

# 防风不同极性部位对腹泻大鼠的止泻作用 和结肠不同亚型 AQP 的调控

梁瑞峰<sup>1,2</sup>, 葛文静<sup>1</sup>, 李兵杰<sup>1,2</sup>, 宋献美<sup>3</sup>, 张艳燕<sup>3</sup>, 王慧森<sup>1</sup>, 李更生<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 河南省中医药研究院中药研究所, 郑州 450004; <sup>2</sup> 河南中医药大学药学院, 郑州 450046;

<sup>3</sup> 河南医学高等专科学校检验系, 郑州 451191

**摘要:**为了观察防风不同极性部位对腹泻大鼠止泻作用和对结肠不同亚型水通道蛋白(aquaporin, AQP)影响的比较,将80只SD大鼠随机分为正常组、模型组、地芬诺酯组、防风石油醚萃取部位组、乙酸乙酯萃取部位组、正丁醇萃取部位组、水溶性部位组和总提取物组,每组10只,除正常组外其余各组每天灌胃番泻叶水煎液,连续7天,于第8天开始各组大鼠上午灌胃番泻叶,下午灌胃相应药物,正常组与模型组给予等体积的2%吐温-80溶液,连续给药7天。观察大鼠排便情况,检测大鼠血清中电解质含量和二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase水平,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察结肠病理形态学变化,Western blot分析结肠中不同亚型AQP的表达情况。结果显示防风石油醚萃取部位、正丁醇萃取部位和总提取物组可降低大鼠的腹泻指数,增加血清中Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>浓度及结肠组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase的活性,降低血清DAO和TNF- $\alpha$ 的水平,改善结肠黏膜损伤,上调结肠组织中AQP-3、AQP-4和AQP-8的蛋白表达;防风石油醚部位还可下调结肠组织中AQP-9的蛋白表达水平。综上表明,防风具有较好的止泻作用,石油醚部位和正丁醇部位是其止泻的活性部位,且二者对肠道不同亚型的AQP调控具有差异。

**关键词:**防风;腹泻;不同极性部位;水通道蛋白

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)8-1348-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.8.011

## Antidiarrheal effect of different polarity extracts from *Saposhnikovia divaricata* and their regulatory roles on colonic expression of different AQP subtypes

LIANG Rui-feng<sup>1,2</sup>, GE Wen-jing<sup>1</sup>, LI Bing-jie<sup>1,2</sup>,  
SONG Xian-mei<sup>3</sup>, ZHANG Yan-yan<sup>3</sup>, WANG Hui-sen<sup>1</sup>, LI Geng-sheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chinese Materia Medica, Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China;

<sup>2</sup> School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

<sup>3</sup> Department of Medical Laboratory Science, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China

**Abstract:** To explore the antidiarrheal effect of different polarity extracts from *Saposhnikovia divaricata* in diarrhea rats and their regulatory roles on colonic expression of different aquaporin (AQP) subtypes, 80 SD rats were randomly divided into normal group, model group, diphenoxylate group, petroleum ether fraction of *S. divaricata* group, ethyl acetate fraction group, *n*-butanol fraction group, aqueous fraction group, and total extracts group, with 10 rats in each group. Except for the normal group, all the other groups were given senna leaf decoction for 7 days. From the 8th day, rats in each group were given senna leaves in the morning and corresponding drugs in the afternoon for 7 days. The feces of rats was observed, the electrolyte contents and the levels of diamine oxidase (DAO), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in the serum were detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was applied to observe the pathomorphological changes of colon. The expression of different AQP subtypes

收稿日期:2020-11-23 接受日期:2021-01-22

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873022);河南省中医药科研重大专项(2019ZYZD09);河南省中医药科研专项普通课题(2016ZY2022)

\*通信作者 Tel:86-019937123489; E-mail:lgshn1962@163.com

was analysed by Western blot. The results showed that the petroleum ether fraction, *n*-butanol fraction and total extract of *S. divaricata* reduced the diarrhea index of rats, increased the contents of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in serum and the activity of  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  in colon, reduced DAO and TNF- $\alpha$  in serum, improved colonic mucosal damage, and upregulated the protein expression of AQP-3, AQP-4 and AQP-8 in colon. The petroleum ether fraction of *S. divaricata* downregulated the protein expression level of AQP-9 in colon. Conclusion could be achieved that *S. divaricata* has obvious antidiarrheal effects, the petroleum ether fraction of *S. divaricata* and *n*-butanol fraction may well be the active sites for antidiarrhea, and they have different regulatory roles on different AQP subtypes in colon.

