

· 实验研究 ·

微生物发酵西素方对脾虚证小鼠的影响[※]

官清华¹ 黄君阳² 陈炳焜¹ 连莲香² 蔡韶芳¹ 饶线明^{1▲}

摘要 目的:探讨通过新型微生物发酵配制的西素方对脾虚证小鼠胃肠功能与免疫功能的影响。方法:将 80 只小鼠随机分为空白对照组、模型组、发酵西素方低剂量组和发酵西素方高剂量组,每组各 20 只,以复合造模法制备脾虚小鼠模型,造模成功后,发酵西素方高、低剂量组分别给予不同浓度的西素方溶液,观察各组小鼠体重和体征变化,测定各组小鼠的消化道排空速率、胸腺指数和脾脏指数、血清胃动素等指标。结果:与空白对照组比较,模型组小鼠的体重降低,消化道排空速率、胃动素水平升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,发酵西素方高、低剂量组小鼠治疗后体重增加,发酵西素方高剂量组小鼠的消化道排空速率、胃动素水平降低,胸腺指数及脾脏指数升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:新型微生物发酵西素方对脾虚小鼠的胃肠功能和免疫功能有较好的调节作用。

关键词 发酵西素方;脾虚证;小鼠;胃肠功能;免疫功能

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)约占我国脾胃病门诊量的 50%^[1],西医治疗以抑酸、促进胃动力、抗焦虑抑郁等为主^[2],但疗效不甚理想,而中医从“脾虚”辨证治疗 FD 具有确切作用^[3]。相关研究表明,现代微生物发酵中药具有提高中药活性成分利用率、增强中药药效、降低中药不良反应、节省药材资源、保护生态环境等优点^[4],同时也能达到标准质控和开展规模生产,故笔者将多年临床实践用于 FD 治疗的西素方,通过新型微生物发酵配制,对脾虚证小鼠胃肠功能与免疫功能进行相应实验研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 ICR 小鼠 80 只,体质量 18 ~ 22 g,雌雄各半,由闽侯县上街行难实验动物工作室提供。动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。分笼饲养于室温 20 ~ 26 °C 的环境,经 3 d 过渡喂养。

1.2 发酵方法 发酵西素方(党参 10 g,茯苓 15 g,淮山 30 g,炒白术 10 g,谷芽 6 g,黄芪 10 g,薏苡仁 30 g,芡实 30 g,扁豆 30 g,马蹄金 30 g,菜豆壳 30 g,

陈皮 10 g,木香 10 g,炙甘草 3 g)按药材总质量与清水 1:5 的比例,用夹层罐通蒸汽加热,待温度达 95 °C 开始计时,保持微沸 1 h,期间控制温度在 95 °C 以上,煎煮 60 min,过滤药液,并进行酶解和灭酶灭菌处理,按 10% 接种量接种活化种子液(含 5% 植物乳杆菌活化种子液、5% 嗜酸乳杆菌活化种子液),于 40 °C 条件下发酵 3 d,再将中药发酵液置于 15 ~ 20 °C 条件下后发酵 2 d,离心过滤和超滤处理,并进行低温真空浓缩处理。

1.3 主要试剂与仪器 活性炭粉;阿拉伯树胶;小鼠胃动素检测试剂盒;酶标测定仪(ThermoFisher);高速离心机;灌胃针。

1.4 动物分组、造模及给药 将 80 只 ICR 小鼠按体重和性别随机分为 4 组:空白对照组、模型组、发酵西素方低剂量组和发酵西素方高剂量组。空白对照组常规饲养,自由饮食饮水。其余各组采用饮食不节加劳倦过度的复合造模法制备脾虚小鼠模型,即第 1 d 至第 12 d,单日禁食不禁水,不限量喂食甘蓝,游泳至耐力极限(即指小鼠口鼻部首次浸入水中);双日根据小鼠体重按 0.02 mL/g 喂食猪油。模型小鼠出现便溏(严重者脱肛)、皮毛枯槁、拱背纳呆、体重减轻、眯眼等症状即表示造模成功。

