



中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358

CN 31-1794/R

双歧杆菌对高脂饮食诱导的C57BL/6小鼠非酒精性脂肪肝的影响

石英, 拉巴普尺, 张丹瑛, 翁书强, 刘心怡, 汪皓琪

引用本文:

石英,拉巴普尺,张丹瑛,翁书强,刘心怡,汪皓琪. 双歧杆菌对高脂饮食诱导的C57BL/6小鼠非酒精性脂肪肝的影响[J]. 中国临床医学, 2022, 29(3): 473–480.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220242>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大黄酸对小鼠非酒精性脂肪肝病的治疗效果分析

Therapeutic effect of rhein on non-alcoholic fatty liver disease in mice

中国临床医学. 2021, 28(1): 106–110 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20200155>

Gasdermin E多肽抑制剂对卵巢癌化疗诱导肠道损伤的改善作用

Effect of gasdermin E on the intestinal damage induced by chemotherapy in ovarian cancer

中国临床医学. 2022, 29(1): 35–41 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20211121>

法尼酯X受体激动剂GW4064减轻小鼠脓毒症诱导的炎症反应和急性肾损伤

FXR agonist GW4064 reduces sepsis-induced inflammation and acute kidney injury in mice

中国临床医学. 2022, 29(3): 365–371 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20212744>

抑郁、焦虑状态人群的肠道菌群构成

Composition of intestinal flora in people with depression and anxiety

中国临床医学. 2021, 28(3): 433–443 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20202551>

小檗碱对非酒精性脂肪性肝病患者血清骨钙素的影响

Effect of berberine on serum osteocalcin in patients with non-alcoholic fatty liver disease

中国临床医学. 2019, 26(6): 822–826 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20191127>

DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220242

· 短篇论著 ·

双歧杆菌对高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠非酒精性脂肪肝的影响

石 英¹, 拉巴普尺², 张丹瑛³, 翁书强^{3*}, 刘心怡³, 汪皓琪^{3*}

1. 奉贤区中医医院消化科, 上海 201400

2. 日喀则市人民医院消化科, 日喀则 857000

3. 复旦大学附属中山医院消化科, 上海 200032

引用本文 石 英, 拉巴普尺, 张丹瑛, 等. 双歧杆菌对高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠非酒精性脂肪肝的影响 [J]. 中国临床医学, 2022, 29(3): 473-480. SHI Y, LABA P C, ZHANG D Y, et al. Effects of *bifidobacteria* on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in C57BL/6 mice[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2022, 29(3): 473-480.

[摘要] **目的** 探讨双歧杆菌是否通过改变肠道菌群, 减少肠道局部炎症, 调节系统性炎症, 从而减轻高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠的非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)。**方法** 将 32 只雄性 C57BL/6 小鼠作为实验动物, 分为对照饲料组、对照饲料加双歧杆菌干预组、高脂饲料组和高脂饲料加双歧杆菌干预组, 每组分 2 笼, 每笼 4 只。检测小鼠血清糖脂代谢及肝功能水平。通过油红 O 染色和苏木精-伊红 (H-E) 染色评估小鼠肝脏脂肪变性情况。采用实时荧光定量 PCR 检测小鼠回肠、结肠组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肠黏膜闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens 1, ZO-1)、紧密连接蛋白 (occludin) 的表达。通过 Illumina Miseq 平台微生物多样性测序检测小鼠粪便中肠道菌群的结构变化。**结果** 高脂饲料加双歧杆菌干预组 C57BL/6 小鼠肝脏脂肪变性程度明显低于高脂饲料组。与高脂饲料组相比, 高脂饲料加双歧杆菌干预组炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达明显下降, 肠道炎症减轻。与对照饲料组相比, 高脂饲料组肠道菌群物种丰度和多样性减少, 存在肠道菌群改变。主成分分析 (PcoA) 及非度量尺度分析 (NMDS) 结果显示, 疾病模型组与阴性对照组肠道菌群构成成分较远, 构成上存在显著差异。菌属差异分析表现为高脂组拟杆菌门增多, 厚壁菌门减少, 拟杆菌属增多。**结论** 双歧杆菌可显著减少高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠 NAFLD 的肝脏脂肪变性程度和肠道炎症程度, 双歧杆菌干预可引起 C57BL/6 小鼠肠道菌群结构的明显改变, 降低小鼠肠道微生物的多样性。双歧杆菌的改善 NAFLD 作用可能与其改变宿主的肠道菌群结构组成有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; 双歧杆菌; 肠道菌群**[中图分类号]** R 575 **[文献标志码]** AEffects of *bifidobacteria* on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in C57BL/6 miceSHI Ying¹, LABA Pu-chi², ZHANG Dan-ying³, WENG Shu-qiang^{3*}, LIU Xin-yi³, WANG Hao-qi^{3*}

1. Department of Gastroenterology and Hepatology, Fengxian District Traditional Chinese Medicine Hospital, Shanghai 201400, China

