

CXCL16、CD36 的释放，进而减少 IFN- $\gamma$ 、IL6、TNF- $\alpha$  等炎症介质的分泌，有效地抑制系膜细胞的增殖而发挥其保护作用。

#### 参考文献：

- [1] 杨霖云, 白克敏. 小儿肾脏病基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 10: 1.
- [2] Andrea CS, Bruce MH. The regulation of mesangial cell proliferation[J]. Nephron Exp Nephrol, 2008, 108: 74-79.
- [3] Lee HS, Song CY. Oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress in the development of glomerulosclerosis[J]. Am J Nephrol, 2009, 29: 62-70.
- [4] Mitsuoaka H, Toyohara M, Kume N, et al. Circulating soluble SR-PSOX/CXCL16 as a biomarker for acute coronary syndrome-comparison with high-sensitivity C-reactive protein[J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16(5): 586-593.
- [5] McKimmie CS, Graham GJ. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 1006-1011.
- [6] Lin Z, Gong Q, Zhou Z, et al. Increased plasma CXCL16 levels in patients with chronic kidney diseases[J]. Eur J Clin Invest, 2011, 41(8): 836-845.
- [7] Yang YL, Lin SH, Chuang LY, et al. CD36 is a novel and potential anti-fibrogenic target in albumin-induced renal proximal tubule fibrosis [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(3): 735-744.
- [8] Yamashita S, Hirano K, Kuwasako T, et al. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 299(1-2): 19-22.
- [9] Miyahara Y, Nishimura S, Watanabe M, et al. Scavenger receptor expressions in the kidneys of mice with lipoprotein glomerulopathy[J]. Clin Exp Nephrol, 2012, 16(1): 115-121.

(编辑: 宋威)

## 健脾活血祛湿方对肝硬化腹水大鼠肝功能及水通道蛋白 9 的影响

李 嘉<sup>1,2</sup>, 刘友章<sup>3</sup>, 陈美仁<sup>1</sup>, 吴海滨<sup>1</sup>(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 湖南中医药高等专科学校, 湖南 株洲 412012; 3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

**摘要:** **目的** 观察健脾活血祛湿方对肝硬化腹水大鼠肝功能及肝组织水通道蛋白 9 (AQP 9) 表达的影响。**方法** 将 Wistar 大鼠, 随机分为 6 组, 即正常组, 模型组, 健脾活血祛湿方高、中、低剂量组(52, 26, 16.25 g·kg<sup>-1</sup>), 秋水仙碱组 (100  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup>), 观察大鼠的一般情况, 测定腹水量、检测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、白蛋白 (ALB) 的含量及 AQP 9 mRNA 转录与蛋白翻译水平。**结果** 健脾活血祛湿方对肝硬化腹水大鼠症状有明显的改善作用, 能促进模型大鼠腹水消退、改善相应肝功能指标, 具有良好的保肝作用; 与模型组比较, 健脾活血祛湿方组 AQP 9 mRNA 转录与蛋白翻译水平均有不同程度的升高, 作用强度与用药剂量呈正相关。**结论** 健脾活血祛湿方良好的保肝作用及对 AQP 9 的升高作用是其治疗肝硬化腹水的靶点之一。

**关键词:** 健脾活血祛湿方; 肝硬化腹水; 水通道蛋白 9

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0437-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.012

### Effect of Jianpi Huoxie Qushi Prescription on Hepatic Function and Aquaporin 9 Expression in Cirrhotic Rats with Ascites

LI Jia<sup>1,2</sup>, LIU Youzhang<sup>3</sup>, CHEN Meiren<sup>1</sup>, WU Haibin<sup>1</sup>(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012 Hunan, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 李嘉, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病。Email: lijiaacy1314@sina.com。

