

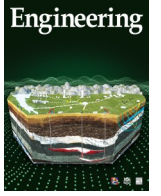


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Gut Microbiota and Health—Article

肠道菌群调控的色氨酸代谢改善了D-Gal/LPS诱导的C57BL/6小鼠急性肝衰竭

郑志鹏[#], 伍莉[#], 韩玉秋, 陈俊, 朱帅, 姚圆圆, 王保红^{*}, 李兰娟^{*}

State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2020

Revised 1 December 2020

Accepted 28 December 2020

Available online 7 February 2021

关键词

肠道菌群
抗生素
色氨酸
犬尿氨酸
芳香烃受体
急性肝衰竭

摘要

急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 发病突然, 常常导致死亡。既往动物实验发现, 口服益生菌或抗生素都可以减轻药物引起的肝损伤, 提示肠道菌群在药物性肝损伤的病理生理过程中发挥着重要作用。然而, 其潜在的作用机制尚不完全清楚。本研究旨在通过多组学的方法, 研究肠道菌群在 ALF 中的综合作用。广谱抗生素 (broad-spectrum antibiotics, Abx) 灌胃 4 周, 明显改善了 D- 盐酸半乳糖胺/脂多糖 [D-(+)-galactosamine hydrochloride/lipopolysaccharide, D-Gal/LPS] 诱导的 ALF 小鼠的生存期。RNA 测序显示, 在 Abx 干预的 ALF 小鼠中, 肝脏的炎症反应受到抑制, 而整体代谢途径上调。肠道菌群 16S rRNA 测序发现, Abx 重塑了肠道菌群的结构和功能, 伴随肠道菌群的色氨酸 (tryptophan, Trp) 代谢通路增强。此外, 经超高效液相色谱串联质谱 (ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS) 代谢谱检测提示, Abx 干预肠道菌群后, 减少了 Trp 的排泄, 释放了更多的 Trp 予宿主, 犬尿氨酸 (kynurenine, Kyn) 水平升高, Kyn 通路增强。Kyn 作为一种内源性芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 的配体, 可以通过结合 AhR 发挥抗炎和免疫抑制的作用。此外, AhR 靶向干预影响了经 Abx 预处理或未经 Abx 预处理的 ALF 小鼠的预后, 表明 AhR 通路在一定程度上调节了机体对 ALF 的易感性。本研究表明, 依赖肠道菌群调控的色氨酸代谢可以通过调节 AhR 的活性, 影响宿主对 ALF 的易感性, 为更好地管理 ALF 提供了一个有前景的靶点。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 是肝细胞突发严重损伤的结果, 通常不可预见。导致 ALF 最常见的原因是药物性肝损伤、缺血、肝炎病毒和自身免疫 [1]。尽管 ALF 的病因多种多样, 但其临床病理特征相似。然而, 由于 ALF 发病突然, 缺少大规模随机对照临床研究 [1]。动物研究中的一个有趣发现是, 益生菌或是抗生素的预处

理都可以减轻药物引起的急性肝损伤, 部分原因是限制了肠道来源的内毒素 [2–3], 这些研究表明肠道菌群在急性肝损伤中发挥着重要作用, 但是其潜在的机制仍未被完全了解。

越来越多的研究表明, 肠道菌群几乎影响宿主生理的各个方面, 肠道菌群的失调已经被认为是疾病发生和发展的重要因素之一 [4–5]。肠道菌群和宿主之间的相互作用大多是由一系列肠道菌群的细菌成分和代谢物介导的。目

* Corresponding authors.

E-mail addresses: wangbaohongzju@zju.edu.cn (B. Wang), lili@zju.edu.cn (L. Li).

[#] These authors contributed equally to this work.

前研究最多的三种肠道菌群代谢物分别是胆汁酸、短链脂肪酸 (short chain fatty acid, SCFA) 和色氨酸 (tryptophan, Trp) 代谢物[6]。

无菌和抗生素处理的动物模型常用来研究肠道菌群的功能。作为无菌小鼠的替代选择, 广谱抗生素处理的小鼠可以避免无菌小鼠发育过程中的一些并发症[7]。抗生素诱导的肠道细菌负荷的降低, 限制了机体暴露于肠道菌群的组分和代谢物, 如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、SCFA 和次级胆汁酸, 从而影响机体的功能和对疾病的易感性[8-9]。有趣的是, 在抗生素处理的小鼠和无菌小鼠中都发现, 肠道菌群的缺失会引起血清 Trp 的升高, 表明肠道菌群参与调控机体对 Trp 的吸收或代谢[10-11]。Trp 作为一种必需氨基酸, 主要通过三种代谢途径, 分别产生吲哚及其衍生物、犬尿氨酸 (kynurenine, Kyn) 和血清素, 这些代谢物的产生都直接或者间接地受到肠道菌群的调控[12]。此外, 肝脏在 Trp 代谢的 Kyn 途径中起着重要的作用[13]。而且, Kyn 途径的一些代谢物, 如 Kyn、犬尿酸 (kynurenic acid, KynA)、3-羟基犬尿氨酸 (3-hydroxykynurenine, 3H-KYN) 和 3-羟基氨基萘酸 (3-hydroxyanthranilic acid, 3-HAA), 都可以通过结合芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 发挥抗炎和免疫抑制的效应[14]。

考虑到抗生素干预肠道菌群可以抑制 Treg 缺陷小鼠的致死性炎症, 也可以减轻小鼠和患者肝移植术后的缺血再灌注肝损伤[15-16], 抗生素干预显示出来的抗炎和免疫抑制作用, 可能与肠道菌群-宿主共代谢有关, 特别是 Trp 代谢的 Kyn 途径, 这有待进一步研究。更重要的是, 当使用抗生素处理的小鼠时, 应该考虑到肠道菌群和宿主代谢的变化对实验结果的影响, 以得到一个全面的解释。

在本研究中, 抗生素预处理 4 周可以抑制 D-Gal/LPS 诱导的 ALF 小鼠的肝脏炎症反应, 提高其存活率。多组学数据联合分析和机制实验提示, 抗生素的免疫抑制作用可能部分归因于肠道菌群参与调控的 Trp 代谢和 Kyn 依赖的 AhR 激活, 这拓展了目前对肠道菌群-宿主 Trp 共代谢在 ALF 中作用的认识, 提示 AhR 可能是 ALF 的潜在治疗靶点。

2. 材料和方法

2.1. 小鼠

无特殊病原体 (specific pathogen-free, SPF) 级别的 C57BL/6 雄性小鼠 (4-6 周龄) 进购自上海斯莱克实验动物有限公司。所有小鼠饲养于 SPF 级别层流架中, 温度控

制在 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 湿度控制在 $60\% \pm 5\%$, 每天 12 h:12 h 昼夜明暗 (06:00 亮灯) 交替, 给予标准的实验室小鼠日常饮食, 自由进食, 自由饮水。实验设计的详细内容见附录 A 的图 S1。所有动物实验遵循美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 《实验动物饲养管理和使用指南》, 并经过浙江大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会批准。

2.2. 急性肝衰竭模型

根据每只小鼠的体重, 将 $0.75 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 的 D-Gal (G0500; Sigma-Aldrich, Germany) 和 $0.01 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的 LPS (*Escherichia coli* O55:B5; #L2880; Sigma-Aldrich, Germany) 溶于 $300 \text{ }\mu\text{L}$ 的无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中, 通过腹腔注射, 建立 ALF 模型[17]。

2.3. 抗生素预处理

每只小鼠每天通过灌胃一次, 服用含有氨苄西林钠盐 (1.86 mg)、盐酸万古霉素 (0.96 mg)、硫酸新霉素 (1.86 mg) 和甲硝唑 (1.20 mg) 的 $300 \text{ }\mu\text{L}$ 无菌蒸馏水, 在 D-Gal/LPS 腹腔注射前持续灌胃 4 周。所有抗生素均购自 Sigma-Aldrich (德国)。

2.4. 破坏黏膜屏障

在 D-Gal/LPS 腹腔注射前 7 天, 将小鼠的日常饮水替换为使用日常饮水配制的 2% (质量/体积) 的右旋糖酐硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS; #42867; Sigma-Aldrich, Germany) 溶液, 供其自由饮用[18]。

2.5. 补充益生菌

将阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*) 接种在 3.7% (m/V) 脑心浸液 (brain heart infusion; BHI; #CM1135; OXOID, USA) 培养基中, 置于厌氧工作站 ($10\% \text{ H}_2$, $10\% \text{ CO}_2$, $80\% \text{ N}_2$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$; AW300SG; Electrotek, UK)。培养 48 h 后, 将培养基离心 5 min ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 在无氧条件下, 用含 2.5% (V/V) 甘油的无菌 PBS 洗涤三次, 最终重悬至 $1 \times 10^{10} \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ [CFU (colony forming unit) 为菌落形成单位]。在腹腔注射 D-Gal/LPS 之前, 小鼠每天灌胃一次 $300 \text{ }\mu\text{L}$ 含 $3 \times 10^9 \text{ CFU}$ *Akkermansia muciniphila* 的悬液, 持续四周。

2.6. 粪菌移植

在粪菌移植 (fecal microbiota transplant, FMT) 当天, 采集准备接受 FMT 的小鼠的新鲜粪便。混合称量后用无菌 PBS 溶液配制粪便悬浊液 ($125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 腹腔注射 D-Gal/LPS 后立即通过灌胃给予 $150 \text{ }\mu\text{L}$ 粪便悬浊液[19]。

