

# 疏肝健脾法肠激安方对 IBS-D 大鼠免疫功能的影响

柴玉娜<sup>1</sup>, 黄育生<sup>1</sup>, 唐洪梅<sup>2\*</sup>, 王婷<sup>1</sup>, 刘媛<sup>1</sup>, 钟如帆<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510405;

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**考察疏肝健脾法肠激安方对腹泻型肠易激综合征( IBS-D)大鼠免疫系统的影响,探讨其调控 IBS-D 脑-肠轴异常的免疫学机制。**方法:**取正常 SD 大鼠采用母子分离、乙酸刺激结合束缚应激的方法制造 IBS-D 模型,造模成功后将大鼠随机分为模型组,匹维溴铵组( $0.018\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),疏肝健脾中药肠激安高、中、低剂量组( $33.48, 16.74, 8.37\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组 6 只,连续 ig 14 d,另取同批次正常大鼠 6 只作为正常组,同法给予生理盐水。给药结束后观察各组大鼠的日进食量、糖水偏好情况、自主活动 3 种行为学特征,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中炎症因子白细胞介素-8(IL-8)和 IL-10 的含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测结肠中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及 IL-1 $\beta$  mRNA 的表达,并测定胸腺系数和脾系数的变化。**结果:**与正常组比较,IBS-D 模型组大鼠的日均进食量、糖水偏好率及自主活动均减少,血清 IL-8 含量及结肠中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA 表达量明显升高,血清 IL-10 含量明显降低,胸腺系数和脾系数明显增高( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组日均进食量、糖水偏好率及自主活动回升,结肠中 TNF- $\alpha$  mRNA 水平降低,血清 IL-10 含量升高( $P < 0.05$ ),匹维溴铵组和肠激安高、中剂量组 IL-8 含量和结肠中 IL-1 $\beta$  mRNA 水平显著降低( $P < 0.05$ ),而低剂量无统计学差异,各组胸腺系数显著降低( $P < 0.05$ ),脾系数呈降低趋势,但无统计学差异。**结论:**疏肝健脾法能够改善 IBS-D 大鼠的肝郁脾虚状态,并能够调节炎症因子的表达和一定程度地改善免疫器官功能,这可能是其调控 IBS-D 脑-肠轴功能异常、治疗 IBS-D 的作用途径之一。

**[关键词]** 腹泻型肠易激综合征;疏肝健脾法;肠激安方;免疫功能;脑-肠轴异常

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0093-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20161210093

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0927.052.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-06 9:27

## Effect of Shugan Jianpi Method (Changji'an Fomulation) on IBS-D Immune Function

CHAI Yu-na<sup>1</sup>, HUANG Yu-sheng<sup>1</sup>, TANG Hong-mei<sup>2\*</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>, LIU Yuan<sup>1</sup>, ZHONG Ru-fan<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine the effects and immunological mechanism of Shugan Jianpi method on diarrhoea-irritable bowel syndrome (IBS-D) brain-gut axis dysfunction. **Method:** SD rats were treated with mother-child separation, acetic acid stimulation combined with restraint stress method to establish the IBS-D model. The model rats were randomly divided into five groups: model control group, pinaverium bromide group ( $0.018\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), Changji'an high, medium and low-dose groups ( $33.48, 16.74, 8.37\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with six in each group. They were continuously administered by gavage for two weeks. At the same time, six normal rats were given normal saline as a normal control group. After administration, average daily food intake, percentage of sugar preferences and automatic activity were observed. ELISA assay was used to detect content of interleukin-8 (IL-8) and IL-10 in

**[收稿日期]** 20151115(032)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073160);广东省自然科学基金项目(S2012010010539);广州中医药大学第一临床医学院优秀博士论文培育项目(YB201402)

**[第一作者]** 柴玉娜,博士,从事中药新药开发与安全性与评价工作,Tel:15920581239,E-mail:yuna999@126.com

**[通讯作者]** \*唐洪梅,主任中药师,从事中药新药开发与安全性评价工作,Tel:020-36588708,E-mail:tanghongmei2000@163.com

serum, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$  mRNA expressions in colon, and determinate changes in thymus and spleen coefficients. **Result:** Compared with normal control group, average daily food intake, percentage of sugar preferences and automatic activity of rats in IBS-D model group were reduced, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  expressions were increased, IL-10 reduced, thymus and spleen coefficient significantly increased ( $P < 0.05$ ); and compared with model group, in each treatment group, average daily food intake, percentage of sugar preferences and automatic activity significantly rebounded, TNF- $\alpha$  level was reduced in colon, and IL-10 increased ( $P < 0.05$ ); IL-8 and IL-1 $\beta$  expressions of pinaverium ammonium group and Changji'an high and median-dose groups were significantly lower ( $P < 0.05$ ), while low-dose group showed no significant statistical difference; In each group, thymus coefficient was significantly lower ( $P < 0.05$ ), and spleen coefficient was decreased, but with no statistical significance. **Conclusion:** Shugan Jianpi method can improve stagnation of liver and deficiency spleen in IBS-D rats, regulate the expression of inflammatory cytokines and enhance the function of immune organs to a certain degree, which may contribute to the improvement of brain-gut axis dysfunction and the treatment of IBS-D.

[**Key words**] diarrhoea-irritable bowel syndrome; Shugan Jianpi method; Changji'an fomulation; immune function; brain-gut axis

腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 是一种慢性功能性疾病,以腹痛、腹泻为主要临床症状,该病发作与环境、心理、胃肠道、遗传等相关,涉及神经、内分泌、免疫等多个系统,脑-肠轴异常是肠易激综合征目前公认的发病机制<sup>[1]</sup>。神经递质、胃肠激素作为脑-轴信号传导的重要介质一直是 IBS-D 研究的重点,而近些年的研究认为 IBS-D 患者肠道内环境的炎症信号同样也是脑-肠轴异常的重要促成因素<sup>[2]</sup>。肝郁脾虚是 IBS-D 的中医学病机,运用疏肝健脾止泻法治疗 IBS-D 也已取得了明显成效,多项研究证明其能够改善 IBS-D 内脏敏感性、肠道动力,并能够调节肠道激素和神经递质如 5-羟色胺 (5-HT),神经肽 Y (NPY),P 物质等的表达<sup>[3-5]</sup>,但在免疫方面的报道尚不多见。课题组前期初步发现,IBS-D 模型大鼠存在炎症因子的表达异常,并且与脑-肠轴相关<sup>[6]</sup>。疏肝健脾是 IBS-D 的重要治则。本研究采用以疏肝健脾、止泻止痛为主要功效的肠激安方由四逆散、四君子汤和痛泻要方加减组成,是广州中医药大学第一附属医院临床使用多年、用于治疗 IBS-D 有显著疗效的验方,已经开发为院内制剂,并获得发明专利(专利号 ZL201110075802.5)。方中白术、白芍补脾燥湿,柔肝缓急止痛;黄芪、茯苓、枳壳等有行气止痛作用。前期多项研究证明该方能够改善 IBS-D 大鼠的脑肠轴异常情况,而能否改善其免疫系统功能尚不明确。疏肝健脾法是否对 IBS-D 的免疫系统功能具有调节作用,本研究在前期研究的基础上进一步对该问题进行探讨,为疏肝健脾法改善 IBS-D 脑-轴异常学说提供新的免疫

