

荔枝核总黄酮通过改善肠道菌群结构减轻四氯化碳诱发的肝纤维化

胡兴兰¹, 杨莹莹¹, 黄盼玲², 罗伟生¹, 梁健钦¹, 周金玲^{1,3}, 夏 星^{1,3*}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

2. 河池市中医医院, 广西 河池 547099

3. 广西中医药大学 广西高校中药神经-代谢及免疫药理重点实验室, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 从荔枝核总黄酮 (total flavonoids from *Litchi Semen*, TFL) 调节肠道微环境的角度探讨其抗肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 的作用机制。 **方法** 采用 40% 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) - 花生油溶液背部 sc 构建 HF 大鼠模型, 将 HF 大鼠分为模型组、扶正化瘀组 (450 mg/kg) 及 TFL 低、中、高剂量 (45、90、180 mg/kg) 组, 连续 ig 给药 8 周后, Masson 染色观察各组大鼠肝脏组织病理变化; ELISA 法检测大鼠血清 HF 标志物 IV 型胶原 (collagen type IV, Col-IV)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、III 型前胶原 (procollagen type III, PC III)、层黏连蛋白 (laminin, LN) 的含量; 检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 含量评价大鼠肝功能, 鲎试剂检测血清内毒素水平; 16S rRNA 高通量测序分析肠道菌群结构; 采用 Western blotting 法检测大鼠回肠组织闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1)、闭合蛋白 (occludin)、封闭蛋白 2 (claudin 2) 的表达。 **结果** TFL 各给药组均能不同程度的改善 HF 大鼠肝脏胶原沉积情况, 显著降低血清中 Col-IV、PC III、HA、LN、ALT、AST 含量 ($P < 0.01$); 显著增加回肠组织 ZO-1、occludin 蛋白表达 ($P < 0.05$)。TFL 能改善 HF 大鼠肠道菌群多样性, 在门、属水平上恢复肠道菌群的正常组成, 并同时显著降低入血内毒素水平 ($P < 0.01$)。 **结论** TFL 可缓解 CCl₄ 诱导的 HF 大鼠症状, 其机制可能为恢复肠道菌群多样性, 改善肠黏膜屏障, 从而减少肠源性内毒素入血, 进而抑制 HF 的进展。

关键词: 荔枝核总黄酮; 肝纤维化; 肠道菌群; 肠黏膜屏障; 内毒素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0145-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.015

Total flavonoids from *Litchi Semen* alleviates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis by restoring intestinal microbiota composition

HU Xinglan¹, YANG Yingying¹, HUANG Panling², LUO Weisheng¹, LIANG Jianqin¹, ZHOU Jinling^{1,3}, XIA Xing^{1,3}

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Hechi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hechi 547099, China

3. Key Laboratory of TCM Neuro-metabolism and Immunopharmacology of Guangxi Education Department, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective The anti-hepatic fibrosis (HF) mechanism of total flavonoids from *Litchi Semen* (TFL) was investigated from the regulating of intestinal microenvironment. **Methods** Rats were injected subcutaneously with 40% carbon tetrachloride (CCl₄)-peanut oil solution to induce HF. Then HF rats were divided into model group, Fuzheng Huayu group (450 mg/kg), and TFL low-, medium-, and high-dose (45, 90, and 180 mg/kg) groups. After eight weeks of ig administration, masson staining was performed to observe the histopathological changes in the liver of rats, ELISA was performed to detect the content of serum hepatic fibrosis markers, collagen type IV (Col-IV), hyaluronic acid (HA), procollagen type III (PC III), and laminin (LN); alanine aminotransferase (ALT);

收稿日期: 2024-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160834); 广西壮瑶药重点实验室开放课题 (GXZYZZ2022-15); 广西中医药大学桂派杏林拔尖人才项目 (2022C007); 广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目 (202405); 中药学广西一流学科 [桂教科研 (2022) 1 号]; 广西高水平中医药重点学科中药药理学 [桂中医药科教发 (2023) 13 号]

作者简介: 胡兴兰 (2000—), 女, 硕士研究生。E-mail: 3184227767@qq.com

***通信作者:** 夏 星 (1981—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药新药研究与开发。E-mail: xiaxing66@163.com

aspartate aminotransferase (AST) were measured to evaluate the rat hepatic function, horseshoe crab reagent was used to detect serum endotoxin levels. 16S rRNA high-throughput sequencing was used to analyze the structure of the intestinal flora. Western blotting was used to detect zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, and claudin 2 in ileum tissue. **Results** All dose of TFL treatment decrease the hepatic collagen deposition in HF rats, and significantly reduced the serum levels of Col-IV, PC III, HA, LN, ALT and AST ($P < 0.01$); meanwhile, it significantly increased ileal ZO-1, Occludin proteins ($P < 0.05$). Moreover, TFL treatment improved the intestinal flora diversity in hepatic fibrosis rats, restored the composition of intestinal flora at the portal and generic levels, and significantly reduced the level of blood-entered endotoxin ($P < 0.01$). **Conclusion** TFL could attenuate CCl₄-induced HF rats, and the mechanism may lie in restoring the diversity of intestinal flora and improving the intestinal mucosal barrier, thus alleviating the chronic exposure to gut-derived endotoxins, ultimately inhibiting the progression of hepatic fibrosis.

