

肠道菌群及代谢产物对高脂饮食介导的非酒精性脂肪肝的潜在影响

韩志伟¹, 陈力², 王占军¹, 修辉², 刘希双^{2*}

¹青岛大学医学部, 山东 青岛

²青岛大学附属医院消化内科, 山东 青岛

收稿日期: 2022年4月27日; 录用日期: 2022年5月21日; 发布日期: 2022年5月31日

摘要

目的: 非酒精性脂肪肝目前是世界范围内最常见的慢性肝病, 发病机制尚未明了。有研究表明肠道菌群及代谢产物可通过门静脉循环影响疾病的发生发展, 但目前没有定论, 本次研究了非酒精性脂肪肝小鼠中肠道菌群及代谢产物的改变, 并探讨了其可能对非酒精性脂肪肝的影响。方法: 将小鼠随机分为高脂饮食组(HFD组)和对照组(CK组), 通过高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝模型, 检测小鼠谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)水平, 通过H.E染色和油红染色观察肝脏病理。通过16S微生物测序技术及代谢组学分析小鼠体内肠道菌群和代谢产物的变化, 推测可能的作用。结果: 与CK组比较, HFD组中ALT、AST、TG水平明显降低($P < 0.05$), 观察肝脏病理发现有明显脂肪变性。通过PCoA分析及Adonis分析($P < 0.001$)发现两组菌群结构及分布有显著差异; 通过Wilcoxon分析得到两组在不同分类阶元的差异菌群($P < 0.05$), *Lactobacillus*及*Coriobacteriaceae_UCG_002*在CK组中升高, 而*Prevotellaceae*在HFD组中升高。代谢组学分析发现两组间有明显差异, 在CK组中有156种产物升高。两组学联合分析, 肠道代谢产物如甘油磷酸胆碱, 鞘氨醇与部分细菌有显著相关性, 可能影响非酒精性脂肪肝的进展。结论: 高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝可以引起肠道菌群及代谢产物的紊乱, 可能通过鞘脂代谢、甘油磷酸胆碱代谢等途径影响非酒精性脂肪肝的进展, 其中机制有待于进一步研究。

关键词

非酒精性脂肪肝, 肠道菌群, 代谢产物

The Potential Effect of Intestinal Flora and Metabolites on High-Fat Diet-Mediated Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Zhiwei Han¹, Li Chen², Zhanjun Wang¹, Hui Xiu², Xishuang Liu^{2*}

*通讯作者 Email: 17691341791@163.com

文章引用: 韩志伟, 陈力, 王占军, 修辉, 刘希双. 肠道菌群及代谢产物对高脂饮食介导的非酒精性脂肪肝的潜在影响[J]. 临床医学进展, 2022, 12(5): 4823-4838. DOI: 10.12677/acm.2022.125700

¹Faculty of Medicine, Qingdao University, Qingdao Shandong²Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao ShandongReceived: Apr. 27th, 2022; accepted: May 21st, 2022; published: May 31st, 2022

Abstract

Objective: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease worldwide. The pathogenesis is unclear. Some studies have shown that intestinal flora and metabolites can affect the occurrence and development of disease through portal vein circulation, but there is no conclusion at present. This study studied the changes of intestinal flora and metabolites in mice with non-alcoholic fatty liver disease, and discussed their possible effects on non-alcoholic fatty liver disease. **Methods:** Mice were randomly divided into high-fat diet group (HFD group) and control group (CK group). Non-alcoholic fatty liver model was induced by high-fat diet, and the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and triglyceride (TG) were detected. Liver pathology was observed by H.E staining and oil red staining. The changes of intestinal flora and metabolites in mice were analyzed by 16S microbial sequencing technology and metabolomics, and the possible effects were predicted. **Results:** Compared with CK group, the levels of ALT, AST and TG in HFD group were significantly lower ($P < 0.05$), liver pathology showed obvious steatosis. According to PCoA analysis and Adonis analysis ($P < 0.001$) significant differences were found in the structure and distribution of bacteria between the two groups. Wilcoxon analysis was used to determine the difference of flora between the two groups in different taxonomic order ($P < 0.05$), Lactobacillus and Coriobacteriaceae_UCG_002 were increased in CK group, while Prevotellaceae was increased in HFD group. Metabolomics analysis revealed significant differences between the two groups, with 156 products elevated in the CK group. Combined with analysis of the two groups, it showed that intestinal metabolites such as glycerophosphorine and sphingosphenol were significantly correlated with some bacteria, which may affect the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Conclusion:** Non-alcoholic fatty liver disease induced by high fat diet can cause disturbance of intestinal flora and metabolites, which may affect the progress of non-alcoholic fatty liver disease through sphingolipid metabolism, glycerophosphatecholine metabolism and other pathways, and the mechanism remains to be further studied.

Keywords

Nonalcoholic Fatty Liver, Intestinal Flora, Metabolite

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 引言

非酒精性脂肪肝已经成为世界上最常见的慢性肝病之一, 据统计目前全球患病率为 25.24%, 且全球各地区的患病率呈上升趋势, 大大增加了社会的经济负担[1], 但目前尚未有良好的治疗方式, 主要以饮食和运动来控制[2] [3]。非酒精性脂肪性肝病 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)包括从单纯性脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎和肝硬化的一系列肝脏表型[4]。虽然大多数 NAFLD 患者仅具有无进展的脂肪变性, 但相当一部分会发展为非酒精性脂肪性肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 并进一步进展

为肝硬化、肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC), 导致肝脏相关死亡率增加[5]。

有研究证明肠道微生物区系与代谢相关性疾病(非酒精性脂肪肝、肥胖和糖尿病)的发病密切相关[6][7], 肠道的代谢产物可以通过门静脉循环进入肝脏, 影响一些受体或者炎症细胞来介导肝脏的氧化应激以及炎症免疫反应[8]。但高脂饮食介导的非酒精性脂肪肝模型小鼠的肠道菌群及代谢产物的变化是不固定的, 所以其对疾病的进展尚未有明确定论。本研究我们通过给小鼠喂食高脂饲料构建非酒精性脂肪肝模型, 利用 16S rDNA 微生物测序技术和非靶向代谢组学分析肠道菌群及代谢产物的变化, 探索其对非酒精性脂肪肝的影响, 为非酒精性脂肪肝发病机制以及诊断提供一定的基础。

2. 方法与材料

2.1. 小鼠饲养与处理

购买自济南朋悦实验动物繁育有限公司的 30 只 SPF 级 5 周龄雄性 C57/BL6J 小鼠适应性喂养 7 天, 后将小鼠随机分为 2 个小组, 包括非酒精性脂肪肝模型组(High-fat Diet, HFD 组)以及对照组(Control check, CK 组), 小鼠饲养在 18℃~24℃的室温环境中, 光暗对照各 12 小时, 每天自由饮水及进食, 饲养 16 周。所有动物操作流程均按照动物实验室伦理准则进行。

2.2. 组织收集

喂食 16 周后使用代谢笼收集小鼠粪便, 液氮速冻 15 min 后转入-80℃冰箱用于后续分析。然后小鼠禁饮食 12 h 后采血处死, 解剖小鼠收集肝脏, 部分保存于 4%多聚甲醛, 用于肝脏 H.E 染色及油红染色, 剩余保存于-80℃冰箱用于后续分析。血液经离心机(2000 rpm, 15 min)离心后采集上清液用于血液生化分析。

2.3. DNA 提取及 16S rRNA 基因测序

采用 DNA 抽提试剂盒(QIAGEN, 12888)对粪便菌群 DNA 进行提取, 之后利用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000 检测 DNA 的浓度。用针对 V3-V4 区域的特异引物 343F (5'-TACGGTAGGCAGCAG-3')和 798R (5'-AGGGTATCTAATCCT-3')扩增细菌 DNA, 检测质量并纯化。纯化后作为二轮 PCR 模板进行扩增, 后 PCR 产物进行 Qubit 定量。将等量的纯化扩增物汇集到 Illumina MiSeq 平台进行后续测序。测序数据进行预处理后, 采用 Vsearch 软件, 根据序列的相似性, 将序列归为多个可操作分类单元(OTU)。使用 QIIME 软件包挑选出各个 OTU 的代表序列, 通过 RDP classifier 将所有代表序列与 Silva (version123) 数据库比对注释, 保留置信区间大于 0.7 的注释结果。

2.4. 粪便代谢组学分析

粪便经过预处理后使用 Nexera UPLC 超高效液相串联 QE 高分辨质谱仪组成的液质联用系统, 分析了在 ESI 正离子和负离子模式下的代谢谱。采用 ACQUITY UPLC HSS T3(1.8μm, 2.1 mm × 100 mm)进行正、负模式实验。二元梯度洗脱体系由 A-水(含 0.1%甲酸)和 B-乙腈(含 0.1%甲酸)组成, 流速 0.35 mL/min。初始组成为 95% A 和 5% B, 采用以下梯度进行分离: 95%A, 0.01~2 min; 70%~95% A, 2~4 min; 50%~70% A, 4~8 min; 20%~50% A, 8~10 min; 0~20% A, 10~14 min, 在 100% B 条件下保持 2 min; 0~95% A, 15~15.1 min, 95% A, 15.1~16 min。在整个分析运行过程中, QC 样品以固定间隔(每 10 个样品)注入, 以提供一组可用于评估重复性的数据。采集的 LC-MS 原始数据通过 progenesis QI v2.3 软件进行分析。

