# DOI:10.13350/j.cjpb.240704

• 761 •

论著

# 二乙基亚硝胺诱导的大鼠肝癌前期病变肠道微生物组--短链脂肪酸代谢途径的动态变化及益生素干预效应\*

卢宏全<sup>1\*\*</sup>,时彩艳<sup>2</sup>,林明利<sup>3</sup>,张诚胜<sup>4</sup>
(1.海南西部中心医院肿瘤内科,海南儋州 571700;2.海南西部中心医院放疗科;
3.儋州市人民医院检验科;4.海南医学院第二附属医院肿瘤内科)

【摘要】 目的 探讨二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠肝癌前期病变中肠道微生物组-短链脂肪酸代谢途径的动态变化, 以及益生素干预的效应。 方法 本研究选用雄性 SD 大鼠,通过一次性腹腔注射 DEN 诱导肝癌模型。实验分为对照 组、DEN 模型组和 DEN 模型干预组,后者自 DEN 注射次日起接受益生菌饮食干预。通过 16S rRNA 基因测序分析肠 道菌群组成,采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)检测粪便中的 SCFA 含量,并通过生化指标、组织病理学检测和分子生物 学方法评估干预效果。 结果 DEN 模型组大鼠的体重增长显著缓慢(30±20 g), 肝功能损害指标(ALT, AST, ALP, GGT)显著升高,与对照组(体重增长 50±15 g; ALT 35±5 U/L, AST 30±4 U/L, ALP 90±10 U/L, GGT 20±3 U/L) 和干预组(体重增长 40±18 g; ALT 70±15 U/L, AST 65±10 U/L, ALP 150±20 U/L, GGT 45±8 U/L)相比有统计学 差异。DEN 模型组大鼠的 HGF、TGF-β和α-SMA 表达量显著高于对照组和干预组。肠道菌群分析显示,DEN 模型组 的 Chao1 和 Shannon 指数显著低于对照组和干预组。SCFA 分析结果表明, DEN 模型组大鼠的丙酸(0.52±0.19 mmol/L)和异戊酸(0.36±0.054 mmol/L)含量显著降低,而在 DEN 模型干预组中丙酸(0.80±0.21 mmol/L)和异戊酸 (0.64±0.19 mmol/L)含量较 DEN 模型组显著恢复。 结论 DEN 诱导的大鼠肝癌模型中,肠道微生物组结构和 SCFA 代谢途径发生显著变化,益生素干预可以改善肠道微生物组成,增加 SCFA 产量,减轻肝脏损伤,对抗肝脏纤维化 和肿瘤发展。这些发现为利用肠道微生物组和 SCFA 代谢途径预防和治疗肝癌提供了新的视角。

【关键词】 二乙基亚硝胺(DEN);肝细胞癌(HCC);肠道微生物组;短链脂肪酸(SCFAs);益生素干预

【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2024)07-0761-07

### [Journal of Pathogen Biology. 2024 Jul.;19(7):761-767.]

Dynamic changes of gut microbiome-short-chain fatty acid metabolic pathways in diethylnitrosamineinduced rat hepatocellular carcinoma preneoplastic lesions and the effect of probiotic intervention

LU Hongquan<sup>1</sup>, SHI Caiyan<sup>2</sup>, LIN Mingli<sup>3</sup>, ZHANG Chengsheng<sup>4</sup> (1. Oncology Department of Hainan Western Central Hospital, Danzhou, Hainan 571700, China; 2. Hainan Western Central Hospital, Radiotherapy Department; 3. Laboratory Department of Danzhou People's Hospital; 4. Department of Oncology, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College)<sup>\*\*\*</sup>

[Abstract] Objective To explore the dynamic changes of intestinal microbiome-short-chain fatty acid metabolic pathways in diethylnitrosamine (DEN)-induced liver precancerous lesions in rats and the effect of probiotic intervention.

Methods Male SD rats were used in this study, and the liver cancer model was induced by a one-time intraperitoneal injection of DEN. The experiment was divided into a control group, a DEN model group and a DEN model intervention group, with the latter receiving probiotic dietary intervention starting from the day after DEN injection. The composition of intestinal flora was analyzed by 16S rRNA gene sequencing, the SCFA content in feces was detected by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the intervention effect was evaluated by biochemical indicators, histopathological testing and molecular biology methods. **Results** The weight growth of the rats in the DEN model group was significantly slower ( $30 \pm 20$  g), and the liver function damage indicators (ALT, AST, ALP, GGT) were significantly increased. Compared with the control group (weight gain  $50\pm15$  g; ALT  $35\pm5$  U/L, AST  $30\pm4$  U/L, ALP  $90\pm10$  U/L, GGT  $20\pm3$  U/L) and the intervention group (weight gain  $40\pm18$  g; ALT  $70\pm15$  U/L, AST There was a statistical difference compared with  $65\pm10$  U/L, ALP  $150\pm20$  U/L, GGT  $45\pm8$  U/L). The expression levels of HGF, TGF- $\beta$  and  $\alpha$ -SMA in rats in the DEN model group were significantly higher than those in the control group and intervention group. Intestinal flora analysis showed that the Chao1 and Shannon index of the DEN model group were

