

红曲发酵炮制前后对脾虚食积证小鼠的胃肠调节作用

罗佳¹, 孙强¹, 马祖兵¹, 何祖新², 李小芳^{1*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 四川得恩德药业有限公司, 四川 绵阳 612000)

[摘要] **目的:** 研究红曲发酵炮制对脾虚食积证小鼠的胃肠调节作用及其作用机制, 为曲类中药的健脾消食作用机制探索新思路。**方法:** 采用随机分组法将50只昆明小鼠分为5组, 包括空白组、模型组、红曲未发酵组(1.17 g·kg⁻¹·d⁻¹), 红曲发酵组(1.17 g·kg⁻¹·d⁻¹), 多潘立酮组(3.9 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 每组10只, 连续灌胃给药10 d。对比红曲发酵炮制前后对脾虚食积证小鼠行为学、体质量、进食量、胃内残留率和小肠推进率的影响。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测红曲对脾虚食积证小鼠血清中胃动素(MTL), 胃泌素(GAS), 5-羟色胺(5-HT)和血管活性肠肽(VIP)水平的影响; 采用苏木素-伊红(HE)染色法研究红曲对脾虚食积证小鼠胃肠组织形态学的影响; 基于细菌16S rRNA基因序列的V3-V4区, 通过高通量测序平台Illumina MiSeq研究红曲对脾虚食积证小鼠肠道菌群结构的调节作用。**结果:** 与模型组比较, 红曲发酵后可恢复脾虚食积证小鼠的体质量和进食量, 显著降低胃内残留率($P < 0.01$)和显著升高小肠推进率($P < 0.01$)。红曲可增加脾虚食积证小鼠胃肠激素MTL和5-HT的水平, 降低VIP水平; 红曲能改善脾虚食积证小鼠胃肠组织形态, 改善脾虚食积证小鼠胃黏膜的轻微充血和局部腺体排列不整齐, 显著升高脾虚食积证小鼠小肠绒毛长度、增加小肠黏膜厚度; 红曲可以恢复脾虚食积证小鼠肠道菌群结构, 增加有益菌双歧杆菌属和乳酸杆菌属的相对丰度, 降低有害菌大肠埃希菌-志贺菌的相对丰度。**结论:** 红曲发酵后能调节脾虚食积证小鼠的胃肠功能, 其机制可能与调节胃肠激素水平、改善胃肠组织形态、恢复肠道菌群结构有关。

[关键词] 红曲; 发酵炮制; 脾虚食积证; 胃肠调节作用; 胃肠激素; 胃肠组织形态; 肠道菌群

[中图分类号] R22; R24; R28; C37; TS193; R943.1; R378.2; TQ92 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903

(2019)22-0108-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192252

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190802.0925.002.html>

[网络出版时间] 2019-08-02 09:36

Gastrointestinal Regulation of Red Yeast Rice on Mice with Syndrome of Food Retention Due to Spleen Deficiency Before and After Fermentation

LUO Jia¹, SUN Qiang¹, MA Zu-bing¹, HE Zu-xin², LI Xiao-fang^{1*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Sichuan Sino-dandard Pharmaceutical Co. Ltd., Mianyang 612000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate gastrointestinal regulation of red yeast rice on spleen deficient dyspepsia mice, and provide reference for clarifying mechanism of invigorating spleen to promote digestion of fermented traditional Chinese medicine. **Method:** Mice were randomly divided into 5 groups, including the blank group, the model group, the unfermented red yeast rice treatment group (1.17 g·kg⁻¹·d⁻¹), the fermented red yeast rice treatment group (1.17 g·kg⁻¹·d⁻¹), the domperidone group (3.9 mg·kg⁻¹·d⁻¹), ten mice in each group were continuous intragastric administration for 10 days. The effects of red yeast rice before and after fermentation on the general behavior, body weight, food intake and gastrointestinal function of spleen deficient

[收稿日期] 20190619(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703706); 国家中医药管理局公益性行业科研专项(201507004-03); 四川省科技厅苗子工程项目(2016RZ0037)

[第一作者] 罗佳, 博士, 讲师, 从事中药炮制研究, Tel:028-61800231, E-mail:303509194@qq.com

[通信作者] * 李小芳, 博士, 教授, 从事中药炮制及制剂研究, Tel:028-61800231, E-mail:lixiaofang918@163.com

