

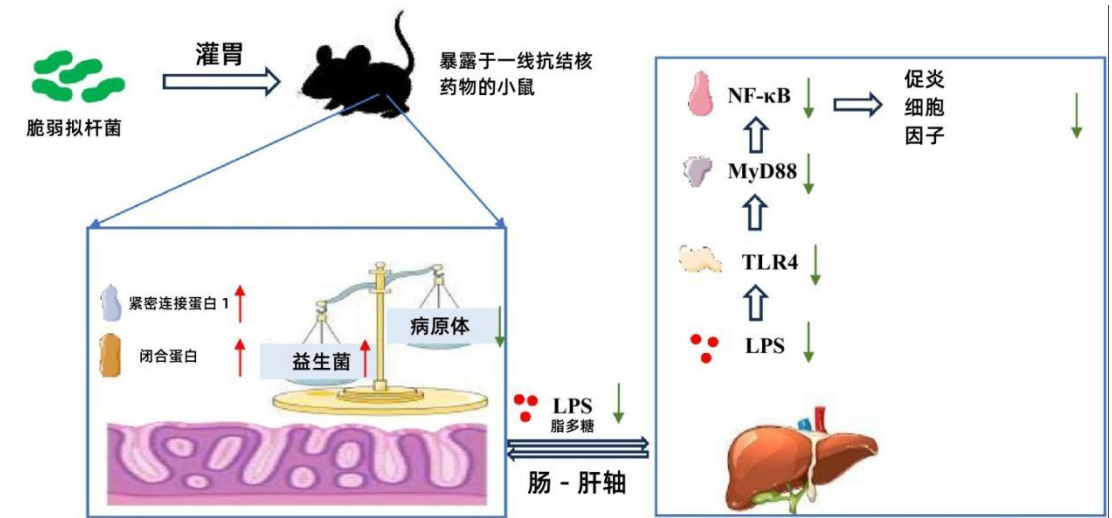
脆弱拟杆菌 839 通过抑制炎症和调节肠道菌群减轻抗结核药物诱导的小鼠肝损伤

李秋娟 1†; 吴晨冰 1†; 张康帅 1; Ziyi Zhou 1; Jing Li 2; 白洁 1; 曹军 3; 史晓霞 1*

- 1 大连医科大学公共卫生实验教学中心, 中国大连
2 大连医科大学病理学与法医学教研室, 中国大连
3 大连医科大学职业与环境健康教研室, 中国大连

抗结核药物性肝损伤 (ATB-DILI) 由一线抗结核药物引发, 会中断治疗并增加耐药风险。肠道菌群和肠屏障完整性通过肝-肠轴在 ATB-DILI 易感性中起关键作用。脆弱拟杆菌 839 (BF839) 等益生菌在调节肠道菌群和炎症反应方面显示出治疗潜力。本研究通过 HRZE 诱导的肝损伤小鼠模型, 探讨了 BF839 对 ATB-DILI 的保护作用。BF839 干预显著减轻 HRZE 诱导的肝损伤, 表现为降低 ALT、AST、AKP 和 MDA 水平, 提升 SOD 和 GSH 水平, 并改善肝脏组织病理学。这些效应与肠道菌群多样性恢复、肠屏障功能增强及炎症反应减轻相关。本研究提示 BF839 或可作为 ATB-DILI 的潜在预防策略。

图表摘要



图表摘要。脆弱拟杆菌 839 (BF839) 可通过调节脂多糖 (LPS) /Toll 样受体 4 (TLR4) /NF-κB 信号通路, 恢复肠道菌群平衡、改善肠屏障功能并抑制炎症反应, 从而对异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇 (HRZE) 诱导的肝损伤产生保护作用。

研究亮点

- 脆弱拟杆菌 839 (BF839) 能有效缓解小鼠 ATB-DILI
- BF839 可恢复肠道菌群平衡并修复肠屏障
- BF839 通过下调 LPS/TLR4/NF- κ B 通路抑制炎症反应

1 引言

结核病 (TB) 是由结核分枝杆菌引起的传染病, 仍是重大公共卫生问题, 对人类健康构成严重威胁 (1)。目前大多数结核病患者对标准 HRZE 方案 (含异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇的 2 个月疗程, 后续 4 个月利福平和异烟肼联用) 反应良好 (2)。但长期抗生素治疗常导致多种药物不良反应, 其中抗结核药物性肝损伤 (ATB-DILI) 最为常见且严重。研究显示多数 ATB-DILI 患者出现肝酶升高, 严重者可导致腹水和凝血功能障碍 (3)。抗结核治疗期间 ATB-DILI 发生率为 2.0-28.0%, 中国发病率更高 (9.5-14.4%) (4,5)。ATB-DILI 是导致治疗中断/失败及产生耐药性的关键因素。

肠道菌群包含 1000 多种细菌、真菌、古菌、寄生虫和病毒, 其中细菌占主导 (6)。人类肠道菌群核心菌门为厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门, 其微生物总量高达 1000 亿。肠道菌群与宿主共生, 其组成变化反映宿主疾病进展。最新研究揭示了肠道菌群与药物性肝损伤 (DILI) 的关联, 包括对乙酰氨基酚和他克林诱导的肝损伤 (7,8)。此外, 抗结核药物治疗可能引发肠道菌群失调、破坏肠屏障功能, 促使有害菌迁移至肝脏, 从而破坏肝脏免疫稳态并加剧肝损伤。Namasivayam 等报道结核分枝杆菌感染小鼠仅出现轻微肠道菌群改变 (9), 而抗结核治疗导致的肝损伤则引起显著变化, 包括有益菌减少和条件致病菌增加 (10)。ATB-DILI 后, FITC-葡聚糖和紧密连接蛋白 Occludin 等肠屏障标志物减少, 内毒素和炎症标志物则急剧升高 (11)。这些发现表明 DILI 与肠道菌群失调存在双向关系, 菌群失衡会加速 DILI 进展。因此, 恢复肠道菌群多样性可能成为 DILI 的新型治疗策略。

益生菌被认为能有效调节胃肠功能、修复肠黏膜屏障、调节免疫功能并抑制有害菌生长。研究表明益生菌对 DILI 具有改善作用。例如在动物模型中, 鼠李糖乳杆菌可激活抗氧化因子 Nrf2, 减轻乙醇和对乙酰氨基酚引起的肝损伤 (12)。阿克曼菌及其外泌囊泡也通过调节肠道通透性和肠道免疫, 减轻 CCL4 和布洛芬诱导的肝损伤 (13,14)。因此益生菌是 DILI 的潜在辅助治疗手段, 但目前针对 ATB-DILI 的研究较少。

脆弱拟杆菌 (*B. fragilis*) 是下消化道必需的专性厌氧菌, 存在产肠毒素和非产肠毒素两种亚型。产肠毒素亚型与腹泻性疾病相关 (15,16)。非产肠毒素菌株如脆弱拟杆菌 839 (BF839) 被视为潜在益生菌, 可减轻结肠炎症。BF839 在预防肿瘤患者化疗所致胃肠道副作用和骨髓抑制方面已显示疗效 (17,18)。该菌株还能通过调节细胞因子表达和肠道菌群平衡, 对银屑病发挥抗炎作用 (17,18)。最新研究表明 BF839 或可改善自闭症谱系障碍相关胃肠问题 (19)。因此我们推测 BF839 可能改善 ATB-DILI 相关胃肠症状并纠正肠道菌群失衡, 成为 ATB-DILI 防治的候选菌株。本研究通过建立小鼠模型, 采用蛋白质印迹法和苏木精-伊红 (H&E) 染色评估肝损伤及胃肠屏障功能, 并通过 16S rRNA 基因测序分析肠道菌群组成与多样性, 以证实 BF839 作为 DILI 患者益生菌的潜力。

