肝宝胶囊对非酒精性脂肪性肝病模型大鼠肠黏膜屏障和肠道菌群的影响Δ

范　兴[1*]，何　艳[2]，杨成梓[3]，林雅婷[3]，黄德福[1#]（1.福建医科大学孟超肝胆医院药学部，福州　350025；2.浙大城市学院医学院，杭州　310015；3.福建中医药大学药学院，福州　350122）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）08-0929-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.08.07

摘　要　目的　研究肝宝胶囊对非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）模型大鼠肠黏膜屏障和肠道菌群的影响，探讨其防治NAFLD的机制。**方法**　将26只SD大鼠随机选择8只作为空白组，给予普通饲料喂养，剩余18只喂食高脂饲料建立NAFLD模型（2只用于成模检查），造模成功后，按随机数字表法分为模型组和肝宝组，每组8只。肝宝组大鼠灌胃肝宝胶囊溶液（1 440 mg/kg），空白组与模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水，每日1次，连续5周。采用全自动生化分析仪检测大鼠血清中丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）和甘油三酯（TG）含量；酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中脂多糖、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）、IL-1β含量；苏木精-伊红染色法观察大鼠肝脏和回肠组织病理形态；免疫组化法测定回肠组织中闭合蛋白（Occludin）和闭锁小带蛋白-1（ZO-1）的表达；16S核糖体RNA基因测序技术测定大鼠肠道菌群。**结果**　与模型组比较，肝宝组大鼠血清中ALT、AST、TG、脂多糖、TNF-α、IL-6与IL-1β含量均显著降低（$P<0.01$），肝脏和回肠组织病变程度均明显改善，回肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。肠道菌群分析显示，与模型组比较，肝宝胶囊能提高大鼠肠道菌群的丰富度和多样性；在门水平上，肝宝胶囊能显著升高拟杆菌门相对丰度，降低厚壁菌门相对丰度以及二者相对丰度比值（$P<0.01$）；在属水平上，肝宝胶囊能显著升高乳杆菌属、布劳特氏菌属、拟杆菌属和阿克曼菌属的相对丰度，显著降低普雷沃氏菌属、苏黎世杆菌属、巍斯氏菌属、*SMB53*和脱硫弧菌属的相对丰度（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组大鼠肠道菌群间均有差异物种。**结论**　肝宝胶囊可能通过保护肠黏膜屏障功能和调节肠道益生菌/有害菌结构来改善NAFLD。

关键词　肝宝胶囊；非酒精性脂肪性肝病；肠黏膜屏障；肠道菌群；16S核糖体RNA

Effects of Ganbao capsules on intestinal mucosal barrier and gut microbiota in rats with non-alcoholic fatty liver disease

FAN Xing[1], HE Yan[2], YANG Chengzi[3], LIN Yating[3], HUANG Defu[1] (1. Dept. of Pharmacy, Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China; 2. School of Medicine, Zhejiang University City College, Hangzhou 310025, China; 3. Pharmacy College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of Ganbao capsules on intestinal mucosal barrier and gut microbiota in rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and to explore its mechanism of prevention and treatment of NAFLD. **METHODS** Eight of 26 SD rats were randomly selected as blank group and fed with ordinary diet, and the remaining 18 rats were fed with high diet to establish NAFLD model (2 for modeling inspection); after successful modeling, they were divided into model group and Ganbao group, with 8 rats in each group. Ganbao group were given Ganbao capsules solution (1 440 mg/kg) intragastrically, and the blank group and model group were given the constant volume of distilled water intragastrically, once a day, for consecutive 5 weeks. The contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and triglyceride (TG) in serum of rats were detected by automatic analyzer; the contents of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1β in serum of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological morphology of liver and ileum tissues were observed by HE staining, the expressions of Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) were detected by immunohistochemistry method, and the intestinal flora were detected by 16S ribosomal RNA gene sequencing technology. **RESULTS** Compared with the model group, the serum contents of ALT, AST, TG, lipopolysaccharide, TNF-α, IL-6 and IL-1β in Ganbao group were decreased significantly ($P<0.01$), the pathological changes of liver and ileum tissues were improved significantly, and the expressions of Occludin and ZO-1 were increased significantly ($P<0.01$). Intestinal microbiota analysis revealed that compared with the model group, Ganbao capsules could recover the abundance and diversity of the gut microbiota in rats. At the phylum level, Ganbao capsules could

Δ**基金项目**　福建省自然科学基金资助项目（No.2021J011296）；福建省中医重点专科建设项目中药制剂室（No.闽卫中医函〔2019〕262号）；福州市科技计划项目（No.2020-WS-85）

