

• 论著-研究报告 •

芪参汤治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效观察及 对肠道菌群的影响^{*}

袁维¹ 王炳予² 杨磊² 张雅丽² 袁星星²

[摘要] 目的:观察芪参汤对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)患者的临床疗效及对肠道菌群稳态的影响。方法:30 例 NASH 患者随机分为治疗组(15 例)和安慰剂组(15 例),其中治疗组给予芪参汤治疗,安慰剂组给予芪参汤模拟剂治疗,疗程 4 周。分别观察 2 组患者治疗前后生化及纤维化指标的变化。另选取 15 例健康受试者作为对照,收集粪便样本通过 16S rRNA 检测各组肠道菌群的多样性和丰度。结果:与组内治疗前比较,芪参汤组治疗后 AST、ALT、GGT、TC、TG、HA、LN、PⅢNP、CIV、LSM 和 CAP 明显降低,HDL 明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),2 组治疗后组间比较,芪参汤组均明显优于安慰剂组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析结果显示,Phascolarctobacterium、Lactobacillus、Bifidobacterium、Akkermansia 的丰度分别与 LN、HA、PⅢNP、CIV、CAP、LSM 和 GGT 水平呈现显著负相关,而 Fusobacterium、Coprococcus、Bilophila 和 Prevotella 的丰度分别与 LN、HA、PⅢNP、CIV、CAP、LSM 和 GGT 水平呈现显著正相关。此外,芪参汤组治疗后 OTU、Chao1 和 Shannon 指数与同组治疗前及健康受试者比较均明显增加,Simpon 指数明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。同时,与同组治疗前比较,芪参汤能够显著增加 Clostridium、Roseburia、Eubacterium、Phascolarctobacterium、Lactobacillus、Parabacteroides、Pseudomonas、Bifidobacterium、Corynebacterium 和 Akkermansia 菌属丰度,降低 Faecalibacterium、Peptostreptococcus、Erysipelatoclostridium、Flavobacterium、Bilophila 和 Escherichia 菌属丰度,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:芪参汤能通过增加 NASH 肠道菌群多样性和稳态,从而改善肝功能、血脂异常和纤维化水平,达到治疗 NASH 的作用。

[关键词] 芪参汤;非酒精性脂肪性肝炎;临床疗效;肠道菌群

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2021.06.02

[中图分类号] R575.1 **[文献标志码]** A

Clinical effect of Qishen decoction on nonalcoholic steatohepatitis and its influence on gut microbiota

YUAN Wei¹ WANG Bingyu² YANG Lei² ZHANG Yali² YUAN Xingxing²

(¹Department of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine; Discipline Construction Project of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007, China; ²Department of Gastroenterology, Nan-gang Branch, Heilongjiang College of Traditional Chinese Medicine)

Corresponding author: YUAN Xingxing, E-mail: jackieaqi@163.com

Abstract Objective: To observe the clinical efficacy of Qishen decoction on patients with nonalcoholic steatohepatitis(NASH) and its influence on gut microbiota. **Methods:** Thirty patients with NASH were randomly divided into treatment group($n=15$) and placebo group($n=15$). The treatment group was treated with Qishen decoction, and the placebo group was treated with Qishen decoction simulant for 4 weeks. The changes of biochemical and fibrosis indexes were observed before and after treatment. Another 15 healthy subjects were selected as the control group. Fecal samples were collected and the diversity and abundance of gut microbiota in each group were detected by 16S rRNA. **Results:** Compared with before treatment, AST, ALT, GGT, TC, TG, HA, LN, PⅢNP, CIV, LSM and CAP levels in Qishen decoction group were decreased, and the level of HDL was increased, differences were statistically significant($P<0.05$), and the Qishen decoction group was significantly better than placebo group after treatment($P<0.05$). The results of correlation analysis showed that the abundance of Phas-

^{*}基金项目:国家自然科学基金青年基金(No:81904182);湖南省自然科学基金(No:2020JJ5441);黑龙江省中医药科研项目(No:ZHY18-029,ZHY19-061,ZHY19-062,ZHY2020-041)

¹湖南中医药大学第一附属医院肝病科;湖南中医药大学中医学国内一流建设学科(长沙,410007)

²黑龙江省中医药科学院南岗分院消化科

通信作者:袁星星, E-mail: jackieaqi@163.com

colarctobacterium, Lactobacillus, Bifidobacterium, and Akkermansia were significantly negatively correlated with LN, HA, PⅢ NP, CIV, CAP, LSM, and GGT levels ($P < 0.05$), while the abundance of Fusobacterium, Coprococcus, Bilophila, and Prevotella were positively correlated with LN, HA, PⅢ NP, CIV, CAP, LSM, and GGT respectively, and these differences were statistically significant ($P < 0.05$). In addition, after treatment, OTU, Chao1 and Shannon index of Qishen decoction group were significantly increased, while Simpson index was significantly decreased when compared with those before treatment and healthy subjects ($P < 0.05$). At the same time, Qishen decoction can significantly increase the abundance of Clostridium, Roseburia, Eubacterium, Phascolarctobacterium, Lactobacillus, Parabacteroides, Pseudomonas, Bifidobacterium, Corynebacterium, and Akkermansia, and reduce the abundance of Faecalibacterium, Peptostreptococcus, Erysipelatoclostridium, Flavobacterium, Bilophila, and Escherichia, and these differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qishen decoction can improve liver function, dyslipidemia and fibrosis by increasing the diversity and restoring the homeostasis of NASH gut microbiota.

