四联活菌制剂 Bornlisy 对小鼠酒精性肝损伤的保护作用研究

童垣皓[1]，蒙龙锡宇[1]，赵亚蓉[1]，沈苏南[1]，赵树立[2]，窦环[1]
（1.南京大学医学院，江苏南京 210093）（2.南京市第一医院，江苏南京 210006）

摘要：本研究采用不同浓度乙醇灌胃的方法建立急、慢性酒精性肝损伤模型，观察四联活菌试剂 Bornlisy（BO）及其上清对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。结果表明，BO 可显著提高急性酒精性肝损伤小鼠的生存率（p<0.05），BO 上清则无上述效果；在慢性酒精性肝损伤模型中，BO 可有效降低慢性酒精性肝损伤引起的肝脏指数升高（p<0.05），改善肝组织脂肪性病变和脂滴蓄存，血清中 ALT 和 TG 水平显著降低（p<0.05），肝脏 SOD 活力显著上升了 43.30%（p<0.05），GSH-Px 活力明显上升了 281.44%（p<0.01），BO 上清则无明确疗效；进一步分析脂肪酸代谢信号通路，发现 BO 可显著抑制过氧化物酶体增殖剂激活受体 α（*PPARα*）、过氧化物酶酰基辅酶 A 氧化酶（*ACOX1*）和肝脏脂肪酸结合蛋白（*L-FABP*）mRNA 水平的降低（p<0.05），而 BO 上清对于 *PPARα*、*ACOX1* 的 mRNA 水平无显著影响（p>0.05）。对固醇调节元件结合蛋白（*SREBP-1c*）通路检测，结果显示 BO 和 BO 上清均对 *SREBP-1c* 和脂肪酸合成酶（*FAS*）mRNA 表达水平无显著性影响。因此，BO 对小鼠酒精性肝损伤具有保护作用，这可能是通过抗氧化应激、选择性增强 *PPARα* 通路来实现。

关键词：益生菌复方制剂；酒精性肝损伤；脂代谢；过氧化物酶体增殖剂激活受体 α；固醇调节元件结合蛋白
文章篇号：1673-9078(2018)01-5-12 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.002

Protective Effect of Bornlisy on Murine Alcoholic-induced Liver Injury and Mechanisms Exploring

TONG Yuan-hao[1], MENGLONG Xi-yu[1], ZHAO Ya-rong[1], SHEN Su-nan[1], ZHAO Shu-li[2], DOU Huan[1]
(1.Nanjing University Medical School, Nanjing 210093, China)(2.Nanjing First Hospital, Nanjing 210006, China)

Abstract: In order to investigate the protective effect of probiotics compound preparations Bornlisy (BO) on murine alcoholic-induced liver injury and explore the underlying mechanisms, acute and chronic alcoholic liver injuries models were establishedin mice by gavage with different concentrations of liquor. Compared with the model group, the survival rate of acute alcoholic liver injury mice with BO treatment was significantly improved (p<0.05), while there was no such effect in BO supernatant treatment group. In chronic alcoholic liver injury model, BO could significantly reduce the increase of liver index and improve fatty pathological injuries and lipid accumulation (p<0.05). Levels of serum ALT and TG decreased significantly (p<0.05), and the activity of liver SOD and GSH-Px increased significantly by 43.30%(p<0.05) and 281.44% in BO treatment group (p<0.01), respectively, while BO supernatant treatment group had no certain effects. Through investigating the fatty acid metabolic pathways, we found that BO treatment could inhibit the decrease of mRNA levels of *PPARα*, *ACOX1* and *L-FABP* significantly (p<0.05), while BO supernatant treatment had no significant effects (p>0.05). The detection results of *SREBP-1c* pathway showed that both BO and BO supernatant treatment had no significant effects on *SREBP-1c* and *FAS* mRNA expressions. Therefore, BO can protect mice from alcoholic induced liver injuries, which may be achieved by anti-oxidative stress and selectively enhancing *PPARα* pathway.

Key words: probiotics compound preparations; alcoholic-induced liver injury; lipid metabolism; *PPARα*; *SREBP-1c*

酒精性肝病(Alcoholic liver disease，ALD)是指过度饮入酒精而造成的肝脏疾病。根据发病程度的不同，可将 ALD 分为 4 个类型，分别是酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化[1]。随着现代社会的发展和人类饮食结构的改变，ALD 已经成为世界范围内慢性肝病的最重要起因之一，其流行病学调查资料显示在我国南方及中西部地区，成人群体 ALD 患病率为 4.3%~6.5%，是我国最常见的肝脏

收稿日期：2017-08-02
基金项目：国家自然科学基金项目（81402940）；江苏省自然科学基金项目（BK20140615）；南京大学本科生创新训练计划国家级项目(G201710284123)
作者简介：童垣皓（1995-），男，博士研究生，研究方向：临床医学；蒙龙锡宇（1996-），男，博士研究生，研究方向：临床医学（共同第一作者）
通讯作者：窦环（1979-），女，博士，高级工程师，研究方向：免疫药理学

