

黄芩汤对非酒精性脂肪肝大鼠肠道菌群的影响

严宝飞^{1,2}, 袁 鹏², 刘圣金², 刘 嘉^{1*}, 段金康², 毛艺蓓¹, 凌旭恒¹

1. 江苏卫生健康职业学院, 江苏 南京 211800

2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 研究黄芩汤对非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 大鼠肠道菌群的影响。方法 将大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药 (多烯磷脂胆碱, 8 mg/kg) 组及黄芩汤低、高剂量 (5、20 g/kg) 组, 采用高脂饮食饲喂 9 周造模。ig 给药 5 周后, 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血脂和肝功能相关指标; 采用 HE 染色法分析各组大鼠肝脏组织病理变化; 采用 16S rRNA 测序技术分析各组大鼠肠道菌群变化。结果 与模型组比较, 黄芩汤低、高剂量组大鼠体质量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血脂指标总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和转氨酶指标丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST) 明显降低 ($P < 0.01$), 血脂指标高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 明显升高 ($P < 0.01$), 肝细胞脂肪变性与气球样变得到纠正, 炎细胞浸润减少。16S rRNA 测序结果显示, 模型组大鼠肠道菌群较空白组发生变化; 黄芩汤低、高剂量组大鼠肠道菌群较模型组 sobs、heip 和 Shannon 指数明显提升 ($P < 0.05$ 、 0.01); 在门和属水平上, 黄芩汤高剂量组大鼠肠道菌群较模型组 unclassified-f-Lachnospiraceae、布劳特氏菌属 *Blautia*、*Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 丰度明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 放线菌门 (Actinobacteria)、乳杆菌属 *Lactobacillus* 和双歧杆菌属 *Bifidobacterium* 丰度明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。黄芩汤高剂量组较模型组明显上调京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 和直系同源簇 (clusters of orthologous groups, COG) 富集的功能水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 黄芩汤可能通过改善 NAFLD 大鼠肠道菌群失调发挥对 NAFLD 的治疗作用。

关键词: 黄芩汤; 非酒精性脂肪肝; 16S rRNA; 肠道菌群; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 芍药苷; 甘草苷; 甘草酸

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)01-0162-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.020

Effects of Huangqin Decoction on gut microbiota in rats with nonalcoholic fatty liver disease

YAN Bao-fei^{1,2}, YUAN Peng², LIU Sheng-jin², LIU Jia¹, DUAN Jin-ao², MAO Yi-bei¹, LING Xu-heng¹

1. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, and Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Huangqin Decoction (黄芩汤) on gut microbiota in rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** The rats were randomly divided into blank group, model group, positive drug group (polyene lecithin choline, 8 mg/kg), low-dose (5 g/kg) and high-dose (20 g/kg) Huangqin Decoction group, and the rats were fed with high-fat diet for nine weeks to establish the NAFLD model. After five weeks of oral administration, the plasma lipids and liver function indexes were detected by fully automatic biochemical analyzer, the pathological changes of liver tissues were analyzed by HE staining and the

收稿日期: 2021-09-18

基金项目: 江苏省高校“青蓝工程”优秀教学团队培养对象 (苏教师 [2020]42 号); 江苏省中医药科技发展计划项目 (YB2020100); 江苏卫生健康职业学院校级课题重点项目 (JKB202003)

作者简介: 严宝飞, 男, 江苏淮安人, 硕士, 助教, 主要从事中药资源学研究。Tel: (025)68172750 E-mail: baofei@163.com

*通信作者: 刘 嘉, 男, 江苏南京人, 硕士, 副教授, 主要从事中药资源学研究。Tel: (025)68172750 E-mail: liujia402@163.com

changes of gut microbiota in rats were analyzed by 16S rRNA sequencing. **Results** Compared with the model group, the weight of rats of low-dose and high-dose Huangqin Decoction group were significantly lower ($P < 0.05, 0.01$), the level of total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were significantly reduced ($P < 0.01$), the level of HDL-C was elevated remarkably ($P < 0.01$), the steatosis and ballooning degeneration of hepatocyte in liver tissues were corrected, and the inflammatory cell infiltration was decreased. 16S rRNA results showed that compared with the blank group, the gut microbiota in model group were changed; compared with the model group, the sobs, heip and Shannon indices of the gut microbiota in rats of low-dose and high-dose Huangqin Decoction group were significantly higher ($P < 0.05, 0.01$), the abundance of unclassified-f-Lachnospiraceae, *Blautia*, *Eubacterium coprostanoligenes* group and *Ruminococcus* in rats of high-dose Huangqin Decoction group increased significantly ($P < 0.05, 0.01$), the abundance of Actinobacteria, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in rats of high-dose Huangqin Decoction group decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$). The functional level of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and clusters of orthologous groups (COG) enrichment related to gut microbiota in rats of high-dose Huangqin Decoction group elevated significantly ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Huangqin Decoction might play a role in the treatment of NAFLD by regulating gut microbiota of rats with NAFLD.

Key words: Huangqin Decoction; nonalcoholic fatty liver disease; 16S rRNA; gut microbiota; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; paeoniflorin; liquiritin; glycyrrhizic acid

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是全球范围内最常见的慢性肝病, 其通常被认为是代谢综合征的肝脏表现, 与诸多代谢性疾病的危险因素如肥胖、血脂异常、高血压和 2 型糖尿病等密切相关^[1]。随着各类代谢综合征的全球化, NAFLD 的患病率也随之升高, 已达 25% 左右^[2]。除可直接进展为肝炎、肝硬化和肝细胞癌, NAFLD 亦与心血管疾病及慢性肾脏疾病的高发病率有关^[3-4]。为此, NAFLD 已严重威胁人类健康。肝脏和肠道通过胆道、门静脉和体循环广泛联系形成“肝-肠轴”, 肝脏可以受来自肠道菌群及其代谢产物、环境毒素和食物抗原等多种信号的调控^[5]。长期研究表明, 肠道菌群能够在调节宿主免疫与内分泌功能、传递神经信号及药物作用和代谢等诸多方面发挥重要作用。健康的肠道菌群有助于调节人类宿主的代谢尤其是肝脏等重要代谢器官的功能^[6]。当肠道菌群异常时, 则可能导致机体免疫状态改变和促进 NAFLD 等各种肝脏疾病的发生发展^[7]。因此, 肠道菌群可能成为 NAFLD 的潜在治疗靶点。

黄芩汤为我国疗效确切的经方之一, 最早出自张仲景的《伤寒论》, 在中医临床应用中已有 1800 余年, 有“万世治痢之祖剂”“温病第一汤”之美称^[8]。该方由黄芩、白芍、炙甘草和大枣组成, 4 药合用共奏清热治利、和中止痛之功效, 治烦热下利、腹挛痛而急迫者^[9]。黄芩汤及其药味组成中含有丰富的黄酮类、三萜类及单萜类等药效物质, 可通过多种途径, 作用于多种靶点, 具有保肝、调脂、降糖、抗炎、免疫调节、抗氧化等功效^[10]。诸多证据显示, 黄芩汤及其药味组成对于 2 型糖尿病等代谢性疾

病, 肝癌、肝损伤等肝脏疾病和炎性肠道疾病具有良好的治疗效果, 但目前尚无关于黄芩汤对 NAFLD 治疗作用的直接报道^[8,11-12]。基于此, 本研究首次以 NAFLD 大鼠模型为研究对象, 研究黄芩汤对 NAFLD 的治疗作用, 并基于肠道菌群角度初步探讨其治疗机制, 以期为黄芩汤治疗 NAFLD 提供有益思路。

1 材料

1.1 动物

33 只 SPF 级 SD 雄性大鼠由杭州医学院提供, 体质量 (220±20) g, 生产许可证号 SCXK (浙) 2019-0002。本次动物实验经江苏卫生健康职业学院 [实验动物使用许可证编号为 SYXK (苏) 2020-0001] 实验动物伦理委员会批准 (批准编号 JHVC-IACUC-2021-B003), 符合实验动物福利与伦理原则。

1.2 药物及试剂

黄芩 (批号 20210322)、白芍 (批号 20210106)、炙甘草 (批号 20210116) 和大枣 (批号 20210223) 饮片均购自江苏省中医院, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为正品, 符合《中国药典》2020 年版标准, 凭证标本存放在江苏卫生健康职业学院中心实验室。多烯磷脂胆碱 (批号 210315) 购自 Sanofi (北京) 公司; 4% 多聚甲醛 (批号 BL539A) 购自 Biosharp 公司; 苏木素-伊红 (HE, 批号 BP-DL001) 购自南京森贝伽生物公司; 普通饲料、高脂饲料 (88% 普通饲料、2% 胆固醇、10% 猪油), 均购自江苏协同医药生物公司; E.Z.N.A.® DNA 抽提、AxyPrep DNA 凝胶回收、NEXTFLEX® DNA 快速测序试剂盒, 均由上海美吉生物公司提供。

