非酒精性脂肪肝与酒精性肝病大鼠肠道菌群比较研究

许文琦[1]，王　生[1]，黄逸安[1]，王　艳[1]，梅其炳[1,2]，刘　莉[1,2*]

（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437；
2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心，上海 200437）

摘要：目的 观察非酒精性脂肪肝与酒精性肝病模型大鼠肠道菌群结构变化。**方法** 以高脂饲料（HFD）和酒精液体饲料（LD）分别构建非酒精性脂肪肝和酒精性肝病模型。30 只雄性 Wistar 大鼠随机分成 3 组，每组 10 只，按喂养饲料分别分为正常组、HFD 组和 LD 组，喂养 6 周后解剖取肝脏，检测各组大鼠肝脏病理学改变；收集各组大鼠粪便，提取粪便脱氧核糖核酸进行 Illumina MiSeq 测序，检测肠道菌群变化。**结果** 肝脏苏木精 - 伊红染色结果显示，HFD 组及 LD 组大鼠肝脏细胞出现明显脂肪变性病理改变；油红 O 染色结果显示，HFD 组及 LD 组大鼠肝细胞内大量脂肪沉积。测序结果显示，与正常组相比，HFD 组和 LD 组大鼠菌群多样性明显下降，差异具有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。主成分分析结果显示，各组之间群落结构存在明显差异，在门水平上，LD 组硬壁菌门相对丰度水平明显高于 HFD 组（$P < 0.05$）；在属水平上，LD 组大肠埃希菌 - 志贺菌属、理研菌科 _RC9_gut_ 组相对丰度低于 HFD 组，而瘤胃球菌属 _1 的相对丰度高于 HFD 组（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。组间群落差异分析结果显示，HFD 组理研菌科、梭杆菌科、巴斯德氏菌科和气球菌科的相对丰度显著高于 LD 组，瘤胃球菌科 _NK4A214_ 组、理研菌科 _RC9_gut_ 组、另枝菌属、*Marvinbryantia*、梭杆菌属、帕匹杆菌属、巴斯德氏菌属、厌氧棍状菌属及格鲁卡比氏菌属等在 HFD 组中相对丰度较高，而瘤胃球菌属 _1、毛螺菌科 _NK4A136_ 组及拟普雷沃菌属在 LD 组中相对丰度较高。**结论** 非酒精性脂肪肝与酒精性肝病大鼠肠道菌群均处于紊乱状态，且两者存在一定差异。

关键词：非酒精性脂肪肝；酒精性肝病；肠道菌群；Illumina 测序

中图分类号：R575.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1672-9188（2018）01-0035-08

DOI：10.13683/j.wph.2018.01.008

Comparison of the gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease in rats

XU Wen-qi[1], WANG Sheng[1], HUANG Yi-an[1], WANG Yan[1], MEI Qi-bing[1,2], LIU Li[1,2*]

（*1. State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437;*
2. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437, China）

Abstract: ***Objective*** To compare the structural changes of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease（NAFLD）and alcoholic liver disease（ALD）in rats. ***Methods*** Thirty Wistar rats were randomized into three groups（10 rats each group）: normal group, high-fat diet（HFD）group, Lieber-DeCarli liquid diet（LD）group. The NAFLD and ALD rat models were established by feeding HFD and LD, respectively. After six weeks, the changes of liver histopathology were assessed in all groups. Their stools were collected and the composition of gut microbiota was determined by Illumina MiSeq sequencing. ***Results*** HE staining showed obvious hepatic pathological change and ORO staining showed obvious hepatic fat deposition in HFD group and LD group. The diversity of gut microbiota in HFD group and LD group was significantly

收稿日期：2017-08-31；**修回日期**：2017-11-29

作者简介：许文琦，硕士研究生，研究方向：天然药物调节肠道菌群预防治疗酒精性肝病。

通信作者：刘　莉，研究员，博士生导师，从事中药调节免疫及中药预防治疗消化系统疾病的研究。

基金项目：上海市青年科技杨帆计划项目（编号：17YF1419000）。

decreased compared to normal group（P<0.05 or P<0.01）. The PCA showed obvious difference in microbial community structure among three groups. At phylum level, the relative abundance of *Firmicutes*in in LD group was increased compared to HFD group（P<0.05）. At genus level, the relative abundance of *Escherichia-Shigella* and *Rikenellaceae_RC9_gut_group* was decreased while *Ruminococcus_1* was increased in LD group compared to HFD group（P<0.05 or P<0.01）. The LEfSe analysis showed that the *Rikenellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* and *Aerococcaceae*were were significantly enriched in HFD group compared to LD group. The *Ruminococcaceae_NK4A214_group*，*Rikenellaceae_RC9_gut_group*, *Alistipes*, *Marvinbryantia*, *Fusobacterium*, *Papillibacter*, *Pasteurella*, *Anaerotruncus* and *Globicatella* were the key phylotypes of HFD group while *Ruminococcus_1*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group* and *Alloprevotella* were the key phylotypes of LD group. ***Conclusion*** The gut microbiota dysbiosis is present both in NAFLD and ALD in rats, but their gut microbiota is still different significantly.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease; alcoholic liver disease; gut microbiota; Illumina sequencing

