

基于“肠道菌群-胆汁酸代谢”探讨茵栀黄颗粒对胆汁淤积症小鼠的改善作用及其机制

张灵雁, 于东升, 李晓萍*

郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

摘要: **目的** 探讨茵栀黄颗粒治疗小鼠胆汁淤积症的作用及其机制。**方法** 将 8 周龄 C57BL/6 小鼠给予含 1%胆酸的饲料 2 周, 构建小鼠胆汁淤积症模型, 将小鼠分为对照组、模型组、熊去氧胆酸 (0.1 g/kg) 组以及茵栀黄颗粒 (5、10、20 g/kg) 组, 各组分别 ig 相应药物, 对照组和模型组大鼠 ig 同体积生理盐水, 连续给药 4 周。分别给予收集小鼠血清, 全自动生化仪测定肝功能相关指标, 超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定胆汁酸成分; 收集小鼠肝组织, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察肝脏组织病理变化; RT-qPCR 检测肝组织炎症因子和胆汁酸代谢关键基因的 mRNA 表达水平; Western blotting 检测肝组织胆汁酸代谢关键蛋白的表达情况; 收集小鼠盲肠内容物, Illumina Miseq 测序平台对 V₃~V₄ 可变区进行扩增和测序, 对小鼠肠道菌群结构进行分析。**结果** 与模型组相比, 茵栀黄颗粒各组小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 且能够显著改善小鼠肝组织损伤。与模型组相比, 茵栀黄颗粒各剂量组小鼠肝脏白细胞介素-10 (IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) mRNA 表达水平均显著降低, 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、胆固醇 7-羟化酶 (CYP7A1)、胆盐输出泵 (Bsep)、牛磺胆酸钠共转运蛋白 (Ntcp)、胆汁酸转运蛋白多耐药相关蛋白 2 (Mrp2)、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族多肽 A1 (Ugt1a1) mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 并影响胆汁酸代谢关键蛋白的 mRNA 和蛋白表达。16S rDNA 测序显示, 茵栀黄颗粒组小鼠肠道菌群中乳杆菌属相对丰度显著升高, 罗斯氏菌属和 Allobaculum 属相对丰度显著降低。胆汁酸代谢组学发现, 茵栀黄颗粒能够降低多种次级胆汁酸的含量。**结论** 茵栀黄颗粒改善胆汁淤积的作用机制可能与调控肠道菌群组成影响胆汁酸代谢有关。

关键词: 茵栀黄颗粒; 胆汁淤积症; 胆汁酸代谢; 肠道菌群; 胆盐输出泵; 牛磺胆酸钠共转运蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)11-2660-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.003

Effect and mechanism of Yinzhihuang Granules on cholestasis mice based on the "intestinal flora-bile acid metabolism"

ZHANG Ling-yan, YU Dong-sheng, LI Xiao-ping

The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of Yinzhihuang Granules in treatment of cholestasis mice. **Methods** C57BL/6 mice at the age of 8 weeks were given a diet containing 1% cholic acid for 2 weeks to establish a mouse cholecystitis model, and the mice were divided into control group, model group, ursodeoxycholic acid (0.1 g/kg) group, and Yinzhihuang Granules (5, 10, 20 g/kg) groups, each group was given the corresponding drug intragaically, and the rats in the control group and model group were given the same volume of normal saline intragaically. The drug was administered continuously for 4 weeks. Serum was collected, liver function indexes were determined by automatic biochemical analyzer, and bile acid components were determined by UPLC-MS/MS. Liver tissues of mice were collected and stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe the pathological changes of liver tissue. The mRNA expression levels of inflammatory factors and key genes of bile acid metabolism were detected by RT-qPCR. The expression of key proteins of bile acid metabolism in liver tissues was detected by Western blotting. The contents of mouse cecum were collected,

收稿日期: 2023-07-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81900468); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20220419); 郑州大学第一附属医院横向课题 (K2019-0148)

作者简介: 张灵雁, 男, 主管药师, 研究方向为中药复方的药效物质基础与合理应用。E-mail: zhanglingyan3527@163.com

***通信作者:** 李晓萍, 女, 主任药师, 从事医院药学管理和中药临床药学研究。E-mail: lixiaoping630209@163.com

and the V₃ — V₄ variable regions were amplified and sequenced by Illumina Miseq sequencing platform, and the structure of mouse intestinal flora was analyzed. **Results** Compared with model group, the serum levels of ALT, AST, and ALP in Yinzhihuang Granules group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and it can significantly improve the liver tissue damage of mice. Compared with model group, the mRNA expression levels of liver *IL-10*, *TNF- α* , *IL-6*, and *MCP-1* in each dose group of Yinzhihuang Granules were significantly decreased. The mRNA expression levels of *IL-1 β* , *CYP7A1*, *Bsep*, *Ntcp*, *Mrp2*, and *Ugt1a1* were all positive significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and affected the mRNA and protein expression of key proteins in bile acid metabolism. 16S rDNA sequencing showed that the abundance of *Lactobacillus* in gut microbiota of mice in Yinzhihuang Granules group was significantly increased, and the abundance of *Roseburia* and *Allobaculum* was significantly reduced. Bile acid metabolomics found that Yinzhihuang Granules could reduce the content of various secondary bile acid. **Conclusion** Mechanism of Yinzhihuang Granules on improving cholestasis liver injury may be related to regulating the composition of gut microbiota and affecting bile acid metabolism. **Key words:** Yinzhihuang Granules; cholestasis; bile acid metabolism; gut microbiota; Bsep; Ntcp

胆汁淤积症是一种由肝细胞分泌受损或肝内外胆管阻塞引起胆汁酸在肝内外积聚的综合症。遗传性疾病如胆道闭锁、自身免疫性肝病、感染性肝病如乙肝病毒感染、药物诱导性和代谢性疾病等多种因素都会引起胆汁淤积症。胆汁淤积症如不及时治疗,会导致肝纤维化和肝硬化^[1]。目前临床常用于胆汁淤积症的药物有熊去氧胆酸、奥贝胆酸和 S 腺苷蛋氨酸等^[2]。

茵陈黄颗粒目前常用于急性黄疸性肝炎,其主要组分为茵陈、栀子和黄芪提取物。前期研究发现,茵陈黄颗粒可以改善高脂饮食引起的肥胖和肝脏脂肪变性^[3],还可以通过上调胆汁酸转运蛋白多耐药相关蛋白 2 (Mrp2) 与胆盐输出泵 (Bsep) 的表达,对异硫氰酸- α -萘酯诱导的大鼠肝内胆汁淤积具有保护作用^[4]。茵陈黄颗粒可以减轻雌激素诱发的大鼠妊娠期肝内胆汁淤积症^[5],但其对胆汁淤积性肝损伤的作用机制尚不清楚。

肠道菌群失调与胆汁淤积症密切相关^[6]。肠道菌群是一个复杂的微生物生态系统,肠道内菌群失调不仅可能通过肠-肝轴引起肝脏的炎症性疾病,还能够影响体内结合型胆汁酸的代谢过程^[7]。因此,本研究采用胆管结扎致小鼠急性肝内胆汁淤积模型对茵陈黄颗粒进行药效学评价,进而通过检测茵陈黄颗粒对小鼠胆汁酸组成和肠道菌群的影响来研究其作用机制,以阐明茵陈黄颗粒通过调节肠道菌群影响胆汁酸稳态调节的作用机制,为茵陈黄颗粒在治疗胆汁淤积症中的临床应用提供证据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

茵陈黄颗粒购自鲁南厚普制药有限公司(规格 3 g/袋,批号 09190871),熊去氧胆酸(质量分数 $\geq 98.5\%$,批号 L21043A)购自德国 Losan Pharma

