

非酒精性脂肪性肝病湿热蕴结证患者肠道菌群与血清代谢物的相关性*

隋国媛¹, 权冬梅², 赵娜¹, 黄艳阳¹, 贾连群^{1**}, 杨关林^{1**}

(1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室 沈阳 110000;

2. 沈阳市第六人民医院 沈阳 110000)

摘要:目的 探讨非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)湿热蕴结证患者肠道菌群特征及其与血清代谢物的相关性。方法 选择40例NAFLD湿热蕴结患者,19例NAFLD肝郁脾虚患者,32例健康人,采用16S rRNA扩增子测序技术检测肠道菌群,LC-MS/MS技术检测血清代谢物,肠道菌群和血清代谢物的联合分析采用Spearman秩相关。结果 与健康对照组比,NAFLD湿热蕴结组志贺氏杆菌属和柯林斯氏菌属相对丰度较高,双歧杆菌属相对丰度较低,以上菌群在NAFLD肝郁脾虚组与健康对照组之间差异无统计学意义。与健康对照组和NAFLD肝郁脾虚组比,NAFLD湿热蕴结组色氨酸水平显著升高;与健康人群比,NAFLD湿热蕴结患者黄尿酸水平升高。色氨酸与土壤杆菌属呈负相关,黄尿酸与不动杆菌属、明串珠菌属、柯林斯氏菌属呈正相关。与健康对照组和NAFLD肝郁脾虚组比,NAFLD湿热蕴结组甲状腺素水平显著降低;与健康人群比,NAFLD湿热蕴结患者苯丙氨酸水平升高,NAFLD肝郁脾虚组比,其水平显著下降。甲状腺素与巨单胞菌属、不动杆菌属、Subdoligranulum呈负相关。与健康对照组和NAFLD肝郁脾虚组比,NAFLD湿热蕴结组水平Inosine 5'-Monophosphate、鸟嘌呤核苷均显著升高;与健康对照组比,尿酸水平均显著升高,与NAFLD肝郁脾虚组比差异无统计学意义。Inosine 5'-Monophosphate与明串珠菌属呈正相关,与双歧杆菌属呈负相关,鸟嘌呤核苷与明串珠菌属呈正相关。结论 NAFLD湿热蕴结证患者存在肠道菌群失调和代谢紊乱。NAFLD湿热蕴结证肠道菌群失调与宿主色氨酸、苯丙氨酸、嘌呤代谢紊乱密切相关。

关键词:非酒精性脂肪肝 湿热蕴结 肠道菌群 血清代谢物

doi: 10.11842/wst.20220620009 中图分类号: R575.5 文献标识码: A

全球成年人非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)患病率约为6.3%~45%(中位数25.2%),中国NAFLD患病率处于中上水平^[1]。NAFLD不仅可以导致肝病残疾和死亡,还可参与2型糖尿病、代谢综合征、动脉硬化性心血管疾病以及相关恶性肿瘤等的发病^[1]。湿热蕴结证是NAFLD常见中

医证候^[2-3]。中医整体观念与微生态的生物与环境统一论、中医“阴平阳秘”与微生态的平衡与失调论以及中医“扶正祛邪”治疗原则与微生态调节均具有相通之处,提示中医学和微生态学都是从多途径、多靶点、多环节去探讨机体与环境之间的整体规律。大量研究表明肠道菌群变化与中医证候之间具有一定相关

收稿日期:2022-06-20

修回日期:2022-08-11

* 国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(81803860):非酒精性脂肪肝湿热蕴结证肠道菌群特征及其与宿主代谢共变化机制研究,负责人:隋国媛;国家自然科学基金委员会面上项目(82074145):基于肠道菌群驱动磷脂酰胆碱/ApoA-I/HDL亚类代谢探讨脾虚脂代谢障碍的分子机制,负责人:贾连群;沈阳市中青年科技创新人才支持计划(RC210094):基于尿酸介导肝细胞与库普弗细胞crosstalk探讨清热祛湿法防治非酒精性脂肪性肝病的作用机制,负责人:隋国媛

** 通讯作者:杨关林,教授,中西医结合防治心血管疾病;贾连群,教授,教务处处长,中西医结合防治心血管疾病。

性^[4]。近年来,肠道菌群与宿主代谢的相互作用得到了广泛关注^[5-7]。李自辉等^[8]联合肠道菌群与肝脏代谢组学探究清热祛湿中药茵陈蒿汤治疗NAFLD的作用机制中发现茵陈蒿汤可通过肠道菌群调控甘油磷脂和谷胱甘肽代谢。本研究采用16S rRNA扩增子测序技术和LC-MS/MS技术,以肠道菌群及其与宿主代谢相互作用为切入点,开展NAFLD湿热蕴结证的研究,有助于揭示NAFLD湿热蕴结证肠道菌群与宿主代谢的关系,阐明NAFLD湿热蕴结证的病机,并为NAFLD的中医药诊疗提供新思路和新靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象

所有病例和对照均来自于2019年3月-2020年3月沈阳市第六人民医院。NAFLD湿热蕴结患者40例,男性28例,女性12例,年龄(49.59±10.88)岁;NAFLD肝郁脾虚患者19例,男性12例,女性7例,年龄(48.22±12.18)岁;32名健康人作为健康对照组,男性12名,女性20名,年龄(45.84±13.83)岁,三组年龄比较差异无统计学意义,性别比较差异具有统计学意义。流行病学调查显示,肝郁脾虚证为NAFLD常见中医证候,因此选用NAFLD肝郁脾虚患者作为对照组^[2]。本研究方案经沈阳市第六人民医院伦理委员会批准(批号:2018-05-002-02),所有研究对象均自愿参与并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准

1.2.1 NAFLD诊断标准

参考《非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018更新版)》^[1]。

1.2.2 肝郁脾虚证和湿热蕴结证的诊断标准

参照中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会《非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见(2017年)》,以下证候确定:具备主症2项和次症1或2项,参考舌脉象和理化检查^[9]。中医证候诊断由两名经验丰富副主任医师完成,意见不统一时,由上级医师参与,直到意见统一为止。

(1) 湿热蕴结证

主症:①右胁肋部胀痛;②周身困重;③脘腹胀满或疼痛;④大便黏腻不爽。次症:①身目发黄;②小便色黄;③口中黏滞;④口干口苦;舌脉:舌质红,舌苔黄腻;脉弦滑或濡数。

(2) 肝郁脾虚证

主症:①胁肋胀闷;②抑郁不舒;③倦怠乏力;④腹痛欲泻。次症:①腹胀不适;②食欲不振;③恶心欲吐;④大便不调;⑤时欲太息;舌脉:舌质淡红,苔薄白或白,有齿痕;脉弦细。

