

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003212

人参皂苷 Rg1 对大鼠非酒精性脂肪性肝病
和肠道菌群影响的研究高娴玲¹, 张磊¹, 杨玥², 罗靖³, 江可蓉¹, 李树德¹, 淳于纬训¹

(1. 昆明医科大学基础医学院, 昆明 650500; 2. 云南省第二人民医院麻醉科, 昆明 650021;

3. 云南省第一人民医院麻醉科, 昆明 650034)

【摘要】目的:探讨人参皂苷 Rg1 对大鼠非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的改善情况及对肠道菌群的潜在影响。**方法:**将 24 只大鼠随机分为对照组、高脂高糖(high-fat and high-sugar, HFHS)组、人参皂苷 Rg1 低剂量治疗组、人参皂苷 Rg1 高剂量治疗组。采用 HFHS 饮食喂养制备大鼠 NAFLD 模型, 给予人参皂苷 Rg1 灌胃干预治疗 4 周。麻醉处死大鼠, 测量各组大鼠的体质量和肝重, 计算肝重/体质量的比值; 采用酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)分别检测各组大鼠血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量变化; 采用苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色法观察各实验组肝脏脂肪变性情况; 采用 16S rRNA 基因高通量测序检测各组大鼠肠道微生物改变情况。**结果:**人参皂苷 Rg1 干预治疗可降低 NAFLD 大鼠的体质量($P<0.01$)和肝重($P<0.05$); HE 染色结果显示, 人参皂苷 Rg1 干预治疗可有效减轻 NAFLD 大鼠肝脏的脂肪变性($P<0.05$); ELISA 检测结果显示, 人参皂苷 Rg1 干预治疗可降低 NAFLD 大鼠血清 TG、TC、ALT、AST、LDL-C、MDA 等指标的表达($P<0.05$), HDL-C、GSH-px 等指标在人参皂苷 Rg1 干预治疗后表达显著升高($P<0.05$); 肠道微生物 α 多样性分析结果显示, 给予高剂量人参皂苷 Rg1 干预治疗可增加 NAFLD 大鼠肠道微生物 α 多样性($P<0.05$); β 多样性结果显示, 给予人参皂苷 Rg1 干预治疗可显著改变 NAFLD 大鼠肠道微生物组成($P<0.01$); 线性判别分析结果显示, 高剂量人参皂苷 Rg1 干预治疗后, 其肠道微生物中的优势物种为毛螺菌属、双歧杆菌属、拟杆菌属、厌氧螺旋菌属等肠道益生菌。**结论:**人参皂苷 Rg1 干预治疗可减轻 NAFLD 大鼠肝脂肪病变和氧化应激反应, 其作用机制可能与 Rg1 改善 NAFLD 大鼠肠道微生物结构和多样性, 以及增加肠道益生菌的丰度有关。

【关键词】人参皂苷 Rg1; 非酒精性脂肪性肝病; 高脂高糖; 肠道微生物群**【中图分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-09-06Effect of ginsenoside Rg1 on non-alcoholic fatty liver disease
and intestinal microbiota in ratsGao Xianling¹, Zhang Lei¹, Yang Yue², Luo Jing³, Jiang Kerong¹, Li Shude¹, Chunyu Weixun¹

(1. School of Basic Medicine, Kunming Medical University; 2. Department of Anesthesiology, The Second People's Hospital of Yunnan Province; 3. Department of Anesthesiology, The First People's Hospital of Yunnan Province)

【Abstract】Objective: To investigate the positive effects of ginsenoside Rg1 on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and regulation of the intestinal microbiota. **Methods:** The 24 SD rats were randomly divided into the control group, high-fat and high-sugar (HFHS) group, ginsenoside Rg1 low dose treatment group, and ginsenoside Rg1 high dose treatment group. The NAFLD model rats were fed with HFHS diet. After 4 weeks' treatment of ginsenoside Rg1, the rats were sacrificed under anesthesia. Then, their body weight and liver weight were measured. Meanwhile, the liver weight/body weight ratios were calculated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), glutathione peroxidase (GSH-px), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in peripheral blood serum. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe liver steatosis. Additionally, 16S rRNA gene bioinformatics analysis and statistics were conducted to detect the changes in microbial diversity of rats among the four groups. **Results:** Ginsenoside Rg1 could reduce NAFLD-induced body weight ($P<0.01$) and liver weight ($P<0.05$). The HE staining results showed that ginsenoside Rg1 intervention could effectively reduce liver ste-

作者介绍: 高娴玲, Email: 750989774@qq.com,

研究方向: 脂肪肝与肠道微生物。

通信作者: 淳于纬训, Email: chunyuweixun@kmmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 31800002)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20230428.0931.002.html>

(2023-04-28)

atosis in NAFLD rats ($P<0.05$). ELISA test results showed that ginsenoside Rg1 intervention could reduce the expression of serum TG, TC, ALT, AST, LDL-C and MDA in NAFLD rats ($P<0.05$), while HDL-C and GSH-px were significantly increased after ginsenoside Rg1 intervention ($P<0.05$). The α diversity results showed that high dosage ginsenoside Rg1 intervention could increase the community richness and community diversity of the intestinal microbiota in NAFLD rats ($P<0.05$). The β diversity results showed that ginsenoside Rg1 intervention could change the structure of the intestinal microbiota in NAFLD rats ($P<0.01$). The LEfSe (linear discriminant analysis effect size) analysis results showed that after high dose ginsenoside Rg1 intervention, the dominant species of intestinal microorganisms were *Lachnospiraceae*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Anaerobiospirillum* and other intestinal probiotics. **Conclusion:** Ginsenoside Rg1 intervention could alleviate liver fatty lesions and oxidative stress response in NAFLD rats. The pharmacological activity of ginsenoside Rg1 is probably related to the improvement of intestinal microbial structure and diversity, especially increasing the beneficial intestinal microbiota in NAFLD rats.

