

网络出版时间:2025-08-15 16:02:58 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250815.1249.009

粪菌移植调节肠源性雌激素及其代谢物组成 与非酒精性脂肪性肝病相关性研究

李婉丽^{1*}, 戚雪平^{2*}, 丛淑琪¹, 张婉婷¹, 张婷婷¹, 汪生³, 方海明⁴, 文继月¹, 王佳佳¹¹ 安徽医科大学基础医学院药理学教研室, ³ 科研实验中心, 合肥 230032;² 南京明基医院药学部, 南京 210019; ⁴ 安徽医科大学第二附属医院消化内科, 合肥 230601)

摘要 目的 研究粪菌移植(FMT)对15种肠源性雌激素及其代谢物(EMs)组成的影响及其与非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的相关性。方法 将30只雄性C57BL/6J小鼠分为正常组(Control)、高糖高脂联合低剂量CCl₄诱导NAFLD模型组(Model)、正常雌鼠粪菌移植造模小鼠组(FMT)。造模17周后,HE染色法观察各组小鼠肝脏病理,生化法检测肝功能包括血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肝组织三酰甘油(TG)、肝组织总胆固醇(TC)水平,超高效液相色谱质谱联用法检测肝门静脉血清15种EMs含量,Pearson法分析疾病表型与肠源性EMs相关性。结果 成功构建NAFLD模型,FMT组肝脏结构形态改善,肝功能、肝脂均较Model组显著下降;NAFLD小鼠肝门静脉血清E1、E2及其2-,4-位代谢物较正常小鼠减少,而大多数16-,17-位代谢物(除16 α -OHE1外)含量则较正常小鼠增多。相关性分析显示,ALT与E3、17-epiE3呈强正相关,与E1、E2、4-MeOE1、16 α -OHE1呈强负相关;TC指标与17-epiE3呈强正相关,与E1、4-MeOE1、16 α -OHE1呈强负相关。结论 FMT通过恢复疾病状态下紊乱的肠源性EMs组成参与改善NAFLD病情。

关键词 非酒精性脂肪性肝病;肠道菌群;粪菌移植;雌激素;代谢组学

中图分类号 R-332;R 322.45;R 575.2;R 977.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1423-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.009

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是全球最常见的慢性肝病之一,女性NAFLD发病率明显低于男性^[1]。临床研究^[2]表明,雌激素信号传导有助于女性预防和限制肝脏代谢和炎症的激增,横断面研究^[3]显示,雌激素羟化代谢物与母体雌激素比率及肠道菌群多样性相关^[3],肠道菌群中某些特定菌属能够显著调节机体雌激素及其代谢物水平及种类^[4]。这些经肠菌代谢产生的肠源性雌激素及其代谢物(estrogen and its metabolites, EMs)可经肝门静脉入肝,其中的活性物质极有可能影响肝病的转归。

粪菌移植术(fecal microbiota transplantation,

FMT)通过改善肠道菌群结构和恢复肠菌稳态,有效减轻NAFLD病情^[5]。然而,该保护作用是否与改善后的肠道菌群的雌激素代谢产物有关尚不清楚。该研究观察了在NAFLD的疾病状态下接受FMT治疗后的肠源性EMs组成的变化规律,通过相关性研究考察FMT对肝脏的保护作用是否与其改善肠源性EMs组成有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验小鼠 30只雄性、10只雌性SPF级8周龄C57BL/6J小鼠,体质量(20 \pm 2)g,购于安徽医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(皖)2017-001,伦理批号:LLSC20242508],所有动物在特定的无病原体条件下饲养,温度控制在(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为(50 \pm 10)% ,光照时间为12 h/d,小鼠自由获取食物和水。

1.1.2 主要试剂 橄榄油、四氯化碳(CCl₄)(上海阿拉丁试剂有限公司,货号:O108686、C639782);氨苄西林、万古霉素、硫酸新霉素、甲硝唑(上海生工生物工程股份有限公司,批号:A100339-0005、A600983、B540727、A429689);丙氨酸氨基转移酶

2025-04-10 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:82370591);安徽省自然科学基金面上项目(编号:2308085MH242);安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划项目(编号:2021xkjT023)

作者简介:李婉丽,女,硕士研究生;

文继月,女,博士,硕士生导师,通信作者,E-mail:wenjiyue139@ahyun.com;

王佳佳,女,博士,硕士生导师,通信作者,E-mail:wjj@ahmu.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

(alanine transaminase, ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒, 三酰甘油(triglyceride, TG) 测试盒, 总胆固醇(serum total cholesterol, TC) 测试盒(南京建成生物工程研究所, 货号: C009-2-1、C010-2-1、A110-1-1、A111-1-1); 超高效液相色谱质谱联用(ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS) 检测相关试剂信息见表 1。

1.1.3 主要仪器 RM2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); BM-II 型病理组织包埋机(合肥电子科学研究所); SW-CJ-1B 型单人单面超净工作台(绍兴苏净净化设备有限公司); KDC-120HR 超速冷冻离心机(德国 hetich 科学仪器公司); Vanquish UH-PLC-Altis plus 液相色谱三重四级杆质谱联用仪(美国赛默飞公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与给药 30 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 3 组: 正常组(Control)、NAFLD 模型组(Model)、正常雌鼠粪菌移植造模小鼠组(FMT), 每组 10 只。此外, 饲养同品系正常供体雌性小鼠 10 只以提供正常雌鼠粪菌液。