1.2.3 NAFLD湿热蕴结证和肝郁脾虚证入选标准

①年龄18-72岁;②超声诊断为NAFLD;③符合中医湿热蕴结证和肝郁脾虚证辨证标准,签署知情同意书者。

1.2.4 NAFLD排除标准

①肝硬化、肝脏恶性肿瘤、急性胆道感染性疾病、正在服用或近3个月服用过肝毒性的中药及西药者;②标准抗高血压治疗后收缩压仍高于160 mmHg,和/或舒张压仍高于100 mmHg;③恶性肿瘤、先天性心脏病、急性心肌梗死、PCI术后、心绞痛IV级(加拿大心血管病学会)、心功能不全Ⅲ级及以上(纽约心脏病协会)、严重心律失常、急性脑梗塞及脑出血、慢性阻塞性肺疾病、肺心病、呼吸衰竭、肾功能不全(血BUN、Cr超过参考值上限1.5倍及以上)、造血系统疾病等严重原发病;④精神疾病;⑤糖尿病;⑥严重腹泻(过去3个月内,每天水样便3次或以上);⑦严重便秘(过去3个月内,每周排便2次或以下,伴有排便困难);⑧妊娠期及哺乳期妇女;⑨近3个月服用抗菌素、甾体类抗炎药物和微生物制剂人群;⑩近1周食用含有益生菌如酸奶的食物。

1.3 健康对照组

①年龄18-72岁;②血脂、血糖、肝功能和肝脏超声均正常;③签署知情同意书者。

1.4 样本收集

收集NAFLD湿热蕴结患者、NAFLD肝郁脾虚患者和健康人新鲜粪便,密封于无菌厌氧袋;并抽取NAFLD湿热蕴结患者、NAFLD肝郁脾虚患者和健康人空腹静脉血,于4000 r·min⁻¹离心10min,取上清。

1.5 主要试剂与仪器

试剂:OMEGA Soil DNA Kit (D5625-01, Omega Bio-Tek), Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (P7589, Invitrogen), 甲醇(色谱纯)(Thermo Fisher), 甲酸(色谱纯)(Merck), 乙腈(色谱纯)(Merck), 2-氯苯丙氨酸(Thermo Fisher)

仪器: Illumina MiSeq (Illumina), 质谱仪(Aglient, 型号: QTOF/MS-6545), 超高效液相色谱仪(Aglient,

型号 1290 Infinity LC), 涡旋混合器(上海净信, 型号: MIX-200)。

1.6 血脂和肝功能检测

全自动生化分析仪检测血脂: 甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C); 肝功能: 谷丙转氨酶(Glutamic-pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Glutamic oxalacetic transaminase, AST)、谷酰转肽酶(Gamma-glutamyl transpeptidase, GGT)。

1.7 肠道菌群检测

采用 OMEGA Soil DNA Kit 试剂盒提取粪便 DNA。对 16S rRNA 的 V3-V4 区进行 PCR 扩增, 扩增产物磁珠纯化回收, 扩增产物荧光定量, 采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库。采用 Agilent High Sensitivity DNA Kit 质检文库。将合格的各上机测序文库梯度稀释后, 根据所需测序量按相应比例混合, 并经 NaOH 变性为单链进行上机测序; 采用 MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles) 试剂, 利用 Illumina MiSeq 测序仪进行双端测序。

1.8 血清代谢组检测

取血清 100 μL 加入 1.5 mL 离心管中, 加入 300 μL 纯甲醇(含 1 ppm 的 2-氯苯丙氨酸); 涡旋 2 min, 放入 -20°C 冰箱孵育 0.5 h; 涡旋 2 min, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件下离心 10 min; 取 200 μL 上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中, -20°C 静置 0.5 h; 再将上清液在 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件下离心 15 min。取上清液于进样瓶中, 用于 LC-MS/MS 分析。色谱柱: Waters T3 C18 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)。流动相 A: 0.04% 甲酸/水, 流动相 B: 纯乙腈(0.04% 的甲酸)。柱温: 35°C , 流速: $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量: 1 μL 。质谱条件: 正离子模式下, 电压 250 V, 气流量 $8\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 碎电压 135 V, 气体温度 325°C , 护套温度 325°C , 鞘流 $11\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 喷雾器 40; 负离子模式下, 电压 1500 V, 其他指标均与正离子模式下相同, 见表 1 和表 2。

1.9 统计分析

对肠道菌群序列进行质量过滤, 去噪和合并, 并使用 DADA2 插件删除嵌合体。NAFLD 湿热蕴结组与 NAFLD 肝郁脾虚组、NAFLD 湿热蕴结组与健康对照组比较采用 LefSe 分析 (LDA Effect Size >2 and $P<$

表 1 正离子流动相梯度条件

时间 (min)	流速 ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	A (%)	B (%)
0	0.3	95	5
2	0.3	90	10
3	0.3	79	21
5	0.3	50	50
9	0.3	30	70
10	0.3	10	90
12	0.3	10	90
12.01	0.3	95	5
14	0.3	95	5

表 2 负离子流动相梯度条件

时间 (min)	流速 ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	A (%)	B (%)
0	0.3	95	5
2	0.3	90	10
3	0.3	79	21
5	0.3	50	50
9	0.3	30	70
10	0.3	10	90
12	0.3	10	90
12.01	0.3	95	5
14	0.3	95	5

0.05)。代谢组学分析中, 代谢物鉴定信息通过检索整合公共库、实验室自建数据库和 metDNA 方法。采用 R 软件和 SPSS13.0 软件进行统计学分析。统计学分析分为单变量统计学分析和多变量统计学分析, 单变量统计分析为 Student's t -test 和差异倍数分析, 多变量统计分析为正交偏最小二乘法判别(Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA)分析。差异菌群和差异代谢物的关联分析采用 Spearman 秩相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组人群临床生化指标特征

表 3 所示, 与健康对照组比, NAFLD 湿热蕴结组 TG、TC、LDL-C、ALT、AST 水平升高, HDL-C 水平下降, 差异具有统计学意义; 与 NAFLD 肝郁脾虚组比, NAFLD 湿热蕴结组 LDL-C 水平显著升高, 差异具有统计学意义。

2.2 NAFLD 湿热蕴结证患者肠道菌群特征

为了确定 NAFLD 湿热蕴结证是否与肠道菌群失调有关, 对研究对象粪便样本进行 16S rRNA 扩增子测序分析。图 1 显示, 从丰富度 (Chao1 和 Observed

表3 各组人群临床理化指标特征[$\bar{x}\pm s, M(Q25-Q75)$]

变量	健康对照组	肝郁脾虚组	湿热蕴结组	湿热蕴结组 vs 健康对照组 T or Z/P	湿热蕴结组 vs 肝郁脾虚组 T or Z/P
TG($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.00±0.29	2.39±1.62	2.17±1.16 [△]	-6.05/0.000	0.587/0.560
TC($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4.78±0.60	4.88±1.24	5.34±1.14 [△]	-0.64/0.011	-1.38/0.174
HDL-C($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.73±0.45	1.43±0.41	1.43±0.39 [△]	3.03/0.003	-0.04/0.972
LDL-C($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.91±0.60	2.93±0.64	3.55±0.93 ^{*#}	-3.50/0.001	-2.61/0.011
ALT($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	15.15 (10.53-20.00)	25.62 (12.33-39.15)	31.11 (21.00-53.89) [†]	-5.61/0.000	-1.60/0.110
AST($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	18.16 (15.89-21.75)	22.00 (18.00-25.66)	23.83 (20.72-30.00) [†]	-4.20/0.000	-1.48/0.140
GGT($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	18.95 (13.06-29.75)	31.00 (19.60-53.48)	31.29 (23.00-72.84) [†]	-3.92/0.000	-0.60/0.551

