

增液汤干预干燥综合征模型鼠 AQP1/AQP8 的表达规律研究

吴晓丹¹ 任长虹² 张 林¹ 周洪伟³ 程 涓⁴ 杨 勇¹

(1 北京中医药大学, 北京, 100029; 2 首都医科大学宣武医院, 北京, 100053; 3 中国中医科学院, 北京, 100700; 4 北京中医药大学东直门医院, 北京, 101121)

摘要 目的: 观察增液汤干预下干燥综合征(Sjogren's Syndrome, SS)模型小鼠肺及结肠组织中水通道蛋白 AQP1(aquaporin1)、AQP8(aquaporin8)的表达规律。方法: 选用 BALB/c 小鼠, 各组 10 只, 免疫诱导法建立干燥综合征小鼠模型, 产生 SS 特异性临床表现和病理改变, 采用免疫组化和 Western blot 蛋白质印迹法观察增液汤对 SS 模型小鼠肺及结肠组织中 AQP1/AQP8 表达的影响。结果: 增液汤可以增强肺及结肠组织中 AQP1 的蛋白表达($P < 0.01$), 对 AQP8 无影响。结论: AQP1 在干燥综合征模型鼠多组织中的表达下调, 可能是干燥综合征水液代谢障碍, 多脏器损伤的机制之一; 增液汤恢复机体阴液, 起到“增水”功效可能与上调 AQP1 蛋白表达有关。

关键词 AQP1; AQP8; 干燥综合征; Western blot; 增液汤

Intervention of Zengye Decoction on Expression of Aquaporin-1, 8 in the Mice with Sjogren's Syndrome

Wu Xiaodan¹, Ren Changhong², Zang Lin¹, Zhou Hongwei³, Cheng Juan³, Yang Yong¹

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China; 3 China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4 Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 101121, China)

Abstract Objective: To observe the expressions of AQP1 and AQP8 in lung and colon tissue of mice with Sjogren's syndrome. **Methods:** Fifty BALB/c mice were randomized into five groups, with 10 mice in each group. The mice models with Sjogren's syndrome were established by immune inducing method. It was able to produce the specific clinical symptoms and pathological changes of Sjogren's syndrome. The effect of Zengye decoction on the expression of AQP1/AQP8 in lung and colon tissue was observed by immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Zengye decoction can strengthen the AQP1 protein expression in lung and colon tissue ($P < 0.01$), however AQP8 was barely changed. **Conclusion:** It could be one of the causes of Sjogren's syndrome that AQP1 expression was reduced in multiple organ in the mice with Sjogren's syndrome. Zengye decoction can increase the body fluid, and the effect may be associated with the increased AQP1 expression.

Key Words AQP1; AQP8; Sjogren's syndrome; Western blot; Zengye decoction

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.026

干燥综合征(sjogren's syndrome, SS)是一种慢性自身免疫性疾病, 以进行性腺体分泌减少为主要临床表现, 同时会累及身体多脏器出现炎性改变及功能受损。水通道蛋白的表达减少是干燥综合征重要的发病机制之一^[1], 为验证增液汤对干燥综合征患者的整体治疗作用, 有必要观察其是否能通过调节水通道蛋白表达而减轻干燥综合征模型的多脏器水液代谢障碍。因此本研究采用免疫组化和 Western blot 蛋白质印迹法, 探索性地观察增液汤对 SS 小鼠模型肺及结肠组织 AQP1 和 AQP8 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用 BALB/c 小鼠 50 只, 雌性, SPF 级, 8~10 周龄, 体质量 20 g 左右, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证: SCXK(京)2012-0001。分笼饲养, 自由饮水, 室温(20 ± 2)℃, 湿度 55%~60%。

1.2 实验试剂及药物 AQP1 抗体(abcam 公司, 批号: ab11025); AQP8 抗体(sigma 公司, 批号: WH0000343M1); 弗氏完全佐剂; Tripure 蛋白提取试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司; 考马斯亮蓝 G-250(南京

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号: 81001495/H2705)

