

不同中医证型非酒精性脂肪性肝炎患者 肠道菌群差异性研究*

祝思思¹ 王炳予² 杨磊² 袁星星^{2,3}

[摘要] 目的:探讨不同中医证型非酒精性脂肪性肝炎(NASH)患者肠道菌群的差异。方法:选择符合诊断和纳入标准的 NASH 患者 74 例,其中湿浊内停证 21 例、肝郁脾虚证 16 例、湿热内蕴证 17 例和痰瘀互结证 20 例。分别收集各组患者血清生化指标和肝脏硬度与可控衰减参数,采用 16S rRNA 高通量测序检测各组患者肠道菌群的差异性。结果:各中医证型 NASH 患者的肝功能指标[天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)]、血脂[总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)]、肝纤维化指标(透明质酸、层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原蛋白和Ⅳ型胶原)、可控衰减参数(CAP)和肝脏硬度测量值(LSM)的比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而碱性磷酸酶(ALP)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。α多样性结果显示,与肝郁脾虚证比较,湿浊内停证、湿热内蕴证和痰瘀互结证 Ace、Chao1 和 Shannon 指数均明显降低,Simpson 指数均明显升高($P < 0.05$)。与湿热内蕴证比较,湿浊内停证和痰瘀互结证 Ace 和 Chao1 指数均明显降低,Simpson 指数均明显升高($P < 0.05$)。各中医证型特征菌属鉴定结果显示,湿浊内停证肠道菌群中 *Ruminococcus* 和 *Dorea* 菌属的丰度明显增加;肝郁脾虚证肠道菌群中 *Oscillospira* 和 *Akkermansia* 菌属的丰度明显增加;湿热内蕴证肠道菌群中 *Heamophilus* 和 *Agathobacter* 菌属的丰度明显增加;痰瘀互结证肠道菌群中 *Alistipes* 菌属的丰度明显降低,*Streptococcus* 菌属的丰度明显增加。结论:各中医证型肠道菌群多样性和菌群结构存在差异,可能参与 NASH 病情和中医证候的发生与发展。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎;中医证型;肠道菌群

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.10.10

[中图分类号] R575.1 [文献标志码] A

Analysis of gut microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis with different Traditional Chinese Medicine syndrome type

ZHU Sisi¹ WANG Bingyu² YANG Lei² YUAN Xingxing^{2,3}

(¹Department of Traditional Chinese Medicine, the People's Hospital of Kaizhou District, Chongqing, 405499, China; ²Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine; ³Heilongjiang University of Chinese Medicine)

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

Abstract Objective: To analysis the difference of gut microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with different Traditional Chinese Medicine(TCM) syndromes type. **Methods:** Seventy-four patients with NASH met the criteria were selected, including 21 cases of congestion of dampness turbidity, 16 cases of liver depression and spleen deficiency, 17 cases of accumulation of dampness and heat, and 20 cases of phlegm and blood stasis. Serum biochemical indexes, CAP and LSM of patients in each group were collected, and gut microbiota of NASH patients with different TCM syndromes were also analysis by 16S rRNA high-throughput sequencing. **Results:** There were statistically significant differences in liver function indexes(AST, ALT and GGT), lipids indexes (TG and TC), liver fibrosis indexes(HA, LN, PⅢNP and CⅣ), CAP and LSM of NASH patients with different TCM syndrome types($P < 0.05$), while there was no statistically significant difference in ALP, HDL-C and LDL-C($P > 0.05$). The diversity results showed that Ace, Chao1 and Shannon indexes of congestion of dampness turbidity, accumulation of dampness and heat and phlegm and blood stasis were significantly lower than those of liver depression and spleen deficiency syndrome, while Simpson index was significantly higher($P < 0.05$). Compared with the accumulation of dampness and heat, the Ace and Chao1 indexes of the congestion of dampness turbidity

*基金项目:黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(No:YQ2022H015);黑龙江省中医药科研项目(No:ZHY19-062、ZHY2022-080)

¹重庆市开州区人民医院中医科(重庆,405499)

²黑龙江省中医药科学院

³黑龙江中医药大学

通信作者:袁星星,E-mail:jackieaqi@163.com

and phlegm and blood stasis were significantly lower, and the Simpson index was significantly higher($P < 0.05$). The identification results of the characteristic gut microbiota of each TCM syndrome type showed that the abundance of *Ruminococcus* and *Dorea* genus in the gut microbiota of the congestion of dampness turbidity group was significantly increased. The abundance of *Oscillospira* and *Akkermansia* genus in the liver depression and spleen deficiency group was increased significantly. The abundance of *Hemophilus* and *Agathobacter* in the accumulation of dampness and heat group was increased significantly. The abundance of *Alistipes* genus in the phlegm and blood stasis group was significantly reduced, while the abundance of *Streptococcus* genus was significantly increased. **Conclusion:** There are differences in diversity and structure of gut microbiota among different TCM syndrome type, which may be involved in the occurrence and development of NASH and TCM syndromes.

