

芸豆激酶粗提物改善小鼠非酒精性脂肪肝的作用

侯寒进, 张俊尧, 杨梦婷, 李张左, 陈茜, 邝美倩, 龚爱华

(江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] **目的:** 探讨芸豆激酶粗提物 (kidney bean enzyme crude extract, KBECE) 对小鼠非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的改善作用。**方法:** 将 30 只雌性 ICR 小鼠随机分出 10 只饲喂普通饲料 (正常组), 其余 20 只饲喂 45% 高脂饲料构建非酒精性脂肪肝模型, 饲喂 2 周后随机分为高脂饮食对照组 (高脂组) 和芸豆激酶粗提物干预组 (干预组), 每组 10 只, 分别每日使用 PBS 和 KBECE 处理 6 周, 记录体重变化, 第 8 周时处死小鼠, 采集血液和肝脏组织; 通过 HE 染色和 Masson 染色观察 NAFLD 小鼠的肝脏病理变化; 通过试剂盒检测肝脏组织丙二醛 (MDA) 和血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 含量。**结果:** KBECE 能降低小鼠体重的相对增长速度 ($P<0.05$), 改善高脂组小鼠肝脏脂肪样变性及其纤维化病变; 与高脂组相比, 干预组小鼠肝脏指数降低至 0.043 ($P<0.05$)、肝脏组织 MDA 含量降低至 71.6 nmol/mgprot ($P<0.05$)、血清 TG、TC、LDL-C 含量分别降低至 1.22 mmol/L、2.81 mmol/L、0.445 mmol/L (P 均 <0.05)。**结论:** KBECE 可通过改善脂质代谢紊乱、抑制氧化应激, 从而发挥对高脂饮食诱导小鼠 NAFLD 的改善作用。

[关键词] 芸豆激酶; 非酒精性脂肪肝; 脂质代谢; 氧化应激

[中图分类号] R575.5 **[文献标志码]** A

DOI: 10.13312/j.issn.1671-7783.y230228

[引用格式] 侯寒进, 张俊尧, 杨梦婷, 等. 芸豆激酶粗提物改善小鼠非酒精性脂肪肝的作用[J]. 江苏大学学报 (医学版), 2024, 34 (6).

Effect of Kidney Bean Enzyme Crude Extract on Improving Nonalcoholic Fatty Liver in Mice

HOU Hanjin, ZHANG Junyao, YANG Mengting, LI Zhangzuo, CHEN Qian, KUANG Meiqian, GONG Aihua

(School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212013, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed to investigate the ameliorative effect of kidney bean enzyme crude extract (KBECE) on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. **Methods:** 30 female ICR mice were randomly divided into 10 mice fed with normal diet (normal group), and the other 20 mice were fed with 45% high fat diet to establish the model of nonalcoholic fatty liver. After 2 weeks, they were randomly divided into high fat diet control

[基金项目] 江苏省科技厅社会发展临床前沿技术项目 (BE2022778)

[作者简介] 侯寒进 (1999—), 男, 硕士研究生; 龚爱华 (通讯作者), 教授, 博士生导师, E-mail: ahg5@ujs.edu.cn

group (high fat group) and kidney bean enzyme crude extract intervention group (intervention group), with 10 mice in each group. The mice were treated with PBS and KBECE daily for 6 weeks, and the body weight was recorded every week. At the 8th week, the mice were killed and the blood and liver tissue were collected. The pathological changes of liver of NAFLD mice were observed by HE and Masson staining. The contents of MDA in liver tissue, TG, TC and LDL-C in serum were measured by kit. **Results:** KBECE decreased the relative growth rate of body weight of mice, KBECE could improve hepatic steatoid degeneration and fibrosis in hyperlipidemic mice. Compared with the high fat group, the liver index of the intervention group decreased to 0.043 ($P<0.05$), the content of MDA in liver tissue decreased to 71.6 nmol/mgprot, and the content of TG, TC and LDL-C in serum decreased to 1.22 mmol/L, 2.81 mmol/L and 0.445 mmol/L respectively (both $P<0.05$). **Conclusion:** KBECE can improve the NAFLD induced by high fat diet by reducing and improving the disorder of lipid metabolism and inhibiting oxidative stress.

