

基于肠道内环境调整的火麻仁润下作用的现代研究

李寒冰^{1,2}, 吴宿慧^{1,2*}, 张颜语¹, 齐月娟¹, 吕宁¹, 李根林², 马敬俦¹

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学基础医学院 肠道菌与能量代谢研究平台老年性疾病中医药防治实验室, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 通过研究火麻仁水提液对便秘模型大鼠肠道菌群结构、短链脂肪酸(SCFAs)水平以及结肠炎症的病理变化,探讨火麻仁润肠通便作用的现代科学内涵。**方法** SPF级Wistar大鼠48只,雌雄各半,随机分为对照组、模型组、火麻仁水提液组、阳性对照(优乐多益生元)组,给药处理28 d。采用复方地芬诺酯制备便秘致肠道菌群紊乱的大鼠模型。采用细菌平板计数法检测新鲜粪便中细菌变化,PCR-DGGE检测盲肠内菌群结构变化;气相色谱法测定盲肠中SCFAs水平;对结肠进行HE病理染色观察并评分。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠新鲜粪便中大肠杆菌及双歧杆菌有增多趋势,乳酸杆菌减少($P<0.01$);盲肠内细菌厚壁菌门与拟杆菌门比值升高,丁酸梭菌属、乳酸杆菌属减少;肠道内乙酸、丁酸水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01);结肠病理评分显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,火麻仁水提液调整盲肠中厚壁菌门与拟杆菌门比值,升高乳酸杆菌、丁酸梭菌、*Blautia*、*颤杆菌*等水平,降低梭菌属IV群等水平;降低乙酸、丁酸水平($P<0.05$);降低结肠病理评分,改善病理损伤($P<0.05$)。**结论** 火麻仁水提液能够缓解模型大鼠的便秘状态并修复结肠炎性损伤,其作用途径与调整肠道微生态有关,即促进失调的肠道菌群恢复平衡,同时通过影响肠道内SCFAs水平而改变肠道内的酸性环境。**关键词:** 火麻仁水提液;便秘;肠道内环境;肠道菌群;短链脂肪酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)14-3334-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.020

Scientific research of laxative action of *Cannabis Fructus* based on intestinal environment adjustment

LI Han-bing^{1,2}, WU Su-hui^{1,2}, ZHANG Yan-yu¹, QI Yue-juan¹, LV Ning¹, LI Gen-lin², MA Jing-zhuo¹

1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Laboratory of Prevention and Treatment of Senile Diseases with Traditional Chinese Medicine, Intestinal Bacteria & Energy Metabolism Research Platform, College of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To investigate the effects of the water extract of *Cannabis Fructus* on intestinal flora structure, short chain fatty acids (SCFAs) levels, and pathological changes of colonic inflammation, and explore its scientific connotation of laxative action. **Methods** A total of 48 Wistar rats (SPF grade), sex in half, were randomly divided into control group, model group, *Cannabis Fructus* water extract group, and positive control group. The rats of model group were caused constipation and enteric flora disturbance by diphenoxylate. The bacterial counts in the fresh stool were tested by plate count method 28 days after administration, and the changes of intestinal flora structure in cecum was detected by PCR-DGGE method, the contents of SCFAs in cecum were determined by GC method, and the colon pathological score of the rats were studied by HE staining method. **Results** Compared with the blank group, the number of *Escherichia coli* and *Bifidobacterium* was increased but *Bacillus acidilactici* was decreased significantly ($P<0.05$, 0.01) in fresh stool of the model group. The ratio of *Firmicutes* bacteria to *Bacteroides* bacteria was increased, the number of *Butyricococcus* and *Cillobacterium* was decreased, the concentration of acetic acid and butyric acid was increased significantly ($P<0.05$, 0.01), and the pathology score of colon was increased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, *Cannabis Fructus* water extract can adjust the ratio of *Firmicutes* bacteria to *Bacteroides* bacteria, increase the number of *Cillobacterium*, *Butyricococcus*, *Blautia*, and *Oscillibacter* in cecum, decrease the number of *Clostridium* IV, etc., decrease the concentration of acetic acid and butyric acid ($P<0.05$), reduce the pathology score, and improve the

收稿日期: 2018-01-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473435); 国家自然科学基金青年项目(81503363); 河南中医学院科技创新人才支持计划(2015XCXRC02); 河南省科技厅科学发展计划(144300510015); 河南省高等学校重点科研项目计划(13A360583)

作者简介: 李寒冰(1973—), 男, 副教授, 研究方向为中药质量生物评价研究。Tel: (0317)69562746 E-mail: lhb8899@163.com

*通信作者 吴宿慧(1980—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药药理学。Tel: (0371)65962746 E-mail: wusuhui@hactcm.edu.cn

damage of intestinal structure ($P < 0.05$). **Conclusion** *Cannabis Fructus* water extract can alleviate constipation and accelerate the recovery of colitis injury in model rats. The functional route of *Cannabis Fructus* water extract may relate to the disorder of intestinal flora balance adjustment and effect of the concentration of SCFAs so as to change the acidic environment in the intestinal tract.

