

党参多糖对番泻叶所致脾虚模型小鼠的补脾作用研究^Δ

孟静^{*}, 曹玲亚, 李建宽, 高建平[#](山西医科大学药学院, 太原 030001)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)10-1209-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.10.09

摘要 目的:研究党参多糖对脾虚模型小鼠的补脾作用。方法:将60只雄性ICR小鼠随机分为空白组,模型组,党参多糖高、中、低剂量组[1.6、0.8、0.4 g/(kg·d)]和四君子汤组[30 g/(kg·d),以生药总量计],每组10只。除空白组外,其余各组小鼠均灌胃番泻叶溶液(0.4 g/d)构建脾虚模型。造模后,各给药组小鼠灌胃相应药液,空白组和模型组小鼠灌胃20 mL/kg生理盐水;每天给药1次,连续6周。给药结束后,测定小鼠体质量并进行一般行为学观察,记录其全血中红细胞计数,测定其血清中D-木糖、胃泌素(GAS)、胃动素(MTL)、生长抑素(SS)、血管活性肠肽(VIP)、淀粉酶(AMS)、免疫球蛋白(IgG和IgM)、脂多糖(LPS)含量,并测定其结肠组织中密封蛋白(Claudin)、闭合蛋白(Occludin) mRNA及其蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组小鼠体质量显著减轻($P<0.05$),出现了背毛稀疏、无光泽等脾虚症状;全血中红细胞计数和血清中D-木糖、SS、VIP、AMS、IgG、IgM含量以及结肠组织中Claudin、Occludin mRNA及其蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清中GAS、MTL、LPS含量均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,党参多糖高剂量组小鼠体质量显著增加($P<0.05$),脾虚症状显著改善;除党参多糖低剂量组小鼠血清中D-木糖、IgM含量和结肠组织中Claudin、Occludin mRNA及其蛋白表达水平差异无统计学意义外($P>0.05$),其余各组小鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:党参多糖对番泻叶所致的脾虚模型小鼠具有改善作用,其作用机制可能与调节其胃肠激素分泌、增强免疫以及保护肠黏膜屏障有关。

关键词 党参多糖;脾虚模型;补脾作用;胃肠激素;密封蛋白;闭合蛋白;小鼠

Study on the Tonifying Spleen Effect of *Codonopsis pilosula* Polysaccharides on Sennae Folium-induced Spleen-deficiency Model Mice

MENG Jingyi, CAO Lingya, LI Jiankuan, GAO Jianping (School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the tonifying spleen effect of *Codonopsis pilosula* polysaccharides (CPP) on spleen-deficiency model mice. METHODS: Totally 60 ICR male mice were randomized into blank group, model group, CPP high-dose, medium-dose and low-dose groups [1.6, 0.8, 0.4 g/(kg·d)], Sijunzi tang (SJZT) group [30 g/(kg·d), by crude drug], with 10 mice in each group. Except for blank group, other groups were given Sennae Folium solution intragastrically (0.4 g/d) to establish spleen-deficiency model. After modeling, administration groups were given relevant drug intragastrically, and blank group and model group were given 20 mL/kg normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 6 weeks. After last administration, body weight of mice in each group was measured and their general behavioral characteristics were observed. The red blood cell count in whole blood were recorded, and the contents of D-xylose, gastrin (GAS), motilin (MTL), somatostatin (SS), vasoactive intestinal peptide (VIP), amylase (AMS), immunoglobulin (IgG and IgM) and lipopolysaccharide (LPS) in serum were determined; mRNA and protein expressions of Claudin and Occludin in colon tissues of mice were also detected. RESULTS: Compared with blank group, body weight of mice in model group was significantly decreased ($P<0.05$), and the spleen deficiency symptoms such as sparse back hair and no luster appeared; the red blood cell count in whole blood, serum contents of D-xylose, SS, VIP, AMS, IgG and IgM, mRNA and protein expressions of Claudin and Occludin were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); serum contents of GAS, MTL and LPS were significantly increased ($P<0.01$). Compared with model group, the body weight of mice were increased significantly in CPP high-dose group ($P<0.05$), and spleen-deficiency symptom was improved significantly. Except for the serum contents of D-xylose and IgM, the protein expressions of Claudin and Occludin in colon tissue had no statistical significance in CPP low-dose group ($P>0.05$), above indexes of other groups were improved significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSION: CPP can improve spleen-deficiency model mice induced by Sennae

