

四君子汤对脾虚大鼠空肠黏膜的修复及对葡萄糖吸收的影响

黄丽花, 王素军, 钟运鸣, 熊晓红, 岑美凤, 臧林泉, 王桂香*
(广东药学院药科学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究四君子汤对脾虚大鼠空肠黏膜损伤的修复作用及对葡萄糖吸收的影响,以探究四君子汤对脾虚证益气健脾的作用机制。**方法:**将SD大鼠分为正常组、模型组、精胺组($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和四君子汤高、中、低剂量组($22.0, 11.0, 5.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$);除正常组外,ih利血平建立脾虚大鼠模型;通过大鼠在体单向肠灌注模型,运用紫外分光光度法测定不同组别大鼠肠道对葡萄糖的吸收,并使用光学显微镜对大鼠空肠组织的病理切片进行观察,比较其黏膜损伤修复情况。**结果:**通过对不同组别的葡萄糖吸收速率常数(K_a)和有效渗透系数(P_{app})的比较显示,与正常组比较,模型组大鼠对葡萄糖的吸收显著降低,且空肠黏膜损伤明显($P < 0.05$);与模型组比较,精胺组和给药组大鼠对葡萄糖的吸收明显增加,空肠黏膜损伤明显得到修复($P < 0.05$)。**结论:**四君子汤能促进脾虚大鼠小肠吸收葡萄糖功能的恢复,其作用机制之一可能是通过修复脾虚大鼠的肠黏膜来增加小肠对葡萄糖的吸收,从而发挥益气健脾作用。

[关键词] 四君子汤;脾虚证;葡萄糖;吸收;肠黏膜

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0094-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030094

Effects of Sijunzi Tang on Glucose Absorption and Jejunum Mucosa Repairing of Spleen Deficiency Rats

HUANG Li-hua, WANG Su-jun, ZHONG Yun-ming, XIONG Xiao-hong,
CEN Mei-feng, ZANG Lin-quan, WANG Gui-xiang*

(School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Sijunzi Tang on glucose absorption and the jejunum mucosa repair in spleen deficiency rats, and investigate the mechanism of Sijunzi Tang for replenishing Qi and invigorating the spleen. **Method:** The SD rats were divided randomly into 6 groups: normal group, model group, spermidine group ($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Sijunzi Tang high dose group, middle dose group and low dose group ($22.0, 11.0, 5.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Spleen deficiency models were prepared by reserpine via subcutaneous administration in all rats except normal group. In situ single-pass intestinal perfusion models were used to determine rat intestinal absorption of glucose in different groups by ultraviolet spectroscopy. Light microscope was used to observe the pathological changes of jejunum tissues, and compare the repairing conditions of mucosal injury. **Result:** The glucose absorption rate constant (K_a) and effective permeability coefficient (P_{app}) in different groups showed that the glucose absorption was significantly lower in the model group than that in the normal group and the injury of jejunum mucosa was more obvious ($P < 0.05$). Compared with the model group, the glucose absorption was significantly increased in rats of spermidine group and Sijunzi Tang groups, and the injury of jejunum mucosa was significantly repaired ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sijunzi Tang could improve the absorption of glucose via repairing the damaged structure of intestinal mucosa of spleen deficiency rats, which may be one of the possibly

[收稿日期] 20150319 (006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81302895);广东省中医药局基金项目(20132193)

[第一作者] 黄丽花, 硕士, 从事中药药理学工作, Tel:13724107855, E-mail:hlh1130@163.com

[通讯作者] *王桂香, 博士, 副教授, 从事中西医结合专业胃肠病药理研究工作, Tel:020-39352123, E-mail:wgx306@aliyun.com

important mechanisms for replenishing Qi and invigorating the spleen.

