

Berberín zmierňuje autoimunitnú hepatitídu vyvolanú konkanavalínom A u myši moduláciou črevnej mikroflóry

Abstrakt

Pozadie:

Autoimunitná hepatitída (AIH) je imunitne sprostredkované ochorenie pečene neznámej etiológie sprevádzané črevnou dysbiózou a poškodenou črevnou bariérou. Berberine (BBR) je tradičný antibakteriálny liek, ktorý má rôzne farmakologické vlastnosti. Bolo hlásené, že BBR zmierňuje AIH, ale príslušné mechanizmy treba ešte úplne preskúmať.

Metódy:

BBR sa perorálne podával v dávkach $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ myšiam počas 7 dní pred vytvorením modelu AIH vyvolaného konkanavalínom A. Histopatologické, imunohistochemické, imunofluorescenčné, western blotting, ELISA, analýza 16S rRNA, prietoková cytometria, kvantitatívna PCR v reálnom čase a štúdie transplantácie fekálnej mikroflóry sa uskutočnili na zistenie účinkov a mechanizmov BBR u myši AIH.

Výsledky:

Zistili sme, že nekróza a apoptóza pečene boli znížené po podaní BBR; hladiny sérovej transaminázy, sérového lipopolysacharidu, pečenej prozápalových faktorov TNF- α , interferónu- γ , IL-1 β a IL-17A a podielu Th17 buniek v bunkách sleziny boli všetky znížené, zatiaľ čo protizápalový faktor IL-10 a proporcie regulačných T buniek sa zvýšili. Okrem toho liečba BBR zvýšila prospešné a znížila škodlivé baktérie v čreve. BBR tiež posilnila funkciu ileálnej bariéry zvýšením expresie proteínov zonula occludens-1 a occludin s tesným spojením, čím blokuje translokáciu lipopolysacharidov, zabraňuje aktivácii lipopolysacharidového/toll-like receptora 4 (TLR4)/NF- κ B dráhy a inhibuje produkciu zápalových faktorov v pečeni. Transplantácia fekálnej mikrobioty z BBR na modelové myši tiež ukázala, že BBR potenciálne zmierňuje AIH zmenou črevnej mikrobioty.

Záver:

BBR zmiernil AIH vyvolaný konkanavalínom A moduláciou črevnej mikroflóry a súvisiacou imunitnou reguláciou. Tieto výsledky vrhajú viac svetla na potenciálne terapeutické stratégie BBR pre AIH.

ÚVOD

Autoimunitná hepatitída (AIH) je progresívne imunitne sprostredkované ochorenie pečene, ktoré môže viesť k cirhóze, HCC a smrti, pričom jej základné mechanizmy zostávajú nejasné. Pacienti s AIH zvyčajne dostávajú dlhodobú liečbu glukokortikoidmi samostatne alebo s inou imunosupresívnou terapiou, pričom väčšina z nich dobre reaguje na glukokortikoidy, ale závažné vedľajšie účinky, ako je imunosupresia, sekundárna infekcia, abnormálne zvýšenie krvného tlaku a cukru v krvi a priemerná osteoporóza že väčšina pacientov po vysadení lieku recidivuje. Preto je potrebný vývoj nových metód prevencie a liečby na zníženie chorobnosti a úmrtnosti.

V poslednej dobe si recipročné interakcie medzi pečeňou a črevom, nazývané os črevo-pečeň, získali intenzívnu výskumnú aktivitu. Zmeny črevnej mikroflóry, ako je zníženie mikrobiálnej diverzity, vyčerpanie prospešných baktérií a obohatenie oportúnnych patogénov,

sú často hlásené pri ochoreniach pečene. Črevná dysbióza už bola pozorovaná u pacientov s AIH; už skôr bolo hlásené, že fekálny mikrobióm pacientov s AIH vykazoval zníženú druhovú bohatosť a rovnomernosť v porovnaní so zdravými kontrolami. Tieto zistenia naznačujú, že modulácia štruktúr črevnej mikroflóry môže byť užitočným vedeckým základom liečby AIH.

Berberín (BBR) je izochinolínový alkaloid extrahovaný z bylenných rastlín, ako je *Coptis chinensis* a *Berberis vulgaris*, a v Číne sa tradične používa na liečbu bakteriálnej hnačky. BBR vykazuje silné priaznivé účinky na NAFLD znížením akumulácie lipidov aktiváciou signalizácie proteínkinázy aktivovanej AMP, zmiernením oxidačného stresu a reguláciou črevného mikroprostredia. Wang a kol. ukázali, že predbežná liečba BBR znížila poškodenie pečene u myši s AIH indukovanou konkanavalínom A (Con A) prostredníctvom aktivácie signalizácie proteínkinázy aktivovanej AMP. Je zaujímavé, že črevná mikroflóra bola nedávno uznaná ako dôležitý cieľ BBR, so štúdiami, ktoré uvádzajú, že BBR stimulovala rast *Akkermansia muciniphila* prostredníctvom zvýšenej produkcie mucínu v hostiteľských črevách. Zostáva však neznáme, či BBR zlepšuje AIH reguláciou črevnej mikrobiológie a súvisiacej imunitnej regulácie. Mechanizmy, ktorými BBR zmierňuje AIH, si vyžadujú ďalší prieskum, takže objasnenie takýchto mechanizmov môže poskytnúť bezpečnejšie, efektívnejšie a cenovo dostupnejšie alternatívy liečby AIH.

V tejto štúdii sme pozorovali, že BBR zmierňuje AIH vyvolanú Con A zmenou črevnej mikroflóry, inhibíciou lipopolysacharidu (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-κB signalizácie a moduláciou regulačnej T bunky (Treg)/ Zostatok Th17. Okrem toho účinky BBR na AIH môžu byť čiastočne závislé od zmien v zložení črevnej flóry.

METÓDY

Činidlá

Použili sme nasledujúce materiály: Con A bol získaný od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). BBR, súpravu na farbenie alcianovou modrou, metylprednizolón (MP), ampicilín, neomycín, metronidazol a vankomycín poskytla spoločnosť Solarbio (Peking, Čína).

Protilátky anti-kaspáza-3, anti-Bax a anti-F4/80 ponúkala technológia bunkovej signalizácie (Boston, MA). Anti-TNF- α , anti-interferón- γ , anti-IL-1 p, anti-IL-17A a anti-IL-10 protilátky boli zakúpené od Bioss (Peking, Čína). Králičie anti-myšie primárne protilátky, vrátane zonula occludens-1 (ZO-1), okludín, TLR4, NF- κ B P65, inhibítor NF- κ B (I κ B), fosfoinhibítor NF- κ B (p-I κ B) a p-aktín, boli získané od Abcam (Cambridge, UK).

Anti-CD4 konjugované s alofykokyanínom, anti-IL-17A konjugované s fluoresceín izotiokyanátom a anti-Foxp3 protilátky konjugované s fykoerytrínom boli zakúpené od BD (Franklin Lakes, NJ).

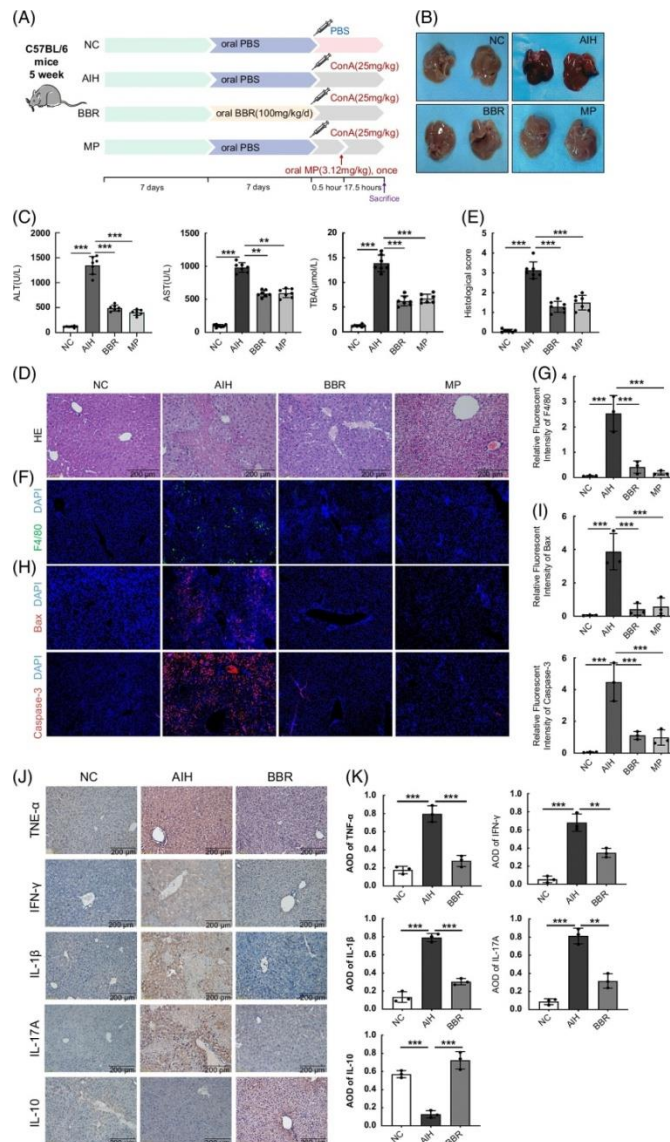
Súpravy LPS ELISA dodal Cloud-clone (Hubei, Čína).

