中国实验方剂学杂志
Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae

苍术提取物对脾虚证大鼠胃黏膜结构及胃肠功能的影响

刘芬[1,2]，刘艳菊[1*]，田春漫[2]
(1. 湖北中医药大学，武汉 430065；2. 湖北民族学院，湖北 恩施 445000)

［摘要］ **目的**:探讨苍术提取物保护脾虚大鼠胃黏膜及胃肠功能的作用,阐明苍术提取物干预脾虚证的作用机制。**方法**:采用喂饲小承气汤煎剂加饥饱失常建立大鼠脾虚证模型,然后将动物随机分为模型组、苍术提取物高、中、低剂量组(20,10,5 g·kg^{-1})、多潘立酮组(5 mg·kg^{-1}),连续 *ig* 给药 10 d。采用碳末 *ig* 法行大鼠胃内残留率、小肠推进比测定,HE 染色观察大鼠胃黏膜病理学,透射电镜观察腺胃区胃黏膜组织细胞及细胞间连接的超微结构改变,激光多普勒微循环血流计测定大鼠胃黏膜血流量,免疫组化法测定大鼠胃黏膜组织中三叶因子 1(TFF1)及结肠组织中受体酪氨酸蛋白激酶(c-kit)的表达量。**结果**:与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜形态学及超微结构明显异常,胃黏膜血流量及胃黏膜组织中 TFF1 和结肠组织中 c-kit 的表达量明显降低($P<0.01$);胃内残留率明显升高,小肠推进比明显降低($P<0.01$),经苍术提取物干预后各指标明显改善($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论**:苍术提取物可抑制脾虚证大鼠胃黏膜损害,保护和修复损伤的黏膜组织,并改善脾虚证大鼠的胃肠功能。

［关键词］ 苍术提取物；脾虚证；胃肠功能；信号传导
［中图分类号］ R285.5 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2015)13-0100-05
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130100

Effect of Atractylodis Rhizoma Extract on Structure of Gastric Mucosa and Gastrointestinal Function in Rats with Spleen Deficiency LIU Fen[1,2], LIU Yan-ju[1*], TIAN Chun-man[2] (1. *Hubei University of Chinese Medicine*, *Wuhan* 430065, *China*; 2. *Hubei Institute for Nationalities*, *Enshi* 445000, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To observe the role of Atractylodis Rhizoma extract on protecting gastric mucosa and gastrointestinal dysfunction of rats with spleen deficiency syndrome, and to elucidate the mechanism of Atractylodis Rhizoma extract regulating spleen deficiency syndrome. **Method**: Male rats were fed with Xiaochengqi decoction and hunger to establish spleen deficiency syndrome models. Then the animal were randomly divided into model group, Atractylodes Rhizome extract high, middle and low dose group (20, 10, 5 g·kg^{-1}), Domperidone group 5 mg·kg^{-1}. After 10 days of treatment, charcoal gavage method was used o determine residual rate of stomach and small intestinal propulsion ratio of the rats, hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the gastric mucosa pathological and histological changes, like gastric mucosa tissue cells of glandular stomach area and ultrastructural alterations of intercellular junctions with transmission electron microscopy method, laser Doppler blood flow meter was used to measure gastric mucosal blood flow, immunohistochemical was used to determinate the expression of trefoil factor 1 (TFF1) in gastric mucosa and c-kit expression in colon tissue volume. **Result**: Compared with the normal group, gastric mucosal morphology had significantly abnormal change in model group; gastric mucosal blood flow, gastric mucosa TFF1 and colon tissue volume c-kit expression were decreased ($P<0.01$); residual rate of stomach was increased and small intestinal propulsion ratio was decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). After intervention of Atractylodis Rhizoma extract, those indicators were improved ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion**: Atractylodis Rhizoma extract can inhibit the gastric mucosal damage of spleen deficiency rat, protect and repair the damaged mucous membrane organization, and improve the gastrointestinal function of spleen deficiency rats.

