

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.13.007

隔山消提取物对功能性消化不良模型大鼠脑肠肽及胃肠道功能的作用机制研究*

秦 兰^{1,2}, 游景瑞^{1,2}, 潘 洁¹, 孙 佳³, 刘春花¹, 彭 梅², 林昌虎^{1△}

(1. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心·省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 探讨隔山消提取物对功能性消化不良(FD)模型大鼠脑肠肽及胃肠道功能的作用机制。方法 将48只雄性SD大鼠随机分为正常组(A组,生理盐水),模型组(B组,0.5 mol/L冰盐酸),多潘立酮组(C组,31.5 mg/kg多潘立酮),以及隔山消提取物低、中、高剂量组(D₁组、D₂组、D₃组,0.5、1.0、2.0 g/kg隔山消提取物),各8只。除A组外,所有大鼠按8.0 mL/kg容量灌胃0.5 mol/L冰盐酸,同时采用不规则喂养,以构建FD大鼠模型,A组大鼠灌胃等量生理盐水。所有大鼠造模第11天后分别给予相应药物;造模第21天后,取各组大鼠小肠、胃和血液,测定小肠推进率,采用酶联免疫吸附法测定血浆中胃动素(MTL)、胃泌素(GAS)、血管活性肠肽(VIP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平,采用苏木精-伊红染色法观察大鼠胃窦组织的病理变化。结果 与B组相比,C组、D₁组、D₂组、D₃组大鼠的小肠推进率和血浆GAS水平均显著升高,TNF- α 水平均显著降低,C组、D₃组大鼠的MTL水平均显著升高,C组、D₂组、D₃组大鼠的VIP水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$);B组大鼠部分黏膜层细胞空泡变性,未见明显脱落、炎性细胞浸润及坏死,其余各组大鼠胃组织整体结构正常。结论 隔山消提取物可通过降低FD模型大鼠血浆VIP和TNF- α 水平,升高MTL和GAS水平,从而促进胃肠道运动,改善胃肠道功能。

关键词:隔山消提取物;功能性消化不良;脑肠肽;胃肠功能;作用机制;大鼠

中图分类号:R932;R285.5;R256.3

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)13-0023-04

Effect Mechanism of the Extract of *Cynanchum Auriculatum Radix* on the Brain Intestinal Peptide and Gastrointestinal Function in Model Rats with Functional Dyspepsia

QIN Lan^{1,2}, YOU Jingrui^{1,2}, PAN Jie¹, SUN Jia³, LIU Chunhua¹, PENG Mei², LIN Changhu¹

(1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants·Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM <Ministry of Education>, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 3. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To investigate the effect mechanism of the extract of *Cynanchum auriculatum Radix* on brain intestinal peptide and gastrointestinal function in model rats with functional dyspepsia(FD). **Methods** A total of 48 male SD rats were randomly divided into the normal group(group A, normal saline), the model group(group B, 0.5 mol/L of glacial hydrochloric acid), the domperidone group(group C, 31.5 mg/kg of domperidone), and low-, medium- and high-dose of the extract of *Cynanchum auriculatum Radix* groups(groups D₁, D₂, D₃, 0.5, 1.0, 2.0 g/kg of the extract of *Cynanchum auriculatum Radix*), 8 rats in each group. Except for the rats in group A, other rats were given 0.5 mol/L glacial hydrochloric acid by gavage at a dose of 8.0 mL/kg, and given irregular diet to establish FD rat model. Rats in group A were given the same volume of normal saline by gavage. On the 11th day after modeling, all rats were given corresponding drugs. On the 21st day after modeling, the small intestine, stomach and blood of rats were taken from each group, the small intestine propulsion rate was measured, the levels of motilin(MTL), gastrin(GAS), vasoactive intestinal peptide(VIP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the pathological changes of gastric antrum tissue of rats were observed by hematoxylin-eosin(HE) staining. **Results** Compared with those in group B, the small intestinal propulsion rate and the levels of plasma GAS in groups C, D₁, D₂ and D₃ were significantly increased, while the level of TNF- α in groups C, D₁, D₂ and D₃ were significantly decreased, the levels of MTL in groups C and D₃ were significantly increased, and the levels of VIP in groups C, D₂ and D₃ were significantly decreased($P < 0.05$ or $P < 0.001$). In group B, some of the mucosa cells of rats were vacuolar degeneration, and no obvious shedding, inflammatory cell infiltration and necrosis were found. However, the overall structure

