

# 芹菜素对慢传输型便秘小鼠的通便作用

苏立杰<sup>1</sup>, 李国坤<sup>1</sup>, 陈淼焕<sup>1</sup>, 曾钰鹏<sup>1</sup>, 韦艳祝<sup>1</sup>, 陈晓熠<sup>1</sup>, 陈静<sup>2\*</sup>

(1. 广州医科大学公共卫生学院, 广东广州 511436) (2. 广州医科大学基础医学院, 广东广州 511436)

**摘要:** 通过小鼠实验和菌群体外培养实验探究芹菜素对慢传输型便秘小鼠的通便作用及其对肠道菌群的调节作用。将 Balb/c 小鼠分为空白组、模型组和芹菜素干预组, 用洛哌丁胺建立慢传输型便秘模型, 给予 200 mg/kg·BW 芹菜素干预便秘, 观测首粒黑便时间、6 h 排便粒数、粪便重量、墨汁推进率、粪便含水率等指标, 评价芹菜素的通便效果。通过体外分离培养各组小鼠的肠道细菌并进行菌落计数, 评价芹菜素对便秘小鼠肠道菌群的调节作用。与模型组相比, 芹菜素干预后小鼠首次排黑便时间减少了 25% ( $p<0.05$ ), 6 h 排便粒数增加了 0.86 倍 ( $p<0.05$ )、粪便重量增加了 1.21 倍 ( $p<0.05$ )、墨汁推进率增加了 1.05 倍 ( $p<0.05$ )、粪便含水率增加了 0.82 倍 ( $p<0.05$ )。体外培养实验发现芹菜素抑制有害菌 (肠杆菌和肠球菌) 的生长 ( $p<0.05$ ), 促进益生菌 (乳杆菌和双歧杆菌) 的生长 ( $p<0.05$ )。芹菜素对慢传输型便秘小鼠具有通便作用, 可能通过调节肠道菌群达到通便效果。

**关键词:** 慢传输型便秘; 芹菜素; 肠道菌群; 通便作用

文章编号: 1673-9078(2022)06-20-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0769

## Laxative Effect of Apigenin on Slow Transit Constipation Mice

SU Lijie<sup>1</sup>, LI Guokun<sup>1</sup>, CHEN Miaohuan<sup>1</sup>, ZENG Yupeng<sup>1</sup>, WEI Yanzhu<sup>1</sup>, CHEN Xiaoyi<sup>1</sup>, CHEN Jing<sup>2\*</sup>

(1.School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

(2.School of Basic Medical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

**Abstract:** The laxative effect on slow transit constipation and intestinal flora-regulating function of apigenin were investigated through experiments with mice and *in vitro* microbial culture. Balb/C mice were divided into a blank control group, model group and apigenin intervention group. The slow transit constipation model was established with loperamide. Apigenin (200 mg/kg BW) was used to intervene constipated mice. The laxative effect of apigenin was evaluated through determining the time for the first black stool, number of stool particles within 6 h, stool weight, ink propulsion rate, and water content of stool. The intestinal bacteria of each group of mice were isolated and cultured *in vitro*, and colony count was measured to evaluate the intestinal flora-regulating function. Compared with the model group, the apigenin intervention group had a shorter time period for the first black stool (reduced by 25%,  $p<0.05$ ), more stool particles within 6 h (increased by 0.86 times,  $p<0.05$ ), higher stool weight (increased by 1.21times,  $p<0.05$ ), higher ink propulsion rate (increased by 1.05 times,  $p<0.05$ ), and higher stool water content (increased by 0.82 times,  $p<0.05$ ). *In vitro* culture experiments showed that apigenin inhibited the growth of harmful bacteria (*Enterobacter* and *Enterococcus*) ( $p<0.05$ ), and promoted the growth of probiotics (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) ( $p<0.05$ ). Apigenin has a laxative effect on slow transit constipation in mice, which may be achieved through regulating the intestinal flora of constipated mice.

**Key words:** slow transit constipation; apigenin; intestinal flora; laxative effect

引文格式:

苏立杰,李国坤,陈淼焕,等.芹菜素对慢传输型便秘小鼠的通便作用[J].现代食品科技,2022,38(6):20-27

SU Lijie, LI Guokun, CHEN Miaohuan, et al. Laxative effect of apigenin on slow transit constipation mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 20-27

收稿日期: 2021-07-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773428); 国家自然科学基金青年项目 (81703219); 广州市科技计划项目 (201904010404)

作者简介: 苏立杰 (1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 42164784@qq.com; 共同第一作者: 李国坤 (1997-), 男, 硕士, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 13725325531@139.com

通讯作者: 陈静 (1986-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 微生物学, E-mail: 2405086799@qq.com

慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 是一种临床上常见的功能性便秘, 以结肠动力减弱、结肠传输时间延长为主要特点, 主要症状为便意消失、排便次数减少、粪便干硬、排便费力, 其症状顽固, 严重者可诱发心脑血管疾病、结直肠癌等并发症, 严重影响患者的生活质量和心理健康<sup>[1,2]</sup>。据相关报道, 慢性传输型便秘全球发病率约为 14%, 其中我国发病率为 3.19%~11.6%, 且呈上升递增趋势<sup>[3]</sup>。已有的研