Key words nonalcoholic steatohepatitis; Traditional Chinese Medicine syndrome type; gut microbiota

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指包括单纯性肝脂肪变和非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)在内的以肝脏中脂质蓄积为主要特征的代谢应激性肝损伤,部分患者甚至可进展为肝硬化及肝细胞癌^[1]。作为单纯性肝脂肪变发展至肝硬化等终末期肝病的重要环节,NASH占NAFLD的41.4%~54.0%,已成为当前肝病领域的第二大肝脏疾病^[2]。因此,积极预防NASH的形成及进展具有重要的意义。

人体的肠道菌群是一个复杂且庞大的微生态系统,近年来被证实可通过其代谢产物参与肥胖、NAFLD、2型糖尿病及心血管系统等疾病的发病^[3]。肠道菌群的紊乱可破坏肠道的黏膜屏障,促进肠道内的内毒素、炎症因子和肠道菌群的代谢产物通过“肠-肝”轴进入肝脏,从而诱导肝细胞的损伤^[4]。作为代谢和人体免疫的重要组成部分,已有不少学者探索了中医证候与肠道菌群的关系。肠道菌群对于中医证型的形成具有重要的影响,同时了解不同中医证型肠道菌群的差异为临床辨证与治疗提供了客观化的依据。

一项关于不同中医证型与NAFLD临床生化指标的相关性研究表明,湿热内蕴证NAFLD患者更易出现丙氨酸氨基转移酶(ALT)损伤,而湿浊内停证患者更易出现总胆固醇(TC)增高^[5]。然而尚未有关于不同中医证型与NASH临床生化指标的相关性研究。尽管课题组前期研究已证实NASH患者肠道菌群的分布与健康受试者存在显著的差异,并且肠道菌群的丰度与临床肝纤维化指标、肝损伤指标存在一定的相关性^[6]。然而基于小样本的研究和单一的中医证型,并未完全阐述肠道菌群在不同中医证型NASH中的差异性。因此,本研究通过分析不同中医证型NASH患者肠道菌群的变化,以肠道微生态特征的角度来阐明现代医学与中医证候之间的相关性,从而为临床的中医辨证治疗与NASH的发病机制提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2022年3月—2022年11月于黑龙江省

中医药科学院南岗院区门诊及住院部就诊的NASH患者74例,各组患者的一般情况见表1。本研究经黑龙江省中医药科学院伦理委员会批准(No:2021-001-01)。

表1 各组患者一般资料的比较

组别	例数	男/女	年龄/岁	病程/年
湿浊内停证	21	12/9	32.0 (28.0~45.5)	5.0 (2.5~9.0)
肝郁脾虚证	16	5/11	32.5 (28.0~35.8)	3.0 (2.0~4.8)
湿热内蕴证	17	10/7	32.0 (32.0~40.5)	5 (3.0~6.5)
痰瘀互结证	20	11/9	39.0 (31.0~44.8)	4.5 (3.0~6.8)

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 NASH的诊断根据《非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018更新版)》^[7]确定:①肝功酶学异常并超过2倍正常值,持续1个月以上;②排除引起肝脂肪变或肝损伤的其他诱因,如大量饮酒、药物性肝病、病毒性肝炎与肝豆状核变性等;③男性饮酒量<140g/周,女性饮酒量<70g/周,或无饮酒史;④临床以腹胀、肝区不适和乏力为主要临床表现;⑤具备NAFLD的典型影像学表现;⑥肝脏组织病理学表现为肝脏炎症、肝细胞脂肪变(超过5%)并伴有气球样变性。

1.2.2 中医诊断标准 NASH的中医证型诊断根据《非酒精性脂肪性肝病中医诊疗指南》^[8]与《非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)》^[9]中标准确定。

湿浊内停证:主症:胁肋胀满痛;次症:①胸膈部痞闷不适,②头目昏沉,③周身困重、乏力倦怠,④恶心、干呕,⑤形体肥胖。舌脉:舌淡红,舌苔白腻,脉弦滑。

肝郁脾虚证:主症:胁肋胀满痛,因情绪诱发;次症:①脘腹胀满,②便溏或腹痛欲泻,③乏力倦怠,④善太息。舌脉:舌淡红、边有齿痕,舌苔薄白,脉弦细或弦。

湿热内蕴证: 主症: 胁肋胀满痛; 次症: ①口中黏腻不爽, ②口苦, ③胸脘部痞闷不适, ④周身困重, ⑤纳呆, ⑥大便黏滞, ⑦小便赤黄。舌脉: 舌红, 舌苔黄腻, 脉滑数或濡数。