基金项目: 湖南省中医药管理局中医药科学研究项目(2013116)。

**Abstract: Objective** To study the influence of *Jianpi Huoxie Qusshi* prescription(JHQP)on the hepatic function and aquaporin 9 (AQP9)expression in the cirrhotic rats with ascites. **Methods** Healthy Wistar rats were evenly randomized into blank control group, model group, colchine ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )group, and high-, middle- and low-dose JHQP groups (in the dosage of 52, 26, 16.25  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively). The rats were given oral administration of the corresponding medicine once a day for 4 continuous weeks. After treatment, the general health status of the rats were observed, the amount of ascites was tested, and the serum levels of ALT, AST and ALB as well as AQP9 mRNA and protein expression were detected. **Results** JHQP could obviously improve the general health state of the rats, promote the subsidence of ascites and improve the indexes of hepatic function, indicating that JHQP had satisfactory protective effect on liver. The expression levels of AQP9 mRNA and protein were increased to various degrees in JHQP groups as compared with those in the model group, and the increase was positively correlated with the dosage. **Conclusion** JHQP shows good hepatic protection for cirrhotic rats with ascites, and the therapeutic mechanism may be related with the increase of AQP9 expression.

**Keywords:** *Jianpi Huoxie Qusshi* prescription; Hepatocirrhosis with ascites; aquaporin 9

肝硬化腹水在许多肝脏疾病终末期的常见并发症。腹水的形成,对人体健康影响极大<sup>[1]</sup>。课题组多年临床实践发现,健脾活血祛湿方法治疗肝硬化腹水疗效显著<sup>[2]</sup>。但其作用靶点尚不十分明确。研究<sup>[3]</sup>发现,肝水通道蛋白(AQP9)主要在肝内分布,对肝细胞内液体的转运发挥重要的作用,可能与肝硬化腹水有着密切联系。本研究拟观察治疗前后肝硬化腹水大鼠肝组织 AQP 9 mRNA 转录水平、蛋白水平变化,探讨健脾活血祛湿方治疗肝硬化腹水的作用靶点,为中医药治疗肝硬化腹水提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 药品及试剂** 健脾活血祛湿方:五爪龙 30 g、白术 30 g、白背叶根 30 g、猪苓 15g、田基黄 20 g、茜草 15 g、土鳖虫 10 g、砂仁 5 g(后下),药材均购自广州中医药大学第一附属医院,水煎浓缩制备。秋水仙碱,购于中科院生物制品标准品中心,批号:130712。以 0.2 %羧甲基纤维素钠将秋水仙碱配制成所需浓度的混悬液,备用。四氯化碳( $\text{CCL}_4$ ),购于广州化学试剂厂,批号:130825。橄榄油,品利(上海)食品有限公司,批号:150201。谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司,批号:120304;免疫组化试剂盒,福州迈新生物技术开发有限公司,批号:1932800; First strand cDNA synthesis kit,北京普洛麦格生物技术有限公司,批号:150207693; Real-time PCR 试剂盒,日本 TOYOBO 公司,批号:

00113315; Western Blotting 试剂盒,广州市杏海生物,批号:41821902。

**1.2 主要仪器** hf-220 全自动生化分析仪,济南汉方医疗器械有限公司; 7501 紫外-可见光分光光度计,北京 Thermo Fish 公司; H1850 低温离心机,湖南长沙湘仪检测设备有限公司; 1658000 垂直电泳仪,美国 Bio-Rad 公司; ABI7500 荧光定量仪,美国 ABI 公司; XDS-1 倒置显微镜,广州粤显光学仪器有限公司。

**1.3 动物** 健康 Wistar 大鼠 90 只,雄性,SPF 级,体质量 240~260 g,购自中山大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(粤)2011-0029。标准普通大鼠颗粒饲料喂养,自由饮水。饲养于广州中医药大学实验动物中心实验室,设施使用许可证号:SCXK(粤)2008-0020。

