

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.19.002

间歇性禁食联合苓桂术甘汤和益生元对非酒精性脂肪肝小鼠的作用研究*

杜鹏云 刘小愉 徐佳宁 王 薇 张成岗[△]

(北京中医药大学生命科学学院 北京 102488)

摘要 目的:探究间歇性禁食联合苓桂术甘汤和益生元对非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的治疗效果及内在机制。**方法:**12周高脂饮食(HFD)喂养建立NAFLD小鼠模型,干预组分别是间歇性禁食组(IF)、禁食联合低浓度苓桂术甘汤组(IFLGL)、禁食联合高浓度苓桂术甘汤组(IFLGH)、禁食联合益生元组(IFpre)、禁食联合益生元和高浓度苓桂术甘汤组(IFLgpre)。检测各组小鼠的体重、血清生化指标、肝脏组织学染色、肠道菌群变化和SREBP-1通路相关基因的表达情况。**结果:**与模型组相比,5个干预组的小鼠体重,血生化指标丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、胆固醇(CHO)、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)均显著降低($P<0.01$);均缓解了肝脏脂质过量积累,肝组织病理损伤得到改善;与对照组相比,模型组的菌群 α 多样性指标ACE、Chao1和Simpson指数显著降低($P<0.05$),在IF组、IFLGH组、IFpre组和IFLgpre组干预后显著升高($P<0.01$),且4种干预方式均显著提高了乳酸菌(Ligilactobacillus)和双歧杆菌(Bifidobacteriale)等益生菌的含量;IFLgpre组与其他干预组相比,在体重、肝功能指标ALT和AST,血脂指标TG、CHO和HDL-C,肝脏组织学以及肠道菌群等多项结果中治疗效果更显著,且差异具有统计学意义。5种干预方式均显著下调了肝脏SREBP-1通路中的SREBP-1c和FAS基因的表达($P<0.01$),缓解了肝脏的脂质过量积累。**结论:**间歇性禁食联合苓桂术甘汤和益生元可以通过调节肠道菌群和SREBP-1通路改善NAFLD,且联合干预的治疗效果更显著。

关键词:非酒精性脂肪肝;肠道菌群;间歇性禁食;苓桂术甘汤;益生元

中图分类号:R259;R574;R242 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)19-3609-07

Effects of Intermittent Fasting Combined with the Decoction of Ling-gui-zhu-gan and Prebiotics on Mice with Non-alcoholic Fatty Liver Disease*

DU Peng-yun, LIU Xiao-yu, XU Jia-ning, WANG Wei, ZHANG Cheng-gang[△]

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102488, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effects and mechanisms of intermittent fasting combined with Lingguizhugan decoction and prebiotics on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** NAFLD mouse models were established using a 12-week high-fat diet (HFD). The intervention groups were: intermittent fasting (IF), IF combined with low-dose Lingguizhugan decoction (IFLGL), IF combined with high-dose Lingguizhugan decoction (IFLGH), IF combined with prebiotics (IFpre), and IF combined with prebiotics and high-dose Lingguizhugan decoction (IFLgpre). Body weight, serum biochemical indices, liver histology, gut microbiota composition, and expression of genes related to the SREBP-1 pathway were measured in each group as parameters. **Results:** Compared to the model group, all intervention groups showed significant reductions in body weight and serum biochemical indices, including ALT, AST, cholesterol (CHO), triglycerides (TG), HDL-C, and LDL-C ($P<0.01$). Hepatic lipid accumulation and histopathological damage were notably alleviated in all intervention groups. Compared to the control group, the model group had significantly lower gut microbiota α -diversity indices (ACE, Chao1, Simpson) ($P<0.05$). However, these indices were increased significantly after intervention in the IF, IFLGH, IFpre, and IFLgpre groups ($P<0.01$). Additionally, these four interventions significantly enhanced the abundance of beneficial bacteria such as Lactobacillales and Bifidobacteriales. The IFLgpre group demonstrated the most significant improvements in body weight, liver function indices (ALT, AST), lipid profiles (TG, CHO, HDL-C), liver histology, and gut microbiota composition, with statistically significant differences compared to other intervention groups. All interventions significantly downregulated SREBP-1c and FAS gene expression in the liver ($P<0.01$), reducing hepatic lipid accumulation. **Conclusion:** Intermittent fasting combined with Lingguizhugan decoction and prebiotics ameliorates NAFLD by modulating gut microbiota and the SREBP-1 pathway. Combined interventions have superior therapeutic effects.