2. Department of Gastroenterology and Hepatology, Shigatse People's Hospital, Shigatse 857000, Tibet, China

3. Department of Gastroenterology and Hepatology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective** To explore whether *bifidobacteria* attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in C57BL/6 mice by altering the gut microbiota, reducing local intestinal inflammation, and modulating systemic inflammation. **Methods** 32 male C57BL/6 mice were randomly allocated into four groups: common feed group, common feed group with *bifidobacteria*, high fat diet group, high fat diet group with *bifidobacteria*, each group is divided into 2 cages, 4 for each cage. Serum glucose and lipid metabolism and liver function levels in mice were detected. Mouse liver steatosis was assessed by Oil red O staining and hematoxylin-eosin (H-E) staining. Expression of TNF- α , IL-6, ZO-1 and occludin in mouse ileum and colon

[收稿日期] 2022-02-11 **[接受日期]** 2022-06-01

[基金项目] 西藏自治区自然科学基金 (XZ2019ZRG-117), 复旦大学附属中山医院临床研究专项 (2018ZSLC09). Supported by Natural Science Foundation of Tibet Autonomous Region (XZ2019ZRG-117), Special Project for Clinical Research of Zhongshan Hospital, Fudan University (2018ZSLC09).

[作者简介] 石 英, 主治医师. E-mail: wangying1913@163.com

*通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-64041990, E-mail: weng.shuqiang@zs-hospital.sh.cn; E-mail: wang.haoqi@zs-hospital.sh.cn

tissue by real time PCR. Gut microbiota profiles were established through 16SrRNA amplicon sequencing. **Results** The degree of liver steatosis in C57BL/6 mice in the *bifidobacteria* intervention group was significantly lower than that in the high-fat diet-fed group. The expression of inflammatory factors TNF- α and IL-6 in the *bifidobacteria* intervention group was significantly decreased. The species abundance and diversity of gut microbiota was decreased in NAFLD group. The results of PcoA and NMDS showed that there were significant differences in the composition of the flora among the groups. The gut microbial structure was changed, and abundance of Firmicutes was increased significantly after treated with *bifidobacteria*. **Conclusion** Taken together, these data suggest that *bifidobacteria* has a protective effect on NAFLD via changing the components of gut microbiota.

[Key Words] non-alcoholic fatty liver disease; *bifidobacteria*; gastro intestinal microbiome

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是慢性肝病的首要病因^[1],在肥胖人群中,NAFLD发病率可高达75%,在全球范围内NAFLD人群所占比例达15%~30%^[2]。随着肥胖及其相关代谢综合征全球化的流行趋势,该病在我国患病率逐年升高。如何预防和治疗NAFLD是近年来大量研究者的关注热点之一^[3]。

肠道微生物对人体的健康起到了至关重要的作用^[4-6]。不仅基础状态下肠道菌群的组成与疾病的发生风险相关,肠道菌群的失衡与消化疾病、心血管疾病、神经系统疾病等的发生密切相关^[7-8]。肠道微生态与NAFLD的发生发展关系密切。Buchman等^[9]发现,基础状态下,变形菌门(尤其是Gamma变形菌亚类)含量较高,与发生脂肪肝的风险较低相关,而基础状态下丹毒丝菌纲(硬壁菌门的成员)含量较高与脂肪肝的高风险相关。与单纯性脂肪变性患者和健康对照者相比,非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)患者的拟杆菌门数量显著降低,对体质指数(BMI)进行校正后也如此。同时,与单纯性脂肪变性组相比,NASH患者的毛螺旋菌科种数量增加,然而在对BMI和脂肪摄入量进行校正后,这种差异的显著性丧失^[10]。相比对照组,NASH和肥胖患者中观察到硬壁菌门和拟杆菌门数量降低,但NASH患者和肥胖患者的拟杆菌门和硬壁菌门的丰度相似。NASH组中大肠杆菌的增加可能导致乙醇水平升高,因为这些微生物能够产生乙醇^[11]。Zhang等^[12]发现,NASH患者的肠道双歧杆菌和乳酸杆菌数量明显低于对照组,而肠杆菌和肠球菌病原菌数量明显高于对照组。

近年来,基因组学和代谢组学的发展为调节肠道菌群防治NAFLD的思路提供了可行性^[13-14]。因此,利用基因、代谢组学的分析方法,从中突破寻求NAFLD防治新方案值得深入。

1 材料与方法

1.1 试验模型的建立 C57BL/6小鼠32只,8周龄,SPF级,体质量(20 ± 2)g,购自上海SLAC实验动物有限公司。置于12h的光照下循环和温度控制的环境。于复旦大学实验动物部SPF级饲养。动物饲养温度(22 ± 2)℃。通过西方高脂饮食建立小鼠NAFLD模型。高脂肪饮食(Research Diet D12492)和对照饮食(对照标准饲料TP26338,南通特洛菲饲料科技有限公司)喂养小鼠24周后处死,取肝脏行病理检测判断脂肪肝模型建立是否成功。小鼠进入动物房后适应性喂养1周,然后随机进行分组:对照饲料组(NC组)、对照饲料加双歧杆菌干预组(NB组)、高脂饲料组(HF组)、高脂饲料加双歧杆菌干预组(FB组),每组分2笼,每笼饲养4只。每只小鼠每天进行双歧杆菌菌液(含双歧杆菌 1×10^9 CFU/mL)灌胃200 μ L/d,菌液现用现配,直至实验结束。

