

驼乳预防小鼠急性酒精性肝损伤的代谢组分析

明亮¹, 赛娜², 其布勒¹, 郝世奇¹, 吉日木图^{1*}

(¹内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018

²苏尼特右旗畜牧工作站 内蒙古锡林郭勒盟 011299)

摘要 目的:检测小鼠血清和肝脏生化指标,分析驼乳对小鼠急性酒精性肝损伤的预防作用,并结合代谢组学探究其机理。方法:将 24 只 ICR 雄性小鼠随机分为空白组(NC)、模型组(ET)和驼乳组(ET+CM),采用短时间灌胃大剂量(7.3 g/kg)酒精的方法复制急性肝损伤小鼠模型。通过测定血清指标(ALT,AST,SOD 和 GSH)和肝脏指标(TG 和 TC)来反映驼乳对肝脏的保护作用,并基于代谢组学的研究手段,探讨驼乳保肝、护肝的作用机理。结果:驼乳显著抑制了因酒精作用而升高的小鼠血清中 ALT 和 AST 以及肝脏中 TG 和 TC 水平;同时,驼乳可通过清除活性氧自由基,增加血清中 SOD 和 GSH 的含量。通过代谢组分析,在 ET 和 NC 组以及 ET 和 ET+CM 组中的差异代谢物,主要涉及脂质代谢、有机酸代谢和有机氧化合物;在 NC、ET 和 ET+CM 3 组中共筛选、鉴定出 28 个差异显著代谢物,其中灌胃酒精会降低肝脏中乙酰胆碱、甘氨酸、亚油酸、磷脂酰胆碱等含量,而灌胃驼乳会显著增加以上代谢物的含量。差异代谢物主要富集在胆碱代谢、甘油磷脂代谢和 ABC 转运蛋白通路中。结论:驼乳干预并缓解了小鼠急性酒精暴露诱导的脂质代谢紊乱,提高了抗氧化能力,并通过调节小鼠肝脏组织胆碱代谢、甘油磷脂代谢以及 ABC 转运蛋白通路中因酒精作用发生明显改变的代谢物,进而有效预防酒精性肝损伤。

关键词 急性酒精性肝病; 驼乳; 代谢组学; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

文章编号 1009-7848(2023)01-0126-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.01.013

酒精性肝病(Alcoholic liver disease,ALD)是由于短时间内大量摄入酒精或长期大量饮酒导致的中毒性肝损伤,是世界范围内发病率很高,甚至导致死亡的疾病之一。ALD 临床表现为酒精性肝损伤、酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌^[1]。ALD 的发病机制复杂,主要有乙醇及其毒性代谢物产物直接损害肝细胞^[2],体内活性氧自由基(Reactive oxygen species,ROS)的增加和/或抗氧化剂水平降低^[3],肝细胞中脂肪的积累^[4],Kupffer 细胞诱发炎症等^[5-6],其中氧化应激和炎性损伤被普遍认为在 ALD 的发生和进程中起着关键作用^[7]。目前使用的治疗肝损伤药物,常伴随有副作用。基于 ALD 的发病机制,探索抗炎、消除氧化应激相关的功能性食品、天然奶源或活性肽提取物,进而抑制酒精诱导的肝脏组织氧化应激和炎性损伤,被认为是有效缓解酒精性肝损伤的方法。

驼乳(Camel milk,CM)是戈壁荒漠地区牧民的主要乳源,富含营养物质,且含有多种生物活性

成分,具有保健功能而被广泛食用。目前,驼乳在游牧地区传统医学实践中,甚至在一些科学研究中被指出具有良好的保肝、护肝的作用。王朝霞等^[8]研究表明,驼乳可减轻肝脏中的炎症应答,改善氧化损伤作用,并通过调节肠道微生态平衡来保护四氯化碳(CCl₄)诱导的肝损伤。Ming 等^[9]研究发现,驼乳可通过降低乙醇对肝脏氧化损伤作用,缓解促炎因子介导的炎症应答,改善肝脏中脂质蓄积和肠道微生态平衡,进而对酒精性肝损伤起到保护作用。Korish 等^[10]研究表明,驼乳能够减少高胆固醇饮食的大鼠肝脏内脂肪的堆积和炎症浸润,降低肝脏丙二醛(MDA)含量,增加肝脏内谷胱甘肽(GSH)水平,对大鼠非酒精性肝损伤的发生具有预防保护作用。Al-Fartosi 等^[11]研究发现,驼乳对扑热息痛诱导的肝脏毒性具有保护作用。此外,驼乳对于糖尿病大鼠的肝功能也具有有益作用^[12],能够保护肝脏免受铝、镉等重金属元素的毒性作用^[13]。然而,驼乳干预酒精性小鼠体内代谢物的影响机制尚不清楚,缺乏相关的研究报道。本研究对小鼠一次性大剂量灌胃酒精,建立急性肝损伤模型,通过检测血清和肝脏指标,分析驼乳对酒精性肝损伤小鼠的预防作用。通过测定小鼠肝脏