**Key words:** *Saposhnikovia divaricata*; diarrhea; different polarity extracts; aquaporin

腹泻是一组由多病原、多因素而导致大便次数增多、性状稀薄或呈水样,常伴有腹痛、呕吐、发热等临床症状及不同程度水液、电解质紊乱的消化系统疾病,流行病学研究显示每年全球人群腹泻发生率约为 5%<sup>[1]</sup>,也是导致 5 岁以下儿童死亡的第 2 大原因<sup>[2]</sup>。肠道是水液转运代谢的主要部位,每天大约有 9 L 的水在肠道分泌和吸收,对维持体内水液平衡和消化吸收功能具有重要意义,肠道对水的重吸收下降是产生腹泻的重要原因。结肠对水的重吸收是逆梯度的主动吸收过程,主要依靠水通道蛋白(aquaporin, AQP)的转运功能来完成。AQP 是负责水分子跨膜转运的主要蛋白,可高效、有选择性地转运水分子以维持细胞内外环境的水液平衡。肠道中表达至少 11 种不同亚型的 AQP,其不仅是肠道水分子吸收代谢的重要载体,还参与了肠内黏液、营养液的分泌和肠道细胞内外环境的稳态维持,在一些肠神经功能调控中具有重要作用。AQP 在肠道表达异常可造成肠道环境紊乱,导致水分子吸收减少,使水分子大量聚集在肠腔中,引起腹泻的发生<sup>[3]</sup>。随着对 AQP 的研究不断深入,AQP 有望成为许多与水液代谢转运有关的肠道疾病的防治靶点<sup>[4]</sup>。

腹泻属中医学“泄泻”范畴,中医认为“湿胜则濡泻”“无湿不成泻”,湿邪为本病病机的关键。风药是具有祛风胜湿、升发清阳等作用的一类药物,以其辛香温燥之性治疗泄泻作用显著<sup>[5]</sup>。防风是风药的典型代表,为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk. 的干燥根,具有祛风解表、胜湿止痛的功效,并且以其升清燥湿之性用于脾虚湿胜、清阳不升所致的泄泻。防风治疗腹泻的临床疗效确切,但其对腹泻大鼠肠道 AQP 的影响未见报道。本研究采用番泻叶灌胃建立大鼠腹泻模型,通过观察防风及其不同极性提取部位对腹泻大鼠体质量、腹泻指数、电解质、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和结肠组织中 AQP-

3、AQP-4、AQP-8 和 AQP-9 蛋白表达的影响,探讨防风止泻的可能作用机制,有助于拓展风药的临床应用,也为开发相关药物提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,体重 180~200 g,由河南省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2015-0004,饲养于河南省中医药研究院实验动物中心,标准饲料喂养,自由饮飮饮水。本研究经河南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准(批准号 HNZYYYJ2019-0034),符合实验动物伦理学要求。

### 1.2 药品与试剂

防风、番泻叶购自亳州市张仲景中药饮片有限责任公司,经河南省中医药研究院中药研究所王慧森副研究员鉴定,分别为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk. 的干燥根和豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl 的干燥小叶;复方地芬诺酯片(安阳市华安药业有限责任公司,批号:20190402);钠、钾、氯、 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20191107、20191213、20191204、20191219);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、二胺氧化酶(DAO)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20191023、20191101;水通道蛋白-3(AQP-3)、AQP-4、AQP-8、AQP-9、 $\beta$ -actin 抗体和羊抗兔 IgG 二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 AH06123353、AI10268996、AH09112517、AE11369128、AD10061684、AC20012695);其他试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器

Synergy NEO 全功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);T18 型匀浆机(德国 IKA 公司);2K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);CX31 显微镜(日本 Olympus 公司);DYCZ-24DN 垂直电泳仪、DYCZ-40D 转印电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Flu-

orChem R 凝胶成像分析仪(美国 ProteinSimple 公司)。

## 2 方法

### 2.1 药物制备

防风总提取物:防风粉碎过 40 目筛,称取 500 g 药材粉末,加入 8 倍量 95% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并滤液,回收溶剂至无乙醇气味,得乙醇提取物 77.64 g。剩余残渣用 6 倍量蒸馏水煎煮 2 次,每次 1.0 h,过滤合并,浓缩干燥后得水提取物 35.89 g。将乙醇提取物与水提取物混合,作为防风总提取物,取一部分用于制备防风不同极性部位,其余实验时用 2% 吐温-80 配制成含生药量 2.5 g/mL 的溶液。

防风不同极性部位的制备:称取防风总提取物用适量蒸馏水制成混悬液,然后依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次,分别合并各部分萃取液,减压回收溶剂得石油醚、乙酸乙酯、正丁醇及水部位。实验时用 2% 吐温-80 配制成含生药量 2.5 g/mL 的溶液。

