

# 鸡胆汁酶转化物对酒精性大鼠胆汁酸代谢和肠道菌群的调控效应

蒋燕妮<sup>1</sup>, 邹泽斌<sup>2</sup>, 胡芳<sup>2</sup>, 李雅琪<sup>2</sup>, 林栩聪<sup>2</sup>, 黎攀<sup>2</sup>, 杜冰<sup>2</sup>, 邱科先<sup>1\*</sup>

(1. 中山百灵生物技术股份有限公司, 广东中山 528437) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 该文旨在探究鸡胆汁酶转化物 (Enzymatically Converted Chicken Bile, CB) 对酒精致大鼠胆汁酸代谢及肠道菌群失调的调节作用。35 只 8 周龄的雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠适应性喂养一周后, 随机分为 5 组: 正常组 (HC)、模型组 (MC)、CB 低、中、高剂量组 (CBL 50 mg/kg, CBM 100 mg/kg, CBH 150 mg/kg)。经过一周的酒精造模及 CB 干预后处死大鼠收集血清及盲肠内容物, 分析血清中胆汁酸的组成及盲肠内容物中肠道菌群的组成。结果表明, 高剂量 CB 的干预显著降低了大鼠血清中初级胆汁酸的水平, 同时未结合型胆汁酸和结合型胆汁酸的比例显著降低 59.90%, 其中牛磺熊去氧胆酸的水平显著升高, 改变了胆汁酸的组成。CB 可以恢复酒精引起的肠道菌群丰富度和多样性的降低, 厚壁菌门与拟杆菌门的比例降低 53.66%, 提高 *Parabacteroides*、*Bacteroides* 等益生菌的丰度, 降低 *Romboutsia*、*Erysipelothrix* 等有害菌的丰度, 同时提高如 *Verrucomicrobiota* 和 *Bacteroides* 等具有代谢胆汁酸能力菌群的丰度。血清胆汁酸与肠道菌群之间存在较强的相关性。综上所述, CB 具有调节肠道菌群组成及血清胆汁酸代谢的效益。

**关键词:** 鸡胆汁酶转化物; 胆汁酸; 肠道菌群; 牛磺熊去氧胆酸

文章编号: 1673-9078(2024)12-10-22

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1245

## Regulatory Effects of Enzymatically Converted Chicken Bile on Bile Acid Metabolism and Gut Microbiota in Alcoholic Rats

JIANG Yanni<sup>1</sup>, ZOU Zebin<sup>2</sup>, HU Fang<sup>2</sup>, LI Yaqi<sup>2</sup>, LIN Xucong<sup>2</sup>, LI Pan<sup>2</sup>, DU Bing<sup>2</sup>, QIU Kexian<sup>1\*</sup>

(1. Zhongshan Belling Biotechnology Co. Ltd., Zhongshan 528437, China)

(2. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The regulatory effects of enzymatically converted chicken bile (CB) on bile acid metabolism and gut microbiota dysbiosis in alcoholic rats were investigated. Thirty-five 8-week-old male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups after 1 week of adaptive feeding: healthy group (HC), model group (MC), low, medium, and high CB dose group (CBL 50 mg/kg, CBM 100 mg/kg, CBH 150 mg/kg). After 1 week of alcohol modeling and CB intervention, the rats were euthanized and serum and cecum contents were collected. The bile acid composition in the serum

引文格式:

蒋燕妮, 邹泽斌, 胡芳, 等. 鸡胆汁酶转化物对酒精性大鼠胆汁酸代谢和肠道菌群的调控效应[J]. 现代食品科技, 2024, 40(12): 10-22.

JIANG Yanni, ZOU Zebin, HU Fang, et al. Regulatory effects of enzymatically converted chicken bile on bile acid metabolism and gut microbiota in alcoholic rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 10-22.

收稿日期: 2023-10-18

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21)

作者简介: 蒋燕妮 (1992-), 女, 学士, 研究方向: 食品、药品注册临床及研究, E-mail: jyn@bellingbio.com

通讯作者: 邱科先 (1968-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品、药品质量研究及生产工艺研究, E-mail: qkx@livgal.com

and the gut microbiota in the cecum contents were analyzed. The results showed that the high-dose CB intervention led to a significant decrease in the concentration of primary bile acids in rat serum, whereas the ratio of unconjugated to conjugated bile acids was reduced by 59.90%, with a significant increase in the level of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), thereby altering the composition of bile acids. CB successfully restored the alcohol-induced reduction in the abundance and diversity of the gut microbiota, resulting in a 53.66% decrease in the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes. Furthermore, the abundance of probiotic bacteria such as *Parabacteroides* and *Bacteroides* was improved, whereas that of harmful bacteria, such as *Romboutsia* and *Erysipelothrix*, was decreased. Meanwhile, the abundance of bile acid-metabolizing bacteria, such as *Verrucomicrobiota* and *Bacteroides*, was improved. A strong correlation was found between serum bile acids and gut microbiota. It can be concluded that CB has beneficial effects on the regulation of gut microbiota composition and serum bile acid metabolism.

**Key words:** enzymatically converted chicken bile; bile acids; gut microbiota; tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)

过度饮酒导致的酒精性肝病 (Alcoholic Liver Disease, ALD) 近年来发病率和死亡率连年攀升<sup>[1]</sup>。胆汁酸 (Bile Acids, BAs) 可作为信号分子在机体中参与糖代谢、脂质代谢和能量稳态等多种重要的代谢作用<sup>[2]</sup>。初级胆汁酸是肝脏胆固醇代谢的产物, 在排入肠道中后, 在微生物的代谢转化为次级胆汁酸, 在回肠末端胆汁酸会被重吸收进入机体, 这是胆汁酸的肠肝循环<sup>[3]</sup>, 酒精的刺激可打破胆汁酸的平衡, 影响肠肝循环<sup>[4]</sup>, 研究表明, 初级胆汁酸的淤积发生在 ALD 的各个阶段<sup>[1]</sup>, 而胆汁酸的淤积会进一步的造成肝脏功能的损伤。同时有报道称, 部分次级胆汁酸如牛磺胆酸 (Taurocholic Acid, TCA)、熊去氧胆酸 (Ursodeoxycholic Acid, UDCA) 和牛磺熊去氧胆酸 (Taurine Ursodeoxycholic Acid, TUDCA) 等在抗炎、调节脂质代谢和护肝上表现出良好的效果<sup>[5]</sup>。且胆汁酸在酒精相关性肝病的关键信号传导上起到重要作用<sup>[4]</sup>, 因此维持胆汁酸的稳态, 可作为治疗 ALD 的一项重要策略<sup>[6]</sup>。

肠道微生物群和 ALD 的作用是近年来的研究重点, 大量研究表明, 酒精导致的肝损伤与肠道微生物群的变化相关<sup>[7]</sup>, 重塑肠道微生物的组成能有效的缓解由酒精造成的肝脏疾病。同时在胆汁酸的肠肝循环中, 肠道微生物的代谢作用是胆汁酸转化的关键<sup>[4]</sup>, 肠道中具有产胆盐水解酶 (Bile Salt Hydrolase, BSH) 菌群和  $7\alpha$ -脱羟基反应菌群, 是参与胆汁酸转化的关键<sup>[8]</sup>。更有研究表明通过粪便微生物移植可以防止酒精引起的小鼠肝损伤。这提示调节肠道微生物群紊乱是治疗 ALD 的另一个重要靶点, 且肠道微生物群会影响胆汁酸的肠肝循环。

通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD) 氧化酶和  $7\alpha$  羟类固醇脱氢酶的氧化作用, 以及醇脱氢酶和  $7\beta$  羟类固醇

