

· 药理 ·

## 补中益气汤治疗脾气虚证大鼠肌无力的机制研究

周昕欣<sup>1,2</sup>, 王彩霞<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110101)

**[摘要]** 目的:研究脾气虚证大鼠体重、肛温、耐寒冷存活百分率、游泳时间和骨骼肌磷酸化肌球蛋白轻链表达变化,明确补中益气汤治疗脾气虚证大鼠肌无力的可能机制。方法:清洁级 Wistar 大鼠,采用饮食不节和劳倦过度结合法建立脾气虚证模型,单日喂食甘蓝 15~20 g/只,双日胃饲猪油脂 3 mL/只,共 15 d。造模成功后,实验分为正常组、脾气虚组和补中益气汤组(高、中、低 3 个剂量组,剂量分别为 7.10, 3.55, 1.78 g·kg<sup>-1</sup>),灌胃给药 10 d。分别检测大鼠体重、肛温、耐寒冷存活率、游泳时间,Western blot 检测骨骼肌中磷酸化肌球蛋白轻链的表达,比较实验结束前后数值变化。结果:与正常组相比,脾气虚组大鼠的体重、肛温、耐寒冷存活率、游泳时间及磷酸化肌球蛋白轻链表达均显著下降( $P < 0.05$ );与脾气虚组相比,中、高剂量补中益气汤组的体重、肛温、耐寒冷存活率、游泳时间及磷酸化肌球蛋白轻链表达均显著上升( $P < 0.05$ )。结论:补中益气汤使磷酸化肌球蛋白轻链均表达升高可能是其治疗脾气虚大鼠肌无力的一个重要机制。

**[关键词]** 补中益气汤; 脾气虚; 磷酸化肌球蛋白轻链; 肌无力

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0092-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030092

### Mechanism of Buzhong Yiqi Tang in Treatment of Spleen Qi Deficiency Syndrome Amyosthenia in Rats

ZHOU Xin-xin<sup>1,2</sup>, WANG Cai-xia<sup>2\*</sup> (1. Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110034, China; 2. Liaoning University of TCM, Shenyang 110101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the possible mechanism of Buzhong Yiqi Tang in treatment of spleen Qi deficiency syndrome amyosthenia in rats. **Method:** A combined method of combined techniques and overstrain were used to establish a spleen Qi deficiency model in rat. Cabbage 15-20 g was given to rats every day, 3 mL pig grease was orally given to rats in every other day for 15 days. After a successful modeling, the rats were divided into normal control group, spleen Qi deficiency group, Buzhong Yiqi Tang treatment group (high dose, middle dose, and low dose of 7.10, 3.55, 1.78 g·kg<sup>-1</sup> respectively), and Buzhong Yiqi Tang was orally administrated for 10 days. The weight, rectal temperature, resistance to cold survival percentage and swimming time of rat were detected, and the expression of p-MLC was detected by Western blot, the value was compared before and after the treatment. **Result:** The weight, rectal temperature, resistance to cold survival percentage, swimming time and the expression of p-MLC in model group had a significant decrease compared to normal control group. The above mentioned indexes in middle dose and high dose groups of Buzhong Yiqi Tang had a significant increase compared to model group. **Conclusion:** Buzhong Yiqi Tang showed an up-regulation expression of p-MLC, which may be an mechanism for the treatment of spleen Qi deficiency syndrome amyosthenia in rats.

