

# 不同益生菌对来曲唑诱导多囊卵巢综合征大鼠症状的改善作用

李新宇<sup>1</sup>, 谢晨阳<sup>1</sup>, 黄秋萍<sup>1</sup>, 金斌<sup>1</sup>, 董哲文<sup>1</sup>, 钟萍<sup>2\*</sup>, 宋家乐<sup>1,3\*</sup>

(1. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541101) (2. 桂林医学院第二附属医院产科, 广西桂林 541109)  
(3. 广西卫生健康委员会全生命周期健康保健研究实验室, 广西环境暴露组学与全生命周期健康重点实验室, 广西桂林 541101)

**摘要:** 该研究探讨不同益生菌对来曲唑诱导的多囊卵巢综合征 (Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS) 大鼠症状的改善作用。经干预后观察大鼠体质量、Lee's 指数、内脏脂肪质量及动情周期变化; 采用 H&E 染色、Masson 染色观察大鼠卵巢组织病理及纤维化改变; 酶联免疫吸附法检测大鼠血清性激素相关指标 (T、E<sub>2</sub>、LH、FSH)、血脂相关指标 (TC、TG、LDL-C、HDL-C)、胰岛素 (INS) 与脂多糖 (LPS) 水平; 蛋白质印迹法检测大鼠卵巢 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路蛋白表达水平。乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌均能有效改善 PCOS 大鼠体质量, 恢复动情周期及卵巢组织多囊样病变, 有效调节 PCOS 组大鼠性激素 (T: 48.49、45.71、40.36 nmol/L; E<sub>2</sub>: 46.63、42.94、49.94 ng/L; FSH: 15.94、17.77、18.73 IU/L; LH: 18.73、18.94、17.27 ng/L)、血脂 (TG: 0.59、0.69、0.79 mmol/L; TC: 4.65、4.72、4.48 mmol/L; LDL-C: 0.39、0.42、0.44 mmol/L; HDL-C: 1.99、1.53、1.39 mmol/L) 和 LPS 水平 (102.62、152.8、136.58 EU/L) ( $p < 0.05$ ), 减轻胰岛素抵抗状态。三种益生菌也能显著抑制 Smad4、p-Smad3 和 p-Smad2 的表达水平。研究提示, 乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌对来曲唑诱导的 PCOS 大鼠均有显著的保护效果。

**关键词:** 多囊卵巢综合征; 益生菌; 性激素水平; 血脂代谢; 卵巢纤维化

文章编号: 1673-9078(2022)11-20-29

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0043

## Effects of Different Probiotics on Symptoms of Letrozole-induced Polycystic Ovary Syndrome in Rats

LI Xinyu<sup>1</sup>, XIE Chenyang<sup>1</sup>, HUANG Qiuping<sup>1</sup>, JIN Bin<sup>1</sup>, DONG Zhewen<sup>1</sup>, ZHONG Ping<sup>2\*</sup>, SONG Jiale<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541101, China)

(2. Department of Obstetrics, Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541109, China)

(3. Guangxi Health Commission Key Laboratory of Entire Lifecycle Health and Care, Guangxi Key Laboratory of Environmental Exposomics and Entire Lifecycle Health, Guilin 541101, China)

**Abstract:** The effects of *Bifidobacterium* sp., *Clostridium butyricum*, and *Lactobacillus plantarum* on the clinical symptoms of letrozole-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats were investigated. During the experiment, the estrus cycle, visceral fat mass and weight, Lee's index, and fasting plasma glucose levels were monitored. Thereafter, all the PCOS rats were sacrificed and the histological and

引文格式:

李新宇, 谢晨阳, 黄秋萍, 等. 不同益生菌对来曲唑诱导多囊卵巢综合征大鼠症状的改善作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 20-29

LI Xinyu, XIE Chenyang, HUANG Qiuping, et al. Effects of different probiotics on symptoms of letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 20-29

收稿日期: 2022-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560530; 81760589; 81960590); 广西自然科学基金资助项目 (2020GXNSFAA159160); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202010601031); 人社部“高层次留学人才回国资助计划” (人社厅函[2019]160号); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助 (桂教人[2018]18号); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题 (Z20200780); 桂林医学院引进人才科研启动基金 (04010150001)

作者简介: 李新宇 (2000-), 男, 本科在读, 研究方向: 营养与食品卫生, E-mail: 1581006461@qq.com

通讯作者: 钟萍 (1972-), 女, 主任医师, 研究方向: 围产期保健与高危妊娠防治, E-mail: 1045860606@qq.com; 共同通讯作者: 宋家乐 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 临床营养与免疫代谢性疾病的分子防治机制, E-mail: songjiale@glmc.edu.cn

fibrotic changes in ovarian tissue were observed using hematoxylin-eosin and Masson staining assays. The serum levels of sex hormones, blood lipids, insulin, and lipopolysaccharide were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of key signaling molecules of the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway, including Smad2, p-Smad2, Smad3, p-Smad3, and Smad4, in the rat ovaries was detected using western blots. *Bifidobacterium* sp., *C. butyricum*, and *L. plantarum* effectively restored the estrous cycle and improved insulin resistance. They significantly modulated the levels of sex hormones (T: 48.49, 45.71, and 40.36 nmol/L; E2: 46.63, 42.94, and 49.94 ng/L; FSH: 15.94, 17.77, and 18.73 IU/L; LH: 18.73, 18.94, and 17.27 ng/L), dyslipidemia (TG: 0.59, 0.69, and 0.79 mmol/L; TC: 4.65, 4.72, and 4.48 mmol/L; LDL-C: 0.40, 0.42, and 0.44 mmol/L; HDL-C: 1.99, 1.53, and 1.39 mmol/L), and LPS (102.62, 152.8, and 136.58 EU/L). Moreover, the intervention by all three probiotics significantly inhibited the expression of Smad4 (52.89%, 29.14%, and 69.80%), p-Smad3 (65.31%, 65.82%, and 78.57%), and p-Smad2 (77.42%, 52.86%, and 56.96%) ( $p < 0.05$ ). Hence, *Bifidobacterium* sp., *C. butyricum*, and *L. plantarum* exert significant protective effects on letrozole-induced PCOS in rats.

