

驼乳对小鼠急性酒精性肝损伤的干预作用

其布勒¹, 吉日木图^{1,2}, 明亮^{1,2*}

(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内蒙古骆驼研究院 内蒙古阿拉善 750306)

摘要 目的:探讨驼乳缓解小鼠急性酒精性肝损伤的作用机制。方法:将 ICR 小鼠随机分为正常组(NC)、模型组(ET)、驼乳组(CM)和驼乳干预组(ET+CM),通过测定肝组织(AST 和 ALT)和血清指标(TNF- α 、IL-10、IL-6 和 IL-1 β)来反映驼乳对肝脏的保护作用;基于转录组学探讨驼乳发挥保肝、护肝作用的机理。结果:与 ET 组相比,驼乳干预降低了酒精诱导的 AST、ALT、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平,增加了 IL-10 水平。对 4 组小鼠肝组织进行转录组测序,在 ET 组和 ET+CM 组中共检出 1 426 个差异表达基因(其中 673 个为上调基因,753 个为下调基因)。功能注释和富集分析结果显示,差异表达基因主要显著富集在 MAPK、Toll-like 和 NF- κ B 信号 3 条炎症通路。对 *CD14*、*TLR5*、*TLR9* 等 6 个代表性差异基因进行实时荧光定量 PCR 测定。结果显示,与模型组相比,驼乳干预后能显著降低 *CD14*、IL-1 β 、IL-6、*TLR5* 和 *TLR9* 表达量,显著升高 IL-10 的表达量,与转录组测序结果一致,验证了测序数据的准确性。研究结果为解析驼乳对酒精性肝损伤的分子机制奠定了良好的基础。

关键词 驼乳;酒精;肝损伤;转录组

文章编号 1009-7848(2023)06-0147-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.017

肝脏是人体最重要的代谢器官,也是酒精代谢的中心,超过 80%的摄入酒精在肝脏代谢^[1]。随着酒精消费的增加,酒精性肝病(ALD)的发病率越来越高,已成为一个严重的健康问题,引起了全世界的关注^[2]。根据肝损伤的严重程度,酒精性肝病包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化和酒精性肝癌^[3]。研究 ALD 的发病机制对治疗及干预病情的发展具有重大意义^[4]。

骆驼是荒漠地带的一种特有畜种,对荒凉、贫瘠、严酷的荒漠环境具有较强的适应能力,也造就了驼乳“沙漠白金”的美称;其营养成分独特,含有丰富的蛋白质、不饱和脂肪酸以及磷、钙、钾等矿物质元素和维生素 B、C、E 等营养成分,易于消化吸收,是有较高的营养价值和食疗保健作用的饮品^[5-8]。此外,驼乳还含有高水平的生物活性物质,如乳过氧化物酶、免疫球蛋白 G(IgG)、分泌性免疫球蛋白 A(SIgA)、乳铁蛋白、溶菌酶、胰岛素、类胰岛素生长因子等,使其具有优异的抗氧化和抗

菌活性^[9-10]。有研究表明,驼乳及其成分还具有其它潜在的功能特性,如抗致癌^[11-12]、抗糖尿病^[13]、抗高血压^[14]和肾保护潜力^[15-16]。

目前,驼乳的功用价值已引起世界各地研究人员的极大关注。为进一步探索驼乳对酒精所致肝损伤的改善作用,本研究以 ICR 小鼠建立急性酒精肝损伤的动物模型,通过给酒精性肝损伤小鼠灌胃驼乳,研究其对肝损伤的预防作用。采用比较转录组学技术探究驼乳对急性酒精性肝损伤的分子调控机制,旨在为利用驼乳开发保肝功能食品或膳食补充剂提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

清洁级(SPF)雄性 ICR 小鼠,由北京维通利华实验动物中心提供。

谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒,南京建成生物有限公司;总 RNA 提取试剂盒,Life Technologies 公司;反转录试剂盒, Thermo Fisher Scientific 公司;扩增试剂盒,Luna 公司;肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、白介素-1 β (IL-1 β)试剂盒,上海酶联生物有限公司。

收稿日期:2022-06-07

基金项目:国家重点研发计划项目(2020YFE0203300);高层次人才引进科研启动项目(NDYB2018-48)

第一作者:其布勒,女,硕士生

通信作者:明亮 E-mail: bmlimau@163.com

1.2 仪器与设备

酶标仪、荧光定量 PCR 仪, 美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及处理 实验小鼠经过 1 周适应性喂养后, 将其随机分为 4 组, 正常组(NC)、模型组(ET)、驼乳组(CM)、驼乳干预组(ET+CM), 每组 10 只。CM 和 ET+CM 组均按 6 g/kg 的剂量灌胃驼乳, NC 组和 ET 组给予同体积蒸馏水灌胃, 连续 14 d。于末次灌胃后禁食不禁水 6 h, 除 NC 组和 CM 组灌胃蒸馏水外, 其它 2 组均给予 50% 酒精(7.3 g/kg bw)。6 h 后, 眼眶取血, 3 000 r/min、4℃离心 20 min 取上清液, 分装贮于-80℃保存备用。然后, 颈椎脱臼处死小鼠, 迅速摘取肝脏组织, 置于-80℃保存备用。

1.3.2 冻干驼乳粉的制备 新鲜驼乳经 3 500 r/min 离心 40 min 脱脂, 然后进行真空冷冻干燥, 密封保存, 备用。试验开始后, 按 6 g/kg 灌胃计量, 以 CM 组和 ET+CM 组小鼠平均体重按照 m_0 计, 每次灌胃量 0.3 mL, 需要配制质量浓度为 $2m_0 \times 10^{-2}$ g/mL 脱脂驼乳粉溶液, 组内个体体质量为 m (g) 小鼠灌胃驼乳粉体积按照下列公式进行计算:

$$V = \frac{m}{m_0} \times 0.3 \quad (1)$$

1.3.3 肝组织中 ALT 和 AST 指标的测定 将 9 倍体积的生理盐水加入肝组织中, 并将肝组织在冰水浴中匀浆。将制备的匀浆在 4℃下以 3 000×g 离心 20 min, 取上清液进行测定。根据试剂盒方法测定肝组织中 ALT 和 AST 水平。

1.3.4 血清中 TNF- α 、IL-10、IL-6 和 IL-1 β 含量的测定 用离心管收集小鼠血清, 静置 2 h 后 3 000×g 离心 20 min, 取上清按照试剂盒方法测定 TNF- α 、IL-10、IL-6 和 IL-1 β 含量。

