

基于肠-肝轴探讨安化黑茶防治非酒精性脂肪肝的作用机制

毛彩薇¹, 夏旭婷¹, 葛俊¹, 李琳莉¹, 喻长红², 刘富林^{1*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 常德市第一中医医院, 湖南常德 415000)

摘要: 为探讨安化黑茶水提液预防小鼠非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的作用机制。将C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组、西药(阿托伐他汀, 10 mg/kg)组及安化黑茶低、中、高剂量(0.75、1.5、3.0 g/kg)组, 采取预防模型, 同时给药与饲喂高脂高糖饲料, 连续10周。结果表明: 与模型组小鼠相比, 安化黑茶低、中、高剂量组小鼠体质量极显著降低($P<0.01$), 体质量增长量极显著减少($P<0.01$), 胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 肝细胞脂肪变性 with 气球样变得到纠正, 回肠病理损伤改善, 闭合蛋白和闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)表达增加($P<0.01$); 安化黑茶高剂量组拟杆菌门、*Muribaculaceae_unclassified*及乳杆菌属相对丰度增加, 厚壁菌门、脱硫弧菌属及毛螺菌属相对丰度降低。综上所述, 安化黑茶具有改善肠黏膜屏障功能, 调节肠道菌群, 恢复肠道微生态的作用, 其可能通过调节肠-肝轴发挥对NAFLD的防治作用。

关键词: 安化黑茶; 非酒精性脂肪肝; 肠-肝轴; 肠道菌群; 肠黏膜机械屏障

Mechanism of Anhua Dark Tea in Controlling Non-alcoholic Fatty Liver Disease Based on Gut-Liver Axis

MAO Caiwei¹, XIA Xuting¹, GE Jun¹, LI Linli¹, YU Changhong², LIU Fulin^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China; 2. First Traditional Chinese Medicine Hospital of Changde, Changde 415000, Hunan, China)

Abstract: To investigate the mechanisms of the aqueous extract of Anhua dark tea in controlling the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice, this study randomly divided the C57BL/6J mice into blank group, model group, western medicine group (atorvastatin, 10 mg/kg), low-dose (0.75 g/kg), medium-dose (1.5 g/kg), and high-dose (3.0 g/kg) Anhua dark tea group. A prevention model was taken and the drug was administered simultaneously with feeding a high-fat and high-sugar diet for 10 consecutive weeks. The results showed that compared with the mice in the model group, the mice in the low-, medium- and high-dose Anhua dark tea groups showed significantly decrease in body mass ($P<0.01$), significantly reduced body mass gain ($P<0.01$), and significantly reduced total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and alanine aminotransferase (ALT) levels ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, they demonstrated refined hepatic steatosis and hepatocyte ballooning, improved ileal pathological lesions, and increased expression of occludin and zonula occludens-1 (ZO-1). Mice in the high-dose Anhua dark tea group had an increase in the relative abundance of the Bacteroidetes, *Muribaculaceae_unclassified* and *Lactobacillus*, and decrease in the relative abundance of the Firmicutes, *Desulfovibrio*, and *Lachnospiraceae_NK4A136*. In conclusion, Anhua dark tea could improve the intestinal mucosal barrier function and regulate the gut microbiota, restoring a healthy intestinal microecology, and it may control NAFLD by regulating the gut-liver axis.

Key words: Anhua dark tea; non-alcoholic fatty liver disease; gut-liver axis; gut microbiota; intestinal mucosal mechanical barrier

基金项目: 常德市临床医疗技术创新引导项目(2021SK055); 校级研究生科研创新项目(2023CX173); 湖南省教育厅重点项目(23A0292); 湖南省教育厅一般项目(23C0164); 湖南省自然科学基金项目(2024JJ7359)

作者简介: 毛彩薇(1999—), 女(汉), 硕士研究生, 主要从事中医治则与治法研究。

*通信作者: 刘富林(1968—), 男(汉), 教授, 博士, 主要从事中医治则与治法研究。

引文格式:

毛彩薇,夏旭婷,葛俊,等.基于肠-肝轴探讨安化黑茶防治非酒精性脂肪肝的作用机制[J].食品研究与开发,2025,46(3):68-75.

MAO Caiwei, XIA Xuting, GE Jun, et al. Mechanism of Anhua Dark Tea in Controlling Non-alcoholic Fatty Liver Disease Based on Gut-Liver Axis[J]. Food Research and Development, 2025, 46(3): 68-75.

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的损肝因素所致的肝脏代谢紊乱性综合征,疾病谱包括非酒精性肝脂肪变(non-alcoholic hepatic steatosis)、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),肝癌为NAFLD患者死亡的主要原因^[1]。NAFLD发病率逐年升高,亚洲地区的患病率高达27.37%,并且NAFLD已经取代病毒性肝炎成为全球最常见的慢性肝病^[2]。研究发现NAFLD的发生发展与“肠-肝轴”密切相关,肠道菌群与肠黏膜机械屏障作为肠肝轴的重要组成部分,对NAFLD的发生发展起重要作用。紊乱的肠道微生态可导致肠道屏障损害,肠道通透性增加,菌群代谢产物通过“肠-肝轴”促使肝脏免疫激活和炎症反应发生,导致肝脏损伤,导致NAFLD发生与进展^[3-4]。

