

- ling[J]. *Circulation*,1996,94(11):2953-2960
- 9 Hadian D, Zipes DP, Olgin JE, *et al.* Short-term rapid atrial pacing produces electrical remodeling of sinus node function in humans[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*,2002,13(6):584-586
- 10 刘丽娟,姚凤娟,彭龙云,等. 高频起搏犬房颤模型心房重塑及窦房结和房室结功能的变化[J]. *中国病理生理杂志*,2013,29(2):248-254
- 11 Fu Y, Huang X, Piao L, *et al.* Endogenous RGS proteins modulate SA and AV nodal functions in isolated heart; implications for sick sinus syndrome and AV block[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007,292(5):H2532-H2539
- 12 Rosanio S, Schwarz ER, Ware DL, *et al.* Syncope in adults: systematic review and proposal of a diagnostic and therapeutic algorithm[J]. *Int J Cardiol*,2013,162(3):149-157
- 13 Wolf RM, Glynn P, Hashemi S, *et al.* Atrial fibrillation and sinus node dysfunction in human ankyrin-B syndrome: a computational analysis[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2013,304(9):H1253-H1266
- 14 Lo HM, Hsu KL, Lin FY, *et al.* Implications of prolonged pause in patients with chronic atrial fibrillation with mitral valve disease undergoing atrial compartment operation[J]. *J Formos Med Assoc*,2003,102(11):762-767

(收稿日期:2013-12-14)

(修回日期:2013-12-20)

金仁陈子方对小鼠脾虚模型肠道菌群的影响研究

赵 冉 王育苗 黄树杰 袁秀娟 藤原裕行 李 薇 黄纯美 刘小虹

摘 要 **目的** 观察金仁陈子方对脾虚证小鼠模型肠道菌群的影响,评价其对肠道微生态调节的作用。**方法** 昆明种小鼠,分成 5 组,即正常对照组、脾虚模型对照组、阳性药对照妈咪爱组、金仁陈子方高剂量组、金仁陈子方低剂量组。以苦寒泻下中药大黄造成脾虚模型小鼠,灌胃给药 7 天后,选用厌氧及需氧菌选择性培养基测定粪便标本中代表性菌种:肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌、双歧杆菌、和乳酸杆菌数量。**结果** 脾虚模型组小鼠肠道双歧杆菌($P < 0.01$)、乳酸杆菌($P < 0.05$)等厌氧菌含量显著下降。给予金仁陈子方灌胃后这两种厌氧菌含量均恢复正常($P < 0.05$)。大肠杆菌($P < 0.01$)、肠球菌($P < 0.01$)、产气荚膜梭菌($P < 0.05$)在造模完成时含量显著上升,灌胃金仁陈子方之后大肠杆菌($P < 0.01$)、肠球菌($P < 0.05$)、产气荚膜梭菌($P < 0.01$)含量显著低于模型组。**结论** 脾虚证小鼠肠道双歧杆菌、乳酸杆菌菌群异常低下,肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌含量显著增加,金仁陈子方可通过扶植肠道有益菌、抑制有害菌,从而调节肠道微生态,对脾虚泄泻的恢复有重要影响。

关键词 金仁陈子方 脾虚小鼠模型 肠道菌群 肠道微生态

[中图分类号] R9 [文献标识码] A

Influence of Jinrenchenzi Prescription on Enteric Bacteria Flora in Mouse Model with Spleen-insufficiency Syndrome. Zhao Ran, Wang Yumiao, Huang Shujie, *et al.* Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China

Abstract Objective To observe the microecological regulative effect of JinRen ChenZi prescription on enteric bacteria flora in the mouse model with spleen-insufficiency syndrome. **Methods** KM mice were divided into five groups, the normal control group, spleen-deficiency control group, positive control group, high-dose of Jinrenchenzi prescription group, low-dose of JinRenChenZi prescription group. The model was established by using Raix et Rhizoma Rhei with bitter-cold flavour and purgative effect for 7 days. The contents of representative bacteria in stool were determined by selective culture media of anaerobe and aerobe: *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, *Enteric bifidobacterium* and *Lactobacillus*. **Results** After the model establishment the contents of *Enteric bifidobacterium* ($P < 0.01$), *Lactobacillus* ($P < 0.05$) were decreased significantly. After the administration of JinRenChenZi prescription the contents of above two anaerobes were recovered ($P < 0.05$). The contents of *Enterococcus* ($P < 0.01$), *Escherichia coli* ($P < 0.01$) and *Clostridium perfringens* were ($P < 0.05$) were significantly increased. After gavage the JinRenChenZi prescription the contents of *Enterococcus* ($P < 0.05$), *Escherichia coli* ($P < 0.01$) and *clostridium perfringens* were ($P < 0.01$) were significantly lower than the model group. **Conclusion** Jinrenchenzi prescription has a regulative effect to promote the proliferation of the health factors *Lactobacillus*.

