

基于 SCFAs/5-HT 途径研究桃胶粉对过食“辛辣醇酒”致便秘小鼠的作用

张文隆, 魏柯健, 董子墨, 陈钰岚, 吕圭源*, 苏洁*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 探讨桃胶粉对过食“辛辣醇酒”致便秘小鼠的作用及机制。**方法** 35 只 ICR 小鼠适应性喂养 1 周后, 按体质量随机分为对照组、模型组、麻仁丸 (0.30 g/kg) 组和桃胶粉低、高剂量 (0.25、0.50 g/kg) 组, 每组 7 只。除对照组外, 每日 ig 辛辣醇酒混合液 (10 mL/kg), 每日 1 次, 连续 6 周, 建立“辛辣醇酒”致便秘小鼠模型。造模成功后, 给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 8 h 后模型组和给药组 ig 辛辣醇酒混合液 (10 mL/kg), 每日 1 次, 连续 7 周。给药期间, 观察各组小鼠排便情况; 末次给药后, 检测血清中一氧化氮 (nitric oxide, NO)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和粪便中短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 含量; 观察结肠组织形态学变化, 并检测结肠 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 含量和 iNOS、闭合蛋白 (occludin)、闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens protein 1, ZO-1)、紧密连接蛋白 1 (claudin-1)、G 蛋白偶联受体 43 (G protein-coupled receptor 43, GPR43)、色氨酸羟化酶 1 (tryptophan hydroxylase 1, TPH1)、血清素转运体 (serotonin transporter, SERT)、5-羟色胺 3 受体 (5-hydroxytryptamine receptor subtype 3, 5-HT₃R) 的蛋白表达。**结果** 桃胶粉可显著增加便秘小鼠 2 h 内排便粒数和粪便含水率 ($P < 0.05$ 、 0.01), 缩短首次排便时间 ($P < 0.01$), 降低血清 NO 和 iNOS 水平 ($P < 0.01$), 增加粪便乙酸、丙酸和总酸含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 改善结肠组织结构异常, 增加结肠 5-HT 含量 ($P < 0.05$), 降低结肠 iNOS、SERT 的蛋白表达 ($P < 0.01$), 提高结肠紧密连接蛋白、GPR43、TPH1、5-HT₃R 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 桃胶粉能改善过食“辛辣醇酒”所致的小鼠排便次数减少、排便时间过长和粪便干硬等便秘症状, 其机制可能与增加 SCFAs 生成进而促进肠道 5-HT 的产生有关。

关键词: 桃胶; 辛辣醇酒; 便秘; 短链脂肪酸; 5-羟色胺; 桃胶多糖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)20-6983-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.015

Effects of Peach Gum Powder on constipated mice induced by excessive consumption of “spicy alcohol” based on SCFAs/5-HT pathway

ZHANG Wenlong, WEI Kejian, DONG Zimo, CHEN Yulan, LYU Guiyuan, SU jie

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Peach Gum Powder (桃胶粉) on constipation in mice induced by excessive consumption of “spicy alcohol”. **Methods** After one week of adaptive feeding, a total of 35 ICR mice were randomly divided into control group, model group, Maren Pill (0.30 g/kg) group, peach gum powder low- and high-dose (0.25, 0.50 g/kg) groups according to body weight, with seven mice in each group. In addition to the control group, a mouse model of constipation induced by “spicy alcohol” was established by intragastric of spicy alcohol mixed solution (10 mL/kg) once a day for six weeks. After the modeling was successful, the drug administration group was given corresponding drugs (10 mL/kg) intragastrically, and the model group and the drug administration group were given spicy alcohol mixture (10 mL/kg) intragastrically 8 h later, once a day, for seven weeks. During the treatment period, fecal characteristics of the mice were monitored; after the last administration, levels of nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS) in serum and short-chain fatty acids (SCFAs) in feces were measured. Additionally, colonic tissue morphology was examined, and the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in colon, along with the protein expressions of iNOS, occludin, zonula occludens protein 1 (ZO-1), claudin-1, G protein-coupled receptor 43 (GPR43), tryptophan hydroxylase 1 (TPH1),

收稿日期: 2024-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274139); 浙江省重点研发计划项目 (2020C04020); 浙江省重点实验室 (2012E10002)

作者简介: 张文隆, 本科, 从事中药抗代谢性疾病药理研究。E-mail: zhangwenlong0316@163.com

*通信作者: 苏洁, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药抗代谢性疾病药理研究。E-mail: sujie198169@126.com

吕圭源, 教授, 博士生导师, 从事中药药理与新产品开发研究。E-mail: zjtcmlgy@163.com

serotonin transporter (SERT), and 5-hydroxytryptamine receptor subtype 3 (5-HT₃R) were analyzed. **Results** Peach gum powder significantly increased the number of fecal pellets within 2 h and the fecal water content ($P < 0.05, 0.01$), shortened the initial defecation time ($P < 0.01$), reduced serum NO and iNOS levels ($P < 0.01$), increased the content of acetic acid, propionic acid and total acid in feces ($P < 0.05, 0.01$), ameliorated abnormalities in colonic tissue structure, increased the content of 5-HT in colon ($P < 0.05$), decreased colonic iNOS and SERT protein expression ($P < 0.01$), and increased expression of colonic tight junction proteins, GPR43, TPH1, and 5-HT₃R ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Peach gum powder can alleviate symptoms of constipation such as decreased defecation frequency, prolonged defecation time, and hard stools induced by excessive consumption of “spicy alcohol”. The mechanism may be related to the increased production of SCFAs to subsequently promote the production of intestinal 5-HT.

Key words: peach gum; spicy alcohol; constipation; SCFAs; 5-HT; peach gum polysaccharide

便秘是常见的胃肠道疾病之一，全球便秘患病率为 14%，表现为排便频率减少、排便困难或排便不完全^[1-2]。便秘不仅会降低生活质量，引发焦虑和抑郁等心理问题，还可能增加其他肠道疾病的风险^[3]。虽然便秘的成因多样，但不良饮食习惯，尤其是过量“辛辣醇酒”的摄入，是其主要诱发因素之一^[4]。《兰室秘藏·大便结燥门》曰：“食辛热厚味之物，而助火邪，伏于血中，耗散真阴，津液亏少，故大便燥结”，认为“辛辣醇酒”可燔灼津液致大肠热盛，燥屎内结而形成便秘。

研究表明，酒精和辣椒、花椒、生姜等辛辣物可抑制肠神经递质 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine, 5-HT）的生成^[5-8]。5-HT 是肠神经系统的重要调节剂，在肠蠕动中起关键作用，而体内 95% 以上的 5-HT 都存储在肠嗜铬细胞中，主要通过色氨酸羟化酶 1（tryptophan hydroxylase 1, TPH1）催化合成，其失调可直接导致便秘^[9-10]。另有研究表明，短链脂肪酸（short chain fatty acids, SCFAs）可通过活化 TPH1 促进 5-HT 的合成，而肠道 SCFAs 减少会引起 5-HT 信号通路的抑制，并在便秘发病机制中起着关键的作用^[11]。

桃胶是蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *P. davidiana* (Carr.) Franch. 等树皮中分泌的红褐色或黄褐色树胶物质，其药用价值首载于《名医别录》，作为中国传统食疗材料已有千年历史^[12]。《本经逢原》载：“桃树上胶，最通津液”，提示桃胶或可改善过食“辛辣醇酒”所致肠燥失润之便秘。现代研究表明，桃胶多糖具有调节 SCFAs 含量和改善便秘的作用^[13-14]，但对桃胶能否改善过食“辛辣醇酒”所致便秘的研究尚未报道。因此，本研究参考中国重辣食用地区对辛辣物的摄入量以及 WHO 等国际组织对辛辣物和酒精摄入量的建议^[15-19]，采用辣椒、花椒、生姜等辛辣物制备辛辣物水提液（2 g/mL）和市售白酒按体积 1：1 配制成“辛辣醇酒”混合液，