^Δ基金项目:国家重点研发计划课题(No.2019YFC1710801, No.2018YFC1706304)

^{*}硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail:821705271@qq.com

[#]通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药药物质基础与质量评价。电话:0351-3985244。E-mail:jpgao123@163.com

Folium, the mechanism of which may be associated with regulating gastrointestinal hormone secretion, enhancing immunity and protecting intestinal mucosal barrier.

KEYWORDS *Codonopsis pilosula* polysaccharides; Spleen-deficiency model; Tonifying spleen effect; Gastrointestinal hormone; Claudin; Occludin; Mice

党参(*Codonopsis Radix*)是临床常用的补益药,有健脾益肺、养血生津的传统功效^[1]。中医脏腑理论认为,“脾”是一个功能性结构单位,曰“脾为后天之本”“四季脾旺不受邪”“脾为之卫”,充分反映了脾与机体防御功能的关系^[2-3]。脾虚证是临床常见证型,表现为运化功能失调及免疫功能受损,与多种疾病的发生密切相关^[4]。党参多糖是党参发挥生物活性的重要物质基础之一,具有抗氧化应激、抗肿瘤、调节免疫等作用^[5-6]。研究发现,党参多糖在胃肠道消化系统疾病中发挥重要作用,可提高正常小鼠小肠蠕动力、胃蛋白酶活性及其排出量^[7],也可缓解葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎^[8],但有关党参多糖补脾的作用机制研究尚少。鉴于此,本研究拟采用番泻叶所致的苦寒泻下脾虚小鼠动物模型来评价党参多糖的补脾作用,并从调节胃肠激素分泌、增强免疫及保护肠黏膜屏障的角度来探讨其补脾机制,为其进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

MS 352型酶标仪购自芬兰 Thermo LabSystems 公司;TG16W型微量高速离心机购自湖南湘仪离心机厂;LightCycler[®]96型实时荧光定量-聚合酶链式反应(qRF-PCR)仪购自瑞士 Roche 公司;PowerPac[™]型电泳仪、ChemiDoc[™]MP型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;D30型核酸蛋白检测仪购自德国 Eppendorf 公司;Z326K型台式高速离心机购自德国 Hermle 公司;T2600型紫外-可见分光光度计购自上海佑科仪器仪表有限公司;KZ-II型高速组织研磨仪购自武汉赛维尔生物科技有限公司;DMi8型倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司;101型细胞计数器购自山东翼动新材料科技股份有限公司。

1.2 主要药品与试剂

党参药材(批号 20170901)购自山西省长治市,番泻叶(批号 20171201)、茯苓(批号 181001)、炒白术(批号 190402)、炙甘草(批号 190301)药材或饮片均购自山西省中医院;以上药材由山西医科大学药学院高建平教授鉴定分别为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf. 的干燥根、狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl 的干燥叶、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf. 的干燥菌核、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。D-木糖试剂盒(批号 20191028)购自南京建成生物工程研究所;小鼠免疫球蛋白 G(IgG)、IgM、胃泌素(Gas)、胃动素(MTL)、生长抑素(SS)、血管活性肠肽(VIP)、淀粉酶(AMS)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为 MM-0057M1、MM-0058M1、MM-44405M1、MM-0492M1、MM-0493M1、MM-0446M1、MM-1018M1)均购自江苏酶免实业有限公司;小鼠脂多糖(LPS)ELISA 试剂盒(批号 202012)购

