

# 归芪白术方联合奥沙利铂通过调节 VIP/cAMP/PKA/AQPs信号通路 保护胃癌荷瘤小鼠肠道屏障

董焕成<sup>1,2</sup>, 苏韫<sup>1,2,3,4\*</sup>, 龚红霞<sup>1,2,3,4</sup>, 曹旺杰<sup>1,2,3</sup>,  
和建政<sup>1,2,3</sup>, 刘永琦<sup>1,2,3</sup>, 张晗<sup>1,2</sup>, 曾元丁<sup>1,2</sup>,  
李从艺<sup>1,2</sup>, 康倩<sup>1,2</sup>

- (1. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000;
2. 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000;
3. 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室, 兰州 730000;
4. 国家卫生健康委胃肠肿瘤诊治重点实验室, 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

**[摘要]** 目的:探讨归芪白术方联合奥沙利铂通过血管活性肠肽(VIP)/环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)信号通路调控下游水通道蛋白3(AQP3)和水通道蛋白4(AQP4)从而保护胃癌荷瘤小鼠肠道屏障的作用。方法:将密度为 $1 \times 10^7$ 个/mL的胃癌细胞株MFC制成细胞悬液,经荷瘤小鼠右腋下接种细胞悬液0.2 mL,构建胃癌荷瘤小鼠模型,造模成功后将小鼠随机分为5组,模型组、奥沙利铂组( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、奥沙利铂加归芪白术方高、中、低剂量组( $17.68$ 、 $8.84$ 、 $4.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每组10只,另外余10只作为空白组。各组小鼠经灌胃或腹腔注射中药、奥沙利铂或生理盐水,治疗14 d。末次给药后,次日眼球取血分离血清并取其结肠样本。苏木素-伊红(HE)染色观察组织形态的变化。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中D-乳酸(D-LA)、二胺氧化酶(DAO)含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测各组小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4 mRNA及蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组黏膜下层水肿,黏膜层中肠腺排列紊乱,杯状细胞缺失,可见大量炎性细胞浸润及绒毛脱落的现象。而各给药组均有不同程度的改善;与正常组比较,模型组血清中DAO和D-LA水平均显著上升( $P < 0.01$ ),与模型组比较,联合用药高剂量组DAO和D-LA水平及联合用药中剂量组D-LA水平均有所下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),与奥沙利铂组比较,联合用药高、中剂量组D-LA水平有所下降( $P < 0.05$ ),其余组DAO和D-LA表达水平也有所下降,但差异无统计学意义;与正常组比较,模型组小鼠的VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4 mRNA及蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠的VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4 mRNA及蛋白表达水平均有所升高,其中联合用药高剂量组VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4 mRNA及蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),联合用药中剂量组cAMP蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ );与奥沙利铂组比较,联合用药高剂量组cAMP蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),其余组mRNA及蛋白表达也有所升高,但差异无统计学意义。结论:归芪白术方联合奥沙利铂通过VIP/cAMP/PKA信号通路调节AQP3和AQP4达到保护胃癌荷瘤小鼠肠道屏障的作用。

**[关键词]** 归芪白术方; 胃癌; 肠道屏障损伤; 血管活性肠肽(VIP)/环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)信号通路; 水通道蛋白3(AQP3); AQP4

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)05-0129-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222103

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221117.1949.003.html>

[网络出版日期] 2022-11-19 15:57:46

[收稿日期] 2022-08-25

[基金项目] 甘肃省“双一流”科研重点项目(GSSYLXM-05);中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2019PT320005);甘肃省高效中(藏)药化学与质量研究重点实验室开放基金项目(zzy-2022-06);甘肃省中医药研究中心专项(zyzx-2020-zx18)

[第一作者] 董焕成,在读硕士,从事中西医结合防治肿瘤相关研究,E-mail:981427544@qq.com

[通信作者] \*苏韫,硕士,教授,硕士生导师,从事中西医结合防治肿瘤基础研究,E-mail:suyungszy@126.com

## Guiqi Baizhu Prescription Combined with Oxaliplatin Protects Intestinal Barrier of Tumor-bearing Mice with Gastric Cancer by Regulation of VIP/cAMP/PKA/AQP Signaling Pathway

DONG Huancheng<sup>1,2</sup>, SU Yun<sup>1,2,3,4\*</sup>, GONG Hongxia<sup>1,2,3,4</sup>, CAO Wangjie<sup>1,2,3</sup>, HE Jianzheng<sup>1,2,3</sup>,  
LIU Yongqi<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Han<sup>1,2</sup>, ZENG Yuanding<sup>1,2</sup>, LI Congyi<sup>1,2</sup>, KANG Qian<sup>1,2</sup>

