

基于正常小鼠排便作用的益智仁燥性效应表征研究

刘静, 黄勤挽*, 王瑾, 陈蓉, 张玉莉, 苏娟
(成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] **目的:**观察益智仁对正常小鼠排便作用的影响及作用机制,从而对益智仁的燥性效应进行表征。**方法:**将 SPF 小鼠分为正常动物组、益智仁 20,10,5 g·kg⁻¹剂量组及益智仁 20 g·kg⁻¹与增液汤 20 g·kg⁻¹联用组,各组动物每天灌胃给药 1 次,连续 28 d,在第 7,14,21,28 d 观察对动物排便作用的影响,并从肠道水分、结肠肌电方面阐明益智仁燥性对肠道影响的机制。**结果:**在连续 6 h 观察中,益智仁低剂量组在 28 d 的首次排黑粪时间为 142.7 min,干粪粒数为 10.1 粒,干粪重量为 176.6 mg;中剂量组在 21 d 的首次排黑粪时间为 145.4 min,干粪粒数为 10.2 粒,干粪重量为 177.0 mg;高剂量组在 21 d 的首次排黑粪时间为 160.3 min,干粪粒数为 9.7 粒,干粪重量为 170.5 mg,说明益智仁能呈剂量依赖和时间依赖使得正常动物逐渐出现便秘症状。在 28 d 时,益智仁低、中、高剂量组的大肠肠腔水分含量分别是 66.23%,64.42%,61.53%,均能显著减少大肠肠腔水分含量。在 28 d 时,益智仁低、中、高剂量组的结肠肌电频率分别是 43.40,45.63,48.26 次/min,结肠肌电振幅分别是 66.23,64.42,61.53 mV,能显著增快结肠肌电频率及降低结肠肌电振幅。增液汤对于益智仁引起的上述便秘作用有显著的拮抗作用。**结论:**益智仁燥性效应表征能引起正常小鼠的便秘作用,且与促进肠道水分重吸收和减弱肠道传输能力有关。

[关键词] 益智仁;燥性效应;排便作用;肠道水分;结肠肌电

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0231-04

[doi] 10.11653/syfy2013230231

Study of Dry Effect Characterization of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* by Defecating Function of Normal Mice

LIU Jing, HUANG Qin-wan*, WANG Jin, CHEN Rong, ZHANG Yu-li, SU Juan
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on defecating function of normal mice and its possible mechanism, and the dry effects were characterized. **Method:** The SPF mice were divided into 5 groups: normal group, *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* with different doses groups (20, 10, 5 g·kg⁻¹), *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* (20 g·kg⁻¹) and increase liquid soup (20 g·kg⁻¹) combination group. All mice were orally administered once a day for 28 d. In the 7, 14, 21, 28 d to observe the effects of defecation function to animals, and from the aspects of intestinal moisture, colonic electromyography to explain the mechanism that the dry effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* impacting on gut. **Result:** After 6 h observation, the first time of defecation with low dose was 142.7 min, dry manure was 10.1 grains, weight was 176.6 mg in 28 d; the first time of defecation with moderate dose was 145.4 min, dry manure was 10.2 grains, weight was 177.0 mg in 21 d; the first time of defecation with high dose was 160.3 min, dry manure was 9.7 grains, weight was 170.5 mg in 21 d. *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* is able to make the normal animal appear symptoms of constipation gradually through dose-dependent and time-dependent. After administrated for 28 days, the moisture content of colon lumen of low dose, moderate dose and high dose group of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* was 66.23%, 64.42%, 61.53%.

[收稿日期] 20130715(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001639);教育部新教师基金项目(2010513120002)

[第一作者] 刘静,硕士研究生,从事中药炮制与制剂研究,Tel:028-61800231,E-mail:540498692@qq.com

[通讯作者] *黄勤挽,博士,副教授,从事中药炮制与制剂研究,Tel:028-61800231,E-mail:36190587@qq.com

significantly reduce the moisture content of colon lumen; frequency of colonic electromyography of low dose, moderate dose and high dose group of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* was 43.40, 45.63, 48.26 times per minute, the amplitude of colonic electromyography was 66.23, 64.42, 61.53 mv, significantly faster frequency of colonic electromyography, reduce the amplitude of colonic electromyography. Increase liquid soup have obvious antagonism effects on above-mentioned constipation caused by *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*. **Conclusion:** Dry effect characterization of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* can cause constipation of normal mice, and it's related to the promotion of intestinal water reabsorption and reduced intestinal transit capacity.

