

麦角甾酮对小鼠急性酒精性肝损伤及肠道菌群群落组成的影响

张岳^a, 赵天倚^a, 王欢^b, 王淑敏^{a*} (长春中医药大学, a.药学院 吉林省菌物药生物技术工程实验室, b.吉林省人参科学研究院 人参化学与药理重点实验室, 长春 130117)

摘要: 目的 研究麦角甾酮对酒精引起的小鼠急性肝损伤的作用及其对肠道菌群群落组成的影响。方法 将 C57BL/6 小鼠随机分成空白组、模型组、甘草酸二铵组(60 mg·kg⁻¹)、麦角甾酮低剂量组(30 mg·kg⁻¹)、麦角甾酮高剂量组(60 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。除空白组、模型组外, 其余组按相应剂量灌胃 10 d。第 9~10 天, 除空白组外, 其余各组均以每剂 12 h 的间隔灌胃 2 剂 50%酒精(10 mL·kg⁻¹)诱导造模。ELISA 检测血清中天冬氨酸转氨酶(AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)和肝脏中的谷丙转氨酶(ALT)、前白蛋白(PA)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的水平, 苏木精-伊红染色法观察肝组织病理变化, 并使用 16S rRNA 基因测序分析技术分析麦角甾酮对小鼠肠道菌群的影响。结果 麦角甾酮可显著降低小鼠血清中 AST、 γ -GT 和肝组织中 ALT、MDA 的水平, 显著升高肝组织中 PA 和 SOD 的水平, 并可调节酒精引起的肠道菌群中门水平和属水平菌群丰富度的变化。结论 麦角甾酮对小鼠酒精诱导的急性肝损伤具有保护作用, 并且可通过调节肠道菌群来改善肝损伤。

关键词: 麦角甾酮; 酒精; 急性肝损伤; 肠道菌群

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)21-2561-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.21.001

引用本文: 张岳, 赵天倚, 王欢, 等. 麦角甾酮对小鼠急性酒精性肝损伤及肠道菌群群落组成的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2561-2569.

Effects of Ergosterone on Acute Alcoholic Liver Injury and Gut Microbiota Community Composition in Mice

ZHANG Yue^a, ZHAO Tianyi^a, WANG Huan^b, WANG Shumin^{a*} (Changchun University of Chinese Medicine, a.College of Pharmacy, Jilin Provincial Fungus Medicine Biotechnology Engineering Laboratory, b.Jilin Provincial Key Laboratory of Ginseng Chemistry and Pharmacology, Jilin Ginseng Academy, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of ergosterone on acute liver injury in mice induced by alcohol and its effect on the composition of gut microbiota. **METHODS** C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, diammonium glycyrrhizinate group(60 mg·kg⁻¹), low dose of ergosterone group(30 mg·kg⁻¹) and high dose of ergosterone group (60 mg·kg⁻¹), 10 in each group. Except for the blank group and the model group, the other groups were administrated with the corresponding dose for 10 d. On day 9–10, the other groups except the blank group were administered with two doses of 50% alcohol(10 mL·kg⁻¹) at 12 h intervals to induce a model. Levels of aspartate aminotransferase(AST), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) in serum and alanine aminotransferase(ALT), prealbumin(PA), malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD) in liver were detected by ELISA. Hematoxylin-eosin staining was used to observe liver tissue pathological changes, and the effect of ergosterone on mice intestinal flora was analyzed by 16S rRNA gene sequencing analysis technology. **RESULTS** Ergosterone could significantly reduce the levels of AST, γ -GT in serum and ALT, MDA in liver tissue, and significantly increase the levels of PA and SOD in liver tissue. Ergosterone also could regulate the alcohol-induced changes gut microbiota in phylum and genus levels. **CONCLUSION** Ergosterone has a protective effect on alcohol-induced acute liver injury in mice, and can improve liver injury by regulating the gut microbiota.

KEYWORDS: ergosterone; alcohol; acute liver injury; gut microbiota

酒精性肝病(alcoholic hepatitis, ALD), 也称为酒精性肝损伤, 是由酒精中毒引起的肝脏疾病。该疾病最初表现为轻度脂肪肝, 随后可能发展为肝炎、肝纤维化和肝硬化, 甚至肝衰竭^[1]。ALD

已逐渐成为人类健康的严重威胁之一。据世界卫生组织(WHO)统计, 2016 年全球约有 300 万人死于饮酒所致的肝病, 占全球死亡人数的 5.3%^[2]。

对于肝损伤的治疗, 临床上主要采用保肝的

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274037)

作者简介: 张岳, 女, 博士生 Tel: (0431)86763398 E-mail: zy869006846@163.com *通信作者: 王淑敏, 女, 博士, 教授 Tel: (0431)86763398 E-mail: wangsm@ccucm.edu.cn

中国现代应用药学 2020 年 11 月第 37 卷第 21 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2020 November, Vol.37 No.21 · 2561 ·

治疗方法,保肝药物中甘草酸二铵临床应用最为广泛。甘草酸二铵系 18 α -甘草酸的二铵盐,是中药甘草有效成分的第 3 代提取物,主要通过作用于细胞激素受体,阻止肝细胞钙离子内流,调节机体物质代谢,达到抗炎、免疫调节、保护肝细胞膜、改善胆红素代谢、抗肝纤维化等方面的作用,对多种原因造成的肝损伤均有较好的保护作用^[3-5]。但研究发现甘草酸二铵也会产生不良反应,其中以过敏反应为主,其次为高血压和低钾血症^[6],所以发掘新的保肝药具有重要意义。

麦角甾酮是多种药用真菌的主要化学成分,具有多种生物活性,如利尿、抗肿瘤、免疫抑制和治疗慢性肾病等^[7-11]。目前对麦角甾酮的研究主要集中在肾脏疾病和肿瘤的治疗方面,但尚未见其关于 ALD 的研究报道。近年来,肠道菌群失衡和 ALD 的发生也逐渐受到关注。研究表明,长期摄入酒精会促进肠道微生物及其产物向体循环转移,并促进肠道菌群的积累,导致肠道菌群失衡^[12]。本研究不仅探讨了麦角甾酮对酒精性肝损伤的保护作用,还探讨了其对肠道菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

