DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.10.022

基于肠菌移植技术研究理气通便方对气滞证STC大鼠“肠道菌群/SCFAs/5-HT”轴的调控作用

刘启鸿[1,2],柯丹枫[2],柯晓[1,2],骆云丰[1,2],胡露楠[1,2],任彦[1,2],方文怡[1,2],赵培琳[1,2],严锦贤[3]
[1.福建中医药大学附属第二人民医院,福建 福州 350003;2.福建省中医脾胃临床医学研究中心,福建 福州 350003;
3.福建省医疗机构中药制剂重点实验室(福建中医药大学),福建 福州 350003]

摘要:目的 通过肠菌移植(fecal microbiota transplantation,FMT)技术,进一步验证理气通便方通过调控“肠道菌群/短链脂肪酸(short chain fatty acids,SCFAs)/五羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)”轴发挥治疗气滞证慢传输型便秘(slow transit constipation,STC)的作用。方法 将24只大鼠适应性喂养7 d后,其中3只作为正常对照组给予无菌水处理,21只大鼠用于复制气滞证STC模型(“洛哌丁胺混悬液+夹尾刺激”)造模,再进行7 d的抗生素鸡尾酒疗法脱菌处理,从中随机抽取3只处死,用于评估肠道动力情况。气滞证STC伪无菌大鼠造模成功后,将动物随机分为3组,分别为正常大鼠粪菌液移植组、气滞证STC模型大鼠粪菌液移植组、理气通便方组大鼠粪菌液移植组,每组6只。以上三组分别给予制备的相应大鼠粪便混悬液灌胃,每日1次,共1周。灌胃结束后,观察各组大鼠的一般情况、结肠组织病理变化,检测各组大鼠粪便的肠道菌群与SCFAs,运用Elisa法检测5-HT的浓度,免疫组化法检测结肠组织中5-羟色胺受体3(5-hydroxytryptamine receptor 3,5-HT3R)、5-羟色胺受体4(5-hydroxytryptamine receptor 4,5-HT4R)的表达及分布,Western Blot法检测结肠组织中色氨酸羟化酶1(tryptophan hydroxylase 1,TPH1)、色氨酸羟化酶2(tryptophan hydroxylase 2,TPH2)、五羟色胺转运体(5-hydroxytamine transporter,SERT)、单胺氧化酶-A(monoamineoxidase A,MAO-A)蛋白的表达水平。结果 理气通便方组大鼠粪菌液移植组能够显著提高粪便含水率、增加排便数量,加快肠道传输,并且能够提高血清中5-HT的浓度,提高结肠组织中5-HT3R和5-HT4R的表达,增加TPH1、TPH2、SERT、MAO-A蛋白的表达水平,并在属分类学水平上,发现毛螺菌属在移植后仍为显著差异菌。SCFAs的测定结果提示,移植理气通便方组治疗后大鼠的粪菌液可显著上调丁酸的水平,其余SCFAs未见明显变化。结论 理气通便方能够改善气滞证STC伪无菌大鼠肠道菌群结构,上调毛螺菌属的丰度,介导了SCFAs(尤其是丁酸)的产生,刺激了5-HT的合成及其受体5-HT3R和5-HT4R表达,同时也促进了5-HT的转运与代谢,从而提高了结肠传输功能,进一步验证了调控“肠道菌群/SCFAs/5-HT”轴是理气通便方治疗气滞证STC的关键环节。

关键词:慢传输型便秘;气滞证;肠菌移植;肠道菌群/SCFAs/5-HT
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)10-0108-10

Regulatory effect of Liqi Tongbian Decoction(理气通便方) on gut microbiota/SCFAs/5-HT axis of rats with STC of Qi Stagnation Syndrome based on fecal microbiota transplantation technology

LIU Qihong[1,2],KE Danfeng[2],KE Xiao[1,2],LUO Yunfeng[1,2],HU Lunan[1,2],REN Yan[1,2],FANG Wenyi[1,2],ZHAO Peilin[1,2],YAN Jinxian[3]
[1.The Second People's Hospital,Fujian University of Traditional Chinese Medicine,Fuzhou 350003,Fujian,China;
2.Fujian Provincial Clinical Research Centre of Chinese Medicine for Spleen and Stomach,Fuzhou 350003,Fujian,China;
3.Fujian Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Preparation for Medical Institutions
(Fujian University of Traditional Chinese Medicine),Fuzhou 350003,Fujian,China]

Abstract:*Objective* To further verify the therapeutic effect of Liqi Tongbian Decoction(理气通便方) in treating slow transit constipation(STC) by regulating the intestinal microbiota/short-chain fatty acids(SCFAs)/5-hydroxytryptamine(5-HT) axis through fecal microbiota transplantation(FMT) technology. *Methods* After 7 days of adaptive feeding,24 rats were used in the ex-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82274282);中央引导地方科技发展资金项目(2023L3013);福建省自然科学基金面上项目(2021J01878);柯晓福建省名中医工作室建设项目(闽卫中医〔2022〕112号);福建省科技厅高校产学合作项目(2023Y4010)
作者简介:刘启鸿(1994-),男(畲族),福建永安人,主治医师,博士,研究方向:消化系统疾病的中西医结合临床基础研究。
通讯作者:柯晓(1965-),男,福建福州人,主任医师,博士研究生导师,硕士,研究方向:消化系统疾病的中西医结合临床基础研究。E-mail:drkxkx@163.com。

periment, of which 3 were the normal control group and received sterile water treatment. The rest 21 rats were used to establish the STC model through loperamide suspension + clamp tail stimulation and were treated with an antibiotic cocktail for 7 days to achieve decolonization. Among them, 3 rats were randomly selected and euthanized to evaluate the intestinal motility. After successfully establishing the STC pseudogerm - free rat model, the animals were randomly divided into the normal rat fecal transplantation group, the STC rat fecal transplantation group and the Liqi Tongbian Decoction rat fecal transplantation group, with 6 rats in each group. All groups were given the corresponding rat fecal suspension daily by oral gavage for a week. After the gavage, the general condition and colonic tissue pathological changes of each group were observed. The intestinal microbiota and SCFAs in the feces of each group were detected. The concentration of 5 - HT was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression and distribution of 5 - hydroxytryptamine receptor 3 (5 - HT3R) and 5 - hydroxytryptamine receptor 4 (5 - HT4R) in colonic tissue were detected by immunohistochemistry. Additionally, the expression levels of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), 5 - hydroxytamine transporter (SERT) and monoamineoxidase A (MAO - A) in colonic tissue were detected by Western Blot. *Results* The Liqi Tongbian Decoction rat fecal transplantation group significantly improved the water content of feces and increased the number of defecations, accelerated the colonic transit, increased the concentration of 5 - HT in the serum, and increased the expressions of 5 - HT3R and 5 - HT4R in colonic tissue. It also increased the expression levels of TPH1, TPH2, SERT and MAO - A proteins. At the taxonomic level, significant differences were found in the genus Mucispirillum after fecal transplantation. The measurement of SCFAs showed that the fecal fluid of the rats in the Liqi Tongbian Decoction group had significantly up - regulated the level of butyric acid after treatment, while the other SCFAs did not show significant changes. *Conclusion* Liqi Tongbian Decoction can improve the structure of the intestinal microbiota in STC pseudogerm - free rats, up - regulate the abundance of Mucispirillum, mediate the production of SCFAs (especially butyric acid), stimulate the synthesis of 5 - HT and the expressions of its receptors 5 - HT3R and 5 - HT4R, and promote the transport and metabolism of 5 - HT, thereby improving the colonic transit function. These results further verify that regulating the intestinal microbiota/SCFAs/5 - HT axis is a key step in the treatment of STC with Liqi Tongbian Decoction.

