

车前子对腹泻大鼠炎症因子和结肠组织 AQP4 mRNA 和蛋白表达的影响

王月¹, 彪雅宁¹, 储心乔¹, 张纳博¹, 张睦清², 王茜¹, 韩雪¹, 张一昕^{1*}

(1. 河北中医学院药学院, 河北省高校中药组方制剂应用技术研究中心, 石家庄 050200;

2. 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的:观察车前子对腹泻大鼠血清中炎症因子和结肠组织水通道蛋白4(AQP4) mRNA和蛋白表达的影响,探讨其治疗腹泻的作用机制。方法:采用番泻叶药液灌胃法复制大鼠腹泻模型。将60只SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、氢氯噻嗪组(9 mg·kg⁻¹)和车前子低、中、高剂量组(0.95, 1.9, 3.8 g·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组均于每日上午灌胃番泻叶药液(20 mL·kg⁻¹),正常组灌胃等量的蒸馏水;每日下午各治疗组灌服相应药物,正常组和模型组灌服等量蒸馏水,连续14 d。实验结束后,根据粪便性状和大便次数,统计对比各组大鼠的稀便率、平均稀便级和腹泻指数,采集血清和结肠组织标本,检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)和C反应蛋白(CRP)的含量;苏木素-伊红(HE)染色观察结肠黏膜病理形态学变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中AQP4 mRNA和蛋白的表达情况。结果:与正常组比较,模型组稀便率、平均稀便级和腹泻指数显著升高($P < 0.01$),结肠黏膜表皮细胞出现凋亡坏死,固有层毛细血管扩张充血明显,少量中性粒细胞浸润,血清中TNF- α , IL-6和CRP的含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), AQP4 mRNA和蛋白的表达均明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,车前子各剂量组大鼠的稀便率、平均稀便级和腹泻指数均显著降低($P < 0.01$),结肠黏膜表皮细胞凋亡坏死、毛细血管扩张充血和中性粒细胞浸润现象明显改善,血清中TNF- α 和CRP的含量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), AQP4 mRNA和蛋白的表达水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:车前子具有较好的止泻作用,其机制可能是抑制炎症反应、修复结肠黏膜病理损伤,上调AQP4的表达,调节水液代谢。

[关键词] 腹泻; 车前子; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 白细胞介素-6(IL-6); C反应蛋白(CRP); 水通道蛋白4(AQP4)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0052-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201902

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200708.1349.002.html>

[网络出版日期] 2020-7-8 15:00

Effect of Plantaginis Semen on Inflammatory Cytokines and mRNA and Protein Expressions of AQP4 in Colon Tissue of Diarrhea Rats

WANG Yue¹, BIAO Ya-ning¹, CHU Xin-qiao¹, ZHANG Na-bo¹, ZHANG Mu-qing², WANG Xi¹,
HAN Xue¹, ZHANG Yi-xin^{1*}

(1. School of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Application Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Prescription in University of Hebei Province, Shijiazhuang 050200, China; 2. Hebei Hospital of TCM, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe Plantaginis Semen's mechanism in treating diarrhea by observing the effect on inflammatory factors in serum and mRNA and protein expressions of aquaporin4 (AQP4) in colon tissue of diarrhea rats. **Method:** Senne Folium was orally administered to duplicate diarrhea rats. Sixty male

[收稿日期] 20200205(016)

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2018210);中央财政公共卫生专项“2018年中药资源普查”项目(Z13508000022);国家级大学生创新创业训练计划项目(201714432001)

