

胃复春胶囊通过抑制 AQP3 调节炎症性水液代谢障碍改善大鼠急性胃溃疡

潘海春¹, 汪玲羽², 顾赞华^{3*} (1.杭州胡庆余堂药业有限公司, 杭州 311199; 2.浙江中医药大学附属第三医院消化内科, 杭州 310061; 3.湖州市南浔区中医院内科, 浙江 湖州 313009)

摘要: 目的 通过观察胃复春胶囊对大鼠胃溃疡组织炎症因子和水通道蛋白(aquaporins, AQP3)表达的影响, 从水液代谢角度阐释胃复春胶囊对胃溃疡的干预作用, 为临床上胃复春胶囊用于胃溃疡的防治提供实验和理论依据。方法 取体质量为 190~210 g 的雄性 SD 大鼠 40 只, 按照体质量随机分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性对照组(雷尼替丁 30 mg·kg⁻¹)和胃复春高、低剂量组(1 000, 500 mg·kg⁻¹)5 组。造模前, 各组大鼠分别以口服灌胃方式给予相应剂量的药物。连续给药 3 d 后行乙酸致大鼠胃溃疡模型手术。继续给药 5 d 后处理大鼠, 解剖收集胃液, 检测胃液量和胃蛋白酶活性。取胃组织用于大体和病理组织学观察。检测胃组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和炎症因子的水平, RT-PCR 法检测胃组织中 AQP3 mRNA 的表达情况, 免疫荧光法检测胃组织中 AQP3 蛋白的表达情况。分离各组大鼠胃壁细胞, 共聚焦显微镜进一步确认胃壁细胞中 AQP3 的表达水平。**结果** 胃溃疡模型组大鼠胃溃疡、糜烂明显, 伴有出血点; 胃复春高、低剂量组大鼠胃黏膜溃疡、糜烂有不同程度的改善。病理组织学可见, 模型组黏膜水肿糜烂, 炎性细胞浸润, 固有层腺体破坏, 间质充血等典型胃溃疡症状; 胃复春不同剂量组对胃溃疡特征性病变有显著的改善作用。模型组胃蛋白酶活性显著升高, 胃复春高、低剂量组和阳性对照组胃蛋白酶活性均下降。此外, 胃复春胶囊可显著减低胃溃疡大鼠胃液分泌量, 抑制胃蛋白酶活性, 提高胃抗氧化酶活性, 降低血清炎症因子水平。通过 RT-PCR 和免疫荧光实验可见, 胃复春胶囊对胃溃疡组织 AQP3 mRNA 和蛋白水平的表达均有显著调控作用, 进一步分离胃壁细胞, 证实胃复春胶囊对胃壁细胞中的 AQP3 表达有显著抑制作用。**结论** 胃复春胶囊能显著改善大鼠胃溃疡症状, 提高机体抗氧化水平, 调节炎症性水液代谢障碍, 其作用机制可能与抑制胃壁细胞中 AQP3 的表达有关。

关键词: 胃复春胶囊; 胃溃疡; 水液代谢; 炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)06-0765-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20220119

引用本文: 潘海春, 汪玲羽, 顾赞华. 胃复春胶囊通过抑制 AQP3 调节炎症性水液代谢障碍改善大鼠急性胃溃疡[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 765-772.

Weifuchun Capsule Improves Acute Gastric Ulcer in Rats by Inhibiting AQP3 and Regulating Inflammatory Water Metabolism Disorder

PAN Haichun¹, WANG Lingyu², GU Zanhua^{3*} (1.Hangzhou Huqing Yutang Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311199, China; 2.Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310061, China; 3.Department of Internal Medicine, Nanxun District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huzhou 313009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explain the intervention effect from the perspective of water metabolism of Weifuchun capsule(WFC) on gastric ulcers by observing the effect of WFC on the expression of inflammatory factors and aquaporins(AQP3) in rat gastric ulcer tissue, providing the experimental and theoretical basis for the clinical prevention and treatment of gastric ulcer with WFC. **METHODS** A total of 40 male SD rats weighing 190–210 g were randomly divided into the following 5 groups according to their body weight: sham operation group(normal saline), model group(normal saline), positive control group(ranitidine 30 mg·kg⁻¹), WFC high-dose group(1 000 mg·kg⁻¹) and WFC low-dose group(500 mg·kg⁻¹). Before modeling, rats in each group were given corresponding doses of drugs by oral gavage. After continuous administration for 3 d, acetic acid-induced gastric ulcer model surgery in rats was performed. After administration for successive 5 d, the rats were treated. The gastric juice was collected for detecting the amount of gastric juice and pepsin activity. The gastric tissue was taken for gross and histopathological observation. The levels of superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), and inflammatory factors in gastric tissue were detected, the expression of AQP3 mRNA was detected by RT-PCR, and the expression of AQP3 protein was detected by immunofluorescence. The parietal cells of rats in each group were separated, and the confocal microscope was used

