

· 论 著 ·

益生菌对非酒精性脂肪肝相关细胞的作用

王 斌, 蔡 敏, 黄 玲, 姜子廷, 童敏思, 李 力 (同济大学附属杨浦医院消化科, 上海 200090)

[摘要] **目的** 探讨益生菌对非酒精性脂肪肝相关的肠上皮细胞、肝 Kupper 细胞和肝实质细胞的作用及其作用机制。**方法** 将人肠上皮细胞 Caco-2、大鼠肝 Kupper 细胞和小鼠肝实质细胞 AML12 分别分成空白对照组、脂多糖(LPS)组、嗜酸乳杆菌组、LPS+嗜酸乳杆菌组、粪肠球菌组、LPS+粪肠球菌组、双歧杆菌组、LPS+双歧杆菌组, 孵育培养 6 h。分别检测人肠上皮细胞 Caco-2 紧密连接相关因子表达情况及细胞通透性、大鼠肝 Kupper 细胞功能表型相关因子和 I κ B 及 p-I κ B 变化水平、小鼠肝实质细胞 AML12 脂代谢基因水平和脂类吸收情况。**结果** 益生菌可显著抑制由 LPS 刺激引起的人肠上皮细胞 Caco-2 紧密连接相关因子 Occludin、Claudin-1、JAM、ZO-1 表达的下降和细胞通透性的增加; 明显抑制 LPS 刺激引起的大鼠肝 Kupper 细胞表达 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 的增加, 同时抑制 IL-4、IL-10、IL-13 的降低和 p-I κ B 蛋白表达的增加; 显著抑制由 LPS 刺激引起的小鼠肝实质细胞 AML12 脂代谢基因 ACACA、SREBF1、FAS、FABP3、FABP4、DGAT1 的上调和脂类吸收的增加。**结论** 益生菌可以通过促进肠上皮细胞紧密连接相关因子的表达, 降低细胞通透性, 抑制肝 Kupper 细胞 NF- κ B 通路活性, 降低促炎性细胞因子、增加抑炎性细胞因子表达水平, 抑制肝实质细胞脂代谢基因表达和脂类吸收等多种途径, 保护非酒精性脂肪肝。

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 益生菌; Caco-2 细胞; 细胞通透性; Kupffer 细胞; p-I κ B; AML12 细胞; 脂类吸收

[中图分类号] Q939 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)05-0409-08

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.006

Role of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease related cells

WANG Bin, CAI Min, HUANG Ling, JIANG Ziting, TONG Minsi, LI Li (Department of Gastroenterology, Yangpu Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200090, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects and mechanisms of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease related in-testinal epithelial cells, Kupffer cells and liver parenchymal cells. **Methods** Human intestinal epithelial cells Caco-2, rat Kupffer cells and mouse liver parenchymal cell AML12 were divided into eight groups respectively: the control group, LPS group, Lactobacillus acidophilus group, LPS+Lactobacillus acidophilus group, Enterococcus faecalis group, LPS+Enterococcus faecalis group, Bifidobacterium group and LPS+Bifidobacterium group. All cells were incubated for 6 h and collected to detect the expression of tight junction related factors and cell permeability of human intestinal epithelial cells Caco-2, the levels of functional factors, I κ B and p-I κ B of rat Kupffer cells, the expression of lipid metabolism genes and lipid absorption of hepatocytes AML12. **Results** Probiotics significantly inhibited the expression of Occludin, Claudin-1, JAM, ZO-1 and cell permeability induced by LPS in human intestinal epithelial cells Caco-2. Probiotics decreased the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6 and increased the levels of IL-4, IL-10, IL-13 caused by LPS in rat Kupffer cells. The protein level of p-I κ B was also inhibited by probiotics. In addition, probiotics significantly inhibited the upregulation of ACACA, SREBF1, FAS, FABP3, FABP4, DGAT1 and lipid absorption induced by LPS in mouse liver parenchymal cells AML12. **Conclusion** Probiotics can protect non-alcoholic fatty liver disease through promoting the expression of intestinal epithelial tight junction related factors, reducing epithelial cells permeability, inhibiting the activity of NF- κ B pathway to decrease the expression of proinflammatory cytokines and increase the levels of anti-inflammatory cytokines in Kuffer cells, inhibiting lipid metabolism genes expression and lipid absorption of hepatocytes.

[Key words] nonalcoholic fatty liver disease; probiotics; Caco-2; cell permeability; Kupffer cell; p-I κ B; AML12; lipid absorption

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver dis-

ease, NAFLD)是非酒精和其他明确肝脏损伤因素引起的,以弥漫性肝实质细胞大泡性脂肪变为特征
的临床病理综合征,主要包括单纯性脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌^[1]。
随着社会的发展,人民生活水平的提高和饮食习惯

[作者简介] 王 斌, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 非酒精性脂肪肝
的治疗研究, Tel: 18302124214

