

枇杷花黄酮提取液缓解小鼠肠道运动障碍的作用

姜帆^{1,2}, 高慧颖³, 郭小玲⁴, 陈亮^{5*}, 郑少泉^{1,2*}

(1. 福建省龙眼枇杷育种工程技术研究中心 福建 福州 350013; 2. 福建省农业科学院果树研究所 福建 福州 350013; 3. 福建省农业科学院农业工程技术研究所 福建 福州 350003; 4. 厦门大学环境生态学院, 福建 厦门 361102; 5. 厦门大学生命科学学院, 厦门市植物遗传重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 植物源功效成分具有多种生物活性且副作用小, 日益成为缓解肠道运动障碍研究的热点。以枇杷花黄酮提取液为受试物, 采用复方地芬诺酯建立小鼠便秘模型, 通过小鼠小肠推进实验和排便实验, 评估小鼠的首次排便时间、5 h 内排便粒数、排便量、小肠墨汁推进率以及对小鼠结肠突触素 (SY) 的影响。结果显示: 枇杷花黄酮提取液不影响试验小鼠体重正常发育。与模型组相比, 枇杷花黄酮提取液能显著缩短小鼠排便时间 ($P<0.05$), 增加排便粒数 ($P<0.05$) 和排便重量 ($P<0.05$), 提高小肠墨汁推进率 ($P<0.05$, $P<0.01$), 并提高小鼠结肠 SY 含量 ($P<0.05$)。上述结果表明枇杷花黄酮提取液可以有效缓解小鼠肠道运动障碍, 为后续枇杷花的功能化开发利用提供参考。

关键词: 枇杷花; 黄酮提取液; 肠道运动障碍; 小鼠突触素

中图分类号: S 38 **文献标志码:** A

慢性功能性肠道障碍主要是以大便排出困难、排便不适感及排便时间延长为主要症状, 其病因不明、无特征性病理改变, 治疗较困难, 经常引起肠道微生态失衡, 增加诱发肠癌的概率^[1]。目前的治疗以泻药为主, 但副作用明显, 长期服用甚至出现依赖性^[3]及顽固性便秘^[3]。植物源食物含有丰富的生物活性物质, 能有效抵抗高血压、肠胃疾病、癌症等多种疾病的发生, 促使机体保持良好的代谢状态, 已成为园艺学、食品营养学和医学等学科交叉的新领域, 逐步形成园艺学发展新的学科增长点^[2]。近年来低聚木糖^[4]、膳食纤维^[5-7]、低聚麦芽糖^[8]、阿拉伯糖^[9]等生物活性物质越来越多的应用于改善功能性便秘研究, 但是黄酮的润便通肠作用还未见报道。

枇杷是起源于我国的亚热带特色果树, 其花作为传统中草药, 味淡、性平, 入肺经, 具

收稿日期: 2018-05-02 **录用日期:** 2019-03-23

基金项目: 福建省农业科学院青年英才计划 (C2017-04); 农业部物种品种资源保护 (热带作物) 项目 (151721301354051701); 国家农作物种质资源共享服务平台 (NICGR2018-054)

***通信作者:** chenlg@xmu.edu.cn (陈亮); zsq333555@163.com (郑少泉)

有润五脏利肺气之功效^[10]。已有的研究表明, 枇杷花含有丰富的黄酮、三萜类物质等多种功效成分^[11-12], 在抗氧化、抑菌、消炎等方面具有显著功效^[10,13,16-17], 本研究以枇杷花黄酮为功能因子, 分析其促进肠蠕动、改善排便功能, 以期为枇杷花的功能化开发提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

昆明种小鼠, 清洁级, 雄性, 体重 18~22 g。购自上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(沪)2012-0002, 常规饲养。

复方地芬诺酯片: 长春长江制药有限公司, 国药准字 H22022037, 批号 20130901。

小鼠突触素 (SY) ELISA 试剂盒, 购买于北京安迪华泰生物科技有限公司 (批号 20170209)。

试验用枇杷为枇杷属普通枇杷种 (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl), 品种为白肉枇杷新品种“贵妃”, 样品来源于国家果树种质福州龙眼枇杷圃 (编号 GPPP0260)。盛花期采集无病虫害、发育正常花序, 70 °C 烘干至恒重, 粉碎后密封保存备用。

1.2 方法

1.2.1 枇杷花黄酮提取液的制备

枇杷花黄酮的提取制备参考文献^[14], 枇杷花经干燥、粉碎后, 采用 70%乙醇提取 3 次, 提取液合并后减压真空浓缩至 1 mL/g (干枇杷花) 备用, 分光光度计法测定总黄酮含量为 1.03%。