番泻叶溶液的制备:番泻叶加蒸馏水浸泡 30 min,煎煮 10 min,减压浓缩至生药含量 0.5 g/mL,4 °C 保存。

### 2.2 分组造模及给药

80 只 SD 大鼠,雌雄各半,适应性饲养 5 天后按体质量随机分为正常组(normal, Nor)、模型组(model, Mod)、地芬诺酯组(diphenoxylate, Dip, 3 mg/kg)、防风石油醚萃取部位组(petroleum ether fraction, PEF)、乙酸乙酯萃取部位组(ethyl acetate fraction, EAF)、正丁醇萃取部位组(*n*-butanol fraction, NBF)、水溶性部位组(aqueous fraction, AF)和总提取物组(total extract, TE),按人与大鼠等效剂量的 5 倍确定防风不同部位给药剂量,均按生药量为 5.0 g/kg,每组 10 只。除正常组外其余各组每天灌胃番泻叶水煎液 20 mL/kg<sup>[6]</sup>,连续 7 天,于造模第 8 天开始,各组大鼠上午灌胃番泻叶水煎液,下午灌胃相应药物,正常组与模型组给予等体积的 2% 吐温-80 溶液,连续给药 7 天。

### 2.3 检测指标

#### 2.3.1 一般情况

造模前、给药前、末次给药后分别观察大鼠精神状态和活动情况、毛色,称量体质量并记录。

#### 2.3.2 腹泻指数

给药前、末次给药后大鼠单只单笼饲养,笼底铺

好滤纸,4 h 后取出滤纸观察粪便并计算腹泻指数。腹泻指数 = 稀便率(每只大鼠所排稀便数与总便数之比) × 平均稀便级(每只大鼠所有稀便级数总和与稀便数之比)。稀便级根据滤纸上污迹范围的大小分为 4 级:1 级,污迹直径 < 1 cm;2 级,污迹直径 1 ~ 1.9 cm;3 级,污迹直径 2 ~ 3 cm;4 级,污迹直径 > 3 cm。

#### 2.3.3 大鼠血清中电解质含量

末次给药后 24 h,10% 水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,在 3 000 rpm 离心分离血清,比浊法检测大鼠血清中钠离子(Na<sup>+</sup>)含量,微板法检测大鼠血清中钾离子(K<sup>+</sup>)、氯离子(Cl<sup>-</sup>)含量。

#### 2.3.4 大鼠 DAO、TNF-α、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 的变化

取血离心分离血清,微量法检测大鼠血清中 DAO 活性,酶联免疫吸附法测定 TNF-α 的含量。取血后快速分离大鼠结肠组织,分为两部分,取一部分精确称重后加生理盐水冰浴条件下制成 10% 匀浆,在 4 °C、12 000 rpm 离心 10 min,取上清,按照试剂盒说明书微量法检测大鼠结肠中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性。

#### 2.3.5 结肠组织病理学变化

取一部分结肠用 4% 多聚甲醛溶液固定,常规脱水、包埋、切片、HE 染色,显微镜下观察。

#### 2.3.6 Western blot 检测结肠中不同亚型 AQP 的表达

称取大鼠结肠组织,RIPA 裂解液提取组织蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,煮沸变性后取等量蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离,然后转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,弃封闭液,漂洗 3 次后分别加 AQP-3(1:800)、AQP-4(1:600)、AQP-8(1:600)、AQP-9(1:600) 及内参 β-actin 一抗(1:1 000),4 °C 过夜,漂洗后滴加二抗室温孵育 1 h,ECL 显色液曝光,拍照,Image J 软件对蛋白条带进行分析,以目的条带/β-actin 灰度值分析结肠中各亚型 AQP 的蛋白表达。

## 2.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对结果进行分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验, $P < 0.05$  表示有统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 大鼠一般情况

正常组大鼠活动自如,毛发光泽正常,饮食饮水

及大小便如常,体质量增长规律。除正常组外其他组大鼠造模后精神萎靡,毛发干枯光泽明显变差,活动减少,体质量明显降低,造模后第5天各组大鼠腹泻率已达100%,大便稀软不成形,次数增加,肛周

污浊。给药后地芬诺酯组、防风石油醚组、正丁醇组和总提取物组大鼠精神状态、体质量和腹泻程度有不同程度改善,而防风乙酸乙酯组和水部位组大鼠体质量和精神状态恢复不明显(见表1)。