[Key words] kidney bean enzyme; nonalcoholic fatty liver disease; lipid metabolism; oxidative stress

高脂饮食是诱导非酒精性脂肪性肝（nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）发生发展的主要因素之一，肝细胞脂肪过度积累引起脂肪变性、炎症以及肝纤维化，最终可发展为肝硬化和终末期肝病^[1]。目前 NAFLD 治疗方法为利用他汀类药物降低患者血脂水平，间接缓解 NAFLD，而他汀类药物疗效差、存在“6%效应”且不良反应较大^[2]。因此，迫切需要寻找高效和低耐药的新型治疗方法。

纳豆激酶是由枯草芽孢杆菌产生的一种相对分子质量为 27 kD、包含 275 个氨基酸残基的胞外酶，具有强大的溶栓功能，在高血压、高脂血症等代谢性疾病中具有广泛应用^[3-4]。然而，纳豆激酶传统的发酵原料为黄豆，由于其高嘌呤特性，限制了痛风患者对纳豆激酶制品的使用^[5]。

本实验室前期研究发现^[6]，以红芸豆为发酵原料，可显著提高发酵产物水解纤维蛋白活性、降低产物中嘌呤含量，并且发酵产物中含有丰富的透明质酸、儿茶素、谷胱甘肽、三萜类化合物，因此将以红芸豆为发酵原料获得的丝氨酸蛋白酶定义为芸豆激酶。在前期的探索中，已证明 KBECE 安全可靠，并发现其具有促进口腔黏膜伤口愈合，以及抑制乳腺癌和肝癌生长的作用^[7-9]。本研究旨在探索 KBECE 对高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD 的改善作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

枯草芽孢杆菌（*B.subtilis* ZY）保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（保藏编号 14434）；凝血酶（中国药品生物制品检定所）；纤维蛋白原（美国 Sigma 公司）；尿激

酶（中国药品生物制品检定所）；PBS（美国 Hyclone 公司）；葡萄糖、氯化钠、胰蛋白胨、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钙、硫酸镁、甘油、琼脂糖（上海国药集团）；酵母提取物、牛肉提取物（北京兰伯瑞生物技术有限公司）；低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、血清总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、丙二醛（MDA）检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）；45%高脂饲料（美迪森生物）；HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒（北京雷根生物技术有限公司）

1.2 实验动物与实验设计

SPF 级 8 周龄雌性 ICR 小鼠 30 只，体重（ 28 ± 2 ）g，购自江苏大学实验动物中心，许可证号：SCXK（苏）2018-0012。小鼠饲养于 IVC 动物房中，设定环境温度 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度 40% ~ 60%，昼夜 12 h : 12 h 循环节律，1 周适应期后开始正式实验。

将 30 只小鼠随机分出 10 只饲喂普通饲料，为正常对照组（正常组），其余 20 只小鼠饲喂 45%高脂饲料构建 NAFLD 模型，两周后 20 只小鼠随机分为高脂饮食对照组（高脂组）与芸豆激酶粗提物干预组（干预组），正常组和高脂组小鼠每日灌胃 100 μL PBS，干预组每日灌胃等体积 KBECE，KBECE 剂量为 7.5 U/g，KBECE 处理剂量的选择及安全性评价来源于本实验室前期研究^[7-9]。小鼠于第 8 周结束时禁食 12 h 处死，采集血液和肝脏组织。

1.3 培养基配制

种子液培养基：1%葡萄糖，1%蛋白胨，0.5%氯化钠，0.1%酵母提取物，0.5%牛肉提取物，自然 pH， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，冷却后备用。

固体培养基：1%葡萄糖，1%蛋白胨，0.5%氯化钠，0.1%酵母提取物，0.5%牛肉提取物，自然 pH，2%琼脂粉， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，待冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右倾注细菌培养板，2 h 后倒置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

基础发酵培养基：1%红芸豆粉，2%葡萄糖，0.5%氯化钠，0.1%磷酸氢二钾，0.1%磷酸二氢钾， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，冷却后添加 0.02%氯化钙和 0.05%硫酸镁，调整 pH 至 7.0。

