

# 芍药汤通过cAMP/PKA/CREB信号通路调控溃疡性结肠炎水液代谢及肠上皮通透性的作用机制

吴东升<sup>1</sup>, 曹晖<sup>1\*</sup>, 曹晓阳<sup>2</sup>, 张彧<sup>1</sup>, 谢念佳<sup>3</sup>, 阳玉婷<sup>3</sup>, 芦易<sup>3</sup>, 李嫣红<sup>3</sup>  
(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 南京医科大学, 南京 211166;  
3. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:基于“大肠主津”理论探讨环磷酸腺苷/蛋白激酶A/环磷酸腺苷反应成分结合蛋白(cAMP/PKA/CREB)信号通路在溃疡性结肠炎(UC)水液代谢及肠上皮通透性中的作用及芍药汤的干预机制。方法:将60只雄性SD大鼠分为空白组、模型组、美沙拉嗪组(0.42 g·kg<sup>-1</sup>)、芍药汤低、中、高剂量组(11.1、22.2、44.4 g·kg<sup>-1</sup>),每组10只。采用复合病因造模法建立UC湿热内蕴证大鼠模型,空白组和模型组分别给予生理盐水灌胃,美沙拉嗪组给予美沙拉嗪灌胃,芍药汤低、中、高剂量给予对应剂量的芍药汤灌胃,灌胃周期为14 d。观察各组大鼠腹泻评分及粪便含水率变化,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血浆二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸含量,免疫组化法检测各组大鼠结肠组织中水通道蛋白(AQP)8、AQP4及肠黏膜通透性相关蛋白ZO-1、Occludin的蛋白表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中cAMP、PKA、CREB蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠腹泻评分及粪便含水率显著增高( $P<0.01$ ),血浆二胺氧化酶(DAO)、血浆D-乳酸含量显著增高( $P<0.01$ ),结肠ZO-1、Occludin、AQP8、AQP4、cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组血浆二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸含量显著降低( $P<0.01$ ),结肠ZO-1、Occludin、AQP8、AQP4、cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。结论:芍药汤减轻UC腹泻的机制可能是通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路,上调AQPs的表达,增强肠上皮间紧密连接,进而改善结肠水液代谢和肠黏膜通透性。

**[关键词]** 芍药汤; 溃疡性结肠炎; 环磷酸腺苷/蛋白激酶A/环磷酸腺苷反应成分结合蛋白(cAMP/PKA/CREB)信号通路; 水液代谢

**[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)09-0053-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230704

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230222.1727.004.html>

**[网络出版日期]** 2023-02-23 14:04:59

## Mechanism of Shaoyaotang in Regulating Water Metabolism and Intestinal Epithelial Permeability in Ulcerative Colitis Through cAMP/PKA/CREB Signaling Pathway

WU Dongsheng<sup>1</sup>, CAO Hui<sup>1\*</sup>, CAO Xiaoyang<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, XIE Nianjia<sup>3</sup>,  
YANG Yuting<sup>3</sup>, LU Yi<sup>3</sup>, LI Yanhong<sup>3</sup>

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;  
2. Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China;  
3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP-response element binding protein (CREB) signaling pathway in water metabolism and

**[收稿日期]** 2022-09-06

**[基金项目]** 湖南省“神农人才”工程第一批中医药学科带头人培养计划项目(2022);湖南省中医药科研计划项目(2021022,B2023030);长沙市自然科学基金项目(kq2014221);湖南省卫健委科研课题(202204134275,B202304138985);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2021ZYX26);2022年校级研究生创新课题(2022CX136,2022CX162)

