

神曲鲜干品组方对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响

王丽芳^{1,2}, 高文远¹, 徐鑫², 张学栋², 冯玛莉^{3*}, 白崇智³
(1. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072;
2. 山西中医学院 附属医院, 太原 030024; 3. 山西省中医院, 太原 030021)

[摘要] **目的:**探讨神曲中青蒿等鲜干品组方及不同制法对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响,为优化神曲组方并揭示其作用机制提供依据。**方法:**制备 4 组神曲样品,分别为基本组(面粉、赤小豆、苦杏仁),鲜品组(鲜品榨汁、煎汁)和干品组(干品煎汁)。采用昆明种小鼠按 0.4 mL·g⁻¹灌胃 100%精炼猪脂制备食积小鼠胃肠动力障碍模型,每日 1 次,连续 10 d。动物分为 6 组(空白组、模型组和 4 组神曲样品)。样品组按 0.2 mL·g⁻¹灌胃给予相应神曲混悬液,空白组和模型组灌胃等量水,每日 1 次,连续 7 d。观察各组样品对食积小鼠胃排空率、小肠推进率的影响。采用聚合酶链式反应技术检测各组小鼠结肠内容物菌群状况。**结果:**与模型组比较,鲜干品各组对胃排空及肠推进均有一定促进作用,但程度不同。其中鲜品煎汁组能显著提高胃排空及肠推进作用;鲜品榨汁组能显著提高肠推进作用。干品组对胃排空及肠推进均有一定影响,但差异不具有显著性。基本组仅对胃排空有显著促进作用,其肠推进作用在各组中最弱。与模型组比较,各给药组均可增加肠道乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌的量,但影响程度不同,排序为鲜品煎汁组 > 鲜品榨汁组 > 干品煎汁组 > 基本组。**结论:**神曲中青蒿等鲜品组方入药可促进食积小鼠胃肠推动作用及肠道菌群调整,两者间作用协同一致。提示鲜品入药优于干品,尤以青蒿等鲜品煎汁入药为佳;神曲健脾消食作用与促进胃肠动力、调整肠道菌群并促进有益菌生长有关。

[关键词] 神曲; 中药鲜品; 食积小鼠; 胃排空; 肠推进; 肠道菌群
[中图分类号] R283.4; R285.5; R943.1; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)04-0020-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017040020
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1457.026.html>
[网络出版时间] 2016-11-29 14:57

Effect of Massa Medicata Fermentata Composed by Fresh or Dry Chinese Medicines on Gastrointestinal Motility and Intestinal Flora Regulating of Dyspepsia Mice

WANG Li-fang^{1,2}, GAO Wen-yuan¹, XU Xin², ZHANG Xue-dong², FENG Ma-li^{3*}, BAI Chong-zhi³
(1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;
2. The Hospital of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;
3. Shanxi Academy of Chinese Medicine, Taiyuan 030021, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of Massa Medicata Fermentata composed by fresh or dry Chinese medicines and prepared by different preparation methods on gastric emptying, intestine propulsion and regulating intestinal flora of dyspepsia mice. **Method:** Four groups of Massa Medicata Fermentata samples were prepared, the first group is the basic one composed of flour, rice bean and bitter almond, the fresh product groups (the basic group and fresh medicine juicing or decocting) and the dry product group (the basic group and dry medicine decocting). Mice were used to set up dyspepsia and gastrointestinal disorders model by *ig* 100% refine lard oil with dose of 0.4 mL·g⁻¹ for 10 d. Experimental animals were divided into 6 groups (the blank group, the

[收稿日期] 20160606(001)
[基金项目] 山西省科技厅科技攻关项目(20140313008-8)
[第一作者] 王丽芳,博士,副主任药师,从事中药新药研究与饮片质量控制研究,Tel:0351-8618540,E-mail:wangli-fang@163.com
[通讯作者] *冯玛莉,硕士,主任药师,从事中药药理研究,Tel:13935129095,E-mail:13935129095@163.com

model group and four sample groups). Sample groups were given Massa Medicata Fermentata suspension by oral administration with $0.2\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, the blank group and the model group were administrated equivalent distilled water, once a day and for seven consecutive days. Impact of sample groups on gastric emptying rate and intestine propulsion rate was observed. Flora condition in colonic contents was detected by polymerase chain reaction technique (PCR). **Result:** In the gastrointestinal dynamics experiment, compared with the model group, each drug administration group could promote the movement of gastric emptying and intestinal propulsion, but their levels were different. In the detection of intestinal flora, each drug administration group could raise significantly the growth of intestinal beneficial bacteria (such as lactobacillus, bifidobacterium and bacteroides) and their levels were different. **Conclusion:** Massa Medicata Fermentata composed of fresh Chinese medicines can promote stomach intestine movement significantly and regulate the intestinal flora, both experiments led to corresponding results together. Massa Medicata Fermentata composed of fresh Chinese medicines is better than dry ones. The principles of formulating prescription about Massa Medicata Fermentata is fresh medicine decocting for the best. The spleen function of Massa Medicata Fermentata is concerned with promoting gastrointestinal, adjusting the intestinal flora and promoting the growth of bacteria.

