

香蕉皮提取物通过调节肠道菌群和肠神经递质水平提高便秘模型小鼠肠动力

沈雨萍¹, 胡琴¹, 孙力军^{1*},
廖建萌^{2*}, 房志家¹, 邓旗¹, 孙东方¹, 王晨¹

¹广东海洋大学食品科技学院; ²湛江市场监管局食品药品监督检测所, 湛江 524008

摘要:探究香蕉皮提取物对便秘小鼠肠动力的干预作用。本研究采用混合抗生素溶液构建便秘小鼠模型。用香蕉皮提取物溶液对便秘小鼠进行干预,并测定其对便秘小鼠的肠道菌群、肠神经递质水平和肠动力的影响。结果表明,高浓度香蕉皮提取物组小鼠的粪便含水量增加了137.5%、小肠推进率增加了3.4倍、首粒黑便排出时长减少了73.7% ($P < 0.05$),且基本恢复到空白组小鼠水平。便秘模型小鼠菌群紊乱,部分有益菌缺失,经低浓度香蕉皮提取物干预后,属水平上 *Trabulsiella* (特布尔西菌属) 和 *Unclassified-f-Enterobacteriaceae* 的相对丰度增加了6倍,肠道 *Bacteroides* (拟杆菌属) 的相对丰度减少了94.4%。在神经递质中,低浓度香蕉皮提取物组小鼠的去甲肾上腺素、多巴胺、 γ -氨基丁酸、乙酰胆碱的浓度显著增加了6.1%、17.6%、63.7%、52.6%。以上结果表明,香蕉皮提取物可调节肠道菌群和肠神经递质水平提高便秘小鼠肠动力。

关键词:香蕉皮;肠道菌群;神经递质;肠动力;便秘

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)5-0750-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.5.003

Banana peel extract improves intestinal motility of constipation model mice by regulating intestinal flora and intestinal neurotransmitter levels

SHEN Yu-ping¹, HU Qing¹, SUN Li-jun^{1*},
LIAO Jian-meng^{2*}, FANG Zhi-jia¹, DENG Qi¹, SUN Dong-fang¹, WANG Chen¹

¹College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University;

²Food and Drug Supervision and Testing Institute of Zhanjiang Market Supervision Bureau, Zhanjiang 524008, China

Abstract: To explore the effect of banana peel extract on intestinal motility in constipated mice. In this study, the mice model of constipation was established with the mixed antibiotic solution. The effects of banana peel extract on intestinal flora, intestinal neurotransmitter and intestinal motility of constipated mice were measured. The results showed that the fecal water content increased by 137.5%, the intestinal propulsion rate increased by 3.4 times, and the first black stool excretion time decreased by 73.7% ($P < 0.05$) in the high-concentration banana peel extract group, which basically recovered to the level of the blank group. The phyla horizontal flora was disordered and some beneficial bacteria were missing in the constipation model mice. After the intervention of low concentration banana peel extract, the relative abundance of *Trabulsiella* and *Unclassified-f-Enterobacteriaceae* increased by 6 times, the relative abundance of intestinal *Bacteroides* decreased by 94.4%. Furthermore, the concentrations of norepinephrine, dopamine, gamma-aminobutyric acid and acetylcholine of neurotransmitters were significantly increased by 6.1%, 17.6%, 63.7% and 52.6%. These results indicated that banana peel extract could regulate intestinal flora and intestinal neurotransmitter levels to improve intestinal motility in constipated mice.

Key words: banana peel; intestinal flora; neurotransmitter; intestinal motility; constipation

便秘是一种常见的内消化道疾病,主要表现为排便困难、次数减少且无规律,消化不良,经常会伴生多种并发症,如抑郁症、糖尿病等疾病^[1],年龄、性别、个人嗜好、滥用药物等因素均会诱发便秘。现有的治疗手段主要有生活方式干预、药物治疗和物理治疗^[2]。传统泻药是最常见的药物治疗方法,但其药物副作用大,药物有效期短,还会产生强烈的药物依赖性;生活方式则干预周期长,难以起到立竿见影的效果,大部分患者都难以坚持,导致最终治疗效果不佳。

临床研究显示,便秘通常是由于粪便在肠道中通过速度慢导致粪便脱水、变硬和干燥所诱发。其形成的原因较为复杂,但主要与结肠传输功能紊乱有关^[3]。近期的研究表明,肠道传输功能与肠道菌群和肠神经递质紊乱存在一定联系,但它们之间的相关性尚不完全明确,尚缺乏针对提高肠动力治疗便秘的药物筛选研究。因此,探明肠道传输功能与肠道菌群和肠神经递质之间的关系对于阐明便秘的发生机制及推动高效低毒治疗药物的开发具有重要的理论价值。

香蕉皮中含有丰富的膳食纤维、氨基酸、多糖、多酚和不饱和脂肪酸等成分,具有改善便秘的作用^[4],但是香蕉皮提取物的便秘调节机制尚不清楚,以及其是否具有提高肠动力的功能仍需要进行实验探究。本研究拟通过香蕉皮提取物对便秘模型小鼠进行口服干预,探究香蕉皮提取物对便秘小鼠肠动力的作用及其机制,为进一步开发香蕉皮高效防控便秘活性功能产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 实验动物饲养与管理

SPF级6周龄雌性C57BL/6J小鼠共42只,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,自由获取Co60辐照灭菌的全价配合饲料进行喂养(营养成分按照GB 14924.3-2001要求),动物实验方案严格按照广东海洋大学动物实验伦理委员会的相关规定(SYXK2014-0053)制定和执行。

1.1.2 实验材料与设备

岛津LCMS-8030超快速液相色谱串联质谱仪(岛津国际贸易(上海)有限公司,日本)、Centrisa rtg-16C高速冷冻离心机(赛多利斯科学仪器有限公司,中国)、超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公

司,中国)、乙酰胆碱(美国Sigma公司);5-羟色胺、多巴胺、 γ -氨基丁酸、去甲肾上腺素、谷氨酸(北京索莱宝科技有限公司)。

1.1.3 香蕉皮提取物溶液的制备

参考前人研究并适当改良^[5,6],以香蕉皮为原料,50℃烘干,粉碎,过40目筛,分别用80%的硝酸钙溶液、70%乙醇溶液提取离心后,浓缩,喷雾干燥后得粉末状香蕉皮提取物(73.7%多糖,14.5%水分,9.6%蛋白)。按照体积浓度比(g/mL)配置,高浓度香蕉粉体积浓度0.32 g/mL,低浓度香蕉粉体积浓度0.16 g/mL。按每日的小鼠总体重称取香蕉皮粉末,按浓度比加灭菌生理盐水,37±0.5℃超声波清洗仪超声溶解,现配现用,使用前摇匀。

