

金荞麦提取物对 D-IBS 大鼠排便功能及离体结肠的作用和机制

刘丽娜^{1,2} 严晶² 孙志广^{1,2}

摘要 目的 探讨金荞麦醇提取物(FAE)干预腹泻型肠易激综合征(D-IBS)模型大鼠及离体结肠肠管运动功能作用及机制。**方法** 用新生期乳大鼠母源性分离(NMS)联合醋酸(AA)灌肠法制作 D-IBS 模型,动物随机分为干预前对照组(10 只,不灌胃)、对照盐水组(8 只,生理盐水灌胃)、干预前模型组(10 只,不灌胃)、模型盐水组(8 只,生理盐水灌胃)、FAE 6 g/kg 组(8 只,FAE 灌胃)、FAE 24 g/kg 组(8 只,FAE 灌胃)、匹维溴铵组(8 只,0.02 g/kg 灌胃),灌胃每天 1 次,共 2 周。用腹壁撤退反射(AWR)评估结肠高敏感性变化,用 Bristol 大便秘性状评分评估大鼠粪便稀便级并计算其粪便湿重。同时体外观察了不同浓度 FAE 和匹维溴铵(0.02 $\mu\text{g/mL}$)对大鼠离体结肠自发收缩、乙酰胆碱(Ach)引发的痉挛性收缩以及对肠内 Ca^{2+} 通道的作用。**结果** 与干预前对照组比较,干预前模型组痛觉压力阈值及最大耐受压力值明显降低($P < 0.05$),粪便稀便级及粪便湿重明显增高($P < 0.01$);与对照盐水组比较,模型盐水组痛觉压力阈值及最大耐受压力值明显降低($P < 0.05$),粪便稀便级及粪便湿重明显增高($P < 0.01$);与模型盐水组比较,FAE24 g/kg 组及匹维溴铵组痛觉压力阈值均明显升高($P < 0.05$)。FAE6 g/kg 组粪便湿重、FAE24 g/kg 组与匹维溴铵组粪便稀便级及粪便湿重均明显下降($P < 0.05$)。FAE(30、100、300、1 000、3 000 $\mu\text{g/mL}$)及匹维溴铵对肠管自发收缩均有显著的抑制效应($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 FAE(30、100、300 $\times 10^{-6}$ g/mL)对 Ach 引发的痉挛性收缩及 CaCl_2 促发的张力性收缩均有剂量依赖地松弛作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),匹维溴铵亦能显著抑制 Ach 及 CaCl_2 引发的收缩作用($P < 0.01$)。**结论** FAE 有效成分可能通过 Ca^{2+} 通道竞争拮抗作用,剂量依赖地抑制结肠运动亢进,进而参与改善 IBS 模型的排便功能及肠痉挛引起的痛觉过敏。

关键词 金荞麦提取物;腹泻型肠易激综合征;粪便稀便级;离体结肠;收缩张力

Effect of *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn Alcohol Extract on Defecation and Isolated Colon of Diarrhea-IBS Rats and Its mechanism LIU Li-na^{1,2}, YAN Jing², and SUN Zhi-guang^{1,2} 1 Department of Hepatopathy, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029), China; 2 Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, First Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210046), China

ABSTRACT Objective To explore the intervention of *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn alcohol extract (FAE) on defecation function and motor functions of isolated colons of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) rats and to study its underlying mechanism. **Methods** The D-IBS rat model was established by neonatal pups maternal separation (NMS) combined with intracolonic infusion of acetic acid (AA). Adult IBS rats were randomly divided into the pre-intervention control group ($n = 10$, with no gastrogavage), the normal saline control group ($n = 10$, administered with normal saline by gastrogavage), the pre-treatment model group ($n = 8$, with no gastrogavage), the normal saline model group ($n = 8$, administered with normal saline by gastrogavage), the low dose FAE group ($n = 8$, administered with 6 g/kg FAE by gastrogavage), the high dose FAE group ($n = 8$, administered with 24 g/kg FAE by

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金项目(No.BK20140959);高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20133237110008)

作者单位:1.南京中医药大学附属医院肝病科(南京 210029);2.南京中医药大学第一临床医学院中西医结合系(南京 210046)