1.2.2 复方地芬诺酯便秘模型组小鼠造模

选用成年雄性小鼠, 共设 5 个组别, 其中 3 个剂量组, 一个阴性对照组和一个模型组。每组 12 只, 给受试样品 15 d 后, 各组小鼠禁食不禁水 16 h。模型对照组和 3 个剂量组灌胃给予复方地芬诺酯 5 mg/kg^[18] (按小鼠体重, 下同), 阴性对照组给蒸馏水。

1.2.3 排便功能试验

以人体推荐量的 10 倍为中剂量组, 另设低、高两个剂量组, 即以枇杷花黄酮含量为指标设置低剂量组 (100 mg/kg 体重)、中剂量组 (200 mg/kg)、高剂量组 (400 mg/kg), 提取浓缩的枇杷花黄酮提取液用蒸馏水稀释后按分组剂量给药。阴性对照组和模型组以同样方式给蒸馏水。受试样品给予时间 15 d。

给复方地芬诺酯后 0.5 h 后, 各剂量组分别给予含相应受试样品的墨汁 (含 5% 的活性炭粉、10% 阿拉伯树胶), 阴性对照组和模型组给墨汁灌胃。动物均单笼饲养, 正常饮水进

食。从灌墨汁开始，记录每只动物首粒排黑便时间、5 h 内排便粒数和排便重。

1.2.4 小肠推进试验

给复方地芬诺酯后 0.5 h 后，各剂量组分别给予含相应受试样品的墨汁（含 5% 的活性炭粉、10% 阿拉伯树胶），阴性和模型对照组给墨汁灌胃。参考金鑫等^[19]测量小肠总长度和墨汁推进长度，计算墨汁推进率：

$$\text{墨汁推进率} = \text{墨汁推进长度} / \text{小肠总长度} \times 100\%$$

上述任何一项指标显阳性，可判定该受试物具有润肠通便的功能^[14]。

1.2.5 小鼠结肠小鼠突触素（SY）含量测定

小肠推进试验结束后另分离大肠，参考金鑫等^[19]测定小鼠突触素（SY）含量。

1.2.6 数据统计分析

使用 DPS 7.05 软件进行数据统计分析。计算平均值、标准偏差，进行 Duncan 新复极差法进行差异显著性分析，比较组间差异。

2 结果与分析

2.1 枇杷花黄酮对试验小鼠体重的影响

灌胃给予枇杷花黄酮提取液及对照药物后，各试验组小鼠体重变化见表 1。分析表明各组小鼠的初始体重分别与阴性对照组比较，均无显著性差异($P > 0.05$)，说明试验前的小鼠分组结果随机均衡。经灌胃处理 15 d 后，各组的小鼠体质量与阴性对照组比较，差异也不显著($P > 0.05$)，说明各受试物不影响小鼠体重的正常增加，这与枇杷花水提取物试验结果一致^[15]。

表1 试验前、后小鼠体重的比较($n=12$)

Tab. 1 Mouse body weights development of the bowel movement experiment ($n=12$)

组别	试验前体重/g	试验后体重/g
对照组	21.73±1.06	36.23±4.04
模型组	21.17±1.17	35.26±2.61
低剂量组	21.40±0.90	35.23±2.60
中剂量组	21.28±0.81	34.52±2.65
高剂量组	20.97±1.04	33.38±4.22

2.2 枇杷花黄酮对模型组小鼠排便的影响

由表 2 可知，与阴性对照组相比，模型组小鼠排便时间延长 72.79% ($P < 0.05$)，5 h 内

的粪便粒数和粪便重量分别减少 13.67% ($P<0.01$)、30.56% ($P<0.05$), 表明便秘模型构建成功。与模型组相比, 枇杷花黄酮的低、中、高剂量组均能够不同程度地缩短给予复方地芬诺酯小鼠的排便时间, 增加 5 h 小鼠排出的粪便粒数和重量。分析表明中、高剂量组枇杷花黄酮显著缩短模型组小鼠排便时间 ($P<0.05$), 高剂量组枇杷花黄酮显著增加排便量 ($P<0.05$), 低、中、高剂量组枇杷花黄酮均能显著增加排数量 ($P<0.05$)。结果表明, 枇杷花黄酮对便秘小鼠具有很好的润肠通便作用。

