

五味子甲素对大鼠及小鼠肠平滑肌功能的抑制作用

徐志立¹, 陶小军¹, 张莹², 李红艳¹, 冯兴腾¹, 康廷国^{1*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁省大连市儿童医院, 辽宁大连 116012)

[摘要] **目的:**考察五味子甲素对大鼠及小鼠小肠平滑肌功能的调节作用,为揭示五味子“收敛固涩”功效的机制及物质基础提供药理学依据。**方法:**取昆明种小鼠50只,按均衡随机分组法分为5组,分别为正常组,五味子甲素高、中、低剂量组(20,40,80 mg·kg⁻¹),莨菪阳性组(20 mg·kg⁻¹);另取昆明种小鼠60只,按均衡随机分组法分为6组,分别为正常组,模型组(ip,新斯的明),五味子甲素高、中、低剂量组(80,40,20 mg·kg⁻¹),莨菪阳性组(20 mg·kg⁻¹),ig给予相应药物,正常组及模型组给予等体积蒸馏水,每日1次,连续5d,分别用炭末推进法分别观察五味子甲素对正常小鼠和新斯的明肠功能亢进模型小鼠肠推进的影响。以孵育在克氏液中大鼠离体小肠为模型,观察五味子甲素对大鼠离体肠平滑肌收缩性的影响。取SD大鼠30只,随机分为正常组,五味子甲素高、中、低剂量组(80,40,20 mg·kg⁻¹),除正常组外,其余各组用番泻叶制备大鼠腹泻模型,造模成功后ig给予相应药物,每日1次,连续7d,观察五味子甲素对腹泻模型大鼠肠平滑肌肌球蛋白轻链激酶(MLCK)表达的影响。**结果:**与正常组和新斯的明模型组比较,五味子甲素高、中剂量组均能显著降低正常小鼠和新斯的明肠功能亢进小鼠的小肠炭末推进率($P < 0.05$, $P < 0.01$)。五味子甲素在10~80 μmol·L⁻¹可显著抑制大鼠离体小肠平滑肌的收缩;与番泻叶模型组比较,五味子甲素高、中、低剂量组均能显著抑制腹泻模型大鼠小肠MLCK蛋白的表达($P < 0.01$)。**结论:**五味子甲素可显著抑制小鼠在体和大鼠离体小肠运动,该作用可能与其抑制小肠收缩运动相关的肠平滑肌肌球蛋白轻链激酶表达相关。

[关键词] 五味子甲素; 肠平滑肌; 小肠推进; 离体小肠收缩性; 肌球蛋白轻链激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0126-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210126

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150924.1104.024.html>

[网络出版时间] 2015-09-24 11:04

Inhibitory Effects of Deoxyschizandrin on Function of Intestine Smooth Muscle in Rats and Mice

XU Zhi-li¹, TAO Xiao-jun¹, ZHANG Ying², LI Hong-yan¹, FENG Xing-teng¹, KANG Ting-guo^{1*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Dalian Children's Hospital, Dalian 116012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory effects of deoxyschizandrin on the function of intestinal smooth muscle in mice and rats, and provide pharmacological basis for revealing the mechanism of 'astringent efficacy' of deoxyschizandrin and its effective substance. **Method:** The 50 Kunming mice were divided into 5 groups according to the balanced random group, normal group, deoxyschizandrin high, medium and low dose groups (20, 40, 80 mg·kg⁻¹), and belladonna positive group (20 mg·kg⁻¹). Another 60 Kunming mice were taken and divided into 6 groups according to the balanced random group, normal group, model group (ip, neostigmine), deoxyschizandrin high, medium, and low dose groups (80, 40, 20 mg·kg⁻¹), belladonna positive group (20 mg·kg⁻¹). Corresponding drugs were given by ig, while the normal group and model group were given with distilled water at the same volume, 1 time a day, for 5 days. Charcoal propulsion method was respectively used to observe the effect of deoxyschizandrin on intestine propulsion in normal mice and mice models with neostigmine. With the isolated small intestine of rats incubated in cuhk's fluid as the model, the effect of

