

泽泻汤加味方对高脂血症模型大鼠肝组织中水通道蛋白8的影响^A

张睦清^{1*}, 韩雪², 段思明², 张一昕^{2#}, 王亚芬², 张纳博², 王彦蕊²(1.河北省中医院心血管内科, 石家庄 050011; 2.河北中医学院药学院, 石家庄 050200)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0651-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.19

摘要 目的:观察泽泻汤加味方对高脂血症模型大鼠肝组织中水通道蛋白8(AQP8)表达的影响,探讨该方防治高脂血症的机制。方法:将60只大鼠随机分为空白对照组(蒸馏水)、模型组、阳性对照组(辛伐他汀1.89 mg/kg)和泽泻汤加味方高、中、低剂量组(29.56、14.78、7.39 g/kg,以生药量计),每组10只。除空白对照组大鼠给予正常饮食外,其余各组大鼠均给予高脂饲料以复制高脂血症模型,并于造模同时每天灌胃给药1次,连续给药5周。给药结束后,检测大鼠血清中三酰甘油(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)含量,观察大鼠肝组织病理形态学变化,并检测大鼠肝组织中AQP8 mRNA和蛋白表达水平。结果:与空白对照组比较,模型组大鼠血清中TG、TC、LDL-C含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清中HDL-C含量显著降低($P<0.01$),肝组织出现细胞排列不整齐、肝血窦充血水肿等病理学变化,肝组织中AQP8 mRNA和蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肝组织的结构趋于正常、脂肪变性明显减轻。结论:泽泻汤加味方可能通过下调肝组织中AQP8 mRNA及蛋白的表达,发挥其对高脂血症的防治作用。

关键词 泽泻汤加味方;高脂血症;水通道蛋白8;大鼠

苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷总含量聚类分析和 HPLC 图谱主成分分析结果一致,进一步说明大理州不同居群坚龙胆叶中合成和积累的裂环烯醚萜类物质种类相似性较高。可见,大理州不同居群坚龙胆叶中裂环烯醚萜类物质种类具有较稳定的遗传性,而不同居群坚龙胆叶中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷含量差异较大,可能与坚龙胆所生长的气候、土壤等生态条件不同有关。在不同生态条件下,坚龙胆叶中裂环烯醚萜类物质合成关键酶的表达量存在较大差异,而这种差异可能是导致坚龙胆叶中裂环烯醚萜类物质含量差异形成的主要原因;同时,只有在 S3 和 S7 样品叶中检测到獐牙菜苷,獐牙菜苷虽然在植物叶中合成,但其可能主要在根茎和花中积累,不同部位的贮藏、运输、积累及转化可能是导致其在叶中含量差异较大的原因,有关问题值得进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志:第62卷[M].北京:科学出版社,1988:52.
- [2] KONDO Y, TAKANO F, HOJO H. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice[J]. *Planta Med*, 1994, 60(5): 414-416.

^A基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(No. 2016008);大学生创新创业训练计划项目(No.201614432002)

* 主治医师,硕士。研究方向:中药及其复方的临床应用和作用机制。电话:0311-89926307。E-mail:mqzhang@yeah.net

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药及其复方的临床应用和作用机制。电话:0311-89926308。E-mail:hbzyx123@163.com

[3] PINTO MM, SOUSA ME, NASCIMENTO MSJ. Xanthone derivatives: new insights in biological activities[J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(21):2517-2538.

[4] GAO LJ, XIANG L, LUO Y, et al. Gentisides C-K: nine new neurotogenic compounds from the traditional Chinese medicine *Gentiana rigescens* Franch[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(6):6995-7000.

[5] SHIN MH, SUH HW, LEE KB, et al. *Gentiana scabra* extracts stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via G protein-coupled receptor pathway[J]. *Bio Chip*, 2012, 6(2):114-119.

[6] 赵瑞芝,梁伟洁,丘小惠.龙胆药材中龙胆苦苷的提取工艺研究[J].*中国药房*,2005,16(12):956-957.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:96.

[8] 徐任生,叶阳,赵维民.天然产物化学[M].2版.北京:科学出版社,2004:184.

[9] NEWMAN JD, CHAPPELL J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(2):95-106.