1.4 肝脏组织 RNA 提取及 cDNA 文库构建

根据试剂盒 (RNAiso Plus 试剂盒和 RNeasy Mini 试剂盒) 的操作流程提取小鼠肝组织总 RNA, 所得总 RNA 经 Agilent Bioanalyzer 2100 电泳质检合格后, 连接有 Oligo(dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA。然后将 mRNA 随机大段成短片为模板进行第一链和第二链 cDNA 的合成并使用

RNAClean XP Kit 和 RNase-Free DNase Set 纯化; 修复黏性末端为平末端并在 3' 末端加碱基 A 并加接头, 最后进行 PCR 扩增获得最终测序文库。由 Agilent 2100 确定文库大小后, 使用 Illumina HiSeq®平台对 cDNA 文库进行测序。测序部分由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.5 转录组数据处理及分析

为了得到高质量数据, 首先采用 fastx_toolkit_0.0.14 软件对原始数据 (Raw Reads) 进行质控。将质控后的原始数据 (clean data 或 Clean reads), 与参考基因组 (Mus musculus.GRCm38.p, http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index) 比对, 然后用 FPKM 法将影响计算基因表达的基因长度和测序量差异进行标准化处理, 使用 RSEM 计算各个样品的基因表达水平, 并用 edgeR 方法进行组间差异表达分析。根据差异基因检测结果, 对候选基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.6 实时荧光定量 PCR 验证相关差异基因

采用 TRIzol 法提取小鼠肝组织当中总 RNA, RNA 样品符合要求 ($OD_{260nm}/OD_{280nm}=1.8\sim 2.2$)。使用 Nanodrop 检测 RNA 纯度和浓度。采用 UEIris II RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒进行反转录, 产物 cDNA 稀释 10 倍用于 qPCR 模板。根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 说明书进行定量检测, 反应体系 20 μ L: cDNA 2 μ L, TB 溶液 10 μ L, 正/反向引物各 0.8 μ L, 无菌水 6.4 μ L, 将样品混合均匀于 96 孔板, 上机运行。其运行条件为: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。本研究所用引物基因序列由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列如表 1 所示。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的表达, 以 β -actin 为内参, 与正常组做比值, 根据样本 CT 值计算各基因相对表达量, 以溶解曲线判断 PCR 产物是否具有特异性。

1.7 数据统计与分析

本研究所有数据均以平均值 \pm 标准差表示, 并由 GraphPad prism 5.03 进行分析并绘图。所有组之间的比较采用单向方差分析 (ANOVA) 检验。根据 Bonferroni 事后检验计算出显著差异。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列(5'-3')
β -action	F:TTTACCAACTGGGACGACA
	R:GGGGTCTTGAAGGTCTCAAA
CD14	F:CCTAGTCGGATTCTATTTCGGAGCC
	R:AACTTGGAGGGTCGGGAACCTTG
IL-1 β	F:TTCATCTTTGAAGAAGAGCCCAT
	R:TCGGAGCCTGTAGTGCAGTT
IL-6	F:AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGAT
	R:GCACTAGCTTTGCCGAGTAGAT
IL-10	F:CCCTTTCATGGTGTCCCTTTTC
	R:GATCTCGGTTTCTCTTCCC
TLR9	F:TCCCAACATGGTTCTCCGTC
	R:GGTGGTGGATACGGTTGGAG
TLR5	F:AAGGACAAGTCTGGAGTTTGA
	R:GCCTGTTTCGGGAACCTGTAGTG

2 结果与分析

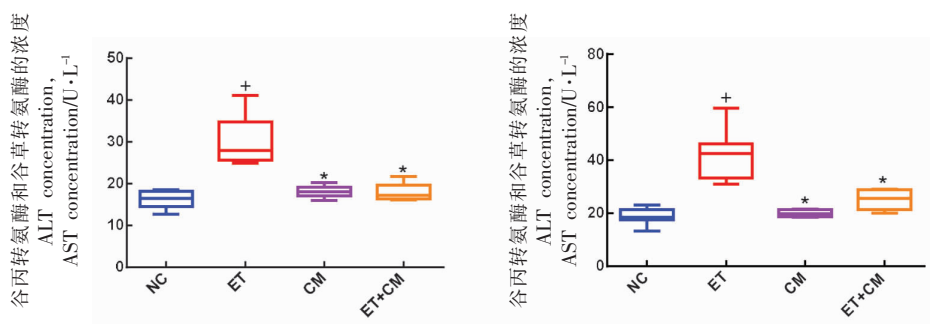
2.1 驼乳对肝损伤小鼠肝组织 AST 和 ALT 的影响

ALT 和 AST 是临床上常用的肝功能评价指标,其水平反映了肝细胞损伤程度。如图 1a、1b 所

示,与 NC 组相比,ET 组小鼠肝组织中的 AST 和 ALT 酶活力显著升高($P < 0.05$),说明 ALD 小鼠建模成功。与 ET 组相比,ET+CM 组的 AST 和 ALT 酶活力显著降低($P < 0.05$),表明驼乳不同程度的抑制了肝组织中该两种酶的活性,从而有效缓解酒精引起的肝损伤。此外,NC 与 CM 组之间没有显著统计学差异。

2.2 驼乳对急性酒精性肝损伤小鼠炎症反应的影响

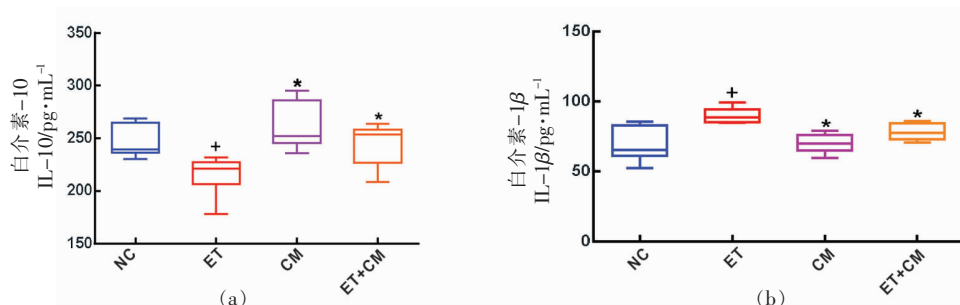
酒精进入机体后,激活 kuffer 细胞释放 IL-10、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子,导致炎症反应,从而加重酒精性肝损伤。为了评估驼乳的抗炎作用,测定了血清中 IL-10、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平。结果如图 2 所示,与 NC 组相比,ET 组的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高($P < 0.05$),IL-10 含量显著降低($P < 0.05$),表明酒精暴露可诱导小鼠肝细胞发生炎性损伤。与 ET 组相比,ET+CM 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著降低($P < 0.05$),IL-10 含量显著升高($P < 0.05$),表明驼乳会产生大量抗炎因子来抑制酒精诱导的炎症反应,从而改善急性酒精性肝损伤。