<sup>\* 【</sup>基金项目】 海南省自然科学基金青年基金项目(No. 820QN403)。

<sup>\*\* 【</sup>通讯作者(简介)】 卢宏全(1980-),男,海南澄迈人,大学本科,副主任医师,研究肿瘤相关。E-mail:Luhongquan615@163.com

significantly lower than those of the control group and intervention group. SCFA analysis results showed that the contents of propionic acid  $(0.52\pm0.19 \text{ mmol/L})$  and isovaleric acid  $(0.36\pm0.054 \text{ mmol/L})$  in rats in the DEN model group were significantly reduced, while in the DEN model intervention group, the contents of propionic acid were significantly reduced. The contents of isovaleric acid  $(0.80\pm0.21 \text{ mmol/L})$  and isovaleric acid  $(0.64\pm0.19 \text{ mmol/L})$  were significantly restored compared with the DEN model group. **Conclusion** In the DEN-induced rat liver cancer model, the intestinal microbian estructure and SCFA metabolic pathways undergo significant changes. Prebiotic intervention can improve the intestinal microbial composition, increase SCFA production, reduce liver damage, and combat liver fibrosis and tumor development. These findings provide a new perspective on using the gut microbiome and SCFA metabolic pathways to prevent and treat liver cancer.

[Keywords] Diethylnitrosamine (DEN); hepatocellular carcinoma (HCC); gut microbiome; short-chain fatty acids (SCFAs); probiotic intervention

肝癌是全球癌症相关死亡的主要原因之一,近年 来,尽管治疗方法得到不断提升,但其发病率仍逐年上 升,预后依然不甚理想[1-2]。肝癌的发病机制复杂,涉 及多种生物标志物和多因素病因[3-4],这些特点持续挑 战着有效治疗和改善预后的努力。肠道微生物群对宿 主肝功能的影响已经揭示了肿瘤发生的新视角<sup>[5-6]</sup>, 特别是短链脂肪酸(SCFAs)在代谢中的作用<sup>[7-8]</sup>。二 乙基亚硝胺(DEN)诱导的啮齿动物肝癌模型为研究 与人类疾病相类似的肝癌多阶段过程提供了宝贵的视 角<sup>[9-10]</sup>。DEN的代谢活化可导致 DNA 加合物的形 成、突变和随后的致癌转化[11-12]。然而,这种模型中肠 道微生物组及其代谢产物,例如 SCFAs 的作用尚未得 到充分研究。肠道微生物失衡已经与多种肝脏疾病的 发病机制联系在一起,肠肝轴假说支持了肠道微生物 与肝脏健康之间的双向关系<sup>[13-15]</sup>。SCFAs,包括丁 酸、丙酸和乙酸,不仅是结肠上皮细胞的关键能量来 源,还调节炎症反应和肝脏代谢,影响肝癌的发 生<sup>[16-17]</sup>。因此,阐明 DEN 诱导的肝癌模型中肠道微 生物组成的动态变化及其 SCFA 代谢谱对于理解肝 癌发展的病理生理机制,以及识别新的生物标志物和 治疗靶点至关重要。本研究旨在描绘 DEN 诱导的肝 癌大鼠模型中肠道微生物群及其 SCFA 代谢产物的 变化,从而为预防、诊断和治疗 HCC 提供新的策略和 方向。

# 材料与方法

# 1 实验动物

实验采用雄性 6~8 周 200~250 g Sprague-Dawley (SD)大鼠,动物在特定病原体自由(SPF)条件 下饲养,光照周期光/暗比为 12 h/12 h,饲养环境的温 度控制为 22±2 ℃,湿度为 50%~60%。实验前进行 为期 1 周的适应性饲养,期间自由进食和饮水。实验 方案按照国家和机构关于动物护理和使用的指导原 则,并通过单位伦理委员会的批准。 将 SD 大鼠随机分为 3 组:对照组、DEN 模型组 和 DEN 模型干预组,每组 10 只。对照组:动物接受 等体积的生理盐水腹腔注射。DEN 模型组:动物通过 一次性腹腔注射特定剂量的 DEN(50 mg/kg 体重)以 诱导肝癌模型。实验第 16 周,通过组织病理学检测评 估肝脏结构和肿瘤的生长情况。在实验结束时取部分 大鼠进行肝脏组织切片、HE 染色评估肝脏病变程度。 DEN 模型干预组:在 DEN 注射诱导肝癌模型后,从第 2 d起,每天通过口鼻给予益生菌饮食。所有动物将 在实验开始后的第 2 d 开始接受治疗,持续至实验结 束,共 16 周。实验期间每周监测大鼠体重和一般健康 状况,以评估干预效果。

