

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.06.009

酪酸梭菌对非酒精性脂肪性肝病的疗效及对肠屏障的影响*

颜美珠, 安敏, 倪倩雯, 黄继英, 唐鄂, 沈曼茹, 高振军[△]
复旦大学医学院附属中山医院青浦分院消化科, 上海 201700

摘要:目的 探讨酪酸梭菌对非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 患者肠屏障的作用及其对 NAFLD 的疗效和作用机制。方法 选择在该院消化科就诊的 NAFLD 患者 100 例纳入 NAFLD 组, 另选取 50 例健康体检者纳入对照组, 比较两组的肠屏障功能指标 [血清内毒素、二胺氧化酶 (DAO) 和 D-乳酸]。将 NAFLD 组患者按照随机数字表法又分为 A 组、B 组, 两组均予以常规低脂饮食 + 有氧运动 + 双环醇 1 粒 tid po, A 组在此基础上, 予以酪酸梭菌 2 粒 tid po。将 NAFLD 组根据丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 值分为 ALT 升高组和 ALT 正常组, 比较两组肠屏障功能障碍发生率及炎症反应指标 [白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)] 水平。分别于给药 1 个月后复查患者肠屏障功能、血脂 [三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)]、肝功能、炎症反应指标等, 并对 A 组与 B 组患者以上指标进行比较。结果 NAFLD 组的血清内毒素、DAO、D-乳酸水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ALT 升高组的 TNF- α 、IL-6 水平明显高于 ALT 正常组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。用药后 A 组与 B 组内毒素、D-乳酸、DAO 水平均较用药前下降, A 组下降比 B 组更明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。用药后 A 组与 B 组 IL-6、TNF- α 、TG 水平均较用药前下降, A 组下降比 B 组更明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。A 组的总有效率 (86.0%) 高于 B 组 (70.0%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 NAFLD 患者存在肠屏障损伤, 可能与炎症反应激活有关。联合酪酸梭菌治疗有助于改善 NAFLD 患者的肠屏障功能, 降低血脂水平, 提高疗效。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 酪酸梭菌; 内毒素; 二胺氧化酶; D-乳酸
中图法分类号: R575.5; R574.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2021)06-0751-04

Clinical effect of clostridium butyricum for nonalcoholic fatty liver disease and the effect on intestinal barrier*

YAN Meizhu, AN Min, NI Qianwen, HUANG Jiying, TANG E, SHEN Manru, GAO Zhenjun[△]
Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Qingpu Branch Affiliated to Fudan University
Medical College, Shanghai 201700, China

Abstract: Objective To investigate the clinic effect and mechanism of clostridium butyricum in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its effect on intestinal barrier. **Methods** A total of 100 patients with NAFLD treated in the hospital were recruited into NAFLD group, another 50 healthy people were selected into control group, compared intestinal barrier function indexes [serum endotoxin, double amine oxidase (DAO) and D-lactic acid] in the two groups. NAFLD group were divided into group A and group B according to random number table method, both set to be low fat diet + aerobic exercise + bicyclol 1 grain, tid po, on this basis, group A was given clostridium butyricum 2 grain, tid po. According to alanine aminotransferase (ALT) level, the NAFLD group was divided into ALT elevated group and ALT normal group, and the incidence of intestinal barrier dysfunction and inflammatory response indicators including interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) were compared between the two groups. Intestinal barrier function, blood lipid [triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC)], liver function and inflammatory response indicators were reviewed 1 month after administration respectively, and the above indicators were compared between group A and group B. **Results** The levels of endotoxin, DAO and D-lactic acid in NAFLD group were all higher than those in control group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α and IL-6 in ALT elevated group were significantly higher than those in ALT normal group ($P < 0.05$). After treatment, endotoxin, D-lactic acid and DAO levels

* 基金项目: 上海市青浦区科技发展基金项目 (QKY2019-09); 上海市青浦区卫生健康委员会人才培养项目 (W2019-18)。

作者简介: 颜美珠, 女, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的研究。 [△] 通信作者, E-mail: shouchen11@163.com。

本文引用格式: 颜美珠, 安敏, 倪倩雯, 等. 酪酸梭菌对非酒精性脂肪性肝病的疗效及对肠屏障的影响[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(6):

in both group A and group B decreased compared with those before treatment, and the decrease in group A was more significant than those in group B ($P < 0.05$). After treatment, IL-6, TNF- α and TG levels in both group A and group B decreased compared with those before treatment, and the decrease in group A were more significant than those in group B ($P < 0.05$). The effective rate of treatment in group A (86.0%) was higher than group B (70.0%, $P < 0.05$). **Conclusion** The intestinal barrier function is impaired in the patients with NAFLD, which might related to the activation of inflammatory reaction. Combined with clostridium butyricum treatment is helpful to improve the intestinal barrier function of NAFLD patients, reduce the blood lipid level and improve the curative effect.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease; clostridium butyricum; endotoxin; double amine oxidase; D-lactate