脱氢酶的还原作用, 将鸡胆汁制成鸡胆汁酶转化物 (CB), 其中 TUDCA 的质量分数超过 28%。在先前的研究发现 CB 可以通过提高酒精代谢、脂质代谢以及减缓氧化应激、炎症应激达到保护肝脏的作用。膳食胆汁酸同样能够重塑肠道微生物群<sup>[9]</sup>, 因此, 通过本实验探究 CB 是否具有通过调节胆汁酸代谢和肠道微生物群双靶点的护肝作用, 同时分析肠道微生物群和胆汁酸代谢之间的作用关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鸡胆汁酶转化物 (CB), 中山丽高生物医药有限公司提供;  $56^\circ$  红星二锅头, 白酒北京红星股份有限公司; 33 种胆汁酸标准品, 购自上海甄准生物科技有限公司; 基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; 乙酸铵 (色谱纯), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、乙腈、甲酸 (色谱纯), 美国 Thermo-Fisher。

### 1.2 仪器与设备

AB Sciex QTRAP 6500 型质谱仪, 上海麦特英杰生物科技有限公司; AB Sciex Exion LCTMAD 型液相色谱, 上海麦特英杰生物科技有限公司; BNR07953 型光栅酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司; H1650R 型台式冷冻离心机, 中国湖南湘仪; PIKOREAL96 型荧光定量 RCP 仪, 美国 Thermo。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 CB物基本成分鉴定

CB 总糖含量, 参考苯酚硫酸法并稍作修改, 质量分数为 5.01%; 蛋白质含量, 参考 GB 5009.5-2016

食品中蛋白质的测定质量分数为 25.03%；游离氨基酸含量，参照《实用食物营养成分分析手册》中游离氨基酸的测定方法，游离氨基酸质量分数为 1.72%；胆固醇含量，参考 GB5009.128-2016 中胆固醇的检测方法，胆固醇质量分数为 0.05%；无机元素含量，参考 GB5009.268-2016 中各类无机元素的检测方法，无机元素质量分数为 8.19%；各类胆汁酸含量测定，以 33 种胆汁酸标准品建立标曲，通过 LC-MS 的方法检测各类胆汁酸的含量<sup>[10]</sup>，胆汁酸质量分数为 47.94%。

### 1.3.2 动物实验

180~220 g (6~8 周龄) 的 (Specific Pathogen Free) 级雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠，购自广东省医学实验动物中心，许可证编号：SYXK (粤) 2022-0002。饲养于华南农业大学实验动物中心 SPF 级屏障环境，按照实验动物保护和伦理规则饲养 [实验动物许可证编号：SYXK(粤)2022-0136，伦理审查编号：2022b199]，室温控制在 20~26 °C，湿度控制在 40%~70% 范围，明暗交替各 12 h，保证通风。

表 1 胆汁酸信息表

Table 1 Bile acids information table

序号	化合物英文名称	缩写	中文名称
1	Taurohyodeoxycholic acid sodium salt	THDCA	牛磺猪脱氧胆酸钠盐
2	Taurohyocholicacidsodium salt	THCA	牛磺猪胆酸钠盐
3	7-Ketolithocholic acid	7_ketoLCA	7-酮基石胆酸
4	Nor Cholic acid	NorCA	23-脱甲胆酸
5	Taurodeoxycholic acid sodium salt	TDCA	牛磺脱氧胆酸钠盐
6	Hyodeoxycholic acid	HDCA	猪脱氧胆酸
7	Glycohyocholic acid sodium salt	GHCA	甘氨酸猪胆酸钠盐
8	23-Nordeoxycholic acid	23norDCA	23-脱甲脱氧胆酸
9	Isolithocholic acid	isoLCA	异石胆酸
10	12-ketolithocholic acid	12_ketoLCA	12-酮基石胆酸
11	Allolithocholic acid	alloLCA	别石胆酸
12	Lithocholic acid 3-sulfate sodium salt	LCA_S	石胆酸-3-硫酸钠盐
13	Deoxycholic acid	DCA	脱氧胆酸
14	Glycolithocholic acid	GLCA	甘氨酸胆酸
15	Taurochenodeoxycholic acid sodium salt	TCDCA	牛磺鹅去氧胆酸钠盐
16	Glycoursodeoxycholic acid	GUDCA	甘氨酸熊脱氧胆酸
17	Chenodeoxycholic acid	CDCA	鹅去氧胆酸
18	Cholic acid	CA	胆酸
19	Tauroursodeoxycholic acid Dihydrate	TUDCA	牛磺熊脱氧胆酸二水合物
20	Chenodeoxycholic acid-3-β-D-glucuronide	CDCA_3Gln	甘氨酸石胆酸-3-葡萄糖苷
21	Lithocholic acid	LCA	石胆酸
22	3β-Ursodeoxycholic acid	3β_UDCA	3β-熊去氧胆酸
23	Glycochenodeoxycholic acid sodium salt	GCDCA	甘氨酸鹅脱氧胆酸钠盐
24	Glycocholic acid hydrate	GCA	甘氨酸胆酸水合物
25	Tauroolithocholic acid sodium salt	TLCA	牛磺石胆酸钠盐
26	Ursodeoxycholic acid	UDCA	熊去氧胆酸
27	3-dehydrocholic acid	3_DHCA	3-脱氢胆酸
28	Hyochoolic acid	HCA	猪胆酸
29	Alpha-Muricholic acid	α-MCA	阿尔法-鼠胆酸
30	Beta-Muricholic acid	β-MCA	贝塔-鼠胆酸
31	Taurocholic acid	TCA	牛磺胆酸
32	Tauro-alpha-Muricholic acid sodium salt	T-α-MCA	牛磺-阿尔法-鼠胆酸钠盐
33	Glycodeoxycholic acid	GDCA	甘氨酸脱氧胆酸

### 1.3.3 实验安排

所有的动物在实验条件下适应性喂养一周后,将SD大鼠随机分为HC(正常组,0.9%生理盐水)、MC(模型组,0.9%生理盐水)、CBL(鸡胆汁酶转化物低剂量组,50 mg/kg·bw)、CBM(鸡胆汁酶转化物中剂量组,100 mg/kg·bw)、CBH(鸡胆汁酶转化物中剂量组,150 mg/kg·bw),每组7只,每周称量并记录大鼠的体质量。所有大鼠在给药2 h之后,HC大鼠给与0.9%生理盐水,其他大鼠给予56°红星二锅头白酒,通过灌胃给予,剂量为6 mL/kg·bw,每天1次,持续6 d。第7天所有大鼠给药后30 min后,HC大鼠给与0.9 wt.%生理盐水,其他大鼠给予56°红星二锅头白酒,通过灌胃给予,剂量为12 mL/kg,禁食禁水2 h后,麻醉大鼠,对大鼠进行腹腔动脉采血并静置后收集血清与盲肠内容物,液氮速冻后保存在-80 °C冰箱长期保存。

### 1.3.4 血清靶向胆汁酸代谢组学

表2 色谱梯度表

Table 2 Chromatographic gradient chart

时间/min	A/%	B/%
0.0	80	20
0.5	80	20
1.0	65	35
2.5	63	37
4.1	62	38
5.0	62	38
6.0	61	39
6.5	60	40
8.5	56	44
9.0	55	45
9.5	48	52
12.5	35	65
13.0	0	100
15.0	0	100
15.1	80	20
17.0	80	20

称取33种胆汁酸标准品,如下表1,通过甲醇稀释成不同质量浓度(25 000、15 000、5 000、2 500、500、250、50、25、15、5、2.5和1.5 ng/mL)的标准品工作液于-20 °C冰箱保存上机备用。取大鼠血清样本(每组7个样品)加入质谱水中,涡旋混匀后取100 μL加入300 μL含混合内标的沉淀剂

(乙腈:甲醇=8:2, V/V),涡旋混匀,冰上静置30 min,12 000 r/min 4 °C离心10 min,取全部上清进行LC-MS分析。其中色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相:A相:体积分数为0.1%甲酸水溶液,B相:乙腈;柱温:50 °C;进样量:2 μL;流量:0.3 mL/min,色谱梯度如下表2。质谱条件:电喷雾电离源(ESI),负离子电离模式,离子源温度550 °C,离子源电压-4 500 V,气帘气0.241 MPa,雾化气和辅助气均为0.414 MPa。采用多反应监测(MRM)进行扫描。