究表明,STC 发病因素众多,其可能与胃肠动力不足、激素水平紊乱、肠道菌群失调<sup>[4]</sup>、Cajal 间质细胞变化<sup>[5]</sup>、肠神经异常<sup>[6-8]</sup>、结肠黏膜水通道改变<sup>[9,10]</sup>等有关。STC 现有的治疗方法主要有药物治疗(缓泻剂和促动力剂)、手术和粪便移植等,常规的药物虽然短期内疗效较好,但长期使用会引起药物依赖、惰性结肠等不良反应,而手术和粪便移植在临床上难以普遍开展,手术治疗的复发率也较高<sup>[11,12]</sup>。因此,寻找安全有效的天然活性物质在治疗和缓解慢传输型便秘具有重要的意义。

研究显示,慢性便秘的发生与肠道菌群失调密切相关。便秘型肠易激综合征患者粪便中的双歧杆菌丰度水平较低<sup>[13]</sup>。Khalif 等<sup>[14]</sup>研究发现成年功能性便秘的患者粪便中双歧杆菌菌属和乳杆菌属细菌菌落数量显著减少。张旭等<sup>[15]</sup>发现老年便秘患者粪便中肠道菌群的双歧杆菌含量显著降低。黄小明等<sup>[16]</sup>认为肠道微生物可能通过改变宿主代谢和代谢产物(包括气体、短链脂肪酸和胆汁酸)而影响肠道蠕动,进而导致慢性便秘。因此,以肠道菌群为靶点干预 STC 是切实可行的。

芹菜素(apigenin)是天然存在的一种黄酮类化合物,已知其具有抗肿瘤、抗炎、抗疲劳、抗动脉硬化、抗氧化、抗痛风、降压、降糖、免疫调节等多种作用<sup>[17-22]</sup>。王丽等<sup>[23]</sup>发现芹菜素能降低糖尿病小鼠血糖,并通过提高 MLCK 蛋白表达来改善肠动力障碍。Thaiss 等<sup>[24]</sup>发现芹菜素可调节肠道菌群,进而影响减肥后的体重恢复速率。常佩亮等<sup>[25]</sup>发现肠道菌群会影响芹菜素的代谢。Hanske 等<sup>[26]</sup>研究发现人体肠道微生物群对芹菜素-7-葡萄糖苷(A7G)生物利用及代谢有很大贡献。结合已有的研究报道,芹菜素与肠动力以及肠道菌群密切相关,我们推测其可能通过调节肠道菌群进而发挥改善慢传输型便秘的作用。

但目前关于芹菜素对便秘及肠道菌群的研究报导较少,故本课题拟基于 STC 小鼠模型,探讨芹菜素对 STC 小鼠的通便效果及其对肠道菌群的调节作用,为 STC 防治及相关功能食品的研发提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

芹菜素(HPLC≥98%),上海金穗生物科技有限公司;盐酸洛哌丁胺胶囊,西安杨森制药有限公司;碳粉,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;阿拉伯胶,上海麦克林生化科技有限公司;吐温 80,天津市福晨化学试剂厂;氯化钠,天津市大茂化学试剂厂;戊巴

比妥钠(1%),天津市大茂化学试剂厂;伊红美蓝琼脂培养基,广州环凯微生物科技有限公司;胆汁七叶苷琼脂,广州环凯微生物科技有限公司;双歧杆菌琼脂培养基,广州环凯微生物科技有限公司;LBS 琼脂,广州环凯微生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

SPX-250B 微机生化培养箱,上海悦丰仪器仪表有限公司;移液枪,艾本德中国有限公司;玻璃仪器气流烘干机,巩义市予华仪器有限责任公司;旋涡混合仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;FE20 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;T6773 电子天平,普利赛斯科学仪器有限公司(瑞士);ZHJH-C1106B 超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;MULTISKAN GO 全自动酶标仪,广东丹利科技有限公司;MLS-3750 高压蒸汽灭菌机,日本三洋;纯水机,南京贝登医疗股份有限公司;DZF-6050 真空干燥,上海-恒科学仪器有限公司。

### 1.3 实验动物

BALB/c 小鼠,SPF 级,30 只,雄性,四周龄,健康状况良好,购买于广东省医学实验动物中心,合格证号:NO.44007200049595,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 小鼠的灌胃

30 只 BALB/c 小鼠随机分为三组:空白组(K 组)、模型组(M 组)和芹菜素干预组(G 组)。根据各组小鼠体重按量给药,其中模型组和干预组给予 10 mg/kg·BW 的盐酸洛哌丁胺溶液,另外干预组再同时给予 200 mg/kg·BW 的芹菜素溶液,空白组和模型组再给予相应的生理盐水。灌胃 14 d 后观察黑便判断其造模和干预效果。其中,根据相关文献报道选择 200 mg/kg·BW 芹菜素剂量进行干预<sup>[27]</sup>。

#### 1.4.2 黑便实验

连续灌胃 14 d 后,将各组小鼠禁食不禁水 12~16 h,再进行黑便观察实验。模型组和干预组小鼠使用洛哌丁胺灌胃,空白组小鼠相应的生理盐水进行灌胃。30 min 后,模型组和空白组使用生理盐水和 0.2 mL 墨汁灌胃,芹菜素干预组使用 200 mg/kg 芹菜素和 0.2 mL 墨汁灌胃,分别放入准备好的小隔间,进行黑便观察实验。通过对黑便粒数、墨汁灌胃时间和首颗黑便排出的时间的记录,统计出首颗黑便时间和黑便粒数。

### 1.4.3 粪便含水率的测定

使用隔板将老鼠隔离开,用镊子收集小鼠粪便于灭菌过的 2 mL EP 管中,做好标记。使用分析天平称量新鲜粪便重量,置于 37 °C 的烘箱中,在 24 h、48 h 后称量烘干后的粪便重量,通过计算,得出粪便的含水量。

$$\text{粪便含水率(\%)} = \frac{\text{粪便湿质量(g)} - \text{粪便干质量(g)}}{\text{粪便湿质量(g)}} \times 100\%$$