**[Key words]** Buzhong Yiqi Tang; spleen Qi deficiency; phosphorylated myosin light chains; amyosthenia

中医学认为,“脾司运化、主肌肉、统血……”, 为气血生化之源,称为后天之本。其功能不仅涵盖

**[收稿日期]** 20140812(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30973689)

**[第一作者]** 周昕欣, 博士后, 主治医师, 从事中药方剂及单味中药对临床皮肤疾病的治疗及中医藏象理论的研究, Tel: 13840279326, E-mail: zhouxinxincc@163.com

**[通讯作者]** \*王彩霞, 博士, 教授, 从事中医藏象理论及脾虚衰老的分子机制研究, Tel: 024-31207083, E-mail: wang\_cai@126.com

了现代医学的整个消化系统,而且与神经、免疫、血液、循环、运动等系统的生理功能密切相关。若运化失职,则气血无从生化四肢肌肉、五脏六腑失其濡养,百病乃作。2002年卫生部药政局颁布中药新药临床研究指导原则,关于中药治疗脾气虚证的临床研究指导原则的诊断与疗效标准阐述气虚证,其中涉及到肌无力的相关症状。有文献[1]通过利血平复制脾虚动物模型,观察实验前后各组小鼠体质量和脏器质量的变化,发现实验后脾虚模型组小鼠体质量明显比正常对照组减轻,这契合了中医有诸内着,必形于诸外理论,通过体质量及脏器质量的变化可以大体测知机体内在的变动情况,受之启发,笔者研究脾气虚证大鼠肌无力将借鉴其研究思路。有文献[2]研究强肌健力口服液对三碘季铵酚肌松反应有拮抗作用,对神经肌肉接点可能具有兴奋作用,且脾虚证的发生与核酸及蛋白质合成减少有关。蛋白质是一切生命现象的物质基础,是展示DNA遗传信息的物质形式,具有复杂空间结构的蛋白质承担着完成生物体内各种生理功能的任务,如果合成受限,势必影响机体的功能。肌球蛋白是一种多功能蛋白质,在生物体内发挥重要作用,参与生物体诸多功能。肌球蛋白调节性轻链(myosin light chains, MLC)是其重要组成成分,MLC的Ser19, Thr18的可逆性磷酸化调节肌球蛋白活性,MLC的磷酸化可大大提高肌球蛋白的ATP酶活性,参与生物体内诸多的功能<sup>[3]</sup>。肌球蛋白轻链表达与中药方剂治疗脾气虚证相关性及其机制的研究尚未见报道。补中益气汤来源于《脾胃论》,为甘温除热代表方。脾失健运,肌肉失养则四肢无力,脾气虚乏源故肌无力的治疗应以补脾气为主,补中益气汤方中重用黄芪正是契合了此点。本实验旨在通过研究大鼠体重、肛温、耐寒冷存活率、游泳时间和骨骼肌磷酸化肌球蛋白轻链表达变化,观察大鼠脾气虚证象的改变,并把游泳时间和骨骼肌磷酸化肌球蛋白轻链表达变化的机制相联系,应用现代实验方法探寻补中益气汤对脾气虚大鼠肌无力的可能治疗机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级Wistar大鼠,雌雄各半,由中国医科大学实验动物中心提供,体重190~210g,合格证号SCXK(辽)2013-0001。

**1.2 药物制备** 补中益气汤药物由辽宁中医药大学附属二院中药饮片局提供,由黄芪18g,甘草9g,人参6g,当归6g,橘皮6g,升麻6g,柴胡6g,白术9g组成。汤药常规方法煎制,浓缩成100%。给药

剂量根据文献[4]方法计算,大鼠剂量( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) = [人剂量 $\times$ 大鼠折算系数]/人折算系数,大鼠折算系数为0.71,人折算系数为0.11,大鼠等效剂量为 $3.55\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,其1/2剂量 $1.78\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为低剂量组,其2倍剂量 $7.10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为高剂量组,第16天即造模成功后开始给药,补中益气汤组给予补中益气汤灌胃治疗10d<sup>[5]</sup>。

**1.3 药物与试剂** MLC抗体(批号02/2009, Cell Signaling公司),磷酸化肌球蛋白调节性轻链(phosphorylated myosin light chains, p-MLC, 批号03/2009, Cell Signaling),抗 $\beta$ -actin抗体(批号03/2014, Santa Cruz公司),羊抗兔辣根过氧化物酶标记的IgG二抗(批号82209,购自北京中山生物技术公司)。

