

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.09.012

基于伪无菌实验与肠菌移植技术研究气滞证慢传输型便秘模型大鼠肠道菌群对肠道动力的影响

刘启鸿¹, 柯晓¹✉, 骆云丰¹, 胡露楠¹, 任彦¹, 方文怡¹, 赵培琳¹, 严锦贤^{1,2}

1. 福建中医药大学附属第二人民医院, 福建省福州市五四路 282 号, 350003; 2. 福建省医疗机构中药制剂重点实验室

[摘要] **目的** 运用伪无菌实验与肠菌移植技术, 探讨气滞证慢传输型便秘 (STC) 大鼠的肠道菌群对肠道动力的影响以及二者的关系。**方法** 24 只 Wistar 大鼠随机分为正常组 6 只、气滞证 STC 组 6 只、伪无菌组 12 只。气滞证 STC 组采用洛哌丁胺混悬液 3 mg/kg 灌胃联合夹尾刺激建立气滞证 STC 大鼠模型, 造模成功后分别采集气滞证 STC 组和正常组大鼠的新鲜粪便制备 100 mg/ml 粪菌混悬液。伪无菌组采用抗生素鸡尾酒法 (给予含杆菌肽、硫酸链霉素、硫酸新霉素各 20 mg/ml 的混合抗生素混悬液灌胃) 建立伪无菌大鼠模型, 造模成功后将大鼠随机分为正常粪菌液组、气滞证 STC 粪菌液组各 6 只, 再分别给予制备的相应大鼠粪菌混悬液 10 ml/kg 灌胃; 气滞证 STC 组大鼠给予等体积无菌水灌胃, 均每日 1 次、连续 7 天。比较气滞证 STC 组、正常粪菌液组、气滞证 STC 粪菌液组小肠推进率; ELISA 法检测血清 5-羟色胺 (5-HT) 水平; 免疫组化法检测结肠组织 5-羟色胺 3 受体 (5-HT_{3R})、5-羟色胺 4 受体 (5-HT_{4R}) 阳性表达水平; Western blot 法检测结肠组织色氨酸羟化酶 1 (TPH1)、色氨酸羟化酶 2 (TPH2)、5-羟色胺转运体 (SERT)、单胺氧化酶 A (MAO-A) 蛋白表达水平。**结果** 与正常粪菌液组比较, 气滞证 STC 组、气滞证 STC 粪菌液组大鼠小肠推进率、血清 5-HT 水平, 结肠组织 5-HT_{3R}、5-HT_{4R} 阳性表达以及 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$); 气滞证 STC 组和气滞证 STC 粪菌液组各项指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 气滞证 STC 大鼠的肠道菌群紊乱可导致肠道传输功能减慢, 其机制可能是通过影响 5-HT 的合成、转运、代谢等途径而导致肠道动力障碍。

[关键词] 慢传输型便秘; 气滞证; 伪无菌实验; 肠菌移植; 肠道菌群; 肠道动力

慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 是临床常见的功能性便秘类型, 主要以结肠传输能力减弱、传输速度减慢为特点, 多表现为排便次数减少, 便质干结^[1]。研究表明, 宿主肠道菌群失调是导致肠道功能紊乱的主要原因之一, 便秘患者肠道菌群的主要特征是有益菌相对减少, 致病菌相对增加^[2]。肠道菌群可直接作用于肠嗜铬细胞, 调控 5-羟色胺 (5-HT) 信号系统, 并作用于相应的 5-HT 受体而促进结肠收缩^[3], 因此肠道菌群失调会影响结肠传输功能。中医学认为脾胃为人体气机升降之

枢, 气机尤为影响 STC 的发生、发展, 气机阻滞乃 STC 的主要病机^[4]。前期研究发现, 气滞证是 STC 的主要证型^[5], 气滞证 STC 大鼠存在肠道菌群紊乱的现象, 其肠道菌群的丰度和多样性均低于正常大鼠^[6]。

