

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90177

莓茶决明子固体饮料对大鼠慢性酒精肝损伤的保护作用

Protective effect of vine tea extract combined with cassia extract on chronic alcoholic liver injury in rats

湛莉^{1,2} 汤荃荃^{1,2} 张梓莹^{1,2} 石昱^{1,2}

ZHAN Li^{1,2} TANG Quan-quan^{1,2} ZHANG Zi-ying^{1,2} SHI Yu^{1,2}

滕建造³ 刘子龙³ 刘仲华^{1,2} 张盛^{1,2}

TENG Jian-zao³ LIU Zi-long³ LIU Zhong-hua^{1,2} ZHANG Sheng^{1,2}

(1. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128; 3. 湖南艾嘉生物科技有限公司, 湖南长沙 410301)

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha, Hunan 410128, China; 3. Hunan A-plus Biotech Co., Ltd., Changsha, Hunan 410301, China)

摘要:目的:探讨莓茶决明子固体饮料对饮酒大鼠酒精肝损伤的保护作用及其机制。方法:43% vol 白酒灌胃 SD 大鼠,建立酒精肝损伤大鼠模型,以低、中、高剂量的固体饮料灌胃模型大鼠,通过细胞毒性试验确定莓茶提取物和决明子提取物颗粒配比,通过试剂盒检测大鼠生理生化指标,再利用转录组学分析相关差异基因表达,评估莓茶决明子固体饮料对酒精肝损伤大鼠的影响并揭示作用机制。结果:与模型组相比,固体饮料组血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)活性显著降低;白细胞介素 6(IL-6),肿瘤坏死因子(TNF- α)水平极显著降低;肝脏还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)活性极显著升高,丙二醛(MDA)、甘油三酯(TG)含量显著降低,明显改善大鼠肝脏氧化应激状态和炎症反应。固体饮料组的肝脏病理切片与模型组相比,肝细胞炎症细胞浸润和空泡变性明显减少;转录组学分析结果表明 *spermidine synthase*、*Sirt7*、*RT1-A2*、*RT1-CE1* 等基因的调节和氨基酸代谢等途径与莓茶决明子固体饮料缓解酒精肝损伤有关。结论:莓茶决明子固体饮料可通过改善肝功能、降低肝脏炎症反应和氧化应激水

平缓解酒精诱导的肝损伤。

关键词:莓茶提取物;决明子提取物;酒精性肝损伤;固体饮料;转录组

Abstract: Objective: This study aimed to investigate the protective effect and mechanism of solid beverage with vine tea combined with and cassia on alcoholic liver injury in rats. **Methods:** SD rats were given 43% vol aging by gavage to establish model of alcoholic liver injury. The model was fed with low, medium and high doses of solid beverage. The appropriate ratio of solid beverages was detected by cell test, the physiological and biochemical indicators of rats were detected by using kits, and the expression of related differential genes was studied by transcriptomic analysis to assessing the effect of vine tea extract combined with cassia extract solid beverage on alcoholic liver injury in rats and revealing the mechanism of action. **Results:** Compared with the model group, the activities of ALT, AST and LDH in the solid beverage group were significantly decreased; the levels of IL-6 and TNF- α was significantly reduced; the activities of GSH and SOD in the liver were significantly increased, while the contents of MDA and TG were significantly decreased; finally the oxidative stress and inflammatory response in rat liver were significantly improved. Compared to the model group, the inflammatory cell infiltration and vacuolar degeneration of liver cells in the liver pathological sections of the solid beverage group were significantly reduced; transcriptomic analysis speculated that the regulation of genes such as *spermidine synthase*, *Sirt7*, *RT1-A2*, *RT1-CE1* and other pathways and amino acid metabolism

基金项目:湖南省重点研发计划项目(编号:2020NK2030, 2020WK2017)

作者简介:湛莉,女,湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:张盛(1973—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail: zhangsheng@hunau.edu.cn

收稿日期:2022-03-09

are related to vine tea extract combined with cassia extract solid beverage to alleviate alcoholic liver injury. **Conclusion:** Vine tea extract combined with cassia extract solid beverage can alleviate alcohol-induced liver injury by improving liver function, reducing liver inflammation and oxidative stress.

Keywords: vine tea extract; cassia extract; alcoholic liver injury; solid beverage; transcriptome

酒精性肝损伤(ALD)是因长期过量饮酒导致的肝脏疾病,通常表现为酒精性脂肪肝、酒精性肝炎,并逐步演变成肝纤维化、肝硬化,甚至是肝癌等^[1]。常用于治疗酒精性肝损伤的方法是药物治疗和手术治疗^[2],但两者存在较大副作用^[3]。

莓茶又名藤茶,学名为显齿蛇葡萄(*Ampelopsis grossedentata*)^[4],具有显著的抗炎、抗氧化^[5]、抗菌^[6]、保肝^[7-8]等功效。莓茶中的二氢杨梅素可改善肝纤维化^[9],总黄酮可有效缩短小鼠醒酒时间^[10]。其他活性成分如莓茶多糖对小鼠体内肝组织 MDA 的生成也具有显著抑制作用。

决明子(*Cassia semen*)是中国传统药食两用资源^[11-12]。研究^[13]发现,决明子蒽醌等成分可以通过调节 Nrf2 介导的 ERK/MAPK/JNK 等信号通路起到肝脏保护作用。

研究拟建立酒精性肝损伤 SD 大鼠模型,用不同剂量莓茶决明子固体饮料灌胃模型大鼠,通过细胞毒性试验确定莓茶提取物和决明子提取物颗粒配比,分析模型大鼠肝脏指数、病理学指标、血清和肝脏生化指标,进行转录组分析探究莓茶决明子固体饮料对大鼠酒精肝损伤的保护作用,以期实现植物固体饮料在功能食品领域的深度开发。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

莓茶提取物、决明子提取物:湖南艾嘉生物科技有限公司;

大鼠正常肝细胞 BRL3A:武汉普诺赛生命科技有限公司;

雄性 SD 大鼠:SPF 级,体重 180~220 g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司;

MEM 培养基:上海中乔新舟生物科技有限公司;

FBS(胎牛血清):赛业生物科技有限公司;

