

基于脂质组学研究骆驼乳对小鼠非酒精性脂肪肝的缓解作用

郝世奇¹, 李雅菲¹, 吕浩迪¹, 李琳¹, Tuyatsetseg Jambal², 吉日木图¹, 明亮^{1*}

¹内蒙古农业大学食品科学与工程学院 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010000

²中蒙生物高分子应用研究联合实验室 蒙古乌兰巴托 999097-15141)

摘要 目的:探讨骆驼乳对小鼠非酒精性脂肪肝(NAFLD)的缓解作用。方法:将 30 只 C57BL/6J 小鼠随机分配为 3 组:对照组(NC 组)、模型组(Mod 组)和骆驼乳组(CaM 组)。对照组饲喂对照饲料,模型组和骆驼乳组饲喂高脂饲料,每日给骆驼乳组灌胃骆驼乳。试验持续 12 周,建立 NAFLD 模型。通过对生化指标、肝脏病理结构和肝脏脂质组的分析,明确骆驼乳缓解小鼠 NAFLD 的作用机制。结果:在骆驼乳的干预下,NAFLD 小鼠的体质量、血糖和肝脏指数显著降低,分别为 31.45 g、8.85 mmol/mL、3.98% ($P<0.05$);血清总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL-c)水平显著降低,分别为 0.657 mmol/mL、4.689 mmol/mL、9.923 μ mol/mL ($P<0.05$);肝脏 TG 和 TC 水平显著降低,分别为 0.034、0.009 mmol/mL ($P<0.05$);肝脏组织结构完整清晰,肝脏中脂质积累减少。脂质组学分析结果表明,CaM 组小鼠肝脏中的胆碱(CEs)、甘油二酯(DG)、不饱和甘油三酯(TGs)、磷脂酰胆碱(PC)和溶血磷脂酰胆碱(LPCs)的相对水平增加;脂质代谢物富集于鞘脂类代谢、甘油酯类代谢和甘油磷脂类代谢。结论:骆驼乳通过调控 NAFLD 小鼠鞘脂类代谢、甘油酯类代谢和甘油磷脂类代谢改变小鼠肝脏脂质谱,缓解 NAFLD。

关键词 骆驼乳;非酒精性脂肪肝;脂质组学;甘油酯类代谢;甘油磷脂类代谢

文章编号 1009-7848(2024)06-0128-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.012

非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)是全球常见的且可预防的肝脏疾病之一^[1-2]。根据肝脏疾病的严重程度可以将 NAFLD 大致分为简单的肝脏脂质积累、肝脏脂肪变性、肝脏细胞炎症浸润、肝纤维化、肝硬化和肝癌;目前也有研究将肝脏脂质积累、肝脏脂肪变性称作代谢相关脂肪性肝病(Metabolic Associated Fatty Liver Disease, MAFLD)^[3]。非酒精性脂肪肝(NAFLD)发生的原因有很多,包括但不限于不健康的饮食习惯、肥胖、生理或心理应激以及胰岛素抵抗;而 NAFLD 的发生是糖尿病、动脉粥样硬化及其他代谢综合征发生的危险信号^[4-7]。NAFLD 的发生有“双重打击”学说和“多重打击”学说。“双重打击”指 NAFLD 是由肝脂肪变性和随后的系统性炎症反应引起的^[8-10];而“多重打击”学说是由“双重打击”扩展而来,指 NAFLD 的发生是由包括胰岛素抵抗、脂肪毒性、氧化损伤、内质网应激、线粒体功能障碍、脂肪组织功能障碍、先天免疫失

调、细胞因子分泌在内的生理功能损伤引起的^[11-12]。可以从多方面来防治 NAFLD,包括改善饮食结构以控制血糖稳定,增加运动量以增强机体代谢控制体质量,增强机体免疫以减少机体内不必要的炎症反应,进行冷刺激和局部热敷,以及临床用药^[13-14]。此类方法有一定的局限性,且没有专门用于治疗 NAFLD 的临床药物,因此通过摄入功能性食品以缓解肝脏脂质沉积缓解 NAFLD 是必要的。

骆驼乳中有丰富的免疫球蛋白和各类维生素,脂肪酸和胆固醇含量较少。骆驼乳不仅具有抗氧化、抑制血管紧张素转化酶(ACE)的作用,还可以激活 Nrf2/HO-1 通路、AKT/eNOS/NO 通路、IL-17 通路和 TNF 通路,保护肾脏功能和肝脏功能^[15-18]。也有研究发现,骆驼乳可以调节血糖,减轻机体对胰岛素的抵抗,阻止糖尿病发生。在亚洲和非洲的干旱地区,骆驼乳常被用来辅助治疗哮喘、水肿和糖尿病^[16,19-21]。此前的研究发现,骆驼乳可以显著抑制 NAFLD 小鼠体质量的生长和肝脏的异常增大,调节小鼠血糖,增加小鼠机体对胰岛素的敏感性^[22]。临床上将血清总胆固醇(Total cholesterol, TC)、总甘油三酯(Total triglycerides, TG)、高密度脂蛋白(High density lipoprotein cholesterin,

收稿日期:2023-06-08

基金项目:国家重点研发计划项目(2020YFE0203300)

第一作者:郝世奇,男,博士生

通信作者:明亮 E-mail: bmlimau@163.com

HDL-c)和低密度脂蛋白(Low density lipoprotein cholesterin, LDL-c)统称为血脂4项,常用于初步判断代谢障碍患者疾病的严重程度。在骆驼乳的干预下,NAFLD小鼠的血脂4项得到有效调节。此外,还发现骆驼乳可以减轻NAFLD小鼠机体炎症反应^[22]。

此前的试验初步证明了骆驼乳可以缓解NAFLD^[22]。为了进一步探究骆驼乳缓解NAFLD的作用机制,本研究采用液-质谱联用的方法分析小鼠肝脏中的脂质,阐述骆驼乳缓解小鼠NAFLD的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料与试剂 骆驼乳采自内蒙古自治区阿拉善盟阿拉善右旗牧区。取骆驼哺乳期鲜乳置于液氮速冻后运回实验室-80℃冻藏。取冷冻骆驼乳,冷水解冻后离心(4℃,5 000 r/min,30 min)去乳脂,冷冻干燥,过筛分装,4℃保存。TP32003高脂饲料(45%脂肪,17%果糖,1.25%胆固醇,编号:TP32003)购买自南通特洛非饲料科技有限公司,生产许可证号:苏饲证(2014)06092。

TG试剂盒 A110-1-1、TC试剂盒 A111-1,南京建成生物工程研究所;HDL-c ELISA试剂盒 ml037765、LDL-c ELISA试剂盒 ml037825,上海酶联生物科技有限公司。4%多聚甲醛,biosharp公司。

试验所用色谱纯级的甲醇、乙腈、甲酸、纯水、丙醇均为Fisher公司产品。

1.1.2 试验设备与仪器 5810R台式高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;冻干机,SCIENTZ-10N上海东芝电器厂;SynergyH1酶标仪,BioTek Instruments;SQ510C立式压力灭菌锅,上海申安医疗器械厂;AUUC-CHEK® Performa罗氏血糖仪,罗氏诊断产品(上海)有限公司;HistoCore MULTICUT轮转式切片机,徕卡公司;LEICA ICC50 W

显微镜,徕卡公司;Wonbio-96c型高通量组织破碎仪,上海万柏生物科技有限公司;UHPLC-Q Exactive超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱,赛默飞公司;HSS T3色谱柱(100 mm×2.1 mm i.d.,7.8 μm),美国Waters公司。

1.2 动物实验设计

SPF级雄性C57BL/6J小鼠,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。试验动物饲养于IVC动物试验系统中,饲养温度为(20±1)℃,相对湿度为(50±5)%,光照12 h,黑暗12 h。试验开始前,小鼠适应性饲养1周,同时,在第3、5、6天,用TP32003高脂饲料替换Mod组和CaM组30%的基础饲料,用TP32003对照饲料替换NC组30%的基础饲料,在第7天将剩余的基础饲料全部替换为TP32003高脂饲料和相应的对照饲料。所有动物实验严格遵守道德伦理标准。本实验方案开展前已获得内蒙古农业大学“乳品生物技术与工程”教育部重点实验室动物使用许可(许可证号:SYXK蒙2020-0002)。

