

· 基础研究 ·

何首乌及其主要成分二苯乙烯苷对非酒精性脂肪肝大鼠肠道短链脂肪酸产生量的影响[△]王艳芳^a, 林佩^a, 陆建美, 张美, 李莉, 杨兴鑫, 俞捷^{*}

(云南中医学院 中药学院, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的:** 探讨何首乌及其主要成分二苯乙烯苷(TSG)对非酒精性脂肪肝模型大鼠肠道内微生物发酵碳水化合物产生短链脂肪酸量的影响。**方法:** SD大鼠随机分为正常组、高脂饮食组和高脂饮食给药组(分别给予何首乌水提物和TSG)。采用气相色谱法检测各组大鼠粪便中短链脂肪酸(以乙酸、丙酸、丁酸为代表)含量。COD-PAP法测定血液和肝脏总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)含量, 鲎试验法检测肝门静脉血内毒素。**结果:** 何首乌总提物及TSG各剂量都能不同程度的降低高脂饮食大鼠肠道内的总短链脂肪酸(SCFA)含量, 但其调节作用可能存在性别差异。生何首乌及TSG能够显著降低高脂饮食雄性大鼠肠道内乙酸、丙酸、丁酸含量, 同时降低实验动物肝脏脂质含量和内毒素水平。生何首乌下调高脂饮食雌性大鼠肠道内丙酸含量, 降低肝脏脂质水平; 而TSG低剂量能够升高乙酸含量, 同时降低血脂和内毒素含量。然而制何首乌对雌、雄鼠肠道内SCFA含量的调节作用均不显著。**结论:** 何首乌及其活性成分TSG能够调节肠道微生物发酵产生的短链脂肪酸含量, 这种调节活性可能与其对非酒精性脂肪肝的治疗作用有关。

[关键词] 何首乌; 二苯乙烯苷; 短链脂肪酸; 非酒精性脂肪肝; 气相色谱

Effect of Radix Polygoni Multiflori and TSG on Short-chain Fatty Acids in Intestinal Tract of NAFLD Rats[△]WANG Yanfang^a, LIN Pei^a, LU Jianmei, ZHANG Mei, LI Li, YANG Xingxin, YU Jie^{*}

(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Radix Polygoni Multiflori and its active ingredient, TSG, on short-chain fatty acids (SCFA), which were gut microbiota fermentation products of carbohydrates, in rats with nonalcoholic fatty liver disease. **Methods:** SD rats were randomly distributed into seven groups, mice were fed with either standard chow diet or high-fat diet, plus daily administration of water or water extract of Radix Polygoni Multiflori or TSG. The contents of acetic acid, propionic acid and butyric acid in stool samples were determined by gas chromatography. TC, TG contents in liver and blood sample, and endotoxin contents in hepatic portal venous blood were tested. **Results:** The water extract of Radix Polygoni Multiflori and TSG could reduce the contents of total SCFA in the intestinal tract of NAFLD mice fed by HFD, however, gender differences might existed. PMR and TSG could reduce acetic acid, propionic acid, butyric acid in HFD-fed male mice. At the same time, they relived high contents of TG, TC in liver tissue and LPS level in portal venous. In female rats, the propionic acid content was lower in PMR group compared with NAFLD rats. PMR also decreased the TC, TG level in hepatic tissues of female rats. However, low dose TSG raised acetic acid content, while reduced blood lipid and LPS level. In the meantime, regulation effect of PMRP on intestinal SCFA content of both female and male mice was not significant. **Conclusion:** Radix Polygoni Multiflori and its active ingredient TSG affected SCFA level produced by gut microbial fermentation. This regulatory activity may contribute to their treatment activity to NAFLD.

[Keywords] Radix Polygoni Multiflori; TSG; short-chain fatty acids; non-alcoholic fatty liver; gas chromatography
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.9.009

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(81060337, 81460623); 云南省应用基础研究重点项目(2014FA035); 云南省教育厅南药协同创新中心项目(30270100500); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(2015HB053); 云南省应用基础研究计划项目青年基金(2016FD050)

^{*} [通信作者] 俞捷, 副教授, 研究方向: 药理学和药物分析学; Tel: (8710)65918055, E-mail: cz.yujie@gmail.com

^a 共同第一作者

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是代谢综合征的肝表现,常合并肥胖、血脂异常及胰岛素抵抗^[1]。近年来,随着生活方式和饮食结构的改变,NAFLD的患病率范围从超重个体的57%到非糖尿病肥胖患者的98%^[2]。NAFLD发病机制尚未完全清楚,经典解释为Day等^[3]提出的二次打击学说:初次打击主要是胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱所导致的单纯性脂肪肝;二次打击是内毒素(lipopolysaccharide, LPS)肠渗漏,引发氧化应激和炎症反应,导致脂肪变性的肝细胞发生炎症和坏死。越来越多的证据已经表明肠道菌群的变化与肥胖相关的NAFLD患者和动物模型的发展相关联,认为肠道菌群通过肠-肝轴促进NAFLD的发展^[4]。短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA)多是由肠道菌群发酵结肠中未被宿主消化吸收的碳水化合物和蛋白质而产生。SCFA是肠道菌群而非宿主的重要代谢产物^[5],主要包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸,其中乙酸、丙酸、丁酸所占比例高达85%^[6]。SCFA不仅能为肠黏膜细胞提供能量,促进细胞的代谢、生长^[7];还可以调节肠道内环境pH值,防止肠道功能紊乱^[8];此外,SCFA还在调节炎症反应^[9]、抗肿瘤^[10]和调控基因表达^[8]等方面发挥重要的作用。同时,有文献报道称肠道菌群主要代谢产物SCFA可能通过多种途径(肠道、脂肪组织、肝脏)介导机体炎症反应,直接或间接影响NAFLD的发生发展^[11]。