随着经济不断发展，我国脂肪肝发病率逐年增加，预计2020年将达到20.21%[1]。临床上将脂肪肝分为非酒精性脂肪肝（NAFLD）和酒精性肝病（ALD）。肥胖及其相关代谢综合征及酒精滥用分别是NAFLD与ALD的主要危险因素[2]。NAFLD与ALD具有相似的病理发展阶段，由单纯的脂肪肝发展为肝纤维化、肝硬化最终导致肝癌[3]。两者由于缺少特异性的临床表现及诊断指标，临床上主要通过是否有酒精摄入史结合生化指标及影像学检测结果加以区分[4]，这需要依靠丰富的临床经验，因此目前很难将两者明确的区别开。

近年来，大量研究证实肠道菌群在多种肝脏疾病如NAFLD、ALD、肝硬化、肝性脑病及肝细胞癌等的发病机制中发挥重要作用[5]。肠道菌群失调通过影响能量平衡、诱导慢性炎症等途径来促进肥胖的发生发展[6]，这是NAFLD发病的主要因素之一。此外，肠道菌群失调能影响胆碱代谢和内源性乙醇的生成从而加速NAFLD的进程[7]。慢性酒精摄入会引起肠道菌群紊乱，失衡的菌群又能影响酒精及其代谢产物的量，从而介导ALD的发生发展[8]。因此肠道菌群成为目前NAFLD与ALD诊断、分期及治疗研究的新热点，然而，NAFLD与ALD肠道菌群结构变化的比较研究并不多见，本研究通过高脂饲料和酒精液体饲料分别构建大鼠NAFLD及ALD模型，分析两种模型大鼠肠道菌群间的差异，以期为临床诊断提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 动物及饲料

雄性Wistar大鼠30只饲养于环境中无特定病原体级动物房，初始体质量160～180 g，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，生产许可证号：SCXK（沪）2013-0016；实验动物使用许可证号：SYXK（沪）2014-0018。饲料购自南通特洛菲饲料科技有限公司。

1.2 动物分组及模型的建立

30只Wistar大鼠随机分成3组，分别为正常组、高脂饲料（HFD）组、酒精液体饲料（LD）组，每组10只。正常组给予对照饲料（脂肪10%），HFD组给予高脂饲料（脂肪35%），LD组给予酒精液体饲料（脂肪35%，酒精36%）。喂养方法按照饲料公司提供的方法[9]。每天称饲料记录摄食量，正常组及HFD组大鼠每天给予的饲料量为LD组前一天的摄食量，LD组大鼠给予的饲料不限量但要有剩余，连续喂养6周。

1.3 标本收集及指标检测

喂养6周后（处死前1 d）收集各组大鼠粪便，于-80 ℃保存用于肠道菌群测序分析。禁食12 h后麻醉处死大鼠，解剖取新鲜肝脏固定，通过苏木精-伊红（HE）染色及油红O染色观察肝脏病理情况。

1.4 肠道菌群Illumina MiSeq测序分析

按照TIANamp Stool DNA Kit说明书提取肠道菌群基因组脱氧核糖核酸（DNA）。按指定测序区

域合成带有 barcode 的特异引物，按照 TransStart FastPfu DNA Polymerase 说明书进行聚合酶链反应（PCR）扩增试验。采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒（Axygen 公司，生产批号：AP-GX-506）回收 PCR 产物，2% 琼脂糖凝胶电泳进行初步定量。PCR 产物用 QuantiFluor-ST 蓝色荧光定量系统（Promega 公司）进行荧光检测定量。构建 Illumina 平台文库，通过 Illumina 平台测序获知模板 DNA 片段的序列，将序列相似性大于 97% 的同源序列聚集成一个操作分类单元（OTU）进行生物信息学分析。根据各组大鼠菌群样本在不同测序深度下 Shannon-Wiener 多样性指数的结果构建曲线来反映各样本中菌群的 α 多样性，采用 Shannon 指数进行菌群多样性分析。对各组大鼠肠道菌群 OTU 的相对丰度进行主成分分析（PCA），研究群落结构的差异。采用组间群落差异分析（LEfSe），通过线性判别分析（LDA）来确定各组大鼠菌群样本之间在属或者更高分类学水平相对丰度有显著差异的类群。