**Key words:** polycystic ovary syndrome; probiotics; sex hormone levels; blood lipid metabolism; ovarian hyperfibrosis

多囊卵巢综合征 (Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS) 是一种育龄期女性常见的内分泌紊乱疾病, 其发病机制尚不明确, 主要临床症状有高雄激素血症、多囊性卵巢、排卵障碍及卵巢纤维化等<sup>[1]</sup>。除生殖障碍与激素失衡外, PCOS 患者常伴有肥胖、胰岛素抵抗、血脂紊乱等代谢疾病<sup>[2]</sup>。目前, 临床上常用胰岛素增敏剂对 PCOS 进行治疗, 但长期或过高剂量的使用会引起头痛、胃肠道不适等不良反应<sup>[3]</sup>。因此, 寻找能有效治疗且副作用较小的方案是目前 PCOS 疾病研究方向上的热点问题之一。

肠道菌群是正常定植于人体肠道的一类微生物的总称, 可通过与宿主细胞的相互作用以及对营养物质的摄取和转化在不同程度上影响人体健康<sup>[4]</sup>。研究表明, 肠道菌群失调与 PCOS 之间存在密切联系<sup>[5]</sup>。临床研究发现, PCOS 患者的肠道菌群失调主要表现为  $\alpha$  多样性下降, 拟杆菌属增加和疣微菌门减少<sup>[6]</sup>。动物研究中也提示来曲唑诱导的 PCOS 小鼠体内肠道菌群物种的多样性和丰富度明显减少<sup>[7]</sup>。此外, 肠道菌群的紊乱将导致肠黏膜屏障功能受损, 使机体免疫系统异常激活, 并由此干扰胰岛素受体功能和性激素分泌, 影响卵巢发育<sup>[8]</sup>。

益生菌作为肠道菌群的主要构成部分, 是一类对宿主健康有益的活性微生物, 其可以调节宿主肠道菌群比例, 改善异常的性激素水平和糖脂代谢紊乱<sup>[9,10]</sup>。目前的研究提示, 益生菌能够作为辅助手段来改善 PCOS 的临床症状。连续服用 12 周的益生菌补充剂 (含嗜酸乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、发酵乳杆菌和双歧杆菌) 可以有效调节 PCOS 患者体内激素和炎症指标的水平<sup>[11]</sup>。而 Meta 分析也提示益生菌补充剂 (含嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、双歧杆菌等) 可有效控制 PCOS 患者的体质量和体质指数 (Body Mass Index, BMI), 并降低血糖、胰岛素 (Insulin, INS)、甘油三酯 (Triglyceride, TG) 和睾酮 (Testosterone, T) 水平<sup>[12]</sup>。来曲唑作为一种芳

香化酶抑制剂, 可通过抑制雄激素向雌激素的转化导致高雄激素血症, 引发类似 PCOS 的症状<sup>[13]</sup>。因此, 本研究以来曲唑诱导的 PCOS 大鼠为模型, 观察乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌三种益生菌对 PCOS 大鼠临床症状的改善作用并探讨作用机制, 为益生菌应用于 PCOS 的临床治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

来曲唑 (L833525, 纯度大于 98%), 上海麦克林生化科技有限公司; 植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*, SG1), 本课题组自行分离保存菌株; 乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*, HH-BA68), 郑州和合生物工程有限公司; 丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*, GIM1.262), 广东省微生物研究所菌种保藏中心; 雌二醇 (Estradiol, E2, MM-0575R1)、T (MM-0577R1)、黄体生成素 (Luteinizing Hormone, LH, MM-0624R1)、卵泡刺激素 (Follicle Stimulating Hormone, FSH, MM-70867R1) 和 INS (MM-0587R1) 水平测定用 ELISA 试剂盒, 江苏酶免实业有限公司; 总胆固醇 (Total Cholesterol, TC, A111-1-1)、TG (A110-1-1)、低密度脂蛋白 (Low-Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C, A113-1-1)、高密度脂蛋白 (High-Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C, A112-1-1)、脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS, H255) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; Masson 三色染色试剂盒 (BP-DL021), 南京森贝伽生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度试剂盒 (P0012)、5X SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (P0286-15 mL)、Smad4 (AF1291)、Smad3 (AF1501)、Phospho-Smad3 (p-Smad3, AF1759)、Smad2 (AF1300)、Phospho-Smad2 (p-Smad2, AF2545)、GAPDH (AF1186) 抗体, 上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.2 仪器与设备

FA2004 电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; Eppendorf 5424R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Varioskan LUX 多功能酶标仪, 美国 Thermo Scientific 科技公司; Leica DM4B 正置显微镜, 德国 Leica 仪器有限公司; FluorChem M 超灵敏全自动化学发光成像分析系统, 美国 ProteinSimple 公司; KZ-II 高速组织研磨仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司。

## 1.3 实验动物

雌性 SD 大鼠(共 35 只, 6 周龄, 体质量 160~190 g), 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(湘)2016-0002, 饲养于桂林医学院 SPF 级动物房, 实验单位许可证号: SYXK(桂)2020-0005。所有大鼠均在标准环境内合笼饲养(每笼 2~3 只), 室温(22±1)℃, 相对湿度 60%, 保持明暗周期(12 h/12 h)一致, 自由摄食及清洁饮水。本研究经桂林医学院实验动物伦理委员会审查通过(GLMC201806003)。

## 1.4 益生菌培养及菌液制备

乳双歧杆菌和植物乳杆菌菌液依照李娜等<sup>[14]</sup>的方法, 丁酸梭菌菌液依照示秀哗等<sup>[15]</sup>的方法进行制备。将乳双歧杆菌、植物乳杆菌接种于 MRS 液体培养基中, 丁酸梭菌接种于丁酸梭菌增殖培养基中, 在厌氧环境下 37℃ 培养 24 h 后进行菌体计数。根据测定的活菌数将一定量的乳双歧杆菌、植物乳杆菌及丁酸梭菌重悬于生理盐水中各配置成浓度为 1×10<sup>9</sup> CFU/mL 的菌液<sup>[16]</sup>。

## 1.5 实验方法

### 1.5.1 动物实验方案

PCOS 大鼠模型建立参考 He 等<sup>[17]</sup>的方法。总 35 只雌性大鼠经适应性喂养一周后, 随机分成正常组、PCOS 组、PCOS+乳双歧杆菌组、PCOS+丁酸梭菌组、PCOS+植物乳杆菌组, 每组 7 只。正常组给予 1wt% 羧甲基纤维素钠(Sodium Carboxymethyl Cellulose, CMC)灌胃(1 mL/d), 其余各组大鼠均给予来曲唑(每天 1 mg/kg)-1wt% CMC 混悬液灌胃。同时, 乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌组分别灌胃等量的相应活菌悬液(1 mL/d)。灌胃共持续 28 d, 其中乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌组每只大鼠益生菌灌胃总量为 28×10<sup>9</sup> CFU。整个实验期间, 所有大鼠均自由摄食及饮水, 并每 3 天进行体质量监测。

### 1.5.2 大鼠动情周期检测

从实验干预的第 10 天开始, 对所有大鼠进行 10 d

的阴道涂片, 以观察其动情周期规律。阴道涂片及巴氏染色法参考 Cora 等的方法<sup>[18]</sup>。发情阶段的判断依据如下: 动情前期以扁平上皮细胞为主; 动情期以角质化细胞为主; 动情期后期白细胞、角质化细胞、扁平上皮细胞 3 种细胞比例相当; 动情间期以白细胞为主。

