

张红娜,王静,刘敬博,等.解淀粉芽孢杆菌缓解非酒精性脂肪肝病的作用机制[J].华中农业大学学报,2022,41(1):210-218.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.01.021

解淀粉芽孢杆菌缓解非酒精性脂肪肝病的作用机制

张红娜¹,王静²,刘敬博³,周玉法⁴

1.河北经贸大学生物科学与工程学院,石家庄 050061; 2.华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070;
3.山东农业大学动物科技学院,泰安 271000; 4.山西农业大学动物医学院,太原 030031

摘要 为探讨解淀粉芽孢杆菌缓解非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的作用机制,构建高脂饮食诱导的NAFLD小鼠模型,饲喂低、高剂量(10^6 、 10^8 CFU)解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 予以干预,通过检测血清生化指标和肝脏病理变化评估其益生作用,然后利用基因组学和转录组学分别分析其对肠道微生物菌群结构和肝脏脂质代谢的影响,并采用定量逆转录 PCR(qRT-PCR)检测小鼠肝脏转录组结果的可靠性。血清指标检测结果显示,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 干预显著降低了血清中 ALT、AST、TC 和 TG 水平;肝组织病理学染色发现,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 明显减少了肝细胞的脂质沉积。基因组学分析发现,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 改变了肠道微生物菌群结构,在属水平显著增加了产短链脂肪酸的双歧杆菌相对丰度;肝脏转录组学结果显示,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 主要抑制了脂肪酸和胆固醇合成等脂质代谢过程。qRT-PCR 检测结果验证了转录组学结果的可靠性。综上所述,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 能通过改变肠道微生物菌群结构,增加双歧杆菌相对丰度,调控肝脏脂质代谢来缓解 NAFLD,可以作为预防和治理 NAFLD 的候选益生菌加以开发和利用。

关键词 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238; 非酒精性脂肪肝; 肠道微生物菌群; 转录组学; 脂质代谢; 益生菌

中图分类号 R 575.5; Q 939.124 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)01-0210-09

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确因素导致肝细胞内脂肪过度沉积的病症,是目前全球最常见慢性肝病,患病率高达 15%~40%^[1-2]。有研究表明,肠道菌群可通过“肠道-肠道微生物-肝脏轴”在 NAFLD 等代谢疾病中发挥调节作用^[2-3],而且临床中也发现 NAFLD 患者会出现肠道菌群失调,肠道微生物代谢功能紊乱,致病菌数量明显增多^[4]。利用乳酸菌、双歧杆菌、芽孢杆菌等增加肠道有益菌,会明显改善 NAFLD 引起的肝脏脂质变性和肝脏炎症^[5-6],这说明益生菌调控肠道微生物和肝脏代谢已成为预防和治疗 NAFLD 的一种新方法。

芽孢杆菌常用于动物饲料、人类膳食的益生菌补充剂^[7]。在一定条件下,芽孢杆菌能够形成内生孢子,抵抗胃部强酸性环境和小肠胆盐,到达肠道发挥其益生作用^[8]。临床中 NAFLD 患者口服枯草芽孢杆菌^[9]或凝结芽孢杆菌^[10]后可起到抑制炎症、改

善肠道微生态系统、调节脂质代谢,以及护肝作用。但是关于芽孢杆菌缓解 NAFLD 的作用机制尚未被揭示。

我们先前的研究发现,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 能够改善动物肠道微生物菌群,减少机体发生过敏性炎症,下调与脂肪酸合成相关的关键酶基因表达^[11]。因此,我们推测解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 作为候选益生菌,可能会通过调节脂质代谢和肠道微生物菌群对 NAFLD 起到缓解作用。本研究通过建立高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠模型,采用肠道基因组学和肝脏转录组学技术探讨解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 缓解 NAFLD 的作用机制,以为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、材料与试剂

解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 由山东宝来利来

收稿日期: 2021-08-25

基金项目:国家自然科学基金项目(81903282);河北省自然科学基金项目(C2020207012)

张红娜, E-mail: zhanghongna186982@126.com

生物有限公司提供。48只C57BL/6雄性小鼠(5周龄,体质量18~20g)购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号SCXK(鲁)20190003。2种实验饲料,购自北京科澳协力饲料有限公司。

天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-c)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-c)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。苏木精和伊红染色液,购自碧云天生物技术公司。细胞油红O染色液,购自索莱宝生物科技有限公司。QIAamp DNA Stool Mini试剂盒、RNeasy Mini试剂盒,购自Qiagen公司。TRIzol A+试剂盒、SYBR Green试剂盒,购自天根生化科技有限公司。

1.2 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 的培养

解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 接种到 LB 液体培养基,37℃摇床(150 r/min)培养8~12 h至对数生长期。培养液5 000 r/min离心10 min,弃上清,无菌PBS洗涤3次后用紫外-可见分光光度计于600 nm处测定吸光度。根据解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 的标准生长曲线测定其浓度,然后分别调整至 10^6 CFU/100 μ L和 10^8 CFU/100 μ L用于后续试验。