Key words: total flavonoids from *Litchi Semen*; hepatic fibrosis; intestinal flora; intestinal mucosal barrier; endotoxin

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是慢性肝病发展为肝硬化、肝癌、肝功能衰竭等终末期肝病的共同病理过程, 以肝内弥漫性的细胞外基质进行性积累为主要特征^[1], 具有可逆性, 形成原因是肝细胞的慢性损伤、炎症和组织的重建。HF 属现代医学病名, 古代中医文献中并无该病名的记载, 根据其发病特点, 可归为“胁痛”“黄疸”“鼓胀”“肝癖”“肝积”等范畴, 其病位在肝, 与脾密切相关^[2]。《肝纤维化中西医结合诊疗指南》^[3]指出, HF 是肝脏的形质损伤, 因阴精亏损不能化气为用, 从而导致机体气血不畅, 凝血蕴里不散而发生积聚, 虚损主要表现在脾气虚、肝肾阴精虚损、肝气虚等方面, 即“虚损生积”, 故临床治疗时应当补益生化精气、祛瘀散结, 使用扶正化瘀胶囊作为治疗 HF 的中成药已获广泛认可。此外, 近年来的研究还发现复方鳖甲软肝片、丹参滴丸等中药有防治 HF 的作用^[4-5]。

荔枝核为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Soon. 的干燥成熟种子, 具有疏肝理气、行气散结、祛寒止痛之功效, 荔枝核主要成分为黄酮类化合物、氨基酸、皂苷、脂肪酸、鞣质等, 其活性成分具有抗感染、抗病毒、抗菌、清除氧自由基、降糖调脂、保护心血管、保护肝脏等功效。荔枝核总黄酮 (total flavonoids from *Litchi Semen*, TFL) 为荔枝核中提取的黄酮类化合物^[6], 有研究发现 TFL 能够有效抑制大鼠的 HF 发展, 还可促进肝脏星状细胞凋亡, 抑制肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体、肝内结缔组织生长因子、转化生长因子 $\beta 1$ 的高表达, 但 TFL 抗 HF 的作用机制尚未清楚。肠道是人体重要的消化器官之一, 近年来研究表明多种肝病的发病机制中均存在“肠-肝轴”机制^[7], 肠道微生态环境紊乱、肠源性内毒素血症、胆汁酸代谢紊乱等机制一直是治疗 HF 的研究热点, 血液循环中肠源性内毒素, 又名脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的

增加是 HF 肝损伤进展的重要原因之一^[8], 故从“肠-肝轴”角度探究 TFL 抗 HF 的作用机制有重要意义。通过探究 TFL 的治疗对大鼠肠道菌群及肠源性 LPS 驱动 HF 进展的影响, 为 TFL 的新药开发提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 SPF 级 Wistar 大鼠, 72 只, 体质量 180~220 g, 由长沙市天勤生物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0013, 动物合格证号 NO.430726200100238274, 饲养于广西中医药大学 SPF 级实验动物中心, 实验动物使用许可证号 SYXK 桂 2019-0001, 实验全程除采样前禁食外, 动物自由摄取水和食物, 饲养温度 (23 ± 2) °C, 相对湿度 55%~65%。动物实验经广西中医药大学动物实验福利伦理委员会标准 (伦理号 DW20200821-135)。

1.2 药品与试剂

TFL 依据文献方法^[9]提取, 由广西中医药大学梁健钦教授提供, 总黄酮含量 49.93%; 扶正化瘀胶囊 (批号 201919, 国药准字 Z20020073) 由上海黄海制药有限责任公司提供; 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄, 批号 20190901) 购自天津市恒兴化学制造有限公司; 花生油 (批号 AC2020/01/15) 购自山东鲁花集团有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 检测试剂盒 (批号分别为 20201207、20201211、20201221) 由南京建成生物工程研究所提供; IV 型胶原 (collagen type IV, Col-IV), III 型前胶原 (procollagen type III, PC III) 检测试剂盒 (批号分别为 A03010435、A03010435) 购自武汉华美生物有限公司; 层黏连蛋白 (laminin,

LN) 检测试剂盒(批号 032021)购自上海江莱生物科技有限公司;内毒素检测试剂盒(批号 100154)购自厦门鲎试剂生物科技有限公司;全蛋白提取试剂盒(批号 20200924)购自南京凯基生物有限公司;闭合蛋白(occludin)、封闭蛋白 2(claudin 2)一抗(批号分别为 VK-313803, VH307373)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1, 批号 00093688)购自武汉三鹰生物技术有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 2118S10)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG(批号 BST16K26C16L)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器

INFINITE M200PRO 型连续波长检测仪(美国 TECAN 公司);NANODROP ONE 型超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Thermostat C 型恒温孵育器(德国 Eppendorf 公司);HVE-50 型高压灭菌锅(日本 HiraYama 公司);ChemiDoc MP 型全能型成像分析系统、PowerPac HC 型稳压电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);GeneAmp 9700 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

随机取 12 只大鼠 sc 等剂量花生油作为对照组,随机取 60 只大鼠进行背部 sc 40% CCl₄-花生油溶液(4 mL/kg)造模^[10],每周 2 次,第 8 周末随机抽取 3 只大鼠,经 3%戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血,检测 HF 生化指标血清 IV-C、ALT 及 AST,并以肝脏病理切片观察组织损伤,判断造模成功情况^[3]。造模成功后,将造模动物随机分为模型组、扶正化瘀组(450 mg/kg)及 TFL 低、中、高剂量组(45、90、180 mg/kg),每组 10 只。TFL 各组 ig 质量浓度在本团队的前期研究基础上适当调节而确定^[9,11],各组动物 ig 相应药物(7.5 mL/kg),1 次/d,对照组与模型组 ig 等体积蒸馏水,连续 8 周。