注:与正常组比,+ $P < 0.05$;与模型组比,* $P < 0.05$ 。NC:正常组,ET:模型组,CM:驼乳组,ET+CM:驼乳干预组。下同。

图 1 驼乳对肝损伤小鼠肝组织 AST 和 ALT 的影响

Fig.1 Effect of camel milk on AST and ALT of liver tissue in mice with liver injury



(a)

(b)

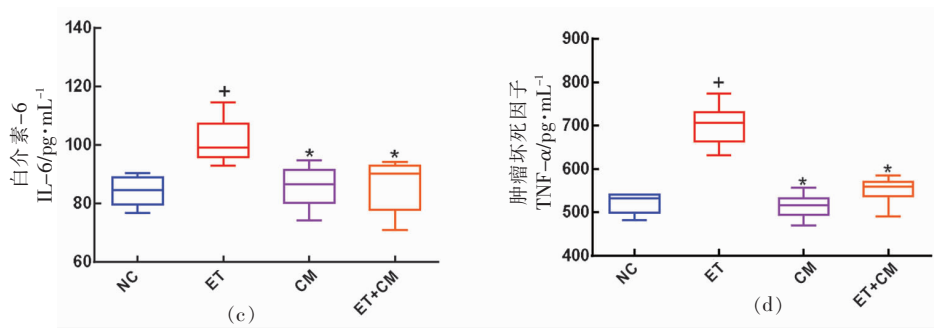


图2 驼乳对急性酒精性肝损伤小鼠炎症反应的影响

Fig.2 Effect of camel milk on inflammatory response in mice with acute alcoholic liver injury

2.3 转录组测序数据及比对分析

本测序的12个样本的质量和比对统计如表2所示,各样本测序共得到5160万条raw reads,然后进行过滤后共得到5124万clean reads。在获得的clean reads中,所有样本能定位

到基因组上的比率高于93%,然后在参考序列上有唯一比对率达到84%以上。测序结果表明,RNA测序数据的质量控制良好,可进行后续生物信息学分析。

表2 样本质量和比对结果

Table 2 Sample quality and comparison results

样品编号	原始序列的条数	质控后序列的条数	比对到参考基因组的总条数(比对率/%)	多位置比对到参考基因组的条数(比对率/%)	唯一比对到参考基因组的条数(比对率/%)
NC0003	53 158 234	52 769 514	50 241 731(95.21)	3 790 923(7.18)	46 450 808(88.03)
NC0011	47 853 612	47 503 894	45 418 129(95.61)	3 451 344(7.27)	41 966 785(88.34)
NC0042	45 408 822	45 115 058	42 763 184(94.79)	3 451 119(7.65)	39 312 065(87.14)
ET1003	57 071 766	56 661 952	53 999 904(95.3)	3 734 697(6.59)	50 265 207(88.71)
ET2004	49 313 288	49 006 700	46 525 930(94.94)	3 571 350(7.29)	42 954 580(87.65)
ET4300	49 387 320	49 007 954	46 470 017(94.82)	4 183 453(8.54)	42 286 564(86.29)
CM0101	58 129 778	57 743 976	54 461 925(94.32)	5 237 846(9.07)	49 224 079(85.25)
CM0401	51 677 078	51 231 174	47 919 217(93.54)	4 599 743(8.98)	43 319 474(84.56)
CM1104	56 807 720	56 421 186	53 211 782(94.31)	4 924 098(8.73)	48 287 684(85.58)
ET+CM_1010	49 667 004	49 320 738	46 799 846(94.89)	4 183 453(8.54)	42 656 242(86.49)
ET+CM_1200	58 416 548	58 055 776	54 979 128(94.7)	4 143 604(8.4)	50 036 077(86.19)
ET+CM_4020	50 724 196	61 004 538	47 675 793(94.62)	4 127 702(8.19)	52 199 216(85.57)

注:Raw Reads:统计原始序列数据的条数;Clean Reads:统计过滤后测序数据的条数;Total Mapped:能定位到基因组上的Clean Reads数;Multiple Mapped:在参考序列上有多个比对位置的Clean Reads数;Uniquely Mapped:在参考序列上有唯一比对位置的Clean Reads数。

2.4 驼乳干预下小鼠转录组基因表达的差异性分析

如图3所示,NC组共检测出10929个基因,ET组测出11170个基因,CM组11026个基因,ET+CM组10750个基因。

采用edgeR对差异基因进行筛选,筛选条件为差异倍数(log2 fold change)>1,P<0.05。结果如

图4所示,NC组与ET组相比,共检测出4105个差异基因,其中2250个基因上调,1855个基因下调。ET组与ET+CM组相比,筛选到1426个基因,其中673个基因上调,753个基因下调。NC组与ET+CM组相比,共检测出3958个差异基因,其中1748个基因上调,2210个基因下调。NC组与CM组相比较,共检测出2368个差异基因,其

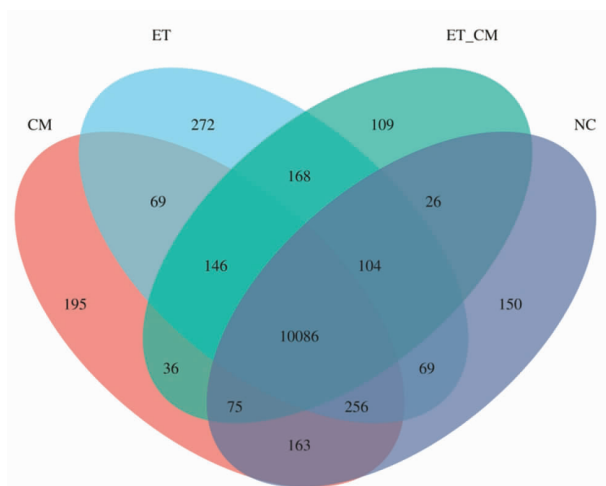


图 3 基因量化维恩图

Fig.3 Gene quantification Venn diagram

中 891 个基因上调,1 477 个基因下调。

2.5 驼乳干预下小鼠转录组差异表达基因的功能分析

为了进一步了解差异表达基因的功能,确定其在分子水平上的作用,针对差异表达基因进行功能分析,发现各功能的基因注释数目有明显差异。结果如图 5 所示,在生物过程中,NC 与 ET 组和 ET+CM 与 ET 组差异基因注释到细胞过程的最多,分别为 2 986、973 条。在细胞组分中,注释到细胞部分的最多,分别为 3 435、1 148 条。在分子功能中,注释到结合的基因最多,分别为 3 049、1 053 条。进一步进行 GO 富集分析,发现 NC 组与 ET 组的差异基因主要参与炎症反应、脂质代谢、氧化应激、脂多糖反应等生物学过程。ET 组和 ET+CM 组的差异表达基因主要参与炎症反应、脂多糖反应、含氧化合物的反应、细胞因子的反应、脂质代谢过程、白细胞迁移等生物学过程,结果如表 3 所示。

