

低剂量黄连素对小鼠肠道短链脂肪酸和胆汁酸成分以及血脂的影响

谭文倩 李锐 于鑫 蒋露芳 王娜 王和兴[△] 姜庆五

(复旦大学公共卫生学院流行病学教研室-公共卫生安全教育重点实验室 上海 200032)

【摘要】 目的 研究低剂量黄连素对正常饮食小鼠肠道短链脂肪酸、胆汁酸以及血脂的影响,探讨其降血脂作用的机制。**方法** 40只C57BL/6小鼠被随机分为对照组和黄连素低、中、高剂量组,每组雌雄各5只。除对照组外,低、中、高剂量实验组分别以10、20、40 mg·kg⁻¹·d⁻¹的剂量将黄连素添加至饮水中进行干预。4周后检测体脂率、瘦体重率、血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、三酰甘油(triglyceride, TG)含量,并用气相色谱法(gas chromatography, GC)检测肠道短链脂肪酸含量,用液相色谱串联质谱法(liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, LC-MS)检测肠道胆汁酸含量。**结果** 雄性小鼠黄连素组肠道异丁酸(isobutyric acid, IBA)、异戊酸(isovaleric acid, IVA)、胆酸(cholic acid, CA)、鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)及去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)含量明显高于对照组且随黄连素剂量升高而升高($P<0.05$),血清TG水平随黄连素剂量升高而降低($P<0.01$)。雌性小鼠黄连素组肠道胆酸及石胆酸(lithocholic acid, LCA)含量明显高于对照组且随黄连素剂量升高而升高($P<0.05$),血脂及肠道短链脂肪酸含量的差异无统计学意义。**结论** 低剂量黄连素可以促进正常饮食小鼠肠道短链脂肪酸和胆汁酸产生,降低正常饮食小鼠血清TG水平。低剂量黄连素的降血脂效果在雄性小鼠中更明显。

【关键词】 黄连素(BBR); 低剂量; 短链脂肪酸(SCFA); 胆汁酸(BA); 血脂; 小鼠

【中图分类号】 R975+.3 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2020.01.016

Effects of low-dose berberine on composition of short chain fatty acids and bile acids in the intestinal tract and serum lipids in mice

TAN Wen-qian, LI Rui, YU Xin, JIANG Lu-fang, WANG Na, WANG He-xing[△], JIANG Qing-wu

(Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education-Department of Epidemiology,

School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of low-dose berberine (BBR) on short chain fatty acids (SCFAs), bile acids (BAs) and serum lipids in normal chow-diet mice, and to explore the possible mechanism of berberine's lipid-lowering effect. **Methods** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into three exposed groups and one control group, and three were 5 male and 5 female mice in each group. Mice of the three exposed groups were respectively administrated with 10, 20 and 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of BBR added drinking water for four weeks. Fat content, lean content, serum total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triglyceride (TG) were evaluated. SCFAs and BAs were examined by gas chromatography (GC) and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS). **Results** For male mice, isobutyric acid (IBA), isovaleric acid (IVA), cholic

上海市科委科研项目(16ZR1403400);上海市卫计委科研课题(201740113)

[△]Corresponding author E-mail: wanghexing@fudan.edu.cn

网络首发时间:2020-01-02 16:31:35 网络首发地址:https://kns.cnki.net/KCMS/detail/31.1885.R.20191231.0833.014.html

acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), taurocholic acid (TCA) and deoxycholic acid (DCA) level increased with BBR dose and were higher than those in the control group ($P < 0.05$), while TG level decreased with oral BBR dose ($P < 0.01$). For female mice, CA and lithocholic acid (LCA) level increased with BBR dose and were higher than control group ($P < 0.05$). There weren't any differences of serum lipids and SCFAs in female mice. **Conclusions** Oral low-dose BBR can lower serum TG level in mice through generating SCFAs and BAs. Its lipid-lowering effects were more obvious in male mice.

【Key words】 berberine (BBR); low dose; short chain fatty acid (SCFA); bile acid (BA); serum lipid; mouse

* This work was supported by the Scientific Research Program of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (16ZR1403400) and the Scientific Research Project of Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission (201740113).