表1 不同时间各组大鼠体质量变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 1 Body weight of rats in each group at different time( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	体质量 Body weight(g)		
		造模前 Before model	给药前 Before administration	给药后 After administration
正常组 Nor	-	198.70 ± 5.36	209.90 ± 6.06	221.60 ± 6.57
模型组 Mod	-	201.30 ± 5.45	193.40 ± 4.87 <sup>##</sup>	190.30 ± 5.26 <sup>##</sup>
地芬诺酯组 Dip	5.0	199.60 ± 5.43	191.20 ± 5.06 <sup>##</sup>	198.50 ± 5.57 <sup>##**</sup>
石油醚部位 PEF	5.0	200.50 ± 4.92	192.70 ± 5.32 <sup>##</sup>	196.80 ± 5.88 <sup>##**</sup>
乙酸乙酯部位 EAF	5.0	196.90 ± 5.61	191.80 ± 5.64 <sup>##</sup>	190.70 ± 5.21 <sup>##</sup>
正丁醇部位 NBF	5.0	199.10 ± 4.85	193.50 ± 4.93 <sup>##</sup>	197.50 ± 5.74 <sup>*##</sup>
水部位 AF	5.0	200.30 ± 5.30	192.20 ± 5.36 <sup>##</sup>	191.30 ± 5.11 <sup>##</sup>
总提取物 TE	5.0	198.90 ± 5.53	192.90 ± 5.17 <sup>##</sup>	197.30 ± 5.45 <sup>##**</sup>

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;下同。

Note: Compared with normal, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with model, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; The same below.

### 3.2 腹泻指数

与正常组大鼠相比,给药前各组大鼠腹泻指数显著增高( $P < 0.01$ ),与模型组比较,给药7天后地芬诺酯组、防风石油醚部位组、正丁醇部位组和总

提取物组大鼠腹泻指数明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),防风乙酸乙酯部位组和水部位组大鼠的腹泻指数无统计学差异(见表2)。

表2 不同时间各组大鼠的腹泻指数( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 2 Diarrhea index of rats in each group at different time( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	腹泻指数 Diarrhea index	
		给药前 Before administration	给药后 After administration
正常组 Nor	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组 Mod	-	1.17 ± 0.28 <sup>##</sup>	1.37 ± 0.39 <sup>##</sup>
地芬诺酯组 Dip	5.0	1.22 ± 0.32 <sup>##</sup>	0.63 ± 0.33 <sup>##**</sup>
石油醚部位 PEF	5.0	1.19 ± 0.29 <sup>##</sup>	0.91 ± 0.48 <sup>##*</sup>
乙酸乙酯部位 EAF	5.0	1.14 ± 0.31 <sup>##</sup>	1.32 ± 0.35 <sup>##</sup>
正丁醇部位 NBF	5.0	1.23 ± 0.23 <sup>##</sup>	0.83 ± 0.44 <sup>##**</sup>
水部位 AF	5.0	1.16 ± 0.28 <sup>##</sup>	1.27 ± 0.39 <sup>##</sup>
总提取物 TE	5.0	1.21 ± 0.27 <sup>##</sup>	0.78 ± 0.41 <sup>##**</sup>

### 3.3 防风不同极性部位对腹泻大鼠血清电解质的影响

与正常组大鼠比较,模型组大鼠血清中 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 和 $\text{Cl}^-$ 浓度显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与模型组比较,地芬诺酯组大鼠血清中 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 和

$\text{Cl}^-$ 浓度明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),防风正丁醇部位组和总提取物组大鼠血清中 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 浓度明显增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),防风石油醚部位组大鼠血清中 $\text{Na}^+$ 浓度升高( $P < 0.05$ )(见表3)。

表3 防风不同极性部位对腹泻大鼠血清电解质的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Effects of different polarity extracts of *S. divaricata* on serum electrolytes in diarrhea rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	$\text{Na}^+$ (mmol/L)	$\text{K}^+$ (mmol/L)	$\text{Cl}^-$ (mmol/L)
正常组 Nor	-	$143.46 \pm 4.62$	$7.41 \pm 0.67$	$101.97 \pm 3.86$
模型组 Mod	-	$128.64 \pm 5.10^{##}$	$5.87 \pm 0.76^{##}$	$98.28 \pm 3.59^{\#}$
地芬诺酯组 Dip	5.0	$141.35 \pm 4.49^{**}$	$7.28 \pm 0.59^{**}$	$101.58 \pm 3.60^*$
石油醚部位 PEF	5.0	$133.87 \pm 5.03^*$	$6.41 \pm 0.68$	$99.43 \pm 3.54$
乙酸乙酯部位 EAF	5.0	$129.68 \pm 5.31$	$5.98 \pm 0.73$	$98.78 \pm 3.73$
正丁醇部位 NBF	5.0	$136.29 \pm 4.87^{**}$	$6.68 \pm 0.78^*$	$99.86 \pm 3.68$
水部位 AF	5.0	$130.34 \pm 5.16$	$6.13 \pm 0.74$	$98.78 \pm 3.72$
总提取物 TE	5.0	$139.72 \pm 4.83^{**}$	$7.16 \pm 0.70^{**}$	$100.81 \pm 3.83$