Keywords: slow transit constipation; Qi stagnation syndrome; fecal microbiota transplantation; gut microbiota/SCFAs/5 - HT

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)主要表现为结肠传输能力下降,传输速度减慢为特点,临床主要表现为排便次数减少(>3 d/次)、粪便干硬、排便困难等[1]。由于社会老龄化的加剧和饮食习惯及生活方式的改变,STC 的发病率逐年上升[2]。STC 不仅严重影响患者的身心健康,而且增加卫生保健系统的财政负担。为此,有效预防和治疗 STC 对于提高患者的生活质量和降低医疗成本具有至关重要的意义。理气通便方是在国医大师杨春波教授学术思想的指导下,中国中西医结合学会慢性便秘专家委员会主任委员柯晓教授的经验方,该方由厚朴、枳实、火麻仁、郁李仁、柴胡、白芍、芒硝、瓜蒌仁等药组成,主要用于治疗气滞证 STC,前期临床研究发现[3-4],理气通便方的临床疗效显著,优于西药对照组,可改善 STC 气滞证患者临床症状,促进自发排便,提高结肠传输功能,能调节肠道菌群的结构与物种多样性;动物实验也发现[5],理气通便方可增加五羟色胺(5 - hydroxytryptamine, 5 - HT)及其 5 - 羟色胺受体 3(5 - hydroxytryptamine receptor 3, 5 - HT3R)、5 - 羟色胺受体 4(5 - hydroxytryptamine receptor 4, 5 - HT4R)的表达、调整肠道菌群结构及短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)的含量,从而起到治疗气滞证 STC 大鼠的作用。

近年来,肠菌移植(fecal microbiota transplant, FMT)作为一种改善菌群紊乱,重塑肠道菌群的有效疗法逐渐被深入研究。有研究表明,对 STC 患者进行 FMT 后,STC 患者的临床症状得以改善,该疗法是目前便秘研究的热点[6]。研究证实,STC 可导致肠道菌群紊乱,中医药具有调控肠道菌群的功效。而理气通便方作为气滞证 STC 的有效方,前期实验已初步确定,理气通便方能调节气滞证 STC 大鼠的肠道菌群,为验证理气通便方是借助肠道菌群来产生作用的,本研究拟通过伪无菌实验和肠菌移植技术,观察理气通便方的药效作用是否会随着粪便微生物的转移而转移,进一步表明理气通便方治疗气滞证 STC 的药效作用与调控"肠道菌群/SCFAs/5 - HT"密切相关。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 *实验动物* 订购 SPF 级 6 周龄 Wistar 雌性大鼠,体质量 160 ~ 170 g(北京华阜康生物科技股份有限公司)。实验动物分笼饲养于我校实验动物中心。动物房内温度 22 ~ 25 ℃,相对湿度 40% ~ 60%,并保持 12 h 昼夜交替,自由获得食物和水,适应性饲养 1 周。本研究均按照福建中医药大学动物伦理委员会(批准号:FJTCM IACUC 2022075)的方案和指南进行。

1.1.2 *主要试剂与仪器* 5 - HT ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM - 71127R2);5 - HT3R 抗体(SAB,货号:32946);5 - HT、5 - HT4R 抗体(BIOSS,货号分别为:BS - 1126R、BS - 2127R);TPH1、TPH2 、SERT 抗体(SAB,货号分别为:41508、43424、53808);MAO - A 抗体(Abcam,货号:ab126751);羊抗兔二抗(SAB,货号:L3012);Pusion Hot start flex 2X Master Mix(上海仪涛生物仪器有限公司,货号:M0536L);Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life technologies,货号:Q32854);Biowest Agarose G - 10(BIOWEST,货号:111860);50 × TAE Buffer (生工生物工程股份有限公司,货号:B548101 - 50);乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸(Dr. Ehrenstorfer,货号分别是:97610、

64197、79094、79312、107926、503742、109524、142621、111148、124072、112050、334485)。

石蜡包埋机(湖北锦源医疗科技有限公司,型号:JY-BMC);组织脱水机(湖北孝感市亚光医用电子技术有限公司,型号:ZT-14);石蜡切片机(Leica,型号:RM2235);酶标仪(Thermo scientific Milli-Q 型号:0511);化学发光成像仪 Amersham Image Quant 800(北京德泉兴业商贸有限公司,型号:AI800);生物安全柜(北京东联哈尔仪器制造有限公司,型号:BSC-1100ⅡA2);半自动化正立式金相显微镜(徕卡显微系统,型号:DM4000);气相色谱仪(日本岛津,型号:GC-2030);质谱仪(日本岛津,型号:QP2020 NX)。

1.1.3 实验用药 盐酸洛哌丁胺胶囊(西安杨森制药有限公司,货号:H10910085);杆菌肽(北京索莱宝科技有限公司,货号:B8181);硫酸链霉素(北京索莱宝科技有限公司,货号:S8290);硫酸新霉素(北京索莱宝科技有限公司,货号:N8090)。

1.2 实验方法

1.2.1 供体准备 根据前期的实验研究[5],取正常对照组大鼠新鲜粪便作为正常大鼠粪菌液移植组(fecal microbiota transplant-control,FMT-CON)的粪菌提供来源,取气滞证 STC 模型组大鼠新鲜粪便作为气滞证 STC 模型大鼠粪菌液移植组(fecal microbiota transplant-slow transit constipation,FMT-STC)的粪菌来源,取理气通便方最佳疗效组大鼠新鲜粪便作为理气通便方组大鼠粪菌液移植组(fecal microbiota transplant-Liqi Tongbian Decoction,FMT-LTD)的粪菌来源。

1.2.2 粪菌液制备 将收集的各组大鼠粪便,按 1 g 粪便+10 mL 无菌 PBS 溶液进行配制,随后将粪便搅拌混匀,涡旋震荡 3 min,震荡 5 次,每次间隔 15 s,接着使用 200 μm 的过滤网将粪便溶液过滤 3 次去除杂质,最后配成粪菌混悬液浓度为 100 mg/mL。分装至无菌 15 mL 离心管中,置于-80 ℃冰箱储存备用。

1.2.3 动物分组与造模给药 将 24 只 SPF 级 Wistar 雌性大鼠适应性喂养 7 d 后,其中 3 只作为正常对照组(control,CTRL)给予无菌水处理,21 只大鼠用于复制气滞证 STC 模型("洛哌丁胺混悬液+夹尾刺激")造模[5],再进行 7 d 的抗生素鸡尾酒疗法[7](浓度分别为:杆菌肽 200 mg/kg+硫酸链霉素 200 mg/kg+硫酸新霉素 200 mg/kg)进行脱菌,从中随机抽取 3 只处死,用于评估肠道动力情况。气滞证 STC 伪无菌大鼠造模成功后,将动物随机分为 3 组,分别为正常大鼠粪菌液移植组、气滞证 STC 模型大鼠粪菌液移植组、理气通便方组大鼠粪菌液移植组,每组 6 只。以上 3 组分别给予制备的相应大鼠粪混悬液灌胃,灌胃量为 1 mL/100 g,每日 1 次,共 1 周。