[10] 张琳,罗智渊,冯丽丽,等.滇龙胆不同居群间品质评价及质量等同性的研究[J].*中国药学杂志*,2014,49(5):412-418.

[11] 张琳,罗智渊,冯丽丽,等.滇龙胆花药材质量标准及品质评价的研究[J].*中国药学杂志*,2014,49(16):1451-1457.

[12] 赵志莲,张琳,刘卫红,等.滇龙胆裂环烯醚萜类活性成分积累规律的研究[J].*时珍国医国药*,2016,27(5):412-418.

(收稿日期:2017-09-11 修回日期:2017-12-20)

(编辑:林静)

Effects of Modified Rhizoma Alismatis Decoction on the Expression of AQP8 in Liver Tissue of Hyperlipidemia Model Rats

ZHANG Muqing¹, HAN Xue², DUAN Siming², ZHANG Yixin², WANG Yafen², ZHANG Nabo², WANG Yanrui²
(1.Dept. of Cardiovascular Medicine, Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang 050011, China; 2.School of Pharmacy, Hebei College of TCM, Shijiazhuang 050200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To observe the effects of Modified Rhizoma Alismatis decoction on the expression of aquaporin 8 (AQP8) in liver tissue of hyperlipidemia model rats, and to investigate the mechanism of preventing and treating hyperlipidemia. **METHODS:** Total of 60 rats were randomly divided into blank control group (distilled water), model group, positive control group (simvastatin 1.89 mg/kg) and modified Rhizoma Alismatis decoction high-dose, medium-dose and low-dose groups (29.56, 14.78, 7.39 g/kg, calculated by crude drug), with 10 rats in each group. Those groups were given high-fat diet to induce hyperlipidemia model and given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 5 weeks except that blank control group was given normal diet. After administration, the serum contents of TG, TC, HDL-C and LDL-C in rats were detected, and the pathomorphology changes of liver tissue were observed; the mRNA and protein expression of AQP8 in liver tissue were detected. **RESULTS:** Compared blank control group, the serum contents of TG, TC and LDL-C in model group were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the serum content of HDL-C was decreased significantly ($P < 0.01$); pathological changes were found in liver tissue, such as irregular cell arrangement and hepatic sinusoidal hyperemia and edema; mRNA and protein expression of AQP8 in liver tissue were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, above indexes of treatment groups were improved significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the structure of liver tissue tended to be normal and the fatty degeneration was obviously alleviated. **CONCLUSIONS:** Modified Rhizoma Alismatis decoction can regulate the mRNA and protein expression of AQP8 in liver tissue so as to play the effects on the prevention and treatment of hyperlipidemia.

KEYWORDS Modified Rhizoma Alismatis decoction; Hyperlipidemia; Aquaporin 8; Rat

高脂血症(Hyperlipidemia, 简称为“HYP”)是导致心脑血管疾病独立而重要的危险因素之一, 积极有效地调节血脂是防治心脑血管疾病的重要途径^[1]。常用的心脑血管治疗药物有他汀类、贝特类等, 虽疗效显著, 但因副作用较多而限制了其临床应用^[2]。近年来, 中医药在防治HYP方面显示出了多途径、多靶点、整体调节、不良反应较少的优势。中医根据HYP临床表现特点, 将其归属于“痰浊”“血瘀”等范畴, 而脾失健运、湿聚痰生、壅滞血脉为其主要发病机制^[3], 健脾祛湿消痰为其有效治法。

泽泻汤出自张仲景《金匮要略》, 由泽泻、白术两味中药材组成, 方中泽泻功利水湿、消痰浊, 为君药; 白术健脾益气、燥湿利水以治生痰之源, 为臣药。泽泻汤加味方是在泽泻汤的基础上增加了一味中药荷叶。荷叶升清降浊、祛湿利尿, 三药合用, 标本兼顾, 共奏祛湿化痰、健运脾胃之功^[4]。水通道蛋白(AQPs)是一种跨膜转运蛋白^[5], 参与液体的吸收、分泌及调节细胞内外水液平衡的生理病理过程, 对机体的水液平衡具有重要的调节作用^[6]。水液代谢失常引起的湿聚痰生是HYP的主要病机, 而AQPs对调节水液代谢发挥着重要的作用, 故笔者推测AQPs的表达失调与HYP发病具有密切的相关性。目前发现的AQPs有13个亚型, 其中, AQP8主要存在于肝细胞中, 且表达量最高^[7]。因此, 本研究通过观察泽泻汤加味方对HYP大鼠肝细胞中AQP8 mRNA和蛋白表达的影响, 探讨其防治HYP的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