痰瘀互结证: 主症: 胁肋胀满痛或刺痛; 次症: ①胸脘部痞闷不适, ②面色晦暗, ③口苦, ④口舌干燥, ⑤手掌赤红。舌脉: 舌暗红, 有瘀斑, 舌苔白腻, 脉涩或弦滑。

1.3 纳入标准

①符合 NASH 西医诊断标准; ②符合湿浊内停证、肝郁脾虚证、湿热内蕴证和痰瘀互结证中医诊断标准; ③愿意参加本试验, 并签署知情同意书。

1.4 排除标准

①合并其他肝病病史; ②存在严重的心脑血管、免疫系统及肿瘤病史; ③临床试验 1 个月内有抗生素服用史; ④妊娠或哺乳期的女性。

1.5 研究方法

1.5.1 粪便样品收集 分别采用一次性粪便储存盒收集各组患者粪便样品, -80℃ 冰箱保存。以粪便基因组 DNA 提取试剂盒提取样品中 DNA, 根据微生物 V4 区设计引物并进行扩增。采用 HiSeq2500 PE250 平台进行高通量测序, 结果经 Reads 拼接后聚类为 OTUs 并进行物种注释。

1.5.2 实验室指标检测 分别收集各组患者晨起静脉血, 通过全自动生化仪检测血清天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、ALT、γ-谷氨酰基转移酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP)、TC、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的水平。另以时间分辨荧光免疫分析法检测血清肝纤维化指标 (透明质酸、层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原蛋白及Ⅳ型胶原) 的水平。

1.5.3 肝脏硬度及可控衰减参数的测定 采用 FibroScan-502 仪器检测各组患者可控衰减参数 (CAP) 和肝脏硬度测量值 (LSM)。其中 CAP 评估脂肪变的程度, LSM 评估肝纤维化的程度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 计量资料如符合正态分布采用单因素方差分析, 非正态分布采用 K-W 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者肝功能水平的比较

各中医证型 NASH 患者的 AST、ALT 和 GGT 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 ALP 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与湿浊内停证患者比较, 湿热内蕴证患者 AST、ALT 和 GGT 明显升高, 痰瘀互结证患者 ALT 明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与肝郁脾虚证比较, 湿热内蕴证和痰瘀互结证 AST 和 ALT 明显升高, 湿浊内停证 ALT 明显升高, 湿热内蕴证 GGT 明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 各组患者血脂水平的比较

各中医证型 NASH 患者 TG 和 TC 的比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 HDL-C 和 LDL-C 的比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与肝郁脾虚证患者比较, 湿浊内停证和痰瘀互结证患者 TG 和 TC 明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与湿热内蕴证患者比较, 湿浊内停证和痰瘀互结证患者 TG 明显升高, 痰瘀互结证患者 TC 明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 各组患者肝功能水平的比较

组别	例数	U/L, $\bar{X} \pm S$			
		AST	ALT	GGT	ALP
湿浊内停证	21	132.52 ± 31.51	159.90 ± 17.37 ²⁾	217.29 ± 26.84	151.86 ± 20.11
肝郁脾虚证	16	119.25 ± 27.56	136.06 ± 22.27 ¹⁾	206.00 ± 34.40	149.75 ± 23.41
湿热内蕴证	17	157.59 ± 23.10 ¹⁾²⁾	162.24 ± 28.52 ¹⁾²⁾	235.71 ± 26.75 ¹⁾²⁾	150.06 ± 29.39
痰瘀互结证	20	141.10 ± 29.15 ²⁾	158.15 ± 34.55 ¹⁾²⁾	216.60 ± 30.36	155.10 ± 37.34
F		5.407	3.478	3.170	0.139
P		0.002	0.020	0.030	0.937

与湿浊内停证比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与肝郁脾虚证比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 各组患者血脂水平的比较

组别	例数	mmol/L, $\bar{X} \pm S$			
		TG	TC	HDL-C	LDL-C
湿浊内停证	21	3.56 ± 1.46 ¹⁾²⁾	6.72 ± 0.36 ¹⁾	1.83 ± 0.24	3.84 ± 0.51
肝郁脾虚证	16	2.31 ± 0.33	6.21 ± 0.68	1.90 ± 0.23	3.85 ± 0.33
湿热内蕴证	17	2.31 ± 0.34	6.48 ± 0.50	1.86 ± 0.15	3.92 ± 0.45
痰瘀互结证	20	3.28 ± 1.51 ¹⁾²⁾	6.83 ± 0.51 ¹⁾²⁾	1.78 ± 0.26	4.06 ± 0.59
F		6.141	5.098	2.355	0.819
P		0.001	0.003	0.079	0.488

