

# 山楂酸对腹泻型肠易激综合征的作用研究

王淇漫<sup>1</sup>, 李晓斐<sup>1</sup>, 陶莉<sup>1</sup>, 谢剑梅<sup>1</sup>, 李建<sup>1</sup>, 丁虹<sup>1</sup>, 王诗<sup>2</sup>

(1. 武汉大学药学院, 湖北武汉 430072) (2. 湖北科技学院药学院, 湖北咸宁 437100)

**摘要:** 本文探究了山楂酸是否对腹泻型肠易激综合征有治疗作用, 实验分空白组, 模型组, 阳性对照组和山楂酸高、低剂量共5组, 运用乙酸-束缚联合刺激法建立了大鼠腹泻型肠易激综合征模型, 检测分析了粪便含水量、腹腔回缩反射、离体肠肌动力、结肠组织病理染色、5-羟色胺免疫组化等多项体内体外指标。实验结果显示在体实验中, 山楂酸高剂量组可明显改善大鼠稀便状况, 且可使腹腔回缩反射恢复至正常范围, 作用效果与阳性药相当, 低剂量的山楂酸也表现出一定作用, 但效果较弱; 离体实验中, 五组均无病理变化; 高剂量山楂酸可恢复结肠对乙酰胆碱、5-羟色胺的正常敏感度, 且使5-羟色胺免疫组化反应阳性的肠嗜铬细胞减少。本研究得出, 山楂酸对腹泻型肠易激综合征有一定的治疗效果, 且高剂量优于低剂量。

**关键词:** 腹泻型肠易激综合征; 山楂酸; 5-羟色胺; 免疫组化

文章编号: 1673-9078(2015)1-16-20

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.004

## Effect of Maslinic Acid on Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome

WANG Qi-man<sup>1</sup>, LI Xiao-fei<sup>1</sup>, TAO Li<sup>1</sup>, XIE Jian-mei<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, DING Hong<sup>1</sup>, WANG Shi<sup>2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

(2. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

**Abstract:** The efficacy of maslinic acid in the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) was investigated. Rats were divided into five groups: blank control, model, positive control, high-dose maslinic acid, and low-dose maslinic acid. The IBS-D model was set up by acetic acid-constraint-combined stimulation. Fecal water content, abdominal withdrawal reflex, *in vitro* colon contraction, and pathological staining and 5-hydroxytryptamine (5-HT) immunohistochemistry of colon were detected and analyzed. The *in vivo* results showed a significant improvement in the fecal water content; and the abdominal withdrawal reflex times returned to the normal range in the high-dose maslinic acid group. The effects were comparable to those of the positive control group. Low-dose maslinic acid exhibited weak activity. No pathological change was observed in any group *in vitro*. The susceptibility of colon to acetylcholine (ACh) and 5-HT was restored to normal in high-dose maslinic acid group, and 5-HT-positive enterochromaffin cells were reduced. These indicate that maslinic acid had certain efficacy for IBS-D, and high-dose maslinic acid displayed better effects than low-dose.

**Key words:** diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; maslinic acid; 5-hydroxytryptamine; immunohistochemistry

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种包括腹痛、腹胀、粪便性状异常、排便习惯改变(腹泻、便秘、腹泻与便秘交替)等临床表现的非器质性肠道功能紊乱性疾病<sup>[1]</sup>。西方国家IBS的发病率为3%~20%<sup>[2]</sup>, 亚洲国家发病率虽然较欧美低, 但患者饱受痛苦给工作生活均带来不便。IBS临床最常见的亚型是腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D), 占患者总数的74.0%<sup>[3]</sup>。目前研究结果显示, 没有一种单一的发病机制可完全解释其所有的临床表现, 多认为其

收稿日期: 2014-06-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273523)

作者简介: 王淇漫(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药理学

通讯作者: 丁虹(1964-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药理学; 王

诗(1984-), 女, 讲师, 硕士研究生导师, 研究方向: 临床药理

主要与内脏高敏感性、胃肠动力学异常及脑-肠轴的改变等有关。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, serotonin, 5-HT)主要由位于胃肠道黏膜的肠嗜铬细胞分泌, 是胃肠道运动及分泌的始动因素, 可通过5-HT<sub>1P</sub>受体、5-HT<sub>3</sub>受体兴奋胃肠道运动及分泌<sup>[4-6]</sup>。近来研究发现, 5-HT系统改变与IBS患者腹痛、腹泻和内脏感觉异常等症密切相关<sup>[7]</sup>。胆碱能神经元是肠道种类最多的一种神经元, 肠道中ACh分布广泛, 且是肠道副交感神经主要的神经递质, 可以兴奋肠肌, 某些抗胆碱能药物的临床结果也表明ACh可能与IBS患者肠动力紊乱机制有一定关系<sup>[8]</sup>。5-羟色胺与乙酰胆碱均能使肠肌兴奋, 且正常肠肌与病症肠肌对两者的敏感程度不同, 可以通过体外给予刺激探究肠肌病理状态。