### 1.4.4 墨汁推进率的测量

重复 1.4.1 灌胃操作 25 min 后,立即使用腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠(1%),待麻醉后,摘眼球取血,处死,开腹取小肠测量小肠长度和墨汁推进长度,计算得出小鼠墨汁推进率。计算公式如下:

$$\text{墨汁推进率(\%)} = \frac{\text{墨汁推进长度(cm)}}{\text{小肠总长度(cm)}} \times 100\%$$

### 1.4.5 新鲜粪便的采集及处理

#### 1.4.5.1 粪便采集

对小鼠肛门附近进行充分消毒后,使用无菌棉棒轻微擦拭小鼠肛门,刺激小鼠排便,并收集粪便于已知质量(b)的 2 mL EP 管中,盖紧备用。称量带有小鼠粪便的 EP 管,质量为 a,计算得小鼠粪便重量为 m,单位为 g,其计算公式如下:

$$m(g) = a(g) - b(g)$$

#### 1.4.5.2 粪便稀释液的制备

对手部充分消毒后,在超净工作台上,使用移液枪向装有粪便的 EP 管中加入 99 倍粪便重量的生理盐水,搅拌捣碎,待充分混合后,再吸取 1 mL 粪便混合液于 10 mL 的无菌试管中,加入 9 mL 无菌生理盐水,制成浓度为  $10^{-3}$  的粪便稀释液。重复以上方法分别制备浓度为  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  的粪便稀释液,做好标记后备用。

### 1.4.6 肠道细菌的体外培养鉴定与计数

#### 1.4.6.1 培养基的配制

伊红美蓝琼脂培养基(EMB):称取 37.5 g 培养基配方粉末,加入蒸馏水或去离子水 1 L,搅拌加热煮沸至完全溶解,分装三角瓶,120 °C 高压灭菌 15 min,冷至 50 °C 倾注灭菌培养皿。

胆汁七叶苷琼脂培养基(BEA):称取 44.5 g 培养基配方粉末,加入 1 L 蒸馏水或去离子水,搅拌加热煮沸至完全溶解,120 °C 高压灭菌 15 min,备用。

双歧杆菌琼脂培养基(BBL):称取 59.3 g 培养基配方粉末,加入蒸馏水或去离子水 600 mL 和西红柿浸出液 400 mL,搅拌加热煮沸至完全溶解,分装三角瓶,120 °C 高压灭菌 15 min。(西红柿浸出液制备:将新鲜西红柿洗净后称量切碎,加入等量的蒸馏水在

100 °C 水浴中加热,搅拌 90 min,然后用纱布过滤,校正 pH 至 7.0)

乳杆菌选择性培养基(LBS):称取 84.0 g 培养基配方粉末,再吸取 1 mL 吐温 80 和冰乙酸 1.3 mL,加热搅拌溶解于 1000 mL 蒸馏水中,120 °C 高压灭菌 15 min。

#### 1.4.6.2 生化鉴定

触酶试验:取洁净玻片 1 片,用接种环挑取细菌,加入 3%过氧化氢 1 滴,立即观察结果。若立即出现大量气泡则为阳性,否则为阴性。

氧化酶试验:直接往待测菌菌落上滴加 1%盐酸四甲基对苯二胺。若细菌在与试剂接触 10 s 内呈深紫色,为阳性。

硝酸盐还原试验:将待测菌接种于硝酸盐培养基中,于 35 °C 培养 1~4 d,将甲、乙液等量混合后(约 0.1 mL)加入培养基中,立即观察结果。若培养基出现红色则为阳性,否则为阴性(或假阴性)。

高盐耐受试验:将待测菌接种于 6.5%氯化钠葡萄糖琼脂培养基的平板中,使用涂布棒涂匀,后置于 37 °C 恒温箱内培养。24~48 h 后,观察平板上是否有细菌生长。

45 °C 生长试验:将待测菌接种至肠球菌选择培养基中,使用涂布棒涂布均匀,后置于 45 °C 下恒温箱内培养。24~48 h 后,观察平板上是否有细菌生长。

氧气生长试验:将待测菌接种至双歧杆菌选择培养基中,用涂布棒涂布均匀,后置于 37 °C 恒温箱内培养。24~48 h 后,观察平板上是否有细菌生长。

#### 1.4.6.3 菌落计数(肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳杆菌)

分别取以上一系列浓度( $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ )的粪便稀释液 100  $\mu$ L 于四种不同培养基中,均匀涂布后,置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24~48 h(双歧杆菌、乳杆菌的培养需使用厌氧培养袋)。每种菌种做三个平行,选取菌落总数在 30~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板进行计数菌落总数取平均数。

## 1.5 数据处理与统计分析

所有数据均独立平行测定,数据结果以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示,采用 SPSS 24.0 软件对试验数据进行统计学分析,通过独立样本 *t* 检验和单因素方差检验做显著性分析, $p < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小鼠 STC 模型的建立

表 1 洛哌丁胺对小鼠排便指标的影响

**Table 1 Effect of loperamide on defecation indexes of mice**

组别	首粒黑便时间/min	6 h 排便粒数/n	粪便重量/g	墨汁推进率/%
空白组	74.60±14.01 <sup>a</sup>	18.80±3.81 <sup>a</sup>	0.91±0.47 <sup>a</sup>	78.63±21.44 <sup>a</sup>
模型组	188.70±42.33 <sup>b</sup>	10.40±4.27 <sup>b</sup>	0.42±0.16 <sup>b</sup>	43.99±15.68 <sup>b</sup>