疾病之一[2]。

ALD 的发病机制十分复杂，氧化应激是酒精性肝损伤发生的主要机制。乙醇主要在肝脏中代谢，在其代谢过程中会产生大量的活性氧簇(reactive oxygen species，ROS)[3]。ROS 介导的脂质过氧化会损伤生物膜，除了对肝细胞有直接损伤外，还会破坏线粒体的正常结构，影响脂肪酸的 β 氧化，机体脂代谢发生紊乱，脂肪在肝细胞内大量堆积形成脂肪肝，导致血清脂代谢相关指标变化，这可能与脂代谢相关通路基因表达水平的变化有关[4]。此外，酒精性肝损伤的发生还与肠道菌群失调有密切的关系。过量酒精摄入能增加肠道的通透性，导致肠道屏障功能减弱，革兰氏阴性菌大量繁殖，内毒素大量入血，血浆中大量的内毒素到达肝脏后激活肝血窦内的巨噬细胞 Kupffer 细胞，引起炎症反应，释放大量炎症因子和 ROS，加重氧化应激的损伤作用[5~8]。通过改善肠道菌群失调进而治疗酒精性肝病是当前的研究热点之一。

益生菌(Probiotics)，又译为原生保健性菌种，是指可改善宿主(如动物或人类)肠内微生态的平衡，并对宿主有正面效益的活性微生物，主要是指双歧杆菌和乳酸菌等。研究显示，益生菌对人体有许多正面的效益，例如治疗腹泻，改善乳糖不耐受，提高人体免疫力，对抗生殖系统和泌尿系统感染等[9]。1994 年，Nanji 等[10,11]首先发现鼠李糖乳杆菌 Lactobacillus GG 干预能够缓解酒精灌胃大鼠造成的内毒素血症和肝损伤，此后越来越多的动物实验证实，补充不同种类的益生菌能在一定程度上缓解酒精性肝损伤。梁慧等[12]以益生菌发酵乳(包含保加利亚乳杆菌、乳双歧杆菌及嗜热链球菌)为干预物进行实验，结果表明益生菌对大鼠酒精性肝损伤的保护作用可能够通过调节肠道菌群、修复肠道屏障功能等实现。因此，对 ALD 患者来说，利用益生菌制剂重建肠道微生态的平衡被认为是一项可行的治疗方法。

本实验所使用的四联活菌制剂 Bornlisy(BO)是由保加利亚乳杆菌、幼儿双歧杆菌、芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌有机混合开发研制而成，其中芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌对 ALD 的保护作用还不甚明确，因此实验结果可能在调节 ALD 患者的肠道菌群谱上具有一定参考价值。

此外，虽然目前保加利亚乳杆菌等益生菌对 ALD 的缓解和治疗作用已经有所体现，但其具体的作用机制仍未明确，需要进一步的探索。开展本研究的目的即评估四联活菌制剂 BO 缓解酒精性肝损伤的疗效，并帮助明确益生菌制剂缓解酒精性肝损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

四联活菌制剂 BO，分别含有等量的由保加利亚乳杆菌、幼儿双歧杆菌、芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌，活菌含量均为 2 亿/mL，由南京伯恩利施生物科技有限公司提供；56 度二锅头，北京红星股份有限公司；SPF 级♂BALB/c 小鼠(20~26 g)(南京大学-南京市生物医药研究院，实验动物许可证号：SCXK(苏)2015-0001)。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒，南京建成生物工程研究所；PCR 引物，南京思普金生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

MM400 混合球磨仪(德国 RETSCH)；5810R 冷冻离心机(德国 eppendorf)；HERAEUS FRESCO17 冷冻微量离心机(德国 Thermo)；DRP-9082 电热恒温培养箱(上海森信)；Heto Ultra Freeze 超低温冰箱(美国 Thermo)；多功能微孔板检测仪(美国 BioTek)；T100TM 梯度 PCR 仪(美国 BIO-RAD)；SmartSpecTM PLUS 核酸蛋白质测定仪(美国 BIO-RAD)；LineGene 9640 荧光定量 PCR 仪(杭州博日)；ZY220 全自动生化分析仪(上海科华)。

1.3 实验动物模型与处理

1.3.1 急性酒精性肝损伤模型

将小鼠适应性喂养 5 d 后，随机分为对照组、酒精模型组、BO 治疗组、BO 上清治疗组，每组 6 只。模型组每次给予 10 mL/kg 蒸馏水灌胃 0.5 h 后给予 56 °红星二锅头配制而成的 50%乙醇 10 mL/kg 灌胃；BO 治疗组每次给予 BO 制剂 10 mL/kg 灌胃，BO 上清治疗组每次给予 BO 上清液(BO 制剂 4000 r/min 离心 5 min 所得)10 mL/kg 灌胃，0.5 h 后给予 BO 治疗组和 BO 上清治疗组等量的 30%乙醇灌胃；对照组每次给予 10 mL/kg 蒸馏水灌胃 0.5 h 后再次给予同等剂量蒸馏水灌胃。每 2 d 灌胃一次，共进行三次。

1.3.2 慢性酒精性肝损伤模型

小鼠分组与处理方法如表 1 所示。将小鼠适应性喂养 5 d 后，随机分为对照组、酒精模型组、BO 治疗组、BO 上清治疗组，每组 8 只。模型组每日给予 10 mL/kg 蒸馏水灌胃 0.5 h 后给予 56 °红星二锅头配制而成的 30%乙醇 10 mL/kg 灌胃；BO 治疗组每日给予 BO 制剂 10 mL/kg 灌胃，BO 上清治疗组每日给予 BO 上清液(BO 制剂 4000 r/min 离心 5 min 所得)10 mL/kg

灌胃，0.5 h 后给予 BO 治疗组和 BO 上清治疗组等量的 30%乙醇灌胃；对照组每日给予 10 mL/kg 蒸馏水灌胃 0.5 h 后再次给予同等剂量蒸馏水灌胃。持续 56 d。