自上海江莱生物科技有限公司;PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(批号 A170713A)、TB Green Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) 荧光定量试剂盒(批号 AJ52620A)均购自宝生物工程(大连)有限公司;全蛋白提取试剂盒(批号 KGP250)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 KGPBCA)均购自江苏凯基生物技术股份有限公司;超敏 ECL 化学发光检测试剂盒(批号 SW134-01)购自赛文创新(北京)生物科技有限公司;兔源密封蛋白(Claudin)多克隆抗体(批号 13050-1-AP)、兔源闭合蛋白(Occludin)多克隆抗体(批号 27260-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号 GB11001)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 RS0002)购自美国 ImmunoWay 公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

ICR 小鼠 60 只,雄性,SPF 级,体质量(18±2)g,由斯贝福北京生物技术有限公司提供,动物生产许可证号为 SCXK(京)2016-0002。小鼠购入后分笼饲养,自由摄食、饮水,饲养环境温度 20~22℃、相对湿度为 40%~60%。实验操作均按照山西医科大学实验动物管理和使用委员会的要求执行。

2 方法

2.1 药液的制备

2.1.1 番泻叶溶液 称取番泻叶药材 50 g,加 5 倍量(mL/g,下同)沸水,小火煎煮 3.5 min,过滤,收集滤液并浓缩至 1 g/mL(以生药量计),即得。

2.1.2 四君子汤 四君子汤的中药组成为党参 12 g、茯苓 12 g、炒白术 12 g、炙甘草 6 g^[9]。按处方量称取各药材或饮片,加入 8 倍量水浸泡 1 h,再用小火煎煮 1 h,过滤,收集滤液;滤渣继续加 6 倍量水煎煮 1 h,过滤,收集滤液。合并 2 次滤液,浓缩至 2 g/mL(以生药总量计),即得。

2.1.3 党参多糖 党参多糖的制备参照课题组前期方法^[10]。称取党参药材 500 g,切段,加 6 倍量水加热回流提取 3 次、每次 1 h,分别过滤并收集滤液。合并 3 次滤液,以 4 000 r/min 离心 15 min,收集上清液并减压浓缩至原体积的 1/4,然后加 95%乙醇至乙醇的终体积分数为 80%,在 4℃下醇沉 12 h,然后以 4 000 r/min 离心 15 min。收集沉淀,分别用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗 3 次,然后在 40℃真空干燥至恒定质量,即得到党参多糖(得率为 18.39%)。

2.2 分组、造模与给药

将 60 只小鼠按随机数字表分为空白组,模型组,党参多糖高、中、低剂量组和四君子汤对照组,每组 10 只。除空白组外,其余各组小鼠均按 0.4 g/d 灌胃番泻叶溶

液,每天1次,连续5周,以复制小鼠苦寒泻下脾虚模型^[11];空白组小鼠灌胃等体积生理盐水。造模完成后,党参多糖高、中、低剂量组小鼠分别按1.6、0.8、0.4 g/(kg·d)灌胃党参多糖(给药体积为20 mL/kg,以水为溶剂),给药剂量参考党参日用剂量(30 g)并按人与动物体表面积换算剂量公式折算^[1],分别为临床成人等效剂量的2、1、0.5倍;四君子汤组小鼠按30 g/(kg·d)(以生药总量计)灌胃四君子汤^[12],为成人临床等效剂量;空白组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。每天下午给药1次,连续给药6周。在给药期间,除空白组外,其余各组小鼠每天上午均继续按0.4 g/d维持灌胃番泻叶溶液,每天1次。

2.3 小鼠体质量测定与行为学观察

实验期间,每3天以及在给药结束后称定小鼠体质量,并每天观察其一般体征。参考《中药新药临床研究指导原则》的脾虚标准,制订本研究中脾虚动物模型的标准为:(1)大便溏稀;(2)体质量减轻或增长缓慢;(3)蜷缩聚堆;(4)神态萎靡,毛色枯槁;(5)弓背;(6)易疲劳。其中,前3项为主症,后3项为次症,具备2项主症或者1项主症兼2项次症者,即可认定脾虚模型构建成功^[13]。