为保护厌氧菌，采集粪便后的准备和粪菌移植过程尽可能快速操作。

2.7. 芳香烃受体激动剂和抑制剂干预

对于 AhR 激动剂干预，在 D-Gal/LPS 腹腔注射前，每周一次，通过腹腔注射，给予每只小鼠 $1\ \mu\text{g}$ 6-甲酰基咪唑并[3,2-b]吡啶 (FICZ; #SML1489; Sigma-Aldrich, Germany)。使用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO; #D2650; Sigma-Aldrich, Germany) 配制浓度为 $0.1\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 FICZ 母液，取 $10\ \mu\text{L}$ FICZ 母液加入 $190\ \mu\text{L}$ 无菌 PBS 溶液配制成 FICZ 注射液。对于 AhR 抑制剂干预，在 D-Gal/LPS 腹腔注射前，每周一次，通过腹腔注射，给予每只小鼠 $10\ \mu\text{g}$ 2-甲基-2H-吡啶-3-羧酸 (CH223191; #C8124; Sigma-Aldrich, Germany)。使用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO; #D2650; Sigma-Aldrich, Germany) 配制浓度为 $1\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 CH223191 母液，取 $10\ \mu\text{L}$ CH223191 母液加入 $190\ \mu\text{L}$ 无菌 PBS 溶液配制成 CH223191 注射液[20]。

2.8. 血清生化指标

全血样本 $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $5\ \text{min}$ 分离血清。使用标准分析仪 (Hitachi 7600-210; Tokyo, Japan) 测定血清丙氨酸转氨酶 (aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和总胆红素 (total bilirubin, TBil) 水平以评估肝功能。

2.9. 病理学检测和评分

将新鲜肝组织置于 4% 多聚甲醛中固定过夜，然后脱水，石蜡包埋。对石蜡包埋的肝组织进行切片，厚度为 $4\ \mu\text{m}$ ，苏木精和伊红染色 (hematoxylin and eosin, H&E) 后显微镜下观察。依据改良组织学活动指数 (histologic activity index, HAI) 对肝脏 H&E 染色全片进行组织学评分[21]。

2.10. 免疫荧光和免疫组织化学检测

对于 Toll 样受体 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和 F4/80 免疫荧光染色，取石蜡包埋的肝组织切片行抗原修复后，与抗 TLR4 兔抗体 (1:500; #GB12186; Servicebio, China) 和抗 F4/80 鼠抗体 (1:500; #GB11027; Servicebio, China) 同时孵育， $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜后，在室温下与 Cy3 标记的山羊抗兔抗体 (1:300; #GB21303; Servicebio, China) 和 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠抗体 (1:400; #GB25301; Servicebio, China) 孵育 50 min。对于 AhR 免疫荧光染色，取石蜡包埋的肝组织切片行抗原修复后，与抗 AhR 兔抗体 (1:100; #ab84833; Abcam, UK) 孵育， $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜后，在室温

下与 Cy3 标记的山羊抗兔抗体 (1:300; #GB21303; Servicebio, China) 孵育 50 min。4',6-二脒基-2-苯基咪唑 (DAPI; #G1012; Servicebio, China) 用于细胞核染色。分别使用 PBS 和固定液冲洗切片。使用荧光显微镜 (Eclipse C1; Nikon, Japan) 观察染色的肝组织切片。使用 ImageJ 软件 (version 1.51j8; NIH, USA) 对免疫荧光染色进行半定量分析，每只小鼠选取 5 个具有代表性的高倍镜视野分析其整合荧光强度。

对于增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 免疫组织化学染色，取石蜡包埋的肝组织切片行抗原修复后，与抗 PCNA 鼠抗体 (1:2000; #GB13010-1; Servicebio, China) 孵育， $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜后，在室温下与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗鼠抗体 (1:200; #GB23301; Servicebio, China) 孵育 50 min。3,3'-二氨基联苯 (DAB; #K5007; Dako, Denmark) 用于显色，苏木精用于细胞核复染。分别使用 PBS 和固定液冲洗切片。使用生物显微镜 (XSP-C204; COIC, China) 观察染色的肝组织切片。对于 PCNA 定量分析，每只小鼠选取 5 个具有代表性的高倍镜视野分析其 PCNA 阳性细胞的比例。

2.11. 细菌 DNA 提取

根据说明书，使用 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (#51604; Qiagen, Germany) 从 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻存的结肠内容物提取总菌 DNA。使用 Nanodrop 2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, USA) 检测 DNA 浓度和纯度，使用 1% (质量/体积) 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。

2.12. 16S rRNA 基因测序

结肠内容物的总菌 DNA 用于 16S rRNA 基因测序。简而言之，对细菌 16S rRNA 的 V3~V4 区进行 PCR (polymerase chain reaction) 扩增，然后根据产品说明，使用 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, CA) 进行测序。测序数据使用 QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) 软件包进行分析。将有效序列以 97% 的相似性聚类成为 OUT (operational taxonomic unit)，并使用 Greengenes 数据库进行分类。丰富度和均匀度指数 (Chao1 和 Shannon) 反映 α 多样性。基于 Bray-Curtis 距离矩阵构建的 PCoA (principal coordinates analysis) 反映 β 多样性。PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 用推断肠道菌群组成的功能预测，并使用 STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) 软件呈现。

2.13. RNA提取和逆转录

根据说明书, 使用RNeasy Plus Mini Kit (#74134; Qiagen, Germany)从-80 °C冻存的肝脏组织提取总RNA。RNA提取之后, 根据说明书, 使用QuantiTect Reverse Transcription Kit (#205311; Qiagen, Germany)进行逆转录。将总RNA和逆转录的到的互补DNA储存在-80 °C备用。

2.14. RNA测序和实时定量PCR

修剪肝脏组织总RNA并合成互补DNA用于RNA建库。使用BGISEQ-500 (MGI, China)平台进行RNA测序。使用QuantiFast SYBR Green PCR Kit (#204054; Qiagen, Germany)和ABI ViiA7 real-time PCR仪进行实时定量PCR, 以验证RNA测序的结果。小鼠激动蛋白 β (ACTB; #B662302-0001; Sangon Biotech Co., Ltd., China)作为内源性内参基因引物, 对靶基因的检测结果进行标准化。

2.15. 全代谢谱分析

采集样本之后储藏在-80 °C备用。参考文献对样本进行预处理。简而言之, 100 mg粪便加入300 μ L预冷的甲醇 (methanol, MeOH; #173433; Thermo Fisher Scientific, USA)和200 mg陶瓷珠 (1 mm; OMNI, USA), 使用高速振荡器将混合物混匀后离心 (4 °C, 12 000 r \cdot min⁻¹) 10 min, 取上清液重新离心 (4 °C, 12 000 r \cdot min⁻¹) 10 min, 上机前使用0.22 μ m的滤网过滤[22]。将50 μ L血清和150 μ L预冷的乙腈 (186448; Thermo Fisher Scientific, USA)混合均匀后离心 (4 °C, 12 000 r \cdot min⁻¹) 10 min, 取150 μ L上清液, 上机前再次离心 (4 °C, 12 000 r \cdot min⁻¹) 10 min; 100 mg的肝脏组织在液氮中被碾磨后加入1 mL甲醇/水 (4:1; #183205; Thermo Fisher Scientific, USA), 静置于冰上20 min后离心 (4 °C, 15 000 r \cdot min⁻¹) 10 min, 取上清液, 上机前再次离心 (4 °C, 15 000 r \cdot min⁻¹) 10 min [23]。对于不同的样本类型, 使用一个空白样本用于监测程序污染, 另每个样本取10 μ L, 充分震荡混匀, 用作质控。

采用超高效液相色谱 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 串联四极轨道离子阱杂交质谱 (mass spectrometry, MS) 进行全代谢谱分析。UPLC采用Dionex MLtiMate 3000 RS LC液相系统, Hypesil Gold C₁₈分析柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μ m, Thermo Fisher Scientific, USA), 温度为35 °C [24]。电喷雾阳离子模式下以含0.1%甲酸的水为流动相A, 含0.1%甲酸的MeOH为流动相B; 电喷雾负离子模式下以水为流动相A, MeOH为流动相B。样本检测前, 使用流动相A和流动相B (98%:2%, V/V)

V) 洗脱分析柱, 流速为400 μ L \cdot min⁻¹, 洗脱30 min。样本上机过程中, 洗脱梯度优化如下: 对于粪便样本, 流动相B的组成在0.5 min内为2%, 在接下来的7.5 min内线性增加到40%, 在额外的7 min内达到98%, 并保持3 min, 然后在运行停止前的2 min内下降到2%; 对于肝脏和血清样本, 流动相B的组成在0.5 min内为2%, 在接下来的4.5 min内线性增加到50%, 在额外的5 min内达到98%, 并保持5 min, 然后在运行停止前的3 min内下降到2%。

采用Q Exactive HF-X质谱系统, heated-ESI-II (HESI-II)离子源 (Thermo Scientific, USA) 在电喷雾负离子或正离子模式下进行质谱分析[24]。参数设置如下: 喷雾电压, 3.5 kV; 毛细管温度, 320 °C; 辅助气, 10 AU; 鞘气, 40 AU; 扫描范围, 70~1050 m/z ; 分辨率, 60 000 (full MS) 和15 000 (dd-MS2); 碰撞能, 20/40/60 eV。

分析样本前, 运行5个质控, 平衡检测系统。为确保数据质量, 在样本分析过程中, 每10次进样运行1次质控。排除空白样本中排名前100的化合物。

根据使用说明, 使用Xcalibur 4.1软件 (Thermo Fisher Scientific, USA) 收集原始数据, 并使用Compound Discoverer™ 3.1软件 (Thermo Fisher Scientific, USA) 处理原始数据。简而言之, 对于原始数据进行选择比对谱图, 对齐保留时间, 检测未知化合物等节点。根据分子量和样品保留时间对输入文件中的未知化合物进行组合。空白填补节点用于查找在某个输入文件中检测到, 但在其他文件中丢失的色谱峰。峰面积细化节点 (归一化面积和标记背景化合物) 用于去除空白样品中检测到的背景化合物, 并根据基于质控面积的校正对色谱峰面积进行归一化。预测成分节点用于预测化学结构和鉴定未知化合物。在本地数据库 (Mass Lists 和 mzVault) 和在线数据库 (ChemSpider 和 mzCloud) 中搜索未知化合物。