与肝郁脾虚证比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与湿热内蕴证比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 各组患者肝纤维化指标的比较

各中医证型 NASH 患者的透明质酸、层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原蛋白和Ⅳ型胶原的比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与肝郁脾虚证患者比较,湿浊内停证和痰瘀互结证患者透明质酸的水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与肝郁脾虚证比较,湿浊内停证和痰瘀互结证透明质酸

的水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与湿浊内停证、肝郁脾虚证和湿热内蕴证比较,痰瘀互结证患者层粘连蛋白与Ⅳ型胶原的水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与湿浊内停证和肝郁脾虚证比较,痰瘀互结证患者Ⅲ型前胶原蛋白的水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组患者肝纤维化指标的比较

组别	例数	透明质酸	层粘连蛋白	Ⅲ型前胶原蛋白	Ⅳ型胶原
湿浊内停证	21	97.85±13.83 ²⁾	84.06±11.15	113.22±11.31	81.37±9.21
肝郁脾虚证	16	82.90±17.98	83.01±10.87	110.52±16.63	84.56±8.37
湿热内蕴证	17	93.20±10.24	85.10±10.41	116.35±15.86	81.45±9.84
痰瘀互结证	20	108.80±16.67 ²⁾	108.38±31.12 ¹⁾²⁾³⁾	126.31±28.54 ¹⁾²⁾	100.39±28.42 ¹⁾²⁾³⁾
F		9.268	8.239	5.432	5.783
P		<0.001	<0.001	0.023	0.001

与湿浊内停证比较,¹⁾ $P < 0.05$;与肝郁脾虚证比较,²⁾ $P < 0.05$;与湿热内蕴证比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

2.4 各组患者 CAP 和 LSM 的比较

各中医证型 NASH 患者的 CAP 和 LSM 的比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。组间比较,与湿浊内停证、肝郁脾虚证和湿热内蕴证相比,痰瘀互结证患者的 CAP 和 LSM 明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

异均有统计学意义($P < 0.05$)。 β 多样性结果显示,通过 PERMANOVA 表明各中医证型 NASH 患者肠道菌群聚类差异有统计学意义($P < 0.05$)。

