

植物乳杆菌 RG-034 对大鼠腹泻型肠易激综合征的治疗作用

徐冯莲¹, 许锐鹏^{2#}, 张沂¹, 王子昱¹, 李煜龙², 陈贵浩², 方伟蓉^{1*}

1. 中国药科大学 基础医学与临床药学院, 江苏 南京 210009

2. 广东强基药业有限公司, 广东 潮州 515636

摘要: **目的** 研究植物乳杆菌 RG-034 的体外抑菌效果以及对大鼠腹泻型肠易激综合征的治疗作用。**方法** 采用活菌计数法测定 RG-034 菌粉活菌数, 利用类“牛津杯法”确定植物乳杆菌 RG-034 对大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性。SD 大鼠按体质量随机分为对照组、模型组、蒙脱石散组及植物乳杆菌 RG-034 胶囊组, 每组 6 只。除对照组外, 其余大鼠每日 ig 5 g/kg 番泻叶联合隔日禁食, 持续 5 周, 制备大鼠腹泻型肠易激综合征模型。自造模第 3 周开始给药, 植物乳杆菌 RG-034 组大鼠 ig RG-034 胶囊 (1×10^9 CFU/粒, 15 mg), 2 粒/d; 蒙脱石散组大鼠 ig 0.81 g/kg 蒙脱石散, 1 次/d; 对照组和模型组大鼠 ig 等量生理盐水, 给药 3 周。观察大鼠一般状态变化, 测定稀便率、稀便级以及腹泻指数, 采用 16S 核糖体 RNA 测序技术分析大鼠结肠中肠道菌群变化。**结果** 植物乳杆菌 RG-034 菌粉活菌数为 2.5×10^{11} CFU/g, 对不同浓度的大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑制作用, 抑菌圈直径为 15.90~25.06 mm。与模型组比较, 植物乳杆菌 RG-034 胶囊可明显改善大鼠腹泻情况, 显著降低稀便率、稀便级以及腹泻指数, 增加了肠道菌群多样性。**结论** 植物乳杆菌 RG-034 对大鼠腹泻型肠易激综合征具有一定的治疗作用, 其机制可能与调节肠道菌群多样性有关。**关键词:** 植物乳杆菌 RG-034; 腹泻型肠易激综合征; 肠道菌群; 16S rRNA 高通量测序; 大肠埃希菌; 乙型副伤寒沙门菌; 金黄色葡萄球菌

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2024)04-0816-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.003

Therapeutic effect of *Lactobacillus plantarum* RG-034 on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats

XU Fenglian¹, XU Ruipeng², ZHANG Yi¹, WANG Ziyu¹, LI Yulong², CHEN Guihao², FANG Weirong¹

1. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Guangdong Qiangji Pharmaceutical Co., Ltd., Chaozhou 515636, China

Abstract: Objective To investigate the bacteriostatic effect of *Lactobacillus plantarum* RG-034 *in vitro* and its therapeutic effect on the diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome in rats. **Methods** The viable bacteria count of RG-034 powder was determined by using the “Oxford Cup method” to determine the antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* RG-034 against *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* B and *Staphylococcus aureus*. SD rats were randomly divided into control group, model group, Montmorillonite Powder group, and *Lactobacillus plantarum* RG-034 capsule group by body weight, with 6 rats in each group. Except the control group, other rats were given 5 g/kg senna leaf combined with alternate day fasting daily for 5 weeks to prepare a rat model of diarrhea-type irritable bowel syndrome. At the 3rd week of self-modeling, rats in *Lactobacillus plantarum* RG-034 group were given RG-034 Capsules (1×10^9 CFU/ Capsule, 15 mg), 2 capsules/d. Rats in Montmorillonite Powder group were ig 0.81 g/kg Montmorillonite Powder once daily. The rats in control group and model group were given the same amount of normal saline intragaically for 3 weeks. The changes of the general status of rats were observed, the rate of loose stool, the grade of loose stool and the diarrhea index were determined, and the changes of intestinal flora in the colon of rats were analyzed by 16S ribosomal RNA sequencing technology. **Results** The viable bacteria number of *Lactobacillus plantarum* RG-034 Powder was 2.5×10^{11} CFU/g, which had certain inhibitory effect on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* B and *Staphylococcus aureus* at different concentrations,

收稿日期: 2023-11-30

作者简介: 徐冯莲, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: 15651711682@163.com

*通信作者: 方伟蓉, 教授, 博士生导师, 研究方向为药理学。E-mail: weirongfang@cpu.edu.cn

#共同第一作者: 许锐鹏, 执业药师, 研究方向为微生态制剂的应用研究。E-mail: 742850212@qq.com

and the inhibitory zone diameter was 15.90 — 25.06 mm. Compared with the model group, *Lactobacillus plantarum* RG-034 Capsules can significantly improve the diarrhea situation of rats, significantly reduce the rate of loose stool, loose stool grade and diarrhea index, and increase the diversity of intestinal flora. **Conclusion** *Lactobacillus plantarum* RG-034 has a certain therapeutic effect on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats, and its mechanism may be related to the regulation of intestinal microbiota diversity.