收稿日期: 2022-01-21

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFE0203300)

第一作者: 明亮,女,博士,讲师

通信作者: 吉日木图 E-mail: yeluotuo1999@vip.163.com

组织代谢物,探究小鼠体内因酒精作用发生变化的差异代谢物、代谢通路及其可能的作用机制,为天然保肝、护肝功能性驼乳制品的开发提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

驼乳采自阿拉善右旗一牧场。离心(3 500 r/min, 40 min)除去上层乳脂,65 °C水浴加热 30 min后,真空冷冻干燥,并置于-20 °C冰箱密封保存,备用。

SPF级 ICR 雄性小鼠(许可证号:SCXK(京)2016-0006),体质量 21~23 g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司;生化指标测定试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)、过氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、甘油三酯(Triglycerides, TG)、胆固醇(Cholesterol, TC),上海酶联生物科技有限公司;乙腈,Merck;乙酸铵,Sigma;甲醇、氨水,Fisher;色谱柱,沃特世(Waters)。

1.2 仪器与设备

AB Triple TOP 600 质谱仪,AB SCIEX;Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪,Agilent;2014-181Ab 真空冷冻干燥机,上海东富龙科技股份有限公司;高速冷冻离心机,德国 Eppencbrf 公司;Bio Tack 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;各型号微量加样器,德国 Eppencbrf 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 分组及急性酒精性肝损伤模型的建立 I-CR 雄性小鼠($n=24$, 6~8 周龄)饲养于实验室 IVC 动物实验系统内,环境温度和湿度分别控制在(22±2)°C和 50%~60%。小鼠自由进食和饮水,12 h 昼夜循环;适应性饲养 1 周后,随机分为空白组(NC, $n=8$)、模型组(ET, $n=8$)和驼乳组(ET+CM, $n=8$)。NC 组和 ET 组灌胃灭菌 ddH₂O,ET+CM 组灌胃脱脂驼乳粉溶液(按照 6 g/kg bw 的计量复原^[14])。灌胃体积和造模参照 Ming 等^[9]研究。灌胃体积均为 0.3 mL,每日灌胃 2 次,连续灌胃 2 周;最后一次灌胃结束后,所有小鼠禁食、不禁水 6 h,ET 组和 ET+CM 组分 3 次(间隔 1h)按照 7.3 g/kg bw 的

计量灌胃体积分数 50%的酒精溶液,建立急性酒精性肝损伤模型^[15-16];同时,NC 组小鼠灌胃等体积 ddH₂O。造模结束后继续禁食、不禁水 6 h 后,异氟烷麻醉小鼠,眼球采血,并解剖取小鼠肝脏。

1.3.2 血清 ALT、AST、SOD 和 GSH 指标的检测 新鲜血液常温下静置 4~6 h 后,离心分离血清(4 °C, 3 000 r/min, 20 min),按照说明书测定血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、过氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)的含量。

1.3.3 肝组织 TG 和 TC 含量的测定 取约 0.1 g 肝组织置于匀浆仪上冰浴匀浆(速度 2.90 m/s, 时间 15 s),并进行离心(4 °C, 3 000 r/min, 20 min)制备肝组织匀浆液。取上清按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测并计算肝组织中甘油三酯(TG)和胆固醇(TC)含量。

1.4 小鼠肝脏组织液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)代谢组测定

1.4.1 小鼠肝脏样本的处理 取出预先分装保存的小鼠肝脏样本,在 4 °C 冰箱中缓慢解冻;剪取适量肝脏样本加入预冷的甲醇/乙腈/水溶液(2:2:1, V/V),利用漩涡混合器充分混合,再离心(14 000×g, 4 °C 离心 15 min)取上清液备用。

1.4.2 色谱条件 样品采用超高效液相色谱系统(UHPLC)HILIC(亲水色谱)色谱柱进行分离。流动相 A 和 B 分别是水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水和乙腈。色谱柱温为 25 °C,流速为 0.5 mL/min,进样量选择 2 μL。梯度洗脱[φ(B)]:0~0.5 min/95%, 0.5~7 min/95%~65%, 7~8 min/65%~40%, 8~9 min/40%, 9~9.1 min/40%~95%, 9.1~12 min/95%。检测过程中设定 QC(Quality control)样品,进而监测整个系统的稳定性。

1.4.3 Q-TOF(四极杆-飞行时间)质谱条件 样品通过色谱系统分离后进行质谱分析(Triple TOF 6600 质谱仪,AB SCIEX)。电喷雾电离(ESI)设置参数如下:雾化气辅助加热气 1 和 2 (Gas1 和 Gas2)均为 60。一级质荷比检测范围:60~1 000 u,二级子离子质荷比检测范围:25~1 000 u;一级和二级质谱扫描累积时间分别是 0.20 s/spectra 和 0.05 s/spectra;每次扫描采集 10 个碎片图谱。

