

基于肠道菌群及 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路研究逍遥散对代谢相关脂肪性肝病大鼠的改善作用及机制

刘希敏^{1,2}, 刘秋卉³, 卢冬雪^{2*}

1. 南京中医药大学附属常州市中医医院, 江苏 常州 213004

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

3. 常州市武进中医医院, 江苏 常州 213161

摘要: 目的 研究逍遥散对高脂饮食诱导的大鼠代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)的保护作用及机制。方法 SD大鼠随机分为5组:对照组、模型组、盐酸吡格列酮(PH, 阳性药, 5 mg·kg⁻¹)和逍遥散低、高剂量(19、38 g·kg⁻¹)组。对照组喂食基础日粮, 而其余组喂食高脂肪和高果糖日粮12周, 从第13周开始ig给药, 每天1次持续4周。试剂盒法检测血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、内毒素(LPS)水平, 肝组织白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平; HE染色观察肝脏、结肠、空肠和回肠组织病理损伤并评分, 油红O染色观察肝脏脂质累积; 检测24 h尿液99mTc-喷替酸(DTPA)排泄评价肠黏膜屏障完整性; Western blotting法检测结肠组织toll样受体2(TLR2)、toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)、核因子- κ B(NF- κ B)、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、封闭蛋白1(Claudin-1)、紧密连接蛋白-1(Occludin-1)、质膜囊泡相关蛋白1(PV-1)蛋白表达; 免疫组化分析结肠和肝组织TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达; 免疫荧光检测ZO-1、Claudin-1、E-钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达。通过16S rRNA基因测序确定肠道菌群种类变化和结构。结果 与模型组相比, 逍遥散和PH组血清中TG、TC、LDL-C、ALT、AST和LPS水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 肝脏IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低($P<0.01$ 、 0.001), 逍遥散高剂量组血清HDL-C水平显著升高($P<0.01$); 逍遥散组肝脏、结肠、空肠、回肠和肝脏病理评分显著降低, 肝脏油红O染色区域占比显著降低($P<0.01$ 、 0.001); 免疫组化与Western blotting结果显示, 逍遥散和PH组TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达显著降低($P<0.01$ 、 0.001); 逍遥散高剂量和PH组大鼠的24 h尿液DTPA排泄显著降低($P<0.05$); 逍遥散高剂量组和PH组ZO-1、Claudin-1和Occludin-1蛋白表达显著升高($P<0.001$), PV-1蛋白表达显著降低($P<0.001$), 免疫荧光显示逍遥散高剂量组和PH组的ZO-1、Claudin-1和E-cadherin的表达明显升高。与模型组比较, 逍遥散增加肠道菌群丰富度和多样性, 减少瘤胃球菌等有害菌、增加拟杆菌等有益菌的相对丰度。结论 逍遥散对高脂饮食诱导的MAFLD大鼠具有改善作用, 可通过减轻肝脏炎症、调节肝功能指标, 机制可能与修复肠道黏膜屏障、调节肠道菌群、调节TLR4/MyD88/NF- κ B通路等相关。

关键词: 逍遥散; 代谢相关脂肪性肝病; 肠道菌群; 肠黏膜屏障; TLR4/MyD88/NF- κ B通路; 高脂饮食

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 11-2533-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.009

Improvement effect and mechanism of Xiaoyao San on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease rats based on gut microbiota and TLR4/MyD88/NF- κ B pathway

LIU Ximin^{1,2}, LIU Qiuhui³, LU Dongxue²

1. Changzhou Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213004, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Wujin District Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Changzhou 213161, China

收稿日期: 2024-07-04

基金项目: 常州市卫健委青年人才科技项目(QN202125); 常州市卫生健康青苗人才培养工程资助项目(CZQM2022015)

第一作者: 刘希敏, 中西医结合主治医师, 研究方向为中西医结合防治消化系统疾病。E-mail: 617963921@qq.com

*通信作者: 卢冬雪, 讲师, 研究方向为中医药防治消化道疾病、营养与食疗。E-mail: 270773@njucm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the protective effects of Xiaoyao San (XYS) on metabolically-related fatty liver disease (MAFLD) induced by high-fat diet in rats and its underlying mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into five groups: control group, model group, phlorizin (PH, positive drug, 5 mg·kg⁻¹), YYS low-dose group (19 g·kg⁻¹), and high-dose group (38 g·kg⁻¹). The control group was fed a basal diet, while the remaining groups were fed a high-fat and high-fructose diet for 12 weeks. From week 13, the rats were ig administered the drugs once daily for four weeks. Serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and endotoxin (LPS) levels, and interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the liver were determined by kits. The liver, colon, jejunum, and ileum were stained with hematoxylin and eosin (HE) and scored, and the liver was stained with oil red O to detect lipid accumulation. The integrity of the intestinal mucosal barrier was evaluated by measuring the excretion of diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA). Western blotting was used to detect the expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4), MyD88, nuclear factor- κ B (NF- κ B), ZO-1, Claudin-1, Occludin-1, and PV-1 proteins in colon tissue; immunohistochemistry was used to analyze the expression of TLR4, MyD88, and NF- κ B proteins in colon and liver tissue; and immunofluorescence was used to detect the expression of ZO-1, Claudin-1, and E-cadherin proteins. 16S rRNA gene sequencing was used to determine the changes in the types and structure of the intestinal microbiome. **Results** Compared with the model group, the levels of TG, TC, LDL-C, ALT, AST, and LPS in the serum of the YYS and PH groups were significantly lower ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the liver were significantly lower ($P < 0.01, 0.001$). The level of HDL-C in the serum of the YYS high-dose group was significantly higher ($P < 0.01$). The scores of liver, colon, ileum, jejunum, and liver pathological grades were significantly lower in the YYS group, and the area stained with oil red O in the liver was significantly lower ($P < 0.01, 0.001$). The immunohistochemistry and Western blotting results showed that the expression of TLR2, TLR4, MyD88, and NF- κ B proteins was significantly lower in the YYS and PH groups ($P < 0.01, 0.001$). The excretion rate of DTPA in 24 h urine of the rats in the YYS high-dose group and PH group was significantly lower ($P < 0.05$). In the high-dose group of YYS and the PH group, the expression of ZO-1, Claudin-1 and Occludin-1 proteins was significantly increased ($P < 0.001$), while the expression of PV-1 protein was significantly decreased ($P < 0.001$). Immunofluorescence showed that the expression of ZO-1, Claudin-1 and E-cadherin was significantly increased in the high-dose group of YYS and the PH group. Compared with the model group, YYS increased the richness and diversity of the intestinal microbiome, reduced the relative abundance of harmful bacteria such as Ruminococcus and increased the relative abundance of beneficial bacteria such as Bacteroides. **Conclusion** YYS has an ameliorative effect on MAFLD rats induced by high-fat diet, which can be achieved by alleviating liver inflammation, regulating liver function indicators. The mechanism may be related to repairing the intestinal mucosal barrier, regulating intestinal microbiota, and regulating the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway.

Key words: Xiaoyao San; metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; intestinal flora; intestinal mucosal barrier; liver inflammation; TLR4/MyD88/NF- κ B pathway; high-fat diet

代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)原名为非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),是一种代谢性疾病,其特征是在没有酒精滥用或其他明确定义的肝脏损害因素的情况下,肝细胞(至少5%的肝细胞)内脂质显著积累^[1-2]。MAFLD被认为是导致全球肝病的主要因素之一,患病率为25%~45%,并出现年轻化趋势。MAFLD的组织学特征从单纯脂肪变性到代谢相关脂肪性肝炎,包括炎症和肝细胞损伤^[3]。虽然并非所有的脂肪变性患者都会发展为更严重的疾病,但代谢相关脂肪性肝炎可进展为肝硬化和肝细胞癌(HCC)。由于肥胖和代谢综合征的发病率不断上升,MAFLD及相关HCC(MAFLD-HCC)病例数量显著增加^[4],严重影响人类健康,造成严重的经济负担。尽管进行了几十年的研究,但仍缺乏有效的药物来治疗MAFLD,因此,新的治疗药物及治疗

手段的研发迫在眉睫。

中医以整体观和辨证论治为治疗基础,已被证明是治疗多种疾病的有效方法。中医药在慢性疾病的防治方面具有优势,这与多目标、多途径的作用方式密切相关。多项研究表明,中药可通过调节肠道菌群改善脂糖代谢,保护肝功能,对MAFLD具有独特的治疗潜力^[5]。如芍药散可改善肝脏血清学指标,降低核因子- κ B(NF- κ B)表达,改善肝脏炎症^[6];四妙散可调节肠道菌群,下调脂肪酸和炎症因子,减少肝脏脂肪变性,降低体质量增加,调节脂质浓度,提高胰岛素敏感性和糖耐量^[7]。

Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/NF- κ B信号通路在机体的免疫反应和炎症过程中起着至关重要的作用。TLR4是一种在某些细胞(包括免疫细胞)表面发现的受体,能够识别病原体和