* 基金项目:北京中医药大学高层次人才科研启动项目(90011451310015)

作者简介:杜鹏云(1995-),男,硕士研究生在读,主要研究方向:NAFLD与肠道菌群,E-mail:dupengyun2020@163.com

[△] 通讯作者:张成岗(1970-),男,研究员,博士研究生导师,研究方向:中医药与肠道菌群,E-mail:jxs@bucm.edu.cn

(收稿日期:2024-04-27 接受日期:2024-05-24)

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease; Gut microbiota; Intermittent fasting; Ling-gui-zhu-gan decoction; Prebiotics

Chinese Library Classification(CLC): R259; R574; R242 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)19-3609-07

前言

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种在无过量酒精摄入和其他肝脏损伤因素的情况下, 肝脏内脂肪过多堆积的病理状态。根据预测, 中国将成为 NAFLD 患者数量最多的国家, 到 2030 年预计达到 3.15 亿例^[1], 越来越多的年轻人甚至儿童开始受到该疾病的影响, 呈现低龄化趋势。NAFLD 的发病机制复杂, 且尚无特效药物, 疾病的治疗须建立在生活方式改善的基础上, 进一步增加了治疗的难度。因此, 寻找新的治疗思路具有重要意义。

间歇性禁食 (Intermittent fasting, IF) 是指在特定时间段消耗很少或不消耗卡路里的饮食模式^[2], 并不影响机体摄入的总热量。IF 对于体重的减轻、脂代谢和糖代谢的改善等具有积极作用^[3], 众多证据表明, 能量摄入的时间与 NAFLD 风险系数具有相关性^[4], 说明通过 IF 对 NAFLD 进行干预治疗具有一定的可行性。在中医药方面, 苓桂术甘汤出自东汉著名医家张仲景《金匮要略》一书, 具有温阳化饮, 健脾利湿的作用, 主治中阳不足之痰饮证, 近年来常被用于治疗如肥胖、高脂血症等代谢性疾病, 不仅能有效改善脂肪肝的病理变化, 还能缓解患者的相关症状, 如疲乏、食欲不振、腹胀等, 从而提高患者的生活质量^[5]。已有相关实验证明, 苓桂术甘汤可以在一定程度上改善小鼠体重, 缓解肝脏的甘油三酯过量积累, 但在相关肝功能异常指标的改善上效果欠佳, 其内在机制尚无定论^[6]。此外, 近年来的研究发现, 肠道菌群在包括 NAFLD 在内的多种疾病的发病过程中起着重要作用, 菌群的失衡可能会影响肝脏的脂质代谢和炎症反应, 进而促进 NAFLD 的发生和发展。因此, 调节肠道菌群可能成为预防和治疗 NAFLD 的一种新策略^[7]。而益生元本身对肠道菌群就具有良好的调节作用, 它能促进有益菌的生长, 从而改善肠道健康, 因此益生元有望成为 NAFLD 治疗的一种新的辅助手段。然而, 肠道菌群的复杂性和个体间的差异性增加了研究的难度, 二者之间的确切关联性仍需要更多数据的支持, 也意味着需要更深入的研究来解析菌群在 NAFLD 发病机制中的具体作用, 以便为未来的治疗策略提供更为可靠的科学依据。

为此, 本研究拟通过间歇性禁食联合苓桂术甘汤和益生元, 观察其对 NAFLD 动物模型的治疗效果, 并从肠道菌群调节以及相关基因通路表达影响的角度开展机制研究, 旨在为形成针对 NAFLD 更为有效的治疗模式并揭示其作用机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

42 只 7 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 体重 20.6~22.7 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物使用许可证号: SYXK(京)2019-0010。实验动物饲养于 SPF 级动物房, 环境温度维持在 22-24℃, 并保持 12 小时的昼夜交替, 适应性喂养 7

天, 期间自由饮食。所有动物实验均通过北京中医药大学动物实验伦理审查, 编号[BUCM-2023041302-2018]。⁶⁰Co 辐照鼠维持饲料和高脂饲料 SFD020 (78.8%基础饲料 +10%猪油 +10%蛋黄粉 +1%胆固醇 +0.2%胆酸钠) 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司。苓桂术甘汤方药组成: 茯苓 12 g, 桂枝 9 g, 白术 9 g, 炙甘草 6 g, 购自北京同仁堂。益生元由北京云医国际科技有限公司提供, 主要成分为多糖和膳食纤维。AH480 型全自动生化分析仪 (BECKMAN COULTER 公司)。实时荧光定量 PCR 仪 QuantStudio6 Flex 型号 (Life Technologies 公司)。RNA Easy Fast 动物组织总 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司。RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒购自 Thermo 公司。2 × Realab Green PCR Fast mixture 通用型试剂盒购自 LABLEAD 公司。

1.2 动物分组及造模方法

将 42 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 7 组: 对照组 (Control)、模型组 (Model)、单纯禁食组 (Intermittent Fasting, IF)、禁食 + 低浓度苓桂术甘汤组 (IFLGL)、禁食 + 高浓度苓桂术甘汤组 (IFLGH)、禁食 + 益生元组 (IFpre)、禁食 + 益生元 + 高浓度苓桂术甘汤组 (IFLGpre)。在 1~12 周期间, 对照组喂食普通维持饲料, 其余 6 组喂食高脂饲料 SFD020 进行 NAFLD 造模。在造模期间, 动物均自由饮水。

1.3 干预方式

在实验的 13~16 周, 所有小鼠均喂食普通维持饲料和自由饮水, 对照组和模型组 24 h 自由进食, 其余 5 组采用间歇性禁食, 即 8:00~16:00 自由进食, 16:00~次日 8:00 禁止进食。在此基础上, 对照组、模型组、IF 组采取 0.2 mL 生理盐水灌胃, IFLGL 组灌胃 0.2 mL 低浓度苓桂术甘汤 (5.46 g/kg), IFLGH 组灌胃 0.2 mL 高浓度苓桂术甘汤 (10.92 g/kg), IFpre 组灌胃 0.2 mL 益生元 (4.55 g/kg), IFLGpre 组灌胃 0.2 mL 高浓度苓桂术甘汤 (10.92 g/kg) 和益生元 (4.55 g/kg) 混合液。16 周后, 将动物禁食 12 h, 麻醉状态下眼眶取血, 分离血清备用。采集肝脏样本, 并留取粪便样品备检。