2.5. 统计学分析

血生化指标采用 SPSS 26.0 软件进行非参数检验, 用 Wilcoxon 秩和检验比较两个对照组间 α 多样性

的差异,并利用加权 Unirac 距离矩阵数据进行主坐标分析(PCOA)以可视化 β 多样性。组间的 LEfSe 分析利用 Kruskal-Wallis 和秩检验进行了显著性检验,组间的两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验对其进行了生物学显著性检验。利用线性判别分析(LDA)获得最终的区分种。用 PICRUST 从 16S rRNA 序列中推测肠道菌群的元基因组,根据 Wilcoxon 算法对预测的 KEGG 数据库结果进行计数。多变量统计分析使用正交偏最小二乘分析(OPLS-DA)来区分组间代谢谱的整体差异,并找到代谢产物在群体之间的不同,应用了默认的 7 轮交叉验证,在每轮中将七分之一的样本排除在数学模型之外,以防止过度拟合。差异代谢物的筛选标准为 OPLS-DA 模型第一主成分为 $VIP > 1$, t 检验 $P < 0.05$ 。利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行通路富集分析。此外,我们利用超几何检验来识别与整体背景相比,在显著差异表达的代谢物中显著富集的通路条目,认为 $P < 0.05$ 的通路显著富集。采用 Spearman 相关检验(Student's t 检验, $P < 0.05$, $|\text{相关系数}| > 0.3$)分析肠道菌群与肠道代谢产物的相关性。所有的分析和图形使用 QIIME(1.8.0)、R 软件(3.6.2)和 R 软件(3.5.1)进行。所有数值均以平均值 \pm SD 表示。 $P < 0.05$ 认为结果有统计学意义。

3. 结果

3.1. 肝脏的病理改变及血生化指标

经过 16 周干预后,小鼠肝脏切片 HFD 组与 CK 组比较肝脏出现明显脂肪变性(图 1)。血生化指标(表 1)显示,小鼠 HFD 组 ALT, AST 及甘油三酯明显升高。

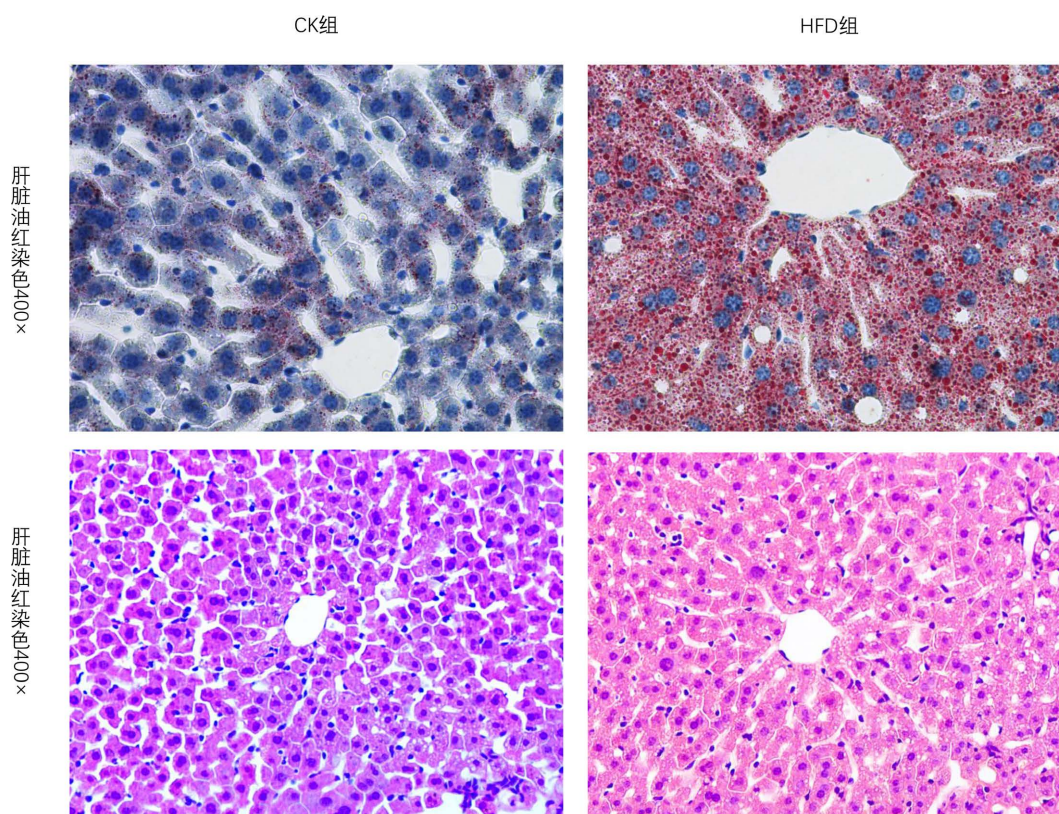


Figure 1. Liver steatosis oil red staining was observed in the high fat diet group. Blue staining for nucleus, red staining for lipid droplets; H.E staining of liver, red staining of cytoplasm and blue staining of nucleus. 400 \times is the magnification of tissue under the microscope

图 1. 高脂饮食组肝脏出现明显脂肪变性油红染色,蓝染表示细胞核,红染代表脂滴;肝脏 H.E 染色,胞质红染,胞核蓝染。400 \times 为组织在显微镜下的放大倍数

Table 1. Comparison of blood biochemical analysis between the two groups (n = 15 per group, $\bar{x} \pm s$)**表 1.** 两组血液生化分析比较(n = 15 只/组, $\bar{x} \pm s$)

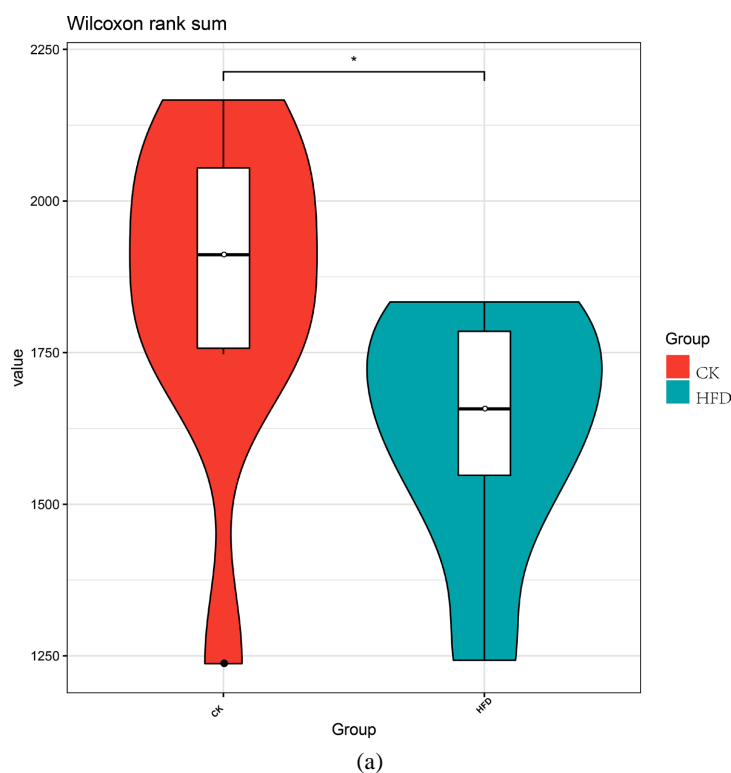
组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/L)
CK 组	29.50 ± 3.44	128.20 ± 13.44	0.65 ± 0.11
HFD 组	37.20 ± 2.94	150.60 ± 18.22	0.92 ± 0.17
P 值	<.05	<.05	<.05

