

# 四君子汤对脾虚北京鸭胃肠组织中血管活性肠肽和生长抑素 mRNA 表达的影响

董虹<sup>1</sup>, 刘凤华<sup>2\*</sup>, 穆祥<sup>2</sup>, 张永东<sup>1</sup>, 许剑琴<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 北京农学院动科系, 北京 102206)

**摘要:** 为从分子水平阐明脾虚与胃肠激素之间的关系以及健脾中药四君子汤防治脾虚的机制, 首次用北京鸭复制脾虚证模型, 以半定量的 RT-PCR 方法检测其腺胃、十二指肠和空肠血管活性肠肽(VIP)和生长抑素(SS) mRNA 表达的变化。结果表明, 脾虚组腺胃 VIP mRNA 表达显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 十二指肠和空肠 VIP mRNA 表达有所升高 ( $P > 0.05$ ); 脾虚组腺胃 ( $P < 0.01$ )、十二指肠 ( $P < 0.05$ ) 和空肠 ( $P < 0.01$ ) SS mRNA 表达显著低于对照组。经四君子汤预防和治疗后二者恢复到接近对照组水平。提示脾虚证与 VIP 和 SS 有一定关系, 四君子汤对 VIP 和 SS 水平的影响可能是该方治疗脾虚证的作用机制之一。

**关键词:** 北京鸭; 脾虚; 四君子汤; 血管活性肠肽; 生长抑素

中图分类号: S853.76

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)10-1042-05

## Effect of Sijunzi Decoction on the Expression of mRNA of VIP and SS of Beijing Duck with Spleen Deficiency

DONG Hong<sup>1</sup>, LIU Feng-hua<sup>2\*</sup>, MU Xiang<sup>2</sup>, ZHANG Yong-dong<sup>1</sup>, XU Jian-qin<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

**Abstract:** The object of this paper is to explore the mechanism of Sijunzi decoction on spleen deficiency (SD) models and the relationship between spleen deficiency syndrome and gastrointestinal hormones. Spleen deficiency model was established in Beijing ducks by injected Reserpine, the expression of mRNA of VIP and SS gene in proventriculus, duodenum and jejunum were measured by semi-quantitative RT-PCR. Results indicated that the expression of mRNA of VIP gene in proventriculus of SD ducks were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of control group while the expression of mRNA of SS gene were lower ( $P < 0.01$  in proventriculus;  $P < 0.05$  in duodenum;  $P < 0.01$  in jejunum) than that of the control group. After treated with Sijunzi decoction, the expression of VIP and SS gene of SD duck were closed to that of control. The data showed that spleen deficiency syndrome was closely related with the change of gastrointestinal hormones (VIP and SS). The regulation effect of Sijunzi decoction on VIP and SS might be one of the therapeutic mechanisms in curing spleen deficiency syndrome.

**Key words:** Beijing duck; spleen deficiency syndrome; Sijunzi decoction; vasoactive intestinal peptide; somatostatin

现代医学认为, 中医学的脾胃是以消化系统为主的、多系统多功能的综合单位。脾虚时出现一系列

收稿日期: 2005-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270977)

作者简介: 董虹(1978-), 女, 四川绵竹人, 博士生, 主要从事中西兽医结合研究

\* 通讯作者: 许剑琴, 刘凤华, 主要从事中兽药研发及其中药机理研究, E-mail: jianqinxu@126.com

以消化和吸收障碍为主的综合症候,胃肠激素在调节消化道的运动、分泌以及消化和吸收等活动中起重要作用。脾虚证动物出现的胃肠功能紊乱等症候与胃肠激素的调节有密切关系<sup>[1]</sup>。血管活性肠肽(Vasoactive Intestinal Peptide, VIP)具有很强的扩血管和松弛胃肠道血管平滑肌作用,并可抑制胃酸、胃蛋白酶的分泌,抑制胃蠕动和胆囊收缩。生长抑素(Somatostatin, SS)是重要的胃肠激素之一,对胃肠道运动、吸收和胃酸分泌具有普遍的抑制作用。研究显示<sup>[2, 3]</sup>,VIP 和 SS 水平在一定程度上可反映胃肠道运动功能状态。健脾益气方剂四君子汤作为中医和中兽医治疗脾虚的经典方已经被广泛地用于临床,并在相关研究中用于探讨脾虚本质以及脾虚与胃肠激素关系。近年来国内对脾虚证进行了多方面研究,但均限于使用放射免疫分析方法,且报道不相一致<sup>[4~9]</sup>。本试验首次以利血平注射北京鸭造脾虚模型,用半定量 RT-PCR 技术检测胃肠组织中 VIP 和 SS 的 mRNA 表达变化,从分子水平研究了脾虚与胃肠激素之间的关系以及中药四君子汤的调节作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物