Key words: *Lactobacillus plantarum* RG-034; diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome; intestinal microbiota; 16S rRNA high-throughput sequencing; *Escherichia coli*; *Salmonella paratyphi* B; *Staphylococcus aureus*

腹泻型肠易激综合征是一种常见的慢性非器质性消化系统疾病, 临床症状表现为反复性腹痛和腹泻, 是肠易激综合征最主要的亚型^[1-2]。腹泻型肠易激综合征的发生与脑-肠轴功能异常、内脏超敏反应、心理应激等因素密切相关^[3], 对患者的生活质量造成了严重影响, 持续的健康问题易导致患者产生焦虑和抑郁等心理问题^[4]。近年来研究表明肠道菌群失调参与了腹泻型肠易激综合征的发生发展, 腹泻型肠易激综合征患者的肠道菌群与正常人相比存在明显差异, 常表现为有益菌减少, 有害菌增多^[5]。同时, 腹泻型肠易激综合征患者肠道内微生物的定植能力受损, 表现为益生菌的流失^[6]。腹泻型肠易激综合征的传统治疗方法包括生活方式和饮食干预、心理治疗以及药物治疗^[7]。止泻药、抗抑郁药、抗痉挛药、抗生素等药物虽然可以缓解症状, 但存在疗效有限、不良反应严重、适应范围狭窄、易产生依赖性等问题^[8-9]。

植物乳杆菌是一种公认的益生菌, 能在低pH值环境中生长, 具有调节肠道菌群平衡、抑制有害菌生长等益生作用^[10-11]。植物乳杆菌可以增强免疫系统功能, 促进食物消化和营养吸收, 缓解肠道炎症。此外, 植物乳杆菌产生的乳酸和其他有益代谢产物有助于维持肠道健康^[12]。由于其多种益生作用, 植物乳杆菌被广泛应用于乳制品、发酵食品和膳食补充剂中^[13]。植物乳杆菌已被证明对革兰阳性菌、革兰阴性细菌以及真菌有良好的抑制作用^[14-15]。植物乳杆菌 1201 可以提高 *Akkermansia*、*Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 等有益细菌的相对丰度, 减轻肠道炎症反应, 从而维护肠道健康^[16]。植物乳杆菌 GMNL-662 通过调节肠道菌群构成, 降低嗜黏蛋白菌属, 维持肠道生态平衡, 抵御炎症; 其代谢产物能够增强肠道屏障功能, 抑制致病菌定植, 调节肠内免疫, 降低炎症因子水平^[17]。植物乳杆菌 HCS03-001 无溶血作用及致病性, 在小鼠急性毒性实验中未引起毒性反应, 表现出良好的安全性和潜在的益生特性^[18]。

常见的益生菌产品剂型包括粉剂、片剂和颗粒

剂等, 然而这些剂型容易受环境影响, 水分、高温、胃酸和小肠中的消化酶等都会降低益生菌的活力, 减少活菌数量。肠溶胶囊是一种良好的益生菌制备技术, 能够在肠道内释放活性成分, 从而保护益生菌免受胃酸和胃蛋白酶的破坏, 提高其存活率和保持活性。本研究制备了植物乳杆菌 RG-034 大鼠肠溶胶囊, 实现了结肠定位释放, 为益生菌提供更好的保护和释放效果。然而, 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征的治疗作用未见报道。本研究通过 ig 番泻叶联合隔日禁食制备大鼠腹泻型肠易激综合征模型, 研究植物乳杆菌 RG-034 对大鼠腹泻型肠易激综合征的治疗效果及可能机制, 为其进一步开发提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

RG-034 菌粉 (广东强基药业有限公司, 批号 20221214); 植物乳杆菌 RG-034 大鼠肠溶胶囊 (广东强基药业有限公司, 批号 20220729); RG-034 菌株 (批号 20231016); 大肠埃希菌[菌号 CMCC (B) 44102], 乙型副伤寒沙门菌[菌号 CMCC (B) 50094], 金黄色葡萄球菌[菌号 CMCC (B) 26003]均来自广东环凯微生物科技有限公司。De Man、Rogosa、Sharpe (MRS) 平皿 (批号 20231001); 番泻叶 (豪州市永刚饮片厂有限公司, 批号 A220622); 蒙脱石散 (江苏奇冠药店有限公司, 批号 U22457)。

1.2 实验仪器

YQX-II 厌氧培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司); SPX-250-II 生化培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司); BSA224S 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); EPED-20TF 超纯水机 (南京易普达科技发展有限公司)。

1.3 实验动物

SD 大鼠, 24 只, 雌雄各半, SPF 级, 体质量 200~250 g, 购于上海市计划生育科学研究所实验动物经营部, 生产许可证号 SCXK (沪) 2018-0006, 合格证编号 20180006040529。动物均饲养于中国药科大学动物实验中心清洁级环境中, 所有动物研究

均遵循国际医学伦理规范并经中国药科大学动物伦理委员会批准, 动物实验伦理批号 2022-08-022。

2 方法

2.1 RG-034 菌粉的制备及活菌数测定

将植物乳杆菌菌株 RG-034 置于培养基中培养, 离心分离后, 加入冻干保护剂, 制得植物乳杆菌 RG-034 菌粉。无菌称取 3.0 g RG-034 菌粉, 加入 27.0 mL 无菌生理盐水, 充分摇匀, 取 1 mL 做 10 倍系列稀释。最终稀释度为 1×10^{-9} , 取最终稀释度的菌液 100 μ L 滴入 MRS 琼脂培养基平皿上, 共做 3 个平皿。用玻棒涂布均匀, 37 $^{\circ}$ C 厌氧条件下倒置培养 36~48 h, 观察每个平皿菌落生长情况并计数。依据《中国药典》2020 年版三部规定: 每 1 克菌粉活菌数不少于 1×10^{10} CFU。活菌数计算公式如下:

活菌数 (CFU/g) = 3 个平皿菌落数之和 / $3 \times 10 \times$ 最终稀释度

2.2 植物乳杆菌 RG-034 大鼠肠溶胶囊的制备

取处方量植物乳杆菌 RG-034 菌粉、预胶化淀粉和硬脂酸镁, 混合均匀后, 将其填充至肠溶型大鼠动物试验胶囊中, 制得植物乳杆菌 RG-034 大鼠肠溶胶囊, 每粒胶囊活菌数为 1×10^9 CFU。

