

基于氨基酸代谢的复合茶降脂作用研究

周才碧, 文治瑞, 赵燕, 梅鑫, 杨再波*

(黔南民族师范学院 贵州都匀 558000)

摘要 为了明确复合茶的降脂作用,建立高脂饮食小鼠模型,采用 UPLC-MS/MS 检测、多元统计分析以及自建数据库相结合的方法研究复合茶样品间代谢组的差异度。设置正常模型组(CK)、高脂饮食组(NK)和复合茶干预组(DH),以血脂康胶囊作为阳性对照组(YK),对比复合茶对高脂血症小鼠肝脏中的氨基酸代谢的影响。结果表明:经复合茶干预后,高脂饮食诱导小鼠肝脏中的 L-高胱氨酸、N-乙酰基蛋氨酸、D-丙氨酸-D-丙氨酸、S-腺苷蛋氨酸、L-天冬酰胺和 L-酪氨酸甲酯等 13 种氨基酸代谢物呈下调趋势,且显著富集在半胱氨酸和甲硫氨酸代谢途径中。对比阳性药物组,血脂康干预后仅 N-乙酰天冬氨酸、N-异戊酰氨基乙酸和丙甘氨酸等 5 种氨基酸代谢物显著下调。说明复合茶对高脂血症小鼠的肝脏氨基酸代谢物及通路具有一定的调节作用,且效果优于阳性药物血脂康。研究结果为利用代谢组学技术,探究复合茶中氨基酸及其衍生物的降脂机理提供参考。

关键词 氨基酸; 高脂血症; 茶叶; 代谢组

文章编号 1009-7848(2023)01-0143-17 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.015

由于能量摄入和消耗之间的不平衡,体力劳动和运动量相对减少,使得肥胖人群持续增长,肥胖逐渐成为世界性的公共健康问题^[1]。肥胖带来的不仅是外表的不美观,对自身健康也造成负面影响,更重要的是随之而来的高脂血症、心血管疾病、代谢综合症等各类代谢疾病^[2]。

高脂血症(Hyperlipidemia,HLP)是因 T-CHD、LDL-C、T-GHD 过高,或 HDL-C 过低,而引发的一类代谢型疾病。HLP 也称为脂质代谢异常或紊乱,是多种代谢通路异常的结果^[3],主要由脂代谢和肠道菌群紊乱,以及氨基酸代谢、氧化应激、糖代谢所致。脂质代谢涉及糖异生、糖酵解、TCA 循环、戊糖磷酸途径、脂质合成以及氨基酸代谢等路径,可以互相转化和影响;若某个代谢路径发生代谢产物累积或过度消耗都会导致其它路径的紊乱,是较为常见的内分泌和代谢性疾病^[3]。HLP 的发生会加剧肥胖,进而引起肠道菌群紊乱^[4]、脂肪组织和肝脏的慢性炎症^[5]、动脉粥样硬化、糖尿病^[6]、中枢神经系统退行性病变^[7]、非酒精

性脂肪肝(NASH)^[8-11]、骨关节炎、心血管疾病等,以及提高某些类型癌症发生的风险。这些病的变异性及其相关的共病使其成为一种复杂的、不易分类和治疗的多元因素疾病^[7]。

茶叶具有降脂、减肥的作用,可调节相关代谢酶活性,阻止胆固醇吸收,抑制胆固醇合成,调节代谢相关基因的表达,对肝脏有保护作用^[9]。通过长期饮茶和适量运动去脂,可让各代谢途径恢复正常。饮茶不仅有降三高,提高免疫力,延年益寿等功能,而且安全、无副作用。

茶叶中茶多酚、儿茶素、茶黄素等化学成分可降低胆固醇、低密度脂蛋白和血浆甘油三酯水平,并促使低密度脂蛋白受体表达,调节或抑制高脂血症,减少脂肪含量^[11]。茶多酚对高脂饮食小鼠结肠菌群组成和多样性的影响,抑制了宿主体质量和血脂的增加。儿茶素可显著降低大鼠肝脏中脂肪酰合酶(FAS)和苹果酸酶(ME)的活性,并可降低葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和酰基辅酶 A 氧化酶(ACO)活性^[12-13]。绿茶提取物中,茶多酚等成分可减少自由基引起的机体损伤,提高 SOD 等抗氧化酶活性及机体自身的抗氧化水平,从而改善血脂水平^[14-15]。普洱茶可以提高 SOD 和 GSP-Px 活性,减少 MDA 含量,促进其避免肝细胞受损,提高肝细胞的抗氧化能力,抑制或减少脂肪肝的合成^[16-17]。凤凰单丛茶提取物可提高 CPT-1、p-

收稿日期: 2022-01-02

基金项目: 贵州省教育厅项目(黔教合 KY 字[2019]001 号);贵州省科技厅项目(黔科合支撑[2019]2377 号)

第一作者: 周才碧,男,硕士,教授

通信作者: 杨再波 E-mail: yzb1976110@sohu.com

ACC 和 p-AMPK 表达,促进脂肪酸的氧化;减少 FAS 表达,抑制体内脂肪合成^[18]。

代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,其在病理诊断及药物机理、作用等与人类健康密切相关的领域被广泛应用^[3,19]。代谢组学在许多方面都存在优势,如代谢组学研究是介于基因、细胞、蛋白质以及组织之间,是位于生物及其信息传递的中端,而代谢产物位于下端,因此对生物体的氨基酸类代谢产物能更直接地分析其病理和生理状态。

本文利用代谢组学技术研究复合茶中氨基酸及其氨基酸衍生物对高脂血症小鼠肝脏代谢的影响,旨在探究复合茶中氨基酸及其氨基酸衍生物的降脂机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

受试样品:由都匀古树绿茶、都匀原树甜茶、都匀阔叶苦丁、荷叶、野薄荷、金银花拼配而成的复合茶。

试剂:乙腈、甲醇、乙醇皆是色谱纯级,德国 Merck。

实验动物:SPF 级雄性 KM 小鼠,体质量(30±2)g,约 5 周龄,上海斯莱克。

1.2 仪器与设备

CTO-20AC 柱温箱、IT-TOF 质谱仪、CBM-20A 系统控制器、DGU-20A5R 在线脱气机、SIL-30AC 自动进样器、LC-30AD 液相输液泵,日本岛津;超纯水器,美国 Thermo。

1.3 茶样制备

取适量的由都匀古树绿茶、都匀阔叶苦丁、都匀原树甜茶、金银花、荷叶、野薄荷配制成复合茶样品粉碎,配制成质量浓度 0.1 g/mL 的茶水于 100 °C 沸水中浸提 30 min,真空抽滤后,茶渣按同样的方法再浸提 1 次,合并 2 次提取液。最后将滤液蒸发至适当浓度,在-80 °C 预冷 12 h 后,真空干燥 30 h,收集干粉,置于-20 °C 超低温冰箱中,备用。

1.4 动物实验

将小鼠适应性喂养 1 周后,随机分成 4 组:饲养基础饲料的正常对照组(CK),以蒸馏水灌胃、

饲养高脂饲料的小鼠模型对照组(NK),以复合茶茶汤灌胃、饲养高脂饲料的复合茶叶组(DH),以血脂康灌胃、饲养高脂饲料的阳性对照组(YK)。各组均分开饲养 30 d,保证实验室里的相对湿度为 50%~60%,温度为 20~26 °C。2 d 更换 1 次垫料,保持环境干净;1 周更换小鼠饮用的蒸馏水。该实验通过了华南农业大学(中国广州)动物实验伦理委员会批准,程序严格按照华南农业大学动物护理和使用实验室指南进行操作。

1.5 样品制备

实验结束后,使用乙醚将小鼠麻醉并解剖,将肝组织取出,用预冷的生理盐水漂洗干净血液。精确称取 50 mg 小鼠肝组织,加入 1 000 μL 预冷提取剂[70%甲醇水溶液(含 2-氯苯丙氨酸 1 μg/mL)作为内标]和预冷的钢珠,匀浆 3 min 并将钢珠取出,再涡旋 1 min,冰上静置 15 min;最后 4 °C 离心(12 000 r/min)10 min,取上清倒入衬管,待 LC-MS/MS 分析。

1.6 色谱条件

质谱条件:质谱电压 5 500 V(positive),-4 500 V(negative);电喷雾离子源(Electrospray ionization,ESI)温度为 500 °C;气帘气(Curtain gas,CUR)25 psi,离子源气体 II(GS II)60 psi、气体 I(GSI)55 psi;碰撞诱导电离(CAD)参数设置为高。在三重四极杆(Qtrap)中,离子对要求根据优化后的去簇电压(Declustering potential,DP)和碰撞能(Collision energy,CE)进行扫描和检测。

流动相:A 相(超纯水)是 0.04%的乙酸,B 相(乙腈)是 0.04%的乙酸;洗脱梯度:14.0 min 为 95:5(V/V),12.1 min 为 95:5(V/V),12.0 min 为 5:95(V/V),11.0 min 为 5:95(V/V),0 min 水/乙腈=95:5(V/V);进样量 2 μL;流速 0.4 mL/min,柱温 40 °C。

色谱条件:色谱柱为 Waters ACQUITY U-PLCHSS T3C 181.8 μm,2.1 mm×100 mm。

1.7 数据处理

采用三重四极杆质谱的多反应监测模式(Multiple reaction monitoring,MRM)及 Analyst 1.6.3 软件处理质谱数据及定量分析,对代谢物进行峰校正和峰提取。所有数据集经过处理后用 O-PLS-DA 模型进行分析,用预测参数 Q2 和 R2X、

R2Y 评价模型的可靠程度,反映模型的有效性。

2 结果与分析

2.1 数据质量评估

由混样质控 QC 样本的总离子流图 (图 1a、1b)所示,在图中帧与帧之间重叠性好,即说明机器运行比较稳定可靠,从而测得的数据结果真实

可信。通过三重四极杆筛选出特征离子,可得到 MRM 代谢物检测多峰图,利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据得到图 1c 和 1d。

