

• 肠道微生物专栏 •

基于伪无菌实验研究芪地通便方对慢传输型
便秘小鼠肠道菌群的影响*王佳丽¹ 石磊¹ 李军祥¹ 毛堂友² 姜慧¹ 张阳¹ 张黎明¹ 陈润花¹

【摘要】 目的:探索芪地通便方是否通过肠道菌群起到治疗慢传输型便秘(slow transit constipation,STC)的作用,并研究芪地通便方对 STC 小鼠肠道菌群的影响。方法:实验 1 将 25 只 BALB/c 小鼠分为 5 组,除空白组外盐酸洛哌丁胺(10 mg/kg)灌胃 14 d 造模,第 15~28 天,抗生素组予抗生素混合液自由饮,中药组予芪地通便方(18.906 g/kg)灌胃,中药+抗生素组予芪地通便方灌胃+抗生素混合液自由饮用。通过小鼠一般情况、体重、粪便含水率与数量、小肠推进率、结肠组织学和粪便 DNA 含量情况评价芪地通便方的疗效以及是否通过肠道菌群发挥作用。实验 2 将 20 只 BALB/c 小鼠分为 4 组,除空白组外盐酸洛哌丁胺(10 mg/kg)灌胃 14 d 造模,随后予芪地通便方(18.906 g/kg)和阳性药物乳果糖(3 mg/kg)灌胃干预 14 d。通过 16S rDNA 基因测序探究小鼠肠道菌群的变化。结果:实验 1 发现抗生素组粪便 DNA 含量明显降低($P<0.05$),证实本研究采用的抗生素混合液方法可有效消耗肠道菌群,成功建立肠道伪无菌小鼠。与模型组比较,中药组粪便含水率与数量、小肠推进率显著提高($P<0.05$),而中药+抗生素组在以上 2 个方面差异无统计学意义($P>0.05$),中药组和中药+抗生素组的疗效形成鲜明对比,反向验证了芪地通便方依赖于肠道菌群的存在从而达到治疗 STC 的作用。实验 2 发现芪地通便方能够改善 STC 小鼠的肠道菌群多样性及结构,尤其是能降低厚壁菌门,提高拟杆菌门丰度,降低厚壁菌门/拟杆菌门的比例。结论:芪地通便方治疗 STC 的疗效依赖于肠道菌群的存在,且该方可以调节 STC 小鼠肠道菌群。

【关键词】 慢传输型便秘;芪地通便方;伪无菌实验;肠道菌群

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.12.03

[中图分类号] R256.3 [文献标志码] A

Effects of Qidi Tongbian Prescription on intestinal flora in mice with slow transit constipation based on pseudo-sterile experiment

WANG Jiali¹ SHI Lei¹ LI Junxiang¹ MAO Tangyou² JIANG Hui¹
ZHANG Yang¹ ZHANG Liming¹ CHEN Runhua¹

(¹Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078, China; ²Experimental Center, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine)

Corresponding author: CHEN Runhua, E-mail: excellentcrh@126.com

Abstract Objective: To explore whether Qidi Tongbian Prescription plays a role in the treatment of slow transit constipation(STC) through the presence of intestinal flora and to study the effect of Qidi Tongbian Prescription on intestinal flora of STC mice. **Methods:** In experiment 1, 25 BALB/c mice were divided into 5 groups. Except the blank group, loperamide hydrochloride(10 mg/kg) was given intragastric administration for 14 days to establish the model. The antibiotic group was given a free drink of antibiotic mixture, the Chinese medicine group was given a Qidi Tongbian Prescription(18.906 g/kg) by gavage, and the Chinese medicine+antibiotics group was given a Qidi Tongbian Prescription by gavage+free drink of antibiotic mixture. The general condition, body weight, fecal moisture content and quantity, small intestinal propulsion rate, colon histology, and fecal DNA content of mice were used to evaluate the efficacy of Qidi Tongbian Prescription and whether it depended on the existence of intestinal flora. In experiment 2, 20 BALB/c mice were divided into 4 groups. Except for the blank group,

*基金项目:中华中医药学会(2021—2023 年度)青年人才托举工程项目(No:CACM-2021-QNRC2-B06);中医药传承与创新“百千万”人才工程项目[No:国中医药人教发(2018)12 号]

¹北京中医药大学东方医院脾胃肝胆科(北京,100078)

²北京中医药大学东方医院实验中心

通信作者:陈润花,E-mail:excellentcrh@126.com

引用本文:王佳丽,石磊,李军祥,等.基于伪无菌实验研究芪地通便方对慢传输型便秘小鼠肠道菌群的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2023,31(12):920-927. DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.12.03.

loperamide hydrochloride(10 mg/kg) was administrated by gavage for 14 days to establish an STC mouse model, and then Qidi Tongbian Prescription(18.906 g/kg) and positive drug lactulose(3 mg/kg) were administrated by gavage for 14 days. The changes in intestinal flora in mice were investigated by 16S rDNA gene sequencing. **Results:** In experiment 1, it was found that fecal DNA content in the antibiotic group was significantly decreased ($P < 0.05$), which confirmed that the antibiotic mixture method adopted in this study could effectively consume intestinal flora and successfully establish intestinal pseudo-aseptic mice. Compared with the model group, fecal moisture content, quantity, and small intestinal propulsion rate of the Qidi Tongbian Prescription group were significantly increased($P < 0.05$), while there was no statistical difference in the above two aspects of Qidi Tongbian Prescription + antibiotic group($P > 0.05$). The effect of the two groups was in stark contrast, which inversely verified that Qidi Tongbian Prescription was dependent on the presence of intestinal flora to treat STC. In experiment 2, it was found that Qidi Tongbian Prescription could improve the intestinal flora diversity and structure of STC mice, especially by reducing firmicutes, increasing the abundance of Bacteroides, and reducing the ratio of firmicutes to Bacteroides. **Conclusion:** The effects of Qidi Tongbian Prescription on STC depended on the presence of intestinal flora, and it could regulate the intestinal flora of STC mice.

