

海参蒸煮液对慢性便秘小鼠的通便作用

郭淑婷¹, 田迎樱², 薄钰莹¹, 蔡维震¹, 赵子方³, 王静凤^{1*}

(¹中国海洋大学 山东青岛 266000

²青岛海洋生物医药研究院 山东青岛 266100

³海南华研胶原科技股份有限公司 海口 570100)

摘要 目的:探究海参蒸煮液(SCCL)对小鼠慢性便秘的改善作用。方法:以盐酸洛哌丁胺构建小鼠慢性便秘模型,检测 SCCL 干预对慢性便秘小鼠排便、小肠推进率以及肠动力相关神经递质和受体基因表达的影响。结果:相较于模型对照组, SCCL 高剂量组(500 mg/kg BW)小肠墨汁推进率显著增加($P<0.05$),首次排便时间极显著缩短($P<0.01$),SCCL 低、高剂量组(250,500 mg/kg BW)6 h 内排黑便粒数和重量均显著增加($P<0.05$);小鼠结肠组织中杯状细胞数量、黏蛋白含量均显著增加($P<0.05$); M_2AChR 、 M_3AChR 、 $5-HT_2R$ 、 $5-HT_4R$ 以及 Cajal 间质细胞(ICC)干细胞因子 $C-Kim$ mRNA 表达显著升高($P<0.05$)。结论:SCCL 通过调节与肠道蠕动的神经递质 ACh 和 5-HT 及其下游信号通路,增加 ICC 细胞数量,提高肠动力,促进肠道蠕动,从而达到改善便秘的效果。

关键词 海参蒸煮液;慢性便秘;肠动力;乙酰胆碱;5-羟色胺

文章编号 1009-7848(2024)03-0056-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.006

便秘是临床常见的肠道疾病,主要表现为排便次数少、排便困难等^[1]。长期便秘会导致机体肝脏损伤、肥胖、焦虑、抑郁等各种疾病,生活质量严重下降^[2]。近年来,便秘已成为全球高发性疾病之一;临床常通过番泻叶、聚乙二醇 4000 散等药物进行治疗,但多会导致胃黏膜、结肠神经系统损伤,甚至产生严重的药物依赖作用,引发顽固性便秘,因此寻找治疗便秘的新途径迫在眉睫^[3]。

有研究表明慢性便秘与胃肠道异常有关,这通常是由于 Cajal 间质细胞(ICC)功能障碍^[4]和肠动力相关神经递质信号传递异常所致^[5]。其中,乙酰胆碱(ACh)和 5-羟色胺(5-HT)是主要的兴奋性神经递质,ACh 作用于肠平滑肌膜上的 M 胆碱受体,可使肌细胞收缩^[6]。Kim 等^[7]研究表明排便延迟可能与 ACh 下游信号通路失调有关。5-HT 参与调节胃肠运动和分泌功能,分布于胃肠道的肠内皮细胞和肠神经元,主要由肠内皮细胞合成和释放^[8-9]。5-HT 受体是位于中枢神经系统中央处和末梢神经系统周边的 G 蛋白偶联受体及配体门控离子通道,它们同时调节兴奋性和抑制性神经传

导物质的传递,其根据结构、生化和药理差异,可分为 7 个亚家族(5-HT₁~5-HT₇)和至少 14 个不同的亚型,其中 5-HT_{3R} 和 5-HT_{4R} 表达于结肠平滑肌细胞,与结肠收缩密切相关^[10]。血管活性肠肽(VIP)是胃肠道的抑制性神经递质,可舒张肠道平滑肌,抑制结肠动力^[11]。

海参蒸煮液(Sea cucumber cooking liquid, SCCL)是为了防止海参捕捞后出现自溶现象而经过高温蒸煮灭酶环节产生的大量废液,其含有海参加工过程中流失的多种脂肪酸、氨基酸、多糖类、皂苷类等海参活性组分。据统计,2020 年海参产量高达 19.65 万 t^[12],而 1 t 新鲜海参在加工过程中至少可产生约 0.6 t 的加工废液^[13],每吨废液又可提取 12 kg 左右的海参活性成分^[14]。目前 SCCL 还未被有效利用,每年排放的 SCCL 估值在 200 亿元以上,浪费资源的同时给环境也造成巨大压力。在传统食谱中木耳、海参炖猪肠有治疗血虚肠燥便秘之效,可改善老年人的习惯性便秘^[15]。对于 SCCL 是否能够缓解便秘,目前还尚无报道。为实现 SCCL 的高值化利用,本研究使用盐酸洛哌丁胺构建慢性便秘模型,通过分析 SCCL 对便秘模型小鼠结肠组织结构、结肠黏膜和结肠平滑肌收缩的关键神经递质含量和基因表达的影响,探究 SCCL 对便秘小鼠的改善作用及机制,为开发抗便

收稿日期:2023-03-30

基金项目:国家自然科学基金项目(32172137)