[**Key words**] Massa Medicata Fermentata; fresh Chinese medicines; dyspepsia mice; gastric emptying; intestine propulsion; intestinal flora

神曲始载于《药性论》,为传统复方发酵曲剂,具有健脾和胃、消食调中的功效,主治脘腹胀满、食少纳呆、肠鸣腹泻之证,为临床健脾消食常用药^[1]。目前,全国各地生产的神曲在组方、配伍、发酵工艺等方面均有不同,组方药物青蒿等鲜干品均有组方入药^[2-3]。另组方中青蒿等药材性味寒凉,与其健脾消食功效不符,有学者提出建议——神曲组方改革^[4],提示神曲中青蒿等鲜干品组方机制有待深入研究。

前期经拆方研究,制备神曲鲜干品入药的不同组别,观察其对食积小鼠胃肠动力作用的差异。另据报道^[5],神曲对脾虚小鼠具有肠道菌群调整与肠保护作用。本实验参考文献[6-8],以精炼的猪脂灌胃建立食积小鼠模型,制备神曲鲜干品各组,包括基本组(面粉、赤小豆、苦杏仁),鲜品组(鲜品榨汁、煎汁)及干品组(干品煎汁),研究各组对饮食积滞小鼠胃排空及肠推进的作用;同时通过聚合酶链式反应检测技术,比较各组小鼠结肠内容物肠道菌群调整及有益菌生长状况。以期探寻神曲鲜干品入药对食积小鼠胃肠推动力的影响及其肠道菌群调整状况,分析神曲中青蒿等鲜干品组方作用机制,为优化神曲组方并揭示其肠道作用机制提供实验依据。

1 材料

BP310S 型电子天平(德国赛多利斯公司),7500 型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司),Microfuge 16 型高速离心机(美国贝克曼公司)。赤小豆、苦杏仁(北京同仁堂药店,批号

150105,150210),青蒿、苍耳、辣蓼鲜品均采自天龙山,经山西医学院裴香萍教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版的相关规定,鲜品与干品为同一批药材。面粉(五得利面粉集团有限公司),100% 精炼猪油脂(自制),全脂奶粉(山西古城乳业集团有限公司,批号 20151217),口服葡萄糖(石家庄市华营联合葡萄糖厂,批号 10100407),羧甲基纤维素钠(上海光铎科技有限公司,批号 090113),可溶性淀粉(四川彭州市军乐化工厂,批号 20100625),活性炭(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20090613),营养性半固体糊(自制,羧甲基纤维素钠 5 g,溶于 125 mL 水中,分别加入全脂奶粉 8 g,口服葡萄糖 4 g,可溶性淀粉 4 g,活性炭 2 g,搅拌均匀,配制成 150 mL 约 150 g 的黑色半固体糊状物,4 ℃ 保存,用时恢复至室温),基因组 DNA 提取试剂盒(凯基生物科技有限公司,批号 KGA27100),SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司,批号 204052),引物均由北京康为世纪生物科技有限公司提供合成服务。

SPF 级健康昆明种小鼠 60 只,体重 20 ~ 24 g,雌雄各半,由中国食品药品检定研究院提供,合格证号 SCXK(京)2014-0013。

2 方法

2.1 神曲供试品制备

2.1.1 配方 以 1988 年版《全国中药炮制规范》中神曲组方为依据,结合目前市场上制作方法,通过拆方研究,制备 4 组神曲样品。第 1 组(基本组,简

称 MCK) 含有面粉 100 g, 赤小豆 4 g 和苦杏仁 4 g, 将苦杏仁和赤小豆粉碎, 过 20 目筛, 与面粉混匀, 即得; 第 2 组(鲜品榨汁组)为 MCK + 鲜青蒿、鲜苍耳、鲜辣蓼各 7 g 榨汁; 第 3 组(鲜品煎汁组)为 MCK + 鲜青蒿、鲜苍耳、鲜辣蓼各 7 g 煎煮; 第 4 组(干品煎汁组)为 MCK + 青蒿、苍耳、辣蓼干品各 7 g 煎煮。煎汁法为各组原料分别加 15, 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 15 min, 煎液兑入前述面粉、赤小豆、苦杏仁中即得; 保持各组神曲样品含水量 40% (包括榨汁、煎汁、干品煎汁等制法)。