Key words slow transit constipation; Qidi Tongbian Prescription; pseudo-sterility experiment; intestinal flora

便秘根据病因可分为功能性便秘(functional constipation, FC)、器质性便秘和药物性便秘^[1]。慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)属于最常见的 FC 类型,其特征示结肠传输速度减慢,以排便困难,排便次数减少,块状便或硬便及排便不尽感等为主要表现^[2]。全球 FC 的合并患病率为 15.3%^[3]。中国 FC 的合并患病率为 8.5%^[4]。约 55% 的便秘患者为 STC^[5]。结肠传输试验表明 STC 约占 FC 的 53%^[6]。长期便秘可能会引起腹胀腹痛,易导致抑郁焦虑,且便秘也是心脑血管病的危险因素^[7]。可见便秘严重影响患者的生活质量甚至生命健康。

STC 的发病机制目前仍未完全明确,目前多认为与肠道菌群失调、结肠运动减慢、肠道屏障障碍及水电解质失衡等相关^[2]。国内外对于 STC 的治疗包括西药、微生物相关疗法、生物反馈、生物电调节及手术等。但长期服用泻剂可能导致腹胀腹泻^[8]。盐类泻剂可能诱发电解质紊乱^[9]。粪菌移植的来源存在一定风险^[10]。生物反馈疗法多用于排便障碍型便秘^[11],不常用于 STC。手术治疗损伤大,术后并发症多^[12]。

中医药在解决 STC 临床问题中展现出了巨大潜力,李军祥教授系首届岐黄学者、北京中医药大学消化病研究院院长,从医 30 余年治疗便秘经验丰富独到,创立芪地通便方治疗 FC 临床疗效良好,但该方治疗便秘的作用机制尚不十分清楚,因肠道菌群失调是 STC 发病的重要环节,因此本研究欲探索芪地通便方是否依赖于肠道菌群发挥作用,并研究其对 STC 小鼠肠道菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 雄性小鼠,体重 20~22 g,8~10 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房,本研究获得

北京中医药大学动物伦理委员会的批准。

1.2 实验用药

盐酸洛哌丁胺(HY-B0418A, MedChemExpress)。芪地通便方配方颗粒购自北京中医药大学东方医院颗粒药房。乳果糖(L812332-5G, Macklin)、氨苄青霉素溶液(A917728, Macklin)、硫酸新霉素(N814740, Macklin)、甲硝唑(M813526, Macklin)。

1.3 实验分组

实验 1:25 只小鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为空白组、模型组、抗生素组、中药组和中药+抗生素组,每组 5 只。

实验 2:20 只小鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为空白组、模型组、中药组及阳性对照组,每组 5 只。

1.4 实验方法

1.4.1 实验 1 (1) STC 模型建立及药物干预:盐酸洛哌丁胺($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[13]给予除空白组外的小鼠灌胃,空白组予无菌水灌胃,1 次/d,共 14 d。第 15 天起,持续造模的同时按表 1 干预,中药组予芪地通便方(18.906 g/kg,人与动物等效剂量换算^[14],相当于临床患者的标准用量)。抗生素混合液:第 15~17 天予氨苄青霉素 1 mg/mL、硫酸新霉素 1 mg/mL 和甲硝唑 0.5 mg/mL,第 18~28 天稀释 1 倍。最后 1 d 收集粪便检测 DNA 含量。

表 1 伪无菌小鼠第 15~28 天干预方法

组别	盐酸洛哌丁胺灌胃	无菌水灌胃	芪地通便方灌胃	无菌水自由饮用	抗生素混合液自由饮用
空白组		0.2 mL		√	
模型组	0.1 mL	0.1 mL		√	
抗生素组	0.1 mL	0.1 mL			√
中药组	0.1 mL		0.1 mL	√	
中药+抗生素组	0.1 mL		0.1 mL		√

(2)观察指标:记录小鼠的体重、粪便情况。最后 1 d 收集每只小鼠 5 粒粪便,称湿重,60 °C 烘箱内干燥 12 h,称干重。最后 1 d 收集 3 h 内粪便计数。末次给药后,小鼠禁食不禁水 12 h,5%阿拉伯树胶与 10% 活性炭配制的炭末混悬液灌胃,0.2 mL/只,30 min 后吸入过量 CO₂ 麻醉处死,剖腹取小肠,测小肠推进率。

粪便含水率(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

小肠推进率(%)=炭末在小肠移动的距离/幽门至回盲部上端的小肠全长×100%。

(3)组织病理学:结肠取材后于 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,切 3 μm 切片,脱蜡至水,用染液套装(G1003,武汉赛维尔生物科技有限公司)进行苏木精-伊红染色,脱水封固,镜下观察。

(4)粪便 DNA 含量测定:采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒(DP328,天根生化科技有限公司)测定。称 100 mg 粪便至 2 mL 灭菌离心管,加 SA、SC,Proteinase K,研磨珠,震荡混匀样本,后续按说明书操作;分光光度计(NANODROP 2000,Thermo Fisher Scientific)检测粪便 DNA 含量。

1.4.2 实验 2 (1)STC 模型建立及药物干预:造模同实验 1,第 15 天起,持续造模的同时予相应药物灌胃。中药组予芪地通便方(18.906 g/kg),阳性对照组予乳果糖(3 g/kg),空白组和模型组予无菌水,1 次/d,共 14 d。最后 1 d 收集粪便进行 16S rDNA 测序。CO₂ 麻醉处死。