### 1.3.5 盲肠内容物肠道微生物分析

通过粪便基因组DNA提取试剂盒(Tian Gen),对大鼠(每组7个样本重复数)盲肠内容物基因组DNA进行提取,在1 wt.%的琼脂糖凝胶上检测DNA的浓度和纯度。根据浓度,用无菌水将DNA稀释至1 ng/μL。以稀释后的基因组DNA为模板,使用带有条形码的特异引物扩增16S V3-V4区域rRNA。PCR产物使用2 wt.%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,对检测合格的PCR产物进行磁珠纯化。使用NEB Next® Ultra™ II FS DNA PCR-free Library Prep Kit文库试剂盒(New England Biolabs)进行文库构建,构建好的文库经过Qubit和Q-PCR定量,文库合格后,使用NovaSeq 6000进行PE 250上机测序。

### 1.4 数据处理

实验数据以“平均值±标准差”来表示,采用GraphPad Prism 8(版本:v8.0.2.263)和Origin 2022(版本:v.9.9.0.225)进行作图,通过单因素方差分析(One-Way ANOVA)和t检验计算实验组之间的显著性。其中与正常组相比\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ,与模型组相比# $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 血清中胆汁酸的靶向代谢分析

#### 2.1.1 血清中胆汁酸组成差异分析

研究表明,酒精可直接导致胆汁酸代谢谱的变化<sup>[1]</sup>,如下图1a所示,相较于HC组,MC组大鼠血清中总胆汁酸的含量升高12.10%,CB的干预分别降低了21.71%、25.95%、23.37%的胆汁酸,但



所有组之间均未表现出统计学显著差异。胆汁酸的组成可分为四类，初级胆汁酸 (Primary)、初级结合型胆汁酸 (Primary Conjugated)、次级胆汁酸 (Secondary) 和次级结合型胆汁酸 (Secondary Conjugated)。如图 1b 所示，HC 组与 MC 组大鼠的四类胆汁酸的组成上没有差异，但中剂量 CB 显著降低了 48.67% 的初级胆汁酸 ( $P < 0.05$ )，低剂量和高剂量的 CB 分别降低了 41.08%、43.18% 的初级结合型胆汁酸 ( $P < 0.05$ )。各组大鼠的胆汁酸组成中，甘氨酸结合型胆汁酸 (Glycine Conjugated BAs) 和牛磺结合型胆汁酸 (Taurine Conjugated BAs) 均没有统计学差异，而 CBM 组大鼠血清中未结合型胆汁酸水平相较于 MC 组大鼠显著降低 41.58% (图 1d)。未结合型胆汁酸与结合型胆汁酸的比例在 MC 组显著升高 172.23% (图 1c)，但在 CBM 与 CBH 组中分别显著降低 59.86% 和 59.90%，且与 HC 组相似。综上所述，CB 的干预降低了大鼠血清中初级胆汁酸的水平，同时降低了结合型与未结合型胆汁酸的比例，改变了血清中胆汁酸的组成。而初级胆汁酸水平的下降可能与胆汁酸淤积性肝损伤的改善有关<sup>[12]</sup>。虽然胆汁酸的组成在酒精及 CB 的干预下有所改变，但初级胆汁酸和次级胆汁酸均在 MC 组含量较高，因此需要具体分析各类胆汁酸的组成变化。

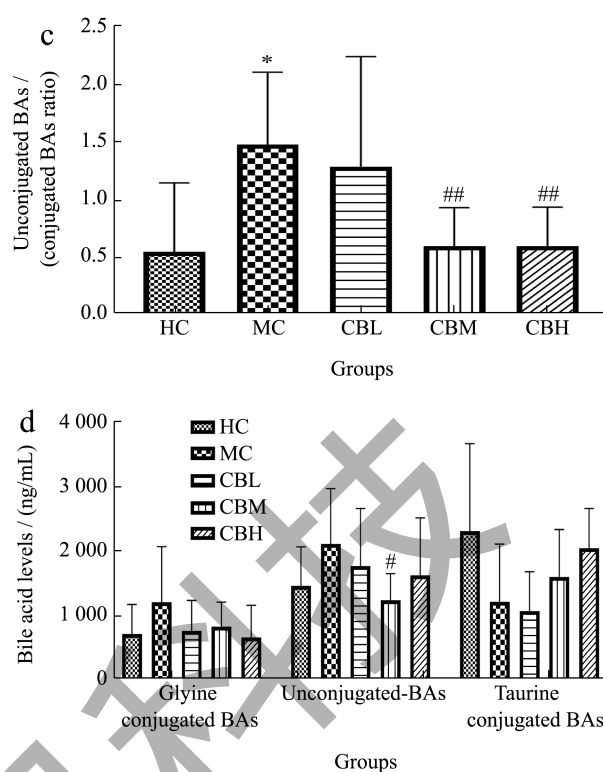
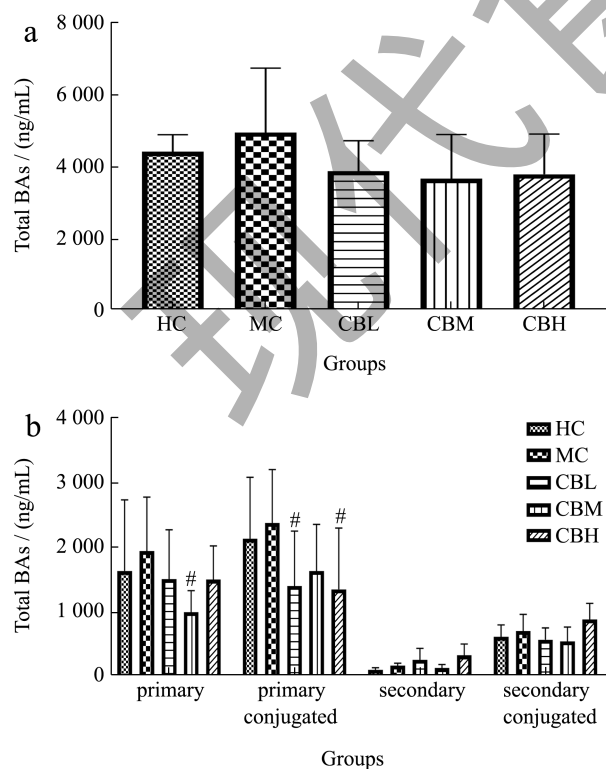


图 1 大鼠血清胆汁酸组成

Fig.1 Composition of serum bile acids in rats

### 2.1.2 胆汁酸组成聚类热图

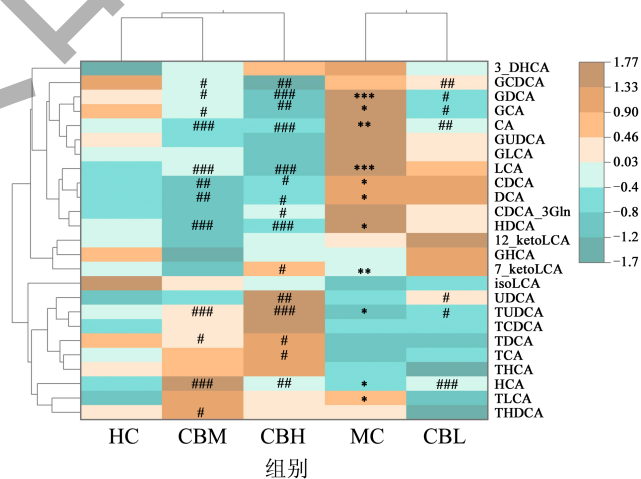


图 2 大鼠血清胆汁酸组成热图

Fig.2 Heat map of serum bile acid composition in rats

通过聚类热图具体分析不同组之间胆汁酸代谢差异及组与组之间的聚类关系，并通过  $t$  检验单独分析每种胆汁酸在各组中的差异，如下图 2 所示，与 MC 组聚类最为相似的是 CBL 组，而 CBM 组则与 HC 较为相似，这一结果表明，酒精的干预造成了大鼠胆汁酸的代谢差异，而 CB 的干预后胆汁酸的代谢则恢复到与 HC 组相似。同时，相较