1.2.4 样本收集 FMT 结束后前 1 d,收集大鼠粪便,置于无菌冻存管中,放于-80 ℃超低温冰箱保存,用于肠道菌群与 SCFAs 检测。粪便收集完成后禁食不禁饮 24 h 后,采用异氟烷吸入麻醉,收集大鼠腹主动脉血,静置后 3 h 后,以 3000 r/min 的速度低温离心取上清,置于-80 ℃储存。将一部分结肠组织装入冻存管后立即放入液氮中,随后再转到-80 ℃冰箱中保存;一部分结肠组织放置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后进行脱水包埋,以便开展后续实验。

1.2.5 粪便排出量(6 h)及粪便含水率 收集各组大鼠当日给药后 6 h 的粪便,并记录排便数量,同时检测其含水率。先称大鼠湿粪的重量,再通过恒温培养箱 60 ℃烘烤 6 h 后称干粪质量。粪便含水率(%)=(湿粪质量-干粪质量)/湿粪质量×100%。

1.2.6 ELISA 法检测血清中 5-HT 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,依次加入待测样品、抗体、酶标试剂、显色剂,并最终加入终止液,用 450 nm 波长测量各孔的吸光度值,根据标准品浓度和吸光度值做出标准曲线,最后根据标准曲线方程计算出 5-HT 的浓度。

1.2.7 小肠炭末推进率 末次给药后,每组均禁食不禁水 24 h,取材前每只大鼠给予灌胃 10% 活性炭混悬液 3 mL,10 min 后立即采用异氟烷吸入麻醉后,剪开腹壁,分离并剪出从胃到盲肠的全部小肠,在肠道松弛状态下置于桌面上,测量活性炭在肠道内的推进长度及小肠全部长度,计算活性炭推进率,即肠道推进率。活性炭推进率=炭末向前推进长度/小肠全长×100%。

1.2.8 HE 染色观察大鼠结肠病理组织 4% 多聚甲醛固定的组织样本,并进行脱水、透明、包埋。将组织切成 4 μm 厚的薄片,在温水中将组织展平后捞在载玻片上,60 ℃烘烤切片 2 h。切片经二甲苯脱蜡后,流水洗涤 20 min,苏木素染色 30 min,流水洗涤 20 min,盐酸酒精分化,伊红染色 5 min,最后梯度酒精脱水,二甲苯透明后用树脂胶封片。显微镜下观察组织病理学变化,并采用显微成像系统拍照记录。

1.2.9 免疫组化法检测结肠组织中 5-HT3R、5-HT4R 的蛋白表达 各组结肠组织包埋后将组织切成厚度约为 4 μm 的组织切片,并对组织块进行修复、封闭后,滴加 5-HT3R、5-HT4R 蛋白的抗体,4 ℃孵育过夜。二抗孵育后,按 DAB 试剂盒说明书操作,对各切片进行 DAB 显色处理,经封片后在 400 倍镜下每份样本随机选取 5 个视野,获取图像,采用多功能真彩色细胞图像分析管理系统进行图像分析。

1.2.10 Western blot 法检测 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 在蛋白水平的表达 实验结束后,取结肠肌层组织用组织裂解液提取蛋白并收集蛋白,BCA 法测定蛋白质含量;变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳;半干转转至 NC 膜上;用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭;洗膜,加入 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 蛋白的一抗,GAPDH 作为对照,在 4 ℃震荡过夜,用含 0.25% tween-20 的 TBST 洗涤后,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育、洗涤后,加入 ECL 发光液,用凝胶成像系统扫描并进行数据分析。

1.2.11 16SrDNA 测序肠道菌群 按照 DNA 抽提试剂盒说明书抽提各组大鼠粪便肠道菌群总 DNA 并检测其提取质量,随后对 DNA 进行定量。基于 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')-806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16SrRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增,扩增程序:95 ℃预变性 3 min,27 个循环(95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s),72 ℃稳定延伸 10 min,最后在 4 ℃进行保存;反应体系:5×TransStart FastPfu 缓冲液 4 μL,dNTPs(2.5

mmol/L)2 μL,上游引物(5 μmol/L)0.8 μL,下游引物(5 μmol/L)0.8 μL,TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL,模板 DNA 10 ng,补足至 20 μL,每个样本 3 个重复。

1.2.12 气相色谱-质谱联用法检测短链脂肪酸 将粪便溶于含 500 μL 甲醇溶液的 EP 管中,静置 5~10 min,振荡混匀,制成粪便悬液。用硫酸调节悬液 pH 至 2~3,静置 5 min,其间振荡混匀数次。将 EP 管于 5000 r/min 离心 20 min 后,取上清以 5000 r/min 离心 5 min 后,其上清用于气相色谱-质谱(GC-MS)联用分析。具体方法:用氮气为载气,控制气流流速为 1 mL/min。将柱温起始温度设置为 100 ℃,维持 0.5 min。以 8 ℃/min 的速度将温度上升至 180 ℃,维持 1 min。再以 20 ℃/min 的速度将温度上升到 200 ℃,维持 5 rmin。检测器温度则控制为 240 ℃,进样口温度设定为 200 ℃,进样体积为 1 μL。每个标本检测时间均为 17.5 min。

1.3 统计学方法

运用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量资料符合正态分布则以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若不符合正态分布则采用中位数与四分位间距即 M(P_{25},P_{75})表示。对于正态分布的数据,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。不满足正态分布的数据采用非参数秩和检验。$\alpha = 0.05$ 为检验水平,$P < 0.05$ 提示差异具有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行绘图,主成分分析图等均使用 R 软件制作。

2 结果

2.1 气滞证 STC 伪无菌大鼠模型肠道动力情况

如插页Ⅻ图 1 所示,我们发现在气滞证 STC 模型造模后给予抗生素混合物,气滞证 STC 大鼠的肠道动力仍处于减慢状态,并且结肠在禁食 24 h 后仍有粪便残余,提示给予抗生素后并未造成抗生素相关腹泻,气滞证 STC 伪无菌大鼠模型仍处于便秘状态,由此说明造模成功。

2.2 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠排便情况的影响

结果如插页Ⅻ图 2 所示,我们发现在进行肠菌移植后,粪便的颜色由棕色变为黑色,同时发现 FMT-STC 组的粪便呈颗粒状,质地相对 FMT-CON 组、FMT-LTD 组较硬。与 FMT-STC 组比较,FMT-CON 组大鼠 6h 粪便总量有所增加($P < 0.05$),粪便含水率虽有所增加,但是差异无统计学意义($P > 0.05$);FMT-LTD 组的 6 h 粪便总量显著增多,粪便含水率明显降低(均$P < 0.05$)。由此提示,在肠菌移植后,FMT-STC 组大鼠的排便情况并未得到明显改善,而在 FMT-CON 组和 FMT-LTD 组的大鼠粪便含水率、排便数量有所提升。

2.3 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠肠道推进率的影响

如插页Ⅻ图 3 所示,各组在禁食 24 h 后,FMT-CON 组与 FMT-STC 组的结肠中有粪便残余,FMT-LTD 组的结肠中无粪便。进一步比较肠道推进率,我们发现与 FMT-STC 组相比,FMT-LTD 组的肠道推进率有所提高($P < 0.05$),而 FMT-CON 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明在肠菌移植后,移植理气通便方干预后的大鼠粪菌液可改善气滞证 STC 伪无菌大鼠的肠道动力。

2.4 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠结肠组织病理学的影响

如插页Ⅻ图 4 所示,FMT-STC 组结肠黏膜破损,肠腺体水肿,肠上皮脱落,黏膜下层间质血管扩张,腺体排列不齐,伴有炎性细胞浸润;FMT-CON 组的结肠黏膜较为完整,肠腺排列较为整齐,但仍存在腺体水肿的表现,可见到黏膜下层间质血管扩张。FMT-LTD 组的结肠组织中肠黏膜完整,腺体排列整齐,未见上皮损伤、血管扩张及腺体水肿表现。