双抗(青霉素、链霉素)、EDTA-胰蛋白酶消化液:北京酷来搏科技有限公司;

RNA 裂解液、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒:美国 Vazyme 有限公司;

细胞计数试剂(CCK8):北京索莱宝科技有限公司;

ELISA 检测试剂盒:长沙奥基生物科技有限公司;

D-hanks 平衡盐溶液:实验室配制;

43% vol 牛栏山陈酿:市售;

CO₂ 培养箱:BPN-80CW(UV)型,上海一恒科学仪器有限公司;

恒温水浴锅:BWS-27 型,上海一恒科学仪器有限公司;

超净工作台:Protect-1FD 型,赛默飞世尔科技公司;

冷冻离心机:Hettich MIKRO-22R 型,德国 Hettich 公司;

倒置显微镜:DMIL 型,德国 Leica 有限公司;

多功能酶标仪:MK3 型,赛默飞世尔科技公司。

1.2 细胞毒性试验

1.2.1 细胞毒性试验

(1) 细胞培养基:10% FBS(胎牛血清)+MEM 培养基+1% P/S(双抗)。

(2) 母液制备:将莓茶提取物和决明子提取物分别溶解于蒸馏水中,37 °C 水浴超声至完全溶解,过 0.45 μm 细菌过滤膜,配制成 20 mg/mL 的莓茶提取物母液和决明子提取物母液,4 °C 下保存备用。无水乙醇过 0.22 μm 细菌过滤膜后保存备用。

(3) 细胞传代:当细胞增殖密度为 80%~90%时将培养皿中的培养基倒出,用 D-hanks 清洗 2~3 次,根据培养皿大小加入 0.5~1.0 mL EDTA 消化液,放入 CO₂ 培养箱静置 1 min。取出培养皿并向其中加入 1~2 mL 培养基混匀终止消化,用移液枪将贴壁细胞轻轻吹打下来,移入 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min;弃上清,加入 1~2 mL 培养基与收集的细胞轻轻吹打均匀,分别接种在 2~3 个培养瓶或培养皿中增殖培养。

(4) 毒性试验:取培养皿贴壁细胞消化离心,弃上清,收集细胞加入 1 mL 培养基吹打均匀,吸取 10 μL 进行细胞计数板计数,如细胞密度过大稀释 10~20 倍再计数。计算得到 1 mL 培养基中细胞数量后按需稀释细胞,接种于 96 孔板培养 24 h 使细胞贴壁。24 h 后移除 96 孔板上清。分别取莓茶提取物和决明子提取物母液 700 μL,配制成质量浓度为 10 000.00,5 000.00,2 500.00,1 250.00,625.00,312.50,156.25,78.13,39.06 μg/mL 溶液,分别加入同体积培养基混匀。空白组仅含培养基。乙醇以培养基稀释,初始体积分数为 20%,稀释至 0.078%,方法同上。

溶液配制完成后加入 96 孔板中进行干预,各质量浓度 6 个平行,每孔加入 100 μL 溶液继续培养 24 h。24 h 后移除上清,加入 90 μL 培养基和 10 μL CCK-8 试剂,培养箱静置 1.5~2.0 h 后,检测 450 nm 处吸光度,计算细胞存活率。酒精干预是 48 h 后进行吸光度检测并计算细胞存活率。最终得出莓茶提取物和决明子提取物安全质量浓度范围及适宜酒精损伤的体积分数范围。确定莓茶提取物和决明子提取物安全质量浓度范围后设置莓茶决明子固体饮料颗粒配比,并进行细胞毒性试验计算细胞存活率,确定安全质量浓度范围并分析固体饮料对大鼠酒精肝细胞模型细胞存活率的影响。

分别按式(1)、式(2)计算试验组和空白组细胞存

活率。

$$R_A = \left(\frac{A_1}{B} + \dots + \frac{A_n}{B} \right) / n \times 100\%, \quad (1)$$

$$R_B = \left(\frac{B_1}{B} + \dots + \frac{B_n}{B} \right) / n \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_A ——试验组细胞存活率, %;

R_B ——空白组细胞存活率, %;

A ——试验组细胞在 450 nm 处的光密度值;

B ——空白组细胞在 450 nm 处的光密度值;

\bar{B} ——空白组的平均光密度值;

n ——试验平行个数。

1.2.2 细胞 RNA 提取及 QPCR 试验 按照 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(引物序列见表 1)步骤检测不同体积分数酒精损伤细胞后的 Nrf2、HO-1 的表达量,确定适合损伤的酒精体积分数。根据确定的酒精体积分数检测莓茶决明子固体饮料颗粒配比对 BRL3A 细胞存活率的影响。

1.3 试验方法

1.3.1 动物试验 饲养环境保持 12 h 光照和黑暗交替,室温控制在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 40%~60%。40 只 SD 大鼠随机分成空白组(CON)、模型组(ETOH)、固体饮料组。固体饮料组分低剂量组(L)、中剂量组(M)、高剂量组(H),每组各 8 只,自由进食进水,适应性喂养 1 周,第 2 周开始灌胃,每周 2 次体重称量;空白组灌胃 7.5 mL/kg 蒸馏水;模型组灌胃 5 mL/kg 蒸馏水,固体饮料组灌胃 5 mL/kg 固体饮料水溶液(L:50.00 mg/kg 莓茶提取物+16.70 mg/kg 决明子提取物;M:250.00 mg/kg 莓茶提取物+83.50 mg/kg 决明子提取物;H:375.00 mg/kg 莓茶提取物+125.25 mg/kg 决明子提取物),灌胃 1 h 后,模型组和固体饮料组大鼠第 1~29 d 灌胃 43% vol 白酒 2.5 mL/kg,第 30 天灌胃 43% vol 白酒 4 mL/kg。

1.3.2 样品的采集与处理 末次灌胃后,各组大鼠空腹(禁食禁水)16 h 后称重,将大鼠麻醉后进行解剖,采集心脏动脉血,摘取肝脏,预冷生理盐水润洗后称重,取一叶肝脏用 4%多聚甲醛固定液固定,制作肝组织切片,后期进行组织病理学观察,其余肝脏分装后于液氮速冻, -80°C 冰箱保存。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列
GAPDH	Forward: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC
	Reverse: TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT
Nrf2	Forward: GAGGATGGGAAACCTTACT
	Reverse: CTTCTTGCTCTGGGAACA
HO-1	Forward: GTGCTCGCATGAACACTCTG
	Reverse: TGCAGAGGTAGTATCTTGAACC

