

附子理中汤对脾阳虚大鼠 AQP4-ANP-pGC 轴的影响

宁晚玲^{1,2}, 唐汉庆^{2*}, 刘燕平¹, 冯悦^{1,2}, 庞路路^{1,2}, 张世田², 黄小珊^{1,2}, 祝程程²
(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 右江民族医学院, 广西百色 533000)

[摘要] 目的:从水通道蛋白4-心房利尿钠肽-非可溶性鸟苷酸环化酶(aquaporin4-atrial natriuretic peptide-particulate guanylate cyclase, AQP4-ANP-pGC)通路探讨附子理中汤温阳健脾祛湿的作用机制。方法:选清洁级 Wistar 大鼠 120 只,分为空白组、假手术组、模型组和附子理中汤高、中、低剂量组共 6 个组,每组 20 只。空白组常态饲养。假手术组与模型组采用“肩胛骨间棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)切除术+高脂饲料喂养+隔日寒冷环境刺激”方法造模(假手术组只找到 BAT 但不切除)。术后第 1 天始喂高脂饲料共 30 d。在模型组基础上,高、中、低剂量各组分别予附子理中汤 40, 20, 10 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃,其他组给予等体积的生理盐水灌胃。于给药 30 d 后(其中模型组于造模成功后第 1 天)取材,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠胃窦与回肠组织病理形态学变化;酶联免疫吸附法(ELISA)检测 ANP 含量;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测 AQP4 mRNA 表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 AQP4 含量。结果:大鼠胃窦与回肠组织 HE 染色光镜下观察可见,附子理中汤各剂量组大鼠胃肠组织病理学改变均有不同程度的减轻,以高剂量组效果明显。与空白组和假手术组相比,模型组 AQP4, ANP 含量及 AQP4 mRNA 相对表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比,中、高剂量组 AQP4, ANP 含量及 AQP4 mRNA 相对表达量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:附子理中汤可能通过影响 AQP4-ANP-pGC 通路中 AQP4, ANP 含量及 AQP4 mRNA 表达以参与脾阳虚证大鼠水液代谢的调节。

[关键词] 附子理中汤; 水通道蛋白; 心房利尿钠肽; 非可溶性鸟苷酸环化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0126-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200126

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1027.024.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:27

Effect of Fuzi Lizhongtang on AQP4-ANP-pGC Axis in Rats with Spleen Yang Deficiency Syndrome

NING Wan-ling^{1,2}, TANG Han-qing^{2*}, LIU Yan-ping¹, FENG Yue^{1,2},
PANG Lu-lu^{1,2}, ZHANG Shi-tian², HUANG Xiao-shan^{1,2}, ZHU Cheng-cheng²
(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;
2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Fuzi Lizhongtang in warming Yang, invigorating the spleen and dispelling dampness through AQP4-ANP-pGC pathway. **Method:** A total of 120 clean grade Wistar rats were randomly selected and divided into blank control group, sham operation group, model group, and high, middle, low-dose Fuzi Lizhongtang groups, with 20 rats in each group. The blank control group was fed normally. Animal models were established in the sham operation group and the model group through interscapular brown adipose tissue (BAT) resection + high-fat diet + cold environment stimulation at alternate days (the sham operation group only received BAT without resection). The high-fat diet was fed for 30 days since the first day of the operation. In addition to the treatment for the model group, the three Fuzi Lizhongtang groups were respectively

[收稿日期] 20170607(019)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139190)

[第一作者] 宁晚玲,在读硕士,从事中医诊疗与辨证的现代临床应用研究, E-mail: 448557800@qq.com

[通讯作者] *唐汉庆,博士,副教授,从事民族医药与中西医结合研究, E-mail: phdtanghanqing@163.com

treated with high-dose ($40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), middle-dose ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and low-dose ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) Fuzi Lizhongtang, while the other groups were given the same amount of normal saline. Materials were collected after 30 days of administration, (the model group was collected on the first day after successful modeling). The morphologic changes in gastric antrum and ileum in rats were observed by HE staining; ANP content was detected by ELISA; the mRNA expression of AQP4 was detected by Real-time PCR. And the AQP4 content was detected by Western blot. **Result:** HE staining of gastric antrum and ileum in rats was observed under light microscope. Pathological changes in gastrointestinal tissues in rats in each Fuzi Lizhongtang group were alleviated to different degrees, with the best effect in high-dose group. Compared with the control group and the sham operation group, the contents of AQP4, ANP and the relative expression of AQP4 mRNA in the model group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the contents of AQP4, ANP and the relative expression of AQP4 mRNA in the middle and the high dose groups increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Fuzi Lizhongtang may regulate body fluid metabolism in rats with spleen Yang deficiency syndrome by changing the contents of AQP4, ANP and the expression of AQP4 mRNA in AQP4-ANP-pGC pathway.