[第一作者] 王月,在读硕士,从事中药及其复方临床应用和机制研究, E-mail: 623179442@qq.com

[通信作者] *张一昕,博士,教授,博士生导师,从事中药及其复方临床应用和机制研究, E-mail: hbzyx123@163.com

SD rats were randomly divided into normal group, model group, hydrochlorothiazide group ($9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low, middle, and high-dose Plantaginis Semen groups ($0.95, 1.9, 3.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Senne Folium ($20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) was intragastrically administered in 5 groups in the morning, except for normal group that was orally given the same dose of distilled water. In the afternoon, each treatment group was orally given the corresponding drugs, while normal group and model group were orally given the same dose of distilled water. The loose stool rate, average degree of loose stool, and diarrhea index were compared according to fecal traits and stool times after 14 days of treatment. The serum and colon tissue were collected to detect the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in serum. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphological changes of colon tissue, and quantitative Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of AQP4 in colon tissue. **Result:** In the model group, the loose stool rate, average degree of loose stool, and diarrhea index were significantly increased ($P<0.01$), apoptosis and necrosis were observed in the epidermal cells of colonic mucosa, telangiectasia and congestion in lamina propria were obvious, and a few neutrophils were infiltrated, and the contents of TNF- α , IL-6 and CRP in serum increased ($P<0.05, P<0.01$), the mRNA and protein expressions of AQP4 significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the loose stool rate, average degree of loose stool, and diarrhea index were significantly decreased in low, middle, and high-dose Plantaginis Semen groups ($P<0.01$), the apoptosis and necrosis of epidermal cells, telangiectasia and hyperemia and neutrophil infiltration in colonic mucosa were obviously improved, and the contents of TNF- α and CRP in serum significantly decreased ($P<0.05, P<0.01$), the mRNA and protein expressions of AQP4 increased ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Plantaginis Semen has a better antidiarrheal effect, and its mechanism may be related to inhibition of inflammatory reaction, repair of pathological damage of colonic mucosa, up-regulation of AQP4 expression and promotion of water and fluid metabolism.

[**Key words**] diarrhea; Plantaginis Semen; tumor necrosis factor- α (TNF- α); interleukin-6 (IL-6); C-reactive protein (CRP); aquaporin4 (AQP4)

腹泻是临床常见的由多种因素所导致的肠道水液代谢紊乱的一种疾病^[1],以大便次数频多、粪质稀薄或呈水样为临床特征。中医学认为,泄泻的主要病因是水湿内停,故通利小便,排泄水湿为常用治法。车前子为车前科植物车前或平车前的干燥成熟种子,具有利尿通淋,渗湿止泻等功效,其入小肠经,善能通水道而分清浊,利小便以实大便,堪称止泻妙品,车前子止泻与其利水作用有关。古代医籍中载有较多以车前子为主要组成的方剂用治泄泻,如《杨氏家藏方》中的车前子散(车前子、猪苓、茯苓、人参、香薷叶)治小儿伏暑吐泻;《杂病源流犀烛》中的车前子汤(车前子、厚朴、泽泻)治肠鸣如雷,一泄如注皆是水等。当代医家单用车前子或自拟方如复方健脾利湿止泻汤、车前子汤和四苓散加车前子等治疗腹泻,均取得了较好的疗效^[2-6],但其作用机制尚不明确。研究发现,水通道蛋白(AQPs)是负责跨细胞转运水分子的主要蛋白,广泛分布在肠道上皮和内皮组织细胞膜上,若因某些因素导致肠道AQPs的表达异常,使肠道对水液的吸收减少,

水分大量在肠道蓄积,便会导致腹泻的发生,因此AQPs的功能状态与腹泻的发生和转归具有非常密切的关系^[7-9]。结肠对于水的吸收功能与粪便的性状密切相关^[10],炎症反应是腹泻发生发展的病理生理基础,有研究发现炎症因子的分泌和释放影响着水通道蛋白的功能状态^[11-13],但目前尚未见到基于结肠组织AQPs途径研究车前子治疗腹泻的相关报道。本实验采用番泻叶致腹泻大鼠模型,通过观察其对实验大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)和C反应蛋白(CRP)含量以及结肠组织AQP4 mRNA和蛋白表达的影响,以探讨车前子止泻的作用途径和作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性SD大鼠60只,体质量160~180 g,由河北省实验动物中心提供,合格证号SCXK(冀)2019-0016。饲养于18~22℃明暗各12h的实验室,自由进食水。该实验经河北中医学院伦理委员会批准同意,编号DWLL2018005。