本课题组前期研究发现,何首乌水提取物及二苯乙烯苷(2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG)能抑制NAFLD大鼠肠道内厚壁菌门与拟杆菌门比例的升高,调节肠道菌群组成的比例,改善肠道微生态紊乱状况,抑制后期肠源性内毒素等一系列炎症因子的释放,表明何首乌水提取物及TSG可在NAFLD发病的二次打击环节中起到改善调节作用^[12]。依据本课题组前期研究基础,我们推测何首乌水提取物及TSG良好的脂代谢调节活性可能与其影响肠道内SCFA含量相关。为了阐明脂代谢调节与SCFA之间可能的关系,进一步发掘何首乌水提取物及TSG的降血脂机制,我们就其对高脂饮食诱导NAFLD模型大鼠肠道内SCFA含量的影响展开了研究。

1 材料

1.1 动物与饲料

清洁级健康 Spraque-Dawley (SD) 大鼠, (180 $\pm$

20)g, 雌雄各半, 购自成都达硕生物科技有限公司(编号:0016254); 实验条件和方法经云南中医学院动物实验中心伦理委员会审查合格(动物伦理学审查文件编号:R-062014012)。

基础饲料配方:面粉20%、米粉10%、玉米20%、麸皮25%、豆料20%、骨粉2%、鱼粉2%。高脂饲料配方:基础饲料79%、胆固醇1%、猪油10%、蛋黄10%。

1.2 材料与试剂

实验所用的何首乌购自云南省禄劝县,经云南中医学院俞捷副教授鉴定为蓼科植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根。样品存于云南中医学院中药炮制研究中心。按《中华人民共和国药典》2015版记载方法用黑豆汁对生何首乌进行炮制得到制何首乌。经高效液相色谱法测定,实验用生何首乌及炮制品中二苯乙烯苷质量分数分别为5.99%及2.94%,均大于1.0%,符合《中华人民共和国药典》标准。

TSG(南京景竹生物科技有限公司,经HPLC检测纯度为98%);标准品乙酸(A116165)、丙酸(D110443)、丁酸(B110439)、己酸(H103630)均为色谱纯(上海晶纯生化科技股份有限公司),己酸为内标物;二水合草酸(四川西陇化工有限公司);叠氮化钠(美国Amresco公司);甘油三酯(Triglycerides, TG)试剂盒(COD-PAP法,中生北控生物科技股份有限公司);总胆固醇(Cholesterol, CHO)试剂盒(COD-PAP法,中生北控生物科技股份有限公司);内毒素定量试剂盒(厦门市鲎试剂实验厂有限公司)。

1.3 仪器与设备

GC 7890B型气相色谱(美国安捷伦科技公司);HR/T16M型台式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);TP 214型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);ZHWY-103D型恒温振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);Milli-Q超纯水机(法国Millipore SAS);DNM-9602G型酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);DY89-II型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 样品的制备

称取150g生何首乌和315g制何首乌,分别加

10 倍量水煎煮 1 h, 过滤,

药渣加 8 倍量水煎煮 40 min, 过滤, 药渣再加 6 倍量水煎煮 40 min, 过滤, 3 次滤液合并, 浓缩至流浸膏即可。得生何首乌水提浓缩液为 600 mL, 制何首乌水提浓缩液 560 mL; 即生何首乌相当于原生药浓度 $0.250 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 制何首乌相当于原生药质量浓度 $0.563 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 动物分组及给药

取 SD 大鼠 98 只, 雄雌各半, 实验前喂养基础饲料 7 d 后, 空腹称重。根据体重、性别随机分为 7 组, 每组雌雄各 7 只: 正常对照组 (CON)、高脂对照组 (MOD)、TSG 低剂量组 (TSG. L)、TSG 中剂量组 (TSG. M)、TSG 高剂量组 (TSG. H)、生何首乌水提液组 (PMR)、制何首乌水提液组 (PMRP)。实验大鼠自由进食及饮水, 实验期为 12 周。除 CON 组喂食基础饲料外, 各组均连续喂食高脂饲料至实验结束。TSG. L 组、TSG. M 组和 TSG. H 组分别按 12、24、48 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予二苯乙烯苷单体。PMR 组、PMRP 组分别按 405、810 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予生、制何首乌水提液 (按《中华人民共和国药典》2015 版剂量分别为 4.5、9.0 g 折算)。