2.2 HF 血清标志物检测

麻醉大鼠后腹主动脉采血,静置 30 min 后 25 ℃、3 500 r/min 离心 15 min,取上清,随后根据试剂盒说明书检测大鼠血清 Col-IV、HA、PC III、LN、ALT 及 AST 水平。

2.3 血清内毒素检测

根据内毒素检测试剂盒说明书,取待测血清,配制系列浓度内毒素标准品溶液,采用酶标仪在 405 nm 波长下测定吸光度(A)值,通过标准曲线计算样品中大鼠血清内毒素含量。

2.4 Masson 染色观察肝脏组织结构

末次给药后,麻醉处死大鼠,取出肝脏于 10%中性甲醛固定 48 h 后,经梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡,Masson 染色,中性树胶封片,光镜下观察各组肝脏组织结构、胶原组织增生变化情况。

2.5 肠道菌群 16S rRNA 测序

根据 HF 血清标志物的检测结果,TFL 在 90 mg/kg 时已有较强的抗 HF 效果,因此进一步观察 TFL 中剂量组动物肠道微生物的变化。给药第 8 周末,随机获取对照组($n=4$)、模型组($n=5$,长期肝纤维化造模导致该组疾病状态的个体差异增加,故适当增加抽样样本以减轻这种影响)、TFL 中剂量组($n=4$)500 mg 粪便样本,按 DNA 提取试剂盒操作抽提粪便样品基因组,利用 NanoDrop2000 及 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和 DNA 质量,根据微生物 16S rRNA V3~V4 区设计引物(F: 5'-ACTCCTACGGGAGGC-AGCAG-3'; R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 DNA 样品进行 PCR 扩增,PCR 扩增后,经 2%琼脂糖凝胶电泳检测产物,采用 Miseq PE300 测序平台获取模板 DNA 片段信息。

2.6 Western blotting 检测 ZO-1、occludin 及 claudin 2 蛋白表达

以全蛋白提取试剂盒提取大鼠回肠总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白含量。将蛋白样本变性,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,经 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。分别滴加 ZO-1(1:1 000)、occludin(1:1 000)、claudin 2(1:250)、GAPDH(1:2 000)一抗 4 ℃孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,二抗(1:10 000)室温孵育 2 h,在 PVDF 膜上滴加 200 μ L 辣根过氧化物酶化学发光底物液进行显影,采用 ChemiDoc MP 成像分析系统采集条带图像,采用 Image-J 软件分析条带灰度值。

2.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 26.0 软件进行统

计学分析, 定量数据结果的组间差异比较采用单因素方差分析, 肠道菌群的组间差异分析使用 Wilcoxon 秩和检验。

3 结果

3.1 对 HF 大鼠血清相关指标的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 Col-IV、PC III、HA、LN、ALT 及 AST 水平均显著升高 ($P<0.001$)。与模型组比较, TFL 中剂量组血清中 Col-IV 水平显著降低 ($P<0.05$); TFL 低、中、高剂量组 PC III 水平均显著降低 ($P<0.05$); TFL 低、高剂量组 HA 水平显著降低 ($P<0.05, 0.01$); TFL 高剂量组 LN 水平显著降低 ($P<0.05$); TFL 低、中、高剂量组血清中 ALT、AST 水平均显著降低 ($P<0.01$)。结果表明, TFL 能够显著降低 HF 大鼠血清纤维四项水平, 并改善 HF 大鼠的肝功能。

