

畅物饮颗粒通便及调节肠道菌群功能的动物实验研究

钟雁, 邹敏亮, 蔡亚 (健士星生物技术研发(上海)有限公司, 上海 200335)

便秘是一种常见病,由于社会的老龄化,现代生活节奏的加快,饮食习惯的改变以及社会心理等因素的影响,便秘呈增多的趋势^[1]。而肠道微生态失衡与便秘、腹泻、抗生素相关性疾病、肠易激综合征等密切相关^[2]。流行病学调查发现,便秘人群中普遍存在肠道菌群失调,肠杆菌、肠球菌、梭杆菌数量增多,乳酸杆菌、双歧杆菌、类杆菌数量减少^[3-4]。本研究采用小鼠复方地芬诺酯致便秘模型研究畅物饮颗粒对小肠运动和排便的影响,以对其通便功能进行评价,并通过检测粪便中菌群的数目,观察畅物饮颗粒对肠道菌群的影响,对其调节肠道菌群的功能进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物来源 畅物饮颗粒由北京澳特舒尔保健品开发有限公司和健士星生物技术研发(上海)有限公司共同提供,人体日推荐剂量为8 g/60 kg。按照人体推荐剂量的5、10、30倍设计小鼠低、中、高剂量,为0.7、1.3、4.0 g/kg体重。

1.1.2 主要试剂 复方地芬诺酯片,常州康普药业有限公司生产,使用时配制成混悬液。墨汁悬液含5%粉末活性炭、10%阿拉伯树胶,4℃保存,用前摇匀。

1.1.3 主要仪器 电子秤(上海太和衡器厂,ACS-3型);电子天平(沙多利斯公司,Bp3100s)。

1.2 实验动物

1.2.1 动物 昆明种小鼠240只,雄性,18~22 g。由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,清洁级(许可证号:SCXK(沪)2007-0005)。实验动物饲养于温度20℃~25℃,相对湿度40%~70%的环境中。动物饲养料由苏州双狮实验动物饲料科技服务有限公司提供(登记证号:苏饲审(2009)05032)。试验期间各组动物均自由进食、饮水。

1.2.2 分组 所有动物适用性饲养后按照体重分层后随机分组。

① 通便功能试验:分连续给予受试物7 d和14 d两个方案,每个方案100只小鼠。两个方案中均包含小肠运动试验和排便试验,每种试验50只小鼠。50只小鼠分为正常对照组、模型对照组、受试样品低剂量组(5倍)、受试样品中剂量组(10倍)、受试样品高剂量组(30倍),每组10只动物。

② 调节肠道菌群试验:共40只小鼠,按照体重随机分为正常对照组、受试样品低剂量组(5倍)、受试样品中剂量组(10倍)、受试样品高剂量组(30倍),每组10只动物。

1.3 试验方法

1.3.1 小肠运动试验 动物连续给予受试物7 d或14 d后,所有动物均禁食不禁水16 h,除正常对照组动物外,各组均灌胃给予复方地芬诺酯5 mg/kg。30 min后,各组分别灌胃给予含相应受试样品的墨汁悬液0.4 mL/20 g体重,正常对照组和模型对照组灌胃给予不含样品的墨汁悬液。25 min后脱臼处死小鼠,开腹腔取小肠,剪去上端至幽门,下端至回盲部的肠管,轻轻拉成直线,测量墨汁推进长度(cm)及小肠全肠(cm),计算墨汁推进率。墨汁推进率(P,%) = (墨汁推进长度/小肠总长度) × 100%。

1.3.2 排便试验 动物连续给予受试物7 d或14 d后,所有动物均禁食不禁水16 h,除正常对照组动物外,各组均灌胃给予复方地芬诺酯10 mg/kg。30 min后,各组分别灌胃给予含相应受试样品的墨汁悬液0.4 mL/20 g体重,正常对照组和模型对照组灌胃给予不含样品的墨汁悬液。给予墨汁后立即将小鼠单个放入小鼠笼内,笼下垫有滤纸,期间维持正常饮食和进食。记录小鼠排首粒黑便时间,记录每只小鼠在6 h内的排便粒数、排便总重量。

1.3.3 调节肠道菌群试验 各组动物分组后给予受试物之前,无菌采取每只小鼠粪便0.1 g,并按照《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)“调节肠道菌群功能”中检查肠道菌群(双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌)的方法,选择合适的稀释度分别接种在培养基上。培养后,以菌落形态、革

