

# 养阴润肠方对便秘小鼠结肠水通道蛋白3/9的影响

蒋峰, 周锦勇, 刘明浩, 朱莹莹, 朱长乐, 杨柏霖, 陈玉根\*  
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨养阴润肠方对便秘小鼠结肠水通道蛋白3(AQP3)和水通道蛋白9(AQP9)表达的影响。方法:50只雄性ICR小鼠随机分为正常组,模型组,养阴润肠方低、高剂量组,普卢卡必利组,每组10只,采用复方地芬诺酯 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 连续灌胃15 d建立便秘模型,每周计算粪便含水量,用养阴润肠方低、高剂量组( $29.6, 59.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )干预15 d,取材结肠组织,进行免疫组化AQP3和AQP9定位和半定量表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测AQP3和AQP9基因和蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组粪便含水量明显下降( $P < 0.01$ ),AQP3表达增加( $P < 0.01$ ),AQP3的mRNA和蛋白表达均增加( $P < 0.05$ ),AQP9表达减少,AQP9的mRNA和蛋白表达亦均下降,但无统计学差异;与模型组比较,养阴润肠方低、高剂量组粪便含水量均增加( $P < 0.05$ ),AQP3表达下降( $P < 0.05$ ),AQP3的mRNA和蛋白表达均下降( $P < 0.05$ );养阴润肠方低剂量组的AQP9表达增加( $P < 0.01$ ),AQP9的mRNA和蛋白表达均升高( $P < 0.05$ ),高剂量组表达有升高趋势,但无统计学差异。结论:养阴润肠方可以增加便秘小鼠粪便含水量,其机制可能与降低结肠组织中AQP3和增加AQP9的表达有关,并且大剂量作用反而不明显。

**[关键词]** 养阴润肠方;便秘;水通道蛋白3;水通道蛋白9

**[中图分类号]** R285.5;R289.5;R269 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0114-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2018050114

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1141.028.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-14 11:41

## Effect of Yangyin Runchang Decoction on Colonic Water Channel Protein 3 and Aquaporin 9 in Constipated Mice

JIANG Feng, ZHOU Jin-yong, LIU Ming-hao, ZHU Xuan-xuan, ZHU Chang-le, YANG Bo-lin, CHEN Yu-gen\*  
(Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Yangyin Runchang decoction on the expressions of aquaporin 3 (AQP3) and aquaporin 9 (AQP9) in constipated mice. **Method:** Fifty male ICR mice were randomly divided into normal group, model group, low-dose group, high-dose group and prucalopride group, with 10 mice in each group. The mice were gavaged with compound diphenoxylate ( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) for 15 days, then treated with Yangyin Runchang decoction at the doses of  $29.6, 59.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 15 days. The colon tissues was collected, the locations and semi-quantified expressions of AQP3 and AQP9 were detected by immunohistochemistry, the mRNA and protein expressions of AQP3 and AQP9 were detected by Real-time PCR and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the fecal water content of the model group decreased significantly ( $P < 0.01$ ), AQP3 expression increased ( $P < 0.01$ ), the mRNA and protein expressions of AQP3 also increased ( $P < 0.05$ ), AQP9 expression decreased, and the mRNA and protein expressions of AQP9 were also decreased, but with no significant difference. Compared with the model group, the fecal water content in treated groups increased ( $P < 0.05$ ), AQP3

**[收稿日期]** 20170901(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373645);江苏高校优势学科建设工程项目(CCI20140822)

**[第一作者]** 蒋峰,博士,主治医师,从事中医药治疗便秘的基础和临床研究,Tel:17805008198,E-mail:jfacer68@hotmail.com

**[通信作者]** \*陈玉根,博士生导师,主任医师,从事肛肠常见疾病的临床研究和中医药治疗便秘的基础研究,Tel:13701409418,E-mail:chenyng666@126.com

expression decreased ( $P < 0.05$ ), and the mRNA and protein expressions of AQP3 were also decreased ( $P < 0.05$ ). The expression of AQP9 in the low-dose group increased ( $P < 0.01$ ), and the mRNA and protein expressions of AQP9 increased ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in the high-dose group. **Conclusion:** Yangyin Runchang decoction can increase the water content of feces in constipated mice. Its mechanism may be correlated with the decreased expression of AQP3 and increased expression of AQP9 in colon tissues, but the effect of high dose is not obvious on the contrary.