第一作者:郭淑婷,女,硕士

通信作者:王静凤 E-mail: jfwang@ouc.edu.cn

秘食品或药品提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 7~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 体质量 18~22 g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供。动物合格证号: SCXK (鲁) 20190003。动物饲养环境温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度为 40%~50%, 12 h 光/12 h 暗节律交替。

1.1.2 材料与药品 海参蒸煮液干粉, 山东好当家海洋发展股份有限公司; 盐酸洛哌丁胺胶囊, 西安杨森制药有限公司; 乳果糖, Fresenius Kabi Austria GmbH。

1.1.3 试剂 乙酰胆碱(ACh)、5-羟色胺(5-HT)、血管活性肠肽(VIP)Elisa 试剂盒, 江苏晶美生物科技有限公司; M-MLV 逆转录酶, 美国 Promega 公司; 引物、随机引物、UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 上海生工生物工程有限公司; SYBR Green 荧光染料, 上海近岸科技有限公司; BCA 试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 其它试剂, 国产分析纯。

1.1.4 仪器与设备 Milli-Q Synthesis 超纯水系统, 美国 Milipore 公司; GL-20M 型高速冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机仪器公司; Ultra Trurrax T18 basic 型高速匀浆机, 德国 IKA 公司; 研究级正置荧光显微镜, OLYMPUS(奥林巴斯)北京销售服务有限公司上海分公司; Model 680 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; NANO-200 微量分光光度计, 杭州奥盛仪器有限公司; ICycler iQ5 系统 Real-Time PCR 扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司; Light Cycler480 实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪, 瑞士 Roche 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 动物模型建立及分组 小鼠随机分为 5 组, 分别为正常组、模型组、阳性药组(乳果糖 500 mg/kg), SCCL 低剂量组(250 mg/kg), SCCL 高剂量组(500 mg/kg), 每组 10 只动物; 试验分为 2 部分, 分别为小肠运动试验($n=4$)与排便试验($n=6$)。试验组小鼠灌胃盐酸洛哌丁胺造模(10 mg/kg), 正常组给予生理盐水, 给药体积 0.1 mL/10 g BW, 连续 3 周, 每日 1 次。

造模 3 周后, 随机挑选正常组小鼠 5 只, 灌药组 10 只, 进行排黑便试验, 记录首粒黑便时间和 6 h 排便数量, 用于检验模型是否建立成功。检验成模后, 各组开始灌胃受试物(早), 并继续给药(晚), 给药体积 0.1 mL/10 g BW, 连续 2 周。

1.2.2 小肠蠕动试验 受试物干预 2 周后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 各组($n=4$)灌胃盐酸洛哌丁胺(10 mg/kg BW), 30 min 后分别灌胃含有相应受试物的墨汁(含 0.8%阿拉伯胶+5%活性炭); 给墨汁 20 min 后, 麻醉后脱颈椎处死小鼠, 打开腹腔, 分离肠系膜, 记录小肠长度和墨汁推进长度。计算小肠墨汁推进率, 公式: 墨汁推进率(%)=墨汁推进长度/小肠长度 $\times 100\%$ 。

1.2.3 排黑便试验 小鼠禁食不禁水 12 h, 各组($n=6$)灌胃盐酸洛哌丁胺(10 mg/kg BW), 30 min 后, 各组均灌胃墨汁(0.8%阿拉伯胶+5%活性炭), 从灌胃墨汁开始计时, 记录各组小鼠首粒黑便时间、6 h 黑便数量和质量; 将收集的粪便在 60°C 干燥器中干燥 12 h 后, 计算粪便含水率, 公式: 粪便含水率(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$, 试验结束后小鼠麻醉取血, 脱颈椎处死小鼠后取结肠组织, 部分组织固定用于组织形态学观察, 部分组织入液氮保存用于相关基因 mRNA 的表示水平测定。

1.2.4 肠道组织形态学观察 结肠组织使用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 酒精脱水、石蜡包埋、制备 6 μm 切片, 苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, H&E)染色, BX53 荧光显微镜观察组织形态并成像。

1.2.5 结肠 MUC-2、ACh、5-HT、VIP 等生化指标测定 使用生理盐水按 1:9(m/V)制备 10% 的结肠匀浆液, 离心, 收集上清液, BCA 试剂盒测定结肠匀浆蛋白浓度, Elisa 试剂盒检测 MUC-2、ACh、5-HT、VIP 含量。

1.2.6 qRT-PCR 法检测 M_2AChR 、5-HT₃、C-Kit 等 mRNA 的表达 取在 -80°C 下保存的结肠, Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取 mRNA, 使用 Nano-200 微量分光光度计测定 RNA 纯度和浓度, 逆转录得到 cDNA 样品, 采用 qRT-PCR 法测定 M_2AChR 、 M_3AChR 、5-HT₃R、5-HT₂R、C-Kit 的转录水平。反应体系为 25 μL , 其中 cDNA 样品、基因的上下游引物、DEPC 水、SYBR 荧光染料各 5, 0.75,