1.2 标本采集 每周记录1次小鼠体质量及进食量,干预周期为24周。采集标本前1d晚上开始禁食,自由进水。小鼠称重后,以5%(0.1 mL/10 g)水合氯醛腹腔注射麻醉。用摘眼球法采血至EP管中,随后用脱颈椎法处死小鼠。立即取出肝脏称重,计算肝脏指数(肝脏质量/体质量)并放入冻存管并置入液氮罐内,同时取结肠、粪便冻存。EP管中的血液静置2h后分离血清(4 000 r/min离心15 min)用于后续实验。

1.3 血清学检测 使用南京建成生物工程研究所试剂盒检测小鼠谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)、血清葡萄糖、血清总胆固醇和血清三酰甘油。

1.4 病理学检测 小鼠处死后肝脏、回肠和结肠组织用10%甲醛固定。常规脱水、包埋、切片后

制成石蜡切片,并用苏木精-伊红(H-E)染色。肝脏组织用油红O和Masson三色(Sigma-Aldrich公司,美国)染色评估脂肪变性程度。回肠及结肠组织进一步行闭锁小带蛋白1(zonula occludens 1, ZO-1)、紧密连接蛋白(occludin)免疫组化检测。切片的每个位点观察5个高倍镜视野($\times 400$),分别计数阳性细胞的百分率(0~5%:0分;6~25%:1分;26~50%:2分;50%:3分),染色强度(0~3分),阳性率 $\times$ 着色强度=免疫组化积分。并予以油红O染色液染色观察脂肪变性情况。按照Masson三色法步骤来染色,观察组织中纤维化情况。

1.5 实时荧光定量PCR 通过实时荧光定量PCR方法测定肠道组织中occludin、ZO-1、TNF- α 、白细胞介素6(IL-6)的基因表达水平。从小鼠回肠和结肠组织提取总RNA(Takara Bio公司,日本),测定浓度后使用SYBR Premix Ex Taq(Takara公司,日本)进行逆转录,使用ABI PRISM 7,500实时荧光定量PCR进行扩增,采用两步法PCR反应。反应混合物为在95℃下孵育300 s,然后进行35倍放大,95℃下30 s、60℃下30 s和72℃下30 s的循环。设定同样的荧光阈值,采用相对定量方法用来确定经过不同处理的样品目标转录本之间的表达差异,结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

1.6 Illumina Miseq 测序 采用Miseq对肠道菌群进行分析,寻找优势菌种,并应用实时荧光定量PCR检测高脂组及对照组粪便肠道菌群数量及优势菌群的差异。步骤如下,(1)基因组DNA抽提:完成基因组DNA抽提后,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。(2)PCR扩增:PCR采用TransGen AP221-02, TransStart Fastpfu DNA Polymerase; PCR仪采用ABI GeneAmp[®] 9700型;全部样本按照正式实验条件进行,每个样本3个重复,将同一样本的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(Axygen公司)切胶回收PCR产物,Tris_HCl洗脱;2%琼脂糖电泳检测。(3)荧光定量:参照电泳初步定量结果,将PCR产物用QuantiFluor[™]-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。(4)Miseq文库构建:连接“Y”字形接头;使用磁珠筛选去除接头自连片段;利用

PCR扩增进行文库模板的富集;氢氧化钠变性,产生单链DNA片段。(5)Miseq测序:DNA片段的一端与引物碱基互补,固定在芯片上;另一端随机与附近的另外一个引物互补,也被固定住,形成“桥”;PCR扩增,产生DNA簇;DNA扩增子线性化成为单链。加入改造过的DNA聚合酶和带有4种荧光标记的dNTP,每次循环只合成1个碱基;用激光扫描反应板表面,读取每条模板序列第1轮反应所聚合上去的核苷酸种类;将“荧光基团”和“终止基团”化学切割,恢复3'端黏性,继续聚合第2个核苷酸;统计每轮收集到的荧光信号结果,获知模板DNA片段的序列。(6)生物信息分析。

1.7 统计学处理 采用SPSS19.0软件进行统计分析,近似正态分布的定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用析因设计方差分析进行统计高脂因素及双歧杆菌因素的作用,多组间样本均数比较采用ANOVA方差分析进行检验,组间两两比较,如符合方差齐性,采用Bonferroni方法进行检验,如方差不齐,采用Tamhane方法进行检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 双歧杆菌对小鼠进食量及体质量的影响 经24周西方高脂饲料饮食造模,结果(图1)显示:高脂饲料组小鼠摄入量明显比对照饲料组多,但高脂饲料模型组间,双歧杆菌灌胃组摄入量及能量不变,小鼠体质量显著减轻。从体质量上可看出双歧杆菌对西方高脂饮食引起的NAFLD有减轻体质量作用(图1)。结果(图1、图2)显示,模型组小鼠肝脏质量明显增加($P < 0.001$),经双歧杆菌灌胃处理后可显著减轻高脂组肝脏质量。

2.2 小鼠空腹血糖及血脂情况 结果(图3)显示:高脂组小鼠血糖及血清总胆固醇升高,经双歧杆菌干预后,血糖及血清总胆固醇有下降趋势,血清三酰甘油各组间差异无统计学意义。

