

贻贝、牡蛎复合物对肠道菌群紊乱型小鼠便秘的干预作用

胡琴, 孙东方, 孙力军, 王晨, 胡莲花, 房志家, 邓旗

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省海洋生物制品工程实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 本研究探讨了贻贝、牡蛎复合物对抗生素诱导小鼠便秘的干预作用, 采用混合抗生素溶液灌胃 C57BL/6 雌性小鼠, 构建肠道菌群紊乱型小鼠便秘模型 (ME), 以 0.02 mL/g·bw 贻贝、牡蛎复合物灌胃 ME 组小鼠为干预组 (IC)。结合 16s RNA 基因测序技术, 7 d 后, 测定小肠推进率、排便量、饲料消耗量、肠道菌群结构等指标, 评估小鼠便秘模型及其贻贝、牡蛎复合物的干预作用。对比空白组, ME 组小肠推进率下降 22.89% ($p<0.05$), 排便量降低 41.00% ($p<0.05$), 日平均饲料消耗量显著下降 2.68 g/d ($p<0.05$), 粪便含水率显著下降 19.40% ($p<0.05$), 同时, ME 组肠道菌群有益菌多样性减少, 表现为 *Prevotella-9*、*Lachnospiraceae*、*Enterobacter*、*Verrucomicrobia* 等有益菌群丰度降低; 经贻贝、牡蛎复合物干预后, 对比 ME 组, IC 组小鼠小肠推进率提升 70.00% ($p<0.05$), 排便量提升 52.00% ($p<0.05$), 粪便含水率显著增加 18.10% ($p<0.05$), IC 组肠道菌群多样性增加, 表现为 *Proteobacteria*、*Fusobacteria*、*Akkermansia*、*Bacteroidetes*、*Verrucomicrobia* 丰度增加, 同时 IC 组肠道菌群结构恢复至与空白组小鼠相似。综上, 贻贝、牡蛎复合物可显著改善由抗生素导致的便秘小鼠的小肠推进率等小肠蠕动功能, 增加小鼠排便, 并提高粪便含水率, 同时调节便秘小鼠的肠道菌群结构及组成, 增加 *Akkermansia* 等肠道有益菌。

关键词: 贻贝; 牡蛎; 便秘; 肠道菌群

文章编号: 1673-9078(2020)10-16-26

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0397

Intervention Effect of Mussel and Oyster Complex on Constipation in Mice with Intestinal Flora Disorder

HU Qin, SUN Dong-fang, SUN Li-jun, WANG Chen, HU Lian-hua, FANG Zhi-jia, DENG Qi

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Food, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In this study, the intervention effect of mussel and oyster compound on antibiotic-induced constipation in mice was investigated. C57BL/6 female mice were administered *via* gavage with the mixed antibiotic solution, to establish a mouse constipation model with intestinal flora disorder (ME). The intervention group (IC) was intragastrically administered *via* gavage with mussel and oyster compound (0.02 mL/g·bw). Combined with the 16s RNA gene sequencing technology, the indices including the small intestinal propulsion rate, defecation volume, feed consumption, intestinal flora structure were measured after 7 days to evaluate the mouse constipation model, and the intervention effect of

引文格式:

胡琴,孙东方,孙力军,等.贻贝、牡蛎复合物对肠道菌群紊乱型小鼠便秘的干预作用[J].现代食品科技,2020,36(10):16-26

HU Qin, SUN Dong-fang, SUN Li-jun, et al. Intervention effect of mussel and oyster complex on constipation in mice with intestinal flora disorder [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 16-26

收稿日期: 2020-04-29

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系共性关键技术创新团队建设专项资金项目 (NO. 2019KJ151); 广东省科技厅公益研究与能力建设专项资金项目 (2014B020204005)

作者简介: 胡琴 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品

通讯作者: 孙力军 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品质量安全与营养功能

mussel and oyster compound. Compared with the blank group, the small intestine propulsion rate of the ME group decreased by 22.89% ($p<0.05$), the defecation amount decreased by 41.00% ($p<0.05$), the average daily feed consumption decreased by 2.68 g/d ($p<0.05$), and the water content of feces decreased by 19.40% ($p<0.05$). In the meantime, the diversity of beneficial bacteria in the intestinal flora decreased in ME group, which was manifested in the decrease in abundance of beneficial bacteria such as *Prevotella-9*, *Lachnospiraceae*, *Enterobacter* and *Verrucomicrobia*. After the intervention with mussel and oyster compound, the IC group had an increased (by 70.00%; $p<0.05$) small intestine propulsion rate, increased (by 52.00%; $p<0.05$) defecation volume, increased (by 18.10%; $p<0.05$) fecal water content, and increased diversity of intestinal flora (as increased abundance of *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Akkermansia*, *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia*), compared with ME group. Also, the composition and structure of the intestinal flora in IC group were similar to those of the blank group. In summary, the mussel and oyster compound could significantly improve the small intestinal peristalsis function of mice with constipation caused by antibiotics, and increase the defecation amount and fecal water content, while regulating the structure and composition of intestinal flora of the mice with constipation and increasing the intestinal beneficial bacteria such as *Akkermansia*.

Key words: mussel; oyster; constipation; intestinal flora

便秘 (Constipation) 是指由单个或多个病因引起的一种复杂病症, 表现为大肠传导功能失常、大便秘结、排便次数明显减少, 排便周期延长; 或排便周期不长, 但粪质干结; 或粪质不硬, 虽有便意, 但便出不畅等特征。根据排便特点分为功能型便秘和肠道菌群紊乱型便秘。据统计, 便秘在人群中的患病率已高达 27%, 并呈日益增长趋势。最新研究发现, 便秘是由肠道菌群紊乱、炎症、肠动力不足、肠营养缺乏等多个因素造成^[1-3]。长期便秘会影响机体健康, 如引起失眠、食欲下降、胃肠功能紊乱、肛肠疾病等, 同时会导致溃疡性结肠炎, 以及心血管疾病等并发症的出现。目前, 多采用传统药物手段治疗便秘病, 如胃肠动力促进药、肠道脱水药、润滑性泻药等, 虽可快速缓解便秘症状, 但副作用较多, 长期使用易发生药物依赖性, 导致正常肠道菌群失调, 进而引起顽固性便秘, 难以治愈^[4-8]。

许多研究报道声称, 纤维素、益生元、益生菌等产品可显著改善便秘^[9-11], 但在实际临床中这些产品由于功能过于单一, 便秘调节效果并不稳定, 周期较长。可能是由于肠道菌群紊乱型便秘同时还会伴有炎症、肠动力不足、肠营养缺乏等情况, 因此寻找一种源自天然、对机体的副作用小, 具有复合调节功能的便秘干预物质具有重要意义。

有研究发现, 贻贝、牡蛎具有抗炎、增加肠营养和改善便秘作用^[8]; 香蕉含有较多的色氨酸, 在肠道内可以转化成五羟色胺, 增加肠动力^[12-16]。本研究旨在利用利用贻贝、牡蛎等提取物进行组方, 通过灌胃抗生素诱导建立菌群紊乱型便秘模型, 探索一种具有润肠通便功能的复合物配方, 并评价其对肠道菌群的调节功能。