**[第一作者]** 吴东升, 硕士, 医师, 从事肠道慢性疾病合并肛周病变的中医药研究, Tel:0731-89669129, E-mail:987909401@qq.com

**[通信作者]** \*曹晖, 硕士, 主任医师, 从事肠道慢性疾病合并肛周病变的研究, Tel:0731-89669129, E-mail:Caohui001818@sina.com

intestinal epithelial permeability in ulcerative colitis (UC) and the intervention mechanism of Shaoyaotang based on the theory of large intestine governing fluids. **Method:** Sixty male SD rats were divided into blank group, model group, mesalazine group ( $0.42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), Shaoyaotang low-dose group ( $11.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), Shaoyaotang medium-dose group ( $22.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and Shaoyaotang high-dose group ( $44.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with 10 in each group. The UC rat model of internal retention of dampness-heat was established by compound factors. The blank group and the model group were given normal saline (*ig*). The mesalazine group was given mesalazine (*ig*), and Shaoyaotang low-, medium- and high-dose groups were administrated with corresponding doses of Shaoyaotang (*ig*). The treatment lasted for 14 days. The diarrhea score and fecal moisture content of rats in each group were observed. The contents of diamine oxidase (DAO) and *D*-lactic acid in plasma were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expressions of aquaporin (AQP)8, AQP4, ZO-1 and Occludin in colon tissues were detected by immunohistochemistry, while those of cAMP, PKA and CREB in colon tissues were determined by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group had elevated diarrhea score and fecal moisture content ( $P<0.01$ ), increased contents of DAO and *D*-lactic acid in plasma ( $P<0.01$ ) and decreased protein expressions of ZO-1, Occludin, AQP8, AQP4, cAMP, PKA and CREB in colon ( $P<0.01$ ). Compared with the conditions in the model group, the contents of DAO and *D*-lactic acid in plasma in each administration groups were lower ( $P<0.01$ ), while the protein expressions of ZO-1, Occludin, AQP8, AQP4, cAMP, PKA and CREB in colon were higher ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Shaoyaotang alleviates the diarrhea in UC, probably through activating cAMP/PKA/CREB signaling pathway, up-regulating expressions of AQPs, enhancing tight junctions in intestinal epithelium and thus improving the water metabolism in colon and the intestinal mucosal permeability.

**[Keywords]** Shaoyaotang; ulcerative colitis; cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP-response element binding protein (CREB) signaling pathway; water metabolism

溃疡性结肠炎(UC)是一种反复发作的慢性非特异性炎症性疾病,以黏液血便、腹痛和腹泻为主要临床表现<sup>[1]</sup>。由于其病因复杂、治愈困难、复发率高、预后差、癌变风险大,UC已成为一种难治性疾病<sup>[2]</sup>。目前,UC的临床治疗方法主要包括糖皮质激素、5-氨基水杨酸、柳氮磺胺吡啶、美沙拉嗪等,他们通过减轻肠道炎症、促进肠黏膜修复、改善肠黏膜屏障来达到临床治疗效果<sup>[3-5]</sup>。然而,这些药物治疗并不能有效抑制UC的发展,尤其是在预防复发方面,长期使用这些药物往往会引起明显的不良反应<sup>[6]</sup>,UC的发病机制尚不完全清楚,但常被认为与肠黏膜损伤和肠黏膜屏障功能障碍有关。肠黏膜屏障是抵御外来抗原的第一道防线,肠上皮细胞紧密连接(TJ)在维持肠黏膜功能方面起着重要作用,TJ受损会导致肠上皮通透性增加,以及肠黏膜免疫异常激活和细菌易位,进而诱发全身炎症<sup>[7]</sup>。

水通道蛋白(AQPs)是一种广泛表达于机体组织中的膜通道蛋白,可以控制细胞内水的输入和输出<sup>[8]</sup>。AQPs表达的丧失可能会严重损害水液代谢,从而影响粪便的形成,导致不同程度的腹泻发生。

现代医学认为UC的发病与湿邪相关<sup>[9]</sup>,而维持水液代谢稳态的关键蛋白AQPs又与湿邪关系密切,因此,可以推断AQPs的异常表达是UC的病理机制之一。《黄帝内经》曰:“湿盛则濡泻”。祛湿是治疗腹泻的重要方法之一,芍药汤具有清热燥湿、清脏腑热等功效,课题组前期实验已证明芍药汤具有减轻UC肠道炎症、增强肠道免疫等作用,可以有效减轻UC腹痛、腹泻等症状<sup>[10-12]</sup>。推测芍药汤改善UC腹泻等症状的作用机制可能与芍药汤的祛湿功能及芍药汤调控AQPs相关,目前也尚无相关文献从AQPs调控的角度探究芍药汤祛湿止泻的作用机理,因此,本研究建立UC大鼠模型,通过芍药汤的治疗观察分析调控AQPs对UC结肠水液代谢及肠黏膜通透性的影响,从结肠水液代谢及肠黏膜通透性角度探究芍药汤治疗UC的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 60只雄性SD大鼠,体重150~170g,SPF级,从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入,动物合格证号SCXK(湘)2019-004,动物质量合格证编号430727211101842621,饲养在湿度40%~60%

和温度24~26℃的环境下,实验方案已取得湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准,伦理编号ZYFY20210615。