GmbH 公司。TRIzol (货号 R401-01), 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR (货号 Q711-02) 和 HiScript II 1st Strand cDNA 逆转录试剂盒(货号 R212-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。含 1%胆酸的饲料购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒(批号 20220410)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒(批号 20220317)、碱性磷酸酶 (ALP)(批号 20220321)购自南京建成生物工程研究所。Anti-NTCP1 一抗(货号 ab131084)、Anti-CYP7A1 一抗(货号 ab234982)购自美国 Abcam 公司, Anti-FXR 一抗(货号#72105)购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Anti-BSEP (货号#67512-1-Ig)、Anti- α -tubulin 一抗(货号 11224-1-AP)、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse 二抗(货号#SA00001-1)购自武汉三鹰生物技术有限公司。高敏 ECL 化学发光试剂盒(批号 20211201)购自苏州新赛美生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

徕卡 RM 2135 病理组织石蜡切片机(德国 Leica 公司); 蔡司 Axiolab 5 型正置光学显微镜(日本 ZEISS 公司); Amersham Image Quant 800 超灵敏多功能成像仪(美国 Cytiva 公司); QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司); AB Triple TOF 6600 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.3 实验动物

48 只 8 周龄 C57BL/6 小鼠, 体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号 SCXK(京)2014-0001。本实验方案获郑州大学第一附属医院生命科学伦理委员会批准, 批号 2021-KY-0990-002。

1.4 实验动物分组、造模及给药

C57BL/6 小鼠饲养于郑州大学第一附属医院 SPF 环境中, 温度 (20±2)℃、相对湿度 (50±5)%, 均自由饮食、饮水。适应性饲养 7 d 后, 按体质量随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、熊去氧胆酸组, 以及茵栀黄颗粒 5、10、20 g/kg 组, 每组 8 只。对照组给予普通饲料, 其余各组均给予含 1%胆酸的饲料 2 周, 构建小鼠胆汁淤积症模型^[8-9]。于实验第 3 周开始, 茵栀黄颗粒组小鼠分别 ig 茵栀黄颗粒 5、10、20 g/kg^[10], 熊去氧胆酸组小鼠 ig 0.1 g/kg 熊去氧胆酸^[4], 对照组和模型组大鼠 ig 同体积生理盐水, 连续给药 4 周。

1.5 样本收集

实验结束后, 收集小鼠肝组织, 一部分用 4%多聚甲醛固定后用于苏木精-伊红 (HE) 染色, 一部分液氮速冻后, -80℃保存, 用于 Western blotting 和 RT-qPCR 检测。收集小鼠盲肠内容物, 液氮速冻后, -80℃保存, 用于肠道菌群测定。收集小鼠血清, -80℃保存, 用于非靶代谢组学检测。

1.6 血清生化指标检测

收集小鼠血液, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 按照试剂盒说明书测定血清 ALT、AST、ALP

水平。

1.7 肝脏组织病理学检测

收集小鼠肝组织, 4%多聚甲醛固定后, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋切片, 行 HE 染色, 封片后显微镜下观察肝组织形态学变化。

1.8 免疫印迹检测

取肝组织, 加入 RIPA 裂解液在匀浆器中充分研磨后, BCA 法测定蛋白浓度, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 30 μg 蛋白, 然后转移至 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后, 加入一抗 4℃ (FXR 一抗 1:1 000 稀释, BSEP 一抗 1:1 000 稀释, NTCP 一抗 1:1 000 稀释, CYP7A1 一抗 1:1 000 稀释, α-tubulin 一抗 1:5 000 稀释) 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, ECL 发光液显色, 用 Cytiva 化学发光成像仪拍照并分析。

1.9 RT-qPCR 检测

取肝组织, 加入 TRIzol 充分匀浆后提取总 RNA, 取 1 μg RNA 为模板, 按照试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。RT-qPCR 按照 SYBR 试剂说明书进行, 反应体系为 10 μL。结果用 2^{-ΔΔCt} 计算, 以相对值表示, 其中引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因	ID	正向 (5'-3')	反向 (5'-3')
36B4	11837	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT	CCGCAGGGGCAGCAGTGG
IL-10	16153	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
IL-1β	16176	GCCACCTTTTGACAGTGATGA	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
IL-6	16193	ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	TGACTCCAGCTTATCTCTTGGT
TNF-α	21926	GATCGGTCCCCAAAGGGATG	CCACTTGGTGGTTTGTGAGT
MCP-1	20296	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
CYP7A1	13122	GCTGTGGTAGTGAGCTGTTG	GTTGTCCAAAGGAGGTTACCC
CYP27A1	104086	GCACAGGAGAGTACGGAGG	CGGGCAAGTGCAGCACATA
CYP8B1	13124	TGCAAAAAGAACTGGTGCTCAA	CGAACCTTTAGGCCCTAGCAT
FXR	20186	GGCAGAATCTGGATTGGAATCG	GCCCAGGTTGGAATAGTAAGACG
Bsep	27413	TCTGACTCAGTGATTCTTCGCA	CCCATAAACATCAGCCAGTTGT
Mrp2	12780	GTGTGGATTCCCTTGGGCTTT	CACAACGAACACCTGCTTGG
Ntcp	20493	CAAACCTCAGAAGGACCAACA	GTAGGAGGATTATCCCGTTGTG
Ugt1a1	394436	GCTTCTTCCGTACCTTCTGTTG	GCTGCTGAATAACTCCAAGCAT

1.10 胆汁酸含量分析

收集模型组和茵栀黄颗粒 20 g/kg 组小鼠胆汁, 甲醇沉淀蛋白后, 12 000 r/min、4℃离心 10 min, 取上清液 100 μL 加入到检测瓶中。数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱 (Waters ACQUITY UPLC) 和质谱 (AB 三重四极杆质谱仪)。色谱条

件为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A 相为超纯水 (含 0.01% 甲酸), B 相为乙腈; 体积流量 0.25 mL/min; 柱温 40℃; 进样量 5 μL; 洗脱梯度: 0~4 min, 25% B; 4~9 min, 25%~30% B; 9~14 min, 30%~36% B; 14~18 min, 36%~38% B; 18~24 min, 38%~50%

B; 24~32 min, 50%~75% B; 32~35 min, 75%~100% B; 35~38 min, 100%~25% B。采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子电离模式。离子源温度 500 °C, 离子源电压-4 500 V, 碰撞气压力 41.37 kPa, 气帘气压力 206.84 kPa, 雾化气和辅助气压均为 344.74 kPa。采用多重反应监测 (MRM) 进行扫描。所采用的对照品信息见表 2。

根据不同浓度的对照品, 以对照品的浓度为横坐标, 以对照品的峰面积为纵坐标作图, 建立靶向

表 2 胆汁酸对照品信息

Table 2 Bile acid reference product information

胆汁酸	名称
alloLCA	别胆石酸
LCA	石胆酸
isoLCA	异石胆酸
NorDCA	23-脱甲脱氧胆酸
6-ketoLCA	6-酮基石胆酸乙酯
12-ketoLCA	12-酮基石胆酸
7-ketoLCA	7-酮基石胆酸
β -UDCA	3 β -熊去氧胆酸
DCA	去氧胆酸
CDCA	鹅去氧胆酸
UDCA	熊去氧胆酸
HDCA	猪去氧胆酸
NorCA	正胆酸
DHCA	脱氢胆酸
7,12-diketoLCA	7,12-二酮石胆酸
6,7-diketoLCA	6,7-二酮石胆酸
α -MCA	α -鼠胆酸
UCA	熊果胆酸
β -MCA	β -鼠胆酸
CA	胆酸
ACA	别胆酸
β CA	3 β -胆酸
GUCA	甘氨酸熊胆酸钠盐
GLCA	甘氨酸石胆酸钠盐
GHDCA	甘氨酸猪去氧胆酸钠盐
GCDCA	甘氨酸鹅脱氧胆酸钠盐
GUDCA	甘氨酸熊脱氧胆酸钠盐
GDCA	甘氨酸脱氧胆酸钠盐
LCA-3S	硫酸化石胆酸钠盐
GCA	甘氨酸胆酸
TLCA	牛磺石胆酸钠盐
THDCA	牛磺猪去氧胆酸钠盐
TUDCA	牛磺熊去氧胆酸钠盐
TDCA	牛磺脱氧胆酸钠盐
TCDCa	牛磺鹅去氧胆酸
TCA	牛磺胆酸钠盐
T- α -MCA	牛磺- α -鼠胆酸钠盐
THCA	牛磺猪胆酸钠盐
T- β -MCA	牛磺- β -鼠胆酸钠盐
CDCA-G	鹅去氧胆酸-葡萄糖醛酸结合物
CDCA-3G	鹅去氧胆酸-3- β -D-葡萄糖醛酸
CDCA-24G	鹅去氧胆酸-24-酰基- β -D-葡萄糖醛酸