Pokusné zvieratá

Päťtýždňové samce myši C57BL/6 s hmotnosťou 18–20 g boli získané z Experimentálneho zvieracieho centra lekárskej univerzity Shanxi (Shanxi, Čína). Zvieratá boli chované v zariadení s laminárnym tokom a bez špecifických patogénov v 12-hodinovom cykle svetlo/12-hodinová tma s voľným prístupom k štandardnej strave a vode. Experimentálne postupy sa uskutočňovali na základe smerníc nariadenia o správe laboratórnych zvierat a boli schválené Etickou komisiou pre pokusy na zvieratách Shanxi Medical University (číslo povolenia: SYDL2021001).

Zásahy BBR

Myši boli náhodne rozdelené do 4 skupín (n = 7 na skupinu): skupina s negatívnou kontrolou (NC), skupina AIH, skupina BBR a skupina MP. Po 7 dňoch aklimatizácie sa myšiam v skupine BBR podával BBR (100 mg/kg/deň) orálnou sondou, kým myšiam v ostatných skupinách sa podával ekvivalentný objem PBS. Predbežné ošetrenie pokračovalo 7 dní. Potom sa myšiam v skupinách AIH, BBR a MP podávalo 25 mg/kg Con A cez chvostovú žilu, zatiaľ čo myšiam v skupine NC sa podával ekvivalentný objem PBS. Myši v skupine MP dostali MP (3,12 mg/kg) intragastrickým podaním raz 0,5 hodiny po injekcii Con A. Všetky myši sa potom humánne usmrtili 18 hodín po injekcii Con A a odobrali sa tkanivá.



Obrázok 1 - Postupy na zvieratách

BBR zmiernil poškodenie pečene vyvolané Con A. (A) Návrh experimentu na zvieratách, (B) Makroskopický vzhľad pečene, (C) Koncentrácia ALT, AST a TBA (n = 7), (D, E) HE farbenie rezov pečene (stupnica, 200 μm) a histologické skóre pre rezy pečene. (F, G) Imunofluorescenčné farbenie infiltrácie makrofágov (F4/80⁺) (zelená) v reze pečeneového tkaniva, kvantifikácia intenzity farbenia F4/80 v každej skupine (n = 3). (H, I) Imunofluorescenčné farbenie hladiny expresie Bax a kaspázy-3 (červená) v reze pečeneového tkaniva, kvantifikácia intenzity zafarbenia Bax a kaspázy-3 v každej skupine (n = 3). (J, K) Expresia TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-17A a IL-10 v pečeni pomocou imunohistochemie (stupnica, 200 μm) (n = 3). Všetky údaje boli vyjadrené

ako priemer \pm SD. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Skratky: AIH, autoimunitná hepatitída; ALT, alanín transamináza; AOD, priemerná optická hustota; AST, aspartát transamináza; BBR, berberín; ConA, konkanavalín A; HE, hematoxylín a eozín; IFN- γ , interferón- γ ; MP, metylprednizolón; NC, negatívna kontrola; TBA, celková žľobá kyselina.

Transplantácia fekálnej mikroflóry

Myši v skupine s transplantáciou fekálnej mikroflóry (FMT) boli liečené ampicilínom (1 mg/ml), neomycínom (1 mg/ml), metronidazolom (1 mg/ml) a vankomycínom (1 mg/ml) v pitnej vode. 7 dní pred podaním fekálnej suspenzie z myši BBR. Konkrétne sa 1 g vzorky stolice od 6 myši BBR homogenizoval v 5 ml PBS, potom sa myšiam v skupine FMT transplantovalo 200 μ l suspenzie perorálnou sondou raz denne počas 7 dní. Myši v skupine s antibiotikami eliminujúcimi črevné baktérie (ABX) boli liečené rovnakými antibiotikami v pitnej vode počas 7 dní, potom im bol podávaný ekvivalentný objem PBS orálnou sondou raz denne. Následné ošetrenia boli rovnaké ako pri intervenčných experimentoch BBR. Postup pokusu na zvieratách je znázornený na [obrázku 7A](#).

Transaminázová aktivita a endotoxínový test

Po odstredení pri 1000 g počas 10 minút sa koncentrácie alaníntransaminázy (ALT), aspartáttransaminázy (AST) a celkových žľobých kyselín (TBA) v sére merali pomocou automatizovaného chemického analyzátoru (BioMajesty, Japonsko) z nemocnice TaiYuan v. Tradičná čínska medicína. LPS v sére sa meral pomocou súpravy ELISA podľa pokynov výrobcu (Cloud-clone, Čína).

Histologické hodnotenia

Vzorky tkaniva pečene a ilea boli fixované v 4% neutrálnom pufrovanom formalínovom roztoku počas 48 hodín. Potom boli vzorky tkaniva dehydratované odstupňovaným etanolom a zaliate do parafínového vosku. Tkanivové rezy (hrúbka 4 μ m) sa narezali na podložné sklíčka a skladovali sa pri teplote miestnosti. Rezy tkaniva zaliate parafínom sa potom zafarbili hematoxylínom a eozínom a alcianovou modrou na histologické vyhodnotenie. Na vyhodnotenie stupňa nekrózy sa uskutočnil systém hodnotenia poškodenia na základe portálneho a intralobulárneho zápalu, degenerácie a nekrózy v pečeni, ako bolo uvedené. Rozsah patológie bol hodnotený od 0 (žiadna patologická zmena) do 4 (závažná patologická zmena).

Imunohistochemia a imunofluorescenčné farbenie

Po zahrievaní počas 20 minút pri 60 °C boli parafínové rezy pečene alebo ilea zbavené parafínu v xyléne a rehydratované v klesajúcich koncentráciách etanolu, premyté v PBS a blokované v hovädzom sérovom albumíne počas 30 minút pri teplote miestnosti. Na imunohistochémiu sa pečňové rezy inkubovali cez noc pri 4 °C s protilátkami proti TNF- α , interferónu- γ , IL-1 p, IL-17A a IL-10. Rezy pečene sa tiež inkubovali so sekundárnymi protilátkami konjugovanými s biotínom pri teplote miestnosti počas 60 minút a zafarbili sa 3, 3'-diaminobenzidínom. Obrázky sa získali pomocou mikroskopu Olympus (Olympus Corporation, Japonsko) a softvér Image J sa použil na výpočet priemernej optickej hustoty.

Na imunofluorescenčné (IF) farbenie boli pečňové rezy zafarbené primárnou anti-F4/80 protilátkou, anti-Bax protilátkou alebo anti-kaspázou-3 protilátkou pri 4 °C cez noc, inkubované so zodpovedajúcimi sekundárnymi protilátkami počas 60 minút pri izbovej teplote nasledujúci deň a podstúpili reakciu DAPI. Rezy ilea boli zafarbené primárnou anti-ZO-1 protilátkou alebo anti-okludínovou protilátkou pri 4 °C cez noc a inkubované so zodpovedajúcimi sekundárnymi protilátkami počas 60 minút pri teplote miestnosti. Bunkové jadrá boli zafarbené DAPI.

Potom bol pozorovaný pod fluorescenčným mikroskopom (Nikon, Japonsko).

Prietoková cytometria

Podrobné prevádzkové kroky pre tento postup sú uvedené v našom predchádzajúcom výskume. Stručne povedané, po humánnom usmrtení zvierat sa pripravili suspenzie buniek sleziny a koncentrácie buniek sa upravili na $1,0 \times 10^7$ / ml. Na detekciu buniek Th17 a Treg sa 1 ml jednotlivých buniek naočkoval do jamiek v 6-jamkových doštičkách a inkuboval sa s ionomycínom, forbol-12-myristát-13-acetátom a Brefeldínom A počas 5 hodín a zozbierali sa. Potom sa zozbierané bunky zafarbili zodpovedajúcimi protilátkami. Vzorky boli spracované na BD Accuri C6 a dáta boli analyzované v analytickom softvéri FlowJo 7.6 (BD Biosciences, USA).

Extrakcia RNA a kvantitatívna PCR v reálnom čase

Celková RNA sa izolovala z čerstvého tkaniva ilea s použitím činidla Trizol podľa pokynov výrobcu. Potom sa cDNA syntetizovala z rovnakého množstva celkovej RNA podľa pokynov výrobcu. Produkty sa zmiešali so zmesou SYBR Green PCR a podrobili sa kvantitatívnej PCR v reálnom čase pomocou fluorescenčného kvantitatívneho detekčného systému BIOER LineGene 9600 Plus (FQD-96A, BIOER, Čína).

TABULKA 1 - Primérové sekvencie použité na kvantitatívnu analýzu PCR v reálnom čase

Gén myši	Dopredu (5'-3')	Obrátený (5'-3')
β-aktín	ATCAGCAAGCAGGAGTATG	GGTAGAGACCACCTTTGCTA
ZO-1	GCGAACAGAAAGGAGCGAGAAGAG	GCTTTGCGGGCTGACTGGAG
Ocludín	TGGACTTGGAGCGGCTATGG	AGGGAAGCGATGAAGCAGAAGGC

Skratka: ZO-1, zonula occludens-1.

Tabuľka - Priméry použité v kvantitatívnej PCR v reálnom čase

Western blotting

Podrobné prevádzkové kroky pre tento postup sú uvedené v našom predchádzajúcom výskume. Proteínové pásy boli vizualizované pomocou vylepšenej chemiluminiscenčnej súpravy (Solarbio, Peking, Čína). Intenzity pásov sa kvantitatívne analyzovali pomocou softvéru ImageJ a expresia proteínu sa normalizovala na signály p-aktínu.

