

参苓白术散对脾虚湿困证溃疡性结肠炎大鼠结肠菌群的影响^{*}

孙 娟, 王 键[△], 胡建鹏, 李姿慧, 叶铭钢, 徐 伟

(安徽中医药大学省部共建新安医学教育部重点实验室, 安徽合肥 230038)

摘要: **目的** 观察参苓白术散对脾虚湿困证溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠菌群的影响,探讨参苓白术散治疗 UC 的作用机制。**方法** 将 40 只 Wistar 大鼠,随机分为正常对照组、脾虚湿困证 UC 模型组、参苓白术散组、阳性对照药组。采用传统中医学病因与现代医学病因相结合的方法复制 UC 模型,给药治疗后,提取结肠内容物细菌总 DNA,应用肠杆菌基因间重复共有序列基因扩增(ERIC-PCR)技术进行菌群分析。**结果** 4 组大鼠的结肠内容物菌丛存在整体差异,模型组 ERIC-PCR 指纹图谱 DNA 条带较少,存在 6 条分布较一致的主带;而其他 3 组 ERIC-PCR 指纹图谱 DNA 条带较多,且主带位置分布无统一趋势,其中参苓白术散组 ERIC-PCR 指纹图谱与正常组最为接近。**结论** UC 可能存在较单一的肠道优势菌,参苓白术散对脾虚湿困证 UC 结肠菌群的失衡具有明显的调整作用,可使肠道优势菌种类增加,恢复菌群平衡状态,从而促进损伤肠组织的恢复。

关键词: 参苓白术散;溃疡性结肠炎;脾虚湿困证;结肠菌群

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)04-0001-04

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称“慢性非特异性溃疡性结肠炎”,是一种病因不明的直肠和结肠炎性病变,临床表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重等,其病程长,病情轻重悬殊,易反复发作,治疗相当棘手。中医学在本病的治疗上独具特色,认为“脾虚湿困”为其关键病机^[1],治疗上以健脾化湿法为主,临床多选用参苓白术散加减予以治疗,均取得较好的疗效。

目前遗传易感性、肠黏膜免疫和肠道微生态环境 3 者的相互作用被认为可能参与 UC 的发病。随着微生物学的发展,研究发现 UC 的发病与肠道菌群失调、肠黏膜屏障功能缺陷、肠道通透性增高以及肠道内成分诱发的异常免疫反应等因素有关。韩捷^[2]指出结肠镜下所见肠黏膜水肿的病理改变,实际上是“脾失健运,水湿内停,内溢组织器官”的病理过程,这与现代医学的血管活性物质(如组胺等)致肠黏膜毛细血管通透性增加及肠道疾患致蛋白质吸收障碍所引起的血浆胶体渗透压降低所致的组织水肿相类似;同时现代医学解释肠黏膜溃疡是

因感染或自身免疫反应,导致肠腺隐窝中性粒细胞浸润伴有腺上皮细胞变性坏死形成脓肿,溃破后出现溃疡,这也恰巧与中医所说的“脾阳受病,不能为胃行其津液,经脉气血不能充分输布,肠黏膜得不到充养,而造成局部缺血,防御功能削弱,久之病气入侵,气血瘀滞,疮疡乃成”相吻合。可见,UC 的发病与肠道微生态环境密切相关。

在肠道微生态体系中,肠道菌群是不可缺少的组成部分。生理状态下,它们对人体具有免疫激活、生物拮抗、解毒与营养等功能,而病理状态下则成为内源性感染的根源^[3]。目前已有实验研究报道参苓白术散可调整脾虚证小鼠肠道真菌菌群微生态,使真菌总数极显著性下降($P<0.01$),酵母菌含量显著降低($P<0.05$)^[4]对脾虚小鼠具有肠道菌群调整及促进损伤肠组织恢复的作用,使肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、类杆菌、乳酸杆菌数量逐渐恢复正常,肠壁肌层厚度增加,杯状细胞数量增多,肠粘膜微绒毛排列紊乱、线粒体肿胀显著改善^[5],为进一步观察参苓白术散治疗 UC 的作用机制,笔者观察参苓白术

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目(NO: 81173172);安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(NO: KJ2011 A184);安徽省“115”产业创新团队项目;安徽中医学院青年科学研究基金项目(NO: 2013qn024);安徽省自然科学基金项目(NO: 1308085QH155)