1.3.3 理化指标检测

(1) 肝脏病理学检查:剪取肝脏一叶组织浸入 4%多聚甲醛中固定,制作石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色,并于光学显微镜下观察肝细胞的形态变化、炎症反应、脂肪空泡等病理变化。

(2) 血清生化指标:取心脏动脉血,静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,按照 ELISA 试剂盒方法检测 ALT、AST、LDH 活性和 IL-6、TNF- α 浓度,其余血清保存于 -80°C 冰箱。

(3) 肝脏生化指标:用预冷生理盐水冲洗肝脏组织并制备 10%肝脏组织匀浆,于 4°C 、3 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书方法检测 SOD 活性和 TG、MDA、GSH 含量。

1.3.4 转录组测序 每组大鼠肝脏随机取 3 份用于转录组测序和差异基因表达分析。RNA 提取和转录组测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。测序得到的原始数据过滤筛选后得到高质量数据(clean data),将各样品的 Clean Reads 与指定参考基因组进行序列比对,采用 TPM 方法计算基因表达量,DESeq2 软件筛选差异表达基因,筛选阈值为 $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$ 和 P 值 < 0.05 。筛选出上调和下调的差异基因并进行 GO 功能注释分析和 KEGG 富集分析从而筛选出差异基因富集通路^[14]。

1.4 数据处理

所有试验均设置至少 3 组生物学重复,数据表示为平均值±标准差,使用 GraphPad Prism 8 进行数据分析。两两比较用 Dunnett- t 检验,多组数据比较采用 One-way ANOVA 进行分析。图中 * 表示与正常组相比, # 表示与模型组相比, * / # 表示 $P < 0.05$; * * / # # 表示 $P < 0.01$; * * * / # # # 表示 $P < 0.001$; * * * * / # # # # 表示 $P < 0.000 1$ 。 $P < 0.05$ 认为差异显著,具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 细胞毒性试验

莓茶提取物对细胞 BRL3A 的安全质量浓度范围为 0.00~156.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [图 1(a)],决明子提取物对细胞 BRL3A 的安全质量浓度范围为 0.00~39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [图 1(b)]。莓茶提取物安全质量浓度最大值是决明子提取物的 3~4 倍,因此固体饮料的比例定为 $\rho_{\text{莓茶提取物}} : \rho_{\text{决明子提取物}} = 3 : 1$,在安全质量浓度范围内进行细胞毒性试验,测定固体饮料的安全配比($\rho_{\text{决明子提取物}} : \rho_{\text{莓茶提取物}}$)范围为 0~30 : 90[图 1(c)]。当细胞存活率为 50%左右时的酒精浓度适宜损伤,因此适宜损伤细胞的酒精体积分数为 2.5%~5.0%[图 1(d)]。

2.2 酒精性肝损伤动物模型的确立

Nrf2 是一种重要的细胞保护转录因子,适度增强 Nrf2 活性可有效抑制细胞氧化应激,提高细胞存活

率^[15]。Nrf2 活性过高会造成细胞氧化损伤,促进肿瘤细胞增殖、增强肿瘤细胞耐药性^[16]。HO-1 是一种抗氧化酶,正常生理状态下,HO-1 表达量较低,当机体发生炎症、感染时,HO-1 表达量上升,对机体产生损伤^[17]。为探究适宜损伤浓度的酒精处理 BRL3A 细胞 48 h 后 Nrf2 和 HO-1 的表达量及固体饮料配方对 BRL3A 细胞存活率的影响,进行了 QPCR 试验,体积分数为 4.5%、5.0% 的酒精处理细胞后 RNA 浓度过低,未进行后续 QPCR 试验。结果表明,当酒精体积分数为 4.0% 时,炎症因子 Nrf2 和 HO-1 的表达量均显著上升[图 2(a)、图 2(b)],所以酒精体积分数为 4.0% 时可有效建立酒精损伤模型。在安全质量浓度范围内,模型组(ETOH)与处理组细胞存活率显著低于空白组(CON),处理组(L、M、H)细胞存

活率显著高于模型组(ETOH),说明固体饮料能够有效缓解酒精造成的细胞存活率降低的问题[图 2(c)]。

2.2 动物试验结果

2.2.1 大鼠肝系数情况 肝系数是指肝脏鲜重与大鼠重量的比值,正常情况下肝脏与体重的比值是恒定的,肝系数增大,表示肝脏水肿、炎症或增生肥大;肝系数减小表示脏器萎缩或者其他退行性病变^[18]。CON 组、ETOH 组及固体饮料组的肝系数无明显差异性($P > 0.05$),说明试验灌胃的酒精浓度对肝脏外在表征无显著影响(表 2)。

2.2.2 肝组织病理形态 由图 3 可知,HE 染色显示 CON 组大鼠肝细胞肝索排列整齐,肝小叶、肝窦结构清晰,无水肿、脂肪变性,有少量肝细胞死亡;ETOH 组大鼠肝组织切片具有典型的病理特征,肝细胞大小不均,气球