Analýza fekálnej 16S rRNA

Vzorky obsahu céka sa čerstvo odobrali do skúmaviek bez mikróbov a ihneď sa zmrazili kvapalným dusíkom a potom sa skladovali pri -80 °C. DNA sa extrahovala z výkalov

pomocou súpravy QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, USA). Sekvencie s $\geq 97\%$ podobnosťou boli priradené k rovnakým operačným taxonomickým jednotkám. Fekálne mikrobiálne zloženie bolo hodnotené pomocou sekvenovania Illumina HiSeq a mikrobiálnej analýzy založenej na QIIME. Na vyhodnotenie diverzity alfa a diverzity beta medzi rôznymi kohortami v sekvenčnej analýze 16S sa uskutočnil Wilcoxonov test poradia súčtu. Významnosť korelácií bola testovaná Spearmanovým hodnotovým korelačným testom. Súbor údajov vygenerovaný pre túto štúdiu možno nájsť v databáze NCBI Sequence Read Archive (prístupové číslo: PRJNA789741).

Štatistická analýza

Údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SD a na kontrolu normality sa použil Shapiro-Wilkov test. Pre väčšinu údajov sa na určenie významnosti medzi skupinami použila jednosmerná ANOVA. Štatistické analýzy sa uskutočnili použitím GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, USA) a softvéru SPSS verzie 22.0 (SPSS Inc., USA). Hodnota $p < 0,05$ sa považovala za štatisticky významnú.

VÝSLEDKY

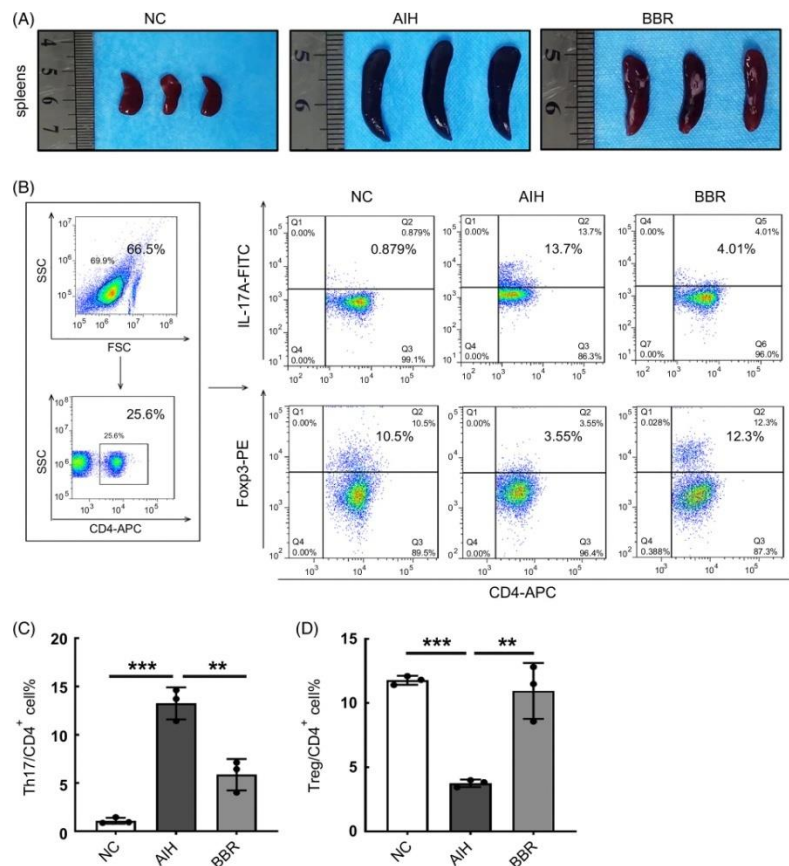
BBR zmiernuje poškodenie pečene vyvolané Con A

Aby sme preskúmali účinky BBR na predbežné ošetrenie AIH, vytvorili sme myšací model AIH s použitím injekcií Con A. Signifikantne zvýšené sérové ALT, AST a TBA boli detegované v skupine AIH ($p < 0,001$). V porovnaní so skupinou AIH mali skupiny BBR aj MP významne znížené koncentrácie ALT, AST a TBA v sére ($p < 0,01$, $p < 0,001$) (obrázok 1C). Sú znázornené morfológické pozorovania (obrázok 1B). Makroskopicky podávanie BBR a MP zlepšilo pasívne prekrvenie pečene vyvolané Con A. Farbenie pečenevých rezov hematoxylínom a eozínom ukázalo rozsiahlu stratu architektúry pečene a nekrózu hepatocytov v skupine AIH, zatiaľ čo BBR zmiernil toto poškodenie pečene (obrázok 1D). Hoci MP tiež zmiernil toto poškodenie pečene, v tejto skupine sa pozoroval edém pečenevých buniek (obrázok 1D, E), ktorý odhalil, že BBR zlepšila AIH-indukované patologické poškodenie u myši a vykazovala rovnaké, ak nie lepšie účinky ako MP.

Makrofágy sú zápalové bunky, ktoré vykazujú silnú fagocytóznú aktivitu a uvoľňujú mnohé zápalové faktory, ktoré podporujú zápal a poškodenie pečene. IF vykazoval výrazne zvýšenú infiltráciu makrofágov (F4/80+) v skupine AIH v porovnaní so skupinou NC, zatiaľ čo intenzita fluorescencie makrofágov bola významne znížená v skupinách BBR a MP (obrázok 1F, G). Hladiny intenzity fluorescencie Bax a kaspázy-3 boli obidve významne zvýšené v pečeni skupiny AIH v porovnaní so skupinou NC, zatiaľ čo intenzita fluorescencie bola výrazne znížená v skupinách BBR a MP (obrázok 1H, I). Imunohistochemické výsledky ukázali, že hladiny expresie TNF-a, interferónu- γ , IL-1 β a IL-17A v pečeni boli výrazne zvýšené v skupine AIH v porovnaní so skupinami NC a BBR. Okrem toho podávanie BBR zvýšilo hladiny protizápalového cytokínu IL-10 v pečeni (obrázok 1J, K), čo naznačuje, že podávanie BBR inhibovalo produkciu prozápalových cytokínov a podporovalo produkciu IL-10 v našom myšom modeli AIH vyvolanom Con A . Celkovo tieto výsledky ukázali, že BBR zlepšilo akútne poškodenie pečene vyvolané Con A znížením zápalu hepatocytov, nekrózy a apoptózy.

Imunoregulačné účinky podávania BBR u AIH myši

Ako je znázornené (obrázok 2A), sleziny myši v skupine AIH boli významne opuchnuté v porovnaní so slezinami v skupine NC, zatiaľ čo sleziny v skupine BBR boli menšie ako sleziny v skupine AIH, čo naznačuje, že myši BBR boli v nižší zápalový stav v porovnaní so skupinou AIH. Rovnováha buniek Th17 a Treg reguluje rozvoj autoimunity a zápalu a považuje sa za potenciálny terapeutický cieľ poškodenia pečene. Ďalej sme vyhodnotili percentá Th17 a Treg buniek v myších slezinách prietokovou cytometriou (obrázok 2B). V porovnaní so skupinou NC sa percentá buniek Th17 okamžite zvýšili, zatiaľ čo percentá buniek Treg sa znížili v skupine AIH ($p < 0,001$). V porovnaní so skupinou AIH sa percentá buniek Th17 znížili, zatiaľ čo percentá buniek Treg sa zvýšili v skupine BBR ($p < 0,01$) (obrázok 2C, D). Na základe týchto údajov malo podávanie BBR imunopresívne účinky v našom modeli AIH vyvolanom Con A.