1.2 药物及试剂 车前子配方颗粒(四川新绿色药

业有限公司,批号8122593);氢氯噻嗪片(山东仁和堂药业有限公司,批号180922);番泻叶(石家庄同仁堂药房);TNF- α , IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海森雄科技实业有限公司,批号分别为SXR032, SXR063);CRP试剂盒(北京普尔伟业科技有限公司,批号20170926);苏木素-伊红(HE)染色液(河北渤海生物有限公司,批号分别为20170526, 20170618);AQP4一抗,荧光二抗,DAPI显色剂,抗荧光淬灭封片剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G5001, G5101, G1201, G1401);AQP4兔多抗(美国Origene公司,货号K101547P);AQP4一抗多克隆抗体,二抗山羊抗兔多克隆抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab46182, ab9485);trizol(美国Invitrogen生命技术有限公司,批号Cat#15596-026);Eastep Super Total RNA Extraction Kit, GoScript Reverse Transcription System, GoTaq qPCR Master Mix(美国Promega公司,货号分别为LS1040, A5001, A6002);TIANScript RT kit, SuperReal PreMix Plus(北京天根生化科技有限公司,批号分别为KR104-02, FP205)。

1.3 仪器 ELx800型酶标仪(美国BioTek公司);1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);TDL-5-A型离心机(上海安亭科学仪器厂);FJ-2021 γ -放射免疫计数器(西安二六二厂);SHB-D型循环水真空泵(郑州长城科工贸有限公司);HMIAS-2000型显微图像分析系统(武汉千屏影像技术有限公司);15D(P)型电泳仪及28D型电泳槽(北京六一生物科技有限公司);UVP凝胶成像系统(美国Thermo公司);QL-902型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);BioPhotometer型生物分光光度计(德国Eppendorf公司);ABI7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Applied Biosystems公司);AE-6687型半干转膜仪系统(日本Atto公司);NIKON ECLIPSE C1型正置荧光显微镜,NIKON DS-U3型成像系统(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 药物制备 车前子药液:实验时将车前子配方颗粒加入到100℃适量的纯净水中,加热搅拌使其溶解。氢氯噻嗪混悬液:实验时以0.5%的羧甲基纤维素钠配成实验所需浓度的混悬液。番泻叶药液:称取番泻叶200g浸入100℃纯净水中1L,充分搅拌,浸渍30min后用四层纱布过滤,滤液蒸发浓缩至600mL,制成番泻叶药液(含生药0.3g·mL⁻¹),置

4℃冰箱中冷藏备用。

2.2 动物分组、造模及给药 将60只大鼠按体重随机分为正常组、模型组、氢氯噻嗪组和车前子低、中、高剂量组,每组10只。本实验造模的同时给予药物治疗。除正常组外,其余各组均于上午9:00灌胃番泻叶药液(20mL·kg⁻¹)造模,大鼠腹泻模型复制方法参照相应文献[14]进行,正常组灌胃等量蒸馏水。下午3:00各治疗组灌服相应药物,正常组和模型组灌服等量蒸馏水。车前子各组给药剂量按照人与大鼠体表面积进行折算,车前子高、中、低剂量组的大鼠用药剂量分别为3.8, 1.9, 0.95g·kg⁻¹,氢氯噻嗪组大鼠的用药剂量为9mg·kg⁻¹,给药体积均为10mL·kg⁻¹,给药14d。每隔3d称量1次体质量变换给药体积,大鼠自由饮水进食,给药期间观察大鼠粪便情况。

2.3 标本采集 实验结束后,以3.5%水合氯醛(10mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血,置洁净试管中,3500r·min⁻¹离心15min,分离血清,检测相关炎症因子含量。取血后迅速剖取固定位置的适宜长短的结肠组织2份,剖开,生理盐水洗净,一份固定于4%多聚甲醛溶液,有待HE染色观察结肠组织病理形态学和免疫荧光法观察AQP4蛋白表达情况;另一份置于冻存管中液氮保存,以备Real-time PCR和蛋白免疫印迹法(Western blot)观察结肠组织AQP4 mRNA和蛋白的表达。

2.4 指标检测

2.4.1 计算各组大鼠的稀便率、平均稀便级和腹泻指数 观察、记录大鼠粪便性状和排便次数,参照相关文献[15],稀便率=每只大鼠的稀便数÷该只大鼠总便数×100%;稀便级:代表稀便的程度,根据稀便污染滤纸形成污迹直径的大小,共分为1~4级,其污迹直径(cm)分别为<1, 1~1.9, 2~3, >3。然后将该鼠所有稀便级数相加除以稀便次数,即为稀便的平均级数。腹泻指数=稀便率×平均稀便级。