注:与健康对照组比较,^{*} $P<0.05$;与肝郁脾虚组比较,[#] $P<0.05$ 。

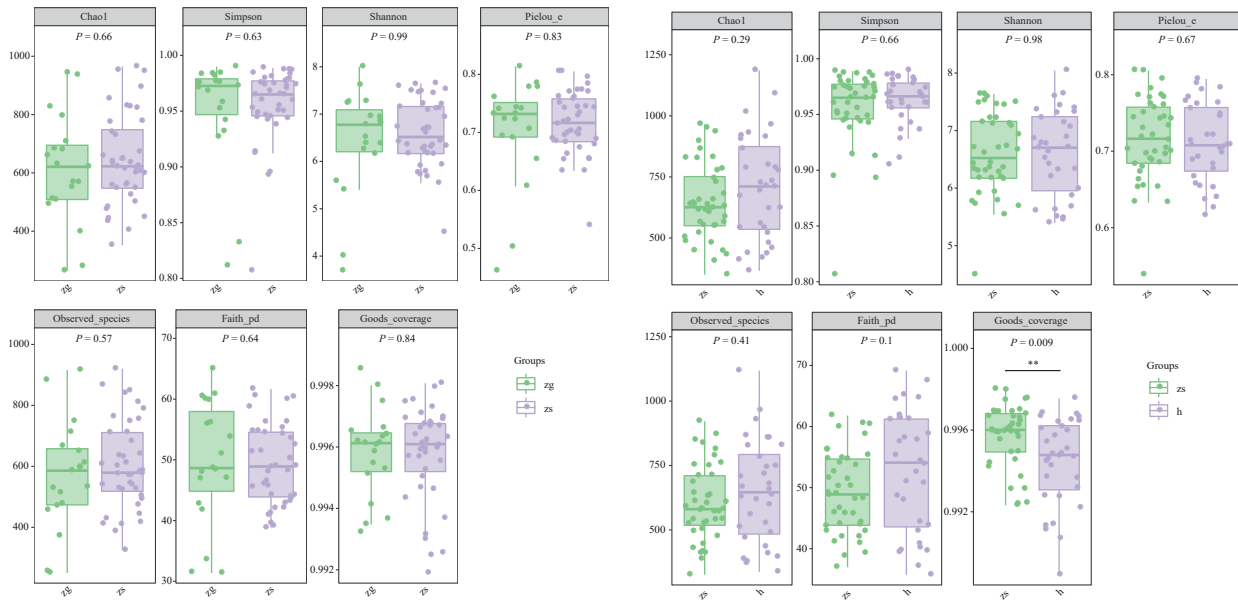


图1 Alpha多样性指数的分组箱线图

注:h:健康对照组,zg:NAFLD肝郁脾虚组,zs:NAFLD湿热蕴结组。

species指数)、多样性(Shannon和Simpson指数)、基于进化的多样性(Faith's PD指数)、均匀度(Pielou's evenness指数)、覆盖度(Good's coverage指数)角度较为全面的评估微生物群落的alpha多样性。图1显示,NAFLD湿热蕴结组与健康对照组、NAFLD肝郁脾虚组间的Alpha系数差异无统计学意义($P>0.05$)。

图2显示,基于属水平,粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、*Blautia*、*Gemmiger*、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、罗氏菌属(*Roseburia*)、链球菌属(*Streptococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、粪球菌属(*Coprococcus*)、普氏菌属(*Prevotella*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、*Dorea*、柯林斯氏菌属(*Collinsella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、*[Ruminococcus]*、梭菌属(*Clostridium*)、*Dialister*、*Akkermansia*、*Alistipes*相对丰度

位于前20。

由图3所示,基于属水平,NAFLD湿热蕴结证与巨单胞菌属(*Megamonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、*Odoribacter*、*Butyricimonas*、*Anaerofustis*、志贺氏菌属(*Shigella*)、柯林斯氏菌属(*Collinsella*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、*Butyricimonas*、*Eggerthella*、*Subdoligranulum*、*WAL_1855D*等菌群失调密切相关。

2.3 NAFLD 湿热蕴结证患者血清代谢物特征

为了更全面地研究微生物-宿主相互作用对NAFLD湿热蕴结的潜在影响,使用LC-MS/MS技术对研究对象进行血清代谢组分析。图4为OPLS-DA散点图,图4a和4b中,NAFLD湿热蕴结组与健康对照组分离趋势明显说明两者血清代谢物方面差异明显;