*基金项目:国家自然科学基金[81760700];贵州医科大学博士启动基金项目[校博合J字[2020]013号]。

第一作者:秦兰,女,在读硕士研究生,研究方向为药物质量控制与药物分析,(电子信箱)1459399883@qq.com。

△通信作者:林昌虎,男,大学本科,研究员,研究方向为中药资源可持续利用及物质基础,(电子信箱)linchh@126.com。

of stomach tissue of rats in other groups was normal. **Conclusion** The extract of *Cynanchum auriculatum Radix* can reduce the levels of serum VIP and $\text{TNF}-\alpha$ and increase the levels of MTL and GAS of FD model rats, which can promote gastrointestinal motility and improve gastrointestinal function.

Key words: extract of *Cynanchum auriculatum Radix*; functional dyspepsia; brain intestinal peptide; gastrointestinal function; mechanism of action; rats

隔山消又名飞来鹤、过山消、白首乌等,为萝藦科白前属植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥块根,主产于湖南、湖北、四川等地,为云南、贵州地区少数民族的常用药材,民间以块根入药,收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准(2003 年版)》^[1]。现代研究表明,隔山消中主要含有苯乙酮类、甾体苷类、有机酸类、香豆素类、木脂素类等多种化学成分,具有促进胃肠道运动、免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、保肝等作用,其中所含 C_{21} 甾体皂苷和苯乙酮类是抗肿瘤与抗免疫的主要活性成分,但对其他成分的研究报道较少^[2-3]。前期研究发现,隔山消提取物的化学成分主要含有白首乌二苯酮、青阳参苷元、去酰基萝藦苷元、告达亭、东莨菪内酯、阿魏酸、丁香酸等。功能性消化不良(FD)是由胃和十二指肠功能紊乱引起的常见功能性胃肠道疾病,不能用器质性、代谢性疾病来解释,具有上腹痛、餐后饱胀不适、早饱感等一项或多项症状的临床综合征。罗马Ⅲ标准将 FD 分为餐后不适综合征和上腹痛综合征,且经胃镜、上胃肠钡餐造影、腹部 B 超检查均无异常^[4]。FD 在全球的发病率为 19%~41%,国内为 18%~45%,消化门诊就诊率为 20%~40%^[5]。传统医学认为,FD 属痞证、腹满、纳呆等范畴,《功能性消化不良中医诊疗专家共识意见(2017)》中提出,FD 的病因病机多为感受外邪、饮食失调、情绪障碍、过度疲劳、先天禀赋不足等,致脾虚气滞、胃失和降^[6]。研究发现,FD 患者普遍存在脑肠肽分泌异常和胃肠道黏膜炎症^[7],其发病与脑-肠轴的功能失调紧密相关,脑肠肽作为脑和胃肠道中双重分布的肽类,主要包括胃动素(MLT)、胃泌素(GAS)、血管活性肠肽(VIP)等^[8],对胃肠功能的调节极为关键。本研究中探讨了隔山消提取物对中医脾虚气滞模型大鼠脑肠肽及胃肠功能的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器: Allegra X30 型离心机(美国贝克曼库尔特有限公司); Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); IMS-20 型全自动雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司); UV-2401PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津仪器公司); AE240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,精度为十万分之一); Nikon Eclipse Cl 型