通信作者: 杨勇(1971—), 男, 北京中医药大学基础医学院方药系副教授, 医学博士, 研究方向: 历代名医组方思想及名方配伍的理论与实验研究

作者简介: 吴晓丹(1978—), 女, 北京中医药大学基础医学院方药系讲师, 医学博士, 研究方向: 方剂配伍规律及疗效客观化研究

建成生物工程研究所,20110510);二甲苯(北京益利精细化学品有限公司,20120822);苏木素染色液、伊红染色液(天合力恩化学试剂,20120907,20120603);石蜡;中性树脂;二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;百白破联合疫苗(武汉生物制品研究所有限责任公司,20111258-2)。增液汤药物(生地黄、玄参、麦冬)购自北京同仁堂药店,依据新版药典规定 HPLC 测定药物成分;水煎液组上药加 8~10 倍水浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次 40 min,合并滤液,浓缩成 1:1 药液,4℃冰箱保存备用,临用时用蒸馏水配成 40% 溶液。重组人干扰素 $\alpha 2b$ 注射液(北京凯因科技股份有限公司,20110571)。

1.3 实验仪器设备 ASP300 自动脱水机(德国 LEICA 公司);RM2135 切片机(德国 LEICA 公司);EG1140H 石蜡烤片机(德国 LEICA 公司);BX60 显微镜(日本 OLYMPUS 公司);SPOT-Ⅱ 图像分析系统(美国 diagnostic instruments Inc.);低温高速离心机(美国,Beckman);Dolphin-View 凝胶成像系统(美国,Wealtec);分光光度仪;-70℃低温冰箱;垂直板电泳转移装置。

1.4 动物模型的建立 选用 BALB/c 小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,模型组及给药各组分别注射百日咳疫苗+完全弗氏佐剂+同种鼠下颌腺抗原(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),多点注射于小鼠足垫、背部皮下,总量为 0.5 mL,腹部注射百日咳疫苗 0.05 mL;佐剂组注射 CFA,0.1 mL/只脚掌;空白对照组不作任何处理。观察 35 d 后造模各组出现饮水量增加,唾液流率减少等 SS 特异性病变后,中药组开始每日灌服增液汤(0.2 mL/10 g);空白组灌服与中药等体积蒸馏水;干扰素组腹腔注射重组人干扰素 $\alpha 2b$ 注射液。各组给药 15 d 后,小鼠脱颈椎处死,立即取肺及结肠组织,经 4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察;免疫组化检测 AQP1、AQP8 的定位表达;其余标本置于 -70℃ 冰箱中备用,作 Western blot 蛋白质印迹分析。

1.5 免疫组化研究 取出组织冷冻切片,0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min $\times$ 2 次;置于 0.3% 甲醇过氧化氢溶液,室温孵育 20 min;PBS 浸泡 5 min,加封闭血清 1 h;加一抗(AQP1、AQP8 抗体稀释度分别为 1:500 和 1:400),37℃孵育 1 h;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,加生物素化兔抗山羊 IgG,37℃孵育 1 h;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,加辣根酶标记链霉卵白素,37℃孵育 1 h;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,DAB 显色、冲洗、封片。对照设置:不加一抗为阴性对照。结果判定:棕黄或棕褐色颗粒判定为阳性。

染色强度评分标准:阳性细胞百分数 $< 5\%$ 、未被染色为阴性,计 0 分;5%~15%、浅棕色为弱阳性,计 1 分;15%~25%、浅棕色为中性,计 2 分; $> 25\%$ 棕色为阳性,计 3 分。

1.6 Western blot 蛋白质印迹分析

1.6.1 组织总蛋白提取 称取 -70℃ 冰箱保存的各组标本 100 mg,分别置于 5 mL 离心管中,各加入 1 mL Tripure 裂解液,以 Lowry 法测定蛋白浓度,转移上清置于 -20℃ 冰箱备用。

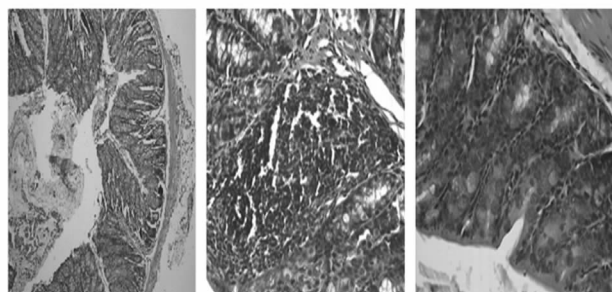
1.6.2 蛋白定量 1)制定标准曲线:将中分子量标准蛋白稀释如下:0、50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,各取 200 μL ,紫外可见分光光度计测吸光度。以蛋白标准浓度、吸光度值为横、纵坐标,绘制标准曲线。2)测样本浓度:将提取的蛋白溶液 25 μL 稀释 8 倍至 200 μL ,得到相应的吸光度值。将待测标本吸光度值在标准曲线上查出其对应的浓度,乘以适当稀释倍数即为样本浓度。