**1.4 分组、模型复制及给药** 采用  $\text{CCL}_4$ -酒精综合改良法<sup>[4]</sup>复制肝硬化腹水模型。实验第 1 天以  $3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  皮下注射  $\text{CCL}_4$ ,之后则予  $\text{CCL}_4$ -橄榄油溶液(4:6),按照  $1.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  腹部皮下注射  $\text{CCL}_4$ ,每周 2 次。每周测体质量 1 次,以调整给药剂量,直至大鼠肝硬化腹水形成,同时予 10 %乙醇溶液为大鼠的唯一饮水,普通饲料自由进食。另取 10 只大鼠作为正常对照组,于腹部皮下注射等容量橄榄油 8 周。大鼠腹部明显膨隆、皮下有波动感,23 号注射针头穿刺后有清亮略呈黄色的液体流出,并且白蛋白(ALB)及胶体渗透压(COP)的参考值分别低于  $34.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $\text{COP} <$

17.4 mmHg, 即为肝硬化腹水伴随低蛋白血症的成模标准<sup>[5-6]</sup>。将 50 只肝硬化腹水大鼠随机分为 5 组, 即模型组, 健脾活血祛湿方高、中、低剂量组 (52, 26, 16.25 g·kg<sup>-1</sup>), 秋水仙碱组 (100 μg·kg<sup>-1</sup>), 每组 10 只, 灌胃给药, 每天 1 次, 模型组和正常组给予等容量生理盐水, 连续 4 周, 为防止肝硬化的可逆性, 成模后仍以 40 % CCL<sub>4</sub> 1 mL·kg<sup>-1</sup> 皮下注射 (正常对照组除外), 每周 1 次, 至实验结束。

**1.5 取材** 各组分别于给药 4 周后, 禁食 12 h, 予 10 % 水合氯醛 (3 mL·kg<sup>-1</sup>) 腹腔注射麻醉, 取肝脏组织置于冻存管内并立即存放于充满液氮的液氮罐内低温保存。

### 1.6 检测指标及方法

**1.6.1 血清肝功能指标的测定** 采集门静脉血 2 mL, 将血样进行低温离心, 取上清液, 用全自动生化仪测定 ALT、AST、ALB 的含量。

**1.6.2 RT-PCR 测定肝组织 AQP 9 mRNA** 按 Trizol 法提取总 RNA。组织研磨后加入 1 mL Trizol 溶液, 用涡旋器混匀移至 1.5 mL 离心管, 室温放置 5 min; 加入 200 μL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温静置 15 min; 4 °C, 10000 g 离心 3 min, 溶液分为 3 层, RNA 溶解在水相中, 转移水相至另一个新的 RNase free EP 管; 加入 0.5 倍体积异丙醇, 涡旋充分混匀; 4 °C, 12000 g 离心 10 min, 离心后管底出现 RNA 沉淀, 去上清; 加入 75 % 乙醇 1 mL, 轻轻颠倒, 12000 g 离心 5 min, 去上清; 室温晾干或真空干燥, 加入 30~50 μL 的 DEPC 水溶解沉淀。取 1 μL RNA 样品, 在微量分光光度计 K2800 上测定 OD 值, OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 的比值大于 1.8, 用于后续实验。

引物设计: *Rattus norvegicus aquaporin9*(AQP 9), mRNA(XM\_006243363.1 1240-1383 144 bp)

Rat AQP 9 上游引物: CGGACTCAACTCTGGCT-GTG

Rat AQP 9 下游引物: GCACCAATCATAGGACC-CACG

Rat 18S rRNA gene

Rat-18S 上游引物: GAATTCCTCAGTAAGTCCGGT-CATA

Rat -18S 下游引物: CGAGGGCCTCACTAAAC-CATC, 105bp

反应体系: cDNA (1:20)5.0 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL, dH<sub>2</sub>O 4.0 μL。