黄连素提取自我国传统的中药材,近年来其降血脂效用得到研究者的广泛关注。大量研究已经确认0.6~2.7 g/天的黄连素可以有效降低患者血中总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白胆固醇含量并升高高密度脂蛋白胆固醇含量^[1-4],其广泛应用于2型糖尿病、高脂血症及心血管疾病的治疗中^[5-7]。最近,低剂量黄连素(0.5 g/天)也被提议用作功能食品调节血脂,并日常应用于高脂血症等疾病的预防控制中^[8-9]。尽管在高脂血症患者中能观察到降血脂效果,但其对一般状态下机体血脂的影响还需进一步研究。

许多研究探索了黄连素调节血脂的机制^[10],但口服黄连素的肠道吸收率低于1%^[11],其调节血脂的机制很可能经由机体的肠道菌群并通过其代谢产物短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)和胆汁酸(bile acid, BA)影响血脂^[12-14]。SCFA在盲肠和结肠中由肠道菌群发酵难消化碳水化合物产生,其可通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、游离脂肪酸受体2和3(Far2, Far3)在不同的组织中影响脂质代谢^[15]。而肠道菌群可以调节BA的组成,并可由此介导细胞核激素受体——法尼醇受体X(FXR)和跨膜G蛋白偶联受体5(TGR5)以调节脂质代谢与能量消耗^[14,16]。目前,已有部分高剂量黄连素研究证据支持这一作用机制^[13,16-17],但尚不明确低剂量黄连素能否由此对血脂进行调节。

为进一步揭示黄连素对血脂的影响及其作用机制,本实验拟研究低剂量黄连素对正常小鼠血脂、肠道SCFA及BA的影响,为该药降血脂作用的机制研究及其合理应用提供科学证据。

材 料 和 方 法

材料与试剂 40只清洁级3周龄C57BL/6小

鼠,雌雄各半,购自复旦大学实验动物科学部。黄连素(Berberine, BBR)(生产批号:K041G005)购于上海安谱实验科技公司。胆酸(cholic acid, CA)、去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)、鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)、石胆酸(lithocholic acid, LCA)、熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)、猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid, HDCA)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)、牛磺鹅胆酸盐(taurochenodeoxycholate, TCDC)、甘氨脱氧胆酸盐(glycochenodeoxycholate, GCDC)、甘氨胆酸(glycocholic acid, GCA)及同位素标记的胆汁酸均购自美国Sigma-Aldrich公司。乙酸(acetic acid, AA)、丙酸(propionic acid, PPA)、丁酸(n-butyric acid, NBA)、异丁酸(isobutyric acid, IBA)、戊酸(n-valeric acid, NVA)、异戊酸(isovaleric acid, IVA)及2-乙基丁酸(2-ethylbutyric acid, EBA)购于德国Dr. Ehrenstorfer公司。血总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、三酰甘油(TG)、载脂蛋白A1(apolipoprotein A1, Apo A1)和脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]测定试剂盒购于上海复星长征医学公司。其余为国产分析纯试剂。

动物分组与处理 本研究经复旦大学动物伦理委员会批准。经过1周的适应性喂养后,使用简单随机法将40只C57BL/6小鼠随机分为对照组和BBR低、中、高剂量组(10、20、40 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组雌雄各半。依照小鼠150 mL·kg⁻¹·d⁻¹^[18]的饮水量分别以66.7、133.4和266.8 mg/L的浓度被加入饮水中。暴露剂量参考黄连素作为功能食品的推荐剂量^[8-9]。所有分组均给予正常饮食并自由饮水摄食。4周后测量小鼠体脂率及瘦体重率;禁食不禁水12 h后,眼球取血,颈椎脱臼处死,解剖并收

集小鼠结肠内容物, -80°C 保存。

身体脂率、瘦体重率及血脂的测定 小鼠的身体脂肪、水份、瘦体重、体脂率及瘦体重率经 Meso-QMR 核磁共振分析仪(苏州钮迈分析仪器股份有限公司)测定。血脂指标的检测包括血总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、三酰甘油、载脂蛋白 A1 和脂蛋白(a), 均使用 BECKMAN COULTER AU680 全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司)测定。

短链脂肪酸的检测 短链脂肪酸的检测包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸, 依照本实验室先前建立的检测方法进行^[19]。将 50 mg 的结肠内容物与 1 mL 0.5 mol/L 草酸溶液混合, 加入 2-乙基丁酸作为内标, 充分反应 5 min。以 $6\,000\times g$ 的速度离心 10 min 后, 将上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。取 1 μL 滤液用气相色谱仪联合火焰离子化检测器(GC-FID)进行短链脂肪酸定量分析。

色谱条件 色谱柱: DB-FFAP 弹性石英毛细管柱($30\text{ m}\times 0.53\text{ mm}\times 1.0\text{ }\mu\text{m}$); 色谱柱升温程序: 初始温度 50°C 保持 1 min, 以 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 180°C 保持 1 min, 再以 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 200°C 保持 2 min。进样口温度 $200^{\circ}\text{C}\sim 240^{\circ}\text{C}$; 分流比 30:1; 载气为氮气, 流速 6.44 mL/min; 尾吹气为氮气, 流速 30 mL/min; 氢气流速 40 mL/min; 空气流速 400 mL/min。