通讯作者:孙志广, Tel:025-83620504, E-mail:pr_zhiguangsun@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.12.1469

gastrogavage), and the Pinaverium Bromide group ($n=8$, administered with 0.02 g/kg Pinaverium Bromide by gastrogavage). All medication was performed once daily for 2 weeks. The abdominal withdrawal reflex (AWR) was employed to evaluate the visceral hypersensitivity; their loose and watery stool grade was assessed by Bristol scores for stool consistency; and their fresh feces weight was calculated. *In vitro* effect of different concentrations of FAE and Pinaverium Bromide (0.02 $\mu\text{g/mL}$) on spontaneous contraction and spasmodic contraction induced by acetylcholine (Ach) in rats' isolated colon were observed and the influence on the intestinal calcium channel was evaluated. Results Compared with the pre-intervention control group, the pain pressure threshold and the maximum tolerance pressure decreased significantly in the pre-intervention model group ($P<0.05$), and the loose and watery stool grade and fresh feces weight increased drastically ($P<0.01$). Compared with the normal saline control group, the pain pressure threshold and the maximum tolerance pressure decreased significantly in the normal saline model group ($P<0.05$), and the loose and watery stool grade and fresh feces weight increased markedly ($P<0.01$). Compared with the normal saline model group, the pain pressure threshold of 24 g/kg FAE and Pinaverium Bromide group significantly increased ($P<0.05$). The loose and watery stool grade and fresh feces weight decreased obviously in the low dose FAE group, the high dose FAE group, and the Pinaverium Bromide group ($P<0.05$). FAE (30, 100, 300, 1 000, and 3 000 $\mu\text{g/mL}$) and Pinaverium Bromide could significantly inhibit spontaneous contraction of isolated intestines ($P<0.05$, $P<0.01$), and FAE (30, 100, and 300 $\times 10^{-6}$ g/mL) could remarkably inhibit their spasmodic contraction and contractile tension induced by Ach and Ca^{2+} respectively ($P<0.05$, $P<0.01$) in a concentration-dependent manner. Pinaverium Bromide also could significantly inhibit Ach and Ca^{2+} induced contraction. Conclusion Effective components of FAE improved the defecation function and inhibited enterospasm induced intestinal hyperactivity in IBS model rats via antagonizing calcium channel competitively and inhibiting colonic motility dose-dependently.

KEYWORDS *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn extract; diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; loose and watery stool grade; isolated colon; contractile tension

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)在中医理论中属于腹痛、泄泻和便秘范畴,病位在大肠^[1]。其发病与脾胃运化功能失调有关,病机是脾胃虚弱,肝气郁结等。传统中药金荞麦[*Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn.]入肺、脾、大肠经,具有解痉止痛,清热利湿,醒脾健运之功,金荞麦主要用于热毒蕴肺,或肺热下移大肠而见的利下脓血,并清热利湿、调理肝脾、畅达气机,进而调节肠道功能^[2]。课题组在临床实践中发现腹泻型 IBS(diarrhea-predominant IBS, D-IBS)患者的方剂中加入金荞麦,可明显改善腹泻腹痛症状。因此本实验观察了金荞麦提取物对 D-IBS 模型大鼠排便功能的体内实验和大鼠离体结肠的体外实验,探讨金荞麦对 IBS 肠道运动功能的作用和机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级新生雄性 Sprague-Dawley 大鼠,120 只,体重 5~6 g,购自上海斯莱克动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2011-0005,乳大鼠每

8~10 只与哺乳母鼠 1 笼。SPF 级雄性成年大鼠,150 只,体重(180 $\pm$ 20)g,购自上海斯莱克动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2011-0032。动物自由进食与饮水,保持昼夜节律各 12 h。

2 药品、试剂与仪器 金荞麦醇提取物[*Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn Alcohol Extracts, FAE]粉剂,由南通精华制药股份有限公司提供,由江苏省药物研究所鉴定,纯度 98.0%;钙离子拮抗剂匹维溴铵(pinaverium bromide),苏威制药有限公司(生产批号:20101223);乙酰胆碱(acetylcholine, Ach, 上海江莱生物科技有限公司,生产批号:60-31-1);氯化钡(barium chloride, BaCl_2 , 开原化学试剂厂,批号:20110212);葡萄糖(Glucose, Glu, 沈阳市化学试剂厂,批号:20110926);NaCl(上海江莱生物科技有限公司,批号:13472-35-0);KCl(沈阳市化学试剂厂,批号:20110220); CaCl_2 (天津市博迪化工有限公司,批号:20100523); NaHCO_3 (天津市博迪化工有限公司,批号:20110421); NaH_2PO_4 (上海江莱生物科技有限公司,批号:

29801-94-3);导尿管(上海医疗爱宝公司,型号:6F);二甲基亚砜(methyl sulfoxide,DMSO,南京东方之珠工贸有限公司,批号:67-68-5);简易血压计(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司生产,型号:20090723);Powerlab 生物信号采集处理系统(澳大利亚 AD Instruments 公司,型号:8 通道);恒温浴槽[成都仪器厂,型号:HSS-1(B)];肌肉张力换能器(成都仪器厂,型号:JZJ01);医用氧气瓶(山东华宸高压容器有限公司,型号:LWH89-1.0-15)。

