

范蒙蒙,张雨,李红伟,等. 肉豆蔻曲代替麸煨肉豆蔻组成方新二神丸的止泻作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 48-57.

FAN M M, ZHANG Y, LI H W, et al. Study on the antidiarrheal effect of the new "Ershen pills" composed of nutmeg koji instead of bran stewed nutmeg [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 48-57.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.01.007

肉豆蔻曲代替麸煨肉豆蔻组成方新二神丸的止泻作用研究

范蒙蒙¹, 张雨¹, 李红伟^{1,2,3}, 张振凌^{1,2,3}, 李凯^{1,2,3*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 郑州 450046; 3. 国家中医药管理局中药炮制传承基地, 郑州 450046)

【摘要】 目的 基于脾肾阳虚泄泻小鼠模型探讨肉豆蔻曲配伍组成新二神丸的止泻作用。方法 将KM小鼠随机分为正常组、模型组、二神丸I组(盐补骨脂+麸煨肉豆蔻)、二神丸II组(盐补骨脂+肉豆蔻曲)、二神丸III组(盐补骨脂+肉豆蔻生品)、盐补骨脂组、肉豆蔻曲组,采用“氢化可的松+番泻叶”的复合造模方法建立脾肾阳虚泄泻小鼠模型,观察各组小鼠一般体征、各脏器病理变化,检测小鼠各脏器指数、小肠推进率、胃残留率、血清胃动素(MTL)、胃泌素(GAS)、肾上腺酮(CORT)、促甲状腺激素(TSH)、睾酮(T)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)水平,对粪便微生物进行16S rDNA测序及信息分析。结果 造模后,与正常组相比,模型组小鼠体重减轻,活动量减少,小肠推进率显著升高,胃残留率、各脏器指数均显著降低,血清GAS、CORT、TSH、T水平均显著下降,MTL、TNF- α 、IL- 1β 水平均显著上升,肠道菌群物种多样性降低;给药后,各给药组小鼠上述指标和症状均有不同程度改善,且二神丸II组整体上优于二神丸I组、二神丸III组、盐补骨脂组及肉豆蔻曲组。结论 肉豆蔻曲与盐补骨脂配伍使用对脾肾阳虚泄泻的作用效果显著,肉豆蔻发酵后能减少其毒性风险,增强其温脾止泻作用,为肉豆蔻曲的开发奠定基础。

【关键词】 肉豆蔻曲;配伍;脾肾阳虚;泄泻

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)01-0048-10

Study on the antidiarrheal effect of the new "Ershen pills" composed of nutmeg koji instead of bran stewed nutmeg

FAN Mengmeng¹, ZHANG Yu¹, LI Hongwei^{1,2,3}, ZHANG Zhenling^{1,2,3}, LI Kai^{1,2,3*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan TCM Characteristic Processing Technology Engineering Research Center, Zhengzhou 450046, China; 3. National Administration of Traditional Chinese Medicine TCM Processing and Inheritance Base, Zhengzhou 450046, China)

Corresponding author: LI Kai. E-mail: cpulikai@163.com

【Abstract】 Objective Exploring the antidiarrhea effect of new Ershen pills composed of nutmeg koji based on the spleen and kidney yang deficiency diarrhea mouse model. **Methods** KM mice were randomly divided into normal, model, Ershen pills I (salt psoralen + bran-stewed nutmeg), Ershen pills II (salt psoralen + nutmeg koji), Ershen pills III (salt psoralen + nutmeg raw product), salt psoralen, and nutmeg koji groups. The combined modeling method of hydrocortisone + senna leaf was used to establish the diarrhea mouse model with spleen-kidney yang deficiency. General

【基金项目】 河南省高校科技创新人才支持计划(21HASTIT047)。

Funded by Henan Province University Science and Technology Innovation Talent Support Program (21HASTIT047).

【作者简介】 范蒙蒙,女,硕士,研究方向:中药炮制技术及炮制机理。Email: 2513768856@qq.com

【通信作者】 李凯,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药炮制。Email: cpulikai@163.com

signs and pathological changes of each organ were observed. Various organ indexes, the small intestine propulsion rate, gastric residual rate, serum motilin (MTL), gastrin (GAS), adrenal ketone (CORT), thyroid stimulating hormone (TSH), testosterone (T), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin 1 β (IL-1 β) were assessed. 16S rDNA sequencing and data analysis were conducted for fecal microorganisms. **Results** After modeling, compared with the normal group, the weight and activity of mice in the model group were reduced, the small intestine propulsion rate was significantly increased, the gastric residual rate and organ indexes were significantly decreased, serum GAS, CORT, TSH, and T levels were significantly decreased, MTL, TNF- α , and IL-1 β levels were significantly increased, and intestinal flora species diversity was decreased. After administration, the above indexes and symptoms were improved by various degrees in each administration group, and the Ershen pills II group was better than Ershen pills I, Ershen pills III, salt-psoralea, and nutmeg koji groups. **Conclusions** Combined use of nutmeg koji and salt psoralea has a remarkable effect on diarrhea of spleen-kidney yang deficiency. Fermented nutmeg reduces its toxicity risk and enhances its effect of warming the spleen and preventing diarrhea, which facilitates the development of nutmeg koji.