C57BL/6 小鼠,♂,SPF 级,体质量 20~22 g,由辽宁长盛生物技术有限公司提供,生产许可证编号:SCXK(辽)2015-0001;合格证编号:211002300047205。所有动物在长春中医药大学动物室饲养,饲养温度为(25 \pm 3) $^{\circ}$ C,饲养相对湿度为(50 \pm 20)%,12 h 光暗循环。

麦角甾酮(纯度 \geq 98%)由本实验室合成。甘草酸二铵肠溶胶囊(中国正大天晴药业集团有限公司,批号:190322102);乙醇(北京化工厂有限责任公司,批号:20180518);谷草转氨酶(AST,批号:20190701)、谷丙转氨酶(ALT,批号:20190701)、前白蛋白(PA,批号:20190715)、丙二醛(MDA,批号:20190727)、超氧化物歧化酶(SOD,批号:20190705) ELISA 试剂盒均购自上海酶联生物技术有限公司; γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT,批号:G20190719GI) ELISA 试剂盒购自上海凌顿生物科技有限公司。

1.2 分组、造模及给药

根据 Koneru 等^[13]对酒精引起的急性肝损伤的研究及实际情况设计本实验(长春中医药大学动物伦理委员会批准编号:20190123),将所有实验动

物随机分为 5 组,每组 10 只,空白组(0.5%羧甲基纤维素钠 0.01 mL \cdot g⁻¹),模型组(0.5%羧甲基纤维素钠 0.01 mL \cdot g⁻¹),甘草酸二铵组(60 mg \cdot kg⁻¹),麦角甾酮低剂量组(30 mg \cdot kg⁻¹),麦角甾酮高剂量组(60 mg \cdot kg⁻¹),各组按照剂量连续灌胃 10 d。在第 9~10 天,给药 4 h 后,除空白组外,其余各组均以每剂量 12 h 的间隔灌胃 2 剂 50%酒精(10 mL \cdot kg⁻¹),空白组给予等量的蒸馏水。

1.3 肝功能指标 AST、 γ -GT、ALT 和 PA 水平的检测

末次给予酒精 1 h 后,眼眶取血,血液 4 $^{\circ}$ C 离心,取上清液,-80 $^{\circ}$ C 保存。小鼠眼眶取血后,颈脱臼处死,取部分肝组织制成 10%肝组织匀浆,4 $^{\circ}$ C 离心,取上清液,-80 $^{\circ}$ C 保存。根据 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 AST 和 γ -GT 的水平、肝组织上清液中 ALT 和 PA 的水平。

1.4 氧化应激指标 MDA 和 SOD 水平的检测

取“1.3”项下肝组织匀浆上清液根据 ELISA 试剂盒说明书测量肝组织上清液中 MDA 和 SOD 的水平。

1.5 肝组织的病理学分析

取部分肝组织样品浸入 4%多聚甲醛溶液中 24 h,将样品梯度酒精脱水,包埋在石蜡中,切成薄片(4 μ m),用苏木精-伊红染色法对石蜡切片进行染色,并用光学显微镜观察肝组织的病理变化。

1.6 小鼠粪便采集与测序

取小鼠直肠中的粪便放入无菌离心管中,迅速用液氮冷冻后放入干冰中,提取粪便中 DNA,以 Primer 341 F(Illumina adapter sequence 1+CCTACGGGNGGCWGCAG)和 Primer 805 R(Illumina adapter sequence 2+GACTACHVGGGTATCTAATCC)为引物,选择扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 区,合成带有错位碱基的融合引物。融合引物经检测、纯化和定量后,得到高质量的测序数据。然后在 Miseq 平台上,以 2 \times 250 bp 的双端测序策略对文库进行测序,相似度 $>$ 97%的序列将聚为同一个可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),同时使用 denovo 模式去除嵌合体序列,将最终产生的 OTU 进行聚类及后续分析。

1.7 数据分析

使用 GraphPad Prism 5 进行统计分析,数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。对于 $>$ 2 个组的比较,通过单向方差分析(one-way ANOVA)确定显著性;比较 2 组,通过

t 检验分析确定显著性, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 麦角甾酮对急性酒精性肝损伤小鼠肝功能指标 AST、 γ -GT、ALT 和 PA 水平的影响

与空白组相比, 模型组 AST、 γ -GT 和 ALT 水平显著升高 ($P < 0.001$), PA 水平显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 麦角甾酮和甘草酸二铵给药组 AST、 γ -GT 和 ALT 水平显著降低 ($P < 0.001$), PA 水平显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。另外, 麦角甾酮低剂量组对 AST、 γ -GT 和 ALT 水平的调节效果与甘草酸二铵组相比较效果无差异, 麦角甾酮高剂量组调节效果稍优于麦角甾酮低剂量组。但对于 PA 水平的调节效果, 甘草酸二铵组优于麦角甾酮给药组。以上结果表明麦角甾酮可以明显减轻酒精引起的小鼠急性肝功能指标变化, 且效果优于对照药甘草酸二铵。结果见图 1。

2.2 麦角甾酮对急性酒精性肝损伤小鼠氧化应激指标 MDA 和 SOD 水平的影响

与空白组相比, 模型组肝组织中的 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$), SOD 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 麦角甾酮给药组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$), SOD 水平显著升高 ($P < 0.05$)。此外,

甘草酸二铵组 MDA 的水平显著降低 ($P < 0.05$), SOD 水平虽有提升, 但差异无统计学意义。以上结果表明麦角甾酮可以明显减轻酒精性肝损伤小鼠氧化应激指标变化, 且效果优于对照药甘草酸二铵。结果见图 2。

2.3 麦角甾酮对急性酒精性肝损伤小鼠的肝组织病理变化影响

与空白组相比, 模型组小鼠肝的颜色和组织发生明显的改变, 而给药干预组则显著改善了这些变化, 从外观可明显观察到甘草酸二铵组和麦角甾酮高剂量组肝组织的颜色与空白组更接近。HE 染色结果显示, 空白组肝组织无病理变化, 肝组织形态清晰完整, 肝细胞排列整齐, 而模型组的肝组织发生了明显的病理变化, 例如细胞水肿, 胞质疏松淡染(黑色箭头), 肝细胞水肿至气球样变性, 胞质空泡化(白色箭头)。麦角甾酮和甘草酸二铵给药组以上病理变化均明显减少, 并且随着麦角甾酮浓度的增加, 效果越明显。结果见图 3。

2.4 麦角甾酮对急性酒精性肝损伤小鼠肠道菌群的影响

2.4.1 测序结果质量分析 对 40 个样品进行测序, 获得 13 259 938 个原始序列。经过双端 Read 剪接和质量控制过滤后, 生成了 12 297 126 个有