经过7 d适应性喂养之后,小鼠被随机分为对照组(NC组)、模型组(Mod组)、骆驼乳组(CaM组),共30只。在实验期间,NC组小鼠饲喂TP32003高脂饲料的对照饲料,Mod组和CaM组小鼠饲喂TP32003高脂饲料。CaM组灌胃骆驼乳(3.0 g/kg/d),每天灌胃两次(9:00 & 16:00),Mod组和NC组灌胃0.5% CMC(0.2 mL/d/只),连续灌胃12周,每日记录小鼠体质量和采食量,每周测定小鼠血糖。实验周期结束,小鼠禁食不禁水12 h,使用封闭环境吸入异氟烷的方式麻醉小鼠后摘眼球采血,颈椎脱臼处死解剖,收集肝脏,使用液氮速冻,并于-80℃保存;并且每组随机分出3个肝脏样本用4%多聚甲醛保存,用于病理学切片分析。血液样本室温静置1 h,离心(4℃,3 000 r/min,20 min)取上层血清,用200 μL离心管分装,液氮速冻,-80℃冻藏。

表1 分组方案与实验设计

Table 1 Groups and experimental design

组别	饲料类型	灌胃剂量	灌胃时间	实验时长
NC	TP32003 对照饲料	0.5% CMC 0.2 mL/d	9:00 & 16:00	12周
Mod	TP32003 高脂饲料	0.5% CMC 0.2 mL/d	9:00 & 16:00	12周
CaM	TP32003 高脂饲料	骆驼乳 3.0 g/kg/d	9:00 & 16:00	12周

1.3 实验方法

1.3.1 基础指标的测定 生理指标：体质量和血糖分别使用电子天平和血糖仪测定。

血清指标：取预先分装好的血清小管置于冰水混合物解冻。待血清消融后，严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测血脂四项（HDL-c、LDL-c、TG、TC）。

肝脏指标：称取大约 0.1 g 冻藏肝脏置于 1.5 mL 离心管中，加入 0.9 mL 无水乙醇，冰水浴下机械匀浆（2 500 r/min 10 min），取上清液，严格按照 TG、TC 试剂盒说明书测定并计算肝脏中 TG 和 TC 的含量。肝脏指数计算方法如下：

$$\text{肝脏指数} = \frac{\text{肝脏鲜重(g)}}{\text{第 12 周体质量(g)}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 肝脏病理学组织分析 取保存于 4% 多聚甲醛中的肝脏组织样本，经过梯度脱水和石蜡包埋后，切成 5 μm 后的切片。使用苏木精染液和伊红染液染色，烘片晾干后置于显微镜下观察肝脏组织结构。

1.3.3 脂质组学的测定 样品预处理：将样本置于 2 mL 离心管中，加入研磨珠、400 μL 提取液（甲醇：水=4：1）及 0.02 mg/mL L-2-氯苯甲氨酸进行脂质代谢物提取。样本冷冻研磨 6 min（-10 °C，50 Hz），低温超声提取 30 min（5 °C，40 kHz）。-20 °C 静置 30 min，4 °C 离心 15 min（13 000 g），移取上清液至进样瓶上机分析。

色谱、质谱条件：流动相 A：95% 水+5% 乙腈（含 0.1% 甲酸），流动相 B：47.5% 乙腈+47.5% 异丙醇+5% 水（含 0.1% 甲酸）。分离梯度：0~0.1 min，0% 流动相 B 线性升至 5%；0.1~2 min，流动相 B 线性升至 25%；2~9 min，流动相 B 线性升至 100%；9~13 min 维持；13.0~13.1 min，流动相 B 线性降至 0%；13.1~16 min，维持。流速 0.4 mL/min，柱温 40 °C。样品质谱信号采集使用正负离子扫描模式，扫描范围 *m/z*：70~1050。离子喷雾电压：正离子 3 500 V，负离子电压：2 800 V，鞘气 40 psi，辅助加热气 10 psi，离子源加热温度 400 °C，20~40~60 V 循环碰撞能，MS1 分辨率 70 000，MS2 分辨率 17 500。

脂质数据处理 上机分析后，LC-MS 原始数据导入 Progenesis QI（Waters Corporation，Mil-

ford，USA）进行处理。同时将质谱信息与公共数据库（KEGG 数据库和 Lipid 数据库）及美吉自建数据库对比匹配得到脂质代谢物信息。搜库后的矩阵数据上传美吉生物云平台（<https://cloud.majorbio.com>）进行数据分析。采用 80% 规则去除缺失值，使用最小值填补空缺值，用总和归一法对样本质谱峰归一化得到归一化后的数据矩阵。同时删除 QC 样本相对标准偏差（RSD）>30% 的变量，进行对数化处理，得到后续分析用的数据矩阵。

1.4 统计方法

所有的实验数据使用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。数据分析使用 SPSS 23.0 版本，各项基础指标图使用 Graphpad prism 9.0 版本进行绘制。脂质组学数据使用上海美吉生物云在线云平台分析。显著性采用字母标注法，不同字母之间 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 骆驼乳可以减轻小鼠 NAFLD 症状

饲喂小鼠高脂饲料 12 周建立 NAFLD 模型，同时每日给骆驼乳组小鼠灌胃相应剂量的骆驼乳。在实验周期结束后，测定小鼠的体质量和血糖；解剖小鼠后称量小鼠肝脏，计算肝脏指数。由图 1 可知，与对照组相比，模型组小鼠的体质量、血糖和肝脏指数显著升高（ $P < 0.05$ ）；与模型组相比，骆驼乳组小鼠的体质量、血糖和肝脏指数显著降低（ $P < 0.05$ ）。

血脂四项包括血清中 TG、TC、HDL-c 和 LDL-c，常被用于初步判断患者血脂异常^[23-26]。测定各组小鼠的血脂四项，有助于判断小鼠脂质代谢状况。由图 2 可知，与对照组相比，模型组小鼠血清中 TC 和 LDL-c 水平显著升高（ $P < 0.05$ ），HDL-c 水平显著降低（ $P < 0.05$ ），TG 水平无显著性差异（ $P > 0.05$ ）。说明经过长期的高脂饮食的摄入，模型组小鼠脂质代谢异常。与模型组相比，虽然骆驼乳组小鼠血清中 HDL-c 水平并未升高（ $P > 0.05$ ），但骆驼乳组小鼠血清中的 TG、TC 和 LDL-c 水平显著降低（ $P < 0.05$ ）。证明在同样的饮食条件下，骆驼乳组小鼠的脂质代谢状况好于模型组。

NAFLD 患者的肝脏异常增大是因为脂质在肝脏中过度积累，而肝脏中 TG 和 TC 水平反映了脂质在肝脏中的积累情况。由图 3a 和 3b 可知，与

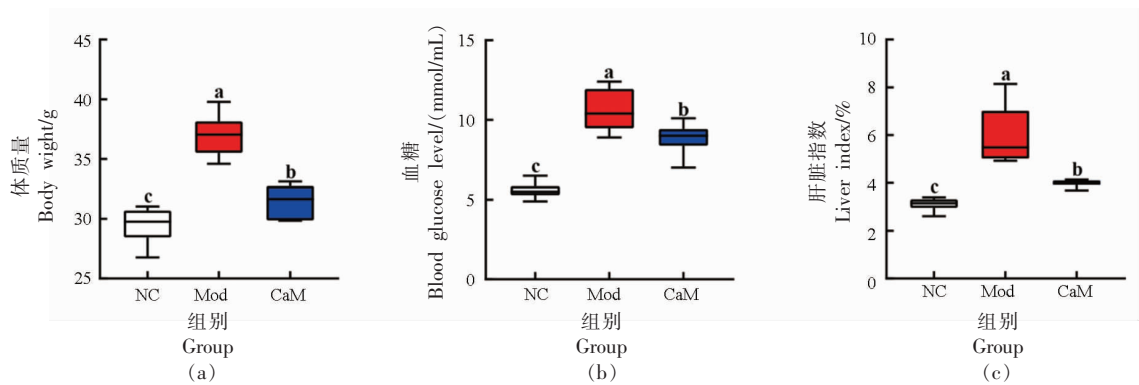


图 1 骆驼乳对 NAFLD 小鼠体质量、血糖和肝脏指数的影响

Fig.1 Effect of camel milk on body wight, blood glucose and liver index of mice with NAFLD