兰染色镜检、生化反应等进行菌落鉴定和计数,计算出每克湿便中的菌数,作为给予受试样品前的菌落情况。灌胃给予受试样品 14 d,并于最后 1 次给予受试品 24 h 后,再次无菌采取每只小鼠的粪便 0.1 g,采用同样的方法检测肠道菌群。

1.4 结果判断

参照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)中“通便功能”、“调节肠道菌群功能”的判定条件。

1.4.1 小肠运动试验、排便试验 6 h 内排便重量和排便粒数任一结果阳性,同时小肠运动实验和排便时间任一结果阳性,可判断通便动物实验结果为阳性。

1.4.2 调节肠道菌群试验 ① 双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加,产气荚膜梭菌减少或不增加,肠杆菌、肠球菌无明显变化。② 双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加,产气荚膜梭菌减少或不增加,肠杆菌和/或肠球菌明显增加,但增加的幅度低于双歧杆菌/乳杆菌增加的幅度。满足任一种情况即可判定调节肠道菌群结果为阳性。

1.5 统计方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。墨汁推进率需进行数据转换,墨汁推进率转换值(X) = $\sin^{-1} \sqrt{P}$ 。菌落数(cfu/g)取

对数值后,再用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 动物体重

7 d 和 14 d 通便功能实验以及 14 d 调节肠道菌群实验中,各组动物体重增长正常,与各正常对照组比较差异均无统计学意义。

2.2 通便功能

与正常对照组比较,复方地芬诺酯模型成立。

2.2.1 小肠运动实验 连续给予畅物饮颗粒 7 d、14 d 后,与正常对照组比较,模型对照组墨汁推进率降低($P < 0.01$),说明该模型成立(表 1)。

连续给予畅物饮颗粒 7 d、14 d 后,1.3、4.0 g/kg 剂量组墨汁推进率大于模型对照组(表 1)。

2.2.2 排便实验 连续给予畅物饮颗粒 7 d、14 d 后,与正常对照组比较,模型对照组首便时间长于正常对照组($P < 0.01$),6 h 粪便粒数和 6 h 粪便重量小于正常对照组($P < 0.01$),说明模型成功(表 2)。

连续给予畅物饮颗粒 7 d、14 d 后,1.3、4.0 g/kg 剂量组小鼠首粒黑便时间较模型对照组缩短,6 h 内粪便粒数和粪便重量较模型对照组增加(表 2)。

表 1 连续给予畅物饮颗粒后小肠运动实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	7 d			14 d		
		墨汁推进率(%)	X	促进率(%)	墨汁推进率(%)	X	促进率(%)
正常对照组	—	60.9 ± 7.6 ¹⁾	0.90 ± 0.08 ¹⁾	—	67.1 ± 11.8 ¹⁾	0.96 ± 0.13 ¹⁾	—
模型对照组	—	28.1 ± 5.3	0.56 ± 0.06	—	34.1 ± 5.0	0.62 ± 0.05	—
畅物饮组	0.7	32.1 ± 3.4	0.60 ± 0.04	7.89	39.5 ± 8.3	0.68 ± 0.09	8.83
	1.3	34.9 ± 6.6	0.63 ± 0.07 ²⁾	13.08	53.5 ± 11.7 ¹⁾	0.82 ± 0.12 ¹⁾	31.94
	4.0	53.9 ± 6.2 ¹⁾	0.82 ± 0.06 ¹⁾	47.85	71.3 ± 9.0 ¹⁾	1.01 ± 0.10 ¹⁾	60.96