学证据。

## 1 材料

**1.1 动物** 新生 SD 大鼠窝鼠,SPF 级,购于广州中医药大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(粤)2013-0034。乳鼠与哺乳母鼠同窝饲养,饲养于含 2.5 cm 木屑垫料的塑料笼中,保持昼夜节律各 12 h。哺乳母鼠自由进食与饮水,饲养环境温度 18 ~ 24 °C,相对湿度 50% ~ 70%。动物实验地点广州中医药大学第一附属医院实验动物中心,许可证号 SYXK(粤)2013-0092。

**1.2 药物及试剂** 肠激安方(为治疗 IBS-D 的临床实验方,由土炒白术、白芍、茯苓、黄芪、枳壳、陈皮等 13 味中药组成),药材购自广州中医药大学第一附属医院中药房。匹维溴铵(法国 Abbott Healthcare 公司,批号 630698),研钵研成细粉,用蒸馏水配至所需浓度。大鼠白细胞介素-10(IL-10),IL-8 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海西塘公司,批号分别为 1412283,1412182);总 RNA 提取,逆转录试剂盒及 SYBR 染料(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AK501,AK3101,AK6004);DEPC 处理水(广州捷倍斯生物,批号 1411GB012)。

**1.3 仪器** 1510 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),DHP-9162 型 37 °C 恒温箱(上海一恒科技),T100 型逆转录仪及 CFX96 型荧光定量 PCR 仪器(美国 Bio Rad 公司),5804R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物配置** 按组方称取药材,加入 10 倍量水煎

煮高火煮沸后小火再煎 0.5 h, 倒出滤液后加入 3 倍量同法 2 次煎煮, 合并 2 次煎液滤过, 减压浓缩至含生药量  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液, 用时蒸馏水稀释至所需浓度。

**2.2 造模及药物治疗<sup>[3]</sup>** 取新生 SD 大鼠 10 窝, 饲养员协助剔除雌性乳鼠, 得雄性乳鼠 50 只(由于雌性动物的痛敏感性要高于雄性动物, 痛阈值波动较大且受到性周期的影响, 易干扰实验结果)。按照文献方法采用三因素法(母婴分离乙酸刺激束缚应激)制造肝郁脾虚模型大鼠, 同时取一窝设为正常。造模结束后, 参照文献[7]用腹部回缩反射(AWR)方法进行模型的评估, 评估标准为 0 分, 给予球囊扩张刺激时, 大鼠无明显变化; 1 分, 给予球囊扩张刺激时大鼠情绪不稳定, 身体静止不动, 头部偶尔扭动或上下运动; 2 分, 给予球囊扩张刺激时腹部肌肉回缩, 但腹肌未离开桌面; 3 分, 给予球囊扩张刺激时大鼠腹部肌肉强烈收缩并抬离桌面; 4 分, 给予球囊扩张刺激时大鼠腹部强烈收缩并呈弓形, 盆骨抬起。以评分在 2 分及以上者为模型成功。将造模成功的大鼠分为模型组, 阳性药组(匹维溴铵)、肠激安高、中、低剂量组。按成人公斤体重的临床用药剂量以人鼠比例换算后的临床等效剂量  $ig$ (参照文献[8]), 分别给予匹维溴铵( $18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 肠激安高、中、低剂量( $33.48, 16.74, 8.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); 正常组和模型组同法给予生理盐水。每日 1 次, 连续  $ig$  14 d。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 反映肝郁脾虚的行为学指标检测** 从进食量、糖水偏好率(依据《中医肝郁证动物模型评价指标概述》, 郭建丽, 2011 年)、自主活动情况进行行为学评分。进食量: 给药 1 周后开始对各组大鼠分别进行进食量测量: 每天上午添加饲料 30 g, 24 h 后称取剩余饲料量。进食量 = 添加饲料量 - 剩余饲料量。连续测 7 d, 求均值。糖水偏好率: 给药结束后, 取各组大鼠, 禁食禁水 24 h, 分别给予一瓶 1% 的 200 mL 蔗糖水, 一瓶为 200 mL 灭菌自来水, 24 h 后各自测量消耗量。自主活动情况: 实验前一天将大鼠放入旷场箱中, 令其适应环境。实验开始时将大鼠分别放入实验箱的正中央格, 在安静环境下记录 5 min 大鼠移动格子数。以移动总格子数反映大鼠的自主活动程度。

$$\text{糖水偏好率} = \frac{\text{糖水摄入量}}{\text{糖水摄入量} + \text{自来水摄入量}} \times 100\%$$

**2.3.2 胸腺系数和脾系数的测量** 给药结束后, 按照  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量  $ip$  水合氯醛, 麻醉处死大鼠, 分

离出脾和胸腺, 用生理盐水洗净表面血迹, 剔除脏器表面筋膜后用吸水纸吸干水分后称质量, 并计算脾脏和胸腺脏器系数。

$$\text{脏器系数} = \frac{\text{脏器湿重}}{\text{体重}} \times 100\%$$

**2.3.3 双抗体夹心 ELISA 法检测 IL-10 和 IL-8 的表** 达量 给药结束后大鼠在麻醉状态下, 用无抗凝剂负压管腹主动脉取血,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上层血清, 于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存; 按照说明书步骤检测 540 nm 波长下吸光度  $A$ , 通过标准曲线计算各样本的含量。

