DOI:10.12441/spyswjs.20241206001 [文章编号] 1673-1689(2025)03-0044-13

植物乳植杆菌CCFM8661缓解由盐酸洛哌丁胺导致小鼠便秘的机制研究

王昭之[1] 孙玉琪[1] 岳 菊[1] 宁博文[1,2] 李柏良[1*]

(1. 东北农业大学食品学院,黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 哈尔滨体育学院,黑龙江 哈尔滨 150008)

摘要:【目的】探讨植物乳植杆菌(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) CCFM8661对小鼠便秘的缓解作用。**【方法】**将100只小鼠分为5组:对照组、模型组及低、中、高剂量组,按照分组给小鼠灌胃14 d益生菌,最后1 d灌胃盐酸洛哌丁胺构建小鼠便秘模型,通过测定小鼠排便情况、短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)、肠道菌群等指标评价植物乳植杆菌CCFM8661对便秘的缓解程度。**【结果】**植物乳植杆菌CCFM8661可以有效缓解小鼠便秘症状,且缓解效果随剂量的升高而更显著。**【结论】**植物乳植杆菌CCFM8661缓解便秘的作用机制可能涉及多层次的调控:一方面通过调节神经递质水平和炎症因子表达,改善肠道功能;另一方面通过增加SCFAs(乙酸、丙酸、丁酸)的质量摩尔浓度、降低肠道pH来抑制致病菌生长,同时调节肠道菌群平衡。KEGG通路分析进一步揭示,这些作用机制可能与糖代谢、氨基酸代谢以及多种物质的合成、转运和循环等生物学过程密切相关,通过多途径调控机制协同发挥改善便秘的作用。该研究进一步表明了植物乳植杆菌CCFM8661在改善便秘方面的潜力,为其应用提供了参考。

关键词:植物乳植杆菌;便秘;肠道菌群;KEGG通路;短链脂肪酸

Lactobacillus plantarum CCFM8661 Alleviates Constipation Caused by Loperamide Hydrochloride

WANG Zhaozhi[1] *SUN Yuqi*[1] *YUE Ju*[1] *NING Bowen*[1,2] *LI Bailiang*[1*]

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Harbin Sport University, Harbin 150008, China)

Abstract: [**Objective**] The study aims to investigate the alleviating effect of *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) CCFM8661 on constipation in mice. [**Method**] One hundred mice were allocated into five groups (control, model, and low-, medium-, and high-dose groups) and administrated with corresponding agents by gavage for 14 d. On the last day, the mouse model of constipation was established by gavage of loperamide hydrochloride. The degree of constipation alleviation by *L. plantarum* CCFM8661 was evaluated through the determination of the defecation situation, short-chain fatty acids (SCFAs), and intestinal flora of mice. [**Result**] *L. plantarum* CCFM8661 effectively alleviated the symptoms of constipation in a dose-dependent manner. [**Conclusion**] *L. plantarum* CCFM8661 may relieve constipation *via* multi-level regulation. On the one hand, it improves the intestinal function by regulating the levels of neurotransmitters and the expression of inflammatory factors; on the other hand, it inhibits the growth of pathogenic bacteria by increasing the molar mass concentrations of SCFAs (acetic acid, propionic acid, and butyric acid) and decreasing the intestinal pH while

基金项目:黑龙江省自然科学基金联合重点项目(ZL2024C022);黑龙江省重大成果产业化项目(32072190)。

通信作者:李柏良(1989—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品微生物与生物技术研究。E-mail: 15846092362@163.com

收稿日期:2024-12-06 **修回日期:**2025-02-21

reshaping the intestinal flora balance. The analysis of KEGG pathways further reveals that these effects may be closely related to biological processes such as glucose metabolism, amino acid metabolism, as well as the synthesis, transport, and cycling of a variety of substances, which synergistically exert their multi-pathway regulatory effects to alleviate constipation. This study further demonstrates the potential of *L. plantarum* CCFM8661 in alleviating constipation and provides a reference for the application of this strain.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; constipation; intestinal flora; KEGG pathway; short-chain fatty acids

便秘是一种常见的胃肠道疾病，表现为排便次数减少、粪便干结、排出困难或伴有腹胀等[1]。人体应对的机制建立于肠道微生态稳定、菌群结构平衡、肠道屏障完好这3个基础之上[2]。近年来，肠道微生物及肠道分泌物与便秘之间的关系受到了广泛关注，便秘患者主要表现为肠道微生态严重失调，厚壁芽孢杆菌、代谢芽孢杆菌、肠杆菌科（大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等）相对丰度增加，乳杆菌、拟杆菌和双歧杆菌相对丰度减少[3-4]。

便秘的治疗手段主要包括饮食治疗、药物治疗、手术治疗等[5-6]。其中，药物治疗是主要的治疗手段。但所用药物存在副作用大、依赖性强等问题[7]，还有部分患者无法通过药物获得理想的治疗效果[8]。研究表明，补充益生菌可改善便秘患者的排便频率[9]。益生菌能够通过调节肠道菌群、恢复肠道稳态，有效缓解便秘[10]，还可以通过代谢产生SCFAs，降低肠道pH，抑制有害菌生长，进而增强肠道上皮细胞的屏障功能，缓解肠道炎症[11]。此外，益生菌可以影响肠道神经系统，从而改善便秘[12]。这些研究表明益生菌干预可作为药物治疗的替代方案。

研究表明，植物乳植杆菌具有良好的改善便秘的效果[13]。植物乳植杆菌CCFM8661是一株具有良好益生特性的益生菌，已被证实具有调节机体免疫，促进肠道蠕动，改善便秘的作用[14-15]，但其改善便秘的机制仍不清楚。作者测定了小鼠排便情况、结肠含水率、神经递质、炎症因子、SCFAs等指标，全面评估了植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠便秘的治疗作用。同时，通过宏基因组测序分析深入探讨了植物乳植杆菌CCFM8661缓解便秘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

6~8周龄雄性BALB/c小鼠：北京维通利华实验动物技术有限公司；植物乳植杆菌CCFM8661菌粉：微康益生菌（苏州）股份有限公司；盐酸洛哌丁胺：美国MedChemexpress生物科技公司；苏木精-伊红染色液套装：南京建成科技有限公司；小鼠5-羟色胺（5-HT）酶联免疫分析试剂盒：睿信生物科技有限公司；小鼠胃动素（MTL）、胃泌素（GAS）酶联免疫分析试剂盒：江苏酶免实业有限公司；小鼠P物质（SP）、乙酰胆碱（ACH）、血管活性肠肽（VIP）、生长抑素（SS）、酪酪肽（PYY）、白细胞介素1β（IL-1β）、白细胞介素6（IL-6）、白细胞介素8（IL-8）、白细胞介素10（IL-10）、干扰素-γ（IFN-γ）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）酶联免疫分析试剂盒：上海酶联生物技术有限公司；活性炭、阿拉伯树胶：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；乙酸标准品、丙酸标准品、丁酸标准品（纯度≥99%）：美国Sigma-Aldrich公司；乙酸乙酯（纯度≥99.5%）：美国Merck公司。

高压蒸汽灭菌器：MLS-3751L-PC型，日本Panasonic公司；-80 ℃冰箱：MDF-382E型，日本Panasonic公司；天平：Cubis®II型，德国Sartorius公司；低温离心机：SORVALLST8/8R型，美国TOMOS公司；漩涡振荡器：HulaDancerbasic型，德国IKA公司；气相色谱-质谱联用（GC-MS）仪：Orbitrap™Exactive™型，美国Thermo Fisher Scientific公司；超纯水机：Milli-QEQ7000型，法国Millipore公司；紫外可见分光光度计：UV-4802型，尤尼柯仪器有限公司；全自动酶标仪：SMATBCDSynergyMX型，美国BioTek公司；核酸蛋白分析仪：Tnano-800型，上海测博生物科技发展中心。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

所有操作均按照东北农业大学《实验动物管理条例》进行，经东北农业大学动物伦理委员会批准，动物伦理号：NEAUEC202404100。在适应环境1周后开始动物试验。将100只小鼠随机分为5组（每组20只）：分别为对照组、模型组、低剂量组、中剂量