6, 12.5 μL ; 扩增过程: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 扩增 35 个循环。基因的具体引物序列见表 1, 各目的基因

mRNA 表达量按 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算, 以 *GAPDH* 作为内参校正。

表 1 目的基因引物序列

Table 1 The primer sequence of different genes

基因	上游 5'→3'	下游 5'→3'
<i>M₂A ChR</i>	ACACTAATTACTACTTCCCGGC	CTTCTCCCTGGATCTGGCTT
<i>M₃A ChR</i>	ATCTGTGTGAGTTCCGCACG	CATCCTGCCAGTTCCCTGTT
<i>5-HT₃R</i>	GAGGCACCTGGTCCTAGACA	AGTGGTTTCCCATGGCTGAG
<i>5-HT₄R</i>	GCAGTCCTTGGGCTCTGATA	CTGTGAGGTGACACCGACTC
<i>C-Kα</i>	GAGTGTAAGGCCTCCAACGA	GGGCCTGGATTTGCTCTTTGT
<i>GAPDH</i>	TCCGAGCTACAGAGGAACC	CGGTCATGAAAGTGCGGTA

1.3 统计分析

试验数据均以“平均值 \pm 标准差”(“ $\bar{x} \pm s$ ”)表示, 采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 同时用 LSD 法进行组间差异比较, 以 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异, $P < 0.01$ 表示存在极显著性差异。

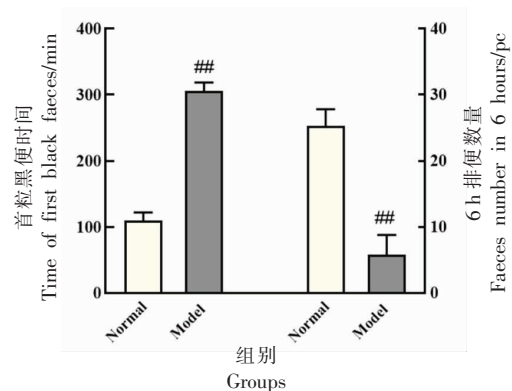
2 结果

2.1 慢性便秘模型的构建

如图 1 所示, 连续给药 3 周后, 较正常组相比, 模型组小鼠首粒黑便时间极显著延长 ($P < 0.01$), 黑便粒数极显著减少 ($P < 0.01$), 提示小鼠慢性便秘模型成功构建。

2.2 SCCL 对慢性便秘小鼠体质量的影响

图 2 显示, 与正常组相比, 盐酸洛哌丁胺造模后, 小鼠体质量增加减缓, 建模前后体质量增量明



注: # 与正常组比较, $P < 0.05$; ## 与正常组比较, $P < 0.01$; * 与模型组比较, $P < 0.05$; ** 与模型组比较, $P < 0.01$; 下同。

图 1 小鼠便秘模型的构建

Fig.1 Indicators of completion of constipation model in mice

显小于正常组 ($P < 0.01$), SCCL 干预后, 小鼠体质量较模型组无显著性差异。

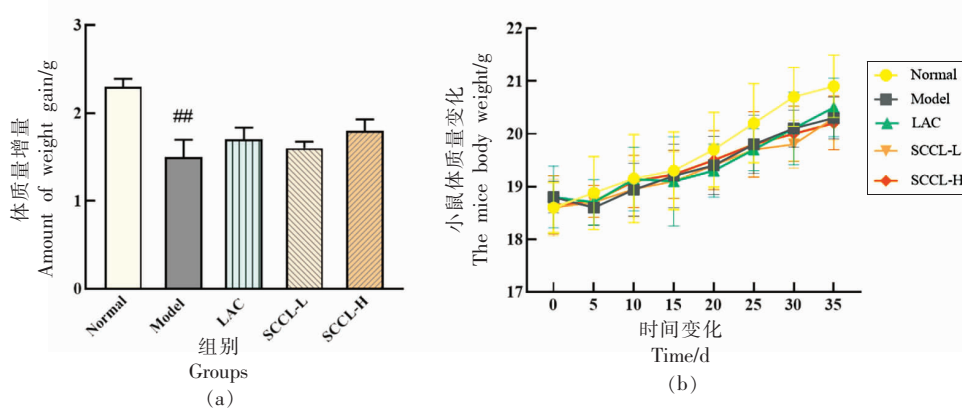


图 2 SCCL 对慢性便秘小鼠体质量的影响

Fig.2 Effect of SCCL on weight of mice with chronic constipation

2.3 SCCL 对慢性便秘小鼠肠道蠕动情况的影响

图 3 显示, 盐酸洛哌丁胺干预使得小鼠肠道蠕动明显减缓, 与正常组相比, 模型组小鼠的胃肠墨汁推进长度明显减短, 小肠推进率极显著降低

($P < 0.01$), SCCL 干预后, 相同时间内小鼠胃肠墨汁推进长度明显增加, SCCL 高剂量组小鼠的小肠推进率显著高于模型组 ($P < 0.05$), 初步结果表明, SCCL 能够加快便秘小鼠小肠蠕动。