1.4 血生化指标检测

取小鼠血清 200 μL, 使用全自动生化分析仪检测小鼠血清丙氨酸转氨酶 (Alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (Aspartate transaminase, AST)、胆固醇 (Cholesterol, CHO)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (Low Density Lipoprotein, LDL-C) 含量。

1.5 肝脏组织病理学检查

油红 O 染色 将固定后的肝脏组织包埋并制备切片, 将其放入油红染液中浸染 10 min, 然后在 60% 的异丙醇中进行两次背景分化, 再用纯净水洗净, 随后浸入苏木素中复染 5 min。使用分化液分化 8 s 后使用蒸馏水洗涤, 返蓝 1 s 后洗净, 最终使用甘油明胶封片剂封片。通过超分辨显微组织成像系统扫描成像, 利用 ImageJ 软件测量红色区域的比例, 并进行统计分析,

以获取脂肪变性面积的百分比数据。

1.6 肠道菌群 16S rDNA 检测

小鼠粪便样本保存于 -80℃ 无菌条件, 委托北京百迈客生物科技有限公司进行 16S rDNA 测序, 采用高通量测序技术对 16S rDNA 基因的 V3-V4 片段进行测序。测序过程中使用了特定设计的保守区引物 (F: ACTCCTACGGGAGGCAGCA; R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT), 经过引物末端添加测序接头的 PCR 扩增后, 对扩增产物进行纯化和定量, 均一化处理后形成测序文库, 使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台获取原始序列数据, 再使用 cutadapt 1.9.1 软件去除引物序列, 得到 Clean Reads。最后, 采用 QIIME2 2020.6 软件进行去噪处理, 得到最终数据。

1.7 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)

检测肝脏组织中 SREBP-1 通路相关基因表达 取 20 mg 小鼠肝脏组织, 加入 350 μL 裂解液, 使用电动匀浆机低温匀浆, 根据 RNA Easy Fast 动物组织总 RNA 提取试剂盒操作提取样品总 RNA, 使用 NanoDrop 检测所提取 RNA 的纯度和含量, 并使用 RNase-Free ddH₂O 将其配置为相同浓度 (2 μg/μL)。使用 RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒将总 RNA 反转录, 获得对应的 cDNA。最后使用 2× Realab Green PCR Fast mixture 通用型试剂盒进行 RT-qPCR。反应条件: 95℃, 30 s, 然后进行 40 个循环, 每个循环 95℃, 10 s; 60℃, 30 s。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达量。所使用的 PCR 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 见表 1。

表 1 用于 RT-qPCR 扩增的引物序列^[8]

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR amplification

	Forward primer	Reverse primer
β-actin	5'-GCCTTCCTTCTTGGGTATGG -3'	5'-GCACTGTGTTGGCATAGAGG -3'
Srebp-1c	5'-GTGAGCCTGACAAGCAATCA -3'	5'-GGTGCCTACAGAGCAAGAG -3'
Fas	5'-GCTGCGAAACTTCAGGAAAT -3'	5'-AGAGACGTGTCACCTCTGGACTT -3'

1.8 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 表示差异显著, P<0.01 表示差异极显著。实验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。使用 Graph-Pad Prism 9.5 软件作图。

2 结果

2.1 不同干预方式对 NAFLD 小鼠体重的改善作用

在体重减少量方面, 与 Control 组和 Model 组相比, 5 种干预方式对小鼠体重均具有显著的降低效果, 其差异具有统计学意义 (P<0.01)。其中 IFLGpre 组效果最显著, 平均减重 7.75 g, 并且与 IF 组相比差异具有统计学意义 (P<0.05)。在减重百分比方面, 其结果与减少量一致, IFLGpre 组效果最显著, 平均减重百分比达 21.79%, 且与 IF 组和 IFpre 组差异具有统计学意义 (P<0.05)。见图 1。

2.2 不同干预方式对 NAFLD 小鼠血清生化指标的改善作用

与 Control 组相比, Model 组小鼠的 ALT、AST 和 TG 有上升趋势 (P>0.05), CHO 和 HDL-C 显著上升 (P<0.05), LDL-C 同样显著上升 (P<0.01); 与 Model 组相比, 包括 IF 在内的 5 种干预方式均可显著降低因 NAFLD 造模而异常升高的 TG、CHO、HDL-C、LDL-C, 均具有统计学意义。与 Model 组相比, IFLGH 组、IFpre 组和 IFLGpre 组可显著改善肝功能指标 ALT 和 AST, 其差异具有统计学意义, 其它干预组仅有降低趋势。见图 2。