基金项目:广东省教育部产学研结合项目(2011B090400167)

作者单位:510006 广州中医药大学(赵冉、藤原裕行、李薇、黄纯美、刘小虹);天津市滨海新区塘沽中医医院(王育苗);515500 揭阳,广东东泰乳业有限公司(黄树杰、袁秀娟)

通讯作者:刘小虹,电子邮箱:rsclxh@gzucm.edu.cn

lus, Bifidobacterium and inhibit the increase of Escherichia coli, Enterococcus and Clostridium perfringens.

Key words Jinrenchenzi prescription; Mouse model with spleen – insufficiency syndrome; Intestinal flora; Intestinal microecology

金仁陈子方为全国名老中医周福生教授的经验方,由鸡内金、火麻仁、陈皮、莱菔子组成,临床上用于治疗小儿饮食积滞、消化不良、不思饮食等证。脾虚证是儿科临床常见的一类证候,脾与消化系统关系最为密切,研究表明脾虚对应着肠道菌群的失调与紊乱^[1]。本研究运用微生物生态学理论与方法,观察金仁陈子方对脾虚证小鼠模型肠道菌群的影响,评价其对肠道微生态调节的作用。

材料与方法

1. 实验动物:健康 KM 种小鼠,体重 18 ~ 22g,雌雄各半 [SPF 级别,由广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(粤)20013 – 0020]。

2. 药物及试剂:鸡内金、莱菔子、火麻仁、陈皮,购自康美药业股份有限公司;大黄购自广东和祥制药有限公司;枯草杆菌二联活菌颗粒(妈咪爱)北京韩美药品有限公司生产(批号 20130320)。培养基:EMB 琼脂培养基(批号:20130418);TPY 琼脂培养基(批号:20130419);TSC 琼脂(批号:20120802);LBS 琼脂(批号:20121018);EA 琼脂(EA 批号:20130718)均为青岛高科园海博生物科技有限公司生产。

3. 仪器:TC – 3K 电子天平(深圳市华恒科技有限公司);BS110S 分析天平(香港佳立国际有限公司);SYQ – DSX – 280B 高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);SW – CJ – 1F 净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司);DZF – 6050 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

4. 实验分组及模型复制:健康 KM 种小鼠 50 只,SPF 级,体重 18 ~ 22g,雌雄各半。于广州中医药大学中药学院实验动物观察室(国家中医药管理局中医药科研实验室三级认证)适应性饲养 1 周后,随机分成 5 组,正常对照组、脾虚模型组、妈咪爱组、金仁陈子方高、低剂量组,每组 10 只。对脾虚模型组、妈咪爱组、金仁陈子方高、低剂量组的小鼠按 0.5ml/20g 给予大黄水煎液,每日 1 次,连续 8 天,造成小鼠脾虚模型,正常组给予等体积的生理盐水。

5. 给药方法:各组小鼠灌胃给药,正常对照组和脾虚模型对照组均以 0.1ml/10g 灌胃蒸馏水,金仁陈子方高、低剂量组分别按 3.09 生药/kg 和 1.59 生药/kg 给药,妈咪爱组予 0.1 亿含菌量/只灌胃,每日给药 1 次,连续 7 天。

6. 肠道菌群检测:按摩小白鼠腹部促其排便,接于事先称重的带有玻璃珠的无菌小瓶内,再次称重,按标本重量,加稀释液作 10 倍稀释,200r/min 充分震荡混合,进行 10^{-3} 、 10^{-4} 与 10^{-5} 稀释。肠道厌氧菌检测时,粪便标本依据预实验结果选取 TPY (10^{-4} 、 10^{-5})、LBS (10^{-4} 、 10^{-5})、TSC (10^{-4} 、 10^{-5}),取此 2 个稀释度菌液,用微量移液器取 20 μ l/滴于培养基表面,每个稀释度滴 3 滴,然后迅速置于厌氧培养箱中培养 72h。肠