收稿日期: 2013-07-16 修回日期: 2013-07-30

作者简介: 孙娟(1980~),女,安徽淮北人,助教,研究方向:治则治法的理论与实验研究。

[△]通信作者: 王键, E-mail: wangjian6301@163.com

散对脾虚湿困证 UC 大鼠结肠菌群的影响, 现报告如下。

1 材料

1.1 药物

参苓白术散组方: 莲子肉 9g, 薏苡仁 9g, 缩砂仁 6g, 桔梗 6g, 白扁豆 12g, 白茯苓 15g, 人参 15g, 甘草(炒) 9g, 白术 15g, 山药 15g, 陈皮 9g。由安徽中医学院门诊部提供。柳氮磺吡啶 (SASP): 批号 20101212, 上海三维制药有限公司生产, 每片 0.25 g。2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS): Sigma 公司生产。

1.2 试剂

大鼠粪便细菌微量 DNA (QIAamp DNA StoolMiniKit) 提取试剂盒: 批号 D4015-00, 由 QIAGEN 公司提供。ERIC-PCR 引物: 上游引物序列 ERIC₁: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTAC-3'; 下游引物序列 ERIC₂: 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGT-GAGCG-3', 由上海生工生物技术有限公司提供。Pfu 酶、10×Taq 缓冲液, dNTPs (2.5mmol/L): 由大连宝生物公司提供。琼脂糖: 批号 111860, 由 Promega 公司提供。50×TAE、0.5×TAE 电泳缓冲液、ddH₂O: 实验室自配。

1.3 动物

健康 Wistar 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体质量 180~250g, 由安徽医科大学动物中心提供, 许可证号: SCXK(皖)2011-002。

1.4 仪器和设备

TGL-16GB 型高速冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂; GL-88B 漩涡混合器: 其林贝尔仪器制造公司; 电子精密天平 BS224S: 德国赛多利斯集团公司; UV-754 型可见紫外分光光度计: 日本岛津公司; PCR 超净工作台: 苏净集团安泰公司; PCR 扩增仪: 德国 Biometra 公司; 水平电泳仪: Pharmacia 公司; 柯达凝胶成像分析系统 120: 上海天能公司。

2 方法

2.1 模型复制

40 只大鼠适应性饲养 1 周后, 根据文献^[6-9]进行模型的制备, 具体步骤为: 随机抽取 10 只作为正常对照组, 于正常环境中饲养, 温度 19~25℃, 相对湿度 42%~65%, 自由进食饮水, 每日给予 0.9% 氯化钠注射液 2mL 灌胃 1 次。其余 30 只大鼠单日禁食 12h (当日 20:00 至次日 8:00), 饥饿状态下灌胃 4℃ 0.9% 氯化钠注射液 (2mL/只) 1 次; 双日充足饮食 (当日 20:00 至次日 8:00), 饱食状态下灌胃猪油 (4mL/

只) 1 次, 模拟“饮食失宜 (饥饱失常、过食生冷、恣食肥甘)”; 然后将大鼠置于笼底 2cm 积水的饲养笼中喂养 8h (12:00-8:00), 模拟“久居湿地, 外湿过盛”; 同时, 大鼠被迫扒笼 (或爬笼), 无法正常休息, 缩短其睡眠时间, 打乱其生物钟, 模拟“过于劳倦, 损伤正气”。连续造模 20d, 大鼠逐渐出现饮水量减少, 体重下降或增长减慢; 精神萎靡, 嗜卧懒动, 蜷缩聚堆, 拱背、眯眼; 皮毛色泽晦暗发黄; 雄鼠阴囊松弛下垂, 小便黄, 大便软或溏, 尾部污秽, 拉尾排便试验呈阳性, 排便出现肛门红肿, 甚者脱肛等症状, 表明脾虚湿困证模型慢性形成。