PE 9600型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国PE公司); Humalyzer 2000型半自动生化分析仪(德国Merck公司); DYCZ-24DN型电泳仪、DYCP-31CN型电泳槽(北京六一生物科技有限公司); GDS-8000 System型UVP凝胶成像系统(美国Thermo公司); WSE-4040型半干转膜仪系统(日本Atto公司); Spectronic® Genesystem型紫外-可见分光光度计(美国MiltonRoy公司); BX51T-PHD-J11型全能显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

泽泻汤加味方组成为泽泻颗粒(批号: 5073461, 规格: 每袋1.5 g, 相当于临床使用量饮片10 g)50 g、白术颗粒(批号: 5063421, 规格: 每袋3.0 g, 相当于临床使用量饮片10 g)20 g、荷叶颗粒(批号: 505037T, 规格: 每袋0.5 g, 相当于临床使用量饮片10 g)10 g, 均购自广东一方制药有限公司, 临用时用100 ℃蒸馏水充分溶解; 辛伐他汀片(石药控股集团有限公司, 批号: 380150701, 批准文号: 国药准字H20093007, 规格: 20 mg/片, 加至0.5%羧甲基纤维素钠混悬液中搅拌均匀); 胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司, 批号: 201501、201411); 高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C, 长春汇力生物技术有限公司, 批号: 2015025、2015055); 总RNA提取试剂、cDNA合成试剂盒、DNA分子量标准物(Marker, 日本

Takara公司,批号:9108、6210A、DL2000); AQP8兔抗鼠免疫球蛋白(IgG)多克隆抗体(美国Origene公司,批号:TA323215s);兔免疫组化(SP)试剂盒、二喹啉甲酸(DAB)显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:16159A07、K164920D); β -肌动蛋白(β -actin)引物序列设计来源于NCBI Reference Sequence: NM_031144.3, AQP8引物序列设计来源于NCBI Reference Sequence: NM_019158.2。

1.3 动物

健康清洁级SD大鼠60只,♂,体质量160~180 g,由河北省实验动物中心提供(生产合格证号:1511283)。购入后饲养于清洁级实验室内,适应性饲养1周后用于实验。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只SD大鼠按体质量分层原则随机分为6组,分别为空白对照组、模型组、阳性对照组和泽泻汤加味方低、中、高剂量组,每组10只。除空白对照组大鼠喂饲普通饲料外,其余各组大鼠均喂饲高脂饲料(组成比例为胆固醇1.5%、猪油10%、猪胆酸钠0.5%、普通饲料88%,由河北省实验动物中心加工)复制HYP大鼠模型^[8]。从造模第1天起,空白对照组与模型组大鼠灌服蒸馏水,阳性对照组灌服1.89 mg/kg辛伐他汀(根据临床等效剂量换算而得),泽泻汤加味方高、中、低剂量组大鼠分别灌服以生药量计7.39、14.78、29.56 g/kg药液(根据成人临床用量的1、2、4倍换算而得),各组大鼠均按1 mL/100 g给药,每天给药1次,连续给药5周。

2.2 样本采集及处理

末次给药后大鼠禁食不禁水24 h,麻醉后股动脉取血,室温静置30 min,在4℃条件下以离心半径为10 cm、3 000 r/min离心10 min,采集血清置于EP管中,待检。迅速剖腹取出肝组织,于肝最大叶处取两块适宜大小的肝组织液氮保存,以观察AQP8 mRNA表达。再取1 cm×1 cm×0.5 cm大小的肝组织,置于4%多聚甲醛液中固定,以观察肝组织病理学变化。

2.3 血脂指标检测

采用半自动生化分析仪检测大鼠血清中TG、TC、HDL-C、LDL-C含量。

2.4 肝组织病理学观察

将4%多聚甲醛固定的肝组织常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度为3 μ m),行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察肝组织的病理形态学变化。