作者简介: 潘海春, 男, 主管中药师
E-mail: seaspring2021@163.com

E-mail: seaspring2021@163.com

*通信作者: 顾赞华, 男, 硕士, 主任中医师

E-mail: 1987319449@qq.com

to further confirm the expression level of AQP3 and the release of inflammatory factors. **RESULTS** Rats in the gastric ulcer model group had obvious gastric ulcers and erosions, accompanied by bleeding points; rats in the high- and low-dose groups of WFC had improved gastric mucosal ulcers and erosions to varying degrees. According to histopathology, the model group showed mucosal edema and erosion, inflammatory cell infiltration, destruction of lamina propria glands, and mesenchymal congestion; different dose groups of WFC had a significant improvement effect on the characteristic lesions of gastric ulcer. The pepsin activity in the model group was significantly increased, which was decreased in the high- and low-dose groups and in the positive control group. In addition, WFC could significantly reduce the secretion of gastric juice in rats with gastric ulcers, inhibit the activity of pepsin, increase the activity of gastric antioxidant enzymes, and reduce the level of serum inflammatory factors. The RT-PCR and immunofluorescence results showed that WFC capsules had a significant regulatory effect on the expression of AQP3 mRNA and protein in gastric ulcer tissues. The gastric parietal cells were further isolated, and it was confirmed that WFC capsules had a significant inhibitory effect on the expression of AQP3 in parietal cells. **CONCLUSION** WFC capsule can significantly improve the symptoms of gastric ulcers in rats, increase the body's antioxidant level, and regulate inflammatory water metabolism disorders. Its mechanism of action may be related to the inhibition of AQP3 expression in gastric parietal cells. **KEYWORDS:** Weifuchun capsule; gastric ulcer; water and fluid metabolism; inflammation

胃溃疡是一种常见的消化系统疾病,它可能由幽门螺杆菌感染,服用阿司匹林等药物,或胃酸和胃蛋白酶分泌异常导致,很多患者对此不够重视。如果不及时采取有效的治疗,可诱发上消化道出血、穿孔甚至癌变^[1]。胃溃疡常表现为胃组织炎性坏死和典型的水肿,其发病机制与炎症反应、水液代谢的失衡有相当密切的关系。

胃溃疡是一种炎症性疾病,而炎症反应会引起水液代谢受阻^[2]。在炎症因子升高,炎症细胞聚集等多种因素促进下,毛细血管膜通透性增加,血管与间质的液体交换出现障碍,使液体积聚在组织中导致水肿,水液代谢的正常运转受到阻碍,引起水液代谢滞留^[3],从而进一步加重病情。此外,有研究表明,具有调节水液代谢作用的药物能显著改善胃溃疡的病变状态^[4]。可见,调节炎症性水液代谢障碍可能是防治胃溃疡的重要手段之一。

胃复春胶囊是胃复春片的新型制剂,由红参、香茶菜、麸炒枳壳3味中药组成,于1982年上市,临床用于慢性萎缩性胃炎、胃癌癌前期病变、慢性非萎缩胃炎、胃十二指肠溃疡的治疗。40年间胃复春胶囊的临床疗效得到了广泛认同^[5],然而目前其对胃溃疡干预的作用机制尚不明确,因此本研究从炎症性水液代谢角度,阐述可能的作用机制,为胃复春胶囊的临床应用提供实验理论依据。

1 材料

1.1 动物

40只SPF级雄性SD大鼠,8~9周龄,体重(200±10)g,购自上海斯莱克实验有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。饲养于浙江中医药大学中医药科学院动物中心,动物使用许可证号:SYXK(浙)2021-0012。环境温度

20~24℃,相对湿度为30%~70%,光照为12h/12h昼夜交替,使用独立通风笼具饲养,采食和饮水自由。在实验过程中按“3R”原则给予人道关怀。实验动物伦理审查由浙江中医药大学IACUC委员会通过,决议编号:IACUC-202004023-04。

1.2 药品和试剂

胃复春胶囊(杭州胡庆余堂药业有限公司,批号:2011153),内容物为棕红色粉末和细小颗粒,味苦、涩。每粒含浸膏粉0.35g,每350g浸膏粉含生药量为红参131g、香茶菜2500g、枳壳(炒)250g。

戊巴比妥钠(含量≥95.0%,Merk进口分装,批号:20201026874);乙酸[阿拉丁试剂(上海)有限公司,货号:A116166];超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程有限公司,货号分别为A001-3-2, A003-1-2; IL-6、TNF- α 试剂盒购自Abcam公司,货号分别为ab100772, ab100785; RNA提取试剂盒(上海宝生物公司,货号:9767);逆转录试剂盒与Sybrgreen荧光染料购自Takara公司,货号分别为639537, RR420A;水通道蛋白(aquaporin, AQP)3抗体(Santa Cruz公司,货号:sc-518001)。

盐酸雷尼替丁胶囊(江西汇仁药业有限公司,国药准字:H36021340;批号:210565412;规格:每粒0.15g)。

1.3 仪器

R550型多通道小动物麻醉机(中国深圳瑞沃德生命科技有限公司);AllegraX-15R型大容量离心机(美国贝克曼公司);ULTRA-TURRAX型分散机(组织匀浆机,德国IKA公司);Varioskan LUX型光谱扫描多功能酶标仪(美国Thermo);Nano Zoomer 2.0

RS 型数字切片扫描设备(日本滨松公司); VS120 型虚拟扫描玻片显微镜(日本 Olympus); RM2245 型石蜡切片机(德国徕卡公司); STP120 组织脱水机、AP280 包埋机均来自德国 MICROM 公司; Stepone 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 AB 公司); LSM880 激光共聚焦显微镜(德国蔡司); Nano Zoomer 2.0RS 全景病理切片扫描仪(日本滨松公司)。