dyspepsia mice were compared. The effects of red yeast rice on the gastrointestinal hormone [motilin (MTL), gastrin (GAS), 5-hydroxytryptamine (5-HT), vasoactive intestinal peptide (VIP)] levels in serum of spleen deficient dyspepsia mice were determined by enzyme-linked immunosorption assay (ELISA). The regulation function of red yeast rice on the pathological changes of gastrointestinal tissue of spleen deficient dyspepsia mice was investigated by hematoxylin-eosin (HE) staining. The effect of red yeast rice on gut microbiota of spleen deficient dyspepsia mice was investigated, the primers were designed on bacterial 16S rRNA V3-V4 region sequences and Illumina Miseq platform was used for high-throughput sequencing. **Result:** Compared with the model group, fermented red yeast rice could recover the body weight and food intake, reduce gastric residual rate ($P < 0.01$) and enhance the small intestinal propulsive rate ($P < 0.01$) of spleen deficient dyspepsia mice. Red yeast rice could increase the gastrointestinal hormone levels of MTL and 5-HT, while reduce the VIP level of spleen deficient dyspepsia mice. Red yeast rice could restore the light congestion and local structural disorder glands of gastric mucosa of spleen deficient dyspepsia mice. Red yeast rice could restore the pathological changes of intestinal tissue of spleen deficient dyspepsia mice by means of increasing the length of intestinal villus and the thickness of mucosa. Red yeast rice could restore the structure of the gut microbiota of spleen deficient dyspepsia mice by means of reducing the relative abundance of pathogenic microorganisms such as *Escherichia-Shigella*, while increasing the relative abundance of the beneficial bacteria such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Conclusion:** Fermented red yeast rice can enhance the gastrointestinal function of spleen deficient dyspepsia mice, the mechanism may be related to regulating gastrointestinal hormone level, improving histopathology of gastrointestinal tissue and restoring intestinal flora structure.

[**Key words**] red yeast rice; fermentation; syndrome of food retention due to spleen deficiency; gastrointestinal regulation; gastrointestinal hormones; gastrointestinal tissue morphology; gut microbiota

发酵炮制是指经净制或处理后的药物,在一定的温度和湿度条件下,利用霉菌等微生物所分泌酶的催化分解作用,使药物发泡、生衣的方法^[1],是中药炮制的基本方法之一。中药发酵炮制起源于我国古老的白酒酿造行业,据考证,早在六七千年前,就已经有使用酒曲酿制白酒的酿酒术^[2]。《书经·说命篇》记载“若作酒醴,尔惟曲蘖”,曲蘖就是最早的酒曲。早期的曲仅供酿酒之用,后《本草纲目》云“古人用麴,多是造酒之麴。后医乃造神麴,专以供药,力更胜之”,便发展出了药曲,如六神曲、半夏曲、沉香曲、红曲等。

红曲由红曲霉属真菌接种于稻米发酵而成,是一种食疗兼备的传统中药。红曲的传统功效在《本草纲目》记载为“健脾消食、活血化瘀”。自 1979 年日本学者远藤章教授^[3]从红曲霉的发酵产物中分离出一种可以降低胆固醇合成的活性物质莫那可林 K (monacolin K) 以来,红曲被开发成了多种中成药,在临床上用于治疗高脂血症,如血脂康胶囊和脂必妥片。同时,降脂西药他汀类药物,如洛伐他汀,越来越多地被报道具有肝功能损伤、肌肉毒性等毒副作用,尤其是很多报道和研究证明服用他汀类药物后会出现胃肠道不良反应,如肠胃胀气、消化不良、

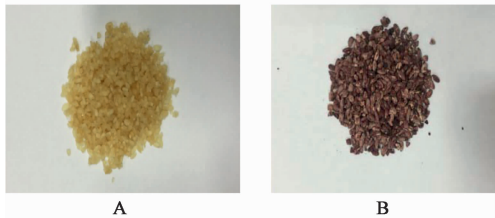
便秘等^[4-5];而红曲在临床应用中降脂的疗效良好,并未见胃肠道的不良反应。但近年来研究者对红曲的药效学研究主要集中于治疗高脂血症^[6]和颈动脉粥样硬化^[7-8]方面,对其传统功效“健脾消食”研究尚未见文献报道,故本实验拟研究红曲发酵炮制前后对脾虚食积证小鼠胃肠功能的影响,探讨红曲发酵炮制的机制,有利于指导红曲的临床应用。

1 材料

BP211DAG 型电子天平(德国 Sartorius 公司),UPT- I -10T 型超纯水器(成都超纯科技有限公司),CX41 型正置显微镜(日本 Olympus 公司),BPG-9106A 型恒温烘箱(上海恒一科学仪器有限公司),SQ2125 型石蜡切片机和 PPTHK-21B 型摊片机(湖北徕克医疗仪器有限公司),MK3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司),GeneAmp® 9700 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司),DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

4% 多聚甲醛(武汉谷歌生物科技有限公司,批号 170406),石蜡(国药集团化学试剂有限公司,批号 69018961),苏木素、伊红(广州鸿泉生物科技有限公司,批号分别为 BASO714094, BASO BA4099);胃动素(MTL),胃泌素(GAS),5-羟色胺(5-HT)以及血管活

