

消脂汤对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肠道主要菌群的影响

朱青¹, 王晓歌², 王奇², 袁冬生^{3*}

- (1. 广州中医药大学 热带医学研究所, 广州 510405;
2. 广州中医药大学 临床药理研究所, 广州 510405;
3. 广州中医药大学 经济与管理学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**观察消脂汤对非酒精性脂肪性肝炎(NAFLD)小鼠模型的治疗作用及对肠道主要菌群的影响。**方法:**采用D12492高脂饲料诱导建立NAFLD小鼠模型,造模成功后分别给予不同剂量药物干预,检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6),内毒素(LPS)及相关生化指标,取肝脏行苏木素-伊红(HE)染色和油红O染色;实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测结肠内容物中普雷沃氏菌属、梭杆菌属、双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠埃希菌等主要肠道菌群数量的变化。**结果:**与正常组比较,模型组血清甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),空腹血糖(FBG),空腹胰岛素(FINS),胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),LPS,TNF- α ,IL-6水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,治疗组FBG,FINS,HOMA-IR,TC,TG显著降低($P < 0.01$),非诺贝特组血清ALT,AST无明显降低;与正常组比较,模型组小鼠结肠内梭杆菌属、普雷沃氏菌属、双歧杆菌及乳酸杆菌数量明显减少($P < 0.01$),大肠埃希菌数量升高($P < 0.01$);正常组与正消组比较无明显差异;与模型组比较,正消组,消脂汤高、中剂量组梭杆菌属、普雷沃氏菌属、双歧杆菌及乳酸杆菌数量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),大肠埃希菌数量显著减少($P < 0.01$);消脂汤低剂量组、非诺贝特组与模型组无明显差异。**结论:**消脂汤能显著改善NAFLD小鼠的胰岛素抵抗,减轻肝脏脂肪蓄积和炎症反应,可能与其调整肠道菌群,促进乳酸杆菌、双歧杆菌等优势菌群数量的增长相关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎; 消脂汤; 肠道菌群; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6; 内毒素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0164-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140164

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.1128.068.html>

[网络出版时间] 2017-04-20 11:28

Effect of Xiaozhitang on Intestinal Flora of Mice with NAFLD

ZHU Qing¹, WANG Xiao-ge², WANG Qi², YUAN Dong-sheng^{3*}

- (1. Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
3. College of Economics and Management, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Xiaozhitang on intestinal flora of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) model. **Method:** Mice were fed with D12492 high-fat diet for 16 weeks to establish the NAFLD model. After successful modeling, they were randomly divided into model group, high-dose Xiaozhitang group, middle-dose Xiaozhitang group, low-dose Xiaozhitang group, fenofibrate group, normal control group and Xiaozhitang control group. All of the mice were given normal diet. Meanwhile, drug groups were given the corresponding drugs, and control group was given equal volume of normal saline. Nine weeks after administration, all of the mice were treated with intraperitoneal anesthesia with 3% hydrate to collect serum. Total cholesterol

[收稿日期] 20161204(001)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A020212596)

[第一作者] 朱青, 硕士, 从事中医药治疗肝病的基础与临床研究, Tel:020-36585419, E-mail: zhenyi19890121@163.com

[通讯作者] *袁冬生, 博士, 研究员, 从事中医药治疗肝病的基础与临床研究, Tel:020-39357660, E-mail: ydshy@21.cn.com

(TC) and Triglyceride (TG) content in liver tissues and aspartase aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) content in serum were detected by automatic biochemical analyzer. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and Lpopolysaccharide (LPS) were detected by enzymes linked immunosorbent assay (ELISA). Two liver tissues were collected for paraffin embedding, hematoxylin-eosin (HE) staining and oil red O staining. Bacterial counts of *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium* and *Lactobacillus* were examined by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with normal group, blood lipid, insulin (INS) and insulin resistance index (HOMAR-IR) were significantly increased in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, TC, TG, FBG, FINS, HOMA-IR were lower in experimental group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, there was no difference between model group and fenofibrate group. The bacterial counts of *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* and *Lactobacillus* in model group were lower than normal group ($P < 0.01$), and *Escherichia coli* was higher in model group. The bacterial counts of *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* and *Lactobacillus* were much higher in high-dose group and middle-dose group than that of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, the bacterial count of *Escherichia coli* was lower than model group ($P < 0.01$). There was no difference between model group, the low-dose group and the Fenofibrate group. **Conclusion:** Xiaozhitang can significantly improve insulin resistance of NAFLD, reduce lipid and inflammation, which may be related to its effects in adjusting intestinal flora and improving the growth of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and other dominant flora.