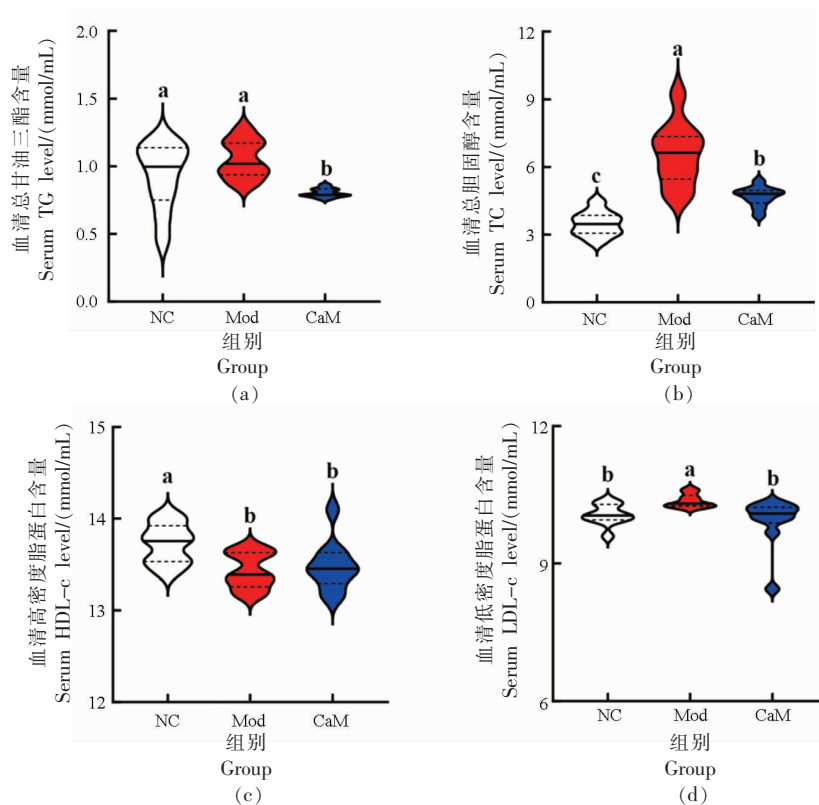


图 2 骆驼乳可以改善 NAFLD 小鼠血清脂质状态

Fig.2 Camel milk improved status of mice with NAFLD in the serum

对照组相比,模型组小鼠肝脏中 TG 和 TC 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,骆驼乳组小鼠肝脏中 TG 和 TC 水平显著降低 ($P<0.05$)。图 3c 是各组小鼠肝脏的病理学切片。由图可知,对照组小鼠肝脏组织状态完整,肝细胞核质分布清晰,排列整齐;模型组小鼠肝脏组织被破坏,肝细胞无序排列,肝脏中脂质积累严重;经过 12 周骆驼乳干预,

骆驼乳组小鼠肝脏并未被严重破坏,肝细胞排列有序,且并无明显的脂质积累情况。

体质量增加、肝脏异常增大、由于机体脂代谢异常而引起的血脂异常,以及脂质在肝脏中过度累积是 NAFLD 的基本特征,也是导致 NAFLD 发生的原因^[27-28]。在本次实验中,模型组小鼠 TG、TC 水平显著高于对照组,且血脂异常。病理学切片也

观察到模型组小鼠肝脏中脂质积累严重,表明实验动物模型建立成功。在骆驼乳干预后,NAFLD小鼠体质量、肝指数、TG和TC水平显著低于模型

组;血脂状况得到改善;肝脏组织状态良好。综上所述,骆驼乳可以抑制由于长期高脂饮食摄入引起的非酒精性脂肪性肝损伤。

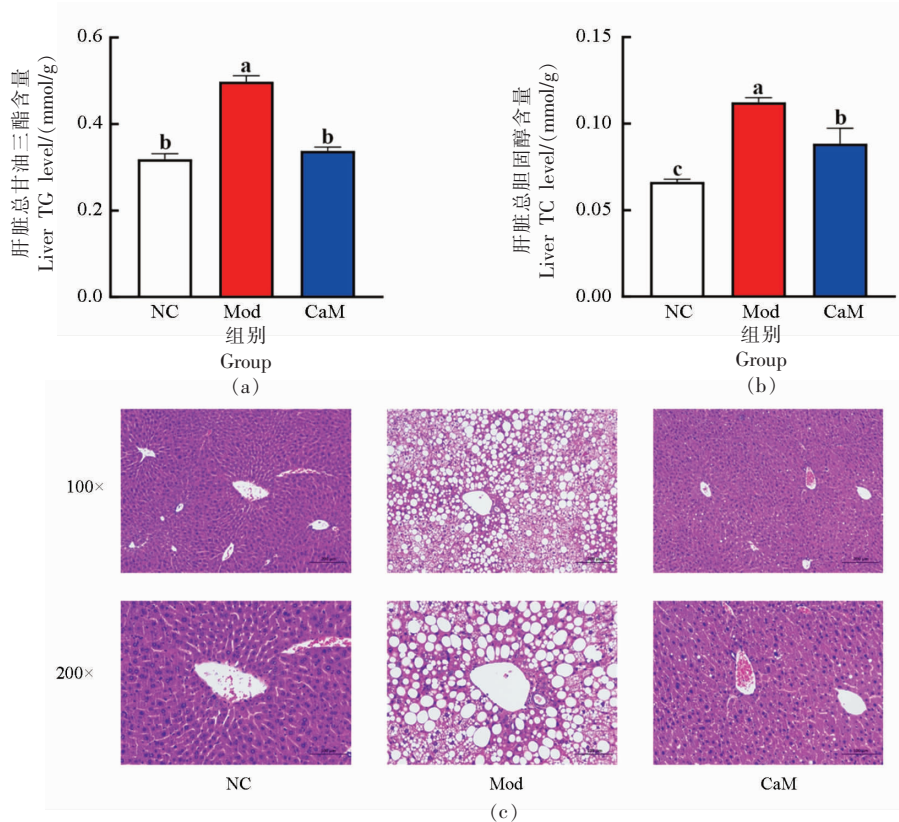


图3 骆驼乳能减少肝脏中的脂质积累

Fig.3 Camel milk reduced the lipid accumulated in the liver

2.2 小鼠肝脏组织脂质代谢物的多元统计分析

为了探究骆驼乳缓解NAFLD的作用机制,本研究采用液质联用(LC-MS)的方法分析了小鼠肝脏中的脂质代谢物。对阳离子和阴离子数据进行

主成分分析(Principal component analysis, PCA)和偏最小二乘回归分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)。

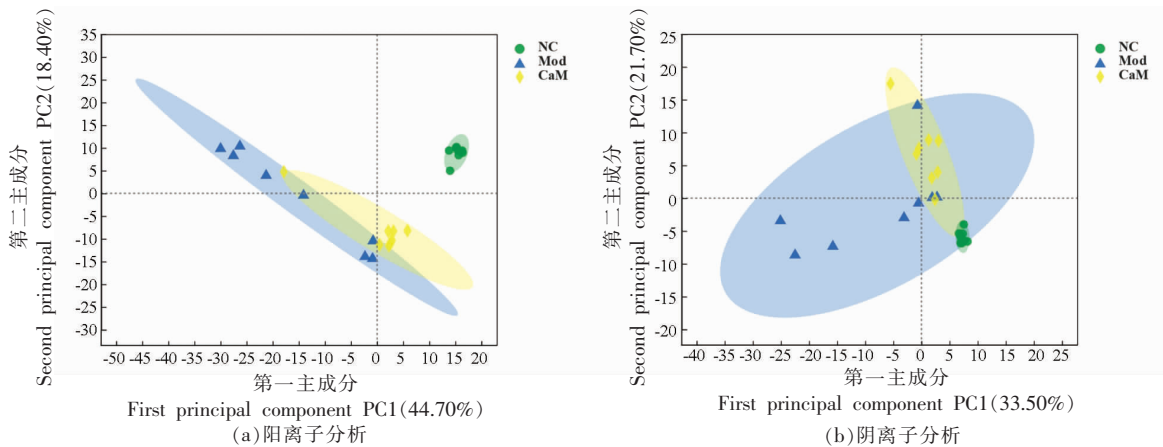


图4 各组之间的PCA分析

Fig.4 The PCA score plots between groups

通过 PCA 分析可以初步判断各组小鼠肝脏脂质代谢物组之间的差异。PCA 分析结果显示(图 4),NC 组和 CaM 组样本点聚集,实验重复性好;Mod 组样本点离散,实验重复性较差。在阳离子 PCA 分析结果中,NC 组样本点远离 Mod 组样本点,CaM 组与 Mod 组样本点聚集区域有部分重叠,说明 3 组小鼠肝脏脂质代谢物之间有较大差异,且 NC 组与 Mod 组小鼠肝脏脂质代谢物差异显著。

