

藻蓝蛋白对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化及肠道微生物的影响

翟诗翔^{1,2,4}, 李文军^{1,4}, 李莉莉^{1,4}, 王 莉³, 秦 松^{1,4}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 烟台市奇山医院, 山东 烟台 264001; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 为开发藻类活性物质的药用价值, 探究了藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)对四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠肝纤维化的影响。试验中将大鼠随机分为3组, 分别为对照组、肝纤维化组、CCl₄+PC 干预组。利用 CCl₄腹腔注射诱导肝损伤模型, 在干预后, 通过 RT-PCR 技术检测了大鼠肝脏中纤维化标志物 I 型胶原蛋白(collagen type I, Co-I)和 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)的表达情况, 通过 16S rRNA 高通量测序技术检测了干预后大鼠肠道微生物的组成和结构。RT-PCR 结果显示 PC 干预显著降低了 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏中纤维化标志物 α -SMA 和 Co-I 的表达。CCl₄ 诱导使大鼠肠道菌群发生了紊乱, 显著降低了具有抗炎活性的益生菌 *Bacteroides*、*Blautia*、*Parabacteroides* 的丰度, PC 干预显著增加了具有抗炎活性的益生菌 *Blautia* 的丰度。结果表明 PC 能够改善 CCl₄ 引起的肠道菌群紊乱, 这种改善可能有助于缓解 CCl₄ 导致的肝纤维化。

关键词: 藻蓝蛋白; 肝纤维化; 肠道微生物; 炎症; 四氯化碳

中图分类号: P375 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2021)07-0103-07

DOI: 10.11759/hyxx20200314002

肝纤维化(hepatic fibrosis)是肝脏在受到刺激反复或连续损伤时肝脏细胞对这些损伤的修复反应。当长期伤害或炎症导致肝脏中过多的疤痕组织积聚, 就会发生肝纤维化。肝纤维化是所有慢性肝病发展成为肝硬化的必经阶段, 晚期肝纤维化会发展为肝衰竭甚至肝癌^[1]。目前肝脏疾病在世界范围内发病率和死亡率都很高, 这与日益增加的经济和社会影响有关。而目前缺乏治疗肝纤维化的有效疗法。

由于肝纤维化的发生涉及多个因素多条通路的参与, 肝纤维化的防治也比较困难。目前在肝纤维化的治疗上还没有特效药, 仅有鳖甲软肝片和扶正化瘀片这两种中药被批准用来治疗肝纤维化^[2]。最近很多研究表明肝脏疾病和肠道微生物相关。肠道和肝脏能通过胆道、门静脉和体循环进行物质交换。肠道中宿主和微生物的代谢物, 能通过门静脉易位至肝脏, 影响肝脏中的胆汁酸合成, 葡萄糖和脂质代谢。如芳香族的氨基酸的微生物代谢产物苯乙酸在非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病进展中起着关键的作用^[3]。肠道微生物产生的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)也能通过肠屏障, 经循环系统进入到肝脏中, 激活肝脏巨噬细胞, 产生促炎因子, 造成肝脏损伤

及纤维化^[4-5]。因此, 肠道微生物的稳态能影响肝脏的健康, 临床上观察到肝脏疾病患者体内存在肠道微生物失调的多种情况^[6]。

藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)是一种天然的色素蛋白, 通常存在于蓝藻和红藻中, 目前规模化制备的 PC 大多来自螺旋藻。近年来的研究证明 PC 具有抗肺纤维化、保肝和调节肠道菌群的作用^[7-10], 同时 PC 还容易得到, 安全无毒。PC 的这些优良特性表明其可能是一种改善肝纤维化的潜在物质。本文探究了 PC 对 CCl₄ 诱导造成的肝纤维化的改善效果及对肠道菌群的影响, 解释了肠道菌群在 PC 抗纤维化过程中的作用机理。

1 材料

1.1 仪器

7500 型实时定量 PCR 仪(Applied Biosystems,

收稿日期: 2020-03-14; 修回日期: 2020-05-02

基金项目: 烟台市重点研发项目(2019XDHZ101; 2020MSGY084)

[Foundation: Key Research and Development Project of Yantai, Shandong Province, Nos. 2019XDHZ10, 2020MSGY084]