Control 组与供体小鼠喂以普通饲料和灭菌水, 每周 1 次腹腔注射 0.15 $\mu\text{L/g}$ 橄榄油; Model 组和 FMT 组小鼠喂以高脂饲料(按质量计含 13% 脂肪、41% 蔗糖、1.25% 胆固醇)和高糖水(含 23.1 g/L 果糖 + 18.9 g/L 葡萄糖), 每周腹腔注射 1 次低剂量 0.15 $\mu\text{L/g}$ 10% CCl_4 橄榄油溶液; 持续 17 周。开始上述造模前, FMT 组先以混合抗菌药物溶液(1 g/L 氨苄西林 + 1 g/L 硫酸锌霉素 + 0.5 g/L 万古霉素 + 1 g/L 甲硝唑)灌胃破坏原有肠道菌群, 每 12 h 1

表 1 超高效液相色谱质谱联用检测相关试剂

Tab. 1 Reagens for UHPLC-MS detection

Chinese name	English name	Catalog number
雌酮(E1) ¹	Estrone	100849
雌二醇(E2) ¹	17 β -estradiol	100182
雌三醇(E3) ¹	Estriol	100934
2-羟基雌酮(2-OHE1) ²	2-hydroxyestrone	IR-71752
2-甲氧基雌酮(2-MeOE1) ²	2-methoxyestrone	ZC-47314
4-羟基雌酮(4-OHE1) ²	4-hydroxyestrone	IR-30410
4-甲氧基雌酮(4-MeOE1) ²	4-methoxyestrone	IR-15263
16 α -羟基雌酮(16 α -OHE1) ²	16 α -hydroxyestrone	ZC-21924
2-羟基雌二醇(2-OHE2) ²	2-hydroxyestradiol	ZC-20830
2-甲氧基雌二醇(2-MeOE2) ²	2-methoxyestradiol	ZC-47513
4-羟基雌二醇(4-OHE2) ²	4-hydroxyestradiol	ZTR-H941895
4-甲氧基雌二醇(4-MeOE2) ³	4-methoxyestradiol	M262632
16-酮雌二醇(16-ketoE2) ²	16-ketoestradiol	ZTR-K188750
17-环雌三醇(17-epiE3) ²	17-epiestriol	ZTR-E586510
16-表雌三醇(16-epiE3) ²	16-epiestriol	ZC-25259
17 β -雌二醇-2, 4, 16, 16-d ₄ (d ₄ -E2) ²	17 β -estradiol-2, 4, 16, 16-d ₄	IR-22922
17 β -雌三醇-d ₃ (d ₃ -E3) ²	17 β -estriol-d ₃	ZTR-E888962
4-对乙酰氨基苯磺酰氯(ASC) ⁴	4-acetamidobenzenesulfonyl chloride	N830288
二氯甲烷 ⁴	Dichloromethane	D807825
甲醇 ⁴	Methanol	M813904
醋酸钠 ⁴	Sodium acetate	767496
碳酸氢钠(NaHCO ₃) ⁴	Sodium bicarbonate	S818082
β -葡萄糖醛酸酶/硫酸酯酶 ⁵	β -glucuronidase/glucuronidase/arylsulfatase/arylsulfatase	S26036
L-抗坏血酸 ⁶	L-ascorbic acid	1034072
甲酸 ⁷	Formic acid	F301957

¹: 中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control); ²: 上海甄准生物科技有限公司(Shanghai Standards Biotechnology Co., Ltd); ³: Toronto Research Chemicals Inc.; ⁴: 上海麦克林生化科技有限公司(Shanghai Macklin Biochemical Technology Co., Ltd); ⁵: 上海源叶生物科技有限公司(Shanghai Yuanye Biotechnology Co., Ltd); ⁶: 上海沪试实验室器材股份有限公司(Shanghai Hushi Laboratory Equipment Co., Ltd); ⁷: 上海阿拉丁生化科技股份有限公司(Shanghai Aladdin Biochemical Technology Co., Ltd).

次,以粪菌液平板计数法鉴定原有菌群基本消失后,每周2次以正常雌鼠粪菌液(5×10^8 CFU/200 μ L/只)灌胃给药。具体流程如图1。

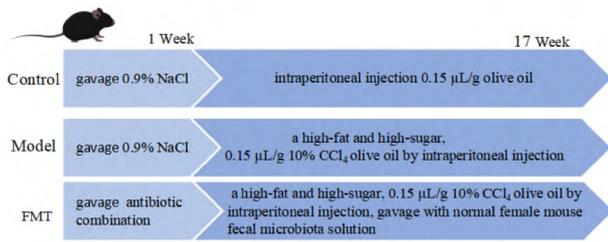


图1 小鼠分组与处理

Fig. 1 Mice groups and treatment

1.2.2 粪菌液平板计数法 在混合抗菌药物溶液灌胃破坏FMT组原有肠道菌群后,取FMT组与Control组新鲜粪便,使用生理盐水稀释后,分别接种于GAM、BHI培养基中,同时设置空白对照组(Blank control),即将生理盐水分别接种于GAM、BHI培养基,将培养基在35℃厌氧培养箱中培养24 h,取出拍照观察。

1.2.3 新鲜粪菌液提取 用按摩刺激小鼠腹部的方法收集小鼠新鲜粪便,置于甘油-无菌生理盐水中(体积比1:5),充分搅拌,倒入研钵。充分研磨后,依次用80目、200目无菌不锈钢滤网过滤,过滤后的混悬液在6 000 r/min、4℃下离心15 min,弃上清液,加入等量生理盐水重悬后再次离心,重复以上操作2~3次,将最终沉淀物加入等量生理盐水混匀后重悬,得到新鲜粪菌液。以上操作均于2 h内在无菌超净台内完成,所有粪菌液现用现配。