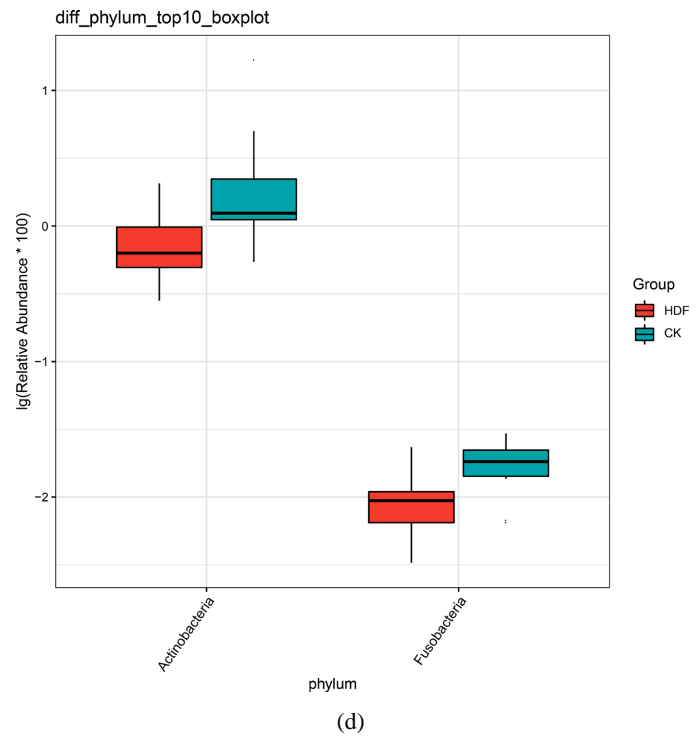
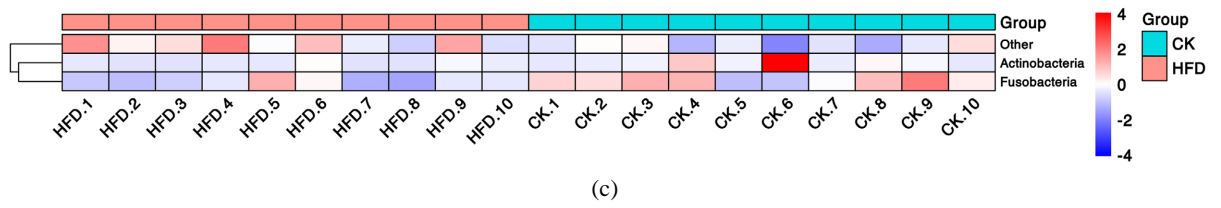
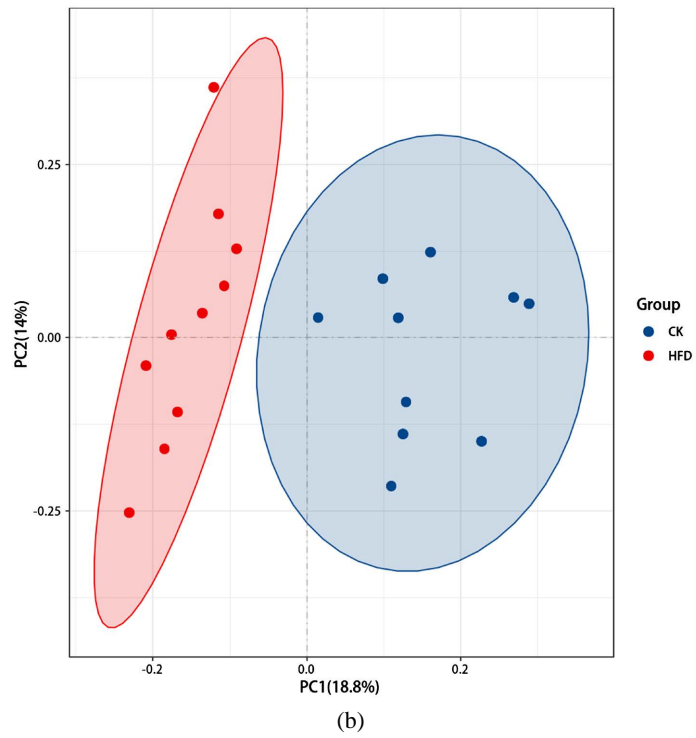
3.2. 低聚木糖对小鼠肠道菌群的影响

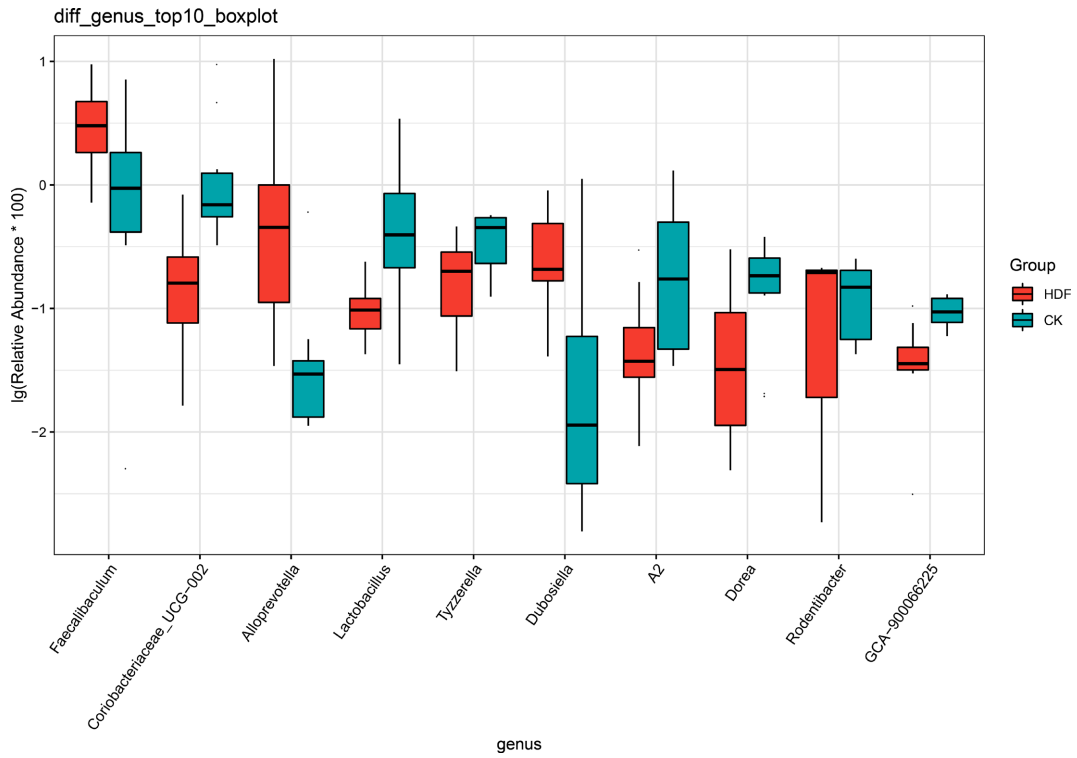
α 多样性 Chao1 指数明显降低表明 HFD 组中肠道菌群丰度明显减少(图 2(a))。PCoA 分析可以观察到两组间距离明显(图 2(b)), 同时 Adonis 分析 $P < 0.001$, 表明肠道菌群分布及结构存在显著差异。

通过 Wilcoxon 分析两组间不同水平的肠道菌落差异, 主要展示了门、种和属水平的菌群差异。在门水平, CK 组中放线菌及梭杆菌丰度升高(图 2(c), 图 2(d)); 在属水平中, HFD 组与 CK 组共有 46 种差异菌群, 16 种菌落在 CK 组丰度升高, 30 种降低, 下图展示了属水平的前 10 种差异肠道菌群, 7 种菌群丰度在 CK 组中升高(图 2(e), 图 2(f)); 在种水平, 共有 19 种差异菌群, 其中 10 种在 CK 组种升高, 图中展示了种水平前 10 种差异菌群, 其中有 6 种在 CK 组种升高(图 2(g), 图 2(h))。

