

开化龙顶绿茶对高脂小鼠肝脂肪变性 AMPK 信号通路和肠道菌群的影响

张一帆¹, 袁懿炜¹, 徐倩倩^{1,2}, 龚明秀¹, 叶江成¹, 赵进^{1,2*}, 马焜阳¹

(¹ 中国计量大学生命科学学院 食品营养与质量安全研究所 杭州 310018

² 特色农产品品质与危害物控制技术浙江省重点实验室 杭州 310018)

摘要 目的:探究开化龙顶绿茶水提物对高脂饮食小鼠肝脂肪变性 AMPK 信号通路和肠道菌群紊乱的干预效果。方法:检测开化龙顶绿茶加工环节茶样主要功能成分动态变化趋势。适应性饲养 30 只小鼠 1 周后,随机将其分为正常组、高脂组和龙顶绿茶组,各 10 只,连续口服灌胃 8 周(正常组和高脂组灌胃生理盐水,龙顶绿茶组灌胃 300 mg/kg bw 的茶汤水提物),记录并分析小鼠体质量、Lee's 指数、血糖水平、血脂、肝组织病理切片、肝组织 AMPK 信号通路和肠道菌群的变化。结果:在加工过程中,开化龙顶绿茶的主要功能成分均发生一定程度改变。与鲜叶相比,提香中茶多酚、游离氨基酸、咖啡碱和水分的含量分别降低了 7.90%、6.20%、0.47%以及 71.05 g/100 g,而可溶性糖和水浸出物的含量分别升高了 0.01%和 0.10%;与高脂组相比,龙顶绿茶组小鼠的体质量为 26.67 g, Lee's 指数为 3.13,血糖曲线下面积为 1 505.25 mmol·min/L,血清生化指标如总胆固醇(TC)和总甘油三酯(TG)的含量分别为 4.23 mmol/L 和 0.76 mmol/L,均表现出明显差异($P<0.05$)。并且,开化龙顶绿茶水提物还能显著降低肝组织 AMPK 信号通路基因转录和蛋白表达水平($P<0.05$);开化龙顶绿茶水提物可显著降低高脂小鼠肠道菌群中厚壁菌门与拟杆菌门的比值($P<0.05$),并增加理研菌科、布劳特氏菌属和另枝菌属等有益菌种的相对丰度。结论:开化龙顶绿茶水提物干预高脂饮食小鼠肝脂肪变性 AMPK 信号通路和肠道菌群紊乱的效果明显。

关键词 开化龙顶绿茶; 高脂饮食; 肝脂肪变性; AMPK 信号通路; 肠道菌群紊乱

文章编号 1009-7848(2024)07-0157-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.016

随着人们生活水平的提高,肥胖症已成为全球普遍存在的人类代谢性疾病^[1]。肥胖症常伴随多种疾病,如高血脂^[2]、糖尿病^[3]、心脑血管疾病^[4]和癌症^[5]等,且会肥胖增加这些疾病的病死率^[6]。目前,传统的化学类药物对肥胖的治疗效果有限,且某些药物会引起一些不良反应^[7-8]。

茶叶作为天然饮料,具有悠久的饮用历史,因含有多种健康功能成分而在全球范围内广受青睐^[9-10]。研究发现茶叶具有明显的减肥降脂功效,且没有明显的毒副作用^[11-12]。因此,以茶叶及其提取物为原料,研发天然减肥产品,具有广阔的应用前景^[13]。开化龙顶绿茶是中国传统名茶,自明朝崇祯年间就被列为贡茶,以茶汤清绿、叶底香绿而闻名,已成为中国众多名茶中的一枝新秀^[14]。近年

来,关于开化龙顶绿茶的功能成分及其相关健康功效研究鲜有报道。本研究采用高脂饮食诱导 C57BL/6J 小鼠建立肝脂肪变性模型,探究开化龙顶绿茶水提物干预高脂饮食小鼠肝脂质代谢 AMPK 信号通路和肠道菌群紊乱的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和实验动物

开化龙顶绿茶样品,2021 年 4 月 10 日采集于浙江开化县兴农茶叶专业合作社,其加工工序为:鲜叶-萎凋(摊放)-杀青-回潮-揉捻-第 2 次杀青-提香(成品),按照加工工序依次采集茶样,用于后续相关指标的检测。

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,杭州子源实验动物科技有限公司;维持饲料(脂肪 12.0%,碳水化合物 67.4%,蛋白质 20.6%,产品编号: SWS9102),协同医药生物工程有限公司;高脂饲料(脂肪 60.0%,碳水化合物 20.0%,蛋白质 20.0%,产品编号: D12492),无锡帆泊生物技术有限公司。实验动物生产许可证号: 2021101Abzz

收稿日期: 2023-07-30

基金项目: 衢州市科技攻关竞争性项目(2023k098);浙江省团队科技特派员项目(2020-2024 开化县茶产业提升);浙江省重点研发计划项目(2020C02045)

第一作者: 张一帆,男,硕士生

通信作者: 赵进 E-mail: zhaojin@cjlu.edu.cn

0105999962。动物实验伦理方案已经中国计量大学动物伦理委员会批准同意实施(2021年027号)。

1.2 试剂和仪器

总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;BCA蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;TRIzol® Plus RNA Purification Kit,Thermo Fisher;DNA Kit,Sigma-Aldrich公司(用于肠道菌群DNA的提取)。

DK-8D 三温三控水槽,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;qTower³ 荧光定量PCR仪,德国耶拿分析仪器股份公司;真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;微量高速冷冻离心机,青岛卓光电科技有限公司;MD全波长酶标仪 Spectra Max190,北京嘉鹏同创科技发展有限公司;罗氏卓越金采血糖仪,罗氏血糖健康医护公司;低温高速冷冻离心机,德国Eppendorf;CFX384多重实时荧光定量PCR仪、蛋白电泳及转印系统,美国Bio-Rad。

1.3 方法

1.3.1 开化龙顶绿茶主要功能成分的检测 可溶性糖检测参考杨勤等^[15]的方法,咖啡碱检测参考涂云飞^[16]的方法,可溶性蛋白检测参考宋亚赛等^[17]的方法,茶多酚检测参考《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》(GB/T 8313-2008)^[18],游离氨基酸检测参考谭建宁等^[19]的方法,水浸出物检测参考《茶水浸出物测定》GB/T 8305-2013^[20]。

1.3.2 开化龙顶绿茶水提物冻干粉的制备 开化龙顶绿茶水提物冻干粉的制备,参照Zhou等^[21]的方法并加以改进。称取一定质量开化龙顶成品绿茶茶样,按料液比1:20加入沸水,在95℃的水浴锅中浸提5 min,趁热抽滤浸提液,并将浸提液置于55℃下减压浓缩至一定体积后,直接放置在-20℃冰柜中,快速冷冻12 h,之后放入冷冻干燥机中,持续干燥24 h获得冻干粉,收集并密封包装后,放于冰箱-65℃冷冻保存,备用。

1.3.3 实验小鼠分组与饲养方案 30只雄性C57BL/6J小鼠饲养于温度(23±2)℃,12 h明暗交替及相对湿度(50±20)%的标准动物房。所有小鼠

均自由饮食,经过1周适应性喂养后,随机分为3组:正常组(10只)、高脂组(10只)和龙顶绿茶组(10只)。正常组小鼠给予维持饲料,高脂组和龙顶绿茶组小鼠给予高脂饲料。灌胃的剂量和体积参考王蝶^[22]、吴文亮等^[23]方法并完善,正常组和高脂组灌胃生理盐水,龙顶绿茶组(300 mg/kg bw)灌胃的龙顶绿茶成品冻干粉茶汤(按正常体质量60 kg成人每日推荐量茶叶9 g计算,折算推荐剂量为15 mg/kg bw,小鼠剂量按照成人的20倍进行实验)。每只小鼠的灌胃体积按照0.1 mL/10 g并根据每周的体质量变化进行调整。小鼠灌胃时间固定为每天下午4点。

1.3.4 小鼠体质量及Lee's指数 每周称量1次小鼠的体质量,记录各组小鼠的体质量增长量,并在实验结束(处死小鼠)前,测量小鼠体质量与体长,根据公式(1)计算Lee's指数:

$$\text{Lee's 指数} = \frac{\sqrt[3]{m} \times 10}{L} \quad (1)$$

式中: m 为体质量,g; L 为体长,cm。

1.3.5 小鼠葡萄糖耐量测试 各组小鼠禁食不禁水12 h过夜,灌糖前测定各组小鼠空腹血糖水平,之后根据各组小鼠体质量,按比例灌胃20%葡萄糖溶液(2 g/kg)^[24]。尾静脉取第2滴血,使用血糖仪测定小鼠的空腹血糖(第0 min时的血糖值),以及口服葡萄糖后15,30,60,120 min时的血糖值(分别记为A0,A15,A30,A60,A120),绘制糖耐受曲线,并根据公式(2)计算血糖曲线下面积(Area under the curve,AUC):

$$\text{AUC} = \frac{30 \times (A0 + 2 \times A15 + 2 \times A30 + 2 \times A60 + A120)}{2} \quad (2)$$