组、高剂量组。第8~21天参考《保健食品功能检验与评价方法(2023年版)》进行造模以及给药,对照组和模型组给予0.2 mL无菌生理盐水,低、中、高剂量组分别按照1.5×10^6、1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/只,给予无菌生理盐水重悬的植物乳植杆菌CCFM8661。第21天下午灌胃,小鼠禁食不禁水16 h。第22天,对照组给予0.2 mL生理盐水,模型组及各剂量组给予0.2 mL盐酸洛哌丁胺(4 mg/kg,以小鼠体质量计),构造小鼠便秘模型[13]。试验分组见表1。

表1 试验分组

Table 1 Experiment grouping

组别	动物数量/只	灌胃剂量(以动物日摄入量计)	灌胃体积/mL	灌胃时间/d
对照组	20	等体积生理盐水	0.2	14
模型组	20	等体积生理盐水	0.2	14
低剂量组	20	1.5×10^6 CFU/只	0.2	14
中剂量组	20	1.5×10^7 CFU/只	0.2	14
高剂量组	20	1.5×10^8 CFU/只	0.2	14

1.2.2 小鼠基本情况观测与记录

分别在试验第8、15、22天称量各组小鼠体质量,记录平均值。并且观测记录小鼠的精神状况、毛发颜色以及活动状况是否良好。

1.2.3 小鼠粪便含水率测定

便秘模型构造成功后等待0.5 h,各组分别取10只小鼠进行墨汁灌胃,用于粪便指标检测。注意各剂量组小鼠灌胃含有相应剂量植物乳植杆菌CCFM8661的墨汁,从灌胃墨汁开始计时,等待小鼠排便。测定各组小鼠粪便干质量、湿质量。粪便含水率计算见式(1)。

$$W_1=\frac{m_1-m_2}{m_1}\times100\% \quad (1)$$

式中:

W_1——粪便含水率,%;

m_1——粪便湿质量,g;

m_2——粪便干质量,g。

1.2.4 小鼠首粒黑便排出时间及粪便粒数测定

从各组小鼠被灌胃墨汁开始计时,到小鼠排出首粒黑便的时间间隔即为首粒黑便排出时间。同时记录5 h内每只小鼠的粪便粒数。

1.2.5 小鼠肠道墨汁推进率测定

再次随机抽取各组10只小鼠进行肠道墨汁推进率的测定。按1.2.3的方式给予墨汁,25 min后采用脊椎脱臼法将小鼠处死,随后取出幽门至盲肠肠管的小鼠肠胃,小心将肠系膜分开剪断,置于有生理盐水的玻璃板上,不改变肠道长度的情况下缓缓拉直,用尺子测量从幽门到墨汁前沿的距离(墨汁推进长度)和从幽门到盲肠起始处的距离。肠管总长度就是小肠总长度。最后收集小鼠盲肠内容物,-80 ℃冷冻保存。墨汁推进率按式(2)计算。

$$T=\frac{L_1}{L_2}\times100\% \quad (2)$$

式中:

T——墨汁推进率,%;

L_1——墨汁推进长度,cm;

L_2——小肠总长度,cm。

1.2.6 小鼠结肠含水率测定

在小鼠脊椎脱臼处死后,剪取盲肠下端部分2 cm,用蒸馏水冲洗干净,将其放在纸上吸附水分,放入EP管内称质量,置于50 ℃鼓风干燥箱干燥24 h后自然冷却,再次称质量。结肠含水率按式(3)计算。

$$W_2=\frac{m_3-m_4}{m_3}\times100\% \quad (3)$$

式中:

W_2——结肠含水率,%;

m_3——未烘干时结肠的质量,g;

m_4——烘干后结肠的质量,g。

1.2.7 组织病理学

收集小鼠从胃幽门入口到回盲瓣的小肠。用生理盐水洗涤小肠管腔物质,然后将小肠固定在体积分数10%的福尔马林溶液中。分别采用体积分数70%、80%、90%、95%的乙醇溶液梯度脱水,用二甲苯处理后横切小鼠小肠进行包埋。对小肠组织进行苏木精-伊红染色,并通过显微镜观察切片。

1.2.8 小鼠血清中神经递质、炎症因子的测定

麻醉小鼠后,摘除眼球取血。将小鼠血液置于离心管中,以3 500 r/min冷冻离心10 min,收集血清。按照试剂盒说明书测定兴奋性神经递质:MTL、SP、GAS、ACH;抑制性神经递质:SS、VIP、5-HT、PYY;炎症因子:IFN-γ、IL-6、IL-8、IL-10、IL-1β、TNF-α。

1.2.9 小鼠粪便中SCFAs的测定

采用GC-MS法测定小鼠粪便中乙酸、丙酸、丁酸的质量摩尔浓度。在0.5 mL饱和NaCl溶液

中加入30 mg冻干小鼠粪便，之后加入20 L体积分数20%的硫酸。在通风橱中破碎样品后，加入1 mL乙醚提取的SCFAs，充分混合，离心15 min后弃去上清液，并将样品转移到离心管中。加入0.25 g无水硫酸钠以除去过量的水。离心后将上清液转移到气体瓶中，随后使用GC-MS进行分析。GC-MS条件：使用Rtx-Wax柱（30 m×25 μm×0.25 μm）；全扫描模式；载气为氦气，流量为2 mL/min；进样体积1 μL；升温程序为7.5 ℃/min升温至140 ℃，再以60 ℃/min升温至200 ℃保持3 min；离子化温度为20 ℃。根据标准曲线计算SCFAs的质量摩尔浓度。

1.2.10　宏基因组测序分析小鼠肠道菌群变化

将小鼠粪便进行宏基因组测序分析，试验操作参照文献[16]。

1.3　数据处理

试验至少重复3次，统计数据以平均值±标准差表示。统计学差异采用GraphPad Prism 5软件的*t*检验进行分析。

2　结果与讨论

2.1　小鼠体质量的测定及状态观察

各组小鼠体质量的测定结果见表2。各组小鼠体质量均呈正常增加趋势，组间无显著差异。对照组、模型组及各剂量组小鼠的毛色状况良好，活动正常。说明试验周期内灌胃益生菌不会对小鼠体质量有显著影响。

表2　各组小鼠体质量

Table 2　Body mass of mice in each group

组别	小鼠体质量/g		
	第8天	第15天	第22天
对照组	19.21±1.13	20.51±0.80	21.64±0.56
模型组	19.17±1.41	20.42±0.76	21.68±0.36
低剂量组	19.30±1.04	20.52±0.71	21.63±0.41
中剂量组	19.29±0.87	20.55±0.73	21.47±0.58
高剂量组	19.25±1.01	20.41±0.69	21.53±0.46

2.2　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠排便指标及结肠含水率的影响

2.2.1　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠粪便含水率的影响

通过测量5组小鼠粪便的干质量、湿质量，计算得到粪便含水率，结果见图1（a）。与对照组相比，模型组小鼠的粪便含水率降低程度极其显著（$P<0.000\ 1$），说明采用盐酸洛哌丁胺成功构建了小鼠便秘模型。与模型组相比，灌胃益生菌后小鼠粪便含水率均显著提高（$P<0.05$），低、中、高剂量组的粪便含水率分别提高了9.22%、13.71%、12.85%，说明灌胃植物乳植杆菌CCFM8661可以适当缓解便秘。

2.2.2　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠首粒黑便排出时间及粪便粒数的影响

首粒黑便排出时间可以反映小鼠肠道的蠕动能力。便秘会抑制肠道蠕动，因此首粒黑便排出时间会延长[17]。如图1（b）所示，对照组小鼠首粒黑便排出时间为（50±7）min，模型组小鼠首粒黑便排出时间最长，达到（91±13）min，各剂量组小鼠的首粒黑便排出时间分别为（52±5）、（54±4）、（58±7）min。如图1（c）所示，与对照组相比，模型组粪便粒数减少程度极其显著（$P<0.000\ 1$）。与模型组相比，低、中、高剂量组粪便粒数分别提高了19.93%、34.55%、38.87%。随着益生菌剂量的增大，粪便粒数变多，基本恢复到对照组水平。可以看出植物乳植杆菌CCFM8661具有良好的缓解便秘作用，且效果有剂量依赖性。