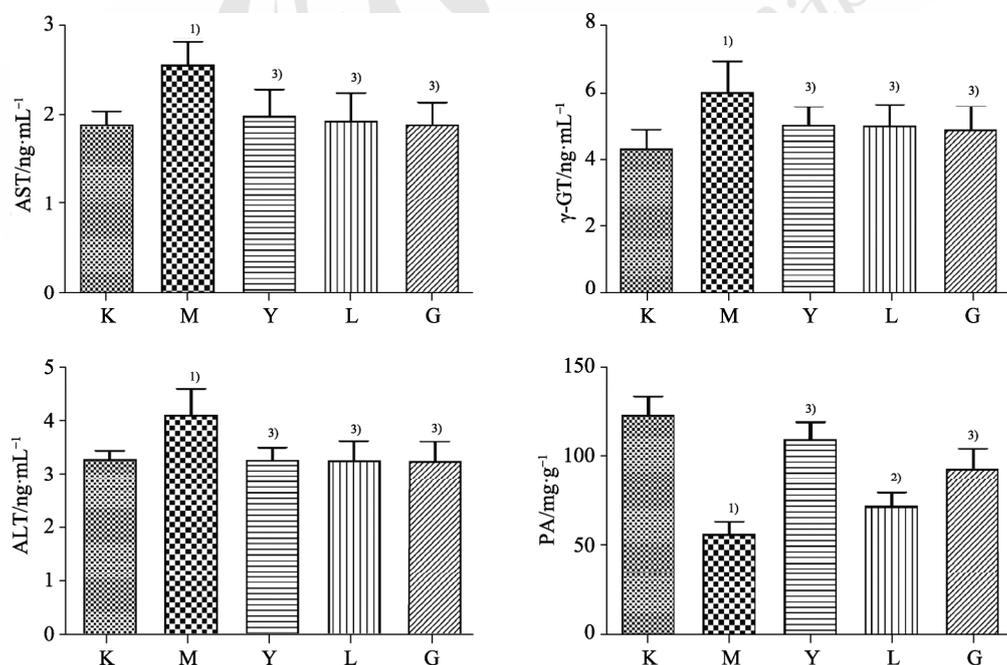


图 1 麦角甾酮对急性酒精性肝损伤小鼠肝功能指标 AST、 γ -GT、ALT 和 PA 水平的影响

与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; K-空白组; M-模型组; Y-甘草酸二铵组; L-麦角甾酮低剂量组; G-麦角甾酮高剂量组。

Fig. 1 Effect of ergosterone on liver function indexes AST, γ -GT, ALT and PA in mice with acute alcoholic liver injury

Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; K-blank group; M-model group; Y-diammonium glycyrrhizinate group; L-low dose of ergosterone group; G-high dose of ergosterone group.

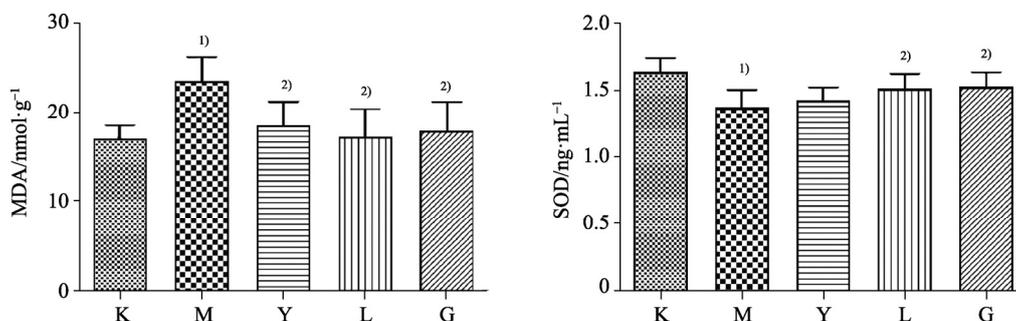


图2 麦角甾酮对急性酒精性肝损伤小鼠氧化应激指标MDA和SOD水平的影响与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$; K-空白组; M-模型组; Y-甘草酸二铵组; L-麦角甾酮低剂量组; G-麦角甾酮高剂量组。

Fig. 2 Effect of ergosterone on the levels of oxidative stress MDA and SOD in mice with acute alcoholic liver injury Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$; K-blank group; M-model group; Y-diammonium glycyrrhizinate group; L-low dose of ergosterone group; G-high dose of ergosterone group.

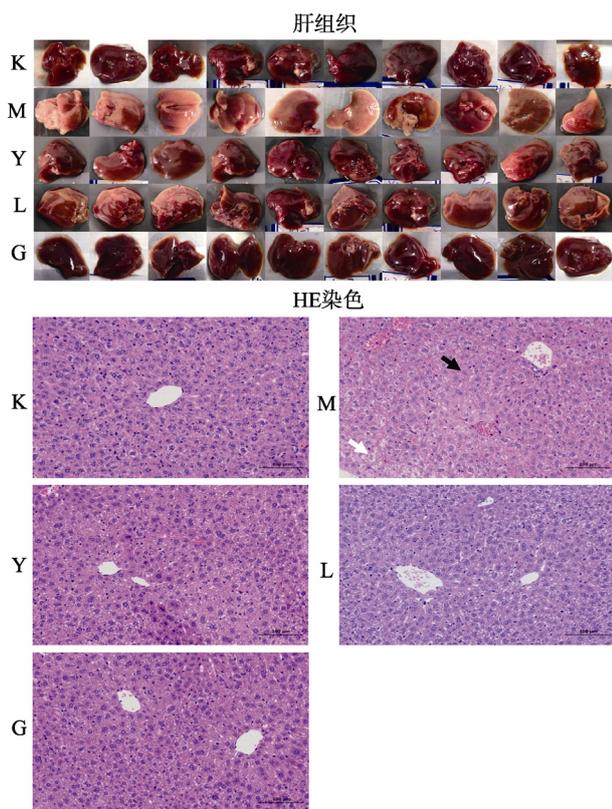


图3 麦角甾酮对急性酒精性肝损伤小鼠肝组织的影响 K-空白组; M-模型组; Y-甘草酸二铵组; L-麦角甾酮低剂量组; G-麦角甾酮高剂量组。

Fig. 3 Effect of ergosterone on liver tissue in mice with acute alcoholic liver injury K-blank group; M-model group; Y-diammonium glycyrrhizinate group; L-low dose of ergosterone group; G-high dose of ergosterone group.

