

茵陈五苓散对肝硬化腹水大鼠模型的影响

苏林红, 柳侠平, 林军(温州市中医院感染科, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 研究茵陈五苓散对肝硬化腹水大鼠血清 AQP2 表达和 NO、ET-1 水平的影响。方法 采用苯巴比妥灌胃联合四氯化碳腹腔注射复制肝硬化腹水模型。将成模后大鼠随机分为模型组、螺内酯片组(0.066 g·kg⁻¹)和茵陈五苓散低、中、高剂量组(生药 4.3, 8.6, 17.2 g·kg⁻¹), 每组 10 只, 并选取 10 只正常大鼠灌服生理盐水作为空白组。硝酸还原酶法测定大鼠血清 NO、ET-1 的水平。RT-PCR 测定大鼠肝组织 AQP2 mRNA 水平, Western blotting 检测大鼠肝组织 AQP2 蛋白含量。结果 与空白组大鼠比较, 模型组大鼠血浆 NO 和 ET-1 水平显著升高($P<0.05$)。与模型组大鼠比较, 茵陈五苓散各剂量组和螺内酯片组大鼠血清 NO、ET-1 水平显著降低($P<0.05$)。与空白组大鼠比较, 模型组大鼠肝脏 AQP2 mRNA 和蛋白含量显著下降($P<0.05$)。与模型组大鼠比较, 茵陈五苓散各剂量组和螺内酯片组大鼠肝脏 AQP2 mRNA 和蛋白含量显著增高($P<0.05$)。结论 茵陈五苓散治疗肝硬化腹水的机制与降低血清 NO、ET-1 水平及调节肝脏 AQP-2 基因表达有关。

关键词: 茵陈五苓散; 肝硬化腹水; AQP2; NO; ET-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)02-0161-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.02.007

引用本文: 苏林红, 柳侠平, 林军. 茵陈五苓散对肝硬化腹水大鼠模型的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 161-164.

Effect of Yinchen Wuling Powder on Cirrhotic Rats Model with Ascites

SU Linhong, LIU Xiaping, LIN Jun(Infectious Department, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Yinchen Wuling powder on AQP2 expression and the plasma levels of NO as well as ET-1 in cirrhotic rats with ascites. **METHODS** The ascites model of cirrhosis was established by intraperitoneal injection of phenobarbital and carbon tetrachloride. The rats were randomly divided into model group, colchicine group, and low, middle and high-dose of Yinchen Wuling powder groups(crude drug 4.3, 8.6, 17.2 g·kg⁻¹). Ten rats in each group, and ten normal rats were given normal saline as blank group. Serum levels of NO and ET-1 were measured by nitrate reductase method. The expression of mRNA and protein of AQP2 was measured by RT-PCR and Western blotting method respectively. **RESULTS** Compared with the blank group, the plasma levels of NO and ET-1 in the model group increased significantly($P<0.05$). Compared with the model group, the plasma levels of NO and ET-1 in Yinchen Wuling powder treat groups and colchicine group decreased significantly($P<0.05$). Compared with the blank group, the expression of mRNA and protein of AQP2 in the liver of the model group were significantly decreased($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of mRNA and protein of AQP2 in liver of rats in Yinchen Wuling powder treat groups and colchicine group were significantly increased($P<0.05$). **CONCLUSION** The mechanism of Yinchen Wuling powder in treating cirrhotic rats with ascites may be related to reduction of plasma levels of NO as well as ET-1 and the regulation of AQP2 gene expression.

KEYWORDS: Yinchen Wuling powder; cirrhotic with ascites; AQP2; NO; ET-1

肝硬化是肝脏在多种原因的长期、反复刺激下发生的慢性病变。腹水则是肝硬化后肝脏功能由代偿期向失代偿期发展的主要标志之一^[1-3]。近年来肝硬化腹水死亡率呈现不断增长的趋势, 如何预防和治疗肝硬化腹水成为目前医药界亟待解决的重要问题之一。茵陈五苓散出自《金匮要略》, 用于治疗湿重于热之黄疸, 部分学者将茵陈五苓散用于肝硬化腹水的治疗, 并取得了较好的临床疗效, 本研究首次基于肝硬化腹水大鼠模型探讨茵陈五苓散对肝硬化腹水的作用机制, 为茵陈五苓

散的临床应用提供有效的科学依据^[4-6]。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

茵陈五苓散: 绵茵陈 15 g, 白术 10 g, 桂枝 10 g, 猪苓 15 g, 泽泻 15 g, 茯苓 15 g。以上药材均购自湖南芝林药业有限公司。在上述药材中加入 7 倍量的水充分浸泡 0.5 h 后, 煎煮 40 min, 过滤并留取药液; 加入 6 倍量的水继续煎煮 40 min 过滤并留取药液, 将 2 次药液混合, 使药液煎煮浓缩至 1 mL(相当于原药 6 g), 置于冰箱保存。螺