Key words Qishen decoction; nonalcoholic steatohepatitis; clinical efficacy; gut microbiota

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)又称为代谢相关脂肪性肝病,是临床常见的慢性肝病之一。随着近年来生活方式和饮食结构的改变,该病已跃居我国第一大慢性肝病,不仅严重危害人民生命健康,而且也给社会带来巨大的经济负担^[1]。非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)作为 NAFLD 的一个进展形式,以肝脏中脂肪和炎性细胞浸润、肝细胞损伤或坏死和纤维化为主要特征,也是肝硬化及肝功能衰竭的重要原因^[2]。近来的有学者发现肝祖细胞中表达的癌基因转录因子通过促使肝祖细胞的重新编程从而促进 NASH 向肝癌的转变,因此认为 NASH 是一种癌前状态^[3]。因此针对 NASH 的有效干预是临床亟待解决的问题。

现有资料显示在 NASH 患者中肝纤维化出现的比例约为 40.76%,并且与 NASH 患者的预后密切相关^[4]。尽管如此,目前全球范围内尚无针对 NASH 相关性肝纤维化的有效治疗药物被批准上

市。课题组前期研究发现,芪参汤可以通过胰岛素信号通路改善 NAFLD 大鼠胰岛素抵抗、脂肪沉积和肝损伤^[5]。同时,动物实验亦表明芪参汤能够通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路和调控肠道菌群的稳态达到治疗肝纤维化的作用^[6-7]。本研究采用 16S rRNA 技术并通过一项随机安慰剂对照的临床试验,以进一步明确芪参汤对 NASH 的疗效及机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2019 年 12 月—2020 年 3 月于黑龙江省中医药科学院消化科门诊就诊的 NASH 患者 30 例,同时选取 15 例健康受试者作为阴性对照。本研究经黑龙江省中医药科学院医学伦理委员会批准。将入组的 NASH 患者按照随机数字表法分为芪参汤组和安慰剂组,每组各 15 例。2 组一般资料比较见表 1。

表 1 NASH 患者与健康受试者一般资料比较

$\bar{x} \pm s$

组别	NASH($n=30$)		健康受试者($n=15$)
	芪参汤组($n=15$)	安慰剂组($n=15$)	
男/女	10/5	8/7	10/5
年龄/岁	40.20 $\pm$ 4.43	40.53 $\pm$ 4.56	40.28 $\pm$ 2.91
病程/年	9.02 $\pm$ 3.14	8.08 $\pm$ 3.15	/
BMI	28.31 $\pm$ 4.01 ¹⁾	30.07 $\pm$ 4.44 ¹⁾	21.91 $\pm$ 2.43
血糖/(mmol·L ⁻¹)	6.85 $\pm$ 2.22 ¹⁾	6.31 $\pm$ 1.12 ¹⁾	5.17 $\pm$ 0.91
腰围/cm	92.37 $\pm$ 7.73 ¹⁾	90.44 $\pm$ 7.59 ¹⁾	80.49 $\pm$ 5.85

与健康受试者组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 NASH 西医诊断标准参照中国医师协会和中华医学会肝病学会联合颁布的《非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)》中相关标准^[8]:①无饮酒史,或者每周饮酒量(折合乙醇) <140 g/周,女性则 <70 g/周;②肝功能酶学指标高于正常值 2 倍以上并持续 1 个月以

上;③临床以肝区不适、腹胀、乏力等症状为主要表现;④除外病毒性肝炎、药物性肝损伤、自身免疫性肝病、全胃肠外营养及肝豆状核变性等可引起肝损伤的特定性疾病;⑤影像学检查符合脂肪性肝病标准;⑥肝脏组织学表现出脂肪变性、气球样变性和肝脏炎症。

1.2.2 中医诊断标准 中医诊断标准参照中华中

医药学会脾胃病分会发布的《非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)》中湿浊内停证相关诊断标准^[9]。

1.3 纳入标准

①符合 NASH 中医湿浊内停证诊断标准;②符合 NASH 西医诊断标准;③年龄 18~60 岁;④确认参加本项目,并签署知情同意书。

1.4 排除标准

①诊断或合并病毒性肝炎、药物性肝炎、酒精性肝病或自身免疫性肝病患者;②合并严重肾功能损伤、心脑血管疾病或造血系统疾病;③对本研究中所用药物过敏者;④妊娠或哺乳期女性。

1.5 治疗方法

2 组患者均参照指南^[10]中要求按照健康饮食宣教和体育锻炼的方式进行干预。其中饮食宣教包括控制热量摄入和调整膳食结构,增加全谷类食物和膳食纤维的摄入;体育锻炼主要为每日 30 min 中等量的有氧运动。在此基础上,芪参汤组给予芪参汤口服治疗(由黑龙江省中医药科学院中草药提供,组成:生黄芪 15 g、西洋参 10 g、丹参 10 g、生山楂 10 g、荷叶 10 g、泽泻 10 g、女贞子 8 g、墨旱莲 8 g、绞股蓝 5 g、三七 5 g、生甘草 3 g),200 mL/袋,1 袋/次,2 次/d。安慰剂组给予芪参汤模拟剂治疗(由黑龙江省中医药科学院制剂室提供,组成:食品添加剂(色素、香精、苦味剂等食品添加剂),200 mL/袋,每次 1 袋,2 次/d。2 组患者疗程均为 4 周。

