

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.011

## EGCG 干预大鼠肝癌形成过程中对肠道菌群结构的影响

唐艳萍, 蔡政民, 唐亚梅, 唐嘉莹, 李霜, 李科志(广西医科大学附属肿瘤医院 精准医学中心, 广西 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:** 探讨绿茶单体表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对大鼠肝癌发生过程中肠道菌群结构变化的影响。**方法:** 建立二乙基亚硝胺(DEN)诱导的肝癌大鼠模型。将 26 只 SD 大鼠随机分成 3 组, 分别为正常对照组、肝癌组和 EGCG 干预组。从实验开始第 1 天起, EGCG 干预组每日给予 EGCG (40 mg/kg) 灌胃, 正常对照组和肝癌组给予等量生理盐水灌胃, 1 次/日, 持续至第 20 周。灌胃结束后, 采集大鼠粪便样本, 提取 DNA, 进行高通量 16S rRNA V3-V4 区测序; 处死大鼠, 取肝, 观察肿瘤形成情况, 并计算肝癌发生率。对测序数据进行生物信息学分析: 经质控、聚类获得操作分类单元(OTU)表, 据此计算  $\alpha$  多样性指数(包括 Observed species、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数), 并进行  $\beta$  多样性分析。同时, 对物种进行分类学注释, 比较各组间菌群组成与丰度差异。**结果:** EGCG 干预组大鼠(8 只)肝脏肿瘤形成率明显低于肝癌组(10 只)(50% vs 100%,  $P = 0.023$ ), 正常对照组(8 只)大鼠无肿瘤发生。在肠道菌群方面, 肝癌组操作分类单元(OTU)数量远低于正常对照组( $P < 0.001$ ), 而 EGCG 干预组 OTU 数量总体上高于肝癌组( $P = 0.021$ )。  $\alpha$  多样性分析显示, 肝癌组 Shannon 指数低于正常对照组( $P < 0.05$ ); 此外, 与肝癌组相比, EGCG 干预组的 Observed species 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均显著提高( $P < 0.05$ )。  $\beta$  多样性分析及主坐标分析(PCoA)表明, 三组肠道菌群结构存在显著分离(PERMANOVA,  $R^2 = 0.3918$ ,  $P = 0.001$ ), 其中 EGCG 干预组群落结构介于肝癌组与正常对照组之间, 并更接近于正常对照组。肝癌组大鼠较正常大鼠肠道菌群中链球菌等潜在致病菌富集, 丁酸产生相关菌(如丁酸球菌属、瘤胃球菌属等)丰度显著降低( $P < 0.05$ )。相比之下, 在 EGCG 干预肝癌发生过程中, 大鼠肠道菌群结构相对稳定。厚壁菌门/拟杆菌门比值较肝癌组显著提高( $P < 0.05$ ), 益生菌(如双歧杆菌属、乳杆菌属等)和丁酸产生相关菌(如丁酸杆菌属)富集。**结论:** EGCG 干预可降低 DEN 诱导的大鼠肝癌发生率, 并有助于稳定肠道菌群结构, 其作用可能与增加菌群多样性、促进益生菌及丁酸产生菌富集、恢复菌群平衡有关。

**[关键词]** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 肝癌; 肠道菌群; 高通量测序

**[中图分类号]** R735.7; Q936 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 02-0190-09

## Effect of epigallocatechin gallate on gut microbiota during hepatocarcinogenesis in rats

TANG Yanping, CAI Zhengmin, TANG Yamei, TANG Jiaying, LI Shuang, LI Kezhi (Precision Medicine Center, Guangxi Medical University Affiliated Cancer Hospital, Nanning 530021, Guangxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) on the structural changes of gut microbiota during hepatocarcinogenesis in rats. **Method:** A Sprague-Dawley (SD) rat model of hepatocellular carcinoma (HCC) induced by diethylnitrosamine (DEN) was established. Twenty-six SD rats were randomly divided into three groups: normal control group, HCC model group and EGCG intervention group. Starting from day 1, the EGCG group received daily intragastric administration of EGCG (40 mg/kg), while the normal control and HCC model groups received an equal volume of saline, once daily for 20 weeks. At the end of the experiment, fecal samples were collected for DNA extraction and high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene V3-V4 region. Rats were then euthanized, livers were collected to observe tumor formation, and the incidence of HCC was calculated. Sequencing data were processed to generate an operational taxonomic unit (OTU) table. Alpha diversity (Observed species, Chao1, Shannon, Simpson) and beta diversity were analyzed, followed by taxonomic annotation to identify compositional differences in gut microbiota among groups. **Results:** The liver tumor formation rate was significantly lower in the EGCG intervention group ( $n = 8$ ) compared to the HCC model group ( $n = 10$ ) (50% vs 100%,  $P = 0.023$ ), with no tumors observed in the normal control group ( $n = 8$ ). In terms of gut microbiota, the number of operational taxonomic units (OTU) in the HCC model group was significantly

**[基金项目]** 广西自然科学基金(2024GXNSFAA010395); 广西壮族自治区中青年骨干教师基础能力提升项目(2024KY0090)

**[作者简介]** 唐艳萍, 硕士, 副主任技师

**[通信作者]** 李科志(扫码获取作者通信方式)



lower than that in the normal control group ( $P < 0.001$ ), while the OTU number in the EGCG intervention group was significantly higher than that in the HCC model group ( $P = 0.021$ ). Alpha diversity analysis revealed that the Shannon index was lower in the HCC model group compared to the normal control group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, compared to the HCC model group, the EGCG intervention group showed significant increases in the Observed species, Chao1, Shannon, and Simpson indices ( $P < 0.05$ ). Beta diversity analysis, based on principal coordinate analysis (PCoA) and PERMANOVA ( $R^2 = 0.3918$ ,  $P = 0.001$ ), indicated a significant separation of the gut microbiota structure among the three groups. The microbial community structure of the EGCG intervention group was positioned between the HCC model and normal control groups, clustering closer to the normal controls. The HCC model group exhibited an enrichment of potential pathobionts (e.g., *Streptococcus*) and a significant reduction in the abundance of butyrate-producing bacteria (e.g., *Butyricoccus*, *Ruminococcus*) ( $P < 0.05$ ) compared to the normal controls. In contrast, EGCG intervention resulted in a more stable gut microbiota structure during hepatocarcinogenesis, characterized by a significantly increased Firmicutes/Bacteroidota ratio ( $P < 0.05$ ), and an enrichment of beneficial bacteria (e.g., *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) and butyrate-producing bacteria (e.g., *Butyricoccus*). **Conclusion:** EGCG intervention reduces the incidence of DEN-induced HCC in rats and helps stabilize the gut microbiota structure. This effect may be associated with increased microbial diversity, promotion of beneficial and butyrate-producing bacteria, and restoration of microbial balance.

