

两种益生菌与枳实联用对功能性消化不良大鼠的改善作用及机制^Δ

李宗年*,熊 英,龚晓惠,王兰兰,郭忠青,蒋林林,刘红樱,邓可众[#](江西中医药大学药学院,南昌 330004)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)13-1593-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.13.07



摘要 **目的** 探讨两种益生菌(枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌)联合中药枳实改善大鼠功能性消化不良(FD)的作用及机制。**方法** 将大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组(多潘立酮,2.7 mg/kg)、枳实组(9 g/kg)、嗜酸乳杆菌组(5×10^7 cfu/kg)、枯草芽孢杆菌组(5×10^7 cfu/kg)、嗜酸乳杆菌+枳实组(嗜酸乳杆菌 5×10^7 cfu/kg+枳实9 g/kg)、枯草芽孢杆菌+枳实组(枯草芽孢杆菌 5×10^7 cfu/kg+枳实9 g/kg),每组8只。除空白组外,其余各组大鼠采用夹尾刺激+饥饿失常+游泳力竭应激干预法建立FD模型;成模后,各组大鼠灌胃相应药物/益生菌混悬液/生理盐水,每天1次,持续14 d。末次给药后,检测大鼠胃排空率和小肠推进率;检测大鼠血清中脑肠肽相关指标[胃泌素(GAS)、P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、生长抑素(SS)、胆囊收缩素(CCK)]水平;观察胃窦组织和十二指肠组织的病理学形态;收集大鼠盲肠内容物进行肠道菌群测序分析;检测大鼠胃窦组织中酪氨酸激酶受体c-Kit、干细胞因子(SCF)和十二指肠组织中Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)、核因子 κ B(NF- κ B)的蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠胃排空率、小肠推进率,血清中GAS、SP水平,厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度,肠道菌群的Ace、Chao、Sobs指数,胃窦组织中SCF、c-Kit蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$);血清中VIP、SS、CCK水平,拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度,十二指肠组织中TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);胃窦组织结构基本正常,但十二指肠组织结构存在异常,可见大量炎症细胞浸润。与模型组比较,各给药组大鼠上述指标水平大部分显著逆转($P < 0.05$),胃窦组织结构正常;除枯草芽孢杆菌组、枯草芽孢杆菌+枳实组外,其余大鼠十二指肠病理状态均逐渐恢复。与各单药组相比,各联合组大鼠上述大部分指标进一步改善($P < 0.05$)。**结论** 枳实与上述两种益生菌联用均可改善FD大鼠的胃肠动力,且效果优于单独用药,具体作用机制可能与激活SCF/c-Kit信号通路、抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路有关。

关键词 功能性消化不良;枳实;枯草芽孢杆菌;嗜酸乳杆菌;肠道菌群;SCF/c-Kit信号通路;TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路

Ameliorative effects and mechanisms of two probiotics combined with Aurantii Fructus Immaturus on functional dyspepsia in rats

LI Zongnian, XIONG Ying, GONG Xiaohui, WANG Lanlan, GUO Zhongqing, JIANG Linlin, LIU Hongying, DENG Kezhong(School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate ameliorative effects and mechanisms of two probiotics (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*) combined with Aurantii Fructus Immaturus (AFI) on functional dyspepsia (FD) in rats. **METHODS** Rats were randomly divided into blank group, model group, positive control group (domperidone group, 2.7 mg/kg), AFI group (9 g/kg), *L. acidophilus* group (5×10^7 cfu/kg), *B. subtilis* group (5×10^7 cfu/kg), *L. acidophilus*+ AFI group (*L. acidophilus* 5×10^7 cfu/kg+ AFI 9 g/kg), and *B. subtilis*+AFI group (*B. subtilis* 5×10^7 cfu/kg+AFI 9 g/kg), with 8 rats in each group. Except for the blank group, FD model was established by tail-clamping stimulation+hunger and satiety disorder+swimming exhaustion in other groups. After modeling, each group was given the corresponding drug/probiotic suspensions/physiological saline intragastrically, once a day, for 14 consecutive days. After the last medication, gastric emptying rate and the rate of propulsion of the small intestine in rats were measured; the levels of brain-gut peptide-related indicators [gastrin (GAS), substance P (SP), vasoactive intestinal peptide (VIP), somatostatin (SS) and cholecystikinin (CCK)] in the serum of rats were measured. The pathological morphology of the gastric antrum tissue and duodenal tissue was observed. Cecal contents from the rats were collected for gut microbiota sequencing analysis. The protein expression levels of tyrosine kinase receptor c-Kit and stem cell factor (SCF) in the gastric antrum tissue, as well as Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and nuclear factor κ B (NF- κ B) in the duodenal tissue of the rats were detected. **RESULTS** Compared with the blank group, model group showed significantly lower gastric emptying rate, small intestinal propulsion rate, serum levels of GAS and SP, relative abundance of Firmicutes, Ace, Chao and Sobs indexes of the gut microbiota, and protein levels of SCF and c-Kit in gastric antrum ($P < 0.05$), while serum levels of VIP, SS and CCK, relative abundance of Bacteroidetes, as well as protein expressions of TLR4, MyD88, and NF- κ B, were significantly higher ($P < 0.05$). The histological structure of the gastric antrum tissue appeared basically normal; however, abnormalities were observed in the duodenal structure, with a significant infiltration of inflammatory cells visible. Compared with the model group, all treatment groups significantly modulated most of the above indexes ($P < 0.05$).

