

DOI:10.13350/j.cjpb.241107

• 论著 •

鼠李糖乳杆菌对非酒精性脂肪肝病小鼠肠道菌群及血清因子的影响^{*}

赵祥运¹, 梁慧洁^{2**}, 陆诗发², 闫厚煜²

(1. 上海市第六人民医院消化内镜中心, 上海 200233; 2. 建瓯市立医院消化科)

【摘要】 目的 评估鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)小鼠的保护作用,特别是其对体重、血糖、肝脏病理学、血清生化指标、炎症和肠道菌群的影响。**方法** 将C57BL/6J小鼠随机分为三组:标准饮食组(Control组)、高脂饮食组(HFD组)和高脂饮食+LGG干预组(HFD+LGG组)。在12周的实验期间,Control组和HFD组小鼠分别接受标准饮食和高脂饮食,HFD+LGG组小鼠在高脂饮食基础上每日口服LGG。通过体重测量、空腹血糖检测、血清生化分析、肝脏组织学检查、炎症标志物测定以及16S rRNA测序分析肠道菌群组成。**结果** HFD组小鼠体重显著增加($P<0.05$),空腹血糖水平显著升高($P<0.05$);HFD+LGG组体重和血糖水平较HFD组显著降低。HFD组小鼠血清ALT、AST、TC、TG和LDL-C水平显著升高($P<0.05$),HDL-C水平显著降低($P<0.05$);LGG干预显著改善上述指标($P<0.05$)。HFD组小鼠血清TNF- α 、IL-6和CRP水平显著升高($P<0.05$);LGG干预显著降低这些炎症标志物($P<0.05$)。16S rRNA测序结果显示,HFD组小鼠肠道Firmicutes和Proteobacteria丰度显著增加,Bacteroidetes和Actinobacteria丰度显著减少($P<0.05$);LGG干预显著逆转了这些变化,恢复了肠道菌群的平衡($P<0.05$)。**结论** 鼠李糖乳杆菌通过调节肠道菌群的组成,改善脂质代谢和炎症反应,有效缓解了高脂饮食诱导的NAFLD小鼠的肝脏损伤和代谢紊乱。LGG干预显著降低了体重、血糖、血清生化指标和炎症标志物水平,并恢复肠道微生物群的平衡,表明其在NAFLD治疗中的潜在应用价值。

【关键词】 鼠李糖乳杆菌;非酒精性脂肪性肝病;高脂饮食;肠道菌群;16S rRNA测序

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)11-1283-07

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Nov.;19(11):1283-1289,1294.]

Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on intestinal flora and serum factors in mice with nonalcoholic fatty liver disease

ZHAO Xiangyun¹, LIANG Huijie², LU Shifa², YAN Houyu² (1. Digestive Endoscopy Center, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 2. Department of Gastroenterology, Jian 'ou Municipal Hospital) * **

【Abstract】 Objective To evaluate the protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mice, especially its effects on body weight, blood sugar, liver pathology, and serum biochemical indicators, inflammation and the influence of intestinal flora. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into three groups: standard diet group (Control group), high-fat diet group (HFD group), and high-fat diet + LGG intervention group (HFD + LGG group). During the 12-week experiment, the mice in the Control group and the HFD group received a standard diet and a high-fat diet respectively. The mice in the HFD+LGG group received LGG orally every day on the basis of the high-fat diet. The composition of intestinal flora was analyzed through weight measurement, fasting blood glucose testing, serum biochemical analysis, liver histological examination, inflammatory marker determination and 16S rRNA sequencing. **Results** The weight of the mice in the HFD group increased significantly ($P<0.05$), and the fasting blood glucose level increased significantly ($P<0.05$); the body weight and blood glucose level of the HFD+LGG group were significantly lower than those of the HFD group. Serum ALT, AST, TC, TG and LDL-C levels of mice in the HFD group were significantly increased ($P<0.05$), and HDL-C levels were significantly decreased ($P<0.05$); LGG intervention significantly improved the above indicators ($P<0.05$). Serum TNF- α , IL-6 and CRP levels of mice in the HFD group were significantly increased ($P<0.05$); LGG intervention significantly reduced these inflammatory markers ($P<0.05$). The 16S rRNA sequencing results showed that the

* **【基金项目】** 福建省检验医学研究会与国家(福建)基因检测技术应用示范中心联合研创课题项目(No. 2023LHYC033)。

** **【通讯作者】** 梁慧洁, E-mail: lianghuijie_gz@163.com

【作者简介】 赵祥运(1983-),男,安徽人,硕士,主治医师,主要研究从事消化道疾病相关工作。E-mail: xiangyun0908@sina.com

abundance of *Firmicutes* and *Proteobacteria* in the intestine of mice in the HFD group significantly increased, and the abundance of *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* significantly decreased ($P < 0.05$); LGG intervention significantly reversed these changes and restored the intestinal flora balance ($P < 0.05$). **Conclusion** *Lactobacillus rhamnosus* can effectively alleviate liver damage and metabolic disorders in NAFLD mice induced by high-fat diet by regulating the composition of intestinal flora, improving lipid metabolism and inflammatory response. LGG intervention significantly reduced body weight, blood glucose, serum biochemical indicators and inflammatory marker levels, and restored the balance of intestinal microbiota, indicating its potential application value in the treatment of NAFLD.