化合物与其峰面积的方程, 根据样品中相应化合物的峰面积计算其浓度。根据样品中胆汁酸浓度进行凝聚层次聚类 (agglomerate hierarchical clustering): 即将每个对象归为一类, 合并这些类成为越来越大的对象, 直到终结。通过 R (v 3.3.2) 中 pheatmap 程序包对数据集进行缩放, 得到代谢物相对定量值层次聚类图, 进行偏最小二乘判别 (PLS-DA) 分析。

1.11 16S rDNA 测序

采用试剂盒说明书对各组小鼠样本的盲肠内容物 DNA 进行提取, 根据测序区域的选择, 使用 NEB Next®Ultra™DNA Library Prep Kit 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库通过 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Qubit 进行质检, 采用 Illumina Miseq 测序平台对 V₃~V₄ 可变区进行扩增和测序, 并利用线性判别分析效应大小 (LEfSe) 和 R 软件进行表达和分析。

1.12 统计分析

采用 GraphPad Prism 8.3 软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用 One-way ANOVA 检验。

2 结果

2.1 茵栀黄颗粒对小鼠血清指标的影响

与对照组相比, 模型组小鼠血清 ALT、AST、ALP 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 茵栀黄颗粒各组小鼠血清 ALT、AST、ALP 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 表明茵栀黄颗粒干预能够显著减轻胆汁淤积小鼠肝损伤, 见表 3。

2.2 茵栀黄颗粒对小鼠肝组织病理学的影响

结果发现, 对照组小鼠肝脏组织结构正常, 未见明显组织病理损伤。与对照组相比, 模型组小鼠肝窦和汇管区炎性细胞浸润增加, 肝组织坏死面积显著增加, 细胞坏死率增加 ($P < 0.001$)。与对照组相比, 熊去氧胆酸组小鼠肝组织炎症细胞浸润减轻, 坏死面积显著减小, 细胞坏死率减少 ($P < 0.001$), 茵栀黄颗粒 5 g/kg 组肝组织坏死面积减小, 细胞坏死率减少 ($P < 0.05$), 但炎性细胞浸润未见减轻。茵栀黄颗粒 10、20 g/kg 组小鼠肝组织炎性细胞浸润和坏死率均显著减少 ($P < 0.01$ 、0.001), 见图 1。

2.3 茵栀黄颗粒对小鼠肝脏炎症因子和胆汁酸代谢关键基因 mRNA 表达水平的影响

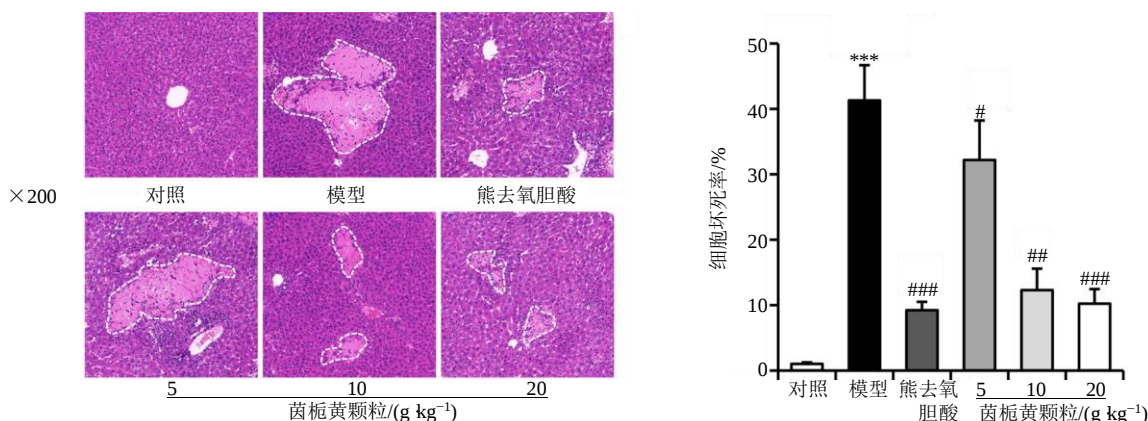
RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏 *IL-10*、*TNF- α* 、*IL-6*、*MCP-1* mRNA 表达水

表 3 茵陈黄颗粒对胆汁淤积小鼠血清 ALT、AST、ALP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Table 3 Effect of Yinzhihuang Granules on serum ALT, AST, and ALP levels of cholestasis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	ALT/(U L ⁻¹)	AST/(U L ⁻¹)	ALP/(U L ⁻¹)
对照	—	28.35 ± 0.79	57.60 ± 5.06	71.50 ± 18.54
模型	—	1 741.60 ± 239.73**	1 821.80 ± 306.50**	658.80 ± 87.56**
熊去氧胆酸	0.1	837.25 ± 73.27###	736.90 ± 82.46###	183.27 ± 21.55###
茵陈黄颗粒	5	1 423.70 ± 146.67#	1 131.80 ± 125.36#	276.50 ± 31.02##
	10	1 132.25 ± 115.16###	1 118.30 ± 98.40###	243.80 ± 24.21###
	20	998.25 ± 152.43###	987.50 ± 151.708###	127.15 ± 15.45###

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 1 茵陈黄颗粒对胆汁淤积小鼠肝脏组织病理学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 1 Effect of Yinzhihuang Granules on histopathology of liver in cholestasis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

平显著上调, *IL-1 β* 、*CYP7A1*、*Bsep*、*Ntcp*、*Mrp2*、*Ugt1a1* mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 熊去氧胆酸组和茵陈黄颗粒各剂量组小鼠肝脏 *IL-10*、*TNF- α* 、*IL-6*、*MCP-1* mRNA 表达水平均显著降低, *IL-1 β* 、*CYP7A1*、*Bsep*、*Ntcp*、*Mrp2*、*Ugt1a1* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。且茵陈黄颗粒各剂量组改变趋势呈剂量相关性。以上结果表明, 茵陈黄颗粒能够降低胆汁淤积引起的肝脏炎症反应, 并影响肝脏胆汁酸代谢相关基因的表达, 见图 2。

2.4 茵陈黄颗粒对小鼠肝组织胆汁酸代谢相关蛋白表达水平的影响

Western blotting 检测小鼠肝组织胆汁酸代谢关键蛋白的表达水平, 结果发现, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织中胆汁酸代谢的主要调节因子 FXR、胆汁酸外排的主要转运蛋白 *Bsep* 和胆汁酸重吸收的主要受体 *Ntcp* 的表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 胆汁酸生物合成的主要限速酶 *CYP7A1* 表达水平显著上调, 表明小鼠肝组织胆汁酸代谢失调。熊去氧胆酸和茵陈黄颗粒各剂量组能够显著上