[收稿日期] 20141104(012)

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(2012M510834);辽宁中医药大学优秀青年药学人才基金项目(yxrc0917)

[第一作者] 徐志立, 博士, 副教授, 从事中药药理学研究工作, Tel:0411-85890142, E-mail:xu_zhilil@126.com

[通讯作者] * 康廷国, 教授, 博士生导师, 从事中药学研究工作, Tel:0411-85890121

deoxyschizandrin on contractility of isolated intestine smooth muscles in rats was observed. 30 SD rats were randomly divided into normal group, deoxyschizandrin high, medium and low dose groups ($80, 40, 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). All the other groups except normal group used folium sennae to prepare diarrhea rat models. After successful modeling, corresponding drugs were given by ig, 1 time a day, for 7 days. The effect of deoxyschizandrin on myosin light-chain kinase (MLCK) expressions in intestinal smooth muscles of diarrhea model rats was observed.

Result: Compared with normal group and neostigmine group, deoxyschizandrin high dose group and middle dose group could significantly decrease the percentage of carbon powder propulsion in small intestine ($P < 0.05, P < 0.01$). $10\text{-}80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ deoxyschizandrin inhibited the contraction of isolated small intestinal smooth muscle *in vitro* of rats. Compared with senna model group, deoxyschizandrin high, middle and low dose groups could significantly inhibit MLCK expressions in intestinal smooth muscles of diarrhea model rats ($P < 0.01$).

Conclusion: Deoxyschizandrin shows the inhibitory effects on the small intestinal movement *in vivo* mice and *in vitro* rats, and the mechanism may be associated with inhibiting the expression of MLCK related to intestinal contraction.

[**Key words**] deoxyschizandrin; intestine smooth muscle; intestine propulsion; contractility of isolated intestine; myosin light chain kinase (MLCK)

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (习称北五味子) 或华中五味子 *S. sphenanthera* (习称南五味子) 的干燥成熟果实。《神农本草经》即有记载, 其性温, 味酸、甘, 归肺、心、肾经, 可益气滋肾、生津敛汗、涩精止泻, 宁心安神^[1]。五味子的主要化学成分为木脂素类, 其中五味子甲素(去氧五味子素, 五味子素 A, deoxyschizandrin) 为其主要活性成分之一。先前对于五味子甲素对消化系统作用的研究主要集中于保肝作用^[2], 而有关其对于肠平滑肌功能的调节作用尚未见报道。为深入研究五味子甲素对胃肠平滑肌的作用, 以利于揭示五味子“收敛固涩”功效的机制及物质基础, 笔者对此进行了初步研究。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 $22 \sim 28 \text{ g}$; SD 大鼠, 雌性, 体重 $150 \sim 200 \text{ g}$, 均由大连医科大学提供, 合格证号 SCXK(辽)2008-0002。

1.2 药物及试剂 五味子甲素(中国食品药品检定研究院, 批号 110764-201111), 实验时用蒸馏水配制成所需药物浓度。番泻叶购自大连益春堂药房, 由辽宁中医药大学中药鉴定教研室王添敏副教授鉴定为豆科植物狭叶番泻或尖叶番泻的小叶。新斯的明(上海信谊金朱药业有限公司, 批号 120203), 凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 20120914), 肌球蛋白轻链激酶(MLCK)一抗(英国 Abcam 公司, 批号 76092)。

1.3 仪器 HW-400S 型恒温平滑肌槽(成都泰盟

科技有限公司), BL 420F 型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司), MA240D 型电子分析天平(上海第二天平仪器厂), JM-250 型电泳仪(大连竞迈生物科技有限公司), UVP 型凝胶成像系统(英国 UVP 有限公司)。