Key words: *Cannabis Fructus* water extract; constipation; intestinal environment; intestinal flora; short chain fatty acid

肠道微生物、短链脂肪酸、消化酶以及酸碱度、渗透压等共同构成了肠道内环境，与机体的消化吸收、排泄、免疫甚至衰老等生理病理过程密切相关^[1-2]。肠道内环境各因素之间往往相互制约或相互促进而形成影响健康的关联因素，其中肠道菌群及短链脂肪酸 (short chain fatty acid, SCFAs) 对健康的影响近年来受到高度重视，成为生命科学领域研究的热点问题^[1,3-4]。近年来发现便秘与肠道菌群结构紊乱及 SCFAs 水平异常关系密切，对健康影响极大，各因素之间往往互为因果、相互促进，进而导致慢性炎症、甚至癌症等相关疾病的发生^[5-6]，因此对便秘治疗药物的研究也越来越多以改善肠道菌群结构及调节 SCFAs 水平为出发点。

火麻仁为治疗便秘的传统中药，来源于桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的种子，临床常用于治疗因老年等原因的虚性便秘，疗效确切。在临床上火麻仁多入汤剂口服使用，如现存最早的食疗专著《食疗本草》中记载火麻仁：“取汁煮粥，去五脏风，润肺，治关节不通、发落、通血脉”，被誉为“长寿汤”。现代，世界长寿之乡的广西巴马地区民间仍采用研磨加煮制的方法制成“火麻汤”，为当地特色美食^[7]。调查研究表明该地区长寿老人群中便秘发生率^[8]，肠道内益生菌比例高^[9]。中药汤剂能够迅速进入胃肠道，不可避免地与肠道内环境相互作用^[10]，从肠道内环境调节的角度研究中药的作用及机制已成为新的重要方向^[6,11]。

基于上述认识并在前期研究基础上，本课题组认为火麻仁润肠通便、滋养补虚等作用或与其对肠道菌群调节、改变肠道代谢产物水平等有关。课题组已成功复制便秘致大鼠肠道菌群紊乱模型^[12]，本实验以火麻仁煎煮液对便秘模型大鼠进行 ig 给药，通过观察大鼠体质量、排便情况、肠道菌群结构、菌群代谢产物 SCFAs 水平、结肠病理结构等变化，从多角度探讨火麻仁润肠通便作用及其机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 48 只，雌雄各半，体质量 180~220 g，购于北京维通利华实验动物有限公司，

许可证号 SCXK (京) 2012-0001；适应性饲养于河南中医药大学科研实验中心 SPF 级动物房 5 d 后备用，整个实验过程中，动物自由饮水和取食。

1.2 药物

火麻仁药材，购自安徽亳州，经河南中医药大学陈随清教授鉴定为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实，系《中国药典》2015 年版一部收载的正品。复方地芬诺酯片 (常州康普药业有限公司，批号 1508017)；优乐多益生元 (成分为低聚果糖，上海懿玺实业有限公司，批号 20151008)。

1.3 主要仪器及试剂

LDZX-30KB 高压灭菌锅 (上海申安医疗器械厂)；PHS-100 生化培养箱 (中科生命科技股份有限公司)；SW-CJ-ZF 超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司)；琼脂凝胶电泳仪 (美国伯乐公司)；IS-680D 全自动凝胶成像系统 (上海培清科技有限公司)；ARKTIK Thermo PCR 仪 (Thermo Fisher)；Dcode DGGE 电泳仪 (美国伯乐公司)；LEICA ST5020 全自动脱水机 (德国徕卡仪器公司)；LEICA EG 1150 H 石蜡包埋机 (德国徕卡仪器公司)；LEICA RM2245 全自动切片机 (德国徕卡仪器公司)；OLYMPUS DP72 BX61 全自动显微镜 (奥林巴斯显微镜公司)；超纯水仪 (上海茸研仪器有限公司)；安捷伦 7890A 气相色谱仪 (Agilent Technologies)。

革兰染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司，批号 20151209)；TEMED (北京索莱宝科技有限公司，货号 816B026)；双歧杆菌琼脂培养基 (产品编号 HB0396-1)、乳酸杆菌选择性培养基 (产品编号 HB0385-1)，均购于青岛高科园海博生物技术有限公司；大肠杆菌培养采用基础培养基 (由酵母粉、胰蛋白胨、氯化钠、琼脂粉配制)；Yeast Extract 酵母粉 (产品编号 LP0021)、Tryptone 胰蛋白胨 (产品编号 LP0040)，购于 OXOID 公司；蛋白胨 (产品编号 01-001)、琼脂粉 (产品编号 01-023)，购于北京奥博星生物技术有限公司；乙酸 (99%)、丙酸 (99.5%)、丁酸 (99.5%)、异丁酸 (99%)、异戊酸 (99%)，均购于阿拉丁试剂公司，氯化钠购于天津市风船化学试剂科技有限公司。

色谱系统为 GC; 火焰离子化检测器 (FID): 色谱柱为 HP-FFAP (30 m×0.320 mm, 0.25 μm) Agilent 色谱柱。升温程序: 初始柱温 60 °C, 以 8 °C/min 升至 150 °C, 保持 1 min, 再以 40 °C/min 的速度升至 220 °C 保持 2 min。FID 和进样口温度分别为 250、