[Key words] non-alcoholic steatohepatitis; Xiaozhitang; intestinal flora; tumor necrosis factor alpha (TNF- α); interleukin-6 (IL-6); lpopolysaccharide (LPS)

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是常见的肝病, 患病率约 25% ~ 30%, 在肥胖, 2 型糖尿病, 高脂血症和高血压等相关代谢综合征中, NAFLD 的患病率大大增加^[1-2]。NAFLD 进展主要包括非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 肝纤维化甚至肝硬化^[3], 其发病机制目前大多认为与肥胖、高脂血症、胰岛素抵抗等多种因素相关^[4-6]。肠道微生物作为肥胖及其相关代谢疾病的发病因素之一, 越来越被研究者们重视^[7]。高脂饮食的无菌小鼠和普通小鼠比较, 无菌小鼠表现出抵抗肝脂肪变性, 改善糖耐量和胰岛素敏感性增加, 同时发现肠道微生物中厚壁菌门及放线菌门丰度减少, 拟杆菌门丰度增加^[8]。大量研究表明肠道微生物参与 NAFLD 的发生, 可进展为 NASH, 但肠道微生物、胰岛素抵抗 (IR) 及炎症三者之间是否相关目前尚缺乏足够的证据。中医药在 NAFLD 治疗中越来越受到关注, 消脂汤 (专利号 中国, 201110416602.1) 基于中医理论制备, 前期研究表明其能显著改善 NAFLD 的胰岛素抵抗和氧化应激, 减轻肝脏脂肪蓄积和炎症反应^[9]。本研究在前期研究基础上进一步探讨其对 NASH 小鼠模型药效学作用, 并且以肠道菌群为着入点, 研究消脂汤对肠道微生物群的调节作用, 探讨肠道主要菌群的变化、胰岛素抵抗及炎症三者之间有无相关性, 为进一步的机制研究和治疗策略提供依据。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 105 只, 体重 12 ~ 15 g, 购自广州中医药大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (粤) 2013-0034, 饲养于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级动物实验室, 通过广州中医药大学实验动物伦理委员会审查, 符合实验动物伦理委员会规定。

1.2 药物 消脂汤: 山楂 30 g, 何首乌 20 g, 决明子 20 g, 丹参 30 g, 虎杖 15 g, 白术 15 g, 泽泻 15 g, 柴胡 10 g, 中药饮片由广州中医药大学第一附属医院提供, 药材来源于广东省药材公司中药饮片厂, 由广州中医药大学中药学院王利胜教授鉴定为正品。复方煎剂被浓缩制成含生药 3.4 g·mL⁻¹ 的水煎剂, 置 4 °C 冰箱保存备用。非诺贝特胶囊 (法国利博福尼制药公司, 批号 24586) 用生理盐水配成 2 g·L⁻¹ 混悬液。

1.3 高脂饲料 D12492 高脂饲料, 营养素由蛋白 26.2%, 碳水化合物 26.3%, 脂肪 34.9% 组成, 由广东省医学实验动物中心提供, 合格证号 No. 44200300008694。

1.4 方法 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组, 模型组, 正常 + 消脂汤组 (正消组), 消脂汤高剂量组, 消脂汤中剂量组, 消脂汤低剂量组及非诺贝特组, 每组 15 只。室温 15 ~ 20 °C, 湿度 60% ~ 70% 条件喂养,

适应性喂养 5 d 后,正常组及正消组给以普通饲料喂养,模型组予 D12492 高脂饲料喂养。

1.5 试剂 小鼠葡萄糖(GLU)测定试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司,批号 20160804147);总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20161012,20160715,20161013,20161014);胰岛素(INS)测定试剂盒,肿瘤坏死因子(TNF)- α ,白细胞介素-6(IL-6)试剂盒(武汉华美生物工程公司,批号分别为 CSB-E05071m,CSB-E04740h,CSB-E04638h)。粪便基因组提取试剂盒(天根生化科技公司,批号 DP328-02);荧光定量 PCR 检测试剂盒,焦磷酸二乙酯(DEPC),伊红染色液,苏木素染色液,油红 O 染色液(武汉谷歌生物公司,批号分别为 AOPR-1200, V900882, 154641, 162535, B1414022)。

