

甘遂半夏膏对肝硬化腹水大鼠腹膜水通道蛋白-1 基因表达影响的实验研究

★ 欧阳钦¹ 吴春明¹ 王晓东² (1. 浙江省温州市中医院肝病科 温州 325000; 2. 浙江省温州医学院附属第一医院 温州 325000)

摘要:目的:通过甘遂半夏膏对肝硬化腹水大鼠腹膜上水通道蛋白-1(AQP-1)表达的影响研究,探讨其利水机制。方法:80只健康SD大鼠分为空白对照组(A组)、模型组(B组)、生理盐水组(C组)、甘遂半夏膏组(D组),各20只,采用苯巴比妥钠诱导加皮下注射CCl₄制造细胞毒性肝硬化腹水大鼠模型;免疫组织化学检测AQP-1在各组大鼠腹膜上的表达。RT-PCR方法检测各组大鼠AQP-1在肝硬化腹水大鼠腹膜上mRNA的表达,并以3-磷酸甘油醛脱氢酶相对定量。结果:AQP-1蛋白质相对积分光密度:A组(28±8)、B组(14±8)、C组(12±6)、D组(23±9)和mRNA:A组(0.68±0.12) μg/μl、B组(0.34±0.14) μg/μl、C组(0.32±0.11) μg/μl、D组(0.58±0.15) μg/μl。结论:甘遂半夏膏可提高肝硬化腹水模型大鼠腹膜的AQP-1的表达,可能是其利水机制之一。

关键词:甘遂半夏膏;肝硬化腹水;水通道蛋白-1

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Empirical Study on the Influence of Gansuibanxia Mastic to Gene Expression of AQP-1

OUYANG Qin¹, WU Chun-ming¹, WANG Xiao-dong²

1. Wenzhou hospital of TCM, Wenzhou 325000;

2. The first hospital affiliated to Wenzhou medicine college, Wenzhou 325000

Abstract: Objective: to study on the influence of Gansuibanxia mastic to gene expression of AQP-1. Methods: 80 SD mice were divided into four groups: blank group (A), model group (B), NS group (C), Gansuibanxia group (D). Using phenobarbital sodium and CCl₄ to make the model of hepatic cirrhosis and abdominal dropsy. Using immunohistochemistry to detect AQP-1 in the abdominal membrane of the mice while using RT-PCR to detect the expression of AQP-1 in the form of 3-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Results: integral optical density of AQP-1 as follows: A (28±8), B (14±8), C (12±6), D (23±9). integral optical density of mRNA: A (0.68±0.12) μg/μl, B (0.34±0.14) μg/μl, C (0.32±0.11) μg/μl, D (0.58±0.15) μg/μl. Conclusion: Gansuibanxia mastic can improve gene expression of AQP-1, that may be the mechanism of alleviation of water retention

Key words: Gansuibanxia mastic; hepatic cirrhosis and abdominal dropsy; abdominal dropsy-1

肝硬化腹水是我国常见病、多发病,如不及时治疗,2~5年内死亡率超过80%。上世纪80年代末Agre^[1,2]领导的研究小组发现并证明了一种分子量为28KD的蛋白质是细胞膜转运水的特异性蛋白,该蛋白具有极强的水通透性,将其命名为1号水通道蛋白Aquaporin(AQP-1)。目前研究发现AQP-1主要分布在毛细血管及小静脉的内皮细胞上,其数量或功能异常对腹水的形成有重要意义。

甘遂半夏膏是根据古代医学大家张仲景《金匱要略》中

甘遂半夏汤加减化裁而成,作者在临床上使用本方治疗各种类型肝硬化腹水,均取得过较好的效果,但其机理却不清楚。本研究拟通过观察甘遂半夏膏对肝硬化腹水大鼠腹膜上水通道蛋白1的基因表达的影响,来探索其利尿机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物选用2月龄的雄性健康SD大鼠80只,体重140~160g,购自并饲养于温州医学院实验动物中心(许可