1.3 仪器与设备

Multiskan MK3 型酶联免疫检测仪, 美国 Thermo 公司; Hitachi7170A 型全自动生化分析仪, 日本日立公司; BX53 型生物显微镜, 日本 Olympus 公司; RM2235 型病理切片机, 德国 Leica 公司; DYY-6C 型核酸电泳仪、ND2000 型光度计、9700 型 PCR 仪、Quantus™ 型高灵敏荧光计、Miseq PE300 测序平台, 均由美吉生物公司提供。

2 方法

2.1 黄芩汤制备

黄芩汤由黄芩、白芍、炙甘草和大枣按 3:2:2:2 配伍组成, 称取药材后加入 10 倍体积水浸泡 1 h 后煎煮, 煎煮 1 h 滤过, 随后滤渣加入 8 倍体积水继续煎煮 1 h, 合并 2 次滤液并浓缩^[13], 最后得到生药量为 1.0 g/mL 黄芩汤药液, 保存于 4 °C 环境中备用。采用液相色谱质谱联用法 (UPLC-TQ-MS) 对上述黄芩汤药液中主要成分进行定量分析, 结果显示其中主要成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、芍药苷、甘草苷、甘草酸质量分数分别为 5.07%、0.55%、0.77%、0.08%、0.81%、0.04%、0.21%。

2.2 大鼠 NAFLD 模型的建立及分组

33 只 SD 雄性大鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为空白组 (6 只) 和高脂饮食组 (27 只)。空白组以普通饲料喂养, 高脂饮食组以高脂饲料饲喂 9 周造模。9 周后随机处死 3 只高脂饮食组大鼠取肝脏进行病理学检查, 确认 NAFLD 是否造模成功, 将余下 24 只按每组 6 只随机分为模型组 (生理盐水)、阳性药组 (多烯磷脂胆碱) 组、黄芩汤低剂量和高剂量组。每天 ig 给药 1 次, 其中空白组和模型组给予等量生理盐水, 阳性药组给予多烯磷脂胆碱 8 mg/kg, 黄芩汤低、高剂量组给予黄芩汤药液 5、20 g/kg^[14]。给药 5 周, 每周称体质量 1 次。

2.3 动物处死与取材

末次给药后禁食 12 h 采用二氧化碳吸入法处死, 处死方法符合实验动物福利伦理要求, 具体方法: 将大鼠至于安乐死箱内, 充入 100% 二氧化碳, 二氧化碳置换率为每分钟 10%~30% 箱内体积; 随后抗凝管采集血液, 液氮速冻结肠内容物, 4% 多聚甲醛固定保留肝脏组织。

2.4 肝组织病理学检查

取固定后各组大鼠肝脏使用梯度浓度乙醇及二甲苯脱水, 石蜡包埋, 储存备用。将肝组织蜡块切片并脱蜡, 根据说明书进行 HE 染色, 随后置于显

微镜下观察并拍照。

2.5 生化指标检测

将各组大鼠抗凝全血分离血浆 (3000 r/min), 采用全自动生化分析仪检测肝功能指标丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST) 和血脂指标总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平。

2.6 结肠内容物 DNA 抽提和 PCR 扩增

按照 DNA 抽提试剂盒说明书抽提各组大鼠结肠内容物肠道菌群总 DNA 并检测其提取质量 (凝胶电泳), 随后对 DNA 进行定量 (紫外分光光度法)。基于 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') - 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增, 扩增程序: 95 °C 预变性 3 min, 27 个循环 (95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 然后 72 °C 稳定延伸 10 min, 最后在 4 °C 进行保存; 反应体系: 5×TransStart FastPfu 缓冲液 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 上游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL, 模板 DNA 10 ng, 补足至 20 μL, 每个样本 3 个重复^[15]。

2.7 结肠内容物 Illumina Miseq 测序

按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书纯化回收的 PCR 产物并检测 (凝胶电泳), 随后对回收产物进行定量 (荧光法)。按照 DNA 快速测序试剂盒说明书进行建库, 基于 Illumina Miseq PE300 平台进行测序, 得到原始测序序列。将上述序列导入 Trimmomatic 质控以及 Flash 软件 (v1.2.11) 拼接, 实现序列优化, 质控及拼接参数与文献报道一致^[15]。

2.8 数据处理与分析

基于 97% 相似度, 运用美吉生物生信云 (<https://cloud.majorbio.com/>) 将处理后的序列归为多个无嵌合体操作分类单元 (operational taxonomic unit, OUT); 利用美吉生信云 Uparse 软件 (v7.0.1090) 进行 OUT 分析、Pan/Core 物种分析、Alpha 多样性分析、稀释曲线分析和 Rank-Abundance 曲线分析; 利用美吉生信云 tax_summary_a 文件夹中的数据表进行群落组成分析; 利用美吉生信云 Qiime 软件

(v1.9.1)和R软件(v3.3.1)进行主成分分析(principal component analysis, PCA);利用美吉生信云R软件(v3.3.1)和Python软件(v3.9)进行组间差异显著性检验;利用美吉生信云进行线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis Effect Size, LEfSe)多级物种差异判别分析;利用美吉生信云R软件(v3.3.1)进行Pearson相关系数分析;利用美吉生信云PICRUST软件(v1.1.0)进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和直系同源簇(clusters of orthologous groups, COG)功能富集分析。

本实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用统计学软件(SPSS 21.0)处理数据,多组均数间采用One-Way ANOVA(单因素方差)分析,以 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠体质量的变化

如图1所示,给药前,模型组、阳性药组、黄芩汤低剂量和高剂量组大鼠体质量差异不大,但与空白组有明显差异($P < 0.01$)。给药后,每组大鼠体质量均有增长,相较于模型组,阳性药(多烯磷脂胆碱)组、黄芩汤低剂量和高剂量组大鼠体质量增长不明显($P < 0.05$ 、 0.01),说明多烯磷脂胆碱和黄芩汤具有控制NAFLD大鼠体质量增长的作用。

3.2 大鼠血脂和转氨酶指标变化情况

如图2所示,相较于空白组,模型组大鼠血脂指标TC、TG、LDL-C和转氨酶指标ALT、AST明

显升高($P < 0.01$),血脂指标HDL-C明显降低($P < 0.01$),说明大鼠NAFLD模型建立成功。相较于模型组,阳性药组、黄芩汤低剂量和高剂量组大鼠血脂指标TC、TG、LDL-C和转氨酶指标ALT、AST明显降低($P < 0.01$),血脂指标HDL-C明显升高($P < 0.01$),说明多烯磷脂胆碱和黄芩汤对NAFLD大鼠都具有调脂和保肝作用。

3.3 大鼠肝脏组织病理学分析

如图3所示,空白组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞形态正常,大小均一,呈放射状排列整齐,细胞核位于胞体中央;模型组大鼠肝小叶结构破坏,肝细胞出现重度脂肪变性,细胞肿胀并出现气球样变,伴炎细胞浸润;阳性药组、黄芩汤高剂量组大鼠肝细胞气球样变被明显纠正,炎性浸润降低,肝小叶结构大致恢复,肝细胞排列呈整齐放射状;黄芩汤低剂量组肝细胞脂肪变性较模型组略有纠正,病变程度减低,以上说明多烯磷脂胆碱和黄芩汤可改善NAFLD大鼠肝脏组织的脂肪变性、炎细胞浸润和气球样变性而发挥治疗作用。

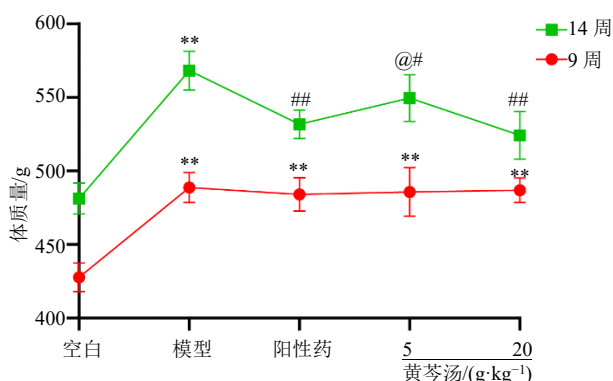
3.4 各组大鼠肠道菌群物种注释与评估

各组大鼠肠道菌群优化后序列数目为2 011 100,碱基数目为834 790 362,平均长度为415 bp,序列长度分布在400~440 bp内,符合16S rRNA(V3~V4)要求,可知后续分析较为可靠。

如图4-A所示,Rank-Abundance曲线可解释物种丰富度和群落均匀度,本研究各组在横轴上的范围较大且平缓下降,表明各组大鼠肠道菌群物种丰富度高和物种分布均匀。如图4-B、C所示,Pan物种分析可解释样本包含的物种总和,Core物种分析可解释所有样本共享物种数目,本研究各组总数目和共享项目增加或减少趋势均逐步减缓并趋于平坦,表明各组样本量满足评估物种丰富度和核心物种数的要求。如图4-D所示,Shannon曲线可反映微生物群落多样性,其值与群落多样性呈正相关,本研究各组曲线趋于平坦,表明各组数据量满足测序要求,各组样本微生物多样性信息可得到较为全面地反映。