无菌动物模型是研究肠道菌群与疾病之间因果关系的关键技术^[7], 但由于无菌动物模型建立并不容易, 如饲养环境要求高、维持成本高、配套体系不完善、制备成功率低等, 难以满足研究需要^[8]。而伪无菌动物模型可以替代无菌动物模型开展肠道菌群的相关研究, 其造模方法主要是采用抗生素鸡尾酒法, 即通过多种抗生素的联用以消除胃肠道的绝大部分微生物, 从而模拟无菌动物的肠道环境; 该模型具有造模周期短、效率高、价格低、对饲养

基金项目: 国家自然科学基金 (82274282); 福建省自然科学基金 (2021J01878); 福建省科技计划 (2023L3013); 福建省科技平台建设项目 (2021Y2010)

✉ 通讯作者: drkxkx@163.com

环境要求相对较低的优势,可满足实验需求^[9],现已成为研究肠道菌群与宿主生理、病理关系的关键模型。因此,本研究通过伪无菌实验建立气滞证STC大鼠模型,并借助肠菌移植技术观察大鼠的粪菌液对肠道动力的影响,探讨气滞证STC模型大鼠的肠道菌群对肠道动力的影响以及二者的因果关系。本研究已通过福建中医药大学动物伦理委员会审批(批准号:FJTCM IACUC 2022075)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级健康Wistar雌性大鼠30只,体质量160~180 g,6~8周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物合格证号:SCXK(沪)2022-0004。所有实验动物饲养于福建中医药大学SPF级动物房,温度22~25℃,相对湿度40%~60%,保持12 h昼夜交替,自由获得食物及无菌自来水。

1.2 药物

盐酸洛哌丁胺胶囊(规格:2 mg/粒,批号:20220302,西安杨森制药有限公司),使用无菌水配制成0.3 mg/ml的盐酸洛哌丁胺混悬液;异氟烷(批号:21122601,瑞沃德公司)。

1.3 主要试剂和仪器

活性炭(货号:2018090716)、阿拉伯树胶(货号:2018040506)、4%多聚甲醛通用型组织固定液(货号:BL539A),Biosharp生物科技有限公司;杆菌肽(货号:B8181)、硫酸链霉素(货号:S8290)、硫酸新霉素(货号:N8090),北京索莱宝科技有限公司;5-HT ELISA试剂盒(货号:MM-71127R2),江苏酶免实业有限公司;免疫显色试剂盒(货号:20190020)、DAB染色液(货号:20190028),福州迈新生物技术开发有限公司;5-羟色胺3受体(5-HT3R)抗体(货号:32946)、色氨酸羟化酶1(TPH1)抗体(货号:41508)、色氨酸羟化酶2(TPH2)抗体(货号:43424)、5-羟色胺转运体(SERT)抗体(货号:53808)、羊抗兔二抗(货号:L3012),SAB公司;5-羟色胺4受体(5-HT4R)抗体(货号:BS-2127R),Bioss公司;单胺氧化酶A(MAO-A)抗体(货号:ab126751),Abcam公司;Pusion Hot start flex 2X Master Mix(货号:M0536L),上海仪涛生物仪器有限公司;Qubit dsDNA HS测定试剂盒(货号:Q32854),Life Technologies公司;Biowest Agarose G-10(货号:111860),BIOWEST公司;50×TAE缓冲液

(货号:B548101-50),生工生物工程股份有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号:23225),Thermo Fisher公司。

石蜡包埋机(型号:JY-BMC),湖北锦源医疗科技有限公司;组织脱水机(型号:ZT-14),湖北孝感市亚光医用电子技术有限公司;石蜡切片机(型号:RM2235)、半自动化正立式金相显微镜(型号:DM4000),德国徕卡公司;酶标仪(型号:0511),Thermo scientific Milli-Q公司;超灵敏多功能成像仪(型号:Amersham Image Quant 800),美国Cytiva公司;电泳仪(型号:EPS-600),上海天能生命科学有限公司。

