

# 麻子仁丸对便秘型小鼠模型通便功能、胃蛋白酶活性和对淋巴细胞增殖的实验研究

张泽丹<sup>1</sup> 谭平<sup>2</sup>

(1 中国人民解放军福州总医院干部保健科,福州,350025; 2 福建医科大学福总临床医学院,福州,350025)

**摘要** 目的:观察麻子仁丸对便秘型小鼠模型通便功能、胃蛋白酶活性和对淋巴细胞增殖的实验研究。方法:72只小鼠随机分为空白组、模型组、观察组,每组24只,其中模型组和观察组建立便秘模型。空白对照组和模型组不采取任何干预,观察组10丸/d麻子仁丸溶水灌胃。1次/d,疗程7d。通过墨汁推进法计算肠道推进率观察小鼠通便功能;采用苏木素-伊红染色(HE染色)在显微镜下观察肠道病理学情况;检测胃蛋白酶活性,并通过MTT和流式细胞仪检测淋巴细胞增殖表达情况。结果:1)观察组和模型组的粪便粒数、粪便重量、粒粪便重量和肠道推进率均较空白组减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,观察组中的通便功能明显改善( $P < 0.05$ )。2)与空白组小鼠比较,模型组小鼠结肠黏膜炎性反应细胞浸润,肌层变薄,经过药物治疗后,炎性反应有所改善,肌层有所增厚。3)与空白组比较,模型组和观察组2h胃液量和胃蛋白酶活性明显下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,观察组中的2h胃液量和胃蛋白酶活性明显提高( $P < 0.05$ )。4)与空白组比较,模型组和观察组淋巴细胞增殖能力( $P < 0.05$ ),包括T淋巴细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 百分数和 $CD4^+/CD8^+$ 比例均下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,观察组中淋巴细胞增殖能力( $P < 0.05$ ),包括T淋巴细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 百分数和 $CD4^+/CD8^+$ 比例均升高( $P < 0.05$ )。结论:麻子仁丸能有效改善便秘型小鼠通便功能,提高小鼠胃液蛋白酶活性,其疗效机制可能与提高了淋巴细胞增殖能力,尤其是T淋巴细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 百分数和 $CD4^+/CD8^+$ 比例有关。

**关键词** 麻子仁丸;便秘型小鼠;通便功能;胃蛋白酶活性;淋巴细胞;增殖

## Experimental Study on Hemp Seed Pill on Defecation Function, Pepsin Activity and Lymphocyte Proliferation on Rat Constipation Model

Zhang Zedan<sup>1</sup>, Tan Ping<sup>2</sup>

(1 Department of Cadre Health Care, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China;

2 Fuzhou General Hospital Clinical Medical School, Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China)

**Abstract Objective:** To observe the hemp seed pill on defecation function, pepsin activity and lymphocyte proliferation on rat constipation model. **Methods:** Seventy two rats were randomly divided into three groups: blank control group, model group and treatment group, twenty four rats in each group. The model group and the treatment group were used to establish constipation model. The blank control group and model group were not given intervention. The treatment group was given 10 hemp seed pills by gavage and in drinking water, once a day for a week. The intestine propulsion rate was calculated by ink propelling test to observe the defecation function of rats; Hematoxylin and eosin (H&E) stains were observed under the microscope to observe the conditions of intestinal tract; Pepsin activity was tested and lymphocyte proliferation was observed by using MTT and flow cytometry. **Results:** 1) Compared with the blank control group, fecal number, fecal weight, particle weight and the intestine propulsion rate in the model group and the treatment group decreased ( $P < 0.05$ ); Compared with the model group, the defecation function of the treatment group was significantly improved ( $P < 0.05$ ). 2) Compared with the blank control group, the inflammatory cell infiltration in colon and the thinning layer of muscle were observed in the model group. After drug treatment, the inflammation was improved and the muscle layer was thickened. 3) Compared with the blank control group, 2 h gastric juice volume and pepsin activity in the model group and the treatment group decreased significantly ( $P < 0.05$ ); Compared with the model group, 2 h gastric juice volume and pepsin activity in the treatment group increased significantly ( $P < 0.05$ ). 4) Compared with the blank control group, the lymphocyte proliferation ( $P < 0.05$ ), including the percentage of  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  T-cells and T-lymphocyte subsets ( $CD4^+/CD8^+$ ) ratios in model group and treatment group decreased ( $P < 0.05$ ); Compared with the model group, the lymphocyte proliferation ( $P < 0.05$ ), including the percentage of  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  T-cells and T-lymphocyte subsets ( $CD4^+/CD8^+$ ) ratios in the treatment group increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Hemp seed pill can effectively improve defecation function and enhance the enzymatic activity of pepsin, which is relevant with the increasing lymphocyte proliferation, especially with the percentage of  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  T-cells, and T-lymphocyte subsets ( $CD4^+/CD8^+$ ) ratios.