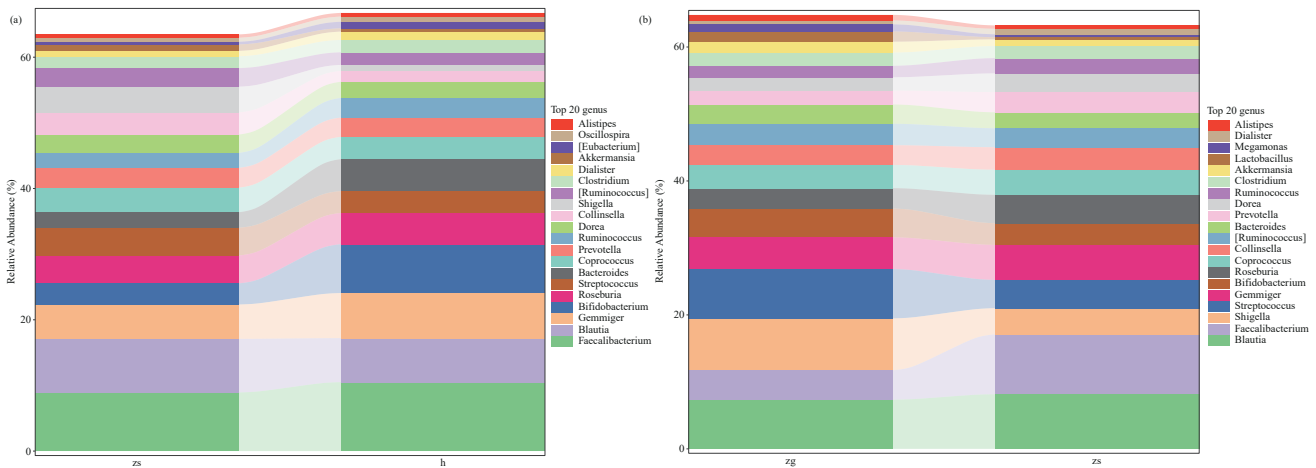


图2 物种组成柱状图

注:h:健康对照组,zg:NAFLD肝郁脾虚组,zs:NAFLD湿热蕴结组。

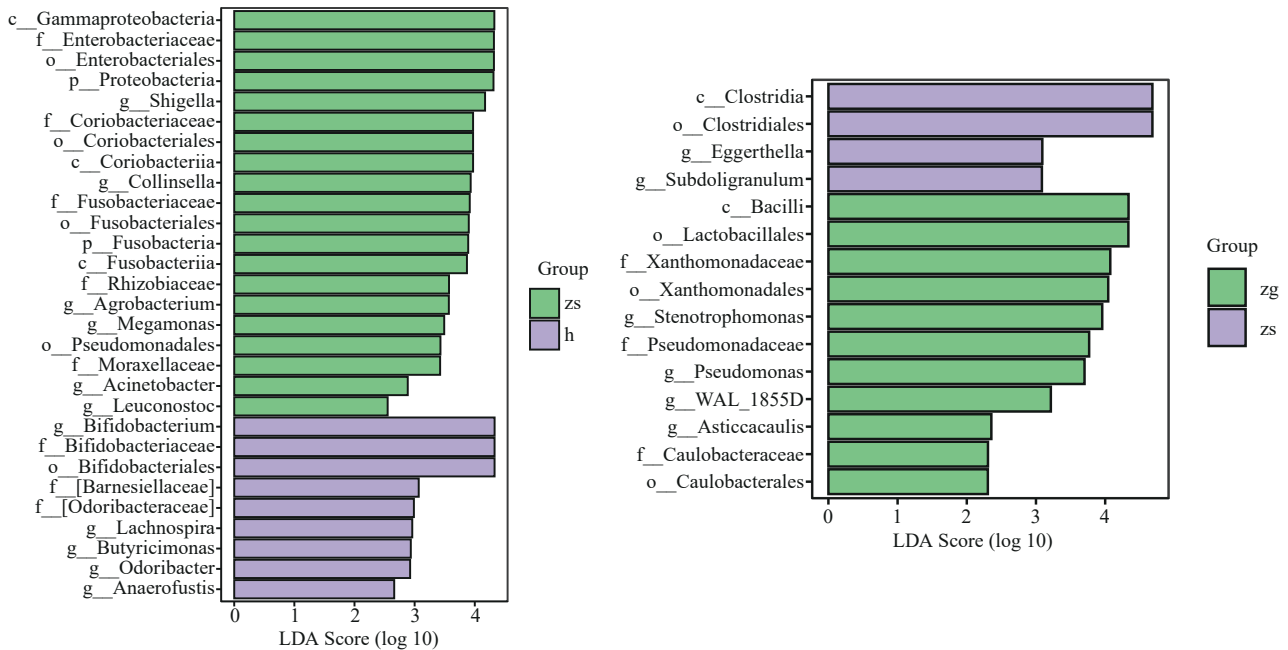


图3 差异肠道菌群

注:h:健康对照组,zg:NAFLD肝郁脾虚组,zs:NAFLD湿热蕴结组。

图4c和4d中,NAFLD湿热蕴结组与NAFLD肝郁脾虚组分离趋势明显说明两者血清代谢物方面差异明显。NAFLD湿热蕴结组与健康对照组比较,上调630个差异显著血清代谢物,下调259个差异显著血清代谢物;NAFLD湿热蕴结组与NAFLD肝郁脾虚组比较,上调329个差异显著血清代谢物中,下调220个差异显著血清代谢物。

根据肠道菌群和血清代谢组学的KEGG通路分析结果、三组间差异分析综合分析结果以及已发表的文献,专注于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成和

代谢、胆汁酸的生物合成和代谢、嘌呤合成与代谢、短链脂肪酸、维生素等相关代谢物。

由表4所示,正离子模式下,与健康对照组和NAFLD肝郁脾虚组比,NAFLD湿热蕴结组水平 Inosine 5'-Monophosphate显著升高;与健康对照组比,NAFLD湿热蕴结组吡啶乙腈(3-Indoleacetonitrile)水平显著降低,甘氨酸去氧胆酸(Glycochenodeoxycholate)、TG(a-21:0/18:0/15:0)[rac]、TG(a-21:0/8:0/12:0)[rac]、TG(i-20:0/i-17:0/10:0)、TG(i-21:0/i-12:0/12:0)、TG(22:0/12:0/10:0)、TG(i-24:0/i-17:0/20:0)、TG(21:0/21:0/16:0)水平均显