[Key words] Sijunzi Tang; spleen deficiency; glucose; absorption; mucosa

中医认为“脾主运化水谷精微”，“脾失健运”可导致营养物质吸收障碍。葡萄糖的小肠吸收是脾“运化水谷精微”的重要形式之一。大量研究表明脾虚证患者及动物存在着肠黏膜上皮细胞损伤及葡萄糖吸收障碍^[1-2]。由于葡萄糖的吸收主要在小肠，葡萄糖的主要转运载体都分布在小肠黏膜上皮细胞中，肠黏膜的结构形态势必会影响葡萄糖转运和吸收。

四君子汤是益气健脾的代表方剂，其方来源于宋代《太平惠民和剂局方》，由党参、白术、茯苓和甘草组成，临床用于治疗脾气虚证引起的食欲不振、脘腹虚胀等不良症状^[3]。现代研究认为，脾气虚证存在肠黏膜上皮细胞损伤及葡萄糖吸收的减少^[4]，而葡萄糖是机体主要能源物质，其吸收部位主要在小肠。目前，尚无关于四君子汤对肠上皮细胞与葡萄糖吸收作用的相关性研究。本研究通过制作脾虚大鼠动物模型，观察四君子汤干预前后模型大鼠小肠黏膜形态和葡萄糖吸收的变化，从而探讨四君子汤益气健脾作用的机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠，SPF 级，体重 290 ~ 320 g，共 42 只，由广州中医药大学实验动物中心提供，许可证号 SYXK(粤)2013-0020，适应性饲养 3 d 后开始实验。

1.2 药物及试剂 党参(甘肃，批号 YPA4F0004)，茯苓(湖南，批号 130601)，白术(浙江，批号 YPA4G0002)，炙甘草(甘肃，批号 YPA4F0001)均购于广州市药材公司，按照质量比 3:3:3:2 组成(即党参 60 g，云茯苓 60 g，白术 60 g 和炙甘草 40 g)，加水 10 ~ 12 倍水，浸泡 2 h，大火煮沸，小火煮 1 h，纱布过滤，5 ~ 6 倍水与药渣同法煎煮，再过滤，合并滤液，70 °C 的条件下旋转蒸发，浓缩至 220 mL，即得到浓缩液每毫升含生药量 1.0 g。生理盐水(广东艾希德药业有限公司，批号 140518201)，利血平注射液(1 g · L⁻¹，天津金耀药业有限公司，批号 1409151)，精眯(spermidine, SPD, 美国 Sigma 公司，批号 124-20-9)，D-木糖(国药集团化学试剂有限公司，批号 F20131026)，对溴苯胺、硫脲、冰乙酸、浓硫酸和 5% 苯酚溶液为分析纯，葡萄糖(中国食品药品鉴定研究所)，2% 对溴苯胺溶液，Krebs-Ringer 缓冲液。

1.3 仪器 UV-1750 型紫外分光光度计(日本岛津公司)，HH-501S 型电热恒温水浴锅(常州百密思仪器有限公司)，CP124C 型号分析天平(美国奥豪斯公司)，HL-2 型恒流泵(上海精科实业有限公司)。

2 方法

2.1 脾虚大鼠模型的建立 脾气虚证模型采用利血平造模法^[5]。正常组皮下注射生理盐水，模型组皮下注射利血平，注射剂量为每天 0.5 mg · kg⁻¹，连续注射 8 d。根据大鼠体重变化和尿 D-木糖排泄率变化来评价造模成功与否。

2.2 动物分组及给药 将大鼠随机分为正常组、模型组、精眯组、四君子汤组高、中、低剂量组，每组各 6 只。造模成功后，正常组不给予药物治疗。模型组 ig 生理盐水；精眯组 ig 精眯，按 7.5 mg · kg⁻¹ 的剂量给药；四君子汤高、中、低剂量组分别按照 22.0, 11.0, 5.5 g · kg⁻¹ 的剂量 ig 四君子汤；均每天给药 1 次，连续 7 d。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 脾虚大鼠模型的检测 脾虚大鼠模型建立成功与否，主要是通过大鼠造模前后体重的变化及尿 D-木糖排泄率的检测。尿 D-木糖排泄率检测是采用对溴苯胺法。将尿液稀释适当倍数，加入 2% 对溴苯胺溶液，紫外-可见分光光度计于 520 nm 波长处测定。