1.6.3 蛋白质印迹测定方法和步骤 分别取样本提取液并加上样缓冲液各 15 μL 混合,取标准蛋白加 200 μL 上样缓冲液,煮沸 5 min;加样(提取液加入总蛋白 30 μg ,标准蛋白加入 5 μg),缓冲液封闭,60 V 电压进行 SDS-PAGE 电泳 5 h;转膜;15 V 电压转膜 40 min;将 PVDF 膜置于 1% BSA 中封闭,4℃冰箱中过夜;倒出 1% BSA 后,加一抗(AQP1、AQP8 稀释度均为 1:1000)置于 37℃中 1 h;PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次,加生物素化兔抗羊 IgG3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37℃摇床 1 h;PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次,加辣根酶标记链亲合素 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37℃摇床 1 h;DAB 显色,凝胶成像系统拍照,以 β -actin 作为内参照。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,各组数据用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用 Student *t* test,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 均表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 增液汤对 SS 模型病理组织学影响



肠空白组 (HE $\times$ 100) 肠模型组 (HE $\times$ 400) 肠中药组 (HE $\times$ 400)

图 1 肠组织病理学改变

图 1 中空白组结肠组织无淋巴细胞浸润,形态正常;SS 模型鼠结肠固有层淋巴细胞浸润明显,灶片状淋巴组织增生;增液汤组结肠固有层仅有散在淋巴细胞浸润。

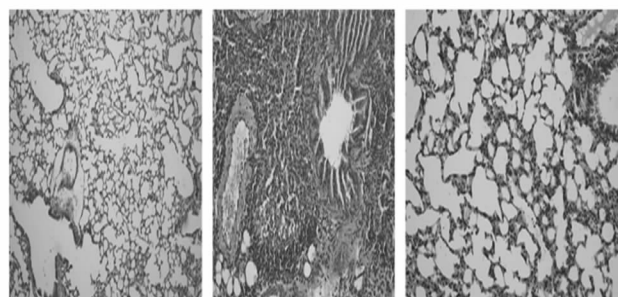


图 2 肺组织病理学改变

图 2 中空白组肺组织形态基本正常;SS 模型肺组织出现轻度胸膜炎,周围肺组织出现重度间质炎,部分出现肺气肿表现;增液汤组上述病理改变明显减轻。

2.2 增液汤对 SS 模型免疫组化的影响

2.2.1 SS 模型肺组织 AQP1 免疫组化结果

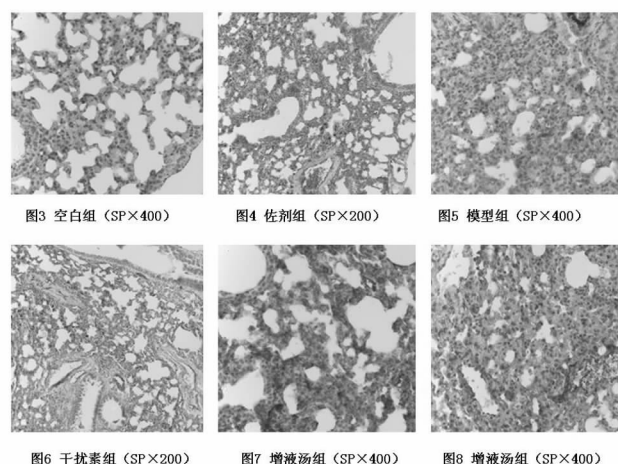


图 3-8 肺组织 AQP1 免疫组织化学结果

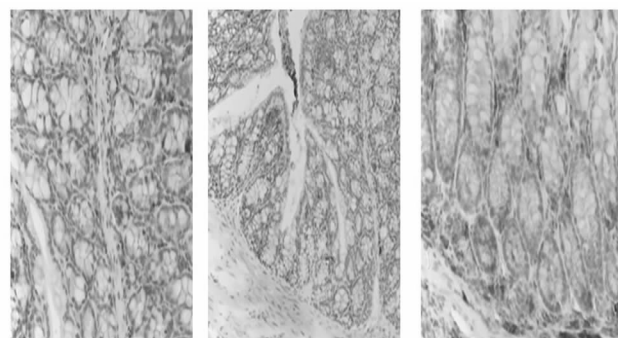


图 9-11 结肠组织 AQP1 免疫组织化学结果

图 5 显示 SS 模型肺泡及毛细血管 AQP1 表达减少,与空白组(图 3)比较差异无统计学意义($P > 0.05$);佐剂组与干扰素组(图 4、图 6) AQP1 表达略有