1.3 试验设计和样品采集

试验小鼠经7 d适应性饲喂后随机分为4组,每组3个重复,每个重复4只。对照组(CON):正常饲料+饮用纯净水;NAFLD模型组:高脂饲料+饮用纯净水;低剂量干预组(BA-L):模型组+每天每只小鼠灌胃 10^6 CFU解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238;高剂量干预组(BA-H):模型组+每天每只小鼠灌胃 10^8 CFU解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238。试验持续16周,每天称小鼠体质量。饲养试验结束后禁食12 h(可自由饮水),麻醉处死小鼠,采集血液、肝脏组织和盲肠内容物。

1.4 血清指标与肝组织病理学检测

每组随机选择6只小鼠(每个重复2只)进行血清和肝组织采样。根据检测试剂盒说明书测定血清

中AST、ALT、TG、TC、LDL-c和HDL-c水平。部分肝脏组织用10%多聚甲醛固定后,经石蜡包埋和切片(5 μ m),进行苏木精和伊红(H&E)染色;另外,对部分肝脏组织经OCT包埋和冷冻器8 μ m切片,进行油红O脂肪染色。染色后镜检分析。

1.5 肠道内容物基因组学分析

从NAFLD模型组和BA-H组分别随机选择6只小鼠(每个重复选择2只),采集盲肠内容物。使用QIAamp DNA Stool Mini试剂盒提取小鼠盲肠内容物的总DNA。PCR扩增16S rRNA的V3-V4高变区,引物和扩增条件参照文献[11]。PCR产物在Illumina HiSeq平台测序,通过UPARSE 7.1对序列进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类分析,用RDP注释,并进行 α 多样性指数分析。

1.6 肝脏组织转录组学分析

从NAFLD模型组和BA-H组分别随机选择3只小鼠(每个重复选择1只),采集肝组织。使用RNeasy Mini试剂盒提取肝脏组织RNA,并用Agilent Bioanalyzer 2100进行质量检测。构建RNA文库,使用Illumina HiSeq平台进行双末端测序。将原始数据进行质控和整理后映射到参考基因组Ensembl GRCm38.91。用StringTie和Ballgown软件计算每个基因的表达量,以Fold change >2和 $P < 0.05$ 为标准筛选差异表达基因,最后对差异基因进行GO富集分析和基因集富集分析(gene-set enrichment analysis, GSEA)。

1.7 定量逆转录 PCR

采用TRIzol法提取肝组织中RNA,使用SYBR Green试剂盒在Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR系统上进行qRT-PCR,检测肝组织中相关基因mRNA表达水平(引物见表1)。每个样品重复3次,以18S rRNA为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法评估相对表达水平。

1.8 统计分析

应用SPSS进行统计分析。采用非配对双尾 t 检验进行差异显著性分析;采用Kruskal-Wallis检验对肠道微生物菌群相对丰度进行LEfSe分析。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

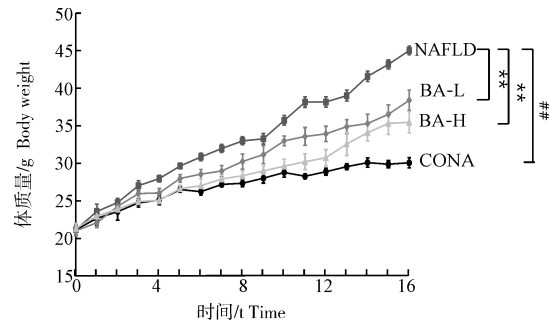
表 1 基因和引物列表
Table 1 Genes and primers used in this study

基因 Genes	登录号 GenBank accession number	大小/bp Size	引物序列 Primer sequence
<i>Cpt1a</i>	NM_013495	133	F:5'-TGGCATCATCACTGGTGTGTT-3' R:5'-GTCTAGGGTCCGATTGATCTTTG-3'
<i>Hadha</i>	NM_178878	177	F:5'-TGCATTTGCCGCAGCTTTAC-3' R:5'-GTTGGCCCAGATTTCGTTCA-3'
<i>Abcd1</i>	NM_007435	182	F:5'-AAATCTACCTCTAGTACGGCAG-3' R:5'-TGTTTCCCGGCACAAGACTC-3'
<i>Acadm</i>	NM_007382	75	F:5'-AACACAACACTCGAAAGCGG-3' R:5'-TTCTGCTGTTCCGTCAACTCA-3'
<i>Pla2g4a</i>	NM_008869	99	F:5'-CAGCACATTATAGTGGAACACCA-3' R:5'-GTCCAGCATATCGCCAAAGGT-3'
<i>Nceh1</i>	NM_178772	193	F:5'-ATGAGGTCGTCATGCGTCCTA-3' R:5'-TGAAATTCAGCGCGATCAGAT-3'
<i>Lipa</i>	NM_001111100	75	F:5'-TGCCCACGGGAAGTGTATC-3' R:5'-ATCCCCAGCGCATGATTATCT-3'
<i>Dagla</i>	NM_198114	91	F:5'-GTCCTGCCAGCTATCTTCCTC-3' R:5'-CGTGTGGGTATAGACCAAGC-3'

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 小鼠体质量的影响

从图 1 可以看出,高脂饮食导致 3 组小鼠的体质量增加幅度均高于对照组,且 NAFLD 组的体质量增加显著高于对照组($P<0.01$);但是,经 BA-L 和 BA-H 干预后的 2 组小鼠体质量显著低于 NAFLD



CON:对照组;NAFLD:高脂诱导的 NAFLD 模型组;BA-L:低剂量解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 干预组;BA-H:高剂量解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 干预组。#代表 NAFLD 组与对照组比较;*代表干预组与 NAFLD 组比较;#/* $P<0.05$,##/* $P<0.01$,###/* $P<0.001$ 。下同。CON:Control group;NAFLD:NAFLD group induced by a high-fat diet;BA-L: Intervention group of low-dose *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238;BA-H: Intervention group of high-dose *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238. # represents comparison between NAFLD group and control group; * represents comparison between intervene groups and NAFLD group; #/* $P<0.05$, ##/* $P<0.01$, ###/* $P<0.001$. The same as below.