1.6 仪器 M1000 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司),DIA X600 型 DIAxgo 型匀浆机(德国 Heidolph 公司),706 型 Forma - 80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司),Neofuge 23R 型台式高速离心机 High Speed Bench-top Centrifuge(上海力申科学仪器有限公司),7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),SMA4000 型微量核酸定量仪(澳大利亚 Merinton 公司)。

2 方法

2.1 动物处理 C57BL/6J 小鼠 105 只,采用区组随机法选取 31 只为非造模组,其余 74 只为造模组。正常组及正消组喂普通饲料,模型组予高脂饲料喂养^[10],16 周后,从正常组和模型组中各随机选取 1 只处死,取肝组织制作苏木素-伊红(HE)染色,模型成功后(模型成功标准参照文献[11])予普通饲料喂养。按照随机数字表法非造模组随机分为正常组和正消组,造模组随机分为模型组、消脂汤组(85,42.5,21.25 g·kg⁻¹),非诺贝特组(0.05 g·kg⁻¹)。各实验组及正消组给予药物灌胃(药物剂量参照文献[12])。正常组与模型组予等体积生理盐水灌胃。各实验组连续给药 1 个月。

2.2 标本采取 取材前,禁食不禁水 12 h,腹腔麻醉后心脏采血,分离血清,全自动生化分析仪检测血清 TC, TG, ALT, AST, FBG 水平,酶联免疫法检测 FINS, TNF- α , IL-6 水平,计算 HOMA-IR,评价 IR 程度。从肝右叶切取两块肝组织,其中一块置于 10% 多聚甲醛固定液里,用以制备病理组织切片,HE 染色;另一块立即置于 0 °C 冰中,制备冰冻切片,油红

O 染色;冰上取结肠内容物,迅速置于液氮罐内,用于后期总 DNA 的提取。

2.3 肝组织病理学检测及评价 取材标本送检于广州中医药大学第一附属医院病理科,进行石蜡包埋,HE 染色;冰冻切片行油红 O 染色。

2.3.1 HE 染色 取出肝组织,依次脱水,浸蜡,包埋,石蜡切片。HE 染色,石蜡切片依次放入二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水;苏木素染色 3~8 min,自来水洗,1% 盐酸-乙醇分化,自来水洗,0.6% 氨水返蓝,流水冲洗;伊红染液染色 1~3 min,脱水,中性树脂封片,显微镜下观察拍照。

2.3.2 油红 O 染色 制作冰冻切片,4% 多聚甲醛固定 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次,再置于丙二醇中固定 5 min,吸去丙二醇,加入 0.5% 油红 O 的丙二醇溶液,置 60 °C 烤箱中染色 15 min,85% 丙二醇冲洗 5 min, PBS 洗 3 次,蒸馏水洗 1 次,苏木素复染 2~5 min,1% HCl 分色及返蓝后封片。置显微镜下观察并摄像,细胞内脂质为红色。

2.4 结肠内容物总 DNA 提取 按照试剂盒说明的方法和步骤提取结肠内容物总 DNA,后用核酸浓度测定仪测定提取的 DNA 浓度,置 -80 °C 备用,以备后期荧光定量 PCR 检测。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测相关基因表达 反应体系(25 μ L):10 \times Buffer 10.0 μ L,上下游引物(2 μ mol·L⁻¹)各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L, dNTP 1 μ L, Taq 酶 0.4 μ L, 双蒸水加至 25 μ L。反应条件:95 °C,预变性 5 min;95 °C 变性 20 s,退火温度普雷活氏菌、双歧杆菌 50 °C,梭杆菌、乳酸杆菌和大肠埃希菌为 55 °C,45 s,72 °C 延伸 45 s,循环 40 次,72 °C 后延伸 5 min,4 °C 保存。PCR 产物普通琼脂糖电泳后按普通 DNA 产物纯化试剂盒回收目的片段,纯化产物用微量核酸定量仪测定其浓度。各回收产物进行 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 反应,根据读取的荧光数,由系统软件自动分析 C_t 并生成标准曲线,将样品的 C_t 代入标准曲线中算出各细菌的绝对含量^[13]。引物序列及标准曲线见表 1。

