

# 痛泻要方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 结肠水通道蛋白 8 表达影响的机制研究

许惠娟, 刘慧慧, 滕超, 王艳杰, 王德山\*  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**[摘要]** **目的:**探讨痛泻要方治疗腹泻型肠易激综合征(D-IBS)模型大鼠的作用机制。**方法:**健康雄性 Wistar 大鼠 40 只随机分为正常组、模型组、中药组、药抗组,采用应激与束缚的方法 18 d 复制肠易激综合征模型,造模成功后中药组和药抗组大鼠给予中药 23.6 g·kg<sup>-1</sup>, ig 1 次/d, 连续 7 d, 药抗组第 4 天开始给予血管活性肠肽(VIP)受体拮抗剂 35 μg·kg<sup>-1</sup>, iv 1 次/d, 连续 4 d。检测大鼠粪便含水量,采用 RT-PCR 法和 SABC 免疫组化法检测结肠组织水通道蛋白 8(aquaporin 8, AQP8)的表达。**结果:**①大鼠粪便含水量:与正常组比较,模型组粪便含水量升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药组粪便含水量降低( $P < 0.01$ );药抗组粪便含水量与模型组差异无统计学意义。②结肠组织 AQP8:与正常组比较,模型组 AQP8 表达下调( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药组 AQP8 表达上调( $P < 0.01$ );药抗组 AQP8 表达与模型组差异没有统计学意义。**结论:**痛泻要方治疗 D-IBS 的药理学机制可能通过 VIP 途径调节 AQP8 的表达实现。

**[关键词]** 痛泻要方; 腹泻型肠易激综合征; 血管活性肠肽拮抗剂; 水通道蛋白 8

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0141-04

## Regulation of Tongxie Yaofang on Aquaporin-8 in Colon Tissue of Rats with Irritable Bowel Syndrome

XU Hui-juan, LIU Hui-hui, TENG Chao, WANG Yan-jie, WANG De-shan\*  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanism of Tongxie Yaofang (TXYF) in rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS). **Method:** Forty male Wistar rats were divided randomly into normal group, model group, TXYF group, antagonism group. The rat D-IBS model was established by binding stress for 18 d, after D-IBS model was established successful, TXYF group and TXYF + antagonism group were orally given TXYF at a dose of 23.6 g·kg<sup>-1</sup>, once a day for 7 d, meanwhile antagonism group was iv given vasoactive intestinal peptide (VIP) antagonist at a dose of 35 μg·kg<sup>-1</sup> for once a day 4 d after 4 d of being given TXYF. The water content in rat feces was determined. The method of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry was used to determine the expression of aquaporin-8 (AQP8) in colon tissue. **Result:** ① The water content in rat feces, compared with normal group, in TXYF group was higher ( $P < 0.01$ ), and compared with model group, in TXYF group the water content was significantly reduced ( $P < 0.01$ ), but in antagonism group no change was found. ② The colon expression level of AQP8, compared with model group, the expression of AQP8 in TXYF group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), but in antagonism group no change was observed. **Conclusion:** The mechanism of TXYF in treatment of D-IBS may be related to

**[收稿日期]** 20111021(005)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2007CB512702)

**[第一作者]** 许惠娟, 硕士研究生, 从事中医药对消化道神经内分泌功能影响的机制研究, Tel: 15040320229, E-mail: xuhuijuan2046@163.com

**[通讯作者]** \* 王德山, 教授, 博士生导师, 从事中医药对消化道神经内分泌功能影响的机制研究, Tel: 13889217511, E-mail: wdddss5768@yahoo.com.cn

regulating the secretion of VIP and up-regulating the AQP8 expression in colon tissue.

[Key words] Tongxie Yaofan; diarrhea irritable bowel syndrome; vasoactive intestinal peptide antagonist; aquaporin8

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以腹部不适或疼痛、大便性状异常等症状为一种常见胃肠道功能性疾病,其病因多与患者的精神状态、社会支持、饮食、生活应激等许多心理和社会因素有密切联系<sup>[1]</sup>。临床发现,中药复方痛泻要方对腹泻型 IBS 具有良好疗效<sup>[2]</sup>,但对痛泻要方的治疗机制尚不清楚。本研究通过建立大鼠腹泻型 IBS (diarrhea IBS, D-IBS)模型,观测痛泻要方对大鼠结肠组织的木通道蛋白 8(AQP8)的表达变化,并通过血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)受体拮抗剂阻断 VIP 的通路来验证 VIP 与水通道蛋白 8(aquaporin 8, AQP8)之间是否存在直接的联系,旨在从分子药理学角度探讨痛泻要方治疗腹泻型 IBS 的药理学机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重(200 ± 20)g,由中国医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(辽)2008-0005。