3.5 各组大鼠肠道菌群Alpha多样性分析

如图5-A所示,sobs指数可解释微生物群落丰富度,相较于空白组,模型组sobs指数显著降低($P < 0.01$),说明NAFLD大鼠肠道菌群丰富度显著下降;相较于模型组,阳性药组和黄芩汤低、高剂量组sobs指数显著升高($P < 0.05$ 、 0.01),说明多烯磷脂胆碱



与空白组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$;

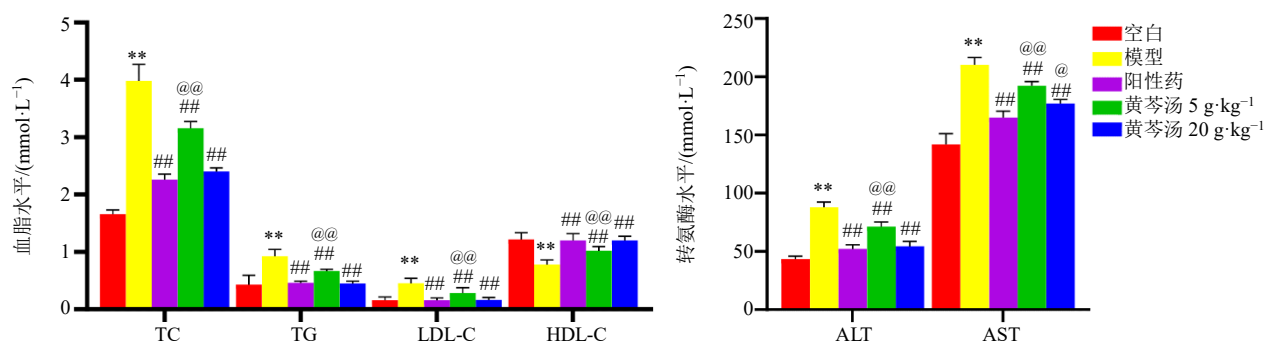
与阳性药组比较: @ $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs blank group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group;

@ $P < 0.05$ vs positive medicine group

图1 各组大鼠体质量变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Weight changes of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与空白组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与阳性药组比较: @ $P < 0.05$ @@ $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs blank group; ## $P < 0.01$ vs model group; @ $P < 0.05$ @@ $P < 0.01$ vs positive medicine group

图 2 各组大鼠血脂和转氨酶指标变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Changes of plasma lipids and transaminases of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

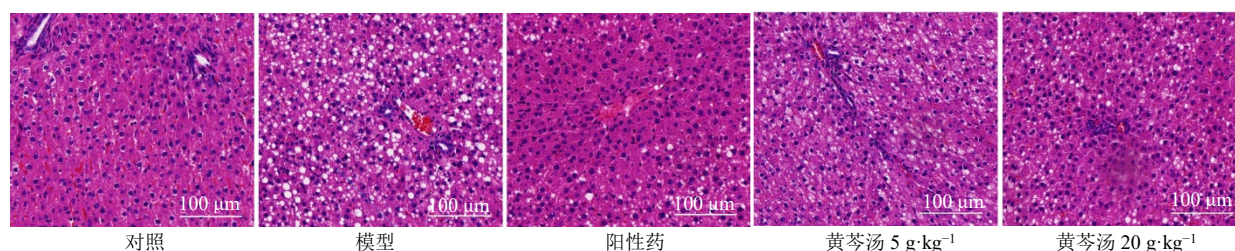


图 3 各组大鼠肝脏组织病理改变 (×200)

Fig. 3 Pathological changes of liver tissue of rats in each group (×200)

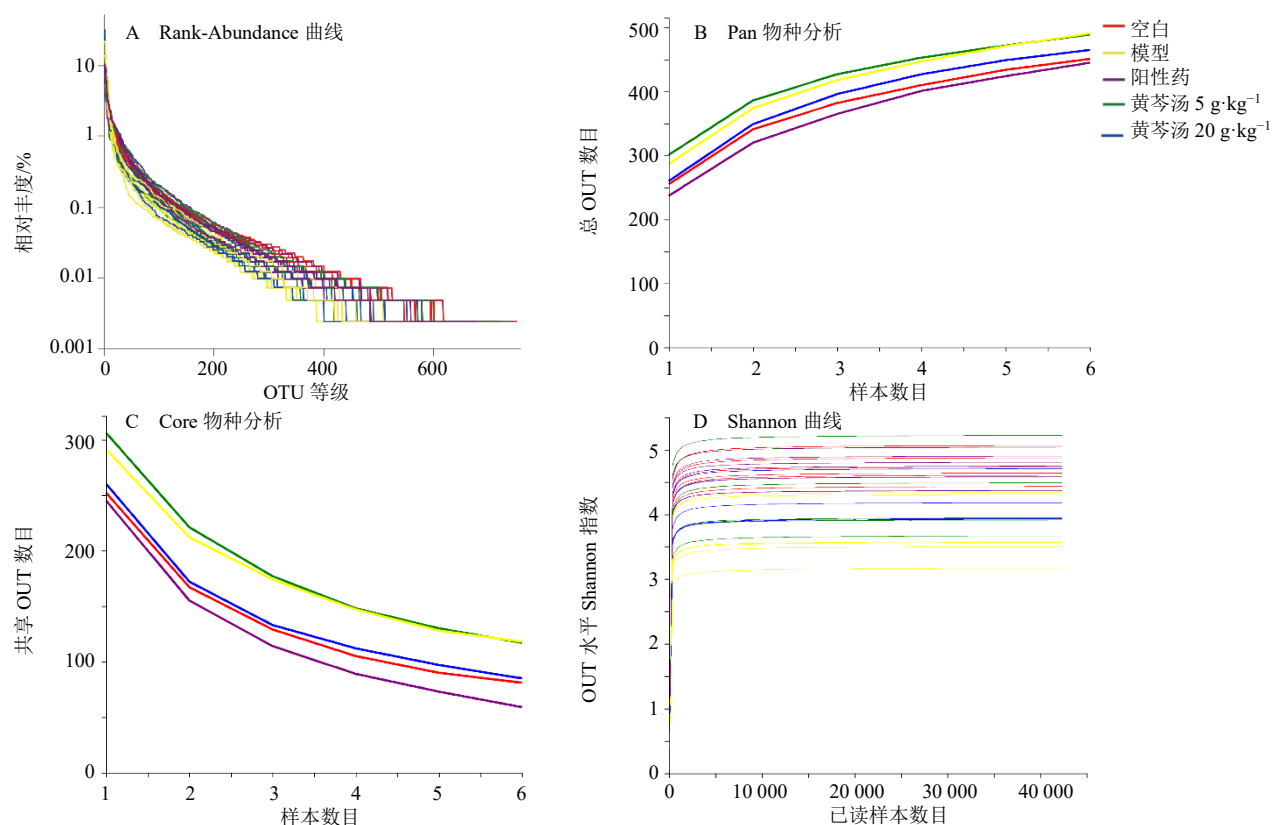


图 4 各组大鼠肠道菌群物种注释与评估

Fig. 4 Annotation and evaluation of gut microbiota of rats in each group

和黄芩汤可提升 NAFLD 大鼠肠道菌群的丰富度。如图 5-B 所示, heip 指数可解释群落均匀度, 相较于空白组, 模型组 heip 指数显著降低 ($P<0.01$), 说明 NAFLD 大鼠肠道菌群均匀度显著下降; 相较于模型组, 阳性药组和黄芩汤低、高剂量组 heip 指数显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明多烯磷脂胆碱和黄芩汤可提升 NAFLD 大鼠肠道菌群的均匀度。如图 5-C 所示, 相较于空白组, 模型组 Shannon 指数显著降低 ($P<0.01$), 说明 NAFLD 大鼠肠道菌群多样性显著下降; 相较于模型组, 阳性药组和黄芩汤低、高剂量组 Shannon 指数显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明多烯磷脂胆碱和黄芩汤可提升 NAFLD 大鼠肠道菌群的多样性。综上, NAFLD 大鼠肠道菌群的丰富度、均匀度和多样性均明显下降, 黄芩汤

具有调节 NAFLD 大鼠肠道菌群丰富度、均匀度和多样性的作用。

3.6 各组大鼠肠道菌群 Beta 多样性分析

如图 6 所示, PCA 分析可通过不同样本群落组成成分反映样本间的差异和距离, 样本物种组成越相似, 则在图中距离越接近, 主成分 1 (PC1) 贡献度为 50.51%, 主成分 2 (PC2) 贡献度为 13.32%, 二者贡献度之和大于 60%, 故二者能较为全面地反映群落组成信息, 空白组、模型组、阳性药组及黄芩汤低、高剂量组所有样本各自聚集在一起, 模型组与空白组距离较远, 而空白组、阳性药组及黄芩汤低、高剂量组距离较为接近, 说明 NAFLD 大鼠肠道菌群组成发生改变, 多烯磷脂胆碱和黄芩汤具有调控 NAFLD 大鼠肠道菌群组成的作用。