1.4 动物造模、分组及粪菌制备

24只Wistar雌性大鼠根据体质量采用随机数字表法为正常组6只、气滞证STC组6只、伪无菌组12只。正常组每日给予10 ml/kg无菌水灌胃,连续14天。气滞证STC组采用洛哌丁胺混悬液灌胃^[10]联合夹尾刺激^[11]建立气滞证STC大鼠模型:给予大鼠盐酸洛哌丁胺混悬液每次3 mg/kg灌胃,每日1次;夹尾刺激于每日早上9点用风尾夹包裹纱布钳夹大鼠尾部刺激1次,每次刺激30 min,灌胃和夹尾刺激均连续14天。当大鼠出现激惹、易怒、烦躁、大便干硬、排便次数减少等表现,说明造模成功^[11]。6只气滞证STC模型大鼠全部造模成功,造模结束后次日采集其新鲜粪便以及正常组大鼠新鲜粪便制备粪菌混悬液。新鲜粪菌混悬液的制备方法:将收集的各组大鼠粪便按照1 g粪便+10 ml无菌PBS溶液进行配制并搅拌均匀,每次涡旋震荡3 min,震荡5次,每次间隔15 s,然后使用200 μm的过滤网将粪便溶液过滤3次去除杂质,最后配制成浓度100 mg/ml的粪菌混悬液。将粪菌混悬液分装至15 ml无菌离心管中,置于-80℃冰箱储存备用。

伪无菌组参照文献^[9]中抗生素鸡尾酒法建立伪无菌大鼠模型:用无菌水配制成含杆菌肽、硫酸链霉素、硫酸新霉素各20 mg/ml的混合抗生素混悬液,按10 ml/kg进行灌胃,每日1次,连续7天。正常组每日给予等体积无菌水灌胃,连续7天。造模结束后次日收集大鼠粪便,通过16S rDNA测序技术对伪无菌组和正常组大鼠进行肠道菌群检测,若伪无菌组大鼠肠道中细菌的多样性及丰度明显低于正常组($P<0.05$),提示该造模方法可剔除大部分肠道菌群,说明造模成功^[9]。12只伪无菌模型大鼠全部造模成功,采用随机数字表法分为正常粪菌液组、气滞证STC粪菌液组各6只,再分别给

予制备的相应大鼠粪菌混悬液 10 ml/kg 灌胃；气滞证 STC 组大鼠给予等体积无菌水灌胃，均每日 1 次，连续 7 天。

1.5 动物取材

末次灌胃结束后禁食不禁水 24 h，取材前每只大鼠灌胃 10% 活性炭混悬液 3 ml，10 min 后立即给予 2% 异氟烷吸入麻醉，先进行腹主动脉取血，用于 ELISA 法检测；再剪开腹壁，分离并剪出从胃到盲肠的全部小肠，用于计算小肠推进率；最后收集结肠组织，将一部分结肠组织置于 4% 多聚甲醛溶液，用于免疫组化实验，另一部分结肠组织立即液氮冷冻并置于 -80 ℃ 冰箱保存，用于 Western blot 实验。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 ELISA 法检测血清 5-HT 水平 将全部大鼠所取血液静置 3 h，4 ℃、3000 r/min 离心 15 min（离心半径 12.5 cm），取上清，置于 -80 ℃ 冰箱保存。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，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绘制标准曲线，再根据标准曲线方程计算出 5-HT 水平。

1.6.2 小肠推进率 将大鼠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，即小肠推进率。小肠推进率=炭末向前推进长度/小肠全长×100%。