由图 1 可知样本中能够检测到的物质,不同颜色的色谱峰代表检测到的不同代谢物;每个色谱峰的峰面积(Area)代表对应物质的相对含量。

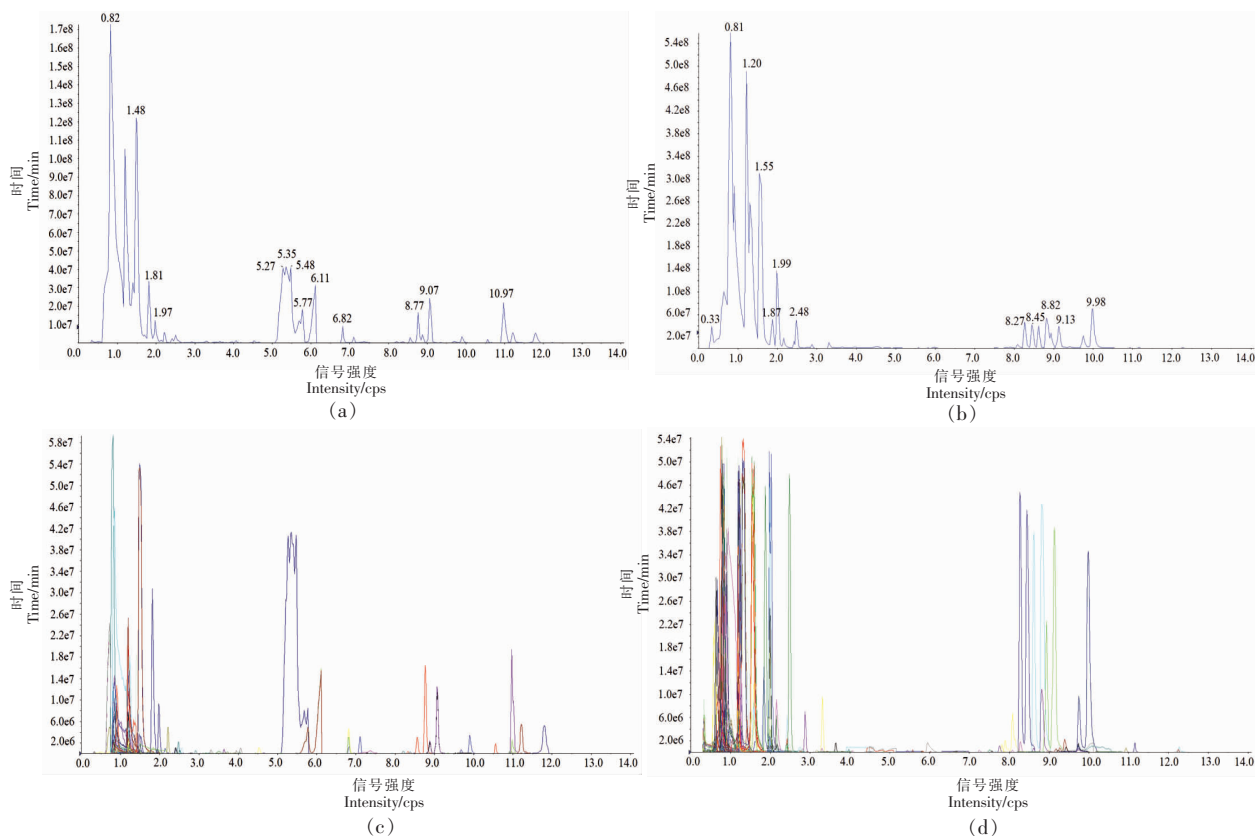


图 1 混样质控 QC 样本的总离子流图及 MRM 代谢物检测多峰图

Fig.1 Total ion flow diagram of sample mass spectrometry and multi peak diagram of MRM metabolite detection

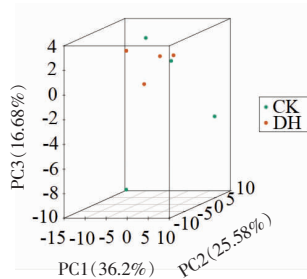
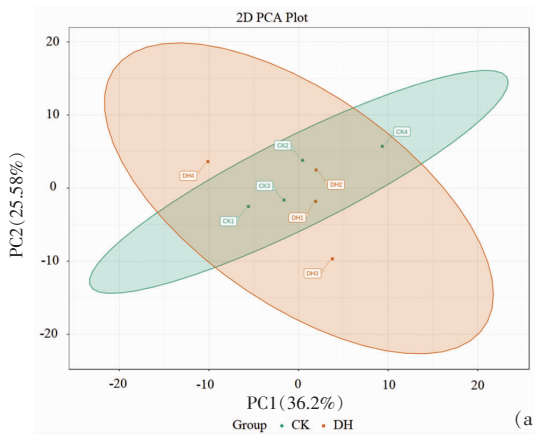
2.2 定性和定量代谢物

通过自建靶向标品数据库 MWDB 和代谢组学数据库,对样本及样本间的氨基酸类代谢物进行质谱定性和定量分析,根据检测物质的子母离子对信息、保留时间 RT 及二级谱数据进行定性分析和广泛靶向氨基酸代谢组技术的代谢分析,检测到 97 个代谢物包括马尿酸、延胡索酸、琥珀酸、丙甘氨酸等。

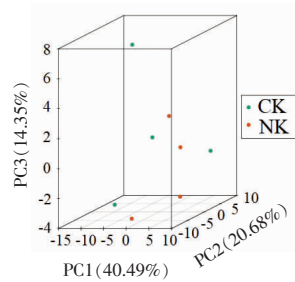
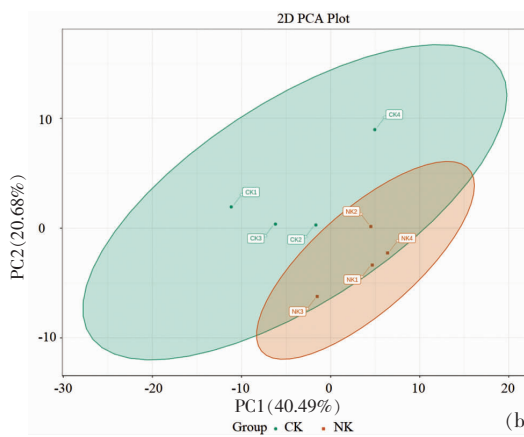
2.3 主成分分析

主成分分析(PCA)显示出各组之间分离的趋势,表示样品组间氨基酸代谢物是否存在差异。

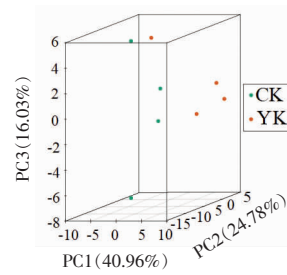
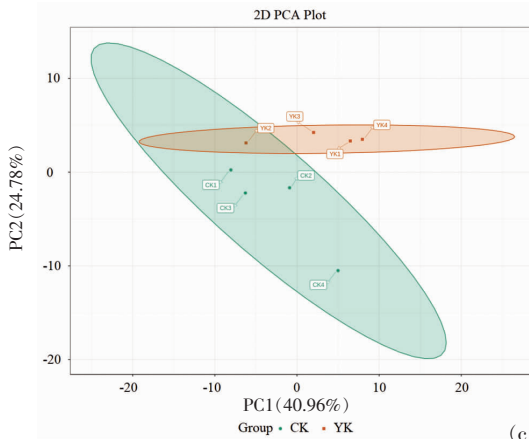
PCA 分析可以看出,本研究得到每组处理内样品间的差异比较小,也具有相似的代谢特性,测试结果可重复且稳定。除了 CK-vs-DH 处理之间的分离趋势较小以外,其余处理组之间分离趋势明显,即 CK-vs-DH 处理之间的氨基酸代谢物差异较小,其 PC1 贡献度为 36.2%(图 2a、2g),说明复合茶可恢复部分氨基酸代谢物至正常对照组的氨基酸代谢情况。CK_vs_NK 组中可以得出,两组之间存在差异(图 2b),且 PC1 贡献度为 40.49%,表明建立的高脂小鼠模型成功。其余处理组之间分离趋势明显,则说明这几组氨基酸代谢物差异较为



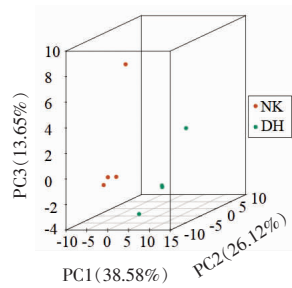
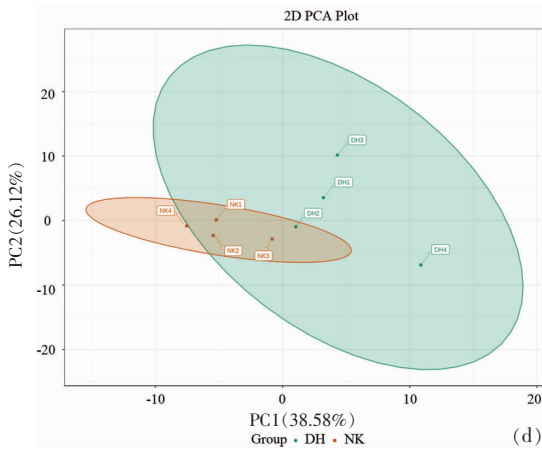
(a) CK-vs-DH