2.5 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠血清 5-HT 含量的影响

结果显示如插页Ⅻ图 5 所示,与 FMT-STC 组比较,FMT-CON 组血清中 5-HT 含量有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),FMT-LTD 组 5-HT 含量有所升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明肠菌移植至气滞证 STC 伪无菌大鼠体内后,通过肠道菌群的重塑定植,理气通便方干预后的大鼠粪菌液可使得 5-HT 含量增加。

2.6 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠结肠组织中 5-HT3R、5-HT4R 表达的影响

免疫组化实验结果如插页Ⅻ图 6 所示,与 FMT-STC 组对比,FMT-CON 组 5-HT3R、5-HT4R 表达量虽有所提高,但差异无统计学意义(均$P > 0.05$);FMT-LTD 组 5-HT3R、5-HT4R 表达量明显上升(均$P < 0.05$)。该结果说明了肠菌移植后,移植理气通便方干预后的大鼠粪菌液后,能够促进肠道组织中的 5-HT3R、5-HT4R 的表达。

2.7 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 蛋白水平的影响

我们进一步探讨了 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠的5-HT 合成过程以及转运代谢过程中 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 蛋白表达水平的影响。Western blot 检测结果如插页Ⅻ图 7 所示,与 FMT-STC 组比较,FMT-LTD 组大鼠结肠 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 蛋白表达水平均明显升高(均$P < 0.05$),FMT-CON 组结肠 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 蛋白表达虽有所上升,但差异无统计学意义(均$P > 0.05$)。由此可见,移植理气通便方干预后的大鼠的粪菌液后可提高 TPH1、TPH2 蛋白的表达,促进 5-HT 的合成、转运与代谢。

2.8 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠肠道菌群的影响

2.8.1 ASV 分布情况 从韦恩图插页Ⅻ图 8 中我们可以看出,FMT-CON 组独有物种 1517 个,FMT-STC 组独有物种 1236 个,FMT-LTD 组独有物种 1364 个,3 组共有物种 576 个。

2.8.2 肠道菌群多样性和丰度检测 (1)Alpha 多样性:如插页Ⅻ图 9A 所示,各组样本的稀释曲线从 0 开始迅速上升,达到平台期后,随着测序数据量的增加,稀释性曲线趋向平坦,已经可以说明各组样本中绝大多数的微生物信息。通过 ASV 的种类和丰度计算获得 goods_coverage 和 shannon 指数,其中 goods_coverage 指数主要是估计群落中包含物种的数目,shannon 指数主要说明肠道菌群的多样性。结果如插页Ⅻ图 9B 所示,FMT-STC 组的 goods_coverage 指数呈现出下降趋势,FMT-STC 组与 FMT-CON 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),与 FMT-LTD 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),而

FMT－CON 组与 FMT－LTD 组相比差异具有显著统计学意义（$P<0.01$）。FMT－STC 组的 shannon 指数低于 FMT－CON 组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），但是与 FMT－LTD 组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。

（2）Beta 多样性分析：结果如插页Ⅻ图 10 所示，我们发现 FMT－CON 组、FMT－STC 组与 FMT－LTD 组三组之间的物种存在明显的差异。此外，FMT－CON 组、FMT－LTD 组与 FMT－STC 组的距离大小为 FMT－LTD＞FMT－CON＞FMT－STC，且与 FMT－STC 组的群落结构差异存在显著的统计学意义（均$P<0.01$）。

（3）对肠道菌群组成的影响：在属分类水平上，由插页Ⅻ图 11 可知，FMT－CON 组排名前五的菌属分别是：Muribaculaceae、Clostridia_UCG－014、UCG－005、Firmicutes、Prevotella_9，FMT－STC 组以 Muribaculaceae、Allobaculum、Clostridia_UCG－014、Ruminococcus、Firmicutes 为主，而 FMT－LTD 组排名前五的菌属是 Muribaculaceae、Allobaculum、Firmicutes、Clostridia_UCG－014、Lachnospiraceae_NK4A136（毛螺菌属）。

基于前期实验的结果[5]，提示 Lachnospiraceae_NK4A136（毛螺菌属）是理气通便方治疗气滞证 STC 的关键菌属，我们进一步通过肠菌移植技术来验证该菌是否为关键菌属，结果如插页Ⅻ图 12 所示，与 FMT－STC 组比较，FMT－CON 组的毛螺菌属丰度虽有所增加，但是无统计学意义（$P>0.05$），而 FMT－LTD 组的丰度明显增加，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。由此可以说明毛螺菌属是理气通便方的关键菌，同时在伪无菌的环境下，可促进该菌的定植与生长。

2.9 FMT 对气滞证 STC 伪无菌大鼠短链脂肪酸（SCFAs）的影响

短链脂肪酸的测定结果由表 1 所示，与 FMT－STC 组相比，我们发现 FMT－LTD 组的丁酸显著上升（$P<0.05$），其余 SCFAs 未见显著变化（均$P>0.05$）。由此可见，移植理气通便方干预后的大鼠粪菌液中对产丁酸具有一定促进作用，并且阐明丁酸是理气通便方治疗气滞 STC 机制之一。

表 1 各组大鼠短链脂肪酸含量比较 单位：μg/g

短链脂肪酸	FMT－STC	FMT－CON	FMT－LTD
Acetic acid（乙酸）	701.99（457.98，718.96）	647.17±88.90	444.91（417.19，769.69）
Propionic acid（丙酸）	411.54±101.54	382.28±56.10	491.96±157.37
Isobutyric acid（异丁酸）	24.08±5.21	26.78±8.58	34.37±10.99
Butyric acid（丁酸）	231.16±90.96	266.29±62.16	406.41（313.85，749.01）*
Valeric acid（戊酸）	34.63±17.70	41.35±12.45	28.78±15.77
Hexanoic acid（己酸）	0.67±0.21	0.74（0.67，1.52）	0.79±0.21
Heptanoicacid（庚酸）	0.22±0.06	0.25±0.04	0.17±0.04
Decanoic acid（癸酸）	0.32±0.10	0.29±0.08	0.32±0.13
总 SCFAs	1 491.73（1 012.46，1 526.17）	1 365.42±154.13	1 328.41（1 211.52，2 190.67）

注：*与 FMT－STC 组相比，$P<0.05$。

3 讨论

肠菌移植是近年来一种新兴治疗疾病的技术和手段，能够重新构建患者的肠道功能菌群，即将健康人的肠道菌群作为粪便供体，随后移植到患者的肠道内，从而使得优势菌大量繁殖，减少致病菌所占数量，以期达到治疗疾病的目的[8－9]。西方医学借助肠菌移植治疗疾病的历史可追溯至 1958 年[10]，然而我国早在西周或春秋战国的《五十二病方》中就有记载人粪入药。东汉医圣张仲景在《金匮要略》书中提到："食诸菌中毒……治之方：人粪汁饮一升，土浆饮一二升，……并解"，该条文指出粪汁具有解毒作用，可用于治疗菌类导致的食物中毒[11]。东晋时期葛洪所著的《肘后备急方》中提到[12]："绞粪汁，饮数合至一二升……陈久者佳"，首先提出对粪便进行发酵处理后的效果更佳。