2.3 不同干预方式对 NAFLD 小鼠肝脏组织学的改善作用

油红 O 染色结果显示, Control 组小鼠胞质中几乎未见脂滴, Model 组小鼠肝组织中可见较大泡样脂滴, 细胞核周围出现大量红色脂滴, 5 个干预组均可见脂滴减少, 并显著降低了肝脏组织中脂肪变性所占百分比 (P<0.01), 其中 IFLGpre 组的效果最显著, 在 IF 干预的基础上, 进一步降低了脂肪变性面积所占比例 (P<0.01)。见图 3, 图 4。

2.4 不同干预方式 NAFLD 肠道微生物群失调的改善作用

2.4.1 Alpha 多样性分析 在属水平上, 与 Control 组相比, Model 组小鼠的 α 多样性指数 (ACE、Chao1 和 Simpson 指数) 均显著下降 (P<0.05), 表明肠道菌群的丰富度降低。包括 IF 在内的 4 种干预方式均可以提高 NAFLD 小鼠肠道菌群的 α 多样性。见图 5。

2.4.2 物种分类学分析 在门水平上, 不同干预方式对 Firmicutes (厚壁菌门) 的影响不同, 其中 IF 组和 IFLGH 组为升高, IFpre 组和 IFLGpre 组为降低; 对于 Actinobacteriota (放线菌门), IFLGH、IFpre 和 IFLGpre 均可显著提高其含量。在纲水平上, Verrucomicrobiae (疣微菌纲) 的含量会因造模后升高, 4 种干预方式均可显著降低其含量 (P<0.01)。在目水平上, 4 种干预方式均可以显著提高 Bacteroidota (拟杆菌目) 的含量, 与

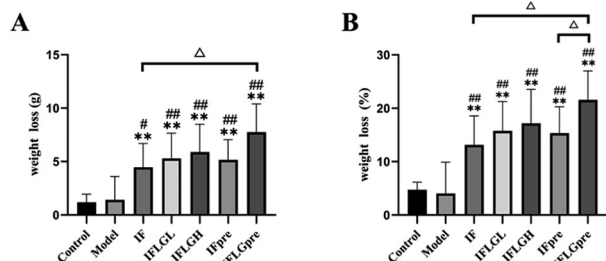


图 1 各组小鼠体重减少量和体重下降百分比对比 (n=6)

Fig.1 Comparison of weight loss and percentage of weight reduction among groups of mice (n=6)

Note: Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01; compared with the model group, #P<0.05, ##P<0.01; compared among intervention groups, Δ P<0.05, ΔΔ P<0.01.

Model 相比,差异均有统计学意义;Bifidobacteriales(双歧杆菌目)的含量同样因 NAFLD 造模而降低,4 种干预方式均可提高其含量,与 Model 相比,IFLGH 组、IFpre 组和 IFLGpre 组的差异具有统计学意义($P<0.01$)。在种水平上,4 种干预方式均可提高因 NAFLD 造模而降低的 Ligilactobacillus (乳酸菌)的含

量,其含量高于 Control 组和 Model 组;4 个干预组提高了 Muribaculaceae 的含量,且均高于 Control 组和 Model 组,其中 IFLGH 组含量最高,与其余干预组组间的差异具有统计学意义。见图 6。

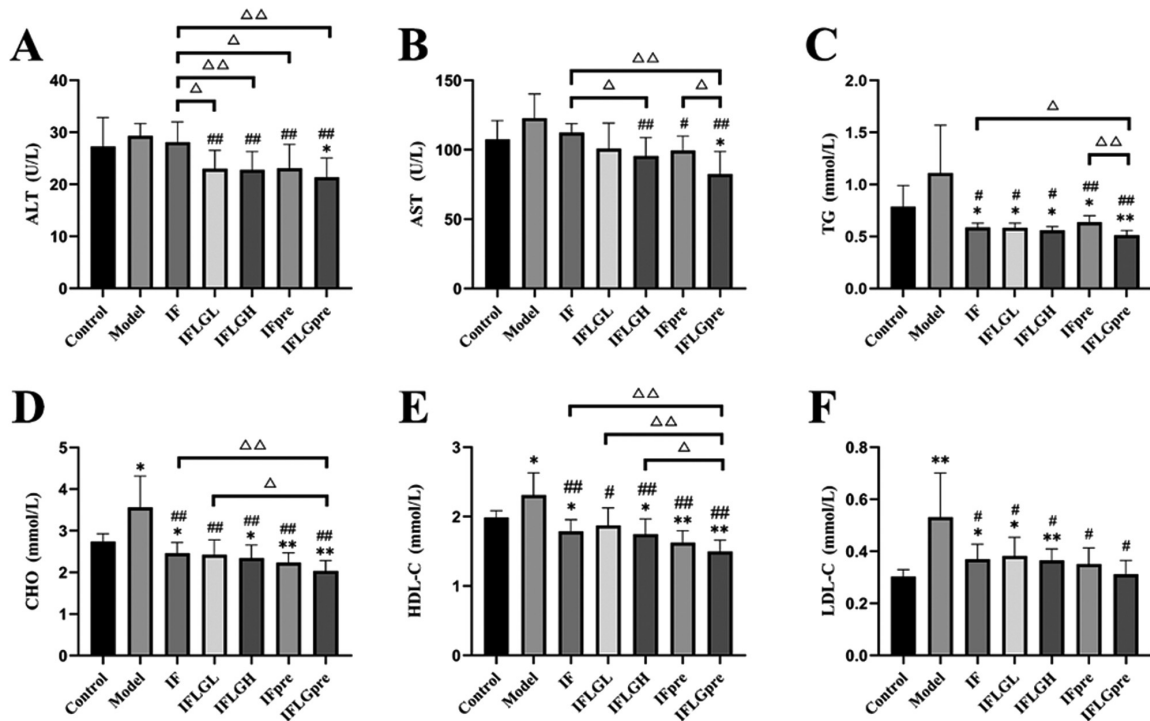


图 2 各组小鼠血清 ALT、AST、TG、CHO、HDL-C 和 LDL-C 水平对比(n=6)

