长双歧杆菌 CCFM1077 缓解小鼠肝内胆汁淤积症的作用机制

柳雅茹， 于雷雷， 张程程， 张青松， 田丰伟， 翟齐啸*
（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要： 肝内胆汁淤积症是一种胆汁分泌及排泄异常引起的病理状态，对人体健康有不利影响。使用 α-萘异硫氰酸酯（ANIT）构建肝内胆汁淤积小鼠模型，探究长双歧杆菌 CCFM1077（*Bifidobacterium longum* CCFM1077）对该症状的缓解作用。结果表明，*B. longum* CCFM1077 可显著改善 ANIT 诱导的小鼠肝脏组织损伤，降低血清中谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）、碱性磷酸酶（ALP）等主要肝功能相关酶水平以及胆汁酸（BAs）浓度。此外，*B. longum* CCFM1077 可能通过激活肠-肝轴 FXR-FGF-15 信号通路来上调 *fxr* 基因的表达，进而抑制 BAs 合成基因 *cyp7a1* 的表达。该菌株可显著提高具有高胆盐水解酶活性的乳杆菌属、双歧杆菌属等肠道共生菌的相对丰度，降低小鼠肝脏中结合态 BAs（T-β-MCA、TCDCA、TUDCA）水平，升高游离态 BAs（CDCA、CA、DCA、UDCA）水平，进而促进 BAs 排出体外。*B. longum* CCFM1077 可降低小鼠肠道中志贺氏埃希氏菌属的相对丰度，升高 *Ruminococcaceae*_UCG_014 菌属的相对丰度。这些结果表明 *B. longum* CCFM1077 能够通过抑制 BAs 的合成代谢来缓解肝内胆汁淤积，这与菌株调控小鼠肠道菌群结构有关。

关键词： 益生菌；肝内胆汁淤积；长双歧杆菌；胆汁酸；肠道菌群
中图分类号：R 151.3　**文章编号：**1673-1689(2024)04-0062-10　**DOI：**10.12441/spyswjs.20231220002

Mechanism of Action of *Bifidobacterium longum* CCFM1077 in Alleviating Intrahepatic Cholestasis in Mice

LIU Yaru, *YU Leilei*, *ZHANG Chengcheng*, *ZHANG Qingsong*, *TIAN Fengwei*, *ZHAI Qixiao**
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Intrahepatic cholestasis is a pathological condition caused by abnormal bile secretion and excretion, which has a adverse impact on human health. A typical model of intrahepatic cholestasis induced by *α*-naphthylisothiocyanate (ANIT) was constructed to investigate the alleviating effect of *Bifidobacterium longum* CCFM1077 on intrahepatic cholestasis in mice. The results showed that *B. longum* CCFM1077 could ameliorate liver histological damage induced by ANIT, reducing the levels of major liver function-related enzymes in serum such as aspartate aminotransferase (AST), alanine

收稿日期： 2023-12-20　**修回日期：** 2024-01-22
基金项目： 国家“十四五”重点研发计划项目（2022YFD2100704）。
* **通信作者：** 翟齐啸（1987—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事益生菌理论与技术、肠道微生物功能挖掘及肠道菌群与功能食品研究。E-mail：zhaiqixiao@jiangnan.edu.cn

transaminase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP), as well as the levels of bile acids (BAs). Furthermore, *B. longum* CCFM1077 could significantly upregulate the expression of *fxr* gene by activating the enterohepatic axis FXR-FGF-15 signaling, thereby inhibiting the expression of *cyp7a1*, a gene involved in the synthesis of BAs. This strain significantly increased the abundance of gut commensals, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, with high bile salt hydrolase activity, decreased the levels of bound BAs (T-*β*-MCA, TCDCA, and TUDCA) in the liver of mice, and increased the levels of free BAs (CDCA, CA, DCA, and UDCA), thus promoting BAs excretion. *B. longum* CCFM1077 also reduced the relative abundance of *Escherichia_Shigell*a and upregulated the relative abundance of *Ruminococcaceae*_UCG_014 in the intestine of mice. These results indicate that intervention with *B. longum* CCFM1077 can inhibit the anabolism of BAs to alleviate intrahepatic cholestasis, which may be related to the regulation of the strain on the gut microbiota structure of mice.

Keywords: probiotics, intrahepatic cholestasis, *Bifidobacterium longum*, bile acids, gut microbiota

胆汁淤积症是一种由于胆汁合成、分泌和排泄障碍，导致胆汁无法进行正常肠肝循环的病理状态。当胆汁的形成或排泄受到影响时,可能会出现不同的后果。一种后果是胆汁的积聚超过了正常肝细胞的极限,导致肝实质细胞损伤、胆道的毒性损伤以及随后的胆汁流入或流出受阻[1]。胆汁淤积症表现为患者感到乏力,皮肤或黏膜出现瘙痒,且呈现黄疸症状，在血液检测中 ALP 和 γ–谷氨酰转肽酶水平会升高[2]。引起肝内胆汁淤积的因素很多,包括胆道梗阻(如胆总管结石)、胆管炎、药物性胆汁淤积、酒精性肝炎、遗传性疾病等[3-4]。在众多因素中,BAs 的肝脏蓄积是胆汁淤积症发病机制的核心,肝脏中过量的 BAs 可引起肝纤维化和肝硬化,甚至肝癌的发生。在胆汁淤积阶段,抑制 BAs 合成是防止肝脏中 BAs 蓄积和细胞中毒的保护机制[5]。

迄今为止，很少有治疗胆汁淤积症的有效方法,只有两种药物被美国食品药品监督管理局授权用于治疗这种疾病。第一种是熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid,UDCA)，是治疗胆汁淤积症的首选药物。然而,大约 40%的患者对 UDCA 没有反应。另一种药物是奥贝胆酸 (obeticholic acid, OCA)，用于对 UDCA 无反应或不耐受的患者,然而,只有 50%的患者有反应[6-7]。那些对 UDCA 和/或 OCA 药物没有反应的人有发展为胆汁性肝硬化、终末期肝病甚至面临死亡的危险[8]。肠道微生物对宿主健康的重要作用在过去的十年中已被确定。肠道微生物充当肠道和其他组织之间的桥梁,接收和释放信号到身体的各个部位,影响宿主营养物质的消化吸收、能量代谢等基本功能[9]。众所周知,微生物群调控了许多与宿主健康和疾病相关的生化活动。一些研究[10-12]表明,胆汁淤积症的发病与肠道微生物群的生态结构失衡密不可分。因此,肝内胆汁淤积不仅会导致血液中胆红素和 BAs 的增加,还可能影响肠道微生物的组成、数量和功能。而肠道微生物的改变会反过来影响肝脏,通过调节 BAs 的合成转运蛋白来调控 BAs 的产生。