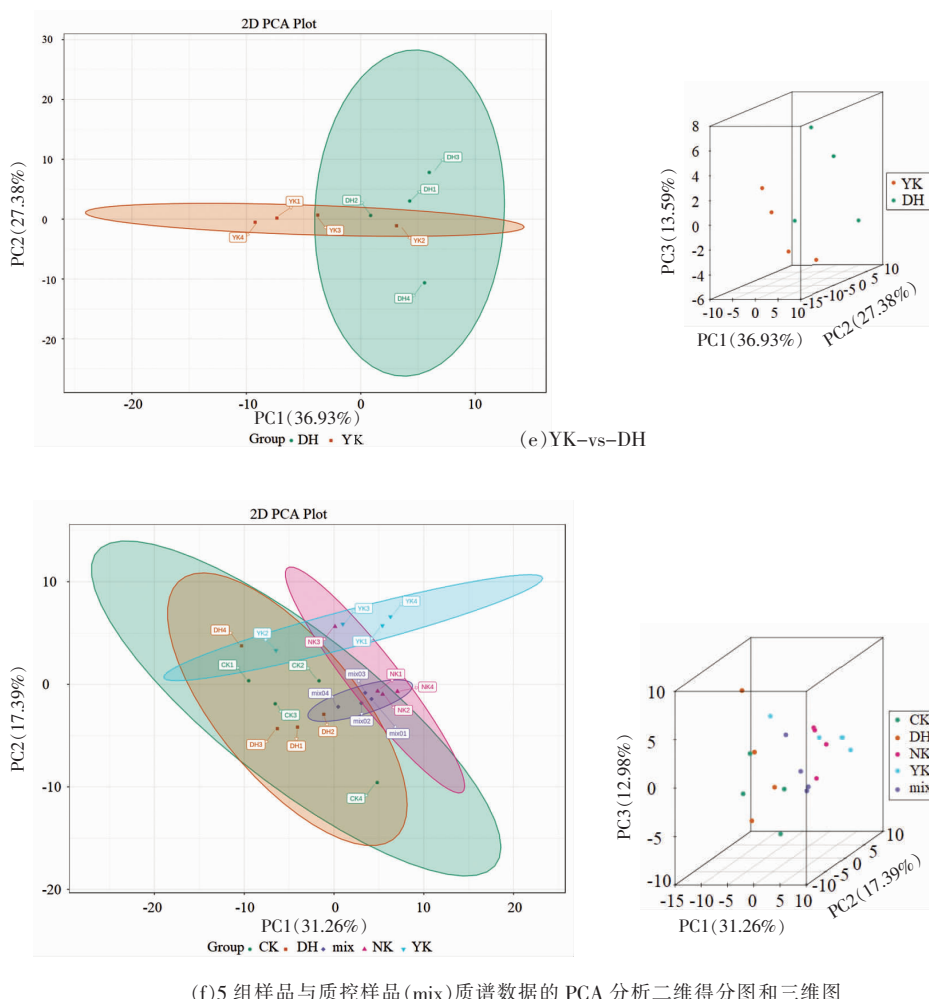
(b) CK-vs-NK



(c) CK-vs-YK



(d) NK-vs-DH



(f) 5 组样品与质控样品 (mix) 质谱数据的 PCA 分析二维得分图和三维图

图 2 主成分分析得分图和三维图

Fig.2 Principal component analysis two dimensional score map and three dimensional graph

显著, PC1 贡献度分别为 40.96%, 38.58%, 36.93%, 31.26% (图 2c~2f)。

2.4 正交偏最小二乘判别分析

主成分分析法能有效提取主要信息, 然而它对于相关性小的变量较不敏感, 而正交偏最小二乘判别分析 (Partial least squares-Discriminant analysis, PLS-DA) 便能够解决此问题。PLS-DA 是一种监督模式识别的统计分析手段, 分别取自变量 (X) 与因变量 (Y) 中的成分后, 再进行成分间相关性计算。与 PCA 相比较, PLS-DA 能够促使组间区分度达到最大化, 这样更有利于找到差异代谢物。而正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least squares-Discriminant analysis, OPLS-DA) 结合了正交信号矫正 (Orthogonal signal cor-

rection, OSC) 和 PLS-DA 方法, 通过去除不相关的差异来筛选差异变量。

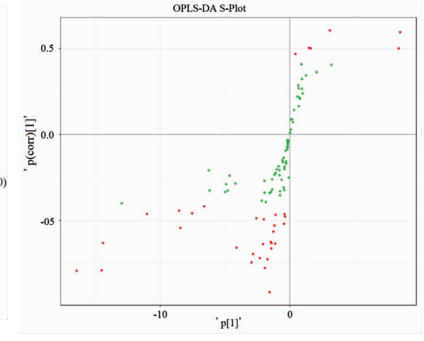
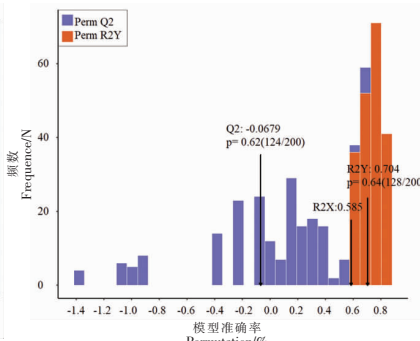
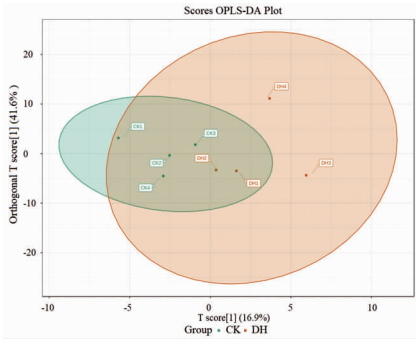
根据 OPLS-DA 模型来分析代谢数据, 绘制出各个分组的得分图, 其中 Q2、R2Y 和 R2X 展示出各个分组间的差异; 相关指标越接近 1, 模型越稳定、可靠, 而 Q2>0.9 时为出色, Q2>0.5 时为有效。

利用 OPLS-DA 模型分析可见, CK-vs-NK (图 3b), CK-vs-YK (图 3c), NK-vs-DH (图 3d), NK-vs-YK (图 3e), YK-vs-DH (图 3f) 的 Q2 分别为 0.792, 0.774, 0.689, 0.52, 0.758, 均>0.5, 即所建立的模型为有效模型, 值得注意的是 CK-vs-DH 中的 Q2<0.5 且 P<0.05, 即该模型是无效模型。在 NK-vs-DH (图 3d), YK-vs-DH (图 3f) 两个对比组中 R2Y 的 P 分别为 0.1, 0.04; Q2 的 P 分别为

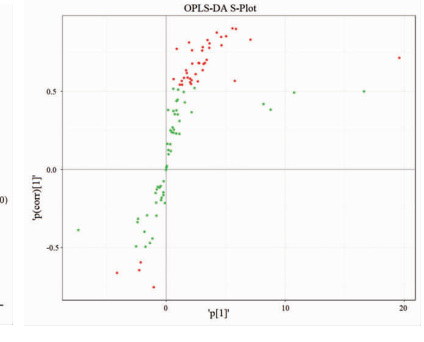
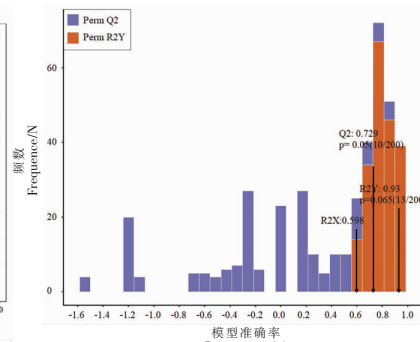
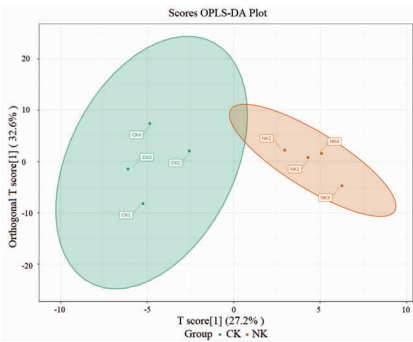
0.015, 0.04, 均 <0.05 , 说明这两个对照模型组是建立的最佳的, 在此次 Permutation 检测中, 各对比组各有 2 和 8 个随机分组模型其对 Y 矩阵的解释

率优于本 OPLS-DA 模型; 各有 3 和 8 个随机分组模型的预测能力优于本 OPLS-DA 模型。

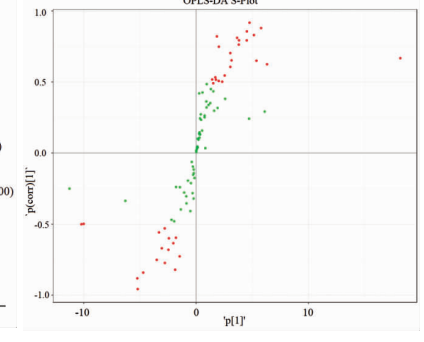
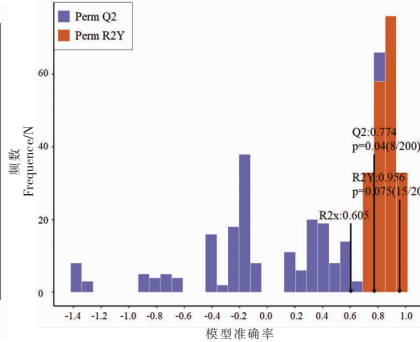
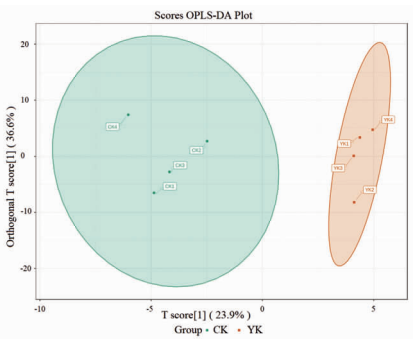
在 OPLS-DA 的 S-plot 图中 NK-vs-DH (图