2.3.2 在体单向肠灌注 试验前，供试液将管道冲洗至出液口药物浓度与供试液浓度相同，以消除试验过程中管路对药物吸附的影响。取禁食 12 h(可自由饮水)的大鼠，ip 20% 乌拉坦麻醉(剂量 4 mL · kg⁻¹)，固定并维持体温。沿腹中线打开腹腔，分离空肠段，选取长度约 10 cm，于两端切口，用预热至 37 °C 的生理盐水冲洗干净，插管后结扎。伤口处用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿，红外灯下保温。进口处用已知质量的装有含有 75 mmol · L⁻¹ 葡萄糖浓度的 Krebs-Ringer 缓冲液小瓶以约 0.3 mL · min⁻¹ 流速进行灌注，在出液口用另一已知质量的小瓶收集，每隔 15 min 迅速更换 1 次供试液小瓶和收集液小瓶，称重，计算灌入和收集的供试液质量。试验结束后处死大鼠，剪下被考察的肠段，测量其长度(*l*)和内径(*r*)，采用质量法按下式计算药物吸收速率常数(*K_a*)和表观吸收系数(*P_{app}*)。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out} Q_{out}}{C_{in} Q_{in}}\right) \frac{Q}{V}$$

$$P_{app} = \frac{-Q \ln\left(\frac{C_{out} Q_{out}}{C_{in} Q_{in}}\right)}{2\pi r l}$$

公式中, Q_{in} 和 Q_{out} 分别为灌入和收集的灌流液体积(假定供试液质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 根据测得质量计算体积), v 为灌流速度; C_{in} 和 C_{out} 分别为进口和出口处缓冲液中的葡萄糖浓度。按照以上方法进行的操作, 计算不同组别的大鼠空肠的 K_a 和 P_{app} 。

2.3.3 小肠黏膜形态观察 在体单向肠灌流试验后, 将大鼠处死, 迅速取出一段空肠组织, 用生理盐水冲洗干净, 放入固定液 4% 甲醛中固定, 使组织硬化, 以保持活体时的结构; 将固定好的组织块放入小瓶中, 于水中冲洗, 充分洗去固定液; 随后, 不同体积分数的乙醇作为脱水剂进行脱水, 以将组织内的水分置换出来; 再用透明剂二甲苯进行组织透明; 组织透明后, 放入熔化的石蜡内浸渍, 使石蜡渗入组织, 以取代组织内的二甲苯; 再将熔化好的石蜡倒入包埋框, 待蜡液表层凝固即迅速冷却, 完全凝固后即做成含有组织块的蜡块; 将包埋好的蜡块用切片进行切片; 最后将切薄的切片贴附载玻片上后, 进行常规的苏木-伊红(HE)染色。每张切片选取 5 个视野拍照, 采用 HPIAs1000 高清晰度彩色病理图文分析系统进行分析。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠体重和尿 D-木糖排泄率的影响 在造模期间, 与正常组比较, 模型组的体重随着给药天数的增加呈现明显下降的趋势, 并于造模第 9 天, 各组大鼠体重降到最低。在第 9 天到第 15 天恢复期间, 模型组和其他给药组体重逐渐增加, 各组比较, 差异无统计学意义。尿 D-木糖排泄率结果造模前, 与正常组比较, 模型组差异无统计学意义, 造模后, 模型组的尿 D-木糖排泄率明显低于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。经过给药后, 精眯组和四君子汤的 3 个剂量组的 D-木糖排泄率明显提高($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对大鼠空肠吸收葡萄糖含量的影响 结果表明, 正常组和模型组对 K_a 和 P_{app} 有显著性影响($P < 0.05$), 说明脾虚大鼠对葡萄糖的吸收较正常大鼠略差; 模型组和给药组对 K_a 和 P_{app} 也有显著性差异