3 Tyrode 营养液配置及药品准备 Tyrode 液配制:Tyrode 液组分(mmol/L):NaCl 136.86,KCl 2.86, CaCl₂1.80, MgCl₂1.05, NaHCO₃11.90, NaH₂PO₄0.41, Glu 5.60, pH = 7.4。无钙 Tyrode 液:由正常的 Tyrode 液将 CaCl₂ 去除,加入 0.1 mmol/L 的乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA);高钾液:正常 Tyrode 液中的 KCl 提高为 60 mmol/L,并去将 NaCl 降到 76.86 mmol/L;无钙高钾 Tyrode 液:高钾液中的 CaCl₂ 去除,加入 0.1 mmol/L 的 EDTA。

4 金荞麦提取物对大鼠排便功能的影响

4.1 药品准备 灌胃前用双蒸水将 Fag 配成低浓度 0.6 g/mL,高浓度 2.4 g/mL,将匹维溴铵配成浓度 0.002 g/mL 备用。

4.2 D-IBS 模型的建立 用新生期母源性分离(neonatal pups maternal separation, NMS)联合醋酸灌肠(acetic acid, AA)法^[3,4]造模。随机选取 20 只作为对照组,其余 100 只乳鼠进行造模,从出生第 4~21 天内,每天将乳鼠分别独自放置在另一新塑料笼中,每天 9:00-12:00 期间不予哺乳;同时于第 8~21 天的 2 周内,每天用直径 1 mm 硬膜外导管插入肛门约 2 cm,注入 0.5% 的 AA 水溶液 0.2~0.5 mL,灌肠结束后用等容积的 PBS 缓冲液冲洗结肠。对照组乳鼠不离乳并与母鼠同一笼,只在 8~21 天每天结肠内灌入相同剂量的生理盐水。第 22 天起所有幼鼠断奶并与母鼠分笼,为避免雌激素对实验结果的干预只选择雄性幼鼠作为研究对象。之后 2 周(第 22~35 天)内不进行任何实验操作,至第 7~8 周龄大鼠体重达 180 g 以上后,评估模型组和正常组的内脏敏感性及其排便性状。实验共用测定内脏高敏感性验证造模是否成功。造模过程中 6 只乳鼠因造模损伤死亡,造模成功有 78 只,造模成功率达 83%。

4.3 分组及给药方法 用配对比较法随机分组,对照组 20 只大鼠随机选取 10 只作为干预前对照组,8 只作为干预后对照盐水组。造模成功的大鼠随

机选择 10 只作为干预前模型组,再随机选择 32 只分成 4 组,每组 8 只,分为模型盐水组、FAE 6 g/kg 组、FAE 24 g/kg 组,匹维溴铵组,给药剂量根据预实验及之前研究结果设定^[5]。FAE 组给予 FAE 6 或 24 g/kg 灌胃,匹维溴铵组给予 0.02 g/kg 灌胃,对照盐水组及模型盐水组给予生理盐水灌胃,各组灌胃容积 10 mL/kg,连续 2 周,每天晨起 9:00 给药 1 次,至大鼠 10~11 周龄再次其评价模型。干预前对照组和模型组大鼠自由饮食,均不给于灌胃。

4.4 内脏高敏感性的测定 模型评价和药物疗效评价均用大鼠腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分标准^[6]。乙醚麻醉大鼠后,三通管连接血压表、充气球囊和导尿管,导尿管末端连接直径 2.5 cm,长 4 cm 乳胶手套制成的扩张球囊,后者塞入大鼠肛门 1 cm。将大鼠限制于自制塑料笼(18 cm × 5 cm × 7 cm)中,待大鼠清醒 30 min 后,分别在 10~80 mmHg 不同压力下对球囊注气行结肠扩张(colorectal distension, CRD)引发的腹壁撤退反射(AWR)来评估内脏对机械刺激的敏感性,评价模型效果。每次扩张持续 20 s,刺激期间出现腹部肌肉收缩时记录压力,标记为痛觉压力阈值;持续加压,出现身体拱起并抬起盆腔和阴囊时标记的压力为最大耐受痛觉压力值。每只大鼠测 3 次,间歇 10 min,取平均值。

4.5 大鼠排便性状及含水量鉴定 各组动物灌胃 2 周结束后用代谢笼收集晚 20:00 至次日晨 8:00 中 12 h 的粪便,自由进饮食。根据 Bristol 分型^[7]记录积分,并求出平均值。1 型:分离的硬团或坚果样大便;2 型:团块状或腊肠样大便;3 型:干裂的腊肠状大便;4 型:光滑、柔软的腊肠状大便;5 型:分散团块样软便;6 型:泥浆糊状样便;7 型:水样便。其中 1、2、3 型为便秘粪形,每型 1 分;4、5 型为正常粪形,每型 2 分;6、7 型为腹泻粪形,每型 3 分。所收集 12 h 粪便称其湿重,取平均值。

5 不同剂量 FAE 对大鼠离体结肠的效应

5.1 药品准备 取生理盐水加 DMSO 配至 5% 浓度作为正常对照液,匹维溴铵用 Tyrode 液配成终浓度 10⁻⁴ mmol/L 溶液备用。称取适量的金荞麦提取物,倒入 5 mL 容量瓶中,用双蒸水加 DMSO 定容,制成混悬液,实验时用 Tyrode 液稀释至所需浓度(以浴槽内药物终浓度 0、10、30、100、300、1 000、3 000 μg/mL 表示)。