**1.2 药物** 芍药汤由白芍30 g,黄连、黄芩、当归各15 g,槟榔、木香、甘草各6 g,大黄9 g,肉桂5 g组成,购自湖南中医药大学附一院门诊中药房,所有药材由湖南三湘中药饮片公司生产,其中白芍、黄芩、当归批号均为2021062103,黄连、大黄批号为2021060301,甘草、肉桂批号为2021052905,木香批号为2021052504,并由该院邓桂明主任药师鉴定均为正品。用双蒸水浸泡饮片0.5 h,煮沸后再用小火煎煮1 h,第1煎加入饮片量8倍水,第2煎加入饮片量6倍水,获得的中药煎剂以1 500 r·min<sup>-1</sup>(离心半径13.5 cm,下同)离心10 min,过滤后取上清液,并将2次药液浓缩至5.5 g·mL<sup>-1</sup>后置于4℃冰箱中备用。由上海爱的发制药有限公司购入美沙拉嗪缓释颗粒剂,批号210401,规格0.5 g/袋,精密称取美沙拉嗪缓释颗粒剂4.2 g,研细成粉末后溶于10 mL蒸馏水中即配制成质量浓度0.42 g·mL<sup>-1</sup>的美沙拉嗪溶液。

**1.3 试剂** 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma公司,批号3LBD6811V);大鼠二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(湖南艾方生物科技有限公司,批号分别为AF3678、AF40018);兔抗鼠闭锁连接蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、AQP4、AQP8抗体(美国Affinity Bioscience公司,批号分别为AF5145、DF7504、AF5164、DF9224);兔抗鼠β-肌动蛋白(β-actin)抗体(北京博奥森生物公司,批号BS-0061R);羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号GB25301)。

**1.4 仪器** KD-BM.BL型组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);RM2235型精密轮转切片机(德国Leica公司);YD-AB型组织摊烤片机(浙江益迪医疗设备有限公司);KZ-II型研磨仪、SVE-2型电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);D3024R型冷冻离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司);AlphaEase FC型灰度分析软件(美国Alpha Innotech公司)。

## 2 方法

**2.1 UC湿热内蕴证模型制备** 随机抽取10只大鼠作为空白组,剩余50只大鼠采用复合病因(高糖高脂饮食+湿热环境+免疫干预+TNBS)建立UC湿热内蕴证大鼠模型。在普通饲料喂养基础上,

200 g·L<sup>-1</sup>蜂蜜水自由饮用,隔日灌服油脂15 g·kg<sup>-1</sup>或52%白酒20 mL·kg<sup>-1</sup>,交替灌服20 d,并置于人工气候箱中(温度35℃、湿度95%,每天6 h),在造模的第6、20天于腹股沟及背部、大鼠的左、右侧足跖皮下注射40 mg·kg<sup>-1</sup>抗原乳化液。在第21天,大鼠禁食不禁水24 h,麻醉大鼠后将0.4 mm直径的软管插入直肠中,深度8 cm,注入5% TNBS 75 mg·kg<sup>-1</sup>+50%乙醇0.25 mL,随后提尾倒置大鼠60 s<sup>[13-14]</sup>。

**2.2 分组与给药** 随机将剩余50只SD大鼠分为5组:模型组、美沙拉嗪组、芍药汤低、中、高剂量组。于造模第28天后开始对应给药,其中芍药汤低、中、高剂量组的给药剂量分别为11.1、22.2、44.4 g·kg<sup>-1</sup>,美沙拉嗪组给予美沙拉嗪0.42 g·kg<sup>-1</sup>,灌胃容积为10 mL·kg<sup>-1</sup>,余各组灌服等体积生理盐水,连续灌胃14 d。根据人和动物按体表面积折算的等效剂量比值计算动物给药剂量。

**2.3 标本采集和检测** 末次给药后禁食不禁水24 h,3%戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠,在低温条件下,解剖分离大鼠结肠组织,选取距离肛门(8±2) cm处的部分结肠组织存放于4%的多聚甲醛中,剩余结肠组织放入-80℃的环境中保存。

## 2.4 指标检测与方法

**2.4.1 观察各组腹泻评分及粪便含水率变化** 观察大鼠粪便的稀稠程度,按照标准方案确定每只大鼠的腹泻评分<sup>[15]</sup>。0分,正常(正常大便);1分,极少(软便);2分,轻微(轻微潮湿和柔软的粪便);3分,中度(潮湿且不成形的粪便,中度肛周被毛染色);4分,严重(水样便,严重肛周被毛染色)。动物转入代谢笼以后,收集粪便并在电子天平上称出粪便的湿重,然后在烘箱中以60℃干燥24 h后再称出其干重,粪含水量=(粪湿重-粪干重)×100%/粪湿重。