益生菌是一种对人体有益的微生物,在很多疾病的治疗中发挥着有效作用,其对胆汁淤积的缓解作用已有报道[13]。长双歧杆菌作为被研究最多的益生菌之一,具有多种健康促进作用,包括改善肥胖、高胆固醇血症、过敏、结肠炎等。在该研究中,作者采用 ANIT 构建肝内胆汁淤积小鼠模型,检测长双歧杆菌 CCFM1077(*Bifidobacterium longum* CCFM1077)对小鼠 BAs 浓度、BAs 合成转运相关基因的表达和肠道微生物群落结构的影响，探究 *B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积症的缓解效果,为 *B. longum* CCFM1077 在治疗胆汁淤积症中的临床应用提供证据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及动物

B. longum CCFM1077:江南大学食品生物技术中心菌种库提供。C57BL/6J 小鼠,SPF 级,6 周龄雄性:江苏集萃药康生物科技股份有限公司。实验在

SPF 级屏障环境中开展，江南大学实验伦理委员会已审核通过该方案，伦理编号：N.No20220615c0800801[216]。

1.2 材料与设备

1.2.1 材料与试剂 氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、硫酸钠、无水葡萄糖、牛肉膏、胰蛋白胨、酵母提取物、七水合硫酸镁、柠檬酸氢二铵、氯化钙、三水合磷酸氢二钾、吐温 80、*L*-半胱氨酸、无水硫酸钠、无水乙酸钠、琼脂粉、盐酸、硫酸、甘油、无水乙醇、DEPC 处理水、橄榄油：国药集团化学试剂有限公司；ANIT：上海麦克林公司；OCA：上海阿拉丁公司；RNA 提取及逆转录试剂盒、SYBR Green PCR 预混液：南京诺唯赞生物公司；进样瓶、进样瓶盖、衬管：美国 Thermo fisher 公司；RT-qPCR 引物：上海生工公司；粪便 DNA 提取试剂盒：美国 MP 公司；DNA 胶回收试剂盒：倍沃医学科技有限公司；总 BAs 测定试剂盒、直接胆红素测定试剂盒：南京建成研究所。

1.2.2 仪器与设备 EL204 分析电子天平、pH 计：梅特勒-托利多公司；GRP-9080 恒温恒湿培养箱、DK-8D 电热恒温水浴锅：上海森信公司；TOMY SX-700 高压灭菌锅：日本 TOMY 公司；Centrifuge 5424 R 小型台式高速离心机：德国 Eppendorf 公司；Whitley DG250 厌氧工作站：英国 DWS 公司；SCIENTZ-48 高通量组织研磨器：宁波新芝生物公司；SPD131DDA-230 旋转蒸发仪、MULTISCAN GO 全波长多功能自动酶标仪、LC-MS/MS 高效液相色谱-质谱联用仪：美国 Thermo fisher 公司；HG2019-HF-105 台式通风橱：上海瀚广公司；CFX384 荧光定量聚合酶链式反应仪、Bio-Rad S1000 PCR 仪：美国 Bio-Rad 公司；MiSeq 第二代高通量测序仪：美国 Illumina 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株培养及菌悬液制备 用无菌接种环挑取保菌管中的 *B. longum* CCFM1077，在含有质量分数 0.05%半胱氨酸的 MRS 平板上划线，倒置于37 ℃培养箱中 48 h。挑取单菌落于 MRS 液体培养基（含有质量分数 0.05%半胱氨酸）中，37 ℃培养 24 h 后通过平板倾注计数法计算 *B. longum* CCFM1077 浓度。以体积分数 2%接种在含有质量分数 0.05%半胱氨酸的 MRS 液体培养基中扩培，获得菌液。在 4 ℃条件下以 6 000 *g* 离心 5 min，弃去上清液收集菌体，并用质量分数 0.9%的生理盐水洗涤菌体两次，调整菌液浓度为 5×10^9 CFU/mL 用于后续实验。

1.3.2 动物实验及分组 雄性 C57BL6/J 小鼠（*n*=40），6~8 周龄，在江南大学动物实验中心饲养，饲养环境（25±2）℃，光照和黑暗期各 12 h。小鼠自由饮食，观察一周时间。然后 40 只小鼠被随机分成 4 组，每组 10 只。分别为：空白对照（NC）组、ANIT 造模（ANIT）组、灌胃 10 mg/kg 阳性药物 OCA[14]组、CCFM1077 组。所有组在实验期间每天给药一次，持续 14 d。第 12 d 时，除了 NC 组给予橄榄油外，其他组均单次灌胃 ANIT（75 mg/kg，溶于橄榄油中）[15]。第 14 d 各组灌胃相应药物后，禁食 4 h，对小鼠进行异氟烷麻醉，眼球取血并脱臼处死取样。

1.3.3 肝脏组织切片及病理观察 用质量分数 4%的多聚甲醛固定液对肝脏组织固定 24 h，然后参考 Liu 等的方法[16]制备小鼠肝脏切片并进行 HE 染色，最后将制作好的切片用 Pannoramic MI1I 数字切片仪扫描，观察肝脏组织病理损伤情况。

1.3.4 血清生化指标测定 取 70 μL 血清用生理盐水稀释 3 倍后，用生化分析仪测定血清中的 AST、ALT、ALP 浓度。血清中总胆汁酸（TBAs）和直接胆红素（direct bilirubin，DBIL）的测定参照对应试剂盒的相关说明。

1.3.5 RT-qPCR 检测 使用 TRIZOL 试剂提取小鼠肝脏及回肠组织的 RNA，并使用 RNA 反转录试剂盒（R302-01，1 000 U）反转录成 cDNA 作为后续 RT-qPCR 实验中的模板。通过 RT-qPCR 分别测定肝脏组织中法尼醇 X 受体（farnesoid X receptor，FXR）、胆固醇 7α-羟化酶（cholesterol 7α-hydroxylase，CYP7A1）、胆盐输出泵（bile salt export pump，BSEP）、Na^+-牛磺胆酸盐共转运多肽（sodium/taurocholate cotransporting polypeptide，NTCP）、多药耐药相关蛋白 2（multidrug resistance-associated protein 2，MRP2）、有机阴离子转运多肽（organic anion transporting polypeptides，OATP）、小鼠回肠 FXR、成纤维细胞生长因子 15（fibroblast growth factor 15，FGF15）、顶端膜钠依赖性胆汁酸转运蛋白（apical sodium-dependent bile acid transporter，ASBT）等蛋白质的基因表达水平，*gadph* 用作内考基因，通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目的基因进行定量分析，表 1 列出了相关引物的序列。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primers sequences used for RT-qPCR

