

运脾止泻方治疗脾虚腹泻的机制研究

郭健*, 赵淑英, 席时芳, 倪磊, 杨向竹
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**观察运脾止泻方治疗脾虚腹泻的作用机制。**方法:**将大鼠随机分为 3 组:空白对照组(蒸馏水)、利血平造模组和运脾止泻方组。以利血平 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 3 d 造模之后,模型组和药物组分别 ig 蒸馏水和运脾止泻冲剂($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)连续 6 d。观察血清 D-木糖、胃蛋白酶、肠胃动素(MTL)、肠血管活性肠肽(Vip)和乙酰胆碱酯酶(AChE)以及小肠微绒毛的变化。**结果:**造模后大鼠 D-木糖、胃蛋白酶、Vip 和 AChE 水平降低,MTL 升高,小肠微绒毛破损严重。而运脾止泻方组大鼠 D-木糖水平 [$(500 \pm 68) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] 高于模型组和空白对照组 [(275 ± 28) , $(419 \pm 57) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$];胃蛋白酶活性 [$(0.63 \pm 0.25) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$] 明显高于模型组 [$(0.25 \pm 0.06) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$], MTL 活性 [$(25.49 \pm 1.9) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$] 明显低于模型组 [$(151.43 \pm 9.7) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$]。Vip 活性 [$(106.25 \pm 15.83) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$] 与空白对照组 [$(113.00 \pm 8.25) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$] 接近, AChE 活性 [$(2.36 \pm 0.09) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$] 高于模型组 [$(1.15 \pm 0.03) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$], 但仍然低于空白对照组 [$(3.25 \pm 0.09) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$];小肠微绒毛明显修复。**结论:**以温中运脾为治则的运脾止泻方能通过促进蛋白质的消化、促进小肠吸收以及减缓胃肠运动而抑制腹泻,且具有明显的保护小肠微绒毛的作用。

[关键词] 运脾止泻方;脾虚;腹泻;利血平

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0189-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1312.048.html>

[网络出版时间] 2012-05-04 13:12

The Antidiarrheal Mechanism of Yunpi Zhixie Formulas

GUO Jian*, ZHAO Shu-ying, XI Shi-fang, NI Lei, YANG Xiang-zhu
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the mechanism of antidiarrheal effect of Yunpi Zhixie formulas (smoothing spleen to stop diarrhea formulas). **Method:** Rats were randomly divided into three groups: control group (distilled water), drug (Yunpi Zhixie formulas) group and model group (reserpine). Reserpine was

[收稿日期] 20120107(107)

[基金项目] 留学归国科研启动基金项目(39批)

[通讯作者] *郭健,副教授,博士,从事生理药理研究, Tel:010-64286952, E-mail: guojian323@sina.com

- [9] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2004:173.
- [10] 雍建平,阿吉艾克拜尔·艾萨. 一枝蒿酮酰胺衍生物的合成和抗 A₃, B 型流感病毒和单纯 1, II 型疱疹病毒活性研究[J]. 有机化学, 2008, 10(28):1807.
- [11] 斯拉甫,哈木拉提,古力娜,等. 一枝蒿总黄酮的药用机理研究[J]. 中药药理与临床, 2000, 5(6):45.
- [12] 王建明,潘晓云. 板蓝根制剂中腺苷含量与抗炎作用的相关性研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5):1269.
- [13] 孙静,宋光明,李玲,等. 板蓝根提取物内外抑菌作用研究[J]. 武警医学, 2011, 22(5):412.
- [14] 晋玉章,宋光明,赵艳威,等. 板蓝根免疫调节作用活性部位的筛选[J]. 武警医学院学报, 2011, 20(7):538.
- [15] 罗霄山,杜铁良,张丹雁,等. 不同产地南板蓝根抗病毒作用的研究[J]. 中医药导报, 2011, 17(9):66.
- [16] 刘钊,杨占秋,肖红. 中药大青叶有效单体抗流感病毒作用[J]. 中南民族大学学报, 2009, 28(3):42.
- [17] 胡永金,乔金玲,朱仁俊,等. 紫草与大青叶提取物体内外抑菌效果研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(9):456.