2 方法

2.1 动物分组给药与造模

取 40 只 SD 大鼠, 按照体质量随机分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性对照组(雷尼替丁 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和胃复春胶囊低、高剂量组($500, 1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 5 组, 每组 8 只。造模前, 各组大鼠分别以口服灌胃给药的方式给予相应剂量的药物或溶剂, 给药体积为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。连续给药 3 d 后, 行乙酸致大鼠胃溃疡模型手术。

采用改良 Okabe 法建立乙酸致大鼠胃溃疡模型^[6]。术前, 各组动物禁食不禁水 16 h。各组大鼠 3%戊巴比妥钠($45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉。腹部剃毛, 碘伏消毒, 沿大鼠右侧肋骨边缘打开腹腔, 游离出胃, 于胃小弯角切迹下方 6 mm 处的浆膜面上, 缓慢注射 20%的冰乙酸 0.1 mL, 持续 60 s, 消毒, 依次缝合腹壁各层, 关闭腹腔。假手术组大鼠仅打开腹腔, 暴露胃, 不作任何处理。手术当天禁食不禁水。胃溃疡模型建立后, 继续给药 5 d 后, 处死大鼠。

2.2 胃液收集与胃蛋白酶活性的测定

从贲门至幽门部剪下胃组织。在胃大弯处剪开小口, 挤出大鼠胃内容物于无菌无内毒素的 5 mL 离心管中, $2\ 000\times g$ 离心 15 min, 分离上清液, 使用有刻度的注射器量取胃液体积。

Mett 毛细管法估算各组大鼠胃蛋白酶活性。胃蛋白酶活性计算公式:

胃蛋白酶活性($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)=蛋白管透明长度的平均值² $\times 16$ 。

2.3 胃组织大体观察与取材

动物处死后, 立即取胃, 沿胃大弯剪开胃壁, 用预冷的生理盐水冲洗干净后平铺, 将胃组织置于含刻度的坐标纸上, 每小方格 $0.5 \text{ cm}\times 0.5 \text{ cm}$, 拍照。Image J 测量溃疡面积。

每组 8 只大鼠中, 随机取 6 只剪取含溃疡面边缘约 2 mm 大鼠胃组织在内的溃疡区域胃组织(假手术组取与模型组溃疡部位置相近的正常胃组织), 一部分置于冻存管内, 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中;

另外一部分含溃疡组织, 约 $1.0 \text{ cm}\times 0.5 \text{ cm}$ 大小, 置于 10%中性甲醛溶液中固定 24 h。另 2 只用于分离胃壁细胞。

2.4 胃组织溃疡部位抗氧化指标与炎症因子的测定

取冻存的各组大鼠胃组织溃疡部位, 1:9 加入 PBS, 匀浆后 $1\ 500\times g$ 离心, 取上清, 试剂盒检测 SOD、MDA 活性和含量, ELISA 法检测法检测大鼠 IL-6 和 TNF- α 水平, 均按试剂盒说明书进行操作。

2.5 胃黏膜病理组织学观察

取固定 24 h 后的取值, 取材、脱水、包埋。制成蜡块后, 用半自动切片机切成 $4 \mu\text{m}$ 薄片, 每个样品切 2 张, 一份用于 HE 染色, 然后用全景病理切片扫描仪对 HE 染色的切片进行扫描拍摄, 观察胃黏膜病理形态学的改变情况, 另一份用于 AQP3 荧光抗体标记的免疫荧光染色, 具体方法: 使用 3%的牛血清白蛋白封闭后, 加入 1:250 稀释抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, PBST 漂洗 3 次, 每次冲洗 5 min。二抗结合孵育, 室温避光孵育 1 h。PBST 漂洗 3 次, 每次冲洗 5 min 后, 再用蒸馏水漂洗 1 次。滴加封片剂 1 滴, 封片。使用 Olympus VS120 虚拟扫描显微镜观察荧光染色后大鼠胃组织中 AQP3 的表达情况。

2.6 胃组织 mRNA 表达的检测

使用总 RNA 提取试剂盒提取冻存的大鼠胃组织 RNA, 反转录成 cDNA 后待用, NCBI 网站上查找 GAPDH、AQP1、AQP3 和 AQP4 序列, 设计各引物序列如下: GAPDH 为 F-GGCAAGTTCAATG GCACAGT, R-TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC; AQP1 为 F-ACCTGCTGGCCATTGACTAC, R-CCAGGGCACTCCCAATGAAT; AQP3 为 F-CAGCTCG TGACTTTGGACCT, R-AGACACCACCAATG GAACCC; AQP4 为 F-CATCTCC CTCTGCTTTGGAC, R-GCGCAGTGATGTAGAAGACG。

将获得的 cDNA 用 RT-PCR 仪进行扩增, 使用 RT-PCR 仪进行反应。反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 包括 $1 \mu\text{g}$ cDNA 溶液 $8 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{L}$ TB green 染料以及上下游引物各 $1 \mu\text{L}$ 。循环次数为 40 次, 反应条件按试剂盒说明书推荐条件进行。GADPH 内参基因内标对照, 并以假手术组的表达量作为参照, 目的基因转录水平通过公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。

