

健脾化湿颗粒对大鼠结肠上皮细胞 OCLN、AQPs 及平滑肌细胞 cAMP、AC 的影响

王迎寒, 刘玉玲, 陈光辉, 胡楠, 张晓峰
(承德医学院中药研究所, 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 探究健脾化湿颗粒对大鼠结肠上皮细胞 OCLN、AQPs 及平滑肌细胞 cAMP、AC 的影响。**方法** 采用 CCK-8 法检测不同浓度健脾化湿颗粒对上皮细胞的存活率影响; 利用 Western blot 检测健脾化湿颗粒对上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达的影响; 分别用健脾化湿颗粒及 Ach、阿托品干预平滑肌细胞后, 利用显微标尺测量平滑肌细胞长度, ELISA 法检测平滑肌细胞 cAMP、AC 的水平。**结果** 健脾化湿颗粒 (≤ 1 mg/mL) 处理上皮细胞 24 h 后, 细胞存活率 $\geq 90\%$ 。与正常组比较, 健脾化湿颗粒上调上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达, 促进结肠平滑肌的舒张, 下调结肠平滑肌 AC、cAMP 的水平 ($P<0.05$, $P<0.01$)。健脾化湿颗粒可抑制 Ach 引起的平滑肌细胞收缩, 及 cAMP、AC 水平的上调; 与阿托品协同作用促进平滑肌细胞舒张, 及 cAMP、AC 水平的下调 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 健脾化湿颗粒可能通过调节离体大鼠结肠 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达及平滑肌细胞舒缩功能来改善 D-IBS 腹泻症状。

关键词: 健脾化湿颗粒; 大鼠结肠上皮细胞; AQPs; 大鼠结肠平滑肌细胞; cAMP; AC

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)02-0323-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.011

Effects of Jianpi Huashi Granules on OCLN and AQPs of colonic epithelial cells and cAMP and AC of colonic smooth muscle cells

WANG Ying-han, LIU Yu-ling, CHEN Guang-hui, HU Nan, ZHANG Xiao-feng
(Hebei Provincial Key Laboratory for Research and Development of Traditional Chinese Medicine; Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Jianpi Huashi Granules (JHG) on OCLN and AQPs of colonic epithelial cells and cAMP and AC of colonic smooth muscle cells. **METHODS** CCK-8 method was used to detect the effect of different concentrations of JHG on the survival rate of epithelial cells. Western blot was applied to identifying the effect of JHG on the expression of OCLN, AQP3 and AQP4 in epithelial cells. The colonic smooth muscle cells treated respectively with JHG+ Ach, and JHG+atropine were measured the length by microscopic scale, and their levels of cAMP and AC detected by ELISA. **RESULTS** The epithelial cells underwent 24 h JHG treatment (≤ 1 mg/mL) were observed with $\geq 90\%$ cellular viability. Compared with the normal group, JHG groups displayed up-regulation in the expression of OCLN, AQP3 and AQP4 in epithelial cells, promotion in the relaxation of colonic smooth muscle, and down-regulation in the levels of AC and cAMP in colon smooth muscle ($P<0.05$, $P<0.01$). JHG inhibited Ach-induced smooth muscle cell contraction and up-regulation of cAMP and AC levels. And the synergistic effect of JHG and atropine was found given the significant promotion of the relaxation of smooth muscle cells and the down-regulation of cAMP and AC ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** JHG may improve diarrhea symptoms in D-IBS by regulating the expression of colonic tight junction protein, AQP3, AQP4 protein of

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目 (YQ2014002); 河北省高校重点学科建设项目 (冀教高 [2013] 4); 承德医学院高层次人才科研启动基金项目 (201602)

作者简介: 王迎寒 (1980—), 女, 博士, 副教授, 从事中药药理学研究。Tel: (0314) 2290076, E-mail: wyh811018@163.com

colonic epithelial cells and the diastolic function of smooth muscle cells of rats.