表 1 四君子汤对大鼠尿 D-木糖排泄率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Sijunzi Tang on D-xylose excretion rate in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	尿 D-木糖排泄/%
正常	-	36.41 ± 1.15
模型	-	18.50 ± 0.84 ¹⁾
精眯	0.007 5	31.42 ± 0.90 ²⁾
四君子汤	5.5	31.25 ± 0.97 ²⁾
	11.0	32.45 ± 0.89 ²⁾
	22.0	34.87 ± 0.89 ²⁾

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

($P < 0.05$), 给药各组的 K_a 和 P_{app} 值是四君子汤低剂量组 < 四君子汤中剂量组 < 四君子汤高剂量组 < 精眯组, 说明给予精眯或四君子汤后, 脾虚大鼠空肠对葡萄糖的吸收明显增加。与正常组比较, 模型组大鼠吸收分数及转运速率明显降低, 经过给药后, 各组吸收及转运速率明显升高($P < 0.05$)。见表 2, 3。

表 2 四君子汤对大鼠空肠吸收葡萄糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Sijunzi Tang on glucose absorption in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	K_a / $\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	P_{app} / $\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$
正常	-	4.06 ± 1.06	6.31 ± 1.29
模型	-	0.78 ± 0.06 ¹⁾	1.55 ± 0.11 ¹⁾
精眯	0.007 5	1.41 ± 0.13 ²⁾	3.33 ± 0.39 ²⁾
四君子汤	5.5	1.01 ± 0.04 ²⁾	2.35 ± 0.11 ²⁾
	11.0	1.30 ± 0.12 ²⁾	2.38 ± 0.13 ²⁾
	22.0	1.62 ± 0.07 ²⁾	2.48 ± 0.48 ²⁾

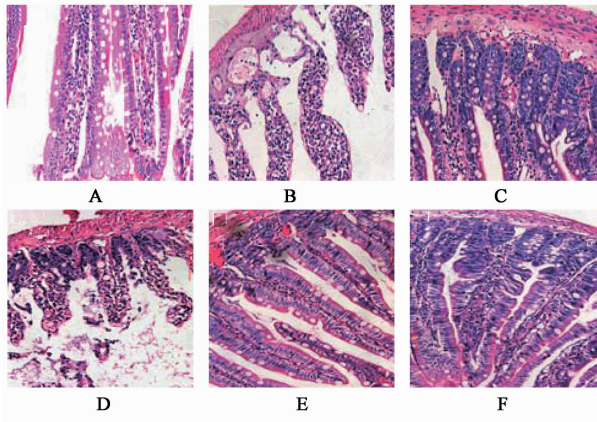
表 3 四君子汤对大鼠吸收分数与转运速率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of Sijunzi Tang on absorption fraction and transport rate in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	吸收分数 /%	转运速率 ($\times 10^{-2}$)/ min^{-1}
正常	-	27.8 ± 1.81	1.85 ± 0.08
模型	-	12.2 ± 0.34 ¹⁾	0.81 ± 0.02 ¹⁾
精眯	0.007 5	21.3 ± 0.60 ²⁾	1.42 ± 0.06 ²⁾
四君子汤	5.5	23.4 ± 0.29 ²⁾	1.43 ± 0.07 ²⁾
	11.0	23.9 ± 0.33 ²⁾	1.59 ± 0.06 ²⁾
	22.0	24.2 ± 0.26 ²⁾	1.61 ± 0.05 ²⁾

3.3 对大鼠小肠黏膜形态的影响 将处理好的大鼠空肠切片于光学显微镜下观察和比较不同组别的肠黏膜的损失修复情况。模型组与正常组比较, 黏

膜层明显变薄,腺体数目显著减少,绒毛变形、肿胀,柱状细胞排列杂乱无章、脱落,出现裂开和破坏。经过给予精眯或四君子汤以后,黏膜层明显变厚;腺体数目显著增多;肠绒毛增多变长,绒毛间变得紧密、逐渐恢复栅栏样结构;其绒毛结构接近于正常组。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 精眯组;D. 四君子汤 $5.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 四君子汤 $11.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;F. 四君子汤 $22.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 1 四君子汤对大鼠空肠黏膜组织病理学的影响(HE, $\times 200$)

