

• 药理与临床 •

甘草总皂苷及水提物对肝损伤大鼠肠道菌群的影响

王 敬^{1,2}, 袁天杰¹, 陈乐天¹, 赵晓莉^{1,2,3}, 李俊松^{1,2,3}, 狄留庆^{1,2,3,4*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

3. 江苏省功效物质研究重点实验室, 江苏 南京 210023

4. 中药品质与效能研究国家重点实验室(培育), 江苏 南京 210023

摘要:目的 探讨甘草总皂苷及水提物对肝损伤大鼠肠道菌群的影响。方法 采用 ip 四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型, 模型大鼠分为 4 组, 分别 ig 给予甘草总皂苷和甘草水提物, 并以联苯双酯作为阳性对照组, 模型组 ig 生理盐水。同时设对照组, ig 给予生理盐水。于给药结束后, 测定各组大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平; 收集大鼠粪便, 通过 16 S rRNA 测序对各组大鼠肠道菌群的多样性进行分析。结果 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 ALT、AST 水平显著升高 ($P < 0.05$, 0.01); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 ALT、AST 水平均显著降低 ($P < 0.05$, 0.01); 与模型组比较, 联苯双酯组大鼠菌群结构未发生显著变化, 而甘草总皂苷组及甘草水提物组均表现出不同的群落组成。并且相对于水提物组, 总皂苷组显著提高了乳酸杆菌属和杆菌门 S24-7 科菌群的相对丰度。但甘草总皂苷组和甘草水提物组的大鼠肠道菌群与对照组大鼠肠道菌群之间仍存在差异, 并没有完全恢复到正常状态。结论 甘草总皂苷与甘草水提物均可以改善慢性肝损伤, 并对肝损伤大鼠肠道菌群发挥不同的调控作用。

关键词: 甘草总皂苷; 甘草水提物; 甘草酸; 肠道菌群; 肝损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)01-0101-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.015

Total saponins of *Glycyrrhiza inflata* and its decoction on intestinal flora in rats with liver injuryWANG Jing^{1,2}, YUAN Tian-jie¹, CHEN Le-tian¹, ZHAO Xiao-li^{1,2,3}, LI Jun-song^{1,2,3}, DI Liu-qing^{1,2,3,4}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Key Laboratory of Efficacy Materials Research, Nanjing 210023, China

4. State Key Laboratory of Quality and Efficacy of TCM (Cultivation), Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the effect of total saponins of *Glycyrrhiza inflata* and its decoction on intestinal flora in rats with liver injury. **Methods** Model of rats with liver injury was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride, which were randomly divided into four groups, including total saponins group (Sap group), water decoction group (Dec group), bifendate group (Bif group) and physiological saline group (NS group), then they were given drugs by oral admission. At the same time, a blank control was used (Control group), and the rats were given physiological saline by oral admission. Finally, the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum of each group of rats were measured; The rat feces were collected for 16 S rRNA sequencing of intestinal flora. **Results** Compared with the control group, the levels of ALT and AST in the serum of the model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of ALT and AST in the serum of the rats in each administration group were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the NS group, the intestinal flora in

收稿日期: 2019-06-18

基金项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18_1624)

作者简介: 王 敬, 女, 硕士研究生, 研究方向为生物药剂学。Tel: (025)85809273 E-mail: njzyydxwj@126.com

*通信作者 狄留庆, 男, 博士生导师, 教授。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing928@163.com

Bif group did not change significantly, while the Sap group and the Dec group showed different community composition. Total saponins significantly increased the relative abundance of *Lactobacillus* and Bacteroidales_S24-7 compared with water decoction. However, the intestinal flora of the Sap group and the Dec group were still different from the intestinal flora of the control group, and did not completely return to the normal state. **Conclusion** Total saponins of *G. inflata* and its decoction may play different roles in regulating the composition of intestinal flora in rats with liver injury, and then improve the pathological condition of liver injury.

Key words: total saponins of *Glycyrrhiza inflata*; decoction of *Glycyrrhiza inflata*; glycyrrhizic acid; intestinal flora; liver injury

肠道菌群是寄居于人体胃肠道的微生物的统称,参与人体代谢、免疫等多种生理作用,与宿主和环境之间保持动态平衡,维持宿主健康状态^[1-3]。近年来肠道菌群以及肠-肝轴受到广泛关注,研究发现肝脏疾病的发生发展与肠道菌群变化密切相关^[4-5]。肝损伤状态下,肠道菌群的组成、结构及功能发生改变,即发生菌群失调,而菌群失调又可进一步加重肝损伤进程^[6]。