1.2.4 生化指标检测 小鼠禁食不禁水12 h后,腹腔注射0.2 mL/10 g三溴乙醇,收集肝门静脉血置于冰上静置,4℃、3 500 r/min离心15 min,收集上层血清,分装后-80℃储存。按照相应检测试剂盒说明书操作方法,检测血清中ALT、AST活性及TG、TC含量。

1.2.5 肝脏指数测定 麻醉动物前称量小鼠体质量,收集肝门静脉血后,颈椎脱臼处死小鼠,立即摘取肝脏并称重,根据以下公式计算小鼠肝脏指数:

肝脏指数(%) = 肝脏重量(g)/体质量(g) × 100%。

1.2.6 病理切片与HE染色 摘取肝脏称重后,使用预冷生理盐水洗涤,使用滤纸吸干水分后,置于4%中性甲醛进行固定,石蜡包埋,制备4 μ m切片。分别使用二甲苯I浸泡10 min,二甲苯II浸泡10 min,依次置于100%、95%、85%、70%乙醇中浸泡

各5 min,苏木精染色5 min,盐酸乙醇反蓝,伊红染色3 min,依次于70%、85%、95%、100%乙醇中浸泡各1 min,封片,风干。

1.2.7 UHPLC-MS检测小鼠肝门静脉血清15种EMs含量 按课题组前期建立的血清雌激素类物质检测方法,采用UHPLC-MS法检测小鼠肝门静脉血清15种EMs浓度^[6]。

1.2.7.1 血清样本前处理 取0.5 mL血清样本,依次加入20 μ L内标工作液(10 ng/mL d₄-E2、50 ng/mL d₃-E3)、0.5 mL酶解缓冲液[5 μ L β -葡萄糖醛酸酶/硫酸酯酶、2 mg L-抗坏血酸、0.5 mL 0.15 mol/L醋酸钠缓冲液(pH = 4.1)],摇床37℃避光孵育20 h。加入3 mL二氯甲烷,液液萃取30 min,于4℃、12 000 r/min离心5 min,收集下层溶液。上述萃取步骤重复2次,合并下层溶液于37℃温和流动氮气下吹干。将30 μ L ASC丙酮溶液和30 μ L NaHCO₃溶液(pH = 10.5)加入吹干后残渣中,避光,于300 r/min、60℃下振摇15 min进行衍生化,-20℃冷却5 min停止反应。4℃、12 000 r/min离心20 min,吸取55 μ L上清液至进样瓶中待检。EMs校准标准品和质量控制样品的水解、提取、衍生化均按相同程序进行。

1.2.7.2 色谱条件 使用赛默飞Vanquish液相色谱系统对血清样本进行色谱分离。色谱柱为Acquity UPLC HSS T3色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相A相为水相(含0.1%甲酸),B相为甲醇;梯度洗脱程序见表2,流速为0.15 mL/min,柱温为40℃,样品盘温度为4℃,进样体积为50 μ L。

表2 肝门静脉血清色谱洗脱梯度

Tab. 2 Serum chromatographic elution gradient for hilar vein blood

Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.15	50	50
90.00	0.15	60	40
120.00	0.15	65	35
125.00	0.15	65	35
125.10	0.15	50	50
130.00	0.15	50	50

1.2.7.3 质谱条件 使用Altis plus三重四极杆质谱仪进行质谱分析,正离子模式下气源参数优化如下,气源温度:300℃,喷雾电压:5 500 V,帘帘气体:70 kPa,加热器气体:105 kPa,雾化器气体:140 kPa。采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM),参数如表3所示。

1.3 统计学处理 使用 Graphpad Prism 8.0.2 软件,采用单因素方差分析(ANOVA)与重复测量资料的方差分析(RM-ANOVA)评估多组实验数据的总体差异,并通过 LSD-*t* 检验确定两组间显著差异,统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 展示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,利用 Pearson 相关性系数法分析两因素间的相关性。

表 3 雌激素及其代谢物串联质谱 MRM 条件的最佳参数

Tab.3 The optimal parameters of tandem mass MRM conditions for estrogen and its metabolites

EMs	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Collision energy (eV)
E1	468.18	198.02	30
E2	470.20	198.02	30
E3	486.19	198.02	30
2-OHE1	681.19	198.02	30
4-OHE1	681.19	198.02	30
2-MeOE1	498.19	198.02	30
4-MeOE1	498.19	198.02	30
16 α -OHE1	484.18	198.02	30
2-OHE2	683.21	198.02	30
4-OHE2	683.21	198.02	30
2-MeOE2	500.21	198.02	30
4-MeOE2	500.21	198.02	30
16-ketoE2	484.18	198.02	30
16-epiE3	486.19	198.02	30
17-epiE3	486.19	198.02	30
d ₄ -E2	474.22	198.02	30
d ₃ -E3	489.21	198.02	30

2 结果

2.1 伪无菌小鼠模型验证 使用粪菌液平板计数法验证 FMT 组小鼠伪无菌造模是否成功。混合抗生素灌胃 7 d 的粪便菌群几乎完全消失,说明伪无菌小鼠模型成功建立。见图 2。