基金项目: 温州市科技计划经费自筹项目(Y20180771)

作者简介: 苏林红, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (0577)56551251

E-mail: s941555637@163.com

内酯片(中科院生物制品标准品中心, 批号: H44023416); 四氯化碳(CCl_4 , 广州化学试剂厂, 批号: 130825); TRIzol 试剂(Invitrogen 公司, 批号: 15596-026); cDNA 逆转录试剂盒(货号: 4366932)、SYBR Green PCR Master Mix(货号: 4367659)购于 Applied Biosystems 公司; AQP2 一抗(批号: sc-515770)、 β -actin 一抗(批号: sc-47778)购于 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗(北京中衫金桥生物技术有限公司, 批号: F2209); 苯巴比妥(江苏南通制药厂, 批号: 081012); NO 测试盒(批号: 20111324)、ET-1 试剂盒(批号: 20120304), 购于中生北控生物科技股份有限公司; AQP2(上游 5'-GGGGAACAGCAGGTAGTTGTA-3'; 下游 5'-CCATCCTCCATGAGATTACTC-3')和 GAPDH(上游 5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3'; 下游 5'-CTGGCGACGCAAAGAAGA-3')的引物由上海吉玛公司合成。

1.2 动物

SD 大鼠, 60 只, ♂, SPF 级, 体质量(200 ± 20)g, 由江苏南京青龙山动物繁殖场提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2009-0001。

1.3 动物模型制备、分组及给药

大鼠适应性喂养 1 周后, 所有大鼠给予 35% 苯巴比妥 CMC-Na 混悬液 [$35 \text{ mg} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] 诱导 1 周。按照 $0.1 \text{ mL} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ 的剂量将 CCl_4 油溶液注入大鼠腹腔内, 1 周 2 次。将成模后大鼠随机分为模型组、螺内酯片组和茵陈五苓散低、中、高剂量组, 每组 10 只, 并选取 10 只正常大鼠灌服生理盐水作为空白组, 茵陈五苓散低、中、高剂量组给予相当于生药 4.3, 8.6, $17.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的药液, 按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行给药, 螺内酯片组大鼠给予螺内酯片药液 ($0.066 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每天 1 次, 连续 4 周, 所有大鼠建模成功。末次给药 12 h 后, 所有大鼠禁食不禁水, 于次日麻醉, 取材。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血清 NO、ET-1 的检测 摘除大鼠单只眼球, 取血 2 mL 注入试管中, 待凝固后分离血清, -40°C 保存。测定前置室温复溶, 混匀后, 4°C $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 取上清测定, 硝酸还原酶法测定血清 NO、ET-1 的水平。

1.4.2 RT-PCR 测定大鼠肝组织 AQP2 mRNA 水平 提取 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书配制反应液, 42°C 反转录 50 min, 95°C 5 min 灭活反转录酶。取出合成的 cDNA 进行 PCR 反应, 严格按照 SYBR

Green PCR Master Mix 试剂盒说明进行, PCR 扩增仪进行扩增。按以下条件进行 RT-PCR 反应: 94°C , 5 min; 94°C , 30 s 35 个循环; 55°C , 30 s; 72°C , 2 min; 72°C , 5 min。扩增完毕后, 以 GAPDH 为内参照基因, 值按照 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 算法进行计算。

1.4.3 Western blotting 检测大鼠肝组织 AQP2 蛋白含量 称取肝组织 250 mg, 加入 500 μL 细胞裂解液。 4°C , $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 15 min, 吸取 EP 管中的上清液, 加入上样缓冲液, 70°C 水浴 10 min。根据 BCA 蛋白浓度定量试剂盒对蛋白浓度进行检测。调整电泳仪电压为 80 V 进行电泳, 当溴酚蓝到达分离胶时加大电泳仪电压 (120 V), 直至电泳结束。转膜、将 PVDF 膜置于脱脂牛奶中 60 min 进行封闭。根据检测的蛋白分别加入稀释好的一抗 AQP2 (1:1000) 和 β -actin (1:1000), 4°C 冰箱摇摆过夜, 二抗室温孵育 1 h, 进行显影和条带分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