利血平注射液(1 mg/mL),上海医科大学红旗制药厂生产;四君子汤由党参、白术、茯苓、炙甘草(购于北京同仁堂)4味中药组成,按 2:2:2:1 的比例,蒸馏水浸泡 30 min,常法煎煮 2 次,每次 40 min,药液混合,纱布过滤,滤液 75 °C 水浴,浓缩为 1 g/mL 和 2 g/mL 浓度,4 °C 冰箱储存备用。

### 1.2 试剂

总 RNA 小量提取试剂盒为博大泰克产品;M-MLV 反转录酶和 *Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品;dNTP、DNA Marker、琼脂糖由上海生工生物有限公司提供。

### 1.3 引物设计

参照 GenBank 中已登陆的鸡 VIP(X80906)、SS(X60191)以及鸭的  $\beta$ -actin(AY251275)基因序列设计了 3 对引物(见表 1)。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.4 造模

选择利血平建立北京鸭脾虚模型。使用剂量:参照其它动物造模剂量<sup>[10~13]</sup>,通过动物试验,以出现便溏、倦怠、毛色枯槁等明显脾虚体征为脾虚模型

复制成功,确定北京鸭脾虚模型使用剂量为 0.3 mL/kg。

表 1 VIP、SS 和  $\beta$ -actin 引物序列

Table 1 Sequence of primer of VIP, SS and  $\beta$ -actin

基因 Gene	引物序列 Sequence of primer
VIP	上游 5'-ATTATTGATAGCTCCCAGGA-CAGT-3'
	下游 5'-GAGGTGGCTCAGCAGTTCATC-3'
SS	上游 5'-AGAGCCAAGCCAGACAGA-3'
	下游 5'-GGAGGACAGGTGGGTTTCA-3'
$\beta$ -actin	上游 5'-AAGTAACTCGCCTCTGTG-3'
	下游 5'-ACTGTAAAGCCTTCATTC-3'

### 1.5 动物及分组

北京鸭,30 日龄,体重 1.5 kg 左右(购于北京金星鸭业中心南口种鸭场)。随机分组,每组 6 只。  
① 对照组:每只肌肉注射生理盐水 0.3 mL/(kg·d),连续 14 d;  
② 脾虚组:每只肌肉注射利血平 0.3 mL/(kg·d),连续 14 d;  
③ 预防组:每只肌肉注射利血平 0.3 mL/(kg·d),同时灌服四君子汤(1 g/mL,10 mL/次,2 次/d),连续 14 d;  
④ 治疗组 I:造模 14 d 后,第 15 天开始灌服四君子汤(1 g/mL,10 mL/次,2 次/d),连续 7 d;  
⑤ 治疗组 II:造模 14 d 后,第 15 天开始灌服四君子汤(2 g/mL,10 mL/次,2 次/d),连续 7 d;  
⑥ 自然恢复组:造模 14 d 后,第 15 天开始灌服蒸馏水(10 mL/次,2 次/d),连续 7 d。  
①、②、③ 组动物,第 15 天禁食不禁水 6 h 后处死;④、⑤、⑥ 组动物第 22 天禁食不禁水,6 h 后处死;分别采腺胃、十二指肠和空肠,生理盐水冲净后液氮速冻,-80 °C 保存备用。