[**Key words**] Fuzi Lizhongtang; aquaporins (AQP); atrial natriuretic peptide (ANP); particulate guanylate cyclase (pGC)

脾阳虚证是中医“脾病”中的常见证型,因阳虚而生寒,故又称脾虚寒证。其病因及发病机制复杂,多由脾气虚发展而来,或过食生冷,误服寒凉药物,攻下太过,损伤脾阳;或肾阳虚衰,火不生土所致。脾阳虚可理解为脾虚和阳虚并存,脾生理功能尤其是脾主运化功能的实现,主要依赖于阳气的充足与健运,脾气虚衰,则脾的运化功能减弱,对机体精微物质的吸收和转运作用降低,对人体津液的转运和输布功能减弱,水谷与水液代谢障碍,最终又会加重机体阳虚状态。因此,脾阳虚证可见畏寒喜温、形寒肢冷、体倦乏力、小便难、出血、纳呆、腹胀、水谷不化、泄泻、痰饮、水肿、带下清稀等脾虚与阳虚症状并存。临床针对脾阳虚衰所致的泄泻、水肿等水液代谢异常的病变,采用温阳健脾法,温中散寒,以达到升中焦脾阳、健脾利水的目的。

附子理中汤来源于《三因极——病症方论》,为温阳健脾的有效方剂,在对脾阳虚模型大鼠干预的前期实验中,或以血糖、血脂作为靶向,促进机体释放能量物质^[1],并可通过改变骨骼肌细胞钠电位以调节能量代谢,促进机体产热增加^[2];或可加快大鼠心率,改善心脏电生理病理变化,使其体温回升等,以达“温阳”之功^[3]。同时,附子理中汤还可健运脾阳,增强机体对糖和脂类物质的消化、吸收与利用,促使机体糖、脂类和蛋白质等物质的代谢趋向正常,为机体提供维持体温所需的能量^[4-5]。实验结果^[6-7]表明附子理中汤可使脾阳虚证模型水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4),心房利尿钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 含量与 AQP4 mRNA 表达

升高,使大鼠空肠肌活动及收缩力振幅降低,减慢大鼠胃肠的蠕动,促使其胃肠动力学趋于正常;同时抑制氯离子的分泌,促进结肠对水、氯化钾的吸收,从而改善脾阳虚大鼠水液代谢失衡,以此体现其“健脾”之效。

本实验在成功建立大鼠脾阳虚模型基础上,选择附子理中汤水煎剂对其进行治疗干预,通过对 AQP4, ANP 等指标进行观察,探讨附子理中汤温阳健脾调节水液代谢的部分机制,同时为临床脾阳虚证的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级 Wistar 大鼠 120 只,雌雄不限,体重 167 ~ 186 g,由右江民族医学院科学实验中心提供,合格证号 SCXK(桂)2012-0003。动物饲养于右江民族医学院实验动物中心,动物房保持 12 h/12 h 光/暗周期,相对湿度 40% ~ 60%,自由采食与饮水。动物实验符合广西中医药大学伦理委员会批准要求。

1.2 试剂与药物 组织总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号分别为 DP421, KR106-02, FP5-205-02);酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定大鼠 ANP 试剂盒、一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab108798, ab951);二抗,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZB-2305, 16A00204); $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl (pH 8.8), $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris (pH 6.8), 电泳液,蛋白上样缓冲液,转膜液,抗体稀释液,膜再生

液, RIPA 裂解液(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 T1010, T1020, T1070, P1016, D1060, A1800, SW3020, 20160505)。附子理中汤组成为炮附子、党参、白术饮片(北京同仁堂科技发展股份有限公司, 批号分别为 Z11020053, Z11020372, Z11020755), 干姜(康美药业股份有限公司, 批号 78782), 炙甘草(贵州同济堂制药有限公司, 批号 H52020114), 按原方 3:5:4:3:2 的比例制成水煎剂。以上药物均由右江民族医学院李克明副主任医师鉴定, 鉴定结果为附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 的子根; 党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根; 白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎; 干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎; 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎。