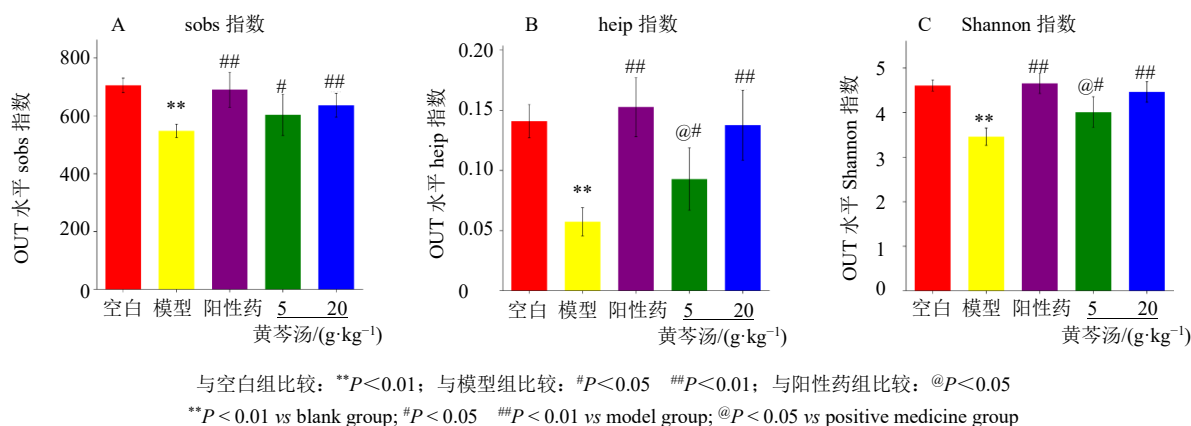


图 5 各组大鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Alpha diversity analysis of gut microbiota of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

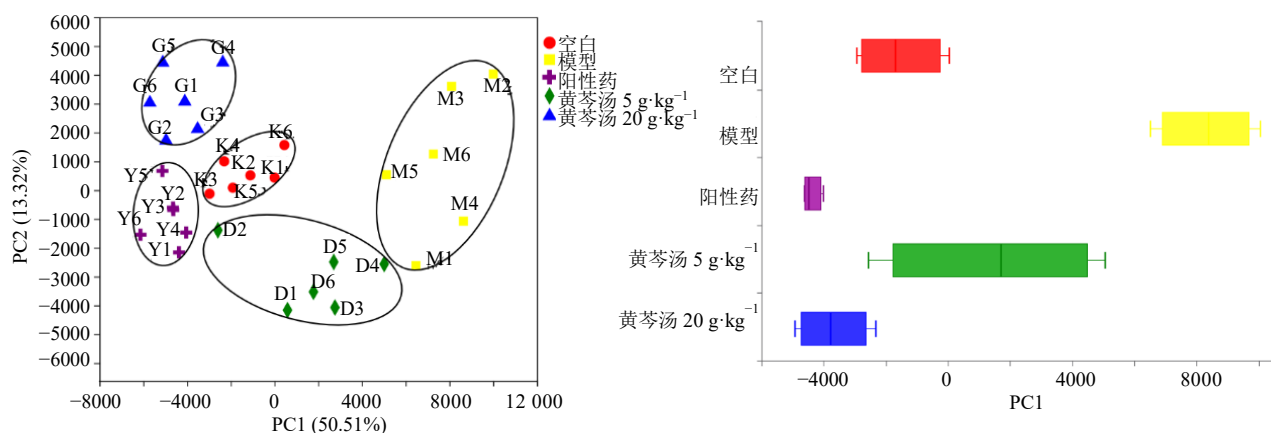


图 6 各组大鼠肠道菌群 Beta 多样性分析

Fig. 6 Beta diversity analysis of gut microbiota of rats in each group

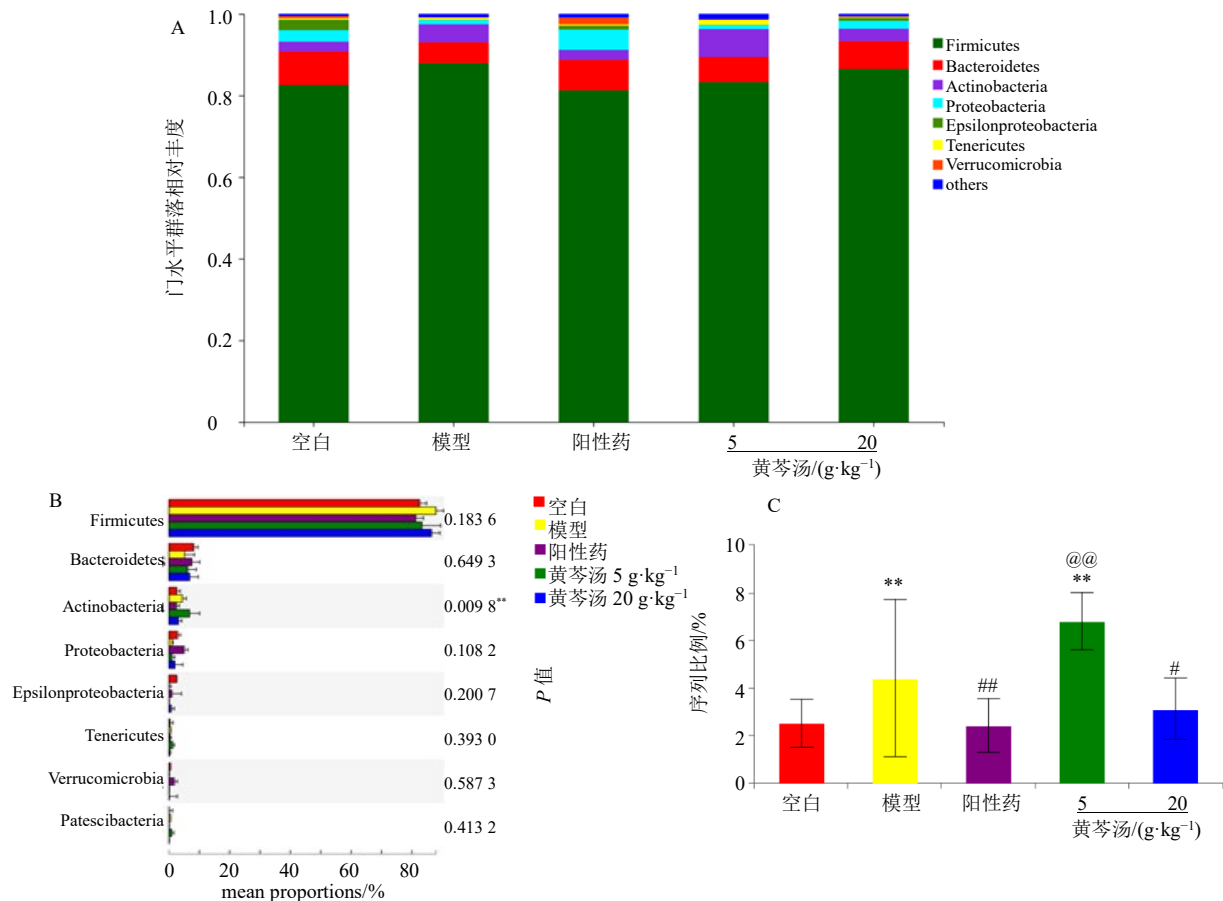
3.7 各组大鼠肠道菌群物种组成及差异分析

3.7.1 门水平物种组成及差异分析 如图 7-A 所示, 群落柱形图可解释各组样本的优势物种及其相

对丰度, 各组大鼠肠道菌群的优势物种主要归属为厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门

(Proteobacteria)、Epsilonbacteraeota、软壁菌门(Tenericutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。如图 7-B 所示, 各组大鼠肠道菌群在门水平群落丰度有显著差异 ($P<0.01$)。如图 7-C 所示, 相较于空白组, 模型组放线菌门群落丰度显著升高 ($P<0.01$),

表明 NAFLD 大鼠肠道菌群放线菌门群落丰度显著上升; 相较于模型组, 阳性药组和黄芩汤高剂量组放线菌门群落丰度显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明多烯磷脂胆碱和黄芩汤高剂量可降低 NAFLD 大鼠肠道菌群优势物种放线菌门的群落丰度。



A-各组样本的优势物种及其相对丰度 B-各组样本门水平群落丰度差异 C-各组放线菌门群落丰度差异 与空白组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与阳性药组比较: @@ $P<0.01$