3.2 对 HF 大鼠血清内毒素的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组血清内毒

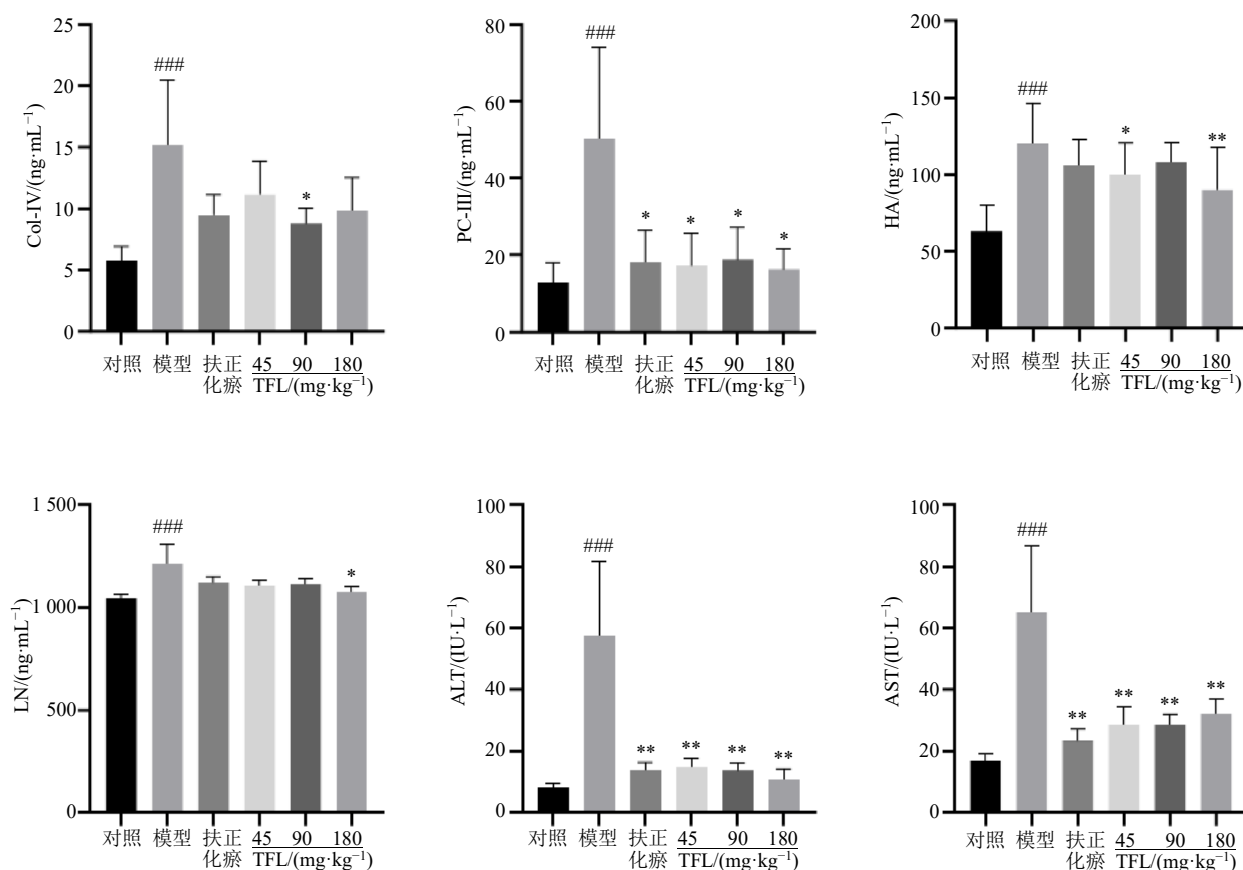
含量显著上升 ($P<0.001$), 与模型组比较, TFL 低、中、高剂量组血清内毒素含量均显著下降 ($P<0.01, 0.001$)。

3.3 对 HF 大鼠肝脏组织形态的影响

如图 3 所示, 对照组大鼠肝脏结构正常, 无变性坏死, 无炎性细胞浸润, 无胶原沉积; 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏均出现肝细胞大面积脂肪变性, 部分区域坏死, 炎性细胞浸润, 肝脏中央静脉或汇管区胶原纤维增生形成纤维间隔。与模型组比较, TFL 低、中、高剂量组大鼠肝脏纤维化程度有所改善, 肝脏胶原纤维明显减少。

3.4 对 HF 大鼠肠道微生物多样性的影响

通过 16S rRNA 测序分析 TFL 中剂量组 HF 大鼠肠道菌群的组成, 并采用 Beta 多样性分析与对照组及模型组大鼠的肠道菌群的组成进行比较。基于操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 分类水平的主成分分析 (principal component analysis,



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

$P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 TFL 对 HF 大鼠血清纤维四项水平及肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9\sim10$)

Fig. 1 Effect of TFL on four indexes of liver fibrosis and hepatic function in HF rats ($\bar{x} \pm s, n=9\sim10$)

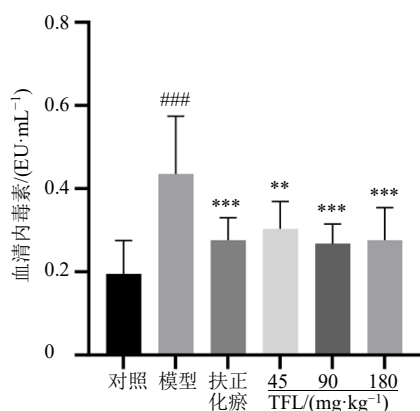
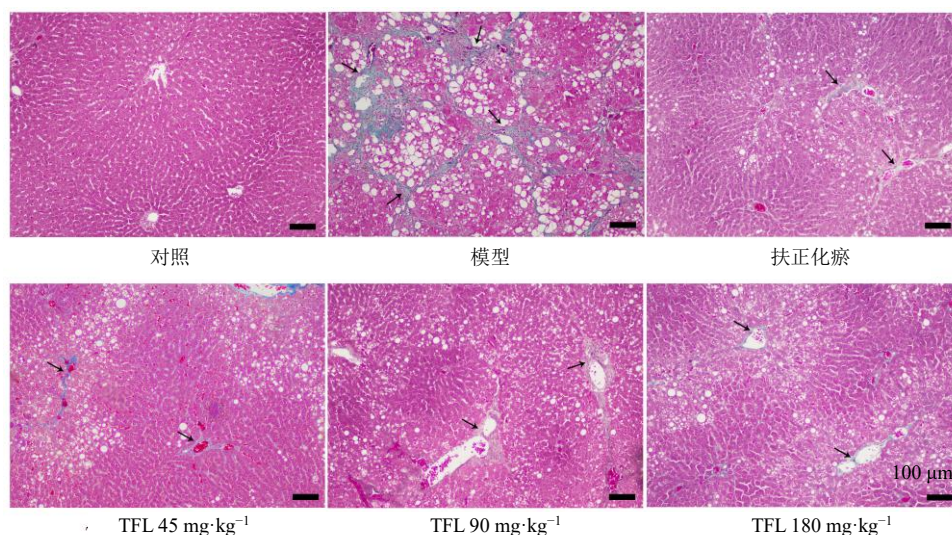


图 2 TFL 对 HF 大鼠血清内毒素的影响
($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Effect of TFL on serum endotoxin in HF rats
($\bar{x} \pm s, n = 9$)



箭头指示胶原纤维沉积处。

Arrows indicate where collagen fibers are deposited.