作者简介: 翟诗翔(1995—), 男, 硕士研究生, 湖北孝感人, 研究方向: 分子藻类学, E-mail: sxzhai@yic.ac.cn; 秦松(1968—), 通信作者, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 分子藻类学、海洋活性物质的开发, E-mail: sqin@yic.ac.cn

7500 Fast System), Basic 电泳仪(Bio-RAD, Power-Pac Basic), 凝胶成像分析系统(Bio-RAD, Chemi-Doc XRS+), 正置显微镜(Zeiss, Axio Scope.A1), 包埋机(Leica, ARCADIA), 石蜡切片机(Leica, RM2235)。

1.2 药物与试剂

本实验中所用的 PC(产品单号 C-190430, Amax/A280=3.0)购自福清市新大泽螺旋藻有限公司; RNAiso Plus(Total RNA 提取试剂)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 购于 Takara 公司; HE 染色试剂盒和 Masson 染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 21 只, 体重 130~160 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号: SCXK(鲁) 2019 0003。饲养于山东国际生物科技园。

2 方法

2.1 实验动物分组及干预

饲养条件: 温度 (23±2) °C, 相对湿度(45±10)%, 光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗, 自由进食和进水。适应性饲喂一周后, 以体重为标签, 将 21 只大鼠随机分成 3 组, 每组 7 只。分组方式为: 对照组(NC), 肝纤维化组(FIB), CCl₄+PC 干预组(FIB_PC)。CCl₄+PC 干预组每天灌胃 100 mg/kg 的 PC, 对照组灌胃同等体积的蒸馏水, 持续 4 周。用腹腔注射 CCl₄ 的方法建立肝纤维化模型, 具体方法为: 腹腔注射体积分数为 12.5%的 CCl₄ 橄榄油溶液, 以 0.01 mL/g 体重每周注射 2 次, 持续 4 周^[11]。

2.2 样本采集

大鼠的粪便于干预的最后一天采集。将大鼠轻轻抓取起来时大鼠就会排便(若无粪便排出, 可用消毒棉签轻轻刺激大鼠的肛门, 即可排便), 将刚排出的粪便样品收集于无菌的冻存管中, 然后立即放入液氮中冷冻后, 置于-80 °C 冰箱进行保存。

2.3 大鼠肝脏组织的 HE 和 Masson 染色

腹腔注射质量分数为 10%的水合氯醛溶液(0.3 mL/100 g 大鼠), 使大鼠进入麻醉状态后, 取肝脏中的最大叶, 置于质量分数为 4%的多聚甲醛固定液中固定, 在

4 °C 冰箱内固定 24 h 后, 按说明书的方法进行 HE 染色(苏木精-伊红染色, hematoxylin and eosin stain) 和 Masson 染色(又称马森三色染色法, masson's trichrome stain), 通过鉴定肝组织中炎性细胞和纤维化的程度来判断肝纤维化的阶段。将剩余的肝脏组织于-80 °C 冰箱中保存, 以备后续检测相关基因的表达。

2.4 RT-PCR 检测大鼠肝脏组织中纤维化标志物的表达

每组取 3 只大鼠肝组织, 用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA。肝纤维化标志物 I 型胶原蛋白(collagen type I, Co-I)和 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)的扩增引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。序列如下所示: α -SMA_F GCCATCAGGAACCTCGAGAA; α -SMA_R AGCTGTCCTTTTGGCCATT; Co-I_F GGAGAGA GCATGACCGATGG; Co-I_R GGGACTTCTTGAG GTTGCCA; β -actin_F CGTAAAGACCTCTATGCC AACA; β -actin_R GGAGGAGCAATGATCTTGA TCT。每个样本设置 2 个技术平行。PCR 反应条件为: 先 95 °C 预变性 30 s, 进入循环, 循环 40 次, 循环条件为 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火和延伸 30 s。以 β -actin 作为内参, 用双德尔塔 Ct 法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算目的基因的相对表达量。