山楂酸(maslinic acid, MA)是一种五环三萜酸,

主要存在于山楂、红枣、油橄榄、石榴和鼠尾草等天然植物中,多用醇提法得到。研究表明,山楂酸具有抗肿瘤<sup>[9]</sup>、抗 HIV<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、抗氧化<sup>[12]</sup>等诸多药理活性。虽然在中医药临床中,山楂的炒制品药液用于治疗脘腹胀满、大便塘泄<sup>[13]</sup>,但目前国内外未见有山楂酸对于肠易激综合征的作用研究,仅邓州<sup>[14]</sup>等研究表明,山楂醇提取液对大鼠胃、肠平滑肌条收缩有抑制作用。本文旨在探究山楂酸对于治疗腹泻型肠易激综合征的功能作用,为传统观念山楂有机酸促进胃肠蠕动添加补充适应症。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级SD大鼠30只,雄性,2月龄左右,体重220~250 g(由武汉大学动物实验中心提供),适应性喂养3 d。所有大鼠都在安静、室温(18~20 °C)、自然光线、昼夜循环12/12 h条件下饲养。

### 1.2 仪器

镊子,剪刀,注射器,灌胃针头,硅胶管,透明胶带,透明塑料笼(20 cm×6 cm×8 cm),BL-420F生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)、光学显微镜(BHS型,日本奥林巴斯产品)等。

### 1.3 试剂

乙醚,冰醋酸,30%过氧化氢,石蜡,水合氯醛,(国药集团),生理盐水,0.01 mol/mL PBS 缓冲液,山楂酸(长沙华康生物),肝素钠,苏木素,甲苯胺蓝,台式液,乙酰胆碱(武汉大学人民医院),5-羟色胺,匹维溴铵片/得舒特(法国苏威)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 动物分组与模型建立

按每组6只,将大鼠随机分成5组,分别为A空白对照组、B模型组、C匹维溴铵对照组、D山楂酸低剂量组、E山楂酸高剂量组。B-E组造模前12 h禁食不禁水,乙醚麻醉后经肛门插入连接注射器的硅胶管(距肛门8 cm),结肠内灌入40 mL/L的乙酸1 mL,缓慢拔出硅胶管,用手压迫肛门并将大鼠尾巴抬高30 s,后用0.01 mol/L PBS 1 mL冲洗结肠。放回笼中自由活动进食水6 d,于第7 d行束缚应激,每天用乙醚麻醉后用宽透明胶带束缚前肩、前上肢及胸部,限制其搔抓头面部,束缚时间2 h,连续7 d。A组用1 mL

生理盐水代替乙酸,且不对其进行束缚刺激,其他都与B-E组一致。造模结束后第2 d给药,A、B组给生理盐水(剂量为0.5 mL/100 g),C组给匹维溴铵做阳性对照(1.5 mg/100 g),D组给低剂量的山楂酸(2 mg/100 g),E组给高剂量的山楂酸(8 mg/100 g),连续灌胃14 d。

#### 1.4.2 粪便含水量检测

于建立模型前(Day 1)、乙酸刺激后第6 d(Day 7)、束缚刺激后(Day 14)、灌胃给药后(Day 28)对粪便性状进行观察,对粪便湿重及干重进行称量,计算粪便含水量。

#### 1.4.3 腹部回缩反射实验

灌胃给药完成后,乙醚麻醉下,将石蜡油润滑后的动脉栓子清除术导管经肛门插入大鼠直肠8 cm左右,用胶布将导管和大鼠尾巴根部缠在一起,防止漏水。大鼠苏醒后,将其放在特制的透明塑料笼(20 cm×6 cm×8 cm)内,大鼠在此笼内只能前后运动,不能转身。30 min后待大鼠适应环境,将5 mL室温水注入直肠进行肠道扩张,观察2 min内大鼠腹部的收缩次数,进行行为评估。