2.1.2 发酵及样品液制备 前期以消化酶活力为检测指标, 动态测定神曲发酵过程中脂肪酶与淀粉酶活力, 优选发酵工艺条件为温度 33 ℃, 湿度 70% ~ 80%, 保持神曲各组样品的含水量 40% 条件下发酵 4 d。取出发酵品, 40 ℃ 下低温烘干粉碎, 过 100 目筛, 加水制成 20% 混悬液, 冷藏备用。

2.2 动物分组 取小鼠 60 只, 随机分为空白组、模型组、神曲第 1 ~ 4 组(给药剂量均为 4 g·kg⁻¹) 共 6 组, 每组 10 只。

2.3 造模^[6-8] 以精炼猪脂灌胃建立食积小鼠模型。除空白组外, 各组动物按 0.4 mL·g⁻¹ 灌胃 100% 精炼猪脂, 每日 1 次, 连续 10 d, 建成食积动物模型。

2.4 给药 上述造模成功小鼠, 停止灌胃精炼猪脂, 继续按 0.2 mL·g⁻¹ 灌胃神曲 1 ~ 4 组混悬液, 空白组和模型组灌胃等量水, 每日 1 次, 连续 7 d。

2.5 指标检测

2.5.1 胃残留率与小肠推进率^[9] 各组于末次给药前禁食 16 h, 末次给药后 30 min, 按 0.8 mL/只灌胃营养性半固体糊, 20 min 后脱颈椎处死小鼠, 开腹, 结扎胃贲门和幽门, 取胃, 用滤纸浸干后称全重, 沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物用滤纸浸干, 称净重。以胃全重和胃净重之差为胃内残留物质量。同时迅速取出小肠, 轻轻剥离后直铺于白纸上, 测量幽门至回盲部全长及幽门至黑色半固体糊前沿的距离。

小肠推进率 = 炭末推进距离 / 小肠全长 × 100%

胃残留率 = (胃全重 - 胃净重) / 营养性半固体糊质量 × 100%

2.5.2 实时定量 PCR 分析结肠肠道菌群 自回盲部剪取远端的升结肠 3 cm, 置于 1.5 cm 无菌离心管中, 精密称取上述含内容物的升结肠 1 g, 置 15 mL 离心管中, 加入无菌磷酸盐缓冲液(PBS) 9 mL, 振荡 10 min, 取 0.1 g, 用 DNA 缓冲液处理, 取上清

100 μL, 使用基因组 DNA 提取试剂盒抽提样品内的细菌基因组 DNA, 操作依照说明书进行。根据双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠埃希氏菌、肠球菌、拟杆菌属及总菌通用 16SrDNA 基因序列, 应用引物设计软件 Primer premier 5.0 设计^[10-11], 见表 1。

表 1 16SrDNA 基因 PCR 扩增引物序列
Table 1 16SrDNA gene primer sequences of PCR amplification

细菌	扩增片段 长度/bp	引物序列
双歧杆菌属	230	上游: 5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACGC-3'
		下游: 5'-CTGATAGGACGCGACCCCAT-3'
乳酸杆菌属	232	上游: 5'-TGGAAACAGRTGCTAATACCG-3'
		下游: 5'-GTCCATTGTGGAAGATTCCC-3'
大肠埃希氏菌属	75	上游: 5'-CTCGCTGGCATTTCGGTAC-3'
		下游: 5'-ATCTTTTGCCGTCGGTTTTGG-3'
肠球菌属	144	上游: 5'-CCCTTATTGTTAGTGCCATCATT-3'
		下游: 5'-ACTCGTTGTACTTCCCATTGT-3'
拟杆菌属	169	上游: 5'-TGACAGTGAGAGATTGCTGCGCTT-3'
		下游: 5'-TCAGCCGACATTTCCTCTTCCGT-3'
总肠道菌群	200	上游: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
		下游: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