2.3 RG-034 抑菌试验

实验以大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌为指示菌株, 采用类似“牛津杯法”检测 RG-034 抑菌性^[19]。

2.3.1 RG-034 菌株的扩增及菌饼制备 RG-034 菌株从甘油管活化后, 按 5% 的比例接种至 5 mL/15 mL (15 mL 离心管装 5 mL 培养基) 的 MRS 培养基中, 培养 12~24 h, 看到明显混浊后获得 RG-034 乳酸菌菌液; 将 9.5 mL/15 mL 的 MRS 固体管沸水浴加热, 待琼脂完全融化后, 放入 55 $^{\circ}$ C 水浴锅, 备用; 将 1.0 mL RG-034 乳酸菌菌液与 19.0 mL MRS 固体培养基混匀, 倾注入 9 cm 平皿内; 完全凝固后, 放入乐扣盒, 放入除氧袋, 平皿倒置培养; 37 $^{\circ}$ C 培养 36~48 h, 取出平皿, 用内径 9 mm 的打孔器, 在琼脂培养基上打孔, 获得菌饼, 备用。

2.3.2 致病菌的扩增和菌饼制备 大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌从甘油管活化后, 按 5% 的比例接种至 10 mL/15 mL 的液体培养基中, 培养 12~24 h; 将 5 mL/15 mL 的半固体培养基沸水浴加热, 待琼脂完全融化后, 放入 55 $^{\circ}$ C 水浴锅内; 用无菌生理盐水稀释液至 10^{-1} 级 (约 1×10^8 CFU/mL)、 10^{-2} 级 (约 1×10^7 CFU/mL) 2 个浓度;

取稀释液 0.5 mL 与 5 mL 半固体培养基混匀, 倾注入 9 cm 平皿内, 等待完全凝固, 备用。

2.3.3 抑菌圈直径测量 将乳酸菌菌饼轻放在半固体培养基表面, 每个皿中各放 1 块 RG-034 菌饼和 1 块空白培养基; 34 $^{\circ}$ C, 平皿正置培养 16~18 h。用游标卡尺测量抑菌圈大小并记录, 拍照记录平皿情况。

2.4 分组及给药

2.4.1 番泻叶溶液的制备 每 100 克番泻叶加入 1 L 纯水, 充分搅拌后浸泡 30 min, 沸水煎煮 30 min, 两层纱布过滤取上清液, 用旋转蒸发仪将药液减压浓缩至 100 mL, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用^[20]。

2.4.2 动物分组 健康成年 SD 大鼠饲养于中国药科大学药理学动物实验中心, 适应性饲养 1 周后, 按体质量随机分为对照组、模型组、蒙脱石散组、植物乳杆菌 RG-034 组, 每组 6 只, 雌雄各半。

2.4.3 造模与给药 对照组大鼠每天 ig 生理盐水, 期间正常饮食。其余各组大鼠 ig 番泻叶溶液 5 g/kg, 1 次/d, 连续 2 周。同时在造模第 1 周时, 各造模组大鼠进行隔日禁食, 饥饱交替。自第 3 周开始, 除对照组和模型组外, 蒙脱石散组 ig 0.81 g/kg 蒙脱石散, 1 次/d, 连续给药 3 周; 植物乳杆菌 RG-034 组单次 ig 胶囊 1 粒 (1×10^9 CFU/粒, 15 mg)^[21], 2 次/d。动物给药期间正常饮水进食。

2.5 检测指标及方法

2.5.1 一般状态变化 实验过程中记录各组大鼠的体质量、精神状态、皮毛色泽、反应力、活动度、存活率以及粪便性状。

2.5.2 稀便率、稀便级和腹泻指数的测定 分别在给药前 1 d 及给药第 7、14、21 天进行指标检测, 当天给药结束后, 将大鼠置于垫有滤纸的代谢笼内, 每笼 1 只, 每隔 1 h 更换滤纸, 连续检测 5 h, 记录每只大鼠的稀便粒数以及粪便总粒数。干便与稀便的区分方法: 以滤纸上有无污迹为标准, 粪便次数以每粒或每堆 (不能分清粒数者) 为 1 次。

稀便率 = 大鼠所排稀便粒数 / 粪便总粒数

依据稀便污染滤纸形成污迹面积的大小进行分级 (表 1)。污迹直径的测量方法: 粪便形状为圆形, 则直接量直径; 如为椭圆形则测量最长和近似圆的直径, 相加除以 2。统计时先逐个统计每一堆湿便的级数, 将该鼠所有稀便级数相加除以稀便次数, 得到稀便的平均级数即稀便级。

腹泻指数 = 稀便率 \times 稀便级

表1 稀便级别标准

污迹直径/cm	稀便级别
<1	1
≥1~≤1.9	2
>1.9~≤3	3
>3	4

2.5.3 16S rRNA 高通量测序 大鼠脱颈处死,在盲肠下端2~3 cm处,取8 cm左右的结肠,用无菌磷酸盐缓冲液轻轻清洗,直到没有内容物流出。用无菌显微镜玻片刮取附着在结肠表面的组织细菌,装入备好的无酶EP管内,随后置于液氮中保存。

实验结束后,将取材得到的大鼠结肠组织细菌采用16S rRNA高通量测序技术进行肠道菌群的检测。基本流程:从样品中提取总基因组DNA,采用Nanodrop对DNA进行定量,并通过1.2%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量。对细菌16S rRNA基因的v4~v5区域进行PCR扩增,将扩增产物进行磁珠纯化回收,随后将PCR扩增回收产物进行荧光定量。根据荧光定量结果,按照每个样本的测序量需求,对各样本按相应比例进行混合。采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库,并进行高通量测序。16S rRNA高通量测序以及生物信息分析流程由苏州帕诺米克生物医药科技有限公司提供,根据公司平台生成的数据和图片进行统计分析处理。