[Key words] *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; dry property; defecating function; intestinal moisture; colonic electromyography

益智为姜科山姜属植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实,药用部位为种仁,为海南省四大南药之一。中医传统用药经验认为,益智仁生品辛温而燥,以温脾止泻、摄涎唾力胜,主治脾寒泄泻,腹中冷痛,口多唾涎;而盐炙后辛燥之性减弱,专行下焦,长于固精、缩尿,主治肾虚遗尿,小便频数,遗精白浊^[1]。笔者认为,益智仁生品的辛温燥之性,在脾虚吐泻、口涎自流的状态下即体现其治疗作用,而在其他状态则体现燥性的副作用。前期研究表明益智仁对番泻叶所致的小鼠泄泻有明显的拮抗作用^[2],但益智仁能否引起正常动物产生便秘作用而体现其燥性的副作用,尚无相关报道。本文观察了灌胃给予益智仁不同剂量和不同周期对正常动物排便作用的影响,并从结肠肌电、肠吸收水分方面阐明其对肠道影响的机制。

1 材料

1.1 仪器 BL-420E 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);BP211D 电子天平(德国赛多利斯集团);DHG-9245A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);自制小鼠代谢笼(专利号 ZL 200720190466.8);0.5 mm 铜丝电极。

1.2 药材与供试品的制备 益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 购于海南省中药材公司,经成都中医药大学中药标本中心卢先明教授鉴定,符合《中国药典》2010 年版相关规定。将益智仁粉碎后过 3 号筛用 70% 乙醇提取回收乙醇,分别制备成 2,1,0.5,0.25 g·mL⁻¹ 的药液;另购玄参、麦冬、生地 3 种饮片,按《温病条辨》中“增液汤”配方,煎煮浓缩至 2 g·mL⁻¹ 的药液,与 2 g·mL⁻¹ 的益智仁药液等体积混合。上述各药液中均加入 5% (v/v) 吐温-80 起增溶作用。

1.3 动物 KM 小鼠,SPF 级,体重 18~22 g,雌雄各半,由成都达硕生物科技有限公司提供,批号 20120420,许可证号 SCXK(川)2008-24。

2 方法

2.1 动物分组 将小鼠按性别、体重随机分成 5 组,即空白对照组,益智仁高、中、低剂量组,益智仁高剂量+增液汤组,每组动物 10 只。

2.2 给药剂量设计 在前期预试验中,益智仁高、中、低剂量分别为 20,10,5 g·kg⁻¹,参考文献将增液汤剂量定为 20g·kg⁻¹^[3]。

2.3 益智仁对正常小鼠排便作用的影响 空白对照组灌胃给予生理盐水,益智仁高、中、低剂量组分别灌胃给予 1,0.5,0.25 g·mL⁻¹ 的药液,益智仁高剂量+增液汤组灌胃给予两者混合药液,给药体积均为 20 mL·kg⁻¹。每天灌胃给药 1 次,连续 28 d,在第 7,14,21,28 天的灌胃药液中均加入 2% 的墨汁,给药后将小鼠装于自制小鼠代谢笼内,下垫白色滤纸,连续观察 6 h,记录小鼠首次排黑粪时间、干粪粒数、干粪重量^[3]。

2.4 益智仁对正常小鼠肠腔水分的影响 给药方式、剂量、周期同 2.3,但药液不加 2% 墨汁。末次给药 1 h 后,处死小鼠剖开腹腔,用手术线结扎幽门下端和回盲部上端,剪断肠管取出小肠段;再于直肠末端结扎,剪断肠管取出大肠段。将肠段称重得到湿重(g),60℃干燥 10 h 后,再次称重得到干重(g),计算肠段含水量 = [湿重(g) - 干重(g)] / 湿重(g) × 100%^[4-5]。

2.5 益智仁对正常小鼠结肠肌电的影响 给药方式、剂量、周期同 2.3,但药液不加 2% 墨汁。末次给药 1 h 后,小鼠腹腔注射 20% 乌来糖 0.3 mL,麻醉后仰卧,75% 乙醇消毒,沿下腹正中纵行切开腹部约 1.5 cm,暴露回盲部,在结肠近段插入浆肌层内安置一对铜丝电极(两电极相距约 0.5 cm),连接 BL-420E 生物机能实验系统。参数选择:增益放大倍数 500,时间常数 0.001s,高频滤波 30 Hz。稳定 20 min 后连续记录 30 min。将每组记录结果以 3 min 作为一个时间段的频率和振幅的平均值进行