1.5　统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，肠道菌群比较采用 Mann-Whitney U 检验分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

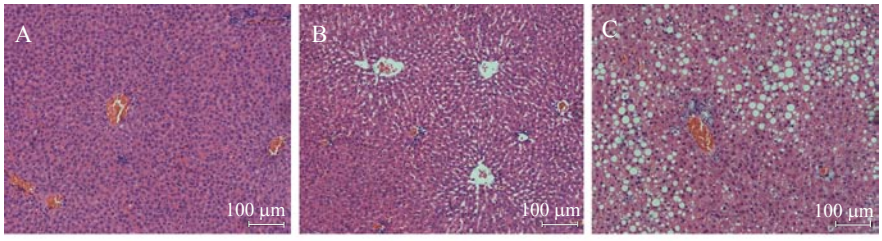
2.1　肝脏病理学改变

肝脏 HE 染色结果（图 1）显示，正常组大鼠肝脏细胞形态及肝小叶结构正常，无脂肪空泡和炎性细胞浸润；HFD 组存在小泡性脂肪变性，少量细胞坏死及炎性细胞浸润；LD 组大鼠肝细胞中出现脂肪变性的大空泡及炎性细胞浸润。肝脏油红 O 染色结果（图 2）显示，与正常组相比，HFD 组及 LD 组大鼠肝脏有大量脂肪沉积。以上结果提示 NAFLD 和 ALD 模型构建成功。

2.2　肠道菌群 Illumina MiSeq 测序结果

2.2.1　α 多样性分析

各组大鼠肠道菌群的 Shannon-Wiener 多样性指

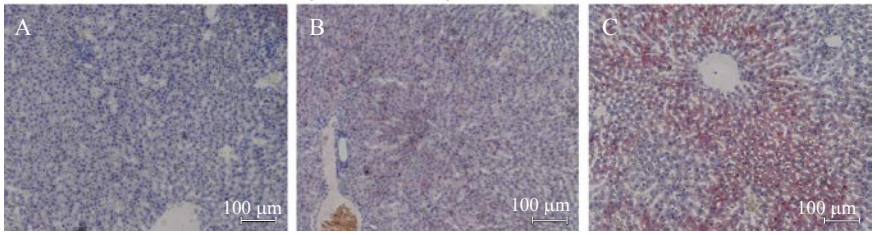


A：正常组；B：HFD 组；C：LD 组

A: normal group; B: HFD group; C: LD group

图 1　大鼠肝脏 HE 染色（200×）

Figure 1　HE staining of liver（200×）



A：正常组；B：HFD 组；C：LD 组

A: normal group; B: HFD group; C: LD group

图 2　大鼠肝脏油红染色（200×）

Figure 2　Oil red O staining of liver（200×）

数曲线见图 3。多样性检测结果显示，HFD 组和 LD 组 Shannon 指数均显著低于正常组，组间差异具有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），提示 HFD 组和 LD 组大鼠菌群多样性减少（表 1）。

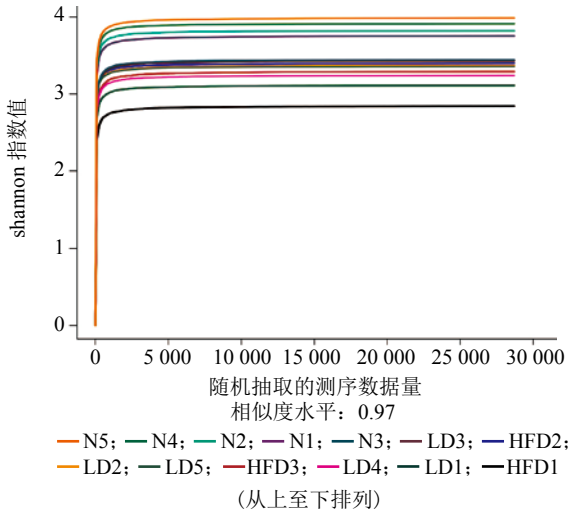


图 3　各组大鼠肠道菌群 Shannon-Wiener 多样性指数曲线

Figure 3　Shannon-Wiener index curves of gut microbiota

表 1　各组大鼠肠道菌群 Shannon 指数（$\bar{x}\pm s$）

Table 1　Shannon index of gut microbiota（$\bar{x}\pm s$）

组别	Shannon指数
正常组（n=5）	3.81±0.19
HFD 组（n=3）	3.19±0.25*
LD 组（n=5）	3.32±0.12**

与正常组比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$

vs normal group, *P<0.05, **P<0.01

2.2.2　主成分分析

基于能够最大反映离散程度的两个主成分（方差贡献率分别为 42.8% 和 21.39%），分析显示，LD 组菌群结构与正常组和 HFD 组在 PC2 轴上有很大差异，正常组与 HFD 组菌群结构在 PC1 轴上存在一定差异，见图 4。