2.6 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用SPSS 26.0进行统计分析。组间差异显著性采用单因素方差分析进行检验,方差齐性时采用LSD事后检验比较组间数据的差异,方差不齐时采用Games Howell事后检验进行组间比较。

3 结果

3.1 植物乳杆菌 RG-034 菌粉活菌数

结果如表2所示,每克RG-034菌粉的活菌数为 2.5×10^{11} CFU,符合《中国药典》2020年版三部标准规定。

表2 植物乳杆菌 RG-034 粉活菌计数

皿号	菌落数/个	平均菌落数/个	活菌数/(CFU·g ⁻¹)
1	29	25	2.5×10^{11}
2	24		
3	22		

3.2 植物乳杆菌 RG-034 抑菌效果

乳酸菌能够产生有机酸、过氧化氢等代谢产物、分泌细菌素,具有抑制致病菌生长及减少腐败菌毒素产生的作用,因此抑菌功能是乳酸菌重要的益生特性^[22]。实验选取大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌为指示菌。结果如表3和图1所示,空白培养基未产生抑菌圈,植物乳杆菌RG-034菌饼周围出现抑菌圈。植物乳杆菌RG-034对不同浓度的大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为15.90~25.06 mm,提示其对以上3种指示菌均有一定程度的抑制作用。

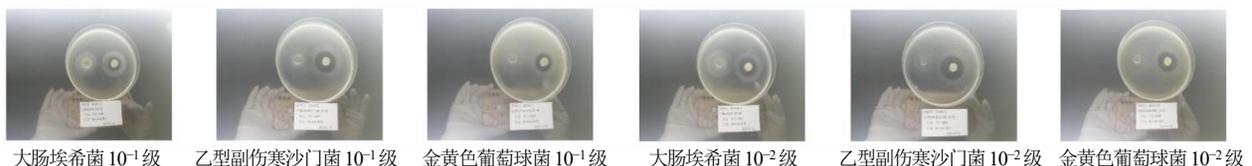
3.3 各组大鼠一般状态变化

对照组大鼠形体正常,活动灵活,毛色光亮,未见腹泻现象。其余各试验组大鼠在造模第2天后均出现腹泻现象,造模2周内各组大鼠腹泻明显,毛色晦暗,肛周污秽。给药阶段,模型组大鼠上述情况加重,出现毛发结穗、扎堆蜷缩、倦怠懒动、激惹,抓捕抵抗减弱。给药1周后,蒙脱石散组与

表3 植物乳杆菌 RG-034 抑菌作用

Table 3 Experimental results of antimicrobial properties of *Lactobacillus plantarum* RG-034

组别	抑菌圈直径/mm
大肠埃希菌 (10 ⁻¹ 级)	15.90
大肠埃希菌 (10 ⁻² 级)	20.37
乙型副伤寒沙门菌 (10 ⁻¹ 级)	22.67
乙型副伤寒沙门菌 (10 ⁻² 级)	25.06
金黄色葡萄球菌 (10 ⁻¹ 级)	19.24
金黄色葡萄球菌 (10 ⁻² 级)	24.21



大肠埃希菌 10⁻¹级 乙型副伤寒沙门菌 10⁻¹级 金黄色葡萄球菌 10⁻¹级 大肠埃希菌 10⁻²级 乙型副伤寒沙门菌 10⁻²级 金黄色葡萄球菌 10⁻²级

图1 植物乳杆菌 RG-034 的抑菌作用

Fig. 1 Antibacterial ability of *Lactobacillus plantarum* RG-034

植物乳杆菌 RG-034 组大鼠精神有所好转，活动度有所增加。

体质量如图 2 所示。造模期间，对照组大鼠体质量按正常生长规律增长，其余各试验组大鼠体质量下降显著，表明腹泻型肠易激综合征大鼠模型造模成功，可严重影响大鼠的自然生长。给药期间，与模型组大鼠相比，植物乳杆菌 RG-034 组和蒙脱石散组大鼠体质量均有所上升，表明 RG-034 治疗能增加腹泻型肠易激综合征大鼠的体质量。造模过程中，蒙脱石散组有 1 只大鼠死亡 ($n=5$)，其余各组大鼠均存活 ($n=6$)。

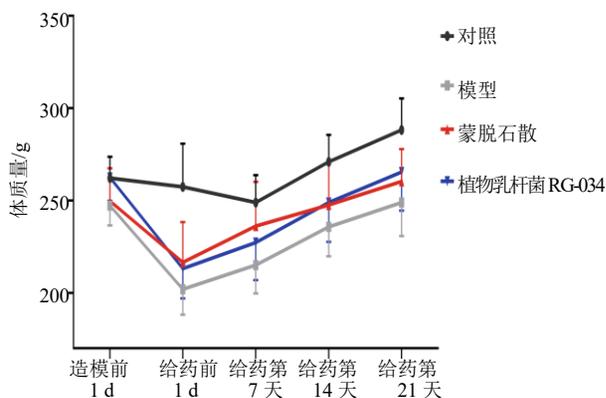


图 2 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of the *Lactobacillus plantarum* RG-034 on the body weight ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 植物乳杆菌胶囊 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠稀便率的影响