性肠肽 (VIP) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 M20170418, M20170418, M20170417, M20170419), 多潘立酮片 (浙江昂利康制药股份有限公司, 批号 7T7I03)。红曲未发酵样品由四川得恩德药业有限公司提供, 见图 1 (A), 取大米与红曲霉菌均匀混合后立即低温烘干, 粉碎过五号筛; 红曲发酵样品也由四川得恩德药业有限公司提供, 见图 1 (B), 大米接种红曲霉菌发酵 15 d 后低温烘干, 粉碎过五号筛。红曲发酵样品经成都中医药大学药学院黄勤挽教授鉴定, 符合 2015 年版《中国药典》的相关规定。



A. 发酵前样品; B. 发酵后样品

图 1 红曲样品的外观

Fig. 1 Appearance of red yeast rice before and after fermentation

昆明种小鼠购买于四川简阳达硕实验动物中心, SPF 级, 雌雄各半, 体质量 18 ~ 22 g, 合格证号 SCXK(川)2013-24。本文涉及的动物实验获得成都中医药大学实验动物伦理委员会的批准, 批准号 TCM-2016-312。

2 方法与结果

2.1 红曲发酵炮制前后对小鼠胃肠功能调节作用的影响

2.1.1 动物分组及给药 采用随机分组法将 50 只昆明小鼠分为 5 组, 包括空白组、模型组、红曲未发酵组, 红曲发酵组, 多潘立酮组, 每组 10 只, 雌雄各半。实验前在动物房适应性喂养 3 d, 常规饲料, 饮水不限制。除空白组外, 其余各组小鼠按“冰水灌胃 + 饮食不节”法造成脾虚食积证模型^[9]。第 1 天小鼠自由进食, 每 4 h 以 10 mL·kg⁻¹ 灌胃 4 ℃ 冰水 1 次; 第 2 天小鼠禁食不禁水, 每 4 h 以 10 mL·kg⁻¹ 灌胃 4 ℃ 冰水 1 次; 第 3 天小鼠以 4 ℃ 冰氢氧化钠 (浓度 0.3 mol·L⁻¹) 灌胃, 每只 0.1 mL。通过前期预试验, 设置空白组和模型组 (每组 10 只, 雌雄各半), 相比于空白组, 造模后小鼠精神萎靡, 体型消瘦, 毛色无光泽, 蜷缩聚堆, 大便溏软; 用半固体黑色糊法检测胃内残留率和小肠推进率, 造模后小鼠胃内残留率升高, 小肠推进率降低。上述表现与文献相符, 说明模型制备成功。

造模成功后给药, 综合各地方炮制规范, 红曲临床剂量为 6 ~ 12 g, 取平均值 9 g, 按人体平均体质量 60 kg 计算, 则红曲人常用剂量为 150 mg·kg⁻¹; 按体表面积折算的等效剂量, 以人临床剂量折算为小鼠灌胃剂量, 即红曲发酵组和红曲未发酵组小鼠的灌胃剂量均为 1.17 g·kg⁻¹, 以 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬后灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 10 d。多潘立酮组按体表面积折算的等效剂量, 以人临床剂量折算为小鼠灌胃剂量, 即 3.9 mg·kg⁻¹, 以 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬后灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 10 d。空白组和模型组每天灌胃等体积生理盐水 1 次, 连续灌胃 10 d。

2.1.2 小鼠一般状态、体质量和进食量考察 每天观察小鼠的一般状态, 包括皮毛、活动度、粪便状态等。期间每日 17:00 对每只小鼠进行称重, 记录, 每日 17:00 每笼给予正常饲料 120 g, 并记录各组小鼠每日平均进食量。结果空白组小鼠精神状态好, 行动敏捷, 毛色光泽顺滑, 大便成型, 呈黄褐色。模型组小鼠精神萎靡, 体型消瘦, 毛色无光泽, 蜷缩聚堆, 大便溏软。红曲发酵组和多潘立酮组小鼠精神状态良好, 行动敏捷, 毛色光泽顺滑, 大便成型, 呈黄褐色, 与空白组接近。红曲未发酵组小鼠体型消瘦, 蜷缩聚堆, 偶见大便溏软。

实验期间各组小鼠体质量情况见表 1。结果发现与空白组相比, 其余各组小鼠造模后体质量均显著下降 ($P < 0.01$)。给药第 3 天, 与空白组相比, 模型组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 3 个给药组小鼠体质量无显著差异。给药第 6 天, 与空白组相比, 模型组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 红曲未发酵组和红曲发酵组小鼠体质量无显著差异, 但多潘立酮组小鼠体质量显著增加 ($P < 0.05$)。给药第 9 天, 与空白组相比, 模型组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 红曲未发酵组小鼠体质量无显著差异, 而红曲发酵组、多潘立酮组小鼠体质量则显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