(1. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;  
2. Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine and Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and Treatment of Major Diseases in Colleges and Universities of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;  
3. Key Laboratory of TCM Prevention and Treatment of Chronic Diseases in Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 4. NHC Key Laboratory of Diagnosis and Therapy of Gastrointestinal Tumor, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the protective effect of Guiqi Baizhu prescription combined with oxaliplatin on the intestinal barrier of tumor-bearing mice with gastric cancer by regulating downstream aquaporin 3 (AQP3) and aquaporin 4 (AQP4) through the vasoactive intestinal peptide (VIP)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling pathway. **Method:** The gastric cancer cell lines MFC with a density of  $1 \times 10^7/\text{mL}$  were prepared into cell suspension. The tumor-bearing mouse model of gastric cancer was established by inoculating 0.2 mL cell suspension under the right axilla of mice. After successful modeling, mice were randomly divided into 5 groups, namely, model group, oxaliplatin group ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and high, medium, and low-dose oxaliplatin + Guiqi Baizhu prescription groups ( $17.68, 8.84, 4.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), with 10 mice in each group, and the remaining 10 mice were set as a blank group. Mice in each group were treated with Chinese medicine, oxaliplatin, or normal saline by gavage or intraperitoneal injection for 14 d. The next day after the last dose, blood was taken from the eyeball to separate serum and take colonic samples. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the changes in tissue morphology. The content of *D*-lactate acid (*D*-LA) and diamine oxidase (DAO) in the serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expressions of VIP, cAMP, PKA, AQP3, and AQP4 were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed edema in the colonic submucosa, disordered arrangement of intestinal glands in the mucosal layer, loss of goblet cells, infiltration of inflammatory cells, and villus shedding. However, there were different degrees of improvement in each administration group. As compared with the blank group, the serum levels of DAO and *D*-LA in the model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the levels of DAO and *D*-LA in the high-dose oxaliplatin + Guiqi Baizhu prescription group and the level of *D*-LA in the medium-dose oxaliplatin + Guiqi Baizhu prescription group were decreased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). As compared with the oxaliplatin group, the levels of *D*-LA in the high and medium-dose oxaliplatin + Guiqi Baizhu prescription groups were decreased ( $P < 0.05$ ), and the levels of DAO and *D*-LA in other administration groups were decreased as well, but the difference had no statistical significance. As compared with the blank group, the mRNA and protein expression levels of VIP, cAMP, PKA, AQP3, and AQP4 in the model group were significantly decreased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). As compared with the model group, the mRNA and protein expression levels of VIP, cAMP, PKA, AQP3, and AQP4 in each administration group were increased, and those in the high-dose oxaliplatin + Guiqi

Baizhu prescription group were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the protein expression level of cAMP in the medium-dose oxaliplatin + Guiqi Baizhu prescription group were increased ( $P < 0.05$ ). As compared with the oxaliplatin group, the protein expression levels of cAMP in the high-dose oxaliplatin + Guiqi Baizhu prescription group were increased ( $P < 0.05$ ), and the mRNA and protein expressions of these indexes in the other groups were also increased but the differences were not statistically significant. **Conclusion:** Guiqi Baizhu prescription combined with oxaliplatin can regulate AQP3 and AQP4 through the VIP/cAMP/PKA signaling pathway to protect the intestinal barrier of tumor-bearing mice with gastric cancer.

**[Keywords]** Guiqi Baizhu prescription; gastric cancer; intestinal barrier damage; vasoactive intestinal peptide (VIP)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling pathway; aquaporin 3 (AQP3); AQP4

胃癌是属于高度异质性的癌症,占世界癌症发病率和死亡率的第4位和第5位<sup>[1]</sup>,严重危害人类的健康。大多数患者发现时已经是中晚期,主要的治疗措施还是手术、放疗和化疗,但放化疗在杀伤胃癌细胞的同时也会损伤正常细胞,使机体的内环境失衡,导致胃肠道黏膜上皮细胞发生充血、水肿,进而导致肠道屏障功能障碍,出现胃肠功能失调。近年来,中医药在治疗肠道黏膜屏障功能障碍方面发挥了重要作用,中医药保护肠道屏障功能的研究逐渐得到肯定<sup>[2-3]</sup>。

