

基于肠道菌群和代谢组学研究化滞柔肝颗粒治疗非酒精性脂肪肝的作用机制

朱春胜, 施亚敏, 付智慧, 于东升, 边 猛, 聂安政, 李晓萍*

郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 探讨化滞柔肝颗粒治疗非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的作用机制。方法 高脂饮食饲养 8 周构建大鼠 NAFLD 模型, 化滞柔肝颗粒 ig 给药 4 周。半自动生化分析仪测定大鼠血脂相关指标; 油红 O 染色观察肝脏组织病理变化; Illumina Miseq 测序平台对 V3~V4 可变区进行扩增和测序, 超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 开展血浆代谢组学研究, 并结合 Spearman 进行肠道菌群与代谢组学之间的关联分析。结果 与模型组相比, 化滞柔肝颗粒中、高剂量组可显著降低大鼠体质量 ($P < 0.05$ 、 0.01) 和血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG) 水平 ($P < 0.01$), 升高高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。此外, 化滞柔肝颗粒高剂量组还可显著降低大鼠低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平 ($P < 0.05$)。油红 O 染色显示各给药组脂肪分布较模型组减少。16S rDNA 测序显示化滞柔肝颗粒可提高 NAFLD 模型大鼠杜氏乳杆菌属 *Dubosiella*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*、Ruminococcaceae-UCG-010 等菌群的相对丰度。代谢组学共筛选出 18 个差异代谢物, 通路分析显示化滞柔肝颗粒抗 NAFLD 主要通过调控氨酰-tRNA 生物合成、胆汁分泌、胆固醇代谢等通路。结论 化滞柔肝颗粒改善 NAFLD 的作用机制可能与调控肠道菌群组成和胆汁分泌、胆固醇代谢等相关代谢通路有关。

关键词: 化滞柔肝颗粒; 非酒精性脂肪肝; 肠道菌群; 代谢组学; 胆固醇代谢

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)04-1190-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.04.019

Mechanism of Huazhi Rougan Granule in treatment of non-alcoholic fatty liver disease based on intestinal flora and metabolomics

ZHU Chun-sheng, SHI Ya-min, FU Zhi-hui, YU Dong-sheng, BIAN Meng, NIE An-zheng, LI Xiao-ping

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

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Huazhi Rougan Granule (化滞柔肝颗粒) in treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Rats were fed a high-fat diet for eight weeks to establish a NAFLD model, and Huazhi Rougan Granules were administered intragastrically for four weeks. The semi-automatic biochemical analyzer was used to determine the blood lipid-related indicators in rats; Oil red O was used to observe the pathological changes of liver tissue; The Illumina Miseq sequencing platform was used to amplify and sequence the V3—V4 variable region, and UPLC-MS/MS was used to research plasma metabolomics. The correlation between intestinal flora and metabolomics was analyzed by Spearman. **Results** Compared with model group, the body weight ($P < 0.05$, 0.01) and serum level of total cholesterol (TC) and triacylglycerol (TG) ($P < 0.01$) of rats were significantly decreased and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) of rats was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01) in Huazhi Rougan Granule medium and high dose groups. In addition, low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) of rats was also significantly decreased in Huazhi Rougan Granule high dose group ($P < 0.05$). Oil red O staining showed that the fat distribution in each administration group was lower than that of the model group. 16S rDNA sequencing showed that Huazhi Rougan Granule could increase the relative abundance of *Dubosiella*, *Desulfovibrio*, Ruminococcaceae-UCG-010 bacteria in NAFLD model rats. A total of 18 differential metabolites were identified by metabolomics, pathway analysis showed that the anti-NAFLD effects of Huazhi Rougan Granules was mainly through the regulation of aminoacyl-tRNA biosynthesis, bile secretion, cholesterol metabolism and other pathways.

收稿日期: 2022-11-12

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20190273); 郑州大学第一附属医院横向课题 (K2020-0004)

作者简介: 朱春胜, 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药防治代谢性疾病。E-mail: zhuchunsheng6@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。Tel: (0371)66278520 E-mail: lixiaoping630209@163.com

Conclusion The mechanism of Huazhi Rougan Granules improving NAFLD may be related to the regulation of intestinal flora composition, cholesterol metabolism and other related metabolic pathways.

Key words: Huazhi Rougan Granule; non-alcoholic fatty liver disease; intestinal flora; metabolomics; cholesterol metabolism

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是世界范围内较常见的慢性肝病, 尤其是在西方国家, 其正成为肝移植最常见的适应证^[1]。NAFLD 包含一系列的组织学特征, 临床以肝细胞内脂质过度堆积为特征的单纯性脂肪变性, 到炎症或纤维化相关的非酒精性脂肪性肝炎, 最终发展为肝硬化和肝脏恶性肿瘤^[2]。流行病学调查显示 NAFLD 的全球患病率已高达 25%, 其中 NAFLD 影响了大约 27% 亚洲人口, 30% 美国人口, 30% 南美人口, 24% 欧洲人口, 以及 13% 非洲人口^[3-5]。值得注意的是, 目前 NAFLD 已成我国第一大慢性肝病, NAFLD 在成人中的患病率已高达 29.2%, 且逐渐呈现出年轻化趋势^[6-7]。此外, 大量临床研究显示 NAFLD 不仅与 2 型糖尿病、慢性肾脏疾病及心血管疾病有着密切联系, 而且还是肝脏恶性肿瘤的主要危险因素^[8-9]。可见, NAFLD 危害严重, 需引起进一步的重视。

目前, NAFLD 的一些治疗方法已在临床试验中被证实具有较好的疗效, 如临床中常采用的吡格列酮、维生素 E、多烯磷脂酰胆碱等药物治疗^[10-11]。然而, 上述药物在临床使用过程中存在部分不良反应, 如服用吡格列酮可使患者体质量增加 3~5 kg, 此外还有增加患膀胱癌的风险^[12-13]; 维生素 E 可增加患前列腺癌和出血性脑卒中的风险^[14-15]; 多烯磷脂酰胆碱使用过程中常出现呕吐、皮疹、腹泻等不良反应, 严重限制了上述药物在临床中的推广^[16]。因此, 寻找更加安全有效的治疗 NAFLD 药物势在必行。化滞柔肝颗粒具有清热利湿、化浊解毒、祛瘀柔肝之功, 临床用于治疗非酒精性单纯性脂肪肝湿热中阻证^[17]。然而, 有关化滞柔肝颗粒治疗 NAFLD 的作用机制研究较薄弱, 目前多停留在临床观察中。近年来, 肠-肝轴的研究模式已在 NAFLD 的研究中逐步获得国内外学者的认可, 肠道菌群亦成为探讨 NAFLD 的研究热点。而代谢组学利用现代分析技术定量测定生物体液内源性代谢产物变化, 结合生物信息学阐明内源性小分子代谢物变化规律, 为揭示中药发挥药效的可能作用机制提供了可能^[18]。因此, 本研究联合肠道菌群和代谢组学探讨化滞柔肝颗粒治疗 NAFLD 的作用机制, 为化滞