正置光学显微镜, Nikon DS-U3 型成像系统,均购自日本尼康公司。

试药: 隔山消药材产地为贵州凯里,经贵州医科大学药学院生药学教研室刘春花副教授鉴定为萝藦科植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥块根; 盐酸(国药集团化学试剂有限公司,批号为 20180628); 多潘立酮(西安杨森制药有限公司,批号为 90301693); 苏木精-伊红染液(HE,武汉市皮诺飞生物科技有限公司,批号为 P10011); 血浆 MTL 试剂盒, GAS 试剂盒, VIP 试剂盒, 肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF}-\alpha$)试剂盒,批号均为 20191220,均购于上海酶联生物科技有限公司。

动物: 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 220~240g, 由长沙市天勤生物技术有限公司提供, 生产许可证号为 SCXK(湘) 2014-0011。均适应性饲养 1 周, 饲养于温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 45%~60% 的动物房内。试验方案均通过贵州医科大学动物伦理委员会批准。

1.2 实验方法

药物制备: 取干燥隔山消块根, 粉碎成粗粉, 用 70% 乙醇回流提取 3 次, 第 1 次 8 倍量(m/V) 70% 乙醇回流提取 1.5 h, 第 2 次、第 3 次 6 倍量(m/V) 70% 乙醇回流提取 1.0 h, 过滤, 合并滤液, 减压, 浓缩得稠膏, 将稠膏加水溶解成每 1 mL 含 1 g 生药的溶液, 加热溶解, 静置过夜, 取上清液浓缩, 过 D-101 大孔吸附树脂柱, 依次用 3 倍柱体积水、60% 乙醇洗脱, 收集 60% 乙醇洗脱液, 减压, 浓缩得稠膏^[9]。

分组、建模及给药: 将 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为正常组(A 组), 模型组(B 组, 0.5 mol/L 冰盐酸), 多潘立酮组(C 组), 隔山消提取物低、中、高剂量组(D_1 组、 D_2 组、 D_3 组), 各 8 只。除 A 组外, 其余大鼠均不规则喂养(隔 1 d 不定时提供食物), 同时按 8 mL/kg 的容量灌胃 0.5 mol/L 冰盐酸 21 d, 1 d 1 次, 以诱发脾胃虚寒型 FD 大鼠模型, A 组大鼠仅灌胃等量生理盐水。造模第 11 天后, D_1 组、 D_2 组、 D_3 组大鼠分别灌胃 0.5, 1.0, 2.0 g/kg 隔山消提取物, C 组大鼠灌胃 31.5 mg/kg 多潘立酮, A 组和 B 组大鼠均灌胃 10 mL/kg 生理盐水, 所有大鼠均给药 10 d, 1 d 1 次; 造模第 21 天后, 禁食不禁饮 24 h, 口服灌胃 2 mL 10% 阿拉伯树胶 + 5% 活性炭, 30 min 后股动脉取血, 解剖, 取出胃及小肠。

小肠推进率测定:将小肠置含有少量生理盐水的培养皿上,用镊子分离肠系膜,铺展于少量生理盐水润湿的玻璃板上,用直尺测量小肠总长度(L ,幽门前端至回盲部)及从幽门前端到碳墨最前端的距离(S ,即碳墨推进距离),按公式计算小肠推进率。

$$\text{小肠推进率}(\%) = L/S \times 100\%^{[10]}$$

大鼠胃窦部组织病理变化观察:采用 HE 染色法,取大鼠胃窦部(距幽门上端 0.5 cm)组织,用 4% 多聚甲醛固定,逐级脱水,包埋,切片,染色,封片,在 200 倍显微镜下观察胃窦组织的病理变化。

血浆 MTL, GAS, VIP, TNF- α 水平测定:造模成功后,股动脉取血,置肝素化的离心管中,离心(3 000 r/min) 30 min,取上层澄清液体,储存于 -20 °C 冰箱中待用,临用前取出,采用酶联免疫吸附法,按试剂盒说明书操作,用酶标仪于 450 nm 波长处检测,读取各样品的吸光度值(A),测定血浆中 MTL, GAS, VIP, TNF- α 水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,组间比较行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小肠推进率

