

植物乳杆菌YS-1对活性炭诱导小鼠便秘的预防作用

易若琨, 骞宇, 王强, 母健菲, 赵欣*

(重庆第二师范学院生物与化学工程系, 重庆市功能性食品协同创新中心, 重庆市功能性食品工程技术研究中心, 功能性食品研发重庆市工程实验室, 重庆 400067)

摘要: 检测植物乳杆菌YS-1 (*Lactobacillus plantarum* YS-1, LP-YS1) 对活性炭诱导便秘昆明小鼠的影响。结果表明LP-YS1的抗胃酸和胆盐能力强于保加利亚乳杆菌。LP-YS1能抑制便秘造成的小鼠体质量、粪便质量、颗粒数和含水量的下降。同时LP-YS1可以提高活性炭在小肠中的推进率和缩短排出首粒黑便的时间。LP-YS1还能使便秘小鼠的胃动素(motilin, MTL)、内皮素(endothelin, ET)、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)、P物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)水平提高和生长抑素(somatostatin, SS)水平下降。逆转录聚合酶链式反应实验进一步显示LP-YS1可以上调便秘小鼠小肠组织*c-Kit*(干细胞因子受体)、干细胞因子(stem cell factor, *SCF*)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cellline-derived neurotrophic factor, *GDNF*)基因的mRNA表达和下调瞬时感受器电位香草酸受体1(transient receptor potential vanilloid 1, *TRPV1*)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, *NOS*)基因的表达。高浓度的LP-YS1显示出更好的作用, 且显著优于保加利亚乳杆菌。这些实验结果证明LP-YS1可有效缓解便秘。

关键词: 植物乳杆菌; 活性炭; 便秘; 胃动素; 内皮素; 乙酰胆碱酯酶

Preventive Effect of *Lactobacillus plantarum* YS-1 on Activated Carbon-Induced Constipation in Mice

YI Ruokun, QIAN Yu, WANG Qiang, MU Jianfei, ZHAO Xin*

(Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing Engineering Research Center of Functional Food, Chongqing Engineering Laboratory for Research and Development of Functional Food, Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

Abstract: The aim of this study was to determine the effect of *Lactobacillus plantarum* YS-1 (LP-YS1) on activated carbon-induced constipation in Kunming mice. The experimental results showed that anti-gastric acid and bile salt activities of LP-YS1 were stronger than that of *Lactobacillus bulgaricus*. LP-YS1 could inhibit the decrease in body weight, fecal weight, fecal pellet number and fecal moisture content caused by constipation in mice. Meanwhile, LP-YS1 could raise gastrointestinal (GI) transit rate and reduce the time to the first black stool defecation. LP-YS1 also could increase serum motilin (MTL), endothelin (ET), acetylcholinesterase (AChE), substance P (SP), and vasoactive intestinal peptide (VIP) levels and decrease somatostatin (SS) level in constipated mice. reverse transcription polymerase chain reaction experiments revealed that LP-YS1 could raise *c-Kit*, stem cell factor (*SCF*) and glial cellline-derived neurotrophic factor (*GDNF*) mRNA expression and reduce transient receptor potential vanilloid 1 (*TRPV1*) and nitric oxide synthase (*NOS*) mRNA expression in the small intestine of constipated mice. High concentration of LP-YS1 had a better effect. Based on these results, LP-YS1 could effectively inhibit constipation.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; activated carbon; constipation; motilin; endothelin; acetylcholinesterase

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201717039

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)17-0238-06

引文格式:

易若琨, 骞宇, 王强, 等. 植物乳杆菌YS-1对活性炭诱导小鼠便秘的预防作用[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 238-243.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201717039. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: 重庆高校创新团队建设计划资助项目(CXTDX201601040);

重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2016jcyjA0339); 重庆第二师范学院科研项目(KY2015TBZC)

作者简介: 易若琨(1989—), 女, 助教, 硕士, 研究方向为食品化学与营养。E-mail: yiruokun1214@hotmail.com

*通信作者: 赵欣(1981—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与营养。E-mail: zhaoxin@cque.edu.cn

YI Ruokun, QIAN Yu, WANG Qiang, et al. Preventive effect of *Lactobacillus plantarum* YS-1 on activated carbon-induced constipation in mice[J]. Food Science, 2017, 38(17): 238-243. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201717039. <http://www.spkx.net.cn>

牦牛酸乳是青藏高原藏族地区的一种自然发酵乳制品, 牦牛酸乳含有丰富的营养成分, 具有抗氧化、降低胆固醇、调节免疫力的作用^[1]。牦牛酸乳由于特殊的自然发酵过程, 其发酵原料乳、发酵温度、发酵时间、发酵器皿, 特别是特殊的发酵微生物均与普通发酵酸乳有较大差异, 造成牦牛酸乳具有特殊风味及品质^[2]。本课题组对青海玉树藏族自治州的牦牛酸乳进行了研究, 对其微生物进行了分离鉴定, 将其中一株命名为植物乳杆菌YS-1 (*Lactobacillus plantarum* YS-1, LP-YS1), 并对其进一步的研究。