2.2 FMT 对 NAFLD 小鼠肝脏病理、体质量和肝指数的影响 如图 3A 所示,各组小鼠肝脏拍照观察,Control 组肝脏呈深红色,质地光滑;而 Model 组肝脏呈粉红色,光泽差,质地明显粗糙且有颗粒感;与 Model 组相比,FMT 组肝脏形态有所好转。HE 染色显示(图 3B),Control 组肝细胞的形态保持完好,排列有序,肝索呈放射状分布,肝小叶结构完整,没有观察到脂肪变性、细胞坏死或炎症细胞浸润的现象;在 Model 组中,肝细胞的细胞核显著扩大,大量的肝细胞出现了空泡化变性现象,表明脂肪变性非常严重,可以观察到明显的细胞坏死和炎症细胞浸润现象,FMT 组的细胞排列出现混乱,肝细胞内也有脂肪变性现象,与 Model 组相比有明显改善。

如图 3C 所示,造模期间各组小鼠体重均稳定增长,Model 组和 FMT 组体质量均高于 Control 组($P < 0.01$),与 Model 组相比,FMT 组体质量下降($P < 0.01$)。如图 3D 所示,与 Control 组相比,Model 组、FMT 组肝重比上升($P < 0.01$),与 Model 组相比,FMT 组肝重比下降($P < 0.01$)。