1.6 样品收集及指标检测

1.6.1 粪便样品收集 分别于治疗前、后采用一次性粪便收集装置收集 30 例 NASH 入组患者粪便样品,另于治疗后时间点收集 15 例健康受试者粪便样品,置于-80℃冰箱备用。样品处理后以 QiaGen 粪便 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。DNA 经质检、V4 区 PCR 扩增和产物纯化后采用 Illumina HiSeq PE250 平台进行 16S rRNA 扩增子测序。根据获得的序列进行 OUT 归类,对归类的结果进行细菌物种间关系及差异进行分析。

1.6.2 实验室指标检测 分别于治疗前、后收集 2 组患者清晨静脉血,采用全自动血液分析仪检测肝功能指标[天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)和 γ -谷氨酰转移酶(gamma glutamyltransferase,GGT)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)]。另采用时间分辨荧光免疫分析法检测血清透明质酸(hyaluronic acid,HA)、层粘连蛋白

(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原(procollagen type Ⅲ, PⅢNP)和Ⅳ型胶原(collagen type Ⅳ, CIV)。

1.6.3 肝脏硬度测量值和可控衰减参数测定 采用法国 Echosens FibroScan-502 分别检测 2 组患者治疗前后肝脏硬度测量值(Liver stiffness measurement, LSM)和可控衰减参数(Controlled attenuation parameter, CAP)值。以 LSM 值判定肝纤维化程度,以 CAP 值判定肝脂肪变程度。

1.7 统计学处理

本研究采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,其中二分类变量以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;连续型变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别采用单因素方差分析和 LSD 检验,临床相关性采用 Pearson 相关系数进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪参汤对 NASH 患者肝功能指标的影响

2 组 NASH 患者治疗前 AST、ALT 和 GGT 比较,差异无统计学意义。芪参汤组治疗后 AST、ALT 和 GGT 与同组治疗前比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。安慰剂组治疗后 ALT 和 GGT 与同组治疗前比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 AST 水平与同组治疗前比较略降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。2 组治疗后组间比较,芪参汤组均明显优于安慰剂组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 芪参汤对 NASH 患者血脂的影响

2 组 NASH 患者治疗前 TC、TG、HDL 和 LDL 比较差异无统计学意义。芪参汤组治疗后除 LDL 外,TC 和 TG 与同组治疗前比较明显降低,HDL 明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。安慰剂组治疗后仅 TG 与同组治疗前比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 TC、HDL 和 LDL 水平与同组治疗前无明显变化,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。2 组治疗后 TC、TG 和 HDL 水平组间比较,芪参汤组均明显优于安慰剂组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 芪参汤对 NASH 患者肝纤维化指标的影响

2 组 NASH 患者治疗前 HA、LN、PⅢNP、CⅣ、LSM 和 CAP 比较差异无统计学意义。芪参汤组治疗后 HA、LN、PⅢNP、CⅣ、LSM 和 CAP 与同组治疗前比较明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。安慰剂组治疗后 CAP 与同组治疗前比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 HA、LN、PⅢNP、CⅣ和 LSM 与同组治疗前比较,差异无统计学意义。2 组治疗后组间比较,芪参汤组均明显优于安慰剂组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4 和表 5。

表 2 2 组患者肝功能指标比较

U/L, $\bar{x} \pm s$

组别	例数	时间	AST	ALT	GGT
芪参汤组	15	治疗前	70.80±12.89	86.73±17.93	114.53±20.18
		治疗后	45.73±19.50 ¹⁾²⁾	48.47±13.27 ¹⁾²⁾	82.13±10.30 ¹⁾²⁾
安慰剂组	15	治疗前	70.53±13.87	87.53±17.11	112.47±16.12
		治疗后	60.33±14.49	65.13±16.40 ¹⁾	94.93±19.19 ¹⁾

与同组治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$;与安慰剂组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

表 3 2 组患者血脂比较

mmol/L, $\bar{x} \pm s$

组别	例数	时间	TC	TG	HDL	LDL
芪参汤组	15	治疗前	5.68±0.49	2.83±0.50	0.97±0.14	3.19±0.35
		治疗后	4.51±0.57 ¹⁾²⁾	1.55±0.39 ¹⁾²⁾	1.17±0.23 ¹⁾²⁾	2.74±0.89
安慰剂组	15	治疗前	5.81±0.54	2.66±0.55	0.96±0.14	3.13±0.50
		治疗后	5.37±0.87	2.01±1.46 ¹⁾	1.02±0.15	2.96±1.16

与同组治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$;与安慰剂组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

表 4 2 组患者血清肝纤维化四项比较

 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	时间	HA/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LN/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	PⅢ NP/($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	CIV/($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
芪参汤组	15	治疗前	171.20±21.54	149.66±18.31	190.48±24.02	132.43±20.86
		治疗后	175.13±19.44 ¹⁾²⁾	142.78±18.25 ¹⁾²⁾	194.68±41.0 ¹⁾²⁾	134.84±20.80 ¹⁾²⁾
安慰剂组	15	治疗前	111.17±20.67	82.89±14.53	94.99±31.56	79.29±22.33
		治疗后	166.60±24.30	135.08±19.19	165.98±25.25	135.13±36.79