[通讯作者] 李 力, 硕士, 主任医师, Tel: 13601728828

的改变,NAFLD的患病率正在不断上升。NAFLD的发病原因和致病机制复杂,已有研究表明,肠上皮细胞、肝Kuffer细胞和肝实质细胞在NAFLD的发生发展过程中发挥重要作用。机体在正常情况下,肠上皮细胞与肠道免疫细胞及肠黏膜构成肠道内第一道防线,阻止病原微生物及其他有害物质侵入组织^[2],但当肠上皮细胞紧密连接蛋白降低、上皮通透性增加时,大量的肠道致病菌进入肝脏,引起NAFLD的发生^[3,4]。作为机体的免疫器官,肝脏含有大量的巨噬细胞、T细胞、树突状细胞等免疫细胞,能分泌TNF- α 、IL-6、MCP-1等多种炎症因子,引起和促进NAFLD的发病^[5]。另外,在NAFLD发生时,肝实质细胞变性,脂质吸收增多,进一步促进NAFLD的发展^[6]。这些受损或变性的细胞共同作用是引起NAFLD发生发展的重要原因。因此,调控肠上皮细胞、肝Kuffer细胞和肝实质细胞的功能及作用在NAFLD的防治中发挥至关重要的作用。

益生菌是一类对宿主有益的活性微生物,其定植于机体肠道和生殖系统内,可以促进宿主微生态平衡,从而改善疾病、促进健康。益生菌可调节肠道微生态、减轻肝脏免疫损伤、降低血脂,有助于NAFLD的控制与治疗^[7-9],但其对NAFLD发病相关细胞的作用及分子机制尚不十分清楚。

本研究欲通过观察益生菌(嗜酸乳杆菌、粪肠球菌、双歧杆菌)对与NAFLD密切相关的肠上皮细胞、肝Kuffer细胞和肝实质细胞功能的影响,揭示益生菌保护NAFLD的可能作用机制,为开发基于益生菌的NAFLD治疗药物提供重要依据。

1 实验材料

1.1 细胞来源及培养

人肠上皮细胞Caco-2、大鼠肝Kuffer细胞、小鼠肝实质细胞AML12均购自上海诺百生物科技有限公司,用含10% FBS的高糖DMEM培养基置于细胞培养箱中培养。

1.2 药品与试剂

嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌(上海诺百生物科技有限公司);LPS、FITC-dextran(Sigma公司);细胞及组织蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究);逆转录试剂盒、SYBY Green Master Mix 荧光定量试剂盒(TaKaRa公司);大鼠 β actin单克隆抗体、I κ B和p-I κ B单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology公司);IRDye 800CW-键合驴抗鼠二抗(LI-COR公司);transwell板(Corning公司);脂肪酸吸收试剂盒(Abcam

公司)。

1.3 实验仪器

ABI7500实时定量PCR仪(Applied Biosystems公司);Odyssey化学发光成像仪(LI-COR公司);Millicell-ERS细胞电阻仪(美国Millipore公司);多功能酶标仪(瑞士Tacan公司);荧光显微镜(日本Olympus公司)。

2 实验方法

2.1 细胞分组及处理

将人肠上皮细胞Caco-2、大鼠肝Kuffer细胞和小鼠肝实质细胞AML12分别分为4组:第一组不加LPS,作为空白对照组,第二、三、四组为LPS处理组,LPS浓度分别为1、2、5 μ g/ml,刺激培养6 h。另一组实验中,将上述3种细胞分别分为8组,第一组为空白对照组,第二组给予LPS(1 μ g/ml),第三组给予嗜酸乳杆菌[感染复数(MOI)=10],第四组给予LPS(1 μ g/ml)和嗜酸乳杆菌(MOI=10),第五组给予粪肠球菌(MOI=10),第六组给予LPS(1 μ g/ml)和粪肠球菌(MOI=10),第七组给予双歧杆菌(MOI=10),第八组给予LPS(1 μ g/ml)和双歧杆菌(MOI=10),孵育培养6 h。

2.2 荧光定量PCR(QPCR)

细胞经Trizol、氯仿、异丙醇和75%酒精提取总RNA后,测定浓度,用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA,cDNA采用SYBR Green Master mix试剂经荧光实时定量PCR仪进行荧光定量。

2.3 蛋白质印迹法(Western blot)

用细胞及组织蛋白裂解液将细胞充分裂解后收集全部液体,离心提取上清液,用BCA试剂盒测定蛋白浓度,蛋白经煮沸变性后进行凝胶电泳,电泳结束后将蛋白电转到硝酸纤维素薄膜上,经牛奶封闭后孵育I κ B和p-I κ B一抗溶液,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜后,洗掉一抗,室温孵育二抗30 min,洗净二抗,用Odyssey扫膜仪进行扫膜。

2.4 细胞通透性

人肠上皮细胞Caco-2接种至transwell小室内,培养21 d至细胞形成紧密单层,同时用细胞电阻仪测量跨上皮电阻抗值(TEER),待TEER值显著升高且保持稳定,表面模型基本形成,将细胞分成8组,按“2.1”项下方式进行处理后,用缓冲液换液并清洗上下室,每组细胞分别用含1 mg/ml FITC-dextran的缓冲液孵育2 h,收集各组小室下层液体,检测FITC-dextran从上室透过下室的荧光值。

2.5 脂质吸收

脂质吸收实验采用脂肪酸吸收试剂盒进行检测,具体步骤为:将细胞按照 6×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中,置于细胞培养箱中孵育 6 h 后,将培养基弃去,加入 90 μ l 无血清培养基继续孵育 1 h,按“2.1”项下方式将细胞分成 8 组,分别加入相应的处理因子 10 μ l,刺激 6 h;向 TF2-C12 小瓶里加入 20 μ l DMSO 配制 TF2-C12 储备试剂,向 10 ml 检测缓冲液中加入 20 μ l TF2-C12 储备试剂,配制脂肪酸染料溶液,然后向 96 孔板中加入 100 μ l 脂肪酸染料溶液,最后用多功能酶标仪检测细胞的荧光值。

