.034 6 ^{2,3)}	4.368 ± 0.216 ³⁾
焦品	864.8	0.279 0 ± 0.112 6 ²⁾	5.554 ± 0.187 ^{2,3)}
	1 729.6	0.273 1 ± 0.119 8 ²⁾	5.663 ± 0.181 ^{2,3)}
	3 459.2	0.197 9 ± 0.011 2 ^{2,3)}	4.515 ± 0.216 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

2.4.2 大鼠结肠黏膜中 AQP3 的含量测定 取全部实验大鼠,依次麻醉。麻醉后解剖取结肠(约 8 cm),刮取内壁黏膜,称重,加入 29 倍量生理盐水,研磨至匀浆,离心 5 min,取上清液。运用酶联免疫法^[9]检测 AQP3 的含量,记录并处理数据,见表 1。结果与空白组相比,阳性组、生品高剂量组及焦品高

剂量组大鼠结肠黏膜中 AQP3 含量与空白组相接近,无显著性差异,其余各组的 AQP3 含量甚至高于空白组且具有显著性差异,提示给药后大鼠泄泻现象逐渐缓解,趋于正常。有些剂量组出现指标偏高,可能是在大鼠病理状态下矫正太过,是出现便秘的前兆;与模型组相比,各给药组结肠黏膜中 AQP3 含量均有升高,具有显著性差异,且焦品组均高于同剂量生品组。直观分析,焦品组大鼠 AQP3 含量升高较生品组明显,尤以中剂量最为突出。提示各给药组均有止泻作用,且焦品止泻作用强于生品。证实苍术炒焦后止泻作用明显增强。

3 讨论

3.1 湿阻中焦模型的选择 选择与中医主治病症相适宜的动物模型,才能保证药效指标的科学可信。焦苍术主要用于湿阻中焦、脾虚泄泻、久痢。湿阻中焦证病因有外湿与内湿之分。外湿因感受湿邪长期阴雨,空气潮湿,或久居卑湿之地,或涉水作业,或工作于潮湿之处,或冒雨露雾湿,使湿邪从体表、肌肤而入。内湿即因脾虚生湿生活不节,如嗜食生冷酒醴肥甘,或饥饱不匀,损伤脾胃,脾胃运化失职,津液不得运化转输,停聚而生湿。湿邪阻滞中焦,升降失常,运化就会出现障碍。脾为湿土,其性喜燥恶湿,湿为阴邪,其性黏腻重浊,湿邪阻滞中焦脾胃,则脾为湿困,脾不能升清,胃不能降浊,脾胃运化失职。水谷既不能运化,水津亦不能转输,则出现腹泻、尿少、水肿、腹水等湿病症状。本实验每天定时将大鼠放到深水中游泳 15 min,然后把大鼠安置在用水浇湿并用保鲜膜覆盖的大鼠笼中饲养,以此来模拟外湿环境;每天给予猪油、蜂蜜灌胃来模拟饮食不节,从而使大鼠内生湿症,当大鼠出现少尿、厌油腻、呆滞、大便稀而黏稠、竖毛、毛色发黄等症状即说明造模成功。焦苍术所治湿阻中焦是由内湿引起,该模型符合焦苍术中医主治病证。

3.2 “湿”邪指标的选择 脾主运化水湿,其性喜燥而恶湿。外感湿邪,留滞体内,常先困住脾气,使脾阳不振,运化水湿功能减弱,水湿停聚。脾为先天之本,肾为后天之本,在运化水液过程中相互协作。肾主通调水道,调节人体代谢,脾气虚弱,可致肾阳不足,使尿液的生成与排泄障碍。AQP2 主要存在于肾脏集合管的主细胞中,是肾脏集合管表达的主要水通道蛋白,参与调节尿液的生成^[10-11]。故检测肾脏集合管中 AQP2 的表达量可反映肾的气化功能,从而反映脾的运化功能。在 AQP2 由胞浆内的囊泡转移至胞膜的过程中,AQP2 蛋白部分从肾脏

集合管的主细胞上脱落分泌出来,分泌出的这部分可在尿液中被检测。经实验证明尿液中 AQP2 蛋白的表达量与肾脏中 AQP2 蛋白的表达量呈正相关,提示检测尿液 AQP2 水平可以反映肾内髓 AQP2 蛋白的水平^[12]。故选择 AQP2 作为评价“湿”邪的指标。