表2 复方地芬诺酯便秘模型小鼠的排便试验结果($n=12$)

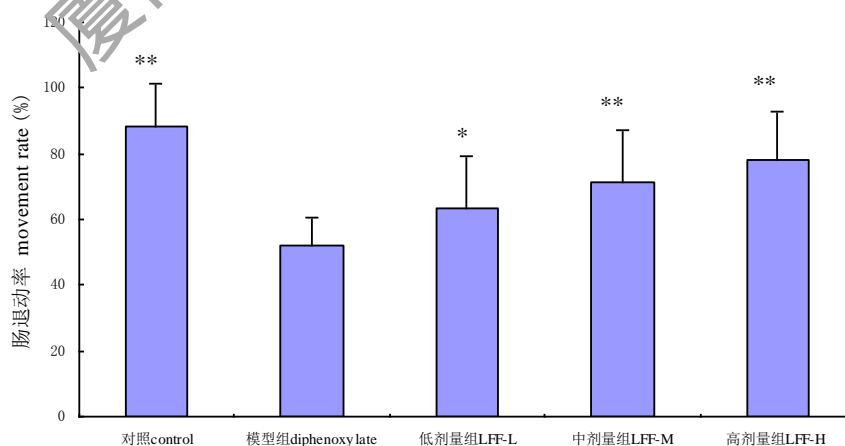
Tab. 2 Results of defecation experiments in mouse models of diphenoxylate-induced constipation ($n=12$)

组别	首便时间/min	5 h 排便量/g	5 h 排便数量/粒
对照组	61.88±27.26 *	0.36±0.11 **	30.0±8.2 *
模型组	106.92±58.22	0.25±0.18	25.9±8.8
低剂量组	78.50±57.57	0.29±0.07	33.5±8.8 *
中剂量组	68.42±35.29 *	0.32±0.12	33.8±7.8 *
高剂量组	60.75±26.16 *	0.35±0.07 *	33.3±7.3*

注: 与模型组比较, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

2.3 枇杷花黄酮对模型组小鼠的小肠推进效果

由图 1 可知, 不同剂量枇杷花黄酮均可以提高模型组小鼠的小肠推进率。模型对照组小鼠给予复方地芬诺酯后, 墨汁推进率为 52.26%, 与空白对照组相比, 具有显著性差异 ($P<0.01$), 表明小鼠便秘模型构建成功。枇杷花黄酮低、中、高剂量组的墨汁推进率分别为 63.47%、71.62%、78.08%, 与同期模型组相比, 具有显著性差异 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明, 枇杷花黄酮具有良好的推进肠蠕动作用。



与模型组比较*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, 下同。

图 1 枇杷花黄酮对小鼠小肠蠕动的试验结果

Fig. 1 Results of bowel movement experiment in mouse models of diphenoxylate- induced constipation

2.4 枇杷花黄酮对模型组小鼠的结肠 SY 的影响

Ellisa 试剂盒测试结果显示, SY 含量在合适浓度范围内与吸光度具有良好的线性关系, SY 含量在 15~180 pg/mL 之间回归方程为 $y=27.322x+0.4172$ ($R^2=0.9969$)。从测试结果 (图 2) 看, 模型组小鼠结肠 SY 含量比对照空白组降低 25.78%, 具有极显著差异 ($P<0.01$), 表明便秘模型制备成功。与模型组相比, 枇杷花黄酮低、中、高剂量组小鼠结肠中 SY 含量分别提高 14.26%、18.77%、23.72%, 其中中、高剂量组与模型组差异显著 ($P<0.05$)。

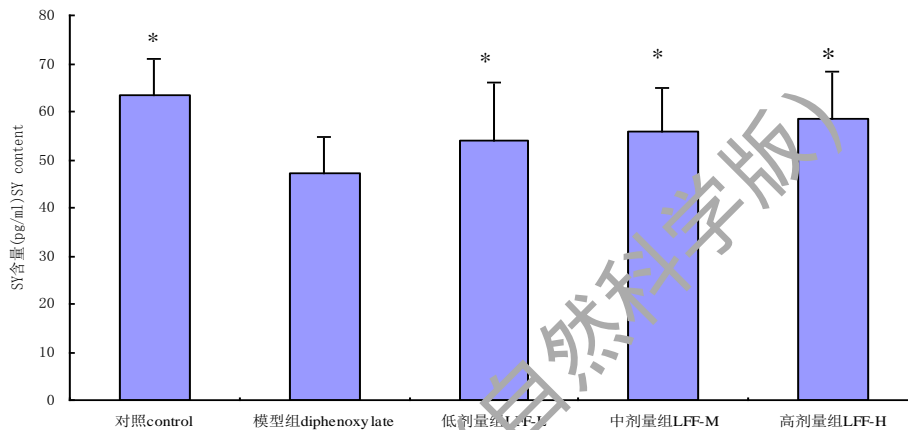


图 2 复方地芬诺酯模型小鼠结肠 SY 含量变化的试验结果

Fig. 2 Results of colonic SY experiment in mouse models of diphenoxylate- induced constipation

