

二神丸中药物炮制前后对肠道菌群和 UCP2 基因表达的影响

陈志敏, 潘新, 张美, 熊瑞, 崔园园, 胡麟, 胡昌江*
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**观察二神丸中补骨脂、肉豆蔻炮制前后对脾肾阳虚泄泻模型大鼠肠道菌群和肾脏线粒体解偶联蛋白 2 (UCP2) 基因表达的影响, 探讨二神丸中药物炮制增效的机制。**方法:**将 24 只 SD 雄性大鼠随机等分为正常组、模型组、二神丸生品组(补骨脂生品 + 肉豆蔻生品)和二神丸炮制品组(盐补骨脂 + 煨肉豆蔻), 运用复合造模方法复制大鼠脾肾阳虚泄泻模型, 后二组灌胃给药量 $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组和模型组给予同等体积生理盐水。采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测各组肠道菌群, 研究二神丸对肠道菌群的影响; 使用免疫组化染色 SP 法测定各组大鼠肾脏组织 UCP2 基因表达。**结果:**脾肾阳虚泄泻大鼠肠道菌群和 UCP2 含量与造模前相比发生明显变化, 其中长双歧杆菌、乳酸杆菌菌群异常低下, 大肠埃希菌、粪肠球菌含量显著增加, 肾脏组织 UCP2 含量明显升高。给予二神丸后, 对肠道菌群失调和 UCP2 异常均有明显的调节和改善作用, 尤以炮制组(盐补骨脂 + 煨肉豆蔻)效果为最佳。**结论:**由盐炙补骨脂和麸煨肉豆蔻组方的二神丸促进脾肾阳虚泄泻模型有益菌的增殖、抑制有害菌以及下调肾脏组织 UCP2 效果更加明显, 提示其增效可能与调节肠道菌群及机体基础代谢率相关。

[关键词] 二神丸; 脾肾阳虚泄泻; 肠道菌群; 解偶联蛋白 2; 炮制

[中图分类号] R283.1; R943.1; R285.5; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0006-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140006

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160523.1025.020.html>

[网络出版时间] 2016-05-23 10:25

Effect of Chinese Medicine in Ershen Wan Before and After Being Processed on Intestinal Flora and mRNA Expression of Uncoupling Protein 2

CHEN Zhi-min, PAN Xin, ZHANG Mei, XIONG Rui, CUI Yuan-yuan, HU Lin, HU Chang-jiang*
(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of Psoraleae Fructus and Myristicae Semen in Ershen Wan after and before being processed on intestinal flora and expression levels of uncoupling protein 2 (UCP2) mRNA of spleen-kidney Yang deficiency diarrhea rats, to preliminarily explore its possible mechanism. **Method:** Rat model of spleen-kidney Yang deficiency diarrhea was made through perfusion of adenine, irregular diet and reception of ice Sennae Folium extract. Rats were averagely subdivided into four groups, such as normal group, model group, raw products group and processing group of Ershen Wan. Real-time fluorescence quantitative technique was employed to investigate effect of Ershen Wan on intestinal flora. Expression levels of UCP2 mRNA in renal tissues were assayed by immunohistochemical staining SP method. **Result:** Intestinal flora and expression levels of UCP2 mRNA of spleen-kidney Yang deficiency diarrhea rats changed obviously by comparing with before modeling; flora of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus* was abnormally low, contents of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* increased significantly, the expression level of UCP2 mRNA in rat renal tissues of model group was significantly increased. The alteration of intestinal flora and expression levels of UCP2 mRNA recovered after receiving Ershen Wan, and the processing group was the best. **Conclusion:** Ershen Wan, consisting of salt-fried

[收稿日期] 20150916(006)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274085)

[第一作者] 陈志敏, 在读硕士, 从事中药炮制与制剂研究, Tel:15281087650, E-mail:346578767@qq.com

[通讯作者] * 胡昌江, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制学的教学和科研工作, E-mail:hhecjj@hotmail.com

Psoraleae Fructus and bran-roasted Myristicae Semen, has function of promoting proliferation of intestinal available bacteria, inhibiting intestinal harmful bacteria and down-regulating expression levels of UCP2 mRNA in renal tissues, which may be related to regulation of intestinal flora and the body's basal metabolic rate.