反应条件: 95 °C, 5 min; 95 °C, 15 s; 60 °C, 34 s, 40 个循环, 融解曲线分析: 温度 60 °C~95 °C。

**1.6.3 肝组织 AQP 9 免疫组化测定** 将石蜡切片置于二甲苯中浸泡 15 min, 更换二甲苯后再浸泡 15 min; 无水乙醇中浸泡 5 min; 95 % 乙醇中浸泡 5 min; 70 % 乙醇中浸泡 5 min; 70 % 乙醇中浸泡 5 min; 蒸馏水冲 2 次。高压热修复。在沸水中加入含乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0)容器。盖上不锈钢高压锅的盖子, 但不进行锁定。将玻片置于金属染色架上, 缓慢加压, 使玻片在缓冲液中浸泡 5 min, 然后将盖子锁定, 保持微沸腾 20 min, 去除热源, 冷却到室温。免疫组化笔画圈圈定范围。一抗孵育: PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 10 % 正常山羊血清封闭液, 室温 20 min, 滴加一抗 50 μL 4 °C 过夜, 在 37 °C 复温 20 min。PBS 洗 3 次, 各 5 min; 滴加二抗复合液 40~50 μL, 37 °C 30 min; PBS 洗 3 次各 5 min; DAB 显色 1~12 min, 在显微镜下掌握染色程度; PBS 或自来水冲洗 10 min; 苏木精复染 2 min, 盐酸酒精分化; 自来水冲洗 10~15 min; 脱水、透明、封片、镜检。应用 BI-2000 图像分析系统, 每张切片随机选取 3~4 个视野(×200), 进行阳性细胞的平均光密度值测定。

**1.6.4 Western Blotting 法检测肝组织 AQP 9** 称取肝组织 250 mg, 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入裂解液 500 μL, 研磨器冰上研磨孵育 30 min, 15000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 收集上清。以 BCA 法进行蛋白定量后浓度均一化, 取 35 μg 蛋白于体积分数为 15 % 的 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 50 g·L<sup>-1</sup> 的脱脂奶粉常温 25 °C 摇床封闭 2 h, 兔抗 AQP 9 一抗 (1 : 500) 孵育 4 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记羊抗兔 IgG (1 : 6000), 25 °C 孵育 40 min, PBST 洗涤后, ECL 发光显色蛋白表达量, 用 Quantity one 软件进行相对定量分析。根据预染蛋白 Marker 条带的清晰度情况, 判断其转移的效率。为保证上样量的一致性, 以 GAPDH 为内参。

**1.7 统计学处理方法** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计。数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 对各组数据先进行正态检验和方差分析, 遵循正态分布和方差齐性的采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法分析, 方差不齐采用 Tamhane's T2 方法。

## 2 结果

**2.1 对各组大鼠一般情况的影响** 正常组大鼠精神状态正常, 摄食情况正常, 皮毛等未见明显异常变

化；模型组大鼠精神较为暴躁，易怒，摄食情况不佳，体质量逐渐减轻（相比其余5组大鼠体质量偏轻），皮毛无泽，活动能力下降，出现大便排泄异常，8周后甚则出现大便稀溏情况、味臭。健脾活血祛湿方各剂量组大鼠基本情况均有一定的好转，摄食情况逐渐好转，体重逐渐增加，皮毛开始恢复一定的光泽度，活动较前增加，大便情况逐渐好转。

**2.2 对各组大鼠腹水情况的影响** 实验结束时，正常组大鼠未出现腹水，模型组和秋水仙碱组大鼠可见较多腹水，淡黄色；健脾活血祛湿方各剂量组大鼠腹水显著消退，颜色较模型组及秋水仙碱组变淡，与模型组比较腹水量，明显减少 ( $P < 0.01$ )。秋水仙碱组与模型组比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，见表1。

表1 各组大鼠12周末腹水量的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Comparison of the amount of ascites in rats of different groups at the end of week