表 1 小鼠分组与处理

Table 1 Grouping and treatment of the mice

分组	处理方法
对照组	基础营养饲料，自由饮食，持续 56 d，蒸馏水(10 mL/kg)+蒸馏水(10 mL/kg)
酒精模型组	蒸馏水(10 mL/kg)+乙醇(30%，*V/V*，10 mL/kg)
BO 治疗组	BO 制剂(10 mL/kg)+乙醇(30%，*V/V*，10 mL/kg)
BO 上清治疗组	BO 制剂上清(10 mL/kg)+乙醇(30%，*V/V*，10 mL/kg)

1.4 血清转氨酶、甘油三酯、总胆固醇和脂蛋白测定

使用全自动生化分析仪检测血清中 ALT 活力与 TG、HDL、LDL 含量。其中 ALT 活力以 U/L 血清表示，TG、HDL、LDL 含量以 mmol/L 血清表示。

1.5 肝脏系数测定

小鼠肝脏吸干血水后，按照下列公式计算肝脏系数：肝脏系数(%)=肝重(g)/体重(g)×100%。

1.6 肝脏超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和丙二醛含量测定

MDA 含量采用 TBA 法测定，结果以 nmol/mg protein 表示；SOD 活力采用 WST-1 法测定，结果以 U/mg protein 表示；GSH-Px 活力采用比色法测定，结果以 U/mg protein 表示。以上操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.7 肝组织病理检查-H&E 染色法

将新鲜肝组织用中性甲醛固定，常规石蜡包埋、切片、脱蜡，然后经水化和染色，最后采用光学显微镜和成像系统进行肝脏病理变化观察。

1.8 定量 PCR(Real time Quantitative PCR，qRT-PCR)测定 mRNA 水平

取 100 mg 肝脏组织块，制备肝脏组织匀浆，提取小鼠肝脏 mRNA。取 0.5 g 提取得到的 mRNA，经 RT 后逆转录得到 cDNA。所得 cDNA 采用 SYBR Green 法进行 qPCR 测定 mRNA 水平。所用引物序列如表 2 所示。

表 2 不同基因 PCR 引物序列

Table 2 PCR primer sequences of different gene

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
PPAR-α	TGGCAAAAGGCAAGGAGAAG	CCCTCTACATAGAACTGCAAGGTTT
ACOX1	GGGAGTGCTACGGGTTACATG	CCGATATCCCCAACAGTGATG
L-FABP	CAGGAGAACTTTGAGCCATTCA	GATTTCTGACACCCCCTTGATG
SREBP-1c	GATGTGCGAACTGGACACAG	CATAGGGGGCGTCAAACAG
FAS	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
β-Actin	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT	CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG

1.9 肝组织病理检查-H&E 染色法

实验数据采用 Prizsm 5 利用软件的 t test 进行统计学分析，各项指标以平均值±标准差(x±s)表示，$p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

目前关于酒精性肝损伤的研究大多仅侧重于急性或慢性两者之中的其中一个方面，在本实验中，我们先建立了小鼠急性酒精性肝损伤模型初步评估 BO 制剂的治疗效果，之后进一步建立慢性肝损伤模型进行实验，将四联活菌制剂 BO 对急性和慢性酒精性肝损伤的疗效均进行了探讨，总结如下：

2.1 急性酒精性肝损伤模型

各组小鼠的生存率见图 1，急性酒精性肝损伤造模后模型组小鼠生存率降至 16.67%，而 BO 治疗组小鼠生存率为 83.33%。与对照组相比，模型组小鼠生存率显著下降($p<0.01$)。与模型组小鼠相比，BO 治疗组的生存率显著上升($p<0.05$)而 BO 上清治疗组生存率

虽有上升趋势，但无显著差异(p>0.05)。初步结果表明 BO 治疗可显著提高急性酒精性肝损伤小鼠的生存率(p<0.01)，对酒精性肝损伤模型小鼠有保护作用，而 BO 上清治疗组则无上述效果。

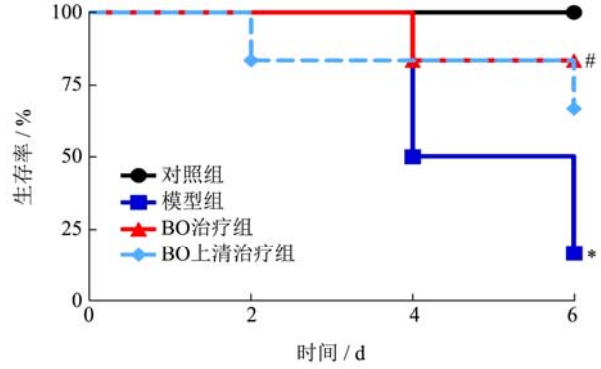


图 1 急性酒精性肝损伤模型生存曲线

Fig.1 Survival curve of acute alcoholic-induced liver injury model

注：**表示与对照组相比，p<0.01；#表示与模型组相比，p<0.05。

2.2 慢性酒精性肝损伤模型

2.2.1 小鼠体重、肝重和肝脏指数

各组小鼠的体重、肝重和肝脏指数见表 2。各组小鼠初体重、终体重和肝重无显著性差异(p>0.05)。与对照组相比，模型组小鼠肝脏指数显著上升(p<0.05)。与模型组小鼠相比，BO 治疗组的肝脏指数显著下降(p<0.05)，而 BO 上清治疗组肝脏指数虽有下降趋势，但无显著差异(p>0.05)。由于各只小鼠的体重不同，仅用肝重进行横向比较缺乏严谨性，因此运用肝脏指数进行比较更为合理。模型组小鼠肝脏指数的上升表明模型组小鼠肝脏出现肿大，BO 制剂治疗后抑制了肝脏指数的上升，减轻了肝脏的肿大。