［**Key words**］ Atractylodes Rhizome extract; spleen deficiency syndrome; gastrointestinal function; signal transduction

［收稿日期］ 20141012(003)
［基金项目］ 国家自然科学基金项目(81073051);国家中管局中医药行业科研专项(201007012-2)
［第一作者］ 刘芬,博士生,讲师,从事中药炮制及中药药理学研究,Tel:13972405805,E-mail:1183794354@qq.com
［通讯作者］ * 刘艳菊,博士,教授,从事中药炮制工艺及质量标准研究,Tel:027-68890239,E-mail:lyj1965955@sohu.com

中医传统理论认为脾主运化，为后天之本，气血化生之本源。现代研究也认为，包括消化、吸收、代谢、免疫、神经 、内分泌等多系统的功能均与脾(胃)有关[1]，而脾虚也常表现为上述多系统的综合征。苍术性温，味甘苦，归肝脾肾三经，主要功能是燥湿健脾，临床常用于消化系统病症的治疗，具有很好的调理胃肠功能，促进胃肠动力，防治慢性胃肠疾病的作用[2]。查阅相关文献，发现国内外对苍术的研究较少，更少涉及对消化系统疾病干预的物质基础、药理机制的深层次研究。在前期研究中发现，采用乙醇提取、大孔树脂精制的方法制备的苍术提取物主要含苍术素、β-桉油醇和茅术醇等成分。本实验拟采用大鼠脾虚模型，并用苍术提取物进行干预，从胃黏膜保护及对胃肠功能障碍的干预这一角度对苍术提取物调理大鼠脾虚证的相关机制作一深入探讨和评价，以阐明苍术提取物干预脾虚证的确切机制，从理论上为苍术提取物调控脾虚找到确切的依据。

1 材料

1.1 动物 取雄性健康 SD 大鼠 60 只，体重(200 ± 20) g，购自同济医科大学实验动物中心，合格证号 SCXK(鄂)2013-0105。

1.2 药物与试剂 苍术 Atractylodis japonicae)提取物(含 46.97% 苍术素，17.87% β-桉油醇和 12.21% 茅术醇，批号 130711，武汉市九州通医药有限公司)，多潘立酮片(批号 20130610，西安杨森制药有限公司)，针剂专用活性碳(承德赫达活性碳制造有限公司)，羧甲基纤维素钠(CMC-Na)，胃黏膜三叶因子 1(TFF1)，Cajal 间质细胞 c-kit 兔多克隆抗体试剂盒(批号分别为 DF130203，DF130401，南京建成生物科技有限公司)。

1.3 仪器 UN-500 型紫外分光光度计及 DG5032 型酶联免疫检测仪(南京市华东电子团体医疗装备有限责任公司)，H-600 型透射电镜(日本日立公司)，XSP-300 型双目显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司)，Image-Pro Plus 5.1 分析系统及 Motic 图像分析系统(奥林巴斯中国有限公司)。

2 方法

2.1 脾虚大鼠模型制备 脾虚大鼠模型的建立参照曾益宏，刘友章等人创立的破气苦降加饥饱失常法[3]。每日给大鼠灌服小承气汤煎剂(大黄、厚朴、枳实按 4∶5∶3的比例组方)1 次，按生药 60 $g \cdot kg^{-1}$ 给药，隔日进食 1 次，自由饮水。造模结束时，正常组大鼠毛发顺整；行为状态、睡眠、饮食、大便均正常。而模型组大鼠均出现毛发不泽、枯乱、少动、拱背、眯眼、扎堆、兴奋性差、饮食明显减少、便溏等症；同时，体温、体重、活动次数、尿 *D*-木糖排泄率均较正常组大鼠明显降低，且差异显著，符合脾虚证的一切要素，由此确定脾虚模型复制成功。

2.2 分组及给药 确认大鼠模型造模成功后，将模型复制组大鼠随机分组：脾虚模型组(简称模型组)、苍术提取物高、中、低剂量组、多潘立酮组，10 只/组，并与正常组 10 只大鼠一同进入实验，结束造模后次日开始 *ig* 给药，动物连续 *ig* 10 d，其中苍术提取物组按等效临床剂量和体表面积公式计算出大鼠每日用药剂量为 1.0 $g \cdot kg^{-1}$，此剂量作为中剂量，其 1/2 和 2 倍量分别为低剂量(5 $g \cdot kg^{-1}$)和高剂量(20 $g \cdot kg^{-1}$)，多潘立酮组用药剂量为 5.0 $mg \cdot kg^{-1}$，正常组和脾虚模型组则 *ig* 给予相同体积的生理盐水。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠胃黏膜血流量的测定 最后 1 次 *ig* 给药后，所有大鼠禁食不禁水24 h，随后用含 5% 碳末和 2% CMC-Na 的碳末混悬液 2.5 mL 灌胃大鼠，30 min 后 30 $mg \cdot kg^{-1}$ 剂量戊巴比妥钠溶液 *ip* 麻醉大鼠，然后从大鼠剑突下正中将腹壁剪开，将大鼠的胃充分暴露，沿胃体前壁切开一约 0.5 cm 的切口，插入激光多普勒微循环血流仪探头，分别于胃体大、小弯，胃窦等处取 4 点进行检测，取平均值并以激光多普勒信号电压(mV) 相对值来表示。