KEY WORDS: Jianpi Huashi Granules (JHG); rat colonic epithelial cells; AQPs; rat colon smooth muscle cells; cAMP; AC

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一种以间歇发作或持续存在的腹痛或腹部不适, 并伴排便习惯或大便性状改变为主要临床特点, 而又缺乏形态学或生化异常等可用器质性疾病解释的功能性肠病。根据罗马IV诊断标准, 其病程至少半年, 且近3个月内每周至少1 d出现相关症状^[1]。根据临床症状可将IBS分为腹泻型 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)、便秘型 (constipation-predominant irritable bowel syndrome, C-IBS)、混合型 (mixed bowel habits irritable bowel syndrome, M-IBS)、不定型 (Unclassified irritable bowel syndrome, U-IBS)^[2], 其中以D-IBS最为多见。近年来, D-IBS发病率呈逐渐上升趋势^[3], 但其病理生理学机制尚未明确, 与肠道动力异常、内脏敏感性、肠黏膜渗透性的改变及肠道微生物改变、自主神经功能障碍、免疫激活、脑-肠轴调节功能异常等有关, 为多方面因素共同作用的结果^[4]。就D-IBS而言, 肠运动增加, 肠黏膜通透性增强是腹泻产生的重要原因; 而肠黏膜的渗透性与肠上皮细胞密切相关, 肠道动力与肠平滑肌细胞密切相关。健脾化湿颗粒源于临床, 具有理气健脾、化湿止泻作用, 用于治疗D-IBS。前期实验结果亦表明, 健脾化湿颗粒能调节肠动力, 减轻腹泻症状, 因此, 本研究着眼于结肠上皮细胞和平滑肌细胞, 拟从上皮细胞紧密连接蛋白 (Occludin, OCLN)、水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 及平滑肌细胞中环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 着手, 研究健脾化湿颗粒止泻作用的机制。

1 材料

1.1 细胞株 结肠上皮细胞株及结肠平滑肌细胞株均购自上海拜力生物科技有限公司。

1.2 药物 健脾化湿颗粒由炙黄芪、益智仁、炒白术、茯苓、砂仁、乌药、陈皮、炒白芍、防风、炙甘草组成; 采用传统水煎煮法、乙醇洗涤沉淀、减压浓缩、真空干燥, 以干膏粉: 乳糖=1:1比例湿法制粒而成; 薄层色谱法鉴别防风、陈皮、乌药、炙甘草、白术五味药材; 高效液相色谱法检测炙黄芪和炒白芍的含有量, 每克颗粒中炙黄芪不得

少于0.15 mg/g (以黄芪甲苷计), 炒白芍不得少于0.75 mg/g (以芍药苷计)^[5]。健脾化湿颗粒 (批号201610) 由承德医学院中药研究所制备。氯化乙酰胆碱 (上海士锋生物科技有限公司, 批号16091902); 盐酸阿托品 (天津金耀氨基酸有限公司, 批号1512241)。

1.3 试剂 高糖DMEM (美国Gibco公司, 批号8115063); 胎牛血清 (德国Bioclot公司, 批号1964); 大鼠cAMP酶联免疫试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司, 批号Oct 2016); 大鼠AC酶联免疫试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司, 批号Oct 2016); CCK8 (500次) 试剂盒 (日本同仁化学研究所, 批号JE603); 兔抗大鼠紧密连接蛋白抗体 (Occludin, 北京博奥森生物技术有限公司, 批号AF09265505); 兔抗大鼠水通道蛋白3抗体 (AQP3, 北京博奥森生物技术有限公司, 批号AE042437); 兔抗大鼠水通道蛋白4抗体 (AQP4, 北京博奥森生物技术有限公司, 批号AF09221494); 0.25%胰酶 (含EDTA, 北京索莱宝科技有限公司, 批号20150423); 山羊抗兔IgG-HRP二抗 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号AF11285098S); 兔抗大鼠 β -actin抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号AF04158601); BCA蛋白定量试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司, 货号P1511); 还原型5 $\times$ SDS上样缓冲液 (碧云天生物技术研究所, 货号P0015); 脱脂奶粉 (美国BD公司, 批号4239539); 化学发光试剂A和B (美国Thermo Scientific公司, 批号P1020); TEMED (美国Sigma公司, 批号M146); 30%丙烯酰胺 (碧云天生物技术研究所, 批号20161021); 过硫酸铵 (北京索莱宝科技有限公司, 批号1024D0313); 预染Marker (美国Thermo Scientific公司, 批号00389282); PVDF膜 (美国Millipore公司, 0.45 μ m)。