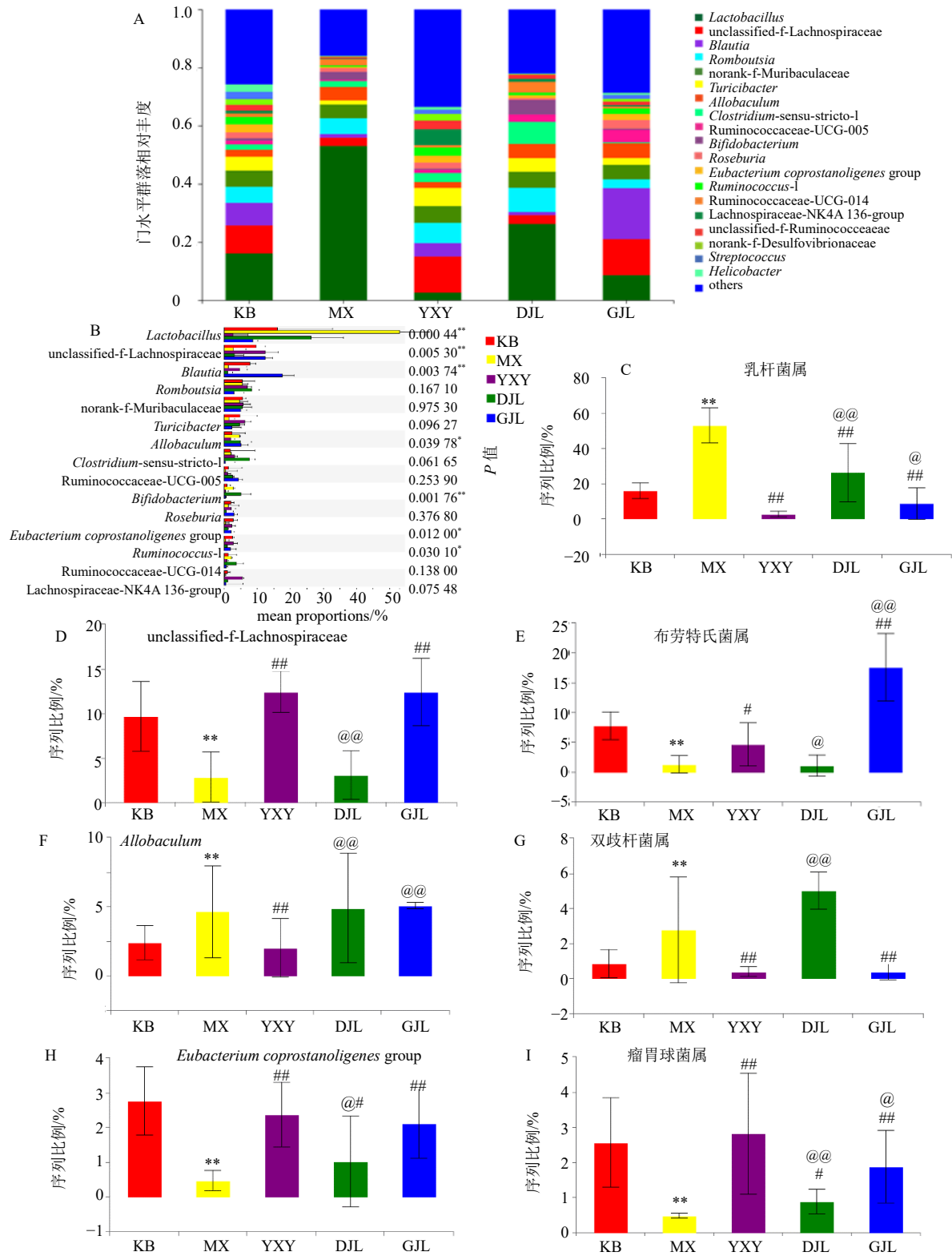
A-dominant species and their relative abundance in each group B-differences in phyla level community abundance in each group C-differences in Actinobacteria abundance in each group ** $P<0.01$ vs blank group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group; @@ $P<0.01$ vs positive medicine group

图 7 各组大鼠肠道菌群门水平组成及差异分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Analysis of phylum level composition and difference of gut microbiota of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7.2 属水平物种组成及差异分析 如图 8-A、B 所示, 各组大鼠肠道菌群在属水平的优势物种主要有 19 种 (以群落相对丰度 >0.023 为筛选条件), 其中在乳杆菌属 *Lactobacillus*、未分类-*f-Lachnospiraceae*、布劳特氏菌属 *Blautia*、*Allobaculum*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、*Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属 *Ruminococcus-1* 群落丰度具有显著差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。如图 8-C~I 所示, 相较于空白组, 模型组乳杆菌属、*Allobaculum* 和双歧杆菌属群落丰度显著升

高 ($P<0.01$), unclassified-*f-Lachnospiraceae*、布劳特氏菌属、*Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属群落丰富显著降低 ($P<0.01$), 表明 NAFLD 大鼠上述属水平肠道菌群发生明显变化; 相较于模型组, 阳性药组和黄芩汤高剂量组乳杆菌属和双歧杆菌属群落丰度显著降低 ($P<0.01$), unclassified-*f-Lachnospiraceae*、布劳特氏菌属、*Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属群落丰度显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01); 相较于模型组, 黄芩汤低剂量组乳杆菌属群落丰度显著降低 ($P<$



KB-空白 MX-模型 YXY-阳性药 DJL-黄芩汤 5 g·kg⁻¹ GJL-黄芩汤 20 g·kg⁻¹ (下同) A-各组样本的优势物种及其相对丰度 B-各组样本属水平群落丰度差异 C-I-各组乳杆菌属、unclassified-f-Lachnospiraceae、布劳特氏菌属、Allobaculum、双歧杆菌属、Eubacterium coprostanoligenes group 和瘤胃球菌属群落丰度差异 与空白组比较: **P<0.01; 与模型组比较: #P<0.05 ##P<0.01; 与阳性药组比较: @P<0.05 @@P<0.01 KB-blank MX-model YXY-positive medicine DJL-Huangqin Decoction 5 g·kg⁻¹ GJL-Huangqin Decoction 20 g·kg⁻¹ (same as below) A-dominant species and their relative abundance in each group B-differences in genus level community abundance in each group C-I-differences in *Lactobacillus*, unclassified-f-Lachnospiraceae, *Blautia*, *Allobaculum*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium coprostanoligenes* group and *Ruminococcus-1* abundance in each group **P<0.01 vs blank group; #P<0.05 ##P<0.01 vs model group; @P<0.05 @@P<0.01 vs positive medicine group

图 8 各组大鼠肠道菌群属水平组成及差异分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Analysis of genus level composition and difference of gut microbiota of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

0.05), *Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属群落丰度显著升高 ($P < 0.05$)。以上表明多烯磷脂胆碱和黄芩汤高剂量具有调控 NAFLD 大鼠肠道菌群优势物种乳杆菌属、双歧杆菌属、unclassified-f-Lachnospiraceae、布劳特氏菌属、*Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属群落丰度的作用, 而黄芩汤低剂量对其调控作用较弱。

3.8 各组大鼠肠道菌群 LEfSe 多级物种差异判别分析

如图 9 所示 (LDA 阈值: 4; 多组比较策略: All-against-all; 保留门和属水平差异物种), LEfSe 多级物种差异判别分析可找出在门、纲、目、科、属各个水平中对样本划分产生显著性差异影响的群落或物种, 相较于空白组, 模型组 unclassified-f-Lachnospiraceae、布劳特氏菌属、*Turicibacter*、链球菌属 *Streptococcus*、*Epsilonbacteraeota*、螺杆菌属 *Helicobacter*、*Eubacterium coprostanoligenes* group、瘤胃球菌属丰度显著下调, 而乳杆菌属丰度显著上

调, 表明 NAFLD 大鼠上述肠道菌属丰度发生显著变化; 相较于模型组, 阳性药组 unclassified-f-Lachnospiraceae、*Turicibacter*、变形菌门、瘤胃球菌属丰度显著上调, 黄芩汤低剂量组 *Alistipes*、*Pygmaibacter*、*Ruminiclostridium-6* 丰度显著上调, 黄芩汤高剂量组布劳特氏菌属、unclassified-f-Lachnospiraceae、*Ruminococcaceae*-UCG-005、GCA-900066225、棒状杆菌属 *Corynebacterium* 丰度显著上调, 表明多烯磷脂胆碱具有回调 NAFLD 大鼠肠道菌群 unclassified-f-Lachnospiraceae、*Turicibacter*、瘤胃球菌属丰度的作用, 黄芩汤高剂量具有回调 NAFLD 大鼠肠道菌群布劳特氏菌属、unclassified-f-Lachnospiraceae 丰度的作用, 而黄芩汤低剂量回调作用较弱。