为了排除样本分类以外的误差,对阴离子数据和阳离子数据进行 PLS-DA 分析,并对模型进

行 200 次独立置换检验。一般认为,Q2 回归线的 Y 轴截距小于 0.05 时,模型较好,未发生过拟合现象;同时累积解释率(R^2_X 、 R^2_Y)和模型预测能力 Q2 越接近于 1,模型越稳定可靠,预测性越好。此次置换检验的 Q2 回归线在 Y 轴的截距皆小于 0(阳离子置换检验截距 = -0.2324,阴离子置换检验截距 = -0.5098),建立的模型未发生过拟合现象;同时阳离子的 $R^2_X = 0.628$, $R^2_Y = 0.679$, $Q2 = 0.606$,说明模型稳定可靠,预测性较好。由图 5A&B 可知,PLS-DA 分析结果与 PCA 分析结果类似,合理印证了 PCA 结果可靠。

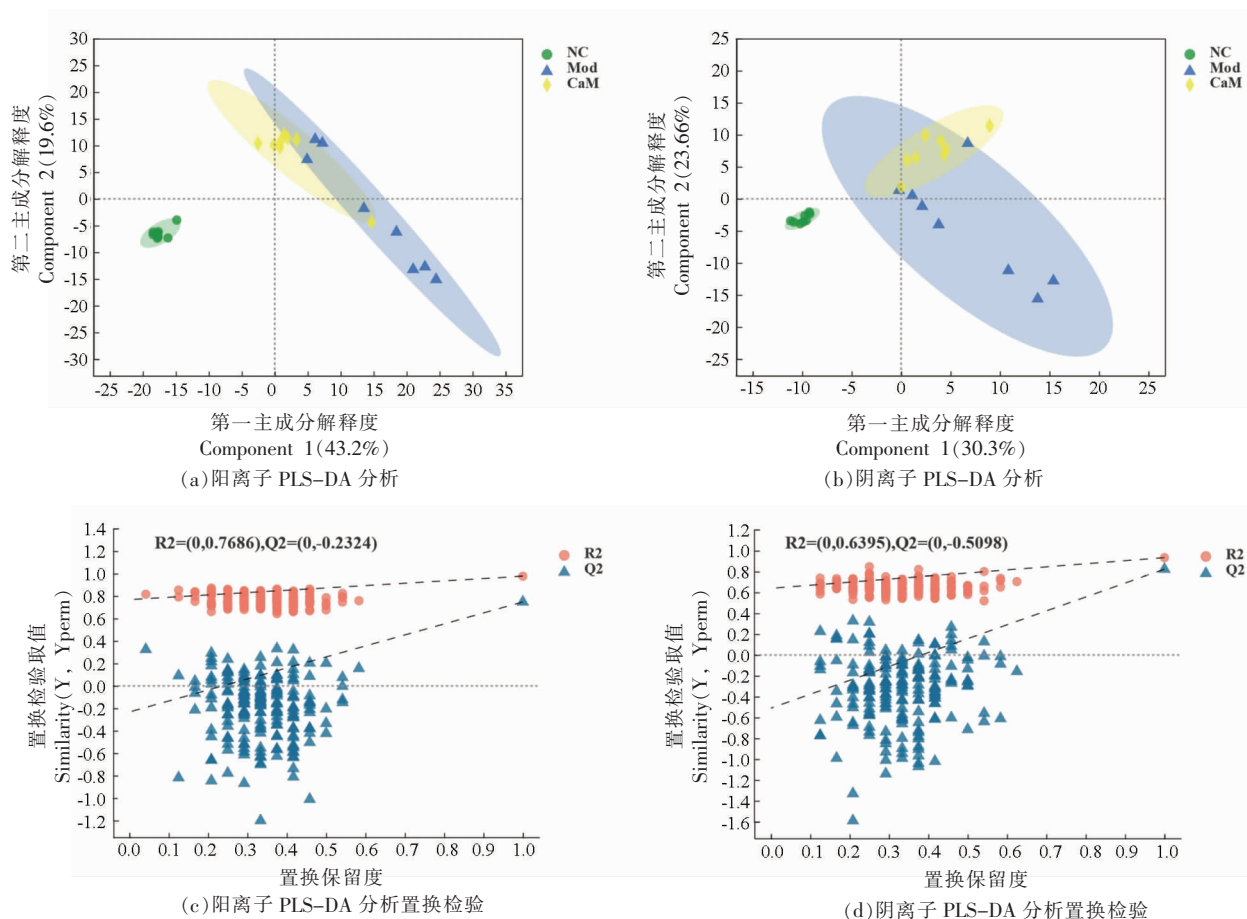


图 5 各组脂质的偏最小二乘法分析及置换检验

Fig.5 Partial least squares discriminant analysis and permutation test for each group of lipids

2.3 小鼠肝脏脂质代谢物的 KEGG 分析

对鉴定到的所有脂质代谢物进 KEGG 搜库,鉴定到两类鞘脂,分别为神经鞘磷脂(Phosphosphingolipids)和神经酰胺(Ceramides);三类甘油磷

脂,分别为甘油磷酸丝氨酸(Glycerophosphoserines)、甘油磷脂乙醇胺(Glycerophosphoethanolamines)和甘油磷脂胆碱(Glycerophosphocholines);两类甘油酯,分别为甘油三酯(Triradyl-

glycerols)和甘油二酯(Diradylglycerols)。随后对经过差异值去除之后的所有脂质代谢物进行 KEGG 通路统计,找出前 10 个重要通路(图 6),包括甘油磷脂代谢、癌症中的胆碱代谢、鞘脂类信号通

路、逆行性内分泌信号传导、胰岛素抵抗、脂肪消化与吸收、脂肪细胞中的脂解调节、脂肪细胞因子信号通路、鞘脂类代谢和产热作用。这些通路大多都是糖脂代谢相关的重要通路。

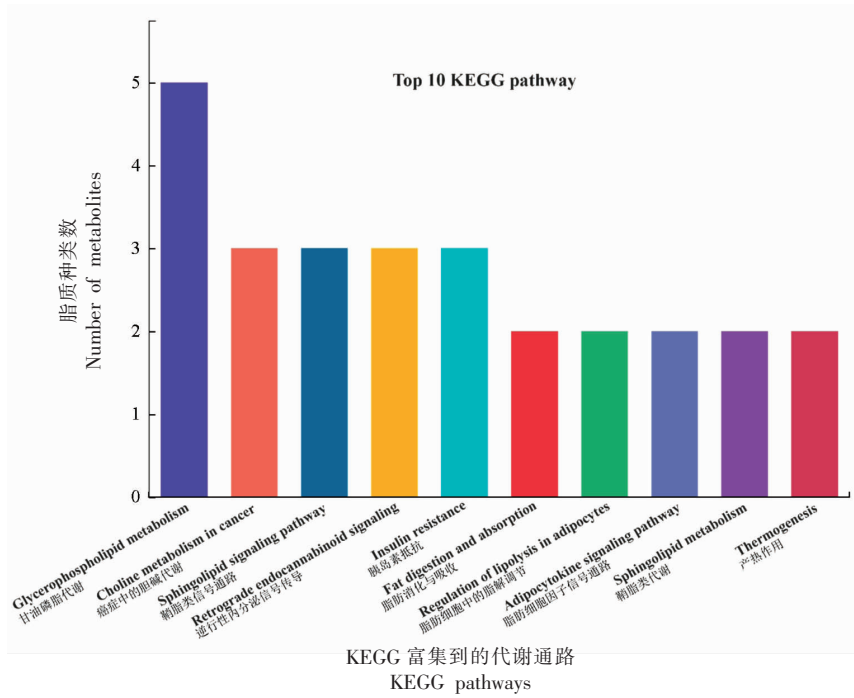


图 6 小鼠肝脏脂质代谢物 KEGG 分析的重要通路统计

Fig.6 Important pathway statistics of lipid metabolites in liver of mice by KEGG analysis