1.5 代谢物分析

采用 XCMS 软件对检测获得的质谱原始数据

进行质谱峰对齐、保留时间统计和峰面积提取,并借助 SIMCA 14.1 软件完成多元统计分析,包括主成分分析(PCA)、最小二乘法判别分析(PLD-DA)和正交最小二乘法判别分析(OPLD-DA)。利用代谢物鉴定及查询的数据库,如 Metlin、HMDB、KEGG、MetaboAnalyst 5.0 等,筛选、鉴定差异代谢物并完成代谢通路分析。以条件 $VIP>1$ 和 $P<0.05$ 筛选显著性差异的代谢物并分析代谢物互作。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对血清及肝脏生化指标数据进行统计学分析;所有统计学数据采用“平均值±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。 $P<0.05$ 为统计学上有显著差异。统计学计算得出的图、表采用 Graphpad 6.01 软件制作。

2 结果与分析

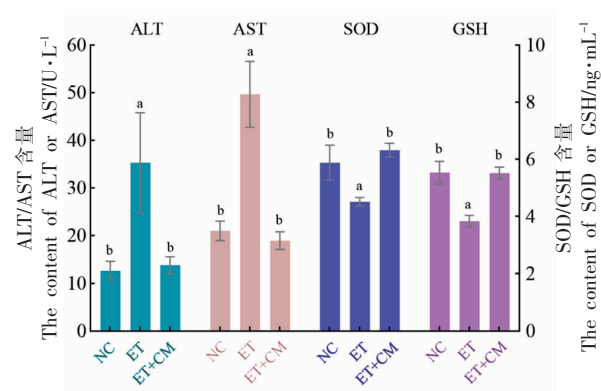
2.1 驼乳对急性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 的影响

酒精性肝损伤会导致血清转氨酶升高,常用的血清转氨酶检测是 ALT 和 AST。ALT 与 AST 主要分布在肝细胞内,参与机体的氨基酸代谢。肝脏受损时,肝细胞发生炎症和坏死,使 ALT 和 AST 释放到血液中。ALT 和 AST 水平的升高是目前最常用的肝功能检测指标。由图 1 可知,与 NC 组相比,ET 组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著增加($P<0.05$);其中 ET 组血清 ALT 和 AST 含量分别是 NC 组的 2.78 倍和 2.36 倍,表明酒精的摄入使小鼠的肝细胞受损,且通过短时间灌胃大量酒精的方式可以成功复制急性酒精性肝损伤模型。与 ET 组比较,ET+CM 组小鼠血清中 ALT 和 AST 含量均显著降低($P<0.05$),且与 NC 组之间无显著差异($P>0.05$),说明驼乳能够在一定程度上保护小鼠肝脏免受酒精的损伤作用。这与前人研究结果一致^[9,17]。

2.2 驼乳对急性肝损伤小鼠氧化损伤的保护作用

研究发现,短时间内大量摄入酒精,机体内会产生过量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),导致氧化应激,即打破氧化与抗氧化防御系统的平衡,被认为是酒精性肝损伤发生与发展的重要机制之一^[18]。SOD 和 GSH 是衡量机体氧化

损伤的主要指标,体内过量的 ROS 作用于 SOD 和 GSH 等抗氧化酶,导致抗氧化酶活性降低^[19]。为了探索驼乳对酒精诱导急性肝损伤小鼠抗氧化能力的影响,检测了血清中 SOD 和 GSH 的含量(图 1)。ET 组小鼠血清中 SOD 和 GSH 的含量与 NC 组相比具有显著下降的趋势($P<0.05$);ET+CM 组小鼠血清内 SOD 和 GSH 的含量较 ET 组显著增加($P<0.05$),基本恢复到正常水平,与 NC 组无显著差异($P>0.05$),表明驼乳能够清除活性氧自由基,增强机体抗氧化的防御机制。

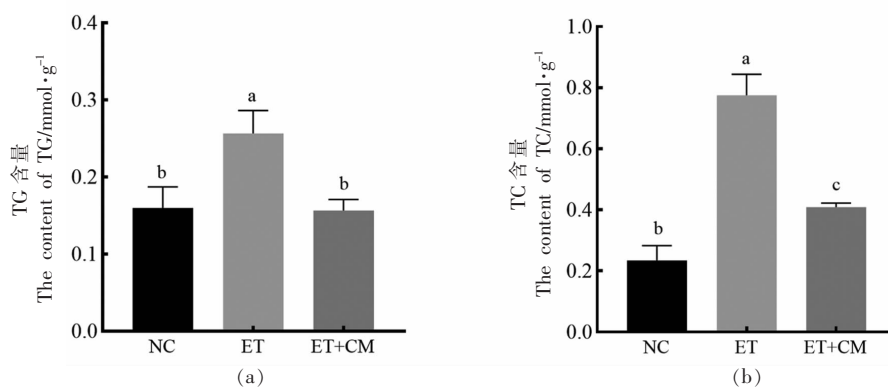


注:不同字母表示组间有显著性差异($P<0.05$)。

图 1 驼乳对小鼠血清 ALT、AST、SOD 和 GSH 的影响
Fig.1 Effect of camel milk on serum ALT, AST, SOD and GSH in mice