道需氧菌群检测时,粪便标本依预试结果选取 EMB (10^{-3} 、 10^{-4})、EA (10^{-2} 、 10^{-3}) 稀释度,接种后在需氧条件下 37℃ 培养 24h。各种菌培养方法如下:肠杆菌:EMB 琼脂,37℃,24 ~ 48h 培养;肠球菌:EA 琼脂,37℃,24 ~ 48h 培养;双歧杆菌:TPY 琼脂,37℃,24 ~ 48h 厌氧培养;乳杆菌:LBS 琼脂,37℃,48 ~ 72h 厌氧培养;产气荚膜杆菌:TSC 琼脂 37℃,48 ~ 72h 厌氧培养。

7. 一般状态观察:观察记录各组小鼠大便含水量、毛发、活动状态、进食量及体重变化。

8. 统计学方法:培养好的细菌经鉴定后计算每克粪便中的细菌数量,即 CFU/g 标本。选择菌落适中的稀释度,算出同一稀释度平均菌落数(X)。公式:CFU/g 标本 = X/0.05 × 稀释倍数 × l/标本重量(克)。检测值一般较大,为计算方便将其转换为对数值,即 lgCFU/g 形式。各组数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析进行统计,实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般状态:小鼠在给予大黄水煎剂灌胃第 3 天出现溏便,以后逐渐出现饮食进水量减少、体重减轻、并出现明显的拱背、眯眼、扎堆、活动减少等症状。随着造模时间的增加逐渐出现,竖毛、背部毛色枯槁、脱毛,粪便变得更稀等脾虚症状。经金仁陈子方煎剂治疗后,小鼠粪便含水量降低,活动增多,体重增加,畏寒减轻,毛色光泽逐渐恢复。第 7 天时上述指标已接近正常对照组水平。脾虚模型组上述指标第 7 天时改善不明显。

2. 肠道菌群变化(表 1):脾虚模型组小鼠与正常对照组比较,粪便内的肠杆菌($P < 0.01$)、肠球菌($P < 0.01$)、产气荚膜梭菌($P < 0.05$)的数量显著增加而双歧杆菌($P < 0.01$)、乳酸菌($P < 0.05$)的数量显著减少,说明给小鼠服用大黄水煎液造成脾虚模后,小鼠的肠道菌群发生失调。妈咪爱组小鼠与模型组小鼠比较粪便内的双歧杆菌、乳酸菌($P < 0.05$)的数量显著增加($P < 0.05$),肠杆菌($P < 0.05$)、肠球菌($P < 0.05$)、产气荚膜梭菌($P < 0.01$)的数量显著降低,说明妈咪爱对脾虚小鼠肠道内的菌群有调节作用。金仁陈子方高、低剂量组与脾虚模型组比较,小鼠粪便内的双歧杆菌、乳酸菌的数量显著增加($P < 0.05$)。肠杆菌($P < 0.01$)、肠球菌($P < 0.05$)、产气荚膜梭菌($P < 0.01$)的数量显著降低,说明脾虚模型小鼠服用金仁陈子方后,肠道菌群得到恢复,表明该方具有调节肠道微生态的作用。

表 1 金仁陈子方对大黄致脾虚模型小鼠肠道菌群的影响($\bar{x} \pm s, \lg\text{CFU/g}$)

组别	肠杆菌	肠球菌	产气荚膜梭菌	乳酸杆菌	双歧杆菌
正常对照组	6.710 ± 4.40	6.040 ± 4.91	9.977 ± 1.69	8.534 ± 3.13	9.308 ± 3.36
脾虚模型组	8.235 ± 2.63 **	7.173 ± 4.37 **	10.268 ± 2.04 *	8.275 ± 2.43 *	8.838 ± 2.67 **
妈咪爱组	7.715 ± 9.32 ** #	6.636 ± 4.76 ** #	9.549 ± 4.89 ** ##	8.558 ± 4.22 #	9.160 ± 3.44 #
金仁陈子方高剂量组	7.435 ± 7.74 ** ##	6.635 ± 12.45 ** #	9.371 ± 2.58 ** ##	8.525 ± 3.44 #	9.121 ± 2.77 #
金仁陈子方低剂量组	7.464 ± 9.42 ** ##	6.640 ± 7.99 ** #	9.313 ± 1.30 ** ##	8.661 ± 2.48 #	9.115 ± 2.93 #

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

讨 论

脾胃为后天之本, 气血生化之源。祖国医学认为“脾主运化”, 指脾具有将水谷化为精微, 并将精微物质转输至全身各脏腑组织的功能。实际上, 就是阐述脾对营养物质的消化、吸收和运输的功能^[2]。脾与消化系统关系最为密切, 消化系统形态和功能的异常是脾最基本的病理变化。一般表现为食欲减退、食后或下午腹胀、大便溏薄、面色饥黄和肌瘦无力等^[3]。