3.9 各组大鼠肠道菌群与血脂、转氨酶指标相关性分析

通过 Pearson 相关系数分析各组大鼠肠道菌群与血脂、转氨酶指标相关性。如图 10 所示, 在门水

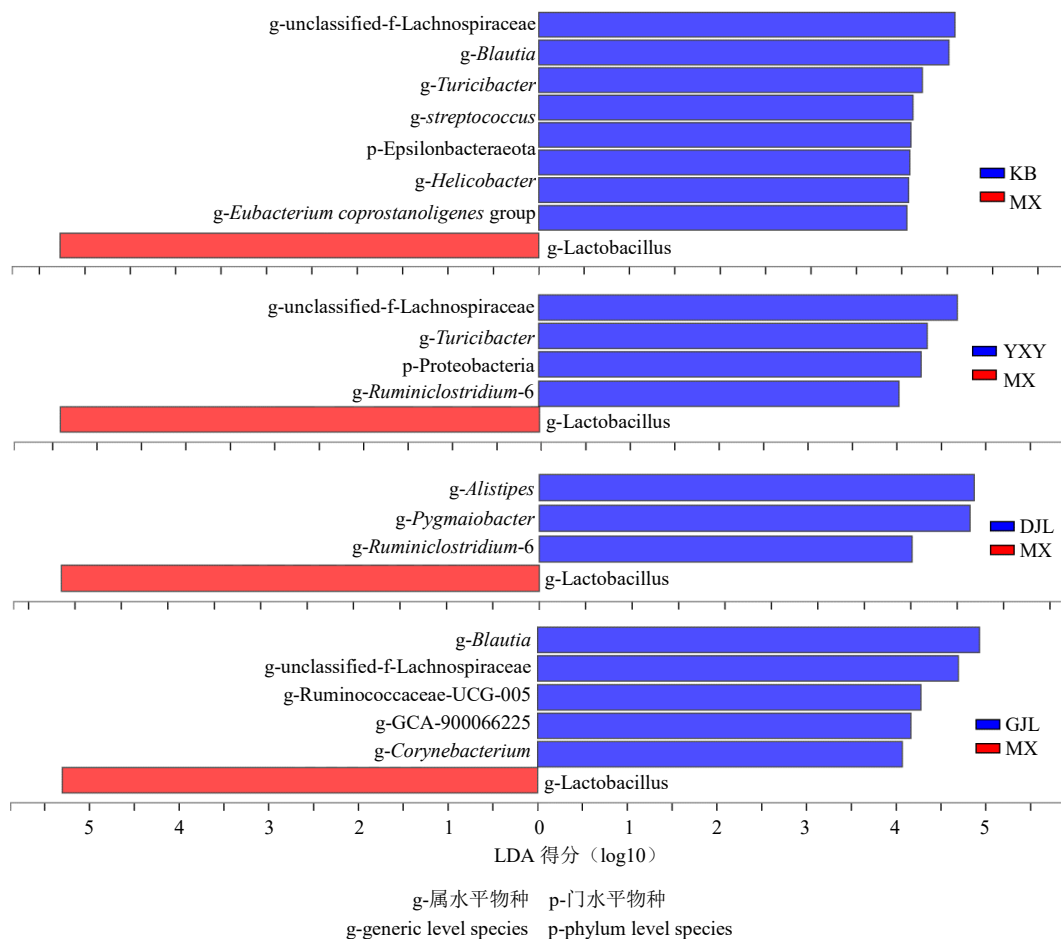


图 9 各组大鼠肠道菌群 LEfSe 多级物种差异判别分析

Fig. 9 LEfSe multilevel species discriminant analysis of gut microbiota of rats in each group

平上, 厚壁菌门与 TC、ALT 呈正相关 ($P<0.05$); 放线菌门、酸杆菌门(Patescibacteria)与 TG、LDL-C、AST 呈正相关 ($P<0.05$); 拟杆菌门与 HDL-C 呈正相关 ($P<0.05$); 变形菌门与 HDL-C 呈正相关 ($P<0.05$), 与 TG、LDL-C、AST、TC、ALT 呈负相关 ($P<0.05$); 迷踪菌门(Elusimicrobia)与 AST、ALT 呈负相关 ($P<0.05$); Epsilonbacteraeota、Kiritimatiellaeota 与 AST、TC、ALT 呈负相关 ($P<0.05$, 0.01); 在属水平上(取属水平丰度前 20), 乳杆菌属、双歧杆菌属与 AST、TG、LDL-C、TC、ALT 呈正相关 ($P<0.05$, 0.01), 与 HDL-C 呈负相关 ($P<0.05$, 0.01); unclassified-f-Lachnospiraceae、*Eubacterium coprostanoligenes* group、瘤胃球菌属、Ruminococcae-

NK4A214-group、norank-f-Desulfovibrionaceae 与 HDL-C 呈正相关 ($P<0.05$, 0.01), 与 AST、TG、LDL-C、TC、ALT 呈负相关 ($P<0.05$, 0.01); 布劳特氏菌属与 HDL-C 呈正相关 ($P<0.05$), 与 TG、LDL-C、TC、ALT 呈负相关 ($P<0.05$, 0.01); Ruminococcaceae-UCG-014 与 AST、TG 呈正相关 ($P<0.05$); unclassified-f-Ruminococceae 与 HDL-C 呈正相关 ($P<0.05$), 与 LDL-C、TC 呈负相关 ($P<0.05$); 链球菌属与 AST、TG、LDL-C、TC、ALT 呈负相关 ($P<0.05$); norank-f-Lachnospiraceae 与 HDL-C 呈正相关 ($P<0.05$)。以上结果显示, 大鼠肠道菌群变化与 NAFLD 血脂和肝功能异常存在相关性。

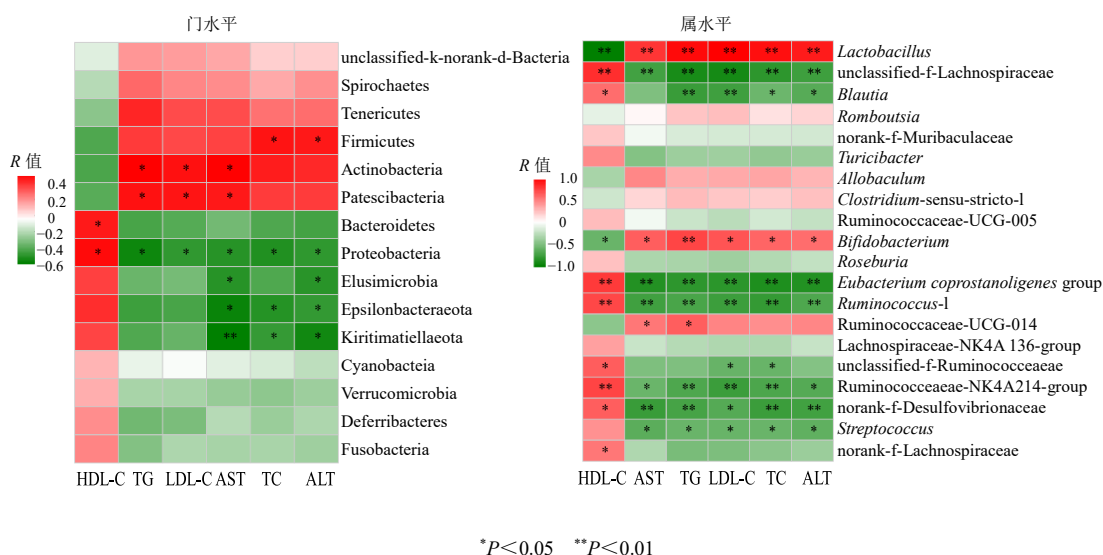


图 10 大鼠肠道菌群与血脂、转氨酶指标 Pearson 相关性分析

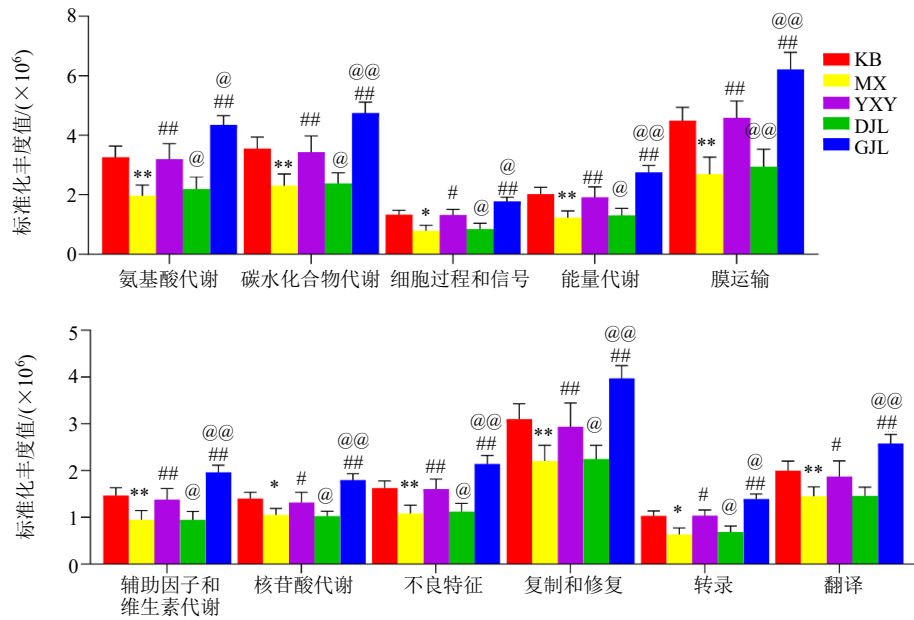
Fig. 10 Pearson correlation analysis of gut microbiota with plasma lipids and transaminases indexes in rats