**1.4 仪器** MCO-15AC型细胞培养箱(日本Sanyo公司),TMS-F型倒置显微镜(日本TMS公司),3K18型台式低温超速离心机(德国Sigma公司),M5型分光光度计(美国Bausch&Lomb公司),TB114型电子分析天平(美国Sartorius公司),702型-80℃超低温冰箱(美国Thermo公司),垂直电泳仪(美国BioLab公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组和造模** 选用同批次雌雄各半健康Wistar大鼠,进行下列指标的实验,平均体重( $200\pm 10$ )g,随机分成5组,正常组,模型组,低、中、高剂量补中益气汤组。依照《实用中医证候动物模型学》在谢仰洲过劳加饥饱失常方法造成脾气虚证的基础上课题组摸索出一套符合中医理论的复合因素方法造模<sup>[6-7]</sup>。脾气虚模型组,第1~14天,单日喂食甘蓝15~20g/只,禁食,自由饮水;游泳至耐力极限。双日胃饲猪油脂3mL/只。第15天,运用中医证候动物模型症状评价专家系统(2.0)对脾气虚模型组进行评价<sup>[8]</sup>,符合标准者入组。

**2.2 体重、肛温的测定** 实验开始前,测定各组大鼠体重和肛温,造模结束和实验结束时再分别测定各组大鼠体重和肛温。然后,分别比较实验结束前、后各组大鼠体重和肛温,进行统计学分析。

**2.3 耐寒冷存活率的测定**<sup>[9]</sup> 各实验组大鼠末次给药30min后放入( $-5\pm 1$ )℃的冰箱内计时,2h后将大鼠取出,统计存活数及存活率。

**2.4 大鼠抗疲劳机能实验**<sup>[9-10]</sup> 采用饮食不节和劳倦过度结合法建立脾气虚证模型。各实验组大鼠,在尾部束体重10%的重物,水深50cm,水温保

持在(20 ± 0.5) °C, 末次给药 30 min 后将大鼠放入玻璃缸内游泳, 注意观察, 当大鼠头部沉没水中 10 s 不能浮出水面者即为体力耗竭, 立即停止计时, 为小鼠的游泳时间。

**2.5 检测骨骼肌中肌球蛋白轻链的表达** 取肱二头肌, 肱三头肌、股四头肌, 剪碎。PBS 冲洗、裂解、匀浆、离心、上清液为蛋白样品液。抗 MLC 抗体(1:500), 抗 p-MLC 抗体(1:500), 抗 β-actin 抗体(1:800) 4 °C 孵育过夜, ECL 化学发光、X 射线片曝光、显像, 所得胶片用 Chemi Imager 5500 V2.0 软件扫描, 通过 Fluor Chen 2.0 软件进行定量分析, 测得吸光度(A)。

**2.6 统计学分析** 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 13 统计软件行统计学分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对脾气虚证大鼠体重和肛温的影响** 与正常组相比, 模型组大鼠的体重和肛温均显著下降(P < 0.05); 与模型组相比, 中、高剂量补中益气汤组的体重和肛温均显著上升(P < 0.05)。见表 1。

表 1 补中益气汤对脾气虚证大鼠体重和肛温的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
Table 1 Effects of Buzhong Yiqi Tang on spleen-Qi deficiency syndrome rat's weight and rectal temperature( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	体重/g	肛温/°C
正常	-	202.3 ± 10.5	38.6 ± 1.2
模型	-	123.4 ± 8.9 <sup>1)</sup>	36.1 ± 1.4 <sup>1)</sup>
补中益气汤	1.78	134.4 ± 9.6	36.7 ± 1.4
	3.55	179.6 ± 10.2 <sup>2)</sup>	37.8 ± 1.5 <sup>2)</sup>
	7.10	183.4 ± 10.5 <sup>2)</sup>	38.4 ± 1.5 <sup>2)</sup>

