研究快报 RAPID COMMUNICATION

半夏泻心汤对幽门螺杆菌感染胃炎小鼠胃内微生物及酶 的影响

尹抗抗,曹蓉,唐标,郭抗萧,王欢,谭周进,谭达全

尹抗抗, 曹蓉, 唐标, 郭抗萧, 王欢, 谭周进, 谭达全, 湖南中 医药大学 湖南省长沙市 410208

尹抗抗, 实验师, 主要从事中医药分子机制的研究.

湖南省教育厅重点基金资助项目, No. 13A068 作者贡献分布: 此课题由谭周进与谭达全设计; 研究过程由尹抗 抗、曹蓉、唐标及郭抗萧完成;数据分析由郭抗萧与王欢完成;

本论文由尹抗抗、郭抗萧及谭达全完成. 通讯作者: 谭达全, 教授, 博士生导师, 410208, 湖南省长沙市学 士路300号,湖南中医药大学.dbxhncs@sohu.com

收稿日期: 2014-04-28 修回日期: 2014-06-01

接受日期: 2014-06-06 在线出版日期: 2014-07-28

Effect of Banxia Xiexin decoction on gastrointestinal microbiota and enzyme activities in mice with Helicobacter pylori associated gastritis

Kang-Kang Yin, Rong Cao, Biao Tang, Kang-Xiao Guo, Huan Wang, Zhou-Jin Tan, Da-Quan Tan

Kang-Kang Yin, Rong Cao, Biao Tang, Kang-Xiao Guo, HuanWang, Zhou-Jin Tan, Da-Quan Tan, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China

Supported by: Key Project of Department of Education of Hunan Province, No. 13A068

Correspondence to: Da-Quan Tan, Professor, Hu'nan University of Chinese Medicine, 300 Xueshi Road, Changsha 410208, Hunan Province, China. dbxhncs@sohu.com

Received: 2014-04-28 Revised: 2014-06-01

Accepted: 2014-06-06 Published online: 2014-07-28

Abstract

AIM: To explore the relationship between the therapeutic effect of Banxia Xiexin decoction on Helicobacter pylori (H. pylori) associated gastritis and gastrointestinal microbiota and enzyme activities.

METHODS: A mouse model *H. pylori* associated gastritis was established, and the effects of clarithromycin and Banxia Xiexin decoction on the microbiota and enzyme activities were analyzed.

RESULTS: The numbers of bacteria, Escherichia coli, lactobacillus and protease activities in mice

with H. pylori associated gastritis were significantly higher than those in control mice (P < 0.05or P < 0.01), while cellulase and amylase activities were significantly lower in model mice than in control mice (P < 0.05 or P < 0.01). The numbers of bacteria, Escherichia coli, lactobacillus and bifidobacteria in clarithromycin-treated mice were significantly lower than those in control mice (P < 0.05 or P < 0.01). After Banxia Xiexin decoction treatment, the numbers of bacteria became lower, but were still higher than those in control mice. Bifidobacteria and lactobacillus in Banxia Xiexin decoction-treated mice grew very rapidly, and their numbers were much higher than those in the other groups (P < 0.01). Amylase and cellulase activities in Banxia Xiexin decoction-treated mice returned to normal levels (P > 0.05).

CONCLUSION: Banxia Xiexin decoction can significantly adjust gastrointestinal microbiotia and enzyme activities in mice with H. pylori associated gastritis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights

Key Words: Banxia Xiexin decoction; Helicobacter pylori; Gastritis; Chinese medicine; Microecology

Yin KK, Cao R, Tang B, Guo KX, Wang H, Tan ZJ, Tan DQ. Effect of Banxia Xiexin decoction on gastrointestinal microbiota and enzyme activities in mice with Helicobacter pylori associated gastritis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(21): 3067-3071 URL: http://www.wjgnet. com/1009-3079/22/3067.asp DOI: http://dx.doi. org/10.11569/wcjd.v22.i21.3067

目的: 探讨半夏泻心汤对幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, H. pylori)感染胃炎小鼠的疗效 与胃肠道微生物及酶活性的关系, 从微生态学 角度研究半夏泻心汤的疗效机制.

方法: 通过建立H. pylori感染胃炎小鼠模型,

背景资料 1994年幽门螺杆

菌(Helicobacter pylori, H. pylori) 已经被世界卫生 组织国际癌症研 究机构列为 1 类 致癌原. 据报道, 在发达国家40% 成人感染H. pylori, 发展中国家 成人H. pylori感染 率高达90%, 我国 属H. pylori高感染 地区. H. pylori是 慢性胃炎、消化 性溃疡的主要病 原菌. 也是慢性胃 炎、消化性溃疡 复发的重要因素.