2.3 驼乳对急性肝损伤小鼠肝组织 TG 和 TC 的影响

一般情况下,肝脏可利用糖、甘油和脂肪酸作为原料,通过磷脂酸途径合成甘油三酯。肝细胞约含 4%~7% 的脂类物质,其中甘油三酯约占 1/2,甘油三酯含量过高会引起脂肪肝。酒精代谢过程中可诱导脂肪变性,导致脂肪沉积在肝细胞中,造成肝组织中 TG 和 TC 的水平异常^[20]。与 NC 组相比,ET 组小鼠肝组织中 TG 和 TC 的含量显著升高($P<0.05$),表明 ET 组小鼠的肝脏出现了较为严重的脂肪变性(图 2)。与 ET 组相比,ET+CM 组的 TG 和 TC 含量显著降低($P<0.05$);NC 和 ET+CM 组之间 TG 的含量无显著差异($P>0.05$),而 TC 含量在两组间差异显著($P<0.05$)(图 2)。以上结果表明驼乳能够有效降低急性酒精性肝损伤小鼠肝脏内甘油三酯和总胆固醇的含量,并提高肝脏内胆



注:不同字母表示组间有显著性差异($P < 0.05$)。

图 2 驼乳对小鼠肝组织 TG 和 TC 的影响

Fig.2 Effect of camel milk on liver TG and TC in mice

固醇的转运能力。

2.4 小鼠肝脏代谢组数据质量评价

UHPLC-QTOF-MS 的稳定性对测试样本差异代谢物的检测极其重要,因此检测过程中的质量控制样本(Quality control, QC)是体现检测系统的稳定性以及检测方法重复性的重要指标。从图 3

结果可知,正、负离子模式下 QC 样本紧密聚集在一起,表明测序重复性良好,不存在分散现象,可保证测定数据的可靠性(3a,3b)。对各组样本采用 OPLD-DA 分析,发现 NC 组和 ET 组,ET 组和 ET+CM 组之间明显分离,表明代谢组图谱存在明显差异。