早期预防肝脏脂肪变性或延缓其组织学病变进展是控制死亡率的关键,然而目前临床尚无针对NAFLD的特效药,主要应用降脂、胰岛素增敏及抗氧化药物来进行治疗^[5]。长期用药不但增加肝肾负担,也给患者造成经济压力,使得患者临床依从性较差,久而导致疾病的发展与恶化。中医重视疾病的预防,强调“未病先防,即病防变”,重视NAFLD的早期干预,认为NAFLD为脏腑功能失调,气血津液代谢失常,痰湿浊瘀蕴于肝而发^[6]。安化黑茶作为药食同源食品,其具有消食化积,行气和胃,芳香化湿,通利小便之功^[7],现代研究亦发现安化黑茶可通过调节脂质代谢与抗氧化作用发挥对NAFLD的治疗作用^[8],然而其防治NAFLD的作用机制是否与肠-肝轴相关目前研究尚少,故本文以肠-肝轴为切入点,探讨安化黑茶对肠黏膜机械屏障和肠道菌群的影响,以期为安化黑茶防治NAFLD提供一定的理论基础及依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 动物

60只SPF级雄性C57BL/6J小鼠:湖南斯莱克景达实验动物有限公司,体质量为(20±2)g。动物质量合格证:430727231100273457。实验动物许可证编号:SCXK(湘)2019-0004。动物实验方案由湖南中医

药大学动物伦理委员会审核并批准,符合实验动物福利与伦理原则。伦理编号:LLBH-202210240005。

1.1.2 材料与试剂

安化黑茶:湖南省白沙溪茶厂股份有限公司,原料为天尖茶一级嫩叶;生产许可证编号:SC114430923-00115;阿托伐他汀钙片:福建东瑞制药有限公司;4%多聚甲醛:兰杰柯科技有限公司;苏木精-伊红:南京森贝伽生物公司;ZO-1多克隆抗体、闭合蛋白(Occludin)多克隆抗体:武汉三鹰生物技术有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体、羊抗兔IgG(H+L)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、RIPA (radio immunoprecipitation assay)裂解液、TBST(tris buffered saline with Tween):武汉赛维尔生物科技有限公司;AMPure XT beads:美国贝克曼库尔特有限公司;Qubit dsDNA HS Assay Kit (500T):美国赛默飞世尔科技公司;Pusion Hot start flex 2X Master Mix:上海仪涛生物仪器有限公司;50×TAE Buffer:上海生工股份有限公司;高脂高糖饲料(基础饲料+10%猪油+20%蔗糖+2.5%胆固醇+0.5%胆酸钠):北京科澳协力饲料有限公司;聚偏氟乙烯膜:美国Millipore公司。

1.1.3 仪器与设备

Chemray 800全自动生化分析仪:山东博科生物产业有限公司;CF1524R台式冷冻离心机:美国SCILGEX公司;5424高速离心机:德国艾本德股份公司;JXFSTPRP-48高速组织研磨仪:上海净信实业发展有限公司;Rt-6100酶标仪:深圳雷杜生命科学股份有限公司;REPS300电泳仪:上海天能科技有限公司;A200PCR基因扩增仪:杭州朗基科学仪器有限公司;HYCD-282C冰箱:海尔集团公司。

1.2 方法

1.2.1 安化黑茶制备

称取适量2015年白沙溪牌天茯茶,戴无菌手套将其掰成小块后用无菌纱布包裹,在蒸馏水中浸泡30min,大火煮至沸腾后改文火继续煎煮30min,冷却过滤,取茶水另置。二煎加入与药包齐平的水量,煎煮同前,将两次茶水混合,小火浓缩至所需体积后冷却,取上清液浓缩为0.3g/mL的茶液,4℃冰箱冷藏备用。成人茶叶推荐剂量为10g/d,以60kg成人质量和20g小鼠体质量作为参考,参照体表面积比值换算实验动物

用药剂量^[9],设置安化黑茶低、中、高剂量分别为0.75、1.5、3.0 g/kg。将阿托伐他汀钙片于干净研钵中碾碎,生理盐水溶解成混悬液,按10 mg/kg剂量进行灌胃,现配现用^[10]。

1.2.2 分组给药及模型建立

实验小鼠适应性喂养7 d后,随机分为空白组(NC组, $n=10$)、模型组(MC组, $n=10$)、黑茶低剂量组(LD组, $n=10$)、黑茶中剂量组(MD组, $n=10$)、黑茶高剂量组(HD组, $n=10$)、西药组(PC组, $n=10$)。空白组饲喂普通饲料,另外5组均采用高脂高糖诱导法(high-fat-high-sugar diet, HFHS)建立NAFLD模型,各组小鼠均自由饮用纯净水和摄食。采取预防模型,同时给药与饲喂高脂高糖饲料,黑茶低剂量组、中剂量组、高剂量组分别灌胃0.75、1.5、3.0 g/kg的安化黑茶水提液;对照组灌胃10 mg/kg阿托伐他汀溶液。空白组及模型组均灌胃等体积生理盐水,根据定期测量所得体质量进行调整,连续灌胃干预10周后,随机取空白组与模型组小鼠5只,进行肝脏病理学检查,确认NAFLD模型是否造模成功。造模成功标准为模型组小鼠肝脏组织可见大小不一的脂滴、气球样变、细胞肿胀及炎症细胞浸润^[11]。

1.2.3 样本收集

确认造模成功后,禁食不禁水12 h,摘取眼球采血,3 000 r/min离心15 min获得血清。颈椎脱臼处死小鼠后,收集结肠内容物液氮速冻, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;取一部分肝脏与回肠组织用4%多聚甲醛溶液进行固定,另一部分保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续检测分析。

