

鳖甲煎丸改善肠道菌群失调治疗大鼠
非酒精性脂肪肝的机制探讨

邱邦东¹，臧月^{2,3}，王生^{2,3}，刘楠^{2,3}，刘莉^{2,3,4*}，梅其炳^{2,3,4*}

(1. 宜宾市第二人民医院，四川 宜宾 644000；2. 中国医药工业研究总院，上海 200040；
3. 上海医药工业研究院 创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437；
4. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心，上海 200437)

〔摘要〕 目的：探讨鳖甲煎丸通过改善肠道菌群失调，进而发挥对非酒精性脂肪肝（non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD）模型大鼠的肝脏保护作用。方法：SD 大鼠随机分为正常组、模型组、罗格列酮（3 mg·kg⁻¹）组及鳖甲煎丸（2.4, 1.2, 0.6 g·kg⁻¹）组，每组 10 只。给予高脂乳剂及四氯化碳橄榄油溶液诱导 NAFLD 模型，造模成功后连续给药 4 周。在实验过程中动态监测各组大鼠肠道菌群变化；实验结束后取结肠组织，采用实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠结肠紧密连接蛋白（occludin）和闭锁连接蛋白 1（ZO-1）mRNA 的表达，用阿利新蓝-过碘酸雪夫（AB-PAS）染色考察结肠组织杯状细胞黏液层厚度的变化；同时动态监测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶（ALT），天冬氨酸转移酶（AST），碱性磷酸酶（ALP），总胆固醇（TC），低密度脂蛋白-胆固醇（LDL-C）指标，并用苏木精-伊红（HE）染色观察肝脏组织病变情况。结果：与正常组比较，模型组拟杆菌门、拟杆菌属、梭杆菌属数量明显增加（*P* < 0.05），乳酸杆菌数量减少（*P* < 0.05），肠道紧密连接蛋白 occludin 表达明显减少（*P* < 0.05），肠道通透性明显增加（*P* < 0.05）。与模型组比较，鳖甲煎丸（0.6 g·kg⁻¹）组拟杆菌 1 和拟杆菌 2 数量明显减少（*P* < 0.05），同时乳酸杆菌数量增加（*P* < 0.05），结肠 occludin 表达明显增加（*P* < 0.05），同时有效降低肝损伤指标，炎性细胞浸润明显改善。结论：鳖甲煎丸能够改善 NAFLD 模型大鼠肠道菌群紊乱，有效降低肠道通透性，显著降低肝细胞损伤。

〔关键词〕 非酒精性脂肪肝；肠道菌群紊乱；肠道通透性；结肠紧密连接蛋白

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2017)04-0145-07

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfxj.2017040145

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1516.048.html>

〔网络出版时间〕 2016-11-07 15:16

Biejia Jianwan Improves Intestinal Flora Imbalance and Attenuates
Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats

QIU Bang-dong¹，ZANG Yue^{2,3}，WANG Sheng^{2,3}，LIU Nan^{2,3}，LIU Li^{2,3,4*}，MEI Qi-bing^{2,3,4*}

(1. The Second People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, China; 2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China; 3. State Key Laboratory of New Drug& Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China; 4. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the effect of Biejia Jianwan on intestinal flora imbalance and investigate its protection effect on liver in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats model. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, model group, rosiglitazone (3 mg·kg⁻¹) group and Biejia Jianwan (2.4, 1.2

〔收稿日期〕 20160324(016)

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81370564)

〔第一作者〕 邱邦东，硕士，副主任医师，从事感染病学研究，Tel:010-84205245，E-mail:136168016@qq.com

〔通讯作者〕 * 刘莉，博士，研究员，从事中药调节免疫疾病研究，Tel:021-55514600-312，E-mail:liuli1129@hotmail.com；

* 梅其炳，博士，研究员，从事心脑血管药理工作研究，Tel:021-65449361，E-mail:qbmei@fmmu.edu.cn

and 0.6 g·kg⁻¹) groups (*n* = 10 in each group). NAFLD rat models were established by high fat emulsion and carbon tetrachloride olive oil solution. The drugs were given for 4 weeks after successful modeling. The changes in intestinal flora were monitored dynamically. Colon tissues were taken after experiment to detect mRNA expression levels of tight junction protein expression occludin and blocking junction protein (ZO-1) with the method of Real-time PCR. In addition, mucus layer thickness was evaluated by Alcian blue-periodic acid Schiff (AB-PAS) staining. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TC), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in blood serum were monitored dynamically. The liver histopathology was observed by means of hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** As compared with the normal group, the number of *Bacteroidetes*, *Bacteroides* and *Fusobacterium* was significantly increased (*P* < 0.05) and the number of *Lactobacilli* was decreased in model group (*P* < 0.05). Besides, the expression level of occludin mRNA was significantly decreased and intestinal permeability was significantly increased (*P* < 0.05) in model group. As compared with the model group, Biejia Jianwan 0.6 g·kg⁻¹ could significantly reduce the number of *Bacteroidetes*, while increase the number of *Lactobacilli* and the expression level of occludin mRNA (*P* < 0.05). Biejia Jianwan could also effectively relieve liver damage and improve inflammatory cell infiltration. **Conclusion:** Biejia Jianwan had protective effects in NAFLD model rats by improving intestinal flora disturbance, effectively reducing intestinal permeability and significantly reducing liver damage.