2.16. 统计分析

在本研究中, 多只小鼠作为生物重复进行分析。条形图使用均数 \pm 标准差或者均数 \pm 标准误来表示。使用GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, USA) 进行数据分析和图表制作。使用Kolmogorov-Smirnov检验来验证整个数据集是否为正态分布。对于未通过正态检验的数据集, 使用非参数检验进行差异分析。对于两组之间的比较, 使用非配对Student's t 检验或Wilcoxon秩和检验来确定显著性。两组以上的比较, 采用方差分析 (ANOVA) 或Kruskal-Wallis检验。采用 F 检验或Bartlett检验分别确定 t 检验和ANOVA的方差差异。当方差不等时, 使用Welch修正的非配对Student's t 检验或

Brown-Forsythe 和 Welch 修正的方差分析。生存时间使用 Kaplan-Meier 曲线表示，其 p 值用 log-rank (Mantel-Cox) 检验计算。当 p 值小于 0.05 时，差异显著。

3. 结果

3.1. 抗生素预处理改善了急性肝衰竭小鼠的预后

通过腹腔注射 D-Gal/LPS 成功构建了 ALF 模型，与 Con 小鼠相比，ALF 小鼠血清 ALT、AST 和 TBil 明显升高，死亡率极高和大面积弥漫性肝细胞坏死（图 1）。此外，本研究中 ALF 小鼠的生存曲线与先前的研究报道一致[17]。

Abx 预处理显著改善了 ALF 小鼠的生存期和存活率[图 1 (b)]，而其他肠道菌群干预措施既没有改善也没有恶化 ALF 小鼠的预后（附录 A 中的图 S2）。尽管生存期有所改善，D-Gal/LPS 腹腔注射 4 h 后，ALF 小鼠和 ALF + Abx 小鼠之间的肝功能并没有统计学差异，ALF + Abx 小鼠的 AST 和 TBil 只表现出下降的趋势[图 1 (a)]，这可能是由于采血时间或个体差异造成的。在组织学方面，H&E 染色显示 ALF 小鼠肝脏存在严重弥漫性坏死和出血，而存活的 ALF + Abx 小鼠肝脏组织中，几乎没有病变[图 1 (c)]。改良的组织学活性指数 (histologic activity index, HAI) 评分也显示，与 Con 小鼠相比，ALF 小鼠得分明显升高，而与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠得分较低[图 1 (d)]。

3.2. 抗生素预处理改变了 ALF 小鼠的肝脏转录组

对肝组织进行了 RNA 测序，以研究 Abx 预处理对

ALF 小鼠肝脏转录组的影响。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 显示 Con 小鼠和 ALF + Abx 小鼠与 ALF 小鼠有较大差异，而 ALF + Abx 小鼠与 Con 小鼠相近[图 2 (a)]。韦恩图显示，Con 小鼠和 ALF 小鼠之间肝脏差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 数目最多，有 6040 个，ALF 小鼠与 ALF + Abx 小鼠之间有 5673 个肝脏 DEG，而 ALF + Abx 小鼠与 Con 小鼠之间肝脏 DEG 最少，有 1346 个[图 2 (b)]，提示与 Con 小鼠相比，ALF 小鼠有大量的肝脏 DEG，其中的大部分在 ALF + Abx 小鼠中被抑制。

为探究 ALF 小鼠和 ALF + Abx 小鼠之间的肝脏基因表达差异，组间基因表达水平的双对数散点图显示，ALF 小鼠和 ALF + Abx 小鼠的基因表达存在明显差异[图 2 (c)]。对组间 DEG 进行 KEGG 通路富集分析，结果显示，与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠表达上调的 DEG 的功能主要集中在代谢通路，而 ALF + Abx 小鼠表达下调的 DEG 主要与炎症反应和免疫调节相关，如细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路和白细胞跨上皮迁移[图 2 (d)]。这些结果提示，ALF + Abx 小鼠肝脏炎症反应被抑制，可能与其代谢通路的变化有关。

3.3. 抗生素减少了细菌负荷和多样性的同时扩大了特定的类群

Abx 预处理对 ALF 小鼠的影响表明，肠道菌群可能在

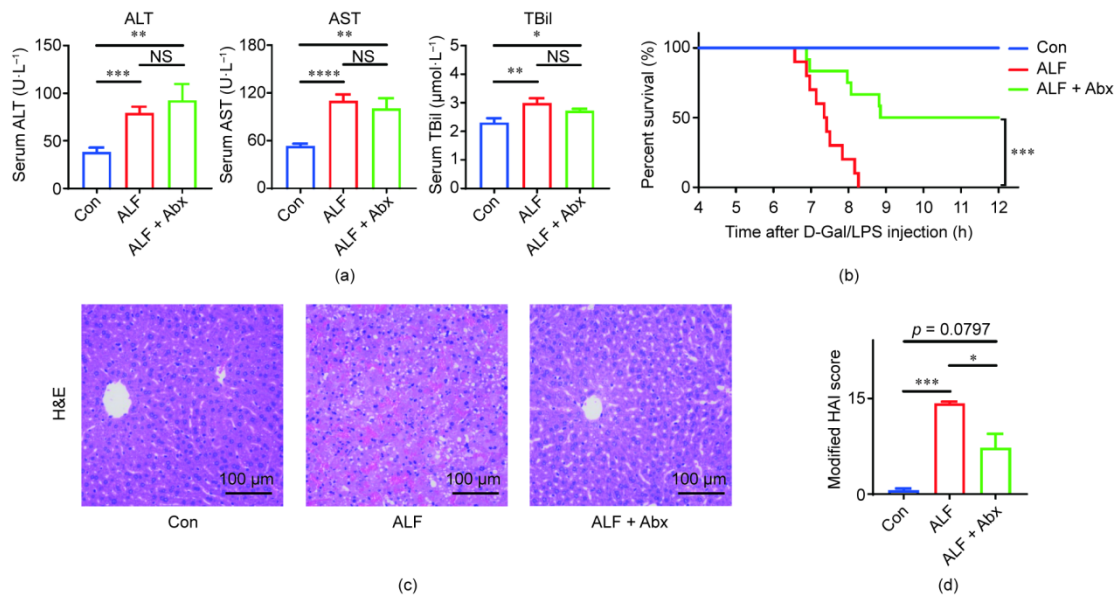


图 1. 抗生素预处理 ALF 小鼠的预后。(a) 血清 ALT、AST 和 TBil 水平 ($n = 10-12$, 每组); (b) Kaplan-Meier 生存曲线 ($n = 10-12$, 每组); (c) 肝脏 H&E 染色; (d) 改良的肝组织病理学 HAI 评分 ($n = 10-12$, 每组)。数据以平均值 \pm 标准误差表示。使用 ANOVA、Kruskal-Wallis 或 log-rank 检验计算，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

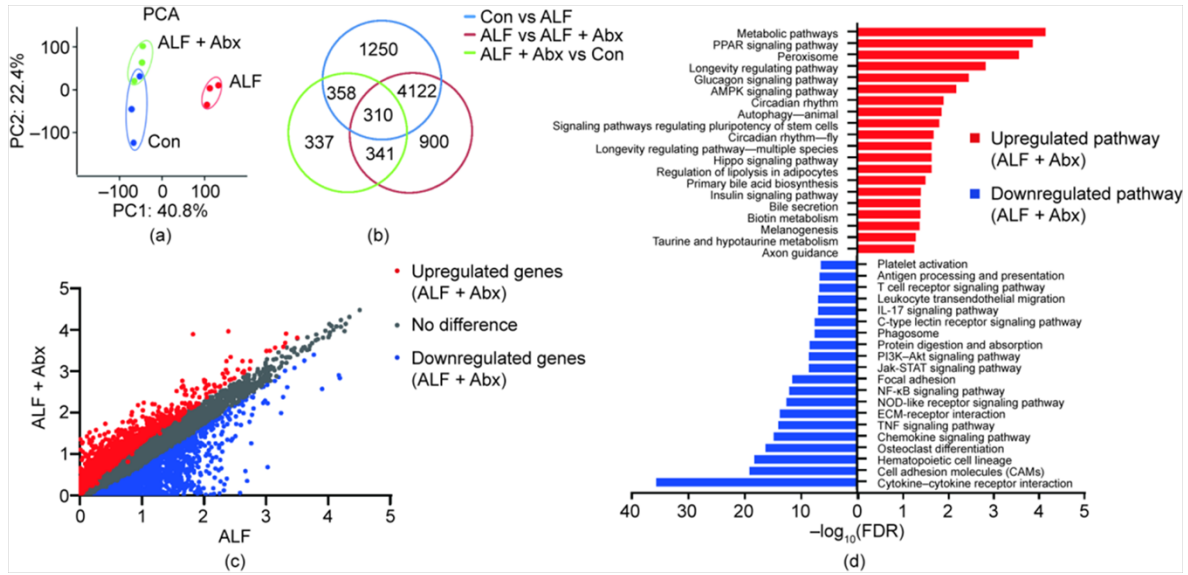


图2. 抗生素预处理改变了ALF小鼠的肝脏转录组。(a) 肝组织RNA测序数据的PCA分析 ($n = 3$, 每组); (b) 组间差异表达基因的韦恩图; (c) ALF + Abx小鼠与ALF小鼠基因表达水平的双对数散点图; (d) ALF + Abx小鼠与ALF小鼠组间差异表达基因的KEGG通路富集分析, 图中显示了ALF + Abx与ALF相比, 前20条上调的通路(红色)和前20条下调的通路(蓝色)。

其病理过程中发挥了重要的作用。因此有必要明确Abx干预后肠道菌群结构的变化特征, 以了解其潜在的作用机制。Abx干预4周显著减少了细菌负荷, 但没有完全清除细菌[图3(a)], 可能是由于抗生素耐药细菌的出现。采用16S rRNA基因测序的方法, 鉴定结肠内容物中肠道菌群的组成和结构。Chao1指数和Shannon指数是反应肠道菌群 α 多样性的指数, 与Con小鼠相比, ALF + Abx小鼠肠道菌群的Chao1指数和Shannon指数显著降低[图3(b)]。此外, 与Con小鼠相比, ALF小鼠肠道菌群的Chao1指数略有升高, 而Shannon指数无明显差异[图3(c)]。基于Bray-Curtis矩阵距离的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)可以反映肠道菌群的 β 多样性[图3(c)], ALF + Abx小鼠的肠道菌群组成与Con小鼠和ALF小鼠的不同, 而ALF小鼠的肠道菌群组成与Con小鼠的肠道菌群组成不同。