1.2.4 组织形态学观察

将固定于4%多聚甲醛溶液中的肝脏和回肠组织脱水,石蜡包埋,常规切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,于显微镜下观察肝脏和回肠组织病理变化。

1.2.5 血清生化指标检测

小鼠血清采用全自动生化分析仪检测血脂指标胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平和肝功能指标门冬氨酸氨基转移酶(aspartatetransami-nase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平。

1.2.6 Western blot 检测回肠中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达情况

小鼠回肠组织块使用预冷 PBS 漂洗除去血污,剪碎称取组织0.1~0.2 g,加入1 mL RIPA 裂解液,冰浴彻底匀浆后转移至离心管中,振荡。冰浴30 min,期间使用移液器反复吹打, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min离心15 min,收集上清液。使用BAC法测定组织上清蛋白浓度,取适

量样本蛋白溶液加入上样缓冲液,涡旋混匀, $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热10 min变性,冻存备用。配制十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)(10%分离胶和5%浓缩胶),上样,浓缩胶为80 V,分离胶为130 V,待溴酚蓝电泳至胶底部时停止电泳。采用250 mA, 1.0 h的条件将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜。聚偏氟乙烯膜使用5%脱脂牛奶于摇床上振荡封闭1 h,使用TBST于摇床上漂洗聚偏氟乙烯膜3次,5 min/次。分别加入一抗稀释液(使用5%脱脂牛奶稀释,体积稀释比为Occludin抗体1:2 000, ZO-1抗体1:50 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,使用TBST于摇床上漂洗聚偏氟乙烯膜5次,5 min/次。加入二抗稀释液(体积稀释比为1:15 000),室温孵育1.0 h,使用TBST于摇床上漂洗聚偏氟乙烯膜5次,5 min/次。加入显色液,于成像仪中曝光,进行蛋白成像,取目的蛋白与 β -actin条带灰度值的比值进行统计分析。实验重复3次。

1.2.7 16S rDNA 测序分析结肠内容物菌群变化

对结肠内容物样本进行总DNA的提取与检测,基于341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')-805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')采用实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法对细菌总DNA中16S(V3~V4)可变区进行扩增,随后回收扩增产物并对其进行纯化、荧光定量,使用NovaSeq测序仪进行2×250 bp的双端测序,对测序所获得的双端数据,根据barcode信息进行数据拆分,并去除接头和barcode序列。利用qiime2软件调用DADA2进行长度过滤和去噪,获得ASV(feature)特征序列和ASV(feature)丰度表格,并使用R-3.4.4软件进行物种差异性分析。

1.3 统计学方法

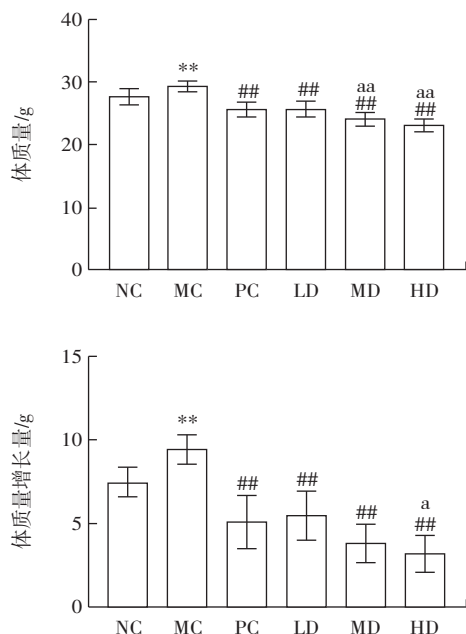
实验数据运用SPSS25.0软件进行统计分析,结果均采用平均值 \pm 标准差表示。满足正态性和方差齐性的计量资料采用方差分析,组间多重比较采用最小显著性差异法,不符合正态性者采用多个独立样本Kruskal-Wallis H非参数检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 各组小鼠体质量与体质量增长量变化

各组小鼠体质量及体质量增长量变化见图1。

由图1可知,经高脂高糖诱导喂养后,模型组小鼠体质量最高,体质量增长量显著高于空白组($P<0.01$);经过安化黑茶和阿托伐他汀干预后,小鼠体质量极显著减少($P<0.01$),体质量增长量极显著减少($P<0.01$),且具有一定剂量依赖性。结果表明安化黑茶具有控制NAFLD小鼠体质量增长的作用。



**表示与 NC 组相比差异极显著 $P<0.01$;##表示与 MC 组相比差异极显著 $P<0.01$;a 表示与 PC 组相比差异显著, $P<0.05$,aa 表示与 PC 组相比差异极显著 $P<0.01$ 。

图 1 各组小鼠体质量及体质量增长量变化 ($n=10$)

Fig.1 Changes in body mass and its gain of mice in each group ($n=10$)

2.2 各组小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C、AST、ALT 水平的变化

各组小鼠血清肝功能及血脂四项变化见表 1。

表 1 小鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT、AST 水平的比较

Table 1 Content of TC, TG, HDL-C, LDL-C, ALT, and AST in the serum of mice

组别	TC/ (mmol/L)	TG/ (mmol/L)	LDL-C/ (mmol/L)	HDL-C/ (mmol/L)	ALT/ (U/L)	AST/ (U/L)
NC 组	2.38± 0.31	1.51± 0.14	0.24±0 .03	1.40± 0.17	34.31± 4.01	121.70± 14.33
MC 组	5.69± 0.42**	2.13± 0.16**	0.69± 0.08**	3.29± 0.33**	54.02± 5.57**	219.59± 13.10*
PC 组	3.80± 0.31##	1.47± 0.13##	0.31± 0.04##	2.70± 0.42	42.26± 1.83#	160.08± 23.28
LD 组	4.40± 0.19#	1.72± 0.12#	0.38± 0.02##	2.19± 0.53	34.95± 3.90##	165.78± 21.89
MD 组	3.98± 0.37##	1.30± 0.10##	0.36± 0.06##	2.46± 0.53	35.27± 3.32##	131.42± 17.73
HD 组	3.39± 0.31##	1.19± 0.16##	0.39± 0.06##	2.48± 0.26	30.84± 2.39##a	131.82± 11.54