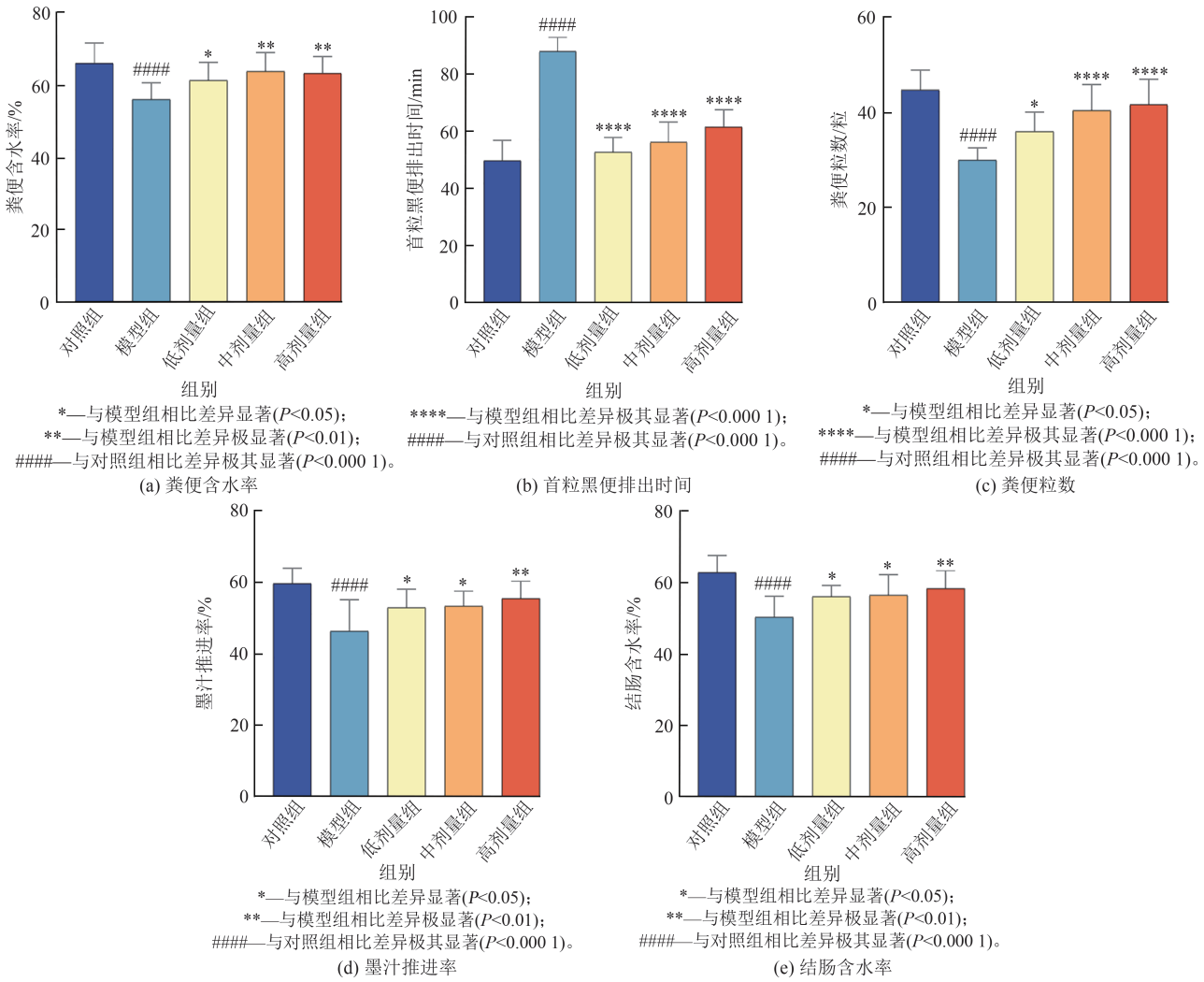
2.2.3　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠墨汁推进率的影响

墨汁推进率可以反映小肠的推进功能，通常表征药物或其他因素对肠道蠕动的影响[18]。如果墨汁推进率高，说明小肠蠕动较快；反之，则表示小肠蠕动较慢，可作为小鼠便秘的评判指标。如图1（d）所示。模型组与对照组相比，墨汁推进率降低了10%左右。与模型组相比，高剂量组墨汁推进率极显著上升（$P<0.01$）。而低、中剂量组的墨汁推进率虽有所升高，但不如高剂量组效果显著，证明高剂量的植物乳植杆菌CCFM8661可以有效缓解小鼠墨汁推进率的降低，加快小肠蠕动。

2.2.4　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠结肠含水率的影响

结肠含水率可以反映结肠的水液代谢情况以及肠道的功能状态。较低的结肠含水率可能表明肠道的吸收和排泄功能出现异常或者可能与某些肠道疾病相关，如结肠炎、便秘等[19]。如图1（e）所示，与对照组相比，模型组结肠含水率极其显著降

低（P<0.000 1）。与模型组相比，低、中、高剂量的植物乳植杆菌CCFM8661干预均可增加小鼠结肠含水率，且高剂量干预能够最大程度提高结肠含水率。综合以上5个指标结果可知，当植物乳植杆菌CCFM8661的添加量控制在一定范围内时，灌胃剂量越高，缓解便秘效果越好。此外，唐田等[20]在植物乳植杆菌P9对小鼠便秘作用的研究中也发现了类似结果。



(a) 粪便含水率　(b) 首粒黑便排出时间　(c) 粪便粒数

(d) 墨汁推进率　(e) 结肠含水率

图 1　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠排便指标及结肠含水率的影响

Fig. 1　Effects of *L. plantarum* CCFM8661 on defecation indicators and colonic water content in mice

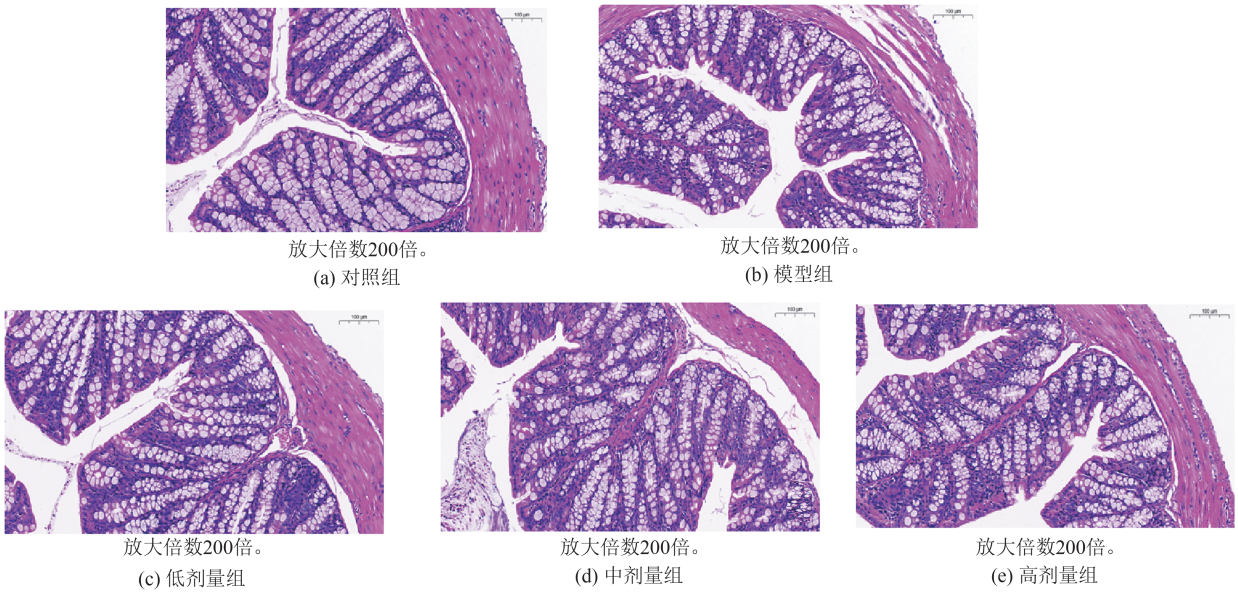
2.3　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠结肠组织病理变化的影响