1.3.6 小鼠血液和肝脏生化指标的测定 实验小鼠眼球采血后离心(4℃,3 000 r/min,5 min),分离的血清按照试剂盒说明书提供的方法分别测定TG、TC、HDL-C和LDL-C的水平以及ALT和AST活性;肝组织样品匀浆后离心(4℃,3 500 r/min,10 min),取上清液,参照试剂盒说明书进行肝脏TC和TG水平的测定。

1.3.7 小鼠肝脏指数和组织切片观察 小鼠眼球采血后立即处死并解剖,取出完整的肝脏,先用生理盐水洗去表面血渍,再用灭菌滤纸吸干水渍后,迅速称重并放于-80℃保存。肝组织切片观察参照

郑丽等^[25]的方法。根据公式(3)计算小鼠肝脏指数：
肝脏指数(%) = (肝脏质量/体质量)×100 (3)
1.3.8 RT-PCR 检测小鼠肝组织脂质代谢基因含量 引物设计通过 Beacon designer 7.8 和 Primer Premier 6.0 软件完成，引物合成通过生工生物工程(上海)股份有限公司完成，引物序列如表 1 所

示。反应条件:95 ℃,1 min;40 个循环(95 ℃,15 s, 63 ℃,25 s, 收集荧光);55~95 ℃熔点曲线。以 *GAPDH* 作为内参基因，每个样品检测重复 3 次，各个基因的相对表达水平以 $2^{(Ct_{\text{内参基因}} - Ct_{\text{目的基因}})}$ 进行统计分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>FAS</i>	GCTTTGCTGCCGTGTCCTTCTA	CTGTCTTGGCACGCAGCAGT
<i>ACCI</i>	CGTGCAATCCGATTTGTTGTCATG	GGAACATAGTGGTCTGCCATCT
<i>CD36</i>	CAGATGACGTGGCAAAGAACAG	CAGAGTTCTTATCTAGCCAAGG
<i>SCD1</i>	GCACATCAAACTTCACCACGTT	CTACTCTTGACTCCCGTCT
<i>SREBP1C</i>	GCTGTTGGTGCTCGTCTCCTTG	GCTTGCGATGCCTCCAGAAGTAC
<i>GAPDH</i>	GAAGGTCGGTGTGAACGGATTTG	CATGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.3.9 Western Blot 检测小鼠肝组织 AMPK 信号通路蛋白水平 采用 RIPA Buffer 对小鼠肝组织进行总蛋白的提取，每孔加 60 μg 总蛋白进行上样，在 10%的 SDS-PAGE 中电泳约 2 h。然后将蛋白转移至 PVDF 膜上（事先在甲醇中浸泡 20 s）。转移结束后，封闭完于相应一抗(含 3%BSA)，4 ℃ 孵育过夜。再用 T-TBS 漂洗数次后，与二抗杂交(含 3%BSA)，室温孵育 1 h 后，用 ECL 工作液进行显影和定影。Western Blot 检测部分试验在杭州浩基生物科技有限公司完成检测分析。

1.3.10 小鼠肠道菌群的 16S rRNA V3-V4 区测序和检测 超净工作台上解剖小鼠并采集结肠中的粪便(约 2~3 粒)，及时液氮冷冻，样品送往北京擎科生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因高通量测序并提供检测结果。DNA 的提取参考试剂盒说明。使用 USEARCH (version 10.0) 在相似性 97%(默认)的水平上对序列进行聚类，并对其进行分类学注释特征性序列和微生物多样性分析。

1.4 数据统计分析

数据采用“平均数±标准差”表示，数据分析使用 SPSS 20.0 软件，并用 Origin 2022 作图。采用单因素方差分析和 Duncan 检验进行多重比较，*P*< 0.05 表示差异显著，*P*>0.05 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 开化龙顶绿茶主要功能成分的检测

2.1.1 开化龙顶绿茶加工工序中样品功能成分的动态变化分析 为更好探究龙顶绿茶的品质特性，本研究采集开化龙顶绿茶加工各环节样品，共 7 个工序依次为鲜叶、萎凋、杀青、回潮、揉捻、第 2 次杀青、提香，并对其主要功能成分进行检测，结果如表 2 所示。鲜叶中茶多酚含量最高为(29.36±0.34)%，提香中茶多酚含量最低为(21.46±0.34)%，并且各工序茶样中茶多酚含量两两之间均呈现显著性差异(*P*<0.05)；鲜叶中咖啡碱含量最高为(4.16±0.01)%，回潮环节样品咖啡碱含量最低为(1.96±0.01)%；鲜叶中水分含量最高为(75.18±0.07)g/100g，提香中水分含量最低为(4.13±0.09)g/100g，并且各工序茶样的水分含量两两之间均表现出显著差异(*P*<0.05)，其中杀青与回潮工序茶样之间的水分含量差异不显著 (*P*>0.05)；萎凋环节茶样可溶性糖含量最高为 (2.13±0.01)%，第 2 次杀青花样可溶性糖含量最低为(1.37±0.01)%，除了鲜叶和提香工序茶样之间可溶性糖含量表现为差异不显著(*P*>0.05)之外，各工序茶样的可溶性糖含量两两之间均表现出明显差异 (*P*<0.05)；鲜叶中游离氨基酸含量最高为(8.70±0.01)%，提香茶样中游离氨基酸含量最低为

(2.50 ± 0.01)%,各工序茶样的游离氨基酸含量两两之间均表现出显著性差异($P<0.05$);回潮中水浸出物含量最高为(35.77 ± 0.08)%,萎凋样品中水浸出物含量最低为(30.30 ± 0.95)%,并且回潮与杀青、揉捻以及第2次杀青工序茶样之间的水浸出物含量均表现为差异显著($P<0.05$)。

表 2 开化龙顶绿茶中的主要功能成分

Table 2 Main functional components in Kaihua Longding green tea

成分	鲜叶	萎凋	杀青	回潮	揉捻	第2次杀青	提香
茶多酚/%	29.36 ± 0.34^a	28.37 ± 0.73^b	26.30 ± 0.42^c	25.51 ± 0.58^d	24.73 ± 0.49^e	23.20 ± 0.14^f	21.46 ± 0.34^g
咖啡碱/%	4.16 ± 0.01^a	3.02 ± 0.01^c	3.56 ± 0.01^b	1.96 ± 0.01^d	3.37 ± 0.01^{bc}	2.28 ± 0.01^d	3.69 ± 0.01^{ab}
水分含量/(g/100g)	75.18 ± 0.07^a	68.14 ± 0.44^b	40.92 ± 1.37^c	42.15 ± 1.09^c	38.63 ± 1.25^d	17.61 ± 1.55^e	4.13 ± 0.09^f
可溶性糖/%	1.90 ± 0.01^b	2.13 ± 0.01^a	1.76 ± 0.01^c	1.47 ± 0.01^e	1.55 ± 0.01^d	1.37 ± 0.01^f	1.91 ± 0.01^b
游离氨基酸/%	8.70 ± 0.01^a	6.86 ± 0.02^b	4.12 ± 0.01^c	4.55 ± 0.01^d	4.57 ± 0.01^e	2.58 ± 0.02^f	2.50 ± 0.01^g
水浸出物/%	34.46 ± 0.39^{ab}	30.30 ± 0.95^d	33.22 ± 0.08^{bc}	35.77 ± 0.08^a	31.59 ± 0.01^{cd}	31.97 ± 1.32^{cd}	34.56 ± 0.97^{ab}

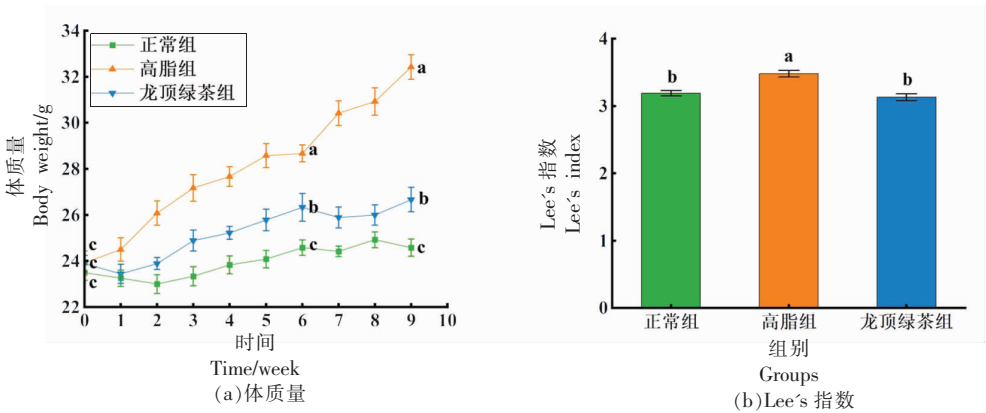
注:同一指标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),下同。

2.1.2 茶水提物冻干粉主要功能成分的检测 开化龙顶绿茶水提物冻干粉主要功能成分为:可溶性糖(3.00 ± 0.01)%,咖啡碱(8.54 ± 0.06)%,可溶性蛋白(4.85 ± 0.05)%,茶多酚(48.24 ± 0.47)%和游离氨基酸(5.08 ± 0.04)%。