2 方法

2.1 五味子甲素对正常小鼠小肠推进运动的调节作用^[3] 取小鼠 50 只, 按均衡随机分组法分为 5 组。正常组 ig 给予等体积蒸馏水; 五味子甲素高、中、低剂量组分别 ig $20, 40, 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 蓖苳阳性药组 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig。每日 1 次, 连续 5 d, 观察小鼠排便情况。末次给药 60 min 后, ig 给予 5% 炭末悬液, 15 min 后脱臼处死小鼠, 立即剖腹, 分离肠系膜, 剪取上端至幽门, 下端至回盲部的肠管, 置于托盘上。轻轻将小肠拉直, 测量肠管长度作为小肠总长。从幽门至炭末前沿的距离作为炭末推进距离。计算炭末推进百分率。

炭末推进百分率 = 炭末混悬液移动距离(cm) / 小肠总长度(cm) $\times 100\%$

2.2 五味子甲素对新斯的明所致功能亢进小鼠小肠推进运动的调节作用^[3] 取小鼠 60 只, 按均衡随机分组法分为 6 组。正常组, 模型组 ig 等体积蒸馏水, 各组给药剂量同 2.1 项, 每日 1 次, 连续 5 d, 末次给药 30 min 后, 模型组及给药组 ih $0.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 新斯的明, 正常组 ih 等体积生理盐水。50 min 后灌给炭末(5% 炭末与 10% 阿拉伯胶制成悬液), 15 min 后脱颈椎处死动物, 测定亢进小鼠的炭末推进百分率。

2.3 五味子甲素对大鼠离体小肠收缩性的影响^[4]

大鼠实验前 48 h 禁食,不禁水,断头处死,立即剖开腹腔,轻轻剪取小肠 2 cm,除去肠系膜并用克氏液冲洗干净,对角线固定于通气管和张力换能器之间,置入 37 ℃ 恒温克氏液浴槽中并通以 95% O₂ 和 5% CO₂,稳定约 30 min 后记录正常小肠活动作为对照,然后滴加不同浓度五味子甲素并记录稳定后小肠活动变化,以克氏液中未加药时正常小肠稳定的收缩波平均振幅为 100%,其余为与其相比所得相对值。

2.4 五味子甲素对腹泻大鼠肠平滑肌 MLCK 表达的调节作用

2.4.1 10% 番泻叶水提取液制备 番泻叶 100 g,加 7 倍量蒸馏水,冷浸过夜,加热至 30 ℃,超声 15 min,过滤。残渣加 5 倍量蒸馏水,冷浸 5 h 后,再加热至 30 ℃,超声 15 min,过滤,合并滤液,浓缩至 1 000 mL,即得 10% 的番泻叶水提取液。

2.4.2 腹泻大鼠模型的制备 取大鼠 30 只,饲养 3 d 适应环境后,禁食 16 h 以上,称重,随机选出 6 只作为正常组,ig 给予等体积的蒸馏水。余下 24 只按每 10 g 给予 0.2 mL 的剂量 ig 给予 10% 番泻叶水提取液,每日 2 次,连续 14 d。可见每次给药后,大鼠开始出现腹泻症状,5.5 h 时腹泻症状加剧,同时出现畏寒,体重较正常鼠增长较慢或减轻。将腹泻大鼠均衡随机分为 4 组,即腹泻大鼠模型组,五味子甲素高、中、低剂量组,分别 ig 给予五味子甲素 20,40,80 mg·kg⁻¹,每日 1 次,连续 7 d,末次给药后处死大鼠,取小肠全长,按蛋白提取试剂盒提取肠平滑肌总蛋白。

2.4.3 Western 印迹分析^[5] 总蛋白提取、电泳、转膜、封闭后,取膜,置于 5% 脱脂奶粉 37 ℃ 孵育 2 h。将 MLCK 以及 GAPDH 蛋白抗体分别配成 1:1 000 和 1:800 的浓度,4 ℃ 孵育过夜,TTBS 室温下脱色摇床洗 3 次,每次 5 min。同上方法用稀释二抗(1:2 000),室温下孵育 90 min,室温下 TTBS 洗 3 次,每次 5 min。化学发光法显影,采集图像,QuantityOne 扫描分析。以正常组大鼠 MLCK 面积灰度值作为 100%,其余为与其比较所得相对值。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 11.5 软件对数据进行方差分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对正常小鼠肠推进运动的抑制作用 五味子甲素高、中剂量组的炭末推进百分率与正常组相比