图 1 小鼠体质量变化

Fig.1 Mice body weight changes

组($P<0.01$)。此结果说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 减缓了 NAFLD 小鼠体质量的增加。

2.2 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 小鼠肝细胞脂肪变性的影响

经组织病理学分析(图 2)发现,NAFLD 组出现肝脏实质细胞脂肪变性和脂肪蓄积的特征,而 BA-L 和 BA-H 干预组可以减轻这些症状。油红 O 染色和 HE 染色结果显示,与对照组相比,NAFLD 组小鼠肝细胞中脂肪含量显著增加;与 NAFLD 组相比,BA-L 组和 BA-H 组中肝脏细胞脂肪含量显著降低,且呈现剂量依赖趋势。此结果说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 减轻了 NAFLD 小鼠的肝细胞脂肪变性和脂质沉积。

2.3 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 小鼠血脂水平和肝脏损伤的影响

通过血清指标检测,发现解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 可有效降低血脂水平(图 3A-D),缓解肝脏炎症(图 3E 和 F)。与对照组相比,NAFLD 组小鼠血清中 TC、TG、LDL-c 的水平显著增加($P<0.05$);与 NAFLD 组相比,BA-L 和 BA-H 的干预能显著降低血清 TC、TG、LDL-c 水平($P<0.05$)。另外,与对照组相比,NAFLD 组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著上升($P<0.01$);而 BA-L 和 BA-H 干预组显著降低了血清 ALT 和 AST 水平($P<0.05$)。此结果说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 降低了 NAFLD 小鼠的血脂水平和肝脏损伤。

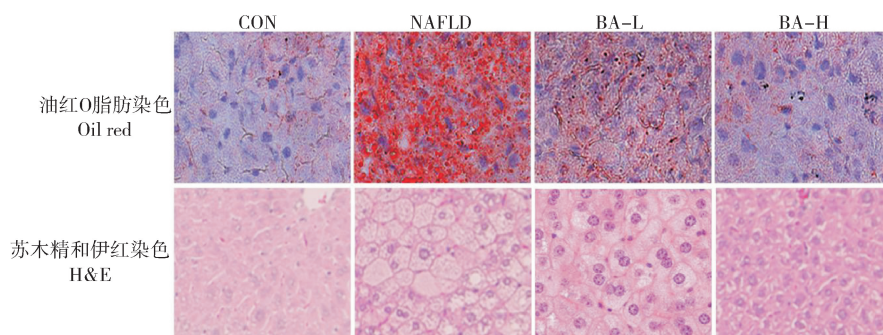


图 2 小鼠肝脏组织病理切片(200×)

Fig.2 The histopathological sections of the mouse liver(200×)

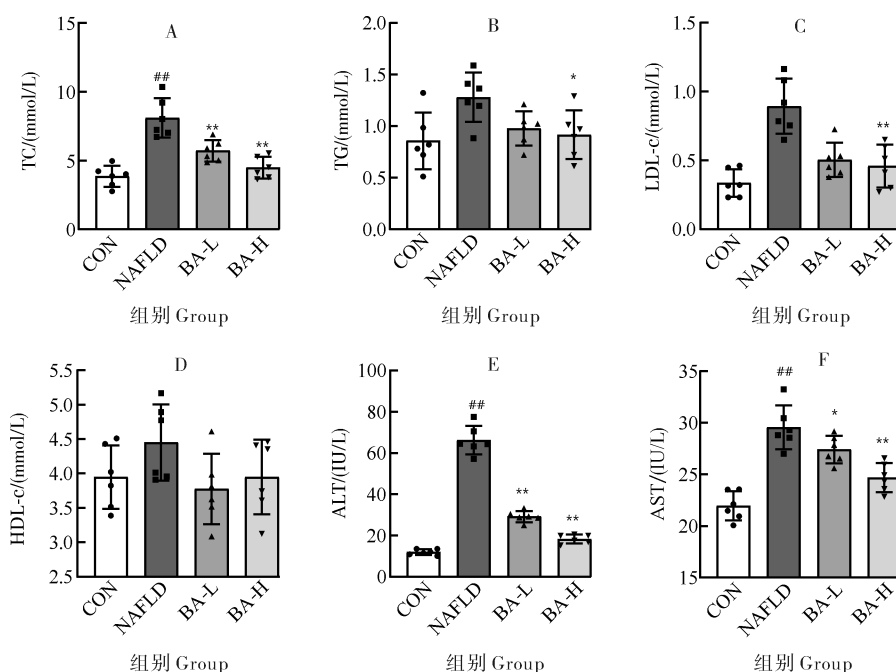


图 3 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 处理下 NAFLD 小鼠血清中脂质含量(A~D)、ALT(E)和 AST(F)水平的变化