于 HC 组 MC 组大鼠血清中 GDCA、CA、GCA、LCA、CDCA、DCA 和 HDCA 的水平出现显著的增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 而 HCA、TUDCA、7\_ketoLCA 的水平出现显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。而高剂量 CB 的干预显著增加了 UDCA、TCDCA、TUDCA、TDCA、TCA、THDCA、HDCA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) 等胆汁酸的含量。这些胆汁酸大多数为牛磺结合型次级胆汁酸。

### 2.1.3 胆汁酸丰度柱形图

通过丰度柱形图揭示大鼠血清中胆汁酸的占比情况, 如下图 3 列举出占比丰度前 17 的胆汁酸的对比, 从图中可以看出, 相较于 HC 组, MC 组含量较为丰富的是 CA、GCA, 且有显著提高, 同时 CDCA 在 MC 组也出现增加的现象, CA 与 CDCA 为初级胆汁酸, 他们与胆汁酸淤积性肝损伤密切相关<sup>[13]</sup>。相较于 HC 组, 在 MC 组中 T- $\alpha$ -MCA、TCA、UDCA、TUDCA, 出现下降的趋势, 且在 CB 剂量组中出现恢复现象, 值得注意的是, UDCA 与 TUDCA 在 CB 的剂量组中占比较高, 有报道称 UDCA 与 TUDCA 是治疗肝脏炎症的良好药物<sup>[14]</sup>, 这可能是 CB 具有良好的护肝效果的关键, 同时有报道指出, 黑树莓提取物<sup>[15]</sup>通过增加 UDCA、T- $\alpha$ -MCA 水平达到降低血脂的效果, TCA 具有降低血脂的功效<sup>[5]</sup>, 这些报道的研究与本实验结果相似。CB 可能也是通过提高 TCA、UDCA 和 TUDCA 以及降低 CA、CDCA 的具有护肝的作用。

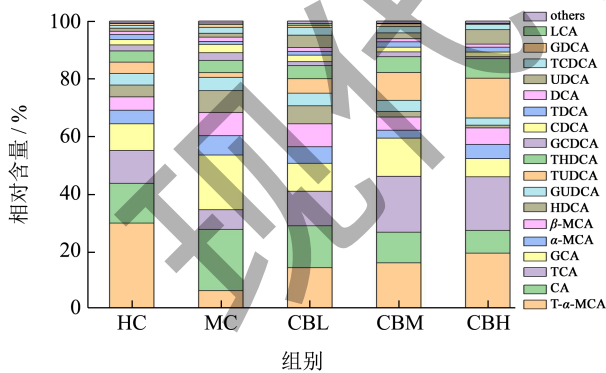


图 3 大鼠血清胆汁酸组成丰度柱形图

Fig.3 Histogram of the abundance of rat serum bile acid composition

## 2.2 肠道微生物组成差异分析

### 2.2.1 韦恩图与组间群落结构差异显著性检验

根据聚类得到 Operational Taxonomic Units (OTUs) 结果进而绘制成韦恩图, 用来显示各组之间独有

或共有的 OTUs 数目, 可表示各组之间物种丰度关系<sup>[16]</sup>, 如图 4a 所示, 各组共有的 OTU 数目为 710, 而 HC、MC、CBL、CBM、CBH 独有的 OTUs 数目分别为 1 385、1 762、701、814、1 123。Adonis 和 Anosim 检验可判断两组之间的微生物群落结构是否具有显著差别<sup>[17]</sup>。如图 4b, 组间群落结构差异分析统计图所示, 结果表明 HC 组与 MC 组之间出现极显著的差别, 这说明酒精的刺激可以显著的改变大鼠肠道内微生物的群落结构。MC 组与 CBL、CBM、CBH 组相比也均出现极显著差异, 在 Adonis 检测结果显示, 且 HC 组与 CBH 之间不具备显著性, 同时 CBM 与 CBH 组之间也不存在显著差异。这些结果表明酒精的干预造成了大鼠的肠道菌群的改变, 且经过 CB 的干预之后, CB 各组的组间群落结构没有显著差异。CB 中各类胆汁酸的含量丰富尤其以牛磺熊去氧胆酸为主, 研究表明在胆汁酸的肠肝循环中, 胆汁酸对肠道微生物的组成具有一定的塑造作用, 同时肠道微生物群对胆汁酸的代谢也是循环的重要组成部分<sup>[7]</sup>。这可能是 CB 具有调节大鼠肠道微生物群组成的主要原因。

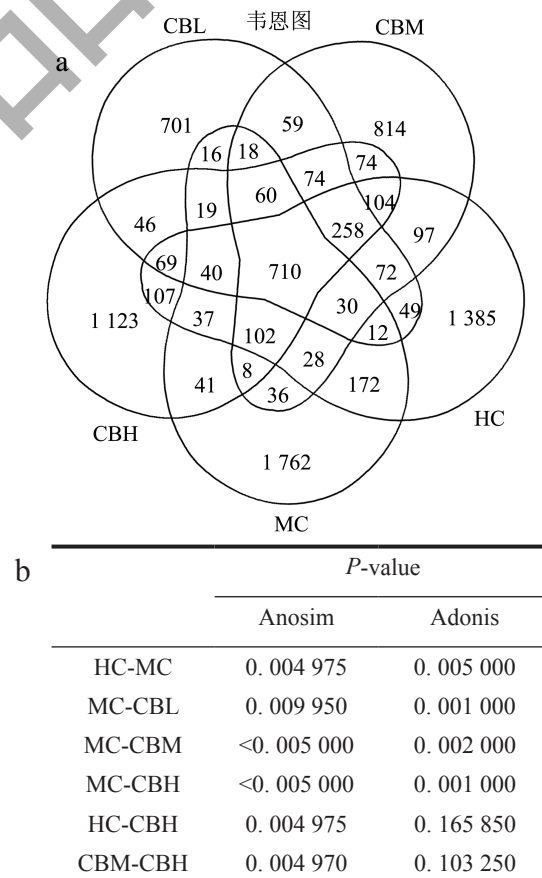


图 4 韦恩图与组间群落结构差异分析

Fig.4 Venn diagram and analyses of differences in community structure between groups

### 2.2.2 Alpha多样性分析

单样本的多样性分析 (Alpha 多样性分析) 中 observed\_otus 指数和 Chao1 指数估算样品中微生物的丰富度, shannon 指数和 pielou\_e 指数表示菌落的多样性<sup>[18]</sup>。如图 5 所示, 相较于 HC 组, MC 组大鼠, observed\_otus、Chao1、shannon 和 pielou\_e 指数均出现显著的降低, 这说明酒精的干预造成了大鼠肠道微生物群丰富度和多样性的降低, 但经过 CB 的干预, Alpha 多样性指数均出现显著恢复的现象, 但 Chao1 指数仅在高剂量组上表现出显著性, 而 observed\_otus 虽有提升恢复的现象, 但未出现统计学显著差异。这些结果表明, CB 调节肠道微生物组成主要是表现在恢复酒精造成的其丰富度和多样性的下降。这可能是由于胆汁酸本身具有塑造微生物群的作用<sup>[19]</sup>。