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No. 82460766, No. 81960709);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(No. JZYC23S53)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药质量评价。E-mail: 1043380247@qq.com

通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药品质评价。E-mail: dengkezhong@126.com

The histological structure of the gastric antrum tissue was normal. Except for the *B. subtilis* group and the *B. subtilis*+AFI group, the pathological states of the duodenum in the remaining rats gradually recovered. Compared with each single drug group, most of above indexes in rats from each combination group showed further improvement ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The combination of AFI with two probiotics can improve gastrointestinal motility in FD rats, and the effect is superior to that of using the drugs alone. The specific underlying mechanisms may be related to the activation of the SCF/c-Kit signaling pathway and the inhibition of the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS functional dyspepsia; Aurantii Fructus Immaturus; *Bacillus subtilis*; *Lactobacillus acidophilus*; probiotics; SCF/c-Kit signaling pathway; TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是常见的功能性消化疾病, 具有发病率高、易反复等特点, 通常表现为胃排空延迟、十二指肠屏障受损与微炎症、肠道菌群紊乱以及脑-肠肽失调等^[1-2]。现代医学对 FD 多用促胃肠动力药或益生菌等进行治疗^[3]。枯草芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌是常见的益生菌, 可通过调节胃肠道菌群、胃肠激素水平、分泌有益代谢物等发挥改善 FD 的作用^[4-5]。枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 具有破气消积、化痰消痞的功效^[6]。在中医看来, FD 可归属于“胃脘痛”“痞满”的范畴^[6], 病机为气机阻滞、脾胃运化无力, 因此应以健脾和胃、疏肝理气为总治疗原则, 多以枳实及其相关方剂进行治疗^[7-8]。近年来研究发现, 中药/化学药联合益生菌治疗 FD 具有较好的疗效^[9]。因此, 笔者推测枳实与上述两种益生菌联用治疗 FD 可能也具有较好的疗效。

研究表明, FD 患者的胃 Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 会发生异常改变, 从而影响胃肠道平滑肌细胞间的信息传递、神经传递及自发电活动的产生, 进而导致胃肠道功能性障碍^[9]。而干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 在调节 ICC 的增殖、分化和功能方面至关重要, 与平滑肌功能障碍密切相关^[10]。SCF 是 ICC 细胞膜中酪氨酸激酶受体 c-Kit 的配体, c-Kit 信号途径被阻断可导致 ICC 的异常增殖^[11]。还有研究表明, 十二指肠炎症及屏障受损是造成 FD 的主要原因之一, 而十二指肠炎症与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路有关^[12]。TLR4 的激活可启动 MyD88/NF- κ B 信号通路的下游促炎途径, 使之释放大量炎症介质, 导致肠道损伤^[13]。有鉴于此, 本研究拟基于 SCF/c-Kit 和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路, 研究枳实与上述两种益生菌联用对 FD 大鼠的改善作用及可能机制, 以期为 FD 的临床治疗提供新参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Multiskan Go1510 型酶标仪、NanoDrop2000 型超微量分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Centrifuge5430R 型低温冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; SPW-DM 型电泳仪购自武汉赛维尔生物科技有限公司; Chemic DoxXR⁺ 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad

公司; ECLIPSE CI-L 型正置白光显微镜、ECLIPSE 80I 型正置荧光显微镜购自日本尼康公司。

1.2 主要药品及试剂

枳实药材 (批号 230612B) 采自江西省樟树市, 经江西中医药大学中药鉴定教研室邓可众教授鉴定为酸橙 *C. aurantium* L. 的干燥幼果。多潘立酮片 (批号 NHJ3542, 规格 10 mg) 购自西安杨森制药有限公司; 戊巴比妥钠 (批号 P3761) 购自美国 Sigma 公司; 羧甲基纤维素钠 (批号 2208302) 购自西陇科学股份有限公司; 胃泌素 (gastrin, GAS)、P 物质 (substance P, SP)、血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)、生长抑素 (somatostatin, SS)、胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (批号分别为 MM-21284R1、MM-0444R1、MM-0625R1、MM-0493R1、MM-0034R1) 均购自江苏酶免实业有限公司; 鼠源 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号 H681707031) 购自杭州华安生物技术有限公司; 兔源 c-Kit 抗体、兔源 SCF 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗大鼠二抗、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号分别为 18696-1-AP、26582-1-AP、SA00001-1、SA00001-2) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 兔源 TLR4、MyD88、NF- κ B 抗体 (批号分别为 HY-P80918、HY-P80760、HY-P80765) 均购自美国 MedChem-express 公司; FastPure 型粪便 DNA 分离试剂盒 (批号 C01-10000) 购自上海美吉途华生物医药科技有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用大鼠为 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 180~220 g, 共 64 只, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK (京) 2019-0010。大鼠在标准实验室条件下适应性饲养 7 d, 均自由进食饮水。本实验均按照江西中医药大学实验动物伦理审查标准进行, 伦理编号为 20241107010。