增强,与空白组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);增液汤组(图 7、图 8) AQP1 分布均匀,与空白组比较表达明显增强($P < 0.01$)。

2.2.2 SS 模型结肠组织 AQP1 免疫组化结果

增液汤组(图 11) AQP1 分布均匀,表达较空白组(图 9)增强($P < 0.05$);模型组(图 10)表达未见增强,与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.3 SS 模型肺及结肠组织 AQP8 免疫组化结果

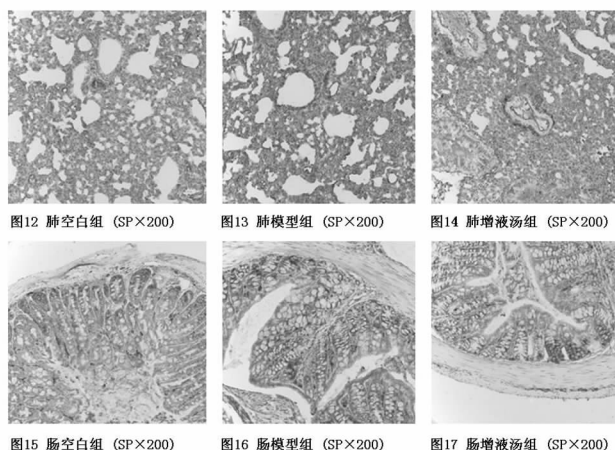


图 12-17 肺及结肠组织 AQP8 免疫组织化学结果

如图 12-17 所示, AQP8 在肺及结肠组织的表达明显,分布均匀,但各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

肺组织 AQP1/AQP8 Western 印迹分析

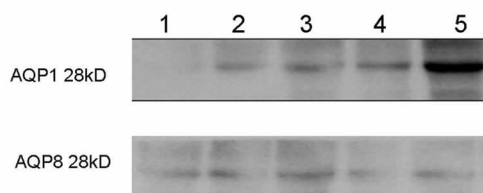


图 18(1 空白组;2 模型组;3 佐剂组;4 干扰素组;5 增液汤组)

结肠组织 AQP1/AQP8 Western 印迹分析

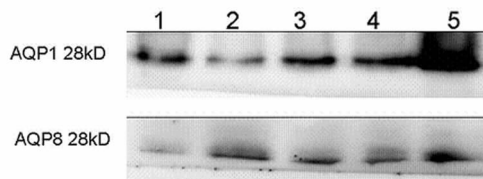


图 19(1 空白组;2 模型组;3 佐剂组;4 干扰素组;5 增液汤组)

2.3 Western blot 印迹分析 采用 Western blot 印迹分析,结果显示与免疫组化基本一致(图 18、图 19)。在肺组织中,与模型组(灰度值 0.785 ± 0.182)比较,增液汤组 AQP1(灰度值 3.795 ± 0.634)表达明显增强($P < 0.01$); AQP8 各组表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结肠组织中,与模型组(灰度值 $0.925 \pm$

0.326) 比较, 增液汤组 AQP1 (灰度值 4.227 ± 1.032) 表达明显增强 ($P < 0.01$); AQP8 增液汤组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

增液汤在《温病条辨》中治疗温病后期, 津亏肠燥证。基于中医理论思考分析, 温病首先犯肺, 肺为水之上源, 通调水道, 输布水液, 且肺与大肠相表里, 所以温病发热会导致肺运转水液功能下降, 进而导致肠道津液亏竭。本项目主要探索增液汤对干燥综合征模型水通道蛋白的调节规律, 进而证明增液汤对干燥综合征患者的整体治疗作用。结合本方主治证及脏腑表里关联性, 对肺及结肠组织中水通道蛋白 AQP1 及 AQP8 进行研究。研究结果显示, 增液汤干预下 AQP1 在肺泡毛细血管间及肠上皮细胞表达, 与模型组比较表达明显增强 ($P < 0.01$)。AQP8 在肺及结肠组织的表达明显, 分布均匀, 但各组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), western blot 结果与免疫组化趋同。Towne 等^[2]发现, 小鼠急性肺部腺病毒感染后 7~14 d, 肺组织中 AQP1 的表达均显著减少, 说明 AQP1 与肺组织水液运转具有相关性。在近 20 年的研究中陆续发现了水通道家族 (aquaporins, AQP) 中的 13 种亚型 (AQP0 - AQP12)^[3]。AQP1 是在人体分布最广泛的水通道蛋