[Key words] Ershen Wan; spleen-kidney Yang deficiency diarrhea; intestinal flora; uncoupling protein 2; processing

二神丸出自宋·许叔微的《普济本事方》^[1],由补骨脂和肉豆蔻组成,功效温肾暖脾、涩肠止泻,是临床治疗脾肾阳虚所致五更泄泻的基础方。为观察中药炮制对其药效的影响,选用不同中药炮制品组方的二神丸进行干预,探讨补骨脂、肉豆蔻炮制前后对肠道菌群和解偶联蛋白 2(UCP2)基因表达的影响。现代研究表明腹泻发生与肠道菌群的种类和数量密切相关^[2];同时 UCP 基因表达是一个重要的调控机体阴阳平衡的基因,在探讨滋阴或壮阳中药上具有重要意义^[3]。课题组前期已结合复方二神丸对补骨脂、肉豆蔻炮制增效机制进行了化学成分和药理、药效研究^[4-9]。本实验将继续选择二神丸为研究对象,采用炮制前后的饮片组方,以中医临证用药实际为出发点,结合脾肾阳虚泄泻模型,通过观察不同组方二神丸对脾肾阳虚泄泻大鼠肠道菌群和 UCP2 的影响,进一步探讨二神丸中药物炮制增效作用机制,为中医临证处方正确选用炮制品提供一定的理论依据。

1 材料

BA200Digital 型数码三目摄像显微摄像系统(麦克奥迪实业集团有限公司),Image-Pro Plus 6.0 型图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司),PIKORed 96 型实时荧光定量仪(RT-PCR,美国 Thermo Fisher 仪器有限公司)。

生物素化山羊抗兔 IgG(H + L)(批号 13152A11),辣根酶标记链霉素卵蛋白素(HRP/A-V,批号 13152A11),封闭用正常山羊血清(批号 13152A11),浓缩型二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(批号 K135925C),3-氨基丙基-3-乙氧基甲硅烷(APES,批号 ZLI-9001),柠檬酸盐缓冲液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.0,批号 ZLI-9064),磷酸盐缓冲液(PBS, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2 ~ 7.4,批号 ZLI-9062)均购自北京中杉金桥生物有限公司;腺嘌呤(成都贝斯特试剂有限公司,批号 D110160),线粒体解偶连蛋白 2(UCP2)抗体兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-1926R),实时荧光定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号 BK402],粪便 DNA 提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司,批号 DE-

05714);补骨脂和肉豆蔻购于成都市荷花池药材市场,番泻叶(批号 20130101)购自四川千方中药饮片有限公司,经成都中医药大学卢先明教授鉴定分别为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* 的干燥成熟果实、肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* 的干燥种仁、豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* 的干燥小叶。

清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 200 ~ 220 g,购自四川达硕动物实验中心,合格证号 SCXK(川)2013-24。

2 方法

2.1 药物炮制及药液的制备

2.1.1 盐补骨脂 取补骨脂药材,加入药材量一半的 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 食盐水,室温闷润 24 h,于 $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 炒制 10 min 后置托盘中,于 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 鼓风烘箱中烘干,即得。

2.1.2 煨肉豆蔻 取肉豆蔻生品与麦麸(100 g:40 g)同置锅内,文火加热,温度控制在 $130 \sim 150 \text{ }^{\circ}\text{C}$,翻炒 20 min,至麦麸呈焦黄色,肉豆蔻呈棕褐色,即得。

2.1.3 番泻叶水浸剂 取番泻叶冷水浸 1 h,加水煮沸约 10 min 后过滤,减压浓缩成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。

2.1.4 二神丸药液^[6] 补骨脂和肉豆蔻的量按《中药大辞典》(方剂分册)中的 2:1 比例配比,粉碎成粗粉,醇水双提(加 8 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,提取时间分别为 1.5,1.0 h;药渣加 10 倍量水回流提取 2 次,提取时间分别为 1.0,0.5 h,合并滤液),浓缩成 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。