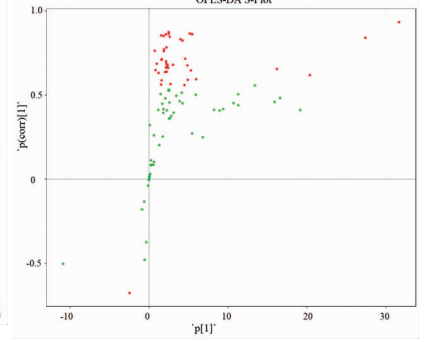
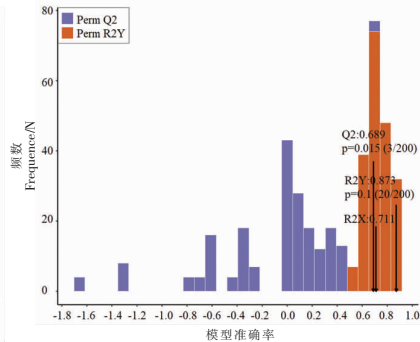
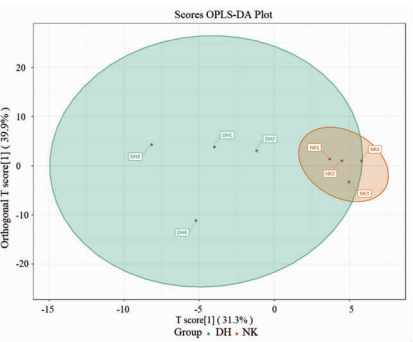
(a) CK-vs-DH



(b) CK-vs-NK



(c) CK-vs-YK



(d) NK-vs-DH

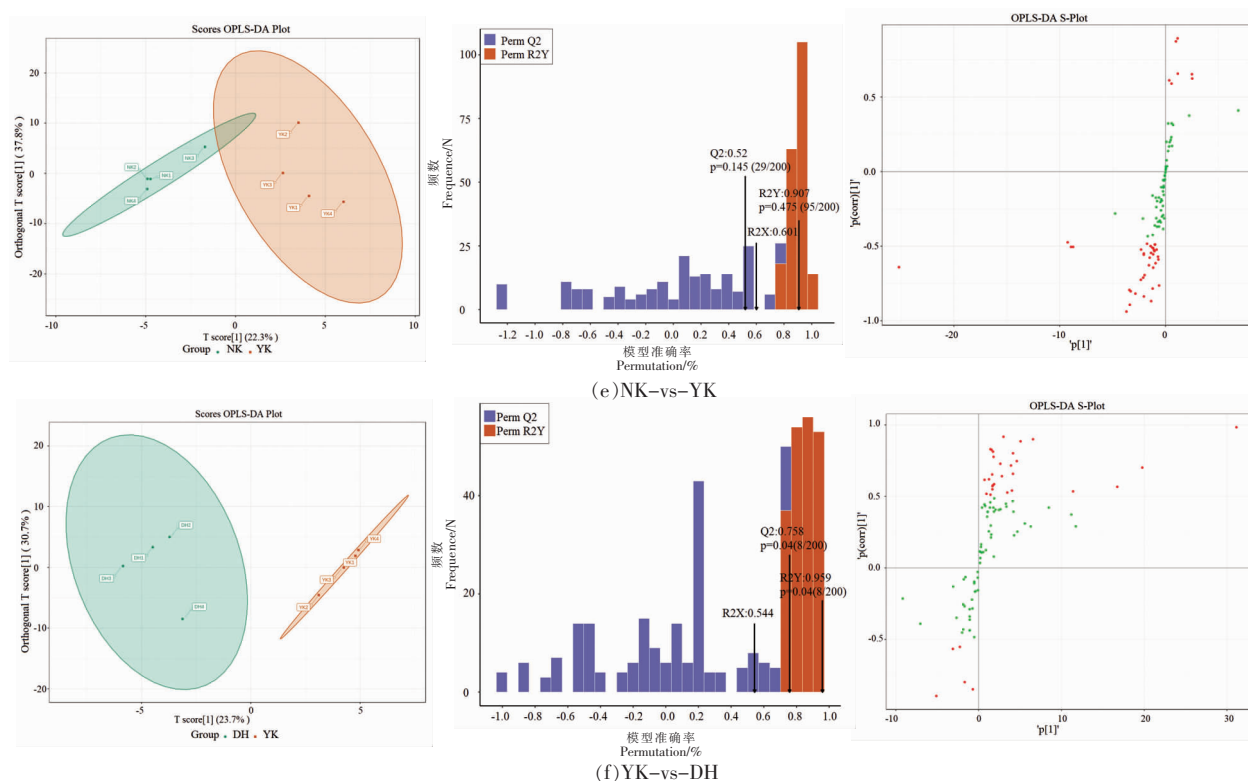


图 3 OPLS-DA 模型的评分(左)、OPLS-DA 验证图(中)、OPLS-DA S-plot(右)

Fig.3 OPLS-DA model score (left), OPLS-DA verification chart (middle), OPLS-DA S-plot (right)

3d)有 43 种氨基酸差异代谢物 $VIP > 1$ 。有趣的是, YK-vs-DH (图 3f) 中的 33 种氨基酸差异代谢物 $VIP > 1$ (甘氨酸 $VIP > 2$) 均包含在 NK-vs-DH 组的差异代谢物中, 其余 10 种差异代谢物不在其中, 分别是 *S*-甲基谷胱甘肽、 γ -*L*-谷氨酸-*L*-半胱氨酸、*N*-乙酰苯丙氨酸、1-甲基组氨酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸、顺式乌头酸、丙酮酸、柠檬酸、马尿酸。推测这 10 种氨基酸差异代谢物可能参与了该复合茶调控高脂饮食小鼠的血脂紊乱。

2.5 差异代谢物筛选

通过观察图 4, 选择 $VIP \geq 1$ 的代谢物作为显著差异代谢物。由差异代谢物条形图中的每一条形, 差异代谢物 VIP 值图、差异代谢物火山图中的每一点及差异代谢聚类热图中的每一行代表一种显著差异代谢物。在差异代谢物筛选结果中可以看出, NK-vs-YK 中代谢物差异较小, CK-vs-YK 中的代谢物差异相对较大 (图 4a~4f)。还知道在 CK-vs-DH、NK-vs-DH、NK-vs-YK 中分别有 9, 13, 5 种下调的显著差异代谢物; 在 DH-vs-YK 中除了 *L*-瓜氨酸和 *N*-乙酰基亮氨酸为上调显著差

异代谢物, 其余皆为下调的显著差异代谢物; 在 CK-vs-YK 中上调和下调的显著差异代谢物数量相近; 在 CK-vs-NK 中仅有 3-羟基-3-甲基谷氨酸是下调显著差异代谢物, 其它显著差异代谢物皆是上调的 (图 4a~4f)。详细情况见表 2 和表 3。

CK-vs-DH 对比发现, 正常对照组与复合茶组的组间差异最小 (图 4a), 说明复合茶对高脂诱导的小鼠肝脏代谢有明显影响, 能减少脂肪, 降低血脂水平。其中, 9 种显著差异代谢物 $VIP > 1$ (图 4a) 均呈现下调, 其中延胡索酸、柠檬酸、*L*-正亮氨酸是该对比组特有的显著差异代谢物, 而 *L*-冬胺基乙酸-*L*-苯丙胺基乙酸是差异倍数最大的代谢物 $\log_2FC = 10$ 。延胡索酸调节高脂血症有促进作用, 说明延胡索酸在氨基酸代谢中对高脂血症的调节呈负相关。

CK-vs-NK 有 10 种显著差异代谢物 $VIP > 1$ (图 4b), 仅有 3-羟基-3-甲基谷氨酸是下调的, 其余 9 种全是上调差异代谢物, 茶氨酸、马尿酸、*L*-色氨酸、*N* α -乙酰-*L*-精氨酸对比组特有的显著差异代谢物。研究表明, 茶氨酸、马尿酸对降脂有积