肠道微生态在慢性便秘的病理过程中扮演着关键的角色，通过微生态移植技术可以重建肠道菌群，从而缓解患者的便秘症状，以达到治疗的效果，但其中的作用机制尚不清楚[13]。有研究发现，肠道菌群可以通过对碳水化合物和膳食纤维的发酵，产生短链脂肪酸（主要是乙酸、丙酸、丁酸）[14]。动物实验发现[15]，丁酸不仅能显著增加胆碱能介导的结肠环行肌收缩反应，还可以刺激结肠对水和电解质的吸收。另一方面能够诱导 5－HT 的合成，从而激活腺苷酸环化酶，使得细胞内 ATP 形成环磷酸腺苷，从而刺激结肠平滑肌，调节结肠的分节活动[16－17]。因此，FMT 治疗便秘的作用机制可能通过重塑肠道菌群，调节肠道内产 SCFAs 菌群的种类和丰度，促进 5－HT 的合成，从而调控肠道动力，缓解便秘症状。前期动物实验也已证实理气通便方可以增加气滞证 STC 大鼠 5－HT 及其受体 5－HT3R、5－HT4R 的表达，调整肠道菌群结构，增加气滞证 STC 大鼠菌群的丰富度与多样性，显著增加毛螺菌属的丰度，上调气滞证 STC 大鼠粪便中 SCFAs 水平，其中丁酸最为显著[5]。

本研究中，通过"气滞证 STC 大鼠＋抗生素鸡尾酒疗法脱菌处理"构建气滞证 STC 伪无菌大鼠，结合肠菌移植技术，将前期制备的正常对照组大鼠、气滞证 STC 组大鼠、理气通便方最佳剂量组大鼠的粪菌混悬液进行移植体内后，结果发现理气通便方最佳剂量组的粪菌液可明显改善气滞证 STC 大鼠便秘症状，提高肠道传输功能，提高肠道菌群的多样性，并提高关键菌属毛螺菌的丰度水平。另外，FMT 不仅可以改变肠道菌群的结构，还可以调节肠道的神经内分泌功能。某些肠道菌群发酵产生的代谢物对 5－HT 的合成有促进作用，5－HT 可直接作用于肠道上皮的 5－HT 受体，引起结肠平滑肌的收缩[18－19]。本研究的结果提示，理气通便方治疗后大鼠的粪菌液可提高 5－HT 的含量，以及 5－HT3R、5－HT4R 的表达。研究发现[20]，肠道微生物群是肠道 5－HT 产生的关键调节剂。5－HT 的分泌增加促进了位于迷走神经感觉纤维上的 5－HT3R、5－HT4R，从而刺激胃肠肌间神经丛释放乙酰胆碱并促进结肠平滑肌收缩。本研究的结果也证实，理气通便方治疗后大鼠的粪菌液可提高血清中 5－HT 的含量和结肠组织中 5－HT3R、5－HT4R 的表达。TPH1 与 TPH2 是在 5－HT 的合成过程中相关限速酶，其可作为反映 5－HT 合成的间接指标。SERT 是一种跨膜转运蛋白，对 5－HT 具有高度的亲和力，可重新摄取 5－HT[21]。MAO－A 是 5－HT 的代谢过程中关键酶，调节 5－HT 分解代谢[22]。因此，TPH1、TPH2、SERT 和 MAO－A 是影响 5－HT 水平的重要指标。本研究结果发现，

理气通便方治疗后大鼠的粪菌液可促进 TPH1、TPH2 的表达，提示能够促进 5 - HT 的合成，同时 SERT 和 MAO - A 的表达也上调，提示可避免由于过多 5 - HT 在肠道累积而引起的受体脱敏。另外，移植理气通便方治疗后的大鼠粪菌液可调节 SCFAs 代谢水平，尤其是丁酸的水平。丁酸主要通过乙酰辅酶 A 途径发酵宿主无法消化的碳水化合物而产生，为机体提供能量，并成为肠道上皮细胞的主要能源[23 - 24]。肠道中的丁酸一方面可促进肠胃肌肉的收缩能力，增强肠胃的蠕动；另一方面还可促进神经递质的传递，以此来促进肠胃蠕动，缓解便秘症状[25 - 26]。

综上所述，本研究结果表明移植理气通便方治疗后的粪菌液，能够改善气滞证 STC 伪无菌大鼠的肠道动力，提高结肠传输功能，上调毛螺菌属的丰度，促进 SCFAs 的产生，尤其是丁酸的产生，从而促进 5 - HT 的合成及其受体 5 - HT3R、5 - HT4R 的表达，并上调结肠组织中 TPH1、TPH2 、SERT 、MAO - A 蛋白表达水平。因此，理气通便方治疗气滞证 STC 的药效作用可通过粪便微生物移植而转移，验证了本方是通过调控“肠道菌群/SCFAs/5 - HT”轴起到治疗气滞证 STC 的作用，并提示毛螺菌属及其代谢产物丁酸对 5 - HT 的调控是理气通便方改善肠道动力的作用机制之一。因此，在后期研究中，本课题组将从粪菌移植后对气滞证 STC 大鼠肠道菌群结构菌属的具体调节作用的角度作更进一步的补充，以期更深入探索其药效作用机制。

参考文献

[1] 柯晓，王文荣. 功能性便秘的中西医结合诊疗[M]. 北京：科学出版社，2022：8 - 9.

[2] WANG L F，WU F，HONG Y L，et al. Research progress in the treatment of slow transit constipation by traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol，2022，290：115075.

[3] 刘启鸿，柯晓，骆云丰，等. 基于“脑 - 肠 - 菌”轴观察理气通便方对气滞证慢传输型便秘患者的影响[J]. 中华中医药杂志，2021，36(6)：3324 - 3328.

[4] 刘启鸿，柯晓，骆云丰，等. 理气通便方治疗慢传输型便秘气滞证 30 例随机对照试验[J]. 中医杂志，2021，62(7)：604 - 608.

[5] 刘启鸿，骆云丰，柯晓，等. 理气通便方对气滞证慢传输型便秘大鼠肠道动力及肠道菌群的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志，2023，31(11)：847 - 854.

[6] ZHANG X Y，TIAN H L，GU L L，et al. Long - term follow - up of the effects of fecal microbiota transplantation in combination with soluble dietary fiber as a therapeutic regimen in slow transit constipation [J]. Sci China Life Sci，2018，61(7)：779 - 786.

[7] ZHU G X，JIANG Y，YAO Y，et al. Ovotransferrin ameliorates the dysbiosis of immunomodulatory function and intestinal microbiota induced by cyclophosphamide [J]. Food Funct，2019，10 (2)：1109 - 1122.

[8] 徐浩杰，王璐，陈蓓迪，等. 肠菌移植：中西医诊疗思维的碰撞[J]. 中国医学科学院学报，2022，44(3)：472 - 477.

[9] EISEMAN B，SILEN W，BASCOM G S，et al. Fecal *Enema* as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis[J]. Surgery，1958，44(5)：854 - 859.

[10] 顾家博，刘建磊，王俊，等. 肠菌移植治疗炎症性肠病 14 例临床观察[J]. 重庆医科大学学报，2023，48 (9)：1143 - 1148.

[11] 郑依玲，David G. Y. Wang，马俊，等. 黄龙汤的药用历史考证及性味归经与功能主治探讨[J]. 时珍国医国药，2024，35 (2)：421 - 424.

[12] 张凯轩，卿香丽，王琳，等. 运用动物粪便类药物治疗脾胃病机制探讨 [J]. 北京中医药，2024，43 (3)：325 - 328.

[13] JANG S H，WOO Y S，LEE S Y，et al. The brain - gut - microbiome axis in psychiatry[J]. Int J Mol Sci，2020，21(19)：E7122.