[**Key words**] Yangyin Runchang decoction; constipation; aquaporin 3; aquaporin 9

便秘(constipation)主要表现为排便次数减少、粪便干硬和(或)排便困难,由于饮食结构改变、生活节奏加快和社会心理因素等影响,慢性便秘的患病率呈上升趋势,全球发病率约为14%<sup>[1]</sup>,我国60岁以上人群慢性便秘患病率高达22%<sup>[2]</sup>,严重影响患者的生活质量。药物治疗是慢性便秘的首选治疗方法,西医治疗便秘的药物较多,但慢性便秘患者多需长期服药,随着使用时间的延长,西药副作用较多,如刺激性泻药可致肠神经损害,渗透性泻药易致电解质紊乱,部分促动力药有严重心血管不良事件,而中医药治疗便秘的历史悠久,具有疗效显著、副作用小、不存在药物依赖等优势。

“养阴润肠方”是著名中医学家朱秉宜教授的经验方,主要根据增液汤和枳术丸化裁而来,朱老认为临床的慢传输型便秘患者多是由于反使用泻剂,长期耗伤气阴肠道推动无力所致。本方在临床使用近60年,疗效确切,长期使用副作用少<sup>[3-5]</sup>,但其作用机制尚不明确。便秘病因复杂,确切发病机制不明,中药治疗功能性便秘的机制可能与调控肠神经递质及激素的含量、影响Cajal间质细胞、调节水通道蛋白、改善微生物等有关<sup>[6]</sup>。在胃肠道中,存在一类水通道蛋白(aquaporin, AQP),研究证实肠黏膜分布大量AQPs,通过介导水分子跨膜运输,在肠道吸收、分泌、水代谢调节中扮演枢纽角色<sup>[7]</sup>。如果其中某些AQP出现异常,将会影响水液代谢,如AQP3, AQP4, AQP8, AQP9异常,将会导致便秘<sup>[8]</sup>,或者腹泻<sup>[9-10]</sup>。结肠黏膜AQP的异常表达和便秘存在明确关系,陈萌等<sup>[11]</sup>报道化瘀通便汤可以降低结肠组织中AQP1和AQP3的表达,从而缓解大鼠的便秘症状;占煜等<sup>[12]</sup>报道大黄治疗便秘的可能作用机制是下调上皮细胞质膜AQP3的表达水平;钱海华等<sup>[13]</sup>发现通便颗粒可能是通过下调AQP3和AQP8的表达治疗大鼠慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)。由此可见,大多数动物研究主要集中在AQP3的表达,对于AQP9的研究文献较少,结合在体研究发现,AQP3和AQP9在便秘和非

便秘患者中表达存在异常,可能对结肠内水代谢起重要作用<sup>[14]</sup>。本课题组前期研究发现,养阴润肠方可以调节大黄灌胃诱导便秘大鼠的AQP3的表达<sup>[15-16]</sup>,基于此,本研究利用复方地芬诺酯诱导的便秘小鼠模型,观察养阴润肠方对便秘小鼠结肠黏膜水通道蛋白AQP3和AQP9表达的影响,以期阐明养阴润肠方治疗便秘的作用和机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性ICR小鼠50只,体质量( $27 \pm 2$ )g,由南通大学动物中心提供,合格证号SCXK(苏)2014-0001。饲养于江苏省中医院药理实验室。清洁级,独立饲养,饲养环境室温( $24 \pm 5$ )℃,湿度( $55 \pm 5$ )%,明暗各12h,自由饮水和饮食。实验动物取得南京中医药大学伦理委员会批准(编号2015NL-127-02)。

**1.2 药物与试剂** 复方地芬诺酯片(常州康普药业有限公司,批号1604029);琥珀酸普芦卡必利片(力洛, Janssen Cilag S. p. A. 公司,批号GCL5T00);养阴润肠方组成为炒瓜蒌仁20g,麸炒枳壳15g,白术30g,地黄20g,麦冬20g,火麻仁20g,玄参20g,郁李仁20g,炙升麻15g,六神曲15g,购自江苏省中医院,所有药物经江苏省中医院曹圆药师鉴定,符合2015年版《中国药典》的标准,中药加水1800mL浸泡0.5h后,武火熬开后文火熬30min,第2煎方法同上,2次药量合并后,浓缩至含生药 $3\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,放于4℃冰箱备用。即用型快速免疫组化MaxVision™试剂(福州迈新生物公司,批号kit5030);trizol(Life公司,批号127704);cDNA转录试剂盒,SYBR试剂盒(日本Takara公司,批号分别为A4202-1, A6704-1);三氯甲烷(南京化学试剂有限公司,批号13101711707);异丙醇(成都市科龙化工试剂厂,批号2016091801);PCR引物由invitrogen公司设计合成;RIP裂解液,SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒(碧云天生物技术公司,批号分别为P0013B, 122016161220);AQP3抗体(英国Abcam公司,批号GR140047-44);AQP9抗体(美国Origene