效序列, 每个样本平均生成了 307 428 个有效序列。序列长度分布在 400~500 bp, 与 16S RDNA V3-V4 区域的序列长度匹配。该序列以 97% 的相似性水平进行聚类, 在门、纲、目、科、属、种的分类中共获得了 205 669 个 OTUs。物种累积曲线是用于描述随着抽样量的增大物种增加的状况, 被广泛用于判断抽样量的充分性。结果见图 4。随测样数量

的增加, 曲线趋于平缓, 表示此环境中的物种并不会随样本量的增加而显著增多, 这表明抽样量充分。以上结果表明, 样本符合测序条件, 可进行后续分析。

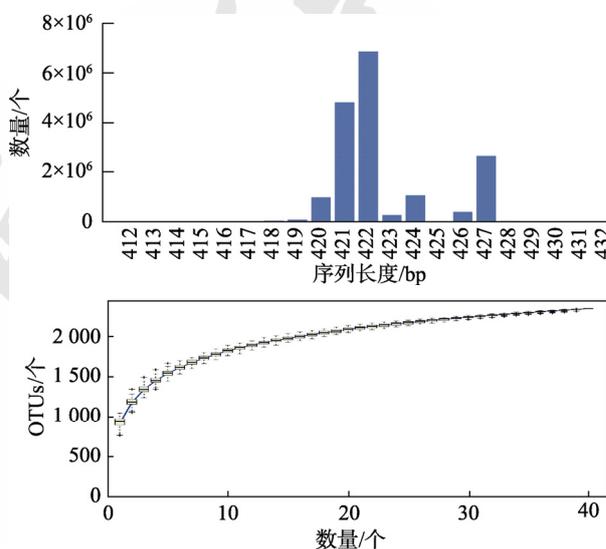


图4 测序结果的质量分析 Fig. 4 Quality analysis of sequencing results

2.4.2 肠道菌群群落组成分析 为直观观测到每组样本物种组成的一致性以及组间物种组成差异, 选择相对丰富度 > 1% 的物种绘制了门和属水平柱状图(图 5 A 和图 6 A)。基于距离对物种和样本进行聚类, 越相似的物种或样本在聚类树上的距离越近, 能够反映出所有样本在特定分类水平上物种组成的相似性及差异性, 选择样本中具有最高丰度的前 100 个物种绘制了热图(图 5 B 和图 6 B)。根据相对丰富度对门水平和属水平具有显著性差异菌绘制了定量统计图(图 5 C 和图 6 C)。从图 5 可知, 菌群主要属于门水平中的 *Bacteroidetes*、*Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 3 大类, 其余属于 *Verrucomicrobia*、*Actinobacteria*、*Deferribacteres*、

Tenericutes、*Fusobacteria*、*Cyanobacteria*、*Spirochaetes*、*Planctomycetes*、*SRI*、*Euryarchaeota*、*Elusimicrobia* 等类别。与空白组相比，模型组 *Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Elusimicrobia*、*Deferribacteres*、*Tenericutes* 的丰富度显著升高 ($P<0.05$)，*Fimicutes*、*Verrucomicrobia*、*Actinobacteria*、*Candidatus_Saccharibacteria*、*Fusobacteria*、*Cyanobacteria*、*Spirochaetes*、*Planctomycetes*、*SRI*、*Euryarchaeota* 的丰富度显著降低 ($P<0.05$)。与模型组相比，麦角甾酮低剂量组、麦角甾酮高剂量组和甘草酸二铵组 *Elusimicrobia* 的丰富度均显著降

低 ($P<0.05$)，*Cyanobacteria* 的丰富度升高 ($P<0.05$)；但甘草酸二铵组 *Proteobacteria* 和 *Deferribacteres* 的丰富度显著降低 ($P<0.05$)，*Euryarchaeota* 和 *Planctomycetes* 的丰富度显著升高 ($P<0.05$)，麦角甾酮低剂量组 *Verrucomicrobia*、*Planctomycetes*、*Candidatus*、*Euryarchaeota* 和 *Fusobacteria* 的丰富度显著升高 ($P<0.05$)；麦角甾酮高剂量组 *Proteobacteria* 的丰富度显著降低 ($P<0.05$)，*Verrucomicrobia*、*Actinobacteria*、*Candidatus*、*Fusobacteria*、*SRI* 的丰富度显著升高 ($P<0.05$)。这表明甘草酸二铵和麦角甾酮均可以调节酒精引起