【Keywords】 nutmeg koji; compatibility of medicines; spleen-kidney yang deficiency; diarrhea

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

曲类中药多具有消导之功,可健脾消食,促进胃肠运动,《本草经疏》中有类似记载:“古人用曲,即造酒之曲,其气味甘温,性专消导,行脾胃滞气,散脏腑风冷”。中药发酵是借助微生物的自身代谢,对原药材中化学成分进行分解、加工、结构修饰,达到“增效”和“减毒”的目的,可对中药的药性以及药理作用产生影响^[1-3]。有研究表明,附子经发酵后,生物碱含量显著降低;黄芪发酵产物的总黄酮含量、体外抗氧化和降糖作用显著增强;固态发酵葛根渣比直接醇提葛根渣获得的葛根素含量提高了 74.8%,发酵技术的应用为中药创新发展提供了广阔空间^[4-10]。

肉豆蔻为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁^[11],其味辛,性温,归脾、胃、大肠经,具有温中行气、涩肠止泻的功效,临床可用于治疗脾胃虚寒、久泻不止、脘腹胀痛、食少呕吐。已有研究表明,麸煨肉豆蔻和盐补骨脂配伍组成的二神丸对脾肾阳虚泄泻模型有较好的干预效果^[12-15]。肉豆蔻生品中含有大量挥发油,有滑肠之弊,煨制后,挥发油含量显著降低,其止泻成分甲基丁香酚、甲基异丁香酚含量升高,毒性成分肉豆蔻醚、黄樟醚含量降低^[16],故临床多用其炮制品,但大剂量地使用煨肉豆蔻亦可能有产生毒性的风险,因此开发可替代麸煨肉豆蔻的新饮片具有重要意义。本研究受“曲类中药多具有消导之功,可健脾消食”的启发,制备肉豆蔻曲,探讨肉豆蔻曲及其配伍组成二神丸能否对脾肾阳虚泄泻起到良好的干预效果,并采用 16S rDNA 测序技术,探讨其作用机制,为新饮片的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

70 只清洁级雄性 KM 小鼠,4 周龄,体重 18 ~ 22 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】,饲养于河南中医药大学动物实验室【SYXK(豫)2021-0015】,自由饮食饮水,提供 12 h 光照与 12 h 黑暗昼夜光照变化周期,室温 20 ~ 25 °C,相对湿度 40% ~ 65%,饲养环境清洁卫生。严格遵循实验动物使用的 3R 原则,所有操作均符合河南中医药大学动物实验伦理学要求(DWLLGZR202202193)。

1.1.2 药物

肉豆蔻(211201,安徽惠丰国药有限公司)、补骨脂(211001,安徽惠丰国药有限公司)、番泻叶(皖 20210456,安徽康和中药科技有限公司)。

1.1.3 主要试剂与仪器

氢化可的松注射液(2106203,国药集团容生制药有限公司);MTL、GAS、CORT、TSH、T、TNF- α 、IL-1 β 酶联免疫检测试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司(202302)。恒温恒湿培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);HWL-125 型电热恒温干燥箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);TGL-16M 型高速冷冻离心机(常州金坛良友仪器有限公司);EPOCH2NSC-SN 酶标仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备

(1)肉豆蔻曲:取肉豆蔻粉末(5 号筛)80 g、麦麸 13 g、面粉 8 g,将面粉加蒸馏水 100 mL 加热制成

稀糊,冷却至室温,与上述药粉揉和均匀,以手捏成团,掷之即散为宜,捏制成立方块,放入恒温恒湿培养箱(温度:32℃,湿度:85%~90%)内发酵 48 h,发酵完成后于 50℃ 恒温干燥箱干燥 24 h,即得。

(2) 麸煨肉豆蔻、盐补骨脂:按照《中国药典》(2020 版)相关项下方法制备。

(3) 药物混悬液的制备:①二神丸混悬液:将 3 种组合中的补骨脂和肉豆蔻按 2:1 配比,粉碎成细粉,加蒸馏水均匀混合配制成 0.24 g/mL 的混悬液,备用。②盐补骨脂、肉豆蔻曲混悬液:取盐补骨脂、肉豆蔻曲适量,粉碎成细粉,加蒸馏水均匀混合配制成 0.24 g/mL 的混悬液,备用。③二神丸 I 组为盐补骨脂 + 麸煨肉豆蔻;二神丸 II 组为盐补骨脂 + 肉豆蔻曲;二神丸 III 组为盐补骨脂 + 肉豆蔻生品。④番泻叶水煎液的制备:取适量番泻叶,浸泡 1 h,加水煮沸 30 min,过滤,减压浓缩成 0.5 g/mL 的药液,备用。

1.2.2 分组、造模及给药

取 70 只雄性健康 KM 小鼠,适应性喂养 3 d,随机分为 7 组(正常组、模型组、二神丸 I 组、二神丸 II 组、二神丸 III 组、盐补骨脂组和肉豆蔻曲组)。除正常组,各组小鼠每天按 0.1 mL/10 g 体重颈部皮下注射氢化可的松注射液,连续 7 d,致肾阳虚,从第 8 天开始,停止给予氢化可的松注射液,上午用番泻叶水煎液(0.2 mL/10 g)连续灌胃至第 17 天,致脾阳虚,正常组给予同等体积生理盐水。除正常组和模型组,其余各给药组从第 8 天开始,每天下午灌胃给药,连续给药 10 d,各给药组分别按 0.2 mL/10 g 体重灌胃给药,正常组和模型组给予同等体积的生理盐水。

1.2.3 一般行为学观察

每天观察记录小鼠的一般状态。

1.2.4 脏器指数检测

小鼠麻醉处死后,迅速摘取脾、胸腺、肾、睾丸、肾上腺等脏器,去除多余结缔组织,称定重量,计算脏器指数(脏器指数 = 器官重量/体重 × 100%)。

1.2.5 病理组织学检查

将脾、肾、睾丸等脏器,用生理盐水冲洗,组织固定液固定,乙醇逐级脱水,常规石蜡包埋,切片,以苏木精-伊红染色并在显微镜下观察。

1.2.6 生化指标测定

小鼠麻醉后取血,分离血清,ELISA 法检测血清中 MTL、GAS、CORT、TSH、T、TNF- α 、IL-1 β 水平。

1.2.7 小肠推进率、胃残留率

末次给药前禁食 12 h,自由饮水。末次给药后 1 h,灌胃炭末糊(5%活性炭)每只 2 mL。求得小肠推进率及胃残留率^[17](小肠推进率 = (炭末在小肠推进距离/小肠全长) × 100%、胃残留率 = (胃全-胃净)/灌胃量 × 100%)。

1.2.8 肠道菌群检测

小鼠取血后迅速开腹,取出肠组织,收集肠内容物,放入无菌冻存管,置于 -80℃ 超低温冰箱保存,以待后续进行 16S rDNA 测序。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计分析,数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般行为学观察