注:*表示与 NC 组相比差异显著, $P<0.05$,**表示与 NC 组相比差异极显著 $P<0.01$;#表示与 MC 组相比差异显著, $P<0.05$,##表示与 MC 组相比差异极显著 $P<0.01$;a 表示与 PC 组相比差异显著, $P<0.05$ 。

如表 1 所示,与 NC 组相比,MC 组小鼠血脂指标 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平与肝功能指标 ALT、AST

水平显著升高 ($P<0.05, P<0.01$);与模型组相比,安化黑茶不同剂量组 TC、TG、LDL-C、ALT 水平显著降低 ($P<0.05, P<0.01$);与西药组相比,黑茶高剂量组 ALT 水平显著下降 ($P<0.05$)。综上,安化黑茶具有调控 NAFLD 小鼠脂质代谢与改善肝损伤的作用。

2.3 各组小鼠肝脏组织病理变化

各组小鼠肝脏组织病理改变见图 2。

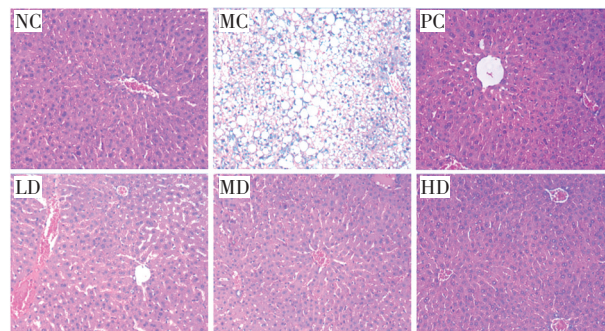


图 2 各组小鼠肝脏组织病理改变 ($\times 200$)

Fig.2 Pathological changes in liver tissue of mice in each group ($\times 200$)

如图 2 所示,NC 组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞大小均匀,细胞核清晰,胞浆均匀,肝索排列整齐,呈放射状分布于中央静脉周围,肝窦可见;MC 组小鼠,小叶结构破坏或消失,肝细胞大小不一,可见大量脂滴空泡及广泛气球样变,肝索结构排列紊乱,局部有炎性细胞浸润;与 MC 组相比,阿托伐他汀与安化黑茶干预后的小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞内脂滴空泡减少,气球样变减轻。结果表明,安化黑茶可以预防肝脏组织脂肪变性,改善肝损伤。

2.4 各组小鼠回肠组织病理变化

各组小鼠回肠组织病理改变见图 3。

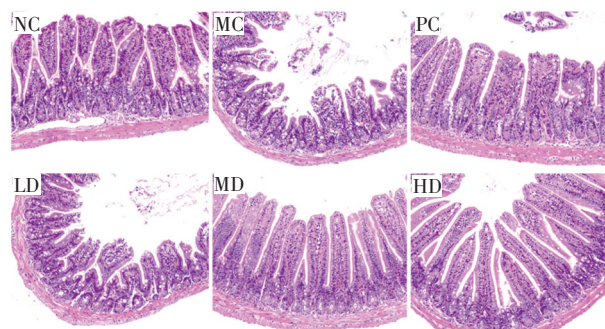


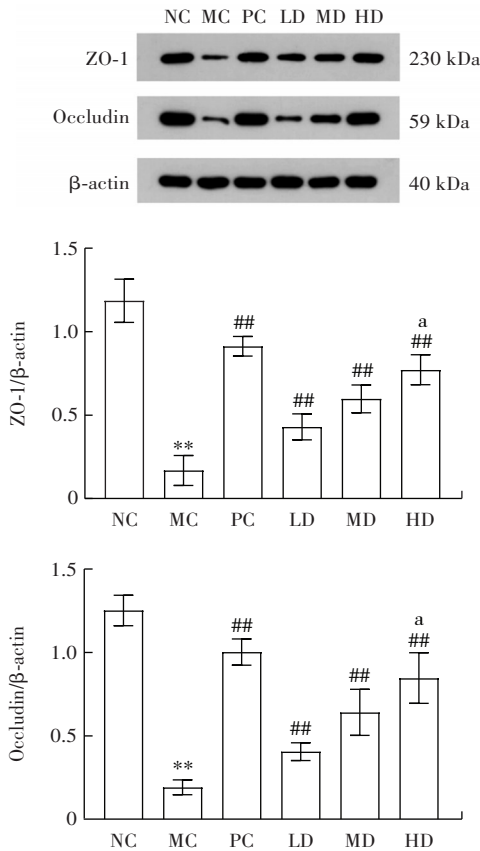
图 3 各组小鼠回肠组织病理改变 ($\times 200$)

Fig.3 Pathological changes in ileum tissue of mice in each group ($\times 200$)