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是最常见的肝病之一,疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化和肝癌。全球成人的发病率达 20%^[1],在我国发达地区发病率在 15%左右。流行病学数据显示,NAFLD 的发病率不断上升,且呈现低龄化的趋势^[2],其中 10%~15%的患者最终发展为肝硬化,甚至肝癌^[3]。因此,有效预防和治疗 NAFLD 越来越受到临床的重视。NAFLD 的发病机制复杂,尚不完全清楚。NAFLD 常伴有肥胖、胰岛素抵抗,但不是所有肥胖人群都有 NAFLD,目前认为肠道因素在 NAFLD 发生、发展中起重要作用^[4]。研究发现,肠屏障功能障碍包括肠黏膜完整性受损、肠黏膜通透性增加、肠道菌群紊乱等,会使内毒素进入门脉系统增加,促进炎症介质释放,导致肝脏的氧化应激和炎症损伤,在 NAFLD 的发病中起重要作用^[5-6]。因此,调节肠道菌群,改善肠屏障功能可作为 NAFLD 的治疗方向,但是目前关于益生菌改善 NAFLD 患者肠屏障功能的临床研究少见,因此,本研究通过比较采用酪酸梭菌治疗前后 NAFLD 患者肝功能、血脂、炎症反应及肠屏障功能指标的变化,评价酪酸梭菌对肠黏膜的保护作用及对 NAFLD 的治疗效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 8—12 月在本院消化科门诊就诊的 NAFLD 患者 100 例纳入 NAFLD 组,其中男 61 例,女 39 例;平均年龄(58.7 ± 13.2)岁。选择同期年龄、性别匹配的健康体检者 50 例纳入对照组,其中男 30 例,女 20 例;平均年龄(55.6 ± 12.8)岁。NAFLD 组纳入标准:(1)诊断符合 2010 年中华医学会修订的《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》中的标准;(2)年龄 ≤ 75 岁;(3)用药前血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)升高,但小于正常值上限 3 倍。排除标准:(1)合并其他肝脏疾病;(2)全身感染或心、脑、肾等重要脏器严重功能不全;(3)其他原因导致的肝硬化;(4)精神疾病;(5)对本研究药物有过敏史;(6)妊娠期、哺乳期女性;(7)病历资料不全;(8)合并其他慢性疾病,需服用其他药物治疗。

1.2 方法

1.2.1 分组给药 将 NAFLD 组患者按照随机数字表法分为 A 组与 B 组,每组 50 例,两组均予以低脂饮食+有氧运动+双环醇 1 粒 tid po(国药准字:H20040467,北京协和药厂)。A 组在此基础上,予以酪酸梭菌 2 粒 tid po(国药准字:S20040054,重庆泰平药业有限公司)。所有患者均连续治疗 1 个月。

1.2.2 检测指标 (1)肠屏障功能指标:对照组于体检当日,NAFLD 患者于药物干预前后检测血清内毒素、二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸水平。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测内毒素,化学比色法检测 DAO、D-乳酸,所有操作严格按照试剂盒说明书进行。(2)生化指标:所有患者药物干预前后均禁食 8 h 后检测空腹血糖(FBG)、血脂[三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)]、肝功能指标(ALT)、炎症反应指标[白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)]。所有操作均采用日立 7600 全自动生化分析仪进行。(3)B 超:由 B 超专科主治医师进行肝胆 B 超检查,采用 PHILIPS EnVisor C 彩色超声仪,探头频率为 3.5 MHz。

1.2.3 疗效评价 显效:患者的临床症状消失,血清肝功能指标降低超过 50%,B 超检查肝脏回声正常,体质量指数(BMI)降低至 25 kg/m² 以下;有效:患者的临床症状有所减轻,血清肝功能指标降低范围为 10%~50%,B 超检查肝脏远场回声增强,近场回声减弱,BMI 有所降低但未达到 25 kg/m² 以下;无效:未达上述标准。总有效率=(显效例数+有效例数)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 观察指标 比较 NAFLD 组与对照组肠屏障功能指标。肠屏障功能指标中出现 1 项及以上异常时则判定为肠屏障功能障碍,将 NAFLD 组根据 ALT 值分为 ALT 升高组和 ALT 正常组,比较两组肠屏障功能障碍发生率及炎症反应指标水平。比较用药前后 A 组与 B 组肠屏障功能指标、血脂、炎症反应指标水平及总有效率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NAFLD 组与对照组肠屏障功能指标比较 NAFLD 组的血清内毒素、DAO、D-乳酸水平分别为(0.86±0.14)U/L、(9.15±1.64)U/L、(25.46±6.78)mg/L,明显高于对照组的(0.43±0.15)U/L、(5.57±1.46)U/L、(13.42±4.18)mg/L,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 ALT 升高组和 ALT 正常组肠屏障功能障碍发生率及炎症反应指标比较 ALT 升高组 71 例,ALT 正常组 29 例,ALT 升高组有 51 例(72%)出现肠屏障功能障碍,ALT 正常组有 5 例(17%)出现肠屏障功能障碍,差异有统计学意义($P<0.05$)。ALT 升高组的 TNF-α 水平为(28.9±8.6)pg/mL,IL-6 水平为(11.48±2.8)pg/mL,明显高于 ALT 正常组的(11.48±2.82)、(7.31±1.77)pg/mL,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 用药前后 A 组与 B 组各项指标比较