表 3 小鼠体重、肝脏重量和肝脏指数(肝重/体重×100%)

Table 3 Mice body weight, liver weight and liver index (liver weight/ body weight×100%)

组别	初体重/g	终体重/g	肝重/g	肝指数/%
对照组	24.46±1.92	30.13±1.52	1.02±0.19	3.38±0.58
模型组	23.96±1.34	29.20±1.36	1.17±0.09	4.01±0.16*
BO 治疗组	24.50±1.19	29.53±1.38	1.14±0.07	3.85±0.13#
BO 上清治疗组	23.28±1.57	28.76±1.52	1.14±0.09	3.96±0.14

注：*表示与对照组相比，p<0.05；#表示与模型组相比，p<0.05。

2.2.2 BO 干预对小鼠肝脏功能的影响

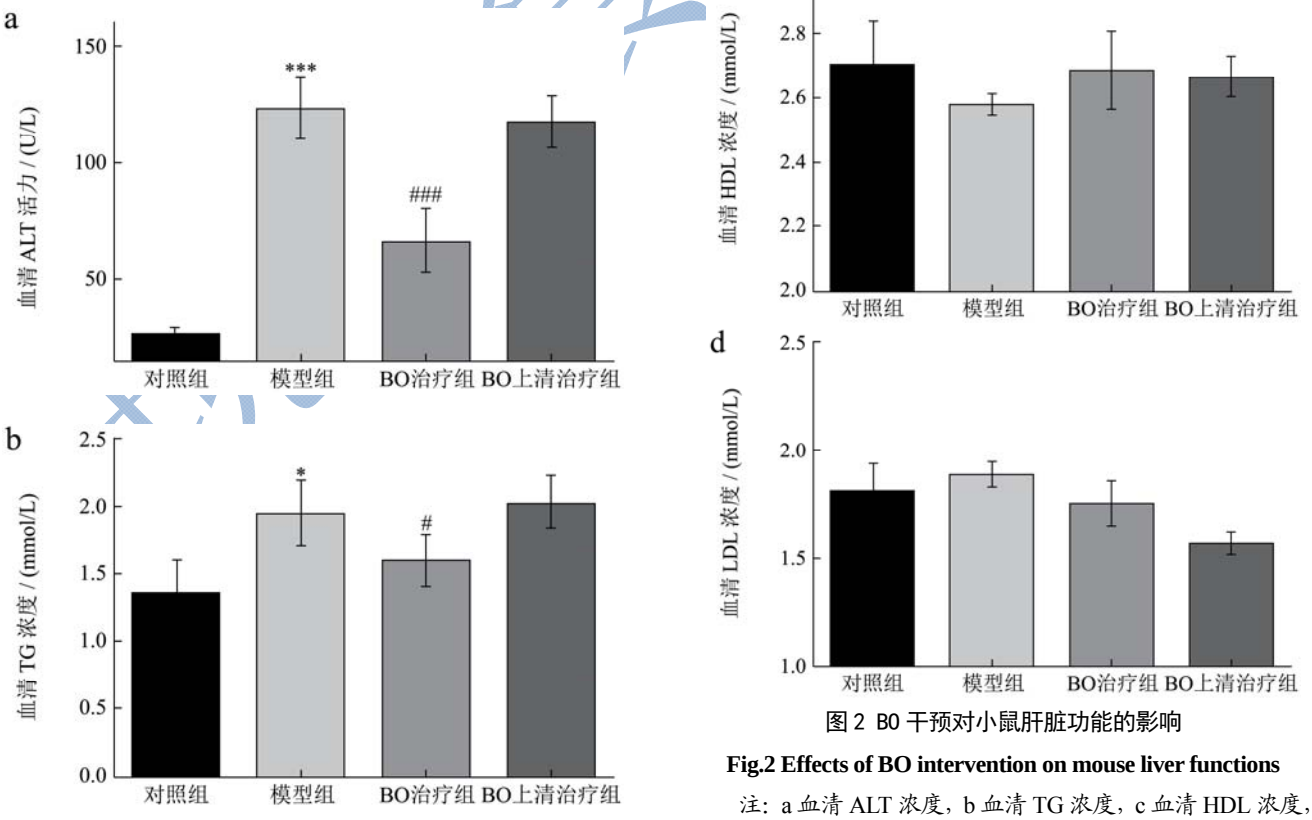


图 2 BO 干预对小鼠肝脏功能的影响

Fig.2 Effects of BO intervention on mouse liver functions

注：a 血清 ALT 浓度，b 血清 TG 浓度，c 血清 HDL 浓度，

d 血清 LDL 浓度；*p<0.05，与对照组相比较；#p<0.05，与模型组相比较。

酒精性脂肪肝作为酒精性肝病的初期表现，是肝脏发生损伤后的结果，脂代谢紊乱是其发生发展的主要原因之一。

如图 2 所示，与对照组相比，模型组小鼠血清 ALT 含量升高了 366.15%(p<0.001)；与模型组相比，BO 治疗组的 ALT 含量下降了 46.37%(p<0.001)，BO 上清治疗组的 ALT 含量无显著变化(p>0.05)。与对照组相比，模型组血清 TG 的含量上升了 36.83%(p<0.05)，血清 HDL 含量下降了 4.87%，血清 LDL 含量上升了 4.55%(p>0.05)；与模型组相比，BO 治疗组的 TG 含量下降了 17.81%(p<0.05)，表明 BO 制剂干预显著抑制了 TG 含量的上升，同时抑制血清 HDL 含量的下降和 LDL 含量的上升，但无显著差异(p>0.05)。与模型组相比，BO 上清治疗组的 TG 含量基本无差异，血清 HDL 含量有所上升，LDL 含量有所下降，但无显著差异(p>0.05)。以上结果显示，慢性酒精性肝损伤可引起 ALT 活力的升高，脂代谢功能发生紊乱。BO 制剂干预后，脂代谢相关指标趋于正常，提示 BO 制剂可能是通过影响脂代谢相关通路发挥治疗作用。