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 统计软件,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,同一样本多组数据间的两两比较采用单因素 ANOVA 分析,并以 Bonferroni 或 Dunnett 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 益生菌对人肠上皮细胞 Caco-2 紧密连接相关因子表达的影响

为了确定 LPS 对人肠上皮细胞 Caco-2 作用的最佳剂量,课题组选取了 3 个不同剂量的 LPS (1、2、5 μ g/ml) 分别刺激 Caco-2 细胞,孵育 6 h 后收集细

胞,抽提 RNA 检测紧密连接相关因子 Occludin 和 ZO-1 的表达变化。结果发现 LPS 浓度为 1 μ g/ml 时,对 Occludin 和 ZO-1 的抑制作用最强,故在后续实验中采用 LPS=1 μ g/ml 处理小鼠 Caco-2 细胞(图 1)。

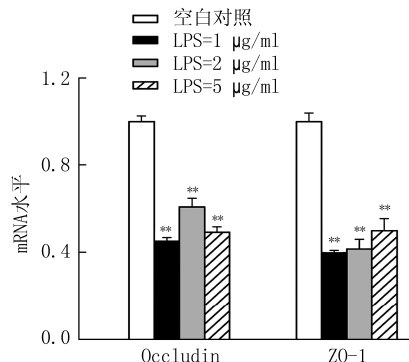


图 1 LPS 对人肠上皮细胞 Caco-2 表达 Occludin 和 ZO-1 的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较 ($n=3$)

LPS 刺激 Caco-2 细胞导致紧密连接相关因子 Occludin、Claudin-1、JAM 和 ZO-1 表达水平均下降,而嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌可显著抑制由 LPS 刺激引起的 Occludin、Claudin-1、JAM 和 ZO-1 的下调(图 2)。

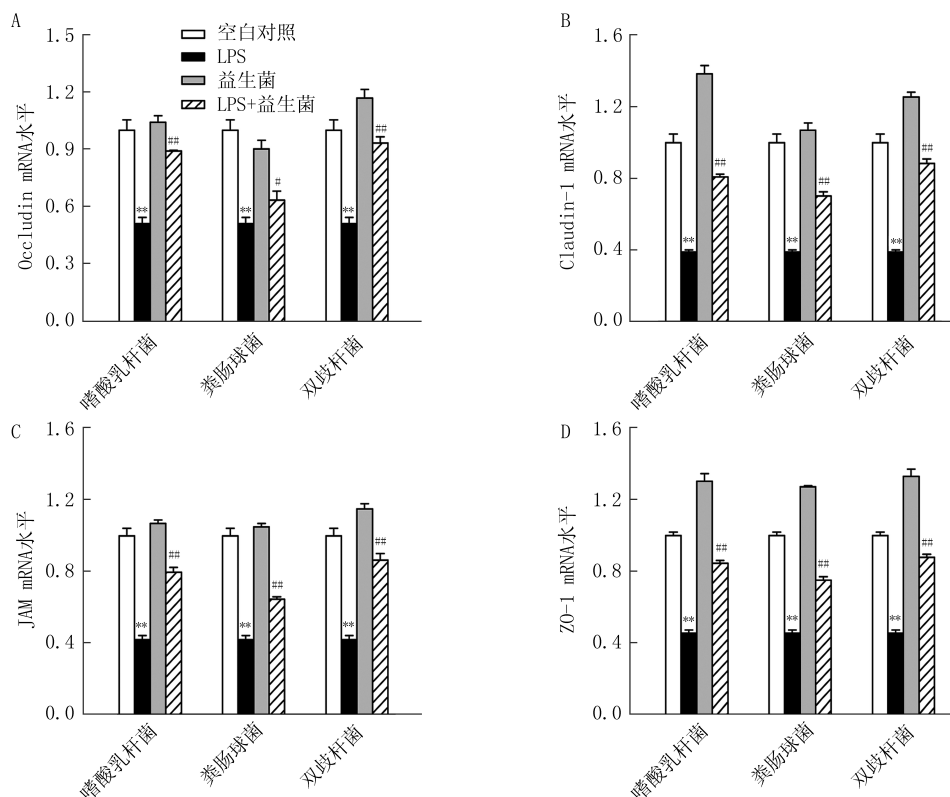


图 2 益生菌对人肠上皮细胞 Caco-2 表达紧密连接相关因子的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 LPS 组比较 ($n=3$)

A. 益生菌对 Caco-2 细胞 Occludin mRNA 水平的影响; B. 益生菌对 Caco-2 细胞 Claudin-1 mRNA 水平的影响; C. 益生菌对 Caco-2 细胞 JAM mRNA 水平的影响; D. 益生菌对 Caco-2 细胞 ZO-1 mRNA 水平的影响

3.2 益生菌对人肠上皮细胞 Caco-2 通透性的影响

LPS 刺激 Caco-2 细胞, FITC-dextran 通透量增加, 嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌显著抑制 LPS 刺激引起的 FITC-dextran 通透量增加(图 3)。