证编号:SCXK 浙 2005-0019)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及肝硬化模型的建立 雄性健康 SD 大鼠 80 只,温度维持在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,进标准饮食 2 周后开始实验。随机取出 20 只大鼠作为 A 组(对照组),继续标准饮食喂养 12 周后处死,留取腹膜组织;另外 60 只大鼠标准饮食喂养并饮用含苯巴比妥钠 350mg/L 的水,并接受 60% CCl₄ 和橄榄油混合液的背部皮下注射(6 ml/100g,每周 2 次,首次剂量加倍),至第 12 周末,随机取出 20 只大鼠为 B 组(模型组),立即处死,留取腹水、腹膜组织及肝组织标本;随机取出 20 只大鼠为 C 组(生理盐水组),改喂生理盐水(1 ml/100g)及标准饮食;另外 20 只大鼠为 D 组(治疗组),改喂甘遂半夏膏(1 g/100g)及标准饮食;C 组及 D 组各喂养 4 周后处死,留取腹水、腹膜组织及肝组织标本。

1.2.2 腹膜组织的留取 大鼠处死后,马上沿腹正中线剖开大鼠腹部,留取腹水;将壁层及脏层腹膜分离、取下,留取部分腹膜放入 10% 甲醛液中用于石蜡切片,余下部分用消毒铝箔包好迅速放入液氮中,保存于 -70°C 冰箱中,备用于总 RNA 的提取。

1.2.3 肝脏组织学分析 肝组织 Masson 染色,光镜下观察肝脏组织的一般形态结构,肝小叶、间质有无组织学异常。

1.2.4 免疫组织化学法检测腹膜组织水通道蛋白 1(AQP-1)的表达 腹膜组织标本在 4% 中性甲醛缓冲液中固定 48 h,70% 乙醇 24 h,80% 乙醇 12 h,95% 乙醇过夜,100% 乙醇 1 h。二甲苯透明 40~60 min(至标本透明为止)。浸蜡 2 h,包埋成石蜡块。用切片机将其切成 2 μm 厚的薄片,贴于经 1% 多聚赖氨酸浸泡的洁净载玻片上,60 $^\circ\text{C}$ 烤箱烤过夜,脱蜡至水。1.5% H₂O₂ 甲醇 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 20 min。TBS 洗 3 次,每次 5 min。0.1% 胃蛋白酶 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min,TBS 洗 3 次,每次 5 min。一抗(兔抗大鼠 AQP-1 多克隆抗体,1:500,美国 Chemicon 公司),4 $^\circ\text{C}$ 过夜,TBS 洗 3 次,每次 5 min。二抗(辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔 EnVision 多聚物,美国 DAKO 公司)37 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min,TBS 洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色,苏木素染色后,用二甲苯透明、风干。用中性树胶封片保存。采用 OLYMPUS BH-1 型光学显微镜、数码摄像机及北航医学图像分析管理系统进行半定量分析,同一条件下对每张标本按顺序选取 15 个视野($\times 10$),每个视野计算免疫组化阳性指数=阳性目标总面积/统计场总面积(面密度) $\times$ 阳性目标 PU 值(阳性单位),然后综合每张标本 15 个视野的免疫组化阳性指数。

1.2.5 腹膜组织总 RNA 提取 参照文献,按抽提总 RNA 试剂盒说明书操作,总 RNA 提取酶 1 ml Trizol(美国 GIBCO 公司)加 50~100 mg 腹膜组织,将组织彻底匀浆溶解。15~30 $^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 5 min,每 1 ml Trizol 加 0.2 ml 氯仿,混匀 15 s。在 15~30 $^\circ\text{C}$ 水浴中静置 2~3 min。4 $^\circ\text{C}$ 冷冻离心,12000 r/min,15 min。取液相,加 0.5 ml 异丙醇,室温静置 10 min。4 $^\circ\text{C}$ 冷冻离心,12000 r/min,10 min。弃上清,加 1 ml 75% 乙醇,混匀。4 $^\circ\text{C}$ 冷冻离心,7 500 r/min,5 min。弃上清,干燥。加无酶水约 20 μl ,在 60 $^\circ\text{C}$ 水浴中溶解 10 min。取 2 μl RNA