2.2 动物模型制备及分组与给药 将 24 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、二神丸生品组(补骨脂生品 + 肉豆蔻生品)和二神丸炮制品组(盐补骨脂 + 煨肉豆蔻)共 4 组。除正常组之外,其余各组均参考潘新等^[10]脾肾阳虚泄泻造模方法,通过按 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃腺嘌呤 4 周致肾阳虚;每只大鼠单、双日交替喂饲甘蓝 10 g 和精炼猪油 2 mL,下午游泳致劳倦过度以伤脾气,从第 3 周起在之前造模基础上再通过按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服冰番泻叶水浸剂 2 周以伤脾阳,致脾阳虚泻下。同时第 3 周起二神丸

各组均按 $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续灌胃给药 2 周, 正常组和模型组给予同等体积生理盐水。取样前禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 颈部脱臼处死, 迅速剖开腹腔取出肾组织, 4% 多聚甲醛固定。

2.3 粪便样品处理及总 DNA 提取 以无菌方法分别采集健康状态、造模、治疗 1 周和 2 周后大鼠新鲜粪便, 置于无菌离心管中, 并迅速置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存。按照粪便 DNA 提取试剂盒说明提取肠道菌总 DNA, 得到的 DNA 样本置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.4 肠道菌群检测 选长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum*, 乳酸杆菌 *Lactobacillus*, 大肠埃希菌 *Escherichia coli*, 粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* 等基因特异性引物, 总通用细菌 *Unibac* 作为内参。引物序列为 ①目的基因乳酸杆菌的正向引物序列 5'-CATAGCCGAGTTGAGAGATG-3', 反向引物 5'-ATCTAATCCTGTTCCGTACCCA-3'。②目的基因大肠埃希菌的正向引物序列 5'-AGAGTTTGATCTGCTCAG-3', 反向引物 5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3'。③目的基因粪肠球菌的正向引物序列 5'-ACTTATGTGACTAACTTAACC-3', 反向引物 5'-TAATGGTGAATCTTGGTTTGG-3'。④目的基因长双歧杆菌的正向引物序列 5'-GCCGTATCTCTACGACCGTCG-3', 反向引物 5'-TATCGGGGAGCAA GCGAGAG-3'。⑤内参照基因 *Unibac* 正向引物序列 5'-CGTGCCAGCCGCGGTAATACG-3', 反向引物 5'-GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT-3'。所有引物均由 Sangon Biotech 公司合成。反应体系使用实时荧光定量 PCR 试剂盒, 采用 PIKORed 96 型实时荧光定量仪进行 PCR 反应监测。

2.5 免疫组化法检测大鼠肾脏 UCP2 蛋白的表达

使用 APES 浸泡, 捞片后置烤箱 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘烤 60 min 以使切片紧密黏附, 以防脱片; 切片常规脱蜡至水; 30% 过氧化氢 1 份和水 10 份混合, 室温放置 10 min 以灭活内源性过氧化物酶, 水洗 3 次; 将切片浸入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 微波炉中高火加热至沸腾后断电, 间隔 5 min 后, 反复 1 次, 冷却后, PBS (pH 7.2 ~ 7.4, 下同) 洗 2 次; 滴加山羊血清封闭液, 室温放置 20 min; 滴加稀释的一抗 (1:200), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置过夜, PBS 洗 3 次; 滴加生物素化山羊抗鼠/兔 IgG 二抗, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应 30 min, PBS 洗 3 次; 滴加辣根过氧化物酶标记链霉素卵蛋白试剂, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应 30 min, PBS 洗 4 次; 按 DAB 显色试剂盒操作室温显色, 镜下控制时间, 一般约 2 min, 加水洗涤; 用苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 中性

树胶封片。

2.6 数据分析 使用 Sequence Detection version 1.2.3 软件分析 PCR 过程各检测样本的循环阈值 (C_t)。以 *Unibac* 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对正常组进行归一化分析, 计算各组目标菌群的 16SrDNA 相对含量。

$$\Delta C_t = C_{t \text{ 目的菌群}} - C_{t \text{ 通用细菌}}$$
$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 试验组}} - \Delta C_{t \text{ 正常组}}$$