2.5 肝组织中AQP8 mRNA表达

采用反转录PCR(RT-PCR)法检测肝组织中AQP8 mRNA表达。取肝组织100 mg,加入到1 mL Trizol试剂中,于冰上匀浆,提取总RNA,紫外-可见分光光度计测量其浓度和纯度,电泳检测其完整性。调整RNA质量浓度为1 μ g/ μ L,将其反转录成cDNA。扩增引物序列:

AQP8上游引物为5'-ATATGTCTGGGGAGCAGACGC-3',下游引物为5'-GGCTGCAGGAGCCAGTATT-3',扩增产物片段长度为211 bp;大鼠 β -actin上游引物为5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3',下游引物为5'-AGGGTACATGGTGGTGGCGCCAGAC-3',扩增产物片段长度为587 bp。反应体系:Taq DNA聚合酶1 μ L, dNTPs 2 μ L,上样染料2 μ L,稳定剂、优化剂、反应缓冲液共25 μ L,反转录反应产物2 μ L,上、下游引物各2 μ L,最后加水补至50 μ L。PCR扩增反应条件:94℃、10 min;94℃、30 s,56℃、30 s,72℃、30 s,共30个循环;最后72℃延伸10 min。半定量分析:取每个标本的扩增产物6 μ L进行琼脂糖凝胶电泳,以DNA Marker作为标准分子量标记,电泳后摄片,并进行光密度扫描,以 β -actin校正作相对量分析,以目标基因与 β -actin积分光密度的比值表示目标基因的表达水平。

2.6 肝组织中AQP8蛋白的表达

2.6.1 免疫组化法观察肝组织中AQP8蛋白的表达 将4%多聚甲醛固定的肝组织常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度为3 μ m),磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)清洗,3% H₂O₂液室温孵育20 min, PBS清洗,0.01 mol/L枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波炉内抗原修复30 min(92℃),室温冷却, PBS清洗,滴加10%正常山羊血清工作液封闭,37℃温箱孵育30 min,吸弃多余血清,滴加兔抗鼠AQP8抗体(1:100),4℃冰箱孵育过夜, PBS清洗;滴加二抗工作液,37℃温箱孵育30 min, PBS清洗;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(S-A/HRP)工作液,37℃温箱孵育30 min, PBS清洗;DAB室温下显色5 min,显微镜下监视, PBS充分冲洗,终止显色。采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图象分析系统,在放大100倍下每张切片取8个视野,阳性表达位于肝细胞胞浆,呈棕黄色,细胞核呈蓝色,测定平均光密度作半定量分析。

2.6.2 Western blot法检测肝组织中AQP8蛋白表达 取大鼠肝组织约100 mg,液氮研磨,然后转移到含1 mmol/L苯甲基磺酰氟的900 μ L RIPA中性裂解液中,混匀,超声裂解,然后在4℃温度下以离心半径为10 cm、12 000 r/min离心15 min,收集上清(即总蛋白),进行蛋白含量的测定。蛋白煮沸变性后,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转至聚偏氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭,一抗(1:600)4℃孵育过夜, PBST洗膜3次,二抗(1:3 000)室温孵育1.5 h, PBST洗膜3次,暗室曝光, X胶片上显影,采用Tanon1600全自动数码凝胶图象分析系统对胶片进行扫描,采用Tanon Gis软件分析条带灰度值,以AQP8蛋白条带灰度值与内参 β -actin条带灰度值的比值表示AQP8蛋白的表达水平。

2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,当方差不齐性时组间两两比较采用Dunnett T3检验,当方差齐性时采用LSD检验。

$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 血脂指标测定结果

与空白对照组比较,模型组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 含量显著升高($P < 0.01$),HDL-C 含量显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),HDL-C 含量显著升高($P < 0.01$)。与泽泻汤加味方低剂量组比较,阳性对照组和泽泻汤加味方高剂量组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 含量显著降低($P < 0.01$),HDL-C 含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);泽泻汤加味方中剂量组大鼠血清中 TC 含量显著降低($P < 0.05$)。与泽泻汤加味方中剂量组比较,阳性对照组和泽泻汤加味方高剂量组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),HDL-C 含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$)