5.2 离体肠管的制备 取 150 只雄性成年大鼠,实验前禁食 24 h,不禁水。脱颈后处死,立即解

剖,找到距肛门 3~5 cm 左右的结肠,用 Tyrode 液冲洗去除肠内容物,剪成 1.5 cm 小段放入 Tyrode 液浴槽中,一端固定于通气钩,一端固定于张力换能器。给予 1 g 前负荷,稳定 60 min,每隔 20 min 换 1 次营养液。浴槽内温度维持在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,持续通入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气。张力换能器连接到 Powerlab 生物信号采集系统中并采集系统数据。

5.3 FAE 对离体结肠自发收缩的影响^[8] 每次用 100 μL 移液枪往浴槽中累积加入不同浓度的 FAE(终浓度 0、10、30、100、300、1 000、3 000 $\times 10^{-6}$ g/mL),待前一浓度的药物产生最大作用后,加入下一浓度。最后待肠管稳定 20 min 后,用正常 Tyrode 液冲洗,每 3~5 min 冲洗 1 次,冲洗 2~3 次后,平衡 20 min 左右至肠管回复到基线水平,加入匹维溴铵(终浓度 0.02 $\mu\text{g/mL}$)。每次给药体积 100 μL ,加液总体积不超过浴槽液体总体积的 5%,描记收缩曲线。实验结束后测量给药前 1 min 内和给药后第 3 min 内的平均张力,并根据平均张力值计算抑制率:抑制率(%) = 给药前平均张力(给药后平均张力)/给药前平均张力 $\times 100\%$ 。

5.4 FAE 对 Ach 致离体结肠痉挛性收缩的影响 离体结肠平滑肌在浴槽中稳定 60 min 后,加入 10^{-2} mol/L ACh,使其在浴槽中的终浓度为 10^{-4} mol/L,结肠平滑肌出现快速收缩相和随后的持续收缩相,持续收缩相在 2~3 min 时收缩平稳,持续 20 min 无明显改变。正常 Tyrode 液冲洗,每 3~5 min 冲洗 1 次,冲洗 2~3 次后,平衡 20 min 左右至结肠平滑肌恢复到基线水平。重新加入 ACh(终浓度为 10^{-4} mol/L),待收缩平稳后,累积加入 5.2 实验中 3 种有效浓度 FAE 或匹维溴铵,方法和记录同 5.2。

5.5 FAE 对离体结肠的 CaCl_2 恢复肠管收缩的效应 待浴槽中标本稳定后,将浴槽内的正常 Tyrode 液更换为换无钙 Tyrode 液温育 30 min 后,换无钙高钾 Tyrode 液,肠肌除极化后 30 min,结肠平滑肌出现稳定性收缩后在浴槽中加入 0.1 mol/L CaCl_2 0.1 mL(终浓度为 3×10^{-3} mol/L),收缩稳定后加入 FAE 或匹维溴铵,药物浓度、方法和记录同 5.3。

6 统计学方法 所获取数据用 SPSS 18.0 软件统计处理,各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Powerlab 生物信号采集及处理系统的分析软件计算,两组样本的比较采用方差齐性检验用方差分析(ANOVA),多组间比较采用方差 SNK-q 检验,组间两两比较采用方差 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠内脏高敏感性结果比较(表 1) 与干预前对照组比较,干预前模型组大鼠 CRD 后的痛觉压力阈值和最大耐受痛觉压力值均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且与对照盐水组比较,模型盐水组大鼠的痛觉压力阈值和最大耐受痛觉压力值亦明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),但干预前模型组与模型盐水组的痛觉压力阈值和最大耐受压力值差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型盐水组比较,FAE 24 g/kg 和匹维溴铵组的痛觉压力阈值显著升高($P < 0.05$),但最大耐受压力值差异无统计学意义($P > 0.05$),而 FAE 6 g/kg 干预后的痛觉压力阈值和最大耐受压力值均无明显变化($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠 AWR 压力阈值 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	痛觉压力阈值	最大耐受压力值
干预前对照	10	43.00 $\pm$ 9.78	55.00 $\pm$ 12.47
干预前模型	10	28.00 $\pm$ 14.94*	41.00 $\pm$ 10.49*
对照盐水	8	40.00 $\pm$ 9.64	51.25 $\pm$ 10.26
模型盐水	8	24.38 $\pm$ 10.50 $\Delta\Delta$	40.63 $\pm$ 7.29 Δ
FAE 6 g/kg	8	35.00 $\pm$ 8.86	47.50 $\pm$ 11.65
FAE 24 g/kg	8	38.75 $\pm$ 11.88 Δ	49.38 $\pm$ 9.80
匹维溴铵	8	38.13 $\pm$ 12.23 Δ	46.88 $\pm$ 15.80