【Keywords】 *Lactobacillus rhamnosus*; nonalcoholic fatty liver disease; high-fat diet; intestinal flora; 16S rRNA sequencing

非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种以肝脏脂肪堆积为特征的代谢性疾病。NAFLD的病理进展从单纯性脂肪肝(NAFL)到非酒精性脂肪性肝炎(NASH),最终可能发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌(HCC)^[1-3]。目前,NAFLD已成为全球范围内最常见的慢性肝病,且其患病率随着肥胖^[4]、2型糖尿病^[5]等代谢疾病的增加而显著上升。然而,针对NAFLD的有效治疗手段仍然有限。近年来,肠道菌群(gut microbiota)与NAFLD的关系引起了广泛关注。研究表明,肠道菌群的失调可能在NAFLD的发生和发展中起重要作用^[6-7]。肠道菌群的改变可能通过增加肠道通透性、炎症反应和代谢失调等机制促进肝脂肪堆积和炎症反应^[8-10]。因此,调节肠道菌群成为NAFLD治疗的一个潜在策略。

益生菌(probiotics)作为一种调节肠道菌群的有效手段,已在多种代谢性疾病中展现出潜在的治疗效果。鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)是一种常见的益生菌,具有抗炎、抗氧化和改善代谢功能等多种生物活性^[11-12]。然而,关于鼠李糖乳杆菌在NAFLD中的作用机制和具体影响的研究仍然不足。

本研究通过建立高脂饮食诱导的NAFLD小鼠模型,系统评估了鼠李糖乳杆菌对小鼠体重、肝脏指数、血清生化指标、肝脏病理学变化、炎症和氧化应激指标、蛋白表达水平及肠道微生物群的影响,通过多维度的实验分析,进一步揭示鼠李糖乳杆菌在NAFLD干预中的作用机制和潜在的应用价值,以期为NAFLD的防治提供新的思路和实验依据。

材料与方法

1 实验动物

本研究选用6周龄雄性C57BL/6小鼠(体重20~25 g),购自赛业(苏州)生物科技公司。所有小鼠均在特定病原体自由(SPF)条件下饲养,饲养环境的温度控制在 22 ± 2 °C,湿度控制在50%~60%,以及光/暗周期为12 h/12 h。饲养过程中保证小鼠能够自由饮

食和饮水。实验开始前,小鼠适应环境1周后随机分为3组,每组10只小鼠($n=10$):标准饮食组(Control组)小鼠给予标准实验室饲料;高脂饮食组(HFD组)小鼠给予高脂饮食(60%脂肪热量);鼠李糖乳杆菌干预组(HFD+LGG组)小鼠给予高脂饮食,同时通过饮水每日补充鼠李糖乳杆菌溶液(1×10^8 CFU/mL)。实验持续12周,期间定期监测小鼠体重和血糖水平。实验结束时,通过二氧化碳(CO₂)麻醉法处死小鼠,进行样本采集。

所有实验操作均获得建瓯市立医院动物实验伦理委员会批准(批准号:JOSLYY2023LHYC033),实验过程遵循动物实验伦理委员会的动物福利指导原则。

2 样本采集

2.1 血样采集 实验结束时,通过CO₂麻醉法处死小鼠,迅速切开胸腔后进行心脏穿刺采血。收集的血液置于无抗凝剂的离心管中,室温下静置30 min后,4 °C 3 000 r/min(离心半径10 cm)离心10 min,分离血清,−80 °C储存待检。

2.2 肝脏组织采集 处死小鼠后,迅速取出肝脏,称量肝脏重量,计算肝脏指数(肝脏重量/体重)。将肝脏分为三部分:一部分固定于10%中性福尔马林溶液中用于病理学分析,第二部分经过液氮冷冻后储存于−80 °C冰箱中,用于生化和分子生物学分析,第三部分用于脂质含量测定。

2.3 粪便样本采集 在实验结束前的最后1周,采集小鼠的新鲜粪便样本。将粪便样本置于无菌离心管中,随即液氮冷冻−80 °C储存用于后续16S rRNA测序分析肠道微生物群组成和多样性。

3 实验方法

3.1 生理指标检测 每周一上午8:00~10:00使用电子天平测量并记录各组小鼠的体重。空腹血糖水平在实验的第0、6和12周通过尾静脉采血并使用血糖仪(罗氏GLUCOTREND-2)测量。所有测量均在小鼠禁食12 h后进行。

3.2 血清生化指标检测 使用全自动生化分析仪(Cobas C311, Roche Diagnostics)检测血清中的生化指标,包括肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨

酶(AST);脂质代谢指标总胆固醇 TC、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C);以及糖代谢指标空腹血糖(FBG)、胰岛素(Insulin)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。

3.3 肝脏病理学分析 固定于10%中性福尔马林溶液中的肝脏组织,经常规石蜡包埋和切片后,进行苏木精-伊红(HE)染色。通过光学显微镜观察肝脏组织学变化,并使用标准病理评分系统评估脂肪变性、炎症和纤维化程度。

3.4 肝脏脂质含量测定 肝脏脂质含量测定 使用 Folch 法进行。首先将 100 mg 肝脏组织置于预冷的生理盐水中,使用组织匀浆器(T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA)进行匀浆。随后,向匀浆液中加入 2 mL 氯仿-甲醇混合液(2:1, v/v),剧烈震荡 1 min,静置分层。取下层有机相,重复提取 2 次。然后,将有机相置于旋转蒸发仪(型号:Hei-VAP Advantage, Heidolph)中,蒸发溶剂。最后,将干燥后的脂质溶于 1 mL 异丙醇中,分别使用酶法试剂盒(E1015,普利莱基因技术有限公司)测定总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)含量,具体操作按照试剂盒说明书进行。

3.5 炎症指标检测和蛋白表达分析 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(R&D Systems)检测血清中炎症标志物的水平,包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和C反应蛋白(CRP)。

使用 Western blot 方法检测肝脏组织中与脂质代谢和纤维化相关的关键蛋白表达水平。具体步骤包括提取肝脏蛋白、SDS-PAGE 电泳分离、转膜、抗体孵育和化学发光检测。目标蛋白包括脂代谢相关蛋白 PPAR- γ , SREBP-1c, FASN, 以及纤维化相关蛋白 TGF- β , COL1A1, α -SMA, 抗体从供应商处购自 Cell Signaling Technology 公司。

3.6 肠道微生物群分析 使用 DNA 提取试剂盒(DNeasy PowerSoil Kit, QIAGEN)提取粪便样本中的总 DNA 之后,采用特异性引物对 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行 PCR 扩增。随后,使用纯化试剂盒(QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN)纯化 PCR 产物,并使用荧光定量仪(Qubit 4 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific)进行定量。纯化后的 PCR 产物于 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序。使用 QIIME2 软件包和 R 语言(版本 4.3.0)对测序数据进行质控、操作分类单元(OTU)聚类、物种分类注释和微生物群落的多样性分析。其中, α 多样性通过 Shannon 指数和 Chao1 指数进行评估, β 多样性通过基于 Bray-Curtis 相异性的非度量多维尺度(NMDS)分析评估。