[责任编辑 何伟]

administrated to rats of drug and model group by intraperitoneal injection for 3 days in a prophylactic manner. In consequent 6 days, distilled water was administrated to model group, while Yunpi Zhixie formulas were administrated to drug group. The changes in *D*-xylose, pepsin, motilitin (MTL), vasoactive intestinal peptide (Vip), acetylcholinesterase (AChE) and microvilli were observed. **Result:** After reserpine was administrated, the level of the *D*-xylose, pepsin, AChE and Vip decreased, MTL increased. Microvilli were disturbed severely. After Yunpi Zhixie formulas was administrated, the level of *D*-xylose [(500 ± 68) mg·L⁻¹] is higher than those in model and control group [(275 ± 28), (419 ± 57) mg·L⁻¹]. Pepsin [(0.63 ± 0.25) U·mg⁻¹] is higher than that in model group [(0.25 ± 0.06) U·mg⁻¹] obviously, MTL [(0.25 ± 0.06) U·mg⁻¹] was lower than that in model group [(151.43 ± 9.7) U·mg⁻¹]. Vip [(106.25 ± 15.83) ng·L⁻¹] was back to control group's level [(113.00 ± 8.25) ng·L⁻¹]. AChE [(2.36 ± 0.09) U·mg⁻¹] was higher than model group [(1.15 ± 0.03) U·mg⁻¹], but still lower than that in control group [(3.25 ± 0.09) U·mg⁻¹]. The microvilli were almostly repaired. **Conclusion:** Yunpi Zhixie formulas by Wang Peng-fei under the direction of warming middle to invigorate spleen inhibits diarrhea through promoting digestion, absorption, slowing motility of gastrointestinal tract and provides a protection for microvilli.

[**Key words**] Yunpi Zhixie formulas; spleen deficiency; diarrhea; reserpine

小儿腹泻是一组由多病原、多因素引起的大便次数增多和大便性状改变的儿科常见病,属中医“泄泻”范畴,是我国重点防治的疾病之一。单纯抗生素治疗对许多小儿腹泻不但无效,还会杀死体内正常菌群,破坏微生态平衡,使腹泻迁延不愈,或继发二重感染。王鹏飞认为小儿发育过程中脏腑娇嫩,脾胃功能薄弱,饮食稍过,则引起消化不良,传化失常,导致腹泻。婴幼儿腹泻,不管是感寒、受暑或伤食而致脾胃失节,其根本原因是脾胃虚弱,因此创立了运脾止泻方,温中健脾和胃为主,在临床应用多年,疗效显著^[1-2]。为进一步研究该方抗腹泻的作用机制,在前期药效研究的基础上,我们选择抑制腹泻最有效的剂量^[3-4],对利血平造模产生的腹泻大鼠^[5-6],从吸收、消化、胃肠运动和微绒毛的变化等方面分析该方抗腹泻作用的机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,(300 ± 20)g,由北京大学医学部实验动物科学部提供。动物合格证号 SCXK(京)2002-0001。

1.2 药品与试剂 运脾止泻冲剂(酒仙桥医院中药制剂室制作,京药制字 Z20053685)每袋 6g,按儿童体重标准 20 kg 计算大鼠给药剂量为 0.6 g·kg⁻¹·d⁻¹,用蒸馏水溶解为 0.15 g·mL⁻¹;利血平注射液购于上海复旦复华药业有限公司,批号 050201;氯仿,购于北京益利精细化学品有限公司,批号 030921;RIPA 裂解液:50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH7.4),150 mmol·L⁻¹ NaCl,1% NP-40,0.1% SDS,均购于 Sigma 公司。*D*-木糖测试盒,胃蛋白酶