对小鼠进行长期 ig，模拟人类过食“辛辣醇酒”，构建拟人化的便秘小鼠模型，并基于 SCFAs/5-HT 途径研究桃胶粉对过食“辛辣醇酒”致便秘小鼠的潜在调节作用，以期为桃胶的进一步开发和临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠 35 只，6~8 周龄，体重 18~25 g，由杭州启真实验动物科技有限公司提供，动物许可证号 SCXK（浙）2022-0005，合格证号 20230302Abbz0100999356。动物饲养于温度 20~25 °C、相对湿度 40%~65%、光照时间 12 h、循环通风的环境中。动物实验方案经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准（批准号 20230918-18）。

1.2 药品与试剂

52°红星二锅头购自北京红星股份有限公司；麻仁丸（国药准字 Z32020097，批号 221102）购自南京同仁堂药业公司；桃胶购自台州温岭，经浙江中医药大学朱波副教授鉴定为桃 *P. persica* (L.) Batsch 树皮中分泌的红褐色树胶物质；一氧化氮（nitric oxide, NO）试剂盒、NO 一步法试剂盒、一氧化氮合酶（nitric oxide synthase, NOS）试剂盒（批号分别为 20230413、20230717、20230722）均购自南京建成生物技术有限公司；5-HT 试剂盒（批号 Oct 2023）购自泉州市睿信生物技术有限公司；诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）抗体（批号 Ab15323）购自上海艾博抗贸易有限公司；闭合蛋白（occludin）抗体、闭锁小带蛋白 1（zonula occludens protein 1, ZO-1）抗体、G 蛋白偶联受体 43（G protein-coupled receptor 43, GPR43）抗体、5-羟色胺 3 受体（5-hydroxytryptamine receptor subtype 3, 5-HT₃R）抗体（批号分别为 10026225、00129646、00115960、00107909）均购自武汉三鹰

生物技术有限公司; 紧密连接蛋白 1 (claudin-1) 抗体、色氨酸羟化酶 1 (tryptophan hydroxylase 1, TPH1) 抗体、血清素转运体 (serotonin transporter, SERT) 抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗 (批号分别为 H0223、H01105、H681218034、H651000028、H680162081) 均购自杭州华安生物技术有限公司; β -actin 抗体 (批号 YT0099) 购自苏州睿瀛生物技术有限公司; 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异戊酸 (批号分别为 C14557384、C15760389、C15263375、C15317244、C15762072) 均购自苏州莫纳生物技术有限公司; 己酸 (批号 H432079) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.3 仪器

MEIKO EC360 型全自动包埋机 (德国 MEIKO 公司); Tissue-TekVIP5Jr 型自动脱水机 (日本樱花检验仪器株式会社); LEICARM2245 型半自动切片机 (德国 Leica 公司); YD-A 型生物组织摊片机 (金华市益迪医疗设备有限公司); HS-KP-G 型烤片机 (沈阳恒松科技有限公司); Power wave 340 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); GC-2010 Plus 型岛津气相色谱仪 (日本岛津公司); AXIOSCOPE.A1 型蔡司正置荧光显微镜 (德国 Carl Zeiss AG 公司); Mshot MF43-N 型正置荧光显微镜 (广州市明美光电技术有限公司)。

2 方法

2.1 辛辣醇酒混合液的制备

生姜、花椒、干辣椒按质量 1:1:1 比例 100 °C 煎制成 2 g/mL 辛辣物水提液, 将其和白酒按体积 1:1 比例配制辛辣醇酒混合液, 4 °C 保存。

2.2 桃胶多糖含量测定

精密称量 0.58 g 桃胶粉, 加入 1 000 mL 纯水制成 0.58 mg/mL, 采用苯酚-浓硫酸法^[20]测定总多糖含量, 紫外检测波长为 486 nm。

2.3 动物分组、造模与给药

35 只 ICR 小鼠适应性喂养 1 周后, 按体质量随机分为对照组、模型组、麻仁丸 (0.30 g/kg) 组和桃胶粉低、高剂量 (0.25、0.50 g/kg) 组, 每组 7 只。除对照组外, 其余各组小鼠 ig 辛辣醇酒混合液 (10 mL/kg), 1 次/d, 持续 6 周, 以首次排黑便时间延长 2 h、排便粒数减少、粪便含水率降低、血清 NO 水平和 iNOS 活性降低为造模成功的标准, 建立小鼠便秘模型。造模成功后, 各给药组 ig 相

应药物 (10 mL/kg), 8 h 后模型组和各给药组继续 ig 辛辣醇酒混合液, 1 次/d, 连续 7 周。

2.4 摄食、饮水量检测

于给药前、给药 5 周后, 24 h 自由进食和饮水, 计算摄食量和饮水量。

摄食量=(总饲料质量-剩余饲料质量)/小鼠只数

饮水量=(总饮水质量-剩余饮水质量)/小鼠只数

2.5 排便情况检测

2.5.1 首次排便时间 于给药前、给药 5 周后, 各组小鼠 ig 5%活性炭半固体糊 (10 mL/kg) 后连续 2 h 观察小鼠排便情况, 并记录每只小鼠首粒排黑便时间。

2.5.2 2 h 内排便粒数 于给药前、给药 5 周后, 统计各小鼠 2 h 内排便粒数。

2.5.3 粪便含水率 于给药前、给药 5 周后, 收集各小鼠 1 h 的粪便, 立即称量记为粪便湿质量, 置于烘箱内烘干 2 h, 温度为 70 °C, 再次称定质量计为粪便干质量, 计算粪便含水率。

粪便含水率=(粪便湿质量-粪便干质量)/粪便湿质量

2.6 血清 NO、iNOS 水平检测

于给药前、给药 5 周后, 各组小鼠眼眶取血 0.3 mL, 3 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 根据试剂盒说明书测定血清 NO 水平和 iNOS 活性。

2.7 结肠组织病理学观察

末次给药后, 小鼠禁食不禁水 24 h, 脱颈椎处死, 快速解剖取小鼠结肠组织, 用生理盐水清洗, 并放入盛有 10%中性福尔马林缓冲液的瓶中。经固定、取材、脱水、包埋、切片, 制得 4 μ m 石蜡切片, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、Masson、阿利新蓝-过碘酸雪夫 (alcian blue and periodic acid-schiff, AB-PAS) 染色, 中性树脂封片, 干燥后于显微镜下观察结肠组织病理变化。

2.8 粪便 SCFAs 含量检测

2.8.1 对照品母液制备 精密称取乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和异戊酸适量, 溶于无水乙醇中, 配制成混合标准品溶液作为对照品母液, 其质量浓度分别为 0.61、0.50、0.40、0.04 和 0.04 mg/mL。

2.8.2 供试品溶液制备 末次给药后, 取 0.50 g 粪便, 加入稀释液 2 mL, 涡旋器振荡 2 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 0.7 mL, 加入 50%的硫酸溶液 0.2 mL, 再加入乙醚 0.7 mL, 振荡、混匀 30 s 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 置于 4 °C 冰箱中放置 30 min, 取上层乙醚溶液, 进行 GC 分析。

2.8.3 色谱条件 DB-FAP 色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度 250 °C; 进样量 3 μL; 氢气体积流量 40 mL/min; 空气体积流量 400 mL/min; 尾吹气体积流量 40 mL/min; 程序升温: 初始以 50 °C 保持 1 min, 以 10 °C/min 上升到 190 °C, 保持 2 min, 30 °C/min 上升到 230 °C 保持 10 min, 最后下降到 50 °C, 保持 5 min。

