

# 附子理中汤对脾阳虚大鼠 AQP4 的影响及其止泻机制

唐汉庆<sup>1</sup>, 韦祎<sup>2\*</sup>, 李晓华<sup>1</sup>, 劳传君<sup>1</sup>

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 海南医学院, 海口 571199)

**[摘要]** 目的: 观察附子理中汤对脾阳虚大鼠水通道蛋白 4 (AQP4) 的影响, 探讨附子理中汤止泻作用的机制。方法: Wistar 大鼠 100 只随机分为对照组、模型组、附子理中汤低、中、高剂量组 5 组, 每组 20 只。在模型组基础上, 低剂量组按 10 g·kg<sup>-1</sup> ig, 中剂量组按 20 g·kg<sup>-1</sup> ig, 高剂量组按 40 g·kg<sup>-1</sup> ig, 每天 1 次, 连续 4 周。取结肠标本, 酶联免疫法 (ELISA) 法检测 AQP4 含量, RT-PCR 法检测 AQP4 mRNA 表达。结果: 和对照组比较, 模型组的 AQP4 含量 (13.25 ± 4.22) ng·L<sup>-1</sup>、AQP4 mRNA 相对表达量 (0.38 ± 0.11) 均降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。和模型组比较, 附子理中汤中剂量组的 AQP4 含量 (23.84 ± 5.68) ng·L<sup>-1</sup>、AQP4 mRNA 相对表达量 (0.54 ± 0.26) 均升高 ( $P < 0.05$ )。和模型组比较, 高剂量组的 AQP4 含量 (28.98 ± 6.12) ng·L<sup>-1</sup>、AQP4 mRNA 相对表达量 (0.62 ± 0.32) 均显著升高 ( $P < 0.01$ )。结论: 附子理中汤能恢复脾阳虚大鼠 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 正常表达, 以高剂量的恢复作用较明显, 附子理中汤可能通过上调 AQP4 表达, 促进胃肠道黏膜对水液的重吸收而起到止泻的作用。

**[关键词]** 附子理中汤; 脾阳虚证; 水通道蛋白 4

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0222-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013120222

## Effect of Fuzi Lizhong Decoction on AQP4 in Rats with Spleen Yang Deficiency Syndrome and its Antidiarrheal Mechanism

TANG Han-qing<sup>1</sup>, WEI Yi<sup>2\*</sup>, LI Xiao-hua<sup>1</sup>, LAO Chuan-jun<sup>1</sup>

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;

**[收稿日期]** 20130113(010)

**[第一作者]** 唐汉庆, 从事中西医结合基础研究, E-mail: iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 韦祎, 从事中西医结合临床研究, E-mail: sue0900cn@163.com

- [5] Pitman R K, Orr S P, Shalev A Y, et al. Psychophysiological alterations in post-traumatic stress disorder [J]. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 1999, 4 (4):234.
- [6] Pitman R K, van der Kolk B A, Orr S P, et al. Naloxone-reversible analgesic response to combat-related stimuli in posttraumatic stress disorder[J]. *Apilot Study Arch Gen Psychiatry*, 1990, 47(6):541.
- [7] 胡燕, 洪敏. 柴胡类方治疗抑郁症研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(17): 247.
- [8] 原红霞, 韦彩柳, 程遥. 小柴胡汤抗抑郁作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15): 190.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta Ct</sup> method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402.
- [10] Fanselow M S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus [J]. *Behavioural Brain Research*, 2000, 110(1/2):73.
- [11] Feldman S, Weidenfeld J. Glucocorticoid receptor antagonists in the hippocampus modify the negative feedback following neural stimuli[J]. *Brain Res*, 1999, 821(1):33.
- [12] 貝谷久宣, 安田新, 土田英人. SSRI/SNRIにおける不安障害でのエビデンス[J]. *精神科*, 2002, 1 (2):140.
- [13] Dna B F, Matthew J F, Terence M K. PTSD 治療ガイドラインエビデンスに基づいた治療戦略[M]. 金剛出版, 2005:84.
- [14] Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage[J]. *PNAS*, 2008, 105(7): 2711.