[14] 陆松翠，郑楠，王加启，等. 短链脂肪酸的生物学功能研究进展[J]. 动物营养学报，2024，36(6)：3514 - 3524.

[15] ISRAELYAN N，DEL COLLE A，LI Z S，et al. Effects of serotonin and slow - release 5 - hydroxytryptophan on gastrointestinal motility in a mouse model of depression[J]. Gastroenterology，2019，157 (2)：507 - 521.

[16] 秦华珍，黄少敏，黄焕迪，等. 3 味山姜属中药黄酮类成分对胃溃疡寒证大鼠肠道短链脂肪酸含量的影响[J]. 中华中医药学刊，2022，40(6)：5 - 10.

[17] 李慧，杨光勇，刘茜明，等. 黄连解毒汤对小鼠血清中 Trp、Kyn、5 - HT 及粪便中短链脂肪酸代谢的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医，2019(9)：126 - 129.

[18] 姚玉乔，徐龙剑，杨俊，等. 基于肠道菌群结构特征及 5 - HT 探究枳术汤改善功能性便秘大鼠肠道传输功能的作用机制[J]. 中国老年学杂志，2024，44(5)：1206 - 1209.

[19] 段婉娥，张齐娟，李婉莹，等. 健脾疏肝针刺法治疗便秘型肠易激综合征(气郁质型)的临床研究及其对 5 - HT、VIP、NPY 水平的影响[J]. 湖北中医杂志，2024，46(1)：36 - 39.

[20] 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.

[21] MONCRIEFF J，COOPER R E，STOCKMANN T，et al. The serotonin theory of depression：a systematic umbrella review of the evidence[J]. Mol Psychiatry，2023，28(8)：3243 - 3256.

[22] SUN X，LI N，ZHONG P，et al. Development of MAO - A and 5 - HT_{2A}R dual inhibitors with improved antidepressant activity[J]. J Med Chem，2022，65(19)：13385 - 13400.

[23] TAN J K，MACIA L，MACKAY C R. Dietary fiber and SCFAs in the regulation of mucosal immunity[J]. J Allergy Clin Immunol，2023，151(2)：361 - 370.

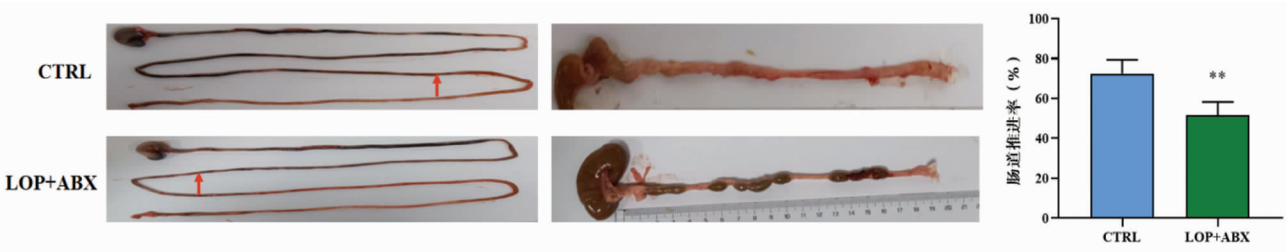
[24] 刘心仪，陈孟涵，李培实，等. 植物乳杆菌体外发酵藜麦水不溶性膳食纤维对肠道菌群及产短链脂肪酸的影响[J]. 食品科学，2024，45(13)：138 - 145.

[25] BAJKA B H，CLARKE J M，TOPPING D L，et al. Butyrylated starch increases large bowel butyrate levels and lowers colonic smooth muscle contractility in rats[J]. Nutr Res，2010，30(6)：427 - 434.

[26] 金霞霞，周锋，雷正权，等. 针刺调控 5 - 羟色胺 - 谷氨酸/γ - 氨基丁酸长神经环路防治广泛性焦虑障碍的作用机制探讨[J]. 安徽医药，2024，28 (3)：441 - 446.

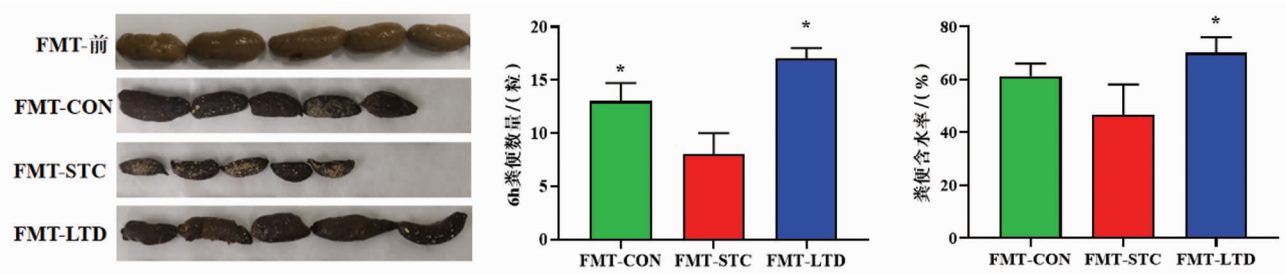
基于肠菌移植技术研究理气通便方对气滞证 STC 大鼠“肠道菌群/SCFAs/5 - HT”轴的调控作用

（正文见 108 - 113 页）



注：* * 与 CTRL 组相比，$P<0.01$；LOP + ABX：洛哌丁胺混悬液 + 抗生素混合物。

图 1　两组大鼠肠道推进率的比较



注：* 与 FMT - STC 组相比，$P<0.05$。

图 2　各组大鼠粪便含水率及 6h 排便数量的比较



注：* 与 FMT - STC 组相比，$P<0.05$。

图 3　各组大鼠肠道推进率的比较

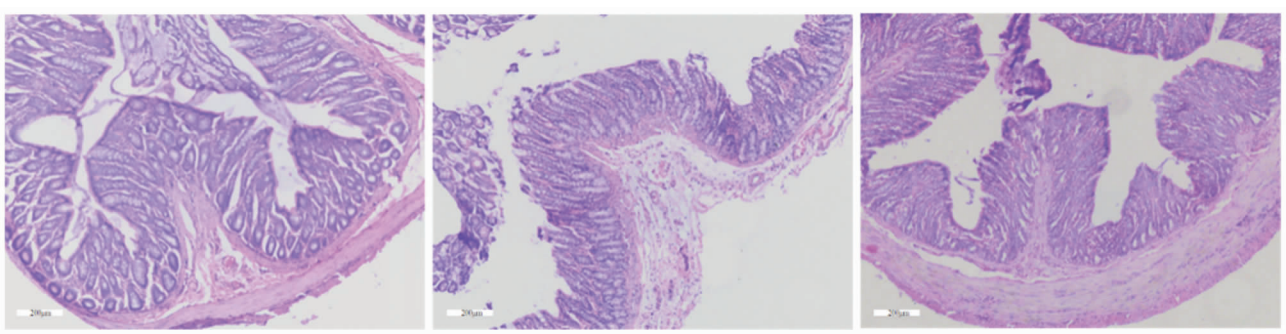
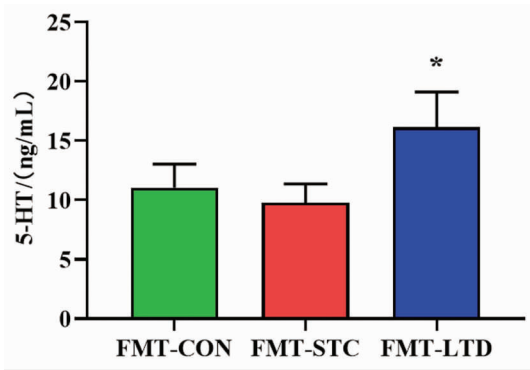
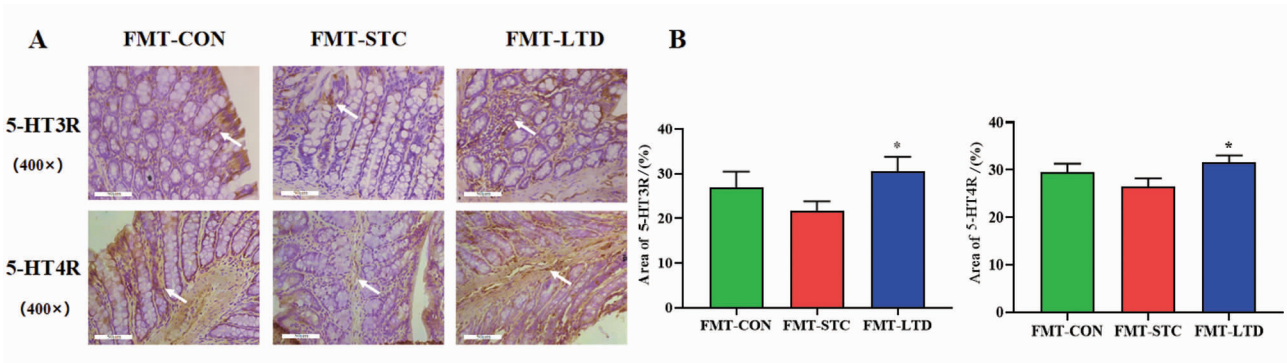