2.9 结肠 5-HT 含量检测

称取结肠组织, 采用组织匀浆机在冰上将组织制成 10% 的结肠组织匀浆液, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。取适量结肠组织匀浆上清液根据试剂盒说明书测定结肠组织 5-HT 水平。

2.10 免疫荧光法检测结肠 occludin、claudin-1、ZO-1 和 TPH1 的蛋白表达

取结肠组织的石蜡切片 (4 μm), 经脱蜡、抗原修复、封闭后, 滴加 occludin、claudin-1、ZO-1 和 TPH1 抗体, 4 °C 孵育过夜, 避光滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min, 在 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 核染色后, 用抗荧光淬灭封片液封片, 并在蔡司正置荧光显微镜下观察结肠中 occludin、claudin-1、ZO-1 和 TPH1 的表达情况, 并用 Image-J 软件进行分析。

2.11 免疫组化法检测结肠 iNOS、GPR43 和 5-HT₃R 的蛋白表达

取结肠组织的石蜡切片 (4 μm), 经过抗原修复、消除内源性过氧化氢酶活性、牛血清白蛋白封闭后, 滴加 iNOS、GPR43 和 5-HT₃R 抗体, 4 °C 孵育过夜, 滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min, 经 DAB 显色、苏木素染色、乙醇脱水及中性树脂封片干燥后, 于显微镜下观察 iNOS、GPR43 和 5-HT₃R 的表达情况, 并用 Image-J 软件进行分析。

2.12 Western blotting 检测结肠 GPR43、TPH1、SERT 和 5-HT₃R 的蛋白表达

取结肠组织, 液氮充分研磨后, 加入适量 RIPA 裂解液, 冰上静置 10 min, 离心取上清, 提取组织蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 1.5 h, 分别加入 GPR43、TPH1、SERT 和 5-HT₃R 抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 加入 ECL 化学发光液后, 采用 Modena 凝胶成像仪检测蛋白条带, 并用 Image-J 软件进行分析。

2.13 统计学分析

数据用 SPSS 26.0 进行统计分析, 数据结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 桃胶多糖含量的测定

以葡萄糖标准品质量浓度为横坐标 (x), 吸光度为纵坐标 (y), 线性回归方程为 $y=0.7897x+0.0116$ ($R^2=0.998$), 计算得出桃胶粉中总多糖质量分数为 67.18%。

3.2 过食“辛辣醇酒”对小鼠的影响

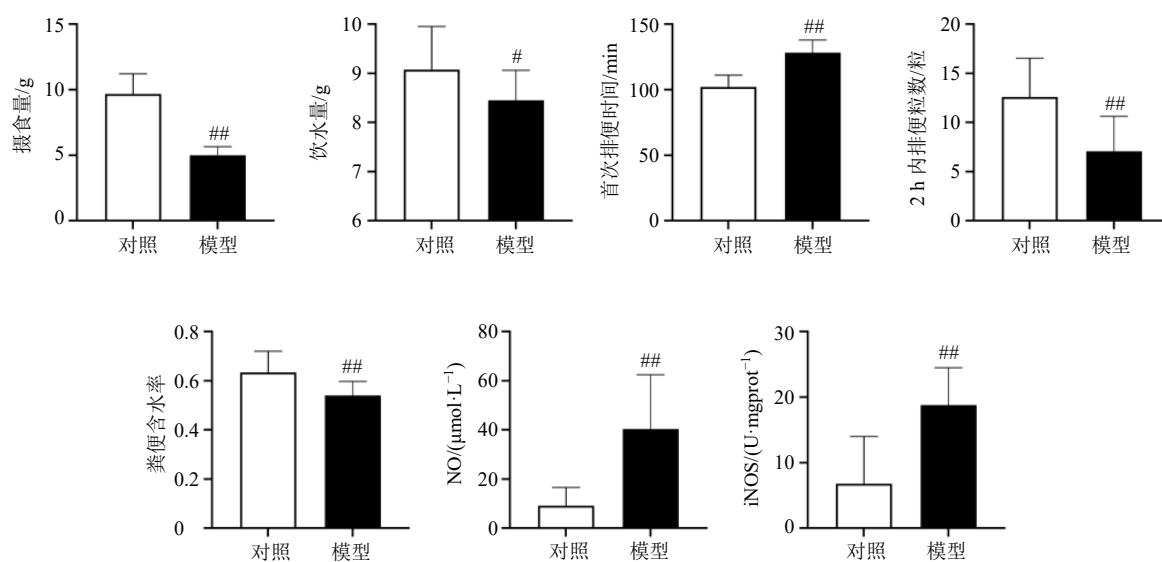
如图 1 所示, 造模 6 周后, 与对照组比较, 模型组小鼠的摄食量 ($P<0.01$) 和饮水量 ($P<0.05$) 均显著减少; 与对照组比较, 模型组小鼠的首次排便时间显著延长 ($P<0.01$), 2 h 内排便粒数显著减少 ($P<0.01$), 粪便含水率显著下降 ($P<0.01$); 与对照组比较, 模型组小鼠血清的 NO 水平和 iNOS 活性均显著升高 ($P<0.01$)。

3.3 桃胶粉对便秘小鼠模型的影响

3.3.1 对模型小鼠摄食量、饮水量、排便情况、血清 NO 含量和 iNOS 活性的影响 如图 2 所示, 给药 5 周后, 与对照组比较, 模型组小鼠的摄食量和饮水量显著减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 桃胶粉低、高剂量组小鼠的摄食量显著增加 ($P<0.01$), 桃胶粉高剂量组小鼠的饮水量显著增加 ($P<0.05$)。给药 5 周后, 与对照组比较, 模型组小鼠的首次排便时间显著延长 ($P<0.05$), 2 h 内排便粒数显著减少 ($P<0.01$), 粪便含水率显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 桃胶粉各剂量组小鼠的首次排便时间显著缩短 ($P<0.01$), 2 h 内排便粒数显著增加 ($P<0.01$), 粪便含水率显著升高 ($P<0.05$)。

3.3.2 对模型小鼠血清 NO、iNOS 水平和结肠 iNOS 蛋白表达的影响 给药 5 周后, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 NO 含量和 iNOS 活性显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 桃胶粉低、高剂量组小鼠血清 NO 含量和 iNOS 活性显著降低 ($P<0.01$)。结肠 iNOS 染色阳性产物主要表达在结肠组织肌层, 呈棕黄色。与对照组比较, 模型组小鼠结肠 iNOS 表达量显著增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 桃胶粉低、高剂量组小鼠结肠 iNOS 表达量显著减少 ($P<0.01$), 见图 3。

3.3.3 对模型小鼠结肠组织形态学的影响 HE 染色结果表明, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织结构紊乱, 上皮细胞破裂受损, 杯状细胞数量减