250 ℃。气体为氢气、空气和氮气以 30、300 和 20 mL/min 比率混合。采用自动进样，进样量 0.5 μL，分流比为 3:1。运行时间为 19 min。

2.9 结肠病理观察

实验结束后，取大鼠近端结肠 2 cm，对其进行苏木素-伊红 (HE) 染色^[13]，病理切片使用 10× 目镜、10× 物镜进行观察。按随机方法，每只大鼠病理切片选择 3 个视野，使用 OLYMPUS DP72 BX61 显微镜拍照系统，在 100 倍的视野内使用 Image pro-Plus6.0 图像分析系统对隐窝深度进行测量及定量分析。并采用结肠病理组织学指数 (colon histopathology index, CHPI) 评分标准^[15] (CHPI=

炎症细胞浸润程度评分+杯状细胞损坏评分情况+病变深度评分)，对结肠病理切片进行评价。

2.10 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析，若方差齐性，采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，若方差不齐，采用非参数检验，组间比较采用多重检验中的 Turkey HSD。细菌测序结果用 Ntsys2.1 软件中的 UPGMA 进行组间聚类分析。

3 结果

3.1 各组大鼠体质量变化

多变量方差分析结果表明：给药不同时间各组间大鼠体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$)；见表 1。

表 1 各组大鼠体质量 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g		
		第 1 天	第 14 天	第 27 天
对照	—	202.21 ± 22.77	256.10 ± 46.43	298.34 ± 65.88
模型	—	197.37 ± 14.97	243.90 ± 38.09	279.16 ± 45.30
火麻仁水提液	21.6	208.42 ± 15.01	252.05 ± 32.91	288.70 ± 41.07
优乐多益生元	2.7	207.14 ± 13.52	248.30 ± 23.86	290.61 ± 35.82

3.2 各组大鼠粪便大体观察结果

结果表明：与对照组比较，在给药 28 d 后，模型组大鼠排便量减少、单粒粪便质量增加、粪便含水量明显减少 ($P<0.05$ 、 0.01)；与模型组相比，在给药 28 d 后，优乐多益生元组大鼠排便量显著增加、单粒粪便质量显著减小、粪便含水量显著增加 ($P<0.01$)，火麻仁水提液组大鼠排便量明显增加、单粒粪便质量明显减小、粪便含水量明显增加 ($P<0.05$)。见表 2。

3.3 各组大鼠粪便中大肠杆菌、双歧杆菌、乳酸杆菌数量比较

结果显示，模型组及火麻仁水提液组大鼠粪便中大肠杆菌菌落数在组间有上升趋势 ($P>0.05$)，在

给药 28 d 后，与对照组相比，模型组大鼠乳酸杆菌明显减少 ($P<0.01$)；与模型组相比，火麻仁水提液组乳酸杆菌增多，但差异不显著 ($P>0.05$)。见图 1。

3.4 盲肠内容物中细菌革兰氏染色结果

结果表明，与对照组相比，模型组细菌总数降低、但差异不显著 ($P>0.05$)， G^+/G^- 值降低 ($P>0.05$)，杆菌/球菌值降低 ($P>0.05$)；与模型组比较，优乐多益生元组盲肠细菌总数升高 ($P>0.05$)， G^+/G^- 值降低 ($P>0.05$)、杆菌/球菌值升高 ($P>0.05$)；火麻仁水提液组盲肠细菌总数升高 ($P<0.001$)， G^+/G^- 值升高 ($P>0.05$)、杆菌/球菌值升高 ($P>0.05$)。见表 3 和图 2。

表 2 火麻仁水提液对肠道菌群紊乱便秘大鼠粪便性状的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of *Cannabis Fructus* water extract on fecal property of rats with constipation and enteric flora disturbance ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	24 h 粪便数/粒			单粒粪便质量/(g·粒 ⁻¹)			粪便含水量/%		
		第 4 天	第 16 天	第 28 天	第 4 天	第 16 天	第 28 天	第 4 天	第 16 天	第 28 天
对照	—	37.06 ± 2.97	36.60 ± 1.06	27.53 ± 2.76	0.15 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	41.12 ± 8.11	42.51 ± 5.49	31.33 ± 4.55
模型	—	26.13 ± 4.31	23.30 ± 2.55	20.45 ± 1.84*	0.17 ± 0.05	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.01*	39.41 ± 7.15	27.02 ± 4.39	16.14 ± 3.89**
火麻仁水提液	21.6	30.42 ± 3.54	30.81 ± 2.26	28.67 ± 0.64 [△]	0.14 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.04 [△]	36.86 ± 9.03	38.67 ± 7.56	28.22 ± 4.67 [△]
优乐多益生元	2.7	40.75 ± 9.69	41.08 ± 2.55	39.08 ± 1.48 ^{△△}	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.04	0.15 ± 0.01 ^{△△}	44.48 ± 7.98	30.23 ± 6.75	31.08 ± 5.31 ^{△△}

与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与模型组比较：[△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ ，下同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs model group, same as below

