

瘤细胞侵入机体时, 机体的细胞免疫是重要防御因素。巨噬细胞的吞噬功能是衡量机体细胞免疫水平的一个重要标志, 是机体细胞免疫清除突变细胞、抑瘤抗瘤的重要因素。T 淋巴细胞是介导机体细胞免疫的免疫活性细胞, 在免疫应答全过程中起着重要的调节、效应作用。但淋巴细胞只有转化为淋巴细胞才能发挥免疫调节作用, T 淋巴细胞转化率(增殖指数)的高低直接反映机体细胞免疫的水平。NK 细胞是细胞免疫中的非特异性成分, 不需预先活化即可直接杀伤肿瘤细胞, 在机体肿瘤非特异免疫中具有重要作用。TNF- α 则具有直接抑制和杀伤肿瘤细胞的功能, 且可诱导肿瘤细胞凋亡。因此, 研究上述 3 种细胞的活性, 可较好地揭示机体细胞免疫能力的变化。

在本实验中当小鼠接种了 H₂₂ 肿瘤细胞后, 胸腺指数、脾脏指数、腹腔巨噬细胞的吞噬功能、脾淋巴细胞的增殖指数均显著低于对照组小鼠。这是因为小鼠接种肿瘤细胞后, 机体的免疫系统对外来抗原物质出现应答, 但是随着肿瘤的进行性生长, 肿瘤细胞不断的分泌免疫抑制因子, 抑制机体的免疫应答。同时, 胸腺和脾脏等免疫器官呈现萎缩现象, 免疫功能受到不同程度的抑制, 使肿瘤细胞能够逃避机体免疫系统对其的杀伤作用, 有利于肿瘤的发生和发展, 并且随免疫抑制和器官萎缩程度、时间而逐渐加剧, 直至机体死亡。本实验中阳性对照物 CTX 在杀伤肿瘤细胞的同时, 对正常细胞也有很大的毒性, 使荷瘤机体整体免疫功能更加低下, 这将会对肿瘤的后期治疗造成不利影响。而龙须菜藻红蛋白在抑制 H₂₂ 肿瘤的同时, 对荷瘤小鼠脾脏、胸腺具有保护作用, 能提高荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 对荷瘤小鼠脾淋巴细胞的增殖有显著促进作用, 甚至可使 NK 细胞杀伤活性超过正常小鼠水平, 并能

提高荷瘤小鼠分泌 TNF- α 的能力, 增强机体对肿瘤的杀伤力。本研究结果说明龙须菜藻红蛋白可通过增强机体的细胞免疫活性和活化免疫细胞分泌细胞因子而激发 NK 细胞、巨噬细胞或直接刺激巨噬细胞活化, 促进这些细胞对肿瘤细胞的杀伤作用, 这可能是龙须菜藻红蛋白抗肿瘤效应机制之一。

据报道, 螺旋藻藻蓝蛋白能被肿瘤细胞选择性吸收到细胞膜中^[14]。至于龙须菜藻红蛋白在小鼠肠道中是否被水解, 是以小肽或多肽形式, 还是以整体分子被选择性吸收到细胞中发挥抑瘤作用和调节细胞免疫功能, 尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 王广策, 邓田, 曾呈奎. 藻胆蛋白的研究概况 (I) 藻胆蛋白的种类与组成 [J]. 海洋科学, 2000, 24(2): 22-24
- [2] 吴萍, 顾铭, 戚艺华, 等. 藻胆蛋白荧光探针及其标记 [J]. 生命科学研究, 2001, 5(2): 109-113
- [3] 陈小强, 史锋, 龚兴国. R-藻红蛋白的结构、功能及其应用 [J]. 细胞生物学, 2004, 26: 399-403
- [4] 李冠武, 王广策, 温博贵, 等. 藻红蛋白介导的光敏反应可诱导人肝癌 7721 细胞凋亡 [J]. 肿瘤防治杂志, 2002, 9(2): 144-146
- [5] 陈美珍, 张永雨, 余杰, 等. 龙须菜藻胆蛋白的分离及其清除自由基作用的初步研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(3): 159-162
- [6] 陈美珍, 葛安山, 余杰, 等. 龙须菜藻红蛋白抗肿瘤活性的研究 [J]. 中国海洋药物, 2007, 26(4): 27-31
- [7] 季宇彬, 徐博慧, 高世勇. 藻红蛋白诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡与细胞周期的关系 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 193-196
- [8] 陈美珍, 余杰, 钟秋玲, 等. 龙须菜藻胆蛋白免疫功能和抗氧化作用的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(9): 456-460
- [9] 张永雨, 陈美珍, 余杰, 等. 龙须菜藻胆蛋白抗突变与抗肿瘤作用的研究 [J]. 中国海洋药物, 2005, 24(3): 36-39
- [10] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002
- [11] 于红, 张学成. 螺旋藻多糖对小鼠 S-180 肉瘤的免疫抑制作用 [J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 58-60
- [12] 曲显俊, 崔淑香, 解砚英. 螺旋藻多糖抗癌作用的实验研究 [J]. 中国海洋药物, 2000(4): 10-14
- [13] 孙国平, 沈玉先, 张玲玲, 等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 160-162
- [14] 陈新美, 梅兴国. 螺旋藻多糖和藻胆蛋白的肿瘤防治作用及其机制 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 100-104