每周排便次数低于3次则被视为处于便秘状态, 当次数低于1次则视为严重便秘状态, 是一种威胁人体健康, 特别是对结肠健康具有较大影响的复杂症状^[3]。便秘通常不被视为疾病, 大多数情况可以通过日常饮食和习惯的调节解除便秘^[4]。通过建立动物便秘模型可以检测食品对便秘的生理作用, 通过给小鼠灌胃活性炭使胃肠道黏膜表面被活性炭附着, 导致消化道中含水量下降, 消化液减少, 引发胃肠运动减慢形成便秘^[5]。大剂量活性炭在消化道造成排便受阻, 本课题组对乳酸菌对便秘预防效果的前期研究中证实, 首粒黑便排便时间、血清胃动素 (motilin, MTL)、胃泌素 (gastrin, Gas)、内皮素 (endothelin, ET)、生长抑素 (somatostatin, SS)、乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE)、P物质 (substance P, SP)、血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 的水平都可作为评价乳酸菌便秘预防作用的指标^[6]。通过进一步的分子生物学实验检测结肠组织中相关mRNA表达能更确切地证实乳酸菌的生理功效。

本研究以LP-YS1为对象, 使用常用的保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*, LB) 为对照菌株, 首先通过体外实验比较LP-YS1和LB人工胃液和胆盐耐受性, 初步了解LP-YS1对胃肠的生理活性作用, 再进一步通过动物实验研究LP-YS1对便秘的活性作用, 以期为进一步开发LP-YS1提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

7周龄雌性昆明小鼠购自于重庆医科大学实验动物中心 (许可证号: SYXK (渝) 2012-0001)。小鼠饲养于控温控湿环境中 (温度 (25±2) °C、相对湿度 (50±5) %), 保持每12 h调节光/暗周期, 提供小鼠标准饲料和饮水。

LP-YS1由本课题组从青海玉树自然发酵牦牛酸乳中分离, 保藏于中国典型培养物保藏中心 (保藏号: CCTCC M 2016747)。

保加利亚乳杆菌 中国工业微生物菌种保藏管理中心; MTL、Gas、ET、SS、AChE、SP、VIP 北京普尔伟业生物科技有限公司; Trizol试剂、OligodT₁₈、RNase、dNTP、MLV (murine leukemia virus) 逆转录酶 美国Invitrogen公司; ROX reference Dye、SYBR Premix Ex Taq II 日本Takara公司; 逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 引物 北京天根生化科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

D550数码相机 日本佳能公司; SevenEasy pH计 瑞士梅特勒-托利多公司; iMark酶标仪、T100梯度PCR仪 美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 LP-YS1耐受pH 3.0人工胃液检测

将NaCl和胃蛋白酶溶于蒸馏水中并用1 mol/L HCl溶液调pH值至3.0, 达到NaCl质量分数为0.2%, 胃蛋白酶为0.35%, 然后真空过滤去除细菌备用。将LP-YS1活化后进行培养, 取培养液 5 mL, 3 000 r/min离心10 min并收集菌体, 加入生理盐水重悬成5 mL的菌悬液, 将此液与人工胃液按体积比1:9混合摇匀后37 °C培养3 h, 测定0、3 h时的LP-YS1活菌数 (n), 按公式 (1) ^[7] 计算乳酸菌耐受人工胃液的能力。

$$\text{耐受能力}/\% = \frac{n_3 \text{ h} / (\text{CFU/mL})}{n_0 \text{ h} / (\text{CFU/mL})} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 乳酸菌耐受胆盐的检测

将LP-YS1 (2%的接种量) 接种于含有0.0%、0.3%、0.5%、1.0%牛胆盐的MRS-THIO培养基 (实验组), 37 °C培养24 h, 以未接种LP-YS1的空白培养基为对照组, 在600 nm波长处测定OD值, 按公式 (2) ^[7] 计算乳酸菌耐受胆盐的能力。

$$\text{耐受能力}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3 动物实验

采用动物模型建立便秘模型时由于小鼠的耐受力比大鼠弱, 所以本研究采用小鼠建模; 选取体质量25 g左右昆明小鼠100只平均分为5组, 分别是正常组、便秘对照组、LB处理组 (1.0×10^9 CFU/kg)、LP-YS1低

浓度处理组 (1×10^8 CFU/kg) 和LP-YS1高浓度处理组 (1×10^9 CFU/kg)。适应饲养1周后正常组和便秘对照组正常自由摄入饮食和饮水2周; LB处理组、LP-YS1低、高浓度处理组在这2周中除了正常自由摄入饮食和饮水外, 对小鼠每日每只按剂量 1×10^9 CFU/kg (以质量计, 下同) 分别灌胃2 mL的LB和按剂量 1×10^8 、 1×10^9 CFU/kg灌胃2 mL的LP-YS1。2周后除正常组小鼠外, 其他4组小鼠每日灌胃2 mL 10%活性炭溶液 (按质量分数10%将活性炭加入含10%阿拉伯树胶的溶液中制成悬液), 持续3 d, 同时LB处理组和LP-YS1各处理组继续灌胃相应浓度的LB和LP-YS1菌悬液^[5]。实验过程中每日上午9:00对测定所有小鼠的体质量、膳食摄入量、饮水量、粪便质量和粪便湿度。