在门水平上, 与Con小鼠相比, ALF小鼠肠菌细菌组成的变化体现在变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度都略有升高, 拟杆菌门(Bacteroidetes)的相对丰度略有下降, 而ALF + Abx小鼠肠道细菌组成出现显著变化, 以变形菌门(Proteobacteria)为主[图3(d)]。在属水平上, 未分类肠杆菌属(*Eteobacteriaceae_unclassified*)、志贺氏菌属(*Esherichia-Shigella*)和摩氏菌属(*Morganella*)的相对丰度在ALF + Abx小鼠的肠道细菌中排名前三[图3(e)]。

Abx在减少了细菌负荷和多样性的同时扩大和压缩了特定的固有类群, ALF本身在短时间内也引起了肠道菌群

结构的变化。肠道菌群结构的变化必然伴随功能的改变, 其发挥的作用需要进一步研究。

3.4. 抗生素重塑了肠道菌群的代谢——犬尿氨酸产量增加和色氨酸排泄减少

PICRUSt用于评估肠道菌群功能的变化。与Con小鼠相比, 在KEGG水平1和KEGG水平2上, ALF小鼠肠道菌群代谢通路和氨基酸代谢通路分别降低(附录A的图S3)。值得注意的是, 在KEGG水平3上, 与ALF小鼠相比, ALF + Abx小鼠的抗坏血酸盐和醛酸盐代谢、核苷酸代谢、谷胱甘肽代谢、色氨酸代谢、脂肪酸代谢、脂质代谢、辅助因子和维生素代谢、聚糖生物合成和代谢、碳水化合物代谢等代谢途径增加, 而神经磷脂代谢途径降低[图4(a)], 提示Abx重塑了肠道菌群的代谢表型, 肠道菌群代谢的变化可能与Abx对ALF的保护作用有关。

进一步, 采用超高效液相串联质谱(ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS)的方法, 对经Abx干预(+)和未经Abx干预(-)的小鼠的粪便进行代谢谱检测[图4(b)]。与Abx(-)小鼠相比, Abx(+)小鼠粪便中Trp以及吲哚-3-乳酸(indole lactic acid, ILA)、吲哚-3-丙酮酸(indole pyruvic acid, IPYA)和吲哚-3-乙酸(indole acetic acid, IAA)的含量显著降低, 这些都集中在肠道菌群Trp代谢的吲哚途径[12]。相比之下, 在Abx(+)小鼠的粪便中, 另一种Trp代谢物Kyn的含量增加了[图4(c)]。Abx(+)小鼠粪便的黄尿酸含量升高, 可能是宿主排泄所致, 因为相

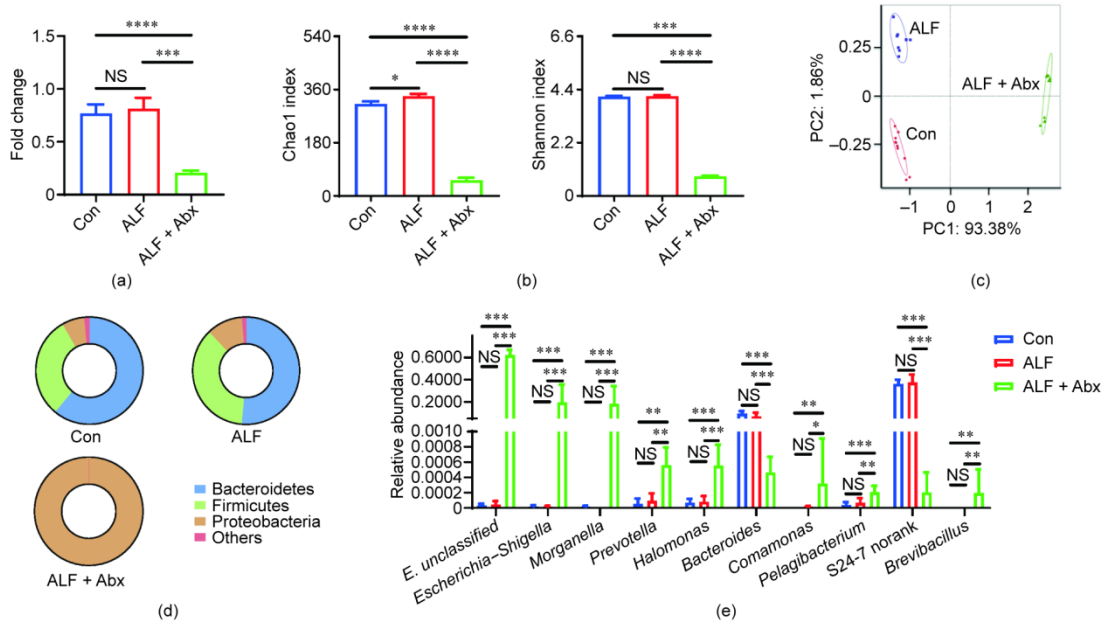


图3. 抗生素减少了细菌负荷和多样性的同时扩大了特定的类群。(a) 结肠内容的总细菌载量 ($n = 9\sim 11$, 每组); (b) 肠道菌群的Chao1和Shannon指数 ($n = 9\sim 11$, 每组); (c) 基于Bray-Curtis矩阵距离的肠道菌群结构的PCoA分析 ($n = 9\sim 11$, 每组); (d) 门水平上肠道菌群的组成 ($n = 9\sim 11$, 每组); (e) 属水平上肠道菌群的相对丰度 (ALF + Abx小鼠的前10, $n = 9\sim 11$, 每组)。数据以平均值 \pm 标准误表示。使用ANOVA、Kruskal-Wallis或Wilcoxon rank-sum检验计算, $p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ 。

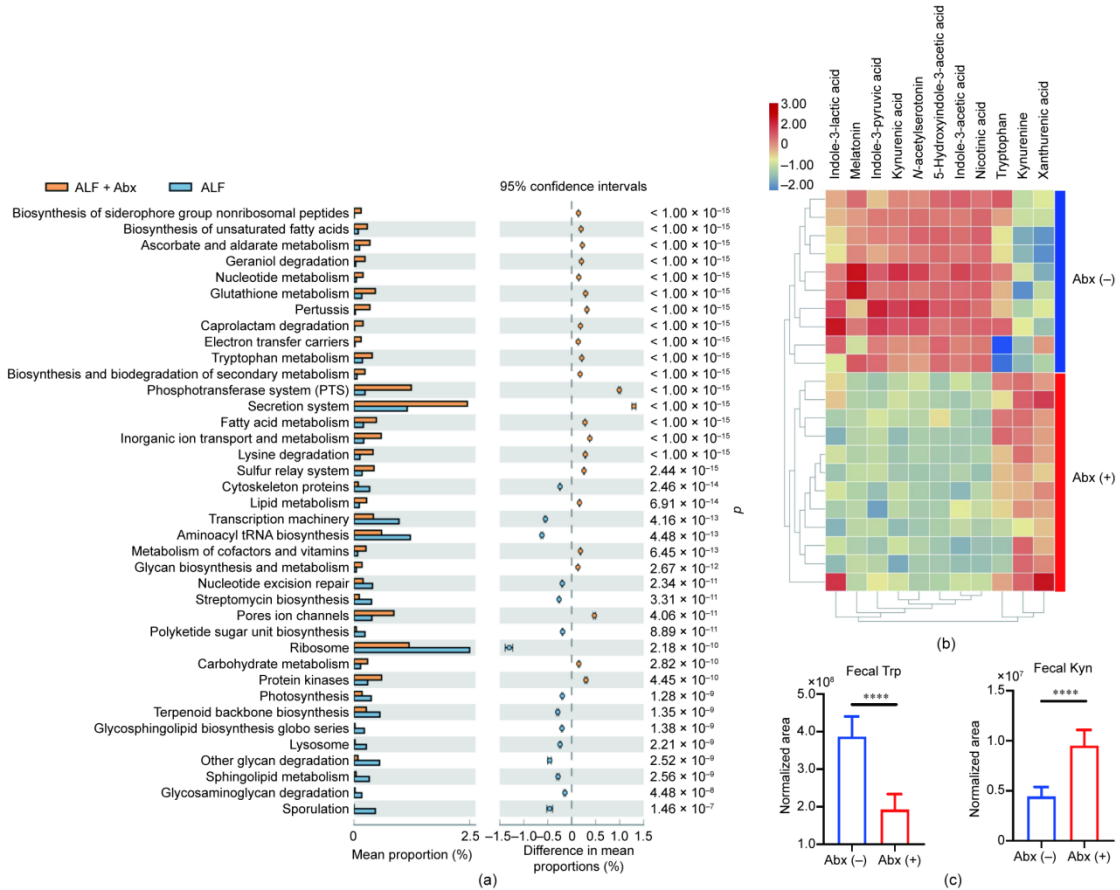


图4. 抗生素重塑了肠道菌群的代谢: 尿尿酸产量增加和色氨酸排泄减少。(a) KEGG水平3的宏基因组功能预测 ($n = 9\sim 11$, 每组); (b) 全代谢谱检测粪便Trp及其代谢产物的热图 ($n = 10\sim 12$, 每组); (c) 经Abx处理和未经Abx处理的小鼠Trp和Kyn的变化 ($n = 10\sim 12$, 每组)。数据以两组间平均比例及其95%置信区间(平均比例之差大于0.12%, 比例的比值大于2, $p < 0.01$)和平均值 \pm 标准差表示。使用Welch's t 和非配对 t 检验计算, $****p < 0.0001$ 。

应的酶在肠道菌群中还没被发现，而宿主具有这种酶[12]。此外，Abx灌胃4周对小鼠体重没有影响（附录A中的图S3），提示经Abx干预的小鼠和未经Abx干预的小鼠从日常饮食中摄入Trp的量相等。这些数据表明，Abx促进了Trp通过粪便排出，改变了肠道菌群Trp代谢，降低了吲哚衍生物的产量，增加了Kyn的产量。