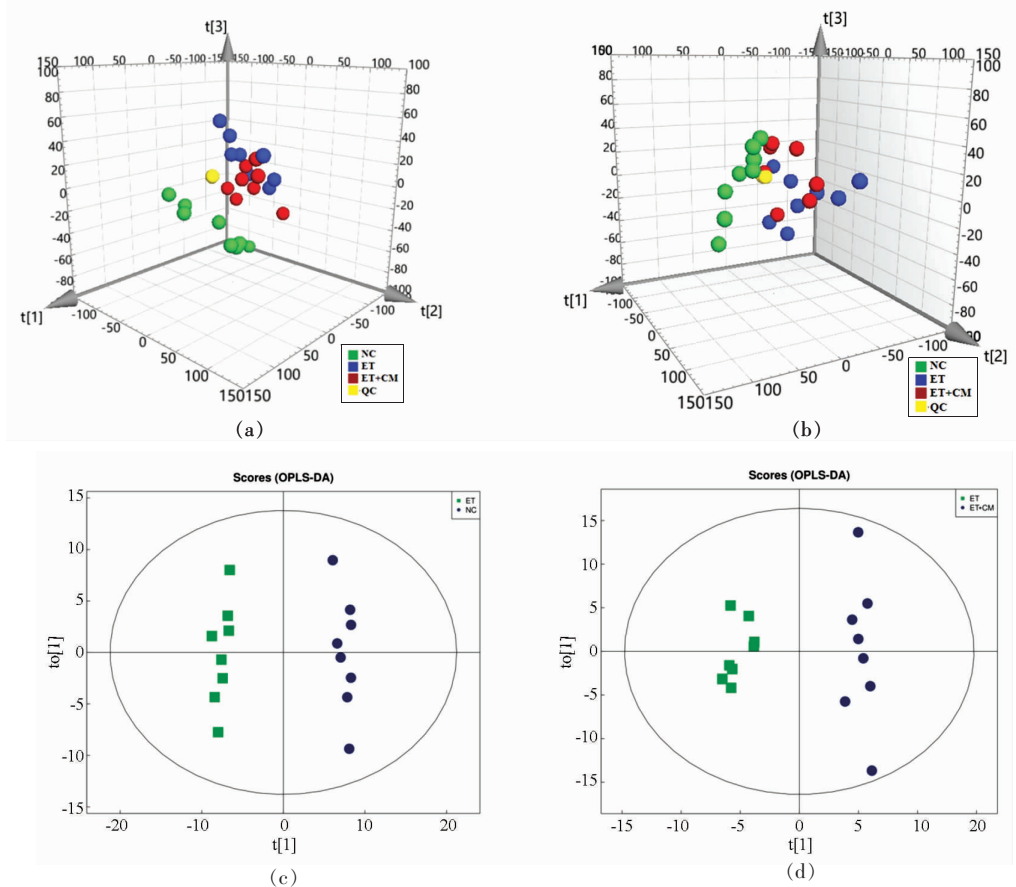


图 3 正、负离子模式总体样本的 PCA 分析(a 和 b)和 OPLS-DA(c 和 d)得分图

Fig.3 PCA (a, b) of positive and negative ion mode and OPLS-DA (c, d) score plot

2.5 差异代谢物的筛选

为提高代谢物的鉴定覆盖率, 每组小鼠肝组织的代谢物经 HILIC 分离后, 分别用正、负离子化方式检测, 并采用公共数据库和中科新生命本地自建标准品数据库 [in-house database (Shanghai Applied Protein Technology)] 搜库^[21-22]、结构鉴定、人工二次核对, 最终共鉴定到 2 156 种代谢物, 其中正负离子模式分别鉴定到了 1 145 和 1 011 个代谢物。

进一步, 为了获得两两组之间的差异代谢物, 本研究基于 OPLS-DA 分析的 VIP>1 和 ANOVA 分析 P 值 < 0.05 作为筛选条件, 在正负离子模式下进行了差异代谢物的分析。由图 4 可知, 在正离

子模式下, 筛选到 ET+CM 组与 ET 组的差异表达代谢物总数为 19 个, 其中 15 个上调, 4 个下调; ET 组与 NC 组的差异表达代谢物总数为 68 个, 其中 36 个上调, 32 个下调。在负离子模式下, 筛选到 ET+CM 组与 ET 组的差异表达代谢物总数为 21 个, 其中 9 个上调, 12 个下调; ET 组与 NC 组的差异表达代谢物总数为 149 个, 其中 64 个上调, 85 个下调。在 ET 组和 NC 组以及 ET 组和 ET+CM 组中的差异代谢物主要涉及脂质代谢、有机酸代谢和有机氧化合物类别中, 说明酒精能引起小鼠肝脏代谢的改变, 尤其是部分氨基酸和有机化合物的改变。

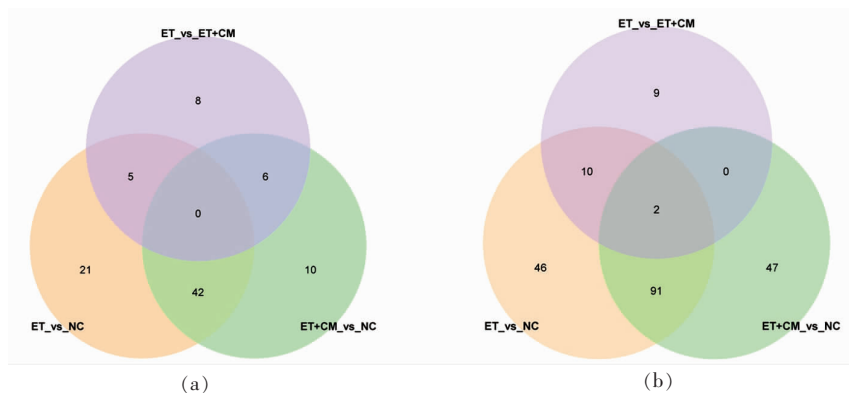


图 4 正离子模式下(a)和负离子模式下(b)的差异代谢物 Venn 图

Fig.4 Venn diagram of differential metabolites in positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

进一步, 在 NC 组、ET 组和 ET+CM 组 3 组中最终筛选鉴定出 28 个差异代谢物(表 1)。由表 1 可知, 与 NC 组相比, 灌胃酒精会降低肝脏中乙酰胆碱、甘氨酸、亚油酸、磷脂酰胆碱等含量; 而灌胃驼乳会对以上代谢物有缓解作用。ALD 小鼠肝脏中甘氨酸的含量降低说明酒精性肝损伤的形成, 与生化指标的测定结果相一致; 而在 ET+CM 组中, 代谢物甘氨酸的含量有显著上升趋势。研究表明, 甘氨酸与机体的炎症、免疫调节等相关, 且甘氨酸的保肝作用与氧化应激反应相关^[23-24]。磷脂酰胆碱(Phosphorylcholine)是人体必需的营养物质, 为人体提供丰富的多不饱和脂肪酸、甘油和乙酰胆碱等生物活性物质; 同时也是甲基和胆碱的良好来源, 参与肝脏解毒及其它生化过程^[25]。它的含量变化提示酒精可能引起胆碱摄取受阻, 并导致

甲基供应不足, 加重了酒精性肝病的程度。驼乳干预下小鼠肝脏中甘氨酸和磷脂酰胆碱水平的变化, 说明驼乳通过氧化应激作用调节体内的代谢异常。

2.6 差异代谢物 KEGG 富集分析

差异代谢物的 KEGG 富集分析结果显示, ET 和 NC 组差异代谢物主要富集在胆碱代谢(Choline metabolism)、矿物质吸收(Mineral absorption)、氨基酸生物合成(Biosynthesis of amino acid)、蛋白质消化吸收(Protein digestion and absorption)、氨酰 tRNA 生物合成(Aminoacyl-tRNA biosynthesis)、甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)以及 ABC 转运蛋白(ABC transporter)等通路(图 5a)。ET+CM 组和 ET 组差异代谢物富集的通路包括胆碱代谢(Choline metabolism)、甘