归芪白术方由明·朱橚等人的《普济方》卷二七二中的“黄芪汤”加味白术所得,全方由黄芪、白术、当归、酒大黄、白芍、甘草、陈皮7味药组成,此方有健脾益气、活血化瘀的作用,课题组经前期临床研究、动物实验和细胞实验发现,归芪白术方可抑制胃癌荷瘤小鼠肿瘤组织的生长和血管生成,降低炎症细胞因子表达水平,减轻炎症免疫反应,促进胃癌细胞凋亡,起到辅助治疗胃癌的效果<sup>[4-7]</sup>。因此,本实验拟通过对胃癌荷瘤小鼠进行不同剂量归芪白术汤联合奥沙利铂灌胃治疗,研究归芪白术方通过血管活性肠肽(VIP)/环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)信号通路对胃癌荷瘤小鼠肠道水通道蛋白的影响,探讨其改善肠道屏障损伤的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞及动物** MFC小鼠胃癌细胞株,批号PNS-MC-20,购自武汉普诺赛生命科技有限公司。60只SPF级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量18~22g,购买于甘肃中医药大学SPF级动物实验中心,动物合格证号SCXK(甘)2020-0001。本研究由甘肃中医药大学伦理委员会批准并指导进行,编号2020-283。

**1.2 药物** 归芪白术方由黄芪20g,白术10g,当归10g,白芍10g,陈皮6g,酒大黄6g,甘草6g共7味药物组成。所有中药饮片从甘肃中医药大学附

属第一医院中药房购进,经甘肃中医药大学中药学教研室杨秀娟副教授鉴定,均为正品。将中药饮片用蒸馏水浸泡1h,武火煮沸后小火煎煮30min,过滤药渣,药渣加水,大火煮沸后小火煎煮,30min,过滤掉药渣,把2次药液合并,浓缩至1.768、0.884、0.442g·mL<sup>-1</sup>,4℃冰箱保存备用<sup>[5]</sup>。奥沙利铂购自山东罗欣药业有限公司,批号519121041。

**1.3 试剂** RPMI 1640培养液(美国Gibco公司,批号11835-030),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号11012-8611),4%多聚甲醛、苏木素-伊红(HE)试剂(Servicebio公司,批号分别为P1101、G1004),TRIzol总RNA提取试剂盒、第一链互补DNA(cDNA) Synthesis Kit、2×SYBR Green实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Mix(德国Qiagen公司,批号分别为74256、205824、330611),二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸(D-LA)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号分别为MM-0228M2、MM-43853M2),VIP、水通道蛋白3(AQP3)抗体(碧云天公司,批号分别为AF8331、AF6222),cAMP抗体(美国Affinity公司,批号DF7741),PKA抗体(美国Immunoway公司,批号YT3749),AQP4抗体(美国GeneTex公司,批号GTX133151)。

**1.4 仪器** SKY-111Z型无菌超净工作台(苏州净化设备有限公司),SKYJH-1112型CO<sub>2</sub>恒温培养箱(日本Sanyo公司),IX81型倒置相差显微镜(日本Olympus公司),TEZ101-L型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),IMARK型酶标分析仪、Power PacUniversal型电泳仪、PACHC型转膜仪、S1000TM型逆转录仪、S1000型CFX96TM Optics Module Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养及小鼠胃癌荷瘤模型的建立** 参照刘艳菊等<sup>[8]</sup>造模方法,小鼠MFC胃癌细胞株放在含

10%胎牛血清、1%双抗的RPMI 1640培养液中培养,并放于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。收集对数生长期细胞并调整密度为1×10<sup>7</sup>个/mL制成细胞悬液,在每只小鼠的右腋下接种细胞悬液0.2 mL,接种5~7 d,当触及结节并且直径约为5 mm时,提示造模成功。

**2.2 动物分组及给药** 将造模成功的小鼠随机分为模型组、奥沙利铂组、联合高、中、低剂量组(奥沙利铂加归芪白术方高、中、低剂量组),每组10只。根据小鼠和人体表面积比值0.002 6计算给药量,得出奥沙利铂为10 mg·kg<sup>-1</sup>,归芪白术方高、中、低剂量分别为17.68、8.84、4.42 g·kg<sup>-1</sup>。小鼠的灌胃体积和腹腔注射体积为0.2 mL,给药周期为14 d<sup>[5]</sup>。另外10只正常昆明种小鼠为空白组,空白组和模型组小鼠给予等体积的生理盐水<sup>[9]</sup>。