[**Key words**] non-alcoholic fatty liver disease; intestinal flora; intestinal permeability; tight junction protein

随着人们饮食结构、生活方式的改变,以高热量饮食为代表的食物在日常饮食中的比例明显增加,非酒精性脂肪肝(NAFLD)呈高患病率、低龄化趋势^[1]。目前,对于NAFLD发病机制的研究主要围绕在脂代谢异常、胰岛素抵抗、脂质过氧化炎症反应等方面。随着对NAFLD发病机制研究的不断深入,新的研究显示肠道菌群失调在NAFLD发病机制中起着重要作用^[2]。肠道菌群失调可以促使肠道通透性增加,损伤肠道黏膜功能^[3-4],并促进内源性乙醇及其内毒素等对机体多种有害代谢产物释放增加,这些毒性物质从肠道位移入血液循环达到肝脏,进一步可激活宿主免疫系统,诱发脂肪肝及肝炎^[5-6]。

研究发现,中医药疗法对NAFLD的治疗具有独特优势^[7],曹毅等^[8]研究发现黄连素能够明显抑制肠道细菌的生长,调节肠道菌群紊乱,肠道通透性下降,减少炎性物质的释放,从而减轻肝脏损伤。李莹等^[9]对肠道菌群基因组采用指纹图谱检测,发现益气清化方(由黄芪、丹参、炒白术、陈皮、荷叶、绞股蓝、茯苓、玉米须组成)能够改善肠道菌群紊乱,减轻NAFLD模型大鼠肝细胞损伤和肝脏脂肪沉积。鳖甲煎丸由张仲景所创,收载于《伤寒杂病论》,处方由鳖甲胶、阿胶、蜂房(炒)、鼠妇虫、蜣螂、柴胡、黄芩、清半夏、党参、干姜、白芍等23种药物组成,其功效为活血化瘀,软坚散结。近年随着鳖甲煎丸

临床应用的扩大和动物实验研究的深入,发现其在肝炎、肝硬化、肝癌等慢性肝病的治疗上具有良好的治疗效果^[10],但鳖甲煎丸治疗NAFLD的机制目前尚未清楚。本实验旨在通过饲喂高脂饮食建立NAFLD大鼠模型,连续监测肠道菌群变化,并对肝组织及结肠组织进行病理学的动态观察,探讨鳖甲煎丸对NAFLD模型大鼠肝功能恢复及改善肠道菌群紊乱的情况,以进一步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠60只。由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(沪)2013-0016。本研究经过中国医药工业研究院实验动物伦理委员会批准,符合中国伦理委员会指导原则。

1.2 高脂乳液剂配制 高脂乳剂在相关配制方法的基础上进行了改进,配方为猪油15%,橄榄油15.5%,胆固醇7.5%,丙硫氧嘧啶0.2%,胆酸盐0.2%,蔗糖15%,氯化钠1%,奶粉8%,聚山梨酯805%,丙二醇5%。

1.3 药物制备 鳖甲煎丸粉末,由武汉中联有限公司提供,批号141215。鳖甲胶18g,阿胶30g,蜂房(炒)40g,鼠妇虫30g,土鳖虫(炒)50g,蜣螂60g,硝石(精制)120g,柴胡60g,黄芩30g,清半夏10g,党参10g,干姜30g,姜厚朴30g,桂枝30g,炒白芍50g,射干30g,桃仁20g,牡丹皮50g,大黄

30 g,凌霄花 30 g,葶苈子 10 g,石韦 30 g,翟麦 20 g,以上 23 味,除硝石、鳖甲胶、阿胶外,其余 20 味酌情予以粉碎,加黄酒 600 g 拌均,加盖封闭,隔水炖至酒尽药熟,干燥,与硝石等 3 味混合粉碎成细粉,过筛,混匀,既得。