实验期间各组小鼠平均进食量情况见表 2。结果发现与空白组相比, 其余各组小鼠造模后平均进食量均有所下降; 给药第 3 天, 各组小鼠平均进食量均有增加, 其中多潘立酮组和红曲发酵组小鼠平均进食量增加最快; 给药第 6 天, 模型组平均进食量略有降低, 其余各组小鼠平均进食量均有增加; 给药第 9 天, 模型组和红曲未发酵组平均进食量略有降低, 其余各组小鼠平均进食量均有增加, 其中多潘立酮组增加较为明显。

表 1 实验期间各组小鼠体质量情况 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Average weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 造模前体质量/g | 造模后体质量/g | 给药期间体质量/g | | |
|-------|----------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | | | 3 d | 6 d | 9 d |
| 空白 | - | 25.99 ± 0.62 | 26.29 ± 0.82 | 29.28 ± 1.15 | 30.63 ± 2.55 | 31.31 ± 3.47 |
| 模型 | - | 24.27 ± 0.89 | 23.83 ± 0.76 ²⁾ | 26.25 ± 1.47 ¹⁾ | 27.18 ± 1.73 ¹⁾ | 28.48 ± 3.16 ¹⁾ |
| 红曲未发酵 | 1 170 | 24.41 ± 0.75 | 23.96 ± 0.93 ²⁾ | 26.92 ± 1.13 | 27.81 ± 2.31 | 28.69 ± 2.72 |
| 红曲发酵 | 1 170 | 24.60 ± 0.88 | 24.07 ± 0.63 ²⁾ | 27.43 ± 1.22 | 28.51 ± 1.94 | 30.58 ± 3.59 ³⁾ |
| 多潘立酮 | 3.9 | 25.31 ± 0.76 | 23.05 ± 0.97 ²⁾ | 27.13 ± 1.33 | 29.84 ± 2.17 ³⁾ | 31.13 ± 3.11 ⁴⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

表 2 实验期间各组小鼠的平均进食量 ($n = 8$)

Table 2 Average daily food intake of mice in each group ($n = 8$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 造模前 进食量/g | 造模后 进食量/g | 给药期间进食量/g | | |
|-------|----------------------------|--------------|--------------|-----------|------|------|
| | | | | 3 d | 6 d | 9 d |
| 空白 | - | 6.44 | 6.28 | 6.35 | 6.52 | 6.56 |
| 模型 | - | 6.36 | 5.67 | 6.07 | 6.01 | 5.84 |
| 红曲未发酵 | 1 170 | 6.36 | 5.63 | 5.71 | 5.83 | 5.74 |
| 红曲发酵 | 1 170 | 6.43 | 5.31 | 5.99 | 6.28 | 6.32 |
| 多潘立酮 | 3.9 | 6.42 | 5.71 | 6.21 | 6.42 | 6.94 |

2.1.3 胃排空和肠推进 末次给药后 1 h, 将禁食(不禁水)18 h 的小鼠灌胃给予半固体黑色糊(羧甲基纤维素钠 10 g, 奶粉 16 g, 葡萄糖 8 g, 淀粉 8 g, 活性炭 2 g, 配制成 300 mL 黑色半固体糊状物), 每只 0.8 mL。30 min 后脱颈处死小鼠, 开腹, 结扎胃贲门和幽门, 取胃, 用滤纸拭干后称全重, 然后沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物后拭干, 称净重。同时迅速取出小肠, 轻轻剥离肠系膜后将小肠拉成直线, 测量幽门至回盲部的小肠全长及幽门至黑色半固体糊前沿的距离, 计算胃内残留率[胃内残留率 = (胃全重 - 胃净重) / 灌服半固体黑色糊质量 × 100%]和小肠推进率(小肠推进率 = 幽门至半固体黑色糊前沿的距离 / 幽门至回盲部全长 × 100%), 见表 3。结果与空白组比较, 模型组小鼠的胃内残留率显著增大 ($P < 0.01$), 小肠推进率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 红曲发酵组和多潘立酮组的胃内残留率显著下降 ($P < 0.01$), 小肠推进率显著升高 ($P < 0.01$); 与空白组比较, 红曲发酵组和多潘立酮组的胃内残留率、小肠推进率差异不显著, 说明红曲发酵炮制后能增强脾虚食积证小鼠胃排空和肠蠕动, 并恢复至正常水平。

2.2 作用机制研究

2.2.1 动物分组及给药 采用随机分组法将 30 只昆明小鼠分为 3 组, 包括空白组、模型组、红曲给药组, 每组 10 只, 雌雄各半。实验前在动物房适应性喂养 3 d, 常规饲料, 饮水不限制。除空白组外, 其余

表 3 各组小鼠的胃内残留率和小肠推进率 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Gastric residual rates and small intestinal propulsion rates of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 胃内残留率 /% | 小肠推进率 /% |
|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白 | - | 21.72 ± 2.92 | 88.36 ± 5.61 |
| 模型 | - | 46.77 ± 8.34 ²⁾ | 65.53 ± 5.84 ²⁾ |
| 红曲未发酵 | 1 170 | 39.81 ± 7.43 | 66.08 ± 8.12 |
| 红曲发酵 | 1 170 | 25.49 ± 7.97 ⁴⁾ | 81.64 ± 4.83 ⁴⁾ |
| 多潘立酮 | 3.9 | 23.67 ± 8.41 ⁴⁾ | 92.36 ± 8.49 ⁴⁾ |