2.6 统计学分析 所有实验数据均在 SPSS 18.0 上建立数据库、数据录入与统计分析。数值资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异采用单因素方差分析,方差齐用 LSD 检验,方差不齐用 Dunnett-t3 检验法,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠死亡情况 实验结束后,剩余 C5713L16J

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列、退火温度、回归方程

Table 1 Primer sequences of microbes for Real-time PCR, annealing temperature and regression curve

细菌种属	引物序列(5'-3')	长度/bp	回归方程	R ²	T _M /°C
普雷沃氏菌	上游 GGTGTGGCTTAAGTGCCAT	151	Y = 69.13 - 3.65X	0.994 85	50
	下游 CGGAYGTAAGGGCCGTGC				
双歧杆菌	上游 TCGCGTTCYGGTGTGAAAG	243	Y = 62.77 - 3.32X	0.999 21	50
	下游 CCACATCCAGCRTCCAC				
大肠埃希菌	上游 CATGCCGCGTGTATGAAGAA	113	Y = 62.06 - 2.89X	0.994 79	55
	下游 CGGCTAACGTC AATGAGCAAA				
梭杆菌	上游 GCGAGAAGGTGAAAGTCTGTAT	100	Y = 56.21 - 3.01X	0.996 27	55
	下游 TGGTCCTCACTGATTACACAGA				
乳酸杆菌	上游 CACCTTCCTCCGGTTTGTCA	126	Y = 57.53 - 2.58X	0.999 48	55
	下游 CGAGCGCAACCCTTATTATCA				

小鼠 93 只,造模及给药阶段正常组死亡 2 只,模型组死亡 4 只,消脂汤高剂量组死亡 4 只,中剂量及低剂量各死亡 1 只,每组随机选取 10 只纳入结果分析。

3.2 消脂汤对小鼠血脂的影响 给药 9 周后,与正常组比较,模型组血清 TC, TG 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组血清 TC, TG 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);其中消脂汤高剂量组较中剂量组血脂含量降低明显 ($P < 0.05$),呈剂量依赖性。见表 2。

表 2 消脂汤对小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Xiaozhitang on lipid in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	mmol·L ⁻¹	
		TC	TG
正常	-	2.351 ± 0.834	0.562 ± 0.169
模型	-	5.711 ± 0.855 ²⁾	1.325 ± 0.072 ²⁾
正消	85	2.939 ± 0.405 ⁴⁾	0.589 ± 0.075 ⁴⁾
消脂汤	85	3.502 ± 0.650 ^{1,4,5)}	0.542 ± 0.132 ^{4,5)}
	42.5	4.354 ± 0.654 ^{2,4)}	0.744 ± 0.110 ⁴⁾
	21.25	4.632 ± 0.748 ^{2,3)}	0.871 ± 0.326 ^{1,4)}
非诺贝特	0.05	3.950 ± 0.629 ^{2,4)}	0.700 ± 0.075 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与消脂汤低剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$;与消脂汤中剂量组比较⁶⁾ $P < 0.05$;与非诺贝特组比较⁷⁾ $P < 0.05$ (表 3~6 同)。

3.3 消脂方对小鼠肝功能的影响 与正常及正消组比较,模型组血清 ALT, AST 显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,消脂汤高、中、低剂量组血清 ALT, AST 均显著降低 ($P < 0.01$)。非诺贝特组与模型组比较无明显差异,其中消脂汤高剂量组较中、低剂量组血清 ALT 偏低 ($P < 0.05$),有剂量依赖性。消脂汤高剂量组血清 AST 与中、低剂量比较无明显差异。见表 3。

表 3 消脂方对小鼠血清 ALT, AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Xiaozhitang on serum ALT and AST in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	U·L ⁻¹	
		ALT	AST
正常	-	14.684 ± 2.788	25.429 ± 7.286
模型	-	86.700 ± 7.427 ²⁾	60.645 ± 4.241 ²⁾
正消	85	16.157 ± 3.867 ⁴⁾	24.668 ± 7.671 ⁴⁾
消脂汤	85	18.538 ± 6.144 ^{2,4,5,6)}	28.978 ± 8.758 ⁴⁾
	42.5	27.851 ± 6.227 ^{2,4)}	34.572 ± 8.972 ⁴⁾
	21.25	28.041 ± 4.633 ^{2,4)}	34.089 ± 7.331 ⁴⁾
非诺贝特	0.05	76.513 ± 7.241 ²⁾	54.891 ± 6.961 ²⁾