**2.3 HE染色观察** 观察各组小鼠结肠组织形态的改变 将各组的结肠组织经4%多聚甲醛溶液固定,脱水、包埋在透明石蜡中。再通过脱蜡、梯度乙醇脱水、分化冲洗并进行HE染色,中性胶密封后,置于光学显微镜下观察结肠形态。

**2.4 ELISA检测** 各组小鼠血清中DAO和D-LA的含量 按照ELISA试剂盒的说明检测待检血清中DAO和D-LA的含量。

**2.5 Real-time PCR检测** 各组小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4 mRNA的表达 参照TRIzol法从小肠组织中提取总RNA,并根据逆转录反应试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,再根据Real-time PCR试剂盒说明书制备反应体系,检测基因的表达水平,反应条件为95℃预变性5 min;95℃变性10 s;55℃延伸20 s;72℃退火20 s;40个循环,绘制溶解曲线,根据各组的C<sub>t</sub>值,通过内参数值和目的基因数值,计算ΔC<sub>t</sub>和ΔΔC<sub>t</sub>,得出2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,则为各组VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4 mRNA相对表达值。PCR引物序列在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询设计,由博迈德生物工程有限公司合成,引物序列见表1。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测** 各组小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4蛋白的表达 从各组结肠组织中提取蛋白质,根据BCA法测定蛋白质浓度,随后在沸水中煮沸变性5 min,并储存在-20℃的冰箱中。经过SDS-PAGE凝胶电泳将蛋白质转移到PVDF膜上后,用含5%的脱脂奶粉的封闭液封闭2 h,用一抗稀释液以1:1 000稀释

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
VIP	上游 CAAGCCTCAGTTCCTGG	266
	下游 GTCTGCTGTAATCGCTGG	
cAMP	上游 TGGCGGTCACATCACTG	250
	下游 AGGCACATTGCTCAGGTAG	
PKA	上游 GGATTGGAAGGTTACAGC	288
	下游 CGTAGATGAGGACTCCGAGAG	
AQP3	上游 ACCTTCGCAATGTGCTTCCTG	251
	下游 GCGGCTGTGCATGAAGTCTG	
AQP4	上游 ATCAGCATCGTAAGTCCGTC	109
	下游 CCAATCCTCCAACCACACTG	
GAPDH	上游 GGTTGTCTCCTGCGACTCA	238
	下游 TGGTCCAGGGTTCTTACTCC	

VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4抗体,并在4℃冰箱中孵育过夜。用TBST洗涤3次后,将其在二抗稀释液(1:5 000)中室温孵育2 h,并用ECL显色曝光条带。利用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值,与内参β-actin进行比较,分析蛋白质的相对表达量。

**2.7 统计学分析** 采用SPSS 22.0软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

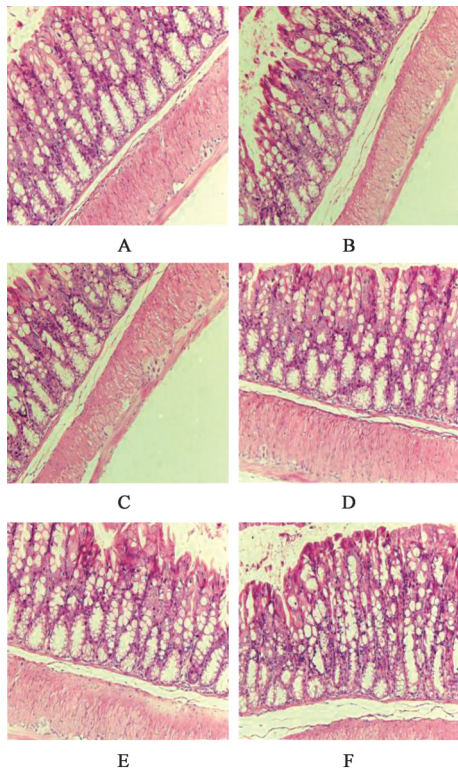
### 3 结果

#### 3.1 对 各 组 胃 癌 荷 瘤 小 鼠 结 肠 组 织 形 态 的 影 响

空白组结肠结构清晰,黏膜上皮完整,肠腺排列紧密,杯状细胞丰富,肠壁无水肿及炎性细胞浸润。与空白组比较,模型组黏膜及黏膜下层水肿,黏膜层中肠腺排列紊乱,杯状细胞缺失,可见大量炎性细胞浸润及绒毛脱落。各给药组,肠黏膜均有不同程度修复,联合用药高、中剂量组腺体排列相对紧密,黏膜及黏膜下层水肿相对减轻,杯状细胞相对丰富;奥沙利铂组和联合用药低剂量组仍可见黏膜下层水肿、杯状细胞缺失,炎性细胞浸润。见图1。