1 材料与方法

1.1 动物与材料

1.1.1 实验动物及饲养

SPF 级 6 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0002。分笼饲养, 自由进食全价配合饲料 (营养成分按照 GB 14924.3-2001 要求), 严格按照广东海洋大学实验动物中心 (SYXK2014-0053) 操作规范。

1.1.2 实验材料

(1) 抗生素混合悬液: 克拉霉素 (批号: D011804031)、头孢拉定 (批号: 180307) 和阿莫西林 (批号: 180710), 按照质量比例, 克拉霉素: 头孢拉定: 阿莫西林=2:2:1 配制, 高浓度抗生素悬液浓度 125 mg/mL, 低浓度抗生素悬液浓度 62.50 mg/mL。配制方法: 按照质量浓度, 用无菌蒸馏水配制上述混合溶液, 26 °C 超声 10 min 混匀, 现配现用。

(2) 贻贝、牡蛎复合物配方: 贻贝、牡蛎复合物活性成分净含量和来源: 低聚果糖, 95%浓缩比, 江门市量子高科生物科技有限公司; 绿唇贻贝提取物, 30:1 浓缩比, 陕西鑫之康生物科技有限公司; 牡蛎粉, 20:1 浓缩比, 陕西森弗天然制品有限公司; 香蕉皮粉 (RBP), 30:1 浓缩比, 陕西森弗天然制品有限公司。低聚果糖剂量为 1.60 g/kg、牡蛎粉 0.80 g/kg、贻贝提取物 0.80 g/kg、香蕉皮粉 1.60 g/kg, 按照质量比低聚果糖: 牡蛎粉: 贻贝提取物: 香蕉皮粉=2:1:1:2 配置。配制方法: 根据实验所需, 按照上述浓度称取一定质量的各物质, 将其溶解于无菌生理盐水中, 26 °C 超声 10 min, 使其充分溶解混匀, 现配现用。

(3) 墨汁: 准确称取 100 g 阿拉伯树胶, 加 800 mL 灭菌水, 煮沸至溶液透明, 称取 100 g 活性炭加至上述溶液中煮沸 3 次, 待溶液凉后加灭菌水定容到 1000 mL, 储存于 4 °C 冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 造模与给药方式

动物分组: 将 31 只小鼠分为空白对照组 (MB2) 和实验组 (ME2), MB2 组 4 只/组, 共 2 组, ME2 组 5 只/组, 共 5 组, 实验组灌胃同体积低浓度抗生素 4 d, 继续灌胃高浓度抗生素 3 d, 第 10 d MB2、ME2 组各解剖 3 只, 测定首粒黑边时长及小肠推进率; 将 ME2 组重新分为干预组 IC1 和 IC2、阳性对照组 IP 和自然恢复组 INR, IC1 组灌胃由低聚果糖:牡蛎粉:贻贝提取物=2:1:1 的复合物, IC2 组灌胃由低聚果糖:牡蛎粉:贻贝提取物:香蕉皮粉 (RBP)=2:1:1:2 组成的复合物, IP 组灌胃低聚果糖溶液, INR 组灌胃生理盐水。按小鼠体重灌胃剂量 0.02 mL/(g·bw), 检测小鼠体重、饲料消耗量、粪便数量、粪便含水率和小肠推进率, 取小鼠粪便 1~2 粒于样本裂解液中, 存放于 -80 °C 冰箱中, 测定肠道菌群结构及分析。

1.2.2 指标测定方法

1.2.2.1 粪便量和小肠墨汁推进率的测定

收集每组小鼠 24 h 内排出的粪便, 采用平均数来表示每组的粪便数; 末次给药后, 独笼饲养每只小鼠, 灌胃墨汁后, 检测小鼠从灌胃开始到首粒黑便排出时间; 小鼠断水断食 24 h 后, 按体重灌胃墨汁, 30 min 后解剖, 测量小肠全长及自胃部下端幽门处到墨水运动前沿的距离, 按公式 (1) 计算小肠推进率。

$$\text{小肠推进率}/\% = \frac{\text{墨汁移动距离}/\text{cm}}{\text{小肠全长}/\text{cm}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2.2 粪便含水率的测定

将小鼠粪便收集到质量为 W_0 的培养皿内, 80 °C 烘箱烘干 10 h 至恒重, 根据公式 (2) 计算粪便含水率。

$$\text{粪便含水率}/\% = (W_1 - W_2)/(W_1 - W_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中: W_0 : 培养皿重量, g; W_1 : 粪便湿重和培养皿的总重量, g; W_2 : 粪便干重和培养皿的总重量, g。

1.2.2.3 肠道菌群的测定

16s rRNA 基因测序, 通过采用 Illumina Hiseq 测序平台使用引物 515F-806R 进行双端测序 (paired-end), 对 V4 区进行扩增测序, 得到 fastq 格式的原始数据, 再配对拼接成单条序列, 通过 barcode 确定序列对应的样本。首先使用 QIIME (version 1.8.0) 工具包对每个样本库的序列进行 OTU 注释, GreenGene (version gg_13-8) 或 Silva (SILVA128) 数据库比较不同样本之间的微生物组成差异, 再根据 V4 区的测序长度, 将序列准确的归类到属级别。包括:

(1) 各分类水平组成分析: 根据物种注释结果, 对每个样本在门、属分类水平上选取丰度排名前 10 的物种来绘制相对丰度柱状图, 得到不同样本或分组间物种组成比例情况; (2) 样本差异分析, 包括 Alpha 多样性分析以及基于属水平的聚类分析: 样本先按照彼此之间组成的相似度进行聚类, 依次排列, 再根据不同样本的分类单位的相似度进行聚类, 聚类结果纵向依次排列, 测定样品之间的相似性以及属水平上的群落构成相似性。

1.3 统计方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。方差齐采用 One-way Anova 分析, 方差不齐用 Nonparametric tests 分析, 组间比较采用多重检验的 Turkey HSD, 计数以百分率 (%) 表示, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 便秘模型的评估

2.1.1 抗生素对小鼠排便功能参数的影响

在建立抗生素诱导的肠道菌群失调便秘小鼠模型时, 采用 3 条标准判断建模成功^[17-21]: (1) 便秘发生时, 小鼠便秘表观特征如排便量减少等; (2) 小鼠的肠道菌群失调, 失调的程度为肠道菌群的组成及数量发生较为明显的改变; (3) 停止灌胃 24 h 后小鼠仍保持便秘特征。由图 1 可知, 对比 MB2 组, ME2 组小鼠排便量、粪便含水率和饲料消耗量显著下降, 排便量最小值 (34 粒/d) 显著减少 56 粒/d ($t=2.78$, $p=0.04$), 粪便含水率显著降低 22% ($t=-8.29$, $p<0.01$), 平均饲料消耗量显著下降 2.22 g/d; 对比第 1 d, ME 组小鼠平均粪便数、粪便含水率和饲料消耗量显著下降 57 粒/d、19.40%、2.68 g/d ($t=-5.98$, $p<0.01$)。图 2 结果显示, 抗生素灌胃 7 d 后, 对比 MB2 组, 小肠推进率显著下降以及排出首粒黑便时长显著延长, ME2 组小鼠小肠推进率显著降低 22.89% ($t=-4.41$, $p<0.01$), 首粒黑便时长显著延长 108 min ($t=7.21$, $p<0.01$)。本研究与白冰瑶^[9]等人研究结果一致, 便秘模型是否建立成功可通过测定小鼠小肠推进率、首粒黑便时长、排便质量等排便参数来判断。通过对本实验结果的分析发现, 对比空白组, 抗生素混合悬液灌胃的便秘模型组小鼠粪便含水率、进食量、饲料消耗率、排便量显著降低, 肠蠕动功能减弱, 排出首粒黑便时长延长, 小肠墨汁推进率降低。说明灌胃抗生素能降低小鼠排便量、粪便含水率及减弱肠蠕动能力等, 导致小鼠排