于造模第 21 天, 采用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS)/乙醇法复制 UC 模型, 禁食不禁水 24h, 称重后按 0.35mL/100g 体重腹腔注射 10% 水合氯醛, 麻醉后固定大鼠, 用直径 2.0mm 长 12cm 的橡胶输液管经液体石蜡润滑后, 由大鼠肛门轻缓插入深约 8cm 处。正常对照组给予 0.9% 氯化钠注射液 0.85mL 灌肠; 一次性将 TNBS/乙醇液 (5% 的 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 与 50% 乙醇以 12:5 比例混合的复合物) 0.85mL, 轻缓注入上述 30 只脾虚湿困证大鼠距肛门 7~8cm 深的肠腔内, 再注入约 0.3mL 空气后提起大鼠尾部, 持续倒置 1min, 使造模剂充分渗入大鼠肠腔内。操作结束后, 使大鼠平躺至自然清醒, 自由饮食饮水。2~4 d 内出现黏液脓血便, 说明 UC 模型复制成功。

2.2 分组与给药

将模型复制成功的大鼠随机分为模型组、参苓白术散组、阳性对照药组, 置于同等条件下喂养。根据《药理实验方法学》^[10]“不同动物等效剂量折算系数表”计算出各组大鼠灌胃剂量。健脾化湿法组给予参苓白术散煎剂 1.2 g/(100 g·d), 阳性对照药组给予 SASP 50mg/(100g·d), 正常对照组和模型组给予 0.9% 氯化钠注射液 1 mL/(100 g·d), 连续 15 d。给药期间正常饮食。

2.3 结肠内容物 ERIC-PCR 指纹图谱分析

各组大鼠给药 15d 后, 禁食不禁水 24h, 称重, 均按 0.35mL/100g 体重腹腔注射 10% 水合氯醛, 30min 后打开腹腔, 自肛门处向上取结肠 6~8cm 处, 沿肠系膜纵轴剪开, 取结肠内容物置于无菌离心管内, 立即放置 -20℃ 保存备用。每份结肠内容物取 0.2g, 用大鼠粪便细菌微量 DNA 提取试剂盒提取结肠细菌总 DNA, 置于 -20℃ 保存。应用紫外分光光度计测定 DNA 含量。以结肠内容物总 DNA 为模

板,进行 ERIC-PCR 指纹图谱分析。PCR 反应体系:10 ×Taq 缓冲液 2.0μL, dNTPs (2.5mmol/L) 2.0μL, ERIC₁ 10pmol, ERIC₂ 10pmol, Pfu 酶 1u, DNA 模板 50ng, ddH₂O 补足 20μL。PCR 反应条件:95℃预反应 7min; 94℃ 10s、92℃ 40s、49℃ 8s、52℃ 1min, 74℃ 10s、72℃ 5min 变性、退火、延伸 35 个循环; 72℃复性 10min。取 PCR 反应产物 10μL 于 1%琼脂糖凝胶中电泳,应用紫外凝胶照相系统照相并记录实验结果,重复 3 次。

2.4 结肠黏膜组织病理形态学检查

沿肠系膜纵轴剪开肠腔后,用 0.9%氯化钠注射液洗去残余肠内容物,肉眼观察大鼠结肠黏膜组织损伤情况,取病变结肠组织 0.5cm 左右,10%甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色,普通光学显微镜下观察。

3 结果

3.1 各组大鼠结肠黏膜病理变化比较

肉眼观:正常对照组大鼠结肠黏膜完整,皱襞纹理清晰,未见溃疡;模型组大鼠结肠黏膜弥漫性充血水肿,血管纹理模糊,浅溃疡形成;参苓白术散组与阳性对照药组大鼠结肠黏膜充血水肿明显减轻,炎性渗出物基本消失,溃疡缩小甚至愈合。

镜下观:正常对照组大鼠结肠黏膜完整,上皮细胞排列整齐,无组织损伤及炎症细胞浸润,固有层内腺体排列规则,结构清晰,杯状细胞丰富;模型组大鼠结肠黏膜大片缺损,腺体被破坏或消失,杯状细胞减少,黏膜固有层有大量中性粒细胞、浆细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润;参苓白术散组大鼠结肠黏膜周围上皮增生修复,部分覆盖,缺损区域不明显,其基本形态与正常对照组相近似,杯状细胞丰富;阳性对照药组结肠黏膜缺损较表浅,溃疡周围上皮修复明显,腺体增生活跃,黏膜及黏膜浅层可见少量炎性细胞浸润。