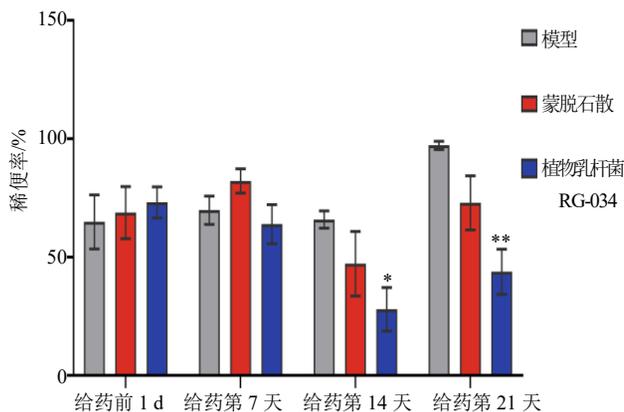
实验过程中，对照组大鼠未排出稀便。给药前，与对照组相比，各造模组大鼠稀便率极显著升高，表明腹泻模型造模成功。由图 3 可见，给药第 14、21 天，与模型组相比，植物乳杆菌 RG-034 组大鼠稀便率显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠稀便级的影响

实验过程中，对照组大鼠所排粪便均干燥且成形，其稀便级均为 0。给药前，与对照组相比，各造模组大鼠稀便级极显著升高，表明腹泻模型造模成功。由图 4 可见，给药第 7、14、21 天，与模型组相比，蒙脱石散组和植物乳杆菌 RG-034 组大鼠稀便级未有明显差异。

3.6 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠腹泻指数的影响

实验过程中，对照组大鼠腹泻指数均为 0。给



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 3 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠稀便率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of the *Lactobacillus plantarum* RG-034 on the loose stool rate ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

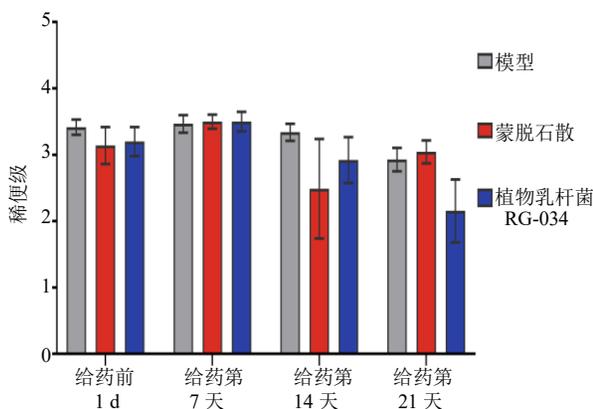


图 4 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠稀便级的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effects of the *Lactobacillus plantarum* RG-034 on the loose stool level ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

药前，与对照组相比，各造模组大鼠腹泻指数显著升高，表明腹泻模型造模成功。由图 5 可见，给药第 14、21 天，与模型组相比，植物乳杆菌 RG-034 组大鼠腹泻指数显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.7 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群的影响

3.7.1 物种累计曲线 物种积累曲线显示，随着测序样本的数量与相应的等级值增加，大鼠样本菌群数量与相对丰度趋于恒定值，表明测序样本量合理，已达到充分的测序深度，能够反映一定的群落丰富度，见图 6。

3.7.2 大鼠结肠组织菌群物种组成分析 根据 OTU

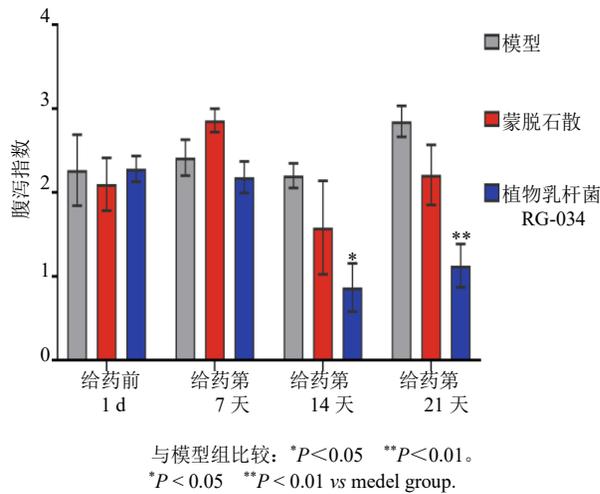


图 5 植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠腹泻指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of the *Lactobacillus plantarum* RG-034 on the loose stool index ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

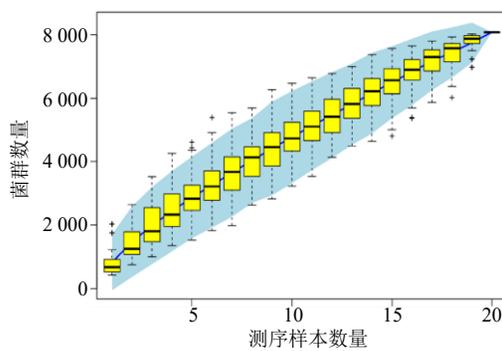


图 6 物种累积曲线

Fig. 6 Species accumulation curve

聚类结果，分别在纲、属水平上发现，4 组的肠道菌群群落结构基本相似，而构成比有差异。

如图 7 所示，在纲 (class) 水平上，各组大鼠梭状芽胞杆菌纲 (*Clostridia*)、弯曲杆菌纲 (*Campylobacteriia*)、芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)、拟杆菌纲 (*Bacteroidia*) 4 种菌纲丰度相对较高。与对照组相比，模型组弯曲杆菌纲有所升高，芽孢杆菌纲和拟杆菌纲则明显降低。而蒙脱石散组和植物乳杆菌 RG-034 组的菌群结构则有所变化。

如图 8 所示，在属 (genus) 水平上，4 组中排在前 4 位的菌属主要有螺杆菌属 *Helicobacter*、毛螺菌属 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、布劳特氏菌属 *Blautia*、*Muribaculaceae* 菌属。与对照组相比，模型组螺杆菌属、毛螺菌属、布劳特氏菌属明显升高，*Muribaculaceae* 明显降低。蒙脱石散组和植物乳杆菌 RG-034 组的菌群结构则在模型组的基础上