造模成功后,从第 13 d 开始,空白对照组和模型组予蒸馏水灌胃。发酵西素方低剂量组给予低浓度西素方溶液(浓度 22.32 g/kg,为成人单位公斤体重的 1 倍量),发酵西素方高剂量组给予高浓度西素方溶液

※ 基金项目 2018 年厦门市医疗卫生项目(指导性项目)(No.3502Z20189067)

▲ 通讯作者 饶线明,男,主任医师,教授。主要从事心脑血管及内分泌代谢疾病的中西医结合临床研究。E-mail:raoxianming2006@126.com

• 作者单位 1. 厦门医学院附属第二医院(福建 厦门 361021); 2. 厦门元之道生物科技有限公司(福建 厦门 361021)

(浓度 59.81 g/kg, 为成人单位公斤体重的 2.68 倍量), 每日早晚各灌胃给药 1 次, 连续给药 7 d。灌胃量按小鼠体重 0.3 mL/10 g 给药。

1.5 观察指标

1.5.1 小鼠一般情况 记录小鼠体重、体征变化, 包括毛色、有无拱背、运动状况、饮食状况、大便性状、有无眯眼、有无脱肛等。

1.5.2 消化道排空速率的测定 第 7 d 灌服给药后 20:00 起禁食不禁水 12 h, 第 8 d 早上 8:00 每只小鼠根据体重按 0.02 mL/g 灌服 5% 活性炭阿拉伯胶混悬液, 30 min 后迅速脱臼处死, 剖开腹腔, 取出小肠(自幽门至回盲部)。将小肠管不加牵引地平铺在玻璃板上, 以幽门为起点, 测量炭末在肠管内的移动距离(cm)和小肠全长(cm), 计算每只小鼠活性炭的移动距离占小肠全长的百分比(%), 其值越大则消化道排空速率越快。

1.5.3 胸腺和脾脏脏器指数的测定 小鼠脱臼处死后, 解剖取胸腺和脾脏, 分别称取胸腺和脾脏重量(mg), 计算脏器与体质量(g)之比, 即为胸腺和脾脏指数(mg/g)。其值越大提示免疫功能强。

1.5.4 胃肠激素的测定 连续给药 7 d 后摘取小鼠眼眶, 取血采集血清, 按试剂盒方法测定和计算小鼠血清胃动素(MTL)浓度。

1.6 数据处理方法 定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理, 在满足参数检验的前提下, 运用方差分析检验实验结果。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况比较 以复合造模法喂养

12 d 后, 模型组、发酵西素方低剂量组和高剂量组小鼠多出现毛发稀疏无光泽、体形消瘦、腹部两侧凹陷、背微弓、大便稀溏、神情萎靡、眯眼等症状或体征, 体重显著低于空白对照组(P<0.01), 提示脾虚证小鼠造模成功。治疗后, 与模型组比较, 发酵西素方高、低剂量组小鼠的毛发较顺亮、食量较大、行为较活跃, 体重增加(P<0.01), 而高剂量组与低剂量组比较无统计学差异(P>0.05)。见表 1。

表 1 各组小鼠体重比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	造模前	造模后	治疗后
空白对照组	23.49±2.00	31.18±1.14	34.36±0.98
模型组	24.61±1.50	19.19±0.69 ^A	23.33±1.26 ^A
发酵西素方低剂量组	23.93±1.70	18.64±0.92 ^A	24.40±1.69 ^{AB}
发酵西素方高剂量组	23.61±1.50	18.49±0.90 ^A	25.33±0.92 ^{AB}

注: 与空白对照组比较, ^AP<0.01, ^aP<0.05; 与模型组比较, ^BP<0.01, ^bP<0.05

2.2 各组小鼠消化道排空速率、MLT 水平比较 与空白对照组比较, 模型组的消化道排空速率、MLT 水平升高, 差异有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较, 发酵西素方高剂量组小鼠的消化道排空速率、MLT 水平降低, 差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。见表 2。