(2)肠道菌群 16S rDNA 测序:采用 DNA 抽提试剂盒提取样本基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳与 Quantus™ Fluorometer (Promega) 检测 DNA 浓度。引物:338F/806R(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'/5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。在热循环 PCR 系统(Applied Biosystems GeneAmp 9700,Thermo Fisher Scientific)上用 TransStart FastPfu DNA Polymerase(AP221-02,北京全式金生物技术股份有限公司)进行 PCR 扩增。

2%琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen Bioscience)切胶回收 PCR 产物。采用 TruSeq DNA Sample Prep Kit(Illumina)构建文库。Illumina MiSeq(Illumina)平台测序。原始序列用 Flash 进行 pair-end 双端序列拼接及 Fastp 进行质控和过滤后得到优化序列。基于美吉生物云平台(https://cloud.majorbio.com)对菌群进行生物学信息比较。Uparse(version 7.0.1090)进行物种注释与评估,按照 97% 相似性对非重复序列(不含单序列)进行操作分类单元(operational taxonomic units,OTU)聚类。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,正态分布的计量资料采用 $\bar{X} \pm S$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhane's T2 检验。非正态分布数据多组比较采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪地通便方对伪无菌 STC 小鼠的影响

2.1.1 体重 实验中小鼠全部存活。第 15~29 天,各组体重增长趋势小于空白组,模型组体重增加小于空白组($P < 0.05$);与模型组比较,中药组体重增加更多($P < 0.05$),抗生素组和中药+抗生素组体重下降($P < 0.01$),见图 1、表 2。

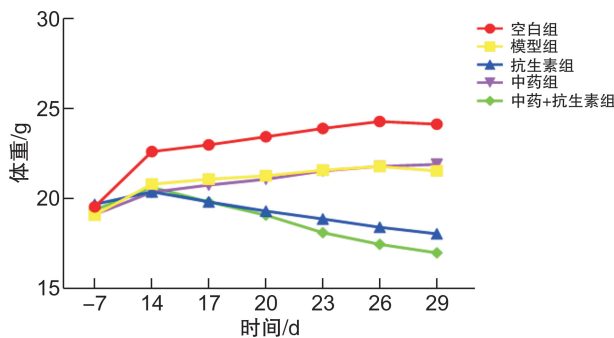


图 1 小鼠体重增长趋势图

表 2 体重增加量、粪便含水率和数量、小肠推进率比较

组别	体重增加/g	粪便含水率/%	粪便数量/个	小肠推进率/%
空白组(n=5)	1.53±0.36	62.85±12.85	22.20±7.33	89.80±5.39
模型组(n=5)	0.74±0.47 ¹⁾	46.60±3.70 ¹⁾	11.60±4.67 ¹⁾	65.59±15.88 ¹⁾
抗生素组(n=5)	-2.35±0.38 ³⁾	51.45±11.33	13.60±4.93	54.86±8.58
中药组(n=5)	1.55±0.13 ²⁾	61.75±7.84 ²⁾	21.80±2.78 ²⁾	87.97±12.94 ²⁾
中药+抗生素组(n=5)	-3.65±0.53 ³⁾⁴⁾	53.94±5.93	16.40±5.13	67.55±10.65 ¹⁾

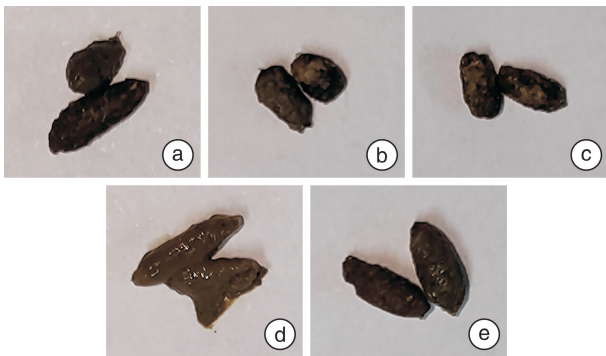
与空白组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与中药组比较,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

2.1.2 粪便含水率与数量 肉眼观察小鼠粪便,模型组与抗生素组粪便均稍干硬、颗粒偏小,

中药+抗生素组粪便较软润、颗粒偏大,中药组粪便明显软润、颗粒大,见图 2。与空白组比较,模型

组小鼠粪便含水率与数量降低($P < 0.05$),与模型组比较,中药组粪便含水率与数量增多($P < 0.05$),抗生素组和中药+抗生素组粪便含水率与数量无明显改善($P > 0.05$),见表 2。

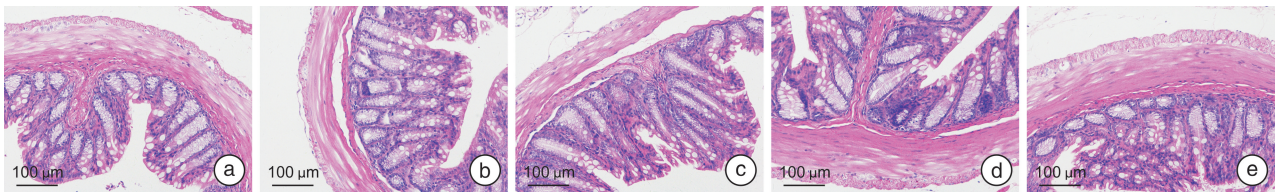
2.1.3 小肠推进率 与空白组比较,模型组小鼠小肠推进率降低($P < 0.05$);与模型组比较,中药组小肠推进率升高($P < 0.05$);与中药组比较,中药+抗生素组小肠推进率降低($P < 0.05$);抗生素组与中药+抗生素组小肠推进率差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、图 3。



a:空白组;b:模型组;c:抗生素组;d:中药组;e:中药+抗生素组。

图 2 小鼠粪便情况

2.1.4 组织病理学 苏木精-伊红染色结果肉眼观察,各组结肠组织结构完整,杯状细胞数量、大小未见明显改变。尽管模型组、抗生素组和中药+抗生素组显示部分固有肌层较薄,黏膜表面稍不平,隐窝排列略紊乱、偶有不规则,但整体而言各组小



a:空白组;b:模型组;c:抗生素组;d:中药组;e:中药+抗生素组。

图 4 各组小鼠结肠组织苏木精-伊红染色($\times 200$)