进一步,将差异表达基因进行了 KEGG 功能富集分析。NC 与 ET 组的差异基因显著富集在 MAPK 信号通路(92 个差异基因)、Insulin resistance(44 个差异基因)、AMPK 信号通路(44 个差异基因)、Pathways in cancer(146 个差异基因)等。ET 与 ET+CM 组差异基因显著富集在 MAPK 信号通路(24 个差异基因)、Oxidative phosphorylation(22 个差异基因)、NF- κ B 信号通路(14 个差

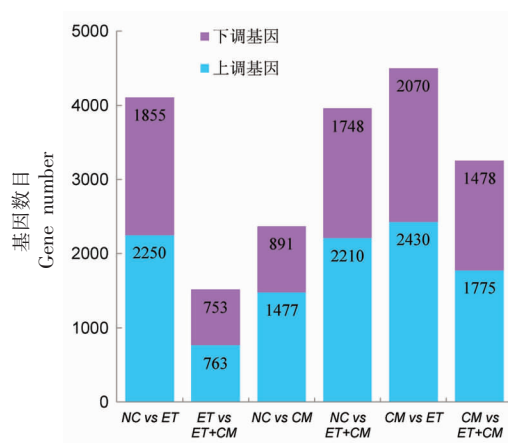


图 4 两组间差异基因表达统计图

Fig.4 Statistical graph of differential gene expression between the two groups

异基因)、Toll-like(11 个差异基因)等。下面主要对 ET 与 ET+CM 组富集在 MAPK、Toll-like 和 NF- κ B 通路上的差异基因进行分析,找出驼乳干预急性酒精性肝损伤的关键基因。

在 MAPK 信号通路中,低表达的白细胞分化抗原 14(CD14)基因表明了驼乳参与了 ALD 小鼠的免疫应答,低表达的 *IL-1R1*、*TNFR1* 基因表明了驼乳调节 ALD 小鼠的炎症因子,低表达的 *ERK1/2*、*JIP3*、*TGF β* 、*TGFBR*、*ATF-2*、*PIK3R1* 基因表明了驼乳通过抑制细胞分化或凋亡从而调控 ALD 小鼠的免疫应答。

在 Toll-like 信号通路中,低表达的 *IL-1R1*、*IL-6*、*TNFR1*、*TLR5* 和 *TLR9* 基因表明了驼乳产生大量抗炎因子从而抑制 ALD 小鼠的炎症反应,低表达的 CD14 基因表明了驼乳参与了 ALD 小鼠的免疫调节,*ERK1/2* 和 *PIK3R1* 基因表明了驼乳通过抑制细胞分化或凋亡从而调控 ALD 小鼠的免疫应答。

在 NF- κ B 信号通路中,低表达的 *CXCL1*、*IL-1R1*、*TNFR1* 表明了驼乳调节 ALD 小鼠的炎症因子,*Bcl2ald* 基因表明了驼乳通过抑制细胞分化或凋亡从而调控 ALD 小鼠的免疫应答。