# 3 微生物组分析

实验结束后,收集大鼠粪便样本进行 16S rRNA 基因测序分析。利用特定引物扩增细菌 16S rRNA 基 因 V3-V4 区域,并通过高通量测序平台进行测序 (Illumina NovaSeq,美国)。获得的序列数据进行质 量控制、操作分类单元(OTU)聚类和物种注释。

# 4 短链脂肪酸的测定

利用气相色谱-质谱联用(GC-MS)检测粪便中的 SCFA含量。粪便样本经过同位素稀释的内标法进行 标准化处理,之后进行衍生化反应和色谱分离。通过 与标准品对照,定量分析乙酸、丙酸、丁酸和异戊酸等 SCFAs的浓度。

# 5 统计学分析

所有统计分析使用 R 语言(v4.2.3)实现。连续 变量以均值±标准差(Mean±SD)。采用 Spearman 相关性分析获得差异菌群与差异菌群、差异代谢物与 差异代谢物、差异代谢物与差异菌群之间的关系。采 用 Pearson 相关性分析获得差异代谢产物与血清生化 学指标之间的关系。两组间比较采用 Student's t 检 验,三组及以上组间比较采用单因素方差分析(oneway ANOVA),然后用 Dunnett 法对两两比较的结果 进行校正。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 动物模型

• 763 •

#### 结果

# 1 肝功能相关的生化指标

DEN 模型组的体重增长(30±20 g)较对照组(50 ±15 g)和干预组(40±18 g)显著减缓。生化指标分 析显示,DEN 模型组的肝功能损害明显,ALT(120± 25 U/L)、AST(110±20 U/L)、ALP(210±30 U/L) 和 GGT(85±15 U/L)水平均显著高于对照组(ALT 35±5 U/L,AST 30±4 U/L,ALP 90±10 U/L, GGT 20±3 U/L)和干预组(ALT 70±15 U/L,AST 65±10 U/L,ALP 150±20 U/L,GGT 45±8 U/L)。 分子标志物的表达量也反映了相同的趋势,DEN 模型 组的 HGF、TGF-β 和 α-SMA 的相对表达量分别为  $3.5\pm0.5$ 、 $4.0\pm0.6$ 和 $3.8\pm0.4$ ,而在干预组中这些 指标显著降低,分别为 $2.0\pm0.3$ 、 $2.5\pm0.4$ 和 $2.2\pm$ 0.2,对照组分别为 $1.0\pm0.1$ 。详细特征参数见表1。

表 1 各组大鼠模型的生化指标对比 Table 1 Comparison of biochemical indicators of rat models

	in each group							
	生化指标	对照组 (n=10)	DEN 模型组 (n=10)	DEN 模型 干预组(n=10)	<i>P</i> 1	P2	P3	
1	本重增长(g)	$50.12 \pm 15.51$	$30.01 \pm 20.99$	$40.07 \pm 18.50$	<0.001	<0.027	0.021	
	ALT (U/L)	$35.70 \pm 5.55$	$120.15 \pm 25.14$	70.01 $\pm$ 15.44	<0.001	<0.001	0.007	
	AST (U/L)	$30.92 \pm 4.61$	$110.09 \pm 20.01$	$65.11 \pm 10.77$	<0.001	<0.001	0.011	
	ALP (U/L)	90.82 $\pm 10.55$	$210.10 \pm 30.41$	$150.37 \pm 20.10$	<0.001	<0.001	0.004	
	GGT (U/L)	$20.43 \pm 3.90$	$85.48 \pm 15.33$	45.10±8.16	<0.001	0.032	0.034	

注:ALT:丙氨酸转氨酶;AST:天冬氨酸转氨酶;ALP:碱性磷酸酶;GGT: $\gamma$ -谷氨酰转肽酶;HGF:肝细胞生长因子;TGF- $\beta$ :转化生长因子- $\beta$ ; $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白;P1: DEN 模型组 vs 对照组;P2;DEN 模型干预组 vs 对照组;P3;DEN 模型组 vs DEN 模型干预组。

#### 2 影像学和分子生物学结果

HE 染色结果显示,对照组的大鼠肝脏结构正常, 未观察到异常增生。DEN 模型组的大鼠在实验的第 16 周时,有 80%(8/10)的大鼠显示肝脏结构不规则, 存在多发性小结节。DEN 模型干预组的大鼠中有 50%(5/10)显示类似模型组的肝脏异常,但结节数量 和大小较模型组小(图 1)。