**2.4.2 ELISA检测血浆DAO、D-乳酸含量** 各组动物结束治疗后,各组大鼠腹主动脉取血2 mL,10 min内分离出血清、血浆,ELISA法检测血浆DAO、D-乳酸含量评估肠黏膜通透性。

**2.4.3 免疫组化法检测ZO-1、Occludin、AQP8、AQP4蛋白的表达** 将石蜡切片脱蜡后,再将切片放在柠檬酸盐缓冲液修复盒中,在高温条件下进行抗原修复,自然冷却,PBS洗涤3次。抗原修复后,滴加一抗(1:500),4℃孵育过夜,滴加二抗(1:1 000),室温孵育50 min。切片用PBS洗涤3次。加入DAB显色,玻片脱水,透明,干燥,中性胶密封。显微镜下观察记录结肠组织中ZO-1、Occludin、AQP8、AQP4的蛋白表达。

### 2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组结肠组织中cAMP/PKA/CREB通路相关蛋白表达

将结肠组织与裂解缓冲液混合,然后在粉碎机中粉碎并均质化,1 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min后吸收上清液。cAMP、PKA、CREB、p-CREB的抗体和β-actin根据制造商的说明进行稀释。结肠组织裂解物中的蛋白质通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离并电转移到PVDF膜上。之后,将膜用5%脱脂牛奶封闭1 h,然后与稀释的一抗(1:1 000)在室温下孵育2 h。将PVDF膜与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(1:2 000)在25℃下孵育1 h。添加化学发光底物后,条带显示在化学发光成像系统上。

### 2.5 统计学处理

采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,对样本先进行正态性检验、方差齐性检验,方差齐用最小显著性差异法(LSD)检验进行两两比较;方差不齐用非参数秩和检验,采用Kruskal-Wallis检验进行统计分析差异。检验水平 $\alpha=0.05$ , $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 对COPD大鼠一般状态、腹泻评分及粪便含水率的影响

治疗结束后,空白组大鼠一般状况良好,饮食摄水量正常,毛发光泽,活动敏捷,大便正常;模型组大鼠精神沉郁,饮食摄水量减少,毛发欠光泽,活动减少,精神萎靡,喜蜷缩、扎堆,大便不成行臭秽,黏腻夹带少许脓血,尿黄,肛管升高,符合湿热内蕴证相关表现,与空白组比较,模型组大鼠腹泻评分及粪便含水率显著增高( $P<0.01$ );给药干预后,大鼠症状好转,精神状态恢复,饮食摄水量增加,脓血便减少甚至消失,活动量增加,小便较清澈,肛温降低,与模型组比较,芍药汤低剂量组、美沙拉嗪组大鼠腹泻评分明显降低( $P<0.05$ ),芍药汤中、高剂量组腹泻评分显著降低( $P<0.01$ ),各给药组粪便含水率明显降低( $P<0.05$ )。见表1。

### 3.2 对COPD大鼠肠黏膜通透性的影响

与空白组比较,模型组血浆DAO、D-乳酸含量显著升高

表1 芍药汤对UC大鼠腹泻评分及粪便含水率的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of Shaoyatong on diarrhea score and stool moisture content in UC rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	粪便含水率/%	腹泻评分/分
空白组		46.91±1.06	0.71±0.07
模型组		62.46±3.84 <sup>1)</sup>	3.23±0.08 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	51.45±2.78 <sup>3)</sup>	2.19±0.08 <sup>2)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	53.88±1.99 <sup>3)</sup>	2.17±0.07 <sup>2)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	49.34±3.50 <sup>3,4)</sup>	1.33±0.08 <sup>3)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	46.79±3.04 <sup>3,5)</sup>	1.17±0.07 <sup>3,4)</sup>

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> $P<0.01$ ;与芍药汤低剂量组比较<sup>4)</sup> $P<0.05$ ,<sup>5)</sup> $P<0.01$ (表2、表3同)

( $P<0.01$ ),肠黏膜通透性增大;与模型组比较,各给药组血浆DAO、D-乳酸含量显著降低( $P<0.01$ ),肠黏膜通透性降低;与芍药汤低剂量组比较,芍药汤高剂量组血浆DAO、D-乳酸含量显著降低( $P<0.01$ ),肠黏膜通透性降低。见表2。

表2 芍药汤对UC大鼠血浆DAO、血浆D-乳酸含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of Shaoyatong on plasma DAO and plasma D-lactic acid content of UC rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	DAO	D-乳酸 ng·L <sup>-1</sup>
空白组		150.85±6.44	950.76±29.85
模型组		175.44±9.38 <sup>1)</sup>	1 145.12±26.42 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	160.40±3.89 <sup>3)</sup>	1 068.76±35.58 <sup>2)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	165.51±5.28 <sup>3)</sup>	1 069.73±23.97 <sup>2)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	158.87±5.32 <sup>3)</sup>	1 019.71±24.64 <sup>3)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	154.07±6.15 <sup>3,5)</sup>	997.31±34.25 <sup>3,5)</sup>