比较^[6-7]。

2.6 数据分析 采用 SPSS 20.0 软件统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间采用单因素方差分析;益智仁 + 增液汤组与益智仁组采用组间 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 益智仁对正常小鼠排便作用的影响 随着给药剂量的增大和给药时间的增加,益智仁有引起正常小鼠便秘的作用,表现较强的量效、时效的相关性。与空白对照组比较,给药第 7 天时,益智仁高、中、低剂量对正常小鼠排便作用尚无明显影响;给药 14 d 时,益智仁高剂量能显著延长正常小鼠首次排黑粪时间($P < 0.05$),但对于干粪粒数、干粪重量仅有

减少趋势;给药 21 d 时,益智仁高、中剂量均能显著延长正常小鼠首次排黑粪时间($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),能显著减少干粪粒数($P < 0.05$),能显著减少干粪重量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),动物肛门周围出现明显的干粪粘附现象;给药 28 d 时,除益智仁高、中剂量外,低剂量亦能显著延长正常小鼠首次排黑粪时间、减少干粪粒数和干粪重量(P 均 < 0.05)。与益智仁高剂量比较,益智仁 + 增液汤在第 21 天时,能显著拮抗益智仁引起的正常小鼠首次排黑粪时间延长($P < 0.05$);在第 28 天时,能显著拮抗益智仁引起的小鼠“首次排黑粪时间延长、干粪粒数和干粪重量减少”的便秘效应($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 益智仁对正常小鼠排便作用的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	给药时间 /d	首次排黑粪时间 /min	干粪粒数 /粒	干粪重量 /mg
空白对照	-	7	118.6 ± 21.5	12.4 ± 4.0	234.9 ± 59.1
		14	116.8 ± 20.8	12.9 ± 3.6	238.9 ± 66.3
		21	120.0 ± 20.6	12.7 ± 3.0	237.1 ± 56.7
		28	123.5 ± 19.7	12.3 ± 3.2	223.0 ± 60.5
益智仁	5	7	116.0 ± 20.6	13.3 ± 3.3	249.4 ± 58.2
		14	121.9 ± 25.3	12.4 ± 3.8	226.4 ± 65.9
		21	132.8 ± 22.6	11.9 ± 2.7	206.5 ± 61.4
		28	142.7 ± 17.1 ¹⁾	10.1 ± 2.0 ¹⁾	176.6 ± 30.5 ¹⁾
	10	7	130.6 ± 30.9	12.7 ± 3.3	245.7 ± 60.2
		14	132.0 ± 27.7	11.8 ± 2.9	217.3 ± 55.3
		21	145.4 ± 19.6 ¹⁾	10.2 ± 1.9 ¹⁾	177.0 ± 44.9 ¹⁾
		28	153.3 ± 22.4 ²⁾	9.0 ± 1.8 ²⁾	154.6 ± 28.6 ²⁾
	20	7	122.0 ± 34.2	13.5 ± 3.7	242.7 ± 60.3
		14	139.8 ± 27.4 ¹⁾	11.1 ± 3.1	194.0 ± 58.5
		21	160.3 ± 21.4 ²⁾	9.7 ± 2.3 ¹⁾	170.5 ± 47.8 ²⁾
		28	162.7 ± 23.5 ²⁾	7.8 ± 1.6 ²⁾	123.7 ± 22.9 ²⁾
益智仁 + 增液汤	20 + 20	7	113.2 ± 19.6	13.9 ± 3.3	260.0 ± 54.1
		14	125.1 ± 16.6	12.1 ± 3.1	220.7 ± 55.7
		21	133.4 ± 27.4 ³⁾	11.4 ± 2.5	215.7 ± 59.4
		28	137.3 ± 20.0 ⁴⁾	10.1 ± 2.7 ^{1,3)}	187.9 ± 46.5 ⁴⁾

注:与相应时间的空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与相应时间益智仁高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 益智仁对正常小鼠肠腔水分的影响 各给药组给药 28 d,随着益智仁给药剂量的增大,对正常小鼠肠腔水分有减少的作用,呈现一定的量效关系。对正常小鼠小肠肠腔水分,益智仁的影响作用较小,与空白对照组比较,仅高剂量能显著减少小肠肠腔

水分含量($P < 0.05$),而中、低剂量仅有减少的作用趋势;对正常小鼠大肠肠腔水分,益智仁的影响作用较大,与空白对照组比较,高、中、低剂量均能显著减少大肠肠腔水分含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与益智仁高剂量比较,益智仁 + 增液汤能显著拮抗益智