2.2 开化龙顶绿茶水提物对高脂饮食小鼠生理指标的干预作用

2.2.1 对小鼠体质量和 Lee's 指数的影响 图 1 表示开化龙顶绿茶水提物对小鼠体质量及 Lee's

指数的影响。结果显示,正常组和高脂组小鼠的初始体质量没有显著差异($P>0.05$),经 1 周的适应性喂养和 8 周的干预实验后,正常组和高脂组小鼠的终体质量和 Lee's 指数具有显著性差异($P<0.05$),同时结合生化指标检测结果,说明高脂肥胖小鼠模型建立成功。同时,与高脂组相比,经过龙顶绿茶的长期干预后,高脂饮食小鼠的终体质量和 Lee's 指数均明显降低($P<0.05$)。



注:图中相同指标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),下同。

图 1 开化龙顶绿茶水提物对小鼠体质量(a)及 Lee's 指数(b)的影响

Fig.1 Effect of Kaihua Longding green tea water extract on body weight (a) and Lee's index (b)

2.2.2 对小鼠血糖代谢水平的影响 葡萄糖耐量主要反映机体对血糖水平的调控能力^[26]。图 2 显示开化龙顶绿茶水提物对小鼠糖代谢的影响。由图 2a 可知,正常组小鼠在口服葡萄糖溶液后,其体内血糖值表现为先升高后降低的趋势,并于 2

h 后基本回到正常水平。与正常组相比,高脂组小鼠体内血糖值虽然也呈先升后降低的趋势,但其在 2 h 后的血糖值仍处于高水平,说明高脂饮食导致小鼠体内的糖耐受产生异常现象。由图 2b 可知,与正常组小鼠相比,高脂组和龙顶绿茶组小鼠

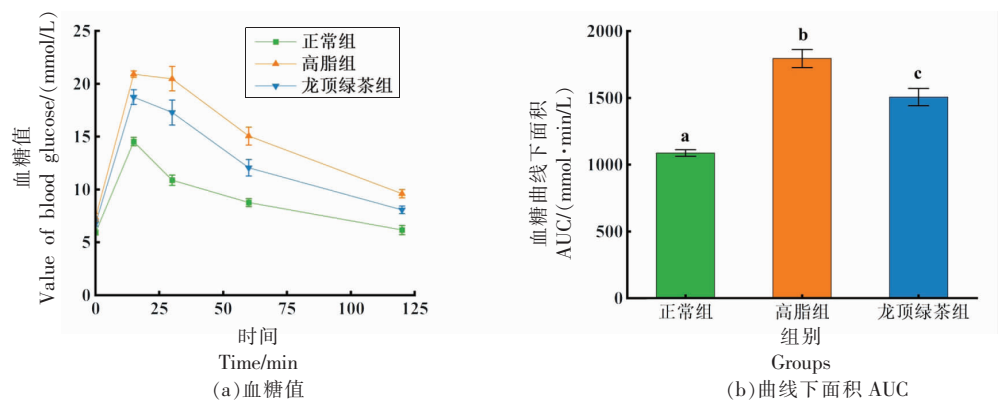


图 2 开化龙顶绿茶水提取物对小鼠糖代谢的影响

Fig.2 Effect of Kaihua Longding green tea water extract on glucose metabolism

的 AUC 值显著升高 ($P<0.05$), 而龙顶绿茶组的 AUC 值显著低于高脂组 ($P<0.05$)。

2.2.3 对小鼠血脂代谢的影响 各组小鼠的血清指标 (TC、TG、LDL-C、HDL-C、AST 和 ALT) 检测结果如表 3 所示。高脂组小鼠血清中 TG、TC、

LDL-C、AST 和 ALT 水平较正常组小鼠显著升高 ($P<0.05$), HDL-C 水平无明显差异 ($P>0.05$); 龙顶绿茶组小鼠 TC、TG、LDL-C、AST 和 ALT 水平较高脂组显著降低 ($P<0.05$)。

表 3 开化龙顶绿茶水提取物对血脂的影响

Table 3 Effect of Kaihua Longding green tea water extract on serum lipids

指标	正常组	高脂组	龙顶绿茶组
总胆固醇 TC/(mmol/L)	3.12 ± 0.26^c	5.52 ± 0.37^a	4.23 ± 0.20^b
总甘油三酯 TG/(mmol/L)	0.57 ± 0.07^c	0.99 ± 0.05^a	0.76 ± 0.03^b
低密度脂蛋白 LDL-C/(mmol/L)	0.21 ± 0.04^c	0.51 ± 0.05^a	0.34 ± 0.02^b
高密度脂蛋白 HDL-C/(mmol/L)	3.12 ± 0.22^a	2.60 ± 0.23^a	2.63 ± 0.15^a
谷草转氨酶 AST/(U/L)	29.40 ± 2.23^c	48.77 ± 2.42^a	32.98 ± 0.63^b
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	7.65 ± 0.30^c	15.51 ± 0.92^a	12.93 ± 0.46^b

2.3 开化龙顶绿茶水提取物对高脂饮食小鼠肝组织脂质代谢的干预效应

2.3.1 对小鼠肝组织形态的影响 脏器指数可用于反映动物内部器官的健康状态^[27]。表 4 为开化龙顶绿茶水提取物对肝脏指数和肝脏 TC、TG 含量的影响。由表 4 可知,与正常组小鼠相比,高脂组和龙顶绿茶组小鼠体内肝脏指数均显著增加 ($P<$

0.05), 而龙顶绿茶组的肝脏指数显著低于高脂组 ($P<0.05$)。另外,经过干预实验第 9 周各组小鼠肝组织中 TC 和 TG 含量两两之间均呈现显著性差异 ($P<0.05$), 其中,高脂组小鼠肝组织 TC 和 TG 含量显著高于正常组 ($P<0.05$), 而龙顶绿茶组的 TC 和 TG 含量较高脂组分别下降 6.30% 和 28.95%, 具有显著性差异 ($P<0.05$)。

表 4 开化龙顶绿茶水提取物对肝脏指数和肝脏 TC、TG 含量的影响

Table 4 Effects of Kaihua Longding green tea water extract on liver index and the contents of TC, TG in liver

指标	正常组	高脂组	龙顶绿茶组
肝脏指数/%	3.16 ± 0.06^c	4.02 ± 0.04^a	3.67 ± 0.04^b
肝脏总胆固醇 TC/(mmol/L)	0.12 ± 0.01^c	0.16 ± 0.01^a	0.15 ± 0.01^b
肝脏总甘油三酯 TG/(mmol/L)	0.12 ± 0.01^c	0.38 ± 0.01^a	0.27 ± 0.02^b

小鼠肝组织切片 HE 染色结果,如图 3 所示,正常组小鼠肝组织细胞形态完整,排列整齐,未见明显的脂肪空泡。高脂组小鼠肝细胞排列不整齐,有明显的脂肪空泡出现。龙顶绿茶组小鼠肝细胞

排列较整齐,肝细胞中出现脂肪空泡的区域相比高脂组明显减少。上述现象不仅与各组小鼠肝脏指数的检测结果相吻合,也验证了高脂饮食诱导小鼠肥胖模型成功。

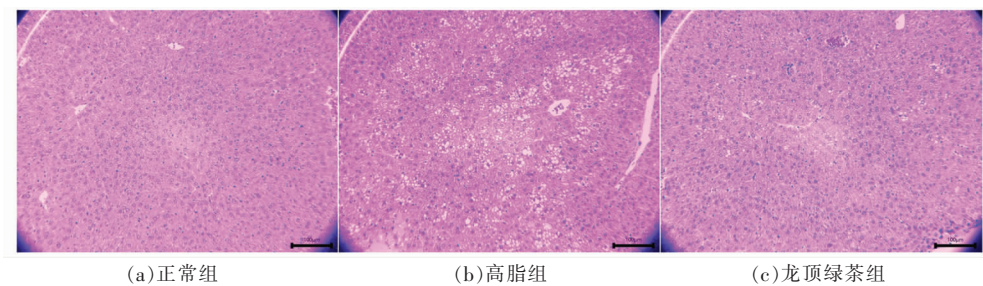


图 3 肝组织染色结果(200×)
Fig.3 Staining results of mouse liver tissue (200×)

2.3.2 对小鼠肝组织 AMPK 信号通路基因转录水平的干预作用 开化龙顶绿茶水提物对小鼠肝组织脂质代谢 AMPK 信号通路相关基因(*FAS*、*ACCI*、*CD36*、*SCD1* 和 *SREBP1C*) 转录水平的影响,如表 5 所示。与正常组相比,高脂饮食导致小

鼠肝组织内 *FAS*、*ACCI*、*CD36*、*SCD1* 和 *SREBP1C* 基因转录水平显著升高($P<0.05$)。与高脂组相比,龙顶绿茶组小鼠肝组织内 *FAS*、*ACCI*、*CD36*、*SCD1* 和 *SREBP1C* 基因转录水平显著降低($P<0.05$)。