**[Key words]** epigallocatechin gallate (EGCG); liver cancer; gut microbiota; high-throughput sequencing

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(2): 190-198. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.011]

绿茶是全国广泛消费的饮品之一,其潜在的防癌抗癌功效多年来备受关注。绿茶的主要活性成分是茶多酚,后者是由黄烷-3-醇类(儿茶素类)、黄酮醇类、酚酸类等多种有效成分组成的混合物,其中活性最强且含量最多的成分为表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)<sup>[1]</sup>。EGCG可通过抑制肿瘤相关蛋白的表达,调节抑癌基因甲基化水平,影响多条信号转导通路以阻滞细胞周期进程、促进细胞凋亡、抑制肿瘤血管新生等,发挥抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。前期已证实EGCG具有良好的抗癌特性<sup>[3]</sup>。肠道菌群是近年来研究的热点,研究<sup>[4]</sup>显示肝脏与肠道之间存在着特殊解剖联系,且肝癌的发生发展与肠道菌群的失衡有关。尽管EGCG的抗肝癌功效与肠道菌群失调的促肝癌作用均已被证实,但两者之间的潜在联系尚未明确。本研究通过高通量16S rRNA测序,了解肝癌大鼠肠道菌群的变化情况及EGCG干预对肝癌大鼠肠道菌群的影响,结合生物信息学分析,从肠道微生物的角度初步阐释EGCG预防肝癌的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)购自Sigma-Aldrich®公司,EGCG购自杭州怡倍嘉茶叶科技有限公司(粉末,25 g/袋,纯度为99%,使用时称取1 g粉末溶于50 mL无菌生理盐水配制成20 mg/mL溶液,现配现用),4%多聚甲醛购自合肥白鲨生物科技有限公司,苏木精-伊红(H-E)染色试剂盒购自北京索莱宝公司,PV-9000通用二步法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人Ki-67多克隆抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公

司,HiPure Stool DNA Kits购自广州美基生物科技有限公司,AMPure XP beads购自Beckman公司,Illumina DNA Prep Kit购自Illumina公司,引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 动物建模与处理

26只4周龄雄性SD大鼠(体质量100~120 g)由广西医科大学动物实验中心提供(实验动物生产许可证号:SCXK桂2025-0005;实验动物使用许可证号:SYXK桂2025-0005;动物实验伦理批号:KY2025624),于标准实验环境(温度24~26°C,相对湿度50%~60%,12 h光照/12 h黑暗循环)适应性饲养1周。随后,将大鼠随机分为正常对照组(8只)、肝癌组(10只)和EGCG干预组(8只)(由于大鼠肝癌模型在造模期具有已知的较高死亡率,初始增加肝癌组动物数量旨在保证最终成功造模的样本数)。其中,肝癌组和EGCG干预组以DEN诱导大鼠肝癌,方法如下:于实验第6~13周腹腔注射DEN,100 mg/kg,1次/周,正常对照组大鼠同期腹腔注射等量生理盐水。同时,从实验开始第1天起,EGCG干预组大鼠每日接受新鲜配制的EGCG灌胃干预(按40 mg/kg剂量给药,该剂量基于预实验确定的有效安全剂量,药物灌胃体积在0.2~1.0 mL范围),1次/日,正常对照组和肝癌组给予等量生理盐水灌胃,所有灌胃持续至第20周。灌胃结束后,无菌采集所有大鼠新鲜粪便,置无菌冻存管中于-80°C保存,并采用过量麻醉法处死大鼠,剖取整个肝组织用于后续分析。

### 1.3 组织病理学评估大鼠肝癌发生率

每只大鼠每叶肝至少取3处组织块(包括肉眼可见结节、交界区及正常外观区域),每块约1.0 cm<sup>3</sup>,立即放入4%多聚甲醛中固定48 h。组织固定后经梯度乙醇脱水(依次为70%、80%、90%、95%、无水乙

醇,每级浸泡 60~90 min),随后转入二甲苯进行透明处理,共2次,每次 30 min。浸入 60 °C液态石蜡 2~3 h,进行石蜡包埋。组织块连续切片,厚度 4 μm,行 H-E 染色,具体步骤如下:切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化后,用苏木精染细胞核 5~8 min,随后以 1% 盐酸乙醇溶液分化数秒,用流动自来水返蓝 5~10 min,再以伊红染细胞质 1~3 min;切片依次经脱水、透明、封片。显微镜下阅片,凡任一叶组织检出肿瘤结节即记为阳性,计算每组阳性大鼠占比作为肝癌发生率。

#### 1.4 免疫组化法观察肝组织中 Ki-67 蛋白的表达

石蜡切片经脱蜡和水化后,在 pH = 6.0 的柠檬酸盐缓冲液中进行微波热修复(中高火 5 min,停火 5 min,中低火 15 min)。室温下于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液反应 15 min 以阻断内源性过氧化物酶活性。PBS 洗涤(3 次,每次 3 min),滴加 5% 正常山羊血清,于室温封闭 30 min,倾去封闭液。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知的阳性组织切片作为阳性对照。滴加兔抗 Ki-67 多克隆一抗(工作浓度 1:200),4 °C 反应过夜。切片经 PBS 洗涤(3 次,每次 5 min),随后严格按照 PV-9000 通用二步法免疫组化检测试剂盒说明书操作:滴加聚合物增强剂,室温反应 20 min;PBS 洗涤后滴加增强酶标山羊抗鼠/兔 IgG 聚合物,室温反应 30 min。DAB 显色 1~3 min,在显微镜下控制显色深度,苏木精复染细胞核,脱水透明后中性树脂封片。显微镜下观察,细胞核内出现棕黄色颗粒判定为 Ki-67 阳性细胞。采用 ImageJ 软件进行定量分析,每张切片随机选取 5 个不重叠的 200 倍视野,计数 Ki-67 阳性细胞核占总细胞核的百分比,取平均值作为该样本的 Ki-67 阳性指数。

