

参苓白术散对慢性腹泻幼年大鼠肠黏膜屏障影响的研究

诸葛远莉¹ 金海林² 刘万里¹

(1.南京中医药大学附属南京市中西医结合医院,江苏南京 210014;

2.南京中医药大学附属医院,江苏南京 210029)

摘要 目的:观察参苓白术散对慢性腹泻幼年大鼠肠黏膜屏障功能的影响。方法:4周龄 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、自然恢复组(不予药物治疗)、谷氨酰胺组和参苓白术散低(5.0g/kg)、中(10.0g/kg)、高(20.0g/kg)剂量组,除空白对照组与自然恢复组以外,其余各组幼鼠予生大黄水煎剂灌胃,造成慢性腹泻模型。造模成功后各组幼鼠每日灌胃给予相应药物 1 次,空白对照组与自然恢复组灌胃等体积无菌蒸馏水,共给药 2 周。治疗后收集尿液检测尿液中乳果糖/甘露醇(L/M)比值,股动脉采血检测血浆内毒素,电镜观察结肠组织超微结构。结果:给药 2 周后,与空白对照组比较,自然恢复组幼鼠尿液中 L/M 比值、血浆内毒素水平明显升高($P<0.01$);与自然恢复组比较,参苓白术散中、高剂量组与谷氨酰胺组幼鼠尿液中 L/M 比值、血浆内毒素水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。电镜观察结果显示,自然恢复组幼鼠结肠微绒毛和线粒体出现明显损害,而参苓白术散中、高剂量组与谷氨酰胺组幼鼠结肠组织病变程度明显轻于自然恢复组。结论:参苓白术散对慢性腹泻幼年大鼠肠黏膜屏障具有明显的改善作用。

关键词 慢性腹泻 参苓白术散 肠黏膜屏障 乳果糖/甘露醇比值 血浆内毒素 幼年大鼠 病理学

中图分类号 R256.340.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2015)05-0080-04

腹泻是指大便性状改变及大便次数比平时增多的疾病,病程在 2 个月以上的腹泻称为慢性腹泻病。慢性腹泻会影响患者蛋白质、脂肪、碳水化合物等物质吸收,导致不同程度的营养不良、免疫功能低下和继发感染等恶性循环状态^[1-2]。中医药治疗慢性腹泻历史悠久,疗效肯定。大量临床报道显示参苓白术散对慢性腹泻疗效确切,且副作用小^[3]。本品在小儿慢性腹泻方面的临床疗效观察亦有报道^[4-5],但相关的实验研究未见开展。本研究建立幼年大鼠慢性腹泻模型,考察参苓白术散对模型幼鼠肠黏膜屏障功能的影响,为本品在小儿腹泻病方面的应用提供依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 4 周龄 Wistar 大鼠,SPF 级,体重 80~100g,雌雄各半,购自军事医学科学院实验动物中心,合格证号:SCXK(军)2012-0004。大鼠均饲养于独立送风笼具(IVC)中,空气洁净度 10000 级,实验室温度(24±2)℃,相对湿度 60%~80%,空气交换次数 10~15 次/h,光照周期 12h(日)/12h(夜),雌雄分开饲养。给予鼠全价颗粒饲料喂养,自由饮用经酸化后的纯化水。

1.2 药物与试剂 参苓白术散(人参、茯苓、白术、扁豆、淮山药、莲肉、桔梗、薏苡仁、砂仁、甘草,剂量比为 2:2:2:1.5:2:1:1:1:1:2),由南京市中西医结合医院提供,将参苓白术散加水煎煮至含 1g 生药/mL 的药液,供大鼠灌胃给药。谷氨酰胺颗粒,2.5g/袋,重庆药友制药有限责任公司,批号:13401190111,临用前采用无菌蒸馏水配制成 3% 的溶液,供大鼠灌胃给药。生大黄,由南京市中西医结合医院提供,用前加水煎煮至含生药 1g/mL 的药液,供大鼠灌胃给药。乳果糖口服溶液(Dupblac),15mL/袋,荷兰雅培公司(进口),批号:343906;甘露醇,惠兴生化试剂有限公司;D-甘露糖醇检测试剂盒(Megazyme 公司);乳果糖检测试剂盒(Megazyme 公司);内毒素试剂盒(ELISA),南京建成生物工程有限公司;其余试剂均为市售分析纯。