甘草,别名“国老”,具有清热解毒、缓急止痛、调和诸药等功效^[7-11]。甘草在中药配伍中起着重要作用,应用极为广泛,大多以佐使形式配伍,起着缓和药性、调和诸药的作用。传统中药主要以口服为主,现已有研究表明,中药可以通过改变肠道菌群,进而改善人体的疾病状态,起到治疗作用。甘草主要含有三萜皂苷、黄酮及多糖类成分,其中三萜皂苷是甘草中主要活性成分。但甘草对于肝损伤状态下肠道菌群的影响一直未能阐明清楚,本实验在前期甘草酸对慢性肝损伤大鼠肠道菌群的改善作用研究^[12]的基础上,进一步探讨甘草总皂苷和甘草水提物对肝损伤大鼠肠道菌群的影响。通过将甘草酸、甘草总皂苷及甘草水提物对大鼠肠道菌群的影响作用进行比较分析,初步探索药物组成差异对肠道菌群构成的影响差异。为深入研究“药物-肠道菌群-疾病”之间的相互作用奠定基础,为临床上疾病的治疗提供新的靶点与思路。

1 材料

1.1 仪器

HY-45 气浴恒温生物摇床(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); Perkin Elmer Victor X3 多标记酶标仪(Bio-Rad 公司); BT25S 十万分之一天平(赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

甘草(产地甘肃,批号 20161201)购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学刘圣金副教授鉴定为豆科植物胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 的根茎;甘草总皂苷(总皂苷质量分数≥

40%,批号 FY35401126)购自南通飞宇生物科技有限公司;联苯双酯滴丸(批号 15100104,北京协和药厂);四氯化碳(CCl_4 ,分析纯)、橄榄油(药用级)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒均购自南京建成科技有限公司。

1.3 实验动物

雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,合格证号 201804216,许可证号 SCXK(苏)2017-0001,动物饲养条件:温度 20~22 °C,湿度(50±10)%,光照时间 12 h,自由饮水。

2 方法

2.1 供试药液的制备

2.1.1 甘草总皂苷溶液的制备 取甘草总皂苷适量,精密称定,加生理盐水超声混悬,制成 22.8 mg/mL 的甘草总皂苷溶液。经测定,甘草总皂苷中含甘草酸 220 mg/g。

2.1.2 甘草水提物制备 称取甘草 10 g,加水提取 2 次,第 1 次加入 10 倍量水提取 2 h,第 2 次加入 5 倍量水提取 1 h,合并药液,滤过,浓缩。临用时以生理盐水稀释至 30 mL,制成 0.33 g/mL 的甘草水提物溶液。经测定,甘草水提物中含甘草酸以生药计为 15 mg/g。

2.1.3 联苯双酯溶液的制备 取联苯双酯滴丸研细,取粉末适量,精密称定,加入生理盐水超声混悬,制成 0.225 mg/mL 的联苯双酯溶液。

2.2 动物分组、造模及给药

将大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 5 组,即对照组、模型组、甘草总皂苷组、甘草水提物组和阳性对照联苯双酯组,每组 5 只。对照组按 1 mL/kg ip 橄榄油溶液,其余各组大鼠 ip 同体积的 50% CCl_4 橄榄油溶液进行造模,诱导慢性肝损伤,造模第 1 周 ip 50% CCl_4 橄榄油溶液 3 次,以后每周 2 次,连续造模 13 周。于造模第 7 周起各组大鼠开始给药,对照组和模型组 ig 生理盐水 10 mL/kg;甘草总皂苷

组、甘草水提物组和联苯双酯组 ig 相应剂量药物，甘草总皂苷和甘草水提物的剂量分别为 0.228、3.3 g/kg（按甘草酸^[12]计，剂量相同），联苯双酯剂量为 2.25 mg/kg，每天给药 1 次，连续给药至造模第 13 周。

2.3 血清中生化指标的测定

至实验第 13 周结束时，大鼠禁食 12 h，眼眶静脉丛取血，离心制备血清，按照试剂盒操作说明测定血清中 ALT、AST 水平。

2.4 粪便样品收集及 16 S rRNA 测序

于末次给药后 24 h，收集各组大鼠粪便，置于 10 mL 干燥灭菌的离心管中，于 -80 °C 冰箱中保存待测。收集的大鼠粪便样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16 S rRNA 测序。粪便细菌基因组 DNA 提取后通过 PCR 扩增、扩增产物的纯化、上机测序和 NCBI 序列比对等步骤得到原始数据^[13-15]。

2.5 测序数据分析

通过生物信息云 i-sanger 平台对测序数据进行分析。基于群落组成信息，进行样本的 α 多样性 (α diversity) 分析和 β 多样性 (β diversity) 分析。 α 多样性包括 Shannon 指数和 Simpson 指数分析以及稀释曲线 (rarefaction curve) 分析，反映的是菌群丰富度和均匀度。其中 Shannon 指数与群落多样性呈正相关性，而 Simpson 指数与群落多样性呈负相关性。当稀释曲线趋向平坦时，说明取样的数量合理，足以说明物种的丰度。 β 多样性主要包括主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和样