图 3 HF 大鼠肝组织的 Masson 染色图 (×100)

Fig. 3 Masson staining of liver tissue in HF rats (×100)

高, 厚壁菌门相对丰度降低。基于属水平对各组肠道微生物组成分析, 如图 5-B 所示, 与对照组比较, 模型组乳杆菌属、未分类梭菌 UCG-014 属、单核菌属等相对丰度升高, 鼠杆状菌属、龙包茨氏菌属、苏黎世杆菌属、瘤胃球菌属等相对丰度降低。经中剂量 TFL 干预后, 乳杆菌属、未分类梭菌 UCG-014 属、单核菌属等相对丰度降低, 鼠杆状菌属、龙包茨氏菌属、苏黎世杆菌属、瘤胃球菌属等相对丰度升高。TFL 中剂量组与模型组的肠道微生物属水平比较分析结果如图 5-C 所示, TFL 中剂量组未分类

PCA) 见图 4-A。Anosin 检验 $R=0.2143$, 两两比较的组间差异显著。模型组与对照组在 PCA 图中距离较远, 2 组分布水平无交集, 而 TFL 中剂量组与对照组距离较近, 且 2 组分布水平有一定重叠。此外, 基于 OTU 分类水平根据样本群落距离矩阵关系进行聚类分析结果见图 4-B, 模型组菌群组成与对照组不在同 1 类枝, 2 组菌群组成差异明显, TFL 中剂量组多与对照组归为 1 簇, TFL 中剂量组大鼠肠道菌群与对照组相近。结果表明, TFL 中剂量治疗促使大鼠肠道菌群组成向正常水平恢复。

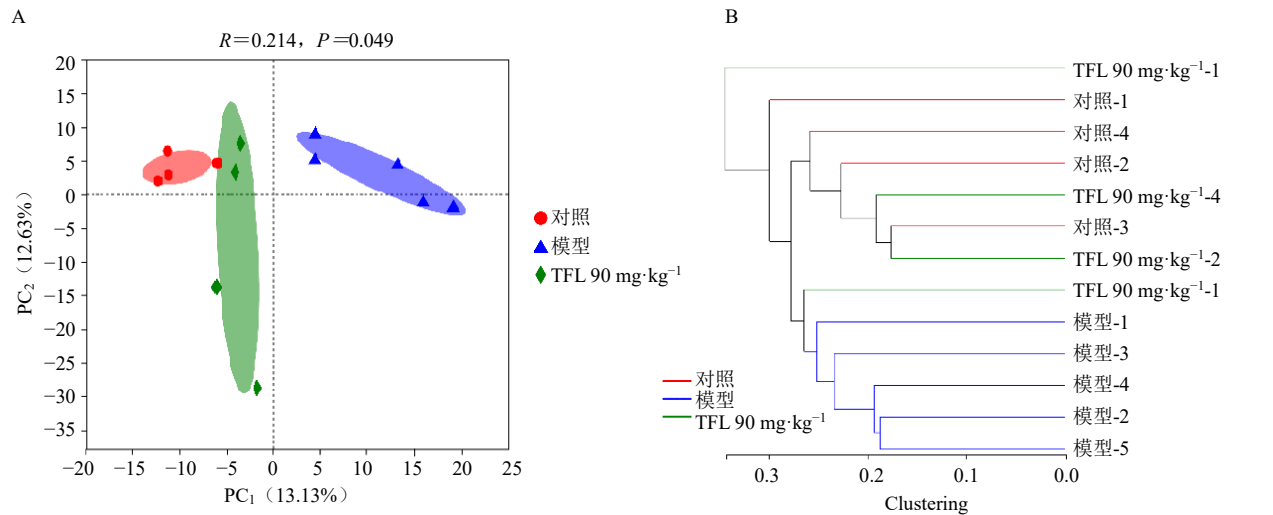
3.5 对 HF 大鼠肠道菌群组成的影响

如图 5-A 所示, 拟杆菌门、厚壁菌门在 3 组大鼠肠道微生物中占比最大, 与对照组比较, 模型组拟杆菌门相对丰度减少, 厚壁菌门相对丰度升高, TFL 中剂量干预后大鼠肠道拟杆菌门相对丰度升