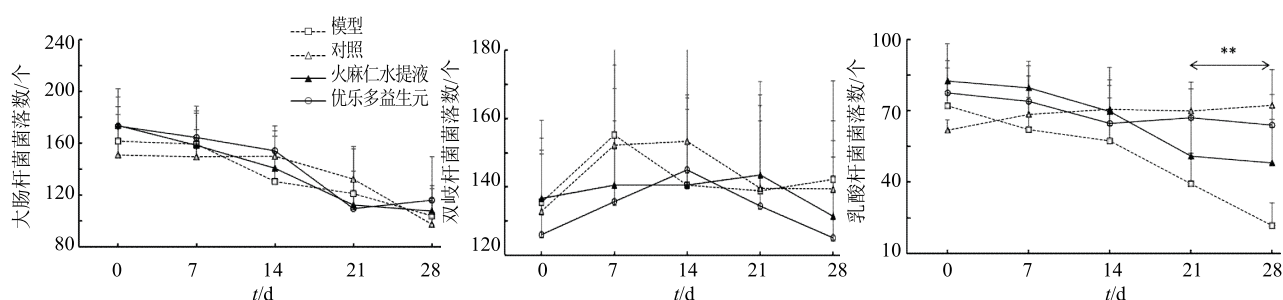


图 1 火麻仁水提液对肠道菌群紊乱便秘大鼠新鲜粪便中大肠杆菌 (A)、双歧杆菌 (B)、乳酸杆菌 (C) 数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Fig. 1 Effects of *Cannabis Fructus* water extract on *Escherichia coli* (A), *Bifidobacterium* (B), and *Lactobacilli* (C) of rats with constipation and enteric flora disturbance ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

表 3 火麻仁水提液对肠道菌群紊乱便秘大鼠盲肠菌群比例的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of *Cannabis Fructus* water extract on flora ratio in cecum of rats with constipation and enteric flora disturbance ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	单个视野细菌总数/个	G ⁺ /G ⁻	杆菌/球菌
对照	—	11	337.25 ± 82.33	0.97 ± 0.49	1.01 ± 0.32
模型	—	10	288.59 ± 90.37	0.83 ± 0.47	0.77 ± 0.62
火麻仁水提液	21.6	12	486.07 ± 97.29***△△	0.89 ± 0.50	0.89 ± 0.48
优乐多益生元	2.7	12	346.50 ± 92.64	0.81 ± 0.22	0.89 ± 0.24

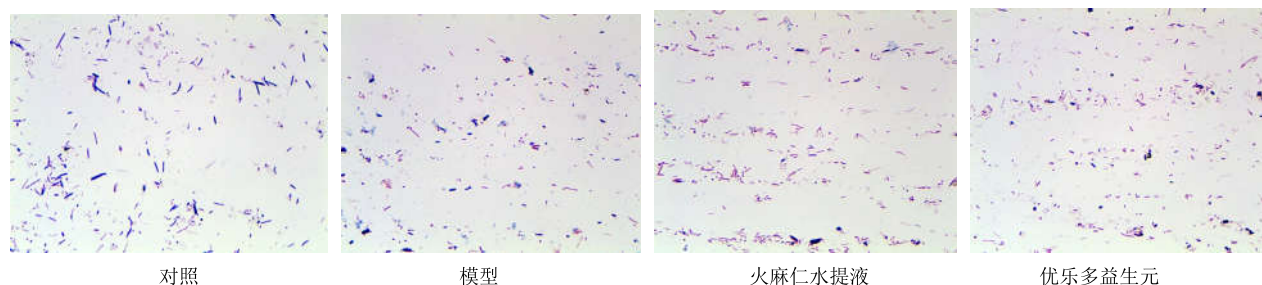


图 2 火麻仁水提液对肠道菌群紊乱便秘大鼠盲肠中细菌的影响

Fig. 2 Effects of *Cannabis Fructus* water extract on bacteria in cecum of rats with constipation and enteric flora disturbance

3.5 盲肠中肠道菌群结构比较

琼脂糖电泳结果表明,粗提的细菌总 DNA 杂质少、无严重的降解和拖尾现象,见图 3-A。扩增后产物约 200 bp,条带清晰明亮,有大量的目标片段生成,无拖尾和非特异性片段产生,见图 3-B。PCR 产物 DGGE 电泳结果表明,不同大小的目标片段在梯度凝胶上分离开来,见图 3-C。

目标条带经测序,并经 NCBI blast 检测测序结果与基因序列已知的细菌种类的相似性,如表 4 所示,其中条带 2、4、17、24、36、38、43 与 NCBI 中最为接近的细菌种属同源性均达到 96% 以上。所测序列按照细菌分类共分为 2 个门类,其中厚壁菌

门 (2、4、6、17、24、28、31、36、38) 最多,其次为拟杆菌门 (1、10、19、20、27),为肠道内优势菌群。与对照组相比,模型组厚壁菌门 (Firmicutes): 丁酸弧菌 (条带 2)、梭菌属 IV 群 (条带 6) 增多, *Allobaculum* (条带 24)、*Blautia* (条带 28)、颤杆菌 (条带 31)、瘤胃球菌 (条带 38)、丁酸梭菌 (条带 17) 减少;拟杆菌门: 普雷沃菌 (条带 1、19)、紫单胞菌 (条带 20)、*Barnesiell* (条带 43) 增多,乳酸菌减少 (条带 4)。与模型组比较,火麻仁水提液组盲肠中厚壁菌门 (Firmicutes): 口腔杆菌 (条带 15)、*Allobaculum* (条带 24)、丁酸弧菌 (条带 2) 变化不大,瘤胃球菌 (条带 35)、