将小鼠结肠末端进行组织学染色来评估肠道形态学变化，结果见图2。对照组显示出健康和完整的小肠组织结构，上皮细胞和隐窝结构完整，小鼠结肠绒毛排列整齐，杯状细胞均匀，腺管排列整齐。模型组小鼠上皮细胞皱襞紊乱，上皮吸收细胞不均匀，黏膜表面凹陷，隐窝缩短，肠结构完整性丧失，所以便秘小鼠的肌肉黏膜变薄，肠道组织结构严重受损。高剂量组中，肠上皮皱襞相对完整和规则，隐窝结构恢复，杯状细胞增多，结肠形态特征最接近对照组。低剂量组与中剂量组也呈现出类似的缓解效果。结果表明，各剂量组植物乳植杆菌CCFM8661都在不同程度上恢复了由盐酸洛哌丁胺引起的组织损伤。

2.4　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠神经递质与炎症因子的影响

2.4.1　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠神经递质的影响

如图3所示，胃肠道神经递质的水平可以显著



放大倍数200倍。(a) 对照组　放大倍数200倍。(b) 模型组

放大倍数200倍。(c) 低剂量组　放大倍数200倍。(d) 中剂量组　放大倍数200倍。(e) 高剂量组

图 2　植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠结肠组织病理变化的影响

Fig. 2　Effects of *L. plantarum* CCFM8661 on histopathological changes in the colon of mice

影响胃肠道运输，当兴奋性神经递质 ACH、SP、GAS 和 MTL 的水平显著降低，或抑制性神经递质 VIP、5-HT、PYY 和 SS 的水平显著升高时，胃肠道运输会受到抑制，引起便秘[21]。同时便秘会引起小肠组织细胞损伤以及炎症的发生[22]。

兴奋性神经递质可以促进肠道蠕动，增加肠道张力，影响肠道分泌黏液和消化液，如果兴奋性神经递质失衡，会导致肠道平滑肌松弛，张力降低，易引起便秘[23]。如图 3(a)~(d)所示，盐酸洛哌丁胺诱导后，兴奋性神经递质 ACH、SP、GAS 和 MTL 的水平降低程度极其显著(P<0.000 1)。高剂量植物乳植杆菌 CCFM8661 能够明显上调这 4 种兴奋性神经递质水平。

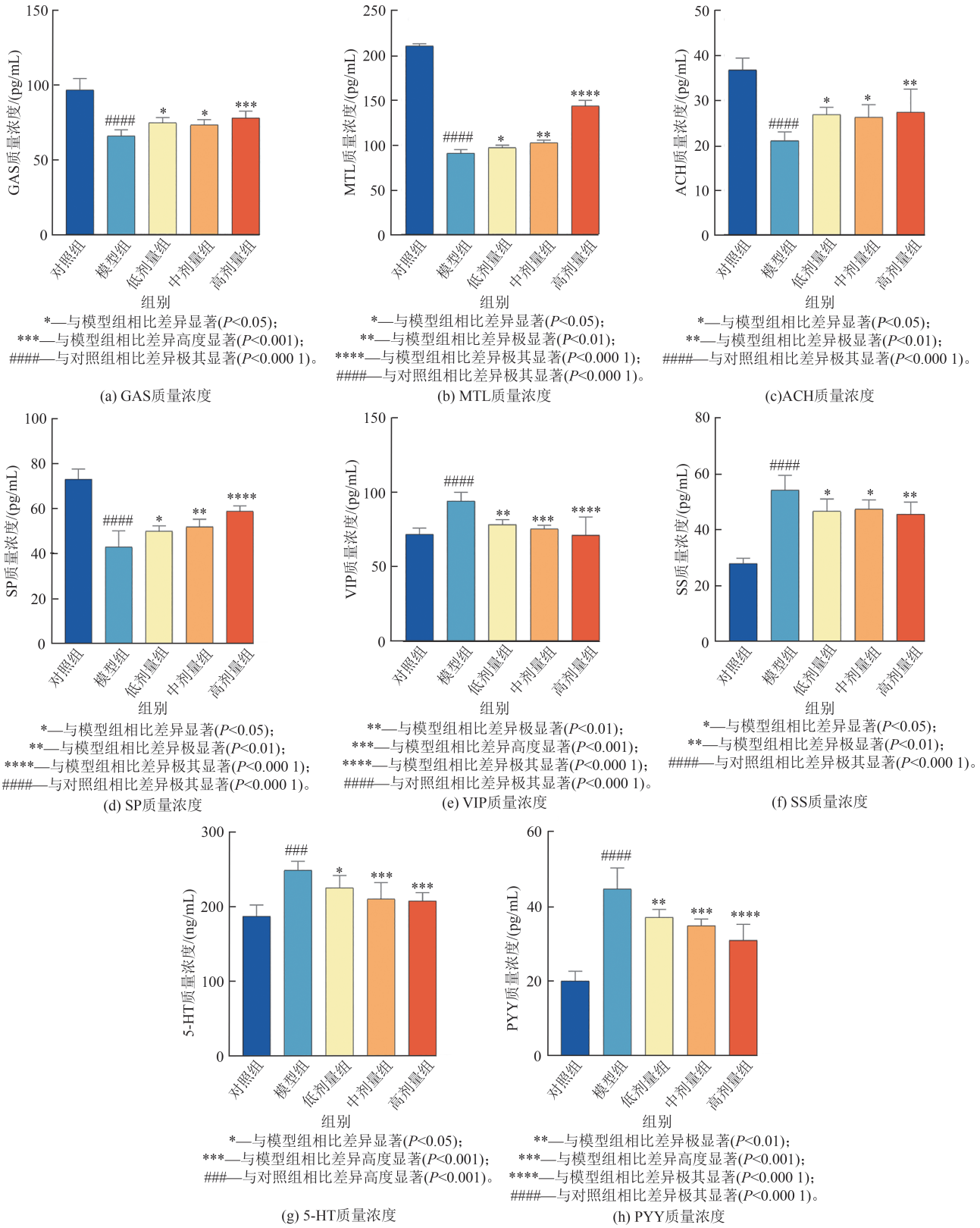
抑制性神经递质与兴奋性神经递质相反，会减弱肠道蠕动，降低肠道张力，影响肠道分泌黏液和消化液[24]。如果抑制性神经递质失衡，可能导致肠道蠕动的协调性变差，出现不规则的收缩和松弛，进而引起便秘。如图 3(e)~(h)所示，模型组小鼠中抑制性神经递质 VIP、5-HT、PYY 和 SS 的水平较对照组明显升高，表明盐酸洛哌丁胺引发的便秘与 4 种抑制性神经递质水平异常有关。当给予益生菌时，高剂量组血清中抑制性神经递质水平明显降低。综合来看，高剂量的植物乳植杆菌 CCFM8661 可以通过上调兴奋性神经递质水平、下调抑制性神经递质水平来有效缓解由盐酸洛哌丁胺引发的便秘。

2.4.2　植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠炎症因子的影响

评估小鼠血清中促炎细胞因子(IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α、IFN-γ)和抗炎细胞因子(IL-10)的水平，以量化不同剂量的益生菌对便秘小鼠免疫调节的影响。由图 4 可知，模型组中 5 种促炎细胞因子的血清水平均极其显著高于对照组(P<0.000 1)。同时，抗炎细胞因子 IL-10 的水平也有极其显著的变化(P<0.000 1)。表明由盐酸洛哌丁胺诱导的小鼠便秘模型可以使血清中促炎细胞因子和抗炎细胞因子的水平异常。而在不同剂量的益生菌干预下，抗炎细胞因子 IL-10 的水平明显上调，5 种促炎细胞因子水平明显下调。说明便秘会诱发小鼠发生低水平炎症，益生菌可以调节小鼠血清中炎症细胞因子水平，从而缓解便秘。

2.5　植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠 SCFAs 的影响

SCFAs 是复杂多囊菌(如肠道内的细菌)发酵的重要产物，其中乙酸、丙酸和丁酸最丰富[25]。SCFAs 具有增加肠道内渗透压、刺激胃肠激素分泌、调节肠道蠕动等功能，还可以参与宿主免疫反应过程[26]。如图 5 所示，与对照组相比，模型组小鼠乙酸、丙酸和丁酸水平均明显降低，表明便秘会