1.4 细菌

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*, GIM 1.208) 由广东省科学院微生物研究所提供; 枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*, CMCC (B) 63501] 由中国医学微生物菌种保藏中心提供。

2 方法

2.1 供试药液的制备

取枳实粉末 50 g, 加 2 500 mL 纯水, 加热回流 1.5 h, 提取 2 次, 合并药液, 过滤后浓缩成质量浓度为 0.9 g/mL (以生药量计) 的供试药液。

2.2 分组、造模与给药

将64只适应性喂养7 d后的大鼠随机分成8组,分别为空白组(K组)、模型组(M组)、阳性对照组(Y组,多潘立酮,2.7 mg/kg^[14])、枳实组(Z组,9 g/kg^[14],以生药量计)、嗜酸乳杆菌组(R组,5×10⁷ cfu/kg)、枯草芽孢杆菌组(B组,5×10⁷ cfu/kg)、嗜酸乳杆菌+枳实组(RL组,嗜酸乳杆菌5×10⁷ cfu/kg+枳实9 g/kg)、枯草芽孢杆菌+枳实组(BL组,枯草芽孢杆菌5×10⁷ cfu/kg+枳实9 g/kg),每组8只。除K组外,其余各组大鼠参考文献[15]方法,采用夹尾刺激+饥饱失常+游泳力竭应激干预法建立FD模型,即用止血钳夹住大鼠尾巴远端1/3处,每次30 min,每日2次(间隔6 h),并于每日下午夹尾结束1 h后进行强迫游泳至大鼠力竭,隔日禁食禁水,连续造模21 d。当大鼠出现活动减少、反应呆滞、毛发枯燥、粪便软溏、进食量减少时,表示造模成功。造模成功后,K组、M组大鼠灌胃生理盐水,其余各组大鼠灌胃相应药液/益生菌混悬液(RL组、BL组在灌胃相应益生菌4 h后,灌胃枳实药液),每天1次,连续14 d。

2.3 大鼠胃排空率及小肠推进率的检测

末次给药后,大鼠禁食不禁水24 h后灌胃黑色营养半固体糊(质量为 m_0),灌胃体积2 mL;30 min后用3%戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血10 mL,室温下静置30 min后,以3 000 r/min离心15 min,取上层血清保存备用。取血完成后,处死各组大鼠,取出胃组织、小肠、盲肠,称取胃全重(m),洗净胃内容物后吸干水分称取胃净重(m_1),计算胃排空率:胃排空率=[1-($m-m_1$)/ m_0]×100%^[14]。用直尺分别测量黑色营养半固体糊自幽门向盲肠的推进距离(L_1)和肠管总长(L_2),计算小肠推进率:小肠推进率= L_1/L_2 ×100%^[15]。检测结束后,收集大鼠胃组织、小肠、盲肠组织备用。

2.4 大鼠血清中脑肠肽相关指标水平检测

取“2.3”项下各组大鼠血清样品,按照ELISA试剂盒说明书方法检测大鼠血清中GAS、SP、VIP、SS、CCK水平。

2.5 大鼠胃窦组织和十二指肠组织的病理学形态观察

取“2.3”项下部分胃组织和十二指肠组织适量,置于4%多聚甲醛中固定,经脱水、包埋、切片后进行苏木素-伊红染色,经封片处理后,采用显微镜观察大鼠胃窦组织和十二指肠组织的病理学形态特征。

2.6 大鼠肠道菌群检测

取“2.3”项下各组大鼠盲肠内容物,根据粪便DNA分离试剂盒操作说明抽提肠道菌群总基因组DNA,使用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA的完整性,使用NanoDrop2000型微量分光光度计测定DNA浓度和纯度;经扩增、纯化后,使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit试剂盒对纯化后的产物建库,再利用Illumina Nextseq2000测序平台测序。肠道菌群检测结果均在美吉生物云平台上进行分析。

2.7 大鼠胃窦组织中SCF、c-Kit和十二指肠组织中TLR4、MyD88、NF-κB蛋白表达水平的检测

取“2.3”项下各组大鼠胃窦组织适量,提取总蛋白,

采用BCA法测蛋白浓度;将蛋白变性处理后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入SCF、c-Kit、β-actin一抗(稀释度分别为1:500、1:1 000、1:5 000),于4℃孵育过夜;次日,用TBST洗膜10 min,重复洗膜3次,加入相应二抗(稀释度为1:10 000)室温孵育1 h,洗膜;经显影处理后,采用凝胶成像仪成像,使用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值比值表示目的蛋白表达水平。另外,同上述方法检测大鼠十二指肠组织中TLR4、MyD88、NF-κB蛋白(稀释度均为1:5 000)表达水平。