2.6 转录组差异表达基因的验证

为了验证转录组测序的准确性以及确定驼乳对酒精性肝损伤的保护作用是否与 MAPK、Toll-like 和 NF- κ B 炎症通路相关,选取 CD14、TLR5、

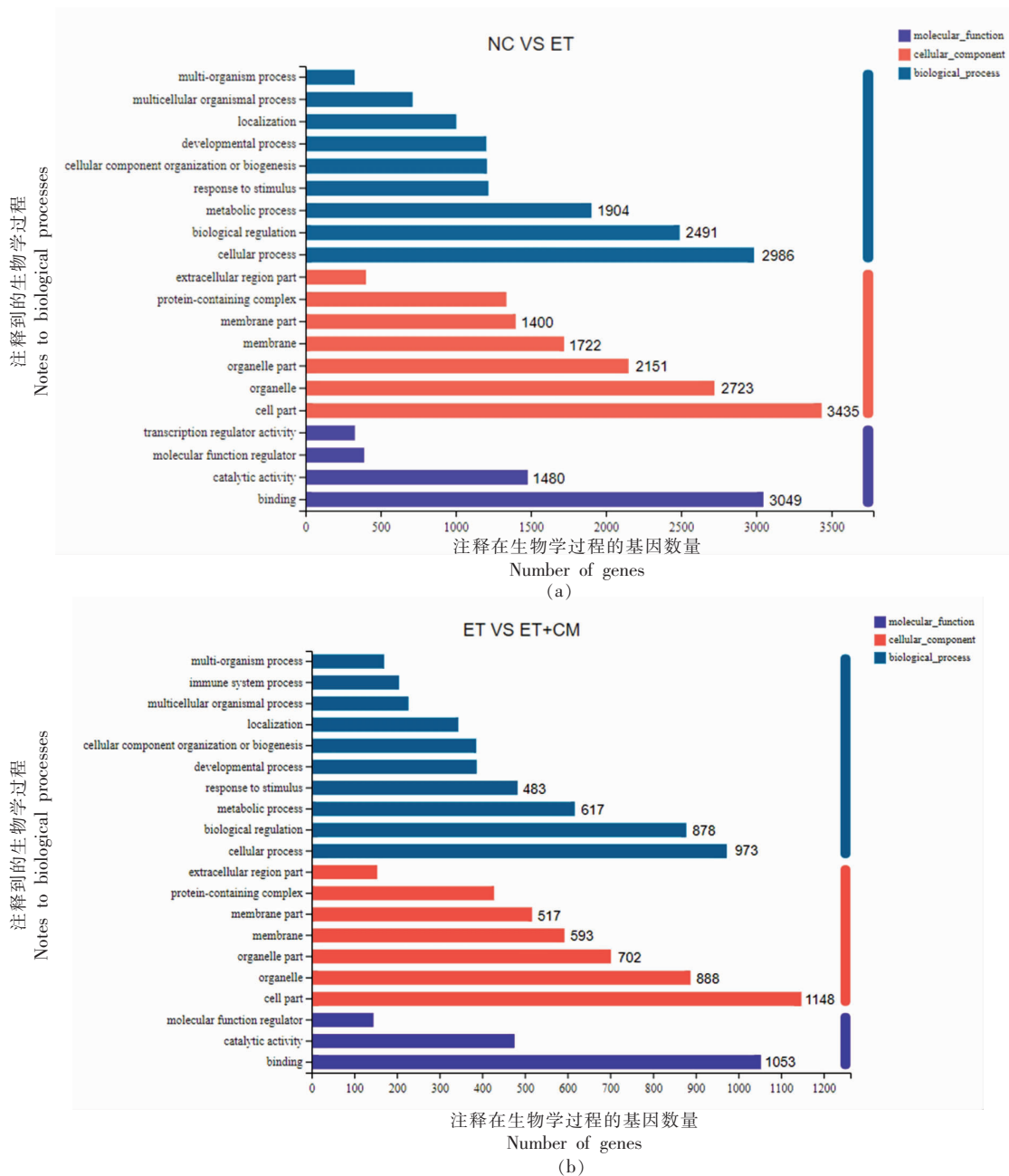


图5 组间 GO 注释图

Fig.5 GO annotation diagram between groups

表3 ET组与ET+CM组差异基因GO富集分析

Table 3 Significant terms of GO analysis for ET vs ET+CM differential gene

名称	GO 编码	基因数量	P 值	校正后的 P 值
脂质代谢过程	GO:0006629	92	0.0000481234	0.0026032285
含氧化合物的反应	GO:1901700	165	0.0000044252	0.00049247704
细胞因子反应	GO:0034097	92	0.00000481572	0.00049617701
肽的反应	GO:1901652	48	0.0001534938	0.0068037999
脂多糖的反应	GO:0032496	44	0.0000245479	0.0014903749
炎症反应	GO:0006954	37	0.0047089792	0.0995338681
白细胞的转移	GO:0050900	19	0.0076484410	0.0136008773

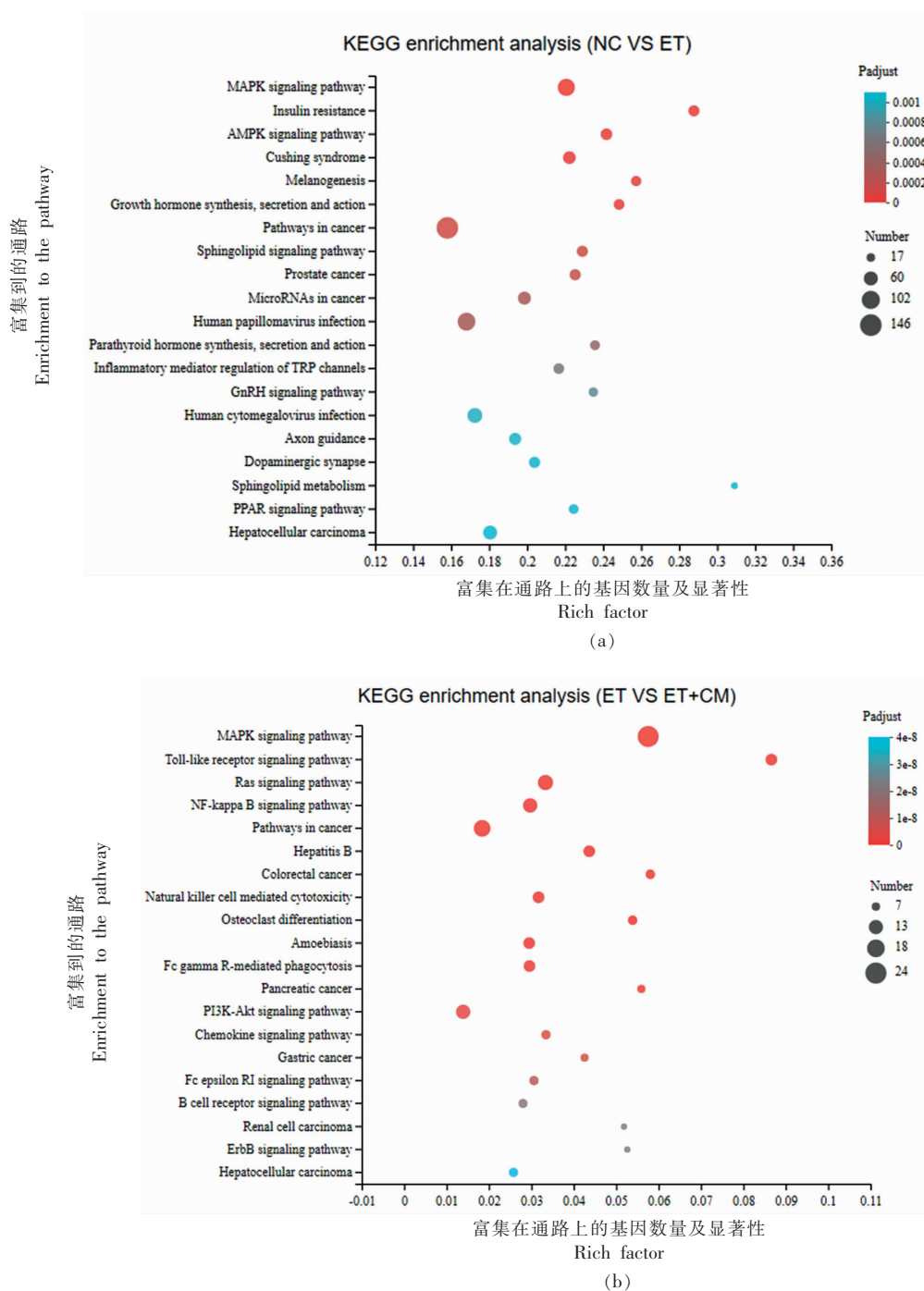


图 6 差异基因 KEGG 富集分析结果

Fig.6 Differential gene KEGG enrichment analysis results

TLR9 等 6 个代表性差异基因进行了实时荧光定量 PCR 测定。结果如图 7 所示,与 NC 组相比,ET 组的 CD14、IL-1 β 、IL-6、TLR5 和 TLR9 表达量显著上升 ($P < 0.05$), IL-10 表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与 ET 组相比,ET+CM 组的 CD14、IL-1 β 、