2.2.3　群落结构分析

在门水平和属水平对各组大鼠肠道菌群组成分析结果显示，给大鼠饲喂不同饲料对肠道菌群结构组成有很大影响。各组大鼠肠道菌群在门水平的相对丰度结果显示，硬壁菌门、变形菌门和拟杆菌门是菌群中最主要的三种门，见图 5。与正常组相比，HFD 组大鼠肠道菌群中硬壁菌门相对丰度显著降低，变形菌门的相对丰度明显增加；LD 组放线菌门的相对丰度明显降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；此外，LD 组硬壁菌门的相对丰度水平明显高于 HFD 组（$P < 0.05$），而拟杆菌门的相对丰度各组间均没有差异，见表 2。

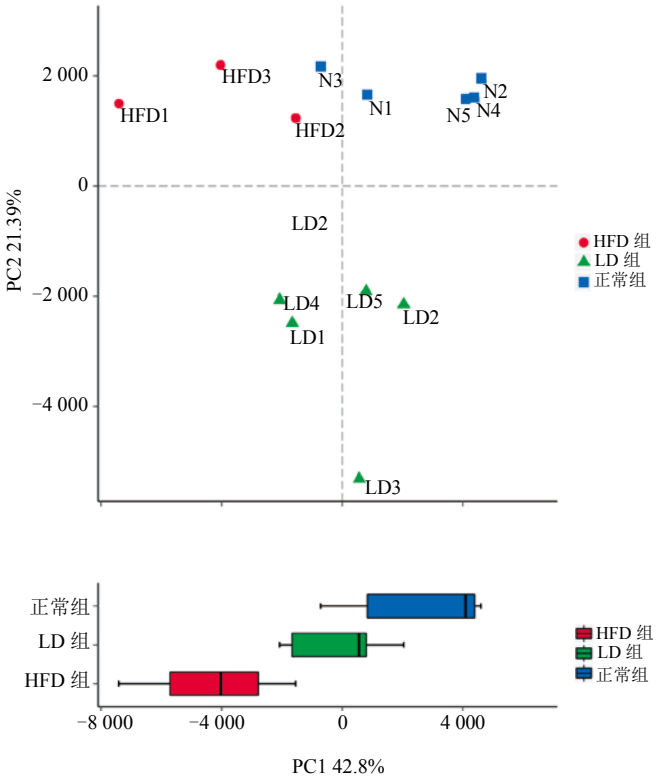


图 4　各组大鼠肠道菌群主成分分析

Figure 4　PCA of gut microbiota

表 2　各组大鼠肠道菌群门水平相对丰度（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

Table 2 Relative abundance of gut microbiota at phylum level（$\bar{x}\pm s$, unit: %）

组别	硬壁菌门	变形菌门	拟杆菌门	放线菌门
正常组（n=5）	69.43±4.45	18.21±7.22	9.63±4.34	2.52±1.33
HFD 组（n=3）	45.42±7.72**	41.14±9.16*	11.00±2.72	1.72±1.18
LD 组（n=5）	58.90±7.41#	25.66±8.95	14.56±4.17	0.64±0.42*