Fig.2 Comparison of serum ALT, AST, TG, CHO, HDL-C, and LDL-C levels among groups of mice (n=6)

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; compared among intervention groups, Δ $P<0.05$, ΔΔ $P<0.01$.

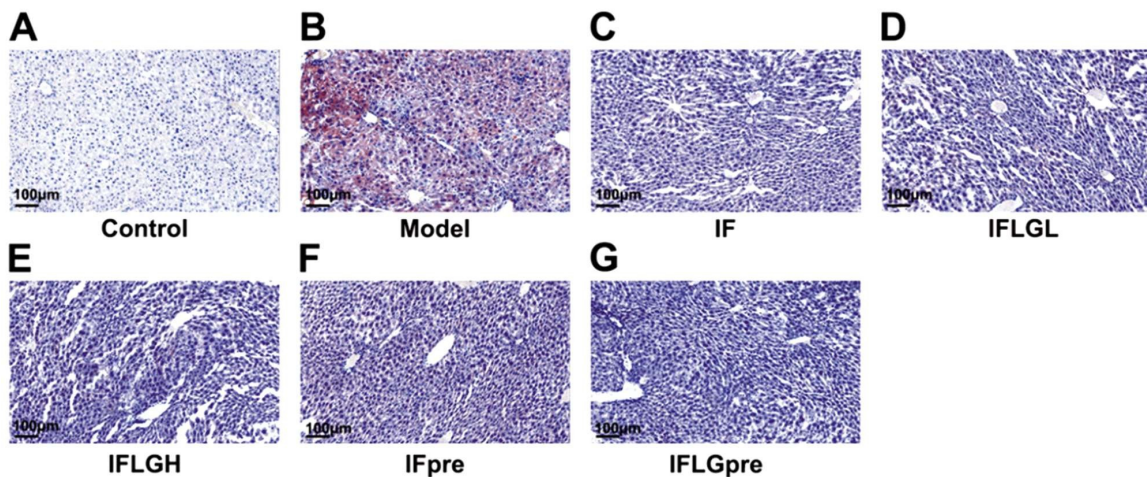


图 3 各组小鼠肝脏组织油红 O 染色结果对比(× 20)

Fig.3 Comparison of Oil Red O staining results of liver tissues among groups of mice (× 20)

2.5 不同干预方式对高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠肝脏中 SREBP-1 通路的影响

使用 RT-qPCR 检测各组小鼠肝脏组织中 SREBP-1c 和 FAS 基因的相对表达量,结果显示,与 Control 组相比,Model 组的 SREBP-1c 和 FAS 基因的表达量显著上升 ($P<0.01$),包括 IF 在内的各干预组的该基因相对表达量相比 Model 组显著

下降($P<0.01$),整体水平与 Control 组接近。其中 IFLGpre 组表达量最低,与 IFLGL 组相比差异具有统计学意义。见图 7。

3 讨论

目前 NAFLD 的治疗方法是通过减少相关风险因素来管理疾病,包括改善肥胖、胰岛素抵抗、高血糖和血脂异常^[9],主要

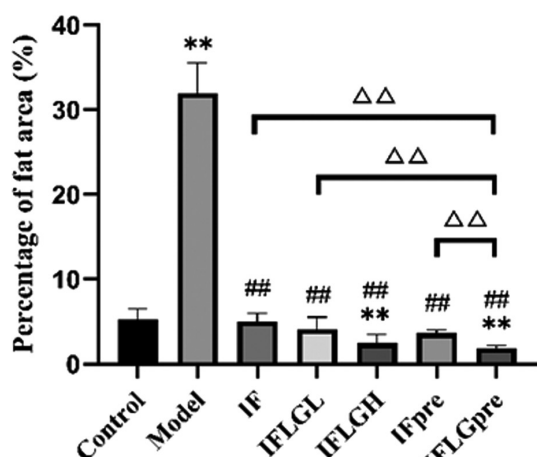


图 4 各组小鼠肝脏组织脂肪变性面积占比对比 (n=6)

Fig.4 Comparison of the percentage of liver tissue steatosis area among groups of mice (n=6)

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; compared among intervention groups, ^ $P<0.05$, ^^ $P<0.01$.