*—与模型组相比差异显著(P<0.05);
***—与模型组相比差异高度显著(P<0.001);
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(a) GAS质量浓度

*—与模型组相比差异显著(P<0.05);
**—与模型组相比差异极显著(P<0.01);
****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1);
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(b) MTL质量浓度

*—与模型组相比差异显著(P<0.05);
**—与模型组相比差异极显著(P<0.01);
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(c)ACH质量浓度

*—与模型组相比差异显著(P<0.05);
**—与模型组相比差异极显著(P<0.01);
****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1);
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(d) SP质量浓度

**—与模型组相比差异极显著(P<0.01);
***—与模型组相比差异高度显著(P<0.001);
****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1);
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(e) VIP质量浓度

*—与模型组相比差异显著(P<0.05);
**—与模型组相比差异极显著(P<0.01);
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(f) SS质量浓度

*—与模型组相比差异显著(P<0.05);
***—与模型组相比差异高度显著(P<0.001);
###—与对照组相比差异高度显著(P<0.001)。

(g) 5-HT质量浓度

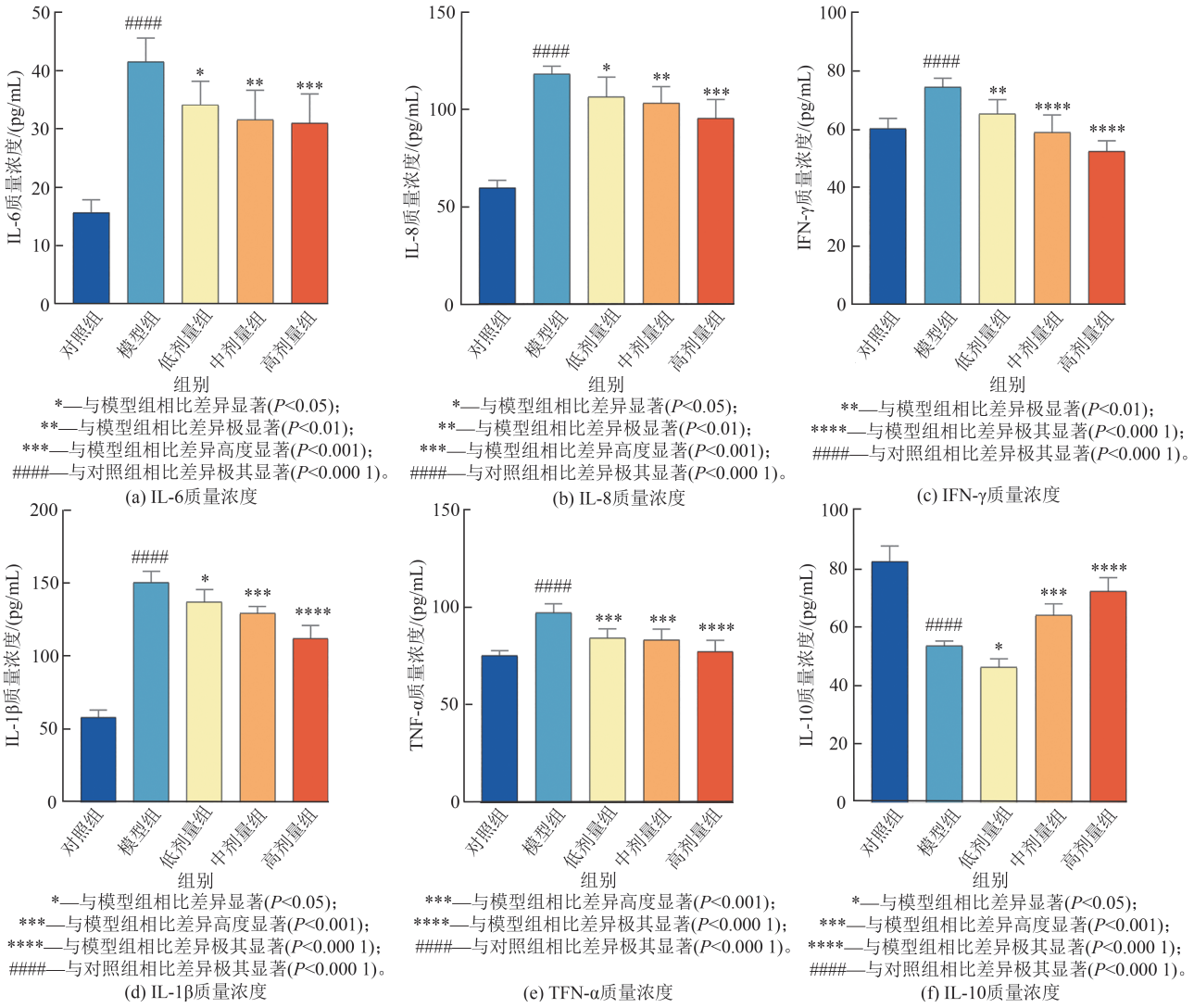
**—与模型组相比差异极显著(P<0.01);
***—与模型组相比差异高度显著(P<0.001);
****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1);
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(h) PYY质量浓度

图 3　植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠神经递质的影响

Fig. 3　Effects of *L. plantarum* CCFM8661 on neurotransmitters in mice

使小鼠 SCFAs 水平异常。低、中、高剂量益生菌干预后，乙酸、丙酸和丁酸质量摩尔浓度均明显上调，其中，高剂量组可以极其显著上调乙酸和丙酸质量摩尔浓度（P<0.000 1），表明植物乳植杆菌



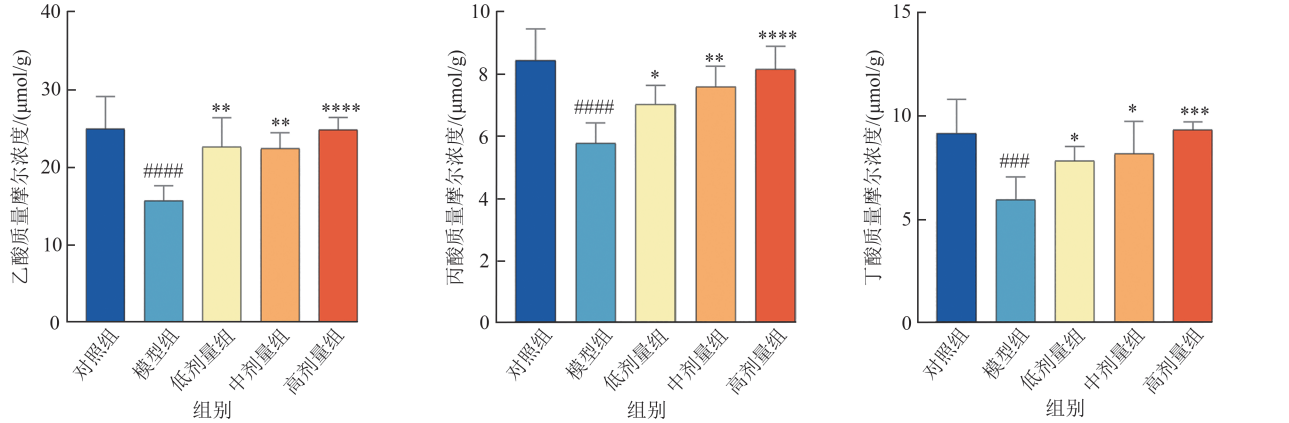
*—与模型组相比差异显著(P<0.05)；
**—与模型组相比差异极显著(P<0.01)；
***—与模型组相比差异高度显著(P<0.001)；
****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1)；
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(a) IL-6质量浓度　(b) IL-8质量浓度　(c) IFN-γ质量浓度

(d) IL-1β质量浓度　(e) TFN-α质量浓度　(f) IL-10质量浓度

图 4　植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠炎症因子的影响

Fig. 4　Effects of *L. plantarum* CCFM8661 on inflammatory factors in mice



**—与模型组相比差异极显著(P<0.01)；
****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1)；
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(a) 乙酸质量摩尔浓度

*—与模型组相比差异显著(P<0.05)；
**—与模型组相比差异极显著(P<0.01)；
****—与模型组相比差异极其显著(P<0.000 1)；
####—与对照组相比差异极其显著(P<0.000 1)。