2 材料与方法

2.1 动物处理

本研究中 BF839 由大连图腾生命科技发展有限公司无偿提供。

30 只 C57BL/6J 雄性小鼠（8 周龄）购自辽宁长生生物技术有限公司。小鼠自由饮水，饲料配方见表 1。饲养于 SPF 级屏障环境，温度控制在 22-26℃，日温差不超过 4℃。实验期间相对湿度维持在 40-70%，空气洁净度保持 7 级。噪声控制在 60 dB 以下，采用 12 h 光照/黑暗循环。所有动物实验均遵循 NIH 指南，并经大连医科大学动物实验伦理委员会批准（许可证号：AEE23078）。

表 1

成分	质量 (g/kg)
酪蛋白	200
L - 胱氨酸	3
蔗糖	100
玉米淀粉	397.486
葡萄糖	132
大豆油	70
纤维素	50
矿物质混合物	35
维生素混合物	23.2
总计	1000.0

表 1. 标准饲料配方

正式实验开始前，小鼠适应性喂养 1 周。随后将小鼠随机分为三组：对照组、HRZE 组和 HRZE+BF839 组。对照组小鼠灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠溶液，4 小时后给予 0.9%生理盐水；HRZE 组给予含 0.15 g/kg 异烟肼、0.3 g/kg 利福平、0.63 g/kg 吡嗪酰胺和 0.38 g/kg 乙胺丁醇的 HRZE 混合液（溶于 0.5%羧甲基纤维素钠溶液），4 小时后给予 0.9%生理盐水；HRZE+BF839 组给予 HRZE 混合液后，灌胃溶于蒸馏水的 BF839 菌液（>10⁹ CFU/天/只）。所有动物连续灌胃给药 6 周，末次给药次日早晨处死。收集血清、肝脏、结肠组织及粪便样本，保存于-80℃ 备用。

2.2 天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、碱性磷酸酶（AKP）检测

采用血清样本检测以下指标：ALT 和 AST 水平分别使用 ALT 检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号：C009-2-1）和 AST 检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号：C010-2-1）测定；AKP 水平使用 AKP 检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号：A059-2）检测。

2.3 超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）含量检测

使用磷酸盐缓冲液 PBS 提取小鼠肝脏样本总蛋白，检测样本蛋白浓度后进行后续分析。SOD、MDA 和 GSH 水平分别使用商品化试剂盒（碧云天生物技术，中国南通，货号：S0101S；S0131S；S0053）定量检测，所有实验步骤严格遵循制造商说明书。

2.4 苏木精-伊红 (H&E) 染色

C57BL/6J 雄性小鼠处死后立即取肝脏和肠道组织,置于 10%中性缓冲福尔马林中固定。随后进行石蜡包埋并切片,4 μm 厚石蜡切片经脱蜡、水化后进行 H&E 染色。染色切片在光学显微镜下观察分析,并适当调节放大倍数。

2.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

使用添加 1 mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的磷酸盐缓冲液提取小鼠肝脏总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定样本蛋白浓度。使用 ELISA 试剂盒 (联科生物,货号: EK282/4-96; EK201B/3-96; EK206/3-96) 定量检测肝脏肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL) -1 β 和 IL-6 水平。血清脂多糖 (LPS) 水平采用 LPS 检测试剂盒 (瑞信生物科技,货号: RX202425M) 测定。

2.6 蛋白质印迹分析

使用含 1 mM PMSF 的 RIPA 裂解液 (索莱宝, R0020) 提取小鼠肝脏和肠道组织总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号: MK164230) 测定蛋白浓度。样本经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后,转印至 0.45 μm 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore, IPVH00010)。用 10% 脱脂牛奶室温封闭 2 小时,Tris 缓冲盐溶液吐温 20 (TBST) 稀释抗体至推荐浓度。封闭后的膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗 12 小时,室温孵育二抗 1 小时。实验使用抗体如下: β -肌动蛋白 (1:5000, Proteintech, 货号: 66009-1-Ig); Toll 样受体 4 (TLR4) (1:1000, Proteintech, 货号: 66350-1-Ig); 髓样分化因子 88 (MyD88) (1:500, 万类生物, WL02494); 核因子 κB (NF- κB) (1:5000, Abmart, T55034); 磷酸化 NF- κB (p-NF- κB) (ser536) (1:1000, 博奥森, 货号: bs17502R); 紧密连接蛋白 1 (ZO-1) (1:500, 万类生物, WL03419); Occludin (1:1000, 万类生物, WL01996); 山羊抗兔 IgG (1:5000, 博奥森, 货号: bs-0295G-HRP)。

2.7 16S rRNA 测序

分别于第 2 周和第 6 周采集粪便样本。提取并纯化样本 DNA 后,使用通用引物 (16S V3-V4: CCTAYGGGRBGCASCAG, GGACTACNNGGGTATCTAAT) 扩增 16S rRNA V3-V4 区。纯化后的扩增子用于构建测序文库,在 Illumina NovaSeq6000 PE250 平台 (北京诺禾致源科技股份有限公司) 进行测序。¹ 使用 FLASH (V1.2.11) 和 fastp (Version 0.23.1) 软件生成并过滤双端读长,随后通过 QIIME2 软件 (Version QIIME2-202202) 中的 DADA2 插件进行读长合并、去噪并聚类为高可信度的扩增子序列变体 (ASVs)。采用 SILVA 参考数据库进行物种注释。基于 ASV 表进行后续多样性分析,包括 α 和 β 多样性。为分析各组群落多样性、丰富度和均匀度,使用 QIIME2 中的 Shannon 和 Chao1 指数评估 α 多样性;为比较组间群落组成差异,基于非加权 unifracs 距离进行主坐标分析 (PCoA)。 α 多样性统计比较采用单因素方差分析, β 多样性差异通过 PERMANOVA 评估。此外,使用 BMKCloud 平台进行多组学关联分析。²

2.8 统计分析

数据以均值 \pm 标准误 (SEM) 表示。为确保实验可靠性,所有实验至少重复三次。采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,多组间比较使用单因素方差分析 (ANOVA)。肠道菌群数据中, α 多样性通过 Chao1 和 Shannon 指数评估,统计差异采用单因素方差分析结合 Tukey

事后检验进行组间两两比较； β 多样性基于非加权 uniFrac 距离评估，显著性通过 PERMANOVA 判定。 $p < 0.05$ 视为具有统计学显著性。

3 结果

3.1 BF839 减轻 HRZE 诱导的肝损伤

如图 1 所示,HRZE 组血清 ALT、AST、AKP 水平及肝脏指数均显著高于对照组($p < 0.05$),表明 HRZE 处理诱导了肝损伤(图 1A-C)。此外, BF839 处理使 ALT、AST 和 AKP 水平产生显著响应(图 1A-C)。与对照组相比, HRZE 组 MDA 水平升高,而肝组织 SOD 和 GSH 水平显著降低($p < 0.05$)(图 1D-F)。相比之下, BF839 处理小鼠的这些指标均被显著逆转(图 1D-F),表明 BF839 可能对 HRZE 诱导的肝损伤具有保护作用。