**Key Words** Hemp seed pill; Rat constipation model; Defecation function; Pepsin activity; Lymphocyte proliferation

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.09.038

便秘是最常见的非器质性的慢性消化道症状,临床上主要表现为粪便的性状改变排便困难或粪便过硬以及排便节律和习惯改变出现排便次数减少等<sup>[1]</sup>。近年来便秘对机体的危害性逐渐受到人们的重视,西医主要采用泻药如液体石蜡油、琼脂、硫酸盐等,然而这些药物的疗效多只是即时效应,但长期运用存在干扰肠道的正常的功能的危害<sup>[2]</sup>。查阅古代文献并无便秘这一病名,古代亦和现代一样将便秘作为一个症状加以描述,最早出现“后不利”“大便难”出现在《黄帝内经》,张仲景《伤寒论》约:“太阳脉浮而涩,浮则胃气强,涩则小便数,浮涩相搏,大便则难,其脾为约,麻子仁丸主之”。中医学中脏腑辨证认为脾喜阳主升,胃喜阴主降,而脾胃互为表里,若脾胃或感受外邪,或内伤湿邪,则会出现脾胃阴阳失调,导致脾胃气机升降功能失常,故本病主要病机为肠胃郁热,脾约便秘,治疗原则主要是润肠泻热,行气通便<sup>[3-5]</sup>。笔者在根据古人的经验展开临床运用,发现麻子仁丸临床疗效显著,故为了进一步研究其疗效机制,进行动物实验研究,观察麻子仁丸干预便秘小鼠对其通便功能、胃蛋白酶活性等的影响,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级昆明雄性小鼠72只,由本院附属中医药大学实验动物中心提供,并在该动物中心SPF级饲养。

1.1.2 药物 1)麻子仁丸,药物组成:麻子仁20g、芍药9g、炙枳实9g、大黄12g、炙厚朴9g、杏仁9g、与蜂蜜混合成丸,每10丸研磨和水装瓶后代用。

1.1.3 试剂与仪器 4%福尔马林溶液、苏木素-伊红、盐酸溶液均购于上海西塘生物试剂有限公司,刀豆素A(ConA, Sigma, USA)、RPMI1640完全培养液(Hyclone, USA), MTT(Trevigen, USA), CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>抗体均购自 Cell Signaling Technology, USA; 酶标仪(Bioteck, USA), 流式细胞仪(BD Biosciences, USA)。

### 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 72只小鼠随机分为空白组、模型组、观察组,每组24只,其中模型组和观察组建立便秘模型。便秘模型制备采用饥饱失常方法,即隔天喂低纤维饲料生大米4~8g,自由饮水1次,0.5h/次,在此基础上采用限制饮水和控制饮食方法造成便秘模型,造模时间共15d。