公司,批号 AQP009AN0102);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号 201609180614);化学发光 HRP 底物(Millipore 公司,批号 1608901)。

**1.3 仪器** GZX-GFC 型电热恒温鼓风干燥机(上海博泰实验设备有限公司);Shandon Panthcentra 型自动脱水机(美国 Thermo Fisher scientific 公司);RM2135 型石蜡切片机,DM-2500 型光学显微镜(德国 Leica 公司);CS-VI 型摊片烤片机(湖北孝感宏业医用仪器有限公司);Tissue-Tek TEL 型组织包埋中心(日本 Sakura 公司),Tiss-24 组织匀浆仪(上海净信实业发展有限公司);DS-11 型紫外光度仪(美国 DeNoVIX 公司);Fresco21 型冷冻高速离心机(Thermo Fisher scientific 公司);7500Fast Real-time PCR 仪(Applied Biosystems 公司);Mini-TransCell 电泳仪、电泳槽,PowerPac™ Basic 电泳仪电源,CHEMIDOC XRS + 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组、造模与给药** 参考 ZHU 等<sup>[17]</sup>的造模方法,50 只小鼠随机分为正常组、模型组、养阴润肠方低、高剂量组、普卢卡必利组,每组 10 只小鼠。按照人和小鼠的换算系数<sup>[18]</sup>,养阴润肠方低剂量为临床等效剂量,临床等效剂量的 2 倍设为高剂量,前期预实验发现低于临床等效剂量,小鼠的便秘症状改善欠佳。除正常组外,其余各组给予 20 mg·kg<sup>-1</sup>的复方地芬诺酯造模,1 次/d,灌胃,连续 15 d。造模成功后,正常组和模型组给予等量生理盐水灌胃,养阴润肠方低、高剂量组分别以 29.6,59.2 g·kg<sup>-1</sup>,灌胃,2 次/d,连续 15 d;普卢卡必利组(0.000 3 g·kg<sup>-1</sup>),1 次/d,灌胃,连续 15 d。

**2.2 粪便总量和含水量测定** 每周 1 次,每只小鼠单独饲养于垫有 3 层吸水纸的塑料盒中,排除尿液对大便的影响,收集 24 h 大便总量,称重。收集 10 粒新鲜大便,称取湿重(A),后置于 100 °C 干燥机中干燥 3 h,称取干重(B),计算粪便含水量:粪便含水量 = (A - B)/A × 100%。

**2.3 取材与标本制备** 各组小鼠禁食 24 h 后,颈椎脱臼处死小鼠,摘取从回盲部到直肠末端的全部肠管,纵行剖开,预冷的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗肠道组织,分别截取长约 2 cm 结肠组织 3 段,分别置于 10% 中性甲醛固定做病理检查,另 2 段分别放于 -80 °C 冰箱冻存,进行相关检查分子检测。

**2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 AQP3, AQP9 mRNA 的表达** 截取远端新鲜结肠组织约 150 mg,按照 trizol 说明书提取 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 样品在 260, 280 nm 处的吸光度 A 比值,以在 1.8 ~ 2.0 为合格。以 RNA 为模版逆转录合成 cDNA,按总体积 20 μL (上游引物 0.4 μL,下游引物 0.4 μL,SYBR Premix Ex Taq 10 μL, Rox Reference Dye II 0.4 μL, cDNA 2 μL, dH<sub>2</sub>O 6.8 μL) 加待测样品基因反应体系,反应条件为 95 °C 30 s,循环 1 次;95 °C 5 s,60 °C 30 s,循环 40 次;最后加溶解曲线(95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s)。引物由 Invitrogen 公司合成,具体序列见表 1。在 PCR 仪上反应,每份样品 3 个复孔测定,设溶剂、空白组。通过分析软件得到样品阈值循环数(Ct)和相对的拷贝定量,再进行样本之间的比较。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行数据分析。

表 1 引物的核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequence of primer

基因	核苷酸序列(5'-3')	长度/bp
AQP3	上游 CCCTCTGGACACTTGGACAT	20
	下游 GTTGACGGCATAGCCAGAAT	20
AQP9	上游 AGTCAGCTCTCCTCCACCA	20
	下游 CGCATAAAGAGCCATCACAA	20
GAPDH	上游 CACCCCATTTGATGTTAGTG	18
	下游 CCATTTGCAGTGGCAAAG	20