**2.3.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的相对表达量** 给药结束后, 麻醉处死大鼠, 分离远端结肠 2 cm, 生理盐水洗去粪便, 迅速放于液氮中, 后转至  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。总 RNA 的提取: 用电子天平称取结肠组织 100 mg, 液氮研成细粉。加入裂解液, 充分混匀后, 用 70% 乙醇沉淀, 后转入 RNA 吸附柱,  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 用试剂盒中洗液充分洗涤柱子后, 用无 RNA 酶水洗脱 RNA, 分装于  $20 \mu\text{L}$  离心管保存。用微量核酸测定仪检测  $A$ , 以  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  在 1.8 ~ 2.2 为标准控制 RNA 的纯度, 用琼脂糖横电泳检测总 RNA 的完整性。逆转录成 C-DNA 采用以下逆转录体系:  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  15 min,  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s。扩增反应: 以 SYBR Premix ExTaq 为荧光染料, 按  $25 \mu\text{L}$  体系进行如下反应:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环, 以无酶水做阴性对照孔, 每个样本 3 个技术性重复。IL-1 $\beta$  引物序列上游为 5'-CCCTGAAGTCAACTGTGAAATAGCA, 下游为 5'-CCCAAGTCAAGGGCTTGAA-3'; TNF- $\alpha$  引物序列上游为 5'-GGCGTGTTCATCCGTTCTC-3', 下游为 5'-CTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT-3';  $\beta$ -actin 引物序列上游为 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3', 下游为 5'-TTTAATGTACGCACGATTTC-3', 扩增结果用  $C_t$  值表示, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对表达量。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理和分析, 计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验; 方差齐时, 整体组间均数比较采用方差分析, 进一步多重比较采用 LSD 法; 方差不齐, 应用近似的稳健方差分析进行整体组间比较, 多重比较采用 Dunnett's T3 法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 IBS-D 大鼠日均进食量、糖水偏好百分比及自主活动的影响** 模型组大鼠的日均进食量、糖水

偏好率及自主活动频率较正常组降低 ( $P < 0.05$ ) ; 给药后, 各给药剂量组的行为学指标和模型组比较均明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 3.2 对 IBS-D 大鼠脾系数及胸腺系数的影响 与

正常组比较, IBS-D 模型大鼠的脾系数及胸腺系数明显升高 ( $P < 0.05$ ) ; 与模型组比较, 各给药组的胸腺系数明显下降 ( $P < 0.05$ ) , 脾系数有下降趋势, 但无统计学差异。见表 2。

表 1 肠激安方对 IBS-D 大鼠日均进食量、糖水偏好率及自主活动的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of Changji'an fomulation on average daily food intake, percentage of sugar preferences and freely moving scores of IBS-D rats

( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	日均进食量/ $\text{g}$	糖水偏好率/%	自主运动穿越格子数/个
正常	-	22.985 ± 0.737	83.078 ± 1.511	140.833 ± 28.659
模型	-	21.134 ± 0.284 <sup>1)</sup>	68.398 ± 0.781 <sup>1)</sup>	57.500 ± 9.289 <sup>1)</sup>
匹维溴铵	0.018	23.283 ± 0.400 <sup>2)</sup>	80.679 ± 1.704 <sup>2)</sup>	100.666 ± 13.894 <sup>2)</sup>
肠激安方	33.48	22.830 ± 0.331 <sup>2)</sup>	76.000 ± 1.445 <sup>2)</sup>	92.166 ± 8.109 <sup>2)</sup>
	16.74	22.793 ± 0.173 <sup>2)</sup>	74.694 ± 1.652 <sup>2)</sup>	79.666 ± 3.777 <sup>2)</sup>
	8.37	22.383 ± 0.394 <sup>2)</sup>	71.856 ± 1.897 <sup>2)</sup>	75.500 ± 6.411 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 2, 3 及图 1 同)。

表 2 肠激安方对 IBS-D 大鼠脾系数及胸腺系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Changji'an fomulation on thymus and spleen coefficient of IBS-D rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) %

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺系数	脾系数
正常	-	0.28 ± 0.01	0.34 ± 0.26
模型	-	0.33 ± 0.19 <sup>1)</sup>	0.41 ± 0.23 <sup>1)</sup>
匹维溴铵	0.018	0.27 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.38 ± 0.02
肠激安方	33.48	0.28 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.39 ± 0.04
	16.74	0.29 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.39 ± 0.02
	8.37	0.29 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.39 ± 0.01

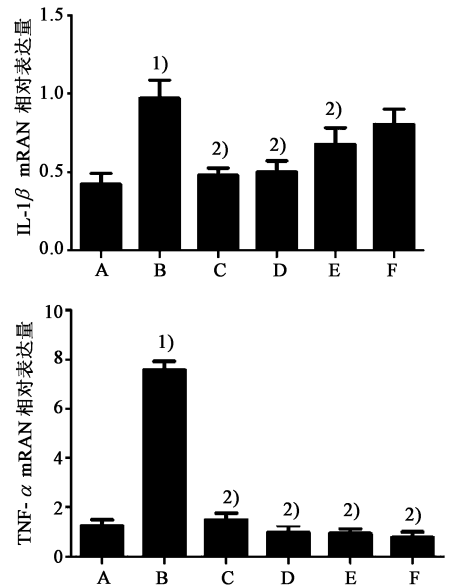
3.3 对 IBS-D 大鼠血清中 IL-8 和 IL-10 含量的影响 与正常组比较, 模型组 IBS-D 大鼠血清中 IL-8 含量升高, IL-10 含量降低 ( $P < 0.05$ ) ; 与模型组比较, 各给药组的 IL-10 的表达均升高 ( $P < 0.05$ ) , 肠激安高、中剂量组的 IL-8 降低 ( $P < 0.05$ ) , 低剂量组有降低趋势, 但无统计学差异。见表 3。

表 3 肠激安方对 IBS-D 大鼠血清中 IL-8 和 IL-10 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Changji'an fomulation on content of IL-8 and IL-10 in IBS-D rat serum ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-8	IL-10
正常	-	63.30 ± 6.75	11.74 ± 0.93
模型	-	97.76 ± 15.10 <sup>1)</sup>	6.48 ± 1.25 <sup>1)</sup>
匹维溴铵	0.018	68.76 ± 5.87 <sup>2)</sup>	10.45 ± 2.73 <sup>2)</sup>
肠激安方	33.48	55.20 ± 7.71 <sup>2)</sup>	9.52 ± 1.64 <sup>2)</sup>
	16.74	64.39 ± 12.13 <sup>2)</sup>	9.45 ± 1.53 <sup>2)</sup>
	8.37	72.77 ± 21.43	9.33 ± 3.61 <sup>2)</sup>

3.4 对 IBS-D 大鼠结肠中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 的含量明显升高 ( $P < 0.05$ ) ; 与模型组比较, 各给药组明显降低 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ) , 肠激安高、中剂量组明显降低 IL-1 $\beta$  mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ) , 低剂量组有降低趋势, 但无统计学差异。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 匹维溴铵组; D. 肠激安方 33.48  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. 肠激安方 16.74  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; F. 肠激安方 8.37  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

图 1 肠激安方对 IBS-D 大鼠结肠中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of Changji'an fomulation on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression in IBS-D rat colon ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