[责任编辑 聂淑琴]

2. Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

**[ Abstract ] Objective:** To observe effect of Fuzi Lizhong decoction on aquaporin 4 (AQP4) in rats with spleen Yang deficiency syndrome and discuss its antidiarrheal mechanism. **Method:** One hundred Wistar rats were randomly divided into control group, model group, low-dose group, middle-dose group and high-dose group, 20 rats each group. low-dose group, middle-dose group and high-dose group were ig given with Fuzi Lizhong decoction according to 10, 20, 40 g·kg<sup>-1</sup> based on model group, once a day for four weeks. colon was collected as sample to examine content of AQP4 by ELISA method and expression of AQP4 mRNA by RT-PCR method. **Result:** Compared with control group, in model group both content of AQP4 (13.25 ± 4.22) ng·L<sup>-1</sup> and expression of AQP4 mRNA (0.38 ± 0.11) reduced ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with model group, in middle-dose group both content of AQP4 (23.84 ± 5.68) ng·L<sup>-1</sup> and expression of AQP4 mRNA (0.54 ± 0.26) increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, in high-dose group both content of AQP4 (28.98 ± 6.12) ng·L<sup>-1</sup> and expression of AQP4 mRNA (0.62 ± 0.32) increased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Fuzi Lizhong decoction could recover content of AQP4 and expression of AQP4 mRNA, and high dose had a better effect. Fuzi Lizhong decoction could up-regulate expression of AQP4 mRNA and promote gastrointestinal reabsorption of water, which perhaps are one of its antidiarrheal mechanisms.

**[ Key words ]** Fuzi Lizhong decoction; spleen Yang deficiency syndrome; aquaporin-4

《素问·至真要大论》指出“诸湿肿满,皆属于脾”。《难经》认为“湿多成五泄”,由于湿为阴邪,其性重浊,易伐阳气,如果脾胃阳气受损,升降失常,运化失司,水湿内停,易形成泄泻、水肿等,水通道蛋白(aquaporin, AQP)是细胞膜上与水通透密切相关的转运蛋白家族,目前已从哺乳动物体内发现有13种,与水液代谢联系最紧密的胃肠、肾是以AQP4<sup>[1]</sup>分布为主,笔者在以往研究<sup>[2]</sup>观察到附子理中汤下调脾阳虚大鼠肾脏AQP4 mRNA表达及降低AQP4含量,从而减少对水的重吸收,增加水液排出,提示这可能是其“利小便”的机制,结合这一研究结果,本实验工作通过检测脾阳虚大鼠结肠AQP4 mRNA表达及蛋白含量,探讨附子理中汤止泻作用,为“利小便而实大便”的论说提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 Wistar 大鼠 100 只,雌雄兼用,体质量 165 ~ 186 g,本院科学实验中心提供,动物许可证号 SCXK (桂)2011-0002。

**1.2 药物** 附子理中汤由炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草组成,实验所用单味药由本校药理教研室提供。经本院药理教研室鉴定:附子为毛茛科植物乌头(*Aconitum carmichaelii* Debx.)的子根;党参为桔梗科植物党参[*Codonopsis pilosula* (franch.) Nannf.]的干燥根;白术为菊科植物白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)的干燥根;干姜为姜

科植物姜(*Zingiber officinale* Rosc.)的干燥根茎;甘草为乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)的根。

**1.3 试剂和仪器** 乌拉坦(批号 20080610,国药集团化学试剂有限公司),氯仿批号 20110322、异丙醇批号 20100811、75%乙醇批号 102110(北京化学试剂公司),Trizol(Gibcobl 公司),AQP4 ELISA 试剂盒(批号 20110603,上海像代公司),M-MLV(Piomegan 公司),Tag 酶、DNAMark(北京博奥公司);AQP4 基因引物(Invitrogen 公司)。

AE160 型电子天平(瑞士 Mettler 公司),DY-89 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司),SONICS 型超声波细胞破碎机(USA),PK121R 型高速低温离心机(ALC 公司),MDF-U72V 型超低温冰箱(日本三洋公司),MK3 型酶标仪(Thermo Labsystem 公司),7900HT 型 PCR 仪(ABI 公司),DU530 型紫外分光光度计(Beckman 公司)。

## 2 方法

**2.1 附子理中汤制备** 炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草按照原方 3:5:4:3:2 的比例,诸药分开均先经蒸馏水浸泡 30 min,炮附子先煎 1 h,后纳入其余诸药,煎煮 2 次(40 min/次),期间将 2 次药液纱布过滤,合并,水浴加热浓缩至含生药量为 2 g·mL<sup>-1</sup> 的药液,灭菌,贮存于 4 °C 冰箱内备用。

**2.2 动物分组和造模** 大鼠随机分为 5 组,每组 20 只。对照组:普通饲料,自由饮水,常态环境喂养。模型组:施行肩胛骨间棕色脂肪组织(brown

adipose tissue, BAT) 切除术, 术后饲以高脂饲料 (83% 基本饲料, 15% 甘油三酯, 2% 胆固醇), 19 °C 环境喂养 3 周。附子理中低、中、高剂量组在模型组基础上, 附子理中汤按 10, 20, 40 g·kg<sup>-1</sup> ig, 每天 1 次, 连续 ig 4 周。4 周后第 1 天按 5 mL·kg<sup>-1</sup> ip 20% 的乌拉坦溶液麻醉并固定。大鼠腹部正中切开约 3 cm, 分离结肠, 取 3 cm 结肠作为标本。