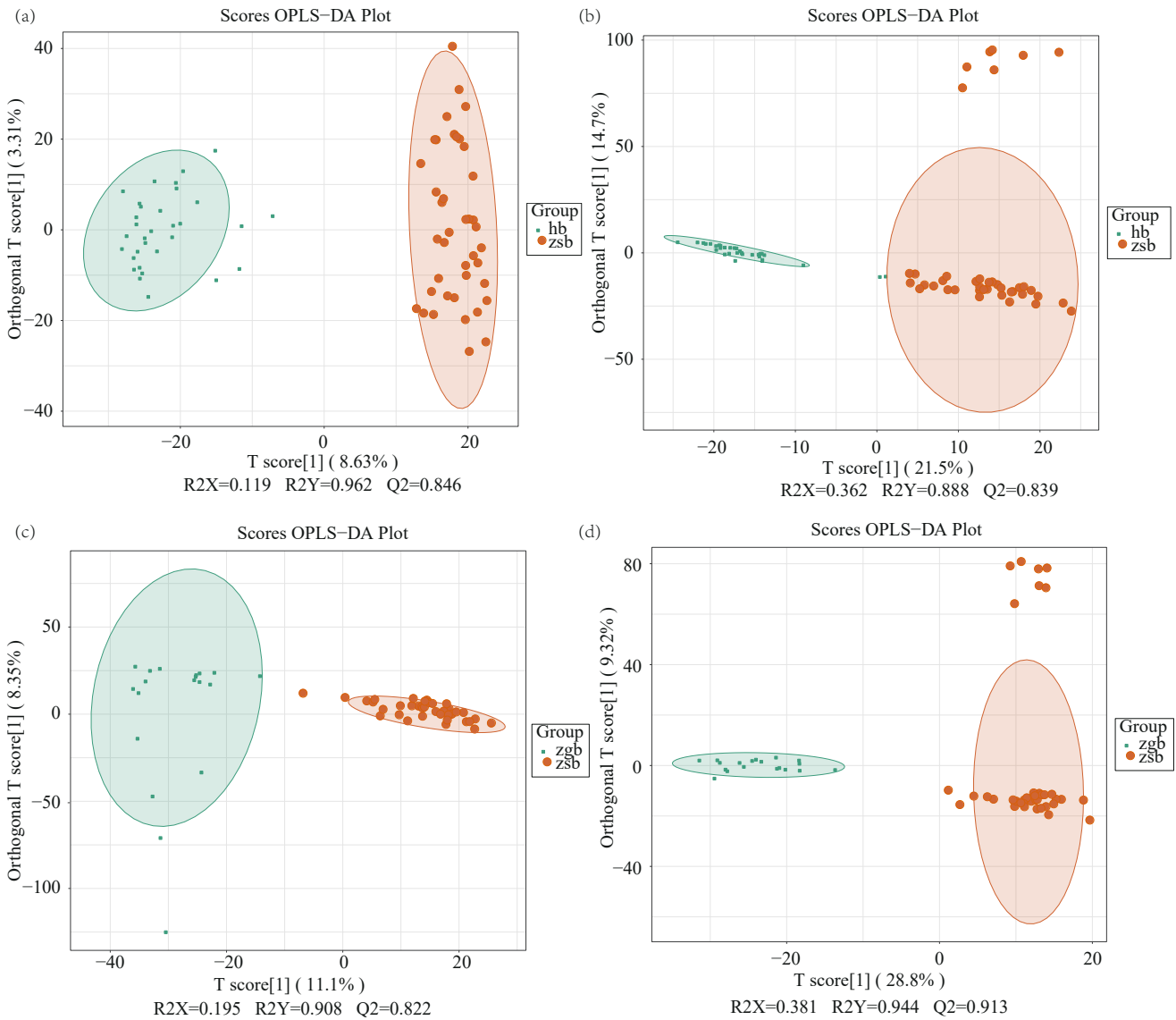


图4 各组人群血清代谢物OPLS-DA分析

注:hs:健康对照组,zsb:湿热蕴结组,zgb:肝郁脾虚组;a和c:正离子模式下,b和d:负离子模式下。

表4 正离子模式下差异代谢物

代谢物	RT (min)	分子量($g \cdot mol^{-1}$)	变化倍数(zs/h)	P	变化倍数(zs/zg)	P
Inosine 5'-Monophosphate	4.0514	348.0470	3.830	<0.05	5.52	<0.05
PS (18:1(9Z)/24:0)	8.6045	873.6459	119.98	<0.05	14.6	<0.05
TG (a-21:0/18:0/15:0)[rac]	11.7716	536.1530	2.930	<0.05	-	>0.05
TG (a-21:0/8:0/12:0)[rac]	9.0283	220.1463	5.120	<0.05	-	>0.05
TG (21:0/a-15:0/17:0)[rac]	8.4300	508.0675	3.090	<0.05	-	>0.05
TG (i-20:0/i-17:0/16:0)	3.5362	544.0523	3.210	<0.05	-	>0.05
TG (22:0/12:0/10:0)	2.5641	232.0042	5.220	<0.05	-	>0.05
TG (i-24:0/i-17:0/20:0)	5.9674	234.1256	2.630	<0.05	-	>0.05
3-indoleacetoneitrile	0.9546	156.0687	0.230	<0.05	-	>0.05
Glycochenodeoxycholate	7.0425	449.3141	2.180	<0.05	-	>0.05

注:zs:NAFLD湿热蕴结组;zg:NAFLD肝郁脾虚组;h:健康对照组。

表5 负离子模式下差异代谢物

代谢物	RT(min)	分子量($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	变化倍数(zs/h)	P	变化倍数(zs/zg)	P
L-Thyroxine	5.6978	776.6867	0.29	<0.05	0.36	<0.05
L-Tryptophan	2.4242	204.0899	2.21	<0.05	477.38	<0.05
L-phenylalanine	1.9090	165.0790	91.95	<0.05	0.19	<0.05
Protein serine	0.8067	105.0426	2.08	<0.05	2.02	<0.05
GUANOSINE	1.3856	283.0917	3.59	<0.05	4.74	<0.05
Phospho-L-serine	0.7209	185.0089	3.90	<0.05	0.25	<0.05
TG (i-21:0/a-17:0/a-17:0)[rac]	2.4325	310.1205	332.92	<0.05	-	>0.05
TG (22:0/i-15:0/i-22:0)	8.8550	518.2305	5.75	<0.05	-	>0.05
TG (a-21:0/18:0/22:0)[rac]	8.9630	398.0849	2.22	<0.05	-	>0.05
Glycochenodeoxycholate	7.0354	449.3141	2.39	<0.05	-	>0.05
Deoxycholic Acid	8.2069	392.2927	3.13	<0.05	-	>0.05
L-Ascorbate	0.9286	176.0320	0.12	<0.05	-	>0.05
Xanthurenic acid	3.0973	205.0375	66.81	<0.05	-	>0.05
Glycocholate	7.7417	465.3090	2.08	<0.05	-	>0.05
Uric acid	1.2277	168.0283	4.24	<0.05	-	>0.05
Ethanal	4.0593	44.0262	13.19	<0.05	-	>0.05

注:zs:NAFLD 湿热蕴结组;zg:NAFLD 肝郁脾虚组;h:健康对照组。

表6 NAFLD 湿热蕴结证差异菌群和正离子模式下差异血清代谢物的关联性分析(r)

菌群	Inosine 5'-Monophosphate	3-indoleacetonitrile	Glycochenodeoxycholate
Megamonas	.163	-.044	-.138
Acinetobacter	.071	-.071	.199
Leuconostoc	.293*	-.005	.014
Odoribacter	-.131	.031	-.220
Butyricimonas	.064	-.029	-.192
Anaerofustis	-.072	-.046	.043
Shigella	-.056	.030	.105
Collinsella	.166	-.074	-.013
Agrobacterium	.159	-.193	.031
Bifidobacterium	-.403**	-.037	.004
Butyricimonas	.064	-.029	-.192
Eggerthella	-.039	.267*	.224
Subdoligranulum	.176	-.264*	-.139
WAL_1855D	-.085	.075	-.199

注:*, $P<0.05$,**, $P<0.01$ 。

著升高,与NAFLD肝郁脾虚组比,以上代谢物差异无统计学意义。

由表5所示,负离子模式下,与健康对照组和NAFLD肝郁脾虚组比,NAFLD湿热蕴结组色氨酸(L-Tryptophan)、Protein serine、鸟嘌呤核苷(GUANOSINE)、TG(21:0/20:0/i-12:0)水平均显著升高,甲状腺素(L-Thyroxine)水平显著降低;与健康对照组比,苯丙氨酸(L-phenylalanine)和Phospho-L-serine水平显著升高,与NAFLD肝郁脾虚组比,苯丙氨酸(L-phenylalanine)

和Phospho-L-serine水平显著下降;与健康对照组比,甘氨酸去氧胆酸(Glycochenodeoxycholate)、脱氧胆酸(Deoxycholic Acid)、黄尿酸(Xanthurenic acid)、甘氨酸胆酸盐(Glycocholate)、尿酸(Uric acid)、乙醛(Ethanal)、TG(i-21:0/a-17:0/a-17:0)[rac]、TG(22:0/i-15:0/i-22:0)、TG(a-21:0/18:0/22:0)[rac]水平均显著升高,维生素C(L-Ascorbate)水平显著降低($P<0.05$),与NAFLD肝郁脾虚组比,以上代谢物差异无统计学意义。