2.3 血液和肝脏组织样品的采集及保存

采用眼内眦取血的方法, 实验开始时采集 1 次, 给药后每隔 6 天采集 1 次, 每次每只取血量约为 1.5~2.0 mL, 所取血液用高速台式冷冻离心机以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清液采用试剂盒测定 TC、TG 含量。

实验 12 周后, 以水合氯醛溶液麻醉大鼠, 使用一次性真空静脉采血管, 采取肝门静脉血, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上层血浆, 采用鲎试剂检测内毒素 (LPS) 含量。而后取出大鼠肝脏, 称重, 取部分肝脏剪碎并称取 1 g 破碎肝脏, 置于匀浆管中加入 9 mL 0.9% 氯化钠溶液, 用电动匀浆机匀浆。匀浆后将离心管放入台式高速冷冻离心机中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min, 取上清液, 采用试剂盒检测肝脏细胞中 TC、TG 的含量。

2.4 粪便样品的采集及保存

在实验周期内, 给药前一天采集 1 次粪便, 给药后每隔 6 d 收集 1 次, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用。

2.5 短链脂肪酸的测定

2.5.1 标准曲线的制作 取乙酸、丙酸、丁酸对照

品溶液分别置于 100 mL 容量瓶中, 用超纯水定容, 配制乙酸浓度分别为 1.749、5.246、10.49、20.98、26.22 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 丙酸浓度分别为 0.534 6、3.207、6.415、12.83、16.04 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 丁酸浓度分别为 0.217 9、0.653 7、1.308、2.615、3.269 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。己酸溶液作为内标物, 其浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 置于以上各浓度对照品溶液中, 混匀, 进行气相色谱分析。以对照品的峰面积与内标物峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 以浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线。

2.5.2 气相色谱条件 采用 Agilent 122-7032: DB-WAX (30 m $\times$ 250 μm , 0.25 μm) 色谱柱进行分析。程序升温, 初温 120 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2.5 min, 然后以 $8^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度升至 130 $^{\circ}\text{C}$, 保持 4 min, 再以 $30^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度升至 210 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min。FID 温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 进样口温度为 200 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 1 μL 。氮气为载气, 流速为 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 分流比为 20:1^[13]。

2.5.3 短链脂肪酸的提取 每组每只大鼠各取粪便一粒 (162 ± 23.55) g, 进行研磨混匀, 而后准确称取粪便样品 500 mg 于 15 mL 离心管中, 加入 3 mL 萃取液 (含 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸、40 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叠氮化钠和 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 己酸), 将混合物溶液放置于摇床上 60 min, 然后以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 10 min; 取上清液经有机系 0.45 μm 微孔滤膜过滤置于安瓿瓶中, 进行 GC 分析。根据标准曲线计算得出短链脂肪酸含量^[14]。

2.6 数据处理

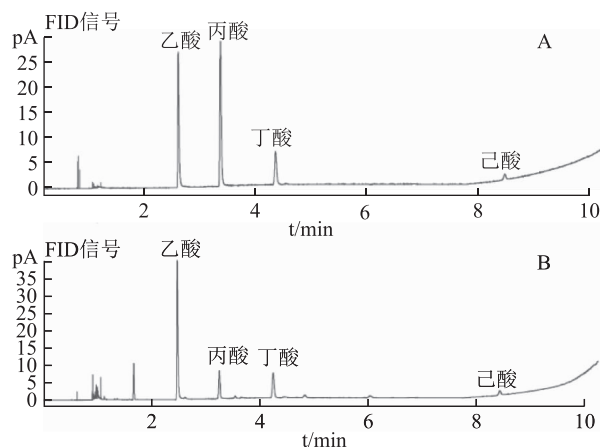
采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 实验数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行单因素方差分析 (ANOVA) 统计, 检验结果均取 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 作为统计学意义差异判断标准; 采用 Pearson 相关性分析乙酸、丙酸、丁酸含量与血清和肝脏中 TG、TC 及 LPS 含量的相关性, 相关系数 $|r| \geq 0.8$, 表明极强相关; $0.6 \leq |r| < 0.8$, 表明强相关; $0.4 \leq |r| < 0.6$, 表明中度相关; $0.2 \leq |r| < 0.4$, 表明弱相关; $0 < |r| < 0.2$, 表明无相关。

3 结果与分析

3.1 标准曲线结果

在气相色谱条件下进样测定, 3 种 SCFA 及内标物的标准品和样品色谱图见图 1, 分离效果好。同

时3种SCFA的线性关系结果列于表1。从线性关系可以看出,乙酸、丙酸、丁酸在对应的浓度范围内线性关系良好, r 均达到0.999 0。



注: A. 对照品; B. 样品。

图1 3种SCFA和己酸内标的标准品及样品GC色谱图

表1 3种短链脂肪酸的回归方程、相关系数、线性范围

名称	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
乙酸	$Y = 2.8551X - 1.9022$	0.999 0	0.105 0 ~ 1.575
丙酸	$Y = 5.4862X - 1.0418$	0.999 7	0.039 6 ~ 1.188
丁酸	$Y = 7.7878X + 0.0022$	0.999 4	0.019 2 ~ 0.288