1.2 实验方法

1.2.1 便秘模型的建立

参考本团队已有实验方法^[7],实验组先灌胃低浓度抗生素(62.5 mg/mL)4 d,后继续灌胃高浓度抗生素(125 mg/mL)3 d,以建立了便秘小鼠模型。

1.2.2 实验设计

本研究共分空白对照组(MB)、便秘模型组(MD)、低浓度低聚果糖组(GTL)、高浓度低聚果糖组(GTH)、低浓度香蕉皮提取物组(XJL)、高浓度香蕉皮提取物组(XJH)6组,MB组小鼠继续作全阶段空白组灌胃无菌生理盐水。将上述建模后的便秘组小鼠随机重新分为5组,每组6只。MD组灌低浓度混合抗生素悬液,香蕉皮提取物灌胃浓度为3.2 g/kg·BW(XJH),香蕉皮提取物灌胃浓度为1.6 g/kg·BW(XJL),阳性对照组低聚果糖灌胃浓度为1.6 g/kg·BW(GTH)和低聚果糖灌胃浓度为0.8 g/kg·BW(GTL),连续灌胃7 d,正常提供无菌饲料和水。

1.2.3 指标测定方法

1.2.3.1 小肠推进率的测定(intestinal propulsive rate, IPR)

灌胃墨汁30 min后,脱颈椎法处死小鼠,解剖并剪取从幽门至回盲部位的肠管,记录每组6只墨汁推进长度占小鼠总全肠百分比。墨汁采用100 g阿拉伯树胶加800 mL水煮沸后,加100 g活性炭煮沸三次,现配现用,使用前摇匀^[6]。

1.2.3.2 首粒黑便排出时长(first black stool excretion time, FSE)

按小鼠体重比灌胃墨汁后,记录每组6只小鼠从灌胃开始到首粒黑便排出时间^[7]。

1.2.3.3 粪便含水量的测定

每天采集每组小鼠的所有粪便,将粪便放烘箱 80 °C 烘 8 h,取出放干燥器冷却 30 min,用分析天平称重后,再放烘箱 80 °C 烘 30 min,比较两次差值,若小于 2 mg,则为恒重,若大于 2 mg,则继续烘干至恒重为止。干燥前的净重减干燥后的净重的差占干燥前的净重的比值为粪便含水量^[7]。

1.2.3.4 小鼠肠道中神经递质的测定

脱颈椎法处死小鼠后,在冰浴中取 6 只小鼠肠道组织样品,精密称重,加冰冷的 0.2% 甲酸-水至 2

mL,搅碎,冰浴超声,取匀浆液 1 mL,加冰冷的 0.2% 甲酸-乙腈 1 mL,混匀后 4 °C 冰箱静置 30 min。用 RC6 Plus 高速冷冻离心机在 4 °C,4 000 r/min 离心 20 min,取上清液,过膜,用 LCMS-8030 高效液相色谱串联质谱仪(参数和洗脱梯度见表 1、表 2)对乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)进行检测,流动相 A:0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 甲醇^[8,9]。

表 1 神经递质测定的参数设置

Table 1 Parameters setting on the determination of neurotransmitter

神经递质 Neurotransmitter	前体离子与产物离子 Precursor ion and product ion(<i>m/z</i>)	Q1 偏转电压 Q1 deflection voltage (V)	碰撞能量 Collision Energy (eV)	Q3 偏转电压 Q3 deflection voltage (V)
DA	154.0→137.0	16	12	23
5-HT	177.0→160.1	18	12	29
ACh	146.0→87.0	30	14	30
GABA	104.0→69.0	20	18	26
Glu	148.0→84.0	15	18	30
NE	170.0→152.1	18	10	26

表 2 神经递质洗脱梯度设置

Table 2 The elution gradient setting of neurotransmitter

时间 Time (min)	流动相 A Flow phase A (%)	流动相 B Flow phase B (%)
0.01	30.0	70.0
3.00	95.0	5.0
6.00	95.0	5.0
6.10	30.0	70.0
10.00	30.0	70.0

1.2.3.5 肠道菌群的测定

每只小鼠取粪便 1、2 粒置于样本裂解液中,放 80 °C 冰箱保存,用 16s rRNA 基因测序,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。包括:(1)各分类水平组成分析;(2)样本差异分析。由杭州谷禾信息技术有限公司完成。

1.3 统计分析

采用 Origin 2018 作图分析和 SPSS 21.0 对数据

进行统计分析和相关性分析,多重比较采用单因素方差分析,组间比较采用多重检验的 Turkey HSD,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 香蕉皮提取物对便秘模型小鼠粪便形态的影响

由图 1 可知,MD 组与 MB 组小鼠的粪便外观形状存在显著形态学差异,对比 MB 组(见图 1a),MD 组(见图 1b)粪便粒型较细小,颜色较深甚至发黑,触感较为坚硬,MB 组粪便粒型大,颜色较浅呈黄褐色,触感较软。图 1c 为 XJL 组的粪便形态,与 MB 组无显著性差异。

2.2 香蕉皮提取物对便秘模型小鼠表观指标的影响

由图 2 可知,经混合抗生素灌胃 7 d 后,对比 MB 组,MD 组小鼠饲料消耗量(见图 2A)、粪便数量(见图 2B)和粪便含水量(见图 2D)均分别显著降低 54.1%、73.9% 和 53.9% ($P < 0.05$)。经香蕉皮提取物干预 7 d 后,对比 MD 组,XJL 组和 XJH 组饲

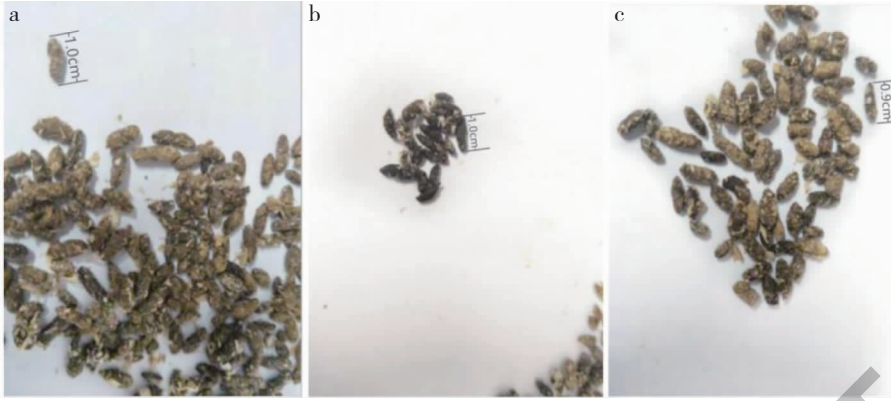


图1 香蕉皮提取物干预后对便秘小鼠粪便形态的影响

Fig. 1 Effect of banana peel powder intervention on fecal morphology in constipated mice

注:a;MD组;b;MB组;c;XJL组。Note:a;MD group;b;MB group;c;XJL group.