表 1 NC、ET 和 ET+CM 三组小鼠肝脏差异代谢物

Table 1 Differential liver metabolites in NC, ET and ET+CM groups of mice

| 序号 | 名称 | 保留 时间/s | m/z | 离子模式 | ET_vs_ | ET+CM_vs_ | HMDB ID |
|----|-------------------------------|------------|--------|---|--------|-----------|-------------|
| | | | | | NC | ET | |
| 1 | 1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油 3-磷酸胆碱(SOPC) | 299.57 | 832.58 | (M-H+2Na)+ | ↓* | ↑# | HMDB0000564 |
| 2 | 乙酰胆碱 | 744.21 | 146.12 | [M]+ | ↓* | ↑# | HMDB0000895 |
| 3 | N-α-乙酰基-L-赖氨酸 | 766.87 | 189.12 | [M+H]+ | ↑* | ↓* | - |
| 4 | 1,2-二十二碳六烯酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 | 58.99 | 878.57 | [M+H]+ | ↓* | ↑* | HMDB0008748 |
| 5 | 5-氨基戊酸甜菜碱 | 758.52 | 160.13 | [M+H]+ | ↑* | ↓* | - |
| 6 | 甘油磷酸胆碱 | 763.90 | 258.11 | [M+H]+ | ↓* | ↑* | HMDB0000086 |
| 7 | 瓜氨酸 | 768.38 | 176.10 | [M+H]+ | ↑* | ↓* | HMDB0000904 |
| 8 | L-焦谷氨酸 | 533.82 | 128.03 | [M-H]- | ↓* | ↑# | HMDB0000267 |
| 9 | Gly-Val | 546.41 | 173.09 | [M-H]- | ↓* | ↑* | - |
| 10 | Gly-Ser | 658.35 | 161.06 | [M-H]- | ↓* | ↑* | - |
| 11 | N-油酰-L-丝氨酸 | 61.55 | 368.28 | [M-H]- | ↑* | ↓* | - |
| 12 | N-乙酰基-D-半乳糖胺 4-硫酸盐 | 264.58 | 300.04 | [M-H]- | ↓* | ↑# | - |
| 13 | β-生育三烯酚 | 235.91 | 409.31 | [M-H]- | ↑* | ↓# | - |
| 14 | 3-羟基-3-甲基戊二酸 | 674.37 | 161.05 | [M-H]- | ↑* | ↓* | HMDB0000355 |
| 15 | 禾草灵 | 611.90 | 254.99 | [M-H-C ₃ H ₄ O ₂ +2i]- | ↑* | ↓* | - |
| 16 | 亚油酰甘氨酸 | 60.27 | 336.25 | [M-H]- | ↑* | ↓# | - |
| 17 | 3-羟基丁酸 | 403.91 | 103.04 | [M-H]- | ↑* | ↓# | HMDB0000357 |
| 18 | 磷酸胆碱 | 705.28 | 242.08 | (M+CH ₃ COO)- | ↓* | ↑* | HMDB0001565 |
| 19 | γ-亚麻酸 | 60.90 | 277.22 | [M-H]- | ↓* | ↑# | HMDB0003073 |
| 20 | sn-甘油 3-磷酸乙醇胺 | 716.22 | 214.05 | [M-H]- | ↓* | ↑* | HMDB0000114 |
| 21 | L-瓜氨酸 | 707.07 | 174.09 | [M-H]- | ↑* | ↓# | HMDB0000904 |
| 22 | 13-hydroxy-9z,11e-十八碳二烯酸 | 61.56 | 295.23 | [M-H]- | ↑* | ↓# | HMDB0112194 |
| 23 | 3-羟基十二烷酸 | 88.92 | 215.16 | [M-H]- | ↑* | ↓# | HMDB0000387 |
| 24 | Pe(18:2e/7-hdohe) | 250.52 | 788.52 | [M-H]- | ↓* | ↑* | - |
| 25 | 6-羟基多巴胺 | 880.68 | 168.04 | [M-H]- | ↓* | ↑* | HMDB0001537 |
| 26 | (n-(-2-乙酰氨基))-2-氨基乙磺酸 | 529.17 | 181.03 | [M-H]- | ↓* | ↑* | - |
| 27 | Pi(18:1/17-hdohe) | 59.60 | 923.51 | [M-H]- | ↓* | ↑* | - |
| 28 | 戊烯酸 | 49.41 | 233.15 | [M-H]- | ↑# | ↓# | - |

注: ↑ 为上调, ↓ 为下调。* P<0.05, # P<0.01。

油磷脂代谢(Glyceropholipid metabolism)、氨基酸生物合成(Biosynthesis of amino acid)以及 ABC 转运蛋白(ABC transporter)等通路(图 5b)。由此可见,胆碱代谢、甘油磷脂代谢和 ABC 转运蛋白是 ET 组和 NC 组以及 ET 组和 ET+CM 组中共有的差异代谢通路,是驼乳对急性酒精性肝损伤小鼠预防作用机制中发挥着重要作用的代谢通路。