胆汁酸的检测 胆汁酸的检测包括胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸、石胆酸、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺鹅胆酸盐、甘氨脱氧胆酸盐和甘氨酸, 使用液质联用系统^[19]。取 50.0 mg 结肠内容物并加入同位素标记物 LCA-d4 和 CA-d5 作为内标物, 将其与 1 mL 0.2 mol/L NaOH 充分混合 20 min 后, 以 $6\,000\times g$ 的速度离心 10 min, 重复 3 次。将提取的上清液加至甲醇水溶液(1:1)活化后的 HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL)中, 以 2 mL 20% 甲醇水溶液洗涤柱, 并使用 3 mL 含 1% 甲酸的乙腈甲醇溶液(9:1)洗脱胆汁酸。弱氮气流气化挥干洗脱液后, 将胆汁酸以 0.5 mL 50% 甲醇水溶液重新溶解, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。吸取 10 μL 滤液用超高效液相色谱串联高分辨率四极杆飞行时间质谱(UPLC-ToF-MS)进行定量分析。

色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 超高效液相色谱柱($100\text{ mm}\times 3.0\text{ mm}\times 1.8\text{ }\mu\text{m}$);

柱温 50°C ; 流速 0.55 mL/min; 流动相为甲醇和含有 0.1% 甲酸的水溶液。线性洗脱程序: 0~3 min, 甲醇从 5% 增至 35%; 3~6 min, 甲醇增至 65%; 6~8 min, 甲醇增至 80%; 8~9 min, 甲醇增至 90%; 9~10 min, 甲醇增至 95%; 10~10.5 min, 甲醇增至 98%; 10.5~11 min, 甲醇降至 5% 并保持至 12 min。

质谱条件 脱溶剂气为氮气; 碰撞气为氩气; 脱溶剂气流速 800 L/h, 锥孔气流速 30 L/h; 毛细管电压 2.8 kV; 锥孔电压 30 V; 脱溶剂气温度 400°C ; 源温度 110°C 。

数据分析 应用 SPSS 25.0 软件和 Graphpad prism 8.0 进行数据分析与呈现。正态性检验使用 Shapiro-Wilk 检验, 方差同质性检验使用 Levene 检验, 对不符合正态分布和方差同质性的数据进行对数变换后再比较。符合正态分布和/或方差同质性的数据使用双因素方差分析或单因素方差分析, 事后比较使用 Dunnett's *t*-test。不符合正态分布的资料使用 Kruskal-Wallis H 检验。剂量反应关系使用 Spearman 秩和分析方法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

低剂量黄连素对小鼠体重、体脂率及瘦体重率的影响 4 周内雌雄小鼠体重的差异无统计学意义, 体重增加在正常范围内(图 1)。雌雄小鼠第 4 周末体脂率及瘦体重率的差异无统计学意义(图 2)。

低剂量黄连素对小鼠肠道短链脂肪酸的影响 各组小鼠肠道短链脂肪酸含量如图 3 所示。雄性 20 mg/kg 组小鼠肠道中异丁酸和异戊酸含量明显高于对照组(异丁酸: $P=0.008$; 异戊酸: $P=0.027$), 各组乙酸、丙酸、丁酸、戊酸及总短链脂肪酸含量的差异无统计学意义。雌性小鼠各组间短链脂肪酸含量的差异无统计学意义。

低剂量黄连素对小鼠肠道胆汁酸的影响 各组小鼠肠道胆汁酸含量如图 4 所示。雌性小鼠 10 mg/kg 组肠道胆酸、石胆酸以及熊去氧胆酸与猪去氧胆酸含量之和明显高于对照组(胆酸: $P=0.03$; 石胆酸: $P=0.023$; 熊去氧胆酸和猪去氧胆酸: $P=0.02$), 且 20 mg/kg 组胆酸含量亦高于对照组。其余各类胆汁酸含量与对照组相比差异无统计学意义。