图 1

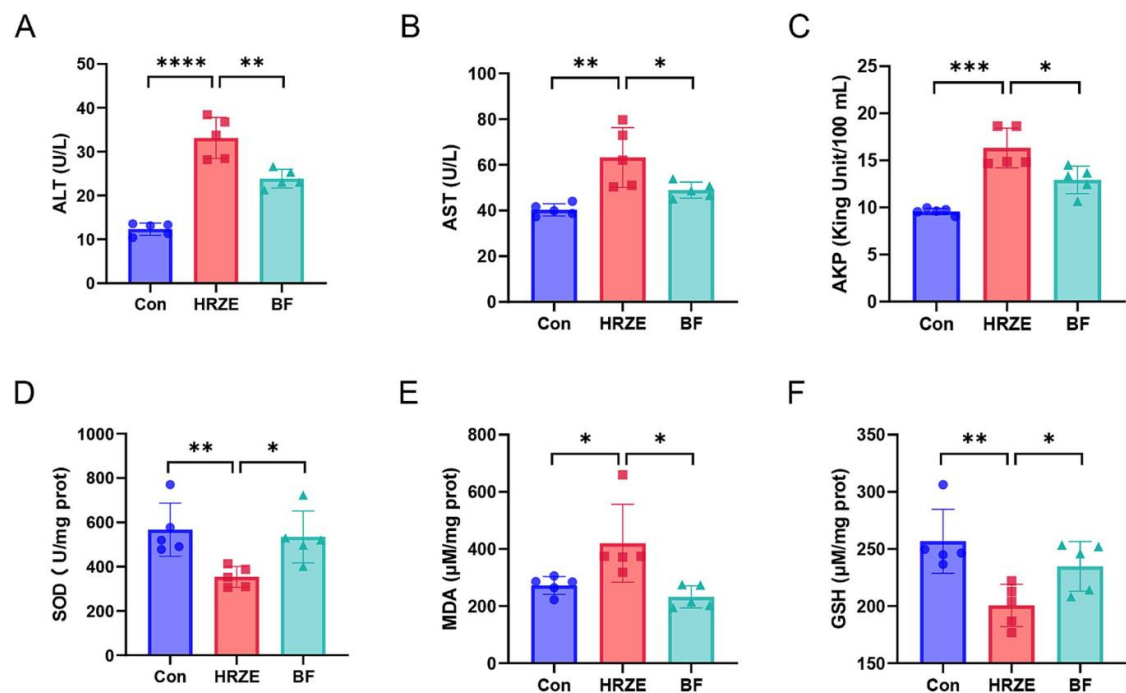


图 1. 脆弱拟杆菌 839(BF839)减轻异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇(HRZE)诱导的肝损伤。(A)血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、(B)天冬氨酸氨基转移酶(AST)和(C)碱性磷酸酶(AKP)水平；(D)肝组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、(E)丙二醛(MDA)和(F)谷胱甘肽(GSH)水平。每组使用 10 只小鼠进行分析。为简化展示，图中显示每组随机选取的 5 只小鼠数据。数值以均值±标准误(SEM)表示。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。Con: 对照组；HRZE: 异烟肼+利福平+吡嗪酰胺+乙胺丁醇模型组；BF: HRZE+BF839 组。

为直观评估 BF839 对肝脏的影响，我们对小鼠肝脏切片进行 H&E 染色(图 2)。对照组中，肝小叶结构完整，大部分肝细胞形态正常，仅少数肝细胞出现轻度水肿。然而 HRZE 组表现出不同程度的肝细胞水肿和轻度脂肪变性，部分肝细胞可见坏死灶，并伴有局灶性炎症细胞浸润。HRZE+BF839 组与 HRZE 组相比，肝细胞水肿和脂肪变性明显减轻，炎症细胞浸润减少。这些结果表明 BF839 对 HRZE 诱导的肝损伤和炎症具有保护作用。

图 2

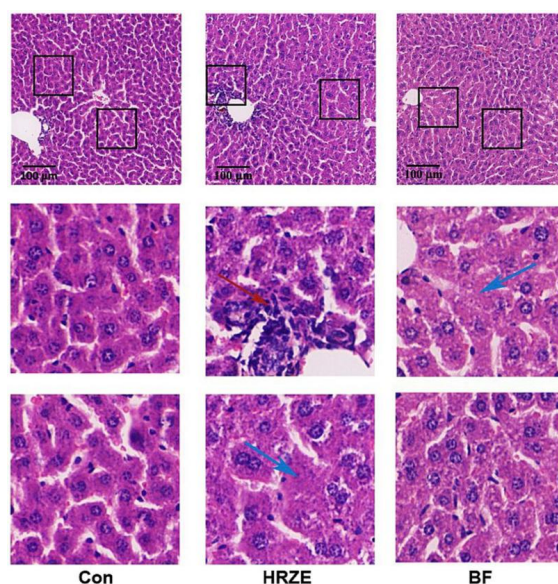


图 2. BF839 减轻肝脏病理改变。肝实质苏木精-伊红(H&E)染色代表性图像(比例尺=100 μm)。蓝色箭头指示脂质空泡；红色箭头代表炎症细胞浸润。Con：对照组；HRZE：异烟肼+利福平+吡嗪酰胺+乙醇丁醇模型组；BF：HRZE+BF839 组。

3.2 BF839 减轻 HRZE 对小鼠肠屏障的负面影响

HRZE 对肠道屏障具有不良影响，而 BF839 对肠道损伤的保护作用需进一步研究。通过 H&E 染色检测病理变化(图 3A)。HRZE 组虽然各层结构正常，但黏膜层杯状细胞数量显著增加，而吸收性结肠细胞和肠道干细胞数量较对照组减少。这表明 HRZE 诱导杯状细胞过度增殖，并促进肠道干细胞向杯状细胞分化，可能用于支持肠道再生和上皮功能(图 3A)。BF839 处理则减轻了杯状细胞的增加(图 3A)。

图 3

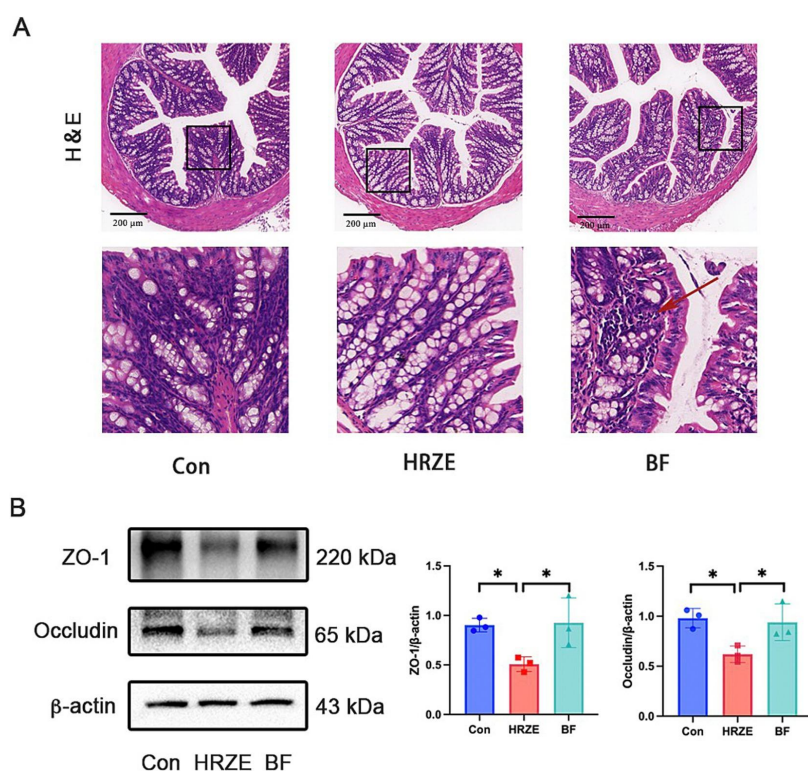


图 3. BF839 改善 HRZE 诱导的肠屏障功能障碍。(A)各组结肠 H&E 染色代表性图像(比例尺=200 μ m)。箭头表示炎症细胞浸润。(B)Western blot 检测结肠组织中紧密连接蛋白 1(ZO-1)和 Occludin 蛋白水平。数据以均值 \pm SEM 表示, 每组 N=3。
* $p < 0.05$ 。Con: 对照组; HRZE: 异烟肼+利福平+吡嗪酰胺+乙胺丁醇模型组; BF: HRZE+BF839 组。

为评估肠屏障功能, 检测各组代表性紧密连接蛋白表达水平(图 3B)。HRZE 组 ZO-1 和 Occludin 蛋白水平较对照组显著下调($p < 0.05$)。BF839 处理显著恢复了 HRZE 组 ZO-1 和 Occludin 蛋白水平($p < 0.05$)。这些结果表明 BF839 减轻 HRZE 诱导的小鼠肠屏障损伤。