Fig.3 Serum level changes of lipid (A-D), ALT (E) and AST (F) in NAFLD mice under *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 treatment

2.4 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 小鼠肠道菌群多样性的影响

基于 16S rRNA 基因测序,评估解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 小鼠肠道微生物菌群多样性的影响。稀释曲线结果(图 4A)显示,每个样本都有足够的测序深度,说明样本多样性的分析指标达到稳定。在 OUT 水平(图 4B 和 C),BA-H 组的 Shannon 指数($P < 0.05$)和 Ace 指数($P < 0.001$)显著低于 NAFLD 组,说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 干预降低了肠道微生物菌群多样性。

2.5 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 小鼠肠道菌群结构的影响

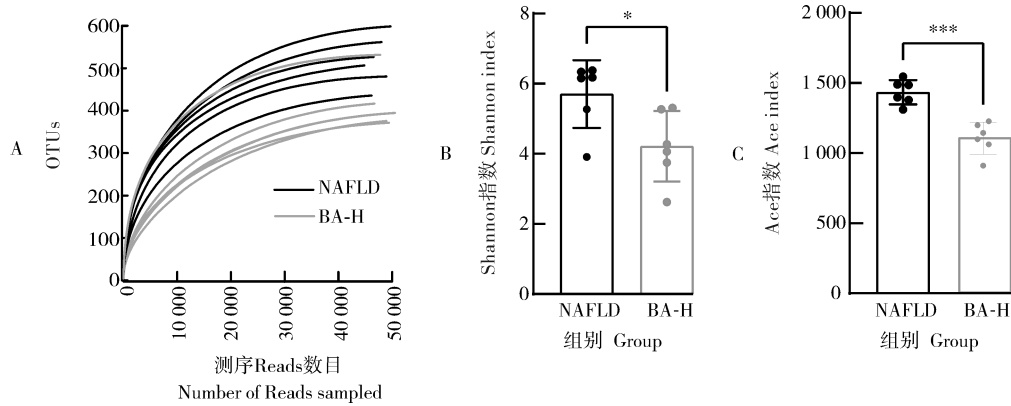
由图 5 可知,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 改变了肠道微生物菌群结构且增加了有益菌相对丰

度。经 PCoA 分析(图 5A),BA-H 组与 NAFLD 组之间在分布上明显分离,说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 干预改变了 NAFLD 小鼠的肠道微生物菌群结构。在门水平(图 5B),与 NAFLD 组相比,BA-H 组增加了放线菌门(Actinobacteria)和变形杆菌门(Proteobacteria)相对丰度,减少了厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度。在属水平(图 5C 和 5D),相较于 NAFLD 组,BA-H 组显著增加了产短链脂肪酸的双歧杆菌(*Bifidobacterium*)相对丰度,且差异极显著($P < 0.001$)。

LEfSe 分析显示(图 6),在属水平上 NAFLD 组的毛螺杆菌属(*Lachnospiraceae* _ NK4A136 _ group)和拟杆菌属(*Bacteroides*)相对丰度较高。相

比之下,BA-H 干预组主要增加了双歧杆菌属、*Curvibacter* 菌属、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)、

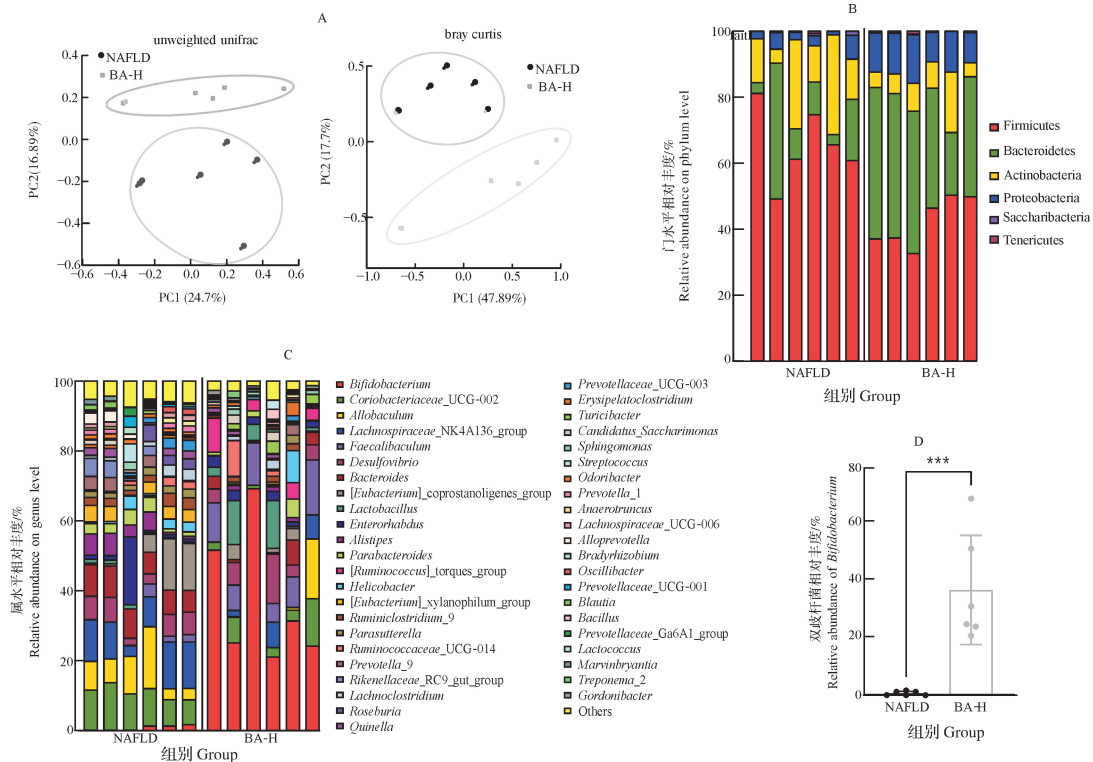
Faecalibaculum 属、*Faecalibacterium* 属的相对丰度,与上述分析结果一致。