2.3 检测小鼠血清转氨酶 结果(图4)显示:高脂饮食NAFLD造模组小鼠ALT、AST、GGT、ALP显著升高($P < 0.001$),经双歧杆菌干预后,AST显著下降,差异有统计学意义($P < 0.001$),ALT、GGT、ALP双歧杆菌干预组比高脂饲料组下降趋势,提示双歧杆菌可改善NAFLD的肝功能损伤。

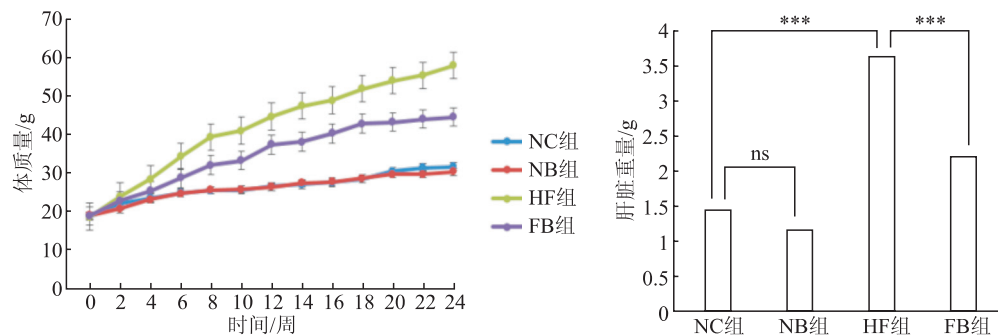


图1 生长曲线图及肝脏质量图

NC组:对照饲料组;NB组:对照饲料加双歧杆菌干预组;HF组:高脂饲料组;FB组:高脂饲料加双歧杆菌干预组。

ns: $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

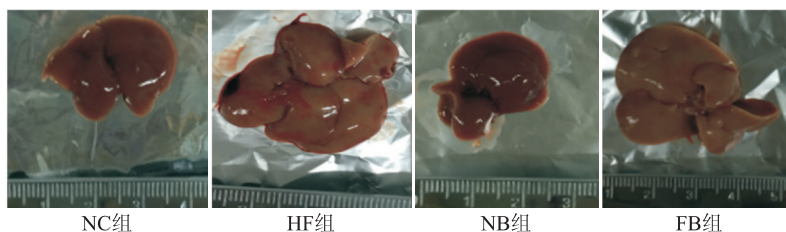


图2 肝脏大体图

NC组:对照饲料组;HF组:高脂饲料组;NB组:对照饲料加双歧杆菌干预组;FB组:高脂饲料加双歧杆菌干预组。

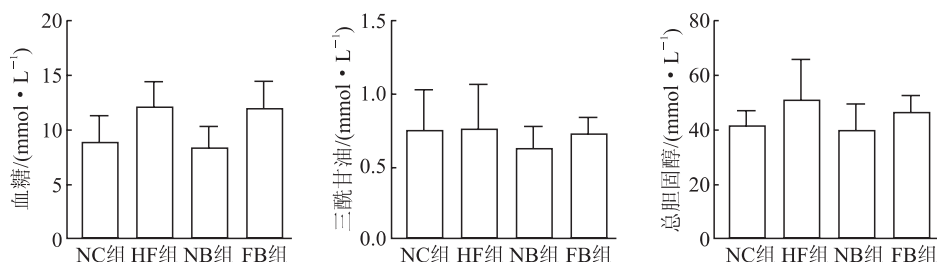


图3 血糖及血脂图

NC组:对照饲料组;HF组:高脂饲料组;NB组:对照饲料加双歧杆菌干预组;FB组:高脂饲料加双歧杆菌干预组。

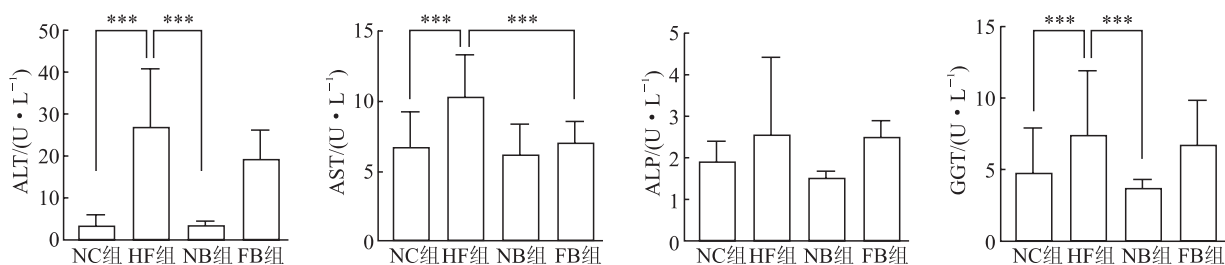


图4 双歧杆菌干预后转氨酶变化

NC组:对照饲料组;HF组:高脂饲料组;NB组:对照饲料加双歧杆菌干预组;FB组:高脂饲料加双歧杆菌干预组。ALT:谷氨酸转氨酶;AST:天冬氨酸转氨酶;ALP:碱性磷酸酶;GGT:γ-谷氨酰转肽酶。*** $P < 0.001$ 。