同行评议者 陈敬贤, 教授, 安 徽医科大学微生 物学教研室



随机分为正常组、模型组、克拉霉素组、半 夏泻心汤组,分别灌胃给药克拉霉素、半夏泻 心汤,分析胃内菌群数及酶活性.

结果:模型组胃内的细菌数、大肠杆菌数、双歧杆菌数、乳酸菌数以及蛋白酶活性均高于正常组(P<0.05或P<0.01),纤维素酶及淀粉酶活性均低于正常组(P<0.05或P<0.01);经克拉霉素治疗后的模型小鼠细菌数、双歧杆菌数、乳酸菌数及纤维素酶酶活性均低于正常组(P<0.05或P<0.01);经半夏泻心汤治疗后,细菌数虽有所降低,但仍高于正常组,双歧杆菌和乳酸菌增长十分迅速,远高于其他各组(P<0.01),纤维素酶及淀粉酶已恢复至正常(P>0.05).

结论: 半夏泻心汤能显著调节H. pylori感染胃炎小鼠胃内微生物及酶活性.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 半夏泻心汤; 幽门螺杆菌; 胃炎; 中医药; 微生态

核心提示: 半夏泻心汤源于汉代张仲景《伤寒杂病论》, 是治疗寒热错杂之痞证的代表方. 该方现多用于胃肠道疾病的治疗, 特别是对于幽门螺杆菌感染的相关性胃肠道疾病, 疗效已得到认同. 本实验以治疗胃肠道疾病的中药复方为半夏泻心汤对象, 从现代微生态学角度研究其疗效, 旨在阐明该中药复方的疗效对胃肠道疾病的微生态学机制.

尹抗抗, 曹蓉, 唐标, 郭抗萧, 王欢, 谭周进, 谭达全. 半夏泻心 汤对幽门螺杆菌感染胃炎小鼠胃内微生物及酶的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(21): 3067-3071 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3067.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i21.3067

0 引言

半夏泻心汤出自张仲景的《伤寒论》,系治疗"心下痞"的代表方,后世医家广泛用于胃肠等多种疾病的治疗.近年来,实验研究^[1-6]表明,该方能明显抗幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, H. pylori)感染,减轻和修复胃黏膜炎变程度,对H. pylori感染有较好的清除作用.

20世纪70年代崛起的微生态学,是研究正常 微生物菌群与其宿主的相互关系及其作用机制 的新兴边缘学科.中医药是祖国医学的瑰宝,中 医治疗更注重整体调节,加上中药组方变化大, 可供选择的药物多,其优势已逐渐被认同.现代 微生态学的兴起,为中医药现代化的发展提供了新的契机^[7],以治疗胃肠道疾病的中药复方为对象,研究其疗效,更有利于阐明该中药复方的疗效对胃肠道疾病的微生态学机制.本研究通过半夏泻心汤对H. pylori感染胃炎小鼠的疗效与胃肠道微生物及酶活性的关系,从微生态学角度探讨其疗效机制. 现将实验方法和结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级C57BL/6小鼠43只, 6-8周龄, 体质 量20 g±2 g, 雌雄各半, 由湖南斯莱克实验有限 公司提供, 生产许可证号: No. 43004700001783, 使用许可证号: SYXK(湘)2009-0001. 在标准饲 养条件下饲养. 半夏泻心汤由生半夏、黄芩、 黄莲、干姜、人参、大枣、甘草组成, 上述药 物均购自湖南中医药大学第一附属医院. 药物 用量根据《伤寒论》所载药量比例, 按中药常 规煎煮法制成1 g/mL溶液, 4 ℃保存备用; 克 拉霉素, 杭州中美华东制药有限公司, 批号: 130391; 氨苄青霉素: 珠海联邦制药股份有限 公司, 批号: 11000303. 牛肉膏蛋白胨琼脂培养 基、伊红美蓝琼脂培养基(eosin-methylene blue medium, EMB)、乳酸菌琼脂培养基(Lactotacillus agar, MRS)和双歧杆菌选择性琼脂培养基 (Bifidobacterium selective agar, BBL)(购自武汉 博士德生物工程有限公司).

1.2 方法

1.2.1 **菌液的制备**: 将*H. pylori*培养物密集划线接种于Skirrow平板, 37 ℃、微需氧环境中培养72 h,用灭菌生理盐水洗下菌苔,混合均匀,以酶标仪测定其 A_{550} 值4.8-8.4(相当于1×10 $^{\circ}$ CFU/mL).上述菌液保存于4 ℃冰箱中.