白, 在机体的各个组织广泛表达, 提示其在维持体内水平衡过程中起重要作用^[4]。如果 AQP1 是增液汤的靶点, 说明增液汤“增水行舟”非独润肠, 可同时参与全身多组织的津液调节^[5]。同时, 肺与结肠组织中 AQP1 的相关性, 是否为“肺与大肠相表里”的联接靶点之一, 尚需进一步通过研究验证。我们的研究明确了养阴中药作用于机体的靶点, 并深入阐释了“增水行舟”的内涵。

参考文献

- [1] Steinfeld S, Cogan E, King LS, et al. Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren's syndrome patients [J]. Lab Invest, 2001, 81(2): 143-148.
- [2] Towne JE, Harrod KS, Krane CM, et al. Decreased Expression of aquaporin AQP1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22: 34-44.
- [3] Castle NA. Aquaporins as targets for drug discovery [J]. Drug Discovery Today, 2005, 10(7): 485.
- [4] 谭美芸. 水通道 AQP1 的研究进展 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(9): 241-243.
- [5] 吴晓丹, 孙丽英, 马伯艳. 《温病条辨》增液汤功效探析 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(6): 351-352.

(2013-07-17 收稿)

(上接第 1460 页)

或刺入坐骨神经) 等方面入手。2) 模型的稳定性, IRP 兔外因去除后是否存在自愈的可能需进一步研究。

综上, 本研究运用联合方法造模, 可重复性强, 为 IRP 的进一步探讨和研究提供了良好的模型和实验依据。

参考文献

- [1] 纪宗正, 吴涛. 直肠内脱垂的外科治疗 [J]. 临床外科杂志, 2011, 19(4): 219-220.
- [2] 何永恒, 凌光烈. 中医肛肠科学 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2011: 181, 190.
- [3] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. 2006-09-30.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [S]. 1993. 91.
- [5] 中华中医药学会肛肠分会. 痔、肛瘘、肛裂、直肠脱垂的诊断标准 (试行草案) [S]. 2002-11.
- [6] 武志弼, 杨光华. 中华外科病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 765.
- [7] 陈凌燕. 健脾固脱汤配合针灸疗法治疗小儿直肠脱垂 13 例疗效观察

[J]. 世界最新医学信息文摘, 2012, 12(12): 233.

- [8] 朱佑旺, 胡红明. 消痔灵加补中益气汤治疗脱肛 86 例体会 [J]. 武警医学院学报, 2011, 20(7): 568-569.
- [9] 刘晓玲. 补中益气汤对脾虚大鼠胃黏膜 TFFI 表达及 MEK/ERK 通路的影响 [M]. 广州中医药大学, 2011: 11.
- [10] 刘佃温, 范培. 中药联合 PPH 技术治疗直肠内脱垂 43 例 [J]. 光明中医, 2012, 27(3): 535-536.
- [11] McLeod NM, Patton DW. Peripheral alcohol injections in the management of trigeminal neuralgia [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 104(1): 12-17.
- [12] 王贵祥. 不同方法治疗混合痔合并直肠黏膜内脱垂 156 例 [J]. 陕西医学杂志, 2012, 41(7): 808-810.
- [13] 石章铁, 汪毓敏, 曾庆阳, 等. 混合痔合并直肠黏膜内脱垂的治疗 [J]. 医学信息, 2011, 24(12): 67.
- [14] 李鹤文. 直肠黏膜内脱垂和 3-4 度痔的微创治疗 [J]. 中国医药指南, 2007, 9: 19-20.
- [15] 王振军, 汤秀英, 王东, 等. 内痔的病理形态改变特征及其意义 [J]. 中华外科杂志, 2006, 44(3): 177-180.

(2013-06-17 收稿)