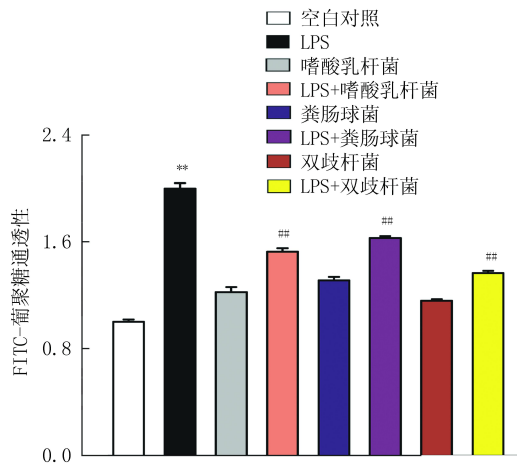


图 3 益生菌对人肠上皮细胞 Caco-2 通透性的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较;
$P < 0.01$, 与 LPS 组比较 ($n=3$)

3.3 益生菌对大鼠肝 Kuffer 细胞功能表型相关因子表达的影响

为了确定 LPS 对大鼠肝 Kuffer 细胞作用的最佳剂量, 课题组选取了 3 个不同剂量的 LPS (1、2、

5 $\mu\text{g/ml}$) 分别刺激大鼠肝 Kupffer 细胞, 孵育 6 h 后收集细胞, 抽提 RNA 检测炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达变化。结果发现 LPS = 1 $\mu\text{g/ml}$ 时, TNF- α 和 IL-6 的表达水平最高, 故确定后续实验中 LPS 对大鼠肝 Kupffer 细胞的作用浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ (图 4)。

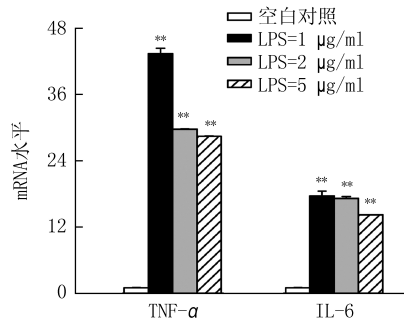


图 4 LPS 对大鼠肝 Kuffer 细胞表达 TNF- α 和 IL-6 的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较 ($n=3$)

LPS 刺激大鼠肝 Kupffer 细胞引起 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 表达明显升高, IL-4、IL-10 和 IL-13 表达明显降低, 嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌显著抑制 LPS 刺激引起的 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 的增加, 同时抑制 IL-4、IL-10 和 IL-13 的降低(图 5)。

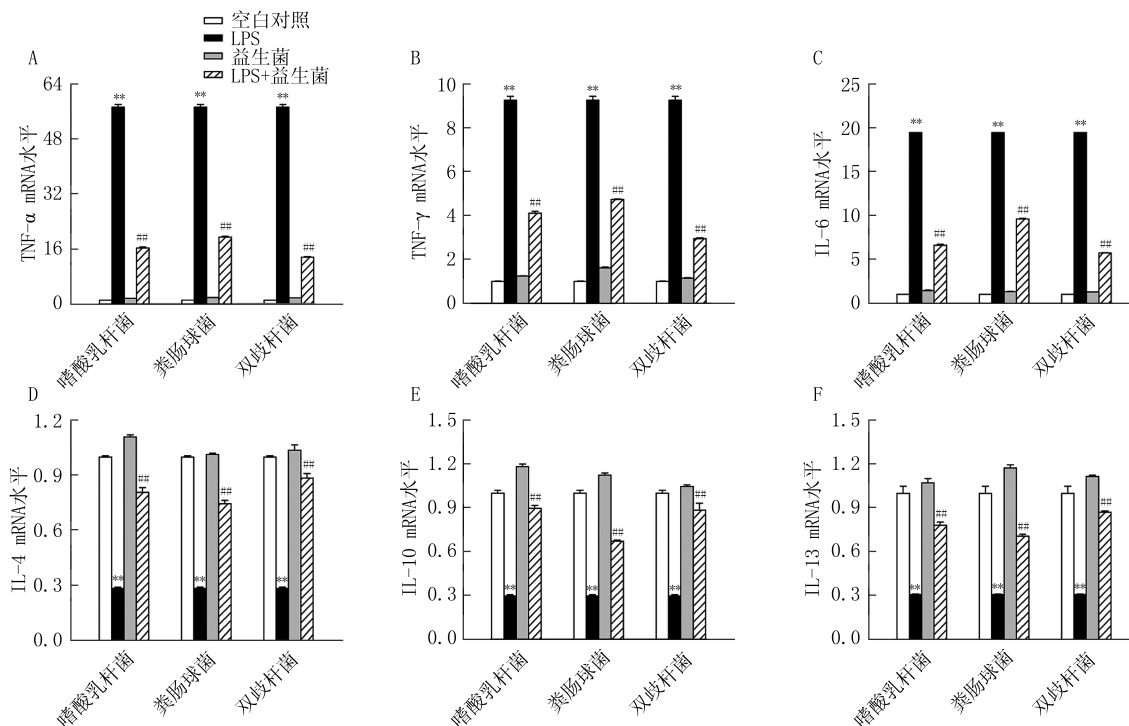


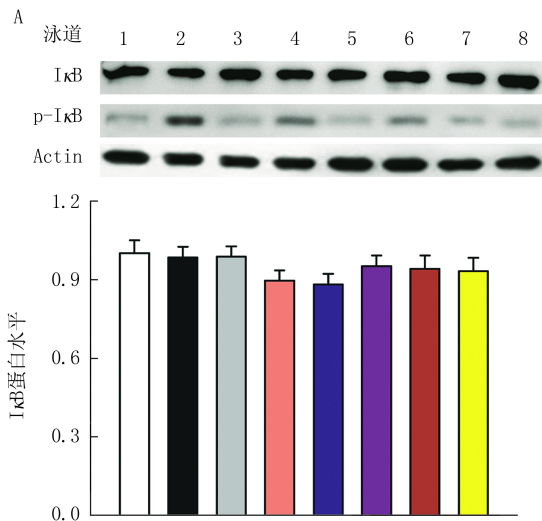
图 5 益生菌对大鼠肝 Kuffer 细胞表达功能表型相关因子的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ## $P < 0.01$, 与 LPS 组比较 ($n=3$)