[Key words] ginsenoside Rg1; non-alcoholic fatty liver disease; high-fat and high-sugar; intestinal microbiota

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种以脂质过度积聚和肝细胞脂肪变性为特征的慢性肝疾病^[1], 常见于肥胖、2 型糖尿病、胰岛素抵抗患者^[2]。大多数 NAFLD 患者无法完全治愈, 脂肪变性可导致脂肪浸润和非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 进而导致肝纤维化和肝硬化, 甚至诱导肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生^[3-4]。NAFLD 作为全球最常见的慢性肝病, 俨然已成为各国的主要公共卫生问题之一^[5], 我国成人 NAFLD 的发病率高达 27.0%^[6]。尽管既往研究表明, NAFLD 的发生与遗传、饮食、炎症刺激等因素有关^[7], 但其发生发展机制尚未完全清楚, 需要进一步研究和探讨。

近年有研究表明, 肠道微生物失衡与 NAFLD 的发生发展密切相关^[8-10]。肠道微生物失衡可诱发肠道发生炎症反应和菌群移位, 导致肝细胞炎性损伤和脂肪变性, 诱导 NAFLD 发生。此外, 还有一项研究指出, 肠道微生物可将肠道中积累的不饱和脂肪酸转化为饱和脂肪酸, 从而激活肝脏中的巨噬细胞迁移诱导出现炎症反应, 进而影响 NAFLD 的发生发展^[11]。由此可见, 寻找一种能有效调节肠道微生物组成的天然药物对临床防治 NAFLD 具有重要意义。

三七是一种传统中药, 常用于心血管疾病的防治^[12-13]。目前从三七中共分离到 200 多种单体化合物, 绝大部分是甾体皂苷, 人参皂苷 Rg1 是最有效的活性成分^[14]。目前已有大量研究表明, 人参皂苷 Rg1 具有抗炎、抗氧化应激、抗糖尿病、抗衰老、抗肿瘤以及神经保护等多种生物活性和药理活性作用^[15-20]。与此同时, 还有研究表明, 人参皂苷 Rg1 可通过减轻肝脂质过氧化、内质网应激和炎症小体活化而改善 NAFLD 的进展^[21]。此外, 也有研究报道, 人参皂苷 Rg1 还具有调节溃疡性结肠炎患者肠道微生物组成进而改善肠道症状的作用^[22]。然而,

人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠肠道微生物变化的调节作用尚未阐明。因此, 本研究拟借助 NAFLD 大鼠模型, 给予人参皂苷 Rg1 灌胃干预治疗后, 研究和探讨人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠肝脏脂肪变性以及对肠道微生物组成和结构的影响, 以期阐明人参皂苷 Rg1 治疗 NAFLD 的机制提供一定的理论依据和基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级成年雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 购于昆明医科大学实验动物学部, 动物质量合格证书编号为 SCXK(滇)K2015-005。所有动物护理和处理均符合《实验动物护理和使用指南》, 实验方案经昆明医科大学动物护理和使用委员会审查和批准 (参考 KMMU 2015002)。实验用 SD 大鼠饲养于室温 (22 ± 2) °C、湿度 40%~60%、12 h 明/暗交替、可自由进食进水的动物房。

1.1.2 动物分组 健康雄性 SD 大鼠 24 只, 随机分为对照 (normal control, NC) 组、高糖高脂 (high-fat and high-sugar, HFHS) 组、人参皂苷 Rg1 低剂量治疗组 (GRL 组)、人参皂苷 Rg1 高剂量治疗组 (GRH 组), 每组 6 只。实验分组和处理见表 1。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 Rg1 (分子量 801.01, 纯度 98%) 由昆明医科大学药学院提供。标准饲料、HFHS 饲料由昆明医科大学实验动物学部提供 (云南昆明); 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所 (江苏南京); E.Z.N.A.® DNA 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 乙醇购自广州金华大化学试剂有限公司; 二甲苯、中性术胶购自四川西陇化工有限公司。

1.3 仪器

显微镜 (日本 Olympus BX53), 石蜡包埋机、石蜡切片机 (德国 Leica 公司), -20 °C 冰箱 (海尔集团)、多功能酶标仪

表 1 动物分组和处理

组别	处理	检测指标	数量
NC 组	适应性喂养 1 周+正常饮食 12 周+4 周生理盐水灌胃对照	肝重/体质量	$n=6$
		ELISA	$n=6$
		HE 染色	$n=6$
		16S RNA 测序	$n=6$
HFHS 组	适应性喂养 1 周+高脂高糖饮食喂养 12 周+4 周生理盐水灌胃对照	肝重/体质量	$n=6$
		ELISA	$n=6$
		HE 染色	$n=6$
		16S RNA 测序	$n=6$
GRL 组	适应性喂养 1 周+高脂高糖饮食 12 周+人参皂苷 Rg1 低剂量灌胃治疗 4 周[25 mg/(kg·d)] ^[23]	肝重/体质量	$n=6$
		ELISA	$n=6$
		HE 染色	$n=6$
		16S RNA 测序	$n=6$
GRH 组	适应性喂养 1 周+高脂高糖饮食 12 周+人参皂苷 Rg1 高剂量灌胃治疗 4 周[100 mg/(kg·d)] ^[23]	肝重/体质量	$n=6$
		ELISA	$n=6$
		HE 染色	$n=6$
		16S RNA 测序	$n=6$

(北京龙跃生物科技发展有限公司)、动物质量称量电子称(奥豪斯仪器上海有限公司)、离心机(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 模型建立及分组给药 24 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,选取 18 只采用 HFHS 饮食(47% 基础日粮、30% 蔗糖、15% 猪油、5% 蛋白粉、2% 胆固醇、1% 胆酸钠)喂养 12 周以建立 NAFLD 模型。然后,将大鼠随机分为 HFHS 组、GRL 组[25 mg/(kg·d)]和 GRH 组[100 mg/(kg·d)],将剩余的 6 只大鼠每天给予灌胃等体积生理盐水作为 NC 组。不同分组给予不同治疗方式继续喂养 4 周。

1.4.2 大鼠体质量和肝重测定 在实验期结束时,通过腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉下处死大鼠。准确称量体质量和肝重并计算肝重/体质量的比值。

1.4.3 ELISA 测定生化指标 眼眶采血获取各实验组大鼠的外周静脉血,4℃、3 000g、15 min 离心取上清。根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。

1.4.4 HE 组织病理染色 获取各实验组大鼠肝脏后,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,切片,脱水。按照 HE 染色试剂盒说明书进行 HE 染色,以评估各组肝脏病变情况。

1.4.5 肠道微生物 16S rRNA 基因高通量测序和生物信息学分析 首先,使用 E.Z.N.A.® DNA 试剂盒提取各实验组大鼠粪便中的微生物 DNA。根据 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区序列 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')、806R(5'