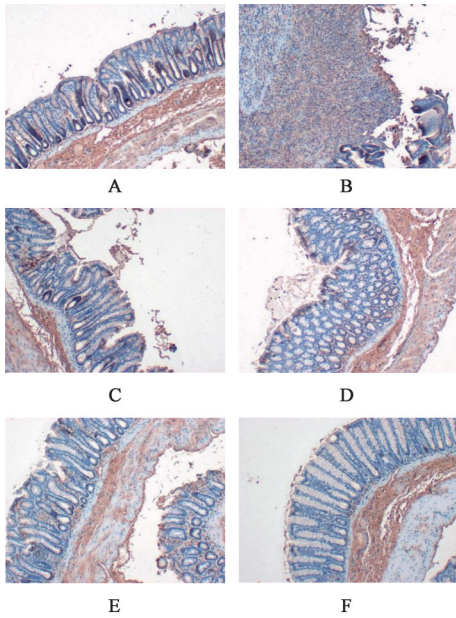
### 3.3 对COPD大鼠肠道紧密连接蛋白的影响

与空白组比较,模型组肠道紧密连接蛋白ZO-1、Occludin蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),提示模型组肠黏膜屏障受损,肠黏膜通透性增大;与模型组比较,各给药组肠道紧密连接蛋白ZO-1、Occludin蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),成功扭转了ZO-1、Occludin蛋白表达降低趋势;与芍药汤低剂量组比较,芍药汤中、高剂量组ZO-1、Occludin蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。见表3、图1、图2。

表3 芍药汤对UC大鼠结肠组织ZO-1、Occludin含量表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Shaoyatong on expression of ZO-1 and Occludin in colon tissue of UC rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ZO-1	Occludin
空白组		0.030 2±0.000 5	0.039 9±0.000 9
模型组		0.013 1±0.000 9 <sup>1)</sup>	0.012 3±0.000 6 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	0.021 4±0.001 2 <sup>3)</sup>	0.023 2±0.001 0 <sup>3)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	0.020 0±0.000 3 <sup>3)</sup>	0.0221±0.000 4 <sup>3)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	0.023 3±0.000 2 <sup>3,4)</sup>	0.027 7±0.000 3 <sup>3,4)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	0.025 6±0.000 4 <sup>3,5)</sup>	0.033 4±0.000 5 <sup>3,5)</sup>



注:A.空白组;B.模型组;C.美沙拉嗪组;D.芍药汤低剂量组;E.芍药汤中剂量组;F.芍药汤高剂量组(图2-图5同)

图1 芍药汤对UC大鼠结肠组织ZO-1蛋白表达的影响(免疫组化,×100)

Fig. 1 Effect of Shaoyatong on ZO-1 protein expression in colon tissue of rats in each group (IHC, ×100)

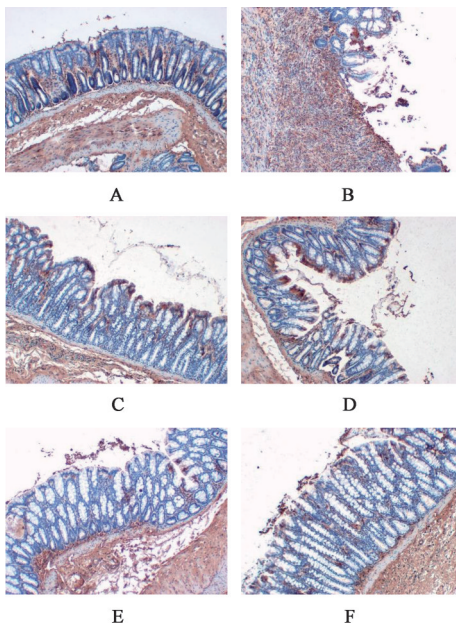


图2 芍药汤对UC大鼠结肠组织Occludin蛋白表达的影响(免疫组化,×100)

Fig. 2 Effect of Shaoyatong on expression of Occludin protein in colon tissue of UC rats (IHC, ×100)

**3.4 对COPD大鼠结肠组织AQP8、AQP4蛋白的影响** 与空白组比较,模型组结肠组织AQP8、AQP4蛋白表达水平降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组结肠组织AQP8、AQP4蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与芍药汤低剂量组比较,芍药汤中、高剂

量组AQP8、AQP4蛋白表达水平明显升高,差异有显著统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表4和图3、图4。