受损细胞,从而触发免疫反应。MyD88是一种衔接蛋白,在TLR4激活时被募集,起到将信号从TLR4传输到下游分子的关键作用。NF- κ B是一种转录因子,当被激活时,它会移动到细胞核并促进各种炎症基因的表达。TLR4/MyD88/NF- κ B通路在很大程度上参与了炎症反应。在MAFLD中,该通路可能被过度激活,导致慢性炎症和肝损伤的进展^[8]。肝脏中的脂肪酸和其他应激信号可以激活TLR4,进而导致MyD88的募集和NF- κ B的激活。这会引发促炎细胞因子的产生,从而导致肝损伤和纤维化^[9]。由于炎症是MAFLD进展的关键驱动因素,靶向该通路有助于理解并可能减轻所涉及的炎症过程。此外,通过抑制该通路,有可能减少炎症和肝损伤,为MAFLD提供潜在的治疗方法。

肠道菌群作为人体的“第二基因组”,在食物和药物的消化、吸收和代谢中发挥着重要作用。一方面,肠道微生物及其代谢产物直接影响肠道形态和免疫应答,导致炎症和肠道内毒素(LPS)血症的异常激活;另一方面还可通过改变胆汁酸代谢途径引起肠肝轴功能障碍,进而作为促进MAFLD发生发展的重要驱动因素。

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,具有疏肝解郁、养血健脾之功效,由柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、甘草组成。MAFLD的主要病理表现是代谢下降引起的脂质堆积,逍遥散已被证明可以调节全身气血运动,促进新陈代谢。此外,逍遥散还具有清热、除湿、化浊、解毒、化瘀、疏肝等多种功效。临床上用于治疗代谢相关单纯性脂肪肝湿热阻证^[10]。先前的临床研究^[11]和动物实验^[12]已经证明,单独或联合使用逍遥散可以显著调节与MAFLD相关的脂质水平。

本研究旨在探讨逍遥散对高脂饮食诱导的MAFLD的治疗作用及其作用机制是否与调节肠道菌群和TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关,为逍遥散的临床应用和进一步开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

高效液相色谱仪(HPLC): Waters Xbridge C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m, 美国 Waters 公司); 5810R离心机(德国Eppendorf公司);FreeZone冷冻干燥机(美国Labconco公司);BX53光学显微镜(日本Olympus公司);2480 Wizard2 γ 计数器(美国PerkinElmer公司);Western blotting设备:Mini-PROTEAN Tetra System(美国Bio-Rad公司);PCR

仪: Veriti 96-Well Thermal Cycler(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 逍遥散制剂

柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、甘草药材购自常州中医医院中药房,由中药鉴定教研室吴启南教授课题组进行药材鉴定,并出具中药材品质鉴定检验合格报告。将柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、甘草按照2:2:2:2:1的质量比混合,并用10倍体积的去离子水(ddH₂O)煮沸3次,每次提取1 h^[13]。将原料药提取物浓缩并冻干,称取冻干粉末并将其溶解在ddH₂O中。将柴胡皂苷和芍药苷作为逍遥散的质控标准,经HPLC法测得柴胡皂苷的质量分数为0.78%,芍药苷的质量分数为0.89%以上。

1.3 实验动物及药物

50只SD大鼠,雌雄各半,5周龄,体质量160~180 g,从杭州医学院获得,实验动物生产许可证号SCXK(浙)2019-0002。实验方案获得南京中医药大学伦理委员会批准,编号SYPU-IACUC-2019-7-06-204。大鼠的饲养温度为22~24 $^{\circ}$ C,相对湿度为40%~50%,昼夜周期为12 h,自由饮水。

1.4 主要试剂

盐酸吡格列酮(PH)片购自常州市中医医院,生产企业江苏德源药业股份有限公司,批号H20110048。ELISA试剂盒:三酰甘油(TG,南京肯根生物技术有限公司);总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),购自南京剑诚生物有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)[爱必信(上海)生物科技有限公司];天冬氨酸氨基转移酶(AST,上海晶抗生物工程有限公司);白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、LPS、油红O、RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司)。抗体:TLR4、TTLR2(Thermo Fisher Scientific);NF- κ B、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、封闭蛋白1(Claudin-1)、紧密连接蛋白-1(Occludin-1)、GAPDH、E-钙黏蛋白(E-cadherin)(美国Abcam公司);质膜囊泡相关蛋白1(PV-1)(Thermo Fisher Scientific)。Bicinchoninic acid(BCA)蛋白检测试剂盒、苏木精、伊红(碧云天生物技术有限公司);10%福尔马林(武汉佰瑞得生物技术有限公司);10%多聚甲醛[生工生物工程(上海)股份有限公司];60%异丙醇(Sigma-Aldrich);DNA提取试剂盒(德国QIAGEN公司)。

2 方法

2.1 动物与实验设计

经过7 d的适应期后,将大鼠随机分为5组(每

组10只);对照组、模型组、PH(阳性药, 5 mg·kg⁻¹)和逍遥散低、高剂量(19、38 g·kg⁻¹)组。对照组喂食基础日粮,而其余组喂食高脂肪和高果糖日粮(52.5%基础食物、2%胆固醇、10%猪油、5%蛋黄粉、0.5%胆酸钠和30%蔗糖)12周^[14]。从第13周开始ig给药,每天1次,持续4周,对照组和模型组给予等量的0.9%氯化钠溶液。

2.2 标本收集

在最后1天,通过异氟烷气体吸入的方式麻醉所有大鼠,收集腹主动脉血,血样在4℃下以12 000 r·min⁻¹离心10 min;颈椎脱臼处死大鼠,迅速取出肝脏、空肠、回肠、结肠,并用干净的冷盐水冲洗,测量结肠的长度。将组织样品(1 cm×1 cm)浸入4%多聚甲醛中24 h,并包埋在石蜡中,用于随后的组织病理学、免疫组织化学和免疫荧光分析。残留的肠道组织样本储存在-80℃,以备进行生化分析。从大鼠的结肠、直肠收集粪便样本用于微生物群分析。

2.3 血清脂质及生化分析

采用市售试剂盒测定血清TG、TC、HDL-C、LDL-C、ALT、AST、LPS水平。

2.4 组织病理学分析

将肝脏、结肠、空肠和回肠组织样品进行苏木精-伊红(HE)染色,并在光学显微镜下进行检查。对于代谢相关脂肪性肝炎的肝脏组织病理诊断标准采用NAFLD活动度积分(NAS)进行评估,NAS组织学评分系统对14项病理改变中的3项指标(肝脂肪变、小叶内炎症、肝细胞气球样变)进行半定量评估计分。具体评分标准为:肝脂肪变依据肝细胞内脂肪含量分为0(<5%)、1(5%~33%)、2(34%~66%)、3(>66%)分;小叶内炎症根据病灶情况计分;肝细胞气球样变在不同程度下分别为无、少量气球样细胞、较多/显著气球样变^[15]。通过不同的评分等级,从4个方面对结肠、空肠和回肠组织炎症的严重程度进行评估,包括中性粒细胞等级、病变深度、隐窝破坏程度以及病变范围^[16]。

2.5 油红O染色

在冷冻切片机上对部分新鲜肝脏进行切片。切片用10%多聚甲醛固定10 min,用蒸馏水洗涤,用60%异丙醇浸泡30 s,用油红O染色15 min,用60%异丙醇洗涤以去除多余的染料,用苏木精复染5 min,用去离子水洗涤3次,并用甘油明胶片密封。在光学显微镜下观察病理变化。用Image J定量油红O染色面积的比例^[17]。

2.6 肝脏炎症因子测定

根据制造商的说明,使用ELISA试剂盒检测保存在-80℃下的大鼠肝组织中IL-6、IL-1β和TNF-α的表达水平。

2.7 肠黏膜通透性

于取材前进行实验,用2 mL水冲洗灌胃针,然后给每只大鼠ig 1 mL含7.4 MBq 锝(0.2 mCi)放射标记的99mTc-喷替酸(DTPA)。提取相同剂量和体积的99mTc-DTPA标记物作为标准品。ig给药后,将大鼠置于代谢笼中,收集尿液24 h。混合后,将尿液样本与标准品稀释400倍,取1 mL,用γ计数器测定放射性1 min。

24 h尿液DTPA排泄率=(尿样计数一本底)×24 h尿量/[标准品计数一本底)×标准品稀释倍数]

2.8 Western blotting分析

新鲜结肠组织(100 mg)用液氮研磨,加入RIPA裂解液充分研磨,离心提取总蛋白。提取上清液,用BCA法测定蛋白浓度。蛋白质样品经SDS-PAGE电泳,转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,一抗TLR2(1:200)、TLR4(1:200)、MyD88(1:1 000)、NF-κB(1:1 000)、ZO-1(1:1 000)、Claudin-1(1:2 000)、Occludin-1(1:1 000)、PV-1(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)包合,4℃孵育过夜。加入山羊抗兔IgG H&L(HRP)(1:2 000)二抗,室温孵育1 h,用增强的化学发光试剂进行可视化,用Image Lab软件进行灰度分析。

2.9 免疫组化分析

结肠和肝组织常规石蜡包埋、切片,厚度3 μm,经脱蜡、水化、修复后,封闭加TLR4、MyD88、NF-κB抗体4℃孵育过夜,二抗(1:2 000)37℃孵育,DAB显色、脱水、封片。染色阳性判定依据为细胞核周围出现棕褐色颗粒。用显微镜读片拍照,Image proplus 6.0免疫组化分析软件计算图片平均吸光度(A)值,用以表示蛋白相对表达量。