1.3 仪器 BS/BT223S 型电子天平(北京赛多利斯); MDF-U72V 型超低温冰箱(日本 Sanyo 公司); UniForce 6k 型微型离心机(广州尤德生物科技有限公司); TDL80-2BC 型低温高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); CFX96 型 Real-time PCR 仪, chemidoc XRS 型凝胶成像系统(美国伯乐公司); ZHI-82A 型恒温培养振荡器(天津泰斯特仪器有限公司); DYCP-31DN 型琼脂糖水平电泳槽(北京六一生物科技有限公司); 1-14K1 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 清洁级 Wistar 大鼠 120 只, 雌雄不限, 随机分为空白组、假手术组、模型组、附子理中汤高、中、低剂量组共 6 组, 每组 20 只。

2.2 造模与给药方法 沿用已往研究中脾阳虚证大鼠造模方法^[1], 空白组常态环境饲养, 模型组与假手术组采用“肩胛骨间棕色脂肪组织(BAT)切除+高脂饲料喂养+隔日寒冷环境刺激”方法造模(假手术组只找到 BAT 但不切除)。术后第 1 天开始喂高脂饲料共 30 d。在模型组基础上, 高、中、低剂量各组分别予附子理中汤 40, 20, 10 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 空白组、假手术组与模型组以等容量生理盐水灌胃。造模及治疗时间共 30 d。大鼠出现食欲不振、倦怠、腹胀、消瘦、便溏等症状或体征, 与中医学“久泻伤脾”而致的脾虚证相似。根据文献[8-9]对脾阳虚大鼠模型的评估标准, 阳虚症状群表现: ①形寒, 肢冷(大鼠喜扎堆); ②倦怠懒动。脾虚症状群表现: ①食欲减退, 消瘦, 体重明显下降, 大鼠毛色不荣; ②腹泻(肛门周围有污物)。造模大鼠出现了食

欲减退、体重下降、体温下降、大便稀、肛门周围有污物、动物蜷伏懒动、喜扎堆、毛稀疏枯槁、无光泽, 符合上述脾阳虚证评估标准, 由此制备脾阳虚证动物模型。附子理中汤给药剂量根据参考文献[10]按照临床上人用剂量通过体表面积法换算为大鼠剂量。

2.3 药液制备 按 2015 年版《中国药典》要求, 附子理中汤由炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草按照 3:5:4:3:2 的比例组方而成, 由右江民族医学院药理教研室提供。诸药分开均先经蒸馏水浸泡过夜, 炮附子先煎 1 h, 后纳入其余诸药, 煎煮 2 次(每次 40 min), 期间将 3 次药液纱布过滤合并, 水浴加热浓缩至含生药量为 2 g·mL⁻¹ 质量浓度的药液, 贮存于 4 ℃ 冰箱内备用。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠胃肠组织病理 大鼠胃及肠组织行包埋、切片, 二甲苯脱蜡, 无水乙醇梯度复水, 苏木素染色, 盐酸乙醇分化, 蒸馏水冲洗, 伊红染色, 乙醇梯度脱水, 甲苯透明, 中性树脂胶封片, 普通光镜观察胃窦及肠组织病理学变化。

2.5 Real-time PCR 检测 AQP4 mRNA 表达 称取结肠组织 50 mg 在液氮中研磨, 离心柱法提取总 RNA。紫外分光光度仪、琼脂糖电泳测定其浓度与纯度。取适量 RNA 溶液按照逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA。对逆转录产物进行 PCR 扩增反应, 并以 GAPDH 为内参。PCR 反应条件为变性 95 ℃ 15 min, 延伸退火 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 40 次循环, 72 ℃ 10 min 稳定产物, 4 ℃ 60 min 保存。AQP4 基因引物由大连宝生物工程有限公司代为设计合成。见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Sequence of RT-PCR primers

基因	引物序列(5'-3')	扩增长度/bp
AQP4	上游CTCATCTCCCTCTGCTTTGG	242
	下游CGATGCTGATCTTTCGTGTG	
GAPDH	上游GACATGCCGCTGGAGAAAC	143
	下游AGCCAGGATGCCCTTAGT	

取适量 PCR 扩增反应产物进行琼脂糖电泳, 经凝胶成像系统读取目的基因灰度值, 以目的基因灰度值/GAPDH 基因灰度值为目的基因 mRNA 的相对表达量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 AQP4 蛋白含量 取大鼠结肠组织 50 mg 剪碎, 加入适量 RIPA 裂解液于匀浆器中进行匀浆。用移液器将裂