策略是通过减少总能量的摄入和改变饮食结构来达到治疗目的。已有实验证明,通过低热量饮食将体重减少 7-10%可以有效治疗 NAFLD^[10],因此,间歇性禁食对于 NAFLD 的治疗具有一定可行性^[11]。

研究结果显示,间歇性禁食、苓桂术甘汤和益生元这三种干预方式对于 NAFLD 都具有一定的治疗效果,并且在间歇性禁食的基础上联合苓桂术甘汤和益生元,可以进一步提高 NAFLD 的治疗效果,三种干预方式联合组与其他干预组相比,在体重、肝功能指标 ALT 和 AST,血脂指标 TG、CHO 和 HDL-C,肝脏组织学以及肠道菌群测序等多项结果中治疗效果最好,且差异具有统计学意义。血清学 HDL-C、LDL-C 以及肝功能指标 ALT 和 AST 的降低都提示肝细胞的损伤减轻、肝脏的炎症情况得到缓解、肝功能得到恢复。TG 和 CHO 的降低提示血清和肝脏的脂质过量累积得到缓解,肝脏以及心血管疾病的风险降低。

到目前为止,NAFLD 的发病机制尚未完全阐明^[12],现有的理论无法说明多种刺激因素在 NAFLD 发生中的协同作用。随着研究的深入,越来越多的证据表明肠-肝轴与 NAFLD 的发

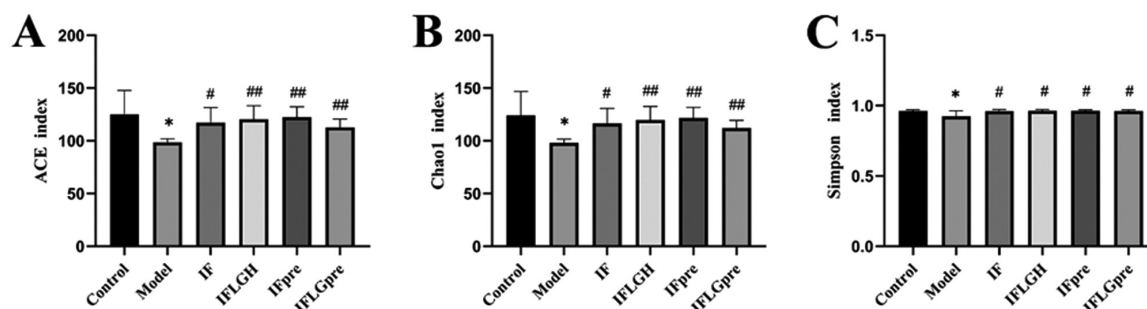


图 5 各组小鼠肠道菌群 α 多样性指数对比 (n=6)

Fig.5 Comparison of gut microbiota α -diversity indices among groups of mice (n=6)

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; compared among intervention groups, ^ $P<0.05$, ^^ $P<0.01$.

生发展密切相关,肠道菌群的紊乱及其代谢产物的失调都可能导致 NAFLD 的发生^[13,14]。肠道稳态的失调可以影响肠道屏障的通透性,导致肝脏暴露在肠道毒素之下,进而影响其基础代谢。同时,高脂饮食会减少菌群多样性,提高肠道能量的吸收效率,进而影响机体的能量代谢能力。由此可见,肠道微生物群及其代谢产物通过肠-肝轴发挥了重要作用,肠-肝轴可能是治疗 NAFLD 的一种新的切入点^[15,16]。

本研究通过对肠道菌群测序发现,间歇性禁食联合苓桂术甘汤和益生元可以纠正 NAFLD 小鼠肠道菌群紊乱,恢复菌群的 α 多样性,增加菌群的丰富度和均匀度,并且显著增加双歧杆菌和乳酸菌在内的益生菌的数量。双歧杆菌能够通过产生双歧杆菌素来帮助控制致病菌的增殖^[17],还可以通过增加免疫球蛋白 A 的水平来增强肠道黏膜屏障功能^[18],调节肠道炎症反应,促进肠道免疫系统的发育和功能^[19,20],达到调节肠道菌群平衡和维护肠道微生态的稳定性效果。乳酸菌可以通过纠正转氨酶水平的异常升高和肝脏脂肪变性,缓解肝脏炎症,并且可以通过调节肠道-肝脏轴的肠道微生物组和代谢环境,产生对 NAFLD 的改善作用^[21]。相关实验证明,乳酸菌可以通过降低肥胖或糖尿病动物的葡萄糖耐受性来减少其脂肪含量^[22,23],减少

与肥胖相关的炎症,对于肝脏相关疾病具有良好的治疗效果^[24,25]。

NAFLD 是一种以肝脏脂肪堆积为特征的疾病,其发病与脂代谢紊乱密切相关^[26]。甾醇调节元件结合蛋白(SREBPs)是一个可以调控所有内源性胆固醇、脂肪酸、三酰基甘油和磷脂生物合成的转录因子家族,具有调节脂质稳态的作用,它也是肝脏中胆固醇和脂肪合成的主要调节因子。其中 SREBP-1 是影响脂肪酸合成的主要调控因子^[27],如果能通过抑制 SREBP 的活性,控制脂肪酸的合成,就可以减少肝脏组织中脂质的合成,有利于 NAFLD 的治疗^[28]。本次研究证明,间歇性禁食联合苓桂术甘汤和益生元可以降低 SREBP-1 通路相关基因的表达,起到了减少肝脏脂质合成和过量积累的作用。并且三种干预方式联合组对 SREBP-1 通路相关基因的抑制作用更强,与 IFLGL 组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。然而,能够对 SREBP-1 起到调控作用的上游通路较多,已有相关实验证明的通路包括 AMPK 信号通路^[29]、AKT/mTOR 信号通路^[30]和 FXR 信号通路^[31],在本研究中,SREBP-1 的上游通路缺乏数据证明。