表4 芍药汤对UC大鼠结肠组织AQP8、AQP4蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

Table 4 Effect of Shaoyatong on expression of AQP8, AQP4 protein in colon tissue of UC rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	AQP8	AQP4
空白组		0.036 1±0.001 2	0.031 2±0.000 8
模型组		0.012 8±0.000 6 <sup>1)</sup>	0.009 8±0.000 7 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	0.025 0±0.000 7 <sup>3)</sup>	0.021 8±0.000 8 <sup>3)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	0.024 6±0.000 8 <sup>3)</sup>	0.020 8±0.000 9 <sup>3)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	0.028 8±0.000 6 <sup>3,4)</sup>	0.025 0±0.000 5 <sup>3,4)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	0.034 2±0.000 8 <sup>3,5)</sup>	0.027 5±0.000 5 <sup>3,4)</sup>

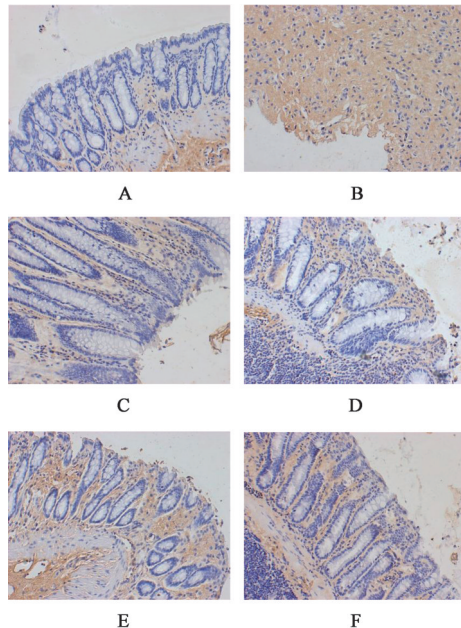


图3 芍药汤对UC大鼠结肠组织AQP8蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of Shaoyatong on expression of AQP8 protein in colon tissue of UC rats (IHC, ×200)

**3.5 对COPD结肠组织中cAMP/PKA/CREB相关蛋白的影响** 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组结肠组织cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与芍药汤低剂量组比较,芍药汤高剂量组cAMP、PKA、CREB蛋白表达明显升高,差异有显著统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表5、图5。

#### 4 讨论

《脾胃论》云:“大肠主津,小肠主液”。水液在

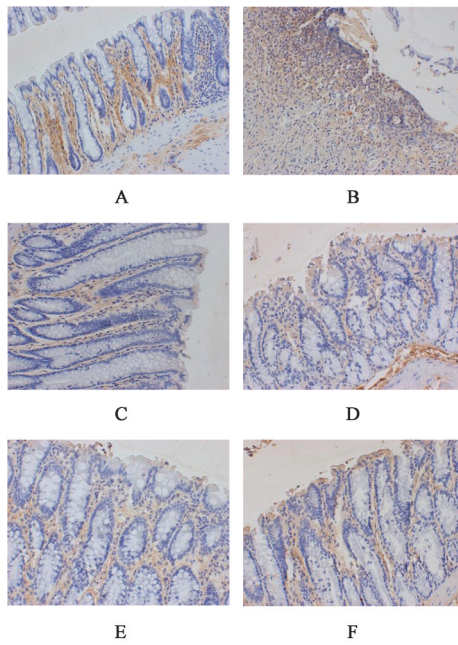


图4 芍药汤对UC结肠组织大鼠AQP4蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effect of Shaoyaotang on expression of AQP4 protein in colon tissue of UC rats (IHC, ×200)

表5 芍药汤对UC大鼠结肠组织cAMP、PKA、CREB蛋白相对表达量的影响(̄x±s, n=4)

Table 5 Effect of Shaoyaotang on relative expression of cAMP, PKA and CREB proteins in colon tissue of UC rats (̄x±s, n=4)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	cAMP/β-actin	PKA/β-actin	CREB/β-actin
空白组		0.912±0.004	0.315±0.006	0.648±0.008
模型组		0.106±0.009 <sup>1)</sup>	0.103±0.005 <sup>1)</sup>	0.265±0.008 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	0.246±0.003 <sup>3)</sup>	0.278±0.004 <sup>3)</sup>	0.401±0.004 <sup>3)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	0.332±0.008 <sup>3)</sup>	0.264±0.009 <sup>3)</sup>	0.405±0.007 <sup>3)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	0.382±0.006 <sup>3,4)</sup>	0.280±0.005 <sup>3)</sup>	0.544±0.006 <sup>3,5)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	0.452±0.008 <sup>3,5)</sup>	0.312±0.008 <sup>3,4)</sup>	0.560±0.007 <sup>3,5)</sup>