2.3 FMT 对 NAFLD 小鼠肝功能、肝脂的影响

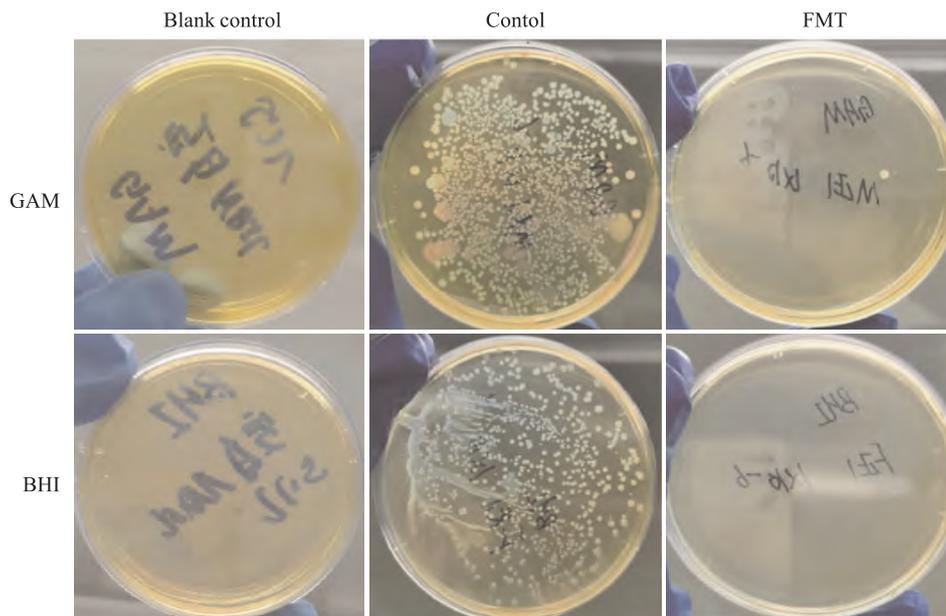


图 2 伪无菌小鼠模型验证

Fig.2 Validation of a pseudo-sterile mouse model

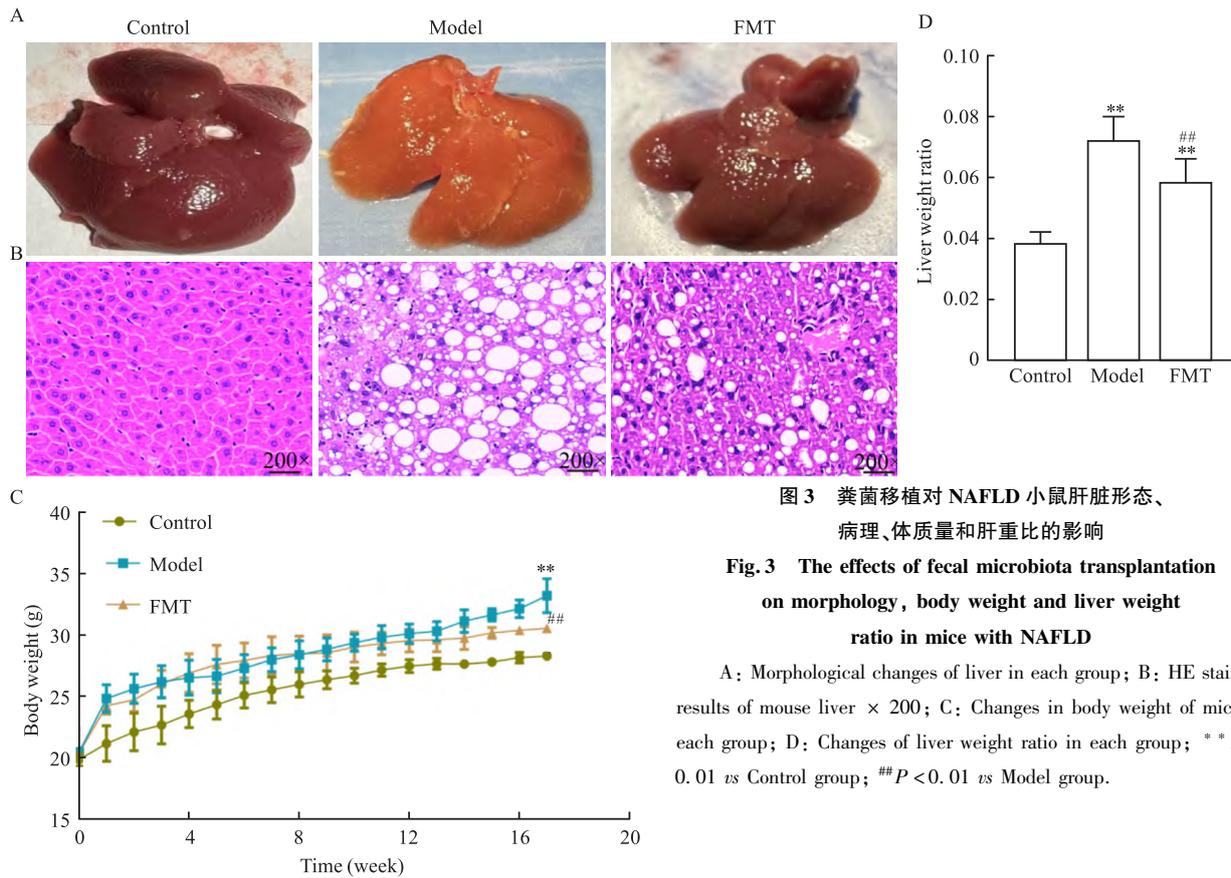


图3 粪菌移植对NAFLD小鼠肝脏形态、病理、体质量和肝重比的影响

Fig.3 The effects of fecal microbiota transplantation on morphology, body weight and liver weight ratio in mice with NAFLD

A: Morphological changes of liver in each group; B: HE staining results of mouse liver × 200; C: Changes in body weight of mice in each group; D: Changes of liver weight ratio in each group; ** $P < 0.01$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs Model group.

ALT、AST 活性和 TG、TC 表达水平可以反应肝脏损伤和脂质生成情况,通过试剂盒检测小鼠血清 ALT、AST 活性及肝组织 TG、TC 浓度。如图 4 所示,与 Control 组相比,Model 组和 FMT 组 ALT、AST 活性与 TG、TC 水平上升(均 $P < 0.05$),说明肝细胞损害程度加重,脂质生成显著增多;与 Model 组相比, FMT 组 ALT、AST 活性和 TG、TC 水平降低(均 $P < 0.05$),说明移植正常雌鼠粪便粪菌可保护肝细胞,减轻其受损程度和脂质堆积。

2.4 FMT 对 NAFLD 小鼠肝门静脉血清中 15 种 EMs 影响 与 Control 组相比,Model 组 E1 及其 2-, 4-位代谢物(E1、2-OHE1、4-OHE1、2-MeOE1、4-MeOE1)、16- α OHE1 均下降($P < 0.05$);与 Model 组相比,FMT 组中上述 E1 及其代谢物均上升($P < 0.05$)。见图 5A。与 Control 组相比,Model 组 E2 及其 2-, 4-位代谢物(E2、2-OHE2、4-OHE2、2-MeOE2、4-MeOE2)均下降($P < 0.01$),而 16-ketoE2 上升($P < 0.01$);与 Model 组相比,FMT 组 E2 及其 2-, 4-位代谢物均上升($P < 0.05$),而 16-ketoE2 下降($P < 0.05$)。见图 5B。与 Control 组相比,Model 组 E3 及其代谢物 17-epiE3 上升($P < 0.05$),16-epiE3 无显著性差异;与 Model 组相比,FMT 组 E3 及其代谢物 16-epiE3、17-epiE3 均下降($P < 0.05$)。见图 5C。

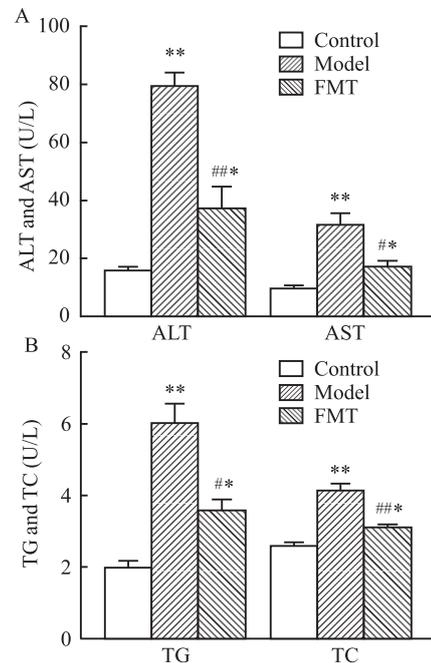


图4 粪菌移植降低NAFLD小鼠血清转氨酶活性和肝脂含量

Fig.4 Fecal microbiota transplantation reduced liver transaminase activity and hepatic lipid levels in mice with NAFLD

A: The activity of serum ALT and AST in mice; B: The contents of TG and TC in mouse liver tissue; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Model group.