1.4 试剂 胆固醇,氯化钠,聚山梨酯 80,丙二醇,胆酸钠,四氯化碳,橄榄油,羧甲基纤维素钠,三氟甲烷,乙醇,异丙醇,醋酸钠,异戊醇,氯化钾,磷酸氢二钠,磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 20120105,20141224,20150113,F20110613,120125,20130820,20130326,F20110708,20150811,20150930,20130516,20140701,20140611,F20131020,F20130815,F20131123);猪油(实验室自制);罗格列酮(江苏黄河药业股份有限公司,批号 140918);全脂奶粉(光明乳业股份有限公司,批号 20150119);复合纤维素(海南养生堂药业有限公司,批号 20140108);丙硫氧嘧啶(上海朝晖药业有限公司,批号 1404F12);Tris-Hcl(北京索莱宝科技有限公司,批号 1128Q078);Tris 酚(北京索莱宝科技有限公司,批号 20150819);AB-PAS 染色试剂盒(上海源叶生物科技有限公司,批号 L20J6G1685);反转录试剂盒,SYBR Green Real-time PCR Master Mix,溶菌酶(Takara 公司,批号分别为 DR014A,AK7101,AK9763);蛋白酶 K(上海嵘威达实业有限公司,批号 201403008);PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,16s V3(459 bp):上游 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3',下游 3'-ATTACCGCGGCTGCTGG-5';拟杆菌 1(bacteroidete,106 bp):上游 5'-CATGTGTTTAATTCGATGAT-3',下游 3'-AGCTGACGACAACCATGCAG-5';拟杆菌 2(bacteroides,126 bp):上游 5'-GAGAGGAAGG TCCCCAC-3',下游 3'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-5';乳酸杆菌(lactobacillus,126 bp):上游 5'-GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC-3',下游 3'-GGC CAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC-5';梭杆菌(fusobacterium,273 bp):上游 5'-CCCTTCAGTGCC GCACT-3',下游 3'-GTCCGAGGATGTCAAGAC-5';厚壁杆菌(firmicutes,126 bp):上游 5'-ATGTGTTTAA TTCGAAGCA-3',3'-AGCT GACGACAACCATGCAC-5';紧密连接蛋白(occludin,169 bp):上游 5'-TGCGTGGCTTCCACACTTGCT-3',下游 3'-TTTGCC GCTCTGGGGTCT GT-5';闭锁连接蛋白 1(ZO-1,149 bp):上游 5'-TGCCCGGCCATTTGAACGCA-3',下游 3'-TCAG GCGGCTGTGTGGAAC-5'。

1.5 仪器 XP105DR 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 公司),7080 型全自动血液生化分析仪(日本日立公司)。

2 方法

2.1 NAFLD 大鼠模型复制 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、罗格列酮(3 mg·kg⁻¹)组、鳖甲煎丸(2.4,1.2,0.6 g·kg⁻¹)组,每组 10 只。除正常组外,其余各组从第 1 周开始灌胃给予高脂乳剂造模,1 次/d,第 7 周开始灌胃给予 CCl₄ 橄榄油溶液,3 d/次,CCl₄ 橄榄油溶液由橄榄油-CCl₄ 1:1 调整为橄榄油-CCl₄ 19:1,灌胃体积为 2 mL·kg⁻¹。造模过程中动态监测肝损伤指标以及血脂指标的变化。模型组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆固醇(TC),低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)指标较正常组明显升高,即为造模成功。造模成功后开始给药,模型组和正常组给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶媒,给药体积为 0.01 mL·g⁻¹,1 次/d,连续 4 周。

2.2 肠道菌群组成检测 粪便样品的收集及提取 粪便菌体分离,取 2~3 粒新鲜粪便置于离心管中,然后加入 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(PBS)混匀,静置后转移上清。200 × g 低速离心 10 min,取上清。200 × g 离心 5 min,收集菌体,加入 PBS 1 mL 溶解,混匀后 200 g 离心 5 min。上层菌体悬液 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min,收集菌体。

2.3 提取 DNA 提取 用 TE 缓冲液(1 mol·L⁻¹ Tris-Hcl,0.5 mol·L⁻¹ EDTA,pH 8.0)0.6 mL 及溶菌酶 20 μL 溶解菌体,37 ℃ 孵育 3 h 后加入 10% SDS 70 μL,蛋白酶 K 15 μL 于 55 ℃ 过夜,加入等体积酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集上清。加入等体积三氯甲烷-异戊醇(24:1),12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集上清。加入醋酸钠和异丙醇,4 ℃ 沉淀 30 min。12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,沉淀用 70% 预冷乙醇洗涤,12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min,弃上清。待乙醇挥发完全后,用 TE 200 μL 溶解 DNA 分子,-80℃ 保存。

2.4 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测大鼠肠道菌群变化 检测肠道内乳酸杆菌,拟杆菌 1,梭杆菌,厚壁菌,拟杆菌 2 变化。PCR 扩增反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,40 个循环,72 ℃ 30 s。以 2^{-ΔΔC_t} 表示 mRNA 相对表达量。

2.5 结肠黏液层厚度及结肠通透性检测 第 11 周实验结束后,取结肠组织通过 AB-PAS 染色,考察结

肠黏液层厚度。液氮研磨结肠组织提取 RNA, 反转录成 cDNA 通过 Real-time PCR 检测结肠组织 occludin 及 ZO-1 mRNA 的表达, PCR 扩增反应条件及检测同 2.4 项。