1.3.4 活性炭小肠推进率和首粒黑便排出时间测定

第17天灌胃活性炭溶液后对包括正常组在内所有小鼠实施断食24 h, 但仍给予小鼠自由摄入饮水。24 h后对所有小鼠每只灌胃0.2 mL的冰活性炭溶液, 30 min后每组一半小鼠 (10只) 实施断颈处死, 取小鼠血浆备用, 同时取小肠观察活性炭在小鼠小肠中的推进距离, 按公式 (3) 计算推进率。每组剩余10只小鼠继续观察其排出首粒黑便的时间。

$$\text{推进率}/\% = \frac{\text{活性炭推进距离}/\text{cm}}{\text{小肠总长度}/\text{cm}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.5 小鼠血清MTL、Gas、ET、SS、AChE、SP和VIP水平测定

将收集的小鼠血浆在4 500 r/min离心15 min, 分离到的血清按试剂盒操作测定小鼠血清MTL、Gas、ET、SS、AChE、SP和VIP水平。

1.3.6 RT-PCR测定小鼠小肠组织mRNA表达

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Sequences of reverse transcription PCR primers used in this study

| 目标基因 | 引物序列 |
|--------------|---|
| <i>c-Kit</i> | 上游引物: 5'-AGA CCG AAC GCA ACT T-3' |
| | 下游引物: 5'-GGT GCC ATC CAC TTC A-3' |
| <i>SCF</i> | 上游引物: 5'-AAA CTG GTG GCG AAT C-3' |
| | 下游引物: 5'-CAC GGG TAG CAA GAA C-3' |
| <i>TRPV1</i> | 上游引物: 5'-AGC GAG TTC AAA GAC CCA GA-3' |
| | 下游引物: 5'-TTC TCC ACC AAG AGG GTC AC-3' |
| <i>GDNF</i> | 上游引物: 5'-TTT TAT TCA AGC CAC CAT C-3' |
| | 下游引物: 5'-AGC CCA AAC CCA AGT CA-3' |
| <i>NOS</i> | 上游引物: 5'-CCA CAT CTG GCA GGA TGA GAA-3' |
| | 下游引物: 5'-AGG CAC AGA ACT GAG GGT ACA-3' |
| <i>GAPDH</i> | 上游引物: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TC-3' |
| | 下游引物: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT CGT GA-3' |

取小鼠的小肠组织粉碎后用RNAzol提取结肠组织的总RNA, 然后将总RNA质量浓度稀释到1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取2 μL 稀释后的总RNA提取液, 在其中依次加入1 μL 的OligodT₁₈、RNase、dNTP、MLV酶和10 μL 的5 \times buffer, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min、99 $^{\circ}\text{C}$ 4 min、4 $^{\circ}\text{C}$ 3 min合成cDNA。然后以RT-PCR法扩增小肠组织*c-Kit* (干

细胞因子受体)、干细胞因子 (stem cell factor, *SCF*)、胶质细胞源性神经营养因子 (glial cellline-derived neurotrophic factor, *GDNF*)、瞬时感受器电位香草酸受体1 (transient receptor potential vanilloid 1, *TRPV1*)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, *NOS*) 基因的mRNA表达 (引物序列见表1), 同时以持家基因*GAPDH*作为内参, 按同样条件进行扩增。最后用含1%溴化乙锭琼脂电泳检查PCR扩增产物^[8], 并使用ImageJ 1.44软件对结果进行了半定量分析。

1.4 数据统计分析

平行实验3次结果取平均值, 然后使用SAS 9.1统计软件采用One-way ANOVA方法分析各组数据, 检测各组间是否具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 LP-YS1耐受人工胃液和胆盐的能力

表2 乳酸菌的人工胃液和胆盐耐受能力

Table 2 Resistance of lactic acid bacteria to artificial gastric juice and bile salt

| 菌种 | pH 3.0人工胃液 耐受能力/% | 胆盐耐受能力/% | | |
|--------|----------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | | 0.3% | 0.5% | 1.0% |
| LP-YS1 | 63.74 \pm 5.12 | 18.33 \pm 1.36 | 13.62 \pm 1.12 | 9.84 \pm 0.65 |
| LB | 25.85 \pm 3.26 | 2.44 \pm 0.29 | 1.38 \pm 0.26 | 1.03 \pm 0.16 |