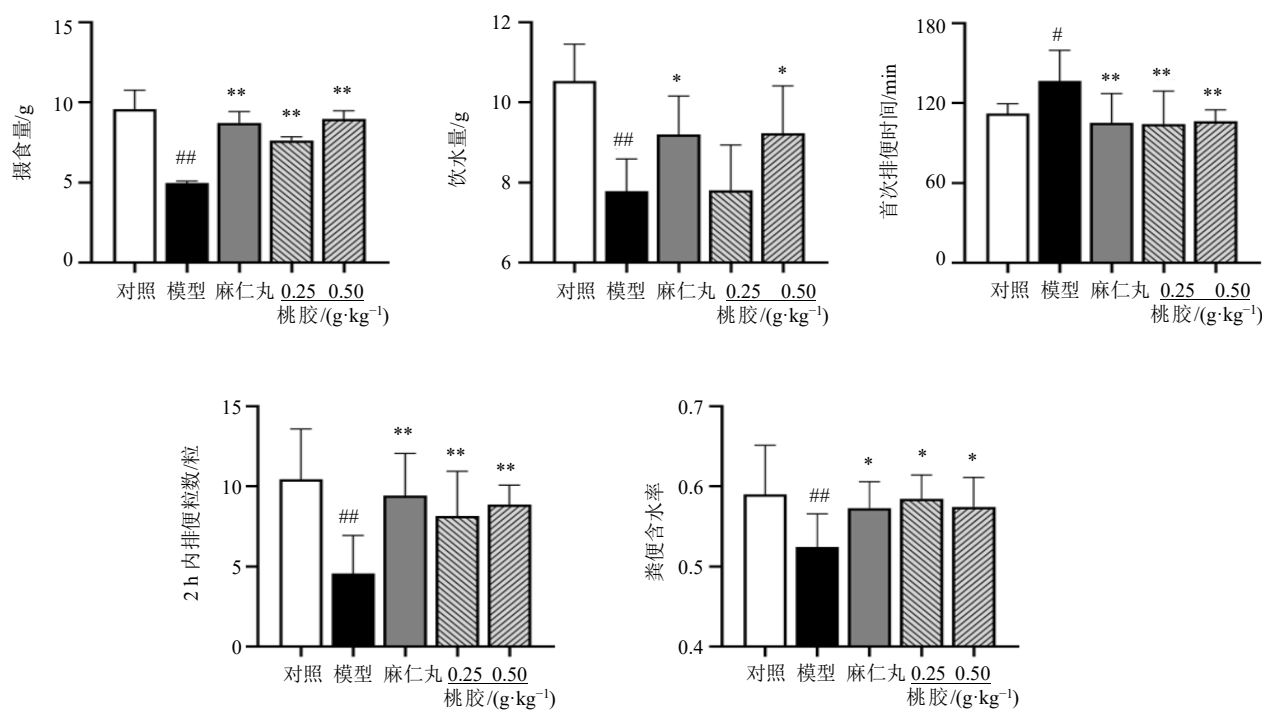


与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group.

图 1 过食“辛辣醇酒”对小鼠摄食量、饮水量、排便情况、血清 NO 含量和 iNOS 活性的影响
($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 1 Effect of peach gum powder on food intake, water intake, defecation, serum NO content and iNOS activity of mice induced by excessive consumption of “spicy alcohol” ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

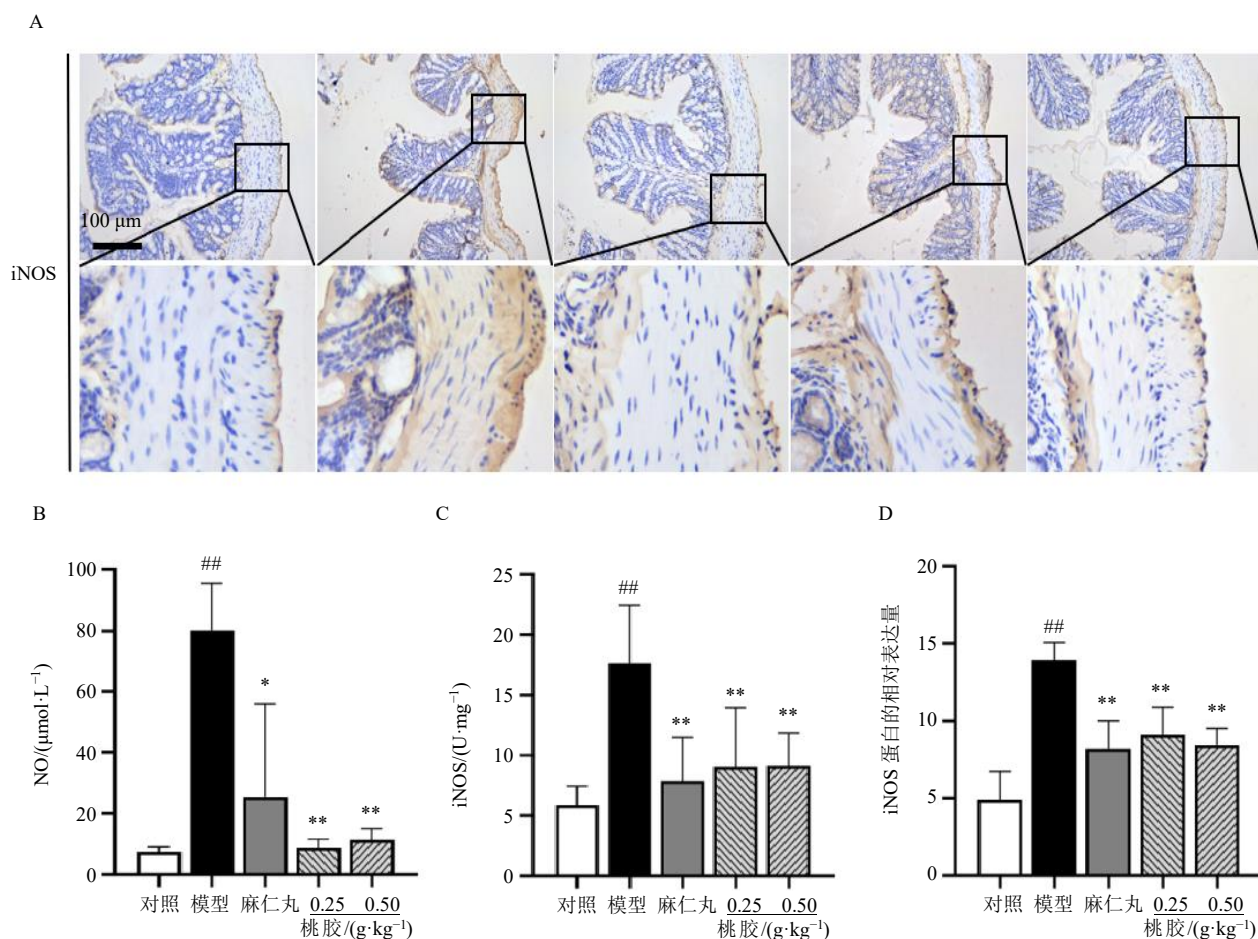


与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 下图同。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; same as below figures.

图 2 桃胶粉对模型小鼠摄食量、饮水量、排便情况的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 2 Effect of peach gum powder on food intake, water intake, and defecation of model mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)



A-iNOS 免疫组化结果 ($\times 200$); B-血清 NO 含量 ($n=7$); C-血清 iNOS 活性 ($n=7$); D-结肠 iNOS 蛋白的相对表达 ($n=3$).

A-representative images of immunohistochemistry for iNOS ($\times 200$); B-serum NO content ($n=7$); C-serum iNOS activity ($n=7$); D-iNOS protein relative expression in colon ($n=3$).