柔肝颗粒向临床推广提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

化滞柔肝颗粒 (批号 0051904010) 购自山东新时代药业有限公司; 多烯磷脂酰胆碱胶囊 (批号 TC10004) 购自赛诺菲 (北京) 制药有限公司; 高脂饲料 (批号 D12451, 配方为 78.8% 普通饲料、1% 胆固醇、0.2% 牛胆盐、10% 蛋黄粉、10% 猪油) 购自协同生物科技有限公司。

三酰甘油 (triacylglycerol, TG) 试剂盒 (批号 A110-1-1)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒 (批号 F002-1-1)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒 (批号 A112-1-1)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒 (批号 A113-1-1) 均购自南京建成生物工程研究所。乙腈 (批号 1499230-935) 购自 Merck 公司, 乙酸铵 (批号 70221) 购自 Sigma 公司, 均为高效液相色谱纯。

1.2 主要仪器

SAF-680T 半自动生化分析仪 (上海巴玖实业有限公司); 石蜡组织切片机 (美国 AO 公司); Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜 (日本 Nikon 公司); AB Triple TOF 6600 质谱仪 (AB SCIEX 公司); Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪 (Agilent 公司); 5430R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 恒温水浴锅 (北京医疗设备厂)。

1.3 动物

36 只雄性清洁级 SD 大鼠, 5 周龄, 体质量 (180±10) g, 购自北京维通利华实验动物中心, 动物合格证号 SCXK (京) 2014-0001。本实验获得郑州大学第一附属医院生命科学伦理委员会批准, 批号 K2020-0004。

2 方法

2.1 动物分组及给药

SD 大鼠饲养于温度 (26±2) °C、相对湿度 (50±5) % 的环境中。适应环境 3 d 后, 按体质量随机分为 6 组, 分别为正常组、模型组、多烯磷脂酰胆碱胶囊阳性药组 (PPC)、化滞柔肝颗粒高剂量组 (HZRG-H)、化滞柔肝颗粒中剂量组 (HZRG-M)、

化滞柔肝颗粒低剂量组 (HZRG-L), 每组 6 只。正常组给予普通饲料, 其余各组均给予高脂饲料 8 周复制大鼠 NAFLD 模型。各组均自由饮食、饮水, 饲料和水每天更换 1 次。于实验第 9 周开始, PPC 组大鼠 ig 多烯磷脂酰胆碱胶囊 0.144 g/kg, HZRG-H、HZRG-M、HZRG-L 组大鼠分别 ig 化滞柔肝颗粒 5.000、2.500、1.250 g/kg, 正常组和模型组大鼠 ig 同体积生理盐水, 连续给药 4 周。

2.2 样本收集

末次给药后, 各组大鼠 ip 水合氯醛麻醉, 腹主动脉采血, 部分全血置于涂有肝素钠的 EP 管中, 其余全血放于普通试管中, 离心 (转速 $3000\times g$, 10 min), 分离上清液, 其中血清用于测定 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平, 血浆用于代谢组学研究; 取部分肝脏组织, 置于 4% 多聚甲醛固定用于病理学观察; 收集各组大鼠足量的盲肠内容物于 1.5 mL 无菌 EP 管中, 液氮速冻后置于超低温冰箱 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 进行 16S rDNA 测序。

2.3 体质量和血脂相关指标测定

于实验第 8 周和 12 周测量大鼠体质量。使用检测试剂盒检测给药 4 周后各组大鼠血清中的 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平。

2.4 油红 O 染色观察肝脏组织病理变化

取部分新鲜肝脏置于冰冻切片机上切取冰冻组织, 甲醛-钙固定 10 min, 蒸馏水洗涤, 60% 异丙醇浸洗 30 s, 油红 O 染液染色 15 min, 60% 异丙醇洗去多余染液, 苏木素复染 5 min, 蒸馏水洗涤 3 次, 甘油明胶封片, 光镜下观察病理改变。

2.5 16S rDNA 测序

采用试剂盒说明书对每组大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 文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 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 和 R 软件进行表达和分析。

2.6 代谢组学分析

2.6.1 血浆样本处理 将各组血浆缓慢解冻, 取 200 μL 样本加入预冷甲醇-乙腈-水溶液 (2:2:1) 600 μL , 涡旋混合, 低温超声 30 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 14 000 r/min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 取上清真空干燥; 质谱分析时加入 100 μL 乙腈水溶液 (乙

腈-水 1:1) 复溶, 涡旋, 14 000 r/min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清液进样分析。

2.6.2 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为水-25 mmol/L 乙酸铵-25 mmol/L 氨水 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~7 min, 95%~65% B; 7~8 min, 65%~40% B; 8~9 min, 40% B; 9~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12 min, 95% B; 柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.5 mL/min; 进样量 2 μL 。

2.6.3 质谱条件 电喷雾离子源温度 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, 质谱电压 5500 V (正离子模式), -5500 V (负离子模式), 离子源气体 I $4.1\times 10^5\text{ Pa}$, 气体 II $4.1\times 10^5\text{ Pa}$, 气帘 (curtain gas) $2.0\times 10^5\text{ Pa}$, 碰撞能量 (35 ± 15) eV。

2.6.4 数据分析 将质谱采集的数据信息导入 R 软件, 进行多元数据处理, 包括主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。多元 OPLS-DA 模型的变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 初步筛选出各组代谢物, 选取 VIP >1.0 且 $P<0.05$ 的变量进行进一步数据分析, 最后将筛选出的差异代谢物导入京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 进行代谢途径的富集分析。

2.7 统计方法

实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 实验数据用 SPSS20.0 (IBM, Armonk, USA) 统计分析软件进行处理, 先进行方差齐性检验, 两组间均数比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

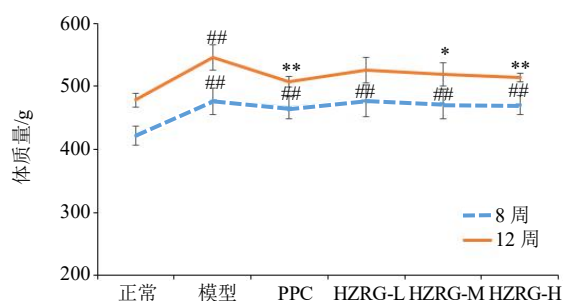
3 结果

3.1 各组大鼠体质量变化

饲养 8 周后, 与正常组相比, 所有喂食高脂饲料大鼠体质量均显著升高 ($P<0.01$), 但各组之间无显著差异 ($P>0.05$), 见图 1。给药 4 周后, 各组大鼠体质量均有增长, 与模型组相比, PPC、HZRG-M、HZRG-H 组大鼠体质量增长显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明化滞柔肝颗粒具有减缓 NAFLD 大鼠体质量增长作用。

3.2 各组大鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 的变化

给药 4 周后, 与正常组相比, 模型组大鼠血清



与正常组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
$P<0.05$ ## $P<0.01$ vs normal group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