1.6.3 免疫组化法检测结肠组织 5-HT3R、5-HT4R 阳性表达水平 取置于 4% 多聚甲醛溶液中的结肠组织固定 48 h 后进行梯度酒精脱水、石蜡包埋。将各组远端结肠组织（距肛门 3 cm）包埋后切成厚度约为 4 μm 的组织切片，进行修复、封闭后，滴加 5-HT3R（1：100）、5-HT4R（1：100）一抗，4 ℃ 孵育过夜，滴加二抗（1：100）室温孵育 1 h，然后按照 DAB 试剂盒说明书操作，对切片进行 DAB 显色处理，经封片后在 400 倍半自动化正立式金相显微镜下每张切片随机选取 5 个视野，获取图像，采用 Image J 1.52a 软件定量分析每张图像阳性面积占比。

1.6.4 Western blot 法检测结肠组织 TPH1、TPH2、SERT、MAO-A 蛋白表达水平 各组采用随机数字表法取 3 只冻存的大鼠结肠组织 50 mg，用组织裂解液提取并收集蛋白，BCA 定量试剂盒测定蛋白含量；变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，半干转至 NC 膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭；洗膜，加入 TPH1（1：1000）、TPH2（1：1000）、SERT

（1：1000）、MAO-A（1：500）一抗，4 ℃ 震荡过夜，用含 0.25% tween-20 的 TBST 洗涤后，加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗（1：5000）孵育、洗涤后，加入 ECL 发光液，用凝胶成像系统扫描，采用 ImageJ 1.52a 软件分析条带相对灰度值。蛋白表达以 GAPDH 作为内参对照。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以均值±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，满足方差齐性多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验；方差不齐时多组间比较采用 Welch 检验，两两比较采用 Games-Howell 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠小肠推进率和血清 5-HT 水平比较

各组大鼠禁食 24 h 后，气滞证 STC 组、气滞证 STC 粪菌液组结肠中有粪便残余，正常粪菌液组结肠中无粪便残余。表 1 示，与正常粪菌液组比较，气滞证 STC 组、气滞证 STC 粪菌液组小肠推进率、血清 5-HT 水平均降低（*P* < 0.05）；气滞证 STC 组和气滞证 STC 粪菌液组上述指标比较差异均无统计学意义（*P* > 0.05）。

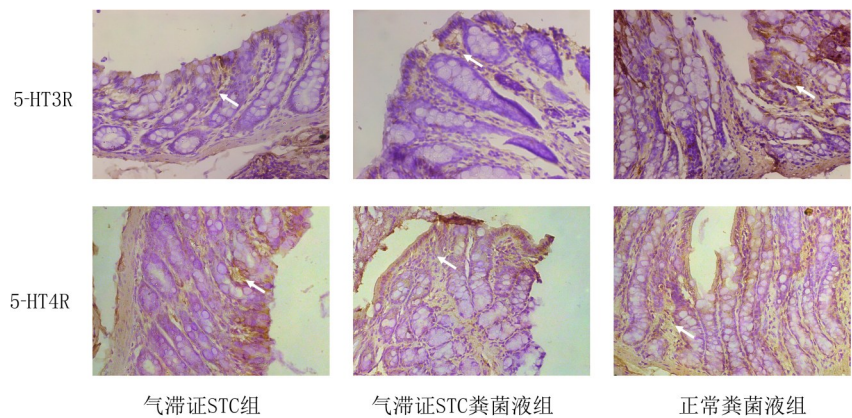
表 1 各组大鼠小肠推进率和血清 5-HT 水平比较
Table 1 Comparison of small intestinal propulsion rate and serum 5-HT level of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	小肠推进率/%	5-HT 水平/ng·ml ⁻¹
正常粪菌液组	6	76.57±4.20	12.62±2.65
气滞证 STC 模型组	6	55.52±9.08 ^{a)}	6.42±1.64 ^{a)}
气滞证 STC 粪菌液组	6	60.77±5.51 ^{a)}	7.76±1.67 ^{a)}