### 3.4 防风不同极性部位对腹泻大鼠 DAO、TNF- $\alpha$ 和 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ 的影响

与正常组大鼠比较,模型组大鼠血清中 DAO 和 TNF- $\alpha$  水平显著升高,结肠组织中  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  活性降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,地芬诺酯组、防风正丁醇部位组和总提取物组大鼠血清中

DAO 和 TNF- $\alpha$  水平明显降低,结肠组织中  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  活性增加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),防风石油醚部位组大鼠血清中 TNF- $\alpha$  含量明显减少,结肠组织中  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  活性升高( $P < 0.05$ ) (见表4)。

表4 防风不同极性部位对大鼠 DAO、TNF- $\alpha$  和  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Effects of different polarity extracts of *S. divaricata* on the levels of DAO, TNF- $\alpha$  and  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  in diarrhea rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	DAO (U/L)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	$\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ (U/mg)
正常组 Nor	-	$32.43 \pm 4.35$	$117.26 \pm 16.48$	$3.67 \pm 0.44$
模型组 Mod	-	$41.16 \pm 5.19^{##}$	$165.73 \pm 18.25^{##}$	$2.88 \pm 0.35^{##}$
地芬诺酯组 Dip	5.0	$33.47 \pm 4.47^{**}$	$137.35 \pm 17.84^{**}$	$3.53 \pm 0.45^{**}$
石油醚部位 PEF	5.0	$38.31 \pm 4.86$	$148.21 \pm 18.46^*$	$3.26 \pm 0.41^*$
乙酸乙酯部位 EAF	5.0	$40.83 \pm 5.05$	$156.32 \pm 20.11$	$2.95 \pm 0.35$
正丁醇部位 NBF	5.0	$36.27 \pm 4.67^*$	$134.82 \pm 17.97^{**}$	$3.38 \pm 0.39^{**}$
水部位 AF	5.0	$39.87 \pm 4.95$	$153.95 \pm 19.05$	$2.91 \pm 0.36$
总提取物 TE	5.0	$34.44 \pm 4.43^{**}$	$127.29 \pm 18.53^{**}$	$3.47 \pm 0.42^{**}$

### 3.5 各组大鼠结肠组织病理学变化

正常组大鼠结肠黏膜上皮结构正常,细胞排列整齐,未见肠黏膜表皮细胞坏死脱落,固有层腺体无萎缩,黏膜下层未见明显改变;模型组大鼠肠黏膜明显萎缩,绒毛稀疏倒伏不规整,短缩融合,结肠隐窝、腺管部分区域黏膜上皮坏死脱落,可见炎性细胞浸润;地芬诺酯组、防风石油醚部位组、正丁醇部位组和总提取物组大鼠结肠黏膜上皮及腺管排列相对整齐,少量炎性细胞浸润,绒毛损伤有不同程度改善。

防风乙酸乙酯部位组和水部位组较模型组病理变化没有明显改善(见图1)。

### 3.6 防风不同极性部位对腹泻大鼠结肠中不同亚型 AQP 表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中 AQP-3、AQP-4 和 AQP-8 的蛋白表达明显减少( $P < 0.01$ ),AQP-9 表达无明显变化。与模型组比较,地芬诺酯组、防风石油醚部位组、正丁醇部位组和总提取物组大鼠结肠组织 AQP-3、AQP-4 和 AQP-8 蛋白表达增

加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),地芬诺酯组和防风石油醚部位组大鼠结肠中 AQP-9 表达明显减少( $P <$