3.4 消脂方对小鼠 IR 程度的影响 与正常组比较,模型组小鼠 FBG, FINS 和 HOMA-IR 显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组小鼠 FBG, FINS, HOMA-IR 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中消脂汤高剂量组 HOMA-IR 较中、低剂量及非诺贝特组明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.5 消脂方对小鼠血清内 LPS, TNF- α , IL-6 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 LPS, TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 TNF- α , IL-6 水平明显降低 ($P < 0.05$),其中消脂汤高剂量组 TNF- α 较中、低剂量及非诺贝特组明显降低 ($P < 0.05$)。见表 5。

3.6 消脂方对小鼠肠道主要菌群数量的影响 与正常组比较,模型组小鼠结肠内梭杆菌属、普雷沃氏菌属、双歧杆菌及乳酸杆菌数量明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$),大肠埃希菌数量明显升高 ($P < 0.05$),正常组与正消组比较无明显差异;与模型组比较,消脂汤高、中剂量组中梭杆菌属、双歧杆菌及乳酸杆菌数量明显升高 ($P < 0.05$),大肠埃希菌数量明显减少 ($P < 0.05$),消脂汤低剂量组、非诺贝特组与模型组无差异。见表 6。

表 4 消脂汤对各组小鼠 IR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Xiaozhitang on IR in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	FINS/mIU·L ⁻¹	HOMER-IR
正常	-	5.046 ± 1.027	17.958 ± 1.106	4.421 ± 0.955
模型	-	15.067 ± 1.621 ²⁾	29.881 ± 4.188 ²⁾	15.203 ± 1.700 ²⁾
正消	85	4.340 ± 0.908 ⁴⁾	16.512 ± 2.177 ⁴⁾	3.393 ± 1.138 ⁴⁾
消脂汤	85	7.124 ± 0.737 ^{1,4)}	22.879 ± 1.932 ⁴⁾	6.952 ± 1.311 ^{2,4,5,6,7)}
	42.5	10.145 ± 1.394 ^{2,4)}	23.683 ± 2.676 ³⁾	10.274 ± 1.771 ^{2,4)}
	21.25	10.268 ± 1.414 ^{2,4)}	23.908 ± 3.008 ²⁾	12.166 ± 2.418 ^{2,3)}
非诺贝特	0.05	9.274 ± 1.509 ^{2,4)}	24.014 ± 5.235 ^{1,3)}	9.865 ± 2.488 ^{2,4)}

表 5 消脂方对各组小鼠血清内细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Xiaozhitang on serum cytokine in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LPS/μg·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
正常	-	9.294 ± 2.298	36.489 ± 9.910	23.192 ± 5.245
模型	-	15.143 ± 1.601 ²⁾	77.142 ± 8.192 ²⁾	291.311 ± 160.305 ²⁾
正消	85	6.739 ± 1.241 ⁴⁾	42.078 ± 8.861 ⁴⁾	23.194 ± 6.237 ⁴⁾
消脂汤	85	9.759 ± 1.443 ⁴⁾	42.516 ± 5.036 ^{4,5,6,7)}	52.286 ± 3.804 ⁴⁾
	42.5	12.852 ± 3.581 ²⁾	54.459 ± 3.287 ⁴⁾	70.540 ± 13.449 ⁴⁾
	21.25	12.738 ± 5.027 ²⁾	60.377 ± 2.489 ^{2,4)}	94.338 ± 26.051 ⁴⁾
非诺贝特	0.05	13.727 ± 3.169 ¹⁾	70.677 ± 12.091 ²⁾	133.622 ± 22.435 ⁴⁾

表 6 消脂汤对各组小鼠肠道主要细菌含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of Xiaozhitang on content of major bacteria in intestine of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