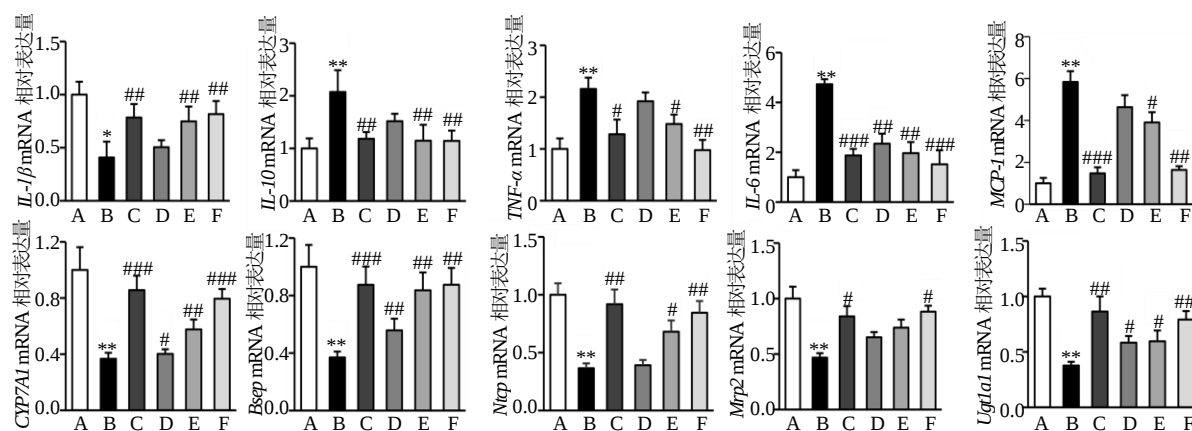
调 FXR、*Bsep*、*Ntcp* 的表达水平, 下调 *CYP7A1* 表达水平, 且其作用呈剂量相关性, 表明茵陈黄颗粒能够上调肝组织 FXR、*Bsep*、*Ntcp* 的表达水平, 促进胆汁酸外排和重吸收, 降低肝组织 *CYP7A1* 表达水平, 减少胆汁酸的合成, 而调节肝脏胆汁酸代谢过程, 见图 3。

2.5 茵陈黄颗粒对胆汁淤积小鼠胆汁酸的影响

收集小鼠胆汁, LC-MS 法检测模型组和茵陈黄颗粒 20 g/kg 组小鼠胆汁中 40 种胆汁酸的成分。

2.5.1 代谢物轮廓分析 用偏最小二乘法 - 判别分析法 (PLS-DA) 分析 2 组小鼠胆汁代谢轮廓, 结果 2 组胆汁酸成分明显区分, 具有可比性, 见图 4A。

2.5.2 差异胆汁酸分析 其中 30 种胆汁酸成分有差异, 见图 4B。从中选出 8 种差异最显著的胆汁酸, 与模型组相比, 茵陈黄颗粒 20 g/kg 组小鼠胆汁中初级胆汁酸 TCDCA、次级胆汁酸 UDCA、ACA、THCA、T- α -MCA、T- β -MCA 和结合型胆汁酸 CDCA-G 的含量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 次级胆汁酸 α -MCA 的含量显著降低 ($P < 0.001$), 见图 4C。



A-对照 B-模型 C-熊去氧胆酸 D-茵栀黄颗粒 5 g kg⁻¹ E-茵栀黄颗粒 10 g kg⁻¹ F-茵栀黄颗粒 20 g kg⁻¹ 与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01; 与模型组比较: #*P*<0.05 ##*P*<0.01 ###*P*<0.001
A- control B-model C- ursodeoxycholic acid D-Yinzhihuang Granules 5 g kg⁻¹ E- Yinzhihuang Granules 10 g kg⁻¹ F- Yinzhihuang Granules 20 g kg⁻¹ **P*<0.05 ***P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05 ##*P*<0.01 ###*P*<0.001 vs model group

图 2 茵栀黄颗粒对胆汁淤积小鼠肝脏组织炎症和胆汁酸代谢相关基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Fig. 2 Effect of Yinzhihuang Granules on liver inflammation and bile acid metabolism related gene expression in cholestasis mice ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

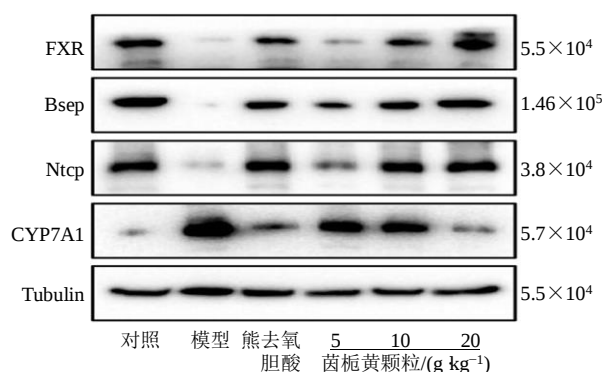


图 3 茵栀黄颗粒对胆汁淤积小鼠肝脏胆汁酸代谢相关蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effect of Yinzhihuang Granules on bile acid metabolism related protein expression in cholestasis mice