2.8 统计学分析

采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析。所有数据均符合正态分布,故均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验(方差齐时)或Dunnett's *T*3检验(方差不齐时)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠胃排空率及小肠推进率检测结果

与K组比较,M组大鼠胃排空率、小肠推进率均显著降低($P<0.05$)。与M组比较,各给药组大鼠胃排空率、小肠推进率均显著升高($P<0.05$)。与Z组、R组、B组分别比较,BL组大鼠小肠推进率均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠胃排空率及小肠推进率比较($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	胃排空率	小肠推进率
K组	63.76±2.91	56.99±2.29
M组	50.00±0.62 ^a	34.90±2.36 ^a
Y组	61.43±1.68 ^b	47.31±1.18 ^b
Z组	58.38±2.31 ^b	43.56±2.06 ^b
B组	59.32±1.99 ^b	43.87±2.45 ^b
BL组	61.24±1.94 ^b	49.27±0.96 ^{bcd}
R组	57.08±1.98 ^b	43.82±1.19 ^b
RL组	58.63±2.21 ^b	46.51±2.20 ^b

a:与K组比较, $P<0.05$;b:与M组比较, $P<0.05$;c:与Z组比较, $P<0.05$;d:与R组比较, $P<0.05$;e:与B组比较, $P<0.05$ 。

3.2 大鼠血清中脑肠肽相关指标水平检测结果

与K组比较,M组大鼠血清中GAS、SP水平均显著降低,VIP、SS、CCK水平均显著升高($P<0.05$);与M组比较,各给药组大鼠血清中GAS、SP水平均显著升高,VIP、SS、CCK水平均显著降低($P<0.05$)。与Z组、R组、B组分别比较,RL组和BL组大鼠血清中GAS、SP(RL组对比B组除外)水平均显著升高($P<0.05$),VIP、SS、CCK水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

3.3 大鼠胃窦组织和十二指肠组织的病理学形态观察结果

各组大鼠胃窦组织结构正常,黏膜上皮细胞排列整齐,黏膜层血管无明显充血,无炎症细胞浸润,胃窦组织无器质性病变。K组、Y组大鼠十二指肠整体结构正常,

表2 各组大鼠脑肠肽相关指标水平比较($\bar{x} \pm s, n=8, \text{ng/L}$)

组别	GAS	SP	VIP	SS	CCK
K组	64.96±5.54	169.60±5.96	92.29±2.69	84.71±2.45	518.70±15.14
M组	29.43±3.67 ^a	117.44±4.53 ^a	134.20±7.34 ^a	144.42±14.04 ^a	711.40±14.65 ^a
Y组	46.15±6.06 ^b	136.84±5.37 ^b	104.51±4.81 ^b	106.48±5.50 ^b	605.56±42.41 ^b
Z组	38.67±2.82 ^b	135.45±12.27 ^b	113.04±4.57 ^b	116.95±9.79 ^b	636.18±24.90 ^b
B组	45.40±3.90 ^b	153.33±4.40 ^b	111.72±5.20 ^b	116.45±3.79 ^b	606.35±17.68 ^b
BL组	55.58±2.53 ^{bcd}	166.93±10.20 ^{bcd}	104.51±2.63 ^{bcd}	101.04±5.21 ^{bcd}	553.18±14.36 ^{bcd}
R组	42.50±2.99 ^b	130.33±3.74 ^b	118.12±4.93 ^b	120.47±3.37 ^b	656.88±14.29 ^b
RL组	51.81±2.88 ^{bcd}	159.03±3.14 ^{bcd}	102.54±1.84 ^{bcd}	106.74±2.02 ^{bcd}	575.33±22.76 ^{bcd}

a: 与K组比较, $P<0.05$; b: 与M组比较, $P<0.05$; c: 与Z组比较, $P<0.05$; d: 与R组比较, $P<0.05$; e: 与B组比较, $P<0.05$ 。

肠绒毛排列较规则, 黏膜上皮细胞无脱落坏死, 黏膜层杯状细胞数量丰富, 间质血管无明显充血扩张, 无炎症细胞浸润。M组、B组、BL组大鼠十二指肠结构均存在异常, 大量肠绒毛粘连, 大量黏膜上皮细胞脱落坏死, 黏膜层杯状细胞数量明显减少, 可见大量炎症细胞浸润; Z组、R组、RL组大鼠十二指肠组织病理状态逐渐恢复正常, 病变程度相比M组减轻。结果见图1、图2。