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	腹水量 /mL
正常组	-	-
模型组	-	3.78 ± 0.52
健脾活血祛湿方高剂量组	52	0.31 ± 0.19**
健脾活血祛湿方中剂量组	26	0.80 ± 0.29**
健脾活血祛湿方低剂量组	16.25	1.11 ± 0.61**
秋水仙碱组	0.0001	3.51 ± 0.41

注：与模型组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

**2.3 对各组大鼠 ALT、AST 和 ALB 的影响** 与正常组比较，模型组大鼠血清 ALT、AST 的水平均明显升高，ALB 水平下降 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，健脾活血祛湿方和秋水仙碱均能不同程度地降低血清 ALT、AST 和升高 ALB 水平 ( $P < 0.01$ )。其中，以健脾活血祛湿方高剂量组效果最明显，经治疗后，健脾活血祛湿方高剂量组各指标与正常组相仿 ( $P > 0.05$ )，而健脾活血祛湿方低、中剂量组和秋水仙碱组指标分别与正常组比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，结果见表2。

**2.4 RT-PCR 实验结果**

**2.4.1 PCR 荧光反应曲线图** 由于检测样品的初始拷贝数差异，PCR 循环次数到达荧光域值时存在差别，当样品浓度越高时，所需 PCR 循环数越少。结果显示，溶解曲线为单一峰型，提示特异性较好，见图1和图2。

**2.4.2 AQP9 基因表达的定量结果** 与正常组比较模型组 AQP 9 mRNA 转录水平表达明显减少 ( $P < 0.01$ )；健脾活血祛湿方高、中剂量组 AQP 9 mRNA 转录水平表达明显增加，与模型组比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，秋水仙碱组和健脾活血祛湿方低剂量组 AQP 9 mRNA 表达与模型组比较差异也有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见图3。

表2 对各组大鼠 ALT、AST 和 ALB 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Comparison of ALT, AST and ALB in rats of different groups

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	ALB/g·L <sup>-1</sup>
正常组	-	38.81 ± 2.34	66.56 ± 12.54	41.24 ± 3.23
模型组	-	140.57 ± 34.29 <sup>#</sup>	557.56 ± 84.36 <sup>#</sup>	30.57 ± 2.78 <sup>#</sup>
健脾活血祛湿方高剂量组	52	44.54 ± 9.45 <sup>**</sup>	76.14 ± 12.12 <sup>**</sup>	40.33 ± 1.79 <sup>**</sup>
健脾活血祛湿方中剂量组	26	57.88 ± 7.92 <sup>**</sup>	88.45 ± 18.56 <sup>**</sup>	34.31 ± 3.88 <sup>**</sup>
健脾活血祛湿方低剂量组	16.25	66.78 ± 9.40 <sup>**</sup>	113.00 ± 23.51 <sup>**</sup>	33.56 ± 4.67
秋水仙碱组	0.0001	66.14 ± 11.56 <sup>**</sup>	134.78 ± 33.34 <sup>**</sup>	36.76 ± 5.12