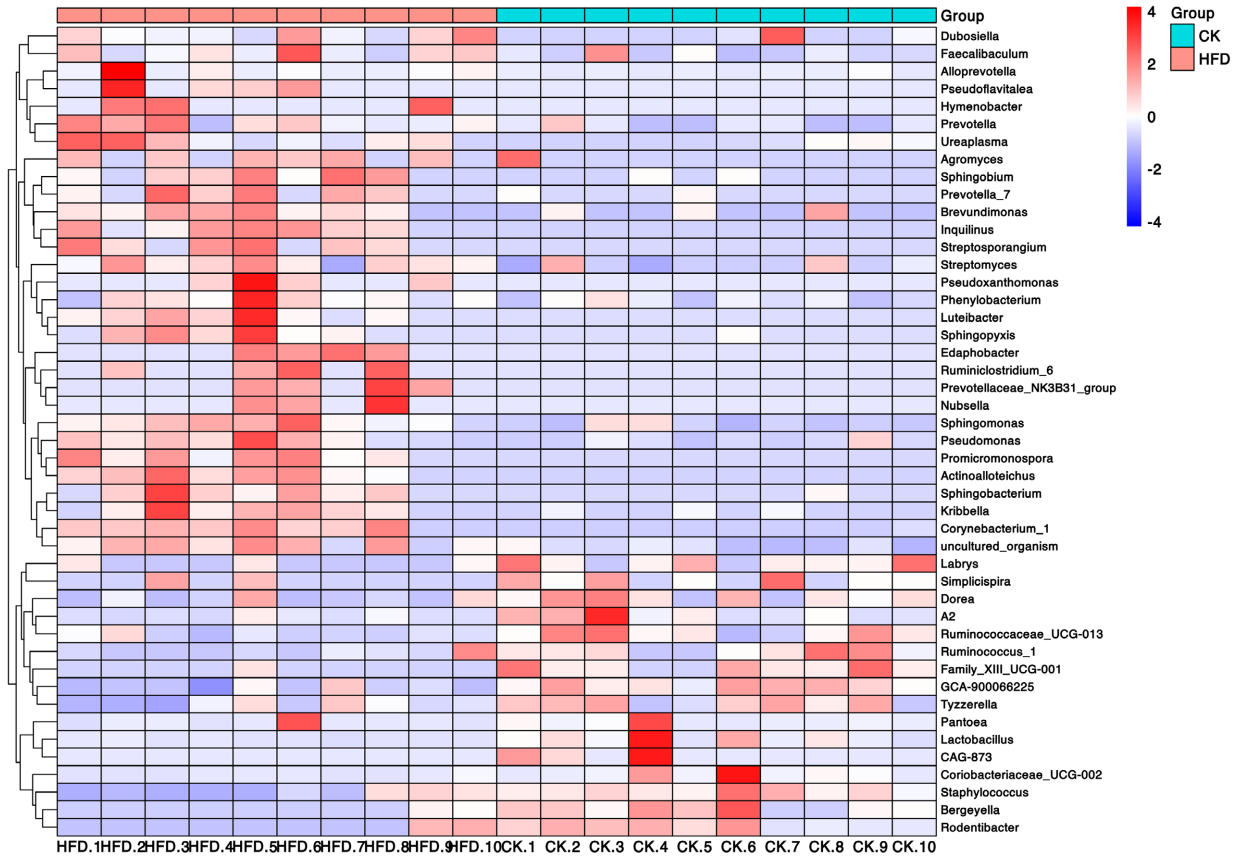
通过 LefSe 分析进一步确定了 NAFLD 模型小鼠的特定菌落和生物标志物, LefSe 分析共发现了 15 个鉴别特征($P < 0.05$, $LDA > 4$), 在门水平, CK 组放线菌丰度水平显著增加; 在纲水平, CK 组 Coriobacteriia, Bacilli 丰度升高; 在目水平, CK 组小鼠 Coriobacteriales, Lactobacillales 丰度升高; 在科水平, Atopobiaceae, Lactobacillaceae 在 CK 组丰度升高, Prevotellaceae, Rs_E47_termite_group 丰度在 HFD 组中升高, 在属水平, HFD 组中 Faecalibaculum, Alloprevotella, uncultured_bacterium 丰度升高, A2, Lactobacillus 及 Coriobacteriaceae_UCG_002 在 CK 组中丰度升高(图 3(a))。







(e)



(f)

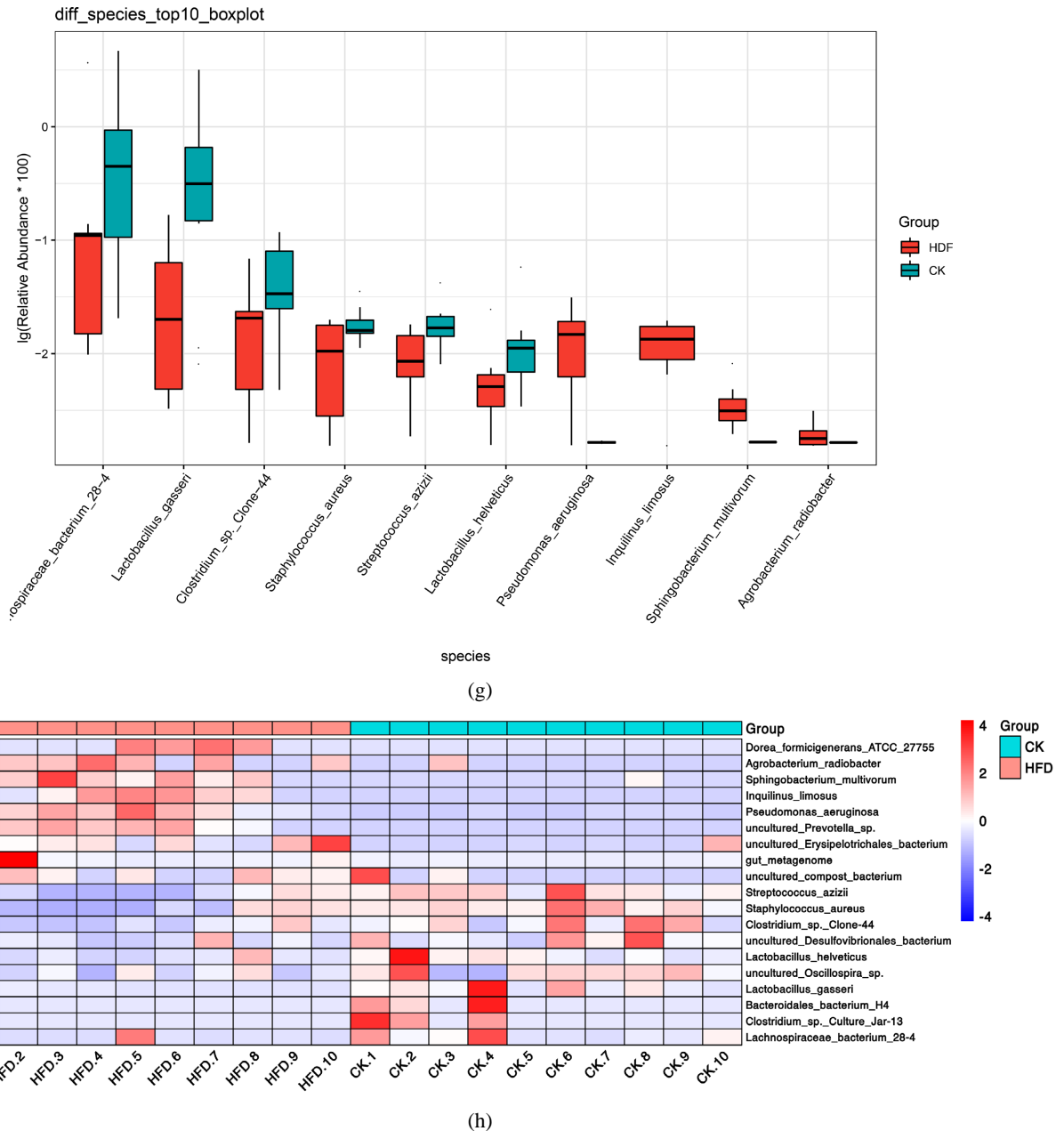


Figure 2. Differences in microflora between the two groups at different levels. (a) Comparison of Shannon index between groups; (b) PCoA analysis based on Bray Curtis distance matrix algorithm. Abscis (PC1) and ordinis (PC2) are the two main coordinates with the largest explanation degree of differences between samples, and ellipses are 95% confidence; ((c), (d)) Analysis of intestinal flora at phylum level; ((e), (f)) Intestinal microflora analysis at genus level; ((g), (h)) Intestinal microflora analysis at species level. *said $P < 0.05$

图 2. 分析两组不同水平的菌群差异。(a) 组间 Shannon 指数比较; (b) 基于 Bray Curtis 距离矩阵算法的 PCoA 分析, 横坐标 (PC1)和纵坐标(PC2)为样本间差异解释度最大的两个主要坐标, 椭圆为 95%置信度; ((c), (d)) 门水平的肠道菌群分析; ((e), (f)) 属水平的肠道菌群分析; ((g), (h)) 种水平的肠道菌群分析。*表示 $P < 0.05$

基于 16S rDNA 数据, 通过 PICRUST 分析预测了小鼠肠道菌群功能组成。两组共有 179 个不同的 KEGG 通路, 下图显示了差异最显著的前 50 项。结果显示, 许多 KEGG 通路包括鞘脂代谢, 甘油磷脂代谢, 脂肪细胞因子信号通路, PPAR 信号通路等可能与 NAFLD 的发生机制有关(图 3(b))。后续基于 LCMS 的