## 4 讨论

IBS-D 是慢性肠道疾病, 属于中医学“肠郁”、

“泄泻”等范畴,肝郁脾虚是其最主要的病机<sup>[9]</sup>,而现代医学认为脑-肠轴异常是其主要病理机制,二者本质上相互统一。胃肠道与中枢神经系统联系起来的神经-内分泌网络称为“脑肠轴”,环境、心理、紧张情绪等导致 IBS 患者的内脏感觉过敏和肠道动力紊乱,脏腑功能失调又反之影响患者焦虑、抑郁情绪,这种双向作用即是脑-肠互动的结果。在这些脑肠互动过程中,神经递质与胃肠激素发挥主要的调节作用<sup>[10-11]</sup>,也一直是 IBS 研究的主导方向。近些年研究证明这种抑郁情绪对机体免疫系统功能失调有重要影响<sup>[12]</sup>,认为脑肠轴异常不仅仅是神经和内分泌两个系统之间的相互作用,免疫系统功能在脑肠互动过程也起着不可忽视的作用。而从中医肝脾两脏功能失调辨证角度来讲,肝具有神经-内分泌-免疫网络调节功能,而脾气虚不仅体现在胃肠运动和胃电节律的紊乱,还体现在胃黏膜及内分泌细胞的变化。目前也已发现 IBS-D 模型大鼠存在炎症因子的表达异常<sup>[6]</sup>,因此考察疏肝健脾法对 IBS-D 的免疫功能的影响对 IBS-D 脑肠轴异常机制的进一步阐释及 IBS-D 的治疗具有积极意义。

实验中采用母婴分离-乙酸刺激-束缚应激三因素结合,是经典的 IBS-D 动物模型制备方法<sup>[7,13-14]</sup>,正是从早期生活事件到成年后的外界束缚刺激制造脑-肠轴异常模型<sup>[15]</sup>,大鼠长期处于抑郁情绪会影响机体神经系统的发育和塑造,表现为成年之后受到外界因素的刺激时会有内脏感知过敏反应及排便功能的异常。实验研究中模型大鼠进食量下降,对于糖水奖赏兴趣降低及自由活动显著下降,都明显呈现肝郁脾虚的状态。

免疫功能的变化在脑-肠互动过程中起着重要的桥梁作用。已证明 IBS-D 大鼠存在 T 淋巴细胞亚群比例失调和肥大细胞异常的情况<sup>[16-17]</sup>,但深入的相关机制报道不多。脾脏是淋巴细胞接受抗原刺激并产生免疫反应的中心,胸腺具有产生 T 淋巴细胞的功能,因此本实验中对这 2 种重要的免疫器官进行了考察;而肥大细胞脱颗粒能够产生多种介质(如组胺、白细胞介素等),介导肠道免疫反应。由于 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 等促炎因子是肠道黏膜屏障损伤的重要启动因子,且据多方报道抗炎因子 IL-10 与 IBS-D 相关,然而其作用尚不明确<sup>[18-19]</sup>,因此促炎因子和抗炎因子的平衡关系也是十分值得探讨。

本实验结果显示模型组胸腺系数和脾系数增高,同时促炎因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 表达增高,抗炎因子 IL-10 降低,说明 IBS-D 发生时机体免疫器

官、免疫细胞到免疫因子多个层面上都出现了免疫功能的异常。给予治疗后,行为学指标均有明显回升,提示各给药剂量均可显著改善大鼠的情绪,使兴奋性加强。前期研究初步发现,肠激安方能够改善肥大细胞脱颗粒及淋巴细胞亚群的比例<sup>[20-21]</sup>。而本实验研究结果表明肠激安方还能够降低胸腺系数,降低血清和结肠中致炎因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  的表达,升高抗炎因子 IL-10 的表达。本研究进一步证明疏肝健脾法能够通过影响免疫器官、免疫细胞和炎症因子来改善 IBS-D 的免疫系统功能,为其调控 IBS-D 脑-肠轴异常功能、治疗 IBS-D 提供了新的免疫学依据。

虽然 IBS-D 神经-内分泌-免疫网络的紊乱及脑-肠轴异常变化的机制正在不断得到证明,但是其中的深层次作用机制还不够深入,这种多系统的同时变化是否存在共同的激活通路还不得而知。机体内脑-肠异常的发生与神经、内分泌和免疫系统的关系,还需要进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] Okumura T. Brain-gut interaction in the pathophysiology of IBS [J]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 2014, 111 (7): 1334-1344.
- [2] Hyland N P, Quigley E M, Brint E. Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (27): 8859-8866.
- [3] 朱慧渊. 疏肝健脾法对肠易激综合征模型大鼠 SP 及 c-fos 表达变化的作用机制 [J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(7): 1526-1528, 1550.
- [4] 彭美哲, 王思玉, 李享, 等. 疏肝健脾法治疗腹泻型肠易激综合征的临床研究 [J]. *世界中医药*, 2014, 9 (12): 1595-1598.
- [5] 汪正芳, 郭前坤, 张声生, 等. 疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜 5-羟色胺及其受体的影响 [J]. *北京中医药*, 2013, 32(6): 406-409.
- [6] 李得堂, 涂星, 柴玉娜, 等. 腹泻型肠易激综合征模型大鼠海马与结肠组织中细胞因子的含量变化及 mRNA 的表达 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (10): 128-132.
- [7] Al-Chaer E D, Kawasaki M, Pasricha P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与*

- 治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [9] 黄绍刚,丁冠福,黎颖婷. 基于聚类分析的腹泻型肠易激综合征中医证候特征研究[J]. 新中医,2013,45(8):40-43.
- [10] Han B. Correlation between gastrointestinal hormones and anxiety-depressive states in irritable bowel syndrome [J]. *Exp Ther Med*, 2013,6(3):715-720.
- [11] Camilleri M, Katzka D A. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. Genetic epidemiology and pharmacogenetics in irritable bowel syndrome[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012,302(10):G1075-G1084.
- [12] Brydon L, Walker C, Wawrzyniak A J. Dispositional optimism and stress-induced changes in immunity and negative mood[J]. *Brain Behav Immun*,2009,23(6):810-816.
- [13] Coutinho S V, Plotsky P M, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282 ( 2 ): 307-316.
- [14] Williams C L, Villar R G, Peterson J M, et al. Stress-Induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988,94(3):611-621.
- [15] O'Mahony S M, Hyland N P, Dinan T G, et al. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2011,214(1):71-88.
- [16] 苏晓兰,魏茹涵,魏玮,等. 温肾健脾法对腹泻型肠易激综合征大鼠血清 T 细胞亚群表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志,2015,35(4):457-460.
- [17] Vicario M, González-Castro A M, Martínez C, et al. Increased humoral immunity in the jejunum of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome associated with clinical manifestations [J]. *Gut*, 2015, 64 ( 9 ): 1379-1388.
- [18] Shiotani A, Kusunoki H, Kimura Y, et al. S100A expression and interleukin-10 polymorphisms are associated with ulcerative colitis and diarrhea predominant irritable bowel syndrome [J]. *Dig Dis Sci*, 2013,58(8):2314-2323.
- [19] Czogalla B, Schmitteckert S, Houghton L A, et al. A meta-analysis of immunogenetic case-control association studies in irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterol Motil*,2015,27(5):717-727.
- [20] 唐洪梅,李得堂,黄樱华,等. 肠激安方抑制肠易激综合征模型大鼠肥大细胞的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理,2008,19(6):464-466.
- [21] 唐洪梅,黄樱华,李得堂,等. 肠激安方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 T 淋巴细胞和 5-羟色胺的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26 ( 2 ): 164-168,200.