各组根据“冰水灌胃 + 饮食不节”法造成脾虚食积证模型。造模成功后给药, 红曲给药组灌胃剂量 1.17 g·kg⁻¹, 以 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬后灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 10 d。空白组和模型组每天灌胃等体积生理盐水 1 次, 连续灌胃 10 d。

2.2.2 血清中 MTL, GAS, 5-HT, VIP 水平的检测 末次给药后, 空白组、模型组、红曲给药组小鼠禁食不禁水 18 h, 眼眶取血, 于 4 ℃, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上层血清。采用 ELISA, 严格按照试剂盒说明书的操作程序测定血清中胃肠激素水平, 见表 4。结果与空白组比较, 模型组小鼠的 MTL, GAS, 5-HT 水平显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), VIP 水平显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 红曲给药组小鼠的 MTL 和 5-HT 水平显著上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), GAS 水平变化不大, VIP 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

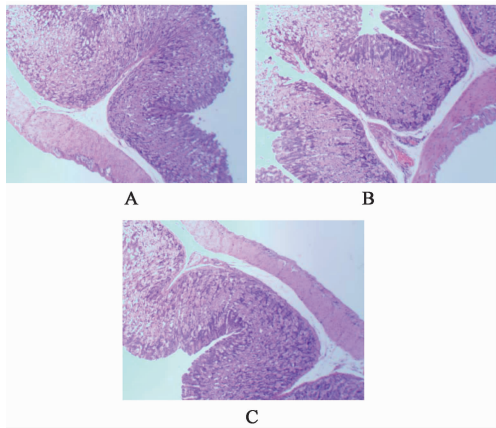
2.2.3 胃肠组织形态的检测 空白组、模型组、红曲给药组小鼠取血后脱颈处死, 剖腹取出全胃, 沿大弯侧切开胃壁, 使黏膜面外翻, 用生理盐水冲洗去胃内容物, 将其置入 4% 多聚甲醛固定液中固定; 剖腹取出距离胃幽门 1 cm 处的小肠 1 cm, 用生理盐水冲洗小肠表面, 将其置入 4% 多聚甲醛固定液中固定。固定后的胃肠组织用石蜡包埋并按厚度 5 μm 切片。组织切片经苏木素-伊红 (HE) 染色后, 通过显微镜拍照, 利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件

表 4 各组小鼠胃肠激素水平的检测 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Levels of gastrointestinal hormones in mice from each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | MTL/ $ng \cdot L^{-1}$ | GAS/ $ng \cdot L^{-1}$ | 5-HT/ $\mu g \cdot L^{-1}$ | VIP/ $ng \cdot L^{-1}$ |
|------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 空白 | - | 349.19 \pm 21.53 | 622.47 \pm 42.92 | 220.35 \pm 25.05 | 229.69 \pm 14.38 |
| 模型 | - | 282.73 \pm 22.56 ²⁾ | 556.44 \pm 36.41 ¹⁾ | 108.40 \pm 22.79 ²⁾ | 349.00 \pm 22.66 ²⁾ |
| 红曲给药 | 1.17 | 326.35 \pm 36.63 ³⁾ | 579.03 \pm 40.88 | 201.01 \pm 26.14 ⁴⁾ | 192.35 \pm 16.12 ⁴⁾ |

分析胃肠组织形态学特点,见图 2,3。



A. 空白组; B. 模型组; C. 红曲给药组 (图 3 同)

图 2 各组小鼠胃黏膜组织的形态观察 (HE, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of red yeast rice on pathological changes of gastric mucosa in mice from each group (HE, $\times 100$)

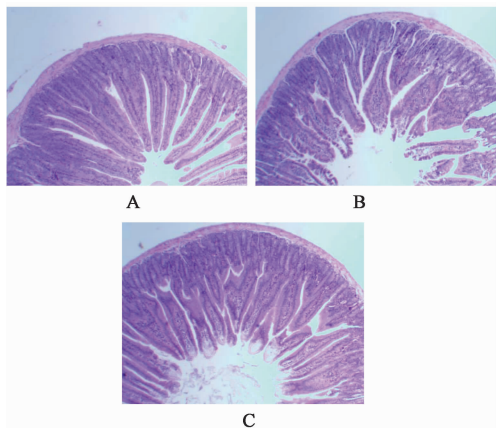


图 3 各组小鼠小肠组织的形态观察 (HE, $\times 40$)

Fig. 3 Effect of red yeast rice on pathological changes of small intestine tissue in mice from each group (HE, $\times 40$)