注: 不同组间同列小写英文字母不同表示差异性显著 ( $p < 0.05$ ), 下同。

表 2 芹菜素对小鼠排便指标的影响

**Table 2 Effect of apigenin on defecation indexes of mice**

组别	首粒黑便时间/min	6 h 排便粒数/n	粪便重量/g	墨汁推进率/%
模型组	188.70±42.33 <sup>a</sup>	10.40±4.27 <sup>a</sup>	0.42±0.16 <sup>a</sup>	43.99±15.68 <sup>a</sup>
干预组	141.80±30.80 <sup>b</sup>	19.30±4.20 <sup>b</sup>	0.93±0.16 <sup>b</sup>	90.61±18.12 <sup>b</sup>

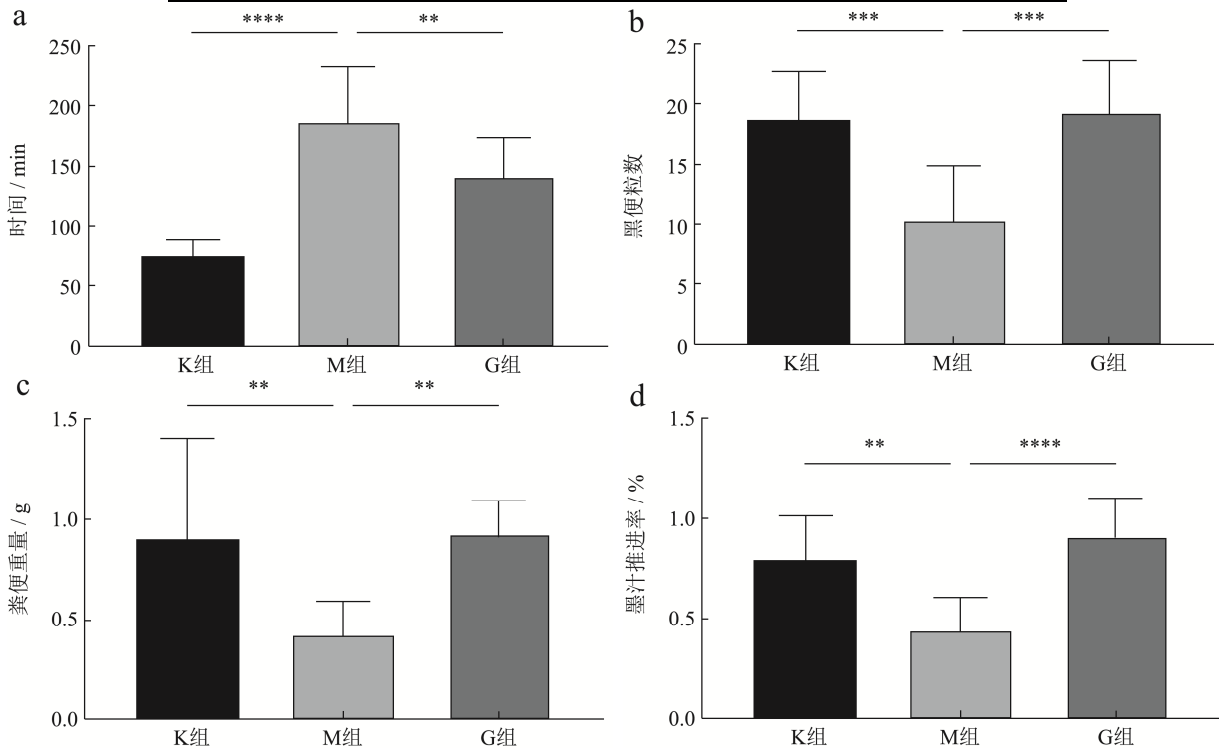


图 1 芹菜素对小鼠排便指标的影响

Fig.1 Effect of apigenin on defecation indexes of mice

注: a 为首粒黑便时间; b 为 6 h 排便粒数; c 为 6 h 粪便重量; d 为墨汁推进率。\*为  $p < 0.05$ ; \*\*为  $p < 0.01$ ; \*\*\*为  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*为  $p < 0.0001$ 。

将空白组与模型组的排便指标进行对比, 如表 1 和图 1 所示, 可得模型组的首粒黑便时间(188.70 min)相对于空白组(74.60 min)增加了 1.53 倍 ( $p < 0.05$ ); 6 h 排便粒数(10.40 n)相对于空白组(18.80 n)减少了 45% ( $p < 0.05$ ); 粪便重量(0.42 g)相对于空白组(0.91 g)减少了 53.85% ( $p < 0.05$ ); 墨汁推进率 43.99% 相对于空白组(78.63%)减少了 44.05% ( $p < 0.05$ )。判断慢性传输型便秘小鼠模型建立成功与否的标准包括首粒黑便时间、6 h 排便粒数、粪便重量、墨汁推进率。通过观察, 小鼠 6 h 排便粒数和粪便重量任一结果阳性, 并且首粒黑便时间和墨汁推进率任一结果阳性, 即可判定 STC 模型成功建立<sup>[28,29]</sup>。根据实验结果,

首粒黑便时间、6 h 排便粒数、粪便重量、墨汁推进率均呈阳性, 可说明小鼠 STC 模型建立成功。本实验使用 10 mg/kg·BW 的盐酸洛哌丁胺溶液灌胃 14 d 可成功建立小鼠 STC 模型, 与相关文献的 STC 模型研究建立方法一致<sup>[30-32]</sup>。