2.5 肠道菌群的高通量测序

利用粪便 DNA 提取试剂盒提取大鼠粪便样本的基因组 DNA。以细菌的 16S 核糖体 RNA 基因的 V3—V4 可变区引物(338F 5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCAG-3'和 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTC TAAT-3'), 将所提取的 DNA 样本进行的 PCR 扩增(ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪)。2%琼脂糖电泳检测扩增样品, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物, 使用 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 试剂盒(Illumina 公司)构建 MiSeq 文库, 并根据测序流程利用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。

2.6 统计学方法

用 IBM SPSS Statistics 22 软件对数据进行统计分析, 最终结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)呈现, 用单因素方差分析检验不同组之间的显著性, 用 wilcoxon 秩和检验分析不同组菌群之间的显著性。 $P < 0.05$ 表明不同组之间有显著性差异。

3 结果

3.1 PC 对 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化标志物的影响

各组干预后组织中 α -SMA 和 Co-I 的 mRNA 的相对表达量如图 1 所示。FIB 组肝脏中 α -SMA 和 Co-I 的表达量较 NC 组显著升高 ($P < 0.05$), 而与 FIB 组相比, FIB_PC 组肝脏中 α -SMA 和 Co-I 的表达量显著降低 ($P < 0.05$)。

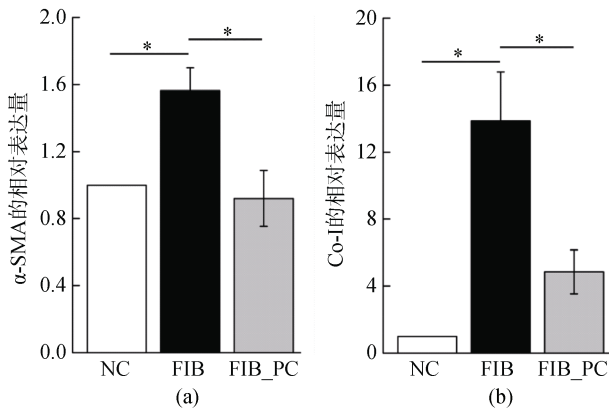


图 1 PC 对 α -SMA (a) 和 Co-I (b) 表达的影响

Fig. 1 Effects of phycocyanin on the liver expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (a) and collagen type I (Co-I) (b).

注: NC: 对照组; FIB: 肝纤维化组; FIB_PC: CCl₄+PC 干预组. *表示 $P < 0.05$ 。下同

3.2 大鼠肝脏病理分析

用 HE 染色和 Masson 染色评价大鼠的肝损伤程度。HE 染色结果显示, NC 组中大鼠的肝脏结构正常, FIB 组中出现了大量的嗜酸小体和大量空泡样变性的肝细胞。FIB_PC 组中嗜酸小体和空泡样变性的肝细胞较 FIB 组都有所减轻。Masson 染色结果显示, NC 组仅在汇管区存在少量的被染成蓝色的胶原纤维, 而 FIB 组中汇管区周围存在大量的胶原纤维, 且胶原纤维连在了一起, 形成了纤维间隔, 说明此时大鼠出现了肝纤维化的症状。FIB_PC 组中虽然汇管区也存在一定量的纤维, 但没有形成纤维间隔, 其纤维化程度较 FIB 组低(图 2)。结合图 1 的结果, 表明 CCl₄ 诱导 4 周能造成肝脏纤维化, PC 干预具有缓解 CCl₄ 造成的肝纤维化的作用。

3.3 肠道微生物基础质控分析

本次测序 21 个粪便样本共产生了 1 043 032 条有效序列, 有效碱基数目为 505 342 145 bp, 有效序列的平均长度为 423 bp。各样本稀释曲线 Shannon 指数达到平缓(图 3a), coverage 指数达到了 95% 以上(图 3b), 且 reads 数在 35 000 以上, 说明本次测序的数据量足够反映出大鼠肠道菌群的组成的真实情况。