#### 1.4.4 离体结肠肌张力检测及其对ACh与5-HT的敏感性实验

在体指标测完之后,将大鼠颈椎脱臼致死,剖开腹部,找到结肠段,剪下约2 cm,分成两段,在37 °C生理盐水中清空粪便,将肠肌固定于与BL-420F生物机能实验系统相连的恒温平滑肌槽内,槽内装有20 mL台式液,恒温37 °C,持续通入95% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>混合气,通过生物信号采集处理,记录各组大鼠结肠肌张力数值,用收缩频率及振幅表示。并向台式液中分别加入100 μg/mL的ACh 100 μL与100 μg/mL的5-HT 80 μL,以检测离体结肠对ACh及5-HT的敏感性。

#### 1.4.5 组织病理学观察

留取结肠段,用10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察大鼠结肠组织是否有病理变化。

#### 1.4.6 免疫组化检测与分析

将石蜡切片常规脱蜡、水化、3%过氧化氢处理,滴加兔来源5-HT一抗(1:150),4 °C过夜,二抗试剂盒(山羊抗兔IgG)处理,DAB显色,酒精逐级脱水,二甲苯透明,封片后光镜下观察,比较阳性细胞数量。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS统计软件进行数据分析,结果以平均

值±标准差 (mean±SD) 表示, 两两比较用 t 检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粪便含水量

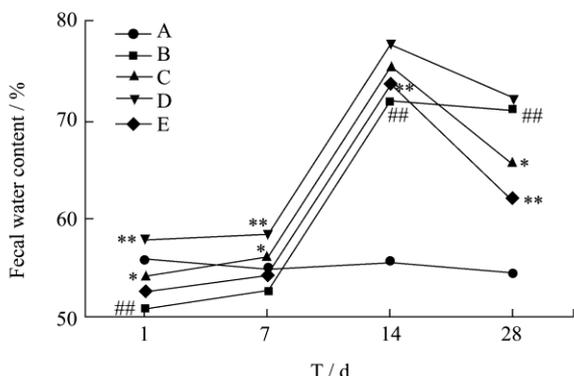


图1 大鼠在第1、7、14、28 d的粪便含水量

Fig.1 Fecal water content in rats on the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 28<sup>th</sup> day

注: A 空白对照组, B 模型组, C 模型+匹维溴铵组, D 模型+山楂酸低剂量组, E 模型+山楂酸高剂量组; ### $p<0.01$ , 与空白对照组相比有显著性差异; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , 与模型组相比有显著性差异。

由第1、7、14、28 d的粪便含水量可以看出, 除空白组外, 建立 IBS-D 模型前粪便呈颗粒状、软度适中, 此时含水量最低。乙酸-束缚联合刺激建立模型过程中, 乙酸刺激后第6 d, 粪便含水量并未见明显升高, 可见少量乙酸刺激且恢复一段时间后, 大鼠可以自行恢复排便状态; 束缚刺激可使粪便明显变稀, 这与压力下易患肠易激综合征的临床数据一致, 此时含水量最高, 造模成功。灌胃给药两周后, 空白组因未受刺激, 粪便含水量一直处于稳定状态; 模型组因生理盐水没有缓解作用, 粪便含水量偏高 (### $p<0.01$ ), 粪便瘫软, 没有固定形态; 作为阳性对照的匹维溴铵可显著降低大鼠的粪便含水量 (\* $p<0.05$ ), 但仍高于初始状态; 山楂酸低剂量组也可降低粪便含水量, 但效果显著性弱于阳性对照; 山楂酸高剂量组与阳性对照组作用效果几乎相同, 可显著性降低粪便含水量 (\*\* $p<0.01$ ), 使粪便恢复到粒状。可见在降低粪便含水量这项指标中, 山楂酸有一定的作用效果, 且高剂量效果优于低剂量。

### 2.2 腹部回缩反射实验

由表1结果可看出, 模型组的腹腔收缩次数最多, 是肠收缩最敏感的一组, 匹维溴铵组可显著性减少肠收缩次数 (\* $p<0.05$ ), 高剂量的山楂酸可显著性抑制肠收缩次数 (\* $p<0.05$ ), 效果较低剂量强。

表1 直肠扩张引起的腹腔回缩反射次数比较

Table 1 Number of rectal distention-induced abdominal retraction reflex

Group	Volume of water enema/mL	Times /2 min
Blank control	5	51.67±5.92
Model	5	67.00±3.16 ###
Model+Pinaverium Bromide	5	62.17±2.86 *
Model+Maslinic acid low dose	5	65.50±3.21
Model+Maslinic acid high dose	5	63.33±2.42 *