表7 NAFLD湿热蕴结证差异菌群和负离子模式下差异血清代谢物的关联性分析(r)

菌群	L-Tryp- tophan	L-phenylal- anine	Glycocheno- deoxycholate	Deoxycholic Acid	GUANO- SINE	L-Asc- bate	L-Thy- roxine	Xanthuren- ic acid	Glyco- cholate	Ethanal	Uric ac- id	Protein serine	Phospho- L-serine
<i>Megamonas</i>	-.020	.090	.057	-.034	-.011	-.217	-.269*	.229	.153	.151	-.077	.248*	.160
<i>Acinetobacter</i>	-.049	.138	.154	.050	.174	-.152	-.343**	.337**	.262*	.160	-.154	.320**	.030
<i>Leuconostoc</i>	.228	.121	.174	.184	.344**	-.170	-.159	.301*	.348**	.281*	-.039	.321**	.038
<i>Odoribacter</i>	-.067	-.109	-.127	-.154	-.129	.054	.172	-.272*	-.227	-.245*	.053	.027	-.268*
<i>Butyricimonas</i>	.071	-.111	.023	-.141	-.119	-.023	.231	-.182	-.113	-.200	-.063	-.063	-.003
<i>Anaerofustis</i>	.000	-.069	-.160	-.146	-.094	-.012	.016	-.145	-.207	-.005	-.129	-.011	-.043
<i>Shigella</i>	.109	.074	.097	.057	.150	-.086	-.210	.159	.244*	.227	.018	.044	.122
<i>Collinsella</i>	.023	.009	.278*	.025	.154	-.121	-.174	.372**	.116	.188	-.103	.393**	.096
<i>Agrobacterium</i>	-.233*	.013	.293*	.172	-.026	-.117	-.084	.145	.010	.032	.066	.220	-.101
<i>Bifidobacterium</i>	-.053	-.015	-.187	-.126	-.197	.121	.038	-.180	-.075	-.081	-.090	-.119	.061
<i>Eggerthella</i>	-.057	.096	.031	.117	-.011	.001	-.100	.098	.114	.146	-.097	.057	.016
<i>Subdoligranulum</i>	.031	.209	-.018	-.115	.022	-.156	-.239*	.109	.047	.120	-.078	.170	.052
WAL_1855D	-.118	-.187	-.073	-.228	-.175	.224	.220	-.122	-.069	-.228	.122	-.191	-.199

注: *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ 。

2.4 NAFLD 湿热蕴结证差异菌群和差异血清代谢物的关联性分析

由表6所示, Inosine 5'-Monophosphate与明串珠菌属(*Leuconostoc*)呈正相关,与双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)呈负相关;吡啶乙腈(3-Indoleacetoneitrile)与*Eggerthella*呈正相关,与*Subdoligranulum*呈负相关。由表7所示,色氨酸(L-Tryptophan)与土壤杆菌属(*Agrobacterium*)呈负相关;甘氨酸去氧胆酸(Glycochenodeoxycholate)与柯林斯氏菌属(*Collinsella*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)呈正相关;鸟嘌呤核苷(GUANOSINE)与明串珠菌属(*Leuconostoc*)呈正相关;甲状腺素(L-Thyroxine)与巨单胞菌属(*Megamonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Subdoligranulum*、*Odoribacter*呈负相关;黄尿酸(Xanthurenic acid)与不动杆菌属(*Acinetobacter*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、柯林斯氏菌属(*Collinsella*)、*Odoribacter*呈正相关;甘氨酸胆酸盐(Glycocholate)与不动杆菌属(*Acinetobacter*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、志贺氏菌属(*Shigella*)呈正相关;乙醛(Ethanal)与明串珠菌属(*Leuconostoc*)、*Odoribacter*呈正相关;Protein serine与巨单胞菌属、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、柯林斯氏菌属(*Collinsella*)、*Odoribacter*呈正相关($P<0.05$)。

3 讨论

本研究在探讨NAFLD湿热蕴结证患者肠道菌群

特征中发现,与健康对照组比,NAFLD湿热蕴结组志贺氏菌属和柯林斯氏菌属相对丰度较高,双歧杆菌属相对丰度较低,以上菌群在NAFLD肝郁脾虚组与健康对照组之间差异无统计学意义。Astbury等^[10]研究发现与健康对照组比,柯林斯氏菌属相对丰度在NAFLD组显著升高。朴勇洙等^[11]研究发现与非湿热组比,湿热组柯林斯氏菌属相对丰度显著增加。柯林斯氏菌属(7 α -去羟基化细菌)可将胆汁酸代谢为次级胆汁酸,这些次级胆汁酸的产生可能会破坏肠粘膜屏障参与NAFLD的发展^[12]。服用抗生素利福昔明导致柯林斯氏菌属的减少与粪便中次级胆汁酸浓度下降有关^[13]。研究显示志贺氏菌属与NAFLD发生发展密切相关^[14],此外与健康对照组比,湿热蕴结型结肠癌患者志贺氏菌属丰度显著升高^[15]。志贺氏菌属是一类革兰氏阴性短小杆菌,脂多糖为肠道革兰氏阴性细菌细胞壁最外层的主要成分,是一种重要炎症刺激物,可对肠道黏膜屏障造成严重破坏,促进疾病发生发展。王灿等^[16]研究发现与健康人群相比,内生湿热证人群双歧杆菌属丰度显著下降。双歧杆菌属可将膳食纤维发酵代谢产生短链脂肪酸。短链脂肪酸在NAFLD的发生发展中发挥了重要作用,其机制可能与改善葡萄糖和脂代谢、保护肠道屏障、调节免疫应答等途径有关^[17]。在研究中,缺乏NAFLD湿热蕴结证较肝郁脾虚证和健康对照者同时存在差异的肠道菌群,肠道菌群作为NAFLD湿热蕴结证生物标志物有一定的局限性,