### 1.5.3 血液及脏器的取材

干预结束后, 各组大鼠禁食不禁水 12 h。期间测量大鼠的体质量, 以鼻尖至肛门的长度为体长, 按公式(1)计算肥胖指标 Lee's 指数(记为  $E$ )<sup>[19]</sup>; 取尾静脉血检测空腹血糖(Fasting Plasma Glucose, FPG)。CO<sub>2</sub> 麻醉处死大鼠后, 腹主动脉取血, 待血液凝固后迅速离心分离出血清, -80℃ 低温保存。大鼠置于冰上开腹, 快速分离两侧卵巢以及内脏脂肪(包括肾周脂肪、腹部脂肪和子宫周脂肪), 并对内脏脂肪进行称重。取一侧卵巢快速置于  $m=4\%$  多聚甲醛固定, 其余 -80℃ 低温保存备用。

$$E = \sqrt[3]{\frac{m \times 1000}{l}} \quad (1)$$

注:

$m$ ——大鼠体质量, g;

$l$ ——大鼠体长, cm。

### 1.5.4 卵巢组织病理学观察

将固定后的卵巢组织浸入石蜡包埋, 连续切取 4 μm 的石蜡切片进行 Masson 染色, 于显微镜下观察大鼠卵巢组织纤维化改变, 其中细胞核、胶原纤维染色结果呈蓝色, 胞浆、肌肉染色结果呈红色。另连续切取 4 μm 的石蜡切片进行 H&E 染色, 于显微镜下观察大鼠卵巢组织病理改变, 统计每张切片的囊性卵泡数、黄体数并拍照记录。

### 1.5.5 血清生化指标的检测

依照 ELISA 试剂盒说明书要求检测大鼠血清中 E2、T、LH、FSH 以及空腹胰岛素(Fasting Insulin, FINS)水平, 并按公式(2)计算胰岛素抵抗指数(Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance, HOMA-IR)。

$$P = \frac{F_1 \times F_2}{22.5} \quad (2)$$

式中:

$P$ ——胰岛素抵抗指数 HOMA-IR;

$F_1$ ——空腹血糖 FPG, mmol/L;

$F_2$ ——空腹胰岛素水平 FINS, mU/L。

### 1.5.6 血脂相关指标及血清 LPS 水平的检测

依照 ELISA 试剂盒说明书要求检测大鼠血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C 及 LPS 水平。

### 1.5.7 蛋白质印迹法检测卵巢组织中 TGF-β/Smads 信号通路相关蛋白的表达水平

称取约 30 mg 的卵巢组织, 生理盐水清洗血污, 按

10:1 的比例加入蛋白质裂解液 (含 PMSF) 提取卵巢总蛋白, 于 4 °C, 12 000 r/min 条件下离心 10 min。收集上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳胶 (SDS-PAGE), 加样进行电泳分离, 待电泳完成后采用湿法转膜。转膜 1 h 后, 将 NC 膜放入 10wt% 脱脂奶粉中封闭 2 h, 一抗孵育过夜。次日采用相应二抗孵育 1 h 后, 加入特超敏 ECL 化学发光试剂, 自动化学发光成像仪检测相关蛋白的表达情况。

### 1.6 数据处理与统计分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析, 正态分布资料以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 显示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 法, 非正态分布资料采用秩和检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同益生菌干预对 PCOS 大鼠动情周期的影响

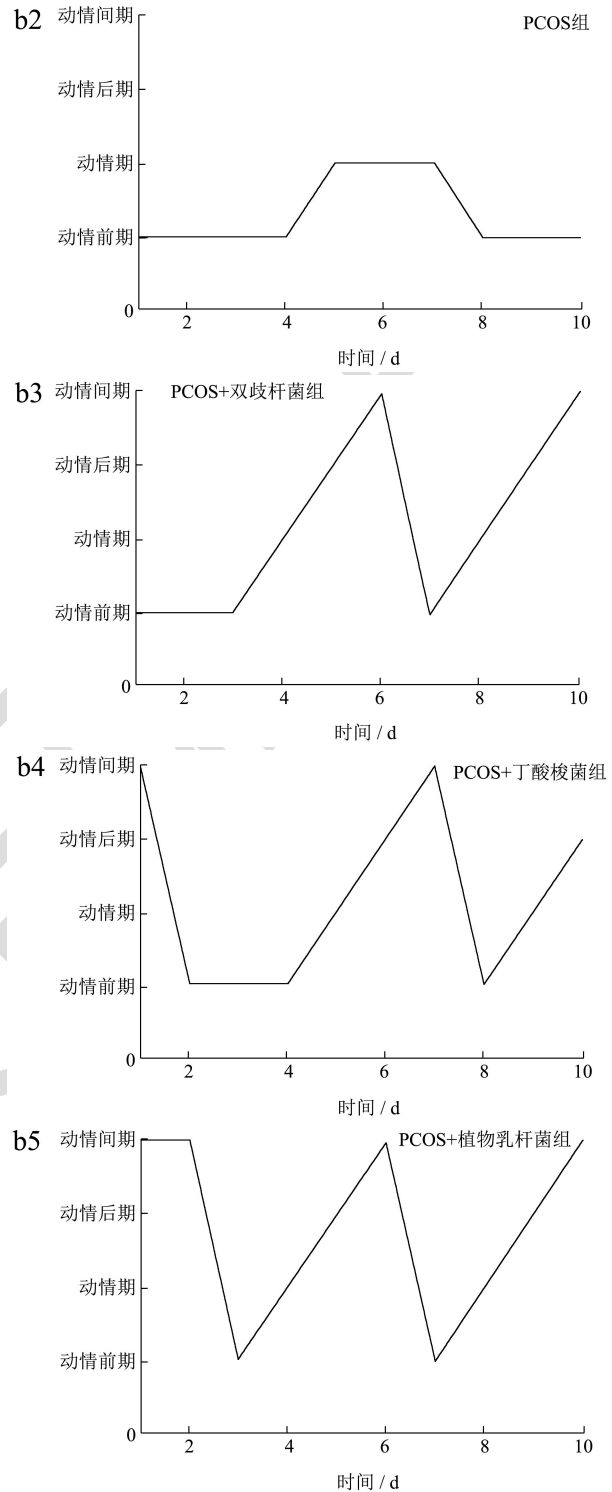
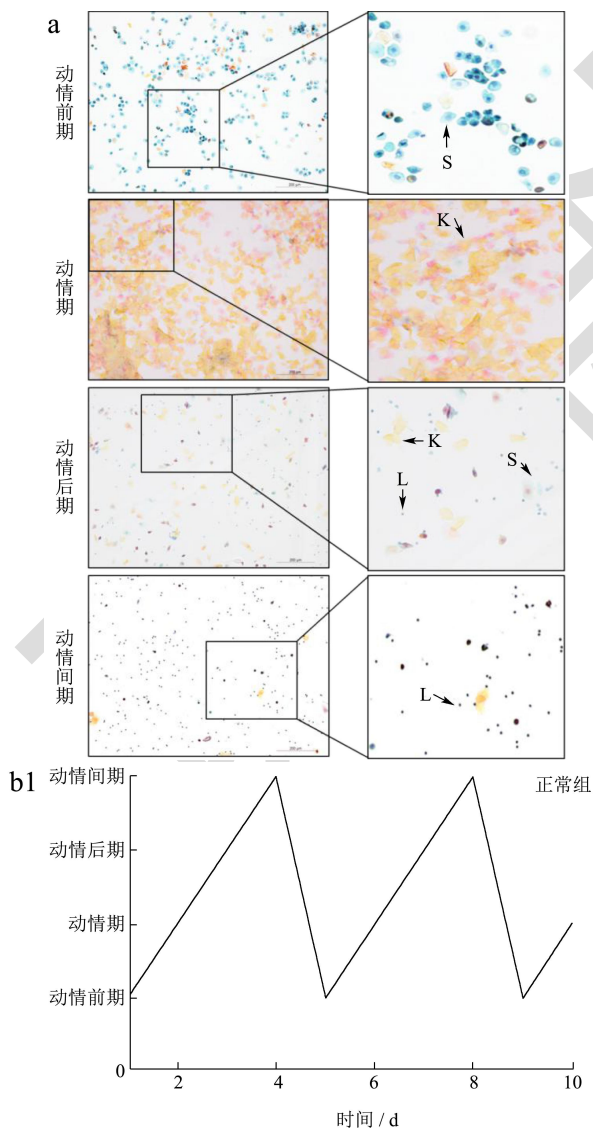