注：与正常组比较，<sup>#</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

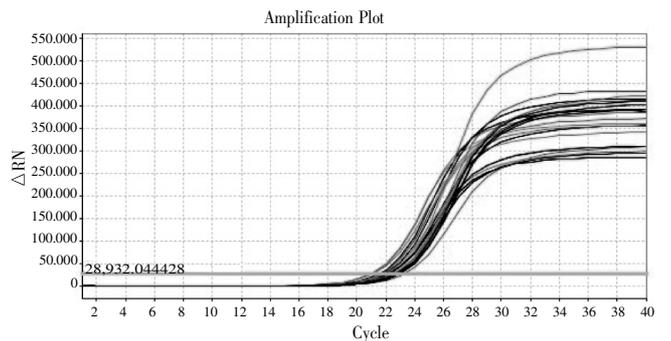


图1 AQP9 扩增曲线

Figure 1 Amplification curve of AQP 9

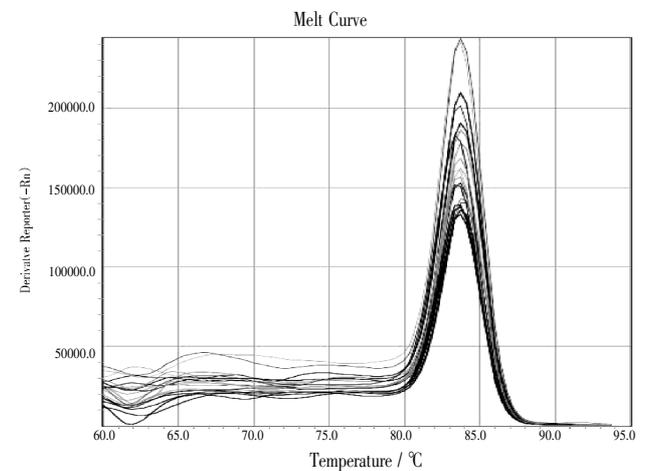


图2 AQP9 溶解曲线

Figure 2 Melting curve of AQP 9

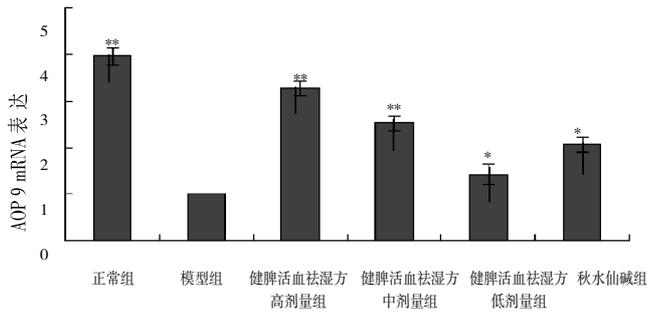


图 3 AQP9mRNA 转录水平表达

Figure 3 APQ 9 mRNA expression level in different groups

注: 与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

**2.5 免疫组化结果** AQP 9 主要是呈棕褐色的阳性染色, 肝细胞核呈蓝色, AQP 9 表达主要定位于肝细胞膜上和胞质内。模型组 AQP 9 少量表达, 与正常组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 健脾活血祛湿方高剂量组与模型组比较, AQP 9 蛋白表达量显著增高 ( $P < 0.01$ ), 见表 3 和图 4。

表 3 各组大鼠肝 AQP9 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Figure 3 Hepatic AQP 9 protein expression level in rats of different groups

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	平均光密度值 (MOD)
正常组	-	0.442 ± 0.013
模型组	-	0.232 ± 0.021 <sup>##</sup>
健脾活血祛湿方高剂量组	52	0.516 ± 0.007 <sup>**</sup>

注: 与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

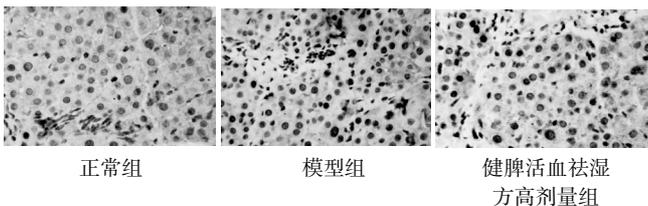


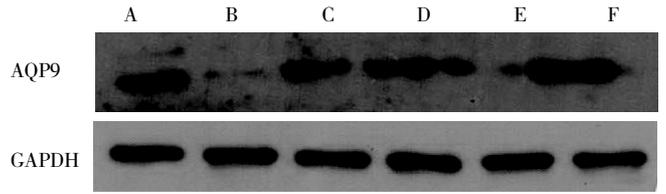
图 4 AQP 9 蛋白免疫组化结果 (DAB 显色, ×200)

Table 4 AQP 9 protein expression showed by immunohisto chemical assay (by DAB staining, ×200)

