

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.05.014

三仁汤对湿热应激小鼠肺组织黏蛋白 5AC、水通道蛋白 1、水通道蛋白 5 表达的影响

赖鹏华, 单晓梅, 卢大为*, 李鹏程, 王彦晖, 何宽其, 吴狄

(厦门大学医学院, 福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学医学院中医系, 361102)

摘要 目的 探讨三仁汤防治湿热环境下呼吸系统疾病的可能作用机制。方法 72 只小鼠随机分为空白组、模型组、三仁汤组, 每组 24 只。空白组普通环境喂养, 其余两组置入气候箱接受高温高湿刺激。三仁汤组小鼠于放入气候箱前、放入气候箱后第 12 h 分别予三仁汤 (浓度 1 g/ml) 0.2 ml 灌胃各 1 次, 空白组和模型组给予等量生理盐水灌胃。放入气候箱后第 12 h、24 h、4 天时每组取材 8 只, 检测肺组织黏蛋白 5AC (MUC5AC)、水通道蛋白 1 (AQP1)、水通道蛋白 5 (AQP5) 表达水平。结果 模型组第 24 h 时 MUC5AC 水平高于空白组, 三仁汤组第 12 h、24 h 时 MUC5AC 表达低于模型组 ($P < 0.05$)。三仁汤组第 12 h、24 h 时 AQP5 水平显著高于空白组, 第 24 h 时高于模型组 ($P < 0.05$)。各组第 4 天时 MUC5AC、AQP5 表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组不同时间点 AQP1 表达水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 三仁汤可能通过促进肺组织 AQP5 表达, 从而抑制 MUC5AC 分泌, 阻止湿热环境下呼吸系统疾病气道黏液高分泌状态进展。

关键词 湿热应激; 三仁汤; 黏液高分泌; 水通道蛋白; 黏蛋白

呼吸系统疾病的发生与气候尤其是气候骤变关系密切。流行病学研究结果显示, 高温高湿影响呼吸系统疾病发病率, 流行性感冒在我国北方流行高峰一般在冬季, 南方地区则全年有 2 个峰, 分别在 12 月和 7 月^[1], 因此, 高温高湿气候下呼吸系统功能防护研究具有重要意义。水通道蛋白 (aquaporins, AQP) 是小分子跨膜蛋白, 主要参与渗透压驱动下水的转运。研究发现, AQP 与湿热证关系密切^[2-3]。黏蛋白 5AC (MUC5AC) 是分布于气道杯状细胞的分泌型蛋白, 是气道黏液中最主要的分泌型蛋白。研究显示, 水通道蛋白 1 (AQP1)、水通道蛋白 5 (AQP5) 表达与 MUC5AC 表达呈负相关^[4-5]。本课题前期实验发现, 健康小鼠置入湿热环境 12~24 h, 气道 MUC5AC、AQP5 发生变化, 呈气道黏液高分泌状态^[6], 是气道慢性炎症性病变的共同特征, 与慢性支气管炎、哮喘、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病等密切相关^[7]。本研究通过观察三仁汤对湿热应激小鼠肺组织 MUC5AC、

AQP1、AQP5 表达的影响, 初步探讨三仁汤防治湿热环境下呼吸系统疾病的可能作用机制, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物

健康清洁级 BABL/c 小鼠 72 只, 4 周龄, 体重 18~20 g, 由厦门大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号: 2013012001。

1.2 药物

三仁汤组成: 苦杏仁 15 g, 滑石 18 g, 通草 6 g, 白蔻仁 6 g, 竹叶 6 g, 厚朴 6 g, 薏苡仁 18 g, 法半夏 15 g, 由厦门大学医院中药房提供, 制成浓度 1 g/ml 溶液。

1.3 试剂及仪器

小鼠免疫组化一抗 (批号: SA00001-2), 购于武汉三鹰生物技术有限公司; 二抗: MUC5AC 抗体 (批号: ab3649)、AQP1 抗体 (批号: ab15080)、AQP5 抗体 (批号: ab104751) 试剂盒均购于 Abcam 公司; 10% 山羊血清 (批号: C0265) 购于上海碧云天生物科技有限公司。PRX-1000B 人工气候箱 (宁波赛福仪器有限公司),

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81302876); 福建省自然科学基金 (2013J05123)

* 通讯作者: ludawei@xmu.edu.cn, (0592) 2183069

GNP-9080 恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),CX41 显微镜(奥林巴斯有限公司),RM2016 转轮式切片机(德国徕卡显微系统有限公司)。