A: 稀释曲线 Rarefaction curve; B: Shannon 指数 Shannon index; C: Ace 指数 Ace index.

图 4 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 处理下 NAFLD 小鼠肠道菌群多样性变化

Fig.4 Diversity changes of gut microbiota in NAFLD mice under *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 treatment



A.PCoA 分析 PCoA analysis; B.门水平 Phylum level; C. 属水平 Genus level; D. 双歧杆菌相对丰度 Relative abundance of *Bifidobacterium*.

图 5 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 处理下 NAFLD 小鼠肠道菌群结构的改变

Fig.5 Composition changes of gut microbiota in NAFLD mice under *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 treatment

2.6 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 小鼠肝脏组织转录组的影响

应用转录组学分析小鼠肝脏基因表达谱发现,NAFLD 组与 BA-H 组之间明显分离(图 7A),表明两组的小鼠肝脏基因表达谱相似性非常低。NAFLD 组与 BA-H 组之间共有 730 个差异表达基

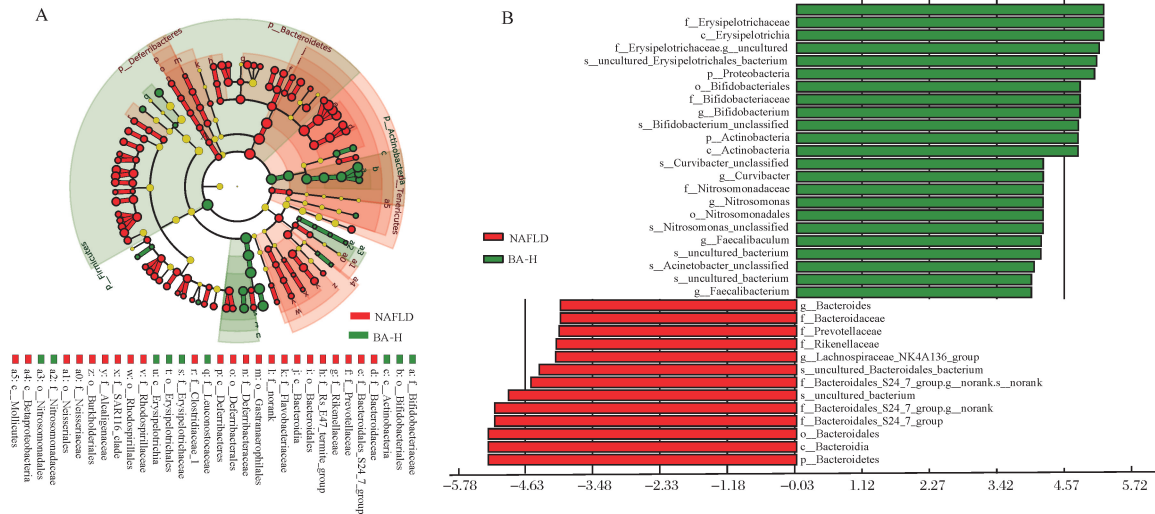
因(图 7B),BA-H 组显著上调 337 个基因,显著下调 393 个基因。

2.7 肝脏组织差异表达基因的功能富集分析

将差异表达基因进行 GO 功能富集,分析解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 缓解 NAFLD 的潜在作用通路。结果(图 8)发现,BA-H 组下调基因主要富

集在氧化还原过程、脂质代谢过程、凋亡过程、胆固醇代谢过程、甘油三酯代谢过程、糖皮质激素反应、细胞对胰岛素刺激的反应、甾醇生物合成、类固醇生物合成、脂肪细胞分化、脂质存储、白色脂肪细胞分化、脂肪酸生物合成正调控等生物学过程。BA-H 组上调基因主要富集在磷酸化作用、免疫反应、细胞增殖调节、MAPK 级联调控、异型生物物质的代

谢、镉离子响应、toll 样受体信号通路正调控、内皮细胞凋亡过程负调控、粘多糖代谢、 γ -干扰素生物合成等生物学过程。从 GO 分析结果可以看出,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 主要抑制了脂肪酸合成、胆固醇合成等脂质代谢生物过程,从而来缓解高脂饮食导致的体质量增加和肝细胞脂肪变性和脂质沉积。



A: 进化分支图; B: LDA 分布柱状图(LDA 分数绝对值大于 4, LDA 分数越高说明丰度差异越大)。A: Cladogram. B: Histogram of LDA discrimination (The absolute value of LDA score was more than 4. The higher the LDA score, the greater the difference in abundance).