因此，Abx重塑了肠道菌群代谢，增加了Kyn的产量，减少了Trp的排泄，这可能供更多的Kyn和Trp进入宿主，从而影响宿主的代谢免疫反应。

3.5. 经抗生素干预的ALF小鼠血清Kyn和Kyn/Trp比值均升高

肝脏代谢Trp主要通过Kyn途径，色氨酸2,3-双加氧酶（tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO2）和吲哚胺2,3-双加氧酶（indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO）2参与其起始代谢反应[25]。与Con小鼠相比，ALF小鼠肝脏*Tdo*和*Ido2*基因的表达水平下调，与ALF小鼠相比，ALF+Abx小鼠肝脏*Tdo*和*Ido2*基因的表达水平上调[图5（a）]，提示ALF小鼠肝脏代谢Trp的能力降低，而在ALF+Abx小鼠肝脏中得到了改善。使用UPLC-MS的方法检测肝组织和血清中Trp以及Kyn的水平。虽然没有统计学差异，但ALF小鼠肝脏和血清Trp水平与Con小鼠相比有升高趋势[图5（b）]，可能是由于循环中游离Trp的水平升高所致。既往研究发现在暴发性肝衰竭中，外周血游离Trp水平升高，可能是由肝衰竭伴随的白蛋白水平的降低和非酯化脂肪酸（nonesterified fatty acid, NEFA）水平的升高所致[26–28]。与Con小鼠相比，ALF小鼠肝脏Kyn水平明显升高，而ALF+Abx小鼠肝脏Kyn水平呈上升趋势[图5

（c）]，这可能是ALF后的补偿反应，以应对肝脏局部严重的炎症反应。与Con和ALF小鼠相比，ALF+Abx小鼠血清Kyn水平显著升高[图5（c）]，这与Abx处理后小鼠粪便Kyn水平呈正相关[图5（d）]。血清Kyn/Trp的比值反映全身IDO活性，IDO介导的Trp降解是一种有效的免疫抑制机制[25]。在本研究，与Con小鼠和ALF小鼠相比，ALF+Abx小鼠血清Kyn/Trp比值升高[图5（e）]，提示ALF+Abx小鼠系统性IDO活性升高。

Abx诱导的肠道菌群结构的变化重塑了宿主的Trp代谢，导致ALF+Abx小鼠血清Kyn和Kyn/Trp比值的升高，这可能抑制了炎症反应，从而保护小鼠免受ALF的影响。

3.6. AhR信号在经抗生素预处理的ALF小鼠中部分逆转

Trp代谢物Kyn的抗炎和免疫抑制作用，主要是通过其作为内源性AhR的配体，结合AhR所介导的，AhR是一种可以调节局部和全身免疫反应的转录因子[12,14,29]。与Con小鼠相比，*Ahr*基因在ALF小鼠肝脏中表达下调，在ALF+Abx小鼠中表达得到改善[图6（a）]，提示AhR信号参与了ALF的病理生理过程。无活性的AhR定位于细胞质中，与配体结合触发AhR暴露其核定位位点，AhR复合物则转移到细胞核中并与AhR核转运蛋白（aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT）相互作用，诱导靶基因的转录，其中包括异物代谢酶细胞色素P450家族1亚家族A多肽-1（cytochrome P450 family-1 subfamily-A polypeptide-1, CYP1A1）[30]。与ALF小鼠相比，ALF+Abx小鼠中*Arnt*基因和AhR靶基因*Cyp1a1*的表达也上调[图6（a）]，提示AhR信号在ALF+Abx小鼠中得到了

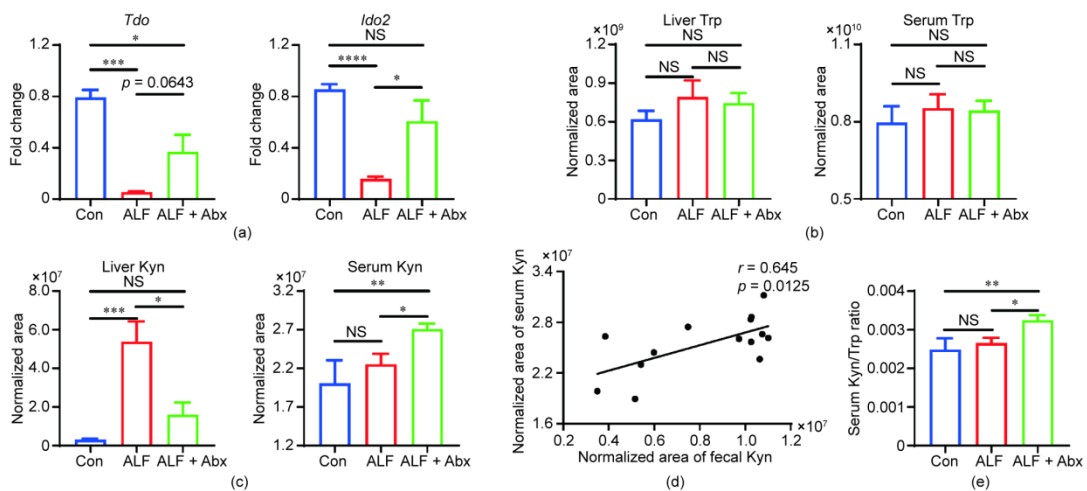


图5. 经抗生素干预的ALF小鼠血清Kyn和Kyn/Trp比值均升高。(a) 肝脏*Tdo*、*Ido2*基因表达水平 ($n = 5\sim 6$, 每组); (b) 肝脏和血清Trp的变化 ($n = 5\sim 9$, 每组); (c) 肝脏和血清Kyn的变化 ($n = 5\sim 9$, 每组); (d) 粪便Kyn和血清Kyn之间线性相关分析 ($n = 14$); (e) 血清中Kyn/Trp比值 ($n = 5\sim 9$, 每组)。数据以平均值 \pm 标准误表示。使用ANOVA、Kruskal-Wallis或Pearson检验计算, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

改善。为确定 *Ahr* 基因表达上调是否与 AhR 蛋白的表达一致，对肝组织切片进行了 AhR 免疫荧光染色，结果显示，与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠肝脏的 AhR 荧光活性显著增强[图 6 (b) 和附录 A 中的图 S4 (a)]。AhR 的激活可以通过调节生长因子和细胞周期，促进细胞增殖和存活[31]。用免疫组织化学染色的方法，检测肝组织 PCNA 的表达，结果显示，ALF 小鼠和 ALF + Abx 小鼠之间的肝细胞增殖状态存在明显差异[图 6 (c)]。与 Con 小鼠相比，ALF 小鼠肝脏的增殖指数下降，而 ALF + Abx 小鼠肝脏的增殖指数显著升高[附录 A 的图 S4 (b)]，提示 ALF + Abx 小鼠的肝细胞增殖活跃，这可能与 Kyn 依赖的 AhR 的激活有关。这些数据提示，AhR 信号在 ALF + Abx 小鼠中得以维持，由此产生的免疫抑制和组织修复作用，可能是 Abx 干预肠道菌群后肝损伤减轻的潜在机制之一。

3.7. 经抗生素预处理的 ALF 小鼠 TLR4 信号受损

在 D-Gal/LPS 诱导的 ALF 模型中，病理反应起始于 LPS 与细胞表面 TLR-4 的结合，而 D-Gal 可以提升啮齿动物对 LPS 的敏感性[32]。LPS 在细胞表面被识别的过程，不仅涉及 TLR-4，而且需要 LPS 结合蛋白 (lipopolysaccharide bonding protein, LBP) 和 CD14 分子，LBP 能够介

导 LPS 内吞而失活，CD14 主要负责 LPS/TLR-4 激活信号的传导[33]。虽然 ALF 小鼠与 ALF + Abx 小鼠 *Tlr4* 和 *Cd14* 基因在肝脏中的表达没有差异，但与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠肝脏 *Lbp* 基因的表达上调[图 7 (a)]，升高的 LBP 可能介导 LPS 内吞，从而减轻炎症反应。此外，肝组织 TLR-4 免疫荧光染色显示，与 Con 小鼠相比，ALF 小鼠肝脏 TLR-4 蛋白的表达升高，而 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠肝脏 TLR-4 蛋白的表达降低[图 7 (b) 和附录 A 的图 S5 (a)]。TLR-4 信号通路对巨噬细胞的募集和活化具有重要作用。肝组织巨噬细胞标志物 F4/80 的免疫荧光染色提示，与 Con 小鼠相比，ALF 小鼠肝脏巨噬细胞的募集和活化升高了，而在 ALF + Abx 小鼠肝脏中，则受到了抑制[图 7 (c)]。与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠的 F4/80 整合荧光强度下降也证实了这一点[附录 A 的图 S5 (b)]。与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠肝脏 *Dhcr24* 基因表达上调，DHCR24 可以抑制巨噬细胞产生炎症细胞因子 TNF- α ，而 *Tnf* 基因及其下游编码炎症小体的 *Nlrp3* 基因，其表达在 ALF + Abx 小鼠肝组织中都出现下调[图 7 (d)]。因此，TLR4 信号在 ALF + Abx 小鼠受到抑制，可能是 Kyn 诱导 AhR 激活导致免疫抑制的潜在机制之一。