2.10 免疫荧光分析

结肠组织常规石蜡包埋、切片,厚度3 μm,经脱蜡、水化、修复后,封闭加ZO-1(1:1 000)、Claudin-1(1:2 000)、E-cadherin(1:1 000)抗体4℃孵育过夜,荧光二抗(1:2 000)37℃孵育,DAB显色、脱水、封片。

2.11 肠道菌群分析

2.11.1 提取粪便基因组DNA用于16s rRNA测序 采用MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit(QIAGEN)技术从对照组、模型组、PH组和逍遥

散低、高剂量组($n=5$)的粪便样品中提取总基因组DNA。提取的DNA用1%琼脂糖凝胶检测。用纳米滴分光光度计测定DNA浓度和质量。用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCA GAG-3')和806R扩增细菌16S rRNA基因V3-V4高变区(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR混合物由25 μL 组成,包括1 μL 正向引物(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 反向引物(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、12.5 μL 2 $\times$ Taq PCR MasterMix、3 μL BSA (2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、2 μL 模板DNA和5.5 μL ddH₂O。热循环包括94 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性5 min,然后是28个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,并最终在72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。混合PCR产品加载在1%的琼脂糖凝胶上进行检测,使用agc court AMPure XP试剂盒和定量的QuantiFluorTM-ST试剂盒进行纯化。将纯化的PCR产物在Miseq平台上进行深度测序。运行后,执行Illumina Analysis Pipeline Version 2.6来分析图像、碱基调用和误差估计。

2.11.2 测序数据分析 对原始数据进行初步筛选,去除短于200 bp的序列、低质量分数(≤ 20)的序列、不明确的碱基或与引物序列和条形码标签不完全匹配的序列。接下来,使用VSEARCH处理数据集,并通过以97%的相似性对序列进行聚类来获得操作分类单元(OTU)。OTU用于生成稀疏曲线和秩-丰度曲线,分别计算丰富度和多样性指数。Shannon指数用于评估微生物多样性,并使用单因素方差分析对香农指数进行多重比较。通过使用核糖体数据库项目(RDP)分类器工具^[18]对所有序列进行分类来识别分类组。为了比较不同组之间的相似性,使用R中每个样本的信息进行主成分分析(PCA)和主坐标分析(PCoA)。Pearson相关性用于探索肠道微生物群、脂质代谢和炎症相关指数之间的关系。应用线性判别分析效应大小(LEfSe)来表征病例和对照之间的粪便微生物差异。

2.12 统计分析

采用GraphPad Prism 8.3进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所有数据分析均采用方差分析,然后采用Tukey的多重比较检验。

3 结果

3.1 逍遥散对肝脂质和炎症损伤的作用

如图1所示,给药4周后,与对照组相比,模型组血清中TG、TC、LDL-C、ALT、AST和LPS水平显著升高($P<0.001$),HDL-C水平显著降低($P<0.001$)。与模型组相比,逍遥散和PH组血清中TG、

TC、LDL-C、ALT、AST和LPS水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),逍遥散高剂量组HDL-C水平显著升高($P<0.01$),且逍遥散作用呈剂量相关性。

与对照组相比,模型组肝脏IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高($P<0.01$ 、 0.001);与模型组相比,逍遥散和PH组肝脏IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。

3.2 逍遥散对大鼠结肠、空肠、回肠和肝脏组织损伤的作用

如图2所示,与对照组比较,模型组大鼠肝细胞形态不规则,胞浆内散在大小不等的脂质空泡,并可见门静脉损伤,油红O染色显示肝脂积累;模型组肠上皮细胞损伤变化多样,不同肠区域均有不同程度的炎症损伤,表现为炎症细胞浸润和绒毛长度缩短。与模型组比较,逍遥散高剂量组和PH组出现脂滴减少和肝细胞球囊化,肠道炎症细胞浸润明显减少,绒毛长度明显增加。

与对照组比较,模型组大鼠肝脏、结肠、空肠、回肠和肝脏病理评分显著升高,肝脏油红O染色区域占比显著升高($P<0.001$);与模型组比较,逍遥散组肝脏、结肠、空肠、回肠和肝脏病理评分显著降低,肝脏油红O染色区域占比显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。

3.3 逍遥散对结肠和肝脏中炎症相关的蛋白表达的作用

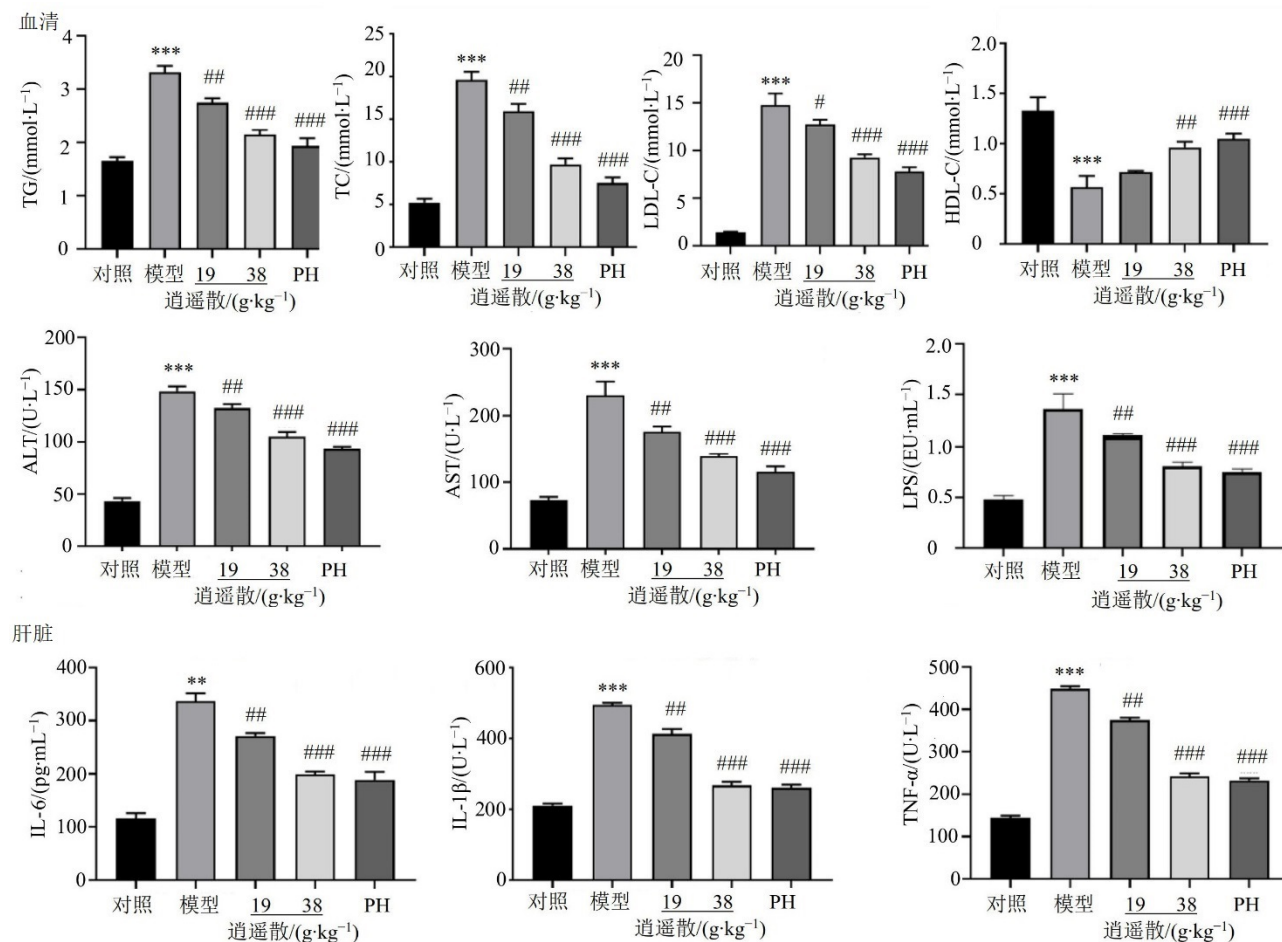
通过Western blotting和免疫组化研究逍遥散对MAFLD中上调的TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关蛋白表达的影响。Western blotting结果(图3)表明,与对照组比较,模型组TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达显著升高($P<0.001$);与模型组比较,逍遥散和PH组TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。免疫组化结果与Western blotting结果一致。

3.4 逍遥散对肠黏膜屏障功能的作用

为评价逍遥散对肠黏膜屏障完整性的影响,测定24 h尿DTPA排泄率。结果(图4)显示,模型组大鼠的通透性显著高于对照组($P<0.01$);与模型组比较,逍遥散高剂量和PH处理后大鼠的DTPA排泄率显著降低($P<0.05$)。结果表明,逍遥散有可能降低MAFLD大鼠的肠道通透性。

3.5 逍遥散对肠黏膜和血管屏障蛋白的作用

结果(图5)表明,与对照组比较,模型组ZO-1、Claudin-1和Occludin-1蛋白表达显著降低($P<0.001$),PV-1蛋白表达显著升高($P<0.001$);与模型