图 3 桃胶粉对模型小鼠血清 NO、iNOS 水平和结肠 iNOS 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of peach gum powder on levels of NO and iNOS in serum and iNOS protein expression in colon of model mice

少;与模型组比较,桃胶粉低、高剂量组小鼠结肠组织结构紊乱、上皮细胞破损和杯状细胞减少的情况均有所改善。Masson 染色结果表明,与对照组比较,模型组小鼠可见结肠组织黏膜层胶原纤维沉积增多,胶原纤维面积增大;与模型组比较,桃胶粉低、高剂量组小鼠结肠组织黏膜层胶原沉积减少。AB-PAS 染色结果表明,与对照组比较,模型组小鼠结肠杯状细胞数量减少;与模型组比较,桃胶粉低、高剂量组小鼠结肠杯状细胞数量增加,见图 4。

3.3.4 对模型小鼠结肠紧密连接蛋白表达的影响 免疫荧光结果显示,结肠 occludin、ZO-1 主要表达在结肠黏膜上层,claudin-1 在结肠黏膜层各部位均有表达,呈荧光绿色。与对照组比较,模型组小鼠结肠 occludin、ZO-1 绿色荧光表达显著减少 ($P<$

0.05、0.01),claudin-1 绿色荧光表达有减少的趋势;与模型组比较,桃胶粉高剂量组小鼠结肠 occludin、claudin-1、ZO-1 绿色荧光表达显著增加 ($P<0.05$ 、0.01),结果见图 5。

3.3.5 对模型小鼠粪便 SCFAs 含量的影响 GC 结果显示,与对照组比较,模型组小鼠粪便乙酸、丙酸和总酸含量显著减少 ($P<0.05$ 、0.01);与模型组比较,桃胶粉高剂量组小鼠粪便乙酸、丙酸和总酸含量显著增加 ($P<0.05$ 、0.01),丁酸、戊酸、异戊酸含量有增加的趋势(图 6)。

3.3.6 对模型小鼠结肠 5-HT 含量和 GPR43、TPH1、SERT 和 5-HT₃R 蛋白表达的影响 如图 7-A 所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠 5-HT 含量显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,桃胶粉高剂量组小鼠结肠 5-HT 含量显著升高 ($P<0.05$)。

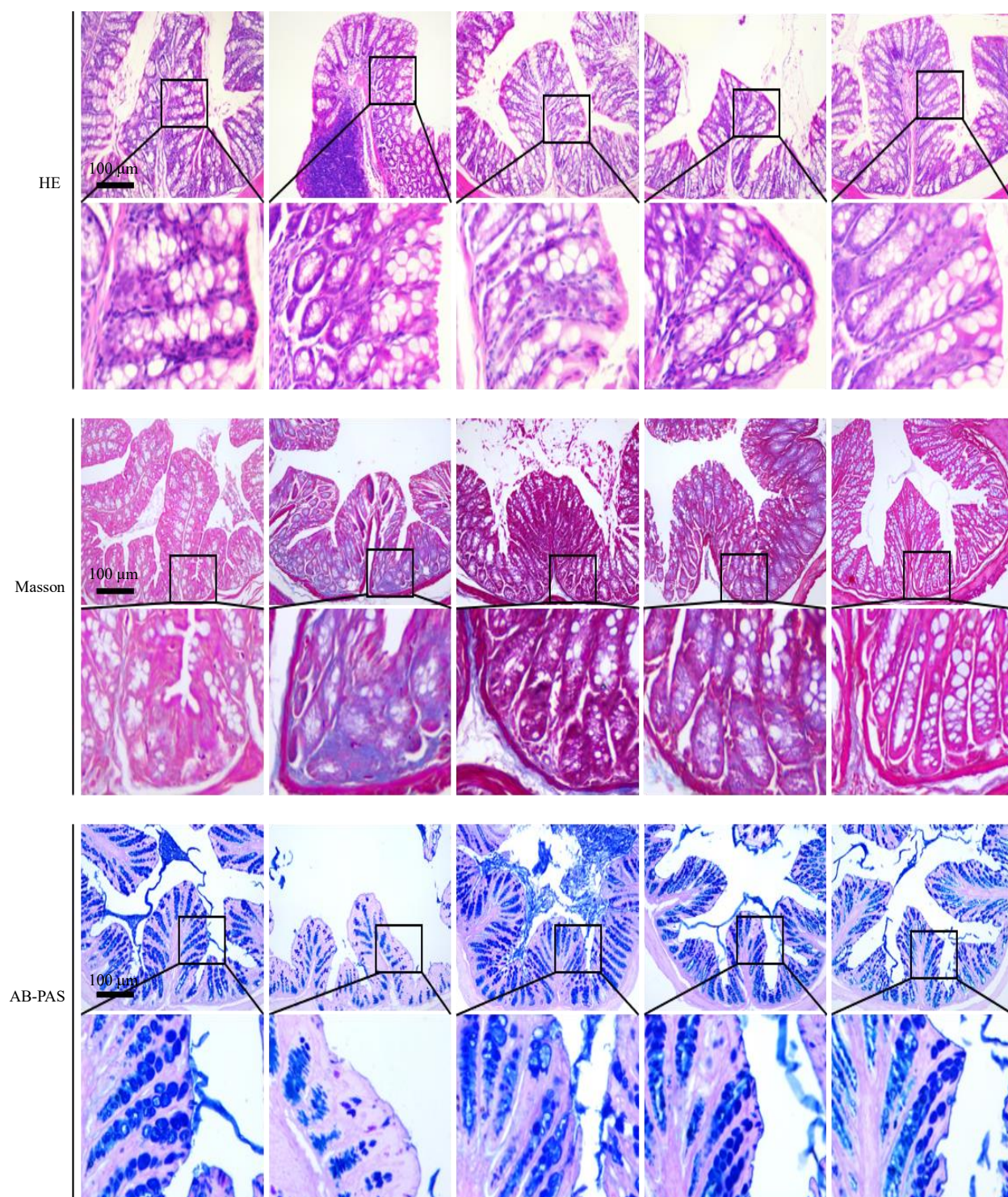
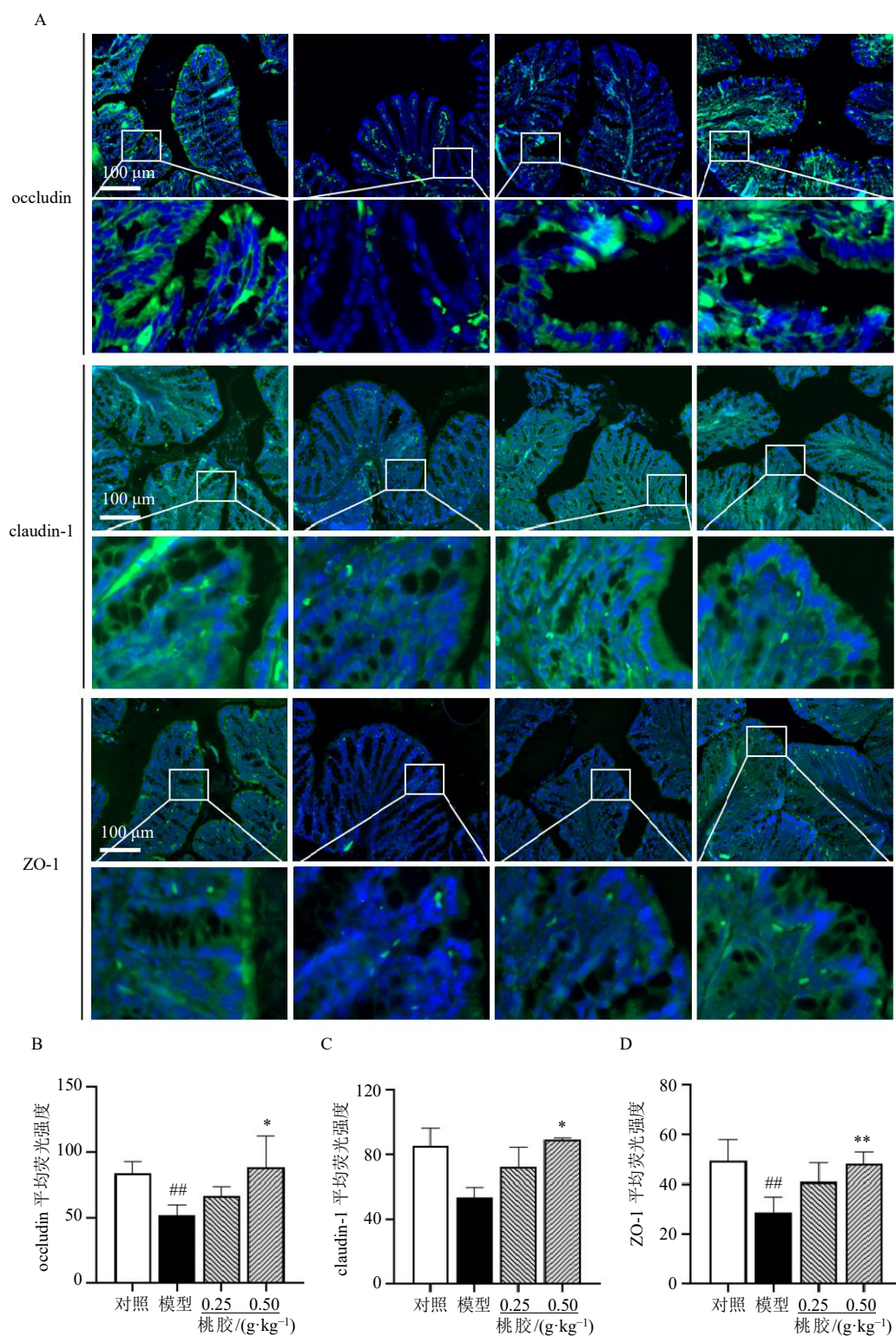