表 5 开化龙顶绿茶水提物对肝脂质代谢 AMPK 信号通路相关基因转录水平的影响
Table 5 Effects of Kaihua Longding green tea water extract on the transcription levels of genes of AMPK signaling pathway in liver lipid metabolism

基因转录水平	正常组	高脂组	龙顶绿茶组
<i>FAS</i>	1.00 ± 0.01 ^c	3.28 ± 0.03 ^a	2.62 ± 0.05 ^b
<i>ACCI</i>	1.00 ± 0.01 ^c	3.04 ± 0.02 ^a	2.41 ± 0.02 ^b
<i>CD36</i>	1.00 ± 0.02 ^c	3.38 ± 0.06 ^a	2.35 ± 0.02 ^b
<i>SCD1</i>	1.00 ± 0.01 ^c	5.12 ± 0.05 ^a	3.52 ± 0.04 ^b
<i>SREBP1C</i>	1.00 ± 0.01 ^c	4.16 ± 0.07 ^a	3.33 ± 0.08 ^b

2.3.3 对小鼠肝组织脂质代谢 AMPK 信号通路蛋白表达的影响效应 开化龙顶绿茶水提物干预小鼠肝组织脂质代谢 AMPK 信号通路蛋白表达水平如表 6 和图 4 所示,高脂饮食会诱发小鼠肝组织中 *FAS*、*SREBP1C* 和 *ACC1* 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),同时伴随着 *ACC1* (p-*ACC1*)磷酸化水平降低($P<0.05$),经开化龙顶绿茶水提物干预实验后,小鼠肝组织中 *FAS*、*SREBP1C* 和 *ACC1* 的表达水平得到抑制 ($P<0.05$),同时,*ACC1* (p-*ACC1*)磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。另外,高脂

饮食导致小鼠肝组织中 APMKα(p-AMPK)的磷酸化水平大幅降低($P<0.05$),经过开化龙顶绿茶水提物干预后,其磷酸化水平显著上升($P<0.05$)。

2.4 开化龙顶绿茶水提物对高脂饮食小鼠的肠道菌群结构与组成效应的影响

2.4.1 α多样性分析 α多样性主要反映样品内部的物种丰富度和均匀度,α多样性结果如图 5 所示。由图 5a 和 5b 可知,3 组小鼠肠道菌群两两之间的 Shannon 指数和 Simpson 指数无明显变化 ($P>0.05$)。由图 5c 和 5d 可知,与正常组相比,龙

表 6 开化龙顶绿茶水提取物对肝脂代谢 AMPK 信号通路蛋白表达水平的影响

Table 6 Effects of Kaihua Longding green tea water extract on the expression levels of AMPK signaling pathway in liver lipid metabolism

蛋白表达水平	正常组	高脂组	龙顶绿茶组
FAS	1.00 ± 0.01 ^c	2.52 ± 0.05 ^a	2.13 ± 0.01 ^b
p-ACC1	1.00 ± 0.02 ^a	0.29 ± 0.02 ^c	0.59 ± 0.01 ^b
SREBP1C	1.00 ± 0.04 ^c	4.21 ± 0.09 ^a	2.48 ± 0.02 ^b
p-APMKα	1.00 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.02 ^c	0.80 ± 0.01 ^b
ACC1(p-ACC1)	1.00 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.01 ^c	0.52 ± 0.01 ^b
APMKα(p-APMKα)	1.00 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.01 ^c	0.71 ± 0.01 ^b

顶绿茶组小鼠肠道菌群 ACE 指数和 Chao1 指数显著升高 ($P<0.05$)。高脂组和龙顶绿茶组小鼠肠道菌群 α 多样性指数虽然没有明显的差异,但龙顶绿茶组的数值具有更高的水平,更接近于正常组小鼠。

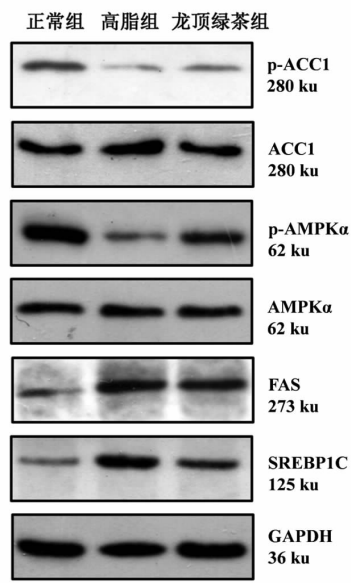


图 4 蛋白表达的电泳结果

Fig.4 Western Blotting of protein expression

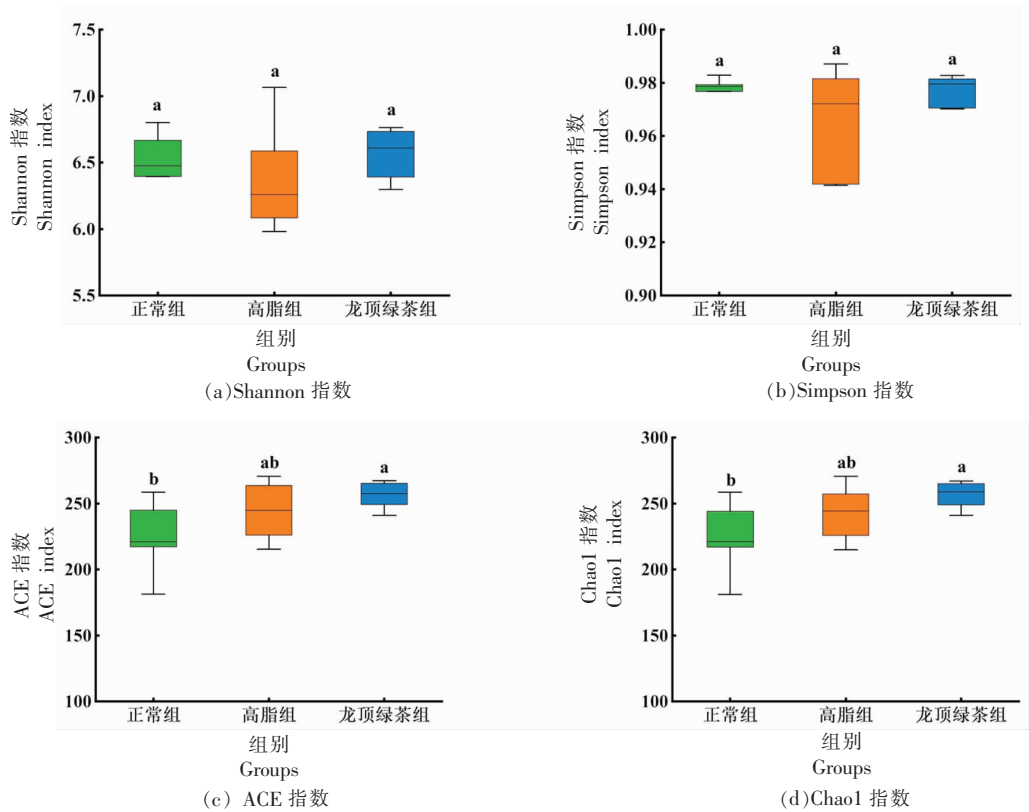


图 5 肠道菌群 α 多样性指数 ($n=6$)

Fig.5 Gut microbiota α -diversity index ($n=6$)

2.4.2 β 多样性分析 小鼠肠道菌群 β 多样性结果,如图 6 所示,PC1 和 PC2 分别占小鼠肠道菌群结构总体差异的 34.68%和 10.36%,可见正常组与高脂组、龙顶绿茶组小鼠肠道菌群组成结构两两

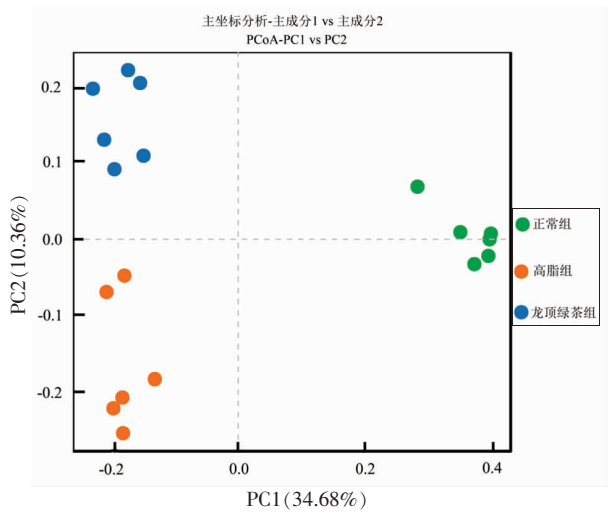


图6 肠道菌群主坐标分析(n=6)

Fig.6 Principal coordinates analysis of gut microbiota (n=6)