基因	序列(5′-3′)
gadph	F:GCAAAGTGGAGATTGTTGCCAT
	R:CCTTGACTGTGCCGTTGAATTT
fxr	F:GCTTGATGTGCTACAAAAGCT
	R:CGTGGTGATGGTTGAATGTCC
cyp7a1	F:GGGATTGCTGTGGTAGTGAGC
	R:GGTTATGGAATCAACCCGTTGT
bsep	F:ATGTGACCTTCCATTATCCTTCTCG
	R:GCTGTAGTGCTGTGCTCTTCC
ntcp	F:TCATCTGCGGCTGCTCTCC
	R:TGGTCATCACAATGCTGAGGTTC
mrp2	F:TCTGTGAGTGCAAGAGACAGGT
	R:TCCAGGACCAAGAGATTTGC
oatp	F:GGGAACATGCTTCGTGGGATA
	R:GCAGTTATGCGGACACTTCTC
fgf15	F:GATTGCCATCAAGGACGTCAG
	R:TCAGCCCGTATATCTTGCCG
asbt	F:ACCACTTGCTCCACACTGCTT
	R:CGTTCCTGAGTCAACCCACAT

1.3.6 BAs 浓度测定 采用高效液相色谱-质谱联用仪测定目标 BAs 的浓度[17]。称取肝脏组织约 80 mg,置于 1.5 mL 离心管中,加 1 mL 甲醇和 3 颗破碎珠研磨成匀浆后,室温下静置 1 h。然后在 4 ℃条件下,13 400 *g* 离心 15 min,收集上清液,沉淀中加入 1 mL 甲醇,通过振荡使其充分混匀,静置 15 min,再次离心,取上清液与之前上清液合并,沉淀再次使用 1 mL 甲醇提取。将所有上清液合并,使用真空离心浓缩仪蒸发至干,最后用 200~400 μL 甲醇复溶。将复溶液离心,取上清液过 0.22 μm 滤膜,加至进样瓶衬管中。BAs 标品准确称量后使用甲醇溶解,并进行梯度稀释,转移至进样瓶中待用。选用 ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 μm(2.1 mm×100 mm)色谱柱用于 BAs 的定量分析,流动相 A 为 1 mmol/L 乙酸铵水溶液,流动相 B 为 1 mmol/L 乙酸铵甲醇溶液,进样量 2 μL,进行梯度洗脱。洗脱程序见表 2。

1.3.7 粪便菌群测定 从小鼠粪便中提取总 DNA 后,使用 Mao 等的扩增引物和扩增条件[18]扩增 V3—V4 区域。使用 TIANgel Mini Purification Kit 试剂盒回收和纯化扩增的 DNA 凝胶,并使用 Illumina MiSeq PE300 平台对 DNA 进行测序和分析。参照 Li 等的方法[19],使用 Qiime2 中的 DADA2 包进行下机数据处理和质量控制。

表 2 高效液相色谱-质谱联用仪洗脱程序

Table 2 Elution gradient of LC-MS/MS

时间/min	流动相 A 体积分数/%	流动相 B 体积分数/%
0	80	20
0~6	80~40	20~60
6~25	0	100
25~26	0	100
26~28	0~50	100~50
28~30	50~80	50~20
30~32	80	20

1.3.8 数据处理与分析 使用 Microsoft Excel、GraphPad 9 和 R 语言进行实验数据的统计分析,所有数据均表示为平均值±标准误差。如果数据集符合正态分布,则两组数据集使用非配对 *t* 检验,两组以上数据集用单因素方差分析和 Dunnett's 检验;当数据集不符合正态分布时,则两组数据集使用 Mann-Whitney 检验,两组以上数据集用 Kruskal-Wallis 分析与 Dunnett's 检验。将 0.05 作为阈值来判别组间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积小鼠肝脏组织的影响

由 HE 染色结果(见图 1)可知,NC 组小鼠肝细胞形态无异常现象且并未发现坏死,在肝窦处无炎性细胞浸润。与 NC 组小鼠相比,ANIT 组小鼠的肝脏形态发生了严重变化,包括肝细胞坏死、肝小叶结构破坏、门静脉水肿、肝窦处中性粒细胞浸润。而OCA 组以及 CCFM1077 组上述症状有所缓解,小鼠肝脏病变程度较 ANIT 组明显改善,肝细胞坏死情况和变性细胞减少,炎性细胞浸润减轻。表明 *B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积小鼠的肝脏具有保护作用。

2.2 *B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积小鼠血清指标的影响

由图 2 可知,相较于 NC 组,ANIT 组小鼠血清中主要肝功能相关酶 AST、ALT、ALP 的水平均明显升高。OCA、*B. longum* CCFM1077 处理明显减弱了这一增幅。此外,ANIT 还导致血清中 TBAs、DBIL 浓度较 NC 组明显升高,而 OCA 和 *B. longum* CCFM1077