梭菌 UCG-014 属、球毛螺菌属、瘤胃梭菌属相对丰度表达显著下降, 小杆菌属、粪小杆菌属、未分类红螺菌属、颤螺菌属 UCG-005 相对丰度显著升高。

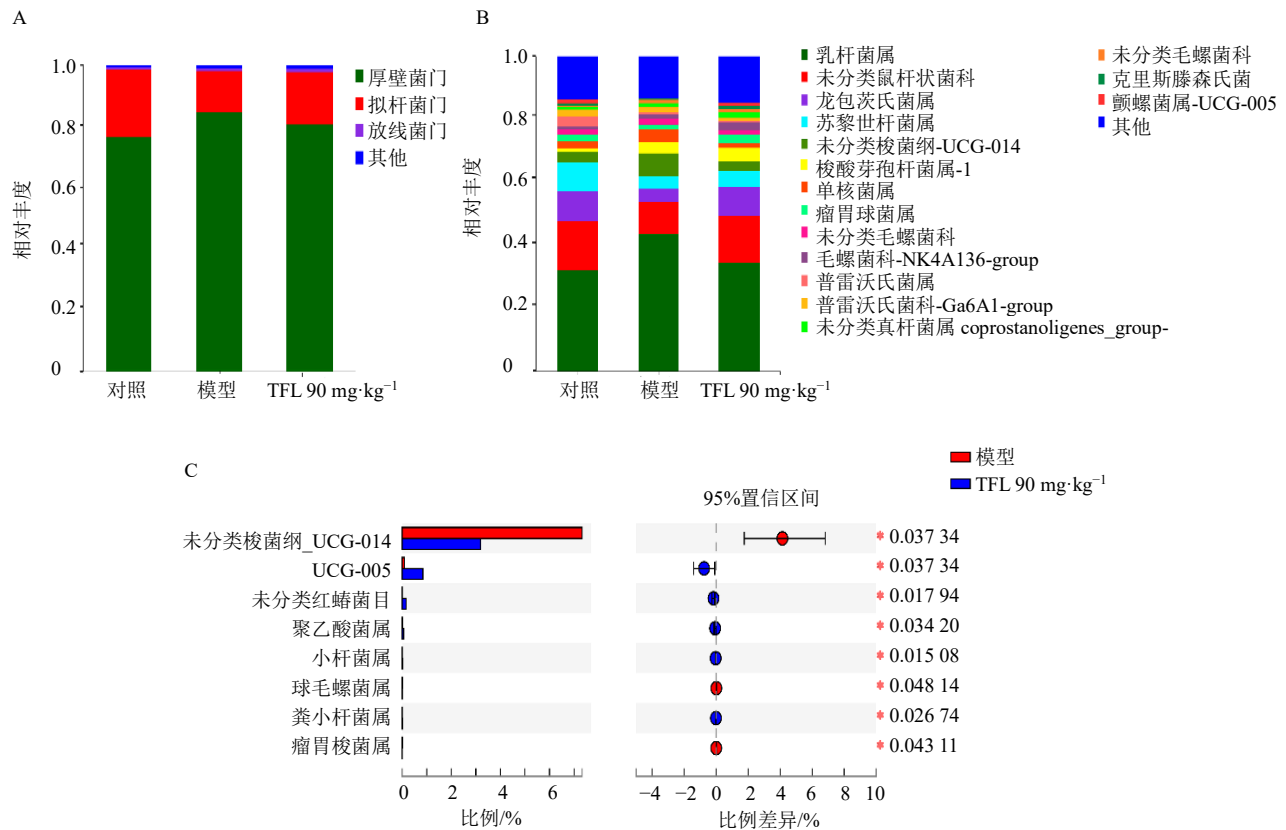
3.6 对 HF 大鼠回肠组织紧密连接蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组回肠组织 ZO-1、occludin 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001) 且 claudin 2 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$)。与模型组比较, TFL 各剂量均增加了 HF 动物 ZO-1 和 occludin 蛋白的表达, 并且低、高剂量对 ZO-1 的增加显著 ($P<0.01$ 、 0.001); 由于组内差异过大, TFL



A-大鼠肠道菌群 PCA 分析图; B-大鼠肠道菌群层级聚类分析图。

A- PCA analysis plot of rats intestinal flora; B-hierarchical cluster analysis plot of rats intestinal flora.

图 4 TFL 改善 HF 大鼠肠道微生物多样性 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 5$)Fig. 4 TFL improved gut microbial diversity in HF rats ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 5$)

A-各组大鼠肠道菌群门水平物种相对丰度柱形图; B-各组大鼠肠道菌群属水平分类的物种相对丰度柱形图; C-各组大鼠肠道菌群属水平差异分析。

A-histogram of relative abundance of species at the level of rat enterobacterial phylum in each group; B-histogram of relative abundance of species categorized at level of rat enterobacterial genus in each group; C-analysis of differences at the level of rat enterobacterial genus in each group.

图 5 TFL 在门、属水平上改善 HF 大鼠肠道菌群组成

Fig. 5 TFL improves intestinal flora composition at portal and generic levels in HF rats