**2.6 Western blotting 检测结果** 与正常组比较, 模型组 AQP 9 表达明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较 健脾活血祛湿方高、中剂量组 AQP 9 表达明显升高 ( $P < 0.01$ ), 低剂量组 AQP 9 表达也虽有升高但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 秋水仙碱组 AQP 9 表达也升高 ( $P < 0.01$ )。见图 5 和图 6。

### 3 讨论

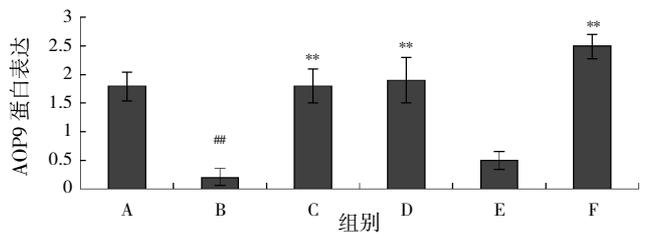
健脾活血祛湿方是由五爪龙、田基黄、白术、



A. 正常组; B. 模型组; C. 健脾活血祛湿方高剂量组; D. 健脾活血祛湿方中剂量组; E. 健脾活血祛湿方低剂量组; F. 秋水仙碱组

图 5 Western blotting 检测 AQP9 表达

Table 5 AQP 9 expression detected by western blotting method



注: 与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 6 Western blotting 检测 AQP9 表达

Table 6 Detection of AQP 9 expression by western blotting method

白背叶根、猪苓、茜草、土鳖虫、砂仁等组成, 具有健脾祛湿、活血化瘀、调理脾胃之功效, 临床上治疗脾虚湿盛兼血瘀型肝硬化腹水患者取得了良好的疗效。

水通道蛋白, 又称作水孔蛋白 (Aquaporin, AQP) 是一组对水有高选择性的细胞跨膜转运蛋白<sup>[7]</sup>。AQPs 在水的分泌吸收、细胞内外水平衡等过程中起着重要的作用<sup>[8]</sup>。研究表明, AQP 9 存在于肝细胞中, 尤以窦状隙表面最丰富, 是一种肝脏特异性的甘油通道<sup>[9]</sup>。AQP 9 对甘油和尿素高度通透, 可能是甘油进入肝细胞以及尿素排出肝细胞的通路<sup>[10]</sup>。另有研究表明, AQP 9 不仅具有重要的生理功能, 其表达失调与脂肪肝的发生也密切相关<sup>[11]</sup>。免疫电镜发现 AQP 9 标记位于肝细胞质膜。因此, 认为肝细胞膜上丰富的 AQP 9 可能参与了肝跨膜水和溶质的转运, 其可能与维持肝细胞渗透压和调节分解代谢有关, 并参与肝窦与肝细胞间水的转运, 并且与 AQP 8 协同调节毛细胆管分泌胆汁<sup>[12]</sup>。由上述可见, AQP 9 在肝腹水形成和消退中均可能起到了重要作用。

本研究结果显示, 经过中药干预治疗后, 可明显改善大鼠肝功能, 提高大鼠肝脏 AQP 9 mRNA 的转录水平表达和 AQP 9 蛋白表达的提高。同时, 秋水仙碱组中 AQP 9 表达也升高, 说明其保肝作用机制

之一可能也是与 AQP 9 相关, 但并没有消退腹水的作用。研究结果还显示, 该方能显著改善模型组大鼠症状、促进模型大鼠腹水消退、降低模型大鼠 ALT、AST, 并能提高 ALB。我们推测健脾活血祛湿方通过护肝保肝作用, 以及对 AQP9 表达的升高作用, 增加了肝细胞膜的通透性, 维持了细胞内外水代谢的平衡, 同时, 在一定程度上改善了肝细胞功能损害, 起到促进腹水消退的作用。上述可能是该方起到健脾利水作用的分子生物学基础之一, 可以作为治疗肝硬化腹水的新靶点。