3.3 BF839 调节 HRZE 处理小鼠的肠道菌群多样性

作为外源性益生菌, BF839 可能影响肠道菌群组成。为验证该假设, 收集第 2 周和第 6 周小鼠粪便样本进行 16S rRNA 测序分析菌群组成变化。细菌相对丰度数据见附表 S1。与对照组相比, HRZE 组在第 2 周和第 6 周的扩增子序列变体(ASVs)数量(微生物丰富度指标)均显著降低($p < 0.05$, 单因素方差分析)。而 BF839 处理部分恢复了 ASVs 数量, 减轻了 HRZE 的影响(图 4A)。采用分别反映微生物丰富度和多样性的 Chao1 指数与 Shannon 指数评估 α 多样性。第 2 周和第 6 周时, HRZE 组的指数均显著低于对照组($p < 0.05$)。相反, BF 组的指数显著高于 HRZE 组($p < 0.05$), 表明 BF839 改善了 HRZE 处理破坏的微生物多样性(图 4B,C)。基于非加权 UniFrac 距离的主坐标分析(PCoA)评估组间微生物群落组成的 β 多样性差异。第 2 周时, PCoA 图显示 HRZE 组的微生物群落与对照组明显分离($p < 0.05$, PERMANOVA)。HRZE+BF839 组的聚类部分重叠于对照组和 HRZE 组之间, 提示 BF839 将菌群调节至更接近对照组的特征。第 6 周时, HRZE 组和 HRZE+BF839 组的菌群特征仍与对照组轻微分离($p < 0.05$, PERMANOVA), 表明 BF839 对肠道菌群的影响虽减弱但仍持续存在(图 4D,E)。这些结果证明 BF839 可通过改善微生物丰富度和群落结构, 缓解 HRZE 诱导的肠道菌群多样性和组成紊乱。

图 4

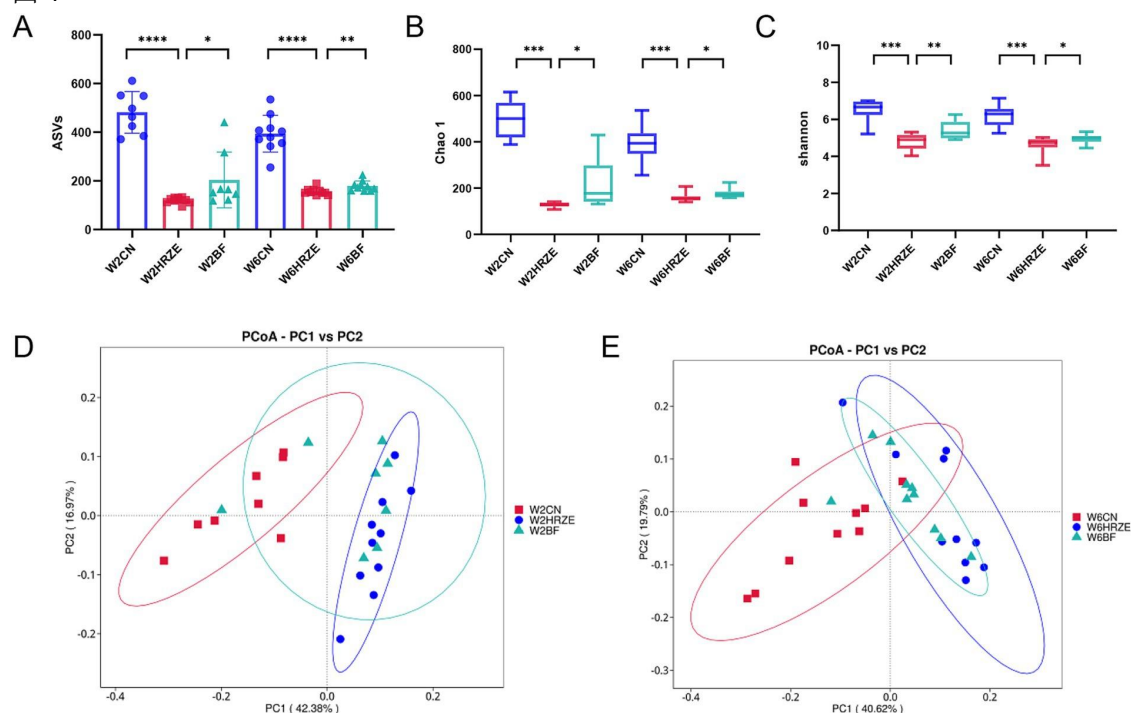


图 4. BF839 恢复 HRZE 诱导的 α 和 β 多样性降低。 α 多样性指标: (A)扩增子序列变体(ASVs)数量, (B)Chao1 指数, (C)Shannon 指数。 β 多样性: (D)第 2 周和(E)第 6 周基于 ASV 水平非加权 UniFrac 距离的主坐标分析(PCoA)。数据以均值 \pm SEM 表

示，每组 N=8。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。Con：对照组；HRZE：异烟肼+利福平+吡嗪酰胺+乙胺丁醇模型组；BF：HRZE+BF839 组。

3.4 BF839 调节 HRZE 处理小鼠的微生物分类谱

如图 5 所示，从门到属水平分析微生物组谱变化。十个最丰富菌门和三十个最丰富菌属显示各组间肠道菌群组成存在显著差异($p < 0.05$ ，单因素方差分析)。

图 5

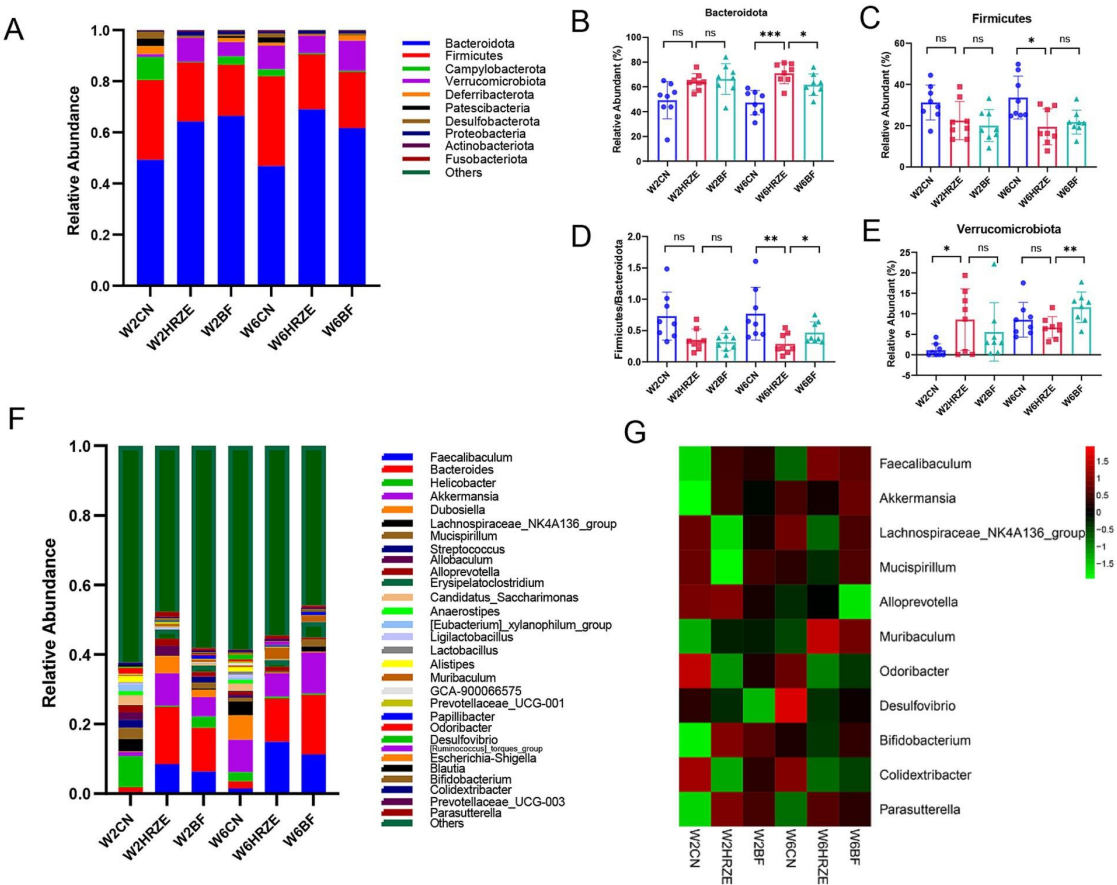


图 5. BF839 调节 HRZE 诱导的肠道菌群组成变化。(A)门水平微生物类群相对丰度，通过粪便样本 16S rRNA 分析确定。门水平肠道微生物类群相对丰度：(B)拟杆菌门(Bacteroidetes)；(C)厚壁菌门(Firmicutes)；(D)厚壁菌门/拟杆菌门(F/B)比值；(E)疣微菌门(Verrucomicrobiota)。(F)属水平物种组成；(G)属水平肠道微生物类群相对丰度。数据以均值 \pm SEM 表示，每组 N=8。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。Con：对照组；HRZE：异烟肼+利福平+吡嗪酰胺+乙胺丁醇模型组；BF：HRZE+BF839 组。