#### 1.5 DNA 提取、PCR 扩增和 16S rRNA 测序检测大鼠肠道菌群

大鼠粪便样本收集完成后,迅速投入液氮中冷冻。随后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存,直至送检。委托广州基迪奥生物科技有限公司进行 16S rRNA V3-V4 高变区高通量测序。具体流程为使用 HiPure Stool DNA Kit 提取样本总基因组 DNA, DNA 质量经琼脂糖凝胶电泳及超微量分光光度计检测,要求浓度  $\geq 20$  ng/μL,  $D_{260}/D_{280}$  介于 1.8~2.0 之间,且电泳条带清晰无降解。不符合上述质量标准的样本在此阶段被排除,未进入后续分析。以提取的总 DNA 为模板,用带有测序接头的特异引物扩增细菌 16S rRNA 的 V3-V4 可变区域。上游引物:341F(5'-CCT ACGGGNGGCWGCAG-3'),下游引物:806R(5'-GGA CTACNNGGGTATCTAAT-3')(其中 N 代表 A/T/C/G, W 代表 A/T)。扩增反应体系(50 μL):10 μL 5 ×

Q5<sup>®</sup>Reaction Buffer, 10 μL 5 × Q5<sup>®</sup>High GC Enhancer, 1.5 μL dNTPs(2.5 mmol/L),各 1.5 μL 上游与下游引物(10 μmol/L),0.2 μL Q5<sup>®</sup>High-Fidelity DNA Polymerase, 50 ng 模板 DNA,纯水补至 50 μL。反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 1 min,60 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。扩增产物经 AMPure XP beads 纯化,并用 Qubit<sup>®</sup> 3.0 荧光计定量。接着,使用 Illumina DNA Prep Kit 进行文库的构建,文库经 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 精确定量后,使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行质检,合格标准为浓度  $\geq 2$  nmol/L,且文库片段主峰约 450 bp,无非特异性扩增产物。最后,质检合格的文库于 Illumina NovaSeq 6000 平台,进行 PE250(双端 250 bp)测序。

#### 1.6 数据处理

对于测序得到的原始读数(raw reads),首先采用 USEARCH 软件对低质量读数(reads)进行过滤,然后将双端 reads 拼接为标签序列(Tag),再对 Tag 进行低质量过滤,获得有效 Tags。随后在 97% 相似度阈值下进行聚类,获得操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),并生成 OTU 丰度矩阵和代表序列。基于 OTU 序列信息,利用 RDP classifier 算法参照 SILVA 数据库(<https://www.arb-silva.de/>)进行物种注释。计算  $\alpha$  多样性指数[Shannon 指数、观测物种数(observed species)指数、Simpson 指数、Chao1 指数],并绘制稀释曲线。基于 Weighted UniFrac 距离矩阵进行主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA),并采用 PERMANOVA 方法检验组间群落结构差异是否具有统计学显著性,以此估算  $\beta$  多样性。为鉴别组间差异显著的菌群,采用统计检验比较具体菌群的相对丰度。为控制多重假设检验带来的假阳性,对所有  $P$  值进行错误发现率校正,将错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 作为差异显著的标准,以此识别并比较各组间具体菌群相对丰度的差异。

#### 1.7 统计学处理

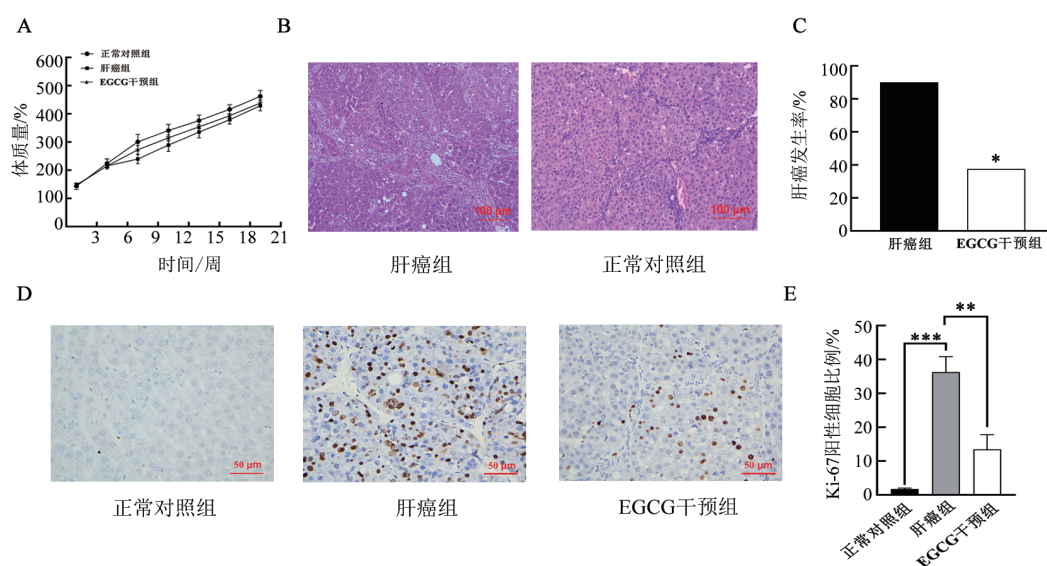
采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料,两组间比较采用独立样本  $t$  检验;不符合正态分布的计量资料,两组间比较采用 Mann-Whitney 检验;多组间比较则采用 Kruskal-Wallis 检验,进一步进行 Dunn's 检验两两比较(如组间 F/B 比值的比较)。对于分类变量(如成瘤率),当总样本量  $\geq 40$  且所有格子的期望频数  $\geq 5$  时使用  $\chi^2$  检验,否则采用 Fisher 精确检验,并计算率的 95% 置信区间(Clopper-Pearson 法)。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EGCG 干预降低 DEN 诱导的大鼠肝癌发生率