[责任编辑 周冰冰]

# 左归丸、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导的影响

葛心慈, 徐岩, 任艳玲\*  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**[摘要]** **目的:**研究左归丸、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)成脂诱导的影响,并探讨其相关的作用机制。**方法:**将90只SD雌性大鼠,随机选取10只作为正常组,其余80只再随机选取10只经双侧腰部切口切除卵巢周围少量脂肪组织作为假手术组,其余70只以相同切口切除双侧卵巢作为模型组,分别以正常组,假手术组,模型组,左归丸组( $18.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),右归丸组( $20.52 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),共同药组( $15.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),滋阴药组( $12.96 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),补阳药组( $8.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和戊酸雌二醇片组( $0.36 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )共9组,对BMSCs进行干预,流式细胞仪鉴定BMSCs,用油红O检测脂滴的形成;采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ),脂蛋白脂肪酶(lipoprotein, LPL),脂肪酸结合蛋白4(fatty acid binding protein 4, FABP4)mRNA的表达;采用蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测CCAAT/增强子结合蛋白 $\beta$ (CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ , C/EBP $\beta$ )蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组BMSCs明显向脂肪细胞分化,PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA表达及C/EBP $\beta$ 蛋白的表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,左归丸、右归丸及其拆方均可抑制BMSCs向脂肪细胞分化,其中右归丸组可明显下调PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA,降低C/EBP $\beta$ 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。**结论:**左归丸、右归丸及其拆方均能抑制BMSCs的成脂分化,且右归丸抑制成脂分化的作用优于左归丸,以及补阳药及二者的共同药组。

**[关键词]** 左归丸; 右归丸; 去卵巢大鼠; 骨髓间充质干细胞; 成脂诱导

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0099-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210099

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0925.048.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-06 9:25

## Effect of Zuogui Wan and Yougui Wan and Their Disassembled Prescriptions on Adipocyte-induced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of Ovariectomized Rat

GE Xin-ci, XU Yan, REN Yan-ling\*  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the effects of Zuogui Wan and Yougui Wan and their disassembled prescriptions on adipocyte-induced bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of ovariectomized rat, and discuss their relevant action mechanism. **Method:** Ninety female rats were selected; 10 of them were randomly selected as the normal group; among the remaining 80 rats, 10 were randomly selected to excide a small amount of fat tissue around ovaries through bilateral lumbar incisions as the sham group, while the other 70 were selected to excide bilateral ovaries as the model group. They were divided into nine groups, namely control group, sham group, ovariectomized group, Zuogui Wan group ( $18.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), Yougui Wan group ( $20.52 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), common prescription group ( $15.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), Yin prescription group ( $12.96 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), Yang prescription group ( $8.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and progynova group, and simultaneously intervened the BMSCs. The BMSCs were identified by flow

**[收稿日期]** 20151103(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373527)

**[第一作者]** 葛心慈, 硕士, 从事方药配伍规律研究, Tel:13555765605, E-mail:503347099@qq.com

**[通讯作者]** \*任艳玲, 博士, 教授, 从事方药配伍规律及作用机制的研究, Tel:024-31207267, Email:camphorwood00@163.com

cytometry, and lipid droplets of BMSCs were assessed by oil red O staining. The mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), lipoprotein (LPL) and fatty acid binding protein 4 (FABP4) were assayed by RT-PCR. The protein expression of CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) was assayed by Western blot. **Result:** Compared with control group, ovariectomized group showed significant differentiation from BMSCs to adipocytes and increases in PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA expressions and C/EBP $\beta$  protein expression ( $P < 0.05$ ). Compared with ovariectomized group, both Zuogui Wan and Yougui Wan and their disassembled prescriptions can inhibit adipogenic differentiation. Especially, Yougui Wan can remarkably down-regulate PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA, and reduce the expression of C/EBP $\beta$  protein ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Zuogui Wan and Yougui Wan and their disassembled prescriptions can inhibit adipogenic differentiation. Yougui Wan may have a better effect in inhibiting onadipogenic differentiation than Zuogui Wan, Yang prescription and common prescription.

**[Key words]** Zuogui Wan; Yougui Wan; ovariectomized rat; bone marrow mesenchymal stem cell; adipocyte

骨髓间充质干细胞(BMSCs)是骨髓中除造血干细胞之外的另一类具有多向分化潜能的干细胞<sup>[1]</sup>。BMSCs 来源于骨髓中,中医“肾藏精”的科学含义与干细胞相似。BMSCs 来源于中胚层,虽然在骨髓中的含量很低<sup>[2]</sup>,但是自我复制能力强,BMSCs 分离和培养方法简便,具有高度的分化潜能,在一定的诱导条件下可向多种细胞分化<sup>[3]</sup>。成骨细胞和脂肪细胞均来源于 BMSCs,二者具有相同的表型,在一定条件下可以相互转化<sup>[4]</sup>。周勇<sup>[5]</sup>研究发现 BMSCs 在诱导剂的作用下可向脂肪细胞转化,使成骨细胞分化抑制,因此越来越多的人关注 BMSCs 脂肪细胞增多在骨量减少的现象中所起的作用<sup>[6]</sup>。有研究发现,去势雌性大鼠的 BMSCs 向脂肪细胞分化的能力增强<sup>[7]</sup>,本项目组利用去势大鼠,对其 BMSCs 进行分离和培养<sup>[8]</sup>,从而研究左、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠 BMSC 成脂诱导的影响。

刘海全等<sup>[9]</sup>研究表明,淫羊藿含药血清可抑制绝经后骨质疏松症大鼠 BMSCs 及其在成脂分化过程中 PPAR $\gamma$  mRNA 的表达。李树强<sup>[10]</sup>研究发现桃红四物汤可抑制激素诱导下的 BMSCs 成脂分化。左、右归丸均出于《景岳全书》,为“滋补肾阴”和“温补肾阳”的代表方剂。本研究团队前期研究表明左、右归丸可显著提高 BMSCs 的 ALP 活性,也可减少 BMSCs 脂滴的形成,表明左、右归丸既可促进 BMSCs 成骨分化同时也抑制 BMSCs 成脂分化,但未对其作用机制进行深入研究<sup>[11]</sup>。本文旨在通过观察左、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠 BMSCs 成脂诱导的影响,探讨以“滋补肾阴”与“温补肾阳”为立法的方剂对 BMSCs 成脂分化的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 雌性大鼠 90 只,2 月龄,体