便功能减弱,造成小鼠便秘。

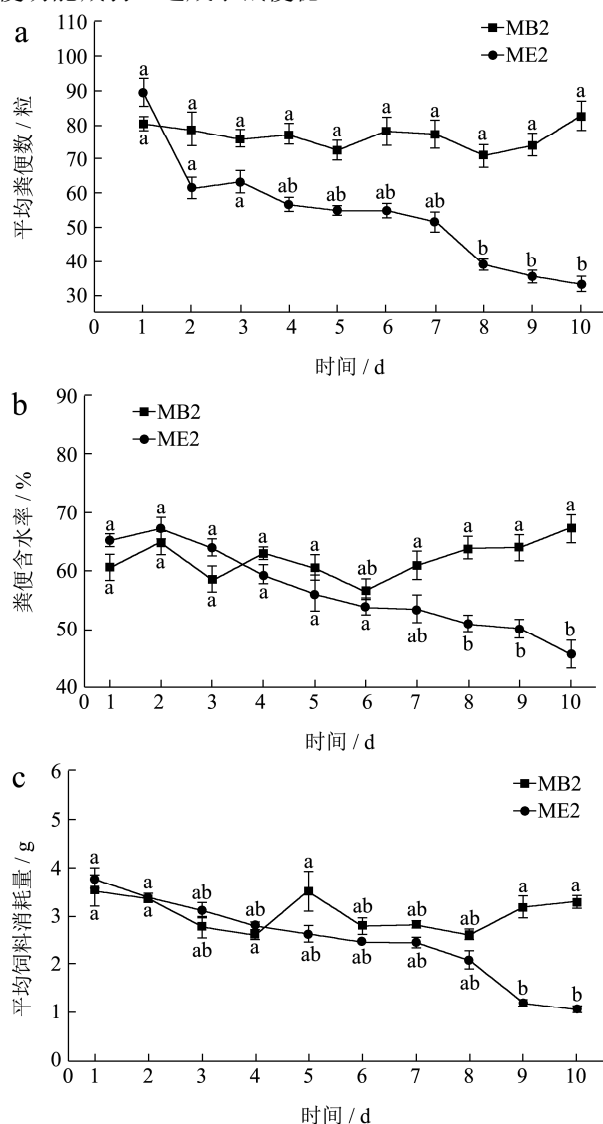


图1 混合抗生素悬液灌胃后小鼠排便功能参数的变化

Fig.1 Changes of fecal function parameters in mice with mixed antibiotic suspension

注: a 为小鼠平均粪便数变化图; b 为小鼠粪便含水率变化图; c 为小鼠饲料消耗量变化图; 不同小写字母存在显著性

表1 抗生素混合灌胃小鼠的 Alpha 多样性指数变化

Table 1 Changes of Alpha diversity index in mice fed by gavage in two-concentration mixed

Sample	Shannon	Simpson	Chao1	Ace	Good's coverage
MB2-1	5.8627	0.9611	387.2071	372.3173	0.9994
MB2-2	6.0157	0.9650	352.4286	342.5587	0.9996
MB2-3	4.6034	0.8892	406.2174	394.7931	0.9995
ME2-1	0.6138*	0.1923*	224.3606*	237.2236*	0.9994*
ME2-2	0.9860*	0.1766*	256.6083*	211.6832*	0.9995*
ME2-3	0.6138*	0.1923*	224.3606*	237.2236*	0.9994*
t 值	-50.12	10.48	7.93	7.30	-30.98
p 值	<0.01	<0.01	=0.01	=0.02	<0.01

注: *表示存在显著性差异, $p < 0.05$ 。

差异, $p < 0.05$; MB2 空白对照组, ME2 便秘模型组, 下同。

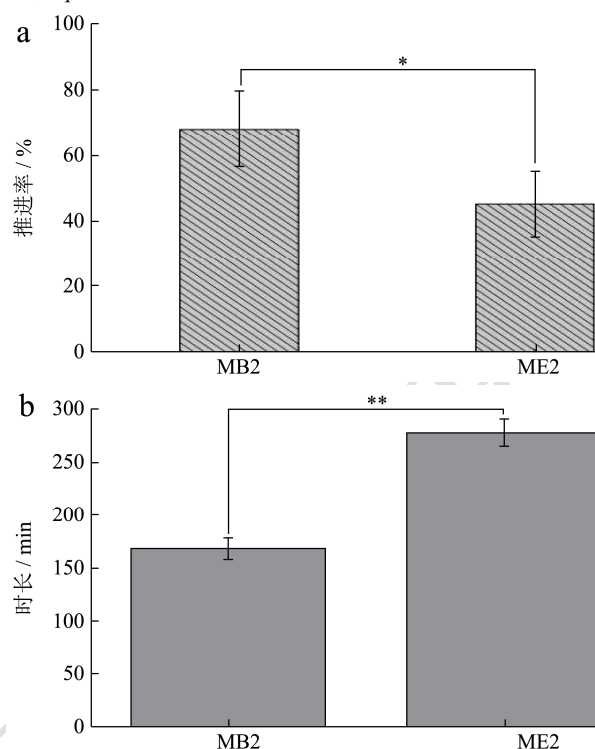


图2 混合抗生素悬液灌胃后小肠推进率及首粒黑便时长变化

Fig.2 Changes of small intestine propulsion rate and the duration of first black stool after intragastric administration of mixed antibiotic suspension

注: a 为小鼠小肠推进率变化图; b 为小鼠首粒黑便时长变化图; *表示存在显著性差异, $p < 0.05$, 下同。

2.1.2 16s RNA 测序小鼠肠道菌群结构组成成分分析

2.1.2.1 Alpha 多样性分析

表1 结果显示, 对比 MB2 组, 肠道菌群丰富度指数 Chao1、Ace 以及多样性指数 Shannon、Simpson 显著下降 ($p < 0.01$), 说明抗生素会导致小鼠肠道菌群的丰富度与多样性显著下降。