1.2.2 造模: 按随机数字表随机将动物分成正常组(n = 10)和造模组(n = 33),除正常组给予正常喂养,造模组动物参照田雪飞等^[8]造模方法,造模16 d,以*H. pylori*菌液0.1 mL/只直接经口灌胃造模,隔天1次,共8次(灌胃前6 h、灌胃后30 min禁食). 末次灌胃2 h后,从造模组中随机挑选出3只动物处死,进行胃黏膜组织尿素酶试验和*H. pylori*培养. 以验证造模是否成功. 胃黏膜组织发生炎症病变、尿素酶试验阳性和黏膜组织培养出*H. pylori*,表明造模成功,造模成功后,将造模组动物随机分为模型组、克拉霉素组和半夏泻

创新盘点

表 1 半夏泻心汤对H. pylori感染胃炎小鼠胃内微生物数量的影响

分组	细菌(10 ⁵ CFU/g)	大肠杆菌(10 ⁵ CFU/g)	双歧杆菌(10 ⁶ CFU/g)	乳酸菌(10 ⁶ CFU/g)
正常组	1.927 ± 0.335	3.200 ± 0.436	8.333 ± 1.436	3.600 ± 0.964
模型组	10.487 ± 0.660 ^b	15.967 ± 3.356 ^b	12.500 ± 1.931°	$53.000 \pm 1.153^{\circ}$
克拉霉素	0.993 ± 0.200^{ad}	2.400 ± 7.937^{d}	1.300 ± 0.656^{bd}	0.633 ± 0.351^{bd}
半夏泻心汤	4.847 ± 0.502^{bdf}	$61.333 \pm 27.227^{\circ}$	144.933 ± 10.567^{bdf}	125.633 ± 20.915^{bdf}

[®]P<0.05, [®]P<0.01 vs 正常组; [©]P<0.05, [®]P<0.01 vs 模型组; [®]P<0.01 vs 克拉霉素组. H. pylori: 幽门螺杆菌.

分组所得计量数据采用mean±SD表示, 两组间均数比较用t检验. P<0.05为差异有统计学意义.

心汤组.

1.2.3 给药: 正常对照组和模型组(等量蒸馏水经口灌胃). 克拉霉素组和半夏泻心汤组所需药量根据人的用量再参照小鼠与人的体表面积比值(R)表^[9]换算出20 g小鼠每天的用药量, 再用蒸馏水调整至所需量(每20 g小鼠每次灌胃0.2 mL),以保证体质量不相同的小鼠灌胃量保持相同.各组分别灌胃给药, 1次/d, 连续8 d. 灌胃前6 h、灌胃后30 min内禁食、禁水. 末次灌胃治疗结束后, 动物禁食、不禁水12 h.

1.2.4 小鼠胃内容物的提取: 将处死的小鼠立即放于超净工作台上, 无菌采集各组胃内容物, 收集同组小鼠的胃内容物通过无菌操作进行混匀. 备用.

1.2.5 **胃內容物微生物数量的测定**: 按组分别无菌操作称取10 g胃内容物放入装有玻璃珠的无菌水瓶中, 摇床120 r/min振摇30 min, 使胃内容物中的微生物尽可能均匀成单分散至无菌水中, 选择10²-10⁶稀释度, 采用混菌法计数, 细菌及大肠杆菌在37 ℃培养箱中培养24 h后计数菌落, 双歧杆菌、乳酸菌37 ℃厌氧培养48 h后计数菌落. 每一个稀释度做3个重复, 求其平均值并计算每克胃内容物所含的菌数^[10].

1.2.6 小鼠胃中酶的活性分析: 取胃内容物, 将内容物用无菌水稀释后, 在40 \mathbb{C} 水浴中保温30 min, 使酶蛋白充分溶出, 2000 r/min离心10 min后取上清液, 分别分析蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶的活性[$^{\text{III}}$. 蛋白酶活采用福林-酚法进行测定, 以1 g肠道内容物在37 \mathbb{C} 作用30 min生成1 μ g氨基酸定义为一个酶活单位U, 纤维素酶活和淀粉酶活均采用DNS比色法进行测定, 纤维素酶活以1 g肠道内容物在50 \mathbb{C} 作用30 min生成1 μ g还原糖定义为一个酶活单位U, 淀粉酶活以1 g肠道内容物在40 \mathbb{C} 作用30 min生成1 μ g还原糖定义为一个酶活单位U, 淀粉酶活以1 g肠道内容物在50 \mathbb{C} 作用30 min生成1 \mathbb{C}