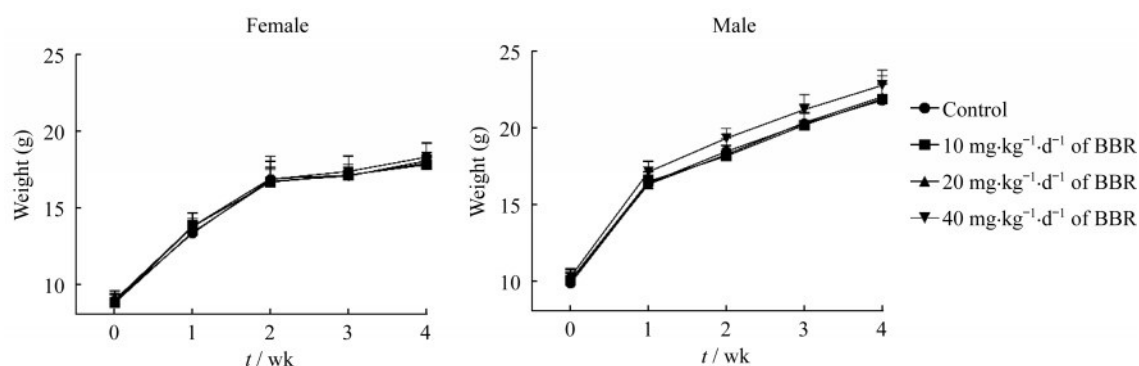


图1 各组小鼠在实验期间的体重变化情况

Fig 1 Weight gains of mice in the four experimental weeks for mice

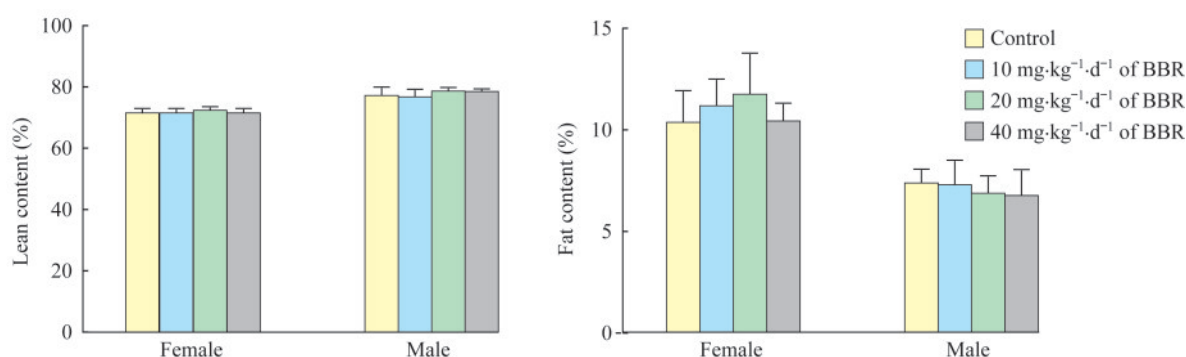
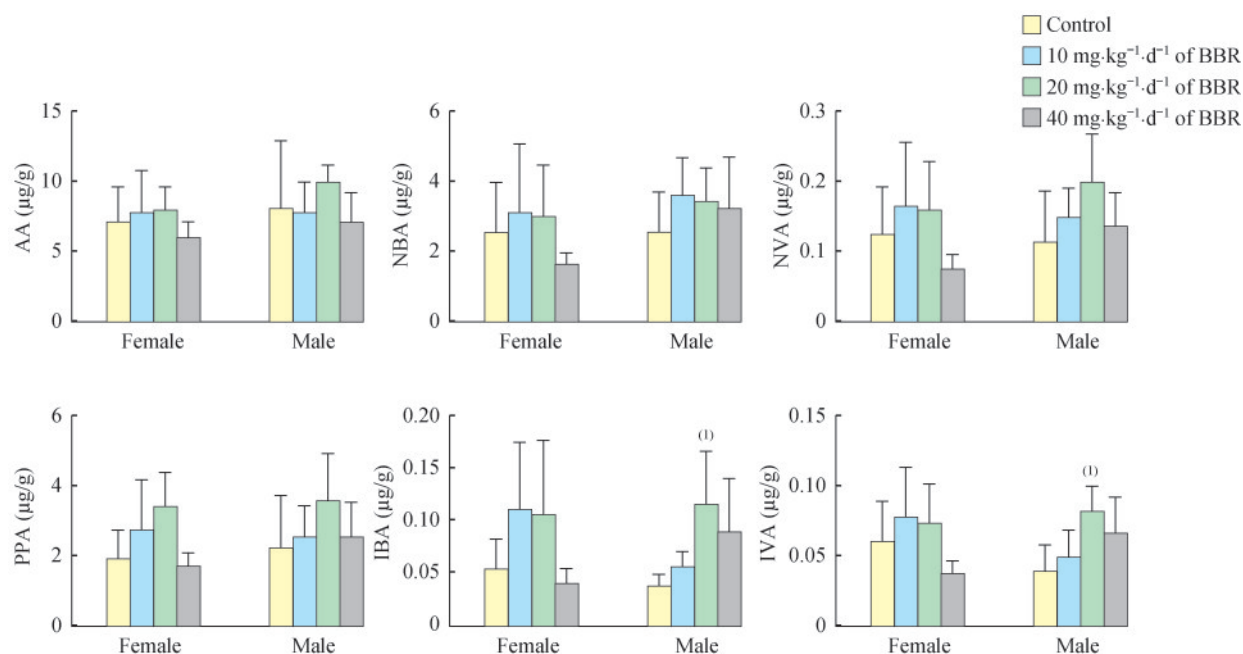