注:与干预前对照组比较,* $P < 0.05$;与对照盐水组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型盐水组比较, $\Delta P < 0.05$

2 FAE 对 D-IBS 模型大鼠排便异常的影响(表 2) 与干预前对照组比较,干预前模型组大鼠的排便粪质为不成形的稀薄便,且粪便性状的 Bristol 评分及粪便湿重升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与对照盐水组比较,模型盐水组大鼠的 Bristol 评分及粪便湿重亦显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型盐水组比较,FAE 24 g/kg 组和匹维溴铵组的 Bristol 评分及粪便湿重改善明显($P < 0.05$),FAE 6 g/kg 组的粪便湿重明显下降($P < 0.05$),但 Bristol 评分无显著改变($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠粪便稀便级和粪便湿重的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bristol 评分(分)	粪便湿重(g/12h)
干预前对照	10	4.25 $\pm$ 1.18	6.30 $\pm$ 2.36
干预前模型	10	6.13 $\pm$ 1.29*	11.30 $\pm$ 3.74*
对照盐水	8	3.88 $\pm$ 1.10	6.70 $\pm$ 2.11
模型盐水	8	5.88 $\pm$ 1.20 Δ	11.10 $\pm$ 3.76 Δ
FAE 6g/kg	8	5.13 $\pm$ 1.19	8.00 $\pm$ 2.16 Δ
FAE 24 g/kg	8	4.28 $\pm$ 1.43 Δ	7.90 $\pm$ 2.28 Δ
匹维溴铵	8	4.13 $\pm$ 1.26 Δ	7.70 $\pm$ 2.90 Δ

注:与干预前对照组比较,* $P < 0.01$;与对照盐水组比较, $\Delta P < 0.01$;与模型盐水组比较, $\Delta P < 0.05$

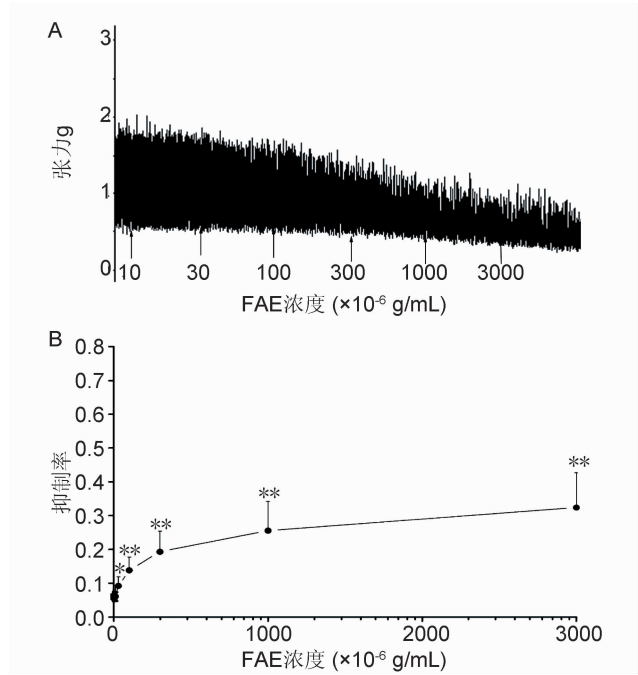
3 FAE 对大鼠离体结肠肠管收缩运动的影响

3.1 对肠管自发性收缩的影响(表 3,图 1) 平衡后可见离体肠管自发收缩张力曲线,加入梯度浓度 FAE 后,结肠自发收缩张力呈浓度依赖地下降,其中 FAE≥30×10⁻⁶ g/mL 时对肠管自发收缩有显著的抑制效应($P<0.05$, $P<0.01$)。而匹维溴铵亦可显著抑制肠管自发收缩($P<0.01$)。选择有意义 FAE 的 3 个 FAE 浓度(30,100,300×10⁻⁶ g/mL)进行实验。

表 3 FAE 对结肠自发收缩张力的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别(10 ⁻⁶ g/mL)	<i>n</i>	抑制率
FAE 0	8	6.23 ± 2.26
FAE 10	8	6.15 ± 3.57
FAE 30	8	9.23 ± 3.93 *
FAE 100	8	13.79 ± 3.84 **
FAE 300	8	19.35 ± 6.11 **
FAE 1000	8	25.46 ± 9.24 **
FAE 3000	8	32.37 ± 10.23 **
匹维溴铵 0.02	8	60.76 ± 14.67 **

注:与 FAE 0×10⁻⁶ g/mL 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$



注:A 为不同浓度 FAE(10,30,100,300,1000,3000×10⁻⁶ g/mL)作用后的肠管收缩波;B 为 FAE 对收缩张力的抑制效应;与 FAE 0×10⁻⁶ g/mL 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 1 FAE 对离体结肠的自发收缩张力的影响

