

颗粒剂四君子膏对脾气虚模型大鼠心肌的保护作用*

孙豪娴, 孙贵香[△], 肖 丹, 邓琳蓉, 张 婷, 厉佳俊

(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

摘要: 目的 探讨颗粒剂四君子膏对脾气虚模型大鼠心肌结构、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的影响。方法 SD 大鼠 60 只,随机分为空白组、模型组、四君子汤组、四君子膏低、中、高剂量组,每组 10 只。采用饮食失节+耗气破气+劳倦过度的方法复合因素造模,除正常组外其余组大鼠隔日进食,每日上午灌服大黄溶液,下午强迫负重游泳至力竭;边造模边给药,每日下午分别给大鼠灌喂等量生理盐水、四君子汤(2.95 g/kg)及四君子膏低、中、高剂量(1.8、3.6、5.4 g/kg)溶液,连续给药 28 d。实验第 29 天取材,高倍光镜下观察心肌组织结构变化,心肌匀浆测定 SOD、MDA 水平。结果 空白组大鼠心肌组织纤维排列整齐有序;模型组大鼠心肌组织纤维排列紊乱,水肿严重;给药组大鼠心肌结构损伤均较模型组轻。与空白组相比,模型组大鼠心肌组织 SOD 活力显著下降,MDA 含量显著升高($P<0.05$)。给药后各组大鼠相较于模型组心肌 SOD 活力均有所升高,MDA 含量均降低($P<0.05$),其中四君子汤与四君子膏低剂量溶液作用效果相当,四君子膏高剂量溶液作用效果最好。结论 颗粒剂四君子膏具有益气健脾之功效,能减轻心肌结构损伤,提高组织的 SOD 活力,降低 MDA 含量,保护心肌。颗粒剂膏的疗效是值得肯定的,颗粒剂可运用于膏剂的制作。

关键词: 四君子膏;脾气虚模型;心肌保护;颗粒剂

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)05-007-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.05.002

The Protective Effect of Sijunzi Ointment on Myocardium of Spleen Qi Deficiency Rat Model

SUN Haoxian, SUN Guixiang, XIAO Dan, DENG Linrong, ZHANG Ting, LI Jiajun

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effects of Sijunzi Ointment Granule on myocardium, SOD, MDA in spleen qi deficiency rat model. **Methods** 60 SD rats were randomly divided into blank group, model group, Sijunzi decoction group, Sijunzi ointment low, medium and high dose groups, with 10 rats in each group. The method of compound factor modeling was adopted, which is, losing diet, exhausting gas and exhaustion working. In the blank group, there is no model making, normal diet and normal saline intervention, others were fed every other day. Model group and drug groups were given rhubarb solution in the morning and forced to swim until exhaustion in the afternoon. Then normal saline intervention in model group, Sijunzi Ointment were administered by gavage at the concentrations of 1.8, 3.6, 5.4 g/kg, and Sijunzi Decoction (2.95 g/kg), respectively. On the 29 d, samples were collected, and the changes of myocardial tissue structure were observed, and SOD and MDA were determined in myocardial homogenate. **Results** In the blank group, the myocardial tissue fibers were arranged neatly and orderly, and the model group were disordered with heavy edema, while the myocardial structural damage were relieved in the drug administration groups. Compared with blank group, the SOD activity decreased and MDA increased significantly in model group ($P<0.05$). After administration, SOD activity was increased and MDA was decreased in drug groups ($P<0.05$). Both the Sijunzi Decoction and Ointment low dose group have the same effect, and

收稿日期: 2019-09-02

* 基金项目: 第四批全国中医(临床、基础)优秀人才研修项目(国中医药人教发[2017]24 号);华润三九集团横向合作项目(5001/0153);2018 年湖南省研究生科研创新项目(2018CX27)

第一作者简介: 孙豪娴(1995-),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病。

[△]通信作者: 孙贵香, E-mail: 84663423@qq.com

Sijunzi Ointment at high dose has the best effect. **Conclusion** Sijunzi Ointment Granule could improve qi and strengthen spleen, alleviate the damage of myocardial structure, increase SOD activity and decrease MDA, and protect the myocardium. The curative effect of granulated ointment is worthy and granules can be used in the preparation of ointments.