由图 2 可知,空白组小鼠胃黏膜正常,结构层次清楚,上皮结构完整,腺体排列整齐,未见明显损伤;模型组胃黏膜上皮基本完整、连续,腺体排列较整齐,部分上皮细胞脱落破坏,胃腺体少量表层坏死,胃黏膜轻微充血;红曲给药组胃黏膜上皮基本完整、连续,腺体排列整齐,部分上皮细胞脱落,胃黏膜未见充血现象。说明模型组相对于空白组有轻微的病理性改变,红曲能改善造模后胃黏膜的轻微充血和

腺体的排列不整齐。由图 3 可知,空白组肠黏膜结构完整,黏膜肌层下层细胞排列整齐、层次清晰,肠绒毛排列整齐规则;模型组黏膜肌层变薄,肠绒毛变短且不规则、萎缩、缺失、脱落较严重并排列紊乱,绒毛数量减少,间距增宽;红曲给药组肠黏膜结构完整,层次清晰,黏膜较厚,肠绒毛排列整齐。表明造模对小肠黏膜组织有明显的病理性改变,红曲能显著改善造模后肠黏膜肌层变薄,肠绒毛变短不规则、萎缩、缺失和脱落的情况,具有保护肠道的作用。

2.2.4 高通量测序技术研究红曲对肠道菌群结构的调节作用 空白组、模型组、红曲给药组小鼠最后一次灌胃 18 h 后,收集空白组、模型组、红曲给药组小鼠粪便,置于灭菌的离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存用于 DNA 提取。采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒提取各组小鼠粪便样品中微生物的总 DNA,采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,检测合格后的 DNA 样本用于 PCR 扩增。取适量 DNA 样本于离心管中,使用无菌水稀释样品至 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以稀释后的基因组 DNA 为模板,针对 16S rRNA 基因 V3-V4 区,合成带有 barcode 的特异引物。采用 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 2 种引物进行 PCR 扩增。同一样本的 PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,对目的条带使用凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物。PCR 产物使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,文库合格后,使用 HiSeq2500 PE250 进行上机测序。对空白组、模型组、红曲给药组小鼠粪便中肠道菌群在门水平上物种组成进行分析,见图 4。结果表明各组小鼠粪便中肠道菌群的优势菌群为厚壁菌门 (Firmicutes),拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和变形菌门 (Proteobacteria),3 个门的总比例 $>95\%$,其次为放线菌门 (Actinobacteria),脱铁杆菌门 (Deferribacteres) 等。各处理组菌群结构相似,但菌群组成比例不同,与空白组相比,造模后厚壁菌门/

拟杆菌门比值显著降低,而红曲给药组厚壁菌门/拟杆菌门比值却显著升高。

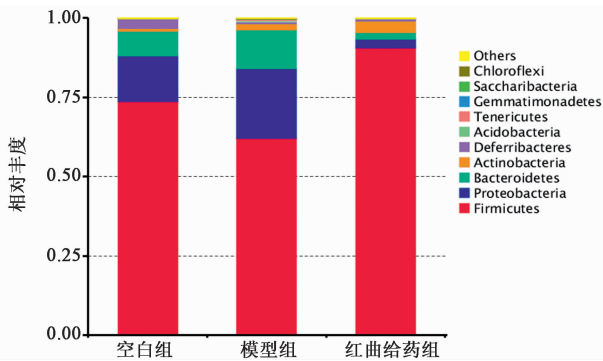


图 4 各组小鼠肠道菌群在门水平下的群落组成
Fig. 4 Relative abundances of intestinal microbes in mice from each group at level of phylum

对空白组、模型组、红曲给药组小鼠粪便中肠道菌群在属水平上物种组成进行分析,见图 5。乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)具有较强的免疫调节作用,可以减少黏膜通透性,预防肠道炎症。空白组 *Lactobacillus* 相对丰度 63.28%,造模后 *Lactobacillus* 相对丰度降低至 13.81%;给予红曲后,小鼠肠道菌群中 *Lactobacillus* 相对丰度恢复明显,达 56.12%。双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)能酸化肠道内环境,抑制腐败菌和病原菌生长,保护肠屏障,减少肉毒素进入血液^[10]。空白组 *Bifidobacterium* 相对丰度 0.31%,造模后其相对丰度降低至 0.029%;给予红曲后,小鼠肠道菌群中 *Bifidobacterium* 相对丰度有所恢复(0.76%)。大肠埃希菌-志贺菌(*Escherichia-Shigella*)是一种革兰阴性菌,某些大肠埃希氏菌对人和动物有病原型,可致婴儿和幼畜(禽)肠道外感染、严重腹泻和败血症。空白组 *Escherichia-Shigella* 相对丰度 0.34%,造模后其相对丰度升高至 11.23%;给予红曲后,小鼠肠道菌群中 *Escherichia-Shigella* 丰度明显恢复(0.71%)。