样品,稀释于 500 μl DEPC 处理水中,在紫外分光光度仪分别于 A₂₆₀、A₂₈₀ 处比色,求 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值。

1.2.6 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) AQP-1 引物(由上海生物工程有限公司合成),上游:5'TCC G GCATCAC-CTCCTCCCT 3',下游:5'T GAAT G GTCCCACCCA GAAA 3',被扩增的 cDNA 产物长 319bp。GAPDH 引物合成:上游:5'A GATCCACAAC G GATACATT3',下游:5'TCCCTCAA GATT GTCA GCAA 3',被扩增的 cDNA 产物长 309bp。采用 Promega cDNA 逆转录试剂盒,按试剂盒说明书操作。取总 RNA 样品 2 μg ,加入 0.5 μg 随机引物,加水至 15 μl ,于 70 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min 后,立即置冰浴。于上反应管中加入以下试剂:5 $\times$ RT 反应缓冲液 5 μl ,10 mM dNTP 混和液 1.25 μl ,RNase Inhibitor (40U/ μl) 0.6 μl ,M-MLV 转录酶(200 U/ μl) 1 μl ,用无 RNA 酶的双蒸水补足至 25 μl ,于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 60 min,置于 -70°C 保存备用。每个 PCR 反应体系为:cDNA 2 μl ,上游引物 1 μl ,下游引物 1 μl ,TaqDNA 聚合酶 1 μl ,10 $\times$ 含镁缓冲液 2.5 μl ,dNTP(0.2 mmol/L) 1 μl ,ddH₂O 16.5 μl ,反应总体积 25 μl 。

1.2.7 RT-PCR 循环过程 预变性 95 $^\circ\text{C}$ 3 min,变性 94 $^\circ\text{C}$ 30 s,退火 58 $^\circ\text{C}$ 45 s,延伸 72 $^\circ\text{C}$ 1 min 热循环 40 次,终末延伸 72 $^\circ\text{C}$ 10 min,PCR 扩增产物 4 $^\circ\text{C}$ 保存。用 BIO-RAD 凝胶成像分析系统(BIO-RAD 公司)采集图像并进行分析,PCR 检测结果以经 GAPDH 校正后的 A 值表示。

1.2.8 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 应用 SPSS 12.0 统计软件进行处理,组间比较采用单因素方差分析法,两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 肝硬化模型的一般状况

至 12 周末,模型组大鼠表现为腹部较正常对照组大,活动量明显下降,食欲减退,处死大鼠时,均可见腹水产生,腹水形成率为 100%。肝脏 Masson 染色镜下表现为肝细胞变性、坏死明显,炎症细胞浸润,肝小叶结构被破坏,由广泛增生的纤维组织将肝小叶分割包绕成大小不等、圆形或椭圆形的肝细胞团,肝细胞索排列紊乱,形成明显肝硬化假小叶。

2.2 四组大鼠腹膜 AQP-1 蛋白及 mRNA 的表达(表 1)

表 1 四组大鼠腹膜 AQP-1 蛋白及 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	AQP-1	mRNA / $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
A	28 $\pm$ 8	0.68 $\pm$ 0.12
B	14 $\pm$ 8	0.34 $\pm$ 0.14 [*]
C	12 $\pm$ 6	0.32 $\pm$ 0.11
D	23 $\pm$ 9 [△]	0.58 $\pm$ 0.15 ^{△△}

注:模型组与对照组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.05$;甘遂半夏膏组与生理盐水组相比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.05$ 。

在第 12 周末 AQP-1 及 mRNA 在 A、B 组之间的表达量有明显差异($P < 0.05$),至 16 周末 C 组、D 组比较,可见 D 组 AQP-1 及 mRNA 表达量明显上调,C 组几乎无改变,C、D 两组 AQP-1 及 mRNA 表达量有明显差异($P < 0.05$)。

3 讨论

肝硬化腹水是肝硬化失代偿期的重要表现,一般认为腹水形成的机制一方面是由于血液动力学的改变、门脉高压形成、血浆胶体渗透压的降低、水钠潴留;另一方面则是与某些

宁心律康颗粒抗心律失常作用研究

★ 张敬杨* 龙子江** 余燕 金花荣 王芳 (安徽中医学院药理教研室 合肥 230038)