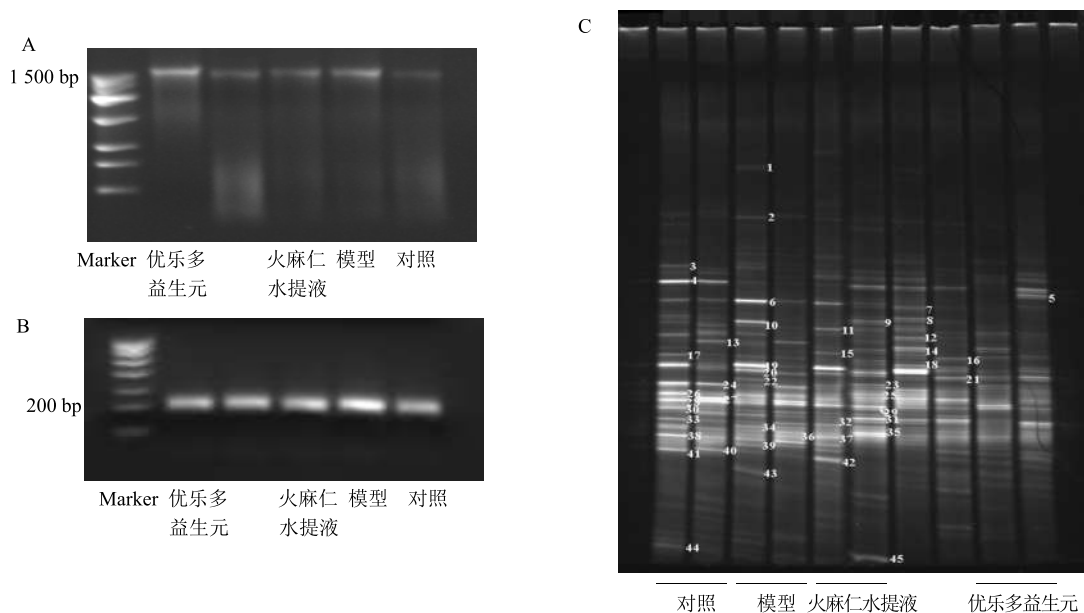


图 3 细菌总 DNA 电泳结果 (A)、16S DNA 扩增产物电泳结果 (B)、PCR-DGGE 图谱分析 (C)

Fig. 3 Electrophoretic results of total DNA (A), amplification products of 16S DNA by PCR (B), and PCR-DGGE (C)

表 4 DGGE 共性条带和特异性条带基因片段序列检测结果

Table 4 Detection of similarity bands and specific band in genes segment by PCR-DGGE

切胶序号	组别	序列长度/bp	NCBI 中最为接近的细菌种属及登录号	相似性/%
1	模型	189	普雷沃菌 <i>Prevotella</i> sp., AY244922	83.0
2	模型	169	丁酸弧菌 <i>Anaerostipes</i> sp., AF371638	100.0
4	对照	194	乳酸菌 <i>Lactobacillus</i> sp., AB186343	100.0
6	模型	172	梭菌属 IV 群 <i>Clostridium</i> IV sp., FJ879063	90.2
10	模型	188	紫单胞菌 <i>Porphyromonadaceae</i> sp., EF098730	86.1
11	火麻仁水提液	169	紫单胞菌 <i>Porphyromonadaceae</i> sp., EF098730	88.9
17	对照	170	丁酸梭菌 <i>Butyricicoccus</i> sp., DQ326231	100.0
19	模型	189	普雷沃菌 <i>Prevotella</i> sp., AY244922	84.1
20	模型	189	紫单胞菌 <i>Porphyromonadaceae</i> sp., AY239409	96.1
24	对照	194	<i>Allobaculum</i> sp., R-9184; FJ878983	97.8
27	对照	190	紫单胞菌 <i>Porphyromonadaceae</i> sp., AY916146	74.7
28	对照	169	<i>Blautia</i> sp., GQ491172	96.3
31	火麻仁水提液	172	颤杆菌 <i>Oscillibacter</i> sp., EU462346	95.7
36	模型	170	罗氏菌 <i>Roseburia</i> sp., DQ800041	96.3
37	火麻仁水提液	179	罗氏菌 <i>Roseburia</i> sp., AY976914	95.7
35	火麻仁水提液	177	瘤胃球菌 <i>Ruminococcaceae</i> sp., AF371781	100.0
38	对照	169	瘤胃球菌 <i>Ruminococcaceae</i> sp., AF371781	100.0
43	模型	190	<i>Barnesiella</i> sp., EF095978	84.2