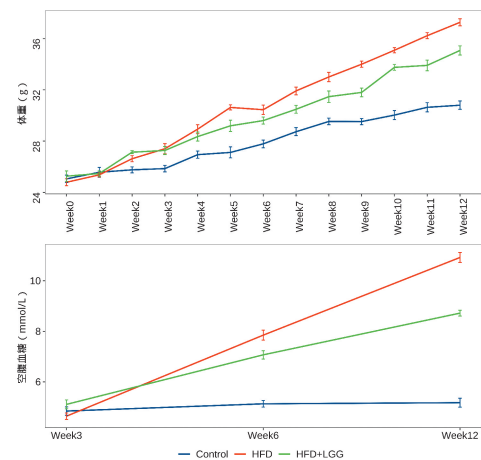
4 统计分析

本研究使用 R 语言(版本 4.3.0)对数据进行统计分析。采用双因素重复测量方差分析(Two-way ANOVA with Repeated Measures)比较各组间体重和空腹血糖分别在各时间点时的差异。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较实验结束时各组间血清生化指标、肝脏脂质含量和炎症标志物水平的差异。若 ANOVA 结果显示显著差异,进一步进行 LSD 事后检验以确定具体的组间差异。使用线性判别分析效应量(LEfSe)方法鉴定不同组间显著差异的微生物种类。本研究所有数据均符合正态分布,采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。所有统计分析均采用双侧检验, $\alpha=0.05$ 。

结果

1 生理指标变化

1.1 体重变化 在实验期间,各组小鼠的体重变化如图 1A 所示。Control 组、HFD 组和 HFD+LGG 组小鼠的体重在 12 周内分别增加了约 6.47、11.88 和 9.5 g。与其他 2 组相比,HFD 组小鼠体重显著增加,从第 3 周开始显著高于 Control 组(28.18 ± 1.38 vs 26.36 ± 1.08 g, $P<0.05$),HFD+LGG 组小鼠的体重增加在实验的第 4 周后开始显著低于 HFD 组(27.76 ± 0.90 vs 28.79 ± 1.13 g, $P<0.05$),但仍高于 Control 组(27.76 ± 0.90 vs 26.558 ± 0.83 g, $P<0.05$)。



Bonferroni 校正 P 值: * $P<0.05$, HFD 组与 Control 组比较; # $P<0.05$, HFD+LGG 组与 HFD 组比较。

图 1 各组小鼠体重(A)和空腹血糖变化(B)

* $P<0.05$, Comparison between HFD group and Control group; # $P<0.05$, Comparison between HFD+LGG group and HFD group.

Fig. 1 Changes in body weight(A) and fasting blood glucose(B) of mice in each group

1.2 血糖水平 空腹血糖水平 在实验第 0 周、6 周和 12 周的空腹血糖结果如图 1B 所示。Control 组、HFD 组和 HFD+LGG 组小鼠在 12 周内分别增加了约 0.34、6.28 和 3.61 mmol/L。HFD 组小鼠的空腹血糖水平在第 6 周(7.85 ± 0.62 vs 5.13 ± 0.41 mmol/L)

L)和第12周(10.92 ± 0.62 vs 5.18 ± 0.55 mmol/L)均显著高于 Control 组($P < 0.05$)。HFD+LGG 组小鼠的空腹血糖水平在第12周时显著低于 HFD 组(8.72 ± 0.36 vs 10.92 ± 0.62 mmol/L, $P < 0.05$),但仍高于 Control 组(8.72 ± 0.36 vs 5.18 ± 0.55 mmol/L, $P < 0.05$)。

1.3 体重与血糖水平的相关性 为了进一步探讨体重与血糖水平之间的关系, *Pearson* 相关性分析表明, 在 HFD 组和 HFD+LGG 组中, 体重与血糖水平呈显著正相关(HFD 组: $r = 0.651$, $P < 0.05$; HFD+LGG 组: $r = 0.583$, $P < 0.05$), 而在 Control 组中未见显著相关性($r = 0.214$, $P > 0.05$)。

2 血清生化指标

2.1 肝功能指标 实验结束时, 各组小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的水平见表1。与 Control 组相比, HFD 组小鼠的 ALT(67.61 ± 7.27 vs 30.27 ± 4.62 U/L)和 AST(83.56 ± 8.06 vs 40.35 ± 6.10 U/L)水平均显著升高($P < 0.05$)。HFD+LGG 组小鼠的 ALT(49.54 ± 7.01 vs 67.61 ± 7.27 U/L)和 AST(66.94 ± 10.80 vs 83.56 ± 8.06 U/L)水平均显著低于 HFD 组($P < 0.05$), 但仍高于 Control 组($P < 0.05$)。

表1 各组第12周肝功能指标比较

Table 1 Comparison of liver function indexes in each group at week 12					
肝功能	Control	HFD	HFD+LGG	$F_{ANOVA}(2,27)$	P_{ANOVA}
ALT(U/L)	30.27 ± 4.62	$67.61 \pm 7.27^*$	$49.54 \pm 7.01^{\# \Delta}$	84.921	< 0.05
AST(U/L)	40.35 ± 6.10	$83.56 \pm 8.06^*$	$66.94 \pm 10.80^{\# \Delta}$	65.133	< 0.05

注: Bonferroni 校正 P 值: $\Delta^* P < 0.05$, HFD 组与 Control 组比较; $\Delta^{\#} P < 0.05$, HFD+LGG 组与 Control 组比较; $\Delta^{\#} P < 0.05$, HFD+LGG 组与 HFD 组比较。

2.2 脂质代谢指标 各组小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的水平见表2。HFD 组小鼠的 TC、TG 和 LDL-C 水平显著高于 Control 组($P < 0.05$), 而 HDL-C 水平显著低于 Control 组($P < 0.05$)。HFD+LGG 组小鼠的 TC、TG 和 LDL-C 水平显著低于 HFD 组($P < 0.05$), HDL-C 水平显著高于 HFD 组($P < 0.05$), 但仍未恢复到 Control 组水平($P < 0.05$)。

表2 各组第12周脂质代谢功能指标比较
Table 2 Comparison of lipid metabolism function indicators among groups at week 12