本层级聚类分析 (hierarchical clustering tree)，反映的是不同样本和分组间微生物群落构成的差异^[16]。

2.6 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 Student-*t* 检验分析，多组间比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验分析。

3 结果

3.1 各组大鼠血清中 ALT、AST 水平比较

结果见图 1，造模 6 周后，与对照组相比，其余各组大鼠血清中 ALT、AST 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，表明大鼠慢性肝损伤模型已成功建立。实验第 13 周结束后（即给药 7 周结束后），与模型组相比，各给药组大鼠血清中 ALT、AST 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，表明甘草总皂苷、甘草水提物及联苯双酯均可降低 CCl₄ 诱导的肝损伤大鼠血清中 ALT、AST 的水平，起到保肝作用。

3.2 各组大鼠菌群分析

3.2.1 物种多样性分析 α 多样性分析结果见表 1 及图 2，从表 1 中可以看出，与对照组相比，模型组 Shannon 指数显著增加，Simpson 指数显著减小；而与模型组相比，各给药组 Shannon 指数增加，Simpson 指数减小，但差异均不显著。结果表明慢性肝损伤大鼠粪便菌群物种多样性会增加，而给药后粪便菌群群落物种多样性并不会降低。如图 2 所示，各样本稀释曲线均趋于平坦，表明本实验取样量合理且物种组成丰富度高。

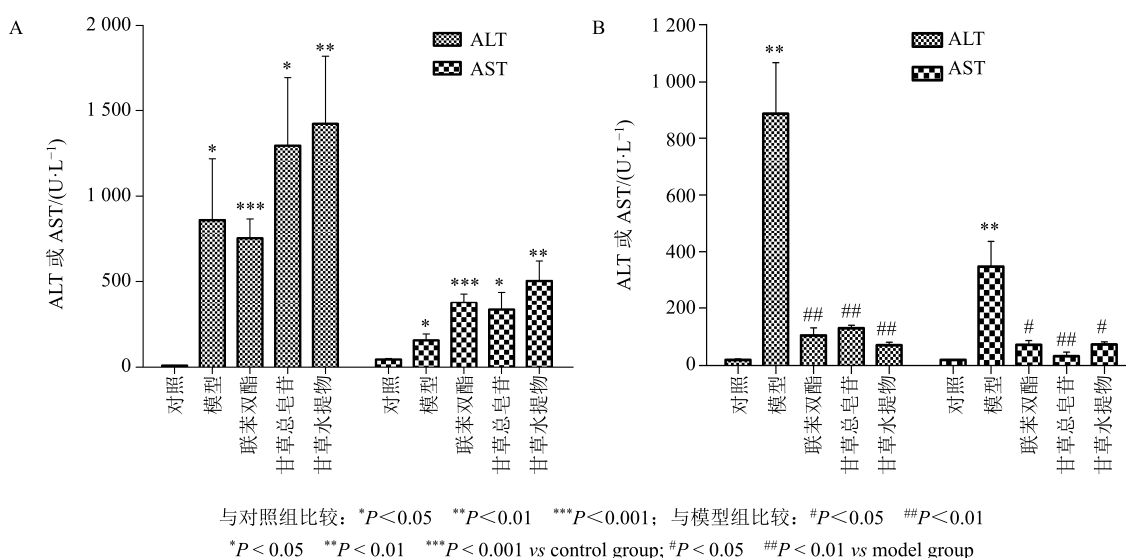


图 1 实验第 6 周 (A) 和第 13 周 (B) 各组大鼠血清中 ALT 和 AST 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Serum ALT and AST levels in rats at 6th (A) and 13th (B) week of experiment ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

表 1 各组大鼠肠道菌群 α 多样性指数分析 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 1 α diversity indices analysis of intestinal flora of each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	Shannon 指数	Simpson 指数
对照	4.128 $\pm$ 0.093	0.055 $\pm$ 0.004
模型	4.813 $\pm$ 0.146***	0.026 $\pm$ 0.005**
联苯双酯	4.920 $\pm$ 0.092***	0.022 $\pm$ 0.003***
甘草总皂苷	4.950 $\pm$ 0.103***	0.024 $\pm$ 0.004***
甘草水提物	4.921 $\pm$ 0.073***	0.019 $\pm$ 0.001***

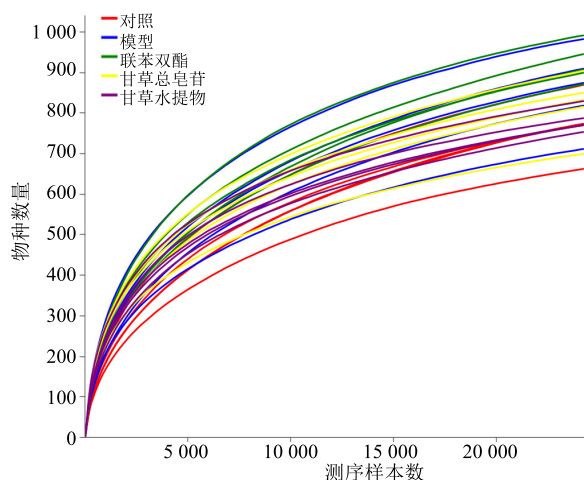
与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