### 1.6 总 RNA 提取

采用博大泰克公司总 RNA 提取试剂盒,分别取各种组织约 50 mg,加入玻璃研磨器中,吸入预冷的变性剂,冰浴研磨至无明显组织块,乙酸钠溶解分离,酚-氯仿-异戊醇抽提,异丙醇沉淀,适量双蒸水溶解总 RNA。

### 1.7 RT-PCR

用微量核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度,取 2  $\mu$ g RNA,加入 1  $\mu$ g oligo(dT)<sub>16</sub> 至无 RNA 酶离心管中,用 DEPC 处理水补充至 13  $\mu$ L,72 °C 水浴 5 min 后,立即置冰上冷却。然后依次加入 5  $\mu$ L 5 $\times$  反应缓冲液,5  $\mu$ L 10 mol/L dNTP,1  $\mu$ L 25 U RNasin 抑制剂和 1  $\mu$ L 200 U M-MLV 反转录酶。

42 ℃水浴 60 min,置-20 ℃冰箱备用。PCR 反应体系中加入下列成分: cDNA 模板 1.0 μL, 25 moL/L MgCl<sub>2</sub> 2.0 μL, 5U Taq-DNA 聚合酶 0.1 μL, 10×buffer 2.0 μL, 10 moL/L dNTPs 2.0 μL, 12.8 pmol/μL 上下游引物各 1.0 μL, 总体积 20 μL。反应液在 95 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 50 s, 52.8 ℃退火 40 s, 72 ℃延伸 40 s, 共 31 个循环; 最后 72 ℃保温 8 min。试验过程中设立 β-actin 作为参照。

### 1.8 PCR 产物分析

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭), 照相。用 Motic Image Advanced 3.0 分析系统分别测定样本及相应 β-actin 阳性条带的灰度平均值, 并计算样本和 β-actin 的比值(可

反映样本 mRNA 含量变化)。

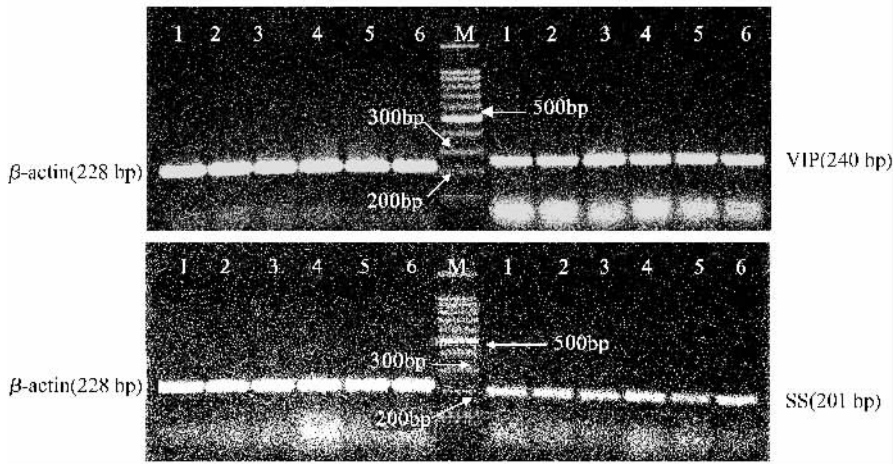
### 1.9 数据处理

各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异显著性判定采用双尾等方差 *t* 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 北京鸭不同组 VIP 和 SS RT-PCR 产物电泳结果

VIP、SS mRNA 含量变化分别由 VIP/β-actin 和 SS/β-actin 灰度平均值反应。图 1 中 Marker 左边为各组 β-actin RT-PCR 扩增产物电泳条带, 右边为 VIP(图 1 上图)和 SS(图 1 下图) RT-PCR 扩增产物电泳条带。



1. 对照组; 2. 脾虚组; 3. 自然恢复组; 4. 预防组; 5. 治疗组 I; 6. 治疗组 II; M. 标准蛋白分子量

1. Control group; 2. Spleen deficiency group; 3. Spontaneous recovery group; 4. Preservation group; 5. Treated group I; 6. Treated group II; M. DNA Marker

图 1 各组 VIP 和 SS RT-PCR 产物电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis of VIP and SS RT-PCR products from different group