＊**第一作者**　主管中药师，硕士。研究方向：中药制剂研发。E-mail：FXTCM2007@126.com

＃**通信作者**　副主任药师。研究方向：医院药学管理、中药药理。E-mail：hdf8833@126.com

significantly increase the relative abundance of Bacteroidetes, and significantly reduce the relative abundance of Firmicutes and the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes ($P<0.01$). At the genus level, Ganbao capsules could significantly increase the relative abundance of *Lactobacillus*, *Blautia*, *Bacteroides* and *Akkermansia*, and significantly reduce the relative abundance of *Prevotella*, *Turicibacter*, *Weissella*, *SMB53* and *Desulfovibrio* ($P<0.05$ or $P<0.01$). There were different species among the gut microbiota of rats in each group. **CONCLUSIONS** Ganbao capsules may improve NAFLD by protecting intestinal mucosal barrier function and regulating gut probiotics/harmful bacteria structure.

KEYWORDS Ganbao capsules; non-alcoholic fatty liver disease; intestinal mucosal barrier; gut microbiota; 16S ribosomal RNA

非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）是指除酒精和其他明确的肝损伤因素之外，以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性和脂肪贮积为病理特征的临床病理综合征，随病程发展，会演变为肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌[1]。我国NAFLD患病率高，且随着现代生活方式和饮食结构的改变，呈持续上升态势，严重威胁人民健康。研究发现，肠道菌群失调会引起致病菌过度繁殖，产生大量内毒素，从而破坏肠黏膜屏障，致使大量内毒素入血，激活机体炎症反应，加剧NAFLD的病程进展[2]。在治疗NAFLD领域，中医药以其整体观念和辨证论治、多成分、多靶点、多途径的优势显示出独特的疗效。

肝宝胶囊（批准文号闽药制字Z04107020）为福建医科大学孟超肝胆医院的院内中药制剂，由鲜青果、虎杖、莱菔子、麦芽、谷芽5味中药组成，具有清热利湿、消食降脂、润肺化痰的功效，临床使用多年，疗效显著。本课题组前期研究表明，肝宝胶囊能有效改善大鼠的NAFLD[3]，其君药成分没食子酸和白藜芦醇能改善肠黏膜屏障功能，重塑肠道菌群[4-5]。故本研究在前期药理实验的基础上，探讨肝宝胶囊对NAFLD大鼠肠黏膜屏障和肠道菌群的影响，从而阐明其防治NAFLD的作用机制，为中医药治疗NAFLD提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括AU5800型全自动生化分析仪（美国Beckman Coulter公司）、xMark型酶标仪（美国Bio-Rad公司）、NanoDrop 2000型超微量分光光度计（美国Thermo Fisher Scientific公司）、MiSeqPE300型高通量测序仪（美国Illumina公司）、SP300S型全自动脱水包埋机和RM2235型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）、CX33型显微镜（日本Olympus公司）等。

1.2 主要药品与试剂

肝宝胶囊（规格0.34 g，批号20210508）由福建医科大学孟超肝胆医院制剂室提供；高脂饲料（87.3%基础饲料+2%胆固醇+10%猪油+0.7%猪胆盐）购于上海帆泊生物科技有限公司；丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、甘油三酯（triglyceride，TG）测试盒（批号分别为20210924、20210923、20210924）均购于南京建成生物工程研究所；大鼠白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号分别为A301B10755、A30610736、A38210815）均购于杭州联科生物技术股份有限公司；大鼠脂多糖ELISA试剂盒（批号202109）购于厦门慧嘉生物科技有限公司；兔抗闭合蛋白（Occludin）抗体、兔抗闭锁小带蛋白-1（zonula occludens-1，ZO-1）抗体（批号均为20220607）均购于北京索莱宝科技有限公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG（批号GB23303）、DAB显色试剂盒（批号G1212-200T）、苏木精染液（批号CR2112051）与伊红染液（批号CR2202010）均购于武汉赛维尔生物科技有限公司；DNA提取试剂盒（批号M5635-02）购于美国Omega Bio-tek公司；水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级雄性SD大鼠，体质量180～200 g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，实验动物生产许可证号为SCXK（沪）2017-0005。大鼠饲养于室温22～25 ℃、相对湿度40%～65%、12 h昼夜交替的环境中，自由饮食摄水，适应性喂养1周后用于实验。本实验方案经福建中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准文号FJTCM IACUC 2021086）。