如表2所示, LP-YS1在pH 3.0人工胃液和胆盐中耐受能力均高于普通保加利亚乳杆菌, 且LP-YS1在pH 3.0人工胃液中耐受能力是LB的约2.5倍, 而对不同含量胆盐的耐受能力是LB的约10倍。乳酸菌要发挥益生菌作用, 需要在胃和肠道的强酸性条件下, 到达目的地 (通常是结肠) 定殖并发挥其生理功效^[9]。因此, 为研究乳酸菌的潜在益生菌作用, 建立体外虚拟模型, 检测乳酸菌的抗胃酸能力和胆酸盐耐受能力是重要的检测手段^[10]。本研究中LP-YS1具有比LB更强的抗人工胃酸和胆酸盐耐受能力, 具有良好的生理活性。

2.2 LP-YS1对便秘小鼠体质量的影响

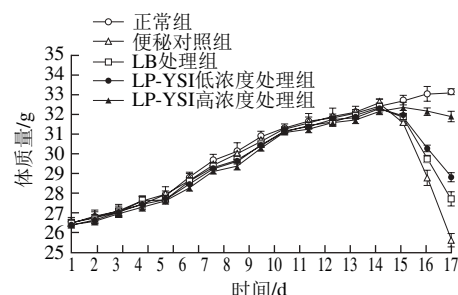


图1 实验过程中小鼠的体质量变化

Fig. 1 Body weight changes of mice during the experiment

由图1可以看出, 前2周中各组小鼠的体质量都呈现出正常的增长状态, 各组之间没有明显差异。活性炭

诱导便秘后, 没有经过活性炭处理的正常组小鼠体质量继续增长, 其余各组小鼠体质量均出现下降, 便秘对照组小鼠的体质量下降最多, 高浓度LP-YS1灌胃小鼠的体质量最接近正常组小鼠。体质量变化是小鼠发生便秘的重要指标, 研究证实活性炭诱导便秘的小鼠体质量低于正常小鼠^[11], 本研究也得到相似的结果; 另外, 有研究证明, 大鼠经盐酸洛派叮胺诱导便秘后体质量也出现下降^[12], 可见动物便秘可导致体质量增加缓慢。通过以上实验结果可显示LP-YS1对便秘造成的小鼠体质量下降具有较好的抑制效果。

2.3 LP-YS1对小鼠排便的影响

表3 实验期间小鼠的排便状态

Table 3 Defecation status of mice during the experiment

| 组别 | 粪便质量/g | | 粪便颗粒数 | | 粪便含水量/% | |
|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | 未诱导便秘 | 诱导便秘 | 未诱导便秘 | 诱导便秘 | 未诱导便秘 | 诱导便秘 |
| 正常组 | 0.88±0.06 ^a | 0.93±0.05 ^a | 37±3 ^a | 39±4 ^a | 48±3 ^a | 39±4 ^a |
| 便秘对照组 | 0.90±0.06 ^a | 0.41±0.05 ^d | 36±5 ^a | 20±3 ^d | 47±3 ^a | 20±3 ^d |
| LB处理组 | 0.89±0.05 ^a | 0.52±0.06 ^{cd} | 37±4 ^a | 25±4 ^c | 48±4 ^a | 25±4 ^c |
| LP-YS1低浓度处理组 | 0.90±0.05 ^a | 0.59±0.04 ^c | 35±4 ^a | 28±4 ^{bc} | 47±3 ^a | 28±4 ^{bc} |
| LP-YS1高浓度处理组 | 0.91±0.05 ^a | 0.72±0.05 ^b | 36±2 ^a | 32±3 ^b | 48±4 ^a | 32±3 ^b |

注: 未诱导便秘为饲养第1~14天; 诱导便秘为灌胃处理第15~17天。同列肩标字母不同表示组间存在显著差异 ($P<0.05$), 表4、6、7同。

如表3所示, 第1~14天各组小鼠的粪便质量、颗粒数和含水量没有显著差异 ($P>0.05$); 活性炭诱导便秘后, 在第15~17天正常组小鼠的粪便质量、颗粒数和含水量最高, 便秘对照组最低, LB和LP-YS1可以显著缓解便秘造成的粪便质量、颗粒数和含水量下降 ($P<0.05$), 高浓度的LP-YS1使便秘小鼠的粪便质量、颗粒数和含水量最接近正常组, 显著高于同浓度LB灌胃的小鼠 ($P<0.05$)。排便状态可以明显地体现便秘程度, 便秘状态中粪便质量、粪便颗粒数和粪便含水量均是重要的粪便状态指标, 这些指数下降表现出便秘程度的加重^[11]。有研究表明, 大鼠和小鼠在诱导便秘后灌胃乳酸菌可缓解便秘导致的粪便颗粒数和含水量减少, 抑制便秘对动物机体造成的影响^[12-13]。本研究中乳酸菌LP-YS1也可通过增加便秘小鼠的排便质量、排便颗粒数、水分含量, 起到缓解便秘的作用。