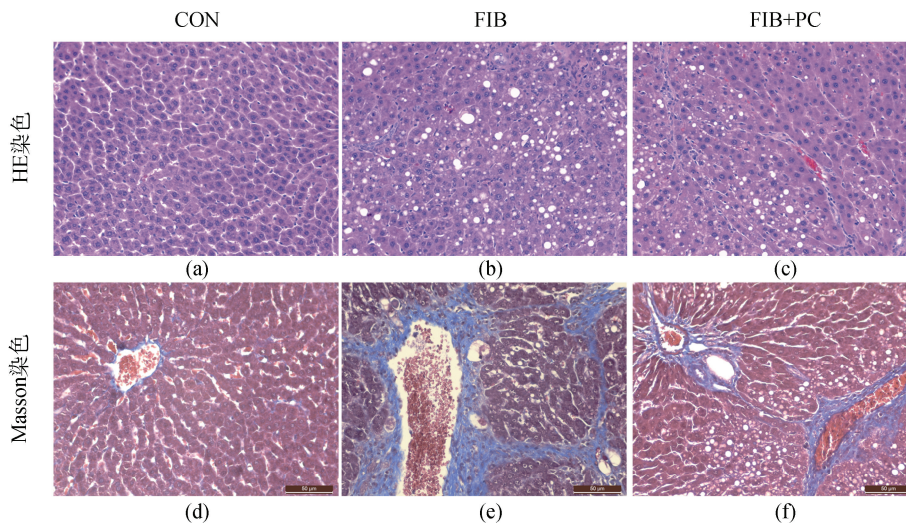


图 2 各组大鼠肝脏组织染色结果(放大 200 倍)

Fig. 2 Pathological section staining of liver tissue (200 \times)

3.4 对 OTUs 的影响

对所得的 reads 以 97% 的相似度进行聚类, 共得到 960 个操作分类单元(operational taxonomic units,

OTUs)(图 3c), NC 组有 760 个, FIB 组有 830 个, FIB_PC 组有 847 个, 这些组共有的 OTUs 有 639 个, NC 组独有 38 个, FIB 组独有 32 个, FIB_PC 组独有 52 个。