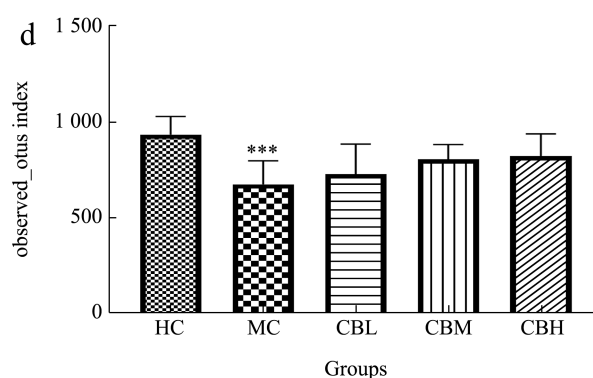
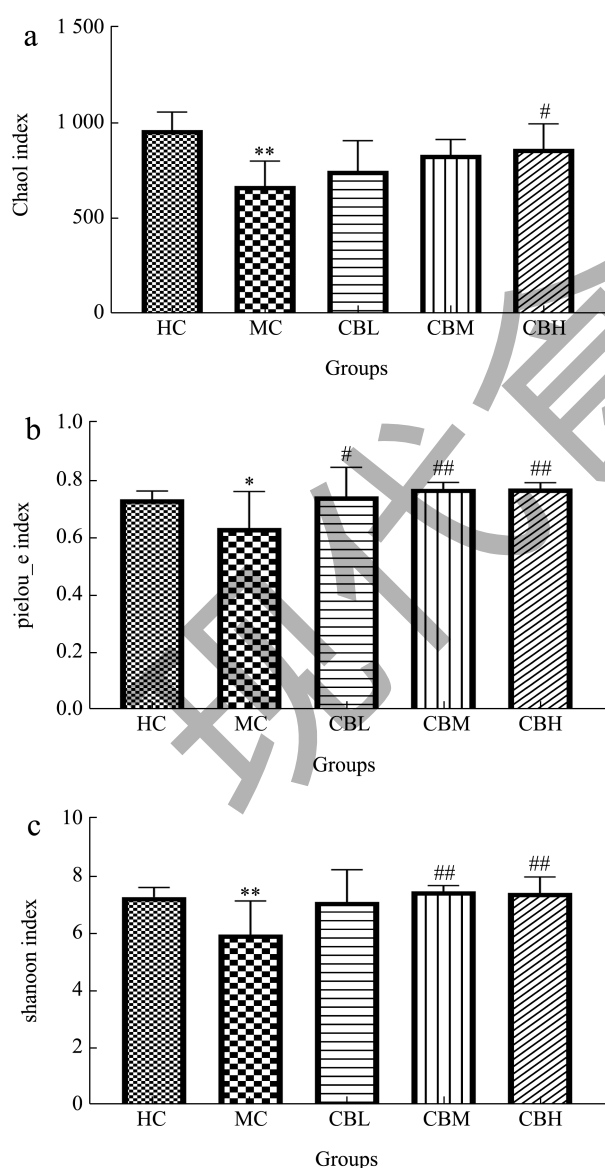


图 5 Alpha 多样性分析

Fig.5 Alpha diversity analysis

### 2.2.3 主成分分析和非度量多维尺度分析

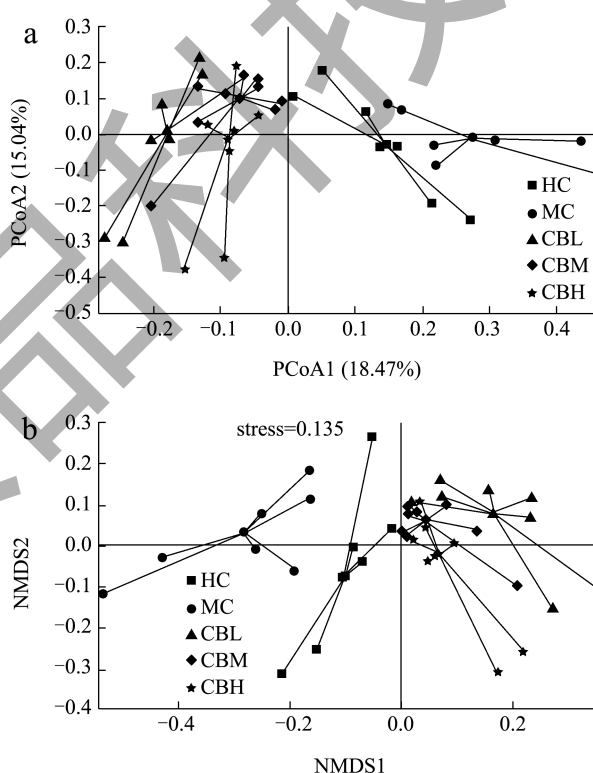


图 6 PCoA 和 NMDS 分析

Fig.6 Principal co-ordinate and Nonmetric multidimensional scaling analysis

基于 Bray-Curtis 距离分析的主成分分析 (Principal Component Analysis, PCoA) 和非度量多维尺度分析 (Non-metric Multidimensional Dimensional Scale, NMDS), 可直观反应样本间的差异程度以及差异变化规律, 两样品距离越近表示物种组成越相似, 群落差异较大的样本则会距离较远<sup>[20]</sup>。如图 6 所示, 结果显示 MC 组与 HC 组和 CBL、CBM、CBH 三组出现显著的分離现象, 且 HC 组和 CBL、CBM、CBH 三组的距离较近, CBL、CBM、CBH 三组之

间则出现聚集现象，这与上述的组间群落结构差异显著性检验的结果保持一致，这进一步的说明，酒精的刺激造成了大鼠肠道微生物群组成的改变，CB重新塑造了大鼠的肠道微生物群的组成。