### 参考文献:

- [1] 贝光明, 李海强, 韦刚. 肝硬化腹水形成机制及治疗的研究进展[J]. 中华临床新医学, 2011, 4(7): 677-678.
- [2] 符小聪. 健脾益肝方对肝硬化腹水 NO 及 ET-1 调节的相关性研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2009: 42-43.
- [3] Jablonski EM, Mattocks MA, Sokolov E, et al. Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2007, 250(1): 140-144.
- [4] 唐倩. 大鼠肝硬化腹水模型的制备及其在白蛋白药理学评价中的应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012: 13-17.
- [5] Satoshi H, Hitoshi N, Takashi Y, et al. Effectiveness of recombinant human serum albumin in treatment of ascites in liver cirrhosis: evidence from animal model[J]. Gen Pharmac, 1998, 31(5): 811-815.
- [6] 詹纯列, 肖育华, 李新春, 等. 普通级、SPF 级 SD、Wistar 大鼠血液生化常值的测定与比较[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(2): 94-96.
- [7] 缪睿, 李昌煜. 水通道蛋白-依赖性细胞迁移的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 601-605.
- [8] 刘凯. 水通道蛋白在肝胆系统中的生理学研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2012, 19(5): 316-318.
- [9] Rojek AM, Skowronski MT, Fichtbauer EM, et al. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP 9) knockout mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(9): 3609-3614.
- [10] 王燕燕, 陈俊虎, 张秀果, 等. 水通道蛋白 9 在子痫前期患者胎盘中的表达及意义[J]. 广东医学, 2013, 34(17): 2663-2665.
- [11] 肖潇, 梅浙川, 邱烈旺, 等. 叉头转录因子 1 基因沉默对水通道蛋白 9 在正常人肝细胞中表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(10): 1157-1159.
- [12] 王良, 邓利平, 黄秀深, 等. 湿阻中焦证模型胃肠水通道蛋白 9 (AQP9) 的病理特征性表达分布谱以及平胃散干预的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 233-235.

(编辑: 宋威)

## 自热式痹痛巴布剂的药效学研究

李亨<sup>1</sup>, 许学猛<sup>2</sup>, 陈能<sup>1</sup>, 李鹏<sup>1</sup>, 胡零三<sup>1</sup> (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广东省第二中医院, 广东 广州 510095)

**摘要:** 目的 观察自热式痹痛巴布剂对小鼠疼痛扭体潜伏时间、扭体次数, 二甲苯所致小鼠耳廓肿胀及血液中 5-羟色胺(5-HT)含量的影响。方法 取 NIH 小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组: 正常对照组(等量基质巴布剂)、扶他林乳胶组(0.78 g·kg<sup>-1</sup>)、活血止痛膏组(36.4cm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup>)、痹痛巴布剂组(1.30 g·kg<sup>-1</sup>)和自热式痹痛巴布剂组(1.30 g·kg<sup>-1</sup>), 观察给药后对小鼠腹腔注射乙酸刺激所致小鼠疼痛扭体的影响、对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响, 并采用酶联免疫法测定小鼠血清内 5-HT 含量的改变。结果 自热式痹痛巴布剂组与痹痛巴布剂组比较, 小鼠疼痛扭体的次数减少, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。自热式痹痛巴布剂组与痹痛巴布剂组比较, 小鼠耳廓肿胀率降低, 但无统计学意义( $P > 0.05$ )。自热式痹痛巴布剂组 5-HT 与痹痛巴布剂组比较含量升高 ( $P < 0.05$ )。结论 适当的温热治疗能使小鼠疼痛扭体次数减少以及二甲苯所致小鼠耳廓肿胀率下降, 体内血清 5-HT 水平增高。

**关键词:** 自热式痹痛巴布剂; 药效学; 5-羟色胺; 外用

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0442-04

收稿日期: 2014-03-14

作者简介: 李亨, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医药治疗退行性骨关节疾病。Email: liheng04zt@126.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B031800414)。