2.4 差异脂质分析

为了进一步研究骆驼乳缓解 NAFLD 的作用机制,筛选出变量重要性 (Variable importance,

VIP)大于 1,差异倍数(Fold change, FC)大于 1.5 或小于 0.5,且 $P < 0.05$ 的脂质代谢物,绘制火山图(图 7)。

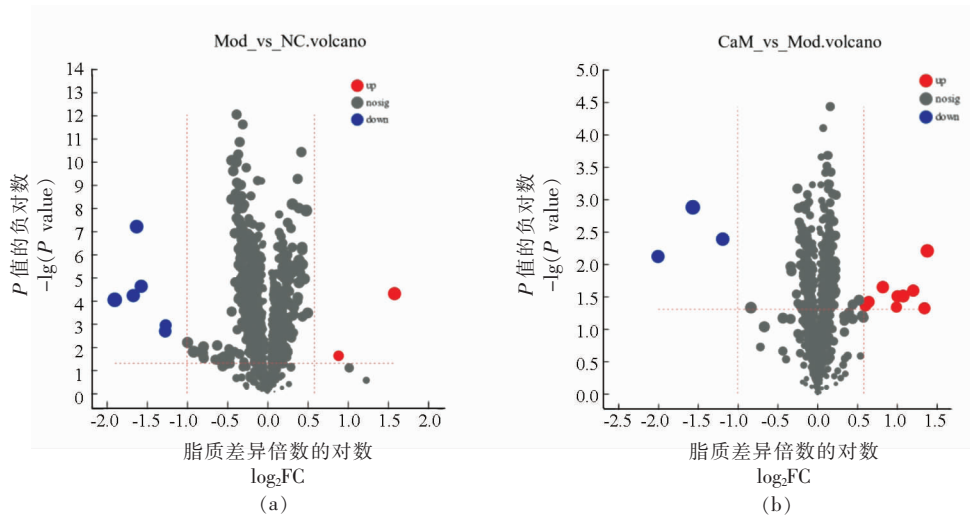


图 7 差异脂质代谢物火山图

Fig.7 Volcano figure of differential lipid metabolites

由图 7a 可知,与 NC 组相比,Mod 组有 2 种脂质代谢物上调,6 种脂质代谢物下调;与 Mod 组相比,CaM 组有 9 种脂质代谢物上调,3 种脂质代谢物下调。表 2 和表 3 是具体的脂质差异代谢物信息。从表 2 可以看出,与 NC 组相比,Mod 组小鼠肝脏中的胆碱(CE18:2)、心磷脂(CL16:1、CL20:3、CL22:6)和不饱和甘油三酯(TG16:0、TG18:1、

TG18:2、TG18:3、TG20:1、TG22:3、TG22:4) 水平减少;而与 Mod 组相比(表 3),这些脂质代谢物在 CaM 组小鼠肝脏中的水平增加。综上所述,CE18:2、CL16:1、CL20:3、CL22:6、TG16:0、TG18:1、TG18:2、TG18:3、TG20:1、TG22:3、TG22:4 可能是骆驼乳缓解 NAFLD 的标志肝脏脂质代谢物。

表 2 Mod 组脂质代谢物变化

Table 2 Differential lipid metabolites in Mod group

代谢物	分子式	VIP	FC	P-value	FDR	m/z	Mod vs NC
CE18:2	C ₄₅ H ₈₀ O ₂ N ₁	2.7059	0.4139	0.0021	0.0055	666.6184	down
DG16:0/DG35:0	C ₅₄ H ₁₀₆ O ₅ Li ₁	1.8447	1.8469	0.0237	0.0412	841.8195	up
PE16:1/PE22:6	C ₄₃ H ₇₃ O ₇ N ₁ P ₁	2.9049	2.9922	0.0000	0.0003	746.5119	up
TG18:1/TG16:0/TG22:4	C ₅₉ H ₁₁₀ O ₅ N ₁	2.9971	0.3365	0.0000	0.0001	912.8379	down
TG20:1/TG18:2	C ₅₉ H ₁₀₇ O ₅	2.4712	0.4155	0.0011	0.0034	895.8113	down
TG18:3/TG22:3	C ₅₉ H ₁₀₈ O ₅ N ₁	3.0627	0.3142	0.0001	0.0003	910.8222	down
TG20:2/TG22:6	C ₆₇ H ₁₀₆ O ₆ N ₁	3.1713	0.3235	0.0000	0.0000	1020.8015	down
CL22:6/CL16:1/CL20:3	C ₈₉ H ₁₄₁ O ₁₇ P ₂	3.6595	0.2677	0.0001	0.0008	1543.9650	down

表 3 骆驼乳组脂质代谢物变化

Table 3 Differential lipid metabolites in CaM group

代谢物	分子式	VIP	FC	P-value	FDR	m/z	CaM vs Mod
CE16:0	C ₄₃ H ₈₀ O ₂ N ₁	2.8559	1.5643	0.0381	0.1477	642.6184	up
CE18:2	C ₄₅ H ₈₀ O ₂ N ₁	3.4177	2.1102	0.0310	0.1390	666.6184	up
DG18:2/DG19:1	C ₄₀ H ₇₅ O ₄	2.8221	1.5213	0.0435	0.1477	619.5660	up
PC24:1/PC22:6	C ₅₄ H ₉₄ O ₈ N ₁ P ₁ Na ₁	3.1006	2.3045	0.0255	0.1325	938.6609	up
PIP10:0/PIP18:1	C ₃₇ H ₇₂ O ₁₉ N ₀ P ₃	3.2174	1.7683	0.0226	0.1286	913.3875	up
TG18:1/TG16:0/TG22:4	C ₅₉ H ₁₁₀ O ₅ N ₁	2.5862	1.9914	0.0460	0.1501	912.8379	up
TG20:1/TG18:2	C ₅₉ H ₁₀₇ O ₅	3.0611	2.0102	0.0312	0.1390	895.8113	up
TG18:3/TG22:3	C ₅₉ H ₁₀₈ O ₅ N ₁	3.7018	2.6037	0.0062	0.1053	910.8222	up
CL18:2/CL18:1/CL16:1	C ₇₉ H ₁₄₃ O ₁₇ P ₂	4.4759	0.3380	0.0013	0.0601	1425.9806	down
CL22:6/CL20:3	C ₈₉ H ₁₄₁ O ₁₇ P ₂	3.0260	2.5408	0.0479	0.2159	1543.9650	up
LPC22:5	C ₂₈ H ₄₆ O ₉ N ₀ P ₁	3.6305	0.2496	0.0076	0.1166	557.2885	down
PI18:4/PI20:4	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₃ N ₀ P ₁	3.8153	0.4386	0.0041	0.0865	877.4873	down