KEY WORDS: Sijunzi Ointment; spleen qi deficiency rat model; myocardial preservation; granules

颗粒膏是以新型配方颗粒为原材料,运用现代科技工艺制作而成。不仅疗疾以缓,功效滋补,而且携带方便,口感较好。颗粒膏的产生不仅解决了传统膏剂制作繁琐的问题,还节约了人力、物力资源。然而关于颗粒膏的功效一直是患者心中的困惑,且目前研究报道较少。本实验通过复制脾气虚模型大鼠来研究颗粒剂四君子膏对大鼠心肌结构、SOD、MDA 的影响,并对四君子膏于大鼠心肌的保护作用进行探讨。旨在以四君子膏为参考,对颗粒剂运用于膏剂制作上的功效做出评价,为临床上颗粒剂膏的运用提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物、药物、试剂与仪器 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量 180 ± 20 g,购自湖南中医药大学,合格证号:SYXK(湘)2013-0005。在湖南中医药大学实验动物中心进行实验,实验室内温度控制在 $18 \sim 22$ °C,相对湿度维持在 40%~70%。

颗粒剂四君子膏溶液:颗粒剂四君子膏由人参、茯苓、白术、炙甘草等组成,由深圳华润三九医药有限公司提供配方颗粒,以《太平惠民和剂局方》为依据,四种药物以 3:3:3:2 的比例溶解浓缩,加入炼蜜收膏而成。再参照《人与动物用药量换算表》70 kg 成人的体表面积是 200 g 大鼠的 56 倍,按照正常成人一日服用膏滋 40 g 计算,3 组大鼠服用的膏剂量分别为 1.8、3.6、5.4 g/kg,将膏剂加蒸馏水分别制成含膏量为 180、360、540 g/L 的溶液,并放入冰箱储存备用。四君子汤溶液:同颗粒剂四君子膏药物组成比例,按书中原方剂量,采用传统中药煎煮方法煎煮至含生药量为 295 g/L 的溶液保存。大黄制剂液:由大黄煎煮浓缩至生药浓度为 54 g/L 而成。实验中所用的中药饮片亦由深圳华润三九医药有限公司提供。大鼠超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒购自长沙鼎国生物技术有限公司(货号:INS20180187)。

JE1002 电子天平:上海浦春计量仪器有限公司;WMY-01 数字温度计:上海医用仪表厂;低温高速离心机:美国 sigma 公司;EL340i 型全自动酶标仪:

Molecular Devices 公司。

1.2 动物模型复制 参考文献^[1-4],采用饮食失节+耗气破气+劳倦过度的方法建立脾气虚动物模型。实验过程中采取隔日进食的方法控制大鼠进食量;每日上午按 10 mL/kg 灌服大黄制剂;在水温为 (22 ± 2) °C 的室内游泳槽中,每天下午强迫负重(按大鼠自身体重的 10%计)游泳至力竭为止——大鼠鼻尖没入水面大于 10 s。

1.3 动物分组与给药 SD 大鼠 60 只,适应性喂养 3 d 后依次编号,采用国际上通用的编号表计,随机分为正常组、模型组、四君子汤组、四君子膏低、中、高剂量组。正常组自由饮食,除同时灌服等量生理盐水外不做特殊处理;实验组在隔日进食、灌胃大黄制剂、负重游泳的基础上,于每日下午各组分别灌服 2 mL 等量生理盐水、四君子汤(2.95 g/kg)及颗粒剂四君子膏低、中、高剂量(1.8、3.6、5.4 g/kg)溶液,连续给药 28 d。

1.4 指标检测 大鼠腹主动脉取血后开胸,夹取心脏,立即用低温生理盐水洗去残留血液,滤纸吸干后于心尖处切取约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的心肌组织,用多聚甲醛溶液固定,经酒精脱水处理后石蜡包埋,制备显微镜切片,常规 HE 染色,光学显微镜观察心肌组织结构变化并摄影。剩余心肌组织准确称重后低温离心,制成心肌匀浆液,采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,均严格按照试剂盒说明书操作。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析,数据资料以“均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示。运用单因素方差分析法进行组间比较,采用 LSD 法和 Dunnett 法进行两两比较,取 $\alpha=0.05$ 为检验水准。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 正常组大鼠活动灵敏,毛发有光泽,肛温正常,体重逐日增加;模型组大鼠造模 1 周后出现稀便,便次增多,继而出现体形瘦弱,蜷缩不好动,反应迟钝,毛发蓬松无光泽,体重、肛温均明显低