-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对基因组 DNA 进行 PCR 扩增。基于 Illumina MiSeq PE 300 测序平台,对肠道菌进行 16S rRNA 基因测序(测序委托上海美吉生物公司完成)。测序完成后,使用 FLASH 软件对原始数据进行过滤、拼接、去除嵌合体序列后得到最优序列,采用 USEARCH(7.1 版)软件进行运算分类单位(operational taxonomic units, OUT)聚类分析和物种分类注释。最后,通过 RDP 分类器算法对每个 OTU 代表性序列进行分类用于后续数据分析。

1.4.6 肠道微生物测序结果生物信息学分析 基于 Sobs、Shannon、Ace 及 Chao1 指数等指标以及各组 OTU 韦恩图来评估菌群的 α 多样性。采用主坐标分析(principal co-ordinate analysis, PCoA)和最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)对菌群的 β 多样性进行分析与评估。为进一步挖掘各实验组间差异显著的菌群,采用线性判别效应分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)来评估差异物种的影响大小。设置 LDA score 筛选值为 3.5。

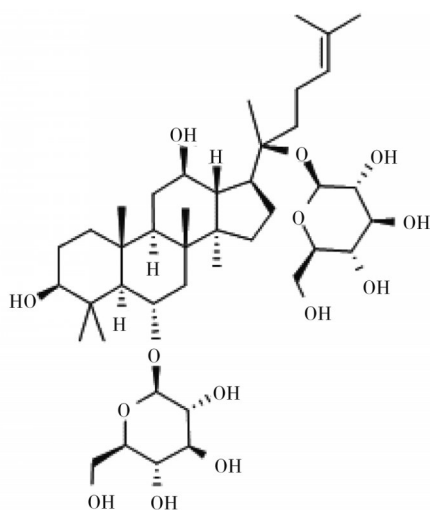
1.5 统计学处理

所有实验数据分析均采用 SPSS 24.0 软件进行。计量资料服从正态分布用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较用单因素方差分析,有差异用 q 检验进一步两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

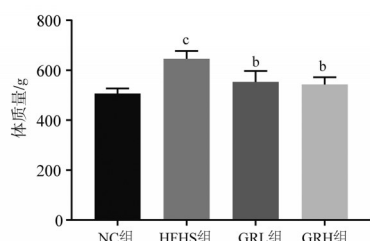
2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1 治疗可减轻 NAFLD 大鼠体质量及肝重

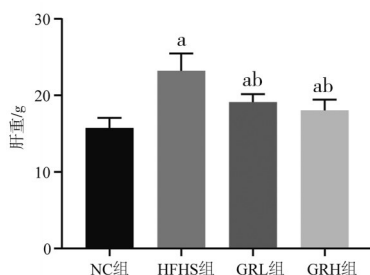
人参皂苷 Rg1 的分子结构如图 1A 所示。和 NC 组相比, HFHS 喂养大鼠后,大鼠的体质量和肝重均显著增加($P<0.01$),人参皂苷 Rg1 干预治疗后,NAFLD 大鼠的体质量和肝重均显著降低($P<0.05$)(图 1B、C);与 NC 组相比, HFHS 组肝重/体质量显著升高($P<0.05$),经高剂量人参皂苷 Rg1 干预治疗后,肝重/体质量显著降低($P<0.05$)(图 1D)。



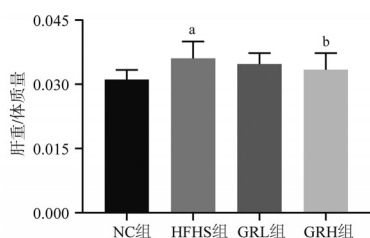
A. 人参皂苷 Rg1 的结构式



B. 各组大鼠体质量结果



C. 各组大鼠肝重结果



D. 各组大鼠为肝重/体质量的比值

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与HFHS组相比较, $P<0.05$;c:与对照组比较, $P<0.01$

图1 人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠体质量及肝重的影响

2.2 人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠肝脏脂肪变、血脂参数及氧化应激的影响

HE 染色结果显示:与 NC 组比较, HFHS 组大鼠的肝细胞排列不规则, 细胞水肿或坏死, 脂肪泡增多并有炎性细胞

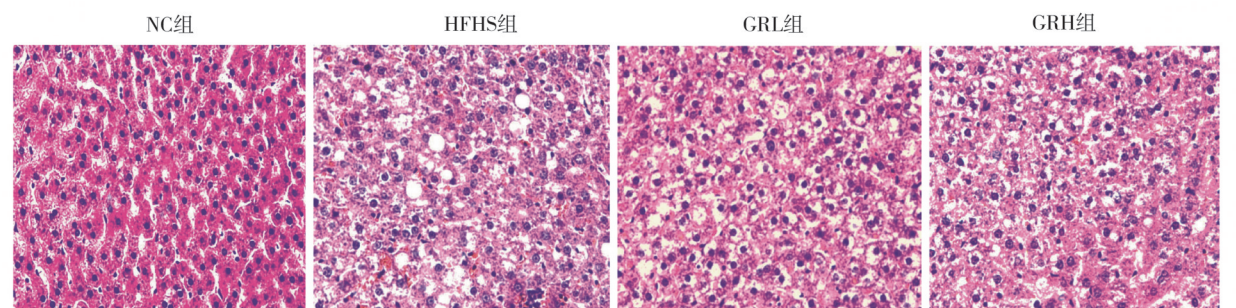
浸润; 给予人参皂苷 Rg1 干预治疗后, 大鼠的肝脏脂肪变性程度可减轻(图 2A)。ELISA 结果显示: 与 NC 组相比, HFHS 组 TC、TG、LDL-C、AST、ALT 水平明显升高, HDL-C 水平降低($P<0.05$); 给予高剂量人参皂苷 Rg1 干预后, 恢复正常($P<0.05$)(图 2B~G)。此外, 与 NC 组比较, HFHS 组 GSH-px 和 SOD 显著降低, MDA 显著升高($P<0.05$); 经人参皂苷 Rg1 干预后, GSH-px、SOD、MDA 等氧化应激指标均不同程度改善($P<0.05$)(图 2H~J)。