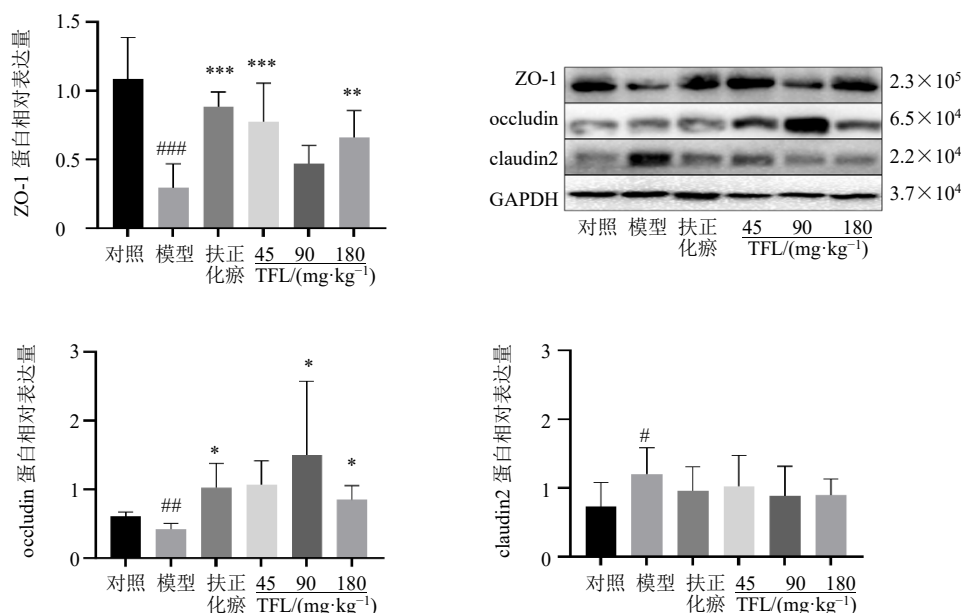


图 6 TFL 对 HF 大鼠回肠组织紧密连接的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Effect of TFL on ileal tight junctions in HF rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

中剂量组 occludin 蛋白表达虽然明显增加,但与模型组的差异不显著;TFL 低、中、高剂量组 claudin 2 蛋白表达均有降低趋势。

4 讨论

HF 导致细胞外基质过度积聚,形成纤维瘢痕,取代受损的正常组织,并损害肝功能^[12],其本质是 1 种可逆的肝脏损伤引起自我过度修复的反应,其常见的病因包括慢性病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病、胆汁淤积、寄生虫病(主要为血吸虫病)以及自身免疫性疾病等。在不同的病因刺激下,慢性肝脏损伤加剧,逐步发展为重症肝病^[13]。已有研究表明,荔枝核提取物在体内外均具有良好的抗 HF 效果作用^[14-17]。本研究表明,TFL 治疗显著改善了 HF 大鼠的肝脏组织结构,减少肝组织胶原纤维沉积,减轻肝功能损伤。

肠道菌群的变化及肠道屏障损伤参与了 HF 的发生和发展过程。肝脏和肠道有共同的胚胎起源-前肠,成熟后通过门静脉与胆道相互关联,其相互作用被称为“肠-肝轴”^[18]。肠道菌群是“肠-肝轴”的肠端主要变化因素,在氧化镍纳米颗粒诱发的 HF 中,肠道菌群的变化对 HF 的进展起到了关键的推动作用^[19]。肠黏膜屏障功能在“肠-肝轴”中扮演重要角色,肠上皮细胞、紧密连接蛋白、肠道内的黏液层是肠黏膜主要机械屏障。其中紧密连接蛋白

ZO-1、occludin 和 claudin-1 在肠道屏障中发挥着关键作用,也是评价肠道机械屏障的关键指标^[20],当肠道肝上皮细胞间的紧密连接受损时,可导致肠黏膜通透性增高,使得肠道革兰阴性菌释放的内毒素大量入血,形成肠源性内毒素血症,入血的 LPS 激活肝脏免疫细胞 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 通路,加快 HF 的进展^[21-22]。而已有的研究中,中药方剂四物汤^[23],中药材灵芝提取物^[24],或者直接补充益生菌^[25],均被证明可以通过改善肠道菌群,改善肠黏膜屏障功能以缓解 CCl₄ 诱发的 HF。

本研究结果表明,经 TFL 治疗后的 HF 大鼠肠道微生物的多样性有所恢复,接近于对照组大鼠,并且在门水平和属水平上调节了肠道菌群的组成。值得注意的颤螺菌属_UCG-005 及红蜡菌属细菌在 TFL 治疗后呈显著增加。当前颤螺菌属_UCG-005 对宿主生物功能影响的研究尚不透彻,但有研究者发现,颤螺菌属_UCG-005 与非酒精性脂肪肝的改善及肠道短链脂肪酸的增加呈正相关^[26],还有研究认为颤螺菌属_UCG-005 能影响肠道乙酸代谢,与减轻 CCl₄ 引发的 HF 有直接关系^[27]。乙酸被认为是肠道细菌调节机体炎症反应的重要介质,它可以上调含三联基序蛋白 40 (tripartite motif-containing protein 40, TRIM 40) 的表达,TRIM40 可能抑制肝组织 TLR4 信号通路的激活,缓解炎症反应驱动的

HF^[28]。与肠道短链脂肪酸的产生和胆汁酸代谢相关的红蜡菌属细菌,被发现介导当归芍药散抗 CCl₄ 引发 HF 的主要肠道细菌之一^[29]。据此,本研究推测 TFL 治疗下颤螺菌属_UCG-005 及红蜡菌属细菌的增加,可能是其调节肠道菌群而减轻 HF 的作用机制之一。本研究尚未涉及对使用 TFL 治疗后肠道短链脂肪酸、胆汁酸的代谢变化,以及其下游的 TRIM40 和 TLR4 信号通路的改变,这值得在后续的研究中加以关注。值得注意的是,虽然 TFL 的治疗作用表现出剂量相关性,但本研究中的 TFL 中剂量对血清 Col-IV、HA、ZO-1 和 occludin 蛋白的影响并未呈现剂量相关性,这可能是实验动物的个体差异过大所导致的。这提示在后续的研究中,进一步提高实验条件一致性的重要性,尤其是采用合理的方式降低大鼠 HF 损伤程度的差异。TFL 对 CCl₄ 诱导的 HF 大鼠模型肠道紧密连接具有较好的修复作用,此外,TFL 治疗后入血的 LPS 显著减少也进一步为 TFL 改善肠黏膜屏障的作用提供了依据。