摘要:目的:通过宁心律康颗粒对乌头碱诱发的大鼠心律失常模型以及对冠状动脉结扎诱发的犬心律失常模型的作用,研究宁心律康的抗心律失常的作用。方法:①一次静注乌头碱复制大鼠心律失常模型,记录出现室性早搏、室性心动过速的出现时间以及心室颤动的发生率。②结扎犬冠状动脉左前降支1/3处复制犬心律失常模型,记录心律失常的潜伏期、出现心律失常后的心电图心律失常评分以及室性心动过速和心室颤动的发生率。结果:①宁心律康能明显推迟大鼠室性早搏、室性心动过速的出现时间,减少心室颤动的发生率;②宁心律康能明显推迟犬冠状动脉结扎后心律失常的出现时间,减少心律失常的分值以及降低室性心动过速和心室颤动的发生率。结论:宁心律康具有良好的抗实验性心律失常作用。

关键词:宁心律康颗粒;抗心律失常;乌头碱;大鼠;冠脉结扎;犬

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Anti-arrhythmic Effects of NXLK Granule

ZHANG Jing-yang, LONG Zi-jiang, YU Yan, JIN Hua-rong, WANG Fang

Department of pharmacology, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038

Abstract: Objective: To observe NXLK granule's effect of anti-arrhythmia through the aconitine-induced arrhythmia model in rats, as well as coronary artery ligation induced arrhythmia model of the dogs. Methods: Intravenous injection aconitine copy arrhythmia model in rats, record the appear times of ventricular premature and ventricular tachycardia, as well as the emergence rate of ventricular fibrillation. Ligate left anterior descending coronary artery copy arrhythmia model in dogs, record the incubation period of arrhythmia, after

体液因素相关,如抗利尿激素等。AQP是一组对水有高度选择性的细胞膜转运蛋白,是跨膜水转运的重要通道,迄今为止已在哺乳动物体内发现了13种水通道蛋白(AQP0~AQP12),其中对AQP-1的分子结构研究得最为清楚。AQP-1在质膜中以四聚体的形式存在,每个单体都由6个贯穿膜两面的长 α 螺旋构成基本骨架,其间还有两个嵌入但不贯穿膜的短 α 螺旋^[3]。每个单体蛋白的中空部分都形成具有高度选择性的通道,只允许水分子跨膜运输而不允许带电解质或其他离子通过,在功能上都可以作为一个独立水通道。梁棋等^[4]最近研究发现,AQP1在大鼠腹膜主要表达在毛细血管及小静脉的内皮细胞上,间皮细胞上仅有微量表达,大鼠腹膜上AQP1表达减少,说明腹膜毛细血管及小静脉对腹水的主动重吸收能力减弱,从而导致腹水的形成。

本研究发现甘遂半夏膏治疗肝硬化腹水的利尿机制可能是通过上调腹膜上水通道蛋白1的表达,增强腹膜毛细血

管及小静脉的内皮细胞对腹水的主动重吸收,从而减少腹水的生成。

参考文献

- [1] Dender BM, Smith BL, Kuhajda FP, et al. Identification, purification and partial characterization of a novel Mr28000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules [J]. J Biol Chem, 1988, 263(30): 15 634 - 15 642.
- [2] Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family of water channel proteins [J]. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1993, 265(3): 461.
- [3] 隋海心, 任昱. 水分子通道蛋白的结构与功能[J]. 化学进展, 2004, 16(2): 145 - 152.
- [4] 梁棋, 徐三荣, 刘伟, 等. 水通道蛋白-1在肝硬化腹水大鼠腹膜上的表达[J]. 中华医学杂志, 2005, (85): 1027 - 1030.

(收稿日期: 2009-07-11)

* 作者简介: 张敬杨(1985-), 男, 安徽中医学院07级中药学硕士研究生。

** 通讯作者: 龙子江(1957-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药复方对心血管疾病的治疗作用, (Tel): 0551-5169216, E-mail: lzjyls@163.com