空白组大鼠精神状态正常, 皮毛色泽、摄食情况未见异常, 体质量增加。模型组大鼠表现为烦躁, 摄食量明显减少, 体质量减轻, 毛色无泽, 活动减少, 饮食减少, 部分大鼠排便异常, 8 周后出现大便稀溏、味臭。茵陈五苓散治疗后, 各治疗组大鼠基本情况好转, 表现为毛色润泽, 摄食量增加, 体质量增加, 大便渐不臭秽。

2.2 茵陈五苓散对各组大鼠腹水情况的影响

实验结束时, 空白组大鼠均无腹水表现, 模型组大鼠腹水量为 $(3.64 \pm 0.48) \text{ mL}$, 明显增多, 色淡黄; 茵陈五苓散各剂量组治疗的大鼠腹水色淡黄, 腹水量明显减少, 茵陈五苓散高剂量组、中剂量组和低剂量组大鼠的腹水量分别为 (0.53 ± 0.21) , (0.92 ± 0.32) 和 $(1.19 \pm 0.75) \text{ mL}$ 。与模型组大鼠比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型组和螺内酯片组大鼠腹水量相比较, 经螺内酯片治疗后大鼠的腹水量为 $(1.01 \pm 0.39) \text{ mL}$, 少于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 茵陈五苓散对各组大鼠血清 NO、ET-1 的影响

与空白组大鼠比较, 肝硬化腹水模型组大鼠血清中 NO、ET-1 含量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型

组大鼠比较, 经螺内酯片及不同剂量的茵陈五苓散治疗的大鼠血清 NO、ET-1 含量均表现不同程度的降低($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清 NO 和 ET-1 水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 1 Comparisons of the plasma levels of NO and ET-1 in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ET-1/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白组	18.39 $\pm$ 1.59 ¹⁾	9.69 $\pm$ 2.32 ¹⁾
模型组	41.16 $\pm$ 2.66	23.98 $\pm$ 4.56
螺内酯片组	38.67 $\pm$ 2.80 ¹⁾	18.22 $\pm$ 2.57 ¹⁾
茵陈五苓散高剂量组	23.74 $\pm$ 2.18 ¹⁾	19.92 $\pm$ 3.01 ¹⁾
茵陈五苓散中剂量组	31.93 $\pm$ 1.80 ¹⁾	18.76 $\pm$ 3.12 ¹⁾
茵陈五苓散低剂量组	35.41 $\pm$ 1.43 ¹⁾	16.05 $\pm$ 2.54 ¹⁾

注: 与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$.

2.4 茵陈五苓散对各组大鼠 AQP2 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 与空白组大鼠比较, 模型组大鼠肝脏组织 AQP2 mRNA 水平明显减少($P<0.05$); 与模型组大鼠比较, 螺内酯片组, 茵陈五苓散不同剂量组治疗大鼠肝脏 AQP2 mRNA 水平表达均明显增加($P<0.05$)。结果见图 1。

Western blotting 结果显示, 与空白组比较, 模型组 AQP2 蛋白表达明显减少($P<0.05$); 与模型组比较, 螺内酯片组, 茵陈五苓散不同剂量组 AQP2 蛋白表达明显增加($P<0.05$)。结果见图 2。

3 讨论

茵陈五苓散由茵陈蒿、泽泻、白术、猪苓、茯苓、桂枝组成, 方中茵陈为治疗湿热黄疸之要药, 有很强的保肝利尿作用; 方中茯苓、泽泻甘淡渗湿, 能除湿利小便, 有固肾治水之功, 利水能宣通内脏之湿^[6-8]; 猪苓入脾通水道, 通淋除湿、消水肿、退黄疸; 白术具有健脾祛湿、扶植脾胃、散湿除痹、消食除痞之功效; 桂枝化气祛湿, 能温通阳气, 与茯苓、猪苓、泽泻同用可温阳。既往有很多关于茵陈五苓散治疗临床疾病的研究, 何栋等^[4]应用茵陈五苓散治疗非酒精性脂肪肝病大鼠, 起到较好的治疗作用。Zhang 等^[9]将茵陈五苓散应用于黄疸的治疗也取得较好的疗效。笔者根据既往研究, 应用不同浓度茵陈五苓散辨证治疗肝硬化难治性腹水, 结果表明茵陈五苓散具有明显的利尿消除腹水、保肝护肝之效。

肝硬化腹水的成因与门静脉高压症高动力循环状态的形成、维持和发展有密切的关系^[10]。有研究表明, 正常人体内缩血管活性物质和血管扩张因子之间处于一种平衡状态。肝硬化时, 体内