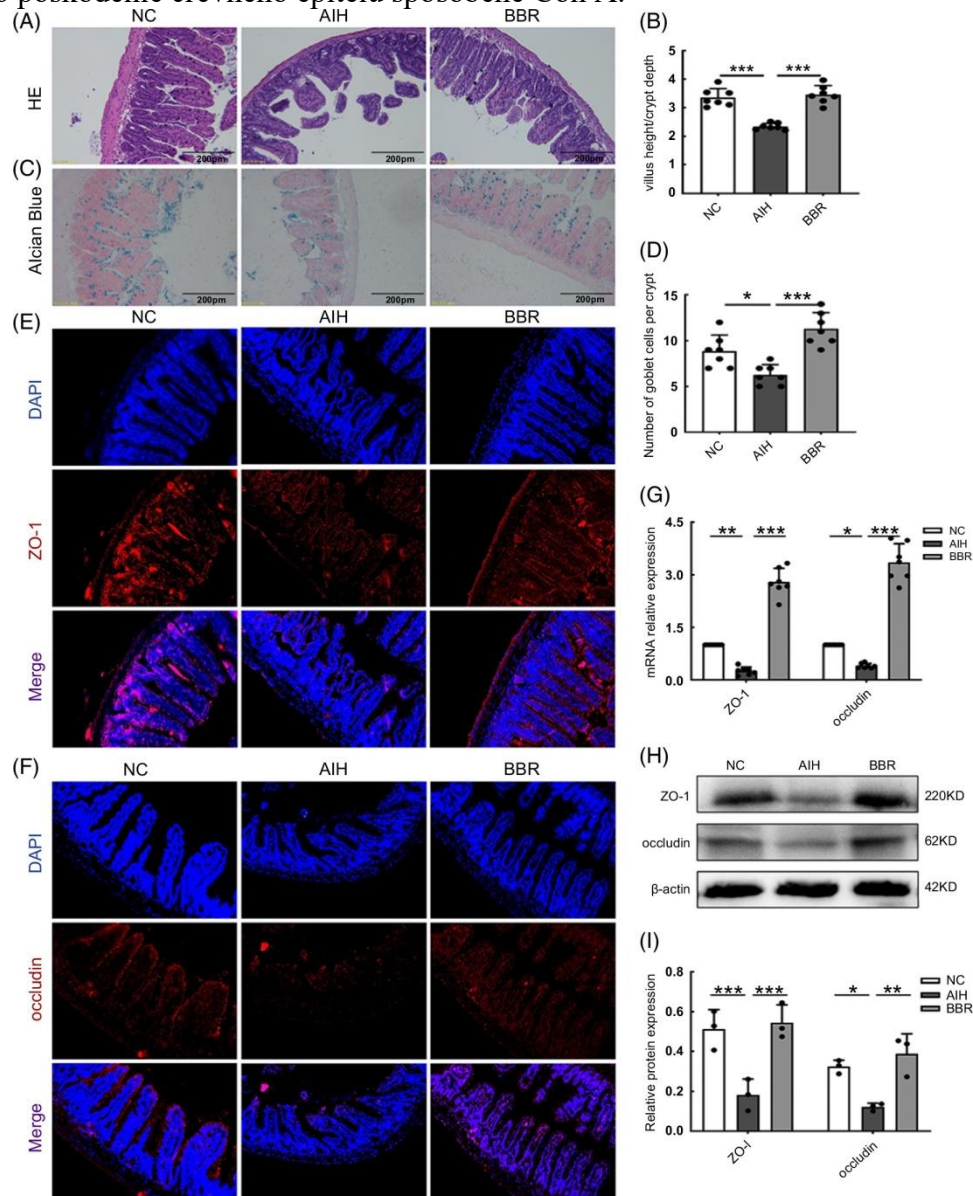


Obrázok 2 – Imunoregulačné účinky

BBR obnovil imunitnú nerovnováhu vyvolanú konkanavalínom A u myši. (A) Makroskopický vzhľad sleziny. (B) Typický graf prietokovej cytometrie Th17 buniek a Treg buniek v slezinách u NC, AIH a BBR skupín myši ($n = 3$). (C, D) Stĺpcové grafy ukazujúce percentá Th17 buniek a Treg buniek v CD4⁺ T bunkách ($n = 3$). Všetky údaje boli vyjadrené ako priemer \pm SD. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Skratky: AIH, autoimunitná hepatitída; APC, alofýkocyanín; BBR, berberín; FITC, fluoresceín izotiokyanát; FSC, dopredný rozptyl; NC, negatívna kontrola; SSC, bočný rozptyl.

BBR posilňuje funkciu črevnej bariéry

Zhoršená funkcia črevnej bariéry môže zvýšiť riziko prístupu bakteriálnej zložky z lúmenu čreva do krvného obehu, čím sa zhorší systémový zápal. Histopatologické vyšetrenia odhalili, že ileum vykazovalo histologické abnormality po stimulácii Con A. Ako je znázornené (obrázok 3A), epitelové klky a krypty ilea v skupine NC boli pevne a úhladne pripojené; ruptúra klkov a obnažené stavy boli pozorované v skupine AIH, zatiaľ čo podávanie BBR zmiernilo poškodenie črevného epitelu spôsobené Con A.



Obrázok 3 – funkcia črevnej bariéry

BBR zlepšila funkciu črevnej bariéry. (A) HE farbenie rezov ilea (stupnica, 200 um). (B) Vyhodnotilo sa päť krýpt na sekciu, potom sa mikroskopicky vyhodnotila výška klkov a hĺbka krýpt a vypočítal sa pomer výšky klkov a hĺbky krýpt ($n = 7$). (C) Farbenie rezov ilea alcianovou modrou (stupnica, 200 um). (D) Počet pohárikovitých buniek produkujúcich kyselinu-mucín na vilus ($n = 7$). (E, F) Membránová lokalizácia ZO-1 a okcludínu (červená) bola hodnotená imunofluorescenciou a vizualizovaná fluorescenčnou mikroskopiou, jadrá boli zafarbené DAPI (modrá) ($n = 3$). (G) Celková RNA bola extrahovaná z tkanív ilea na kvantitatívnu PCR analýzu v reálnom čase. Ukázali sa relatívne expresie ZO-1 a okcludínu ($n = 7$). (H, I) Expresie ZO-1 a okcludínu v tkanivách ilea z každej skupiny sa hodnotili westernovým prenosom a kvantifikovala sa relatívna expresia proteínu ($n = 3$). Všetky údaje boli vyjadrené ako priemer \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Skratky:

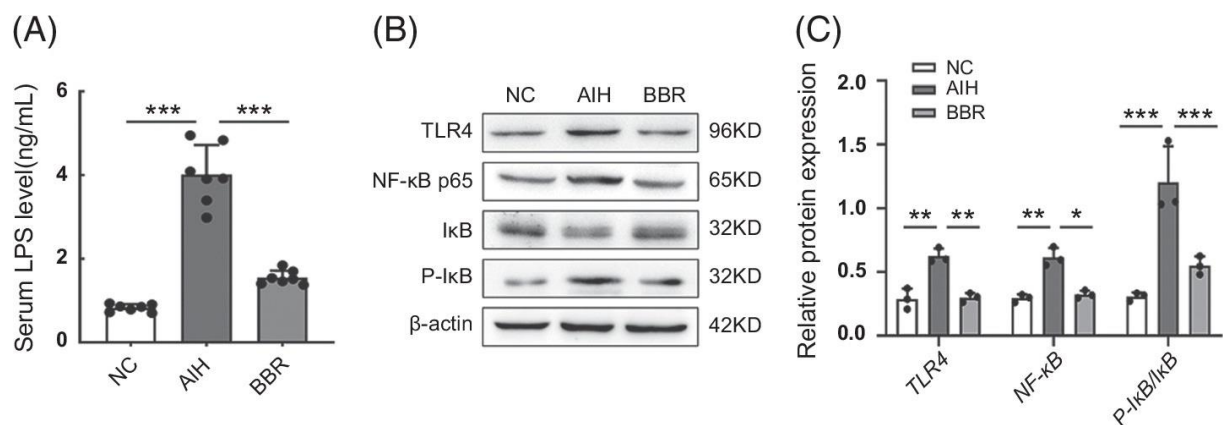
AIH, autoimunitná hepatitída; BBR, berberín; HE, hematoxylín a eoizín; NC, negatívna kontrola; ZO-1, zonula occludens-1.

Ďalej sme hodnotili črevné morfológické zmeny výpočtom pomerov výšky klkov k hĺbke krypty. Ako je znázornené (obrázok 3B), pomery v skupine AIH sa významne znížili v porovnaní so skupinou NC, zatiaľ čo BBR obnovilo pomery späť na úrovne NC ($p < 0,001$) (obrázok 3B). Z farbenia ilea Alciánovou modrou sme pozorovali výrazné zníženie počtu pohárikovitých buniek (GC) v skupine AIH v porovnaní so skupinou NC, ktoré boli normalizované pomocou BBR ($p < 0,05$ a $< 0,001$) (obrázok 3C, D).

Hladiny proteínov tesného spojenia (TJ), menovite ZO-1 a okludínu, boli stanovené kvantitatívnou PCR v reálnom čase, westernovým prenosom a farbením IF. Na rozdiel od skupiny AIH mali skupiny NC a BBR vyššie hladiny expresie ZO-1 a okludínu a rovnomernú pozitívnu distribúciu oboch proteínov v apikálnej oblasti ilea (obrázok 3E, F). Pozorovali sme, že hladiny expresie ZO-1 a okludínovej mRNA v tkanive ilea boli významne vyššie v skupine BBR v porovnaní so skupinou AIH ($p < 0,001$) (obrázok 3G). Hladiny expresie ZO-1 a okludínového proteínu v tkanive ilea boli tiež zvýšené v skupine BBR v porovnaní so skupinou AIH ($p < 0,01$ a $< 0,001$) (obrázok 3H, I). Tieto výsledky ukázali, že sa zabránilo strate expresie ZO-1 a okludínu indukovanej Con A, keď sa myšiam podával BBR.