图 2 各样本稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curve of different groups

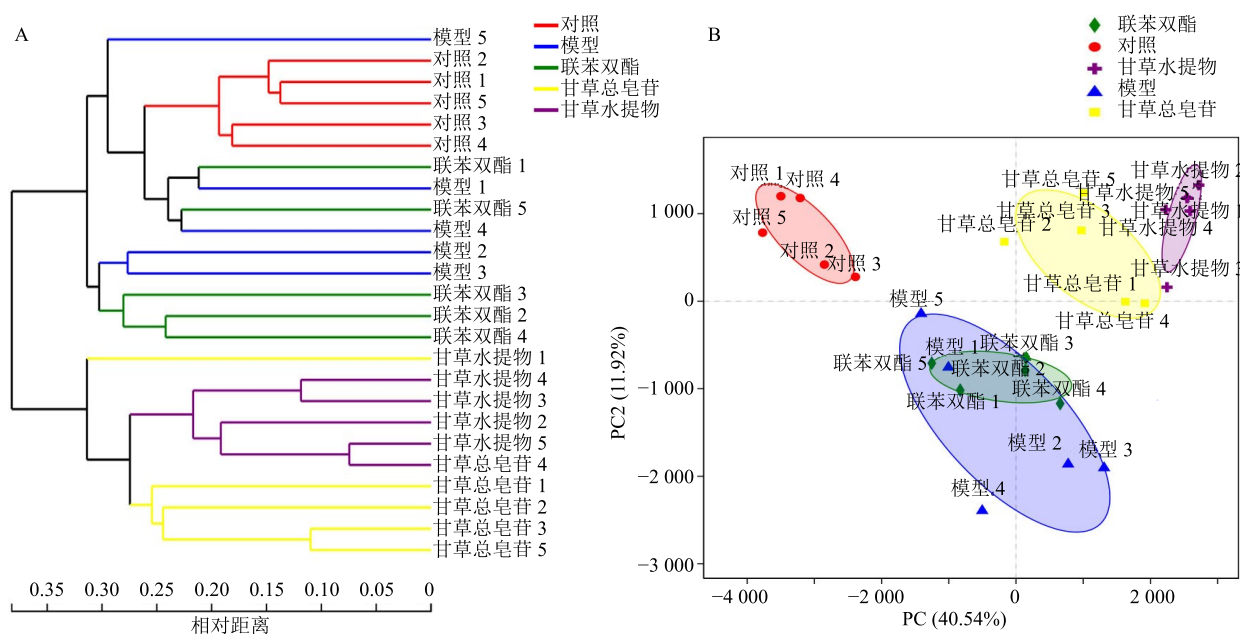


图 3 样本层级聚类分析 (A) 和 PCA (B)

Fig. 3 Hierarchical clustering tree (A) and PCA (B) on OTU level

β 多样性表示的是微生物群落构成的比较, 评估微生物群落间的差异。 β 多样性主要包括样本层级聚类分析 (图 3-A) 和 PCA (图 3-B), 图中两样品距离越近, 表示物种组成越相似。实验结果表明, 模型组大鼠肠道菌群组成结构较对照组大鼠发生显著变化, 阳性药组大鼠肠道菌群与模型组比较接近, 而甘草总皂苷组和甘草水提物组大鼠肠道菌群发生显著变化, 偏离模型组, 但并未接近对照组, 且甘草总皂苷组与甘草水提物组之间的大鼠肠道菌群组成与结构也存在一定距离。上述结果说明慢性肝损伤可导致大鼠肠道菌群组成及结构发生变化, 即菌群失调; 甘草总皂苷及甘草水提物均可改变慢性肝损伤大鼠肠道菌群的组成及多样性, 且两者对肠道菌群产生的影响存在差异性。而联苯双酯虽然也可改善肝损伤, 但并未对大鼠肠道菌群组成、结构产生影响。前期研究发现, 甘草酸可改善慢性肝损伤大鼠肠道菌群失调, 使得慢性肝损伤大鼠肠道菌群组成结构恢复正常状态。综合研究结果表明, 不同物质、不同成分对大鼠肠道菌群的影响是存在差异的。

3.2.2 群落组成分析 在不同分类水平上对各样本的物种丰度进行统计, 分析群落组成。结果显示, 在门分类水平上 (图 4), 各组大鼠粪便菌群主要由厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门