与同组治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$;与安慰剂组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

表 5 2 组患者 LSM 和 CAP 的比较

 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	时间	LSM/kPa	CAP/($\text{dB} \cdot \text{m}^{-1}$)
芪参汤组	15	治疗前	7.18±1.18	298.82±168.48
		治疗后	5.44±1.21 ¹⁾²⁾	221.43±16.91 ¹⁾²⁾
安慰剂组	15	治疗前	7.35±0.76	312.94±28.05
		治疗后	7.05±0.95	274.93±17.95 ¹⁾

与同组治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$;与安慰剂组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

2.4 NASH 患者肠道菌群与临床指标相关性分析

通过相关性分析结果显示,Phascolarctobacterium、Lactobacillus、Bifidobacterium、Akkermansia 菌属的丰度分别与 LN、HA、PⅢ NP、CIV、CAP、LSM 和 GGT 水平呈现显著负相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 Fusobacterium、Coprococcus、Bilophila 和 Prevotella 菌属的丰度分别与 LN、HA、PⅢ NP、CIV、CAP、LSM 和 GGT 水平呈现显著正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

2.5 芪参汤对 NASH 患者肠道菌群 α 多样性的影响

2 组患者治疗前 α 多样性的比较,差异均无统计学意义,且与健康受试者比较,差异亦无统计学意义。芪参汤组治疗后 OTU、Chao1 和 Shannon 指数与同组治疗前及健康受试者比较均明显增加,Simpon 指数明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。而安慰剂组治疗后 OTU、Chao1、Shannon

和 Simpon 指数与同组治疗前及健康受试者比较均无明显变化,差异均无统计学意义。见表 6。

2.6 芪参汤对 NASH 患者肠道菌群分布的影响

肠道菌群门水平的物种分布结果显示,与健康受试者比较,芪参汤组治疗前 Proteobacteria 和 Fusobacteria 门丰度明显增加,Actinobacteria 门丰度明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与同组治疗前比较,芪参汤能够显著增加 Bacteroidetes、Actinobacteria 和 Verrucomicrobia 门的丰度,降低 Proteobacteria、Fusobacteria 和 Tenericutes 门的丰度,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2a。

肠道菌群属水平的物种分布结果如图 2b~c 所示,同时采用 LEfSe 和 LDA 分析法对各组间菌群进行差异分析,结果显示与健康受试者比较,芪参汤组治疗前 Sarcina、Dorea、Coprococcus、Peptostreptococcus、Enterococcus、Firmicutes_unclassified、Prevotella、Bilophila 和 Fusobacterium 属丰度明显增加,Clostridium、Eubacterium、Phascolarctobacterium、Lactobacillus、Streptococcus、Parabacteroides、Neisseria、Bifidobacterium、Akkermansia 属丰度明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与同组治疗前比较,芪参汤能够显著增加 Clostridium、Roseburia、Eubacterium、Phascolarctobacterium、Lactobacillus、Parabacteroides、Pseudomonas、Bifidobacterium、Corynebacterium 和 Akkermansia 菌属丰度,降低 Faecalibacterium、Peptostreptococcus、Erysipelatoclostridium、Fla-

vobacterium、Bilophila 和 Escherichia 菌属丰度,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 3。采用 circos 图展示临床样本与肠道菌群分布的对应关系,可见