在门水平上，拟杆菌门(Bacteroidota)在所有组别中占比最大(图 5A)。与 Con 组相比，HRZE 处理组在第 2 周和第 6 周时拟杆菌门的相对丰度显著增加($p < 0.05$ ；图 5B)。此外，HRZE 组在第 6 周时厚壁菌门(Firmicutes)的富集显著降低($p < 0.05$ ；图 5C)。补充 BF839 后，与 HRZE 组相比，第 6 周时拟杆菌门的相对丰度显著降低($p < 0.05$ ；图 5B)。HRZE 组的厚壁菌门/拟杆菌门(F/B)比值显著低于对照组($p < 0.05$)，而第 6 周时 BF839 干预使 F/B 比值较 HRZE 组显著升高($p < 0.05$ ；图 5D)。BF839 处理还显著提高了 HRZE 组第 6 周时疣微菌门(Verrucomicrobiota)的相对丰度($p < 0.05$ ；图 5E)。

在属水平上, 观察到 11 个关键菌属的相对丰度发生显著改变, 包括粪杆菌属 (*Faecalibaculum*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、毛螺菌科 NK4A136 组 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、粘螺旋菌属 (*Mucispirillum*)、异普雷沃菌属 (*Alloprevotella*)、鼠杆菌属 (*Muribaculum*)、气味杆菌属 (*Odoribacter*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、纤维杆菌属 (*Colidextribacter*) 和副萨特氏菌属 (*Parasutterella*) (图 5F,G)。具体而言, 与对照组相比, HRZE 组中粪杆菌属、鼠杆菌属和副萨特氏菌属的相对丰度显著增加 ($p < 0.05$), 而阿克曼菌属、毛螺菌科 NK4A136 组、粘螺旋菌属、异普雷沃菌属、气味杆菌属、脱硫弧菌属、双歧杆菌属和纤维杆菌属的相对丰度显著降低 ($p < 0.05$)。BF839 处理则显著提高了阿克曼菌属、毛螺菌科 NK4A136 组、粘螺旋菌属、异普雷沃菌属、气味杆菌属、脱硫弧菌属、双歧杆菌属和纤维杆菌属的丰度, 同时显著降低了粪杆菌属、鼠杆菌属和副萨特氏菌属的丰度 ($p < 0.05$)。这些发现表明 BF839 通过将肠道菌群恢复至更健康的组成来调节 HRZE 诱导的菌群失调。

3.5 BF839 通过 LPS/TLR4/NF- κ B/MyD88 信号通路改善 HRZE 介导的肝脏炎症反应

为评估炎症程度, 检测各组小鼠肝组织中促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。与对照组相比, HRZE 组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著升高 ($p < 0.05$) (图 6A-C)。而 BF839 处理显著降低 ($p < 0.05$) 了 HRZE 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平升高。这些结果表明 BF839 可减轻 HRZE 诱导的小鼠肝组织促炎反应。

图 6

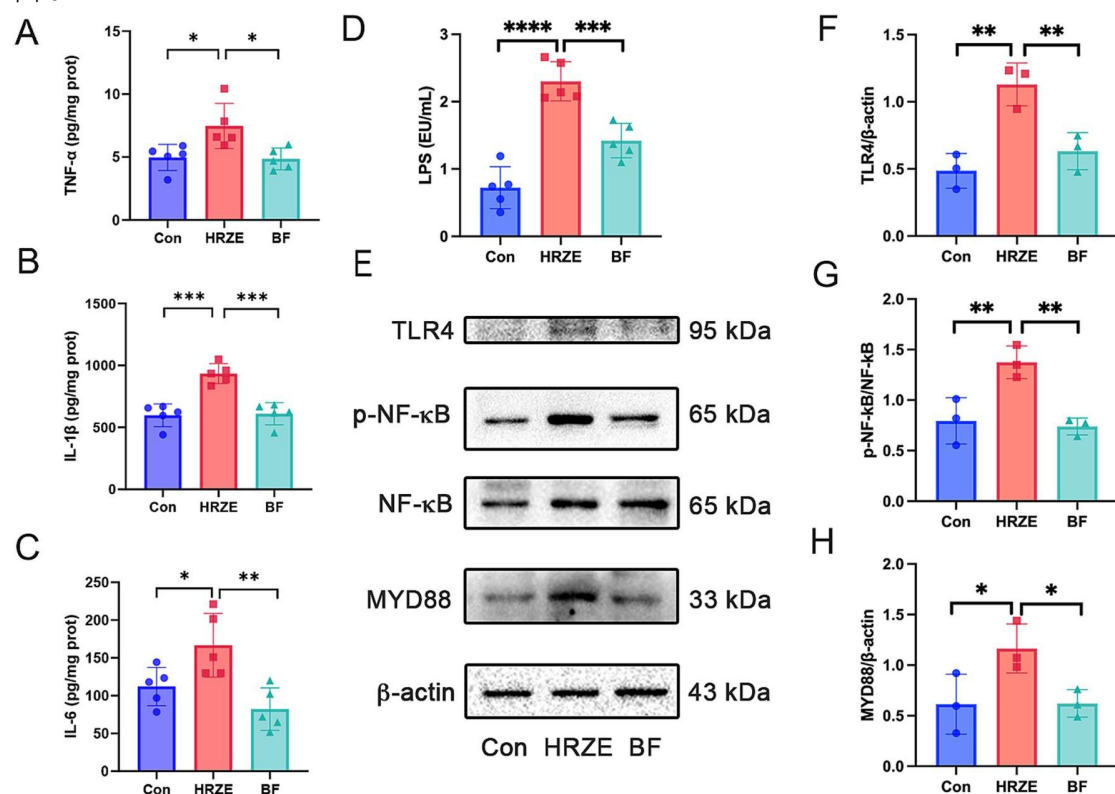


图 6. BF839 抑制 HRZE 诱导的炎症反应及脂多糖(LPS)/Toll 样受体 4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)/髓样分化因子 88(MyD88) 信号通路。(A)肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平; (B)白细胞介素(IL)-6 水平; (C)IL-1 β 水平; (D)血清 LPS 水平; (E)Western blot 检测 TLR4、NF- κ B 和 MyD88 蛋白表达; (F)TLR4 蛋白表达定量分析; (G)NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白表达定量分析; (H)MyD88 蛋白表达定量分析。数据以均值 \pm SEM 表示, LPS 检测每组 N=5, 蛋白表达检测每组 N=3。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。Con: 对照组; HRZE: 异烟肼+利福平+吡嗪酰胺+乙胺丁醇模型组; BF: HRZE+BF839 组。

为探究 HRZE 诱导的促炎反应是否通过 LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路介导，检测小鼠血清 LPS 水平及 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达。HRZE 处理升高血清 LPS 水平，而 BF839 处理显著降低($p < 0.05$)LPS 分泌(图 6D)。此外，HRZE 处理增强 NF- κ B 磷酸化并上调 TLR4 和 MyD88 表达水平，BF839 处理则缓解这些效应(图 6E-H)。这些结果表明 BF839 可能通过抑制 LPS/TLR4/NF- κ B/MyD88 信号通路减轻 HRZE 诱导的肝损伤。