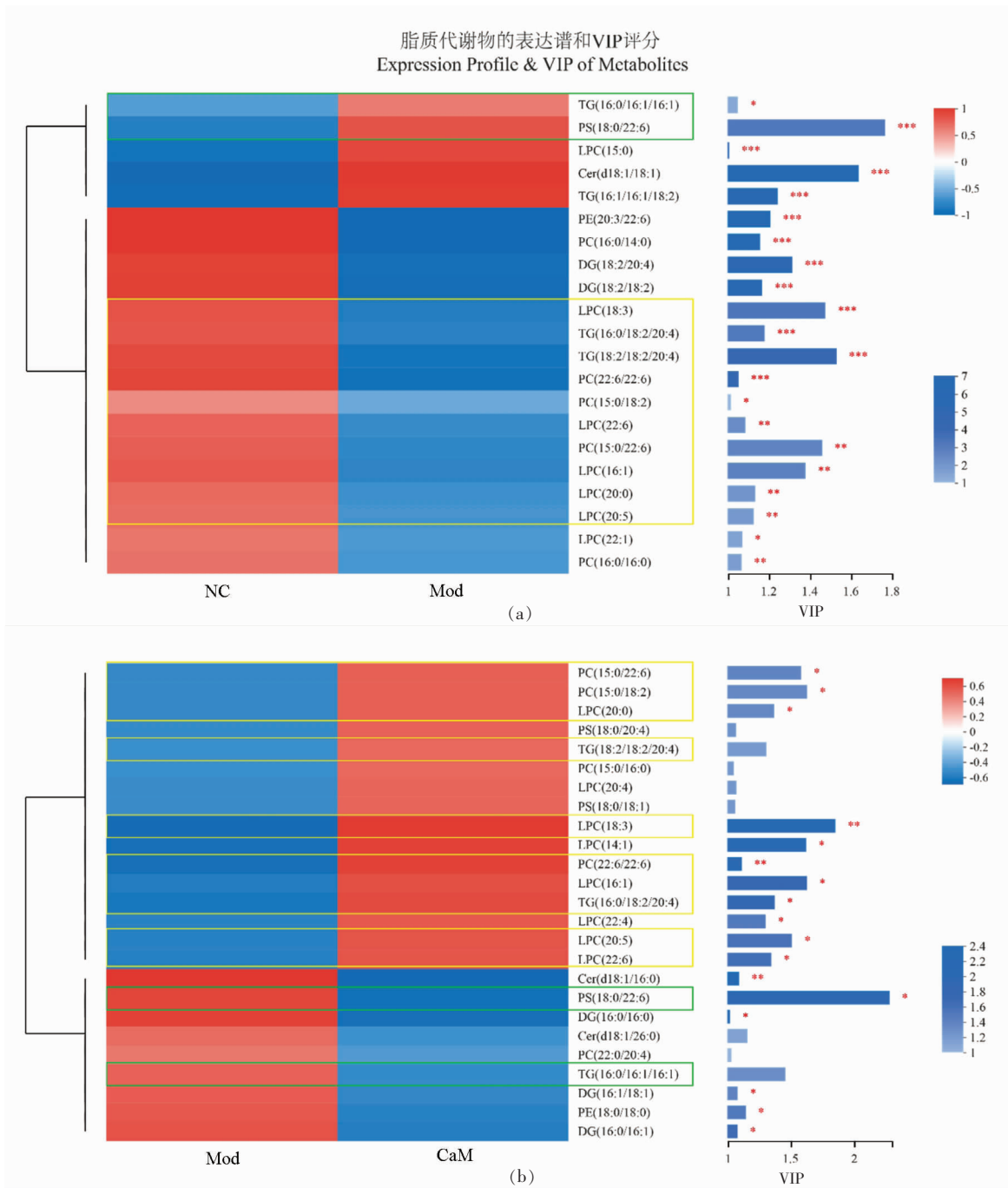
2.5 特殊脂质子集的两两比较分析

进一步,将 KEGG 分析中注释到的甘油磷脂代谢、胆碱代谢、胰岛素抵抗、鞘脂类信号通路、脂肪细胞中脂质生成的调控以及脂肪细胞因子信号通路的脂质代谢物组成脂质代谢物子集进行分析。该子集共有 60 种脂质代谢物,筛选出 VIP>1 的代谢物进行两组比较。对比图 8a 和 8b 可知,与 NC 组相比,Mod 组 TG16:0、TG16:1、PS18:0、

PS22:6 下调,TG16:0、TG18:2、TG20:4、PC15:0、PC18:2、PC22:6、LPC16:1、LPC18:3、LPC20:0、LPC20:5、LPC22:6 上调;而与 Mod 组相比,CaM 组的这些脂质代谢物的变化呈相反趋势。

2.6 特殊脂质子集的 iPathway 分析与 KEGG 分析

为了解骆驼乳缓解 NAFLD 调控的代谢物分布,对代谢子集进行 iPathway 和 KEGG 分析。由图



注:特殊脂质子集的两组比较;绿色框表示与 NC 组相比,Mod 组上调,与 Mod 组相比,CaM 组下调的脂质代谢物;黄色框表示与 NC 组相比,Mod 组下调,与 Mod 组相比,CaM 组上调的脂质代谢物;右侧是 VIP 评分,值越大越重要;条形图的颜色深浅代表 P 值的大小,颜色越深 P 值越小。

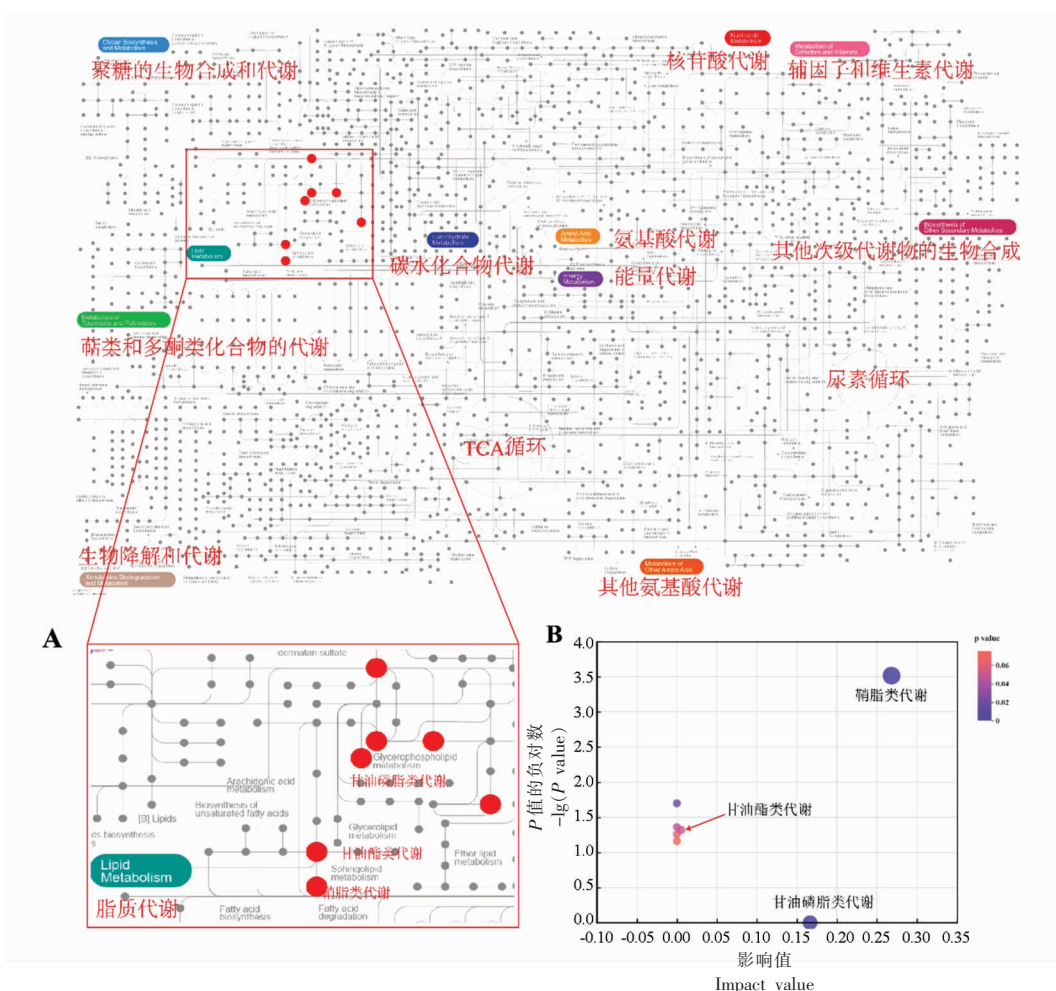
图 8 分组与差异脂质代谢物的相关性热图分析

Fig.8 Heatmap analysis of the correlation between subgroups and differential lipid metabolites

9a 可知,我们筛选出的脂质子集全部注释到了脂质代谢部分,主要是甘油磷脂类代谢、甘油酯类代谢和鞘脂类代谢。随后对该子集进行 KEGG 分析,

统计重要性靠前的子集中脂质注释到的 7 个代谢通路。从图 9b 可以看出,通过 KEGG 分析得到的前 3 个重要通路分别是鞘脂类代谢、甘油磷脂类

代谢和甘油酯类代谢。这个分析结果和 iPathway 分析结果一致,二者相互印证,说明分析结果可靠可信。



注:图 A 中的节点表示代谢物,线段表示代谢物关系和生化反应过程,红色节点表示脂质子集中的脂质注释到代谢通路上的位置;图 9B 中的每一个气泡代表一个 KEGG 通路,气泡越大,表示通路重要性越大,横轴表示代谢物在代谢通路中的相对重要性(Impact value),纵轴代表代谢物参与通路的富集显著性(-lg(P-value))。