图 4 桃胶粉对模型小鼠结肠组织形态学的影响 (×200)

Fig. 4 Effect of peach gum powder on colonic histomorphology of model mice (× 200)

如图 7-B~F 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠 GPR43、TPH1、5-HT₃R 蛋白表达显著减少 ($P<0.05$ 、 0.01), SERT 蛋白表达显著增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 桃胶粉低、高剂量组

小鼠结肠 GPR43 和桃胶粉高剂量组小鼠结肠 TPH1、5-HT₃R 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01), 桃胶粉各剂量组小鼠结肠 SERT 蛋白表达显著减少 ($P<0.01$)。



A-occludin、claudin-1、ZO-1 免疫荧光代表性图片 ($\times 200$); B-occludin 平均荧光强度; C-claudin-1 平均荧光强度; D-ZO-1 平均荧光强度。
A-representative immunofluorescence images of occludin, claudin-1 and ZO-1 ($\times 200$); B-average fluorescence intensity of occludin; C-average fluorescence intensity of claudin-1; D-average fluorescence intensity of ZO-1.

图 5 桃胶粉对模型小鼠结肠紧密连接蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of peach gum powder on expressions of tight junction protein in colon of model mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

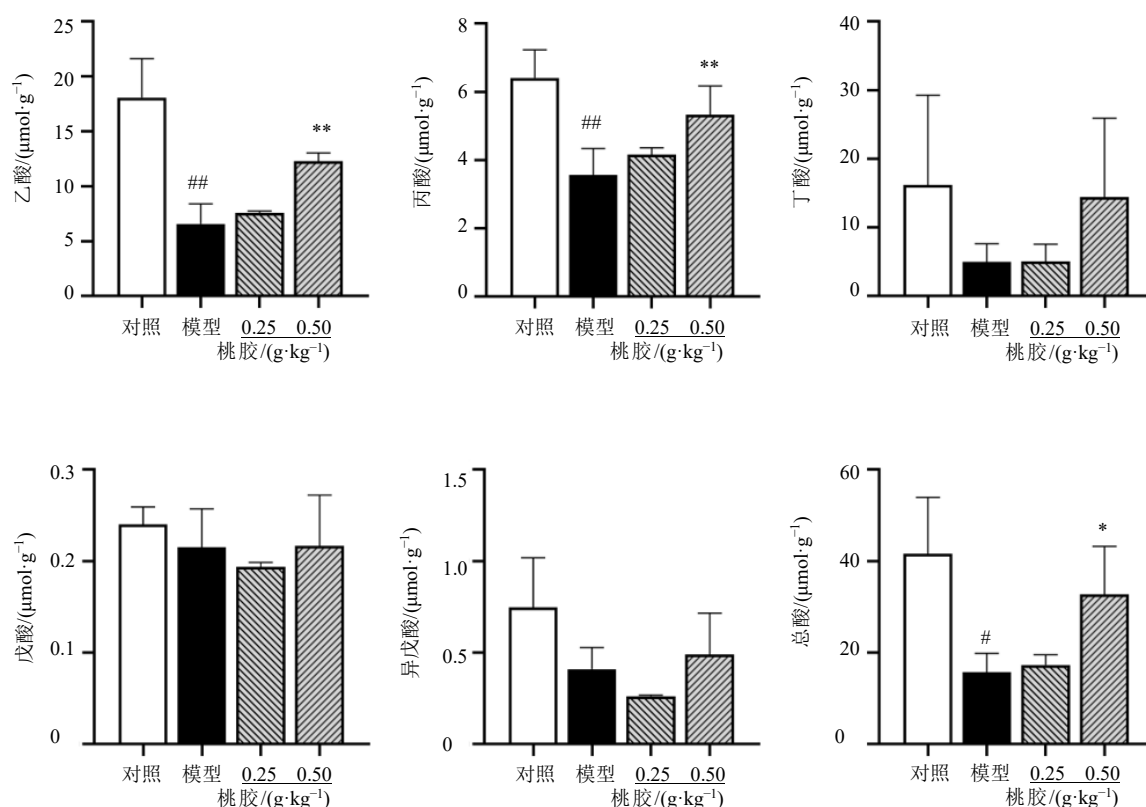
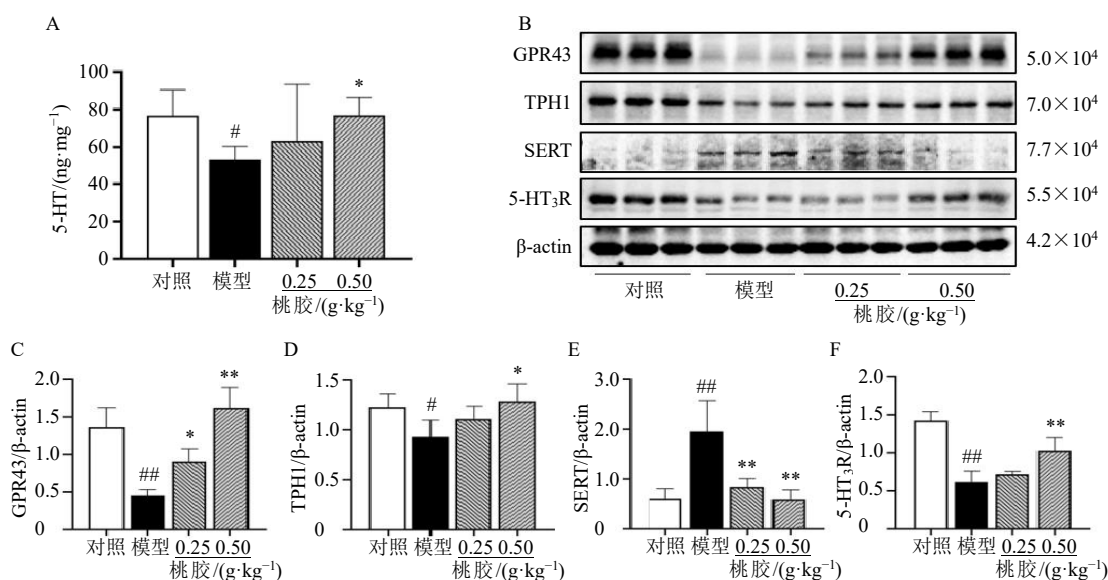


图 6 桃胶粉对模型小鼠粪便短链脂肪酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of peach gum powder on fecal SCFAs content in model mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-结肠 5-HT 含量 ($n = 7$); B-Western blotting 代表性图像, 以 β -actin 作为内参; C-GPR43 相对表达量 ($n = 3$); D-TPH1 相对表达量 ($n = 3$); E-SERT 相对表达量 ($n = 3$); F-5-HT₃R 相对表达量 ($n = 3$).