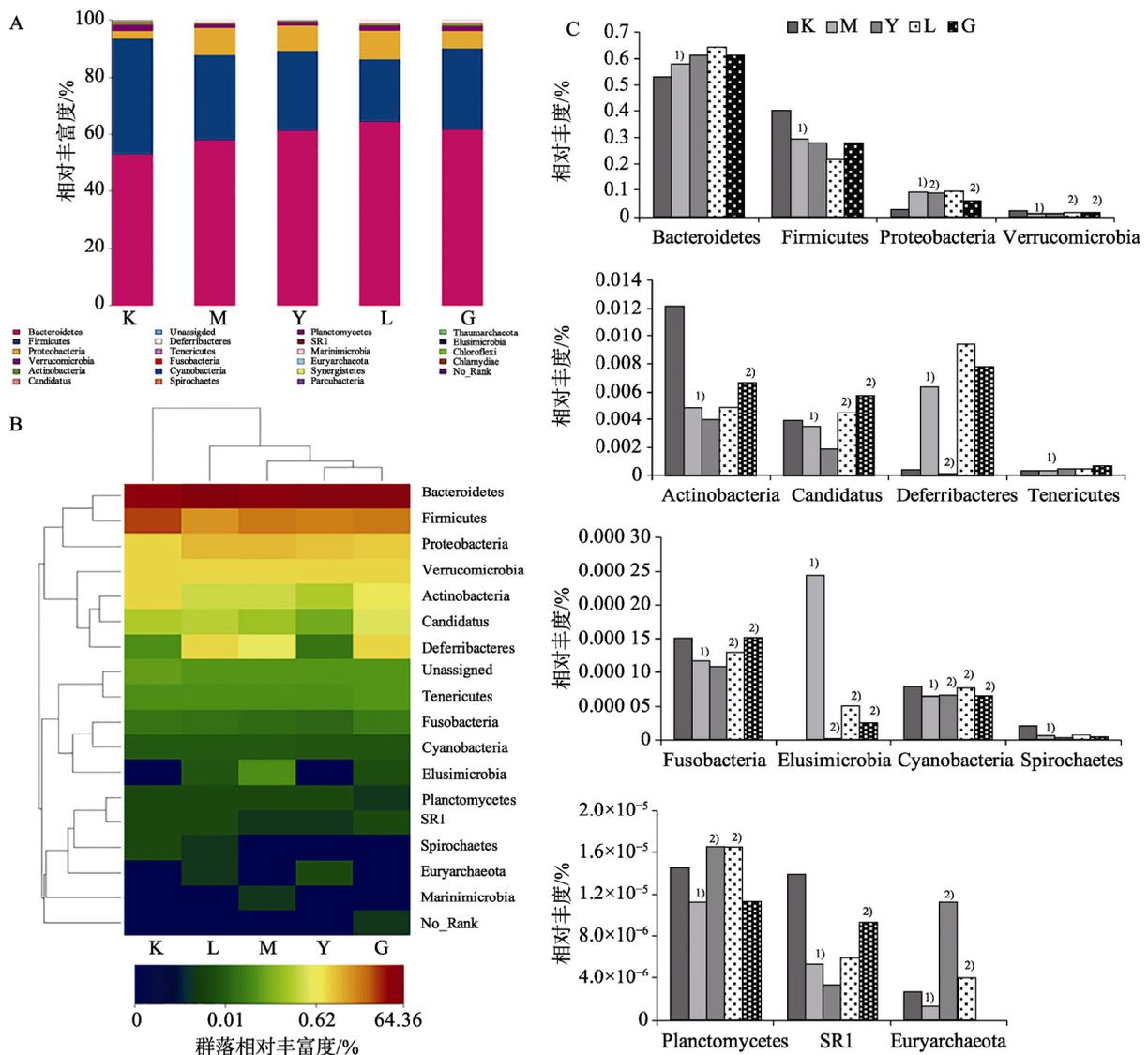


图5 麦角甾酮对门水平肠道菌群的影响

A-门水平柱状图；B-物种丰度聚类热图；C-显著性差异菌定量统计图；与空白组相比，¹⁾ $P<0.05$ ；与模型组相比，²⁾ $P<0.05$ ；K-空白组；M-模型组；Y-甘草酸二铵组；L-麦角甾酮低剂量组；G-麦角甾酮高剂量组；*Candidatus-Candidatus_Saccharibacteria*。

Fig. 5 Effect of ergosterone in phylum level gut microbiota

A-horizonta histogram of phylum level; B-species abundance clustering heat map; C-quantitative statistical chart of significant difference bacteria; compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; K-blank group; M-model group; Y-diammonium glycyrrhizinate group; L-low dose of ergosterone group; G-high dose of ergosterone group; *Candidatus-Candidatus_Saccharibacteria*.

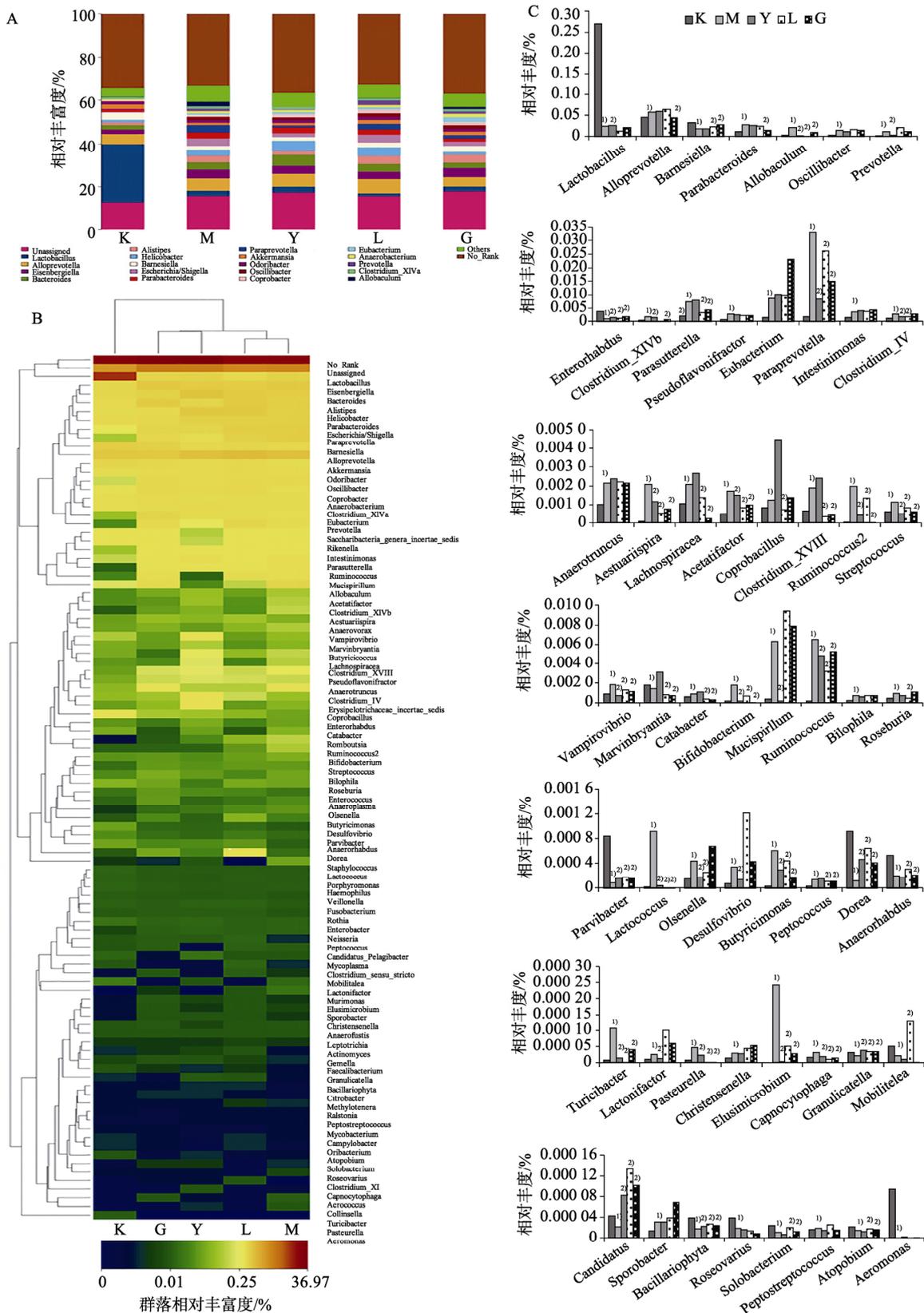


图6 麦角甾酮对属水平肠道菌群的影响

A-属水平柱状图; B-物种丰度聚类热图; C-显著性差异菌定量统计图; 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$; K-空白组; M-模型组; Y-甘草酸二铵组; L-麦角甾酮低剂量组; G-麦角甾酮高剂量组; *Lachnospiraceae-Lachnospiraceae_incertae_sedis*; *Candidatus-Candidatus_Pelagibacter*。