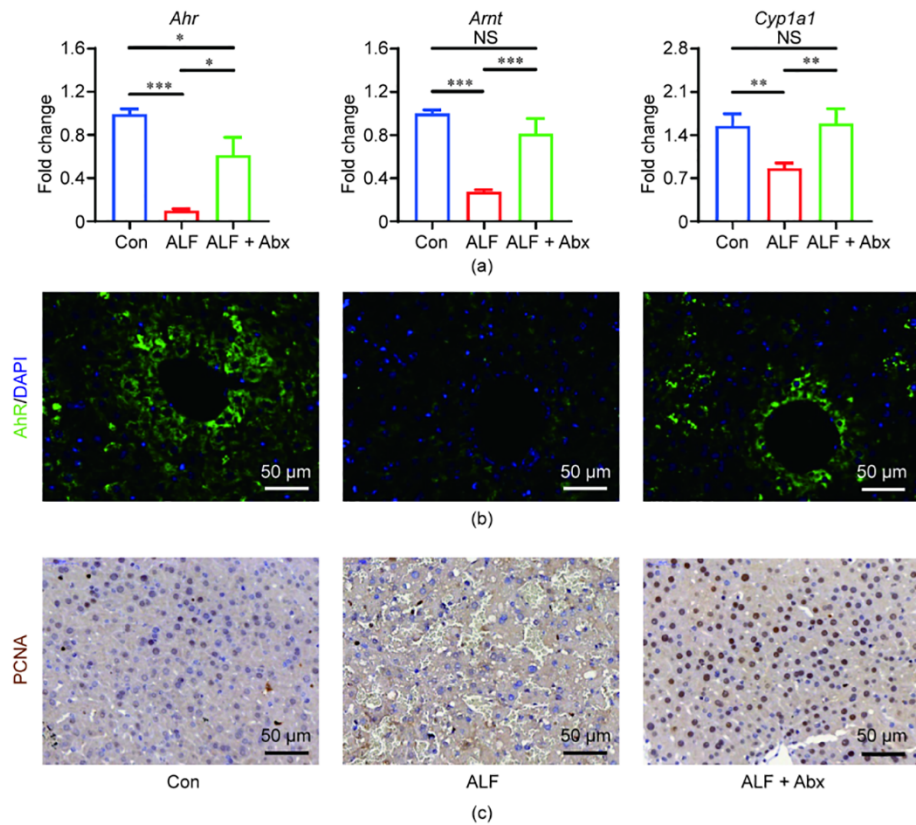


图 6. AhR 信号在经抗生素预处理的 ALF 小鼠中部分逆转。(a) 肝脏 *Ahr*、*Armt* 和 *Cyp1a1* 基因的表达水平 ($n = 10\sim 12$, 每组); (b) 肝脏 AhR 免疫荧光染色 (绿色); (c) 肝脏 PCNA 免疫组织化学染色。数据以平均值 \pm 标准误表示。使用 Kruskal-Wallis 检验计算, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

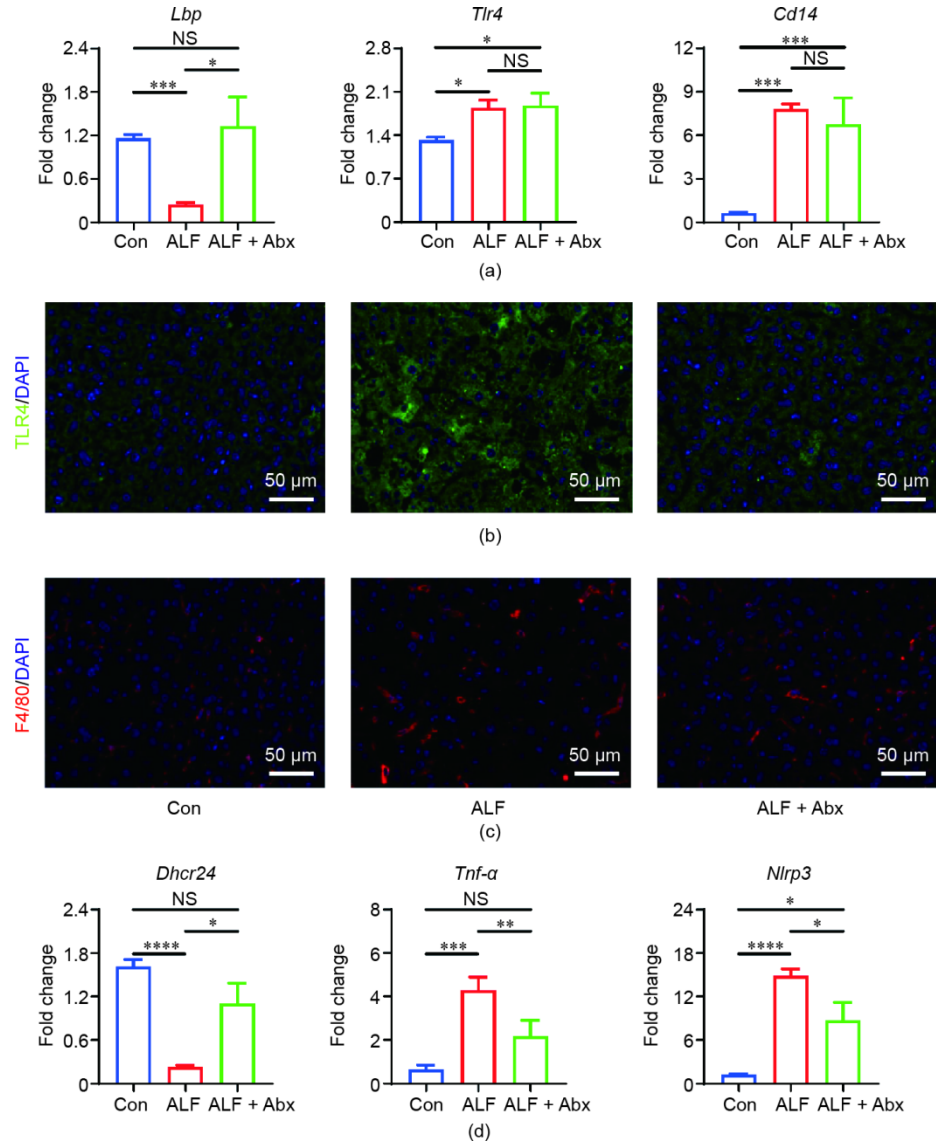


图7. 经抗生素预处理的ALF小鼠TLR4信号受损。(a) 肝脏*Lbp*、*Tlr4*和*Cd14*基因的表达水平 ($n = 10\sim 12$, 每组); (b) 肝脏TLR4免疫荧光染色(绿色); (c) 肝脏F4/80免疫荧光染色(红色); (d) 肝脏*Dhcr24*、*Tnf-a*和*Nlrp3*基因的表达水平 ($n = 10\sim 12$, 每组)。数据以平均值 \pm 标准误表示。使用ANOVA或Kruskal-Wallis检验计算, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

3.8. AhR激动剂部分模拟而拮抗剂不完全抵消抗生素对ALF小鼠的保护作用

进一步, 采用AhR靶向干预策略研究AhR在ALF中的作用。与ALF + Abx小鼠相比, ALF + Abx + AhR拮抗剂小鼠血清AST升高, 血清ALT有升高趋势[图8 (a)], 提示AhR拮抗剂加重了ALF + Abx小鼠的肝损伤。此外, AhR拮抗剂在诱导ALF后早期加速了经Abx预处理小鼠的死亡, 但在最终结局上不能完全抵消Abx预处理对ALF小鼠生存的影响[图8 (b)]。因此, 我们又评估了AhR激动剂对ALF的直接作用。与ALF小鼠相比, ALF + AhR激动剂小鼠的血清ALT降低, 血清AST有下降的趋势[图8 (c)]。此外, AhR激动剂延长了的ALF小鼠的生存时间, 但没有提高其生存率[图8 (d)]。与ALF小鼠相

比, ALF + AhR激动剂小鼠AhR靶向基因*Cyp1a1*表达上调, 提示AhR激动剂发挥了作用, *Lbp*基因表达呈升高趋势, 炎症因子*Tnf-a*基因表达下调[图8 (e)]。综上所述, 这些结果表明, AhR激动剂可以部分模拟, 而AhR拮抗剂不能完全抵消, Abx干预肠道菌群对ALF小鼠的保护作用, 提示Abx干预肠道菌群对ALF的影响至少在一定程度上是由AhR途径介导的。