2 方法

2.1 分组及给药

26只大鼠中随机选择8只作为空白组，给予普通饲料喂养；剩余18只喂食高脂饲料，持续8周后，随机抽取2只大鼠，采用苏木精-伊红（HE）染色法观察肝脏组织，判断NAFLD是否造模成功。将16只造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组和肝宝组，每组8只。肝宝组大鼠灌胃肝宝胶囊溶液（1 440 mg/kg，前期药理实验最佳给药剂量[3]），空白组与模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水，每日1次，连续5周。

2.2 标本采集与处理

末次给药后，采用应激性排便法收集大鼠新鲜粪便于无菌冻存管中，－80 ℃保存备用。末次给药12 h后，麻醉大鼠，腹主动脉取血，室温静置2 h后，3 000 r/min离心10 min，取血清，－80 ℃保存备用。大鼠取血后，处死，解剖取肝脏和回肠组织，其中肝左叶和回肠组织用10%中性甲醛固定备用。

2.3 血清肝功能和血脂指标测定

严格按试剂盒说明书操作，用全自动生化分析仪检测大鼠血清中ALT、AST和TG含量；用ELISA法检测血清中脂多糖及炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β含量。

2.4 肝脏与回肠组织病理形态观察

取经固定的肝左叶与回肠组织，脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、切片、HE染色后，采用显微镜观察肝脏与回肠组织的病理形态变化。

2.5 回肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达测定

采用免疫组化法进行检测。取回肠组织切片进行脱蜡、复水、修复抗原、封闭、孵育抗体（一抗Occludin和ZO-1稀释比均为1∶200，二抗IgG稀释比为1∶100）、DAB显色、复染、返蓝、脱水封片后，采用显微镜观察并采集图片。每张切片各选5个不同视野，采用Image J软件分析，以平均光密度值评价Occludin和ZO-1蛋白表达水平。

2.6 大鼠肠道菌群基因测序

采用16S核糖体RNA（16S ribosomal RNA，16S rRNA）基因测序技术进行检测。取大鼠粪便，采用DNA提取试剂盒对样本总DNA进行抽提，采用超微量分光光度计对DNA进行定量，再通过琼脂糖凝胶电泳分析其质量。用正向引物5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′，反向引物5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′，产物大小为480 bp，对16S rRNA基因的V3～V4可变区进行聚合酶链式反应扩增。通过磁珠对扩增产物进行纯化回收，采用酶标仪进行荧光定量，测序文库制备后在Illumina MiSeq PE300平台进行高通量测序。对原始数据进行序列质控、去噪、拼接、去嵌合等处理后，得到有效数据。使用QIIME2.0软件对操作分类单元（operational taxonomic units，OTUs）进行韦恩（Venn）、α和β多样性、物种注释、菌群结构组成及差异分析。

2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示，符合正态分布且方差齐的资料组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-t检验；若非正态分布或方差不齐的资料组间比较采用非参数秩和检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 肝宝胶囊对大鼠肝功能和血脂指标的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中ALT、AST和TG含量均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，肝宝组大鼠血清中ALT、AST和TG含量均显著降低（$P<0.01$）。结果见表1。

表1 各组大鼠血清中ALT、AST和TG含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TG/(mmol/L)
空白组	54.18±4.77	90.36±3.73	1.05±0.08
模型组	116.37±8.12[a]	201.59±11.77[a]	3.45±0.17[a]
肝宝组	67.67±3.05[b]	103.26±6.38[b]	1.16±0.07[b]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$

3.2 肝宝胶囊对大鼠血清中脂多糖及炎症因子含量的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中脂多糖、TNF-α、IL-6和IL-1β含量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），表明高脂饮食诱导的大鼠NAFLD会造成肝脏炎症反应。与模型组比较，肝宝组大鼠血清中脂多糖、TNF-α、IL-6和IL-1β含量均显著降低（$P<0.01$）。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中脂多糖、TNF-α、IL-6和IL-1β含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	脂多糖/(ng/L)	TNF-α/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)
空白组	10.69±0.95	77.51±2.74	60.66±2.92	87.33±5.91
模型组	11.80±0.84[a]	166.12±4.95[b]	249.18±7.42[b]	332.24±9.89[b]
肝宝组	10.57±0.98[c]	89.41±2.43[c]	86.93±3.63[c]	120.89±9.18[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.01$