Blautia (条带 28)、丁酸梭菌 (条带 17)、颤杆菌 (条带 31) 增多, 梭菌属 IV 群 (条带 6) 减少; 拟杆菌门: 乳酸菌增多 (条带 4), 普雷沃菌 (条带 1、19)、*Barnesiella* (条带 43) 无显著变化; 放线菌门: 罗氏菌 (条带 37) 增高。

将测序结果按照“全 (1) 或无 (0)”进行聚

类分析, 结果表明, 对照组、模型组与火麻仁水提液组、优乐多益生元组肠道总菌群的相似性为 60%, 火麻仁水提液组与优乐多益生元组肠道总菌群的相似性为 61%~72%, 对照组与模型组肠道总菌群的相似性为 67%~78%, 表明模型在某种程度上影响了肠道菌群的变化, 且火麻仁水提

液与优乐多益生元对肠道菌群有类似的调整作用。见图 4。

3.6 盲肠细菌代谢产物 SCFAs 的测定

单因素方差分析结果表明：不同组间的乙酸 ($P<0.001$)、异丁酸 ($P<0.05$)、丁酸 ($P<0.05$)、异戊酸 ($P<0.05$)、正己酸 ($P>0.05$)、总 SCFAs ($P<0.001$) 有显著性差异。丙酸 ($P>0.05$) 无显著性差异。多重检验 (Turkey HSD) 结果表明：与对照组比较，模型组与火麻仁水提液组乙酸、丁酸和总 SCFAs 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)，而丙酸、异丁酸、异戊酸、正己酸无显著变化。见表 5。

3.7 火麻仁水提液对模型大鼠结肠病理结构的影响

单因素方差分析表明：不同组间结肠隐窝深度

有显著性差异 ($P<0.001$, one-way ANOVA)。采用非参数检验 (Nonparametric tests) 比较 CHIP 评分，结果表明：不同组间结肠病理病变有极显著差异 ($P<0.001$, Kruskal-Wallis ANOVA)。多重检验 (Turkey HSD) 结果表明：与对照组相比，模型组隐窝深度变浅，杯状细胞大量破裂；炎症浸润连续分布至固有层，差异极显著 ($P<0.01$)；与模型组相比，火麻仁水提液组隐窝深度加深，结肠组织损伤明显恢复 ($P<0.05$ 、 0.01)。见表 6 和图 5。

4 讨论

正常情况下，肠道内环境各因素之间保持着动态平衡维持宿主健康，超出一定范围可能会导致疾病的发生或其他健康问题的出现。如便秘是打破这

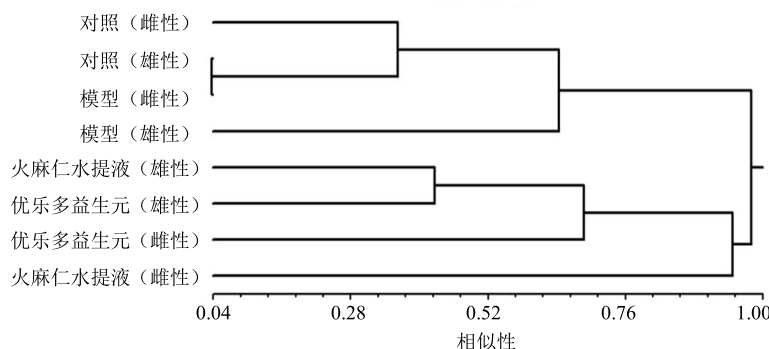


图 4 肠道菌群测序结果的 UPGMA 相似性聚类分析

Fig. 4 UPGMA similarity clustering analysis of sequencing results of intestinal microflora

表 5 火麻仁水提液对肠道菌群紊乱便秘大鼠盲肠 SCFAs 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 5 Effects of water extract from *Cannabis sativa* seed on SCFAs in the cecum of rats with constipation and enteric flora disturbance ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	SCFA/(μmol·g ⁻¹)						
		乙酸	丙酸	异丁酸	丁酸	异戊酸	正己酸	总量
对照	—	79.32±15.62	3.43±2.65	0.97±0.24	3.42±0.87	1.21±0.27	0.34±0.34	90.75±21.27
模型	—	138.42±37.55**	3.19±0.80	0.80±0.10	6.71±3.12*	1.13±0.15	0.31±0.13	166.65±44.62**
火麻仁水提液	21.6	122.65±48.91**△△	2.99±0.56	0.86±0.19	5.82±1.81*	1.17±0.20	0.39±0.11	145.82±31.93**
	2.7	78.67±12.98△△	2.17±0.37	0.59±0.15**△	3.71±0.97△	0.92±0.20	0.15±0.12	86.23±14.44△△

表 6 火麻仁水提液对肠道菌群紊乱便秘结肠病理结构的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of *Cannabis Fructus* water extract on pathological structure in colon of rats with constipation and enteric flora disturbance

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	隐窝深度/μm	CHIP 评分
对照	—	11	68.50±13.15	1.45±1.86
模型	—	10	39.55± 8.72**	9.30±2.31**
火麻仁水提液	21.6	12	59.63±17.82△	3.58±0.79△△
优乐多益生元	2.7	12	52.36± 9.76**	3.08±1.62*△△