2.1.2.2 抗生素对小鼠肠道菌群在门、属水平上组成的影响

黄毅激等^[22]研究发现,小鼠的肠道菌群失调程度表现为肠道菌群的组成及数量发生较为明显的改变。图3和表2结果显示,在门水平上,小鼠肠道共有的3类优势菌门为:厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)无显著性变化。对比MB2组,ME2组的Firmicutes比例显著降低,ME2-1组Firmicutes菌丰度下降38.99%,Proteobacteria比例增加,ME2组Verrucomicrobia缺失,Fusobacteria丰度大于1.00%。图4和表3结果显示,丰度相对较高的菌属有6个,分别是拟杆菌属(*Bacteroides*)、毛螺旋菌科(*Lachnospiraceae*)、*Ruminiclostridium*属、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)。对比MB2组,ME2组有益菌属*Prevotella-9*、*Lachnospiraceae*、*Enterobacter*等丰度显著下降,*Blautia*、*Akkermansia*缺失,*Bacteroides*丰度增加。说

明采用抗生素灌胃可以导致模型组小鼠肠道菌群紊乱,可能的机理包括^[23-25]:(1)抗生素可减少肠道中部分菌群数量,导致肠道菌群多样性及丰富度降低,导致肠道菌群紊乱型便秘症状出现;(2)抗生素导致*Akkermansia*、*Verrucomicrobia*等有益菌缺失,进而出现便秘症状。

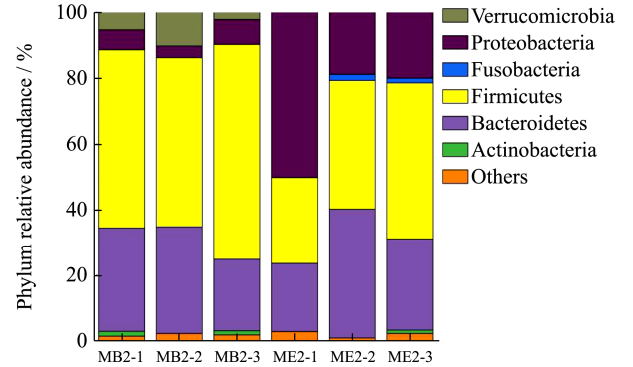


图3 抗生素对小鼠肠道菌群门水平组成的影响
Fig.3 Effect of antibiotics on the level of intestinal microflora in mice at phylum

表2 门水平细菌组成

Table 2 Proportion of composition of bacteria at phylum level (%)

Taxon	MB2-1	MB2-2	MB2-3	ME2-1	ME2-2	ME2-3
Other	1.63	2.42	2.00	3.00	1.09	2.44
Actinobacteria	1.48	0.00	1.29	0.00	0.00	1.04
Bacteroidetes	31.46	32.47	21.70	20.73	39.20	27.73
Firmicutes	54.10	51.37	65.33	26.15	39.09	47.43
Fusobacteria	0.00	0.00	0.00	0.00%	1.89	1.45
Proteobacteria	6.12	3.60	7.55	50.12	18.73	19.91
Verrucomicrobia	5.21	10.14	2.13	0.00	0.00	0.00

表3 两种浓度混合灌胃小鼠导致肠道菌群在属水平的变化

Table 3 Changes of intestinal microflora at genus level in mice fed by gavage in two-concentration mixed (%)

Taxon	MB2-1	MB2-2	MB2-3	ME2-1	ME2-2	ME2-3
Other	4.21	8.90	6.09	3.96	4.66	4.82
<i>Bacteroides</i>	11.58	9.71	8.22	23.69	24.03	31.67
<i>Muribaculaceae</i>	3.56	5.38	3.02	2.00	2.89	5.78
<i>Prevotella-9</i>	1.55	7.20	11.82	2.05	2.22	1.03
<i>Alistipes</i>	3.95	2.28	2.36	1.07	4.66	2.31
<i>Parabacteroides</i>	1.55	0.00	1.19	1.21	2.48	1.63
<i>Lactobacillus</i>	0.00	1.19	1.27	0.00	1.30	1.60
<i>Clostridium</i>	23.55	13.06	8.93	2.56	5.99	4.96
<i>Blautia</i>	2.24	2.30	1.33	0.00	0.00	0.00
<i>Lachnoclostridium</i>	2.85	1.18	2.20	1.00	1.24	2.12
<i>Lachnospiraceae</i>	9.37	11.62	11.90	6.67	3.43	4.04
<i>Roseburia</i>	3.42	3.09	3.44	1.73	5.43	1.48
<i>Faecalibacterium</i>	1.56	1.26	1.23	3.24	2.33	2.84

转下页

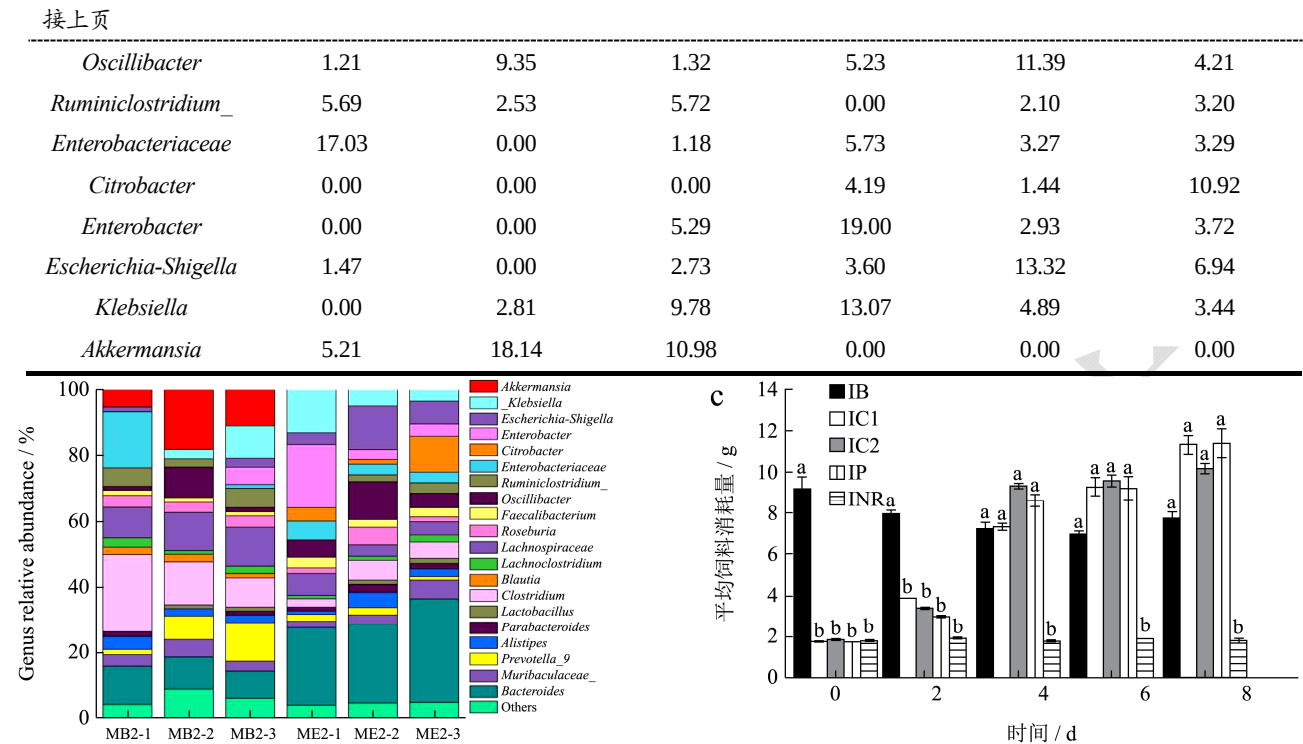


Fig.4 Effect of antibiotics on the level of intestinal microflora in mice at genus