按 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作。反应体系为 SYBR Green PCR 反应混合物 10 μL, 引物 A 1 μL, 引物 B 1 μL, PCR 专用灭菌水 7 μL, 模版 DNA 1 μL, 反应总体积 20 μL。反应条件为初始热变性, 5 min, 95 ℃; 变性, 10 s, 95 ℃; 退火, 30 s, 60 ℃; 循环数 40 次。

2.6 统计学处理 数据采用 SPSS 16.0 统计软件包计算, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 对食积小鼠胃肠推动的影响 模型组胃残留率高于空白组, 肠推进率低于空白组, 组间差异具有显著性(*P* < 0.05), 表明食积小鼠模型胃肠动力障碍; 与模型组比较, 除基本组肠推进率低于模型组外, 其他鲜干品各组对胃排空及肠推进均有一定促进作用, 但程度不同。其中鲜品煎汁组能显著提高胃排空及肠推进作用, 差异具有显著性(*P* < 0.05); 鲜品榨汁组能显著提高肠推进作用。干品组对胃排空及肠推进均有一定影响, 但差异不具显著性。另基本组仅对胃排空有显著促进作用, 其肠推进作用在各组中最弱。另与基本组比较, 鲜品煎汁组、榨汁组肠推进作用差异均具显著性(*P* < 0.05)。综合考

虑,鲜干品各组对食积小鼠胃肠推动作用的排序为鲜品煎汁组 > 鲜品榨汁组 > 干品煎汁组,见表 2。

表 2 神曲各组样品对食积小鼠胃排空及肠推进的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Influence of Massa Medicata Fermentata samples on gastric emptying and intestine propulsion of dyspepsia mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	胃残留率 /%	小肠推进率 /%
空白	—	53.9 ± 12.1 ¹⁾	68.4 ± 10.1 ¹⁾
模型	—	69.6 ± 17.6	59.6 ± 8.4
基本	4	51.3 ± 14.1 ¹⁾	58.7 ± 12.1
鲜品榨汁	4	64.3 ± 19.8	69.6 ± 5.4 ^{2,3)}
鲜品煎汁	4	54.9 ± 11.5 ¹⁾	70.9 ± 10.0 ^{1,3)}
干品煎汁	4	62.5 ± 20.3	67.7 ± 15.4

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与基本组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

表 3 神曲各组样品对食积小鼠结肠肠道菌群相对量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Influence of Massa Medicata Fermentata samples on the relative amount of Colon intestinal flora of dyspepsia mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肠杆菌	肠球菌	乳酸杆菌	双歧杆菌	拟杆菌
空白	—	0.85 ± 0.12	0.92 ± 0.13	1.17 ± 0.24	1.69 ± 0.37 ²⁾	1.51 ± 0.34 ¹⁾
模型	—	1.01 ± 0.21	1.02 ± 0.23	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.50	1.00 ± 0.08
基本	4	0.87 ± 0.22	0.94 ± 0.26	1.52 ± 0.45 ¹⁾	2.16 ± 0.17 ²⁾	1.32 ± 0.43
鲜品榨汁	4	0.88 ± 0.23	0.80 ± 0.12	2.62 ± 0.49 ²⁾	3.31 ± 0.84 ²⁾	1.77 ± 0.23 ²⁾
鲜品煎汁	4	0.69 ± 0.25 ¹⁾	0.88 ± 0.12	2.63 ± 0.86 ²⁾	3.34 ± 1.15 ²⁾	1.82 ± 0.51 ²⁾
干品煎汁	4	0.83 ± 0.34	0.79 ± 0.34	1.87 ± 0.91 ²⁾	2.88 ± 0.69 ²⁾	1.65 ± 0.54 ¹⁾

各组中最高,与模型组比较差异具有显著性,说明青蒿等药材的加入对神曲的胃排空能力有所影响且程度不同,鲜品煎汁组对其影响最弱,且胃排空率与基本组较为接近,其他各组影响较大。②肠推进试验中,基本组在各组中作用最弱,甚至低于模型组,差异具显著性。说明青蒿等药材的加入有效地推动了食积小鼠的肠推进作用,鲜品强于干品。③肠道菌群检测中,基本组与鲜干品各组均可调节肠道菌群,促进肠道有益菌(乳酸杆菌、双歧杆菌及拟杆菌)的增加,降低肠杆菌及肠球菌。但基本组作用最弱,说明神曲中青蒿等药材组方入药可促进肠道有益菌的生长。提示神曲中青蒿等药材的加入可促进其胃肠推动作用并调节肠道有益菌群的生长,是作为组方药物参与神曲药效作用的。