A. 对 TNF- α mRNA 水平的影响; B. 对 IFN- γ mRNA 水平的影响; C. 对 IL-6 mRNA 水平的影响;
D. 对 IL-4 mRNA 水平的影响; E. 对 IL-10 mRNA 水平的影响; F. 对 IL-13 mRNA 水平的影响

3.4 益生菌对大鼠肝 Kuffer 细胞表达 IκB 和 p-IκB 蛋白的影响

LPS 刺激大鼠肝 Kupffer 细胞, IκB 蛋白表达



无明显变化, p-IκB 蛋白表达水平明显升高, 而嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌显著抑制 LPS 刺激引起的 p-IκB 蛋白表达的增加(图 6)。

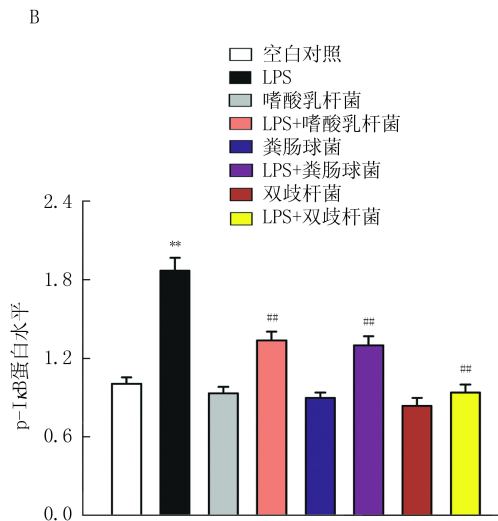


图 6 益生菌对大鼠肝 Kuffer 细胞内 IκB 及 p-IκB 的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; # $P < 0.01$, 与 LPS 组比较 ($n=3$)

A. 益生菌对 Kupffer 细胞 IκB 蛋白水平的影响; B. 益生菌对 Kupffer 细胞 p-IκB 蛋白水平的影响

3.5 益生菌对小鼠肝实质细胞 AML12 脂代谢基因的影响

为了确定 LPS 对小鼠肝实质细胞 AML12 作用的最佳剂量, 课题组选取了 3 个不同剂量的 LPS (1、2、5 $\mu\text{g/ml}$) 分别刺激小鼠 AML12 细胞, 孵育 6 h 后收集细胞, 抽提 RNA 检测成脂相关因子 FAS 和 SREBF1 表达变化。结果发现 3 个浓度的 LPS 均能抑制 FAS 和 SREBF1 的表达, 故决定后续实验采用低浓度的 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), 见图 7。

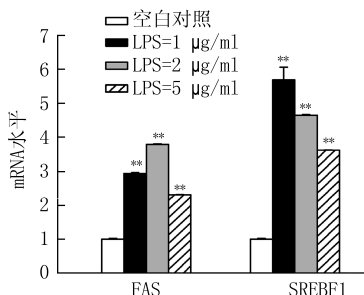


图 7 LPS 对小鼠肝实质细胞 AML12 表达 FAS 和 SREBF1 的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较 ($n=3$)

LPS 刺激小鼠 AML12 细胞导致脂代谢基因 ACACA、SREBF1、FAS、FABP3、FABP4 和 DGAT1 表达均增加, 而嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌可显著抑制由 LPS 刺激引起的 ACACA、SREBF1、FAS、FABP3、FABP4 和 DGAT1 的上调

(图 8)。

3.6 益生菌对小鼠肝实质细胞 AML12 脂类吸收的影响

LPS 刺激导致小鼠 AML12 细胞对脂肪酸的吸收增加, 而嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌显著抑制 LPS 引起的细胞对脂肪酸吸收的增加(图 9)。

4 讨论

肠道菌群与肠黏膜上皮及肠道免疫系统构成人体肠道微生态, 在机体健康与疾病过程中发挥重要的调控作用。肠道微生态失衡不仅能引起肠道炎症^[10], 还可以通过菌群与肝脏、脑组织、肺组织和心血管系统等多种器官和系统的相互作用, 引起肝脏和其他组织器官的病变^[11-14]。益生菌可以通过纠正肠道菌群的失衡改善多种疾病的进展, 如结肠炎、2 型糖尿病、血脂异常以及肝细胞癌等^[15-17]。其中, 益生菌对 NAFLD 的保护与改善作用非常显著, NAFLD 患者在常规保肝治疗基础上, 加用双歧杆菌三联活菌胶囊后, 肝功能指标明显改善^[18]; 双歧三联活菌+枯草杆菌肠球菌二联活菌联合多烯磷脂酰胆碱胶囊治疗 NAFLD, 患者血清 ALT、AST 均低于单用多烯磷脂酰胆碱胶囊组, 肝脏损伤明显减轻^[19]; 应用含乳酸菌、双歧杆菌、肺炎链球菌的益生菌制剂 12 周, 可显著降低 NAFLD 患者的血清 ALT、胆固醇水平, 肝脏纤维化程度减轻^[20]。但是