注：5-HT，5-羟色胺；STC，慢传输型便秘。
a) 与正常粪菌液组比较，*P* < 0.05。

2.2 各组大鼠结肠组织 5-HT3R、5-HT4R 阳性表达水平比较

显微镜下观察大鼠结肠组织 5-HT3R、5-HT4R 阳性表达情况，呈现棕黄褐色者为阳性表达，二者在黏膜层和肌层均有表达。图 1 示，正常粪菌液组大鼠结肠组织中可见大量棕黄褐色 5-HT3R、5-HT4R 阳性表达；与正常粪菌液组比较，气滞证 STC 组、气滞证 STC 粪菌液组大鼠结肠组织 5-HT3R、5-HT4R 阳性表达较为松散，着色较浅。表 2 示，与正常粪菌液组比较，气滞证 STC 组、气滞证 STC 粪菌液组大鼠结肠组织 5-HT3R、5-HT4R 阳性表达均降低（*P* < 0.05）；气滞证 STC 组和气滞证 STC 粪菌液组上述指标比较差异均无统计学意义（*P* > 0.05）。



注：白色箭头指向表示阳性细胞；5-HT3R，5-羟色胺3受体；5-HT4R，5-羟色胺4受体；STC，慢传输型便秘。

图1 各组大鼠结肠组织5-HT3R、5-HT4R阳性表达情况（免疫组化法，×400）

Figure 1 Positive expression of 5-HT3R and 5-HT4R in colon tissue of rats (immunohistochemistry, ×400)

表2 各组大鼠结肠组织5-HT3R、5-HT4R阳性表达水平比较

Table 2 Comparison of positive expression levels of 5-HT3R and 5-HT4R in colon tissue of rats (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	5-HT3R	5-HT4R
正常粪菌液组	6	34.67±3.04	41.40±0.40
气滞证STC组	6	24.50±4.36 ^{a)}	27.94±2.67 ^{a)}
气滞证STC粪菌液组	6	26.03±3.06 ^{a)}	32.94±1.93 ^{a)}

注：5-HT3R，5-羟色胺3受体；5-HT4R，5-羟色胺4受体；STC，慢传输型便秘。

a) 与正常粪菌液组比较， $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠结肠组织TPH1、TPH2、SERT、MAO-A蛋白表达比较

表3示，与正常粪菌液组比较，气滞证STC组、气滞证STC粪菌液组大鼠结肠组织TPH1、TPH2、SERT、MAO-A蛋白表达均降低（ $P < 0.05$ ）；气滞证STC组和气滞证STC粪菌液组各蛋白表达比较差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。各组大鼠结肠组织TPH1、TPH2、SERT、MAO-A蛋白表达电泳图见图2。

3 讨论

5-HT是参与调控胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质^[12]，其对肠道功能的特异性调节依赖

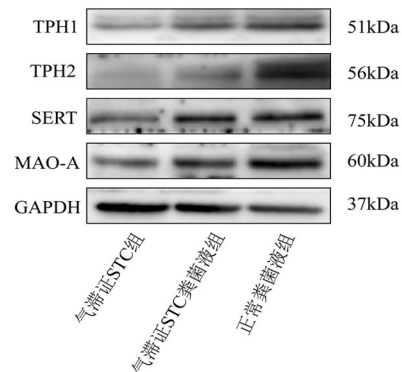
表3 各组大鼠结肠组织TPH1、TPH2、SERT、MAO-A蛋白表达水平比较

Table 3 Comparison of TPH1, TPH2, SERT and MAO-A protein expression levels in colon tissue of rats (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TPH1	TPH2	SERT	MAO-A
正常粪菌液组	3	1.42±0.31	1.54±0.42	1.34±0.37	1.37±0.28
气滞证STC组	3	0.65±0.30 ^{a)}	0.38±0.14 ^{a)}	0.42±0.32 ^{a)}	0.57±0.07 ^{a)}
气滞证STC粪菌液组	3	0.75±0.10 ^{a)}	0.62±0.21 ^{a)}	0.67±0.10 ^{a)}	0.75±0.16 ^{a)}