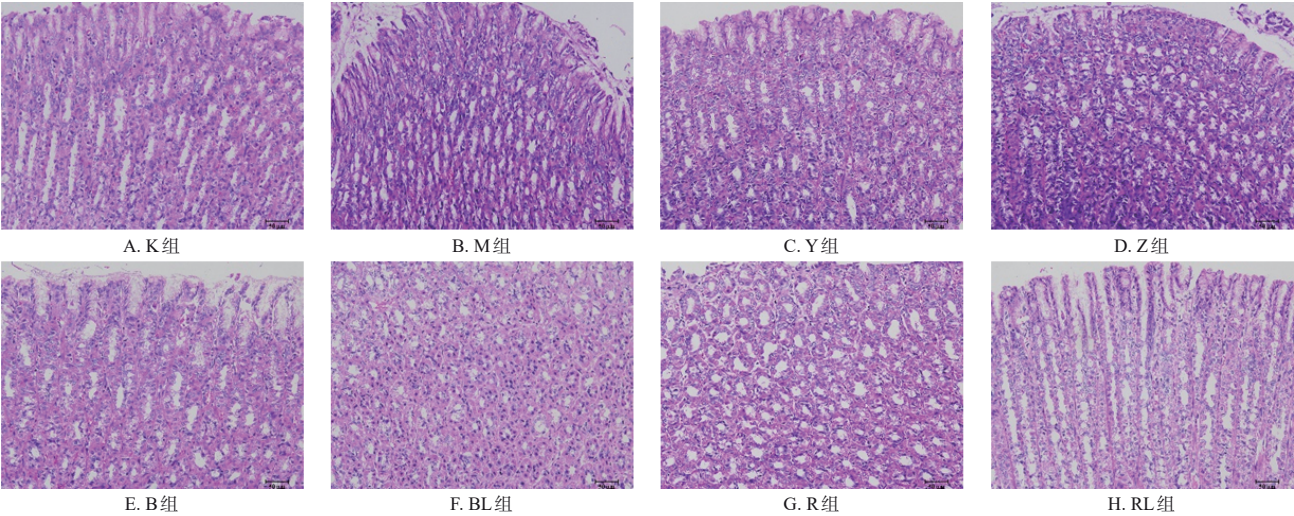
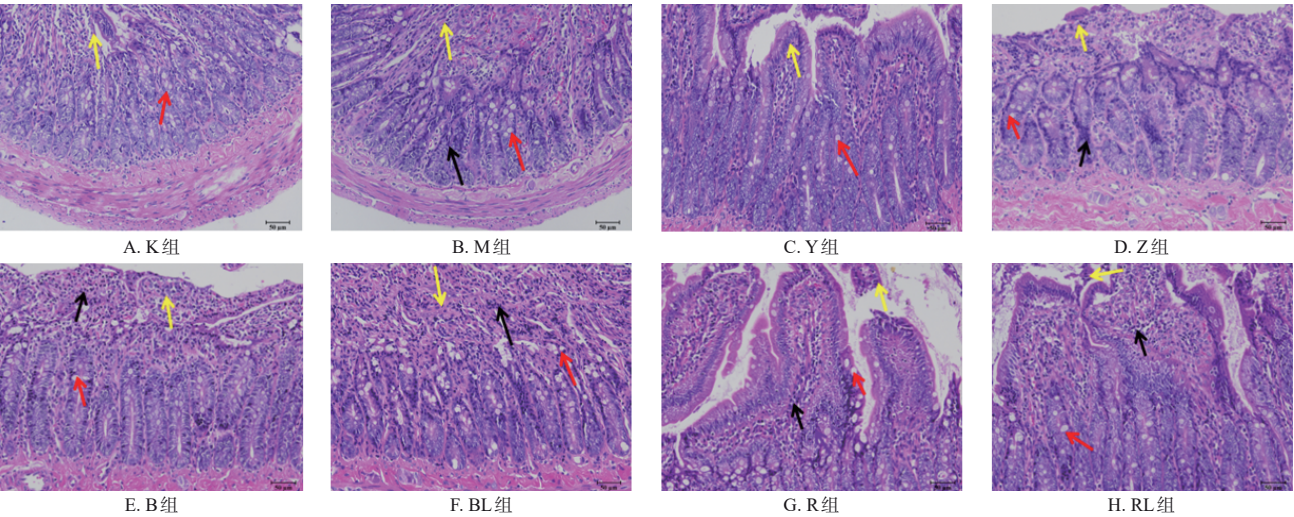


图1 各组大鼠胃窦组织病理学形态观察结果(HE染色, 标尺为50 μm)



黄色箭头: 黏膜上皮细胞; 红色箭头: 杯状细胞; 黑色箭头: 炎症细胞浸润。

图2 各组大鼠十二指肠组织病理学形态观察结果(HE染色, 标尺为50 μm)

3.4 大鼠肠道菌群检测结果

在门水平上, 与K组比较, M组大鼠厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度显著降低($P<0.05$), 拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度显著升高($P<0.05$); 与M组比较, 各给药组大鼠厚壁菌门相对丰度均显著升高($P<0.05$), 拟杆菌门相对丰度均显著降低($P<0.05$); 与Z组比较, RL组、BL组大鼠厚壁菌门相对丰度差异无统计学意义($P>0.05$), 拟杆菌门相对丰度均显著升高($P<0.05$), 变形菌门(Proteobacteria)相对丰度均显著降低($P<0.05$); 与B组比较, RL组、BL组大鼠厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度差异均无统计学意义($P>0.05$); 与R组比较, RL组、BL组大鼠厚壁菌门相对丰度均显著降低($P<0.05$), 拟杆菌门相对丰度均显著升高($P<0.05$)。结果见图3。