2.2.3 BO 干预对小鼠肝脏组织病理变化的影响

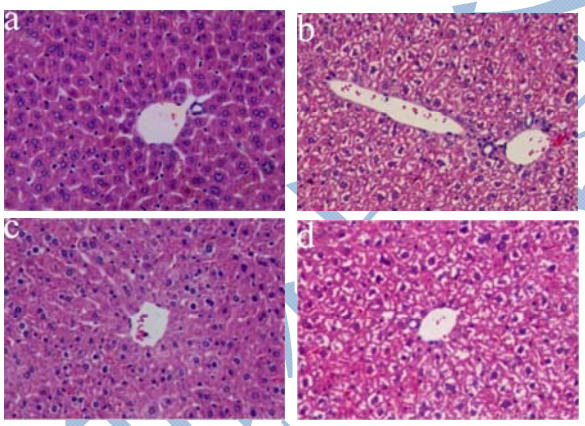


图 3 小鼠肝脏组织 H&E 染色光镜像(×400)

Fig.3 H&E staining light microscope images of mice liver tissues (×400)

注：a 表示对照组；b 表示模型组；c 表示 BO 治疗组；d 表示 BO 上清治疗组。

如图 3 所示，组织病理检查结果显示对照组小鼠肝小叶在镜下结构清晰，肝细胞形态大小规整，肝索排列整齐，以中央静脉为中心大致呈放射状排列；模型组小鼠肝脏内脂肪大量蓄积，表现为 H&E 染色下肝细胞内出现大量脂肪空泡，呈弥散性脂肪变，肝细胞肿胀明显，肝索排列紊乱，肝血窦狭窄充血；BO 治疗组小鼠肝脏与模型组相比肝细胞大小基本正常，脂肪空泡明显减少，脂肪变有所缓解，肝索排列较为整齐，肝血窦清晰，整体接近于对照组，提示制剂治疗有一定效果；BO 上清治疗组小鼠肝细胞内仍可见大量脂肪空泡，肝细胞肿胀明显，肝索排列仍紊乱，肝血窦狭窄充血，其与模型组相比未见明显改善，提示制剂上清组治疗效果不理想甚至基本无效果，表明 BO 制剂干预后能在一定程度上改善脂代谢紊乱的情况。

2.2.4 BO 干预对小鼠肝内 MDA、SOD、GSH-Px 水平的影响

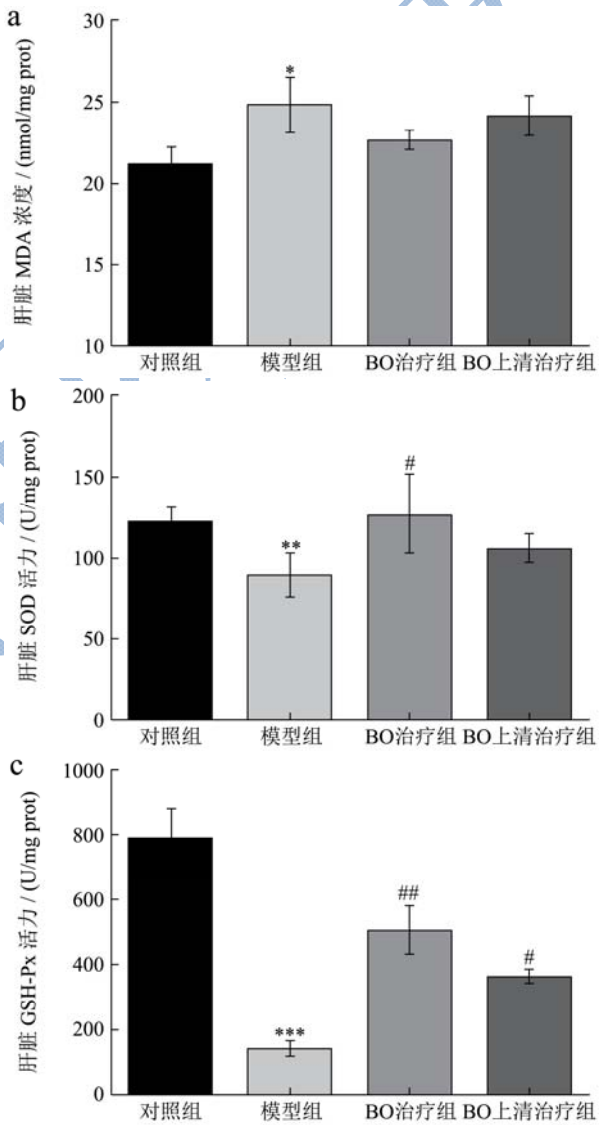


图 4 BO 干预对小鼠肝内 MDA、SOD 和 GSH-Px 水平的影响

Fig.4 Effects of BO intervention on the levels of MDA, SOD and GSH-Px in mice livers

注：a 肝内 MDA 浓度，b 肝内 SOD 活力，c 肝内 GSH-Px 活力；*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001，与对照组相比较；#p<0.05、##p<0.05，与模型组相比较。