为了研究不同样品间的相似性,对样品进行聚类分析,构建样品的聚类树状图。在环境生物学中,非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)是一种较为常用的聚类分析方法。基于 unweighted unifracs 距离矩阵做 UPGMA 聚类分析,并将分析结果与各样品在门水平上的物种相对丰度整合,见图 6。结果表明空白组和红曲给药组小鼠肠道菌群结构能很好的聚为一类,而模型组小鼠肠道菌群结构与其余 2 组差距较大,说明红曲可改善脾虚食积证小鼠肠道菌群结构。

2.3 数据处理及分析 采用 SPSS 22.0 统计软件

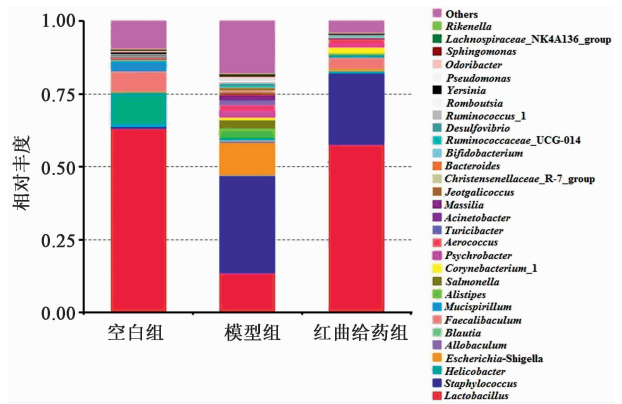


图 5 各组小鼠肠道菌群在属水平下的群落组成
Fig. 5 Relative abundances of intestinal microbes in mice from each group at level of genus

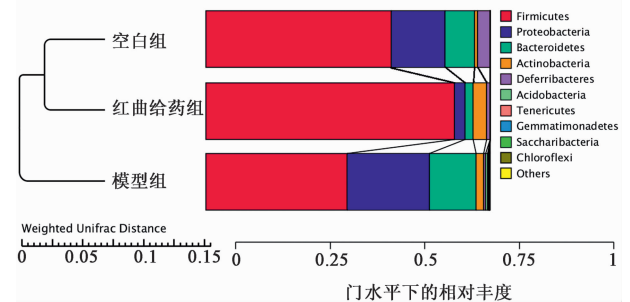


图 6 各组小鼠肠道菌群结构的 UPGMA 聚类分析
Fig. 6 UPGMA cluster analysis of intestinal microbes in mice from each group

进行数据统计,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差(One-way ANOVA)处理,组间差异以 Dunnett's *t*-test 进行比较。因为造模过程有小鼠死亡,所以在药效研究时取了其中 8 只小鼠进行统计学分析。

3 讨论

关于曲的功效,缪希雍在《本草经疏》记载“曲,其味甘温,性专消导,行脾胃滞气,散腑风冷”,阐明了健脾消食是曲类中药共有的性质。在曲类中药消食作用的研究中,部分研究认为在发酵过程中,霉菌等微生物在生长时会产生淀粉酶和蛋白酶等,这类消化酶可以起到消食的作用,并认为酶含量的多少是判断曲剂质量好坏的指标^[11]。张鹏等^[12]在调查六神曲的质量现状,完善其质量评价方法时,也将六神曲淀粉酶活力作为考察指标之一,不同产地六神曲淀粉酶活力有显著差异,提出六神曲质量评价体系亟待完善。现代研究表明,曲类中药也有增强胃肠动力的作用。王丽芳等^[13]研究神曲中青蒿等鲜干品组方及不同制法对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响,表明神曲中青蒿等鲜品组方入药可促进食积小鼠胃肠推动作用及肠道菌群调整。王

世宇等^[14]在研究半夏曲最佳发酵处方时也将半夏曲对小肠推动率作为评价的指标之一。本研究回归红曲传统功效——健脾消食,比较了红曲发酵前后对脾虚食积证小鼠行为学、体质量、进食量、胃内残留率和小肠推进率的影响,结果表明红曲发酵后可以显著恢复脾虚食积证小鼠的胃肠功能。

胃肠道是人体最大的内分泌器官,其黏膜内存在数十种内分泌细胞,可分泌多种调节胃肠道分泌、运动、吸收等自身活动的胃肠激素,主要的胃肠激素有 MTL, GAS, 胆囊收缩素(CCK), 生长抑制素(SS), VIP, 5-HT 等。其中 MTL, GAS, 5-HT 是兴奋性胃肠激素; CCK, VIP 及 SS 是抑制性胃肠激素^[15]。本研究表明红曲可增加脾虚食积证小鼠 MTL 和 5-HT 的水平,降低 VIP 水平,说明红曲调节脾虚食积证小鼠胃肠功能的机制可能与调节胃肠激素水平有关。