造模前,所有组小鼠精神状态良好,毛发洁白有光泽,粪便呈颗粒状。造模 3 d 后,除正常组外,小鼠活动量减少,毛色暗黄,大便稀软;7 d 后模型组小鼠体型逐渐消瘦,毛发枯糙,出现拱背卷曲、排水样便、肛周污秽等情况;给药后,各给药组小鼠状况均出现不同程度好转。

2.2 脏器指数

由表 1 可知,模型组各脏器指数显著低于正常组,说明造模后各脏器均发生不同程度病变;各给药组小鼠脏器指数较模型组出现不同程度升高,其中二神丸 II 组对脾肾阳虚泄泻小鼠脏器指数的干预效果优于其他给药组。

2.3 病理组织学检查

如图 1 所示,肾组织切片中:与正常组相比,模型组小鼠肾小球萎缩,肾小囊体积变大,肾小管出现空泡,细胞形态发生改变,各给药组出现不同程度好转,其中二神丸 I、II 组对肾小球形态的改善效果最明显,二神丸 II 组肾小管的破坏明显减轻;睾丸组织切片中,正常组小鼠生精细胞排列整齐,基底膜完整,精原细胞排列整齐,精子数量丰富,模型组小鼠生精细胞形态发生改变,基底膜受损,精原细胞紊乱,未见成熟的精子,各给药组中以二神丸 I、II 组对睾丸组织的恢复效果最佳;脾组织切片中:与正常组相比,模型组小鼠骨髓萎缩,骨髓中淋巴细胞明显减少,骨髓与红髓交界的边缘区模

表 1 各组小鼠脾、肾、肾上腺、胸腺、睾丸的脏器指数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Organ index of spleen, kidney, adrenal gland, thymus gland, and testis in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	脾 Spleen	肾 Kidney	肾上腺 Adrenal gland	胸腺 Thymus gland	睾丸 Testicle
正常组 Normal group	0.2406 ± 0.0163	1.4821 ± 0.0079	0.0198 ± 0.0008	0.2003 ± 0.0097	0.6033 ± 0.0070
模型组 Model group	0.2088 ± 0.0102**	1.4053 ± 0.0153**	0.0183 ± 0.0010**	0.1807 ± 0.0077**	0.5797 ± 0.0075**
二神丸 I 组 Ershen pills I group	0.2514 ± 0.0168 [#]	1.4789 ± 0.0111 [#]	0.0208 ± 0.0008 [#]	0.2123 ± 0.0156 [#]	0.6064 ± 0.0109 [#]
二神丸 II 组 Ershen pills II group	0.2666 ± 0.0152 [#]	1.5291 ± 0.0191 ^{#&&}	0.0219 ± 0.0013 ^{#&&}	0.2120 ± 0.0139 [#]	0.6082 ± 0.0147 [#]
二神丸 III 组 Ershen pills III group	0.2257 ± 0.0050 ^{#&&}	1.4312 ± 0.0089 ^{#&&}	0.0204 ± 0.0015 [#]	0.1927 ± 0.0116 ^{#&&}	0.5935 ± 0.0073 [#]
盐补骨脂组 Salt psoralen group	0.2192 ± 0.0064 ^{&&}	1.4166 ± 0.0082 ^{&&}	0.0196 ± 0.0015 ^{#&}	0.1938 ± 0.0096 ^{#&&}	0.5852 ± 0.0078 ^{&&}
肉豆蔻曲组 Nutmeg koji group	0.2324 ± 0.0074 [#]	1.4489 ± 0.0148 ^{#&&}	0.0200 ± 0.0012 [#]	0.1950 ± 0.0123 ^{#&&}	0.5950 ± 0.0065 [#]

注:与正常组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$;与二神丸 I 组相比, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$ 。(下表同)

Note. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$. Compared with Ershen pills I group, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$. (The same in the following tables)

糊,各给药组淋巴细胞出现不同程度的增多。

2.4 血清生化指标检测

与正常组相比,模型组小鼠胃肠激素相关血清指标 GAS 水平下降、MTL 水平上升;肾功能相关指标 CORT、TSH、T 水平均下降;炎症因子相关指标

TNF- α 、IL- β 水平均上升,给药后,血清各指标水平均有不同程度改善,二神丸 I、II 组对血清相关指标的干预效果优于其他给药组,且两组之间无明显差异,说明二神丸 I、II 组对脾肾阳虚泄泻模型小鼠的血清生化指标均有显著的改善效果,见表 2。

表 2 各组小鼠血清相关指标检测($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Detection of serum related indicators in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	GAS/ (pg/mL)	MTL/ (pg/mL)	CORT/ (ng/mL)	TSH/ (mU/L)	T/ (ng/mL)	TNF- α / (pg/mL)	IL- β / (pg/mL)
正常组 Normal group	54.25 ± 3.07	278.18 ± 13.54	155.02 ± 11.71	8.52 ± 0.81	17.38 ± 1.11	504.36 ± 13.49	94.80 ± 10.19
模型组 Model group	44.09 ± 8.94**	342.78 ± 19.31**	113.53 ± 7.14**	7.55 ± 0.35**	15.62 ± 0.63*	551.29 ± 27.50**	116.02 ± 6.43**
二神丸 I 组 Ershen pills I group	57.65 ± 4.19 [#]	257.38 ± 13.74 [#]	136.66 ± 4.48 [#]	8.31 ± 0.59 [#]	17.86 ± 0.62 [#]	502.42 ± 28.75 [#]	95.85 ± 6.03 [#]
二神丸 II 组 Ershen pills II group	57.98 ± 5.29 [#]	253.90 ± 16.80 [#]	142.00 ± 6.26 [#]	8.35 ± 0.62 [#]	17.29 ± 0.47 [#]	491.21 ± 15.73 [#]	93.84 ± 5.81 [#]
二神丸 III 组 Ershen pills III group	53.43 ± 3.95 [#]	216.85 ± 24.33 ^{#&&}	124.34 ± 5.57 ^{#&&}	7.84 ± 0.84	16.35 ± 1.36	515.83 ± 15.02 [#]	100.58 ± 6.63 [#]
盐补骨脂组 Salt psoralen group	50.71 ± 4.95 ^{#&&}	285.18 ± 43.98 ^{#&&}	129.08 ± 6.37 [#]	9.58 ± 0.88 ^{#&&}	16.77 ± 1.18	479.58 ± 26.91 ^{#&}	101.58 ± 8.83 [#]
肉豆蔻曲组 Nutmeg koji group	47.45 ± 7.47 ^{#&&}	308.15 ± 30.90 ^{#&&}	127.77 ± 9.30 ^{#&&}	9.85 ± 0.93 ^{#&&}	20.72 ± 2.12 ^{#&&}	513.87 ± 19.00 [#]	106.50 ± 9.21 ^{#&&}