**1.2 药物** 痛泻要方煎剂制备 按原方比例:白术 9 g,白芍 6 g,陈皮 4.5 g,防风 3 g 进行配制(购于辽宁中医药大学附属医院药房)。将中药浸泡 30 min 后加水 10 倍煎煮 30 min,计 2 次,过滤液浓缩为含生药 2.36 g·mL<sup>-1</sup>,4 ℃冷藏备用。

**1.3 试剂** AQP8 抗体(ab15126,购于 Abcam 公司)、RT-PCR 试剂盒(DRR019A,购于大连宝生物工程有限公司);VIP 拮抗剂[Lys1, Pro2, 5, Arg3, 4, Tyr6](V2132 购自美国 Sigma-Aldrich 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 按照随机数字表法分为正常组、模型组、痛泻要方组(下称中药组)、痛泻要方 + VIP 受体拮抗剂(下称药抗组),每组 10 只。

**2.2 模型复制** 采用慢性应激结合束缚方法建立 D-IBS 动物模型<sup>[3]</sup>。18 d 循环接受 6 种不同的应激刺激:冷水游泳(14 ℃,5 min)、夹尾(180 s)、禁水(24 h)、禁食(24 h)、电击(电压 40 V,电击 5 s,间歇 5 s,共进行 120 s)、温箱(40 ℃,5 min),平均每种刺激用 3 次,同时每天用束缚小铁笼对大鼠束缚 1 h。依据文献成模标准进行评价<sup>[4,5]</sup>。

**2.3 给药** 按大鼠剂量换算,造模结束后痛泻要方按成人等效剂量 10 倍 ig 23.6 g·kg<sup>-1</sup>。中药组每天

上午 9 点给药,正常组和模型组给予相同量的生理盐水灌胃,总计治疗 7 d。药抗组,每天 ig 给痛泻要方 23.6 g·kg<sup>-1</sup> 1 次,连续 7 d,第 4 天开始给予 VIP 受体拮抗剂干预,剂量为 35 μg·kg<sup>-1</sup>,连续 4 d。

**2.4 大鼠粪便含水量的检测** 各组均在造模成功后开始收集大鼠粪便,先称量粪便湿重。然后将粪便放入烘干箱 20 min,称重并记录,再次放入烘干箱 5 min,称重并记录,重复此过程直至粪便质量不再变化,此时即为干质量。湿质量与干质量之差除以湿重即为粪便含水量。

**2.5 标本采集** 治疗结束后,20% 乌拉坦 30 mL·kg<sup>-1</sup> ip 麻醉,取距肛门 8 cm 处结肠全层 1 cm,4% 多聚甲醛固定 48 h 以上,备用;取距肛门 9 cm 处结肠全层 1 cm,用灭菌 EP 管保存,放置 -80 ℃冰箱,备用。

## 2.6 指标检测方法

**2.6.1 AQP8 的蛋白表达** 采用免疫组化方法。按 SABC 免疫组化法进行标记,操作步骤按试剂盒说明书进行。以出现清晰棕褐色颗粒为阳性。应用 BI-2000 图像分析系统,随机选取每张采集图像 3 ~ 5 个视野测定阳性反应物的平均吸光度(A)。

**2.6.2 AQP8 的 mRNA 表达** 以 β-actin 为内参,采用 RT-PCR 法。AQP8 上游引物:5'-ATGCTCTTGG TATTGGCTGTGTG-3',下游引物:5'-CCTGTCTCTTTT CTATGTGCT-3',扩增片段长度为 556 bp;β-actin 上游引物:5'-ACAGAGTACTTGCCTCAGGAG-3',下游引物:5'-TGTATGCCTCTGGTCTACCAC-3',扩增片段长度为 592 bp。琼脂糖凝胶电泳,用 WD-9413B3 凝胶成像分析仪进行摄像,Gelpro32 软件分析积分吸光度(IA)。

**2.7 统计学处理** 采用 SPASS 13.0 软件,多组间统计资料采用单因素方差分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示结果,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对大鼠一般状态与粪便含水量的影响** 实验过程中无动物死亡。与正常组相比,模型组动物均出现皮毛干枯、消瘦、精神萎靡、喜蜷缩、扎堆,大便变软或不成形,肛门部多有粪便黏附等。依据成模标准进行评价均达到了 D-IBS 模型标准<sup>[4,5]</sup>。经过一周治疗后,与模型组相比,中药组一般状态明显好转,腹泻已经完全治愈;药抗组变化不明显。结肠组