#### 3.2 对 胃 癌 荷 瘤 小 鼠 血 清 中 DAO 和 D-LA 的 影 响

与空白组比较,模型组DAO和D-LA含量显著升高(P<0.01);与模型组比较,各给药组血清中的DAO和D-LA含量均降低,其中联合用药高剂量组血清中的DAO和D-LA及联合用药中剂量组D-LA含量明显降低(P<0.05, P<0.01);与奥沙利铂组比较,联合用药高、中剂量小鼠血清中的D-LA含量均明显降低(P<0.05),其余组DAO和D-LA表达也有



注:A.空白组;B.模型组;C.奥沙利铂组;D.奥沙利铂加高剂量组;E.奥沙利铂加中剂量组;F.奥沙利铂加低剂量组(图2同)  
图1 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌荷瘤小鼠结肠组织病理学变化的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Guiqi Baizhu prescription combined with oxaliplatin on pathological morphology of colon tissue in mice with MFC gastric cancer (HE, ×200)

表3 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌荷瘤小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4 mRNA表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Guiqi Baizhu prescription combined with oxaliplatin on mRNA expression levels of VIP, cAMP, PKA, AQP3 and AQP4 in colon tissues of MFC gastric cancer tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	VIP	cAMP	PKA	AQP3	AQP4
模型组		0.21±0.06 <sup>1)</sup>	0.24±0.33 <sup>1)</sup>	0.21±0.1 <sup>2)</sup>	0.16±0.10 <sup>2)</sup>	0.23±0.09 <sup>2)</sup>
奥沙利铂组	10×10 <sup>-3</sup>	0.45±0.13	0.61±0.11	0.43±0.17	0.44±0.12	0.33±0.07
奥沙利铂加高剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +17.68	0.66±0.06 <sup>3)</sup>	0.75±0.15 <sup>3)</sup>	0.57±0.28 <sup>3)</sup>	0.53±0.15 <sup>3)</sup>	0.47±0.06 <sup>3)</sup>
奥沙利铂加中剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +8.84	0.48±0.21	0.50±0.20	0.42±0.27	0.48±0.12	0.37±0.08
奥沙利铂加低剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +4.42	0.49±0.39	0.47±0.28	0.34±0.19	0.36±0.28	0.32±0.08

注:设空白组mRNA相对表达量均为1;与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05

3.4 对胃癌荷瘤小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织中的VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4蛋白表达水平明显降低(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,联合用药高剂量组VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4,联合用药中剂量组cAMP蛋白表达明显升高(P<0.05, P<0.01);与奥沙利铂组比较,联合用药高剂量组cAMP蛋白表达升高(P<0.05),其余组VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4

所降低,但差异无统计学意义。见表2。

表2 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌荷瘤小鼠血清中DAO和D-LA的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Guiqi Baizhu prescription combined with oxaliplatin on serum DAO and D-LA in tumor-bearing mice with MFC gastric cancer ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	DAO/μg·L <sup>-1</sup>	D-LA/ng·L <sup>-1</sup>
空白组		19.46±1.93	125.47±7.99
模型组		34.11±3.66 <sup>1)</sup>	258.58±11.85 <sup>1)</sup>
奥沙利铂组	10×10 <sup>-3</sup>	31.89±4.34	230.20±34.95
奥沙利铂加高剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +17.68	27.74±4.91 <sup>2)</sup>	171.76±31.00 <sup>3,4)</sup>
奥沙利铂加中剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +8.84	29.12±4.40	184.59±11.47 <sup>3,4)</sup>
奥沙利铂加低剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +4.42	31.36±2.21	239.66±6.75

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与奥沙利铂组比较<sup>4)</sup>P<0.05

3.3 对胃癌荷瘤小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4 mRNA表达水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织中的VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4 mRNA表达水平明显降低(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,联合用药高剂量组VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4 mRNA表达水平明显升高(P<0.05),其余组mRNA表达也有所升高,但差异无统计学意义。见表3。

蛋白表达也有所升高,但差异无统计学意义。见表4和图2。

#### 4 讨论

胃癌的发生发展多伴有脾胃虚弱、运化无力,从而导致气机瘀滞,久而成痰,且邪毒入侵导致卫气防御功能受损,邪毒入里伤及五脏六腑。胃与大肠同属阳明经,且都参与食物的消化与吸收,因此胃癌的发生与肠道功能受损密切相关。归芪白术方具有健脾祛湿、益气活血加散瘀的功效,其中黄

