

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.14.009

HD 双歧杆菌结肠溶性软胶囊改善家兔通便效果实验研究

周佰慧, 王珍婷, 宋霞宇, 韩德权[△]

(黑龙江大学生命科学学院·黑龙江省高校微生物重点实验室·教育部农业微生物工程中心, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要:目的 考察 HD 双歧杆菌结肠溶性软胶囊改善便秘兔的排便效果。方法 用盐酸洛哌丁胺建立家兔便秘模型, 分为 HD 双歧杆菌结肠溶性软胶囊组与空白对照组、模型组、阳性对照组, 考察药物对便秘家兔的采食、饮水、排便粒数及粪便含水量的影响, 以及其对肠道菌群的调节作用。结果 模型组与 HD 双歧杆菌结肠溶性软胶囊组的采食量、水摄入量、排便粒数和粪便含水量比较均有显著性差异 ($P < 0.05$); HD 双歧杆菌结肠溶性软胶囊组肠杆菌的数量远低于模型组, 双歧杆菌和乳酸杆菌的数量高于模型组 ($P < 0.05$)。结论 HD 双歧杆菌结肠溶性软胶囊能有效促进肠道蠕动, 可使便秘家兔排便形态、含水率正常, 具有良好的通便效果。

关键词: 双歧杆菌; 软胶囊; 结肠溶性; 肠道菌群; 通便效果; 家兔

中图分类号: R965; R975⁺.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)14-0025-04

Experimental Study on HD Bifidobacteria Colon - Soluble Soft Capsules in Improving Laxative Effect in Rabbits

ZHOU Baihui, WANG Zhenting, SONG Xiayu, HAN Dequan

(College of Life Sciences of Heilongjiang University, University Key Laboratory of Microbiology of Heilongjiang Province, Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology of Ministry of Education, Harbin, Heilongjiang, China 150080)

Abstract: Objective To investigate the effect of HD Bifidobacterium Colon - Soluble Soft Capsules on improving the defecation of rabbits with constipation. **Methods** The rabbit models with constipation were established by loperamide hydrochloride, and then they were divided into HD Bifidobacterium Colon - Soluble Soft Capsules group and blank control group, model group and positive control group. The effects of drug on food intake, water intake, fecal grains and fecal water content of rabbits with constipation were investigated, as well as its regulating effect on the intestinal flora. **Results** Compared with the model group, the food intake, water intake, fecal grains and fecal water content in HD Bifidobacterium Colon - Soluble Soft Capsules group had significant differences ($P < 0.05$). In addition, the number of *Enterobacteriaceae* in HD Bifidobacterium Colon - Soluble Soft Capsules group was much lower than that in the model group, and the number of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* in HD Bifidobacterium Colon - Soluble Soft Capsules group was higher than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** HD Bifidobacterium Colon - Soluble Soft Capsules can effectively promote intestinal peristalsis and make rabbits with constipation have normal bowel movement pattern and water content, which have good laxative effect.

Key words: *Bifidobacteria*; soft capsule; colon - soluble; intestinal flora; laxative effect; rabbits

目前,便秘的主要治疗方法为药物治疗^[1],常见的
润滑性泻药包括液体石蜡、开塞露等长期使用会干扰维

生素的吸收,患者使用更痛苦^[2];刺激性泻药,如番泻叶
和大黄等,起效快,但长期使用会削弱结肠动力^[3],易引

第一作者:周佰慧,男,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全,(电子信箱)zhoubaihui@yeah.net。

[△]通信作者:韩德权,男,硕士研究生,教授,研究方向为生物制药、保健食品材料,(电子信箱)handequan2003@163.com。

中国医药科技出版社,2015.

[2] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[3] 刘 骅. 注射用克林霉素磷酸酯降压力物质检查法的研究[J]. 中国现代应用药学,2013,30(3):306-308.

[4] 邓利娟,闫安庄,范慧红. 胸腺肽注射剂降压力物质检查及其限值的确定[J]. 药物分析杂志,2010,30(8):1493-1498.

[5] 徐晓月,周继春,王海波,等. 驱虫斑鸠菊注射液的质量标准提高研究[J]. 中国药品标准,2011,12(4):255-257.