3.10 各组大鼠肠道菌群功能富集差异分析

3.10.1 KEGG 功能富集差异分析 KEGG 数据库是系统分析基因功能、联系基因组信息和功能信息的大型知识库。本研究将每个样本 OTU 丰度标准化后获取对应 ID, 并根据 OTU 丰度计算 KEGG 功能类别的丰度。如图 11 所示, 各组大鼠肠道菌群 KEGG 功能主要富集在氨基酸代谢、碳水化合物代谢、细胞过程和信号、能量代谢等 11 个功能类别; 相较于空白组, 模型组上述 11 个 KEGG 功能水平均有显著下调 ($P<0.05$, 0.01), 说明 NAFLD 大鼠肠道菌群在上述 11 个 KEGG 功能上发生异常; 相较于模型组, 阳性药组和黄芩汤高剂量组上述 11 个 KEGG 功能水平平均显著上调 ($P<0.05$, 0.01), 表明多烯磷脂胆碱和黄芩汤高剂量具有调控 NAFLD 大

鼠肠道菌群上述 11 个 KEGG 功能的作用。

3.10.2 COG 功能富集差异分析 直系同源蛋白分组比对 (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups, EggNOG) 数据库是国际上普遍认可的同源聚类基因群的专业注释数据库, 可基于此数据库进行 COG 的功能分类和功能注释。本研究将每个样本 OTU 丰度标准化后获取对应 ID, 并根据 OTU 丰度计算 COG 功能类别的丰度。如图 12 所示, 各组大鼠肠道菌群 COG 功能主要富集在能量生产与转换、氨基酸转运与代谢、碳水化合物运输与代谢、辅酶转运与代谢等 10 个功能类别; 相较于空白组, 模型组上述 10 个 COG 功能水平平均显著下调 ($P<0.05$, 0.01), 表明 NAFLD 大鼠肠道菌群在上述 10 个 COG 功能上发生异常; 相



与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与阳性药组比较: @ $P < 0.05$ @@ $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; @ $P < 0.05$ @@ $P < 0.01$ vs positive medicine group, same as below

图 11 各组大鼠肠道菌群 KEGG 功能富集差异分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 KEGG function enrichment analysis of gut microbiota of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

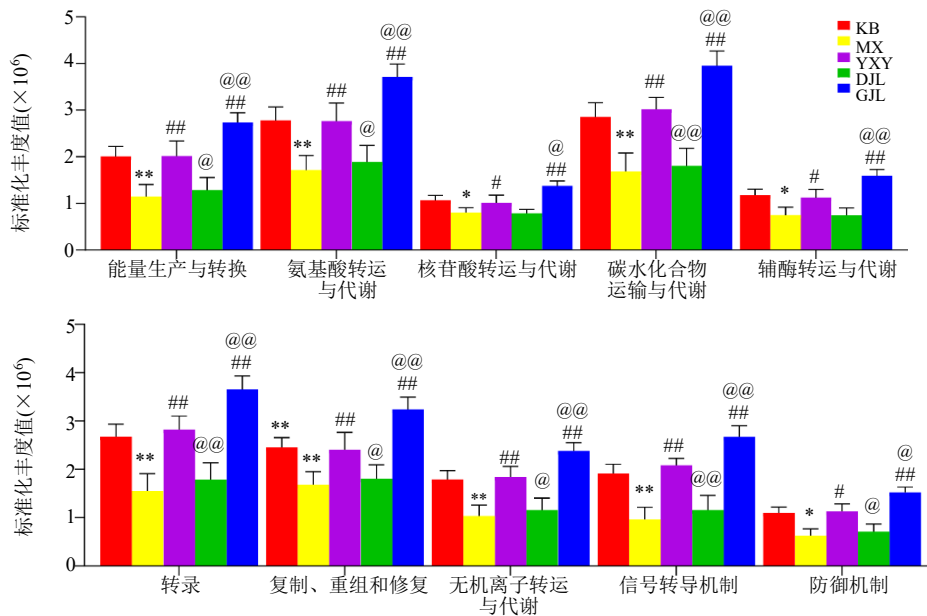


图 12 各组大鼠肠道菌群 COG 功能富集差异分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 COG function enrichment analysis of gut microbiota of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

较于模型组, 阳性药组和黄芩汤高剂量组上述 10 个 COG 功能水平均显著上调 ($P < 0.05, 0.01$), 表明多烯磷脂胆碱和黄芩汤高剂量可通过调控 NAFLD 大鼠肠道菌群上述 10 个 COG 功能发挥治疗 NAFLD 的作用。

4 讨论

近年来, 大量研究揭示了肠道菌群在 NAFLD 等代谢性疾病发生发展中发挥重要作用。肥胖是导致 NAFLD 等代谢性疾病的重要原因之一, 肠道菌群可通过短链脂肪酸等代谢产物调节宿主能量获取或

调控宿主能量代谢信号通路, 最终在肥胖及肥胖相关代谢性疾病中发挥关键作用^[16]。肠道菌群中革兰阴性菌的过度繁殖, 会增加肝毒性产物如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的产生, 研究显示 LPS 与其靶蛋白结合, 进而与单核细胞分化抗原复合物结合, 可引发胰岛素抵抗与炎症反应^[17]。胰岛素抵抗是代谢性疾病的基本病理生理过程, 可加速 NAFLD 患者肝细胞的脂肪堆积和炎症, 最终使得 NAFLD 进一步恶化^[18]。胆碱在脂质代谢中发挥重要作用, 可促进肝细胞中的脂质转运并防止脂质在肝脏中的异常积累, 而胆碱缺乏通常会导致肝脏脂肪变性诱发 NAFLD^[19]。肠道菌群也参与胆碱代谢, 将其转化为有毒的二甲胺和三甲胺, 这些物质在肝脏中进一步转化为三甲胺氧化物, 导致肝脏炎症和损伤, 加剧 NAFLD 进展^[20]。胆汁酸由胆固醇合成, 具有广泛的生理功能, 不仅能促进脂溶性食物的消化, 亦能保护肠道屏障, 防止细菌的移位^[21]。此外, 胆汁酸可以作为信号分子, 通过激活胆汁酸受体和跨膜 G 蛋白偶联胆汁酸受体 5 (transmembrane G protein-coupled receptor 5, TGR5) 来调节胆汁酸代谢的平衡^[22]。有证据显示, 抗生素可通过改变胆汁酸的组成和抑制类法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 来减弱高脂饮食诱导的 NAFLD 发展^[22]。而肠道菌群则可以通过将初级胆汁酸解偶联并代谢为肠道中的次级胆汁酸来影响胆汁酸池的稳态, 从而调节机体脂质和能量代谢, 最终参与 NAFLD 发生发展^[23]。综上, 肠道菌群可通过介导胰岛素抵抗、炎症、胆碱和胆汁酸代谢等过程参与 NAFLD 的发生发展, 肠道菌群可能成为 NAFLD 的潜在治疗靶点。

黄芩汤由黄芩、白芍、炙甘草和大枣组成, 单味药“个性之专长”是组方“合群之妙用”的根本, 单味药中复杂的化学成分正是其发挥多种药理作用和多方面功效的重要基础^[24]。研究显示, 黄芩可通过腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 介导的固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP) 信号通路调节游离脂肪酸代谢从而改善 NAFLD^[25]; 而黄芩中的黄芩素也可通过激活 AMPK 和抑制 SREBP1 减少肝脏脂肪积累, 以及影响抗氧化活性等作用改善 NAFLD^[26]。白芍中的芍药苷则可通过抑制干预脂质代谢、促进脂肪酸氧化、增加胆固醇合成、降低血糖和抑制炎症反应阻止 NAFLD 疾病发展并降低发生动脉粥样硬化的风