之间存在差异,经过开化龙顶绿茶水提物干预,小鼠肠道菌群的组成多样性发生变化,并且促使小鼠肠道菌群结构趋向于正常组小鼠肠道菌群生态。

2.4.3 小鼠肠道菌群门水平、纲水平和属水平物种丰度的结果分析 小鼠肠道菌群门水平、纲水

平和属水平物种丰度,如图7所示。从门的水平上微生物分类组成及比例可以看出(图7a),厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)是所有肠道菌群中相对丰度最高的门类,平均占比超过80%。与正常组相比,高脂组小鼠肠道菌群中厚壁菌门的丰度占比明显上升,拟杆菌门的丰度占比明显下降。图7b为各组小鼠肠道菌群中厚壁菌门与拟杆菌门之间的比值(F/B值),其中高脂组的F/B值最高,约为正常组F/B值的3倍,而龙顶绿茶组的F/B值较高脂组下降了46.40%。

从纲水平(图7c)上菌群分类及组成可以看出,拟杆菌纲(Bacteroidia)和梭菌纲(Clostridia)在各组小鼠肠道中均为优势菌。其中,拟杆菌纲的相对丰度在正常组中最高(63%),其次为龙顶绿茶组(51%)和高脂组(36%),而梭菌纲在龙顶绿茶组(31%)和高脂组(30%)中相对丰度远高于正常组(15%)。

在属水平上(如图7d所示)小鼠肠道菌群中相对丰度大于10%的菌属,正常组有:unclassified_Muribaculaceae(39%)和 uncultured_Bac-

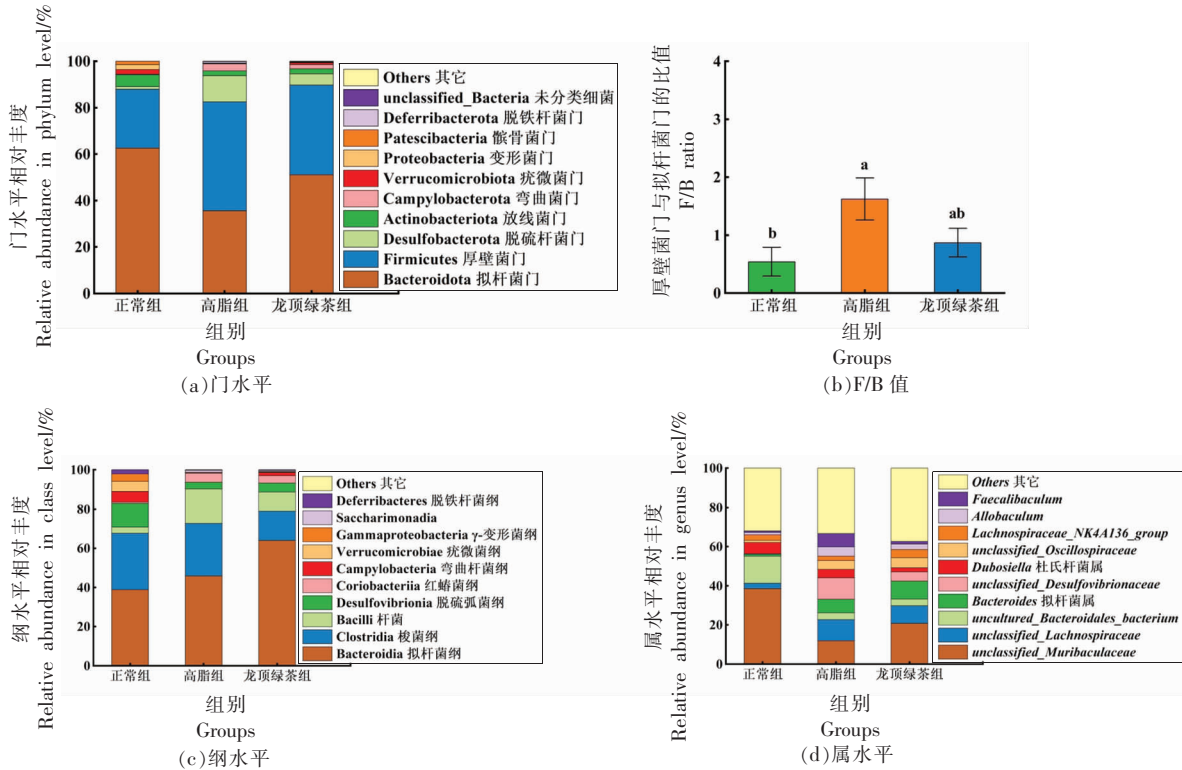


图7 开化龙顶绿茶水提物对小鼠肠道菌群结构的影响

Fig.7 Effects of Kaihua Longding green tea water extract on the structure of gut microbiota

teroidales_bacterium (14%); 高脂组有 :unclassified_Muribaculaceae (12%)、unclassified_Lachnospiraceae (11%) 和 unclassified_Desulfovibrionaceae (11%); 龙顶绿茶组 :unclassified_Muribaculaceae (21%)。研究结果表明 3 组小鼠肠道菌群在属水平上存在明显差异($P<0.05$)。

2.4.4 LEfSe 分析 LEfSe 多级物种差异线性判别分析($LDA\geq 4$),解析经过开化龙顶绿茶水提物干预实验,各组小鼠体内菌群的具体变化结果如图 8 所示。正常组小鼠肠道中主要标志性菌群为 Muribaculaceae、拟杆菌纲、拟杆菌目和拟杆菌门;高脂组的标志性菌群为厚壁菌门和脱硫弧菌目;龙顶绿茶组的标志性菌群为理研菌科(Rikenellaceae)、布劳特氏菌属(*Blautia*)和另枝菌属(*Alis-tipes*)。

3 讨论

3.1 开化龙顶绿茶水提物对肝脂肪变性 AMPK 信号通路干预作用

肝组织作为脂质代谢的重要场所之一,能够调节动物机体内血脂代谢水平,促进脂肪在动物机体内的转化。因此,当肝脏出现病变时,动物机体内的血脂代谢过程也会发生复杂的变化。茶叶作为一种天然的健康饮品,能够有效缓解机体内肝等脏器的损伤^[28-30]。开化龙顶绿茶的主要成分检测结果显示其主要功能成分含量与其它名优绿茶相类似^[31],具有良好品质。动物实验结果证实,开化龙顶绿茶水提物能够有效抑制高脂饮食诱导的小鼠体质量和 Lee's 指数的增加,改善糖耐受异常现象,降低血清中 TC、TG、LDL-C、AST 和 ALT 水平,减轻肝组织中脂质的过度堆积,并有效干预小鼠肝组织脂质代谢 AMPK 信号通路基因(*FAS*、*ACC1*、*CD36*、*SCD1* 和 *SREBP1C*)mRNA 转录水平和蛋白(*FAS*、*SREBP1C*、*ACC1* 和 *AMPK α*)表达水平^[32-41],上述结论与其他学者的研究结果相一致^[42-46]。

对开化龙顶绿茶水提物主要功能成分含量与脂质代谢生化指标、信号通路分子水平进行相关性分析,结果如图 9 所示。

由图 9a 可知,茶多酚含量与血清 TC、TG、LDL-C、AST 和 ALT 水平以及肝脏 TC、TG 水平呈

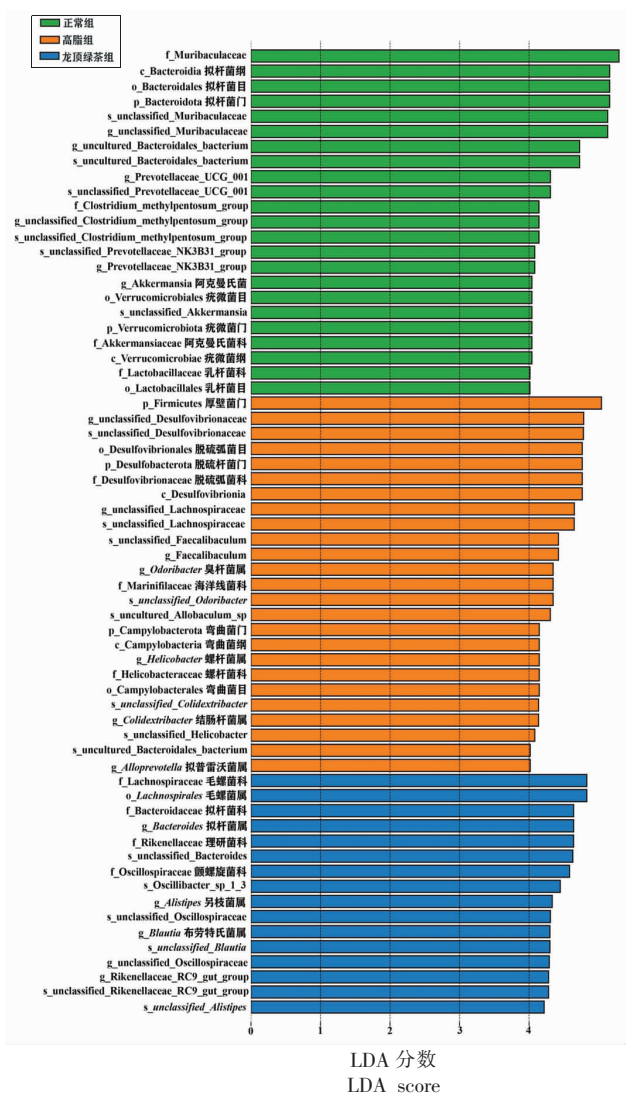


图 8 LEfSe 多级物种差异线性判别分析

Fig.8 Linear discriminant analysis of LEfSe multilevel species differences

负相关(相关系数 r 分别为 -0.43 , -0.45 , -0.31 , -0.38 , -0.46 , -0.44 , -0.47),与血清 HDL-C 水平呈正相关(相关系数 r 为 0.6);游离氨基酸含量与血清 TC、TG、LDL-C、AST 和 ALT 水平以及肝脏 TC、TG 水平呈负相关(相关系数 r 分别为 -0.3 , -0.23 , -0.098 , -0.2 , -0.32 , -0.29 , -0.21),与血清 HDL-C 水平呈正相关(相关系数 r 为 0.47);可溶性糖含量与血清 TC、TG、LDL-C、AST 和 ALT 水平以及肝脏 TC、TG 水平呈负相关(相关系数 r 分别为 -0.56 , -0.61 , -0.54 , -0.72 , -0.66 , -0.7 , -0.66),与血清 HDL-C 水平呈正相关(相关系数 r