随着脾虚证动物模型的建立和现代科学技术的引入等, 使得脾虚证的实验研究从多角度展开。近年来新兴的肠道微生物学与“脾”的联系引起了中医药学者的广泛关注^[4]。肠道微生态系统是机体最庞大、最重要的微生态系统, 健康成人的肠道栖息着 $10^{13} \sim 10^{14}$ 个细菌, 其数量是人体细胞数 10 倍^[5]。肠道菌群与宿主在正常情况下处于共生状态。肠道菌群主要参与机体的营养吸收与代谢、生物拮抗(防御感染)、免疫应答调节等^[6]。

脾虚证是反映机体脾胃生理功能不足的综合征。机体胃肠功能异常时, 肠道的微生态系统会受到严重破坏^[7,8]。在本实验中, 笔者发现当给小鼠灌服大黄水煎液造成脾虚模型时, 检测肠道菌群发现与正常对照组相比, 脾虚模型组小鼠肠道的大肠杆菌($P < 0.01$)、肠球菌($P < 0.01$)、产气荚膜梭菌($P < 0.05$)的数量显著增加, 而双歧杆菌($P < 0.01$)和乳酸杆菌($P < 0.05$)数量等益生菌数量显著下降。杨旭东等^[9]用大黄水煎液灌胃造小鼠实验性脾虚证模型, 引起小鼠肠道内菌群紊乱, 大肠杆菌、肠球菌含量上升, 双歧杆菌和乳杆菌菌量均下降。给予神曲治疗后, 双歧杆菌和乳杆菌数量上升至正常水平, 同时动物的体征也有所改善。这些研究都说明了脾虚与肠道菌群的失调密切相关。

厌氧菌减少是肠道菌群失调的基本改变之一^[10]。本实验发现脾虚模型小鼠粪便中的双歧杆菌的含量较正常对照组明显降低。双歧杆菌是健康动物消化道的有益菌, 具有维护肠道正常细菌菌群平衡

的功能。同时还可以提高人体的防御能力在保护机体健康等方面起到不可替代作用^[11]。本实验中灌服金仁陈子方的水煎液后的小鼠粪便中的双歧杆菌的含量较脾虚模型组显著升高($P < 0.05$), 在实验结束后已接近正常水平。而且通过对脾虚小鼠一般状态观察表明, 脾虚小鼠经金仁陈子方治疗后, 期脾虚症状逐渐恢复, 而且明显好于脾虚模型组的小鼠。

乳酸杆菌是益生菌的重要组成部分, 可通过表面黏附素与宿主受体特异性结合, 竞争黏附位点来抑制病菌。通过诱导黏附素的分泌或阻止细胞凋亡而增强肠道的屏障功能, 从而保护肠道^[12,13]。本实验中金仁陈子方的水煎液组小鼠的粪便中的乳酸杆菌的含量较脾虚模型组显著升高($P < 0.05$), 实验结束后已恢复到接近正常水平。观察脾虚小鼠一般体征状态发现, 脾虚小鼠经金仁陈子方治疗后, 脾虚症状逐渐恢复, 明显好于脾虚模型组自然恢复的小鼠。表明金仁陈子方对双歧杆菌、乳酸杆菌这两个重要的“健康因子”表现出明显的扶植作用。通过扶植益生菌而间接排斥病原菌或条件致病菌, 是微生态调节剂的基本作用途径之一^[14]。

肠球菌由于其具有天然耐药和获得性耐药的特性已成为医院内感染的临床治疗棘手的问题之一, 越来越受到人们的重视^[15,16]。本研究发现, 脾虚模型小鼠肠道肠球菌含量有显著程度上升($P < 0.01$), 而经金仁陈子方水煎液治疗之后, 肠球菌含量显著低于模型组($P < 0.05$)。金仁陈子方显示出对肠球菌的较强抑制作用, 表明其有潜在拮抗耐药性菌株的能力。

近年肠道微生态的重要性以及其与脾虚证发生发展的联系逐步引起了人们的广泛重视。随着对肠道微生态结构与功能研究的不断加深, 肠道菌群对机体健康的重要性逐步被认识。深入的分析肠道菌群也是研究脾胃疾病的生理功能和病理变化的一个重要和有效途径。通过对脾虚动物肠道菌群变化的分析, 将有助于阐明脾虚的本质。本实验发现金仁陈子

方可使脾虚小鼠肠道内已降低的双歧杆菌、乳杆菌数量显著升高,而使脾虚小鼠已升高的需氧菌如大肠杆菌、肠球菌等的数量减少,表明金仁陈子方可调整肠道微生态,为该方在临床的应用提供了实验依据。