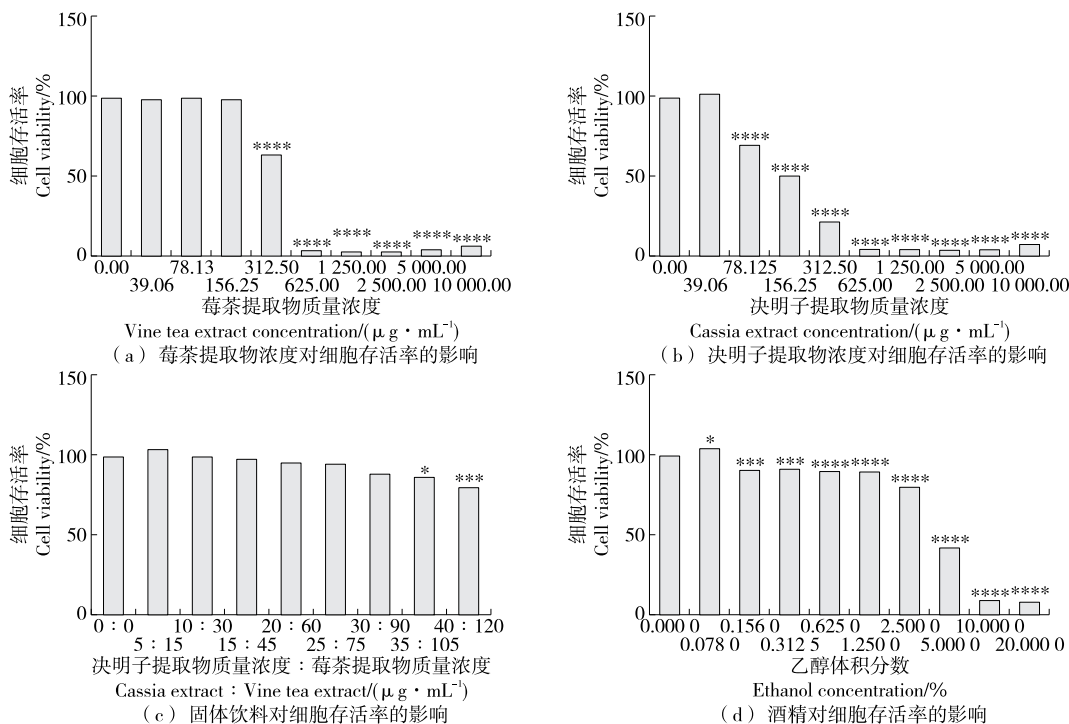


图 1 细胞毒性试验结果

Figure 1 Cytotoxicity test results

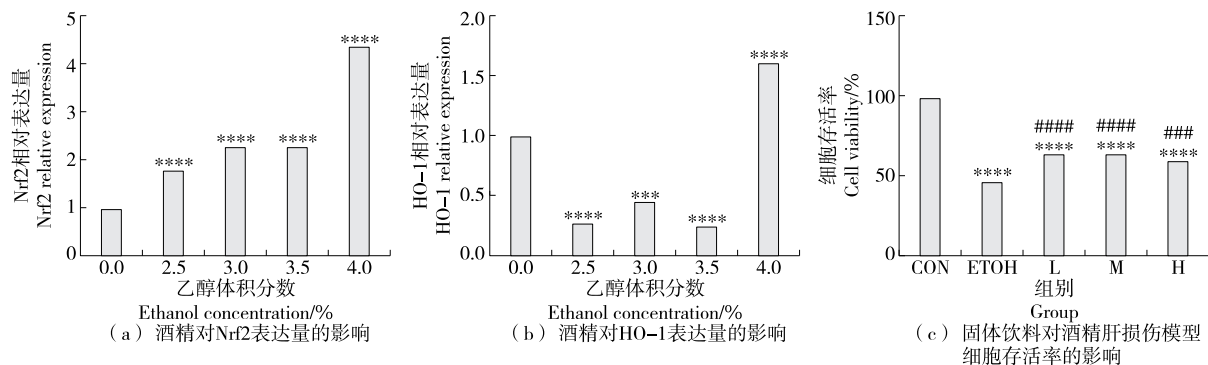


图 2 酒精模型的确立及固体饮料对其细胞存活率的影响

Figure 2 Establishment of the alcohol model and effects of formulation on cell viability

样变性,有较多小泡性脂肪空泡,同时伴有炎症浸润、细胞坏死。相较于 ETOH 组, L 组大鼠肝细胞水肿明显改善,空泡变性减少,炎症因子浸润减少,肝细胞排列紊乱情况有所改善。M 组和 H 组与 ETOH 组相比,肝细胞形态趋于正常,炎症细胞浸润明显改善,细胞空泡变性明显减少,偶有细胞坏死,肝细胞排列与 CON 相比差异较小。综上,莓茶决明子固体饮料可有效改善大鼠酒精性肝损伤的组织病理学病变。

2.2.3 大鼠血清生化指标 临床上,AST、ALT、LDH 是反应肝损伤的敏感指标^[17-18],AST、ALT 和 LDH 的活

性升高与肝损伤呈正比。与 CON 组相比, ETOH 组血清 ALT、AST、LDH 水平极显著升高(图 4, $P < 0.000 1$),说明酒精肝损伤模型建立成功,提示肝细胞坏死、细胞膜通透性增加^[18]。固体饮料各剂量组均可显著抑制大鼠饮酒导致的 AST、ALT、LDH 的酶活增高,且效果呈剂量依赖性。

2.2.4 IL-6 和 TNF- α 水平 炎症因子分泌是导致肝损伤的重要途径。IL-6 是促炎症细胞因子,参与机体炎症反应。TNF- α 在介导肝损伤中起一定作用,可直接导致细胞毒性,造成肝细胞坏死,影响肝内微循环^[19]。如图 5 所示,与 CON 组相比, ETOH 组血清炎症因子 IL-6、TNF- α 水平极显著升高,相对于 ETOH 组,固体饮料各剂量组均可极显著降低炎症因子水平($P < 0.000 1$),且与剂量浓度呈正比。因此,莓茶决明子固体饮料可显著减轻大鼠饮酒造成的炎症反应。

2.2.5 大鼠肝脏生化指标 酒精代谢过程产生活性氧自由基,过氧化剂会造成自由基脂质过氧化,机体抗氧化酶 GSH、SOD 活性下降,抗氧化防御系统水平降低^[20]。由图 6(a)、图 6(c)可知,与 CON 组相比, ETOH 组大鼠

表 2 各组大鼠肝系数

Table 2 Hepatic index of each group rats

组别	终体重量/g	肝重量/g	肝系数/%
CON	432.64±41.90	11.22±0.73	2.60±0.18
ETOH	450.24±55.54	11.45±1.92	2.53±0.15
L	423.42±14.80	10.72±0.84	2.53±0.15
M	416.08±11.45	10.86±0.72	2.61±0.13
H	437.90±23.16	10.99±1.24	2.50±0.17