3.3 肝宝胶囊对大鼠肝脏与回肠组织病理形态的影响

肝脏组织显微图显示，空白组大鼠肝小叶结构清晰，肝细胞大小均匀，肝细胞索排列整齐，细胞核位于中央；模型组大鼠肝细胞内有许多大小不等的脂肪空泡聚集和气球样变，细胞核被挤向一边，同时伴随着炎症细胞浸润；与模型组比较，肝宝组大鼠脂肪变性明显减轻，几乎恢复至空白组水平。回肠组织显微图显示，空白组大鼠回肠黏膜结构清晰，肠绒毛结构正常，绒毛细胞排列整齐、紧密，黏膜上皮完整，固有层腺体细胞结构清晰；模型组大鼠肠绒毛明显增厚变短、排列紊乱，肠绒毛上皮不完整、部分坏死脱落，固有层水肿增厚，伴有炎症细胞浸润；肝宝组大鼠回肠组织结构接近空白组，肠绒毛上皮结构基本完整，炎症细胞浸润与模型组比较明显减轻。显微图见图1。

3.4 肝宝胶囊对大鼠回肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达水平的影响

Occludin和ZO-1阳性染色呈棕黄色，主要分布在大鼠回肠上皮细胞。与空白组比较，模型组大鼠回肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，肝宝组大鼠回肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见图2、表3。

3.5 肝宝胶囊对大鼠肠道菌群结构和组成的影响

3.5.1 OTUs的Venn分析 通过3组样本OTUs的Venn分析，共检测到29 025个OTUs，其中3组共有的OTUs为137个。空白组、模型组、肝宝组分别有11 917、7 135、11 687个OTUs，各组独有的OTUs分别为11 392、5 641、10 415个，可见造模后大鼠肠道菌群OTUs数量明显减少，经肝宝胶囊干预后OUTs数量明显增加，说明各组间菌群OTUs存在明显差异。

3.5.2 肠道菌群的稀释曲线和Rank-Abundance曲线分析 如图3A所示，各组大鼠肠道菌群的稀释曲线先上升后趋于平坦，即更多的数据量只会产生很少量新的物种，表明测序深度足够。如图3B所示，各组大鼠肠道菌