与同时时间模型对照组比较,1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.05$

表 2 连续给予畅物饮颗粒后排便实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	7 d			14 d		
		首便时间(min)	6 h 粪便粒数	6 h 粪便重量(mg)	首便时间(min)	6 h 粪便粒数	6 h 粪便重量(mg)
正常对照组	—	116.2 ± 3.4 ¹⁾	26.7 ± 2.2 ¹⁾	275.5 ± 20.2 ¹⁾	119.4 ± 3.1 ¹⁾	25.1 ± 3.4 ¹⁾	244.9 ± 32.0 ¹⁾
模型对照组	—	138.0 ± 8.9	12.2 ± 0.8	131.4 ± 9.4	132.0 ± 4.7	12.0 ± 0.5	131.1 ± 6.9
畅物饮组	0.7	132.3 ± 5.0	12.9 ± 1.0	137.7 ± 9.8	126.2 ± 8.6	12.6 ± 1.4	136.9 ± 8.1
	1.3	130.4 ± 7.4	13.7 ± 2.2	146.0 ± 20.6	119.2 ± 1.9 ¹⁾	14.7 ± 0.9 ¹⁾	157.0 ± 8.5 ¹⁾
	4.0	118.8 ± 5.8 ¹⁾	18.9 ± 2.7 ¹⁾	205.4 ± 22.3 ¹⁾	113.4 ± 3.1 ¹⁾	20.2 ± 2.7 ¹⁾	222.4 ± 31.1 ¹⁾

与同时时间模型对照组比较,1) $P < 0.01$

从表 1、表 2 可见,4.0 g/kg 剂量组连续给予畅物饮颗粒 7 d、14 d 后,均出现非常显著的通便效果;1.3 g/kg 剂量组连续给予畅物饮颗粒 14 d 后出现非常显著的通便效果。根据“通便功能”的判定条件,畅物饮颗粒 4.0 g/kg 剂量组对小鼠具有通便功能。

2.3 调节肠道菌群功能

正常对照组动物肠道菌群在正常饲养 14 d 后与

实验开始前比较未出现明显变化。4.0 g/kg 剂量组连续给予畅物饮颗粒 14 d 后,粪便中双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌较正常对照组显著增加,同时双歧杆菌、乳杆菌比自身实验前显著增加。1.3 g/kg 剂量组连续给予畅物饮颗粒 14 d 后,粪便中乳杆菌、肠杆菌较正常对照组显著增加(表 3)。

根据“调节肠道菌群”的判定条件,畅物饮颗粒

4.0 g/kg 剂量组对小鼠具有调节肠道菌群的功能。

表 3 连续给予畅物饮颗粒后调节肠道菌群实验结果($\bar{x} \pm s$)

菌群	正常对照组	畅物饮组		
		0.7 g/kg	1.3 g/kg	4.0 g/kg
双歧杆菌				
实验前	8.85 ± 0.88	8.89 ± 0.74	8.92 ± 0.54	8.74 ± 0.43
14 d 后	8.77 ± 0.86	9.13 ± 0.71	9.32 ± 0.46	9.45 ± 0.49 ¹⁾²⁾
变化率(%)	-0.90	2.70	4.48	8.12
乳杆菌				
实验前	7.68 ± 0.17	7.70 ± 0.16	7.72 ± 0.16	7.85 ± 0.13
14 d 后	7.67 ± 0.12	7.78 ± 0.23	7.84 ± 0.18 ¹⁾	8.13 ± 0.23 ¹⁾²⁾
变化率(%)	-0.13	1.04	1.55	3.57
肠球菌				
实验前	3.80 ± 0.35	3.81 ± 0.37	3.93 ± 0.42	3.81 ± 0.34
14 d 后	4.01 ± 0.45	4.00 ± 0.42	4.14 ± 0.44	4.04 ± 0.47
变化率(%)	5.52	4.99	5.07	5.69
肠杆菌				
实验前	4.66 ± 0.43	4.81 ± 0.43	4.64 ± 0.39	4.76 ± 0.48
14 d 后	4.64 ± 0.36	4.84 ± 0.40	4.95 ± 0.27 ¹⁾	4.98 ± 0.26 ¹⁾
变化率(%)	-0.43	0.62	6.68	4.62
产气荚膜梭菌				
实验前	2.53 ± 0.38	2.85 ± 0.23	2.49 ± 0.34	2.67 ± 0.22
14 d 后	2.74 ± 0.20	2.63 ± 0.26	2.67 ± 0.13	2.62 ± 0.20
变化率(%)	8.30	-7.72	7.23	-1.87

1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与实验前比较, $P < 0.05$

3 讨论

功能性便秘以排便持续困难, 排便次数减少或排便不尽为诊断标准。目前认为功能性便秘主要与结肠或直肠动力障碍、盆底功能失调、社会心理因素以及胃肠调节肽异常等有关。有研究表明, 便秘时由于粪便不能及时清除, 有害菌大量繁殖, 内毒素大量释放, 肠道黏膜的屏障功能受到破坏, 血液中的内毒素水平上升, 继而引起相关炎症因子水平上升^[5]。