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 AQP3, AQP9 蛋白表达** 截取约 2 cm 的肠道组织,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,充分匀浆,4 °C 12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min,收集上清液,BCA 法进行总蛋白定量。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳,每孔加入 30 μg 蛋白,用夹心法电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。置于 BSA 配制的 AQP3, AQP9 多克隆抗体(AQP3 稀释 1:100, AQP9 稀释 1:100, GAPDH 1:1 000),4 °C 孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔 IgG 的二抗(1:3 000),室温下孵育 1 h。用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。凝胶成像系统发光成像。

**2.6 苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织结构改变** 结肠组织常规固定、脱水透明、石蜡包埋后切片,HE 常规染色:切片放入二甲苯浸泡,5 ~ 10 min/次,3 次;无水乙醇浸泡,1 min/次,2 次,

95% 乙醇浸泡, 1 ~ 2 min/次, 2 次; 80% 乙醇浸泡 1 min, 去离子水漂洗 4 ~ 5 次; 苏木素染色(染细胞核) 5 ~ 6 min, 去离子水漂洗 4 ~ 5 次; 浸于 1% 盐酸-乙醇分色 5 s, 自来水冲洗返蓝; 1% 的伊红染色(染细胞浆) 30 s; 95% 的乙醇脱水, 1 ~ 2 min/次, 2 次; 无水乙醇脱水, 1 ~ 2 min, 2 次; 二甲苯脱水透明, 2 min/次, 3 次; 中性树胶封片、镜检。

**2.7 免疫组化法(IHC)检测 AQP3, AQP9 表达** 肠管组织浸入 10% 中性甲醛固定, 脱水, 包埋, 切片厚度 4  $\mu\text{m}$ ; 二甲苯、梯度乙醇、蒸馏水脱蜡水化, 浸于柠檬酸盐缓冲液, 高压抗原修复喷气 2 min; 正常山羊血清室温孵育 10 min; 滴加适当稀释的 AQP3 一抗(1:500)和 AQP9 一抗(1:400), 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜; 隔日取出, PBS 冲洗, 滴加即用型快速免疫组化 MaxVision™ 二抗, 室温孵育 15 min; 滴加新鲜配制的显色剂(DAB) 2 ~ 3 min, 显微镜下观察; 去离子水充分冲洗, 苏木素复染, 自来水冲洗返蓝; 梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。

**2.8 统计学方法** 免疫组化分析软件 Image-Pro Plus 6.0, Western blot 分析软件 Image J。数据结果采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行处理分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD 法; 方差不齐者采用 Dunnett's  $T_3$  检验。 $P < 0.05$  表示有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 动物一般情况比较** 实验过程中, 无小鼠死亡, 说明造模方法具有较好的安全性和可操作性。正常组小鼠体质量较实验前明显加重, 活动、饮食、二便均正常。造模组小鼠体质量增加稍缓慢。与正常组相比, 造模组小鼠皮毛欠光泽、粪便量少, 颗粒细小, 质硬, 结合 24 h 大便总量减少和粪便含水量降低, 与空白组小鼠比较出现明显统计学差异( $P < 0.01$ ), 判定小鼠便秘模型建立成功。

**3.2 养阴润肠方对便秘小鼠粪便的影响** 造模成功后, 与空白组相比, 24 h 粪便总量, 模型组小鼠明显减少( $P < 0.01$ ), 粪便含水量明显降低( $P < 0.01$ ), 说明成功复制便秘模型。经养阴润肠方干预后, 24 h 粪便总量, 治疗组比模型组均增多( $P < 0.05$ ), 低剂量组与高剂量组无明显差异, 但稍低于正常组, 大便形状变大, 变软, 粪便含水量增加( $P < 0.05$ )。普卢卡必利组小鼠 24 h 粪便总量增加( $P < 0.01$ ), 粪便含水量亦增加( $P < 0.05$ )。说明复方地芬诺酯可以诱导小鼠便秘, 养阴润肠方可以增加小