2.2 贻贝、牡蛎复合物对小鼠便秘的改善效果

评价

2.2.1 贻贝、牡蛎复合物对小鼠排便功能参数的影响

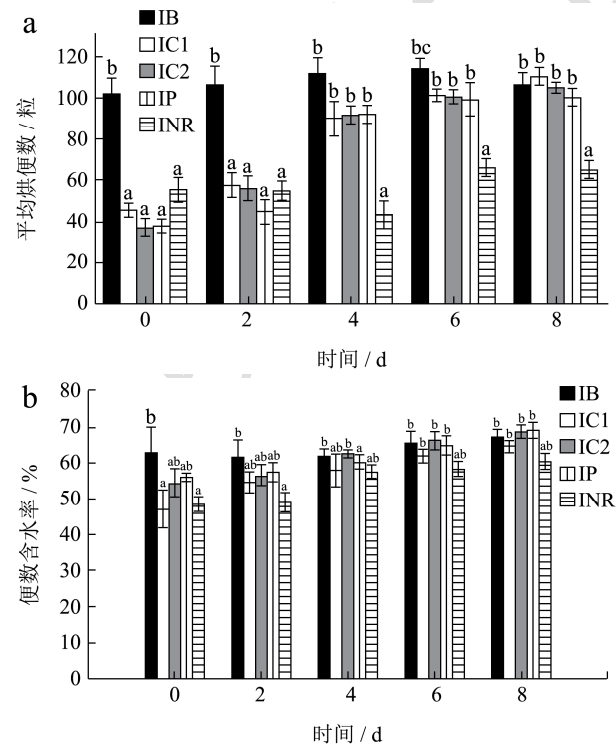


Fig.5 The changes of fecal quantity and fecal water content in mice improved by compound food extract

注：IB 空白组，IC1、IC2 干预组，IP 阳性对照组，INR 自然恢复组，a 为平均粪便数量图，b 为粪便含水率变化图，c 为饲料消耗率变化图；d 为首粒黑便时长变化图，不同小写字母、*表示存在显著性差异， $p < 0.05$ ，下同。

目前益生元、益生菌产品虽对便秘有一定改善功能，但多数研究仅针对调节肠道蠕动功能方面，关于通过同时调节肠道菌群及肠动力多方面改善便秘的研究较少^[7]。图5结果显示，对比干预前，IC1、IC2组粪便数量、粪便含水率显著增加，IC1和IC2组排便数量分别增加65粒/d、69粒/d($t=6.52$, $t=3.97$, $p < 0.01$)，粪便含水率分别提高了18.10%、14.20% ($t=4.19$, $t=7.95$, $p < 0.01$)，高于IP组，逐渐趋于IB组。干预7d后，对比INR组，IC1、IC2组小鼠日平均饲料消耗量显著增加9.55 g/d、8.38 g/d ($t=-45.96$, $t=-44.96$,

$p<0.01$), 小肠推进率组显著提高 24.20%、34.50% ($t=1.28$, $t=1.61$, $p<0.05$); 对比 IB 组, IC1、IC2 组小鼠小肠推进率、饲料消耗量与 IB 组无显著性差异 ($p>0.05$), INR 组显著低于 IB 组 ($p<0.05$)。说明了贻贝、牡蛎复合物可提高粪便数量、粪便含水率及小肠推进率等排便参数, 可改善小鼠的排便能力及肠蠕动能力。所以, 推测贻贝、牡蛎复合物改善小鼠便秘的作用机理可能为贻贝、牡蛎复合物改善了小鼠的肠道蠕动功能, 提高了胃肠动力, 以及贻贝提取物和牡

蛎粉成分降低了小鼠机体内的炎性, 增加了肠营养物质合成。

2.2.2 16s RNA 测序肠道菌群结构组成分析

2.2.2.1 Alpha 多样性分析

表 4 可知, 对比 IB、INR 组, 肠道菌群丰富度指数 Chao1、Ace 以及多样性指数 Shannon、Simpson 值显著增加, IC1、IC2 组多样性大于 IP 组, INR 组显著低于其他组, 说明贻贝、牡蛎复合物能提高肠道菌群的丰富度和多样性。

表 4 Alpha 多样性指数变化

Table 4 Changes of alpha diversity index

Sample	Shannon	Simpson	Chao1	Ace	Good's coverage
ME2	1.1556 ^a	0.3386 ^a	246.1962 ^a	229.0533 ^a	0.9995 ^a
IB	5.5594 ^c	0.9544 ^b	723.9699 ^b	701.6252 ^b	0.9989 ^a
IC1	2.9584 ^b	0.8119 ^b	366.5000 ^a	399.1935 ^a	0.9992 ^a
IC2	3.3963 ^b	0.8752 ^b	412.5675 ^a	416.9773 ^a	0.9994 ^a
IP	2.84303 ^b	0.8001 ^b	375.8571 ^a	384.6301 ^a	0.9994 ^a
INR	1.7981 ^a	0.5023 ^a	261.3076 ^a	299.0267 ^a	0.9991 ^a
t 值	-141.55	-6.70	8.96	9.01	-16.59
p 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 不同大小写字母表示存在显著性差异, $p<0.05$ 。

2.2.2.2 贻贝、牡蛎复合物对小鼠肠道菌群在门、属水平组成上的差异

图 6 和表 5 结果显示, 在门水平上共有的 3 类优势菌为: Bacteroidetes、Proteobacteria、Firmicutes, 对比 IB 组, Proteobacteria 相对丰度增长 10%以上, Verrucomicrobia 丰度增加, INR 组 Firmicutes、Actinobacteria 等菌群丰富度显著低于其他组。图 7、图 8 及表 6 结果显示, 干预组属水平结构改变表现为 *Enterobacter*、*Klebsiella*、*Lachnospiraceae*、*Parabacteroides*、*Akkermansia*、*Faecalibacterium prausnitzii* 等有益菌丰度上调。对比 ME 组, IC1、IC2 组 *Akkermansia* 与 *Verrucomicrobium* 丰度提高; 特殊功能有益菌 *Faecalibacterium prausnitzii*、*Parabacteroides distasonis*、*Lachnospiraceae*、*Blautia* 丰度增加, *Akkermansia* 丰度显著增加 16%, 有害菌属 *Pre-prevotella-9* 显著下降, INR 组 *Klebsiella* 等有益菌丰富度低于其他组。研究发现, *Akkermansia*、*prevotella* 属于肠道益生菌, 可提高肠道上皮屏障的功能、缓解肠道炎症, 调节肠道菌群, *Faecalibacterium prausnitzii* 作为肠道共生菌, 能产生丁酸, 调节肠道免疫系统、氧化应激和结肠上皮细胞的代谢,