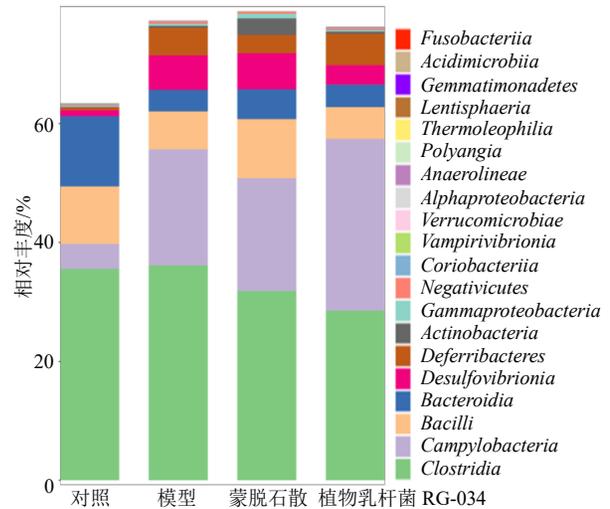


图 7 纲水平上物种分布

Fig. 7 Species distribution at class level

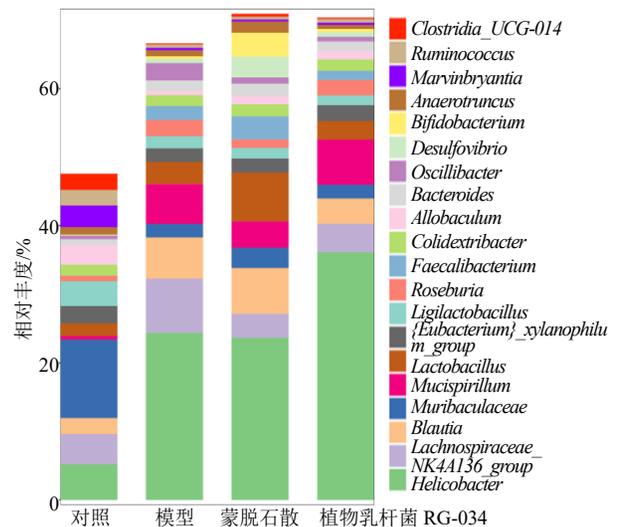


图 8 属水平上物种分布

Fig. 8 Species distribution at genus level

有所变化。

3.7.3 大鼠结肠组织菌群多样性比较 β 多样性分析用来比较不同样本在物种多样性方面的相似程度。采用 Jaccard 的算法计算样本间的距离，得到主坐标 (PCoA) 分析的结果。如图 9 所示，模型组与对照组的肠道菌群在坐标系的不同空间区域分布，且对照组、模型组的组内集群效果好，植物乳杆菌 RG-034 组较差，说明了植物乳杆菌 RG-034 组样本在向对照组靠近，在一定程度上改善了腹泻型肠易激综合征大鼠模型的 β 多样性。

3.7.4 代谢通路预测 如图 10、11 所示，KEGG 通路富集分析结果显示，各样本功能可能与细胞进程、

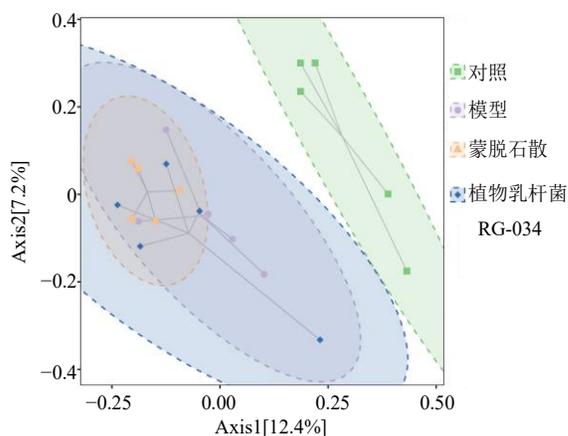


图 9 基于 Jaccard 距离的 PCoA 分析
Fig. 9 PCoA analysis based on Jaccard distance

环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、生物体系统以及各种物质与能量代谢有关。MetaCyc 富集分析结果显示各样本功能可能与生物合成、降解作用、同化作用、解毒作用、前体代谢物和能量的产生、聚糖途径、高分子修饰以及物质代谢有关。

4 讨论

腹泻型肠易激综合征是一种常见的胃肠道疾病，常伴有气胀、恶心和食欲不振等症状，严重影响患者的正常生活。腹泻型肠易激综合征的诱发因素可能与肠道运动紊乱、感染或过敏反应有关，同时心理因素也可能参与其中。抗生素、止泻药、阿片类药物等药物存在药物不良反应较大、治疗效果有限、药物依赖性高且无法彻底治愈等问题^[23]。近