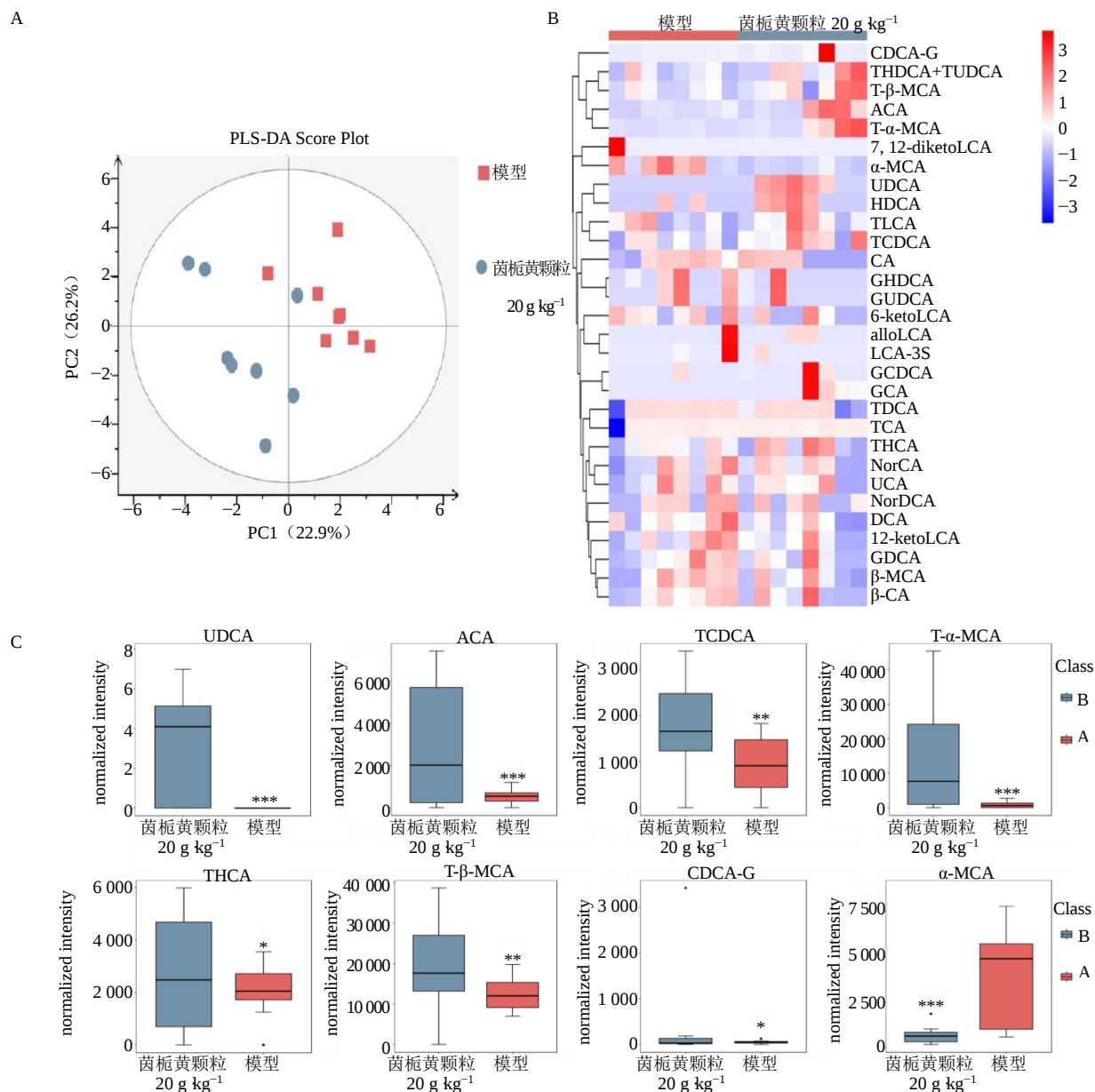
2.6 茵栀黄颗粒对胆汁淤积小鼠肠道菌群结构的影响

收集小鼠肠道内容物, 16S rRNA 测序分析茵栀黄颗粒对胆汁淤积小鼠肠道菌群结构的影响。

2.6.1 α 多样性分析 采用 α 多样性分析对小鼠肠道菌群物种多样性进行评价, 见表 4。结果显示, 模型组 Shannon 指数, Chao 指数和 Ace 指数显著降低 (*P*<0.05), 表明模型组小鼠肠道菌群物种多样性显著减少。与模型组相比, 茵栀黄颗粒 20 g/kg 组小鼠 Shannon 指数, Chao 指数和 Ace 指数显著升高 (*P*<0.05), 表明茵栀黄颗粒可以增加胆汁淤积小鼠肠道菌群的物种多样性。

2.6.2 β 多样性分析 基于 OUT(operational taxonomic units) 水平的 ANOSIM 分析表明, 模型组小鼠的肠道菌群组成较对照组发生了显著变化 (*R*=0.371 1, *P*=0.001); 茵栀黄颗粒组小鼠的肠道菌群结构与对照组无明显差异 (*R*=0.211 1, *P*=0.066), 而与模型组相比存在显著差异 (*R*=0.146 9, *P*=0.033)。NMDS 分析结果显示, 模型组小鼠肠道菌群结构与对照组相比显著偏离, 给予茵栀黄处理能显著恢复肠道菌群结构, 见图 5。以上结果表明, 胆汁淤积小鼠的肠道菌群失调, 茵栀黄颗粒能够恢复胆汁淤积小鼠的肠道菌群结构。

2.6.3 群落结构分析 主坐标分析 (PCoA) 结果提示模型组与茵栀黄颗粒 20 g/kg 组小鼠整体肠道菌群组成有显著差异 (图 6)。在门水平上, 厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门是 2 组小鼠肠道菌群主要门, 但在各组中组成不同。与模型组相比, 茵栀黄颗粒组小鼠肠道菌群厚壁菌门与拟杆菌门相对丰度降低, 而放线菌门相对丰度升高。在目水平上, 梭菌目、乳酸杆菌目和拟杆菌目是 2 组小鼠肠道菌群主要目, 与模型组相比, 茵栀黄颗粒组小鼠肠道菌群中乳杆菌属相对丰度显著升高, 梭菌目和拟杆菌目相对丰度显著降低。在属水平上, 乳杆菌属、罗斯氏菌属和 *Allobaculum* 属是 2 组小鼠肠道菌群主要的属, 与模型组相比, 茵栀黄颗粒组小鼠肠道菌群中乳杆菌属相对丰度显著升高, 罗斯氏菌属和 *Allobaculum* 属相对丰度显著降低 (图 7、8)。



A-代谢物轮廓分析图 B-差异胆汁酸热图 C-差异胆汁酸分析图 与茵栀黄颗粒 20 g kg⁻¹ 组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001

A-metabolite profile diagram B-differential bile acid heat diagram C-differential bile acid analysis diagram **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001 vs Yinzhihuang Granules 20 g kg⁻¹ group

图 4 茵栀黄颗粒对胆汁淤积小鼠胆汁成分的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Fig. 4 Effect of Yinzhihuang Granules on bile components in cholestasis mice ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

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

Table 4 Analysis on α diversity of intestinal flora of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao 指数	Ace 指数
对照	—	6.18 ± 0.05	0.010 ± 0.001	5 864.42 ± 352.60	8 061.97 ± 326.31
模型	—	5.88 ± 0.09*	0.015 ± 0.002	4 625.58 ± 319.78*	6 772.05 ± 426.21*
茵栀黄颗粒	20	6.11 ± 0.06 [#]	0.012 ± 0.001	5 386.48 ± 396.41 [#]	8 452.81 ± 513.77 [#]