图1 大鼠动情周期中各阶段的阴道涂片 (a) 及不同益生菌干预对大鼠发情周期的影响 (b)

Fig.1 Vaginal smears at each stage of the rat estrus cycle (a) and the effect of different probiotics intervention on the rat estrus cycle (b)

注: S: 扁平上皮细胞, 染色结果为淡蓝色; K: 角质化细胞, 染色结果为橘红色; L: 白细胞, 染色结果为蓝紫色。

如图 1 所示, 正常组大鼠始终保持规律的动情周期, 而 PCOS 组大鼠的动情周期呈不规律变化。经乳

双歧杆菌、丁酸梭菌和植物乳杆菌干预后，三组大鼠的动情周期逐渐恢复。上述结果提示，乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌均能纠正 PCOS 大鼠不规律的动情周期，且植物乳杆菌的干预效果较好。

## 2.2 不同益生菌干预对 PCOS 大鼠体质量及 Lee's 指数的影响

如表 1 所示，造模前各组大鼠体质量之间无显著性差异 ( $p>0.05$ )。干预结束后，PCOS 组大鼠体质量、内脏脂肪质量和 Lee's 指数均显著上升，与正常组相比

差异具有统计学意义 ( $p<0.05$ )。与 PCOS 组相比，乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组和植物乳杆菌组大鼠体质量显著下降 7.91%、9.08%、9.91% ( $p<0.05$ )；Lee's 指数显著降低 3.33%、2.81%、4.55% ( $p<0.05$ )，内脏脂肪显著下降 34.04%、23.76%、33.79% ( $p<0.05$ )，各干预组之间差异无统计学意义 ( $p>0.05$ )。以上结果提示，乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌可有效降低 PCOS 大鼠体质量，改善其肥胖程度。石刘婷等<sup>[20]</sup>对 3 株植物乳杆菌进行豆乳发酵后发现植物乳杆菌 LP5 的发酵豆乳能有效降低 PCOS 大鼠的体质量，所得结论与本研究类似。

表 1 不同益生菌干预对 PCOS 大鼠体质量、Lee's 指数以及内脏脂肪质量的影响

Table 1 Effects of different probiotics intervention on body mass, Lee's index and visceral fat mass in PCOS rats

组别	初始体质量/g	最终体质量/g	Lee's 指数	内脏脂肪质量/g
正常组	173.83±9.32	291.33±15.11	22.96±0.28	7.11±1.53
PCOS 组	172.33±12.45 <sup>ns</sup>	352.25±15.19 <sup>a</sup>	24.63±0.38 <sup>a</sup>	12.25±3.07 <sup>a</sup>
PCOS+乳双歧杆菌组	174.33±12.18 <sup>ns</sup>	324.40±23.26 <sup>b</sup>	23.81±0.55 <sup>b</sup>	8.08±2.08 <sup>b</sup>
PCOS+丁酸梭菌组	175.14±11.42 <sup>ns</sup>	320.25±15.46 <sup>b</sup>	23.94±0.30 <sup>b</sup>	9.34±1.56 <sup>b</sup>
PCOS+植物乳杆菌组	173.67±13.91 <sup>ns</sup>	317.33±23.83 <sup>b</sup>	23.51±0.52 <sup>b</sup>	8.11±2.96 <sup>b</sup>

注：a 表示与正常组比较， $p<0.05$ ；b 表示与 PCOS 组比较， $p<0.05$ ；ns 表示与正常组比较， $p>0.05$ 。

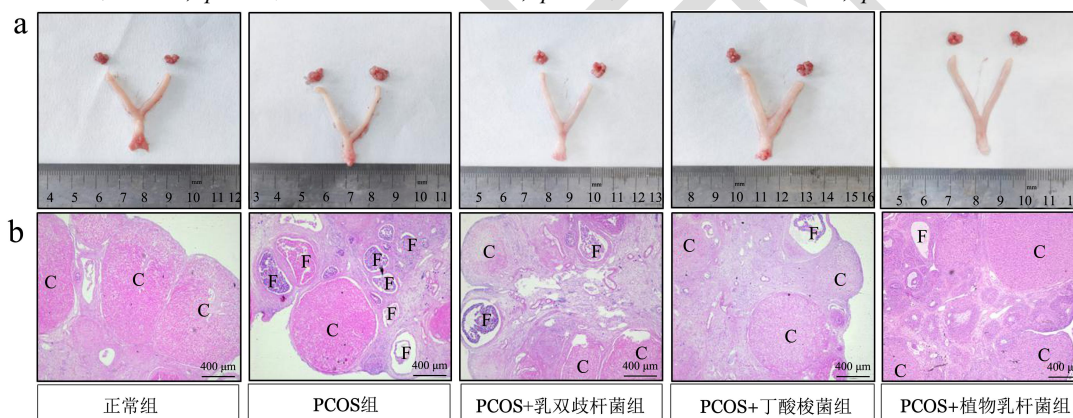


图 2 不同益生菌干预对各组大鼠卵巢形态 (a) 及其组织变化 (b) 的影响

Fig.2 Effect of different probiotics on ovarium morphological (a) and its histological observation (b) in PCOS rats

注：C：黄体；F：卵泡。

表 2 不同益生菌干预对各组大鼠卵巢黄体数以及囊性卵泡数的影响

Table 2 Effect of different probiotics on number of ovarian luteal bodies and cystic follicles in each group

组别	黄体数/个	囊性卵泡数/个
正常组	8.40±1.14	0.00±0.00
PCOS 组	4.50±0.58 <sup>a</sup>	8.33±1.53 <sup>a</sup>
PCOS+乳双歧杆菌组	5.17±0.75 <sup>c</sup>	5.75±1.26 <sup>b</sup>
PCOS+丁酸梭菌组	5.25±0.96 <sup>c</sup>	5.50±1.29 <sup>b</sup>
PCOS+植物乳杆菌组	6.33±0.58 <sup>b</sup>	5.40±1.14 <sup>b</sup>