图2 第4周末各组小鼠体脂率及瘦体重率比较

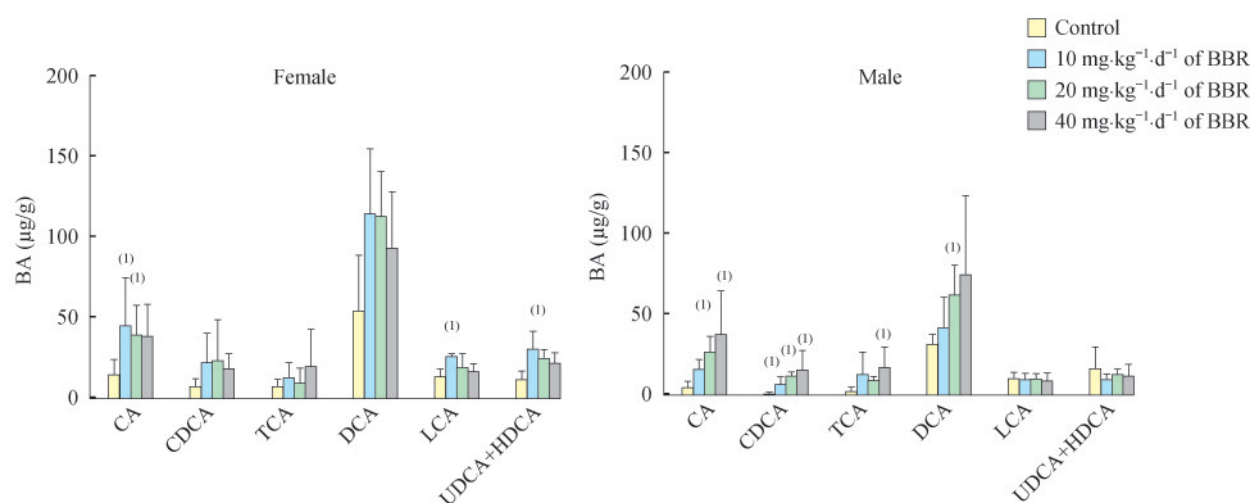
Fig 2 Lean content and fat content of mice at the end of the fourth week



vs. the control group, ⁽¹⁾ $P < 0.05$. AA: Acetic acid; NBA: n-butyric acid; NVA: n-valeric acid; PPA: Propionic acid; IBA: Isobutyric acid; IVA: Isovaleric acid.

图3 各组小鼠肠道短链脂肪酸含量比较

Fig 3 Contents of SCFAs in the intestinal tract among the four mice groups



⁽ⁱ⁾ vs. the control group, $P < 0.05$. CA: Cholic acid; CDCA: Chenodeoxycholic acid; TCA: Taurocholic acid; DCA: Deoxycholic acid; LCA: Lithocholic acid; UDCA: Ursodeoxycholic acid; HDCA: Hyodeoxycholic acid.

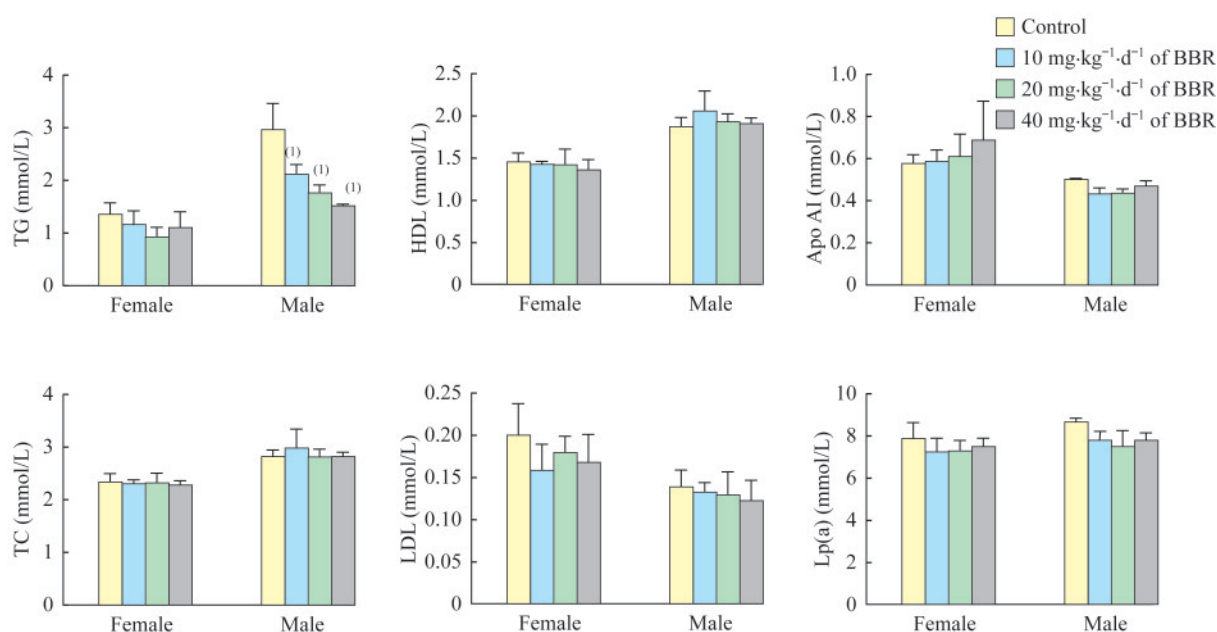
图4 各组小鼠肠道胆汁酸含量比较

Fig 4 Contents of BAs in the intestinal tract among the four mice groups

而雄性小鼠中,胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺胆酸和去氧胆酸随剂量升高而升高(胆酸: $P=0.005$;鹅去氧胆酸: $P=0.004$;牛磺胆酸: $P=0.004$;去氧胆酸: $P=0.008$),其余各胆汁酸含量与对照组相比差异无统计学意义。