在整个实验过程中对大鼠进行体质量监测。第 6 周开始注射 DEN, 1 周后观察发现肝癌组大鼠体质量增长出现明显停滞, 而 EGCG 干预组大鼠体质量仍保持平稳增长(图 1A)。直到第 20 周实验结束, 3 组大鼠的体质量并无显著差异。随后处死大鼠, 取肝组织进行病理学分析。经统计, 正常对照组无肿瘤发生(0/8), 肝癌组中所有大鼠肝组织均形成肿瘤结节(100.0%, 10/10; 95% CI: 72.2%~100.0%), 而 EGCG 干预组只有 4 只发生肝癌, 肝癌发生率为

(50.0%, 4/8; 95% CI: 15.7%~84.3%), EGCG 干预组肝癌发生率显著低于肝癌组( $P = 0.023$ , 图 1B、C)。通过免疫组化法检测各组大鼠肝组织中 Ki-67 蛋白的表达情况, 结果(图 1D、E)显示, 正常对照组大鼠的肝组织中 Ki-67 阳性率为 1.74%, 而肝癌组中 Ki-67 阳性细胞显著增多, 阳性率(36.29%)明显高于正常对照组( $P = 0.000 2$ ), 反映了肝癌组织的高增殖特性。与肝癌组相比, EGCG 干预后肝癌组织中的 Ki-67 阳性细胞显著减少, 阳性率(13.45%)明显降低( $P = 0.003 3$ ), 提示 EGCG 可有效抑制肝癌细胞的增殖活性。上述结果表明 EGCG 显著抑制 DEN 诱导大鼠肝癌的形成。



A: 各组大鼠的体质量变化; B: 肝癌大鼠和正常大鼠肝组织的 H-E 染色; C: 比较肝癌组与 EGCG 干预组大鼠的肿瘤发生率; D: 免疫组化法检测各组大鼠肝组织中 Ki-67 蛋白的表达情况。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 1 EGCG 干预对 DEN 诱导大鼠肝癌形成的影响

### 2.2 EGCG 增加肝癌大鼠肠道菌群 OTU 多样性

采集大鼠粪便, 提取粪便微生物总 DNA, 结果显示 8 只正常对照组大鼠、6 只肝癌模型组大鼠和 7 只 EGCG 干预组大鼠的样本符合质量要求, 可进行后续实验。Venn 图(图 2)分析显示, 正常对照组、肝癌组和 EGCG 干预组特有的 OTU 数目分别为 1 329、103 和 118 个。此外, 各组样本的 OTU 总数分别为: 正常对照组 2 567 个, 肝癌组 974 个, EGCG 干预组 1 326 个。肝癌组 OTU 数量远低于正常对照组( $P < 0.001$ ), 而 EGCG 干预组 OTU 数量总体上高于肝癌组( $P = 0.021$ ), 表明 EGCG 处理可能有助于增加肝癌大鼠粪便菌群的 OTU 丰富度。

每个样本得到的测序数据量足够大, 测序深度已基本覆盖样本中的微生物多样性, 满足后续分析要求。同时, 通过比较曲线平台期高度发现, 肝癌组的群落丰富度显著低于正常对照组, 而 EGCG 干预组的曲线平台期高度趋近正常对照组, 提示 EGCG 干预可能部分恢复了因肝癌而降低的菌群丰富度。

### 2.3 EGCG 增加肝癌大鼠肠道菌群 $\alpha$ 多样性

#### 2.3.1 稀释曲线

如图 3A 所示, 所有样本的 Shannon 指数稀释曲线在测序量达 1 000 条序列 reads 后均趋于平缓, 表明

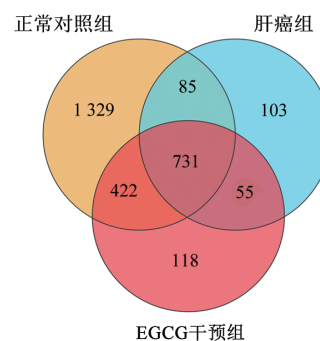
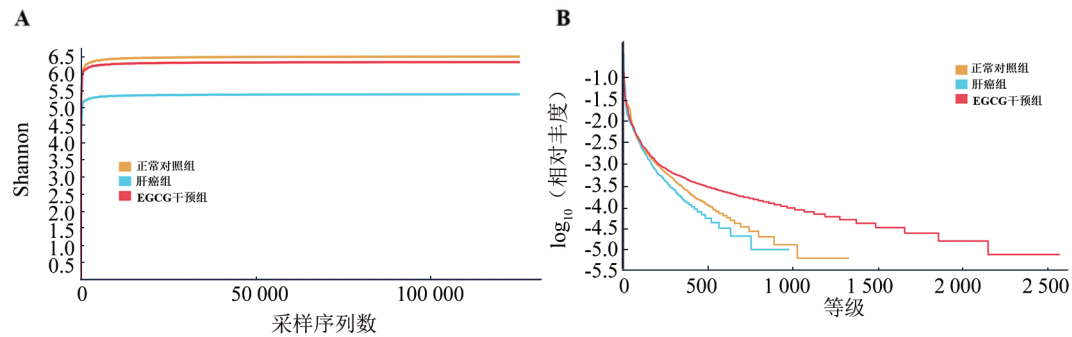


图 2 各组肠道菌群 OTU 数目 Venn 图

### 2.3.2 Rank 丰度曲线

Rank 丰度曲线(等级丰度曲线)可直观地反映样品中包含的物种丰富度和均匀度。曲线水平跨度(横轴范围)反映物种丰富度(Observed species 值), 垂直分布斜率表征物种均匀度(Shannon 均匀度指

数)。如图 3B 所示, 与正常对照组相比, 肝癌组的曲线显著左移且陡峭, 表明肝癌导致菌群多样性丧失及优势物种扩增, 而 EGCG 干预组曲线右移趋缓, 说明菌群多样性增加。