较显著降低,表明五味子甲素可显著抑制正常小鼠肠推进百分率。见表 1。

表 1 五味子甲素对小鼠小肠推进运动的调节作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Regulatory effects of deoxyschizandrin on intestine progradation in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	小肠总长 /cm	炭末推进 距离/cm	炭末推进 率/%
正常	-	52.0 ± 5.2	41.4 ± 6.2	80.4 ± 15.1
五味子甲素	80	50.3 ± 2.9	25.8 ± 8.1	51.2 ± 15.5 ²⁾
	40	55.0 ± 6.6	33.4 ± 9.5	63.0 ± 25.1 ¹⁾
	20	55.3 ± 6.4	39.4 ± 6.2	72.6 ± 16.8
萹苳	20	50.4 ± 2.6	32.0 ± 6.4	63.7 ± 12.8 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对新斯的明所致功能亢进小鼠肠推进运动的抑制作用 小鼠给予新斯的明后,炭末推进百分率显著提高,显示新斯的明可导致小鼠肠推进亢进。而给予小鼠五味子甲素后,高、中剂量组均显示出明显抑制这种推进亢进状态,与模型组比较具有统计学显著性。见表 2。

表 2 五味子甲素对新斯的明所致功能亢进小鼠小肠推进运动的调节作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Regulatory effects of deoxyschizandrin on intestine progradation in hyperfunction mice induced by neostigmine ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	小肠总长 /cm	炭末推进 距离/cm	炭末推进 率/%
正常	-	53.3 ± 3.5	42.4 ± 4.4	79.6 ± 6.7
模型	-	53.0 ± 11.0	49.0 ± 11.5	92.0 ± 4.7 ¹⁾
五味子甲素	80	51.0 ± 2.4	28.7 ± 8.5	56.2 ± 16.1 ²⁾
	40	54.7 ± 6.7	35.7 ± 10.3	67.8 ± 27.2 ²⁾
	20	52.1 ± 2.5	40.2 ± 5.3	77.3 ± 11.8
萹苳	20	50.4 ± 2.6	31.7 ± 10.5	63.3 ± 21.3 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对大鼠离体肠平滑肌收缩幅度的影响 在克氏液中小肠收缩幅度为 100%,分别加入 10,20,40,80 μmol·L⁻¹ 的五味子甲素,随着五味子甲素浓度的增加,大鼠离体小肠收缩幅度呈现剂量依赖性抑制,在 10~80 μmol·L⁻¹ 五味子甲素在克氏液中均显著抑制大鼠离体小肠平滑肌的收缩($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对腹泻大鼠肠平滑肌 MLCK 表达的抑制作用 与正常组比较,腹泻大鼠肠平滑肌 MLCK 表达明显升高,而给予 20,40,80 mg·kg⁻¹ 五味子甲素后,

给药组大鼠肠平滑肌内 MLCK 表达与腹泻大鼠(模型组)相比显著降低($P < 0.01$)。见图 1。

表 3 五味子甲素对大鼠离体小肠收缩幅度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of deoxyschizandrin on contractility of isolated intestine of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	收缩幅度/%
正常	-	100.00 \pm 3.17
五味子甲素	10	92.01 \pm 2.00 ¹⁾
	20	88.15 \pm 4.96 ²⁾
	40	75.00 \pm 5.50 ²⁾
	80	51.13 \pm 10.23 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