1.2.2 干预方法 空白对照组和模型组不采取任何干预,观察组10丸/d麻子仁丸溶于水灌胃。1次/d,疗程7d。

### 1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 造模成功标志小鼠 大便干结、数量减少、颗粒细小。解剖见大便集中在结肠,呈球状或串珠状,空肠、回肠无明显粪便残留。

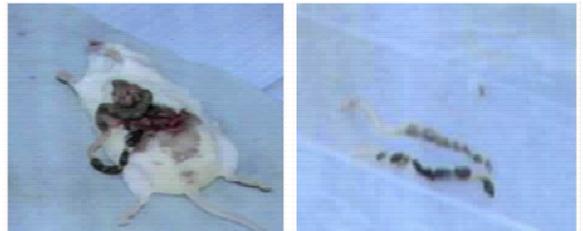


图1 造模成本解剖标志

1.2.3.2 通便功能检测 造模成功及观察组停药后,各组小鼠禁食24h,经口0.2mL墨汁灌胃20min后,依次处死试验动物,剖腹取出幽口到直肠末段的全部肠道,测量肠道全长及墨汁在肠道内推进长度,测量全程在无张力状况下进行,并计算肠道推进率=墨染肠管长度/肠管总长度,观察小鼠通便功能。

1.2.3.3 苏木素-伊红染色(HE染色) 每组8只小鼠,治疗结束后,脱臼处死小鼠,10%水合氯醛注射麻醉,取距盲肠2cm处结肠1cm左右,用无菌外科手术剪刀从肠系膜处剪开,生理盐水将内容物冲洗干净,放入4%福尔马林溶液固定48h,常规脱水、石蜡包埋、切片,常规HE染色,在显微镜下观察。

1.2.3.4 胃蛋白酶活性检测 每组8只小鼠,小鼠禁食不禁水16h。采用水合氯醛麻醉大鼠并采用幽门结扎法,收集并测定单位时间内胃液量。50mL量瓶中加入1mL胃液,加0.065mol/L盐酸溶液稀释至刻度,作为供试品溶液测定胃蛋白酶活力。胃蛋白酶活性单位(U/mL)=四端蛋白管透明部分长度均值平方( $\bar{x}^2$ )×16。

1.2.3.5 淋巴细胞增殖检测 每组8只小鼠,将制备好的小鼠肠细胞悬液加入96孔板培养,100 $\mu$ L/孔,继而加入经RPMI1640完全培养液配制的ConA 100 $\mu$ L(终浓度5 $\mu$ g/mL),每只大鼠设3复孔。置于5%CO<sub>2</sub>,37 $^{\circ}$ C孵箱内培养44h,加入MTT20 $\mu$ L/孔(终浓度5mg/mL),继续培养4h。取出培养板,3000r/min离心10min,小心吸去上清液,每孔加入

150 μL DMSO 溶解甲瓚,轻轻震荡,用酶标仪测定波长 570 nm 处 OD 值,检测大鼠肠 T 淋巴细胞的增殖能力。另外取 200 μL 1 × 10<sup>7</sup> 细胞/mL 的单核细胞悬液,分别加入 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 抗体,常规避光孵育,流式细胞仪上样常规制备离心后,上流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析。各组实验数据用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,2 组间显著性分析用两样本均数差别的 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组小鼠通便功能观察比较 观察组和模型组的粪便粒数、粪便重量、粒粪便重量和肠道推进率均较空白组减少 (*P* < 0.05);与模型组比较,观察组中的通便功能明显改善 (*P* < 0.05)。见表 1、图 2。

表 1 各组小鼠粪便观察比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 24$ )

组别	粪便粒数(粒)	粪便重量(g)	粒粪便重量(mg)
空白组	96.43 ± 12.46	1.84 ± 0.34	19.23 ± 0.89
模型组	13.56 ± 7.45 <sup>△</sup>	0.12 ± 0.06 <sup>△</sup>	10.12 ± 1.35 <sup>△</sup>
观察组	59.64 ± 11.25 <sup>*△</sup>	1.05 ± 0.35 <sup>*△</sup>	17.34 ± 1.03 <sup>*△</sup>