1.3 主要仪器 KD-160 型电子秤(东莞百利达健康器材有限公司);BSA124S 精密电子天平(Sartorius 公司);TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Safire2 多功能测读仪(TECAN 公司);JEM 1400 钨灯丝透射电镜(日本电子株式会社)。

2 实验方法

2.1 分组与造模 幼鼠随机分为空白对照组、自然

基金项目:南京市卫生局重点课题(ZKX12043)

恢复组、谷氨酰胺组和参苓白术散低、中、高剂量组,每组 12 只。除空白对照组以外各组大鼠均以含生药 1g/mL 生大黄水煎剂按 0.02mL/g 剂量灌胃,每日 1 次,连续 8d,造成慢性腹泻模型^[6]。幼鼠予单笼饲养,笼底垫滤纸和铁丝网,每日观察体重、活动、皮毛变化及腹泻情况。以腹泻率和腹泻指数作为腹泻的主要指标。腹泻率=腹泻的动物数/该组动物总数×100%。腹泻指数=稀便率×平均稀便级。稀便率:每只动物所排的稀便数与总便数之比。稀便级:表示每只动物稀便的程度,以稀便污染滤纸的直径定级,分为 4 级:<1cm(1 级),1~1.9cm(2 级),2~3cm(3 级),>3cm(4 级)。平均稀便级=所有稀便级数/稀便次数。给药 8d 后,造模各组大鼠腹泻率及腹泻指数明显高于空白对照组($P<0.01$),表明造模成功。

2.2 给药 造模成功后谷氨酰胺组予 6g/kg 谷氨酰胺颗粒灌胃,参苓白术散低、中、高剂量组分别予 5、10、20g 生药/kg 灌胃,空白对照组、自然恢复组均给予等体积无菌蒸馏水灌胃,各组灌胃给药体积均为 20mL/kg,各组均每日给药 1 次,2 周后进行各项指标检测。

2.3 指标检测

2.3.1 尿液中乳果糖和甘露醇(L/M)比值测定 给药结束后将幼鼠在代谢笼中单独饲养,并将乳果糖 100mg、甘露醇 50mg,加蒸馏水配制成 2mL 混合溶液灌胃,12h 内连续收集尿液并记录体积。期间为保证充足的尿量,灌胃乳果糖和甘露醇混合溶液 2h 后再灌入蒸馏水 4mL。灌胃前按压大鼠下腹部,排空膀胱;收集尿液期间禁食不禁水;所收集的尿液于 -80℃ 冻存待测。采用试剂盒分别测定尿液中乳果糖和甘露醇水平,计算乳果糖和甘露醇(L/M)比值。

2.3.2 血浆内毒素水平测定 给药结束后各组幼鼠股动脉采血,置于肝素抗凝试管内,3000r/min 离心 10min,吸取上层血浆,采用 ELISA 试剂盒测定血浆中内毒素水平。

2.3.3 结肠组织超微结构观察 每组随机选取 2 只幼鼠的结肠标本,经 2.5%戊二醛固定,1%锇酸后固定,逐级酒精、丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋,铀铅双重染色,超薄切片,透射电镜观察。

2.4 统计学方法 数据用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,结果以($\bar{x}\pm s$)表示,先做 ANOVA 分析,然后进行 t 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

3 实验结果

3.1 各组幼鼠尿液中乳果糖和甘露醇(L/M)比值比

较 见表 1。与空白对照组比较,自然恢复组幼鼠尿液中 L/M 比值明显升高($P<0.01$);与自然恢复组比较,谷氨酰胺组和参苓白术散中、高剂量组幼鼠尿液中 L/M 比值明显降低($P<0.05$)。