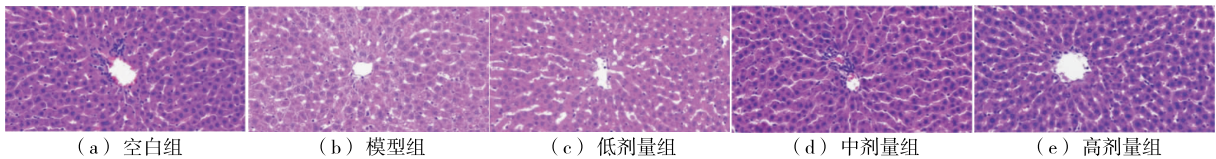


图 3 大鼠肝组织 H&E 染色

Figure 3 HE staining of rat liver tissue (40X)

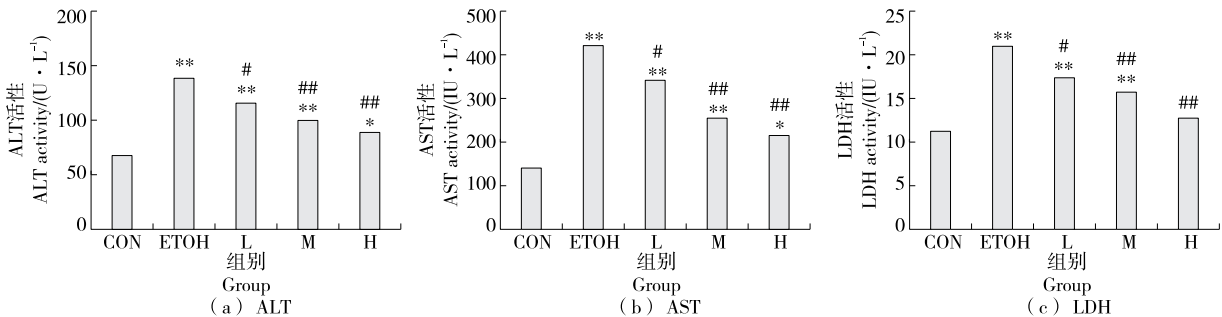


图 4 大鼠血清生化指标水平

Figure 4 Serum biochemical index levels in rats

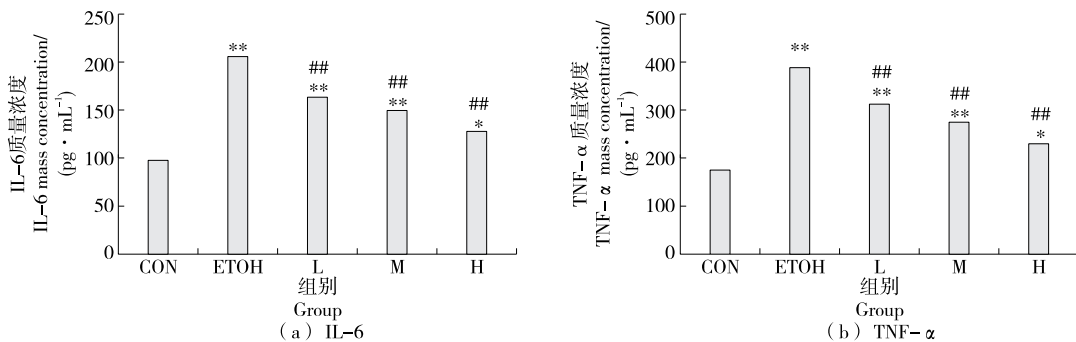


图 5 大鼠血清炎症因子水平

Figure 5 Rat serum inflammatory factor level

肝脏中 GSH、SOD 含量均极显著下降 ($P < 0.000 1$)。MDA 是脂质过氧化的第二产物,是反映组织损伤的重要指标, ETOH 组大鼠肝脏 TG、MDA 含量较 CON 极显著升高 ($P < 0.000 1$) [图 6(b)、图 6(d)]。通过固体饮料干预, 各剂量组 GSH、MDA、TG 浓度和 SOD 活性与 ETOH 组相比具有显著差异 ($P < 0.05$), 固体饮料 M、H 组 MDA 含量与 CON 组无显著差异 ($P > 0.05$), H 组 SOD、TG 含量与 CON 组无显著差异 ($P > 0.05$), 结果表明固体饮料低中高剂量组均可有效提高大鼠肝脏抗氧化酶的活力, 加速清除氧自由基, 缓解脂肪肝形成。

以上研究表明固体饮料低、中、高剂量组均能显著降低血清中肝损伤酶活性和炎症因子表达水平, 抑制脂质过氧化和脂肪肝的生成, 且呈剂量依赖性, 高剂量组效果最佳。

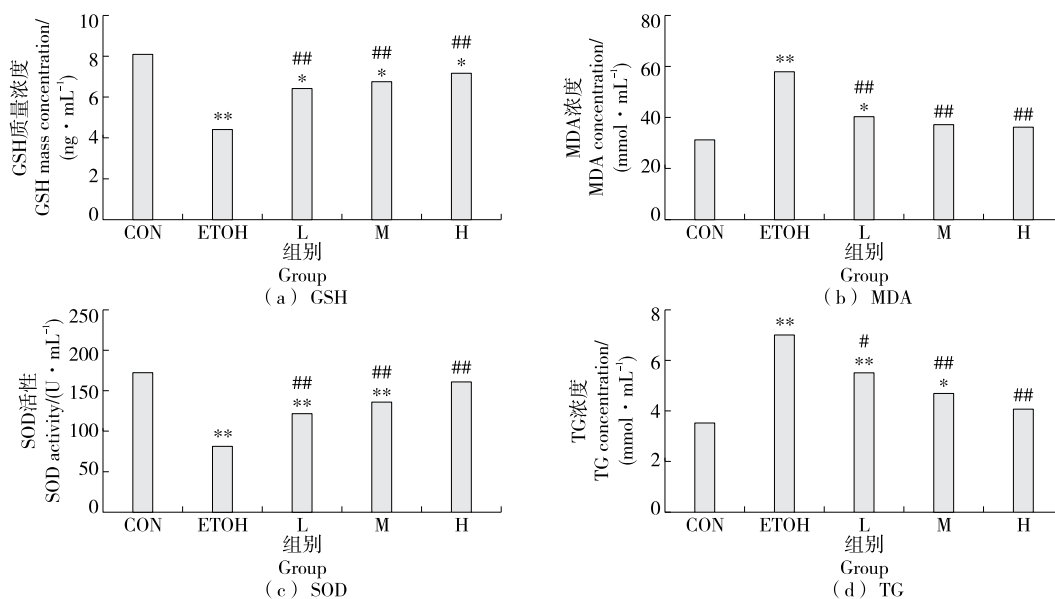


图 6 大鼠肝脏生化指标水平

Figure 6 Rat liver biochemical index levels

表 3 样本测序质量和序列[†]