[6] [H] GPT1-1, 化学药物急性毒性试验技术指导原则[S].

[7] 张均田,杜冠华. 现代药理实验方法[M]. 第2版. 北京:中国协和医科大学联合出版社,2012:2170-2173.

[8] 王亚敏. 舒洛地特研究进展及临床应用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2010,15(1):109-115.

[9] 吴超权,周 智,张 赞,等. 注射用甲磺酸加贝酯异常毒性及降压力物质方法学研究[J]. 食品与药品,2015,17(4):247-251.

[10] 李湛军,徐康森. 浅谈生化药质量标准中的异常毒性等安全性检查[J]. 中国药品标准,2006,7(5):17-18.

[11] 王 欣,周继春,张军霞,等. 注射用丹参酮 II_A 磺酸钠安全性检查法的研究[J]. 中国现代应用药学,2017,34(5):723-725.

[12] 许雷鸣,武 谷,堵伟锋,等. 门冬氨酸鸟氨酸注射液安全性检查法的研究[J]. 中国现代应用药学,2014,31(1):87-89.

(收稿日期:2018-11-07)

起依赖性和继发性便秘^[4]。便秘的发生与肠道微生物菌群失衡^[5], 微生态制剂治疗已成为当前研究的热点^[6]。双歧杆菌在维持肠道菌群平衡中扮演重要的角色, 且已被证实可调节人体肠道菌群平衡^[7-8]、提高免疫力^[9]及改善便秘等^[10]。目前, 常见的双歧杆菌制剂主要是硬胶囊、片剂等, 难以确保药物在储存期间的稳定性, 且由于其不耐胃酸和胆盐, 难以确保在到达肠后仍存在大量活菌^[11]。因此, 本研究中开发了一种具有结肠溶性的青春双歧杆菌软胶囊, 是以大豆油为载体^[12], 将 HD 青春双歧杆菌混悬其中, 制成软胶囊并对其胶囊壳进行处理使其具有一定的结肠溶性^[13]。本研究中从肠道菌群、排便功能和生理体征 3 个方面探讨了 HD 双歧杆菌结肠溶性软胶囊对便秘家兔缓解便秘的影响, 旨在为其临床应用提供有效的实验依据^[14]。现报道如下。

1 仪器、试剂与动物

仪器: Purification Equipment 洁净工作台(苏州净化设备有限公司); 3.5 L 厌氧产气包(海博生物技术有限公司); DHG-914 型电热恒温鼓风干燥箱、DNP-9082 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司); H-1650 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪有限公司); MVS-1 型漩涡混合器(北京金北德工贸有限公司); BCD-118TMPA 型冰箱(海尔集团); LDZM-75 型立式蒸汽压力灭菌器(上海申安医疗器械厂); ME203E 型电子天平(梅特勒-托利多仪器 <上海> 有限公司); ZB-1E 型智能崩解仪(天津市天大

天发科技有限公司)。

试剂: 盐酸洛哌丁胺(西安杨森制药有限公司, 批号为 20150917); HD 结肠溶性双歧杆菌软胶囊(黑龙江大学生命科学院 204 实验室, 批号为 20151013, 规格为 0.1 g 含 1×10^8 cfu); 双歧杆菌活菌胶囊(丽珠集团丽珠制药厂, 批号为 20150607, 规格为 0.35 g 含 1×10^8 cfu)。

动物: 雄性健康家兔, SPF 级, 体质量 1 500 ~ 2 000 g。饲养条件为室内温度 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 40% ~ 55%。在每天 12 h 光照和 12 h 黑暗处理后, 在喂食兔配方饲料后 7 d 开始实验。

2 方法与结果

2.1 结肠溶性软胶囊制备(甲醛浸渍法)

体外崩解时间确定: 将软胶囊浸入锥形瓶中, 甲醛体积分数分别为 5%, 8%, 10%, 12%, 14%, 浸渍时间分别为 0.5, 1.0, 2.0 h。取出浸泡过的软胶囊, 用无水乙醇洗涤多次, 直至甲醛气味消失。