红芸豆发酵培养基：2%红芸豆粉，2%葡萄糖，0.5%氯化钠，0.1%磷酸氢二钾，0.1%磷酸二氢钾， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，冷却后添加 0.02%氯化钙和 0.05%硫酸镁，调整 pH 至 7.0。

1.4 生长曲线测定

过夜培养的菌株以 2%接种至种子液培养基， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，225 r/min 条件下培养 24 h。0 ~ 12 h 间隔 1 h 取样，12 ~ 24 h 间隔 2 h 取样，以空白种子培养基为空白对照，采用酶标仪检测样品在 600 nm 处光密度值，样品光密度值超过 0.8 时稀释后检测（光密度值=稀释后光密度值 \times 稀释倍数），以时间为横坐标，光密度值为纵坐标，绘制生长曲线。

1.5 KBECE 生产及分离

取 30 μL 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的甘油菌接种于 3 mL 种子液培养基， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，225 r/min 条件下培养 7 h。四区划线接种于固体培养基， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 15 h，挑取单菌落，接种于 3 mL 种子液体培养基， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，225 r/min 条件下培养 7 h 制备种子液。将种子液接种于红芸豆发酵培养基中，接种量 0.8%， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，225 r/min 条件下发酵 48 h，发酵结束后将红芸豆发酵培养基在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $12000\times\text{g}$ 条件下离心 10 min，收集上清，获取 KBECE，检测活性后备用。

1.6 KBECE 活性测定

配制 30 mL 1% 琼脂糖溶液，加热溶解后倾注至 $100\text{ mm}\times 20\text{ mm}$ 细胞培养皿，冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加入 200 μL 纤维蛋白原工作液和 60 μL 凝血酶工作液，混匀后静置冷却。琼脂糖冷却凝固后使用打孔器制备 15 个孔径 2 mm 的加样孔。尿激酶使用 PBS 稀释至 10、20、40、60、80、100 U/mL，样品使用 PBS 稀释 400 倍；每孔加入 10 μL 液体， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 h，垂直测量溶圈直径，以尿激酶浓度为横坐标，溶圈面积为纵坐标，绘制工作曲线计算 KBECE 活性。

1.7 测定相对体重

实验开始的第 0、1、2、3、4、5、6、7 周记录每组小鼠的体重，使用以下公式计算相对体重：相对体重 $= (w_n - w_0) / w_0$ ， w_n 为小鼠各周体重。

1.8 血脂分析

将收集的血液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $1000\times\text{g}$ 条件下离心 15 min，吸取上层血清，分装后保存。TG、TC 和 LDL-C 含量根据试剂盒说明书测定。

1.9 测定肝脏指数

小鼠处死后立即通过肝门静脉灌注适量的 PBS 冲洗肝脏的血液，获得完整干净的新鲜肝脏，拍照并立即记录肝脏的湿重。使用以下公式计算肝脏指数：肝脏指数 $=$ 肝脏重量/体重。

1.10 肝脏组织 MDA 检测

肝脏组织拍照后取 0.1 g 新鲜肝脏组织，PBS 洗涤后于冰上使用匀浆器制备组织匀浆，PBS 调节匀浆液体积至 3 mL，在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，2500 r/min 条件下离心 10 min，收集上清。MDA 含量根据试剂盒说明书测定。

1.11 肝脏组织形态学检测

使用 4% 多聚甲醛 (pH 7.4) 固定剩余肝脏组织，48 h 后经过水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、展片和烤片后制成约 4 μm 厚度的组织病理切片，进行 HE 染色和 Masson 染色后通过光学显微镜观察。