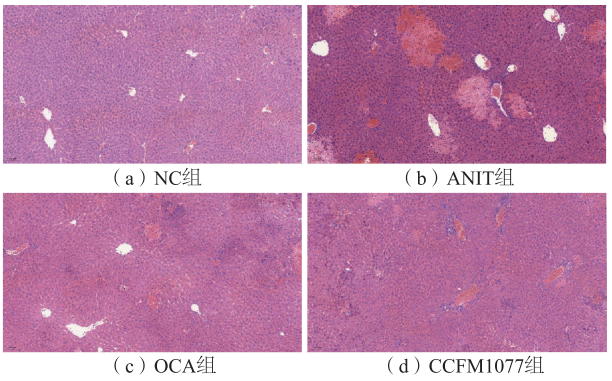


图 1　小鼠肝脏组织 HE 染色图

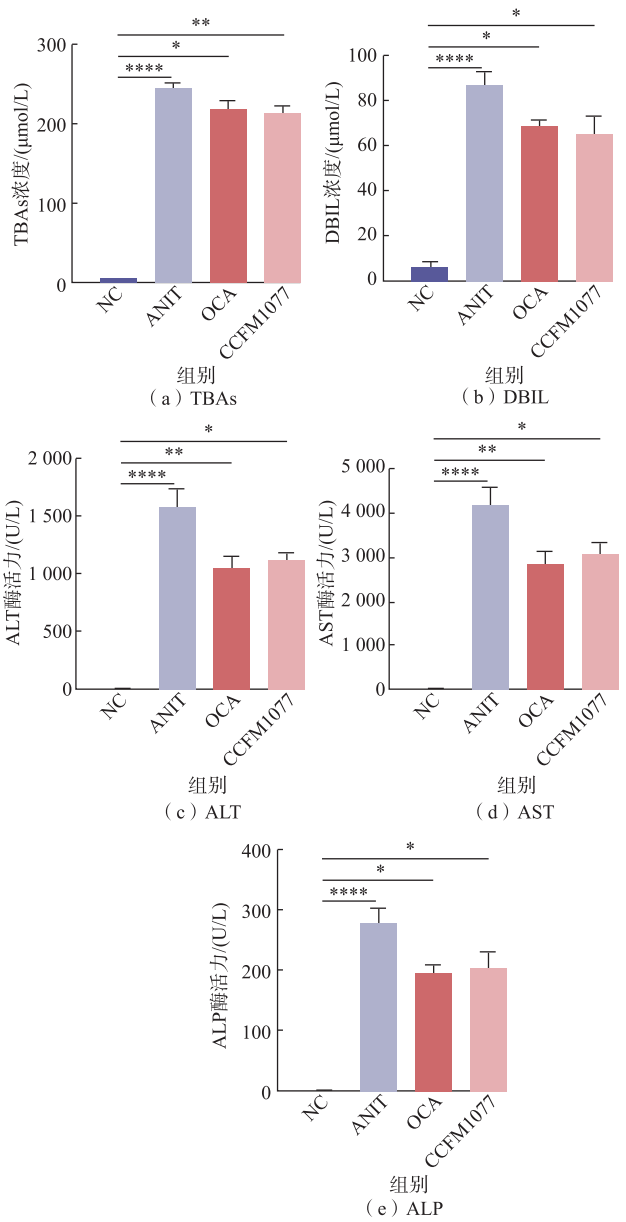
Fig. 1　HE staining in liver tissue of mice

可以显著抑制 TBAs、DBIL 浓度的上升。这表明 *B. longum* CCFM1077 可改善 ANIT 诱导的胆汁淤积小鼠的肝脏功能。

2.3　*B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积小鼠 BAs 代谢关键靶基因表达水平的影响

为了评估胆汁淤积症中 *B. longum* CCFM1077 治疗对 BAs 循环的影响，通过 qPCR 定量分析了小鼠肝脏 *fxr*、*cyp7a1*、*bsep*、*ntcp*、*mrp2*、*oatp* 和小鼠回肠 *fxr*、*fgf15*、*asbt* 等基因的表达。由图 3（a）可知，ANIT 处理后，肝脏中除了 *bsep* 基因，其他基因（*fxr*、*cyp7a1*、*ntcp*、*mrp2*、*oatp*）的表达水平均显著下调，而 OCA 组和 CCFM1077 组可以显著逆转 *fxr* 基因表达水平的降低，同时进一步下调 BAs 合成基因 *cyp7a1* 的表达，见图 3(b)。但对于转运相关基因的表达，*B. longum* CCFM1077 并没有表现出显著的调节效果。由图 4 可知，回肠中 *fxr*、*asbt* 基因的表达水平在 ANIT 组中并没有显著变化，但 *fgf15* 基因的表达水平显著降低。*B. longum* CCFM1077 干预后，小鼠回肠中 *fxr*、*asbt*、*fgf15* 基因的表达显著增强。

FXR 是维持 BAs 肠肝循环和稳态的重要核受体，具有多种功能，如调节 BAs 的吸收、代谢、运输和排泄[20-21]。FXR 在临床上与胆汁淤积症的发展密切相关，是胆汁淤积症和其他肝病的关键治疗靶点。OCA 作为 FXR 配体，比 BAs 的天然类似物能更有效地激活 FXR[22]。在肝脏中，FXR 参与 BAs 合成的反馈抑制，主要通过降低用于合成 BAs 的限速酶 CYP7A1 的表达，并可直接调节包括 BSEP 在内的几种 BAs 转运蛋白的表达，提高 BAs 的清除率，减少肝细胞暴露于 BAs（具有潜在毒性）的时间，并显著改善生化指标[23]。研究表明[24]，体内给予 OCA 可



图中 * 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$，*** 表示 $P<0.001$，**** 表示 $P<0.000\ 1$。

图 2　小鼠血清中 TBAs、DBIL、ALT、AST 和 ALP 水平

Fig. 2　Levels of TBA, DBIL, ALT, AST, and ALP in the serum of mice

通过增加肝脏中 BSEP 和 MRP2 的表达，以及减少 CYP7A1、NTCP 的 mRNA 和固醇 12α-羟化酶的表达，发挥有益作用。回肠中 FXR 可调节 BAs 转运蛋白的表达，在 BAs 重吸收过程中起关键作用。特别是回肠 FXR 的激活可以加速 FGF-15 的表达，FGF-15 通过门静脉血转运到肝脏中，抑制 CYP7A1 的表达[25]。因此，肝脏 FXR 和回肠 FXR 协调调节 CYP7A1 的表达。该研究又进一步证实了上述观点。

这些数据共同表明,通过激活肠–肝轴 FXR–FGF–15 信号通路,*B. longum* CCFM1077 治疗可以显著缓解 ANIT 引起的胆汁淤积症。

2.4 *B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积小鼠肝脏 BAs 浓度的影响

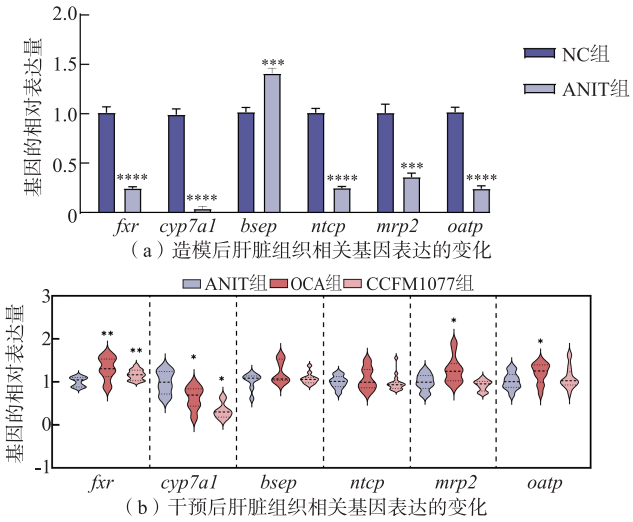
如图 5 所示,ANIT 给药后,小鼠肝脏中 T–β–MCA、TCDCA、TUDCA 等结合态 BAs 提高。*B. longum* CCFM1077 干预后,结合态 BAs 浓度均显著下调,同时游离态 BAs(CDCA、CA、DCA、UDCA)均有上调的趋势。在胆汁淤积症中,FXR 可被不同结构的 BAs 激活,并介导 BAs 的合成和分泌,CDCA 被认为是 FXR 的最有效配体,DCA 次之,最后是 CA 和 LCA[26]。这也进一步解释了 *B. longum* CCFM1077 干预后,肝脏及回肠 FXR 受体激活的原因。