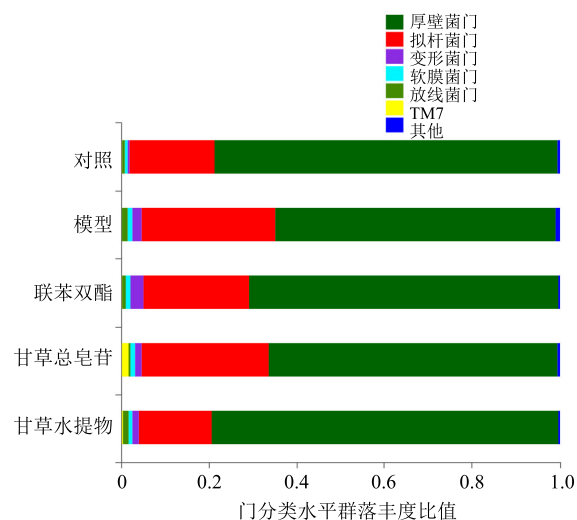


图 4 门分类水平肠道群落的组成与丰度
Fig. 4 Distribution and abundance of intestinal microflora on phylum level in different groups

(Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和软膜菌门 (Tenericutes) 组成, 其中以厚壁菌门比例最大。将不同分类水平上的群落组成进行差异比较分析, 具有显著性差异的菌群如图 5 所示。由图 5 可见, 与模型组相比, 在门分类水平上 (图 5), 甘草总皂苷菌群中放线菌门丰度显著减少, 甘草水提物组菌群中厚壁菌门丰度显著增加, 拟杆菌门丰度显著减少, 而联苯双酯组菌群均未有显著性变化。在科分类水平上 (图 5), 甘草水提物组群落组成中毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 显著增加, S24-7 科 (Bacteroidales_S24-7) 和乳杆菌科 (Lactobacillaceae) 比例显著减少, 而在联苯双酯组和甘草总皂苷菌群中这 3 科菌均未有显著性差异。在属分类水平上 (图 5), 甘草水提物组菌群中毛螺菌科菌属 (norank_f_Lachnospiraceae) 丰度显著增加, 而拟杆菌门 S24-7 科菌群 (norank_f_Bacteroidales_S24-7_group) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 丰度显著减少, 在甘草总皂苷组和联苯双酯组均不存在显著性变化。