IL-6、TLR5 和 TLR9 表达量显著降低 ($P < 0.05$), IL-10 表达量显著升高 ($P < 0.05$)。说明驼乳通过调控 MAPK、Toll-like 和 NF- κ B 通路上的基因,缓解急性酒精性肝损伤。

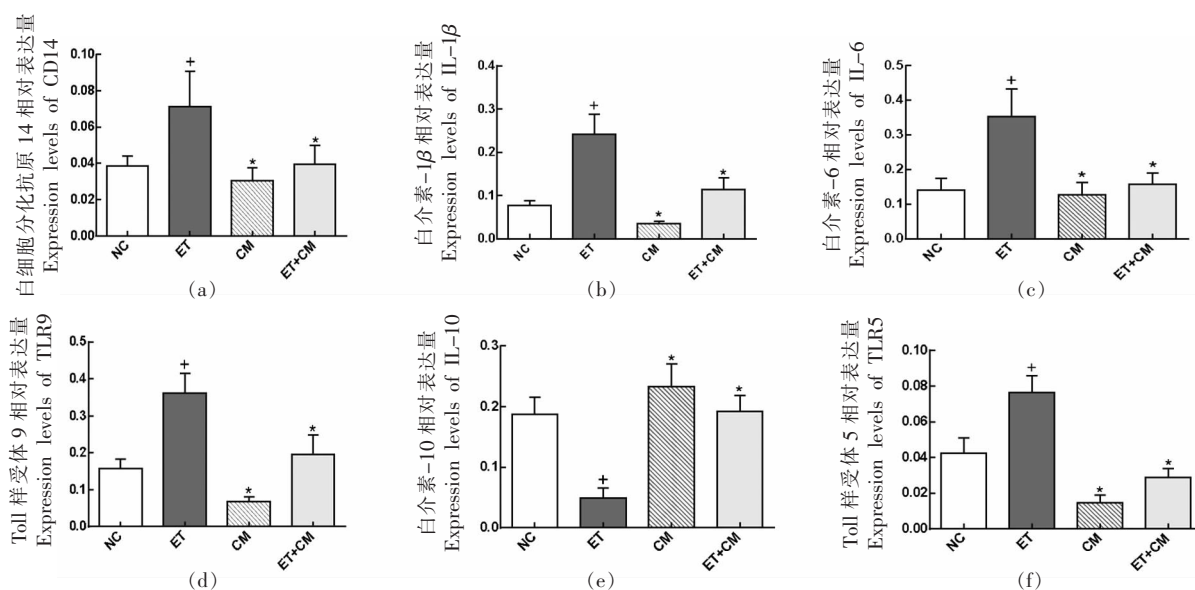


图7 差异基因表达量

Fig.7 Differential gene expression

3 讨论

肝脏是人体最重要的代谢器官,通过吞噬和解毒功能对机体起保护作用。摄入大量酒精会导致肝脏出现一系列损害性病变。如何安全有效的预防和治疗酒精性肝病已成为各国科研人员的研究热点。大量研究表明,ALD的发病机制与乙醇及其代谢物对肝脏的毒性、脂质代谢紊乱、氧化应激、炎症介质、免疫反应等多种因素有关^[17-18]。此外,酒精诱导的肝损伤发生在多个层面,从先天免疫细胞到肝实质细胞、肝细胞,该过程需要多条肝细胞信号通路的相互作用^[19]。ALT和AST是评估肝细胞损伤的重要指标之一,通过测定肝组织中ALT和AST活性可以判断肝损伤程度。炎症反应是导致酒精性肝损伤的典型病理机制。IL-10是一种抗炎和免疫抑制细胞因子,TNF- α 是一种促炎细胞因子,主要由巨噬细胞和单核细胞产生,参与炎症和免疫反应过程。IL-6是一种同时促进炎症和肝再生的多效性细胞因子,主要调节抗凋亡基因转录和肝再生。IL-1 β 通过诱导中性粒细胞趋化因子,加重炎症反应。因此,通过测定血清IL-10、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平综合分析肝脏因炎症反应发生的损伤程度。结果表明,驼乳不仅可以显著降低肝组织中AST和ALT水平,还可以显著降低血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平,提高IL-10

水平。表明驼乳能够抑制酒精引发的炎症反应,发挥对肝脏的保护作用。

基于生化指标测定结果,进一步研究驼乳改善酒精性肝损伤的作用机制,对各组小鼠肝组织进行转录组测序,NC与ET组共获得4105个差异基因,ET与ET+CM组共获得1426个差异基因,挑选6个差异基因经实时荧光定量PCR验证,结果与测序结果表达一致,说明了本次测序结果准确可靠。在差异表达基因的GO富集分析中发现,ET与ET+CM组大多数差异基因显著富集到免疫炎症相关的功能上,如基因*CXCL1*和*CD14*分别富集到GO term的免疫应答和细胞对脂多糖的反应,且共同富集到炎症反应。

在KEGG富集分析中,ET与ET+CM组差异基因显著富集到MAPK、Toll-like、NF- κ B信号等免疫炎症相关的信号通路。已有的研究表明,Toll-like信号通路与MAPK信号通路和NF- κ B信号通路密切相关,通过抑制Toll-like信号通路,可以进一步抑制MAPK信号通路和NF- κ B信号通路,从而缓解酒精引发的一系列病理反应,发挥对肝脏的保护作用^[20]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)在细胞凋亡和炎症因子信号传递过程中起着重要的作用。主要包含细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)和p38 MAPK这3条途

径^[22]。本研究结果显示,在 ET 组中起到信号传导作用的基因 ERK 表达显著上调,效应因子 TNF-R1、JIP3、ATF-2 和 TGF- β 基因表达上调,而经驼乳预处理后均显著下调。MAPK1 (ERK2) 和 MAPK3 (ERK1) 是与细胞增殖、转化、分化相关的 MAPK^[22]。MAPK 被酒精刺激后可释放炎症因子 TNF- α , 进而加剧炎症反应^[23]。TNF-R1 作为 TNF- α 受体,与 TNF- α 结合经一系列反应形成多种复合物激活 JNK^[24-25],被激活的 JNK 靶向 JIP3 (JNK 信号通路上的支架蛋白)、ATF-2 参与 Toll-like 受体 (TLR) 的调控,TLR 识别炎症细胞因子,发生炎症反应^[26]。本研究中,驼乳降低了酒精引发的 TNF-R1、JIP3 和 ATF-2 的高表达。研究表明,敲除 JIP3 基因可降低氧化应激和炎症反应,从而改善 NAFLD 小鼠肝损伤^[26]。此外,Stebbins 等^[27]发现通过抑制 JNK-JIP 位点以剂量依赖性方式抑制 JNK 底物的磷酸化,从而阻断肝损伤。Deng 等^[28]研究表明,JNK 基因敲除降低了 HCC 细胞在体外的侵袭和淋巴黏附能力,同时在基因和蛋白质水平下调了 ATF-2 的表达,认为 ATF-2 是肝癌预后的潜在标志物。由此可知,驼乳通过调控 MAPK 信号通路,改善酒精引发的炎症反应以及肝细胞凋亡和损伤。