3.6 肠道菌群与血清肝功能、氧化应激及炎症指标的相关性分析

图 7 展示属水平肠道菌群标志物与血清肝功能、氧化应激和炎症指标的相关性分析。脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、毛螺菌科 NK4A136 组(*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)和气味杆菌属(*Odoribacter*)与 ALT、AST 和 AKP 水平呈负相关，与 ZO-1 和 Occludin 呈正相关。相反，粪杆菌属(*Faecalibaculum*)、鼠杆菌属(*Muribaculum*)和副萨特氏菌属(*Parasutterella*)与血清肝功能指标呈正相关，与紧密连接蛋白呈负相关。双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)、毛螺菌科 NK4A136 组、气味杆菌属、异普雷沃菌属(*Alloprevotella*)、粪杆菌属和鼠杆菌属与氧化应激和炎症指标相关。具体而言，双歧杆菌属、阿克曼菌属、毛螺菌科 NK4A136 组和气味杆菌属与 MDA、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 呈负相关，与 SOD 和 GSH 呈正相关。而异普雷沃菌属、粪杆菌属和鼠杆菌属与 MDA、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 呈正相关，与 SOD 和 GSH 呈负相关。关于 LPS/TLR4/NF- κ B 通路，脱硫弧菌属、毛螺菌科 NK4A136 组和气味杆菌属呈负相关，粪杆菌属、鼠杆菌属和副萨特氏菌属则呈正相关。

图 7

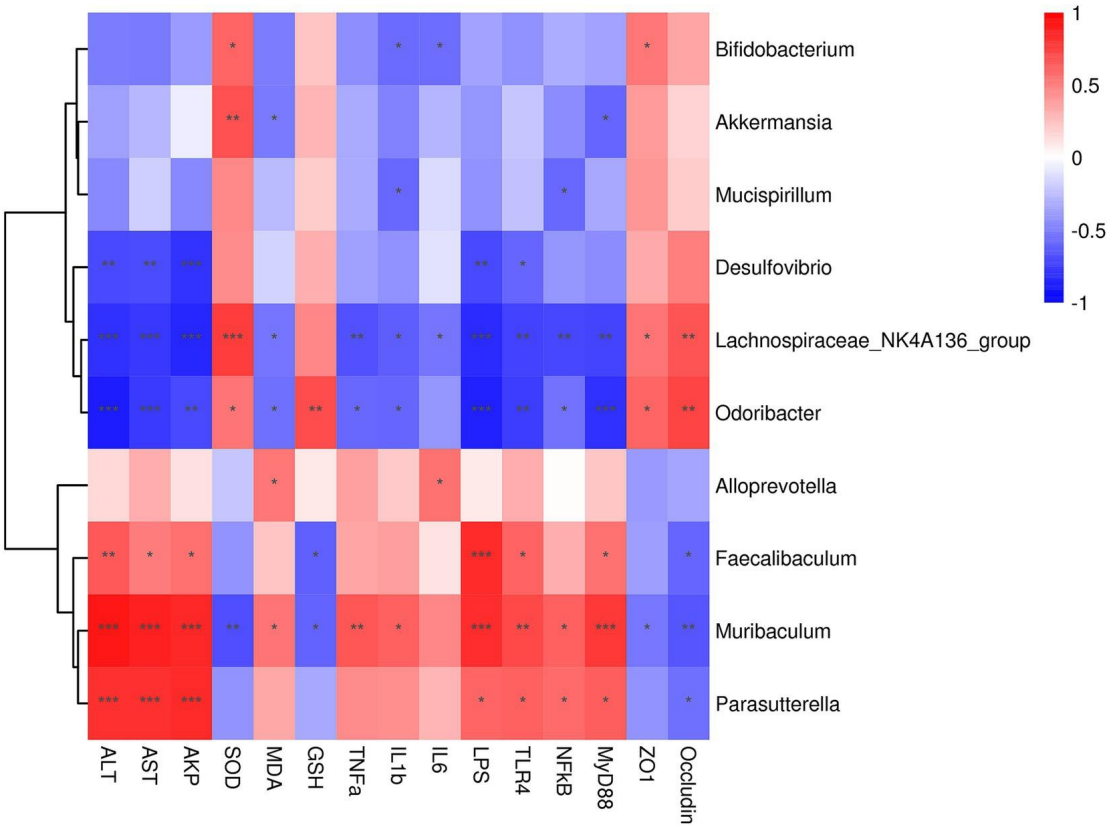


图 7. 属水平肠道微生物与血清肝功能、氧化应激及炎症指标的 Spearman 相关性分析。采用 Spearman 相关分析法对所有组别的肠道菌群与血清肝功能、氧化应激及炎症指标进行相关性分析。每组 N=8。相关系数阈值设为 0.5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

4 讨论

上述数据证实 BF839 可通过纠正肠道菌群失衡和改善肠屏障功能来预防 HRZE 诱导的小鼠肝损伤。ATB-DILI 对结核病的治疗和预后产生不利影响。肠道-肝脏轴代表肠道菌群与肝脏间的相互作用,在肝脏药物代谢中起关键作用,并促进 ATB-DILI 的发生。既往研究表明,包括干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)和鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)在内的多种益生菌可通过恢复肠道菌群失调来改善 ATB-DILI(11,20,21)。本研究通过 HRZE 暴露建立 ATB-DILI 模型,结果显示 BF839 可减轻 HRZE 诱导的肝损伤,表现为降低肝酶(ALT、AST 和 AKP)水平、改善氧化应激标志物(增加 SOD 和 GSH 水平并降低 MDA 水平)、调节肠道菌群组成、修复肠屏障、通过调节 LPS 释放入血和肝脏 TLR4/NF- κ B/MyD88 通路来减轻炎症反应。

血清 ALT 和 AST 水平是肝功能(包括 DILI)的关键敏感指标(3)。本研究中 HRZE 给药显著升高 ALT、AST 和 AKP 水平,并伴有肝脏病理改变。补充 BF839 显著减轻 HRZE 诱导的小鼠肝损伤。氧化应激在 ATB-DILI 中起关键作用(22,23)。抗氧化酶系统(包括 SOD、MDA 和 GSH)常用于评估氧化应激。SOD 活性间接反映机体清除氧自由基的能力,而 MDA 水平可反映脂质过氧化程度。此外,GSH 作为重要的抗氧化剂和自由基清除剂,可增强免疫力并减轻炎症。本研究中 HRZE 处理小鼠肝组织 MDA 水平显著升高,而 SOD 和 GSH 水平显著降低。BF839 处理则降低 MDA 水平并提高 SOD 和 GSH 水平,表明 BF839 可减轻 HRZE 诱导的肝损伤。

肠-肝轴在肝损伤和各种肝脏疾病的发生发展中起关键作用(24,25)。它代表胃肠道、其微生物群和肝脏之间主要通过门脉循环介导的双向相互作用。肠道黏膜屏障主要由肠道菌群平衡和肠上皮细胞构成(24)。近期研究强调了肠道菌群、肠屏障功能与 ATB-DILI 之间的关系(11,20,21)。隐窝-绒毛结构和肠上皮的快速更新(依赖于位于隐窝的肠道干细胞)对维持肠道吸收和屏障功能至关重要(26,27)。肠道干细胞分化为过渡扩增细胞,随后发育为分泌细胞或吸收细胞并沿绒毛迁移(28,29)。为应对损伤,肠道干细胞被激活以促进上皮功能和再生。本研究中 HRZE 暴露诱导杯状细胞过度增殖并促进肠道干细胞向杯状细胞分化,表明上皮损伤加重。此外,在 HRZE 处理小鼠结肠黏膜观察到炎症。而 BF839 处理减少杯状细胞增殖、增加肠道干细胞数量并减少炎症细胞浸润。更重要的是,与 HRZE 处理小鼠相比,BF839 显著上调紧密连接蛋白(如 ZO-1 和 occludin)的表达,提示 BF839 可能改善 ATB-DILI 诱导的肠屏障功能障碍。