解液移至 1.5 mL 离心管中,4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清分装于 0.5 mL 离心管中,测定蛋白浓度。经 10% 丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转移至 PVDF 膜,封闭,加一抗(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,TBST 溶液洗膜 5 次,加入二抗(1:2 000),摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 5 次,加 ECL 试剂反应 2 min,放入压片盒中,暗室中曝光、显影、定影,将胶片进行扫描或拍照,用凝胶图像处理系统分析目标带的灰度值。

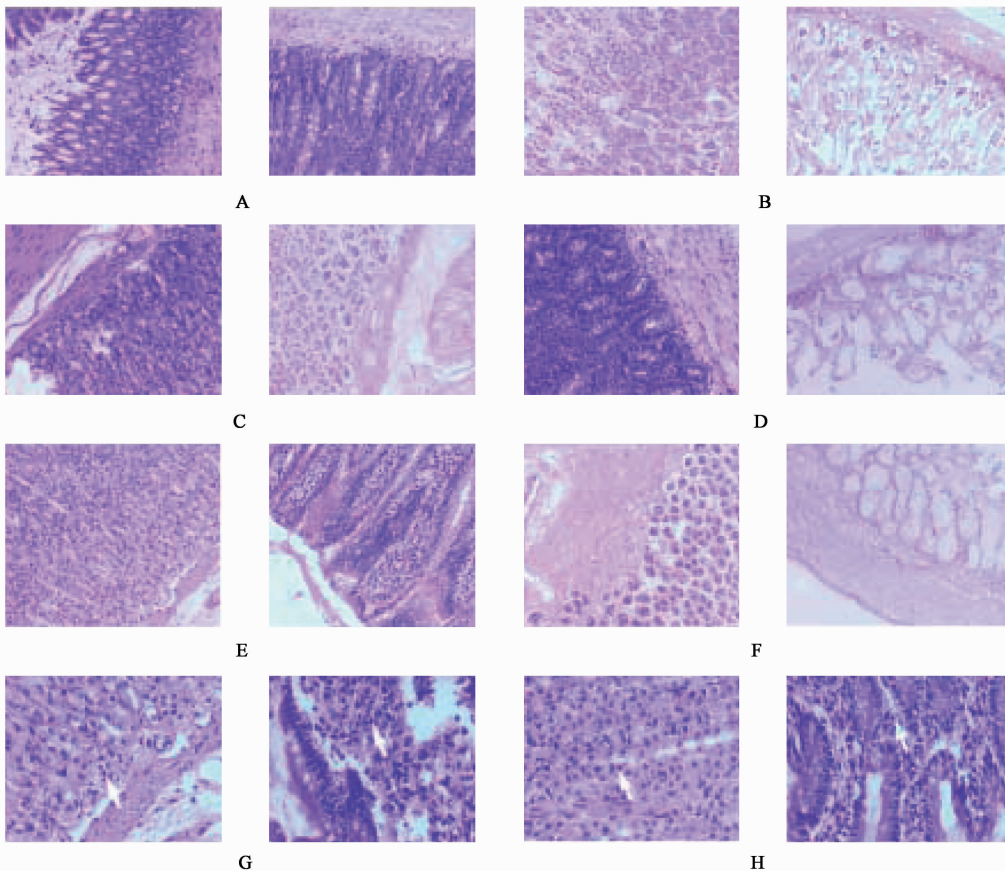
2.7 ELISA 检测 ANP 含量 设空白孔、标准孔、待测样品孔,加样,37 ℃ 反应 2 h,洗板 5 次,加 Biotinylated ANP Antibody 50 μL,37 ℃ 反应 2 h,洗板 5 次,加 SP Conjugate 50 μL,37 ℃ 孵育 30 min,洗板 5 次,加 Chromogen Substrate 50 μL,放入温育器温育 10 min 至转蓝,加入终止液,在酶标仪上于 450 nm 测量每孔的吸光度 *A*,以标准品浓度为横坐