2.3 人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠肠道菌群的影响

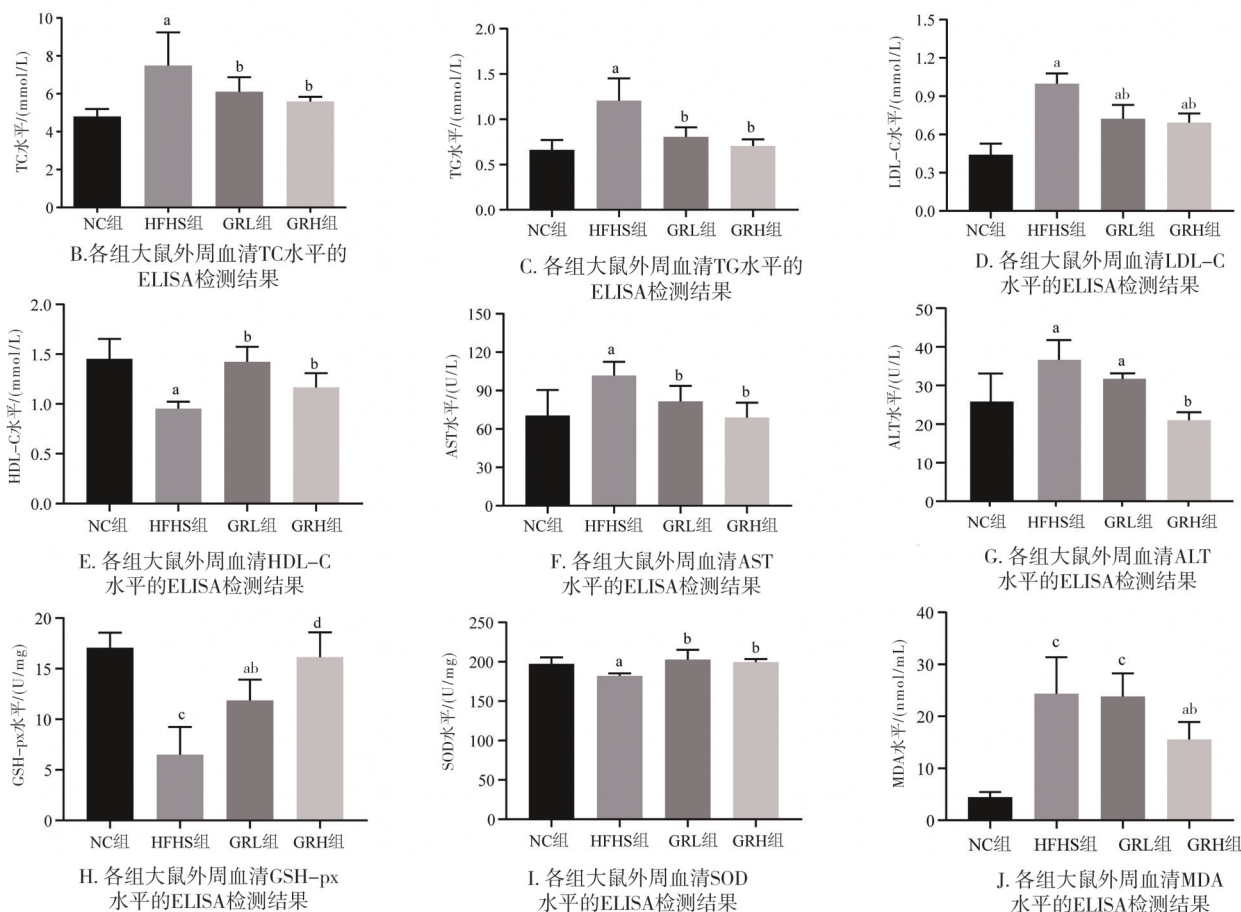
肠道微生物 α 多样性分析结果显示: 与 NC 组相比较, HFHS 组大鼠细菌群落的 Sobs、Ace 和 Chao1 丰富度指数显著降低($P<0.01$); 人参皂苷 Rg1 干预治疗后, 其肠道微生物群的 Sobs、Ace 和 Chao1 指数增加, 尤其是 GRH 组, 物种丰富度和多样性均显著增加($P<0.05$)(图 3A~D)。维恩图结果显示: NC 组、HFHS 组、GRL 组和 GRH 组的 OTU 数目分别为 790、669、748 和 777, 结果进一步表明 HFHS 组大鼠肠道微生物 α 多样性降低。给予人参皂苷 Rg1 干预治疗后, NAFLD 大鼠肠道微生物 α 多样性增加(图 3E)。肠道菌群结构 β 多样性分析结果显示: 与 NC 组比较, 人参皂苷 Rg1 组、HFHS 组的肠道微生物群落组成结构差异显著(ANOSIM, $R=0.6205$, $P=0.001$)。PCoA 分析结果显示: 与 HFHS 组相比, 人参皂苷 Rg1 干预治疗后, NAFLD 大鼠肠道菌群结构发生了显著改变(图 3F); PLS-DA 分析结果也证实了人参皂苷 Rg1 干预治疗后, NAFLD 大鼠肠道微生物组成结构发生了显著改变(图 3G)。基于 PCoA 的分析结果和 PLS-DA 的分析结果, 揭示了人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠肠道菌群失调有明显改善作用。

肠道菌群物种组成分析显示: 在门水平, 各实验组间肠道菌群组成成分存在一定的差异(图 3H), 门水平主要包括 Firmicutes(厚壁菌门)、Bacteroidota(拟杆菌门)、Campilobacterota(弯曲杆菌门)、Actinobacteriota(放线菌门)、Proteobacteria(变形菌门)、Desulfobacterota(脱硫杆菌门)、Patescibacteria(巴氏杆菌门)和 Spirochaeta 8 个菌门。其中, 厚壁菌门、拟杆菌门在所有组中均为占比最高的门。与 NC 组相比较, HFHS 模型组中的厚壁菌门相对丰度升高, 而拟杆菌门的相对丰度降低($P<0.05$)(图 3J~K)。相应的, HFHS 模型组中厚壁菌门与拟杆菌门的比例均升高($P<0.05$)(图 3L); 在属水平上, 相对丰度 $>1\%$ 的属有 34 个。其中, 丰度前 10 的属分别是 *Lactobacillus*(乳酸杆菌属)、*Muribaculaceae*、*Prevotellaceae*(普雷沃氏菌属)、*Romboutsia*(罗姆布茨菌属)、*Lachnospiraceae*(毛螺菌属)、*Clostridium_sensu_stricto1*(狭义梭菌属 1)、*Helicobacter*(螺杆菌属)、*Turicibacte*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Alloprevotella*(拟普雷沃氏菌属)(图 3I)。

基于属水平的测序结果, 进一步寻找和挖掘在人参皂苷 Rg1 治疗 NAFLD 大鼠中起作用的菌属。采用 LEfSe 统计并分析出 NC 组、HFHS 组、GRL 组和 GRH 组中有显著作用微生物