A-5-HT content in colon ($n = 7$); B-representative images of Western blotting, using β -actin as internal parameter; C-GPR43/ β -actin expression ($n = 3$); D-TPH1/ β -actin expression ($n = 3$); E-SERT/ β -actin expression ($n = 3$); F-5-HT₃R/ β -actin expression ($n = 3$).

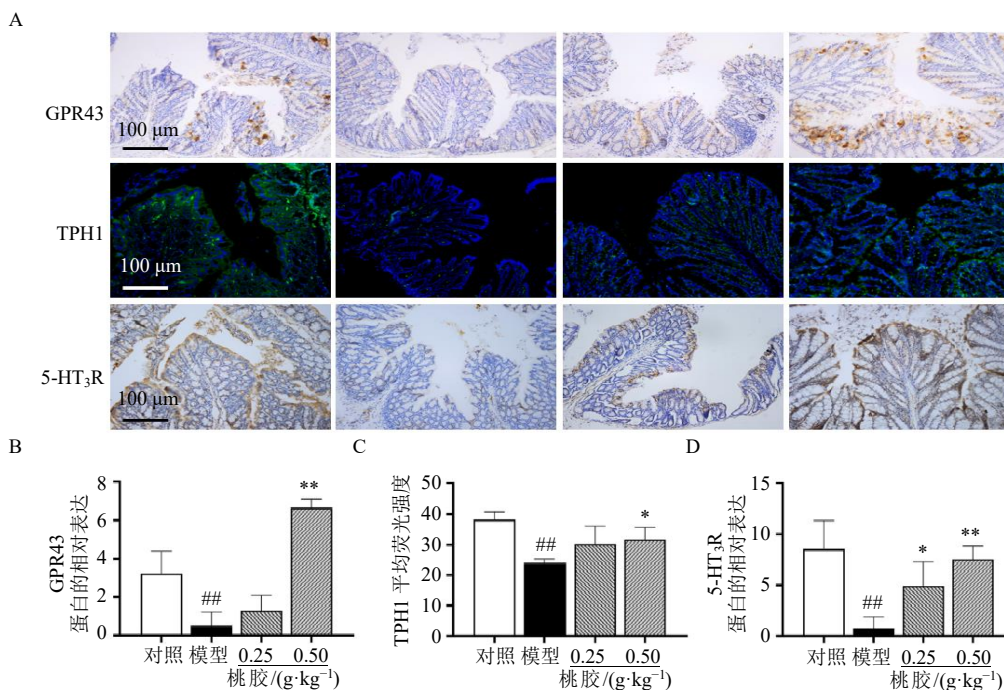
图 7 桃胶粉对模型小鼠结肠 5-HT 含量和 GPR43、TPH1、SERT、5-HT₃R 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of peach gum powder on content of 5-HT and expressions of GPR43, TPH1, SERT and 5-HT₃R protein in colon of model mice

如图 8-A、C 所示, 结肠 TPH1 主要表达在结肠黏膜固有层, 呈荧光绿色。与对照组比较, 模型组小鼠结肠 TPH1 绿色荧光表达显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 桃胶粉高剂量组小鼠结肠 TPH1 绿色荧光表达显著增加 ($P < 0.05$)。

如图 8-A、B、D 所示, 结肠 GPR43 和 5-HT₃R

染色阳性产物主要表达在结肠黏膜上层, 呈棕黄色。与对照组比较, 模型组小鼠结肠 GPR43 和 5-HT₃R 棕黄色表达显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 桃胶粉高剂量组小鼠结肠 GPR43 和桃胶粉低、高剂量组结肠 5-HT₃R 棕黄色表达显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。



A-GPR43、5-HT₃R 免疫组化和 TPH1 免疫荧光代表性图像 ($\times 200$); B-GPR43 蛋白的相对表达量; C-TPH1 平均荧光强度; D-5-HT₃R 蛋白的相对表达量。

A-representative immunohistochemical images of GPR43 and 5-HT₃R, and representative immunofluorescence images of TPH1 ($\times 200$); B-relative expression of GPR43 protein; C-average fluorescence intensity of TPH1; D-relative expression of 5-HT₃R protein.

图 8 桃胶粉对模型小鼠结肠 GPR43、TPH1、5-HT₃R 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of peach gum powder on expressions of GPR43, TPH1 and 5-HT₃R in colon of model mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中国传统医学认为, 过食“辛辣醇酒”将致机体水火失衡, 进而伤其津液运行, 致大便燥结而排便无力^[21]。《血证论·阴阳水火气血论》认为“气生于水”“下后亡津液则伤血”, 津液虚少无以化气血, 气血虚则大肠传导无力。

《医学正传·秘结论》则直接指出: “恣饮酒浆, 过食辛热, 饮食之火起于脾胃……以致火盛水亏津液不生, 故传道失常, 渐成燥结之证”, 认为过食“辛辣醇酒”引起的津液亏虚可致大便燥结。在现代医学中, 津液亏虚证是以口渴尿少、大便干燥等为主要临床表现的病证^[22]。造模结果显示, 长期 ig 辛辣醇酒混合液后, 小鼠出现饮少纳差、大便干结而少便的症状, 可能与过食“辛辣醇酒”所致的津液亏

虚证有关。

现代中医认为, 对于过食“辛辣醇酒”所致的便秘应以“滋阴养血、益气温阳”为主要治则^[23]。桃胶味甘、苦, 性平, 归大肠经^[24]。《本草纲目》载其具“和血益气”之功, 《本经逢原》载: “桃树上胶, 最通津液。”故而桃胶或可中和体内水火, 从而改善过食“辛辣醇酒”所致气血失衡, 最终改善便秘之证。本研究结果显示, 桃胶粉可提高便秘小鼠摄食量、饮水量、2h 内排便粒数和粪便含水率, 缩短首次排便时间; 降低血清 NO 含量、iNOS 活性和结肠 iNOS 蛋白表达, 表明桃胶粉可以明显改善小鼠机体状态和排便功能, 并对机体气血失衡有潜在调节作用。

现代研究表明, 便秘患者常伴有结肠杯状细胞减少以及胶原纤维沉积, 其中杯状细胞减少会导致

黏液分泌不足,大便干硬而难以排出;而胶原纤维沉积会导致结肠壁僵硬增加,肠道运动受损而粪便推进困难^[25]。此外,便秘患者还伴有肠道屏障功能障碍,表现为紧密连接蛋白减少、肠壁通透性增加。研究显示,肠道屏障可通过维持物理和化学屏障等来保护肠道功能,而其中的肠黏膜屏障在便秘的改善或预防中起到重要的调节作用^[26]。肠黏膜屏障上皮成分是肠黏膜细胞和细胞之间的连接结构,由 claudin-1、occludin 和 ZO-1 等紧密连接蛋白构成连接系统^[27-28]。当紧密连接蛋白被破坏时,会导致肠黏膜屏障受损,影响肠道运动,间接引发便秘^[29]。结肠组织形态学结果显示,辛辣醇酒混合液会引发结肠组织黏膜上皮细胞损伤、杯状细胞减少和胶原沉积等病理损伤,并造成结肠组织黏膜屏障损伤,桃胶粉给药后可改善这一系列病理损伤,并增加结肠 claudin-1、occludin 和 ZO-1 的蛋白表达,改善肠黏膜屏障损伤。