图 1 各组大鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

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

表 1 各组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Serum levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
正常	—	3.16±0.28	2.60±0.48	1.24±0.12	1.10±0.23
模型	—	12.67±0.99##	7.16±0.41##	1.84±0.26##	0.82±0.08#
PPC	0.144	6.58±1.72**	5.50±0.35**	1.48±0.12*	1.01±0.07**
HZRG-L	1.250	7.09±1.10**	4.90±0.24**	1.66±0.25	0.89±0.12
HZRG-M	2.500	7.64±0.18**	4.66±0.19**	1.61±0.24	0.95±0.09*
HZRG-H	5.000	6.74±0.73**	4.26±0.15**	1.47±0.30*	0.96±0.05**

与正常组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
$P<0.05$ ## $P<0.01$ vs normal group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

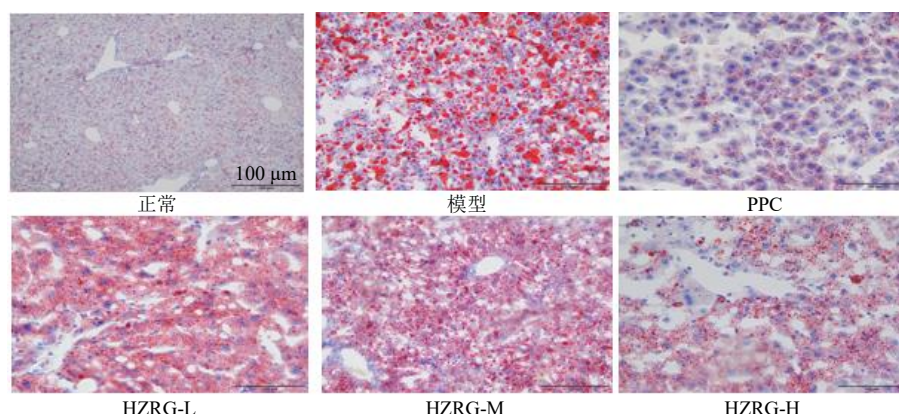


图 2 各组大鼠肝脏组织病理变化 (×200)

Fig. 2 Pathological changes of liver tissues of rats in each group (×200)

3.4 各组大鼠肠道菌群变化

鉴于 HZRG-H 组具有较好的药效和改善 NAFLD 大鼠病理形态的作用, 后续实验选择 HZRG-H 组大鼠开展肠道菌群和代谢组学研究。

3.4.1 多样性分析

(1) α 多样性指数分析: 采用 α 多样性对各组大鼠肠道物种多样性进行评价, 包括 Shannon、Simpson、Ace、Chao 指数, 结果显示 3 组之间虽无

TC、TG、LDL-C 显著升高 ($P<0.01$), HDL-C 显著降低 ($P<0.05$); 与模型组相比, 各给药组大鼠血清 TC、TG 均显著降低 ($P<0.01$), PPC 组、HZRG-H 组大鼠血清 LDL-C 显著降低 ($P<0.05$), PPC、HZRG-M、HZRG-H 组大鼠血清 HDL-C 显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 其余各组无显著差异, 见表 1。

3.3 各组大鼠肝脏组织病理变化

油红 O 染色显示, 正常组大鼠肝细胞形态正常, 胞质内几乎无红色脂滴; 模型组大鼠肝细胞形态不规则, 胞质内散在大小不等的脂滴空泡; PPC、HZRG-L、HZRG-M、HZRG-H 组大鼠肝细胞间界较模型组清晰, 胞质内的脂滴均呈现不同程度的减轻, 其中化滞柔肝颗粒 3 个剂量组脂滴数量与给药剂量成反比 (图 2)。

显著性差异,但值得注意的是,与正常组相比,模型组 Ace、Chao 指数降低,与模型组相比,HZRG-H 组可升高 Ace、Chao 指数,说明高剂量的化滞柔肝颗粒可改善高脂饮食引起的 NAFLD 大鼠肠道菌群物种多样性,结果见表 2。

(2) β 多样性分析:采用 Weighted Unifrac 距离

的 β 多样性比较不同样本间的肠道菌群组成差异,结果显示 HZRG-H 组大鼠肠道菌群物种组成与模型相比差异明显,与正常组大鼠肠道菌群物种 β 多样性较接近,说明高剂量化滞柔肝颗粒能够纠偏高脂饲料引起的 NAFLD 大鼠肠道菌群群落组成差异,结果见图 3。

表 2 各组大鼠肠道菌群 α 多样性分析 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Analysis on α diversity of intestinal flora of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao 指数
正常	—	6.61±1.29	0.93±0.10	1 486.53±204.14	1 421.45±186.36
模型	—	6.69±0.37	0.96±0.01	1 336.99±56.68	1 274.19±53.39
HZRG-H	5.000	6.78±0.44	0.97±0.01	1 473.89±163.27	1 405.05±145.81

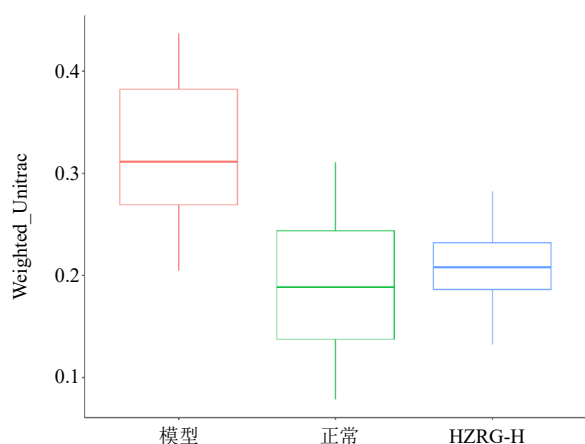


图 3 基于 Weighted Unifrac 距离的各组大鼠肠道菌群 β 多样性分析

Fig. 3 Analysis on β diversity of intestinal flora of rats in each group based on Weighted Unifrac distance

3.4.2 群落结构分析 在门水平上,厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门是 3 组大鼠肠道菌群主要的门,但在各组中组成不同。与模型组相比,HZRG-H 组大鼠肠道菌群厚壁菌门与拟杆菌门比值降低。在属水平上,与正常组相比,模型组大鼠肠道菌群中 *Odoribacter* 属相对丰度显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,HZRG-H 组大鼠肠道菌群中 *Odoribacter* 属相对丰度显著降低 ($P<0.05$),结果见图 4-A~C。

3.5 各组大鼠肠道菌群 LEfSe 分析

LEfSe 多级物种层级树图显示了从门到属水平各组肠道菌群变化,如图 5 所示,HZRG-H 组从纲水平调控放线菌纲、螺旋体纲、柔膜菌纲等优势菌,从属水平调控杜氏乳杆菌属、脱硫弧菌属、*Ruminococcaceae*-UCG-010 等优势菌。