采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的平均吸光度 A , 应用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肠道菌群影响 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对各组肠道菌群的表达差异进行分析, 发现脾肾阳虚泄泻模型大鼠大肠埃希菌和粪肠球菌增高, 长双歧杆菌和乳酸杆菌下降, 说明大鼠的肠道菌群出现了严重失调。在给予二神丸后, 与模型组相比, 二神丸各组长双歧杆菌和乳酸杆菌极显著高于模型组 ($P < 0.01$), 大肠埃希菌和肠球菌显著低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 说明二神丸具有扶植正常菌群生长和调整菌群失调的作用。且炮制品组对道菌群失调调节作用的综合效果最好, 见表 1。

表 1 二神丸对大鼠肠道菌群表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Ershen Wan on rat intestinal flora ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	长双歧杆菌	乳酸杆菌	大肠埃希菌	粪肠球菌
正常	1	1	1	1
模型	0.22 ± 0.07	0.18 ± 0.07	2.02 ± 0.26	1.95 ± 0.35
二神丸生品	$0.77 \pm 0.21^{2)}$	$0.64 \pm 0.14^{2)}$	$1.64 \pm 0.10^{2)}$	$1.69 \pm 0.17^{1)}$
二神丸炮制品	$0.87 \pm 0.23^{2)}$	$0.85 \pm 0.14^{2,3)}$	$1.33 \pm 0.11^{2,3)}$	$1.49 \pm 0.11^{2)}$

注: 与模型组比较 $^{1)} P < 0.05, ^{2)} P < 0.01$; 与二神丸生品组比较 $^{3)} P < 0.05$ 。二神丸组给药剂量均为 $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3.2 UCP2 蛋白免疫组化染色图像的采集和分析

采用 BA200Digital 型数码三目摄像显微摄像系统对切片进行图像采集, 每张切片先于 100 倍下观察全部组织, 根据组织大小及表达情况分别选取 1 ~ 3 个区域 400 倍采集图像; 颜色为浅黄色或棕黄色, 阴性表达为蓝色, 底色为白色。结果显示正常组大鼠肾细胞呈阴性表达; 模型组大鼠中阳性细胞多, 呈弥漫性分布, 主要表达在细胞浆、细胞膜或间质等。二神丸各组大鼠中阳性细胞呈弥漫性分布, 但表达强度有减弱, 且相对于二神丸生品组, 二神丸炮制品组表达强度更弱, 见图 1。

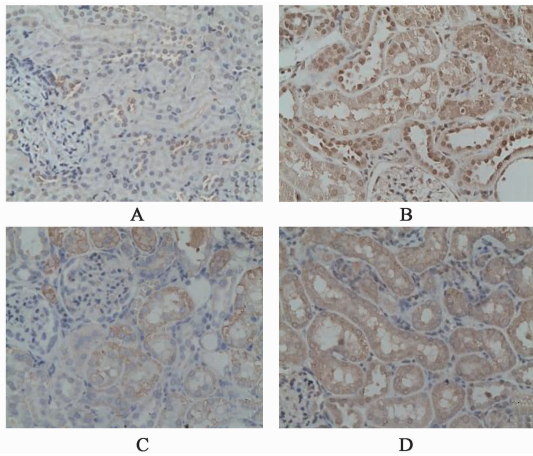


图 1 正常组(A),模型组(B),二神丸炮制品组(C)和二神丸生品组(D)的 UCP2 免疫组化染色(免疫组化,×400)

Fig. 1 UCP2 immunohistochemical staining of normal group(A), model group(B), raw products group(D) and processing group(C) of Ershen Wan(IHC, ×400)

采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定采集图像的平均 A,若每张切片采集多张图像,则取平均值,结果正常组、模型组、二神丸生品组和炮制品组的 A 分别为 0.269 ± 0.012 , 0.304 ± 0.018 , 0.284 ± 0.004 , 0.280 ± 0.018 。与正常组相比,模型组大鼠肾脏线粒体 UCP2 含量明显升高 ($P < 0.01$),提示模型大鼠处在能量代谢障碍状态。与模型组相比,二神丸各组大鼠 UCP2 含量降低 ($P < 0.05$),提示二神丸具有下调脾肾阳虚泄泻大鼠 UCP2 含量的作用,且炮制组优于生品组,推测炮制后二神丸对机体基础代谢率的调节作用更强。