料消耗量显著增加了 69.4% 和 102.9% ($P < 0.05$),粪便含水量显著增加 108.3% 和 137.5% ($P < 0.05$),对比阳性对照组和 MB 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。香蕉皮提取物干预组和阳性对照组粪

便数量相对于 MD 组显著增加 ($P < 0.05$) (见图 2C),其中 XJL 组粪便总数显著增加 397% ($P < 0.05$)。表明香蕉皮提取物显著改善便秘模型小鼠的粪便质量和排便功能。

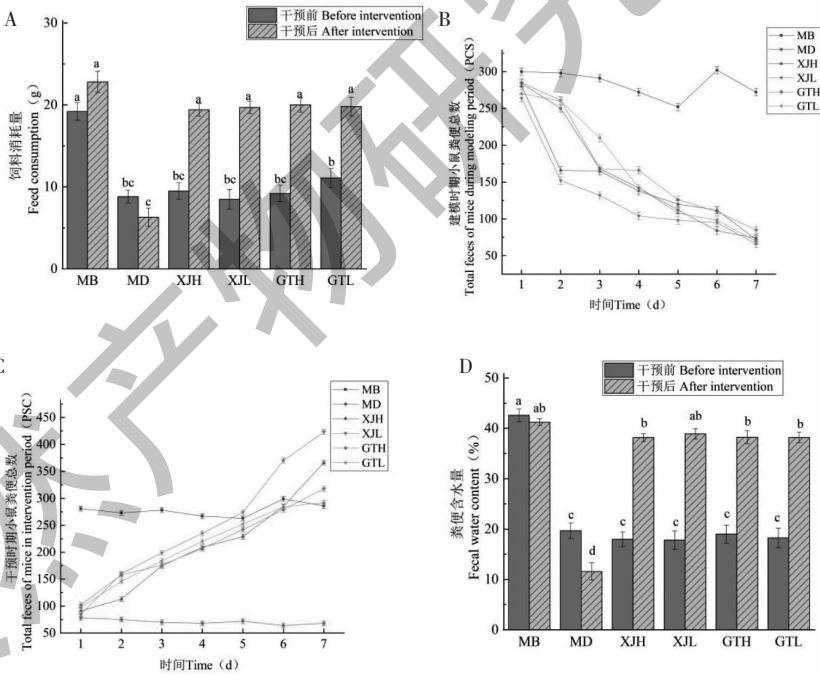


图2 干预前后各组小鼠饲料消耗量、粪便总数及含水量参数的变化

Fig. 2 Effect of feed consumption, total feces and total water content, parameters of mice in each group before and after intervention

注:不同小写字母表示存在显著性差异, $P < 0.05$,下同。Note:Different lowercase letters indicate significant differences, $P < 0.05$, the same below.

2.3 香蕉皮提取物对便秘模型小鼠胃肠蠕动的影响

由图 3A 可知,对比 MB 组,MD 组的 IPR 显著降低了 76.9%,FSE 显著增加了 206.9% (见图 3B),均显著性低于 MB 组 ($P < 0.05$)。经干预后,

对比 MD 组,XJL 组和 XJH 组的 IPR 显著提高 3.4 倍、FSE 分别减少 61.4%、73.7%,FSE 减少率大于阳性对照组的 51.4%、64.1%,与 MB 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