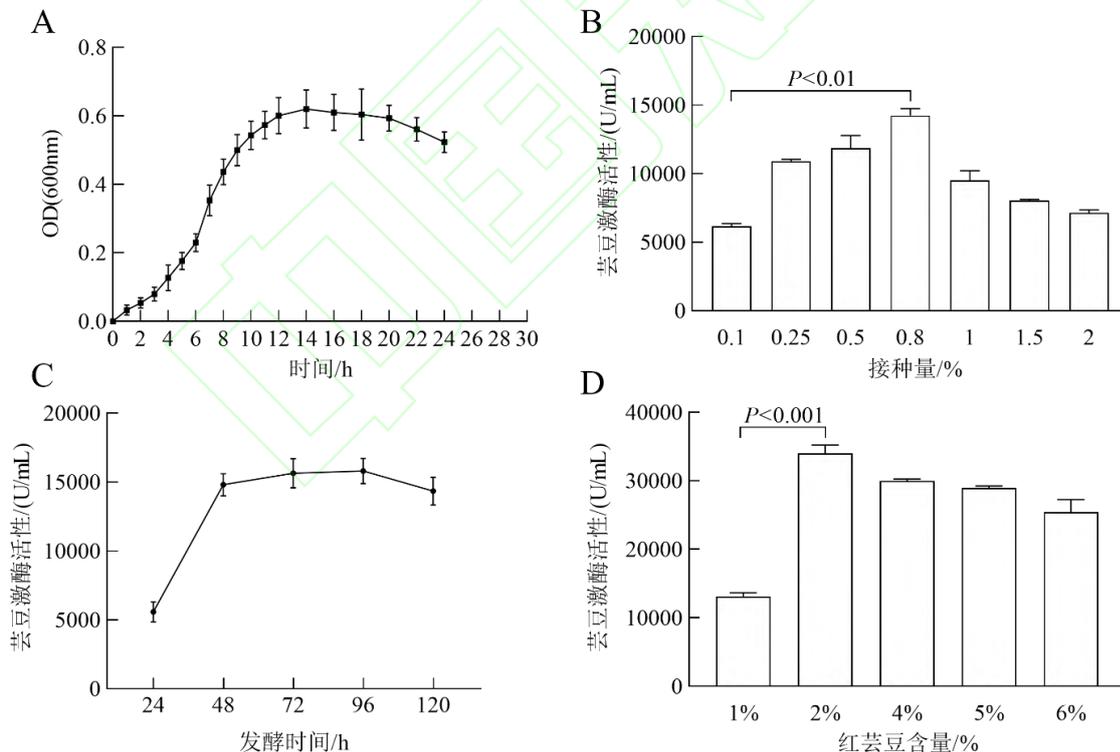
1.12 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析，数据使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)显示，多组间数据比较采用单因素方差分析，进一步组间比较使用 LSD-*t* 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 探究 KBECE 最优制备条件

将 *B.subtilis* ZY 甘油菌接种于种子液培养基培养活化，发现活化 7 h 光密度值最高，因此确定 7 h 为最佳活化时间。将种子液以 0.1%、0.25%、0.5%、0.8%、1%、1.5% 以及 2% 接种量接种于基础发酵培养基，发酵 72 h 后检测活性，结果显示在接种比例为 0.8% 时 KBECE 活性达到最高，为 14250 U/mL，随后逐渐下降，因此确定最佳接种比例为 0.8% ($P < 0.01$)；以 0.8% 接种量将种子液接种于基础发酵培养基，发酵 48 h 后 KBECE 活性趋于稳定，确定发酵时间为 48 h。设置红芸豆发酵培养基 1%、2%、4%、5%、6% 的红芸豆添加比例，以 0.8% 接种比例发酵 48 h，结果显示添加 2% 红芸豆时 KBECE 活性最高，因此确定红芸豆的最佳添加比例为 2% ($P < 0.001$)。见图 1。