结果见图 1。在不同体积分数的甲醛溶液中浸泡 0.5 h, 后崩解时间小于 300 min, 表明软胶囊在到达结肠时就已崩解, 不能达到结肠溶性胶囊的工艺要求。5% 及 8% 的甲醛溶液浸泡 1.0 h 及 2.0 h 后, 胶囊崩解时间都无法达到结肠溶性要求。浸泡在 10% 的甲醛溶液, 胶囊的崩解时间超过 300 min, 可满足结肠溶性条件。考虑到应尽量减少甲醛残留, 故选择 10% 甲醛溶液处理软胶囊。

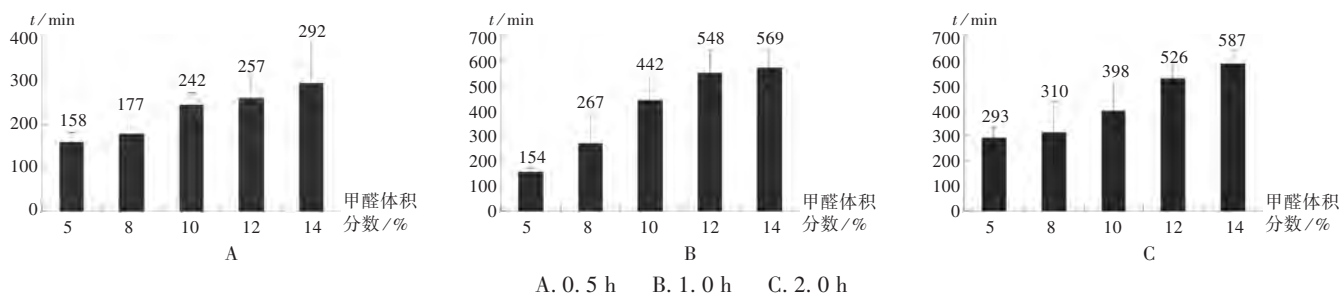


图 1 甲醛浸泡 0.5, 1.0, 2.0 h 的软胶囊崩解时间变化

结肠溶性基准判断: 取浸泡后的软胶囊, 每次 6 粒, 放入崩解仪器中。在人工胃液中崩解 2 h, 用少量蒸馏水冲洗, 置人工肠液中崩解 3 h, 取出, 放入人造结肠液中进行崩解, 记录最终的崩解时间。如软胶囊到达结肠溶液并崩解, 则证明其符合结肠溶性要求。

2.2 便秘家兔造模及处理

造模: 选取 16 只健康家兔并称重。随机选取 4 只家兔作为空白对照组, 给予生理盐水; 其他 12 只家兔被用作便秘组, 每天 2 mL 盐酸洛哌丁胺生理盐水(按 4.0 mg/kg 体质量将盐酸洛哌丁胺溶于 2 mL 生理盐水)灌胃, 连续灌胃 4 d 制作便秘模型^[15]。判断模型是否成功的依据有家兔食物摄入量、饮水量、体质量增加, 排便次数和粪便含水量 5 个指标。与空白对照组相比, 如

果上述指标均显著下降, 则证明造模成功。

粪便形态观察: 每天定期观察家兔粪便, 描述不同时期家兔粪便、便秘的症状^[16]。记录 24 h 内的饮水量、采食量、体质量变化和粪便颗粒数。每天收集的粪便立即称重, 以防止水分流失并导致实验错误。然后将粪便在 80°C 下干燥 8 h 至恒重。称量粪便的质量并计算含水量, 按含水量/% = $(m_1 - m_2) / m_1 \times 100\%$ ^[17], m_1 为粪便鲜重(g), m_2 为粪便干重(g)。结果见图 2。A 组正常, 家兔粪便呈球形, 大小相似, 整齐, 但模型组粪便形状不平整, 较小, 可能为便秘引起。

正常组和造模组指标比较: 由表 1 可知, 便秘组家兔食物摄入量和水摄入量显著减少, 因此导致体质量增加较慢。提示便秘家兔由于便秘导致食欲不振和生长缓



A. 空白对照组 B. 便秘造模组

图2 造模后家兔粪便外观对比

表1 空白对照组和便秘造模组指标比较($\bar{X} \pm s, n=4$)