3 讨论

植物类黄酮属于实际无毒级^[20], 具有降压、活血化瘀、止咳、祛痰、抗氧化等多种功效^[21], 开发利用前景广阔。枇杷花作为传统民间用药, 显著缓解消炎止咳等症状。贵妃枇杷花茶水提取物具有显著的干预急性炎症的作用, 还能明显促进模型小鼠小肠运动能力^[13]。枇杷花 95% 乙醇提取物和混合提取物具有明显止咳作用, 50% 乙醇提取物和水提取物具有一定止咳效果, 75% 乙醇提取物无明显止咳效果^[16]。本研究以黄酮为目标因子, 通过小鼠排便、肠推动等证实枇杷花黄酮提取液是缓解肠道运动障碍的主要功效成分之一, 而且对试验小鼠体重正常发育无影响。

社会经济快速发展中, 人们生活水平和饮食习惯发生较大改变, 便秘等肠道运动障碍因严重影响现代人生活质量而越来越受到重视^[18]。近年来探索预防和治疗便秘的活性成分以膳食纤维等多糖类物质居多。与膳食纤维等活性成分相比, 枇杷花黄酮有效剂量相对较小。本研究表明枇杷花黄酮改善便秘有效剂量为 200 mg/kg, 明显低于低聚麦芽糖 400 mg/kg^[5]、

山楂膳食纤维 500 mg/kg^[8]、阿拉伯糖 1.5 g/kg^[9]等功效成分有效剂量。

小鼠突触素(SY)是一种特异性蛋白质,在神经传导中有重要的连通细胞骨架作用^[22-23]。SY 抗体能选择性标记结肠肠壁肌层的神经肌肉接头和肌间神经丛的突触,是评价结肠动力功能单元的一个重要指标。本研究发现枇杷花黄酮提取液可以提高试验小鼠结肠中 SY 含量 14.26%-23.72%,与模型组差异显著($P<0.05$),这与提高小肠蠕动率和促进排便等作用一致,表明枇杷花黄酮可能是通过激活 SY 达到肠管收缩和蠕动增强从而改善便秘的效果。研究显示由于肠神经系统(enteric nervous system, ENS)主要由胃肠道壁内微小神经节内所含有的各类神经元和节间索组成,是一个结构和功能独特的系统^[24]。而 SY 作为特殊蛋白质是如何参与调解 ENS 中 SP、VIP、ET、ACh 等众多神经递质^[25-26]还需要进一步研究,以探讨枇杷花黄酮缓解便秘的机制。

参考文献:

- [1] 方玉,刘刚,张晓喻,等.青刺尖茶汤对便秘模型小鼠润肠通便的效果[J].食品科学,2014,35(11):265-268.
- [2] 张上隆,陈昆松.果实品质形成与调控的分子生理[M].北京:中国农业出版社,2007:208.
- [3] 周峰,张旗.慢性功能性便秘的治疗进展[J].光明中医,2010,25(7):1310-1311.
- [4] 李解,陈雪皎,郭承义,等.雅安藏茶和低聚木糖复配物润肠通便作用[J].食品科学,2015,36(1):220-224.
- [5] 陈洪雨,马蕾,杨建乔,等.山楂膳食纤维改善功能性便秘及预防铅中毒作用[J].食品科学,2013,34(15):232-235.
- [6] 杨光,董立军,周茜,等.膳食纤维强化冻干山楂果对小鼠润肠通便作用研究[J].食品研究与开发,2016,37(5):8-10,105.
- [7] 程明明,黄苇.西番莲果皮中湿法改性膳食纤维的降脂保肝及润肠通便功能研究[J].食品科学,2016(11):202-207.
- [8] 周慧,易翠平.大米低聚异麦芽糖的润肠通便研究[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2014,29(6):28-32.
- [9] 杨子明,董仲玺,吴建璋,等.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.
- [10] 姜帆,高慧颖,郑少泉.枇杷花茶抗氧化作用及其食品卫生指标检测[J].福建农业学报,2015,30(2):146-149.
- [11] 姜帆,周丹蓉,高慧颖,等.枇杷种质花中黄酮含量分析与评价[J].植物遗传资源学报,2016,17(6):1031-1035.
- [12] 姜帆,高慧颖,陈秀萍,等.枇杷花中三萜类物质的分析与评价[J].热带亚热带植物学报,2016,24(2):233-240.
- [13] 姜帆,高慧颖,郑少泉.枇杷花茶水提取物消炎与促进小肠运动作用的研究[J].福建农业学报,2016,31(7):743-746.
- [14] 金宗濂.功能食品教程[M].北京:中国轻工业出版社,2003:173.
- [15] 姜帆,邓朝军,陈秀萍,等.贵妃枇杷花茶成分分析及安全性初步评估[J].东南园艺,2016(4):5-7.