2.4 肝脏H-E染色、油红O染色和Masson染色结果(图5)显示:对照饲料组、对照饲料加双歧杆菌干预组肝细胞未见变性,汇管区未见炎症。而高脂饲料组肝脏肝细胞出现脂肪变性,肝细胞变性程度为重度,汇管区未见炎症,而高脂饲料加双歧杆菌干预组肝细胞也存在脂肪变性,但变性

程度为轻至中度,汇管区未见炎症。高脂组油红O染色见高脂组内大量脂滴形成,伴空泡变性,经双歧杆菌干预后,肝脏内脂滴显著减少。Masson染色结果显示,高脂饲料NAFLD疾病模型组出现纤维化条索,而经双歧杆菌干预后高脂组无纤维化。

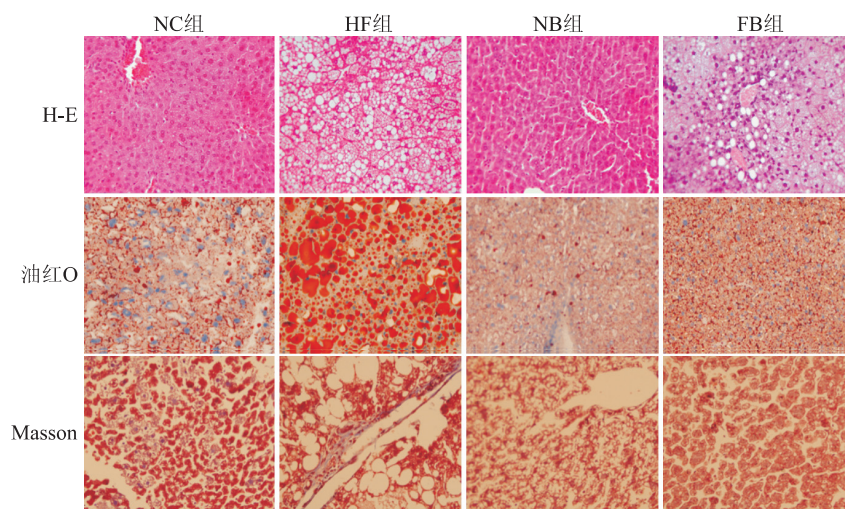


图5 肝脏病理及油红O染色、Masson染色

NC组:对照饲料组;HF组:高脂饲料组;NB组:对照饲料加双歧杆菌干预组;FB组:高脂饲料加双歧杆菌干预组。Original magnification:×200。

2.5 肠道功能检测 回结肠病理NC组、NB组黏膜层,黏膜下层和肌层均无明显炎症,而FB组黏膜层及黏膜下层均有轻至中度炎症,肌层未见炎症,HF组黏膜层中度炎症(图6)。ZO-1和occludin的PCR检测结果(图7)显示:结肠和回肠组织内HF组occludin及ZO-1减少,提示NAFLD组结

肠和回肠组织均存在肠道黏膜屏障的损害,而FB组中,ZO-1和occludin均有不同程度的升高,提示双歧杆菌可通过改善肠黏膜屏障来发挥对NAFLD的保护作用。检测结肠及回肠组织中TNF- α 和IL-6表达,结果显示高脂饲料组肠道炎症因子显著升高,而高脂饲料加双歧杆菌干预组升高不显著。

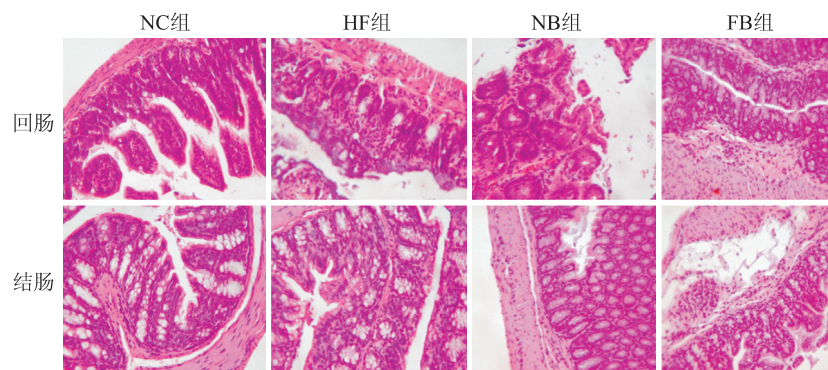


图6 回肠、结肠病理图

NC组:对照饲料组;HF组:高脂饲料组;NB组:对照饲料加双歧杆菌干预组;FB组:高脂饲料加双歧杆菌干预组。Original magnification:×200。