注：a 表示与正常组比较， $p<0.05$ ；b 表示与 PCOS 组比较， $p<0.05$ ；c 表示与 PCOS 组比较， $p>0.05$ 。表 3、5 同。

## 2.3 不同益生菌干预对 PCOS 大鼠卵巢组织学改变的影响

由图 2a 所示，正常组大鼠卵巢表面较红润，而 PCOS 组大鼠卵巢表面较苍白，体积明显增大。乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌组大鼠经干预后卵巢表面相比 PCOS 组色泽偏红，体积减小。H&E 染色结果显示 (图 2b)，与正常组相比，PCOS 组大鼠卵巢囊性卵泡数量增多，黄体数量明显减少。如表 2 所示，与 PCOS 组相比，植物乳杆菌组大鼠卵巢黄体数量明显增多，且囊性扩张卵泡数量显著减少 ( $p<0.05$ )，而乳双

歧杆菌组、丁酸梭菌组大鼠卵巢黄体数量并未有显著增加,但囊性卵泡数量明显减少 ( $p < 0.05$ )。以上结果表明,乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌均能有效改善 PCOS 大鼠的卵巢组织损伤。

### 2.4 不同益生菌干预对 PCOS 大鼠卵巢纤维化的改善程度

卵巢组织的 Masson 染色结果如图 3 所示。与正常组相比,PCOS 组大鼠卵泡膜周围呈高度纤维化,且胶原纤维由黄体膜颗粒渗入黄体颗粒细胞。与 PCOS 组相比,乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌组大鼠卵巢纤维化程度均有明显改善。结果提示,乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌均能改善 PCOS 大鼠的卵巢纤维化症状。

### 2.5 不同益生菌干预后各组大鼠血清性激素水平的变化

高雄激素血症是 PCOS 重要的病理特征之一,过高的雄激素水平可加剧性激素分泌紊乱,造成排卵障碍<sup>[1]</sup>。正常情况下,LH 与卵泡膜细胞上的 LH 受体结合生成 T,同时 FSH 可激活颗粒细胞中芳香化酶的活性致使 T 进一步转化为 E2。而 PCOS 的卵巢病变可导致下丘脑-垂体-卵巢轴 (HPO) 功能发生异常,刺激垂体生成更多的 LH

并抑制 FSH 的分泌,造成 T 和 LH/FSH 比值升高<sup>[21]</sup>。此外,血清中异常升高的胰岛素也可与胰岛素样生长因子共同作用于卵泡膜细胞,造成体内 T 的过度生成<sup>[22]</sup>。研究发现,脑肠介质如胃饥饿素 (Ghrelin)、酪酪肽 (Peptide Tyrosine Tyrosine, PYY) 和生殖生理的内分泌调节之间存在相互作用<sup>[23]</sup>。Liu 等<sup>[24]</sup>发现,PCOS 患者 Ghrelin 和 PYY 水平显著降低,且与 T 呈负相关。益生菌作为一种肠道微生态调节剂,可通过调节肠道菌群结构影响 Ghrelin 和 PYY 的分泌,并由此参与脑-肠互动,从而降低异常升高的 LH 和 T 水平<sup>[25-27]</sup>。如表 3 所示,PCOS 组大鼠血清 T、LH 和 LH/FSH 比值较正常组显著升高 ( $p < 0.05$ ); E2 和 FSH 水平显著降低 ( $p < 0.05$ ),这与 Kafili 等<sup>[28]</sup>的研究结果一致。与 PCOS 组相比,乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌组大鼠血清 T 水平分别下降 25.87%、30.11%、38.29%且具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ); LH 水平分别下降 25.26%、24.42%、31.08% ( $p < 0.05$ ); LH/FSH 比值分别下降 25.45%、24.24%、23.64%且具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),其中以植物乳杆菌的干预效果最好。此外,植物乳杆菌能显著升高 PCOS 大鼠血清中的 E2、FSH 水平分别至 49.94 ng/L、18.73 IU/L,丁酸梭菌能显著升高 FSH 水平至 17.77 IU/L ( $p < 0.05$ )。上述结果提示,乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌均能有效调节 PCOS 大鼠血清性激素水平。He 等<sup>[17]</sup>的研究结果也提示,植物乳杆菌 HL2 能显著下调 PCOS 大鼠体内 LH、FSH 和 T 水平,这与本研究的结果相一致。

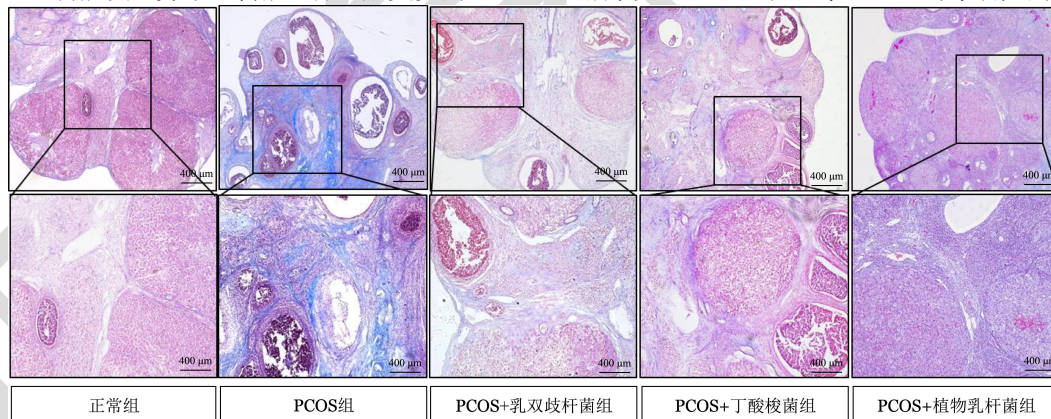


图 3 不同益生菌干预对 PCOS 大鼠卵巢纤维化程度的影响

Fig.3 Effect of different probiotics on the degree of ovarian fibrosis in PCOS rats

表 3 不同益生菌干预对各组大鼠血清激素水平的影响

Table 3 Effect of different probiotics on serum levels of sex hormone in PCOS rats

组别	T 浓度/(nmol/L)	E2 质量浓度/(ng/L)	FSH(IU/L)	LH 质量浓度/(ng/L)	LH/FSH
正常组	54.24±6.51	52.05±1.16	19.73±4.32	20.80±1.09	1.17±0.23
PCOS 组	65.41±8.48 <sup>a</sup>	40.16±5.59 <sup>a</sup>	13.57±1.95 <sup>a</sup>	25.06±0.18 <sup>a</sup>	1.65±0.12 <sup>a</sup>
PCOS+乳双歧杆菌组	48.49±5.18 <sup>b</sup>	46.63±8.10 <sup>c</sup>	15.94±2.67 <sup>c</sup>	18.73±3.72 <sup>b</sup>	1.23±0.23 <sup>b</sup>
PCOS+丁酸梭菌组	45.71±2.91 <sup>b</sup>	42.94±6.63 <sup>c</sup>	17.77±0.86 <sup>b</sup>	18.94±1.40 <sup>b</sup>	1.25±0.13 <sup>b</sup>
PCOS+植物乳杆菌组	40.36±4.36 <sup>b</sup>	49.94±6.63 <sup>b</sup>	18.73±0.66 <sup>b</sup>	17.27±2.11 <sup>b</sup>	1.26±0.26 <sup>b</sup>