2.4.2 HE染色观察各组大鼠结肠组织病理形态学改变 取4%多聚甲醛溶液固定的结肠组织,常规脱水,包埋,切片,HE染色,显微镜下观察。

2.4.3 各组大鼠血清炎症因子含量变化 采用ELISA法检测血清中TNF- α 和IL-6的含量,采用放免法检测CRP的含量,以上均严格按试剂盒说明书要求进行操作。

2.4.4 免疫荧光法检测结肠组织AQP4蛋白表达 将4%多聚甲醛溶液固定的结肠组织石蜡包埋、切片脱蜡至水;置于EDTA抗原修复缓冲液

(pH 8.0)的修复盒中进行抗原修复,然后以磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗涤 5 min×3 次,甩干,滴加 BSA,封闭 30 min;甩掉封闭液,滴加一抗(1:500) 4 °C 孵育过夜;次日取出等待切片恢复至室内温度后, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,甩干后滴加二抗,避光室温孵育 50 min; PBS 充分清洗;滴加 DAPI 染色液,室温避光孵育 10 min,水洗终止显色、晾干,抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并采集图像。各组内每张切片随机挑选至少 3 个 200 倍视野进行拍照,应用 Image-Pro Plus 6.0 软件对每张照片进行分析,得出每张照片阳性的积分吸光度 IA 以及组织的像素面积 (AREA)。并求出平均积分吸光度 AA , $AA=IA/AREA$, AA 值越大表明阳性表达水平越高。

2.4.5 Real-time PCR 检测结肠组织 AQP4 mRNA 表达 用 trizol 提取结肠组织样本中总 RNA,取 RNA 5 μ L 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,以检测 RNA 的完整性。取完整的 cRNA Real-time PCR 反应,用 TIANScript RT KIT 进行反转录,实验操作按产品说明书进行。Real-time PCR 反应体系为 2×Mix 10 μ L,正反引物各 0.6 μ L, Reference Dye 0.4 μ L, 无菌水 20 μ L。第 1 次循环 95 °C 15 min,后 40 次循环 95 °C 10 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参。对溶解曲线进行分析,检测 AQP4 mRNA 表达,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法数据的相对表达量进行分析。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,见表 1。

2.4.6 Western blot 检测结肠组织中 AQP4 的蛋白表达 称取结肠组织约 100 mg,液氮研磨,然后转移到含有 1 mmol·L⁻¹ PMSF 的 RIPA 900 μ L 中性裂解液当中,混匀,超声裂解,配平后 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,收集上清液,进行蛋白含

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度/bp
AQP4	上游 5'-CATCGCCAAGTCCGTCTTCTAC-3' 下游 5'-AACCGTGGTGACTCCCAATCCT-3'	118
β -actin	上游 5'-CCTAGACTTCGAGCAAGAGA-3' 下游 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGA-3'	140

量的测定。蛋白煮沸变性以后,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,然后转移到 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭,一抗(1:500) 4 °C 孵育过夜, PBST 洗膜 3 次,洗净未结合的一抗。将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液(1:1 万)中,室温孵育 1.5 h, PBST 洗膜 3 次,洗去游离二抗。暗室曝光, X 胶片上显影,用 Tanon Gis 软件扫描各条带的吸光度值并分析结果。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料采用方差分析,方差齐用 LSD 法检验,方差不齐用 Dunnett' T3 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠稀便率、平均稀便级及腹泻指数的影响 与正常组比较,模型组大鼠的稀便率、平均稀便级和腹泻指数显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各用药组的稀便率、平均稀便级和腹泻指数均明显降低 ($P<0.05, P<0.01$);与氢氯噻嗪组比较,车前子中、高剂量组各项指标均显著降低 ($P<0.01$),而低剂量组虽有下降趋势,但差异无统计学意义。与车前子低剂量组比较,车前子高、中剂量组各项指标均明显降低 ($P<0.05, P<0.01$),而车前子低、中剂量组之间无统计学差异;与车前子中剂量组比较,车前子高剂量组的稀便率降低 ($P<0.05$),而平均稀便级和腹泻指数虽有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 2。