Table 3 Sample sequencing quality and sequence mapping

样本	总条目数		Q20 值/%	Q30 值/%	GC 质量/%	唯一 Clean reads 数目	唯一 Clean reads 百分比/%
	原始测序数据	质控后测序数据					
CON ₁	45 635 054	45 200 724	97.22	92.36	50.34	39 179 609	86.68
CON ₂	41 397 112	41 023 812	97.18	92.23	50.16	35 082 412	85.52
CON ₃	46 515 238	45 980 180	97.19	92.28	50.49	40 072 390	87.15
ETOH ₁	43 129 262	42 686 972	97.00	91.78	50.33	36 991 684	86.66
ETOH ₂	43 255 488	42 822 788	97.05	91.90	50.64	37 141 383	86.73
ETOH ₃	44 893 266	44 368 632	96.97	91.76	50.63	38 582 865	86.96
H ₁	42 401 284	4 196 945	97.13	92.14	50.61	36 390 033	86.71
H ₂	45 967 080	45 512 652	97.16	92.17	49.96	39 211 185	86.15
H ₃	46 359 798	45 894 336	97.05	91.98	50.70	39 735 893	86.58

[†] Q20 值、Q30 值分别指测序质量在 99% 和 99.9% 以上的碱基占总碱基的百分比; GC 质量指质控数据对应的 G 和 C 碱基总和占总碱基的百分比; 唯一 Clean reads 数目指参考序列上有唯一比对位置的质控后测序数据的总条目数; 参考序列上有唯一比对位置的质控后测序数据总条目数的百分比。

大鼠与正常大鼠的差异减小,表达统计图见图7。

2.2.8 差异表达基因的功能注释和富集分析

(1) GO 注释:对 ETOH 组与 CON 组的 229 个差异基因以及 H 组与 ETOH 组的 106 个差异基因进行注释分析,注释结果统计:分子功能分组主要涉及分子功能调节剂、转录调节活性、催化活性和结合等功能;生物过程分组主要涉及免疫系统过程、细胞成分组织或生物发生、定位、多细胞生物过程、发展过程、对刺激的反应、代谢过程、生物调节等功能;细胞组分分组主要涉及胞外区部分、含蛋白质复合物、膜、膜部分、细胞器部分、细胞器和细胞部分等功能(表 4)。

(2) KEGG 注释:将 ETOH 组与 CON 组、H 组与 ETOH 组差异基因进行 KEGG 注释分析,表 5 和表 6 显示了酒精干预和固体饮料干预后上调和下调的差异基因涉及排名前 20 的通路情况。酒精干预后,上调和下调基因涉及代谢通路分支有代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、有机系统、人类疾病,上调差异基因主要富集在运输和分解代谢、折叠、分类和降解、其他氨基酸代谢等通路,下调差异基因主要富集在细胞生长与死亡、运输和分解代谢、氨基酸的代谢和脂质代谢等通路(表 5)。

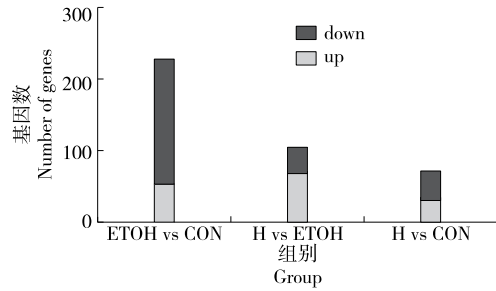


图 7 差异表达统计

Figure 7 Statistic analysis of the differentially expressed genes

固体饮料干预后,上调和下调差异基因涉及人类疾病、有机系统、细胞过程、环境信息处理遗传信息处理和代谢等通路分支,上调基因富集包括癌症、心血管疾病、免疫系统、细胞生长和死亡等通路,下调差异基因富集包括氨基酸代谢、辅因子和维生素代谢、碳水化合物代谢等通路(表 6)。

为明确酒精干预和固体饮料干预后的关键差异基因,进行进一步 KEGG 富集分析,其校正后的 P 值 < 0.05,为显著富集。由表 7 可知,基因主要富集到氨基酸的生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、代谢途径、精氨

表 4 ETOH 组与 CON 组、H 组与 ETOH 组差异基因的 GO 分类统计表

Table 4 GO classification statistics of Classification charts of CON group vs ETOH group and H group vs ETOH group

组别	GO 一级分类名称	GO 二级分类术语	注释到该 GO 二级分类功能的基因数	组别	GO 一级分类名称	GO 二级分类术语	注释到该 GO 二级分类功能的基因数
ETOH vs CON	生物过程	免疫系统过程	18	H vs ETOH	生物过程	免疫系统过程	7
		细胞成分组织或生物发生	35			细胞成分组织或生物发生	14
		定位	36			多细胞有机体过程	15
		多细胞有机体过程	37			定位	15
		发展过程	64			发展过程	21
		对刺激的反应	67			对刺激的反应	31
		代谢过程	73			代谢过程	33
		生物调节	133			生物调节	51
		细胞过程	134			细胞过程	59
		细胞外区部分	16			细胞外区部分	14
	细胞组分	含蛋白质复合物	50	H vs ETOH	细胞组分	含蛋白质复合物	25
		膜	59			膜	25
		膜部分	65			膜部分	33
		细胞器部分	85			细胞器部分	33
		细胞器	87			细胞器	43
		细胞部分	168			细胞部分	67
	分子功能	分子功能调节剂	20	H vs ETOH	分子功能	转录调节活性	10
转录调节活性		24	分子功能调节剂			11	
催化活性		77	催化活性			34	
黏合物		166	黏合物			72	