## 2.6 不同益生菌干预对各组大鼠空腹血糖、胰岛素及 HOMA-IR 的变化

胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)同样也是 PCOS 的主要病理生理事件之一<sup>[21]</sup>, 持续的 IR 状态会加重 PCOS 的病理进程, 并引起糖耐量异常, 进而发展为糖尿病和心血管疾病<sup>[29,30]</sup>。研究发现, 肠道菌群失调可导致肠道内 LPS 的大量生成, 并通过破坏肠黏膜屏障升高体循环中的 LPS, 进而引发代谢内毒素血症, 最终导致慢性炎症反应和 IR 的发生<sup>[8,31]</sup>。由表 4 可知, 相比正常组, PCOS 组大鼠血清 INS、LPS 水平和 HOMA-IR 指数显著上升 23.82%、66.9%和 22.18% ( $p<0.05$ ), 而血糖水平与正常组未有较大差异, 其原因可能是 PCOS 大鼠通过代偿性分泌胰岛素来维持血糖水平。与 PCOS 组相比, 乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌组大鼠血清 INS 水平分别显著下降

20.01%、26.22%、14.24%, LPS 水平分别下降 72.03%、58.35%、62.78%且具有显著性差异, HOMA-IR 指数分别下降 12.57%、24.58%、18.99%且具有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 其中 INS、HOMA-IR 以丁酸梭菌的干预效果最好, LPS 水平以乳双歧杆菌干预效果最好。各干预组之间 INS、LPS 和 HOMA-IR 均无显著性差异。上述结果提示益生菌可能通过调节肠道菌群结构降低血清 LPS 水平, 进而缓解全身炎症反应, 达到改善 IR 的目的。Ahmadi 等<sup>[32]</sup>发现, 服用 12 周的益生菌补充剂可显著降低 PCOS 患者血清 FPG、INS 水平和 HOMA-IR 指数, 改善其代谢水平。同时, 也有研究指出而给予婴儿乳双歧杆菌及酪酸梭菌则可有效降低肥胖小鼠体内 LPS 水平<sup>[16]</sup>。陈烨等<sup>[33]</sup>的研究也发现, 在给予 PCOS 患者 12 周的双歧杆菌三联活菌片(含乳双歧杆菌、嗜酸乳杆菌, 粪肠球菌)治疗后, 患者 INS 水平和 HOMA-IR 均得到改善, 这与本研究的结果相一致。

表 4 不同益生菌干预对各组大鼠空腹血糖、胰岛素及 HOMA-IR 的变化

Table 4 Effect of different probiotics on serum levels of FPG, INS and HOMA-IR in PCOS rats

组别	FPG 浓度/(mmol/L)	INS/(mU/L)	LPS(EU/L)	HOMA-IR
正常组	4.41±0.21	14.69±0.53	219.83±88.03	2.93±0.11
PCOS 组	4.73±0.33 <sup>ns</sup>	18.19±0.94 <sup>a</sup>	366.91±135.68 <sup>a</sup>	3.58±0.15 <sup>a</sup>
PCOS+乳双歧杆菌组	4.72±0.05 <sup>ns</sup>	14.55±0.36 <sup>b</sup>	102.62±17.23 <sup>b</sup>	3.13±0.12 <sup>b</sup>
PCOS+丁酸梭菌组	4.50±0.31 <sup>ns</sup>	13.42±0.96 <sup>b</sup>	152.80±42.99 <sup>b</sup>	2.70±0.64 <sup>b</sup>
PCOS+植物乳杆菌组	4.43±0.33 <sup>ns</sup>	15.60±0.89 <sup>b</sup>	136.58±20.05 <sup>b</sup>	2.90±0.13 <sup>b</sup>

注: a 表示与正常组比较,  $p<0.05$ ; b 表示与 PCOS 组比较,  $p<0.05$ ; ns 表示与正常组比较,  $p>0.05$ 。

表 5 不同益生菌干预对各组大鼠血脂水平的影响 (mmol/L)

Table 5 Effect of different probiotics on serum levels of lipid in PCOS rats (mmol/L)

组别	TG 浓度	TC 浓度	LDL-C 浓度	HDL-C 浓度
正常组	0.82±0.09	5.16±0.52	0.42±0.01	1.36±0.35
PCOS 组	1.03±0.18 <sup>a</sup>	7.68±1.32 <sup>a</sup>	0.86±0.01 <sup>a</sup>	0.93±0.27 <sup>a</sup>
PCOS+乳双歧杆菌组	0.59±0.09 <sup>b</sup>	4.65±0.77 <sup>b</sup>	0.39±0.01 <sup>b</sup>	1.99±0.52 <sup>b</sup>
PCOS+丁酸梭菌组	0.69±0.08 <sup>b</sup>	4.72±0.71 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>	1.53±0.36 <sup>c</sup>
PCOS+植物乳杆菌组	0.71±0.20 <sup>b</sup>	4.48±1.41 <sup>b</sup>	0.44±0.02 <sup>b</sup>	1.39±0.53 <sup>c</sup>

## 2.7 益生菌干预对 PCOS 大鼠血清脂代谢水平的影响

脂代谢异常作为 PCOS 患者体内常见的代谢紊乱之一, 主要以血清中 TC、TG 及 LDL-C 水平升高, HDL-C 水平降低为特征<sup>[34]</sup>。研究发现, 肠道内厚壁菌门数量的增加和拟杆菌门数量的减少可增加饮食中能量的获取<sup>[35]</sup>。此外, 肠道菌群失调可通过内毒素血症诱发慢性炎症反应, 导致血脂紊乱进一步加重<sup>[36]</sup>。由表 5 可知, 与正常组相比, PCOS 组大鼠血清 TG、TC、

LDL-C 水平显著升高 ( $p<0.05$ ), HDL-C 水平显著降低 ( $p<0.05$ )。相比 PCOS 组, 乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组、植物乳杆菌组大鼠血清 TG 水平分别显著降低 42.72%、33.01%、31.06%; TC 水平分别降低 39.45%、38.54%、41.67%且具有显著性差异; LDL-C 水平分别降低 53.67%、51.22%、49.24%且具有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 其中以乳双歧杆菌的干预效果最好。此外, 乳双歧杆菌组 HDL-C 水平较 PCOS 组显著下降 ( $p<0.05$ )。乳双歧杆菌组、丁酸梭菌组和植物乳杆菌组之间 TG、TC、LDL-C、HDL-C 均无显著性差异 ( $p>0.05$ )。方圆圆等<sup>[16]</sup>的研究提示, 婴儿乳双歧杆菌

及酪酸梭菌可有效降低肥胖小鼠体内 TG、TC 和 LDL-C 水平,同时升高 HDL-C 水平,这与本研究的结果相一致。因此,可推测益生菌可能通过调节肠道菌群结构减少摄入能量并改善全身炎症状态,从而达到改善血脂紊乱的目的。