项目	空白对照组	便秘造模组
采食量(g)	176.27 ± 6.77	85.56 ± 10.55 [#]
水摄入量(mL)	297.50 ± 18.20	225.32 ± 39.67 [*]
体质量增加量(kg)	0.53 ± 0.04	0.13 ± 0.02 [*]
粪便粒数	283.22 ± 13.31	169.32 ± 17.25 [#]
粪便含水量(%)	59.53 ± 1.43	50.61 ± 2.01 [*]

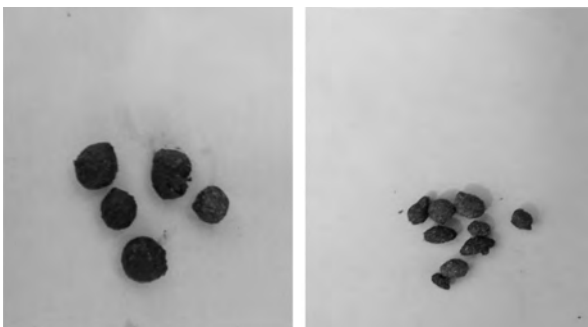
注:与空白对照组相比,^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$ 。

慢。此外,便秘组家兔的排便数量和粪便含水量也显著低于空白对照组,证明便秘造模组的家兔排便不畅,并伴有粪便干结等症状,可判断造模成功。

2.3 喂食家兔效果试验

家兔分组及处理:将造模成功的12只家兔分为模型对照组(B组)、阳性对照组(C组)和HD双歧杆菌结肠溶性软胶囊组(D组),空白对照组(A组)和B组喂食正常,其余2组分别给予双歧杆菌活菌胶囊和HD双歧杆菌结肠溶性软胶囊,胶囊中含有相同数量的双歧杆菌数(均为 1×10^8 cfu)。

粪便形态:由图3可见,D组家兔的粪便在7d后大小相似并且形状均匀,几乎与正常兔无法区分,便秘症状消失;C组喂食后粪便的形态、大小接近正常,但存在一些条带,便秘症状并未完全消失。表明双歧杆菌结肠溶性软胶囊对便秘的疗效更好。



A. 软胶囊组 B. 阳性对照组

图3 给药后家兔粪便外观比较

采食量、水摄入量、体质量增加量:结果见表2。

D组家兔食物摄入量和摄水量均显著高于B组,与A组无显著差异($P > 0.05$);与C组相比,D组食物摄入量显著增加,但水摄入量无明显差异($P > 0.05$);与A组相比,D组体质量增加量无显著差异($P > 0.05$)。结果表明,HD双歧杆菌结肠溶性软胶囊可显著改善便秘家兔的食物摄入和水摄入量,不会阻碍家兔的生长,因此与正常家兔无明显差异。

排便粒数和粪便含水量:结果见表2。与B组相比,C组和D组粪便粒数显著增加,D组与A组粪便粒数无显著性差异($P > 0.05$)。但与A组相比,C组无显著增加排便量,且未恢复到正常排便状态。D组便秘兔的粪便粒数和含水量明显增加,具有明显的改善便秘作用。

表2 4组家兔观察指标比较($\bar{X} \pm s, n=4$)

组别	采食量(g)	水摄入量(mL)	体质量增加量(kg)	粪便粒数	粪便含水量(%)
A组	184.96 ± 7.27	279.64 ± 13.22	0.57 ± 0.06	266.50 ± 21.54	55.48 ± 2.13
B组	107.00 ± 10.66 [*]	274.29 ± 2.67	0.31 ± 0.17 [*]	165.32 ± 10.83 [*]	49.05 ± 4.57
C组	138.83 ± 15.01 [#]	262.86 ± 9.31	0.18 ± 0.14 [#]	211.86 ± 12.20 [#]	52.48 ± 2.43
D组	146.75 ± 5.20 [#]	278.21 ± 6.88	0.44 ± 0.19	238.39 ± 25.48 [#]	51.13 ± 1.73