3.6 各组大鼠代谢组学分析

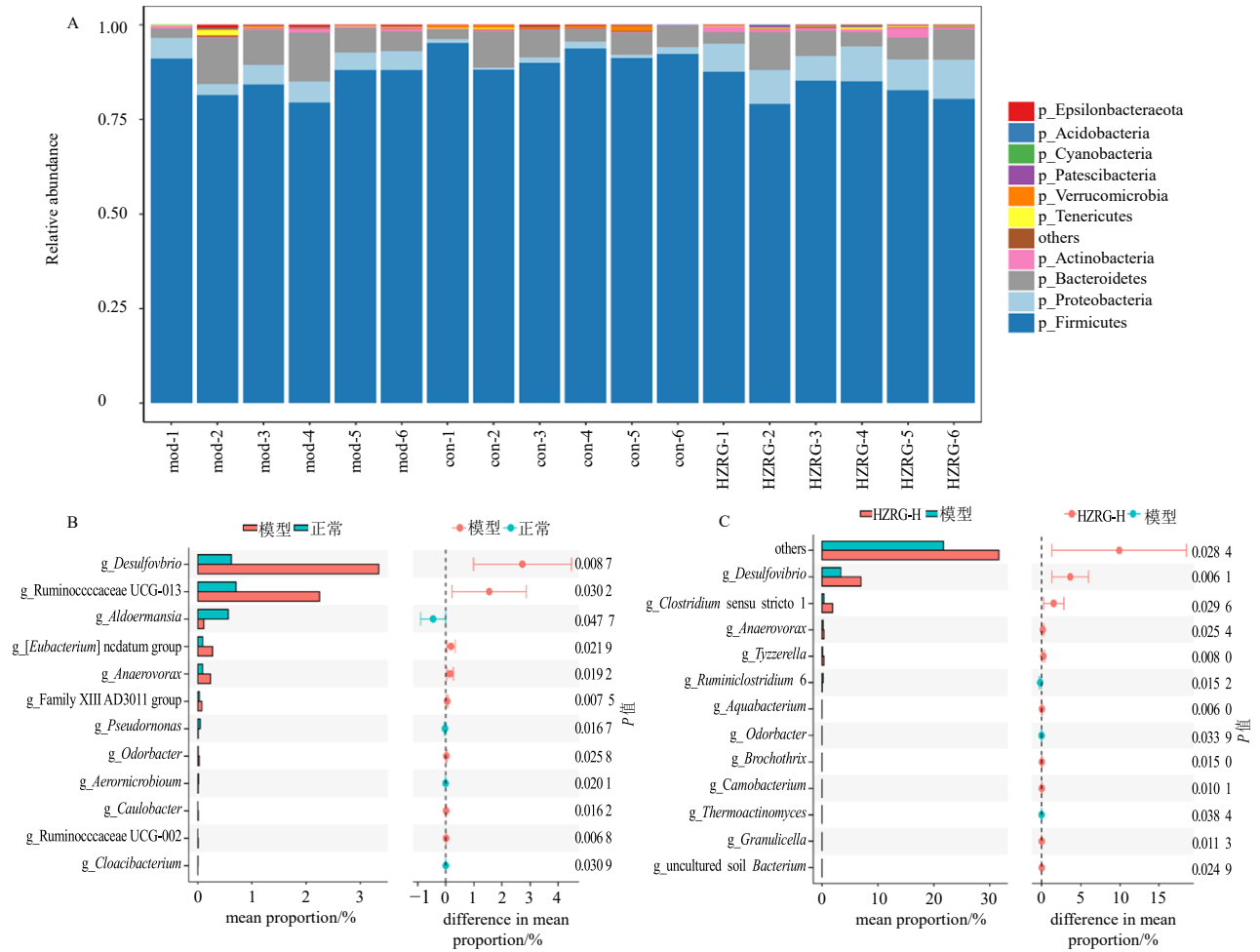
3.6.1 代谢轮廓分析 PCA 是一种可快速表征样本差异信息的化学计量学方法。因此,采用 PCA 对正、负离子模式下各组样本间差异进行分析,结果表明正常组与模型组明显区分,HZRG-H 组在正离子模式下部分样本有向正常组转化趋势,见图 6。

3.6.2 差异代谢物筛选 基于 OPLS-DA 对正、负离子模式下检测到的所有代谢物进行差异分析,绘制正、负离子模式下代谢物火山图(图 7),观察差异代谢物的分布。以同时满足 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 作为条件筛选差异代谢物,并结合 HMDB、KEGG 等数据库,最终共筛选 18 个差异代谢物,其中负离子模式下 12 个,正离子模式下 6 个,见表 3。

3.6.3 差异代谢物的相关通路分析 基于 Metabo Analyst 5.0 KEGG 进行生物途径分析,筛选潜在的关键代谢通路,结果显示化滞柔肝颗粒主要通过调节氨酰-tRNA 生物合成、胆汁分泌、胆固醇代谢等通路来发挥清热利湿、化浊解毒、祛瘀柔肝的功效,见图 8。

3.7 肠道菌群与代谢组学关联分析

为进一步探讨肠道菌群与代谢组学是否有相关关系,本实验结合 Spearman 数据分析方法对模型组和 HZRG-H 组肠道菌群与代谢组学进行关联分析,结果见图 9,HZRG-H 组调控肠道菌群的关键菌属为 *Akkermansia*、*Ruminiclostridium*-6、杜氏乳杆菌属、脱硫弧菌属、*Tyzzera*,其中 *Akkermansia*、*Ruminiclostridium*-6 属与 D-吡啶酸、L-组氨酸代谢物呈负相关,与牛磺胆酸、神经酸、2(E)-二十碳烯酸代谢物呈正相关,而杜氏乳杆菌属、脱硫弧菌属、*Tyzzera* 与之相反。



mod-模型组 con-正常组 HZRG-化滞柔肝颗粒高剂量组 (图 6 同) A-门水平上各组物种丰度聚类热图 B-属水平上正常组与模型组样本菌群差异 C-属水平上模型组与 HZRG-H 组样本菌群差异
mod-model group con-normal group HZRG-Huazhi Rougan Granules high dose group (same as fig. 6) A-clustering heat map of species abundance of each group at phylum level B-microflora difference between normal group and model group samples at genus level C-microflora difference between model group and HZRG-H group samples at genus level