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

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

图1 逍遥散对血清脂质、炎症因子和肝脏炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of Xiaoyao San on serum lipids and inflammatory factors, and liver inflammation factors ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组比较,逍遥散高剂量组和PH组ZO-1、Claudin-1和Occludin-1蛋白表达显著升高($P < 0.001$),逍遥散和PH组PV-1蛋白表达显著降低($P < 0.001$)。

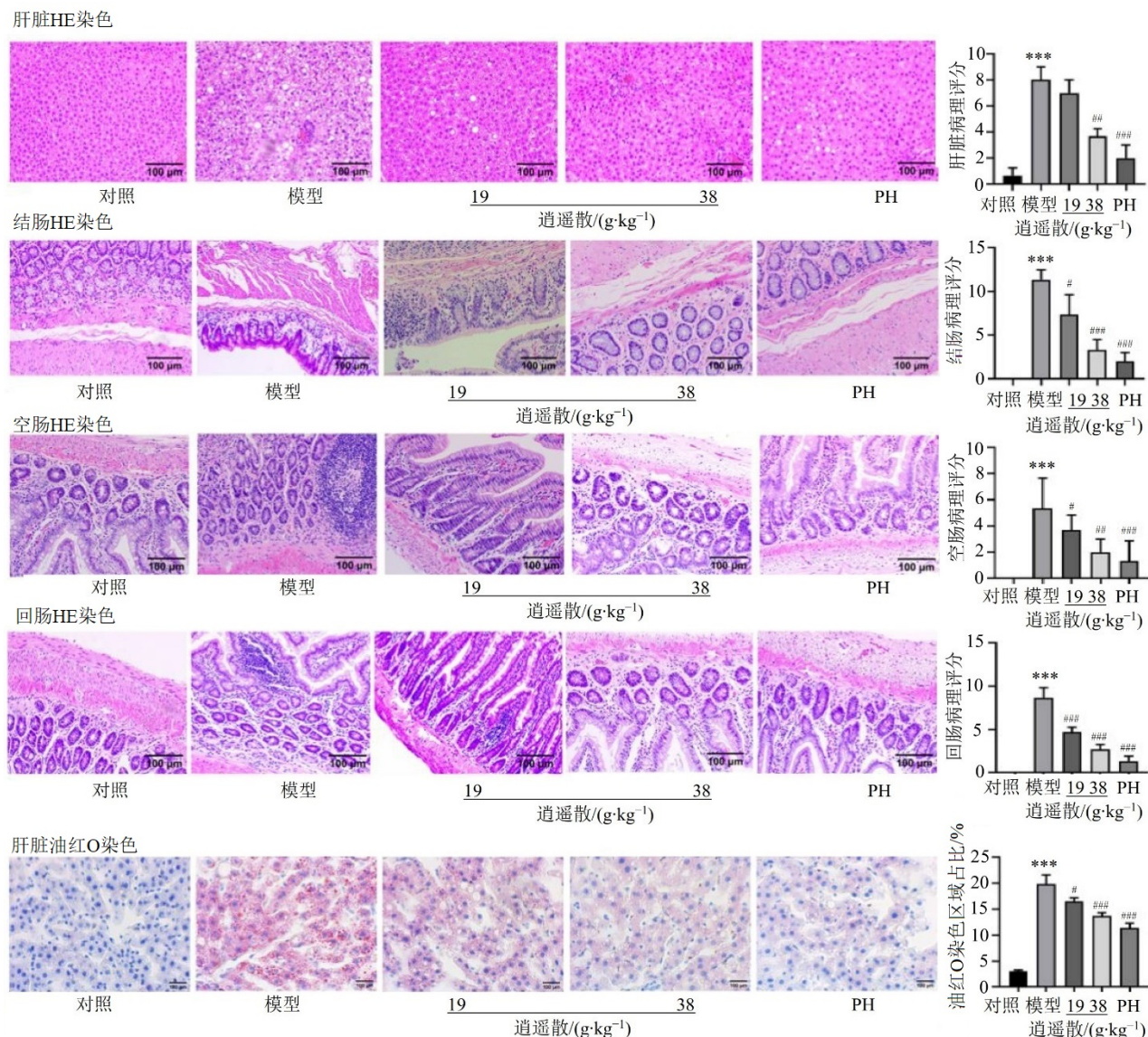
进一步免疫荧光分析发现,与对照组比较,模型组ZO-1、Claudin-1和E-cadherin的表达明显降低;与模型组比较,逍遥散高剂量组和PH组的ZO-1、Claudin-1和E-cadherin的表达明显升高。

3.6 逍遥散改变MAFLD大鼠肠道菌群丰富度和多样性

3.6.1 肠道菌群alpha多样性分析 对于有分组的样本,使用R脚本将数据绘制成箱线图,以直观地展示不同样本组之间的alpha多样性差异,通过Student's *t* 检验验证差异的显著性。分析结果表明,与对照组比较,模型组Simpson指数下降;与模型组相比,逍遥散组和PH组的Simpson指数显著升高($P < 0.05, 0.01$)。结果见图6。

稀释性曲线从样本中随机抽取一定数量的序列,统计这些序列所代表的物种数目,并以序列数与物种数来构建曲线,用于验证测序数据量是否足以反映样品中的物种多样性,并间接反映样品中物种的丰富程度。分析结果表明,与对照组比较,模型组大鼠肠道菌群丰富度明显减少。与模型组比较,逍遥散组和PH组的肠道菌群丰富度均显著升高。结果见图6。

利用Mothur软件和R语言工具依据各样品的测序量在不同测序深度时的Shannon指数(反映样品中微生物多样性的指数)绘制Shannon多样性指数稀释曲线,以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。Shannon指数越大则物种种类越多,物种越丰富;分析结果表明,与对照组相比,模型组大鼠肠道菌群明显减少;与模型组相比,逍遥散组和PH组的肠道菌群Shannon指数均明显升高。结果见图6。



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2 逍遥散对大鼠结肠、空肠、回肠和肝脏组织损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=10, \times 100$)

Fig. 2 Effect of Xiaoyao San on colon, jejunum, ileum, and liver tissue damage in rats ($\bar{x} \pm s, n=10, \times 100$)

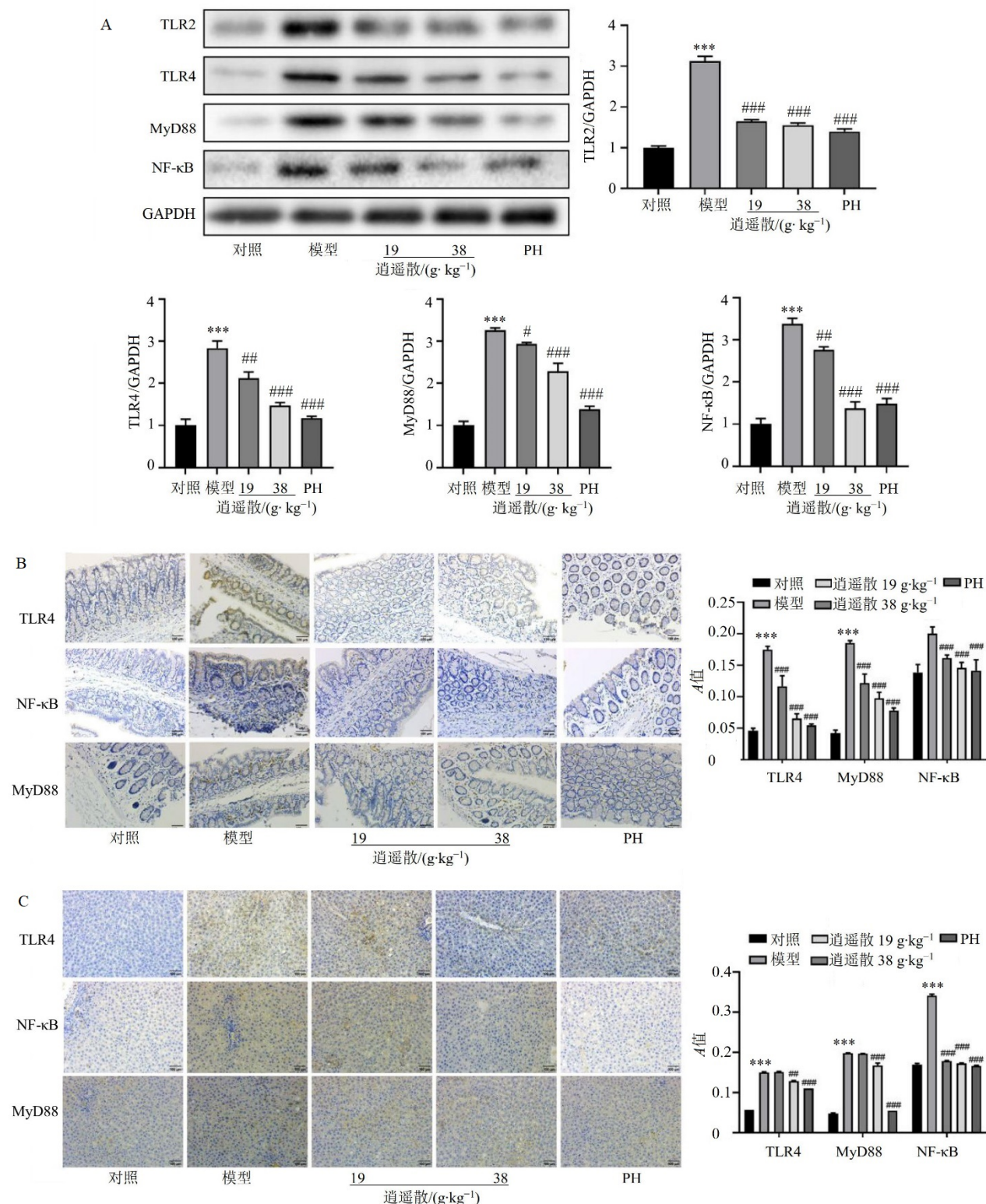
3.6.2 大鼠肠道菌群 β 多样性分析 PCA是一种分析和简化数据集的技术。通过分析不同样品特征组成可以反映样品的差异和距离。两个样品距离越近,则表示这两个样品的组成越相似。结果表明,模型组与对照组的差异和距离明显较大;逍遥散、PH组与对照组的差异和距离有所拉近(图7-A)。