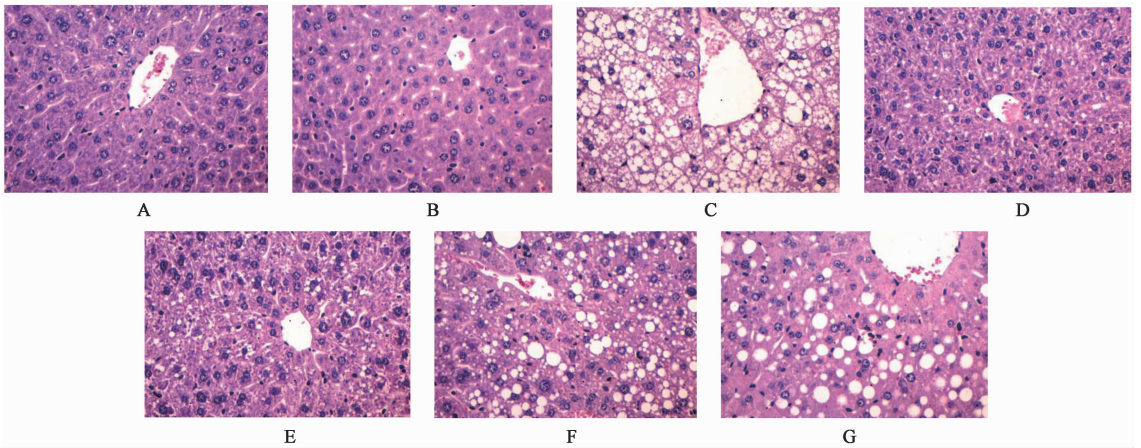
组别	剂量/g·kg ⁻¹	梭杆菌属	拟杆菌-普雷沃氏菌属	双歧杆菌	乳酸杆菌	大肠埃希菌
正常	-	9.650 ± 0.020	14.507 ± 0.012	12.367 ± 0.300	13.973 ± 0.201	11.250 ± 0.061
模型	-	8.930 ± 0.046 ²⁾	14.003 ± 0.172 ²⁾	11.860 ± 0.854 ¹⁾	12.773 ± 0.040 ²⁾	12.643 ± 0.124 ²⁾
正消	85	9.813 ± 0.777 ⁴⁾	14.470 ± 0.026 ⁴⁾	12.560 ± 0.217 ⁴⁾	14.183 ± 0.166 ⁴⁾	11.250 ± 0.191 ⁴⁾
消脂汤	85	9.717 ± 0.059 ⁴⁾	14.573 ± 0.029	12.443 ± 0.051 ⁴⁾	14.097 ± 0.031 ⁴⁾	11.680 ± 0.030 ^{2,4)}
	42.5	9.627 ± 0.839 ⁴⁾	14.390 ± 0.035	12.377 ± 0.031 ³⁾	13.960 ± 0.104 ⁴⁾	11.743 ± 0.029 ^{2,4)}
	21.25	9.167 ± 0.248 ²⁾	14.307 ± 0.050	12.267 ± 0.127	13.467 ± 0.085 ^{2,4)}	11.927 ± 0.146 ^{2,4)}
非诺贝特	0.05	9.223 ± 0.110 ²⁾	14.213 ± 0.021	12.077 ± 0.159	13.493 ± 0.181 ^{2,4)}	11.810 ± 0.040 ^{2,4)}

3.7 消脂方对小鼠肝脏病理变化的影响 正消组及正常组肝小叶中肝细胞核结构清晰,细胞浆未见肿胀,肝细胞也未见发生坏死,肝板结构清晰,排列规则,小叶结构完整,未见假小叶形成。肝间质也未见纤维组织沉积。模型组肝小叶周边肝细胞发生明显脂肪变性,肝细胞中可见大量脂肪空泡,部分小泡融合成大的脂肪空泡,肝细胞核被挤压至一侧,可见气球样变,肝板结构不清。消脂汤高、中剂量组肝小叶中肝细胞中可见少量脂肪小泡,肝细胞发生轻微的脂肪变性,肝板结构清晰,肝细胞未见肿胀及坏死样改变。消脂汤低剂量及非诺贝特组肝小叶中肝细

胞发生明显的脂肪变性,肝细胞中可见大的脂肪空泡,肝板结构不清,排列不规则,小叶结构完整,未见假小叶形成。见图 1,2。

4 讨论

NASH 被定义为肝脏脂肪蓄积的炎症反应,导致慢性肝损伤,瘢痕形成和纤维化,其中肝细胞损伤可能导致肝功能障碍。高脂饮食的 C57BL/6J 小鼠表现出对高脂饮食的可变代谢反应,表现为代谢综合征和 NASH 特征,如高脂血症、炎症反应和肝脂肪变性^[14]。因此本实验检测血清内 TC, TG 水平及肝脏病理染色,以此评价肝脂肪蓄积, AST, ALT, LPS,