氧化应激在酒精性肝损伤的进展中发挥重要作用，肝细胞的损伤与自由基的产生密切相关。饮酒后，

乙醇被乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase，ADH)、细胞色素 P4502E1(CYP2E1)氧化为乙醛，乙醛由乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase，ALDH)转换为乙酸，导入三羧酸循环生成乙酰辅酶 A，在这一代谢过程中会产生大量的 ROS[15]。同时乙醇暴露会引起内毒素血症，血浆中大量内毒素到达肝脏后激活 Kupffer 细胞也会产生一定量的 ROS。ROS 的大量生成会打破肝细胞内氧化与抗氧化之间的相对平衡，进而使肝细胞中发生脂质过氧化损伤，降低抗氧化酶促防御体系中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase，GSH-Px)的活力，增加脂质过氧化产物如丙二醛(malondialdehyde，MDA)的形成[16]。

如图 4 所示，模型组小鼠肝脏的氧化应激水平显著增强，表现为氧化应激 marker 分子 MDA 含量显著增加，以及抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活力显著减少。与对照组相比，模型组小鼠肝内 MDA 含量上升了 17.40%(p<0.05)，SOD 活力下降了 28.34%(p<0.01)，GSH-Px 活力下降了 83.35%(p<0.001)；与模型组相比，BO 治疗组 MDA 含量下降了 9.09%(p>0.05)，SOD 活力上升了 43.30%(p<0.05)，GSH-Px 活力上升了 281.44%(p<0.01)，表明 BO 制剂干预有效地抑制了 MDA 含量的增加和 SOD、GSH-Px 活力的下降。与对照组相比，BO 上清治疗组的 GSH-Px 活力上升了 170.65%(p<0.05)，对 MDA 和 SOD 则无显著作用。结果表明 BO 制剂干预后可通过提高抗氧化酶的活力，减少脂质过氧化产物的生成，缓解酒精暴露引起的氧化应激对肝细胞的损伤。

2.2.5 BO 干预对小鼠肝脏组织 *SREBP-1c* 通路相关基因 mRNA 表达的影响

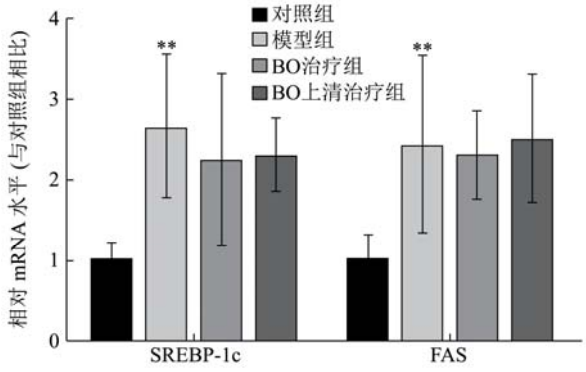


图 5 BO 干预对 SREBP-1c 通路的影响

Fig.5 Effects of BO intervention on *SREBP-1c* pathway

注：p<0.01，与对照组相比较。

固醇调节元件结合蛋白 1c(sterol regulatory element-binding protein-1c，*SREBP-1c*)，是肝细胞内调控脂肪酸合成的重要转录调节因子，能够调控 *FAS* 等生脂酶的活性。*FAS* 即脂肪酸合成酶，与脂肪酸的合成密切相关，*SREBP-1c* 能够提高 *FAS* 的活性从而调控脂肪酸代谢[17]。有研究表明，乙醇暴露会导致 *SREBP-1c* 的 mRNA 水平上升，进而使 *FAS* 活化[18~20]，脂肪酸合成增加，加速脂肪肝的形成。

如图 5 所示，与对照组小鼠相比，模型组小鼠肝组织中 *SREBP-1c*、*FAS* 的 mRNA 水平均显著升高(p<0.01)。然而 BO 及 BO 上清干预后对于 *SREBP-1c*、*FAS* 的 mRNA 水平影响不显著(p>0.05)，表明 BO 制剂可能不是作用于 *SREBP-1c* 通路而起到治疗作用。

2.2.6 BO 干预对小鼠肝脏组织 *PPARα* 通路相关基因 mRNA 表达的影响

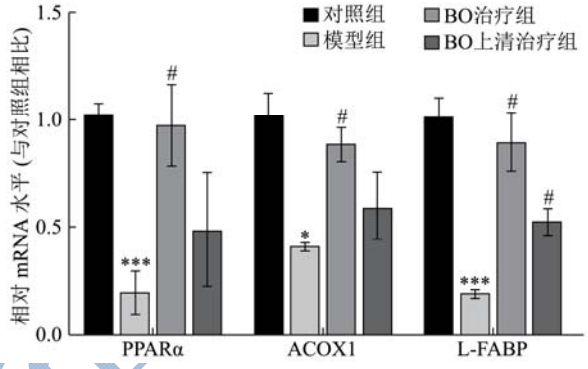


图 6 BO 干预对 PPAR α 通路的影响

Fig.6 Effects of BO intervention on *PPARα* pathway

注：* p<0.05、*** p<0.001，与对照组相比较；# p<0.05，与模型组相比较。

过氧化物酶体增殖剂激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors，*PPARs*)包含 *PPARα*、*PPAR β/δ* 和 *PPARγ* 三种亚型，其中 *PPARα* 是在肝细胞内高表达的一种调控脂肪酸氧化分解代谢的核转录因子，可调控多种靶基因的表达，包括参与脂代谢几乎所有过程如脂肪酸摄取、结合与氧化，脂蛋白组合、运输与代谢的基因，是脂代谢关键的调节因子[21~23]。酰基辅酶 A 氧化酶 1(acyl-CoA oxidase 1，*ACOX1*)和肝脏脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid-binding protein，*L-FABP*)是 *PPARα* 的下游靶基因[24,25]。*ACOX1* 主要调节脂肪酸在线粒体和过氧化物酶体中的 β 氧化过程，促进脂肪酸的代谢，是脂肪酸 β 氧化的关键限速酶[26]。*L-FABP* 是一族多源性的小分子胞内蛋白质，其主要作用是调节脂肪酸的摄取和胞内运输，可将脂肪酸从细胞膜上运送到脂肪酸氧化和甘油三酯及磷脂合成的场所[27]。上述三者可共同介导脂肪酸在肝细胞内的氧化代谢。并有研究显示，乙醇暴露能够抑制 *PPARα* 的转录活性及其调控的某些靶基因的表达[28~30]。