近期研究表明,除 TLR3 和 IL-1 受体外,所有 TLR 均以 MyD88 作为衔接分子,激活 NF- κ B 和 MAPK 通路^[29]。本研究结果显示,摄入酒精使 Toll-like (CD14、TLR5、TLR9、ERK1/2、PIK3R1) 和 NF- κ B 信号通路 (CXCL1、TNFR1、IL-1R1、Bcl2a1) 基因的显著上调,而在 ET+CM 组中均显著下调。此外,本研究 PCR 结果表明驼乳干预显著降低 CD14、TLR5、TLR9 的表达。据文献报道,TLR9 信号的激活可诱导肝细胞产生 CXC 趋化因子配体 1 (CXCL1),从而诱导中性粒细胞进入肝脏^[30]。CXCL1 是炎症趋化因子,可促进炎症因子释放并加重炎症反应^[31]。在免疫相关的差异基因中,我们还关注到重要的促炎因子 IL-6,它与可溶性 IL-6 受体结合,然后与膜受体 b 链 gp130 结合,激活 PI3K/Akt 通路。而 PIK3R1 是 PI3K 的调节亚基,所以驼乳通过抑制炎症因子 IL-6 的产生间接抑制 PIK3R1 的表达。赵宏等^[32]发现巴亚格七味散可通过抑制 PIK3R1 表达,来减轻酒精性肝病模型

小鼠肝组织损伤。还发现肝癌中 PIK3R1 表达显著上调,沉默 PIK3R1 可抑制 HCC 细胞系增殖、迁移并加速凋亡^[33]。IL-1 家族是一个重要的促炎因子家族,可导致炎症并与急性和慢性炎症密切相关。IL1R1 作为 IL-1 的受体,能够介导 IL-1 的级联反应,激活 JNK/c-Jun 和 NF- κ B p65 信号通路并加重炎症反应程度^[34]。研究表明,肝细胞中缺失 IL-1R1 可保护小鼠免受急性肝衰竭,降低肝脏炎症细胞因子和趋化因子水平,以及减轻中性粒细胞因损伤而渗入肝脏^[35]。本研究结果如上所述,驼乳能够调控 Toll-like 和 NF- κ B 信号通路抑制酒精诱导的细胞凋亡和肝脏炎症反应,从而保护肝脏免受酒精的损伤。

4 结论

本研究表明,驼乳能够有效降低肝脏中 AST、ALT 的酶活力并可以降低血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平,提高 IL-10 水平。然后通过生物信息学分析,发掘出驼乳干预急性酒精性肝损伤的显著差异表达基因和重要的免疫炎症信号通路以及免疫应答关键基因,为预防酒精性肝损伤研究提供了新的视角,为进一步研发保肝护肝功能性食品奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] STORNETTA A, GUIDOLIN V, BALBO S. Alcohol-derived acetaldehyde exposure in the oral cavity [J]. *Cancers*, 2018, 10(1): 20.
- [2] SEITZ H K, BATALLER R, CORTEZ-PINTO H, et al. Alcoholic liver disease [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4(1): 16.
- [3] GUAN M J, ZHAO N, XIE K Q, et al. Hepatoprotective effects of garlic against ethanol-induced liver injury: a mini-review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 111(5): 467-473.
- [4] GAO B, BATALLER R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2011, 141(5): 1572-1585.
- [5] 蔡树东, 黄浩, 阿里甫·努肉力, 等. 骆驼乳对疾病辅助治疗作用研究进展 [J]. *中国草食动物科学*, 2019, 39(6): 52-55.

- CAI S D, HUANG H, ALIFU · NURULI, et al. Research progress of camel milk in adjuvant treatment of diseases [J]. *Chinese Herbivore Science*, 2019, 39(6): 52–55.
- [6] GADER A G, ALHAIDER A A. The unique medicinal properties of camel products: A review of the scientific evidence[J]. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 2016, 11(2): 98–103.
- [7] MULLAICHARAM A R. A review on medicinal properties of camel milk[J]. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 2(3): 237–242.
- [8] KONUSPAYEVA G, FAYE B, LOISEAU G. The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data[J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2009, 22(2): 95–101.
- [9] HAJ O, KANHAL H. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk[J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(12): 811–821.
- [10] 陆东林, 徐敏, 李景芳, 等. 双峰驼乳的化学成分和营养价值[J]. *新疆畜牧业*, 2019, 34(5): 4–12.
- LU D L, XU M, LI J F, et al. The chemical composition and nutritional value of bactrian camel milk[J]. *Xinjiang Animal Husbandry*, 2019, 34(5): 4–12.
- [11] MAGJEED N A. Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1[J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2005, 9(2): 253–263.
- [12] HABIB H M, IBRAHIM W H, SCHNEIDER-STOCK R, et al. Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(1): 148–152.
- [13] AGRAWAL R P, SARAN S, SHARMA P, et al. Effect of camel milk on residual β -cell function in recent onset type 1 diabetes [J]. *Diabetes Research and Clinical Practices*, 2007, 77(3): 494–495.
- [14] QUAN S, TSUDA H, MIYAMOTO, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in inner Mongolia, China [J]. *Journal Science of Food Agriculture*, 2008, 88(15): 2688–2692.
- [15] ARAB H H, EID A H, GAD A M, et al. Inhibition of oxidative stress and apoptosis by camel milk mitigates cyclosporine induced nephrotoxicity: Targeting Nrf2/HO and AKT/eNOS/NO pathways[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(6): 3177–3190.
- [16] ARAB H H, ASHOUR A M, ALQARNI A M, et al. Camel milk mitigates cyclosporine-induced renal damage in rats: Targeting p38/ERK/JNK MAPKs, NF- κ B, and matrix metalloproteinases [J]. *Biology*, 2021, 10(5): 442.
- [17] LIU X, HOU R L, YAN J J, et al. Purification and characterization of *Inonotus hispidus* exopolysaccharide and its protective effect on acute alcoholic liver injury in mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129(15): 41–49.
- [18] PARK K M, PARK Y N, KWON O Y, et al. Orally administration of *neotenus lepidus* extracts attenuated ethanol induced accumulation of hepatic lipid in mice [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(1): 243–251.
- [19] 王凤华, 韩吉春, 李德芳, 等. 霍山石斛水提取物通过介导 NF- κ B/p65 和 p38 MAPK 减轻小鼠酒精性肝损伤 [J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(4): 569–574.
- WANG F H, HAN J C, LI D F, et al. Water extract of *dendrobium huoshanense* reduces alcoholic liver injury in mice by mediating NF- κ B/p65 and p38 MAPK [J]. *Research and Development of Natural Products*, 2017, 29(4): 569–574.
- [20] 刘惠麟. 虾青素干预酒精性肝损伤炎症反应的信号机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- LIU H L. Research on the signal mechanism of astaxanthin intervention in the inflammatory response of alcoholic liver injury [D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [21] 刘畅, 丁晶鑫, 周英, 等. 基于网络药理学的金银花对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(17): 4531–4540.
- LIU C, DING J X, ZHOU Y, et al. Study on the protective effect of honeysuckle on acute alcoholic liver injury in rats based on network pharmacology [J]. *Chinese Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(17): 4531–4540.
- [22] 刘瑞, 高维娟. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路及其在细胞凋亡中的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(18): 4089–4092.
- LIU R, GAO W J. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway and its role in apoptosis [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2012, 32(18): 4089–