图 4　各组大鼠结肠组织病理学 HE 染色比较（×100 倍）



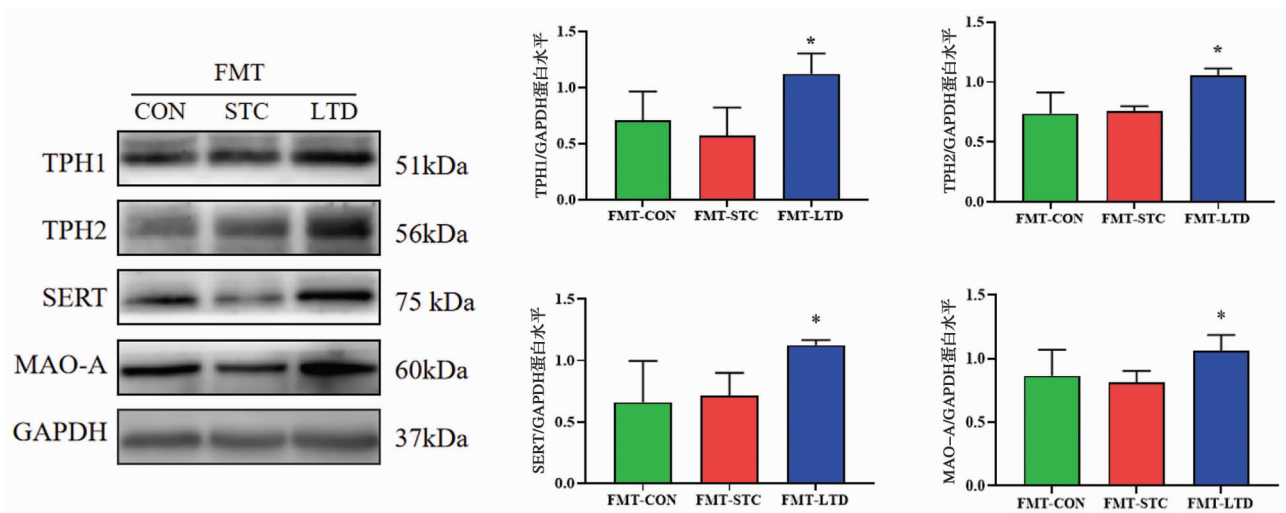
注：* 与 FMT－STC 组相比，$P<0.05$。

图 5　各组大鼠血清 5－HT 浓度的比较



注：(A)通过显微镜在 400 倍视野下进行拍照；(B)对染色阳性率进行分析和统计。* 与 FMT－STC 组相比，$P<0.05$。

图 6　各组大鼠结肠组织中 5－HT3R、5－HT4R 表达比较



注：* 与 FMT－STC 组相比，$P<0.05$。

图 7　各组大鼠结肠组织中 TPH1、TPH2、SERT、MAO－A 表达比较

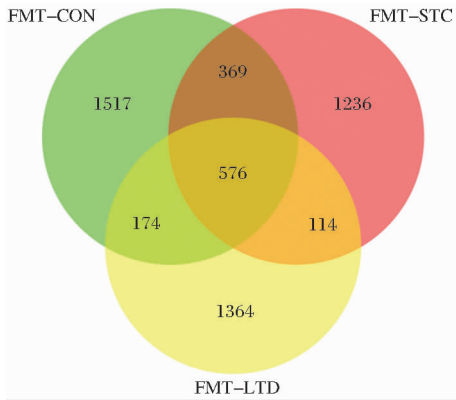
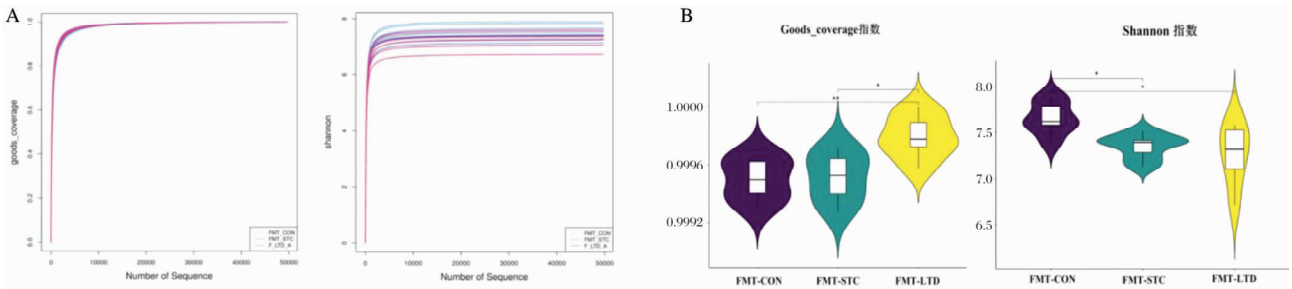
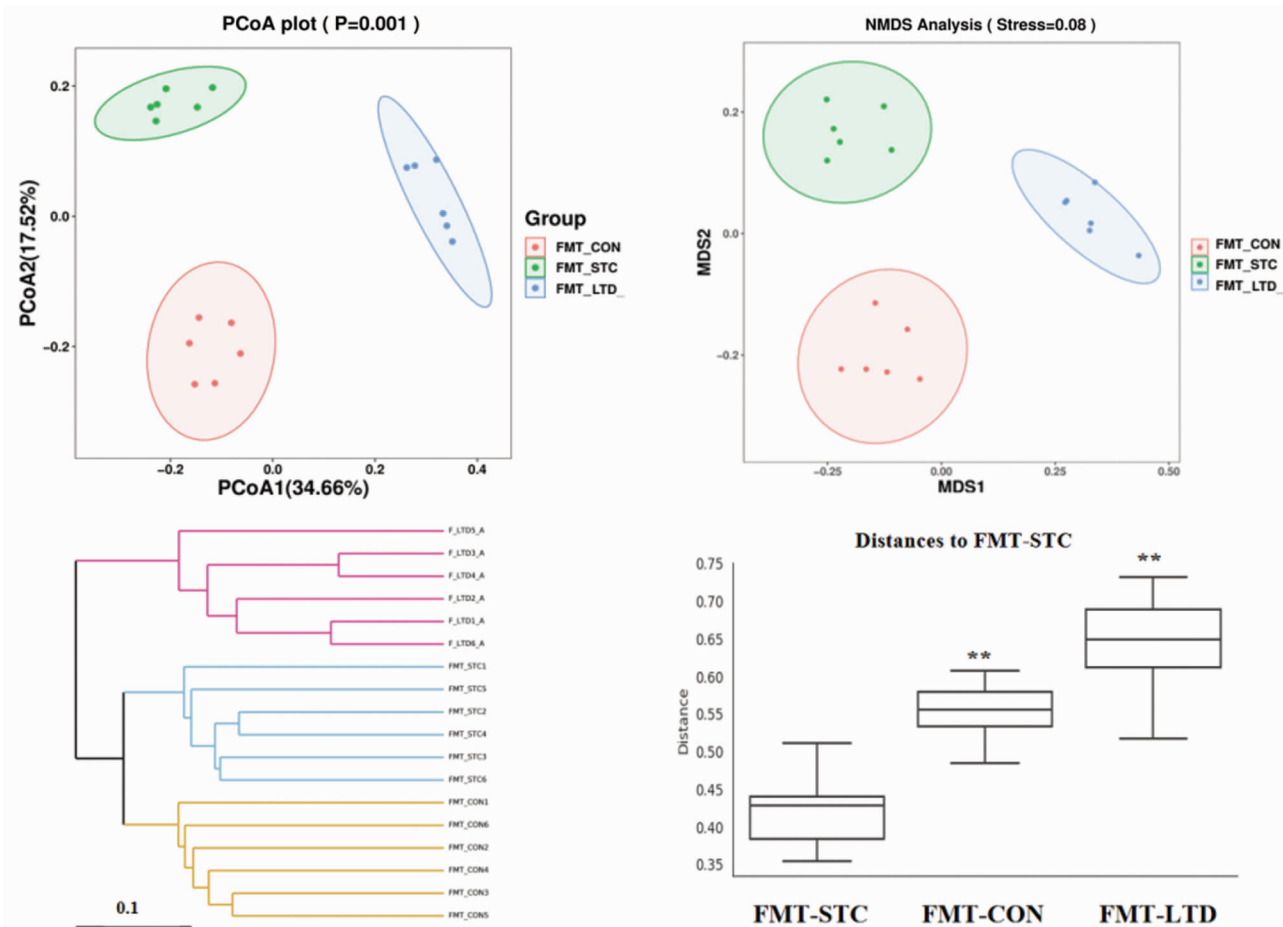