血清脂质代谢	Control	HFD	HFD+LGG	$F_{ANOVA}(2,27)$	P_{ANOVA}
TC(mg/dL)	100.54 ± 9.24	$198.85 \pm 17.49^*$	$157.97 \pm 12.30^{\# \Delta}$	134.863	< 0.05
TG(mg/dL)	80.70 ± 12.19	$142.35 \pm 26.99^*$	$120.35 \pm 11.44^{\# \Delta}$	29.043	< 0.05
HDL-C(mg/dL)	58.81 ± 3.64	$38.94 \pm 4.73^*$	$50.15 \pm 5.63^{\# \Delta}$	44.232	< 0.05
LDL-C(mg/dL)	46.78 ± 4.03	$102.33 \pm 9.82^*$	$71.08 \pm 9.04^{\# \Delta}$	119.661	< 0.05

注: Bonferroni 校正 P 值: $* P < 0.05$, HFD 组与 Control 组比较; $\Delta^{\#} P < 0.05$, HFD+LGG 组与 Control 组比较; $\Delta^{\#} P < 0.05$, HFD+LGG 组与 HFD 组比较。

3 肝脏病理学分析

HE 染色结果显示, Control 组肝组织结构正常, 肝细胞排列整齐, 无明显病理变化。HFD 组肝组织中可见明显的脂肪变性、炎症细胞浸润和纤维化。肝细胞出现不同程度的气球样变性, 显示出严重的脂肪肝特征。HFD+LGG 组肝组织中仍存在脂肪变性和炎症细胞浸润, 但较 HFD 组显著减轻, 纤维化程度也有所降低, 部分肝细胞结构较为正常(图2)。

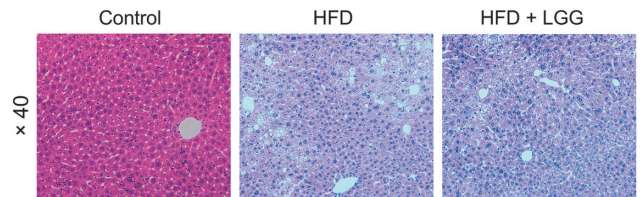


图2 各组小鼠第12周肝脏组织 HE 染色
Fig. 2 HE staining of liver tissues of mice in each group at Week 12

各组小鼠肝脏组织的病理学评分见表3。结果显示, HFD 组的炎症评分为显著高于 Control 组(3.02 ± 0.44 vs 1.07 ± 0.35 , $P < 0.05$), 而 HFD+LGG 组则显著降至 2.00 ± 0.47 ($P < 0.05$)。对于脂肪变性评分, Control 组为 1.01 ± 0.48 , HFD 组显著升高至 3.05 ± 0.55 ($P < 0.05$), HFD+LGG 组与之相比显著降低至 1.96 ± 0.52 ($P < 0.05$), 但仍显著高于 Control 组($P < 0.05$)。此外, 与 Control 组相比, HFD 组的纤维化评分显著升高(2.04 ± 0.54 vs 0.52 ± 0.21 , $P < 0.05$), 而 HFD+LGG 组显著降低(1.01 ± 0.26 vs 2.04 ± 0.54 , $P < 0.05$)。

表3 各组小鼠肝脏组织第12周脂病理学评分比较
Table 3 Comparison of lipid pathology scores in liver tissue of mice in each group at week 12

病理学评分	Control	HFD	HFD+LGG	$F_{ANOVA}(2,27)$	P_{ANOVA}
炎症评分	1.07 ± 0.35	$3.02 \pm 0.44^*$	$2.00 \pm 0.47^{\# \Delta}$	124.262	< 0.05
脂肪变性评分	1.01 ± 0.48	$3.05 \pm 0.55^*$	$1.96 \pm 0.52^{\# \Delta}$	100.124	< 0.05
纤维化评分	0.52 ± 0.21	$2.04 \pm 0.54^*$	$1.01 \pm 0.26^{\# \Delta}$	125.821	< 0.05

注: Bonferroni 校正 P 值: $* P < 0.05$, HFD 组与 Control 组比较; $\Delta^{\#} P < 0.05$, HFD+LGG 组与 Control 组比较; $\Delta^{\#} P < 0.05$, HFD+LGG 组与 HFD 组比较。

4 肝脏脂质含量

本研究采用氯仿-甲醇提取法(Bligh-Dyer 法)对各组的小鼠肝脏组织进行了脂质提取, 通过重量法测定 Control 组、HFD 组、HFD+LGG 组脂质含量分别为 10.54 ± 2.33 mg/g、 25.83 ± 3.40 mg/g、 18.22 ± 2.71 mg/g。高脂饮食显著增加了肝脏中的脂质含量, 而 LGG 的补充则有助于降低脂质含量。实验第12周, HFD 组的肝脏脂质含量与 Control 组相比显著增加($P < 0.05$), 而经过 LGG 干预后, HFD+LGG 组的肝脏脂质含量显著降低降至($P < 0.05$), 但仍显著高于 Control 组($P < 0.05$)。

5 炎症和蛋白表达分析

5.1 血清炎症标志物检测 ELISA 检测结果见图 3。高脂饮食显著增加了小鼠血清中 TNF-α、IL-6 和 CRP 的水平,而 LGG 干预则显著缓解了高脂饮食导致的上述炎症标志物的增加。与 Control 组相比(TNF-α: 1.0±0.2 pg/mL,IL-6:1.0±0.3 pg/mL,CRP:1.0±0.2 mg/L),HFD 组的血清 TNF-α、IL-6 和 CRP 分别显著增加至 3.5±0.5 pg/mL、4.0±0.6 pg/mL 和 4.5±0.7 mg/L($P<0.05$)。相应地,HFD+LGG 组小鼠血清中的 TNF-α、IL-6 和 CRP 分别显著降低至 2.0±0.4 pg/mL、2.5±0.5 pg/mL 和 2.8±0.6 mg/L($P<0.05$)。