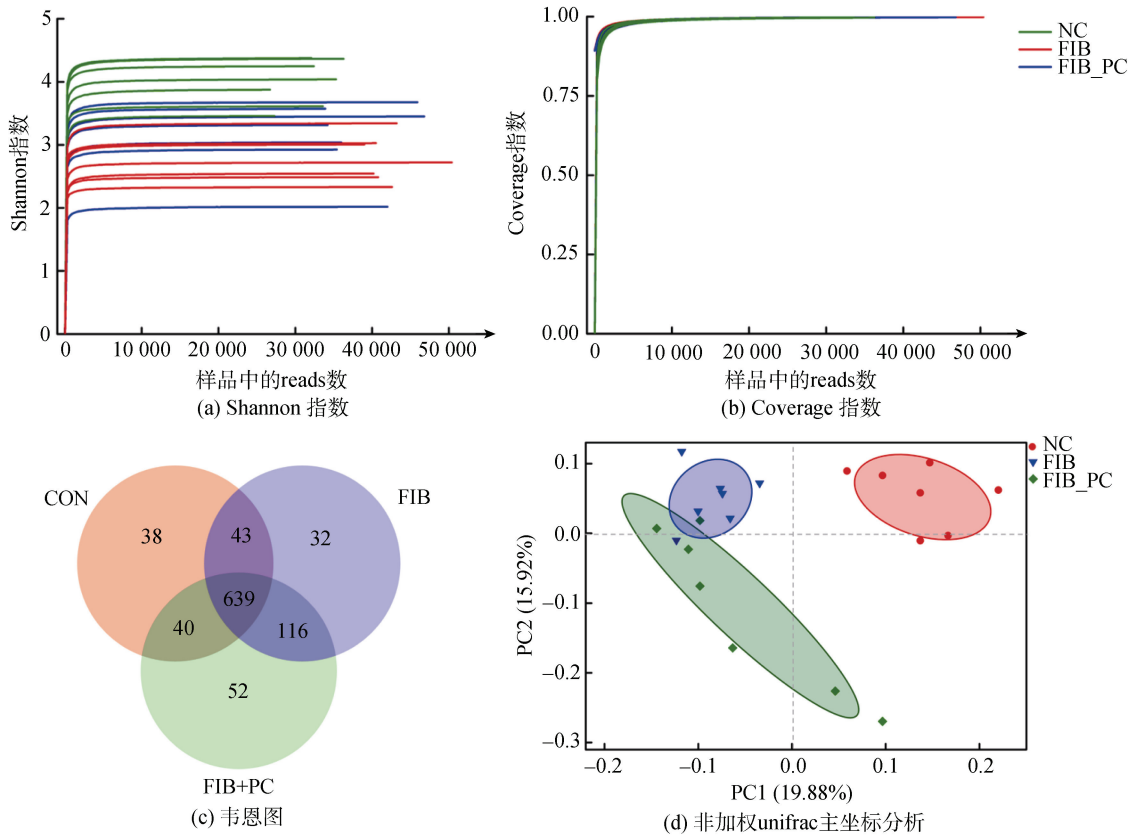


图 3 藻蓝蛋白干预对肠道微生物组成的影响
Fig. 3 Phycocyanin intervention modulated composition of gut microbiota

3.5 OTUs 聚类分析

对测得的各组肠道微生物进行 OTUs 聚类分析, 非加权 unifrac 主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)的结果如图 3d 所示, 以 95%的置信区间给图中各组加上分组椭圆, 结果显示 NC 组、FIB 组和 FIB_PC 组在图中对应的点分布比较集中, 且 NC 组与 FIB 组、FIB_PC 组的分组椭圆没有交集, 说明 PC 和 CCl₄ 都能改变肠道菌群。与 FIB 组相比, PC_FIB 组的分类椭圆距 NC 组远, 可能是因为 PC_FIB 组是 CCl₄ 和 PC 双重干预, 且 PC 是灌胃干预, 在消化道中直接与肠道微生物接触, 因此对肠道微生物的影响较大。

在门水平上, 将相对丰度小于 0.005 的门设为其他组, 可以看出大鼠肠道内主要的门为厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)(图 4)。FIB 组中, 与 NC 组相比, CCl₄ 诱导增加了厚壁菌门的相对丰度而减少了拟杆菌门的相对丰度。与 FIB 组相比, FIB_PC 组内 Firmicutes 与 Bacteroidetes 的比值降低。

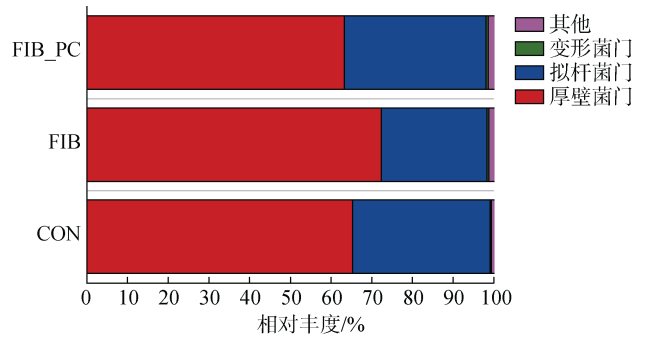


图 4 Relative abundance of gut microbiota at the phylum level

在科水平上, CCl₄ 诱导降低了拟杆菌科(Bacteroidaceae)、理研菌科(Rikenellaceae)、坦纳菌科(Tannerellaceae)等菌群的丰度, PC 加入后这些科的细菌相对丰度增加。此外, 与 NC 组相比, FIB_PC 组还显著增加了消化链球菌科(Peptostreptococcaceae)、双歧杆菌科(Bifidobacteriaceae)的相对丰度(图 5)。

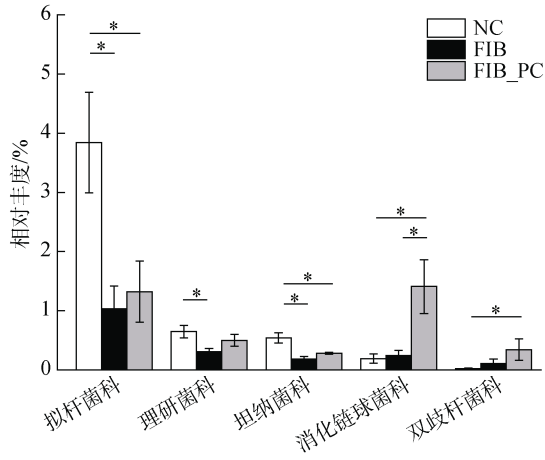


图 5 藻蓝蛋白干预在科水平上对肠道微生物丰度的影响
Fig. 5 Phycocyanin intervention changed the relative abundance of gut microbiota at the family level