2.6 大鼠血清指标检测 血液生化分析仪检测大鼠血清中 ALT, AST, ALP, TC, LDL-C 指标变化。

2.7 肝脏病理学形态检测 第 11 周末处死大鼠, 肝脏固定于 10% 多聚甲醛中, 制作石蜡切片, 通过苏木素伊红(HE)染色观察肝脏病理情况。根据文献[11], 对肝脏病理进行评分。肝脏病理评分标准, 肝小叶结构, 肝小叶结构正常为 0 分, 出现大小不等的假小叶为 I 分, 出现大量假小叶为 II 分, 肝小叶结构破坏或消失为 III 分。肝脏内脂滴大小, 细胞浆内无脂肪滴为 0 分, 胞浆内出现少量脂肪滴为 I 分, 胞浆内出现大量脂肪滴为 II 分。肝脏炎症细胞浸润, 肝脏汇管区无炎性细胞浸润为 0 分, 汇管区出现少量炎性细胞浸润为 I 分, 计算总分得出肝脏病理严重程度。

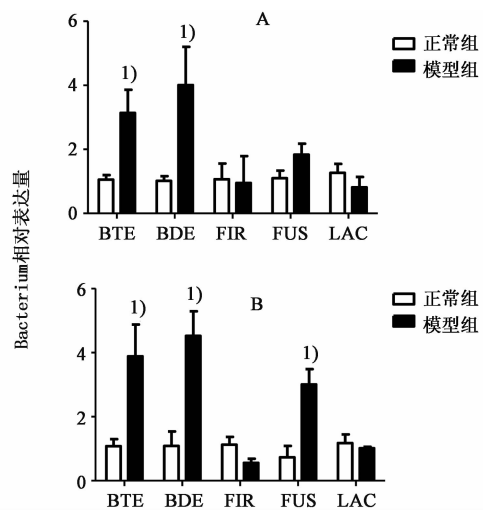
2.8 统计学方法 采用 Graph Prism5 软件进行统计分析, 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组独立样本之间比较采用 *t* 检验; 两组以上多组间比较用单因素方差分析; 方差不齐时用秩和检验或非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠肠道菌群失调的影响 模型组大鼠在连续灌胃高脂乳剂 5 周后, 与正常组比较, 拟杆菌数量明显增加 ($P < 0.05$), 梭杆菌数量有增加趋势, 乳酸杆菌数量有减少趋势。模型组大鼠在连续灌胃高脂乳剂 7 周后, 拟杆菌 1, 拟杆菌 2, 梭杆菌数量明显增加 ($P < 0.05$), 厚壁菌门和乳酸杆菌数量有减少趋势。见图 1。

给予鳖甲煎丸 4 周后, 与正常组比较, 模型组大鼠拟杆菌 1, 拟杆菌 2, 梭杆菌数量明显增加 ($P < 0.05$), 乳酸杆菌数量明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸 3 个剂量组均能明显降低拟杆菌 1, 2 数量 ($P < 0.05$), 鳖甲煎丸 ($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组明显降低拟杆菌 1, 2 数量 ($P < 0.05$), 同时有效增加乳酸杆菌数量 ($P < 0.05$); 罗格列酮组对模型大鼠肠道菌群失调无明显改善作用。见图 2。

3.2 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠菌群失调诱导的结肠通透性的影响 与正常组比较, 模型组大鼠结肠黏液层厚度明显降低 ($P < 0.05$)。而鳖甲煎丸 $0.6, 2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均对黏液层厚度无明显影响。见图 3。



A. 5 周; B. 7 周。BTE. 拟杆菌 1; BDE. 拟杆菌 2; FIR. 厚壁菌; FUS. 梭杆菌; LAC. 乳酸杆菌。与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 1 NAFLD 大鼠肠道内 BTE, BDE, FIR, FUS, LAC 菌群变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 BTE, BDE, FIR, FUS, LAC expression of intestinal flora in NAFLD model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

进一步考察鳖甲煎丸调节肠道菌群失调的作用, 与正常组比较, 模型组大鼠结肠组织 occludin mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$), ZO-1 mRNA 表达有降低趋势。与模型组比较, 鳖甲煎丸 ($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组 occludin mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$), 同时 ZO-1 mRNA 表达有升高趋势。罗格列酮对结肠 occludin 和 ZO-1 mRNA 表达均无明显影响。见图 4。