与 A 组比较, B 组大鼠的小肠推进率显著降低($P < 0.05$);与 B 组比较, C 组、D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组大鼠的小肠推进率均显著升高($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.2 血浆中 MTL, GAS, VIP, TNF- α 水平

与 A 组比较, B 组大鼠血浆 MTL 和 GAS 水平均显著降低, VIP 和 TNF- α 水平均显著升高($P < 0.001$);与 B 组比较, C 组、D₃ 组大鼠血浆 MTL 水平均显著升高($P < 0.01$), C 组、D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组大鼠 GAS 水平均显著升高, TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), C 组、D₂ 组、D₃ 组大鼠 VIP 水平均显著降低($P < 0.01$);且 D₃ 组与 C 组药效相当。结果见表 2。

2.3 大鼠胃窦部组织病理变化

A 组大鼠胃窦部组织未见明显变化; B 组大鼠整体

表 1 隔山消提取物对各组大鼠小肠推进率的影响($\bar{X} \pm s, \%, n=8$)

Tab.1 Effect of the extract of *Cynanchum auriculatum Radix* on the small intestine propulsion rate of rats in each group($\bar{X} \pm s, \%, n=8$)

组别	小肠全长(cm)	推进长度(cm)	推进率(%)
A 组	104.83 ± 13.14	92.33 ± 5.61	79.92 ± 2.82
B 组	113.00 ± 10.35	72.00 ± 14.90	63.85 ± 12.22*
C 组	110.83 ± 7.99	81.83 ± 7.36	73.80 ± 3.49#
D ₁ 组	99.33 ± 10.54	76.67 ± 7.69	77.30 ± 3.45#
D ₂ 组	112.50 ± 2.07	77.83 ± 12.89	79.16 ± 7.08#
D ₃ 组	110.33 ± 7.58	73.67 ± 9.33	79.34 ± 9.23#

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in group A, * $P < 0.05$; compared with those in group B, # $P < 0.05$.

表 2 隔山消提取物对各组大鼠胃肠激素及炎症因子的影响($\bar{X} \pm s, \text{pg/mL}, n=8$)

Tab.2 Effect of the extract of *Cynanchum auriculatum Radix* on gastrointestinal hormones and inflammatory factors of rats in each group($\bar{X} \pm s, \text{pg/mL}, n=8$)

组别	MTL	GAS	VIP	TNF- α
A 组	392.00 ± 24.16	281.95 ± 20.46	148.88 ± 22.15	46.85 ± 16.96
B 组	278.40 ± 31.48**	119.34 ± 29.69**	228.21 ± 15.57**	191.88 ± 22.91**
C 组	368.85 ± 31.25##	226.86 ± 24.34##	153.66 ± 15.41##	75.34 ± 30.18##
D ₁ 组	289.40 ± 37.63	176.78 ± 33.52#	210.37 ± 16.03	138.01 ± 19.44##
D ₂ 组	305.90 ± 39.91	206.89 ± 39.35##	193.34 ± 18.90##	106.64 ± 12.19##
D ₃ 组	345.00 ± 33.92##	233.24 ± 42.21##	171.32 ± 13.04##	79.16 ± 14.34##

注:与 A 组比较, ** $P < 0.01$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those in group A, ** $P < 0.01$; compared with those in group B, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

轻度异常,部分黏膜层细胞空泡变性,黏膜上皮细胞无明显脱落,黏膜层未见明显炎性细胞浸润及坏死,基本排除器质性损伤,符合 FD 病变特征,说明建模成功。其余各组大鼠胃组织结构整体正常,黏膜上皮细胞无明显脱落,黏膜层未见明显炎性细胞浸润及坏死。详见图 1。