2.4 LP-YS1对活性炭推进率的影响

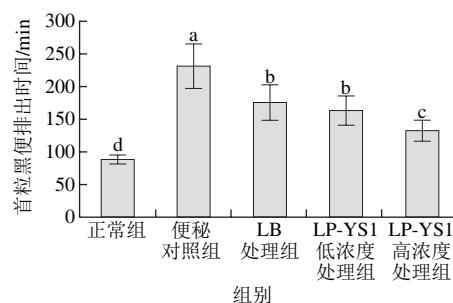
表4 乳酸菌对活性炭诱导便秘模型小鼠胃肠道活性炭推进率的影响

Table 4 Effect of lactic acid bacteria on gastrointestinal (GI) transit in activated carbon-induced constipation model mice

| 组别 | 小肠总长度/cm | 小肠中活性炭推进距离/cm | 活性炭推进率/% |
|--------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 正常组 | 39.6±4.2 ^a | 39.6±4.2 ^a | 100.0±0.0 ^a |
| 便秘对照组 | 39.1±3.3 ^a | 9.2±1.4 ^c | 23.5±2.1 ^c |
| LB处理组 | 40.2±4.6 ^a | 16.6±1.5 ^d | 41.3±2.6 ^d |
| LP-YS1低浓度处理组 | 39.4±3.2 ^a | 19.4±1.6 ^c | 49.2±2.4 ^c |
| LP-YS1高浓度处理组 | 40.4±3.3 ^a | 25.2±2.2 ^b | 62.4±2.5 ^b |

由表4可以看出, 活性炭诱导便秘后, 乳酸菌可以增进活性炭在小肠中的推进距离, 高浓度的LP-YS1推进距离最大, 由此产生的活性炭推进率最高, 显著高于低浓度LP-YS1和LB灌胃小鼠 ($P<0.05$)。便秘造成肠道蠕动频率降低, 粪便停留在肠道的时间延长, 造成有害细菌以粪便为食物连续繁殖, 从而威胁肠道健康, 加重便秘^[14]。活性炭诱导小鼠便秘后小肠中活性炭推进长度和推进率可以作为评价小肠活动和便秘程度的指标^[6]。本研究中LP-YS1使活性炭在小鼠小肠中推进长度和推进率均高于LB, 且高浓度LP-YS1的效果更为明显。

2.5 LP-YS1对首粒黑便排出时间的影响



字母不同表示组间存在显著差异 ($P<0.05$)。

图2 小鼠首粒黑便排出时间

Fig. 2 Time to the first black stool defecation in mice

根据中医理论中的寒积中阻致腑气不通使用冰活性炭溶液诱导小鼠便秘将会导致首粒排便时间延迟, 与临床上寒积里实证的症状相似^[15]。由图2可以看出, 正常组小鼠表现出最短的首粒黑便排出时间 (88 ± 7) min, 便秘对照组的时间最长, 达到 (231 ± 33) min, LB、低浓度LP-YS1和高浓度LP-YS1灌胃小鼠的首粒黑便排出时间分别为 (175 ± 27)、(163 ± 22) min和 (132 ± 16) min。便秘造成肠道运动减慢, 粪便在肠道中滞留时间延长, 使首粒黑便排出时间加长, 越短的首粒黑便排出时间意味肠道运动越正常^[6]。本研究中相对于便秘对照组小鼠LP-YS1可以显著降低首粒黑便排出时间 ($P<0.05$), 具有良好的便秘缓解作用。

2.6 LP-YS1对小鼠血清MTL、Gas、ET、SS、AChE、SP和VIP水平的影响

表5显示, 正常组小鼠血清的MTL、Gas、ET、AChE、SP、VIP含量最高, SS含量最低, 便秘对照组小鼠呈现出相反的趋势, LB和LP-YS1可以使这些血清指数接近正常组水平, 而高浓度LP-YS1灌胃小鼠的血清水平最为接近正常组。MTL可以刺激胃蛋白酶的产生和促进肠道运动^[16], Gas在胃肠中具有显著作用, 能促进胃肠分泌和胃肠运动, 促进幽门松弛, 起到缓解便秘的作用^[6]。ET在血管张力稳定性和维持基本心血管系统中起重要作用^[17], SS已用来刺激肠道运动^[18], 这些作用都有助于缓

解便秘。AChE可以条件肌肉收缩和黏液分泌，可以使肌肉放松从而推进粪便排出^[19]。SP也是一种有助于肠道蠕动的物质^[20]，保持VIP在肠壁中的正常含量也是稳定肠道功能的重要手段^[21]。本研究实验结果也体现出LP-YS1可以使这些血清水平尽量保持正常，缓解便秘。