2.7 胃壁细胞的分离与共聚焦观察

将收集胃内容物后的胃组织翻转, PBS 溶液

冲洗干净后, 结扎制成胃袋。胃袋内注入链霉菌蛋白酶 E 后放入缓冲液中, 37 °C 水浴振荡消化, 每 30 min 更换新鲜的消化液, 共 3 次。消化结束后, 将胃袋放入 1 640 细胞培养液中, 37 °C 水浴条件下使用灭菌的玻璃棒轻轻搅拌, 每 10 min 更换 1 次细胞培养液, 共 5 次。更换下的细胞培养液过无菌 200 目尼龙细胞筛, 过筛后的液体 180×g 离心 5 min, 收集沉淀, 用细胞培养液重悬制成胃黏膜混合细胞悬液。

富集胃壁细胞: 将细胞悬液铺在 40% Percoll 液上, 720×g 离心 15 min, 用细胞培养液重悬沉淀后将其铺在 60% Percoll 液上, 再次 720×g 离心 15 min。收集沉淀, 用 PBS 溶液重悬细胞 180×g 离心 10 min, 重复 1 次清洗, 最后用含血清的细胞培养液重悬细胞。细胞涂片后, 使用多聚甲醛固定细胞, 30 min 后使用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 封闭后的染色方法与上述免疫荧光相同。共聚焦荧光显微镜下拍照, 红色为 AQP3, 蓝色为细胞核。

2.8 统计学方法

用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料应用 ANOVA 方差分析评价试验结果, 两两比较采用 LSD 检验, 统计结果的数值均保留小数后 2 位。

3 结果

3.1 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠溃疡愈合的影响

假手术组大鼠胃黏膜完整光滑, 未见溃疡、糜烂及出血点; 模型组大鼠胃溃疡、糜烂明显, 伴有出血点; 胃复春胶囊高、低剂量组大鼠胃黏膜溃疡、糜烂有不同程度改善, 未见明显出血点; 阳性对照组胃黏膜溃疡、糜烂程度改善, 亦未见明显出血点。与假手术组相比, 模型组大鼠的溃疡面积显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 胃复春胶囊高、低剂量组和阳性对照组溃疡面积均有不同程度降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图 1。

3.2 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠胃液量、胃蛋白酶活性的影响

假手术组大鼠胃内几乎无胃液, 模型组大鼠胃液量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 胃复春高、低剂量组胃液量有不同程度的下降, 且呈一定的剂量依赖性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而阳性对照组与模型组差异无统计学意义。与假手术组比,

模型组胃蛋白酶活性显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 胃复春高、低剂量组和阳性对照组胃蛋白酶活性均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图 2。

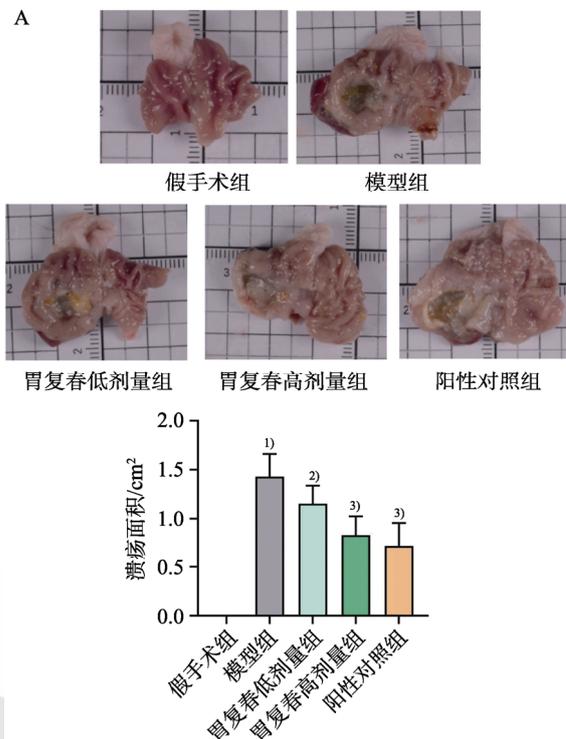


图 1 各组大鼠胃溃疡大体标本的观察及统计图

与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Observation and statistical diagram of gastric ulcer gross specimen in rats of each group

Compared with sham operation group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

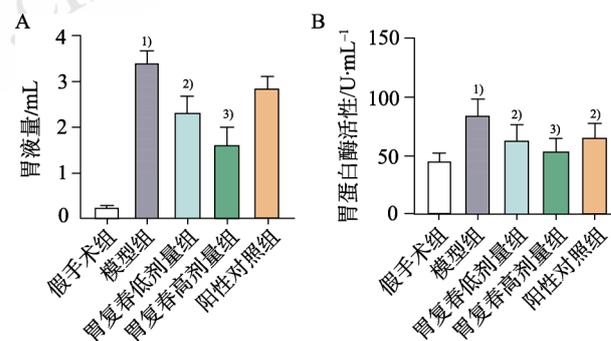


图 2 各组大鼠胃液量与胃蛋白酶活性

与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Gastric juice volume and pepsin activity in rats of each group

Compared with sham operation group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