注: 与正常组相比<sup>1)</sup> P < 0.05; 与模型组相比<sup>2)</sup> P < 0.05 (表 2 ~ 3 同)。

**3.2 对脾气虚证大鼠耐寒冷存活率的影响** 与正常组相比, 模型组大鼠的耐寒冷存活率显著下降(P < 0.05); 与模型组相比, 中、高剂量补中益气汤组的耐寒冷存活率均显著上升(P < 0.05)。见表 2。

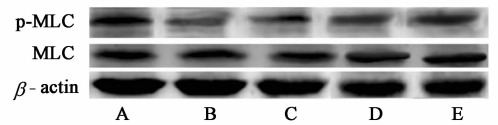
表 2 补中益气汤对脾气虚证大鼠耐寒冷存活率的影响(n = 15)  
Table 2 Analysis of resistance to cold survival percentage in each group(n = 15)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	死亡数/只	存活率/%
正常	-	0	100
模型	-	12	20 <sup>1)</sup>
补中益气汤	1.78	11	25
	3.55	6	50 <sup>2)</sup>
	7.10	5	58 <sup>2)</sup>

**3.3 对脾气虚证大鼠抗疲劳能力及骨骼肌中肌球蛋白轻链的表达的影响** 与正常组相比, 模型组大鼠的游泳时间和磷酸化肌球蛋白轻链显著下降(P < 0.05); 与模型组相比, 中、高剂量补中益气汤组的游泳时间和磷酸化肌球蛋白轻链均显著上升(P < 0.05)。见表 3, 图 1。

表 3 补中益气汤对脾气虚证大鼠抗疲劳机能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
Table 3 Analysis of anti-fatigue function test in each group(n = 15)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	游泳时间 /s	磷酸化肌球蛋白轻链比值
正常	-	1 324 ± 212	1.81 ± 0.31
模型	-	835 ± 117 <sup>1)</sup>	0.49 ± 0.12 <sup>1)</sup>
补中益气汤	1.78	877 ± 130	0.59 ± 0.18
	3.55	1 090 ± 163 <sup>2)</sup>	1.26 ± 0.28 <sup>2)</sup>
	7.10	1 210 ± 160 <sup>2)</sup>	1.48 ± 0.26 <sup>2)</sup>



A. 正常组; B. 脾气虚模型组; C-E. 补中益气汤依次为 1.78, 3.55, 7.10 g·kg<sup>-1</sup> 组

图 1 各组磷酸化肌球蛋白轻链表达

Fig. 1 Expression of phosphorylated myosin light chains in each group

### 4 讨论

本实验证明了补中益气汤组可以使“脾气虚”大鼠体重、肛温、耐寒冷存活率、游泳时间及磷酸化肌球蛋白轻链表达均显著上升(P < 0.05), 改善大鼠“脾气虚”证象。

近年来, 根据中医理论, 人们通过脾气虚证动物模型从与肌肉能量物质贮存、肌肉能量生成及肌肉能量代谢有关的环节入手, 开展了很多脾气虚与肌肉能量代谢关系方面的研究, 目前认为肌无力是由于先天禀赋不足、后天失调、情志刺激、外邪所伤、疾病失治误治、病后失养等原因引起的脾胃气虚, 渐而积虚成损, 延及五脏, 脾司运化、主肌肉, 为气血生化之源, 若脾气虚失运, 则脏腑、肌肉无以充养, 故肌肉萎缩应属于“脾气虚”之象, 治疗应以重补脾胃、益气升陷、兼治五脏为原则<sup>[9]</sup>。已有大量研究表明脾气虚与肌无力的相关性, 有学者<sup>[2]</sup>在失重或模拟失重条件下, 机体会出现不同程度的“脾气虚”证象, 已有文章证明<sup>[13-14]</sup>补脾益气中药复方(主要成分党