### 2.8 不同益生菌对 PCOS 大鼠卵巢纤维化相关因子蛋白表达影响

卵巢纤维化是卵巢功能障碍的重要病理因素之一,可导致机体排卵障碍,激素紊乱甚至功能衰竭,其特征主要为白膜增厚和间质结缔组织增厚<sup>[37]</sup>。TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路已被证实具有在 PCOS 卵巢纤维化中具有重要作用<sup>[38]</sup>。TGF- $\beta$ 1 首先与 TGF- $\beta$ II 型受体 (TGF- $\beta$ R2) 结合激活 TGF- $\beta$ R1,活化的 TGF- $\beta$ R1 在细胞内磷酸化 Smad2 和 Smad3,随后磷酸化的 Smad2、Smad3 与未磷酸化的 Smad4 形成复合物进入细胞核<sup>[39]</sup>。TGF- $\beta$ 1 过度表达时,Smad2-Smad3-Smad4 复合物于细胞核大量积累,并引起细胞外基质 (Extracellular

Matrix, ECM) 的大量沉积,进而引发器官纤维化<sup>[40]</sup>。为进一步探究三种益生菌对 PCOS 大鼠卵巢纤维化的影响机制,检测了 Smad4、p-Smad3、p-Smad2 在卵巢中的表达。

由图 4 可知,与正常组相比,PCOS 组大鼠卵巢中 Smad4、p-Smad3、p-Smad2 蛋白表达水平均有显著上升 ( $p < 0.05$ )。与 PCOS 组相比,乳双歧杆菌组大鼠卵巢组织中 Smad4、p-Smad3、p-Smad2 水平分别下降 52.89%、65.31%、77.42% ( $p < 0.05$ ); 丁酸梭菌组大鼠卵巢组织中 Smad4、p-Smad3、p-Smad2 水平分别下降 29.14%、65.82%、52.86% ( $p < 0.05$ ); 植物乳杆菌组大鼠卵巢组织中 Smad4、p-Smad3、p-Smad2 水平分别下降 69.80%、78.57%、56.96% ( $p < 0.05$ )。以上结果提示,乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌均能显著下调 PCOS 大鼠卵巢组织中 Smad4、p-Smad3、p-Smad2 的表达水平。Zhang 等<sup>[41]</sup>的研究发现,干酪乳杆菌可通过降低肝纤维化小鼠肝脏组织中 p-Smad3、Smad4 的表达水平改善肝纤维化,这提示益生菌可通过抑制 TGF- $\beta$ 1/smads 信号通路阻止卵巢纤维化的发生。

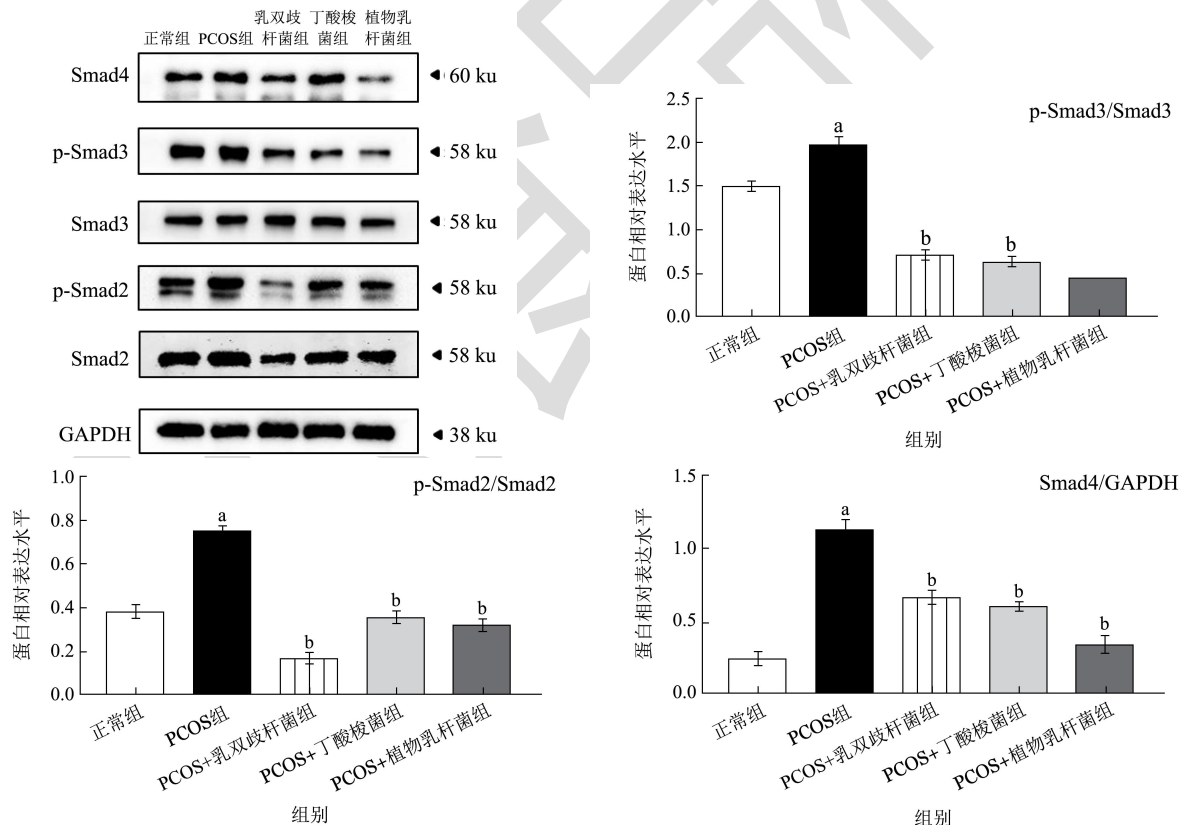


图 4 不同益生菌对 PCOS 大鼠卵巢纤维化相关因子蛋白表达影响

Fig.4 Effects of different probiotics on the protein expression of ovarian fibrosis-related factors in PCOS rats

注: a 表示与正常组比较,  $p < 0.05$ ; b 表示与 PCOS 组比较,  $p < 0.05$ 。



### 3 结论

综上所述,乳双歧杆菌、丁酸梭菌、植物乳杆菌均可一定程度上改善来曲唑诱导 PCOS 大鼠的症状,且三种益生菌对于 PCOS 大鼠各项指标的改善程度不一,其中乳双歧杆菌在调节脂代谢水平和方面具有优势,丁酸梭菌在改善 IR 方面具有优势,植物乳杆菌在调节血清性激素水平方面具有优势。本研究为益生菌用于 PCOS 的辅助治疗提供了一定研究基础。然而,益生菌改善 PCOS 大鼠症状的具体机制尚未得到验证,后续有待完善相关实验进一步讨论。