如图 6 所示，与对照组小鼠相比，模型组小鼠肝组织中 *PPARα* 和 *L-FABP* 的 mRNA 水平极显著降低

(p<0.001)，*ACOX1* 的 mRNA 水平显著降低(p<0.05)；与模型组相比，BO 制剂干预则抑制了 *PPARα*、*ACOX1* 和 *L-FABP*mRNA 水平的降低(p<0.05)，表现为三者的 mRNA 水平显著提高；而 BO 制剂上清干预后对于 *PPARα*、*ACOX1* 的 mRNA 水平无显著影响(p>0.05)，但对对于 *L-FABP* 的 mRNA 水平有一定影响(p<0.05)。这些结果表明 BO 制剂干预能够有效抑制 *PPARα*、*ACOX1* 和 *L-FABP* 转录活性的降低。综合以上结果，提示 BO 制剂可能是通过选择性调控 *PPARα* 通路相关基因的表达缓解脂代谢紊乱，对酒精性肝损伤起到保护作用。

2.2.7 BO 上清干预对小鼠的影响

在本实验中我们还设法探究了 BO 制剂上清液的治疗作用。BO 制剂上清液是由 BO 制剂 4000 r/min 离心 5 min 所得，所弃沉淀为深褐色块状固体。实验结果显示，与 BO 制剂组相比，BO 制剂上清治疗组无显著的治疗效果。病理切片显示，BO 制剂上清治疗组小鼠肝细胞内仍可见大量脂肪空泡，肝细胞肿胀明显，肝索排列仍紊乱，肝血窦狭窄充血，与模型组相比未见明显改善，并且其所测各项生化指标及基因表达水平与模型组相近。推测原因可能是所弃沉淀含有大量的菌体成分，而菌体成分是发挥治疗作用的主要因素，所以 BO 制剂上清的治疗作用不甚理想。

3 结论

3.1 长期大量摄入酒精可引起肝损伤，表现为肝脏肿大，肝指数上升，肝细胞肿胀、脂肪变，伴有血清学指标的改变，如血清谷丙转氨酶(ALT)活力的升高(p<0.001)、脂代谢相关通路的基因表达水平发生改变，表现为肝组织中 *SREBP-1c* 通路相关基因 mRNA 水平的升高以及 *PPARα* 通路相关基因 mRNA 水平的显著降低。BO 制剂干预能显著提高急性酒精性肝损伤小鼠的生存率(p<0.05)。对于慢性酒精性肝损伤小鼠，BO 制剂干预能缓解小鼠肝脏的肿大，减轻肝组织病理学改变，显著降低血清 ALT 活力，降低血清 TG 和 LDL 的含量，升高血清 HDL 的含量，并可降低脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量，显著升高超氧化物岐化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力。同时，BO 制剂干预后显著抑制了 *PPARα*、*ACOX1* 和 *L-FABP* mRNA 水平的降低，肝组织病理检查也显示肝细胞损伤有所缓解。综合以上结果，BO 制剂对酒精性肝损伤具有保护作用，作用机制可能与提高肝组织的抗氧化能力，抑制脂质过氧化，缓解酒精暴露引起的氧化应激对肝细胞的损伤，并选择性地调控与脂代谢相关的 *PPARα* 通路相关基因的表达，缓解脂代谢紊乱有关。

3.2 现今益生菌制剂对于酒精性肝损伤的保护作用在许多研究中已得到初步体现，但大多数研究还停留在乳杆菌、双歧杆菌等单一或两种菌体治疗效果的探究，对于多种菌种联合应用的研究还少之又少。本实验采用的 BO 制剂为一种四联活菌制剂，对于复杂的肠道微生态而言，多种益生菌之间潜在的相互协同作用以及其对肠道菌群的影响或许对酒精性肝损伤有着更好的疗效，可能在未来为 ALD 的防治提供一种更加切实有效的方法和途径。

参考文献

[1] 吕灏,吴高峰,杨建成,等.牛磺酸对酒精性肝病的防治作用[J].动物医学进展,2017,38(1):104-107
LV Hao, WU Gao-feng, YANG Jian-cheng, et al. Preventive and curative effects of taurine on alcoholic liver disease [J] Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(1): 104-107

[2] 孔维宗,王迎春.酒精性肝病的治疗进展[J].现代医药卫生,2017,1:15-17
KONG Wei-zong, WANG Ying-chun. Progress on alcohol liver disease treatment [J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2017, 1: 15-17

[3] Sha Li, Hor-Yue Tan, Ning Wang, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases [J]. Int. J Mol. Sci., 2015, 16(11): 26087-26124

[4] Livero F A R, Acco A. Molecular basis of alcoholic fatty liver disease: From incidence to treatment [J]. Hepatology Research, 2016, 46: 111-123

[5] Gyongyi Szabo, Shashi Bala. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis [J]. World Journal of Gastroenterology, 2010, 16(11): 1321-1329

[6] Bala S, Marcos M, Gattu A, et al. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96864

[7] Voican C S, Perlemuter G, Naveau S. Mechanisms of the inflammatory reaction implicated in alcoholic hepatitis: 2011 update [J]. Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol., 2011, 35(6): 465-474

[8] Sung Hotaik, Kim Seung Woo, Hong Meegun, et al. Microbiota-based treatments in alcoholic liver disease [J]. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(29): 6673-6682

[9] 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
ZANG Yue, WANG Sheng, LIU Nan, et al. Alcoholic liver disease: gut microbiota and therapeutic perspectives [J].

Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(4): 451-455

[10] 郭永月,陶明煊,程光宇,等.黑牛肝菌多糖对急性酒精肝损伤小鼠的保护作用[J].中国食品学报,2016,16(1):35-41
GUO Yong-yue, TAO Ming-xuan, CHENG Guang-yu, et al. Protective effect of polysaccharides from *boletus aereus* on alcoholic liver injury in mice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 35-41

[11] 张敏,宋秋梅,张予心,等.鼠李糖乳杆菌 LGG 上清液改善急性酒精性脂肪肝损伤研究[J].食品科技,2014,9:41-45
ZHANG Min, SONG Qiu-mei, ZHANG Yu-xin, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant attenuates acute alcohol-induced fatty liver injury [J]. Food Science and Technology, 2014, 9: 41-45

[12] 梁惠,吕锐,傅泳,等.益生菌对大鼠酒精性肝损伤的保护作用及机制研究[J].中国药理学通报,2016,32(7):991-997
LIANG Hui, LV Rui, FU Yong, et al. Effects of probiotics on alcoholic liver injury in rats and its mechanisms [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(7): 991-997

[13] 王曦,周俊英.脂毒性脂凋亡与酒精性脂肪性肝病[J].中华肝脏病杂志,2015,23(4):307-309
WANG Xi, ZHOU Jun-ying. Roles of lipotoxicity and lipoapoptosis in the pathogenesis of alcoholic fatty liver disease [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2015, 23(4): 307-309

[14] 陈洋洋.氯美噻唑对小鼠急性酒精性脂肪肝的拮抗作用研究[D].济南:山东大学,2016
CHEN Yang-yang. The protective effects of chlormethiazole against acute ethanol-induced fatty liver in mice [D]. Jinan: Shandong University, 2016

[15] Elisabetta Ceni, Tommaso Mello, Andrea Galli. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(47): 17756-17772

[16] 邱萍,李相,孔德松,等.酒精性肝病发病机制研究的新进展[J].中国药理学通报,2014,30(2):160-163
QIU Ping, LI Xiang, KONG De-song, et al. Research progress on pathogenesis of alcoholic liver disease [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2014, 30(2): 160-163

[17] Wang X, Sato R, Brown M S, et al. SREBP-1c, a menbrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis [J]. Cell, 1994, 77(1): 53-62

[18] Wada Satoshi, Yamazaki Tomomi, Kawano Yukari, et al. Fish oil fed prior to ethanol administration prevents acute ethanol-induced fatty liver in mice [J]. Journal of Hepatology, 2008, 49(3): 441-450

[19] Ji Cheng, Kaplowitz Neil. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice [J]. Gastroenterology, 2003, 124(5): 1488-1499

[20] Zeng T, Zhang CL, Song FY, et al. PI3K/Akt pathway activation was involved in acute ethanol-induced fatty liver in mice [J]. Toxicology, 2012, 296(1-3): 56-66

[21] Contreras A V, Torres N, Tovar A R. *PPAR-α* as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation [J]. Advances in Nutrition: An International Review Journal, 2013, 4(4): 439-452

[22] Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR-*α* [J]. Molecular Metabolism, 2014, 3(4): 354-371

[23] Tao Zeng, Cui-Li Zhang, Fu-Yong Song, et al. CMZ Reversed Chronic Ethanol-Induced Disturbance of *PPAR-α* Possibly by Suppressing Oxidative Stress and *PGC-1α* Acetylation, and Activating the *MAPK* and *GSK3β* Pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98658

[24] 朱书彤,赵越.*PPAR-α* 在肝脏相关疾病中作用的研究进展[J].生命科学,2017,5:479-484
ZHU Shu-tong, ZHAO Yue. Research process of PPAR*α* in liver diseases [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2017, 5: 479-484

[25] Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, et al. Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules [J]. Am. J Pathol., 2004, 165(4): 1243-1255

[26] 仝巧云,葛存锦,郑世华. *PPAR-α* 及 *Acox1* 在酒精性脂肪肝中的表达[J]. 华中科技大学学报(医学版),2016, 45(3):288-291
TONG Qiao-yun, GE Cun-jin, ZHENG Shi-hua. Expression of *PPAR-α* and *acox1* in rats with alcoholic fatty liver disease [J]. Acta Medicinae Universitatis Scientiae et Technologiae Huazhong, 2016, 45(3): 288-291

[27] Smathers R L, Galligan J J, Shearn C T, et al. Susceptibility of L-FABP-/- mice to oxidative stress in early-stage alcoholic liver [J]. J Lipid Res., 2013, 54(5): 1335-1345

[28] Purohit V, Gao B, Song B J. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver [J]. Alcohol. Clin. Exp. Res., 2009, 33(2): 191-205

[29] Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(47): 17756-17772

[30] An L, Wang X, Cederbaum A I. Cytokines in alcoholic liver disease [J]. Arch. Toxicol., 2012, 86(9): 1337-134