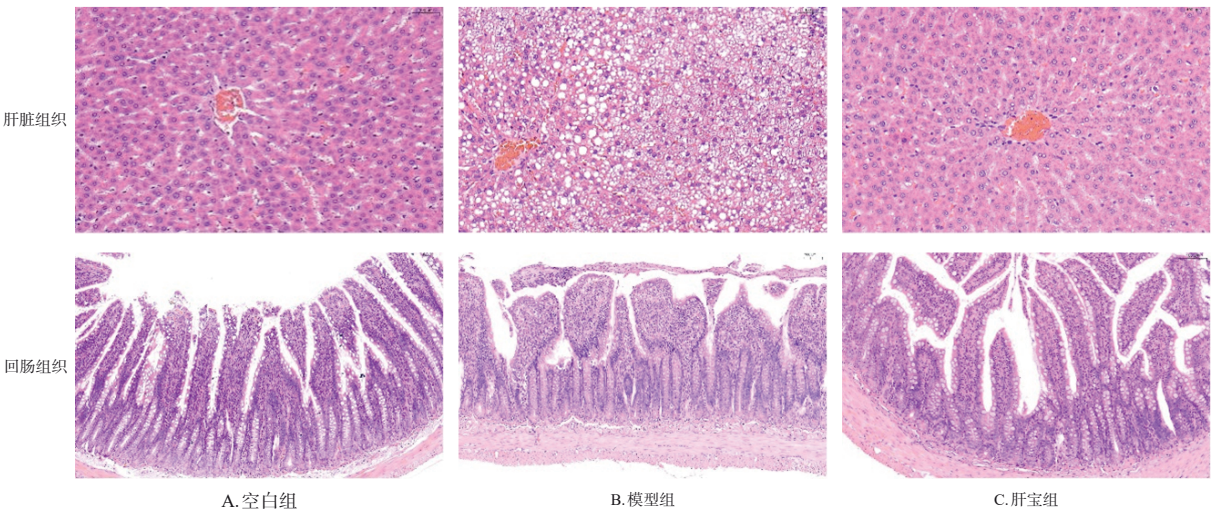


图1　各组大鼠肝脏与回肠组织病理形态的显微图（HE，×200）

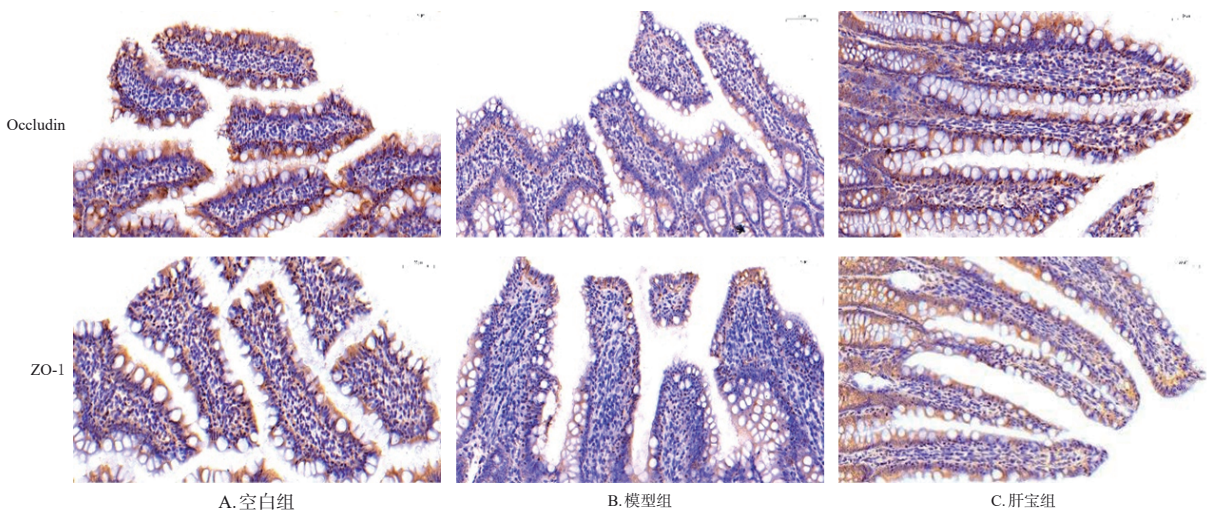


图2　各组大鼠回肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达显微图（免疫组化，×400）

表3　各组大鼠回肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	Occludin	ZO-1
空白组	0.253±0.010	0.217±0.008
模型组	0.172±0.006[a]	0.165±0.005[a]
肝宝组	0.236±0.009[b]	0.199±0.011[b]

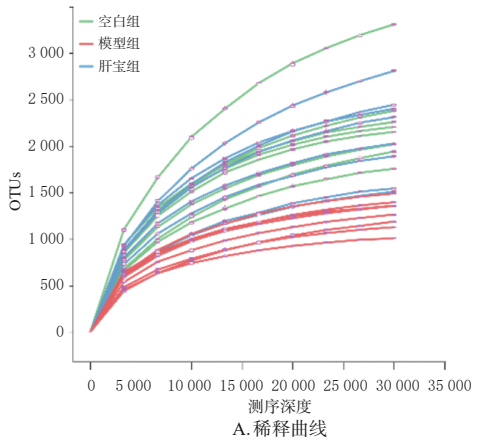
a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$

群的Rank-Abundance曲线在横轴上的宽度较大且平缓下降，样品物种丰富度和均匀度较好，且曲线的宽度大小为空白组＞肝宝组＞模型组。Rank-Abundance曲线越长，说明物种组成越丰富；曲线越平滑，说明物种组成的均匀程度越高[6]。由此可见，本次测序数据量充足合理，物种丰富度和均匀度高，足以代表所有样本的生物学信息，可用于后续数据分析。

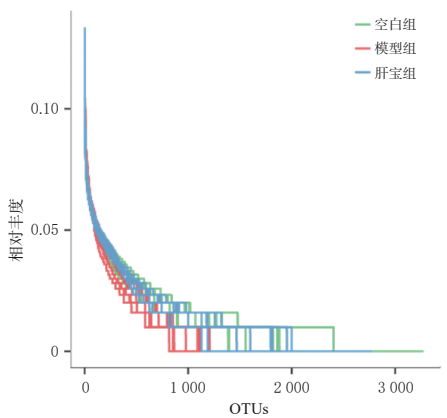
3.5.3　肠道菌群α多样性分析　α多样性用于反映样品内微生物群落的丰富度和多样性，OTUs数目（Chao1）指数和物种数目（Observed_species）指数表征丰富度，Shannon指数和Simpson指数表征多样性[7－8]。与空白组比较，模型组Chao1、Observed_species、Shannon指数均显著降低（$P<0.01$），Simpson指数显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，肝宝组Chao1、Observed_species、Shannon指数均显著升高（$P<0.01$），Simpson指数显著降低（$P<0.05$），表明肝宝胶囊有利于提高NAFLD模型大鼠肠道菌群的丰富度和多样性。结果见表4。