注:与模型组比较,\**P* < 0.05;与空白组比较,<sup>△</sup>*P* < 0.05

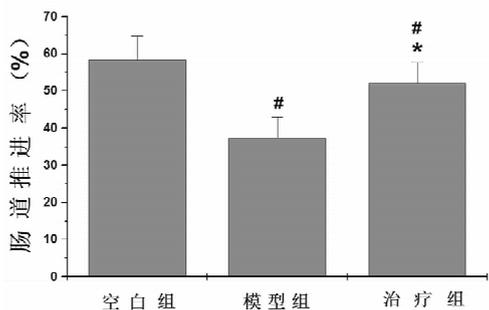


图 2 各组肠道推进率比较

注:与模型组比较,\**P* < 0.05;与空白组比较,<sup>#</sup>*P* < 0.05

2.2 各组 HE 染色病理性改变情况 与空白组小鼠比较,模型组小鼠结肠黏膜炎性反应细胞浸润,肌层变薄,经过药物治疗后,炎性反应有所改善,肌层有所增厚。见图 3。

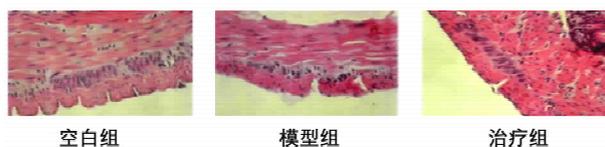


图 3 各组 HE 染色病理性改变情况 (HE × 40)

2.3 各组小鼠胃蛋白酶活性的表达情况 由表 2 可知,与空白组比较,模型组和观察组 2 h 胃液量和胃蛋白酶活性明显下降 (*P* < 0.05);与模型组比较,观察组中的 2 h 胃液量和胃蛋白酶活性明显提高 (*P* < 0.05)。

2.4 各组淋巴细胞增殖比较 与空白组比较,模型组和观察组淋巴细胞增殖能力 (*P* < 0.05),包括 T 淋巴细胞亚群 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 百分数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例均下降 (*P* < 0.05);与模型组比较,观察组中淋巴细胞增殖能力 (*P* < 0.05),包括 T 淋巴细胞亚群 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 百分数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例均升高 (*P* < 0.05)。见图 4 和表 3。

表 2 各组小鼠胃蛋白酶活性的表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	2 h 胃液量 (mL)	胃蛋白酶活性 (U/mL)
空白组	2.53 ± 0.34	26.37 ± 2.54
模型组	2.02 ± 0.38 <sup>△</sup>	20.98 ± 2.49 <sup>△</sup>
观察组	2.36 ± 0.41 <sup>*△</sup>	22.84 ± 2.37 <sup>*△</sup>

注:与模型组比较,\**P* < 0.05;与空白组比较,<sup>△</sup>*P* < 0.05

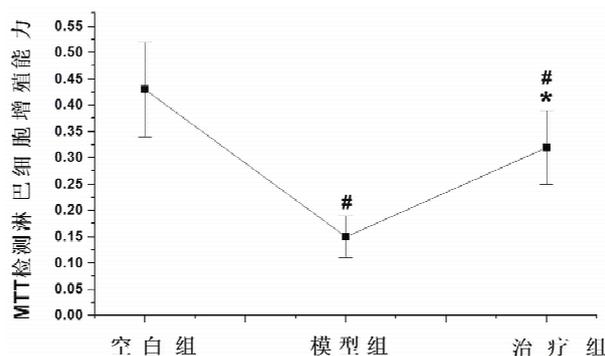


图 4 MTT 检测淋巴细胞增殖能力

注:与模型组比较,\**P* < 0.05;与空白组比较,<sup>#</sup>*P* < 0.05

表 3 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞亚群 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (%)
空白组	64.75 ± 5.06	21.99 ± 4.12	2.95 ± 0.33
模型组	58.88 ± 4.19 <sup>△</sup>	28.97 ± 5.88 <sup>△</sup>	2.02 ± 0.35 <sup>△</sup>
观察组	62.11 ± 4.94 <sup>*△</sup>	26.76 ± 3.51 <sup>*△</sup>	2.31 ± 0.33 <sup>*△</sup>