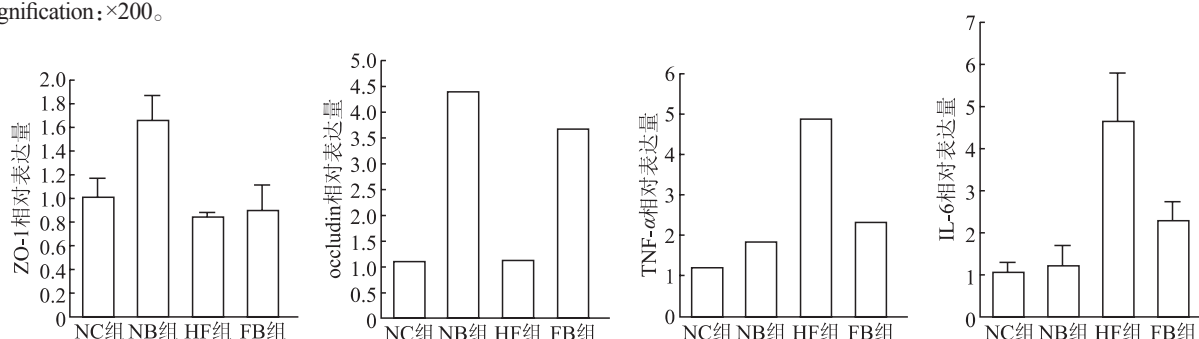


图7 肠道屏障及炎症指标

NC组:对照饲料组;NB组:对照饲料加双歧杆菌干预组;HF组:高脂饲料组;FB组:高脂饲料加双歧杆菌干预组。

2.6 高通量检测各组间肠道菌群差异 结果(图8A)显示:此次检测深度足够。高脂组肠道菌群多样性下降,经双歧杆菌干预后,可恢复肠道菌群多样性(图8B)。图8C和图8D显示各组间

肠道菌群存在显著差异,高脂饲料组与对照饲料组比较,存在肠道菌群失衡,高脂饲料组经双歧杆菌干预后可改变肠道菌群。结果(图8E)显示从门水平,高脂组优势菌属为拟杆菌门,而对

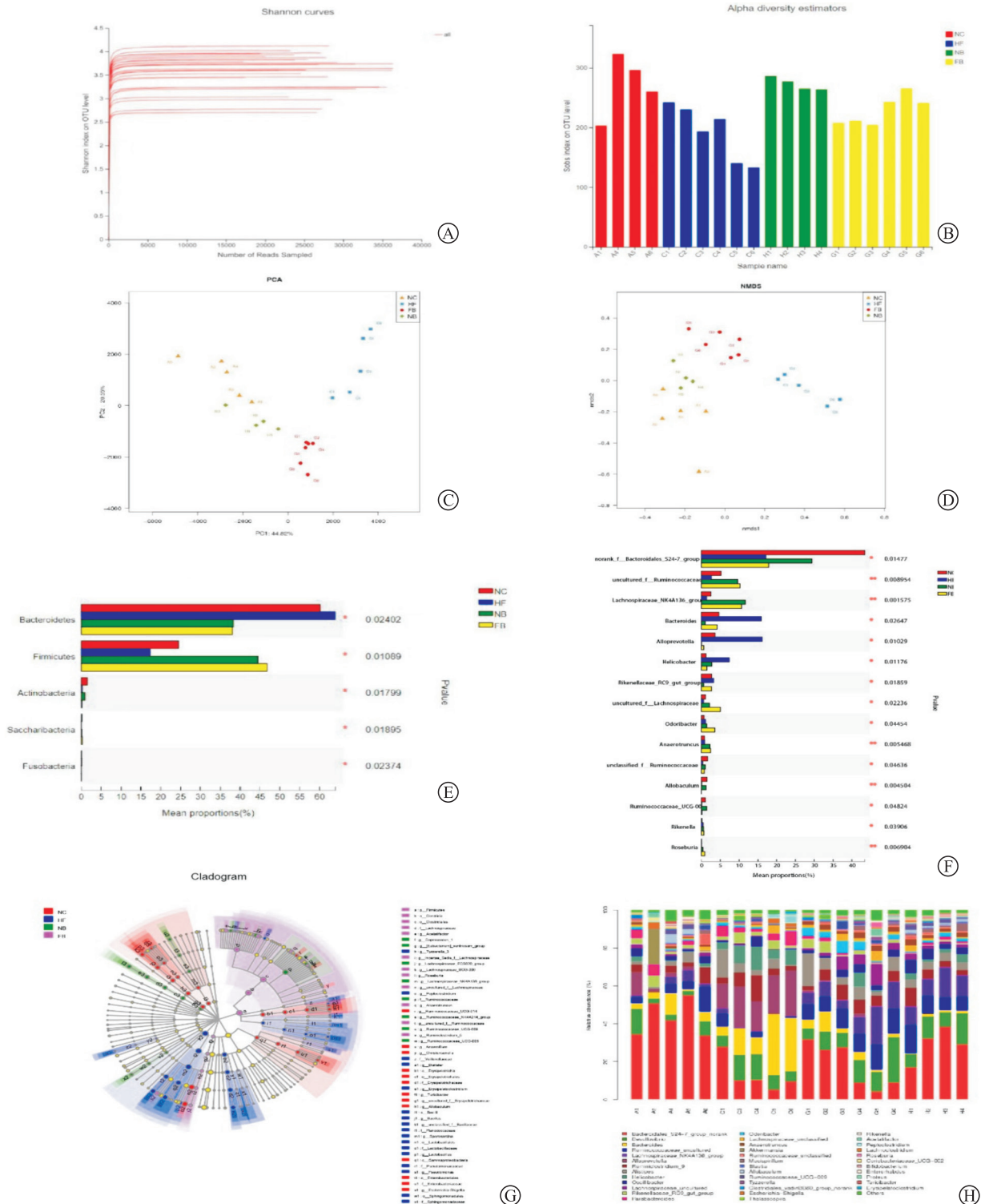


图8 16S 肠道菌群分析

A: 稀释曲线; B: α 多样性比较; C: β 多样性分析 PCA; D: β 多样性分析 NMDS; E: 门水平组间菌群差异; F: 优势菌属的单因素方法分析; G: LEFSe 分析; H: 属水平菌群差异。