2.4 小鼠血清中D-木糖含量测定

末次给药12 h后,各组小鼠均灌胃6% D-木糖溶液10 mL/kg;1 h后,摘眼球取血1.5 mL,迅速吸取全血10 μL用于红细胞计数。剩余血样于室温静置90 min后,以3 000 r/min离心10 min,分离上层血清。取部分血清,按照D-木糖试剂盒说明书要求,采用间苯三酚显色法于紫外-可见分光光度计下测定小鼠血清中D-木糖含量。

2.5 小鼠全血中红细胞计数测定

取“2.4”项下全血10 μL,以生理盐水稀释10 000倍至100 mL,取1或2滴稀释血样置于载有干燥盖玻片的红细胞计数板的一端,于倒置荧光显微镜下采用细胞计数器进行小鼠全血红细胞计数。

2.6 小鼠血清中生物学指标含量测定

取“2.4”项下血清适量,按照试剂盒说明书方法操作,采用ELISA法以酶标仪测定各组小鼠血清中胃肠激素(GAS、MTL、SS、VIP)、AMS、IgG、IgM、LPS含量。

2.7 小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA表达测定

采用qRT-PCR法进行检测。取血后将小鼠处死,取其结肠,液氮速冻后,按照Trizol法提取结肠组织总RNA,检验其纯度后,反转录合成cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系(共20 μL)包括cDNA模板2 μL,上、下游引物各0.8 μL, TB Green Premix Ex Taq II 10 μL,灭菌水6.4 μL。采用两步法进行扩增反应,扩增条件为95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,60 °C延伸31

s,共40个循环。以GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法计算各目的基因mRNA的相对表达量(以空白对照组的值为1)。引物序列及扩增产物长度见表1[引物序列由本课题组采用Primer premier 5.0软件自行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成]。

表1 各基因引物序列及产物扩增长度

Tab 1 Primer sequence and amplification length of each gene

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度, bp
Claudin	正向引物:GGCCACAGCATGGTATGGAA	158
	反向引物:GGGGACAGGAGCAGGAAAGT	
Occludin	正向引物:GCCTCCACCCCATCTGACT	252
	反向引物:TTGCCCTTCTCTGCTTTCCC	
GAPDH	正向引物:CGGACACATTGGGGGTAG	122
	反向引物:GGCTGCCAGAACATCAT	

2.8 小鼠结肠组织中Claudin、Occludin蛋白表达测定

采用Western blot法进行检测。取小鼠结肠组织适量,加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的蛋白提取液,用高速组织研磨仪匀浆,然后在4 °C下以12 850 r/min离心5 min,取上清液,按照BCA蛋白定量试剂盒方法测定总蛋白含量。将总蛋白于100 °C加热变性10 min后,取变性蛋白样品30 μg进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶层80 V恒压、分离胶层120 V恒压),然后以0.3 A恒流转移至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,分别加入Claudin、Occludin、β-actin抗体(稀释度分别为1:8 000、1:6 000、1:2 000),于4 °C孵育过夜;TBST溶液清洗5 min×3次,加入辣根过氧化物酶标记的IgG二抗(稀释度为1:20 000),室温下孵育1 h;TBST溶液清洗5 min×3次,经超敏ECL化学发光液显色后,于凝胶成像仪上成像。使用Image Lab 1.6.0软件分析条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白(β-actin)条带的灰度比值作为目标蛋白的表达水平。

2.9 统计学方法

利用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 党参多糖对脾虚模型小鼠体质量和行为学的影响

实验期间,空白组小鼠活动正常,背毛光泽,反应灵敏,粪便正常。模型组小鼠自灌胃番泻叶溶液进行造模后,其粪便就时软时溏;后期出现了体质量增长缓慢、扎堆、懒动现象,且出现了肛周污秽和背毛稀疏、无光泽等脾虚症状,提示脾虚小鼠模型造模成功。给药6周后,各给药组小鼠的活动及背毛情况均恢复正常。与空白组比较,模型组小鼠体质量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,党参多糖高剂量组小鼠体质量显著升高($P <$