图 6 BA-H 组与 NAFLD 组之间显著差异肠道菌群的 LEfSe 分析

Fig.6 LEfSe analysis of significantly different gut microbiota between BA-H group and NAFLD group

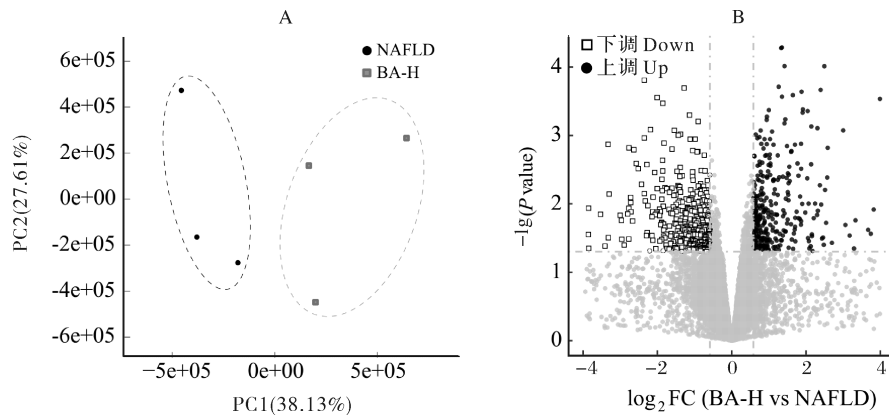


图 7 肝脏组织转录组的 PCoA 分析(A)和差异基因火山图(B)

Fig.7 PCoA analysis of hepatic transcriptome (A) and volcano plot of differentially expressed genes (B)

结合 GO 富集结果和基因表型相关性,进一步对差异基因进行 GSEA,结果(图 9)发现,BA-H 组的大多数差异基因参与脂肪代谢过程的负调控,包括碳水化合物代谢、脂肪酸 β -氧化、脂质分解、脂滴、类固醇代谢和甾醇生物合成过程,这与 GO 富集结果一致。

2.8 qRT-PCR 对肝脏脂质代谢相关基因表达的验证

qRT-PCR 结果(图 10)显示,与 NAFLD 相比,

BA-H 组显著下调了羟辅酶 A 脱氢酶 a(*Hadha*),中链酰基辅酶 A 脱氢酶(*Acadm*)、磷脂酶 A2-IVA(*Pla2g4a*)等与脂肪酸合成和沉积有关基因的 mRNA 表达;显著下调了肉毒碱棕榈酰基转移酶 1a(*Cpt1a*)、ATP-结合盒 D 亚组膜 1(*Abcd1*)等与脂肪酸运输相关基因的 mRNA 表达;显著下调了中性胆固醇酯水解酶 1(*Nceh1*)、溶酶体酸性脂肪酶 A(*Lipa*)、二酰基甘油脂肪酶(*Dagla*)等参与调控胆

固醇合成和甘油三酯合成的 mRNA 表达。qRT-PCR 作用确实与调控脂肪酸、胆固醇、甘油三酯等脂质合
结果说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 缓解 NAFLD 成有关,验证了转录组学分析结果的正确性。