于正常组($P<0.05$),符合脾气虚证的症状,参照田葺等^[9]制订的脾气虚证模型大鼠的评分标准:倦缩扎堆 1 分;眯眼弓背 1 分;食量减少 1 分;体质量减轻 1 分;便形质软 1 分;便形溏稀 2 分;肛温下降 2 分;游泳耐力下降 1 分。模型组大鼠得分为 7 分,大于 5 分,提示造模成功;四君子汤组、四君子膏低、中、高剂量组大鼠症状较模型组均有所减轻($P<0.05$),四君子膏组呈现出剂量趋势;四君子汤组大鼠肛温及体重变化与四君子膏中、高组存在差异($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠肛温、体重情况($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	肛温 /℃	体质量 /g
正常组	—	38.00±0.19	257.96±3.18
模型组	—	36.40±0.23*	174.42±5.85*
四君子汤组	2.95	37.30±0.16*△	214.54±3.78*△
四君子膏低剂量组	1.8	37.40±0.12*△	215.07±2.36*△
四君子膏中剂量组	3.6	37.68±0.08*△▲	235.98±4.74*△▲
四君子膏高剂量组	5.4	37.92±0.24△▲	254.47±6.01△▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$;与四君子汤组比较,▲ $P<0.05$

2.2 各组大鼠心肌组织 SOD、MDA 水平 相较于正常组,模型组大鼠心肌组织 SOD 活力水平显著降低,MDA 含量显著升高($P<0.05$);4 组给药组较模型组大鼠心肌 SOD 活力均升高,心肌 MDA 含量均降低($P<0.05$),并以四君子膏高剂量组最明显;四君子膏中、高剂量组对提高大鼠心肌组织的 SOD 活力、降低 MDA 含量的作用强于四君子汤($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠心肌组织 SOD、MDA 水平($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	SOD (U·mg ⁻¹)	MDA (nmol·mg ⁻¹)
正常组	—	69.57±2.20	0.79±0.11
模型组	—	41.17±1.50*	1.42±0.06*
四君子汤组	2.95	51.27±5.80*△	1.19±0.13*△
四君子膏低剂量组	1.8	51.42±4.59*△	1.07±0.07*△
四君子膏中剂量组	3.6	54.32±2.20*△▲	1.03±0.07*△▲
四君子膏高剂量组	5.4	65.53±3.15△▲	0.85±0.10△▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$;与四君子汤组比较,▲ $P<0.05$

2.3 各组大鼠心肌结构比较 在 400 倍光镜下观察各组大鼠心肌组织 HE 切片,其中正常组大鼠心肌组织纤维排列整齐有序,心肌细胞大小、形态正常,染色均匀,周围未见炎性细胞浸润;模型组大鼠心肌组织纤维排列紊乱,部分组织正常结构消失,心肌细胞肥大、坏死,细胞间质增宽,间质细胞增多,水肿严重,周围可见炎性细胞浸润;给药组大鼠心肌组织结构损伤均较模型组轻,其中四君子汤组及四君子膏低剂量组心肌组织间质增宽,存在轻度水肿、排列紊乱;四君子膏中剂量组心肌组织染色均匀,排列较整齐,存在轻度水肿;四君子膏高剂量组心肌组织与正常组相近,见图 1。