4.2 神曲应以青蒿等鲜品煎汁入药 神曲中青蒿等鲜干品组方及不同制法中,鲜品组在胃排空、肠推进及肠道菌群调整中均表现明显优于干品的特性。青蒿等鲜品入药可明显促进食积小鼠的肠推进作

3.2 对食积小鼠结肠肠道菌群的影响 与空白组比较,模型组双歧杆菌、拟杆菌量明显减少 ($P < 0.01, P < 0.05$),其他菌属量无明显变化;与模型组比较,各给药组均可增加肠道乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌的量,但影响程度不同。其中鲜品煎汁组对 3 种有益菌的促进作用最强,且可降低肠杆菌的量,差异具有显著性 ($P < 0.01, P < 0.05$)。各组促进有益菌生长情况为鲜品煎汁组 > 鲜品榨汁组 > 干品煎汁组 > 基本组,见表 3。

4 讨论

4.1 神曲中青蒿等药材的组方作用 本实验通过拆方研究,比较了不加药材的基本组与鲜干品组间胃肠动力及肠道菌群调整作用差异,可为神曲中青蒿等药材的组方作用提供实验依据。①胃排空试验中,基本组中无青蒿、苍耳、辣蓼,但其胃排空率在

用,尤以鲜品煎汁组作用最强,与基本组、模型组比较差异具有显著性。另外,食积小鼠肠道菌群检测数据显示,鲜品煎汁组可显著提高肠道有益菌,为组间最高。各组促进有益菌生长情况为鲜品煎汁组 > 鲜品榨汁组 > 干品煎汁组 > 基本组。且仅有该组可显著降低肠杆菌,差异具有显著性,表明其肠道菌群调节作用强于其他各组。综合考虑,神曲中青蒿等鲜品中药以煎汁方式入药为佳,明显优于基本组与干品组。

4.3 神曲药效作用机制有待深入研究 食积小鼠模型试验结果表明,神曲中青蒿等鲜品煎汁入药为佳,其胃排空及肠推进作用均较强,并且促进肠道菌群调整及有益菌的生长能力亦最强,二者间作用协同一致。表明神曲中青蒿等鲜品组方其药效作用的实现与促进胃肠动力及肠道菌群调整有一定关系。近年来,食积机制的研究中主要涉及的指标包括对血生化影响、胃肠功能的改变及免疫功能的作用等,有学者报道神曲对脾虚小鼠具有肠道菌群调整

及肠保护作用^[5],亦有检测其对脾虚小鼠胃中总酸分泌的影响^[12]等,那么神曲药效作用的实现除了上述途径外,亦或包括其他作用机制^[13],这有待于更深入的研究证实。

[参考文献]

[1] 王再谟. 现代中药临床应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:205.

[2] 府炳荣. 影响中药“神曲”功效的因素分析[J]. 抗感染药学,2009,6(4):237-240.

[3] 任巧玲,宋潇潇. 六神曲的质量情况分析[J]. 中国现代药物应用,2010,4(10):113-114.

[4] 陶文元. 关于神曲的正误及改革后的意见[J]. 中国中药杂志,1985,10(10):46-47.

[5] 胡静,杨旭东,夏清平,等. 中药“神曲”对脾虚小鼠肠道菌群的调整及肠保护作用研究[J]. 中国微生态学杂志,2004,16(4):208-211.

[6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:1082-1083.

[7] 吴慧,赵文龙,单国顺,等. 生、熟白术之枳术丸对脾

虚食积模型鼠作用的比较研究[J]. 中成药,2013,35(10):2093-2097.

[8] 李中南,许冠荪,孙子平. 健脾和胃饮对食积动物模型的实验研究[J]. 陕西中医,1996,17(7):330-331.

[9] 邢建峰,封卫毅,侯家玉. 小鼠胃排空及小肠推进实验方法的探讨[J]. 北京中医药大学学报,2003,26(4):50-52.

[10] 李丽婷,郝立月,段晓梅,等. 小鼠对于高脂诱导的肥胖的易感性与肠道菌群的关系[J]. 中国微生态学杂志,2015,27(8):869-873.

[11] 华川,曹海涛. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法分析肠易激综合征患儿肠道菌群的变化[J]. 解放军医药杂志,2014,26(9):93-96.

[12] 曹国琼,张永萍,徐剑,等. 神曲与酶对化风丹药母发酵过程中毒性成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):1-4.

[13] 王丽芳,高文远,裴香萍,等. 鲜干品组方及不同制法神曲中消化酶活力的动态检测及分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(1):20-24.

[责任编辑 刘德文]