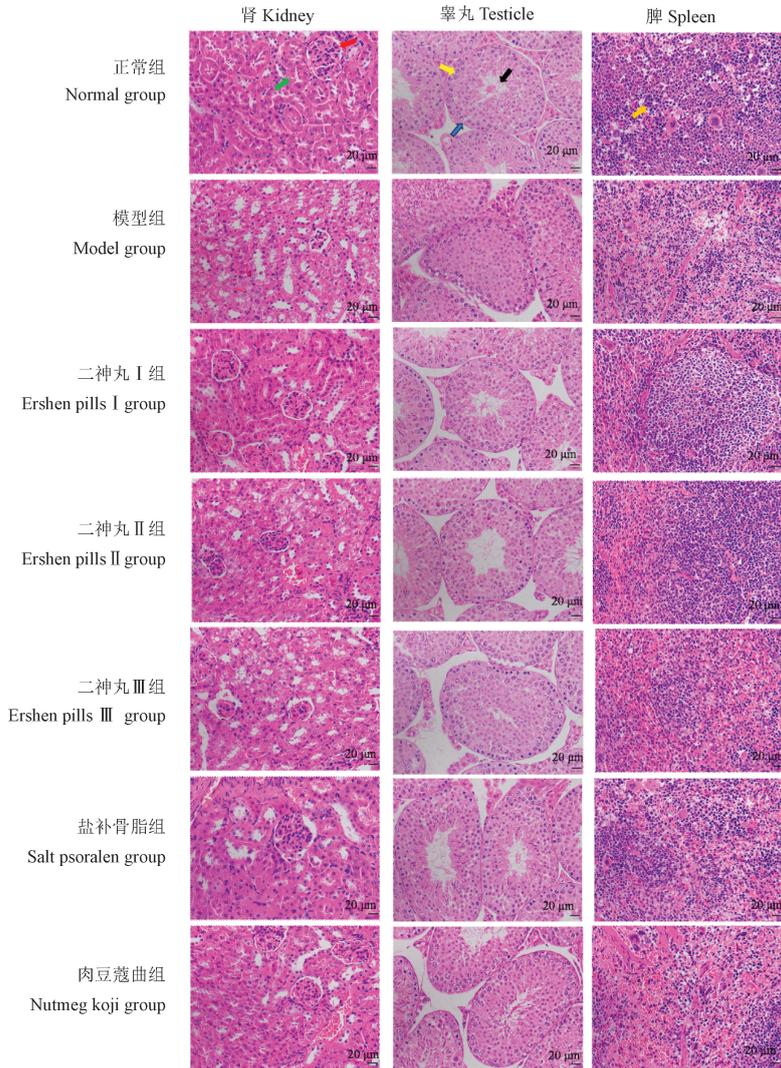
注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$.

2.5 对小肠推进及胃排空的影响

与正常组相比,模型组小鼠小肠推进率显著升高、胃残留率降低,各给药组小鼠小肠推进率水平低于模型组,二神丸 I、II 组以及肉豆蔻曲组胃残

留率显著升高。实验结果见表 3,说明二神丸 I、II 组对脾肾阳虚泄泻模型小鼠胃肠功能的干预效果优于其他组,且二神丸 II 组效果更佳,二神丸 III 组与盐补骨脂组对小肠功能的干预作用更强,但其显



注:红色箭头:肾小球;绿色箭头:肾小管;蓝色箭头:基底膜;黄色箭头:生精细胞;黑色箭头:精子;橙色箭头:淋巴细胞。

图 1 各组小鼠病理组织的 HE 染色切片

Note. Red arrow. Glomerulus. Green arrow. Renal tubules. Blue arrow. Basement membrane. Yellow arrow. Spermatogenic cells. Black arrow. Sperm. Orange. Lymphocytes.

Figure 1 HE staining sections of pathological tissues in each group of mice

著低于正常水平,可能引发胃肠道副作用。

2.6 肠道菌群结果

2.6.1 各组小鼠肠道菌群 OTU 聚类分析结果

以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs (见图 2), 7 组小鼠肠道菌群检测共检出 3083 个 OTU, 组间共有 OTU 为 45 个, 与正常组相比, 模型组 OTU 明显降低, 与模型组相比, 各给药组 OTU 出现不同程度升高, 说明脾肾阳虚泄泻模型会降低小鼠肠道菌群多样性, 给药后物种多样性得到改善, 二神丸 II 组对肠道菌群的改善作用优于二神丸 I 组。

2.6.2 α 多样性与 β 多样性分析

α 多样性指数反映样本内物种多样性, 由图 3 可知, 与正常组相比, 模型组 Shannon、Simpson、

ACE、Chao1 指数均明显降低, 与模型组比较, 二神丸 I、II 组与肉豆蔻曲组各指标明显上升, 组间比较未见显著性差异 ($P > 0.05$)。

β 多样性反映不同组间的群落多样性, 主要用于样本组间差异的比较, 样本距离越近, 表示物种组成结构越相似。由图 4 可知, 不同组样本在群落结构及组成上和模型组之间的存在差异。

2.6.3 各组小鼠肠道菌群物种组成差异分析

如图 5 所示, 在科水平上, 正常组优势物种普雷沃菌科 (Prevotellaceae) 和毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 相对丰度分别为 23.70% 和 18.59%, 模型组显著降低, 给药后, 二神丸 I、II、III 组、盐补骨脂组、肉豆蔻曲组在 Prevotellaceae 水平