3 讨论

FD 模型有动力障碍型,如吗啡、抗肿瘤药物抑制胃肠蠕动;另一种常见模型为内脏高敏型,常采用碘乙酰胺造模法、胃酸刺激法、夹鼠尾法及复合因素造模法(不

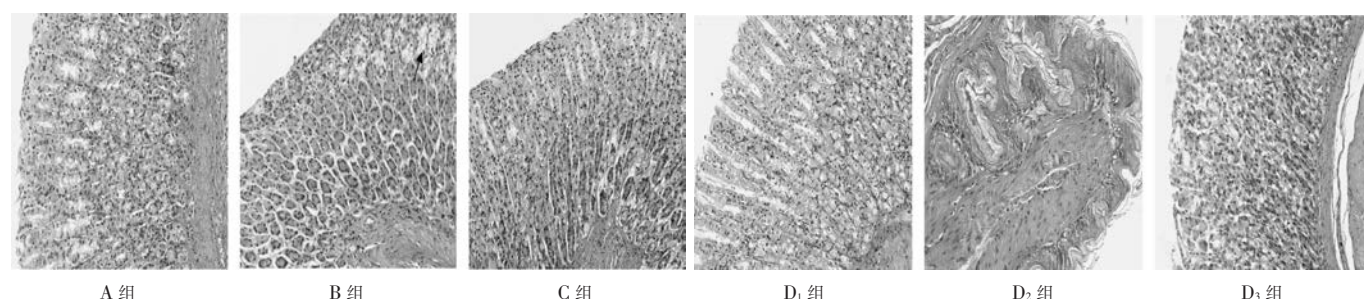


图 1 大鼠胃窦部组织病理切片图(HE 染色, ×200)

Fig.1 The pathological section of the tissue of gastric antrum of the rats(HE staining, ×200)

规则喂养、夹尾刺激、光刺激等)^[11]。研究表明,FD 的发病与内脏敏感性增高有关^[12]。本研究前期试验时,采用了致内脏高敏的造模方式,如夹鼠尾刺激法和复合因素造模法,结果在单纯采用外部刺激的方式下,大鼠个体差异及对环境刺激改变的耐受性差异较大,导致结果重复性差。故本研究中采用口服灌胃冰稀盐酸加不规律喂养法造模,盐酸可以进入胃黏膜下层,刺激胃肠平滑肌收缩,延缓胃内压恢复,减慢胃排空,刺激胃液分泌,致胃寒胀满^[13]。李杲《兰室秘藏·中满腹胀门》提出:“多食寒凉之人,胃中寒则胀满,或脏寒生满病。”不规则喂养可致饮食失律,日久则脾胃虚弱,气机不畅,符合中医脾胃虚弱证型。通过观察大鼠造模成功后的状态,模型大鼠出现倦卧少动、扎堆、拱背、反应迟钝,捉拿时反抗无力,饮水、饮食量逐渐减少,体质量呈下降趋势,皮毛粗糙、稀疏,便溏等现象。有研究表明,该方法导致的内脏敏感性增加受神经及脑肠肽共同调控,一方面通过酸刺激迷走神经通路,产生抑制性胃肠反射;另一方面氢离子可激活十二指肠传入通道的酸感受器受体释放一氧化氮^[14]。一氧化氮是非肾上腺能神经和非胆碱能神经递质,介导胃容受性舒张的反射活动,并具有抗乙酰胆碱对胃的收缩作用,影响胃的舒张、蠕动和排空。可见,该造模方法更贴合现代人群 FD 的发病机制,且操作简单,造模重复性好,存活率较高。