注:与模型组比较,\**P* < 0.05;与空白组比较,<sup>△</sup>*P* < 0.05

## 3 讨论

麻子仁丸源于汉代张仲景的《伤寒论》,原方用于治疗脾约便秘,方中“麻子仁二升(甘平)、芍药半斤(酸平)、枳实半斤(炙,苦寒)、大黄一斤(去皮,苦寒)、厚朴一斤(炙,去皮,苦温)、杏仁一斤(去皮尖,熬,别作脂,甘温)、右六味,为末,炼蜜为丸”,组成全方,起到润肠泻热,行气通便之功。《伤寒论》之“脾约”,成无己说:“约者,约结之约,又约束也<sup>[6-7]</sup>。经曰:脾主为胃行其津液者也,今胃强脾弱,约束津液不得四布,但输膀胱,致小便数而大便硬,故曰其脾为约”。《伤寒明理论》根据“燥者润之”“留者攻之”“胃肠同治”的原则,故当润肠泻实,宜润肠药与泻下药同用,方中麻子仁性味甘平,归属脾、胃、大肠经,质润多脂,功能润肠通便,即可将脾、胃之燥热经

由大肠泻出,是为君药;肺与大肠相表里,杏仁向上可肃肺气,向下可润大肠,表里皆清;白芍养血敛阴缓燥热之涩,同时又缓急止便秘之腹痛为臣;大黄、枳实、厚朴即小承气汤,以轻下热结,除胃肠燥热为佐;蜂蜜甘缓,在帮助麻子仁润肠通便的同时缓和承气汤攻下的迅猛之力,作为佐使药;综观本方,在益阴增液以润肠通便,使腑气通津液行的基础上,甘润减缓小承泻下泄热通便的攻下之力,具有下不伤正、攻润相合的特点,以达燥热去,阴液复,大便自调之功<sup>[8]</sup>。我们对麻子仁丸进行为期 7 d 的干预,结果显示麻子仁丸不论在改善便秘型小鼠的通便功能还是提高胃蛋白酶活性均体现了明显的优势,这一发现又惊人的与中医脏腑辨证“胃肠同治”理论相呼应,再进一步机制研究中我们证实麻子仁丸的疗效可能与上调淋巴细胞增殖有关。

T 淋巴细胞亚群及增殖能力变化可以一定程度上体现机体的细胞免疫功能成熟 T 淋巴细胞在生物机体中扮演着“细胞免疫”的角色。T 淋巴细胞包含 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 亚群,各亚群的百分数多少及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比例是衡量机体免疫系统稳定性的关键因素,其中 T 细胞增殖是机体对抗原刺激产生免疫应答的重要反应过程,是体现机体的细胞免疫效应的重要途径<sup>[9-12]</sup>。研究表明便秘的发生会对机体产生不良的影响,长时间持续性的便秘症状会降低患者免疫应答反应,导致体内淋巴细胞数目显著减少<sup>[13]</sup>。有学者报道提出随着便秘症状时间的持续性增加,小鼠重要免疫器官能力的脾脏系数及胸腺系数持续下降,进一步导致淋巴细胞发源地,骨髓的结构遭受破坏,从而直接影响了 T 淋巴细胞增殖、分化和成熟,而这些生理结构及过程的破坏则进一步导致了机体免疫功能的下降<sup>[14-15]</sup>。其他学者的研究也探讨了便秘对肠道淋巴细胞影响的可能性,并阐述其可影响免疫功能的相关机制<sup>[16-17]</sup>,在进一步的研究中发现交感神经可以释放儿茶酚胺类物质,可以抑制淋巴细胞的免疫功能,进而影响机体的免疫功能,有润肠作用的中药可以增强肠道的免疫功能,这可能与中药导致肠道交感神经兴奋性降低有关<sup>[18]</sup>。我们的研究中显示,与空白组比较,模型组和观察组淋巴细胞增殖能力 ( $P < 0.05$ ),包括 T 淋巴细胞亚群 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 百分数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例均下降 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,观察组中淋巴细胞增殖能力 ( $P < 0.05$ ),包括 T 淋巴细胞亚群 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 百分数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例均升高 ( $P < 0.05$ )。即麻子仁丸的治疗有助于增强 T 淋巴细