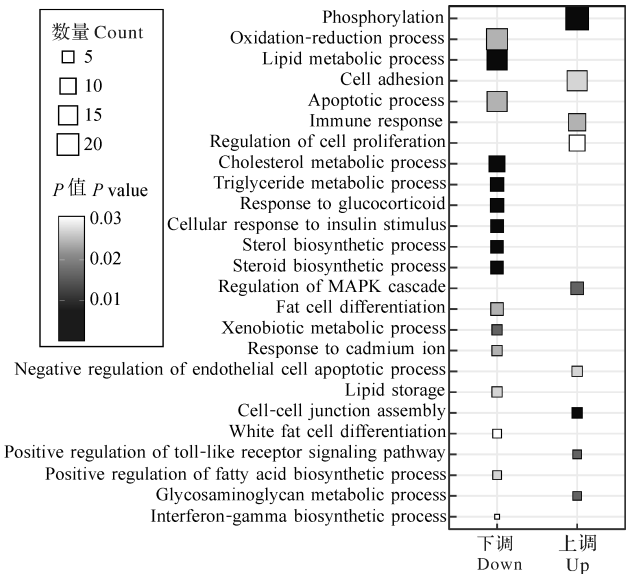


图 8 差异表达基因的 GO 富集分析

Fig.8 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

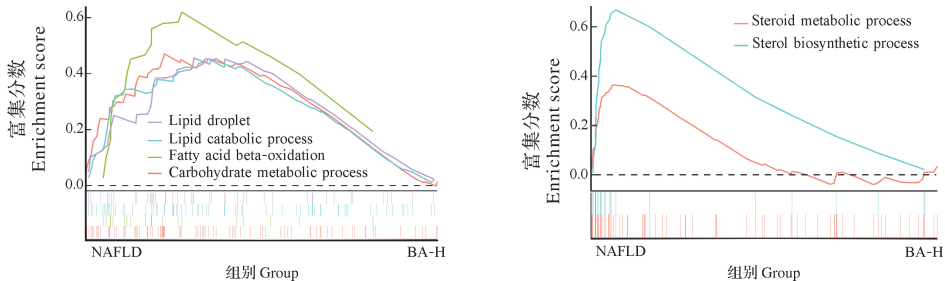


图 9 差异表达基因的 GSEA

Fig.9 GSEA of differentially expressed genes

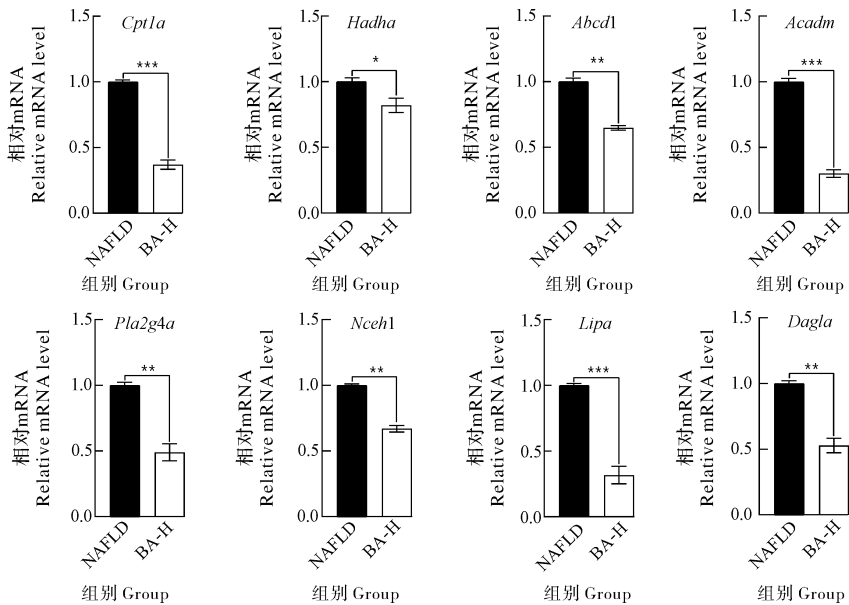


图 10 脂质代谢相关基因 mRNA 表达的 qRT-PCR 验证

Fig.10 qRT-PCR verification of mRNA expression levels of genes related to lipid metabolism

3 讨论

益生菌调节肠道微生物菌群已成为治疗代谢疾病的一种新方法^[12-14]。本研究了解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 干预可有效减缓高脂诱导的 NAFLD 小鼠的体质量增加,减少肝脏细胞脂肪变性和沉积,降低血清中胆固醇水平以及 AST 和 ALT 水平,说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对 NAFLD 具有明显的缓解作用。这与 Shobharani 等^[15]饲喂弯曲芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌后降低了大鼠血清胆固醇水平的研究结果一致。

双歧杆菌是肠道中主要益生菌,可产生短链脂肪酸(在脂质稳态和减少炎症中发挥重要作用),对代谢类疾病有缓解作用。临床中口服双歧杆菌可降低 NAFLD 患者的肝脏脂肪沉积、转氨酶活性以及炎症指标水平^[16]。在本研究中,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 改变了 NAFLD 小鼠肠道微生物菌群的多样性,显著增加了肠道中双歧杆菌的相对丰度,表明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 可通过调节肠道微生物菌群结构,增加有益菌数量,影响机体脂质代谢等过程来缓解 NAFLD。

肝细胞内脂质过度沉积是 NAFLD 发生的重要因素^[17]。本研究肝组织转录组学分析显示,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 抑制了许多 NAFLD 引起的基因表达活性,显著下调了脂质代谢、胆固醇代谢、甘油三酯代谢、甾醇生物合成、类固醇生物合成、脂肪酸生物合成等脂质合成和代谢生物过程,说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 可有效降低 NAFLD 小鼠肝细胞内的脂肪变性和脂质沉积。研究发现,5 种芽孢杆菌混合物能够显著降低高脂饮食导致的小鼠肠道通透性增加,明显逆转肝脂肪变性,保护小鼠免受高脂饮食诱导的肥胖、NAFLD 的影响^[18];鼠李糖乳杆菌 LV108 发酵乳能够通过改变过氧化物酶、乙酰基-CoA 羧化酶复合体等蛋白质表达,来调控胆固醇合成、脂肪酸 β -氧化等代谢过程^[19]。这些研究结果均与本研究一致,再次说明解淀粉芽孢杆菌能够成为候选益生菌,通过调节肠道微生物菌群和脂质代谢平衡来缓解 NAFLD。

综上,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 可以有效减轻高脂饮食诱导 NAFLD 小鼠的体质量增加并降低肝脏和血清中脂质水平。经肠道基因组学和肝脏转录组学分析,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 通过调节肠道微生物菌群结构,增加双歧杆菌相对丰度,以及调控肝脏脂质代谢通路来缓解 NAFLD。我们的研究表明,芽孢杆菌是一种很有前景的益生菌,可