重 200 ~ 220 g,购买于辽宁长生生物技术有限公司,合格证号 SCXK(辽)2010-0001,用于提取骨髓间充质干细胞。

**1.2 药物及试剂** 中药饮片购买于辽宁中医药大学附属第一医院,左归丸(组方:熟地黄 24 g,炒山药 12 g,枸杞子 12 g,山茱萸 12 g,鹿角胶 12 g,菟丝子 12 g,牛膝 9 g,龟板胶 12 g),右归丸(组方:熟地黄 24 g,炒山药 12 g,枸杞子 12 g,山茱萸 12 g,鹿角胶 12 g,菟丝子 12 g,当归 9 g,肉桂 6 g,杜仲 9 g,附子 6 g),共同药(熟地黄 24 g,炒山药 12 g,枸杞子 12 g,山茱萸 12 g,鹿角胶 12 g,菟丝子 12 g),滋阴药(熟地黄 24 g,炒山药 12 g,枸杞子 12 g,山茱萸 12 g,龟板胶 12 g)和补阳药(肉桂 6 g,杜仲 9 g,附子 6 g,鹿角胶 12 g,菟丝子 12 g),药材均由辽宁中医药大学李亚秋教授鉴定符合 2015 年版《中国药典》规定,以上 5 种药方自制成水煎液,生药量为  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;戊酸雌二醇(戊酸雌二醇片,国药准字 J20080036,给药量为  $0.36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ );地塞米松,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx),吡啶美辛(美国 Sigma 公司,批号分别为 D1756,STBF2497,BCBK0293V);逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 BK801),引物委托 TaKaRa 公司试剂合成, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物序列:上游 5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3',扩增长度 227 bp;过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )引物序列:上游 5'-CTGCCTATGAGCACTTCCACAAG-3',下游 5'-TAAGCTCAATCGGATGGTTCT-3',扩增长度 455 bp;脂蛋白脂肪酶(LPL)引物序列:上游 5'-GTCATCGTGGTGGACTGG-3',下游 5'-TGGAAAGTGCCTCCGTTA-3',扩增长度 398 bp;脂肪酸结合蛋白

4 (FABP4) 引物序列: 上游 5'-AACATTAAATCAGAAAGCAC-3', 下游 5'-ACAGCACATCCAACAGAA-3', 扩增长度 316 bp。

**1.3 仪器** 3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司), DFC320 型倒置显微镜(美国 Leica 公司), BioSpec-nano 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), MyCycler 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), WD-9413B 型凝胶成像分析仪(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 大鼠骨质疏松模型的建立及实验分组** 将 90 只大鼠称重后, 随机选取 10 只作为正常组, 其余 80 只 *ip* 10% 水合氯醛, 在无菌条件下随机选取 10 只经双侧腰背部切口切除卵巢周围少量脂肪组织作为假手术组, 其余 70 只以相同切口切除双侧卵巢。适应性喂养 1 周之后, 随机分成 7 组, 每组 10 只, 分别为正常组、模型组、假手术组、左归丸组、右归丸组、共同药组、滋阴药组、补阳药组和戊酸雌二醇片组, 正常组、模型组和假手术组 *ig* 蒸馏水, 其余组 *ig* 相应的制备好的药液, 按照每 kg 体重的给药量为人的 6.3 倍计算, 且每次给药剂量为正常人用药量的 2 倍, 上述给药组给药剂量分别为 18.9, 20.52, 15.12, 12.96, 8.1  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 生药量为 1  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 戊酸雌二醇片的剂量为 0.36  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 每日 *ig* 1 次, *ig* 12 周。

**2.2 BMSCs 分离与培养** 将 90 只 SD 雌性大鼠脱颈处死, 75% 乙醇浸泡 15 min 后移至超静台, 在无菌条件下取大鼠双侧股骨和胫骨, 剪断骨的两端, 暴露骨髓腔, 用含青链霉素无 FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养液 5 mL 反复冲洗骨髓腔至培养皿中, 直至骨的颜色变白, 将培养皿中的液体移至离心管中, 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 3 min, 弃上清后再用含 10% FBS  $\alpha$ -MEM 培养液重悬细胞, 移入 25  $\text{cm}^2$  培养瓶, 再放入  $\text{CO}_2$  培养箱孵育, 至细胞传至第 4 代(P4)时用于实验。

**2.3 BMSCs 鉴定** P4 代 BMSCs 经胰酶消化后, 用 PBS 悬浮细胞移入 1.5 mL 离心管中, 1 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 1 mL PBS 再重悬, 确定细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 取 3 管细胞分别加入 CD29 抗体, CD90 抗体, CD45 抗体, 另设空白管不加抗体, 避光, 4  $^{\circ}\text{C}$  30 min 孵育后, 再用 PBS 清洗 1 次, 0.3 mL PBS 再次重悬, 上流式细胞仪检测。

**2.4 油红 O 染色** 取 P4 代细胞经胰酶消化后, 以  $1 \times 10^5$  个/L 每孔 1 mL 接种于 24 孔板, 细胞同步化 24 h 后弃旧饥饿液, 成脂诱导 10 d, 诱导液为含 10% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养液(1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  地塞米松, 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  胰岛素, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  吡啶美辛, 500

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IBMX, 100  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素和 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  链霉素), 10 d 后弃原培养液, PBS 洗 3 次, 10% 多聚甲醛固定 15 min 后, 用 PBS 洗 3 次, 加入过滤后的 4% 油红 O 染色工作液反应 30 ~ 60 min 后弃去, 蒸馏水冲洗残留染液后立即对样品进行拍照。

**2.5 PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 的 mRNA 的检测** 采用 RT-PCR 法, 取 P4 BMSCs 接种于 9 个 25  $\text{cm}^2$  培养瓶, 干预方法同 2.3 项, 10 d 后将细胞从  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中取出, 用 PBS 洗 3 遍后, 每瓶中加入 500  $\mu\text{L}$  RNAiso Plus, 刮取细胞, 移至离心管中, 提取细胞总 RNA, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。按照 RT-PCR 试剂盒进行 20  $\mu\text{L}$  反应体系进行反转录。PCR 按如下条件反应: 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 30 个循环, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析仪对图像进行分析, 并用凝胶分析软件对 PCR 产物进行半定量分析, 分别用 PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4/ $\beta$ -actin 的积分吸光度来表示 LPL, PPAR $\gamma$ , FABP4 的 mRNA 的表达。