2.2 芪地通便方对 STC 小鼠肠道菌群的影响

实验 2 中,各组小鼠均死亡 1 只,每组余 4 只小鼠。

2.2.1 Rank-abundance 曲线 4 组小鼠曲线平滑下降,表明样本的物种多样性较高,与阳性对照组比较,空白组、模型组和中药组均匀度较好。见图 5。

2.2.2 α 多样性 在属水平上进行 α 多样性分析,Ace 指数经 Wilcoxon 秩和检验判断组间差异

鼠的结肠病理学差异不明显,见图 4。

2.1.5 粪便 DNA 含量测定 模型组、抗生素组干预结束后收集粪便检测粪便 DNA 含量以确认自由饮用抗生素混合液后肠道菌群的消耗情况。抗生素组粪便 DNA 含量较模型组明显降低[(46.28 \pm 35.26)ng/ μ L vs (199.46 \pm 101.06)ng/ μ L, $P < 0.05$],证实抗生素混合液处理能够消耗小鼠肠道菌群。

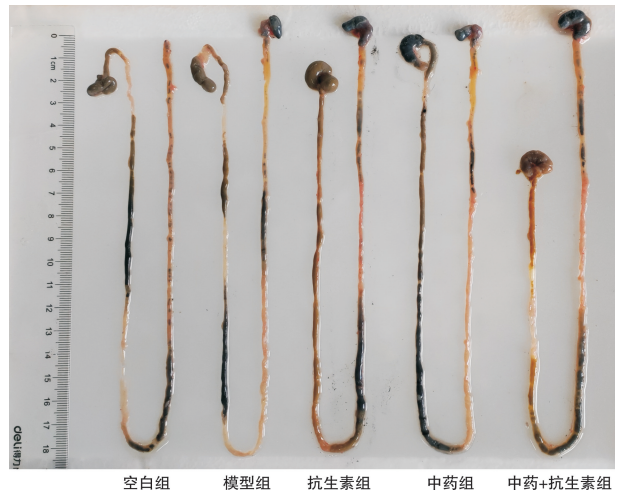


图 3 小肠炭末推进实验

综上,盐酸洛哌丁胺可成功诱导 STC,在体重、粪便含水率和数量、小肠推进率等方面芪地通便方疗效优于芪地通便方+抗生素,表明在肠道菌群被消耗的情况下,芪地通便方的疗效被减弱。

是否显著,与空白组比较,模型组肠道菌群多样性更高($P < 0.05$);与模型组比较,中药组肠道菌群多样性更高($P < 0.05$),而阳性对照组更低($P < 0.05$),说明便秘可能导致肠道菌群丰度增高,芪地通便方干预后可使肠道菌群丰度进一步增高,而乳糖干预则可能使肠道菌群丰度降低,见表 3。在 OTU 水平上采取 Coverage 指数作稀释曲线,曲线在末端趋向平坦,说明测序数据量充足合理,见图 6。

2.2.3 β多样性 图 7 示,空白组与模型组肠道菌群分离明显,表明便秘可能会产生与正常肠道菌群不同的肠道菌群,而无论是芪地通便方还是乳果糖干预后均表现出与模型组完全分离,表明芪地通便方或乳果糖治疗便秘可能会使肠道菌群发生与便秘肠道菌群不同的变化。

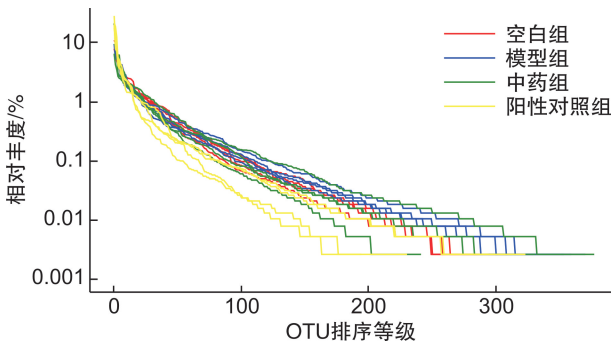


图 5 Rank-abundance 曲线

表 3 小鼠肠道菌群 α 多样性 Ace 指数 $\bar{X} \pm S$

组别	Ace 指数
空白组 (n=4)	90.65 ± 1.35
模型组 (n=4)	102.17 ± 1.25 ¹⁾
中药组 (n=4)	111.66 ± 5.73 ²⁾
阳性对照组 (n=4)	85.27 ± 5.79 ²⁾