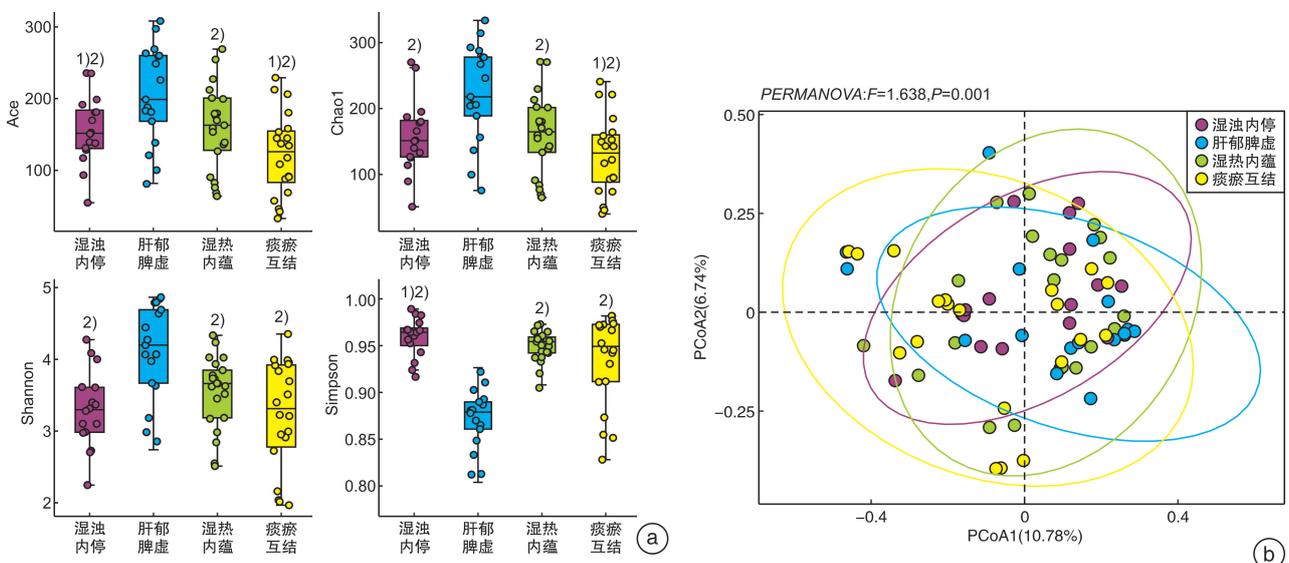
表 5 各组患者 CAP 和 LSM 的比较 $\bar{X} \pm S$

组别	例数	CAP/(dB/m)	LSM/kPa
湿浊内停证	21	294.87±30.53 ¹⁾	5.44±1.05 ¹⁾
肝郁脾虚证	16	280.22±20.42 ¹⁾	5.32±0.99 ¹⁾
湿热内蕴证	17	289.44±23.38 ¹⁾	5.38±0.94 ¹⁾
痰瘀互结证	20	322.04±30.23	6.33±1.61
F		8.265	3.055
P		<0.001	0.034

与痰瘀互结证比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.5 各组患者肠道菌群多样性的比较

各中医证型 NASH 患者肠道菌群多样性的结果如图 1 所示。 α 多样性结果显示,与肝郁脾虚证比较,湿浊内停证、湿热内蕴证和痰瘀互结证 Ace、Chao1 和 Shannon 指数明显降低,Simpson 指数明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与湿热内蕴证比较,湿浊内停证和痰瘀互结证 Ace 和 Chao1 指数明显降低,Simpson 指数明显升高,差



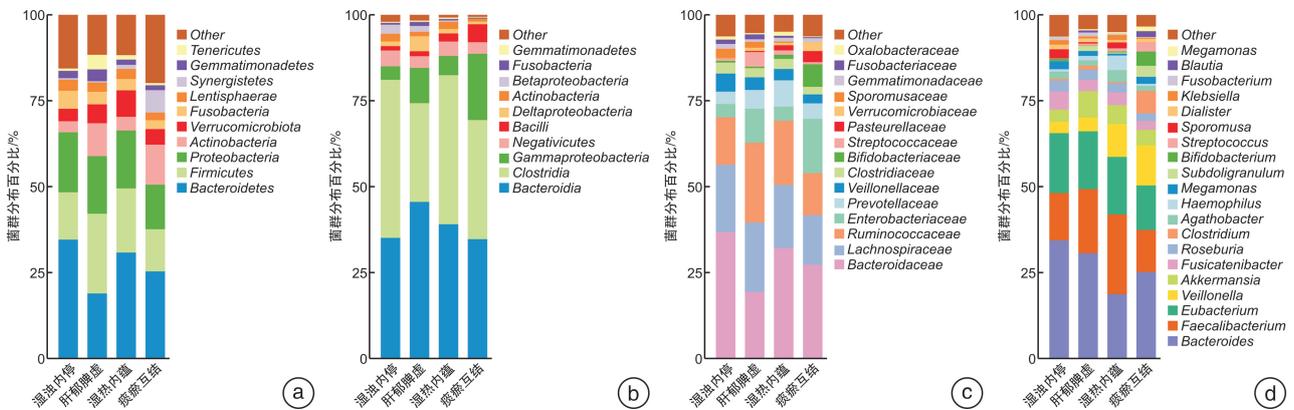
a:各组肠道菌群 α 多样性的比较;b:各组肠道菌群 β 多样性的比较。与肝郁脾虚证比较,¹⁾ $P < 0.05$;与湿热内蕴证比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 各组患者肠道菌群多样性的比较

2.6 各组患者肠道菌群分布的比较

如图 2 肠道菌群结构显示,各中医证型 NASH 患者肠道菌群均由 *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria* 和 *Verrucomicrobiota* 等菌门构成,其中肝郁脾虚证 NASH 患者肠道菌群 *Firmicute* 菌门的比例明显降低,而湿热内蕴证 *Verrucomicrobiota* 菌门的比例明显增加。纲水平,各中医证型 NASH 患者肠道菌群排名前 5 的分别为 *Bacteroidia*、*Clostridia*、*Gamma**proteobacteria*、*Negativicutes* 和 *Bacilli*,其中痰瘀互结证患者 *Bacilli* 菌纲的比例明显增加。科水平,各中医证型 NASH 患者肠道菌群排名前 5 的分别