注：TPH1，色氨酸羟化酶1；TPH2，色氨酸羟化酶2；SERT，5-羟色胺转运体；MAO-A，单胺氧化酶A；STC，慢传输型便秘。

a) 与正常粪菌液组比较， $P < 0.05$ 。



注：TPH1，色氨酸羟化酶1；TPH2，色氨酸羟化酶2；SERT，5-羟色胺转运体；MAO-A，单胺氧化酶A；STC，慢传输型便秘。

图2 各组大鼠结肠组织TPH1、TPH2、SERT、MAO-A蛋白电泳图

Figure 2 Protein electropherogram of TPH1, TPH2, SERT and MAO-A in rat colon tissues

于不同受体的亚型，其中5-HT3R、5-HT4R主要分布于消化道，与乙酰胆碱的释放有关，并与胃肠道动力存在紧密联系^[13]。5-HT3R属于配体门控阳离子通道受体，激活后可导致细胞膜去极化、增加胞内Ca²⁺浓度并促进神经递质乙酰胆碱的释放，从而促进肠道平滑肌收缩^[14]。5-HT4R属于G蛋白偶联

受体,在结肠黏膜下及肌间神经丛中均有表达,激活后能够打开电压敏感性钙通道,促进P物质、乙酰胆碱等神经递质释放,使结肠平滑肌细胞收缩,以调节结肠平滑肌的运动^[15]。

5-HT信号系统包括5-HT的合成、转运和代谢,其中色氨酸羟化酶(TPH)、SERT和MAO-A是影响5-HT信号系统的重要指标。TPH在5-HT的合成过程中发挥催化酶的作用,可作为反映5-HT合成的间接指标^[16]。TPH包括2种亚型,TPH1在非神经元细胞中表达,主要是在肠嗜铬细胞;TPH2在神经元细胞中表达,主要是在肠神经元及中枢神经元。生理情况下,色氨酸在TPH催化下生成5-羟色氨酸,再经左旋芳香氨基酸脱羧酶的作用形成5-HT,存于细胞内^[17]。SERT是一种跨膜转运蛋白,对5-HT具有高度亲和力,可将5-HT重新摄取存于细胞内而使其失活,终止其生理作用^[18]。若5-HT不能及时失活,导致细胞外的5-HT堆积过多,进而产生毒性作用,使受体敏感性下降,则5-HT与受体结合的亲和力减弱^[19]。细胞外5-HT除被再摄取外,也可被单胺氧化酶(MAO)代谢降解^[20],并随着尿液排出体外。MAO是5-HT代谢过程中的关键酶,其中MAO-A对5-HT具有较高亲和力,是调控5-HT水平的重要因素^[21]。综上,5-HT的合成与分泌增加有助于促进肠道动力,5-HT的转运与代谢增加有助于避免5-HT堆积引起受体敏感性下降,TPH1、TPH2、SERT、MAO-A等指标正常有助于维持5-HT的动态平衡,若该平衡被打破,会导致肠道动力、分泌等一系列功能紊乱。

本研究选取“杆菌肽+硫酸链霉素+硫酸新霉素”组合的抗生素鸡尾酒法进行伪无菌大鼠造模,模拟肠道无菌环境,为肠菌移植奠定了研究基础。根据前期研究^[6]结果,气滞证STC大鼠存在肠道菌群紊乱的表现,肠道菌群的丰度和多样性较正常组降低,5-HT及其受体表达水平降低。但气滞证STC的肠道动力障碍是否由菌群紊乱所致尚不清楚,故本研究针对该问题进行实验探索,为中医病证结合的发病机制提供实验依据。本研究通过建立伪无菌大鼠模型和肠菌移植技术推断肠道菌群与肠道动力的因果关系。实验结果表明,气滞证STC组和气滞证STC粪菌液组大鼠的小肠推进率、血清5-HT以及结肠组织5-HT_{3R}、5-HT_{4R}、TPH1、TPH2、SERT、MAO-A蛋白表达水平较正常大鼠粪菌液组呈现降低趋势,且气滞证STC组和气滞证STC粪菌液组上述指标比较均无明显差异,提示气滞证STC大鼠的肠道菌群紊乱可导致肠道传输功能减慢,即