4 讨论

脾肾阳虚泄泻,以脾肾虚寒为本,泄泻为标。现代研究表明内源性专性厌氧菌(长双歧杆菌、乳酸杆菌等)抑制潜在需氧致病菌群(大肠埃希菌,粪肠球菌等)的能力^[11]反映了肠道菌群的平衡状态。UCP2 作为线粒体内膜的载体蛋白,起质子通道作用,在解偶联状态下, H^+ 通过腺苷三磷酸(ATP)合成旁路从线粒体膜外重新进入膜内,从而消除跨膜质子电化学梯度,使线粒体氧化磷酸化解偶联,阻止线粒体呼吸时将能量合成 ATP,此外 UCP2 在氧化应激方面也发挥着重要作用^[12]。

本研究将炮制前后的补骨脂、肉豆蔻分别组方二神丸,从中医标本兼治入手,比较炮制前后对脾肾阳虚泄泻大鼠肠道菌群和 UCP2 影响。造模后肠道菌群与造模前相比发生明显变化,说明脾肾阳虚泄泻大鼠肠道微生态平衡遭到破坏,菌群失调。UCP2 含量明显升高,使其 H^+ 漏速度增加,ATP 合成减

少,这与脾肾阳虚泄泻状态下,机体供能不足相符。二神丸各组对脾肾阳虚泄泻大鼠肠道菌群的失调和 UCP2 均有明显的调节和改善作用,表明二神丸对肠道菌群和 UCP2 的调节可能为其治疗作用的机制之一。比较补骨脂、肉豆蔻炮制前后组成二神丸,炮制品组的综合疗效最好。其中补骨脂盐炙引药入肾,增强温肾助阳、纳气止泻;肉豆蔻煨制可增强固肠止泻的作用,这可能是造成炮制品组药效最佳的原因所在,可为临床正确选用炮制品提供一定理论依据。

[参考文献]

- [1] 彭怀仁. 中医方剂大辞典. 第 1 册[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:93-94.
- [2] 李琳,李岩. 肠道菌群失调与功能性腹泻[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(7):723-726.
- [3] 毛水龙,周卫民,郑怡健,等. 六味地黄丸对甲状腺素所致甲亢大鼠脂肪组织 UCP2、骨骼肌 UCP3mRNA 表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2012,22(11):849-852.
- [4] 耿媛媛,胡昌江,潘新,等. 二神丸不同提取部位温脾止泻的谱效关系研究[J]. 中草药,2014,45(18):2658-2663.
- [5] 耿媛媛,胡昌江,潘新,等. 二神丸中药物炮制前后化学成分含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(13):117-120.
- [6] 潘新,胡昌江,耿媛媛,等. 复方二神丸中的药物炮制后对 T 淋巴细胞亚群及 cAMP/cGMP 的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(13):138-141.
- [7] 潘新,胡昌江,耿媛媛,等. 补骨脂、肉豆蔻炮制前后在“二神丸”中对脾肾阳虚泄泻小鼠的止泻研究[J]. 中成药,2014,36(5):1059-1062.
- [8] 潘新,胡昌江,耿媛媛,等. 复方二神丸中两味药物炮制前后的高效液相色谱指纹图谱比较研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(8):1868-1870.
- [9] 耿媛媛,胡昌江,潘新,等. GC-MS 分析炮制对二神丸中挥发性成分的影响[J]. 中成药,2014,36(10):2148-2151.
- [10] 潘新,胡昌江,耿媛媛,等. 脾肾阳虚泄泻大鼠模型造模方法研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(23):4659-4663.
- [11] 吴仲文,李兰娟,马伟杭,等. 肠道微生物定植抗力的新指标—B/E 值[J]. 浙江预防医学,2000,12(7):4-5.
- [12] 王倩,管小琴,罗凯. 维生素 E 和硒对大鼠非酒精性脂肪性肝病解偶联蛋白 2 及相关因子表达的影响[J]. 动物学研究,2008,29(1):37-42.

[责任编辑 刘德文]