与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与HFD 组比较，#P<0.05

vs normal group, *P<0.05, **P<0.01; *vs* HFD group, #P<0.05

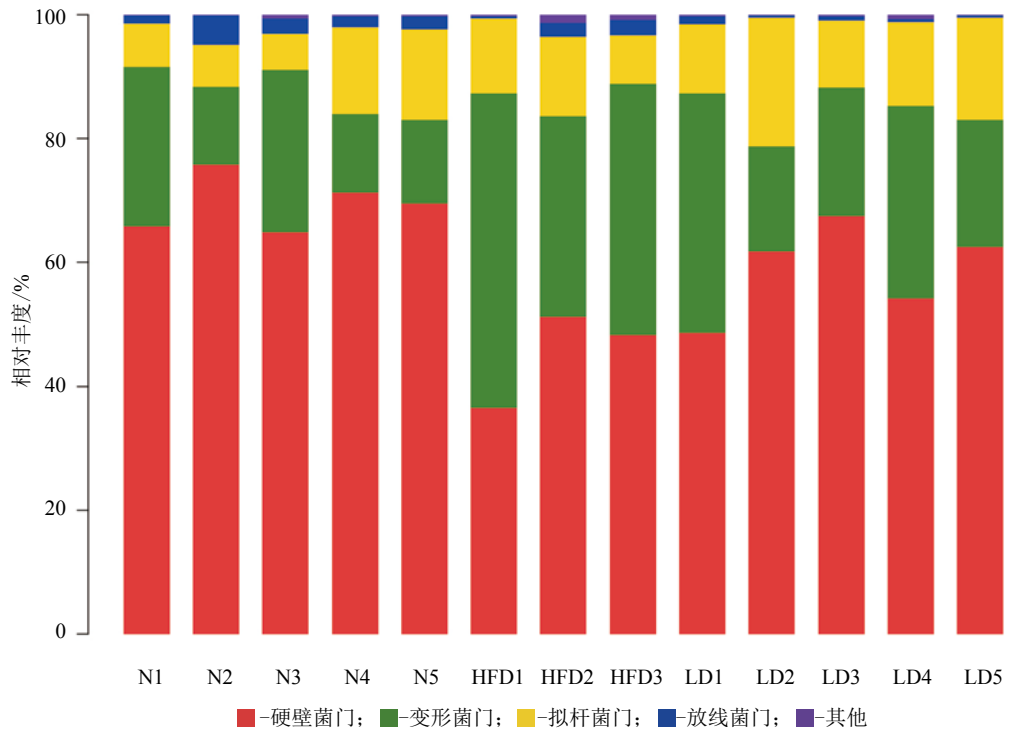


图 5　各组大鼠肠道菌群门水平组成及相对丰度

Figure 5　The composition and relative abundance of gut microbiota at phylum level

各组大鼠肠道菌群在属水平上的组成及相对丰度见图 6，对相对丰度超过 1% 的属进行统计分析，结果显示，与正常组相比，HFD 组中大肠埃希菌 - 志贺菌属的相对丰度明显增加，LD 组中瘤胃球菌属 _1、肠球菌属的相对丰度明显增加，考拉杆菌属、布劳特氏菌属、理研菌科 _RC9_gut_ 组、*Marvinbryantia* 的相对丰度明显降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。与 HFD 组相比，LD 组大肠埃希菌 - 志贺菌属、理研菌科 _RC9_gut_ 组的相对丰度明显降低，而瘤胃球菌属 _1 的相对丰度明显增加（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），见表 3。

表 3　各组大鼠肠道菌群属（相对丰度＞ 1%）水平相对丰度（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

Table 3　Relative abundance of gut microbiota at genus (relative abundance >1%) level ($\bar{x}\pm s$, unit: %)

肠道菌群属	正常组（n=5）	HFD 组（n=3）	LD 组（n=5）
大肠埃希菌-志贺菌属	13.94±7.38	37.02±10.22**	21.08±5.92#
瘤胃球菌属_1	0.48±0.39	0.15±0.16	11.34±7.67*#
肠球菌属	0.79±0.57	1.06±0.37	8.05±5.65*
考拉杆菌属	5.05±3.55	4.45±3.72	0.53±0.88*
布劳特氏菌属	6.13±4.39	1.72±0.79	0.93±1.29*
理研菌科_RC9_gut_组	2.00±0.84	2.00±0.41	0.21±0.14**##
Marvinbryantia	2.33±1.28	1.03±0.43	0.36±0.06*

与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与HFD 组比较，#P<0.05，#P<0.01

vs normal group, *P<0.05, **P<0.01; *vs* HFD group, #P<0.05, #P<0.01

2.2.4　组间差异显著的物种分析

LEfSe 分析结果显示，对正常组和 HFD 组（图 7A）、正常组和 LD 组（图 7B）以及 HFD 组和 LD 组（图 7C）间差异起重要作用的微生物类群分别有 33、70 及 37 个。在正常组和 HFD 组之间起重要作用的微生物类群的 LDA 值均＞ 3.5，其中在正常组和 HFD 组之间 LDA 值最大的分别是硬壁菌门和肠杆菌科。在正常组和 LD 组之间 LDA 值最大的类群分别是毛螺菌科和瘤胃球菌属 _1。HFD 组和 LD 组之间有 4 个科的 LDA 值＞ 3，分别为理研菌科、梭杆菌科、巴斯德氏菌科和气球菌科，它们在 HFD 组中相对丰度较高。HFD 组和 LD 组之间有 12 个属的 LDA 值＞ 3，瘤胃球菌科 _NK4A214_ 组、理研菌科