Parasutterell 属占据特定肠道生态位, 影响菌群和宿主代谢^[26-30]。李寒冰等^[31-34]发现便秘可导致肠道菌群紊乱及肠道炎性损伤发生。在本研究中经贻贝、牡蛎复合物干预结果显示后, 对比便秘模型组, 肠道菌群多样性增加, *Blautia*、*Akkermansia*、*Verrucomicrobia* 丰度增长 10%以上, *Faecalibacterium prausnitzii*、*Blautia*、*Parasutterell* 等肠道有益菌丰度上调, 肠道菌群结构大致恢复到空白组, 证明了复合贻贝、牡蛎复合物可调节小鼠肠道菌群, 改善小鼠便秘。所以, 推测贻贝、牡蛎复合物改善便秘小鼠肠道菌群的作用机理可包括以下几点^[35-44]: (1) 贻贝、牡蛎复合物降低了 *Enterobacteriaceae*、*Oscillibacter*、*Klebsiella* 等肠炎致病菌, 增加了 *Blautia*、*Roseburia*、*Faecalibacterium* 等产生肠营养物质的有益菌, *Blautia* 代谢产生乙酸, *Roseburia*、*Faecalibacterium* 代谢产生丁酸, 均为有利于优势菌生产繁殖的营养物质, 使有益菌成为肠道内优势菌, 为小肠运动提供能量, 达到改善便秘的效果; (2) 贻贝、牡蛎复合物, 尤其是香蕉皮粉和低聚果糖改善了小鼠的肠道菌群结构, 提高了多样性, 增加了有益菌, 改善了小鼠便秘。

表 5 门水平细菌组成

Table 5 Proportion of composition of bacteria at phylum level (%)

Taxon	ME	IB	IC1	IC2	IP	INR
Others	0.62	0.47	0.47	0.57	0.46	0.19
Actinobacteria	1.39	1.01	1.23	1.15	1.37	0.52
Bacteroidetes	25.71	44.00	31.78	33.72	32.71	31.12
Epsilonbacteraeota	0.49	0.40	0.08	0.65	0.23	0.40
Firmicutes	49.39	48.80	46.92	42.46	43.97	46.69
Fusobacteria	1.22	0.19	0.70	0.71	0.69	0.88
Patescibacteria	0.23	0.32	0.17	0.36	0.11	0.13
Proteobacteria	18.98	4.56	16.00	15.96	18.47	18.54
Synergistetes	0.84	0.00	0.65	0.38	0.15	0.09
Verrucomicrobia	1.12	0.24	2.00	4.03	1.85	1.43

表 6 小鼠肠道菌群在属水平所占比例

Table 6 Proportion of intestinal flora at genus level in mice (%)

Taxon	ME	IB	IC1	IC2	IP	INR
Other	11.67	5.80	8.73	8.73	7.76	8.41
<i>Bacteroides</i>	3.72	0.12	1.92	1.92	1.32	1.72
<i>Enterobacter</i>	3.62	0.00	1.81	1.81	1.21	1.61
<i>Klebsiella</i>	2.31	3.71	3.01	3.01	3.24	3.09
<i>Alistipes</i>	1.92	0.53	1.23	1.23	0.99	1.15
<i>Citrobacter</i>	2.12	1.11	1.61	1.61	1.45	1.56
<i>Lachnospiraceae</i>	2.16	6.54	4.35	4.35	5.08	4.59
<i>Lachnospiraceae-NK4A136-group</i>	2.84	0.82	1.83	1.83	1.50	1.72
<i>Faecalibacterium</i>	1.63	1.13	1.38	1.38	1.30	1.35
<i>Parabacteroides</i>	2.08	1.47	1.78	1.78	1.68	1.74
<i>Lachnospiraceae-UCG-008</i>	1.94	0.56	1.25	1.25	1.02	1.18
<i>Escherichia-Shigella</i>	1.11	1.27	1.19	1.19	1.22	1.20
<i>Prevotella-9</i>	1.48	1.85	1.66	1.66	1.72	1.68
<i>Roseburia</i>	1.13	0.24	0.69	0.69	0.54	0.64
<i>Akkermansia</i>	0.91	0.16	0.53	0.53	0.41	0.49
<i>Lachnospiraceae_UCG-004</i>	4.67	0.00	2.33	2.33	1.56	2.08
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	1.16	0.29	0.73	0.73	0.58	0.68
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.84	0.40	1.12	1.12	0.88	1.04
<i>Lactobacillus</i>	0.61	1.42	1.02	1.02	1.15	1.06
<i>Blautia</i>	1.52	0.38	0.95	0.95	0.76	0.88
<i>Sutterella</i>	1.37	0.20	0.79	0.79	0.59	0.72
<i>Megamonas</i>	0.86	0.69	0.78	0.78	0.75	0.77
<i>Parasutterella</i>	1.14	0.27	0.71	0.71	0.56	0.66
<i>Subdoligranulum</i>	0.66	0.29	0.48	0.48	0.41	0.45
<i>Ruminococcaceae_UCG-002</i>	0.78	0.21	0.50	0.50	0.40	0.47
<i>Anaerostipes</i>	0.47	2.10	1.28	1.28	1.55	1.37

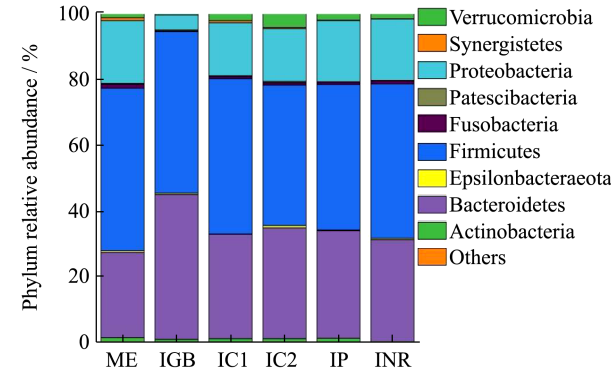


图6 贻贝、牡蛎复合物干预后小鼠肠道菌群门水平组成

Fig.6 Effect of mussel and oyster complex on the phylum level of intestinal flora in mice

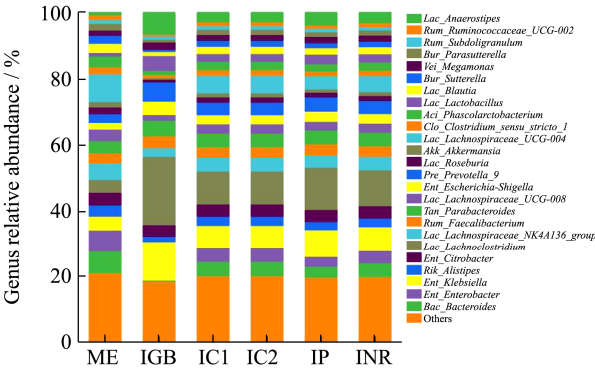


图7 贻贝、牡蛎复合物对小鼠肠道菌群属水平组成的影响

Fig.7 Effect of mussel and oyster complex on the genus level of intestinal flora in mice