3.2 肠道内容物SCFA含量与肝脏、血清中TG、TC及LPS含量的相关性分析

对雌、雄鼠各组肠道内SCFA含量与肝脏、血清中的TC、TG及LPS含量进行Pearson相关性分析,结果见表2,雄鼠肠道内产生的SCFA不仅与肝脏中的TC、TG呈正相关,还与LPS呈正相关,提示雄性大鼠肝脏中脂质含量的降低以及内毒素水平的下降与肠道内SCFA含量的降低有显著的相关性。其中乙酸含量与肝脏TG含量相关, $r = 0.917 (P < 0.01)$;丙酸、丁酸的含量与肝脏中TC、TG及LPS含量呈明显正相关($P < 0.01, P < 0.05$)。

雌鼠肠道内仅乙酸含量与血清中的TC及LPS含量呈负相关,相关系数分别为0.927、0.920 ($P < 0.01$),提示肠道内容物总SCFA含量的变化与其NAFLD程度无明显相关性,但何首乌提取物给药能使肠道内乙酸含量升高,这可能与降低血清TC含量的功效相关。

表2 肠道内容物SCFA含量与TG、TC及LPS间相关性分析结果

性别	指标	肝TC	肝TG	血TC	血TG	LPS
雌鼠	乙酸 r 值	-0.624	-0.563	-0.927	0.427	-0.920
	乙酸 P 值	0.134	0.189	0.003	0.340	0.003
	丙酸 r 值	0.224	0.175	-0.147	0.482	0.121
	丙酸 P 值	0.630	0.707	0.754	0.274	0.796
	丁酸 r 值	0.396	0.418	0.487	-0.176	0.604
	丁酸 P 值	0.379	0.351	0.268	0.706	0.151
雄鼠	乙酸 r 值	0.738	0.917	0.185	-0.248	0.706
	乙酸 P 值	0.058	0.004	0.691	0.592	0.076
	丙酸 r 值	0.974	0.904	0.376	-0.138	0.948
	丙酸 P 值	0.000	0.005	0.406	0.768	0.001
	丁酸 r 值	0.851	0.830	0.623	0.291	0.808
	丁酸 P 值	0.015	0.021	0.135	0.526	0.028

注:表中数值是第12周所有组别指标数据进行相关性分析的结果。

3.3 何首乌总提物和TSG对血液、肝脏中TC、TG及LPS含量的影响

如表3雌鼠血脂及肝脏脂质结果显示,饲喂高脂饲料12周后,雌鼠模型组肝脏组织匀浆TC、TG含量分别升高89.8%、40.5%,雌鼠NAFLD模型复制成功。同时,雌鼠模型组血液中TC、LPS含量显著高于正常组($P < 0.001, P < 0.01$),但TG含量无明显变化。药物治疗各组对雌鼠肝脏或血清脂质含量均有不同程度的改善,其中以TSG低剂量组对血液中TC、LPS的调节改善效果最佳,其次是高剂量组;而生何首乌调节肝脏脂质含量的效果优于其他组,其次是TSG低剂量组。

如表4雄鼠血脂及肝脏脂质结果分析显示,雄鼠模型组肝脏匀浆TC、TG含量升高幅度分别为81.7%、63.3%,雄鼠NAFLD模型复制成功。同时,雄鼠血清TC、LPS含量显著高于正常组($P < 0.001, P < 0.01$)。给予何首乌总提物及TSG治疗的非酒精性脂肪肝模型都得到不同程度的改善,其中以生何首乌对肝脏脂质含量的调节作用最佳,其次是TSG中剂量组。TSG高剂量组调节LPS的作用优于其他组,其次是生何首乌组。

3.4 SCFA含量测定结果

3.4.1 何首乌总提物及TSG对雌鼠肠道内SCFA含量的影响 实验选取给药前(0周)、给药后1周及实验最后一周(12周)雌性大鼠粪便样本进行检测,雌鼠的食量变化见图2。如图3结果显示,高脂饲料饲喂1周后,正常组雌鼠肠道内乙酸、丙酸、丁酸含量变化幅度不大,而其余各组雌鼠肠道内产生的乙酸、