PCoA是一种与PCA类似的降维排序方法。通过PCoA可以实现多个样品的分类,进一步展示样品间物种多样性差异。在PCoA图中,同一组的样本用相同颜色的点表示,样本点之间的距离越大,样本物种组成之间的差异越大。第一个水平主成

分(axis1)的贡献率为29.95%,第二个垂直主成分(axis2)的贡献率为19.70%。这2个原则的综合贡献率超过90%,说明它们能够综合反映社区构成信息^[19]。逍遥散组和PH组具有重叠组分,表明它们的微生物组成具有较高的相似性(图7-B)。

3.6.3 肠道菌群的种类组成及差异分析 群落植物区系分类单位的相对丰度如图8所示。1种颜色代表1个物种,色块长度表示物种所占相对丰度比例;为使视图效果最佳,只显示丰度水平前10的物种,并将其他物种合并为Others在图中显示。

在门水平上,与对照组比较,模型组厚壁菌门(Firmicutes)和脱硫杆菌门的相对丰度明显增加,

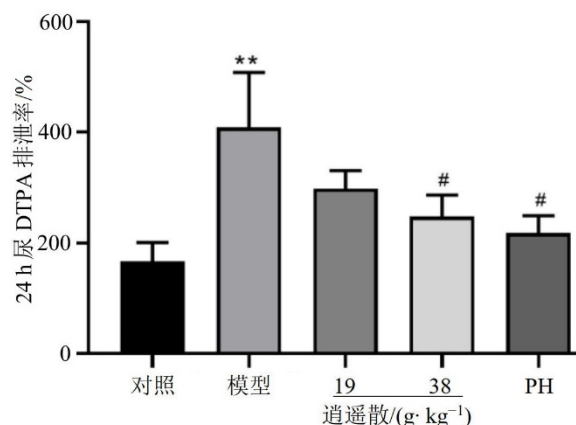


A-Western blotting 检测结肠组织 TLR4/MyD88/NF-κB 蛋白的表达;免疫组化染色显示逍遥散对结肠(B)和肝脏(C)TLR4/MyD88/NF-κB 通路蛋白的影响;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-intestinal mucosal barrier protein detected by Western blotting; TLR4/MyD88/NF-κB pathway proteins in colon (B) and liver (C) demonstrated by immunohistochemical staining; *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图3 逍遥散对结肠和肝脏炎症相关的蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10, \times 100$)

Fig. 3 Effect of Xiaoyao San on protein expression related to colon and liver inflammation($\bar{x} \pm s, n=10, \times 100$)

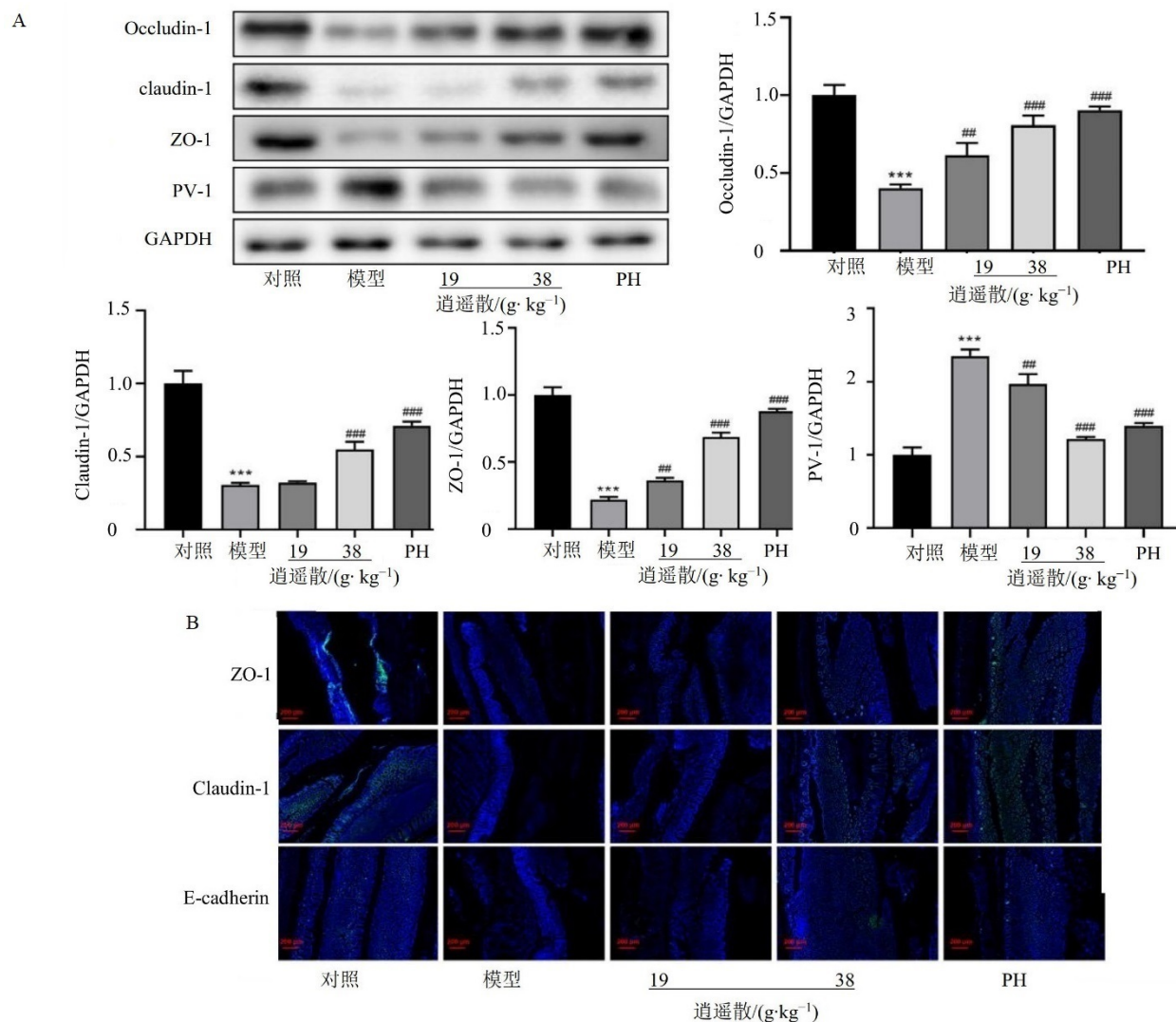


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

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

图4 逍遥散对肠黏膜屏障功能的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 4 Effect of Xiaoyao San on intestinal mucosal barrier function ($\bar{x} \pm s, n=10$)



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

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

图5 逍遥散对肠黏膜(A)和血管(B, ×100)屏障蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Effect of Xiaoyao San on expression of barrier proteins in intestinal mucosa (A) and blood vessels (B, ×100) ($\bar{x} \pm s, n=10$)

拟杆菌门(Bacteroidota)的丰度明显降低;逍遥散高剂量和PH处理后,与模型组相比,逍遥散高剂量组的厚壁菌门丰度降低,拟杆菌门丰度增加,而逍遥散低剂量组厚壁菌门和拟杆菌门未见明显改善。

在纲水平上,对照组以芽孢杆菌、拟杆菌和梭状芽孢杆菌为主。与对照组比较,模型组芽孢杆菌和拟杆菌丰度降低,梭状芽孢杆菌丰度增加。干预后,与模型组比较,逍遥散和PH组的芽孢杆菌丰度均增加,但仍低于对照组,而逍遥散高剂量组在降低梭状芽孢杆菌丰度上最为明显。