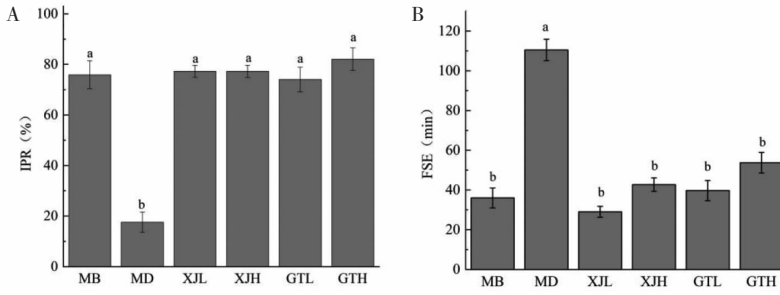


图3 干预后各组小鼠 IPR 及 FSE 功能参数的比较差异

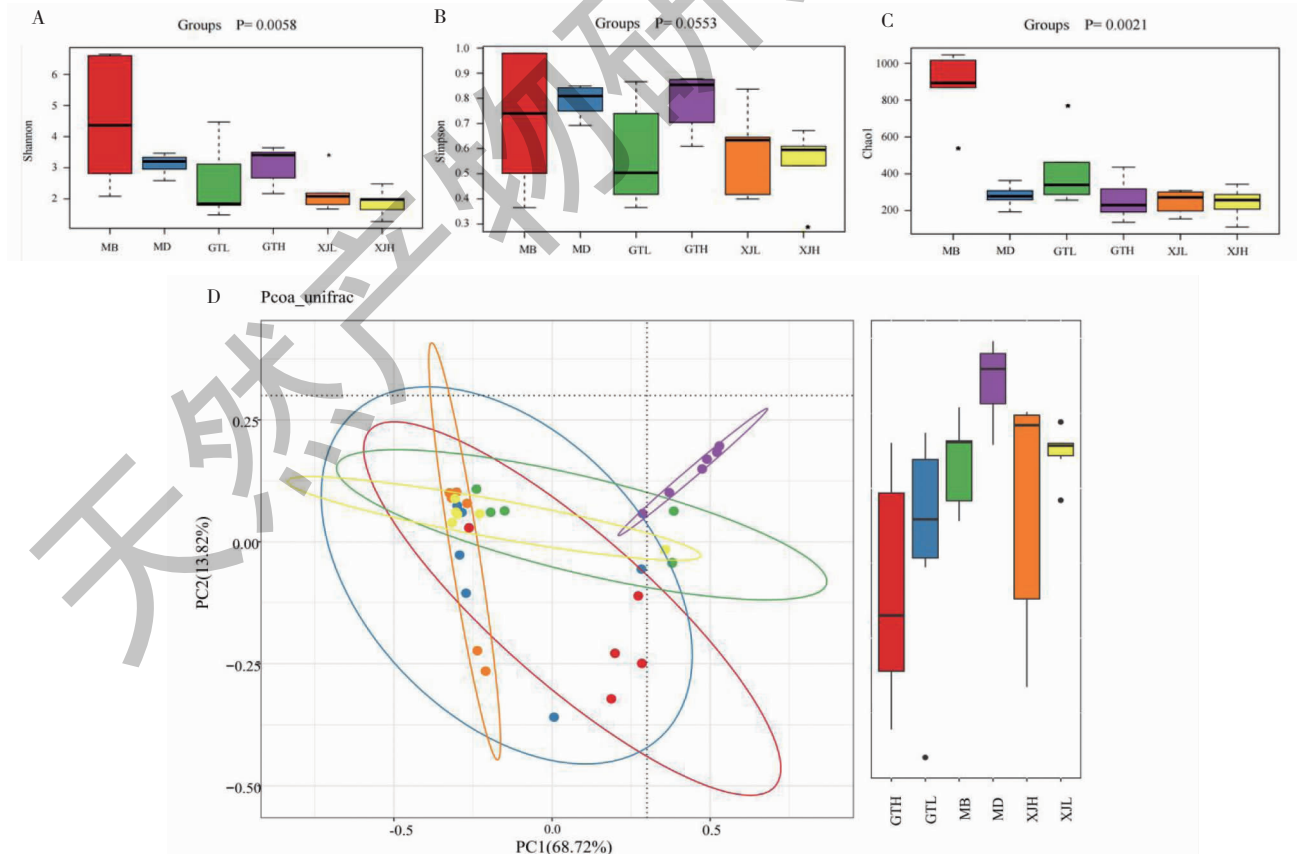
Fig. 3 Comparison of functional parameters of IPR and FSE in each group of mice after intervention

2.4 香蕉皮提取物对便秘模型小鼠肠道菌群结构的影响

2.4.1 香蕉皮提取物对便秘模型小鼠肠道菌群多样性的影响

由图 4F 可知, OTU 数量存在显著性组间差异, 在图 4E 中, MB 组小鼠肠道菌群的 OTU 数量显著高于其他组, 丰度等级曲线平缓且长, 群落丰富度高, 对比 MD 组, GTL 组、XJL 组及 GTH 组的折线更缓更长, 其菌群 OTU 数、菌群均匀度、菌群丰富度均高于 MD 组, 并逐渐趋于 MB 组。由图 4~4C 可知,

对比 MB, MD 组的 Shannon 指数和 Chao 1 指数均显著降低 ($P < 0.05$), Simpson 指数升高。对比 MD 组, GTL 组的 Chao 1 指数有所上升, 而 GTH 组、XJL 组与 XJH 组无较大变化, 而 GTL 组、XJL 组与 XJH 组的 Simpson 指数降低。由图 4D 可知, MB 与 MD 两组间的置信椭圆重合部分少, 有显著性差异, 经干预后, 干预组样本置信椭圆的距离与 MB 组拉近, 有较大的重合部分。表明便秘小鼠肠道菌群多样性降低, 香蕉皮提取物可改善便秘模型小鼠的肠道菌群丰富度和均匀度。



续图 4 (Continued Fig. 4)

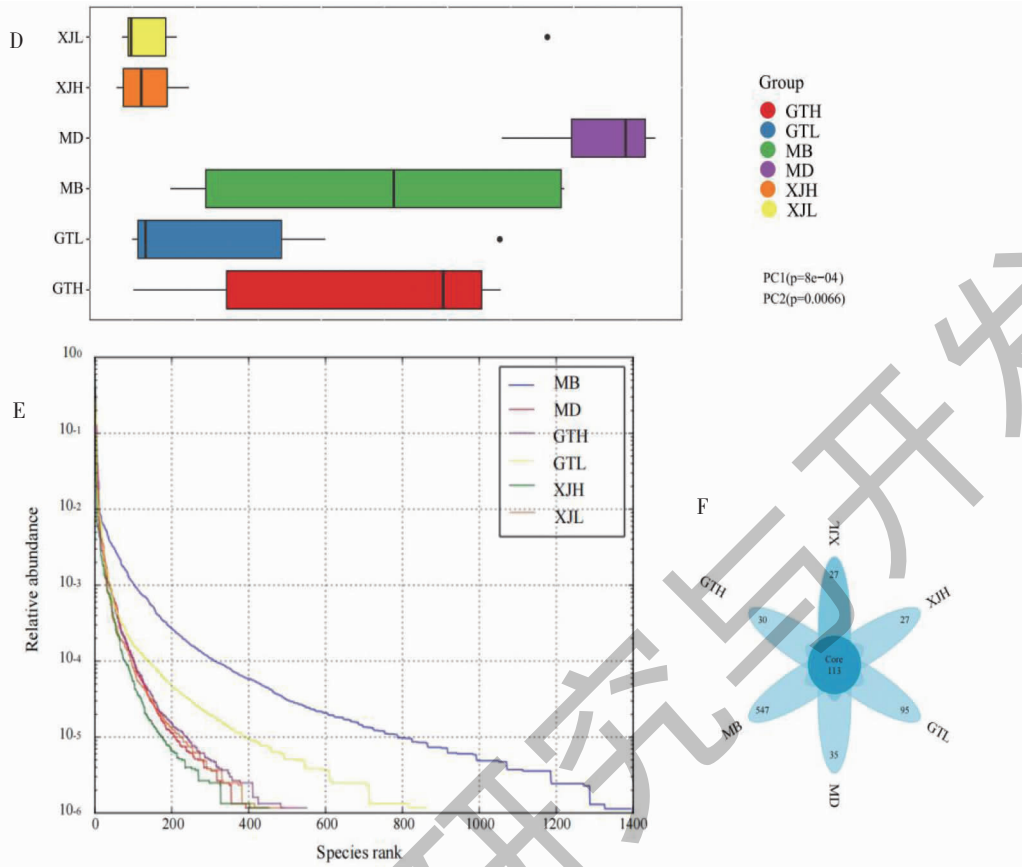


图 4 干预后各组小鼠 OTU 数、丰度等级曲线及 beta 多样性的比较差异

Fig. 4 Comparison of OTUs, abundance grade curve and beta diversity of mice in each group after intervention

注: A ~ C; 组间 beta 多样性的比较; D: 组间置信椭圆的比较; E: 组间丰度等级曲线比较; F: 组间 Venn 图。Note: A-C; Comparison of beta-diversity between groups; D: Comparison of confidence ellipses between groups; E: Comparison of abundance grade curves between groups; F: Inter-group Venn diagram.