与对照组比较: **P* < 0.05; 与模型组比较: [#]*P* < 0.05

**P* < 0.05 vs control group; [#]*P* < 0.05 vs model group

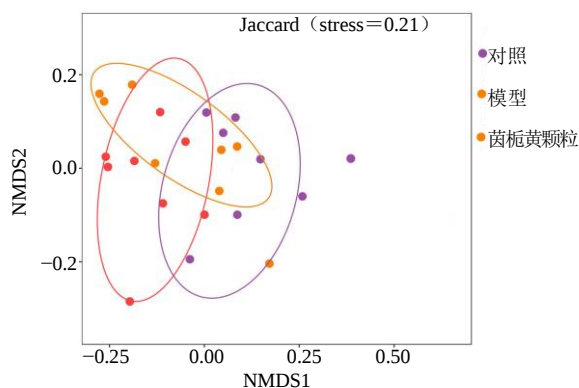


图 5 NMDS 分析

Fig. 5 Non-metric multidimensional scaling

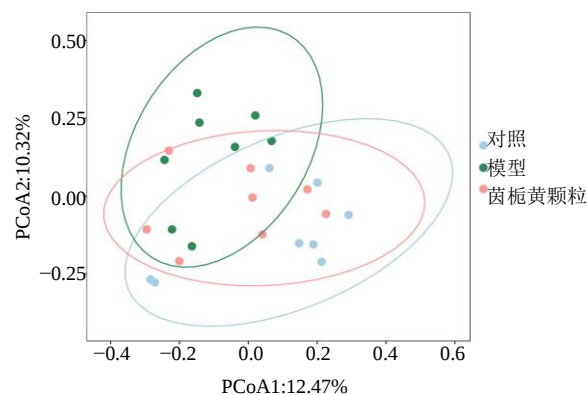


图 6 群落结构差异分析

Fig. 6 Analysis of differences in community structure

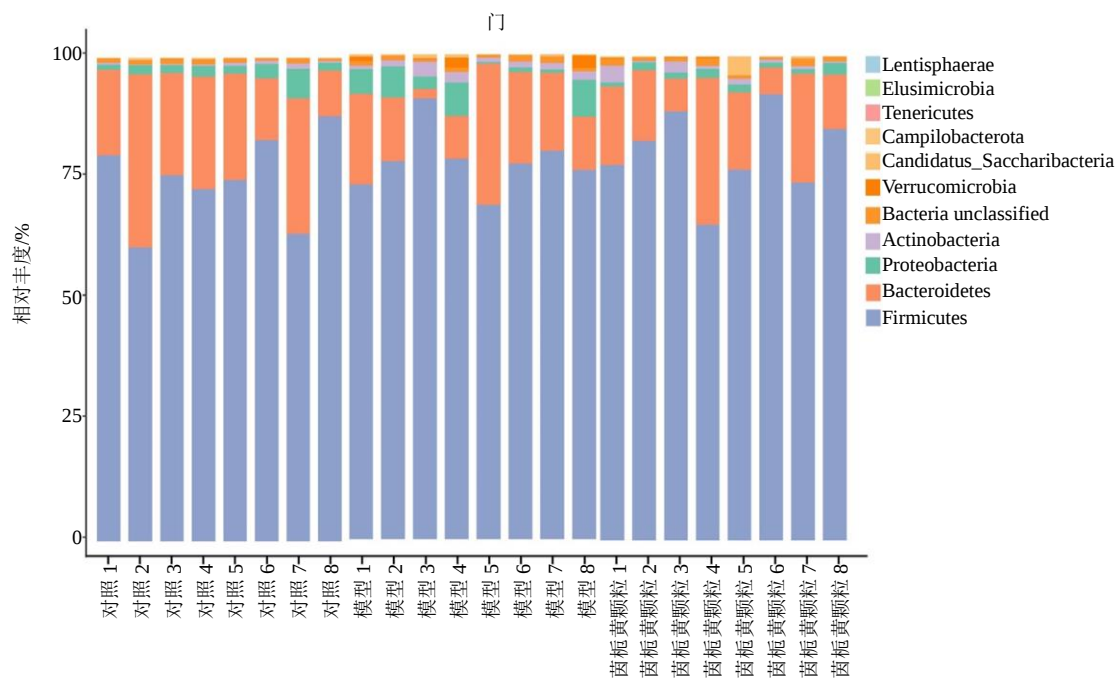


图 7 门水平上各组肠道菌群相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of gut microbiota at phylum level in each group

LDA (Linear discriminant analysis) LefSe (Effect Size) 分析是一种用于发现和解释高维度数据生物标识 (基因、通路和分类单元) 的分析工具, 可用于 2 个或多个分组的比较, 它强调统计意义和生物相关性, 能够在组间寻找具有统计学差异的生物标识, LefSe LDA 分析进一步证实了以上结果 (图 9)。茵栀黄颗粒能够显著降低肠道菌群中与胆汁酸次级代谢相关 *Clostridium* 和 *Bacteroides* (图 10)。

3 讨论

中医古籍中并无胆汁淤积症对应病名, 近现代医家根据其症状将其归属为“淤黄”“黄疸”等范畴, 其病机与湿、热、瘀有关。如《黄帝内经》记

载“溺黄赤, 安卧者, 黄疸, 目黄者曰黄疸。”这是对黄疸最早的论述^[11]。《医学集成》说: “疸症有五, 曰黄汗、曰黄疸、曰谷疸、曰酒疸、曰女劳疸……同是湿热湿寒所化, 故曰治湿不利小便, 非其治也。”指出湿热为黄疸的主要病机。现代医家结合自身临床经验认为, 脾虚亦是发黄的潜在病机, 即“湿主瘀从、黄因虚生”^[12]。治疗黄疸时尤为注重固护肝阴、固护胃阴、固护元气^[13]。经过历代医家的实践与总结, 黄疸是由湿热困阻脾胃, 脾肾阳虚、寒湿内停, 进而血分, 产生血瘀、血热之证, 方可发黄。故在临床治疗中, 除了从湿论治, 还应加以凉血化瘀、温补脾肾之品。

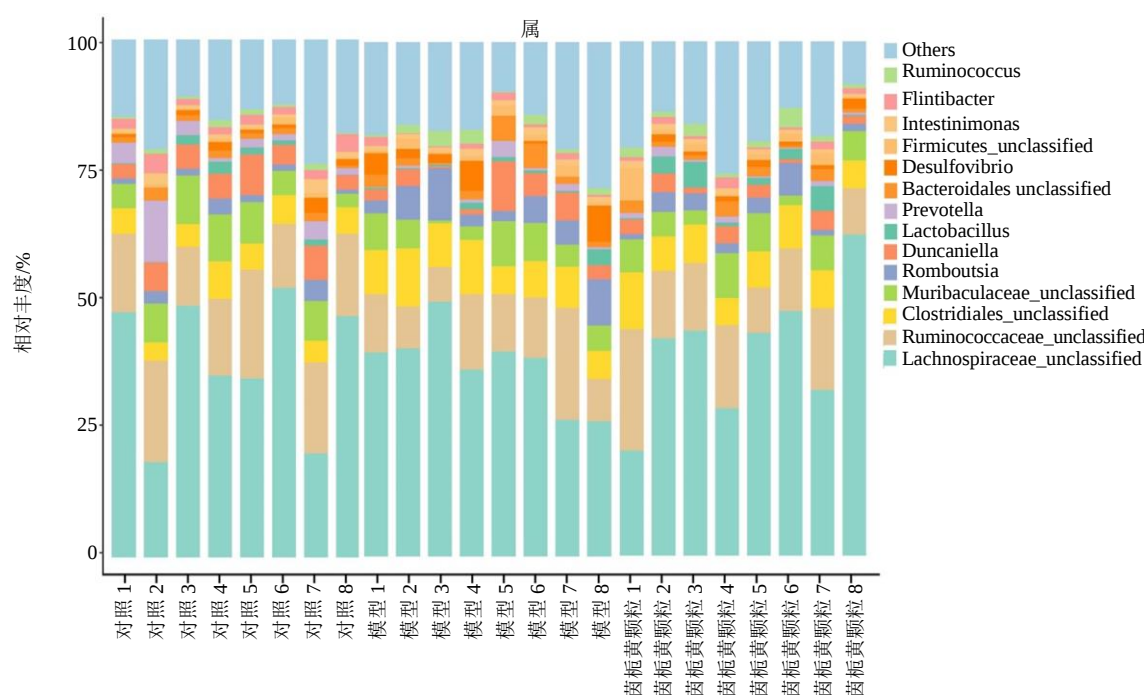


图 8 属水平上各组肠道菌群相对丰度

Fig. 8 Relative abundance of gut microbiota at genus level in each group

茵栀黄颗粒由《伤寒论》中经典名方“茵陈蒿汤”（茵陈蒿、栀子、大黄）经演化而成，主要组分为茵陈、栀子、黄芩、金银花，具有清热解毒、利湿退黄的功效，主要用于治疗肝炎、肝硬化以及肝内胆汁淤积^[4-5, 14-16]。目前临床治疗中，多与谷胱甘肽联用治疗药物性肝损伤引起的黄疸，与亮菌甲素连用治疗胆汁淤积引起的黄疸，与双环醇联用治疗病毒性肝炎引起的黄疸^[17]，但其相关分子机制尚不清楚。本研究发现，茵栀黄颗粒可以降低胆汁淤积引起的肝脏炎症反应，减小胆汁淤积引起的肝组织坏死面积。

有报道称，茵栀黄颗粒的主要有效成分绿原酸、黄芩苷、栀子苷和木犀草素^[18]。黄芩苷能够通过上调肠道中产丁酸盐的菌群如 *g_Alistipes*、*g_Butyricoccus* 等的丰度，维持肠道屏障完整性而发挥降压作用^[19]。祛湿化痰方中的绿原酸和栀子苷可以通过上调拟杆菌及梭菌的相对丰度显著而改善非酒精性脂肪性肝炎症状^[20-21]。本研究发现，茵栀黄颗粒能够上调胆汁淤积小鼠肠道中乳杆菌相对丰度，降低梭菌和拟杆菌的含量，而且能够降低与胆汁酸次级代谢相关的 *Clostridium* 和 *Bacteroides* 的相对丰度。