综上所述,本研究发现通过间歇性禁食、苓桂术甘汤和益生元的联合干预模式,对于非酒精性脂肪肝具有显著的治疗作用,可以降低小鼠因高脂饲养异常升高的体重、血生化指标,显

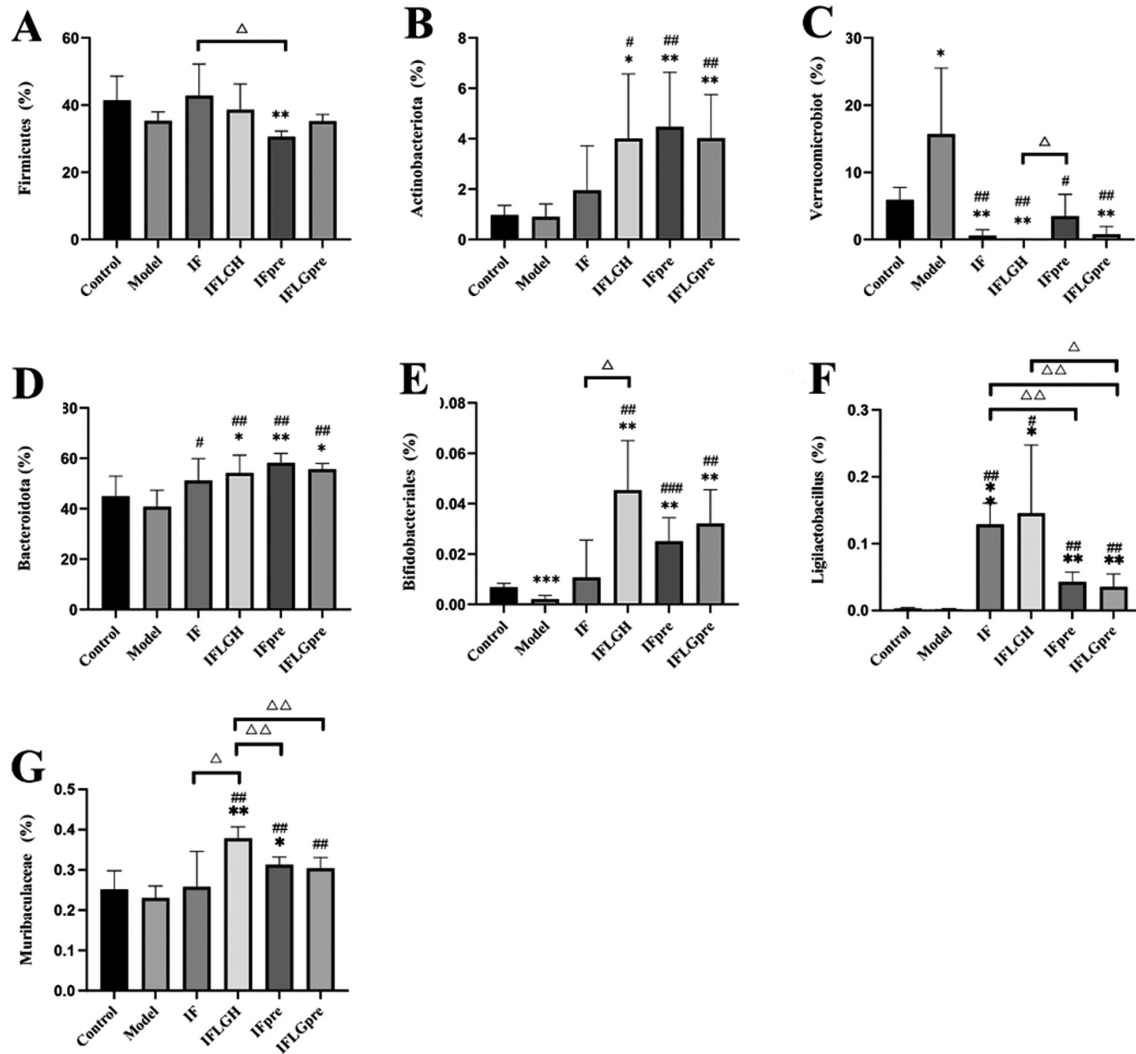


图 6 各组小鼠相关肠道菌群的含量对比(n=6)

Fig.6 Comparison of relative abundances of gut microbiota among groups of mice (n=6)

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; compared among intervention groups, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$.

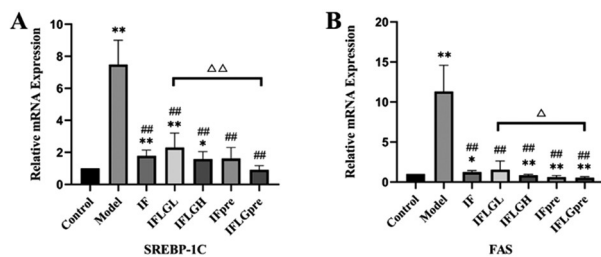


图 7 各组小鼠肝组织 mRNA 表达情况对比(n=6)

Fig.7 Comparison of hepatic mRNA expression among groups of mice (n=6)

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; compared among intervention groups, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$.