- [16] 王静波, 杨必坤, 张宏, 等. 枇杷花提取物止咳作用研究[J]. 中草药, 2009,40(7): 1106-1109.
- [17] ZHOU C H, SUN C D, CHEN K S, et al. Flavonoids, Phenolics, and antioxidant capacity in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. [J]. Int J Mol Sci, 2011,12(5):2935-2945.
- [18] 周晓丹, 刘爱萍, 张明, 等. 副干酪乳杆菌LC-01对便秘小鼠的通便作用[J]. 乳业科学与技术, 2012,35(5):7-11.
- [19] 金鑫, 高擎, 葛亚中. 一种中草药组方保健食品润肠通便功能的研究[J]. 现代食品科技, 2016,32(1):77-81,76.
- [20] 童文, 杨晓, 胡尚钦, 等. 变异白色红花总黄酮提取物安全性毒理学评价[J]. 天然产物研究与开发, 2016,28(2):202-209.
- [21] 周新, 李宏杰. 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展[J]. 中国新药杂志, 2007,16(5):350-355.
- [22] GOUIN S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends[J]. Trends in Food Sci & Tech, 2004,15(7):330-347.
- [23] 孔利霞, 宋建亭, 赵士彭. 突触素在慢传输型便秘患者结肠壁的表达[J]. 现代中西医结合杂志, 2014,23(16):1726-1729.
- [24] SJOLUND K, FASTH S, EKMAN R, et al. Neuropeptides in idiopathic chronic constipation (slow transit constipation)[J]. Neurogastroent Motil, 1997,9:143-150.
- [25] 丁义江, 哈楠林, 丁曙晴, 等. 结肠慢传输型便秘与突触素和P物质及血管活性肠肽的临床研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2004,7(6):485-487.
- [26] 王岚, 彭成, 郭力. 附子大黄配伍对阳虚便秘动物的治疗作用及其机制研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006,14(2):82-85.

Effect of *Eriobotrya japonica* (Lindl.) flower flavonides extract on intestinal motility disorders in rats

JIANG Fan^{1,2}, GAO Huiying³, GUO Xiaoling⁴, CHEN Liang^{5*}, ZHENG Shaoquan^{1,2*}

(1. Fujian Fruit Breeding Engineering Technology Research Center for Longan & Loquat, Fuzhou 350013, China; 2. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China; 3. Institute of agricultural engineering technology, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350003, China; 4. College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 5. Xiamen Key Laboratory for Plant Genetics, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Active ingredients from fruit and vegetable had become the focus of research to alleviate constipation, based on a variety of biological activity and few side effects. In this study, loquat flower flavonides (LFF) extract was studied in improving intestinal motility disorders. A

mouse model of constipation induced using diphenoxylate was used in small intestinal motility and bowel evacuation experiments. Measurements included the first evacuation time, the number of fecal pellets in 5 h, the weight of evacuation, the movement rate of ink in the small intestine, and the effect of the herbal compound on colonic substance synaptophysin (SY). The results showed that there was no effect on mouse body development by LFF intragastrical administration. Compared with the control group, the groups treated with the LFF exhibited a shortened evacuation time ($P<0.05$), an increased number of fecal pellets ($P<0.05$), an increased weight of feces in five hours ($P<0.05$), an increased movement rate of ink ($P<0.05$, $P<0.01$), and an increased SY level ($P<0.05$). Therefore, the results demonstrate that the LFF can improve intestinal motility disorders in mice.

Keywords: loquat flower; flavonoid extract; intestinal motility disorders; substance synaptophysin

廈門大學學報(自然科學版)