A. 各组大鼠肝脏HE染色结果

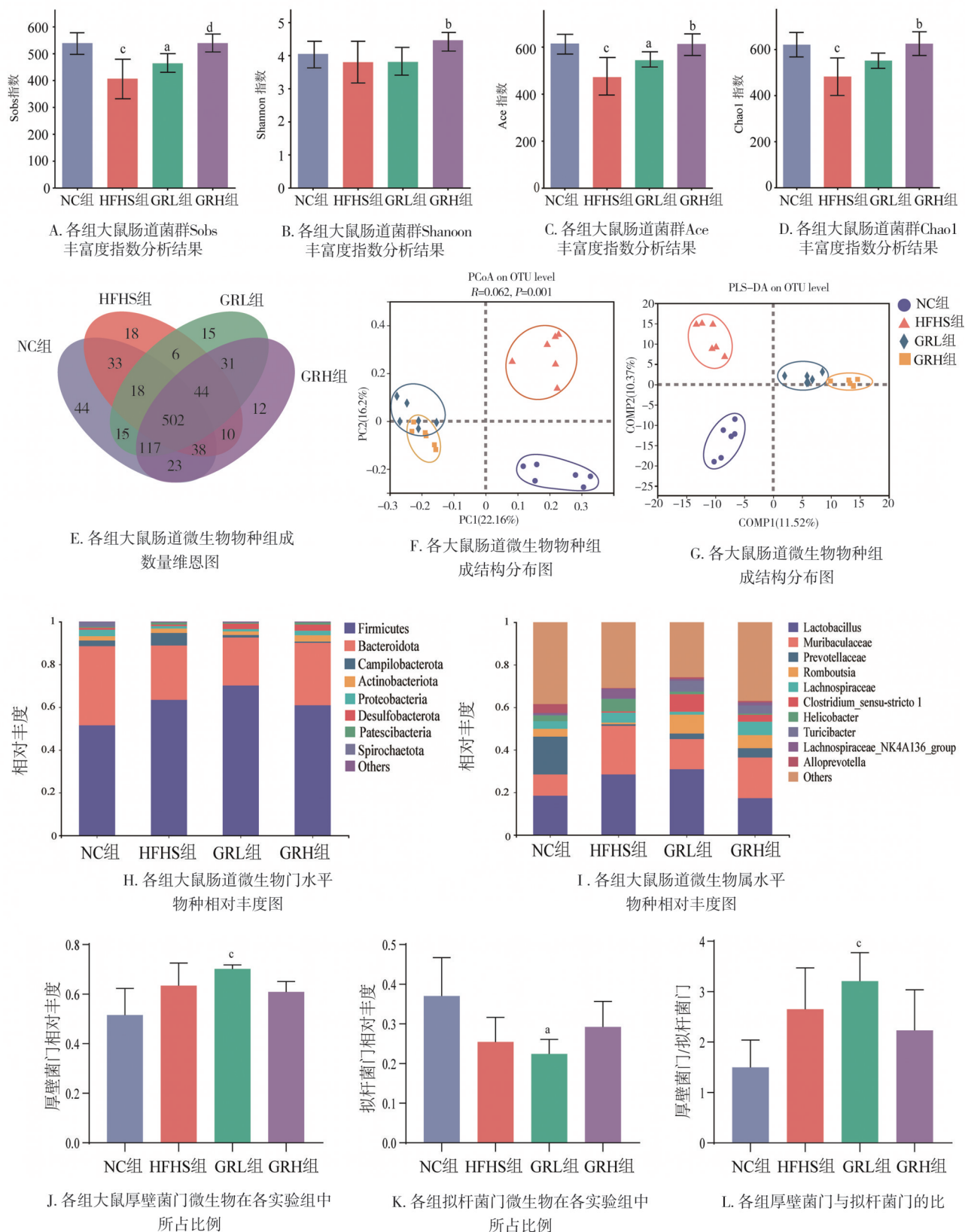


注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与HFHS组相比较, $P<0.05$;c:与对照组比较, $P<0.01$;d:与HFHS组相比较, $P<0.01$

图2 人参皂苷Rg1对NAFLD大鼠肝脏脂肪变性、血脂参数的影响

物类群。与此同时,对LDA分值大于3.5的物种绘制LDA值分布柱状图(图4),柱状图的长度代表显著差异物种的影响大小。结果显示:在NC组中,*Unclassified_f_Prevotellaceae*、*Alloprevotella*(拟普氏菌属)、*Treponema*(密螺旋体菌属)、*Anaerostipes*(粪厌氧棒杆菌属)、*Prevotella*(普氏菌属)、*Prevotellaceae_UCG-001*、*Corynebacterium*(棒状杆菌属)、*Nosocomiicoccus*、*norank_f_Desulfovibrionaceae*、*Ruminococcus*(瘤胃球菌属)为优势属;在HFHS组中,*norank_f_Muribaculaceae*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*UCG-005*、*Allobaculum*、*Phascolarctobacterium*、*unclassified_f_Ruminococcaceae*、*Escherichia-shigella*(志贺菌属)、*norank_f_Lachnospiraceae*、*Blautia*(布劳特氏菌)为优势属;*Clostridium_sensu_stricto1*(狭义梭菌属1)、*Romboutsia*(罗姆布茨菌属)、*Turicibacter*、*Prevotellaceae_Ga6A1_group*、*Desulfovibrio*(脱硫弧菌)、*Monoglobus*是GRL组的优势属;*unclassified_f_Lachnospiraceae*、*Quinella*、*Bifidobacterium*(双歧杆菌属)、*Bacteroides*(拟杆菌属)、*Anaerobiospirillum*(厌氧螺旋菌属)和*Colidextribacter*属是GRH组的优势菌群。

物类群。与此同时,对LDA分值大于3.5的物种绘制LDA值分布柱状图(图4),柱状图的长度代表显著差异物种的影响大小。结果显示:在NC组中,*Unclassified_f_Prevotellaceae*、*Alloprevotella*(拟普氏菌属)、*Treponema*(密螺旋体菌属)、*Anaerostipes*(粪厌氧棒杆菌属)、*Prevotella*(普氏菌属)、*Prevotellaceae_UCG-001*、*Corynebacterium*(棒状杆菌属)、*Nosocomiicoccus*、*norank_f_Desulfovibrionaceae*、*Ruminococcus*(瘤胃球菌属)为优势属;在HFHS组中,*norank_f_Muribaculaceae*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*UCG-005*、*Allobaculum*、*Phascolarctobacterium*、*unclassified_f_Ruminococcaceae*、*Escherichia-shigella*(志贺菌属)、*norank_f_Lachnospiraceae*、*Blautia*(布劳特氏菌)为优势属;*Clostridium_sensu_stricto1*(狭义梭菌属1)、*Romboutsia*(罗姆布茨菌属)、*Turicibacter*、*Prevotellaceae_Ga6A1_group*、*Desulfovibrio*(脱硫弧菌)、*Monoglobus*是GRL组的优势属;*unclassified_f_Lachnospiraceae*、*Quinella*、*Bifidobacterium*(双歧杆菌属)、*Bacteroides*(拟杆菌属)、*Anaerobiospirillum*(厌氧螺旋菌属)和*Colidextribacter*属是GRH组的优势菌群。