研究发现,FD 患者普遍存在脑肠肽分泌异常和胃肠道黏膜炎症,胃肠动力障碍疾病与胃肠道的免疫细胞浸润有关,免疫细胞释放炎性介质可能介导了胃肠动力的改变^[15]。TNF- α 是一种诱导细胞化学趋势表达的机体炎性因子,主要与肿瘤相关的巨噬细胞分泌,在肿瘤炎性微环境中发挥启动慢性炎症的作用,对于促进炎性细胞在病变部位聚集和释放中起重要作用,而 FD 患者血清中炎性因子水平显著高于正常人群^[16]。MTL 是一个由 22 个氨基酸所组成的多肽,可使胃体、胃窦收缩,幽门松弛,在消化间期对胃排空起促进作用。GAS 属胃分泌的一种胃肠激素,有刺激胃壁细胞分泌胃蛋白酶原、促进胰液和胆汁分泌的作用。如果 GAS 分泌不足,会引起消化功能方面的问题,导致胃肠道功能紊乱,引起慢性胃炎、消化不良。VIP 是一种神经肽,主要来自肠道神经元,可抑制下食管括约肌、胃、胆囊、小肠环形肌和血管平滑肌收缩,其分泌增加会抑制胃肠道运动。研究表明,胃肠道功能障碍小鼠体内胃肠激素 MTL 和 GAS 的水平会降低,而 VIP 水平会升高^[9]。

综上所述,隔山消提取物改善 FD 的作用机制除可能与升高 MTL 和 GAS 水平,降低 VIP 和 TNF- α 水平有关外,还可能影响了十二指肠的化学敏感性传入通

路,减弱了因酸刺激对周围或脊髓水平的致敏而引起胃的牵张敏感性增强。

参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准 (2003 年版)[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:384.
- [2] 李 艳,黎开燕. 隔山消的药理作用研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2015,24(2):213-215.
- [3] 陈 艳,徐必学,曹佩雪,等. 隔山消化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(11):1522-1524.
- [4] 罗马委员会. 功能性胃肠病罗马 III 诊断标准[J]. 胃肠病学,2006,11(12):761-765.
- [5] OHARA S, KAWANO T, KUSANO M, et al. Survey on the prevalence of GERD and FD based on the Montreal definition and the Rome III criteria among patients presenting with epigastric symptoms in Japan[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(5):603-611.
- [6] 中华中医药学会脾胃病分会,张声生. 功能性消化不良中医诊疗专家共识意见(2017 年)[J]. 中华中医药杂志,2017, 32(6):2595-2598.
- [7] 毛兰芳,汪龙德,张宏伟,等. 功能性消化不良与脑肠肽的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2015,23(4):570-576.
- [8] FANG JL, WANG DH, ZHAO Q, et al. Brain-Gut Axis Modulation of Acupuncture in Functional Dyspepsia: A Preliminary Resting-State fMRI Study[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015:1-11.
- [9] 刘 亭,杨淑婷,黎 娜,等. 隔山消水溶性部位对阿托品抑制小鼠胃肠功能的影响[J]. 贵州医科大学学报,2018, 43(11):1252-1255.
- [10] 杨少军,王晓敏,刘建鸿. 胃安胶囊对功能性消化不良大鼠胃排空及胃动素、胃泌素的影响[J]. 时珍国医国药,2012, 23(9):2156-2157.
- [11] 范明明,张嘉裕,张湘龙,等. 功能性消化不良造模方法的述评[J]. 世界中医药,2020,15(7):1080-1083.
- [12] 李培彩,张声生,吴震宇,等. 枳实总黄酮对功能性消化不良模型大鼠内脏敏感性的影响[J]. 北京中医药大学学报,2016,39(12):1027-1032.
- [13] HOLZER P, PAINSIPP E, JOCIC M, et al. Acid challenge delays gastric pressure adaptation, blocks gastric emptying and stimulates gastric fluid secretion in the rat[J]. Neurogastroenterol Motil, 2003, 15(1):45-55.
- [14] AKIBA Y, KAUNITZ JD. Luminal chemosensing and upper gastrointestinal mucosal defenses[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 90(3): 826S-831S.
- [15] BERCIK P, VERDU EF, COLLINS SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? [J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2005, 34(2):235-245.
- [16] 刘 馥,孙 毅,曾 妍. 功能性消化不良患者血清白介素-6 的水平与其焦虑评分、抑郁评分的相关性[J]. 当代医药论丛, 2018, 16(13):11-13.

(收稿日期:2020-09-08;修回日期:2020-11-09)