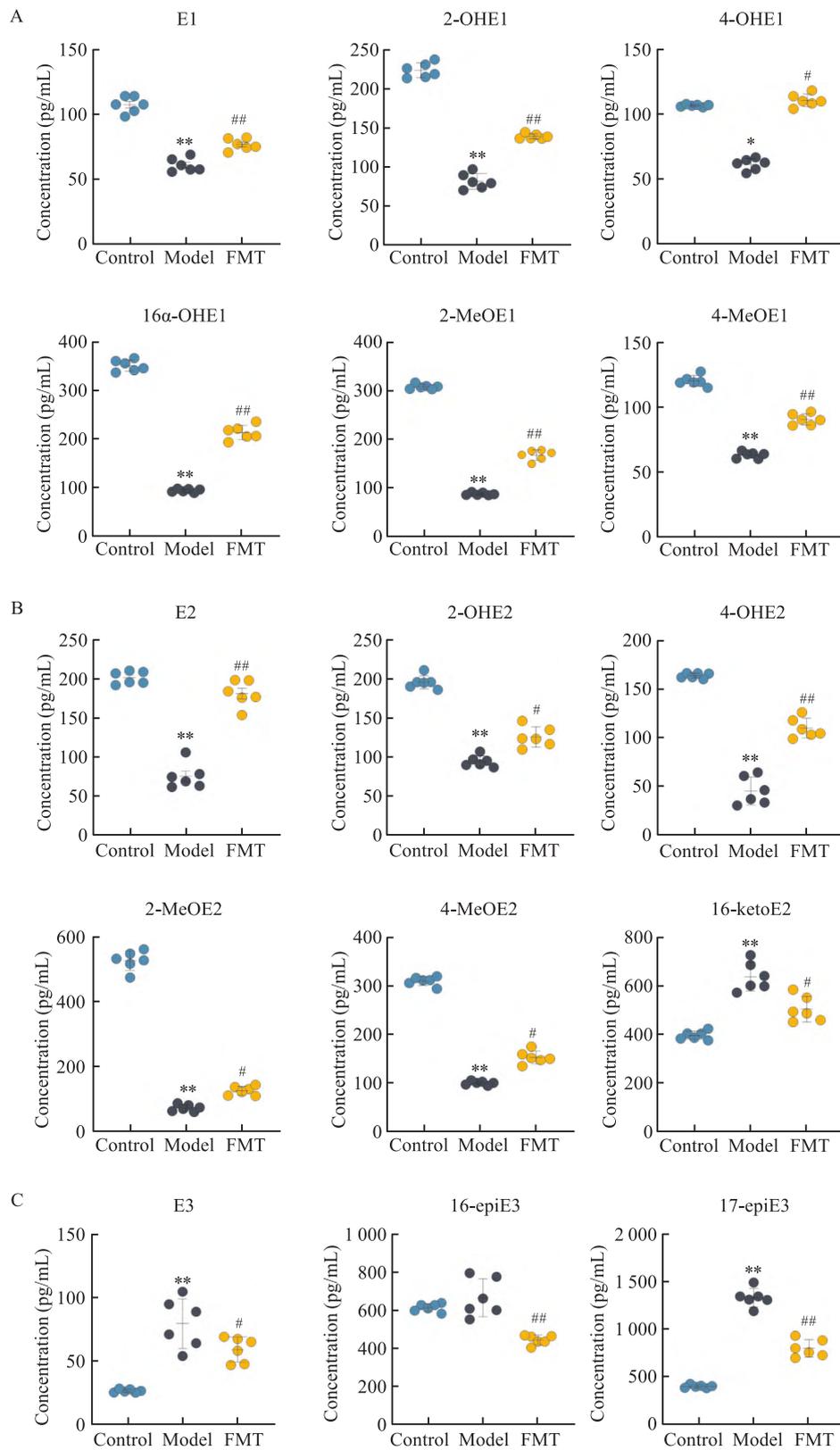


图5 UHPLC-MS 法检测小鼠肝门静脉血清 15 种雌激素及其代谢物

Fig.5 UHPLC-MS method was used to detect 15 estrogens and their metabolites in rat hepatic portal venous blood serum

A: Comparison of concentrations of E1 and its metabolites in each group; B: Comparison of concentrations of E2 and its metabolites in each group; C: Comparison of the concentrations of E3 and its metabolites in each group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Model group.

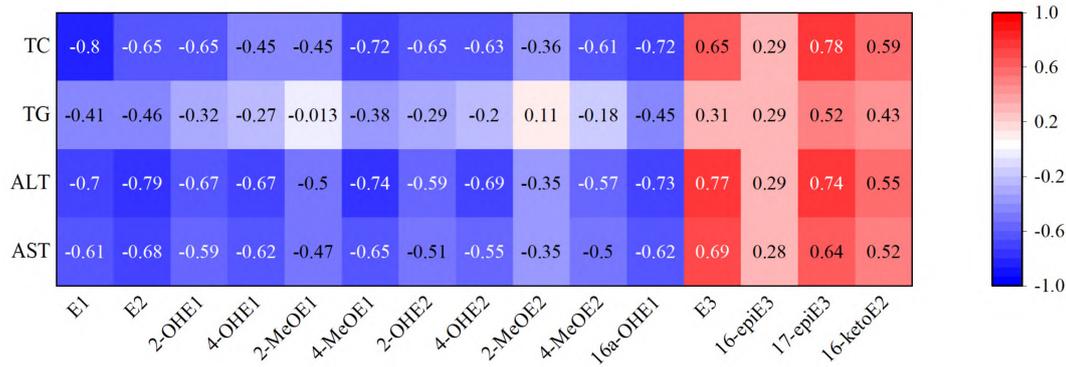


图6 NAFLD表型指标与肠源性EMs相关性分析

Fig. 6 Heat map of correlation analysis between phenotypic indicators of NAFLD and enterogenic EMs

以上结果提示,NAFLD小鼠肝门静脉血清中E1、E2及其2-,4-位代谢物含量较正常小鼠减少,而大多数16-,17-位代谢物(除16- α OHE1外)含量则较正常小鼠增多,说明在疾病过程中,肠源性EMs组成显著紊乱,FMT处理显著恢复了疾病中紊乱的肠源性EMs构成比例。