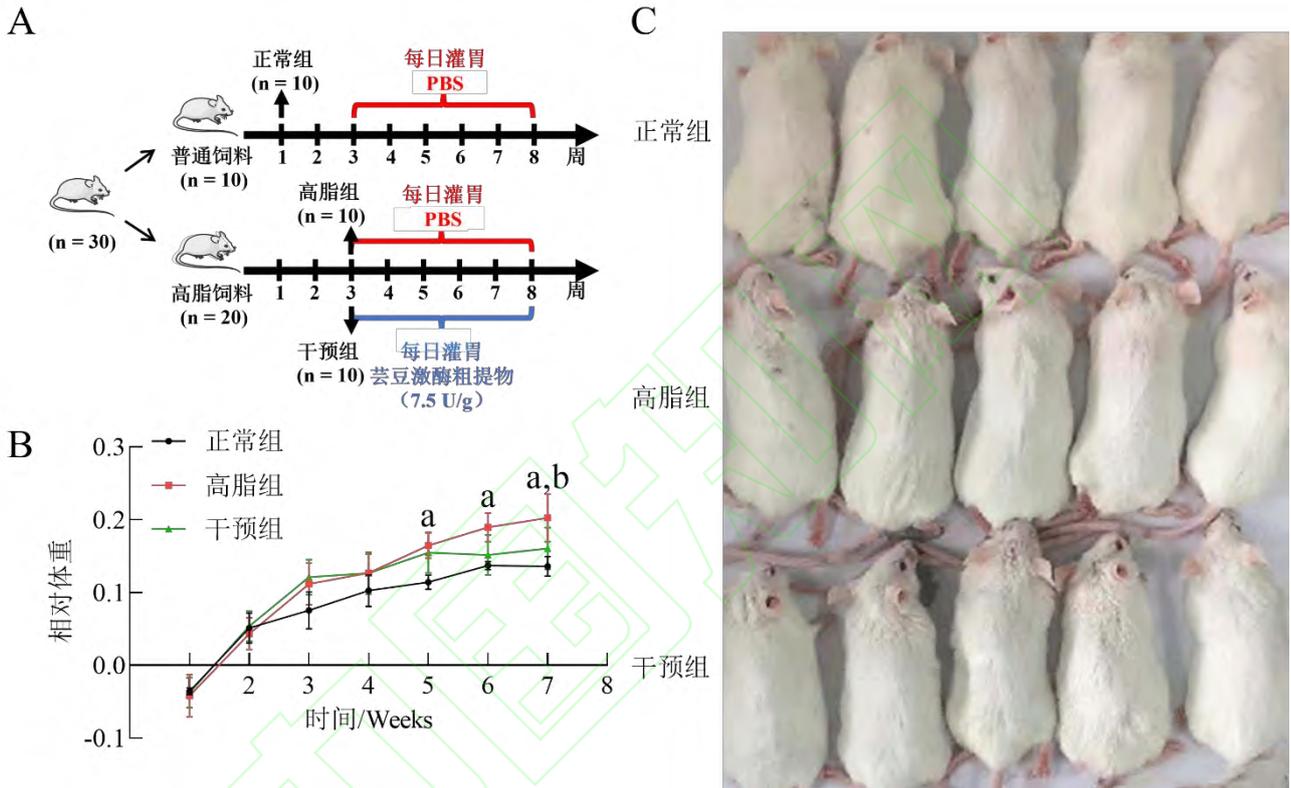
A: *B.subtilis* ZY 生长曲线; B: 发酵培养基中不同接种量对 KBECE 活性的影响; C: 发酵时间对 KBECE 活性的影响;

D: 发酵培养基中不同红芸豆添加比例对 KBECE 活性的影响

图 1 高活性芸豆激酶粗提物的制备

2.2 KBECE 对高脂饮食小鼠体重和体态的影响

在实验进行第 5 周时，与正常组相比，高脂组小鼠体重增速显著增加 ($P<0.01$)；在实验进行第 7 周时，与高脂组相比，干预组小鼠体重增长速度受到抑制 ($P<0.05$)。在实验进行第 8 周时，高脂组小鼠表现为体型偏大、行动迟缓且毛发粗糙发黄，经 KBECE 处理后，干预组小鼠恢复至正常体型，行动活跃且毛发柔软有光泽，接近正常组。见图 2。



A: 实验设计图; B: ICR 小鼠体重变化; C: KBECE 处理 6 周后小鼠体型变化;

a: $P<0.01$, 高脂组与正常组相比, b: $P<0.05$, 高脂组与干预组相比

图 2 KBECE 对小鼠体重的及体态变化的影响

2.3 KBECE 改善小鼠 NAFLD 肝脏病变

与正常组相比，高脂组小鼠的肝脏体积明显增大，颜色呈暗黄色；与高脂组相比，干预组小鼠肝脏体积明显减小，外观呈红褐色，接近正常组小鼠肝脏外观。与空组相比，高脂组小鼠肝脏指数显著增加，经 KBECE 处理后，干预组小鼠肝脏指数由 0.058 下降至 0.043，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3。