$0.05$  或  $P < 0.01$ ) (见图 2、表 5)。

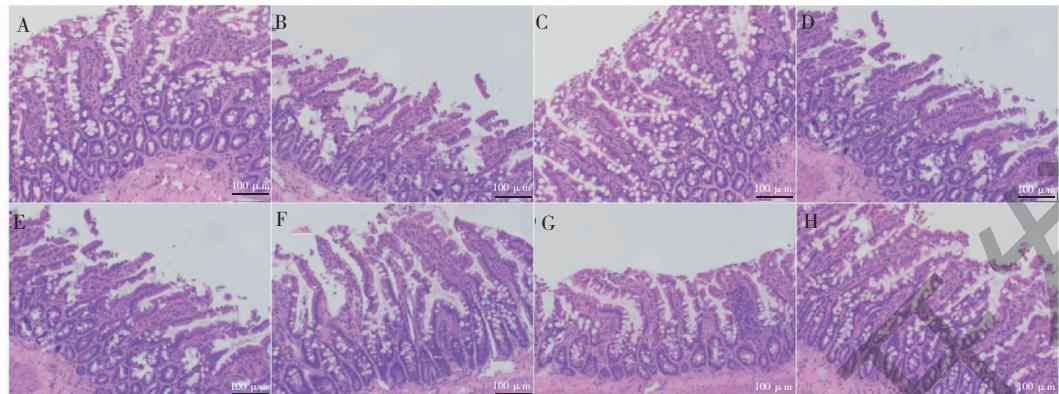


图 1 各组大鼠结肠组织病理学形态(HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Pathomorphology of colonic tissue in rats of each group (HE,  $\times 200$ )

注:A:正常组;B:模型组;C:地芬诺酯组;D:石油醚部位组;E:乙酸乙酯部位组;F:正丁醇部位组;G:水部位组;H:总提取物组;下同。Note:  
A:Nor;B:Mod;C:Dip;D:PEF;E:EAF;F:NBF;G:AF;F:TE;The same below.

表 5 防风不同极性部位对大鼠 AQP-3、AQP-4、AQP-8 和 AQP-9 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effects of different polarity extracts of *S. divaricata* on the expressions of AQP-3,  
AQP-4, AQP-8 and AQP-9 in rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 (g/kg)	AQP-3	AQP-4	AQP-8	AQP-9
正常组 Nor	-	$0.45 \pm 0.11$	$0.51 \pm 0.12$	$0.56 \pm 0.13$	$0.41 \pm 0.10$
模型组 Mod	-	$0.19 \pm 0.07^{##}$	$0.22 \pm 0.06^{##}$	$0.28 \pm 0.06^{##}$	$0.39 \pm 0.11$
地芬诺酯组 Dip	5.0	$0.41 \pm 0.10^{**}$	$0.39 \pm 0.11^{**}$	$0.44 \pm 0.10^{**}$	$0.22 \pm 0.09^{**}$
石油醚部位 PEF	5.0	$0.27 \pm 0.08^*$	$0.30 \pm 0.08^*$	$0.37 \pm 0.07^*$	$0.28 \pm 0.10^*$
乙酸乙酯部位 EAF	5.0	$0.22 \pm 0.06$	$0.23 \pm 0.07$	$0.28 \pm 0.08$	$0.42 \pm 0.13$
正丁醇部位 NBF	5.0	$0.31 \pm 0.09^{**}$	$0.34 \pm 0.09^{**}$	$0.41 \pm 0.11^{**}$	$0.41 \pm 0.11$
水部位 AF	5.0	$0.23 \pm 0.07$	$0.20 \pm 0.06$	$0.26 \pm 0.08$	$0.40 \pm 0.14$
总提取物 TE	5.0	$0.39 \pm 0.11^{**}$	$0.44 \pm 0.10^{**}$	$0.45 \pm 0.11^{**}$	$0.43 \pm 0.12$

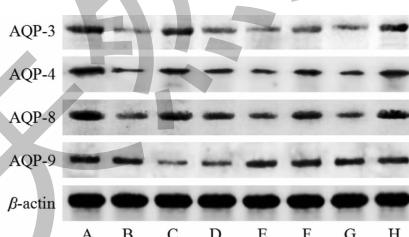


图 2 大鼠结肠中 AQP-3、AQP-4、AQP-8 和 AQP-9 的表达情况

Fig. 2 The expressions of AQP-3, AQP-4,  
AQP-8 and AQP-9 in colon of rats

#### 4 讨论

腹泻是由于各种因素造成肠道对水分的吸收功能下降或者分泌功能增强而导致大便含水量增加所

致的肠道疾病,属于中医学“泄泻”范畴,其病机为脾虚湿盛,运化功能失常,致使清浊不分、水湿下注而泄泻。中医认为湿胜则濡泄,而风能胜湿。风药属于法象药理的称谓,是具有祛风胜湿、升发清阳等作用,用于风邪致病的一类药物。风药气轻味薄,性味多辛香走窜,因其温燥之性而可祛湿。AQP 是特异性跨膜转运水的蛋白家族,参与水的吸收与转运,与机体津液的生成、输布、排泄关系密切。中医认为,湿邪致病从其性状上可分为有形可见的湿病如水肿、泄泻和潜在不可见的湿病如风湿痹痛,但均与津液失衡有关,AQP 可能是津液病证发生的生物学基础<sup>[7]</sup>。基于“风能胜湿”的中医理论,AQP 可能是风药治病的靶点。防风为风药的代表药物,以其升