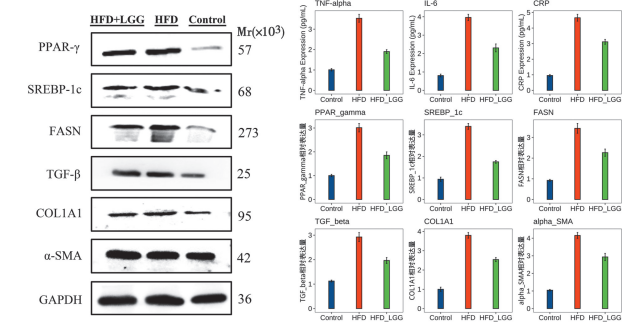


图 3 各组间小鼠血清炎症标志物和肝组织脂质代谢和纤维化相关蛋白表达水平比较

Fig. 3 Comparison of serum inflammatory markers and expression levels of lipid metabolism and fibrosis-related proteins in liver tissue among mice in each group

5.2 肝组织脂质代谢和纤维化 相关蛋白表达 Western blot 检测的蛋白包括脂代谢相关蛋白 PPAR-γ、SREBP-1c 和 FASN,以及纤维化相关蛋白 TGF-β、COL1A1 和 α-SMA(图 3)。HFD 组的上述蛋白表达水平均显著高于 Control 组($P<0.05$),而高脂饮食加 HFD+LGG 组的上述蛋白表达水平较 HFD 组显著降低($P<0.05$),但仍显著高于 Control 组($P<0.05$),结果见表 4。

表 4 各组小鼠血清和肝组织中炎症标志物及脂质代谢和纤维化蛋白表达水平比较

Table 4 Comparison of the expression levels of inflammatory markers, lipid metabolism and fibrosis proteins in serum and liver tissue of mice in each group

指标	HFD (n=10)	HFD+LGG (n=10)	$F_{ANOVA}(2,27)$	P_{ANOVA}
TNF-α (pg/mL)	3.52±0.55 *	2.03±0.40 #,△	100.211	<0.05
IL-6 (pg/mL)	4.01±0.62 *	2.50±0.52 #,△	94.891	<0.05
CRP (mg/L)	4.50±0.71 *	2.83±0.61 #,△	138.662	<0.05
PPAR-γ (相对表达量)	3.04±0.54 *	1.81±0.41 #,△	56.113	<0.05
SREBP-1c (相对表达量)	3.56±0.53 *	2.03±0.43 #,△	145.923	<0.05
FASN (相对表达量)	3.82±0.63 *	2.36±0.58 #,△	53.922	<0.05
TGF-β (相对表达量)	3.23±0.50 *	2.03±0.43 #,△	49.121	<0.05
COL1A1 (相对表达量)	3.81±0.68 *	2.55±0.51 #,△	134.332	<0.05
α-SMA (相对表达量)	4.01±0.61 *	2.82±0.54 #,△	104.703	<0.05

注:Bonferroni 校正 P 值: * $P<0.05$,HFD 组与 Control 组比较;△ $P<0.05$,HFD+LGG 组与 Control 组比较;# $P<0.05$,HFD+LGG 组与 HFD 组比较。

6 肠道微生物群分析

6.1 肠道微生物组结构和多样性分析 16S rRNA 基因测序的结果表明,各组小鼠共有的肠道菌群在属水平(Genus)前 10 优势菌种分别为 *Lactobacillus*、*Bacteroides*、*Clostridium*、*Prevotella*、*Ruminococcus*、*Akkermansia*、*Escherichia*、*Bifidobacterium*、*Enterococcus* 和 *Streptococcus*(图 4)。

表 5 各组小鼠肠道微生物组 α 多样性比较
Table 5 Comparison of α-diversity of intestinal microbiome in each group of mice

α 多样性指数	Control	HFD	HFD+LGG	$F_{ANOVA}(2,27)$	P_{ANOVA}
Chao1 指数	41.09±8.23	33.65±9.14 *	40.19±14.93 #,△	119.181	<0.05
Shannon 指数	4.18±0.31	3.31±0.16 *	4.29±0.40 #,△	134.611	<0.05

注:Bonferroni 校正 P 值: * $P<0.05$,HFD 组与 Control 组比较;△ $P<0.05$,HFD+LGG 组与 Control 组比较;# $P<0.05$,HFD+LGG 组与 HFD 组比较。

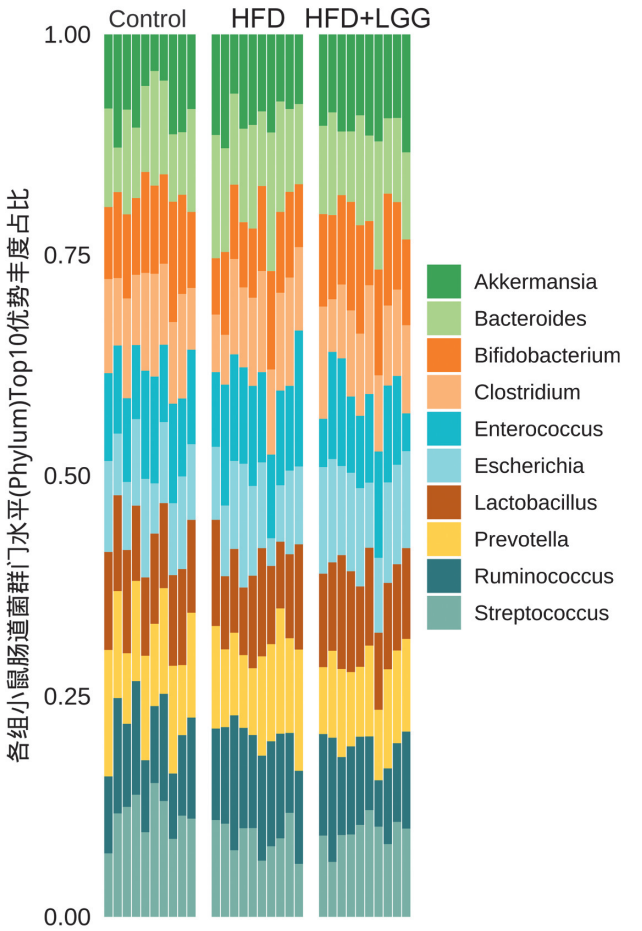


图 4 各组小鼠肠道菌群属水平(Genus)Top10 优势丰度占比的微生物
Fig. 4 Top 10 dominant microorganisms at the genus level in the intestinal flora of each group of mice