2.5 *B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积小鼠肠道菌群多样性的影响

收集不同组小鼠的粪便样品,并对各组小鼠的肠道菌群进行分析。α–多样性用于表征肠道菌群的多样性、丰富度和均匀度等。小鼠肠道菌群的多样性结果如图 6 所示。与 NC 组相比,ANIT 组小鼠肠道菌群 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数及 Pielou 指数均降低,说明微生物群落丰富度、均匀度都显著降低;而与 ANIT 组相比,补充 *B. longum* CCFM1077 后,上述指数均显著升高,表明 *B. longum* CCFM1077 具有增加胆汁淤积小鼠肠道微生物群落多样性的能力。β–多样性用来描述组间物种组成的差异程度,因此,采用主坐标分析(principal coordinate analysis,PCoA)评价菌群的 β–多样性差异。结果表明,不同组别均能较好地区分开,ANIT 组小鼠的菌群结构较 NC 组发生显著变化,而给予 *B. longum* CCFM1077 后,小鼠的肠道菌群结构向 NC 组靠近。

2.6 *B. longum* CCFM1077 对胆汁淤积小鼠肠道菌群结构及组成的影响

肠道微生物群是一个丰富多元的生态网络,由细菌、真菌、原生动物和病毒组成。众所周知,肠道微生物在宿主的生理和病理条件下参与营养消化和免疫调节[15,27]。此外,它们充当肠道和其他组织之间的桥梁。因此,微生物群组成的变化被认为会影响宿主的健康状况。胆汁淤积症的发生、发展与肠道菌群的失调密切相关。从物理上讲,胆管将肝脏连接到肠道,门静脉将含有肠道菌群产物的血液输



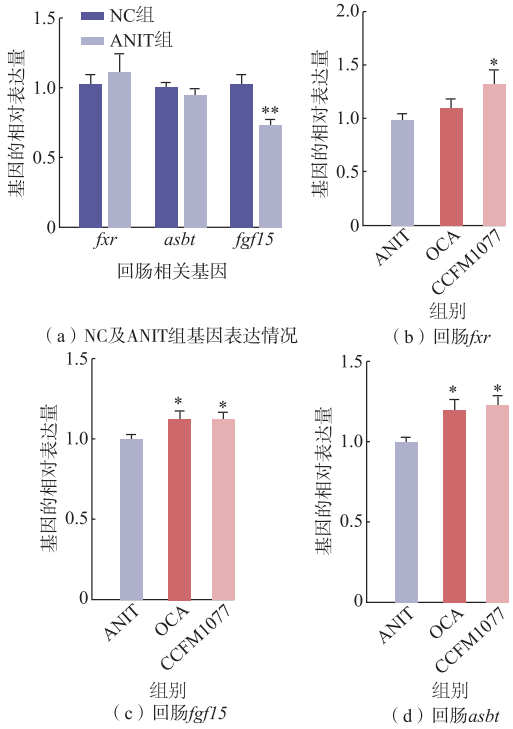
（a）造模后肝脏组织相关基因表达的变化

（b）干预后肝脏组织相关基因表达的变化

图中 * 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$,**** 表示 $P<0.000\ 1$。

图 3 *B. longum* CCFM1077 对小鼠肝脏组织中 BAs 合成和转运相关基因的影响

Fig. 3 Effect of *B. longum* CCFM1077 on genes related to the synthesis and transport of BAs in mouse liver tissue



（a）NC及ANIT组基因表达情况

（b）回肠*fxr*

（c）回肠*fgf15*

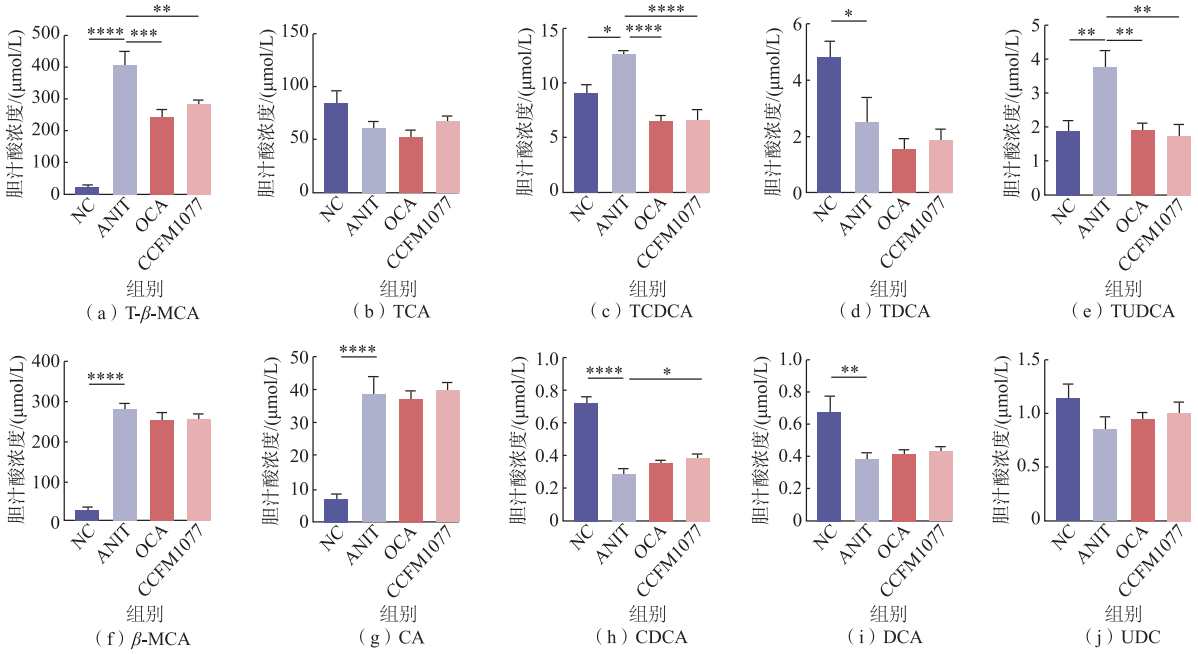
（d）回肠*asbt*

图中 * 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$。

图 4 *B. longum* CCFM1077 对小鼠回肠组织中 BAs 合成和转运相关基因的影响

Fig. 4 Effect of *B. longum* CCFM1077 on genes related to the synthesis and transport of BAs in mouse ileal tissue