鼠粪便总量和含水量, 作用与普卢卡必利相似。见表 2。

表 2 养阴润肠方对便秘小鼠粪便的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Yangyin Runchang decoction on feces inconstipation mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	时间 /周	24 h 粪便总量 /g	粪便含水量 /%
正常	-	0	1.94 ± 0.11	59.84 ± 10.33
		1	2.27 ± 0.10	62.53 ± 6.97
		2	2.31 ± 0.11	64.51 ± 7.43
		3	2.14 ± 0.10	62.36 ± 7.76
模型	-	0	1.85 ± 0.08	59.51 ± 16.68
		1	2.06 ± 0.07	57.85 ± 8.39
		2	1.62 ± 0.11 <sup>2)</sup>	56.36 ± 3.91 <sup>2)</sup>
		3	1.65 ± 0.08 <sup>1)</sup>	55.62 ± 4.94 <sup>1)</sup>
养阴润肠方	29.6	0	1.87 ± 0.08	60.86 ± 6.35
		1	2.12 ± 0.10	57.86 ± 6.18
		2	1.40 ± 0.05 <sup>2)</sup>	56.52 ± 6.16 <sup>2)</sup>
		3	1.77 ± 0.11	59.37 ± 4.61
普卢卡必利	0.000 3	0	1.96 ± 0.09	60.04 ± 8.37
		1	2.17 ± 0.13	55.41 ± 6.99 <sup>1)</sup>
		2	1.58 ± 0.04 <sup>2)</sup>	57.24 ± 8.78 <sup>1)</sup>
		3	1.87 ± 0.15	57.84 ± 7.78
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.08	58.54 ± 5.87
普卢卡必利	0.000 3	0	1.86 ± 0.11	59.98 ± 6.08
		1	2.12 ± 0.15	56.58 ± 6.66
		2	1.41 ± 0.07 <sup>2)</sup>	56.56 ± 6.05 <sup>1)</sup>
		3	1.65 ± 0.0	

表 3 养阴润肠方对便秘小鼠结肠 AQP3, AQP9 mRNA 和蛋白表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Yangyin Runchang decoction on mRNA and protein expression of AQP3 and AQP9 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

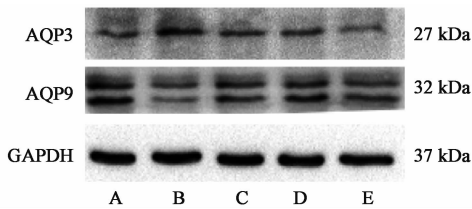
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	mRNA		蛋白	
		AQP3	AQP9	AQP3/GAPDH	AQP9/GAPDH
正常	-	1	1	0.19 ± 0.04	0.63 ± 0.28
模型	-	1.98 ± 0.67 <sup>1)</sup>	0.68 ± 0.37	0.36 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.27 ± 0.14
养阴润肠方	29.6	0.71 ± 0.11 <sup>3)</sup>	5.01 ± 0.96 <sup>1,3)</sup>	0.17 ± 0.05 <sup>3)</sup>	0.66 ± 0.22 <sup>3)</sup>
	59.2	1.06 ± 0.03	3.49 ± 2.31	0.17 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.49 ± 0.16
普卢卡必利	0.000 3	0.98 ± 0.08 <sup>3)</sup>	3.90 ± 3.31	0.16 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.53 ± 0.22

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 同)。

组小鼠 AQP9 mRNA 较模型组小鼠升高明显 ( $P < 0.05$ ), 高剂量组和普卢卡必利组小鼠表达同样有升高趋势, 但未见统计学差异。见表 3。

与正常组比较, 模型组小鼠 AQP3 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 养阴润肠方低剂量、高剂量组小鼠蛋白表达均下降 ( $P < 0.05$ ), 普卢卡必利组 AQP3 蛋白表达亦下降 ( $P < 0.05$ )。见表 3, 图 1。

与正常组比较, 模型组小鼠 AQP9 蛋白表达减少, 但无统计学差异。与模型组比较, 养阴润肠方低剂量组小鼠 AQP9 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 高剂量组和普卢卡必利组小鼠表达同样有升高趋势, 但未见统计学差异。见表 3, 图 1。说明低剂量养阴润肠方在降低便秘小鼠结肠 AQP3 表达的同时, 可以升高结肠 AQP9 的表达。



A. 正常组; B. 模型组; C. 养阴润肠方低剂量组; D. 养阴润肠方高剂量组; E. 普卢卡必利组 (图 2, 3 同)

图 1 养阴润肠方对便秘小鼠结肠 AQP3, AQP9 蛋白水平的影响  
Fig. 1 Effect of Yangyin Runchang decoction on protein expression of AQP3 and AQP9 of constipation mice