表4 归芪白术方联合奥沙利铂对MFC胃癌荷瘤小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4蛋白含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Guiqi Baizhu prescription combined with oxaliplatin on protein expression levels of VIP, cAMP, PKA, AQP3 and AQP4 in colon tissues of MFC gastric cancer tumor-bearing mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	VIP/ $\beta$ -actin	cAMP/ $\beta$ -actin	PKA/ $\beta$ -actin	AQP3/ $\beta$ -actin	AQP4/ $\beta$ -actin
空白组		0.49±0.06	1.18±0.06	0.70±0.08	0.80±0.07	1.21±0.18
模型组		0.25±0.03 <sup>1)</sup>	0.49±0.02 <sup>2)</sup>	0.31±0.01 <sup>2)</sup>	0.32±0.04 <sup>2)</sup>	0.64±0.08 <sup>2)</sup>
奥沙利铂组	10×10 <sup>-3</sup>	0.32±0.07	0.63±0.07	0.43±0.07	0.43±0.08	0.70±0.12
奥沙利铂加高剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +17.68	0.43±0.02 <sup>3)</sup>	1.02±0.06 <sup>4,5)</sup>	0.55±0.04 <sup>3)</sup>	0.48±0.02 <sup>3)</sup>	0.89±0.08 <sup>3)</sup>
奥沙利铂加中剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +8.84	0.37±0.10	0.69±0.09 <sup>3)</sup>	0.44±0.07	0.37±0.03	0.56±0.07
奥沙利铂加低剂量组	10×10 <sup>-3</sup> +4.42	0.21±0.07	0.63±0.03	0.46±0.13	0.31±0.06	0.68±0.03

注:与空白组比较<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;与奥沙利铂组比较<sup>5)</sup>P<0.05

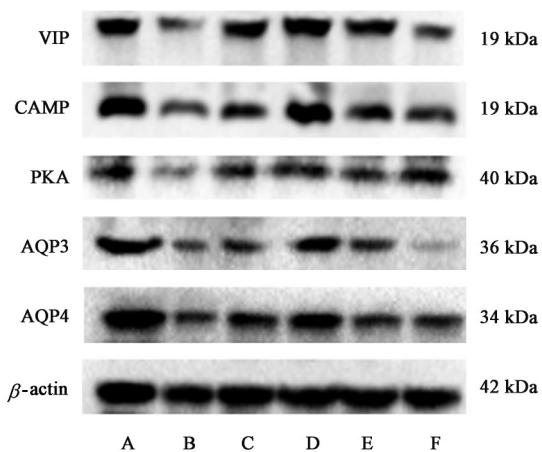


图2 各组小鼠结肠组织中VIP、cAMP、PKA、AQP3和AQP4蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of VIP, cAMP, PKA, AQP3 and AQP4 protein expression levels in colon tissues of mice

芪补中益气,白术健脾益气,燥湿利水,两者共为君药;当归养血和营、补血活血,酒大黄泻下痰湿兼以活血逐瘀,二者共为臣药;白芍滋阴补血,陈皮理气燥湿,醒脾和胃,行气以助活血,两者共为佐药;甘草补脾益气,清热解毒,调和诸药为使药<sup>[10]</sup>。胃癌患者脾胃虚弱,中焦气机不利,脾胃升降失疏,周身气机不利,导致肠功能障碍。而归芪白术方通过发挥健脾益气、活血化瘀的功效,顾护脾胃,恢复脾胃升降之功调畅气机,发挥固本培元之功。

在胃癌的发生、发展的过程中,机体的炎症反应会加重,导致IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等炎症因子的高表达<sup>[11-13]</sup>。由于促炎细胞因子水平的升高导致肠上皮化生不完全,出现肠道屏障受损的表现<sup>[14]</sup>。VIP是肠道中最丰富的神经肽,可以与G蛋白耦联跨膜受体相结合,活化腺苷酸环化酶(ACs)从而促进cAMP释放,cAMP是组织细胞维持生理功能的重要物质,而PKA是cAMP的主要目标蛋白之一,cAMP可以与PKA的调节亚基结合,从而促使PKA