3.5.4　肠道菌群β多样性分析　Bray-Curtis的主坐标分析（principal coordinates analysis，PCoA）显示，肝宝组介于空白组与模型组之间，与空白组分布距离较近，组内相对聚集，组间明显分开，各自分类聚集成3簇。组间相似性分析显示，$R=0.781\ 6$，$P=0.001$，表明各组间肠道菌群结构存在显著差异。非度量多维尺度分析（non-metric multidimensional scaling，NMDS）结果与PCoA分析结果基本一致。结果见图4。

3.5.5　肠道菌群在门水平上的结构分析　在门水平上，共鉴定出20种菌门，从相对丰度可以看出，3组肠道菌群的优势菌门主要集中在厚壁菌门Firmicutes、拟杆菌门Bacteroidetes、变形菌门Proteobacteria、放线菌门Actinobacteria等，其中厚壁菌门在各组中相对丰度最大，其次是拟杆菌门，总占比超过95%。与空白组比较，模型组的厚壁菌门相对丰度显著升高（$P<0.01$），拟杆菌门



A. 稀释曲线



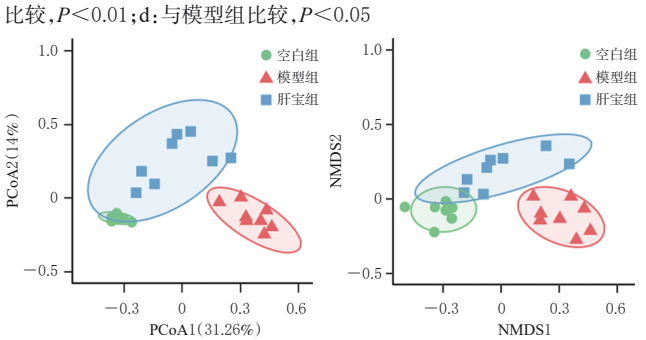
B. Rank-Abundance 曲线

图3　各组大鼠肠道菌群稀释曲线图和Rank-Abundance曲线图

表4　各组大鼠肠道菌群α多样性结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	Chao1指数	Observed_species指数	Shannon指数	Simpson指数
空白组	2 468.178±552.060	2 252.413±468.379	8.044±0.571	0.952±0.016
模型组	1 407.559±174.716[a]	1 273.750±158.340[a]	6.834±0.647[a]	0.974±0.009[b]
肝宝组	2 357.800±532.621[c]	2 116.500±456.886[c]	7.608±0.753[c]	0.951±0.018[d]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与空白组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与模型组比较，$P<0.05$



A. PCoA　　B. NMDS

图4　各组大鼠肠道菌群PCoA和NMDS结果

相对丰度显著降低（$P<0.01$），厚壁菌门与拟杆菌门相对丰度比值（F/B）显著升高（$P<0.01$）；经肝宝胶囊干预后，显著逆转了上述现象（$P<0.01$），且基本恢复至空白组水平。结果见表5。

3.5.6　肠道菌群在属水平上的结构分析　在属水平上，共鉴定出141种菌属，选择相对丰度较高的22种菌属进行差异分析。3组间有9种菌属的相对丰度差异有统计学意义：与空白组比较，模型组普雷沃氏菌属*Prevotella*、苏黎世杆菌属*Turicibacter*、魏斯氏菌属*Weissella*、*SMB53*、脱硫弧菌属*Desulfovibrio*均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），乳杆菌属*Lactobacillus*、布劳特氏菌属*Blautia*、拟杆菌属*Bacteroides*、阿克曼菌属*Akkermansia*均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。经肝宝胶囊干预后，以上9种菌属的相对丰度均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表6。

表5　各组大鼠肠道菌群相对丰度及F/B测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	厚壁菌门相对丰度	拟杆菌门相对丰度	F/B
空白组	0.752 82±0.117 28	0.234 17±0.116 07	4.438 50±2.202 48
模型组	0.961 01±0.031 27[a]	0.018 63±0.009 76[a]	165.988 35±45.194 21[a]
肝宝组	0.773 18±0.124 54[b]	0.205 09±0.121 77[b]	5.187 15±2.149 48[b]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$