表5 乳酸菌对小鼠血清MTL、Gas、ET、SS、AChE、SP和VIP水平影响

Table 5 Effect of lactic acid bacteria on serum MTL, Gas, ET, SS, AChE, SP and VIP levels in mice

| 指标 | pg/mL | | | | |
|------|-------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 正常组 | 便秘对照组 | LB处理组 | LP-YS1低浓度处理组 | LP-YS1高浓度处理组 |
| MTL | 185.3±14.5 ^a | 97.5±6.9 ^c | 126.3±5.1 ^d | 133.6±4.9 ^c | 154.3±8.9 ^b |
| Gas | 87.2±2.6 ^a | 37.1±1.9 ^c | 46.3±1.6 ^d | 53.9±2.3 ^c | 68.0±2.3 ^b |
| ET | 16.1±0.3 ^a | 4.8±0.2 ^c | 6.3±0.3 ^d | 8.1±0.3 ^c | 11.6±0.5 ^b |
| SS | 31.6±1.6 ^c | 63.3±3.2 ^a | 48.3±2.2 ^b | 41.2±1.4 ^c | 36.1±1.3 ^d |
| AChE | 36.3±1.7 ^a | 10.8±0.7 ^c | 17.6±0.9 ^d | 22.6±0.9 ^c | 28.3±1.1 ^b |
| SP | 68.2±2.3 ^a | 32.1±1.4 ^c | 42.6±1.9 ^d | 53.1±0.8 ^c | 60.3±0.5 ^b |
| VIP | 62.3±1.5 ^a | 22.6±1.5 ^c | 38.3±1.4 ^d | 45.6±1.2 ^c | 55.1±1.2 ^b |

注：同行肩标字母不同表示组间存在显著差异（ $P<0.05$ ）。

2.7 LP-YS1对小鼠小肠*c-Kit*和*SCF*基因mRNA表达的影响

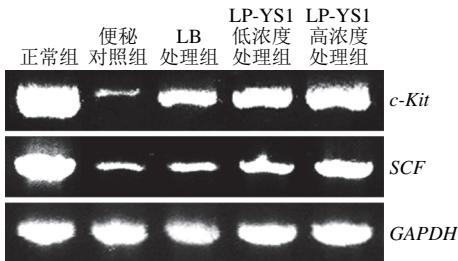


图3 LP-YS1对小鼠小肠组织*c-Kit*和*SCF* mRNA表达的影响

Fig. 3 Effects of LP-YS1 on *c-Kit* and *SCF* mRNA expression in small intestine tissue of mice

表6 LP-YS1对小鼠小肠组织*c-Kit*和*SCF*基因mRNA表达的半定量分析
Table 6 Semi-quantitative analysis of *c-Kit* and *SCF* mRNA expression in small intestine tissue of mice

| 组别 | <i>c-Kit</i> 相对表达量 | <i>SCF</i> 相对表达量 |
|--------------|------------------------|------------------------|
| 正常组 | 7.38±0.52 ^a | 5.78±0.39 ^a |
| 便秘对照组 | 1.00±0.04 ^c | 1.00±0.08 ^c |
| LB处理组 | 4.25±0.18 ^d | 1.44±0.18 ^d |
| LP-YS1低浓度处理组 | 4.62±0.22 ^c | 2.29±0.23 ^c |
| LP-YS1高浓度处理组 | 5.66±0.34 ^b | 3.25±0.28 ^b |

注：表中数值为便秘对照组的倍数，表7同。

RT-PCR结果显示（图3、表6），相对于便秘对照组LP-YS1可以显著上调小鼠小肠中的*c-Kit*和*SCF*基因mRNA表达（ $P<0.05$ ），且高浓度的LP-YS1使*c-Kit*和*SCF*基因表达更为接近正常组小鼠。ICC（Cajal间质细胞）是肠道慢波的起搏细胞，同时ICC在肠神经信号传递中也有重要的作用，确实ICC将会影响肠胃功能^[22]。研究显示便秘患者肠道内ICC密度比正常状态低，将导致ICC

与神经递质的突触后反应降低，使ICC产生自发性节律性活动慢波的作用丧失，使结肠运动不规则，影响肠道功能性^[22-24]。*c-Kit*是ICC的特异性标志物，是ICC增殖的关键^[25]。而SCF浓度对ICC的生殖非常重要，SCF不存在的环境下ICC不能生长。动物实验也显示便秘小鼠结肠组织中的ICC含量较少，结肠组织中的*c-Kit*表达水平也下降^[26]。有研究也表明，乳酸菌可以有效提高便秘小鼠肠道中的*c-Kit*含量，实现ICC的含量增加，促进肠道蠕动，缓解便秘^[27]。本实验中便秘也造成小鼠小肠中*c-Kit*和*SCF*表达下降，LP-YS1可以有效上调*c-Kit*和*SCF*的表达（ $P<0.05$ ），将起到增加便秘小鼠肠道中ICC的作用，从而抑制便秘。

2.8 LP-YS1对小鼠小肠*TRPV1*、*GDNF*和*NOS*基因mRNA表达的影响

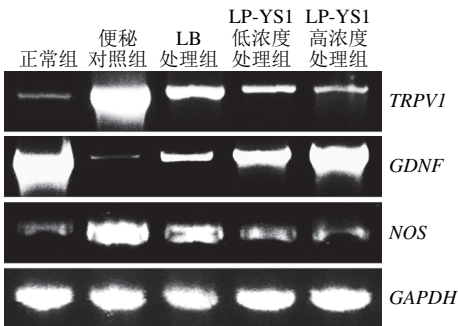


图4 LP-YS1对小鼠小肠组织*TRPV1*、*GDNF*和*NOS*基因mRNA表达的影响

Fig. 4 Effect of LP-YS1 on *TRPV1*, *GDNF* and *NOS* mRNA expression in small intestine tissue of mice