图 9 特殊脂质子集的 iPathway 分析与 KEGG 分析

Fig.9 iPathway analysis and KEGG analysis of special lipid subsets

将 iPathway 分析结果、KEGG 分析结果与差异脂质结果进行总结。如图 10,甘油三酯(TG)与鞘氨醇合成鞘磷脂参与鞘脂类代谢。3-磷酸甘油在转酰酶和磷酸酶的作用下转化为 1,2-甘油二酯(DG)参与甘油磷脂类代谢。DG 可以直接与 CDP-CE 生成 PC/LPC。而 DG 在 CTP 的参与下转化成 CDP-DG,随后在合成酶的作用下,可以分别与丝氨酸、肌醇和磷脂酰甘油生成 PS、PI 和 CL。这些结果充分证明骆驼乳可以通过调节小鼠鞘脂类代谢、甘油酯类代谢和甘油磷脂类代谢缓解

NAFLD。

3 讨论

NAFLD 是机体代谢紊乱的表现,是许多其它代谢类疾病的重要致病原因^[28]。治疗 NAFLD 最有效的方法就是减肥和加强肝脏脂质代谢。对于那些通过改变生活方式无法达到缓解 NAFLD 目的的人员,也可以通过减脂手术来减轻体质量,从而缓解 NAFLD^[29]。目前,还没有专门治疗 NAFLD 的药物获得批准,临床上常常通过用药降低机体血

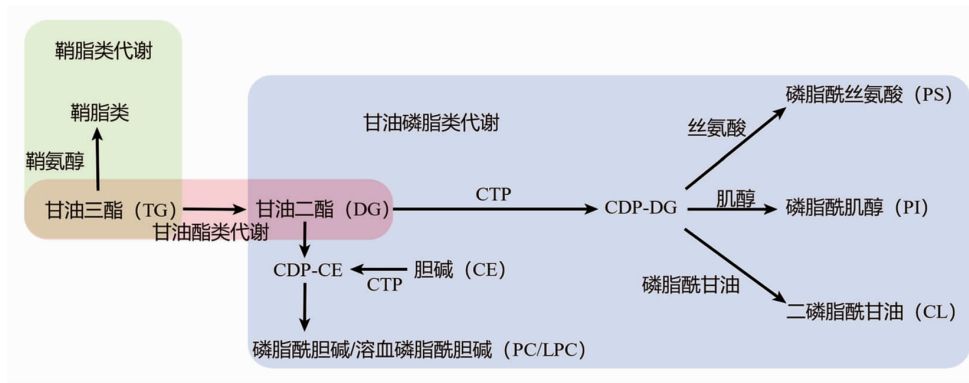


图 10 鞘脂类代谢、甘油酯类代谢和甘油磷脂类代谢

Fig.10 Sphingolipid metabolism, triglyceride metabolism and glycerol phospholipid metabolism

糖和血脂、增加机体对胰岛素敏感、增强机体抗氧化能力和增强胆汁酸代谢来间接缓解 NAFLD^[14,30-32], 但通过药物缓解 NAFLD 有一定的局限性,且长期用药会降低患者生活质量^[33]。所以摄入功能性食品可以作为辅助治疗 NAFLD 的方法。在本研究中,经过骆驼乳干预后,NAFLD 小鼠血清中脂质状况有所改善,肝脏中脂质积累减少,肝脏组织结构状态完整。初步说明骆驼乳可以缓解 NAFLD。

脂质分子的结构和功能具有多样性,在细胞生命过程中有重要作用^[34]。脂质组学技术愈加成熟,通过脂质组学技术诠释代谢疾病机制的研究也越来越多^[35-36]。Huang 等^[37]和 Tanaka 等^[38]的研究都证明了 LPCs 水平是 NAFLD 和其它类型肝病的效应器。在本研究中筛选出的脂质代谢物子集中发现,NAFLD 小鼠肝脏中 LPCs 水平显著降低,而经过骆驼乳干预后,NAFLD 小鼠肝脏中 LPCs 水平显著升高。此外还发现,NAFLD 小鼠肝脏中的 CE 水平和不饱和 TGs 水平减少,摄入骆驼乳后,NAFLD 小鼠肝脏中的 CE 水平和不饱和 TGs 水平显著增加。这和 Deng 等^[39]的研究结果相似。PCs 水平和极低密度脂蛋白 (Very low density lipoprotein, VLDL-c)密切相关,VLDL-c 参与肝脏脂质转运^[39]。所以 PCs 水平减少会影响肝脏 VLDL-c 的水平,从而阻碍肝脏脂质转运,进而促进 NAFLD 的发生。在本研究中,与对照组相比,模型组小鼠肝脏中的 PCs 水平没有显著变化;而与模型组相比,骆驼乳组小鼠肝脏中 PCs 水平显著上调,这有效抑制了 NAFLD 的发生。此外,骆驼乳还增加了 NAFLD 小鼠肝脏中的 CL (22:6/16:1/20:3/22:6)

水平。这些结果都与甘油磷脂在 NAFLD 的进展中发挥重要作用的概念一致^[40]。鞘脂类与机体胰岛素抵抗、肝脏氧化应激、炎症反应和脂质氧化相关,在 NAFLD 代谢过程中有重要作用^[41]。在本研究中,对特殊脂质子集的 KEGG 分析和 iPathway 分析发现,骆驼乳主要通过调控 NAFLD 小鼠鞘脂类代谢缓解小鼠 NAFLD。

综上所述,本研究通过脂质组学技术找出了骆驼乳缓解 NAFLD 的多种差异脂质标志物,分别是:CE18:2、CL 16:1、CL 20:3、CL22:6、TG16:0、TG16:1、TG18:1、TG18:2、TG18:3、TG20:1、TG20:4、TG22:3、TG22:4、PC15:0、PC18:2、PC22:6、LPC16:1、LPC18:3、LPC20:0、LPC20:5、LPC22:6。同时通过 KEGG 分析确定了骆驼乳通过鞘脂类代谢、甘油酯类代谢和甘油磷脂类代谢缓解 NAFLD。然而本研究也有不足之处,本研究虽然通过脂质组学技术找出了骆驼乳缓解 NAFLD 的脂质标志物和相关代谢通路,但缺乏转录水平和蛋白质水平的证据,后续研究可以在 RNA 水平和蛋白质水平展开。

参 考 文 献

- [1] COTTER T G, RINELLA M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: The state of the disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1851-1864.
- [2] HUANAN C, SANGSANG L, AMOAH A N, et al. Relationship between triglyceride glucose index and the incidence of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: A retrospective cohort study in China