1.4 仪器 YT-875SB型医用净化工作台 (苏州苏杭实验动物设备厂); MCO-15AC CO₂培养箱 (日本三洋公司); HZQ-X100恒温震荡培养箱 (江苏同君仪器科技有限公司); BH-2型显微镜及摄像装置 (日本Olympus公司); Multiskan MK 3酶标仪 (美国Thermo Labsystems公司); LD4-2A低速离心

机（北京京立离心机有限公司）；LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；Velocity18 r 台式高速冷冻离心机（瑞士 Dynamica 公司）；WD-9405B 水平摇床、DYY-7C 转印电泳仪电源（北京市六一仪器厂）；CP214 电子分析天平 [奥豪斯仪器（上海）有限公司]；DYCZ-40D 迷你转印电泳仪、DYCZ-24DN 迷你双垂直电泳仪（北京市六一仪器厂）；Tanon 6100 电化学发光成像系统（北京原平皓生物技术有限公司）。

2 方法

2.1 细胞培养 收到细胞株后，镜下观察，上皮细胞呈不规则卵圆形，平滑肌细胞呈梭形，均已长满 90% 瓶底。常规方法按 1：3 比例进行传代扩增，调细胞浓度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于培养瓶中， $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、95% O_2 和 5% CO_2 条件下培养。24 h 后换液，以后每 3 d 更换培养基 1 次，期间用倒置显微镜观察细胞生长情况。待细胞长满 90% 培养瓶底时传代，部分冻存，将第 8 代细胞用于实验。

2.2 健脾化湿颗粒溶液配制 精确称定 200 mg 健脾化湿颗粒粉（未加辅料），加入 2 mL PBS 缓冲液，充分溶解，无菌滤膜过滤除菌，质量浓度为 100 mg/mL ， $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。用时按比例稀释。

2.3 检测健脾化湿颗粒处理后上皮细胞存活率 采用 CCK-8 法。收集长满培养瓶 80% 融合度的第 7 代结肠上皮细胞，调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ ，接种到 96 孔板中，每孔 200 μL ，培养 24 h 后，加入不同浓度的健脾化湿颗粒溶液，使健脾化湿颗粒的质量浓度为 1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/mL ，每个质量浓度 3 个复孔，孵育 24、48 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8，继续孵育 2 h，用酶标仪于 450 nm 处测吸光度值 [OD (45 nm)]。重复 3 次，选择适宜的健脾化湿颗粒浓度。

2.4 检测健脾化湿颗粒处理后上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达 采用 Western blot 法。收集长满培养瓶 80% 融合度的第 7 代结肠上皮细胞，调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ ，接种到 6 孔板中，每孔 3 mL，培养 24 h 后，加入健脾化湿颗粒（0.25、0.5、1 mg/mL ），每个浓度 3 个复孔，孵育 24 h 后，弃去培养液，PBS 缓冲液洗 3 次，弃去，将培养板倒扣在吸水纸上吸干液体，每孔加入 200 μL 含 PMSF 的裂解液，于冰上裂解 30 min，经常来回摇动使细胞充分裂解。裂解完后，用干净的刮棒迅速将细胞刮下，然后将细胞碎片和裂解液

移至 1.5 mL 离心管中。 $4\text{ }^\circ\text{C}$ ，12 000 r/min 离心 5 min。将离心后的上清分装 0.5 mL 的离心管中，每管 50 μL ， $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存，重复 3 次。用 BCA 蛋白定量试剂盒检测各样本蛋白浓度，各样本取 50 μg 蛋白量上样（5% 浓缩胶，12.5% 分离胶），电泳至溴酚兰刚跑出边缘终止（浓缩胶 80 V，分离胶 120 V）。400 mA 恒流转膜 3 h，一抗（OCLN 抗体 1：200，AQP3 抗体 1：200，AQP4 抗体 1：1 000； β -actin 抗体 1：2 000） $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜，室温下二抗（1：2 000）孵育 2 h，滴加电化学发光液，1 min 后用 Tanon 6100 电化学发光成像系统曝光拍照，曝光时间 10 s。图片用 WD-94BA 凝胶成像系统自带软件进行半定量分析，测定目的条带光密度值。各目的蛋白的光密度与 β -actin 条带光密度的比值乘以 100% 作为该蛋白表达水平参数。