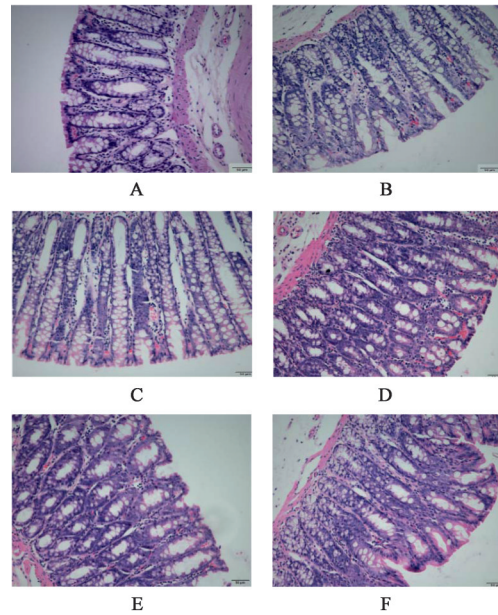
表 2 车前子对大鼠稀便率、平均稀便级及腹泻指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Plantaginis Semen on loose stool rate, average ranking of loose stool, and diarrhea index in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	稀便率/%	平均稀便级	腹泻指数
模型	-	67.45±7.35 ¹⁾	2.63±0.29 ¹⁾	1.77±0.24 ¹⁾
氢氯噻嗪	0.009	52.39±8.16 ³⁾	2.35±0.30 ²⁾	1.21±0.13 ³⁾
车前子	0.95	50.89±6.17 ³⁾	2.16±0.34 ³⁾	1.10±0.19 ³⁾
	1.9	41.14±4.48 ^{3,4,5)}	1.73±0.28 ^{3,4,5)}	0.71±0.11 ^{3,4,6)}
	3.8	36.37±4.81 ^{3,4,6,7)}	1.52±0.25 ^{3,4,6)}	0.57±0.12 ^{3,4,6)}

注:设正常组稀便率、平均稀便级、腹泻指数均为 0;与正常组比较 ¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$;与氢氯噻嗪组比较 ⁴⁾ $P<0.01$;与车前子低剂量组比较 ⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$;与车前子中剂量组比较 ⁷⁾ $P<0.05$ 。

3.2 对大鼠结肠黏膜病理形态学的影响 正常组大鼠结肠黏膜上皮较完整,细胞排列规整,未见肠黏膜表皮细胞坏死脱落,固有层腺体亦无萎缩,黏膜下层未见明显改变;模型组大鼠结肠黏膜表皮细胞出现凋亡坏死,固有层毛细血管扩张充血,少量中性粒细胞浸润;氢氯噻嗪组大鼠结肠表皮细胞凋亡坏死,上皮细胞核大小排列及染色与正常组一致,固有层毛细血管扩张轻度充血,少量中性粒细胞浸润;车前子低、中剂量组结肠黏膜表皮细胞少量凋亡坏死,上皮细胞增生活跃,核大,深染,排列密集,少量中性粒细胞浸润,低剂量组毛细血管充血现象明显;车前子高剂量组大鼠结肠黏膜表皮细胞凋亡与坏死减轻明显,上皮细胞增生减轻,偶见核分裂,固有层充血以及中性粒细胞浸润均缓解。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 氢氯噻嗪组;D. 车前子低剂量;E. 车前子中剂量组;F. 车前子高剂量组(图2同)

图1 车前子对大鼠结肠黏膜病理形态学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Plantaginis Semen on pathomorphology of colonic mucosa in rats (HE, ×200)

3.3 对大鼠血清中 TNF- α , IL-6 和 CRP 含量的影响 与正常组比较,模型组血清中 TNF- α , IL-6 和 CRP 的含量均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,车前子各剂量组 TNF- α 和 CRP 的含量以及氢氯噻嗪 TNF- α 含量均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与氢氯噻嗪组比较,车前子中、高剂量组 TNF- α 和 CRP 的含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),低剂量组虽有降低趋势,但差异无统计学意义。车前子各剂量组之间比较,中、高剂量组 TNF- α 的含量低于低剂量组($P < 0.05$, $P < 0.01$);高剂量组 CRP

的含量低于低剂量组($P < 0.01$);高剂量组 TNF- α 和 CRP 的含量虽低于中剂量组,但差异无统计学意义。本研究中 IL-6 的含量,各用药组之间均未差异无统计学意义,说明车前子的抗炎作用主要与抑制 TNF- α 和 CRP 的分泌和释放有关,而对 IL-6 的影响较小。见表3。