注: ### $p<0.01$ , 与空白对照组相比有显著性差异; \* $p<0.05$ , 与模型组相比有显著性差异。

### 2.3 离体结肠肌张力检测及其对 ACh 与 5-HT 的敏感性实验

由图2结果可看出, (1) 离体结肠在 ACh 体外刺激后, 收缩频率在第1、2 min 内均增加, 且第1 min 的变化值明显大于第2 min, 呈累积增加趋势; (2) 5-HT 刺激结肠后, 收缩频率的整体趋势和程度与 ACh 刺激后相似, 只是第1 min 内的变化值较之变小, 第2 min 较之增大, 兴奋肠肌作用较 ACh 稍慢; (3) ACh 刺激后第1 min 内收缩振幅增大, 第2 min 减小, 总体趋势仍为振幅增大; (4) 5-HT 刺激后, 振幅变化趋势与 ACh 刺激后相同, 但变化值第1分钟较之增大, 第2 min 较之减小, 最后呈现振幅显著增大的效果, 说明在改变振幅方面, 5-HT 作用大于 ACh。

综合四幅图可看出, 模型组对 ACh 和 5-HT 的刺激作用最为敏感, 频率、振幅均大幅度显著改变; 山楂酸低剂量组次之; 山楂酸高剂量组、阳性对照组与空白组对于 ACh 和 5-HT 敏感度相似, 说明高剂量的山楂酸对缓解肠肌过分兴奋有良好的作用。

### 2.4 结肠病理学观察

图3显示各组结肠组织都呈现完好, 并未有病理变化, 符合 IBS 非器质性肠道功能紊乱的病理状态。

### 2.5 结肠 5-HT 免疫组化

各组结肠组织切片经免疫组化后呈现出 5-HT 免疫反应阳性的肠嗜铬细胞, 胞质和胞突中有棕色或棕黑色颗粒, 且 5-HT 免疫反应阳性的肠嗜铬细胞形态多样, 如锥形、梭形、圆形、椭圆形等。

代表腹泻型 IBS 的模型组 (22.47±3.52) 显示结肠部位 5-HT 免疫反应阳性细胞显著多于其他组; 空白组 (15.36±2.11) 最少; 高剂量的山楂酸 (17.85±2.08)

与阳性对照药匹维溴铵 (16.93±2.79) 作用效果相似, 阳性细胞数相近; 低剂量山楂酸组阳性细胞数 (20.06±3.71) 较高剂量多, 但显著性少于模型组。