图 8 各组大鼠肠道菌群 ASV 分布 Venn 图



注：$*P<0.05$，$**P<0.01$。

图 9 各组大鼠肠道菌群多样性及丰度检测结果



注：$**$ 与 FMT－STC 组相比，$P<0.01$。

图 10 各组大鼠肠道菌群 Beta 多样性分析

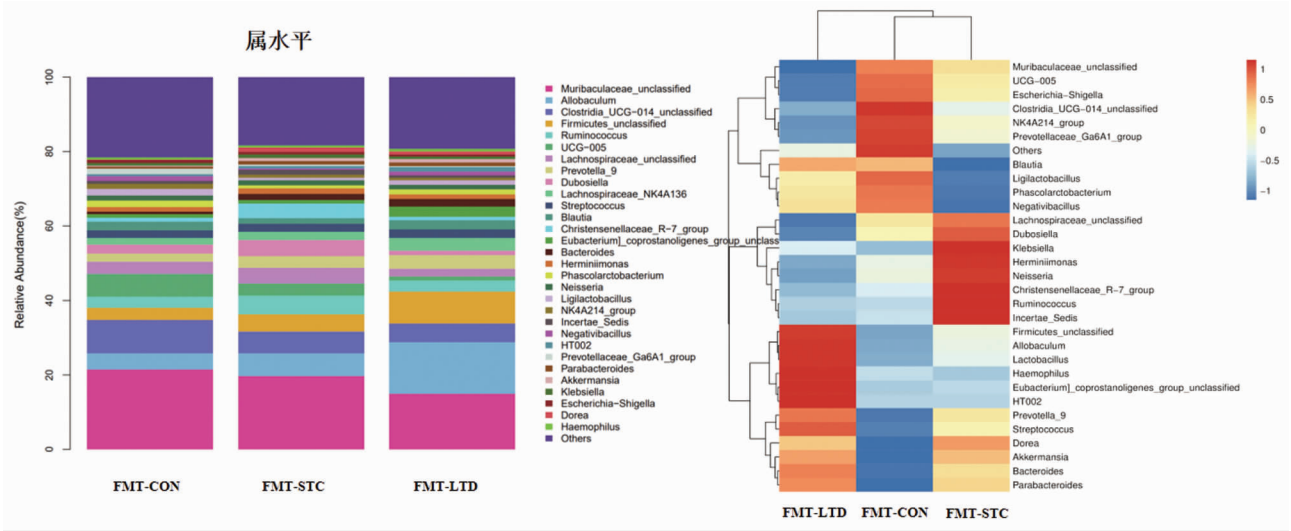
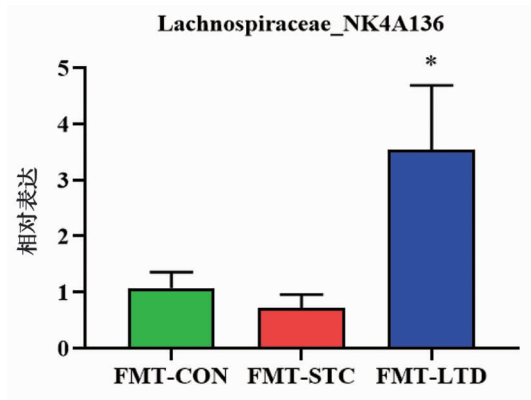


图 11　各组大鼠肠道菌群在属水平群落组成分析



注：* 与 FMT－STC 组相比，$P<0.05$。

图 12　各组大鼠中 Lachnospiraceae_NK4A136 的丰度比较

补阳还五汤合黄连解毒汤加减治疗糖尿病脑病的磁共振波谱与代谢指标评估研究

（正文见 118－123 页）

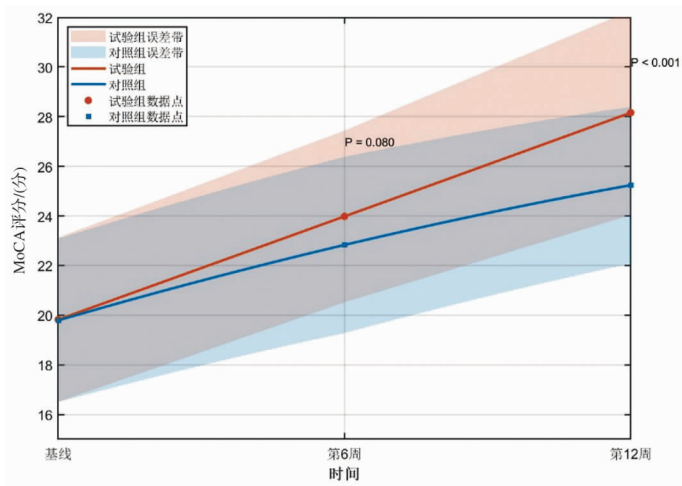


图 2　MoCA 评分动态监测趋势图