标,*A* 为纵坐标制出标准曲线,再由标准曲线和已知实验样品的 *A* 计算 ANP 含量,在此结果基础上乘以稀释倍数即为最终结果。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件统计数据,符合正态的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间进行 *t* 检验,两两比较用 *q* 检验;进行显著性检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠胃肠组织形态学变化 镜下观察各组大鼠胃肠组织,空白组与假手术组胃肠组织结构均较为完整,无水肿与炎细胞浸润;模型组可见胃肠组织局部或弥漫性水肿及炎细胞浸润,局部回肠绒毛变矮或消失,腺体排列紊乱、萎缩等;低剂量组和中剂量组具体情况大致同模型组,未见明显改善;高剂量组基本接近正常组与假手术组,仍可见少量炎细胞浸润,如淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞等。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 假手术组;D~F. 附子理中汤中、高、低剂量组(左为胃窦组织,右为回肠组织,HE, ×200);G. 附子理中汤高剂量组胃窦组织(左为嗜酸性粒细胞,右为淋巴细胞,HE, ×400);H. 附子理中汤低剂量组回肠组织(左为浆细胞,右为嗜酸性粒细胞,HE, ×400)

图 1 各组胃肠组织形态学变化

Fig.1 Morphological changes of gastrointestinal tissue in each group

3.2 附子理中汤对大鼠 ANP, AQP4 含量及 AQP4 mRNA 表达的影响 与空白组相比,模型组 AQP4,

ANP 含量及 AQP4 mRNA 表达水平降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01);与模型组相比,附子理中汤中、高剂量组

AQP4, ANP 含量及 AQP4 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 附子理中汤对大鼠 ANP, AQP4 含量及 AQP4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Fuzi Lizhongtang on content of ANP and AQP4 and expression of AQP4 mRNA in rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AQP4 /g·L ⁻¹	AQP4 mRNA	ANP /μg·L ⁻¹
空白	-	30.26 ± 6.39	0.72 ± 0.24	228.06 ± 32.14
假手术	-	32.68 ± 6.45	0.64 ± 0.21	236.54 ± 32.69
模型	-	10.25 ± 5.62 ²⁾	0.32 ± 0.14 ¹⁾	95.68 ± 26.16 ²⁾
附子理中汤	10	15.68 ± 5.84	0.38 ± 0.15	119.67 ± 29.13
	20	24.21 ± 6.01 ³⁾	0.62 ± 0.18 ³⁾	175.25 ± 30.24 ³⁾
	40	29.22 ± 6.12 ⁴⁾	0.68 ± 0.24 ³⁾	219.85 ± 32.06 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医学认为,津液的代谢是以脾肺肾三脏为中心、以三焦为通路,依赖胃的受纳腐熟、脾的运化转输、肺的宣发肃降以及三焦的通调水道而完成^[11-13]。“脾主运化水液”,是津液代谢的枢纽之一,脾阳虚衰与水液代谢异常有密切的关系,水湿内停、泄泻水肿等均属于水液代谢失常的表现,治当温阳健脾祛湿。

AQP4 是 AQPs 家族中的一员,其生理功能之一是维持水液平衡。研究表明,AQP4 与细胞内外水液输送与转运密切相关,在水盐代谢调节中发挥着重要的作用,极可能是维持机体水液代谢平衡的分子生物学物质基础之一^[14-15]。相关研究表明大鼠肾脏 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 表达降低,可减少其对水的重吸收,增加排出体外的水液^[16];而上调大鼠胃肠道 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 表达,能促进胃肠道黏膜对水的重吸收,以达到“利小便而实大便”之目的。

ANP 由 28 个氨基酸组成^[17],研究发现 ANP 可通过 ANP-PGC 路径实现利尿排钠的功能,corin 酶可通过 ANP 通路调控体液平衡^[18]。此外,ANP 也参与调节胃肠平滑肌运动以及水、电解质等物质的吸收。相关研究结果表明,脾阳虚模型大鼠 ANP 含量及 pGC mRNA 表达量升高可抑制氯离子的分泌,促进结肠对水、氯化钾的吸收,从而改善脾阳虚大鼠腹泻症状^[19];而 ANP 抑制胃肠道平滑肌收缩作用也与此有关,其作用机制可理解为通过调节水液代谢相关的 AQP4-ANP-pGC-cGMP 信号转导途径,

增加细胞 K⁺ 外流,使细胞膜超极化,而抑制胃肠道平滑肌的收缩。

本课题组此前已经进行过一批动物实验研究^[20],对动物造模,AQP4 含量检测以及荧光定量法检测 AQP4 mRNA 表达进行了探索性的工作,初步掌握了一整套实验方案,包括动物造模的步骤、方法、动物分组处理、模型动物评价,AQP4 含量检测法以及荧光定量法检测 AQP4 mRNA 表达的反应条件和反应体系内容。