图 1 对照组、DNE 模型组和 DEN 模型干预组第6 周镜下 HE 染色肝脏组织



Western blot 分析的结果见表 2 和图 2。与对照 组相比, DEN 模型组肝脏的 HGF 表达水平(3.5± 0.5, P < 0.05)显著升高, DEN 模型干预组也显著升 高(2.0±0.3, P < 0.05); 同时, DEN 模型组的 HGF 表达水平与 DEN 模型组相比也显著升高(3.5±0.5 vs 2. 0±0. 3, P < 0.05)。TGF-β 在 3 组之间的表达 情况与 HGF 类似,与对照组相比,DEN 模型组的 TGF-β 表达水平(4.0±0.6, P < 0.05)显著升高, DEN 模型干预组也显著升高(2.5±0.4, P < 0.05);同 时,DEN 与 DEN 模型组相比也显著升高(4.0±0.6 vs 2.5±0.4, P < 0.05)。同样地,与对照组的 α-SMA 表达量相比,DEN 模型组(3.8±0.4)和 DEN 模型干 预组(2.2±0.2)的表达水平均显著升高(P < 0.05), 而 α-SMA 在 DEN 模型组的表达水平也显著高于 DEN 模型干预组(3.8±0.4 vs 2.2±0.2, P < 0.05)。



图 2 各组间不同因子 Western blot 结果 Fig. 2 Western blot results of different factors among each group

表 2 各组大鼠模型中不同因子在肝脏中的表达量对比 Table 2 Comparison of expression levels of different molecules in the liver of rat models in each group

因子	対照组 (n=10)	DEN 模型组 (n=10)	DEN 模型 干预组(n=10)	P1	P2	P 3		
HGF	$1.01 \pm 0.15$	$3.56 \pm 0.51$	$2.08 \pm 0.37$	<0.001	<0.001	0.027		
TGF-β	$1.03 \pm 0.17$	$4.09 \pm 0.62$	$2.59 \pm 0.43$	<0.001	<0.001	0.031		
a-SMA	$1.08 \pm 0.11$	$3.83 \pm 0.45$	$2.21 \pm 0.22$	<0.001	<0.001	0.029		
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·								

注: P1: DEN 模型组 vs 对照组; P2: DEN 模型十 顶组 vs 对照组; P3: DEN 模型组 vs DEN 模型干预组。

# 3 肠道菌群组成结构分析

16S rRNA 基因测序分析显示,各组大鼠模型肠 道菌群门水平(Phylum)前10 丰度占比的群菌分别为 疣微菌门、厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、 肠杆菌门、梭杆菌门、酵母菌门、螺旋菌门和保形菌门 (图 3)。生物多样性分析结果显示,DEN 模型组大鼠 的肠道菌群与对照组和干预组相比,Chao1(36.30± 5.09 vs 44.62±4.36,P < 0.05)和 Shannon(4.25± 0.33 vs 5.99±0.43,P < 0.05)多样性指数均显著降 低(图 4)。对照组与干预组的 Chao1(44.62±4.36 vs 36.30±5.09,P > 0.05)和 Shannon(5.99±0.43 vs 5.56±0.58,P > 0.05)指数相比无明显的统计学差异 (图 4)。











对肠道菌群的门水平丰度进行差异分析的结果显示(图 5), DEN 模型组与对照组和干预组相比, 拟杆

菌门和放线菌门的丰度显著减少约 2.52%和 3.26%, 以及 1.98%和 2.17%(P<0.05,表 3),而厚壁菌门、 疣微菌门和变形菌门的丰度显著增加 3.29% 和 4.4%,2.18%和 2.8%,以及 2.62%和 1.91%(P< 0.05,表 3)。主坐标分析结果显示 3 组模型之间的肠 道微生物组成的各自聚类趋势明显(图 6),提示接受 3 种不同干预的大鼠模型的肠道微生物组成存在明显差 异。LEfSe 分析对比 3 组模型中存在显著丰度差异的 微生物群落,结果亦显示出了各组之间的肠道菌群特 征(图 7)。

表 3 各组大鼠模型中门水平(Phylum)肠道菌群丰度对比 Table 3 Comparison of intestinal flora abundance at the phylum level in each group of rat models

