

湿阻中焦证模型胃肠水通道蛋白 2 的表达分布谱及平胃散的干预作用

彭 晋¹ 王 良² 黄秀深^{1*} 陈 钢¹

(1. 成都中医药大学基础医学院, 四川省成都市温江区柳台大道 1166 号, 611137; 2. 四川省安岳县中医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973713)

* 通讯作者: jcb17747@sina.com, 13608031734

[摘要] 目的 探讨平胃散对湿阻中焦证模型的干预作用机制。方法 SD 大鼠 50 只, 随机分空白组、空白给药组、模型组、平胃散组和自然恢复组, 每组 10 只。模拟外湿过盛、饮食不节、情志不遂三大致湿病因, 建立湿阻中焦证模型。空白给药组和平胃散组给予平胃散汤剂灌胃 10ml/kg, 空白组和自然恢复组给予 0.9% 生理盐水灌胃 10ml/kg, 3 天后取材。用免疫组化技术测定胃肠组织 AQP2 的分布, 用酶联免疫法测定胃肠组织 AQP2 的含量。结果 模型组大鼠 AQP2 在胃体中间黏膜、大肠中段黏膜下组织表达减少, 在小肠中段组织、大肠黏膜、大肠末端黏膜下组织表达增加。平胃散增强湿阻中焦证胃体中间黏膜、大肠中段的黏膜 AQP2 的表达, 抑制湿阻中焦证大肠中段黏膜下组织 AQP2 的表达。结论 AQP2 在湿阻中焦证胃肠特征性表达分布谱可能是湿阻中焦证的分子基础之一; 平胃散对其表达的干预可能是该方治疗湿阻中焦证的分子机理之一。

[关键词] 湿阻中焦证; 水通道蛋白 2; 平胃散; 动物模型

Expressional Distribution Spectrum of Aquaporin 2 in Gastrointestinal Tissue of Animal Models with Damp Retention in the Middle Jiao Syndrome and Intervention by Pingwei Powder

PENG Jin¹, WANG Liang², HUANG Xiushen¹, CHEN Gang¹

(1. College of Preclinical Medicine, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 611137; 2. Anyue TCM Hospital of Sichuan Province)

ABSTRACT Objective To study the effect and mechanism of Pingwei Powder (Powder for gastrointestinal diseases) on TCM syndrome of damp retention in the middle jiao (energizer). **Methods** Fifty SD rats were randomized into blank group, blank group with medication, model group, Pingwei Powder group, and natural recovery group, with 10 in each. The models of damp retention in the middle jiao syndrome were prepared with the imitated pathogenic factors including excessive exogenous damp, improper food-intake, and emotional stress. Pingwei Powder Decoction was given to the Pingwei Powder group and blank medication group 10mg/kg by gastric perfusion; normal saline 10mg/kg was given to the blank group and natural recovery group. Samples were collected 3 day later. The immunohistochemical technique was used to measure the distribution of aquaporin 2 (AQP2) in the gastrointestinal tissues, and the enzyme-linked immunosorbent assay was adopted to measure its content. **Results** In the model rats of damp retention in the middle jiao syndrome, the AQP2 expression in the intermucosa of body of stomach and the submucous tissue in the middle part of large intestine was decreased, while in the tissues of middle part of small intestine, the mucosa of large intestine, and the submucous tissue in the ending part of large intestine it was increased. Pingwei Powder made the AQP2 expression in the intermucosa of body of stomach, the mucosa of the middle part of large intestine, and the submucous tissue in the ending part of large intestine enhanced and its expression in the submucous tissue of the middle part of large intestine inhibited. **Conclusion** The expressional distribution spectrum of AQP2 with its pathological characteristics in the gastrointestinal tissue may be one of the molecular bases in the damp retention in the middle jiao syndrome. The intervention of Pingwei Powder on its expression may be one of the molecular mechanisms of this formula in treating this syndrome.

Key Words damp retention in the middle jiao syndrome; aquaporin 2 (AQP2); Pingwei Powder (Powder for gastrointestinal diseases)

湿阻中焦证的发生与人体津液代谢失衡密切相关。红细胞和某些上皮细胞在渗透压梯度存在时, 其水通透性远超出简单扩散强度。水通道蛋白

(AQP) 是人红细胞膜上的一种主要蛋白质, 可以使红细胞快速膨胀和收缩以适应细胞间渗透压的改变^[1]。AQP 在机体水液转运和代谢中起重要作用

的,在微观水平细胞膜上转运水的水通道蛋白家族(AQPs)与湿的病理生理息息相关^[2]。可见,湿阻中焦证产生与 AQP 表达异常有关,本实验探讨湿阻中焦证动物模型胃肠组织水通道蛋白 2(AQP2)的分布和含量以及平胃散的干预作用,揭示湿阻中焦证动物模型 AQP 病理特征性表达分布谱。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 50 只,清洁级,雌雄各半,体重 180~220g,由成都中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(川)2004-11。适应性饲养 5 天,自由摄食全价颗粒饲料,室内温度维持在 18~25℃。