照饲料组和对照饲料加双歧杆菌干预组优势菌属为厚壁菌门。结果(图 8F)显示:高脂饲料组显著升高了如下菌属:*Bacteroides*、*Helicobacter* 和 *Alloprevotella*。高脂饲料加双歧杆菌干预组增加了以下菌属:*Lachnospiraceae*、*Ruminococcaceae*、*Odoribacter*、*Anaerotruncus*、*Roseburia*, 而减少了以下属的水平:*Bacteroides*。而 LEfse 分析结果显示这些差异具有显著性(图 8)。

2.7 析因方差分析 结果(表 1)显示,高脂因素对 ALT、AST、GGT、血糖、肝脏质量、结肠 ZO-1、结肠 IL-6 都有显著性作用,而双歧杆菌干预可减少高脂饮食的作用。

表 1 高脂因素及双歧杆菌干预因素的析因方差分析结果

指标	高脂饮食P值	双歧杆菌干预P值	二者交互
谷氨酸转氨酶	0.000	0.268	0.280
天冬氨酸转氨酶	0.027	0.050	0.142
碱性磷酸酶	0.057	0.569	0.674
谷氨酰转肽酶	0.037	0.486	0.905
血糖	0.001	0.694	0.828
总胆固醇	0.481	0.075	0.797
三酰甘油	0.398	0.548	0.580
肝脏质量	0.000	0.001	0.003
回肠ZO-1	0.403	0.168	0.166
回肠occludin	0.058	0.132	0.203
回肠TNF- α	0.801	0.002	0.008
回肠IL-6	0.739	0.628	0.757
结肠ZO-1	0.000	0.018	0.149
结肠occludin	0.615	0.000	0.198
结肠TNF- α	0.081	0.141	0.103
结肠IL-6	0.004	0.008	0.011

ZO-1: 闭锁小带蛋白 1; occludin: 紧密连接蛋白; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α ; IL-6: 白介素 6。

3 讨论

随着生活条件的改善及饮食结构的丰富, NAFLD 已经成为慢性肝病的第一大病因, 影响了越来越多的患者。肠道微生物因其惊人的数量和高度的多样化被称为人类的“第 2 基因组”, 对肠道局部免疫屏障功能的维持至关重要, 有研究者^[15]尝试应用各种益生菌调节肠道菌群, 恢复正常的肠道微生态, 已获得对肝脂肪变性的治疗作用。Wong 等^[16]提出肠道微生物与肝脏疾病不同的机制或假说, 包括微生物群对能源利用的影响以及肥胖的关系; 微生物群对导致机体低度炎症

的肠道通透性的影响; 肠道微生物群调节膳食胆碱代谢; 肠道微生物群调节胆汁酸代谢; 肠道微生物群内源性产生肝脏毒性物质(如乙醇)和其他挥发性有机化合物等^[17]。

此外, 肠道微生物还可以通过多种途径对机体免疫功能产生影响^[18]。有研究^[19]证实, 无菌动物的免疫功能较正常下降, 具体表现为免疫器官形态的缩小以及免疫细胞数量的减少。令人惊喜的是, 当无菌动物肠道的微生物得到恢复以后, 其肠道及整个机体的免疫功能都得到相应的增强^[20]。双歧杆菌在促进维生素的合成与吸收、调节机体免疫等领域发挥着重要的作用^[21]。以往研究^[22]发现, 双歧杆菌可能通过诱导 DCs 活化, 从而纠正 Th1/Th2 细胞的失衡, 另一方面, 可以通过刺激 DCs 分泌 TGF- β 或 IL-10 调节 CD4⁺CD25⁺Treg 数量, 进而影响 Treg/Th17 细胞的分化。

肠道屏障功能损害包括肠道菌群紊乱、肠细胞紧密连接蛋白的改变、肠道通透性增高、血液中脂多糖(lipopoly-saccharide, LPS)升高等^[23]。NAFLD 患者肠道黏膜通透性增高, 紧密连接完整性损伤, 肠道革兰阴性菌细胞壁的成分 LPS 进入门脉系统, 超过肝脏的清除能力后, 可形成内毒素血症^[24]。本研究表明, NAFLD 模型小鼠末端回肠上皮细胞 ZO-1、occludin RNA 显著减少, 提示肠黏膜上皮细胞屏障功能减退。而高脂饲料组应用双歧杆菌干预后可改善肠道屏障功能。