### 2.2 腺胃 VIP 和 SS mRNA 表达变化

如表 2 所示, 脾虚组鸭 VIP mRNA 表达明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 预防组与治疗组 I、II mRNA 表达都接近对照组 ( $P > 0.05$ ), 其中预防组和治疗组 I 明显低于脾虚组 ( $P < 0.05$ ), 治疗组 II 和脾虚组差异不显著; 脾虚组鸭 SS mRNA 表达显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 预防组和脾虚组比较虽然有所提高, 但差异不显著, 和对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 治疗组 I 和 II SS 的表达与对照组接近 ( $P > 0.05$ ), 都明显高于脾虚组 ( $P < 0.05$ ); 自然恢复组 VIP 和 SS 表达同脾虚组比较差异不大, 与对照组比较虽然数值上有差异, 但无统计学意义。

表 2 北京鸭腺胃 VIP、SS mRNA 表达变化

Table 2 Expression of mRNA of VIP and SS in proventriculus of Beijing duck (n=6)

组别 Group	VIP	SS
对照组 Control group	0.77 ± 0.08	1.09 ± 0.10
脾虚组 Spleen deficiency group	0.89 ± 0.09▲	0.85 ± 0.10▲▲
预防组 Preservation group	0.76 ± 0.06*	0.95 ± 0.07▲
治疗组 I Treated group I	0.77 ± 0.06*	0.98 ± 0.06*
治疗组 II Treated group II	0.79 ± 0.04	0.99 ± 0.08*
自然恢复组 Spontaneous recovery group	0.86 ± 0.12	0.91 ± 0.33

与对照组比较 ▲.  $P < 0.05$ , ▲▲.  $P < 0.01$ ; 与脾虚组比较 \*.  $P < 0.05$ , \*\* .  $P < 0.01$ , 下表同

Compared with control group ▲.  $P < 0.05$ , ▲▲.  $P < 0.01$ , compared with spleen deficiency group \*.  $P < 0.05$ , \*\* .  $P < 0.01$ , the same as below

### 2.3 十二指肠 VIP 和 SS mRNA 表达变化

如表 3 所示,脾虚组 VIP mRNA 表达虽高于对照组,但差异不显著,SS mRNA 表达明显低于对照组( $P < 0.05$ );预防组与治疗组 I 和 II SS mRNA 表达都接近对照组,和脾虚组比较,预防组和治疗组 II 差异显著( $P < 0.05$ ),治疗组 I 差异极显著( $P < 0.01$ );自然恢复组 SS mRNA 表达和脾虚组比较有所升高,但差异不显著,和对照组比较差异也不显著。

表 3 北京鸭十二指肠 VIP、SS mRNA 表达变化

Table 3 Expression of mRNA of VIP and SS in duodenum of Beijing duck (n=6)

组别 Group	VIP	SS
对照组 Control group	0.73±0.17	0.72±0.14
脾虚组 Spleen deficiency group	0.78±0.13	0.57±0.05▲
预防组 Preservation group	0.70±0.16	0.69±0.10*
治疗组 I Treated group I	0.74±0.02	0.69±0.06**
治疗组 II Treated group II	0.63±0.04	0.71±0.10*
自然恢复组 Spontaneous recovery group	0.75±0.12	0.65±0.13

### 2.4 空肠 VIP 和 SS mRNA 表达变化

如表 4 所示,脾虚组 VIP mRNA 表达高于对照组,但差异不显著。脾虚组 SS mRNA 表达显著低于对照组( $P < 0.01$ );预防组 SS 表达与脾虚组接近( $P > 0.05$ ),和对照组比较差异显著( $P < 0.05$ ),治疗组 I 和 II SS mRNA 表达接近对照组( $P > 0.05$ ),同脾虚组比较差异显著( $P < 0.05$ )。自然恢复组和脾虚组比较有所升高,但差异不显著。

表 4 北京鸭空肠 VIP、SS mRNA 表达变化

Table 4 Expression of mRNA of VIP and SS in jejunum of Beijing duck (n=6)