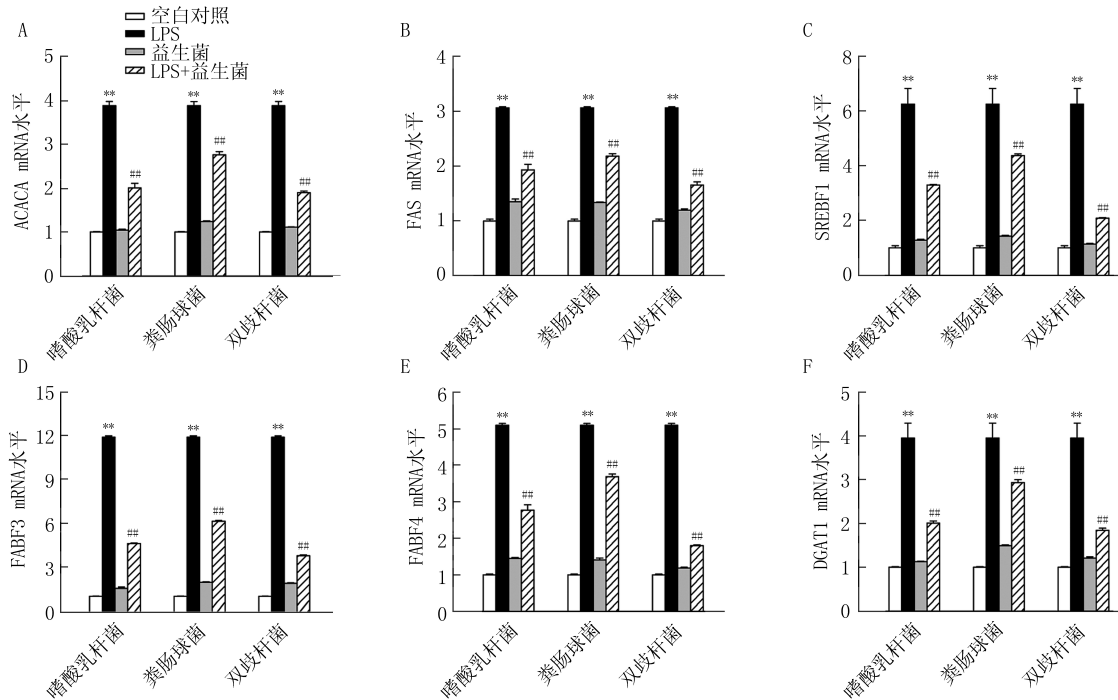


图8 益生菌对小鼠肝实质细胞 AML12 脂代谢基因的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ## $P < 0.01$, 与 LPS 组比较 ($n = 3$)

A. 对 ACACA mRNA 水平的影响; B. 对 FAS mRNA 水平的影响; C. 对 SREBF1 mRNA 水平的影响;
D. 对 FABP3 mRNA 水平的影响; E. 对 FABP4 mRNA 水平的影响; F. 对 DGAT1 mRNA 水平的影响

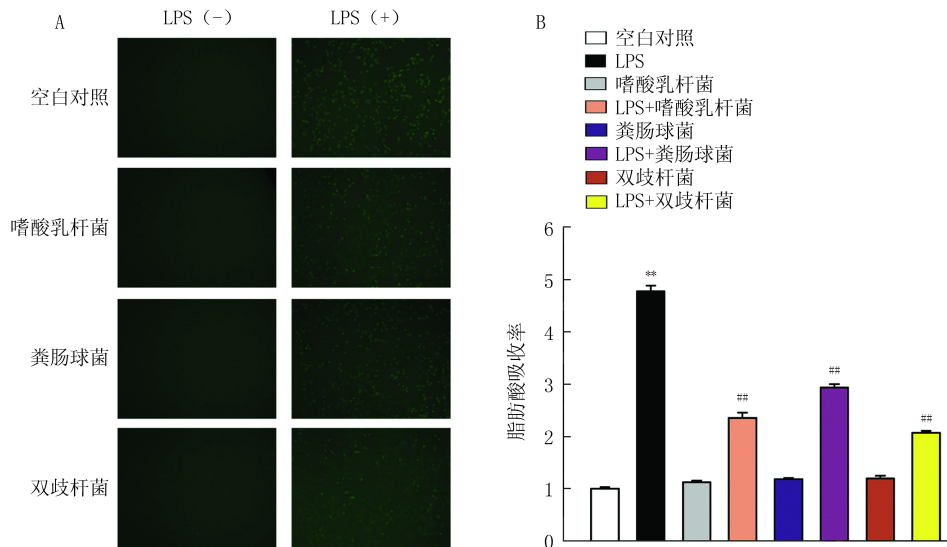


图9 益生菌对小鼠肝实质细胞 AML12 脂类吸收的影响

** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ## $P < 0.01$, 与 LPS 组比较 ($n = 3$)

A. 益生菌对 AML12 细胞脂肪酸吸收的影响荧光图;
B. 益生菌对 AML12 细胞脂肪酸吸收影响的统计图

益生菌保护 NAFLD 的机制研究甚少,因此本课题组拟从细胞分子学角度阐释益生菌保护 NAFLD 的可能作用机制。

NAFLD 发生时,肠上皮细胞发挥重要作用,肠上皮细胞紧密连接蛋白降低,上皮通透性增加, G^+

菌过度繁殖产生大量的内毒素进入血液循环,引起肝脏损伤,导致 NAFLD 的进展^[3, 21, 22]。益生菌降低血清内毒素、降钙素原(PCT)和 D-乳酸水平,间接表明其可增强肠黏膜上皮细胞的修复能力,降低肠黏膜的通透性^[23]。本研究发现 LPS 刺激可引起人