胃黏膜具有损伤与自我修复的动态平衡机制,保护着胃部的正常运作。一旦外界给予胃的负担过重或刺激过强,动态平衡就会被打破,造成胃黏膜受损。而小肠作为体内最大的消化和吸收器官,其黏膜结构具有良好的状态是正常生长的生理学基础以及营养物质被充分消化吸收的保证。本研究表明红曲能改善胃黏膜的轻微充血和局部腺体排列不整齐,能显著升高脾虚食积证小鼠小肠绒毛长度及增加小肠黏膜厚度,提示红曲改善小鼠胃肠组织形态也可能是其调节脾虚食积证小鼠胃肠功能的机制之一。

人体肠道栖息着数量众多的细菌,包括生理性细菌、条件致病菌、病原菌等,构成了复杂的肠道微生态系统,作为人体的特殊“器官”,肠道菌群直接参与人体的消化、营养吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节等多方面功能^[16]。中医认为人体正常生命活动是整体统一和阴阳动态平衡状态的结果。肠道微生态系统不断与宿主和外界环境交互感应,构成了人体、肠道正常菌群和外界环境物质、能量、信息、基因流动的动态平衡^[17],当肠道菌群处于协调的动态平衡被打破,就会引起菌群失调,进而导致机体出现消化系统疾病、代谢性疾病等各种病证^[18]。本研究对肠道菌群进行物种分析和 UPGMA 聚类分析,结果表明红曲可以恢复脾虚食积证小鼠肠道菌群结构,这可能也是红曲调节脾虚食积证小鼠胃肠功能的机制之一。

本研究结果表明红曲发酵后能调节脾虚食积证小鼠的胃肠功能,机制可能与调节胃肠激素水平、改善胃肠组织形态、恢复肠道菌群结构等有关。但在药效学研究中,本文只关注了红曲对脾虚食积证小

鼠胃肠动力的影响,后续会系统研究红曲对脾虚食积证小鼠胃肠消化酶活力的影响。红曲霉菌在发酵过程中会产生多种次级代谢产物,如红曲色素、他汀类成分以及 γ -氨基丁酸等,但红曲健脾消食相关的物质基础还不明确,尚需进一步的深入研究。

[参考文献]

[1] 王延年,刘晓秋.现代中药炮制[M].北京:人民军医出版社,2008:207.

[2] 《生物学史专辑》编纂组.科技史文集:生物学史专辑[M].上海:上海科学技术出版社,1980:140.

[3] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. J Antibiot (Tokyo), 1979, 32(8): 852-854.

[4] Hadeer A A, Syed A S S. Why cardiac patients discontinued lipid lowering agents: views on gastrointestinal adverse reactions and their risk factors [J]. Int J Pharm Pharm Sci, 2012, 4(S1): 374-378.

[5] Vishnuvardhan D, Beinfeld M C. Lovastatin is a potent inhibitor of cholecystokinin secretion in endocrine tumor cells in culture [J]. Peptides, 2000, 21(4): 553-557.

[6] YANG C W, Mousa S A. The effect of red yeast rice (*Monascus purpureus*) in dyslipidemia and other disorders [J]. Complement Ther Med, 2012, 20(6): 466-474.

[7] 吴昕,罗冬珍.红曲治疗颈动脉粥样硬化斑块的临床疗效观察[J].中临床临床研究,2013,5(22):7-8.

[8] 杨俊慧,何玉涛,袁艾丽,等.降脂红曲微粉对颈动脉粥样硬化患者血清 MCP-1, MMP-9 水平的影响[J].临床合理用药,2015,8(1A):77-78.

[9] 张徐雯,周驰,王晓彤,等.白术散加减对胃寒型功能性消化不良小鼠胃肠功能的影响[J].中国医学科学院学报,2015,37(4):435-439.

[10] Sanz Y, Nadal I, Sánchez E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections [J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2007, 2(2): 148-156.

[11] 黄国能.神曲等药曲中消化酶的检测与质量标准的探讨[J].中成药研究,1981(5):18-20.

[12] 张鹏,陈冰,李宝银,等.六神曲的质量调查与评价研究[J].北京中医药,2017,36(7):658-662.

[13] 王丽芳,高文远,徐鑫,等.神曲鲜干品组方对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(4):20-24.

[14] 王世宇,任振雨,傅超美,等.半夏曲发酵处方的筛选[J].华西药理学杂志,2009,24(4):367-369.

[15] 张志,李昕弦,徐柳,等.大黄煨制前后对正常大鼠胃肠功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(12):140-144.

[16] Kelly P. Nutrition, intestinal defence and the microbiome [J]. Proc Nutr Soc, 2010, 69(2): 261-268.

[17] 张北平,赵喜颖,吴艺锋.肠道微生态与中医理论相关性的研究进展[J].现代消化及介入诊疗,2011,16(4):276-277.

[18] 李艳,宋亚刚,白明,等.基于调控肠道菌群探讨中药防治脑卒中[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):228-234.

[责任编辑 刘德文]