图 4 各组大鼠肠道菌群群落结构分析

Fig. 4 Analysis on community structure of intestinal flora of rats in each group

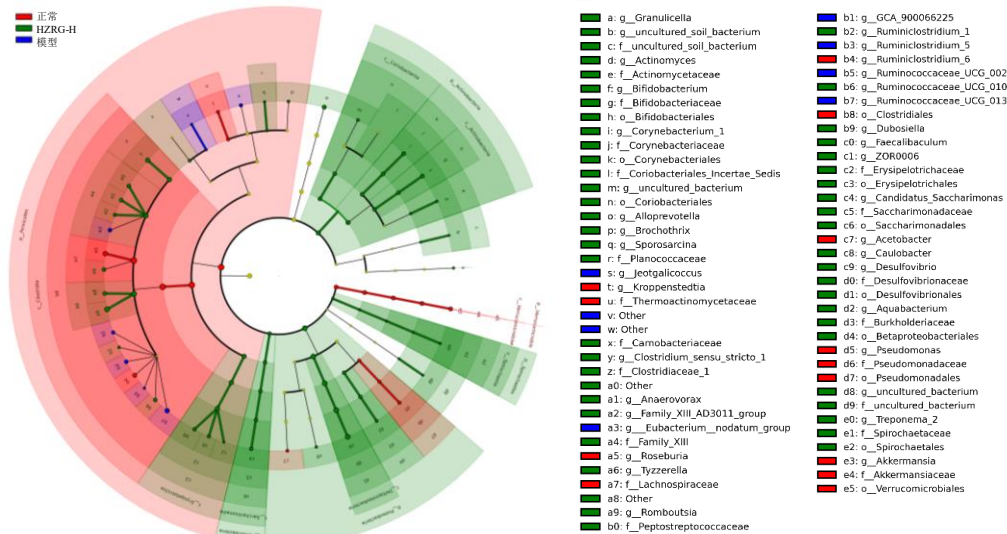


图 5 各组大鼠肠道菌群 LEfSe 进化分支图

Fig. 5 LEfSe branching diagram of intestinal flora of rats in each group

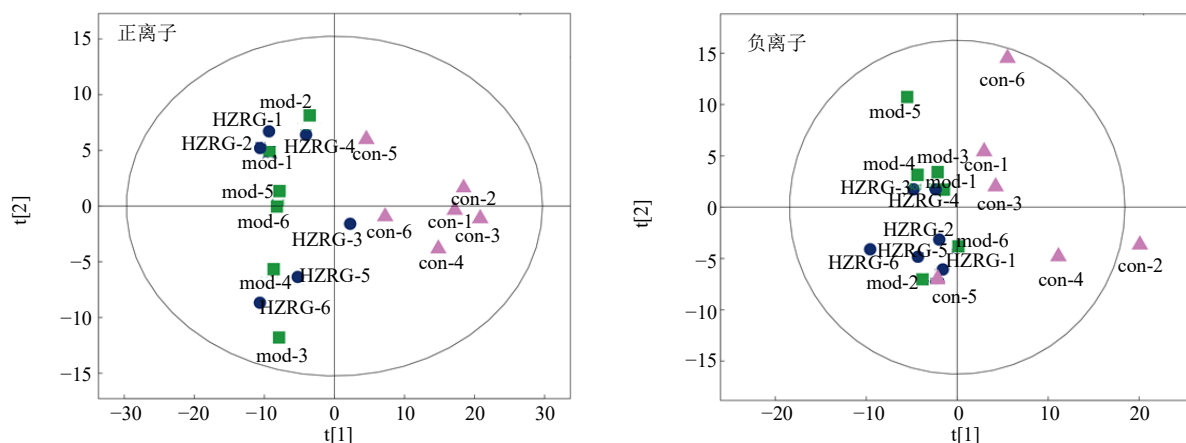


图 6 不同离子模式下各组大鼠血浆代谢物的 PCA 分析

Fig. 6 PCA analysis of plasma metabolites of rats in each group under different ion modes

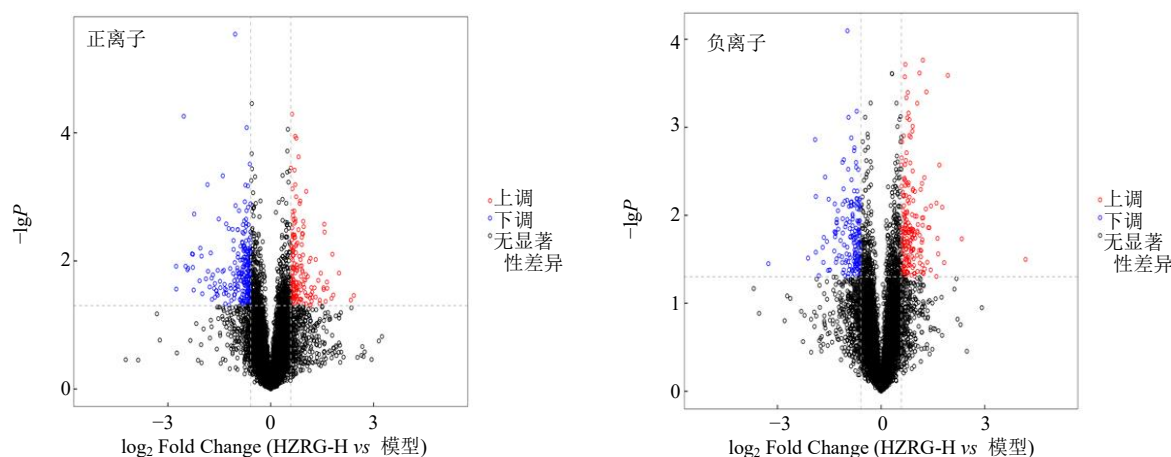


图 7 不同离子模式下模型组和 HZRG-H 组代谢物火山图

Fig. 7 Volcanic maps of metabolites in model group and HZRG-H group under different ion modes

表 3 正、负离子模式显著性差异代谢物

Table 3 Metabolites of significant difference between positive and negative ion modes

模式	化合物名称	m/z	VIP	P	模式	化合物名称	m/z	VIP	P
负离子	2(E)-二十碳烯酸	309.28	4.23	0.003	正离子	D-哌啶酸	130.08	1.49	0.001
	D-甘露醇	163.06	2.77	0.009		组氨酸	156.08	4.39	0.004
	11(Z),14(Z)-二十二碳烯酸	307.26	2.71	0.011		皮甾酮	347.22	1.41	0.022
	鹅去氧胆酸盐	451.31	4.32	0.013		1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	522.35	4.64	0.040
	D-鸡纳糖	223.08	1.77	0.015		1-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	468.31	1.68	0.042
	芥酸	337.31	1.34	0.021		L-蛋氨酸	150.06	1.52	0.048
	牛磺胆酸	514.28	1.87	0.027					
	1-甲基黄嘌呤	203.00	1.60	0.027					
	十七烷酸	269.25	2.23	0.031					
	神经酸	365.34	2.13	0.031					
	D-(+)-β-hydroxy butyric acid	103.04	3.54	0.041					
	N-苯甲酰基甘氨酸	178.05	1.95	0.046					