藿香正气软胶囊提取物调节 D-IBS 模型鼠水液代谢的研究

吕妍, 金兆祥, 李丹, 唐方*

(天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

摘要: 目的 探讨藿香正气软胶囊提取物对腹泻型肠易激综合征 (D-IBS) 模型大鼠水液代谢的影响。方法 以

* 收稿日期: 2009-12-30

基金项目: 天津市科委科技创新专项基金项目 (07FDZDSH01001)

基金项目: 吕妍 (1969-), 女, 天津人, 副主任医师, 硕士, 从事消化系统及变态反应的中医药治疗研究。

Tel: (022) 60362617 60362435 E-mail: doctorydongxiu@163.com

番泻叶 0.2 g/mL 煎剂加四肢束缚应激 2 h, 连续 6 d, 建立 D-IBS 大鼠模型, 采用考马斯亮蓝蛋白质测定法、酶联免疫吸附法及高效液相色谱法测定 D-IBS 模型大鼠肠黏膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性和结肠组织水通道蛋白 4 (AQP4) 水平变化, 比较模型大鼠药物干预前后尿中乳果糖和甘露醇的量。结果 D-IBS 模型大鼠小肠及结肠黏膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性较对照组显著降低 ($P < 0.01$), 结肠近端和远端组织内 AQP4 的表达明显减弱 ($P < 0.01$), 乳果糖和甘露醇比值显著升高 ($P < 0.01$)。经藿香正气软胶囊提取物干预后, Na^+ , K^+ -ATP 酶活性、结肠组织近端和远端 AQP4 的表达均明显提高 ($P < 0.05, 0.01$), 乳果糖和甘露醇比值降低, 接近对照组水平 ($P < 0.01$)。结论藿香正气软胶囊提取物对 D-IBS 模型大鼠水液代谢具有正向调节作用。

关键词: 藿香正气软胶囊提取物; 腹泻型肠易激综合征; Na^+ , K^+ -ATP 酶; 水通道蛋白

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1332-04

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是较常见的消化系统疾病之一, 是一种具有特殊病理生理基础的、独立的肠功能紊乱性疾病。本病主要症状之一就是腹泻, 而诊断腹泻的标准是排便次数增多、粪便稀薄、含水量增加。近年来研究发现, 位于上皮细胞基侧膜上的 Na^+ , K^+ -ATP 酶通过促进能量 ATP 利用, 调节 Na^+ , K^+ 分布而维持细胞内外的水平衡。同时, 肠细胞质膜上还存在着一种水通道 (Aquaporins, AQP), 其形成小孔作为水通道起作用^[1]。其能显著增加水的通透性, 参与水的分泌和吸收, 对保持细胞内外环境的稳态平衡起重要作用^[2-3]。肠黏膜通透性的高低也是影响水代谢的因素之一。藿香正气软胶囊提取物是从藿香正气软胶囊中提取的, 藿香正气软胶囊目前广泛用于现代医学的胃肠型感冒、急性慢性肠炎等^[4-5]。本研究通过测定腹泻型 IBS (D-IBS) 模型大鼠肠黏膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶的含量和结肠组织 AQP4 水平以及比较 D-IBS 模型大鼠药物干预前后尿中乳果糖 (4-O-β-D-吡喃半乳糖基-D-果糖) 和甘露醇的量, 来阐释藿香正气软胶囊提取物参与 D-IBS 模型大鼠水液代谢的调节作用, 为藿香正气软胶囊的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物: SPF 级 Wistar 大鼠, 体质量 (160 ± 10) g, 雌性, 购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 许可证号 SCXK-(军) 2002-001, 实验大鼠平衡饲养 3 d 后用于实验。

1.2 药物: 番泻叶, 产地广西, 由天津医科大学总医院中药房提供; 藿香正气软胶囊提取物由中新药业天津达仁堂制药厂提供。10% 水合氯醛由天津医科大学总医院制剂室提供。