有研究报道抗结核药物会降低肠道微生物多样性(11,20,21,30)。本工作中我们观察到类似结果,HRZE 处理减少小鼠 ASVs 数量、降低 α 多样性指数并改变肠道菌群组成。而 BF839 补充恢复肠道菌群多样性和结构,有助于维持微生物平衡。厚壁菌门和拟杆菌门是构成人类肠道菌群主体的两个优势菌门,其中厚壁菌门在结肠中最为丰富。拟杆菌门包含条件致病菌,具有促炎特性(31)。HRZE 暴露小鼠中拟杆菌门丰度增加,而厚壁菌门和疣微菌门水平下降。BF839 补充改善厚壁菌门和疣微菌门的相对丰度并提高厚壁菌门/拟杆菌门比值。在属水平上,HRZE 处理增加拟杆菌门成员鼠杆菌属(*Muribaculum*)的丰度,该菌在菌群失调肠道中作为致病共生体发挥作用(32)。此外,HRZE 处理小鼠潜在益生菌(包括阿克曼菌属、毛螺菌科 NK4A136 组和双歧杆菌属)水平降低。BF839 补充恢复这些有益菌属的相对丰度。值得注意的是,已知阿克曼菌属能促进肠道干细胞增殖分化、增厚黏液层并修复肠黏膜损伤(33)。这

些发现提示 BF839 可能通过潜在益生菌介导的机制促进肠上皮再生。

革兰阴性菌产生的 LPS(34)与厚壁菌门/拟杆菌门比值密切相关。肠道菌群平衡破坏会增加肠通透性,使更多 LPS 进入血流(35)。本研究中 HRZE 处理小鼠血液 LPS 水平显著升高,而 BF839 补充有效降低这些水平。LPS 激活 TLR4,触发关键促炎细胞因子释放,这些因子是启动强效免疫应答所必需的(34)。当 LPS 进入血流时,TLR4/NF- κ B 通路在启动促炎级联反应中起关键作用,特别是在 ATB-DILI 诱导的肝损伤中(11,21)。该过程导致 TNF- α 和 IL-6 产生(36)。我们的研究表明 HRZE 给药增加肝组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平并激活 TLR4/NF- κ B/MyD88 通路,这与 LPS 水平升高相关。相反,BF839 处理抑制 TLR4、磷酸化 NF- κ B、MyD88 以及 HRZE 诱导的炎症因子表达。这些结果提示 BF839 可能通过抑制 LPS/TLR4/NF- κ B/MyD88 信号通路减轻 ATB-DILI。

5 结论

综上所述,本研究证明益生菌对 ATB-DILI 具有保护作用。BF839 通过恢复肠道菌群、增强肠屏障完整性及抑制 LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路减轻炎症,从而缓解 HRZE 诱导的肝损伤。这些结果为 BF839 作为 ATB-DILI 患者潜在益生菌治疗方案提供理论支持。未来研究将重点评估 BF839 对人体 ATB-DILI 的保护作用。

数据可用性声明

本研究数据集可在在线存储库中获取,存储库名称及登录号见文章/补充材料。

伦理声明

动物实验经大连医科大学动物实验伦理委员会批准(许可证号:AEE23078)。研究遵循当地立法和机构要求实施。

作者贡献

QL: 概念设计、实验操作、方法建立、初稿撰写; CW: 数据整理、形式分析、方法验证、初稿撰写; KZ: 形式分析、方法建立、软件应用、初稿撰写; ZZ: 方法验证、初稿撰写; JL: 方法建立、可视化、初稿撰写; JB: 资源提供、可视化、初稿撰写; JC: 研究监督、初稿撰写; XS: 概念设计、资金获取、实验设计、项目管理、初稿撰写、文稿修订。

基金资助

作者声明本研究获得科研/出版经费支持。本项目受辽宁省教育厅基金(项目编号:JYTQN2023155)和大连医科大学交叉学科研究合作项目团队资助(项目编号:JCHZ2023012)。

致谢

感谢大连图腾生命科技发展有限公司无偿提供本研究所用 BF839 菌株。该公司未参与研究设计、实验实施、数据收集分析及文章撰写发表决策。

利益冲突声明

作者声明不存在可能构成潜在利益冲突的商业或财务关系。

生成式 AI 声明

作者声明本文撰写未使用生成式 AI 技术。

出版方声明

本文所有观点仅代表作者立场，与所属机构、出版方及审稿人无关。文中提及的任何产品或厂商声明均不代表出版方认可或担保。

补充材料

本文补充材料可在以下网址在线获取：
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2025.1538528/full#supplementary-material>

脚注

[^]<https://magic.novogene.com/customer/main#/homeNew>

[^]www.biocloud.net

参考文献

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2023. Geneva, Switzerland: World Health Organization (2023).
2. Peloquin, CA, and Davies, GR. The treatment of tuberculosis. *Clin Pharmacol Ther.* (2021) 110:1455–66. doi: 10.1002/cpt.2261
3. Andrade, RJ, Chalasani, N, Björnsson, ES, Suzuki, A, Kullak-Ublick, GA, Watkins, PB, et al. Drug-induced liver injury. *Nat Rev Dis Prim.* (2019) 5:58. doi: 10.1038/s41572-019-0105-0
4. Yang Yang, S, Guo, JQ, and Yan, XF. Updated progress on the pathogenesis of liver injury induced by anti-tuberculosis drugs. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* (2019) 42:378–81. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2019.05.012
5. Chinese Medical Association Tuberculosis Branch. Guidelines for diagnosis and management of drug-induced liver injury caused by anti-tuberculosis drugs (2024 version). *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* (2024) 47:1069–90. doi: 10.3760/cma.j.cn112147-20240614-00338
6. Zhang, T, Du, J, Yin, X, Xue, F, Liu, Y, Li, R, et al. Adverse events in treating smear-positive tuberculosis patients in China. *Int J Environ Res Public Health.* (2015) 13:86. doi: 10.3390/ijerph13010086
7. Gong, S, Lan, T, Zeng, L, Luo, H, Yang, X, Li, N, et al. Gut microbiota mediates diurnal variation of acetaminophen induced acute liver injury in mice. *J Hepatol.* (2018) 69:51–9. doi: 10.1016/j.jhep.2018.02.024
8. Yip, LY, Aw, CC, Lee, SH, Hong, YS, Ku, HC, Xu, WH, et al. The liver-gut microbiota axis modulates hepatotoxicity of tacrine in the rat. *Hepatology.* (2018) 67:282–95. doi: 10.1002/hep.29327

9. Namasivayam, S, Maiga, M, Yuan, W, Thovarai, V, Costa, DL, Mittereder, LR, et al. Longitudinal profiling reveals a persistent intestinal dysbiosis triggered by conventional anti-tuberculosis therapy. *Microbiome*. (2017) 5:71. doi: 10.1186/s40168-017-0286-2
10. Yan, R, Wang, K, Wang, Q, Jiang, H, Lu, Y, Chen, X, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* Shiota prevents acute liver injury by reshaping the gut microbiota to alleviate excessive inflammation and metabolic disorders. *Microbiol Biotechnol*. (2022) 15:247–61. doi: 10.1111/1751-7915.13750
11. Gong, JY, Ren, H, Chen, HQ, Xing, K, Xiao, CL, Luo, JQ, et al. Magnesium Isoglycyrrhizinate attenuates anti-tuberculosis drug-induced liver injury by enhancing intestinal barrier function and inhibiting the LPS/TLRs/NF- κ B signaling pathway in mice. *Pharmaceuticals*. (2022) 15:1130. doi: 10.3390/ph15091130
12. Saeedi, BJ, Liu, KH, Owens, JA, Hunter-Chang, S, Camacho, MC, Eboka, RU, et al. Gut-resident lactobacilli activate hepatic Nrf 2 and protect against oxidative liver injury. *Cell Metab*. (2020) 31:956–968.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2020.03.006
13. Keshavarz Azizi Raftar, S, Ashrafi, F, Yadegar, A, Lari, A, Moradi, HR, Shahriary, A, et al. The protective effects of live and pasteurized *Akkermansia muciniphila* and its extracellular vesicles against HFD/CCl4-induced liver injury. *Microbiol Spectr*. (2021) 9:e0048421. doi: 10.1128/Spectrum.00484-21
14. Xia, J, Lv, L, Liu, B, Wang, S, Zhang, S, Wu, Z, et al. *Akkermansia muciniphila* ameliorates acetaminophen-induced liver injury by regulating gut microbial composition and metabolism. *Microbiology Spectr*. (2022) 10:e0159621. doi: 10.1128/spectrum.01596-21
15. Moore, WE, and Holdeman, LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*. (1974) 27:961–79. doi: 10.1128/am.27.5.961-979.1974
16. Sears, CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev*. (2009) 22:349–69. doi: 10.1128/CMR.00053-08
17. Lin, C, Zeng, T, Deng, Y, Yang, W, and Xiong, J. Treatment of psoriasis vulgaris using *Bacteroides fragilis* BF839: a single-arm, open preliminary clinical study. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. (2021) 37:3828–35. doi: 10.13345/j.cjb.210198
18. Zeng, T, Deng, YH, Lin, CH, Chen, XX, Jia, HX, Hu, XW, et al. A randomized trial of *Bacteroides fragilis* 839 on preventing chemotherapy-induced myelosuppression and gastrointestinal adverse effects in breast cancer patients. *Asia Pac J Clin Nutr*. (2024) 33:23–32. doi: 10.6133/apjcn.202403_33(1).0003
19. Lin, CH, Zeng, T, Lu, CW, Li, DY, Liu, YY, Li, BM, et al. Efficacy and safety of *Bacteroides*