2.4.2 香蕉皮提取物干预后便秘模型小鼠肠道菌群的影响

门水平分类下, 对比 MB 组, MD 组中小鼠的拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 比例占菌群丰度的 89.3% (见表 3), 是典型肠道紊乱特征之一。由图 5 可知, Bacteroidetes 为优势菌, 变形杆菌门 (Proteobacteria) 的相对丰度下降了 73.2%, 疣微菌门 (Verrucomicrobia)、放线菌门 (Actinobacte-

ria) 缺失。香蕉皮提取物干预后, 小鼠肠道菌群的结构显著改善 ($P < 0.05$), XJL 组中, Bacteroidetes 的相对丰度降低 87.2%, Proteobacteria 的相对丰度显著增加 6 倍 ($P < 0.05$), 其中 Verrucomicrobia、Actinobacteria 菌门显著增加 5.4%、0.2%。对比 MD 组, XJH 组 Firmicutes 菌门的相对丰度减少 41.8%, Verrucomicrobia、Actinobacteria 菌门分别提高 0.6%、0.2%, Proteobacteria 菌门的相对丰度显著提

表 3 干预后各组小鼠的门水平菌群占比组成比较

Table 3 Comparison of the proportion of microflora at the phylum level of mice in each group after intervention

门水平菌群 Microflora at the phylum level	MB	MD	XJL	XJH	GTL	GTH
拟杆菌门 Bacteroidetes	28.20%	72.80%	9.30%	0.10%	9.00%	21.10%
厚壁菌门 Firmicutes	31.20%	16.50%	10.80%	9.60%	13.70%	14.30%
B/F (Bacteroidetes /Firmicutes)	90.38%	441.21%	86.11%	1.04%	65.69%	147.55%

高 8 倍 ($P < 0.05$), 较阳性对照组显著增加 43.1% ($P < 0.05$)。由表 3 可知, MD 组的 B/F 较 MB 组显著增加 4 倍 ($P < 0.05$)。香蕉皮提取物干预后, 小

鼠 B/F 比值恢复与 MB 组接近, 以低浓度香蕉皮提取物对肠道菌群的调节效果较好。

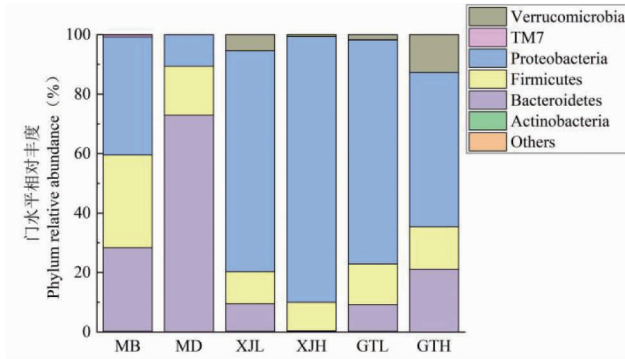


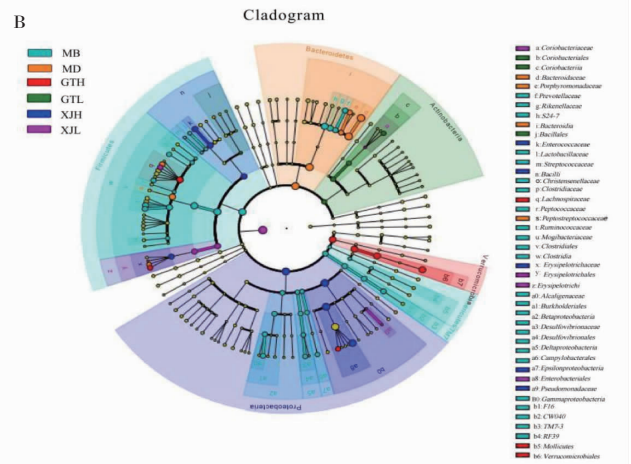
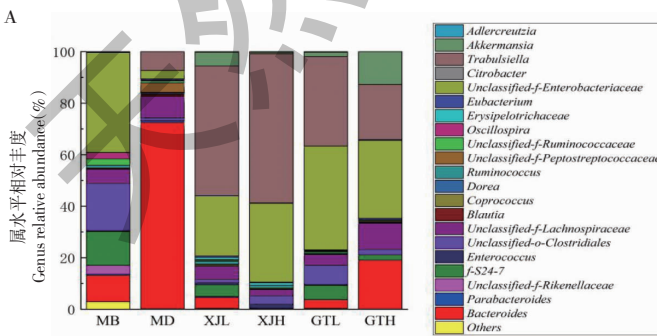
图 5 干预后各组小鼠门水平物种组成丰度图

Fig. 5 Species composition abundance map at phylum level of mice in each group after intervention

由图 6A 可知, 在属水平上, MB 组相对丰度比例最大的优势菌属 *Unclassified-f-Enterobacteriaceae*, MD 组的优势菌属为拟杆菌属 (*Bacteroides*), 占菌群丰度的 72.3%, 而 *Unclassified-f-Enterobacteriaceae* 相对丰度对比 MB 组下降 91.5%, 有益菌 *Unclassified-f-Rikenellaceae* *f-S24-7* 缺失。香蕉皮提取物干预组及阳性对照组的优势菌为特布尔西菌属 (*Trabulsiiella*)、*Unclassified-f-Enterobacteriaceae*。对比 MD 组, XJL 组 *Bacteroides* 的相对丰度减少 94.4%, GTL 组 *Bacteroides* 相对丰度减少 95.3%, GTH 组 *Bacteroides* 相对丰度减少 73.8%。XJL 组和 XJH 组 *Trabulsiiella*、*Unclassified-f-Enterobacteriaceae* 相对丰度均显著增长 ($P < 0.05$), 且高于 GTL 和 GTH 组。表明香蕉皮提取物具有显著调节肠道菌群的效果, 具体表现为 *Unclassified-f-Enterobacteriaceae*、*Trabulsiiella*、阿克

曼氏菌 (*Akkermansia*) 等有益菌属的相对丰度显著上调 ($P < 0.05$), *Bacteroides* 等属的相对丰度显著下调 ($P < 0.05$)。