0.05)。给药6周后各组小鼠体质量测定结果见表2。

表2 给药6周后各组小鼠体质量和血清中D-木糖含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Body weight and serum content of D-xylese of mice in each group after 6 weeks of administration($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	体质量,g	D-木糖,mmol/L
空白组	39.49±0.57	0.512±0.043
模型组	35.91±1.97*	0.322±0.043*
党参多糖高剂量组	39.74±1.27 [#]	0.494±0.021 [#]
党参多糖中剂量组	39.12±1.44	0.465±0.040 [#]
党参多糖低剂量组	38.58±0.99	0.392±0.021
四君子汤组	38.88±0.80	0.447±0.030 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

3.2 党参多糖对脾虚模型小鼠血清中D-木糖含量的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中D-木糖含量显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,党参多糖高、中剂量组和四君子汤组小鼠血清中D-木糖含量均显著升高($P<0.05$)。各组小鼠血清中D-木糖含量测定结果见表2。

3.3 党参多糖对脾虚模型小鼠全血中红细胞计数的影响

空白组,模型组,党参多糖高、中、低剂量组和四君子汤组小鼠全血中红细胞计数分别为(9.24 ± 0.91) $\times 10^{12}$ 、(6.61 ± 0.33) $\times 10^{12}$ 、(9.98 ± 0.12) $\times 10^{12}$ 、(6.06 ± 0.31) $\times 10^{12}$ 、(5.02 ± 3.35) $\times 10^{12}$ 、(9.44 ± 0.18) $\times 10^{12} L^{-1}$ ($\bar{x} \pm s, n=10$)。与空白组比较,模型组小鼠全血中红细胞计数显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,党参多糖高剂量组和四君子汤组小鼠全血中红细胞计数均显著升高($P<0.05$)。

3.4 党参多糖对脾虚模型小鼠血清生物学指标的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中GAS、MTL、LPS含量均显著升高($P<0.01$),SS、VIP、AMS、IgG、IgM含量均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,除党参多糖低剂量组小鼠血清中IgM含量升高不显著外($P>0.05$),其余各组小鼠上述血清学指标均显著改善($P<$

0.05或 $P<0.01$)。各组小鼠血清生物学指标含量测定结果见表3。

3.5 党参多糖对脾虚模型小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA表达的影响

与空白组比较,模型组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA的表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,党参多糖高、中剂量组和四君子汤组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA的表达水平测定结果见表4。

3.6 党参多糖对脾虚模型小鼠结肠组织中Claudin、Occludin蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组小鼠结肠组织中Occludin、Claudin蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,党参多糖高、中剂量组和四君子汤组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin蛋白表达的电泳图见图1,表达水平测定结果见表5。

4 讨论

四君子汤出自《太平惠民和剂局方》,是健脾的代表方剂,临床常用于治疗消化系统疾病,主治脾虚证^[14]。现代研究表明,四君子汤可明显改善脾虚动物的D-木糖含量,提高其消化吸收功能,具有健脾作用^[15]。因此,本研究在利用番泻叶复制脾虚小鼠模型的基础上,采用健脾代表方四君子汤为阳性对照,对评价党参多糖的补脾作用并挖掘其作用机制具有重要意义。

本研究发现,党参多糖干预后可增加脾虚模型小鼠的体质量,改善了其扎堆懒动、毛发不光泽等症状,提示其可改善番泻叶所致的小鼠脾虚症状。血清中D-木糖含量可反映小肠吸收功能^[16]。AMS是一种重要的消化酶,是反映消化、吸收功能的公认指标之一^[17]。在本研究中,模型组小鼠血清中D-木糖、AMS含量和全血红细胞计数均显著降低,表明模型组小鼠胃肠道吸收功能下降及气血生化不足。经党参多糖干预后,脾虚模型小鼠