测试盒和乙酰胆碱酯酶(AChE)测试盒购于南京建成生物工程研究所,生产批号均为 051022;胃动素(MTL)和血管活性肠肽(Vip)由北京科美东亚生物技术有限公司提供放免检测。

1.3 仪器 紫外-可见分光光度计(Pharmacia,美国),Polytron 匀浆机(Kinematica AG,瑞士),台式离心机(Eppendorf,德国)。

2 方法

2.1 分组造模与给药 大鼠 30 只,随机分成 3 组,空白对照组,模型组和药物组。雌雄各半,空白组每天蒸馏水 0.2 mL·kg⁻¹ip,造模大鼠每天 ip 利血平 0.2 mg·kg⁻¹,连续 3 d^[5-6]。造模完成后,模型组用蒸馏水 2 mL·kg⁻¹,2 次/d,ig;药物组采用运脾止泻方冲剂 0.3 g·kg⁻¹(0.15 g·mL⁻¹,2 mL·kg⁻¹),2 次/d,ig,均连续 6 d。

2.2 取材 末次药后 1 h,各组均于麻醉后腹主动脉取血,4℃保存。胃和空肠用生理盐水冲洗干净后,切成小块,部分放入液氮速冻,备提取蛋白用;部分放入戊二醛固定,备电镜使用。

2.3 样品制备 血浆 4℃过夜,5 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液,于 -20℃冰箱冻存。胃肠组织从液氮中取出,添加 RIPA 裂解液,用匀浆器研磨,12 000 r·min⁻¹,4℃离心 15 min,吸取上清液,采用紫外-可见分光光度计测试蛋白浓度。

2.4 血清 *D*-木糖含量、胃蛋白酶和肠 AChE 活性检测 用化学比色法,按试剂盒说明书操作。

2.5 肠 MTL, Vip 含量检测 用放射性免疫法,由北京科美东亚生物技术有限公司完成。

2.6 大鼠空肠微绒毛扫描电镜观察 取近端空肠黏膜组织,用戊二醛固定后,0.1 mmol·L⁻¹ PBS 漂洗,丙酮梯度脱水,包埋,超薄切片机切片,植被样品,在中日友好医院电镜室扫描电镜观察小肠微绒毛的变化。

2.7 数据统计 采用 SPSS 13.0 软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠状态 利血平 ip 3 d 后,大鼠大便稀溏,体重减轻、摄食量减少、活动减少、精神不振、皮毛疏松粗糙无光泽,表明脾虚模型已成。模型组改用蒸馏水 ig 后,大便很快由稀溏转为正常,但毛发仍疏松粗糙,活动基本正常。药物组予运脾冲剂 ig 后,同样观察到大鼠大便由稀溏转为正常,与模型组不

同的是大鼠毛发逐渐致密有光泽,活泼好动,精神恢复正常。

3.2 生化指标的变化 模型组 *D*-木糖、胃蛋白酶水平下降,运脾止泻方组二者增加,明显高于模型组 ($P < 0.01$),其中 *D*-木糖高于空白对照组 ($P < 0.01$)。模型组 MTL 水平明显升高,Vip 明显下降,表明胃运动增强。运脾止泻方组 MTL 水平降低,明显低于模型组和空白对照组 ($P < 0.01$);药物组 Vip 有一定升高,接近空白组水平,表明二者共同作用抑制胃运动。模型组 AChE 活力降低,表明乙酰胆碱降解能力下降,导致乙酰胆碱水平升高,维持副交感神经的兴奋状态。运脾止泻方组 AChE 活力明显升高,与模型组比,差异显著 ($P < 0.01$),但仍低于空白对照组,表明副交感神经兴奋状态尚未完全恢复。见表 1。