**3.4 养阴润肠方对便秘小鼠结肠组织结构的影响** 正常组小鼠结肠黏膜光滑, 肠腺丰富, 排列整齐, 无明显炎症细胞浸润, 各层无明显异常。与正常组比较, 部分模型组小鼠结肠黏膜可见上皮脱落, 少量炎性渗出, 偶可见肉芽组织增生; 经养阴润肠方治疗后, 炎性渗出减轻, 个别见到上皮脱落; 普卢卡必利组小鼠结肠黏膜改善更明显, 个别小鼠结肠黏膜炎性渗出。见图 2。

**3.5 养阴润肠方对便秘小鼠结肠组织中 AQP3, AQP9 定位表达及半定量的影响** AQP3 阳性信号

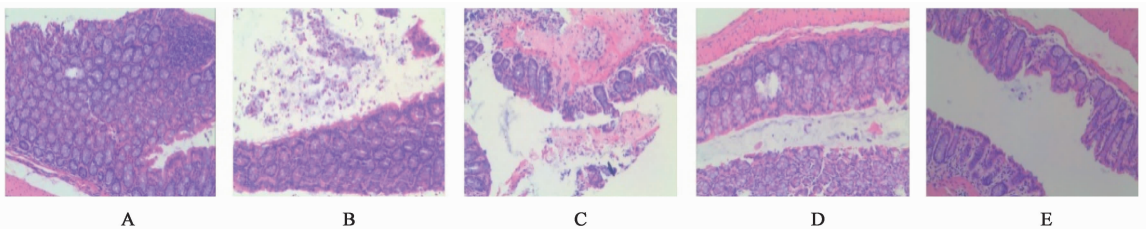


图 2 养阴润肠方对便秘小鼠结肠组织结构的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Yangyin Runchang decoction on colonic tissue structure of constipation mice (HE, ×200)

黄色或棕色, 定位于结肠黏膜上皮细胞顶部质膜, 底侧部未见明显分布。与正常组比较, 模型组 AQP3 表达增加 ( $P < 0.01$ )。经养阴润肠方干预后, 与模型组比较, AQP3 表达下降 ( $P < 0.05$ ), 普卢卡必利组 AQP3 表达亦下降 ( $P < 0.05$ )。见图 3, 表 4。

AQP9 阳性信号黄色或棕色, 定位于杯状细胞质膜。与正常组比较, 模型组表达下降, 但未见统计学差异。养阴润肠方干预后, 与模型组比较, AQP9

表达上升 ( $P < 0.01$ ), 普卢卡必利组轻微上升, 未见统计学差异。说明养阴润肠方可下调便秘小鼠结肠 AQP3 的表达, 同时升高 AQP9 的表达量。见图 3, 表 4。

#### 4 讨论

AQPs 广泛分布于消化道和消化腺, 在消化道水分转运中起重要作用, 并且分布不同有不同的作用。临床研究发现 STC 患者的 AQP 表达异常, YUAN

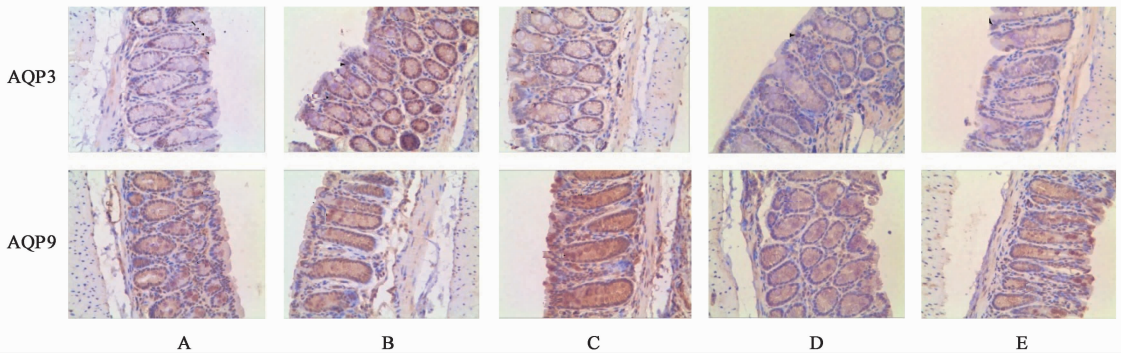


图 3 养阴润肠方对便秘小鼠结肠 AQP3, AQP9 的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Yangyin Runchang decoction on expression of AQP3 and AQP9 of constipation mice(IHC, ×400)