统计学处理 用SPSS17.0软件处理数据, 各

2 结果

2.1 半夏泻心汤对H. pylori感染胃炎小鼠胃内微生物数量的影响 由表1可知,治疗结束后,模型组的细菌数、大肠杆菌数、双歧杆菌和乳酸菌数明显高于正常组(P<0.01或P<0.05),克拉霉素组的细菌、大肠杆菌、双歧杆菌和乳酸菌的数量明显下降,且低于正常组(P<0.01或P<0.05),这是由于克拉霉素消灭的胃肠道中的大量细菌,也包括其中的有益菌-双歧杆菌和乳酸菌.在经过半夏泻心汤灌胃后的小鼠虽然细菌数有所下降,但与正常组比较仍有显著性差异(P<0.01),大肠杆菌、双歧杆菌和乳酸菌数均有所增加,其中大肠杆菌数与正常组比较无差异(P>0.05)双歧杆菌和乳酸菌增长十分迅速,这可能与半夏泻心汤中的某些成分有关.

2.2 半夏泻心汤对H. pylori感染胃炎小鼠胃内酶酶活的影响 由表2可知,模型组的小鼠胃内的蛋白酶活性明显高于正常组,而纤维素酶、淀粉酶活性较正常组低,均有显著性差异(P<0.01或P<0.05),经克拉霉素灌胃治疗后,蛋白酶酶活和纤维素酶酶活均有所下降,但与正常组比较仍有显著性差异(P<0.01或P<0.05);经过半夏泻心汤治疗后纤维素酶和淀粉酶的活性与正常组比较无差异(P>0.05),但蛋白酶酶活性强,均高于其他各组(P<0.01).

3 讨论

自1983年澳大利亚学者Warren和Marshall在人胃黏膜组织中发现并分离出*H. pylori*以来,人们逐渐发现*H. pylori*与人类的胃炎、消化性溃疡、胃癌等疾病的发生发展密切相关^[12],并且世界卫生组织已将*H. pylori*列为第一级致癌物质^[13]. 相关文献报道,根除*H. pylori*能加速消化性溃疡的愈

▲研究形式 A Pylorion 为的形式 A Pylorion 为的形式 A Pylorion 为的方,不可能是一个人,可能是一个人,可能是一个一个一点,可能是一个一个一点,可能是一个一个一点,可能是一个一个一点,可能是一个一个一点,可能是一个一点,可能是一个一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一个一点,可能是一个一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是一个一点,可能是



同行评价 本文具有一定指 导意义.

表 2 半夏泻心汤对H. pylori感染胃炎小鼠胃内酶活的影响 (mean ± SD, U)

分组	蛋白酶	纤维素酶	淀粉酶
正常组	19.667 ± 7.094	15.667 ± 3.819	56.000 ± 6.764
模型组	69.000 ± 16.454^{b}	11.167 ± 2.754^{a}	15.500 ± 3.775 ^b
克拉霉素	35.500 ± 3.775 ^{bd}	4.500 ± 2.291 ^{bd}	48.333 ± 2.082^d
半夏泻心汤	247.333 ± 9.504^{bdf}	13.333 ± 6.788	59.833 ± 14.092^{de}

[®]P<0.05, [®]P<0.01 vs 正常组; [®]P<0.01 vs 模型组; [®]P<0.05, [®]P<0.01 vs 克拉霉素组. H. pylori: 幽门螺杆菌.

合,降低胃癌的发病风险^[14]. 目前抗*H. pylori*感染的治疗,主要采用西药三联疗法和四联疗法,治疗费用高,更为严重的是随着耐药株的出现,疗效有下降趋势,且药物不良反应大,停药后易复发,易导致胃肠道内的微生态失衡. 近年来,国内外学者通过动物实验研究发现多种中药具有抗*H. pylori*的活性物质,为*H. pylori*感染的治疗开辟一条新途径.

有研究^[15]表明, 半夏泻心汤能增加合并*H. pylori*感染大鼠慢性胃炎模型黏液层磷脂和氨基己糖含量, 对胃黏膜屏障起到一定的保护作用. 还有研究^[16]证实, 半夏泻心汤具有良好的调节胃肠激素的分泌、增强胃黏膜修复能力、改善胃功能的作用. 本方有明显的促进胃蠕动次数和幅度. 缩短胃排空时间的作用: 对胃蠕动增强的患者, 又可起到抑制胃运动作用. 方中半夏双向调节异常状态下的胃肠功能; 干姜、党参等都对上消化道有调节作用: 黄芪可促进血液中前列腺素的合成, 加强胃黏膜屏障作用. 黄连素能明显抑制肠道平滑肌细胞内钙离子浓度的升高, 改善肠道运动功能.