在目水平上,对照组以毛螺菌、颤螺菌、拟杆菌和乳酸杆菌为主;与对照组比较,模型组拟杆菌和乳酸杆菌明显降低,而毛螺菌、颤螺菌丰度增加;与

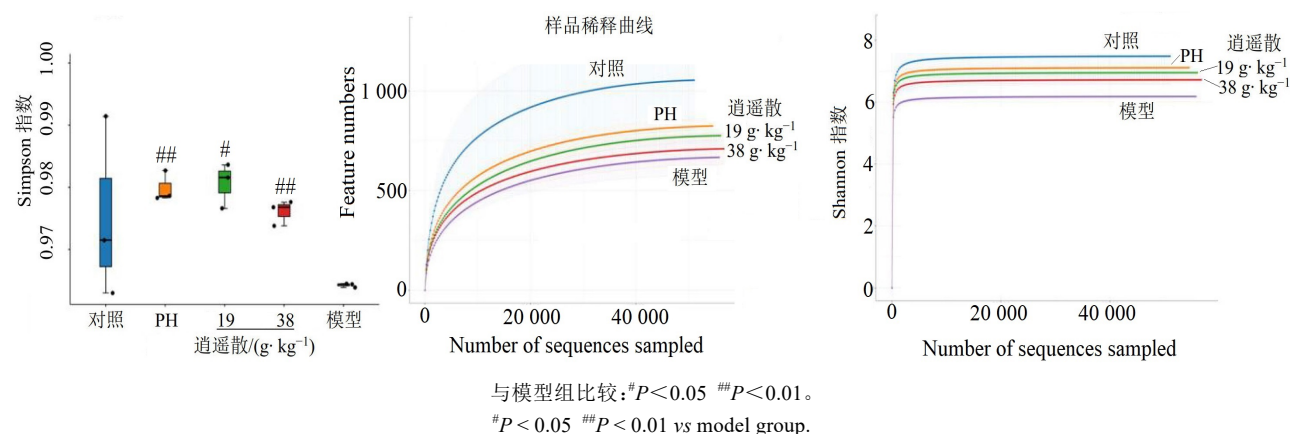


图6 各组大鼠肠道菌群alpha多样性指数分析

Fig. 6 Analysis of alpha diversity index of intestinal flora of rats in each group

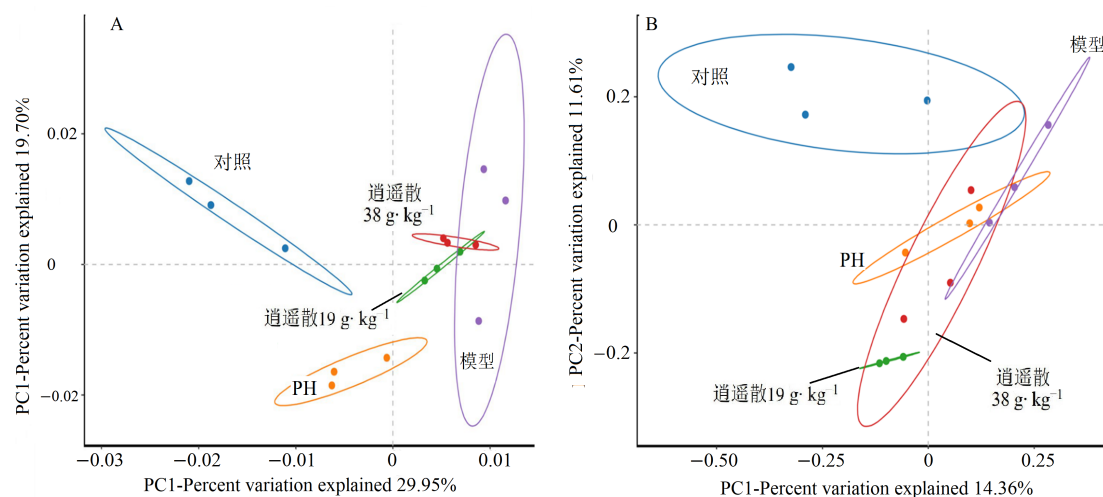


图7 各组大鼠肠道菌群β多样性指数的PCA(A)、PCoA(B)

Fig. 7 PCA (A) and PCoA (B) of β diversity index of intestinal flora of rats in each group

模型组比较,经药物干预后逍遥散高剂量组的拟杆菌丰度增加最为明显。

在科水平上,与对照组比较,模型组毛螺菌、颤螺菌均增加,拟杆菌减少,瘤胃球菌增加;给药后,瘤胃球菌减少,拟杆菌增加,以逍遥散高剂量组最为明显。属水平上,模型组拟杆菌属的丰度降低,而瘤胃球菌的丰度增加;给药后逍遥散高剂量组拟杆菌的丰度明显增加。在种水平上,主要以未分类的毛螺菌、颤螺菌、拟杆菌和 *Ligilactobacillus* 为主。

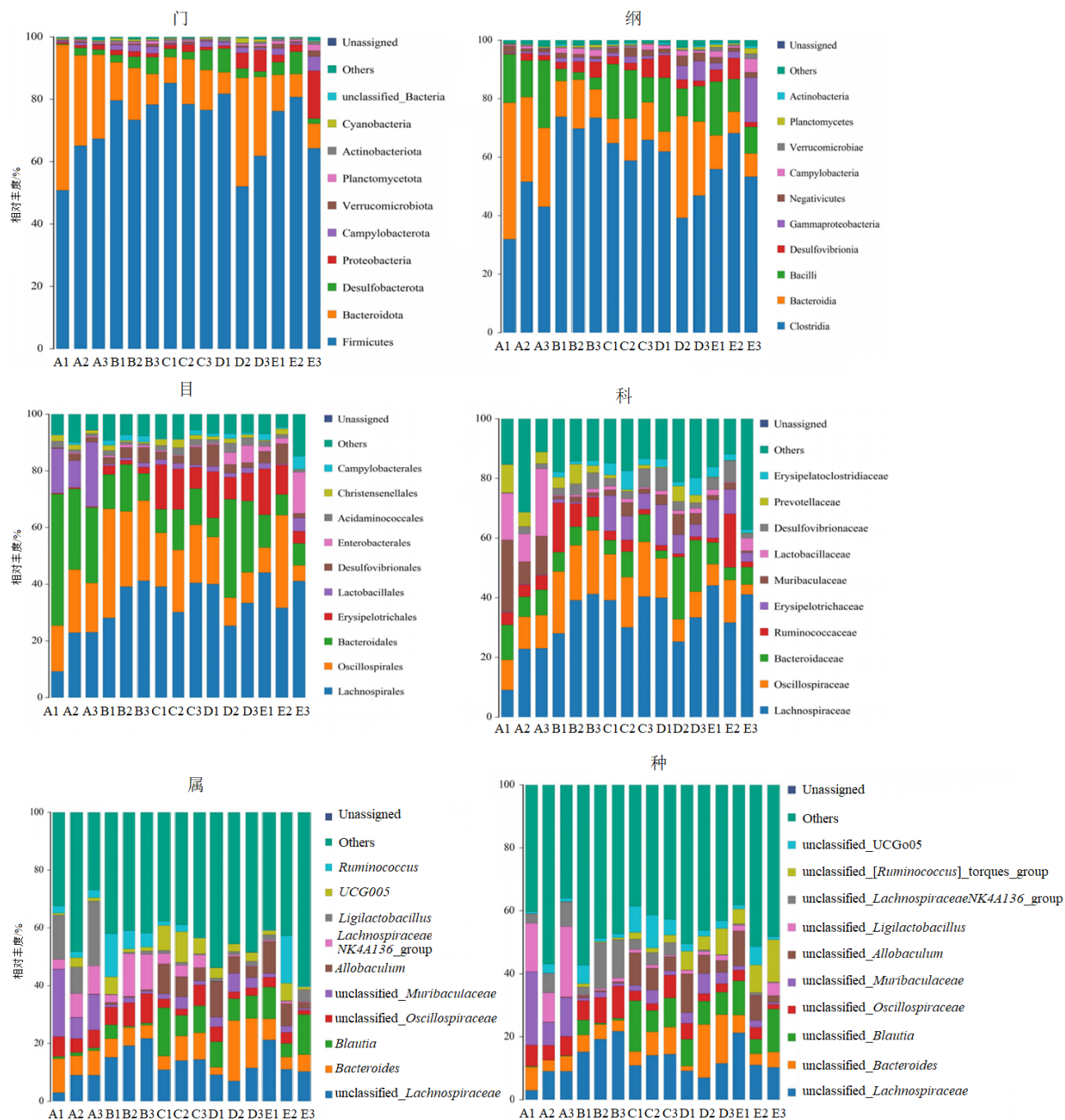
用 LEfse 法检测各组中特定菌群。从分支图(图9-A)中,在门水平(图9-B)选择各组间差异显著的特定细菌。对照组以普雷沃氏菌和 Muribaculaceae 为优势门,而模型组以颤螺菌和毛螺菌为优势门,提示它们在 MAFLD 的发病机制中可能发挥作用。逍遥散高剂量组啮齿枸橼酸杆菌和异杆菌属相对丰度增加。

4 讨论

MAFLD 是一种代谢性疾病,特征是肝细胞内脂质显著积累,对健康有重大影响。中医药在治疗包括 MAFLD 在内的多种疾病方面已有数千年的历史。因此,了解逍遥散缓解 MAFLD 的潜在机制非常重要。本研究表明,逍遥散可降低 MAFLD 模型中 TLR4/MyD88/NF- κ B 蛋白和促炎蛋白的表达,改善脂质谱,并调节肠道菌群失调。

研究表明逍遥散对脂质代谢和肝脏炎症有改善作用^[20-21]。模型组结肠、空肠、回肠和肝脏的形态损伤,表现为肠绒毛缩短、肠炎症细胞浸润、胞浆脂滴堆积、肝细胞球囊化。而逍遥散能明显减轻这些病理改变。逍遥散能降低大鼠血清中 TG、TC、LDL-C、ALT、AST 和内毒素水平,升高 HDL-C 水平。