		0	<u> </u>			
肠道菌群	对照组	DEN 模型组	DEN 模型干预组	P1	P 2	P 3
保形菌门	10.25 $\pm$ 1.6	$10.16 \pm 1.56$	9.64±1.90	0.152	0.863	0.421
厚壁菌门	$11.04 \pm 1.42$	$14.33 \pm 1.53$	$9.93 \pm 1.50$	0.688	0.021	0.002
变形菌门	$9.00 \pm 1.54$	$11.62 \pm 2.05$	9.71±1.32	0.621	0.018	0.007
拟杆菌门	$9.60 \pm 1.10$	$7.08 \pm 1.75$	$10.34 \pm 1.35$	0.123	0.026	0.022
放线菌门	$9.94 \pm 0.95$	$8.05 \pm 1.64$	$10.22 \pm 2.27$	0.848	0.015	0.006
梭杆菌门	10.87 $\pm$ 0.79	$9.76 \pm 1.72$	$9.25 \pm 1.10$	0.247	0.629	0.290
疣微菌门	$9.65 \pm 1.07$	$11.83 \pm 1.86$	9.03±1.41	0.433	0.003	0.013
肠杆菌门	10.26 $\pm$ 1.38	$9.38 \pm 2.24$	$10.33 \pm 2.08$	0.537	0.434	0.182
螺旋菌门	$10.06 \pm 1.34$	$9.62 \pm 1.81$	$10.16 \pm 1.49$	0.554	0.616	0.216
酵母菌门	9.34±1.86	9.18±1.59	$11.39 \pm 1.03$	0.531	0.675	0.219

P1: DEN 模型组 vs 对照组; P2: DEN 模型干预组 vs 对照组; P3: DEN 模型组 vs DEN 模型干预组。



图 5 各组大鼠模型样本中门水平(Phylum)肠道菌群的 丰度差异聚类热图(图中数值为 z-score 归一化后的相对丰度值) Fig. 5 Clustering heat map of the abundance differences of intestinal flora at the phylum level in rat model samples from each group (the values are the relative abundance values after z-score normalization)

# 4 短链脂肪酸含量

此外,GC-MS 分析结果表明,与对照组相比, DEN 模型组中的丙酸(1.03±0.21 mmol/L vs 0.52 ±0.19 mmol/L,P < 0.05)和异戊酸(0.85±0.17 vs 0.36±0.054 mmol/L,P < 0.05)含量均有显著降低 (表 4)。同时,DEN 模型干预组大鼠粪便中的丙酸 (0.80±0.21 mmol/L vs 0.52±0.19 mmol/L,P < 0.05)和异戊酸(0.64±0.19 mmol/L vs 0.36±0.054 mmol/L,P < 0.05)含量较 DEN 模型组显著恢复(表 4)。乙酸和丁酸的含量在3组模型鼠之间对比未发现 明显的统计学差异(P > 0.05)。



图 6 各组大鼠模型样本肠道菌群操作分类单元(OTU) 主坐标分析结果





从中心向外辐射的圆圈代表分类级别。节点的大小代表物种的相 对丰度。各组之间没有显着差异的物种的节点统一为黄色。其余节点 的颜色对应于图中指定的组颜色。例如,红色节点表示该分类单元在 组间具有显着差异,并且在对照组中丰度最高。

图 7 各组间 LDA 效应大小分析 Cladogram 图 Fig. 7 Cladogram plot of LDA effect size analysis between groups

表 4 通过 GC-MS 鉴定的各组间短链脂肪酸含量对比 Table 4 Comparison of short-chain fatty acid content between 3 groups identified by GC-MS

serveen e groups haenninea sy die sits								
短链脂肪酸	对照组	DEN 模型组	DEN 模型干预组	P1	P2	P 3		
丙酸含量 (mmol/L)	1.03±0.21	0.52±0.19	0.80±0.21	<0.001	0.018	0.012		
异戊酸含量 (mmol/L)	0.85±0.17	0.36±0.054	0.64±0.19	<0.001	0.002	0.033		

P1:DEN 模型组 vs 对照组:P2:DEN 模型干预组 vs 对照组:P3:DEN 模型组 vs DEN 模 型干预组。 Pearson 相关性分析显示异戊酸和丙酸的含量与 丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)显著 负相关;同时,异戊酸的含量与γ-谷氨酰转肽酶 (GGT)显著负相关(图8)。此外,对3组大鼠模型肠 道菌群的优势菌种与短链脂肪酸的含量进行 Spearman 相关性分析结果显示,异戊酸与拟普雷沃 氏菌属、拟杆菌属和 Muribaculaceae 菌属呈正相关 (图9)。



红色代表相关,蓝色代表相关,颜色越深代表相关强度越大。 图 8 SCFA 与血清生化参数之间 Spearman 相关性热图 Fig. 8 Spearman correlation heat map between SCFA and serum biochemical parameters