低剂量黄连素对小鼠血脂的影响 由图5可见,喂养4周后,雄性实验组小鼠的血清三酰甘油随

着黄连素剂量升高呈现下降趋势(10 mg/kg组: $P=0.009$; 20 mg/kg组: $P=0.001$; 40 mg/kg组: $P<0.001$)。而血总胆固醇,高密度脂蛋白,低密度脂蛋白,载脂蛋白A1和脂蛋白(a)含量与对照组相比的差异无统计学意义。各组雌性小鼠的血脂指标差异无统计学意义。



⁽ⁱ⁾ vs. the control group, $P < 0.05$. TG: Triglyceride; TC: Total cholesterol; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; Apo A1: Apolipoprotein A1; Lp(a): Lipoprotein(a).

图5 各组小鼠的血脂指标比较

Fig 5 Indices of serum lipids among the four mice groups

讨 论

本研究选取正常饮食的C57BL/6小鼠作为研究对象,并选用了黄连素作为功能食品的推荐剂量作为暴露剂量^[8-9],探索了低剂量黄连素对普通状态机体的血脂调节作用。本研究结果显示低剂量黄连素增加了正常饮食小鼠肠道短链脂肪酸及胆汁酸的含量,并能降低其血清三酰甘油水平,但其效应有明显的性别差异。这与Jia^[20]及Hu^[21]等研究中使用雄性高脂饮食动物模型进行黄连素干预的结果一致,补充了低剂量黄连素对普通状态机体血脂调节的数据资料。但既往研究较少使用雌性动物,黄连素对雌性的血脂调节作用还需更广泛的动物及临床试验进行验证。短链脂肪酸是肠道菌群在肠道中发酵难消化碳水化合物产生的小分子化合物,能被快速吸收进入血液,在许多组织中加快脂肪酸的氧化,还能减少脂肪在白色脂肪组织中储存^[25],是机体能量吸收与物质代谢的关键物质^[12,15]。本研究首次发现低剂量黄连素的使用增加了小鼠异丁酸和异戊酸的含量。异丁酸和异戊酸可以减少激素敏感性脂肪酶(HSL)的磷酸化作用^[22],并由此抑制异丙肾上腺素刺激导致的脂肪生成^[23]。异丁酸和异戊酸还能抑制胰岛素介导的脂肪生成,对机体脂质代谢平衡有重要影响^[22],这与研究结果中短链脂肪酸含量变化与血脂指标变化相符。在仓鼠中的实验研究发现,相对高剂量($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)黄连素导致丁酸产生细菌的富集并增加丁酸的产生,降低血脂水平^[13]。这些研究结果提示黄连素导致的菌群结构改变可能是短链脂肪酸含量及血脂水平变化的重要原因^[17]。本研究结果仅观察到异丁酸和异戊酸含量的变化,还需要深入研究低剂量黄连素对肠道菌群结构特别是异丁酸、异戊酸产生菌的影响,并进一步探讨异丁酸和异戊酸对血脂作用的影响与机制。

胆汁酸不但能促进脂质的消化吸收,还是重要的信号分子,在脂质代谢与胆固醇平衡的调节中扮演了重要角色^[14]。本研究发现,3种初级胆汁酸(胆酸、鹅脱氧胆酸和牛磺胆酸)含量在雄性小鼠中随黄连素剂量升高而升高,这一结果与Guo等^[24]和Sun等^[16]的研究一致,而且在雄性小鼠中发现黄连素导致1种次级胆汁酸(去氧胆酸)含量升高。有研

究报道胆酸、鹅脱氧胆酸、牛磺胆酸及去氧胆酸均能激活法尼醇受体X(FXR)^[14],增加肝脏脂肪酸氧化,由此降低三酰甘油水平^[25],激活FXR,提高极低密度脂蛋白受体的表达并加快血三酰甘油的清除^[25]。这与本研究中雄性小鼠实验组三酰甘油水平降低的结果相符,黄连素可能通过增加初级胆汁酸及部分次级胆汁酸含量而发挥降血脂作用。尽管在雌性小鼠中,黄连素也导致胆酸和熊去氧胆酸或猪去氧胆酸含量增加,但熊去氧胆酸则会抑制FXR的活化^[26],对三酰甘油的清除造成影响,这可能部分解释了为何在雌性小鼠中未观察到血脂降低的现象。