BBR inhibuje translokáciu LPS a aktiváciu signalizácie TLR4/NF-KB

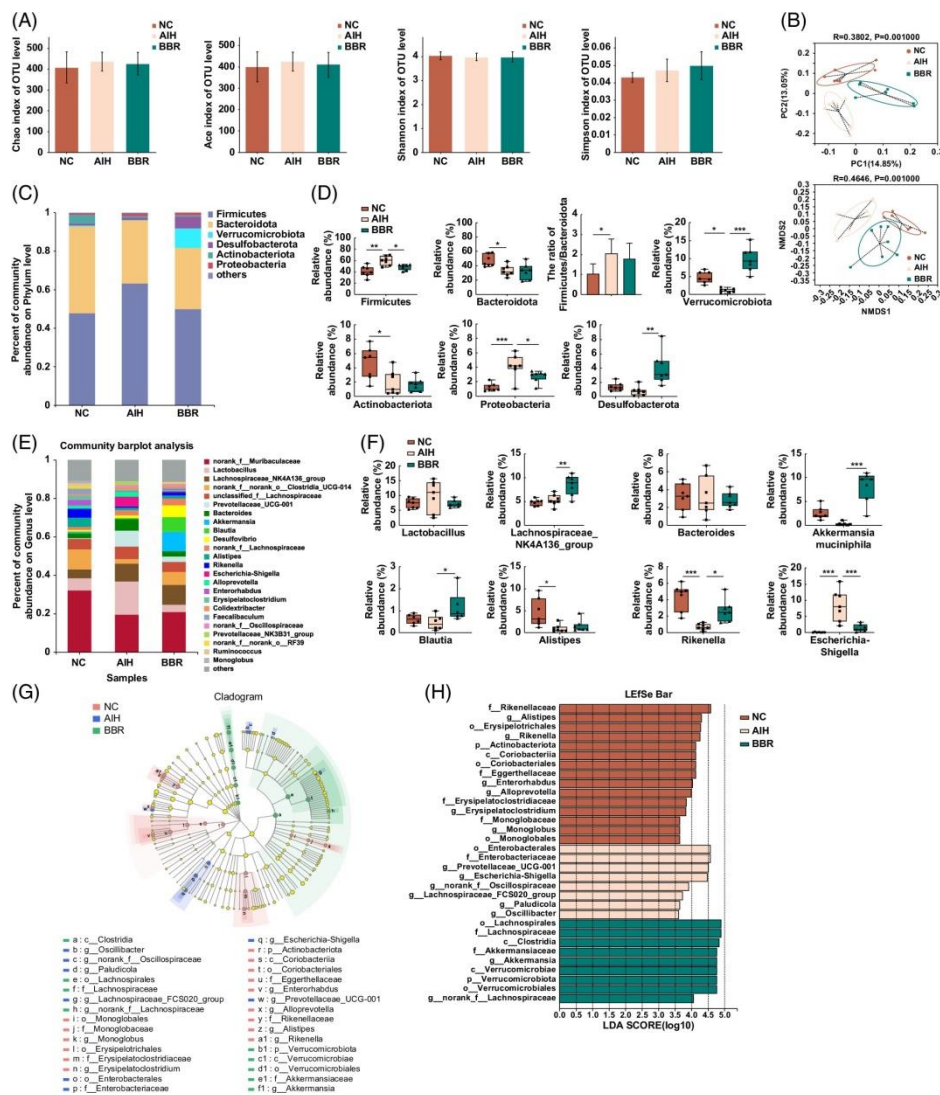
Plazmatické endotoxíny, ktoré sú markermi funkcie črevnej bariéry, sú kľúčovými prvkami, ktoré naznačujú progresiu poškodenia pečene. Keď je poškodená črevná bariéra, bakteriálne zložky reprezentované LPS prenikajú cez bariéru a môžu spôsobiť vážne poškodenie pečene. Pozorovali sme, že sérové koncentrácie LPS a hladiny expresie TLR4, NF- κ B a P-I κ B/I κ B v pečeni boli výrazne znížené v skupine BBR v porovnaní so skupinou AIH ($p < 0,001$, $< 0,05$, $< 0,01$ alebo $< 0,001$) (obrázok 4A–C). Podávanie BBR teda inhibovalo translokáciu LPS posilnením črevnej bariéry a potlačením aktivácie signalizácie TLR4/NF-KB. Tieto výsledky tiež poskytli ďalší dôkaz o posilnenej funkcii črevnej bariéry po podaní BBR.



BBR inhiboval translokáciu LPS a aktivoval signálnu dráhu TLR4 / NF-KB v pečeni myši AIH. (A) Sérové koncentrácie LPS v každej skupine boli detegované pomocou ELISA ($n = 7$). (B) Expresie TLR4, NF-KB, I κ B a P-I κ B v tkanivách pečene z každej skupiny sa hodnotili pomocou westernového prenosu ($n = 3$). (C) Boli kvantifikované relatívne proteínové expresie TLR4, NF-KB a P-I κ B/I κ B ($n = 3$). Všetky údaje boli vyjadrené ako priemer \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Skratky: AIH, autoimunitná hepatitída; BBR, berberín; LPS, lipopolysacharid; NC, negatívna kontrola; p-I κ B, fosfo-inhibítor NF-KB; TLR4, Toll-like receptor 4.

BBR mení štruktúru črevnej mikroflóry u myši s AIH

Aby sa preskúmal vplyv BBR na zloženie črevnej mikrobioty, obsah slepého čreva bol hodnotený sekvenovaním 16S rRNA. Alfa diverzita, reprezentovaná indexmi Chao, Ace, Shannon a Simpson, nevykazovala žiadne významné rozdiely medzi týmito 3 skupinami, čo naznačuje, že celková mikrobiálna diverzita a bohatstvo boli podobné ([obrázok 5A](#)). Injekcie Con A však zreteľne zmenili β -diverzitu v črevnej mikroflóre myši. Nevážená analýza komponentov Unifrac Principle Component a nemetrická multidimenzionálna škálovacia analýza, založená na operačných taxonomických jednotkách, odhalili, že črevná mikroflóra v skupine AIH sa oddelila od skupiny NC a že štruktúry črevnej mikrobiálnej komunity sa tiež odlišne segregovali medzi skupinami ([obrázok 5B](#)).



BBR zmenil štruktúru črevnej mikroflóry u myši AIH indukovaných Con A. Celkové fekálne baktérie z každej myši boli detegované sekvenovaním 16S rRNA. (A) α -diverzita odhadnutá pomocou indexov Chao, Ace, Shannon a Simpson. (B) Graf Principal Coordinate Analysis (PCoA) a nemetrické multidimenzionálne škálovanie (NMDS) ukazujúci β -diverzitu črevnej mikroflóry medzi tromi skupinami na základe nevázenej metriky UniFrac. Každý symbol predstavuje jednu vzorku. (C) Spoločenská barplotová analýza každej skupiny na úrovni kmeňa. (D) Relatívna hojnosť Firmicutes, Bacteroidota, Verrucomicrobia, Desulfobacterota, Actinobacteriota a Proteobacteria na úrovni kmeňa. (E) Spoločenská barplotová analýza každej skupiny na úrovni rodu. (F)

Relatívna abundancia *Lactobacillus*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Bacteroides*, *Akkermansia muciniphila*, *Blautia*, *Alistipes*, *Rikenella* a *Escherichia-Shigella* na úrovni rodu. (G) Kladogramy LEfSe reprezentovali taxóny obohatené o skupinu NC (červená), skupina AIH (modrá) a skupina BBR (zelená). (H) Porovnanie črevnej mikroflóry medzi tromi skupinami analyzovanými pomocou LEfSe na rôznych úrovniach taxonómie (skóre LDA > 3,5). Údaje boli vyjadrené ako priemer ± SD. n = 7 na skupinu, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Skratky: AIH, autoimunitná hepatitída; BBR, berberín; LDA, lineárna diskriminačná analýza; LEfSe, metóda lineárnej diskriminačnej analýzy veľkosti účinku; NC, negatívna kontrola; NMDS, nemetrické viacrozmerné škálovanie; OUT, prevádzková taxonomická jednotka.

Prevádzkové analýzy taxonomických jednotiek odhalili relatívnu abundanciu črevnej mikroflóry na úrovni klasifikácie kmeňa a rodu. Na úrovni kmeňa je znázornené zloženie črevnej mikroflóry v skupinách (obrázok 5C). Vo všetkých vzorkách boli 2 najdominantnejšie fyly *Firmicutes* a *Bacteroidota*. Je zaujímavé, že vzťah medzi týmito 2 dominantnými kmeňmi, vyjadrený ako pomer *Firmicutes* / *Bacteroidota*, bol spojený s niekoľkými patologickými stavmi. Ako je znázornené (obrázok 5D), injekcie Con A zvýšili pomer *Firmicutes* / *Bacteroidota* v skupine AIH viac ako v skupine NC ($p < 0,05$). V porovnaní so skupinou NC sa relatívny výskyt *Firmicutes* a *Proteobacteria* v skupine AIH významne zvýšil, zatiaľ čo relatívny výskyt *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* a *Verrucomicrobia* sa významne znížil ($p < 0,001$, $< 0,01$ alebo $< 0,05$). V porovnaní so skupinou AIH sa relatívna abundancia *Firmicutes* a *Proteobacteria* znížila v skupine BBR, zatiaľ čo relatívna abundancia *Verrucomicrobia* a *Desulfobacterota* sa významne zvýšila ($p < 0,001$, $< 0,01$ alebo $< 0,05$).

Na úrovni rodu je znázornené zloženie črevnej mikroflóry v skupinách (obrázok 5E). V porovnaní so skupinou NC sa relatívna abundancia *Escherichia-Shigella* významne zvýšila v skupine AIH, zatiaľ čo relatívna abundancia *Alistipes* a *Rikenella* sa významne znížila ($p < 0,001$ alebo $< 0,05$). V porovnaní so skupinou AIH sa relatívna abundancia