表3 各组小鼠血清生物学指标含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Contents of serum biological indexes of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	GAS,pg/mL	MTL,pg/mL	SS,pg/mL	VIP,pg/mL	AMS,ng/mL	IgG,mg/mL	IgM,μg/mL	LPS,EU/L
空白组	35.78±1.47	143.26±76.30	182.87±10.37	170.99±7.28	578.41±23.65	23.36±0.97	3 976.07±180.70	30.08±0.52
模型组	82.03±2.02**	413.39±11.49**	80.31±5.84**	62.07±11.64**	230.62±23.22**	9.61±0.71**	2 453.63±104.90**	32.56±0.51**
党参多糖高剂量组	52.93±2.66 [#]	249.13±9.15 [#]	171.45±9.76 [#]	125.29±10.84 [#]	474.50±22.01 [#]	21.18±0.87 [#]	4 021.00±97.89 [#]	27.34±0.57 [#]
党参多糖中剂量组	57.60±2.28 [#]	254.97±8.51 [#]	143.37±8.92 [#]	123.30±6.36 [#]	429.98±17.22 [#]	17.03±0.80 [#]	3 175.16±114.40 [#]	28.01±0.41 [#]
党参多糖低剂量组	65.24±1.82 [#]	314.96±6.92 [#]	98.47±7.00 [#]	75.50±5.21 [#]	305.01±10.35 [#]	12.22±0.56 [#]	2 740.92±57.78	30.79±0.56 [#]
四君子汤组	50.41±2.86 [#]	218.32±12.12 [#]	185.45±8.45 [#]	162.25±10.95 [#]	528.82±37.29 [#]	19.83±0.84 [#]	3 555.33±133.70 [#]	29.04±0.96 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

Note: vs. blank group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

血清中D-木糖、AMS含量和全血红细胞计数均显著升高,提示党参多糖可以改善脾虚模型小鼠的胃肠道吸收功能及气血生化能力。

表4 各组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA的表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 mRNA expression of Claudin and Occludin in colon tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Claudin	Occludin
空白组	1	1
模型组	0.20±0.13**	0.29±0.14**
党参多糖高剂量组	0.53±0.25 ^{##}	8.18±4.22 ^{##}
党参多糖中剂量组	0.39±0.22*	1.97±0.68 [#]
党参多糖低剂量组	0.27±0.15	1.84±2.46
四君子汤组	0.50±0.32 ^{##}	4.77±1.03 ^{##}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. blank group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$,

^{##} $P<0.01$

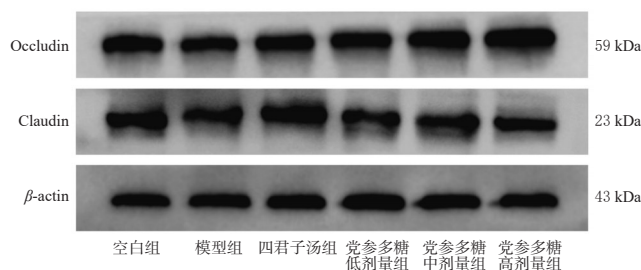


图1 各组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoresis of Claudin and Occludin protein expression in colon of mice in each group

表5 各组小鼠结肠组织中Claudin、Occludin蛋白的表达水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Protein expressions of Claudin and Occludin in the colon tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Claudin/ β -actin	Occludin/ β -actin
空白组	1.41±0.21	1.13±0.30
模型组	0.90±0.33**	0.58±0.19**
党参多糖高剂量组	1.74±0.35 ^{##}	1.23±0.53 ^{##}
党参多糖中剂量组	1.41±0.53*	1.02±0.41 [#]
党参多糖低剂量组	1.14±0.23	0.72±0.34
四君子汤组	1.51±0.72 ^{##}	0.97±0.25 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

胃肠道功能的改变受机体内胃肠激素分泌的影响^[18]。GAS能促进胃酸、胃蛋白酶的分泌,刺激胃肠道的蠕动,增加黏膜血流量,营养胃肠道黏膜^[19]。MTL可激活胃肠道平滑肌,能促进消化道运动,加速胃排空,并刺激胃蛋白酶和胰液分泌^[20]。SS能抑制胃酸的分泌和胃的蠕动,可舒张血管平滑肌^[21]。VIP可抑制多种胃肠