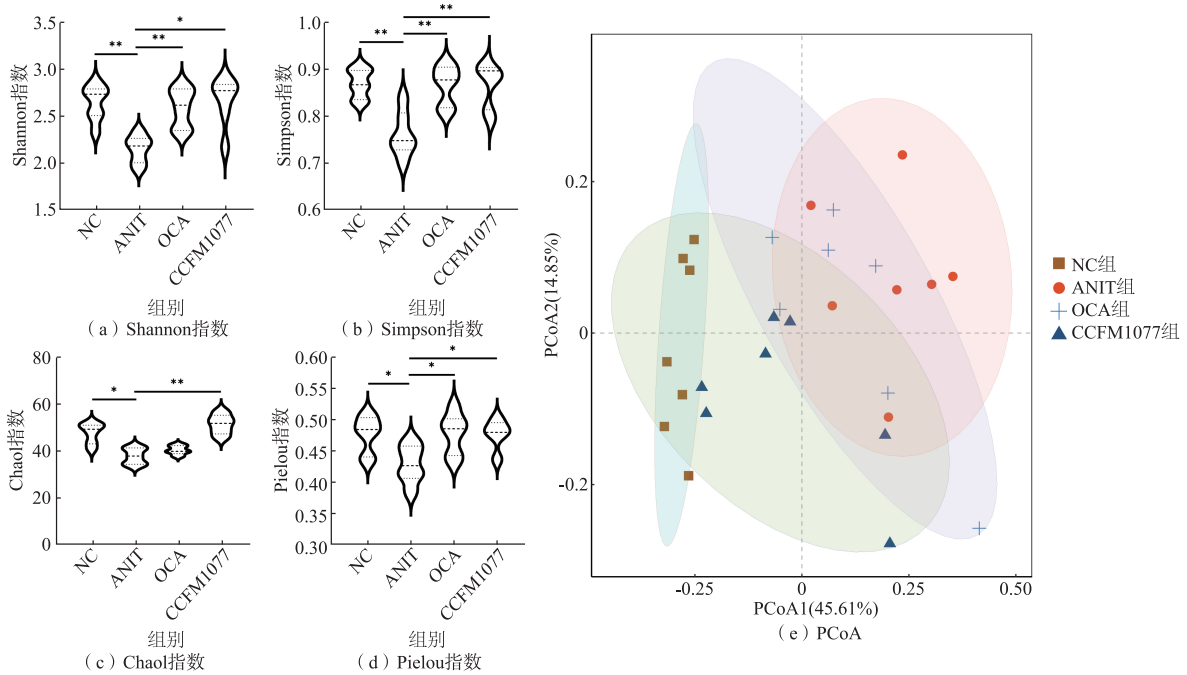
送到肝脏,然后进入循环系统,这意味着肝脏在肠道微生物群和宿主之间的相互作用中扮演着关键角色[28]。微生物群衍生分子可以激活免疫系统,并保证肝脏能够耐受有益和无害的代谢产物,是抵御病原体和有害微生物衍生分子的强大防线[29-30]。因此,肠道微生物群紊乱可能是胆汁淤积的关键因素,这也归因于肠道微生物群是 BAs 稳态的核心。肠道微生物群通过各种化学反应(去偶联、7-脱羟基)来调



图中 * 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$,**** 表示 $P<0.000\ 1$。