如图 3 所示,NC 组小鼠肠绒毛和隐窝结构完整,细胞排列整齐,少见固有层充血、水肿;MC 组小鼠小肠绒毛短、少,间隙增宽,有明显断裂与脱落情况,隐窝结构破坏、数量减少,黏膜下层可见充血水肿,伴有炎症细胞浸润;PC 组与安化黑茶各剂量组小肠绒毛和隐

窝结构趋于完整,绒毛小面积脱落,黏膜上皮细胞水肿及炎症细胞浸润均减轻,尤其以安化黑茶中、高剂量组更为明显。结果表明安化黑茶对回肠结构具有保护作用。

2.5 各组小鼠回肠中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达情况
各组小鼠回肠中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达变化见图 4。



**表示与 NC 组相比差异极显著, $P < 0.01$; ##表示与 MC 组相比差异极显著, $P < 0.01$; a 表示与 PC 组相比差异显著, $P < 0.05$ 。

图 4 各组小鼠回肠中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达情况 ($n=4$)
Fig.4 Expression levels of Occludin and ZO-1 proteins in ileum tissues of mice in each group ($n=4$)

如图 4 所示,与 NC 组相比,MC 组小鼠回肠组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达水平极显著降低 ($P < 0.01$);与 MC 组相比,PC 组与 LD、MD、HD 组小鼠回肠组织中 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

2.6 各组小鼠肠道菌群变化

2.6.1 多样性分析

2.6.1.1 Alpha 多样性分析

各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数见表 2。

Alpha 多样性分析用来反映微生物丰富度和多样性,主要通过 Shannon、Simpson 和 Chao1 指数来体现。如表 2 所示,结果显示各组之间虽无明显差异,但与 NC 组相比,MC 组 Chao1 指数降低,与 MC 组相比,

表 2 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数

Table 2 α diversity of gut microbiota of mice in each group

组别	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
NC 组	1 038.57±427.44	6.46±1.96	0.88±0.13
MC 组	685.30±63.72	6.62±0.40	0.96±0.01
PC 组	652.63±94.03	5.62±0.55	0.92±0.02
LD 组	863.23±66.96	6.67±0.49	0.96±0.02
MD 组	710.17±147.68	6.12±0.49	0.93±0.05
HD 组	734.36±151.52	6.44±0.76	0.94±0.04

LD、MD、HD 组 Chao1 指数升高,说明安化黑茶可改善高脂饮食导致的 NAFLD 小鼠肠道菌群多样性降低。

2.6.1.2 Beta 多样性分析

各组小鼠肠道菌群 Beta 多样性分析见图 5。

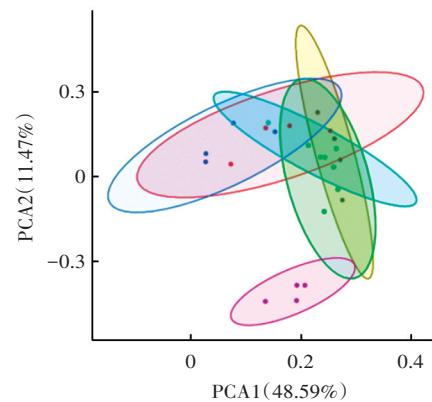


图 5 各组小鼠肠道菌群 Beta 多样性分析

Fig.5 Beta diversity analysis of gut microbiota of mice in each group

Beta 多样性分析用来比较不同样本之间的物种差异性,其中主成分分析 (principal component analysis, PCA) 通过分析不同样本群落组成可视化反映样本间的距离和差异,样本物种组成越相似,则样本点之间距离越接近,如图 5 所示,主成分 1 (PCA1) 贡献度为 48.59%,主成分 2 (PCA2) 贡献度为 11.47%,二者贡献度之和大于 60%,故二者能较为全面地反映群落组成信息。NC 组与 PC 组重合度较低,LD、MD、HD 组与 NC 组距离呈逐渐增高趋势,说明 NAFLD 小鼠肠道菌群组成发生改变,安化黑茶可调控 NAFLD 小鼠肠道菌群组成,使其趋向于正常。

2.6.2 小鼠肠道菌群物种组成及差异分析

2.6.2.1 基于门水平的物种组成及差异分析

各组小鼠肠道菌群门分类学水平下相对丰度见表 3 和图 6。

柱状堆叠图可直观反映各组样本物种的相对丰度及优势物种的表达情况,如表 3 与图 6 所示,各组小鼠肠道菌群在门水平上主要组成部分为厚壁菌门、拟杆

表 3 各组小鼠门分类学水平下相对丰度分析

Table 3 Relative abundance analysis of phylum level composition of gut microbiota of mice in each group

门水平	NC 组	MC 组	PC 组	LD 组	MD 组	HD 组
Firmicutes(厚壁菌门)	15.95	62.35	64.37	51.36	52.95	53.23
Bacteroidota(拟杆菌门)	50.97	16.95	14.66	25.12	19.36	26.73
Desulfobacterota(脱硫杆菌门)	2.68	8.58	11.41	15.38	14.67	8.54
Verrucomicrobiota(疣微菌门)	23.97	0.44	0.54	0.40	0.44	0.40
Actinobacteriota(放线菌门)	2.30	4.84	4.18	2.38	3.74	4.95
Patescibacteria	0.86	3.56	1.69	1.94	6.20	3.21
Proteobacteria(变形菌门)	1.92	2.08	1.75	1.98	2.08	2.18
Campylobacterota	0.86	0.73	1.20	1.06	0.36	0.40
Deferribacterota	0.23	0.31	0.04	0.04	0.03	0.19
unclassified	0.21	0.03	0.08	0.19	0.11	0.06