3.3 止泻指标的选择 脾阳不振、运化水湿失常会出现腹泻症状,本文选择 AQP3 作为止泻指标。AQP3 主要分布在人类小肠和结肠的上皮细胞中,其所介导的自由水快速被动地跨生物膜转运,是水进出细胞的主要途径^[13]。目前已证实 AQP1, AQP2, AQP3, AQP4 和 AQP8 在结肠中均有表达,其中 AQP3 是结肠中表达量最大的 AQPs,在结肠的水分运转中起到重要作用。Ikarashi 等^[14]在比沙可啶引起的大鼠刺激性腹泻模型中发现,粪便含水率随结肠 AQP3 表达量的不断减少而增加,而后随着结肠 AQP3 表达量的恢复而减少。在另一项实验中^[15],用 HgCl₂ 抑制 AQP3 功能后,大鼠粪便含水率较对照组高出 3 倍,并出现腹泻。康乐等^[16]研究提示 AQP3 的低表达或功能障碍可通过减少水分从肠腔的转运来参与腹泻的发生。大量实验证实^[17] AQP3 高表达可引起结肠黏膜对水的吸收增加而导致便秘, AQP3 低表达可引起结肠黏膜对水的吸收减少而导致腹泻或便溏。说明 AQP3 与腹泻关系密切,通过调节 AQP3 使其恢复到正常水平,则可起到治疗腹泻的作用。

模型大鼠给予不同药物灌胃后,生品组和焦品组的 AQP2 含量均有不同程度的下降,炒焦后燥性有所缓和,且成一定的剂量依赖性。在结肠黏膜 AQP3 含量测定结果中,焦品中、低剂量组出现指标偏高,甚至高于空白组,可能是在大鼠病理状态下矫正太过,是出现便秘的前兆,提示苍术在用药过程中有效且作用较强。本实验结果表明,高剂量组 AQP3 含量低于中、低剂量组。其原因是,药物在一定剂量范围内,随着剂量的增加,疗效会相应提高,但当剂量超过一定的限度,不仅疗效不会提高,而且会出现毒副反应,有的疗效反而下降^[18]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:161-162.
[2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 9 版. 北京:中国中医药出版社,2012:161.

[3] 张虎,夏新中,向丽娟,等. 3 种炮制方法对湖北苍术挥发油的化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):83-87.
[4] 孙雄杰,蒋濛,涂济源,等. 焦苍术炮制工艺研究[J]. 中成药,2015,46(4):526-529.
[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:98.
[6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2011:1262.
[7] 刘艳菊,陈雯雯,曾敏,等. 苍术炮制前后水提物药效学研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2276-2279.
[8] 廖荣鑫,周福生,文小敏,等. 脾胃湿热证大鼠湿偏重、热偏重模型尿液中 AQP₂ 的变化及在肾组织中的表达[J]. 山东中医杂志,2007,26(12):846-848.
[9] 张晓丹. 白术、茯苓与白术茯苓汤对脾虚泄泻动物模型胃肠形态及水液代谢的影响研究[D]. 成都:成都中医药大学,2014.
[10] 王聆宇,汪静. 年轻女性乳腺癌 200 例临床及病理特点分析[J]. 实用临床医药杂志,2009,13(15):8.
[11] Cuesta A, Vargas-Chacoff L, Arjona F J, et al. Effect of sexsteroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream[J]. Fish Shellfish Immunol,2007,23(3):693-700.
[12] 吴仕九,廖礼兵. 湿热证大鼠肾内髓及尿液中水通道蛋白 AQP2 含量的变化[J]. 中国中医药科技,2003,10(1):4-5.
[13] Matsuzaki T, Tajika Y, Abimit A. Aquaporins in the digestive system[J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(2):71-80.
[14] Ikarashi N, Baba K, Ushiki T, et al. The laxative effect of bisacodyl is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE2 secretion from macrophages [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2011,301(5):G887-G895.
[15] Ikarashi N, Kon R, Lizasa T, et al. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea [J]. Biol Pharm Bull,2012,35(6):957-962.
[16] 康乐,高明,丁宁,等. 复方儿茶止泻霜对腹泻大鼠结肠 AQP3 表达的影响[J]. 天津医药,2013,41(11):1089-1091.
[17] Laforenza U. Water channel proteins in the gastrointestinal tract[J]. Mol Aspects Med,2012,33(5/6):642-650.
[18] 张碧玉,黄南龙. 中药的剂量问题[J]. 海峡药学,2010,22(2):148-149.

[责任编辑 刘德文]