### 2.2.4 门水平物种丰度分析

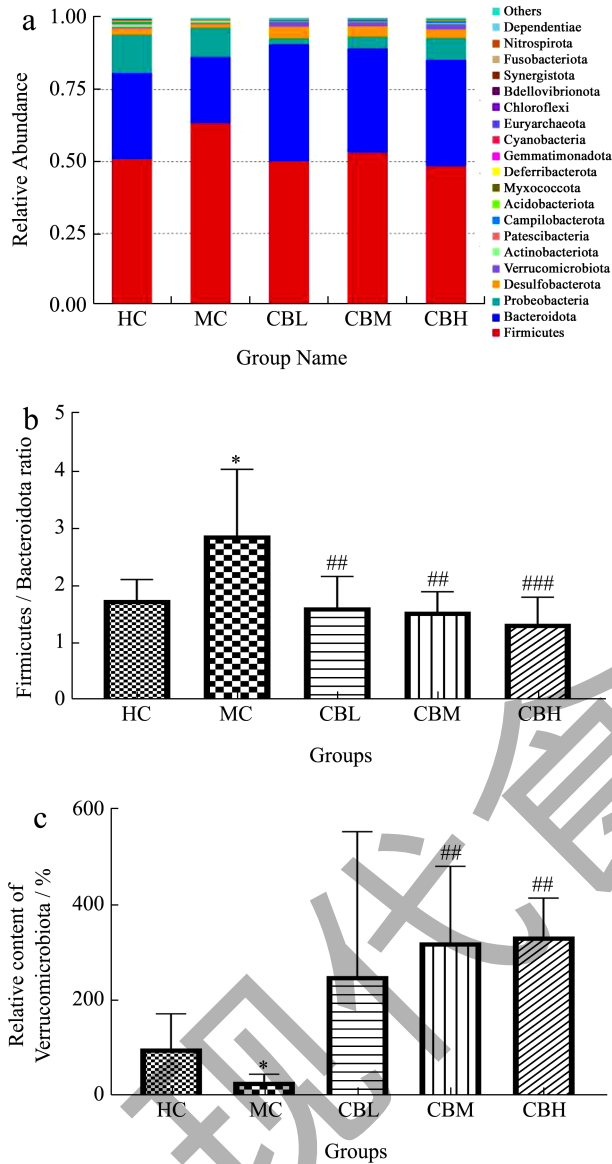


图 7 门水平物种丰度

Fig.7 Phylum level species abundance

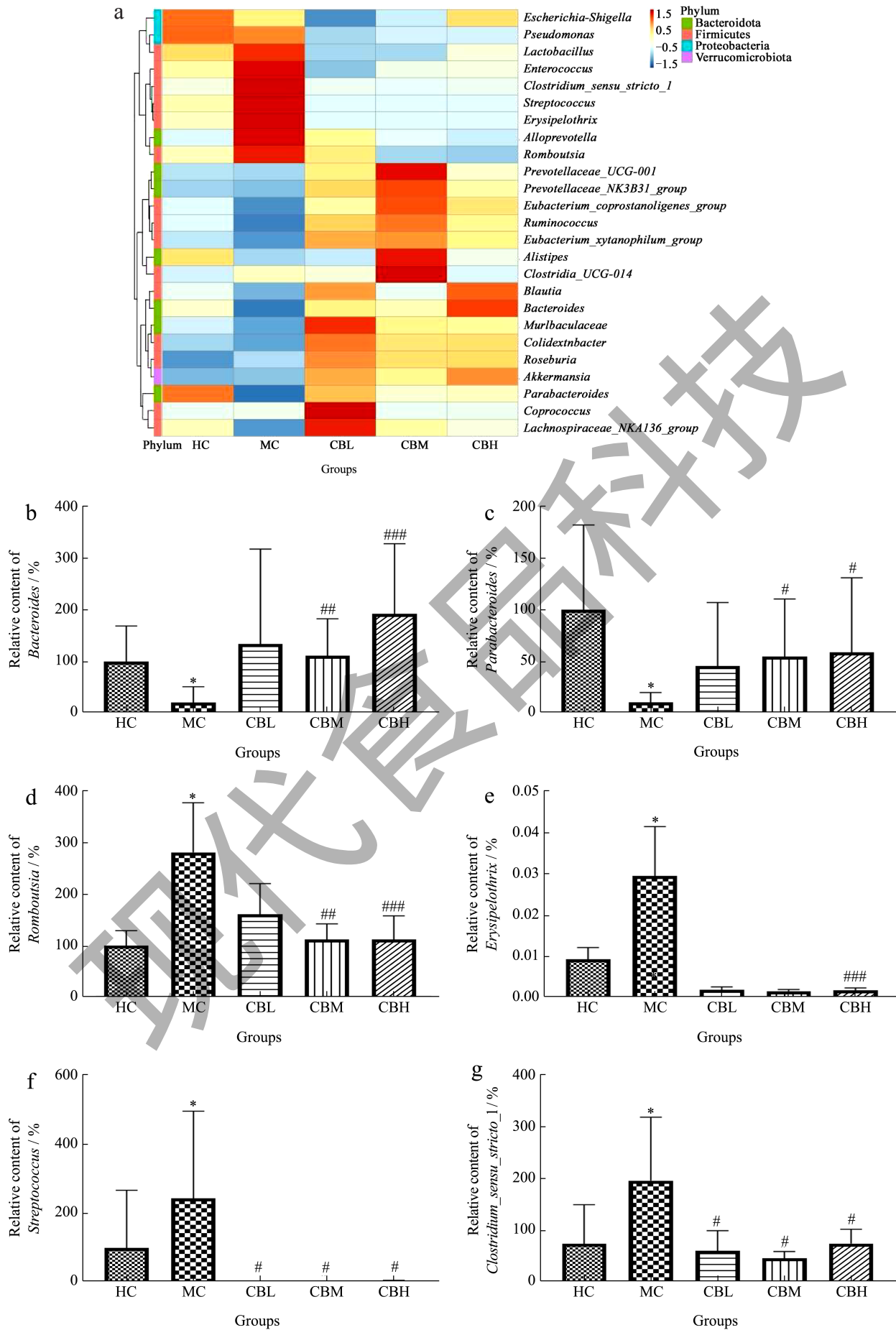
通过制作门水平上的物种丰度柱形图，分析各分类水平上各个类群的丰度信息，如图 7 所示，在门水平上鉴定出 Firmicutes、Bacteroidota、Proteobacteria 和 Deferribacteres 为主要优势菌门。与 HC 组相比，MC 组中的 Firmicutes 比例出现增加，且 Bacteroidota 所占比例出现减少，Firmicutes 与 Bacteroidota 的比例出

现显著增加 66.47% ( $P < 0.05$ )，在先前的报道中，厚壁菌门与拟杆菌门的比例升高似乎是肠道微生态失调的主要表现，同时也是高血脂的主要表现<sup>[21]</sup>，在先前的研究中发现大鼠血清中胆固醇 (TC) 与甘油三酯 (TG) 的水平均有所提高。值得注意的是 Verrucomicrobiota 仅在 CB 组中出现显著的增加，有报道称 Verrucomicrobiota 与胆汁酸的牛磺酸偶联相关<sup>[22]</sup>，这可能是 CB 各组大鼠血清中牛磺酸偶联的胆汁酸增加的原因。

### 2.2.5 属水平物种丰富分析

选取属水平丰度排名前 40 物种，绘制成热图 (图 8a)。如图 8 所示与 HC 组相比，MC 组的 *Bacteroides* (图 8b)、*Parabacteroides* (图 8c) 等菌属丰度出现显著降低，且经过 CB 的干预后，不同的剂量组其丰度出现显著恢复的现象，*Parabacteroides* 作为一种益生菌，通过增加 LCA 和 UDCA 的含量提高脂质代谢<sup>[23]</sup>，*Bacteroides* 是胆盐水解酶 (BSH) 的天然生产者<sup>[8]</sup>，BSH 可以介导肝脏来源初级胆汁酸向次级胆汁酸转化，这可能是 CB 组次级胆汁酸高于 MC 组的原因。与 HC 组相比，MC 组中 *Romboutsia* (图 8d)、*Erysipelothrix* (图 8e)、*Streptococcus* (图 8f)、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1* (图 8g)、*Enterococcus* (图 8h) 等菌属丰度显著升高，且不同剂量的 CB 干预后出现一定的下调，其中 *Romboutsia* 丰度减少有助于维持胆汁酸的代谢平衡<sup>[24]</sup>，*Erysipelothrix* 和 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 的降低与脂质代谢和胆汁酸稳态有关的肝基因水平增加相关<sup>[25]</sup>。同时 CB 组的干预显著增加了 *Colidextribacter* (图 8i)、*Eubacterium\_coprostanoligenes\_group* (图 8j)、*Eubacterium\_xylanophilum\_group* (图 8k)、*Ruminococcus* (图 8l) 和 *Prevotellaceae\_NK3B31\_group* (图 8m) 的丰度。*Ruminococcus* 与 TDCA 的增加有关<sup>[26]</sup>，*Eubacterium\_coprostanoligenes\_group* 和 *Eubacterium\_xylanophilum\_group* 是与 7 $\alpha$ -脱羟基反应菌群<sup>[27]</sup> 可转化 CDCA 和 CA 为 DCA 和 LCA，减轻胆汁酸的淤积。*Colidextribacter* 与 GUDCA、TCDCA、GCDCA 等呈负相关与本实验结果相似<sup>[27]</sup>。这些结果表明，CB 的干预可能是通过调节大鼠肠道微生物群的组成，在肠道微生物群的作用下促进胆汁酸的肠肝循环，改变了大鼠血清中胆汁酸代谢谱。