芪参汤治疗后 Akkermansia 菌属的构成比显著增加,见图 4。

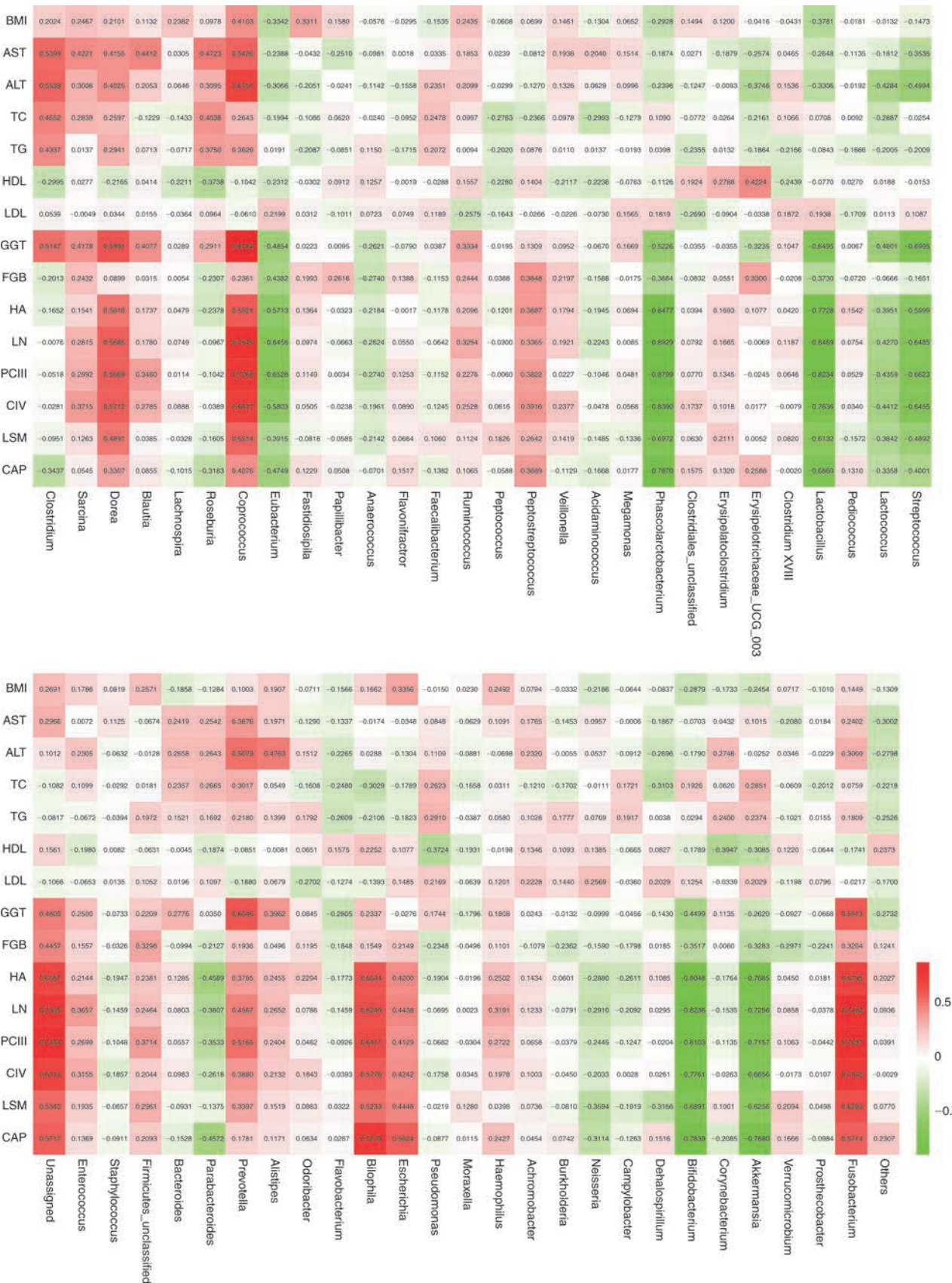


图 1 NASH 患者肠道菌群丰度与临床指标 Pearson 相关性分析

表 6 各组肠道菌群 α 多样性的比较

组别	例数	时间	OTU	Chao1	Shannon	Simpon
健康受试者	15	/	404.49±12.28	150.29±16.81	3.52±0.53	0.82±0.12
芪参汤组	15	治疗前	406.27±12.38	450.96±18.88	3.44±0.34	0.88±0.18
		治疗后	443.12±13.21 ¹⁾²⁾³⁾	498.78±19.17 ¹⁾²⁾³⁾	4.16±0.91 ¹⁾²⁾³⁾	0.43±0.11 ¹⁾²⁾³⁾
安慰剂组	15	治疗前	406.27±13.67	482.28±18.42	3.38±0.33	0.86±0.16
		治疗后	409.53±18.95	454.73±13.13	3.48±0.34	0.88±0.12

与同组治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$;与安慰剂组比较,²⁾ $P<0.05$;与健康受试者比较,³⁾ $P<0.05$ 。

3 结论

NAFLD 正成为全球肝移植的主要基础病因,以往研究认为 NAFLD 的发病来自“二次打击”学说,但是近年来随着对其研究的深入,“多重打击”学说越来越受到学界的认可^[11]。“二次打击”学说认为在 NAFLD 的形成过程中,胰岛素抵抗可导致脂肪分解加速,从而释放大量的游离脂肪酸进入体循环。过度的游离脂肪酸导致肝细胞内甘油三酯的超负荷蓄积,并且通过肝细胞毒性破坏线粒体功能,从而进一步增加胰岛素抵抗和肝脏对损伤因子的敏感性^[12]。本研究结果显示,芪参汤能够显著降低 NASH 患者 TC、TG 和增加 HDL 的水平,这与课题组前期在动物实验研究的结果相一致。在“一次打击”驱动的肝细胞脂肪变性的基础上,代偿性 β 线粒体氧化导致大量活性氧簇的产生和清除障碍^[13]。随着抗氧化物和促氧化之间的动态失衡及炎性细胞因子的增加、脂质过氧化的产生,从而导致对 NAFLD 的“二次打击”。过量的氧化物可以导致肝细胞损伤和坏死,而损伤的肝细胞通过诱导肝星状细胞的活化,进而促使肝纤维化的发生^[14]。此外,在肝脏脂质蓄积和氧化应激“二次打击”的基础上,炎症反应、胆汁酸代谢、表观遗传学和遗传多态性、肠道菌群等因素均可通过协同或相互作用影响 NAFLD 的整个发病过程,从而对 NAFLD 进程“多重打击”^[15]。

肝脏酶学指标和纤维化四项作为判定肝脏炎症的重要生化指标,对于判定药物治疗效应具有一定的指导意义。除肝纤维化指标外,非侵入性的影像学诊断对于肝纤维化的诊断和疗效判定作用已被越来越多的研究所证实。CAP 是被 NAFLD 指南所推荐的肝脏中脂肪定量检测的方法,其能够准确区别轻度和中重度肝脏脂肪变^[16]。此外,研究发现 LSM 值与肝脏的炎症程度、纤维化水平呈现显著的正相关^[17-18]。因此在当前的研究中我们不仅检测血清肝功能、血脂、纤维化指标,还结合体外非侵入性的影像学诊断。研究结果显示,芪参汤能够显著改善 NASH 患者的肝功能水平、降低肝纤维化指标 LN、HA、PⅢNP 和 CIV 的水平。与此同时,芪参汤能够显著降低 NASH 患者 LSM 和 CAP 值,其疗效明显优于安慰剂组,这表明芪参汤