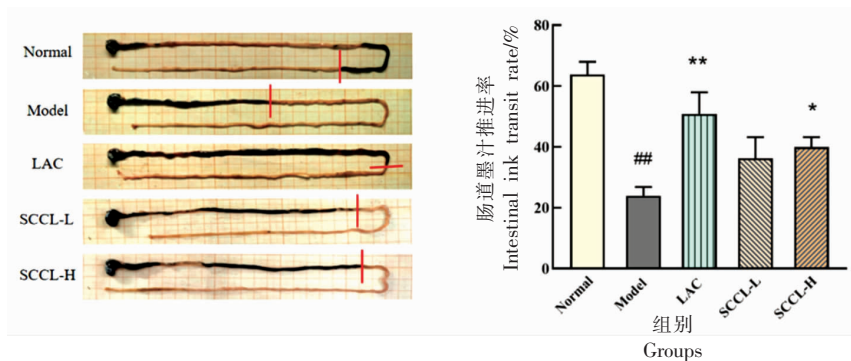


图 3 SCCL 对慢性便秘小鼠小肠运动的影响

Fig.3 Effect of SCCL on intestinal motility in mice with chronic constipation

2.4 SCCL 对便秘小鼠排便情况的影响

图 4 结果显示, 盐酸洛哌丁胺干预后小鼠出现明显的便秘症状, 与正常组相比, 模型组首粒黑便排除时间极显著增加 ($P < 0.01$), 6 h 内排出的黑便的粒数及黑便重量均极显著减少 ($P < 0.01$), 同时测得黑便含水率显著降低 ($P < 0.05$), SCCL 干预后, 首粒黑便时间明显缩短, 黑便数量、质量和含水率明显增加。其中高剂量 SCCL 组首粒黑便时

间较正常组极显著缩短 ($P < 0.01$), 低剂量和高剂量组的 6 h 黑便粒数、重量较模型组均显著增加 ($P < 0.05$); 高剂量组含水率较正常组极显著增大 ($P < 0.01$)。小鼠粪便形态图可知, 模型组黑便颗粒多呈球形、小而干硬、有尖头, 出现明显便秘症状; SCCL 干预后, 黑便颗粒明显增大, 质地湿软、黑便两头圆润。以上结果表明, SCCL 对小鼠的便秘症状有明显的缓解作用。

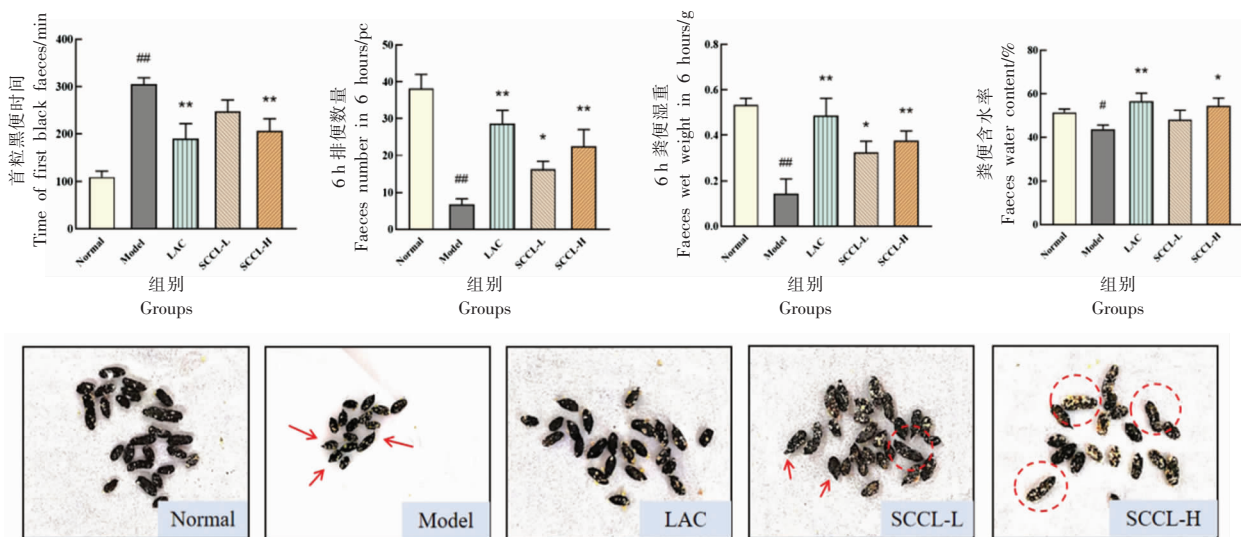


图 4 SCCL 对便秘小鼠排便情况的影响

Fig.4 Effect of SCCL on defecation in mice with chronic constipation

2.5 SCCL对慢性便秘小鼠结肠组织参数的影响

在组织病理学评估中,结肠杯状细胞的数量和结肠黏膜中黏液产生的减少与便秘直接相关^[16-17]。为进一步确定SCCL对小鼠便秘的改善作用,采用H&E染色观察小鼠结肠形态和杯状细胞的变化,如图5所示,与正常组相比,模型组结肠黏膜层变薄,腺体减少,杯状细胞减少,固有层炎