1.3 试剂: Na^+ , K^+ -ATP 酶测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白质测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所提供。水通道蛋白 4 (AQP4) 酶联免疫吸附试剂盒, ADL 公司生产。乳果糖、甘露醇对照品, Sigma 公司生产。甘露醇 (分析纯)、乙腈 (色谱纯)、甲醇

(色谱纯) 均为国产试剂。实验用水为超纯水。

1.4 主要仪器: TU-1810 PC 型紫外可见分光光度计, TL-18M 台式高速冷冻离心机, HZS-H 水浴振荡器, KHB ST-360 酶标仪 (上海科学实验仪器有限公司), Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 示差检测器。

2 方法

2.1 药物制备: 取番泻叶加水煮沸约 10 min, 两层纱布滤过, 滤液浓缩得到含生药 0.2 g/mL 番泻叶煎剂, 4 °C 保存, 临用前将药液温度升至室温。

2.2 分组与模型制备: 实验动物随机分为 3 组, 每组 8 只, 分别为对照组、模型组、藿香正气软胶囊提取物组。对照组自由饮用蒸馏水, 自由摄食, 未做任何处理。模型组及给药组参照文献方法^[6]进行改良造模: 大鼠 ig 25 °C 番泻叶水煎剂 2 mL, 5 min 后, 使用统一拉力强度橡皮筋 (5 圈), 将大鼠四肢末端固定于 18 cm × 25 cm 的木板上, 大鼠仰面向上, 使其活动受限, 木板直立 90° 放置, 2 h 后解除束缚。给药组于束缚应激结束后 ig 藿香正气软胶囊提取物 536 mg/kg (相当于成人临床剂量的 20 倍), 1 次/d, 对照组与模型组 ig 同等剂量的蒸馏水。为消除生物节律影响, 于每日同一时间进行应激 1 次, 连续 6 d。

2.3 肠黏膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性测定: 末次给药后禁食 12 h, 10% 水合氯醛 ip 麻醉大鼠, 剖开腹腔, 分别摘取幽门下 10 cm 处至回盲部的空肠、回肠组织及回盲部下 10 cm 的结肠组织, 纵向剪开, 0 °C 生理盐水清洁冲洗, 滤纸吸干水分, 载玻片 0 °C 下刮取黏膜组织, 入冻存管内于液氮中保存, 移至 -70 °C 低温冰箱储存备用。取肠黏膜组织 200 mg, 以冷生理盐水 0 °C 下制成 1% 组织匀浆液, 严格按试剂盒说明书操作, 用紫外可见分光光度计于 636 nm 波长, 以蒸馏水调零, 测定吸光度 (A) 值。同时用考马斯亮蓝法进行组织匀浆蛋白定量, 并计算 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力。

2.4 结肠及血清中 AQP4 水平的测定

2.4.1 标本采集: 禁食 12 h 后, 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 剖开腹腔, 分别剪取距回盲部、近直肠部结肠组织 100 mg, 纵向剪开, 0 °C 生理盐水反复冲洗, 立即放入冻存管内于液氮中保存, 储存于 -70 °C 低温冰箱中备用。

2.4.2 组织匀浆制备: 将蛋白酶抑制剂溶解于生理盐水中, 配制成蛋白酶抑制剂 40 μg/mL 的混合溶液, 低温冷藏。取 100 mg 结肠组织加入该混合溶液 2 mL, 4 °C 条件下制成 10% 组织匀浆, 在 4 °C 低温离心机中离心 15 min (3 000 r/min), 提取组织上清液待测。

2.4.3 血清制备: 模型制备结束, 各组大鼠禁食 12 h, 经 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 腹主动脉取血 2 mL, 4 °C 静置 3 h, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 留取上清液。-20 °C 保存待测。

2.4.4 AQP4 的测定: 使用 AQP4 酶联免疫吸附测试盒, 在酶标仪 450 nm 波长处测定 A 值。

2.5 尿中乳果糖与甘露醇比值的测定

2.5.1 尿液收集: 模型制备后 96 h 每只实验大鼠 ig 由乳果糖 100 mg、甘露醇 50 mg 加蒸馏水 2 mL 配制成的混合溶液, 2 h 后再 ig 蒸馏水 4 mL 以保证充足的尿量。ig 前按压大鼠下腹部排空膀胱, 利用代谢笼收集 ig 后 8 h 尿液, 立即冰冻保存。收集尿液期间禁食, 可自由饮水。