清燥湿之性用于治疗泄泻。因此,明确防风不同极性部位的止泻作用及对结肠 AQP 的影响,有助于拓展风药的临床应用,也为开发相关药物提供参考。

番泻叶是常用的泻下药,其主要成分为番泻苷、大黄酚、芦荟大黄素及大黄酸等,能使肠蠕动增加,肠道对水等物质的消化吸收受抑制,并刺激肠道引起炎症介质合成和释放,使肠黏膜受损和促进大肠排空,泻下作用显著,因此被常用于药理研究中腹泻动物模型造模药物<sup>[8]</sup>。本研究显示,当大鼠灌胃番泻叶至第 5 天时,大鼠腹泻率已达 100%;第 7 天时模型大鼠的体质量较正常大鼠明显下降,腹泻指数明显升高。番泻叶致泻大鼠停止灌胃番泻叶后有可能恢复正常,因此本实验在第 8 天给药时的同时继续灌胃番泻叶,以消除动物腹泻症状自动恢复的影响。给药结束后,地芬诺酯组、防风石油醚部位组、正丁醇部位组和总提取物组大鼠体质量较模型组大鼠增加,腹泻指数降低,表明防风具有良好的止泻作用,石油醚部位、正丁醇部位可能是其止泻的有效部位。

腹泻的发病机制研究发现致病因素激活腺苷酸环化酶,细胞内 ATP 转化为 cAMP,结肠  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase 活性降低,促使肠黏膜细胞中  $\text{K}^+$  流出,  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  等进入细胞内,使细胞肿胀坏死,肠腔中水分明显增加而引起腹泻,导致电解质紊乱<sup>[9]</sup>。DAO 是存在于肠道黏膜上皮细胞中的具有高度活性的细胞内酶,当肠黏膜细胞受损时 DAO 释放入血,导致血清 DAO 活性升高,因此 DAO 的活性可反映肠道黏膜损伤程度,评价肠黏膜屏障功能的状态<sup>[10]</sup>。腹泻发生时肠黏膜受到损伤,巨噬细胞及 T 细胞被活化,促进 TNF- $\alpha$  的合成和释放,TNF- $\alpha$  进一步促进炎症因子(如 IL-1、IL-6 等)分泌,加重肠黏膜损伤,致其水肿、充血并形成恶性循环<sup>[11]</sup>。本研究显示番泻叶诱导的腹泻大鼠血清中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Cl}^-$  浓度明显降低,DAO 和 TNF- $\alpha$  水平升高,结肠组织中  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase 活性下降,病理形态学显示结肠黏膜受损。地芬诺酯组、防风正丁醇部位组、石油醚部位组和总提取物组大鼠血清中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Cl}^-$  浓度不同程度升高,DAO 和 TNF- $\alpha$  水平降低,结肠组织中  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase 活性增加,受损的结肠黏膜有不同程度的修复改善,表明防风石油醚部位、正丁醇部位和总提取物可修复受损的肠道黏膜,平衡电解质紊乱。

肠道是机体重要的水液转运代谢器官,早期认为水在肠道的转运取决于电解质产生的肠腔内外渗

透压差,现在研究发现结肠对水的重吸收是 AQP 介导的逆渗透梯度的主动吸收过程。AQP 在肠道的异常表达是导致肠道对水分吸收减少继而引发大量水分累积的关键因素,与肠道环境失衡密切相关<sup>[12]</sup>。目前已发现水通道蛋白的 13 个亚型(AQP0 ~ AQP12),表达于肠道的有 11 种,起主要作用的有 AQP3、4、8 和 9。AQP3 属于具有相对选择性的组成型水通道蛋白,除了水以外还可以转运甘油、尿素,研究发现 AQP3 通过介导肠腔与血管之间的水液转动调节结肠中的粪便含水量<sup>[13]</sup>;AQP4 主要位于结肠上皮细胞的基底外侧膜,作为高度选择性的水通道蛋白,具有高度快速转运水的能力,是其他水通道蛋白通透性的 3~4 倍<sup>[14]</sup>,将肠腔内的水分子转运到肠道间质,在消化系统中起到很重要的作用;AQP8 在结肠表达于黏膜吸收上皮细胞,参与结肠对水分的重吸收,在腹泻患者结肠表达明显降低,且结肠 AQP8 的表达越低,粪便含水量越高<sup>[15]</sup>;AQP9 不仅参与结肠水液代谢,而且还可合成和分泌黏液,保护肠黏膜和润滑大便,与便秘的发生相关<sup>[16]</sup>。本实验显示,腹泻模型大鼠结肠 AQP3、4、8 表达下调,AQP9 无明显变化,说明 AQP 对肠道内水的重吸收具有重要意义,其表达异常是腹泻形成的分子学基础;地芬诺酯、防风石油醚部位、正丁醇部位和总提取物可提高腹泻大鼠结肠组织 AQP-3、AQP-4 和 AQP-8 的蛋白表达;值得注意的是,地芬诺酯和防风石油醚部位可减少大鼠结肠中 AQP-9 水平,而防风总提取物对 AQP9 无明显影响,推测防风的其他部位可能调控了 AQP9 的异常表达。上述结果表明防风及其石油醚部位、正丁醇部位可能通过调控结肠 AQP 的表达发挥止泻作用,且石油醚部位与正丁醇部位对不同亚型的 AQP 调控具有差异。