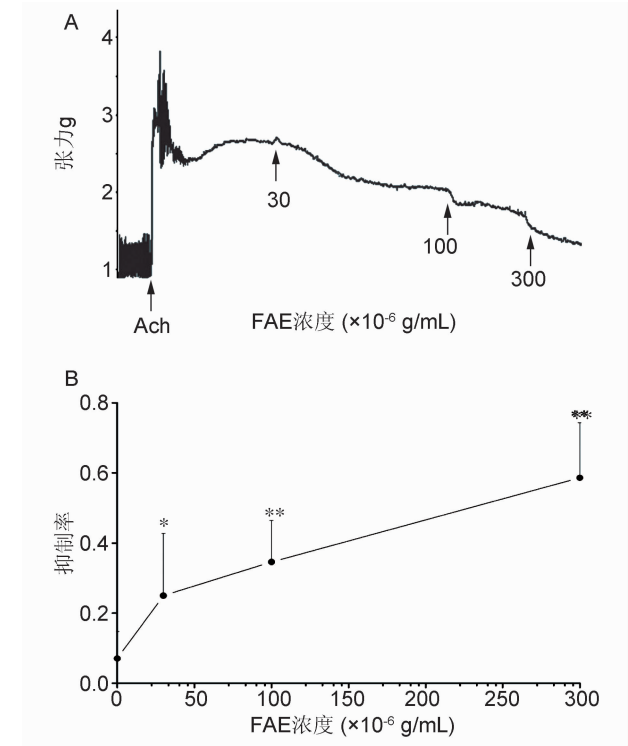
3.2 对肠管痉挛性收缩的影响(表 4,图 2) 离体结肠在浴槽中平衡后加入 Ach,可见肠管迅速收缩并稳定于较高张力水平,随后累积加入 FAE 后,FAE 仍对 Ach 致结肠痉挛性收缩有剂量依赖地松弛作用($P<0.05$, $P<0.01$)。其中 FAE 300×10⁻⁶ g/mL

对痉挛性收缩张力的抑制率可达 58.52% ($P<0.01$)。匹维溴铵亦可显著抑制 Ach 诱导的肠管收缩($P<0.01$)。

表 4 FAE 对 Ach 致离体结肠痉挛性收缩张力的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别(10 ⁻⁶ g/mL)	<i>n</i>	抑制率
FAE 0	8	7.12 ± 7.70
FAE 30	8	24.85 ± 26.75 *
FAE 100	8	34.63 ± 11.72 **
FAE 300	8	58.52 ± 15.93 **
匹维溴铵 0.02	8	77.82 ± 12.55 **

注:与 FAE 0×10⁻⁶ g/mL 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$



注:A 为 Ach (10⁻⁴ mol/L) 刺激肠管痉挛性收缩后给予 FAE(30, 100, 300×10⁻⁶ g/mL)干预的收缩波;B 为 FAE 对痉挛性收缩张力的抑制效应;与 FAE 0×10⁻⁶ g/mL 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

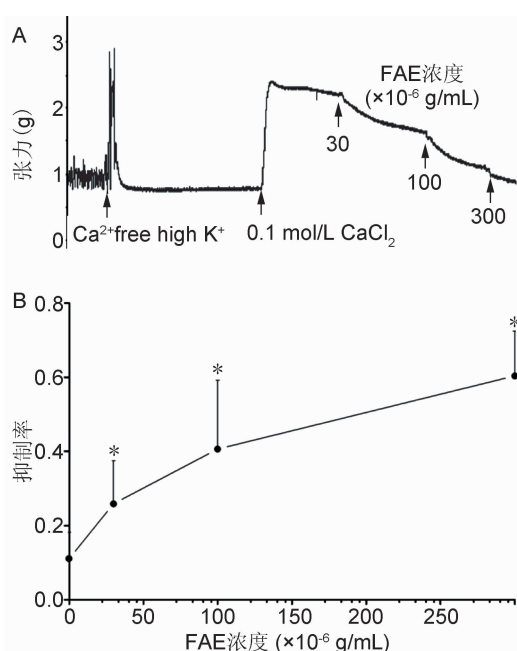
图 2 FAE 抑制 Ach 诱发的离体结肠肠管收缩张力

3.3 对 Ca²⁺ 促发的肠管收缩的拮抗作用(表 5,图 3) 离体结肠加入无钙高钾溶液,见肠管收缩迅速解除随后处于完全松弛状态,待稳定后再加入 CaCl₂,见肠管迅速收缩并稳定于较高张力水平,稳定后加入不同浓度 FAE 后可见 CaCl₂ 致结肠痉挛收缩有剂量依赖地抑制作用($P<0.01$)。其中 FAE 300×10⁻⁶ g/mL 对 Ach 所致的收缩张力抑制率可达 60.34% ($P<0.01$),匹维溴铵可显著抑制 CaCl₂ 诱导的肠管收缩($P<0.01$),抑制率达 80.25%。