2.5.2 对照品溶液的配制: 精密称取乳果糖及甘露醇对照品各 100 mg, 分别置于 100 mL 量瓶中, 加水溶解, 稀释成含乳果糖及甘露醇对照品各 1 mg/mL 储备液, 于 4 °C 冰箱保存。用时将储备液用流动相稀释成所需质量浓度, 即得乳果糖及甘露醇工作液。

2.5.3 色谱条件: 色谱柱 Kromasil NH₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相为乙腈-水 (70: 30), 体积流量为 1 mL/min, 示差检测器内加热 35 °C, 进样量 10 μL。

2.5.4 样品测定: 取大鼠尿液 0.4 mL 高速离心 (4 000 r/min) 5 min, 取上清液 0.25 mL 加入乙腈 1 mL, 漩涡混合器上混匀萃取 5 min, 高速离心 (12 000 r/min) 10 min, 取上清进行色谱分析。记录乳果糖及甘露醇的峰面积, 在标准曲线上求得样品中乳果糖及甘露醇的质量浓度, 计算乳果糖与甘露醇质量浓度比值。

2.6 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 S-N-K 检验。

3 结果

3.1 肠黏膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的比较: 与对照组比较, 模型组大鼠小肠黏膜、结肠黏膜的 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性降低 (P < 0.01), 经藿香正气软胶囊提取物干预后, 可以提高 D-IBS 模型大鼠小肠黏膜、结肠黏膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性, 与模型组比较差异显著 (P < 0.05, 0.01)。结果见表 1。

表 1 藿香正气软胶囊提取物对 D-IBS 模型大鼠肠黏膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

Table 1 Effect of Huoxiang Zhengqi Soft Capsula extract on activity of Na⁺, and K⁺-ATPase in intestine of D-IBS model rats ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶活性/(U · mg ⁻¹)	
		小肠	结肠
对照	-	1 807.26 ± 379.34	1 472.59 ± 292.74
模型	-	1 093.31 ± 296.01**	932.43 ± 107.78**
藿香正气软胶囊提取物	536	1 630.99 ± 395.28 [△]	1 158.02 ± 129.21 ^{△△}

与对照组比较: ** P < 0.01

与模型组比较: [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01 表 2 同

** P < 0.01 vs control group

[△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01 vs control group Table 2 is same

3.2 结肠及血清中 AQP4 水平比较

3.2.1 结肠中 AQP4 水平比较: 如表 2 所示, 正常大鼠结肠近端 AQP4 水平较远端组织增强, 但二者间未见统计学差异。D-IBS 模型大鼠近端、远端结肠 AQP4 水平显著降低, 与对照组比较差异显著 (P < 0.01); 藿香正气软胶囊提取物干预后, 近端、远端结肠组织中 AQP4 水平有所升高 (P < 0.05, 0.01)。

3.2.2 血清中 AQP4 水平比较: 模型大鼠血清 AQP4 水平明显升高, 与对照组比较差异显著 (P < 0.01), 经藿香正气软胶囊提取物干预后, 血清 AQP4 水平明显降低 (P < 0.01)。见表 2。

表 2 藿香正气软胶囊提取物对 D-IBS 模型大鼠结肠、血清 AQP4 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

Table 2 Effect of Huoxiang Zhengqi Soft Capsula extract on level of serum AQP4 in colon of D-IBS model rats ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	AQP4/(ng · mL ⁻¹)		
		结肠近端	结肠远端	血清
对照	-	1.16 ± 0.22	1.08 ± 0.17	1.22 ± 0.33
模型	-	0.77 ± 0.14**	0.79 ± 0.12**	5.46 ± 0.60**
藿香正气软胶囊提取物	536	1.04 ± 0.13 ^{△△}	0.95 ± 0.14 [△]	1.33 ± 0.51 ^{△△}

3.3 大鼠尿液乳果糖/甘露醇值比较: 经 HPLC 法对尿液中乳果糖、甘露醇测定发现, 模型组乳果糖/甘露醇值为 16.50 ± 3.34, 明显高于对照组 (2.24 ± 0.83, P < 0.01), 藿香正气软胶囊提取物可显著降低

尿液中乳果糖/甘露醇值,降至 2.36 ± 0.97 ($P < 0.01$)。

4 讨论

水在胃肠道内的吸收多继发于电解质主动转运所产生的静水压和渗透压,水在小肠内吸收还有一种快速的细胞旁途径。由 Na^+ , K^+ -ATP 酶作用所产生的离子梯度是其他离子和营养物质跨膜转运的驱动力。 Na^+ , K^+ -ATP 酶(又称钠泵)是一种膜转运蛋白^[7],它从水解 ATP 获得能量,逆化学梯度转运 Na^+ ,同时反方向转运 K^+ ,形成和维持了 Na^+ 、 K^+ 在细胞膜内外正常的浓度差。保持此酶活性正常,能产生并维持可兴奋细胞的膜电位,以维持神经细胞的兴奋性和传导性^[8]。 Na^+ , K^+ -ATP 酶通过促进能量 ATP 利用,调节 Na^+ 、 K^+ 分布而维持细胞内外的水平衡。