A: 各组 Shannon 指数稀释曲线; B: 各组 Rank 丰度曲线。

图3 EGCG对肝癌大鼠肠道菌群α多样性的影响

### 2.3.3 α多样性指数

α多样性主要包括 Observed species、Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数。其中 Observed species 指数、ACE 指数和 Chao1 指数主要反映样本中 OTU 丰富度, Shannon 指数和 Simpson 指数综合反映群落的丰富度与均匀度。肝癌组中 5 个多样性指数均低于正常对照组。与正常对照组相比, 肝癌组

大鼠粪便菌群 Observed species 指数有降低趋势, 但差异无统计学意义, Shannon 指数明显降低 ( $P < 0.05$ )。与肝癌组相比, EGCG 干预组大鼠粪便菌群 Observed species 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均较肝癌组提高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表1 各组α多样性指数的比较

组别	Observed species 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
正常对照组	1 172.500	1 429.580	1 379.050	6.459	0.960
肝癌组	967.333	1 305.728	1 284.979	5.365*	0.912
EGCG 干预组	1 216.143 <sup>△</sup>	1 543.001 <sup>△</sup>	1 521.882	6.301 <sup>△</sup>	0.966 <sup>△</sup>

与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与肝癌组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

根据稀释曲线、Rank 丰度曲线和 α多样性指数的结果, 肝癌大鼠肠道菌群丰富度与多样性呈下降趋势, 而 EGCG 干预与肝癌大鼠肠道菌群丰富度及多样性的升高有关。

### 2.4 EGCG改善肝癌大鼠肠道菌群β多样性结构

β多样性指不同生态系统间物种多样性的差异, 其分析旨在比较样本/分组间菌群结构的差异。本研究基于加权 UniFrac 距离矩阵(weighted UniFrac distance)通过 PCoA 评估各组菌群组成的差异。如图 4 所示, 正常对照组、肝癌组标本点与 EGCG 干预组的样本点呈组内聚集并组间分离的趋势。PERMANOVA 分析结果证实, 3 组间的肠道菌群结构存在显著差异 ( $R^2 = 0.3918, P = 0.001$ )。肝癌组与正常对照组分离明显, 说明肝癌组与正常组相比, 菌群

群落发生显著改变, EGCG 干预可能在一定程度上调节肝癌大鼠肠道菌群结构。

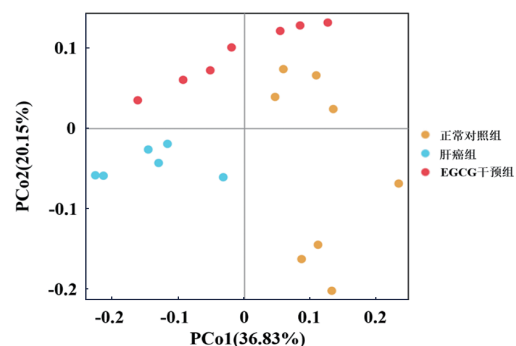


图4 PCoA评估各组菌群β多样性

## 2.5 EGCG 影响肝癌大鼠肠道菌群物种组成

根据物种注释结果,选取所有样本中平均相对丰度排名前十的菌群绘制物种相对分布堆叠图。图 5 展示了各组样本在门水平的菌群相对丰度。在正常对照组门水平,拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)为优势菌门。与正常对照组相比,肝癌组中厚壁菌门丰度降低,同时拟杆菌门丰度升高,厚壁菌门/拟杆菌门比值(F/B 比值)显著降低(正常对照组 vs 肝癌组:1.08 vs 0.32),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。而 EGCG 干预组与肝癌组相比,拟杆菌门相对丰度显著下降,同时厚壁菌门丰度明显增加,F/B 比值随之升高(肝癌组 vs EGCG 干预组:0.32 vs 0.69),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

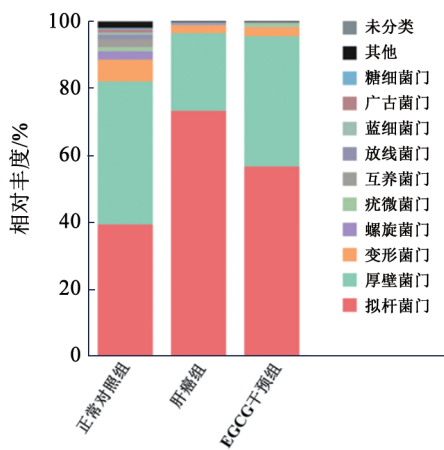


图5 各组肠道菌群物种在门水平的相对丰度堆叠图

## 2.6 EGCG 影响肝癌大鼠肠道关键菌属的丰度

在属水平,分别比较了正常对照组和肝癌组、肝癌组和 EGCG 干预组大鼠肠道菌群的差异菌属(图 6A、B)。正常对照组和肝癌组相比,发现有 12 个差异菌属,其中肝癌组丰度显著高于正常对照组的菌属有 2 种,分别是拟杆菌门的普雷沃氏菌属 UCG-003 (*Prevotellaceae*\_UCG-003)和来自厚壁菌门的链球菌属(*Streptococcus*)。肝癌组中丰度显著低于正常对照组的菌属有 10 种,包括来自厚壁菌门的乳杆菌属(*Lactobacillus*)、瘤胃菌科 UCG014 (*Ruminococcaceae*\_UCG\_014)、瘤胃梭菌属 6 (*Ruminiclostridium*\_6)、泰泽氏菌属(*Tyzzerella*)、瘤胃菌科 UCG010 (*Ruminococcaceae*\_UCG-010)、丁酸球菌属(*Butyricoccus*)、罕见小球菌属(*Subdoligranulum*);变形菌门的螺杆菌属(*Helicobacter*);来自疣微菌门(Verrucomicrobia)的嗜黏蛋白阿克曼菌属(*Akkermansia*);以及放线菌门(Actinobacteria)的双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)。