2.5 NAFLD表型与EMs的相关性分析 Pearson法分析上述肠源性EMs组成的显著变化与疾病病情的相关性。结果显示AST、ALT、TG、TC与16 α -OHE1、E1、E2及其2-,4-位部分取代物(2-OHE1、4-OHE1、2-MeOE1、4-MeOE1、2-OHE2、4-OHE2、4-MeOE2)呈负相关关系,与16-,17-位取代物(E3、16-epiE3、17-epiE3、16-ketoE2)呈正相关。以上结果提示,FMT对肝脏的保护作用极有可能与其改善肠源性EMs组成结构有关。

3 讨论

随着全球代谢综合征、肥胖和糖尿病的增加,NAFLD的患病率急剧上升,影响了世界约四分之一的人口,NAFLD已成为最普遍的慢性肝病类型^[7]。有队列研究^[8]证明,NAFLD患者主要死亡原因是心血管疾病,其次是肝外恶性肿瘤和肝脏相关并发症。NAFLD男性的发病率约为女性的2倍,且随着年龄的增大,发病率增高^[9]。

NAFLD的主要致病因素在于肝细胞中脂肪酸的过度积累^[10],Maddinemi et al^[11]探索发现微生物治疗可以显著改善NAFLD人群的肝脏硬度、肝脂肪变性。有研究^[12]表明基因可通过调控肠道菌群而调控肝损伤,也有实验研究^[13]显示,高脂肪饮食诱导的NASH小鼠经过8周FMT相关干预后,肝脏脂肪变性显著减少。本次实验结果显示,FMT可减弱NAFLD小鼠血清ALT、AST活性,降低肝组织

TG、TC含量,改善肝细胞损伤,为临床通过FMT治疗NAFLD提供依据。

过去,肝脏调节机体雌激素代谢功能研究较多,而肠道菌群雌激素代谢功能则有待更多探索。Flores et al^[14]首次在临床证实了肠道菌群可调节机体雌激素水平,发现男性和绝经后女性体内非卵巢来源雌激素及其代谢物与梭状芽孢杆菌呈现相关性。过去研究中多采用血、尿作为检测雌激素代谢物的样本,这些传统样本中的EMs属于“肝后性因素”,即是经肝脏代谢后释放入体循环的,无法从机制上阐明经由肠道菌群代谢产生的EMs(属于“肝前性因素”)对肝脏疾病带来的潜在影响。由于肠道游离EMs可通过门静脉大量汇入肝脏(肝脏70%~80%血供来自门静脉)。因而,该研究采用肝门静脉血进行肠源性EMs的检测。

Fuhrman et al^[15]的临床研究发现肠道菌群多样性越高,其产生的雌激素代谢产物(如2-羟基、4-羟基、16-羟基化产物)与母体雌激素(E1和E2)的比例也越高,该实验分析了NAFLD小鼠经过FMT,15种肠源性EMs组成结构的变化,显示FMT在升高肝门静脉血清中的E1和E2浓度的同时,降低了E3以及E2的16-位羟基取代物浓度。此外,课题组还进一步细化研究了母体雌激素取代物,发现经过FMT,母体雌激素的2-,4-取代产物浓度有所升高,同时16 α -OHE1浓度升高,该结果与Fuhrman et al^[15]的临床数据一致。可见,FMT可增加小鼠肠道菌群多样性,并调节肠道内EMs的类型和水平,进而可能导致慢性肝病的性别差异。

本次实验中15种EMs与NAFLD小鼠的肝功能、肝脂相关性分析显示,母体雌激素(E1、E2)及其2-,4-位代谢物(2-OHE1、4-OHE1、2-MeOE1、4-MeOE1、2-OHE2、4-OHE2、4-MeOE2)与疾病表型呈

负相关,为潜在具有护肝活性的物质,而16-,17-位代谢物与疾病表型呈正相关,为潜在具有损伤肝活性的物质,这一发现不仅为NAFLD的发病机制提供了新的代谢层面的见解,还为开发基于EMs调节的新型治疗策略提供了潜在靶点,有助于未来精准医学在NAFLD治疗中的应用,具有重要的临床转化价值。但这些物质对肝脏的活性作用和机制仍有待进一步研究明确。