Tab 1 Results of content determination of TG, TC, LDL-C and HDL-C in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$)

组别	TG	TC	LDL-C	HDL-C
空白对照组	0.860 ± 0.091	0.994 ± 0.132	0.641 ± 0.083	1.032 ± 0.117
模型组	$2.183 \pm 0.204^{**}$	$2.013 \pm 0.250^{**}$	$1.267 \pm 0.087^{**}$	$0.731 \pm 0.085^{**}$
阳性对照组	$1.153 \pm 0.144^{\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$1.154 \pm 0.145^{\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$0.775 \pm 0.083^{\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$0.955 \pm 0.100^{\Delta\Delta\Delta\Delta}$
泽泻汤加味方低剂量组	$1.505 \pm 0.145^{\Delta\Delta}$	$1.566 \pm 0.140^{\Delta\Delta}$	$0.964 \pm 0.083^{\Delta\Delta}$	$0.749 \pm 0.071^{\Delta}$
泽泻汤加味方中剂量组	$1.428 \pm 0.131^{\Delta\Delta}$	$1.358 \pm 0.169^{\Delta\Delta}$	$0.900 \pm 0.099^{\Delta\Delta}$	$0.757 \pm 0.072^{\Delta}$
泽泻汤加味方高剂量组	$1.205 \pm 0.139^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.164 \pm 0.177^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.787 \pm 0.057^{\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$0.904 \pm 0.115^{\Delta\Delta\Delta}$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与泽泻汤加味方低剂量组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与泽泻汤加味方中剂量组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; vs. modified Rhizoma Alismatis decoction low-dose group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; vs. modified Rhizoma Alismatis decoction medium-dose group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

3.2 肝组织病理形态学观察结果

空白对照组大鼠肝细胞为规则六边形,排列整齐,围绕中央静脉呈放射状分布;肝血窦结构正常,无脂肪滴和炎性浸润。模型组大鼠肝细胞排列不整齐,且出现大量脂肪滴,细胞核位置被挤压偏离;肝血窦充血水肿。阳性对照组大鼠肝细胞结构清晰,脂肪滴明显减少;肝血窦充血水肿减轻,但存在细胞坏死及炎性浸润。与模型组比较,泽泻汤加味方高、中、低剂量组大鼠肝组织结构排列清晰,脂肪滴也不同程度减少,肝血窦形态趋于正常,其中尤以高剂量组效果最为显著,结果见图 1。

3.3 肝组织中 AQP8 mRNA 表达水平测定结果

与空白对照组比较,模型组大鼠肝组织中 AQP8 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠肝组织中 AQP8 mRNA 表达均显著降低

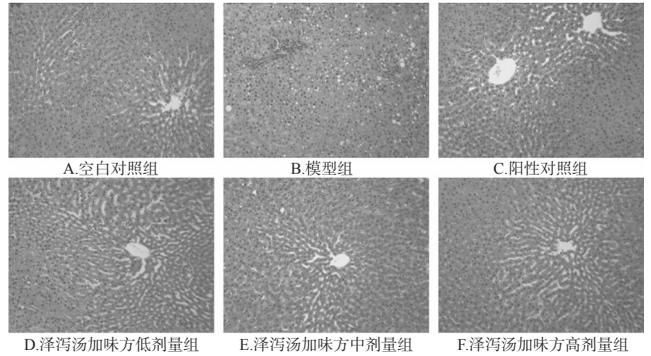


图 1 各组大鼠肝组织病理学观察切片图($\times 200$)

Fig 1 Pathological observation of liver tissue of rats in each group($\times 200$)

($P < 0.01$)。与泽泻汤加味方低、中剂量组比较,泽泻汤加味方高剂量组大鼠肝组织中 AQP8 mRNA 表达均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。空白对照组、模型组、阳性对照组和泽泻汤加味方低、中、高剂量组大鼠肝组织中 mRNA 表达水平测定结果依次为 0.272 ± 0.011 、 0.596 ± 0.014 、 0.511 ± 0.018 、 0.483 ± 0.035 、 0.461 ± 0.122 、 0.383 ± 0.020 ,电泳图见图 2。