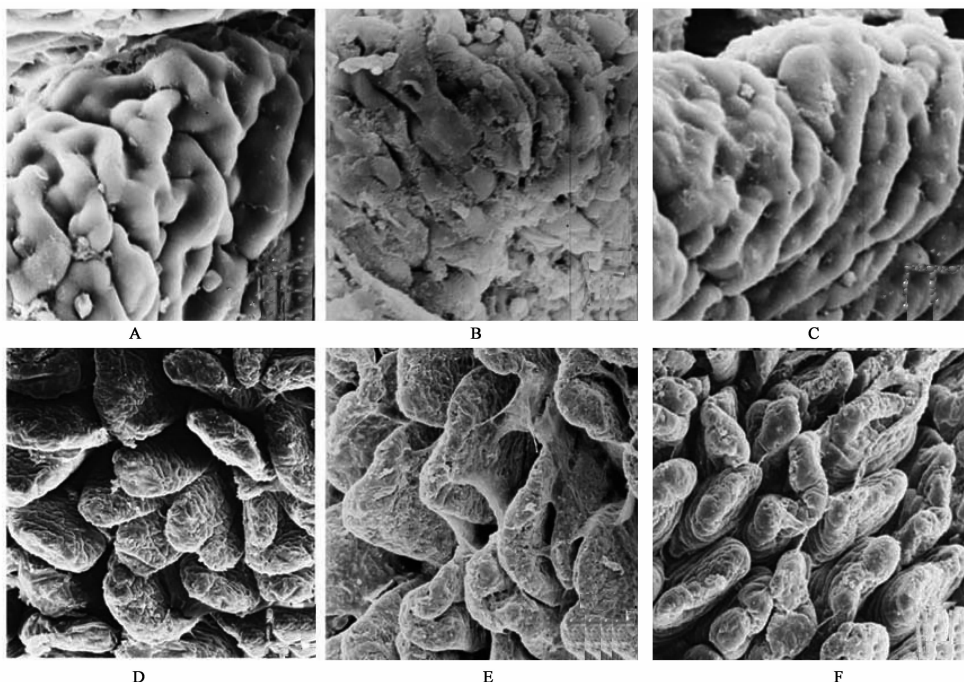
表 1 运脾止泻方对血清 *D*-木糖、胃蛋白酶、肠 MTL、肠 Vip、肠 AChE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | <i>D</i> -木糖/mg·L ⁻¹ | 胃蛋白酶/U·mg ⁻¹ | 肠 MTL/U·mg ⁻¹ | 肠 Vip/ng·L ⁻¹ | 肠 AChE/U·mg ⁻¹ |
|-------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 419 ± 57 ³⁾ | 0.76 ± 0.13 ³⁾ | 66.74 ± 5.1 ³⁾ | 113.00 ± 8.25 ³⁾ | 3.25 ± 0.09 ³⁾ |
| 模型 | - | 275 ± 28 | 0.25 ± 0.06 | 151.43 ± 9.7 | 96.00 ± 15.00 | 1.15 ± 0.03 |
| 运脾止泻方 | 0.6 | 500 ± 68 ^{1,3)} | 0.63 ± 0.25 ³⁾ | 25.49 ± 1.9 ^{2,3)} | 106.25 ± 15.83 | 2.36 ± 0.09 ^{2,3)} |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 大鼠小肠微绒毛观察 从扫描电镜图片可以看出,空白对照组大鼠小肠上皮微绒毛排列致密整齐,表面光滑完整无缺损。模型组大鼠小肠微绒毛排列杂乱,顶部结构变形、破损严重,间隙变宽,甚至消失脱落。药物组小肠微绒毛较造模组明显完整致

密,排列较整齐,但顶部仍有变形,大多数嵴较清楚。同模型组相比,小肠黏膜厚度、绒毛高度、隐窝深度恢复较好,提示运脾止泻方可有效地保护小肠黏膜。见图 1。



A, D. 空白组; B, E. 利血平造模组; C, F. 药物治疗组; A, B, C. ($\times 1000$); D, E, F. ($\times 100$)