本研究仅在雄性小鼠中观察到血清三酰甘油水平下降及异丁酸、异戊酸含量升高,且雌雄性小鼠胆汁酸的差异种类各有不同,这可能与肠道菌群有关。雌雄小鼠的肠道菌群结构存在差异^[27],而肠道菌群结构不仅会影响机体短链脂肪酸、胆汁酸和脂质代谢^[14-15,28],还与药物的代谢及疗效息息相关^[29]。肠道菌群可产生水解酶、氧化还原酶等多种酶类,进行水解、还原、甲基化等一系列生化反应,从而影响药物的活性及生物利用度^[29]。不同的肠道细菌对黄连素的生物转化存在差异^[30],而且肠道菌群还在黄连素代谢物的肠肝循环中起重要作用^[31]。这可能是雌雄小鼠对黄连素药效的敏感性存在差异的重要原因。

上述结果提示,黄连素的降血脂效应与短链脂肪酸和胆汁酸存在关联。但短链脂肪酸和胆汁酸含量受多种因素影响,在体内不断变化^[32-33],本研究基于实验终点进行单次取样测量,不能灵敏地反映其代谢变化情况,对探讨肠道代谢物与血脂之间的关系有一定局限性。尚需利用体外实验或体内荧光标记等方式进一步对肠道代谢物进行动态研究。此外,本研究仅使用低剂量黄连素开展动物试验研究,小鼠和人体的生理状态存在一定差异,后续还需更广泛的人群试验评估低剂量黄连素对普通人群血脂及健康的影响。

综上所述,使用低剂量黄连素可以降低正常饮食小鼠血清三酰甘油水平、调节血脂,其作用可能通过影响短链脂肪酸及胆汁酸含量实现,但其降血脂效应存在明显性别差异,需进一步研究低剂量黄连素对肠道菌群的影响及其对血脂影响的性别差异原因。以上结果为黄连素的合理应用和降血脂

作用的机制研究提供了证据,补充了低剂量黄连素对普通状态机体血脂调节的数据资料,可为进一步评估低剂量黄连素作为功能食品在高脂血症等疾病的预防和治疗中的应用前景提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Y, LI X, ZOU D, *et al.* Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(7): 2559-2565.
- [2] KONG WJ, WEI J, ABIDI P, *et al.* Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. *Nature Med*, 2004, 10(12): 1344-1351.
- [3] DONG H, ZHAO Y, ZHAO L, *et al.* The effects of berberine on blood lipids: a systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Planta Med*, 2013, 79(6): 437-446.
- [4] YIN J, XING H, YE H. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 2008, 57(5): 712-717.
- [5] XU J, LIAN F, ZHAO L, *et al.* Structural modulation of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula[J]. *ISME J*, 2015, 9(3): 552-562.
- [6] LIU C, HUANG Y. Chinese herbal medicine on cardiovascular diseases and the mechanisms of action[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 469.
- [7] GUO M, LIU Y, GAO ZY, *et al.* Chinese herbal medicine on dyslipidemia: progress and perspective[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 163036.
- [8] MAZZA A, LENTI S, SCHIAVON L, *et al.* Nutraceuticals for serum lipid and blood pressure control in hypertensive and hypercholesterolemic subjects at low cardiovascular risk[J]. *Adv Ther*, 2015, 32(7): 680-690.
- [9] MARAZZI G, CACCIOTTI L, PELLICCIA F, *et al.* Long-term effects of nutraceuticals (berberine, red yeast rice, policosanol) in elderly hypercholesterolemic patients[J]. *Adv Ther*, 2011, 28(12): 1105-1113.
- [10] WANG Y, ZIDICHOUSKI JA. Update on the benefits and mechanisms of action of the bioactive vegetal alkaloid berberine on lipid metabolism and homeostasis[J]. *Cholesterol*, 2018, 2018: 7173920.
- [11] LIU CS, ZHENG YR, ZHANG YF, *et al.* Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability[J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 274-282.
- [12] NIEUWDORP M, GILIJAMSE PW, PAI N, *et al.* Role of the microbiome in energy regulation and metabolism[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1525-1533.
- [13] WANG Y, SHOU JW, LI XY, *et al.* Berberine-induced bioactive metabolites of the gut microbiota improve energy metabolism[J]. *Metabolism*, 2017, 70: 72-84.
- [14] WAHLSTROM A, SAYIN SI, MARSCHALL HU, *et al.* Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1): 41-50.
- [15] BESTEN GDEN, EUNEN KVAN, GROEN AK, *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism[J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(9): 2325-2340.
- [16] SUN R, YANG N, KONG B, *et al.* Orally administered berberine modulates hepatic lipid metabolism by altering microbial bile acid metabolism and the intestinal FXR signaling pathway[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91(2): 110-122.
- [17] ZHANG X, ZHAO YF, ZHANG MH, *et al.* Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42529.
- [18] FOX JG, DAVISSON MT, QUIMBY FW, *et al.* The Mouse in Biomedical Research (2nd Edition) [M]. Burlington: Academic Press, 2007: 321-383.
- [19] LI R, WANG H, SHI Q, *et al.* Effects of oral florfenicol and azithromycin on gut microbiota and adipogenesis in mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181690.
- [20] JIA X, CHEN Y, ZIDICHOUSKI J, *et al.* Co-administration of berberine and plant stanols synergistically reduces plasma cholesterol in rats[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 201(1): 101-107.
- [21] HU Y, DAVIES GE. Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(5): 358-366.
- [22] HEIMANN E, NYMAN M, PALBRINK AK, *et al.* Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes[J]. *Adipocyte*, 2016, 5(4): 359-368.
- [23] MORIGNY P, HOUSIER M, MOUISEL E, *et al.* Adipocyte lipolysis and insulin resistance[J]. *Biochimie*, 2016, 125: 259-266.
- [24] GUO Y, ZHANG Y, HUANG W, *et al.* Dose-response effect of berberine on bile acid profile and gut microbiota in mice[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 394.
- [25] LI T, CHIANG JY. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy[J]. *Pharmacol Rev*, 2014, 66(4): 948-983.
- [26] MUELLER M, THORELL A, CLAUDEL T, *et al.*

- Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(6):1398-404.
- [27] ORG E, MEHRABIAN M, PARKS BW, *et al.* Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(4):313-322.
- [28] BAARS A, OOSTING A, LOHUIS M, *et al.* Sex differences in lipid metabolism are affected by presence of the gut microbiota[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):13426.
- [29] WILSON ID, NICHOLSON JK. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity[J]. *Transl Res*, 2017, 179:204-222.
- [30] 崔祥, 陶金华, 江曙, 等. 小檗碱与肠道菌群的相互作用研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(12):1373-1377.
- [31] ZUO F, NAKAMURA N, AKAO T, *et al.* Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. 2006, 34(12):2064-2072.
- [32] TANGERMAN A, NAGENGAST FM. A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method[J]. *Anal Biochem*, 1996, 236(1):1-8.
- [33] OLTMER S, VONENGLHARDT W. Absorption of short-chain fatty acids from the *in-situ*-perfused caecum and colon of the guinea pig. [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1994, 29(11):1009-1016.

(收稿日期:2019-03-04; 编辑:张秀峰)

(上接第82页)

- [24] GANDHI L, RODRÍGUEZ-ABREU DELVYS, GADGEEL S, *et al.* Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer[J]. *NEJM*, 2018, 378(22):2078-2092.
- [25] MEHTA R, SHAH A, ALMHANNA K. Pembrolizumab for the treatment of patients with recurrent locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: an evidence-based review of place in therapy [J]. *OncoTargets Ther*, 2018, 11:6525-6537.
- [26] KATO K, SHAH MA, ENZINGER P, *et al.* KEYNOTE-590: Phase III study of first-line chemotherapy with or without pembrolizumab for advanced esophageal cancer[J]. *Future Oncol*, 2019, 15(10):1057-1066.
- [27] KUDO T, HAMAMOTO Y, KATO K, *et al.* Nivolumab treatment for oesophageal squamous-cell carcinoma: an open-label, multicentre, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(5):631.
- [28] KANG Y, BOKU N, SATOH T, *et al.* Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2017, 390(10111):2461-2471.
- [29] BOKU N, RYU MH, KATO K, *et al.* Safety and efficacy of nivolumab in combination with S-1/capecitabine plus oxaliplatin in patients with previously untreated, unresectable, advanced, or recurrent gastric/gastroesophageal junction cancer: interim results of a randomized, phase II trial (ATTRACTION-4) [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(2):250-258.

(收稿日期:2019-02-14; 编辑:王蔚)

(上接第88页)

- [15] OEI L, KOROMANI F, BREDA SJ, *et al.* Osteoporotic vertebral fracture prevalence varies widely between qualitative and quantitative radiological assessment methods: the rotterdam study [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(4):560-568.
- [16] SZULC P, MUNOZ F, MARCHAND F, *et al.* Semiquantitative evaluation of prevalent vertebral deformities in men and their relationship with osteoporosis: the MINOS Study [J]. *Osteoporos Int*, 2001, 12(4):302-310.
- [17] LEE HS, LEE SH, CHUNG YS, *et al.* Usefulness of fracture risk assessment tool using lumbar bone mineral density in prediction of osteoporotic vertebral fracture [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2015, 58(4):346-369.
- [18] JIANG G, EASTELL R, BARRINGTON NA, *et al.* Comparison of methods for the visual identification of prevalent vertebral fracture in osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2004, 15(11):887-896.

(收稿日期:2019-03-14; 编辑:段佳)