磷酸化,形成完整的VIP/cAMP/PKA活化通路<sup>[15-17]</sup>。同时,水分子的快速跨膜转移是通过驻留在细胞膜上的AQP实现的,而AQPs是该通路的下游主要靶蛋白之一。AQP主要参与水的分泌和吸收,调节细胞内外水分的平衡。有研究表明AQP3和AQP4在结肠中高表达,参与消化道液体和电解质的转移和代谢<sup>[18-19]</sup>。AQP3表达受cAMP/PKA途径调控<sup>[20-21]</sup>。另有研究表明PKA可以调控AQP4对水的通透性<sup>[22-23]</sup>。因此,VIP/cAMP/PKA/AQPs信号通路在组织细胞水液代谢的调控中发挥着重要的作用<sup>[24]</sup>。且课题组前期研究发现,归芪白术汤可升高脾虚小鼠结肠AQP3与AQP4的表达量,减少结肠内含水量,增加水重吸收的能力<sup>[25]</sup>。GAN等<sup>[26]</sup>研究发现AQP3升高可改善肠道对水分的吸收,减轻肠道屏障损伤。*D*-LA是机体肠道维生素发酵后的产物,在肠道屏障功能受损时进入血液,血液中*D*-LA会呈现高表达。作为临床常用的肠道屏障检测指标,*D*-LA反映了肠道通透性的变化情况<sup>[27-28]</sup>。DAO则主要存在于肠黏膜和纤毛上皮细胞中,肠黏膜受损也会导致DAO释放进入血液循环,使血液中DAO含量增加<sup>[29]</sup>。

本实验研究结果显示,模型组小鼠血清中DAO和*D*-LA的含量升高,说明胃癌荷瘤小鼠肠黏膜屏障功能减弱,通透性增加,肠黏膜受损。本实验发现各给药组胃癌荷瘤小鼠结肠中VIP、cAMP和PKA mRNA水平及蛋白水平均有所下降。VIP运动神经元主要抑制胃肠道肌张力,已被证明通过调节cAMP/PKA/AQP信号转导途径在水转运中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。当VIP mRNA及蛋白水平表达水平降低时,VIP与其特异性受体结合激活cAMP/PKA信号通路的能力减弱,导致cAMP、PKA释放量减少。AQPs是一种在肠道中广泛表达的通道蛋白,而cAMP激活PKA后,决定AQPs的磷酸化,若cAMP

水平下降,则小鼠结肠中AQP3、AQP4 mRNA和蛋白水平降低,导致肠道水液代谢能力下降,减弱膜对水的渗透性。因此,当肠道内的通透性降低时,肠道内稳态失衡、肠道屏障功能受损。王璐等<sup>[31]</sup>研究发现助阳通便膏能够升高VIP、cAMP、PKA、AQP3的表达,提高结肠动力,改善肠道水液代谢。本实验发现各给药组降低了小鼠血清中DAO和D-LA的含量,升高了结肠组织中的VIP、cAMP、PKA、AQP3、AQP4 mRNA及蛋白水平,其中联合用药高剂量组改善明显,说明联合用药治疗胃癌可以调节肠道水运,改善肠道屏障损伤的作用。综上所述,归芪白术方联合奥沙利铂对胃癌荷瘤小鼠肠道屏障的保护和对肠道中水运的调节与VIP/cAMP/PKA/AQPs信号通路有关。因此,归芪白术方不仅可以辅助治疗胃癌,也可用于辅助治疗胃癌荷瘤小鼠肠道屏障损伤。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 李翔子,李市荣,杨田野,等. 首荟通便胶囊对慢性传输性便秘小鼠肠道屏障的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(5): 1458-1462.

[3] 王宏,徐娟,江茜,等. 大黄-丹参药对慢性肾衰竭模型大鼠肠源性尿素氮含量和肠道屏障功能的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(7): 825-831.

[4] 牛世伟,苏韞,龚红霞,等. 归芪白术方联合奥沙利铂对胃癌荷瘤小鼠机体免疫炎症分子的影响及抑癌作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(3): 328-333.

[5] 张晗,苏韞,龚红霞,等. 归芪白术方联合奥沙利铂对胃癌荷瘤小鼠EGFR、VEGFR2表达和血管生成的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 57-63.

[6] 龚红霞,李婷婷,苏韞,等. 归芪白术方含药血清通过PI3K/Akt信号通路对共培养的胃癌MKN-45细胞凋亡的影响[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(12): 2890-2893.

[7] 牛世伟,苏韞,龚红霞,等. 胃癌患者血清IL-1的升高和癌组织JAK2/STAT3信号通路的激活[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(3): 401-405.

[8] 刘艳菊,刘景超,王永飞,等. 绞股蓝多糖对MFC胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长抑制及免疫调节作用[J]. *中成药*, 2019, 41(12): 2876-2881.

[9] 牛世伟. 归芪白术方联合奥沙利铂调控IL-6/JAK2/

STAT3信号通路对荷瘤小鼠胃癌细胞增殖及炎症免疫的影响[D]. 兰州:甘肃中医药大学, 2022.

[10] 李春波,苏韞,薛轩,等. 基于中药分子机制的生物信息学在线分析归芪白术方辅助治疗胃癌的作用机制[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2019, 36(6): 7-13.