3 结论

本研究对小鼠一次性大剂量灌胃酒精,建立急性肝损伤模型,通过血清和肝脏生化指标检测分析驼乳对小鼠进行酒精性肝损伤的预防作用;进一步,基于 UHPLC-QTOF-MS 技术的代谢组学分析方法探究驼乳的护肝功效作用机制。通过灌胃驼乳可有效抑制小鼠血清中 ALT 和 AST 的水

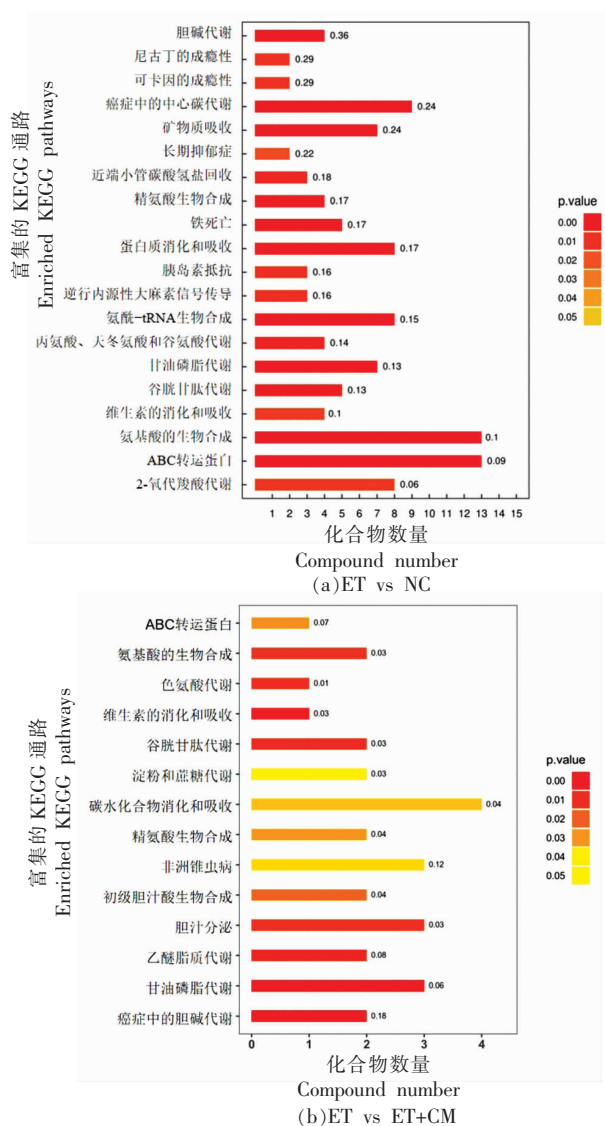


图5 差异代谢物 KEGG 通路富集分析

Fig.5 Enrichment analysis of differential metabolite KEGG pathway

平,显著增加 GSH 和 SOD 的活性,且缓解小鼠肝脏中 TG 和 TC 的水平。通过代谢组的分析,在 NC 组、ET 组和 ET+CM 组 3 组中最终筛选鉴定出 28 个差异代谢物,其中 ET+CM 组小鼠肝脏中甘氨酸、亚油酸、磷脂酰胆碱等含量显著增加;且差异代谢物主要富集在胆碱代谢、甘油磷脂代谢和 ABC 转运蛋白通路中,说明驼乳可以通过氧化应激作用调节小鼠体内的代谢异常。

参 考 文 献

[1] LACKNER C, TINIAKOS D. Fibrosis and alcohol-

related liver disease [J]. *Journal of Hepatology*, 2019, 70(2): 294-304.

[2] WANG T L. Pathology and classification of alcoholic liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2013, 8(5): 299-303.

[3] WU D, CEDERBAUM A I. Oxidative stress and alcoholic liver disease[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2009, 29(2): 141-154.

[4] ARTEEL G E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2011, 124(3): 778-790.

[5] TSUKAMOTO H. Iron regulation of hepatic macrophage TNF alpha expression[J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2009, 32(4): 309-313.

[6] WANG H J, GAO B, ZAKHARI S, et al. Inflammation in alcoholic liver disease[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2012, 32(1): 343-368.

[7] XIE J, ZHANG A H, WANG X J. Metabolomic applications in hepatocellular carcinoma: Toward the exploration of therapeutics and diagnosis through small molecules[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(28): 17217-17226.

[8] 王朝霞. 骆驼乳对四氯化碳诱导肝损伤小鼠保护机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.

WANG Z X. Protective mechanisms of camel milk on carbon tetrachloride-induced hepatic injury mice [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.

[9] MING L, QIAO X, LI Y, et al. Camel milk modulates ethanol-induced changes in the gut microbiome and transcriptome in a mouse model of acute alcoholic liver disease[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(5): 3937-3949.