症细胞浸润。与模型组相比,SCCL干预后,大部分黏膜恢复正常,杯状细胞增加,可明显改善盐酸洛哌丁胺引起的小鼠结肠组织学损伤。ELISA测定结肠组织中黏蛋白MUC-2的含量,并对H&E切片中杯状细胞进行定量,结果显示杯状细胞数量和MUC-2(图5右)明显增高($P<0.05$),说明SCCL可能通过增加杯状细胞数量和黏蛋白含量,使便秘小鼠肠道润滑,从而加速粪便排出。

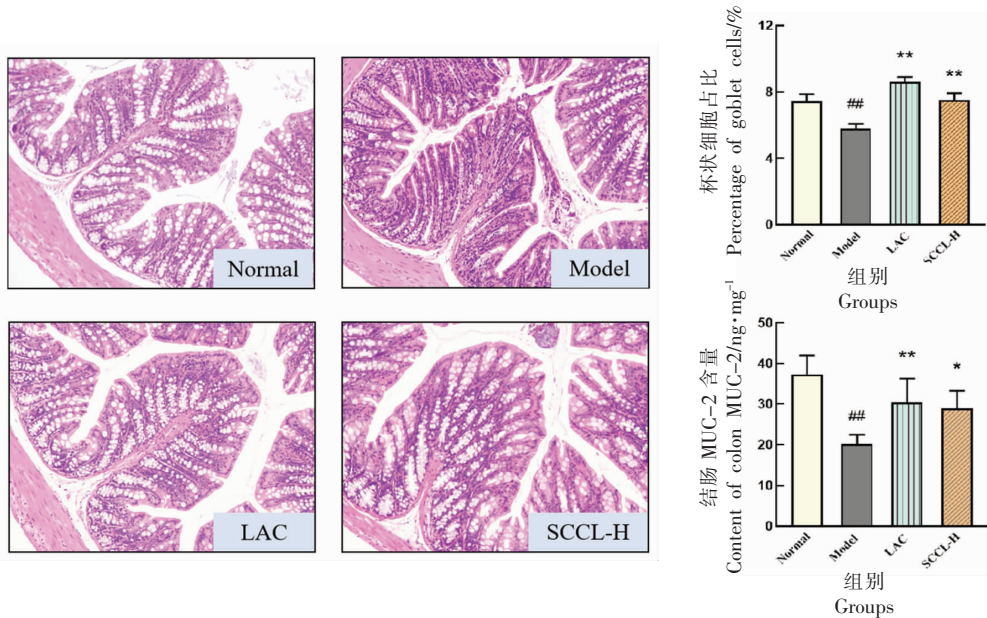


图5 SCCL对慢性便秘小鼠结肠组织的影响

Fig.5 Effect of SCCL on colon tissue of chronic constipation mice

2.6 SCCL对慢性便秘小鼠胃肠道调节相关神经递质的影响

5-HT和ACh已被证实是分布在肠神经系统(ENS)的兴奋性神经递质,参与调节胃肠运动和分泌功能^[9,18],VIP作为调节肠蠕动的抑制性神经递质,可诱导肌肉松弛^[11]。如图6所示,与正常组相比,模型组小鼠结肠组织中的兴奋性神经递质5-HT、ACh显著降低,抑制性神经递质VIP显著升高($P<0.05$)。SCCL干预后,改善了盐酸洛哌丁胺导致的5-HT降低和VIP的升高($P<0.05$),但ACh含量没有明显变化。这些结果表明,SCCL一定程度上能够调节胃肠神经递质的水平,改善盐酸洛哌丁胺诱导的便秘小鼠肠动力水平下降,同时推测SCCL可能通过影响神经递质受体变化来发挥改善肠动力的作用。

2.7 SCCL对慢性便秘小鼠肠蠕动关键基因表达的影响

为进一步探讨5-HT和ACh相关受体在远端结肠中的表达变化,采用RT-PCR方法检测相关受体基因的mRNA表达水平。如图6所示,与正常组相比,模型组 M_2AChR 、 M_3AChR 表达显著降低($P<0.05$),5-HT₃和5-HT₄表达极显著降低($P<0.01$)。SCCL-H组 M_2AChR 、 M_3AChR 、5-HT_{3R}和5-HT_{4R}mRNA表达较模型组分别上升了251%、316%、148%和146%($P<0.01$)。ICC是胃肠道中的起搏器细胞,直接影响平滑肌的收缩^[9],对其干细胞因子*C-kit*的mRNA表达量进行测定,发现与正常组相比,模型组*C-kit*表达显著降低($P<0.05$)。SCCL-L组和SCCL-H组*C-kit*的mRNA表达较模型组上升了164%($P<0.01$)。提示SCCL