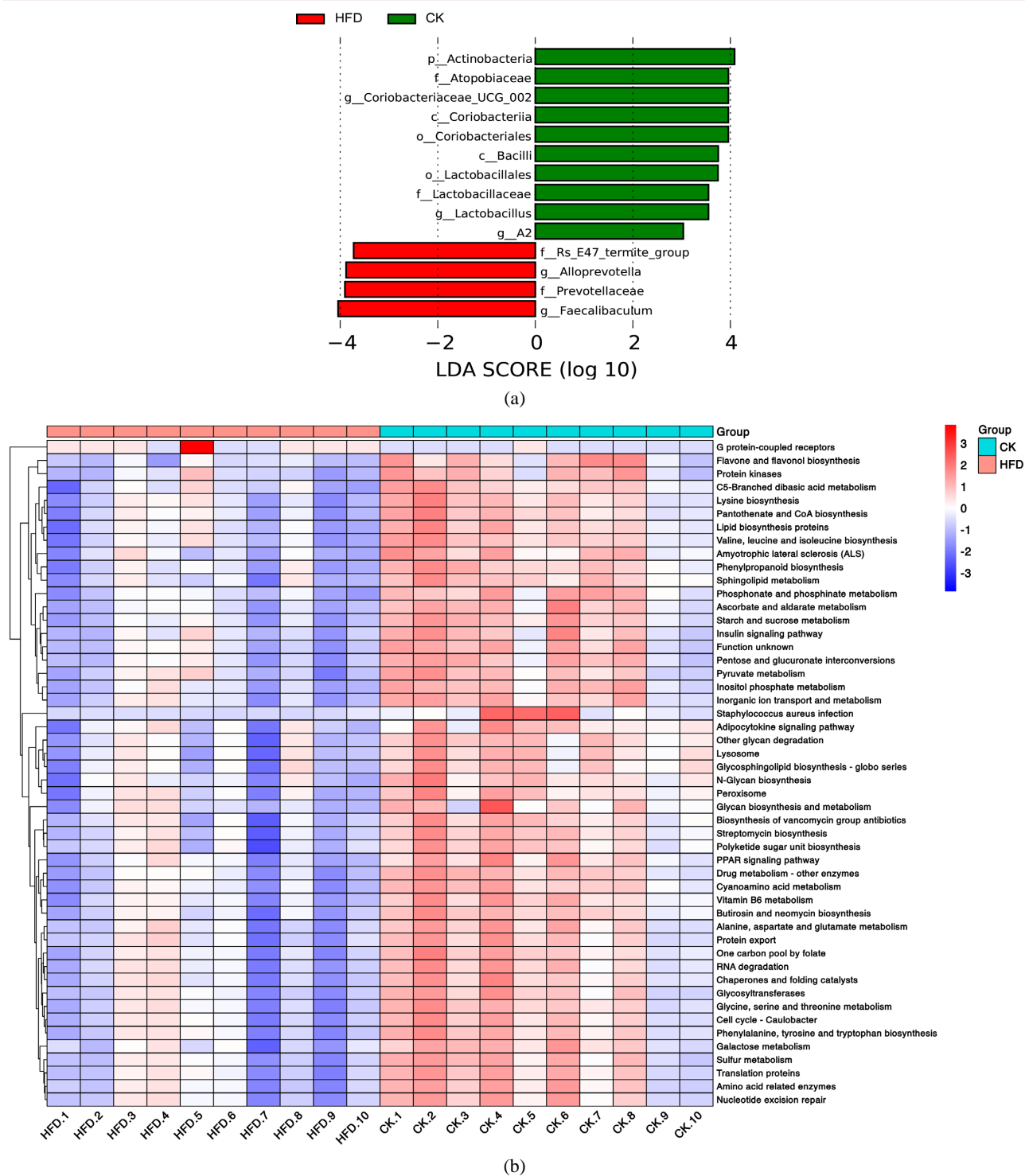


Figure 3. Results of LefSe analysis and PICRUSt analysis. (a) T-axis family tree plots obtained by LefSe analysis and Wilcoxon test of 16S sequence using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LefSe) analysis. LefSe identified the groups with the greatest differences in abundance between CK and HFD groups at phylum, class, order, family and genus levels. HFD group is red, CK group is green, and only LDA threshold reaches > 3; (b) PICRUSt analysis results for predicting functional pathways of intestinal flora

图 3. LefSe 分析和 PICRUSt 分析结果。(a) 利用线性判别分析(LDA)效应大小(LefSe)分析和 16S 序列的 Wilcoxon 检验获得的 T 轴系谱系图。LefSe 鉴定出在门、纲、目、科和属水平上 CK 组和 HFD 组丰度差异最大的类群。HFD 组表示为红色, CK 组为绿色, 仅显示 LDA 阈值达到 > 3 的菌群; (b) 预测肠道菌群功能通路的 PICRUSt 分析结果

代谢组学分析也支持了一些通路。

3.3. 非靶向组学分析肠道差异代谢产物

我们采用正交偏最小二乘方 - 判别分析(Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA)表征两组之间的整体代谢组学差异。结果显示, 各组样本在 OPLS-DA 评分图中均具有明显的分离。这说明, 在高脂饮食干预的小鼠粪便中, 代谢产物存在显著差异(图 4(a))。

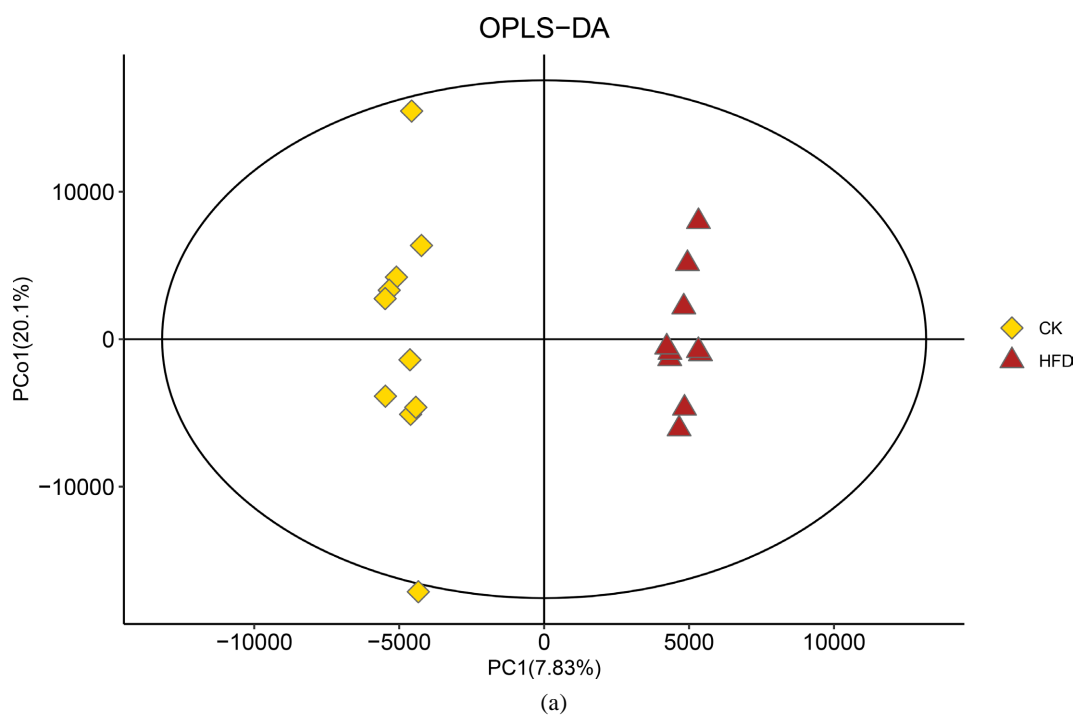
为防止模型过拟合, 采用七次循环交互验证(7-fold cross validation)和 200 次响应排序检验(response permutation testing, RPT)的方法来考察模型的质量。下图表明 OPLS-DA 模型具有良好的稳定性, 不存在过拟合问题(图 4(b), $R^2 = 0.87$, $Q^2 = -0.65$)。

然后通过 OPLS-DA 评分和 t 检验, 两组共鉴定出 371 种显著变化的差异物($VIP > 1$, $P < 0.05$)。371 种代谢产物进一步分类, 包括脂质和脂样分子(180), 生物碱及其衍生物(4), 类苯(8), 木酚素、新木酚素及相关化合物(1), 核苷、核苷酸和类似物(2), 有机酸及其衍生物(34), 有机氮化合物(1), 有机氧化合物(11), 有机单环化合物(15), 苯基丙酮类化合物和聚酮类化合物(13), 未分类代谢物(102)。与对照组比较, HFD 组中有 156 种代谢产物降低, 在这些代谢物中, 主要为脂肪酸及共轭物、氨基酸、多肽和类似物等, 下图主要展示了两组间前 50 的差异代谢物(图 4(c))。

我们对差异代谢产物进行了 KEGG 功能富集分析。图中显示了具有统计学意义的代谢途径($P < 0.05$) (图 5(a), 图 5(b)), 有研究证实甘油磷脂代谢, 鞘脂代谢, 细胞衰老都可能与非酒精性脂肪肝的发病有关 [9] [10]。在甘油磷脂代谢途径中, HFD 组小鼠肠道中甘油磷脂、2-溶血磷脂酰胆碱平均含量降低, 磷脂酸水平升高, 在鞘脂代谢途径中, 鞘氨醇、鞘氨醇 1 磷酸在 HFD 组小鼠中水平升高。