- [J]. *BMJ Open*, 2020, 10(11): 1–8.
- [3] ZHANG J L, WANG S H, ZHAO Y J, et al. The role and mechanism of CREBH regulating SIRT3 in metabolic associated fatty liver disease[J]. *Life Sci*, 2022, 306: 1–9.
- [4] HANSEN C D, GRAM –KAMPMANN E M, HANSEN J K, et al. A non–calorie restricted low carbohydrate high fat diet improves non –alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score (NAS) and HbA1c in type 2 diabetes: A six–month randomised controlled trial[J]. *Journal of Hepatology*, 2022, 77(S1): S9–S10.
- [5] TANG A S P, CHAN K E, QUEK J, et al. Non–alcoholic fatty liver disease increases risk of carotid atherosclerosis and ischemic stroke: An updated meta–analysis with 135,602 individuals[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2022, 28(3): 483–496.
- [6] WANG R M, WANG L, WU H B, et al. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit phenolic extract supplementation ameliorates NAFLD by modulating insulin resistance, oxidative stress, inflammation, liver metabolism and gut microbiota[J]. *Food Research International*, 2022, 160: 1–13.
- [7] ZHAO J Q, FAN H C, WANG T, et al. TyG index is positively associated with risk of CHD and coronary atherosclerosis severity among NAFLD patients[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 1–11.
- [8] NAUDHANI M, THAKUR K, NI Z J, et al. Formononetin reshapes the gut microbiota, prevents progression of obesity and improves host metabolism[J]. *Food Funct*, 2021, 12(24): 12303–12324.
- [9] SUNNY N E, BRIL F, CUSI K. Mitochondrial adaptation in nonalcoholic fatty liver disease: Novel mechanisms and treatment strategies[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(4): 250–260.
- [10] WANG C K. Health benefits of onion bioactives on hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, and bone mineral density[J]. *Food Frontiers*, 2020, 1(2): 107–108.
- [11] FANG Y L, CHEN H, WANG C L, et al. Pathogenesis of non–alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From ‘two hit theory’ to ‘multiple hit model’ [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(27): 2974–2983.
- [12] ZHANG J K, ZHOU X L, WANG X Q, et al. Que Zui tea ameliorates hepatic lipid accumulation and oxidative stress in high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Food Res Int*, 2022, 156: 1–19.
- [13] JILEK J L, FROST K L, JACOBUS K A, et al. Altered cisplatin pharmacokinetics during nonalcoholic steatohepatitis contributes to reduced nephrotoxicity[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3869–3878.
- [14] RIEMANN A, BLASCHKE M, JAUHO –GHADIMI A, et al. Metformin improves the hepatic steatosis index in non–obese patients with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(15): 1–12.
- [15] ALMNAIZEL A T, AL–KHALIFAH A S, ALHAJ O A, et al. Hypocholesterolemic effect of camel milk on rats fed a high–cholesterol diet [J]. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2018, 30(4): 288–294.
- [16] 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–1 and AKT/eNOS/NO pathways [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(6): 3177–3190.
- [17] IBRAHIM M A B, WANI F A, RAHIMAN S. Hepatorprotective effect of olive oil and camel milk on acetaminophen–induced liver toxicity in mice[J]. *Medical Science and Public Health*, 2017, 6(1): 186–194.
- [18] KHAN M Z, XIAO J, MA Y, et al. Research development on anti–microbial and antioxidant properties of camel milk and its role as an anti–cancer and anti–hepatitis agent[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(5): 1–16.
- [19] KHALESY M, SALAMI M, MOSLEHISHAD M, et al. Biomolecular content of camel milk: A traditional superfood towards future healthcare industry [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 62: 49–58.
- [20] SARIN S K, KUMAR M, ESLAM M, et al. Liver diseases in the Asia–Pacific region: A lancet gastroenterology & hepatology commission[J]. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 5(2): 167–228.
- [21] SBOUI A, ATIG C, KHABIR A, et al. Camel milk used as an adjuvant therapy to treat type 2 diabetic patients: Effects on blood glucose, HbA1c, cholesterol, and TG levels[J]. *Journal of Chemistry*, 2022, 2022: 1–6.
- [22] 郝世奇, 李雅菲, 吴晓云, 等. 骆驼乳对非酒精性

- 脂肪肝小鼠糖脂代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 376-383.
- HAO S Q, LI Y F, WU X Y, et al. Effects of camel milk on glycolipid metabolism in mice with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 376-383.
- [23] CHOI S S, SYN W K, KARACA G F, et al. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway[J]. J Biol Chem, 2010, 285(47): 36551-36560.
- [24] HU X M, LIU J L, LI W, et al. Elevated serum uric acid was associated with pre-inflammatory state and impacted the role of HDL-C on carotid atherosclerosis[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2022, 32(7): 1661-1669.
- [25] SHIH P H, SHIUE S J, CHEN C N, et al. Fucoidan and fucoxanthin attenuate hepatic steatosis and inflammation of NAFLD through modulation of leptin/adiponectin axis[J]. Mar Drugs, 2021, 19(3): 1-17.
- [26] XU L, YAN X F, TANG Z S, et al. Association between circulating oxidized OxLDL/LDL-C ratio and the severity of coronary atherosclerosis, along with other emerging biomarkers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 191: 1-8.
- [27] BISCHOFF M, ZIMNY S, FEINER S, et al. Multi-disciplinary lifestyle intervention is associated with improvements in liver damage and in surrogate scores of NAFLD and liver fibrosis in morbidly obese patients[J]. Eur J Nutr, 2022, 61(5): 2725-2735.
- [28] POUWELS S, SAKRAN N, GRAHAM Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss[J]. BMC Endocr Disord, 2022, 22(1): 63.
- [29] ABDEL-RAHMAN R. Non-alcoholic fatty liver disease: Epidemiology, pathophysiology and an update on the therapeutic approaches[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2022, 12(3): 99-114.
- [30] SUN L, DENG C H, GU Y P, et al. Effects of dapagliflozin in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2022, 46(4): 1-10.
- [31] XIE P C, PENG Y, QIU L Y. Responsive oligochitosan nano-vesicles with ursodeoxycholic acid and exenatide for NAFLD synergistic therapy via SIRT1[J]. Carbohydr Polym, 2022, 288: 1-12.
- [32] YONEDA M, KOBAYASHI T, HONDA Y, et al. Combination of tofogliflozin and pioglitazone for NAFLD: Extension to the ToPiND randomized controlled trial[J]. Hepatol Commun, 2022, 6(9): 2273-2285.
- [33] ALRASHEED M, GUO J J, LIN A C, et al. The effect of polypharmacy on quality of life in adult patients with nonalcoholic fatty liver disease in the United States[J]. Qual Life Res, 2022, 31(8): 2481-2491.
- [34] QIN L L, ZHANG Z X, GUO M X, et al. Plasma metabolomics combined with lipidomics profiling reveals the potential antipyretic mechanisms of Qingkailing injection in a rat model[J]. Chem Biol Interact, 2016, 254: 24-33.
- [35] CHECA A, BEDIA C, JAUMOT J. Lipidomic data analysis: tutorial, practical guidelines and applications[J]. Anal Chim Acta, 2015, 885: 1-16.
- [36] YANG K, HAN X L. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences[J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(11): 954-969.
- [37] HUANG H J, ZHANG A Y, CAO H C, et al. Metabolomic analyses of faeces reveals malabsorption in cirrhotic patients[J]. Dig Liver Dis, 2013, 45(8): 677-682.
- [38] TANAKA N, MATSUBARA T, KRAUSZ K W, et al. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology, 2012, 56(1): 118-129.
- [39] DENG Y, PAN M, NIE H, et al. Lipidomic analysis of the protective effects of Shenling Baizhu San on non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. Molecules, 2019, 24(21): 3943-3960.
- [40] MEIKLE P J, SUMMERS S A. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(2): 79-91.
- [41] PAGADALA M, KASUMOV T, MCCULLOUGH A

J, et al. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23 (8): 365-371.

The Alleviating Mechanism of Camel Milk on Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Mice Based on Lipidomics

Hao Shiqi¹, Li Yafei¹, Lü Haodi¹, Li Lin¹, Tuyatsetseg Jambal², Ji Rimutu¹, Ming Liang^{*}

(¹Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010000

²Sino-Mongolian Joint Laboratory for Applied Research on Biopolymers, Ulaanbaatar 999097-15141, Mongolia)

Abstract Objective: To investigate the alleviating mechanism of camel milk on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. Methods: Thirty C57BL/6J mice were randomly assigned into three groups: negative control group (NC group), model group (Mod group) and camel milk group (CaM group). The negative control group was fed control diets, the model and camel milk groups were fed high-fat diets, and camel milk was given daily by gavage to the camel milk group mice. The experiment lasted for 12 weeks, and the NAFLD model was established. The alleviation mechanism of NAFLD in mice by camel milk was investigated by analyzing biochemical indices, liver pathological structure and liver lipidome. Results: With the intervention of camel milk, the body weight, blood glucose and liver index of NAFLD mice were significantly reduced to 31.45 g, 8.85 mmol/mL and 3.98%, respectively ($P<0.05$); the levels of total triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and low density lipoprotein (LDL-c) in serum were significantly reduced to 0.657 mmol/mL, 4.689 mmol/mL, and 9.923 μ mol/mL, respectively ($P<0.05$); the levels of TG and TC in liver were dramatically reduced to 0.034 mmol/mL and 0.009 mmol/mL, respectively ($P<0.05$); liver tissue structure was intact and clear, and the lipid accumulation was reduced in the liver. Lipidomic analysis showed that the relative levels of choline (CEs), diglycerides(DGs), unsaturated triglycerides (TGs), phosphatidylcholine (PC) and lysophosphatidylcholine (LPCs) were increased in the liver of mice in the CaM group; lipid metabolites were enriched in sphingolipid metabolism, glycerol ester metabolism and glycerophospholipid metabolism. Conclusion: Camel milk alleviates NAFLD by modulating sphingolipid metabolism, triglyceride metabolism and glycerophospholipid metabolism in mice with NAFLD by altering liver lipid profiles.

Keywords camel milk; non-alcoholic fatty liver disease; lipidomics; triglyceride metabolism; glycerophospholipid metabolism