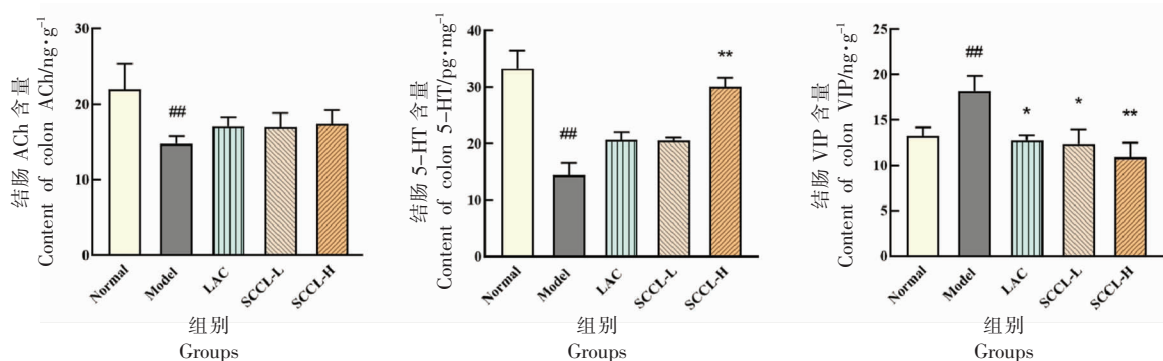


图 6 SCCL 对慢性便秘小鼠结肠神经递质的影响

Fig.6 Effect of SCCL on colonic neurotransmitters in mice with chronic constipation

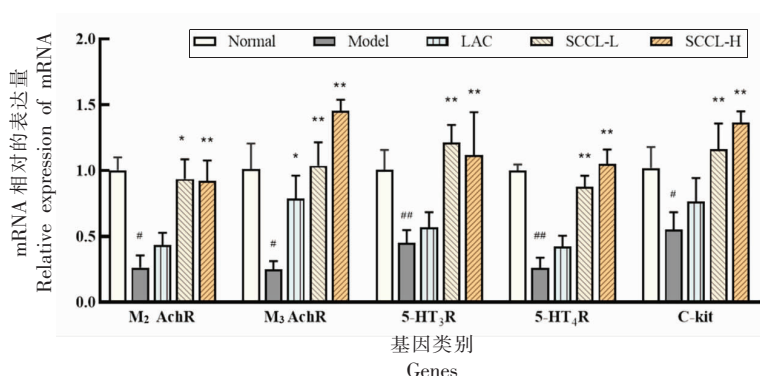


图 7 SCCL 对肠蠕动相关基因表达的影响

Fig.7 Effect of SCCL on the expression of intestinal peristalsis related genes

通过增加兴奋性神经递质受体的表达，激活兴奋性神经递质的信号通路，从而增强肠道动力。

3 讨论

慢性便秘病因较多，在小鼠模型中难以复制各种疾病因素，已有研究表明盐酸洛哌丁胺可以抑制小鼠平滑肌收缩，降低肠蠕动，减少粪便含水量，可用来建立慢性便秘模型^[20]。海参具有较高的食用和药用价值，其在加工过程中流失的多种脂肪酸、肽类蛋白和多糖类具有良好的生物活性。在传统食谱中木耳海参炖猪肠有治疗血虚肠燥便秘之效，为了确定 SCCL 是否可以用于治疗慢性便秘，本研究通过评估小鼠排便指标(时间、数量、质量和水分)、小肠推进率和结肠组织结构来检测 SCCL 对洛哌丁胺诱导的便秘小鼠的影响。研究发现盐酸洛哌丁胺干预后，小鼠体质量，粪便粒数、质量，含水率，小肠推进率明显降低，排便时间明显增加，结肠组织中的平滑肌细胞萎缩、排列紊

乱，结肠组织神经细胞减少，炎性细胞渗入黏膜。而 SCCL 明显改善了由盐酸洛哌丁胺引起的便秘症状，改善结肠隐窝和杯状细胞的形态，表现出治疗便秘和保护结肠组织的效果。

胃肠道神经递质或激素在胃肠道中可直接参与胃肠道运动^[21]，Huang 等^[22]研究发现在盐酸洛哌丁胺诱导的小鼠便秘模型中，盐酸洛哌丁胺会扰乱小鼠胃肠调节激素及神经递质的动态平衡，抑制性神经递质的产生过度 and 兴奋性神经递质的产生不足可能抑制结肠蠕动，从而导致慢传输性便秘。Huang 等^[18]研究发现，便秘小鼠模型中刺激胃肠蠕动相关基因显著下调，肠动力抑制基因显著上调，与本研究结果中模型组小鼠 5-HT、ACh 极显著降低，VIP 极显著升高($P < 0.01$)一致，SCCL 干预后小鼠结肠组织中 5-HT 显著升高，VIP 显著降低($P < 0.05$)，说明 SCCL 可一定程度上改善盐酸洛哌丁胺引起的肠道激素及神经递质的失调，SCCL 组结肠 ACh 含量较模型组升高但无