肝癌组和 EGCG 干预组相比,共鉴定出 14 种差异菌属。其中,EGCG 干预组丰度显著高于肝癌组的菌属有 9 种,分别是厚壁菌门的乳杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 群(*Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group)、肠单胞菌属(*Intestinimonas*)、瘤胃梭菌属(*Ruminiclostridium*)、厌氧棍状菌属(*Anaerotruncus*)、瘤胃梭菌属 9 (*Ruminiclostridium*\_9)、丁酸球菌属;拟杆菌门的普雷沃氏菌属 NK3B31 群(*Prevotellaceae*\_NK3B31\_group)、普雷沃氏菌属 1 (*Prevotella*\_1)。EGCG 干预组丰度显著低于肝癌组的菌属有 5 种,包括拟杆菌门的普雷沃氏菌属 UCG-003、另枝菌属(*Alistipes*)、气味杆菌属(*Odoribacter*);厚壁菌门的链球菌属、优杆菌属(*Anaerovorax*)。

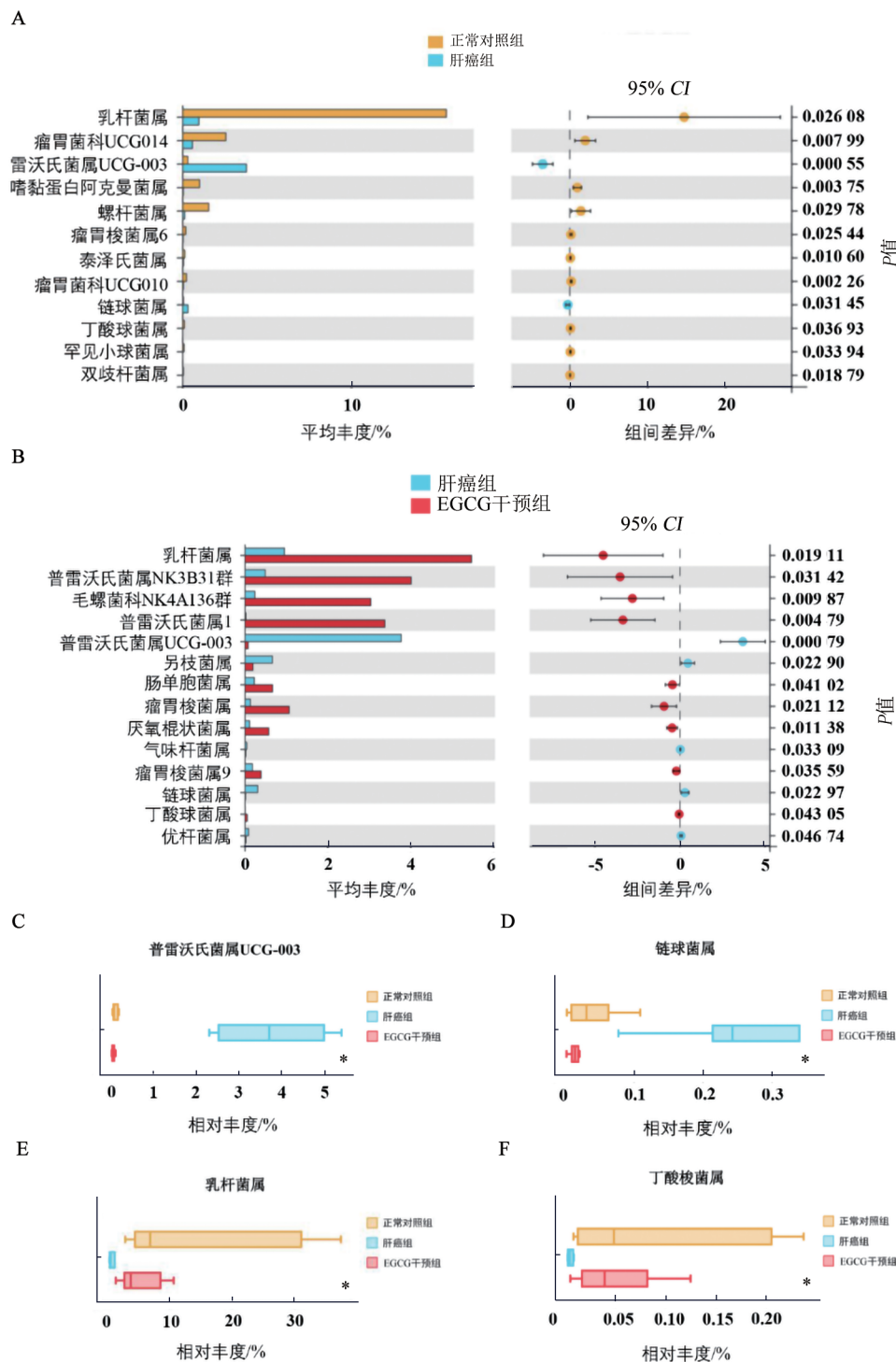
值得注意的是,在肝癌大鼠粪便中富集的普雷沃氏菌属 UCG-003 和链球菌属,经 EGCG 干预后显著降低( $P < 0.05$ );同时,在肝癌大鼠粪便中丰度降低的乳杆菌属和丁酸球菌属,其丰度在 EGCG 干预后显著恢复( $P < 0.05$ )(图 6C~F)。

## 3 讨论

肝癌患者存在肠道菌群紊乱现象,表现为微生物多样性降低、菌群结构与特定菌种丰度异常<sup>[5-6]</sup>。肠道菌群失调与肝癌发生发展密切关联,其通过多种机制促进肝癌的发生,包括破坏肠道屏障、释放内毒素、激活炎症通路、扰乱胆汁酸代谢及免疫失衡<sup>[7]</sup>。调节肠道菌群可作为肝癌辅助治疗的潜在新策略<sup>[8]</sup>。

EGCG 具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤等生物活性,可调节肠道微生物发挥其生理效应<sup>[9-10]</sup>。尽管 EGCG 口服生物利用度相对较低,但其消化吸收主要发生于小肠,能直接与肠道微生物相互作用<sup>[11]</sup>。EGCG 能够促进益生菌的增殖,抑制致病菌的生长,有助于维持肠道微生态的稳定性和多样性<sup>[12]</sup>,如 EGCG 抑制健康大鼠肠道嗜黏蛋白阿克曼菌属的过度增殖,增加益生菌双歧杆菌属的丰度<sup>[13]</sup>。EGCG 还可增强肠道屏障功能,增加具有抗炎作用的短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)等有益代谢物的产量,降低促炎因子表达从而改善肠道微环境<sup>[14-15]</sup>。