α 多样性分析结果见表 5。Control 组小鼠的肠道微生物的 Chao1 指数显著高于 HFD 组小鼠($P<0.05$),表明高脂饮食显著降低了肠道微生物群的物种丰富度。此外,HFD+LGG 组小鼠的 Chao1 指数显著高于 HFD 组($P<0.05$),但仍低于 Control 组,说明 LGG 补充在一定程度上恢复了由于高脂饮食引起

的物种丰富度下降。同时,Control组小鼠的Shannon指数显著高于HFD组($P<0.05$),表明高脂饮食不仅减少了肠道微生物群的物种丰富度,还降低了物种均匀度。类似地,HFD+LGG组小鼠的Shannon指数显著高于HFD组($P<0.05$),但仍低于Control组。此外,基于Bray-Curtis距离矩阵的NMDS分析结果表明各组小鼠间的肠道微生物组成的各自聚类趋势明显(图5),提示接受3种不同干预的大鼠模型的肠道微生物 β 多样性存在明显差异。

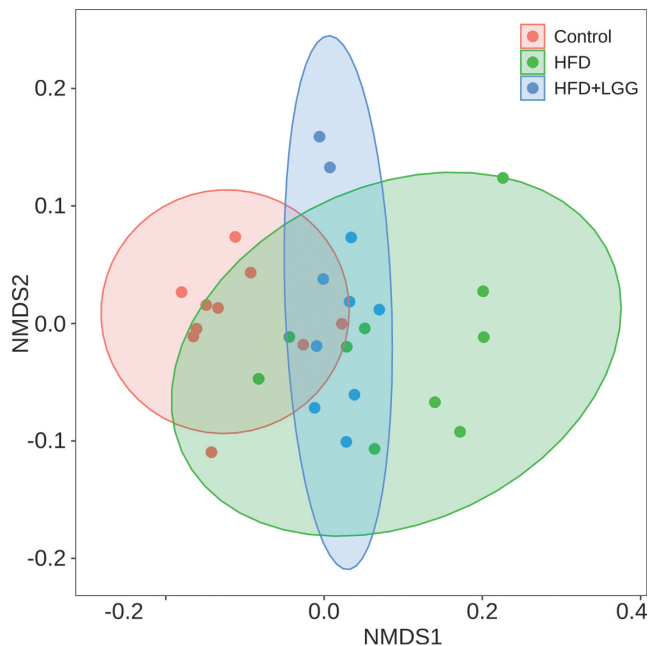


图5 基于Bray-Curtis相异性的非度量多维尺度(NMDS)分析各组小鼠肠道微生物的 β 多样性比较

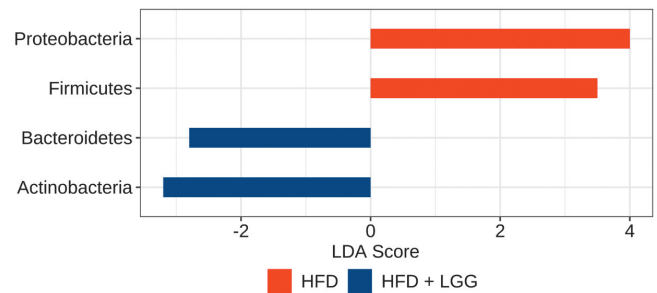
Fig. 5 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of the β diversity of intestinal microorganisms in each group of mice based on Bray-Curtis dissimilarity

6.2 差异微生物种类分析 LEfSe分析结果显示高脂饮食对肠道微生物群的组成产生了显著影响,导致Firmicutes和Proteobacteria的丰度增加,而Bacteroidetes和Actinobacteria的丰度减少,LGG干预在一定程度上逆转了上述变化,即通过减少Firmicutes和Proteobacteria的丰度,增加Bacteroidetes和Actinobacteria的丰度,来恢复肠道微生物群的平衡(图6)。结果提示益生菌LGG可能通过调节肠道微生物群的组成和功能,进而缓解高脂饮食引起的肝脏炎症和代谢紊乱。

讨论

本研究系统地评估了鼠李糖乳杆菌(LGG)对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)小鼠的体重、血糖、肝脏病理学、血清生化指标、炎症和肠道菌群的影响。结果表明,LGG干预显著改善了高脂饮食诱导的小鼠体重增加、空腹血糖水平升高、肝脏脂质堆

积和炎症反应,为LGG在NAFLD治疗中的临床应用提供了实验支持。本研究显示,HFD组小鼠体重显著增加,且空腹血糖水平显著升高,这与NAFLD及其相关代谢紊乱的临床特征一致^[13]。然而,HFD+LGG组小鼠体重增加和空腹血糖水平明显低于HFD组,但仍高于标准饮食组(Control组)。这表明LGG在一定程度上能够抑制高脂饮食引起的体重增加和血糖水平升高。既往研究表明,LGG可能通过改善宿主的代谢状态和能量平衡来发挥这一作用,一方面通过调节肠道菌群组成,另一方面通过影响宿主的代谢途径^[14-17]。血清生化指标和肝脏病理学分析结果进一步表明了LGG对NAFLD的保护作用。LGG干预显著降低了高脂饮食诱导的小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的水平,表明其对肝脏损伤的缓解作用。这与先前的研究结果一致,表明LGG具有减轻肝脏损伤和改善肝功能的潜力^[18-19]。此外,LGG干预显著降低了血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,提高了高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平,表明其在调节脂质代谢中的作用,脂质代谢的改善可能是由于LGG能够调节肝脏和肠道中的脂质代谢途径^[20-22]。



注:仅展示LAD >2.0 且 $P<0.05$ 的差异富集微生物群。
图6 HFD组和HFD+LGG组小鼠的LEfSe差异肠道微生物分析
Fig. 6 LEfSe differential intestinal microbial analysis of mice in the HFD group and HFD+LGG group