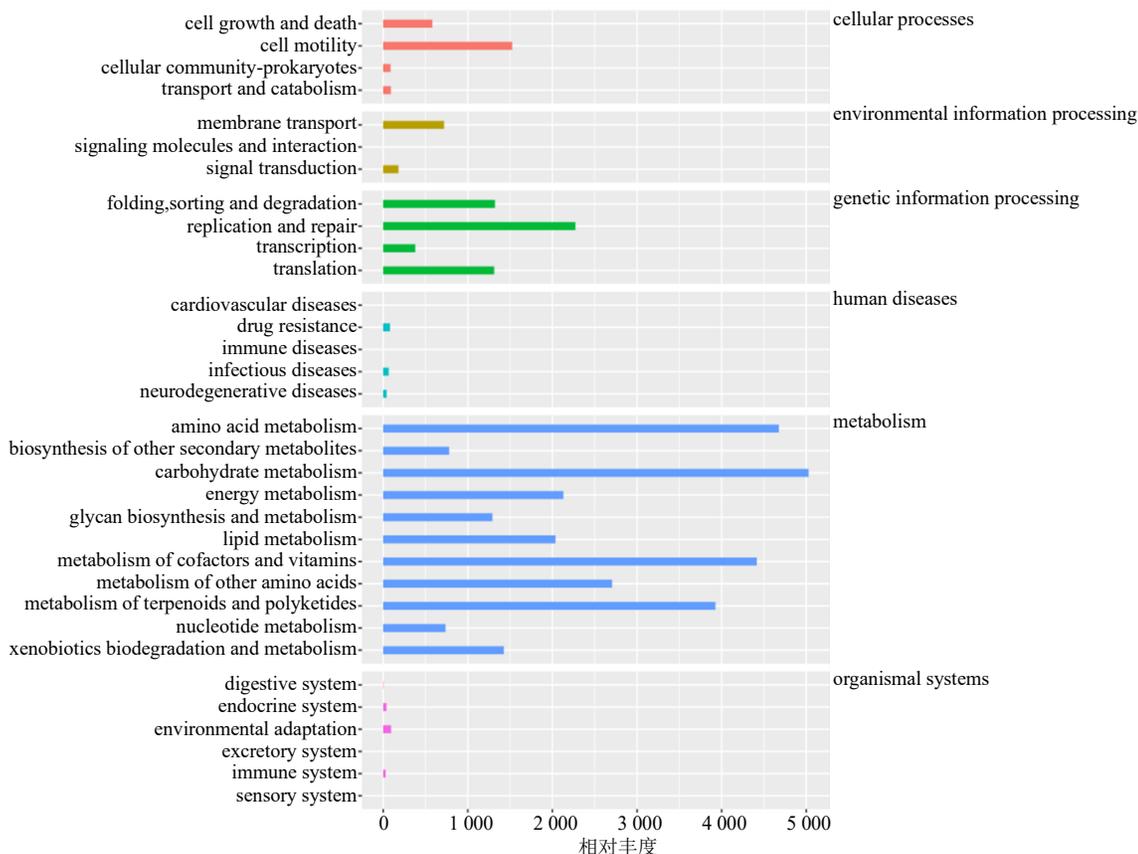


图 10 KEGG 二级功能通路丰度图

Fig. 10 Abundance of KEGG secondary functional pathways

年来，益生菌制剂成为腹泻型肠易激综合征的潜在治疗策略。植物乳杆菌是一类常见的肠道益生菌，能够抑制有害菌的生长，调节肠道微环境，促进营养物质的吸收和代谢^[24]。1 项临床试验证实，口服植物乳杆菌 CCFM8610 后，患者的腹泻型肠易激综合征症状明显减轻，同时肠道菌群的多样性得到恢复，其缓解作用可能与在肠道中促进丁酸生产种属

的相对丰度上升相关^[25]。

番泻叶的主要成分是大黄素和大黄酚，它们能够刺激肠道壁上的神经末梢，诱发肠道平滑肌的收缩，进而促进肠道蠕动^[26]。在隔日禁食期间，由于饮食模式的变化，可能导致排便频率、大便量和质地发生变化。此外，隔日禁食可能引起胃酸分泌过多，刺激肠道黏膜，进一步加剧腹泻型肠易激综合



图 11 MetaCyc 二级功能通路丰度图

Fig. 11 Abundance of MetaCyc secondary functional pathways

征的症状^[27]。本实验通过采用 ig 番泻叶联合隔日禁食成功制备了稳定的大鼠腹泻型肠易激综合征模型。造模期间，与对照组大鼠相比，各造模组大鼠毛发失去光泽，出现毛发凌乱、精神不振等现象，体质量降低，粪便溏稀，稀便率、稀便级以及腹泻指数显著升高。ig 给予大鼠植物乳杆菌 RG-034 胶囊 2 周后，腹泻情况明显改善，大便成形，大鼠精神状态良好，活动度增加。给药 3 周后，大鼠稀便率、稀便级以及腹泻指数相较于模型组显著下降，表明植物乳杆菌 RG-034 对大鼠腹泻型肠易激综合征有一定治疗作用，持续用药才能发挥最佳疗效。

肠道菌群包括了有益菌和有害菌 2 大类，其中有益菌占据主导地位，如双歧杆菌、乳酸菌和梭菌等。此类有益菌协助食物消化，合成维生素和酶，

平衡免疫系统以及抵抗有害微生物的入侵^[28]。在正常情况下，肠道微生态系统中的肠道菌群保持着动态平衡，维持肠黏膜上皮细胞的增殖和分化，促进免疫系统的正常发育。一旦这种平衡被打破，有害菌将占据主导地位，造成免疫系统被过度激活，诱发多种腹泻型肠易激综合征症状^[29]。研究表明腹泻型肠易激综合征患者肠道菌群结构与健康人相比存在失调情况，其肠道微生物在粪菌移植治疗后，会出现菌群丰度增加、结构改变的情况^[30-31]。近几年，学者们将肠道菌群作为治疗腹泻型肠易激综合征的靶点，得到了较好的效果^[32]。16S rRNA 高通量测序结果表明，蒙脱石散和植物乳杆菌 RG-034 对腹泻型肠易激综合征大鼠的肠道菌群总体的丰富度和多样性均无明显影响，推测植物乳杆菌 RG-034 对腹

泻型肠易激综合征大鼠的治疗作用可能不是通过改变大鼠总体肠道菌群的丰富度实现的,而是通过改变其中的某些特定菌的丰富度或者某些特定菌的功能来实现的。此外,测序结果表明植物乳杆菌 RG-034 在一定程度上改善腹泻型肠易激综合征大鼠模型的 β 多样性。因此,改善肠道菌群多样性可能成为植物乳杆菌 RG-034 治疗腹泻型肠易激综合征的潜在机制。

综上所述,植物乳杆菌 RG-034 能够有效减轻由 ig 番泻叶合并隔日禁食引发的腹泻型肠易激综合征症状,为利用植物乳杆菌作为治疗腹泻型肠易激综合征的方法提供了有力的支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Qian W N, Li W L, Chen X Y, *et al.* Exploring the mechanism of Xingpi Capsule in diarrhea predominant irritable bowel syndrome treatment based on multiomics technology [J]. *Phytomedicine*, 2023, 111: 154653.