表 3 各组小鼠小肠推进率和胃残留率($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Small intestine propulsion rate and gastric residue

rate of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	小肠推进率/% Small intestine propulsion rate /%	胃残留率/% Gastric residue rate/%
正常组 Normal group	74.55 ± 3.15	34.34 ± 8.32
模型组 Model group	81.73 ± 3.69**	21.62 ± 4.44**
二神丸 I 组 Ershen pills I group	76.50 ± 2.20#	37.58 ± 3.97##
二神丸 II 组 Ershen pills II group	71.92 ± 4.75##	43.35 ± 5.98##
二神丸 III 组 Ershen pills III group	61.86 ± 9.46##&&	28.91 ± 5.96##&&
盐补骨脂组 Salt psoralen group	64.96 ± 8.39##&	28.53 ± 10.72##&
肉豆蔻曲组 Nutmeg koji group	77.32 ± 5.80	31.37 ± 6.73##&

上相对丰度分别为 9.66%、12.90%、13.87%、4.89%、4.93%，在 Lachnospiraceae 水平上相对丰度分别为 9.80%、11.82%、0.85%、7.70%、8.47%，其

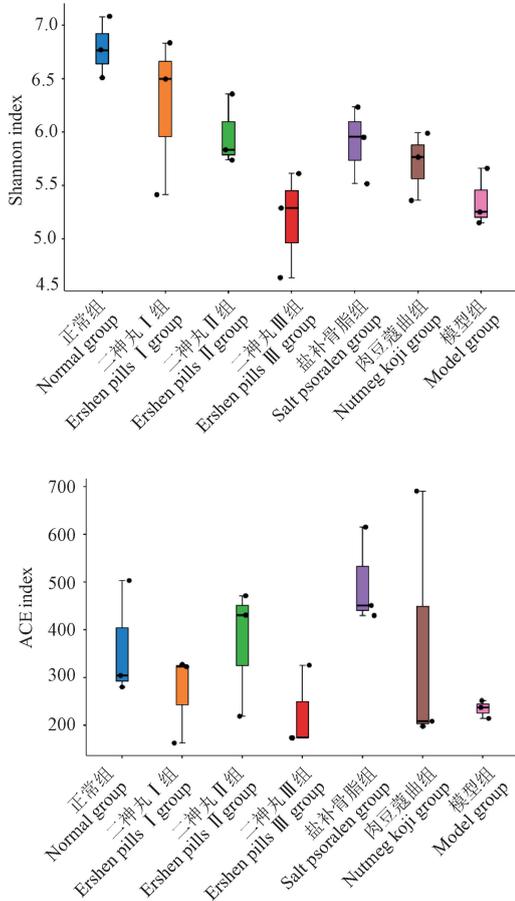
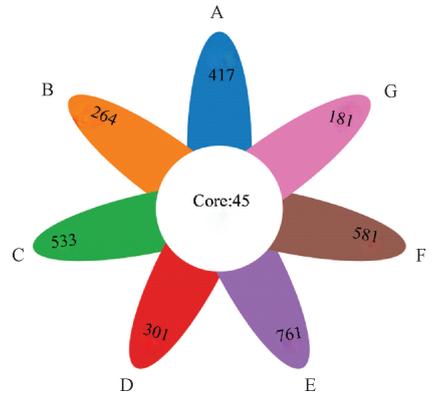


图 3 各组小鼠肠道菌群箱线图

Figure 3 Box plot of gut microbiota in each group of mice



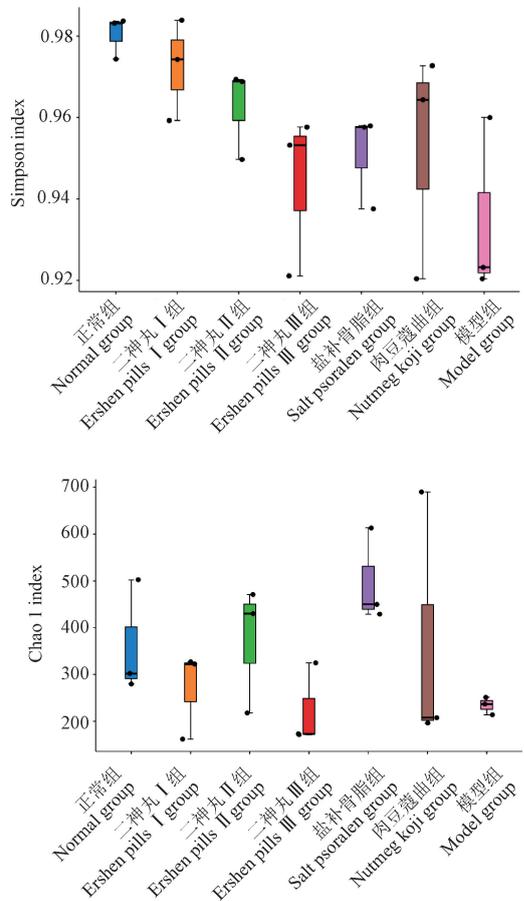
注:A:正常组;B:二神丸 I 组;C:二神丸 II 组;D:二神丸 III 组;E:盐补骨脂组;F:肉豆蔻曲组;G:模型组。

图 2 各组小鼠肠道菌群 OTU 聚类分析结果

Note. A. Normal group. B. Ershen pills I group. C. Ershen pills II group. D. Ershen pills III group. E. Salt psoralen group. F. Nutmeg koji group. G. Model group.