注:与A组比较,^{*} $P < 0.05$;与B组比较,[#] $P > 0.05$ 。图4同。

2.4 家兔肠道菌群变化试验

采集实验第1天、建模后第5天和给药后的第7天的家兔新鲜粪便4~6粒。用无菌镊子挑取新鲜粪便0.1g,加入0.9mL生理盐水中,漩涡振荡1min。进行10倍系列梯度稀释,每次选择 10^{-2} 到 10^{-5} 的稀释度,分别接种于TPY,LBS,PS,EMB,YEPD培养基上,培养48~72h后,计算粪便中大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、酵母菌及消化球菌的活菌数(cfu/g)^[18]。

结果见图4。造模前所有家兔的肠道菌群无明显差异,肠道菌群正常,可以开始实验。造模后,除A组外,各组家兔肠道菌群中大肠杆菌和酵母菌增多,双歧杆菌、乳酸杆菌和消化球菌均显著减少($P < 0.05$),表明便秘家兔肠道菌群紊乱,有害菌增加,有益菌减少。给药7d后,与B组相比,D组乳酸杆菌和消化球菌显著增加,大肠杆菌、酵母菌显著减少。结果表明,HD双歧杆菌结肠溶性软胶囊能调节便秘家兔肠道菌群平衡。在C组家兔肠道中双歧杆菌、乳酸杆菌和消化球菌的数量增加,但差异不显著($P > 0.05$),大肠杆菌数量减少。因此,HD双歧杆菌结肠软胶囊对治疗便秘和调节兔肠道菌群平衡具有显著作用。