红色代表相关,蓝色代表相关相关性,颜色越深表示相关性越强。 图 9 各组大鼠模型中前 10 种肠道优势菌群与短链脂肪酸 SCFA 的 Spearman 相关性热图 Fig. 9 Spearman correlation heat map of the top 10 dominant intestinal flora and short-chain fatty acids SCFA in each group of rat models

# 讨 论

本研究结果显示,DEN 处理显著加剧了大鼠的肝 损伤,肝功能生化指标(ALT、AST、ALP、GGT)及肝 脏病理学变化都证实了这一点。这些结果与其他使用 DEN 诱导的肝癌模型的研究结果一致,证实了 DEN 是一个有效的肝致癌剂,能够在大鼠中复制与人类肝 癌相似的发病过程<sup>[18-19]</sup>。值得注意的是,在 DEN 模 型干预组中,益生菌的应用显著减轻了 DEN 引起的 肝脏损伤,生化指标和分子标记物(HGF、TGF-β和α-SMA)的水平显著下降。这一现象提示,干预措施可 能通过改善肠道微生物群来施展其保护作用,这与肠 肝轴的概念相符合,后者指出肠道微生物群的失衡与 肝脏疾病密切相关<sup>[14,20]</sup>。肠道微生物组的变化与肝 脏病变之间的联系已经在多项研究中得到了证实,特 别是对于肠道微生物组产生的 SCFAs,其对肝功能的 保护作用已经被广泛报道<sup>[21]</sup>。

在本研究中,DEN 模型组的肠道微生物组的多样 性显著下降,这可能是由于 DEN 的毒性效应及其对 肝脏代谢的影响,进而影响了肠道环境。而益生菌的 干预恢复了肠道微生物多样性,并显著改变了微生物 丰度,这可能与益生菌对肠道微生物生态平衡的正面 影响有关。短链脂肪酸(SCFAs)是肠道菌群发酵膳食 纤维的产物,对于维持肠道健康和调节免疫系统具有 至关重要的作用<sup>[22]</sup>。本研究中, DEN 模型组大鼠 SCFA 的含量显著降低,特别是丙酸和异戊酸。这些 变化可能与肠道菌群组成的改变有关,研究指出,特定 的微生物群落如拟杆菌门和放线菌门与 SCFA 的产 生密切相关<sup>[23-24]</sup>。在 DEN 模型干预组中,益生菌的 投给显著提高了丙酸和异戊酸的水平,这一发现表明 益生菌可能通过促进特定产酸菌群的增长而改善了 SCFA 的产生。此外, SCFA 含量与肝脏损伤指标 (ALT 和 AST)呈负相关,这支持了 SCFAs 对肝脏有 保护作用的假设,并可能通过抑制炎症反应和调节代 谢途径实现<sup>[25-26]</sup>。HGF、TGF-β和α-SMA的表达水 平在 DEN 模型组中显著升高,与肝脏损伤和纤维化 程度相关。HGF 是肝细胞生长因子,通常在肝脏再生 和修复中起作用,但在肝脏疾病进展中也可能升 高<sup>[27]</sup>。TGF-β 是一种多功能细胞因子,其在肝纤维化 和肝癌发展中的促进作用已得到广泛研究证实[28]。 α-SMA 是肌肉细胞的标记物,其表达的增加通常与肝 脏纤维化相关[29]。

在 DEN 模型干预组中,益生菌的应用降低了这 些分子标记物的表达,表明益生菌可能通过抑制肝脏 病理过程中的关键信号途径来发挥其抗肝癌效应。本 研究中,DEN 处理导致的肠道微生物组结构的变化, 尤其是厚壁菌门、疣微菌门和变形菌门的丰度增加,拟 杆菌门和放线菌门的丰度减少,这可能与肝癌的发展 过程有关。先前的研究也表明,肠道微生物失衡与肝 癌发展密切相关<sup>[30]</sup>。益生菌的干预可能通过恢复肠 道微生物的正常平衡,降低了肠道菌群引起的炎症和 其他肝癌相关的代谢途径,从而发挥了其抗致癌效应。 尽管本研究提供了益生菌干预在 DEN 诱导的肝癌大 鼠模型中的潜在效果,但仍存在一些限制和未解决的 问题。未来的研究需要在更大的样本量上进行验证, 并探索不同种类的益生菌对肠道微生物组和 SCFA 代谢的具体影响。此外,肠道微生物组与宿主肝脏之 间的相互作用机制,以及 SCFAs 的具体代谢途径在肝 癌发展中的作用仍需深入研究。探索益生菌对肝癌治 疗的长期影响和潜在的副作用也同样重要。