与空白组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

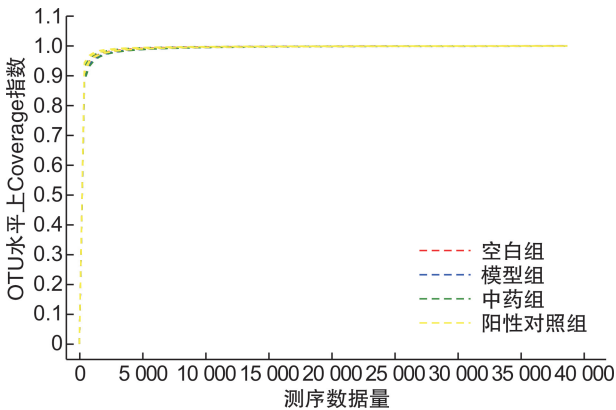
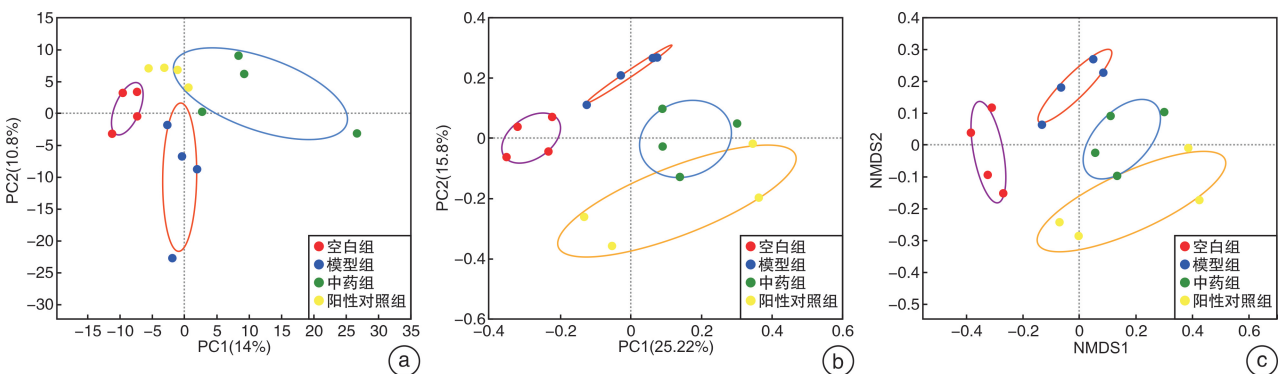


