

四君子汤调整小鼠运化功能紊乱的实验研究*

易崇勤¹ 孙建宁¹ 张家俊¹ 堀口贞次郎² 江崎宜久² 陈文为¹

内容提要 **目的:** 为阐明“脾主运化”和“肝主疏泄”的相关性。**方法:** 用小承气汤合并半量饮食塑造小鼠消化功能紊乱模型, 选择补益方剂四君子汤, 观察其对小鼠小肠吸收功能、体重、自主活动以及肝脏线粒体氧化磷酸化效率和细胞能荷的影响, 从整体验证该方的作用。**结果:** 小承气汤组小鼠小肠糖吸收功能低下, 体重下降, 自主活动能力减弱, 肝线粒体呼吸控制率(RCR)和肝细胞能荷值均低于对照组, 而四君子汤组各项指标均有明显改善, 大剂量四君子汤组更为显著。提示四君子汤具有纠正胃肠功能紊乱和调整肝脏能量代谢的作用。**结论:** 脾主运化应涉及两方面内容: 胃肠消化吸收过程(外运化)以及被吸收的物质在肝脏相互转化和能量的生成过程(内运化)。

关键词 四君子汤 小承气汤 脾气虚 氧化磷酸化 细胞能荷

Study on Sijunzi Decoction in Rectifying Digestive Disorder in Mice YI Chong-qin, SUN Jian-ning, ZHANG Jia-jun, et al *Central Research Laboratory of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing(100029)*

Objective: To observe the Sijunzi Decoction in rectifying the digestive disorder. **Methods:** Sijunzi decoction (SJZD) was chosen to treat digestive dysfunction in mice. The model was induced by Xiaochengqi decoction and semi-starvation. The effects on the absorptive function of the small intestine, body weight, autonomous activity levels, oxidative phosphorylation of hepatic mitochondrion, respiratory control rate (RCR) and cells energy charge were observed in vivo. **Results:** The group given Xiaochengqi decoction had lower absorption, decreased body weight, and lower autonomous activity levels, and their hepatic mitochondrion RCR and cell energy charge were also lower than those of the control group. The figures for the group given SJZD all showed improvement, especially the group given the larger dose of SJZD. **Conclusion:** SJZD could correct Deficiency of the Spleen and Stomach which to some extent is caused by digestive dysfunction. So it is considered that the Spleen's function of transportation and transformation includes two meanings: external transportation and transformation — the digestive and absorptive function of the small intestine, and internal transportation and transformation — the liver's conversion of nutrients and generate energy (ATP).

Key words Sijunzi decoction, Xiaochengqi decoction, Deficiency of the Spleen and Qi, oxidative phosphorylation, cell energy charge

近年来, 中西医结合对实验性脾气虚证的研究, 证实中医关于脾胃得健, 气血来源充足, 不断地充盈后天生命活动之本的论点^(1, 2)。本研究是在前人工作的基础上, 应用生化药理学理论与技术, 从整体探讨四君子汤煎剂对小承气汤合并半饥饿状态引起小鼠消化吸收和肝脏能量代谢紊乱的调整作用, 为阐明“脾

主运化”和“肝主疏泄”的相关性提供实验资料。

材料与方法

1 药物 实验所用单味药均购于北京同仁堂药店。四君子汤由人参、白术、茯苓、炙甘草四种单味药组成, 按 10:9:9:6 的比例, 先经蒸馏水浸泡 2 h, 煎煮两次(40 min/次)后, 过滤, 合并滤液加热蒸发至含生药量约为 1 g/ml 浓缩药液。小承气汤由大黄、枳实、厚朴组成, 按 4:3:5 的比例, 制备步骤同上, 含生药量约为 2.5 g/ml 浓缩药液。两方水

* 本课题得到国家教委博士点基金和日本国养命酒制造公司中央研究所资助

1. 北京中医药大学中心实验室(北京 100029); 2. 日本国养命酒制造公司中央研究所

煎剂均贮存于 4℃ 冰箱内待用。

2 试剂和仪器 二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙基磺酸(N-2-hydroxy ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, HEPES)分别为 Serva 和 Sigma 公司产品, 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。高速低温离心机为 20 PR-52 D 型日本日立公司产品, 日产 MK-ANIMEX 小鼠自主活动记录仪, 美国 Waters 840 型高效液相色谱仪, 490 型可调波长检测器等。

3 动物及分组 选用 NIH 种雄性小鼠(由中国中医研究院动物室提供), 体重 20~25 g, 鼠龄 4 周。将小鼠随机分为 4 组(各组动物数见表)。对照组: 常规饲养, 以等体积生理盐水代替药物。小承气汤组: 每日上午、下午各灌饲小承气汤煎剂 1 次, 每次 72 g/kg(0.6 ml/20 g 体重), 半量进食, 自由饮水。小剂量四君子汤组: 灌饲小承气汤, 剂量和次数与小承气汤组相同, 并于上午灌饲小承气汤前 1~2 h 灌饲四君子汤煎剂, 11 g/kg 体重, 半量进食, 自由饮水。大剂量四君子汤组: 动物饲药方法与小剂量组相同, 但四君子汤剂量加倍, 22 g/kg 体重。