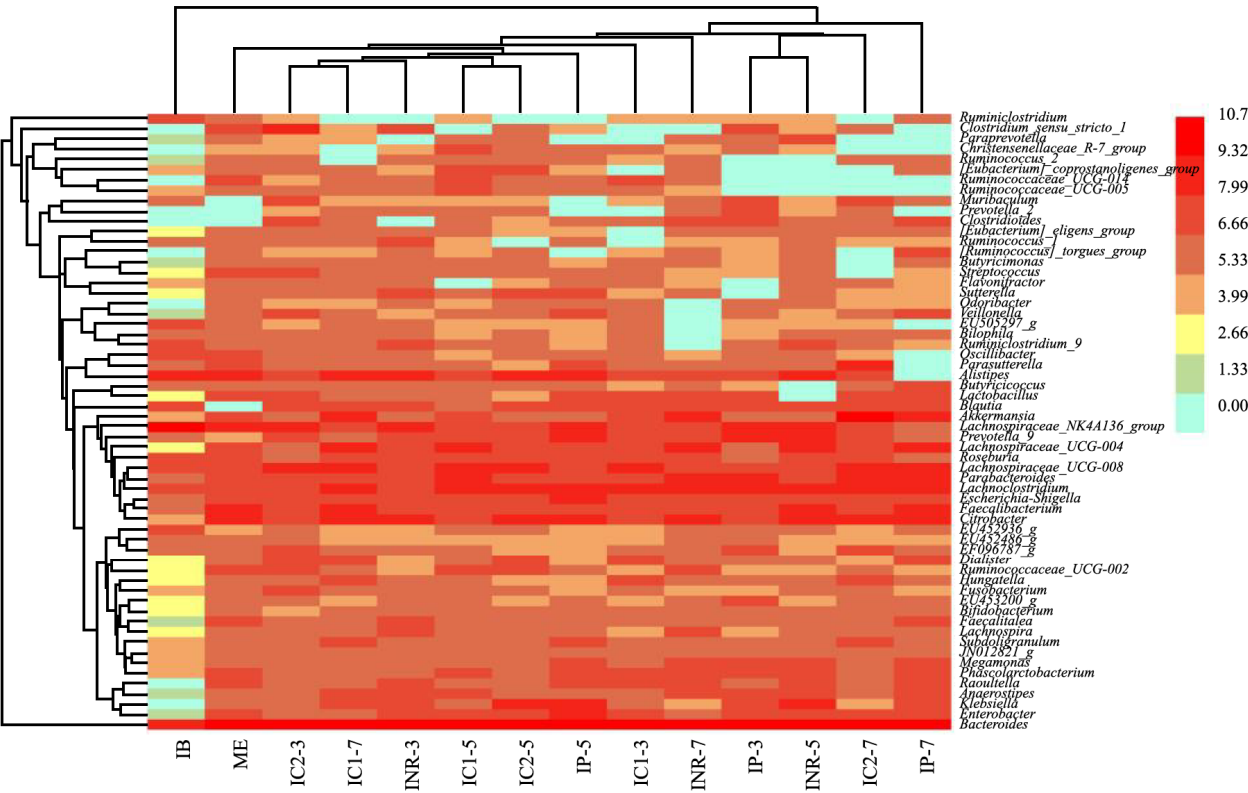


图8 肠道菌群群落构成相似性图

Fig.8 Community composition similarity of intestinal flora

3 结论

本实验探究了贻贝、牡蛎复合物对肠道菌群紊乱型便秘小鼠的肠道功能及其肠道菌群的干预作用,研究发现,贻贝、牡蛎复合物能显著改善小肠蠕动功能、加快小肠推进、缩短粪便排出时间、增加粪便含水率,同时增加了肠道益生菌 *Akkermansia*、*Parasutterell*、*Blautia* 等的相对丰度,调节小鼠肠道菌群结构,说明贻贝、牡蛎复合物对肠道菌群紊乱型便秘小鼠具有良好的干预作用,为后续便秘产品的开发提供理论数据

支撑以及新的开发思路。

参考文献

[1] Huang Z Y, Tang C W. Intestinal microecology and acute pancreatitis [J]. J Clin Intern Med, 2016, 10: 659-661

[2] XIN Yue-ly, HUI Guo-ding, JUN Fu-Zheng, et al. Rifaximin improves survival in cirrhotic patients with refractory ascites: a real-world study [J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(2): 199-218

[3] YU Zhi-chao, CEN Yong-xin, WU Ben-hua, et al. Berberine

- prevents stress-induced gut inflammation and visceral hypersensitivity and reduces intestinal motility in rats [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(29): 3956-3971
- [4] Aziz Q, Dore J, Emmanuel A, et al. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions [J]. Neurogastroenterol Motil, 2013, 25(1): 4-15
- [5] Jae R C, Saem Y K, Sung E K, et al. Prebiotic UG1601 mitigates constipation-related events in association with gut microbiota: a randomized placebo-controlled intervention study [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(40): 6129-6144
- [6] 张跃奇,董方芳,王克杰.便秘病因分析及研究进展[J].河南预防医学杂志,2012,23(3):248-250
ZHANG Yue-qi, DONG Fang-fang, WANG Ke-jie. Constipation pathogeny analysis and research progress [J]. Henan J Prev Med, 2012, 23(3): 248-250
- [7] 李延青,于岩波.功能性便秘的诊断与治疗[J].中国实用内科杂志,2011,31(2):158-160
LI Yan-qing, YU Yan-bo. Diagnose and treatment of functional constipation [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2011, 31(2): 158-160
- [8] 查勤芳,闫伟,陈洪林.便秘的原因及治疗进展[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(11):117-119
ZHA Qin-fang, YAN Wei, CHEN Hong-lin, et al. Current situations about reasons and treatments of constipation [J]. Journal of Liaoning University of TCM, 2013, 15(11): 117-119
- [9] 杜鹏强,陈明月,王雪,等.慢性便秘的治疗药物现状与新进展[J].食品与药品,2016,18(4):296-299
DU Peng-qiang, CHEN Ming-yue, WANG Xue, et al. Present situation and new progress of chronic constipation drugs [J]. Food and Drug, 2016, 18(4): 296-299
- [10] 白冰瑶,刘新愚,周茜,等.红枣膳食纤维改善小鼠功能性便秘及调节肠道菌群功能[J].食品科学,2016,37(23):254-259
BAI Bing-yao, LIU Xin-yu, ZHOU Qian, et al. Dietary fiber of red jujube ameliorates functional constipation and improves intestinal health in mice [J]. Food Sci, 2016, 37(23): 254-259
- [11] 王尤丽.低聚乳糖调节小鼠肠道菌群的作用[D].郑州:郑州大学,2012
WANG You-li. The effect of galactooligosaccharides on intestinal flora in mice [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2012
- [12] 曾群,赵果毅.疏通胶囊对燥结型便秘通便功能的研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,16(18):139-141
ZENG Qun, ZHAO Guo-yi. Experiment research of Shutong capsule on defecating function with coprostasis type of dry stagnation in stomach and intestines [J]. Chinese Journal of ETMF, 2012, 16(18): 139-141
- [13] 吴丽红,闵炜,蒋丽萍.贻贝提取物的抗氧化活性研究[J].药学研究,2016,35(6):325-327
WU Li-hong, MIN Wei, JIANG Li-ping. Study on antioxidation activity of *Mytilus edulis* extracts [J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 35(6): 325-327
- [14] Raoss K, Patcharatrakul T. Diagnosis and management of chronic constipation in adults [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(5): 295-305
- [15] 谭姣姣,王晶,岳洋,等.海带膳食纤维的理化特性及通便作用研究[J].Marine Sciences, 2018,42(6):53-56
TAN Jiao-jiao, WANG Jing, YUE Yang, et al. Physicochemical properties and laxative effect of dietary fiber from *Saccharina japonica* [J]. Marine Sciences, 2018, 42(6): 53-56
- [16] 张琳,许喜林.海洋膳食纤维通便产品的研制[J].食品研究与开发,2015,36(10):45-48
ZHANG Lin, XU Xi-lin. Development of marine dietary fiber laxative product [J]. Food Research and Development, 2015, 36(10): 45-48
- [17] 刘响,曹海龙,安莹莹.慢性便秘患者肠道菌群对小鼠肠道5-羟色胺转运体表达及排便功能的影响[J].中华消化杂志, 2017,37(6):399-403
LIU Xiang, CAO Hai-long, AN Ying-ying. Effects of intestinal microbiota of patients with chronic constipation on the expression of serotonin transporter and the bowel movement in mice [J]. Chin J Dig, 2017, 37(6): 399-403
- [18] Mearin F, Ciriza C, Minguez M, et al. Clinical practice guideline: irritable bowel syndrome with constipation and functional constipation in the adult [J]. Rev Esp Enferm Dig, 2016, 108(6): 332-363
- [19] 刘井如,季宇彬,陈明苍.便秘动物模型的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):353-356
LIU Jing-ru, JI Yu-bin, CHEN Ming-cang. Advances of pharmacological researches in constipation animal model [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(22): 353-356
- [20] SUN Zhi-gao, HU Ya-zhuo, WANG Yu-guo, et al. Bupi Hewei decoction ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal dysbiosis in rats through T helper 17/T regulatory cell signaling pathway [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 40(1): 38-48
- [21] 王林,姜军,丁威威,等.顽固性便秘病人结肠黏膜菌群的变