A. 正常组; B. 正消组; C. 模型组; D ~ F. 消脂汤高、中、低剂量组; G. 非诺贝特组 (图 2 同)

图 1 消脂汤对各组小鼠肝组织的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Xiaozhitang on hepatic tissue of mice in each group (HE, $\times 200$)

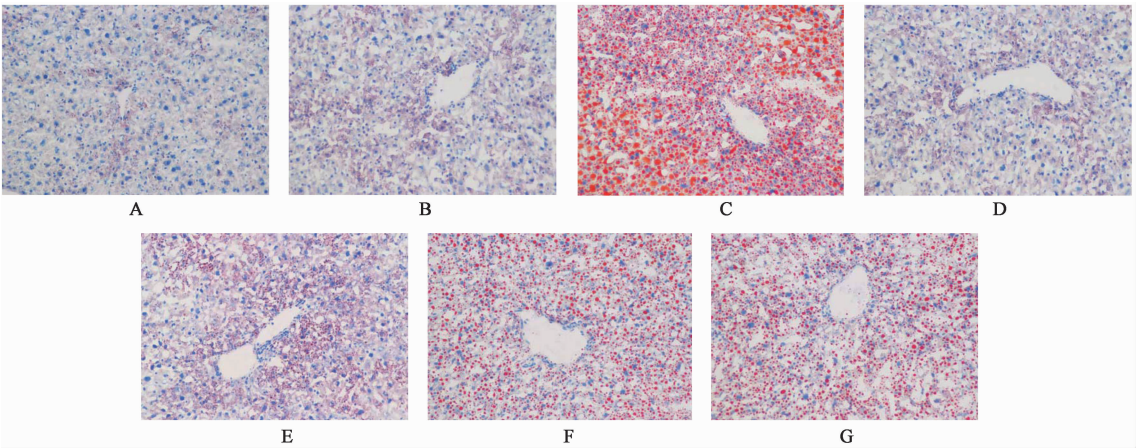


图 2 消脂汤对各组小鼠肝组织内脂滴的影响 (油红 O, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Xiaozhitang on lipid droplets in liver tissue of mice in each group (oil red O, $\times 200$)

TNF- α , IL-6 间接反映肝损伤情况, 本研究结果表明消脂汤具有改善 IR, 肝功能, 减轻肝脏脂肪蓄积及炎症反应。

众多研究关注肠道微生物改变与 NASH 进展的相关性, JIANG 等^[15] 研究显示, NASH 患者变形菌门的相对丰度较肥胖者明显增加, 而在变形菌门内, NASH 患者肠杆菌科和大肠埃希氏菌属具有更高的丰度。WONG 等^[16] 研究发现 NASH 患者与健康组比较存在潜在菌群失调, 与健康组比较, NASH 患者的厚壁菌门丰度减少, 两组之间的拟杆菌水平没有发现变化。本实验研究结果表明 NASH 模型组内大肠杆菌数量较给药组及空白组明显偏高, 消脂汤高、中剂量组相较于模型组, 乳酸杆菌 (厚壁菌门)、双歧杆菌数量明显偏高, 大肠埃希菌 (变性菌门) 数量明显减少, 拟杆菌-普雷沃氏菌属无明显差异, 研究结果与相关研究^[16] 一致, 均显示肠道微生物变化与 NASH 的相关性。

肠道微生物代谢物 LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁中的可以诱发全身炎症反应的一种物质, 是肝损伤中的一个重要因子^[17], LPS 与肝细胞及窦状隙中的库普弗细胞上的 CD14 和 TLR4 结合形成复合物, 导致炎症级联反应, 促炎细胞因子如 TNF- α , IL-6 分泌和氧化应激产生增多^[18-19]。而 TNF- α , IL-6 可激活核转录因子- κ B 抑制物激酶 (IKK), IKK 是胰岛素受体底物的丝氨酸磷酸化激酶, 可使胰岛素受体底物丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 导致正常的酪氨酸磷酸化受抑制, 影响胰岛素受体与胰岛素受体底物 (IRS) 结合, 干扰胰岛素信号转导引起 IR, IKK 是将炎症和 IR 联系起来的枢纽^[20]。高脂饮食诱导的小鼠模型出现代谢性内毒素血症^[21], 伴随胰岛素抵抗, 肝脂肪堆积的增加。通过给肥胖小鼠模型抗生素治疗^[22], 改善内毒素血症, 导致肠道微生物群结果发生重大变化, 与体重、炎症及胰岛素抵抗敏感性增加相一致, 间接表明肠道微生物群可能参与胰岛