3.3 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠肝生化指标的影响 与正常组比较, 灌胃 6 周后, 模型组肝损伤大鼠血清 ALT, AST, ALP 无差异。查阅文献后^[12], 给予 50% CCl₄ 溶液灌胃, 与正常组比较, 模型组 ALT, AST 和 ALP 水平显著升高 ($P < 0.01$), 造模成功。由于灌胃 50% CCl₄ 溶液后血清肝生化指标过高, 故降低 CCl₄ 溶液浓度, 减轻肝损伤水平, 调整 20% CCl₄ 为 5% CCl₄, 肝损伤程度减弱。与正常组比较, 模型组 ALT, AST 和 ALP 水平升高 ($P < 0.05$)。见图 5。

给药 4 周后, 与正常组比较, 模型组 ALT, AST, ALP 指标显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸 ($0.6, 2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及罗格列酮组能够显著降低 ALT 水平 ($P < 0.01$), 鳖甲煎丸 3 个剂量组均能显著降低 AST 水平 ($P < 0.01$), 鳖甲煎丸 ($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组能有效降低 ALP 水平 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组大鼠 TC 和 LDL-C 均有显著升高 ($P < 0.01$), 鳖甲煎丸各剂量组及罗格列酮组对血

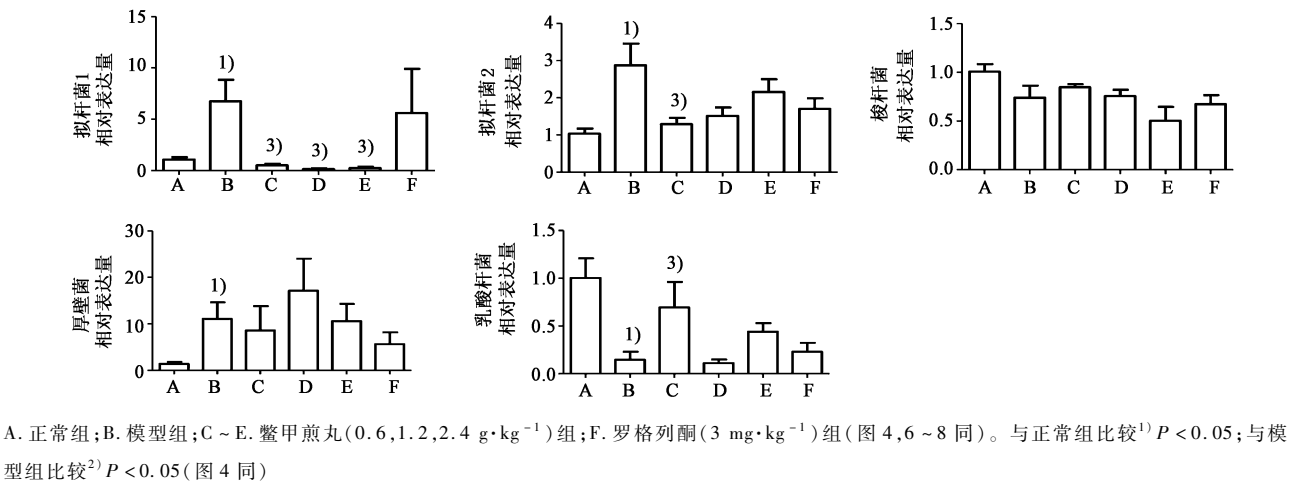
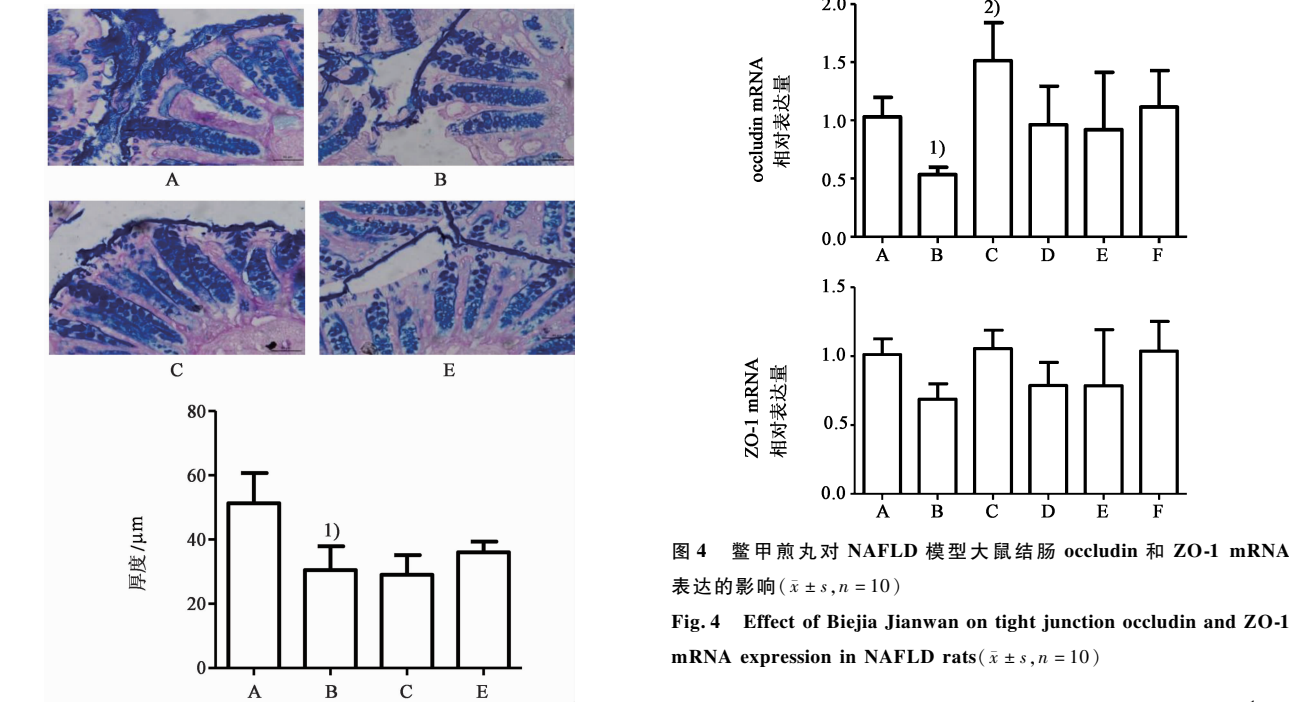