肠道菌群紊乱是因,肠道动力障碍是果,其作用机制与影响5-HT的合成、转运及代谢密切相关。

综上,伪无菌大鼠移植气滞证STC大鼠的粪菌液后出现肠道推进率下降,5-HT及其受体表达水平降低,且这些表现均与气滞证STC大鼠相似。气滞证STC大鼠肠道菌群紊乱导致肠道动力障碍的机制与5-HT信号系统密切相关,可能是通过影响5-HT合成、转运、代谢等途径而引起肠道动力的改变。本研究证实了气滞证STC大鼠肠道菌群会导致肠道动力减慢,但是未能明确气滞证STC的特定菌群以及5-HT信号系统在肠道菌群影响肠道动力中的具体介导机制,仍需进一步研究。

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]DE VADDER F, GRASSET E, MANNERÅS HOLM L, et al. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(25):6458-6463.
- [3]WANG SZ, YU YJ, ADELI K. Role of gut microbiota in neuroendocrine regulation of carbohydrate and lipid metabolism via the microbiota-gut-brain-liver axis [J]. Microorganisms, 2020, 8(4):527-548.
- [4]陈霞,王华宁.从滞论治慢传输型便秘[J].云南中医杂志,2014,35(10):30-32.
- [5]蔡雪红,柯晓.福州地区慢传输型便秘患者中医证型分布规律研究[C]//中国中西医结合学会.第三十届全国中西医结合消化系统病学术会议论文集.郑州:中国中西医结合学会,2018:284-285.
- [6]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.
- [7]杜然浩,宋刚,赵吉春.从相关到因果:运动与肠道菌群-肠-脑轴[J].中国体育科技,2020,56(11):78-83.
- [8]LI J, WEI H. Establishment of an efficient germ-free animal system to support functional microbiome research [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(10):1400-1403.
- [9]李建香,王君君,黄天马,等.无菌鼠模型制作方法与评价[J].实验动物科学,2022,39(3):67-69,73.
- [10]黄亚娟,蒋士生,向燕芳.洛哌丁胺对大鼠慢传输型便秘模型的稳定性研究[J].湖南中医杂志,2020,36(7):153-156.
- [11]汤水华,李思汉,林翔英,等.理气通便方对功能性便秘气滞证大鼠脑肠肽的影响[J].北京中医药大学学报,2021,44(7):615-624.
- [12]刘启鸿,胡剑云,王宁馨,等.5-羟色胺信号系统的研究概况[J].医学综述,2021,27(11):2099-2103.

- [13] YU Y, CHEN JH, LI H, et al. Involvement of 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in colonic motor patterns in rats[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2015, 27(7):914–928.
- [14] KATO S. Role of serotonin 5-HT₃ receptors in intestinal inflammation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(9):1406–1409.
- [15] GU Y, QIN X, ZHOU G, et al. Lactobacillus rhamnosus GG supernatant promotes intestinal mucin production through regulating 5-HT₄R and gut microbiota[J]. *Food Funct*, 2022, 13(23):12144–12155.
- [16] GRASBERGER H, CHANG L, SHIH W, et al. Identification of a functional TPH1 polymorphism associated with irritable bowel syndrome bowel habit subtypes[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(11):1766–1774.
- [17] ISRAELYAN N, DEL COLLE A, LI Z, 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, e4.
- [18] YANG D, GOUAUX E. Illumination of serotonin transporter mechanism and role of the allosteric site[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(49):eabl3857. doi:10.1126/sciadv.abl3857.
- [19] KRISTENSEN AS, ANDERSEN J, JORGENSEN TN, et al. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation[J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(3):585–640.
- [20] CAO H, LIU X, AN Y, et al. Dysbiosis contributes to chronic constipation development via regulation of serotonin transporter in the intestine[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10322.
- [21] MIALET-PEREZ J, SANTIN Y, PARINI A. Monoamine oxidase-A, serotonin and norepinephrine: synergistic players in cardiac physiology and pathology[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018, 125(11):1627–1634.