素抵抗、炎症等疾病变化过程。本研究模型组小鼠内双歧杆菌、乳酸杆菌等菌群数量减少,血清 IR, TNF- α , IL-6 水平升高,各治疗组则相反,表明消脂汤可调整菌群变化,间接改善 IR 及炎症反应。

综上,消脂汤可改善 IR,肝功能,减轻肝脏脂肪蓄积和炎症反应,可能与其调整肠道菌群,促进肠道有益菌群数量的生长相关。肠道菌群数量庞大,肠道微生物群整体变化对 NAFLD/NASH 的相关作用机制仍需更深入的研究。

[参考文献]

[1] Lonardo A, Byrne C D, Caldwell S H, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of *Prevalence, Incidence, and outcomes*[J]. *Hepatology*,2016,64(4):1388-1389.

[2] Rinella M E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review [J]. *J Am Med Assoc*, 2015, 314 (14):2263-2273.

[3] Kim N H, Park J, Kim S H, et al. Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and subclinical cardiovascular changes in the general population [J]. *Heart*,2014,100(12):938-943.

[4] Orlik B, Handzlik G, Olszanecka-Glinianowicz M. The role of adipokines and insulin resistance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Postep Hig Med Dosw*,2010,64(7):212-219.

[5] Assy N, Kaita K, Mymin D, et al. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients [J]. *Digest Dis Sci*, 2000,45(10):1929-1934.

[6] Ahmed A, WONG R J, Harrison S A. Nonalcoholic fatty liver disease review: diagnosis, treatment, and outcomes [J]. *Clin Gastroenterol H*,2015,13(12):2062-2070.

[7] Backhed F, Manchester J K, Semenkovich C F, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2007,104(3):979-984.

[8] Rabot S, Membrez M, Bruneau A, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism [J]. *Faseb J*,2010,24(12):4948-4949.

[9] 杨道炬,李常青,廖向彬,等. 消脂汤对非酒精性脂肪性肝病模型大鼠治疗的作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*,2014,20(18):159-164.

[10] Passos E, Pereira C D, Goncalves I O, et al. Role of physical exercise on hepatic insulin, glucocorticoid and inflammatory signaling pathways in an animal model of

non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Life Sci*, 2015, 123: 51-60.

[11] 范建高. 中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版) [J]. *中国医学前沿杂志:电子版*,2012,4(7):4-10.

[12] 石磊,袁冬生,朱彩平,等. 消脂汤对四环素致小鼠脂肪肝模型的保护作用研究 [J]. *热带医学杂志*,2008,8(8):769-809.

[13] 周毅,文斌,孙豪,等. 应用 PCR-DGGE 和 Real-time PCR 分析健康与腹泻獭兔盲肠菌群 [J]. *微生物学通报*,2016,43(1):131-139.

[14] Mouzaki M, Comelli E M, Arendt B M, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*,2013,58(1):120-127.

[15] JIANG W W, WU N, WANG X M, et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Sci Rep*,2015, doi: 10.1038/srep08096.

[16] WONG V, WONG G, CHAN H Y, et al. Bacterial endotoxin and non-alcoholic fatty liver disease in the general population: a prospective cohort study [J]. *Aliment Pharm Ther*,2015,42(6):731-740.

[17] Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. *Nature*, 2000,406(6797):782-787.

[18] Asehounne K, Strassheim D, Mitra S, et al. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B [J]. *J Immunol*, 2004,172(4):2522-2529.

[19] LU Y C, Yeh W C, Ohashi P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151.

[20] YUAN M S, Konstantopoulos N, Lee J S, et al. Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK beta [J]. *Science*,2001,293(5535):1673-1677.

[21] Rivera C A, Adegboyega P, van Rooijen N, et al. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*,2007,47(4):571-579.

[22] MA Y Y, LI L, YU C H, et al. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis [J]. *World J Gastroentero*,2013,19(40):6911-6918.

[责任编辑 张丰丰]