表 3 雌鼠各组血液及肝脏中 TC、TG 测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

		mmol · L ⁻¹						
指标	周数	CON	MOD	TSG. L	TSG. M	TSG. H	PMR	PMRP
血清 TC	0 周	1.71 ± 0.08	1.72 ± 0.41	1.82 ± 0.50	1.61 ± 0.52	1.44 ± 0.45	1.60 ± 0.24	1.72 ± 0.47
	1 周	1.80 ± 0.15 ***	3.43 ± 0.25	3.27 ± 0.31	3.67 ± 0.97	2.86 ± 0.33	3.72 ± 0.33	3.44 ± 0.70
	12 周	1.86 ± 0.23 ***	6.55 ± 0.72	3.30 ± 1.21 ***	4.97 ± 1.97	4.23 ± 0.88 ***	5.09 ± 0.94 **	4.44 ± 1.11 **
血清 TG	0 周	1.44 ± 0.43	1.30 ± 0.30	1.37 ± 0.34	1.42 ± 0.42	1.45 ± 0.25	1.50 ± 0.29	1.53 ± 0.28
	1 周	1.19 ± 0.16 ***	1.77 ± 0.15	1.29 ± 0.36 *	1.53 ± 0.20 *	1.09 ± 0.14 ***	1.88 ± 0.65	1.18 ± 0.31 **
	12 周	1.23 ± 0.34	1.24 ± 0.35	1.20 ± 0.17	1.10 ± 0.44	1.28 ± 0.44	0.95 ± 0.39	1.09 ± 0.44
肝脏 TC		0.55 ± 0.01 ***	1.05 ± 0.08	0.71 ± 0.00 ***	0.77 ± 0.02 *	0.84 ± 0.01 *	0.64 ± 0.01 ***	0.71 ± 0.01 ***
肝脏 TG		1.06 ± 0.02 **	1.49 ± 0.01	1.14 ± 0.01 ***	1.24 ± 0.01 **	1.20 ± 0.01 ***	1.02 ± 0.01 ***	1.25 ± 0.00 ***
肝门静脉血 LPS		0.045 ± 0.001 **	0.084 ± 0.003	0.064 ± 0.000 *	0.070 ± 0.009	0.069 ± 0.002 *	0.069 ± 0.002 *	0.068 ± 0.001 *

注: 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 下同。

表 4 雄鼠各组血液及肝脏中 TC、TG 测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

		mmol · L ⁻¹						
指标	周数	CON	MOD	TSG. L	TSG. M	TSG. H	PMR	PMRP
血清 TC	0 周	1.76 ± 0.25	1.65 ± 0.33	1.74 ± 0.57	1.53 ± 0.42	1.95 ± 0.71	1.51 ± 0.51	1.85 ± 0.45
	1 周	2.16 ± 0.22 ***	3.73 ± 0.56	3.44 ± 0.57	3.42 ± 0.63	3.66 ± 0.85	3.50 ± 0.50	4.18 ± 0.40
	12 周	1.49 ± 0.22 ***	2.74 ± 0.31	2.73 ± 0.44	2.50 ± 0.66	2.63 ± 0.40	2.90 ± 0.37	2.90 ± 0.25
血清 TG	0 周	1.38 ± 0.39	1.35 ± 0.24	1.24 ± 0.39	1.58 ± 0.54	1.25 ± 0.21	1.46 ± 0.46	1.38 ± 0.29
	1 周	1.75 ± 0.57	2.58 ± 0.88	2.82 ± 0.56	2.21 ± 0.44	2.39 ± 0.48	2.90 ± 0.88	3.33 ± 0.51
	12 周	1.01 ± 0.33	1.22 ± 0.43	1.58 ± 0.26	1.43 ± 0.17	1.43 ± 0.42	1.60 ± 0.63	1.63 ± 0.37
肝脏 TC		0.71 ± 0.01 ***	1.29 ± 0.00	1.00 ± 0.01 ***	0.86 ± 0.01 ***	0.80 ± 0.01 ***	0.78 ± 0.03 ***	0.91 ± 0.02 ***
肝脏 TG		1.06 ± 0.04 **	1.73 ± 0.00	1.28 ± 0.08 *	1.45 ± 0.01 ***	1.36 ± 0.04 *	1.19 ± 0.01 ***	1.40 ± 0.07 *
肝门静脉血 LPS		0.036 ± 0.002 **	0.066 ± 0.001	0.050 ± 0.001 **	0.049 ± 0.002 **	0.044 ± 0.001 **	0.047 ± 0.001 **	0.048 ± 0.001 **

丙酸、丁酸含量急剧增加,而这一周高脂饲料组大鼠的摄食量也明显增加(见图 2),考虑这种肠道内产短链脂肪酸量的明显增加可能与高脂饲料在实验初期对实验动物摄食行为影响较大相关。随着饲喂时间的延长,雌鼠进食量出现下降(见图 2),而到实验的第 12 周各组乙酸、丙酸、丁酸的含量均有明显降低(见图 3),但是组别之间总 SCFA 的含量受食量影响的关系不明显。

如图 3 所示,与正常组相比,模型组乙酸含量降低,而丙酸、丁酸含量升高。给予药物治疗后,生何首乌降低雌鼠肠道内丙酸含量的效果优于其他组,降幅为 26.67%;低剂量 TSG 升高雌鼠肠道内乙酸含量的效果较佳,比模型组升高 18.21%;TSG 中剂量降低肠道内丁酸含量的效果最佳,较模型组降低 63.16%。从调节总 SCFA 的角度来看,TSG 低剂量组调节效果优于高剂量组,而 TSG 的调节作用优于总提物。

3.4.2 何首乌总提物及 TSG 对雄鼠肠道内 SCFA 含量的影响 雄鼠的食量变化见图 2,对雄鼠 0 周、1

周、12 周粪便中 SCFA 含量的检测结果如图 4 显示,雄鼠肠道内各时间段的总 SCFA 含量均高于雌鼠肠道内的 SCFA 含量,饲喂高脂饲料 1 周的雄鼠肠道内总 SCFA 含量显著高于饲喂正常饲料的大鼠含量。随着喂养时间的延长,各组大鼠肠道内的总 SCFA 含量均有明显降低。