2.3.1 用药前后 A 组与 B 组肠屏障功能指标比较 用药前两组的内毒素、D-乳酸、DAO 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。用药后两组内毒素、D-乳酸、DAO 水平均较用药前下降,A 组下降比 B 组更明显,差异统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.3.2 用药前后 A 组与 B 组血脂及炎症反应指标比较 用药前两组血脂及炎症反应指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。用药后 B 组 TG 水平较用药前明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),TC 水平有所下降,但与用药前比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。A 组 TG、TC 水平均较用药前明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);A 组用药后 TG 与 TC 水平比 B 组下降更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。用药后两组 TNF-α、IL-6 水平较用药前均明显下降,A 组下降比 B 组更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 用药前后 A 组与 B 组肠屏障功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	内毒素(U/L)		DAO(U/L)		D-乳酸(mg/L)	
		用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
A 组	50	0.86±0.15	0.64±0.18 [*]	9.18±1.55	5.13±1.27 [*]	26.12±8.30	7.52±2.46 [*]
B 组	50	0.87±0.13	0.76±0.17 ^{*#}	9.11±1.81	6.88±1.68 ^{*#}	24.80±5.21	9.19±1.12 ^{*#}

注:与同组用药前比较,^{*} $P<0.05$;与 A 组用药后比较,[#] $P<0.05$ 。

表 2 用药前后 A 组与 B 组血脂及炎症反应指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TG(mmol/L)		TC (mmol/L)		TNF-α(pg/mL)		IL-6(pg/mL)	
		用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
A 组	50	2.6±0.4	1.5±0.2 [*]	6.1±0.8	5.4±0.6 [*]	25.2±9.4	8.2±1.5 [*]	9.9±3.5	6.5±0.9 [*]
B 组	50	2.4±0.5	1.9±0.6 ^{*#}	6.2±0.9	5.8±0.6 [#]	25.0±8.8	10.9±3.1 ^{*#}	10.1±3.1	7.3±1.0 ^{*#}

注:与同组用药前比较,^{*} $P<0.05$;与 A 组用药后比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3.3 A 组与 B 组疗效比较 经过 1 个月的用药后,A 组的总有效率为 86.0%,B 组为 70.0%,A 组明显高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 A 组与 B 组疗效比较

组别	n	显效(n)	有效(n)	无效(n)	总有效率[n(%)]
A 组	50	21	22	7	43(86.0)
B 组	50	15	20	15	35(70.0) [*]

注:与 A 组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨 论

目前研究认为,肠屏障功能障碍是 NAFLD 常见的表现之一,是 NAFLD 发生、发展的重要因素。肠屏障是由完整的肠上皮细胞和相邻肠上皮细胞间的连接构成,能防止肠腔内的有害物质,如细菌、毒素等穿过肠黏膜进入体内,肠上皮细胞间的紧密连接是保持肠屏障功能的基础^[7]。动物实验发现,脂肪肝小鼠的肠黏膜连接蛋白 Occludin、Claudin-1、ZO-

1mRNA 表达下降^[8-10],肠黏膜通透性增加,大量内毒素通过肠-肝轴进入体循环,从而诱导释放 TNF-α 等炎症介质,引发炎症瀑布反应,促进 NAFLD 的发生、发展。目前,临床上通过检测某些物质的肠黏膜通透性来间接反映肠屏障功能,其中血清 D-乳酸、DAO 和内毒素水平是应用较多的血液学指标,通过这些指标可以间接反映肠黏膜完整性,有助于发现肠黏膜的早期损伤^[11]。本研究对 100 例 NAFLD 患者和 50 例健康体检者进行肠屏障功能指标检测,结果表明 NAFLD 组血清 D-乳酸、DAO、内毒素水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 NAFLD 患者存在肠屏障功能受损,肠黏膜通透性明显增加,证实肠屏障功能障碍是 NAFLD 的致病机制之一。进一步对数据进行分析发现,存在 ALT 水平升高的患者更容易出现肠屏障功能障碍,提示肠屏障受损随肝脏病变程度增加而加重,内毒素、DAO 等肠