在改善脂肪变、肝细胞损伤和纤维化方面具有较好的疗效。

由于肠道和肝脏均起源于肠内胚层并且通过门静脉相连,因此肠道菌群与 NAFLD 之间存在密切的关联。肠道中的环境毒素、细菌及其代谢产物能够通过门静脉进入肝脏从而诱导肝脏糖脂代谢和炎症反应^[19]。同时益生菌及其代谢产物能够通过树突状细胞或调节性 T 细胞反应来激活一系列适应性免疫抑制炎症反应和肝星状细胞的活化^[20]。在前期研究的基础上,为了进一步研究芪参汤的治疗作用,本研究通过安慰剂对照的方法显示芪参汤组治疗后 OTU、Chao1 和 Shannon 指数与同组治疗前及健康受试者比较均明显增加,Simpon 指数明显降低,这表明芪参汤能够显著增加 NASH 患者肠道菌群的多样性。相关性分析结果显示 *Phascolarctobacterium*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium*、*Akkermansia* 菌属的丰度分别与 LN、HA、PⅢNP、CIV、CAP、LSM 和 GGT 水平呈现显著负相关,而 *Fusobacterium*、*Coprococcus*、*Bilophila* 和 *Prevotella* 菌属的丰度分别与 LN、HA、PⅢNP、CIV、CAP、LSM 和 GGT 水平呈现显著正相关,而芪参汤能够显著 NASH 患者肠道中 *Phascolarctobacterium*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 和 *Akkermansia* 菌属丰度,这些菌属可能与芪参汤改善 NASH 患者肝损伤、血脂和纤维化的作用密切相关。此外, *circos* 分析结果表明芪参汤治疗后 *Akkermansia* 菌属的构成比增加最为显著,因此 *Akkermansia* 菌属的丰度增加可能是芪参汤改善 NASH 炎症、脂质蓄积和纤维化重要的途径之一。*Akkermansia muciniphila* 是 *Akkermansia* 菌属的重要组成一员,于 2004 年由 Derrien 分离。近年来,越来越多的研究表明 *Akkermansia muciniphila* 菌在调节代谢紊乱中发挥着重要作用,包括肥胖、糖尿病、肝脏疾病和心血管疾病等^[21-23]。因此,有学者指出 *Akk* 菌有望成为继乳酸杆菌、双歧杆菌之后的下一代益生菌。

综上所述,芪参汤能够显著改善 NASH 患者肝损伤、血脂和纤维化水平,其作用机制可能是通过增加肠道菌群的多样性和恢复菌群稳态实现的,其中芪参汤上调的 *Akkermansia* 菌属可能在其治疗 NASH 中发挥着重要的作用。