注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与HFHS组相比较, $P<0.05$;c,与对照组比较, $P<0.01$;d,与HFHS组相比较, $P<0.01$

图3 人参皂苷Rg1对NAFLD大鼠肠道菌群的影响

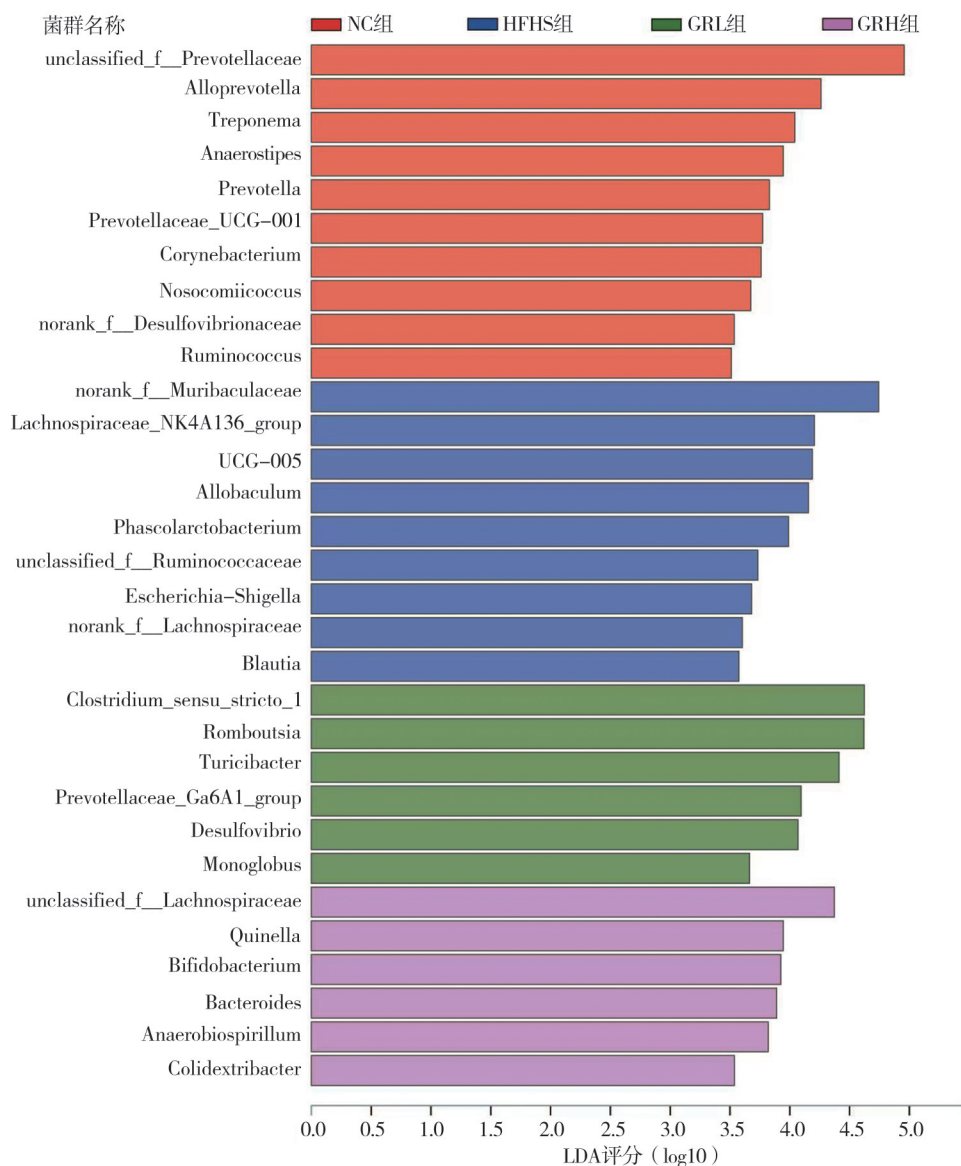


图4 基于LEfSe分析的线性判别(LDA)分数大于3.5的属水平菌群

3 讨论

NAFLD是一种与肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱、肠道菌群紊乱等多种因素相关的慢性肝病^[2,7,9]。随着全球范围内NAFLD的发病率和治疗费用不断增加,NAFLD日趋成为严重的医疗卫生问题^[4-5]。目前,尚未有治疗NAFLD的特效药或者方法批准用于临床。因此,寻找一种能靶向治疗NAFLD的天然药物具有重要研究意义。

人参皂苷Rg1是从三七中分离出来的一种天然活性成分,具有作用靶点多和副作用少的优点^[24]。目前有研究表明,人参皂苷Rg1可通过抑制Toll样受体4信号通路、NF-κB信号通路、炎症小体、AMPK/ERK激活降低肝脏炎性病变,从而起到保护

作用^[24-27]。与此同时,在前期研究中发现人参皂苷Rg1具有改善和调节HFHS诱导的胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱作用^[28-29]。

HFHS饮食在NAFLD的发生发展中起重要作用^[30]。HFHS饮食可造成TG、TC、LDL-C的合成速率超过肝细胞转运和代谢速率,从而导致肝内异位脂肪储存增加,肝脏中的脂肪过量堆积将诱导肝细胞功能障碍,因此导致脂肪酸氧化异常。脂肪酸的异常氧化可导致活性氧形成增加,活性氧的增加不仅能造成细胞膜脂肪酸和磷脂破坏,还能影响胆固醇水平的变化^[31-32]。肝细胞内ALT和AST释放到血液中引起转氨酶升高是肝损伤最显著的特征之一,血清中肝酶的高低可间接反映肝损伤的程度^[33]。SOD和GSH-Px在自由基代谢中具有协同防止氧化