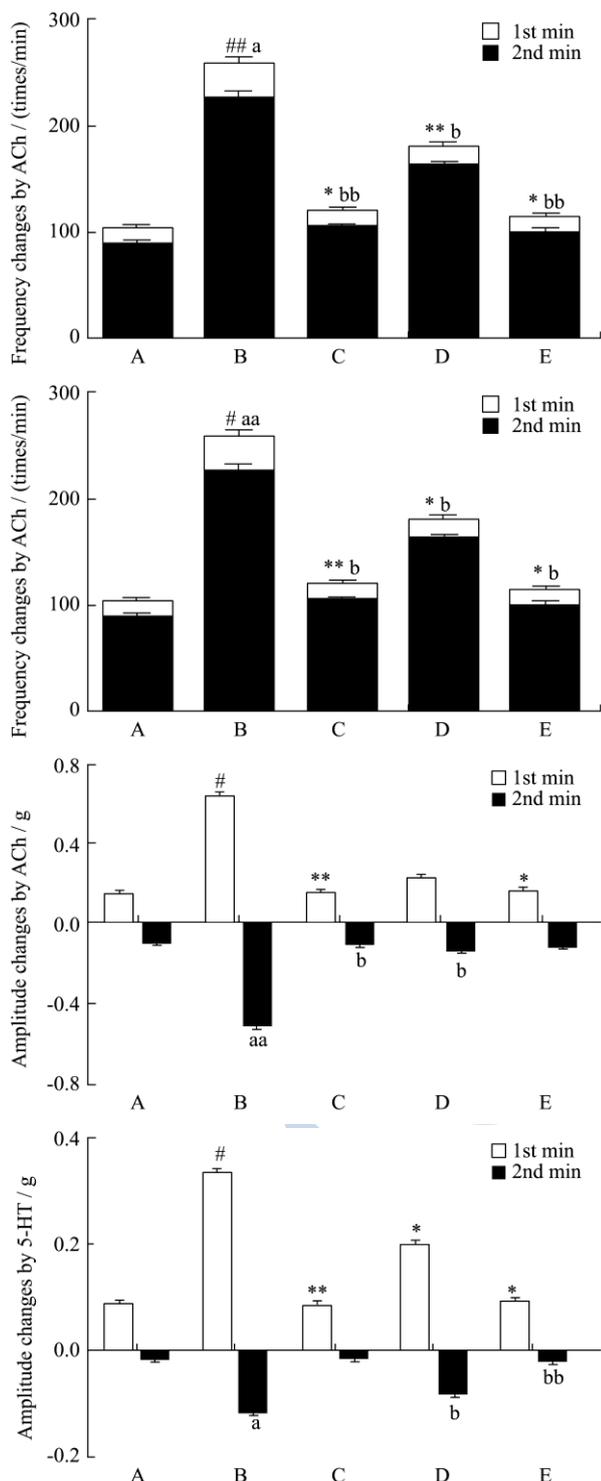


图2 ACh与5-HT刺激后第1、2分钟内结肠收缩频率与振幅变化

Fig.2 Changes in the frequency and amplitude during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> min after ACh or 5-HT stimulation

注: A 空白对照组, B 模型组, C 模型+匹维溴铵组, D 模型+山楂酸低剂量组, E 模型+山楂酸高剂量组; 1<sup>st</sup> min:

#p<0.05, ##p<0.01, 与空白对照组相比有显著性差异; \*p<0.05, \*\*p<0.01, 与模型组相比有显著性差异。2<sup>nd</sup> min: <sup>a</sup>p<0.05, <sup>aa</sup>p<0.01, 与空白对照组相比有显著性差异; <sup>b</sup>p<0.05, <sup>bb</sup>p<0.01, 与模型组相比有显著性差异。