2.5 检测健脾化湿颗粒处理后结肠平滑肌细胞舒缩 收集长满培养瓶 80% 融合度的第 7 代结肠平滑肌细胞，调整浓度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ ，接种到 96 孔板中，每孔 200 μL ，培养 24 h 后，加入健脾化湿颗粒（0.25、0.5、1 mg/mL ），每个浓度 3 个复孔，并设空白对照，孵育 24 h 后，用胰酶消化，收集各孔细胞，调整细胞浓度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ ，加入 $1 \times 10^{-7}\text{ mmol/mL}$ Ach 或 0.18 mg/mL 阿托品，使终浓度 Ach 为 $1 \times 10^{-8}\text{ mmol/mL}$ ，阿托品为 60 $\mu\text{mol/L}$ ，孵育 30 s，最后加入 30 μL 2.5% 戊二醛终止反应，各组分别取 20 μL 细胞悬液滴于载波片上，作为一个检体，于倒置显微镜下观察，每个检体随机测量边续视野下 30 个完整细胞的长度，计算细胞平均长度，重复 3 次。

2.6 检测健脾化湿颗粒处理后结肠平滑肌细胞 cAMP、AC 的水平 收集长满培养瓶 80% 融合度的第 7 代结肠平滑肌细胞，调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ ，接种到 24 孔板中，每孔 200 μL ，培养 24 h 后，加入健脾化湿颗粒（0.25、0.5、1 mg/mL ），每个浓度 3 个复孔，并设空白对照，孵育 24 h 后，加入 $1 \times 10^{-7}\text{ mmol/mL}$ Ach 或 0.18 mg/mL 阿托品，使终浓度 Ach 为 $1 \times 10^{-8}\text{ mmol/mL}$ ，阿托品为 60 $\mu\text{mol/L}$ ，孵育 30 s，快速弃去培养上清，PBS 缓冲液洗 3 次，然后每孔加入 PBS 缓冲液 400 μL ，反复冻融 3 次， $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存，重复 3 次。严格按照 ELISA 试剂盒要求检测大鼠结肠平滑肌细胞内 cAM、AC 水平。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析，计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，组间比较采

用单因素方差分析。若方差齐则采用 LSD 检验，若方差不齐采用 Dunnett's T3 检验，以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度的健脾化湿颗粒对结肠上皮细胞存活率的影响 健脾化湿颗粒质量浓度 ≤ 1 mg/mL 时，结肠上皮细胞存活率 $\geq 90\%$ ，且 24 h、48 h 趋势相同，差异无统计学意义。确定健脾化湿颗粒质量浓度分别为 1、0.5、0.25 mg/mL，孵育时间为 24 h，做后续研究。见图 1。

3.2 健脾化湿颗粒对结肠上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达的影响 与正常组比较，健脾化湿颗粒（1、0.5、0.25 mg/mL）上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达升高（ $P < 0.05$ ， $P <$

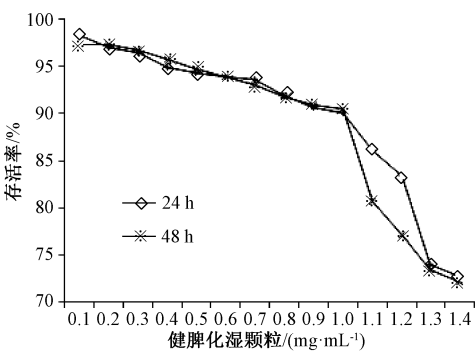


图 1 不同浓度健脾化湿颗粒对结肠上皮细胞存活率的影响 (n=9)

Fig.1 Effects of different concentrations of JHG on the survival rate of colonic epithelial cells (n=9)

0.01)。见表 1、图 2。

表 1 健脾化湿颗粒对结肠上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达的影响 (x̄±s, n=6)

组别	OCLN	AQP3	AQP4
正常组	0.11±0.03	0.52±0.14	0.05±0.03
1 mg/mL 健脾化湿颗粒组	0.34±0.08 ^{##}	0.67±0.10 [#]	0.21±0.08 ^{##}
0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒组	0.59±0.06 ^{##}	0.96±0.17 ^{##}	0.39±0.05 ^{##}
0.25 mg/mL 健脾化湿颗粒组	0.25±0.07 ^{##}	0.79±0.11 ^{##}	0.27±0.07 ^{##}