的这种平衡受到破坏, 进而引起肝硬化高动力循环的病理状态^[1-2]。门脉高压形成后多种血管活性因子, 包括 SNS、P 物质、RAAS、ET-1 和 NO 等神经体液系统的激活是引起肝硬化高动力循环的主要病理生理原因, 其中 ET-1 和 NO 在该肝硬化病理过程中发挥着主要作用^[3]。肝硬化时, 患者肝功能减退和侧支血管开放, 使得肝脏对部分血管活性物质(如 NO、ET-1)灭活减少, 促进腹水的形成。

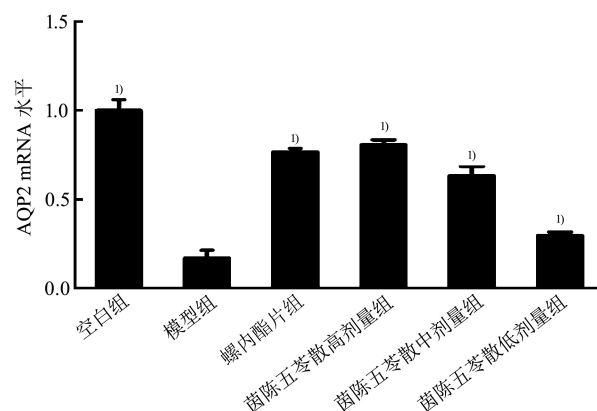


图 1 AQP2 mRNA 水平表达情况与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 Expression of AQP2 mRNA Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$.

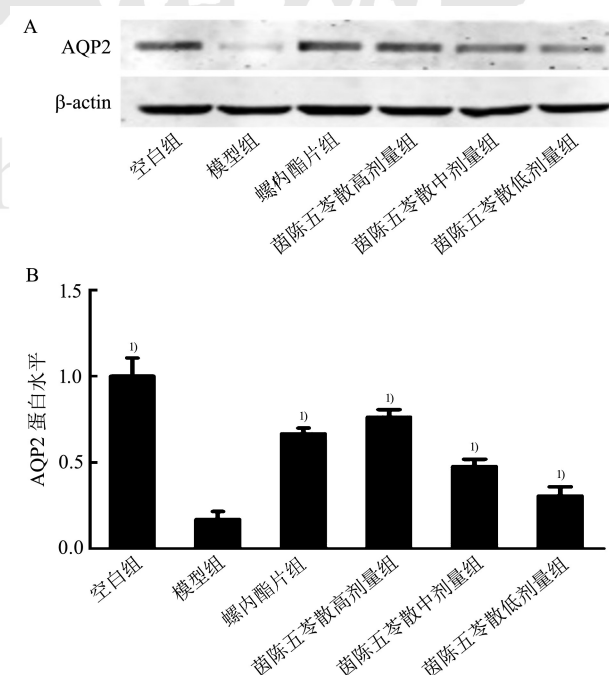


图 2 AQP2 蛋白水平表达情况

A—Western blotting 检测 AQP2 蛋白表达; B—AQP2 蛋白相对表达量; 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Expression of AQP2 protein

A—expression of AQP2 detected by Western blotting; B—relative expression of AQP2 protein; compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$.

本实验中,模型组大鼠血清 NO 水平明显高于空白组,而茵陈五苓散治疗后,大鼠 NO 血清水平均显著降低。NO 是体液中常见的因子之一,具有血管舒张作用。NO 在体内很多病理生理过程中发挥重要的作用,研究发现 NO 能引起明显的肝外分流,使全身有效血容量相对或绝对不足,低血容量进一步刺激球旁小体促进肾素分泌,使血浆醛固酮和促肾上腺皮质激素水平升高,导致保钠、排钾、保水,引发钠潴留和腹水^[11]。本实验结果说明,茵陈五苓散可能通过影响肾血浆 NO 浓度,减轻水钠潴留,从而达到消除腹水的目的。

肝脏丰富的血管是 ET 产生的重要场所,也是 ET 的靶器官,血浆 ET 的浓度直接影响血管的舒缩功能^[12]。ET 有 3 种异构体:ET-1、ET-2 和 ET-3,其中 ET-1 缩血管作用最强。ET-1 除具有血管舒缩特性外,还能刺激成纤维细胞、系膜细胞和血管平滑肌细胞的有丝分裂,刺激心肌细胞分泌心房利钠肽,抑制肾素分泌,诱导前列腺素的合成。而且许多资料提示,ET-1 在肝硬化的肝脏中,其生物活性处于激活状态,所以 ET 对肝脏血流动力学及细胞代谢功能的调节具有重要作用^[12-13]。本实验中,茵陈五苓散各剂量组 ET-1 水平明显降低,且呈现剂量依赖性。进一步应用茵陈五苓散治疗后,大鼠腹水量明显减少。这些结果表明,茵陈五苓散可能通过改善肝功能水平,增强 ET-1 的清除能力,从而抑制腹水生成。