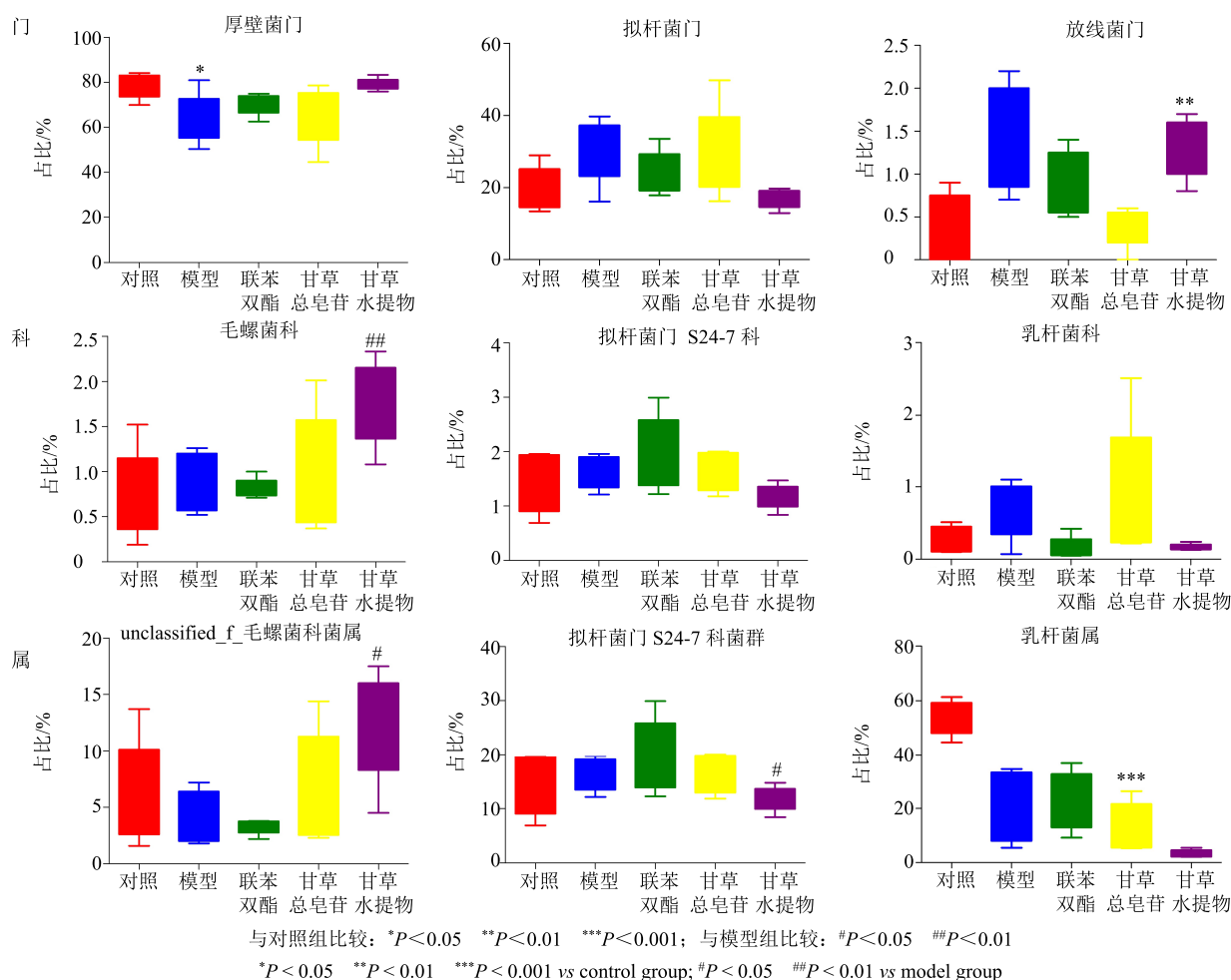
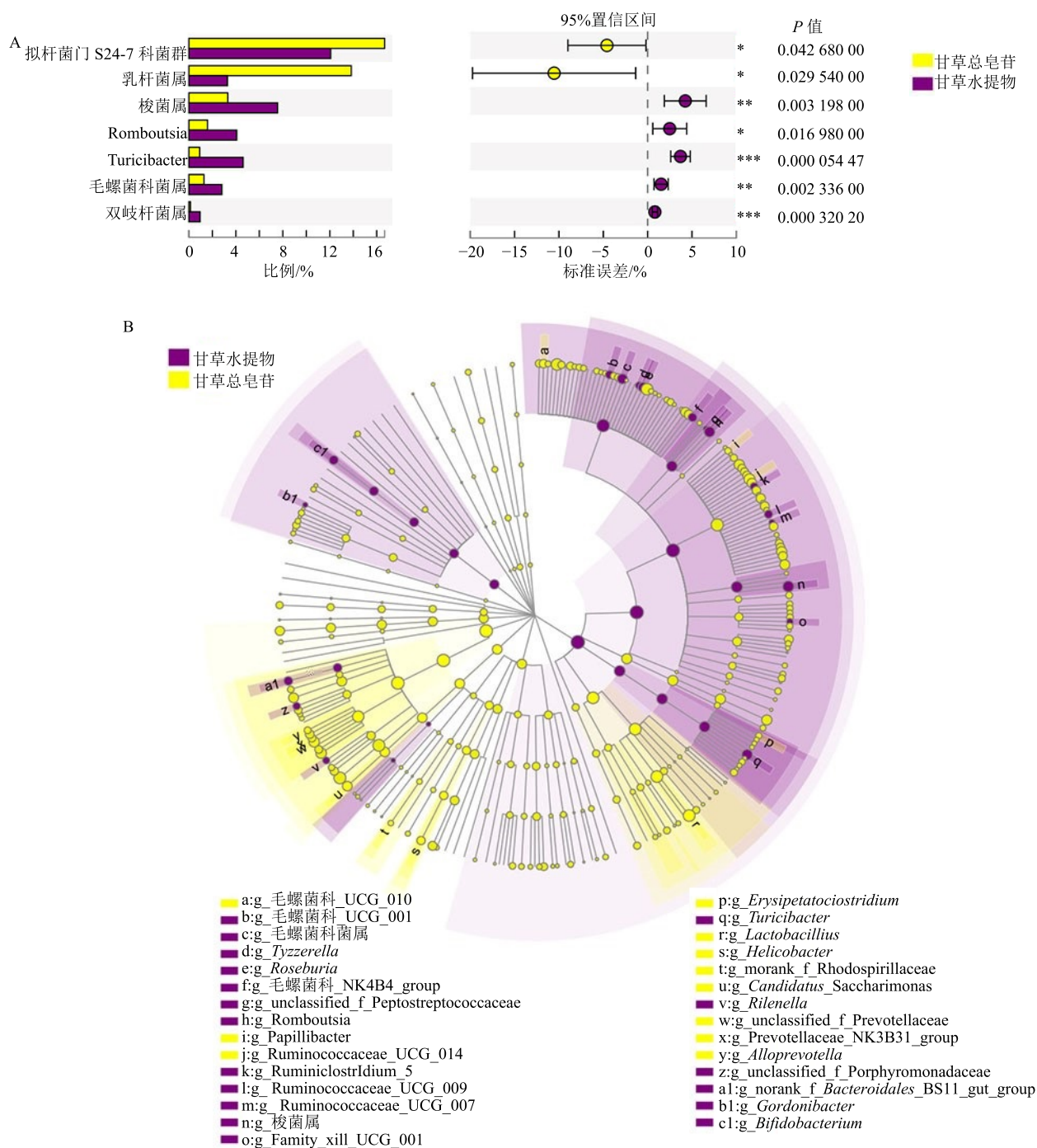