在属水平上, 与 NC 组相比, FIB 组拟杆菌属 (*Bacteroides*)、副拟杆菌属 (*Parabacteroides*)、布劳特氏菌属 (*Blautia*) 的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。而与 FIB 组相比, FIB_PC 组中别样棒菌属 (*Allobaculum*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 等菌的相对丰度显著增加 (图 6)。

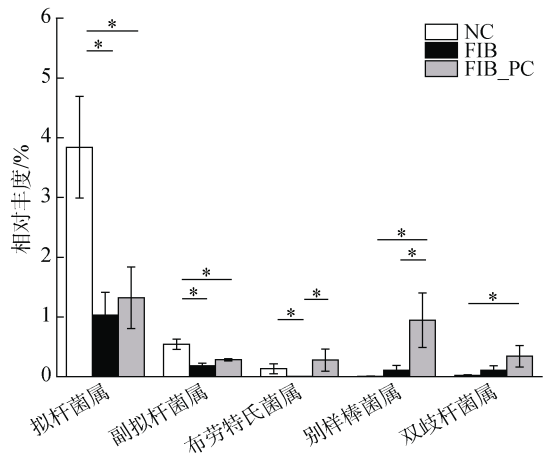


图 6 藻蓝蛋白在属水平上对肠道微生物丰度的影响
Fig. 6 Phycocyanin intervention changed the relative abundance of gut microbiota at the genus level

4 结论和讨论

因为 CCl_4 腹腔注射诱导的肝纤维化与真实的化学物质造成的肝损伤类似, 所以该肝纤维化模型在实验室广泛使用。本实验中, CCl_4 诱导的大鼠肝脏组织中肝纤维化标志物 α -SMA 和 Co-I 显著增加, 病理检查发现肝脏出现了纤维化样病变, 说明建模成功。

CCl_4 能通过多种方式对肝脏造成损伤。 CCl_4 在生物组织中发生碳键的断裂, 形成活性三氯甲烷 ($CCl_3\bullet$) 自由基和三氯甲烷过氧基 ($CCl_3OO\bullet$) 自由基, 这些自由基攻击肝脏细胞, 导致了细胞膜上脂质过氧化, 进而引起肝细胞的持续损伤^[12]。之前的研究表明 PC 能够通过抗氧化作用降低 CCl_4 诱导的肝损伤。Vadiraja 等^[13]研究表明, PC 能够清除大鼠肝脏内 CCl_4 产生的自由基, 从而降低脂质过氧化和肝损伤。Ou 等^[7]证明 PC 可以通过清除活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 并增强超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的活性来减少 CCl_4 诱导的肝损伤。此外, PC 上的色素藻蓝胆素 (phycocyanobilin, PCB) 能显著提高 CCl_4 小鼠血清和肝脏中的 SOD 水平, 降低肝损伤^[12]。在本研究中, PC 干预降低了 CCl_4 诱导的大鼠肝脏组织中 α -SMA 和 Co-I 的增加, 改善了大鼠肝脏组织的病理状态, 说明 PC 具有改善肝纤维化的作用。

除了诱导脂质过氧化外, CCl_4 诱导的肝纤维化还可能与肠道菌群相关。D'Argenio 等^[14]用 CCl_4 诱导了大鼠肝纤维化, 发现纤维化大鼠存在肠道菌群失调。临床上也发现了肝硬化患者存在肠菌失调, Qin 等^[15]通过定量宏基因组学的方法揭示了肝硬化患者和健康人菌群之间的差异, 和健康人相比, 肝硬化患者肠道中 Bacteroidetes 的丰度降低, 而 Firmicutes 的丰度升高。Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) 可以反映肠道微生物的失调情况。本研究发现大鼠粪便中主要的菌门为 Firmicutes 和 Bacteroidetes, 这 2 个菌门占据大鼠总微生物的 90% 以上, 数量上涵盖了大部分的肠道细菌。 CCl_4 诱导增加了 Firmicutes 的丰度, 降低了 Bacteroidetes 的丰度, 说明 CCl_4 诱导了大鼠的肠道菌群的失调, 而 PC 抑制了 CCl_4 造成的 Bacteroidetes 的丰度降低和 Firmicutes 的丰度升高, 说明 PC 能够改善 CCl_4 引起的肠道微生物的紊乱, 这种改善可能有助于 PC 缓解肝纤维化。