(b) 丙酸质量摩尔浓度

*—与模型组相比差异显著(P<0.05)；
***—与模型组相比差异高度显著(P<0.001)；
###—与对照组相比差异高度显著(P<0.001)。

(c) 丁酸质量摩尔浓度

图 5　植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠 SCFAs 的影响

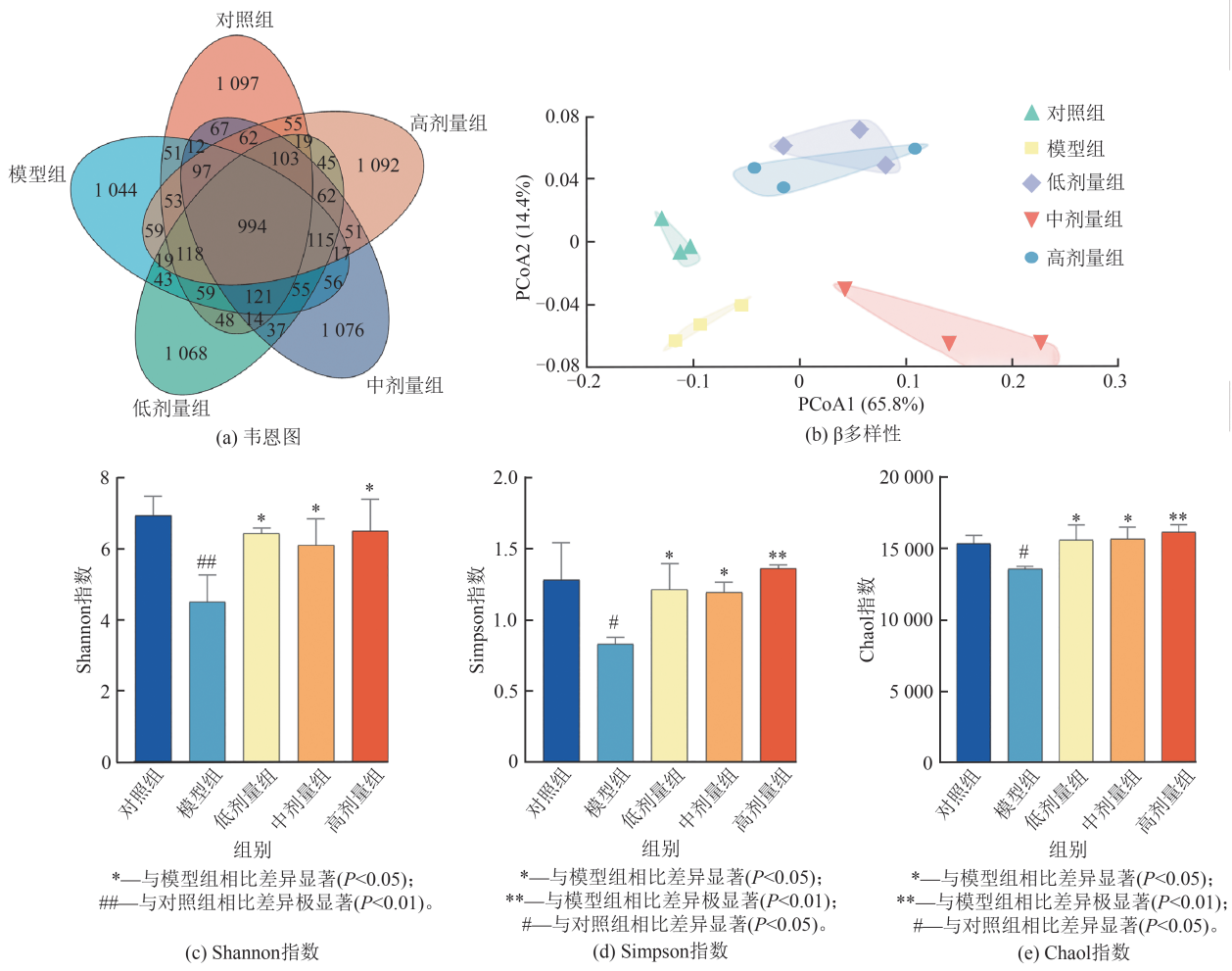
Fig. 5　Effects of *L. plantarum* CCFM8661 on SCFAs in mice

CCFM8661 能够调控肠道菌群代谢物，降低肠道 pH，从而缓解小鼠便秘。

2.6　宏基因组测序分析植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道菌群的影响

便秘会引起肠道菌群失衡，造成有益菌相对丰度减少和有害菌相对丰度增加，与肠道菌群相关的指标也会明显改变[27]，益生菌可以调节由便秘造成的各项肠道菌群指标失衡[28]。作者为探讨由盐酸洛哌丁胺引起的便秘以及灌胃植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道菌群的影响，分析了韦恩图、α 多样性、β 多样性以及肠道菌群属水平的群落热图等。

α 多样性分析主要包括 3 方面：Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数。Shannon 指数和 Simpson 指数可以反映肠道菌群的多样性，数值越大说明肠道菌群的多样性越丰富。如图 6 所示，韦恩图反映出了不同组别的肠道菌群存在不同程度的层叠关系。与对照组相比，模型组小鼠 Shannon 指数和 Simpson 指数都明显降低，说明便秘确实引起了肠道菌群多样性的减少。植物乳植杆菌 CCFM8661 干预后，低、中、高剂量组的 Shannon 指数和 Simpson 指数与模型组相比都有明显提高。Chao1 指数可以反映肠道菌群的相对丰度，Chao1 指数越大代表肠道菌群越庞大。如图 6(e)所示，模型组小鼠的 Chao1 指数下降，说明便秘造成了小鼠肠道菌群相对丰度的降低。植物乳植杆菌 CCFM8661 干预后，低、中、高剂量组的 Chao1 指数明显提高。β 多样性指数是通过分析不同菌群之间的离散程度来反映不同样本之间的差异性。如图 6(b)所示，对照组和模型组数据呈现明显偏离，而植物乳植杆菌 CCFM8661 干预后样本分布相对分散，但低剂量组与高剂量组表现出聚类关



(a) 韦恩图　(b) β多样性　(c) Shannon指数　(d) Simpson指数　(e) Chao1指数

图 6　植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠肠道菌群各项指标的影响

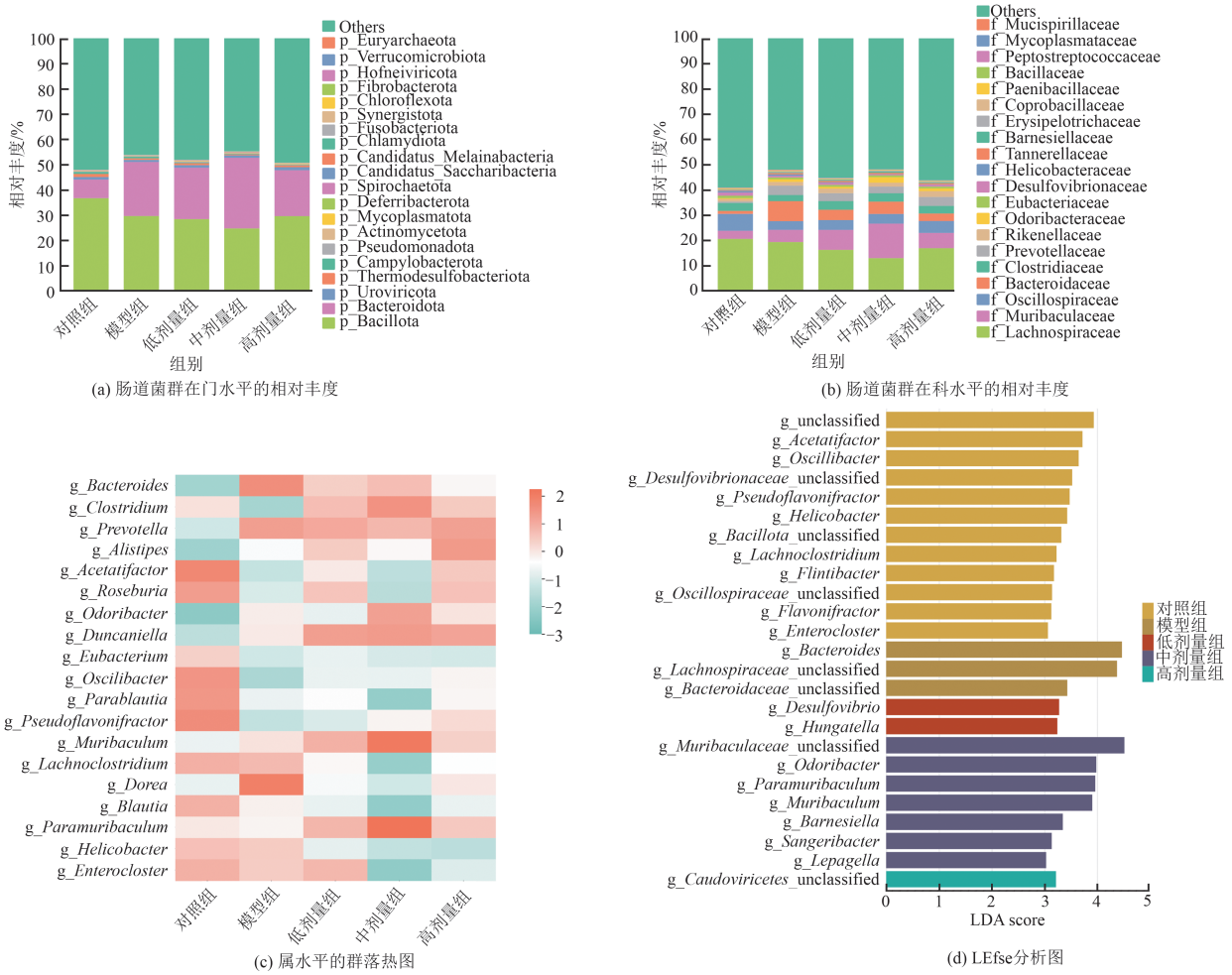
Fig. 6　Effects of *L. plantarum* CCFM8661 on various indicators of intestinal flora in mice