激素的分泌^[22]。研究表明,脾虚模型小鼠胃肠道吸收功能的下调与胃肠激素的紊乱有关^[23]。在本研究中,模型组小鼠血清中GAS、MTL含量异常升高,SS、VIP含量均异常降低,表明模型组小鼠胃肠激素水平失调。而与模型组相比,党参多糖高、中、低剂量组小鼠血清中GAS、MTL含量显著降低,VIP、SS含量显著升高,表明党参多糖可明显改善脾虚模型组小鼠胃肠激素的失调状态。以上结果提示,党参多糖能改善脾虚模型小鼠的胃肠吸收功能,其作用机制可能与调节胃肠激素水平有关。

免疫球蛋白作为免疫活性物质,是“卫气”功能活动的重要物质之一^[24]。IgG在血清中含量最高,IgM则是抗原刺激诱导体液免疫应答中最先产生的免疫球蛋白,二者是体液免疫应答中的关键因子,可作为评价机体免疫力的指标^[25]。在本研究中,与空白组比较,模型组小鼠血清中IgG、IgM含量均异常降低,表明模型组小鼠“卫气”功能下降。而给予不同剂量党参多糖干预后,脾虚模型小鼠血清中IgG、IgM含量均不同程度升高。以上结果提示,党参多糖可通过调节脾虚模型小鼠血清中IgG、IgM含量而提高机体免疫力,进而发挥健脾作用。

肠上皮是机体免疫系统与外界的主要屏障,脾虚则会影响肠道通透性以及肠黏膜屏障完整性^[26]。紧密连接蛋白是肠黏膜屏障的重要组成部分,而Claudin、Occludin蛋白是紧密连接蛋白的基本组成单位^[27-28]。本研究结果显示,脾虚模型小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA及其蛋白的表达均显著下调,这与李晶等^[29]的研究结果一致,提示其肠道屏障功能受损。而给予党参多糖干预后,脾虚模型小鼠结肠组织中Claudin、Occludin mRNA及其蛋白的表达均不同程度上调。当肠黏膜屏障受损后,微生物、LPS等有毒物质会大量入血,血清中LPS含量会异常升高^[30]。本研究结果显示,脾虚模型小鼠血清中LPS含量异常升高;而给予党参多糖后,可显著降低脾虚模型小鼠血清中LPS含量。以上结果显示,脾虚模型小鼠存在肠黏膜屏障受损和血清中LPS含量异常升高的现象,而党参多糖可恢复肠黏膜紧密连接并显著降低血清中LPS含量,有效改善了小鼠的肠黏膜屏障损伤,这可能是党参多糖在脾虚模型小鼠肠道发挥“脾为之卫”健脾作用的机制之一。

综上所述,本研究结果揭示党参多糖是党参补脾作用的重要物质基础之一,可改善脾虚模型小鼠的胃肠吸收功能,作用机制可能与调节其胃肠激素分泌、增强免疫以及保护肠黏膜屏障有关。此外,在本研究中笔者发现,党参多糖发挥补脾作用与肠道屏障功能有密切的联系。而肠道微生物的多样性与丰度会影响宿主肠道屏障功能且肠道菌群失调可诱发多种消化系统疾病^[31]。因此,在下一步研究中,本课题组将从代谢组学和肠道