为 *Bacteroidaceae*、*Lachnospiraceae*、*Ruminococcaceae*、*Enterobacteriaceae* 和 *Prevotellaceae*,其中肝郁脾虚证 NASH 患者肠道菌群 *Bacteroidaceae* 菌科的比例明显降低,湿热内蕴证 *Prevotellaceae* 菌科的比例明显增加,痰瘀互结证患者 *Enterobacteriaceae* 菌科的比例明显增加。属水平,各中医证型 NASH 患者肠道菌群排名前 5 的分别为 *Bacteroides*、*Faecalibacterium*、*Eubacterium*、*Veillonella* 和 *Akkermansia*,其中肝郁脾虚证 NASH 患者肠道菌群 *Akkermansia* 菌属的比例明显增加,湿热内蕴证 *Bacteroides* 菌属的比例最低。



a: 各组患者菌门水平的分布; b: 各组患者菌纲水平的分布; c: 各组患者菌科水平的分布; d: 各组患者菌属水平的分布。

图 2 各组患者肠道菌群分布的比较

2.7 各组患者肠道菌群关键菌属的鉴定

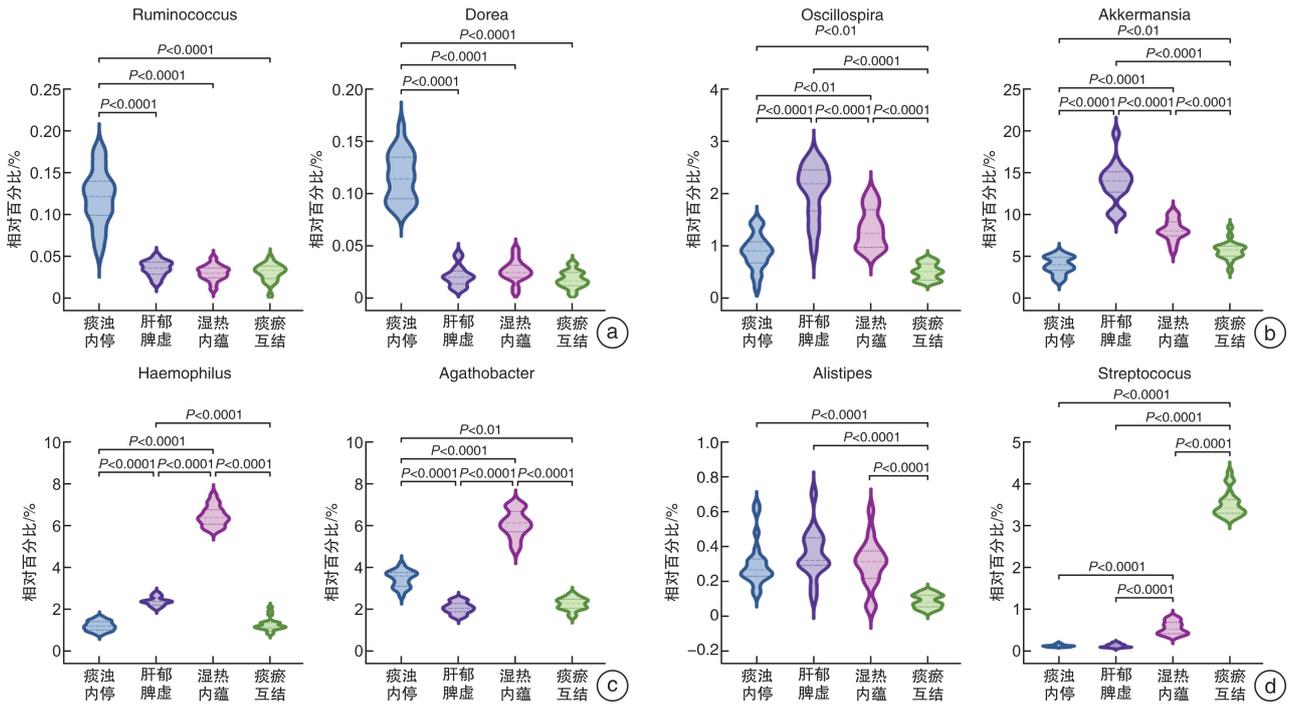
通过取交集,各中医证型 NASH 患者肠道菌群共得到 365 个共同菌属。组间差异分析结果显示,湿浊内停证 NASH 患者肠道菌群 *Ruminococcus* 和 *Dorea* 菌属的丰度较湿热内蕴证、肝郁脾虚证和痰瘀互结证明显增加;肝郁脾虚证 NASH 患者肠道菌群 *Oscillospira* 和 *Akkermansia* 菌属的丰度较湿热内蕴证、湿浊内停证和痰瘀互结证明显增加;湿热内蕴证 NASH 患者肠道菌群 *Heamophilus* 和 *Agathobacter* 菌属的丰度较湿浊内停证、肝郁脾虚证和痰瘀互结证明显增加;痰瘀互结证 NASH 患者肠道菌群 *Alistipes* 菌属的丰度较湿浊内停证、肝郁脾虚证和痰瘀互结证明显降低, *Streptococcus* 菌属的丰度明显增加。见图 3。