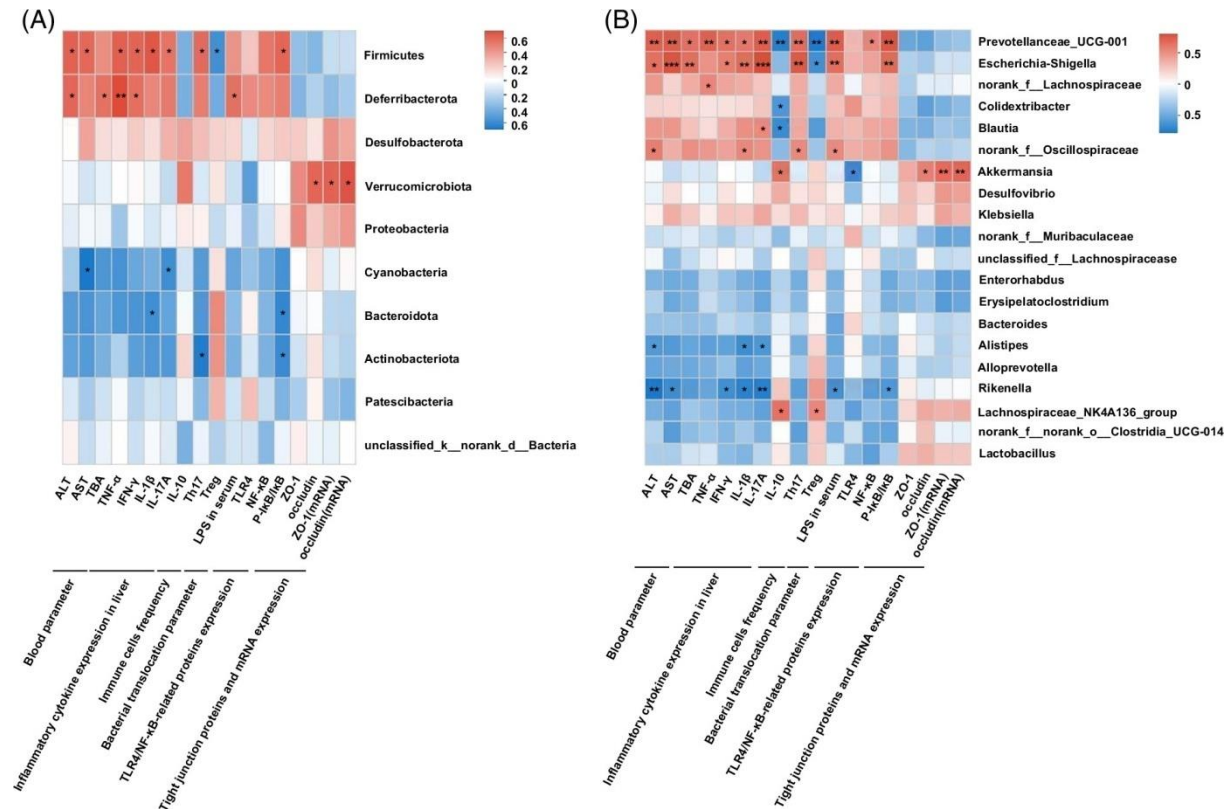
Escherichia-Shigella znížila v skupine BBR, zatiaľ čo relatívna abundancia *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Akkermansia muciniphila*, *Blautia* a *Rikenella* sa významne zvýšila ($p < 0,001$, $< 0,05$) alebo 5F).

Okrem toho sa na rozlíšenie biomarkerov a dominantnej mikroflóry v skupinách použila metóda lineárnej diskriminačnej analýzy veľkosti účinku (LEfSe) (lineárna diskriminačná analýza > 3,5, $p < 0,05$). Ako je znázornené (obrázok 5H), na úrovni rodiny analýza LEfSe ukázala, že *Rikenellaceae* boli obohatené v skupine NC, *Enterobacteriaceae* boli obohatené v skupine AIH a početnosť *Lachnospiraceae* a *Akkermansiaceae* bola relatívne vyššia v skupine BBR v porovnaní s inými skupinami. Na úrovni rodu analýza LEfSe ukázala, že *Alistipes* a *Rikenella* boli obohatené v skupine NC, *Prevotellaceae* a *Escherichia-Shigella* boli obohatené v skupine AIH a abundancia *A. muciniphila* bola relatívne vyššia v skupine BBR v porovnaní s ostatnými skupinami. Ako je uvedené (obrázok 5G), kľúčové bakteriálne zmeny sú znázornené v taxonomickom kladograme LEfSe.

V súhrne tieto výsledky naznačujú, že podávanie BBR zrejme moduluje zloženie črevnej mikroflóry u myši s AIH.

Korelácie medzi rozdielnymi črevnými mikróbmami a parametrami hostiteľa

Vykonalí sme Spearmanove korelačné analýzy na vyhodnotenie potenciálnych väzieb medzi významnými zmenami v zložení črevnej mikrobioty vyvolanými BBR a parametrami hostiteľa, vrátane indexov poškodenia pečene, zápalových cytokínov, indexov imunitnej funkcie, proteínov TJ a hladín expresie proteínov súvisiacich s TLR4/NF- κ B. Tieto vyšetrenia kriticky ďalej objasnili vzťahy medzi rôznymi parametrami hostiteľa a mikrobiálnymi komunitami na úrovni kmeňa a rodu. Pozorovali sme, že niektoré mikróby boli úzko spojené s poškodením pečene a zápalom. Na úrovni kmeňa (obrázok 6A) vykazovali *Firmicutes* a *Deferribacterota* významné pozitívne korelácie medzi poškodením pečene a zápalom. *Firmicutes* a *Actinobacteriota* vykazovali pozitívnu koreláciu s expresiou TLR4. Pozorovali sme tiež významnú negatívnu koreláciu medzi hladinami AST, ALT a TBA v sére a množstvom črevnej mikrobioty, z ktorých najvýznamnejšiu negatívnu koreláciu s hladinami AST vykazovali *cyanobaktérie*. *Cyanobaktérie* mali najvýznamnejšiu negatívnu koreláciu s IL-17A, zatiaľ čo *Bacteroidota* preukázala významnú negatívnu koreláciu s expresiami IL-1 β a P-I κ B/I κ B. Je pozoruhodné, že koncentrácie LPS v sére pozitívne korelovali s relatívnym množstvom *Deferribacterota*. Relatívne množstvo *Verrucomicrobiota* bolo pozitívne spojené s hladinami ZO-1 a okcludínu.

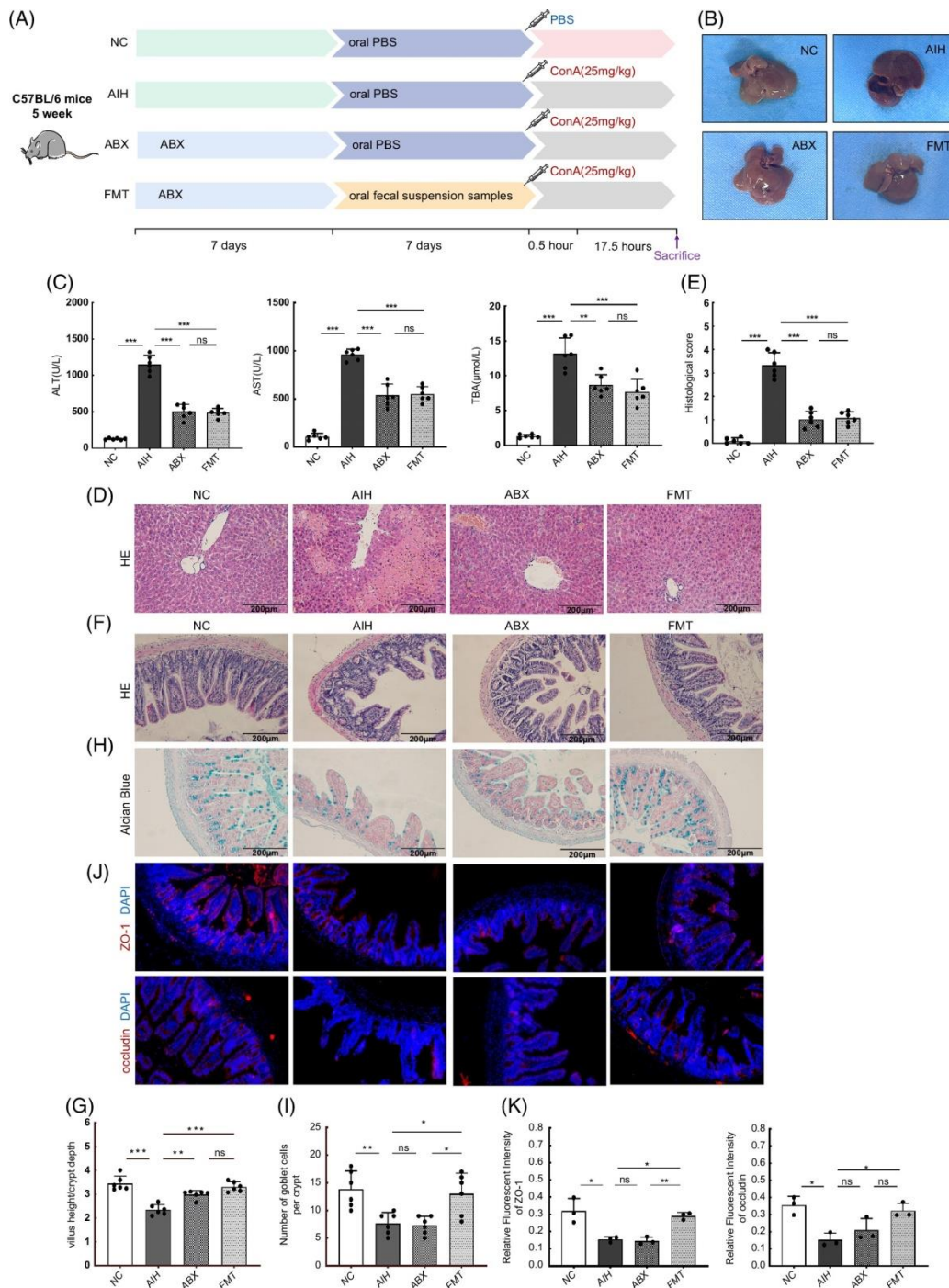


Spearman hodnotí korelácie medzi množstvom črevnej mikrobioty a parametrami hostiteľa (A) na úrovni kmeňa a (B) na úrovni rodu. Červená znamená pozitívnu koreláciu a modrá znamená negatívnu. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Skratky: ALT, alanín transamináza; AST, aspartát transamináza; IFN- γ , interferón- γ ; LPS, lipopolysacharid; TBA, celková žľčová kyselina; TLR4, Toll-like receptor 4; ZO-1, zonula occludens-1.