肠上皮细胞紧密连接因子 Occludin、Claudin-1、JAM 和 ZO-1 的表达下调, FITC-dextran 的通透量增加, 而嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌可显著抑制 Occludin、Claudin-1、JAM 和 ZO-1 的下调, 并减少 FITC-dextran 的通透量, 直接证明了益生菌可以增强上皮细胞的紧密连接, 恢复肠道屏障功能, 降低肠黏膜的通透性, 从而减少肠源性内毒素对肝脏的损害作用, 保护 NAFLD。从机制上丰富了含鼠李糖乳杆菌 GG 的高果糖饮食促进小鼠肠道中有益菌的生长, 增强肠道屏障功能的作用^[24]。

作为代谢器官, 肝脏时刻受到食物、药物和肠道微生物抗原的作用, 抗原作用于肝脏免疫细胞上的 Toll 样受体, 引起炎症反应, 正常情况下, 免疫细胞对抗原具有耐受性, 但在慢性肝脏疾病或大量抗原存在的条件下, 免疫细胞的耐受性降低, 肝 Kupffer 细胞和 T 细胞产生大量炎症因子, 使炎症反应持续, 损伤肝脏^[25]。因此, 肝 Kuffer 细胞在多种肝脏疾病中发挥至关重要的作用。笔者发现, LPS 刺激大鼠肝 Kupffer 细胞使 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 表达明显升高, IL-4、IL-10 和 IL-13 表达明显降低, 嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌显著抑制 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 的增加, 以及 IL-4、IL-10 和 IL-13 降低, 表明益生菌可以直接作用于肝巨噬细胞, 不仅抑制其促炎因子的表达, 而且增加其抑炎因子的水平。本研究印证了应用双歧杆菌三联活菌胶囊治疗 NAFLD, 患者血清内毒素、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低^[18], 副干酪乳杆菌促进 M2 型 Kupffer 细胞的极化, 降低 TLR-4、NOX-4、TNF- α 、MCP-1、IL-4、PPAR- γ 等炎症因子的水平, 减少肝脂肪沉积和血清 ALT 水平, 明显改善肝功能指标^[26]。炎症因子的表达接受多种通路的调控, 其中最重要的一条是 NF- κ B 调控通路^[27], 接下来课题组检测了益生菌对大鼠肝 Kupffer 细胞 I κ B 和 p-I κ B 的影响, 结果发现嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌显著抑制 LPS 刺激引起的 p-I κ B 蛋白表达的增加, 说明益生菌通过抑制 NF- κ B 通路的活性来减轻肝细胞的炎症反应, 降低肝巨噬细胞炎症因子的表达, 保护肝细胞, 延缓 NAFLD 的进展。

NAFLD 患者肝实质细胞变性, 脂质代谢紊乱, 导致脂肪积聚和胰岛素抵抗, 另外, 氧化脂质诱导的肝细胞损伤可能促进肝脏炎症反应, 进一步加重 NAFLD^[28-30]。在本项研究中, 课题组用 LPS 刺激小鼠 AML12 细胞, 发现脂质代谢基因 ACACA、SREBF1、FAS、FABP3、FABP4 和 DGAT1 表达均增加, 同时, 细胞对脂肪酸的吸收也明显增加。应用

嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和双歧杆菌处理细胞后, ACACA、SREBF1、FAS、FABP3、FABP4 和 DGAT1 水平显著下降, 细胞对脂肪酸的吸收水平也降低, 益生菌制剂调节 NAFLD 患者肝脏脂质代谢, 降低血清三酰甘油、总胆固醇等含量^[31], 双歧杆菌降低患者血清 ALT 和 AST^[32], 与含嗜酸乳杆菌和双歧杆菌的酸奶使 NAFLD 患者血清 ALT、AST、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平均明显降低^[33]结果一致。这些结果表明, 益生菌可以直接抑制肝实质细胞对脂肪酸的吸收, 改善脂质代谢。

本研究阐释了益生菌对在 NAFLD 发病过程中发挥重要作用的肠上皮细胞、肝 Kupper 细胞和肝实质细胞的影响及其机制: 促进肠上皮细胞紧密连接因子的表达, 降低细胞通透性, 恢复肠上皮细胞屏障功能; 抑制肝 Kupper 细胞 NF- κ B 通路的活性, 降低炎症因子的表达水平, 抑制炎症反应; 降低肝实质细胞脂质代谢基因的表达, 减少对脂类的吸收, 改善脂质代谢紊乱, 为益生菌对肝脏保护与治疗的作用机制提供了新的认识。但是, 整体动物实验、NAFLD 与以上 3 种细胞的直接关系, 以及益生菌对 NAFLD 的保护机制还有待更为深入和系统的研究。