损伤的作用,因此在清除自由基和维持氧化还原状态平衡方面具有重要生理意义^[34-35]。此外,MDA 是多种不饱和脂肪酸过氧化的主要产物,被认为存在潜在致突变和致动脉粥样硬化的作用^[36]。

本研究 NAFLD 模型组中,大鼠的体质量、肝重、肝重/体质量比都显著增加。与此同时,HE 染色结果显示大鼠肝细胞出现更多的水肿、变性、凋亡、坏死以及炎细胞浸润。此外,ELISA 结果显示 NAFLD 大鼠外周血清中 TC、TG、LDL-C、AST、ALT 和 MDA 表达增加。给予 NAFLD 大鼠高剂量人参皂苷 Rg1 治疗后,其体质量和肝重降低、肝脂肪变性减少,同时,TC、TG、LDL-C、AST、ALT 和 MDA 浓度显著降低,HDL-C、GSH-px 和 SOD 浓度升高,揭示人参皂苷 Rg1 可能具有改善 NAFLD 大鼠肝功能和脂质过氧化能力。与此同时,有研究表明,人参皂苷 Rg1 干预治疗可预防 HFHS 饮食诱导的肥胖,抑制 HFHS 饮食诱导的脂肪积累和脂质过氧化^[37]。基于以上,本研究组推测人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠具有抗过氧化应激和脂质过氧化的作用,其发挥药理活性作用的机制尚不清楚,仍需要深入研究和探讨。

天然人参皂苷很难被直接吸收,人参皂苷 Rg1 的口服生物利用度约为 6.1%^[38]。目前,相关研究表明人参皂苷需要通过去糖基化作用转化为二级皂苷后才能被血液吸收利用^[39]。还有研究表明,大多数人参皂苷在胃肠道中的去糖基化作用是通过肠道微生物群的代谢来发挥^[40]。因此,本研究组进一步推测人参皂苷 Rg1 在 NAFLD 中的药理作用可能通过其对肠道微生物的调节而发挥。基于以上推测,作者借助 NAFLD 大鼠模型,给予人参皂苷 Rg1 灌胃治疗 4 周后,对大鼠肠内微生物进行高通量测序,检测 NAFLD 大鼠肠道微生物的变化,以明确人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠肠道微生物群的调节作用。既往研究报道,长期高脂高糖饮食会导致肠道菌群多样性和丰富度下降^[40]。本研究中,菌群 α 多样性结果分析显示,高剂量人参皂苷 Rg1 干预治疗可增加 NAFLD 大鼠的肠道微生物多样性和丰富度。菌群 β 多样性结果分析显示,人参皂苷 Rg1 干预治疗可改善 NAFLD 大鼠肠道微生物中的物种组成结构。结果揭示人参皂苷 Rg1 能改善 NAFLD 大鼠肠道微生物的多样性。此外,肠道菌群物种组成分析结果显示,HFHS 组大鼠厚壁菌门/拟杆菌门的比增高。尽管拟厚壁菌门和杆菌属是宿主肠道微生物群中的优势有益菌,具有降解复杂、不易消化的多糖的作用^[41]。然而,厚壁菌门/拟杆菌门的比增加可导致肠道微生物对未消化碳水化合物的能量收集能力更强,进而产生更多的脂质^[42-43],出现脂质的异常堆积

和氧化,导致肝氧化应激反应和脂肪变性。给予人参皂苷 Rg1 干预治疗后,NAFLD 大鼠肠道微生物中厚壁菌门/拟杆菌门比降低。基于此,本研究组推测人参皂苷 Rg1 改善 NAFLD 大鼠肝脂肪变性的作用可能与其降低厚壁菌门/拟杆菌门比有关。

为进一步寻找并挖掘介导人参皂苷 Rg1 在 NAFLD 大鼠中发挥药理活性的优势物种,基于属水平,对各组大鼠的肠道微生物测序结果进行了 LEfSe 分析。LEfSe 分析结果显示,给予高剂量人参皂苷 Rg1 干预治疗后,毛螺菌属、昆氏菌属、双歧杆菌属、拟杆菌属、厌氧螺旋菌属和大肠杆菌属表现出相对富集。在这些属中,双歧杆菌和拟杆菌具有去糖基化活性^[44]。同时,双歧杆菌的低丰度与肝损伤和炎症有关^[45]。此外,*Lachnospiraceae*、*Quinella* 和 *Bifidobacterium* 有利于肠道微生物代谢物短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA)的产生^[46-47]。目前有研究表明,SCFA 在健康维护和疾病发展中起着至关重要的作用。比如,SCFA 可通过调节脂肪酸合成和氧化之间的平衡而具有抗肥胖作用^[48-49]。这表明高剂量人参皂苷 Rg1 对 NAFLD 大鼠的治疗可能与 SCFA 的产生有关。

综上所述,HFHS 饮食可导致非酒精性脂肪性肝病,而三七中的活性成分人参皂苷 Rg1 可减轻非酒精性脂肪性肝病引起的体质量和肝脏增重、脂肪沉积和氧化应激,并能促进有益肠道微生物增加,进而发挥治疗 NAFLD 的作用。本研究结果为人参皂苷 Rg1 的临床应用提供了一定的理论依据和基础。

参 考 文 献

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American association for the study of liver diseases, American college of gastroenterology, and the American gastroenterological association[J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107: 811-826.
- [2] Tarantino G, Citro V, Capone D. Nonalcoholic fatty liver disease: a challenge from mechanisms to therapy[J]. J Clin Med, 2019, 9(1): 15.
- [3] Mavrogiannaki AN, Migdalis IN. Nonalcoholic fatty liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease: newer data[J]. Int J Endocrinol, 2013, 2013: 450639.
- [4] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(3): 274-285.
- [5] Mogahed EA, Sayed AA, Khalifa SE, et al. Causes of secondary non-alcoholic fatty liver disease in non-obese children below 10 years[J]. Eur J Pediatr, 2020, 179(5): 719-726.
- [6] Fan JG. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1): 11-17.
- [7] Arab JP, Arrese M, Shah VH. Gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease and alcohol-related liver disease: current concepts and perspectives[J]. Hepatol Res, 2020, 50(4): 407-418.
- [8] Boursier J, Mueller O, Barret M, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the meta-