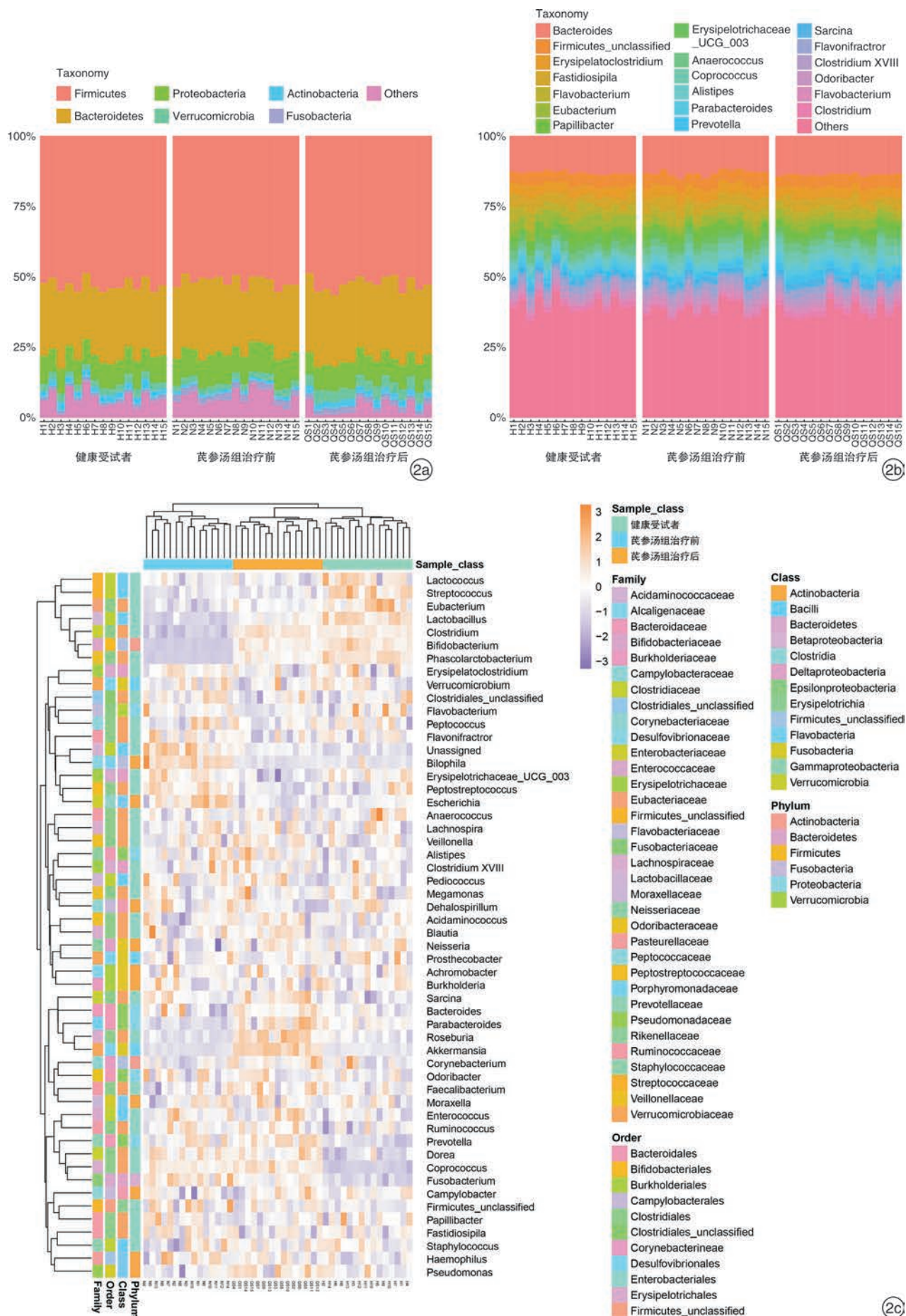


图 2 芪参汤组和健康受试者门和属水平的物种分布直方图和热图

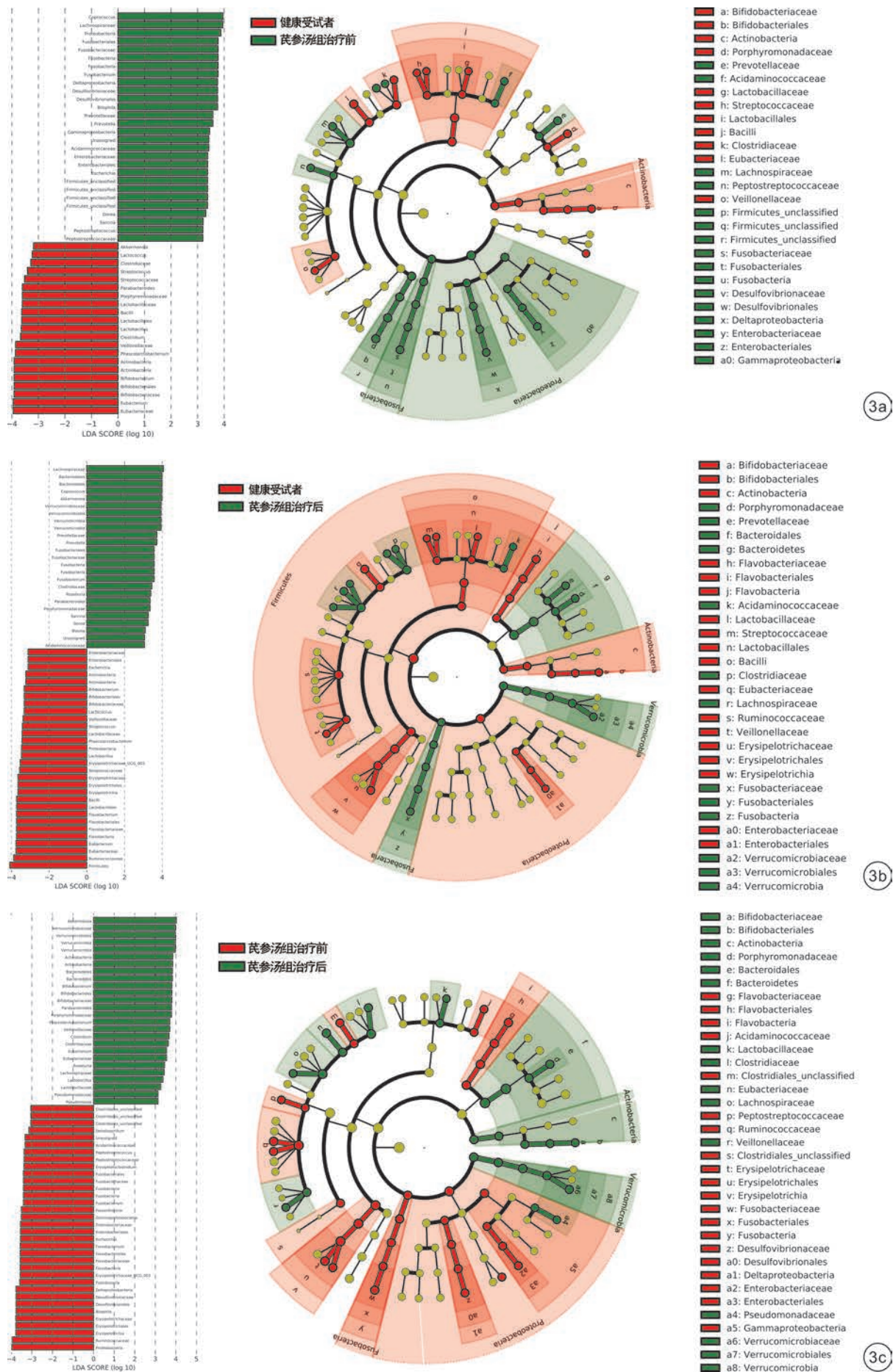


图 3 芪参汤组治疗前、后和健康受试者属水平的物种分布 LEfSe 分析

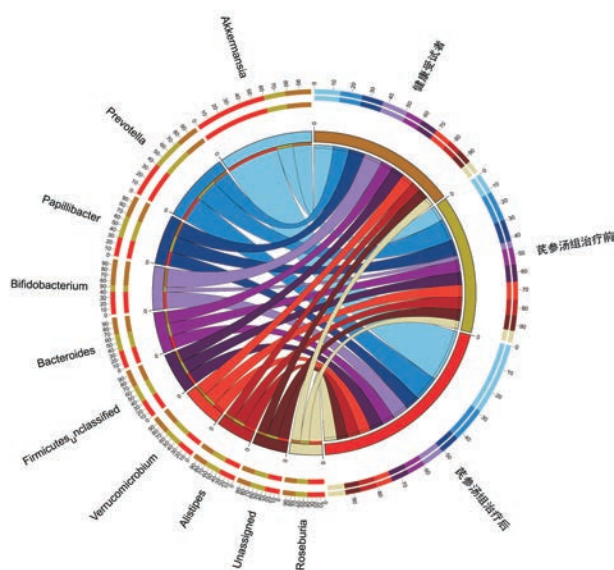


图4 Circos图

参考文献

- [1] 舒筠然,李俊琪,刘琼. 非酒精性脂肪性肝炎的流行病学和危险因素分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9):2085-2090.
- [2] Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review[J]. JAMA, 2020, 323(12): 1175-1183.
- [3] Xu G, Ye J, Liu XJ, et al. Activation of pluripotent genes in hepatic progenitor cells in the transition of nonalcoholic steatohepatitis to pre-malignant lesions[J]. Lab Invest, 2017, 97(10):1201-1217.
- [4] 沈波,陆伦根. 巨噬细胞髓细胞-上皮-生殖酪氨酸激酶促进 NASH 纤维化的机制及治疗策略[J]. 肝脏, 2020, 25(10):1021-1023.
- [5] 李硕熙,袁星星,杨磊,等. 基于网络药理学方法分析芪参汤治疗非酒精性脂肪性肝炎的作用机制及实验验证[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(14):1074-1082.
- [6] 李硕熙,王炳予,杨磊,等. 芪参汤通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抗肝纤维化的机制研究[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(12):905-909,914.
- [7] 王炳予,张雅丽,杨磊,等. 基于 16S rRNA 技术探讨芪参汤治疗非酒精性脂肪性肝纤维化的作用机制[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(1):18-24,29.
- [8] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(3):195-203.
- [9] 李军祥,陈諒,王允亮. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见(2017 年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(11):805-811.
- [10] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. 传染病信息, 2018, 31(5):393-402,420.
- [11] 程贤文,张博,万文雅,等. 脂肪性肝病中西医研究进展[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(4):318-322.