3.2 各组幼鼠血浆内毒素水平比较 见表 2。与空白对照组比较,自然恢复组幼鼠血浆中内毒素水平明显升高($P<0.01$);与自然恢复组相比,谷氨酰胺组、参苓白术散中、高剂量组幼鼠血浆中内毒素水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。

3.3 各组幼鼠结肠组织超微结构比较 电镜观察结果显示,空白对照组幼鼠结肠微绒毛排列整齐,致密。自然恢复组幼鼠结肠微绒毛出现明显变化,表现为微绒毛排列疏松、不整齐以及部分缺失,部分细胞核固缩变小,染色质致密,部分线粒体肿胀,基质密度降低,嵴减少。与自然恢复组相比,谷氨酰胺组幼鼠结肠微绒毛排列整齐紧密,线粒体形态和分布基本正常,表明黏膜屏障基本恢复。参苓白术散高、中剂量组幼鼠结肠微绒毛排列略见疏松,未见明显缺失,线粒体形态和分布基本正常;低剂量组微绒毛排列略可见疏松、不整齐,未见明显缺失,线粒体形态和分布基本正常。可见参苓白术散对于慢性腹泻模型动物的肠黏膜屏障具有剂量相关性的改善作用。见图 1。

表 1 各组幼鼠尿液中乳果糖和甘露醇比值的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	给药剂量(g/kg)	尿量(mL)	乳果糖/甘露醇(L/M)
空白对照组	12		8.4±1.3	0.19±0.05
自然恢复组	12		7.9±1.9	0.28±0.07**
谷氨酰胺组	12	6.0	8.2±1.6	0.22±0.05#
参苓白术散低剂量组	12	5.0	8.1±1.2	0.26±0.05
参苓白术散中剂量组	12	10.0	7.9±1.5	0.22±0.06#
参苓白术散高剂量组	12	20.0	7.8±1.2	0.21±0.04#

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与自然恢复组比较,# $P<0.05$ 。

表 2 各组幼鼠血浆内毒素水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	给药剂量(g/kg)	内毒素(U/L)
空白对照组	12		8.2±1.9
自然恢复组	12		14.3±3.1**
谷氨酰胺组	12	6.0	11.4±1.8#
参苓白术散低剂量组	12	5.0	13.1±1.7
参苓白术散中剂量组	12	10.0	11.5±1.6#
参苓白术散高剂量组	12	20.0	11.0±1.5###

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与自然恢复组比较,# $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

4 讨论

幼儿慢性腹泻可导致肠绒毛萎缩、变性,细胞脱落增加,黏膜双糖酶活性降低,肠黏膜屏障破坏,肠道通透性增加,同时伴有呕吐、厌食等,使患儿营

养摄入不足,营养不良,进而使得腹泻迁延不愈,重者可进一步发展为“肠道细菌和毒素移位”,导致败血症甚至多器官功能衰竭,严重者可危及生命^[7]。肠道黏膜屏障是机体抵御细菌及内毒素侵袭最大的天然屏障,正常肠道黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、免疫屏障与生物屏障共同构成。其中机械屏障是肠黏膜屏障的首要屏障,其他屏障发生作用有赖于肠黏膜结构的完整性^[8]。目前,肠黏膜屏障功能障碍的治疗原则主要包括:积极治疗引起肠屏障功能障碍的原发疾病;调整内环境稳定,改善肠道微循环;合理实施营养支持治疗;促进肠黏膜修复;维持肠道菌群平衡,避免菌群失衡发生。谷氨酰胺是血浆中含量最高的氨基酸,是肠黏膜细胞的主要能量来源。研究表明,谷氨酰胺可显著改善肝硬化患者肠道黏膜通透性,改善肠道黏膜屏障功能,有助于减少自发性腹膜炎等并发症的发生^[9]。