Figure 2 OTU cluster analysis results of gut microbiota in each group of mice

中二神丸II组与二神丸I组提高二者物种相对丰度的程度相当;模型组在肠杆菌科(Enterobacteriaceae)占



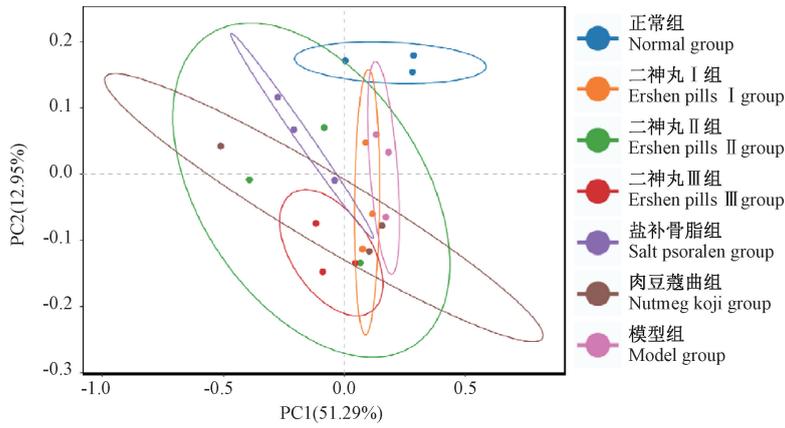


图 4 基于 weighted unifrac 算法的 PCoA 图

Figure 4 PCoA diagram based on weighted unifrac algorithm

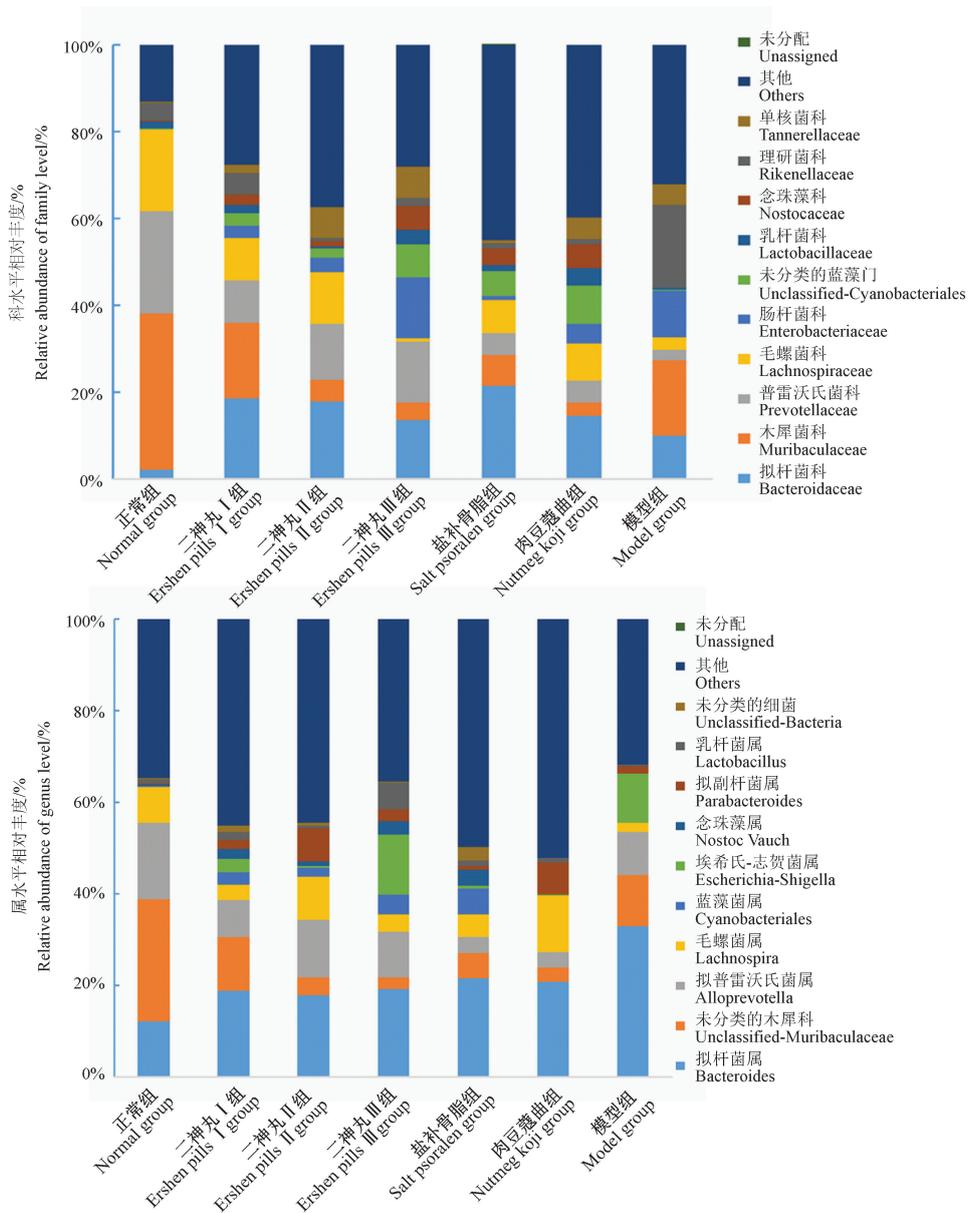


图 5 各组小鼠肠道菌群结构分析

Figure 5 Analysis of gut microbiota structure in each group of mice

比 10.70%，正常组占比 0.07%，给药治疗后，各组水平较模型组显著降低，占比分别为 2.88%、3.36%、13.99%、0.89%、4.66%，二神丸 II 组与二神丸 I 组下调趋势相当，盐补骨脂组效果最显著。

在属水平上，模型组在拟杆菌属 (*Bacteroides*) 占比较高，为 32.86%，正常组占比为 12.10%，给药后，二神丸 I、II、III 组、盐补骨脂组、肉豆蔻曲组占比分别为 18.69%、17.85%、19.20%、21.47%、20.76%，埃希氏-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*) 在模型组中的相对丰度 (10.69%) 显著高于正常组 (0.03%)，治疗后，各给药组占比分别为 2.77%、0.31%、13.19%、0.51%、0.13%，二神丸 II 组与肉豆蔻曲组能显著下调 *Escherichia-Shigella* 相对丰度。