3.4. 肠道菌群与差异代谢产物之间的联系

我们通过 Spearman 分析研究了属水平差异肠道菌群与前 50 的代谢产物之间的联系, 如图所示, 我



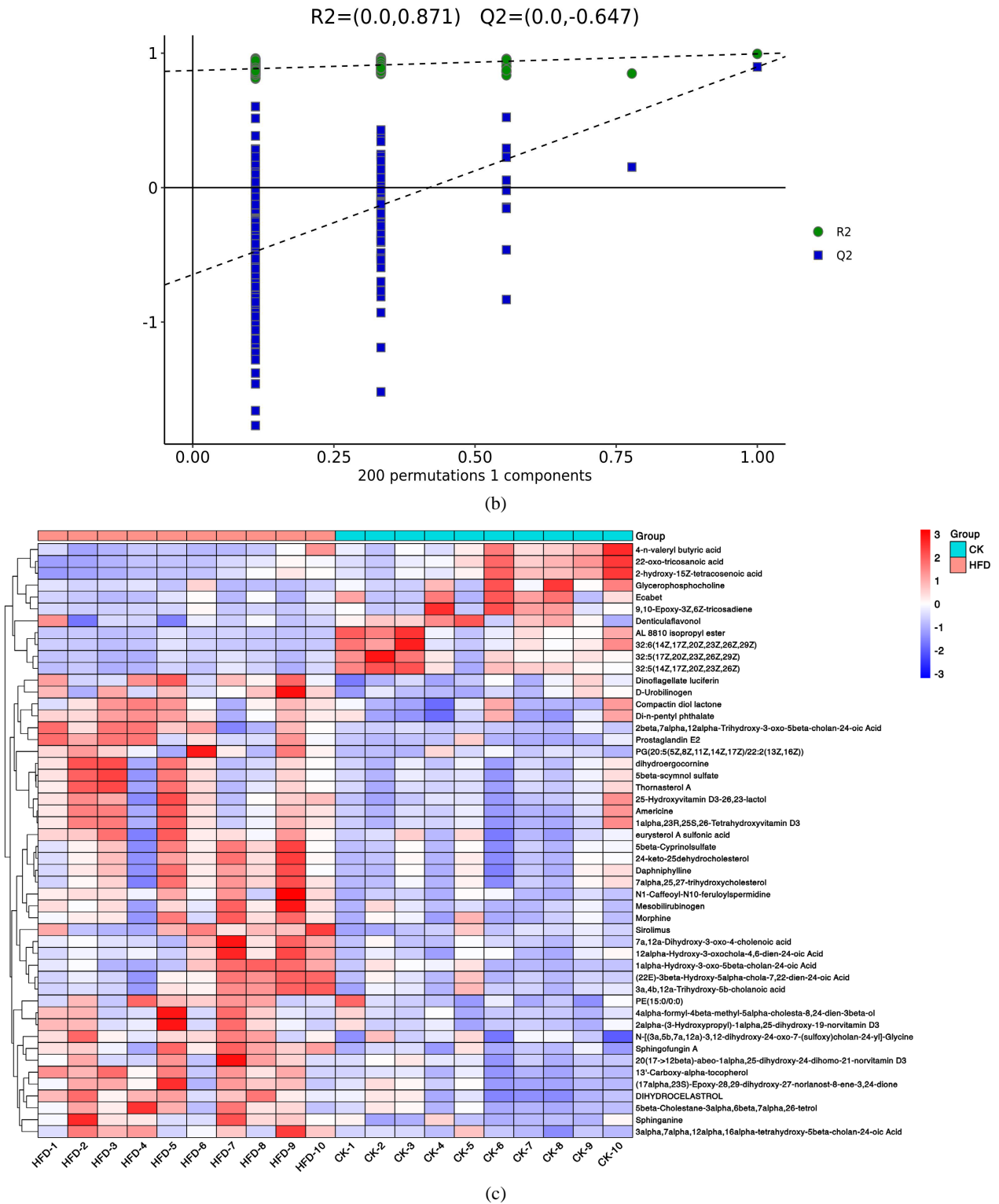
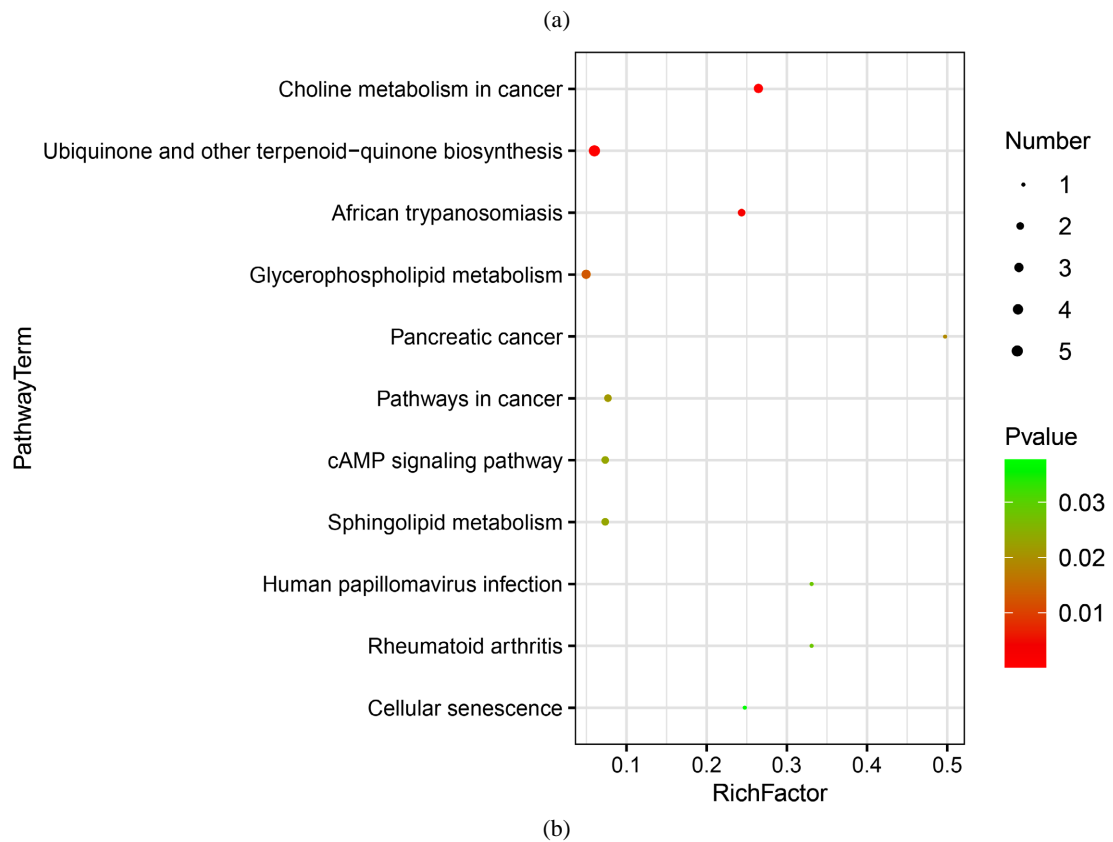
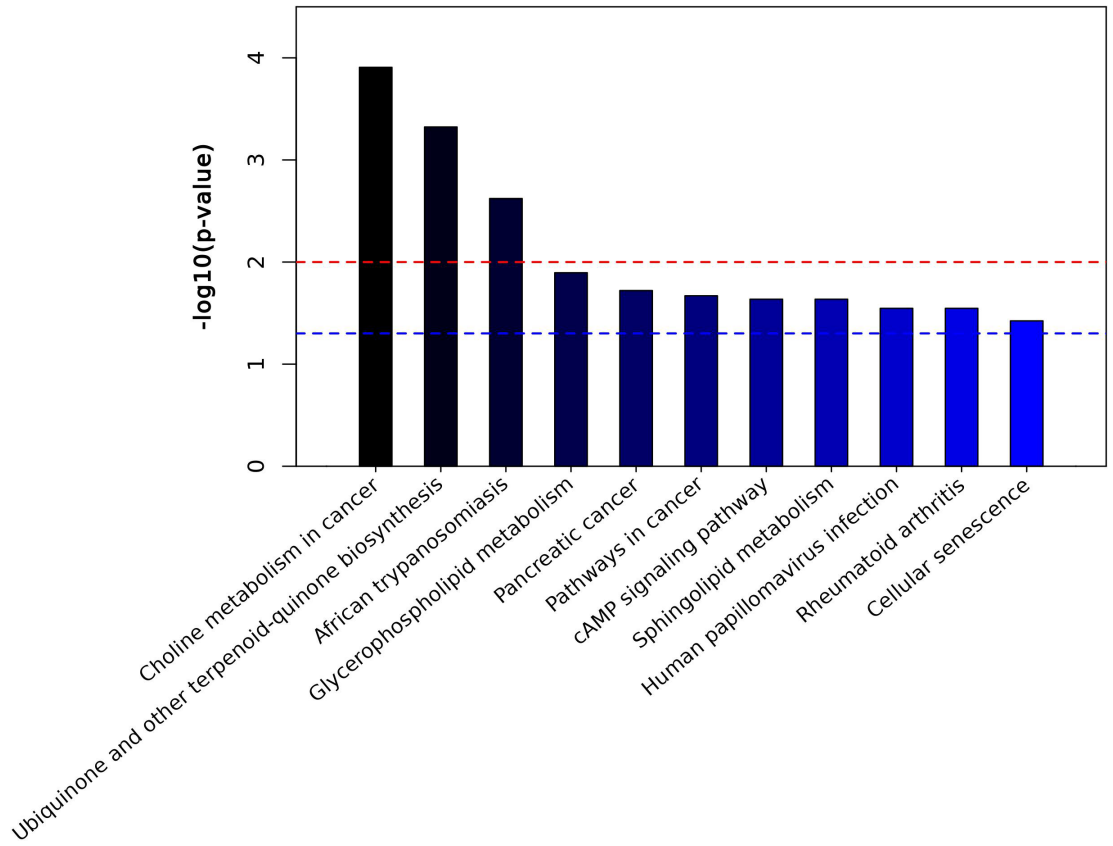