4 测定项目及方法 连续给药(或生理盐水)14 天后, 用 MK-ANIMEX 仪分别测定小鼠 5 min 自主和站立活动次数, 处死前禁食 24 h, 称体重, 然后分别进行下列各项测定。

4.1 小肠糖吸收功能的测定 各组小鼠均灌饲 25 g/L 的葡萄糖溶液(约 0.2 ml/10 g 体重), 30 min 后, 自眼眶取血, 用葡萄糖氧化酶法测定血糖浓度^[3]。

4.2 小鼠肝线粒体氧化磷酸化活性的测定 参考许正春等方法^[4]。颈椎脱臼处死动物后, 迅速取出适当肝脏洗净残血, 置入预冷的线粒体分离介质中(HEPES 缓冲液), 用聚四氟乙烯匀浆器研磨成肝匀浆, 按常规方法分离线粒体, Lowry 法^[5]测定线粒体蛋白质含量, 以谷氨酸-苹果酸为底物, 用 Clark 氧电极测定线粒体耗氧量。测氧系统, 加 200 μl 新鲜鼠肝线粒体(约 5 mg 蛋白/ml)至反应介质液中, 总体积 2 ml。30℃ 保温 3 min 后, 开始记录耗氧量, 加 500 μmolADP(5 μl)至反应体系中, 此时耗氧速度明显增加, 此段称为呼吸态 3(Respiratory State 3, S₃)。当 ADP 磷酸化形成 ATP 时, 抑制呼吸, 耗氧速度降低, 此段称为呼吸态 4(Respiratory State 4, S₄)。呼吸控制比率(Respiratory Control Rate, RCR)是 S₃/S₄ 比值, 以此值表示氧化磷酸化反应效率。

4.3 小鼠肝细胞能荷值的测定 采用张家俊等方法^[6]。取上述各组小鼠肝脏(约 0.25 g)用预冷的生理盐水洗净表面残血, 制备 10% 肝匀浆, 分别吸取 1 ml 匀浆液, 各加入 1 ml 3% HClO₄ 沉淀蛋白, 离心 3,000 rpm 10 min, 取上清液 1 ml, 加入 80 μl 20% KOH, 中和至 pH 7.0 左右, 置 4℃ 冰箱内 30 min, 使 KClO₄ 析出结晶, 取上清液 10 μl 用高效液相色谱仪直接测定三种腺苷酸(AMP、ADP、ATP)含量, 按下列公式分别计算各组肝细胞能荷值。

$$\text{能荷值} = \frac{1}{2} \left(\frac{\text{ADP} + 2 \text{ATP}}{\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP}} \right)$$

结 果

1 四君子汤对小鼠糖吸收和体重的影响 见表 1。各组空腹小鼠口服葡萄糖后, 四君子汤组小鼠血糖明显高于小承气汤组($P < 0.01$), 但未见剂量依赖关系, 证明四君子汤具有促进糖吸收作用, 同时该两组小鼠的体重也明显高于小承气汤组($P < 0.01$)。小承气汤组小鼠血糖和体重都显著低于对照组($P < 0.01$)。

表 1 4 组小鼠糖吸收和体重的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠 数	血糖浓度 (mg/dl)	体重(g)	
			喂药前	喂药后
对 照	11	183±31	22.1±3.0	24.7±2.0
小承气汤	20	118±72*	22.1±4.5	20.2±2.6*
小剂量四君子汤	17	335±103 [△]	23.3±3.2	26.4±2.3 [△]
大剂量四君子汤	17	300±67 [△]	23.1±2.7	26.8±2.0 [△]

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与小承气汤组比较, $\Delta P < 0.001$

2 四君子汤对小鼠自主活动与站立能力的影响 见表 2。四君子汤组小鼠 5 min 自主活动和站立能力均强于小承气汤组, 并接近对照组, 大剂量四君子汤组优于小剂量四君子汤组, 表明四君子汤通过纠正小承气汤所致的胃肠功能紊乱, 促进糖吸收, 提供机体自主活动的物质基础(能源)。

表 2 4 组小鼠自主活动和站立能力的比较
(次/5 min, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠 数	自主活动	站立活动
对 照	5	694±16	56±8
小承气汤	9	658±26*	44±9*
小剂量四君子汤	11	681±16 [△]	47±4
大剂量四君子汤	8	680±39	54±9

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与小承气汤组比较, $\Delta P < 0.01$

3 四君子汤对小鼠肝脏线粒体氧化磷酸化反应

的影响 见表 3。小承气汤组 RCR 值显著低于对照组($P < 0.001$)和小剂量四君子汤组、大剂量四君子汤组(P 均 < 0.01)，而后者又接近对照组；说明小承气汤引起小鼠肝脏线粒体 RCR 值降低，是与胃肠吸收功能下降有关，四君子汤则有保护肝线粒体合成 ATP 的功能，并呈量效关系。