3 讨论

本研究中,D组在给予受试药品7d后与B组比较,便秘家兔的粪便粒数显著增加,粪便含水量提高,说明HD双歧杆菌结肠溶性软胶囊具有润肠通便作用,可

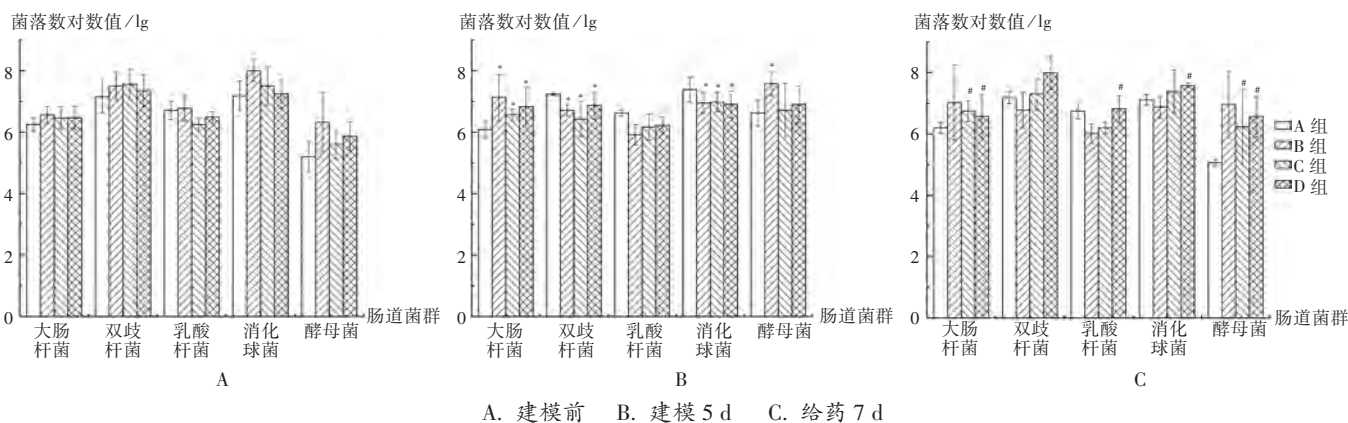


图4 4组家兔肠道菌群比较

增强家兔的肠道蠕动能力,促进肠道内积累的粪便排出,因而能缓解家兔便秘症状。对家兔粪便中菌群进行细致分析,与B组相比,D组家兔肠道内大肠杆菌数量明显减少,这可能是由于双歧杆菌代谢产生的大量有机酸等物质可促进肠道蠕动、增加肠管内的渗透压、分泌水分,从而产生通便效果^[19]。与C组相比,HD双歧杆菌可更有效地增加家兔肠道中乳酸杆菌,双歧杆菌和消化道球菌的数量,并减少大肠杆菌的数量。同是双歧杆菌胶囊,HD双歧杆菌肠溶软胶囊效果优于阳性对照药的原因主要有2个方面:所用双歧菌体活性高于双歧杆菌活菌胶囊;HD双歧杆菌肠溶软胶囊中具有大豆油载体,可起到物理润肠作用。

采用家兔主要是考虑喂饲方便,实际上与人应用活菌制剂的情况仍有一定差异。所用的HD双歧杆菌结肠溶性软胶囊的结肠溶性是仿照人的代谢时间对囊壳进行处理而得到的,对家兔是否具有结肠溶性不得而知,还需测定其粪便中的脂肪含量,再综合各项指标,以便为HD双歧杆菌结肠溶性软胶囊改善便秘的机理研究提供实验依据。

参考文献:

[1] 李桂荣,王英凯,唐 岚. 功能性便秘的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2011,31(12): 2372-2375.
 [2] LIU Z, SAKAKIBARA R, ODAKA T, et al. Mosapride citrate, a novel 5-HT₄ agonist and partial 5-HT₃ antagonist, ameliorates constipation in parkinsonian patients [J]. *Mov Disord*, 2005, 20(6): 680-686.
 [3] WALD A. Chronic constipation: advances in management[J]. *Neurogastroenterology & Motility the Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 2007, 19(1): 4-10.
 [4] 钱伯初,史 红,郑晓亮. 正常和便秘模型动物排便实验研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2007,12(12): 1339-1343.
 [5] 赵先平,肖新云,蔡 锐,等. 便秘相关肠道微生物研究进展[J]. 中国微生物学杂志,2014,26(10): 1236-1240.

[6] WERTH BL, WILLIAMS KA, Pont LG. A longitudinal study of constipation and laxative use in a community-dwelling elderly population [J]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2015, 60(3): 418-424.
 [7] 代 荀,刘亚男. 浅谈益生菌的保健作用[J]. 饮料工业, 2008,11(9): 1-2.
 [8] D'AIMMO MR, MODESTO M, BIAVATI B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115(1): 35-42.
 [9] 胥振国,蔡玉华,刘修树,等. 双歧杆菌研究进展及应用前景[J]. 中国生物制品学杂志,2017,30(2): 215-220.
 [10] QUIGLEY EMM. The enteric microbiota in the pathogenesis and management of Constipation [J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2011, 25(1): 119-126.
 [11] 刘晓梅,彭芝榕,倪学勤. 低聚果糖、乳酸杆菌对便秘模型大鼠的通便功能影响[J]. 食品科学,2013,34(11):296-299.
 [12] 石绍福,韩 豪,刘 新,等. 软胶囊制备工艺研究现状[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(1):76-78.
 [13] 郑 颖. 三七总皂苷肠溶软胶囊的研制[D]. 石家庄:河北医科大学,2009.
 [14] EAMONN MM. Probiotics in the Management of Colonic Disorders[J]. *Probiotics for Colonic Disorders*, 2007, 9(5):434-440.
 [15] 辛 玉,张红星,周 利. 功能性便秘大鼠模型的研究进展[J]. 湖北中医杂志,2014,36(3):74-76.
 [16] 杨子明,董仲奎,吴建璋. L-阿拉伯糖润肠通便作用的研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(5):7-9.
 [17] 姚海燕,库宝善,马 行,等. 中药复方一身清改善便秘小鼠的排便功能[J]. 中国临床康复,2006(19): 100-102.
 [18] 张振瑞. 家兔肠道正常微生物的分离培养基特性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2007.
 [19] 丁 圣,蒋菁莉,刘松玲,等. 长双歧杆菌 BBMN68 对便秘模型小鼠的通便作用[J]. 食品科学,2011,32(3):195-198.

(收稿日期:2018-10-24)