3.3 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠胃黏膜病理学的影响

由图 3 可见, 假手术组胃黏膜层、固有层、肌层结构完整连续, 腺体排列紧密, 未见明显炎性细

胞浸润；模型组中出现不同程度的黏膜水肿糜烂，上皮细胞疏松脱落，可见大量炎性细胞浸润，固有层腺体形态破坏严重，毛细血管充血扩张，细胞间质可见大量红细胞；胃复春高低剂量组以及阳性对照组黏膜轻度糜烂，少许炎性细胞浸润，未见灶性出血，偶见黏膜完整性缺失。

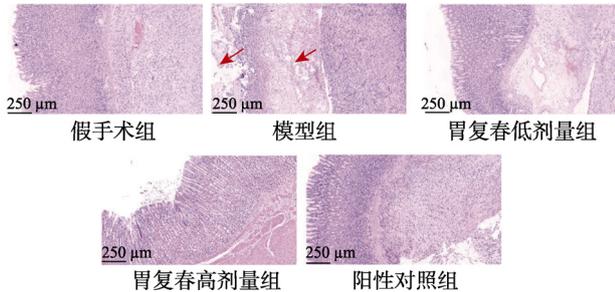


图3 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠胃组织病理改变的影响(HE染色, 100×, 箭头为病变部位)

Fig. 3 Effect of Weifuchun capsule on pathological changes of ulcer tissue in gastric ulcer model(HE staining, 100×, the arrow indicated the lesion site)

3.4 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠胃组织抗氧化指标和炎症因子的影响

与假手术组比，模型组大鼠胃组织 SOD 活性显著下降，MDA、IL-6 和 TNF- α 含量显著上升($P < 0.01$)。与模型组比较，胃复春高剂量大鼠胃组织 SOD 活性显著上升($P < 0.05$)，MDA 含量显著下降($P < 0.05$)，而阳性对照组与模型组差异无统计学意义。与模型组相比，胃复春高、低剂量组与阳性对照组胃组织 IL-6 和 TNF- α 水平均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图 4。

3.5 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠 AQP mRNA 表达的影响

与假手术组比，模型组大鼠胃组织中 AQP3 和 AQP4 mRNA 的表达显著上升($P < 0.01$)，而 AQP1 无显著变化。与模型组比，胃复春高、低剂量组 AQP3 明显下降，且呈剂量依赖性($P < 0.01$)，而阳性对照组未见显著变化。模型组与各给药组之间，AQP4 差异无统计学意义。结果见图 5。

3.6 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠 AQP3 表达的影响

经免疫荧光染色后可见，AQP3 蛋白被染成绿色荧光，结果见图 6。假手术组阳性表达较少。与假手术组相比，模型组 AQP3 表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比，胃复春高、低剂量组 AQP3 均有下降($P < 0.01$)，半定量分析结果见图 7。

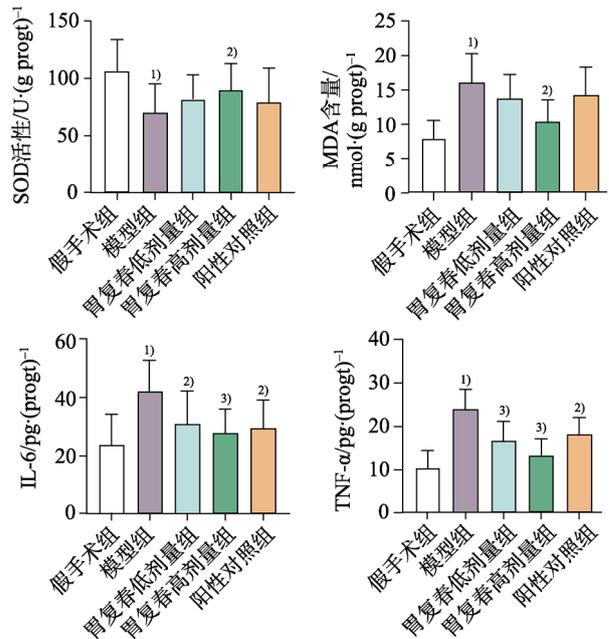


图4 各组大鼠抗氧化指标与炎症因子的水平与假手术组相比，¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型组相比，²⁾ $P < 0.05$ ，³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Levels of antioxidant indexes and inflammatory factors in rats of each group

Compared with sham operation group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

3.7 胃复春胶囊对胃溃疡模型大鼠胃壁细胞 AQP3 表达的影响

AQP3 主要表达于胃壁细胞，为进一步证实胃复春对 AQP3 的干预作用，本研究通过分离胃壁细胞，并采用共聚焦显微镜观察 AQP3 的表达。结果显示，与假手术组比，模型组大鼠胃壁细胞表面 AQP3 表达增高($P < 0.01$)，与模型组比，胃复春高剂量组大鼠胃壁细胞 AQP3 表达显著下降($P < 0.01$)。结果见图 8。

4 讨论

胃复春是经原国家食品药品监督管理总局批准上市的中成药，曾二度被载入国家中药二级保护品种，其主要成分为红参、香茶菜、枳壳(炒)。根据中医“养正积自除”的理论，是以扶正为主，攻补兼施的治则组方的中成药。该组方严谨、重点突出、少而精悍，采用扶正药和解毒药的强力组合，最大性的突出“治、养、护”三位一体的治疗特点^[7]。红参甘、微苦，平，归脾、肺、心经，补脾益气，振脾阳而资化源，有气血双补之效，为补脾要药，用于脾气不足，生化无力而致的倦怠无力、食欲不振、脘腹痞满、大便溏泻等。香茶菜辛、苦，凉，归经、肝经、肾经，清热利湿，活血散瘀，解毒消肿等。枳壳(炒)苦、辛、酸，微寒，归脾、胃经，具有理气宽胸，行滞消积的功