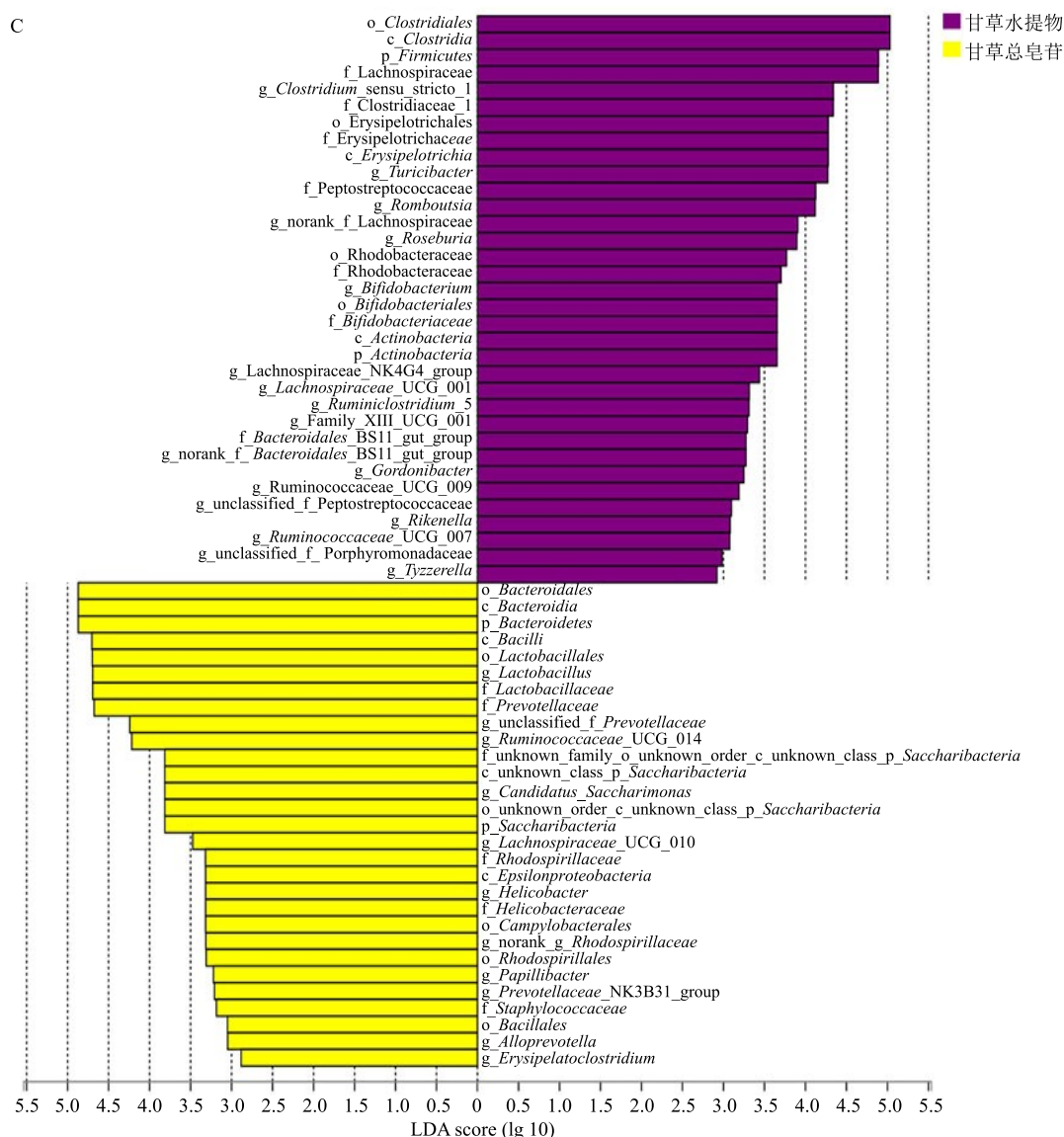