1.4 动物分组、造模及给药

72 只 BABL/c 小鼠普通环境下(温度 22 ~ 24℃,相对湿度 65%)适应性喂养 1 周后按随机数字表法分成空白组、模型组、三仁汤组,每组 24 只。空白组继续普通环境饲养。模型组、三仁汤组置于人工气候箱给予湿热刺激,人工气候箱设置为湿度(95 ± 5)% ,温度(33 ± 0.5)℃^[8]。三仁汤组放入气候箱前及放入气候箱后第 12 h 分别予三仁汤 0.2 ml 灌胃各 1 次。空白组和模型组给予等量生理盐水灌胃。

1.5 观察指标及方法

各组小鼠分别在放入气候箱后第 12 h、24 h、4 天时分别处死 8 只,小鼠后迅速开胸,取右肺中叶用生理盐水清洗后浸入 10% 中性甲醛中固定 24 h,脱水、包埋,制成蜡块,切片。采用过氧化物酶标记的链酶卵白素(SP)染色法,切片经常规脱蜡、水化后,用 3% 过氧化氢除去内源性的过氧化氢酶,柠檬酸缓冲液,高压修复 3 min,10% 山羊血清 37℃ 封闭 0.5 h。依次加入一抗、二抗、SP、显色剂,然后复染;脱水、封片、拍照。最后用 Image Pro Plus 6.0 图像系统分别计量 MUC5AC、AQP1、AQP5 阳性表达(棕黄色)的累积光密度(IOD),每张切片均选取上、下、左、右、中间共 5 个不连续视野(×400),取平均值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 进行统计学描述和分析。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较均采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织 MUC5AC 水平比较

表 1 示,与空白组同时间比较,模型组 MUC5AC 水平在第 24 h 时显著升高,并且高于本组第 12 h 和第 4 天时($P < 0.05$)。与模型组同时间比较,三仁汤组在第 12 h、24 h 时 MUC5AC 水平明显升高($P < 0.05$)。三仁汤组各时间点 MUC5AC 水平比较差异均无统计学意义,与空白组同时间比较差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠肺组织 AQP1、AQP5 水平比较

表 2 示,各组组内不同时间点 AQP1 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);各组不同时间点组间比较 AQP1 水平比较差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。模型组在 12 h 时 AQP5 水平显著高于本组第 24 h、第 4 天($P < 0.05$);三仁汤组在 12 h、24 h 时 AQP5 水平均显著高于第 4 天($P < 0.05$)。与空白组同时间比较,模型组、三仁汤组第 12 h 时 AQP5 水平显著高于空白组,三仁汤组第 24 h 时 AQP5 水平显著高于空白组和模型组($P < 0.05$)。第 4 天时,各组组间比较 AQP5 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

“三因制宜”是中医学重要的疾病防治指导思想,因地理、气候差异导致病因不同是其立论重要依据。《素问·阴阳应象大论》言“天气通于肺”,说明气候为病,肺首当其冲。因此,临床中呼吸系统疾病发生发展受气候影响巨大。在江浙、岭南等地,因地理气候环境原因,高温高湿天气多见,如释继洪《岭南卫生方》云:“岭南既号炎方

表 1 各组小鼠肺组织不同时间点 MUC5AC 水平比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 12 h	第 24 h	第 4 天
空白组	8	33943.13 ± 11053.88	32820.50 ± 9172.86	36663.00 ± 6665.25
模型组	8	37590.00 ± 12495.32 [▲]	57094.38 ± 15614.55 [*]	34102.00 ± 5705.90 [▲]
三仁汤组	8	24323.25 ± 7404.32 [△]	22493.75 ± 12124.00 [△]	31962.63 ± 10509.30

注: MUC5AC, 黏蛋白 5AC; 与空白组同时间点比较, $* P < 0.05$; 与模型组同时间点比较, $\Delta P < 0.05$; 与本组第 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组小鼠肺组织不同时间点 AQP1、AQP5 水平比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AQP1			AQP5		
		第 12 h	第 24 h	第 4 天	第 12 h	第 24 h	第 4 天
空白组	8	31601.00 ± 8379.54	31131.00 ± 4347.15	29855.00 ± 10093.80	31023.00 ± 5116.58	31975.88 ± 8277.41	31841.75 ± 8349.97
模型组	8	31131.00 ± 4347.15	37272.38 ± 11907.33	35015.88 ± 9274.96	45478.00 ± 9488.99 [*]	35923.28 ± 4971.18 [▲]	34082.13 ± 2427.65 [▲]
三仁汤组	8	29855.00 ± 10093.80	34602.00 ± 7994.22	32967.75 ± 13818.53	42366.63 ± 3119.32 [*]	44561.25 ± 13407.07 ^{*△}	31274.88 ± 5243.0 ^{▲#}

注: AQP1, 水通道蛋白 1; AQP5, 水通道蛋白 5; 与空白组同时间点比较, $* P < 0.05$; 与模型组同时间点比较, $\Delta P < 0.05$; 与本组第 12 h 比较, $\Delta P < 0.05$; 与本组 24 h 比较, $\# P < 0.05$