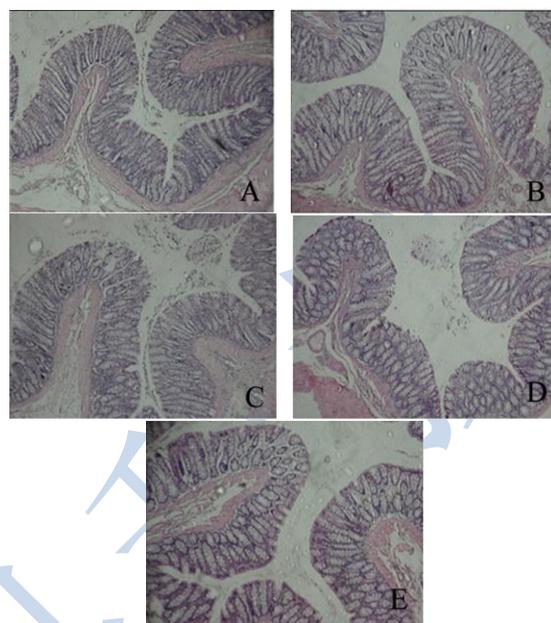


图3 结肠组织切片 HE 染色

Fig.3 HE staining of colon tissue sections

注: A 空白对照组, B 模型组, C 模型+匹维溴铵组, D 模型+山楂酸低剂量组, E 模型+山楂酸高剂量组。

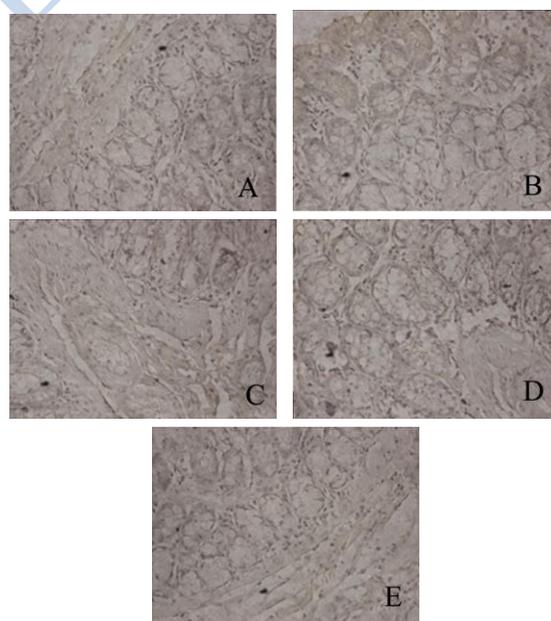


图4 结肠组织切片 5-HT 免疫组化

Fig.4 Immunohistochemistry of colon tissue sections

注: A 空白对照组, B 模型组, C 模型+匹维溴铵组, D 模型+山楂酸低剂量组, E 模型+山楂酸高剂量组。

### 3 结论

本实验通过随机分组、乙酸-束缚联合刺激法建立

SD 大鼠的 IBS-D 模型, 分别监测了不同实验阶段的粪便含水量、腹腔回缩反射次数、离体结肠肌运动状态及对 ACh 与 5-HT 的敏感性、结肠病理切片、肠嗜铬细胞 5-HT 免疫组化等体内体外指标, 得出山楂酸对于腹泻型肠易激综合征有一定的治疗效果, 且高剂量 (8 mg/100 g) 的山楂酸比低剂量 (2 mg/100 g) 的对大鼠 IBS-D 治疗效果好, 可以为中医药学山楂治疗大便塘泄初步寻找到组分依据。更多不同剂量的山楂酸组别需要进一步实验, 因山楂在传统中药中还有消积化滞的作用, 所以便秘型及腹泻便秘混合型肠易激综合征均可在后续实验中作为实验模型, 为开发山楂酸的新作用提供依据。

### 参考文献

- [1] Lyra A, Rinttilä T, Nikkilä J, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification [J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15(47): 5936-5945
- [2] Grundmann O, Yoon S L. Irritable bowel syndrome: epidemiology, diagnosis and treatment: an update for health-care practitioners [J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2010, 25(4): 691-699
- [3] 赵迎盼,唐旭东,卞兆祥,等.IBS-D 肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价的初步研究[J].中国中西医结合杂志,2013,33(11):1507-1514  
ZHAO Ying-pan, TANG Xu-dong, BIAN Zhao-xiang, et al. Preliminary study of establishing and assessing IBS-D model rats of gan stagnation and pi deficiency syndrome [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2013, 33(11): 1507-1514
- [4] Wade P R, Mawe G M, Branchek T A, et al. Use of stereoisomers of zacopride to analyze actions of 5-hydroxytryptamine on enteric neurons [J]. American Journal of Physiology, 1991, 260: 80-90
- [5] Glatzle J, Semini C, Robin C, et al. Expression of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat gastrointestinal tract [J]. Gastroenterology, 2002, 123(1): 217-226
- [6] Mazzia C, Hicks GA, Clerc N. Neuronal location of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor-like immunoreactivity in the rat colon [J]. Neuroscience, 2003, 116(4): 1033-1041
- [7] 石卿,赵云,梅竹松,等.5-羟色胺与褪黑素在母婴分离致腹泻型肠易激综合征模型大鼠中的表达[J].军事医学,2013, 37(8):604-608  
SHI Qing, ZHAO Yun, MEI Zhu-song, et al. Expression of 5-HT and MT in IBS-D rats caused by maternal separation [J]. Military Medical Sciences, 2013, 37(8): 604-608
- [8] Leng YX, Wei YY, Chen H, et al. Alteration of cholinergic and peptidergic neurotransmitters in rat ileum induced by acute stress following transient intestinal infection is mast cell dependent [J]. Chinese Medical Journal (English), 2010, 123(2): 227-233
- [9] Reyes-Zurita FJ, Pachón-Peña G, Lizárraga D, et al. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 154
- [10] 赵声兰,陈朝银.天然食物中的抗艾滋病有效成分[J].食品与机械,2007,23(3):166-170  
ZHAO Sheng-lan, CHEN Chao-yin. Effective components with anti-hiv effect in natural food [J]. Food and Machinery, 2007, 23(3): 166-170
- [11] Huang L, Guan T, Huang M, et al. Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B [J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 672(1-3): 169-174
- [12] Mkhwanazi B N, Serumula M R, Myburg R B, et al. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function [J]. Renal Failure, 2014, 36(3): 419-431
- [13] 冯志晖.山楂的药理作用研究[J].医学信息,2014,13: 433-433  
FENG Zhi-hui. Study on Pharmacological action of hawthorn [J]. Medical Information, 2014, 13: 433-433
- [14] 邓州,林原,刁云鹏,等.山楂醇提物对大鼠离体胃、肠平滑肌条收缩性的影响[J].现代生物医学进展,2009,9(7): 1262-1264  
DENG Sa, LIN Yuan, DIAO Yun-peng, et al. Effects of hawthorn alcohol extract on the contractility of isolated rat gastric and intestine muscle strips [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(7): 1262-1264