半夏泻心汤中的某些成分能促进为胃肠道中的双歧杆菌和乳酸菌的生长,研究表明胃内的常驻菌多为革兰氏阳性菌和厌氧菌,这些细菌分布在胃黏膜表面,对于胃内免疫防护,维持胃内微环境稳定方面起着重要的作用.其中,乳酸菌是维持胃内生态平衡的主要力量[17],药材中丰富的蛋白质可能成为一种益生源,小肽、氨基酸等营养因子可能促进芽孢杆菌和乳酸菌的生长,也有可能为菌群的生长提供氮源[11].由于乳酸菌等有益菌的迅速增加变成优势菌种,可通过争夺营养物质和定植位点、影响微生物代谢途径和增强免疫功能来抑制H. pylori等有害菌的增殖. 本研究中在经过半夏泻心汤治疗后,大肠杆菌数和蛋白酶酶活并没有恢复到正常,

甚至更加偏离正常值, 其具体情况还有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 莫莉, 皮明钧, 伍参荣, 郭春秀. 半夏泻心汤及其拆方对 幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜CD4、CD8表达的影响. 湖南中医学院学报 2006; 26: 8-10, 15
- 2 谭达全, 邓冰湘, 周祖怡, 伍参荣, 郭春秀. 半夏泻心汤 对幽门螺杆菌相关性胃炎小鼠血清IL-2、IL-8影响的 实验研究. 中国中医药科技 2005; 37: 92-93
- 3 吴忠祥, 贺龙刚, 谭达全, 周丽. 半夏泻心汤及其拆方对 Hp感染小鼠胃黏膜保护作用的研究. 湖南中医药大学 学报 2010; 30: 23-25
- 4 吴忠祥, 尹抗抗, 谭达全. 半夏泻心汤及其有效组份黄连素对Hp感染小鼠胃黏膜保护作用的实验研究. 新中医 2009; 41: 108-109
- 5 罗桂香, 尹抗抗, 谭达全. 半夏泻心汤及其有效组分黄芩苷对幽门螺杆菌相关性胃炎胃黏膜保护作用和对TNF-α影响的研究. 中国中医药现代远程教育 2009; 7: 19-20
- 6 周文, 尹抗抗, 王述湘, 张波, 邓冰湘, 谭达全. 半夏泻心 汤及其有效组分总皂苷对幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜 保护作用的影响. 新中医 2011; 43: 136-138
- 7 蔡子微, 康白. 关于中医学与微生态学在原理上的统一性. 中国微生态学杂志 1995; 7: 43-48, 55
- 8 田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕. C57BL6小鼠幽门螺杆菌 感染动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1313-1316
- 9 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学. 长沙: 湖南科技出版社, 2006: 48-49
- 10 曾奥, 张华玲, 谭周进, 蔡莹, 蔡光先, 周赛男. 小鼠菌群 失调腹泻模型的建立及超微七味白术散的疗效. 微生 物学通报 2012; 39: 1341-1348
- 11 谭周进, 吴海, 刘富林, 蔡莹, 蔡光先, 张华玲, 曾奥. 超 微七味白术散对肠道微生物及酶活性的影响. 生态学报 2012; 32: 6856-6863
- Fuccio L, Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Helicobacter pylori eradication treatment reduces but does not abolish the risk of gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 3100; author reply 3101-3102 [PMID: 19956126 DOI: 10.1038/ajg.2009.516]
- 13 Zuo DS, Dai J, Bo AH, Fan J, Xiao XY. Significance of expression of heat shock protein90alpha in human gastric cancer. World J Gastroenterol 2003; 9: 2616-2618 [PMID: 14606110]
- 14 Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain. Gastroenterology 1997; 112: 1386-1397 [PMID: 9098027 DOI: 10.1016/



S0016-5085(97)70155-0]

- 15 吴丽芹,姜惟,姚欣,顾武军.半夏泻心汤对合并幽门螺杆菌感染大鼠慢性胃炎模型胃粘液层磷脂、氨基己糖的影响.中国中医药信息杂志 2001;8:29-30
- 16 秦立伟, 刘桂英. 半夏泻心汤加减治疗慢性胃炎62例. 光明中医 2010; 25: 2228-2229

编辑 田滢 电编 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集 团有限公司所有

消息

《世界华人消化杂志》 再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、计算和分析,以及学科专家评审,《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊.

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法. 定量评价指标体系采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种,统计到的文献数量共计221177余万篇次,涉及期刊14400余种. 参加核心期刊评审的学科专家达8200多位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊.

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下,期刊学术水平稳步提升,编校质量稳定,再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录.在此,向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者,表示衷心的感谢!(《世界华人消化杂志》编辑部).