图 6 稀释曲线

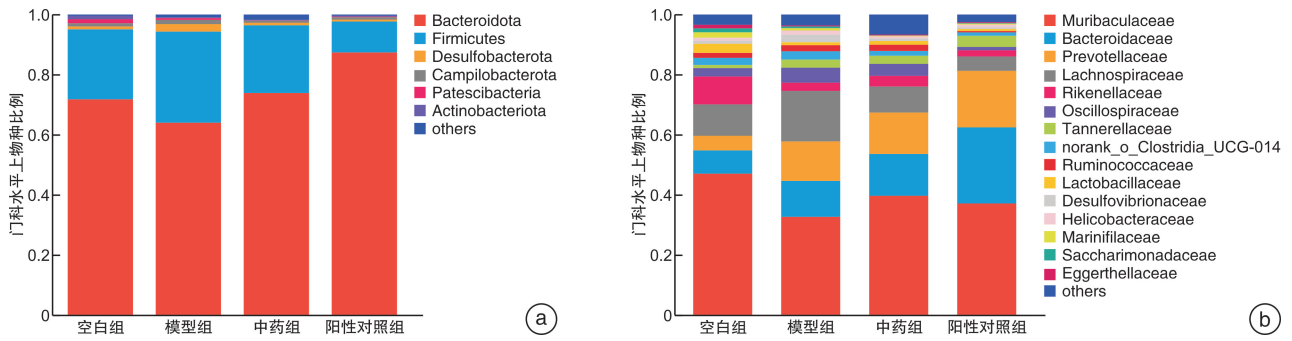


a:PCA;b:PCoA;c:NMDS。

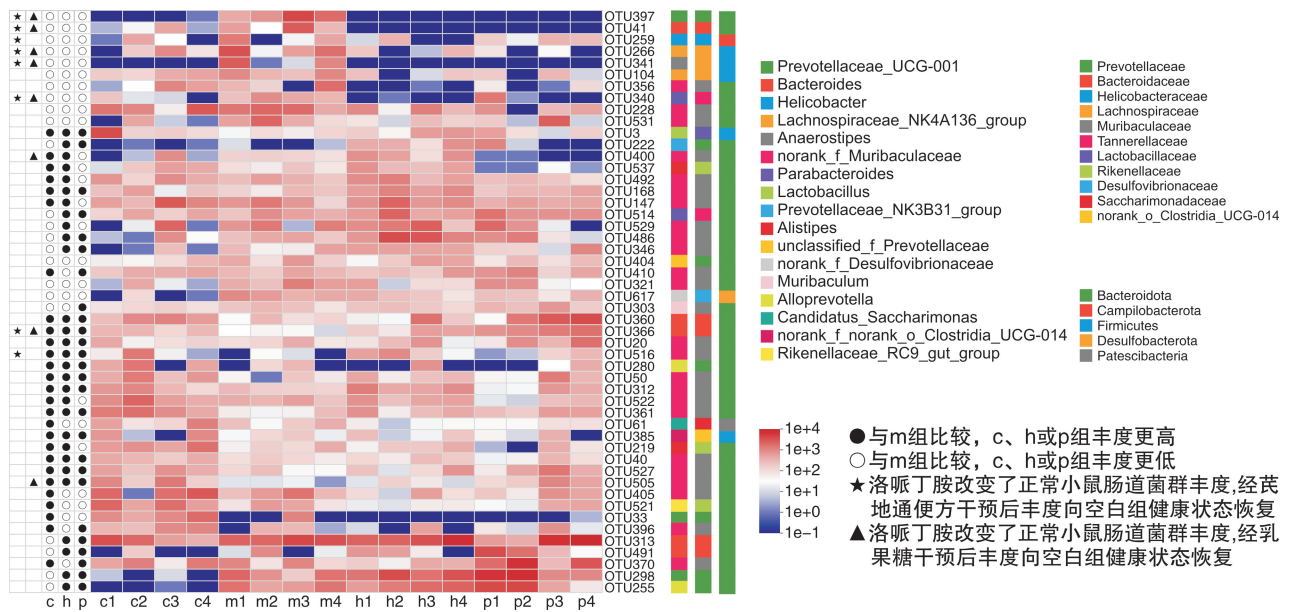
图 7 β多样性

2.2.4 物种组成分析 门水平上,4 组的优势菌门为拟杆菌门和厚壁菌门,与空白组比较,模型组中拟杆菌门丰度降低,厚壁菌门丰度增加,表明厚壁菌门/拟杆菌门的比例升高可能会促进便秘的发生。芪地通便方或乳果糖干预后,拟杆菌门增加丰度,厚壁菌门丰度降低,厚壁菌门/拟杆菌门比例降低。科水平上,与空白组比较,模型组中拟杆菌科、普雷沃菌科、毛螺菌科、颤螺菌科丰度增加,Muribaculaceae 科和理研菌科丰度降低,芪地通便方或乳果糖干预后,拟杆菌科、普雷沃菌科、Muribaculaceae 科丰度增加,毛螺菌科和颤螺菌科丰度降低。可以看到芪地通便方干预后肠道菌群物种组成在门、科水平上更接近正常的空白组,说明芪地通便方可能是通过降低厚壁菌门/拟杆菌门的比例从而发挥治疗便秘的作用,见图 8。图 9 显示了丰度前 50 的 OTU,其中,8 个 OTU 示正常肠道菌群丰度受洛派丁胺而丰度增高,芪地通便方干预后又被逆转;乳果糖干预的另外 8 个 OTU 也表现出同样的逆转趋势。这些改变的 OTU 在门水平上多属拟杆菌门、黄杆菌门、厚壁菌门。侧面反映了芪地通便方或乳果糖对厚壁菌门/拟杆菌门比例的影响。

2.2.5 LEfSe 多级物种差异判别分析 图 10 示,空白组的主要富集菌且对组间差异影响效果显著的菌是放线菌门、Eggerthellaceae 科、Marinifilaceae 科、理研菌科等 ($P < 0.05$);模型组的富集菌且对组间差异影响效果显著的菌是厚壁菌门、梭菌纲、毛螺菌目 ($P < 0.05$);阳性对照组的富集菌并对组间差异影响效果显著的菌是拟杆菌门、拟杆菌纲、拟杆菌目 ($P < 0.05$),再次说明厚壁菌门与拟杆菌门对便秘的重要影响;而空白组与中药组差异影响效果显著的菌门更为丰富,除了厚壁菌门下菌种以外,中药组中增加了蓝藻细菌门和变形菌门下的菌群 ($P < 0.05$),其丰度对差异效果影响明显。

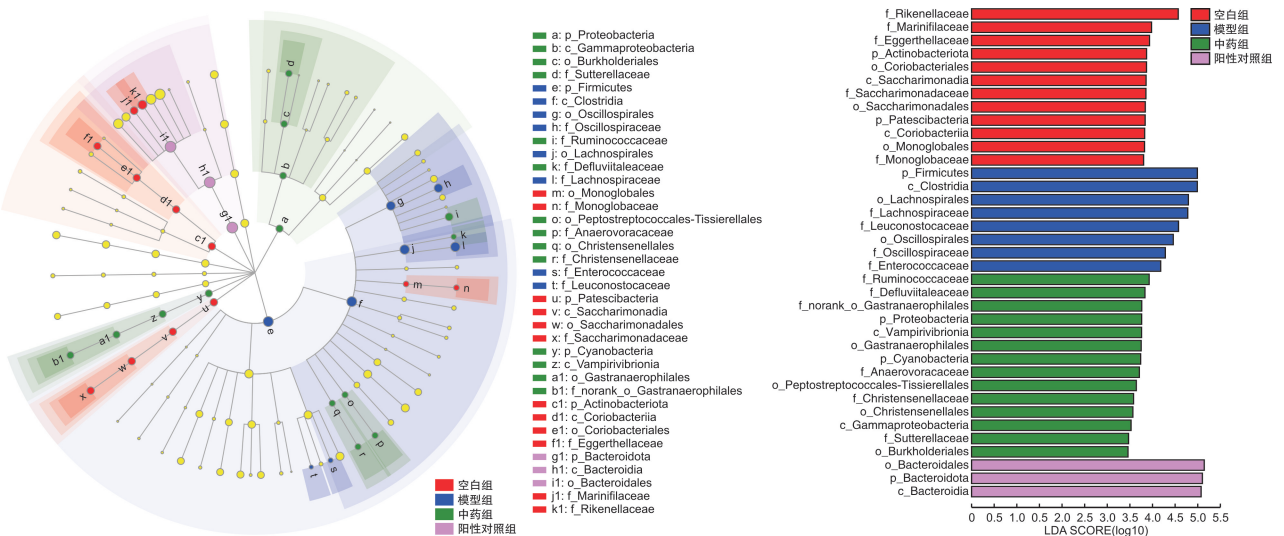


a: 门水平; b: 科水平。
图 8 群落条形图



注: 色块颜色梯度代表数值来展示样本中不同物种的丰度变化情况。c: 空白组; m: 模型组; h: 中药组; p: 阳性对照组。

图 9 群落热图



注: LEfSe 多级物种层级树图; 不同颜色节点表示在对应组别中显著富集, 且对组间差异存在显著影响的微生物类群; 淡黄色节点表示在不同分组中均无显著差异, 或对组间差异无显著影响的微生物类群。

图 10 LEfSe 多级物种层级树图(左)和 LDA 判别柱状图(右)