3 讨论

3.1 脾气虚证大鼠模型的建立和评价 动物造模的成功与否是决定实验的关键,在近几十年的研究过程中,脾气虚证动物模型的建立从单因素造模的方法发展到现在普遍的复合因素造模的方法^[6]。本实验采用饮食失节、耗气破气结合劳倦过度的复合因素造模。脾胃为水谷之海,后天之本,脾胃功能的正常有赖于饮食规律节制,饮食失节,饥饱失常,则脾胃损伤。大黄味苦性寒,具有泻下攻积,清热泻火之效,而《本草经疏》云:“脾虚忌下、降泄、破气”,采用灌服大黄制剂液耗气破气后,大鼠可出现明显脾气虚症状^[7]。张景岳云:“脾胃之伤于外者,惟劳倦最能伤脾”,脾胃为气血生化之源,而劳倦易散气耗气,因此采取力竭游泳的方法使大鼠劳倦过度,可以较好建立脾气虚证的动物模型^[8]。实验证明,采用上述 3 种因素联合进行造模后,大鼠出现肛温下降、体重减轻、饮食量减少、大便偏稀、蜷缩畏寒等症状,符合脾气虚证的表现。四君子汤出自《太平惠民和剂局方》具有益气健脾的功效,是治疗脾气虚证的基础方^[9]。本实验结果表明,大鼠灌服四君子汤后一般情况较模型组大鼠好,脾气虚症状得以改善,有是证用是方,根据“方证对应”的逻辑理论^[10-11],说明所造模型为脾气虚证模型。

3.2 四君子膏对脾气虚模型大鼠心肌组织结构及 SOD、MDA 的影响 心肌组织结构的改变可以很直观的反映心肌细胞的损伤程度,有学者发现脾气虚大鼠心肌细胞存在不同程度的坏死^[12]。SOD 是生物体内存在的一种抗氧化酶,具有清除自由基,防止自由基损伤的作用,有研究表明 SOD 可以减轻组织的氧化