菌群的角度出发对党参多糖补脾功能进行评价,以期深入探索其补脾的作用机制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:294.
- [2] 刘芬,刘艳菊,田春漫.苍术麸炒前后对脾虚证模型大鼠免疫系统及胃肠激素影响的比较研究[J].时珍国医国药,2015,26(6):1371-1373.
- [3] TU J, XIE Y, XU K, et al. Treatment of spleen-deficiency syndrome with atractyloside a from bran-processed *Atractylodes lancea* by protection of the intestinal mucosal barrier[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:1-13.
- [4] 孟凡征,李亚男,赵金生,等.“脾虚证”实质的现代研究进展[J].时珍国医国药,2019,30(12):2975-2977.
- [5] GAO S M, LIU J S, WANG M, et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Codonopsis*: a review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219:50-70.
- [6] HE J Y, MA N, ZHU S, et al. The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): a review of phytochemistry, bioactivity and quality control[J]. *J Nat Med*, 2015, 69(1):1-21.
- [7] 马方励,沈雪梅,时军.党参多糖对实验动物胃肠道功能的影响[J].安徽医药,2014,18(9):1626-1630.
- [8] JING Y P, LI A P, LIU Z R, et al. Absorption of *Codonopsis pilosula* saponins by coexisting polysaccharides alleviates gut microbial dysbiosis with dextran sulfate sodium-induced colitis in model mice[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018:1781036.
- [9] 赵盛云.四君子汤对脾虚证大鼠胃黏膜屏障功能影响的实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2014.
- [10] 张霞,李建宽,曹玲亚,等.不同基源、产地对党参总多糖中低分子量果聚糖的影响[J].中成药,2020,42(1):145-149.
- [11] 黄文武,彭颖,王梦月,等.四君子汤及其单味药水煎液对脾虚大鼠肠道菌群的调节作用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(11):8-15.
- [12] 闫清华.基于Label free蛋白质组学和LC-Q-TOF-MS代谢组学的四君子汤干预脾虚证机制研究[D].兰州:甘肃农业大学,2017.
- [13] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则[S]. 2002年版.北京:中国医药科技出版社,2002:361-363.
- [14] 高永珍,武瑞珍,陈永利.四君子汤在中医内科疾病脾胃气虚证中的应用[J].中国民族民间医药,2013,22(5):52.
- [15] 刘琳,李岩.四君子汤对胃肠道药理作用的研究进展[J].医学综述,2019,25(5):990-994.
- [16] 段永强. Ca^{2+}/CaM 信号通路在大鼠脾虚证躯体泛化效应中的响应及益气健脾中药干预研究[D].兰州:兰州大学,2014.
- [17] 李元.基于脑肠肽探讨功能性腹泻脾虚证“脾失健运”生物学机制及中药疗效机制[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [18] 孙凤蓬,宋于刚.胃泌素及其相关胃肠激素的研究进展[J].国外医学(生理、病理科学与临床分册),2000,20(3):229-231.
- [19] FOURM D, GIGOUX V, REUBI JC. Gastrin in gastrointestinal diseases[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3):814-818.
- [20] 张国梁,丰广宁,陶永等.消化复宁汤对肝郁脾虚大鼠胃泌素、胃动素和胃肠运动功能的影响[J].安徽中医药大学学报,2009,28(3):35-38.
- [21] STENGEL A, TACHE Y. Central somatostatin signaling and regulation of food intake[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2019, 1455(1):98-104.
- [22] 罗云波.白术茯苓汤调控脾虚大鼠血管活性肠肽的物质基础研究[D].成都:成都中医药大学,2010.
- [23] 游宇,罗林,陈哲杰,等.生脉饮多糖提取工艺优化及对脾虚模型大鼠肠道功能调节作用的研究[J].中国药房,2019,30(4):493-498.
- [24] 林燕.基于代谢组学的肺卫气虚证候变化规律及中药复方干预的临床研究[D].石家庄:河北医科大学,2014.
- [25] 梁丽萍,梁一彪,李锦灵,等.补中益气汤对气虚发热大鼠体液免疫能力的影响[J].中国医院药学杂志,2017,37(13):1224-1227.
- [26] 黄玉珍.参苓白术散对脾虚泄泻幼鼠模型肠黏膜屏障的影响[D].南京:南京中医药大学,2016.
- [27] 卢璐,袁建业,费晓燕,等.肠易激综合征发病机制研究及治疗进展[J].中国中西医结合消化杂志,2015,23(9):661-665.
- [28] MUZA-MOONS M M, SCHNEEBERGER E E, HECHT G A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(8):783-793.
- [29] 李晶,王垂杰,李玉锋,等.参苓白术颗粒对功能性腹泻大鼠结肠黏膜紧密连接蛋白表达的作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(12):102-107.
- [30] 陈健.黄芩苷对LPS诱导的肠上皮细胞损伤的保护及机制探讨[D].广州:广州中医药大学,2015.
- [31] 林璋.脾虚证候患者肠道微生物和宿主代谢表型的关联性研究[D].上海:上海交通大学,2018.

(收稿日期:2021-01-01 修回日期:2021-03-08)

(编辑:林 静)