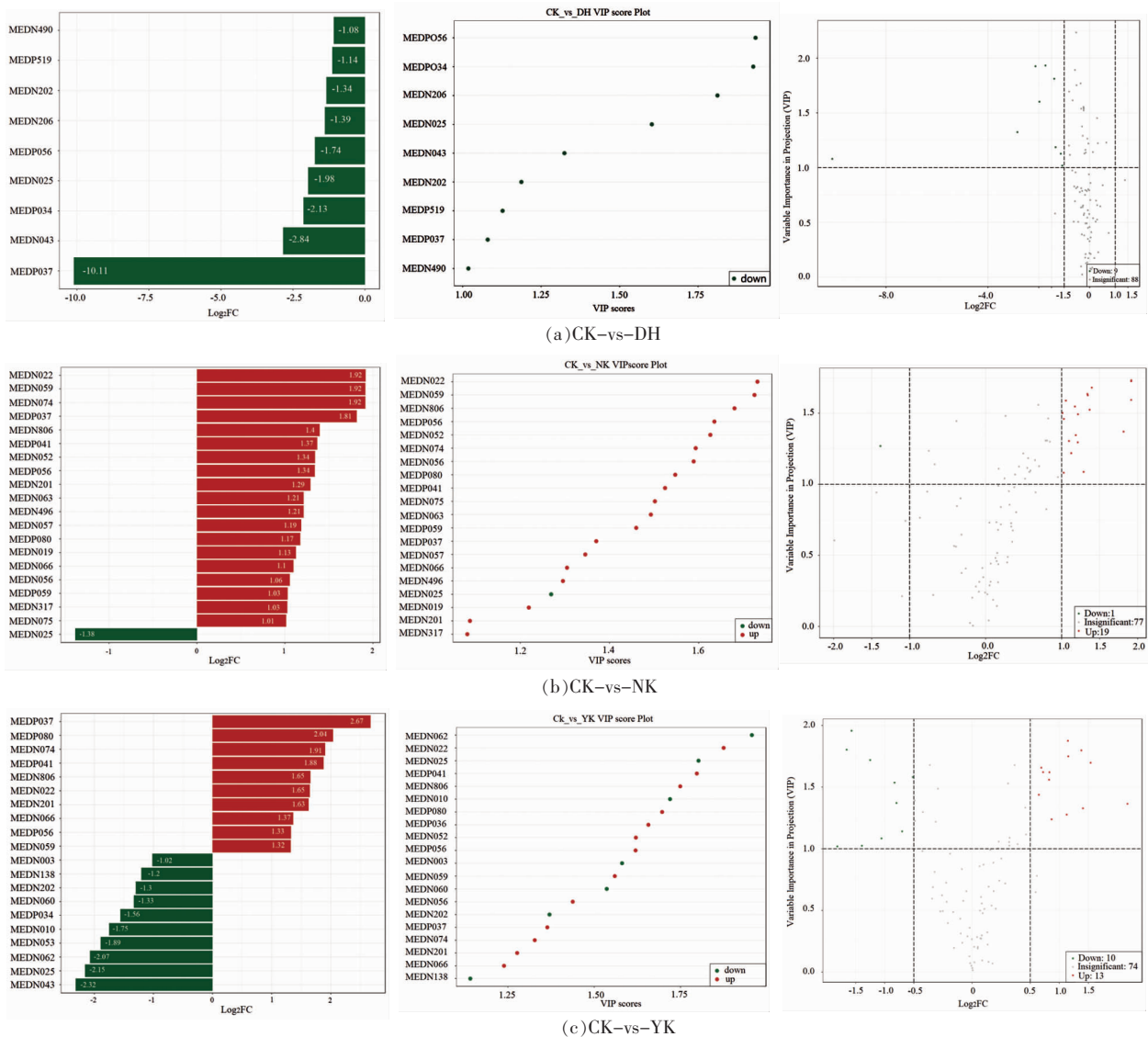
极作用,说明茶氨酸、马尿酸在氨基酸代谢中对调节高脂血症表现出正相关的关系。

CK-vs-YK 有 23 种显著差异代谢物 VIP>1 (图 4c),其中与 CK-vs-NK 共有的差异代谢物均显示对氨基酸代谢有上调作用,除了 *L*-冬胺基乙酸-*L*-苯丙胺基乙酸、5-氧化脯氨酸上调以外,其余均下调,包括 1-甲基组氨酸和甘氨酸,它是该组特有的显著差异代谢物。*L*-瓜氨酸通过改变肠道菌群和菌门丰度,导致小鼠高脂或增重^[20],说明 *L*-瓜氨酸在氨基酸代谢通路中对高脂血症的调节是正相关。3-羟基-3-甲基谷氨酸是前 3 组共有的下调差异代谢物,目前尚未明确其是否与正常对照组有密切关系。

NK-vs-DH 有 13 种对氨基酸代谢有下调的显著差异代谢物 VIP>1(图 4d)。

NK-vs-YK 有 5 种对氨基酸代谢有下调的显著差异代谢物 VIP>1(图 4e),且与 NK-vs-DH 无共有差异代谢物,3-碘化酪氨酸和 *N*-乙酰基甘氨酸是该对照组特有的显著差异代谢物。

YK-vs-DH 有 14 种显著差异代谢物 VIP>1 (图 4f),除了与 CK-vs-YK 共有的 *L*-瓜氨酸和丙甘氨酸上调外,其余皆是下调的差异代谢物。半胱氨酰甘氨酸是该对照组特有的显著差异代谢物。*L*-冬胺基乙酸-*L*-苯丙胺基乙酸和 *L*-高胱氨酸是 CK-vs-DH、NK-vs-DH、YK-vs-DH 及 CK-vs-NK 共有的显著差异代谢物。



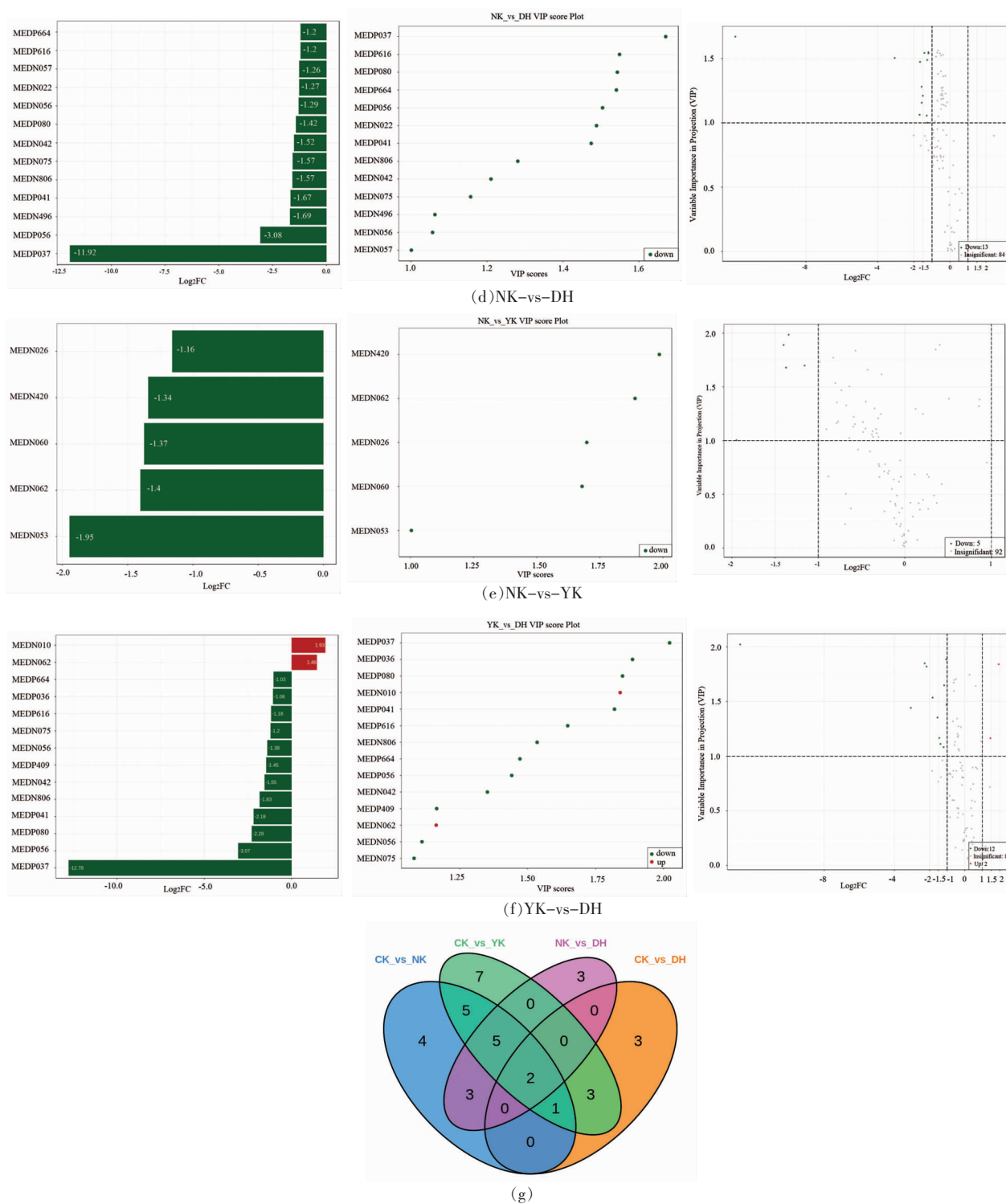


图 4 差异代谢物的条形图、VIP 值图、火山图、各组差异韦恩图

Fig.4 Bar chart of differential metabolites, VIP value chart of differential metabolites, Volcano chart of differential metabolites, Venn diagram of different groups

2.6 差异代谢物的统计分析

利用 UPLC-MS/MS 检测平台进行多元统计

分析, 检测出氨基酸及其衍生物代谢物 97 个, 组间对比筛选出有显著差异代谢物 39 种。

表1 差异代谢物数目统计表

Table 1 Statistical table of the number of differential metabolites

组别	总显著代谢物	上调代谢物	下调代谢物	组别	总显著代谢物	上调代谢物	下调代谢物
CK_vs_NK	20	1	19	NK_vs_DH	13	13	0
CK_vs_DH	9	9	0	NK_vs_YK	5	5	0
CK_vs_YK	23	10	13	YK_vs_DH	14	12	2

表2 差异代谢物筛选结果

Table 2 Screening results of differential metabolites

物质	CK-vs-DH	CK-vs-NK	CK-vs-YK	NK-vs-DH	NK-vs-YK	YK-vs-DH
3-羟基-3-甲基谷氨酸	down	down	down			
左旋肌肽	down		down			
α -酮戊二酸	down		down			
柠草酸	down					
延胡索酸	down					
3-N-甲基-L-组氨酸	down		down			
L-冬胺基乙酸-L-苯丙胺基乙酸	down	up	up	down		down
L-高胱氨酸	down	up	up	down		down
L-正亮氨酸	down					
L-色氨酸		up				
5-L-谷氨酰-L-丙氨酸		up	up	down		
N6-乙酰-L-赖氨酸		up	up			
N-乙酰基亮氨酸		up		down		down
N-乙酰-L-酪氨酸		up	up	down		
N-甘氨酸-L-亮氨酸		up	up			
N α -乙酰-L-精氨酸		up				
N-苯乙酰基-L-谷氨酰胺		up	up			down
γ -L-谷氨酸-L-半胱氨酸		up	up			
N-乙酰苯丙氨酸		up		down		down
琥珀酸		up	up			
马尿酸		up				
N-乙酰基蛋氨酸		up		down		
N-乙酰-L-谷氨酰胺		up	up	down		
D-丙氨酸-D-丙氨酸		up	up	down		down
茶氨酸		up				
S-腺苷蛋氨酸		up	up	down		down
甘氨酸			down			
L-瓜氨酸			down			up
N-乙酰天冬氨酸			down		down	
N-异戊酰氨基乙酸			down		down	
丙甘氨酸			down		down	up
1-甲基组氨酸			down			
5-氧化脯氨酸			up			down
L-天冬酰胺				down		down
N-乙酰-D-苯丙氨酸				down		down
L-酪氨酸甲酯				down		down
3-碘化酪氨酸					down	
N-乙酰基甘氨酸					down	
半胱氨酸甘氨酸						down