图 5 不同分类水平肠道群落的丰度比较
Fig. 5 Abundance of intestinal flora on different classification levels in each group

3.2.3 甘草总皂苷与甘草水提物两组间菌群物种差异分析 甘草总皂苷与水提物都表现出对肠道菌群的调控作用, 进一步对甘草总皂苷组和水提物组之间菌群物种丰度进行比较分析, 结果表明, 甘草总皂苷和甘草水提物对大鼠肠道菌群的影响存在显著差异。如图 6-A 所示, 在属分类水平上, 与水提物组相比, 总皂苷组中拟杆菌门 S24-7 科菌群、乳杆菌属细菌丰度显著增加, 而毛螺菌科菌群和梭菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*) 细菌丰度均显著减

少。此外, 采用 LEfSe 多级物种差异判别分析 (图 6-B) 及 LDA 线性判别分析 (图 6-C) 比较 2 组大鼠肠道菌群中具有显著丰度差异的细菌发现, 甘草总皂苷组中乳杆菌属为优势菌, 而甘草水提物组大鼠肠道菌群中占主导地位的是毛螺菌科和梭菌属的菌群。与水提物组相比, 总皂苷组可以提高益生菌的相对比例, 特别是乳酸杆菌属的比例。与前期研究结果进行比较发现, 甘草总皂苷的作用与甘草酸的菌群调控作用更为接近。





A-组间物种差异比较分析 B-LEfSe 多级物种差异判别分析 C-LDA 判别
A-comparison of abundant taxa at the bacterial genus levels between Sap and Dec groups B-LEfSe prediction C-LDA scores

图 6 甘草总皂苷和甘草水提物对肠道菌群影响的差异性比较

Fig. 6 Difference comparison of effect of total saponin and decoction of *G. inflata* on intestinal flora of rats

4 讨论

本研究将不同给药组与肝损伤模型大鼠肠道菌群多样性进行比较分析,研究不同药物对大鼠肠道菌群的影响。实验结果发现,联苯双酯组的肠道菌群与模型组大鼠肠道菌群组成结构相似,表明联苯双酯虽能显著改善肝损伤的指标,但其未参与改善肠道菌群的作用。甘草总皂苷组和甘草水提物组大鼠肠道菌群与模型组均表现出不同的菌群结构组成,其中总皂苷组中毛螺菌科、拟杆菌门 S24-7 科和乳杆菌科菌群均发生显著变化。有研究表明^[1],

这些细菌可能是控制肠道炎症的核心菌群,因其可产生短链脂肪酸、清除自由基,提示肝损伤下肠道菌群失调与肠道炎症有关,这与 Acharya 等^[5]报道肝硬化下肠道菌群失调可导致肠道或全身炎症的结果一致,该结果同时也揭示了“肠-肝轴”在肝脏疾病中发挥的重要作用。研究发现,甘草酸、甘草总皂苷以及甘草水提物对大鼠肠道菌群的作用存在差异,这说明成分与成分之间、成分与肠道菌群之间、菌群与菌群之间相互作用的不同都可能导致菌群种类及丰度存在差异,进而影响疾病发展进程。本研

究基于“药物-肠道菌群-疾病”之间的联系,初步探讨了甘草有效成分、有效组分以及多成分对肠道菌群影响的差异,为临床相关疾病的治疗以及创新药物的研发提供了新的靶点与思路。

参考文献

- [1] Burrello C, Garavaglia F, Cribiù F M, *et al.* Therapeutic faecal microbiota transplantation controls intestinal inflammation through IL10 secretion by immune cells [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5184-5200.
- [2] Fadlallah J, Sterlin D, Fieschi C, *et al.* Synergistic convergence of microbiota-specific systemic IgG and secretory IgA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, doi: 10.1016/j.jaci.2018.09.036.
- [3] Kuntal B K, Chandrakar P, Sadhu S, *et al.* ‘NetShift’: A methodology for understanding ‘driver microbes’ from healthy and disease microbiome datasets [J]. *ISME J*, 2019, 13(2): 442-454.
- [4] 吴夏飞, 连娜琦, 郑仕中, 等. 肠道菌群对慢性肝脏疾病影响的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(12): 1644-1647.
- [5] Acharya C, Bajaj J S. Altered microbiome in patients with cirrhosis and complications [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(2): 307-321.
- [6] 王敬, 袁天杰, 狄留庆, 等. 肠道菌群与慢性肝脏疾病相关性的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(12): 2312-2317.
- [7] 张泽生, 崔翠翠, 孙宇. 甘草酸对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 食品科技, 2009, 34(5): 225-227.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] 彭燕, 谭晓斌, 贾晓斌. 甘草总皂苷及甘草酸对Caco-2细胞P-gp功能和表达的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(9): 1846-1851.
- [10] 曹玉洁, 唐于平, 沈娟, 等. 基于数据挖掘分析甘草药对配伍应用规律 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4552-4559.
- [11] 李志华, 颜苗, 张毕奎, 等. 基于药动学的甘草配伍减毒机制研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3611-3616.
- [12] Yuan T, Wang J, Di L, *et al.* Glycyrrhizic acid improving the liver protective effect by restoring the composition of *Lactobacillus* [J]. *J Funct Foods*, 2019, 52: 219-227.
- [13] Kindt A, Liebisch G, Clavel T, *et al.* The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3760-3774.
- [14] Stevenson T J, Buck C L, Duddleston K N. Temporal dynamics of the cecal gut microbiota of juvenile arctic ground squirrels: A strong litter effect across the first active season [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(14): 4260-4268.
- [15] Zhou Y, Zheng T, Chen H, *et al.* Microbial intervention as a novel target in treatment of non-alcoholic fatty liver disease progression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(5): 2123-2135.
- [16] 徐鹏程, 栾英桥, 张丹, 等. 甘草水提取物对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(2): 228-232.