图 5 *B. longum* CCFM1077 对小鼠肝脏 BAs 浓度的影响

Fig. 5 Effect of *B. longum* CCFM1077 on the levels of BAs in mouse liver

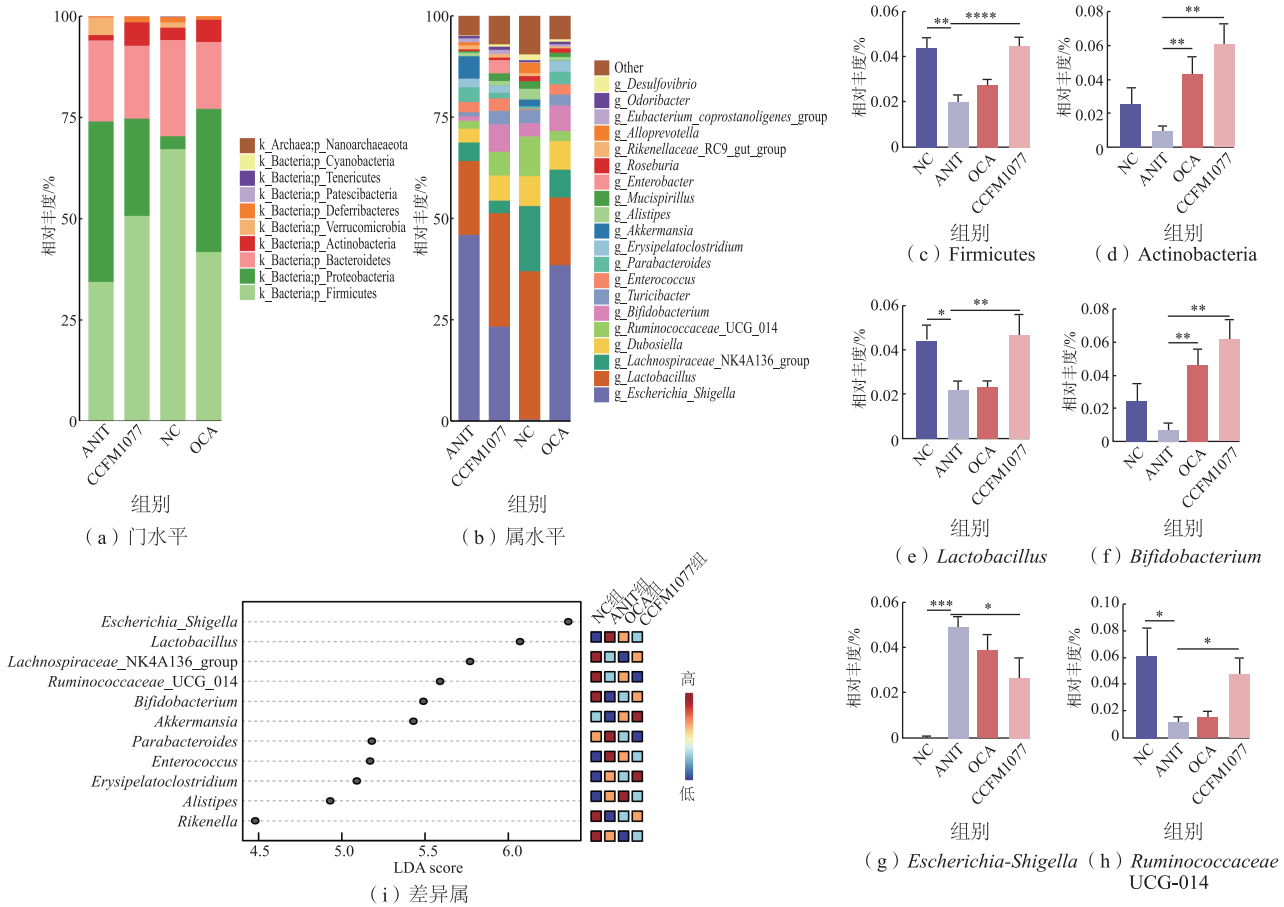


图中 * 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$。

图 6 *B. longum* CCFM1077 对小鼠肠道菌群多样性的影响

Fig. 6 Effect of *B. longum* CCFM1077 on the diversity of gut microbiota in mice

节 BAs 的多样性,从而影响 BAs 的肠道吸收及其对微生物的毒害作用[31]。BSH 调控的微生物去偶联反应是肠内环境中的微生物代谢 BAs 的第一步。目前已在双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、梭菌、拟杆菌等微生物中检测和表征到 BSH 酶的基因[32-33]。研究表明,妊娠期间,具有高 BSH 活性的拟杆菌丰度的增加减少了 BAs 的结合,从而增加了 BAs 的排出[34]。如图 7 所示,门水平的群落堆叠柱状图表明,厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)共同构成小鼠肠道中主要的菌门。其中 ANIT 可以显著降低具有 BSH 活性的放线菌门和厚壁菌门的相对丰度,而 *B. longum* CCFM1077 干预后,胆汁淤积小鼠肠道菌群中放线菌门和厚壁菌门的相对丰度显著上调。为了进一步探索微生物群的改变,在属水平上基于线性判别式分析法(LEfSe)对各组小鼠肠道菌群中的差异属进行了分析,鉴定了 11 个细菌属作为不同组别的生物标志物(lg LDA>4.0 和 P<0.05),包括志贺氏埃希氏菌属(*Escherichia_Shigella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*Ruminococcaceae*_UCG_014 属、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)。属水平柱状图显示,ANIT 可以降低乳杆菌属、双歧杆菌属的相对丰度,而 *B. longum* CCFM1077 的干预可以显著逆转该变化。据报道,乳杆菌属和双歧杆菌属广泛含有 BSH 酶的基因[35],说明 *B. longum* CCFM1077 可以通过增加具有 BSH 活性的肠道共生菌的相对丰度来促进 BAs 排泄,缓解胆汁淤积。ANIT 处理后,志贺氏埃希氏菌的相对丰度显著上升,*Ruminococcaceae*_UCG_014 菌的相对丰度显著降低,而 *B. longum* CCFM1077 干预后显著下调志贺氏埃希氏菌的相对丰度,富集 *Ruminococcaceae*_UCG_014 菌。志贺氏埃希氏菌是一种常见病原菌,它能以极高的效率突破免疫防御,在肠道和肝脏引起严重的炎症。*Ruminococcaceae*_UCG_014 是一种富产丁酸盐的



(a) 门水平　(b) 属水平　(c) Firmicutes　(d) Actinobacteria　(e) *Lactobacillus*　(f) *Bifidobacterium*　(g) *Escherichia-Shigella*　(h) *Ruminococcaceae* UCG-014　(i) 差异属

图中 * 表示 P<0.05,** 表示 P<0.01,*** 表示 P<0.001;**** 表示 P<0.000 1。

图 7　*B. longum* CCFM1067 对小鼠肠道菌群结构及组成的影响

Fig. 7　Effect of *B. longum* CCFM1077 on the structure and composition of gut microbiota in mice

细菌[36],有助于减轻炎症反应,说明 *B. longum* CCFM1077 也可能通过调节炎症反应来发挥作用。这些结果都表明 *B. longum* CCFM1077 干预后能够有效改善胆汁淤积小鼠的肠道微生物群结构,调节 BAs 的合成代谢来缓解肝内胆汁淤积。

3 结 语

研究表明 *B. longum* CCFM1077 可能通过刺激肠肝循环内肠道微生物和 BAs 合成之间的串扰而产生有益作用。首先,*B. longum* CCFM1077 显著激活 FXR-FGF-15 信号通路,改变肝脏 BAs 组成,抑制肝脏 BAs 合成。同时,*B. longum* CCFM1077 改变了肠道菌群结构,提高了具有高 BSH 活性的肠道共生菌的相对丰度,通过将结合 BAs 转化为游离 BAs,有利于 BAs 从肠道排出。因此,未来的研究可以集中在微生物群靶向治疗方面,以及探索益生菌缓解胆汁淤积症的具体机制,并在临床研究中与 UDCA、OCA 等标准治疗药物相结合来证明其有效性。

参考文献:

[1] ONOFRIO F Q,HIRSCHFIELD G M. The pathophysiology of cholestasis and its relevance to clinical practice [J]. **Clinical Liver Disease**,2020,15(3):110-114.

[2] BEUERS U,BOBERG K M,CHAPMAN R W,et al. EASL clinical practice guidelines:management of cholestatic liver diseases [J]. **Journal of Hepatology**,2009,51(2):237-267.

[3] HILSCHER M B,KAMATH P S,EATON J E. Cholestatic liver diseases:a primer for generalists and subspecialists[J]. **Mayo Clinic Proceedings**,2020,95(10):2263-2279.

[4] HIRSCHFIELD G M,HEATHCOTE E J,GERSHWIN M E. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches [J]. **Gastroenterology**,2010,139(5):1481-1496.

[5] 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.

[6] GOLDSTEIN J,LEVY C. Novel and emerging therapies for cholestatic liver diseases[J]. **Liver International**,2018,38(9):1520-1535.