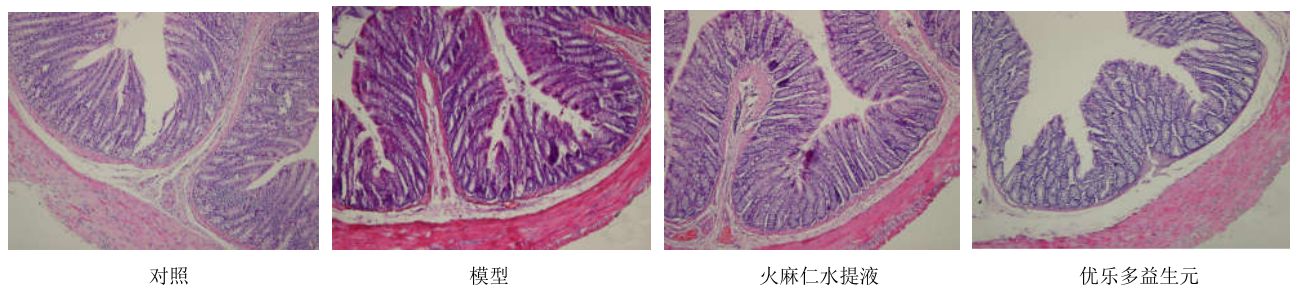


图 5 火麻仁水提液对模型大鼠结肠结构的影响 (×100)

Fig. 5 Effects of *Cannabis Fructus* water extract on pathological structure in colon of rats with constipation and enteric flora disturbance (× 100)

种平衡的常见因素,便秘发生后会出现肠道菌群紊乱、SCFAs 水平异常等^[15-16]。其中 SCFAs 是菌群代谢产物,是参与调节机体生命活动与代谢的重要物质,适量 SCFAs 可以使肠道 pH 值降低,对稳定肠道菌群结构平衡、促进健康有积极意义,但其含量过高能够触发或加重炎症反应,是便秘后肠道受损的一种表现^[17-19],这或与 SCFAs 对肠道内免疫起双向调节的作用有关^[20-22]。

本课题组前期研究也证实了该结论,通过建立便秘致肠道菌群紊乱大鼠模型,表明便秘引起的病理学特征与肠道菌群紊乱相互影响、互为因果,即便便秘易导致肠道菌群紊乱,反过来菌群紊乱又会加重便秘状态,并易致肠黏膜的炎性损伤^[12]。本研究从肠道内环境调整的角度重新审视并探讨了火麻仁水提液治疗虚性便秘等作用的可能途径及机制。

在本实验中相对于模型组,火麻仁水提液组大鼠用药后排便粒数增多、单粒质量减轻、含水量升高,说明火麻仁水提液能够缓解便秘。同时发现该组动物盲肠内细菌总数升高,并且菌群结构发生了改变, G^+/G^- 以及杆菌/球菌值趋于正常。进而采用 PCR-DGGE 法检测了代表性菌群的变化,发现便秘大鼠在火麻仁水提液作用下,盲肠中瘤胃球菌、*Blautia*、丁酸梭菌、颤杆菌、乳酸菌、罗氏菌等增多,梭菌属 IV 群等减少。其中瘤胃球菌是重要的纤维降解菌,可以促进纤维性食物的降解与吸收,对人体健康具有重要的保障作用^[9]; *Blautia* 属通常是乙酸产生者,对维持肠道及机体健康有重要意义^[23]; 丁酸梭菌是人和动物肠道的正常菌群,主要代谢产物是丁酸,而丁酸盐是结肠上皮细胞的能量代谢和正常生长主要的营养物质,在维持微生态平衡、肠道免疫等方面有重要意义,能够产生丁酸的还有罗

氏菌属^[24-25],本实验中两者所占比例变化趋势一致;乳酸杆菌以其对健康广泛而重要的影响,被认为是评判肠道健康与否的生物标记物之一^[26],可见乳酸杆菌丰度的增加是肠道和机体趋于健康的标志;梭菌属 IV 群是一类与机体过度摄入能量而导致肥胖有密切关系的细菌^[27],该菌簇的减少有助于阻止机体过于肥胖。该结果提示火麻仁水提液能够缓解便秘症状并改善肠道菌群结构。

本实验便秘模型大鼠表现为结肠内 SCFAs 异常升高,或与便秘致肠黏膜受损导致游离 SCFAs 通过肠黏膜转运困难有关。应用火麻仁水提液后,一方面使乳酸菌、丁酸梭菌、*Blautia* 属以及罗氏菌等菌群丰度增加产生 SCFAs 增多;另一方面火麻仁水提液表现出对损伤的肠黏膜有很好的修复作用,利于生成的 SCFAs 通过肠黏膜转运而发挥生理作用,因此火麻仁水提液组多种 SCFAs 及总 SCFAs 水平相对模型组有所下降而高于对照组,本结果进一步印证了上述 SCFAs 对肠道免疫起双向调节作用^[20-22]的论点,其在肠道及机体内的水平应当适宜,过高并不是健康的表现^[17-19]。