为 0.14);咖啡碱含量与血清 TC、TG、LDL-C、AST 和 ALT 水平以及肝脏 TC、TG 水平呈负相关(相关系数 r 分别为 -0.6, -0.64, -0.56, -0.56, -0.63, -0.67, -0.49),与血清 HDL-C 水平呈正相关(相关系数 r 为 0.052)。

由图 9b 可知,茶多酚含量与 FAS、ACC1、CD36、SCD1、SREBP1C/GAPDH 和 FAS/GAPDH 的水平呈负相关(相关系数 r 分别为 -0.44, -0.46, -0.41, -0.43, -0.45, -0.46, -0.47),与 p-ACC1/ACC1、p-ACC1/GAPDH、p-AMPK α /AMPK α 和 p-AMPK α /GAPDH 的水平呈正相关(相关系数 r 分别为 0.45, 0.45, 0.44, 0.45);游离氨基酸含量与 FAS、ACC1、CD36、SCD1、SREBP1C/GAPDH 和 FAS/GAPDH 的水平呈负相关(相关系数 r 分别为 -0.23, -0.3, -0.21, -0.21, -0.24, -0.29, -0.29),

与 p-ACC1/ACC1、p-ACC1/GAPDH、p-AMPK α /AMPK α 和 p-AMPK α /GAPDH 的水平呈正相关(相关系数 r 分别为 0.26, 0.26, 0.23, 0.26);可溶性糖含量与 FAS、ACC1、CD36、SCD1、SREBP1C/GAPDH 和 FAS/GAPDH 的水平呈负相关(相关系数 r 分别为 -0.7, -0.72, -0.69, -0.6, -0.61, -0.73, -0.72),与 p-ACC1/ACC1、p-ACC1/GAPDH、p-AMPK α /AMPK α 和 p-AMPK α /GAPDH 的水平呈正相关(相关系数 r 分别为 0.71, 0.71, 0.64, 0.71);咖啡碱含量与 FAS、ACC1、CD36、SCD1、SREBP1C/GAPDH 和 FAS/GAPDH 的水平呈负相关(相关系数 r 分别为 -0.49, -0.6, -0.53, -0.6, -0.59, -0.57, -0.58),与 p-ACC1/ACC1、p-ACC1/GAPDH、p-AMPK α /AMPK α 和 p-AMPK α /GAPDH 的水平呈正相关(相关系数 r 分别为 0.61, 0.61, 0.63, 0.61)。

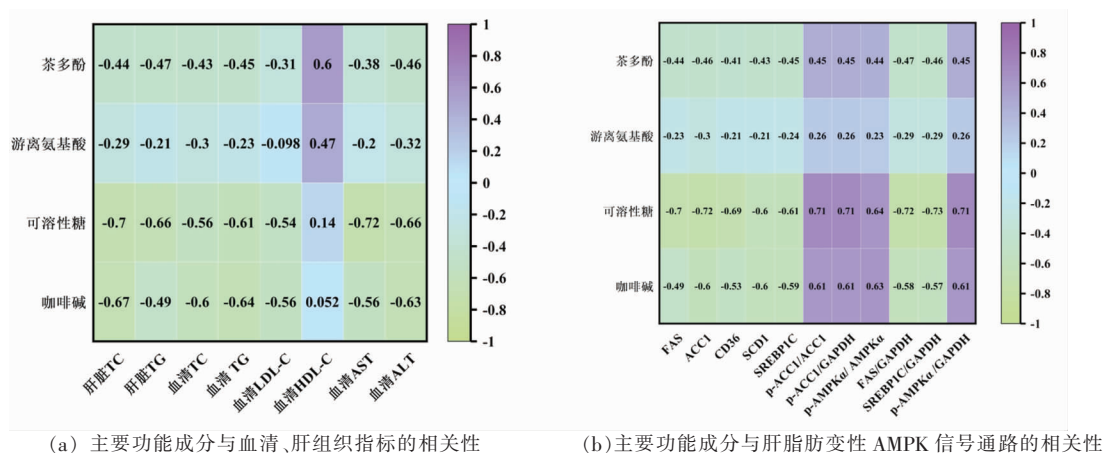


图 9 开化龙顶绿茶水提取物主要功能成分与脂质代谢指标的相关性分析

Fig.9 Correlation between main functional components in Kaihua Longding green tea water extract and indexes in lipid metabolism

3.2 开化龙顶绿茶水提取物对肠道菌群紊乱的干预效应

相关研究已证实肠道菌群与机体的能量代谢有一定关联^[47-48],而不同饮食习惯会显著影响肠道菌群的微生物结构^[49-50]。小鼠肠道菌群的 α 和 β 多样性分析结果显示,高脂饮食可以改变小鼠体内肠道菌群的分布,而开化龙顶绿茶水提取物能通过增加肠道菌群的物种数,在一定程度上缓解这种趋势。F/B 值是衡量机体肥胖程度的重要参考因素之一^[51],本研究结果显示高脂组小鼠肠道菌群中 F/B 值较正常组显著增加 ($P < 0.05$),在开化龙

顶绿茶水提取物的干预下,F/B 值增加这一趋势得到缓解,这可能也是开化龙顶绿茶水提取物能够减轻肥胖小鼠体质量的原因之一。

LEfSe 分析的结果表明,高脂饮食导致小鼠体内肠道菌群结构发生显著变化,而开化龙顶绿茶水提取物可通过促进理研菌科、布劳特氏菌属和另枝菌属等有益菌^[52-55]相对丰度的增加,具有调节并明显改善高脂饮食导致小鼠体内肠道菌群紊乱的效应。

对开化龙顶绿茶水提取物主要功能成分与门水平肠道菌群主要群落进行相关性分析,结果如图

10 所示。茶多酚含量与放线菌门、变形菌门和髌骨菌门的相对丰度呈负相关 (相关系数 r 分别为 $-0.81, -0.68, -0.78$), 与拟杆菌门、厚壁菌门、脱硫杆菌门和疣微菌门的相对丰度呈正相关 (相关系数 r 分别为 $0.0031, 0.068, 0.51, 0.84$); 游离氨基酸含量与拟杆菌门、放线菌门、变形菌门和髌骨菌门的相对丰度呈负相关 (相关系数 r 分别为 $-0.21, -0.67, -0.8, -0.62$), 与厚壁菌门、脱硫杆菌门和疣微菌门的相对丰度呈正相关 (相关系数 r 分别为 $0.24, 0.65, 0.79$); 可溶性糖含量与厚壁菌门和脱硫杆菌门的相对丰度呈负相关 (相关系数 r 分别为 $-0.75, -0.55$), 与拟杆菌门、放线菌门、变形菌门、髌骨菌门和疣微菌门的相对丰度呈正相关 (相关系数 r 分别为 $0.75, 0.27, 0.47, 0.21, 0.049$); 咖啡碱含量与厚壁菌门和脱硫杆菌门的相对丰度呈负相关 (相关系数 r 分别为 $-0.51, -0.36$), 与拟杆菌门、放线菌门、变形菌门、髌骨菌门和疣微菌门的相对丰度呈正相关 (相关系数 r 分别为 $0.47, 0.25, 0.16, 0.2, 0.064$)。

上述结果表明, 开化龙顶绿茶水提物对高脂饮食小鼠脂质代谢和肠道菌群的干预作用, 可能与其所含的功能成分物质 (如茶多酚、可溶性糖和咖啡碱等) 有关, 该结果与其他学者的研究结论相一致^[56-59]。因此, 绿茶中主要功能成分的含量可能会极大程度影响其对脂质代谢和肠道菌群的作用效果。研究已经发现茶在加工过程中其主要功能成分的含量往往会发生一些改变^[60]。本文通过分析开化龙顶绿茶在各加工环节主要功能成分的变化趋势, 发现随着加工工序的不断深入, 其某些组分 (如茶多酚和游离氨基酸) 的含量明显降低 ($P < 0.05$)。因此, 可以通过改进开化龙顶绿茶某些加工环节的工艺 (如时间和温度), 最大程度降低其主要功能成分在加工过程中的损失, 从而提升开化龙顶绿茶对脂质代谢和肠道菌群的干预效果。