3 讨论

MTL 和 GAS 是重要的胃肠激素，其中 MTL 能够作用于消化道平滑肌细胞上的受体，促进胃肠运动和胃肠道对水、电解质的运输^[18]。GAS 可刺激消化腺分泌，促进食管和胃的括约肌及消化道平滑肌的收缩，加强胃肠道运动^[19]。CORT、TSH、T 均为评价肾功能状态的重要指标^[20]，作为下丘脑-垂体-肾上腺轴、下丘脑-垂体-甲状腺轴、下丘脑-垂体-性腺轴相关激素指标，在机体受到应激时，可引发轴功能紊乱，引发机体产生一系列的肾虚症状。脾虚常常伴随炎症的产生，TNF- α 和 IL-1 β 是炎症产生时重要的细胞因子，TNF- α 主要由活化的单核细胞和巨噬细胞产生，TNF- α 为促炎因子，可诱导其他炎症因子 IL-1 β 的产生^[21]。本实验选取以上血清相关指标探讨二神丸 I、II、III 组以及盐补骨脂、肉豆蔻曲在治疗脾肾阳虚泄泻中的作用效果，结果显示各给药组对脾肾阳虚泄泻小鼠模型具有不同程度的改善，且二神丸 II 组能达到二神丸 I 组的改善水平。

肠道菌群是寄生在胃肠道内的众多微生物的统称，随着对肠道菌群的深入研究，中药通过调节微生态治疗腹泻性疾病的作用机制越来越明确。有研究表明，黄芩汤可降低溃疡性结肠炎小鼠大肠杆菌志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*)、毛螺菌属 NK4A136 (*Lachnospiraceae*-NK4A13-group)、肠杆菌属 (*Enterobacteriaceae*) 相对丰度^[22-23]，金晶等^[24]在研究四神丸、二神丸及五味子散对结肠炎小鼠肠道菌群实验中发现，致病菌拟杆菌属 (*Bacteroides*)、断链真杆菌 (*Eubacterium-fissicatena*) 和毛螺菌科 UCG-006

(*Lachnospiraceae*-UCG-006) 等相对丰度降低，毛螺菌科 NK4A136 (*Lachnospiraceae*-NK4A136)、木犀草科 (*Muribaculaceae*) 和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 菌群的相对丰度增加；二神丸可上调大鼠普雷沃菌属 (*Prevotellaceae*)，降低变形菌门 (*Proteobacteria*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*) 等群落水平的物种多样性来治疗腹泻型肠易激综合征^[25]。本研究对各组小鼠肠道菌群进行高通量测序，发现模型组小鼠的肠道菌群物种丰富度显著降低，拟杆菌属 (*Bacteroides*)、埃希氏-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 丰度增加，普雷沃菌科 (*Prevotellaceae*) 和毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 丰度降低，*Escherichia-Shigella* 和 *Enterobacteriaceae* 是与泄泻疾病相关的致病菌^[26]，给药治疗后，各给药组小鼠肠道菌群水平得到不同程度改善，二神丸 I、II 组优于其他给药组，且两组之间无显著性差异。本实验证明肉豆蔻曲及其配伍组成二神丸可改善脾肾阳虚泄泻模型导致的菌群失调，降低致病菌 *Bacteroides*、*Escherichia-Shigella*、*Enterobacteriaceae* 丰度，增加有益菌 *Prevotellaceae*、*Lachnospiraceae* 丰度，发挥治疗作用。

本研究创新性地以肉豆蔻为发酵原料，采用自然发酵法对其进行炮制，制得肉豆蔻曲，代替麸煨肉豆蔻并对组方新二神丸的药理作用进行探究，发现其在减少肉豆蔻用量的情况下，与盐补骨脂配伍使用对脾肾阳虚泄泻小鼠也可达到良好的效果，减少了肉豆蔻的使用量，降低了中毒的风险。

综上所述，肉豆蔻曲配伍使用对脾肾阳虚泄泻模型的作用效果显著，与生品相比，其温脾止泻作用增强，本研究初步探索了肉豆蔻曲配伍组成二神丸的作用机制，建立了肉豆蔻曲的炮制方法，为创新饮片的研究提供了参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] 卫若楠, 张映红, 赵林华. 常用曲类中药研究进展 [J]. 河南中医, 2021, 41(5): 785-788.
WEI R N, ZHANG Y H, ZHAO L H. Research progress in commonly used traditional Chinese medicine [J]. Henan Tradit Chin Med, 2021, 41(5): 785-788.
- [2] 屈青松, 李智勋, 周晴, 等. 发酵中药的研究进展及其“发酵配伍”理论探索 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2262-2273.
QU Q S, LI Z X, ZHOU Q, et al. Research progress on fermented traditional Chinese medicine and its theoretical exploration of “fermentation compatibility” [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(7): 2262-2273.
- [3] 刘莹, 郭二燕, 冯锋, 等. 曲类中药发酵炮制研究进展 [J].