表 5 FAE 对无钙条件下 CaCl_2 致结肠收缩张力的拮抗效应 ($\bar{x} \pm s$)

组别 (10^{-6} g/mL)	n	抑制率 (%)
FAE 0 + CaCl_2	8	11.06 ± 7.03
FAE 30	8	$25.87 \pm 11.55^*$
FAE 100	8	$40.63 \pm 18.59^*$
FAE 300	8	$60.34 \pm 12.13^*$
匹维溴铵 0.02	8	$80.25 \pm 9.38^*$

注:与 FAE 0×10^{-6} g/mL + CaCl_2 比较, $^*P < 0.01$



注:A 为 CaCl_2 (3×10^{-3} mol/L) 刺激收缩后 FAE (30, 100, 300 $\times 10^{-6}$ g/mL) 干预的收缩曲线图;B 为 FAE 对 CaCl_2 刺激后的收缩张力的抑制效应;与 FAE 0×10^{-6} g/mL + CaCl_2 比较, $^*P < 0.01$

图 3 FAE 抑制无钙高钾条件下 CaCl_2 诱导结肠肠管的收缩张力

讨 论

既往研究发现肌肉松弛药物可改善 IBS 患者疼痛症状^[9],且 IBS 患者远端结肠频发低频慢波^[10],其胃、小肠、肛门、直肠的运动异常^[11],所以肠道平滑肌张力异常可能是 IBS 发病的主要原因。国内学者亦发现相对健康者,D-IBS 患者乙状结肠移行性高幅收缩波的波幅及持续时间明显增高,说明腹泻症状的产生与推进性运动过强有关^[12]。因 IBS 患者结肠内肥大细胞数量增多,并释放化学性炎症介质如 P 物质、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、ACH 等^[13],促使肠道蠕动增加,肠内容物在肠道停留时间缩短进而引发腹泻。本实验采用 NMS 结合 AA 灌肠

法建立 D-IBS 模型,发现成年后模型大鼠存在内脏高敏感性,且粪便稀便级和含水量都显著增加。而高剂量的 FAE 和阳性对照药匹维溴铵治疗 2 周后,模型大鼠的粪便稀便级和含水量亦明显降低。说明 FAE 具有剂量依赖地改善 D-IBS 的排便功能的作用。

为进一步探究 FAE 作用机制,本实验应用电生理技术证明 FAE 可使正常大鼠离体结肠肠管的收缩作用减弱,且呈剂量依赖性。且 3 000 $\mu\text{g/mL}$ FAE 对肠管自发收缩抑制率 32.37%,而 300 $\mu\text{g/mL}$ FAE 对 Ach 刺激的肠管痉挛性收缩抑制率达 58.52%,说明 FAE 对正常状态的肠功能影响相对较小,对收缩亢进的肠管有较强的松弛作用。Ach 可结合平滑肌 M 受体,活化磷酸酯酶 C (phospholipase C, PLC),使三磷酸肌醇 (inositol 1,4,5-triphosphate, IP₃) 增加,细胞内 Ca^{2+} 释放和外 Ca^{2+} 内流增多引发平滑肌收缩^[14]。匹维溴铵肌松作用的机制是影响细胞膜上的电压依赖性 Ca 通道,抑制外 Ca^{2+} 内流,所以能抑制 Ach 可引发结肠的收缩反应。FAE 也能抑制 Ach 引发痉挛性收缩,推测 FAE 可无选择性地抑制细胞内 Ca^{2+} 释放或细胞外 Ca^{2+} 内流。实验进一步用无钙高钾刺激,发现肠管收缩达最大极限,随后细胞外 Ca^{2+} 因释放完全而肠管又重新松弛。因再次加入 Ca^{2+} 后,静息状态的细胞膜产生去极化,并达到引起 Ca 通道开放的阈电位时,电压依从性 Ca 通道开放, Ca^{2+} 转运至细胞,胞浆内游离 Ca^{2+} 浓度增加引起平滑肌细胞收缩^[15]。而 FAE 可浓度依赖地抑制再次给予 Ca^{2+} 刺激的收缩反应,说明 FAE 具有类似匹维溴铵的阻滞 Ca^{2+} 通道的作用并呈剂量依赖地竞争性抑制。