2.3 各组小鼠胸腺和脾脏脏器指数比较 与空白对照组比较, 发酵西素方高剂量组的胸腺指数升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。与模型组比较, 发酵西素方高剂量组小鼠的胸腺指数、脾脏指数升高, 差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。见表 3。

表 2 各组小鼠消化道排空定量指标观测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	幽门至回盲部的长度(cm)	炭末前沿至幽门的距离(cm)	消化道排空速率(%)	胃动素浓度(ng/L)
空白对照组	45.40±3.19	23.60±4.05	52.10±8.48	65.58±4.34
模型组	43.00±1.80	30.70±4.84 ^A	71.50±9.88 ^A	85.18±3.10 ^A
发酵西素方低剂量组	44.70±1.83	28.40±4.24	63.84±11.55	80.33±7.70 ^A
发酵西素方高剂量组	45.50±1.57	27.30±4.12	60.28±10.66 ^b	73.84±3.27 ^{AB}

注: 与空白对照组比较, ^AP<0.01, ^aP<0.05; 与模型组比较, ^BP<0.01, ^bP<0.05

3 讨论

现代医学认为 FD 的发病因素及机制呈多元化, 与胃肠功能障碍、心理精神因素、胃肠激素改变、幽门螺杆菌感染、炎症、内脏高敏感性、特定基因型改变与遗传易感性、早期生活应激等有关。西医主要采取对症治疗, 病情易反复, 疗效满意度较差。中医认为 FD

主要是以脾胃虚弱为本, 气机阻滞为标, 因此尤其注重健脾补虚来治疗消化系统疾病。以饮食不节加劳倦过度的复合造模法制备的脾虚动物模型, 无其他药物干扰且更符合临床特点, 可用于相关中药的药理学研究。

西素方系第三批全国名老中医陈炳焜及饶线明

表 3 各组小鼠脏器指数定量指标的观测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	胸腺重量(mg)	胸腺指数(mg/g)	脾脏重量(mg)	脾脏指数(mg/g)
空白对照组	80.24±21.63	2.33±0.61	102.48±13.94	2.98±0.39
模型组	46.03±22.92	1.99±1.02	39.55±17.68	1.69±0.74
发酵西素方低剂量组	70.18±21.64	2.87±0.80	65.86±36.38	2.65±1.39
发酵西素方高剂量组	77.99±19.44	3.08±0.77 ^{ab}	89.65±22.42	3.55±0.91 ^B

注:与空白对照组比较,^AP<0.01,^aP<0.05;与模型组比较,^BP<0.01,^bP<0.05

师徒二人临床多年用于治疗FD的有效实践方,全方按照中医健脾益气,药食同源的思路组合,以四君子汤为基础,佐药食同源之品,结合当地草药合制而成。四君子汤出自《太平惠民和剂局方》,由党参、茯苓、白术和甘草四味中药组成。方中君药党参具有补气健脾养胃的功效;臣药白术味甘、苦,性温,可补气健脾、燥湿利水;佐药茯苓味甘、淡,性平,可利水渗湿、健脾化痰;使药甘草味甘,性平,可益气滋养、通阳复脉。诸药共用以益气健脾,为祖国传统医学补益脾胃之名方^[5]。Meta分析^[6]结果显示,四君子汤加味治疗FD在总有效率方面优于常规西药组。西素方中有淮山、芡实、扁豆、薏苡仁等药食同源补脾之品,通过影响消化系统、内分泌系统、免疫系统等相关功能以达到健脾的作用^[7],方中地方草药马蹄金^[8]、菜豆壳^[9]常被用于理气消胀,能有效缓解FD症状。