[11] SUN X, CUI Y, SU Y, et al. Dietary fiber ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier function damage in piglets by modulation of intestinal microbiome [J]. *Msystems*, 2021, 6(2): e01374-e01420.

[12] LI M, RAO X, CUI Y, et al. The keratin 17/YAP/IL6 axis contributes to E-cadherin loss and aggressiveness of diffuse gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2022, 41(6): 770-781.

[13] FILALY H E, OUTLIOUA A, MEDYOUF H, et al. Targeting IL-1 $\beta$  in patients with advanced Helicobacter pylori infection: A potential therapy for gastric cancer [J]. *Future Microbiol*, 2022, 17(8): 633-641.

[14] BASILE D, DI NARDO P, CORVAJA C, et al. Mucosal injury during anti-cancer treatment: From pathobiology to bedside [J]. *Cancers*, 2019, 11(6): 857.

[15] PEARCE L R, KOMANDER D, ALESSI D R, et al. The nuts and bolts of AGC protein kinases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(1): 9-22.

[16] GANCEDO J M. Biological roles of cAMP: Variations on a theme in the different kingdoms of life [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2013, 88(3): 645-668.

[17] WEI C X, WU J H, HUANG Y H, et al. Lactobacillus plantarum improves LPS-induced Caco2 cell line intestinal barrier damage via cyclic AMP-PKA signaling [J]. *PLoS One*, 2022, 17(5): e0267831.

[18] ZHI X, TAO J, LI Z, et al. MiR-874 promotes intestinal barrier dysfunction through targeting AQP3 following intestinal ischemic injury [J]. *FEBS letters*, 2014, 588(5): 757-763.

[19] HU R, ZHANG T, TANG F, et al. Effect of Weichang'an pill on intestinal digestion enzymes and the AQP4 concentration in proximal colon in IBS-D rats [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 2010, 35(21): 2899-2903.

[20] HUA Y, DING S, ZHANG W, et al. Expression of AQP3 protein in hAECs is regulated by CAMP-PKA-CREB signalling pathway [J]. *Front Biosci*, 2015, 20(7): 1047-1055.

[21] WANG W B, LI J T, HUI Y, et al. Combination of pseudoephedrine and emodin ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating macrophage M1/M2

- polarization through the VIP/cAMP/PKA pathway[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 1-17.
- [22] MARMAROU C R, LIANG X, ABIDI N H, et al. Selective vasopressin-1a receptor antagonist prevents brain edema, reduces astrocytic cell swelling and GFAP, V1aR and AQP4 expression after focal traumatic brain injury[J]. Brain research, 2014, 1581: 89-102.
- [23] KITCHEN P, DAY R E, TAYLOR L H J, et al. Identification and molecular mechanisms of the rapid tonic-induced relocalization of the aquaporin 4 channel [J]. J Biol Chem, 2015, 290 (27) : 16873-16881.
- [24] TAN Q, HU J, ZHOU Y, et al. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HFY14 on diphenoxylate-induced constipation in mice by regulating the VIP-cAMP-PKA-AQP3 signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 1971.
- [25] 李婷婷, 苏韞, 龚红霞, 等. 归芪白术汤对脾虚小鼠免疫因子及水通道蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 805-808.
- [26] GAN Y, AI G, WU J, et al. Patchouli oil ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats via protecting intestinal barrier and regulating water transport[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 250: 112519.
- [27] SUN S, LIU W, LI Y, et al. CADM1 enhances intestinal barrier function in a rat model of mild inflammatory bowel disease by inhibiting the STAT3 signaling pathway[J]. J Bioenerg Biomembr, 2020, 52 (5): 343-354.
- [28] LI Q, XU T, ZHONG H, et al. Impaired intestinal barrier in patients with obstructive sleep apnea [J]. Sleep Breath, 2021, 25(2): 749-756.
- [29] ZHANG X, PENG B, ZHANG Y, et al. Biliary drainage reduces intestinal barrier damage in obstructive jaundice by regulating autophagy [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2022, doi: 10.1155/2022/3301330.
- [30] 周永学, 王郁金, 张红, 等. 血管活性肠肽对便秘大鼠排便及结肠组织中VIP-cAMP-PKA-AQP3信号通路的影响[J]. 中南大学学报: 医学版, 2016, 41(11): 1175-1180.
- [31] 王璐, 隋楠. 基于大肠主津理论助阳通便膏对便秘模型小鼠结肠组织VIP-CAMP-PKA-AQP3通路的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(5): 147-151, 277-278.

[责任编辑 周冰冰]