本实验研究结果表明,附子理中汤可升高脾阳虚模型大鼠的 AQP4, ANP 含量与 AQP4 mRNA 表达。结合相关研究结论,提示附子理中汤可能通过调节 AQP4-ANP-pGC 通路环节中 AQP4 和 ANP 的含量,减慢大鼠胃肠的蠕动,促进胃肠黏膜对水、氯化钾的吸收,从而改善脾阳虚大鼠腹泻症状,并不同程度地改善脾阳虚大鼠胃肠道黏膜间质水肿、细胞水肿、腺体病变、炎性病变。且其改善程度与用药剂量成正相关。

综上,AQP4 和 ANP 均有调节水液代谢的功能,而这一功能的实现,与激活 pGC,增加 cGMP 含量并最终激活 cGMP 依赖蛋白激酶以调控 AQP4-ANP-pGC 通路有关。本研究注意到附子理中汤可明显升高脾阳虚大鼠 AQP4, ANP 含量与 AQP4 mRNA 表达,改善大鼠腹泻症状,并不同程度地改善脾阳虚大鼠胃肠道病理形态变化,推测附子理中汤温阳健脾祛湿作用可能与调控 AQP4-ANP-pGC 通路有关,确切的机制尚需深入补充实验研究。

[参考文献]

- [1] 唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯及总胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):230-233.
- [2] 唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚大鼠骨骼肌能荷及 CNTF mRNA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1):248-251.
- [3] 卢兰,陈桦,唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚证模型大鼠心肌电生理的影响[J]. 中国中医急症, 2013, 22(12):2003-2004, 2047.
- [4] 窦锡彬,唐汉庆,张红参,等. 附子理中汤对脾阳虚大鼠轴浆运输及腺苷酸转移酶活性的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(3):348-349.
- [5] 唐汉庆,黄岑汉,黄赞松,等. 附子理中汤及拆方干预脾阳虚模型大鼠[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(15):2743-2748.
- [6] 劳传君,唐汉庆,李晓华,等. 附子理中汤对脾阳虚模型大鼠在体空肠肌活动、leptin 和 neuropeptide Y 的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 32(4):446-449.

- [7] 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.
- [8] 杨雪, 杨文思, 王勇, 等. 脾阳虚证中阳虚症状群的实验评价[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 244-246
- [9] 杨雪, 杨文思, 王勇, 等. 脾阳虚消化不良症状群客观评价的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(4): 271-272.
- [10] 黄娟萍, 罗裕, 江力, 等. 中药药动学研究中给药剂量的现状分析[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(21): 1685-1691.
- [11] 周丽, 纪立金, 梁海凌, 等. 试论“脾主运化”的机制内涵[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(4): 24-26.
- [12] 郭晟, 郭娟, 郑进. 人体津液链与燥证的关系[J]. 河南中医, 2012, 32(6): 668-669.
- [13] 王新月, 杨舒, 王健云, 等. 肺脾相关理论及其应用[J]. 中医杂志, 2012, 53(17): 1441-1445.
- [14] Knepper M A, Verbalis J G, Nielsen S. Role of aquaporin in water balance disorders [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 6(6): 367-368.
- [15] Orisni F, Santacroce M, Cremona A, et al. Atomic force microscopy on plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes containing human aquaporin 4 [J]. J Mol Recognit, 2014, 27(11): 669-675.
- [16] Verkman A S. Dissecting the roles of aquaporins in renal pathophysiology using transgenic mice [J]. Semin Nephrol, 2008, 28(3): 217-226.
- [17] 宋春丽, 刘海红, 赵宁. 利尿钠肽在诊断心力衰竭中的应用价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(1): 3-5.
- [18] 杨建梅, 赵丹阳, 李建华. 心脏心房利尿钠肽转换酶在妊娠期高血压疾病发病机制中的作用研究[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(11): 34-37.
- [19] 卢兰, 唐汉庆, 李晓华, 等. 附子理中汤对脾阳虚大鼠 ANP 含量、pGC mRNA 表达及胃肠动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 262-266.
- [20] 吴云起, 唐汉庆, 吴翠松, 等. 脾阳虚证大鼠棕色脂肪组织和解偶联蛋白 1 关联性的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 206-210.

[责任编辑 邹晓翠]