但有助于从新的视角揭示 NAFLD 湿热蕴结病机,并为 NAFLD 的中医药诊疗提供新思路和新靶点。

犬尿酸途径是色氨酸代谢的主要途径,超过 95% 的游离色氨酸通过此途径代谢。色氨酸在吡哆胺 2,3-双加氧酶 1 作用下生成犬尿酸,进一步降解为黄尿酸,色氨酸代谢紊乱参与炎症性肠病、肠易激综合征、代谢综合征、肥胖、感染性疾病和神经精神异常等疾病的发生发展^[18]。在研究中发现与健康对照组和非酒精性脂肪肝肝郁脾虚组比,NAFLD 湿热蕴结组色氨酸水平显著升高;与健康人群比,NAFLD 湿热蕴结患者黄尿酸水平升高。彭晓婷等^[19]基于尿液代谢组学发现湿热泄泻模型大鼠存在色氨酸代谢紊乱。苟小军等^[20]研究发现非酒精性脂肪性肝病肝胆湿热证患者色氨酸水平显著升高,其生物学本质涉及色氨酸代谢。程晓旭等^[21]研究发现清热祛湿中药栀子可降低糖尿病肾病大鼠黄尿酸含量。差异菌群和差异代谢物联合分析显示色氨酸与土壤杆菌属呈负相关,黄尿酸与不动杆菌属、明串珠菌属、柯林斯氏菌、*Odoribacter* 属呈正相关。已有研究发现肠道菌群可调控色氨酸-犬尿酸途径,与提高犬尿酸代谢途径的限速酶吡哆胺 2,3-双加氧化酶 1 活性密切相关^[22]。由此可见,NAFLD 湿热蕴结与肠道菌群-色氨酸-犬尿酸途径代谢紊乱密切相关。

苯丙氨酸作为人体必需氨基酸之一,参与多种疾病发生发展,例如心力衰竭、肥胖、高甘油三酯血症、2 型糖尿病等^[23-26]。苯丙氨酸在体内大部分经苯丙氨酸羟化酶催化作用氧化成酪氨酸,再由酪氨酸转氨酶转化为 4-羟苯丙酮酸,也能转化为甲状腺素。甲状腺素可通过血管生成素样蛋白 3 (Angiopoietin-like protein, ANGPTL3) 途径改善 NAFLD 大鼠肝脂肪变性程度^[27]。苯丙氨酸也可脱氨基为苯丙酮酸,进一步得到苯乙酸。苯乙酸与肝脏脂肪变性的严重程度呈正相关,苯乙酸干预 2 周的小鼠肝脏甘油三酯积累显著增加^[5]。研究发现与健康对照组和 NAFLD 肝郁脾虚组比,NAFLD 湿热蕴结组甲状腺素水平显著降低;与健

康人群比,NAFLD 湿热蕴结患者苯丙氨酸水平升高,NAFLD 肝郁脾虚组比,其水平显著下降。童宁宁^[28]研究发现与健康人群相比,慢性胃炎湿热证苯丙氨酸水平显著升高。甲状腺素与巨单胞菌属、不动杆菌属、*Subdoligranulum* 呈负相关。Hoyle 等^[28]发现由肠道菌群降解苯丙氨酸生成的苯乙酸对于肝脂肪变性具有直接作用。本研究中肠道菌群可能减弱苯丙氨酸-酪氨酸途径,增强苯丙氨酸-苯乙酸途径,但并未发现苯乙酸水平升高,尚需进一步证实。由此可见,NAFLD 湿热蕴结证与肠道菌群-苯丙氨酸-酪氨酸途径代谢紊乱密切相关。

嘌呤主要以嘌呤核苷酸的形式存在,在人体内嘌呤氧化而变成尿酸,嘌呤代谢紊乱与 NAFLD 和湿热证的发生发展密切相关^[29-30]。在研究中发现与健康对照组和 NAFLD 肝郁脾虚组比,NAFLD 湿热蕴结组水平 Inosine 5'-Monophosphate、鸟嘌呤核苷均显著升高;与健康对照组比,尿酸水平均显著升高,与 NAFLD 肝郁脾虚组比差异无统计学意义。已有研究发现与健康人群相比,NAFLD 湿热证患者血尿酸水平较高^[31]。血尿酸可通过增加肝中脂肪积累、激活炎症反应和增加过氧化物的产生等多种途径促进 NAFLD 的发生发展^[32]。Inosine 5'-Monophosphate 与明串珠菌属呈正相关,与双歧杆菌属呈负相关,鸟嘌呤核苷与明串珠菌属呈正相关。肠道排泄尿酸的能力主要取决于肠表面的三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2), 用来将体内多余的尿酸输送到肠外,从而促进尿酸的排出。已有研究发现双歧杆菌和乳酸杆菌增加小鼠肠道尿酸转运蛋白 ABCG2 表达,促进尿酸排泄,降低了血清尿酸水平^[29-33]。由此可见,NAFLD 湿热蕴结证与肠道菌群-嘌呤代谢途径紊乱密切相关。

综上所述,NAFLD 湿热蕴结证患者存在肠道菌群失调和代谢紊乱。NAFLD 湿热蕴结证肠道菌群失调与宿主色氨酸、苯丙氨酸、嘌呤代谢紊乱密切相关。

参考文献

- 1 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 年更新版). 实用肝脏病杂志, 2018, 21(2):177-186.
- 2 李志国, 姜韩雪, 焦云涛, 等. 非酒精性脂肪性肝病中医证型分布的

文献分析. 中华中医药杂志, 2017, 32(10):4713-4715.

- 3 隋国媛, 刘光颖, 赵娜, 等. 非酒精性脂肪肝湿热蕴结证肠道菌群特征及其与宿主代谢共变化机制研究. 时珍国医国药, 2020, 31(5):