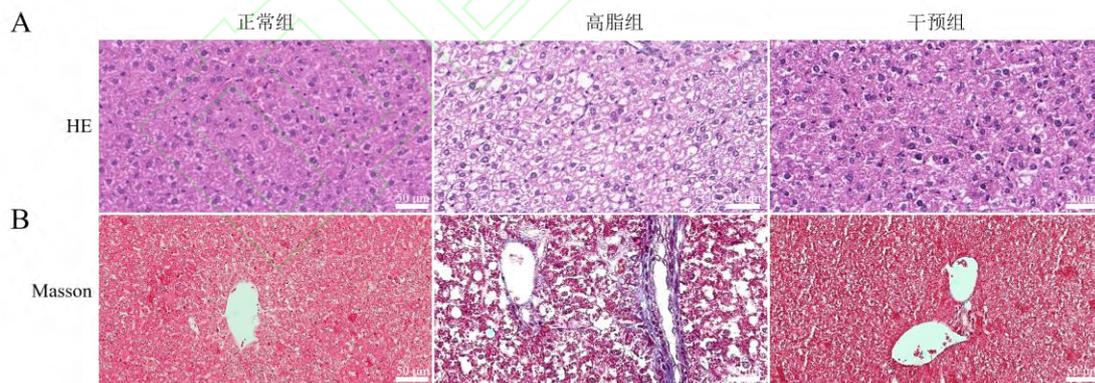


A: KBECE 处理 6 周后小鼠肝脏体积和色泽的变化; B: 肝脏指数

图 3 KBECE 对小鼠肝脏外观及肝脏指数的影响

2.4 KBECE 改善小鼠 NAFLD 肝脏组织形态

HE 染色结果显示, 正常组小鼠肝脏细胞形态正常, 组织结构清晰; 高脂组小鼠肝脏细胞排列紊乱, 结构异常, 脂肪空泡增加, 存在炎症浸润; 经 KBECE 处理后, 干预组小鼠肝脏炎症浸润减少, 细胞恢复至正常形态。Masson 染色结果显示, 正常组小鼠肝索结构完整, 血管壁胶原含量低; 高脂组小鼠出现纤维化增生, 血管壁增厚, 胶原沉积增加; 经 KBECE 处理后, 胶原沉积减少。见图 4。



A: 小鼠肝组织 HE 染色($\times 400$); B: 小鼠肝组织 Masson 染色($\times 400$)。标尺: 50 μm

图 4 KBECE 对小鼠肝脏组织形态学的影响

2.5 KBECE 增强小鼠 NAFLD 抗氧化能力

肝脏组织 MDA 含量检测结果显示, 与正常组相比, 高脂组肝脏组织 MDA 含量由 65 nmol/mgprot 升高至 81 nmol/mgprot, 经 KBECE 处理后, 干预组小鼠肝脏 MDA 含量降低至 71.6 nmol/mgprot ($P<0.05$)。见图 5。

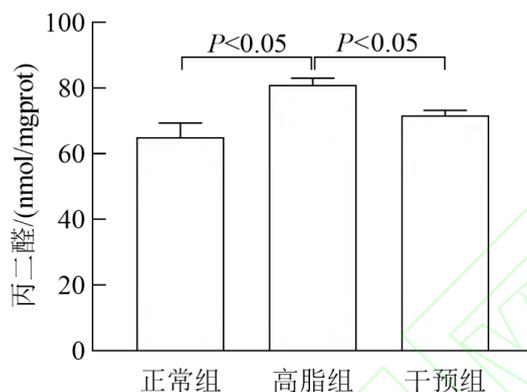
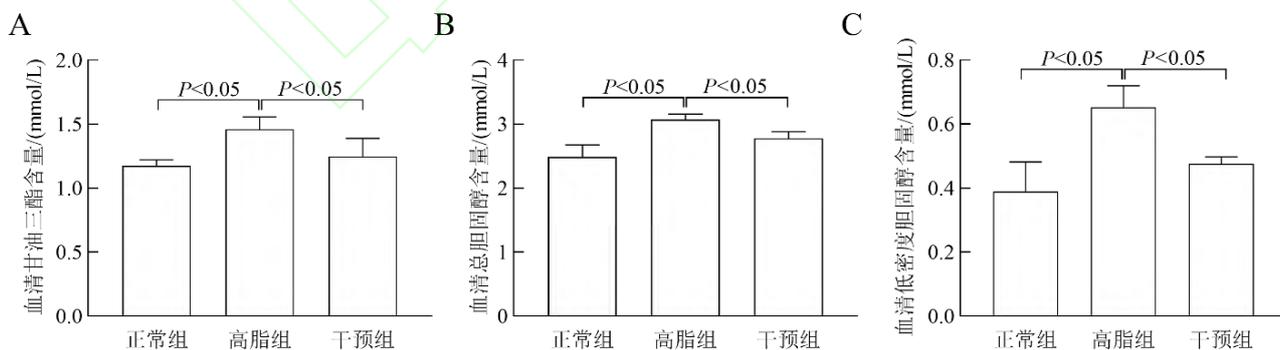