组别 Group	VIP	SS
对照组 Control group	0.81±0.18	0.68±0.07
脾虚组 Spleen deficiency group	0.90±0.08	0.56±0.05▲▲
预防组 Preservation group	0.86±0.03	0.58±0.05▲
治疗组 I Treated group I	0.80±0.25	0.65±0.06*
治疗组 II Treated group II	0.85±0.25	0.63±0.06*
自然恢复组 Spontaneous recovery group	0.84±0.03	0.59±0.16

## 3 讨论

VIP 是由 28 个氨基酸组成的直链肽,属于抑制性递质,主要通过旁分泌形式作用于靶细胞<sup>[14]</sup>。胃

肠上皮细胞基底膜有 VIP 的受体,当其与 VIP 结合时,刺激细胞中的 Ca-P 的蓄积,促进肠上皮细胞分泌电解质和水分,VIP 是黏膜水、电解质的强烈刺激剂<sup>[15]</sup>。VIP 能引起胃容受性舒张、抑制胃酸分泌、刺激小肠分泌和胰腺分泌碳酸氢盐及水分,松弛胃肠道平滑肌,抑制结肠和直肠的紧张性,VIP 功能一旦紊乱会导致胰腺分泌异常,从而出现一系列与消化吸收有关的疾病。有研究显示<sup>[16]</sup>脾虚患者组织中 VIP 含量明显高于非脾虚患者及正常对照组,这和本次试验所得结果脾虚腺胃 VIP mRNA 的表达明显高于对照组一致,可见 VIP 异常与脾虚关系紧密。本次试验显示,与对照组比较,脾虚北京鸭十二指肠和空肠 VIP mRNA 的表达有所升高,但差异不显著,是否因为 VIP 在胃和肠道表达差异引起,还需要进一步验证。

SS 是一种环状 14 氨基酸多肽,具有五个不同受体亚型,广泛分布于细胞膜上,其作用方式是通过高亲和性的特异 G 蛋白介导的膜受体调节<sup>[17]</sup>。研究显示<sup>[18]</sup>脾气虚(含脾虚夹寒、脾虚夹郁、脾虚夹热)患者胃窦黏膜 SS 均减少。因 SS 具有保护胃肠道黏膜、抑制胃酸分泌和抑制胃肠运动及其它激素分泌的作用,故其减少时胃肠道黏膜易受损而发生炎症,从而认为胃窦黏膜 SS 含量减少是脾虚证的一项重要病理改变。本试验显示脾虚北京鸭腺胃、十二指肠和空肠 SS mRNA 表达都明显减少,和上述观点一致。在鼠的研究显示<sup>[3,7]</sup>脾虚时外周组织 SS 含量升高,而本试验研究对象是北京鸭,是否因为种属不同而造成的差异,还需要进一步探讨。

四君子汤作为健脾益气的经典方,广泛应用于临床治疗脾虚,疗效确实。魏彦明等研究发现四君子汤益气健脾作用与其调整血浆  $\beta$ -内啡肽、降钙素基因相关肽和神经肽 Y 的含量有关<sup>[9]</sup>。本研究显示脾虚与胃肠道 VIP 和 SS 基因表达变化有关,四君子汤在脾虚鸭能降低腺胃 VIP 基因表达和提高腺胃、十二指肠、空肠 SS 基因表达,调整血浆中 VIP 和 SS 浓度,使其趋于正常,从而促进胰酶分泌,增强消化功能,使脾主运化功能恢复正常。试验中还发现四君子汤两种浓度(1 g/mL 和 2 g/mL)治疗效果差异不大,从十二指肠 SS mRNA 表达看,治疗组 I(四君子汤浓度为 1 g/mL)效果要比治疗组 II(浓度 2 g/mL)效果更好。