Na úrovni rodu (obrázok 6B) sme pozorovali významnú negatívnu koreláciu medzi hladinami AST, ALT a TBA v sére a množstvom črevnej mikroflóry (v 20 najlepších rodoch). *Rikenella* vykazovala najvýznamnejšiu negatívnu koreláciu s hladinami ALT. Bolo dôležité poznamenať, že *Prevotellaceae_UCG-001* a *Escherichia-Shigella* pozitívne korelovali s markermi poškodenia pečene, percentami buniek Th17, koncentraciami LPS a hladinami expresie P-IκB/IκB v pečeni. Indexy črevnej bariéry, vrátane ZO-1 a okludínu, významne pozitívne korelovali s relatívnou abundanciou *A. muciniphila*, ktorá bola obohatená v skupine BBR. Expresia TLR4 v pečeni tiež vykazovala negatívnu koreláciu s *A. muciniphila*. Okrem toho skupina *Lachnospiraceae_NK4A136* pozitívne korelovala s expresiou IL-10 v pečeni a podielom Treg buniek v slezine. Preto sme špekulovali, že BBR modifikoval črevnú mikrobiotu a zohral kľúčovú úlohu pri obmedzovaní nevýhodných účinkov injekcií Con A.

Črevná mikroflóra sprostredkúva citlivosť na AIH u myší

Aby sme zistili, či BBR znížila citlivosť na AIH u myší reguláciou črevnej mikroflóry, vykonali sme štúdiu FMT a zistili sme, že myši transplantované fekálnymi vzorkami od myší BBR boli odolné voči poškodeniu pečene vyvolanému Con A. Tiež sme pozorovali, že hladiny ALT, AST a TBA v sére u myší v skupine FMT boli nižšie v porovnaní s hladinami v skupine AIH ($p < 0,001$) (obrázok 7C). Ako je znázornené (obrázok 7B), morfológia pečene u myší v skupine FMT bola podobná ako u NC myší. Farbenie pečenevých rezov hematoxylínom a eozínom ukázalo, že pečenevé štruktúry u myší FMT boli normálne bez nekrózy hepatocytov (obrázok 7D, E). Tiež sme pozorovali, že myši ABX sa stali rezistentnými na poškodenie pečene vyvolané Con A po odstránení črevnej komenzálnej mikrobioty antibiotikami (obrázok 7B-E). Tieto zistenia ukázali, že črevná mikroflóra zohrávala dôležitú úlohu pri vývoji AIH.



Črevná mikroflóra je spojená s poškodením pečene vyvolaným ConA a FMT zlepšila funkciu črevnej bariéry. (A) Návrh pokusu na zvieratách. (B) Makroskopický vzhľad pečene. (C) Koncentrácia ALT, AST a TBA (n = 6). (D, E) HE farbenie rezov pečene (stupnica, 200 μm) a histologické skóre pre rezy pečene (n = 6). (F) HE farbenie rezov ilea (stupnica, 200 μm). (G) Vyhodnotilo sa päť krýpt na sekciu, potom sa mikroskopicky vyhodnotila výška klkov a hĺbka krýpt a vypočítal sa pomer výšky klkov a hĺbky krýpt (n = 6). (H) Farbenie rezov ilea alcianovou modrou (stupnica, 200 μm). (I) Počet pohárikovitých buniek produkujúcich kyselinu-mučín na vilus (n = 6). (J) Membránová lokalizácia ZO-1 a okcludínu (červená) bola hodnotená imunofluorescenciou a vizualizovaná fluorescenčnou mikroskopiou, jadrá boli zafarbené DAPI (modrá) (n = 3). (K) Kvantifikácia intenzity farbenia ZO-1 a okcludínu v každej skupine (n = 3). Všetky údaje boli vyjadrené ako priemer ± SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Skratky: ABX, antibiotiká likvidujú črevné baktérie; AIH, autoimunitná hepatitída; ALT, alanín transamináza; AST, aspartát transamináza; ConA, konkanavalín A; FMT, transplantácia fekálnej mikrobioty; HE, hematoxylín a eozín; NC, negatívna kontrola; ns, žiadny význam; TBA, celková žľobá kyselina; ZO-1, zonula occludens-1.

Je zaujímavé, že poškodenie črevného epitelu spôsobené Con A sa významne zmiernilo u myší FMT po FMT od myší v skupine BBR. Konkrétne pomery výšky klkov k hĺbke krypty a čísla GC v ileu boli u myší FMT významne zvýšené v porovnaní s hladinami v skupine AIH, čo sú faktory kriticky dôležité pre funkciu črevnej bariéry ($p < 0,01$ a $< 0,001$) (obrázok 7F-ja). Okrem toho boli hladiny TJ proteínov v skupinách stanovené farbením IF. Hladiny expresie ZO-1 a okcludínu boli zvýšené v ileu FMT myší v porovnaní s hladinami u AIH myší ($p < 0,05$) (obrázok 7J, K). Tieto výsledky ukázali, že BBR mala dôležité úlohy pri inhibícii presakujúcich čriev a rozvoja AIH.

Lin et al uviedli, že LPS odvodený z čreva podporoval poškodenie pečene vyvolané Con A spôsobom závislým od TLR4, pričom zníženie LPS sprostredkované antibiotickými režimami výrazne potláčalo toto poškodenie pečene. V našej štúdii sa v dôsledku nedostatku črevnej komenzálnej mikrobioty u myší ABX výrazne zvrátilo poškodenie pečene vyvolané Con A. Je zaujímavé, že napriek tomuto zvratu boli črevné bariéry u ABX myší podobné tým v skupine AIH. Ako je znázornené (obrázok 7G), pomery výšky klkov k hĺbke krypt v ileu sa zvýšili u ABX myší v porovnaní so skupinou AIH ($p < 0,01$). Avšak počty GC a hladiny ZO-1 a okcludínu v ileu boli podobné v oboch skupinách ($p > 0,05$). Tieto pozorovania naznačujú, že črevná mikroflóra mala pri vývoji AIH dôležitejšie úlohy ako integrita črevnej bariéry.

DISKUSIA

Predchádzajúce štúdie ukázali, že zápalová infiltrácia a apoptóza v pečeni sú základnými procesmi pre ochorenie pečene súvisiace so zápalom. V našej štúdii sme pozorovali, že vážne poškodenie architektúry hepatocytov vyvolané Con A bolo účinne zmiernené BBR. Zápalové bunky, zápalové faktory a proteíny súvisiace s apoptózou Bax a kaspáza-3 boli významne znížené v pečeni po podaní BBR, zatiaľ čo protizápalový cytokín IL-10 bol zvýšený.

Th17 bunky vylučujú IL-17A, stimulujú sekréciu prozápalových molekúl a ďalej sa podieľajú na patogenéze autoimunitného ochorenia. Treg bunky vyrovnávajú zápal tkaniva vylučovaním protizápalového IL-10. Predchádzajúce štúdie ukázali, že BBR môže inhibovať reakcie Th17 pri autoimunitných ochoreniach sprostredkovaných T-bunkami. Naša štúdia ukázala, že BBR zlepšil rovnováhu Treg/Th17 zvýšením Treg a znížením hladín buniek Th17.

Črevná epiteliálna bariéra, ktorá sa vyvinula na udržanie rovnováhy medzi absorpciou živín a zabránením vstupu toxínov a luminálnych baktérií, pozostáva z vrstvy hlienu, epiteliálnych buniek a medzibunkových spojení. Proteíny TJ obsahujú multifunkčné komplexy, ktoré utesňujú paracelulárne priestory medzi epitelovými bunkami, čím zabraňujú paracelulárnej difúzii mikroorganizmov a iných antigénov cez epitel. Počas udržiavania bariéry vytvárajú GC vrstvy hlienu, ktoré lemujú lúmen čreva. Normálne prenosu LPS do extraintestinálnych orgánov bráni neporušená črevná bariéra, ale narušená bariéra môže zvýšiť translokáciu LPS. Preto je inhibícia signalizácie LPS/TLR4/NF- κ B kľúčom k zmierneniu zápalu pečene. Naše výsledky ukázali, že injekcie Con A zničili črevnú bariéru, zatiaľ čo podávanie BBR zvýšilo expresiu proteínu TJ, čísla GC a zlepšilo morfológiu ilea. Identifikovali sme tiež nižšie hladiny LPS v sére a potlačili signalizáciu TLR4 / NF- κ B v skupine BBR, čo ako vplyv zosilnenej črevnej bariéry indukovanej BBR cez zhrubnutú vrstvu hlienu a zosilnené TJ.

Porucha črevnej mikroflóry môže slúžiť ako primárny faktor pri zvyšovaní LPS a prozápalových cytokínov v lúmene, čo vedie k zvýšenej intestinálnej permeabilite. Črevná mikroflóra sa ukázala byť dôležitým cieľom BBR. Naše analýzy ukázali, že črevná mikroflóra

sa podieľala na náchylnosti na poškodenie pečene vyvolanej Con A a zdá sa, že podávanie BBR priaznivo pretvára komunity črevnej mikroflóry. Je potrebné poznamenať, že spomedzi zmenenej mikroflóry bola *A. muciniphila* najviac ovplyvnená BBR, čo je v súlade s pozorovaniami Donga et al. Preto významne zvýšená abundancia *A. muciniphila* môže zlepšiť črevnú bariéru a imunitné funkcie a znížiť translokáciu LPS.