3 讨论

中医药治疗 STC 具有多效性、复发率低等优势,且方药安全性高。李教授认为,根据 STC 的症状特点,符合中医“便秘”诊断,本病病位在肠,涉及肺、脾、肝、肾诸脏,多以气阴两虚为本、湿热阻滞为标,虚实夹杂;基于以上认识创立了芪地通便方,由生黄芪 15 g,生地 15 g,枳实 9 g,生白术 9 g,肉苁蓉 9 g,火麻仁 10 g,威灵仙 9 g,瓜蒌 10 g,皂角刺 6 g 组成,诸药同用共奏益气养阴,清热除湿,行气导滞,润肠通便之功,用于气阴两虚为本、湿热阻滞为标之便秘。团队前期对 72 例 FC 患者进行的随机双盲安慰剂对照研究发现,芪地通便方治疗 FC 临床疗效好、安全性高,能够改善排便困难程度,增加排便频率,减少排便时间,并提高便秘患者的生活质量^[15]。但该方作用机制尚不明确,因此,本研究基于前期报道^[13],采用 10 mg/kg 盐酸洛哌丁胺灌胃 BLAB/c 小鼠 14 d 的方法诱导 STC 模型。盐酸洛哌丁胺是一种 μ 阿片受体激动剂,主要通过激活 μ 阿片样受体导致胃肠动力降低、转运时间增加及分泌减少^[16]。如同众多阿片类药物,盐酸洛哌丁胺也会导致肠道微生物生态失调和肠道屏障受损^[17-18]。国际众多研究以 10 mg/kg 的盐酸洛哌丁胺灌胃 14 d 制备了成功的 STC 模型^[19-20]。

胃肠道中存在超过 100 万亿种不同的共生微生物,包括细菌、真菌、古细菌、病毒等,具有消化食物、抵抗病原体、维持肠屏障与黏膜免疫完整等方面的作用。肠道内细菌主要分 4 类,即厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门,健康人的肠道菌群中以拟杆菌门和厚壁菌门为主。肠道菌群及其代谢产物失衡会影响结肠转运导致 STC。本研究采用伪无菌小鼠模型探索芪地通便方治疗 STC 的疗效是否依赖于肠道菌群的存在。伪无菌动物类似于无菌级动物,一般联合多种抗生素通过自由饮用的方法建立伪无菌模型,相较于无菌级动物,伪无菌模型更易获取,价格经济且饲养条件无需严苛的标准,现已广泛应用于肠道菌群相关研究。口服抗生素可使肠道菌群减少 90% 以上,伪无菌动物与野生型动物的生理特点接近,但所得研究结果常与无菌动物模型一致^[21]。本研究中伪无菌模型的建立是改良于 Zhang 等^[22]的方法,即氨苄青霉素 1 mg/mL、硫酸新霉素 1 mg/mL 和甲硝唑 0.5 mg/mL 的组合方案,实验中观察到在抗生素给药的前 3 d,小鼠体重明显下降,毛糙精神萎靡反应度差,为最大保障小鼠存活及实验的顺利进行,实验的第 18~28 天将抗生素混合液稀释 1 倍。模型组和抗生素组的粪便 DNA 含量对比表明本实验采用的抗生素混合液可消耗肠道菌群。芪地通便方可改善盐酸洛哌丁胺诱导的 STC 小鼠的小肠推进率、粪便数量、含水率,而芪地通便方+抗生素

组在以上各方面并未见明显改善,与芪地通便方改善以上指标的疗效形成鲜明对比。此外,抗生素组与芪地通便方+抗生素组在小肠推进率、粪便数量、含水率等方面比较差异无统计学意义。因此,抗生素混合液的干预消耗了肠道菌群,在肠道菌群被消耗的情况下,芪地通便方无法发挥治疗 STC 的作用,表明芪地通便方是通过肠道菌群的存在从而起到治疗 STC 的作用。

随后本研究继续对芪地通便方对肠道菌群的具体影响进行研究。健康个体与 STC 之间存在菌群多样性及结构差异,来自 STC 患者的临床证据表明厚壁菌的丰度增加,拟杆菌的丰度降低^[23]。本研究通过收集各组小鼠的粪便样本,进行 16S rDNA 基因测序,发现芪地通便方能够提高肠道菌群物种多样性,调节菌群结构。也证实了前人研究结果^[23],即 STC 小鼠菌群物种组成与低比例的拟杆菌门丰度和高比例的厚壁菌门丰度相关。而芪地通便方或乳果糖干预后对 STC 小鼠肠道菌群的物种组成具有一定的逆转作用,主要体现在芪地通便方或乳果糖的干预可以降低厚壁菌门丰度,增加拟杆菌门丰度,降低了厚壁菌门/拟杆菌门的比例,促使 STC 小鼠菌群物种组成向空白组健康状态逆转恢复。进一步通过 LEfSe 多级物种差异判别分析发现,对乳果糖干预与其余组差异影响效果显著的菌均为拟杆菌门下的菌种,Zhang 等^[22,24]的研究结果与本研究相似,乳果糖可能通过对肠道微生物群和肠道代谢物的益生元作用,重塑肠道微生物群落的结构,如富集拟杆菌等促进肠道运输,来改善洛哌丁胺诱导的小鼠便秘。乳果糖作为渗透性泻剂是 FC 首选的维持疗法,临床中较为常用,其疗效毋庸置疑,且不良反应较小。基于以上考量,本研究采用了乳果糖作为阳性对照药物。对芪地通便方干预与其余组组间差异影响显著的主要是厚壁菌门下菌种,如瘤胃球菌。临床与动物研究均表明,STC 中存在高丰度的瘤胃球菌^[25-26]。瘤胃球菌也是产生短链脂肪酸(SCFA)的重要细菌,而结肠转运时间与粪便 SCFA 呈负相关^[27]。本研究中,芪地通便方干预后瘤胃球菌的丰度对组间差异的影响极为显著,表明芪地通便方可能通过调控瘤胃球菌等产 SCFA 菌的丰度,来加速结肠传输速度,从而改善 STC。