**2.3 检测 AQP4 含量** 将结肠组织标本先用 PBS 洗涤, 除去多余血液, 匀浆超声破碎后放在 PBS 于 -20 °C 放置过夜, 再经过 2 次反复冻融破膜, 4 °C, 3 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 5 min, 取上清液 50 μL, 按照 (AQP4) ELISA 试剂盒说明在酶标仪波长为 450 nm 处测定吸光度 (A), 根据样品的 A 在标准曲线上计算其浓度。

**2.4 检测 AQP4 mRNA 表达** 取 100 μL 组织匀浆, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 氯仿和异丙醇抽提。紫外分光光度仪和琼脂糖电泳鉴定 RNA 的浓度和纯度, 取 10 μL 根据逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA, -70 °C 冻存备用。取 5 μL 逆转录产物进行 PCR 扩增反应, 并以 β-actin 为内对照。AQP4 基因引物由 Invitrogen 公司设计合成。PCR 反应条件: 64 °C 2 min→94 °C 4 min→(94 °C 15 s→70 °C 1 min) 共 35 个循环。β-actin 反应条件: 95 °C 30 s 变性, 56 °C 30 s 退火, 72 °C 4 min 延伸。具体序列及扩增长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度

| 基因      | 引物序列 (5'-3')           | 扩增长度/bp |
|---------|------------------------|---------|
| AQP4    | GCGCGAATCCGCTTAAGCCATC | 242     |
|         | AGCGGTAGCTTAACGTTAGCTC |         |
| β-actin | TCGAACGCATTAATGCGCGAC  | 262     |
|         | AGCGTCATTGACGTTAGGACT  |         |

PCR 扩增反应产物经 2% 琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 通过凝胶电泳分析系统读取目的基因灰度值, 将目的基因灰度值与 β-actin 基因灰度值的比值作为目的基因 mRNA 的表达量, 目的基因 mRNA 的表达量 = 目的基因灰度值/β-actin 基因灰度值。

**2.5 统计学处理** 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件包统计分析, 组间比较用 *t* 检验, 多组间用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般情况** 全部大鼠纳入统计分析, 没有脱落。

### 3.2 大鼠结肠组织 AQP4 含量及 AQP4mRNA 表达

与对照组比较, 模型组的 AQP4 含量及 AQP4 mRNA 相对表达量降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。与模型组比较, 附子理中汤中剂量组的 AQP4 含量及 AQP4 mRNA 相对表达量升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 附子理中汤高剂量组的 AQP4 含量及 AQP4 mRNA 相对表达量显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 附子理中汤对脾阳虚大鼠 AQP4 含量及 AQP4mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

| 组别    | 剂量 /g·kg <sup>-1</sup> | AQP4 /ng·L <sup>-1</sup>   | AQP4mRNA 相对表达量            |
|-------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 对照    | -                      | 32.21 ± 6.32               | 0.68 ± 0.38               |
| 模型    | -                      | 13.25 ± 4.22 <sup>2)</sup> | 0.38 ± 0.11 <sup>1)</sup> |
| 附子理中汤 | 10                     | 15.02 ± 4.52               | 0.42 ± 0.16               |
|       | 20                     | 23.84 ± 5.68 <sup>3)</sup> | 0.54 ± 0.26 <sup>3)</sup> |
|       | 40                     | 28.98 ± 6.12 <sup>4)</sup> | 0.62 ± 0.32 <sup>4)</sup> |

注: 与对照组比较<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>  $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

AQP4 是一种选择性水通透的内在膜蛋白, 具有高选择性、高通透率及自动调节机制, 目前研究<sup>[3]</sup>表明除水之外不转运其他小分子溶质并阻止离子通过, 以往的研究集中于 AQP4 与脑水肿的联系, 现在认为其与全身水液代谢有紧密联系, 特别是对消化道水液的重吸收有关键调节作用, 在胃肠道, AQP4 主要表达于近端结肠, AQP4 表达下调是引起腹泻的重要病理基础<sup>[4]</sup>。

中医学认为脾阳升清作用是水谷运化得以正常的前提, 如果脾阳虚弱, 则水液积聚引为湿邪, 导致泄泻等, 本实验工作沿用以往脾阳虚动物造模方法<sup>[5-6]</sup>, 参考有关脾阳虚大鼠造模文献和评价标准<sup>[7-8]</sup>, 采用 BAT 切除术, 由于 BAT 是成年动物主要的产热物质<sup>[9-10]</sup>, 切除 BAT 后, 减少大鼠产热物质, 大幅衰减其阳气, 而后采用高脂饮食并置大鼠于较低温度环境下, 模拟“肥甘厚腻”、“寒伤中阳”导致的脾虚, 使脾虚和阳虚症状同时具备, 从而制备了脾阳虚大鼠模型。由于脾虚的造模方法较多, 因此这一造模方法有待同仁的指正和实践的检验。