炎症和氧化应激在NAFLD的发生发展中起到了关键作用^[23]。本研究发现,LGG干预显著降低了高脂饮食诱导的小鼠血清中炎症标志物(TNF- α 、IL-6和CRP)的水平,并下调了肝脏中与脂质代谢和纤维化相关的关键蛋白(PPAR- γ 、SREBP-1c、FASN、TGF- β 、COL1A1、 α -SMA)的表达。这表明LGG可能通过抑制炎症反应和纤维化过程来减轻肝脏损伤,保护肝功能。因此,LGG的抗炎和抗氧化作用可能通过其代谢产物(如短链脂肪酸)的介导,进而调节宿主的免疫反应。本研究通过16S rRNA测序分析发现,LGG干预显著改变了高脂饮食诱导的小鼠肠道菌群结构,提高了肠道菌群的 α 多样性和 β 多样性,促进了有益菌群(如乳杆菌属)的增殖,抑制了潜在致病菌(如拟杆菌

属)的生长。这与 LGG 作为益生菌调节肠道菌群的作用机制相一致^[15]。肠道菌群的改善可能通过多种机制发挥作用,包括增强肠道屏障功能、调节肠道免疫反应以及通过肠-肝轴影响肝脏代谢^[24]。LEfSe 分析结果显示,高脂饮食对肠道微生物群的组成产生了显著影响,导致 *Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 的丰度增加,而 *Bacteroidetes* 和 *Actinobacteria* 的丰度减少。LGG 干预在一定程度上逆转了上述变化,即通过减少 *Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 的丰度,增加 *Bacteroidetes* 和 *Actinobacteria* 的丰度,来恢复肠道微生物群的平衡。这些变化表明,LGG 可能通过调节肠道微生物群的组成和功能,进而缓解高脂饮食引起的肝脏炎症和代谢紊乱。高脂饮食组小鼠的 *Firmicutes*/*Bacteroidetes* 比值显著升高通常与肥胖和代谢紊乱相关联^[25]。已有研究表明,*Firmicutes* 的增加和 *Bacteroidetes* 的减少与高脂饮食导致的能量提取效率增加和脂肪堆积有关^[26]。LGG 通过调节这一比值,可能有助于恢复正常的能量代谢平衡。

Proteobacteria 的丰度增加被认为是肠道菌群失调和炎症的标志^[27]。在本研究中,高脂饮食组小鼠的 *Proteobacteria* 丰度显著增加,而 LGG 干预组则显著减少。这一结果表明,LGG 可能通过抑制 *Proteobacteria* 的过度生长,减少肠道和全身的炎症反应,从而保护肝脏。*Actinobacteria* 尤其是双歧杆菌属,被认为是有益菌群,具有抗炎和免疫调节功能^[28]。本研究发现,LGG 干预增加了 *Actinobacteria* 的丰度,这可能通过增加有益菌群的比例,进一步促进肠道健康和宿主的代谢平衡。

尽管本研究提供了初步的实验依据,未来仍需进一步的临床研究来验证 LGG 在 NAFLD 治疗中的应用潜力,包括进一步探究其具体的分子作用机制以及未来大规模临床验证及联合疗法,以期为 NAFLD 的防治提供新的思路和策略。本研究表明 LGG 具有显著的抗炎、抗氧化和调节肠道菌群的作用,能够有效改善高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠的肝脏健康和代谢状态,提示 LGG 可能通过多种机制,包括调节能量代谢、减少炎症和氧化应激,来保护肝脏功能。

【参考文献】

[1] 李文娟,潘美民,刘阳珍,等. 益生菌调节肠道微生物群/Nrf2/HO-1 信号通路对高脂喂养大鼠非酒精性脂肪肝的影响[J]. 中国病原生物学杂志,2024,19(1):42-46.

[2] Guo X, Yin X, Liu Z, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 15489.

[3] Eslam M, Sanyal AJ, George J, et al. International consensus, P. , MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. Gastroenterology,

2020, 158(7): 1999-2014, e1991.

[4] Shaunak M, Byrne CD, Davis N, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and childhood obesity[J]. Arch Dis Child, 2021, 106(1): 3-8.

[5] Liu NY, Wang G, Liu C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and complications in type 1 and type 2 diabetes: A Mendelian randomization study[J]. Diabetes Obes Metab, 2023, 25(2): 365-376.

[6] Behary J, Amorim N, Jiang XT, et al. Gut microbiota impact on the peripheral immune response in non-alcoholic fatty liver disease related hepatocellular carcinoma[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 187.

[7] 王亚涛,程妍,徐静远,等. 非酒精性脂肪肝病大鼠肠道菌群对肠促胰素效应的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2022, 49(3): 332-338.

[8] Zhou X, Zhang X, Niu D, et al. Gut microbiota induces hepatic steatosis by modulating the T cells balance in high fructose diet mice[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 6701.

[9] Mijangos-Trejo A, Nuno-Lambarri N, Barbero-Becerra V, et al. Prebiotics and probiotics: therapeutic tools for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14918.

[10] Chae YR, Lee YR, Kim YS, et al. Diet-induced gut dysbiosis and leaky gut syndrome[J]. J Microbiol Biotechnol, 2024, 34(4): 747-756.

[11] Liu Y, Chen K, Li F, et al. Probiotic lactobacillus rhamnosus GG prevents liver fibrosis through inhibiting hepatic bile acid synthesis and enhancing bile acid excretion in mice [J]. Hepatology, 2020, 71(6): 2050-2066.

[12] Si W, Liang H, Bugno J, et al. Lactobacillus rhamnosus GG induces cGAS/STING- dependent type I interferon and improves response to immune checkpoint blockade[J]. Gut, 2022, 71(3): 521-533.

[13] Pouwels S, Sakran N, Graham Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss[J]. BMC Endocr Disord, 2022, 22(1): 63.

[14] 赵锐豪,郑鹏远,梅璐,等. 降脂益生菌对非酒精性脂肪性肝病小鼠肠黏膜屏障功能和肠道菌群的影响及机制[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(8): 620-627.

[15] Li X, Zheng P, Cao W, et al. Lactobacillus rhamnosus GG ameliorates noise-induced cognitive deficits and systemic inflammation in rats by modulating the gut-brain axis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1067367.

[16] Guo M, Liu H, Yu Y, et al. Lactobacillus rhamnosus GG ameliorates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating the Th17/Treg balance and gut microbiota structure [J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2190304.