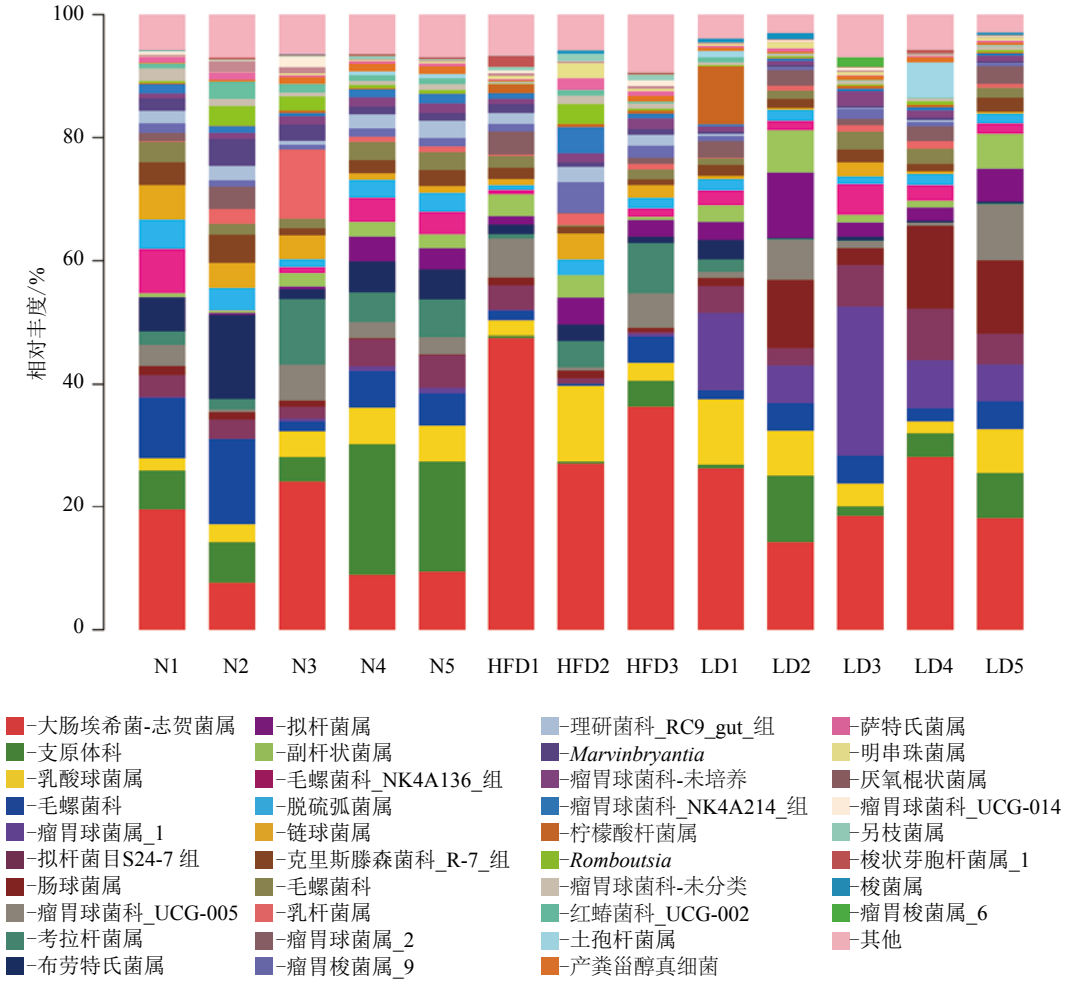


图 6　各组大鼠肠道菌群属水平组成及相对丰度

Figure 6　The composition and relative abundance of gut microbiota at genus level

_RC9_gut_ 组、另枝菌属、*Marvinbryantia*、梭杆菌属、帕匹杆菌属、巴斯德氏菌属、厌氧棍状菌属、格鲁卡比氏菌属在 HFD 组中相对丰度较高；瘤胃球菌属_1、毛螺菌科 _NK4A136_ 组和拟普雷沃菌属在 LD 组中相对丰度较高。

3　讨论

近年来随着生活水平的不断提高，高脂、高糖的饮食结构及酒精消耗量逐年增加，我国 NAFLD 及 ALD 的发病率不断上升。肝组织活检是临床急、慢性肝病诊断的金标准[10]，但其创伤性大，并不能被大多数患者接受。影像学检验是目前临床常用的诊断方法，但检查结果具有一定的主观性[11-12]，因此临床诊断脂肪肝仍需发展特异性和灵敏度更高的方法。