表3 车前子对大鼠血清中 TNF- α , IL-6 和 CRP 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	CRP
正常	-	17.13±1.79	15.97±2.42	2.02±0.25
模型	-	25.65±2.42 ¹⁾	20.30±3.27 ²⁾	2.92±0.36 ¹⁾
氢氯噻嗪	0.009	21.15±1.87 ⁴⁾	20.52±5.84	2.63±0.26
车前子	0.95	19.83±1.79 ⁴⁾	20.22±3.59	2.51±0.28 ³⁾
	1.9	18.04±1.71 ^{4,6,7)}	19.36±4.56	2.26±0.34 ^{4,5)}
	3.8	17.15±1.47 ^{4,6,8)}	19.32±4.03	2.11±0.38 ^{4,6,8)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与氢氯噻嗪组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与车前子低剂量组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 对大鼠结肠组织 AQP4 蛋白表达的影响 结肠组织 AQP4 蛋白免疫荧光下阳性表达的产物为呈现绿光的颗粒,与正常组比较,模型组大鼠 AQP4 蛋白阳性表达强度明显减弱、范围明显减少,各用药组阳性表达强度明显增加、范围明显扩大,尤以车前子中、高剂量组变化为著。见图2。经软件分析,与正常组比较,模型组平均积分吸光度显著下降

($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组平均积分吸光度均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与氢氯噻嗪组比较,高剂量组显著增高($P < 0.01$);与低剂量组比较,高、中剂量组显著增高($P < 0.01$)。与中剂量组之间比较,高剂量组明显增高($P < 0.05$)。见表4。

3.5 对大鼠结肠组织 AQP4 mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 AQP4 mRNA 和

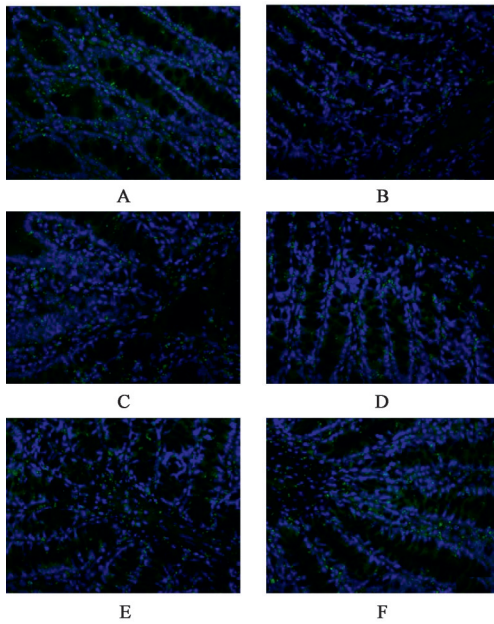


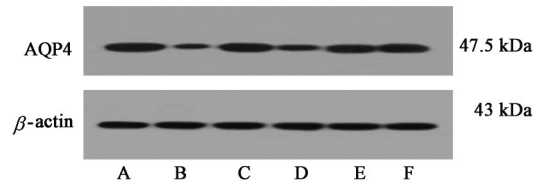
图2 车前子对大鼠结肠组织AQP4蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of Plantaginis Semen on expression of AQP4 protein in colon tissue of rats (IF,×400)

AQP4蛋白表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,各用药组AQP4 mRNA和蛋白的表达均显著升高($P<0.01$);与氢氯噻嗪组比较,中、高剂量组明显增高($P<0.01$),低剂量组差异无统计学意义。车前子各剂量组之间比较,高剂量组均高于低剂量组($P<0.01$),高剂量组高于中剂量组($P<0.01$)。见图3,表4。

4 讨论

腹泻为临床常见病、多发病,中医学认为其发病多由饮食所伤、情志失畅、外感寒湿等多种原因导致脾运失常,湿困中焦,湿浊下注于肠所致,湿邪为病因的关键,《景岳全书·泄泻》篇中明确提出泄泻多因水谷不分,其根本在于脾胃不运,则水反为湿,以致泄泻^[16]。《黄帝内经·素问·阴阳应象大论



A. 正常组;B. 模型组;C. 车前子高剂量组;D. 车前子低剂量组;E. 车前子中剂量组;F. 氢氯噻嗪组

图3 大鼠结肠组织中AQP4蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of AQP4 protein expression in colon tissue of rats