本研究中 CCl_4 干预降低了 *Bacteroides*、*Parabacteroides*、*Blautia* 等的丰度, 这些菌都能产生短链脂肪酸^[16-20]。肠道中短链脂肪酸具有抗炎作用, 短链脂肪酸减少会增加机体的炎症反应^[21]。之前的研究观察到自身免疫性肝炎中 *Parabacteroides* 的丰度降低^[22], 非酒精性脂肪肝患者和纤维化患者体内 *Blautia* 菌显著降低^[23], Yan 等人^[24]观察到 CCl_4 处理后大鼠肠道中 *Bacteroides* 丰度下降, D'argenio 等^[14]发现 CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠体内肠道菌群发生了紊乱, 促炎

细胞因子水平升高。说明 CCl₄ 或许可以通过降低短链脂肪酸产生菌的丰度, 增加机体炎症, 促进肝纤维化的发展。PC 干预增加了肠道中益生菌 *Blautia* 的丰度。*Blautia* 能够调节免疫反应, 从而发挥抗炎活性, 能改善肝硬化患者的预后^[25]。因此, 我们推测 PC 能够通过调节肠道菌群调节免疫反应, 从而降低肝脏的炎症水平, 缓解肝脏纤维化。

PC 对 CCl₄ 诱导的肝纤维化具有良好的改善作用。本文首次比较了 PC 干预对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肠道微生物组成与结构的影响。结果表明了 PC 能够增加大鼠体内具有抗炎活性的益生菌的丰度, 降低肝纤维化标志物的表达水平, 具有缓解 CCl₄ 诱导的肝纤维化的潜力。但 PC 在消化道中的代谢及其与机体和肠道微生物相互作用的机理较为复杂, 是 PC 通过肠道微生物影响肝纤维化, 还是 PC 通过减弱肝纤维化, 进一步影响肠道菌群, 还需要通过粪菌移植等试验进行验证。

参考文献:

- [1] SCHWABE R, BATALLER R. Liver fibrosis. Foreword[J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(2): 95-96.
- [2] 赵双双, 邵荣光, 何红伟. 抗肝纤维化的潜在作用靶点[J]. *药学学报*, 2014, 49(10): 1365-1371.
ZHAO Shuangshuang, SHAO Rongguang, HE Hongwei. Potential targets for anti-liver fibrosis[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49(10): 1365-1371.
- [3] CAUSSY C, LOOMBA R. Gut microbiome, microbial metabolites and the development of NAFLD[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(12): 719-720.
- [4] 任怡琳. 肠道微生物对肝纤维化进程的影响及樟芝的干预作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
REN Yilin. The effects of gut microbiota on the development of liver fibrosis and the Intervention of *Antrodia camphorata*[D]. Wuxi: Jiangnan university, 2018.
- [5] WOODHOUSE C A, PATEL V C, SINGANAYAGAM A, et al. Review article: the gut microbiome as a therapeutic target in the pathogenesis and treatment of chronic liver disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(2): 192-202.
- [6] 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.
- [7] OU Y, ZHENG S, LIN L, et al. Protective effect of C-phycoerythrin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage *in vitro* and *in vivo*[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 185(2): 94-100.
- [8] XIE Y, LI W, ZHU L, et al. Effects of phycocyanin in modulating the intestinal microbiota of mice[J]. *Microbiology Open*, 2019: e825.
- [9] LI C, YU Y, LI W, et al. Phycocyanin attenuates pulmonary fibrosis via the TLR2-MyD88-NF-kappaB signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5843-5846.
- [10] 刘琪, 李文军, 唐志红, 等. 藻蓝蛋白对氧化应激相关疾病防治作用的研究进展[J]. *海洋科学*, 2017, 41(10): 132-138.
LIU Qi, LI Wenjun, TANG Zhihong, et al. Research advances in the preventative and therapeutic effects of phycocyanin on oxidative stress-related diseases[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(10): 132-138.
- [11] ZHAO W, YANG A, CHEN W, et al. Inhibition of lysyl oxidase-like 1 (LOXL1) expression arrests liver fibrosis progression in cirrhosis by reducing elastin crosslinking[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(4 Pt A): 1129-1137.
- [12] LIU J, ZHANG Q Y, YU L M, et al. Phycocyanobilin accelerates liver regeneration and reduces mortality rate in carbon tetrachloride-induced liver injury mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(18): 5465-5472.
- [13] VADIRAJA B B, GAIKWAD N W, MaADYASTHA K M. Hepatoprotective effect of C-phycoerythrin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(2): 428-431.
- [14] D'ARGENIO G, CARIELLO R, TUCCILLO C, et al. Symbiotic formulation in experimentally induced liver fibrosis in rats: intestinal microbiota as a key point to treat liver damage?[J]. *Liver Int*, 2013, 33(5): 687-697.
- [15] QIN N, YANG F, LI A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis[J]. *Nature*, 2014, 513(7516): 59-64.
- [16] XU J, CHEN H B, LI S L. Understanding the molecular mechanisms of the interplay between herbal medicines and gut microbiota[J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(5): 1140-1185.
- [17] CHOTIRMALL S H, GELLATLY S L, BUDDEN K F, et al. Microbiomes in respiratory health and disease: An Asia-Pacific perspective[J]. *Respirology*, 2017, 22(2): 240-250.
- [18] SHUKLA S D, BUDDEN K F, NEAL R, et al. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung[J]. *Clin Transl Immunology*, 2017, 6(3): e133.
- [19] CRYAN J F, O'RIORDAN K J, COWAN C S M, et al. The microbiota-gut-brain axis[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1877-2013.
- [20] QIN L, WANG Z L, FENG Y, et al. Analysis of structural features of gut microbiota in two-kidney-one-clip hypertensive rats based on high-throughput sequencing