表6　各组大鼠肠道菌群的差异菌属相对丰度测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

序号	差异菌属	空白组	模型组	肝宝组
1	*Lactobacillus*	0.411 14±0.169 81	0.197 18±0.081 90[a]	0.407 84±0.218 89[b]
2	*Blautia*	0.023 69±0.014 16	0.003 38±0.002 39[a]	0.051 30±0.019 68[c]
3	*Prevotella*	0.006 41±0.003 16	0.055 77±0.026 99[a]	0.002 37±0.001 37[c]
4	*Bacteroides*	0.035 77±0.020 14	0.000 30±0.000 19[d]	0.030 90±0.019 76[c]
5	*Turicibacter*	0.002 84±0.001 93	0.018 22±0.010 90[d]	0.001 68±0.000 90[c]
6	*Weissella*	0.000 03±0.000 04	0.035 23±0.023 32[d]	0.000 02±0.000 03[c]
7	*SMB53*	0.003 02±0.002 67	0.042 93±0.026 53[d]	0.002 89±0.002 21[c]
8	*Desulfovibrio*	0.000 54±0.000 21	0.004 38±0.003 75[d]	0.000 52±0.000 29[c]
9	*Akkermansia*	0.001 92±0.000 67	0.000 15±0.000 09[d]	0.001 28±0.000 61[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与空白组比较，$P<0.01$

3.5.7　肠道菌群差异物种筛选　通过线性判别分析效应量（linear discriminant analysis effect size，LEfSe）分析，找出在各组间产生显著影响的标志物种，同时根据预实验结果选择线性判别分析得分≥2.9且$P<0.05$的菌群作为差异物种。从门水平和属水平分析可知，各组大鼠间均有差异物种，拟杆菌门、软壁菌门Tenericutes、乳杆菌属、瘤胃球菌属*Ruminococcus*、屠场杆状菌属*Macellibacteroides*、拟杆菌属、*Odoribacter*、节杆菌属*Arthrobacter*、阿克曼菌属、厌氧棒杆菌属*Anaerostipes*、副拟杆菌属*Parabacteroides*在空白组大鼠中富集，厚壁菌门、变形菌门、普雷沃氏菌属、梭菌属*Clostridium*、*SMB53*、魏斯氏菌属、苏黎世杆菌属、葡萄球菌属*Staphylococcus*、*p_75_a5*在模型组大鼠中占比较大；给予肝宝胶囊干预后，放线菌门、柔嫩梭菌属*Faecalibacterium*、布劳特氏菌属、毛螺菌科的瘤胃球菌属*Ruminococcus*、罕见小球菌属*Subdoligranulum*、双歧杆菌属*Bifidobacterium*、萨特氏菌属*Sutterella*、*Dorea*在肝宝组大鼠中发挥主要作用。结果见图5。

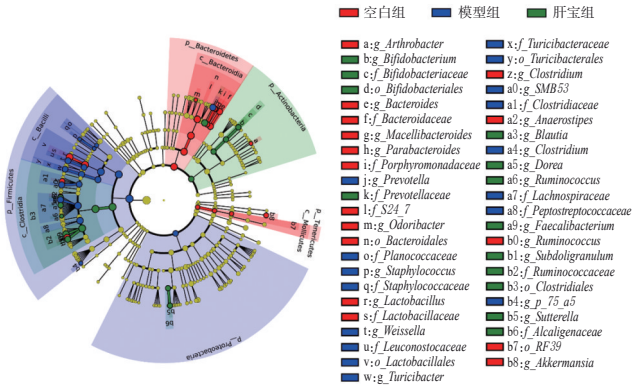


图5　各组大鼠肠道菌群LEfSe分析

4　讨论

Occludin和ZO-1是细胞间紧密连接蛋白，是评价肠黏膜屏障完整性和通透性的重要指标[9]。本研究结果显示，与空白组比较，模型组的Occludin和ZO-1蛋白表达水平均显著降低，表明其肠黏膜屏障被破坏，通透性增加。此外，由于模型组大鼠肠道菌群紊乱，肠道菌群普雷沃氏菌属、苏黎世杆菌属、脱硫弧菌属等肠道菌群过度繁殖，致使炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α大量合成与释放[2]，这与模型组中脂多糖、IL-1β、IL-6、TNF-α含量显著升高的研究结果一致。经肝宝胶囊干预后，上述指标均显著逆转，表明肝宝胶囊能够恢复NAFLD模型大鼠的肠黏膜屏障功能。