- 中国现代应用药学, 2022, 39(10): 1371-1381.
- LIU Y, GUO E Y, FENG F, et al. Research progress on the fermentation processing of fermented medicine [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(10): 1371-1381.
- [4] LI L, WANG L, FAN W, et al. The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: a review [J]. Am J Chin Med, 2020, 48(4): 899-921.
- [5] FILLION M, VALOIS-PAILLARD G, LORIN A, et al. Membrane interactions of synthetic peptides with antimicrobial potential; effect of electrostatic interactions and amphiphilicity [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2015, 7(1): 66-74.
- [6] 张雨晴. 附子生物碱发酵降解技术的研究 [D]. 烟台: 烟台大学; 2022.
- ZHANG Y Q. Study on fermentation degradation technology of aconite alkaloids [D]. Yantai: Yantai University; 2022.
- [7] 陈银翠, 杜静, 王琪琪, 等. 冠突散囊菌固态发酵对黄芪化学成分和生物活性的影响 [J]. 中成药, 2022, 44(7): 2202-2207.
- CHEN Y C, DU J, WANG Q Q, et al. Effects of *Eurotium cristatum* solid-state fermentation on chemical constituents and biological activity of *Astragali Radix* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(7): 2202-2207.
- [8] 刘必旺, 赵换, 马一方, 等. 黄芪及其发酵产物对 PM_{2.5} 肺损伤动态可视化微循环的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5581-5585.
- LIU B W, ZHAO H, MA Y F, et al. Effects of *Astragali Radix* and its fermentation products on dynamic visualization microcirculation of lung injury caused by PM_{2.5} [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(9): 5581-5585.
- [9] 乔宏兴, 张立恒, 张晓静, 等. 基于 LC-MS 代谢组学的植物乳杆菌发酵黄芪的代谢产物分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(9): 3283-3292.
- QIAO H X, ZHANG L H, ZHANG X J, et al. Metabonomics analysis of fermented *Astragalus* by *Lactobacillus plantarum* based on LC-MS metabonomics [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2021, 48(9): 3283-3292.
- [10] 张帅, 罗静怡, 唐婷范, 等. 固态发酵葛根渣制备葛根素 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43(12): 102-106.
- ZHANG S, LUO J Y, TANG T F, et al. Puerarin preparation from *Pueraria* root residue through solid state fermentation [J]. Food Res Dev, 2022, 43(12): 102-106.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's republic of China [M]. Beijing: China Medical Science Press; 2020.
- [12] XIONG R, LI W, LI Y, et al. Er Shen Wan extract reduces diarrhea and regulates AQP4 and NHE3 in a rat model of spleen-kidney Yang deficiency-induced diarrhea [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 834-846.
- [13] XIONG R, LI Y, ZHENG K, et al. Er Shen Wan extract alleviates polyuria and regulates AQP2 and AVPR2 in a rat model of spleen-kidney Yang deficiency-induced diarrhea [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110: 302-311.
- [14] 潘新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. 补骨脂、肉豆蔻炮制前后在“二神丸”中对脾肾虚泄泻小鼠的止泻研究 [J]. 中成药, 2014, 36(5): 1059-1062.
- PAN X, HU C J, GENG Y Y, et al. Study on the antidiarrheal effect of *Psoralea corylifolia* and Nutmeg in “Er Shen Pill” on diarrhea mice with spleen-kidney Yang deficiency before and after processing [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(5): 1059-1062.
- [15] 陈志敏, 潘新, 张美, 等. 二神丸中药炮制前后对肠道菌群和 UCP2 基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 6-9.
- CHEN Z M, PAN X, ZHANG M, et al. Effect of Chinese medicine in Ershen Wan before and after being processed on intestinal flora and mRNA expression of uncoupling protein 2 [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(14): 6-9.
- [16] 袁子民. 中药肉豆蔻炮制原理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2006.
- YUAN Z M. Study on processing principle of nutmeg [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2006.
- [17] 祝婧, 钟凌云, 龚千锋, 等. 升麻不同炮制品对脾气虚动物胃肠功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 1-4.
- ZHU J, ZHONG L Y, GONG Q F, et al. Effect of different processed products of *cimicifugae rhizoma* in gastrointestinal function of spleen-qi deficiency animals [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2015, 21(21): 1-4.
- [18] 黄鹤飞, 陈颖, 朱晓新, 等. 中药干预肠易激综合征的脑肠肽调节研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 208-217.
- HUANG H F, CHEN Y, ZHU X X, et al. Traditional Chinese medicine intervention regulates brain-gut peptides of irritable bowel syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(11): 208-217.
- [19] 李吉彦, 陈大朋, 滕烧, 等. 益气除痞汤对酸性反流性食管炎模型大鼠血清胃动素以及胃泌素的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1907-1909.
- LI J Y, CHEN D P, TENG R, et al. Effect of Yiqichupi Decoction on expressions of serum motilin and gastrin in acid reflux esophagitis rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(7): 1907-1909.
- [20] 唐维我, 张会永, 李芹, 等. 肾虚证动物模型造模方法及模型评价 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(4): 1317-1324.
- TANG W W, ZHANG H Y, LI Q, et al. Modeling methods and model evaluation of animal models for kidney Yang deficiency syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2021, 23(4): 1317-1324.
- [21] 周轲, 牛淳, 刘文娟, 等. 电针百会穴对脾虚泄泻模型大鼠影响的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(3): 947-955.

- ZHOU K, NIU C, LIU W J, et al. Study on the effect of electric acupuncture at Baihui acupoint on rats with spleen-deficiency diarrhea [J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 2022, 53(3): 947-955.
- [22] 郑佳荟, 李欢, 赵重博, 等. 黄芩汤、葛根芩连汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 陕西中医药大学学报, 2023, 46(2): 53-62.
- ZHENG J H, LI H, ZHAO C B, et al. Effect of Huangqin Decoction and Gegen Qinlian Decoction on intestinal flora in mice with ulcerative colitis [J]. J Shaanxi Univ Chin Med, 2023, 46(2): 53-62.
- [23] 刘雅清, 徐航宇, 王敦方, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响及肠黏膜屏障的保护作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 11-19.
- LIU Y Q, XU H Y, WANG D F, et al. Effect of Huangqintang on intestinal flora in mice with ulcerative colitis and its protective mechanism on intestinal mucosal barrier [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(7): 11-19.
- [24] 金晶, 刘端勇, 黄洁, 等. 四神丸、二神丸及五味子散对结肠炎小鼠肠道菌群失衡的调控作用 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(4): 169-173, 289.
- JIN J, LIU D Y, HUANG J, et al. Regulation of Sishen pills, Ershen pills and Wuweizi powder on intestinal Micro-flora imbalance in mice with colitis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(4): 169-173, 289.
- [25] 刘佳星, 王彦礼, 李璇, 等. 四神丸对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群影响的实验研究 [J]. 药科学报, 2019, 54(4): 670-677.
- LIU J X, WANG Y L, LI Y, et al. Experimental study on the effect of Sishen Wan on intestinal flora in rats with diarrhea-type irritable bowel syndrome [J]. Acta Pharm Sin, 2019, 54(4): 670-677.
- [26] 凌霄, 李春晓, 赵娅, 等. 生、熟大黄对湿热泄泻大鼠炎症性细胞因子、胃肠激素与肠道菌群的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(11): 53-57, 266-267.
- LING X, LI C X, ZHAO Y, et al. Effects of raw and cooked dahuang (rhubarb) on inflammatory cytokines, gastrointestinal hormones and intestinal flora in rats with damp-heat diarrhea [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(11): 53-57, 266-267.

[收稿日期] 2023-06-14

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zggydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!