2.3.2 大鼠胃内残留率、小肠推进比的测定 用颈椎脱臼法处死大鼠，剖开腹腔，将幽门至回盲部的肠管取出并测量其长度，此即小肠的总长度，然后测出炭末推进长度，即幽门部到碳末前沿的长度，计算出小肠推进率，其公式为：小肠推进率 = 幽门部到碳末前沿的长度/小肠的总长度 × 100%；然后将大鼠的胃贲门和幽门部两端分别结扎并称取胃的全重，然后将胃体剪开(沿胃大弯)，将胃内残留物洗净，滤纸拭干称重，此即胃净重，用胃全重减去胃净重即得胃内残留物的质量，胃内残留率的计算公式是(胃全重 - 胃净重)/碳末混悬液灌胃总质量 ×100%。

2.3.3 大鼠胃黏膜病理学观察 用生理盐水将大鼠胃黏膜冲洗干净，选择病变的胃黏膜(所有大鼠均取相同部位)，剪取 0.5 cm ×0.5 cm 胃黏膜一块，置入 10% 甲醛液中固定，常规石蜡包埋，5 μm 连续切片，HE 常规染色，光镜下观察胃黏膜病理学改变并摄像。

2.3.4 电镜标本制作及观察 于腺胃区剪取 0.1 cm ×0.1 cm 大小黏膜组织 1 块，2.5% 戊二醛前固定，0.1 $mol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液漂洗 3 次，1% 锇酸后固

定,0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液漂洗 3 次,梯度乙醇脱水(50%,70%,80%,95%,100%)2 次,每次 15 min,环氧树脂包埋,纯丙酮脱水 2 次(15 min),EPON812∶丙酮(1∶1)浸透 30 min,纯包埋液浸透 1 h,纯包埋液固化 37 ℃ 24 h 后 60 ℃ 48 h,超薄切片机切片,铀、铅染色(醋酸双氧铀,枸橼酸铅),透射电镜观察胃黏膜组织细胞超微病理学改变。

2.3.5 大鼠胃黏膜组织中 TFF1 及结肠组织中c-kit 表达量的测定　实验大鼠切取长宽均为 5 mm 的胃黏膜及结肠组织 1 块,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片。按 SABC 法免疫组化处理,Image-Pro Plus 5.1 分析系统分析,高倍显微镜下观察胃黏膜腺体和上皮单位面积上 TFF1 及结肠组织横断面固有层单位面积上 c-kit 的表达量,每张切片随机观察 5 个视野,以积分吸光度 *IA* 表示,5 个高倍视野 *IA* 的均数即为该样本阳性细胞 *IA*。

2.4 统计方法　数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件,对所获得的数据进行组间单因素方差分析和显著性检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对模型大鼠胃黏膜血流量的影响　与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜血流量明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,苍术提取物高、中、低剂量组大鼠胃黏膜血流量显著升高($P < 0.05$,$P < 0.01$),并呈现一定量效关系。见表 1。