参考文献

- 1 吴三明,张万岱. 脾虚泄泻患者肠道微生物学的初步研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志,1996,4(4):203-204
- 2 徐涛. 中医脾虚证的现代研究进展[J]. 时珍国医国药,2002,13(4):243-245
- 3 孔令彪,江琪,董明霞,等. 中医脾虚证研究的现状和展望[J]. 北京中医药,2008,9(27):738-739
- 4 彭颖,李晓波. 脾虚证与肠道微生态[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(34):3287-3291
- 5 李志川,郑跃杰. 肠道菌群及免疫[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(7):507-510
- 6 程茜,刘作义. 肠道菌群与肠黏膜免疫[J]. 中国微生态学杂志,2003,4(15):59-60
- 7 王卓,彭颖,李晓波. 四君子汤对两种脾虚模型大鼠肠道菌群紊乱的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2009,9(29):825-829
- 8 朱珊. 健脾止泻颗粒对脾虚泄泻小鼠肠道菌群和小肠粘膜的作用

- [J]. 北京中医药大学学报,2003,26(3):28-30
- 9 杨旭东,胡静,夏清平,等. 神曲1号、2号对脾虚小白鼠肠道菌群调整及肠保护作用的研究[J]. 中国微生态学杂志,2004,16(5):22-25
- 10 李秋明,张亚杰,张大方,等. 健脾止泻颗粒对脾虚证及抗生素肠道菌群失调模型小鼠的微生态调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(12):1119-1121
- 11 吴淑清,王顺余,谭克,等. 双歧杆菌的研究现状[J]. 长春大学学报,2007,17(4):57-61
- 12 章文明,汪海峰,刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展[J]. 动物营养学报,2012,24(3):389-396
- 13 许珂,魏萍. 益生菌作用机制的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(1):90-92
- 14 丁维俊,周邦靖,翟慕东,等. 参苓白术散对小鼠脾虚模型肠道菌群的影响[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(8):530-533
- 15 周霞,王晓兰,剡根强,等. 肠球菌研究进展[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2008,26(6):708-712
- 16 李爽,张正. 肠球菌耐药性的研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(10):86-89

(收稿日期:2013-12-27)

(修回日期:2014-01-02)

引经药醋柴胡对索拉非尼在大鼠血液和肝脏中药物浓度的影响

何春晓 张贝贝 郑 蕾 黄 翔 艾进超 施 思 卢红阳 张沂平

摘 要 **目的** 研究引经药醋柴胡对索拉非尼在大鼠血液和肝脏中药物浓度的影响。**方法** 选用健康雄性 SD 大鼠,随机分为对照组和醋柴胡组。醋柴胡组按醋柴胡的给药剂量分低、中、高(600mg/kg、1200mg/kg、2400mg/kg)3 个小组,对照组给蒸馏水,连续灌胃 5 天后各组均按 65mg/kg 剂量灌胃索拉非尼。采用高效液相色谱法测定大鼠血浆和肝脏中索拉非尼的药物浓度。**结果** 与对照组相比,醋柴胡组的索拉非尼在肝脏中浓度差异有统计学意义($P < 0.05$),但在血浆中药物浓度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 醋柴胡可以增加索拉非尼在大鼠肝脏中的浓度。

关键词 醋柴胡 索拉非尼 高效液相色谱法 药物浓度

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

Effects of Medicinal Guide Drug Vinegar Processing Radix Bupleuri on Sorafenib Concentration in Plasma and Liver of Rats. He Chunxiao, Zhang Beibei, Zheng Lei, et al. Department of Medical Oncology, Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang 310022, China

Abstract Objective To research the effects of medicinal guide drug vinegar processing Radix Bupleuri on sorafenib concentration in plasma and liver of rats. **Methods** Healthy male SD rats were recruited and randomly divided into control group and vinegar processing Radix Bupleuri group. Vinegar processing Radix Bupleuri group had three group according to the dose of Vinegar processing Radix Bupleuri administered at 600mg/kg, 1200mg/kg and 2400mg/kg. The control group were administered with distilled water. After 5 days con-

基金项目:浙江省中医药科学研究基金资助项目(2012ZA022)

作者单位:310022 杭州,浙江省肿瘤医院化疗中心(何春晓、张贝贝、郑蕾、卢红阳、张沂平);310053 杭州,浙江中医药大学(何春晓、黄翔、艾进超、施思)

通讯作者:张沂平,电子信箱:zyp@medmail.com.cn