屏障功能指标可作为临床评估肝脏病变严重程度的监测指标。由此推测,出现肝功能损伤的 NAFLD 患者炎症因子分泌增加,影响胆汁正常分泌,从而导致肠道内环境改变,诱发肠道菌群改变,加重肠屏障功能受损,而大量内毒素等有害物质通过肠上皮屏障进入肝脏,肝细胞损伤进一步加重。

有基础研究显示,补充肠道益生菌可以通过改善高脂饮食小鼠的肠道菌群,有效修复肠屏障功能,改善肝功能^[12-13]。既往的研究也发现,酪酸梭菌可抑制肠道的高敏感性,降低肠黏膜通透性,恢复肠屏障功能^[14]。本研究结果显示,A 组和 B 组给药 1 个月后内毒素、DAO、D-乳酸水平均下降,且 A 组与 B 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),证实酪酸梭菌有助于修复肠屏障功能,减少内毒素等入血,从而减少炎症反应指标激活,改善肝功能。本研究结果显示,用药后 A 组与 B 组的炎症反应指标 TNF- α 、IL-6 水平均较用药前下降,A 组比 B 组下降更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示采用酪酸梭菌治疗可降低炎症因子水平,抑制炎症反应,维持肠道黏膜的稳定性,改善肝脏炎症反应,其调控炎症因子的机制还需进一步研究探讨。A 组用药后复查 TG、TC 水平分别为 (1.5 ± 0.2) 、 (5.4 ± 0.6) mmol/L,低于 B 组的 (1.9 ± 0.6) 、 (5.8 ± 0.6) mmol/L,考虑酪酸梭菌有助于血脂代谢,既往也有研究证实益生菌有助于降低 TC 和 TG 水平^[15],与本文研究结果一致。本研究还发现,A 组的总有效率为 86.0%,B 组的总有效率为 70.0%,说明酪酸梭菌联合常规治疗的效果更佳。

本研究结果提示,常规治疗联合酪酸梭菌口服对 NAFLD 的治疗效果更佳,通过调节肠道菌群改善肠道微生态,改善肠屏障功能,从而减轻体内炎症反应,改善肝功能。而且酪酸梭菌不需要冷藏,常温保存即可,所有入组患者均无明显不良反应,值得临床进一步应用。

综上所述,肠屏障受损是 NAFLD 的发病机制之一,且肝脏病变程度与肠屏障功能障碍有关。联合酪酸梭菌治疗 NAFLD 的效果优于传统保肝治疗,其机制主要与修复肠黏膜,减少炎症因子等有关。肠屏障功能指标可作为 NAFLD 的临床监测、随访指标。

参考文献

- [1] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] PIMPIN L, CORTEZ-PINTO H, FRANCESCO N, et al. Burden of liver disease in Europe: epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(3): 718-735.
- [3] AMEDEO L, NASCIMBENI F, MAURO M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: evolving paradigms[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(36): 6571-6592.
- [4] LAMBERT J E, PARNELL J A, EKSTEEN B, et al. Gut microbiota manipulation with prebiotics in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15: 169-172.
- [5] FENYUAN L, KANGMIN D, CUILING W, et al. Probiotics and alcoholic liver disease: treatment potential mechanisms[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 20(4): 549-552.
- [6] TEMPLE J L, CORDERO P, LI J, et al. A guide to non-alcoholic fatty liver disease in childhood and adolescence[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 947-953.
- [7] ANNAHAZI A, FERRIER L, BEZIRARD V, et al. Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(8): 1322-1331.
- [8] WANG J H, BOSE S, KIM G C, et al. Flos lonicera ameliorates obesity and associated endotoxemia in rats through modulation of gut permeability and intestinal microbiota[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86117.
- [9] YUN L, LIU T Y, CHEN Y, et al. Diammonium glycyrrhizinate protects against nonalcoholic fatty liver disease in mice through modulation of gut microbiota and restoration of intestinal barrier[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 3860-3870.
- [10] RAHMAN K, DESAI C, SMITA S I, et al. Loss of junctional adhesion molecule a promotes severe steatohepatitis in mice on a diet high in saturated fat, fructose, and cholesterol[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(4): 733-746.
- [11] SHARMA D, MALIK A, CLIFFORD S G, et al. Pyrin inflammasome regulates tight junction integrity to restrict colitis and tumorigenesis[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(4): 948-964.
- [12] LI X, HE J T, NING G, et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 45176.
- [13] ROTMAN Y, SANYAL A J. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Gut*, 2017, 66(1): 180-190.
- [14] 颜美珠, 沈曼茹, 崔英, 等. 腹泻型肠易激综合征患者肠屏障功能的治疗研究[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(1): 27-30.
- [15] AN H M, PARK S Y, LEE D K, et al. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats[J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10(12): 116-123.