Mastné kyseliny s krátkym reťazcom (SCFA), ako je acetát, propionát a butyrát, vznikajú bakteriálnou fermentáciou vlákniny v črevnom lúmene. Okrem ich významu pre integritu čriev majú SCFA silné protizápalové účinky. Predchádzajúce štúdie uviedli, že SCFA zrejme regulujú Treg bunky na zníženie zápalu. Treg bunky udržujú črevnú homeostázu sekréciou protizápalových cytokínov, hlavne IL-10, a inverznou reguláciou Th17 buniek.⁴⁰ *Lachnospiraceae* je probiotikum, ktoré produkuje SCFA. V našej štúdii skupina *Lachnospiraceae_NK4A136_* ukázala pozitívnu koreláciu s podielom Treg buniek v slezine. V predchádzajúcej práci *Alistipes* preukázal dobré protizápalové účinky v štúdiách na ľuďoch a zvieratách. V našej štúdii *Alistipes* preukázal negatívnu koreláciu s expresiou IL-1p a IL-17A v pečeni. Naše výsledky teda poskytli ďalší dôkaz, že BBR môže znížiť náchylnosť na výzvu Con A reguláciou črevnej mikroflóry a súvisiacich udalostí imunitnej regulácie.

Ukázalo sa, že BBR priamo inhibuje poškodenie pečene vyvolané Con A, takže nemožno vylúčiť, že BBR priamo zmiernuje poškodenie pečene, čím zlepšuje črevnú mikroflóru a črevné štruktúry prostredníctvom krížovej reči medzi črevom a pečeňou. Aby sme rozlíšili, či zmeny črevnej mikroflóry po intervencii BBR boli príčinou alebo dôsledkom remisie AIH, vykonali sme štúdiu FMT. Ako sa predpokladalo, pozorovali sme, že injekcie Con A do chvostovej žily u myší FMT nespôsobili vážne poškodenie pečene a že FMT tiež vykazovala priaznivé výsledky, pokiaľ ide o ukazovatele súvisiace s črevami. Tieto výsledky naznačujú, že pretvorená mikrobiota zlepšila AIH a nebolo to dôsledkom remisie AIH. To ďalej naznačuje, že BBR hlavne zmiernuje poškodenie pečene zlepšením črevnej mikroekológie, zlepšením funkcie čriev, znížením hepatálnej translokácie LPS a inhibíciou zápalovej dráhy LPS/TLR4/NF-KB.

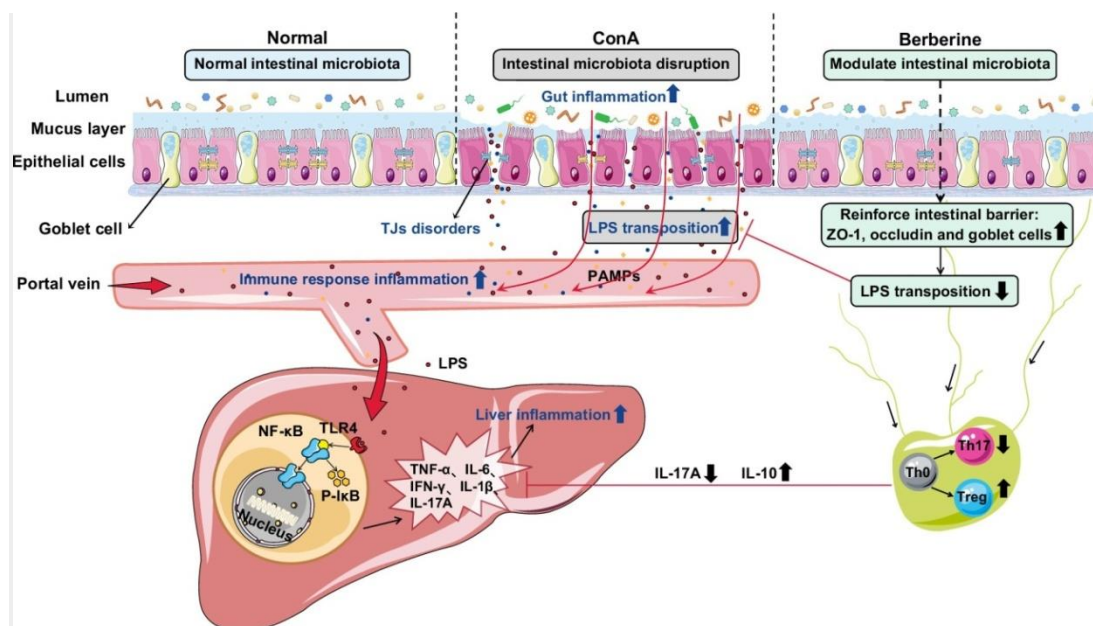
Predchádzajúca štúdia ukázala, že poškodenie pečene u experimentálnych myší s AIH bolo významne inhibované, keď sa črevná komenzálna mikroflóra vyčistila zmesami širokospektrálnych antibiotík, čo naznačuje, že poškodenie pečene vyvolané S100 čiastočne závisí od črevnej komenzálnej mikrobioty. Ďalšia štúdia ukázala, že v porovnaní s myšami bez špecifických patogénov liečba Con A nespustila aktiváciu hepatálnych prirodzených zabíjačských T buniek u myší bez mikróbov, čo naznačuje, že glukolipidové antigény pochádzajúce z črevných komenzálnych baktérií boli potrebné na aktiváciu prirodzených zabíjačských T buniek pri poškodení pečene vyvolanom Con A. Uskutočnili sme tiež podobné štúdie a zistili^{sme}, že skupina ABX vykazovala výrazne nižšiu expresiu proteínu TJ v čreve, podobnú expresiu u myší AIH. Poškodenie pečene však nebolo zjavné. Tieto výsledky naznačujú, že črevná mikroflóra zohráva dôležitejšiu úlohu pri výskyte hepatitídy, bez ohľadu na to, či sa na vyvolanie AIH použil Con A alebo S100. Na aktiváciu vrodenej imunitnej odpovede je teda potrebný komenzálny črevný mikrobióm. Úlohy črevnej mikroflóry v imunite pečene však zostávajú kontroverzné a na potvrdenie tohto spojenia sú potrebné ďalšie štúdie. Nedávna štúdia o vzťahu medzi akútnou pankreatitídou a črevnou mikroflórou u myší ukázala, že v porovnaní s myšami bez špecifických patogénov bola črevná bariéra u myší GF a ABX narušená, ale závažnosť akútnej pankreatitídy sa zlepšila v dôsledku nedostatku črevnej mikroflóry. .⁴⁴ Tento výsledok bol podobný ako náš a ďalej naznačoval, že samotná zvýšená črevná permeabilita nestačí na vyvolanie zápalu prenášaného

črevami. Okrem toho významne znížená expresia črevného proteínu TJ u myši ABX tiež ukázala, že deštrukcia črevnej mikrobioty viedla k nízkej expresii proteínu TJ v čreve.

BBR vykazovala podobné zmiernujúce účinky ako glukokortikoidy na AIH indukovanú Con A, ale zdôraznila účinky zmeny črevnej mikrobioty a imunitnej regulácie. Tieto zistenia naznačujú, že BBR môže predstavovať bezpečnejší, účinnejší a cenovo dostupnejší liek na liečbu AIH. V dôsledku účinkov zmeny črevnej mikrobioty a imunitnej regulácie môže BBR zmierniť iné ochorenia pečene, ako je vírusová hepatitída a fibróza pečene, prostredníctvom imunitnej osi črevo-pečeň-imunitná os. Tieto zistenia môžu naznačovať úlohu BBR pri iných autoimunitných ochoreniach. Prieskum týchto ciest môže v konečnom dôsledku poskytnúť širší rozsah použitia tejto tradičnej medicíny.

ZÁVERY

Celkovo sme preukázali, že zmiernenie poškodenia pečene podávaním BBR súviselo so zmenenou črevnou mikrobiotou a zosilnenou črevnou bariérou. Toto posledné pozorovanie inhibovalo translokáciu látok pochádzajúcich z čreva a potenciálne škodlivých látok do pečene. Potom bola zablokovaná signálna dráha LPS/TLR4/NF- κ B, čo viedlo k zníženiu produkcie prozápalových cytokínov. Upravená črevná mikrobiota môže súvisieť s priaznivejšou rovnováhou Treg/Th17 a expresiou zápalových cytokínov. V súhrne navrhujeme, aby BBR cielil na os črevnej mikrobioty a imunitného systému a mohol sa použiť ako terapeutické činidlo pri terapii AIH (obrázok 8).



Ochranné mechanizmy berberínu proti myšiam s autoimunitnou hepatitídou. Skratky: ConA, konkanavalín A; IFN- γ , interferón- γ ; LPS, lipopolysacharid; PAMP, molekulárne vzory spojené s patogénom; p-I κ B, fosfoinhibít NF- κ B; TJs, tesné križovatky; TLR4, Toll-like receptor 4; ZO-1, zonula occludens-1.

Zdroj: Berberine alleviates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice by modulating the gut microbiota, *Yang, Hao¹; Liu, Qingqing¹; Liu, Haixia¹; Kang, Xing¹; Tian, Haixia¹; Kang, Yongbo^{1,2}; Li, Lin^{1,2}; Yang, Xiaodan¹; Ren, Peng¹; Kuang, Xiaoyu¹; Wang, Xiaohui^{2,3}; Guo, Linzhi^{2,3}; Tong, Mingwei^{1,2}; Ma, Jieqiong^{1,2}; Fan, Weiping,*

Department of Microbiology and Immunology, Shanxi Medical University, Jinzhong, China, Key Laboratory of Cellular Physiology (Shanxi Medical University), Ministry of Education, and Shanxi Key Laboratory of Cellular Physiology, Taiyuan, China, Laboratory of Morphology, Shanxi Medical University, Jinzhong 030619, China