综上,实验初期雌性、雄性动物肠道内 SCFA 含量受其进食量影响较明显,而随着实验动物对高脂饲料的适应及进食量的下降,肠道内 SCFA 含量与进食量间不呈现明显关联。

第 12 周末,模型组大鼠肠道内乙酸、丙酸、丁酸含量均显著高于正常组;给予生、制何首乌以及 TSG 治疗后,均能显著降低 SCFA 的含量,以生何首乌降低乙酸、丙酸、丁酸的效果最佳,降幅分别为 56.47%、76.53%、46.94%;其次是 TSG 低剂量组降低乙酸、高剂量组降低丙酸、中剂量组降低丁酸的效果优于其他组。从调节总 SCFA 的角度来看,生何首乌总提物的调节作用优于 TSG,而 TSG 低剂量组的调节效果优于中、高剂量组。

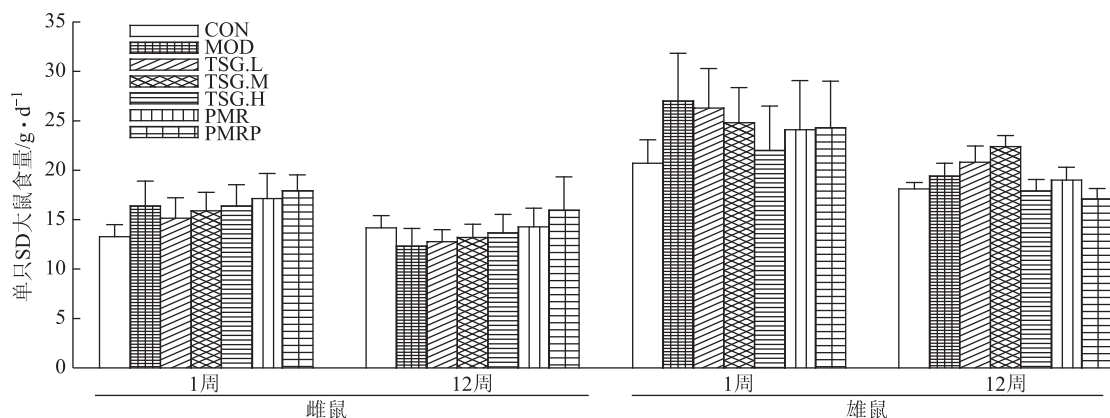


图2 雌、雄鼠的食量变化

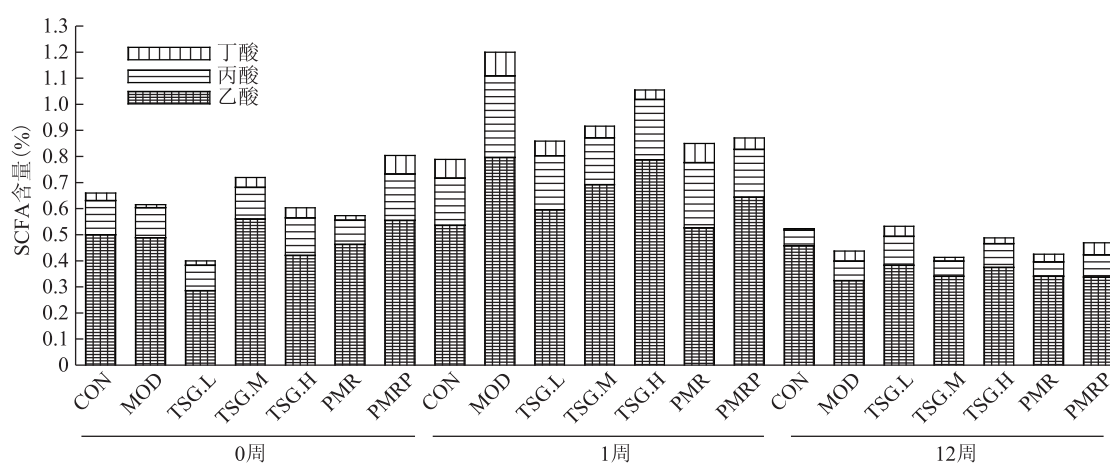


图3 雌鼠肠道内 SCFA 含量变化

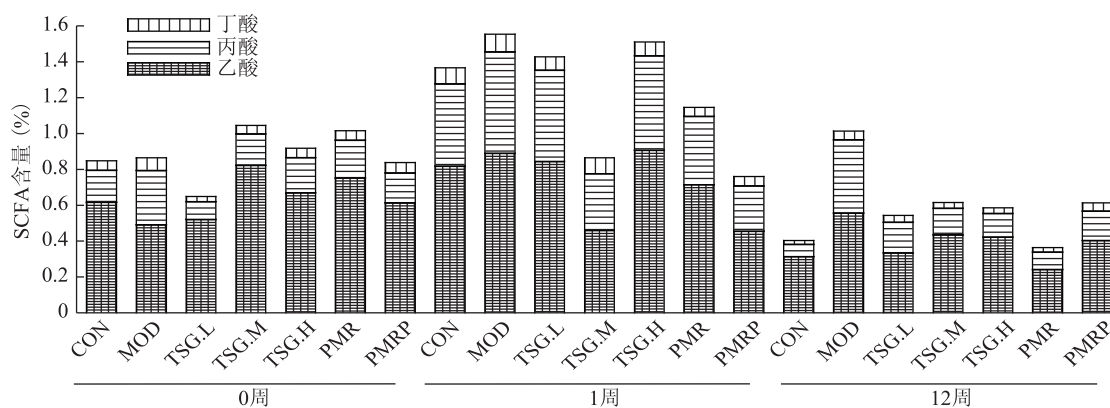


图4 雄鼠肠道内 SCFA 含量变化

4 讨论

SCFA 是肠道菌群的主要发酵产物,在人类结肠中,正常肠道菌群产生 $50 \sim 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SCFA^[15],主要包括乙酸、丙酸、丁酸。相关文献显示关于 SCFA 对肥胖和 NAFLD 发展的贡献存在争议。有文献报道表明 SCFA 可能通过多种机制影响肥胖的发生,同

时保护肝细胞。丙酸可使体外培养的肝细胞合成胆固醇的量以及离体肝细胞培养液中 HMG-CoA 还原酶活性显著下降^[16]。人类炎症肠道疾病与肠道内 SCFA 的减少有关,炎症能够增强肠黏膜通透性,使得菌群产物 LPS 通过门脉循环进入肝脏诱发疾病,因此通过增加 SCFA 抑制炎症在保护肝脏健康中扮演了重要角色^[17]。Kimura 等^[18]认为 SCFA/GPR43 在肠

道及肠道外均能发挥作用,鼠的脂肪组织中 SCFA 能通过 GPR43 受体抑制胰岛素信号的传递,从而抑制脂肪堆积。