表 3 4 组小鼠肝线粒体氧化磷酸化效率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	S_3 ($[O_2]$ nmol·mg ⁻¹ 蛋白·min ⁻¹)	S_4	RCR
对照	9	151.41 ± 31.83	34.03 ± 4.49	4.25 ± 0.88
小承气汤	12	113.64 ± 18.94	43.66 ± 4.46	2.75 ± 0.40*
小剂量四君子汤	12	134.74 ± 36.96	38.54 ± 7.37	3.44 ± 0.67△
大剂量四君子汤	14	149.52 ± 40.77	36.17 ± 7.73	3.77 ± 0.91△

注：与对照组比较，* $P < 0.001$ ；与小承气汤组比较，△ $P < 0.01$

4 四君子汤对各组小鼠肝细胞能荷的影响 见表 4。小承气汤组能荷值低于其他 3 组，说明小承气汤模型组小鼠 ATP 水平的调节受到影响，大剂量四君子汤组可明显地调整能荷值，并近于对照组。

表 4 4 组小鼠肝线粒体能荷比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	能荷值
对照	10	0.754 ± 0.037
小承气汤	10	0.732 ± 0.080
小剂量四君子汤	11	0.749 ± 0.071
大剂量四君子汤	11	0.759 ± 0.052

讨 论

近年来，有关脾主运化的文献资料，大都侧重于观察该方对胃肠运动、消化吸收和某些有关消化酶活性的变化等，但联系肝脏能量代谢功能的实验报道尚少。因此，我们在整体观察四君子汤纠正小承气汤致小鼠消化吸收功能紊乱的同时，并观察对肝脏能量代谢的影响，企图扩大对脾主运化和脾气虚的认识。

实验结果说明，四君子汤组小鼠均对糖的吸收功能有明显改善，体重增加和自主活动能力增强等，这可缓解气血生成不足所引起的气虚现象。

肝脏能量代谢实验包括两项内容：能量(ATP)的生成和能量的调节。四君子汤组小鼠肝线粒体 RCR 明显高于小承气汤组，尤以大剂量组更为显著。因为小承气汤有耗气破气，损伤胃肠正常功能的作用，加之饥饱失常，两者互为影响，而导致肝脏氧化磷酸化效率降低。RCR 是反映线粒体氧化磷酸化功

能主要指标：RCR 值大，说明偶联能量效率高，能量(ATP)合成增加；反之，偶联效率低，即解偶联占优势，能量合成减少。正常情况下，机体以偶联和解偶联方式不间断地调整着能量动态平衡和温煦四肢维持体温的作用。本实验结果说明四君子汤具有调整肝脏线粒体合成能量功能或参与治疗脾气虚证的作用。

细胞能荷值是机体组织细胞能量状态的一种参数。正常机体细胞能荷值在 0.80~0.95 较窄范围内波动，它受生理或病理等多种因素的调节。实验中观察到小承气汤组动物肝细胞能荷值均低于其他 3 组，说明四君子汤可改善消化功能低下所引起的细胞能荷的平衡失调，这有利于组织细胞代偿性的调节能量转换，以应激维持细胞的正常生理功能。此外，曾有文献报道，四君子汤具有增强体内超氧化物歧化酶活性和抑制脂质过氧化反应，这对保护机体组织，尤其是胃肠系统和肝脏组织的结构与功能完整性是有益的，也属于四君子汤健脾益气功效的主要内容之一^[7]。

中医学认为，脾主运化指经腐熟、消化吸收后，水谷之精微化为气血，养全身而灌溉脏腑。临床上一些肝脏疾病都伴有胃肠消化功能(运化)不良，反之，胃肠消化疾病也影响肝脏物质代谢功能失调，并出现一些相同的症状。本实验结果和近年文献综述提示我们考虑脾主运化应包含两方面内容，即“外运化”是指胃肠系统自外环境摄取的食物经一系列的消化吸收经血液循环至肝脏。“内运化”是指肝脏将所吸收外源性物质转化为内源性精微物质，运行布于周身，不断弥补气血之源(即肝主疏泄)。所以，脾主“内运化”与“肝主疏泄”是极为吻合的，也说明脏腑之间是相互连系和相互依存的。总之，脾主运化是研究脾实质的关键性起始点。

参 考 文 献

1. 夏 天，徐重明，胡家露，等。四君子汤健脾益气作用的研究进展。新消化病学杂志 1994；2(1)：43。
2. 张道杰，吴玉生，彭立义，等。四君子汤治疗脾气虚型胃病疗效的评估。中国医药学报 1995；10(1)：49。
3. 周序开。血浆(及全血)葡萄糖测定——葡萄糖氧化酶法的探讨。中华医学检验杂志 1982；5(1)：56。
4. 许正春，陈文为。川芎Ⅲ号碱对鼠肝线粒氧化磷酸化作用的研究。生物化学杂志 1987；3(1)：33—39。
5. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265.
6. 张家俊，陈文为。补气理气中药对大鼠肝细胞能荷的影响。中西医结合杂志 1988；8(8)：477—478。
7. 叶 林，毛海燕。人参黄芪及四君子汤抗脂质过氧化作用的观察。山东中医学院学报 1995；19(3)：195。

(收稿：1996—06—03 修回：1996—08—29)