## 2.2 芹菜素对小鼠首次黑便时间、6 h 排便粒数、粪便重量、墨汁推进率的影响

将干预组与模型组的排便指标进行对比, 如表 2 和图 1 所示, 得干预组的首粒黑便时间(141.80 min)相对于模型组(188.70 min)减少了 24.85% ( $p < 0.05$ );

6 h 排便粒数 (19.30 n) 相对于模型组 (10.40 n) 增加了 0.86 倍 ( $p < 0.05$ ); 粪便重量 (0.93 g) 相对于模型组 (0.42 g) 增加了 1.21 倍 ( $p < 0.05$ ); 墨汁推进率 (90.61%) 相对于模型组 (43.99%) 增加了 1.05 倍 ( $p < 0.05$ )。根据保健食品的通便功能检验方法: 6 h 排便粒数和粪便重量任一项结果显著, 同时墨汁推进率和首粒黑便时间任一项结果显著, 可判定该受试样品对便秘小鼠具有通便功效<sup>[33]</sup>, 而在本次实验中, 首粒黑便时间、6 h 排便粒数、粪便重量、墨汁推进率均呈阳性, 可判定 200 mg/kg·BW 芹菜素对 STC 小鼠具有显著的通便作用。

### 2.3 芹菜素对 STC 小鼠粪便含水率的影响

表 3 芹菜素对小鼠粪便含水率的影响

Table 3 Influence of apigenin on various defecation indexes in mice

组别	粪便湿重/g	粪便干重/g	粪便含水率/%
空白组	0.91±0.47	0.31±0.12	62.37±13.11 <sup>b</sup>
模型组	0.42±0.16	0.25±0.11	39.45±16.40 <sup>a</sup>
干预组	0.93±0.16	0.25±0.17	72.15±16.31 <sup>b</sup>

将空白组和干预组的粪便含水率与模型组进行对比, 如表 3 所示, 可得模型组的粪便含水率 (39.45%) 相较于空白组 (62.37%) 减少了 36.75% ( $p < 0.05$ ), 干预组的粪便含水率 (72.15%) 相较于模型组 (39.45%) 增加了 0.82 倍 ( $p < 0.05$ )。可得出洛哌丁胺在建立小鼠 STC 模型可显著地降低粪便含水率, 而芹菜素可增加 STC 小鼠的粪便含水率。

上述结果表明芹菜素具有润肠通便作用。相关报道发现一些富含黄酮类物质成分的天然产物也有通便的效果。付山等<sup>[34]</sup>通过检测便秘小鼠的小肠推进率, 发现桑葚果汁具有通便作用, 并证明其通便作用

与总黄酮类成分有关; 研究发现<sup>[35]</sup>沙葱中的黄酮类物质成分对洛哌丁胺诱导的便秘有通便作用, 可以通过影响肠动力和肠道水分转运来达到通便的效果。因此, 同属于黄酮化合物的芹菜素, 也可能通过影响肠道蠕动和水分转运来发挥通便作用。

### 2.4 芹菜素对 STC 小鼠肠道菌群的调节作用

#### 2.4.1 试验菌生化鉴定

取各组小鼠粪便, 用生理盐水稀释后, 分别接种在 EMB、BEA、BBL、LBS 培养基上, 放 37 °C 恒温箱培养 24-48 h, 通过对所培养的试验菌进行生化鉴定, 确保菌群为研究所需的试验菌, 其菌落形态和生化鉴定结果如表 4 和图 2 所示, 肠杆菌、肠球菌、乳杆菌和双歧杆菌菌落形态的生化鉴定结果均符合《伯杰氏系统细菌学手册》第九版的相关规定, 可用作以下小鼠肠道细菌菌落总数计数使用。

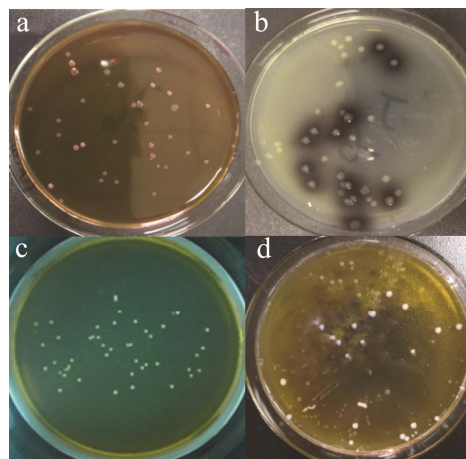


图 2 试验菌的菌落形态

Fig.2 Colony morphology of the test bacteria

注: a 为肠杆菌, b 为肠球菌, c 为乳酸杆菌, d 为双歧杆菌。

表 4 试验菌菌落形态和生化鉴定结果

Table 4 Colony morphology and biochemical identification results of the test bacteria

菌种	菌落形态	生化鉴定结果
肠杆菌	菌落中等大小, 菌落呈紫红色后变成紫黑色, 有金属光泽	触酶试验阳性、氧化酶试验呈阴性、硝酸盐还原试验呈阳性
肠球菌	菌落较小, 白色菌落, 周围有黑圈	触酶试验阴性; 高盐耐受试验、45 °C 生长试验呈阳性
乳杆菌	菌落中等大小, 表面光滑, 呈乳白色, 且有酸味	触酶试验、硝酸盐还原试验呈阴性; 氧气生长试验呈阳性*
双歧杆菌	菌落中等大小, 表面光滑, 呈乳白色	触酶试验、硝酸盐还原试验呈阴性; 氧气生长试验呈阴性