4 结论

本研究发现长期饮用开化龙顶绿茶, 可以显著改善高脂饮食小鼠体内的血脂代谢水平, 明显影响小鼠肝组织脂质代谢 AMPK 信号通路基因转录和蛋白质的表达水平, 能够促进小鼠肠道理研菌科、布劳特氏菌属和另枝菌属等有益菌丰度的

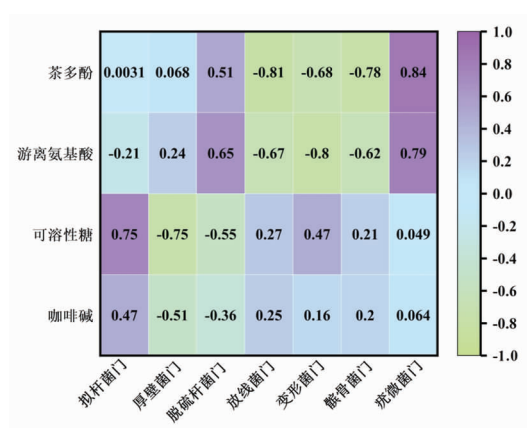


图 10 开化龙顶绿茶水提物主要功能成分与门水平肠道菌群主要群落的相关性

Fig.10 Correlation between main functional components in Kaihua Longding green tea water extract and main gut microbiota in phylum level

增加, 有效缓解小鼠体内肠道菌群的紊乱症状, 进一步分析开化龙顶绿茶水提物对小鼠脂质代谢和菌群的干预作用, 发现其干预效果与其所含的主要功能成分具有重要相关性。因此, 通过动物体内营养健康功效实验数据, 验证和指导开化龙顶绿茶加工工艺的优化, 进而提高茶制品中特定功能成分的含量, 减少其在加工过程中的损耗, 为进一步创制开化龙顶新产品和资源高值化利用, 提供理论依据和数据支撑。

参 考 文 献

- [1] SARMA S, SOCKALINGAM S, DASH S. Obesity as a multisystem disease: Trends in obesity rates and obesity - related complications [J]. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2021, 23(S1): 3-16.
- [2] ZIPPL A L, SEEGER B, WILDT L. Obesity and infertility: Are hyperlipidemia and hyperinsulinemia the bad guys?[J]. Fertility and Sterility, 2021, 116 (2): 365-366.
- [3] ROHM T V, MEIER D T, OLEFSKY J M, et al. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders[J]. Immunity, 2022, 55(1): 31-55.
- [4] HALL M E, COHEN J B, ARD J D, et al. Weight-loss strategies for prevention and treatment of hypertension: A scientific statement from the American heart association[J]. Hypertension, 2021,

- 78(5): e38-e50.
- [5] PETRELLI F, CORTELLINI A, INDINI A, et al. Association of obesity with survival outcomes in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. JAMA network open, 2021, 4 (3): e213520.
- [6] 崔丽梅,吕纳强. 肥胖的疾病特征[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 22-25.
CUI L M, LÜ N Q. The clinical characteristics of obesity[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 22-25.
- [7] HAZZARD V M, SIMONE M, AUSTIN S B, et al. Diet pill and laxative use for weight control predicts first - time receipt of an eating disorder diagnosis within the next 5 years among female adolescents and young adults[J]. International Journal of Eating Disorders, 2021, 54(7): 1289-1294.
- [8] LEVINSON J A, SARDA V, SONNEVILLE K, et al. Diet pill and laxative use for weight control and subsequent incident eating disorder in US young women: 2001-2016[J]. American Journal of Public Health, 2020, 110(1): 109-111.
- [9] LIN F J, WEI X L, LIU H Y, et al. State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 126-138.
- [10] SHANG A, LI J, ZHOU D D, et al. Molecular mechanisms underlying health benefits of tea compounds[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 172: 181-200.
- [11] XU X Y, ZHAO C N, LI B Y, et al. Effects and mechanisms of tea on obesity[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 63(19): 1-18.
- [12] ZHOU F, LI Y L, ZHANG X, et al. Polyphenols from Fu Brick tea reduce obesity via modulation of gut microbiota and gut microbiota-related intestinal oxidative stress and barrier function[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69 (48): 14530-14543.
- [13] BUKHARI H M, ZAHRAN S E, BAKR E S H, et al. Comparison study between drugs (orlistat and chitocal) and food supplements (green tea and apple cider vinegar) for weight loss and hepatoprotection in rats [J]. The Egyptian Journal of Hospital Medicine, 2021, 83(1): 1218-1223.
- [14] 方辉韩,金翠,郑志林,等. 开化龙顶茶产业发展现状及对策[J]. 中国茶叶, 2020, 42(8): 70-73.
- FANG H H, JIN C, ZHENG Z L, et al. Development status and countermeasures of Kaihua Longding tea[J]. China Tea, 2020, 42(8): 70-73.
- [15] 杨勤,谷文超,周浓,等. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究[J]. 食品科技, 2020, 45(1): 343-350.
- YANG Q, GU W C, ZHOU N, et al. Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric methods for determination of polysaccharide in *Lycopus lucidus* tilrcz. var. *hirtus* regel[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(1): 343-350.
- [16] 涂云飞. 茶叶儿茶素及咖啡碱检测方法中提取条件研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(22): 73-78.
- TU Y F. Studies on extraction method for quantification of catechins and caffeine in green tea [J]. Food Research and Development, 2018, 39 (22): 73-78
- [17] 宋亚赛,宁井铭,张正竹,等. 考马斯亮蓝法定量评估绿茶涩味强度[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42 (6): 141-146.
- SONG Y S, NING J M, ZHANG Z Z, et al. Study on the quantitative evaluation of green tea astringency intensity using Bradford method [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(6): 141-146.
- [18] 国家标准化管理委员会. 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法:GB/T 8313-2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1-5.
- Standardization Administration. Detectionation of total polyphenols and catechins in tea: GB/T 8313-2018 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2018: 1-5.
- [19] 谭建宁,杜成智,梁臣艳,等. 龙脑叶总游离氨基酸含量测定[J]. 南方农业学报, 2016, 47(4): 645-649.
- TAN J N, DU C Z, LIANG C Y, et al. Determination of total free amino acid content in *Sauropus spatulifolius* Beille[J]. Journal of Southern Agriculture, 2016, 47(4): 645-649.
- [20] 全国茶叶标准化技术委员会. 茶 水浸出物测定:GB/T 8305-2013. 北京: 中国标准出版社, 2013: 1-2.
- National Technical Committee on Tea of Standardization Administration of China. Tea-Determination of water extracts content: GB/T 8305-2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2013: 1-2.
- [21] ZHOU C B, ZHOU X L, WEN Z R, et al. Compound Fu brick tea modifies the intestinal micro-

- biome composition in high - fat diet - induced obesity mice[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(10): 5508–5520.
- [22] 王蝶. 茶叶对肥胖大鼠的减肥作用及机制研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- WANG D. Studies on anti-obesity effects of tea extracts on high fat diet induced obese rats and their potential mechanisms[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012.
- [23] 吴文亮, 刘仲华, 林勇, 等. 陈年六堡茶对高脂血症小鼠的调脂护肝作用研究[J]. 茶叶科学, 2018, 38(4): 430–438.
- WU W L, LIU Z H, LIN Y, et al. Alleviative effects of aged Liupao tea on lipid metabolism and liver injury in hyperlipidemic mice[J]. Journal of Tea Science, 2018, 38(4): 430–438.
- [24] 李金磊. 黄芪散改善二型糖尿病胰岛素抵抗模型小鼠糖脂代谢及其机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- LI J L. Research on Huang Qi San improving glucose and lipid metabolism in C57BL/6j T2DM-IR mice and its mechanism[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [25] 郑丽, 侯彩云, 任发政. 几种茶叶提取物对高脂饮食小鼠肥胖的预防作用[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 192–199.
- ZHENG L, HOU C Y, REN F Z. Anti-obesity efficacy of extracts from several kinds of tea in high-fat diet-induced obese mice[J]. Food Science, 2018, 39(17): 192–199.
- [26] HAN L, SHEN W J, BITTNER S, et al. PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ [J]. Future Cardiology, 2017, 13(3): 279–296.
- [27] PIAO Y, LIU Y E, XIE X D. Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages[J]. Journal of Toxicologic Pathology, 2013, 26(1): 29–34.
- [28] HSU Y W, CHEN W K, TSAI C F. Senescence-mediated redox imbalance in liver and kidney: Antioxidant rejuvenating potential of green tea extract [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 19(1): 260.
- [29] SHAREEF S H, IBRAHIM I A A, ALZHRANI A R, et al. Hepatoprotective effects of methanolic extract of green tea against thioacetamide-induced liver injury in Sprague Dawley rats[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2022, 29(1): 564–573.
- [30] LI J, CHEN Q Y, ZHAI X M, et al. Green tea aqueous extract (GTAE) prevents high - fat diet - induced obesity by activating fat browning[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(12): 6548–6558.
- [31] 张雪寒, 潘波旭, 宋勤飞, 等. 7种贵州名优绿茶品质化学成分分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5105–5111.
- ZHANG X H, PANG B X, SONG Q F, et al. Analysis of quality chemical components of 7 kinds of famous green tea in Guizhou[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(16): 5105–5111.
- [32] 王金亭. 生物化学[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 2017: 163–169.
- WANG J T. Biochemistry[M]. Beijing: Beijing institute of technology press, 2017: 163–169.
- [33] VEPRİK A, DENWOOD G, LIU D, et al. Acetyl-CoA-carboxylase 1 (ACC1) plays a critical role in glucagon secretion[J]. Communications Biology, 2022, 5(1): 1–13.
- [34] BISWAS S, GAO D T, ALTEMUS J B, et al. Circulating CD36 is increased in hyperlipidemic mice: Cellular sources and triggers of release[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 168: 180–188.
- [35] SHU H Y, PENG Y Z, HANG W J, et al. The role of CD36 in cardiovascular disease[J]. Cardiovascular Research, 2022, 118(1): 115–129.
- [36] CIFARELLI V, APPAK-BASKOY S, PECHE V S, et al. Visceral obesity and insulin resistance associate with CD36 deletion in lymphatic endothelial cells[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1–15.
- [37] HOU Y J, WANG Q, HAN B S, et al. CD36 promotes NLRP3 inflammasome activation via the mtROS pathway in renal tubular epithelial cells of diabetic kidneys[J]. Cell Death & Disease, 2021, 12(6): 1–16.
- [38] ZOU Y, WANG Y N, MA H, et al. SCD1 promotes lipid mobilization in subcutaneous white adipose tissue[J]. Journal of lipid research, 2020, 61(12): 1589–1604.
- [39] OLGA L, VAN DIEPEN J A, BOBELDIJK-PAS-TOROVA I, et al. Lipid ratios representing SCD1, FADS1, and FADS2 activities as candidate