但是,由于FD患者众多,传统中药煎煮费时耗力,无法统一质控和规模生产,因此需要结合现代工艺进行药剂转化,以期满足众多患者便捷服用的需求。目前,现代发酵工程技术既可满足标准质控、规模生产、方便携带的现实需要,又可以有效提取中药活性成分,提高中药利用率,减低中草药毒性^[4]。陈旸等^[10,11]利用植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌对人参进行发酵,将有效成分人参总苷转化为小分子单体人参皂苷Rd和稀有人参皂苷Rg,有效提高人参有效成分活性与功能性。王身艳^[12]采用药用真菌使草乌发酵,降低了草乌中剧毒成分乌头碱、中乌头碱与次乌头碱的含量,而增加了毒性较小的苯甲酰乌头原碱、苯甲酰中乌头原碱及苯甲酰次乌头原碱的含量。故本实验利用现代发酵工程技术,以新型微生物发酵制备西素方药液,对脾虚证小鼠进行实验研究。实验中采用饮食不节加劳倦过度的复合造模法制备脾虚证小鼠模型,结果显示脾虚证小鼠造模成功。通过对成功造模的脾虚证小鼠给予发酵西素方进行治疗发现,高剂量西素方对于脾虚模型小鼠的体重变化、消化道排空速率、胃动素浓度以及脏器指数都有较显著的改善,进一步证实新型微生物发酵西素方对脾虚小鼠的胃肠

功能和免疫功能有较好的调节作用。因此本研究提示,新型微生物发酵西素方可通过调节胃肠功能和免疫功能而用于治疗FD。本研究的不足之处在于未开展阳性药物组与西素方(不发酵)组对脾虚小鼠影响的比较实验,将在今后研究中进一步予以探讨和证实。

综上,本动物实验研究证实了新型微生物发酵西素方有助于调节胃肠功能和免疫功能,后期可进一步探讨高剂量西素方的微生物发酵法与传统煎煮法的优劣及其作用机制的差异,为广大FD患者提供简便效廉的健康服务新途径。

参考文献

- [1]葛均波,徐永健.内科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018:384-358.
- [2]TACK J,MASUY I,VAN D H K,et al. Drugs under development for the treatment of functional dyspepsia and related disorders[J]. Expert Opin Investig Drugs,2019,28(10):871-889.
- [3]刘嘉彬,王静,叶振昊,等.从“脾虚”论治功能性消化不良机制的研究[J].中国中医基础医学杂志,2022,28(5):827-830,838.
- [4]宋予震,史洪涛,范明夏,等.微生物发酵中药研究进展[J].动物医学进展,2021,42(1):105-109.
- [5]HUANG J Y,NONG H,PEI X,et al. Mechanism underlying effect of Si-junzi decoction on intestinal mucosal barrier of mice with ulcerative colitis[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2015, 23 (27):4326-4334
- [6]冷雪峰,车思阳,白光.四君子汤加味治疗功能性消化不良的系统评价[J].国际医药卫生导报,2021,27(21):3366-3369.
- [7]肖吉祥,周杨升,田鏊清,等.“健脾”类药食同源中药现状及产业前瞻[J].现代食品,2021,27(18):44-49.
- [8]马贞,彭亚婷,荣立洋.连朴饮联合黎药治疗慢性萎缩性胃炎脾胃湿热证临床疗效观察[J].广州中医药大学学报,2021,38(2):236-241.
- [9]林月宏.基于古今医案云平台系统挖掘康良石治疗非酒精性脂肪性肝病临床经验研究[D].福州:福建中医药大学,2021.
- [10]陈旸,王义,孙亮,等.植物乳杆菌发酵转化人参总苷的研究[J].中国中药杂志,2014,39(8):1435-1440.
- [11]陈旸,张美萍,王义,等.枯草芽孢杆菌转化人参总苷为Rg3的研究[J].时珍国医国药,2014,25(11):2676-2678.
- [12]王身艳.药用真菌发酵有毒中药草乌减毒增效基础研究[D].南京:南京中医药大学,2012.

(收稿日期:2022-06-13)

(本文编辑:蒋艺芬)