肠道菌群在脂肪肝发病机制和治疗中的作用日益凸显，不少研究证实 NAFLD 与 ALD 患者的肠道菌群之间存在差异。由于菌群门水平的结果差异较大，因此可能较低分类学水平的差异更有研究意义。Zhu 等[13] 研究发现非酒精性脂肪肝炎（NASH）患者体内菌群中产酒精的埃希氏菌属水平升高，并且患者血中酒精浓度也显著增加，提示肠道中产酒精的细菌可能会破坏肠道屏障功能，影响肝脏氧化应激，引起肝脏炎症从而引起 NASH。有研究发现，与正常儿童相比，NASH 儿童菌群中硬壁菌门、毛螺菌科及瘤胃球菌科的比例减少，布劳特氏菌属和普氏

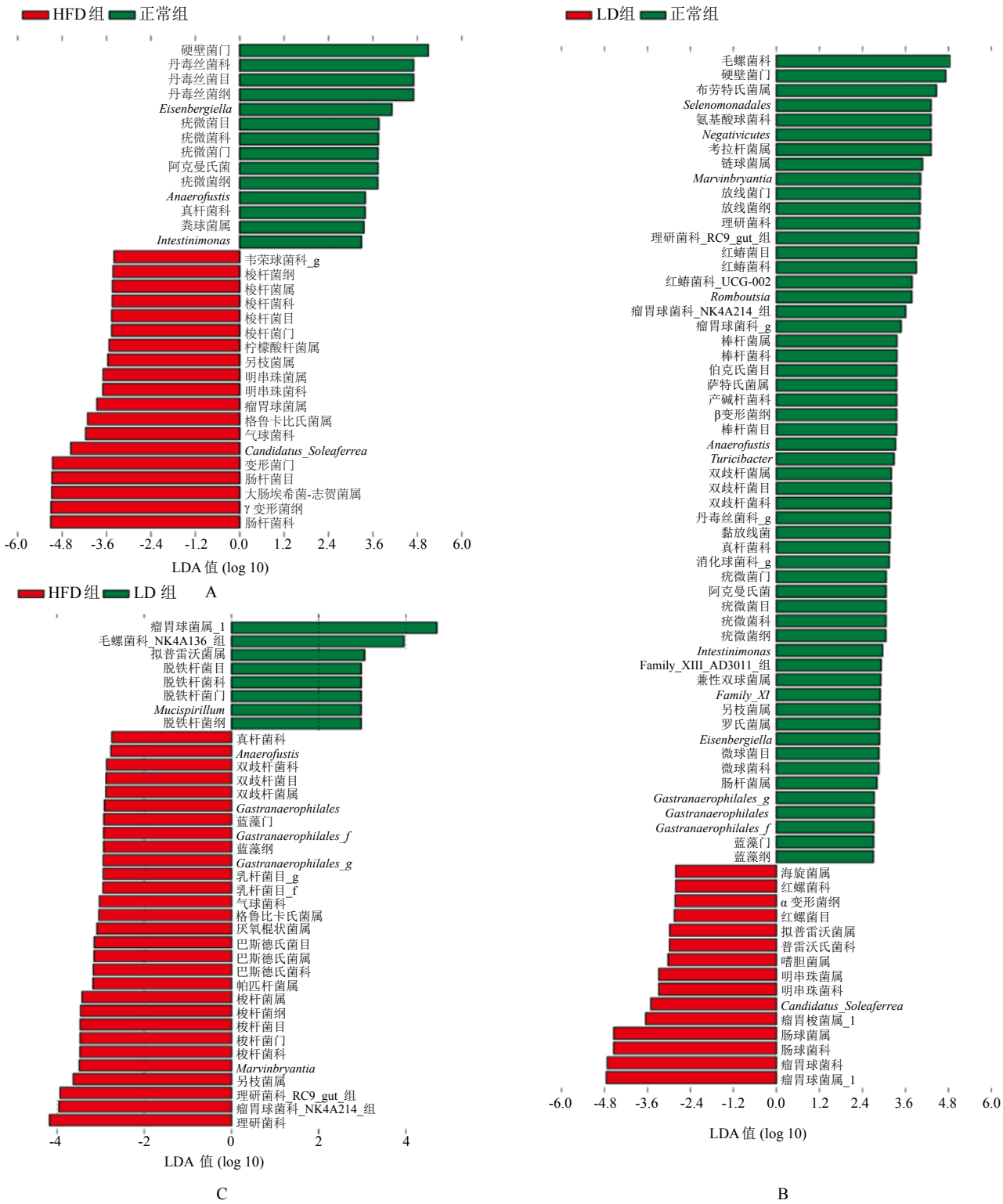


图 7　各组大鼠肠道菌群 LEfSe 分析

Figure 7　LEfSe analysis of gut microbiota

栖粪杆菌明显减少[14]。Yan等[15]对ALD模型小鼠肠道菌群进行焦磷酸测序发现乳球菌属、小球菌属、乳杆菌属及明串珠菌属的量明显降低。

本研究成功构建大鼠NAFLD（HFD组）与ALD（LD组）模型，采用Illumina MiSeq测序技术对各组大鼠肠道菌群进行测序。结果，正常组、HFD组及LD组符合肠道菌群分析标准的大鼠分别为5、3、5只。肠道菌群分析采用Mann-Whitney U检验，这是一种独立样本非参数检验方法，因本研究结果不满足*t*检验的条件（如正态分布和方差齐性），采用该方法进行统计分析。结果显示，正常组肠道菌群多样性明显高于HFD组与LD组，并且三组之间存在明显的群落结构差异。属水平的群落结构分析结果显示，大肠埃希菌 - 志贺菌属、理研菌科_RC9_gut_组以及瘤胃球菌属_1的相对丰度在HFD组与LD组中存在显著差异。LEfSe分析结果显示，瘤胃球菌属_1、瘤胃球菌科_NK4A214_组、毛螺菌科_NK4A136_组及理研菌科_RC9_gut_组是引起HFD组与LD组肠道菌群差异最主要的菌属。

由于大鼠菌群组成与人体存在一定差异，而NAFLD与ALD的诊断方法特异性有待加强并且治疗药物又有所不同，为了能够进一步给临床诊断NAFLD与ALD提供借鉴，需要采集临床NAFLD与ALD患者粪便进行测序分析比较，从而确定这两种患者肠道菌群中具有显著差异的特征性菌种，进而能通过肠道菌群来辅助区分这两种脂肪肝。

4 结论

综上所述，NAFLD与ALD模型大鼠肠道菌群组成及比例具有很大差异性。在门水平上，ALD大鼠肠道菌群中硬壁菌门的相对丰度水平明显高于NAFLD大鼠。在属水平上，与NAFLD大鼠相比，ALD大鼠肠道菌群中大肠埃希菌 - 志贺菌属、理研菌科_RC9_gut_组的相对丰度明显降低，而瘤胃球菌属_1的相对丰度明显升高。

参考文献：

[1] Zhu JZ, Zhou QY, Wang YM, *et al*. Prevalence of fatty liver disease and the economy in China: a systematic review[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(18): 5695-5706.

[2] Bluemel S, Williams B, Knight R, *et al*. Precision medicine in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease via modulating the gut microbiota[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 311(6): G1018-G1036.