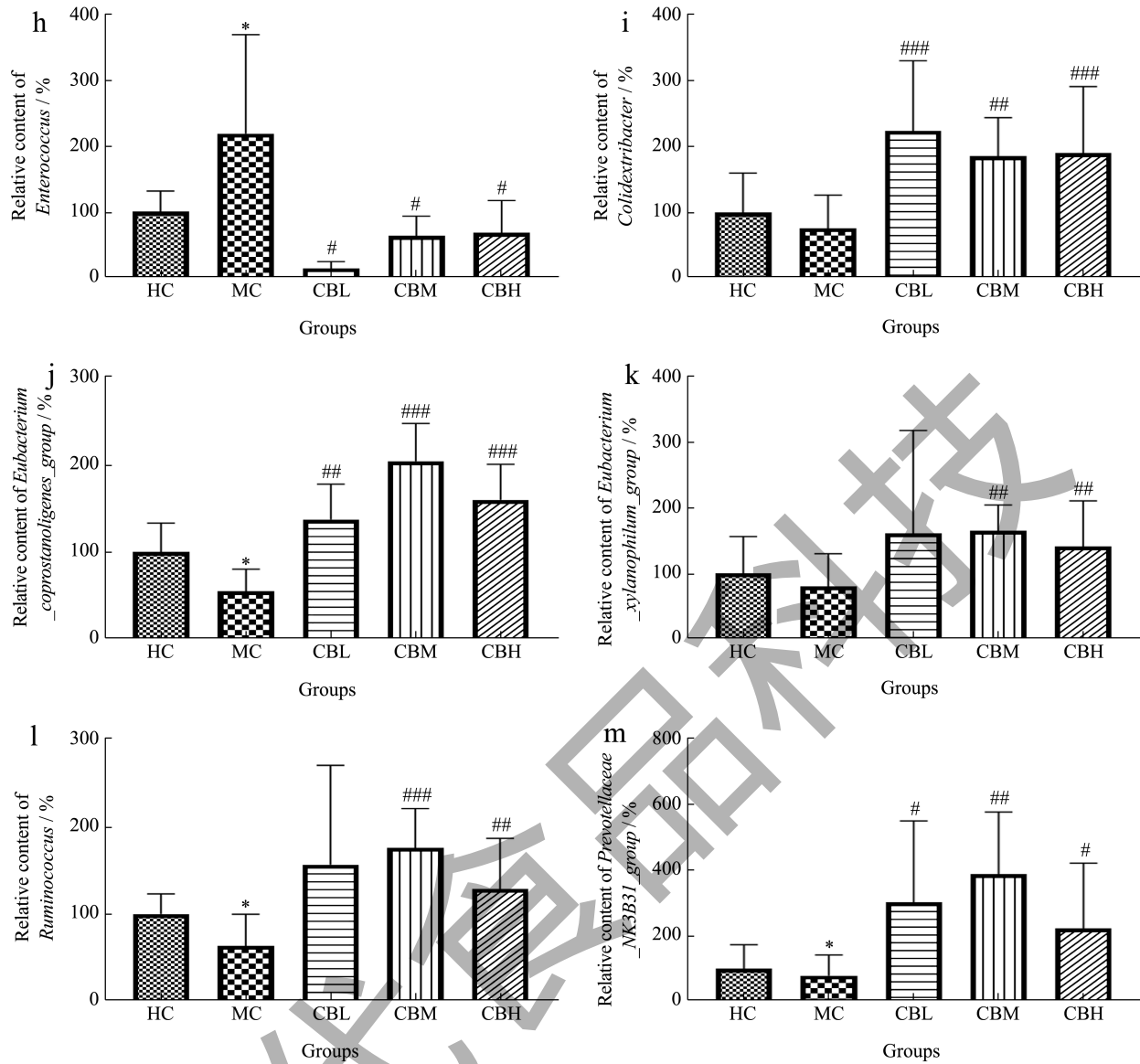


图 8 属水平物种丰度

Fig.8 Genus level species abundance

2.2.6 Linear Discriminant Analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) 分析

Linear Discriminant Analysis (LDA) Effect Size 分析中可用于显示每个组完全独特于其他组的微生物种属，图 9a 是各组中优势菌属的进化关系树，主要用于显示各菌属的分类。如图 9b 所示，在上述 5 个类群中，发现了 70 个丰富的差异类群 (LDA > 3.5)，在 HC 组中是由 *Escherichia*、*Shigella*、*Turneriella*、*Parabacteroides*、*Sphingopyxis* 和 *Elev\_16S\_1166* 构成优势菌属，在 MC 组中是由 *Enterococcus*、*Alloprevotella*、*Streptococcus*、*Romboutsia*、*Treponema* 构成优势菌属，这些多数均为有害菌属，与肝硬化、肝炎有关<sup>[28]</sup>，CL 组中

是由 *Muribaculaceae*、*Roseburia*、*Colidextribacter*、*Oscillibacter*、*Turicibacter* 构成优势菌属，CM 组中是由 *Cutibacterium*、*Eubacterium\_coprostanoligenes\_group*、*Prevotellaceae\_UCG\_001*、*Ruminococcus*、*Prevotellaceae\_NK3B31\_group*、*Alistipes* 构成优势菌属，CH 组中是由 *Bacteroides*、*Akkermansia*、*Helicobacter*、*Eubacterium\_siraeum\_group* 构成优势菌属，这些菌属中多数是具有产生 BSH 能力的菌属 (*Eubacterium\_coprostanoligenes\_group*、*Eubacterium\_siraeum\_group*、*Ruminococcus*、*Bacteroides*) 和 7 $\alpha$ -脱羟基反应菌属 (*Ruminococcus*)，同时部分是牛磺酸代谢相关菌属 (*Roseburia*、*Prevotellaceae\_UCG\_001*)。

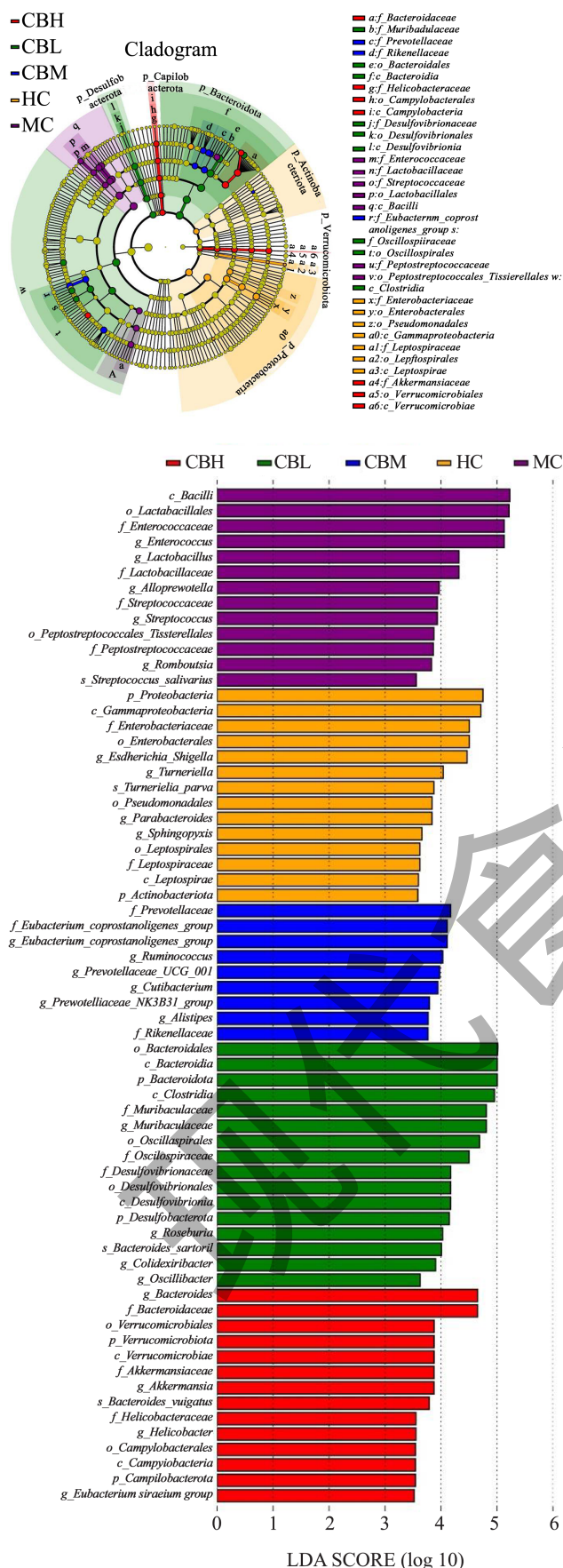


图 9 LDA Effect Size ( LEfSe ) 分析

Fig.9 Linear discriminant analysis (LDA) effect sizes (LEfSe)

### 2.3 肠道微生物群与血清胆汁酸组成相关性分析

研究表明，膳食胆汁酸可以调节肠道微生物的组成和胆汁酸的代谢<sup>[5]</sup>。一方面，胆汁酸的干预会造成宿主肠道微生物群的变化，另一方面，微生物的对胆汁酸的修饰可进一步的影响宿主的代谢。因此肠道微生物群的组成与血清中胆汁酸的组成相关性的研究是必要的。如下图 10 所示，大鼠肠道微生物丰度前 30 的物种与大鼠血清胆汁酸组成具有较强的相关性，其中 *Romboutsia*、*Alloprevotella*、*Turicibacter* 菌属与 CA、3\_CDCA、GLCA、GUDCA、LCA 等表现出正相关，这也是 MC 组中的优势菌属，这些菌属同时可能与初级胆汁酸的淤积有关。*Helicobacter*、*Eubacterium\_coprostanoligenes\_group*、*Bacteroides* 等与 TUDCA、TCA、UDCA 表现出正相关，与 CA 等表现出负相关，这些菌属可能与胆汁酸在肠道中的代谢转化有关。