AQP 是一种位于细胞膜上与水分通透性密切相关的转运蛋白^[14]。肝细胞上有多种 AQP,研究表明,AQP2 在肝细胞中表达较高。AQP2 通过水和溶质之间的转运过程维持肝细胞的分解代谢和渗透压。研究发现,AQP2 表达缺乏与肝硬化化患者的预后及对托伐普坦的治疗反应密切相关^[14-15]。在本研究中,笔者应用 RT-PCR 方法检测茵陈五苓散干预治疗肝硬化大鼠 AQP2 的 mRNA 表达,结果发现大鼠肝脏 AQP2 的 mRNA 表达水平明显上升。Western blotting 检测结果也证实了茵陈五苓散干预治疗肝硬化大鼠后,大鼠肝脏 AQP2 蛋白表达也明显上升。结合 AQP2 蛋白的分子生物学功能,笔者推测茵陈五苓散通过上调 AQP2 的表达,改善了肝细胞的通透性,使肝细胞内外水代谢处于平衡状态,促进了腹水的消退。

综上所述,茵陈五苓散对大鼠肝硬化腹水的治疗具有较好的临床疗效,其机制与降低血浆

NO、ET-1 水平及上调 AQP2 的表达有关。

REFERENCES

- [1] GU T M, ZHANG Y, JIANG Y P, et al. Efficacy of acarbose-linked ornithine aspartate in hepatic encephalopathy in cirrhotic patients [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(10): 1538-1542.
- [2] DOU Z H, LUO L, HOU J Y, et al. Studies on liver protection of Yinchenhao decoction by seropharmacological method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(10): 868-871.
- [3] TRAUSNIGG S, KIENBACHER C, HALILBASIC E, et al. Challenges and management of liver cirrhosis: practical issues in the therapy of patients with cirrhosis due to NAFLD and NASH [J]. Dig Dis, 2015, 33(4): 598-607.
- [4] HE D, TAN T, WANG H L, et al. Effect of Yinchenwuling powder on chemerin in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Med Theor Pract(医学理论与实践), 2018, 31(14): 2045-2047, 2058.
- [5] CAI X R, YANG J Y, XIAO B K, et al. Progress in pharmacology and clinical application of Yinchenwuling powder [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2017, 33(9): 857-860.
- [6] FAN Y H, OU H Y, WANG H Y, et al. Progress in pharmacology and clinical application of Yinchenwuling powder [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(11): 193-200.
- [7] XU X J. Protective effects and mechanism of Yinchen Wuling San on immune liver injury [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2017, 9(31): 89-90.
- [8] ZHANG T L, SHE X H, ZENG Z Y. Curative effect analysis of modified artemisiae scopariae and poriae powder in the treatment of jaundice [J]. China Pract Med(中国实用医药), 2017, 12(2): 108-109.
- [9] ZHANG Z M, XU Q S, XIAO X L. Effect of Yinchen Wuling powder on leptin and adiponectin in treatment of metabolic syndrome patients [J]. Med Inn China(中国医学创新), 2017, 14(20): 77-80.
- [10] ZHENG J B. Detection value of platelet parameters and coagulation indexes in cirrhosis patients with hemorrhage [J]. J Rare Uncommon Dis(罕见疾病杂志), 2018, 25(6): 19-21.
- [11] 邹波, 张鑫鑫. 一氧化氮和内毒素水平在肝硬化合并肝肾综合征中的作用研究[J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(3): 526-527.
- [12] ZHANG Z C, YANG X, YANG X G. Efficacy of Ping-gan-yi-shen decoction in combination with Alprostadil in treatment of vertebra-basilar artery ischemic vertigo and its effects on level of ET-1 and CGRP [J]. China J Mod Med(中国现代医学杂志), 2016, 26(4): 44-47.
- [13] ZHAO Z H, WANG M X, LI F Y, et al. Effects of Supplementing Qi and activating blood circulation of traditional Chinese drugs on serum TGF-β1 and ET-1 levels of rabbits with radiation-induced liver injury [J]. Med Pharm J Chin PLA(解放军医药杂志), 2015, 27(10): 39-41.
- [14] XIE J L, LIU J, LIAN Z Y, et al. Association of GTF2IRD1-GTF2I polymorphisms with neuromyelitis optica spectrum disorders in Han Chinese patients [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(2): 346-335.
- [15] 吴一中, 周会新, 胡小宣, 等. 肝胆系统水通道蛋白研究进展[J]. 医学临床研究, 2007(10): 1792-1795.

收稿日期: 2019-01-31

(本文责编: 李艳芳)