注:up. 代谢物上调;down. 代谢物下调。

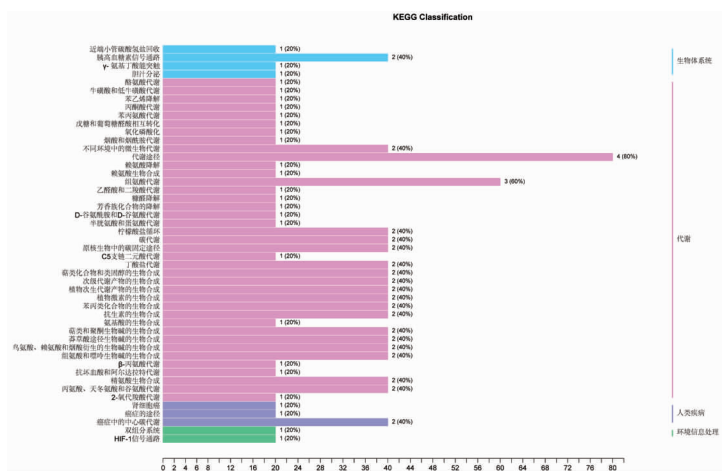
2.7 差异代谢物的富集分析与功能注释

KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库可以把基因信息表达和代谢物含量看成一个整体的网络。

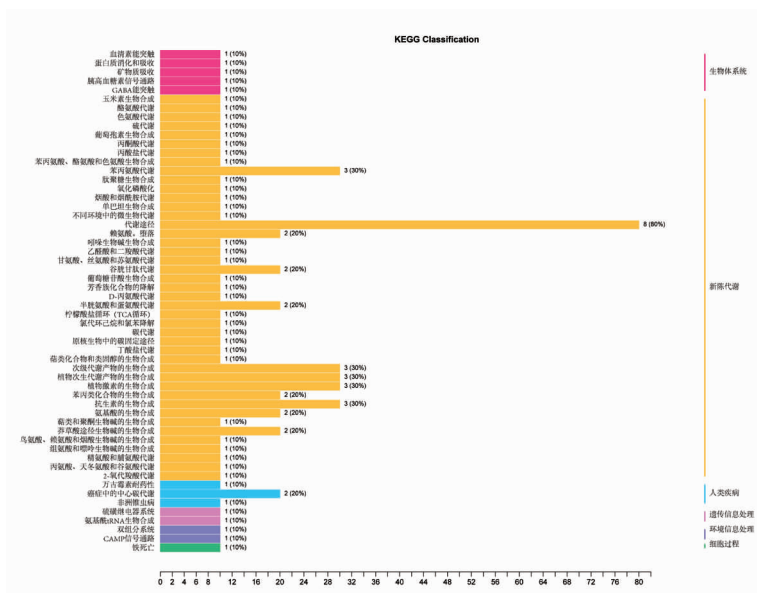
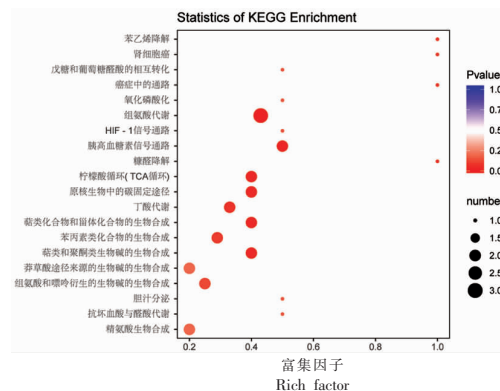
按照 KEGG 通路类型进行显著差异代谢物的分类绘图,同时进行 KEGG 通路的富集分析;其中 Rich factor 值越大,富集程度越大;P 值越接近 0,富集越显著。差异代谢物 KEGG 分类图中点的大小表示富集到相应通路上显著差异代谢物的个数。

CK-vs-DH 对比中的显著差异代谢物主要存

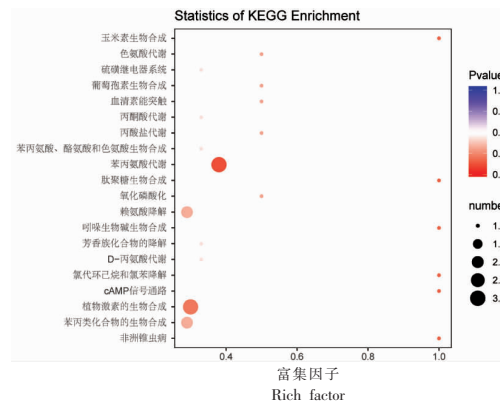
在的路径是组织系统、代谢、人类疾病、环境信息处理,代谢主要是组氨酸代谢,在该途径中的差异代谢物数量较多而且差异也相对显著,其余途径包括丁酸代谢、精氨酸生物合成、原核生物的碳固定途径、柠檬酸循环(TCA 循环)、胰高血糖素信号途径(图 5a);CK-vs-NK 的显著差异代谢物主要存在的路径是丙氨酸代谢途径(图 5b);CK-vs-YK 对比中显著差异代谢主要路径是赖氨酸降解(图 5c);NK-vs-DH 对比中氨基酸代谢路径是半胱氨酸和甲硫氨酸代谢(图 5d);其余两对比组差异代谢物较少,且差异很小(图 5e、5f)。

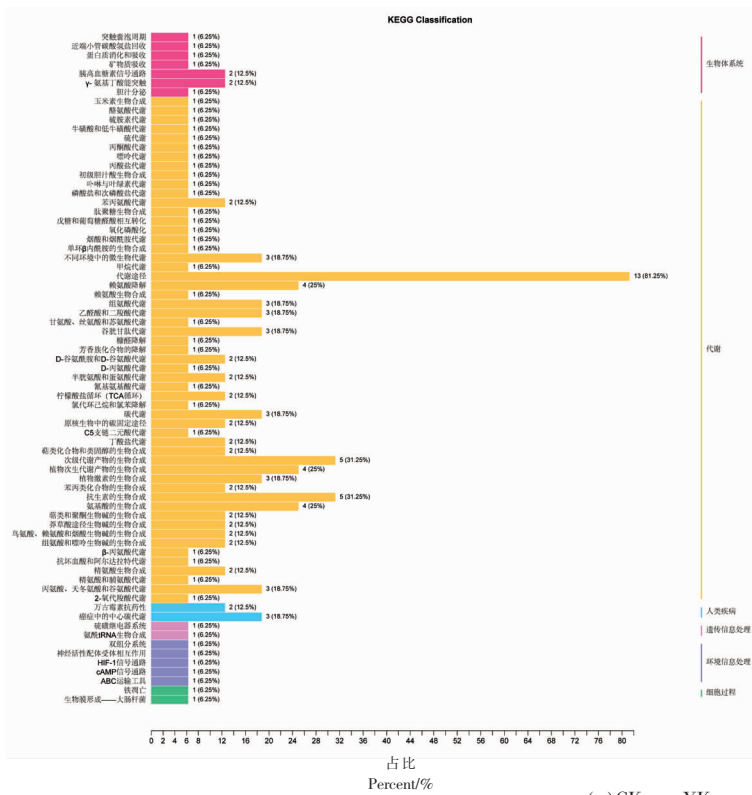


(a)CK-vs-DH

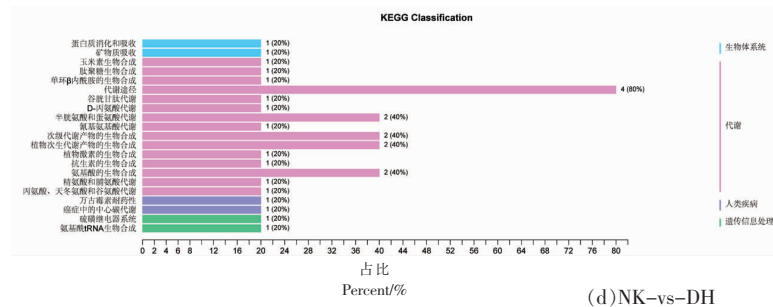
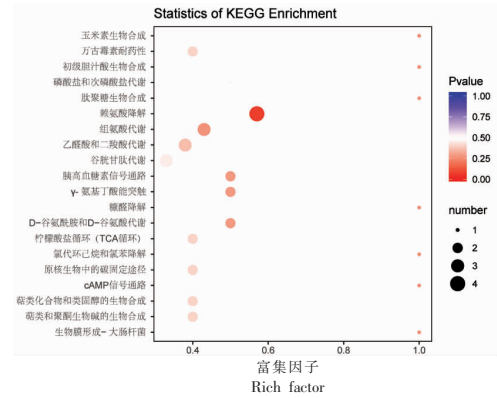


(b)CK-vs-NK

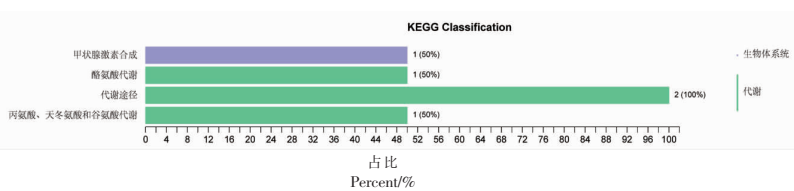
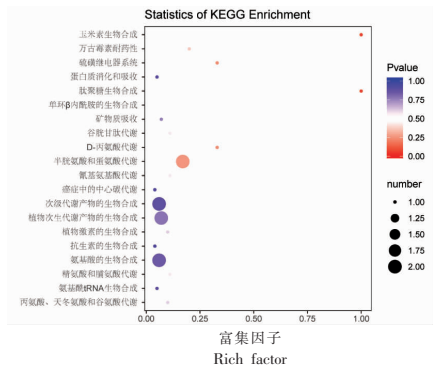