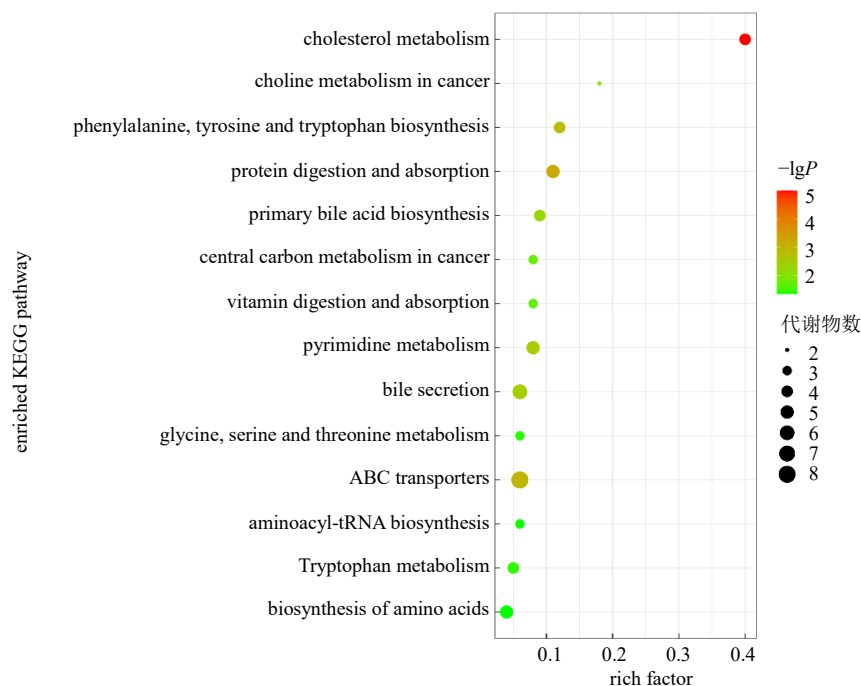


图 8 KEGG 富集通路图
Fig. 8 KEGG enrichment pathway diagram

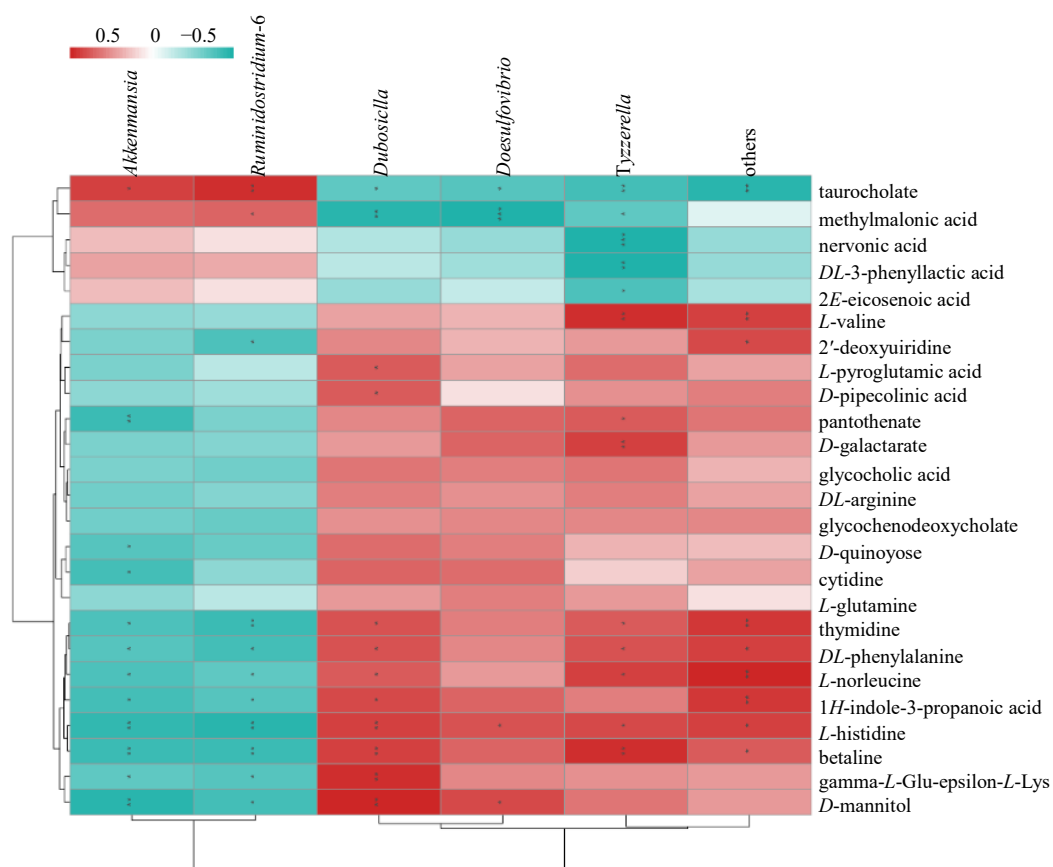


图 9 模型组和 HZRG-H 组肠道菌群与差异代谢物的相关性热图
Fig. 9 Heat map of correlation between intestinal flora and differential metabolites in model group and HZRG-H groups

4 讨论

中医古籍中并无 NAFLD 病名记载,近代医家根据其临床症状将其归属于“肝癖”“肝积”“胁痛”“积聚”等范畴^[19]。如《圣济总录·癖气》^[20]记载:“癖气者、聚于两胁间。有时而痛是也。以其僻在肋下,故名癖气”;《灵枢·百病始生篇》^[21]记载:“留而不去,持舍于肠胃之外,募原之间,留著于脉,稽留而不去,息而成积”;《丹溪心法·胁痛》^[22]记载:“胁痛,肝火盛,木气实,有死血,有痰流注”。现代医家结合古籍记载及自身的临床经验,认为 NAFLD 主要病因与个体体质、饮食不节、劳逸失度、情志失调等有关,且普遍认为 NAFLD 早期多以肝郁脾虚为主,后期可演变为痰湿内阻、湿热蕴结,进而发展为痰湿阻滞气血循行,最终导致气滞血瘀^[23-24]。可见,NAFLD 临床多以本虚标实为主要表现,本虚以肝、脾虚为主,标实可见痰湿、气滞、瘀血等因素,最终痰湿瘀互结,瘀阻肝络。

化滞柔肝颗粒由决明子、茵陈、大黄、泽泻、猪苓、山楂、炒苍术、白术、陈皮、瓜蒌、女贞子、墨旱莲、枸杞子、小蓟、柴胡、甘草组成,2017 年 NAFLD 中医诊疗专家共识意见推荐化滞柔肝颗粒用于 NAFLD 的治疗^[25]。研究发现,决明子可通过调控 *Akkermansia* 属、双歧杆菌属、黏液真杆菌属相对丰度,改善肠屏障损伤,减少脂质在肝脏的积累及 NAFLD 引起的肝损伤^[26];由大黄、泽泻、白术组成的大黄泽泻汤可提高 NAFLD 大鼠拟杆菌属、颤螺旋菌属和 *Butyricicoccus* 属的相对丰度,抑制肠道 Toll 样受体 4 信号通路,增加肠道紧密连接蛋白表达发挥治疗 NAFLD 药效^[27];枸杞中的枸杞多糖能增加脱铁杆菌门,降低疣微菌门的相对丰度,上调短链脂肪酸水平,从而修复肠道屏障,发挥治疗 NAFLD 作用^[28];茵陈可通过激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路,促进自噬进而减少 NAFLD 小鼠肝脏 TG 沉积,保护肝细胞,延缓 NAFLD 的发展^[29];山楂中的山楂酸可通过抗炎及抑制氧化应激反应,有效改善高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠肝脏病变程度^[30];女贞子中有效成分女贞子总苷可通过抑制固醇调节元件结合蛋白-1c、肝脏 X 受体- α 和白细胞介素-6 蛋白表达,抑制炎症反应,进而调节血脂改善 NAFLD^[31]。可见,化滞柔肝颗粒可能是通过多组分、多通路发挥治疗 NAFLD 的药效。值得注意的是,目前化滞柔肝颗粒治疗 NAFLD 的基础研究较少,有学者^[32]采用网络药理学和分子对接技术发现