[2] Li L, Cui H R, Li T, *et al.* Synergistic effect of berberine-based Chinese medicine assembled nanostructures on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1210.

[3] Ford A C, Sperber A D, Corsetti M, *et al.* Irritable bowel syndrome [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1675-1688.

[4] Xie P W, Luo M, Deng X H, *et al.* Outcome-specific efficacy of different probiotic strains and mixtures in irritable bowel syndrome: A systematic review and network Meta-analysis [J]. *Nutrients*, 2023, 15(17): 3856.

[5] Raskov H, Burcharth J, Pommergaard H C, *et al.* Irritable bowel syndrome, the microbiota and the gut-brain axis [J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(5): 365-383.

[6] 王菲, 高斌. 腹泻型肠易激综合征患者的肠道微生态特征 [J]. *临床合理用药杂志*, 2021, 14(8): 157-158.

[7] Ikechi R, Fischer B D, DeSipio J, *et al.* Irritable bowel syndrome: Clinical manifestations, dietary influences, and management [J]. *Healthcare*, 2017, 5(2): 21.

[8] Camilleri M. Diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome: A review [J]. *JAMA*, 2021, 325(9): 865-877.

[9] Brenner D M, Sayuk G S. Current US Food and Drug Administration-approved pharmacologic therapies for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *Adv Ther*, 2020, 37(1): 83-96.

[10] Wassenaar T M, Klein G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements [J]. *J Food Prot*, 2008, 71(8): 1734-1741.

[11] 伊婷, 乔家运, 李玉鹏, 等. 植物乳杆菌对小鼠体重、

炎症反应及肠道健康的影响 [J]. *动物营养学报*, 2023, 35(4): 2668-2676.

[12] 曹承旭, 郭晶晶, 乌日娜, 等. 植物乳杆菌的生理功能和组学研究进展 [J]. *乳业科学与技术*, 2018, 41(1): 33-39.

[13] 王鸿蕉, 蔡昀洁, 岳明祥, 等. 植物乳杆菌的抑菌性能及其影响因素研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(14): 212-218.

[14] 张欢, 李沛军, 田兴垒, 等. 乳酸菌和木糖葡萄糖球菌对产气荚膜梭菌抑制能力分析 [J]. *食品科学*, 2020, 41(6): 86-92.

[15] 张文羿, 李康宁, 孟和毕力格. 抗真菌植物乳杆菌的筛选及其抗菌因素的研究 [J]. *中国乳品工业*, 2018, 46(7): 9-12.

[16] 彭玲玲, 任中月, 陶飞越, 等. 植物乳杆菌 1201 对 DSS 诱导结肠炎的缓解作用 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(7): 394-405.

[17] 兰慧, 郑晗盈, 庄滢滢, 等. 植物乳杆菌 GMNL-662 和胚芽乳酸杆菌 299v 对小鼠结肠炎的保护作用研究 [J]. *营养学报*, 2021, 43(6): 577-583.

[18] 矫艳平, 余萍, 赵迪, 等. 植物乳杆菌 HCS03-001 安全性评价及其益生特性分析 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(5): 165-171.

[19] 郑柳青, 刘冬梅, 张馨月, 等. 鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的安全性评价及其益生特性初步研究 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 111-116.

[20] 杨海燕, 张黎莉, 袁秀荣. 肠安颗粒对 IBS 模型大鼠的影响 [J]. *中药材*, 2008(11): 1699-1702.

[21] Liu Y W, Wang Y P, Yen H F, *et al.* *Lactobacillus plantarum* PS128 ameliorated visceral hypersensitivity in rats through the gut-brain axis [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2020, 12(3): 980-993.

[22] Karami S, Roayaei M, Hamzavi H, *et al.* Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens [J]. *Int J Pharm Investig*, 2017, 7(3): 137-141.

[23] Collins S M, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(6): 2003-2014.

[24] Liu Y, Xiao W, Yu L L, *et al.* Evidence from comparative genomic analyses indicating that *Lactobacillus*-mediated irritable bowel syndrome alleviation is mediated by conjugated linoleic acid synthesis [J]. *Food Funct*, 2021, 12(3): 1121-1134.

[25] 刘洋, 郁辛杰, 于雷雷, 等. 植物乳杆菌 CCFM8610 缓解肠易激综合征并改善肠道菌群失调——一项随机、双盲、安慰剂对照的先导性临床试验 [J]. *Engineering*,

- 2021, 7(3): 226-247.
- [26] 吴丹, 郑学宝. 番泻叶的研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2008(11): 151-153.
- [27] Chen Q, Zhang H, Sun C Y, *et al.* Evaluation of two laboratory model methods for diarrheal irritable bowel syndrome [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 5.
- [28] O'Mahony S M, Marchesi J R, Scully P, *et al.* Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: Implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses [J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 65(3): 263-267.
- [29] 何佳璨, 周桂荣, 李欣欣, 等. 肠道菌群与肠易激综合征相关研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(1): 117-124.
- [30] Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 49.
- [31] Halkjær S I, Christensen A Hø, Lo B Z S, *et al.* Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: Results from a randomised, double-blind placebo-controlled study [J]. *Gut*, 2018, 67(12): 2107-2115.
- [32] 王婧雯, 郑淑霞, 林晟, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序研究电针对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 环球中医药, 2023, 16(5): 846-851.

[责任编辑 高源]