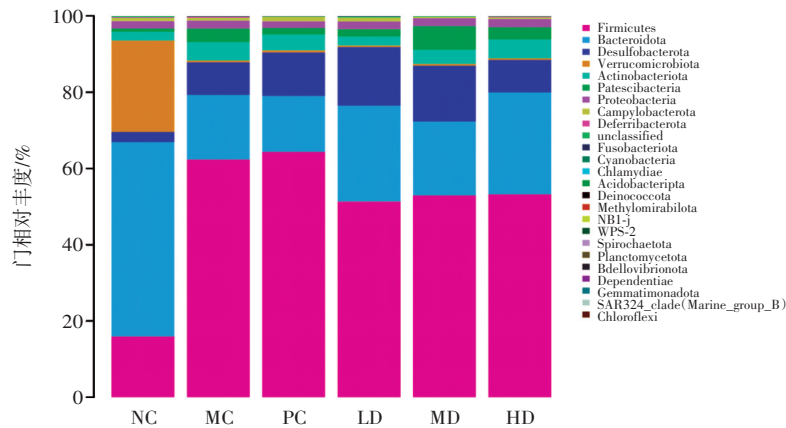


图 6 各组小鼠门分类学水平下相对丰度

Fig.6 Relative abundance of phylum level composition of gut microbiota of mice in each group

菌门、脱硫杆菌门、疣微菌门、放线菌门、Patescibacteria 及变形菌门。与 NC 组相比,MC 组厚壁菌门、脱硫杆菌门、放线菌门、Patescibacteria、变形菌门及 Deferribacterota 相对丰度增加,拟杆菌门、疣微菌门及 Campylobacterota 相对丰度减少。经安化黑茶治疗后,厚壁菌门相对丰度减少,拟杆菌门相对丰度增加;HD 组脱硫

杆菌门、Patescibacteria 及 Deferribacterota 相对丰度减少。表明 NAFLD 小鼠在门水平上存在肠道菌群紊乱,而安化黑茶可在一定程度上改善此紊乱。

2.6.2.2 基于属水平的物种组成及差异分析

各组小鼠肠道菌群属分类学水平下相对丰度见表 4 和图 7。

表 4 各组小鼠属分类学水平下相对丰度分析

Table 4 Relative abundance analysis of genus level composition of gut microbiota of mice in each group

属水平	NC 组	MC 组	PC 组	LD 组	MD 组	HD 组
<i>Muribaculaceae_unclassified</i>	36.17	11.65	9.05	15.63	10.34	18.97
<i>Dubosiella</i> (杜氏杆菌属)	3.69	11.41	36.30	10.81	5.47	11.38
<i>Eubacterium_coprostanoligenes</i> (产粪甾醇真杆菌属)	0.51	17.00	8.65	15.61	19.47	7.42
<i>Desulfovibrio</i> (脱硫弧菌属)	2.44	8.40	11.23	15.03	14.33	8.15
<i>Akkermansia</i> (阿克曼菌属)	23.97	0.44	0.54	0.40	0.44	0.40
<i>Lachnospiraceae_NK4A136</i> (毛螺菌属)	0.93	5.02	2.48	2.29	2.95	3.88
<i>Candidatus_Saccharimonas</i>	0.86	3.56	1.69	1.94	6.20	3.21
<i>Muribaculum</i>	6.35	1.71	1.59	3.12	1.65	2.52
<i>Lactobacillus</i> (乳杆菌属)	0.71	1.52	0.36	0.56	0.32	10.67
<i>Clostridiales_unclassified</i>	0.64	2.12	2.97	2.08	3.55	2.14

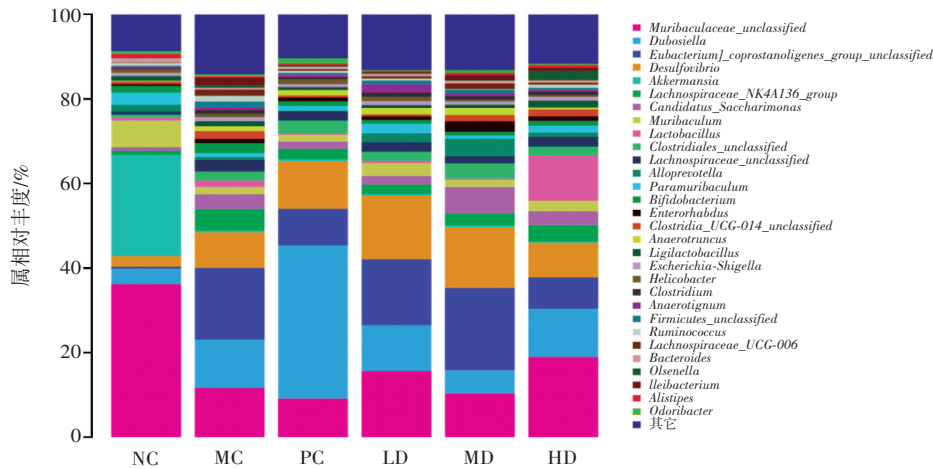


图7 各组小鼠属分类学水平下相对丰度

Fig.7 Relative abundance of genus level composition of gut microbiota of mice in each group