图 5 KBECE 对小鼠抗氧化能力的影响

2.6 KBECE 调节小鼠 NAFLD 脂质代谢水平

高脂组小鼠 TG、TC 和 LDL-C 含量分别为 1.46 mmol/L、3.07 mmol/L、0.625 mmol/L, 显著高于正常组的 1.175 mmol/L、2.47 mmol/L、0.36 mmol/L (P 均 <0.05)。经 KBECE 处理后, 干预组小鼠血清 TG、TC 含量明显降低 (P 均 <0.05)。经 KBECE 处理后, 与高脂组相比, 干预组血清 LDL-C 降低至 0.445 mmol/L ($P<0.05$)。见图 6。



A: 小鼠血清甘油三酯含量; B: 小鼠血清总胆固醇含量; C: 小鼠血清低密度脂蛋白胆固醇含量

图 6 KBECE 对小鼠血清脂质含量的影响

3 讨论

高脂饮食是导致 NAFLD 发病率日益增长的重要因素，目前 NAFLD 发病具有年轻化的趋势，但缺乏有效的治疗方法，迫切需要探寻治疗 NAFLD 的新思路^[1]。本研究发现，KBECE 可显著抑制小鼠体重增加，恢复肝脏正常结构，并通过调节脂质代谢、抑制氧化应激缓解 NAFLD 严重程度，为 NAFLD 的治疗提供新的途径。

NAFLD 发病机制尚未完全明确，随着研究深入，虽然包含脂质代谢、氧化应激、炎症反应在内的“多重打击”理论成为研究的主流，但调节脂质代谢和缓解氧化应激仍是治疗 NAFLD 的主要方向^[10]。口服益生菌可作为 NAFLD 的辅助治疗手段，临床试验指出，连续 12 周服用益生菌合剂可降低 NAFLD 患者的 TG、TC、LDL-C、丙氨酸转氨酶和天门冬氨酸转氨酶含量^[11]。李兰娟团队指出，益生菌还可以通过产生短链脂肪酸来改善 NAFLD 病变程度^[12]。研究报道，枯草芽孢杆菌和粪肠球菌的活菌制剂可提高肝功能，改善血脂状态，降低内毒素和炎症细胞因子水平，对 NAFLD 具有治疗作用，但具体机制尚未明确^[13]。在此基础上，推测芸豆激酶作为枯草芽孢杆菌的代谢产物可能具有改善非酒精性脂肪肝的作用。目前临床常用尿激酶和链激酶进行溶栓治疗，易出现全身出血等不良反应，与之相比，芸豆激酶具有使用安全、低成本、可工业化生产等优势，有望作为治疗代谢性疾病的潜在药物^[14]。

研究证实高脂饮食可引起哺乳动物的氧化应激，由于活性氧含量的增加导致脂质过氧化，因此氧化应激与 NAFLD 的发病机制密切相关^[15]。丙二醛是自由基诱导的脂质过氧化的最终产物，可反映氧化应激水平，并可作为组织损伤的标志物，Wu 等^[16]研究证实，纳豆激酶通过降低 MDA 含量抑制炎症及氧化应激，保护小鼠免受急性肾损伤。在本研究中，KBECE 的处理降低了肝脏组织中 MDA 含量，提示 KBECE 可增强肝脏抗氧化能力，发挥对小鼠 NAFLD 的改善作用。