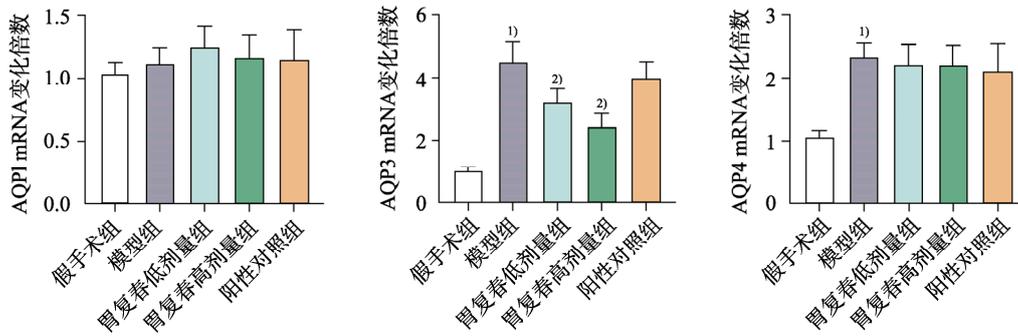


图5 各组大鼠胃组织 AQP mRNA 表达水平与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 AQP mRNA expression levels in gastric tissues of rats in each group Compared with sham operation group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

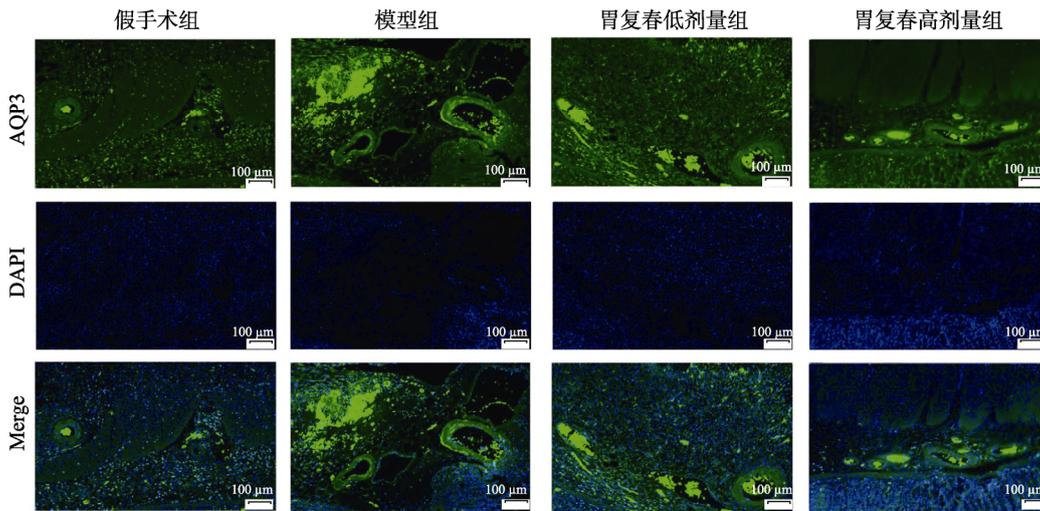


图6 各组大鼠溃疡组织 AQP3 免疫荧光染色免疫荧光定位 AQP3 位置与表达, 绿色荧光表示 AQP3 的表达, 蓝色荧光表示 DAPI 标记的细胞核。

Fig. 6 AQP3 immunofluorescence staining of rat ulcer tissues in each group

Immunofluorescence located the location and expression of AQP3, green fluorescence indicated the expression of AQP3, and blue fluorescence indicated the DAPI-labeled nuclei.

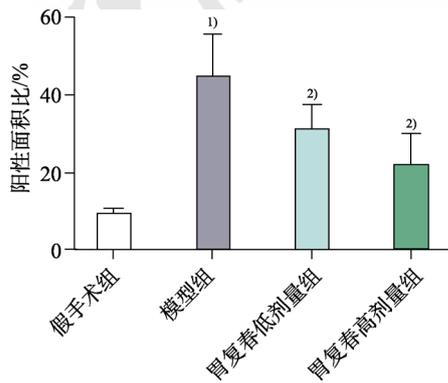


图7 各组大鼠溃疡组织 AQP3 免疫荧光的表达差异与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 7 Difference of AQP3 immunofluorescence expression in ulcer tissues of rats in each group

Compared with sham operation group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

效。全方共奏健脾益气、活血解毒之功效。胃复春胶囊是胃复春片的新型制剂, 本研究发现, 胃

复春胶囊能显著改善大鼠胃溃疡症状, 这与胃复春片在胃溃疡中应用结果相一致, 证实了胃复春胶囊的功效。

胃溃疡是由各种原因导致的胃黏膜破坏, 为黏膜表面发生局部缺损, 从而诱发溃疡, 是一种常见的消化系统疾病。乙酸诱导的胃溃疡模型是研究胃溃疡病理生理学、抗溃疡药物疗效及药理作用机制的常用模型, 其病理特征和对药物的反应均与人类溃疡较为接近^[8-9]。雷尼替丁为强效组胺 H2 受体拮抗剂, 能有效地抑制胃组织中组胺、胃泌素和氨甲酰胆碱等物质刺激后引起的胃酸分泌, 减少胃酸生成和抑制胃蛋白酶活性, 对胃黏膜起较强的保护作用^[10]。因此本实验选用乙酸制备急性胃溃疡模型, 并用雷尼替丁进行药物干预, 作为对模型的验证。研究发现, 该模型出现胃溃疡、糜烂甚至穿孔, 病理表现为黏膜水肿糜烂,