目前对便秘的治疗多为容积性泻剂、刺激性泻剂、胃肠动力药物、外用的润滑剂等^[6], 这些泻剂对缓解便秘症状确实能够起到立竿见影的效果, 但对肠道通畅的维持、防止便秘的再次发生却缺少有效的手段。

畅物饮颗粒是以低聚果糖、生地黄提取物、杜仲叶提取物、当归提取物为主要原料制成的颗粒剂, 其人体推荐服用剂量为 8 g/d。低聚果糖为目前国际上公认的益生元之一。其具有不被上消化道利用, 绝大部分可以原形到达下消化道, 并在下消化道被菌群选择性分解利用的特点, 因此可特异性地使双歧杆菌、乳杆菌等有益菌得到增殖^[7]。生地黄和当归在古方中常配搭使用, 其基本功效为补血滋阴、润肠通便^[8]。生地黄在润肠丸和四物汤等传统方剂中使用, 临床治疗便秘取得了较好的疗效^[9-10]。现代药理学研究证实, 生地黄提取液有通便功效^[12]。生地黄中含有水苏糖、棉籽糖等低聚糖成分, 其中以水苏

糖为多^[12], 水苏糖同低聚果糖一样, 具有通便和调节肠道菌群的作用^[13]。杜仲叶在通便功能产品中罕有应用, 杜仲叶中含有的环烯醚萜类物质具有一定的泻下作用^[14-15], 绿原酸可抑制内毒素损伤^[16]、促进黏膜自身修复^[17]。

本研究中畅物饮颗粒的配方沿用传统使用习惯, 同时具有良好的物质基础, 动物试验结果显示具有良好的通便和调节肠道菌群的功能。

4 参考文献

- [1] 史红, 周铭心. 便秘的病因研究[J]. 新疆中医药, 2007, 25(3): 107-111.
- [2] 袁杰利, 李兵, 康白. 我国人群亚健康状态下微生态失衡状况的调查[C]. 营养、代谢与慢性病——达能营养中心第十届学术年会会议论文集, 2007.
- [3] 毕洪玲, 张桂兰, 何婧. 便秘患者肠菌群的调查[J]. 临床军医杂志, 2003, 31(3): 82-84.
- [4] 余英. 老年性便秘与肠道菌群失调的相关性及药物干预性研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010, 19(12): 1133-1135.
- [5] 吴先哲. 出口梗阻性便秘对大鼠血浆 ET 及血清 TNF- α 含量的影响[J]. 大肠肛门病外科杂志, 2004, 10(1): 11-13.
- [6] 贡鸣, 李岩. 功能性便秘的治疗现状[J]. 中国当代医药, 2009, 16(16): 199-200.
- [7] 杨正梅, 卜友泉. 低聚果糖的生物学效应及其安全性研究进展[J]. 生命科学研究, 2004, 8(S2): 122-126.
- [8] 柳越冬, 陶弘武, 张弘玺, 等. 便秘的古代文献信息挖掘与整理[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(增刊): 12-14.
- [9] 廖慧玲, 尹思源, 石含秀, 等. 浅析当归在方剂中的配伍意义[J]. 河南中医, 2008, 28(2): 65-66.
- [10] 甘莉, 何亚琴. 四物汤加味治疗老年人便秘 48 例[J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15(11): 722.
- [11] 张红敏, 侯书杰, 陈世伟. 生地提取液润肠通便作用的实验研究[J]. 河南预防医学, 2001, 12(5): 265-266.
- [12] 雷金艳, 贾建伟. 地黄中水苏糖的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(6): 935-937.
- [13] 高鹏, 黄晓春, 杨建武, 等. 水苏糖改善人体肠道菌群作用的人体试食研究[J]. 中国新技术新产品, 2009(8): 7.
- [14] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 424-426.
- [15] 南京中医药大学. 中药大辞典(下册)[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 2240-2243.
- [16] 叶星沈, 王自力, 穆祥, 等. 绿原酸对肠黏膜微血管内皮细胞分泌 NO 和 ET-1 的影响[J]. 解剖与临床, 2005, 10(2): 101-103.
- [17] 刘蓉, 唐方. 中药保护肠屏障功能研究概况[J]. 上海中医药, 2004, 38(12): 57-59.

(收稿日期: 2012-12-24)