4. 讨论

作为肝脏生理和病理生理的重要参与者, 肠道菌群已成为一个有吸引力的研究领域[34]。由于其特殊的解剖位

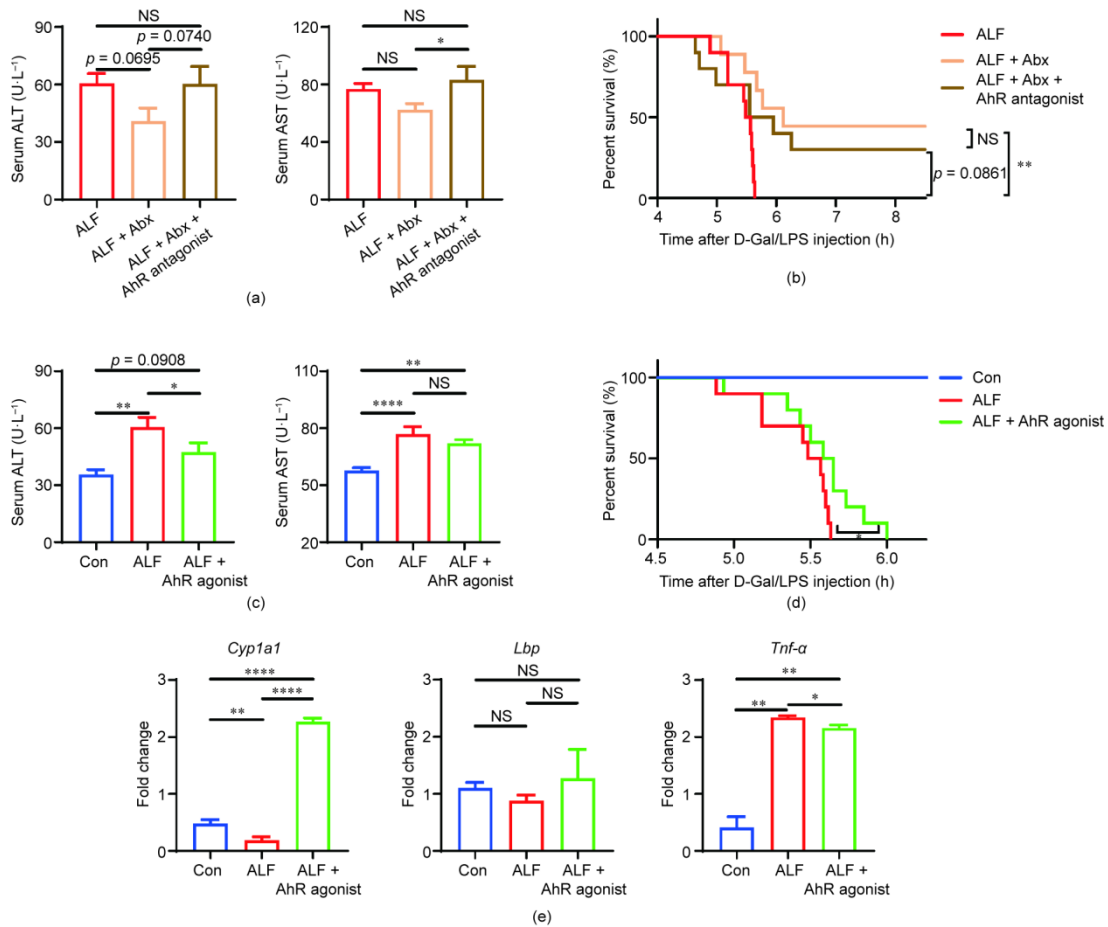


图8. AhR激动剂部分模拟而拮抗剂不完全抵消了抗生素对ALF小鼠的作用。(a)血清ALT和AST水平 ($n=9\sim 10$, 每组); (b) Kaplan-Meier生存曲线 ($n=9\sim 10$, 每组); (c)血清ALT和AST水平 ($n=8\sim 10$, 每组); (d) Kaplan-Meier生存曲线 ($n=8\sim 10$, 每组); (e)肝脏 *Cyp1a1*、*Lbp* 和 *Tnf-α* 基因的表达水平 ($n=4\sim 5$, 每组)。数据以平均值 \pm 标准误表示。使用ANOVA、Kruskal-Wallis或log-rank检验计算, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

置, 肝脏不断暴露于肠道来源的内毒素、抗原和微生物代谢物[35]。肠道来源的代谢物可以调节宿主的免疫系统, 使得肠道菌群在一定距离内可以发挥多种作用。SCFA、多胺和Trp代谢物是目前研究最多的三类由肠道菌群产生的代谢物[5]。肠道菌群结构的变化会导致肠道菌群代谢的改变, 可能会影响宿主的免疫反应。正常情况下, 免疫耐受维持肝脏的稳态。但是, 当平衡被打破, 免疫系统被内外因素过度激活时, 就会发生急性肝损伤。虽然既往的研究已经证明, 肠道来源的内毒素和抗原在肝损伤中发挥普遍作用[2], 肠道菌群代谢对肝损伤的影响尚不清楚。在这项研究中, 我们报道了此前未被重视的肠道菌群调控的色氨酸代谢在ALF的免疫调节中的作用。Abx增强了肠道菌群Trp代谢的Kyn产生, 允许更多的Trp进入宿主, 并增加了血清Kyn, 可能是通过AhR信号通路改善了D-Gal/LPS诱导的C57BL/6小鼠的ALF。

Abx预处理提高了D-Gal/LPS诱导的C57BL/6小鼠ALF的存活率。Abx灌胃预处理4周减少了肠道细菌负

荷, 限制了肠道来源的LPS。肠道来源的LPS已被证实是四氯化碳 (carbon tetrachloride, CC14)、乙醇、D-Gal或对乙酰氨基酚诱导的肝脏损伤模型中的关键辅助因子[2]。然而, 我们使用D-Gal联合LPS诱导ALF, 可以部分抵消Abx介导的肠道来源的LPS减少的效应。此外, 由于耐抗生素细菌的存在, Abx并不会完全清除细菌。因此, 肠道菌群在Abx处理后对ALF的作用有待进一步研究。

Abx干预4周扩大了特定的固有类群。在属水平, *Enterobacteriaceae unclassified*、*Escherichia-Shigella* 和 *Morganella* 构成了肠道菌群的大部分, 都能够产生色氨酸酶 (tryptophanase, TnaA), 从而代谢色氨酸产生吲哚[36]。吲哚是一种肠道菌群代谢Trp的产物。色氨酸是9种必需氨基酸之一, 对蛋白质的合成至关重要, 必须依赖于外源性摄入, 还可作为底物产生生物活性化合物。肠道在色氨酸代谢中起着重要作用, 主要包括三条代谢途径: 血清素途径、Kyn途径和吲哚途径[12]。一般来说, 肠道菌群主要将Trp代谢为吲哚和吲哚衍生物[37]。然而,

经 Abx 预处理小鼠的粪便中鉴定出的吲哚衍生物减少，而肠道菌群 Trp 代谢的平均比例增加，Kyn 增加。这些结果表明，Abx 使肠道菌群的 Trp 代谢转向 Kyn 的产生。有趣的是，经 Abx 预处理小鼠的粪便中 Trp 减少，表明 Abx 降低了肠道菌群对 Trp 的吸收。而且，在经 Abx 预处理小鼠以及无菌小鼠中，都观察到血清 Trp 水平升高，而能够被 FMT 纠正[10–11]。因此，肠道菌群不仅能代谢 Trp，还能调节宿主对 Trp 的利用。

正常情况下，摄入 Trp 后，一部分被肠道菌群利用，其余被宿主吸收。组织中 Trp 的含量很低，主要是以与白蛋白结合的形式在循环中，可被代谢的 Trp 只占 Trp 总量的 5%~10% [13,25]。Trp 代谢的主要途径是 Kyn 途径。肝脏含有一整套 Kyn 代谢途径的酶，在系统性 Trp 调节中具有重要作用[13]。TDO 和 IDO2 介导 Trp 在肝脏代谢的第一步，肝脏 TDO 可被其底物 Trp 直接诱导[25]。在本研究中，与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠肝脏中 *Tdo* 的表达升高，提示 Trp 的供给和代谢在 ALF + Abx 小鼠中增加。此外，与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠肝脏中 *Ido2* 表达上调。与 Con 小鼠和 ALF 小鼠相比，反映全身 IDO 活性的血清 Kyn/Trp 比值也在 ALF + Abx 小鼠中升高。IDO 在免疫细胞中高表达，IDO 介导的 Trp 代谢是代谢免疫调节的重要步骤[13]。其中，潜在机制可能是具有免疫调节活性的 Trp 代谢物的产生，如 Kyn [38]。此前的研究表明，Kyn 可以抑制自然杀伤细胞和抗原提呈细胞的功能，如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞[39–40]。此外，Kyn 抑制 T 细胞增殖导致 T 细胞死亡，而树突状细胞中 Kyn 的产生有助于调节性 T 细胞的增殖[41–42]。Kyn 还诱导树突状细胞对内毒素耐受[43]。Kyn 在炎症调节中的免疫抑制效应，在一定程度上是通过其作为 AhR 配体所介导的，AhR 是一种重要的转录因子，在免疫细胞中广泛表达，参与调节局部和系统的免疫反应[29]。

AhR 参与异物代谢，调控靶基因的转录，如细胞色素 P450 依赖的单氧酶 CYP1A1 和 CYP1A2 [30]。除了介导环境污染物的毒性外，AhR 还具有重要的免疫作用[44]。AhR 在健康和疾病中发挥着重要的免疫调节作用，如感染、神经系统疾病、炎症性肠病、自身免疫性疾病和代谢综合征[45–47]。AhR 与其他转录因子，如 NF- κ B 和 c-Maf，相互作用，调节其靶基因的转录[48]。除了基因组机制，AhR 还通过非基因组信号调节免疫应答。AhR 调控的 c-SRC 激活在疾病耐受防御通路的调节和抑制巨噬细胞对炎症刺激的反应中起着关键作用[49–50]。然而，AhR 信号在 ALF 中的作用尚不清楚。我们观察到 *Ahr* 基因表达在 D-Gal/LPS 诱导的 ALF 小鼠中显著下调，而在 ALF +

Abx 小鼠中得到改善，表明 Abx 的作用至少部分依赖于 AhR。与 ALF 小鼠相比，ALF + Abx 小鼠 *Arnt* 和 *Cyp1a1* 基因表达上调，表明 ALF + Abx 小鼠 AhR 被激活，AhR 免疫荧光活性升高也证实了这一点。AhR 激活介导的免疫调节可以防止失控的炎症反应。此外，AhR 具有调节细胞增殖和存活的双重功能，这可能与配体的剂量和作用时间、细胞类型的差异有关，也可能与是在体内或是体外进行的实验有关[31]。然而，AhR 通过调节受体表达，参与生长因子信号转导，促进抗凋亡，调节细胞周期，促进细胞因子表达，对组织再生具有重要作用[31]。在本研究中，通过 PCNA 免疫组化检测，观察到经 Abx 预处理的 ALF 小鼠和未经 Abx 预处理的 ALF 小鼠肝细胞增殖存在显著差异，提示 Abx 诱导的肠道菌群和宿主 Kyn 的增加刺激了肝脏的修复过程。此外，作为一种 AhR 激动剂，吲哚可能通过降低 *Cd14* 的 mRNA 水平而导致 LPS 信号通路受损[51]。LPS 在细胞表面的识别的生物过程涉及三个关键蛋白：TLR4、CD14 和 LBP。LBP 能够介导 LPS 的内化，而 CD14 主要负责 TLR4 激活信号的转导[33]。在低水平下，LBP 增强 LPS 诱导的炎症反应，而更高水平的 LBP 能够中和 LPS 并缓解 LPS 诱导的 TLR4 激活[52]。在本研究中，ALF + Abx 小鼠肝脏 *Lbp* 表达上调，这可能介导了 LPS 的内化或中和，进而抑制了 TLR4 信号。因此，AhR 介导的免疫抑制和细胞增殖可能都参与了 Abx 诱导的 Kyn 通路激活的保护作用。此外，AhR 拮抗剂不能完全抵消 Abx 预处理对 ALF 的保护作用，这可能与实验的规模、配体的作用时间和剂量、给药方式以及脱靶效应有关。然而，AhR 激动剂改善了小鼠的肝功能，延长了 ALF 小鼠的生存时间。因此，除了肠道菌群负荷降低伴随的肠道来源 LPS 的减少，肠道菌群调控的色氨酸代谢可以通过调节 AhR 信号通路降低宿主对肝损伤的易感性。