注:与正常组比较, #P<0.05, ##P<0.01。

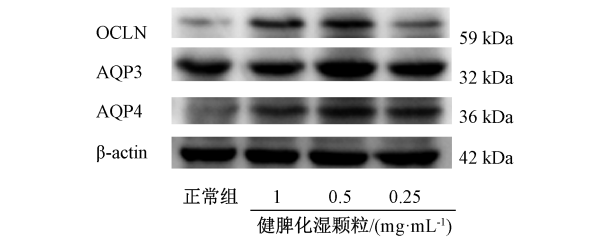


图 2 健脾化湿颗粒对结肠上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of JHG on the protein expressions of OCLN, AQP3 and AQP4 in colonic epithelial cells

3.3 健脾化湿颗粒对结肠平滑肌细胞舒缩的影响 健脾化湿颗粒（1、0.5、0.25 mg/mL）能增加结肠平滑肌细胞长度（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）；加入 Ach 干预后，结肠平滑肌细胞长度减小（ $P < 0.01$ ），而健脾化湿颗粒（1、0.5、0.25 mg/mL）能显著抑制 Ach 引起的平滑肌细胞收缩（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）；加入阿托品干预后，结肠平滑肌细胞长度增加，健脾化湿颗粒（1、0.5 mg/mL）与阿托品协同作用促进平滑肌细胞舒张（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）。见表 2。

3.4 健脾化湿颗粒对结肠平滑肌细胞 cAMP、AC 的影响 与正常组比较，健脾化湿颗粒（1、0.5 mg/mL）可降低结肠平滑肌细胞内 cAMP、AC 的

表 2 健脾化湿颗粒对结肠平滑肌细胞长度的影响 (μm, x̄±s, n=9)

Tab.2 Effects of JHG on the length of colonic smooth muscle cells (μm, x̄±s, n=9)

组别	细胞长度
正常组	81.65±3.17
1 mg/mL 健脾化湿颗粒组	95.89±4.11 ^{##}
0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒组	92.53±3.54 ^{##}
0.25 mg/mL 健脾化湿颗粒组	87.79±3.48 [#]
Ach 组	47.21±4.01 ^{##}
1 mg/mL 健脾化湿颗粒+ Ach 组	69.44±3.32 ^{**}
0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒+ Ach 组	60.30±3.57 ^{**}
0.25 mg/mL 健脾化湿颗粒+ Ach 组	52.07±2.65 [*]
阿托品组	109.23±2.86 ^{##}
1 mg/mL 健脾化湿颗粒+阿托品组	117.55±2.81 ^{△△}
0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒+阿托品组	114.62±3.09 [△]
0.25 mg/mL 健脾化湿颗粒+阿托品组	110.22±2.89

注:与正常组比较, #P<0.05, ##P<0.01;与 Ach 组比较, *P<0.05, **P<0.01;与阿托品组比较, △P<0.05, △△P<0.01。

水平（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）；Ach 升高结肠平滑肌细胞内 cAMP、AC 的水平（ $P < 0.01$ ）；健脾化湿颗粒（1、0.5 mg/mL）能抑制 Ach 引起的平滑肌细胞内 cAMP、AC 水平升高（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）；与阿托品有协同作用降低平滑肌细胞内 cAMP、AC 水平（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）。见表 4。

表 4 健脾化湿颗粒对结肠平滑肌细胞 cAMP、AC 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Tab. 4 Effects of JHG on cAMP and AC in colonic smooth muscle cells ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	cAMP/(nmol·L ⁻¹)	AC/(U·L ⁻¹)
正常组	6.97±0.34	216.69±16.55
1 mg/mL 健脾化湿颗粒组	5.93±0.37 ^{##}	173.27±14.38 ^{##}
0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒组	6.34±0.43 [#]	188.07±13.26 [#]
0.25 mg/mL 健脾化湿颗粒组	6.64±0.38	199.40±9.63
Ach 组	7.74±0.41 ^{##}	260.11±28.47 ^{##}
1 mg/mL 健脾化湿颗粒+ Ach 组	6.73±0.27 ^{**}	181.64±26.96 ^{**}
0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒+ Ach 组	7.28±0.44 [*]	203.27±23.38 ^{**}
0.25 mg/mL 健脾化湿颗粒+ Ach 组	7.58±0.32	224.73±21.35 [*]
阿托品组	6.37±0.45 ^{##}	190.35±25.16 ^{##}
1 mg/mL 健脾化湿颗粒+阿托品组	3.92±0.67 ^{△△}	154.93±19.15 ^{△△}
0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒+阿托品组	4.61±0.38 ^{△△}	171.04±18.52 [△]
0.25 mg/mL 健脾化湿颗粒+阿托品组	5.19±0.52 ^{△△}	185.53±22.00