为了探究 EGCG 潜在的肝脏保护机制与肠道菌群的关联,本研究收集了大鼠的新鲜粪便,评估 EGCG 对大鼠肠道菌群结构的影响。肝癌组大鼠的肠道菌群群落丰富度显著降低,结构发生显著改变,提示肝癌发生伴随肠道微生态失衡。经 EGCG 干预后,肠道菌群丰富度与多样性指标均显著回升,且其菌群结构与肝癌组存在明显差异,说明 EGCG 干预有效改善并调节了菌群结构。



A: 在属水平, 比较正常对照组和肝癌组大鼠肠道菌群的差异菌属; B: 在属水平, 比较肝癌组和EGCG干预组大鼠肠道菌群的差异菌属; C~F: 普雷沃氏菌属UCG-003、链球菌属、乳杆菌属、丁酸球菌属在正常对照组和肝癌组、肝癌组和EGCG干预组中丰度的比较, EGCG干预组与肝癌组比较, \* $P < 0.05$ 。

图6 各组大鼠肠道菌群差异菌属的比较

本研究发现3组大鼠的肠道优势菌门均为厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门。这与人类健康肠道中拟杆菌门和厚壁菌门占绝对优势(> 90%)的组成特征具有一定相似性<sup>[16]</sup>。值得注意的是, F/B比值已被广泛认为是评估人类肠道微生物稳态和宿主健康状况的有效指标<sup>[17]</sup>。临床研究<sup>[18]</sup>证实, 肝癌患者肠道F/

B比值会低于健康人群。本研究结果与此相似, 肝癌组大鼠F/B比值明显降低, 而EGCG干预则显著逆转这一降低趋势, 说明EGCG在一定程度上改善宿主的健康状态。

通过组间差异菌属分析, 进一步揭示了3组大鼠肠道菌群在属水平的显著结构性差异。与正常大鼠

相比,肝癌组大鼠肠道中潜在有害菌属显著富集,如普雷沃氏菌属 UCG-003 和链球菌属丰度显著升高。普雷沃氏菌属 UCG-003 在肝癌大鼠粪便中显著富集,这与以往研究报道其在食管鳞癌模型大鼠<sup>[19]</sup>、结肠直肠癌患者<sup>[20]</sup>粪便中富集结果一致。普雷沃氏菌属 UCG-003 促癌的潜在机制可能与加剧炎症和代谢紊乱相关,其可增加肠道通透性并促进细菌移位<sup>[21]</sup>,加剧慢性炎症,同时参与初级胆汁酸向次级胆汁酸转化的过程,导致胆汁酸代谢紊乱,加速肿瘤发展<sup>[22]</sup>。链球菌属在肝癌进展中呈现肠道菌群丰度的渐进性积累<sup>[23]</sup>,其通过门静脉从肠道迁移至肝脏,破坏肠道屏障(如闭锁小带蛋白-1 下调),增加内毒素易位诱发肝内炎症<sup>[24]</sup>;通过代谢胆碱生成氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO),抑制法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)介导的胆汁酸代谢,导致次级胆汁酸积累并诱导 DNA 损伤;同时削弱肝内 NKT 细胞的抗肿瘤活性,协同促进肝癌进展<sup>[25]</sup>。

同时发现多种具有益生潜能的菌属丰度显著降低,包括乳杆菌属、丁酸球菌属等 10 个属。作为核心益生菌,乳杆菌属通过增强短链脂肪酸合成(如乙酸、丙酸、丁酸)降低肠道 pH,抑制致病菌生长,减少内毒素释放,从而减轻肝脏炎症和纤维化<sup>[26]</sup>。乳杆菌属还可通过 G 蛋白偶联受体 43(G protein-coupled receptor 43, GPR43)受体诱导巨噬细胞向 M2 抗炎表型转化,增加 IL-10 分泌,减少 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等促炎因子,对抗肿瘤进展<sup>[27]</sup>。丁酸球菌属的代谢产物丁酸具有多重抑癌作用,其丰度降低导致丁酸盐合成减少。丁酸盐缺乏会损害肠黏膜屏障,导致更多菌群代谢物进入肝脏;同时,LPS 升高加剧肝脏炎症与氧化损伤,两者协同促进肝癌进展<sup>[28]</sup>。

DEN 诱导肝癌形成过程伴随肠道菌群微生态失衡,表现为潜在致病菌增多而有益共生菌减少。而 EGCG 干预显著逆转了上述有害变化趋势,主要表现在促进多种益生菌属的增殖,如乳杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 群等 9 个属的丰度显著提高,同时抑制多种有害菌属的生长,包括普雷沃氏菌属 UCG-003、另枝菌属等 5 个属。上述结果表明,EGCG 可抑制致病菌生长,提升益生菌竞争优势,重塑菌群生态位,可能通过上述途径改善微环境促癌效应。

综上所述,本研究证实 EGCG 通过提升大鼠肠道菌群多样性及优化菌群结构,降低大鼠肝癌发生率。然而,本研究仍存在部分局限性:一方面,未通过粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)实验验证菌群变化的因果性;另一方面,缺乏短链脂肪酸、胆汁酸等关键代谢物的检测,导致无法解析“菌群-代谢物-宿主”这一完整作用轴。未来研究需结合 FMT