1.2 药物制备

平胃散(由苍术 24g、厚朴 18g、陈皮 12g、炙甘草 6g 组成),均购自同仁堂成都分店,经成都中医药大学制剂室鉴定合格。先将药物浸泡 1h,然后与大枣 2 枚、生姜 2 片一同煎煮,最后浓缩成浓度为 1g/ml 生药的药液。

1.3 试剂

PBS 缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司);兔 SP 检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:701323A);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:614846A);AQP2(北京博奥森生物技术有限公司,bs-0261R,批号:019806)。

1.4 仪器

自制造模箱;RM2245 切片机、Hi1220 烤片机、Hi1210 摊片机、EG1160 包埋机(均为德国 Leica 公司);酶标定量测定仪(美国 Thermo Fisher 公司);XSZ-H 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);DY89-2 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.5 造模分组及给药

SD 大鼠 50 只,按简单随机法随机选取 20 只常规饲养,其余大鼠模拟外湿过盛、饮食不节、情志不遂三大致湿病因,建立湿阻中焦证模型^[3]。将造模大鼠置于温度 18~25℃,湿度(90±5)%的造模箱内饲养,模拟“久居湿地,外湿过盛”;造模大鼠单日常禁食并予以 4℃ 冰水(2ml/只)灌胃 1 次,双日供应充足饲料并予以猪油(4ml/只)灌胃 1 次,模拟“饮食不节,饥饱失常”;每日 9:00~16:00 令大鼠站在 4cm 深的水中(即向鼠笼里加入 4cm 深的水,大鼠

四肢着地),控制睡眠时间 7h,打乱其生物钟,模拟“情志不遂”。连续 20 天。

造模结束当日,常规饲养的 20 只大鼠按随机数字表法分为空白组和空白给药组各 10 只,造模大鼠分为湿阻中焦证模型组(模型组)、平胃散治疗组(平胃散组)和自然恢复组,每组 10 只。并把模型组大鼠处死取材。次日空白给药组和平胃散组大鼠给予平胃散汤剂灌胃(10ml/kg),同时空白组和自然恢复组给予 0.9%生理盐水灌胃(10ml/kg),3 天后处死取材。

1.6 指标检测

1.6.1 组织取材 取胃贲门(从贲门中间分开,右侧固定)、胃体中间(右侧 1/3 固定)、小肠中段(取距幽门 16~21cm 之间,16~18cm 固定)、大肠中段(取距盲端 6~11cm 之间,6~8 固定,8~11cm 刮黏膜保留黏膜下组织)、大肠末端(取距肛门 5cm,0~2.5cm 去黏膜保留黏膜下组织,2.5~5cm 固定),将以上组织剪开平坦于滤纸上,要固定的用 15%的中性甲醛(PBS 配制)固定 48h,脱水,包埋,4℃ 保存待用。

1.6.2 AQP2 测定 采用 BOSTER 免疫组化检测试剂盒(SA2002,浓缩型)检测 AQP2 分布。形态学评分标准^[4]:分 5 级强度,(-)表示阴性,无表达;(±)表示略阳性,似有表达;(+)表示阳性范围小,有表达;(++)表示阳性范围近一半,表达明显;(+++表示阳性分布接近整个区域,表达十分明显。大肠中段、大肠末端黏膜下组织称重,(1:9)匀浆、离心(2500r/min,20min)、抽取上清液存于-80℃冰箱待测。酶联免疫法(ELISA)测定 AQP2 含量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠胃肠组织 AQP2 的分布

表 1 示,空白组大鼠 AQP2 分布在胃和大肠的黏膜,胃贲门和大肠的外膜。模型组大鼠 AQP2 在胃体中间黏膜分的布减少,在小肠中段和大肠的黏膜增加,在小肠中段的肌层和外膜增加。自然恢复组大鼠 AQP2 在胃体中间黏膜的分布更加减少,在小肠中段和大肠黏膜减少,在小肠中段肌层和外膜减少。平胃散组大鼠 AQP2 在胃体中间黏膜的分布增加;与自然恢复组比较,在大肠中段黏膜的分布有所增加。

表 1 胃肠组织 AQP2 的分布

组别	胃贲门		胃体中间		小肠中段		大肠中段		大肠末端	
	黏膜	外膜	黏膜	外膜	黏膜	外膜	黏膜	外膜	黏膜	外膜
空白组	+++	±	++	-	-	-	+	±	++	±
模型组	+++	±	±	-	+++	±	++	±	+++	±
平胃散组	+++	±	+++	±	++	-	+	±	++	±
空白给药组	++	±	+++	±	-	-	+	±	++	±
自然恢复组	+++	±	-	-	++	-	±	±	++	±