- 化特征[J].肠外与肠内营养,2014,21(1):12-15
- WANG Lin, JIANG Jun, DING Wei-wei, et al. Alteration of colonic mucosa-associated microbiota in patients with refractory constipation [J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2014, 21(1): 12-15
- [22] Grehan M, Borody T, Leis S, et al. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora [J]. J Clin Gastroenterol, 2010, 44(8): 551-561
- [23] 黄毅激,金鑫,娜迪拉·巴吾尔江,等.三联益生菌对便秘小鼠肠道推进功能改善及其对小鼠肠道菌群调节作用的研究[J].中国微生态学杂志,2018,30(4):402-408
- HUANG Yi-wei, JIN Xin, NADILA·Ba-wu-er-jiang, et al. The promoting and regulating effects of triple probiotics on the intestine and intestinal peristalsis in mice with constipation [J]. Chin J Microecol, 2018, 30(4): 402-408
- [24] 丁圣,蒋菁莉,刘松玲,等.长双歧杆菌 BBMN68 对便秘模型小鼠的通便作用[J].食品科学,2011,32(3):195-198
- DING Sheng, JIANG Jing-li, LIU Song-ling, et al. Effect of bifidobacteria strain on defecating function in constipation mice [J]. Food Sci, 2011, 32(3): 195-198
- [25] 赵先平,肖新云,蔡锐,等.便秘相关肠道微生物研究进展[J].中国微生态学杂志,2014,26(10):1236-1240
- ZHAO Xian-ping, XIAO Xin-yun, CAI Rui, et al. The progress in research of constipation-related gut microbes [J]. Chin J Microecol, 2014, 26(10): 1236-1240
- [26] 黄林生,高仁元,严雪冰,等.慢性功能性便秘患者的肠道菌群分析[J].中华结直肠疾病电子杂志,2017,6(2):121-126
- HUANG Lin-sheng, GAO Ren-yuan, YAN Xue-bing, et al. Structure analysis of the gut microbiota in chronic functional constipation patients [J]. Chin J Colorectal Dis, 2017, 6(2): 121-126
- [27] Memba R, Duggan S N, Ni Chonchubhair H M, et al. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease [J]. A Systematic Review, 2017, 6: 867-874
- [28] 韩伟,王超,李晓敏,等.肠道中 *Akkermansia muciniphila* 数量影响因素的研究进展[J].中国微生态学杂志,2019,31(3): 356-359,364
- HAN Wei, WANG Chao, LI Xiao-min, et al. Research progress on factors influencing the quantity of *Akkermansia muciniphila* in the intestines [J]. Chin J Microecol, 2019, 31(3): 356-359, 364
- [29] 乌日拉嘎,孙志宏,孟和毕力格. *Faecalibacterium prausnitzii* 与人类疾病关系的研究进展[J].中国微生态学杂志,2017, 29(5):604-614
- WURI La-ga, SUN Zhi-hong, MENGHE Bi-lige. The relation between *Faecalibacterium prausnitzii* and human diseases [J]. Chin J Microecol, 2017, 29(5): 604-614
- [30] 黄业保,刘春强.调节肠道菌群治疗功能性便秘的研究进展[J].大众科技,2018,20(230):42-44
- HUANG Ye-bao, LIU Chun-qiang. Research progress of the treatment of functional constipation [J]. Popular Science & Technology, 2018, 20(230): 42-44
- [31] Kim G, Deepinder F, Morales W, et al. *Methanobrevibacter smithii* is the predominant methanogen in patients with constipation predominant IBS and methane on breath [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(12): 3213-3218
- [32] 李寒冰,吴宿慧,李根林,等.火麻仁油对便秘大鼠肠道炎症反应的改善作用[J].中华中医药杂志,2018,33(8):3599-3602
- LI Han-bing, WU Su-hui, LI Gen-lin, et al. Effects of hemp seed oil on intestinal inflammation of constipation rat [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2018, 33(8): 3599-3602
- [33] Carrillo S, Spitler K, Pandey D, et al. Inhibition of TLR4 attenuates vascular dysfunction and oxidative stress in diabetic rats [J]. Journal of Molecular Medicine, 2015, 93(12): 1341-1354
- [34] Zheng P, Zeng Ben-hua, Zhou C, et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host 7 S metabolism [J]. Mol Psychiatry, 2016, 21(6): 786-796
- [35] Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(4): 859-867
- [36] LI Ting, LU Xin-shan, YANG Xing-bin. Stachyose-enriched α -galacto-oligosaccharides regulate gut microbiota and relieve constipation in mice [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(48): 11825-11831
- [37] Yano J M, Yu K, Donaldson G P, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis [J]. Cell, 2015, 161(2): 264-276
- [38] JI Hong-yuan, LING Hong-yuan, YI Wang-ying, et al. Effects of dietary fiber in enteral nutrition on inflammatory reaction, immune response and intestinal mucosal barrier in patients with severe acute pancreatitis [J]. Journal of Hainan Medical University, 2019, 25(1): 27-31

(下转第 124 页)