系并且更接近于对照组，说明这2种剂量的植物乳植杆菌CCFM8661可以使小鼠肠道菌群趋于正常水平，缓解便秘。

在门水平和科水平上分析不同肠道菌群的相对丰度可以在一定程度上反映肠道菌群的动态平衡[29]。如图7所示，在门水平上，模型组芽孢杆菌门（Bacillota）的相对丰度降低，而拟杆菌门（Bacteroidota）的相对丰度明显提高。3种剂量的处理组均明显恢复了拟杆菌门的相对丰度。此外，在科水平上，模型组拟杆菌科（Bacteroidaceae）和普雷沃氏菌科（Prevotellaceae）的相对丰度与对照组相比明显增加，而模型组梭菌科（Clostridiaceae）和颤螺菌科（Oscillospiraceae）的相对丰度与对照组相比明显减少，这2种改变也都在益生菌干预后有明显恢复。说明植物乳植杆菌CCFM8661可以缓解肠道菌群相对丰度的紊乱，保持肠道菌群的动态平衡。

将小鼠肠道中属水平上相对丰度排名靠前的菌群与小鼠的5个组别相关联，结果如图7（c）所示。7个菌属与发生便秘的组别呈现正相关，其中包括多雷亚菌属（*Dorea*）及螺杆菌属（*Helicobacter*）等与便秘相关的有害菌属。但是在植物乳植杆菌CCFM8661干预后，上述有害菌属呈现负相关性，说明植物乳植杆菌CCFM8661缓解便秘的机制可能与降低肠道内有害菌属的相对丰度有关。

如图7（d）所示，在模型组中，拟杆菌属（*Bacteroides*）和毛螺菌属（*Lachnospiraceae* unclassified）高度富集，植物乳植杆菌CCFM8661干预组中，*Muribaculaceae* unclassified相对丰度较高。张伶俐等[30]的研究结果显示，甲烷抑制剂干预后，毛螺菌属水平显著降低。因此推断植物



(a) 肠道菌群在门水平的相对丰度

(b) 肠道菌群在科水平的相对丰度

(c) 属水平的群落热图

(d) LEfse分析图

图7　植物乳植杆菌CCFM8661对小鼠肠道菌群的影响

Fig. 7　Effects of *L. plantarum* CCFM8661 on the intestinal flora in mice

乳植杆菌 CCFM8661 可能通过降低毛螺菌属的相对丰度，有效缓解便秘。

进一步对 5 组中差异显著的代谢产物进行 KEGG 通路富集分析，预测植物乳植杆菌 CCFM8661 缓解便秘的通路。如图 8 所示，差异最显著的代谢通路有 19 种，如半胱氨酸与甲硫氨酸代谢、糖酵解/糖异生、嘌呤代谢、嘧啶代谢、ABC 转运蛋白、淀粉和蔗糖代谢、柠檬酸循环、次级代谢产物的生物合成等。这些细胞代谢通路不仅直接参与机体氧化供能及体内多种化学合成过程，还具有调节机体能量代谢的作用[31]。

受药物影响，模型组各个通路中的代谢物质与对照组相比均有上调或者下调。当小鼠受到不同剂量的植物乳植杆菌 CCFM8661 干预后，相应通路中的代谢物质发生相反变化，说明植物乳植杆菌 CCFM8661 缓解便秘的作用机制很可能与机体的糖代谢、氨基酸代谢、各类物质的合成转运等代谢途径密切相关。

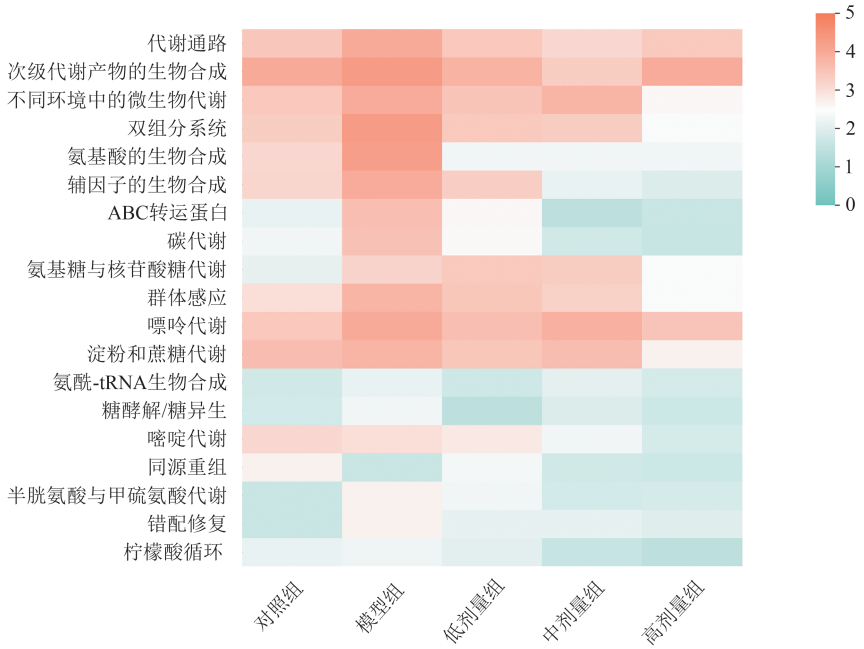


图 8　植物乳植杆菌 CCFM8661 缓解便秘的 KEGG 代谢通路分析

Fig. 8　KEGG metabolic pathway analysis of *L. plantarum* CCFM8661 in relieving constipation

3　结论

通过灌胃盐酸洛哌丁胺建立小鼠便秘模型，旨在研究不同剂量的植物乳植杆菌 CCFM8661 对小鼠便秘的改善效果以及作用机制。结果表明，植物乳植杆菌 CCFM8661 可以通过多种机制缓解由盐酸洛哌丁胺引起的小鼠便秘，且对便秘的缓解效果随剂量的升高而更显著，其中 1.5×10^8 CFU/只的高剂量对于缓解便秘的效果最佳。该研究为植物乳植杆菌 CCFM8661 改善便秘的临床应用提供了理论基础。然而，还需要进一步结合代谢组学、免疫学技术，阐明植物乳植杆菌 CCFM8661 缓解便秘的机制。

现有研究多从肠道相互作用的角度解释益生菌对小鼠便秘的改善机制，未来可能需要通过肠-脑轴等角度来阐释益生菌缓解便秘的机制。

参考文献

[1] MAMIEVA Z，POLUEKTOVA E，SVISTUSHKIN V，et al. Antibiotics，gut microbiota，and irritable bowel syndrome：what are the relations? [J]. World Journal of Gastroenterology，2022，28(12)：1204-1219.