**2.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测 C/EBP $\beta$  的蛋白检测** P4 代 BMSCs 接种于与 9 个 25  $\text{cm}^2$  培养瓶, 干预方法同 2.3 项, 10 d 后, 用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 洗 3 遍, 甩干; 每瓶细胞中加入蛋白裂解液 100  $\mu\text{L}$ , 刮取细胞, 冰上静置 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取上清液; 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 蛋白变性后, 每孔上样 20  $\mu\text{L}$ , 电泳后转膜 3 h, 一抗孵育 1 h 后, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 次日二抗孵育 1 h 后, 暗室中曝光, 扫描图像后分析结果, 将目的蛋白与内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 条带的吸光度比较, 以表示 C/EBP $\beta$  蛋白的表达。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 软件处理, 用 One-Way Anova 分析进行组间统计比较, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

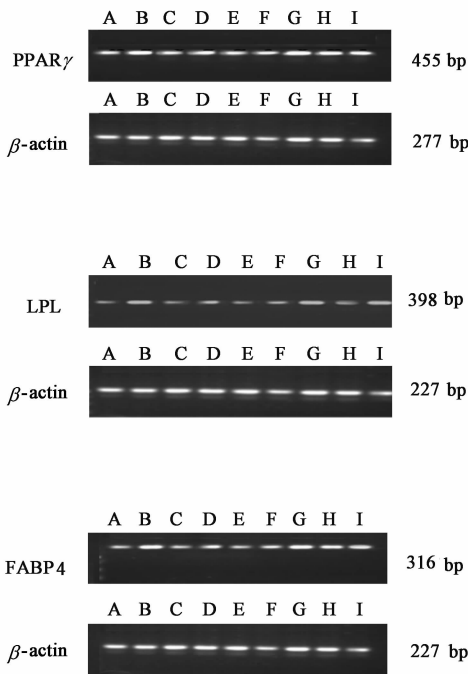
**3.1 BMSCs 流式细胞仪鉴定** 经流式细胞仪检测 CD29 (99.6%), CD90 (92.9%) 表达为阳性, CD45 (4.1%) 表达为阴性。

**3.2 对 BMSCs 成脂诱导脂滴的影响** 左、右归丸及其拆方的 BMSCs 成脂诱导 10 d 后, 镜下可观察到 BMSCs 由梭形变为椭圆或圆形, 细胞质内有小脂滴出现。油红 O 染色后, 脂滴呈现出光亮的红色。与正常组比较, 其余各组脂滴数增加; 与模型组比较, 其余各组脂滴数减少; 与戊酸雌二醇片组比较, 左归丸组、右归丸组、共同药组、滋阴药药组和补阳药组脂滴数减少, 与右归丸组比较, 假手术组脂滴数

减少,左归丸组、共同药组、滋阴药组和补阳药组脂滴数增加。见图 1。

### 3.3 对 BMSCs PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA 的影响

与正常组比较,假手术组无显著统计学差异,模型组 PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA 表达均明显上调 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,假手术组、左归丸组、右归丸组、共同药组、滋阴药组、补阳药组、戊酸雌二醇片组 PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA 表达均明显下调 ( $P < 0.05$ );与戊酸雌二醇片组比较,滋阴药组无显著统计学差异,左归丸组、右归丸组、共同药组和补阳药组 PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA 表达均明显下调 ( $P < 0.05$ )。与右归丸组比较,共同药组无显著统计学差异,假手术组 PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA 表达下调 ( $P < 0.05$ ),左归丸组、滋阴药组和补阳药组 PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA 表达均显著上调 ( $P < 0.05$ )。见图 2。



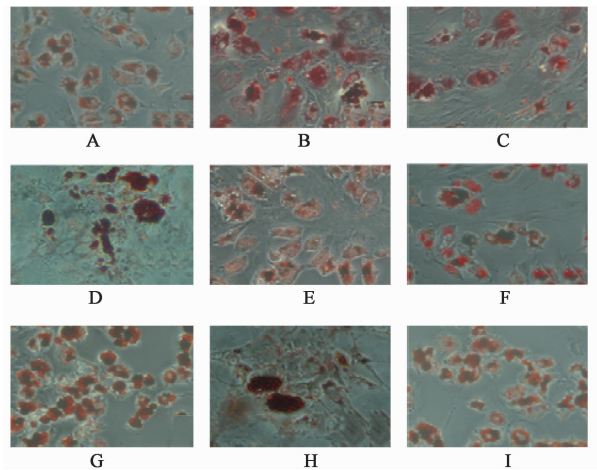
与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与戊酸雌二醇片组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与右归丸组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$  (图 3 同)

图 2 左归丸、右归丸及其拆方对 BMSCs PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of Zuogui Wan, Yougui Wan and their disassembled prescriptions on mRNA level of PPAR $\gamma$ , LPL, FABP4 in BMSCs

### 3.4 对 BMSCs C/EBP $\beta$ 蛋白的影响

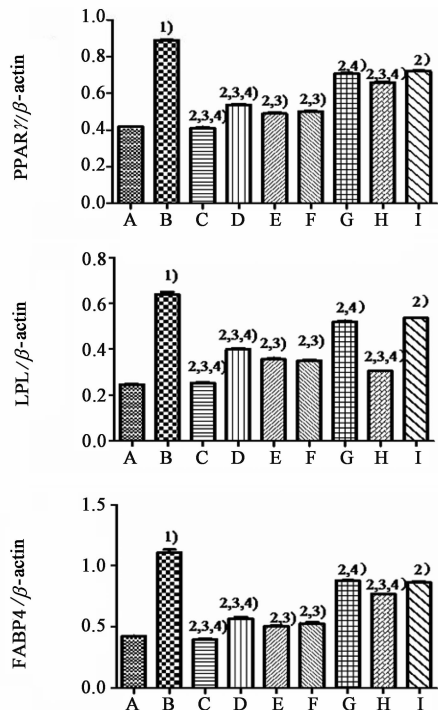
与正常组比较,假手术组无显著统计学差异,模型组 C/EBP $\beta$  蛋白表达均明显上调 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,假手术组、左归丸组、右归丸组、共同药组、滋阴药组、补阳药组、戊酸雌二醇片组 C/EBP $\beta$  蛋白表达均明显下调 ( $P < 0.05$ );与戊酸雌二醇片组比较,滋阴药组无显著统计学差异,左归丸组、右归丸组、共同药组



A. 正常组;B. 模型组;C. 假手术组;D. 左归丸组;E. 右归丸组;F. 共同药组;G. 滋阴药组;H. 补阳药组;I. 戊酸雌二醇片组 (图 2,3 同)

图 1 左归丸、右归丸及其拆方对 BMSCs 脂滴的影响 (油红 O,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Zuogui Wan, Yougui Wan and their disassembled prescriptions on lipid droplets of BMSCs (oil red O,  $\times 400$ )