化滞柔肝颗粒通过活性成分槲皮素、山柰酚、木犀草素和汉黄芩素激活核心靶点白细胞介素-6、肿瘤坏死因子、表皮生长因子等蛋白,进而调控糖基化终产物/糖基化终末产物受体信号通路、人巨细胞病毒感染等信号通路来发挥抗 NAFLD 药效,但未得到进一步验证。因此,本研究联合肠道菌群和代谢组学,明晰化滞柔肝颗粒治疗 NAFLD 的作用机制。

首先,考察了化滞柔肝颗粒治疗 NAFLD 的药效。结果显示,给药 4 周后,与模型组相比,HZRG-H、HZRG-M 组可显著降低 NAFLD 大鼠体质量 ($P < 0.05$ 、 0.01)。HZRG-H、HZRG-M、HZRG-L 组可显著降低 NAFLD 大鼠 TC、TG 水平 ($P < 0.01$),HZRG-H、HZRG-M 组可升高 HDL-C 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01),HZRG-H 组还可显著降低 LDL-C 水平 ($P < 0.05$),表明化滞柔肝颗粒具有较好的抗 NAFLD 药效,且呈一定的量效关系。宋立艳等^[33]选取 88 例湿热蕴结型 NAFLD 患者,分为 2 组,对照组口服疏普罗宁肠溶片,观察组在此基础上加服化滞柔肝颗粒,给药 2 月后,发现观察组有效率达 93.18%,且 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平较治疗前及对照组改善更明显,该发现与本研究结果一致。此外,油红 O 染色显示不同剂量化滞柔肝可有效改善 NAFLD 大鼠肝脏病理状态,提示化滞柔肝颗粒可有效减少脂滴在大鼠肝脏内聚集。

其次,为了探讨化滞柔肝颗粒治疗 NAFLD 的作用机制,本研究采用 16S rDNA 观察化滞柔肝颗粒对 NAFLD 大鼠肠道菌群的影响。结果显示,与模型组相比,高剂量化滞柔肝颗粒可降低肠道菌群厚壁菌门与拟杆菌门比值,厚壁菌门与拟杆菌门比值是反映肠道菌群紊乱的重要指标^[34-35],提示化滞柔肝颗粒可缓解 NAFLD 引起的肠道菌群紊乱。Liu 等^[36]发现化滞柔肝颗粒可改变高脂饮食小鼠肠道菌群的组成,降低厚壁菌门与拟杆菌门的比例,这与本研究结果一致。此外,与模型组相比,高剂量化滞柔肝颗粒可显著降低 *Odoribacter* 属相对丰度,有学者发现 *Odoribacter* 丰度与肝纤维化指标 α -平滑肌肌动蛋白和转化生长因子- β 呈正相关^[37],表明化滞柔肝颗粒可能通过降低 *Odoribacter* 的丰度来减少 NAFLD 相关致病因子水平。值得注意的是,LEfSe 分析显示高剂量化滞柔肝颗粒可显著提高大鼠肠道瘤胃球菌属-UCG-010 相对丰度。有学者发现瘤胃球菌属与 NAFLD 相关指标如肝脏质量、血清转氨酶水平、肝脏脂肪变性和炎症程度呈负相关^[38],

上述研究结果提示化滞柔肝颗粒可能通过改善部分菌群丰度来发挥治疗 NAFLD 的作用。

再者,本研究结合代谢组学进一步观察化滞柔肝颗粒对 NAFLD 大鼠体内代谢物的影响。代谢组学结果显示,高剂量化滞柔肝颗粒可上调鹅去氧胆酸盐、牛磺胆酸、神经酸含量,下调 D-哌啶酸等差异代谢物含量。有研究发现鹅去氧胆酸盐是形成羟甲基戊二酰辅酶 A、抑制胆固醇合成的关键物质^[39]。牛磺胆酸可缓解高脂饮食诱导的小鼠肝脏脂肪变性、炎症反应、肥胖和胰岛素抵抗^[40]。NAFLD 的形成与神经酸浓度呈负相关^[41]。肠道菌群对膳食 D-赖氨酸的分解代谢会引起血浆中 D-哌啶酸水平的升高,进而加重慢性肝病的进展^[42]。以上报道结合本研究筛选的差异代谢产物结果,提示化滞柔肝颗粒发挥抗 NAFLD 药效可能是通过调控多个代谢物共同发挥作用。同时,对上述差异代谢物进行 KEGG 通路分析,发现化滞柔肝颗粒通过调控胆汁分泌、胆固醇代谢等途径发挥抗 NAFLD 药效,这为后期深入开展化滞柔肝颗粒治疗 NAFLD 作用机制提供了研究基础。

最后,为了探讨肠道菌群与代谢产物是否有依存关系,本研究对肠道菌群与代谢组学进行了关联分析。结果表明,给予化滞柔肝颗粒后差异菌杜氏乳杆菌属、脱硫弧菌属与血浆中的代谢物 L-组氨酸、甘露醇呈显著正相关,与甲基丙二酸呈显著负相关。有研究发现杜氏乳杆菌属的丰度提高可减轻 NAFLD 大鼠肝脏和脂肪代谢紊乱、减少肝损伤和抑制肝脏炎症细胞因子的释放^[43]。脱硫弧菌属可提高硫化氢水平进而触发蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路改善 NAFLD^[44]。与此同时,关联分析还显示 *Akkermansia* 属与牛磺胆酸呈显著正相关,而 *Akkermansia* 属被认为与肠道免疫稳态有关,且 *Akkermansia* 属下的 *Akkermansia muciniphila* 与脂肪代谢直接相关^[45]。