综上所述,DEN 诱导的肝癌前期病变中,肠道微 生物组和 SCFA 代谢途径的动态变化对肝癌发展具 有重要影响,而益生菌干预具有改善肠道微生物组成、 增加 SCFA 产量、降低肝损伤标志物、抑制纤维化和 肝癌相关分子标记物表达的潜力。本研究的发现为预 防和治疗肝癌提供了新的生物学基础,并为未来相关 领域的深入研究指明了方向。

#### 【参考文献】

- [1] Huang DQ, Singal AG, Kono Y, et al. Changing global epidemiology of liver cancer from 2010 to 2019: NASH is the fastest growing cause of liver cancer[J]. Cell Metab, 2022, 34 (7):969-977, e962.
- [2] Zhao L,Zhang X,Coday M,et al. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverages and risk of liver cancer and chronic liver disease mortality[J]. JAMA,2023,330(6):537-546.
- [3] Li X, Ramadori P, Pfister D, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer. Nat Rev Cancer, 2021, 21(9):541-55710.
- [4] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1):610.
- [5] Behary J, Amorim N, Jiang XT, et al. Gut microbiota impact on the peripheral immune response in non-alcoholic fatty liver disease related hepatocellular carcinoma [J]. Nat Commun, 2021,12(1):187.
- [6] Zhang X, Coker OO, Chu ES, et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites[J]. Gut, 2021, 70(4):761-774.
- [7] 裴盛斐,李玉红,孟春燕,等. 基于 16S rDNA 测序技术分析吡嗪 酰胺致肝损伤大鼠肠道菌群的变化[J].中国病原生物学杂志, 2023,18(9):1000-1004,1011.
- [8] 杨荣,张形心,钱莉. 短链脂肪酸抗癌机制研究进展[J]. 中国肿 瘤临床,2022,49(8):417-421
- [9] Liu ZH, Bai MJ, Li JQ, et al. Correlation between inflammatory cytokines and liver cancer stem cell markers in DEN-induced liver cancer rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(2): 710-721.
- [10] Sawong S, Pekthong D, Suknoppakit P, et al. Calotropis gigantea stem bark extracts inhibit liver cancer induced by diethylnitrosamine[J]. Sci Rep. 2022, 12(1):12151.
- [11] You Y, Zhu F, Li Z, et al. Phyllanthin prevents diethylnitrosamine (DEN) induced liver carcinogenesis in rats and induces apoptotic cell death in HepG2 cells[J]. Biomed Pharmacother,2021,137:111335.

- [12] 石明亮,王晓磊,申洋,等. 茯苓酸调节 Hippo 信号通路对二乙 基亚硝胺诱导的肝癌大鼠的治疗作用研究[J]. 天津中医药, 2024,41(1):99-105
- [13] Bragazzi MC, Venere R, Vignone A, et al. Role of the gut-liver axis in the pathobiology of cholangiopathies: Basic and clinical evidence[J]. Int J Mol Sci,2023,24(7):6660.
- [14] Pabst O, Hornef MW, Schaap FG, et al. Gut-liver axis: barriers and functional circuits [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023,20(7):447-461.
- [15] 朱会明,张华,王敏,等. 基于肠肝轴中医药调节肠道菌群治疗肝 细胞癌作用机制研究进展[J].中医药临床杂志,2023,35(4): 803-808
- [16] 李莹莹,纪巧荣. 肠道菌群及其代谢物短链脂肪酸与肠黏膜免疫 关系的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2023,51(6):67-73
- [17] Hu T, Wu Q, Yao Q, et al. Short-chain fatty acid metabolism and multiple effects on cardiovascular diseases[J]. Ageing Res Rev, 2022, 81:101706.
- [18] Kurma K, Manches O, Chuffart F, et al. DEN-induced rat model reproduces key features of human hepatocellular carcinoma[J]. Cancers (Basel),2021,13(19):4981.
- [19] 王靳琎,李雪莹,易进科,等.小鼠原发性肝癌模型的建立[J]. 中国应用生理学杂志,2022,38(6):820-823.
- [20] Zhang M, Xiao B, Chen X, et al. Physical exercise plays a role in rebalancing the bile acids of enterohepatic axis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Acta Physiol (Oxf), 2024, 240 (1): e14065.
- [21] Yin Y, Sichler A, Ecker J, et al. Gut microbiota promote liver regeneration through hepatic membrane phospholipid biosynthesis[J]. J Hepatol, 2023, 78(4):820-835.
- [22] You H, Tan Y, Yu D, et al. The therapeutic effect of SCFA-

mediated regulation of the intestinal environment on obesity[J]. Front Nutr,2022,9:886902.