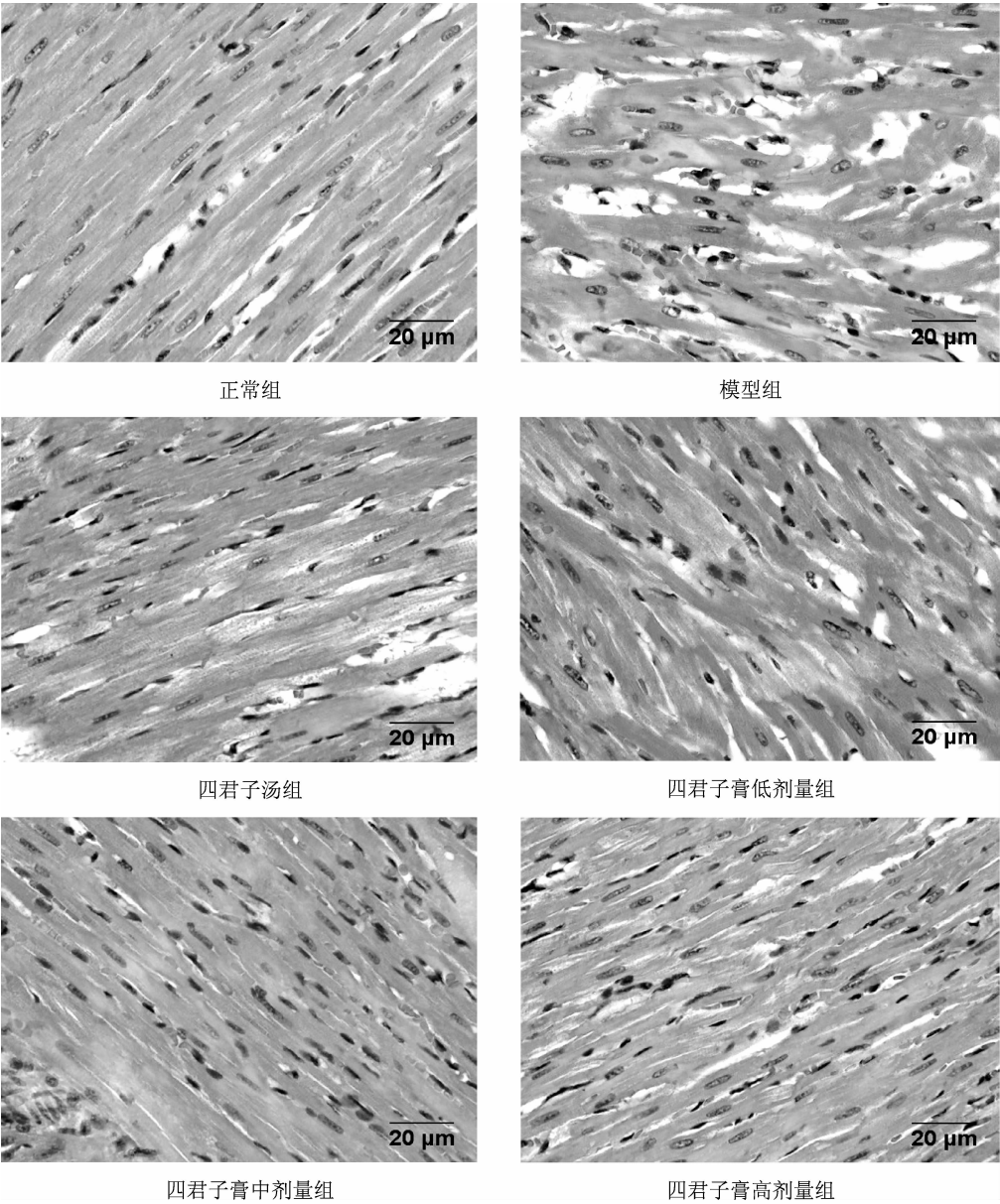


图 1 各组大鼠心肌组织(HE 400×)

应激损伤,保护心肌缺血再灌注损伤^[13]。MDA 是体内脂质过氧化作用的代谢产物,其含量的多少可以反映脂质过氧化的程度^[14]。本实验研究结果显示,模型组大鼠心肌损伤明显,心肌组织 SOD 活力水平显著降低,MDA 含量显著升高,说明大鼠经脾气虚造模后清除自由基能力减弱,心肌组织产生较多氧自由基受到损伤。经四君子制剂治疗后各组大鼠情况均有所改善,其中四君子膏的效果在低浓度时与四君子汤相同,在中、高浓度时优于四君子汤,在高浓度时效果最好,说明四君子膏的疗效值得肯定,颗粒剂四君子膏可以提高脾气虚证大鼠心肌组织 SOD 活力,降低 MDA 含量,增强大鼠心肌组织抗氧化能力及自由基

清除能力,减轻脾气虚证大鼠心肌组织损伤。

3.3 探讨四君子膏对脾气虚模型大鼠心肌的保护作用 心者,君主之官,神明出焉;脾胃者,仓廪之官,五味出焉。《内经》书中载:“五脏相通,移皆有次”,心与脾之间存在着密切联系,后世医家对其进行了总结与延展,认为二者的关系主要体现在:母子相依:在五行上心属火,脾属土,二脏存在着母子相生、母子互病的关系;气血互济:“食气入胃,浊气归心,淫精于脉”《素问·经脉别论》),心主血脉,脾胃为气血生化之源,心与脾在气血上存在互济的关系;经脉相贯:“脾足太阴之脉也……其支者,复从胃,别上膈,注心中”,心脾二脏通过经脉相贯,联系互通;病理互制:基于心脾二脏间

上述关系的特殊性,因此在病理上相互影响^[15]。

四君子汤是治疗脾气虚证的一首基础方,现代药理学研究表明,方中的有效成分主要为多糖、皂苷、黄酮及挥发油类物质^[16],具有促进消化吸收、增强机体免疫、促进内分泌腺功能、延缓衰老等作用^[17-19]。颗粒剂四君子膏则是以四君子汤为依据,由配方颗粒药材以最新工艺熬制而成,既保留了四君子汤健脾益气之功,又具备了膏剂滋补保健之效^[20-21]。本实验研究发现,脾气虚证大鼠在出现脾气虚症状的同时,其心肌组织亦存在较明显损伤。而四君子膏可以通过提高心肌组织 SOD 活力,降低 MDA 含量,减少心肌损伤,从而达到对心肌组织的保护作用。《脾胃论》载“内伤脾胃,百病由生”,脾病及心,子病及母。实验结果从另一方面说明了心脾二脏之间的关系性,同时为临床“从脾论治”心系疾病提供了理论依据。

综上所述,采用饮食失节+耗气破气+劳倦过度复合因素的方法可以建立良好稳定的脾气虚大鼠模型。基于心脾二脏之间的生理、病理联系,脾气虚证模型大鼠心肌细胞存在损伤,心肌组织中的 SOD 活力水平下降,MDA 含量升高。四君子制剂可以保护脾气虚证大鼠的心肌组织结构,其中颗粒剂四君子膏的疗效值得肯定,并在一定浓度上优于四君子汤。临床上颗粒剂不仅可以运用于汤剂,亦可运用于膏剂的制作。