MAFLD 的发病机制复杂,涉及炎症反应、肠屏障功能障碍和肠道菌群失调,最终导致肝损伤。有



A-对照组;B-模型组;C-逍遥散 19 g·kg⁻¹组;D-逍遥散 38 g·kg⁻¹组;E-PH组。

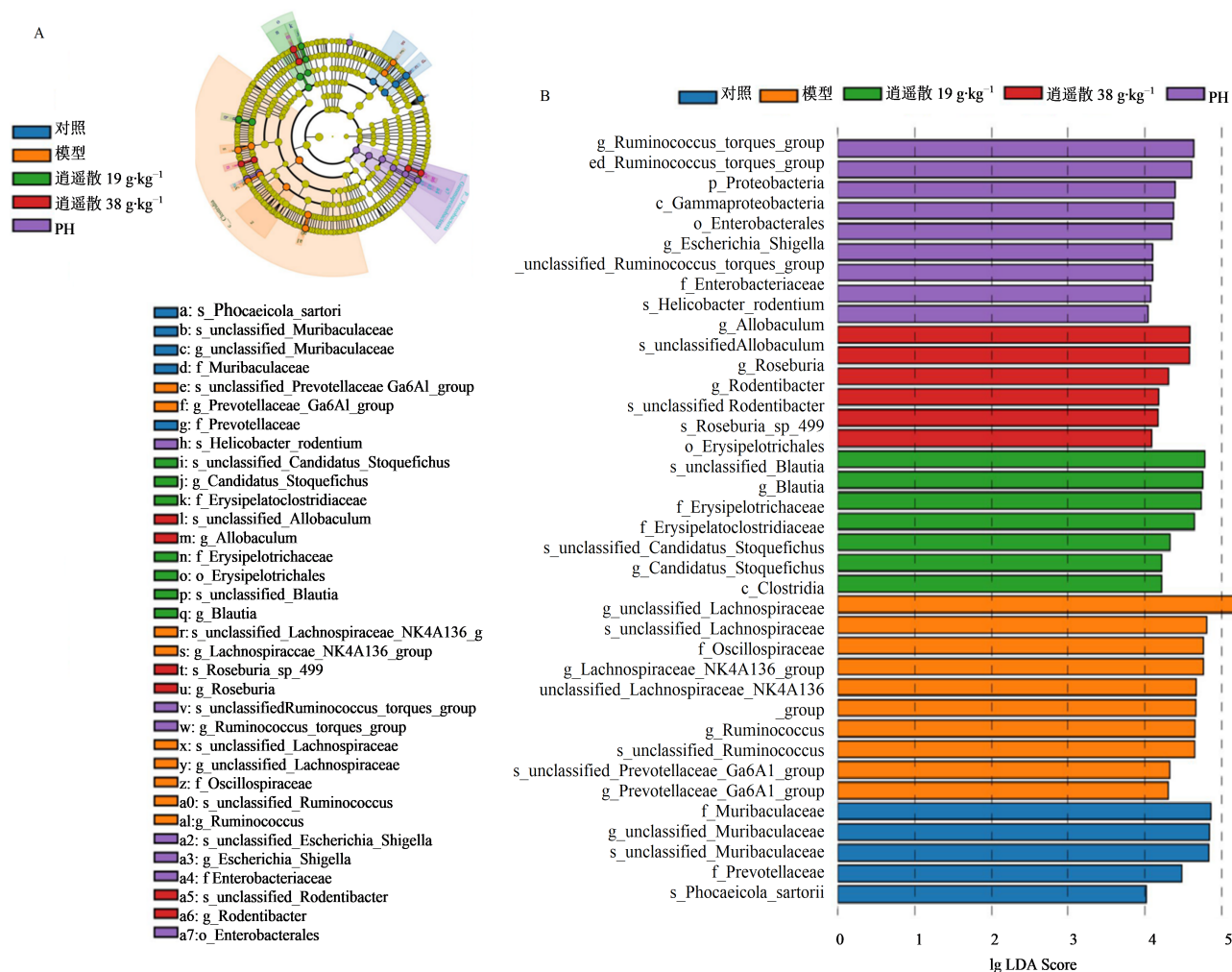
A-control group; B-model group; C-Xiaoyao San 19 g·kg⁻¹ group; D-Xiaoyao San 38 g·kg⁻¹ group; E-PH group.

图8 微生物群落分类分析

Fig. 8 Classification and analysis of microbial communities

研究报道TLR4/NF- κ B信号通路调控炎症细胞因子IL-6、IL-10、TNF- α 和IL-1 β 的产生,IL-1 β 是MAFLD发生的主要因素^[22]。值得注意的是,过表达TLR4可以上调NF- κ B的表达,并加剧炎症反应^[23]。NF- κ B是重要的核转录因子,在生理和病理过程中起着重要的调节作用。TLR4是先天免疫系统的模式识别受体,对病原体识别和炎症启动至关

重要^[24]。TLR4激活肝细胞后,与下游连接介质MyD88结合,导致NF- κ B激活。该信号通路可触发TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎细胞因子的释放,促进MAFLD的进展^[25-26]。本研究结果显示,高脂饮食喂养大鼠肝脏组织中促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6显著上调,抗炎细胞因子IL-10显著下调。TLR4、MyD88、NF- κ B在模型组肝组织中表达显著升高。



A-LEfSe 分析进化分枝图; B-线性判别分析 (LDA) 值分布柱状图。

A-LEfSe analysis of evolutionary branching diagram; B-Linear Discriminant Analysis (LDA) Value Distribution Bar Chart.

图 9 LEfse 分析

Fig. 9 LEfse analysis

而逍遥散干预后, 这些炎症细胞因子和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关蛋白的异常表达均出现明显逆转。

除肠道炎症外, 肠黏膜屏障的破坏是 MAFLD 发生的关键机制。肠道黏膜屏障的完整性, 尤其是紧密连接, 在高脂肪饮食诱导的 MAFLD 发病机制中起着重要作用。紧密连接由黏着的核心蛋白组成, 通过关闭肠上皮细胞的细胞旁空间来维持肠黏膜屏障的结构和功能。炎症条件下, 这些紧密连接被破坏^[27-28], 导致肠道通透性增加, 肠道炎症, 肝脏炎症的发生^[29-30]。通过测定 24 h 尿 DTPA 排泄率, 发现逍遥散可降低高脂饮食大鼠肠道通透性。此外, Western blotting 和免疫荧光分析发现, 模型组紧密连接蛋白 (ZO-1、Claudin-1 和 E-cadherin) 的表达水平显著降低。逍遥散能够逆转这些变化并增加黏附蛋白的表达, 且作用呈剂量相

关性。

Spadoni 提出^[31], 人类和大鼠中存在肠道血管屏障 (GVB), 它调节物质从肠道进入体循环。研究表明, 高脂饮食引起的 MAFLD 中, GVB 的破坏可促进肠道细菌产物进入肝脏^[32]。通过肠肝血液循环, 肠道细菌产物通过门静脉进入肝脏。这一过程激活肝 Kupfer 细胞, 刺激促炎因子的释放, 导致肝细胞炎症、纤维化, 并导致肝脏疾病^[33]的进展。质膜囊泡相关蛋白 1 (PV-1) 是内皮细胞中表达的一种 6×10^4 的糖蛋白, 对跨越内皮细胞窝颈部区域的辐条状膜结构的产生至关重要。在黏膜诱导的 MAFLD 模型中, 肠道上皮屏障和 GVB 的显著损伤被认为是代谢相关脂肪性肝炎发生的早期事件, 其特征是紧密连接蛋白 ZO-1 表达减少, PV-1 表达增加^[34]。目前的研究结果表明, 在逍遥散可逆转 PV-1 的高表达, 提示逍遥散对 MAFLD 中 GVB 的破坏具

有潜在的保护作用。

人类肠道中含有大量的微生物,经过长期的共同进化,这些微生物已经扮演了一个重要的角色,类似于一个重要的“器官”^[35]。肠道微生物、宿主基因组和环境因素之间的相互作用影响着机体的生理代谢。越来越多的证据表明,肠道菌群失调与肥胖、2型糖尿病、MAFLD等代谢紊乱的发生有关^[36-38]。肠道菌群失调被认为是促进MAFLD的重要因素^[39-41]。MAFLD大鼠各物种丰度比例异常,尤其是厚壁菌门、拟杆菌门比例异常,表明微生物生态失衡。本研究证据显示,与对照组相比,模型组瘤胃球菌数量增加,拟杆菌门减少,厚壁菌门增加,肠道屏障功能减弱,细菌毒素易位风险增加。逍遥散通过减少瘤胃球菌、增加拟杆菌等有益菌的相对丰度来缓解风险。由此可见,逍遥散可通过提高肠道菌群的丰度和多样性来调节菌群的物种比例平衡,并通过支持有益菌的生长来改善肠道通透性。逍遥散通过调节肠肝轴,抑制肝脏对有害物质的暴露,从而防止MAFLD疾病的发生和发展,建立肠道微生物群-肠肝轴的良性循环。