初级胆汁酸是指在肝脏中以胆固醇为原料从头合成的胆汁酸，以胆酸和鹅去氧胆酸为主。初级

胆汁酸的从头合成包括经典通路和非经典通路 2 种途径，分别受 CYP7A1 和 CYP27A1 调节^[22-23]。经典通路合成 70% 以上的胆汁酸，其过程包括甲基化、加氧反应、合成胆汁酸核心结构和侧链加氢等步骤^[24-25]。首先，胆固醇在内质网上经过甲基化反应，产生甲基胆固醇，然后通过加氧反应，形成醛类物质。醛类物质通过多环化合成形成某种胆汁酸的核心结构，最后进行侧链加氢反应，生成初级胆汁酸。经典通路以肝细胞内质网中的 CYP7A1 为主要限速酶催化发生，且 FXR 负反馈调控^[26-27]。初级胆汁酸在体内经转运、排泄、重吸收和代谢等多种途径。约 50% 的初级胆汁酸在小肠内被肠道吸收，重吸收的初级胆汁酸经过肝脏代谢，转化为次级胆汁酸，再排泄到肠道中。这一过程中，Ntcp 和 Bsep 是肝胆汁酸摄取和排泄过程中的 2 个关键的转运蛋白^[28]。肝细胞表面的 Bsep 负责将胆汁酸运输至胆小管，经血液循环后，小部分被肝细胞基底膜的胆汁酸转运体和肠道主动摄取吸收，剩余的被排泄出体外，Ntcp 则负责摄取所有的结合性胆汁酸。胆汁酸循环中任一环节受损均可能导致胆汁淤积性肝损伤的发生。茵栀黄颗粒能抑制肝组织中 CYP7A1 mRNA 和蛋白表达水平，上调 FXR、Bsep、Ntcp mRNA 和蛋白表达水平，通过抑制胆汁酸合成，促进胆汁酸代谢、转运和重吸收而减轻胆汁酸诱导的

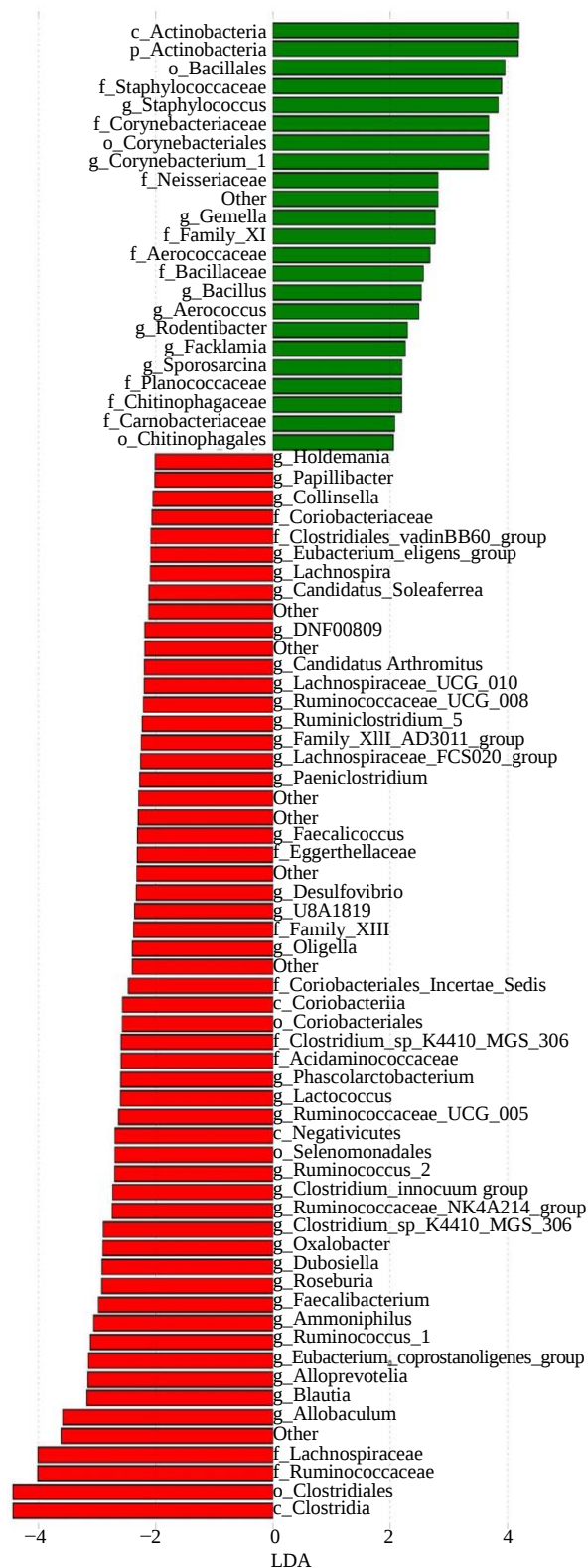
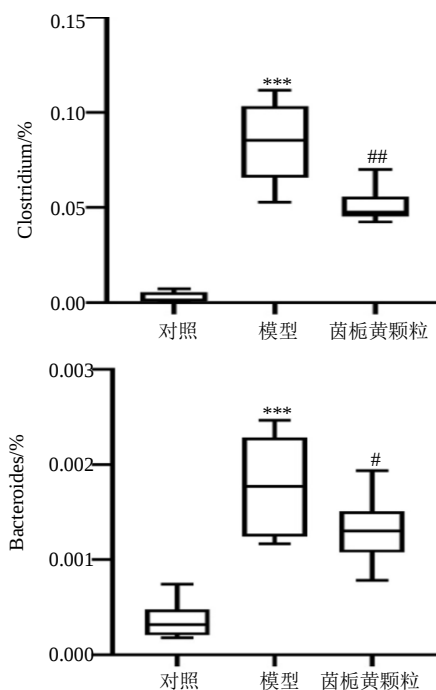


图 9 LEfSe LDA 分析

Fig. 9 LEfSe LDA analysis

肝损伤。

肠道菌群的分布在胆汁酸代谢中发挥着重要的作用^[29-30]。在肠道中，初级胆汁酸可以被菌群代



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 10 茵栀黄颗粒对胆汁淤积小鼠肠道菌群结构的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 10 Effect of Yinzhihuang Granules on the structure of gut microbiota in cholestasis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

谢, 进行大量的生物转化, 主要包括水解、氧化、聚合、脱硫和酯化、7 α -脱羟基和7 β -脱羟基等^[31]。初级胆汁酸在胆汁酸辅酶 A 合成酶和胆汁酸氨基酸转移酶的催化下与甘氨酸和牛磺酸结合, 形成初级结合型胆汁酸, 初级结合型胆汁酸生物转化的第 1 步是由胆盐水解酶 (BSH) 介导的水解去结合化, 将结合胆汁酸水解为游离胆汁酸和甘氨酸或牛磺酸, BSH 高表达于 *Bacteroides*、*Enterococcus*、*Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Lactobacillus* 和 *Listeria* 等多种肠道菌群中^[32-33]。CA 和 CDCA 的 7 α -脱羟基反应, 分别产生 DCA 和 LCA; 熊去氧胆酸的胆汁酸 7 β -脱羟基反应产生 LCA^[34]。水解后生成的初级游离型胆汁酸会经过 7 α -脱羟基酶介导的 7 α -脱羟基化反应生成次级胆汁酸, 7 α -脱羟基酶仅有少数菌群产生, 如 *Clostridium*、*Eubacterium*^[35-36]。除此之外, 生成的次级胆汁酸还会经过氧化、差异异构化, 主要由 *Peptostreptococcus*、*Escherichia*、*Bacteroides*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Eggerthella*、*Ruminococcus*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* 等参与^[37-40]。而酯化和脱硫作用可以促进胆汁酸通过粪

便排泄, 主要由 *Clostridium*、*Peptococcus*、*Fusobacterium*、*Proteobacteria*、*Pseudomonas*、*Bacteroides* 等参与^[31, 41-42]。由此可见, 肠道菌群的生物转化功能, 是决定总胆汁酸池中各成分胆汁酸浓度最重要的因素, 肠道菌群群落结构的不同, 可以导致胆汁酸池的明显变化。本研究发现, 茵栀黄颗粒能够降低肠道菌群中 *Clostridium* 和 *Bacteroides* 的含量, 影响胆汁酸在肠道中的生物转化相关。