仁引起的正常小鼠肠腔水分减少的作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 益智仁对正常小鼠小肠、大肠肠腔水分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	含水量/%	
		小肠	大肠
空白对照	-	63.84 ± 2.28	69.84 ± 3.39
益智仁	5	63.33 ± 2.61	66.23 ± 4.01 ¹⁾
	10	62.75 ± 1.95	64.42 ± 4.95 ²⁾
	20	60.42 ± 3.60 ¹⁾	61.53 ± 2.97 ²⁾
益智仁 + 增液汤	20 + 20	63.41 ± 3.54 ³⁾	67.63 ± 3.55 ^{2,4)}

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与益智仁高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 益智仁对正常小鼠结肠肌电的影响 各给药组给药 28 d,随着益智仁给药剂量的增大,对正常小鼠结肠肌电频率增快并对肌电振幅降低的作用,呈现一定的量效关系。与空白对照组比较,益智仁高、中剂量能显著增快结肠肌电频率 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)及显著降低结肠肌电振幅 ($P < 0.01$)。与益智仁高剂量比较,益智仁 + 增液汤能显著拮抗益智仁引起的正常小鼠结肠肌电频率增快、振幅降低的作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 益智仁对正常小鼠结肠肌电的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	频率 /次/min	振幅 /mV
益智仁	5	43.40 ± 3.14	0.22 ± 0.06
	10	45.63 ± 4.55 ¹⁾	0.17 ± 0.05 ²⁾
	20	48.26 ± 5.55 ²⁾	0.12 ± 0.03 ²⁾
益智仁 + 增液汤	20 + 20	44.36 ± 4.41 ³⁾	0.20 ± 0.05 ^{1,4)}

4 讨论

益智仁对番泻叶引起的小鼠腹泻有拮抗作用,体现其止泻的功效。益智仁 5 g·kg⁻¹剂量下连续给药 28 d,而在 10,20g·kg⁻¹剂量下连续给药 14 ~ 21 d,均能表现出明显的便秘症状,同时动物表现出行动较缓、皮毛光洁度较差、腹部胀气等症状,而增液汤对上述症状有显著性的改善作用,体现出益智仁对正常动物的燥性副作用,可使用该方法筛选益智仁燥性物质基础和盐炙是否具有润燥效应。但应注意便秘仅仅是益智仁燥性表征的一个方面,还需从唾液、消化液、血液生化学、血液流变学等多方面综合评价益智仁的燥性。

进而研究发现益智仁对小鼠肠腔水分特别是大肠肠腔水分有显著的减少作用,说明益智仁引起动物出现便秘症状原因之一与加强小肠、大肠肠腔水分的重新收有关,因此下一步应重点研究益智仁对肠道水通道蛋白不同亚型的影响。

进而研究发现益智仁引起动物便秘后,导致动物结肠肌电功能学发生改变。结肠的肌电动作电位产生于慢波之上,与平滑肌收缩相一致,是推进性运动的主要动力。慢波是相对规律的一种周期性电活动,控制着肠道收缩节律,无论收缩与否始终存在。益智仁特别是高、中剂量,使得结肠肌电慢波频率增快、振幅减低,可能导致动作电位不易发生,致使肠道传输能力减弱而出现便秘的情况,而增液汤对上述症状均有显著的拮抗作用。课题组前期曾证明益智仁能降低正常小鼠胃排空、肠推进的作用^[2],说明益智仁引起动物出现便秘症状原因之二与减弱肠道传输能力有关。Cajal 间质细胞是胃肠起搏细胞,具有产生、传导电慢波和调节胃肠道平滑肌运动的功能及传递神经递质的作用,与慢传输性便秘密切相关^[8],因此下一步应重点研究益智仁对结肠 Cajal 间质细胞表达的影响。

[参考文献]

- [1] 叶定江. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996,175.
- [2] 李兴华,胡昌江,李文兵,等. 益智仁止泻作用初步研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(10):2498.
- [3] 王彦武,赵鹏,李彬,等. 通便养生茶通便作用的动物实验研究[J]. 广西预防医学,2004,10(2):105.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006,330.
- [5] 马伯艳,李冀,肖洪彬. 《温病条辨》增液汤治疗津亏液竭便秘的实验研究[J]. 江苏中医药,2007,39(5):57.
- [6] 姜洪波,杜爱林,郭红云,等. 芦荟凝胶汁对便秘小鼠结肠肌电生理变化的影响[J]. 时珍国医国药,2012,23(6):1456.
- [7] Ross G R, Gabra B H, Dewey W L, et al. Morphine tolerance in the mouse ileum and colon[J]. J Pharmacol Exp Ther,2008,327(2):561.
- [8] 吴至久,王飞. 益气养血温阳方对泻药性便秘大鼠结肠 Cajal 间质细胞表达影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):219.

[责任编辑 聂淑琴]