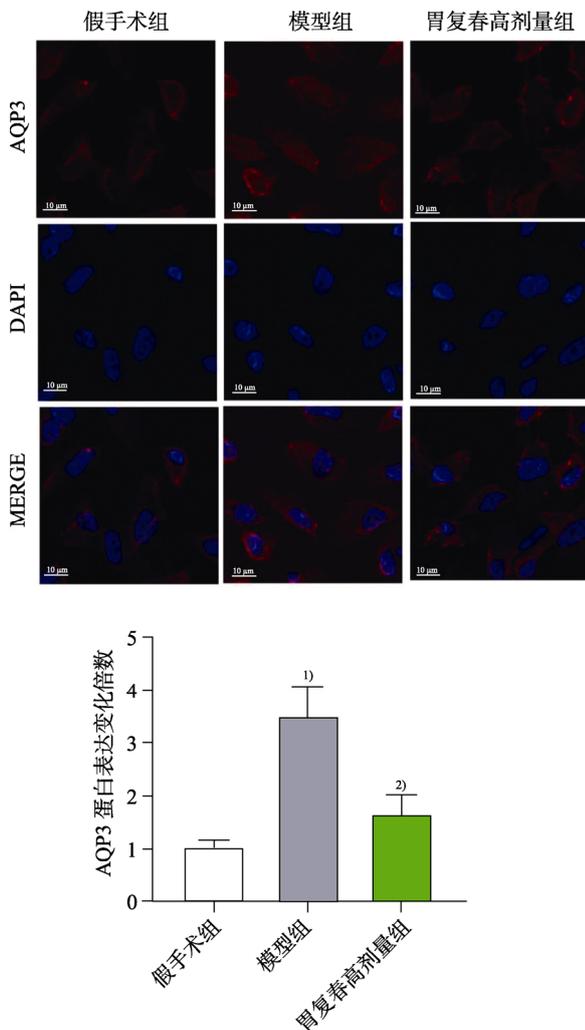


图 8 胃复春胶囊对胃溃疡组织壁细胞 AQP3 表达的影响
免疫荧光定位 AQP3 位置与表达, 红色荧光表示 AQP3 的表达, 蓝色荧光表示 DAPI 标记的细胞核。与假手术组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 8 Effect of Weifuchun capsule on the expression of AQP3 in gastric ulcer tissue parietal cells
Immunofluorescence located the location and expression of AQP3, red fluorescence indicated the expression of AQP3, and blue fluorescence indicated the dAPI-labeled nuclei. Compared with sham operation group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

表层上皮细胞疏松脱落, 炎性细胞浸润, 固有层腺体破坏, 毛细血管扩张, 间质充血, 少量出血等胃溃疡典型症状, 此外还伴有胃液分泌增多, 胃蛋白酶活性异常增强, 氧化应激和炎症因子的产生增多等炎症性水液代谢失衡, 可见该模型适合用于研究炎症性水液代谢障碍胃溃疡。给予胃复春胶囊后, 大鼠胃溃疡特征性病变有显著改善。模型组胃蛋白酶活性显著升高, 胃复春高、低剂量组和阳性对照组胃蛋白酶活性均下降。此外, 胃复春胶囊可显著减低胃溃疡大鼠胃液分泌量, 以及抑制胃蛋白酶活性。可见, 胃复春胶囊能调节水液代谢障碍, 改善胃溃疡症状。

炎症是引发水液代谢障碍的重要病理因素。研究发现, 炎性细胞分泌产生的炎症因子会影响 AQP 的表达, 并且可能是通过改变 AQP 对特定物质的通透性影响机体的水液代谢调节^[11]。胃溃疡患者往往感染幽门螺杆菌, 幽门螺杆菌产生的内毒素是 TLR4 的强效激动剂, TLR4 介导细胞分泌 IL-6、TNF- α 等细胞因子。IL-6 是一种具有促炎和抗炎双向调节作用的多功能细胞因子, 由巨噬细胞、淋巴细胞和上皮细胞产生。TNF- α 是一种单核因子, 主要由单核细胞和巨噬细胞产生。TNF- α 能诱导细胞间黏附因子 ICAM-1 的极化表达, 后者是在炎症患者中性粒细胞与上皮细胞间相互作用中起重要作用的一种黏附颗粒^[12]。TNF- α 还能提高中性粒细胞的吞噬能力, 增加过氧化物的产生, 增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒功能, 刺激细胞脱颗粒和分泌髓过氧化物酶^[13]。本实验研究发现, 胃复春胶囊能显著提高机体抗氧化水平, 降低溃疡部位炎症因子 IL-6 和 TNF 的水平, 提示胃复春胶囊是对炎症性水液代谢障碍有积极的调控作用, 其作用机制可能为减少炎症因子的表达而进一步抑制过氧化物的产生。