3 结论

“多重打击”是目前 NALFD 形成的主要机制导向,在多种因素作用下引起的肝脏脂质蓄积,通过炎症应答和脂毒性等诱导胰岛素抵抗的形成,进一步加重代谢紊乱^[10]。越来越多的研究证实肠道菌群失调通过“多重打击”参与 NAFLD 的形成及进展^[11-12]。研究表明,肠道菌群的易位一方

面通过炎症因子介导的病原体相关模式分子门静脉的积聚,从而加重肝脏炎症反应并诱导 NASH 的发展。另一方面,肠道菌群还可以通过胆汁酸及其代谢产物,进而引起肝脏脂质代谢的紊乱和胰岛素抵抗,促进肝脏炎症与纤维化的形成^[13]。因此,以肠道菌群为靶向的治疗策略和以特定菌群的选择性干预手段的运用,不仅展现出对 NASH 的改善作用,还进一步证实了肠道微生态在 NASH 中的作用。

朱或等^[14]研究证实,NAFLD 患者肠道菌群的多样性较健康受试者显著下调,通过增加其肠道菌群的多样性能够显著改善 NAFLD 患者的糖脂代谢、脂肪变性和纤维化程度。课题组前期通过四氯化碳腹腔注射联合高脂肪饲料喂养构建非酒精性脂肪性肝纤维化大鼠模型,证实 NASH 发病过程中肠道菌群的多样性显著降低,通过增加肠道菌群的多样性,能够对肝脏炎症、脂质蓄积和纤维化发挥显著的抑制作用^[15]。在当前的研究结果中,湿浊内停证和痰瘀互结证 NASH 患者肠道菌群的多样性降低的最为明显,而肝郁脾虚证肠道菌群多样性明显高于其他证型。



a:湿浊内停证特征菌属;b:肝郁脾虚证特征菌属;c:湿热内蕴证特征菌属;d:痰瘀互结证特征菌属。

图 3 各组患者肠道菌群关键菌属的鉴定

研究证实,NASH 患者肠道菌群的 *Proteobacteria* 和 *Bacteroides* 菌门的丰度明显增加,而 *Firmicutes* 菌门的丰度显著降低^[16]。而郭晓霞等^[17]通过对比不同中医证型肝硬化演变过程中肠道菌群分布变化,结果显示肝硬化患者肠道菌群中以 *Firmicutes* 菌门为优势菌群,且明显高于健康对照组,以脾胃湿热证患者 *Firmicutes* 菌门的丰度最高。本研究结果显示,各中医证型的 NASH 患者肠道菌群以 *Bacteroides* 菌门和 *Firmicutes* 菌门为优势菌,其中以肝郁脾虚证 NASH 患者 *Firmicutes* 菌门的比例最低。在属水平,我们当前的研究证实各中医证型 NASH 患者肠道菌群以 *Bacteroides*、*Faecalibacterium* 和 *Eubacterium* 菌属为优势菌群。通过对各中医证型中共同菌属的丰度比较,鉴定了 8 个显著差异的菌属作为相应证型的关键菌。结果显示,湿浊内停证以 *Ruminococcus* 和 *Dorea* 菌属的丰度明显增加,肝郁脾虚证以 *Oscillospira* 和 *Akkermansia* 菌属的丰度明显增加,湿热内蕴证以 *Haemophilus* 和 *Agathobacter* 菌属的丰度明显增加,痰瘀互结证以 *Alistipes* 菌属的丰度明显降低和 *Streptococcus* 菌属的丰度明显增加为主要特征,这与吴巧玲^[18]的研究结果一致。*Ruminococcus* 菌属是最早发现的胃部革兰阳性厌氧菌,已被证实与神经、免疫系统疾病及炎症性肠病相关^[19]。同时,还有研究显示 *Ruminococcus* 菌属与 2 型糖尿病呈现显著的正相关,并且在 NASH

和肝癌患者的肠道中丰度显著升高^[20]。*Alistipes* 菌属于 2003 年在阑尾炎患儿的组织样本中发现,已被证实在肝纤维化的整个进展过程中其丰度显著降低^[21]。

NASH 属于中医“肝癖”的范畴,本病多由嗜食肥甘厚味、情志失调、劳逸失度及他病传变引起,从而引起湿浊内停、肝失疏泄、脾失健运和痰瘀互结,导致壅滞肝络,引起胁肋胀痛、乏力纳差。王敏等(2022)研究结果显示,NAFLD 中医证型与血清铁蛋白、CAP 之间存在一定的相关性,并证实肝郁脾虚证可能是 NAFLD 病情最初阶段。本研究结果亦证实肝郁脾虚证 NASH 患者的肝损伤程度最轻,而以湿热蕴结证最高,这与之前的研究结果一致。同时本研究结果表明,湿浊内停证 NASH 患者的血脂水平较其他证型明显升高,表明湿浊内停证 NASH 患者的脂质代谢程度最重。肝纤维化程度方面,以痰瘀互结证 NASH 患者肝纤维化指标和 LSM 升高最为明显。