表 4 养阴润肠方对便秘小鼠结肠 AQP3, AQP9 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 4 Effect of Yangyin Runchang decoction on expression of AQP3 and AQP9 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	AQP3	AQP9
正常	-	0.011 7 ± 0.006 6	0.028 9 ± 0.011 8
模型	-	0.020 3 ± 0.010 9 <sup>2)</sup>	0.024 1 ± 0.006 7
养阴润肠方	29.6	0.013 9 ± 0.005 7 <sup>3)</sup>	0.042 5 ± 0.016 8 <sup>2,4)</sup>
	59.2	0.013 8 ± 0.002 2 <sup>3)</sup>	0.029 3 ± 0.006 1
普卢卡必利	0.000 3	0.013 7 ± 0.006 6 <sup>3)</sup>	0.029 5 ± 0.009 9

等<sup>[19]</sup>发现功能性便秘患者 AQP3 在升结肠黏膜表达增强, AQP9 在降结肠黏膜表达减弱; WANG 等<sup>[20]</sup>通过 STC 患者术前、术后比较发现, 术前 AQP4 高表达伴有大便干结者, 术后大便干结和胃肠通过时间均优于低表达者, 说明 AQP4 与 STC 发病有一定关系; ZHI 等<sup>[21]</sup>通过复方地芬诺酯成功造模 STC 大鼠, 发现只有 AQP3 在升结肠表达下调, 这与人体标本及部分动物实验结果相反, 作者认为一方面可能是由于药物直接作用所致, 另外可能是肠蠕动减慢后的继发改变; 而 Kon 等<sup>[8]</sup>通过吗啡诱导大鼠便秘模型, 粪便含水量明显下降, 同时伴有结肠 AQP3 的表达增加。由此看出, STC 的发病与 AQP 存在一定关系。在人体结肠 AQP1, 3, 4, 8, 9 均有表达, 以上文献分析与便秘相关的主要是 AQP3, 4, 9, 但是较多文献报道<sup>[22-23]</sup> AQP4 对于粪便含水量影响较小; AQP8 在结肠虽然表达较高, 但是通过基因敲除小鼠, 发现它对粪便含水量影响很小, 在水分吸收和分泌上作用有限<sup>[23]</sup>。Okadaa 等<sup>[24]</sup>发现 AQP9 在小鼠结肠在部分杯状细胞上表达, 其功能可能是合成和(或)分泌黏液, 保护肠黏膜和润滑大便。因此本研究选择 AQP3, AQP9 进行研究。

本研究发现给予便秘小鼠口服养阴润肠方后,

粪便中含水量较自然恢复组明显上升, 表明养阴润肠方对便秘小鼠产生作用。免疫组化显示 AQP3 在模型组中升高, 经治疗后数量下降; mRNA 和蛋白水平同样得到证实。AQP3 蛋白有两条带, 30 ~ 40 带代表糖基化形式, 与蛋白稳定性和胞内移位有关系, 但是和水分渗透性无明显关系, 27 带代表去糖基化形式。Western blot 条带显示 27 带处变化较大, 与水分渗透性相关, 干预后蛋白表达下降, 证实养阴润肠方增加粪便含水量与其降低 AQP3 的表达有关, 这与文献的研究结果一致<sup>[11-13, 15]</sup>。AQP9 在结肠上的分布不同于小肠, 仅在部分杯状细胞上表达, 其功能可能是合成和(或)分泌黏液, 保护肠黏膜和润便<sup>[23]</sup>。本研究显示 AQP9 主要位于杯状细胞, 与文献报道吻合, 便秘组小鼠表达下降, 经养阴润肠方治疗后, AQP9 蛋白表达上升, 其中 32 条带显示 AQP9 单体, 35 条带显示糖化的 AQP9 单体, 65 条带显示可能是 AQP9 二聚体; 笔者发现这 3 条带的变化趋势一致, 说明养阴润肠方可以增加杯状细胞 AQP9 的表达, 增加黏液的分泌, 有利于粪便的排出。

本研究结果表明, 便秘组小鼠 AQP3 表达增加, AQP9 表达下降, 结肠水分吸收增加, 黏液分泌减少, 粪便干硬。经低剂量养阴润肠方干预后, AQP3 表达下降, 同时 AQP9 表达升高, 粪便含水量增加, 高剂量组并未提示有更好的结果, 可能是药物浓度过高, 不利于吸收, 反而减低疗效。另外, 模型组 AQP9 的表达下降, 但与正常组无统计学差异, 原因可能在于造模时间较短。普卢卡必利组小鼠粪便含水量增加, 一方面可能是由于 AQP3 的表达下降, 另一方面可能是由于使用促肠动力药后, 粪便在肠道停留时间缩短, 导致粪便水分吸收减少有关。由此说明, 养阴润肠方治疗便秘的机制可能通过降低结肠组织中 AQP3 和升高 AQP9 的表达来实现。更深入的调节机制是今后重点研究的方向。