参考文献:

- [1] 曾梅艳,陈雪莲,宋厚盼,等. 脾气虚证动物模型造模方法与模型评价的研究概述 [J]. 湖南中医药大学学报,2019,39(02):284-289.
- [2] 罗良,陈嘉辉,王园园,等. 脾气虚证模型大鼠尿液的 ¹H-NMR 代谢组学研究 [J]. 中国药理学通报,2017,33(10):1363-1370.
- [3] 成映霞,段云燕,段永强,等. 脾气虚大鼠骨骼肌组织钙调蛋白信号通路中 CaM 及 CaM II 基因表达变化[J]. 中国老年学杂志,2015,35(13):3489-3492.
- [4] 张彩云,肖满珊,廖双叶,等. 实验性大鼠脾气虚证模型的建立及指标检测[J]. 广东药学院学报,2015,31(6):808-810.
- [5] 田草,巩子汉,杨晓轶,等. 四君子汤对脾气虚证大鼠脑肠 CaM/CaMKII 干预效应研究 [J]. 中国中药杂志,2015,40(20):4075-4079.
- [6] 吴天石,张会永,张哲,等. 脾虚证动物模型造模方法述评 [J]. 中医杂志,2015,56(11):978-983.
- [7] 何秀丽,王非,王敏,等. 从“脾不主时”理论出发用“四君子汤”治疗脾虚动物模型的实验研究 [J]. 吉林中医药,2017,37(8):814-817.
- [8] 李锦灵,梁一彪,梁丽萍,等. 不同大鼠脾气虚证模型对血常规指标的影响 [J]. 广东药科大学学报,2017,33(2):217-220.
- [9] 陶功勇. 四君子汤在中医内科疾病脾胃气虚证中的效果 [J]. 临床医药文献电子杂志,2019,6(23):166-167.
- [10] 卢林竹,胡志希,李琳,等. “以方测证”法在动物模型研究中的运用 [J]. 湖南中医药大学学报,2017,37(5):570-573.
- [11] 乐智卿,陶平,占雪平,等. “以药测证”应用于动脉粥样硬化证候模型研究的可行性分析及存在问题 [C]//第二届江西省科协学术年会第三十六分会场暨江西省中医药学会 2012 年学术年会论文集. 南昌:江西省科协、江西省中医药学会,2012:4.
- [12] 姜晓琳,张立德. 脾气虚证模型大鼠中 BNP 介导的 cAMP-PKA 信号通路对 bFGF 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(2):251-255.
- [13] DU X J, HU X R, WEI J. Postconditioning with rosuvastatin reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein expression [J]. Exp Ther Med,2014,7(1):117-120.
- [14] 韩丽,赵百孝,刘铜华,等. 不同浓度艾烟干预对大鼠肺脏及血清 SOD、MDA 表达的影响[J]. 中国针灸,2015,35(7):687-690.
- [15] 田苗,陈智慧,张哲,等. 基于心脾相关理论指导临床“从脾论治”心系疾病的现状 [J]. 中国中医急症,2017,26(7):1191-1193.
- [16] WANG Y Y, HE S, CHENG X C, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting of Traditional Chinese Formula SiJunZiTang[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis,2013,80:24-33.
- [17] 吕苑. 四君子汤的药理研究和临床应用 [J]. 中医研究,2012,25(1):76-79.
- [18] 黄佩,宋洋. 四君子汤药理作用和质量控制研究[J]. 辽宁中医杂志,2014,41(7):1395-1397.
- [19] 梁华,王燕,李奇玮,等. 四君子汤补脾益气的主要有效成分与系统生物学刍议 [J]. 中医药学报,2017,45(6):96-99.
- [20] 朱佳,吴龙传. 徐景藩膏方经验谈 [J]. 江苏中医药,2012,44(3):8-9.
- [21] 申力,吴瑾瑾,易会助,等. 多指标正交试验法优选四君子汤煎膏剂的提取工艺 [J]. 浙江中医杂志,2014,49(11):852-854.