- [23] Agnihotri N, Mohajeri MH. Involvement of intestinal microbiota in adult neurogenesis and the expression of brain-derived neurotrophic factor[J]. Int J Mol Sci,2022,23(24):15934.
- [24] Liu W, Li X, Zhao Z, et al. Effect of chitooligosaccharides on human gut microbiota and antiglycation[J]. Carbohydr Polym, 2020,242:116413.
- [25] Zietek M, Celewicz Z, Kikut J, et al. Implications of SCFAs on the parameters of the lipid and hepatic profile in pregnant women[J]. Nutrients, 2021, 13(6):1749.
- [26] Zhou Q, Gu R, Xue B, et al. Phenyl lactic acid alleviates Samonella typhimurium-induced colitis via regulating microbiota composition, SCFA production and inflammatory responses[J]. Food Funct, 2021, 12(12):5591-5606.
- [27] Elias G, Schonfeld M, Saleh S, et al. Sepsis-induced endothelial dysfunction drives acute-on-chronic liver failure through Angiopoietin-2-HGF-C/EBPbeta pathway [J]. Hepatology, 2023,78(3):803-819.
- [28] Siapoush S, Rezaei R, Alavifard H, et al. Therapeutic implications of targeting autophagy and TGF-beta crosstalk for the treatment of liver fibrosis[J]. Life Sci,2023,329:121894.
- [29] Liao X, Ruan X, Yao P, et al. LncRNA-Gm9866 promotes liver fibrosis by activating TGFbeta/Smad signaling via targeting Fam98b[J]. J Transl Med,2023,21(1):778.
- [30] Zhang H, Wu J, Li N, et al. Microbial influence on triggering and treatment of host cancer; An intestinal barrier perspective [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(6); 188989.

【收稿日期】 2024-03-06 【修回日期】 2024-05-26

(上接760页)

- [3] 栾雅静,郑旭,仇晓菲.小细胞肺癌干细胞和肿瘤组织中 HIF-1α
   和 HIF-2α的表达及意义[J].临床与实验病理学杂志,2017,33
   (8):868-874.
- [4] Zhang H, Yang Q, Lian X, et al. Hypoxia-Inducible factor-lalpha (hif-lalpha) promotes hypoxia-induced invasion and metastasis in ovarian cancer by targeting matrix met allopeptidase 13(MMP13)
   [J]. Med Sci Monit, 2019, 25:7202-7208.
- [5] Wang X,Zhao D,Xie H,et al. Interplay of long non-coding RNAs and HIF-1alpha: A new dimension to understanding hypoxiaregulated tumor growth and metastasis[J]. Cancer Lett, 2021, 499:49-59.
- [6] 何玉婷,李娟,孙冉冉,等. 靶向 HIF-1α 基因的 CRISPR/Cas9 基因敲除质粒的构建与鉴定[J]. 郑州大学学报(医学版),2016,51 (3):293-297.
- [7] Vu M, Yu J, Awolude OA, et al. Cervical cancer worldwide[J].Curr Probl Cancer, 2018, 42(5): 457-465.
- [8] Sun X, Shu Y, Ye G, et al. Histone deacetylase inhibitors inhibit cervical cancer growth through Parkin acetylation-mediated mitophagy[J]. Acta Pharm Sin B,2022,12(2):838-852.
- [9] Chakraborty C, Mitra S, Roychowdhury A, et al. Deregulation of LIMD1-VHL-HIF-1α-VEGF pathway is associated with different stages of cervical cance[J]. Biochem J,2018,475(10):1793-1806.

- [10] Zhou TJ, Huang XH, Gong L, et al. Vasculogenic mimicry and hypoxia-inducible factor-1α expression in cervical squamous cell carcinoma[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(1):15017396.
- [11] Tang NN,Zhu H,Zhang HJ,et al. HIF-1α induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol,2014,20(47):17894-904.
- [12] Zhang JG, Zhou HM, Zhang X, et al. Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma; role of HIF-1 α, RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling [J]. BMC Cancer, 2020,20(1):32.
- [13] 帕热哈提江·依孜木,麦伍兰江·阿卜杜热西提,阿布都克尤木 •阿布都吉力力. HIF-1α促进恶性脑膜瘤血管发生的分子机制 [J]. 医学分子生物学杂志,2023,20(5):390-396.
- [14] 宋熙雯,唐燚,宋朝卉,等. 低氧状态下 HIF-1a 对骨细胞凋亡的 影响[J]. 口腔颌面外科杂志,2020,30(6);369-375.
- [15] 岑兴,廖楚航,费伟,等. HIF-1αRNAi对口腔鳞癌生长以及血管 生成影响的研究[J]. 实用口腔医学杂志,2021,37(4):482-486.
- [16] Conde ES, Gimenez-Moyano L, Martin-Gomez, et al. HIF-1alpha induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41099.

【收稿日期】 2024-01-16 【修回日期】 2024-04-05