Figure 4. Changes of intestinal metabolites in NAFLD mice. (a) OPLS-DA score charts of CK group and HFD group; (b) Response sequencing test to verify whether the model is over-fitting; (c) The expression levels of the metabolites with significant differences and the 50 differentially expressed metabolites with the highest VIP values were analyzed by hierarchical clustering (VIP > 1, p < 0.05)

图 4. NAFLD 小鼠肠道代谢产物的变化。(A) CK 组与 HFD 组的 OPLS-DA 评分图; (b) 响应排序检验, 用于验证模型是否过拟合; (c) 通过层次聚类分析存在显著差异的代谢物以及 VIP 值最高的 50 个差异表达代谢物的表达水平 (VIP > 1, p < 0.05)



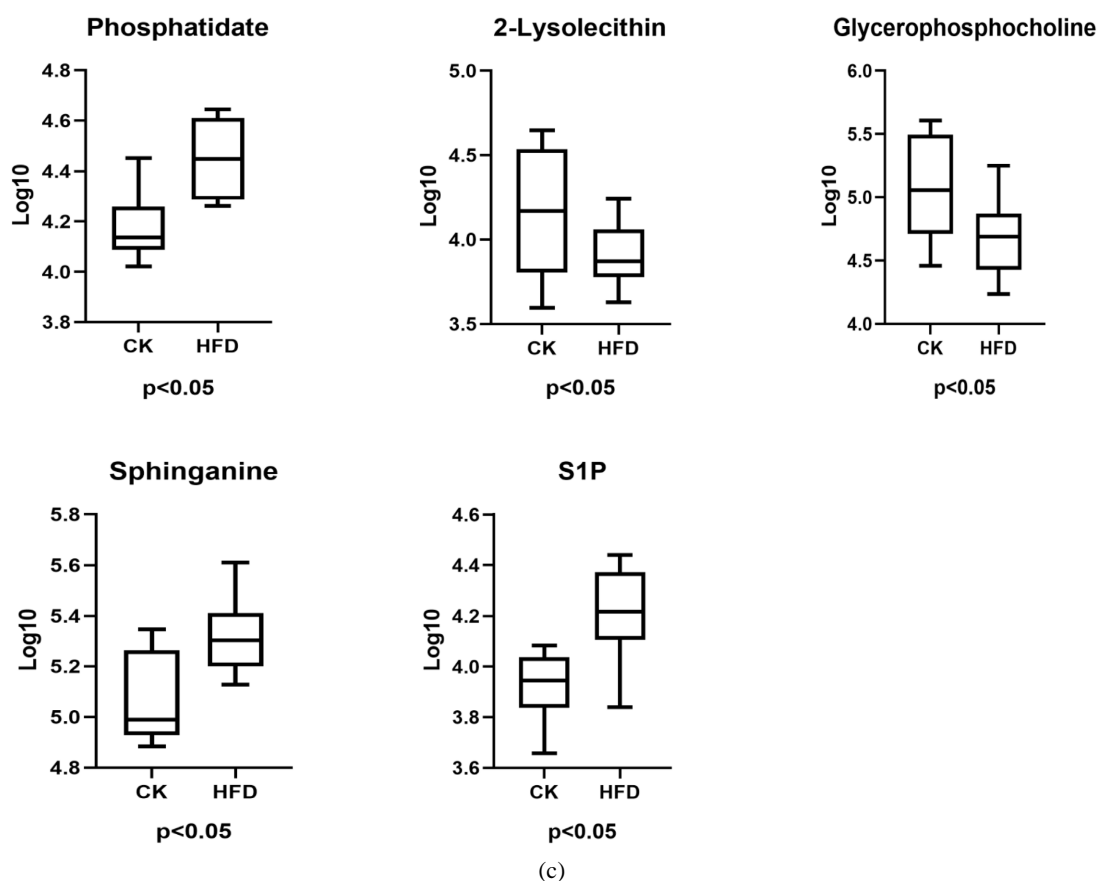


Figure 5. KEGG analysis of differential metabolites. ((a), (b)) Metabolic pathways with the highest concentration of differential metabolites; (c) Comparison of levels of differential metabolites in metabolic pathways. $P < 0.05$, indicating statistically significant difference

图 5. 差异代谢物 KEGG 分析。((a), (b)) 差异代谢物富集程度最高的的代谢途径; (c) 代谢通路中差异代谢产物的水平比较。 $P < 0.05$, 代表差异有统计学意义

们重点关注了鞘氨醇，甘油磷酸胆碱等物质。甘油磷酸胆碱与 *Coriobacteriaceae_UCG-002*，*Lactobacillus* 成正相关，与 *Prevotella_7* 成负相关。鞘氨醇与 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*，*Coriobacteriaceae_UCG-002*，*Tyzzarella*，*A2*，*GCA-900066225*，*Ruminococcus_1*，*Simplicispira*，*Family_XIII_UCG-001* 等肠道菌群成负相关，与 *Hymenobacter*，*Corynebacterium_1* 呈正相关(图 6)。

4. 讨论

非酒精性脂肪性肝病已经是世界上最常见的慢性肝病之一，且肠肝轴被认为是非酒精性脂肪肝发病中的重要参与者，多项研究表明肠道菌群紊乱可以通过门静脉循环促进非酒精性脂肪肝的疾病进展，如加剧炎症反应等[6] [11] [12]。在本次研究中，我们在 HFD 组中磷脂酸高表达，甘油磷酸胆碱、2-溶血磷脂酰胆碱低表达，通过 KEGG 通路甘油磷脂代谢可以得知 LPIN、磷脂酶 A2 等基因参与磷酸酯，甘油磷酸胆碱的代谢。通过与肠道菌群的关联分析，我们发现甘油磷酸胆碱与 *Coriobacteriaceae_UCG-002*，*Lactobacillus* 成正相关，与 *Prevotella_7* 呈负相关。甘油磷酸胆碱(GPC)是一种类似于磷脂酰胆碱的胆碱前体，已有证据表明 GPC 具有一定的促进脂质代谢的功能，可以减少脂质的局部累积[13]。另外，*Coriobacteriaceae* 和 *Lactobacillus* 均在 CK 组中升高，有研究表明 *Coriobacteriaceae* 可以减轻胰岛素抵抗[14]，并可改善肝脏脂肪变性[15]。同时乳酸杆菌也被证明可以通过降低胆固醇及肝脏脂肪变性来改善