综上,本研究通过肠道菌群及代谢组学联合分析证实,化滞柔肝颗粒可通过调控 NAFLD 大鼠肠道菌群脱硫弧菌属、杜氏乳杆菌属、*Akkermansia* 等菌属丰度,进而调控胆固醇代谢、胆汁酸等代谢相关通路来调节肝脏脂质堆积,发挥改善 NAFLD 作用。总之,本研究不仅为深入研究化滞柔肝颗粒干预 NAFLD 的作用机制提供依据,同时也为化滞柔肝颗粒的进一步临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cotter T G, Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: The state of the disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1851-1864.
- [2] Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic fatty liver disease: Basic pathogenetic mechanisms in the progression from NAFLD to NASH [J]. *Transplantation*, 2019, 103(1): e1-e13.
- [3] Younossi Z M, Koenig A B, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [4] Vernon G, Baranova A, Younossi Z M. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(3): 274-285.
- [5] Petersen K F, Dufour S, Feng J, et al. Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48): 18273-18277.
- [6] 闫冰冰, 晁旭, 冯雪松, 等. 非酒精性脂肪性肝病发病机制的研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2021, 27(12): 956-960.
- [7] Zhou F, Zhou J H, Wang W X, et al. Unexpected rapid increase in the burden of NAFLD in China from 2008 to 2018: A systematic review and meta-analysis [J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1119-1133.
- [8] Rafiq N, Bai C H, Fang Y, et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7(2): 234-238.
- [9] Li X, Ge J D, Li Y J, et al. Integrative lipidomic and transcriptomic study unravels the therapeutic effects of saikosaponins A and D on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3527-3541.
- [10] 徐京杭. 多烯磷脂酰胆碱在肝病临床应用的专家共识 [J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2017, 11(4): 313-319.
- [11] Carr R M, Oranu A, Khungar V. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2016, 45(4): 639-652.
- [12] Musso G, Gambino R, Cassader M, et al. A Meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2010, 52(1): 79-104.
- [13] Lewis J D, Ferrara A, Peng T, et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(4): 916-922.
- [14] Schürks M, Glynn R J, Rist P M, et al. Effects of vitamin E on stroke subtypes: Meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *BMJ*, 2010, 341: c5702.
- [15] Klein E A, Thompson I M Jr, Tangen C M, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT) [J]. *JAMA*, 2011, 306(14): 1549-1556.
- [16] 文晓玲, 张海浪. 多烯磷脂酰胆碱不良反应文献分析

- [J]. 中国药物警戒, 2020, 17(8): 526-530.
- [17] 于洋, 钱丽旗, 侯鹏, 等. 化滞柔肝颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(21): 2302-2304.
- [18] 王杰, 隗鑫, 陈威, 等. 代谢组学技术在中药复方配伍规律研究中的应用 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1528-1539.
- [19] 朱振红, 郭朋, 唐旭东, 等. 脂肪肝从毒论治 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(12): 2568-2570.
- [20] 钟郁萱. 基于数据挖掘的刘汶教授治疗非酒精性脂肪性肝病回顾性研究 [J]. 北京中医药大学, 2021.
- [21] 王洪图, 贺娟. 黄帝内经灵枢白话解 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 244.
- [22] 元·朱震亨. 丹溪心法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 231.
- [23] 王乾皓. 中药代茶饮干预非酒精性脂肪性肝病(湿热蕴结证)的临床疗效观察 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [24] 张春花. 非酒精性单纯性脂肪肝患者体质与出生时期五运六气的规律探究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [25] 张声生, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(12): 2270-2274.
- [26] Luo H Y, Wu H W, Wang L X, *et al.* Hepatoprotective effects of *Cassiae Semen* on mice with non-alcoholic fatty liver disease based on gut microbiota [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1357.
- [27] Fang J, Sun X Q, Xue B Y, *et al.* Dahuang Zexie Decoction protects against high-fat diet-induced NAFLD by modulating gut microbiota-mediated toll-like receptor 4 signaling activation and loss of intestinal barrier [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 2945803.
- [28] Gao L L, Ma J M, Fan Y N, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide combined with aerobic exercise ameliorated nonalcoholic fatty liver disease through restoring gut microbiota, intestinal barrier and inhibiting hepatic inflammation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 1379-1392.
- [29] 贾宁, 邵珊珊, 陈文斌, 等. 茵陈对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂质沉积及 p38 MAPK、p62/LC3 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(3): 229-235, 277.
- [30] 何峰, 张雪莲, 温祥臣. 山楂酸对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝模型小鼠炎症反应及氧化应激的影响 [J]. 中国药房, 2019, 30(7): 901-905.
- [31] Yang N Y, Zhang Y W, Guo J M. Preventive effect of total glycosides from *Ligustri Lucidi Fructus* against nonalcoholic fatty liver in mice [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2015, 70(9/10): 237-241.
- [32] 刘莹莹, 张景媛, 谭影影, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的化滞柔肝颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(4): 395-400, 406.
- [33] 宋立艳, 袁庆丰. 化滞柔肝颗粒治疗湿热蕴结型非酒精性脂肪肝 44 例 [J]. 浙江中医杂志, 2022, 57(4): 253-254.
- [34] Vaiserman A, Romanenko M, Piven L, *et al.* Differences in the gut Firmicutes to Bacteroidetes ratio across age groups in healthy Ukrainian population [J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 221.
- [35] Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [36] Liu Y Y, Tan Y Y, Huang J Q, *et al.* Revealing the mechanism of Huazhi Rougan Granule in the treatment of nonalcoholic fatty liver through intestinal flora based on 16S rRNA, metagenomic sequencing and network pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 875700.
- [37] Yamamoto K, Honda T, Yokoyama S, *et al.* Microbiome, fibrosis and tumor networks in a non-alcoholic steatohepatitis model of a choline-deficient high-fat diet using diethylnitrosamine [J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(11): 1443-1450.
- [38] Milton-Laskibar I, Cuevas-Sierra A, Portillo M P, *et al.* Effects of resveratrol administration in liver injury prevention as induced by an obesogenic diet: Role of Ruminococcaceae [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8): 1797.
- [39] Broughton G 2nd. Chenodeoxycholate: the bile acid. The drug. A review [J]. *Am J Med Sci*, 1994, 307(1): 54-63.
- [40] Wang W J, Zhao J F, Gui W F, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid inhibits intestinal inflammation and barrier disruption in mice with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(3): 469-484.
- [41] Konstantynowicz-Nowicka K, Berk K, Chabowski A, *et al.* High-fat feeding in time-dependent manner affects metabolic routes leading to nervonic acid synthesis in NAFLD [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3829.
- [42] Fujita T, Amuro Y, Hada T, *et al.* Plasma levels of pipecolic acid, both L- and D-enantiomers, in patients with chronic liver diseases, especially hepatic encephalopathy [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, 287(1/2): 99-109.
- [43] Hu M Y, Zhang L, Ruan Z, *et al.* The regulatory effects of *Citrus* peel powder on liver metabolites and gut flora in mice with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3022.
- [44] Chen L, Gao Y S, Zhao Y J, *et al.* Chondroitin sulfate stimulates the secretion of H₂S by *Desulfovibrio* to improve insulin sensitivity in NAFLD mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 213: 631-638.
- [45] Depommier C, Hul MV, Everard A, *et al.* Pasteurized *Akkermansia muciniphila* increases whole-body energy expenditure and fecal energy excretion in diet-induced obese mice [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(5): 1231-1245.

[责任编辑 潘明佳]