笔者以不同剂量的附子理中汤进行干预, 从实验结果观察到, 与对照组比较, 模型组的 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 相对表达量均降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 提示 AQP4 的异常可能是脾阳虚大鼠泄

泻的因素,这和一些研究结果是类似的<sup>[11-12]</sup>。和模型组比较,附子理中汤低剂量组对 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 相对表达量影响不明显,中剂量组升高 AQP4 含量并上调 AQP4 mRNA 表达( $P < 0.05$ ),高剂量组则显著升高 AQP4 含量并上调 AQP4 mRNA 表达( $P < 0.01$ ),接近对照组的水平,提示附子理中汤能恢复脾阳虚大鼠 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 正常表达,但恢复作用的强弱与剂量相关,以高剂量( $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )的恢复作用较明显,推测附子理中汤可能通过上调 AQP4 表达,促进胃肠道黏膜对水液的重吸收而起到“止泻”的作用。

明代医家李中梓在《医宗必读》提出治泻九法,淡渗、升提是其中重要方法,淡渗之法源于“治湿不利小便,非其治也”及“利小便而实大便”论说,升提是升阳止泻之义,笔者在以往的研究<sup>[2]</sup>通过建立脾阳虚大鼠模型,检测肾脏 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 表达,观察到模型组的 AQP4 含量、AQP4 mRNA 表达和对照组比较是升高的,以附子理中汤干预模型组后,AQP4 含量和 AQP4 mRNA 表达下降,上述结果似乎和本次实验结果有分歧,据推测这可能是因为附子理中汤作用的靶点不同,即肾脏和胃肠道的不同,附子理中汤作用于肾脏,其机制可能是下调 AQP4 表达、降低 AQP4 含量,减少对水的重吸收,增加水液排出体外,表现为“利小便”作用;附子理中汤作用于胃肠道,其机制可能是上调 AQP4 表达,促进胃肠道黏膜对水液的重吸收,表现为“实大便”即“止泻”作用。由此推测“利小便而实大便”的论说是具有微观物质基础的,体现中药复方多点起效、效应共聚的特征。

附子理中汤对肾脏和胃肠道 AQP4 含量及 AQP4 mRNA 表达的不同影响,可能和不同的信号转导通路有关,附子理中汤作用于肾脏下调 AQP4 表达、降低 AQP4 含量,其机制可能与第二信使 cAMP-蛋白激酶 A 信号转导通路有关<sup>[13]</sup>,作用于胃肠道,上调 AQP4 表达,其机制可能与 ANP-cGMP-蛋白激酶 G 通路有关<sup>[14]</sup>,这需要更多实验研究。

#### [参考文献]

[1] Terris J, Eelbarger C A, Marples D, et al. Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat

kidney[J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(6):F775.

- [2] 唐汉庆. AQP2 和 AQP4 在脾阳虚证动物中的表达及附子理中汤干预效应的生理机制[J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(增刊):248.
- [3] Nicchia G P, Nico B, Camassa L M, et al. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models[J]. *Neuro Science*, 2004, 129(4):935.
- [4] Wang K S, Ma T, Filiz F, et al. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin 4 water channels[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(2):G463.
- [5] 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.
- [6] 唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯以及总胆固醇的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15):212.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Smith R E, Horwitz B A. Brown fat tissue and thermogenesis [J]. *Physiol Rev*, 1969, 49(2):330.
- [10] Nicholls D G, Locke R M. Thermogenic mechanisms in brown fat [J]. *Physiol Rev*, 1984, 64(1):1.
- [11] 刘洋,苏凤哲,徐华洲,等.五苓散对腹泻模型小鼠结肠 AQP-4 mRNA 表达的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2005, 11(3):197.
- [12] 薛晓倩,黄学宽,高宁,等.藿香正气液对湿阻证大鼠结肠黏膜水通道蛋白 4 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(19):165.
- [13] Een P M, Verdijk M A, Knoers N V, et al. Requirement of human renal water channel aquaporin2 for vasopressin dependent concentration of urine [J]. *Science*, 1994, 264:92.
- [14] Gerbes A L, Nathrath W, Cantin M, et al. Presence of atrial natriuretic factor prohormone in enterochromaffin cells of the human large intestine [J]. *Gastroenterology*, 1991, 101:424.

[责任编辑 聂淑琴]