2.2 各组大鼠胃肠组织 AQP2 表达水平比较

表 2 示,与空白组比较,模型组和空白给药组的大肠中段黏膜下组织 AQP2 的水平均降低($P < 0.05$);与模型组比较,平胃散组和自然恢复组的大肠中段黏膜下组织 AQP2 的表达水平均降低,且平胃散组差异有统计学意义($P < 0.05$)。与自然恢复组比较,平胃散组的大肠中段黏膜下组织 AQP2 的水平有降低趋势。

表 2 各组大鼠大肠组织 AQP2 表达水平比较(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	大肠中段黏膜下组织	大肠末端黏膜下组织
空白组	10	215.93±33.29	112.93±8.42
模型组	10	176.05±36.19*	167.56±20.84**
平胃散组	10	142.92±20.23△	162.11±28.73
空白给药组	10	147.80±20.66*	141.93±16.50*
自然恢复组	10	166.48±36.46	155.47±18.23

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$

与空白组比较,模型组和空白给药组的大肠末端黏膜下组织 AQP2 的水平均升高,且模型组差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,平胃散组和自然恢复组的大肠末端黏膜下组织 AQP2 的水平均显示降低趋势。与自然恢复组比较,平胃散组的大肠末端黏膜下组织 AQP2 的水平有升高趋势。

3 讨论

湿阻中焦证又称湿困脾胃证、湿胜证、中湿证、湿滞脾胃证、湿困脾阳证^[5]。其临床主要表现为脘腹胀满,不思饮食,口淡无味,口干不欲饮,恶心呕吐,头身困重,倦怠嗜睡,便溏腹泻,舌苔厚腻,脉缓等。平胃散出自《简要济众方》,主治胃气不和,由苍术、厚朴、陈皮、甘草组成,以生姜、大枣为引,有燥湿运脾、行气导滞、散中焦之湿阻的功效。

本研究中,湿阻中焦证胃肠组织 AQP2 在胃体中间黏膜、大肠中段黏膜下组织表达减少,使水通透性降低,机体内水潴留,发生体液及体液内物质多种成分代谢失调,胃肠组织轻度水肿,胃肠节律性运动失调,消化吸收功能降低,这可能是湿阻中焦证湿邪滞于中焦,脾运不健,气机受阻产生脘腹胀闷、不思

食或食少的分子基础之一;大肠参与机体对水平衡的调节功能失调,这可能是湿阻中焦证湿邪中阻,脾胃散输水津失调,下注肠道产生便溏腹泻的分子基础之一。本研究中,湿阻中焦证胃肠组织 AQP2 在小肠中段组织、大肠黏膜、大肠末端黏膜下组织表达增加,使水通透性升高,促使水转运到肠细胞,这可能是湿阻中焦证湿阻碍气机,脾胃散输水津失调,津液不正常输布产生口干不欲饮的分子基础之一。同时,本研究表明,AQP2 在胃肠黏膜下组织(主要是外膜)表达,这可能是中医津液代谢以三焦为通道的分子基础之一。总之,胃肠组织 AQP2 在湿阻中焦证胃肠特征性表达分布谱可能是湿阻中焦证湿邪困阻脾胃,阻遏气机,散输水津失调所表现证候的分子基础之一。

本研究显示,平胃散能增强湿阻中焦证胃体中间黏膜、大肠中段的黏膜、大肠末端黏膜下组织 AQP2 的表达,促使湿阻机体内积聚的水吸收排泄,胃肠节律性运动恢复正常,消化吸收功能恢复,大肠参与机体对水平衡的调节功能恢复,这可能是平胃散燥湿运脾,行气导滞,散中焦之湿阻,治疗湿阻中焦证湿邪滞于中焦,脾运不健,气机受阻产生脘腹胀闷,不思食或食少以及湿邪中阻,脾胃散输水津失调,下注肠道产生便溏腹泻的分子机理之一。同时,平胃散对正常大鼠胃肠干预,主要增强胃肠 AQP2 的表达,可能是通过升高水通透性,促使机体内水吸收排泄。平胃散抑制湿阻中焦证大肠中段黏膜下组织 AQP2 的表达,抑制水转运到肠细胞,这可能是平胃散燥湿运脾,行气导滞,散中焦之湿阻,治疗湿阻中焦证湿阻碍气机,散输水津失调,津液不正常输布产生口干口渴的分子机理之一。

参考文献

- [1] 张乐颖,王加后,卜登攀,等.水通道蛋白研究进展[J].中国畜牧兽医,2008,35(11):40-41.
- [2] 程波,蒋静.水通道蛋白亚型 AQP1 的研究进展[J].实用医学杂志,2008,24(2):317-318.
- [3] 张丰华,黄秀深,刘伟,等.湿困脾胃证动物模型的实验研究——宏观体征研究[J].成都中医药大学学报,2008,31(2):37-38,57.
- [4] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989,96(3):795-803.
- [5] 邓铁涛.中医证候规范[M].广州:广东科技出版社,1990:139-146.

(收稿日期:2011-03-09;修回日期:2011-05-22)

[编辑:行之]