水的转运除以顺浓度梯度扩散外,还可依靠水通道蛋白(AQPs)主动转运完成。AQPs 是生物膜上特异性转运水的整合蛋白^[9],与水代谢密切相关,结肠中的 AQP4 参与结肠对肠腔内水分的吸收,AQP4 在结肠的高表达与肠道水吸收有关^[10]。如果 AQP4 的表达超过或低于正常水平,就会影响水的分泌或吸收,出现水平衡紊乱,引发排便异常。

肠黏膜通透性是指某一特定物质在肠黏膜表面通过非易化扩散方式渗透的能力。一般以单位时间内某种物质(如糖分子)从肠腔吸收入血并从尿液排出的量来表示肠通透性。肠黏膜通透性增高可以反映早期肠黏膜屏障的损伤。本实验通过测定尿液中乳果糖/甘露醇的值来反映肠黏膜通透性的改变。

中医治疗泄泻是以健运脾胃,分利水湿为基本原则。但健运脾胃并非单纯补脾。而是意在恢复脾胃运化水谷、运化水液的功能。所以凡能祛除影响脾胃运化之邪,有助于脾胃功能恢复的治疗法则均可称之为健脾,包括消积、芳香、清热、疏肝、补益、温中、涩敛等。同样祛湿并非仅指淡渗利湿,通过利小便而实大便,芳香化湿、苦温燥湿、辛散除湿均属于利湿范畴。藿香正气复方是芳香化湿的代表方剂,重在芳香化浊,化湿和胃,来恢复脾胃运化及小肠泌

别清浊的功能。本研究结果显示,D-IBS 模型大鼠小肠及结肠黏膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性较对照组显著降低,结肠近端和远端组织内 AQP4 的表达明显减弱,大鼠尿乳果糖/甘露醇值显著升高。经藿香正气软胶囊提取物干预后, Na^+ , K^+ -ATP 酶活性、结肠组织近端和远端 AQP4 的表达均有所改善,同时还可显著降低 D-IBS 模型大鼠尿液中乳果糖/甘露醇值。表明藿香正气软胶囊提取物对 D-IBS 的止泻功效主要通过调整 D-IBS 模型大鼠 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性,提高结肠组织 AQP4 的表达,改善肠黏膜通透性,保护肠机械屏障来完成正向调节肠道水液代谢作用。

参考文献:

- [1] Yang Y, Cui Y, Wang W, *et al.* Molecular and functional characterization of a vasotocin sensitive aquaporin water channel in quail kidney [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287: 915-924
- [2] Marinelli R A, Tietz P S, Caride A J, *et al.* Water transporting properties of hepatocyte basolateral and canalicular plasma membrane domains [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 43157-43162
- [3] Agre P, Preston G M, Smith B L, *et al.* Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel [J]. *Am J Physiol*, 1993, 265(4Pt2): 463-467
- [4] 瓮勃, 韩卫平. 藿香正气散(水、胶囊)临床研究进展 [J]. *中草药*, 2002, 33(6): 574-附2
- [5] 李丹, 吕妍, 唐方. 藿香正气提取物对腹泻型肠易激综合征大鼠免疫功能的调节作用 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 440-442
- [6] Williams C L, Villar R G, Peterson J M, *et al.* Stress induced changes in intestinal transit in the rats: A model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988, 94(3): 611-621
- [7] 沈洪兴, 王光毅, 于宝军, 等. 严重烫伤大鼠心、肝、肾组织 Na^+ , K^+ -ATP 酶, Ca^{2+} -ATP 酶活性的变化 [J]. *第二军医大学学报*, 1998, 19(3): 247-249
- [8] 夏舒萌, 张德琛, 吴小晶, 等. 缺血再灌注损伤对骨骼肌细胞生命活动的影响 [J]. *中国临床康复*, 2003, 7(8): 1240-1241
- [9] Knepper M A, Verbalis J G, Nielsen S, *et al.* Role of aquaporins in water balance disorders [J]. *Curr Opin Nephrol Hyper*, 1997, 6: 367
- [10] 王俊平, 王大骏. 消化系统水通道蛋白研究进展 [J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(2): 111-112