另一些研究报道则认为 SCFA 的增加能够促进肥胖的发展。向无菌动物移植肠道菌群的研究结果显示,肠道菌群产生的 SCFA 所提供的能量是从饮食中所摄取能量的 30%^[19]。乙酸是多数细菌发酵的主要代谢产物,也是胆固醇合成的最主要底物,在机体内,大部分乙酸被吸收入血,进入肝脏的代谢,作为外周组织的能量来源^[20]。丙酸在很大程度上由肝脏吸收,是糖异生、脂质合成、蛋白质合成很好的前体^[21-22]。Schwartz 等^[23]发现在肥胖人群的肠道中拟杆菌门与厚壁菌门的比例升高;虽然两种门类菌群都产生 SCFA,但拟杆菌门(如谱氏菌属)产生的 SCFA 更多。

另一方面,高脂饲料对雌、雄大鼠脂代谢的影响可能存在性别差异,本课题组前期研究表明高脂饮食诱导使雌、雄鼠血脂异常类型方面表现出显著的性别差异^[24]。本研究结果也显示 SCFA 与 NAFLD 相关性可能存在一定性别差异,雄鼠相关性结果支持 SCFA 的增加能够促进肥胖发展这一观点,即雄鼠肠道内 SCFA 量与 NAFLD 发病正相关;而雌鼠结果显示乙酸含量的增加减少血液 TC 和 LPS 含量,表明雌鼠肠道内 SCFA 量可能与 NAFLD 发病负相关。

有研究表明肠道菌群中的肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌等多种菌属与脂代谢有着密切的关系,而脂代谢的异常会直接影响肠道菌群的数量和分布^[25];然而肠道内发酵所产生的 SCFA 的种类和数量受发酵基质的数量、类型、降解速率、降解程度,以及肠道菌群和宿主生理状态等因素的影响^[26]。本研究结果发现,高脂饮食雄鼠粪便中乙酸、丙酸、丁酸的含量均明显高于正常组,而高脂饮食雌鼠粪便中乙酸的含量低于正常组;提示高脂饮食大鼠的肠道微生态系统出现紊乱,可能存在着生成乙酸、丙酸和丁酸的菌属增加或减少,致使肠道菌群对宿主代谢产生异常影响,引发代谢紊乱。

给予何首乌总提物及 TSG 治疗后,雄鼠给药组的总 SCFA 含量有所降低,其中生何首乌、TSG 低剂量组调节效果最佳;同时也发现生何首乌和 TSG 低剂量组能够显著降低肝脏脂质及血液内毒素。有研究称短链脂肪酸主要被肠上皮细胞吸收,增加体内能量的储备,同时通过门脉循环进入肝脏,经肝脏代谢转变为三酰甘油,使血脂水平升高,促进脂