虽然 ALF 是一个重要的临床难题，但使用 Abx 进行预处理很大程度上限制了其治疗潜力。进一步的介入研究需要评估 ALF 发病后直接补充 Kyn 或 AhR 靶向治疗的效果。然而，在肝移植的情况下，受体经 Abx 预处理后减轻了肝脏缺血再灌注损伤，并改善了小鼠和人原位肝移植的预后[16]。虽然目前还不清楚 Abx 介导的 Kyn-AhR 激活是否与其潜在机制有关，但 Abx 治疗可能适合于需要接受肝移植，但正在等待肝脏供体的晚期 ALF 患者。然而，应该注意的是，考虑到耐药细菌和经济效益，并不鼓励过度使用 Abx，因此，需要进一步研究合适的 Abx 方案，如利福昔明，以及其他的肠道菌群干预策略，如益生菌、益生元和后生元等。此外，AhR 与慢性疾病有关，如非酒精性脂肪肝、酒精性肝病和肝纤维化[46–47,53]。由于这些肝

损伤比 ALF 持续的时间更长，因此肠道菌群干预可能用于提高 AhR 活性并在确诊疾病后减轻肝脏损伤。

这项研究存在一定的局限性。虽然结合免疫组化、免疫荧光染色和实时定量 PCR 可以确定蛋白质表达水平，蛋白质电泳检测的结果可能更具有说服力。另外，仅使用了非靶向的方法检测代谢物，靶向的方法可以更好地确认代谢物。此外，利用基因敲除动物是研究 AhR 在 ALF 中功能的理想方法。未来的研究需加以注意和克服这些不足。

总之，这项研究增加了目前对 Abx 介导的肠道菌群如何通过调节宿主代谢免疫反应影响肝脏疾病易感性的认识。Abx 使肠道菌群的色氨酸代谢转向 Kyn 的产生，并向宿主释放了更多的 Trp，这增加了免疫抑制代谢物 Kyn 的产生，从而改善了 D-Gal/LPS 诱导的 ALF，可能是通过 AhR 信号通路。本研究提示肠道菌群调控的 Trp 代谢通过调节 AhR 影响宿主对肝脏疾病的易感性。进一步研究肠道菌群-宿主 Trp 共代谢将为肝脏疾病提供有前景的治疗策略。

致谢

本研究由国家自然科学基金重大项目(81790630, 81790633)、中德科学中心中德合作与交流项目(GZ1546)和中国医学科学院医学科学创新基金(2019-I2M-5-045)资助。

Compliance with ethics guidelines

Zhipeng Zheng, Li Wu, Yuqiu Han, Jun Chen, Shuai Zhu, Yuanyuan Yao, Baohong Wang, and Lanjuan Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.12.013>.

References

- [1] Stravitz RT, Lee WM. Acute liver failure. *Lancet* 2019;394(10201):869–81.
- [2] Nolan JP. The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history. *Hepatology* 2010;52(5):1829–35.

- [3] Wei Y, Zeng B, Chen J, Cui G, Lu C, Wu W, et al. Enterogenous bacterial glycolipids are required for the generation of natural killer T cells mediated liver injury. *Sci Rep* 2016;6(1):36365.
- [4] Sharon G, Garg N, Debelius J, Knight R, Dorrestein P, Mazmanian S. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab* 2014;20(5):719–30.
- [5] Postler TS, Ghosh S. Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab* 2017;26(1):110–30.
- [6] Blacher E, Levy M, Tatirovsky E, Elinav E. Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity. *J Immunol* 2017;198(2):572–80.
- [7] Morgun A, Dzutsev A, Dong X, Greer RL, Sexton DJ, Ravel J, et al. Uncovering effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. *Gut* 2015;64(11):1732–43.
- [8] Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol* 2012;33(9):459–66.
- [9] Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, Chang MW, Marotz CA, Saghatelian A, et al. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat Commun* 2018;9(1):2872.
- [10] Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome–gut–brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 2013;18(6):666–73.
- [11] Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O’ Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun* 2015;48:165–73.
- [12] Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe* 2018;23(6):716–24.
- [13] Cervenka I, Agudelo LZ, Ruas JL. Kynurenines: tryptophan’s metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science* 2017;357(6349):eaaf9794.
- [14] Clària J, Moreau R, Fenaile F, Amorós A, Junot C, Gronbaek H, alet; CANONIC Study Investigators of the EASL Clif Consortium, Grifols Chair and the European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure (EF Clif). Orchestration of tryptophan–kynurenine pathway, acute decompensation, and acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. *Hepatology* 2019;69(4):1686–701.
- [15] He B, Liu Y, Hoang TK, Tian X, Taylor CM, Luo M, et al. Antibiotic-modulated microbiome suppresses lethal inflammation and prolongs lifespan in Tregdeficient mice. *Microbiome* 2019;7(1):145.
- [16] Nakamura K, Kageyama S, Ito T, Hirao H, Kadono K, Aziz A, et al. Antibiotic pretreatment alleviates liver transplant damage in mice and humans. *J Clin Invest* 2019;129(8):3420–34.
- [17] Gehrke N, Hövelmeyer N, Waisman A, Straub BK, Weinmann-Menke J, Wörns MA, et al. Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation. *J Hepatol* 2018;68(5):986–95.
- [18] Taniki N, Nakamoto N, Chu PS, Mikami Y, Amiya T, Teratani T, et al. Intestinal barrier regulates immune responses in the liver via IL-10-producing macrophages. *JCI Insight* 2018;3(12):e91980.
- [19] 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(1):51–9.
- [20] Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2011;141(1):237–48.e1.
- [21] Wu W, Lv L, Shi D, Ye J, Fang D, Guo F, et al. Protective effect of *Akkermansia muciniphila* against immune-mediated liver injury in a mouse model. *Front Microbiol* 2017;8:1804.
- [22] Cao H, Huang H, Xu W, Chen D, Yu J, Li J, et al. Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2011; 691(1–2):68–75.
- [23] Huang Q, Tan Y, Yin P, Ye G, Gao P, Lu X, et al. Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. *Cancer Res* 2013;73(16):4992–5002.
- [24] Simonato M, Fochi I, Vedovelli L, Giambelluca S, Carollo C, Padalino M, et al. Urinary metabolomics reveals kynurenine pathway perturbation in newborns with transposition of great arteries after surgical repair. *Metabolomics* 2019;15(11):145.
- [25] Comai S, Bertazzo A, Brughera M, Crotti S. Tryptophan in health and disease. *Adv Clin Chem* 2020;95:165–218.
- [26] Hijikata Y, Hara K, Shiozaki Y, Murata K, Sameshima Y. Determination of free tryptophan in plasma and its clinical applications. *J Clin Chem Clin Biochem*

- 1984;22(4):291–9.
- [27] Badawy A. Letter to the editor: the kynurenine pathway in hepatic cirrhosis. *Hepatology* 2019;70(3):1077–8.
- [28] Günther J, Fallarino F, Fuchs D, Wirthgen E. Editorial: immunomodulatory roles of tryptophan metabolites in inflammation and cancer. *Front Immunol* 2020;11:1497.
- [29] Sorgdrager FJH, Naudé PJW, Kema IP, Nollen EA, Deyn PPD. Tryptophan metabolism in inflammaging: from biomarker to therapeutic target. *Front Immunol* 2019;10:2565.
- [30] Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity* 2018;48(1):19–33.
- [31] Yin J, Sheng B, Qiu Y, Yang K, Xiao W, Yang H. Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival. *Cell Prolif* 2016;49(5):554–60.
- [32] Maes M, Vinken M, Jaeschke H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;290:86–97.
- [33] Gegner JA, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J Biol Chem* 1995;270(10):5320–5.
- [34] Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, Karin M, Looma R, Schnabl B, et al. The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15(7):397–411.
- [35] Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver—from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13(2):88–110.
- [36] Lee JH, Lee J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34(4):426–44.
- [37] Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun* 2018;9(1):3294.
- [38] Mándi Y, Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm* 2012;119(2):197–209.
- [39] Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002;196(4):459–68.
- [40] Orabona C, Puccetti P, Vacca C, Biccianti S, Luchini A, Fallarino F, et al. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 2006;107(7):2846–54.
- [41] Belladonna ML, Puccetti P, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Volpi C, et al. Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation* 2007;84(1 Suppl):S17–20.
- [42] Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, Chauveau C, Asghar K, Tesson L, et al. IDO expands human CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* 2007;37(11):3054–62.
- [43] Manni G, Mondanelli G, Scalisi G, Pallotta MT, Nardi D, Padiglioni E, et al. Pharmacologic induction of endotoxin tolerance in dendritic cells by l-kynurenine. *Front Immunol* 2020;11:292.
- [44] Esser C. The aryl hydrocarbon receptor in immunity: tools and potential. *Methods Mol Biol* 2016;1371:239–57.
- [45] Neavin DR, Liu D, Ray B, Weinshilboum RM. The role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune and inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2018;19(12):3851.
- [46] Natividad JM, Agus A, Planchais J, Lamas B, Jarry AC, Martin R, et al. Impaired aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is a key factor in metabolic syndrome. *Cell Metab* 2018;28(5):737–49.e4.
- [47] Krishnan S, Ding Y, Saedi N, Choi M, Sridharan GV, Sherr DH, et al. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages. *Cell Reports* 2018;23(4):1099–111.
- [48] Hankinson O. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys* 2005;433(2):379–86.
- [49] Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Matino D, Servillo G, Brunacci C, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* 2014;511(7508):184–90.
- [50] Quintana FJ. LeA(H)Rning self-control. *Cell Res* 2014;24(10):1155–6.
- [51] Beaumont M, Neyrinck AM, Olivares M, Rodriguez J, Rocca Serra A, Roumain M, et al. The gut microbiota metabolite indole alleviates liver inflammation in mice. *FASEB J* 2018;32(12):6681–93.
- [52] Gutschmann T, Muller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun* 2001;69(11):6942–50.
- [53] Yan J, Tung HC, Li S, Niu Y, Garbacz WG, Lu P, et al. Aryl hydrocarbon receptor signaling prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in mice. *Gastroenterology* 2019;157(3):793–806.e14.