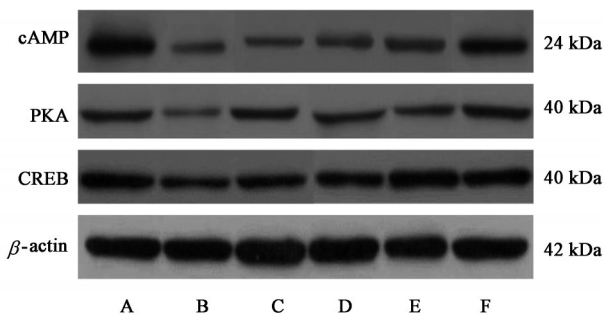


图5 各组大鼠cAMP、PKA、CREB蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of cAMP, PKA and CREB protein expression in each group of rats

AQPs在消化道中广泛表达,且表达量与肠道水液的吸收和分泌关系密切<sup>[20-22]</sup>。AQP4和AQP8在结肠中存在表达<sup>[23]</sup>,结肠AQP4和AQP8表达降低与肠道水液代谢失衡密切相关<sup>[24]</sup>,可以引起腹泻

大肠被重吸收,并参与体内水液代谢的过程被称为大肠主津<sup>[16]</sup>。肠上皮通透性增加和结肠水液代谢紊乱是“大肠主津”功能下降的体现。紧密连接蛋白Occludin、ZO-1在维持肠黏膜屏障完整性中起重要作用<sup>[17-18]</sup>。当肠黏膜功能受损时,黏膜通透性增加,更多细胞内DAO、D-乳酸被放到血液中,因此DAO、D-乳酸可以反映肠上皮通透性改变<sup>[19]</sup>。实验发现,模型组大鼠腹泻评分及粪便含水率明显增高,提示模型组存在水液代谢紊乱,模型组血浆DAO、D-乳酸含量升高,ZO-1、Occludin表达降低,提示模型组大鼠肠黏膜屏障受损,肠黏膜通透性增加,侧面揭示大肠主津功能降低;而给予芍药汤干预后,腹泻评分及粪便含水率降低,血浆DAO、D-乳酸含量降低,ZO-1、Occludin表达增加,提示芍药汤组大鼠肠黏膜屏障损伤减轻,肠黏膜通透性降低。上述结果表明芍药汤能够减轻UC湿热内蕴证腹泻症状,减轻结肠水液代谢紊乱,降低肠黏膜通透性,提高大肠主津功能,芍药汤的这一干预效果呈现剂量依赖性。

等症,进而诱发肠道炎症,日久则使肠道黏膜受损<sup>[25-27]</sup>。研究发现UC大鼠AQP4、AQP8降低,特别是肠黏膜AQP4、AQP8降低,可以引起肠黏膜屏障损伤<sup>[28]</sup>。研究证实cAMP/PKA/CREB通路参与AQP4表达的调控<sup>[29]</sup>,cAMP/PKA通路通过调节炎症细胞因子的释放、免疫系统的激活在肠易激综合征中发挥重要作用,如实验发现在便秘大鼠的结肠中cAMP和PKA均显著升高,可以致使结肠AQP4的表达和活性增加,水分吸收增多而形成便秘<sup>[30]</sup>,此外,有研究已经表明cAMP/PKA/CREB信号通路参与水液代谢调节,激活cAMP可使AQP1、AQP3和AQP8的表达上调,从而维持肠道水液代谢稳态<sup>[31]</sup>。本研究结果显示,不同剂量的芍药汤均能不同程度地增加AQP8、AQP4的表达,激活cAMP/PKA/

CREB信号通路,其中高剂量组的总体效果最为明显。表明芍药汤以剂量依赖的方式促进cAMP/PKA/CREB信号通路的表达,上调AQP8、AQP4的表达,发挥对UC大鼠的保护作用。