篇》曰:“湿盛则濡泻”,《医宗必读》亦强调“无湿不成泻”。古今诸多医家皆推崇以利小便为治泄泻必用之法,可收不止泻而泻自止之效^[17]。车前子因其能分清降浊而止泻,即利小便以实大便,为医家临证喜用之品。

番泻叶是腹泻模型中常用的导泻剂,其可刺激肠道,损伤肠黏膜,活化巨噬细胞及T细胞,引起炎症介质TNF- α 的合成和释放^[14-15,18],TNF- α 可促进炎症因子(如IL-1,IL-6等)分泌,损伤肠黏膜,致其水肿、充血并加重炎症反应^[19]。CRP是急性时相反应蛋白,为炎症反应评价的关键指标,在诊断损伤、感染等非特异性炎症反应方面有极高的价值^[20-21]。王东悦^[21]在双歧杆菌三联活菌散治疗感染性腹泻临床观察中发现患者治疗后血清中TNF- α ,CRP和IL-6的水平均下降。由此可见,炎症因子促进的肠道炎症反应与腹泻的发生、发展有密切联系。

结肠的主要功能是吸收水分和电解质,形成、贮存和排泄粪便。对水的吸收主要是跨细胞转运途径,与粪便的成形密切相关^[22]。AQPs通过调整结肠内生物膜的透水性,介导结肠肠腔内水的跨膜转运,是维持结肠正常水液代谢的分子学基础^[23]。AQP4主要表达于近端结肠的吸收细胞,据报道AQP4基因敲除小鼠其结肠对水分的吸收功能下降,粪便中水分明显增多,对肠道内水的重吸收具

表4 车前子对大鼠结肠组织AQP4 mRNA和蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Plantaginis Semen on expressions of AQP4 mRNA and protein in colonic tissue of rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP4 mRNA	AQP4/ β -actin	AA
正常	-	1.32±0.17	1.29±0.21	0.028±0.004
模型	-	0.14±0.02 ¹⁾	0.21±0.03 ¹⁾	0.011±0.002 ¹⁾
氢氯噻嗪	0.009	0.48±0.06 ³⁾	0.49±0.07 ³⁾	0.015±0.002 ²⁾
车前子	0.95	0.47±0.06 ³⁾	0.48±0.07 ³⁾	0.014±0.003 ²⁾
	1.9	0.69±0.07 ^{3,4,5)}	0.71±0.13 ^{3,4,5)}	0.018±0.003 ^{3,5)}
	3.8	0.94±0.10 ^{3,4,5,7)}	0.96±0.14 ^{3,4,5,7)}	0.022±0.004 ^{3,4,5,6)}

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与氢氯噻嗪组比较⁴⁾ $P<0.01$;与车前子低剂量组比较⁵⁾ $P<0.01$;与车前子中剂量组比较⁶⁾ $P<0.05$,⁷⁾ $P<0.01$ 。

有重要意义^[14]。李立胜等^[24]在腹泻模型大鼠给予洛哌丁胺治疗的实验中发现,治疗后大鼠升、降结肠中AQP4蛋白表达均高于模型组。刘洋等^[14]发现番泻叶灌胃建立的腹泻大鼠模型中,结肠AQP4 mRNA和蛋白表达均下调,结肠对水的重吸收能力下降,大便含水量升高。由此可见,AQP4在结肠的表达减少可导致结肠内水液代谢紊乱,是腹泻发生发展的重要因素。

本实验结果显示,大鼠灌胃番泻叶后,稀便率、平均稀便级和腹泻指数均明显升高,血清中TNF- α , IL-6, CRP含量均显著升高,结肠黏膜上皮细胞部分凋亡坏死,固有层毛细血管扩张充血,少量中性粒细胞浸润,结肠组织中AQP4 mRNA和蛋白表达水平明显降低,表明番泻叶可诱发结肠黏膜炎性损伤,AQP4表达量下降,水分吸收减少而致腹泻。车前子给药治疗后,大鼠的稀便率、平均稀便级和腹泻指数均显著降低,血清中TNF- α , CRP含量均明显下降,结肠黏膜上皮细胞凋亡坏死、毛细血管充血及中性粒细胞浸润现象明显减轻,结肠组织AQP4 mRNA和蛋白表达水平升高,表明车前子可通过抑制炎症反应、改善肠黏膜炎性损伤,上调AQP4 mRNA和蛋白表达,促进结肠对水分的吸收而达到止泻的目的,此可能是车前子止泻的作用机制之一。

[参考文献]

[1] 石芳,郝旭曼,刘阳,等. 胃肠安丸治疗功能性腹泻临床疗效评价[J]. 中医临床研究,2018,10(33):15-18.