本病属中医学“泄泻”范畴,引起小儿泄泻的原因以感受外邪、内伤饮食及脾胃虚弱为主,其中脾胃虚弱为小儿泄泻虚证的主要病因。因胃主腐熟水谷,脾主运化精微,如脾胃受病,则饮食入胃,水谷不化,精微不布,水反为湿,谷反为滞,和污而下,致为泄泻。其治法为健脾益气,升提止泻。参苓白术散出自《太平惠民和剂局方》,为在四君子汤基础上加山药、莲子、白扁豆、薏苡仁、砂仁、桔梗而成。方中人参、白术、茯苓、甘草平补脾胃之气,益气健脾渗湿为君;配伍山药、莲子肉助君药以健脾益气,兼能止泻,并用白扁豆、薏苡仁助白术、茯苓以健脾渗湿,均为臣药;砂仁醒脾和胃,行气化滞,为佐药;桔梗宣肺利气,通调水道,又能载药上行,培土生金,炒甘草健脾和中、调和诸药,共为佐使。

目前对肠屏障功能多采用间接方法进行监测,主要包括:尿乳果糖和甘露醇比值(L/M)、血浆内毒素水平、血浆D-乳酸含量、二胺氧化酶(DAO)活性等。乳果糖和甘露醇都经小肠吸收,在体内不被人体代谢,主要经小便以原型排出体外。甘露醇是单糖,分子较小,主要通过肠黏膜细胞膜上的水溶性微孔透过肠黏膜。乳果糖是双糖,分子较大,主要通过肠黏膜细胞间的紧密连接透过肠黏膜,这也是细菌及其毒素通过肠黏膜的途径。在疾病状态下,肠黏膜可能萎缩,吸收面积减少,甘露醇通过减少。同时,因肠

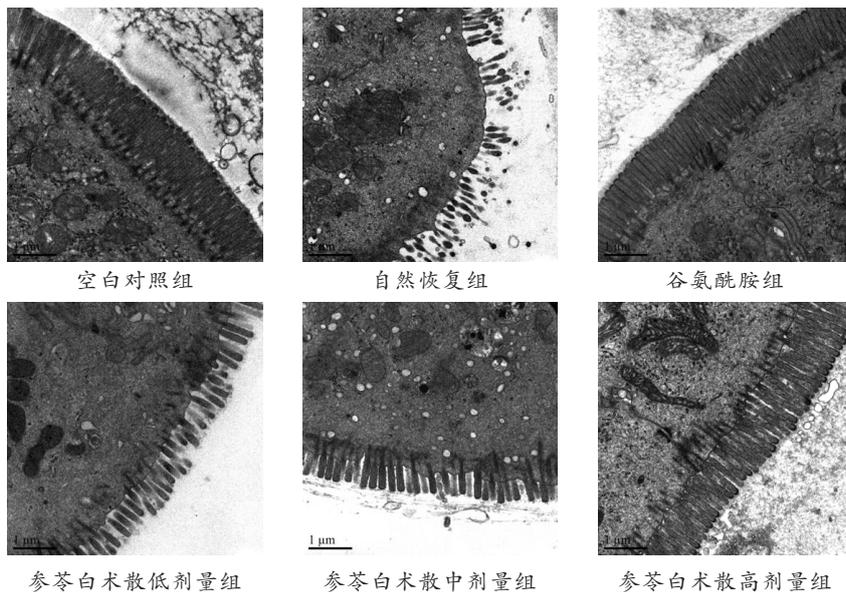


图1 各组幼鼠结肠组织透射电镜观察结果(×30000)

黏膜细胞间的紧密连接受到破坏,乳果糖通过增加,这样可使乳果糖/甘露醇排出率比值增加。采用乳果糖和甘露醇排出率(L/M)比值可排除一些非特异因素,如胃排空、肠蠕动、肠黏膜表面积、心排出量和肾清除能力的影响^[10]。本研究结果表明,参苓白术散可明显降低慢性腹泻模型幼鼠尿液中L/M比值,且具有一定的剂量依赖性,提示本品对慢性腹泻模型动物肠道屏障功能具有保护作用。