4 结论

芪地通便方治疗 STC 的疗效依赖于肠道菌群的存在,且该方可以调节 STC 小鼠肠道菌群结构和丰度,降低厚壁菌门丰度,增加拟杆菌门丰度,降低厚壁菌门/拟杆菌门的比例。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组,功能性胃肠

- 病协作组. 中国慢性便秘专家共识意见(2019,广州)[J]. 中华消化杂志, 2019, 39(9): 577-598.
- [2] Bharucha AE, Lacy BE. Mechanisms, Evaluation, and Management of Chronic Constipation[J]. Gastroenterology, 2020, 158(5): 1232-1249. e3.
- [3] Barberio B, Judge C, Savarino EV, et al. Global prevalence of functional constipation according to the Rome criteria: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2021, 6(8): 638-648.
- [4] Chen Z, Peng Y, Shi Q, et al. Prevalence and Risk Factors of Functional Constipation According to the Rome Criteria in China: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 815156.
- [5] Tanner S, Chaudhry A, Goraya N, et al. Prevalence and Clinical Characteristics of Dyssynergic Defecation and Slow Transit Constipation in Patients with Chronic Constipation[J]. J Clin Med, 2021, 10(9): 2027.
- [6] 王娅琼. 结肠传输试验对慢性功能性便秘诊断和分型的临床研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2019.
- [7] 崔文文, 管忠安. 中医诊治慢性便秘现状与进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(36): 4094-4099.
- [8] Li H, Zhang P, Xue Y. A comparison of the safety and efficacy of polyethylene glycol 4000 and lactulose for the treatment of constipation in pregnant women: a randomized controlled clinical study [J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(6): 3785-3792.
- [9] Southwell BR. Treatment of childhood constipation: a synthesis of systematic reviews and meta-analyses [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 14(3): 163-174.
- [10] Blaser MJ. Fecal Microbiota Transplantation for Dysbiosis-Predictable Risks[J]. N Engl J Med, 2019, 381(21): 2064-2066.
- [11] Sharma A, Rao S, Kearns K, et al. Review article: diagnosis, management and patient perspectives of the spectrum of constipation disorders[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2021, 53(12): 1250-1267.
- [12] Corsetti M, Brown S, Chiarioni G, et al. Chronic constipation in adults: Contemporary perspectives and clinical challenges. 2: Conservative, behavioural, medical and surgical treatment [J]. Neurogastroenterol Motil, 2021, 33(7): e14070.
- [13] Huang J, Li S, Wang Q, et al. Pediococcus pentosaceus B49 from human colostrum ameliorates constipation in mice[J]. Food Funct, 2020, 11(6): 5607-5620.
- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [15] 杨志然, 李军祥, 陈润花, 等. 芪地通便方治疗功能性便秘患者的临床疗效分析[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022, 30(12): 820-825.
- [16] Farmer AD, Holt CB, Downes TJ, et al. Pathophysiology, diagnosis, and management of opioid-induced constipation[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(3): 203-212.
- [17] Meng J, Abu YF, Zhang Y, et al. Opioid-induced microbial dysbiosis disrupts irinotecan(CPT-11) metabolism and increases gastrointestinal toxicity in a murine model[J]. Br J Pharmacol, 2023, 180(10): 1362-1378.
- [18] Jalodia R, Abu YF, Oppenheimer MR, et al. Opioid Use, Gut Dysbiosis, Inflammation, and the Nervous System[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2022, 17(1-2): 76-93.
- [19] Huang J, Lin B, Zhang Y, et al. Bamboo shavings derived O-acetylated xylan alleviates loperamide-induced constipation in mice[J]. Carbohydr Polym, 2022, 276: 118761.
- [20] Bai J, Cai Y, Huang Z, et al. Shouhui Tongbian Capsule ameliorates constipation via gut microbiota-5-HT-intestinal motility axis[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 154: 113627.
- [21] 李建香, 王君君, 黄天马, 等. 无菌鼠模型制作方法与评价[J]. 实验动物科学, 2022, 39(3): 67-69, 73.
- [22] Zhang X, Yang H, Zheng J, et al. Chitosan oligosaccharides attenuate loperamide-induced constipation through regulation of gut microbiota in mice[J]. Carbohydr Polym, 2021, 253: 117218.
- [23] Yu T, Ding Y, Qian D, et al. Characteristics of fecal microbiota in different constipation subtypes and association with colon physiology, lifestyle factors, and psychological status[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2023, 16: 17562848231154101.
- [24] Zhang X, Zheng J, Jiang N, et al. Modulation of gut microbiota and intestinal metabolites by lactulose improves loperamide-induced constipation in mice [J]. Eur J Pharm Sci, 2021, 158: 105676.
- [25] Tian H, Chen Q, Yang B, et al. Analysis of Gut Microbiome and Metabolite Characteristics in Patients with Slow Transit Constipation[J]. Dig Dis Sci, 2021, 66(9): 3026-3035.
- [26] Wang L, Wang F, Zhang X, et al. Transdermal Administration of Volatile Oil from Citrus aurantium-Rhizoma Atractylodis Macrocephalae Alleviates Constipation in Rats by Altering Host Metabolome and Intestinal Microbiota Composition[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9965334.
- [27] Müller M, Hermes G, Canfora EE, et al. Distal colonic transit is linked to gut microbiota diversity and microbial fermentation in humans with slow colonic transit [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020, 318(2): G361-G369.