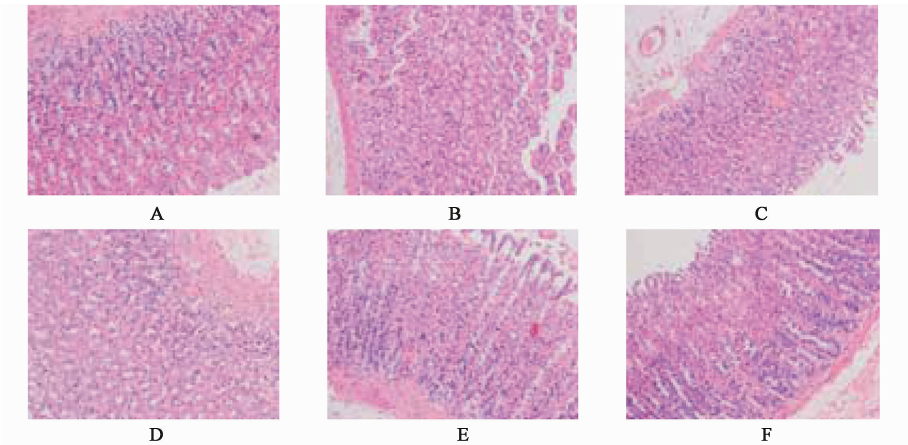
表 1　苍术提取物对模型大鼠胃黏膜血流量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1　Influence of Atractylodes Rhizoma extract on gastric mucosal blood flow of model rat ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg^{-1}	GMBF /mV
正常	-	60.2 ± 3.6
模型	-	30.9 ± 8.3$^{1)}$
多潘立酮	5×10^{-3}	38.1 ± 3.5$^{2)}$
苍术提取物	5.0	39.4 ± 5.4$^{2)}$
	10.0	48.5 ± 4.4$^{3)}$
	20.0	58.1 ± 3.1$^{3)}$

注:与正常组比较$^{1)}$ $P < 0.01$;与模型组比较$^{2)}$ $P < 0.05$,$^{3)}$ $P < 0.01$(表 2 ~ 3 同)。

3.2 对模型大鼠胃黏膜病理学的影响　正常组大鼠胃黏膜结构正常,层次清楚;模型组大鼠胃黏膜及黏膜下层出血、水肿明显,黏膜变薄,大片状脱落,连续性胃黏膜中断,黏膜上皮细胞坏死;多潘立酮组大鼠胃黏膜部分中断,黏膜、黏膜下层部分水肿,部分可见炎细胞浸润;苍术提取物低剂量组大鼠胃黏膜及黏膜下层部分水肿较明显,部分可见黏膜上皮细胞坏死及炎细胞浸润;苍术提取物中剂量组胃黏膜及黏膜下层少量炎症、水肿,腺体排列较齐,部分可见炎细胞浸润;苍术提取物高剂量组大鼠胃黏膜、黏膜下层充血水肿轻,腺体排列整齐,有少量炎细胞浸润。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 多潘立酮 5 mg·kg^{-1}组;D. 苍术提取物 5 g·kg^{-1}组;E. 苍术提取物 10 g·kg^{-1}组;F. 苍术提取物 20 g·kg^{-1}组(图 2 同)

图 1　苍术提取物对大鼠胃黏膜病理学的影响(HE,×200)

Fig.1　Histopathological effect of Atractylodex Rhizoma extract on gastric mucosa in model rats (HE, ×200)

3.3 对模型大鼠胃黏膜细胞超微结构的影响　正常组大鼠胃黏膜上皮细胞基质及细胞核均正常;模型组大鼠胃黏膜上皮细胞体积增大,肿胀,膜上某些酶活性改变,胞浆膨出,细胞器互相离散,内质网肿胀,线粒体基质型肿胀,染色质边集,出现核浓缩,碎裂,溶解等结构改变;多潘立酮组大鼠胃黏膜上皮细

胞体积部分增大，细胞部分肿胀，胞浆无明显膨出，基浆染色较深，细胞器互相连接较紧密，内质网及线粒体部分肿胀，染色质部分边集及核溶解；苍术提取物低剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞体积增大，细胞部分肿胀，膜上某些酶活性部分改变，基浆染色变淡，细胞器互相连接较松散，内质网部分肿胀，染色质部分边集并伴核浓缩等结构改变；苍术提取物中剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞体积稍肿胀，膜上某些酶活性明显改善，基浆染色变深，细胞器连接较紧密，内质网无明显肿胀，线粒体及高尔基体可见少量扩张，染色质无明显边集；苍术提取物高剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞体积已基本恢复正常，细胞无肿胀，基浆染色正常，线粒体及内质网无明显肿胀，染色质无边集及核浓缩，核碎等结构改变。见图 2。