著缓解小鼠肝脏组织中过量的脂质积累和脂肪变性,并且能够通过提高肠道菌群的丰富度和均匀度,增加有益菌的数量,改善肠道微生物稳态,并且干预方式的联合使用可以显著提高对NAFLD的治疗效果,对于间歇性禁食在临床中的应用具有一定的参考价值。

参考文献(References)

- [1] Man S, Deng Y, Ma Y, et al. Prevalence of Liver Steatosis and Fibrosis in the General Population and Various High-Risk Populations: A Nationwide Study With 5.7 Million Adults in China [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 1025-1040.
- [2] Malinowski B, Zaleska K, Wesierska A, et al. Intermittent Fasting in Cardiovascular Disorders-An Overview [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (3): 673.
- [3] Nowosad K, Sujka M. Effect of Various Types of Intermittent Fasting (IF) on Weight Loss and Improvement of Diabetic Parameters in Human[J]. *Curr Nutr Rep*, 2021, 10(2): 146-154.
- [4] Sadeghirad B, Motaghipisheh S, Kolahdooz F, et al. Islamic fasting and weight loss: a systematic review and meta-analysis [J]. *Public Health Nutr*, 2014, 17(2): 396-406.
- [5] Yang L, Lin W, Nugent C A, et al. Lingguizhugan Decoction Protects against High-Fat-Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Alleviating Oxidative Stress and Activating Cholesterol Secretion[J]. *Int J Genomics*, 2017, 2017: 2790864.
- [6] Liu T, Yang L L, Zou L, et al. Chinese medicine formula

- lingguizhugan decoction improves Beta-oxidation and metabolism of Fatty Acid in high-fat-diet-induced rat model of Fatty liver disease[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 429738.
- [7] Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(5): 279-297.
- [8] Zhu X, Bian H, Wang L, et al. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 141: 192-204.
- [9] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases [J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 328-357.
- [10] Moore M P, Cunningham R P, Dashek R J, et al. A Fad too Far? Dietary Strategies for the Prevention and Treatment of NAFLD [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2020, 28(10): 1843-1852.
- [11] Marjot T, Tomlinson J W, Hodson L, et al. Timing of energy intake and the therapeutic potential of intermittent fasting and time-restricted eating in NAFLD [J]. *Gut*, 2023, 72(8): 1607-1619.
- [12] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038-1048.
- [13] Moschen A R, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24(11): 537-545.
- [14] Tripathi A, Debelius J, Brenner D A, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(7): 397-411.
- [15] Kobyliak N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn G, et al. A Multi-strain Probiotic Reduces the Fatty Liver Index, Cytokines and Aminotransferase levels in NAFLD Patients: Evidence from a Randomized Clinical Trial [J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2018, 27(1): 41-49.
- [16] 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.
- [17] Yoon S J, Yu J S, Min B H, et al. Bifidobacterium-derived short-chain fatty acids and indole compounds attenuate nonalcoholic fatty liver disease by modulating gut-liver axis [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1129904.
- [18] Kim J Y, Bang S J, Kim J Y, et al. The Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* HY8002 Potentially Improves the Mucosal Integrity of an Altered Intestinal Microbial Environment [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 817591.
- [19] Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, et al. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects [J]. *Microbiol Spectr*, 2017, 5(3).
- [20] Tojo R, Suarez A, Clemente M G, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(41): 15163-15176.
- [21] Lee N Y, Yoon S J, Han D H, et al. Lactobacillus and Pediococcus ameliorate progression of non-alcoholic fatty liver disease through modulation of the gut microbiome [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(4): 882-899.
- [22] Stenman L K, Waget A, Garret C, et al. Potential probiotic *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice [J]. *Benef Microbes*, 2014, 5(4): 437-445.
- [23] Sung H K, Youn S J, Choi Y, et al. Body Fat Reduction Effect of *Bifidobacterium breve* B-3: A Randomized, Double-Blind, Placebo Comparative Clinical Trial [J]. *Nutrients*, 2022, 15(1): 28.
- [24] Alvarez-Arrano V, Martin-Pelaez S. Effects of Probiotics and Synbiotics on Weight Loss in Subjects with Overweight or Obesity: A Systematic Review [J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3627.
- [25] Lin X, Xia Y, Wang G, et al. Lactic Acid Bacteria With Antioxidant Activities Alleviating Oxidized Oil Induced Hepatic Injury in Mice [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2684.
- [26] Li H, Liang J, Han M, et al. Polyphenols synergistic drugs to ameliorate non-alcoholic fatty liver disease via signal pathway and gut microbiota: A review [J]. *J Adv Res*, 2024 [Epub ahead of print].
- [27] Horton J D, Shimomura I, Brown M S, et al. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2 [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(11): 2331-2339.
- [28] Shimomura I, Shimano H, Horton J D, et al. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(5): 838-845.
- [29] Li Y, Xu S, Mihaylova M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(4): 376-388.
- [30] Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N, et al. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(5): 725-738.
- [31] Watanabe M, Houten S M, Wang L, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(10): 1408-1418.