表7 LP-YS1对小鼠小肠组织*TRPV1*、*GDNF*和*NOS*基因表达的半定量分析

Table 7 Semi-quantitative analysis of *TRPV1*, *GDNF* and *NOS* mRNA in small intestine tissue of mice

| 组别 | <i>TRPV1</i> 相对表达量 | <i>GDNF</i> 相对表达量 | <i>NOS</i> 相对表达量 |
|--------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 正常组 | 0.06±0.02 ^c | 49.76±6.71 ^a | 0.17±0.05 ^c |
| 便秘对照组 | 1.00±0.10 ^a | 1.00±0.28 ^c | 1.00±0.12 ^a |
| LB处理组 | 0.43±0.06 ^b | 10.42±2.88 ^d | 0.75±0.11 ^b |
| LP-YS1低浓度处理组 | 0.19±0.02 ^c | 23.85±4.12 ^c | 0.35±0.04 ^c |
| LP-YS1高浓度处理组 | 0.16±0.01 ^d | 37.42±4.79 ^b | 0.24±0.02 ^d |

图4、表7显示正常组小鼠具有最高的*GDNF*表达和最低的*TRPV1*、*NOS*表达，而便秘对照组小鼠的*GDNF*相对表达量最低，*TRPV1*、*NOS*相对表达量最高，相对于便秘对照组LB和LP-YS1均可以上调*GDNF*表达和下调*TRPV1*、*NOS*表达，高浓度的LP-YS1表现出更强的作用。*TRPV1*已经被证实与排便有密切关系，激活*TRPV1*可以触发神经递质的释放，从而导致小肠运动障碍。*TRPV1*表达增加是肠损伤的一个显著现象，由于肠胃紊乱造成肠道损伤，使便秘患者有更高的*TRPV1*表达^[28]。*GDNF*可以调节神经节细胞的功能，从而有助于修复受损

的肠道,可防止便秘。便秘与肠神经系统有一定关系,NO是肠神经系统中一种主要抑制性神经递质,NO可导致平滑肌松弛,使胃肠运动减弱,NOS阳性纤维增多将导致NO含量增加,从而影响肠道功能,导致便秘^[29-30]。NOS对调节胃肠运动起重要作用^[31]。NO的增加能造成更严重的结肠动力障碍,控制NOS可以降低NO的含量,是控制便秘的可行途径^[32]。通过调控TRPV1、GDNF和NOS表达,使肠道中的这些表达恢复正常,能缓解便秘,是乳酸菌起到便秘抑制作用的机制之一。

3 结 论

藏区牦牛酸乳分离的LP-YS1具有良好的胃酸和胆盐耐受能力,可以有效缓解便秘造成的小鼠体质量下降,粪便质量、颗粒数和含水量下降,同时提高活性炭在小肠中的推进率和缩短排出首粒黑便的时间。通过试剂盒对小鼠血清的检测也发现LP-YS1可以使便秘小鼠的MTL、ET、SS、Gas、AChE、SP、VIP含量提高和SS水平下降。RT-PCR实验进一步显示LP-YS1可以上调便秘小鼠*c-Kit*、*SCF*、*GDNF*基因的mRNA表达和下调基因*TRPV1*、*NOS*表达。通过这些实验结果证明LP-YS1可以有效地缓解便秘,且效果优于常用的LB。

参考文献:

- [1] 吴春生,舒畅,李键,等. 牦牛酸乳中乳酸菌的研究进展及前景展望[J]. 食品工业, 2012, 33(9): 129-133.
- [2] 吴春生,李键,蒋宇,等. 牦牛乳及牦牛酸乳营养价值的研究现状[J]. 乳业科学与技术, 2012, 35(3): 43-46.
- [3] UEKI A, OTSUKA M. Life style risks of Parkinson's disease: association between decreased water intake and constipation[J]. Journal of Neurology, 2004, 251(7): 18-23. DOI:10.1007/s00415-004-1706-3.
- [4] QIAN Y, SUO H Y, DU M Y, et al. Preventive effect of *Lactobacillus fermentum* Lee on activated carbon-induced constipation in mice[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2015, 61(9): 272-278. DOI:10.3177/jnsv.61.131.
- [5] ZHAO X, SUO H Y, QIAN Y, et al. Therapeutic effects of *Lactobacillus casei* Qian treatment in activated carbon-induced constipated mice[J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12(2): 3191-3199. DOI:10.3892/mmr.2015.3737.
- [6] SUO H Y, ZHAO X, QIAN Y, et al. Therapeutic effect of activated carbon-induced constipation mice with *Lactobacillus fermentum* Suo on treatment[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(12): 21875-21895. DOI:10.3390/ijms151221875.
- [7] 陈孝勇,李键,赵欣,等. 传统发酵牦牛酸乳中益生性乳酸菌的体外筛选[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 85-90. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201604016.
- [8] 冯霞,赵欣. 不同容器发酵水豆豉预防CCl₄诱导肝损伤的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(7): 338-342. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.07.056.
- [9] MERCENIER A, PAVAN S, POT B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects[J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9(2): 175-191. DOI:10.2174/1381612033392224.
- [10] 赵维俊,吕嘉彬,马强,等. 嗜酸乳杆菌的表面疏水性分析[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(10): 8-11. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2011.10.002.
- [11] QIAN Y, ZHAO X, KAN J Q. Preventive effect of resistant starch on activated carbon-induced constipation in mice[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 6(1): 228-232. DOI:10.3892/etm.2013.1096.
- [12] 彭芝榕,刘晓梅,倪学勤,等. 植物乳杆菌F1208对便秘大鼠胃肠道功能的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 243-246. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201313051.
- [13] 周晓丹,刘爱萍,张明,等. 副干酪乳杆菌LC-01对便秘小鼠的通便作用[J]. 乳业科学与技术, 2012, 35(5): 7-11.
- [14] GIBSON G R, ROBERFROID M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics[J]. Nutrition Research Reviews, 2004, 125(2): 1401-1412.
- [15] 王岚,彭成. 便秘动物模型的研究进展[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(2): 174-176. DOI:10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2007.02.023.
- [16] FEIGNER S D, TAN C P, MCKEE K K, et al. Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system[J]. Science, 1999, 284: 2184-2188. DOI:10.1126/science.284.5423.2184.
- [17] PRESTON D M, ADRIAN T E, CHRISTOFIDES N D, et al. Positive correlation between symptoms and circulating motilin, pancreatic polypeptide and gastrin concentrations in functional bowel disorders[J]. Gut, 1985, 26(10): 1059-1064. DOI:10.1136/gut.26.10.1059.
- [18] SOUDAH H C, HASLER W L, OWYANG C. Effect of octreotide on intestinal motility and bacterial overgrowth in scleroderma[J]. New England Journal of Medicine, 1991, 325(21): 1461-1467. DOI:10.1056/NEJM199111213252102.
- [19] FURCHGOTT R F, ZAWADZKI J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. Nature, 1980, 288: 373-376. DOI:10.1038/288373a0.
- [20] TZAVELLA K, RIEPL R L, KLAUSER A G, et al. Decreased substance P levels in rectal biopsies from patients with slow transit constipation[J]. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 1996, 8(12): 62-63.
- [21] MILNER P, CROWE R, KAMM M A, et al. Vasoactive intestinal polypeptide levels in sigmoid colon in idiopathic constipation and diverticular disease[J]. Gastroenterology, 1990, 99(3): 666-675.
- [22] 郑倩,徐华,毕淑英. c-kit基因在慢传输型便秘大鼠胃肠道的表达[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(6): 570-574. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2013.06.023.
- [23] LYFORD G L, HE C L, SOFFER E, et al. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation[J]. Gut, 2002, 51(4): 496-501.
- [24] SALMHOFER H, NEUHUBER W L, RUTH P, et al. Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine[J]. Cell and Tissue Research, 2001, 305(3): 331-340.
- [25] FARRUGIA G. Interstitial cells of Cajal in health and disease[J]. Neurogastroenterology and Motility, 2008(Suppl 1): 54-63. DOI:10.1111/j.1365-2982.2008.01109.x.
- [26] BRADING A F, MCCLOSKEY K D. Mechanisms of disease: specialized interstitial cells of the urinary tract—an assessment of current knowledge[J]. Nature Clinical Practice Urology, 2005, 2(11): 546-554. DOI:10.1038/ncpuro0340.
- [27] 曹永强,张健,郑喆,等. 干酪乳杆菌N1115发酵乳对小鼠便秘的疗效[C]//乳酸菌健康及产业化. 第十一届乳酸菌与健康国际研讨会摘要汇编. 北京: 中国食品科学技术学会, 2016: 67.
- [28] GEPPETTI P, TREVISANI M. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function[J]. British Journal of Pharmacology, 2004, 141(8): 1313-1320. DOI:10.1038/sj.bjp.0705768.
- [29] 孟萍,尹建康,高晓静,等. 白术对慢传输型便秘大鼠结肠黏膜NO及NOS的影响[J]. 江西医学院学报, 2012, 24(2): 61-63. DOI:10.11569/wcjd.v18.i27.2884.
- [30] SHAH V, LYFORD G, GORES G, et al. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease[J]. Gastroenterology, 2004, 126(3): 903-913.
- [31] 徐国萍,范一宏,吕宾. 神经营养因子影响肠道的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010(27): 2884-2888. DOI:10.11569/wcjd.v18.i27.2884.
- [32] TOMITA R, IGARASHI S, FUJISAKI S, et al. The effects of neurotensin in the colon of patients with slow transit constipation[J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(78): 1662-1666.