Fig.2 Effect of Biejia Jianwan on BTE, BDE, FIR, FUS, LAC expression of intestinal flora in NAFLD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)



A. 正常组;B. 模型组;C. 鳖甲煎丸(0.6 g·kg⁻¹)组;D. 鳖甲煎丸(2.4 g·kg⁻¹)组。与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 3 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠结肠黏液层厚度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.3 Effect of Biejia Jianwan on colonic mucus layer thickness in NAFLD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

脂指标无明显影响。见图 6。

3.4 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠肝脏形态的影响

模型组大鼠肝小叶结构消失,大量假小叶被纤维间隔包裹分隔,出现大量炎症细胞浸润。与模型组比较,罗格列酮组及鳖甲煎丸(0.6 g·kg⁻¹)组大鼠肝脏纤维化程度降低,炎症细胞浸润得到改善。病理评分结果显示,模型组病理评分显著高于正常组

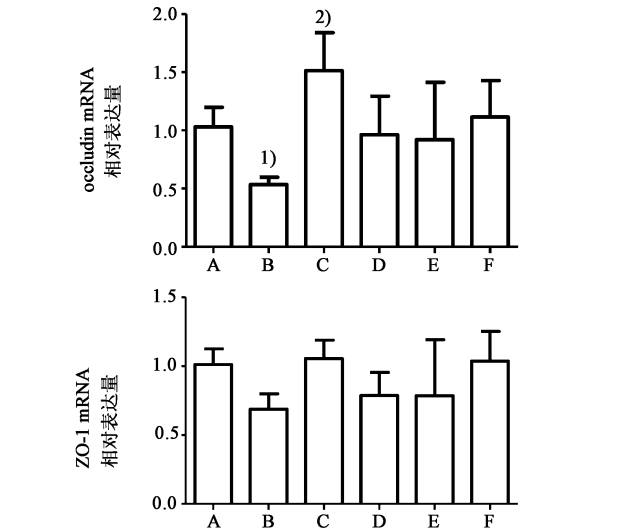


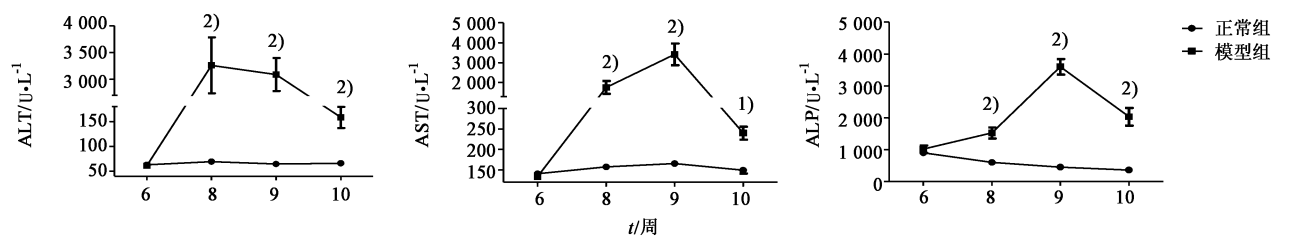
图 4 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠结肠 occludin 和 ZO-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.4 Effect of Biejia Jianwan on tight junction occludin and ZO-1 mRNA expression in NAFLD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