[2] 谢明,杨爽爽,王亮亮,等. 中药车前子的研究进展[J]. 黑龙江医药,2015,28(3):474-476.

[3] 王大勇. 单味车前子治疗慢性腹泻2例[J]. 中国社区医师:医学专业,2012,14(8):275.

[4] 刘祺. 复方车前健脾利湿止泻散联合常规用药治疗小儿秋季腹泻临床研究[J]. 新中医,2019,51(9):171-173.

[5] 张鲜桃. 车前子汤治疗小儿腹泻[J]. 陕西中医学院学报,1993,16(3):8.

[6] 张桂花,孙焕明,段玉环. 山药车前子汤治疗泄泻113例疗效观察[J]. 河南中医药学刊,1994,9(1):51-52.

[7] 陈文锋,宋丽军,赵文昌. 水通道蛋白在腹泻中的研究进展[J]. 医学综述,2018,24(6):1041-1046.

[8] SUNDELL K S, SUNDH H. Intestinal fluid absorption in anadromous salmonids: importance of tight junctions and aquaporins[J]. Front Physiol, 2012, doi:

10.3389/fphys.2012.00388.

[9] 赵凯科,郑立,毛智斌,等. 水通道蛋白与胃肠道疾病关系研究进展[J]. 动物医学进展,2016,37(1):77-80.

[10] 武志娟,张志敏,张大鹏,等. 附子理中汤对腹泻型肠易激大鼠模型结肠组织中AQP8 mRNA表达水平的影响[J]. 中药材,2014,37(6):1046-1048.

[11] 谢婧,周祎青,郑锋玲,等. 温病湿热证动物模型中炎症因子与水通道蛋白表达的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2018,36(9):2163-2166.

[12] 张晶,陈志斌,王春娥,等. 基于气道炎症调控的全真一气汤干预肾气虚型哮喘大鼠的机制研究[J]. 中国中医急症,2019,28(8):1354-1357.

[13] 甘江华,黄珂璠,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.

[14] 刘洋,向丽华,孙刚,等. 五苓散对腹泻模型大鼠结肠AQP4及AQP4mRNA表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2012,18(5):547-549.

[15] 郭艳丽. 动物腹泻模型构建及进展[J]. 世界医学最新信息文摘,2015,15(44):38.

[16] 王珊珊. 四神汤加减治疗脾虚泄泻的疗效观察[J]. 中国疗养医学,2019,28(7):769-770.

[17] 李志轩,赵云,王汉岑. 利小便实大便治飧泄、洞泄、溏泄探讨[J]. 新中医,2015,47(4):330-331.

[18] 秦永照. 利福昔明治疗急性细菌感染性腹泻疗效的调查分析[J]. 浙江临床医学,2015,1(7):1139-1140.

[19] 张根民. 神曲消食口服液治疗小儿腹泻的疗效及其对IL-6、TNF- α 水平的影响[J]. 北方药学,2019,16(3):142-143.

[20] RETTIG T C, VERWIJMEREN L, DIJKSTRA I M, et al. Postoperative interleukin6 level and early detection of complications after elective major abdominal surgery [J]. Ann Surg,2016,263(6):1207-1212.

[21] 王东悦. 双歧杆菌三联活菌散对感染性腹泻患者IL-6、TNF- α 和CRP水平的影响[J]. 中国实用医药,2019,14(32):111-113.

[22] 杜丽军,雒军,吴国泰,等. 当归对血虚便秘模型小鼠结肠水通道蛋白4表达的影响[J]. 中药药理与临床,2017,33(5):103-107.

[23] 王杨,彪雅宁,张纳博,等. 车前子对腹泻大鼠小肠黏膜AQP1表达的影响[J]. 河北中医药学报,2020,35(2):5-8.

[24] 李立胜,王俊平. 洛哌丁胺对腹泻模型大鼠结肠水通道蛋白4表达的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2013,22(12):1225-1227.

[责任编辑 周冰冰]