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与 Ach 组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与阿托品组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

4 讨论

IBS 是临床上常见的功能性消化道疾病,以 D-IBS 较为多见,好发于青壮年,具有发病率高和反复发作的特征,给患者的工作和生活带来不便,且消耗大量的医疗资源。D-IBS 的病理生理学机制尚未明确,D-IBS 的发生与肠道动力异常、内脏敏感性异常、脑肠轴功能异常等因素密切相关,并通过神经系统、免疫系统、内分泌系统等多方面的综合作用导致肠道平滑肌运动障碍和水液代谢功能紊乱^[6]。现代医学认为,水液的吸收部位主要在肠道,消化道内大部分水分被小肠吸收,不能被小肠吸收的水液进入结肠。如果进入结肠的水液超过了其吸收能力或者结肠吸收水液的能力下降,都会导致粪便中的水液增加,发生腹泻^[7]。因此,AQPs 表达减少,不能有效的转运水液;肠运动加快,使结肠不能充分吸收水液,均可以导致腹泻的发生。

AQPs 又名水孔蛋白,广泛分布于机体中,目前在消化道已发现有 9 种 AQPs 表达。它们分布于肠黏膜中,主要介导水液的跨膜转动,以便维持肠道细胞内外环境稳定。研究发现,AQP3 可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,其作用可被 HgCl₂ 或 CuSO₄ 抑制^[8];血管活性肠多肽可通过 cAMP-PKA 依赖性途径上调 AQP3 的表达,从而改变肠黏膜对水的通透性,调节水的跨膜运动,影响胃肠道分泌、吸收功能^[9]。AQP4 主要位于结肠上皮细胞的基底外侧膜,同样参与了跨细胞水液转动,在 cAMP-PKA 信号通路介导下,AQP4 异常表达在 D-IBS 的病理生理过程中起关键作用^[10]。

一直以来,胃肠动力异常作为 IBS 的主要病理生理之一。胃肠运动依赖于胃肠道平滑肌的收缩和

舒张,并受肠神经系统和中枢神经系统共同调控。随着科学技术的不断进步,对胃肠运动的研究已经从宏观的在体和离体肠管实验转到细胞层面,甚至是某个信号通路的研究。平滑肌细胞是胃肠运动的基本单位,其上分布着各种类型的受体,如激动型受体中的 M 受体、5-HT 受体等,激活此类受体,可引起细胞的收缩,使肠道运动加快。

cAMP 被称为细胞内的第二信使,在 G 蛋白偶联信号通路中起重要的调控作用,参与人体的各种活动。在胃肠道,cAMP 调控作用涉及黏膜层、肌层以及肠神经系统,对胃肠道的运动功能、内脏感觉及分泌功能都具有非常重要的调节作用^[11]。当细胞受到外界刺激时,首先激活 Gs 蛋白,再激活 AC,从而产生 cAMP,生成的 cAMP 可进一步激活蛋白激酶 A,进而影响多种蛋白的磷酸化及离子通道的激活或失活,使细胞对外界刺激产生相应反应。在结肠平滑肌中,可由 M 受体活化而增加。

健脾化湿颗粒配方来源于临床,该方具有理气健脾、祛湿止泻之效,主要用来治疗 D-IBS,疗效确切。本课题组前期研究^[12-18]结果显示,健脾化湿颗粒可以降低 D-IBS 大鼠结肠运动及内脏敏感性,其作用机制可能与调节脑肠轴功能,改善脑肠肽的水平及其受体的表达有关。在本实验中,应用 CCK-8 试剂盒检测不同浓度健脾化湿颗粒对上皮细胞存活率的影响,确定 1、0.5、0.25 mg/mL 为后续实验用质量浓度,孵育时间为 24 h;3 个浓度的健脾化湿颗粒可显著升高上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 表达;均可显著增加结肠平滑肌的长度,显著抑制 Ach 引起的平滑肌细胞收缩及协同阿托品促进平滑肌细胞舒张 ($P<0.05$, $P<0.01$);1、0.5 mg/mL 健脾化湿颗粒可显著降低平滑肌细胞内