而又濒海,地卑而土薄。炎方土薄故阳燠之气常泄,濒海地卑故阴湿之气常盛”。因此,高温高湿天气影响呼吸系统功能及疾病的发生发展的机理和防治研究具有重要临床意义。

现代研究发现,AQPs与湿热证关系密切,在以湿热环境干预为主,加生物因子和高脂饮食等复合因素所致的湿热证中,各脏腑AQPs均发现改变,如吴仕九等^[9]研究发现,湿热证大鼠肾内髓及尿液水通道蛋白2(AQP2)的含量较正常组明显降低;常丽萍等^[10]研究发现,湿热证大鼠舌组织AQP5表达较正常组明显增加。在慢性支气管炎、哮喘、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病等气道慢性炎性病变性疾病中气道黏液均呈高分泌状态,而黏蛋白是决定气道黏液弹性、黏性最主要的成分,其中MUC5AC是病理性增加的主要黏蛋白表型^[11]。熊本强等^[12]研究显示,随着臭氧应激的气道高反应大鼠肺组织AQP1 mRNA和蛋白水平表达的下降,黏液分泌量明显增多,MUC5AC的表达也增多。本研究中模型组在置入湿热环境后第12 h AQP5升高,第24 h MUC5AC升高,而AQP5下降至正常;AQP1则在置入湿热环境4天内均无明显变化。从结果推测,MUC5AC在第12 h未升高与AQP5的负性调节作用相关。AQP5增高而AQP1未见明显变化,可能与本研究观察对象为健康小鼠,非病理模型小鼠,自身适应调节能力较强,但AQP5除调节水液代谢外,还是气道高反应的易感基因之一^[13],对外界刺激敏感,因而较早出现反应相关。置入湿热环境4天后模型组小鼠MUC5AC、AQP5表达水平均回复至正常水平,考虑原因如下:1)本实验设置温度为(33±0.5)℃,温度可能较低,刺激量较小。2)本实验观察对象为健康小鼠,非疾病模型小鼠,抵抗力较强,小鼠能迅速适应环境变化,产生习服。

三仁汤出自温病大家吴鞠通《温病条辨》,为湿温初起而设,具有宣肺化湿之效,是治疗上焦湿热证的代表方。既往研究^[14-15]显示,三仁汤对湿热组、湿偏重组大鼠尿液中AQP2的降低有调节作用;三仁汤能降低脾胃湿热证小鼠肾脏AQP3表达,恢复机体正常的水液代谢平衡。本研究结果显示,三仁汤组小鼠在置入湿热环境第12、24 h气道MUC5AC蛋白表达水平均低于模型组,AQP5表达水平则均高于空白组,提示三仁汤能促进AQP5表达,从而抑制MUC5AC分泌,阻止气道黏液高分泌发展。第4天,三仁汤组AQP5表达水平恢复至正常水平,考虑可能与药效持续时间已过有关。

综上,三仁汤能有效阻止湿热环境早期应激诱发的气道黏液高分泌状态发展,其机制可能与上调AQP5水平,从而抑制MUC5AC高分泌有关。

参考文献

- [1] 徐红. 2002~2003年中国南、北方地区流感监测分析[J]. 世界感染杂志, 2003, 3(4): 282-285.
- [2] 吴仕九, 廖礼兵. 湿热证大鼠肾内髓及尿液中水通道蛋白AQP2含量的变化[J]. 中国中医药科技, 2003, 10(1): 4-5.
- [3] 韦嵩, 劳绍贤, 黄志新, 等. 湿热因素对大鼠胃黏膜水通道蛋白3.4基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(6): 34-36.
- [4] 陈智鸿, 沈瑶, 董春玲, 等. 水通道蛋白敲除对支气管哮喘小鼠气道黏蛋白谱表达的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(23): 1409-1412.
- [5] 熊本强, 李翔, 李喜兵, 等. 水通道蛋白1对气道高反应大鼠黏液高分泌的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2012, 9(1): 6-10.
- [6] 赖鹏华, 单晓梅, 卢大为, 等. 湿热应激和习服对小鼠气道黏液分泌的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(3): 266-269.
- [7] NADEL JA. Mucous hypersecretion and relationship to cough[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(5): 510-513.
- [8] 赖鹏华, 林培政, 王晓萍, 等. 流感病毒性肺炎湿热证小鼠TLR-7介导信号通路的变化[J]. 中医杂志, 2011, 52(17): 1489-1491.
- [9] 吴仕九, 廖礼兵. 湿热证大鼠肾内髓及尿液中水通道蛋白AQP2含量的变化[J]. 中国中医药科技, 2003, 10(1): 4-5.
- [10] 常丽萍, 阙铁生, 吕军影, 等. 加味藿朴夏苓汤对温病湿热证大鼠舌组织AQP-5的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(9): 2458-2461.
- [11] HOVENBERG HW, DAVIES JR, HERRMANN A, et al. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions[J]. Glycoconj J, 1996, 13(5): 839-847.
- [12] 熊本强, 李翔, 李喜兵, 等. 水通道蛋白1对气道高反应大鼠黏液高分泌的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2012, 9(1): 6-10.
- [13] KRANE AM, FORTNER CN, HAND A, et al. Aquaporin-5-deficient mouse lungs are hyperresponsive to cholinergic stimulation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 14114-14119.
- [14] 文小敏, 谭永振. 三仁汤对脾胃湿热证、湿偏重组大鼠尿液中AQP2的影响[J]. 湖南中医杂志, 2008, 24(2): 91-93.
- [15] 万滢聪, 吴泽徐, 翁雪荣, 等. 三仁汤对脾胃湿热证小鼠Aquaporin-3的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(10): 2348-2350.