高脂饮食诱导的 NAFLD 往往伴随体重的增加和肝脏脂肪变性^[1]。KBECE 处理抑制了 NAFLD 小鼠肝脏和体重的上述变化，减少 NAFLD 对机体的损伤程度。脂质代谢紊乱是导致 NAFLD 的关键因素之一^[17]。本研究中，KBECE 可以改善 NAFLD 小鼠血脂代谢，这与 Mohd 等的发现一致^[18]，这些结果表明，KBECE 可通过抑制高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠的体重增长和改善脂质代谢紊乱，从而实现治疗 NAFLD 小鼠的治疗。

研究表明 KBECE 对高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD 有一定的治疗作用，与 KBECE 改善脂质代谢紊乱、保护肝脏免受胆固醇积累和调节氧化应激的能力有关。研究结果证实芸豆激酶可能是预防和治疗 NAFLD 的一种很有前途的候选药物。

[参考文献]

- [1] 陈有为, 康星, 严雨, 等. 肥胖患者不同糖代谢状态对非酒精性脂肪性肝病严重程度的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(3): 231-238.
- [2] Sveinbjornsson G, Ulfarsson MO, Thorolfsson RB, et al. Multiomics study of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nat Genet, 2022, 54: 1652-1663.
- [3] Wang Y, Wang H, Zhang YP, et al. Stepwise strategy to identify thrombin as a hydrolytic substrate for nattokinase[J]. J Chem Inf Model, 2022, 62: 5780-5793.
- [4] Chen HJ, Chen JP, Zhang FP, et al. Effective management of atherosclerosis progress and hyperlipidemia with nattokinase: a clinical study with 1,062 participants[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 964977.
- [5] Xiao ZJ, Shen J, Li Y, et al. High and economical nattokinase production with acetoin as a useful byproduct from soybean milk and glucose[J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2022, 14: 792-803.
- [6] 高安平, 龚爱华. 以红芸豆与黄豆为氮源的枯草芽孢杆菌液态发酵代谢组学比较分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2021, 21(89): 174-175,178.
- [7] Zhang J, Tang Y, Yuan T, et al. Nattokinase crude extract enhances oral mucositis healing[J]. BMC Oral Health, 2021, 21(1): 555.
- [8] Zhang B, Chai J, He LM, et al. Nattokinase produced by natto fermentation with *Bacillus subtilis* inhibits breast cancer growth[J]. Int J Clin Exp Med, 2019, 12: 13380-13387.
- [9] Yan Y, Wang Y, Qian J, et al. Nattokinase crude extract inhibits hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(8): 1281-1287.
- [10] Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell, 2021, 184: 2537-2564.
- [11] Behrouz V, Aryaeian N, Zahedi MJ, et al. Effects of probiotic and prebiotic supplementation on metabolic parameters, liver aminotransferases, and systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial[J]. J Food Sci, 2020, 85: 3611-3617.
- [12] Yao MF, Qv LL, Lu YM, et al. An update on the efficacy and functionality of probiotics for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Engineering, 2021, 75: 679-686.
- [13] Jiang J, Xiong J, Ni JB, et al. Live combined *B.subtilis* and *E.faecium* alleviate liver inflammation, improve intestinal barrier function, and modulate gut microbiota in mice with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Med Sci Monit, 2021, 27: e931143.

- [14] Gallelli G, Di MG, Palleria C, et al. Data recorded in real life support the safety of nattokinase in patients with vascular diseases[J]. *Nutrients*, 2021, 13(6): 2031.
- [15] Ning DS, Chen YJ, Lin CJ, et al. Hepatoprotective effect of botanical drug formula on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting lipogenesis and promoting anti-oxidation[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1026912.
- [16] Wu H, Wang Y, Zhang Y, et al. Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2020, 32: 101500.
- [17] Izha G, Dragomiretska N, Gushcha S, et al. Features of clinical, biochemical, and sonographic parameters in patients with chronic viral hepatitis C with concomitant non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2023, 30: 49-54.
- [18] Mohd R, Shafie NH, Azlan A, et al. Functional food mixtures: Inhibition of lipid peroxidation, HMGCoA reductase, and ACAT2 in hypercholesterolemia-induced rats[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 9(2): 875-887.

[收稿日期] 2023-10-11

[编辑] 郭欣