- [12] 刘勤,牛春燕. 由“二次打击”到“多重打击”:发病机制的演变带给非酒精性脂肪性肝病的治疗启示[J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(19):1171-1178.
- [13] 周雨,张智伟,王京奇. 从“二次打击”学说探讨中药防治非酒精性脂肪肝的研究进展[J]. 中医药导报, 2017, 23(18):109-111.
- [14] 吴健. 非酒精性脂肪性肝炎所致肝纤维化的机制及干预[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(6):415-419.
- [15] 高明月,杨雅坤,殷雅楠,等. 肠道菌群介导的非酒精性脂肪性肝病发病机制研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(9):990-995.
- [16] 付懿铭,纪冬,邵清,等. 肝脏硬度值及血清生化指标与非酒精性脂肪性肝炎的相关性分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(11):2473-2477.
- [17] 陆伦根,尤红,谢渭芬,等. 肝纤维化诊断及治疗共识(2019 年)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10):2163-2172.
- [18] 歧红阳,王志民,肖占宇,等. GPRI、LSM、GPC3、AFP 联合检测在肝纤维化及肝癌中的应用价值[J]. 实用医院临床杂志, 2019, 16(4):268-270.
- [19] 叶毅,郑亮,郑恩典,等. 非酒精性脂肪性肝病的肠道菌群变化及粪菌移植治疗作用研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(10):758-763.
- [20] 王蓉,谢伶俐,宋明宇. 肠道微生物对慢性肝病影响的研究进展[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(11):879-882.
- [21] Li J, Lin S, Vanhoutte PM, et al. Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe^{-/-} Mice[J]. Circulation, 2016, 133(24): 2434-2446.
- [22] Greer RL, Dong X, Moraes AC, et al. Akkermansia muciniphila mediates negative effects of IFN γ on glucose metabolism[J]. Nat Commun, 2016, 7:13329.
- [23] Depommier C, Everard A, Druart C, et al. Supplementation with Akkermansia muciniphila in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study[J]. Nat Med, 2019, 25(7):1096-1103.

(收稿日期:2020-12-07)