- biomarkers of early growth and adiposity[J]. *EBio Medicine*, 2021, 63: 103198.
- [40] LIU K L, LIN L Y, LI Q, et al. *Scd1* controls de novo beige fat biogenesis through succinate-dependent regulation of mitochondrial complex II[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(5): 2462–2472.
- [41] TAO W, CAO W G, YU B, et al. Hawk tea prevents high-fat diet-induced obesity in mice by activating the AMPK/ACC/SREBP1c signaling pathways and regulating the gut microbiota[J]. *Food & Function*, 2022, 13(11): 6056–6071.
- [42] ZHANG X N, WU Q, ZHAO Y, et al. Consumption of post-fermented Jing-Wei Fuzhuan brick tea alleviates liver dysfunction and intestinal microbiota dysbiosis in high fructose diet-fed mice[J]. *RSC advances*, 2019, 9(30): 17501–17513.
- [43] YE J, ZHAO Y, CHEN X M, et al. Pu-erh tea ameliorates obesity and modulates gut microbiota in high fat diet fed mice[J]. *Food Research International*, 2021, 144: 110360.
- [44] ZHANG X, ZHANG M, HO C T, et al. Metagenomics analysis of gut microbiota modulatory effect of green tea polyphenols by high fat diet-induced obesity mice model[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 46: 268–277.
- [45] WU Y, SUN H L, YI R K, et al. Anti-obesity effect of Liupao tea extract by modulating lipid metabolism and oxidative stress in high-fat-diet-induced obese mice [J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(1): 215–227.
- [46] LI M X, XU J L, ZHANG Y, et al. Comparative analysis of fecal metabolite profiles in HFD-induced obese mice after oral administration of huangjinya green tea extract[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 145: 111744.
- [47] NGOWI E E, WANG Y Z, KHATTAK S, et al. Impact of the factors shaping gut microbiota on obesity[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(5): 2131–2147.
- [48] DA SILVA T F, CASAROTTI S N, DE OLIVEIRA G L V, et al. The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2021, 61(2): 337–355.
- [49] ZMORA N, SUEZ J, ELINAV E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota[J]. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2019, 16(1): 35–56.
- [50] CHO K Y. Lifestyle modifications result in alterations in the gut microbiota in obese children[J]. *BMC microbiology*, 2021, 21(1): 1–15.
- [51] TURNBAUGH P J, BÄCKHED F, FULTON L, et al. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome[J]. *Cell Host & Microbe*, 2008, 3(4): 213–223.
- [52] TAVELLA T, RAMPELLI S, GUIDARELLI G, et al. Elevated gut microbiome abundance of Christensenellaceae, Porphyromonadaceae and Rikenellaceae is associated with reduced visceral adipose tissue and healthier metabolic profile in Italian elderly[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1880221.
- [53] ARNORIAGA-RODRÍGUEZ M, MAYNERIS-PERXACHS J, BUROKAS A, et al. Gut bacterial ClpB-like gene function is associated with decreased body weight and a characteristic microbiota profile[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 1–10.
- [54] OZATO N, SAITO S, YAMAGUCHI T, et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2019, 5(1): 1–9.
- [55] YAN X, YANG C F, LIN G P, et al. Antidiabetic potential of green seaweed *Enteromorpha prolifera* flavonoids regulating insulin signaling pathway and gut microbiota in type 2 diabetic mice[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(1): 165–173.
- [56] SONG R, KELMAN D, JOHNS K L, et al. Correlation between leaf age, shade levels, and characteristic beneficial natural constituents of tea (*Camellia sinensis*) grown in Hawaii[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(3): 707–714.
- [57] ZAPATA F J, REBOLLO -HERNANZ M, NOVAKOVSKI J E, et al. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103646.
- [58] UCHIYAMA S, TANIGUCHI Y, SAKA A, et al. Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nu-*

- trition, 2011, 27(3): 287–292.
- [59] LI Y, RAHMAN S U, HUANG Y Y, et al. Green tea polyphenols decrease weight gain, ameliorate alteration of gut microbiota, and mitigate intestinal inflammation in canines with high-fat-diet-induced obesity[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 78: 108324.
- [60] HAN Z X, RANA M M, LIU G F, et al. Green tea flavour determinants and their changes over manufacturing processes[J]. Food Chemistry, 2016, 212: 739–748.

Effect of Kaihua Longding Green Tea on AMPK Signaling Pathway of Hepatic Steatosis and Gut Microbiota Dysbiosis in High-fat Diet Mice

Zhang Yifan¹, Yuan Yiwei¹, Xu Qianqian^{1,2}, Gong Mingxiu¹, Ye Jiangcheng¹, Zhao Jin^{1,2*}, Ma Zhanyang¹

¹*Institute of Food Nutrition, Quality and Safety, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018*

²*Key Laboratory of Specialty Agri-product Quality and Hazard Controlling Technology of Zhejiang Province, Hangzhou 310018*

Abstract Objective: To explore the effect of Kaihua Longding green tea water extract on intervening AMPK signaling pathway of liver hepatic steatosis and gut microbiota dysbiosis in high-fat diet mice. Methods: Detect the dynamic changes trend of main functional components of samples from each processing procedures in Kaihua Longding green tea. After acclimation feeding for 1 week, 30 mice were randomly divided into the following three groups: normal control group (NC), high-fat diet group (HF) and Longding green tea group (LD), and were continuously administrated (NC and HF were given normal saline, LD was given tea water extract (300 mg/kg bw) for 8 weeks. The changes of body weight, Lee's index, blood glucose levels, serum lipid, pathobiology in liver tissues, AMPK signaling pathway in liver and gut microbiota were measured. Results: During processing procedures, the main functional components of Kaihua Longding green tea undergone certain changes. Compared to the "Fresh leaves" sample, the contents of tea polyphenol, free amino acids, caffeine, and moisture in the "Drying" sample were respectively reduced by 7.90%, 6.20%, 0.47%, and 71.05 g/100 g, while the contents of soluble sugar and water extract were respectively increased by 0.01% and 0.10%. Compared to the HF group, the LD group exhibited a significant difference ($P < 0.05$) in body weight (26.67 g), Lee's index (3.13), area under the glucose curve (1 505.25 mmol·min/L), and serum biochemical indices such as total cholesterol (TC) (4.23 mmol/L), and total triglycerides (TG) (0.76 mmol/L), and also reduced the level of AMPK signaling pathway related genes and proteins of liver tissue in mice ($P < 0.05$). The results of gut microbiota analysis showed that Kaihua Longding green tea water extract decreased the ratio of Firmicutes/Bacteroidetes (F/B), and increased the growth of beneficial bacteria, including Rikenellaceae, *Blautia* and *Alistipes*. Conclusion: The effect of Kaihua Longding green tea water extract on intervening AMPK signaling pathway of liver hepatic steatosis and gut microbiota dysbiosis in high-fat diet mice was effective.

Keywords Kaihua Longding green tea; high-fat diet; liver hepatic steatosis; AMPK signaling pathway; gut microbiota dysbiosis