- 4092.
- [23] YAO J, MACKMAN N, EDINGTON T S, et al. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor- α promoter in human monocytic cells: regulation by Egr-1, c-jun and NF- κ B transcription factors[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(28): 17795-17801.
- [24] PELTZER N, WALCZAK H. Cell Death and inflammation - a vital but dangerous liaison[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(5): 387-402
- [25] YANG Y M, KIM S Y, SEKI E. Inflammation and liver cancer: Molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. *Semin Liver Dis*, 2019, 39(1): 26-42.
- [26] 魏凯迪. JIP3 基因敲除对 NAFLD 小鼠肝损伤的作用及机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- WEI K D. The effect and mechanism of JIP3 gene knockout on liver injury in NAFLD mice [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019.
- [27] STEBBINS J L, DE S K, MACHLEIDT T, et al. Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(43): 16809-16813.
- [28] DENG Q, WANG H X, PAN Z, et al. Annexin A7 and JNK knockdown suppress the lymphatic metastasis potential of hepatocellular carcinoma cells: Possible contributions of ATF2 and sequence-related lncRNA NONMMUT114121.1[J]. *Translational Cancer Research*, 2021, 10(3): 1410-1419.
- [29] TAKEUCHI O, AKIRA S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 270: 155-167.
- [30] ROH Y S, ZHANG B, LOOMBA R, et al. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology*, 2015, 309(1): G30.
- [31] VAN GEMST J J, KOUWENTBERG M, ROPS A, et al. Differential binding of chemokines CXCL1, CXCL2 and CCL2 to mouse glomerular endothelial cells reveals specificity for distinct heparan sulfate domains[J]. *Plos One*, 2018, 13(9): e0201560.
- [32] 赵宏, 孔令洲, 张宇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术及动物实验探究巴亚格七味散对酒精性肝病的作用机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(10): 1480-1489.
- ZHAO H, KONG L Z, ZHANG Y, et al. Based on network pharmacology, molecular docking technology and animal experiments to explore the mechanism of Bayag Qiwei San on alcoholic liver disease[J]. *New Chinese Medicines and Clinical Pharmacology*, 2021, 32(10): 1480-1489.
- [33] 向雷, 黄智, 张帅, 等. 磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚基 1 过表达对肝细胞癌进展的影响[J]. *介入放射学杂志*, 2019, 28(10): 962-968.
- XIANG L, HUANG Z, ZHANG S, et al. Effect of overexpression of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 on the progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Interventional Radiology*, 2019, 28(10): 962-968.
- [34] GEHRKE N, HOVELMEYER N, WAISMAN A, et al. Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation[J]. *Journal of Hepatology*, 2018, 68(5): 986-995.
- [35] 吴敬涛. 酒精肝的致病机理及其相关细胞信号通路[J]. *济南大学学报: 自然科学版*, 2017, 31(6): 513-518.
- WU J T. Pathogenic mechanism of alcoholic liver and its related cell signaling pathways[J]. *Journal of University of Jinan: Natural Science Edition*, 2017, 31(6): 513-518.

The Intervention of Camel Milk on Acute Alcoholic Liver Injury in Mice

Qi Bule¹, Ji Ri Mutu^{1,2}, Ming Liang^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018

²Camel Research Institute of Inner Mongolia, Alashan 750306, Inner Mongolia)

Abstract Objective: To explore the molecular mechanism of camel milk to relieve acute alcoholic liver injury in mice. Methods: ICR mice were randomly divided into normal group (NC), model group (ET), camel milk group (CM) and

camel milk intervention group (ET+CM), and measured liver tissue (AST and ALT) and serum indexes (TNF- α , IL-10, IL-6 and IL-1 β) to reflect the protective effect of camel milk on the liver; and based on transcriptomics research methods to explore the mechanism of camel milk to protect the liver. Results: Compared with the ET group, camel milk intervention reduced the alcohol-induced AST, ALT, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels, and at the same time increased IL-10 levels. Furthermore, transcriptome sequencing was performed on four groups of mouse liver tissues. The results showed that a total of 1426 differentially expressed genes were detected in the ET group and the ET+CM group (673 were up-regulated genes and 753 were down-regulated genes), and then combined with gene function and enrichment analysis, it was found that the differentially expressed genes were mainly significantly enriched in the three inflammatory pathways of MAPK, Toll-like and NF- κ B signaling. Six representative differential genes, including *CD14*, *TLR5* and *TLR9*, were determined by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that compared with the model group, the expression levels of *CD14*, IL-1 β , IL-6, *TLR5* and *TLR9* were significantly decreased after camel milk intervention, and the expression levels of IL-10 were significantly increased, which was consistent with the transcriptomic sequencing results, and verified the accuracy of sequencing data. The results laid a good foundation for the analysis of the molecular mechanism of camel milk on alcoholic liver injury.

Keywords camel milk; alcohol; liver damage; transcriptome