表 5 ETOH 组与 CON 组差异基因 KEGG 分类统计
Table 5 KEGG Classification chart CON group vs ETOH group

分组	KEGG 代谢通路(分支)	KEGG 代谢通路名称	注释到该通路的基因数	分组	KEGG 代谢通路(分支)	KEGG 代谢通路名称	注释到该通路的基因数
CON vs ETOH 上调	人类疾病	传染病:病毒	1	CON vs ETOH 下调	人类疾病	免疫疾病	3
		免疫疾病	1			传染病:病毒	4
		内分泌代谢疾病	1			内分泌代谢疾病	4
		心血管疾病	1			心血管疾病	4
		癌症:概述	1			癌症:概述	5
	有机系统	免疫系统	1		有机系统	发展与再生	1
	细胞过程	细胞生长和死亡	1		细胞过程	细胞生长和死亡	7
		运输和分解代谢	3			运输和分解代谢	5
		环境信息处理	信号分子和相互作用			1	环境信息处理
	遗传信息处理	翻译	1		遗传信息处理	信号转导	2
		折叠、分类和降解	3			信号分子和相互作用	3
		其他氨基酸的代谢	3			翻译	1
	代谢	碳水化合物代谢	2		代谢	折叠、分类和降解	5
		氨基酸代谢	2			萜类化合物和聚酮化合物的代谢	1
		辅因子和维生素的代谢	1			辅因子和维生素的代谢	1
脂质代谢		3	聚糖生物合成和代谢	3			
				碳水化合物代谢		3	
				脂质代谢	5		
				氨基酸代谢	6		

表 6 H 组与 ETOH 组差异基因 KEGG 注释统计
Table 6 KEGG comment statistics of Classification chart of H group and ETOH group

分组	KEGG 代谢通路(分支)	KEGG 代谢通路名称	注释到该通路的基因数	分组	KEGG 代谢通路(分支)	KEGG 代谢通路名称	注释到该通路的基因数	
H vs ETOH 上调	人类疾病	传染病:细菌	3	H vs ETOH 下调	人类疾病	癌症:概述	1	
		免疫疾病	2			遗传信息处理	翻译	1
		癌症:概述	4			转录	1	
		心血管疾病	4			代谢	异生素生物降解和代谢	1
		传染病:病毒	3				脂质代谢	1
	癌症:特定类型	2	其他氨基酸的代谢		2			
	内分泌代谢疾病	2	有机系统		碳水化合物代谢	2		
	免疫系统	4			辅因子和维生素的代谢	3		
	内分泌系统	2			氨基酸代谢	6		
	细胞过程	运输和分解代谢	3		细胞过程	细胞生长和死亡	4	
		细胞生长和死亡	4			膜运输	1	
		环境信息处理	信号分子和相互作用			2	环境信息处理	信号转导
	遗传信息处理	折叠、分类和降解	3		遗传信息处理	折叠、分类和降解	3	
		聚糖生物合成和代谢	2			聚糖生物合成和代谢	2	
		脂质代谢	2			脂质代谢	2	
代谢	碳水化合物代谢	2	代谢	碳水化合物代谢	2			
	氨基酸代谢	1		氨基酸代谢	1			
	异生素生物降解和代谢	1		异生素生物降解和代谢	1			

表 7 KEGG 富集结果
Table 7 KEGG enrichment results

分组	通路编号	描述	基因比例	未校正 P 值	校正后 P 值	基因编号
H vs ETOH	rno01230	氨基酸的生物合成	5/50	<0.000 1	0.003 2	59085/25044/25698/24813/108351137
	rno00270	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	4/50	0.000 2	0.003 4	25044/84596/81508/24813
						59085/25044/25698/266674/24552/84596/
	rno01100	代谢途径	17/50	0.002 7	0.029 8	81508/362196/245960/24813/361602/81924/
						25618/108351137/303745/266685/299825
	rno00220	精氨酸生物合成	2/50	0.005 1	0.033 9	25698/59085
	rno01200	碳代谢	4/50	0.004 8	0.039 2	5044/24552/361602/108351137
ETOH vs CON	rno00072	酮体的合成与降解	2/106	0.004 9	0.217 6	295458/29637

酸生物合成和碳代谢。结合上述结果,筛选出关键差异基因 *spermidine synthase* (亚精胺合酶)、*Sirt7* (去乙酰化酶 7)、*RT1-A2* (RT1 class Ia, locus A2)、*RT1-CE1* (RT1 I类, 轨迹 1)、*LOC103692716* (热休克蛋白 HSP 90- α)、*Acap2* (ArfGAP), 这些基因与肝脏功能、炎症反应、脂质过氧化等相关。由此推测莓茶决明子固体饮料缓解酒精肝损伤与上述关键差异基因和通路相关。

3 结论

将莓茶提取物与决明子提取物颗粒配成的固体饮料应用于酒精肝损伤的护肝功效研究, 最终结果表明低、中、高剂量的固体饮料均能改善饮酒大鼠的肝功能, 有效缓解酒精引起的肝损伤, 且作用机制与 *spermidine synthase*、*Sirt7*、*RT1-A2*、*RT1-CE1*、*LOC103692716*、*Acap2* 基因调节及氨基酸的生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、代谢途径、精氨酸生物合成和碳代谢等通路有关。后续可进一步挖掘数据探明更详细的作用机制并开展莓茶与决明子的协同功效研究。