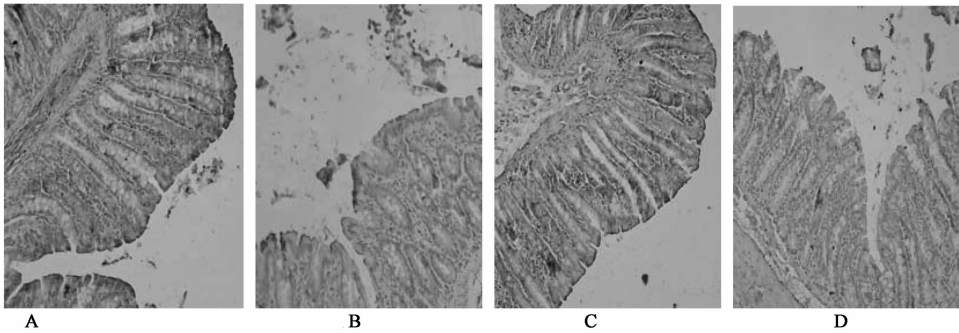
织 HE 染色结果表明,各组大鼠结肠黏膜均未见充血、水肿、溃疡及炎症细胞浸润等病理学改变。结肠黏膜层上皮细胞呈单层柱状,细胞排列整齐。

大鼠的粪便含水量检测结果:正常组的粪便含水量为(44.9 ± 2.8)%,模型组为(73.2 ± 9.1)%,中药组为(48.3 ± 3.1)%,药抗组为(74.7 ± 8.1)%,模型组的粪便含水量明显高于正常组( $P < 0.01$ )。经过治疗后,中药组与正常组粪便含水量基本一致。而药抗组的粪便含水量与模型组差异没有统计学意义。

### 3.2 对 D-IBS 模型大鼠结肠组织 AQP8 蛋白及 mRNA 的表达影响 大鼠结肠组织 AQP8 蛋白表达

如图 1 和表 1 所示,其阳性物表达部位主要在结肠黏膜层较多,在固有层细胞核周围也有少量表达。与正常组比较,模型组 AQP8 表达水平显著下调( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药组结肠组织 AQP8 表达水平显著上调( $P < 0.01$ )。药抗组与模型组之间差异无统计学意义。

AQP8 mRNA 的表达结果如表 1 和图 2 所示,与正常组比较,模型组 AQP8 mRNA 表达明显下调( $P < 0.01$ )。经过中药治疗后,与模型组比较,中药组结肠组织中 AQP8 mRNA 表达显著上调( $P < 0.01$ ),但是药抗组 AQP8 mRNA 与模型组差异没有统计学意义。



A. 正常组; B. 模型组; C. 痛泻要方 23.6 g·kg<sup>-1</sup>组; D. 药抗(痛泻要方 23.6 g·kg<sup>-1</sup> + VIP 拮抗剂 35 μg·kg<sup>-1</sup>)组

图 1 痛泻要方对 D-IBS 模型大鼠结肠组织 AQP8 阳性细胞表达影响(免疫组化, × 200)

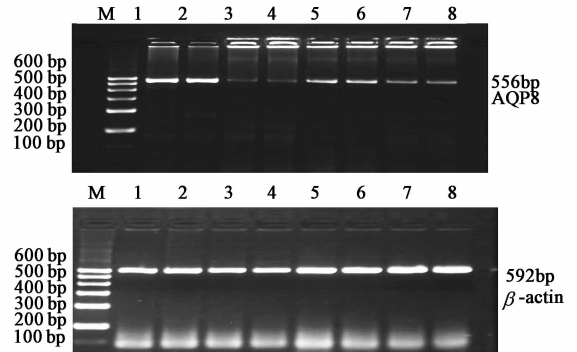
表 1 痛泻要方对 D-IBS 模型大鼠结肠组织 AQP8 的表达影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	AQP8 mRNA / $\beta$ -actin	AQP8 (A)
正常	-	0.71 ± 0.05	0.51 ± 0.01
模型	-	0.28 ± 0.02	0.34 ± 0.02
痛泻要方	23.6	0.62 ± 0.04 <sup>1,2)</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>
药抗	23.6(第4天施加 VIP 拮抗剂 35 μg·kg <sup>-1</sup> )	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.01

注:与模型组相比<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与药抗组(痛泻要方 23.6 g·kg<sup>-1</sup> + VIP 拮抗剂 35 μg·kg<sup>-1</sup>)相比<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

AQP8 作为哺乳动物水通道蛋白家族成员之一,其 cDNA 于 1997 年被克隆,包括 261 个氨基酸的编码序列,基因包括 5 个内含子和 6 个外显子。功能性研究证明 AQP8 为特异性的水通透蛋白,AQP8 对水的通透性具有高度选择性。Tsuji-kawa 等<sup>[6]</sup>检测 SD 大鼠的回肠和结肠 AQP mRNA 表达,发现 AQP8 mRNA 表达最明显,认为 AQP8 与肠道水的吸收与分泌关系比较密切。王德山等<sup>[7]</sup>检测