[3] Rowell RJ, Anstee QM. An overview of the genetics, mechanisms and management of NAFLD and ALD [J]. Clin Med (Lond), 2015, 6(Suppl 6): S77-S82.

[4] Toshikuni N, Tsutsumi M, Arisawa T. Clinical differences between alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(26): 8393-8406.

[5] Minemura M, Shimizu Y. Gut microbiota and liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(6): 1691-1702.

[6] Kobyliak N, Virchenko O, Falalyeyeva T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity[J]. Nutr J, 2015, 15(1): 1-12.

[7] 周达, 范建高. 肠道菌群与非酒精性脂肪性肝病[J]. 上海医药, 2016, 37(19): 13-16.

[8] 臧月, 王生, 刘楠, 等. 肠道菌群失调介导酒精性肝病发生发展的机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 451-455.

[9] Meng W, Zhang XJ, Feng K, *et al*. Dietary α-linolenic acid-rich flaxseed oil prevents against alcoholic hepatic steatosis via ameliorating lipid homeostasis at adipose tissue-liver axis in mice[J]. Sci Rep, 2016, 6(15): 26826-26826.

[10] 何学学, 孙昱, 屈昊, 等. 肝脏活检的临床应用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(15): 3882-3885.

[11] 王泽和, 杨焰, 黄密伶, 等. 影像技术在诊断非酒精性脂肪性肝病中的应用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(3): 197-200.

[12] 厉有名, 范建高, 王炳元, 等. 酒精性肝病诊疗指南(2010年1月修订)[J]. 现代医药卫生, 2011, 49(6): 617-621.

[13] Zhu L, Baker SS, Gill C, *et al*. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 601-609.

[14] Betrapally NS, Gillevet PM, Bajaj JS. Changes in the intestinal microbiome and alcoholic- and non-alcoholic liver diseases-causes or effects?[J]. Gastroenterology, 2016, 150(8): 1745-1755.

[15] Yan AW, Fouts DE, Brandl J, *et al*. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease[J]. Hepatology, 2011, 53(1): 96-105.

（责任编辑：赵绪韬）