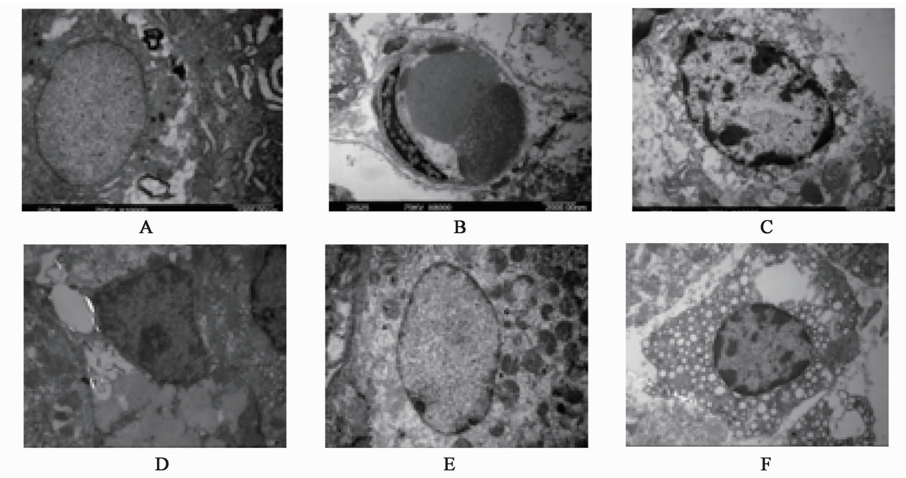


图 2　苍术提取物对大鼠胃黏膜细胞超微结构的影响(醋酸双氧铀枸橼酸铅染色，透射电镜观察，×8 000)

Fig. 2　Influence of Atractylodex Rhizoma extract on cells ultrastructural of gastric mucosa in model rats (transmission electron microscopy, ×8 000)

3.4　对模型大鼠胃排空、小肠推进比的影响　与正常组比较，模型组大鼠胃内残留率明显升高，小肠推进比明显下降（$P<0.01$）；与模型组比较，苍术提取物高、中、低剂量组大鼠胃内残留率显著下降，小肠推进比明显升高($P<0.05$，$P<0.01$)，并呈现一定量-效关系。见表 2。

表 2　苍术提取物对模型大鼠胃排空、小肠推进的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2　Influence of Atractylodex Rhizoma extract on gastric emptying and small intestinal propulsion of model rat ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /g·kg^{-1}	胃内残留率 /%	小肠推进率 /%
正常	–	26.2±3.6	74.4±6.8
模型	–	69.9±8.3$^{1)}$	29.8±4.4$^{1)}$
多潘立酮	5×10^{-3}	29.1±3.5$^{2)}$	62.4±5.7$^{2)}$
苍术提取物	5.0	52.4±5.4$^{2)}$	40.2±7.2$^{2)}$
	10.0	39.5±4.4$^{3)}$	53.8±6.1$^{3)}$
	20.0	28.1±3.1$^{3)}$	72.7±5.1$^{3)}$

3.5　对模型大鼠胃黏膜组织中 TFF1，结肠组织中 c-kit 表达量的影响　TFF1 主要表达在胃黏膜腺体细胞胞浆中，颜色呈棕黄色。与正常组比较，模型组大鼠胃黏膜腺体细胞胞浆中 TFF1 的表达量明显降低（$P<0.01$），与模型组比较，苍术提取物高、中、低剂量组大鼠胃黏膜腺体细胞胞浆中 TFF1 的表达量明显升高($P<0.05$，$P<0.01$)，并呈现一定量-效关系；大鼠结肠中 c-kit 阳性物质表达均呈棕黄、褐色分布。与正常组比较，模型组大鼠结肠组织中 c-kit 表达量明显降低（$P<0.01$）；与模型组比较，苍术提取物高、中、低剂量组大鼠结肠组织中 c-kit表达量明显升高($P<0.05$，$P<0.01$)，并呈现一定量-效关系。见表 3。

4　讨论

脾虚证是一个多器官多系统功能障碍的综合性症候群，而消化系统障碍是其主要表现。目前，文献记载的脾虚证模型造模的方法有多种[4]，而在大黄苦寒泻下基础上改进的破气苦降加饥饱失常法是目前较普遍运用的一种造模方法。有研究报道[5]该种造模方法所造成的脾虚证模型症状与临床所见的脾虚证表现非常相似。