M. marker; 1~2. 正常组; 3~4. 模型组; 5~6. 痛泻要方 23.6 g·kg<sup>-1</sup>组; 7~8. 药抗(痛泻要方 23.6 g·kg<sup>-1</sup> + VIP 拮抗剂 35 μg·kg<sup>-1</sup>)组

图 2 痛泻要方对 D-IBS 模型大鼠结肠组织 AQP8 mRNA 表达影响

脾虚模型大鼠结肠的 AQP8 的 mRNA 表达和蛋白含量的变化时获得了同样的结果,AQP8 表达下调可能是脾虚大鼠产生腹泻症状的病理生理机制之一,其结果间接地支持了上述学者的观点。以上均表明,AQP8 在结肠水的转运方面具有重要的生理学作用,其表达异常可以引起腹泻或便秘。本实验中,

模型组大鼠结肠组织 AQP8 蛋白和 mRNA 表达与正常组相比均下降,与王晓玲等<sup>[8]</sup>的报道比较吻合。由此推测 D-IBS 模型大鼠出现腹泻的症状可能与 AQP8 表达降低相关。

痛泻要方又名白术芍药散,最早载于《丹溪心法》。该方由白术、白芍、陈皮、防风四药组成,主治脾虚肝旺之“痛泻”。根据以往的文献报道,痛泻要方或者是在本方基础上衍生的复方对 D-IBS 获得了比较好的治疗效果,但其治疗机制尚不明确。在本研究中,D-IBS 大鼠经过痛泻要方治疗 7 d 后,其结肠组织 AQP8 蛋白与 mRNA 较模型组表达量均有所提高,表明痛泻要方可以增加结肠组织 AQP8 的表达,由此不但促进了结肠内水的转运,同时由于结肠残存的水液减少还可能降低了结肠组织的高敏感性,从而达到减轻或缓解 D-IBS 的腹痛、腹泻等症状。

VIP 属于非胆碱能非肾上腺素能神经递质和脑-肠肽物质。Van Der Veek 等<sup>[9]</sup>研究发现,VIP 等胃肠激素参与了 IBS 的发生过程,其中 VIP 正是通过细胞蛋白激酶 A 系统来改变膜上 AQP 的含量,以调节跨膜水流动。调节方式主要通过“穿梭”机制使 AQP 在胞内贮存囊泡与质膜之间不断地循环,从而调节膜对水的通透性。文献报道与本课题组研究前期都发现痛泻要方可以降低大鼠结肠组织的 VIP 表达,由此推测痛泻要方可能通过 VIP 影响 AQP8 的表达,从而发挥疗效。本实验通过在痛泻要方治疗过程中给予 VIP 拮抗剂,比较痛泻要方组和药抗组之间 AQP8 的表达,来探讨 VIP 和 AQP8 之间的联系。实验结果表明,药抗组大鼠结肠组织 AQP8 的表达量与痛泻要方组比较出现有意义的降低,因此认为,痛泻要方可能通过 VIP 途径调节 AQP8 的表达而发挥作用。

本实验结果表明,在结肠组织中的 VIP 和 AQP8 之间是存在着联系的,但是具体的信号转导通路尚不清楚,还有待于进一步的实验验证。

#### [参考文献]

- [1] 周振理,袁红霞. 中西医结合胃肠病学[M]. 上海:华中科技大学出版社,2009:373.
- [2] 章宸,刘斌,郑虎占,等,痛泻要方药理作用和临床应用研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):223.
- [3] Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247.
- [4] 李丹,张锋雷,李任锋,等,匹维溴胺对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠组织 SP 含量的影响[J]. 辽宁医学院学报,2010,31(1):13.
- [5] 李东华,白霞,谢小磊,等,从脑肠互动的角度研究痛泻要方治疗肠易激综合征的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):118.
- [6] Tomoyuki Tsujikawa, Akihiko Itoh, Tetsuya Fukun, et al. Alteration of aquaporin mRNA expression after small bowel resection in the rat residual ileum and colon[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18:803.
- [7] 王德山,张宇. 脾虚模型大鼠结肠上皮细胞水通道蛋白 8 表达变化[J]. 中国中西医结合消化杂志,2008, 16(2):71.
- [8] 王晓玲,王俊平. 腹泻大鼠结肠水通道蛋白 8 表达的研究[J]. 中国药物与临床,2008,8(4):295.
- [9] Patrick P J, Van Der Veek, Biemond I, et al. Proximal and distal gut hormone secretion in irritable bowel syndrome[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2006, 41:170.

[责任编辑 聂淑琴]