Fig. 6 Effect of ergosterone in genus level gut microbiota

A-horizontal histogram of genus level; B-species abundance clustering heat map; C-quantitative statistical chart of significant difference bacteria; compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$; K-blank group; M-model group; Y-diammonium glycyrrhizinate group; L-low dose of ergosterone group; G-high dose of ergosterone group; *Lachnospiraceae-Lachnospiraceae_incertae_sedis*; *Candidatus-Candidatus_Pelagibacter*。

的肠道菌群门水平的变化,同等剂量的甘草酸二铵和麦角甾酮分别调节了6种和7种菌门丰富度的变化,而高剂量的麦角甾酮则调节了8种菌门丰富度的变化。另外,根据聚类分析(图5B)可知,高剂量的麦角甾酮组与甘草酸二铵组的聚类最相似,但低剂量麦角甾酮组聚类更接近空白组。综上可知,麦角甾酮在调节酒精引起的肠道菌门水平变化效果较好。

从图6可知,与空白组对比,模型组已知的15种菌属水平的菌属丰富度降低($P<0.05$)(*Parvibacter*、*Enterorhabdus*、*Candidatus_Pelagibacter*、*Bacillariophyta*、*Granulicatella*、*Dorea*、*Anaerorhabdus*、*Barnesiella*、*Solobacterium*、*Atopobium*、*Aeromonas*、*Mobilitalea*、*Lactobacillus*、*Marvinbryantia*、*Roseovarius*)、40种菌属的丰富度升高($P<0.05$)(*Vampirovibrio*、*Lactococcus*、*Capnocytophaga*、*Parasutterella*、*Streptococcus*、*Pasteurella*、*Allobaculum*、*Pseudoflavonifractor*、*Bifidobacterium*、*Clostridium_XIVb*、*Clostridium_IV*、*Clostridium_XVIII*、*Parabacteroides*、*Acetatifactor*、*Butyricimonas*、*Ruminococcus*、*Aestuariispira*、*Ruminococcus2*、*Elusimicrobium*、*Turicibacter*、*Peptococcus*、*Catabacter*、*Lachnospiracea_incertaine_sedis*、*Alloprevotella*、*Oscillibacter*、*Peptostreptococcus*、*Olsenella*、*Roseburia*、*Coprobacillus*、*Lactonifactor*、*Desulfovibrio*、*Mucispirillum*、*Bilophila*、*Prevotella*、*Christensenella*、*Intestinimonas*、*Eubacterium*、*Sporobacter*、*Anaerotruncus*、*Paraprevotella*)。与模型组相比,麦角甾酮低剂量组、麦角甾酮高剂量组和甘草酸二铵组 *Parvibacter*、*Enterorhabdus*、*Candidatus_Pelagibacter*、*Bacillariophyta*、*Granulicatella*、*Dorea* 的丰富度均显著升高($P<0.05$)、*Vampirovibrio*、*Lactococcus*、*Capnocytophaga*、*Streptococcus*、*Pasteurella*、*Allobaculum*、*Paraprevotella*、*Bifidobacterium*、*Clostridium_XIVb*、*Acetatifactor*、*Butyricimonas*、*Ruminococcus*、*Aestuariispira*、*Ruminococcus2*、*Elusimicrobium*、*Turicibacter* 的丰富度显著降低($P<0.05$)。另外,麦角甾酮低剂量组和麦角甾酮高剂量组 *Anaerorhabdus*、*Barnesiella*、*Solobacterium*、*Atopobium* 的丰富度均显著升高($P<0.05$)、*Peptococcus*、*Catabacter*、*Clostridium_XVIII*、*Parasutterella*、*Marvinbryantia*、*Lachnospiracea_incertaine_sedis* 的丰富度显著降低($P<0.05$);麦角甾酮

低剂量组 *Coprobacillus*、*Clostridium_IV*、*Roseburia* 的丰富度显著降低($P<0.05$)、*Mobilitalea* 的丰富度升高($P<0.05$);麦角甾酮高剂量组 *Parabacteroides* 的丰富度显著降低($P<0.05$);甘草酸二铵组乳杆菌属 *Lactobacillus* 的丰富度显著升高($P<0.05$)、*Lactonifactor*、*Clostridium_IV*、*Desulfovibrio*、*Mucispirillum*、*Prevotella*、*Olsenella* 的丰富度显著降低($P<0.05$)。这表明甘草酸二铵和麦角甾酮均可以调节酒精引起的肠道菌群属水平的变化,同等剂量的甘草酸二铵和麦角甾酮分别调节了29种和36种菌属丰富度的变化,而高剂量的麦角甾酮则调节了33种菌属丰富度的变化。此外,根据聚类分析(图6B),高剂量的麦角甾酮组与甘草酸二铵组的聚类最相似,且高剂量的麦角甾酮组聚类更接近空白组。综上可知,麦角甾酮在调节酒精引起的肠道菌属水平菌门变化的整体效果优于甘草酸二铵组,且高剂量麦角甾酮调节效果最佳。

3 讨论

酒精饮料在人类社会中有数百年的历史,几乎世界各地都有生产和消费^[14]。但是,饮酒也会引发许多健康问题,比如短时间内饮用大量酒精会导致机体机能异常、神经系统和肝脏严重损伤的酒精中毒情况,而酒精中毒引起的ALD在全球范围内造成了大量死亡,已严重威胁人类的健康^[15-16]。大多数患者最初被诊断为酒精性脂肪肝,然后发展为肝炎、肝纤维化和肝硬化,甚至引起急性肝功能衰竭或死亡^[17]。