注: \*表示乳杆菌为兼性厌氧 (微好氧), 氧气生长试验不能作为充分的判断依据, 可省略。

#### 2.4.2 菌落计数

如表 5 所示, 模型组的肠杆菌菌落总数 ( $7.1 \times 10^6$ ) 显著多于空白组 ( $2.6 \times 10^6$ ), 而干预组的菌落总数

( $2.9 \times 10^6$ ) 相对于模型组显著降低 ( $p < 0.05$ )。模型组的肠球菌菌落总数 ( $5.4 \times 10^6$ ) 相对于空白组 ( $1.2 \times 10^6$ ) 显著增加, 而干预组的菌落总数 ( $1.9 \times 10^6$ ) ( $p < 0.05$ )

有显著下降。模型组的双歧杆菌菌落总数 ( $2.4 \times 10^7$ ) 显著少于空白组 ( $6.9 \times 10^7$ ), 而干预组 ( $4.6 \times 10^7$ ) 则显著增加双歧杆菌菌落总数 ( $p < 0.05$ )。模型组的乳酸杆菌菌落总数 ( $2.1 \times 10^7$ ) 显著少于空白组 ( $8.4 \times 10^7$ ), 而干预组可显著增加乳酸杆菌菌落总数 ( $6.7 \times 10^7$ )

( $p < 0.05$ )。上述结果表明 STC 小鼠粪便有害菌肠杆菌、肠球菌显著增加, 芹菜素的干预可有效地抑制肠杆菌、肠球菌的过度生长; 另一方面, STC 小鼠粪便中有益菌双歧杆菌、乳酸杆菌显著减少, 芹菜素干预可有效地扶植双歧杆菌、乳酸杆菌的增殖。

表 5 芹菜素对肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌的影响 (CFU/g)

Table 5 Effects of apigenin on *Enterobacterium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (CFU/g)

组别	肠杆菌菌落总数	肠球菌菌落总数	双歧杆菌菌落总数	乳酸杆菌菌落总数
空白组(K组)	$(2.6 \pm 0.5) \times 10^{6a}$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{6a}$	$(6.9 \pm 0.4) \times 10^{7a}$	$(8.4 \pm 0.3) \times 10^{7a}$
模型组(M组)	$(7.1 \pm 0.3) \times 10^{6b}$	$(5.4 \pm 0.1) \times 10^{6b}$	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^{7b}$	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^{7b}$
干预组(G组)	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{6a}$	$(1.9 \pm 0.7) \times 10^{6a}$	$(4.6 \pm 0.4) \times 10^{7a}$	$(6.7 \pm 1.1) \times 10^{7a}$

根据相关文献报道, 可以选择益生菌中的双歧杆菌和乳杆菌, 及有害菌中的肠杆菌和肠球菌为试验菌进行体外培养, 来评价对肠道菌群的影响。如李根林等<sup>[36]</sup>通过对 STC 模型老鼠新鲜粪便中的肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳杆菌进行培养和计数, 研究复方地芬诺酯建立的 STC 模型老鼠中肠道菌群的变化情况。彭祺菲等<sup>[37]</sup>通过对肠杆菌、肠球菌、乳杆菌和双歧杆菌进行培养和计数, 发现野山杏果肉不溶性膳食纤维具有改善小鼠肠道菌群和通便的作用。因此, 本课题选取双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌和肠球菌作为试验菌对象来评价芹菜素对肠道微生物的调节作用。本研究结果发现芹菜素干预可有效地抑制肠杆菌、肠球菌的过度生长, 以及有效地扶植双歧杆菌、乳酸杆菌的增殖。相关研究报道也发现类似结果。如魏涛等<sup>[38]</sup>以复方地芬诺酯建立小鼠便秘模型, 连续给予低聚木糖干预 14 d 后, 低、高剂量组小鼠粪便内乳杆菌、双歧杆菌均显著增加, 从而证明了低聚木糖具有改善小鼠肠道菌群及润肠通便的功能。唐飞等<sup>[39]</sup>发现适度的青砖茶可以抑制肠杆菌、肠球菌繁殖, 扶植双歧杆菌和乳杆菌, 从而改善小鼠肠道功能。肠球菌是一种条件性致病菌, 可导致院内感染和抗生素耐药。研究报道通过体外模拟人升结肠的粪便接种物培养, 发现芹菜素有效地抑制了肠球菌的生长, 并影响肠球菌中涉及 DNA 修复、应激反应等基因的表达<sup>[40]</sup>。双歧杆菌和乳杆菌是常见的益生菌。研究报道富含双歧杆菌和乳杆菌的酸奶可以抑制洛哌丁胺诱导的便秘<sup>[41]</sup>。双歧杆菌可增加肠动力, 可能与其促进短链脂肪酸 (SCFAs) 的产生相关<sup>[42]</sup>。研究报道给予便秘小鼠乳杆菌处理, 可增加粪便含水量从而达到通便效果<sup>[43]</sup>。因此, 推测芹菜素的通便作用可能与促进双歧杆菌和乳杆菌的生长, 从而增加肠动力和粪便含水量相关。当然, 本研究仅能表明芹菜素对四种试验菌的调节作用, 还应用 16s rRNA 测序等技术对便秘小鼠肠道菌群中的其他微生物种群、丰度进行分析, 进一步探究芹菜素调节

肠道菌群改善便秘的作用机制。

### 3 结论

芹菜素可通过减少首粒黑便时间, 增加排便粒数和重量, 促进肠蠕动和增加粪便含水量, 对慢传输型便秘小鼠起到通便的作用。芹菜素可能通过抑制有害菌肠球菌和肠杆菌的过度生长, 以及扶植有益菌双歧杆菌和乳杆菌的生长, 改善肠道微生态环境, 增加肠动力和粪便含水量, 从而达到通便的效果。