进一步通过Ace、Chao、Sobs指数对大鼠肠道菌群 α 多样性进行分析后发现, 与K组比较, M组大鼠肠道菌群的Ace、Chao、Sobs指数均显著降低($P<0.05$); 与M组比较, 各给药组大鼠肠道菌群的Ace、Chao、Sobs指数均显著升高($P<0.05$); 与Z组、R组分别比较, RL组大鼠肠道菌群的Ace、Chao、Sobs指数均显著升高($P<0.05$)。结果见图4。

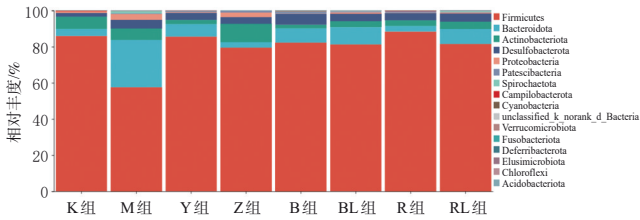
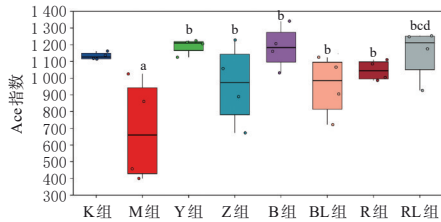
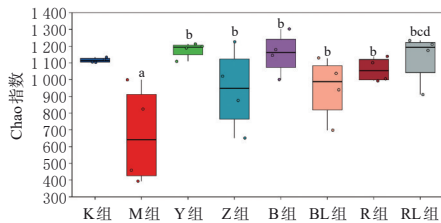


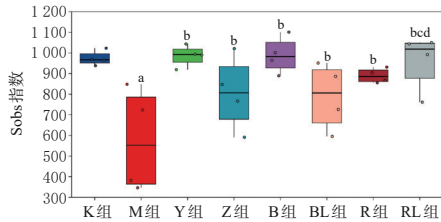
图3 各组大鼠胃水平菌群组成的柱形图



A. Ace指数检测结果



B. Chao指数检测结果



C. Sobs指数检测结果

a: 与K组比较, $P < 0.05$; b: 与M组比较, $P < 0.05$; c: 与Z组比较, $P < 0.05$; d: 与R组比较, $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠肠道菌群Ace、Chao和Sobs指数检测结果

3.5 大鼠胃窦组织中SCF、c-Kit和十二指肠组织中TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达水平检测结果

与K组比较, M组大鼠胃窦组织中SCF、c-Kit蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 十二指肠组织中TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与M组比较, 各给药组大鼠胃窦组织中SCF、c-Kit蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 十二指肠组织中TLR4(B组和BL组除外)、MyD88、NF- κ B蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。与Z组、R组、B组分别比较, RL组、BL组大鼠胃窦组织/十二指肠组织中大部分蛋白表达水平均显著升高/降低 ($P < 0.05$)。结果见表3、图5、图6。

4 讨论

FD是一种肠-脑相互作用的疾病,其特征是无器质性原因的慢性症状,严重影响了患者的生活质量^[16]。枳实、枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌对FD均有治疗效果,因此枳实与两种益生菌联合治疗FD可能有明显的疗效优势。本研究中,枳实与两种益生菌联合给药14 d后,与M组比较,各给药组大鼠的胃排空率、小肠推进率均显

表3 各组大鼠胃窦组织中SCF、c-Kit和十二指肠组织中TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SCF/ β -actin	c-Kit/ β -actin	TLR4/ β -actin	MyD88/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
K组	0.918 $\pm$ 0.023	0.929 $\pm$ 0.021	0.323 $\pm$ 0.068	0.192 $\pm$ 0.023	0.384 $\pm$ 0.039
M组	0.536 $\pm$ 0.024 ^a	0.409 $\pm$ 0.047 ^a	0.936 $\pm$ 0.046 ^a	0.916 $\pm$ 0.060 ^a	0.977 $\pm$ 0.017 ^a
Y组	0.700 $\pm$ 0.029 ^b	0.780 $\pm$ 0.049 ^b	0.339 $\pm$ 0.024 ^b	0.393 $\pm$ 0.051 ^b	0.465 $\pm$ 0.016 ^b
Z组	0.695 $\pm$ 0.030 ^b	0.728 $\pm$ 0.091 ^b	0.486 $\pm$ 0.025 ^b	0.590 $\pm$ 0.073 ^b	0.504 $\pm$ 0.007 ^b
B组	0.728 $\pm$ 0.017 ^b	0.684 $\pm$ 0.087 ^b	0.905 $\pm$ 0.057	0.763 $\pm$ 0.020 ^b	0.764 $\pm$ 0.065 ^b
BL组	0.702 $\pm$ 0.025 ^b	0.801 $\pm$ 0.073 ^b	0.862 $\pm$ 0.057 ^c	0.755 $\pm$ 0.029 ^{bcd}	0.802 $\pm$ 0.014 ^{bcd}
R组	0.723 $\pm$ 0.016 ^b	0.716 $\pm$ 0.057 ^b	0.721 $\pm$ 0.052 ^b	0.482 $\pm$ 0.034 ^b	0.561 $\pm$ 0.023 ^b
RL组	0.880 $\pm$ 0.013 ^{bcd}	0.894 $\pm$ 0.071 ^b	0.403 $\pm$ 0.025 ^{bcd}	0.342 $\pm$ 0.030 ^{bcd}	0.399 $\pm$ 0.057 ^{bcd}