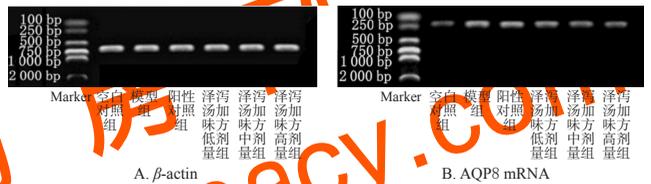


图 2 各组大鼠肝组织中 AQP8 mRNA 表达测定的电泳图

Fig 2 Electropherograms of mRNA expression of AQP8 in liver tissue of rats in each group

3.4 肝组织中 AQP8 蛋白表达水平测定结果

3.4.1 免疫组化测定结果 空白对照组大鼠仅在肝细胞的细胞膜上有少许 AQP8 蛋白表达,呈浅棕色。模型组大鼠除在细胞膜上有 AQP8 蛋白表达外,细胞核、细胞浆也表达较多,呈深棕色。与模型组比较,各给药组大鼠肝组织中 AQP8 蛋白的阳性表达数量、着色程度均降低,免疫组化图见图 3。

半定量分析结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠肝组织中 AQP8 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肝组织中 AQP8 蛋白表达水平均显著降低,且泽泻汤加味方高剂量组大鼠肝组织中 AQP8 蛋白表达水平低于泽泻汤加味方低、中剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。空白对照组、模型组、阳性对照组和泽泻汤加味方低、中、高剂量组大鼠肝组织中蛋白表达水平测定结果依次为 0.018 ± 0.004 、 0.054 ± 0.009 、 0.045 ± 0.007 、 0.042 ± 0.007 、 0.037 ± 0.005 、 0.029 ± 0.006 。

3.4.2 Western blot 法测定结果 与空白对照组(0.341 ± 0.069)比较,模型组(0.806 ± 0.131)大鼠肝组织中 AQP8 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组

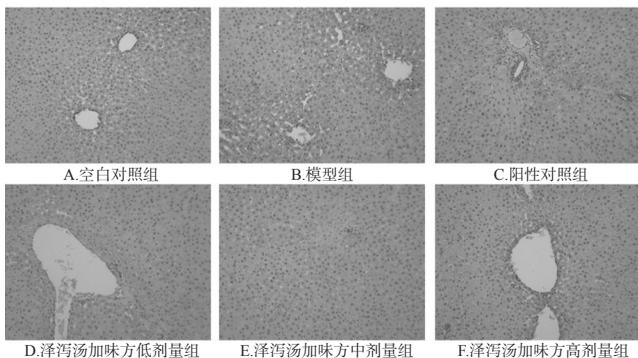


图3 各组大鼠肝组织中AQP8蛋白表达检测的免疫组化图($\times 100$)

Fig 3 Immunohistochemistry maps of protein expression of AQP8 in liver tissue of rats in each group ($\times 100$)

比较,阳性对照组和泽泻汤加味方低、中、高剂量组(0.685 ± 0.100 、 0.571 ± 0.073 、 0.512 ± 0.061 、 0.431 ± 0.069)大鼠肝组织中AQP8蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且泽泻汤加味方高剂量组大鼠肝组织中AQP8蛋白表达水平低于泽泻汤加味方低、中剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),电泳图见图4。

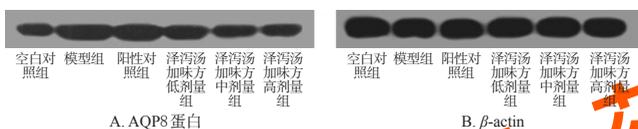


图4 各组大鼠肝组织中AQP8蛋白表达测定的电泳图

Fig 4 Electropherograms of AQP8 protein expression in liver tissue of rats in each group

4 讨论

中药免煎颗粒是以传统中药饮片为原料,经提取浓缩制成的、供中医临床配方用的颗粒,具有统一规格、统一剂量和统一质量标准。其在味道和疗效方面与中药饮片煎煮后效果大体一致,且具有稳定性好、吸收快速、携带方便、应用方便等优点,目前使用较为流行,因此本研究选用了中药免煎颗粒进行实验。