参、白术、茯苓)能减轻废用条件下引起的动物及人体“脾气虚”的证象,本实验的组方遵循以上理论和实践的原则,选用补中益气汤,补中益气汤是公认的治疗肌无力的经典方剂,但其机制尚待明确。

在笔者的实验中,证明了补中益气汤可以使大鼠的体重和耐寒冷存活率及游泳时间显著升高,减轻“脾气虚”的证象,其中游泳时间的变化直接说明“脾气虚”可以使大鼠肌无力,这和施旭光和崔利萍研究结果相一致<sup>[9-10]</sup>。肌球蛋白是粗肌丝的主要构成成分,它与细肌丝中的肌动蛋白共同参与肌肉的收缩和舒张过程,每个肌球蛋白分子有两条重链和两条轻链组成,当细胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高,  $Ca^{2+}$  与钙调蛋白结合,使 MLC 的 Ser19 和 Thr18 发生磷酸化,导致肌球蛋白头部的 ATP 酶激活,引发肌动蛋白和肌球蛋白相互作用,从而调节肌球蛋白参与的诸多生物学功能<sup>[3]</sup>。笔者的研究证实了 p-MLC 表达升高提高大鼠骨骼肌收缩能力,同样有研究证实 p-MLC 表达升高,促进肌丝运动,提高肌肉收缩能力<sup>[5]</sup>。本实验证明补中益气汤可以使 p-MLC 表达升高, p-MLC 表达升高可能是补中益气汤治疗脾气虚状态下大鼠肌无力的一个重要机制。本实验为临床研究提供科学资料,可望为脾气虚证肌无力的药物开发提供新思路。

#### [参考文献]

[1] 陈芝喜,徐志伟,刘小斌,等. 强肌健力口服液对脾虚小鼠 RNA 合成的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(43):129-131.  
[2] 陈芝喜,徐志伟,刘小斌,等. 强肌健力口服液影响脾虚小鼠蛋白质合成的效应[J]. 中国临床康复, 2006, 10(35):97-99.  
[3] 王丛阳,王辉,沈传陆. 肌球蛋白轻链的调节及其对

肿瘤细胞增殖、转移的影响[J]. 医学综述, 2010, 6(21):3251-3254.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993:33-34.  
[5] 刘晓玲,王汝俊,赵琪琪. 补中益气汤对脾气虚大鼠胃黏膜 MUC5ACmRNA 与蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4):7-9.  
[6] 李德新. 脾虚证对生物膜结构与功能影响的研究[J]. 辽宁中医杂志, 1993, 20(6):39-43.  
[7] 王晓明,易杰,廖世新,等. 脾虚证动物模型的客观评估[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(7):406-407.  
[8] 陈雷. 应用模糊数学中模式识别方法进行脾气虚大鼠模型评价研究[D]. 沈阳:辽宁中医学院, 2004.  
[9] 施旭光,翟理祥,邓淙友,等. 补中益气汤“益气升阳”配伍对脾虚小鼠作用的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(8):45-46.  
[10] 崔利萍,孙远岭,周纬,等. 运脾方不同剂量对脾虚大鼠耐力作用的研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(4):446-447.  
[11] 邓铁涛. 邓铁涛医集[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995:62.  
[12] 马媛媛,王立峰,赵慧,等. 强肌健力方及黄芪多糖对脾气虚大鼠细胞因子水平的影响[J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(6):23-25.  
[13] 刘小斌,邓中光. 强肌健力口服液治疗脾胃气虚型重症肌无力的临床观察[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(5):361-364.  
[14] 陈芝喜,徐志伟,刘小斌,等. 脾气虚证小鼠脾肾组织核酸和蛋白质含量变化及强肌健力口服液的影响[J]. 中国组织工程研究及临床康复, 2007, 11(8):1581-1584.  
[15] 梁明丽,崔颖,吕广艳,等. 肌球蛋白轻链激酶非激酶活性调节磷酸化肌球蛋白 ATP 酶活性及肌丝运动[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(1):91-96.

[责任编辑 聂淑琴]