综上,TFL 可改善 CCl₄ 诱导的 HF 大鼠肝功能损伤,肝脏胶原纤维沉积及炎症浸润,其抗 HF 的作用机制可能在于恢复肠道菌群多样性,增加颤螺菌属_UCG-005 属及红蜡菌属细菌水平,以及降低肠道屏障通透性,减少肠源性内毒素入血,从而抑制 HF 的进展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Luo X Y, Meng X J, Cao D C, *et al.* Transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells attenuates liver fibrosis in mice by regulating macrophage subtypes [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 16.
- [2] 王刚, 靳茜, 郭紫薇, 等. 基于“脾气散精”理论探讨慢性肝病的中医治疗 [J]. *中医药学报*, 2024, 52(1): 1-5.
- [3] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南 (2019 年版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(7): 1444-1449.
- [4] 刘兆凤, 胡金芳, 马洁, 等. 丹参滴丸对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及其作用机制 [J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1991-1996.
- [5] 邓莉, 申宝德, 刘园, 等. 复方鳖甲软肝片减方对 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化的影响及机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1371-1378.
- [6] 王倩, 赵立春, 周改莲, 等. 荔枝核研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(6): 343-350.
- [7] 胡义扬, 彭景华, 冯琴. 中医药治疗酒精性和非酒精性脂肪肝的重要靶位: 肠道 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(9): 1296-1272.
- [8] Soffientini U, Beaton N, Baweja S, *et al.* The lipopolysaccharide-sensing caspase(s)-4/11 are activated in cirrhosis and are causally associated with progression to multi-organ injury [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 668459.
- [9] Yan J Y, Feng Y Y, Fang X W, *et al.* Anti-liver fibrosis effects of the total flavonoids of litchi semen on CCl₄-induced liver fibrosis in rats associated with the upregulation of retinol metabolism [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1264-1277.
- [10] 刘伟, 符小红, 黄思远, 等. 藏药波棱瓜子总木脂素对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用及机制探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(3): 567-571.
- [11] 黄旭平, 康毅, 黄红, 等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化转化生长因子-β1 受体和胶原的影响 [J]. *医药导报*, 2016, 35(6): 559-565.
- [12] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [13] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [14] 唐尧, 欧士钰, 杜凌, 等. 荔枝核总黄酮对猪血清诱导的免疫性肝纤维化大鼠肝脏中 EGR1、TGF-β1 表达的影响 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2023, 46(6): 67-72.
- [15] 肖颖梅, 崔官炜, 黄盼玲, 等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝脏 NLRP3 表达的影响 [J]. *药学研究*, 2023, 42(3): 145-148.
- [16] 蒋云霞, 罗伟生, 蔡碧莲, 等. 荔枝核总黄酮对大鼠 HSC-T6 差异表达蛋白的筛选及生物信息学分析 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(4): 776-779.
- [17] 冯茵怡, 严炯艺, 夏星, 等. 荔枝核总黄酮对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制和潜在 Q-Marker 的预测 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(23): 5722-5731.
- [18] 周怡驰, 胡世平, 晏军, 等. 基于肠-肝轴与肝病实脾理论探讨脂肪肝的发病与治疗思路 [J]. *新中医*, 2021, 53(14): 186-189.
- [19] Tang J R, Zhao H J, Li K, *et al.* Intestinal microbiota promoted NiONPs-induced liver fibrosis via effecting serum metabolism [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 270: 115943.
- [20] 赵彦恒. 抑制肝脏库普弗细胞功能对脓毒症大鼠肠黏膜机械屏障功能的影响及其机制研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
- [21] 杨洪超, 徐龙进, 孙建光. 健脾化浊饮对代谢相关脂肪性肝病大鼠肠肝轴体系影响的研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(24): 2623-2630.

- [22] 刘哲睿, 贾晓东, 陆荫英. 肝细胞癌相关胆汁酸代谢失衡及调控机制的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(3): 690-694.
- [23] Xue X Y, Wu J Z, Ding M N, *et al.* Si-Wu-Tang ameliorates fibrotic liver injury via modulating intestinal microbiota and bile acid homeostasis [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 112.
- [24] Zhang J, Wang W, Cui X G, *et al.* *Ganoderma lucidum* ethanol extracts ameliorate hepatic fibrosis and promote the communication between metabolites and gut microbiota g_Ruminococcus through the NF- κ B and TGF- β 1/Smads pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322: 117656.
- [25] Li M, Zhu L, Xie A, *et al.* Oral administration of *Saccharomyces boulardii* ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via reducing intestinal permeability and modulating gut microbial composition [J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 170-179.
- [26] Zhao H, Gao X, Liu Z Z, *et al.* Sodium alginate prevents non-alcoholic fatty liver disease by modulating the gut-liver axis in high-fat diet-fed rats [J]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4846.
- [27] Yu L H, Wang L L, Wu X J, *et al.* RSPO4-CRISPR alleviates liver injury and restores gut microbiota in a rat model of liver fibrosis [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 230.
- [28] Yang H G, Meng L, Ai D B, *et al.* Acetic acid alleviates the inflammatory response and liver injury in septic mice by increasing the expression of TRIM40 [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 2789-2798.
- [29] Zhao Y H, Zhao M, Zhang Y M, *et al.* Bile acids metabolism involved in the beneficial effects of Danggui Shaoyao San via gut microbiota in the treatment of CCl₄ induced hepatic fibrosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117383.

[责任编辑 罗 曦]