肪的积累^[27]。这从降血脂方面对本实验结果提供了一个有力的佐证。对于高脂饮食雌鼠,生何首乌显著降低丙酸含量,TSG 低剂量升高乙酸含量,且总 SCFA 含量趋近于正常组;与此同时生何首乌显著降低肝脏脂质,TSG 低剂量降低血液中的 TC 和 LPS。近年来,“肝-肠轴”概念的提出为寻找肝病的发病机制和诊疗方法提供了新思路。一系列研究显示,肠源性内毒素血症在 NAFLD 的发生发展中起重要作用^[28]。然而本研究在检测 SCFA 含量时,由于样品量不足,通过组内合并样品进行检测,并且只检测了一次,结果没有标准差值而对组间进行了比较,但是课题组对 SCFA 含量的测定方法进行了稳定性、精密度、相对回收率等方法学验证,其结果均满足分析要求,表明数据的准确性及可靠性。这是本研究的不足之处,在日后的实验中,应多收集粪便样品或采取所需样品量少的方法对每个样品进行 SCFA 含量的检测,也许能够得出更好的结论。

综上所述,何首乌总提物及 TSG 能够调节肠道内 SCFA 含量,促使通过门脉循环进入肝脏的 SCFA 适宜,能够减轻脂质在肝细胞内的蓄积,阻止肠源性内毒素易位,有效防护 NAFLD 的发生发展。然而,SCFA 是如何调控 NAFLD 宿主外周组织调控能量代谢、抑制炎症反应的信号转导,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Rinella M E, Sanyal A J. NAFLD in 2014: Genetics, diagnostics and therapeutic advances in NAFLD [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(2): 65-66.
- [2] 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: 274-285.
- [3] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845.
- [4] Compare D, Coccoli P, Rocco A, et al. Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non-alcoholic fatty liver disease [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012, 22(6): 471-476.
- [5] Mcorist A L, Abell G C, Cooke C, et al. Bacterial population dynamics and faecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in healthy humans [J]. Br J Nutr, 2008, 100(1): 138-146.
- [6] Macfarlane G T, Gibson G R. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large in-

- testine[J]. *Gastrointest Microbiol*, 1997, 269-317.
- [7] 王子花, 申瑞玲, 李文全. 短链脂肪酸的产生及作用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007(2): 12-13.
- [8] 刘小华, 李舒梅, 熊跃玲. 短链脂肪酸对肠道功效及其机制的研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2012, 19(1): 56-58.
- [9] Marco A R V, Hosana G R, Elaine H, et al. Suppressive effect of short chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils[J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(9): 849-855.
- [10] Piekarska J, Mista D, Houszka M, et al. *Trichinella spiralis*: The influence of short chain fatty acids on the proliferation of lymphocytes, the goblet cell count and apoptosis in the mouse intestine[J]. *Exp Parasitol*, 2011, 128(4): 419-426.
- [11] 梁荫基, 林琛莅, 王少娜, 等. 肥胖相关非酒精性脂肪性肝病防治的新靶点: 短链脂肪酸及其受体信号通路的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(6): 628-631.
- [12] Lin P, Lu J M, Wang Y F, et al. Naturally occurring stilbenoid TSG reverses non-alcoholic fatty liver diseases via gut-liver axis[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(10): 1-14.
- [13] K. Schäfer. Analysis of Short Chain Fatty Acids from different intestinal samples by capillary gas chromatography[J]. *Chromatographia*, 1995, 40(9/10): 550-556.
- [14] Andreas Schwartz, David Taras, Klaus Schäfer, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects[J]. *Obesity*, 2010, 18(1): 190-195.
- [15] Duncan S H, Louis P, Thomson J M, et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota[J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(8): 2112-2122.
- [16] Nakamura N, Hamazaki T, Jokaji H, et al. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on plasma polyunsaturated fatty acid concentrations in patients with hyperlipidemia[J]. *Int J Clin Lab Res*, 1998, 28(3): 192-195.
- [17] Treem W R, Ahsan N, Shoup M, et al. Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1994, 18(2): 159-164.
- [18] Kimura I, Ozawa K, Inoue D, et al. The gut microbiota suppresses insulin mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1829.
- [19] Wostmann B S, Larkin C, Moriarty A, et al. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germ-free Wistar rats[J]. *Lab Anim Sci*, 1983, 33(1): 46-50.
- [20] Wolever T M, Brighenti F, Royall D, et al. Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects[J]. *Am J Gastroenterol*, 1989, 84(9): 1027-1033.
- [21] Wolever T M, Spadafora P, Eshuis H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans[J]. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(3): 681-687.
- [22] Vernay M. Origin and utilization of volatile fatty acids and lactate in the rabbit; influence of the faecal excretion pattern[J]. *Br J Nutr*, 1987, 57(3): 371-381.
- [23] Schwartz A, Taras D, Schäfer K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(1): 190-195.
- [24] 张婷, 林佩, 陆建美, 等. 高脂饮食诱导大鼠高脂血症模型的性别差异研究[J]. 实验动物学, 2015, 32(2): 7-13.
- [25] 易园骊, 姚萍. 脂代谢与肠道菌群关系的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(6): 991-994.
- [26] 刘松珍, 张雁, 张名位, 等. 肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展[J]. 广东农业科学, 2013, (11): 99-103.
- [27] 郑军. 肠道菌群失调与脂肪肝患者血脂和丙氨酸氨基转移酶的变化研究[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(2): 161-162.
- [28] 曹毅, 沈峰, 徐雷鸣, 等. 肠道菌群和内毒素血症与非酒精性脂肪性肝病[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(2): 163-165.

(收稿日期 2016-09-12)