此外, 炎症也在 NAFLD 的致病中发挥了重要作用, 其中, 肠道微生物紊乱是驱动炎症的主要因素^[25]。本研究观察到双歧杆菌除了能改善肥胖小鼠的肠道屏障功能, 同时能降低血清和肠道组织中 TNF- α 、IL-6 等促炎细胞因子表达水平。

综上所述, 与对照饲料组小鼠相比, 高脂饲料组小鼠肠道菌群物种丰度和多样性减少, 存在肠道菌群失调, 主成分分析(PcoA)及非度量尺度分析(NMDS)均能观察各组标本微生物菌群构成的比较, 结果显示疾病模型组与阴性对照组肠道菌群构成分隔较远, 构成上存在显著差异。菌属差异分析表现为高脂组拟杆菌门增多, 厚壁菌门减少, 拟杆菌属增多。由此推测, 双歧杆菌可通过改善肠道菌群紊乱, 发挥延缓 NAFLD 进展的作用。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] RATZIU V, GOODMAN Z, SANYAL A. Current efforts and trends in the treatment of NASH[J]. J Hepatol, 2015, 62(1): S65-75.
- [2] HUANG R C, BEILIN L J, AYONRINDE O, et al. Importance of cardiometabolic risk factors in the association between nonalcoholic fatty liver disease and arterial stiffness in adolescents[J]. Hepatology, 2013, 58(4): 1306-1314.
- [3] WRUCK W, GRAFFMANN N, KAWALA M A, et al. Concise review: current status and future directions on research related to nonalcoholic fatty liver disease[J]. Stem cell, 2017, 35(1): 89-96.
- [4] WIELAND A, FRANK D N, HARNKE B, et al. Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 201, 42(9): 1051-1063.
- [5] GKOLFAKIS P, DIMITRIADIS G, TRIANTAFYLLOU K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2015, 14(6): 572-581.
- [6] LAURA-BERENICE OLVERA-ROSALES, ALMA-ELIZABETH CRUZ-GUERRERO, ESTHER RAMÍREZ-MORENO, et al. Impact of the gut microbiota balance on the health-disease relationship: the importance of consuming probiotics and prebiotics[J]. Foods, 2021, 10(6): 1261.
- [7] LI R, MAO Z S, YE X J, ZUO T. Human gut microbiome and liver diseases : from correlation to causation[J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 1017.
- [8] KAZEMIAN N, MAHMOUDI M, HALPERIN F, et al. Gut microbiota and cardiovascular disease: opportunities and challenges[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 36.
- [9] BUCHMAN A L, DUBIN M D, MOUKARZEL A A, et al. Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation[J]. Hepatology (Baltimore, MD), 1995, 22: 1399-1403.
- [10] MOUZAKI M, COMELLI E, ARENDT B, et al. Intestinal microbiota in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2013, 58(1): 120-127.
- [11] ZHU L, BAKER S S, GILL C, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 601-609.
- [12] ZHANG J, WANG C, WANG J, et al. Relationship between intestinal flora and inflammatory factors in patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 723-726.
- [13] COHEN J C, HORTON J D, HOBBS H H. Human fatty liver disease: old questions and new insights[J]. Science, 2011, 332(6037): 1519-1523.
- [14] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Disease, American Gastroenterological Association[J]. Hepatology, 2012, 55: 2005-2023.
- [15] WOODHOUSE C A, PATEL V C, SINGANAYAGAM A, et al. The gut microbiome as a therapeutic target in the pathogenesis and treatment of chronic liver disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2018, 47(2): 192-202.
- [16] WONG V W, WON G L, CHIM A M, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study[J]. Ann Hepatol, 2013, 12(2): 256-262.
- [17] SCHNABL B, BRENNER D A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases[J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1513-1524.
- [18] HOSSEINKHANI F, HEINKEN A, THIELE I, et al. The contribution of gut bacterial metabolites in the human immune signaling pathway of non-communicable diseases[J]. Gut Microbes, 2021, 13 (1): 1-22.
- [19] XIAO J J, BI Z W, LI Y. Research between intestinal microecology and tumor immune regulation[J]. Journal of International Oncology, 2017, 44(1): 34-37.
- [20] IVANOV I I, LITTMAN D R. Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria[J]. Current opinion in microbiology, 2011, 14(1): 106-114.
- [21] YANG J, ZHANG H, JIANG L, et al. Bifidobacterium longum BBMN68-specific modulated dendritic cells alleviate allergic responses to bovine β -lactoglobulin in mice[J]. Journal of applied microbiology, 2015, 119(4): 1127-1137.
- [22] MI H, DONG Y, ZHANG B, et al. Bifidobacterium infantis ameliorates chemotherapy induced intestinal mucositis via regulating T cell immunity in colorectal cancer rats [J]. Cell physiol Biochem, 2017, 42(6): 2330-2341.
- [23] MIELE L, VALENZA V, GIUSEPPE L T, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2009, 49(6): 1877-1887.
- [24] LI D, ZHENG J, HU Y, et al. Amelioration of intestinal barrier dysfunction by berberine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease in rats[J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13(52): 677-682.
- [25] BIBBÒ S, IANIRO G, DORE M P, et al. Gut microbiota as a driver of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 9321643.

[本文编辑] 王迪