LEfSe 分析以及物种进化树结果进一步可视化地展现了香蕉皮对便秘小鼠肠道菌群的调节作用。图 6B 中物种发育树结果显示, MD 组丰度变化集中在 *Bacteroides*, 对比 MD 组, XJH 组菌群丰富度提高, 丰度变化主要集中在 *Unclassified-f-Enterobacteriaceae*。图 6C 中 Lefse 进化分析图分析显示, 在 MB 组、MD 组、GTL 组、GTH 组、XJL 组与 XJH 组中分别发现 39 个、9、5、7、7、8 个分类群。MD 组主要受有 *Bacteroides* 的影响, 有害菌相对丰度增大, XJH 组主要受有益菌 *Trabulsiiella*、*Unclassified-f-Enterobacteriaceae* 的影响, 有益菌相对丰度增大。



续图 6 (Continued Fig.6)

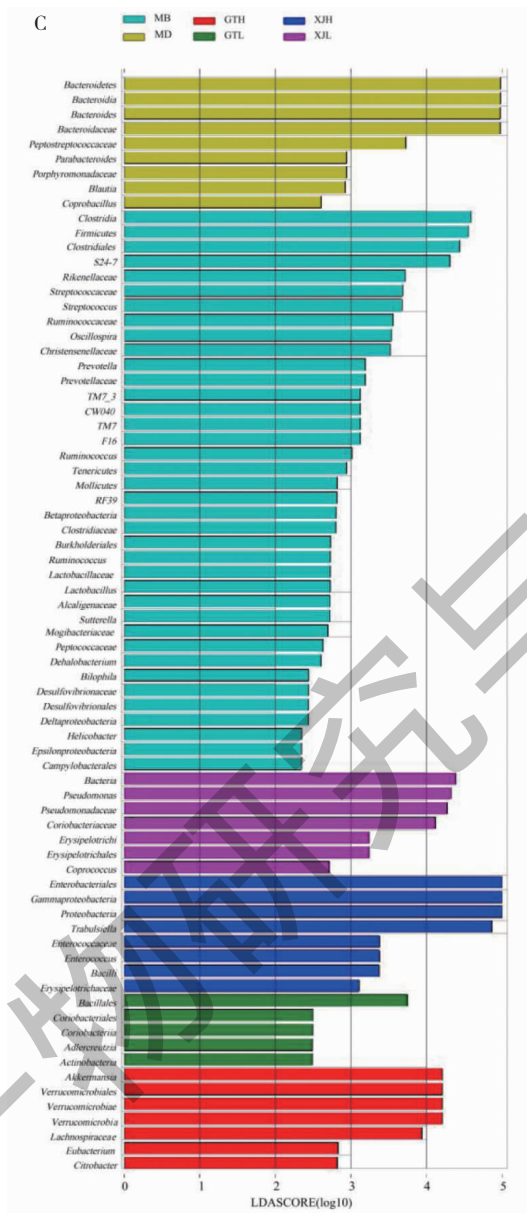


图6 干预后各组小鼠属水平物种组成丰度图及菌群 LEfSe 分析比较

Fig. 6 Species composition abundance map at genus level and LEfSe analysis and comparison of flora in mice in each group after intervention

2.5 香蕉皮提取物对便秘模型小鼠肠组织中神经递质水平的影响

由表4可知,对比MB组,MD组小鼠肠道中平均ACh浓度显著下降53.8%。经干预后,对比阳性对照组,XJL组小鼠肠道中平均ACh浓度相比于阳性对照组显著增加52.6%,存在显著性差异($P < 0.05$)。对比MB组,MD组小鼠肠道中平均GABA浓度显著下降25.6% ($P < 0.05$),XJL组小鼠肠道中平均GABA浓度显著增加63.7% ($P < 0.05$),MD组小鼠肠道中平均DA浓度下降8.2%,但不具有显

著性。对比MD组,XJL组肠道中DA浓度水平显著增加17.6% ($P < 0.05$)。说明低浓度的香蕉皮提取物对肠道ACh和GABA有着显著的促进作用($P < 0.05$)。对比MB组,MD组肠道组织中平均5-HT浓度相对下调,XJL组小鼠肠道组织中平均5-HT浓度升高11.7%,XJH组降低52.8% ($P < 0.05$),XJL组肠道中平均5-HT浓度恢复到了与MB组浓度水平。对比MD组,XJL组平均NE浓度显著增加6.1% ($P < 0.05$),XJH组平均Glu浓度显著下降17.4% ($P < 0.05$)。

表4 干预后各组小鼠肠道神经递质的分析比较

Table 4 Analysis and comparison of intestinal neurotransmitters in mice in each group after intervention ($\mu\text{g/L}$)

组别 Group	ACh	GABA	DA	5-HT	NE	Glu
MB	0.198 9 \pm 0.03 ^a	0.713 5 \pm 0.04 ^c	0.206 5 \pm 0.01 ^{bc}	0.356 4 \pm 0.02 ^{ab}	3.016 4 \pm 0.06 ^{bc}	84.69 \pm 3.78 ^d
MD	0.091 8 \pm 0.01 ^{bc}	0.530 7 \pm 0.02 ^d	0.189 5 \pm 0.01 ^c	0.337 3 \pm 0.01 ^{ab}	2.838 2 \pm 0.03 ^{cd}	82.38 \pm 5.67 ^c
XJL	0.140 1 \pm 0.01 ^{ab}	0.868 7 \pm 0.03 ^b	0.222 9 \pm 0.01 ^b	0.376 8 \pm 0.06 ^{ab}	3.021 5 \pm 0.04 ^b	76.68 \pm 4.64 ^c
XJH	0.063 0 \pm 0.02 ^c	0.486 1 \pm 0.03 ^d	0.206 2 \pm 0.01 ^{bc}	0.159 2 \pm 0.06 ^c	2.763 9 \pm 0.03 ^d	68.07 \pm 2.55 ^b
GTL	0.192 3 \pm 0.02 ^a	0.996 6 \pm 0.03 ^a	0.295 7 \pm 0.01 ^a	0.494 5 \pm 0.07 ^a	3.583 0 \pm 0.04 ^a	102.42 \pm 4.30 ^e
GTH	0.107 9 \pm 0.03 ^{bc}	0.447 8 \pm 0.03 ^d	0.136 8 \pm 0.01 ^d	0.229 4 \pm 0.05 ^{bc}	3.539 0 \pm 0.08 ^a	39.56 \pm 2.67 ^a

注:同列中不同小写字母表示存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences, $P < 0.05$.