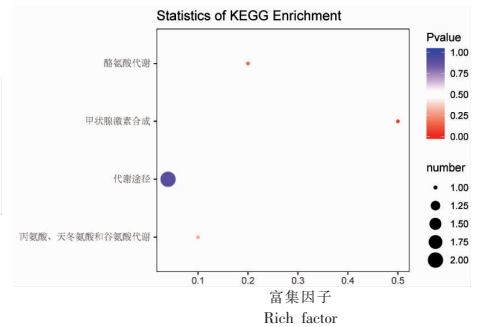
(c)CK-vs-YK



(d)NK-vs-DH



(e)NK-vs-YK



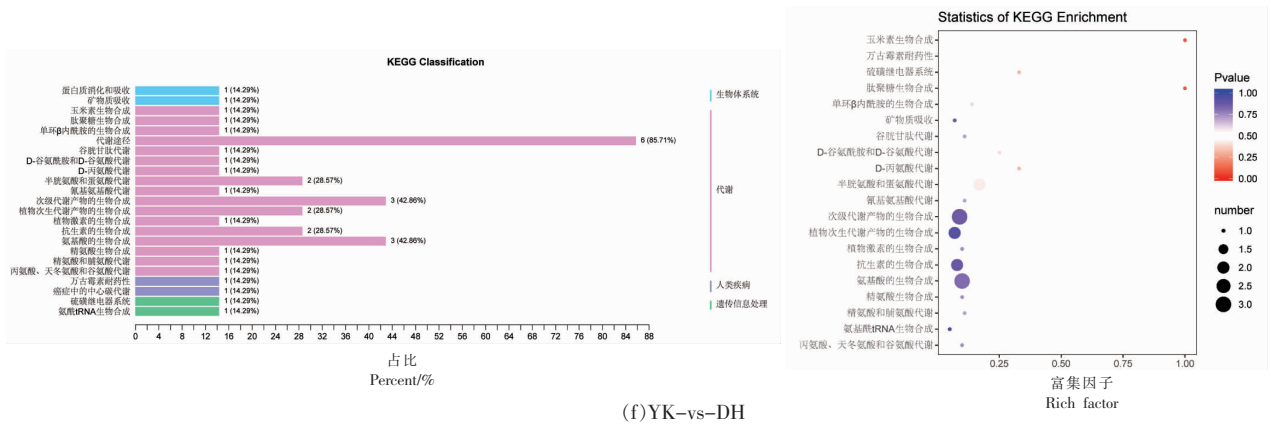


图 5 差异代谢物 KEGG 分类图(左)、差异代谢物 KEGG 富集图(右)
 Fig.5 Classification map of differential metabolite KEGG (left), enrichment map of differential metabolite KEGG (right)

通路归属分析是使找到的差异代谢物定位到相应代谢途径中,再根据差异物质找出组间有显著差异的代谢途径;差异代谢则在生物体内产生相互作用,从而形成了不同的通路。而在整个通路

中有多种酶催化复杂反应,在通路图中与其表达基因有关的酶,使用 KEGG 数据库标示相应酶的数字,再根据对比组之间差异,观察出代谢通路的差异表达,寻找研究对象中表型差异的原因。

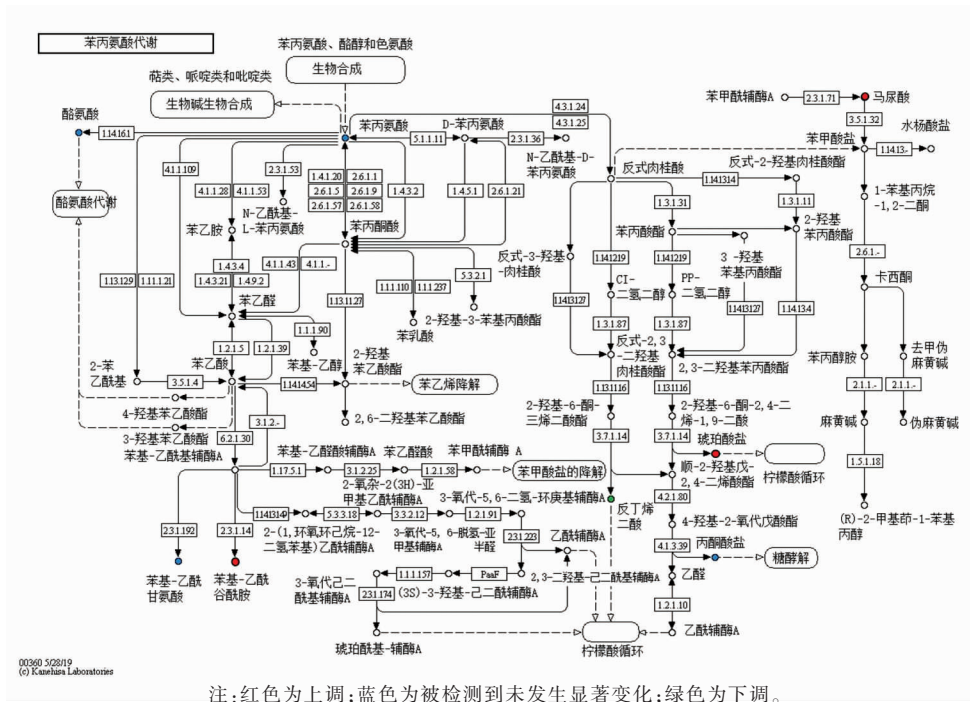


图 6 差异代谢物 KEGG 通路图
 Fig.6 Pathway of differential metabolite KEGG

3 讨论与结论

3.1 讨论

氨基酸及其衍生物是构成生物机体的活性大

分子,在肝脏中进行代谢制造出相关的酶和激素来维持和调节机体的新陈代谢。多个氨基酸和多个肽键(主要是在肽基转移酶等酶催化下形成肽

键)组合合成蛋白质,是一个很复杂的催化过程,有不止一个酶的参与。细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450)酶系统是机体重要的代谢酶,它参与了许多内源性和外源性物质的代谢,也是氨基酸代谢中重要的催化酶^[21]。马尿酸是连续性静脉-静脉血液透析滤过(CVVHDF)治疗中含量上升的一种氨基酸,可改善氨基酸代谢等过程,维持机体代谢平衡^[22];在本实验条件中,于CK-vs-NK中发现马尿酸呈上调,即NK组里抑制了马尿酸的表达,可能就使机体不能正常维持代谢平衡,导致高脂现象出现。吕艳秋等^[23]研究延胡索酸可以使体外培养中的丙酸和总挥发性脂肪酸的含量提高,降低其乳酸的沉积量,从而减少脂肪的积累。许婷^[24]研究了大肠杆菌中,通过扩增延胡索酸还原酶(FRD)基因,从而增大了延胡索酸转化为琥珀酸这一代谢途径上的通量,从而减少脂肪的积累。在该试验中,空白对照组与模型对照组和阳性对照组对比下,琥珀酸皆呈上调趋势,说明在模型对照组和阳性对照组处理中,可能是通过抑制琥珀酸的表达,使得脂肪累积引起高脂;而空白对照组与复合茶组对比中,延胡索酸是下调的,即可能是复合茶通过诱导延胡索酸的表达,及促进转化为琥珀酸来减少脂肪,起到降脂的作用。李晓斌等^[20]研究L-瓜氨酸通过增加放线、软壁、拟杆菌门及疣微菌门的丰度来改变小鼠盲肠门水平菌群组成,从而增加小鼠的末重、总增重及平均日增重,可能会出现高脂现象。在本研究的阳性对照与复合茶对比组中,L-瓜氨酸表现出上调,说明复合茶可能是通过抑制了生成L-瓜氨酸基因的表达,有效控制其增重,即血脂康处理的减脂效果可能不如该复合茶。这些结论说明氨基酸及其衍生物代谢可以调节高脂血症,然而其机理还需进一步研究论证。

本实验受试样品是由都匀古树绿茶、都匀阔叶苦丁、都匀原树甜茶、金银花、荷叶、野薄荷配制而成的复合茶。苦丁茶能够降低肝脏中脂肪合成和积累相关基因(FAS、SREBP-1c、PPAR γ 和LXR α)的表达,促进脂代谢相关基因(CPT-1和PPAR α)的表达,可以降低小鼠肝脏的质量以及血清中总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL-C)的浓度,具有一定减脂的作用^[25]。甜茶提取物中发现的

主要化合物是没食子酸、鞣花酸,通过维持胰岛素敏感性,有助于防止肥胖症和2型糖尿病等代谢性疾病的早期发作^[26]。金银花提取物可显著降低血清中前载脂蛋白B(apo-B)、INS水平以及蛋黄中TG、TC、LDL/HDL含量,显著提高血清中超氧化物歧化酶(SOD)水平($P<0.05$)^[27]。荷叶中的主要活性成分为荷叶碱,是一种具有调节血脂和治疗肥胖相关疾病的阿朴啡类生物碱,它对细胞色素P450酶活性有抑制作用,且对转运体P-糖蛋白(P-gp)功能具有抑制效果^[28]。小鼠肝脏中氨基酸代谢可能受到这些物质的某些积极刺激或抑制相应的表达,达到减脂作用。

3.2 结论

本研究通过高脂饮食建立高脂小鼠模型,随机分组饲养30d后杀死并取出肝脏,检验分析氨基酸及其衍生物代谢情况。首先观察样品总离子流图说明机器运行比较稳定可靠,证明测得的数据结果真实可信;再经PCA分析、OPLS-DA模型分析、差异代谢物筛选及其通路分析;最后发现各对比组之间氨基酸及其衍生物代谢对高脂血症小鼠的治疗效果各有不同。经分析CK-vs-DH,CK-vs-NK,CK-vs-YK,NK-vs-DH,NK-vs-YK以及YK-vs-DH 6个对比组,比较组内和组间对高脂血症小鼠肝脏的影响发现:1)该复合茶可能通过促进马尿酸、延胡索酸、琥珀酸等氨基酸代谢物生产,来减少脂肪和抑制L-瓜氨酸等氨基酸代谢物产生来控制其增重,达到降脂作用;2)本实验所用的复合茶与血脂康减脂效果相比更加明显;3)丙甘氨酸与L-瓜氨酸的降脂功效可能相仿,尚不明确,还需进一步研究。

4 展望

基于代谢组学技术探讨复合茶中氨基酸及其氨基酸衍生物代谢对小鼠肝脏代谢的影响,以及探索复合茶中氨基酸及其氨基酸衍生物的降脂机理,为该复合茶的开发和利用提供一定参考。同时研究发现,氨基酸及其衍生物代谢可能是预防和治疗高脂血症、肥胖、肠道菌群紊乱、脂肪组织和肝脏的慢性炎症、动脉粥样硬化、糖尿病、中枢神经系统退行性病变、非酒精性脂肪肝、骨关节炎、心血管等疾病以及某些相似癌症的新途径。