3.2 各组大鼠结肠内容物 ERIC-PCR 产物分析及比较

对各组大鼠结肠内容物都进行 3 次 ERIC-PCR 指纹图谱分析,得到清晰、稳定、可重复的图谱。模型组、参苓白术散组、阳性对照药组和正常对照组的结肠菌丛存在整体差异,模型组 ERIC-PCR 指纹图谱 DNA 条带较少,正常对照组、阳性对照药组和健脾化湿法组指纹图谱 DNA 条带多。其中,模型组中有 6 个样本主带分布非常一致,其他 3 组主带位置无统一趋势,其中以参苓白术散法组 ERIC-PCR

指纹图谱与正常组最为接近。见图 1。

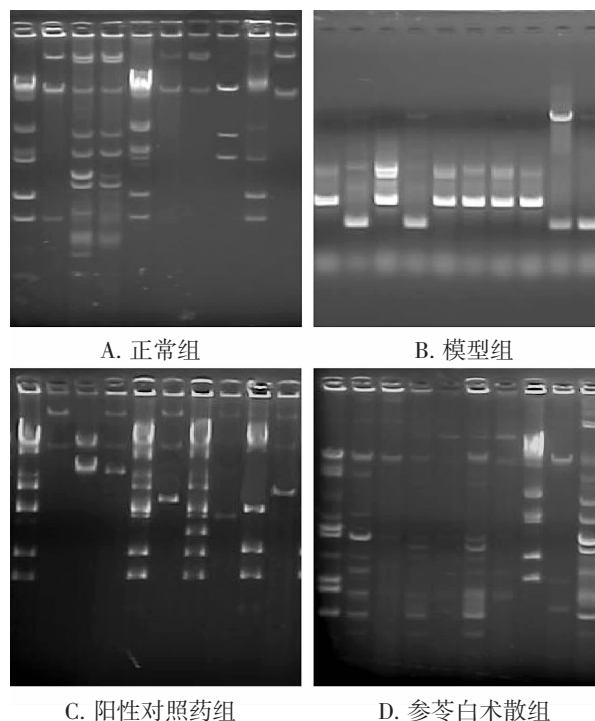


图 1 肠道菌群 DNA 指纹图谱

4 讨论

以往对 UC 肠道细菌的研究主要是通过传统的细菌培养方法,费时费力,易受操作的影响,且绝大多数肠道未知菌无法检出,不能完全准确地反映菌群的结构情况。本研究采用的 ERIC-PCR 指纹图谱分析方法,是利用 ERIC 核心的高度保守序列设计引物进行 PCR,ERIC-PCR 扩增的产物大小在 50~3 000bp 之间,每种菌株均存在数目不等的各自独特的电泳带型,各特异性扩增的主带型能重复稳定出现,可以区别不同种类的细菌和同一种类细菌中不同的菌株,比较全面的反映肠道菌群的整体变化状况。

张静等^[11]通过 ERIC-PCR 技术建立 UC 和其它肠道疾病的肠道细菌 DNA 指纹图谱,以分析其肠道菌群结构特征的整体差异。结果显示:UC 组指纹图谱电泳 DNA 条带较少,正常对照组和急性胃肠炎组指纹图谱电泳 DNA 条带多;UC 组中有 18 个样本主带分布非常一致,正常对照组主带位置无统一趋势。推测 UC 发病可能与特定的肠道细菌感染有关。王志红等^[12]的研究结果表明:UC 患者样本 DNA 条带明显少于其他肠道疾病患者和正常对照组,提示 UC 和正常对照组的肠道菌群存在整体差异,此结果虽然仍证实了 UC 患者可能存在相对单

一的肠道优势细菌,但同时也反映出 UC 患者个体可能存在不同的主带菌群,即存在个体差异性。

本实验研究结果发现:脾虚湿困证 UC 大鼠结肠菌群 ERIC-PCR 指纹图谱条带与正常组相比较发生改变,肠道优势菌群种类明显减少,且有 6 个分布较一致的主带,表明 UC 的发病可能与存在较单一的肠道优势细菌有关,也说明造模后肠道微生物平衡遭到破坏,即肠道“菌群失调”,与以上文献报道基本一致^[11-12]。而参苓白术散组和阳性对照组 ERIC-PCR 指纹图谱 DNA 条带较模型组增多,表明参苓白术散和 SASP 对脾虚湿困证溃疡性结肠炎大鼠的结肠菌群失调均有明显的调节和改善作用。其中尤以参苓白术散组 ERIC-PCR 指纹图谱与正常组最为接近,表明参苓白术散可有效调节脾虚湿困证 UC 大鼠的结肠菌群平衡,从而改善机体的免疫功能,减轻炎症反应,促进溃疡的愈合。