[7] NEVENS F,ANDREONE P,MAZZELLA G,et al. A placebo-controlled trial of obeticholic acid in primary biliary cholangitis[J]. **The New England Journal of Medicine**,2016,375(7):631-643.

[8] HARMS M H,LAMMERS W J,THORBURN D,et al. Major hepatic complications in ursodeoxycholic acid-treated patients with primary biliary cholangitis:risk factors and time trends in incidence and outcome[J]. **The American Journal of Gastroenterology**,2018,113(2):254-264.

[9] LIN Z S,WU J M,WANG J P,et al. Dietary *Lactobacillus reuteri* prevent from inflammation mediated apoptosis of liver *via* improving intestinal microbiota and bile acid metabolism[J]. **Food Chemistry**,2023,404(2):134643.

[10] LI Y,TANG R Q,LEUNG P S C,et al. Bile acids and intestinal microbiota in autoimmune cholestatic liver diseases [J]. **Autoimmunity Reviews**,2017,16(9):885-896.

[11] TANG R Q,WEI Y R,LI Y M,et al. Gut microbial profile is altered in primary biliary cholangitis and partially restored after UDCA therapy[J]. **Gut**,2018,67(3):534-541.

[12] KUMMEN M,HOLM K,ANMARKRUD J A,et al. The gut microbial profile in patients with primary sclerosing cholangitis is distinct from patients with ulcerative colitis without biliary disease and healthy controls[J]. **Gut**,2017,66(4):611-619.

[13] XIONG K,CAI J,LIU P Y,et al. *Lactobacillus casei* alleviated the abnormal increase of cholestasis-related liver indices during tuberculosis treatment:a post hoc analysis of randomized controlled trial[J]. **Molecular Nutrition and Food Research**,2021,65(16):e2100108.

[14] GAO X G,FU T,WANG C Y,et al. Yangonin protects against cholestasis and hepatotoxity *via* activation of farnesoid X receptor *in vivo* and *in vitro*[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**,2018,348:105-116.

[15] YANG R,ZHAO Q,HU D D,et al. Metabolomic analysis of cholestatic liver damage in mice[J]. **Food and Chemical Toxicology**,2018,120:253-260.

[16] LIU Y R,DUAN H,CHEN Y,et al. Intraspecific difference of *Latilactobacillus sakei* in inflammatory bowel diseases:insights

into potential mechanisms through comparative genomics and metabolomics analyses[J]. **iMeta**, 2023, 2(4): 1-12.

[17] HULTMAN K, ALEXANDERSON C, MANNERAS L, et al. Maternal taurine supplementation in the late pregnant rat stimulates postnatal growth and induces obesity and insulin resistance in adult offspring[J]. **The Journal of Physiology**, 2007, 579(3): 823-833.

[18] MAO B Y, LI D Y, ZHAO J X, et al. Metagenomic insights into the effects of fructo-oligosaccharides (FOS) on the composition of fecal microbiota in mice[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63(3): 856-863.

[19] LI M Y, QIAN W K, YU L L, et al. Multi-time-point fecal sampling in human and mouse reveals the formation of new homeostasis in gut microbiota after bowel cleansing[J]. **Microorganisms**, 2022, 10(12): 2317.

[20] FIORUCCI S, MENCARELLI A, CIPRIANI S, et al. Activation of the farnesoid-X receptor protects against gastrointestinal injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice[J]. **British Journal of Pharmacology**, 2011, 164(8): 1929-1938.

[21] DONG R C, WANG J Q, GAO X G, et al. Yangonin protects against estrogen-induced cholestasis in a farnesoid X receptor-dependent manner[J]. **European Journal of Pharmacology**, 2019, 857: 172461.

[22] PELLICCIARI R, FIORUCCI S, CAMAIONI E, et al. 6α-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity[J]. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2002, 45(17): 3569-3572.

[23] WAN Y Y, SHENG L L. Regulation of bile acid receptor activity[J]. **Liver Research**, 2018, 2(4): 180-185.

[24] KJRGAARD K, FRISCH K, SORENSEN M, et al. Obeticholic acid improves hepatic bile acid excretion in patients with primary biliary cholangitis[J]. **Journal of Hepatology**, 2021, 74(1): 58-65.

[25] CHEN Q W, LI Q R, CAO M W, et al. Hierarchy-assembled dual probiotics system ameliorates cholestatic drug-induced liver injury *via* gut-liver axis modulation[J]. **Advanced Science**, 2022, 9(17): e2200986.

[26] JIANG C T, XIE C, LI F, et al. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease[J]. **The Journal of Clinical Investigation**, 2015, 125(1): 386-402.

[27] 赵崔雨,吴子健,李树森,等. 益生菌发酵乳辅助调节机体健康的研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(6): 210-218.
ZHAO C Y, WU Z J, LI S S, et al. Research advances on the functions of probiotic fermented milk in regulating body health[J]. **Food & Machinery**, 2023, 39(6): 210-218. (in Chinese)

[28] KUMMEN M, HOV J R. The gut microbial influence on cholestatic liver disease[J]. **Liver International**, 2019, 39(7): 1186-1196.

[29] DHILLON A K, KUMMEN M, TROSEID M, et al. Circulating markers of gut barrier function associated with disease severity in primary sclerosing cholangitis[J]. **Liver International**, 2019, 39(2): 371-381.

[30] BALMER M L, SLACK E, GOTTARDI A D, et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota[J]. **Science Translational Medicine**, 2014, 6(237): 237-246.

[31] GRÜNER N, MATTNER J. Bile acids and microbiota: multifaceted and versatile regulators of the liver-gut axis[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021, 22(3): 1397.

[32] HORÁCKOVÁ S, PLOCKOVÁ M, DEMNEROVÁ K. Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol reduction[J]. **Biotechnology Advances**, 2018, 36(3): 682-690.

[33] LONG S L, GAHAN C G M, JOYCE S A. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease[J]. **Molecular Aspects of Medicine**, 2017, 56: 54-65.

[34] REN S J, ZHOU Y P, XUAN R R. Research progress in the role of gut microbiota and its metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, 2021, 15(12): 1361-1366.

[35] JIA W, XIE G X, JIA W P. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis[J]. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2018, 15(2): 111-128.

[36] GUO L, GUAN Q J, DUAN W H, et al. Dietary goji shapes the gut microbiota to prevent the liver injury induced by acute alcohol intake[J]. **Frontiers in Nutrition**, 2022, 9: 929776.