### 参考文献

- [1] Wong S W, Lubowski D Z. Slow-transit constipation: Evaluation and treatment [J]. *Anz Journal of Surgery*, 2007, 77(5): 320-328
- [2] 刘芳,魏先鹏,唐学贵. 枳实导滞丸加减治疗慢传输型便秘热积秘证的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 2: 92-97
- [3] LIU Fang, WEI Xianpeng, TANG Xuegui. Clinical efficacy of modified Zhishidaozhiwan on slow transit constipation [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2020, 2: 92-97
- [4] Bharucha A E, Lacy B E. Mechanisms, evaluation, and management of chronic constipation [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(5): 1232-1249
- [5] Zhao Y, Yu Y. Intestinal microbiota and chronic constipation [J]. *Springer Plus*, 2016, 5(1): 1130
- [6] Bassotti G, Villanacci V, Maurer C A, et al. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurons in the neuropathology of intractable slow transit constipation [J]. *Gut*, 2006, 55(1): 41-46
- [7] Tomita R, Fujisaki S, Ikeda T, et al. Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation [J]. *Diseases of the Colon & Rectum*, 2002, 45(5): 593-600
- [7] Tzavella K, Riepi 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): 1207-1211
- [8] Tomita R. Regulation of the peptidergic nerves (substance P and vasoactive intestinal peptide) in the colon of women patients with slow transit constipation: an *in vitro* study [J]. *Hepato-gastroenterology*, 2008, 55(82-83): 500-507
- [9] Zhan Y, Tang X, Xu H, et al. Maren pills improve constipation via regulating AQP3 and NF- $\kappa$ B signaling pathway in slow transit constipation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 1: 1-12
- [10] Sun L L, Jiang H B, Liu B Y, et al. Effects of rhein on intestinal transmission, colonic electromyography and expression of aquaporin-3 by colonic epithelium cells in constipated mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(2): 614-623
- [11] Rao S C, Rattanakit K, Patcharakul T. Diagnosis and management of chronic constipation in adults [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2016, 13: 295-305
- [12] 卜佳,许翠萍.慢性便秘和慢病管理[J].*世界华人消化杂志*, 2016,24(30):4162-4168  
BU Jia, XU Cuiping. Chronic constipation and chronic disease management [J]. *World Journal of Chinese Digestion*, 2016, 24(30): 4162-4168
- [13] Ohkusa T, Koido S, Nishikawa Y, et al. Gut microbiota and chronic constipation: a review and update [J]. *Front Med*, 2019, 6: 19
- [14] Khalif I L, Quigley E M, Konovitch E A, et al. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation [J]. *Dig Liver Dis*, 2005, 37(11): 838-849
- [15] 张旭,潘仁智,张晓玲,等.南京非便秘与便秘老人肠道菌群生态分布调查[J].*南京中医药大学学报*,2004,20(5):287-288  
ZHANG Xu, PAN Renzhi, ZHANG Xiaoling, et al. Investigation on the ecological distribution of intestinal flora in non-constipated and constipated elderly people in Nanjing [J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 20(5): 287-288
- [16] 黄小明,张敏.肠道菌群与慢性便秘关系的研究进展[J].*安徽医药*,2020,24(2):220-224  
HUANG Xiaoming, ZHANG Ming. Research progress on the relationship between intestinal flora and chronic constipation [J]. *Anhui Medical Journal*, 2020, 24(2): 220-224
- [17] 郭霜,张晚霞,余薇.芹菜素药理作用的研究进展[J].*湖北科技学院学报(医学版)*,2016,30(3):273-276  
GUO Shuang, ZHANG Wanxia, YU Wei. Research progress on pharmacological effect of apigenin [J]. *Journal of Hubei University of Science and Technology (Medical Science Edition)*, 2016, 30(3): 273-276
- [18] Goto T, Hagiwara K, Shirai N, et al. Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(2): 357-365
- [19] 郭丛丛,姚金铭,范正媛,等.芹菜素治疗糖尿病及其并发症作用机制概述[J].*山东中医杂志*,2019,38(10):990-995  
GUO Congcong, YAO Jinning, FAN Zhengyuan, et al. A review of apigenin in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 38(10): 990-995
- [20] Suh Y A, Jo S Y, Lee H Y, et al. Inhibition of IL-6/STAT3 axis and targeting Axl and Tyro3 receptor tyrosine kinases by apigenin circumvent taxol resistance in ovarian cancer cells [J]. *Int Oncol*, 2014, 46(3): 1405-1411
- [21] 林丽文,辛勤.芹菜素药理作用的研究进展[J].*中国热带医学*,2012,12(8):1023-1026  
LIN Liwen, XIN Qin. Research progress of apigenin in pharmacological effect [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 12(8): 1023-1026
- [22] 邢志华.芹菜素及其衍生物药理作用研究新进展[J].*中国药理学杂志*,2018,8(53):1241-1247  
XING Zhihua. Research progress on pharmacological effects of apigenin and its derivatives [J]. *China Pharmacol Clin*, 2018, 8(53): 1241-1247
- [23] 王丽,田飞鸿,饶木艳,等.芹菜素对糖尿病小鼠肠动力障碍的调节作用研究[J].*医学食疗与健康*,2020,18(2):7-9  
WANG Li, TIAN Feihong, RAO Muyan, et al. Effects of apigenin on intestinal motility in diabetic mice [J]. *Journal of Food Therapy and Health*, 2020, 18(2): 7-9
- [24] Thaiss C A, Itav S, Rothschild D, et al. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain [J]. *Nature*, 2016, 540(7634): 544-551
- [25] 常佩亮.大鼠肠道菌群对芹菜素代谢影响[J].*中国公共卫生*, 2008,3(24):383-384  
CHANG Peiliang. Effects of intestinal flora on apigenin metabolism in rats [J]. *Chin J Public Health*, 2008, 3(24): 383-384
- [26] Hanske L, Loh G, Sczesny S, et al. The bioavailability of apigenin-7-glucoside is influenced by human intestinal microbiota in rats [J]. *Journal of Nutrition*, 2009, 139(6):