- bolic function of the gut microbiota[J]. *Hepatology*, 2016, 63 (3) : 764–775.
- [9] Leung C, Rivera L, Furness JB, et al. The role of the gut microbiota in NAFLD[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(7) : 412–425.
- [10] Henao-Mejia J, Elinav E, Jin CC, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity[J]. *Nature*, 2012, 482(7384) : 179–185.
- [11] Yamada S, Kamada N, Amiya T, et al. Gut microbiota-mediated generation of saturated fatty acids elicits inflammation in the liver in murine high-fat diet-induced steatohepatitis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2017, 17(1) : 136.
- [12] Xie WJ, Meng XB, Zhai YD, et al. *Panax notoginseng* saponins: a review of its mechanisms of antidepressant or anxiolytic effects and network analysis on phytochemistry and pharmacology[J]. *Molecules*, 2018, 23(4) : 940.
- [13] Bahramsoltani R, Farzaei MH, Farahani MS, et al. Phytochemical constituents as future antidepressants: a comprehensive review[J]. *Rev Neurosci*, 2015, 26(6) : 699–719.
- [14] Jin C, Wang ZZ, Zhou H, et al. Ginsenoside Rg1-induced antidepressant effects involve the protection of astrocyte gap junctions within the prefrontal cortex[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 75: 183–191.
- [15] Fan XM, Zhang C, Niu SW, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates hepatic insulin resistance induced by high-fat and high-sugar by inhibiting inflammation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854: 247–255.
- [16] Sun ZG, Chen LP, Wang FW, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 against hydrogen peroxide-induced injury in human neuroblastoma cells[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(7) : 1159–1164.
- [17] Sun JZ, Zhang LH, Zhang J, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 on splenocytes and thymocytes in an aging rat model induced by D-galactose[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 58: 94–102.
- [18] Yu ML, Yu XB, Guo DH, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates invasion and migration by inhibiting transforming growth factor- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in HepG2 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4) : 3167–3173.
- [19] Fan XM, Tao JY, Zhou YL, et al. Investigations on the effects of ginsenoside-Rg1 on glucose uptake and metabolism in insulin resistant HepG2 cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 843: 277–284.
- [20] Wang L, Zhao H, Zhai ZZ, et al. Protective effect and mechanism of ginsenoside Rg1 in cerebral ischaemia-reperfusion injury in mice[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 99: 876–882.
- [21] Xu YS, Yang C, Zhang SJ, et al. Ginsenoside Rg1 protects against non-alcoholic fatty liver disease by ameliorating lipid peroxidation, endoplasmic reticulum stress, and inflammasome activation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(11) : 1638–1644.
- [22] Cheng H, Liu J, Zhang DD, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates acute ulcerative colitis by modulating gut microbiota and microbial tryptophan metabolism[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 817600.
- [23] Gu DS, Yi HA, Jiang KR, et al. Transcriptome analysis reveals the efficacy of ginsenoside-Rg1 in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Life Sci*, 2021, 267: 118986.
- [24] Gao Y, Li JT, Wang J, et al. Ginsenoside Rg1 prevent and treat inflammatory diseases: a review[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 87: 106805.
- [25] Gao Y, Chu SF, Li JW, et al. Anti-inflammatory function of ginsenoside Rg1 on alcoholic hepatitis through glucocorticoid receptor related nuclear factor-kappa B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173: 231–240.
- [26] Li JP, Gao Y, Chu SF, et al. Nrf2 pathway activation contributes to anti-fibrosis effects of ginsenoside Rg1 in a rat model of alcohol- and CCl₄-induced hepatic fibrosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35 (8) : 1031–1044.
- [27] Ning CQ, Gao XG, Wang CY, et al. Hepatoprotective effect of ginsenoside Rg1 from *Panax ginseng* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury by activating Nrf2 signaling pathway in mice[J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(10) : 1050–1060.
- [28] Yao X, Jiang W, Ma CH, et al. Protective effects of Ginsenoside Rg1 against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of inflammation[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(6) : 583–588.
- [29] Hou YH, Gu DS, Peng JZ, et al. Ginsenoside Rg1 regulates liver lipid factor metabolism in NAFLD model rats[J]. *ACS Omega*, 2020, 5 (19) : 10878–10890.
- [30] Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity[J]. *Gastroenterology*, 1999, 116(6) : 1413–1419.
- [31] Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Lancet*, 2021, 397(10290) : 2212–2224.
- [32] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1) : 1–26.
- [33] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States[J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(5) : 960–967.
- [34] Lv LS, Cheng YH, Zheng TS, et al. Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* thunb[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 99: 765–773.
- [35] Gu XS, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2012, 14: e4.
- [36] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005, 15(4) : 316–328.
- [37] Gao Y, Chu SF, Zhang Z, et al. Hepatoprotective effects of ginsenoside Rg1: a review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 206: 178–183.
- [38] Li XY, Wang GJ, Sun JG, et al. Pharmacokinetic and absolute bioavailability study of total panax notoginsenoside, a typical multiple constituent traditional Chinese medicine (TCM) in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(5) : 847–851.
- [39] Wang Y, Liu TH, Wang W, et al. Research on the transformation of ginsenoside Rg1 by intestinal flora[J]. *China J Chin Mater Med*, 2001, 26(3) : 188–190.
- [40] Merra G, Noce A, Marrone G, et al. Influence of Mediterranean diet on human gut microbiota[J]. *Nutrients*, 2020, 13(1) : 7.
- [41] Canfora EE, Meex RCR, Venema K, et al. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15 (5) : 261–273.
- [42] Kolodziejczyk AA, Zheng DP, Shibolet O, et al. The role of the microbiome in NAFLD and NASH[J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11 (2) : e9302.
- [43] Abdallah Ismail N, Ragab SH, Abd Elbaky A, et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults[J]. *Arch Med Sci*, 2011, 7 (3) : 501–507.
- [44] Yu K, Chen F, Li C. Absorption, disposition, and pharmacokinetics of saponins from Chinese medicinal herbs: what do we know and what do we need to know more?[J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13 (5) : 577–598.
- [45] Fang DQ, Shi D, Lv LX, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* LI09 and *Bifidobacterium catenulatum* LI10 attenuate D-galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota[J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) : 8770.
- [46] Yu GH, Ji XG, Huang JH, et al. Immunity improvement and gut microbiota remodeling of mice by wheat germ globulin[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(4) : 64.
- [47] Gerritsen J, Hornung B, Renckens B, et al. Genomic and functional analysis of *Romboutsia ilealis* CRIB^T reveals adaptation to the small intestine[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3698.
- [48] Ge HF, Li XF, Weiszmann J, et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(9) : 4519–4526.
- [49] Gao ZG, Yin J, Zhang J, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice[J]. *Diabetes*, 2009, 58(7) : 1509–1517.