本研究旨在探讨逍遥散改善早期MAFLD的作用机制。逍遥散具有一系列抗MAFLD的特性,包括通过恢复肠道屏障功能和降低肠道屏障通透性来调节细菌产物易位,抑制促炎细胞因子,以及通过促进有益菌生长来调节肠道微生物群。逍遥散能改善血脂代谢指标,抑制肝脏脂肪变性,对高脂饮食诱导的MAFLD有较好的早期治疗作用。逍遥散调控肠道菌群的确切机制尚不清楚,本研究为进一步研究提供了理论框架。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dou L, Shi X M, He X S, et al. Macrophage phenotype and function in liver disorder [J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 3112.
- [2] Draijer L, Benninga M, Koot B. Pediatric NAFLD: An overview and recent developments in diagnostics and treatment [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 13 (5): 447-461.
- [3] Kasper P, Martin A, Lang S, et al. NAFLD and cardiovascular diseases: A clinical review [J]. *Clin Res Cardiol*, 2021, 110(7): 921-937.
- [4] Govaere O, Petersen S K, Martinez-Lopez N, et al. Macrophage scavenger receptor 1 mediates lipid-induced inflammation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2022, 76(5): 1001-1012.
- [5] Wang H, Xu Z J, Wang Q, et al. Danshao Shugan Granule therapy for non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lipids Health Dis*, 2022, 21(1): 76.
- [6] Cao L, Xu E J, Zheng R D, et al. Traditional Chinese medicine Lingguizhugan decoction ameliorate HFD-induced hepatic-lipid deposition in mice by inhibiting STING-mediated inflammation in macrophages [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 7.
- [7] Han R T, Qiu H H, Zhong J, et al. Si Miao Formula attenuates non-alcoholic fatty liver disease by modulating hepatic lipid metabolism and gut microbiota [J]. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153544.
- [8] Deng G H, Zhao C C, Cai X, et al. Untargeted metabolomics and TLR4/NF- κ B signaling pathway analysis reveals potential mechanism of action of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1374158.
- [9] Liu Y L, Zhang Q Z, Wang Y R, et al. Astragaloside IV improves high-fat diet-induced hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease rats by regulating inflammatory factors level via TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 605064.
- [10] 乔会秀, 徐萍萍, 张望. 逍遥散合调脂方治疗非酒精性脂肪肝(肝郁脾虚型)的效果及对血清LPS、LEP、NSF-1的影响 [J]. *四川中医*, 2022, 40(4): 101-103.
Qiao H X, Xu P P, Zhang W. The effects and LPS, LEP and NSF-1 of Xiaoyao Powder and Tiaozhi Decoction on non-alcoholic fatty liver (Liver-Qi and spleen-deficiency type) [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2022, 40(4): 101-103.
- [11] 李文. 逍遥散联合辛伐他汀治疗非酒精性脂肪肝临床观察 [J]. *光明中医*, 2019, 34(14): 2213-2215.
Li W. Clinical observation of Xiaoyao San combined with simvastatin in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Guangm Med*, 2019, 34(14): 2213-2215.
- [12] 董璐, 曹雅静, 薛焕利, 等. 丹栀逍遥散对非酒精性脂肪性肝病大鼠LKB1/AMPK/ACC通路及肝脂肪变性的影响 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2022, 32(1): 44-48.
Dong L, Cao Y J, Xu H L, et al. Effects of Danzhi Xiaoyao Powder on LKB1/AMPK/ACC pathway and hepatic steatosis in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Int Tradit West Med Liver Dis*, 2022, 32(1): 44-48.
- [13] Kuut T A, Müller F, Csorba I, et al. Efficacy of cognitive-behavioral therapy targeting severe fatigue following coronavirus disease 2019: Results of a randomized controlled trial [J]. *Clin Infect Dis*, 2023, 77(5): 687-695.
- [14] van Herck M A, Vonghia L, Francque S M. Animal

- models of nonalcoholic fatty liver disease-a starter's guide [J]. *Nutrients*, 2017, 9(10): 1072.
- [15] Wang Z X, Wang M Y, Yang R X, et al. Ammonia scavenger restores liver and muscle injury in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis with sarcopenic obesity [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 808497.
- [16] Ding J, Lin J W, Li Q, et al. Optical coherent tomography to evaluate the degree of inflammation in a mouse model of colitis [J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2020, 10(5): 945-957.
- [17] Li Z Y, Wu G, Qiu C, et al. Mechanism and therapeutic strategy of hepatic *TM6SF2*-deficient non-alcoholic fatty liver diseases *via in vivo* and *in vitro* experiments [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(25): 2937-2954.
- [18] Hua D, Yang J, Meng Q H, et al. Soufeng Sanjie formula alleviates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting Th17 cell differentiation [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 39.
- [19] 严宝飞, 袁鹏, 刘圣金, 等. 黄芩汤对非酒精性脂肪肝大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 162-175.
Yan B F, Yuan P, Liu S J, et al. Effects of Huangqin Decoction on gut microbiota in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(1): 162-175.
- [20] 孟雅楠, 张玉伟, 张馨月, 等. 逍遥散调节非酒精性脂肪性肝炎模型大鼠肠道菌群的研究 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2023, 52(4): 517-524.
Meng Y N, Zhang Y W, Zhang X Y, et al. Study on regulation of intestinal flora in rats with nonalcoholic steatohepatitis by Xiaoyao Powder [J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2023, 52(4): 517-524.
- [21] 孟永丽, 马芳, 陈祖琨. 逍遥散穴位贴敷改善慢性乙型肝炎肝郁脾虚型患者疲乏的疗效观察 [J]. *云南中医药大学学报*, 2023, 46(5): 21-27.
Meng Y L, Ma F, Chen Z K. Observation on the application effect of acupoint sticking therapy with Xiaoyaosan in chronic hepatitis B fatigue patients with liver depression and spleen deficiency [J]. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med*, 2023, 46(5): 21-27.
- [22] Yan B F, Wang Y, Wang W B, et al. Huangqin decoction mitigates hepatic inflammation in high-fat diet-challenged rats by inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 115999.
- [23] Xiong T X, Zheng X, Zhang K, et al. Ganluyin ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by inhibiting the enteric-origin LPS/TLR4/NF- κ B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115001.
- [24] Li J Q, Wang X J, Wang Q H, et al. Galectin from *Trichinella spiralis* alleviates DSS-induced colitis in mice by regulating the intestinal microbiota [J]. *Vet Res*, 2024, 55(1): 3.
- [25] Zheng L J, Han Z W, Luo D S, et al. IL-6, IL-1 β and TNF- α regulation of the chondrocyte phenotype: A possible mechanism of haemophilic cartilage destruction [J]. *Hematology*, 2023, 28(1): 2179867.
- [26] Chen Z P, Huang H P, He X Y, et al. Early continuous blood purification affects TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in patients with severe acute pancreatitis *via* inhibiting TLR4 signaling pathway [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2022, 38(5): 479-485.
- [27] Beisner J, Filipe Rosa L, Kaden-Volynets V, et al. Prebiotic inulin and sodium butyrate attenuate obesity-induced intestinal barrier dysfunction by induction of antimicrobial peptides [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 678360.
- [28] He Z Y, Dong H. The roles of short-chain fatty acids derived from colonic bacteria fermentation of non-digestible carbohydrates and exogenous forms in ameliorating intestinal mucosal immunity of young ruminants [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1291846.
- [29] Liu W X, Luo X L, Tang J, et al. A bridge for short-chain fatty acids to affect inflammatory bowel disease, type 1 diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease positively: By changing gut barrier [J]. *Eur J Nutr*, 2021, 60(5): 2317-2330.
- [30] Chu Y N, Yu F C, Wu Y K, et al. Identification of genes and key pathways underlying the pathophysiological association between nonalcoholic fatty liver disease and atrial fibrillation [J]. *BMC Med Genomics*, 2022, 15(1): 150.
- [31] Spadoni I, Zagato E, Bertocchi A, et al. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria [J]. *Science*, 2015, 350(6262): 830-834.
- [32] Mouries J, Brescia P, Silvestri A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(6): 1216-1228.
- [33] Schnabl B, Brenner D A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1513-1524.
- [34] Fiaschini N, Mancuso M, Tanori M, et al. Liver steatosis and steatohepatitis alter bile acid receptors in brain and induce neuroinflammation: A contribution of circulating bile acids and blood-brain barrier [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14254.
- [35] Fang J, Yu C H, Li X J, et al. Gut dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis, diagnosis, and therapeutic implications [J]. *Front Cell Infect*

- Microbiol, 2022, 12: 997018.
- [36] Ling Z, Liu X, Cheng Y, et al. Gut microbiota and aging [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(13): 3509-3534.
- [37] Gagnon E, Mitchell P L, Manikpurage H D, et al. Impact of the gut microbiota and associated metabolites on cardiometabolic traits, chronic diseases and human longevity: A Mendelian randomization study [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 60.
- [38] Yuan S, Merino J, Larsson S C. Causal factors underlying diabetes risk informed by Mendelian randomisation analysis: Evidence, opportunities and challenges [J]. *Diabetologia*, 2023, 66(5): 800-812.
- [39] Tilg H, Adolph T E, Trauner M. Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(11): 1700-1718.
- [40] Behary J, Amorim N, Jiang X T, et al. Gut microbiota impact on the peripheral immune response in non-alcoholic fatty liver disease related hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 187.
- [41] Wang Y M, Fleishman J S, Li T D, et al. Pharmacological therapy of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease-driven hepatocellular carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 14: 1336216.

[责任编辑 兰新新]