总之,NASH 在由肝郁脾虚、湿热蕴结、湿浊内停到痰瘀互结证型演变的过程中,脂质蓄积、肝脏炎症和纤维化水平呈现持续发展的模型,其中肠道菌群的构成中发生了显著的变化。本研究在前期的基础上进一步阐明了各中医证型与 NASH 患者临床指标的相关性。结合肠道菌群的分析和各证型关键菌属的鉴定,本研究一方面在一定程度阐述了 NASH 中医证型的内涵,另一方面也为临床

NASH 的中医证型的鉴别、预防疾病的发展和临床的治疗提供了理论依据和启发。在今后的研究中,课题组将进一步通过大样本的临床研究验证不同中医证型 NASH 患者肠道中特定菌属的差异性,并且通过实验探索各菌属在 NASH 中的保护与致病作用,从而以肠道微生态的角度阐明 NASH 疾病发展的病理机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] McPherson S, Armstrong MJ, Cobbold JF, et al. Quality standards for the management of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): consensus recommendations from the British Association for the Study of the Liver and British Society of Gastroenterology NAFLD Special Interest Group[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(8): 755-769.
- [2] Tokushige K, Ikejima K, Ono M, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020 [J]. *J Gastroenterol*, 2021, 56(11): 951-963.
- [3] 刘云娜, 李帅广, 刘飞, 等. 肠道菌群代谢产物影响非酒精性脂肪肝的研究进展[J]. *食品与药品*, 2022, 24(6): 583-588.
- [4] 韦璐莹, 卢清华, 张扬武, 等. 基于“肠-肝轴”理论对非酒精性脂肪性肝病影响的研究进展[J]. *大众科技*, 2022, 24(5): 88-91, 78.
- [5] 顾立梅, 曹培让, 顾超, 等. 非酒精性脂肪肝中医证型及临床生化指标相关性研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(6): 738-740.
- [6] 袁维, 王炳予, 杨磊, 等. 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[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2021, 29(6): 383-391.
- [7] 中华医学会肝病学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年更新版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(5): 947-957.
- [8] 赵文霞, 许二平, 王宪波, 等. 非酒精性脂肪性肝炎中医诊疗指南[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2022, 32(11): 1059-1062.
- [9] 张声生, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中医杂志*, 2017, 58(19): 1706-1710.
- [10] 魏倩, 郭津生. 非酒精性脂肪性肝病肝纤维化的发生机制、诊断与治疗[J]. *西南医科大学学报*, 2020, 43(2): 97-102.
- [11] 刘印聪, 罗金波, 张玉亭, 等. 肠道菌群代谢产物在非酒精性脂肪性肝病发病中的作用机制研究进展[J]. *山东医药*, 2023, 63(5): 103-106.
- [12] 钱林惠, 陈新利, 吴晖. 肠道菌群及其影响因素在非酒精性脂肪性肝病中的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2022, 42(6): 348-352.
- [13] 王宇威, 刘近春, 安秀琴, 等. 肠道微生态与非酒精性脂肪性肝病研究进展[J]. *中国现代医生*, 2022, 60(15): 192-196.
- [14] 朱彧, 何学敏, 陈明, 等. 降脂方对非酒精性脂肪肝的治疗效果及其对患者肠道菌群和代谢的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(17): 2250-2256.
- [15] 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.
- [16] Vallianou N, Christodoulatos GS, 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*, 2021, 12(1): 56.
- [17] 郭晓霞, 叶永安, 李小科, 等. 肝硬化患者中医证型演变过程中肠道菌群结构变化及其临床意义[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2022, 32(12): 1066-1072.
- [18] 吴巧玲. 非酒精性脂肪性肝病中医辨证分型与肠道菌群相关性的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [19] Henke MT, Brown EM, Cassilly CD, et al. Capsular polysaccharide correlates with immune response to the human gut microbe *Ruminococcus gnavus* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(20): e2007595118.
- [20] Pal D, Naskar M, Bera A, et al. Chemical synthesis of the pentasaccharide repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Ruminococcus gnavus* [J]. *Carbohydr Res*, 2021, 507: 108384.
- [21] Parker BJ, Wearsch PA, Veloo A, et al. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 906.

(收稿日期: 2023-03-06)