[参考文献]

- [1] GE X, TIAN H, DING C, et al. Fecal microbiota transplantation in combination with soluble dietary fiber for treatment of slow transit constipation: a pilot study [J]. Arch Med Res, 2016, 18(3): 236-242.
- [2] 刘智勇, 杨关根, 沈忠, 等. 杭州市城区便秘流行病学调查[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(7): 435-436.
- [3] 周青, 商洪涛, 谷云飞, 等. 养阴润肠方治疗功能性便秘的临床疗效观察[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12): 2280-2882.
- [4] 曲丁好, 陈玉根. 养阴润肠方治疗慢传输型便秘 72 例[J]. 河南中医, 2015, 35(12): 3115-3117.
- [5] 吴本升, 陈玉根, 吴霜, 等. 养阴润肠方治疗慢性传输型便秘 32 例[J]. 安徽中医药学院学报, 2012, 31(5): 26-29.
- [6] 王韶, 刘蕾蕾, 崔丽娜, 等. 中药治疗功能性便秘的机制研究[J]. 四川中医, 2017, 35(2): 210-213.
- [7] Laforenza U. Water channel proteins in the gastrointestinal tract [J]. Mol Aspects Med, 2012, 33(5): 642-650.
- [8] Kon R, Ikarashi N, Hayakawa A, et al. Morphine-induced constipation develops with increased aquaporin-3 expression in the colon *via* increased serotonin secretion [J]. Toxicol Sci, 2015, 145(2): 337-347.
- [9] Ikarashi N, Kon R, Iizasa T, et al. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 36(5): 957-962.
- [10] 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): 115-120.
- [11] 陈萌, 于永铎. 化痰通便汤对慢传输型便秘大鼠结肠水通道蛋白 1 和水通道蛋白 3 影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(11): 26-28.
- [12] 占煜, 申旭龙, 徐红, 等. 大黄对洛哌丁胺便秘模型大鼠结肠水通道蛋白 3 表达及肠动力的作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2315-2320.
- [13] 钱海华, 徐天舒, 曾莉, 等. 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 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 180-184.
- [14] 杨会锋, 袁维堂. 水通道蛋白 3 和水通道蛋白 9 在结肠黏膜的表达及意义 [J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(6): 12-14.
- [15] 吴本升, 杨柏霖, 周锦勇, 等. “养阴润肠方”对慢传输便秘模型大鼠结肠黏膜水通道蛋白 3 和水通道蛋白 8 的影响 [J]. 江苏中医药, 2013, 45(4): 66-68.
- [16] 吴本升, 周锦勇, 王海丹, 等. 养阴润肠方对慢性传输型便秘模型大鼠 Cajal 间质细胞影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(2): 25-28.
- [17] ZHU F, XU S, ZHANG Y, et al. Total glucosides of paeony promote intestinal motility in slow transit constipation rats through amelioration of interstitial cells of Cajal [J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160398.
- [18] ZHANG X, DING J, GOU C, et al. Qingchanglign formula attenuates the inflammatory response to protect the liver from acute failure induced by d-galactosamine/lipopolysaccharide in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 201(6): 108-116.
- [19] YUAN W T, YANG H, ZHANG F, et al. Expression and significance of aquaporin 3 and aquaporin 9 in colonic mucosa of patients with functional constipation [J]. Chin J Gastrointest Surg, 2008, 11(1): 57-60.
- [20] WANG X, YAN J W, SONG T J, et al. Expression and significance of aquaporin 4 in the colonic mucosa of patients with slow transit constipation [J]. Chin J Gastrointest Surg, 2010, 13(6): 445-447.
- [21] 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 Gastrointest Surg, 2011, 16(6): 459-461.
- [22] WANG K, MA S T, Filiz H F, et al. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels [J]. Am J Physiol-Gastr L, 2000, 279(2): 463-470.
- [23] ZHU S, RAN J, YANG B, et al. Aquaporins in digestive system [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 969(3): 123-130.
- [24] Okada S, Misakaa T, Matsumoto I, et al. Aquaporin-9 is expressed in a mucus-secreting goblet cell subset in the small intestine [J]. Febs Lett, 2003, 540(1): 157-162.

[责任编辑 邹晓翠]