如表4与图7所示,各组小鼠肠道菌群在属水平上的主要组成部分为 *Muribaculaceae_unclassified*、杜氏杆菌属、产粪甾醇真杆菌属、脱硫弧菌属、阿克曼菌属、毛螺菌属、*Candidatus_Saccharimonas*、*Muribaculum*、乳杆菌属、*Clostridiales_unclassified*。与NC组相比,MC组 *Muribaculaceae_unclassified*、阿克曼菌属及 *Muribaculum* 相对丰度减少。杜氏杆菌属、产粪甾醇真杆菌属、脱硫弧菌属、毛螺菌属、*Candidatus_Saccharimonas*、乳杆菌属及 *Clostridiales_unclassified* 相对丰度增加。基于前述血脂与肝功能指标及病理结果可以看出安化黑茶3个剂量组中,HD组效果较好,故以HD组为主要比较对象。与MC组相比,HD组 *Muribaculaceae_unclassified*、*Muribaculum* 及乳杆菌属相对丰度增加,杜氏杆菌属、产粪甾醇真杆菌属、脱硫弧菌属、毛螺菌属及 *Candidatus_Saccharimonas* 相对丰度减少。与PC组相比,HD组 *Muribaculaceae_unclassified*、*Muribaculum* 及乳杆菌属相对丰度增加,杜氏杆菌属、产粪甾醇真杆菌属、脱硫弧菌属及 *Clostridiales_unclassified* 相对丰度减少。

3 讨论

NAFLD属于现代医学病名,中医根据其发病症状、部位及临床特点将其归属为“痞满”“肥气”“胁痛”等范畴^[12]。目前医家对NAFLD的认识尚未统一,在病因病机及治则治法上各有心得^[6, 13],但总的来说,其病机正虚不外肝脾肾功能失调,邪实不外痰湿热浊瘀内阻。安化黑茶为黑茶代表之一,中医认为黑茶陈久而芳香,特有冠突散囊菌的黄色金花,色黄入脾经,助脾和胃,芳化湿浊,消积化滞,减少膏浊在人体内的积聚,同时舒畅气机,使气血调和;其制后色黑入肾经,利湿以泄浊^[14]。人体脾气健运,气血调和,水湿痰饮得以运化,膏浊无以积聚,则NAFLD可治。

本研究成功建立了NAFLD小鼠模型,从小鼠体质量、血脂与肝功能指标及肝脏组织病理学分析证实了安化黑茶能够对NAFLD起到预防作用,并从肠-肝轴角度初步探讨安化黑茶防治NAFLD的作用机制。研究结果显示,与空白组小鼠相比,NAFLD小鼠的紧密连接蛋白Occludin和ZO-1表达下降,肠道菌群结构及丰度发生明显改变。表明NAFLD疾病发生过程中会伴有肠黏膜屏障功能障碍与肠道菌群失调。安化黑茶能够改善回肠病理损伤,增加紧密连接蛋白Occludin和ZO-1表达,维护肠黏膜屏障功能。肠道菌群结果显示Alpha多样性分析各组虽无显著差异,但从主成分分析可知,NAFLD模型组小鼠与空白组小鼠肠道菌群结构差异明显,而安化黑茶干预后的小鼠肠道菌群结构随剂量递增逐渐趋于空白组,表明安化黑茶具有恢复肠道菌群正常结构的功能。门水平上,NAFLD小鼠厚壁菌门相对丰度增加,拟杆菌门相对丰度减少,厚壁菌门与拟杆菌门的比值(F/B)升高;而安化黑茶可以增加拟杆菌门相对丰度,降低厚壁菌门相对丰度及F/B值。研究发现F/B值升高会导致机体对能量的摄取增强,而降低F/B值对治疗NAFLD起重要作用^[15]。在属水平上,NAFLD小鼠 *Muribaculaceae_unclassified*、阿克曼菌属相对丰度减少,脱硫弧菌属、毛螺菌属、乳杆菌属相对丰度增加。经安化黑茶干预后, *Muribaculaceae_unclassified* 及乳杆菌属相对丰度增加,脱硫弧菌属及毛螺菌属相对丰度减少。乳杆菌属是肠道内主要的益生菌类群,研究发现,乳杆菌可作用于FXR/FGF15通路抑制胆汁酸合成,减少肝损伤与纤维化^[16-17],但本研究NAFLD小鼠乳杆菌相对丰度增加,可能与机体代谢异常状态下的自我调节有关^[18]。*Muribaculaceae*与阿克曼菌属与丙酸水平关系密切,研究发现 *Muribaculaceae* 相对丰度与丙酸含量具有高度相关性^[19],而阿克曼菌属可产生丙酸改善高脂饮食诱发的

炎症与肥胖^[20]。脱硫弧菌属为潜在致病菌,其能提高肠道内硫化氢水平,破坏肠黏膜上皮细胞进而导致黏膜屏障损伤,引发炎症导致疾病进展^[21]。毛螺菌属能够促进 NAFLD 肝纤维化,研究发现其在 NASH 患者中的相对丰度高于非 NASH 患者^[22],并且毛螺菌属能够增加肠黏膜通透性,导致炎症肠病发生^[23]。综上,安化黑茶防治 NAFLD 可能与其升高有益菌及产 SCFAs 菌群相对丰度,降低潜在有害菌相对丰度,改善肠黏膜屏障功能相关。

4 结论

安化黑茶水提液能够降低 NAFLD 模型小鼠体质量、体质量增长量与血清血脂,改善肝功能,具有保护肠黏膜屏障功能,调节肠道菌群,恢复肠道微生态的作用,其可能通过调节肠-肝轴发挥对 NAFLD 的防治作用。

参考文献:

- [1] MANTOVANI A, DALBENI A. Treatments for NAFLD: State of art[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(5): 2350.
- [2] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84.
- [3] WANG Z Y, ZENG M M, WANG Z J, et al. Dietary polyphenols to combat nonalcoholic fatty liver disease via the gut-brain-liver axis: A review of possible mechanisms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3585-3600.
- [4] WANG S Z, YU Y J, ADELI K. Role of gut microbiota in neuroendocrine regulation of carbohydrate and lipid metabolism via the microbiota-gut-brain-liver axis[J]. Microorganisms, 2020, 8(4): 527.
- [5] 杨雷雷, 李昌平. 非酒精性脂肪性肝病的诊治进展[J]. 现代临床医学, 2020, 46(1): 73-76, 80.
YANG Leilei, LI Changping. Progress in diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Journal of Modern Clinical Medicine, 2020, 46(1): 73-76, 80.
- [6] 孙建光. 脂肪肝辨治思路探析[J]. 山东中医杂志, 2011, 30(8): 531-532.
SUN Jianguang. Discussion and analysis of mentality of differential treatment of fatty liver[J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 30(8): 531-532.
- [7] 赵睿, 徐星航, 徐凌川. 安化黑茶药性及其部分功效之中医理论解读[J]. 农业考古, 2014(2): 263-265.
ZHAO Rui, XU Xinghang, XU Lingchuan. Interpretation of the medicinal properties and some functions of Anhua black tea in TCM theory[J]. Agricultural Archaeology, 2014(2): 263-265.
- [8] 张文将. 安化黑茶防治脂类代谢障碍相关疾病的机理研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
ZHANG Wenjiang. Study on the mechanism of Anhua black tea in preventing and treating diseases related to lipid metabolism disorder[D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2019.
- [9] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
ZHAO Wei, SUN Guozhi. Conversion of medication dosage among different experimental animals[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010(5): 52-53.
- [10] 张文将, 刘圆月, 易健, 等. 安化黑茶减轻高脂诱导的 ApoE-/-小鼠非酒精性脂肪肝[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7): 1274-1280.
ZHANG Wenjiang, LIU Yuanyue, YI Jian, et al. Effects of Anhua
- dark tea on ApoE-/-mice with non-alcoholic fatty liver induced by high-fat diet[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2020, 36(7): 1274-1280.
- [11] 赵维良, 王治霞, 喇登海, 等. 血管生成抑制剂 ZM 306416 对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病小鼠的保护作用[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023, 15(2): 36-46.
ZHAO Weiliang, WANG Zhixia, LA Denghai, et al. Protective effects of angiogenesis inhibitor ZM 306416 on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in mice[J]. Chinese Journal of Liver Diseases (Electronic Version), 2023, 15(2): 36-46.
- [12] 许勇, 陶颖, 苟小军. 非酒精性脂肪肝中医药因病机探析[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2586-2589.
XU Yong, TAO Ying, GOU Xiaojun. Differentiation and analysis on TCM etiology and pathogenesis of non-alcoholic fatty liver[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2016, 34(11): 2586-2589.
- [13] 张杨, 吴伟东, 赵悦, 等. 从脾论治非酒精性脂肪肝的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(11): 203-206.
ZHANG Yang, WU Weidong, ZHAO Yue, et al. Research progress on treatment of non-alcoholic fatty liver from spleen[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 48(11): 203-206.
- [14] 丁然, 焦宏官, 曹峰. 从中医五色养理论认知茶的功效[J]. 中医学报, 2021, 36(7): 1443-1444.
DING Ran, JIAO Hongguan, CAO Feng. Understanding the efficacy of tea from the theory of five color for health maintenance in Chinese medicine[J]. Acta Chinese Medicine, 2021, 36(7): 1443-1444.
- [15] 周方, 欧阳建, 黄建安, 等. 茶多酚对肠道微生物的调节作用研究进展[J]. 茶叶科学, 2019, 39(6): 619-630.
ZHOU Fang, OUYANG Jian, HUANG Jianan, et al. Advances in research on the regulation of tea polyphenols and effects on intestinal flora[J]. Journal of Tea Science, 2019, 39(6): 619-630.
- [16] LIU Y H, CHEN K F, LI F Y, 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.
- [17] SANTOS A A, AFONSO M B, RAMIRO R S, et al. Host miRNA-21 promotes liver dysfunction by targeting small intestinal *Lactobacillus* in mice[J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1-18.
- [18] 严宝飞, 袁鹏, 刘圣金, 等. 黄芩汤对非酒精性脂肪肝大鼠肠道菌群的影响[J]. 中草药, 2022, 53(1): 162-175.
YAN Baofei, YUAN Peng, LIU Shengjin, et al. Effects of Huangqin Decoction on gut microbiota in rats with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(1): 162-175.
- [19] SMITH B J, MILLER R A, ERICSSON A C, et al. Changes in the gut microbiome and fermentation products concurrent with enhanced longevity in acarbose-treated mice[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 130.
- [20] SUNG M M, KIM T T, DENOUE E, et al. Improved glucose homeostasis in obese mice treated with resveratrol is associated with alterations in the gut microbiome[J]. Diabetes, 2017, 66(2): 418-425.
- [21] XU P F, HONG F, WANG J L, et al. Microbiome remodeling via the montmorillonite adsorption-excretion axis prevents obesity-related metabolic disorders[J]. EBioMedicine, 2017, 16: 251-261.
- [22] SHEN F, ZHENG R D, SUN X Q, et al. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2017, 16(4): 375-381.
- [23] PENG Y J, YAN Y M, WAN P, et al. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2019, 136: 96-108.