险^[27]。甘草中甘草酸可通过减少肝脏脂肪生成、增加脂肪酸氧化、促进三酰甘油代谢、减少糖异生、增加糖原合成和胰岛素敏感性, 实现对 NAFLD 的保护作用^[28]。综上可知, 黄芩汤可通过多种途径对 NAFLD 产生潜在的治疗作用。亦有研究显示, 黄芩汤可增加肠道内有益菌丰度并降低有害菌丰度, 恢复肠道内微生态而实现对 2 型糖尿病、冠心病和溃疡性结肠炎的治疗作用^[8,29-30]。黄芩汤经人肠道菌群作用后的代谢产物能显著降低 D-半乳糖胺诱导的肝损伤小鼠的 ALT 水平, 表明黄芩汤肠道菌群代谢产物是其发挥保肝作用的重要物质基础^[12]。此外, 利用黄芩汤组分中的甘草酸干预可显著改变 NAFLD 小鼠肠道菌群的组成, 降低厚壁菌门与拟杆菌门的比率和产生内毒素的细菌的丰度, 提高有益菌和产生短链脂肪酸细菌的丰度, 并促进短链脂肪酸的产生, 最终改善 NAFLD^[31]。因此, 黄芩汤有望通过改善肠道菌群发挥对 NAFLD 的治疗作用。

本研究成功建立了 NAFLD 大鼠模型, 并基于 16S rRNA 技术评价黄芩汤对 NAFLD 大鼠肠道菌群的调节作用, 从肠道菌群角度初步探讨黄芩汤改善 NAFLD 的作用机制。本研究结果显示, 相较于正常大鼠, NAFLD 大鼠肠道菌群的丰富度、均匀度和多样性均明显下降, 表明 NAFLD 疾病进展过程会伴随肠道菌群的失调。其中, 在门水平上, NAFLD 大鼠放线菌门群落丰度显著提高, Epsilonbacteraeota 丰度显著降低; 在属水平上, NAFLD 大鼠乳杆菌属、*Allobaculum* 和双歧杆菌属群落丰度显著升高, unclassified-f-Lachnospiraceae、布劳特氏菌属、*Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属群落丰度显著降低。放线菌门的次级代谢产物是抗生素的重要来源, 放线菌门丰度的提高可增加肠道内抗生素的产量, 进而破坏肠道菌群的稳态, 加剧相关疾病的进展^[32]。乳杆菌和双歧杆菌为肠道内的有益菌群, 但 NAFLD 大鼠乳杆菌属和双歧杆菌属丰度显著增加, 原因可能为机体处于代谢异常状态下菌群产生了代偿作用, 自我调节并逐步逆转机体的慢性炎症状态^[33]。布劳特氏菌属是一种具有益生菌特性的厌氧菌, 诸多证据显示其具有调节宿主健康和缓解代谢综合征的能力^[34]。瘤胃球菌属与谷氨酰胺代谢关系密切, 谷氨酰胺代谢失调与 NAFLD 进展为非酒精性脂肪肝有关^[15,35]。除此之外, 大鼠肠道菌群变化与 NAFLD 血脂和肝功能异常存在相关性, 且 NAFLD 大鼠肠道菌群富

集的代谢相关功能均有显著下降。

本研究从大鼠体质量、血脂指标、肝功能指标及肝脏组织病理分析证实了黄芩汤对 NAFLD 大鼠具有较好的治疗作用。此外,黄芩汤能够提升 NAFLD 大鼠肠道菌群的丰富度、均匀度和多样性,提升 Epsilonbacteraeota、unclassified-f-Lachnospiraceae、布劳特氏菌属、*Eubacterium coprostanoligenes* group 和瘤胃球菌属丰度,降低放线菌门、乳杆菌属和双歧杆菌属丰度,促进 NAFLD 大鼠肠道菌群向正常水平恢复。综上,黄芩汤对 NAFLD 的治疗作用与其对 NAFLD 大鼠肠道菌群失调的改善作用具有相关性。后期将采用粪菌定植法和无菌大鼠,结合 16S rRNA 和宏基因组测序技术从肠道菌群角度进一步验证与研究黄芩汤治疗 NAFLD 的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Loomba R, Friedman S L, Shulman G I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell*, 2021, 184(10): 2537-2564.
- [2] Makri E, Goulas A, Polyzos S A. Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and emerging treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Arch Med Res*, 2021, 52(1): 25-37.
- [3] Eslam M, Newsome P N, Sarin S K, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 202-209.
- [4] Athyros V G, Alexandrides T K, Bilianou H, et al. The use of statins alone, or in combination with pioglitazone and other drugs, for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and related cardiovascular risk. An expert panel statement [J]. *Metabolism*, 2017, 71: 17-32.
- [5] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(1): 55-71.
- [6] Lynch S V, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(24): 2369-2379.
- [7] Wang R, Tang R, Li B, et al. Gut microbiome, liver immunology, and liver diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(1): 4-17.
- [8] 曹敏, 薛俊, 董莽菁, 等. 黄芩汤联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病疗效及对肠道菌群构成、胰岛素信号转导分子水平影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(11): 2792-2795.
- [9] 徐静波, 瞿溢谦, 叶海勇. 黄芩汤囊胞探析 [J]. *新中医*, 2020, 52(3): 19-21.
- [10] Li T, Zhuang S X, Wang Y W, et al. Flavonoid profiling of a traditional Chinese medicine formula of Huangqin Tang using high performance liquid chromatography [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(2): 148-157.
- [11] 李岩, 郭鹏, 田月洋. 黄芩汤联合序贯肝动脉化疗栓塞术对原发性肝癌患者核因子 κ B 及细胞缺氧诱导因子-1 α 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3870-3873.
- [12] 左凤, 周钟鸣, 熊玉兰, 等. 黄芩汤及其肠道菌群的代谢产物对 D-半乳糖胺诱导的肝损伤的保护作用的比较研究 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(9): 842-844.
- [13] 吴娜, 万治平, 韩玲, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠 NLRP3/caspase-1 细胞焦亡通路的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5): 1191-1196.
- [14] 王怡薇, 张会会, 王彦礼, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 NF- κ Bp65 调控作用研究 [J]. *药学报*, 2015, 50(1): 21-27.
- [15] 袁鹏, 马瑜璐, 刘圣金, 等. 矿物药青礞石对戊四唑点燃癫痫大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(7): 2011-2023.
- [16] Ma J L, Zhou Q H, Li H K. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease: Insights on mechanisms and therapy [J]. *Nutrients*, 2017, 9(10): 1124.
- [17] Caesar R, Reigstad C S, Bäckhed H K, et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice [J]. *Gut*, 2012, 61(12): 1701-1707.
- [18] Tarantino G, Caputi A. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(33): 3785-3794.
- [19] Corbin K D, Zeisel S H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28(2): 159-165.
- [20] Kolodziejczyk A A, Zheng D P, Shibolet O, et al. The role of the microbiome in NAFLD and NASH [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(2): e9302.
- [21] Fuchs C, Claudel T, Trauner M. Bile acid-mediated control of liver triglycerides [J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33(4): 330-342.
- [22] Jiang C, Xie C, Li F, et al. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 386-402.
- [23] Ferslew B C, Xie G X, Johnston C K, et al. Altered bile

- acid metabolome in patients with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(11): 3318-3328.
- [24] 段金殿. 中药资源化学: 理论基础与资源循环利用 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 151.
- [25] Chen Q, Liu M, Yu H, *et al.* *Scutellaria baicalensis* regulates FFA metabolism to ameliorate NAFLD through the AMPK-mediated SREBP signaling pathway [J]. *J Nat Med*, 2018, 72(3): 655-666.
- [26] Sun W L, Liu P P, Wang T Q, *et al.* Baicalein reduces hepatic fat accumulation by activating AMPK in oleic acid-induced HepG2 cells and high-fat diet-induced non-insulin-resistant mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 711-721.
- [27] Zhang L, Yang B, Yu B. Paeoniflorin protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(7): 1005-1011.
- [28] Sun X, Duan X, Wang C, *et al.* Protective effects of glycyrrhizic acid against non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 806: 75-82.
- [29] 徐航宇, 王彦礼, 王敦方, 等. 高通量测序技术研究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响 [J]. 药学报, 2017, 52(11): 1673-1682.
- [30] 程艳, 王浩, 陈文静, 等. 黄芩汤基于调控 apelin-13、Ghrelin、Obestatin 的表达及肠道菌群构成改善冠心病机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2089-2092, 2308.
- [31] Li Y, Liu T, Yan C, *et al.* Diammonium glycyrrhizinate protects against nonalcoholic fatty liver disease in mice through modulation of gut microbiota and restoration of intestinal barrier [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 3860-3870.
- [32] Katsuyama Y. Mining novel biosynthetic machineries of secondary metabolites from actinobacteria [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(9): 1606-1615.
- [33] 戴新新, 蔡红蝶, 宿树兰, 等. 地黄叶对糖尿病肾病大鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 药学报, 2017, 52(11): 1683-1691.
- [34] Liu X, Mao B, Gu J, *et al.* *Blautia*-a new functional genus with potential probiotic properties? [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-21.
- [35] Simón J, Martínez-Chantar M L, Delgado T C. Glutamine, fatty liver disease and aging [J]. *Aging*, 2021, 13(3): 3165-3166.

[责任编辑 潘明佳]