参 考 文 献

- [1] 杨凤啸, 卢敏莹. 高脂饮食诱发小鼠肥胖及其对肠道菌群结构影响的研究[J]. 现代医院, 2017(6): 863-866.
YANG F X, LU M Y. Effects of high fat diet on mouse obesity and its effect on intestinal microflora structure[J]. Modern Hospital, 2017(6): 863-866.
- [2] 朱超霞, 陆颖理. 肠道菌群与肥胖及相关代谢性疾病关系的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(12): 1829-1833.
ZHU C X, LU Y L. Advances of relationships among gut microbiota, obesity, and metabolic diseases relevant to obesity [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2014, 34(12): 1829-1833.
- [3] 罗朵生, 李坤平, 朴胜华, 等. 高脂血症大鼠造模过程中血液代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016(1): 70-74.
LUO D S, LI K P, PU S H, et al. Study of blood metabolomics in rat hyperlipidemia model[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2016(1): 70-74.
- [4] 艾琴英, 吉燕华, 傅灵艳, 等. 黄连解毒汤干预高脂血症大小鼠肠道菌群研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(2): 112-116.
AI Q Y, JI Y H, FU L Y, et al. Advance on the research of gut microbiota in hyperlipidemia rats and mice intervened by Huanglian jiedu decoction [J]. Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 31(2): 112-116.
- [5] DANIEL A W, HELEN L, SUE T, et al. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance[J]. Cell Metabolism, 2016, 23(3): 413-426.
- [6] 李雯雯, 朱爱如, 龙怡静, 等. 高脂与维生素 D 缺乏饮食诱导的 2 型糖尿病小鼠血清和肝脏代谢组学研究[J]. 高等学校化学学报, 2018(11): 2395-2404.
LI W W, ZHU A R, LONG Y J, et al. Metabolomics study of serum and liver in type 2 diabetes mice induced by high fat diet with vitamin D deficiency[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2018(11): 2395-2404.
- [7] 李艳, 孙珂焕, 白芳, 等. 高脂血症相关疾病发病机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(4): 84-87.
LI Y, SUN K H, BAI F, et al. Research progress on pathogenic mechanism of hyperlipidemia-related diseases[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 21(4): 84-87.
- [8] STREBA L A M, VERE C C, ROGOVEANU I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: An open question[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(14): 4103-4110.
- [9] ZHENG J P, ZHU L, HU B F, et al. 1-Deoxynojirimycin improves high fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by restoring gut dysbiosis[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2019, 71: 16-26.
- [10] WANG L, ZENG B H, LIU Z W, et al. Green tea polyphenols modulate colonic microbiota diversity and lipid metabolism in high-fat diet treated HFA mice[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(3): 864-873.
- [11] 潘联云, 鹿颜, 龚雨顺. 茶叶调节 SREBPs 的降脂作用[J]. 茶叶科学, 2018, 38(1): 102-111.
PAN L Y, LU Y, GONG Y S. The mechanism of the lipid-lowering effect of tea by regulating the SREBP[J]. Journal of Tea Science, 2018, 38(1): 102-111.
- [12] 姜玉芳, 吴远双, 宋玉竹, 等. 茶叶减肥降脂机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 353-357.
JIANG Y F, WU Y S, SONG Y Z, et al. Research progress on mechanism of reducing weight and lipid by tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(14): 353-357.
- [13] IKEDA I, HAMAMOTO R, UZU K, et al. Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69(5): 1049-1053.
- [14] 赵献云, 张辉, 何丽芬. 绿茶提取物对高脂血症大鼠的降脂和抗氧化作用[J]. 武警医学院学报, 2006(6): 574-575.
ZHAO X Y, ZHANG H, HE L F. Effects of green tea on blood lipid and antioxidation in rats[J]. Journal of Logistics University of PAP (Medical Sciences), 2006(6): 574-575.
- [15] 刘安军, 郭丹青, 刘慧慧, 等. 绿茶提取物的降血脂

- 及减肥作用研究[J]. 现代食品科技, 2012(6): 601-605.
- LIU A J, GUO D X, LIU H H, et al. Study of the anti-obesity function of green tea extracts for development of a hypolipidemic agents[J]. Modern Food Science & Technology, 2012(6): 601-605.
- [16] 侯艳, 肖蓉, 邵宛芳, 等. 普洱茶对高脂实验大鼠肝脏病理的影响[J]. 茶叶科学, 2010, 30(S1): 573-578.
- HOU Y, XIAO R, SHAO W F, et al. Effect of Pu-erh tea on liver pathology of high-fat rats[J]. Journal of Tea Science, 2010, 30(S1): 573-578.
- [17] 陈婷, 彭春秀, 龚加顺, 等. 普洱茶茶褐素对高脂血症大鼠血脂代谢的影响[J]. 中国食品学报, 2011, 11(1): 20-27.
- CHEN T, PENG C X, GONG J S, et al. Effect of theabrownin extracted from Pu-erh tea on the metabolism of blood lipid in hyperlipidemia rats[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(1): 20-27.
- [18] 段雪菲. 不同储存年限单丛茶的减肥作用及机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- DUAN X F. Study on weight loss effect and mechanism of Dancong tea with different storage years[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [19] 苗华. 基于代谢组学技术研究泽泻对高脂血症大鼠防治的生物化学作用机制[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2016(3): 397-402.
- MIAO H. Biochemical mechanism of *Alisma orientalis* on hyperlipidemia rats based on metabonomics technology[J]. Journal of Northwest University (Natural Science Edition), 2016(3): 397-402.
- [20] 李晓斌, 赵国栋, 邱昊日, 等. *L*-瓜氨酸对小鼠体重及肠道菌群多样性的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(9): 4235-4241.
- LI X B, ZHAO G D, QIU H R, et al. Effects of *L*-citrulline on body weight and intestinal flora diversity of mice[J]. Acta Zoologica Sinica, 2019, 31(9): 4235-4241.
- [21] 张莎莎. 细胞色素 P450 表氧化酶 2J2 基因过表达通过增加脂肪酸氧化改善小鼠高脂血症[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- ZHANG S S. Overexpression of cytochrome P450 eoxxygenase 2j2 gene improves hyperlipidemia in mice by increasing fatty acid oxidation [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2015.
- [22] 许云鹏. 血液净化治疗对多脏器衰竭犬血浆磷脂代谢与凋亡信号途径的影响及分子机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.
- XU Y P. Effect of blood purification on plasma phospholipid metabolism and apoptosis signaling pathway in dogs with multiple organ failure[D]. Urumchi: Xinjiang Medical University, 2018.
- [23] 吕艳秋, 韩圣忠, 李德允, 等. 日粮中添加不同水平延胡索酸对瘤胃内营养物质消化率的影响[J]. 吉林农业, 2019(18): 58.
- LV Y Q, HAN S Z, LI D Y, et al. Effects of dietary fumaric acid on rumen nutrient digestibility[J]. Jilin Agriculture, 2019(18): 58.
- [24] 许婷. 延胡索酸还原酶的扩增对大肠杆菌产琥珀酸的作用[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- XU T. Effect of fumarate reductase amplification on succinic acid production in *Escherichia coli* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007.
- [25] 谢旻皓. 苦丁茶二咖啡酰奎尼酸与肠道微生物的相互作用[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- XIE M H. Interaction between Kudingcha dicaffeoylquinic acid and intestinal microorganisms [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [26] ZHANG H, QI G L, ZENG Y H, et al. Chinese sweet leaf tea (*Rubus suavisissimus*) mitigates LPS-induced low-grade chronic inflammation and reduces the risk of metabolic disorders in a C57BL/6J mouse model[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(1): 138-146.
- [27] 龙彬. 金银花、蓝莓、葡萄籽提取物对蛋鸡生产性能、蛋品质、脂质代谢及免疫力的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- LONG B. Effects of honeysuckle, blueberry and grape seed extracts on production performance, egg quality, lipid metabolism and immunity of laying hens[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [28] 叶林虎. 荷叶代谢性药物相互作用及体内成分研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- YE L H. Study on metabolic drug interactions and components in lotus leaf[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014.

Studies on the Lipid-lowering Effect of Compound Tea Based on Amino Acid Metabolism

Zhou Caibi, Wen Zhirui, Zhao Yan, Mei Xin, Yang Zaibo*
(Qiannan Normal University for Nationalities, Duyun 558000, Guizhou)

Abstract In order to study the lipid-lowering effect of compound tea, the high-fat mice model was established by high-fat diet. Based on the method of UPLC-MS/MS detection platform, multivariate statistical analysis and self-built database, the difference degree of metabolism group among samples was studied. In this experiment, the normal model group (CK), high-fat diet group (NK) and compound tea group (DH) were set up, and the Xuezhikang capsule was used as the positive drug group (YK) to compare the effects of compound tea on the metabolism of amino acids in the liver of hyperlipidemic mice. The results showed that a total of 13 amino acid metabolites such as *L*-homocystine, *N*-acetylmethionine, *D*-alanyl-*D*-alanine, *S*-adenosylmethionine, *L*-asparagine and *L*-tyrosine methyl ester in the liver of mice induced by high-fat diet showed a downward trend, which were significantly enriched in the cysteine and methionine metabolism after the intervention of compound tea. Compared with the YK group, only five of amino acid metabolites such as *N*-acetylaspartate, *N*-isovaleric acid and alanine were significantly down-regulated after treatment of Xuezhikang. These findings indicated that compound tea had a certain regulatory effect on liver amino acid metabolites and pathways in hyperlipidemia mice, which effect was better than the positive drug Xuezhikang. The purpose of this study is to explore the mechanism of reducing lipid of amino acids and their derivatives in compound tea by using metabonomics technology, and to provide some reference for the development and utilization of compound tea.

Keywords amino acids; hyperlipidemia; tea; metabolome