肠道是体内最大的细菌库,肠黏膜屏障破坏可使得肠道的微生物、内毒素侵入肠外组织,这一现象与肠黏膜屏障功能受损程度密切相关。血清内毒素的水平既可以反映屏障完整性,也可以评价药物对于内毒素侵入的改善作用^[11]。参苓白术散对模型动物血浆中内毒素水平具有明显降低作用,提示本品能改善慢性腹泻模型动物肠道屏障损害。

慢性腹泻患者肠道屏障的损害除了表现为透过性的功能改变外,往往伴有肠道组织结构的变化,尤其是超微结构的损害,包括微绒毛缺失、变短,细胞器形态和分布异常等^[12]。本实验中自然恢复组幼鼠结肠组织电镜检查可见结肠微绒毛排列疏松、不整齐以及部分缺失,同时线粒体亦可见肿胀,而参苓白术散各剂量对模型动物结肠组织微绒毛和线粒体的改变具有一定的改善作用。

综上,本实验成功建立了慢性腹泻幼鼠模型,综合各项指标的检测结果,参苓白术散对慢性腹泻幼鼠的肠黏膜机械屏障功能的损伤具有明显的修复作用。然而,机械屏障仅是肠黏膜屏障的一部分,参苓白术散对慢性腹泻幼鼠的肠黏膜化学屏障及免疫屏障功能的影响尚有待进一步研究。

(下转第85页)

- [7] 陈玲玲,刘炜,陈建国,等.桑叶黄酮对糖尿病小鼠调节血糖的作用机制研究.中国临床药理学杂志,2010,26(11):835
- [8] 孙玉秀,鲁云霞,汪凌云,等.豹皮樟总黄酮降低2型糖尿病大鼠血糖的可能机制研究.中国中西医结合杂志,2010,30(6):617
- [9] 赵海燕,王勇,吴力武,等.甘草黄酮对2型糖尿病大鼠血糖、血脂等生化指标的影响.中国糖尿病杂志,2012,20(1):65
- [10] 何佳奇,李效贤,熊耀康.紫苏总黄酮提取物对四氧嘧啶致糖尿病小鼠糖脂代谢及抗氧化水平的影响.中华中医药学刊,2011,29(7):1667
- [11] 薄海美,田春雨,魏勃,等.唐山产荷叶中荷叶总黄酮对2型糖尿病大鼠糖、脂代谢作用研究.辽宁中医药大学学报,2014,16(4):41
- [12] 章超群,武晓旭,吴永贵,等.白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织 Toll 样受体信号通路调节的研究.中国药理学通报,2014,30(3):354
- [13] 张家瑞.槲皮苷和山奈酚对糖尿病小鼠血糖及血脂水平的影响.现代食品科技,2013,29(3):459
- [14] 林华,牛艳芬,王芳,等.芒果苷对糖尿病小鼠糖脂代谢的影响.中药药理与临床,2012,28(6):41
- [15] 张园,董林,许晓乐,等.二苯乙炔苷对2型糖尿病大鼠氧化应激、炎症反应及主动脉细胞凋亡相关基因的影响.中国糖尿病杂志,2012,20(10):775
- [16] 孙玉红,姜鲜,张红,等.积雪草苷通过抑制 NF- κ B 核转移影响糖尿病大鼠血管平滑肌细胞增殖.四川生理科学杂志,2013,35(2):49
- [17] 刘冬恋,马松涛.牛蒡子苷对糖尿病大鼠视网膜和视神经病变的治疗作用.中华中医药杂志,2013,28(12):3732
- [18] 常景芝,王琛,陈剑.雷公藤多苷对糖尿病大鼠肾脏病变的疗效观察.中华中医药学刊,2013,31(4):839
- [19] 东野圣伊,张惠杰,张志国,等.盐酸小檗碱对糖尿病小鼠胰岛 β 细胞增殖与凋亡的影响.内科理论与实践,2012,7(3):169
- [20] 王会玲,李燕,胡伟锋,等.小檗碱影响 AMPK/PGC-1 信号途径改善糖尿病胰岛素抵抗和线粒体功能的研究.中华临床医师杂志(电子版),2014,8(5):896
- [21] 王凤玲,唐丽琴,杨峰,等.小檗碱对高脂合并 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠肾脏 FN 与 CTGF 表达的影响.安徽医药,2013,17(4):549
- [22] 陈艳华,蒋丽琴,王柏琦.檳榔碱对2型糖尿病大鼠凝血功能和血液流变学的影响.中国动脉硬化杂志,2011,19(4):319
- [23] 尹金凤,周阳,沈江山.青藤碱对糖尿病肾病大鼠肾脏 MCP-1 表达的影响.江西医药,2012,47(3):195
- [24] 李珍珠,燕军,张高小,等.穿心莲内酯衍生物对2型糖尿病大鼠的降糖作用及机制研究.中南药学,2014,12(1):10
- [25] 闵志雪,包鹏举,崔凤娟,等.银杏内酯 B 对实验性糖尿病血管病变的保护作用.医学理论与实践,2012,25(21):2616
- [26] 李唯佳,王绪平,俞忠明,等.肉桂挥发油对糖尿病大鼠血糖、血脂的影响.中国中医药科技,2012,19(1):37
- [27] Diaz-Flores M, Angeles-Mejia S, Baiza-Gutman L A, et al. Effect of an aqueous extract of Cucurbita ficifolia Bouche on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. J Ethnopharmacol, 2012,144(1):101