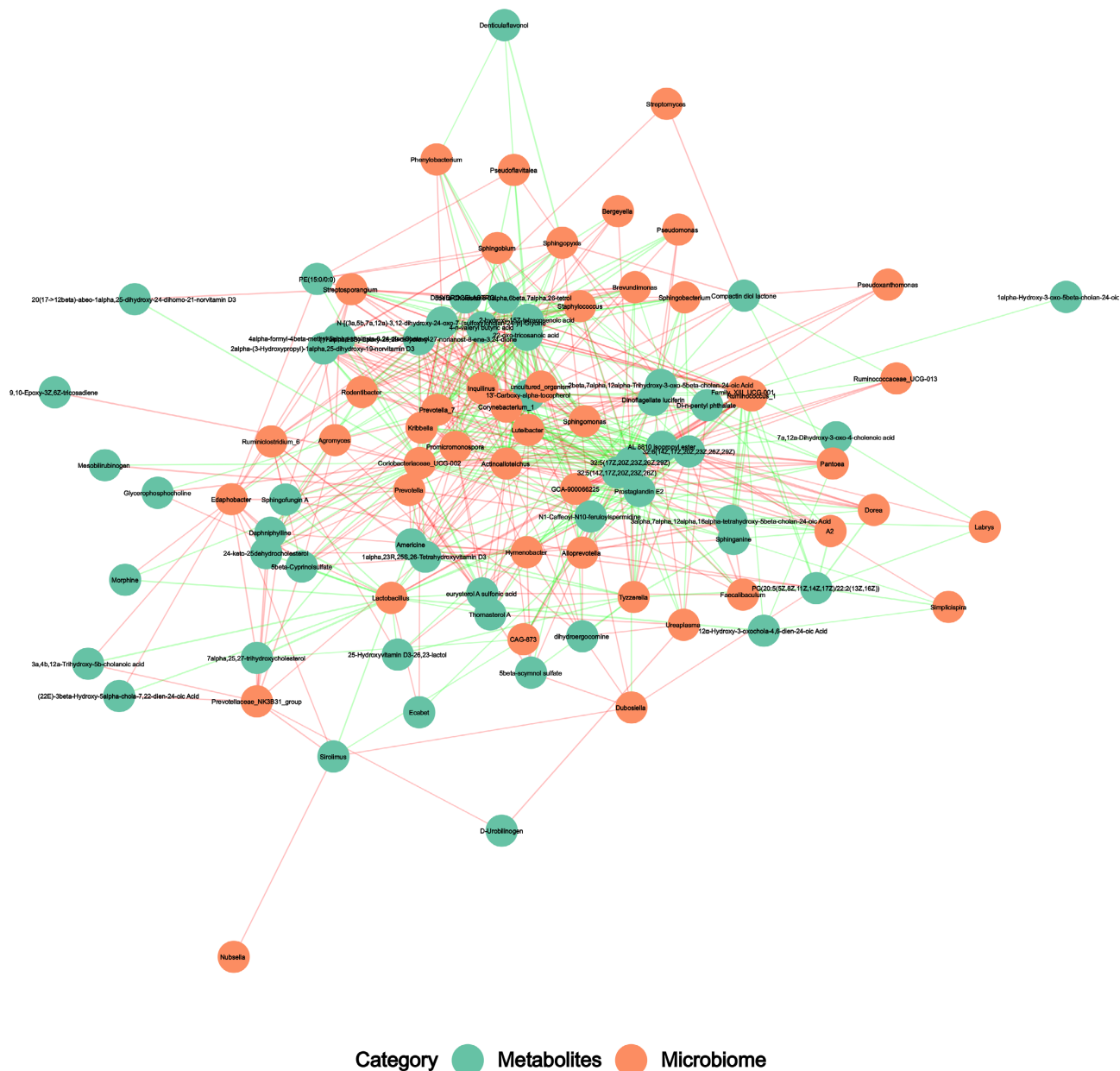


Figure 6. Potential correlations between gut microbiota and metabolites. Correlation between genus level intestinal bacteria with the first 50 metabolites, the red line represents positive correlation, the green line represents negative correlation, and the thickness of the line represents correlation coefficient.

图 6. 肠道微生物群与代谢物之间的潜在相关性。属水平肠道细菌属与前 50 种代谢产物之间的相关性，红线表示正相关，绿线表示负相关，线的粗细表示相关系数。

NAFLD 的进展[16]。而 *Prevotella_7* 被报道是一种与高膳食纤维有关的一种菌群，可以有效改善脂肪变性及炎症[7]，且在 CK 组中低表达，这与甘油磷酸胆碱的功能一致，所以我们推测这些菌群可能通过干预甘油磷酸代谢途径中的 LPIN、磷脂酶 A2 等基因的表达来影响 NAFLD 的进展，其中的机制需要进一步研究。

鞘氨醇是一种鞘磷脂，是鞘氨醇 1-磷酸的底物，它可以被鞘氨醇激酶-1 (SphK1)磷酸化为鞘氨醇 1-磷酸(SIP)。有证据表明，鞘氨醇 1-磷酸及鞘氨醇激酶是肝脏脂质积累和脂肪组织中脂质储存的重要参与

者[17], 它们可以通过激活 S1P-Akt-mTOR 信号通路调节 PPAR- γ 来影响肝脏的脂肪变性及炎症[18]。但也有证据显示鞘氨醇激酶-2 (SphK2)过表达可以增加 S1P, 减少体内鞘氨醇及神经酰胺的含量, 并且可以减轻肝脏的胆固醇及甘油三酯的积累, 减轻胰岛素抵抗[19]。通过我们的研究显示, 鞘氨醇在 CK 组中低表达, 且与 Coriobacteriaceae_UCG-002, Ruminococcus_1, Tyzzerella, A2 等细菌成负相关, Ruminococcus_1 被证明是一种可以产生丁酸的菌群, 丁酸可以调节非酒精性脂肪肝的脂肪变性[20]。上文也提出 Coriobacteriaceae_UCG-002 可以改善非酒精性脂肪肝的脂肪变性, 这表明 Coriobacteriaceae_UCG-002, Ruminococcus_1 可能也具有通过影响鞘脂代谢途径来改善脂肪变性的功能, 可以降低鞘氨醇激酶 1 或者使鞘氨醇激酶 2 过表达, 来降低体内鞘氨醇的含量, 减少 S1P 的产生, 减少肝脏细胞的脂肪变性, 其中的机制需要进一步明确。

5. 总结

非酒精性脂肪肝会引起肠道菌群的改变, 不进行干预, 肠道菌群就无法恢复, 这可能是非酒精性脂肪肝发生发展的重要因素。另外, 我们通过 LEfSE 分析得出了非酒精性脂肪肝不同门类水平的生物标志物, 并对差异微生物功能进行了预测, 为进一步从菌群角度对 NAFLD 进行干预提供了重要参考。鞘氨醇以及鞘氨醇 1 磷酸增加可能会促进非酒精性脂肪肝的进展, 而甘油磷脂可能会改善 NAFLD 的进展, 后续有必要增加样本量, 并进行药物干预, 进一步了解非酒精性脂肪肝的发病机制。

参考文献

- [1] Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., *et al.* (2016) Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology*, **64**, 73-84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
- [2] Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., *et al.* (2015) Weight Loss through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, **149**, 367-378.e365. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.005>
- [3] Wong, V.W., Chan, R.S., Wong, G.L., *et al.* (2013) Community-Based Lifestyle Modification Programme for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Hepatology*, **59**, 536-542. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.013>
- [4] Sheldon, R.D., Nicole Blaize, A., Fletcher, J.A., *et al.* (2016) Gestational Exercise Protects Adult Male Offspring from High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Journal of Hepatology*, **64**, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.022>
- [5] Tsuchida, T., Lee, Y.A., Fujiwara, N., *et al.* (2018) A Simple Diet- and Chemical-Induced Murine NASH Model with Rapid Progression of Steatohepatitis, Fibrosis and Liver Cancer. *Journal of Hepatology*, **69**, 385-395. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.011>
- [6] Betrapally, N.S., Gillevet, P.M. and Bajaj, J.S. (2017) Gut Microbiome and Liver Disease. *Translational Research*, **179**, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.005>
- [7] Cornejo-Pareja, I. and Munoz-Garach, A., Clemente-Postigo, M., *et al.* (2019) Importance of Gut Microbiota in Obesity. *European Journal of Clinical Nutrition*, **72**, 26-37. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0306-8>
- [8] Dai, X., Hou, H., Zhang, W., *et al.* (2020) Microbial Metabolites: Critical Regulators in NAFLD. *Frontiers in Microbiology*, **11**, Article ID: 567654. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.567654>
- [9] Nikolova-Karakashian, M. (2018) Sphingolipids at the Crossroads of NAFLD and Senescence. *Advances in Cancer Research*, **140**, 155-190. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.05.002>
- [10] Bellanti, F. and Vendemiale, G. (2021) The Aging Liver: Redox Biology and Liver Regeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, **35**, 832-847. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0048>
- [11] Schnabl, B. and Brenner, D.A. (2014) Interactions between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology*, **146**, 1513-1524. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.020>
- [12] Shen, T.D., Pysopoulos, N. and Rustgi, V.K. (2018) Microbiota and the Liver. *Liver Transplantation*, **24**, 539-550. <https://doi.org/10.1002/lt.25008>

-
- [13] Kim, G.W. and Chung, S.H. (2021) The Beneficial Effect of Glycerophosphocholine to Local Fat Accumulation: A Comparative Study with Phosphatidylcholine and Aminophylline. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, **25**, 333-339. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2021.25.4.333>
- [14] Liu, H., Zhang, H., Wang, X., *et al.* (2018) The Family Coriobacteriaceae Is a Potential Contributor to the Beneficial Effects of Roux-en-Y Gastric Bypass on Type 2 Diabetes. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, **14**, 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2018.01.012>
- [15] Saeb, A., Grundmann, S.M., Gessner, D.K., *et al.* (2022) Feeding of Cuticles from *Tenebrio molitor* Larvae Modulates the Gut Microbiota and Attenuates Hepatic Steatosis in Obese Zucker Rats. *Food & Function*, **13**, 1421-1436. <https://doi.org/10.1039/D1FO03920B>
- [16] Lee, N.Y., Shin, M.J., Youn, G.S., *et al.* (2021) Lactobacillus Attenuates Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Lowering Cholesterol and Steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, **27**, 110-124. <https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0125>
- [17] Sanyal, A.J. and Mbbs, P.T. (2015) A Lipidomic Readout of Disease Progression in a Diet-Induced Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, **126**, 271-288.
- [18] Chen, J., Wang, W., Qi, Y., *et al.* (2016) Deletion of Sphingosine Kinase 1 Ameliorates Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obese Mice: Role of PPAR γ . *Biochimica et Biophysica Acta*, **1861**, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2015.11.006>
- [19] Lee, S.Y., Hong, I.K., Kim, B.R., *et al.* (2015) Activation of Sphingosine Kinase 2 by Endoplasmic Reticulum Stress Ameliorates Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice. *Hepatology*, **62**, 135-146. <https://doi.org/10.1002/hep.27804>
- [20] Hong, Y.H., Nishimura, Y., Hishikawa, D., *et al.* (2005) Acetate and Propionate Short Chain Fatty Acids Stimulate Adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*, **146**, 5092-5099. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0545>