金荞麦性寒、味酸苦、清热解毒、祛风利湿,传统用于治疗呼吸系统疾病,包括肺炎、气管炎、慢阻肺及肺脓肿^[16],国内早年研究发现金荞麦可用于治疗小儿腹泻^[17];还发现金荞麦片联合培菲康可降低慢性结肠炎的大便次数和发作次数,缓解患者症状和改善生活质量^[18,19]。现代药理学研究证实金荞麦中富含原花青素的缩合性单宁混合物、槲皮素及其槲皮苷类物质^[20],可降低脾虚湿热证腹泻型 IBS 模型大鼠的结肠运转功能并抑制免疫炎症反应^[21]。而金荞麦所含有的化学成分,在既往药理研究发现高血压模型大鼠长期服用原花青素类衍生物表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 200 mg/kg/d 后,可能通过阻断血管平滑肌 Ca^{2+} 通道降低动脉血压^[22]。而 Campos-Toimil M^[23] 通过细胞膜片钳实验发现 30 mmol/L 的 EGCG 可激活大鼠主动脉平滑肌细胞硝苯地平敏感性 Ca^{2+} 通道电流,而

100 mmol/L 的 EGCG 与细胞孵育时间 > 10 min 则抑制细胞 Ca^{2+} 内流作用。槲皮素也能够拮抗 Ca^{2+} 通道,减少 Ca^{2+} 进入细胞内,使细胞内 Ca^{2+} 浓度降低,肠道蠕动减慢,从而延长水、电解质及营养物质在肠道内停留时间,促进其吸收,减少腹泻次数和粪便量^[15]。推测金荞麦可能通过其有效成分拮抗或协同作用,影响不同状态的肠管功能,但具体机制有待进一步研究。

总之,FAE 可能通过其有效成分,抑制 Ca^{2+} 通道的竞争拮抗作用,抑制肠道的痉挛性收缩,并可能参与 IBS 肠痉挛引起的腹痛,并改善 D-IBS 大鼠肠功能亢进引发的腹泻。本研究为开发金荞麦治疗 IBS 奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Robin S. Clinical update: irritable bowel syndrome [J]. *Lancet*, 2007, 369(9573): 1586–1588.
- [2] 上海中医学院中药教研室编. 中药临床手册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1993:106.
- [3] Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, et al. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats [J]. *Gut*, 2004, 53(4): 501–506.
- [4] Winston J, Shenoy M, Medley D, et al. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 615–627.
- [5] 刘丽娜,孙志广,石伟,等.金荞麦提取物抑制腹泻型肠易激综合征大鼠的肠运动功能 [J]. *中国临床研究*, 2012, 25(12): 1153–1155.
- [6] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276–1285.
- [7] Jewis SJ, Heaton KW. Stool from scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1997, 32(9): 920–924.
- [8] 官富兰,王如俊,王建华.陈皮及橙皮苷对离体肠管运动的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2002, 13(2): 65–67.
- [9] Poynard T, Regimbeau C, Benhamou Y. Meta-analysis of smooth muscle relaxants in the treatment of irritable bowel syndrome [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2001, 15(3): 355–361.
- [10] Snape WJ, Carlson GM, Cohen S. Colonic myoelectric activity in the irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1976, 70(3): 326–330.
- [11] Nanda R, James R, Smith H, et al. Food intolerance and the irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 1989, 30(8): 1099–1104.
- [12] 梁荣新,张志雄,张法灿,等.肠易激综合征患者进食前后乙状结肠动力的差异 [J]. *中国实用内科杂志*, 2004, 24(4): 205–207.
- [13] Park JH, Rhee PL, Kim HS, et al. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(1 Pt 1): 71–78.
- [14] Shiozaki K, Fujii A, Nakano T, et al. Inhibitory effects of hot water extract of the Stevia stem on the contractile response of the smooth muscle of the guinea pig ileum [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(2): 489–494.
- [15] Wu SN, Chiang HT, Shen AY, et al. Differential effects of quercetin, a natural polyphenolic flavonoid, on L-type calcium current in pituitary tumor (GH3) cells and neuronal NG108-15 cells [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(2): 298–308.
- [16] 朱千勇.金荞麦药理研究及临床应用进展 [J]. *交通医学*, 2013, 27(2): 145–148.
- [17] 洪夏生.金荞麦治疗小儿腹泻 36 例 [J]. *湖北中医杂志*, 1996, 18(3): 31.
- [18] 马向仁.金荞麦片联合培菲康胶囊治疗慢性结肠炎 36 例 [J]. *社区医学杂志*, 2013, 11(1): 38–39.
- [19] 李建华,冯丕敏,李婷,等.金荞麦片与培菲康联合治疗慢性结肠炎的临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 38(6): 1343–1344.
- [20] Takano F, Takata T, Yoshihara A, et al. Aqueous extract of peanut skin and its main constituent procyanidin A1 suppress serum IgE and IgG₁ levels in mice-immunized with ovalbumin [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(5): 922–927.
- [21] 牛晓玲,周英豪,孙书焰,等.金荞麦片对脾虚湿热证腹泻型肠易激综合征大鼠免疫炎症和内脏高敏感性的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(32): 3543–3549.
- [22] Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, et al. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(5): E1378–E1387.
- [23] Campos-Toimil M, Orallo F. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels and voltage-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle cells [J]. *Life Sci*, 2007, 80(23): 2147–2153.