Effect of *Sanren Tang* (三仁汤) on Mucin 5AC, Aquaporin 1 and Aquaporin 5 in Lung Tissue of Damp-heat Stressed Mice

LAI Penghua, SHAN Xiaomei, LU Dawei, LI Pengcheng, WANG Yanhui, HE Kuanqi, WU Di

(Medical College of Xiamen University, Xiamen, 361102)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Sanren Tang* (三仁汤) in preventing and treating respiratory diseases under damp-heat circumstances. **Methods** Seventy-two mice were randomized into blank group, model group and *Sanren Tang* group, with 24 mice in each group. The blank group was fed under conventional environment, while the other two groups were put into climate chamber with high temperature and high humidity. The *Sanren Tang* group was given *Sanren Tang* (1 g/ml 0.2 ml) by gavage before and at the 12th hour of being put into climate chamber. The blank group and model group were given equivalent normal saline by gavage. At the 12th, 24th hour and on the 4th day after being put into climate chamber, eight mice in each group were selected to draw materials, and the levels of mucin 5AC (MUC5AC), aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 5 (AQP5) were detected. **Results** The 24th-hour MUC5AC level in the model group was higher than that in the blank group; the MUC5AC level at the 12th and the 24th hour in *Sanren Tang* group was respectively lower than that in the model group ($P < 0.05$). In *Sanren Tang* group, the AQP5 level at the 12th and the 24th hour was significantly higher than that in the blank group, and at the 24th hour, it was higher than that of the model group ($P < 0.05$). On the 4th day, there was no significant difference of MUC5AC level and AQP5 level among groups ($P > 0.05$). In each group, there was no significant difference of AQP1 level at different time points ($P > 0.05$). **Conclusion** By promoting the expression of AQP5 in lung tissue, *Sanren Tang* may inhibit the secretion of MUC5AC, and prevent the airway mucus hypersecretion in respiratory diseases under damp-heat circumstances.

Keywords damp-heat stress; *Sanren Tang* (三仁汤); mucus hypersecretion; aquaporin; mucin

(收稿日期: 2016-07-06; 修回日期: 2016-10-20)

编辑: 王利芬

欢迎订阅 2017 年 《中国针灸》杂志 (月刊), 《针刺研究》杂志 (双月刊)

两刊均为中国针灸学会、中国中医科学院针灸研究所主办的针灸学术权威期刊, 均已成为中国科技核心期刊、中文核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 来源期刊 (核心库)。《中国针灸》为中国精品科技期刊、百种中国杰出学术期刊。全面报道国内、国外针灸学科的最新研究成果。《中国针灸》报道以临床为主, 介绍临床有效治疗方法、专家经验、特色疗法等, 提供继续教育培训、技能培训、学术会议、医疗药品器械信息。《针刺研究》报道以基础研究为主, 反映针灸机制探讨最新进展及研究现状。实为针灸科研、医务工作者及针灸爱好者订阅之首选。

2017 年《中国针灸》杂志每册 25 元, 全年 300 元, 邮发代号: 2-53 《针刺研究》杂志每册 25 元, 全年 150 元, 邮发代号: 82-171。在全国各地邮局均能订阅。

如当地邮局订阅困难者, 请直接与中国中医科学院针灸研究所期刊中心发行部联系, 或到我部淘宝网店购买, 淘宝网店铺名称: 针灸广发。地址: 北京东直门内南小街 16 号, 邮编: 100700。电话: 010-84046331, 010-64089349。E-mail: zhenjiuguangfa@aliyun.com

《中国针灸》网址: www.cjcupuncture.com, E-mail: zhenjiubj@vip.sina.com

《针刺研究》网址: www.zhencianjiu.cn, E-mail: zcyj2468@sina.com

《中国针灸》微信公众平台