显著性变化,提示SCCL也可能通过改变神经递质下游信号通路,影响神经递质发挥作用。

进一步对ACh和5-HT的下游信号进行了检测,已有研究证明当便秘发生时,小鼠横结肠中ACh下游的M2和M3型受体的转录水平和5-HT受体中的5-HT_{3R}和5-HT_{4R}的转录水平均显著降低^[23-24],本研究结果发现盐酸洛哌丁胺引起了小鼠结肠组织中M₂AChR、M₃AChR、5-HT_{3R}和5-HT_{4R} mRNA表达水平显著降低($P<0.05$),SCCL干预后测得4种受体mRNA的表达均极显著升高,这与Cao等^[24]、Wu等^[10]研究结果基本一致,提示SCCL可能通过影响ACh和5-HT的下游信号通路,促进兴奋性神经递质发挥作用,增强肠道收缩功能,从而加快肠道的传递,缩短肠道内容物通过肠道的时间。

肠道运动还受各种ENS相关细胞的复杂协作和交流的调节,包括肠神经递质、ICC和平滑肌^[26]。以往研究已证明在便秘的发病过程中,动物模型和人类患者的肠道神经元和ICC的数量都发生了显著的变化^[27-28]。本研究对直接影响平滑肌的收缩的ICC细胞的干细胞因子*C-kit*的mRNA表达量进行测定,结果发现与模型组相比,SCCL两个剂量组的转录水平均极显著升高($P<0.01$),推测SCCL可能通过调控ACh和5-HT的下游信号通路,上调ICC细胞数量,改善便秘小鼠肠蠕动缓慢等问题。

综上所述,SCCL对盐酸洛哌丁胺所致的小鼠便秘有明显的缓解作用,其机制可能是SCCL通过调节刺激胃肠蠕动的相关神经递质ACh和5-HT及其下游信号通路,增加ICC细胞数量,加速肠道收缩,促进肠道蠕动,从而达到缓解便秘的效果。

参 考 文 献

- [1] 姜华. 中老年功能性便秘患者症状与生活质量的关联性观察[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(92): 26-27.
JIANG H. Correlation between symptoms and quality of life in middle-aged and elderly patients with functional constipation[J]. Electronic Journal of Clinical Medical Literature, 2019, 6(92): 26-27.
- [2] 刘宝华, 刘沂. 国内外便秘诊治指南比较分析[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(19): 1846-1851.
LIU B H, LIU Y. Comparison analysis between domestic and foreign guidelines on constipation diagnosis and treatment [J]. Journal of Third Military Medical University, 2019, 41(19): 1846-1851.
- [3] RODRIGUEZ R W. Off-label uses of alvimopan and methylnaltrexone[J]. American Journal of Health-system Pharmacy, 2014, 71: 1450-1455.
- [4] ZHU F Y, XU S, ZHANG Y S, et al. Total glucosides of paeony promote intestinal motility in slow transit constipation rats through amelioration of interstitial cells of caja[J]. PLoS One, 2017, 11(8): e0160398.
- [5] 包云光, 舒小莉, 李小兵, 等. 肠神经系统递质和Cajal间质细胞在大鼠慢传输型便秘中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(6): 481-485.
BAO Y G, SHU X L, LI X B, et al. Roles of enteric nervous system neurotransmitters and interstitial cells of Cajal in the colon in slow transit constipation in rats[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2009, 11(6): 481-485.
- [6] WU H, CHEN Y J, HUANG B B, et al. Aster tataricus alleviates constipation by antagonizing the binding of acetylcholine to muscarinic receptor and inhibiting Ca influx[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111005.
- [7] KIM J E, CHOI Y J, LEE S J, et al. Molecular characterization of constipation disease as novel phenotypes in CRISPR-Cas9-Generated leptin knockout mice with obesity[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9464.
- [8] GUARINO M, CHENG L, CICALA M, et al. Progesterone receptors and serotonin levels in colon epithelial cells from females with slow transit constipation[J]. Neurogastroenterol Motil, 2011, 23(6): 575-e210.
- [9] REYNAUD Y, FAKHRY J, FOTHERGILL L, et al. The chemical coding of 5-hydroxytryptamine containing enteroendocrine cells in the mouse gastrointestinal tract [J]. Cell Tissue Res, 2016, 364(3): 489-497.
- [10] WU M, LI Y R, GU Y F. Hesperidin improves colonic motility in loeramide-induced constipation rat model via 5-hydroxytryptamine 4R/cAMP signaling pathway[J]. Digestion, 2020, 101: 692-705.