技术与代谢组学分析,以深入阐明其作用机制。

**利益冲突声明:**所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参 考 文 献]

- [1] FARHAN M. Green tea catechins: nature's way of preventing and treating cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10713. DOI:10.3390/ijms231810713.
- [2] KCIUK M, ALAM M, ALI N, et al. Epigallocatechin-3-gallate therapeutic potential in cancer: mechanism of action and clinical implications[J]. *Molecules*, 2023, 28(13): 5246. DOI: 10.3390/molecules28135246.
- [3] RODRIGUEZ S, SKEET K, MEHMETOGLU-GURBUZ T, et al. Phytochemicals as an alternative or integrative option, in conjunction with conventional treatments for hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers*, 2021, 13(22): 5753. DOI:10.3390/cancers13225753.
- [4] 刘珂良, 王晓慧, 李思柔, 等. 肠道微生物群在肝胆胰恶性肿瘤中的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(2): 279-286. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.014.
- [5] WANG X L, FANG Y, LIANG W, et al. Gut-liver translocation of pathogen *Klebsiella pneumoniae* promotes hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Nat Microbiol*, 2025, 10(1): 169-184. DOI: 10.1038/s41564-024-01890-9.
- [6] ZHANG W Z, XU X S, CAI L P, et al. Dysbiosis of the gut microbiome in elderly patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 7797. DOI:10.1038/s41598-023-34765-w.
- [7] SCHWABE R F, GRETEN T F. Gut microbiome in HCC - Mechanisms, diagnosis and therapy[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 230-238. DOI:10.1016/j.jhep.2019.08.016.
- [8] LAIVACUMA S, OBLATE O, DEROV S A. Gut microbiota and the gut-liver axis in liver disease: from chronic viral hepatitis to cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and microbiome-based therapies[J]. *Microorganisms*, 2025, 13(5): 1053. DOI: 10.3390/microorganisms13051053.
- [9] CAI S, XIE L W, XU J Y, et al. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates the composition of the gut microbiota to protect against radiation-induced intestinal injury in mice[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 848107. DOI:10.3389/fonc.2022.848107.
- [10] LIU X X, ZHAO K, JING N N, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) promotes the immune function of ileum in high fat diet fed mice by regulating gut microbiome profiling and immunoglobulin production [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 720439. DOI:10.3389/fnut.2021.720439.
- [11] ZHANG S L, MAO B Y, CUI S M, et al. Absorption, metabolism, bioactivity, and biotransformation of epigallocatechin gallate[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64(19): 6546-6566. DOI: 10.1080/10408398.2023.2170972.
- [12] LIU Z B, DE BRUIJN W J C, BRUINS M E, et al. Reciprocal interactions between epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and human gut microbiota *in vitro*[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(36): 9804-9815. DOI:10.1021/acs.jafc.0c03587.
- [13] 岳晨博, 李敏玉, 于雷雷, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对健康小鼠肠道菌群及代谢组学的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(19): 70-78. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030631.

- [14] CHE S Y, QIN B B, WU K F, et al. EGCG drives gut microbial remodeling-induced epithelial GPR43 activation to lessen Th1 polarization in colitis[J]. *Redox Biol*, 2024, 75: 103291. DOI: 10.1016/j.redox.2024.103291.
- [15] LIU C M, LIU J B, WANG W L, et al. Epigallocatechin gallate alleviates staphylococcal enterotoxin A-induced intestinal barrier damage by regulating gut microbiota and inhibiting the TLR4-NF- $\kappa$ B/MAPKs-NLRP3 inflammatory cascade[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(43): 16286-16302. DOI:10.1021/acs.jafc.3c04526.
- [16] MADHOGARIA B, BHOWMIK P, KUNDU A. Correlation between human gut microbiome and diseases[J]. *Infect Med*, 2022, 1(3): 180-191. DOI:10.1016/j.imj.2022.08.004.
- [17] O' TOOLE P W. Ageing, microbes and health[J]. *Microb Biotechnol*, 2024, 17(5): e14477. DOI:10.1111/1751-7915.14477.
- [18] ZHANG L, WU Y N, CHEN T, et al. Relationship between intestinal microbial dysbiosis and primary liver cancer[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2019, 18(2): 149-157. DOI:10.1016/j.hbpd.2019.01.002.
- [19] 张玉双, 于富洋, 吴忠冰, 等. 食管鳞癌原位模型小鼠肠道菌群分析[J]. *中国全科医学*, 2022, 25(8): 945-951. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.01.501.
- [20] WANG T T, CAI G X, QIU Y P, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers[J]. *ISME J*, 2012, 6(2): 320-329. DOI: 10.1038/ismej.2011.109.
- [21] 李宗岩, 胡云霏, 赵昌会, 等. 肠道普雷沃菌与人类相关疾病关系研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2024, 36(1): 100-104. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.202401017.
- [22] YOON S J, HAN S K, KIM T S, et al. The crosstalk between gut microbiota and microbiota-derived metabolites in hepatocellular carcinoma[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2025, 51(6): 1315-1329. DOI: 10.1080/1040841X.2025.2501590.
- [23] YANG J H, HE Q K, LU F, et al. A distinct microbiota signature precedes the clinical diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2201159. DOI: 10.1080/19490976.2023.2201159.
- [24] HUANG J H, WANG J, CHAI X Q, et al. The intratumoral bacterial metataxonomic signature of hepatocellular carcinoma[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(5): e00983-e00922. DOI:10.1128/spectrum.00983-22.
- [25] WU L W, FENG J, LI J J, et al. The gut microbiome-bile acid axis in hepatocarcinogenesis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111036. DOI:10.1016/j.biopha.2020.111036.
- [26] KIM M, FRIESEN L, PARK J, et al. Microbial metabolites, short-chain fatty acids, restrain tissue bacterial load, chronic inflammation, and associated cancer in the colon of mice[J]. *Eur J Immunol*, 2018, 48(7): 1235-1247. DOI:10.1002/eji.201747122.
- [27] YAO Y, ZHANG Y H, SONG M Z, et al. *Lactobacillus* alleviates intestinal epithelial barrier function through GPR43-mediated M2 macrophage polarization[J]. *Anim Dis*, 2024, 4(1): 20. DOI: 10.1186/s44149-024-00125-y.
- [28] 陈苗, 张家康, 李述捷, 等. 肠道菌群与肝癌[J]. *中国微生态学杂志*, 2022, 34(10): 1232-1237. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.202210023.

[收稿日期] 2025-03-02

[修回日期] 2026-01-07

[本文编辑] 苏念