有研究表明脾虚证与多种胃肠功能障碍都有密切关系[6]，本实验中观察到脾虚模型大鼠胃排空及小肠推进率降低明显。而通过苍术提取物干预以

表 3 苍术提取物对对模型大鼠胃黏膜组织中 TFF1,结肠组织中 c-kit 表达量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Influence of Atractylodes Rhizoma extract on gastric mucosa tissues TFF1, colon tissue c-kit expression of model rat ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /$g\cdot kg^{-1}$	TFF1 /IA	c-kit /IA
正常	–	11.01 ± 2.38	16.27 ± 4.01
模型	–	$4.06\pm1.18^{1)}$	$5.69\pm1.21^{1)}$
多潘立酮	5.0×10^{-3}	$8.13\pm1.66^{2)}$	$9.01\pm2.32^{2)}$
苍术提取物	5.0	$6.36\pm1.01^{2)}$	$8.09\pm1.89^{2)}$
	10.0	$8.04\pm1.53^{3)}$	$12.07\pm2.87^{3)}$
	20.0	$9.98\pm2.06^{3)}$	$15.98\pm3.81^{3)}$

后,脾虚证大鼠胃肠动力障碍明显改善,说明苍术提取物可从胃肠道-神经肌肉调控系统来调节胃肠功能,改善脾虚证临床症状。

脾气虚可致胃黏膜血流量(GMBF)的下降,从而导致胃黏膜损伤[7],TFF1 可加强黏液凝胶层的防御能力,减少各种损伤因素对胃黏膜的侵袭,在保护胃肠道黏膜中发挥了及其重要的作用[8]。本实验显示,脾虚时胃黏膜保护因子是减少的,而苍术提取物能明显提高脾虚证大鼠胃黏膜三叶因子 1 的表达,增加胃黏膜血流量,从而保护胃黏膜,促进损伤部位的修复。ICC 主要参与胃肠道的电活动并参与神经信号的传导[9]。c-kit 是 ICC 上的跨膜蛋白,在对胃肠道 ICC 的研究中,c-kit 是一个非常好的标志物[10]。结果显示,脾虚证模型大鼠结肠组织中c-kit 的表达明显减少,导致不规则慢波的出现,这可能是胃肠道平滑肌运动功能失调的主要原因。而用苍术提取物治疗后 c-kit 的表达明显升高,说明苍术提取物对胃肠动力起搏细胞 ICC 表达的调节可能是其治疗脾虚证的重要机制。

[参考文献]

[1] 冯秋瑜,黄瑾明,薛丽飞,等. 黄瑾明教授治疗脾胃病经验[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):318-320.

[2] 付梅红, 朱东海,方婧,等. 苍术的化学、分子生药学和药理学研究进展 [J]. 中国中药杂志,2009,34(20):2669-2671.

[3] 曾益宏,刘友章,徐升. 益气健脾法对脾虚证大鼠红细胞膜 ATPase 活性的影响[J]. 四川中医,2011,29(2):24-27.

[4] 赵荣华,谢鸣,李聪,等. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的变化及柴疏四君子汤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):119-122.

[5] 易受乡,彭艳,彭芬,等. 艾灸对脾虚大鼠小肠上皮线粒体超微结构及呼吸链酶含量的影响[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(29):3028-3030.

[6] 廖乐乐,罗翱翔,唐千益,等. 四君子汤对大黄脾虚模型小鼠的影响[J]. 广东药学院学报,2013,29(2):202-205.

[7] 施伟. 胃黏膜保护研究的新进展[J]. 中国医药指南,2013,11(24):59-61.

[8] 刘娜,江伟. 溃疡方对乙酸胃溃疡大鼠黏膜 TFFI、EGF 和 EGFR 的影响[J]. 河南中医,2013,33(10):1649-1651.

[9] 纪云西,凌江红,庞黎明,等. 胃肠道 Cajal 间质细胞、Ca^{2+} 与胃肠动力[J]. 实用医学杂志, 2013,29(11):1872-1875.

[10] 徐蕾,黄穗平. 人参皂苷 Rb1 对培养的小鼠小肠 Cajal 细胞起搏电流影响的研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(10):2541-2543.

[责任编辑 聂淑琴]