胞的增殖活性、改善 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比例。

总之,麻子仁丸可以有效改善便秘型小鼠通便功能,提高小鼠胃液蛋白酶活性,其疗效机制可能与麻子仁丸可有效的调节激活免疫机制,抑制免疫细胞凋亡,增加免疫细胞的数量,增强淋巴细胞增殖活化能力有关。

参考文献

[1] Zhang D, Zhu A. Pathogenesis and treatment of slow transit constipation[J]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2016, 19(12): 1447-1450.

[2] Mínguez M, López HA, Júdez J. Use of polyethylene glycol in functional constipation and fecal impaction[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2016, 108(12): 790-806.

[3] 张骞,梁爽. 麻子仁丸加减治疗便秘型肠易激综合征疗效观察[J]. 陕西中医, 2012, 33(12): 1618-1619.

[4] 布明亮. 中药治疗老年慢性功能性便秘 36 例观察[J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(9): 614-615.

[5] 刘畅. 培本通幽汤对便秘小鼠胃肠蠕动功能影响的实验研究[J]. 临床医药实践, 2010, 23(2): 17-19.

[6] 刘湘云, 佃雨萍, 佃泽佃. 《伤寒论》之脾约证与麻子仁丸证探析[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(3): 53-53, 59.

[7] 刘智群, 金小晶. 《伤寒论》脾约证证治探析[J]. 河南中医, 2016, 36(10): 1675-1677.

[8] 陈宽圣. 经方治疗脾胃病的理论与现代临床应用研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2015.

[9] 冯帼, 何柳芳, 刘素丽, 等. 双歧杆菌对坏死性小肠结肠炎新生大鼠肠上皮  $\gamma\delta$ T 淋巴细胞的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(21): 3177-3180.

[10] Dieckmann NM, Frazer GL, Asano Y, et al. The cytotoxic T lymphocyte immune synapse at a glance[J]. J Cell Sci, 2016, 129(15): 2881-2886.

[11] El-Rashedi FH, El-Hawy MA, Helwa MA, et al. Study of CD4( + ), CD8( + ), and natural killer cells (CD16( + ), CD56( + )) in children with immune thrombocytopenic purpura[J]. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2017, 10(1): 8-14.

[12] Shao MJ, Zhu YJ, Qiu YE, et al. Changes in the Level of Immunoglobulins and CD4/CD8 Ratio in Young and Aged Mice with Estradiol Deficiency[J]. Immunol Invest, 2017, 46(3): 305-313.

[13] 黄裕, 陈启仪, 姜军, 等. 顽固性功能便秘患者免疫功能的变化[J]. 肠外与肠内营养, 2015, 22(6): 340-342.

[14] 陈东晖, 陈海荣, 刘志强, 等. 利用小鼠模型研究肠道免疫功能紊乱在肠易激综合征致病机制中的作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(6): 445-451.

[15] Vassallo M, Fabre R, Durant J, et al. A decreasing CD4/CD8 ratio over time and lower CSF-penetrating antiretroviral regimens are associated with a higher risk of neurocognitive deterioration, independently of viral replication[J]. J Neurovirol, 2017, 23(2): 216-225.

[16] 计敏, 王建蔚, 蓝显明, 等. 不同亚型肠易激综合征患者肠黏膜 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 甘肃医药, 2016, 35(3): 195-197.

[17] Bruno G, Saracino A, Monno L, et al. The Revival of an “Old” Marker: CD4/CD8 Ratio[J]. AIDS Rev, 2017, 19(2): 81-88.

[18] 赵海燕. 麻仁软胶囊药理分析和合理应用[J]. 中国保健营养(上旬刊), 2014, 7(4): 2268-2268.