本研究发现, 小鼠胆汁淤积时, 肝组织胆汁酸合成增加, 而胆汁酸转运、重吸收和代谢降低, 肠道菌群结构改变, 影响胆汁酸生物转化, 改变胆汁酸池中各种胆汁酸的含量。茵栀黄颗粒能够抑制肝组织中胆汁酸合成, 促进胆汁酸转运、重吸收和代谢, 并通过调节肠道菌群结构, 而改善胆汁酸成分, 减轻胆汁淤积引起的肝损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wei C L, Qiu J, Wu Y Y, et al. Promising traditional Chinese medicine for the treatment of cholestatic liver disease process (cholestasis, hepatitis, liver fibrosis, liver cirrhosis)[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 297: 115550.
- [2] 华静, 倪茜茜. 胆汁淤积性肝病的药物治疗进展 [J]. 内科理论与实践, 2018, 13(6): 334-338.
- [3] Yao Q, Li S, Cheng X, et al. Yin Zhi Huang, a traditional Chinese herbal formula, ameliorates diet-induced obesity and hepatic steatosis by activating the AMPK/SREBP-1 and the AMPK/ACC/CPT1A pathways [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(5): 231.
- [4] Ou Q Q, Qian X H, Li D Y, et al. Yinzhihuang attenuates ANIT-induced intrahepatic cholestasis in rats through upregulation of Mrp2 and Bsep expressions [J]. *Pediatr Res*, 2016, 79(4): 589-595.
- [5] 李润, 叶晓秀, 李贵平, 等. 茵栀黄颗粒对 17- α -乙炔雌二醇诱发的肝内胆汁淤积孕大鼠的肝保护作用机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(17): 2646-2649.
- [6] Isaacs-Ten A, Echeandia M, Moreno-Gonzalez M, et al. Intestinal microbiome-macrophage crosstalk contributes to cholestatic liver disease by promoting intestinal permeability in mice [J]. *Hepatology*, 2020, 72(6): 2090-2108.
- [7] 王朋, 陈倩倩, 方正锋, 等. 肠道微生物代谢产物胆盐水解酶的生物学功能及其抑制剂研究进展 [J]. 动物营养学报, 2022, 34(3): 1388-1397.
- [8] Song G C, Zou B, Zhao J, et al. Yinchén decoction protects against cholic acid diet-induced cholestatic liver injury in mice through liver and ileal FXR signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313: 116560.
- [9] Pan Q, Zhang X, Zhang L, et al. Solute carrier organic anion transporter family member 3A1 is a bile acid efflux transporter in cholestasis [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(5): 1578-1592.
- [10] Tan Y Y, Huang Z H, Liu Y Y, et al. Integrated serum pharmacochrometry, 16S rRNA sequencing and metabolomics to reveal the material basis and mechanism of Yinzhihuang granule against non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 310: 116418.
- [11] 王洪图. 黄帝内经灵枢白话解 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [12] 张苗苗, 刘永刚, 李京涛, 等. 常占杰教授从“湿主瘀从、黄因虚生”治疗黄疸经验 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(10): 936-938.
- [13] 葛学颐, 徐云生. 尹常健从顾护肝脾胃阴辨治肝硬化黄疸 [J]. 湖北中医杂志, 2023, 45(3): 19-22.
- [14] 麻景梅, 麻朝朝, 李斯, 等. 茵栀黄化学成分及药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(4): 202-206.
- [15] 申凤霞, 范建伟, 李倩, 等. 基于网络药理学及分子对接探究茵栀黄颗粒治疗肝纤维化的作用机制 [J]. 山东科学, 2023, 36(1): 23-33.
- [16] Zhang G Q, Zhou Y, Rao Z, et al. Effect of Yin-Zhi-Huang on up-regulation of Oatp2, Ntcp, and Mrp2 proteins in estrogen-induced rat cholestasis [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(3): 319-325.
- [17] 崔鑫, 张成, 席俊羽, 等. 基于真实世界与靶点网络聚类的茵栀黄颗粒治疗黄疸的联合用药方案及分子机制分析 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 210-221.
- [18] 张伟, 孙亦钊, 张娟娟, 等. 高效液相色谱法同时测定茵栀黄制剂中 4 种有效成分含量 [J]. 中国药业, 2021, 30(21): 73-76.
- [19] 李蒙丽, 吴丹丹, 陈瑜, 等. 黄芩苷对血管紧张素 II 诱导的高血压小鼠肠道屏障的干预作用 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5375-5379.
- [20] Peng J H, Leng J, Tian H J, et al. Geniposide and chlorogenic acid combination ameliorates non-alcoholic steatohepatitis involving the protection on the gut barrier function in mouse induced by high-fat diet [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1399.
- [21] 李红山, 冯琴, 朱德东, 等. 祛湿化痰方治疗痰瘀互结型非酒精性脂肪性肝炎临床观察 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(8): 1764-1767.
- [22] Wahlstrom A, Sayin S I, Marschall H U, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1): 41-50.
- [23] Rizzolo D, Kong B, Taylor R E, et al. Bile acid homeostasis in female mice deficient in Cyp7a1 and

- Cyp27a1 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3847-3856.
- [24] Jia W, Wei M, Rajani C, *et al.* Targeting the alternative bile acid synthetic pathway for metabolic diseases [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(5): 411-425.
- [25] Lorbek G, Lewinska M, Rozman D. Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids—from mouse models to human diseases [J]. *FEBS J*, 2012, 279(9): 1516-1533.
- [26] Chambers K F, Day P E, Aboufarrag H T, *et al.* Polyphenol effects on cholesterol metabolism via bile acid biosynthesis, CYP7A1: A review [J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2588.
- [27] Chiang J Y, Kimmel R, Weinberger C, *et al.* Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(15): 10918-10924.
- [28] Cheng X, Buckley D, Klaassen C D. Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(11): 1665-1676.
- [29] Lucas L N, Barrett K, Kerby R L, *et al.* Dominant bacterial phyla from the human gut show widespread ability to transform and conjugate bile acids [J]. *mSystems*, 2021, 31: e0080521.
- [30] 吴和霏, 章方玲, 邓昕雨, 等. 芍药苷通过调控肠道菌群改善 α -异硫氰酸酯诱导胆汁淤积大鼠的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7091-7101.
- [31] Zhan K, Zheng H, Li J, *et al.* Gut microbiota-bile acid crosstalk in diarrhea-irritable bowel syndrome [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 3828249.
- [32] Oh H K, Lee J Y, Lim S J, *et al.* Molecular cloning and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus* PF01 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(3): 449-456.
- [33] Jarocki P, Targonski Z. Genetic diversity of bile salt hydrolases among human intestinal bifidobacteria [J]. *Curr Microbiol*, 2013, 67(3): 286-292.
- [34] Ridlon J M, Harris S C, Bhowmik S, *et al.* Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria [J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(1): 22-39.
- [35] Wells J E, Berr F, Thomas L A, *et al.* Isolation and characterization of cholic acid 7 α -dehydroxylating fecal bacteria from cholesterol gallstone patients [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(1): 4-10.
- [36] Narushima S, Itoha K, Miyamoto Y, *et al.* Deoxycholic acid formation in gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria [J]. *Lipids*, 2006, 41(9): 835-843.
- [37] Gerard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota [J]. *Pathogens*, 2013, 3(1): 14-24.
- [38] Zhuang X J, Tian Z Y, Li L, *et al.* Fecal microbiota alterations associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1600.
- [39] Kim G, Deepinder F, Morales W, *et al.* Methanobrevibacter smithii is the predominant methanogen in patients with constipation-predominant IBS and methane on breath [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(12): 3213-3218.
- [40] Tap J, Derrien M, Tornblom H, *et al.* Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 111-123.e8.
- [41] Durbán A, Abellán J J, Jiménez-Hernández N, *et al.* Structural alterations of faecal and mucosa-associated bacterial communities in irritable bowel syndrome [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2012, 4(2): 242-247.
- [42] Duan R Q, Zhu S W, Wang B, *et al.* Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome based on 16S rRNA-targeted sequencing: A systematic review [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2019, 10(2): e00012.

[责任编辑 高源]