实验结果显示,给予火麻仁水提液后便秘大鼠的便秘症状得到有效缓解,紊乱的肠道菌群结构逐渐得到调整和改善,肠道内 SCFAs 水平有所提高,肠道炎症性损伤得到显著修复。该结果提示便秘大鼠多项生理病理状态可在火麻仁水提液作用下逐步得到改善并相互影响形成良性循环。体现出火麻仁不仅能够泻下,还能促进机体病伤的恢复,验证了本课题组提出的火麻仁具有“补泻”双重功效的观点^[28],也很好地阐释了中医“腑宜通即是补”(保持胃肠道的畅通便能增强体质,起到了补的作用)的理念。

参考文献

- [1] Sunil T, Jacques I, Emily W, *et al.* The host microbiome regulates and maintains human health: A primer and perspective for non-microbiologists [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(8): 1783-1812.
- [2] Clark R I, Salazar A, Yamada R, *et al.* Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(10): 1656-1667.
- [3] Besten G D, Eunen K V, Albert K, *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(9): 2325-2340.
- [4] Soldavini J, Kaunitz J D. Pathobiology and potential therapeutic value of intestinal short-chain fatty acids in gut inflammation and obesity [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(10): 2756-2766.
- [5] Dimidi E, Christodoulides S, Fragkos K C, *et al.* The effect of probiotics on functional constipation in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Amer J Clin Nutr*, 2014, 100(4): 1075-1084.
- [6] 李寒冰, 吴宿慧, 张颜语, 等. 中药与肠道菌相互作用研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 147-151.
- [7] 覃世辉, 陈小梦, 覃勇荣, 等. 巴马民间火麻汤中的油脂含量测定与制作工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 78-80.
- [8] 黄克林. 世界第五长寿之乡——广西巴马长寿因素综合分析 [J]. 广西医学, 1993, 22(1): 17-22.
- [9] 王芳. 广西巴马长寿老人肠道菌群及其与膳食纤维多糖饮食关联性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2015.
- [10] 陈秀琴, 黄小洁, 石达友, 等. 中药与肠道菌群相互作用的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1031-1036.
- [11] 汤齐, 高霞, 耿婷, 等. 肠道菌群与中药相互作用的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3629-3635.
- [12] 李根林, 张颜语, 李寒冰. 复方地芬诺酯建立大鼠便秘模型及对肠道菌群的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(49): 7404-7410.
- [13] 白云. 表达鼠源 GLP-2 嗜酸乳杆菌的构建及其对 IBD 模型小鼠的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [14] 梁健钦, 邓裕彦, 熊万娜, 等. 芒果苷对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎的预防作用及其抗炎机制初步研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(2): 283-288.
- [15] 沈小雪, 俞汀, 林琳. 胃肠道微生态如何影响慢性便秘以及指导临床治疗 [J]. 胃肠病学, 2017, 22(5): 308-311.
- [16] Dimidi E, Christodoulides S, Fragkos K C, *et al.* The effect of probiotics on functional constipation in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Amer J Clin Nutr*, 2014, 100(4): 1075-1084.
- [17] Rabbani G H, Albert M J, Rahman H, *et al.* Short-chain fatty acids inhibit fluid and electrolyte loss induced by cholera toxin in proximal colon of rabbit *in vivo* [J]. *Digest Dis Sci*, 1999, 44(8): 1547-1553.
- [18] Grider J R, Piland B E. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF [J]. *Am J Physiol Gastro Liver Physiol*, 2007, 292(1): G429-G437.
- [19] Liu T, Hougén H, Vollmer A C, *et al.* Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids [J]. *Anaerobe*, 2012, 18(3): 331-337.
- [20] Kaji I, Iwanaga T, Watanabe M, *et al.* SCFA transport in rat duodenum [J]. *Amer J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(3): 188-197.
- [21] 吴水芸. 高脂肥胖对肠道微生态、短链脂肪酸的影响 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [22] 王璐璇, 刘玥宏, 朱继开, 等. 短链脂肪酸在疾病治疗中的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(13): 1179-1186.
- [23] Park S K, Kim M S, Roh S W, *et al.* *Blautia stercoris* sp. nov, isolated from human faeces [J]. *Int J System Evol Microbiol*, 2012, 62(4): 776-779.
- [24] 张善亭, 史燕, 张淑丽, 等. 丁酸梭菌的研究应用进展 [J]. 生物技术通报, 2013, 254(9): 27-33.
- [25] Abell G C, Christophersen C T, McOrist A L, *et al.* Dietary resistant and butyrylated starches have different effects on the faecal bacterial flora of azoxymethane-treated rats [J]. *Br J Nutr*, 2011, 105(10): 1480-1485.
- [26] Kaur I P, Kuhad A, Garg A, *et al.* Probiotics: delineation of prophylactic and therapeutic benefits [J]. *J Med Food*, 2009, 12(2): 219-235.
- [27] Li M, Wang B, Zhang M, *et al.* Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes [J]. *PNAS*, 2008, 105(6): 2117-2122.
- [28] 李寒冰, 吴宿慧. 火麻仁油干预能量代谢与衰老进程的作用研究 [A] // 第一届《药学报》药学前沿论坛暨 2015 年中国药学会中药与天然药物专业委员会会议论文摘要集 [C]. 北京: 《药学报》编委会、中国药学会中药与天然药物专业委员会, 2015.