[17] 陶永彪,汪龙德,李正菊,等. 肠道菌群代谢物短链脂肪酸改善非酒精性脂肪肝的作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(1): 47-53.

[18] Vatsalya V, Feng W, Kong M, et al. The beneficial effects of lactobacillus GG therapy on liver and drinking assessments in patients with moderate alcohol-associated hepatitis[J]. Am J Gastroenterol, 2023, 118(8): 1457-1460.

(下转 1294 页)

出序列 64 条), 同样推测可能为极似诊断病原体。

综上所述, tNGS 作为一种新型检测技术, 在肺部感染的病原学检测方面具有一定的应用价值, 可在大部分传统方法检测阴性的标本中诊断出潜在感染病原体, 在诊断病毒、真菌及混合感染方面更显著, 可作为传统病原学诊断的一种有效补充方法^[18-20], 提高整体病原体的检出效率, 协助临床对不明原因肺部感染患者进行合理用药。

【参考文献】

- [1] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4): 255-280.
- [3] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11): 681-689.
- [4] 高通量测序共识专家组. 高通量测序技术在分枝杆菌病诊断中的应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2023, 41(3): 175-178.
- [5] 李秀文, 王运铎, 张毅华. 肺泡灌洗液、纤支镜刷出物及痰病原菌培养对下呼吸道感染的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(12): 2091-2094.
- [6] 陈刚, 柴燕玲. 支气管肺泡灌洗液相关检测在肺部疾病中的应用进展[J]. 中国老年保健医学, 2021, 19(1): 113-116.
- [7] 陶毅, 王凯飞, 宋立成, 等. 支气管肺泡灌洗液中性粒细胞比例对于肺部细菌感染的诊断价值[J]. 解放军医学院学报, 2022, 43(1): 36-39.
- [8] 姚仲伟, 李美锦, 王桃, 等. 肺泡灌洗液宏基因组测序在儿童重症社区获得性肺炎的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2021(9): 1203-1206.
- [9] 冯荣光, 周丽岩, 窦蕊, 等. 支气管肺泡灌洗液宏基因组二代测序在儿童难治性肺炎诊治中的应用[J]. 中国当代儿科杂志, 2023, 25(12): 1253-1258.
- [10] 钮月英, 吴晓虹, 应可净. 肺泡灌洗液宏基因组二代测序技术对下呼吸道感染病原体检测的优势[J]. 中国实用内科杂志, 2020, 40(9): 754-758.
- [11] 李群, 董晨明, 张芳, 等. 基于 ICU 可疑感染患者探讨 mNGS 与传统病原学检测的相关性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(5): 568-573.
- [12] Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, 等. 临床微生物学手册[M]. 中华医学电子音像出版社, 2021.
- [13] Fenollar F, Ponge T, La Scola B, et al. First isolation of *Tropheryma whipplei* from bronchoalveolar fluid and clinical implications[J]. J Infect, 2012, 65(3): 275-278.
- [14] Li W, Zhang Q, Xu Y, et al. Severe pneumonia in adults caused by *Tropheryma whipplei* and *Candida* sp. infection: a 2019 case series[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 29.
- [15] 程燕, 宁永忠. 惠普尔养障体导致急性肺炎的探讨[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(11): 1090-1093.
- [16] 吴登峰, 黄虎翔. 艾滋病合并惠普尔养障体与耶氏肺孢子菌混合感染 1 例[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(11): 1377-1380.
- [17] 宁永忠. 细菌性感染性疾病的诊断分级[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(1): 49-52.
- [18] 吴媛媛, 黄宏. 支气管肺泡灌洗液二代测序在检测肺部感染病原体中的应用[J]. 内科急危重症杂志, 2023, 29(4): 280-285.
- [19] Lin R, Xing Z, Liu X, et al. Performance of targeted next-generation sequencing in the detection of respiratory pathogens and antimicrobial resistance genes for children[J]. J Med Microbiol, 2023, 72(11): 1521-1524.
- [20] 徐伟玲, 于少飞. 病原靶向二代测序在下呼吸道感染病原体诊断中应用价值研究进展[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(20): 3068-3072.
- 【收稿日期】 2024-06-19 【修回日期】 2024-09-05
- (上接 1289 页)
- [19] Ge Y, Sun H, Xu L, et al. The amelioration of alcohol-induced liver and intestinal barrier injury by *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (LGG) is dependent on interleukin 22 (IL-22) expression[J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 12650-12660.
- [20] Zhang D, Wei Y, Huang Q, et al. Important hormones regulating lipid metabolism[J]. Molecules, 2022; 27(20): 7052.
- [21] Yang S, Duan Z, Zhang S, et al. Ginsenoside Rh4 improves hepatic lipid metabolism and inflammation in a model of NAFLD by targeting the gut liver axis and modulating the FXR signaling pathway[J]. Foods, 2023, 12(13): 2492.
- [22] 俞佳珂, 刘琦. 鼠李糖乳杆菌与儿童非酒精性脂肪肝病研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2022, 37(5): 389-392.
- [23] Legaki AI, Moustakas II, Sikorska M, et al. Hepatocyte mitochondrial dynamics and bioenergetics in obesity-related non-alcoholic fatty liver disease[J]. Curr Obes Rep, 2022, 11(3): 126-143.
- [24] Yin Y, Sichler A, Ecker J, et al. Gut microbiota promote liver regeneration through hepatic membrane phospholipid biosynthesis[J]. J Hepatol, 2023, 78(4): 820-835.
- [25] Zhu H, Hou T. Modulatory effects of lactarius hatsudake on obesity and gut microbiota in high-fat diet-fed C57BL/6 mice[J]. Foods, 2024, 13(6): 948.
- [26] Cheng Z, Zhang L, Yang L, et al. The critical role of gut microbiota in obesity[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 1025706.
- [27] Fakharian F, Thirugnanam S, Welsh DA, et al. The role of gut dysbiosis in the loss of intestinal immune cell functions and viral pathogenesis[J]. Microorganisms, 2023, 11(7): 1849.
- [28] van Bergeijk DA, Terlouw BR, Medema MH, et al. Ecology and genomics of *Actinobacteria*: new concepts for natural product discovery[J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(10): 546-558.
- 【收稿日期】 2024-06-17 【修回日期】 2024-08-25