($P < 0.01$),与模型组比较,鳖甲煎丸 0.6 g·kg⁻¹组及罗格列酮组病理评分均明显降低($P < 0.05$)。见图 7,图 8。

4 讨论

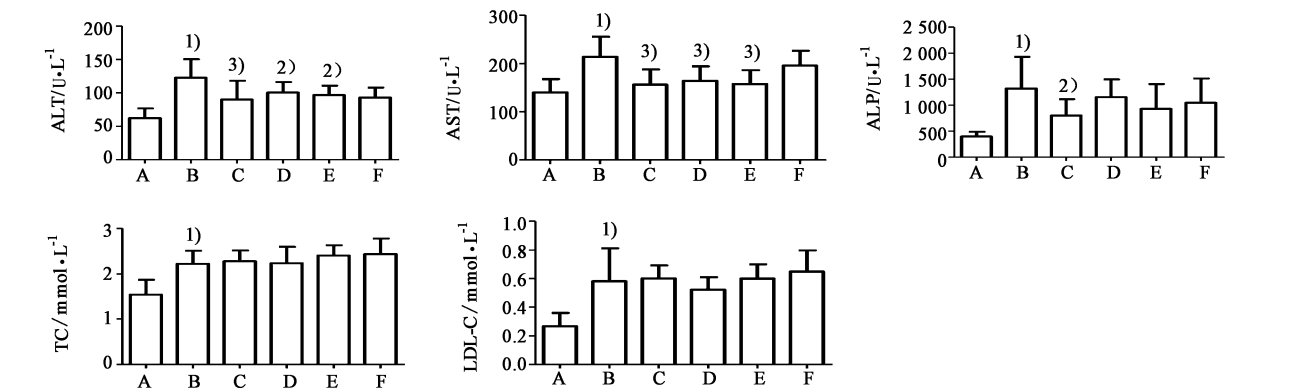
NAFLD 病位虽在肝脏,但肠道是其重要靶点之一。随着对肠-肝轴研究的不断深入,发现 NAFLD 的发生发展与肠道功能紊乱密切相关^[13]。饮食习惯及外界环境因素的改变能明显诱导肠道菌群的变化,高脂饮食亦会显著诱导肠道菌群失衡,在 NAFLD 发展进程中,表现为肠道菌群紊乱,肠道通透性增加,促使细菌及其代谢产物从肠道内位移进入血液循环到达肝脏,活化肝脏 Kupffer 细胞,释放细胞因子,促进 NAFLD 发生发展。Boursier 等^[14]



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 5 NAFLD 大鼠造模过程中肝损伤指标变化趋势 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Changes of liver damage indexes in NAFLD rats during modeling process ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



A. 正常组;与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (图 7 同)

图 6 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠血清肝生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of Biejia Jianwan on serum biochemical indexes in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

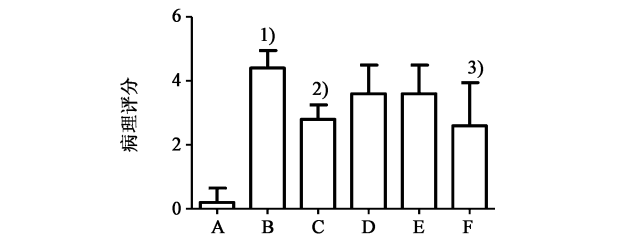


图 7 鳖甲煎丸对 NAFLD 模型大鼠肝脏病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Effect of Biejia Jianwan on liver pathology score in NAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

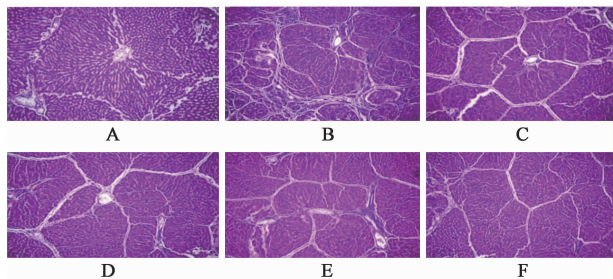


图 8 鳖甲煎丸对 NAFLD 大鼠肝脏组织病理形态的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 8 Effect of Biejia Jianwan on pathologic morphology of liver tissues in NAFLD rats (HE, $\times 200$)

与后面通过肠道菌群多样性分析发现 NAFLD 患者菌群丰度较健康人明显减少,随着病情的加重,拟杆

菌数量逐渐增加。Ritze 等^[15]通过高果糖饮食复制 NAFLD 小鼠模型中发现结肠 occludin 蛋白表达较正常组降低。本实验发现,采用高脂乳剂灌胃造模过程中,NAFLD 模型大鼠肠道菌群失调,且随着造模时间延长,模型大鼠肠道菌群失调越严重,表现为模型大鼠肠道内的拟杆菌、梭杆菌数量增加,乳酸杆菌数量减少。本实验第 5 周采集大鼠粪便提取 DNA 发现,模型组肠道菌群开始出现紊乱,但肝损伤 ALT,AST,ALP 指标与正常组无明显差异,说明肠道菌群紊乱要先于肝损伤的发生。在实验第 11 周发现模型组肠道黏液层及肠道组织紧密连接蛋白表达较正常组明显下调,同时结合大鼠血清肝生化指标与肝脏病理结果发现肠道通透性增加能够促进 NAFLD 模型大鼠肝损伤发生发展。