为了更深入地探究参苓白术散调节、恢复脾虚湿困证 UC 大鼠的结肠菌群平衡的作用机制,下一步我们将基于 16S rRNA 的分子生物学方法,根据不同细菌的 16S rRNA 序列设计特异性引物,应用荧光实时定量 PCR 法对四组大鼠结肠菌群中的双歧杆菌属、乳酸杆菌属、肠球菌属和大肠杆菌属这几种优势菌进行定量分析,为临床治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] 关晓辉. 中医药综合治疗溃疡性结肠炎效果分析[J]. 中国医药导报,2010,7:97-98.

- [2] 韩捷. 溃疡性结肠炎病因及中医研究进展 [J]. 中医药信息,2002,19(5):4-5.
- [3] 杨景云. 医学微生物学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1997:1-9.
- [4] 丁维俊,周邦靖,冯立秀,等. 脾虚造模及参苓白术散的真菌菌群调整功能 [J]. 成都中医药大学学报,2004,27(1):24.
- [5] 杨旭东,张杰,王崴. 参苓白术散对脾虚小鼠肠保护作用及其机制的研究[J]. 牡丹江医学院学报,2009,30(5):9-11.
- [6] 黄秀深,沈涛,刘伟,等. 平胃散对湿困脾胃证模型大鼠部分免疫功能的影响[J]. 中医杂志,2007,48(8):730-732.
- [7] 景明,陈晖,刘喜平,等. 藏药湿生扁蕾抗大鼠实验性溃疡性结肠炎有效部位筛选研究 [J]. 中药材,2011,34(12):1934-1936.
- [8] 赖象权,何本求,肖成,等. 侗药五味止泻汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜电镜超微结构的影响[J]. 贵阳中医学院学报,2013,35(1):9-12.
- [9] 李姿慧,王键,蔡荣林,等. 脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立与评价 [J]. 中西医结合学报,2012,10(8):918-924.
- [10] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:203.
- [11] 张静,韩英,王继恒,等. UC 和其它肠道疾病肠道菌丛结构的 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2007,16(5):430-433.
- [12] 王志红,韩英,王继恒,等. 几种肠道疾病患者肠道菌群结构特征的 DNA 指纹图谱分析 [J]. 解放军医学杂志,2009,34(11):1326-1327.

(编辑:迟越)

The Influence of Shenlingbaizhusan on Intestinal Flora of Rats Modeled by Ulcerative Colitis of Spleen Deficiency and Dampness Type

SUN Juan, WANG Jian, HU Jian-peng, LI Zi-hui, YE Ming-gang, XU Wei

(Jointly Key Laboratory of Xin'an Medicine of the Ministry of Education in Anhui of Chinese Medicine, Hefei Anhui 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the influence of Shenlingbaizhusan on intestinal flora of rats modeled by ulcerative colitis (UC) of spleen deficiency and dampness type in order to explore the therapeutic mechanism of Shenlingbaizhusan to UC. **Methods** 40 healthy Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, Shenlingbaizhusan treated group, and sulfasalazine (SASP) group. The damp-heat syndrome of stomach and intestine were copied by multivariate methods which simulated the etiology of Traditional Chinese Medicine. The treatment had been given to the appropriate model. Total bacterial DNA was extracted from the contents of the colon. Flora was analyzed by ERIC-PCR technology. **Results** There were the differences of the intestinal flora in four groups according to the analysis. The DNA bands of ERIC-PCR fingerprinting electrophoresis were little in model group. The DNA bands of ERIC-PCR fingerprinting electrophoresis were numerous in other three groups. The trend of main-belt location of Shenlingbaizhusan was close to normal group. **Conclusion** There might be an advantage intestinal bacterium. Shenlingbaizhusan played an important role in adjusting microflora imbalance of UC of spleen deficiency and dampness type, Increasing dominant strain of intestinal, restoring the flora balance status in order to promote the recovery of damaged intestinal tissue.

KEY WORDS: Shenlingbaizhusan; ulcerative colitis; spleen deficiency and dampness type; colonic microflora