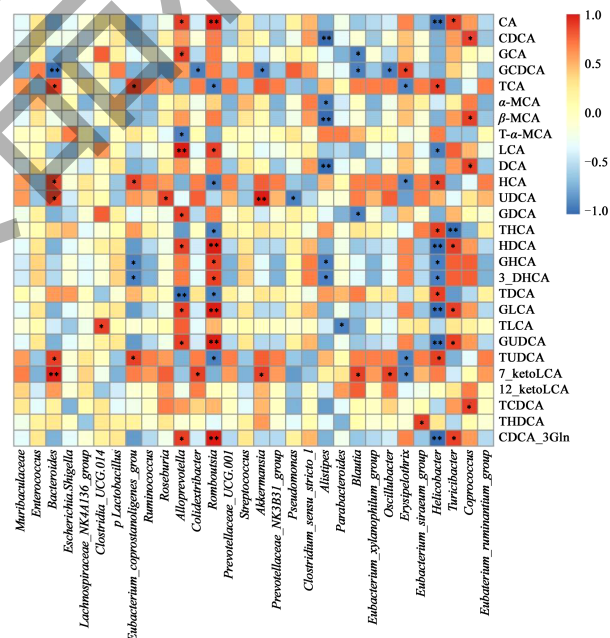


图 10 肠道微生物群与血清胆汁酸组成相关性分析

Fig.10 Correlation analysis between gut microbiota and serum bile acid composition

### 3 结论

CB 可以降低初级胆汁酸的含量，以及通过改变结合型胆汁酸和未结合型胆汁酸的比例，改变血清胆汁酸的组成。同时，CB 对酒精诱导的大鼠肠道菌群失调的具有改善作用，主要逆转了由酒精导致的大鼠厚壁菌门与拟杆菌门比值的升高，降低由

酒精造成的 *Romboutsia*、*Erysipelothrix* 等有害菌的积累, 增加如 *Verrucomicrobiota* 和 *Bacteroides* 等具有代谢胆汁酸能力的肠道菌群的丰度, 相关性分析发现, 肠道微生物群与胆汁酸之间存在较强的相关性, 这可能是大鼠血清胆汁酸组成改变的重要原因。因此, 研究表明 CB 具有调节肠道微生物群以及血清胆汁酸组成的效果。

### 参考文献

- [1] 刘雅丽, 柳涛, 赵旭, 等. 酒精性肝病中基于胆汁酸的调控机制及潜在治疗靶点[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2023, 15(2): 58-64.
- [2] ARAB J P, KARPEN S J, DAWSON P A, et al. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives [J]. *Hepatology*, 2017, 65(1): 350-362.
- [3] QU Y C, SU C J, ZHAO Q H, et al. Gut microbiota-mediated elevated production of secondary bile acids in chronic unpredictable mild stress [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 837543.
- [4] WAY G W, JACKSON K G, MUSCU S R, et al. Key signaling in alcohol-associated liver disease: The role of bile acids [J]. *Cells*, 2022, 11(8): 1374
- [5] XU J, XIE S W, CHI S Y, et al. Protective effects of taurocholic acid on excessive hepatic lipid accumulation via regulation of bile acid metabolism in grouper [J]. *Food Function*, 2022, 13(5): 3050-3062.
- [6] PURI P, DAITA K, JOYCE A, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids [J]. *Hepatology*, 2018, 67(2): 534-548.
- [7] ARAB J P, ARRESE M, SHAH V H. Gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease and alcohol-related liver disease: Current concepts and perspectives [J]. *Hepatology Research*, 2020, 50(4): 407-418.
- [8] MULLISH B H, MCDONALD J A K, PECHLIVANIS A, et al. Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment of recurrent *clostridioides difficile* infection [J]. *Gut*, 2019, 68(10): 1791-1800.
- [9] YANG B W, HUANG S M, ZHAO G X, et al. Dietary supplementation of porcine bile acids improves laying performance, serum lipid metabolism and cecal microbiota in late-phase laying hens [J]. *Animal Nutrition*, 2022, 11: 283-292.
- [10] 王杰, 熊爱珍, 程绒绒, 等. 不同来源引流熊胆粉的化学成分系统分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2326-2332.
- [11] HARTMANN P, HOCHRATH K, HORVATH A, et al. Modulation of the intestinal bile acid/farnesoid X receptor/fibroblast growth factor 15 axis improves alcoholic liver disease in mice [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2150-2166.
- [12] WREN S N, DONOVAN M G, SELMIN O I, et al. A villin-driven fxr transgene modulates enterohepatic bile acid homeostasis and response to an n-6-enriched high-fat diet [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7829.
- [13] 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.
- [14] HOU Y H, LUAN J Y, HUANG T D, et al. Tauroursodeoxycholic acid alleviates secondary injury in spinal cord injury mice by reducing oxidative stress, apoptosis, and inflammatory response [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 216.
- [15] LIM T, LEE K, KIM R H, et al. Black raspberry extract can lower serum LDL cholesterol via modulation of gut microbial composition and serum bile acid profile in rats fed trimethylamine-N-oxide with a high-fat diet [J]. *Food Science Biotechnology*, 2022, 31(8): 1041-1051.
- [16] 马晶, 王德亚, 田忠景, 等. 饮水摄入抗生素对小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 7: 833-841.
- [17] YAN J, XUE Q Y, CHEN W Y, et al. Probiotic-fermented rice buckwheat alleviates high-fat diet-induced hyperlipidemia in mice by suppressing lipid accumulation and modulating gut microbiota [J]. *Food Research International*, 2022, 155: 111125.
- [18] 苏玲玲, 黎小银, 易宏波, 等. 原花青素通过塑造肠道菌群调节免疫应答的作用与机制研究进展[J]. 动物营养学报, 2023, 35(3): 1454-1467.
- [19] ZHHANG Y P, FENG H X, LIANG X F, et al. Dietary bile acids reduce liver lipid deposition via activating farnesoid X receptor, and improve gut health by regulating gut microbiota in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 121: 265-275.
- [20] 李秀平, 欧阳建, 唐静怡, 等. 茯砖茶通过调节肠道菌群和胆汁酸代谢预防肥胖及高胆固醇血症作用机制[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 136-149.
- [21] STOJANOV S, BERLEC A, STRUKELJ B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1715.
- [22] MARTINEZ G L, PECHLIVANIS A, MCDONALD J A K, et al. Bacterial and metabolic phenotypes associated with inadequate response to ursodeoxycholic acid treatment in primary biliary cholangitis [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2208501.



- [23] WANG K, LIAO M F, ZHOU N, et al. *Parabacteroides distasonis* alleviates obesity and metabolic dysfunctions *via* production of succinate and secondary bile acids [J]. *Cell Reports*, 2019, 26(1): 222.
- [24] YE Z, XU Y J, LIU Y F. Different typical dietary lipid consumption affects the bile acid metabolism and the gut microbiota structure: an animal trial using Sprague-Dawley rats [J]. *Journal Science and Food Agriculture*, 2022, 102(8): 3179-3192.
- [25] ZHANG Q, GUO W L, CHEN G M, et al. *Pediococcus acidilactici* FZU106 alleviates high-fat diet-induced lipid metabolism disorder in association with the modulation of intestinal microbiota in hyperlipidemic rats [J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5: 775-788.
- [26] LIN H, AN Y P, TANG H R, et al. Alterations of bile acids and gut microbiota in obesity induced by high fat diet in rat model [J]. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 2019, 67(13): 3624-3632.
- [27] SUN J Y, FAN J M, LI T T, et al. Nuciferine protects against high-fat diet-induced hepatic steatosis *via* modulation of gut microbiota and bile acid metabolism in rats [J]. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 2022, 70(38): 12014-12028.
- [28] VALLIANOU N, CHRISTODOULATOS G S, KARAMPELA I, et al. Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in non-alcoholic fatty liver disease: Current evidence and perspectives [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(1): 56