本研究发现,罗格列酮能一定程度降低血清 ALT,改善肝脏组织病理学,但是并不能通过改善肠道菌群紊乱进而有效抑制 NAFLD 的发生发展。罗格列酮治疗 NAFLD 的作用机制是降低脂肪细胞游离脂肪酸和肿瘤坏死因子 (TNF) 的释放,增加葡萄糖的作用,同时提高胰岛素的敏感性,调节血糖和游离脂肪酸的水平,能抑制脂质过氧化 TNF- α 的活

性,并能选择性的将脂肪从内脏转移到皮下组织^[16]。诸多研究表明,罗格列酮对 NAFLD 的治疗主要是通过改善脂肪肝大鼠的胰岛素抵抗,影响肝细胞脂质代谢,从而减轻肝细胞脂肪变性^[17-18]。

通过调节肠道菌群失调治疗 NAFLD 已成为国内外广泛关注的热点,Ritze 等^[15]通过小鼠体内外研究发现,乳酸杆菌可增加 NAFLD 模型小鼠远端小肠内的乳酸杆菌数量,修复肠道屏障功能,减少肝脏内 TNF- α ,白细胞介素(IL)-1 β mRNA 表达,同时降低 ALT 及减少肝脏内脂肪聚集。本实验发现,鳖甲煎丸能够明显抑制 NAFLD 模型大鼠肠道内拟杆菌数量增加,同时促进有益菌乳酸杆菌增加,结合肝生化指标检测发现鳖甲煎丸可改善 NAFLD 模型大鼠肝损伤相关指标。进一步观察肝脏组织病理学发现鳖甲煎丸能够进一步减少肝脏炎性细胞浸润,纤维间隔减少并变细。

综上所述,鳖甲煎丸能够改善 NAFLD 模型大鼠肠道菌群紊乱,有效降低肠道通透性,显著降低肝细胞损伤,减少炎症细胞浸润,从而抑制大鼠 NAFLD 的发生发展。

[参考文献]

[1] Ahmed M H, Abu E O, Byrne C D. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): new challenge for general practitioners and important burden for health authorities? [J]. Prim Care Diabetes, 2010, 4 (3) : 129-137.

[2] Wigg A J, Roberts-Thomson I C, Dymock R B, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Gut, 2001, 48 (2) : 206-211.

[3] JIANG W, WU N, WANG X, 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, 5 (6) : 8096-8113.

[4] Lau E, Carvalho D, Freitas P. Gut microbiota; association with NAFLD and metabolic disturbances [J]. Bio Med Res Int, 2015 (10) : 1-9. doi: 10. 1155/ 2015/979515.

[5] Le Roy T, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. Gut, 2013, 62 (12) : 1787-1794.

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

[7] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism [J]. Nature, 2012, 489 (7415) : 242-249.

[8] 曹毅, 徐雷鸣, 潘勤, 等. 黄连素灌胃对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 实用肝病杂志, 2013, 16 (2) : 137-140.

[9] 李莹, 岳维芸, 沈天白, 等. 益气清化方对非酒精性脂肪性肝病模型大鼠肠道菌群的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49 (8) : 79-83.

[10] 张再康, 邓国兴, 郑玉光, 等. 鳖甲煎丸的临床和实验研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (8) : 965-967.

[11] 陈嘉, 顾丰华, 刘翔, 等. 鳖甲煎丸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型肝纤维化的治疗作用 [J]. 世界临床药物, 2013, 34 (3) : 162-167.

[12] 王俊杰, 方会龙, 李纯伟, 等. 非酒精性脂肪肝模型小鼠的建立 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15 (24) : 4395-4399.

[13] 张琴, 高维嘉, 郭奔, 等. 肠功能与非酒精性脂肪肝病关系的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, 21 (1) : 95-98.

[14] Boursier J, Mueller O, Barret M, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota [J]. Hepatol, 2016, 61 (3) : 764-775.

[15] Ritze Y, Bárdos G, Claus A, et al. Lactobacillus rhamnosus GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. PLoS One, 2014, 9 (1) : e80169.

[16] Mayerson A B, Hundal R S, Dufour S, et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2002, 51 (3) : 797-802.

[17] WANG H N, WANG Y R, LIU G Q, et al. Inhibition of hepatic interleukin-18 production by rosiglitazone in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14 (47) : 7240-7246.

[18] ZHOU M, XU A, Lam K S L, et al. Rosiglitazone promotes fatty acyl CoA accumulation and excessive glycogen storage in livers of mice without adiponectin [J]. J Hepatol, 2010, 53 (6) : 1108-1116.

[责任编辑 张丰丰]