fragilis BF839 for pediatric autism spectrum disorder: a randomized clinical trial. *Front Nutr.* (2024) 11:1447059. doi: 10.3389/fnut.2024.1447059

20. Li, Y, Zhao, L, Hou, M, Gao, T, Sun, J, Luo, H, et al. *Lactobacillus casei* improve anti-tuberculosis drugs-induced intestinal adverse reactions in rat by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids. *Nutrients.* (2022) 14:1668. doi: 10.3390/nu14081668

21. Li, Y, Zhao, L, Sun, C, Yang, J, Zhang, X, Dou, S, et al. Regulation of gut microflora by *Lactobacillus casei* Zhang attenuates liver injury in mice caused by anti-tuberculosis drugs. *Int J Mol Sci.* (2023) 24:9444. doi: 10.3390/ijms24119444

22. Nwido, LL, and Oboma, YI. *Telfairia occidentalis* (Cucurbitaceae) pulp extract mitigates rifampicin-isoniazid-induced hepatotoxicity in an in vivo rat model of oxidative stress. *J Integr Med.* (2019) 17:46–56. doi: 10.1016/j.joim.2018.11.008

23. Yang, Y, Jiang, L, Wang, S, Zeng, T, and Xie, K. Diallyl trisulfide protects the liver against hepatotoxicity induced by isoniazid and rifampin in mice by reducing oxidative stress and activating Kupffer cells. *Toxicol Res.* (2016) 5:954–62. doi: 10.1039/c5tx000440c

24. Albillos, A, de Gottardi, A, and Rescigno, M. The gut-liver axis in liver disease: pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol.* (2020) 72:558–77. doi: 10.1016/j.jhep.2019.10.003

25. Wang, F, Cui, Q, Zeng, Y, and Chen, P. Gut microbiota-an important contributor to liver diseases. *Southern Med Univ J.* (2020) 40:595–600. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.04.23

26. Gehart, H, and Clevers, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2019) 16:19–34. doi: 10.1038/s41575-018-0081-y

27. Clevers, H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.* (2013) 154:274–84. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004

28. Barker, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15:19–33. doi: 10.1038/nrm3721

29. Van der Flier, LG, and Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* (2009) 71:241–60. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145

30. Luo, M, Liu, Y, Wu, P, Luo, DX, Sun, Q, Zheng, H, et al. Alternation of gut microbiota in patients with pulmonary tuberculosis. *Front Physiol.* (2017) 8:822. doi: 10.3389/fphys.2017.00822

31. Zafar, H, and Saier, MH Jr. Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes.* (2021) 13:1–20. doi: 10.1080/19490976.2020.1848158

32. Abbondio, M, Tanca, A, De Diego, L, Sau, R, Bibbò, S, Pes, GM, et al. Metaproteomic assessment of gut microbial and host functional perturbations in *Helicobacter pylori*-infected patients subjected to an antimicrobial protocol. *Gut Microbes*. (2023) 15:2291170. doi: 10.1080/19490976.2023.2291170
33. Duan, C, Wu, J, Wang, Z, Tan, C, Hou, L, Qian, W, et al. Fucose promotes intestinal stem cell-mediated intestinal epithelial development through promoting *Akkermansia*-related propanoate metabolism. *Gut Microbes*. (2023) 15:2233149. doi: 10.1080/19490976.2023.2233149
34. Szabo, G, Bala, S, Petrasek, J, and Gattu, A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis*. (2010) 28:737–44. doi: 10.1159/000324281
35. Verhaar, BJH, Prodan, A, Nieuwdorp, M, and Muller, M. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: a review. *Nutrients*. (2020) 12:2982. doi: 10.3390/nu12102982
36. Soares, JB, Pimentel-Nunes, P, Roncon-Albuquerque, R, and Leite-Moreira, A. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol Int*. (2020) 4:659–72. doi: 10.1007/s12072-010-9219-x

术语表

ATB-DILI - 抗结核药物性肝损伤
anti-TB - 抗结核
ASVs - 扩增子序列变体
AST - 天冬氨酸氨基转移酶
ALT - 丙氨酸氨基转移酶
AKP - 碱性磷酸酶
B. fragilis - 脆弱拟杆菌
BF839 - 脆弱拟杆菌 839
DILI - 药物性肝损伤
ELISA - 酶联免疫吸附试验
GSH - 谷胱甘肽
H&E - 苏木精-伊红染色
HRZE - 异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇
IL - 白细胞介素
LPS - 脂多糖
MDA - 丙二醛
MyD88 - 髓样分化因子 88
NF- κ B - 核因子 κ B
OTU - 操作分类单元
SEM - 均值 \pm 标准误
ANOVA - 单因素方差分析
PMSF - 苯甲基磺酰氟
SOD - 超氧化物歧化酶
SEM - 标准误

SPF - 无特定病原体
TLR4 - Toll 样受体 4
TB - 结核病
TNF- α - 肿瘤坏死因子- α
ZO-1 - 紧密连接蛋白-1

关键词: 脆弱拟杆菌 839, 抗结核药物, 肝损伤, 肠屏障, LPS/TLRs/NF- κ B 通路

引用格式: Li Q, Wu C, Zhang K, Zhou Z, Li J, Bai J, Cao J and Shi X (2025) *Bacteroides fragilis* 839 ameliorates anti-tuberculosis drugs-induced liver injury by suppressing inflammation and regulating gut microbiota in mice. *Front. Med.* 12:1538528. doi: 10.3389/fmed.2025.1538528

收稿日期: 2024 年 12 月 3 日; **接受日期:** 2025 年 3 月 27 日;
出版日期: 2025 年 4 月 17 日。

编辑:

Philippe Gérard, 法国国家农业、食品与环境研究院(INRAE)

审稿人:

Rajbir Singh, 帕坦伽利研究所, 印度
Yongshou Yang, 安徽大学, 中国

版权声明: © 2025 Li, Wu, Zhang, Zhou, Li, Bai, Cao and Shi。这是一篇基于知识共享署名许可协议(CC BY)发布的开放获取文章。允许在任何媒介中不受限制地使用、分发和复制, 但必须正确署名原始作者和版权所有, 并引用本刊原始出版物, 符合学术惯例。不符合这些条款的使用、分发或复制均不被允许。

***通讯作者:** Xiaoxia Shi, xiaoxia.shi@foxmail.com

†这些作者对本文贡献均等, 共享第一作者身份

免责声明: 本文表达的所有观点仅代表作者个人, 不代表其所属机构、出版商、编辑和审稿人的立场。文中评价的任何产品或厂商声明均不代表出版商担保或认可。