以往研究都基于放射免疫分析(RIA)方法探讨脾虚与胃肠激素的关系。如魏彦明等<sup>[6]</sup>用放射免疫

法测得实验性脾虚大鼠血清胃泌素(GAS)和胃动素(MOT)含量均降低,四君子汤能提高血浆 GAS 和 MOT 含量,有效地改善脾虚证的胃肠功能;证明脾虚时消化吸收机能障碍和胃肠动力学的改变与 GAS 和 MOT 的分泌减少密切相关。RIA 法虽在研究中应用较为广泛,但因其有放射污染,且试验受到抗体种类的限制,存在一定的局限性。本试验采用 RT-PCR 方法(该方法简便、快速、灵敏,不受抗体限制,可用于不同品种动物任何激素检测),通过检测脾虚时胃肠激素 mRNA 的表达从分子水平揭示脾虚和胃肠激素 VIP 和 SS 的关系,脾虚时腺胃 VIP mRNA 表达显著升高,SS 在腺胃、十二指肠和空肠 mRNA 表达都显著降低。同时也揭示了四君子汤可通过调整胃肠激素的平衡而达到健脾益气的目的,为开发和研究健脾助消化新药奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 刘素梅,曲瑞瑶,王伟,等. 实验性脾虚证大鼠胃窦部 SP、VIP、CGRP 含量的研究[J]. 首都医科大学学报, 1998, 19(2): 105~107.
- [2] 毛炯,李艳嫦,朱伟淑,等. 脾阴虚与脾气虚血浆血管活性肠肽水平对比[J]. 中医药学刊, 2003, 21(5): 693.
- [3] 封吉化,尚虎虎,黄熙,等. 脾虚早期与脾虚期大鼠组织和血浆中 SS、CCK、MOT 含量变化的探讨[J]. 武警医学, 2005, 5: 336~339.
- [4] 马建伟,徐丽梅,郝刚,等. 脾虚证与血浆和胃窦组织中生长抑素关系的探讨[J]. 实用中西医结合杂志, 1995, 8(11): 664~665.
- [5] 张万岱,姚永莉,宋于刚. 脾虚证大鼠组织中胃泌素及生长抑素含量的变化及意义[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1998, 6(4): 223~225.
- [6] 魏彦明,宗瑞谦,杨孝朴,等. 实验性脾虚证大鼠血浆胃泌素和胃动素含量变化及四君子汤对其调整作用[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(3): 281~283.
- [7] 刘芳,任平,李月彩,等. 脾虚证大鼠胃、肠电-机械活动异常与 CCK、SS 含量变化的关系[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(10): 881~884.
- [8] 李利生,曲瑞瑶,王伟. 实验性脾虚大鼠与冷应激大鼠回肠段 SP、VIP 含量的变化[J]. 中西医结合杂志, 2002, 12(2): 75~77.
- [9] 魏彦明,杨孝朴. 四君子汤对实验性脾虚证模型大鼠血浆内几种神经肽含量的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 404~407.
- [10] 王肃,邹世洁,陈小野,等. 利血平脾虚证模型海马基因表达谱变化的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(7): 841~844.
- [11] 崔红霞,徐辉. 灵五芪口服液对利血平所致小鼠脾虚模型的实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2004, 25(3): 242~243.
- [12] 张锐,王联庆,李雨升,等. 捏脊疗法对脾虚家兔血浆胃泌素的影响[J]. 按摩与导引, 2004, 20(5): 5~7.
- [13] 李婷,陈小兵. 电针太白穴对实验性脾虚家兔的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(5): 25~26.
- [14] Chaiseha Y, Youngren O M, El-Halawani M E. Expression of vasoactive intestinal peptide receptor messenger RNA in the hypothalamus and pituitary throughout the turkey reproductive cycle [J]. Biology of Reproduction, 2004, 70(3): 593~599.
- [15] 谢建群,陆雄,龚丽萍,等. 健脾温中法对脾胃虚寒型肠易激综合征模型大鼠血管活性肠肽影响的实验研究[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(4): 49~51.
- [16] 马建伟. 脾虚证与胃肠激素关系的研究概况[J]. 空军总医院学报, 1994, 10(2): 98~100.
- [17] Slagter B J, Kittilson J, Sheridan M A. Expression of somatostatin receptor mRNAs is regulated in vivo by growth hormone, insulin, and insulin-like growth factor-I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Regulatory Peptides, 2005, 128(1): 27~32.
- [18] 赵燕玲,夏天. 脾虚证与胃肠激素关系研究的现状与展望[J]. 安徽中医学院学报, 1999, 18(6): 58~60.