改善高脂饮食导致的 NAFLD。

参考文献 References

- [1] BYRNE C D, TARGHER G. NAFLD: a multisystem disease [J]. *Journal of hepatology*, 2015, 62(Suppl1): S47-S64.
- [2] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nature medicine*, 2018, 24(7): 908-922.
- [3] SUK K T, KIM D J. Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 2019, 13(3): 193-204.
- [4] MIELE L C, VALENZA V, LA TORRE G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2009, 49(6): 1877-1887.
- [5] MYKHAL'CHYSHYN H P, BODNAR P M, KOBYLIAK N M. Effect of probiotics on proinflammatory cytokines level in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Likars'ka sprava*, 2013(2): 56-62.
- [6] AZARANG A, FARSHAD O, OMMATI M M, et al. Protective role of probiotic supplements in hepatic steatosis: a rat model study [J/OL]. *BioMed research international*, 2020, 6: 5487659 [2021-08-25]. <https://doi.org/10.1155/2020/5487659>.
- [7] CUTTING S M. *Bacillus* probiotics [J]. *Food microbiology*, 2011, 28(2): 214-220.
- [8] ELSHAGHABEE F M F, ROKANA N, GULHANE R D, et al. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives [J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8: 1490 [2021-08-25]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>.
- [9] 王薇, 史林平, 石蕾, 等. 肠道益生菌辅助治疗非酒精性脂肪性肝病的临床研究 [J]. *中华内科杂志*, 2018, 8(2): 101-106. WANG W, SHI L P, SHI L, et al. Efficacy of probiotics on the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Chinese journal of internal medicine*, 2018, 8(2): 101-106 (in Chinese with English abstract).
- [10] ABHARI K, DE SAADATI S, YARI Z, et al. The effects of *Bacillus coagulans* supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, placebo-controlled, clinical trial [J]. *Clinical nutrition ESPEN*, 2020, 39: 53-60.
- [11] 张红娜, 周玉法, 崔娜, 等. 基于盲肠菌群和回肠粘膜基因表达探讨解淀粉芽孢杆菌提高蛋鸡生产性能的潜在机制 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2516-2525. ZHANG H N, ZHOU Y F, CUI N, et al. Exploring mechanisms for *Bacillus amyloliquefaciens*-mediated production performance improvement of laying hens based on cecal microflora and ileum mucosal gene expression [J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2516-2525 (in Chinese with English abstract).
- [12] ZHANG X, COKER O O, CHU E S, et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites [J]. *Gut*, 2021, 70(4): 761-774.
- [13] BORDALO TONUCCI L, DOS SANTOS K M O, DE LUCES FORTES FERREIRA C L, et al. Gut microbiota and probiotics: Focus on diabetes mellitus [J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2017, 57(11): 2296-2309.
- [14] LIU X F, CAO S Q, ZHANG X W. Modulation of gut microbi-

- ota-brain axis by probiotics, prebiotics, and diet[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2015, 63(36): 7885-7895.
- [15] SHOBHARANI P, MUTHUKUMAR S P, KIZHAKAYIL D, et al. Strain-specific quantification of native probiotic *Bacillus* spp. and their effect on liver function and gut microflora of experimental rats [J]. Probiotics and antimicrobial proteins, 2019, 11(2): 478-492.
- [16] 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]. Journal of gastrointestinal and liver disease, 2018, 27(1): 41-49.
- [17] BESSONE F, RAZORI M V, ROMA M G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression [J]. Cellular and molecular life sciences, 2019, 76(1): 99-128.
- [18] KIM B, KWON J, KIM M S, et al. Protective effects of *Bacillus* probiotics against high-fat diet-induced metabolic disorders in mice[J/OL]. PLoS One, 2018, 13(12): e0210120[2021-08-25]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210120>.
- [19] 瞿恒贤. 鼠李糖乳杆菌 LV108 发酵乳对非酒精性脂肪肝病保护机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2018. QU H X. Protective mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* LV108 fermented milk on nonalcoholic fatty liver disease[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2018 (in Chinese with English abstract).

Mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* in alleviating non-alcoholic fatty liver disease

ZHANG Hongna¹, WANG Jing², LIU Jingbo³, ZHOU Yufa⁴

1.College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China;

2.College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China;

4.College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, China

Abstract To investigate the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* BLCC1-0238 in alleviating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), a mice NAFLD model induced by a high-fat diet was established, and then low and high dose (10^6 or 10^8 CFU) *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 was used to intervene. The protective effects of *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 on the NAFLD mice were evaluated by examining physiochemical indexes in the serum and histopathological changes in the liver. The effects of *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 on gut microbiota and hepatic lipid metabolism in the NAFLD mice were analyzed by genomics and transcriptomics, respectively. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was applied to verify the reliability of transcriptomics results. The results of physiochemical indexes showed that the levels of TC, TG, ALT, and AST were significantly reduced by *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 intervention and the liver histopathological changes demonstrated that *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 significantly reduced lipid deposition in hepatocytes. The results of genomic analysis showed that *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 altered the microbial community structure in the gut, and significantly increased the relative abundance of *Bifidobacteria*, which produce short chain fatty acids. The liver transcriptomic analysis showed that *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 was mainly involved in negative regulation of lipid metabolism pathways, such as fatty acid and cholesterol syntheses. Additionally, qRT-PCR confirmed the reliability of transcriptomic results. Collectively, *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 can alleviate mice NAFLD by changing the microbial community structure in the gut and regulating hepatic lipid metabolism.

Keywords *Bacillus amyloliquefaciens* BLCC1-0238; non-alcoholic fatty liver; gut microbiota; transcriptomics; lipid metabolism; probiotics

(责任编辑: 边书京)