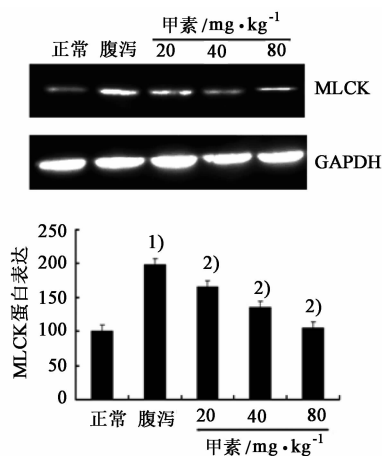


图 1 五味子甲素对腹泻模型大鼠肠 MLCK 的蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.1 Effects of deoxyschizandrin on MLCK expression in diarrhea rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

五味子能涩肠止泻,如与补骨脂、肉豆蔻、吴茱萸同用可治疗脾肾虚寒之五更泄泻(如四神丸《内科摘要》)^[6-7]。而五味子甲素五味子中木脂素类有效成分之一,主要来源于木兰科植物五味子的干燥成熟果实。近年来对其药理作用的研究非常广泛,涉及消化、心血管、中枢神经、生殖系统以及泌尿系统等各个方面。研究报道五味子甲素具有抗病毒、钙通道阻滞及血管舒张作用;能降低肝炎患者谷氨酸氨基转氨酶及抑制神经功能的作用^[2]。为更深入的研究五味子具有的药理作用,揭示其作用机制及物质基础,笔者考察了五味子甲素对肠平滑肌收缩功能的调节作用。

肠推进实验及大鼠离体肠管收缩性实验是常用的考察胃肠功能的整体及组织模型。目前公认的引

起平滑肌收缩的主要机制是在 Ca^{2+} 参与下,肌球蛋白轻链激酶(MLCK)催化 20 KD 的肌球蛋白轻链(20 KD regulating myosin light chains, MLC_{20})的磷酸化^[8],磷酸化肌球蛋白 Mg^{2+} -ATPase 活性增强,能分解足够的 ATP,将化学能转变为机械能,通过肌球蛋白与肌动蛋白相互作用而产生收缩^[8-9]。因此,MLCK 是平滑肌细胞收缩关键的调节蛋白。腹泻型大鼠 MLCK 表达量显著升高,而给予 20,40,80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 五味子甲素后可显著抑制这种 MLCK 的过表达。

研究结果表明,五味子甲素明显抑制小鼠肠推进运动,对大鼠离体肠平滑肌收缩性具有抑制作用,表明其显著抑制肠平滑肌功能。本研究亦提示其对肠平滑肌的抑制可能是通过抑制肠平滑肌肌球蛋白轻链激酶的过表达而实现的。当然,五味子甲素对肠平滑肌的具体作用途径与机制仍需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王佳丽,杨洪涛. 五味子主要化学成分的药理研究[J]. 河南中医, 2014, 34(2):357-359.
- [2] 于丽萍,李晓梅,孔令超,等. 五味子甲素的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2013, 26(2):313-314.
- [3] 黄麟媛,翟海峰,宣迪斐,等. 洋葱对不同便秘小鼠肠运动和大鼠离体肠管的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12):2825-2828.
- [4] 徐志立,张莹,陶小军,等. 环氧橙皮油素对平滑肌肌球蛋白功能及肠平滑肌收缩性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):149-153.
- [5] Chen D, Lin Y, Xiong Y. Epithelial MLCK and smooth muscle MLCK may play different roles in the development of inflammatory bowel disease[J]. Dig Dis Sci, 2014: 1-2.
- [6] 高学敏. 中药学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社, 2007:486-487.
- [7] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 236-237.
- [8] 徐志立,刘守义,李云兴,等. 槲皮素对平滑肌收缩性及肌球蛋白 Mg^{2+} -ATPase 活性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(2):407-409.
- [9] Tang Z Y, Liu Z N, Fu L, et al. Effect of lithium on smooth muscle contraction and phosphorylation of myosin light chain by MLCK [J]. Physiol Res, 2010, 59: 919-926.

[责任编辑 周冰冰]