- 1188–1189.
- 4 肖翠霞, 吴科锐, 韩凌. 中医药对肠道菌群的影响研究进展. *中成药*, 2017, 39(6):1239–1243.
 - 5 Hoyles L, Fernández-Real J M, Federici M, *et al.* Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nat Med*, 2018, 24(7):1070–1080.
 - 6 Oh T G, Kim S M, Caussy C, *et al.* A universal gut-microbiome-derived signature predicts cirrhosis. *Cell Metab*, 2020, 32(5):901.
 - 7 张宁, 李自辉, 赵洪伟, 等. 寒凝血瘀证大鼠的肠道菌群变化与粪便代谢特征分析. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2):79–85.
 - 8 李自辉, 张娜, 王宇, 等. 基于16S rRNA技术与代谢组学探究茵陈蒿汤治疗非酒精性脂肪肝的作用机制. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5):1908–1913.
 - 9 李军祥, 陈諳, 王允亮. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见(2017年). *中国中西医结合消化杂志*, 2017, 25(11):805–811.
 - 10 Astbury S, Atallah E, Vijay A, *et al.* Lower gut microbiome diversity and higher abundance of proinflammatory genus *Collinsella* are associated with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis. *Gut Microbes*, 2020, 11(3):569–580.
 - 11 朴勇洙, 孙姐男, 邵音, 等. 基于中医证候研究白塞病患者肠道菌群的特征性变化及临床指标相关性的分析. *海南医学院学报*, 2020, 26(13):1012–1018.
 - 12 Doden H, Sallam L A, Devendran S, *et al.* Metabolism of oxo-bile acids and characterization of recombinant 12 α -hydroxysteroid dehydrogenases from bile acid 7 α -dehydroxylating human gut bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(10):e00235–18.
 - 13 Kakiyama G, Pandak W M, Gillevet P M, *et al.* Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol*, 2013, 58(5):949–955.
 - 14 Shen F, Zheng R D, Sun X Q, *et al.* Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2017, 16(4):375–381.
 - 15 初旭, 脱璐尧, 辛红, 等. 30例湿热蕴结型结肠癌患者的肠道菌群结构变化研究. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(3):305–310.
 - 16 王灿, 张心怡, 金黑鹰, 等. 内生湿热证人群的肠道菌群特点研究. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(1):38–43.
 - 17 Ding Y F, Yanagi K, Cheng C, *et al.* Interactions between gut microbiota and non-alcoholic liver disease: The role of microbiota-derived metabolites. *Pharmacol Res*, 2019, 141:521–529.
 - 18 Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(6):716–724.
 - 19 彭晓婷, 马琪, 张晓松, 等. 湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6):700–708.
 - 20 苟小军, 刘丽萍, 马诗瑜, 等. 非酒精性脂肪性肝病肝胆湿热证患者尿液代谢组学研究. *中华中医药杂志*, 2020, 35(8):3846–3853.
 - 21 程晓旭, 门丽慧, 皮子凤, 等. 黄芩-栀子配伍治疗糖尿病肾病大鼠的尿液代谢组学研究. *分析测试学报*, 2020, 39(1):128–135.
 - 22 Krautkramer K A, Fan J, Bäckhed F. Gut microbial metabolites as multi-Kingdom intermediates. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(2):77–94.
 - 23 Cheng M L, Wang C H, Shiao M S, *et al.* Metabolic disturbances identified in plasma are associated with outcomes in patients with heart failure: Diagnostic and prognostic value of metabolomics. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(15):1509–1520.
 - 24 Libert D M, Nowacki A S, Natowicz M R. Metabolomic analysis of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: Amino acid and acylcarnitine levels change along a spectrum of metabolic wellness. *Peer J*, 2018, 6:e5410.
 - 25 Li R, Huang X, Liang X, *et al.* Integrated omics analysis reveals the alteration of gut microbe-metabolites in obese adults. *Brief Bioinform*, 2021, 22(3):bbaa165.
 - 26 Mook-Kanamori D O, Römisch-Margl W, Kastenmüller G, *et al.* Increased amino acids levels and the risk of developing of hypertriglyceridemia in a 7-year follow-up. *J Endocrinol Invest*, 2014, 37(4):369–374.
 - 27 程静屏, 傅念, 罗艳云, 等. 甲状腺素对非酒精性脂肪肝大鼠ANGPTL3表达的影响. *中南医学科学杂志*, 2016, 44(1):25–28.
 - 28 童宁宁. 慢性胃炎湿热蕴脾证唾液代谢组的初步研究. 广州: 广州中医药大学硕士学位论文, 2006.
 - 29 Wang J, Chen Y, Zhong H, *et al.* The gut microbiota as a target to control hyperuricemia pathogenesis: Potential mechanisms and therapeutic strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(14):3979–3989.
 - 30 董姝. 基于尿代谢组学对非酒精性脂肪肝中医证候的研究. 上海: 上海中医药大学硕士学位论文, 2013.
 - 31 朱春燕. 湿热蕴结型非酒精性脂肪性肝病患者饮食习惯、生化及LTB4的相关研究. 北京: 北京中医药大学硕士学位论文, 2018.
 - 32 Wan X, Xu C, Lin Y, *et al.* Uric acid regulates hepatic steatosis and insulin resistance through the NLRP3 inflammasome-dependent mechanism. *J Hepatol*, 2016, 64(4):925–932.
 - 33 Shao T J, Shao L, Li H C, *et al.* Combined signature of the fecal microbiome and metabolome in patients with gout. *Front Microbiol*, 2017, 8:268.

The Association of gut Microbiota with Serum Metabolites in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Damp-Heat Accumulation Syndrome

Sui Guoyuan¹, Quan Dongmei², Zhao Na¹, Huang Yanyang¹, Jia Lianqun¹, Yang Guanlin¹
 (1. Key Laboratory of Ministry of Education for Traditional Chinese Medicine Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110000, China; 2. The Sixth People's Hospital of Shenyang City, Shenyang 110000, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of the gut microbiota of patients with non-alcoholic fatty liver (NAFLD) damp-heat accumulation syndrome and its correlation with serum metabolites. Methods 40 NAFLD patients with damp-heat accumulation, 19 NAFLD patients with depressed liver and deficient spleen and 32 healthy people were selected, using 16 SrRNA amplicon sequencing technology and LC-MS/MS technology to test gut microbiota and serum metabolites. The correlation between gut microbiota and serum metabolites was analyzed using Spearman rank correlation. Results Compared with the healthy control group, the relative abundance of *Shigella* and *Collinsella* in the NAFLD with damp-heat accumulation group was higher, and the relative abundance of *Bifidobacterium* was lower, there was no difference between NAFLD with damp-heat accumulation group and depressed liver and deficient spleen group. Compared with the healthy group and NAFLD with depressed liver and deficient spleen group, the level of L-Tryptophan in NAFLD with damp-heat accumulation group was significantly higher; compared with healthy people, the level of Xanthurenic acid in NAFLD with damp-heat accumulation group increased. L-Tryptophan is negatively correlated with *Agrobacterium*, and Xanthurenic acid is positively correlated with *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, and *Collinsella*. Compared with the healthy group and NAFLD with depressed liver and deficient spleen group, the level of L-Thyroxine in NAFLD with damp-heat accumulation group was significantly lower; compared with healthy people, the level of L-phenylalanine in NAFLD with damp-heat accumulation group was increased, and compared with NAFLD with depressed liver and deficient spleen group, its level was significant decline. L-Thyroxine is negatively correlated with *Megamonas*, *Acinetobacter*, and *Subdoligranulum*. Compared with the healthy control group, the levels of Glycochenodeoxycholate, Deoxycholic Acid, and Glycocholate in the NAFLD with damp-heat accumulation group were significantly higher. Compared with the NAFLD depressed liver and deficient spleen group, the above metabolites were not significantly different. Glycochenodeoxycholate is positively correlated with *Collinsella* and *Agrobacterium*, and Glycocholate is positively correlated with *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, and *Shigella*. Compared with the healthy control group and NAFLD with depressed liver and deficient spleen group, the levels of Inosine 5'-Monophosphate and guanine nucleoside in NAFLD with damp-heat accumulation group were significantly increased; compared with the healthy control group, the level of uric acid was significantly increased, and there was no significant difference compared with the NAFLD with damp-heat accumulation group. Inosine 5'-Monophosphate was positively correlated with *Leuconostoc*, negatively correlated with *Bifidobacterium*, and guanosine was positively correlated with *Leuconostoc*. Conclusion NAFLD patients with damp-heat accumulation syndrome have gut microbiota imbalance and metabolic disorders. The gut microbiota imbalance of NAFLD with damp-heat accumulation syndrome is closely related to the host tryptophan, phenylalanine, and purine metabolism disorder.

Keywords: Non-Alcoholic fatty liver, Damp-heat accumulation, Gut microbiota, Serum metabolites

(责任编辑: 刘玥辰)