和补阳药组 C/EBP $\beta$  蛋白表达均明显下调 ( $P < 0.05$ ),与右归丸组比较,共同药组无显著统计学差异,假手术组 C/EBP $\beta$  蛋白的表达下调 ( $P < 0.05$ ),左归丸组、滋阴药组和补阳药组 C/EBP $\beta$  蛋白的表达均明显上调 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

## 4 讨论

左归丸、右归丸均出于《景岳全书》,分别为“滋

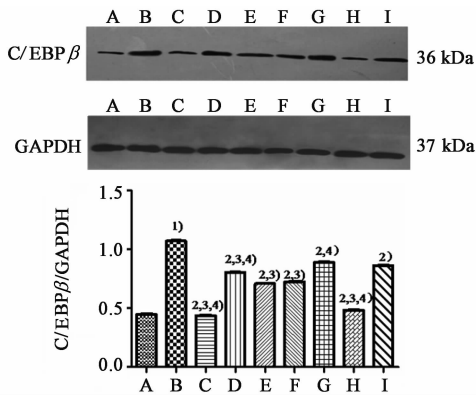


图 3 左归丸、右归丸及其拆方对 BMSCs 的 C/EBP $\beta$  蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Zuogui Wan, Yougui Wan and their disassembled prescriptions on protein level of C/EBP $\beta$  in BMSCs

补肾阴”和“温补肾阳”的代表方剂，二者均有填精益髓的功效，使髓有所化，精有所补，气血化生有源<sup>[12]</sup>。《灵枢·五癯津液别》云：“五谷之津液和合而为膏者，内渗入于骨空，补益脑髓，而下流于阴股。”是说饮食所化生的津液，混合成为脂膏样物质，布散于人体各部分。如若肾精亏虚，气血生化无源，则脂肪无力布散于全身。成体干细胞具有先天之精的属性，因此可认为调节“肾”的阴阳可以调控 BMSCs 的分化能力<sup>[13]</sup>。故中医学认为左归丸、右归丸可以通过补肾益精化生气血，助阳化气，促进脂肪细胞的转化，抑制 BMSCs 向脂肪细胞的转化<sup>[14]</sup>。

PPAR $\gamma$  广泛存在于机体内，是激素核受体超家族成员<sup>[15]</sup>，通过调节转录因子 C/EBP $\beta$  诱导 BMSCs 向脂肪细胞分化<sup>[16]</sup>，具有脂肪组织的特异性，是脂肪细胞分化的关键因子<sup>[17]</sup>。LPL 是脂肪代谢过程中的限速酶<sup>[18]</sup>。FABP4 是 FABPs 中最有特征性的一员，主要功能是参与脂肪细胞的分化<sup>[19]</sup>。本次实验结果表明右归丸的效果优于左归丸及其拆方。说明右归丸可能是通过温补肾阳，助阳化气，从而促进脂肪细胞的转化，抑制 BMSCs 向脂肪细胞分化，补阳药为 2 方中的温补肾阳的药物，具有与右归丸类似样作用，也可促进脂肪细胞的转化，抑制 BMSCs 向脂肪细胞分化。表明中医喻以“阴中求阳”立法的代表方剂“右归丸”抑制成脂分化的作用优于喻以“阳中求阴”立法的代表方剂“左归丸”，以及纯阳药及二者的共同药组，其作用机制可能是通过下调 PPAR $\gamma$ ，LPL，FABP4 mRNA 的表达，从而抑制 BMSCs 的成脂分化。

[参考文献]

[1] 钱燕翔,宋琳,徐路尧,等.大鼠骨髓间充质干细胞向脂肪细胞诱导分化的研究[J].苏州大学学报:医学版,2009,29(3):400-402.

[2] 陈晓云.大鼠骨髓间充质干细胞体外分离培养及成骨成脂诱导[J].咸宁学院学报,2011,25(3):185-188.

[3] 董平,焦虎.人骨髓间充质干细胞体外成骨与成脂分化过程中 FGF1 及其受体表达的变化[J].基础医学与临床,2013,33(8):941-946.

[4] 郑亮,李萍华.诱导骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化[J].中国组织工程研究,2012,16(32):5926-5930.

[5] 周勇.腺毒素介导 Wnt10b 基因调控人 BMSCs 成骨成脂分化的体外实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2014,28(10):1284-1291.

[6] 陈槐卿,周江,唐艳娟.骨质疏松症与骨髓基质细胞[J].国外医学内分泌学分期,2003,23(2):81-83.

[7] 章斌.去势大鼠骨髓基质干细胞增殖及其成骨成脂分化的研究[D].西安:第四军医大学,2009.

[8] 王小娜.影响骨髓间充质干细胞成脂化的部分因素[J].广东医学,2011,32(6):803-805.

[9] 刘海全,秦佳佳,吴倩.淫羊藿对骨质疏松 MSCs 成脂分化 PPAR $\gamma$  mRNA 表达的影响[J].中药新药与临床药理,2013,24(4):382-385.

[10] 李树强.桃红四物汤对激素诱导骨髓间充质干细胞成脂分化的干预作用[J].中国组织工程研究与临床复,2010,14(19):3539-3543.

[11] 徐岩,宋囡.左、右归丸对大鼠骨髓间充质干细胞成骨及成脂诱导的研究[J].中国中医基础医学杂志,2015,21(8):946-948.

[12] 潘乐.补肾药对 BMSCs 成骨与成脂分化及  $\beta$ -catenin、PPAR $\gamma$  甲基化的影响[D].咸阳:陕西中医学院,2014.

[13] 程志安,韩凌,危建安,等.六味地黄丸、金匱肾气丸及健骨二仙丸含药血清对 BMSCs 成脂、成骨细胞分化相关基因的影响[J].中国中西医结合杂志,2013,33(2):261-265.

[14] 危建安,韩灵,程志安,等.六味地黄丸、金匱肾气丸和健骨二仙丸对大鼠 BMSCs 向脂肪细胞分化相关基因表达的影响[J].中药药理与临床,2012,28(4):1-3.

[15] 李雅娜.兔 BMSCs 体外培养及定向诱导为脂肪细胞、成骨细胞的研究[D].昆明:昆明医学院,2005.

[16] 高运臻,潘玉春.转录因子 CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) 的研究进展[J].遗传,2011,33(3):198-206.

[17] 于涛.红花提取物对激素诱导骨髓间充质干细胞成脂分化的干预作用[D].福州:福建中医药大学,2011.

[18] 肖波.过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  的抗炎作用及机制的体外研究[D].重庆:第三军医大学,2010.

[19] 田淑燕.脂肪型脂肪酸结合蛋白在大鼠肝纤维化组织的表达及意义[D].石家庄:河北医科大学,2014.

[责任编辑 周冰冰]