综上所述,防风具有较好的止泻作用,其止泻作用可能与提高  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase 活性、修复黏膜损伤、调控肠道 AQP 表达有关,石油醚部位和正丁醇部位是防风止泻的活性部位,且二者对肠道不同亚型的 AQP 表达具有差异。不同亚型的 AQP 调控机制不同,防风及其不同极性部位对 AQP 差异调控的机制有待进一步研究。

## 参考文献

- 1 Schiller LR. Evaluation of chronic diarrhea and irritable bowel syndrome with diarrhea in adults in the era of precision medicine[J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113:660-669.
- 2 Zhang Y, Quan SY, Zeng LN, et al. Evidence-based evalua-

- tion of global existed diarrhea guidelines of children [J]. Chin Pharm(中国药房), 2018, 29:1109-1116.
- 3 Camilleri M, Carlson P, Chedid V, et al. Aquaporin expression in colonic mucosal biopsies from irritable bowel syndrome with diarrhea[J]. Clin Transl Gastroenterol, 2019, 10 (4) :e00019.
- 4 Ikarashi N, Kon R, Sugiyama K. Aquaporins in the colon as a new therapeutic target in diarrhea and constipation[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17 :1172.
- 5 Tang YY, Lv GH. Mechanism research of wind medicine in the treatment of diarrhoea[J]. Clin J Tradit Chin Med(中医药临床杂志), 2019, 31:1612-1615.
- 6 Zhou NH, Lv SS, Qiao ZW, et al. Experimental research on the antidiarrheal effect of Jianpi Zhixiening granules [J]. Word J Integr Tradit Chin West Med(世界中西医结合杂志), 2016, 11:190-195.
- 7 Li ZH, Wang J, Cai RL. Progress in research on correlation between dampness disease and aquaporin[J]. J Integr Med (中西医结合学报), 2011, 9(1):5-10.
- 8 Pan X, Hu CJ, Geng YY, et al. Research on building method of spleen kidney Yang deficiency diarrhea rats model [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39:4658-4663.
- 9 Pongkorpsakol P, Yimnual C, Chatsudhipong V, et al. Cellular mechanisms underlying the inhibitory effect of flufenamic acid on chloride secretion in human intestinal epithelial cells [J]. J Pharmacol Sci, 2017, 134 :93-100.
- 10 Liu F. Influence of bifid triple viable capsules on intestinal flora and intestinal mucosal barrier function of patients with post-operation diarrhea after colostomy[J]. Chin J Microecol (中国微生态学杂志), 2017, 29:814-817.
- 11 Biao YN, Zhang NB, Zhang MQ, et al. Effects of *Plantago asiatica* L. on inflammatory cytokines and expressions of AQP8 gene and protein in colon tissue of diarrhea rats [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:665-671.
- 12 Chen WF, Song LJ, Zhao WC. Research progress of aquaporins in diarrhea[J]. Med Recapit(医学综述), 2018, 24 : 1041-1046.
- 13 Ikarashi N, Kon R, Iizasa T, et al. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35:957-962.
- 14 Yde J, Keely S, Wu Q, et al. Characterization of AQPs in mouse, rat, and human colon and their selective regulation by bile acids[J]. Front Nutr, 2016, 3:46.
- 15 Escudero-Hernández C, Münch A, Østvik AE, et al. The water channel aquaporin 8 is a critical regulator of intestinal fluid homeostasis in collagenous colitis[J]. J Crohns Colitis, 2020, 14:962-973.
- 16 Cao YX, He Y, Wei C, et al. Aquaporins alteration profiles revealed different actions of senna, sennosides, and sennoside A in diarrhea-rats[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10) :3210.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社