参考文献

- [1] Della T S. Non-alcoholic fatty liver disease as a canonical example of metabolic inflammatory-based liver disease showing a sex-specific prevalence; relevance of estrogen signaling[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 572490. doi:10.3389/fendo.2020.572490. 490.
- [2] Della Torre S. Beyond the X factor: relevance of sex hormones in NAFLD a physiology[J]. *Cells*, 2021, 10(9):2502. doi: 10.3390/cells10092502.
- [3] Fuhrman B J, Feigelson H S, Flores R, et al. Associations of the fecal microbiome with urinary estrogens and estrogen metabolites in postmenopausal women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(12): 4632-40. doi:10.1210/jc.2014-2222.
- [4] Hu S, Ding Q, Zhang W, et al. Gut microbial beta-glucuronidase: a vital regulator in female estrogen metabolism[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2236749. doi:10.1080/19490976.2023.2236749.
- [5] Xue L, Deng Z, Luo W, et al. Effect of fecal microbiota transplantation on non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 759306. doi:10.3389/fcimb.2022.759306.
- [6] Zhou J, Qi X, Pan N, et al. A novel UPLC-ESI-MS assay for fifteen portal estrogens and metabolites detection and application in hepatic fibrosis[J]. *Anal Biochem*, 2023, 671: 115158. doi: 10.1016/j.ab.2023.115158.
- [7] Younossi Z, Anstee Q M, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(1): 11-20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109.
- [8] Targher G, Byrne C D, Tilg H. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications[J]. *Gut*, 2020, 69(9): 1691-705. doi:10.1136/gutjnl-2020-320622.
- [9] Fattahi M R, Niknam R, Safarpour A, et al. The prevalence of metabolic syndrome in non-alcoholic fatty liver disease; a population-based study[J]. *Middle East J Dig Dis*, 2016, 8(2): 131-7. doi:10.15171/mejdd.2016.18.
- [10] Xu H L, Wan S R, An Y, et al. Targeting cell death in NAFLD: mechanisms and targeted therapies[J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 399. doi:10.1038/s41420-024-02168-z.
- [11] Maddineni G, Obulareddy S J, Paladiya R D, et al. The role of gut microbiota augmentation in managing non-alcoholic fatty liver disease: an in-depth umbrella review of meta-analyses with grade assessment[J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2024, 86(8): 4714-31. doi:10.1097/MS9.0000000000002276.
- [12] 崔笑妍, 于笑涵, 周静, 等. miR-199a-5p通过调节肠道菌群促进胆总管结扎诱导的大鼠肝纤维化[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(10): 1794-801. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.014.
- [12] Cui X Y, Yu X H, Zhou J, et al. miR-199a-5p promotes bile duct ligation-induced liver fibrosis of rats by regulating intestinal microbiota[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(10): 1794-801. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.014.
- [13] Zhou D, Pan Q, Shen F, et al. Total fecal microbiota transplantation alleviates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice via beneficial regulation of gut microbiota[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1529. doi:10.1038/s41598-017-01751-y.
- [14] Flores R, Shi J, Fuhrman B, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 253. doi:10.1186/1479-5876-10-253.
- [15] Fuhrman B J, Feigelson H S, Flores R, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 253. doi:10.1186/1479-5876-10-253.

Fecal microbiota transplantation regulates the composition of intestinal-derived estrogens and their metabolites: a study on the correlation with non-alcoholic fatty liver disease

Li Wanli¹, Qi Xueping², Cong Shuqi¹, Zhang Wanting¹,

Zhang Tingting¹, Wang Sheng³, Fang Haiming⁴, Wen Jiyue¹, Wang Jiajia¹

(¹Dept of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, ³Center for Scientific Research,

Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pharmacy, Mingji Hospital, Nanjing 210019;

⁴Dept of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the impact of fecal microbiota transplantation (FMT) on the composition of 15 intestinal-derived estrogens and their metabolites (EMs) and its correlation with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Thirty male C57BL/6J mice were divided into a normal control group (Control), a high-sugar high-fat diet combined with low-dose CCl₄-induced NAFLD model group (Model), and a group of model

mice treated with fecal microbiota from normal female mice (FMT). After 17 weeks of modeling, liver pathology in each group was observed using HE staining, biochemical methods were used to measure serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels, as well as hepatic triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels. and the content of 15 EMs in portal vein serum was detected using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS). The correlation between disease phenotype and intestinal EMs was analyzed using Pearson's method. **Results** The NAFLD model was successfully established, and the FMT group showed improved liver structure and morphology, with significant decreases in liver function and hepatic lipids compared to the Model group. In NAFLD mice, the contents of E1, E2, and their 2- and 4-position metabolites in portal vein blood serum was reduced compared to normal mice, while the content of most 16- and 17-position metabolites (except 16 α -OHE1) increased compared to normal mice. Correlation analysis showed that ALT was strongly positively correlated with E3 and 17-epiE3, and strongly negatively correlated with E1, E2, 4-MeOE1, and 16 α -OHE1. The TC was strongly positively correlated with 17-epiE3 and strongly negatively correlated with E1, 4-MeOE1, and 16 α -OHE1. **Conclusion** FMT restores the disrupted composition of intestinal EMs and improves NAFLD.

Key words non-alcoholic fatty liver disease; gut microbiota; fecal microbiota transplantation; estrogens; metabolomics

Fund Programs National Natural Science Foundation of China (No. 82370591); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085MH242); Basic and Clinical Collaborative Research Enhancement Project of Anhui Medical University (No. 2021xkjT023)

Corresponding authors Wen Jiyue, E-mail: wenjiyue139@aliyun.com; Wang Jiajia, E-mail: wjj@ahmu.edu.cn

(上接第 1422 页)

The experimental study of titanium nanotube loaded dexamethasone hydroxyapatite composite coating

Gao Qikun, Wu Mingyue

(College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases
Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the biocompatibility of hydroxyapatite and dexamethasone composite coatings on the surface of TiO₂ nanotubes. **Methods** A composite coating was constructed by loading hydroxyapatite and dexamethasone on the surface of titanium nanotubes. Field emission scanning electron microscopy, atomic force microscopy, and contact angle measurement instrument was used to observe the characteristics of sample substrates, and *in vitro* biological evaluation was conducted to evaluate the effect of the coating on the adhesion and proliferation of human skull osteoblasts. **Results** The microstructure, three-dimensional morphology and hydrophilic properties of the modified composite coating had changed. After cytological examination, it could significantly promote the adhesion and proliferation of osteoblasts. **Conclusion** By simulating the immersion of body fluids and the method of adding dropwise loads, the titanium nanotube-hydroxyapatite-dexamethasone composite coating is successfully constructed, which has good biocompatibility.

Key words TiO₂ nanotubes; hydroxyapatite; dexamethasone; composite coating; osteoblasts

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81170993); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2024AH050683)

Corresponding author Wu Mingyue, E-mail: wumingyue321@126.com