2.6 便秘模型小鼠肠道菌群与肠神经递质和肠动力指标的相关性分析

图7为筛选出的属水平上相关菌群 *Unclassified-f-Lachnospiraceae*、多尔氏菌属 (*Dorea*)、*Unclassified-o-Clostridiales*、*f-S24-7* 等与肠神经递质 Da、ACh、5-HT、GABA、NE、Glu 等指标的相关性分析。如图7A所示,与NE呈强相关的菌属有肠球菌属 (*Enterococcus*) ($r = 0.912$)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) ($r = 0.898$)、阿德勒克罗伊茨菌 (*Adlercreutzia*) ($r = 0.828$)、*Unclassified-f-Lachnospiraceae* ($r = 0.828$)、与5-HT呈强相关的菌属有 *Dorea* ($r =$

0.926)、费氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter*) ($r = -0.845$)、与Glu呈强相关的菌属有 *Citrobacter* ($r = -0.845$)、颤螺菌属 (*Oscillospira*) ($r = 0.811$)、*Dorea* ($r = 0.678$)、*Unclassified-f-Ruminococcaceae* ($r = 0.771$)、与ACh呈强相关的菌属有 *Ruminococcus* ($r = 0.811$)、*Adlercreutzia* ($r = 0.828$)。通过图7B中肠神经递质与肠动力的相关性分析可得,小鼠小肠推进率与肠神经递质5-HT ($r = -0.829$)、Glu ($r = -0.829$)呈显著负相关,小鼠首粒黑便排出时间与5-HT ($r = 0.771$)呈显著正相关。

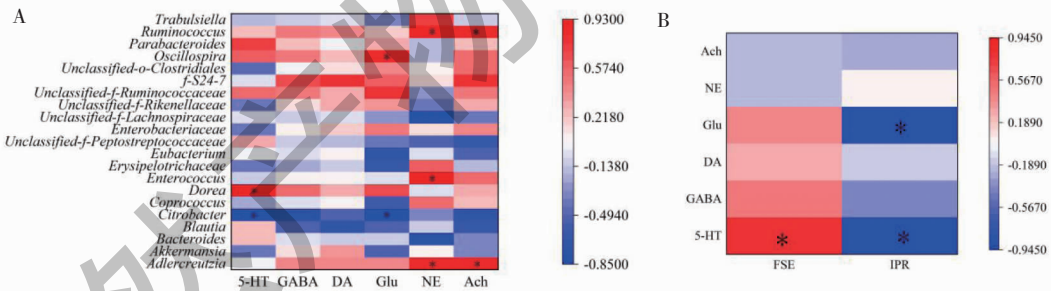


图7 干预后小鼠肠道菌群与神经递质、神经递质与肠动力的 Spearman 比较分析

Fig. 7 Spearman's correlation of gut microbiota and neurotransmitters, neurotransmitters and gut motility in mice after intervention

注:若 $R > 0.8$ 且 $P < 0.05$, 则存在相关性显著。Note: If $R > 0.8$ and $P < 0.05$, the correlation is significant.

3 讨论与结论

增加膳食纤维的摄入和药物刺激已被证实能够有效缓解便秘,然而目前针对便秘的干预手段主要还是通过药物治疗,还未能能在生活方式上找到满意的缓解方法。本研究中便秘表观指标显示,对比空白组,便秘模型小鼠的粪便数量、粪便含水量和小肠墨汁推进率等指标均显著降低,经香蕉皮提取物和低聚果糖干预后,上述指标均有显著性恢复,且香蕉皮提取物效果显著优于低聚果糖。特别是在肠动力

指标上,能够恢复至空白组水平,说明香蕉皮提取物溶液具有显著促进排便、改善粪便指标和肠道蠕动力的作用。目前,关于改善便秘的研究文献相对较多,但主要集中在中医药领域,对天然食物成分干预作用的研究相对较少。且多数研究主要关注表观指标,缺乏对肠动力改善作用的研究,从肠道菌群和肠神经递质角度探讨便秘发生和恢复的基本作用机制研究也相对缺乏。

本研究发现香蕉皮提取物具有润肠通便、提高小鼠肠动力的作用,其潜在的原因是香蕉皮提取物中含有膳食纤维、焦皮素、色氨酸等活性成分^[6],其能够调节肠道微生物、调节神经递质,增强小鼠肠动力,对功能性便秘有很好的改善作用^[4]。此外,有学者提出可以将植物活性成分与抗生素联合应用研发成协同抗菌制剂,这能较好地恢复被抗生素抑制的相关菌群^[10],而香蕉皮含有的焦皮素可以抑制细菌和真菌滋生,对肠道菌群有很好的调节作用,这提示了其在抗菌制剂应用中具有一定的潜力。

已有的研究多从便秘表观指标中探究干预物质对便秘的缓解作用,并未揭示其潜在的机制。而有学者^[11]发现肠源性 5-HT 与肠动力紧密相关,其可通过与肠道平滑肌纤维细胞上相应的受体结合,控制肠道肌肉收缩或舒张,从而影响粪便的排出速率。但其他神经递质在调节肠动力功能上的作用目前还不清楚。经本研究进一步发现,对比空白组,便秘模型小鼠肠神经递质除 5-HT 水平显著降低之外,GA-BA、ACh 和谷氨酸水平也存在显著差异,其中谷氨酸水平与小肠推进率之间呈显著负相关,说明肠道中高水平的谷氨酸可抑制肠动力。而香蕉皮提取物可有效提高 5-HT 水平,降低谷氨酸的水平,从而增强肠动力。本研究结果说明香蕉皮提取物可通过影响肠神经递质的水平干预小鼠肠动力。此外,本研究还发现在肠神经递质含量变化上,香蕉皮提取物高剂量组和低剂量组之间存在显著差异,这可能与肠道中复杂的肠道菌群的相互作用有关,但其具体原因尚待进一步探究。

肠道菌群平衡是评估健康的重要因素,其中 B/F 是判断肠道菌群是否失衡的关键指标^[11]。Yang 等^[12]研究表明,便秘会引起 B/F 值的突变。本研究中 16s rRNA 基因测序结果显示,在门水平上,MD 组的 B/F 值较 MB 组增加了 350.83%,香蕉粉干预可使小鼠 B/F 值恢复至正常水平。由于 B/F 值突变是肠道菌群失调的典型特征,而香蕉皮提取物干预后可使该值恢复至正常水平,说明香蕉皮提取物具有调节小鼠肠道菌群失调的作用。在属水平上,对比 MD 组,香蕉皮提取物低、高剂量组的有益菌 *Trabulsilla* 的相对丰度分别增长了 6 倍和 7 倍,低聚果糖高剂量组 *Trabulsilla* 相对丰度增长了 3 倍,说明 *Trabulsilla* 是便秘发生关键生物标志菌群,也是香蕉皮提取物和低聚果糖干预便秘的靶标菌群。