[2] 汪家琦，康文丽，吴忠坤，等. 益生菌复合配方对小鼠肠道功能的影响[J]. 食品与机械，2022，38(8)：7-13. WANG J Q，KANG W L，WU Z K，et al. Effects of probiotics on the intestinal function in mice[J]. Food & Machinery，2022，38(8)：7-13.(in Chinese)

[3] KHALIF I L，QUIGLEY E M M，KONOVITCH E A，et al. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability

and evidence of immune activation in chronic constipation [J]. Digestive and Liver Disease, 2005, 37(11): 838-849.

[4] ZHANG X Y, YANG H B, ZHENG J P, et al. Chitosan oligosaccharides attenuate loperamide-induced constipation through regulation of gut microbiota in mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 253: 117218.

[5] LIU B H. Interpretation of Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of constipation surgery [J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery, 2017, 20(12): 1331-1333.

[6] MORISHITA D, TOMITA T, MORI S, et al. *Senna* versus magnesium oxide for the treatment of chronic constipation: a randomized, placebo-controlled trial[J]. The American Journal of Gastroenterology, 2021, 116(1): 152-161.

[7] 李梦洋，孟媛，孙庆申，等. 双歧杆菌对功能性便秘影响的研究进展[J]. 乳业科学与技术，2020，43(6)：26-30.
LI M Y, MENG Y, SUN Q S, et al. Recent progress in the alleviating effect of *Bifidobacteria* on functional constipation [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2020, 43(6): 26-30.(in Chinese)

[8] BOKIC T, STORR M, SCHICHO R. Potential causes and present pharmacotherapy of irritable bowel syndrome: an overview[J]. Pharmacology, 2015, 96(1/2): 76-85.

[9] DIMIDI E, CHRISTODOULIDES S, FRAGKOS K C, et al. The effect of probiotics on functional constipation in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2014, 100(4): 1075-1084.

[10] WANG L L, HU L J, XU Q, et al. *Bifidobacterium adolescentis* exerts strain-specific effects on constipation induced by loperamide in BALB/c mice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(2): 318.

[11] WANG L L, HU L J, XU Q, et al. *Bifidobacteria* exert species-specific effects on constipation in BALB/c mice [J]. Food & Function, 2017, 8(10): 3587-3600.

[12] DIMIDI E, SCOTT S M, WHELAN K. Probiotics and constipation: mechanisms of action, evidence for effectiveness and utilisation by patients and healthcare professionals[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2020, 79(1): 147-157.

[13] 陈雪，矫艳平，余萍，等. 植物乳杆菌HCS03-001对小鼠功能性便秘及肠道菌群的影响[J]. 中国酿造，2022，41(1)：55-58.
CHEN X, JIAO Y P, YU P, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001 on functional constipation and intestinal flora in mice[J]. China Brewing, 2022, 41(1): 55-58.(in Chinese)

[14] 张晨玥，马微微，卢慧敏，等. 植物乳杆菌CCFM8661调节肠道菌群及缓解便秘研究[J]. 食品与发酵工业，2023，49(18)：58-65.
ZHANG C Y, MA W W, LU H M, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 to regulate intestinal microbiota and relieve constipation [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(18): 58-65.(in Chinese)

[15] 陈峰，马微微，于雷雷，等. 植物乳杆菌CCFM8661增强小鼠免疫力的功能评价[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：37-43.
CHEN F, MA W W, YU L L, et al. Functional evaluation of *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM8661 for enhancing immunity in mice [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(5): 37-43.(in Chinese)

[16] 李明凯，赵丽萍，李学珍，等. 噪音环境对黄土边坡微生物群落的影响[J]. 微生物学报，2024，64(11)：4219-4233.
LI M K, ZHAO L P, LI X Z, et al. Noise affects microbial communities on loess slopes [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4219-4233.(in Chinese)

[17] 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.

[18] 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.
PENG Z R, LIU X M, NI X Q, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* F1208 on gastrointestinal functions in constipated rats[J]. Food Science, 2013, 34(13): 243-246.(in Chinese)

[19] 杜丽东，吴国泰，牛亭惠，等. 当归“润肠通便”功效物质基础的实验研究[J]. 甘肃中医药大学学报，2018，35(3)：11-16.
DU L D, WU G T, NIU T H, et al. Experimental study on the material basis of *Angelica sinensis* in "moistening intestines and relieving constipation" [J]. Journal of Gansu University of Chinese Medicine, 2018, 35(3): 11-16.(in Chinese)

[20] 唐田，沈真如，石璐，等. 植物乳杆菌P9对小鼠功能性便秘的作用及机制[J]. 食品科学，2023，44(9)：123-130.
TANG T, SHEN Z R, SHI L, et al. Effect and mechanism of *Lactiplantibacillus plantarum* P9 on functional

constipation in mice[J]. Food Science, 2023, 44(9): 123-130.(in Chinese)

[21] CHENG S, CUI H, ZHANG J, et al. Probiotic potential of *Lacticaseibacillus rhamnosus* VHProbi M15 on sucralfate-induced constipation in mice [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 1131.

[22] 黄佳铭,杨冬雪,李晓曦,等. 肠道黏膜免疫与炎症小体的研究进展[J]. 微生物与感染,2019,14(2):113-123.
HUANG J M, YANG D X, LI X X, et al. Inflammasome and intestinal mucosal immunity[J]. Journal of Microbes and Infections, 2019, 14(2): 113-123.(in Chinese)

[23] MAZZONE A, FARRUGIA G. Evolving concepts in the cellular control of gastrointestinal motility: neurogastroenterology and enteric sciences [J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2007, 36(3): 499-513.

[24] YI R K, ZHOU X, LIU T J, et al. Amelioration effect of *Lactobacillus plantarum* KFY02 on low-fiber diet-induced constipation in mice by regulating gut microbiota [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 938869.

[25] 崇洁,马继登,张进威,等. SCFAs对肠道免疫调控的研究进展[J]. 生命科学,2023,35(5):663-670.
CHONG J, MA J D, ZHANG J W, et al. Advances in the intestinal immune regulation by SCFAs [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2023, 35(5): 663-670.(in Chinese)

[26] 杨丽婷,王子微,王加启,等. 短链脂肪酸及其调节肠道炎症作用的研究进展[J]. 食品工业科技,2022,43(24):433-443.
YANG L T, WANG Z W, WANG J Q, et al. Research progress of short-chain fatty acids and its regulation of intestinal inflammation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 433-443.(in Chinese)

[27] ZHANG C L, ZHANG Y, MA K, et al. *Lactobacillus plantarum* Lp3a improves functional constipation: evidence from a human randomized clinical trial and animal model [J]. Annals of Translational Medicine, 2022, 10(6): 316.

[28] JEONG J J, GANESAN R, JIN Y J, et al. Multi-strain probiotics alleviate loperamide-induced constipation by adjusting the microbiome, serotonin, and short-chain fatty acids in rats[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1174968.

[29] QIAO Y T, QIU Z C, TIAN F W, et al. *Pediococcus acidilactici* strains improve constipation symptoms and regulate intestinal flora in mice[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 655258.

[30] 张伶俐,孙毅,陈锦,等. 产甲烷菌抑制剂对便秘小鼠结肠微生物菌群及代谢产物的影响[J]. 应用与环境生物学报,2020,26(3):506-511.
ZHANG L L, SUN Y, CHEN J, et al. Effects of methanogen inhibitor on the composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in mice with constipation[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(3): 506-511.(in Chinese)

[31] 徐海峰,刘青,张阳,等. 芬芳素诱发小鼠体内代谢的紊乱[J]. 生物技术,2024,34(6):715-721.
XU H F, LIU Q, ZHANG Y, et al. Fengycin induces metabolic disorders in mice[J]. Biotechnology, 2024, 34(6): 715-721.(in Chinese)

（责任编辑：史润东东）