综上所述,芍药汤减轻UC腹泻的机制可能是通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路,上调AQPs(AQP4、AQP8)的表达,增强肠上皮间紧密连接,进而改善结肠水液代谢和肠黏膜通透性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] BAKER D M, FOLAN A M, LEE M J, et al. A systematic review and Meta-analysis of outcomes after elective surgery for ulcerative colitis [J]. *Colorectal Dis*, 2021, 23(1):18-33.
- [2] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1):74.
- [3] ROWAN C R, BOLAND K, HAREWOOD G C. Ustekinumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1):91.
- [4] WU D, YANG Z, ZHAO C, et al. Infliximab versus cyclosporine for severe ulcerative colitis refractory to steroids: A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(41):e12657.
- [5] WU B, TONG J, RAN Z. Tacrolimus therapy in steroid-refractory ulcerative colitis: A review [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2020, 26(1):24-32.
- [6] LIU Y, WEI W, LIANG S, et al. Esculentoside A could attenuate apoptosis and inflammation in TNBS-induced ulcerative colitis via inhibiting the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(14):771.
- [7] SHI L, WANG J, YANG Q, et al. Effect of Yang-activating and stasis-eliminating decoction from traditional Chinese medicine on intestinal mucosal permeability in rats with ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(4):452-460.
- [8] SHANGZU Z, DINGXIONG X, CHENGJUN M, et al. Aquaporins: Important players in the cardiovascular pathophysiology [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 183:106363.
- [9] 雷超芳, 翟昌明, 马重阳, 等. 王庆国治疗溃疡性结肠炎活动期经验总结 [J]. *山东中医杂志*, 2019, 38(9):861-865.
- [10] 吴东升, 曹晖, 张彧, 等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜免疫屏障的干预作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9):6-11.
- [11] 曹晖, 吴东升, 张彧, 等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理变化及免疫功能的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(6):59-63.
- [12] 曹晖, 吴东升, 张彧, 等. 基于高通量测序技术研究芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(1):61-66.
- [13] 吴东升, 曹晖, 张彧, 等. 芍药汤通过抑制 HIF-1 $\alpha$  调节 Th17/Treg 平衡治疗溃疡性结肠炎 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(16):9-15.
- [14] 徐敏, 王凤仪, 赵党生, 等. 芍药汤对湿热内蕴型溃疡性结肠炎大鼠 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 和 IL-6 表达的调控作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(14):53-58.
- [15] ZHANG D, YANG L, SU W, et al. Aquaporin-4 is downregulated in the basolateral membrane of ileum epithelial cells during enterotoxigenic escherichia coli-induced diarrhea in mice [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8:2655.
- [16] 隋楠, 田振国, 刘继东. 基于大肠主津理论下助阳通便膏对便秘模型小鼠结肠组织中 MUC2、AQP3 的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(10):40-43, 后插 7-7 后插 8.
- [17] ZHAO D Y, ZHANG W X, QI Q Q, et al. Brain-derived neurotrophic factor modulates intestinal barrier by inhibiting intestinal epithelial cells apoptosis in mice [J]. *Physiol Res*, 2018, 67(3):475-485.
- [18] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2022, 1514(1):21-33.
- [19] SHI L, XUN W, PENG W, et al. Effect of the single and combined use of curcumin and piperine on growth performance, intestinal barrier function, and antioxidant capacity of weaned wuzhishan piglets [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7:418.
- [20] LIU S, QIU Y, GU F, et al. Niacin improves intestinal health through up-regulation of AQPs expression induced by GPR109A [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15):235.
- [21] 甘江华, 黄琦璠, 彭代银, 等. 3种石斛对脾阴虚型大鼠便秘的治疗作用及其机制初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(12):2600-2606.
- [22] 吴璐, 赖艳, 王莹, 等. 高通量测序技术研究蚕沙对湿阻中焦证大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(3):623-630.
- [23] 徐雯, 王楠, 丁浩然, 等. 广藿香对湿阻中焦证大鼠胃

- 肠功能的影响[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4649-4655.
- [24] ZHAO G X, DONG P P, PENG R, et al. Expression, localization and possible functions of aquaporins 3 and 8 in rat digestive system[J]. *Biotech Histochem*, 2016, 91(4):269-276.
- [25] 彭强丽,张永会,杨丽娟. 中药促进宫颈柱状上皮异位物理治疗后创面修复的临床观察及基于AQP2的机制探讨[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(7): 1683-1685.
- [26] 汪刘华. AQP4在胃肠道的功能及与相关疾病关系的研究进展[J]. *河北医科大学学报*, 2018, 39(2): 244-248.
- [27] 张馨心,周唯,陆金根,等. 基于网络药理学探讨红黄饮治疗溃疡性结肠炎的分子机制[J]. *世界中医药*, 2021, 16(1):52-62.
- [28] 屈映,张书信,傅丽元,等. 荆芥、防风对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜AQP4和AQP8表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15):3719-3725.
- [29] WU Z Y, YAO Y, HU R, et al. Cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A signal pathway may be involved in pulmonary aquaporin-5 expression in ischemia/reperfusion rats following deep hypothermia cardiac arrest [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): 15017377.
- [30] MENG Y, LI X, WANG X, et al. Network pharmacological prediction and molecular docking analysis of the combination of *Atractylodes macrocephala* Koidz. and *Paeonia lactiflora* Pall. in the treatment of functional constipation and its verification[J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(2): 120-132.
- [31] CHAO G, ZHANG S. Aquaporins 1, 3 and 8 expression and cytokines in irritable bowel syndrome rats' Colon via cAMP-PKA pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(8):4117-4123.

[责任编辑 周冰冰]