AC、cAMP 的水平，抑制由 Ach 引起的平滑肌细胞内 AC、cAMP 水平的升高及协同阿托品引起平滑肌细胞内 AC、cAMP 水平的降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。提示健脾化湿颗粒可通过增加上皮细胞 OCLN、AQP3、AQP4 表达增强肠道对水液的主动吸收；亦可通过调节平滑肌细胞内 AC、cAMP 的水平，从而改善平滑肌运动功能，此过程中有 M 受体的参与。结合前期研究结果，课题组分析健脾化湿颗粒的作用机制并不单一，对上皮细胞和平滑肌细胞的作用也不止于此，因此，在后续研究工作中，课题组还需要进一步扩展思路，深度挖掘健脾化湿颗粒治疗 D-IBS 的作用机制。

参考文献：

[1] Lacy B E, Mearin F, Chang L. Bowel disorders [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(6) : 1393-1407.

[2] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 肠易激综合征中西医结合诊疗共识意见 (2017) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3) : 227-232.

[3] Karantanos T, Markoutsaki T, Gazouli M, *et al.* Current insights in to the pathophysiology of irritable bowel syndrome [J]. *Gut Pathog*, 2010, 2(1) : 3.

[4] 赵 飞. 便秘型肠易激综合征治疗中生物反馈疗法的应用价值[J]. 重庆医学, 2017, 46(2) : 384-386.

[5] 梁 文. 健脾化湿颗粒的制备工艺及质量标准研究[D]. 承德: 承德医学院, 2010.

[6] 金琳莹, 张 烁. 水通道蛋白调控腹泻型肠易激综合征的研究进展[J]. 胃肠病学, 2016, 21(6) : 380-382.

[7] 吕 妍. 芳香化湿法及代表方药对 D-IBS 模型鼠肠动力、水液代谢及相关胃肠激素调控机理研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2009.

[8] 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(6) : 957-962.

[9] Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, *et al.* Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(2) : 203-210.

[10] 谭 洁, 滕久祥, 彭芝配, 等. 九香止泻片对湿热型泄泻肠易激综合征模型大鼠 AQP4、PKA 与 cAMP 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(7) : 23-26.

[11] 王迎寒, 周淑媛, 巩仔鹏, 等. 戊己丸不同配伍方对结肠平滑肌细胞 5-HT3, 4 受体及下游信号传导通路主要元件的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(9) : 1027-1030.

[12] 陈光辉, 刘玉玲, 杜海燕, 等. 健脾化湿颗粒对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠运动及中枢 c-fos 的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(12) : 1943-1948.

[13] 王迎寒, 刘玉玲, 杜海燕, 等. 健脾化湿颗粒对 D-IBS 模型大鼠脑-肠轴中 CRF 和 CRFR1 的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(25) : 4075-4083.

[14] 王迎寒, 刘玉玲, 陈光辉, 等. 健脾化湿颗粒对 IBS 模型大鼠小肠运动的影响[J]. 实验动物科学, 2009, 26(6) : 26-29.

[15] 王迎寒, 赵素微, 陈光辉, 等. 健脾化湿颗粒对 D-IBS 模型大鼠脑中 5-HT 及 5-HTR3, 5-HTR4 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(2) : 255-261.

[16] 杜海燕, 王迎寒, 张晓峰, 等. 健脾化湿颗粒对 D-IBS 模型大鼠内脏敏感性和脑中 CRF 及其受体的影响[J]. 实验动物科学, 2013, 30(5) : 15-19.

[17] 赵立波, 王迎寒, 刘玉玲, 等. 健脾化湿颗粒对实验性 IBS-D 大鼠结肠黏膜 5-HT 表达的影响[J]. 重庆医学, 2014, 43(14) : 1713-1715.

[18] 付聪敏, 王 烨, 王迎寒, 等. 健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠模型 CGRP 表达的影响[J]. 重庆医学, 2015, 44(12) : 1603-1605.