近年来, AQP 的发现极大地推动了水液代谢调节的研究进展, AQP 是细胞膜上的一种整合蛋白, 作为水液代谢的物质基础, 其功能是组成和调节特异性的水通道, 促使水或其他物质有选择地通过细胞膜。AQP 在消化系统的器官中广泛分布, AQP1、AQP3、AQP4、AQP5 及 AQP7 均在胃组织中有表达, 又以 AQP1 和 AQP3 的表达最高^[14-15]。AQP1 表达于胃固有层血管内皮, 参与胃组织水的跨膜转运; AQP3 主要表达于贲门腺细胞肌侧膜和壁细胞, 参与胃酸分泌时水的运转, 且由于 AQP3 为水油通道蛋白, 具备转运甘油的功能^[16]。通过 RT-PCR 试验筛查胃复春胶囊对不同 AQPs 的干预作用发现, 胃复春胶囊对 AQP3 的调控尤为明显, 因此笔者聚焦于 AQP3 这个蛋白。AQP3 是介导胃肠道水液代谢的关键因子之一, 其表达可受多种细胞炎症因子的调控^[17]。当胃组织中炎症反应激活, 释放大量炎症因子, 诱导 AQP3 的异常表达升高, 改变胃肠道吸收水分的速率平衡, 引起胃酸分泌过多, 进一步导致胃黏膜的损伤。通过免疫荧光实验, 考察胃复春胶囊干预 AQP3 的作用部位, 发现主要作用于胃黏膜位置, 因此进一步分离纯化胃壁细胞, 通过免疫共聚焦显微镜, 进

一步观察不同组大鼠胃壁细胞中 AQP3 的差异表达,证实胃复春胶囊对 AQP3 的调控作用。

基于此,笔者发现胃复春胶囊能显著改善大鼠胃溃疡症状,提高机体抗氧化水平,调节炎性水液代谢障碍,其作用机制可能与抑制胃壁细胞中 AQP3 的表达有关。

REFERENCES

- [1] GRAHAM D Y. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18): 5191-5204.
- [2] YADAV S K, ADHIKARY B, MAITY B, et al. The gastric ulcer-healing action of allylpyrocatechol is mediated by modulation of arginase metabolism and shift of cytokine balance[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 614(1/2/3): 106-113.
- [3] LU Y F. Investigation of the common mechanisms from inflammatory water- fluid dysbolism by different animal modeling methods[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015.
- [4] LOU Q J, XU Y S, ZHAO W C, et al. Study on the regulation roles of water metabolism in gastric mucosa injury induced by ethanol and the effect of *Veronicastrum axillare*[J]. J Zhejiang Chin Med Univ(浙江中医药大学学报), 2016, 40(1): 13-18.
- [5] 陈曦, 赵亚红, 张也青, 等. 胃复春的临床应用和现代研究进展[J]. 江西中医药, 2016, 47(9): 77-80.
- [6] OKABE S, AMAGASE K. An overview of acetic acid ulcer models: The history and state of the art of peptic ulcer research[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(8): 1321-1341.
- [7] 邓军芳. 胃复春片联合雷贝拉唑三联疗法治疗 Hp 阳性胃溃疡的疗效观察[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(4): 579-580.
- [8] SIMÕES S, LOPES R, CAMPOS M C D, et al. Animal models of acute gastric mucosal injury: Macroscopic and microscopic evaluation[J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(2): 121-126.
- [9] YU Y, JIA T Z, CAI Q, et al. Comparison of the anti-ulcer activity between the crude and bran-processed *Atractylodes lancea* in the rat model of gastric ulcer induced by acetic acid[J]. J Ethnopharmacol, 2015(160): 211-218.
- [10] YEOMANS N D, TULASSAY Z, JUHÁSZ L, et al. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group[J]. N Engl J Med, 1998, 338(11): 719-726.
- [11] 李艺莹, 刘晋萍. 急性肺损伤过程中水通道蛋白的作用研究进展[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(4): 590-592.
- [12] QING H, DESROULEAUX R, ISRANI-WINGER K, et al. Origin and function of stress-induced IL-6 in murine models[J]. Cell, 2020, 182(2): 372-387.e14.
- [13] VARFOLOMEEV E, VUCIC D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease[J]. Cytokine, 2018(101): 26-32.
- [14] JIANG L, LI J, LIU X, et al. Expression of aquaporin-4 water channels in the digestive tract of the Guinea pig[J]. J Mol Histol, 2014, 45(2): 229-241.
- [15] REN H M, LUO X Q, WAN C P, et al. Characterization of the active components of aurantii fructus causing dry mouth by analysis of aquaporin 5 expression[J]. Revista Brasileira De Farmacognosia, 2020, 30(1): 80-89.
- [16] WEN J F, WANG Y, GAO C, et al. *Helicobacter pylori* infection promotes aquaporin 3 expression via the ROS-HIF-1 α -AQP3-ROS loop in stomach mucosa: A potential novel mechanism for cancer pathogenesis[J]. Oncogene, 2018, 37(26): 3549-3561.
- [17] SHEN X L. Based on AQP3 mediated water fluid metabolism of colon to explore the experimental study of bst effects on cathartic action[D]. Nanchong: North Sichuan Medical College, 2016.

收稿日期: 2022-01-12

(本文责编: 蔡珊珊)