肠神经递质 5-HT 可通过调节肠道运动影响肠道功能,而过食“辛辣醇酒”不仅会影响结肠组织的病理变化,还会抑制 5-HT 的释放,使其无法激活 5-HT₃R 刺激肠道平滑肌收缩^[30]。TPH1 作为肠嗜铬细胞生物合成 5-HT 的限速酶,其表达的失调直接影响结肠 95% 的 5-HT 的释放^[31]。另有研究表明,SCFAs 是 5-HT 生物合成的刺激剂,主要包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异戊酸等,不仅可以通过 GPR43 受体刺激黏膜肥大细胞影响结肠 5-HT 含量,还可以通过促进肠嗜铬细胞中 TPH1 的转录直接影响 5-HT 的合成^[11,32]。而 SERT 作为结肠黏膜上皮细胞产生的一种转运蛋白,能够特异性识别并结合外周 5-HT,再摄取进入细胞内,使外周 5-HT 含量降低而间接调节肠动力^[33]。本研究发现,桃胶粉组小鼠粪便中 SCFA 含量尤其是乙酸含量有所增加,结肠组织中 5-HT 含量增加,GPR43、TPH1、5-HT₃R 蛋白表达上调,而 SERT 蛋白表达减少,推测桃胶粉可能通过促进 SCFA 生成而活化肠嗜铬细胞中的 TPH1,继而增加肠道 5-HT 产生,或生成的 SCFA 另与黏膜肥大细胞上的 GPR43 结合而刺激肠道 5-HT 产生。同时,桃胶粉可能通过抑制 SERT 活性以减少对 5-HT 的转运,使得更多的 5-HT 用以激活 5-HT₃R,从而刺激肠道平滑肌的收缩,最终达到改善结肠动力的作用。

综上,桃胶粉能够改善便秘模型小鼠排便次数减少、排便时间过长和粪便干硬等症状,并能修复

肠道屏障。其作用机制可能与调控 SCFAs/5-HT 途径而促进肠道运动有关,故推测桃胶或可食疗用于改善过食“辛辣醇酒”所致便秘。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lee K J, Jung K W, Myung S J, *et al.* The clinical characteristics of colonic pseudo-obstruction and the factors associated with medical treatment response: A study based on a multicenter database in Korea [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(5): 699-703.
- [2] Chen Y, Zhang R, Xu J L, *et al.* Alteration of intestinal microflora by the intake of millet porridge improves gastrointestinal motility [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 965687.
- [3] Zhang S S, Wang R X, Li D Y, *et al.* Role of gut microbiota in functional constipation [J]. *Gastroenterol Rep*, 2021, 9(5): 392-401.
- [4] Song J, Bai T, Zhang L, *et al.* Clinical features and treatment options among Chinese adults with self-reported constipation: An internet-based survey [J]. *J Dig Dis*, 2019, 20(8): 409-414.
- [5] Xiang Q R, Guo W L, Tang X, *et al.* Capsaicin—The spicy ingredient of chili peppers: A review of the gastrointestinal effects and mechanisms [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 116: 755-765.
- [6] Gao Y G, Lu Y J, Zhang N, *et al.* Preparation, pungency and bioactivity of gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64(9): 2708-2733.
- [7] Shi H L, Liu C H, Ding L L, *et al.* Alterations in serotonin, transient receptor potential channels and protease-activated receptors in rats with irritable bowel syndrome attenuated by Shugan Decoction [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(16): 4852-4863.
- [8] Dylag K A, Fidalgo S V S, Gard P R, *et al.* Prenatal alcohol exposure reduces 5-HT concentration in mouse intestinal muscle and mucosa [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 61: 24-29.
- [9] Xie L L, Xu C, Fan Y D, *et al.* Effect of fecal microbiota transplantation in patients with slow transit constipation and the relative mechanisms based on the protein digestion and absorption pathway [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 490.
- [10] Ye L H, Bae M, Cassilly C D, *et al.* Enteroendocrine cells sense bacterial tryptophan catabolites to activate enteric and vagal neuronal pathways [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(2): 179-196.
- [11] Reigstad C S, Salmonsén C E, Rainey J F, *et al.* Gut microbes promote colonic serotonin production through an

- effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells [J]. *FASEB J*, 2015, 29(4): 1395-1403.
- [12] 杨庆, 郭伟, 曹慧婕, 等. 桃胶食用情况调查研究 [J]. 食品安全导刊, 2023, 17(32): 112-116.
- [13] Wei C Y, Yao L, Zhang L, *et al.* *In vitro* digestion and fecal fermentation of peach gum polysaccharides with different molecular weights and their impacts on gut microbiota [J]. *Foods*, 2022, 11(24): 3970.
- [14] 刘晶, 李若兰, 文君. 桃胶多糖润肠通便功能的实验研究 [J]. 现代食品, 2020, 10(19): 194-197.
- [15] Luo Q W, Ding R, Chen L L, *et al.* The association between spicy food intake and risk of hyperuricemia among Chinese adults [J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 919347.
- [16] Poyarkov A A, Orlova Y M. The impact of capsaicin on human health [J]. *J Nutr Intermed Metab*, 2015, 2(4): 95-101.
- [17] Lv J, Qi L, Yu C Q, *et al.* Consumption of spicy foods and total and cause specific mortality: Population based cohort study [J]. *BMJ*, 2015, 351: h3942.
- [18] Daily J W, Yang M. Ginger as a functional food in the prevention of chronic diseases: Review of current evidence [J]. *Food Nutr Res*, 2015, 59: 25956.
- [19] World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health 2018 [R]. Geneva: World Health Organization, 2018.
- [20] 韩辉, 王蔓蔓, 冯丹妮, 等. 桃胶多糖的提取纯化表征及降血糖作用 [J]. 武汉轻工大学学报, 2023, 42(2): 9-15.
- [21] 崔婷菲. 基于临床数据和科学统计探析符思教授治疗便秘的用药经验 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [22] 马千, 程荣菲, 武哲丽. 基于经典理论的津液亏虚证治研究 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(31): 119-121.
- [23] 王星晨, 曹永清. 曹永清教授治疗便秘常用药组探析 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(7): 143-147.
- [24] 徐熠. 桃胶的食用及药用价值 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(10): 140.
- [25] de Giorgio R, Ruggeri E, Stanghellini V, *et al.* Chronic constipation in the elderly: A primer for the gastroenterologist [J]. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15: 130.
- [26] Gao J X, Song G Z, Shen H B, *et al.* Allicin improves intestinal epithelial barrier function and prevents LPS-induced barrier damages of intestinal epithelial cell monolayers [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 847861.
- [27] Zhao Y M, Liu Q J, Hou Y M, *et al.* Alleviating effects of gut micro-ecologically regulatory treatments on mice with constipation [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 956438.
- [28] Wallen Z D, Demirkan A, Twa G, *et al.* Metagenomics of Parkinson's disease implicates the gut microbiome in multiple disease mechanisms [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6958.
- [29] Chen X G, Sun W J, Xu B C, *et al.* Polysaccharides from the roots of *Millettia speciosa* Champ modulate gut health and ameliorate cyclophosphamide-induced intestinal injury and immunosuppression [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 766296.
- [30] 冯文林, 伍海涛. 基于短链脂肪酸调控 5-HT 探讨中医药治疗肠易激综合征作用机制 [J]. 吉林中医药, 2019, 39(1): 7-9.
- [31] Engevik M A, Luck B, Visuthranukul C, *et al.* Human-derived *Bifidobacterium dentium* modulates the mammalian serotonergic system and gut-brain axis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 11(1): 221-248.
- [32] Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, *et al.* Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine [J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 324(3): 353-360.
- [33] Lavoie B, Roberts J A, Haag M M, *et al.* Gut-derived serotonin contributes to bone deficits in colitis [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 140: 75-84.

[责任编辑 罗 曦]