a: 与K组比较, $P < 0.05$; b: 与M组比较, $P < 0.05$; c: 与Z组比较, $P < 0.05$; d: 与R组比较, $P < 0.05$; e: 与B组比较, $P < 0.05$ 。

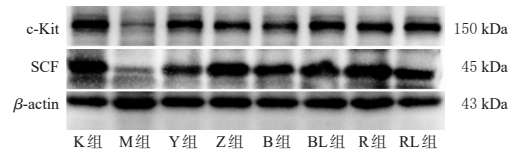


图5 大鼠胃窦组织中SCF、c-Kit蛋白表达电泳图

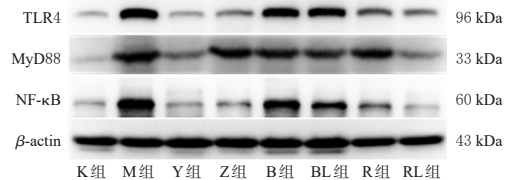


图6 大鼠十二指肠组织中TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达电泳图

著升高,表明枳实、两种益生菌以及枳实联用益生菌均可改善FD大鼠的胃肠动力。进一步的病理观察结果发现,FD大鼠的胃窦组织无明显器质性病变,但是十二指肠有一定程度的损伤,且伴有炎症细胞浸润。枳实、嗜酸乳杆菌以及两者联合使用均对FD大鼠的十二指肠损伤具有一定的改善作用,但是枯草芽孢杆菌及其与枳实的联合使用均对FD大鼠的十二指肠损伤无明显改善,这可能是由于枯草芽孢杆菌对十二指肠损伤的修复作用较弱,且能转化枳实中具有调节肠道屏障作用的黄酮苷类成分(如橙皮苷、柚皮苷等^[17])。

GAS、SP、VIP、SS、CCK是广泛分布在胃肠道的胃肠激素。研究表明,GAS和SP可以促进胃肠蠕动,加速胃排空;VIP、SS、CCK可以抑制胃酸分泌,进而减缓胃肠蠕动^[18]。本研究结果显示,与M组比较,各给药组大鼠血清中GAS、SP水平均显著升高,VIP、SS、CCK水平均显著降低;与Z组、R组、B组分别比较,RL组和BL组大鼠血清中GAS、SP(RL组对比B组除外)水平均显著升高,VIP、CCK、SS水平均显著降低。这说明枳实、枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌均可促进FD大鼠胃肠运动,且枳实与两种益生菌的联合作用更好。

研究表明,肠道菌群紊乱可能会通过破坏肠黏膜屏障、微生物-肠-脑轴等导致FD的发生和发展^[19]。正常情况下,厚壁菌门与拟杆菌门的相对丰度比值(简称为厚壁菌门/拟杆菌门值)处于稳定状态,当厚壁菌门/拟杆菌门值降低时,表明肠道益生菌减少,易导致消化不良等

问题^[20]。本研究结果显示,相较于K组,M组大鼠厚壁菌门相对丰度降低,拟杆菌门相对丰度升高,即厚壁菌门/拟杆菌门值降低;与M组比较,各给药组大鼠厚壁菌门/拟杆菌门值升高,提示肠道益生菌增多;与Z组比较,BL组、RL组厚壁菌门相对丰度无明显差异,拟杆菌门相对丰度升高,变形菌门相对丰度降低,说明枳实与两种益生菌联合后虽未提升肠道益生菌水平,但抑制了变形菌门的有害菌增殖。

研究表明,ICC的生长、表型维持和功能活性主要由SCF/c-Kit信号通路介导,而c-Kit作为Ⅲ型酪氨酸激酶受体,是ICC的特异性受体,主要由平滑肌细胞分泌,可与SCF结合^[10-11]。ICC的数量和形态结构异常可直接影响胃肠动力^[9]。ICC不仅可以接受SP、5-羟色胺等兴奋性脑肠肽介导的肠壁紧张性收缩,促进肠道运动;还可以接受抑制性脑肠肽如VIP等,使肠壁松弛^[21]。此外,SCF/c-Kit信号通路的激活可增强胃肠激素的反应性,通过磷酸化SP、神经激肽1等受体,调节ICC内在的起搏节律,从而增强胃肠道功能^[22]。另有研究表明,肠道内TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的激活可导致大量炎症因子的分泌,从而引发广泛的炎症反应,破坏肠上皮的完整性,进而损伤肠道的机械屏障和免疫屏障功能^[12-13]。本研究结果显示,与M组比较,各给药组大鼠胃窦组织中SCF、c-Kit蛋白表达上调,十二指肠组织中TLR4(B组和BL组除外)、MyD88、NF- κ B蛋白表达下调,且枳实与两种益生菌联合使用后可进一步调控上述蛋白的表达。这说明枳实、枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌可通过激活SCF/c-Kit信号通路、抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路,发挥改善FD大鼠胃肠动力的作用。