1994年,中国正式批准了甘草酸二铵用于肝病临床治疗,目前已成为临床最常用的保肝、抗炎药物之一,主要应用于伴有ALT升高的急、慢性病毒性肝炎的治疗^[18-19]。所以本研究选择了甘草酸二铵作为阳性对照药,并检测了肝脏中ALT的含量。ALT在肝脏中的释放是肝损伤的重要指标,其主要存在于肝细胞胞浆中,当肝细胞受损或变性时,该转氨酶的含量会急剧升高^[20-21]。肝脏中AST的释放也是肝损伤的重要指标,过量饮酒会引起AST过度释放,引起肝部损伤^[22]。另外,过量饮酒也会导致细胞质肝酶 γ -GT进入血液,导致血清中 γ -GT含量增加^[23]。而PA是一种急性负相蛋白,作为早期肝功能损伤的指标,比白蛋白具有更高敏感性,可以反映肝脏的合成功能,其含量的增加可显著减少急性发炎的产生^[24-25]。在本研究中,酒精显著提升了小鼠血清中AST、 γ -GT

和肝组织中 ALT 的含量,显著降低了肝组织中 PA 的含量,而麦角甾酮显著降低了 AST、 γ -GT 和 ALT 的含量,且效果与甘草酸二铵比较无显著差异,麦角甾酮还显著提升了 PA 的含量,但效果不及甘草酸二铵。这表明麦角甾酮可通过调节肝功能指标 AST、 γ -GT、ALT 和 PA 的含量达到预防肝损伤的作用,但调节肝功能指标 PA 的效果略次于甘草酸二铵。

众所周知,氧化应激在酒精性肝损害的发病机制中也起着重要的作用,而 MDA 和 SOD 是氧化应激的重要指标^[25-26]。MDA 是评估脂质过氧化的终产物,其含量越高表示氧化应激越严重;SOD 活性高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,是酒精急性氧化应激状态下的重要防御酶系,其活性越高,表明机体清除氧自由基的能力越强^[14,25,27]。在本研究中,酒精明显增加了肝脏中 MDA 的含量,降低了 SOD 的活性,麦角甾酮则有效降低了 MDA 的含量,提高了 SOD 的活性,且预防效果明显优于甘草酸二铵。这表明麦角甾酮可通过调节 MDA 含量和 SOD 活性抑制氧化应激对肝脏的损伤以达到保护肝脏的作用,且其效果明显优于甘草酸二铵。

此外,因为“肠-肝”轴的存在,肠道菌群在肝损伤过程中发挥着重要作用,很多改善肝损伤的天然产物均具有调节肠道菌群的作用^[28]。“肠-肝”轴学说由 Marshall 于 1998 年提出,该学说指出,肝脏和肠道通过门脉系统相连,少量内毒素经肠黏膜进入门静脉,这些内毒素可维系肝脏网状内皮系统处于激活状态;但当肠道受到打击,肠内菌群失调导致肠内大量毒素从肠道经门脉系统进入肝脏,引起或加重肝损伤;而肝细胞受损后分泌的炎症因子,通过胆汁的肝肠循环引起或加重肠道损伤^[29]。当人体在摄入酒精后,大约 90% 的酒精在肝中被氧化,剩余的酒精会在肠道吸收^[16-17]。肠道菌群参与酒精的代谢,将乙醇转化为有毒的乙醛,导致肠道通透性增加,打破肠道菌群的平衡,肠道菌群失调造成内毒素升高而引起肝脏损伤^[28]。本研究观察到急性饮酒影响了小鼠的肠道菌群平衡,给予酒精后的小鼠肠道中 15 种菌门和 55 种菌属丰富度均发生变化。在门水平中,饮酒主要引起了厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰富度的变化;在属水平中,饮酒引起了 15 种菌属丰富度的明显升高和 40 种菌属

丰富度的明显降低,且菌属大部分属于为厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*),其中厚壁菌门的 *Lactobacillus* 丰富度降低、厚壁菌门的 *Clostridium_XIVb*、*Clostridium_IV*、*Clostridium_XVIII* 和拟杆菌门的 *Parabacteroides* 丰富度升高,这与相关报道一致^[12,28,30-31]。在给予药物预防治疗后,小鼠肠道菌群变化被调节:在门水平中,麦角甾酮低剂量组、麦角甾酮高剂量组和甘草酸二铵组分别调节了 7 种、8 种和 6 种门水平丰富度的变化,从聚类方面可知,麦角甾酮高剂量组与甘草酸二铵组相近,而麦角甾酮低剂量组更接近空白组;在属水平中,麦角甾酮低剂量组、麦角甾酮高剂量组和甘草酸二铵组分别调节了 36 种、33 种和 29 种属水平丰富度的变化,其中 *Clostridium_XIVb* 丰富度均显著降低,另外麦角甾酮给药组显著降低了 *Parabacteroides*、*Clostridium_XVIII* 的丰富度,甘草酸二铵组显著升高了 *Lactobacillus* 的丰富度,显著降低了 *Clostridium_IV* 的丰富度,但从的聚类方面分析,麦角甾酮高剂量组与甘草酸二铵组的聚类最相似,且麦角甾酮高剂量组的聚类更接近于空白组。这表明,麦角甾酮可以调节酒精引起的肠道菌群变化,且可以通过调节肠道内菌群变化,从而抑制内毒素的升高来保护肝脏,且其整体调节效果优于甘草酸二铵。

综上所述,本研究基于 16S rDNA 测序技术探索了麦角甾酮对酒精引起的肠道菌群变化及酒精对肝损伤的保护作用,发现麦角甾酮预防给药对急性酒精性肝损伤具有保护作用,并对伴有的肠道菌群失调具有一定的调节作用,且整体效果优于甘草酸二铵,这为麦角甾酮预防酒精性肝损伤提供了有利的理论依据,也为麦角甾酮和真菌类中药的发展奠定了基础。另外,机体肠道菌群组成复杂,本研究只分析了相对丰度较高的前 100 个物种,仍有大部分菌群有待检测与分析,麦角甾酮对酒精性肝损伤的干预机制也有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] DUGUM M, MCCULLOUGH A. Diagnosis and management of alcoholic liver disease [J]. *J Digest Dis*, 2015, 3(2): 109-116.
- [2] World Health Organization. Global status report on alcohol and health [R]. 2018.
- [3] WEI X R, ZHU W T, DU Q R, et al. Evaluation of effectiveness, safety and economy of four oral hepatoprotectants in treatment of drug-induced liver injury [J].

- Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(8): 965-968.
- [4] ZHUANG J T. Observation of curative effect by diammonium glycyrrhizinate enteric-coated capsules combined with silibinin capsules in the treatment of alcoholic liver injury [J]. China Pract Med(中国实用医药), 2016, 11(4): 8-10.
- [5] 曹学冬, 张海阳, 陈佳骏, 等. 苦参素联合甘草酸二铵对肝硬化患者脾切除术后肝功能的影响[J]. 肝胆胰外科杂志, 2016, 28(3): 238-240.
- [6] LI Y F, CHENG G Y. Pharmaceutical care for patients with liver damage induced by traditional Chinese medicine fructus psoraleae by clinical pharmacists [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China(中国医院用药评价与分析), 2016, 16(4): 571-573.
- [7] XU W Y, LI A, MU S S, et al. Simultaneous determination of ergot sterone and ergosterol in 19 species of medicinal peritoneal fungi by HPLC with dual wavelength method [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2019, 30(4): 1002-1005.
- [8] YANG X, MENG J Q, LI T, et al. Simultaneous determination of ergosterol and ergosterone in fruiting body and liquid fermentation mycelia of *Lycoperdon pedicellatus* by HPLC dual wavelength method [J]. Edible Fungi China(中国食用菌), 2018, 37(5): 57-61.
- [9] GUO N, WU Z N, WANG J G, et al. Analysis of three effective components of *Polyporus Umbellatus* in different regions, different growth periods and different harvest periods [J]. Spec Wild Eco Animal Plant Res(特产研究), 2019, 41(1): 72-77, 94.
- [10] SHI Q Q, HUANG Y J, SU H G, et al. C28 steroids from the fruiting bodies of *Ganoderma resinaceum* with potential anti-inflammatory activity [J]. Phytochemistry, 2019, 168: 112109.
- [11] FERNANDO D, ADHIKARI A, NANAYAKKARA C, et al. Cytotoxic effects of ergone, a compound isolated from *Fulviformes fastuosus* [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 484.
- [12] MERONI M, LONGO M, DONGIOVANNI P. Alcohol or gut microbiota: Who is the guilty? [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4568.
- [13] KONERU M, SAHU B D, GUDEM S, et al. Polydatin alleviates alcohol-induced acute liver injury in mice: Relevance of matrix metalloproteinases(MMPs) and hepatic antioxidants [J]. Phytomedicine, 2017(27): 23-32.
- [14] LYU Y B, ZHONG L, LIU Y N, et al. Protective effects of *Lactococcus lactis* expressing alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase on acute alcoholic liver injury in mice [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2018, 93(5): 1502-1510.
- [15] MENG B, ZHANG Y Z, WANG Z Q, et al. Hepatoprotective effects of *Morchella esculenta* against alcohol-induced acute liver injury in the C57BL/6 mouse related to NRF-2 and NF- κ B signaling [J]. Oxidative Med Cell Longev, 2019(7): 1-12.
- [16] GALLEGOS-OROZCO J F, CHARLTON M R. Alcoholic liver disease and liver transplantation [J]. Clin Liver Dis, 2016, 20(3): 521-534.
- [17] SEITZ H K, BATALLER R, CORTEZ-PINTO H, et al. Alcoholic liver disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 16. Doi: 10.1038/s41572-018-0014-7.
- [18] ZHANG M F, SHEN Y Q. Clinical evaluation on diammonium glycyrrhizinate in the treatment of liver diseases [J]. Shanghai Med Pharm J(上海医药), 2011, 32(4): 174-178.
- [19] YU M X, LI Z W, YANG W H, et al. Meta-analysis of clinical efficacy and safety of diammonium glycyrrhizinate in treatment of patients with drug-induced liver injury [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(4): 478-484.
- [20] LU Y C, PENG W W, AO Y Q, et al. Protective effect and mechanism of *Ficus pandurata* Hance on acute alcoholic liver injury in rats [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2019, 42(10): 174-178.
- [21] HUANG J Z, MO Y, HUANG J J, et al. Efficacy of preconditioning with lychee seed extract for ameliorating acute alcoholic liver injury in mice [J]. Guangxi Med J(广西医学), 2019, 41(11): 1406-1409.
- [22] ZHANG Y H, ZHANG J, ZHANG Q, et al. Study on the extraction of polysaccharide from *Ustilago maydis* and its protective effect on acute alcoholic liver injury in mice [J]. J Chengdu Med Coll(成都医学院学报), 2020, 15(1): 50-53.
- [23] HOU R L, LIU X, YAN J J, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia Auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice [J]. Food Funct, 2019, 10(2): 1017-1027.
- [24] 张玉, 陈娟, 钱小伟, 等. 血清前白蛋白检测在消化道恶性肿瘤中的诊断价值[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(13): 149, 151.
- [25] CHEN L X, JIANG L H, LI Y C, et al. Screening of parasitic active part of persimmon and its effect on acute liver injury in mice [J]. J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报), 2019, 36(5): 738-742.
- [26] HE G X, CHEN H G, DENG Q F, et al. Research progress of hepatoprotective mechanism of flavonoids [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(12): 1583-1591.
- [27] LI Y, QIN Y, FAN Y, et al. The effects of garlic polysaccharide on the intestinal microflora dysbiosis in acute alcohol-induced hepatic injury mice [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2018, 39(22): 148-153.
- [28] FAN Y, ZHAO X, LI N, et al. The effects of garlic polysaccharide on the intestinal microflora dysbiosis in acute alcohol-induced hepatic injury mice [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2018, 39(22): 148-153.
- [29] LOU Z H, WANG J W. The effect of "gut-liver axis" on the development of alcoholic liver disease and the intervention of linderiae Radix [J]. J Zhejiang Chin Med Univ(浙江中医药大学学报), 2017, 41(6): 545-547.
- [30] ZHANG X X, WANG H, YIN P P, et al. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice [J]. Lipids Heal Dis, 2017, 16(1): 44. Doi: 10.1186/s12944-017-0431-8.
- [31] LIU M, LIU Y, WANG W C, et al. The protective effect of phytosterols on liver tissue and intestinal microbiota in rats treated with ethanol [J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2019, 41(4): 367-373.

收稿日期: 2020-02-29
(本文责编: 沈倩)