第一作者:王云卿(1985—),男,医师,硕士,研究方向:中西医结合诊治内分泌疾病的临床及实验研究。

通讯作者:吴君平,本科学历,主任医师。
wjw86207@163.com

收稿日期:2014-12-20

编辑:傅如海

(上接第82页)

参考文献

- [1] Guarino A,Lo Vecchio A,Canani RB.Chronic diarrhoea in children. Best Pract Res Clin Gastroenter,2012,26(5):649
- [2] Zella G C,Israel E J.Chronic diarrhea in children. Pediatr Rev,2012,33(5):207
- [3] 宋惠凤,金火星.参苓白术散的现代临床应用概述.中成药,2013,35(2):379
- [4] 聂小丽,尚清.参苓白术散口服加脐贴治疗小儿秋季腹泻46例疗效观察.中国中西医结合儿科学,2014,6(2):178
- [5] 郭鹏,唐斌,梁勇.参苓白术散辅助西药治疗小儿秋季腹泻疗效的 Meta 分析.现代药物与临床,2014,29(10):1173
- [6] 韩海荣,宋观礼,胡申.参苓白术散对大黄引起的脾虚泄泻作用机制的研究.现代中西医结合杂志,2008,17(1):15
- [7] 黄小流,阮征,张梅英,等.低聚乳果糖对断奶大鼠肠道发育的影响.食品科学,2012,33(9):226
- [8] 刘晓昌,梅俏,许建明.肠黏膜屏障功能检测研究进展.山东医药,2009,49(16):106
- [9] 刘小琴.谷氨酰胺对肝硬化患者肠黏膜屏障保护功能及机体免疫功能的影响.胃肠病学和肝病杂志,2014,23(4):449
- [10] 瞿平,胡燕,黎海芪.高效液相色谱法检测尿样中甘露醇和乳果糖浓度.儿科药学杂志,2005,11(2):1
- [11] 宋卫兵,张振书,肖冰,等.姜黄素对肠黏膜损伤保护作用的实验研究.南方医科大学学报,2008,(1):119
- [12] 夏阳,秦环龙.肠道屏障功能临床评估方法.中国实用外科杂志,2008,28(11):1006

第一作者:诸葛远莉(1981—),女,本科学历,主治医师,研究方向:儿童消化系统疾病。

通讯作者:刘万里,医学博士,副主任医师,硕士生导师。Liutianwu2001@163.com

收稿日期:2015-03-04

编辑:吴宁