[10] KORISH A, ARAFAH M. Camel milk ameliorates steatohepatitis, insulin resistance and lipid peroxidation in experimental non-alcoholic fatty liver disease [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 13(1): 264-274.

[11] AL-FARTOSI K, KHUON O, AL-TAE H. Protective role of camel's milk against paracetamol induced hepatotoxicity in male rats [J]. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2011, 2(4): 1795-1799.

[12] AL-HASHEM F. Camel's milk protects against aluminum chloride-induced toxicity in the liver and kidney of white albino rats[J]. *American Journal of*

- Biochemistry and Biotechnology, 2009, 5(3): 98–109.
- [13] ALHASHEM F, DALLAK M, BASHIR N, et al. Camel's milk protects against cadmium chloride induced toxicity in white albino rats [J]. American Journal of Pharmacology and Toxicology, 2009, 4(3): 107–117.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003版)[S]. 北京: 北京科学技术出版社, 2003: 133–139.
Ministry of Health, PRC. Technical specification for inspection and evaluation of health food (2003 edition) [S]. Beijing: Beijing Science and Technology Press, 2003: 133–139.
- [15] ZHAO J, CHEN H, LI Y. Protective effect of bicyclicol on acute alcohol-induced liver injury in mice[J]. European Journal of Pharmacology, 2008, 586(1): 322–331.
- [16] DING W X, LI M, CHEN X, et al. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice [J]. Gastroenterology, 2010, 139(5): 1740–1752.
- [17] 乔向宇. 鲜驼乳和自然发酵驼乳对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
QIAO X Y. Protective effects of fresh camel milk and naturally fermented camel milk on acute alcoholic liver injury in mice[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [18] CICOZLACH H, MICHALAK A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(25): 8082–8091.
- [19] LI S, TAN H Y, WANG N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(11): 26087–26124.
- [20] TESCHKE R. Alcoholic liver disease: Alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects[J]. Biomedicines, 2018, 6(4): 106.
- [21] LUO D, DENG T, YUAN W, et al. Plasma metabolomic study in Chinese patients with wet age-related macular degeneration[J]. BMC Ophthalmology, 2017, 17(1): 165.
- [22] ZHAO B, GU L, LI S K, et al. Metabolomics reveals that crossbred dairy buffaloes are more thermotolerant than Holstein cows under chronic heat stress [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(49): 12889–12897.
- [23] YUAN L, KAPLOWITZ N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2009, 30(1): 29–41.
- [24] FRAZIER T H, STOCKER A M, KERSHNER N A, et al. Treatment of alcoholic liver disease [J]. Therapeutic Advances Gastroenterology, 2011, 4(1): 63–81.
- [25] 贾丹. 肝脏磷脂酰胆碱对酒精性肝损伤的保护作用研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2007.
JIA D. Protective effect of hepatic phosphatidylcholine on alcoholic liver injury[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2007.

Metabolomic Analysis of Camel Milk in Preventing Acute Alcoholic Liver Injury in Mice

Ming Liang¹, Sai Na², Qibule¹, Hao Shiqi¹, Jirimutu^{1*}

¹Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

²Animal Husbandry Workstation of Sunit Right Banner, Xilingol 011299, Inner Mongolia

Abstract Objective: The preventive effect of camel milk on acute alcoholic liver injury in mice was analyzed by detecting serum and liver indexes, and the mechanism of metabonomics was explored. Methods: 24 ICR male mice were randomly divided into normal control group (NC), model group (ET) and camel milk group (ET+CM). The mouse model of acute liver injury was established by gavage of large dose (7.3 g/kg) of alcohol for a short time. The protective effect of camel milk on liver was reflected by measuring serum indexes (ALT, AST, SOD and GSH) and liver indexes (TG and TC). The mechanism of camel milk on liver protection was discussed based on metabonomics. Results: Camel milk sig-

nificantly inhibited the levels of ALT and AST in serum and TG and TC in liver. Meanwhile, camel milk can increase the contents of SOD and GSH in serum by eliminating reactive oxygen free radicals. Through metabolome analysis, the differential metabolites in ET, NC groups and ET, ET+CM groups were mainly related to lipid metabolism, organic acid metabolism and organic oxygen compounds; 28 metabolites with significant differences were screened and identified in NC, ET and ET+CM groups. Alcohol could reduce the contents of acetylcholine, glycine, linoleic acid and phosphatidylcholine in liver; however, camel milk alleviated the above metabolites. KEGG enrichment analysis of different metabolites showed that they were involved in choline metabolism, glycerol phospholipid metabolism and ABC transporter. Conclusion: Camel milk could alleviate the disorder of lipid metabolism and increase antioxidant capacity induced by acute alcohol exposure, and effectively prevents alcoholic liver injury by regulating choline metabolism, glycerol phospholipid metabolism and ABC transporter in mice.

Keywords acute alcoholic liver disease; camel milk; metabolomics; UHPLC-Q-TOF-MS/MS