- 1095-1102
- [27] Ding Y M, Lin J T, Fang L M, et al. The neuroprotective effect of apigenin against OGD/R injury in rat hippocampal neurons [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 33(4): 1527-1533
- [28] 姚一博,王迪,王钱陶,等.盐酸洛哌丁胺诱导的小鼠慢传输型便秘模型的实验研究[J].中国实验动物学报,2020,28(3): 370-375
- YAO Yibo, WANG Di, WANG Qiantao, et al. Effects of loperamide hydrochloride on slow transit constipation in mice [J]. Chinese Journal of Experimental Animals, 2020, 28(3): 370-375
- [29] 李国坤,董嘉华,肖健海,等.复合代糖的通便功效及其对肠道菌群的调节作用[J].现代食品科技,2021,37(7):14-22
- LI Guokun, DONG Jiahua, XIAO Jianhai, et al. The effect of complex glycogen on the defecation and regulation of intestinal flora [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 14-22
- [30] Kim J, Park J, Kang M, et al. Laxative effect of spicatoside A by cholinergic regulation of enteric nerve in loperamide-induced constipation: ICR mice model [J]. Molecules, 2019, 24(5): 896
- [31] Chen Z Y, Lin S S, Ling J, et al. Effects of breadyeast cell wall beta-glucans on mice with loperamide-induced constipation [J]. J Med Food, 2019, 22: 1009-1021
- [32] He Q, Han C, Huang L, et al. Astragaloside IV alleviates mouse slow transit constipation by modulating gut microbiota profile and promoting butyric acid generation [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(16): 9349-9361
- [33] 中华人民共和国卫生部.卫监发[2003]42 号保健食品检验与评价技术规范[S].北京:人民卫生出版社,2003:153-161
- Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical specification for inspection and evaluation of health food, No. 42, health supervision and development [2003]. [S]. Beijing: People's Health Publishing House, 2003: 153-161
- [34] 付山,吕开原,贺凌霜,等.桑葚提取物主要成分分析及润肠通便作用的观察[J].武警后勤学院学报(医学版),2019,28(1):7-11
- FU Shan, LYU Kaiyuan, HE Lingshuang, et al. Analysis of main components of extract of mulberry and observation on the effect of nourishing intestines and defecating [J]. Journal of Armed Police Logistics College (Medical Edition), 2019, 28(1): 7-11
- [35] Chen Y, Ding Z, Wu Y, et al. Effects of allium mongolicum regel and its flavonoids on constipation [J]. Biomolecules 2019, 10(1): 14
- [36] 李根林,张颜语,李寒冰.复方地芬诺酯建立大鼠便秘模型及对肠道菌群的影响[J].中国组织工程研究,2016,20(49): 7404-7410
- LI Genlin, ZHANG Yanyu, LI Hanbing. Effects of difenoxate on intestinal microflora in rats with constipation [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2016, 20(49): 7404-7410
- [37] 彭祺菲,阿依姑丽·艾合麦提,王妙颖,等.野山杏果肉不溶性膳食纤维对小鼠肠道功能及肠道菌群的影响[J].食品工业科技,2020,41(8):307-310
- PENG Zhenfei, AHMAT Aygul, WANG Miaoying, et al. Effects of insoluble dietary fiber on intestinal function and intestinal microflora in mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(8): 307-310
- [38] 魏涛,赵建元,高兆兰,等.低聚木糖调节 BALB/c 小鼠肠道菌群及润肠通便作用研究[J].安徽农业科学,2013,41(1): 159-160
- WEI Tao, ZHAO Jianyuan, GAO Zhaolan, et al. Effects of xylo-oligosaccharides on intestinal microflora and purgative effect in BALB/c mice [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(1): 159-160
- [39] 唐飞,张岳峰,曲凤凤,等.不同渥堆程度青砖茶改善小鼠胃肠道功能的研究[J].湖北农业科学,2019,58(12):124-129
- TANG Fei, ZHANG Yuefeng, QU Fengfeng, et al. Study on the improvement of gastrointestinal function in mice with different accumulation degree of black brick tea [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 58(12): 124-129
- [40] Wang M, Firman J, Zhang L, et al. Apigenin impacts the growth of the gut microbiota and alters the gene expression of enterococcus [J]. Molecules, 2017, 22(8): 1292
- [41] Kim B K, Choi I S, Kim J, et al. Effects of fermented milk with mixed strains as a probiotic on the inhibition of loperamide-induced constipation [J]. Korean J Food Sci Anim Resour, 2017, 37(6): 906-916
- [42] Wang L, Hu L, Xu Q, et al. Bifidobacteria exert species-specific effects on constipation in BALB/c mice [J]. Food Funct, 2017, 8(10): 3587-3600
- [43] Jeong D, Kim D H, Kang I B, et al. Modulation of gut microbiota and increase in fecal water content in mice induced by administration of *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 [J]. Food Funct, 2017, 8(2): 680-686