Study on the Effect of Intestinal Flora on Intestinal Motility in Rats with Slow Transit Constipation of *Qi* Stagnation Pattern Based on Pseudo-Sterile Experiment and Fecal Microbiota Transplantation

LIU Qihong¹, KE Xiao¹, LUO Yunfeng¹, HU Lunan¹, REN Yan¹, FANG Wenyi¹, ZHAO Peilin¹, YAN Jinxian^{1,2}

1. Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350003; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Preparation in Medical Institutions

ABSTRACT Objective To clarify the relationship between intestinal flora and intestinal motility in rats with slow transit constipation (STC) and *qi* stagnation syndrome by conducting a pseudo-sterile experiment and fecal microbiota transplantation (FMT) technology. **Methods** Twenty-four Wistar rats were randomly divided into normal group (n=6), STC with *qi* stagnation pattern group (n=6) and pseudo-sterile group (n=12). In the STC group with *qi* stagnation pattern, 3 mg/kg of loperamide suspension by intragastric administration combined with tail clamping stimulation were performed to establish the rat model of STC with *qi* stagnation pattern. After successful modeling, fresh feces from the rats in the STC with *qi* stagnation pattern group and the normal group were collected to prepare 100 mg/ml of fecal bacterial suspension. In the pseudo-sterile group, the antibiotic cocktail method was used (a mixed antibiotic suspension containing bacitracin, streptomycin sulfate, and neomycin sulfate at 20 mg/ml each was administered intragastrically) to establish pseudo-sterile rats model. After successful modeling, the rats were randomly divided into normal fecal bacterial liquid group and STC with *qi* stagnation pattern fecal bacterial liquid group, with six rats in each group, and then were given 10 ml/kg of the prepared corresponding rat fecal bacterial suspension by gavage. Rats in STC with *qi* stagnation pattern group were given an equal volume of sterile water by gavage. All groups were administered once a day for 7 consecutive days. The small intestinal propulsion rate of the STC with *qi* stagnation pattern group, the normal fecal bacterial liquid group, and STC with *qi* stagnation pattern fecal bacterial liquid group were compared. ELISA method was used to detect serum 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression levels of 5-hydroxytryptamine 3 receptor (5-HT₃R) and 5-hydroxytryptamine 4 receptor (5-HT₄R) in colon tissue. Western blot method was used to detect the protein expression levels of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), serotonin transporter (SERT), and monoamine oxidase A (MAO-A) in colon tissue. **Results** Compared to those in the normal fecal bacterial liquid group, the small intestinal propulsion rate, serum 5-HT level, positive expression of 5-HT₃R and 5-HT₄R in colon tissue, and protein expression of TPH1, TPH2, SERT and MAO-A significantly decreased in the STC with *qi* stagnation pattern group and STC with *qi* stagnation pattern fecal bacterial liquid group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the indicators between the STC with *qi* stagnation pattern group and STC with *qi* stagnation pattern fecal bacterial liquid group ($P > 0.05$). **Conclusion** The intestinal flora in STC rats with *qi* stagnation pattern can lead to a slowdown in intestinal transmission function, whose mechanism may be related to intestinal motility disorders affected by the synthesis, transport, metabolism and other pathways of 5-HT.

Keywords slow transit constipation; *qi* stagnation pattern; pseudo-sterile experiment; fecal microbiota transplantation; intestinal flora; intestinal motility

(收稿日期: 2023-11-17; 修回日期: 2024-02-09)

[编辑: 王利芬]