【参考文献】

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. 中华肝病杂志, 2010, 19(3): 163-166.
- [2] KE P, SHAO BZ, XU ZQ, *et al.* Intestinal autophagy and its pharmacological control in inflammatory bowel disease[J]. *Front Immunol*, 2016, 7:695.
- [3] XIN D, ZONG-SHUN L, BANG-MAO W, *et al.* Expression of intestinal tight junction proteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(129): 136-140.
- [4] BASHIARDES S, SHAPIRO H, ROZIN S, *et al.* Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota[J]. *Mol Metab*, 2016, 5(9): 782-794.
- [5] BAO Y. The progress of studying the mechanisms of immune cells in the regulation of non-alcoholic fatty liver diseases[J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2017, 25(7): 553-556.
- [6] CHEN J, LI J, YIU JHC, *et al.* TRIF-dependent Toll-like receptor signaling suppresses Scd1 transcription in hepatocytes and prevents diet-induced hepatic steatosis[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(491): eal3336.
- [7] MOUZAKI M, BANDSMA R. Targeting the gut microbiota for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 16(12): 1324-1331.
- [8] KELISHADI R, FARAJIAN S, MIRLOHI M. Probiotics as a novel treatment for non-alcoholic fatty liver disease; a systematic review on the current evidences[J]. *Hepat Mon*,

- 2013, 13(4): e7233.
- [9] LYU M, WANG YF, FAN GW, *et al.* Balancing herbal medicine and functional food for prevention and treatment of cardiometabolic diseases through modulating gut microbiota [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2146.
- [10] LI M, WANG B, SUN X, *et al.* Upregulation of intestinal barrier function in mice with DSS-induced colitis by a defined bacterial consortium is associated with expansion of IL-17A producing gamma delta T cells [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 824.
- [11] BETRAPALLY NS, GILLEVET PM, BAJAJ JS. Gut microbiome and liver disease [J]. *Transl Res*, 2017, 179: 49-59.
- [12] MU C, YANG Y, ZHU W. Gut microbiota: the brain peace-keeper [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 345.
- [13] BUDDEN KF, GELLATLY SL, WOOD DL, *et al.* Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(1): 55-63.
- [14] ZHU W, GREGORY JC, ORG E, *et al.* Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk [J]. *Cell*, 2016, 165(1): 111-124.
- [15] SHEN ZH, ZHU CX, QUAN YS, *et al.* Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(1): 5-14.
- [16] CAVALCANTI NETO MP, AQUINO JS, ROMAO DA SILVA LF, *et al.* Gut microbiota and probiotics intervention: a potential therapeutic target for management of cardio-metabolic disorders and chronic kidney disease? [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 130: 152-163.
- [17] WAN MLY, EL-NEZAMI H. Targeting gut microbiota in hepatocellular carcinoma: probiotics as a novel therapy [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2018, 7(1): 11-20.
- [18] 钱晓婷, 章期生. 双歧杆菌三联活菌胶囊对非酒精性脂肪性肝炎患者血清内毒素和炎症因子的影响 [J]. *中国微生物学杂志*, 2014, 26(4): 435-437.
- [19] WANG W, SHI LP, SHI L, *et al.* Efficacy of probiotics on the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2018, 57(2): 101-106.
- [20] MANZHALI E, VIRCHENKO O, FALALYEYeva T, *et al.* Treatment efficacy of a probiotic preparation for non-alcoholic steatohepatitis: a pilot trial [J]. *J Dig Dis*, 2017, 18(12): 698-703.
- [21] DAI X, WANG B. Role of gut barrier function in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2015, 2015: 287348.
- [22] ZHU L, BAKER RD, BAKER SS. Gut microbiome and non-alcoholic fatty liver diseases [J]. *Pediatr Res*, 2015, 77(1-2): 245-251.
- [23] 杨群菲, 吴建业. 双歧杆菌四联活菌片保护非酒精性脂肪性肝炎患者肠黏膜屏障功能的机制及疗效 [J]. *中国微生物学杂志*, 2015, 27(6): 696-698.
- [24] RITZE Y, BARDOS G, CLAUS A, *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e80169.
- [25] MIYAKE Y, YAMAMOTO K. Role of gut microbiota in liver diseases [J]. *Hepatol Res*, 2013, 43(2): 139-146.
- [26] SOHN W, JUN DW, LEE KN, *et al.* Lactobacillus paracasei induces M2-dominant kupffer cell polarization in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(11): 3340-3350.
- [27] ANEST V, HANSON JL, COGSWELL PC, *et al.* A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression [J]. *Nature*, 2003, 423(6940): 659-663.
- [28] KIM YA, KEOGH JB, CLIFTON PM. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity [J]. *Nutr Res Rev*, 2018, 31(1): 35-51.
- [29] SHEN F, ZHENG RD, SUN XQ, *et al.* Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *HBPD Int*, 2017, 16(4): 375-381.
- [30] IBRAHIM SH, HIRSOVA P, GORES CJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation [J]. *Gut*, 2018, 67(5): 963-972.
- [31] 郑啼婴, 李瑜元, 聂玉强, 等. 肠道菌群对非酒精性脂肪性肝病病变程度的影响 [J]. *广州医科大学学报*, 2016, 1: 9-13.
- [32] MALAGUARNERA M, VACANTE M, ANTIC T, *et al.* Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(2): 545-553.
- [33] NABAVI S, RAFRAF M, SOMI MH, *et al.* Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(12): 7386-7393.

[收稿日期] 2018-01-21 [修回日期] 2018-07-11

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 408 页)

- [18] PAN X, ZHANG Y, KIM HG, *et al.* FOXO transcription factors protect against the diet-induced fatty liver disease [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44597.
- [19] DOWNWARD J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(1): 11-22.

- [20] SEKI E, PARK E, FUJIMOTO J. Toll-like receptor signaling in liver regeneration, fibrosis and carcinogenesis [J]. *Hepatol Res*, 2011, 41(7): 597-610.

[收稿日期] 2018-04-09 [修回日期] 2018-06-25

[本文编辑] 李睿旻