### 参考文献

- [1] 赵甲维,李晓宁,黄炎清,等.多囊卵巢综合征病因学研究进展[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2018,37(5):414-416
- [2] Teede H J, Misso M L, Costello M F, et al. International PCOS Network. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome [J]. Hum Reprod, 2018, 33(9): 1602-1618
- [3] Escobar-Morreale H F. Polycystic ovary syndrome: definition, etiology, diagnosis and treatment [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(5): 270-284
- [4] Justin L Sonnenburg, Fredrik Backhed. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism [J]. Nature, 2016, 535(7610): 56-64
- [5] GuoYanjie, Qi Yane, Yang Xuefei, et al. Association between polycystic ovary syndrome and gut microbiota [J]. Plos One, 2016, 11(4): 1-15
- [6] Lindheim L, Bashir M, Münzker J, et al. Alterations in gut microbiome composition and barrier function are associated with reproductive and metabolic defects in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): A pilot study [J]. Plos One, 2017, 12(1): e0168390
- [7] Scott T Kelley, Danalea V Skarra, Alissa J Rivera, et al. The gut microbiome is altered in a letrozole-induced mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. Plos One, 2016, 11(1): 1-17
- [8] Tremellen K, Pearce K. Dysbiosis of gut microbiota (DOGMA) - a novel theory for the development of polycystic ovarian syndrome [J]. Med Hypotheses, 2012, 79(1): 104-112
- [9] Kim S K, Guevarra R B, Kim Y T, et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases [J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(9): 1335-1340
- [10] Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial [J]. Eur J Clin Nutr, 2010, 64(6): 636-643
- [11] Shamasbi S G, Ghanbari-homati S, Mirghaourvand M. The effect of probiotics, prebiotics, and symbiotic on hormonal and inflammatory indices in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis [J]. Eur J Nutr, 2020, 59(2): 433-450
- [12] Garcia-Velasco J A, Moreno L, Pacheco A, et al. The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves *in vitro* fertilization outcome in low responder patients: a pilot study [J]. Fertil Steril, 2005, 84(1): 82-87
- [13] Tabrizi R, Ostadmohammadi V, Akbari M, et al. The effects of probiotic supplementation on clinical symptom, weight loss, glycemic control, lipid and hormonal profiles, biomarkers of inflammation, and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2022, 14(1): 1-14
- [14] 李娜,杨江华,韦宇拓.植物乳杆菌 ZJ316 高密度发酵条件优化[J].中国酿造,2021,40(5):43-48
- [15] 亓秀晔,张志焱,谢全喜,等.丁酸梭菌的筛选、鉴定及生物学功能分析[J].中国饲料,2021,17:16-20
- [16] 方圆圆,吴亚,陈彦辉,等.不同益生菌干预对高脂饮食诱导肥胖小鼠脂代谢及脂多糖影响的研究[J].中国实验诊断学, 2019,23(4):692-695
- [17] He Yufeng, Wang Qianqian, Li Xiu, et al. Lactic acid bacteria alleviate polycystic ovarian syndrome by regulating sex hormone related gut microbiota [J]. Food Funct, 2020, 11(6): 5192-5204
- [18] Cora M C, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears [J]. Toxicol Pathol, 2015, 43(6): 776-793
- [19] Lin B, Liu Y, Zhang W, et al. Role of diet on intestinal metabolites and appetite control factors in SD rats [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3): 2665-2674
- [20] 石刘婷,贺禹丰,杨羽倩,等.植物乳杆菌发酵豆乳对多囊卵巢综合征大鼠的影响[J].食品与发酵工业,2022,48(4):165-170
- [21] P Desai, N Malhotra, D Shah. Principles and Practice of Obstetrics and Gynecology for Postgraduates [M]. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Private Limited, 2008: 676-683
- [22] Ranasinha S, Joham A E, Norman R J, et al. The association between polycystic ovary syndrome (PCOS) and metabolic

- syndrome: a statistical modelling approach [J]. *Clin Endocrinol*, 2015, 83(6): 879-887
- [23] Gambineri A, Pagotto U, Tschöp M, et al. Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome [J]. *J Endocrinol Invest*, 2003, 26(7): 629-634
- [24] Liu R, Zhang C, Shi Y, et al. Dysbiosis of gut microbiota associated with clinical parameters in polycystic ovary syndrome [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 324-336
- [25] Zhang J, Sun Z, Jiang S, et al. Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 regulates the secretion of sex hormones in polycystic ovary syndrome patients through the gut-brain axis [J]. *mSystems*, 2019, 4(2): e00017-19
- [26] Ogata R, Matsuzaki T, Iwasa T, et al. Hypothalamic ghrelin suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone via beta-endorphin in ovariectomized rats [J]. *Neuroendocrinology*, 2009, 90(4): 364-370
- [27] Graham E J, Selgrade J F. A model of ovulatory regulation examining the effects of insulin-mediated testosterone production on ovulatory function [J]. *J Theor Biol*, 2017, 41(6): 149-160
- [28] Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease [J]. *Arch Med Res*, 2004, 35(2): 103-108
- [29] Lazaridou S, Dinas K, Tziomalos K. Prevalence, pathogenesis and management of prediabetes and type 2 diabetes mellitus in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Hormone*, 2017, 16(4): 373-380
- [30] Bhatena R K. Insulin resistance and the long-term consequences of polycystic ovary syndrome [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2011, 31(2): 105-110
- [31] Andreasen A S, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects [J]. *Br J Nutr*, 2010, 104(12): 1831-1838
- [32] Ahmadi S, Jamilian M, Karamali, et al. Probiotic supplementation and the effects on weight loss, glycaemia and lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Hum Fertil*, 2017, 20(4): 254-261
- [33] 陈焯,朱明慧,王婵妮. 益生菌补充对多囊卵巢综合征患者血糖和血脂的影响[J]. *国际妇产科学杂志*, 2018, 45(2): 199-202
- [34] Guan Yuanyuan, Wang Dongjun, Bu Huaian, et al. The effect of metformin on polycystic ovary syndrome in overweight women: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Int J Endocrinol*, 2020, 1-12
- [35] Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 120-126
- [36] Harris K, Amira K, Geneviève M, et al. Is the gut micro-biota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? [J]. *J Obes*, 2012, 1-14
- [37] Hughesdon P E. Morphology and morphogenesis of the stein - Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis" [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 1982, 37(2): 59-77
- [38] Wang D, Wang W, Liang Q, et al. DHEA-induced ovarian hyper fibrosis is mediated by TGF- $\beta$  signaling pathway [J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 6-17
- [39] Zhou J, Tan Y, Wang X, et al. Paeoniflorin attenuates DHEA-induced polycystic ovary syndrome via inactivation of TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway *in vivo* [J]. *Aging*, 2021, 13(5): 7084-7095
- [40] DiRenzo D M, Chaudhary M A, Shi X, et al. A crosstalk between TGF-beta/Smad3 and Wnt/beta-catenin pathways promotes vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(5): 498-505
- [41] Zhang D, Hao X, Xu L, et al. Intestinal flora imbalance promotes alcohol-induced liver fibrosis by the TGF $\beta$ /smad signaling pathway in mice [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4511-4516