图 1 各组大鼠小肠微绒毛的变化

4 讨论

王鹏飞治疗腹泻的运脾止泻方以温中运脾为原则,主要组成有肉豆蔻、丁香、茯苓、赤石脂、伏龙肝、黄连、寒水石等^[1]。全方温清并用,在临床不仅应用于脾虚腹泻的患儿,针对其他证型,也多获良效^[1-2]。动物实验也表明,给小鼠 ig 不同剂量(1.8, 1.2, 0.6 g · kg⁻¹) 的该方提取物,能明显抑制腹泻^[3-4]。在前期药效学基础上,我们采用利血平 ip 造模,通过耗竭儿茶酚胺类递质,兴奋副交感神经,使大鼠胃肠蠕动增强产生腹泻,这和脾虚病人大便次数增多,大便不实是相符的。造模后,大鼠出现大便稀溏,进食减少,精神不振、毛发粗糙等现象符合脾虚腹泻的证候特点^[5-6]。从生化指标分析,木糖排泄率主要反映小肠吸收功能^[7]。脾气虚弱,不能运化水谷精微,吸收能力降低,则见 D-木糖下降。我们的实验结果也符合这一规律,利血平造模后血糖 D-木糖下降,给药后 D-木糖升高,表明运脾止泻方组可以促进小肠的吸收。胃蛋白酶反映胃对蛋白质的消化能力,造模后胃蛋白酶水平下降,给药后胃蛋白酶水平升高,表明运脾止泻方可以提高胃蛋白酶的含量,进而促进胃对蛋白质的分解。此外 MTL 能增强消化道肌肉活动^[8-9],而 Vip 抑制胃肠运动^{10]}。造模后,MTL 增加,Vip 降低,说明胃肠运动加强而导致大鼠大便稀溏;用药后 MTL 降低,Vip 增加,和空白对照组水平接近,表明运脾止泻方可通过下调 MTL、上调 Vip 的释放而抑制胃运动。模型组小肠微绒毛排列紊乱,破损明显;用药后微绒毛明显好转,表明该方有很强的修复小肠黏膜作用,这是脾胃功能恢复与否的重要形态学标志。

以上实验表明,在温中运脾治则下组成的运脾止泻方通过促进蛋白质消化、促进小肠吸收、抑制胃肠运动、修复小肠微绒毛等多个环节达到止泻的目

的,同时又兼顾了后续脾胃功能的发育和养护,阐明了该方在临床上针对各种小儿腹泻均有疗效的机制,为其在临床的应用提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] 北京儿童医院. 王鹏飞儿科临床经验选[M]. 北京: 北京出版社, 1981:36.
- [2] 杨燕,闫慧敏. 运脾止泻颗粒治疗小儿腹泻的临床疗效观察[J]. 中西医结合杂志, 2006, 26(10):899.
- [3] 郭健,杨燕,赵淑英,等. 运脾止泻颗粒抗腹泻主要药效学研究[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(5):60.
- [4] 郭健,李国彰,赵淑英,等. 运脾止泻颗粒抗腹泻的机制研究[J]. 中国药师, 2009, 12(7):844.
- [5] 陈小野,艾景录,吕爱平,等. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993:189.
- [6] 苗明三. 常用中医药研究动物模型[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997:91.
- [7] 中华人民共和国卫生部药政局. 中药治疗脾虚的临床研究指导原则[J]. 中国医药学报, 1988, 3(5):71.
- [8] 史雪川,朱文平,敬宗玉,等. 小儿腹泻病血胃泌素、胃动素和生长抑素含量变化与胃肠运动功能的关系[J]. 中国儿童保健杂志, 2002, 10(2):104.
- [9] 赵菊辉,董蕾,郝筱倩. 多种胃肠激素对肠易激综合征患者小肠运动功能的研究[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(10):1492.
- [10] Moody T W, Ito T, Osefo N, et al. VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2011, 18(1):61.

[责任编辑 何伟]