AQPs是细胞膜上选择性高效转运水分子的特异孔道,其在维持细胞内外水液平衡具有重要的作用。AQPs介导水的转运作用一旦失常,就会引起体内多种机能的紊乱。AQPs主要有13种亚型(AQP0~AQP12)^[9],肝组织中主要有AQP0、AQP1、AQP3、AQP8、AQP9、AQP11等6种亚型,其中以AQP8的表达量最高^[10]。研究发现,AQP8又以两种亚型存在于肝细胞中,一种与渗透性水转运有关,另一种在线粒体上表达,参与了线粒体容量的稳态调节^[11]。AQP8的表达异常,不仅影响着肝细胞通透性的强弱、水液代谢,而且关系着肝细胞线粒体的能量代谢,影响着肝细胞功能和肝对脂代谢作用的发挥。而HYP的病机关键是脾失健运、痰湿内阻,肝脏是脂质代谢的重要器官。因此,通过观察肝组织中AQP8的表达变化,探讨中药及其复方防治HYP的作用

机制具有重要意义,有望成为一个新的研究方向。

本研究结果显示,模型组大鼠血清中TG、TC、LDL-C含量较空白对照组显著升高,HDL-C含量较空白对照组显著降低,这提示HYP造模成功;另外AQP8 mRNA及其蛋白的表达水平升高,提示大鼠血脂异常与肝组织中AQP8的表达失常可能存在相关性。而经泽泻汤加味方治疗后,HYP大鼠血清中TC、TG、LDL-C含量显著降低,HDL-C含量显著升高,肝组织脂肪变性明显改善,这提示泽泻汤加味方较好地调节血脂作用;同时,大鼠肝组织中AQP8 mRNA及其蛋白的表达水平均显著降低,推测该方可能通过下调大鼠肝组织中AQP8 mRNA及其蛋白的过度表达,降低了肝细胞过高的通透性,维持了细胞内外水液代谢的平衡,保护了肝细胞的正常功能,从而使肝正常地发挥脂质代谢的作用,这可能是泽泻汤加味方防治HYP的机制之一,但其确切机制有待进一步验证。

参考文献

- [1] 申强,张海晶,杨明华,等.血脂平胶囊对高血脂模型金黄色地鼠血脂水平的影响及机制研究[J].中国药房,2017,28(16):2212-2215.
- [2] 孙吉叶,蔡旭东,康秀娟,等.治疗高脂血症的新药研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(5):435-441.
- [3] 赵润生,王敏,张永志,等.泽泻汤加味治疗痰浊阻遏型高脂血症55例临床观察[J].甘肃中医学院学报,2015,32(4):42-44.
- [4] 韩雪,张睦清,常冰,等.泽泻汤对高脂血症大鼠脂代谢及PPAR α 和ACO基因和蛋白表达的影响[J].中国药理学通报,2017,33(12):1761-1765.
- [5] DENKER BM, SMITH BL, KUHAJDA FP, et al. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(30):15634-15642.
- [6] 张宁,刘树民,于栋华,等.水通道蛋白与中医学水液代谢的相关性探索[J].时珍国医国药,2017,28(5):1170-1172.
- [7] 张霖,王锦权.水通道蛋白在急性肝损伤中的作用的研究进展[J].中华医学杂志,2012,96(12):1148-1150.
- [8] 高天曙,赵玉瑶,魏征.积雪草苷对高脂饲料诱导的肥胖小鼠降脂作用研究[J].中华中医药杂志,2016,31(1):279-282.
- [9] 彭圆,田黎明,张翀,等.便秘对小鼠皮肤、肺组织水通道蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2013,24(2):293-295.
- [10] 张强,赵相轩,孙巍,等.水通道蛋白在肝纤维化及肝硬化进程中的作用[J].临床肝胆病杂志,2016,32(6):1192-1195.
- [11] CARRERAS FI, GRADILONE SA, MAZZONE A, et al. Rat hepatocyte aquaporin-8 water channels are down regulated in extrahepatic cholestasis[J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):1026-1033.

(收稿日期:2017-05-22 修回日期:2017-12-11)

(编辑:林 静)