综上所述,枳实与枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌两种益生菌联用均可改善FD大鼠的胃肠动力,且效果优于单独用药,具体作用机制可能与激活SCF/c-Kit信号通路、抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路有关。

参考文献

- [1] OUSTAMANOLAKIS P, TACK J. Dyspepsia: organic versus functional[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2012, 46(3): 175-190.
- [2] WAUTERS L, TALLEY N J, WALKER M M, et al. Novel concepts in the pathophysiology and treatment of functional dyspepsia[J]. *Gut*, 2020, 69(3): 591-600.
- [3] LACY B E, CHASE R C, CANGEMI D J. The treatment of functional dyspepsia: present and future[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 17(1): 9-20.
- [4] 陈振海,冯江毅,胡淞,等. 枯草芽孢杆菌通过TGR5/TRPA1信号通路调节慢性传输型便秘小鼠的肠蠕动[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(7): 878-884.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 258.
- [6] 付郁,单国顺,尹爱凝,等. 中西医治疗功能性消化不良研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(10): 82-85, 270.
- [7] 周彩凤,唐友明,吴德坤,等. 中医治疗功能性消化不良肝胃不和型临床研究进展[J]. *实用中医药杂志*, 2024, 40

(9): 1892-1895.

- [8] KIM K, KO S J, CHO S H, et al. Herbal medicine, Banxia-xiexin tang, for functional dyspepsia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1130257.
- [9] 任春艳,陈月,时召平,等. 舒胃方调控SCF/c-Kit通路对功能性消化不良大鼠胃排空功能及Cajal间质细胞的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2024, 32(4): 321-327.
- [10] FENG J L, GAO J, ZHOU S, et al. Role of stem cell factor in the regulation of ICC proliferation and detrusor contraction in rats with an underactive bladder[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1516-1522.
- [11] 刘胜来,田大伟,吴长利. 梗阻性膀胱逼尿肌功能失调分子机制的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(10): 1606-1610.
- [12] WANG D, ZHANG J L, YANG D Y, et al. Electroacupuncture restores intestinal mucosal barrier through TLR4/NF- κ B p65 pathway in functional dyspepsia-like rats[J]. *Anat Rec*, 2023, 306(12): 2927-2938.
- [13] SONG W Y, HUANG J, LI Y, et al. The role of TLR4/MyD88/NF- κ B in the protective effect of ulinastatin on the intestinal mucosal barrier in mice with sepsis[J]. *BMC Anesthesiol*, 2023, 23(1): 414.
- [14] 曾琳琳,沈灵,范依霖,等. 枳实麸炒前后对功能性消化不良大鼠内质网应激相关因子的影响[J]. *华西药学杂志*, 2023, 38(3): 285-289.
- [15] 符佳,周赛男. 四磨汤口服液改善功能性消化不良模型大鼠的作用机制[J]. *中国药房*, 2023, 34(21): 2589-2594.
- [16] ROSCA V, GHEORGHE L, FLORIA D, et al. Functional dyspepsia assessment-current diagnostic methods and new promising techniques[J]. *Arch Clin Cases*, 2025, 12(1): 37-43.
- [17] CHEN S S, JIANG J P, CHAO G Q, et al. Pure total flavonoids from citrus protect against nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small intestine injury by promoting autophagy *in vivo* and *in vitro*[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 622744.
- [18] 梁兰琪,黎丽群,胡鑫,等. 基于脑肠互动理论探讨中医治疗功能性消化不良的研究进展[J]. *中国医药*, 2024, 19(4): 619-623.
- [19] ZHOU L, ZENG Y, ZHANG H X, et al. The role of gastrointestinal microbiota in functional dyspepsia: a review[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 910568.
- [20] BROWN G, HOEDT E C, KEELY S, et al. Role of the duodenal microbiota in functional dyspepsia[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2022, 34(11): e14372.
- [21] 张远哲,董文然,赵罗娜,等. 附子-肉桂配伍对阳虚型慢传输型便秘大鼠肠动力及SCF、c-Kit表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43(10): 1228-1235.
- [22] CHAI Y N, HUANG Y S, TANG H M, et al. Role of stem cell growth factor/c-Kit in the pathogenesis of irritable bowel syndrome[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1187-1193.

(收稿日期:2025-02-15 修回日期:2025-05-25)

(编辑:唐晓莲)