- technology[J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2018, 46(9): 706-712.
- [21] VAN DER BEEK C M, DEJONG C H C, TROOST F J, et al. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing[J]. *Nutr Rev*, 2017, 75(4): 286-305.
- [22] WEI Y, LI Y, YAN L, et al. Alterations of gut microbiome in autoimmune hepatitis[J]. *Gut*, 2020, 69(3): 569-577.
- [23] BRANDL K, SCHNABL B. Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2017, 33(3): 128-133.
- [24] YAN Z, YANG F, HONG Z, et al. Blueberry attenuates liver fibrosis, protects intestinal epithelial barrier, and maintains gut microbiota homeostasis[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2019: 5236149.
- [25] JENQ R R, TAUR Y, DEVLIN S M, et al. Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease[J]. *Biology of Blood & Marrow Transplantation*, 2015, 21(8): 1373-1383.

Effects of phycocyanin on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis and gut microbiota in rats

ZHAI Shi-xiang^{1, 2, 4}, LI Wen-jun^{1, 4}, LI Li-li^{1, 4}, WANG Li³, QIN Song^{1, 4}

(1. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Infectious Disease (Qishan) Hospital of Yantai, Yantai 264001, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Mar. 14, 2020

Key words: phycocyanin; hepatic fibrosis; gut microbiota; inflammation; carbon tetrachloride

Abstract: The effect of phycocyanin (PC) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis and gut microbiota in rats were investigated to develop a medicinal value of algal active substances. Rats were randomly divided into three groups: control group (NC), hepatic fibrosis group (FIB), and PC + CCl₄ intervention group (FIB_PC). After a 4-wk-long intervention, the messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type I (Co-I) in rat liver were detected by real-time reverse transcription polymerase chain reaction, and composition of gut microbiota were detected by 16S rRNA high-throughput sequencing. Expression of α -SMA and Co-I in liver were significantly higher in FIB group than those in NC group. Expression of α -SMA and Co-I in the PC group was decreased after PC intervention. CCl₄ reduced the abundance of *Bacteroides*, *Parabacteroides*, and *Blautia*, which had anti-inflammatory activity. PC intervention significantly increased the abundance of *Blautia*, a probiotic with anti-inflammatory activity. These results indicated that PC could maintain gut microbiota homeostasis, which might alleviate liver fibrosis caused by CCl₄.

(本文编辑: 丛培秀)