肠道菌群α、β多样性分析结果显示，与空白组比较，NAFLD模型大鼠的肠道菌群结构发生了显著变化；经肝宝胶囊干预后，可有效改善NAFLD模型大鼠肠道菌群结构的变化。在门、属水平上，肝宝胶囊具有调控NAFLD模型大鼠肠道菌群优势物种丰度的作用。F/B通常被用作评价肠道生态紊乱的指标，本研究结果显示，模型组的F/B显著高于空白组，与文献报道结果一致[10]；经肝宝胶囊干预后，F/B恢复至空白组水平。研究表明，有害菌普雷沃氏菌属能够产生脂多糖从而诱发炎症反应[11]；苏黎世杆菌属是产生炎症介质的促炎菌[12]；脱硫弧菌属是还原硫酸盐产生H_2S的厌氧菌，内源性的H_2S会破坏肠道上皮细胞导致肠道黏膜屏障受损，从而引发炎症[13]。本研究结果显示，模型组上述3种菌属的相对丰度均显著高于空白组，经肝宝胶囊干预后可显著降低。益生菌乳杆菌属可通过调节肠道菌群结构和干预炎症反应来减缓NAFLD发展进程[14]；布劳特氏菌属、拟杆菌属均为促产短链脂肪酸的菌属，短链脂肪酸对肠黏膜的完整性起到重要的保护作用，同时具有抗炎的作用[15]。阿克曼菌属可改善肠道通透性，增强肠道功能屏障[12]。本研究结果显示，模型组上述4种菌属的相对丰度均显著低于空白组，经肝宝胶囊干预后可显著升高。

综上所述，肝宝胶囊能改善肠黏膜屏障功能，从而减少有害菌产生的毒性物质进入血液，有效降低血清中炎症因子水平；同时能够通过调节优化肠道菌群的结构，增加益生菌丰度，降低有害菌丰度，保持肠道微生态平衡来发挥改善NAFLD的作用。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组，中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南：2018年更新版[J]. 临床肝胆病杂志，2018，34(5)：947-957.

[2] KOLODZIEJCZYK A A，ZHENG D P，SHIBOLET O，et al. The role of the microbiome in NAFLD and NASH[J]. EMBO Mol Med，2019，11(2)：e9302.

[3] 范兴，蔡沓栗，杨成梓，等. 基于代谢组学研究肝宝胶囊治疗非酒精性脂肪肝大鼠的作用机制[J]. 中成药，2021，43(3)：635-642.

[4] DU F，HUANG R F，LIN D，et al. Resveratrol improves liver steatosis and insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease in association with the gut microbiota[J]. Front Microbiol，2021，12：611323.

[5] 刘清培. 橄榄酚类物质降血脂活性及其作用机制的研究[D]. 福州：福建农林大学，2016.

[6] 王重娟，周锦妍，王崇静，等. 双歧杆菌联合左卡尼汀对菌群失调腹泻模型大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国药房，2021，32(6)：682-690.

[7] 苗兰，彭勃，孙明谦，等. 祛瘀化痰通脉方对高脂血症金黄地鼠肠道菌群的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28(1)：109-120.

[8] 王平，赵澄，卢芳国，等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肠道菌群及趋化因子CCL5、CXCL10的影响[J]. 中草药，2021，52(1)：160-175.

[9] 秦百君，唐曦平，杨昕，等. 清解化攻方调节重症急性胰腺炎模型大鼠肠道菌群及对肠黏膜屏障的影响[J]. 中国药房，2022，33(15)：1825-1832.

[10] MILOSEVIC I，VUJOVIC A，BARAC A，et al. Gut-liver axis，gut microbiota，and its modulation in the management of liver diseases：a review of the literature[J]. Int J Mol Sci，2019，20(2)：395.

[11] JIA W，RAJANI C，XU H X，et al. Gut microbiota alterations are distinct for primary colorectal cancer and hepatocellular carcinoma[J]. Protein Cell，2021，12(5)：374-393.

[12] YE J Z，LV L X，WU W R，et al. Butyrate protects mice against methionine-choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by improving gut barrier function，attenuating inflammation and reducing endotoxin levels[J]. Front Microbiol，2018，9：1967.

[13] XU P F，HONG F，WANG J L，et al. Microbiome remodeling via the montmorillonite adsorption-excretion axis prevents obesity-related metabolic disorders[J]. EBioMedicine，2017，16：251-261.

[14] LEE N Y，SHIN M J，YOUN G S，et al. *Lactobacillus* attenuates progression of nonalcoholic fatty liver disease by lowering cholesterol and steatosis[J]. Clin Mol Hepatol，2021，27(1)：110-124.

[15] 林日添，吴维，刘占举. 短链脂肪酸对肠黏膜稳态免疫调节作用的研究进展[J]. 免疫学杂志，2017，33(10)：900-904.

（收稿日期：2022-11-01　修回日期：2023-03-18）
（编辑：邹丽娟）