- [11] GRIDER J R. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(2): 460–467.
- [12] 农业农村部渔业渔政管理局. 2021 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 23. Ministry of Agriculture and Rural Affairs. 2021 China fishery statistics yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2021: 23.
- [13] 袁文鹏, 刘新, 樊廷俊, 等. 仿刺参加工废液中几种海参皂苷化合物的分离鉴定[J]. 山东大学学报(理学版), 2011, 46(7): 17–20, 34. YUAN W P, LIU X, FAN T J, et al. Isolation and identification of the structure of several holothurian glycosides compounds from the processing liquid waste of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Journal of Shandong University (Natural Science)*, 2011, 46(7): 17–20, 34.
- [14] 孙明河. 信息集萃[J]. 渔业现代化, 2010, 37(3): 74. SUN M H. Collection of information [J]. *Fishery Modernization*, 2010, 37(3): 74.
- [15] 陈日益. 便秘实用食疗方[J]. 健康生活, 2023(4): 49–50. CHEN R Y. Practical diet for constipation[J]. *Health Life*, 2023(4): 49–50.
- [16] 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]. *Carbohydr Polym*, 2021, 253: 117218.
- [17] YANG Z H, YU H J, PAN A, et al. Cellular mechanisms underlying the laxative effect of flavonol naringenin on rat constipation model[J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3348.
- [18] HUANG J Q, LIN B, ZHANG Y, et al. Bamboo shavings derived *O*-acetylated xylan alleviates loperamide-induced constipation in mice[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 276: 118761.
- [19] ZHANG G S, XIE S, HU W, et al. Effects of electroacupuncture on interstitial cells of Cajal (ICC) ultrastructure and connexin 43 protein expression in the gastrointestinal tract of functional dyspepsia (FD) rats[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2021–2027.
- [20] 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, 2020, 28(3): 370–375. YAO Y B, WANG D, WANG Q T, et al. Establishment of an oral mucositis model in golden hamsters by 5-fluorouracil combined with mechanical scratch[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2020, 28(3): 370–375.
- [21] 于红珍, 付明海, 吉小平, 等. 简述胃肠动力调节机制的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2020, 28(23): 1183–1191. YU H Z, FU M H, JI X P, et al. Progress in research of gastrointestinal motility regulation[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2020, 28(23): 1183–1191.
- [22] HUANG J Q, LI S Y, WANG Q, et al. *Pediococcus pentosaceus* B49 from human colostrum ameliorates constipation in mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(6): 5607–5620.
- [23] KIM J E, LEE Y J, KWAK M H, et al. Aqueous extracts of *Liriope platyphylla* induced significant laxative effects on loperamide-induced constipation of SD rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13(1): 333.
- [24] CAO P Q, LI X P, OU Y J, et al. The protective effects of yellow tea extract against loperamide-induced constipation in mice[J]. *Food Funct*, 2021, 12(12): 5621–5636.
- [25] KIM J E, GO J, SUNG J E, et al. Uridine stimulate laxative effect in the loperamide-induced constipation of SD rats through regulation of the mAChRs signaling pathway and mucin secretion[J]. *BMC Gastroenterol*, 2017, 17(1): 21.
- [26] AL-SHBOUL O A. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2013, 19(1): 3–15.
- [27] LIM Y L, YANG L T, BI C C, et al. *Nostoc sphaeroides* Kütz polysaccharide improved constipation and promoted intestinal motility in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5596531.
- [28] 张东旭, 朱安龙. 慢传输型便秘的发病机制与诊治[J]. 中华胃肠外科杂志, 2016, 19(12): 1447–1450. ZHANG D X, ZHU A L. Pathogenesis and treatment of slow transit constipation[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2016, 19(12): 1447–1450.

Effect of Sea Cucumber Cooking Liquid on Chronic Constipation Mice

Guo Shuting¹, Tian Yingying², Bo Yuying¹, Cai Weizhen¹, Zhao Zifang³, Wang Jingfeng^{1*}

¹*Ocean University of China, Qingdao 266000, Shandong*

²*Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266100, Shandong*

³*Hainan Huayan Collagen Technology Co., Ltd., Haikou 570100*

Abstract Objective: To investigate the effect of sea cucumber cooking liquid (SCCL) dry powder on chronic constipation in mice. Methods: Loperamide hydrochloride was administered intragastrically to establish the chronic constipation model. To evaluate the positive effect of SCCL in intestinal motility of constipation mice, the defecation situation, intestinal ink transit rate and mRNA expression levels of intestinal motility related neurotransmitters and receptors were detected. Result: Compared with the model control group, the intestine ink transit rate of mice in the high-dose SCCL group was significantly increased ($P<0.05$), the time of first black faeces was significantly shortened ($P<0.01$), and the number and weight of faeces in 6 hours in the low-dose and high-dose SCCL groups were significantly increased ($P<0.05$); The number of goblet cells and the content of mucin in the colon of mice were improved significantly ($P<0.05$); The mRNA expression levels of M_2AChR , M_3AChR , $5-HT_3R$, $5-HT_4R$ and C-Kit in colon tissue were significantly increased ($P<0.05$). Conclusion: SCCL alleviated constipation by regulating intestinal peristalsis related neurotransmitters such as ACh, 5-HT and its downstream signaling pathways, eventually increased the number of ICC cells, improved intestinal motility and promoted intestinal peristalsis.

Keywords sea cucumber cooking liquid; chronic constipation; intestinal motility; ACh; 5-HT