Fig.1 Effects of Sijunzi Tang on jejenum mucosa tissue pathology in rats(HE, $\times 200$)

4 讨论

D-木糖是一种单糖,其尿排泄率可以反映空肠对单糖的吸收水平;D-木糖排泄率被列为公认的脾气虚证诊断参考指标^[6]。由于 D-木糖吸收试验不能直接定量测定糖的吸收数据,而 D-木糖在小肠的吸收途径与葡萄糖相似^[7],因此本实验在测定 D-木糖排泄率的基础上,采用美国 FDA 所认可的,肠道吸收模型中最接近于体内真实吸收状态的在体单向肠灌注法测定葡萄糖的吸收,结合肠灌注大鼠肠黏膜病理学的改变,探讨脾虚大鼠肠黏膜形态对葡萄糖吸收的影响及四君子汤益气健脾的作用机制。

精眯是多胺的一种,能够调节动物肠道的生长发育、促进细胞的增殖、分化和迁移,在维持正常肠黏膜的完整性及修复中起关键作用^[8]。本研究显示,精眯组脾虚大鼠肠黏膜的黏膜层明显变厚,腺体数目显著增多,肠绒毛增多变长,其绒毛结构接近于正常组,柱状细胞排列变得紧密,D-木糖排泄率、空肠葡萄糖 K_a , P_{app} , 吸收分数和转运速率明显提

高。而四君子汤各剂量组能促进脾虚大鼠肠道葡萄糖吸收,并具有量效关系,其中高剂量组的空肠葡萄糖 K_a 与精眯相当,且吸收分数和转运速率四君子汤各剂量组略优于精眯,笔者认为其机制与促进多胺的合成有关^[9]。有文献报道四君子汤对肠上皮细胞病理损伤有明显治疗作用^[10],四君子汤总多糖对 IEC-6 细胞增殖、损伤后迁移具有明显的促进作用^[11],而本研究结果显示四君子汤对肠黏膜损伤的修复作用和促进肠道对葡萄糖吸收作用,进一步揭示了四君子汤益气健脾功效的作用机制。

[参考文献]

- [1] 许长照,张瑜瑶台,刘隆棣,等. 脾虚证患者十二指肠的病理形态及组织化学研究[J]. 中西医结合杂志, 1987,7(12):722-724.
- [2] 姚永莉,宋于刚,赵彤,等. 大鼠脾虚证模型的胃肠黏膜形态学研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志,2000,8(1):8-10.
- [3] 吕苑. 四君子汤的药理研究和临床应用[J]. 中医研究,2012,25(1):76-79.
- [4] 危北海. 中医脾胃学说应用研究[M]. 北京:北京出版社,1993:77-79.
- [5] 陈玉龙. 四君子汤对利血平致脾虚大鼠唾液淀粉酶分泌的影响[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(5):465-467.
- [6] 孙弼刚,刘健,鄢顺琴,等. 脾虚证分度定量诊断研究[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14(3):35-138.
- [7] 李开明,马吉庆. 试验性脾虚时葡萄糖转运电位的变化及其机理的初步探讨[J]. 辽宁中医杂志,1984,11(3):34-36.
- [8] Seiler N, Paul F. Polyamines and the intestinal tract [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2007, 44(4):365-411.
- [9] 黎同明,潘雪刁,金桂芳,等. 四君子汤对脾虚大鼠肠黏膜 SMS mRNA 表达的影响[J]. 中药材,2011,34(5):762-765.
- [10] 彭成,雷载权. 四君子汤抗脾虚动物胃肠细胞损伤的研究[J]. 中药药理与临床,1995,11(6):7-10.
- [11] 韩凌,王培训,刘良. 四君子汤总多糖对大鼠小肠上皮细胞株 IEC-6 迁移的影响[J]. 山东中医杂志,2006,25(8):544-546.

[责任编辑 周冰冰]