肠道菌群的稳态与小鼠便秘有着一定的关系,

功能性便秘大多伴有结肠运动功能减弱,与肠神经递质功能水平及肠道菌群的结构联系密切^[13],饮食和肠道菌群代谢物通过影响肠神经系统或刺激肠内分泌细胞的受体,直接或间接影响肠道功能^[14]。高碳水化合物饮食会提高肠道中 *Ruminococcus*、*Dorea* 等的丰度^[15],*Lachnospiraceae* 能保护小鼠肠道健康,降低外界环境对大肠和小肠的损伤以及肠道渗透性^[16]。此外,有研究发现与健康人群相比,帕金森患者的肠道菌群 *Dorea*、*Ruminococcus* 等含量降低,*Oscillospira* 等升高^[17],同时患者 5-HT、NE 等神经递质含量减少,说明 *Dorea*、*Ruminococcus*、*Oscillospira* 与 5-HT、NE 等神经递质可能具有一定的相关性。本研究的相关性分析发现,NE、5-HT、Glu 分别与 *Enterococcus*、*Dorea*、*Citrobacter* 等不同菌群呈强相关性,说明肠道神经递质与肠道菌群的种类显著相关。而在神经递质与肠动力相关性发现,小鼠小肠推进率与肠神经递质 5-HT、Glu 呈显著负相关,小鼠首粒黑便排出时间与 5-HT 呈显著正相关。上述结果说明,肠道菌群可能通过调节特定肠神经递质水平影响小鼠肠动力,从而决定粪便排出推进率以及便秘是否发生。Nzakizwanayo^[18]和 Peng 等^[19]也认为肠道菌群与神经递质紧密相关,但他们尚没有进一步验证的相关报道,也未探究肠道菌群与肠神经递质和肠动力间的相互关系。

综上所述,便秘模型小鼠的肠道菌群与肠神经递质存在显著相关性,肠神经递质又与肠动力显著相关。香蕉皮提取物可作为益生元通过调节肠道菌群和肠神经递质的水平,提高肠动力,从而改善便秘。但目前有关对肠道菌群与肠动力的研究还处于起步阶段,有许多问题尚不清楚,仍需对其进行深入研究。

本研究发现香蕉皮提取物对混合抗生素溶液诱导的肠道紊乱型便秘模型小鼠具有显著改善作用。其作用途径可能与香蕉皮提取物通过调节小鼠肠道中某些特定菌群,进而影响肠道神经递质的水平和改善小鼠肠动力有关。本研究结果可为开发高效治疗便秘的活性产品奠定理论基础。

参考文献

- 1 Vallianou NG, Stratigou T, Tsagarakis S. Microbiome and diabetes: where are we now? [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 146: 111-118.
- 2 Wang JW, Sun HH, Jiang YX, et al. Research progress in

- treatment of functional constipation and constipated irritable bowel syndrome [J]. *Int J Dig Dis* (国际消化病杂志), 2021, 41:19-22.
- 3 Makizaki Y, Uemoto T, Yokota H, et al. Improvement of loperamide-induced slow transit constipation by *Bifidobacterium bifidum* G9-1 is mediated by the correction of butyrate production and neurotransmitter profile due to improvement in dysbiosis [J]. *PLoS One*, 2021, 16:e248584.
 - 4 Zhao GH, Chen ZL. Research progress on active ingredients and function of banana peel [J]. *Pack Food Mach* (包装与食品机械), 2013, 31:42-45.
 - 5 Liu T, Zhang TP, Liu N, et al. Study on the extraction technology of starch from banana peel by water extraction method [J]. *Chin Condiment* (中国调味品), 2021, 46:23-28.
 - 6 Zhang X, Li LL, Yang J, et al. Study on the moistening and laxative function of dietary fiber from fermented roxburgh rose pomace [J]. *Food Ferment Technol* (食品与发酵科技), 2021, 57:30-34.
 - 7 Hu Q, Sun DF, Sun LJ, et al. Intervention effect of mussel and oyster complex on constipation in mice with intestinal flora disorder [J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2020, 36:16-26.
 - 8 Zhang Q, Hu XS, Qin L, et al. Isolation and purification of 5-hydroxytryptophan from *Griffonia simplicifolia* by ultrafiltration technique [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:2033-2036.
 - 9 Zhang L, Kong LT, Sun L, et al. Simultaneous determination of seven neurotransmitters in mice brain tissue by LC-MS/MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19:132-136.
 - 10 Chen JY, Liu DY, Zhao Y, et al. Research progress on the synergistic effects between plant active ingredients and anti-biotics to reduce drug resistance of bacteria [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:1063-1071.
 - 11 Tian Y, Mai XD, Ma K, et al. Intestinal flora regulating the occurrence and development of metabolic diseases [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2021, 66:1602-1613.
 - 12 Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension [J]. *Hypertension*, 2015, 65:1331-1340.
 - 13 Xiang CY, Liu J, Zhang YZ, et al. Effect of modified Simotang on adult functional constipation and intestinal neurotransmitter [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2019, 25:150-155.
 - 14 Xie Y, Wang C, Zhao D, et al. Dietary proteins regulate serotonin biosynthesis and catabolism by specific gut microbes [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68:5880-5890.
 - 15 Dahl WJ, Rivero MD, Lambert JM. Diet, nutrients and the microbiome [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2020, 171:237-263.
 - 16 Guo H, Chou WC, Lai Y, et al. Multi-omics analyses of radiation survivors identify radioprotective microbes and metabolites [J]. *Science*, 2020, 370:eaay9097.
 - 17 Petrov VA, Saltykova IV, Zhukova IA, et al. Analysis of gut microbiota in patients with Parkinson's disease [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2017, 162:734-737.
 - 18 Nzakizwanayo J, Dedi C, Standen G, et al. *Escherichia coli* Nissle 1917 enhances bioavailability of serotonin in gut tissues through modulation of synthesis and clearance [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17324.
 - 19 Peng Y. Large intestinal microbes and host metabolism response to low protein amino acid supplementation diets and ileum terminal antibiotic intervention in pigs [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2017.