参考文献

- [1] 杨冬晗, 张文龙, 侯瑞丽, 等. Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤中的作用研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 126-130.
YANG Dong-han, ZHANG Wen-long, HOU Rui-li, et al. The role of the toll-like receptor 4 signaling pathway in alcoholic liver injury[J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 126-130.
- [2] 颜蜜, 滕春丽, 陶会, 等. 红托竹荪多糖对大鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 菌物学报, 2022, 41(2): 1-18.
YAN Mi, TENG Chun-li, TAO Hui, et al. Protective effects of *Dicthyophora rubrovalvata* polysaccharide on alcoholic liver injury in rats[J]. Mycosystema, 2022, 41(2): 1-18.
- [3] 欧阳香, 程虹毓, 胡伟琼. 黄酮类化合物抗酒精性肝损伤作用及机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(9): 1 200-1 205.
OU Yang-xiang, CHENG Hong-yu, HU Wei-qiong. Research progress on the effect and mechanism of flavonoids on alcoholic liver injury[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(9): 1 200-1 205.
- [4] 邓杰夫, 邓武成, 胡维军, 等. 张家界市莓茶园杂草调查研究初报[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(17): 79-81.
DENG Jie-fu, DENG Wu-cheng, HU Wei-jun, et al. Preliminary investigation on weeds in vine tea garden in Zhangjiajie city[J]. Anhui Agri Sci Bull, 2021, 27(17): 79-81.
- [5] 张云坤, 娟李, 丹黄, 等. 中药藤茶化学成分及抗感染作用研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(6): 2 012-2 022.
ZHANG Yun-kun, LI Juan, HUANG Dan, et al. Research progress on chemical constituents and anti-infective effects of the traditional chinese medicine vine tea (*ampelopsis grossedentata*) [J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2021, 23(6): 2 012-2 022.
- [6] HOU X L, TONG Q, WANG W Q, et al. Suppression of inflammatory responses by dihydromyricetin, a flavonoid from *ampelopsis grossedentata*, via inhibiting the activation of NF-kappaB and MAPK signaling pathways[J]. J Nat Prod, 2015, 78(7): 1 689-1 696.
- [7] WU Y, BAI J, ZHONG K, et al. A dual antibacterial mechanism involved in membrane disruption and DNA binding of 2R, 3R-dihydromyricetin from pine needles of *Cedrus deodara* against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Chem, 2017, 218: 463-470.
- [8] YAN L F, MEI C S, BING Z H. Investigation of in vitro antioxidant activity of dihydromyricetin and flavonoids rich extract from vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) [J]. Traditional Medicine Research, 2021, 6(1): 1-11.
- [9] ZHOU X, YU L, ZHOU M, et al. Dihydromyricetin ameliorates liver fibrosis via inhibition of hepatic stellate cells by inducing autophagy and natural killer cell-mediated killing effect [J]. Nutr Metab (Lond), 2021, 18(1): 64.
- [10] 蔡建峰, 蓝文明, 魏亮龙, 等. 显齿蛇葡萄总黄酮对急性酒精中毒小鼠的解酒及肝损伤的保护作用[J]. 福建中医药, 2016, 47(3): 16-17.
CAI Jian-feng, LAN Wen-ming, WEI Liang-long, et al. The protective effect of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* on hangover and liver injury in mice with acute alcoholism [J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 47(3): 16-17.

(下转第 172 页)

- 的研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(11): 113-118.
- NIE Ling-hong, FENG Yi-qiu. Preparation of collagen peptide from eel skin and its antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2017(11): 113-118.
- [15] KU S K, CHOUNG J J, KIM J K. Enhancement of alcohol metabolism by ginseng berry extract and its mixed herbal beverages: In vitro and in vivo experiments[J]. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2019, 11(2): 144-154.
- [16] 蒋婧. 蛋白质水解度测定及其标准曲线绘制研究[J]. 广东轻工职业技术学院学报, 2012, 11(1): 4-6.
- JIANG Jing. Determination of protein hydrolysis degree and drawing of standard curve[J]. Journal of Guangdong Vocational and Technical College of Light Industry, 2012, 11(1): 4-6.
- [17] 蔡转章. 豆粕源抗氧化肽对急性酒精性肝损伤的预防作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021: 23-25.
- CAI Zhuan-zhang. Preventive effect and mechanism of soybean meal derived antioxidant peptides on acute alcoholic liver injury[D]. Changchun: Jilin University, 2021: 23-25.
- [18] CHIA C S B. A Review on the Metabolism of 25 Peptide Drugs[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021, 27(2): 1 397-1 418.
- [19] HABEEBULLAH S F K, ALAGARSAMY S, SATTARI Z, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of red and green seaweeds and characterization of the active extracts[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2021, 98(2): 185-200.
- [20] GARCÍA A V. Enzymatic hydrolysis and fermentation of pea protein isolate and its effects on antigenic proteins, functional properties, and sensory profile[J]. Foods, 2022, 11(1): 118.
- [21] WU Ying-mei, XU Long-quan, LIU Xiao-yi, et al. Effect of thermosonication treatment on blueberry juice quality: Total phenolics, flavonoids, anthocyanin, and antioxidant activity [J]. LWT-Food Science & Technology, 2021, 150: 112021.
- [22] 李珂, 杨秀华, 扈麟, 等. 酶解骨胶原多肽的抗氧化特性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(2): 311-314.
- LI Ke, YANG Xiu-hua, HU Lin, et al. Study on antioxidant properties of enzymatic hydrolyzed bone collagen peptides[J]. Research and Development of Natural Products, 2010, 22(2): 311-314.
- [23] 王玉华, 高晶, 张静, 等. 鼠李糖乳杆菌 B10 通过抗氧化途径改善酒精性肝损伤的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 270-273.
- WANG Yu-hua, GAO Jing, ZHANG Jing, et al. Improvement of alcoholic liver injury by *Lactobacillus rhamnosus* B10 through antioxidant pathway[J]. Food Science, 2012, 33(23): 270-273.
- [24] 翟硕, 张海悦, 田田. 黑豆多肽的制备及其对乙醇脱氢酶活性的影响研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4 864-4 869.
- ZHAI Shuo, ZHANG Hai-yue, TIAN Tian. Preparation of black bean polypeptide and its effect on ethanol dehydrogenase activity[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2016, 7(12): 4 864-4 869.
-
- (上接第 165 页)
- [11] 刘金金, 殷军艺, 黄晓君, 等. 决明子多糖结构和生物活性功能研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(23): 212-221.
- LIU Jin-jin, YIN Jun-yi, HUANG Xiao-jun, et al. Research progress on structure and biological activity of polysaccharide from Cassia seed[J]. Food Research and Development, 2019, 40(23): 212-221.
- [12] HOU J, GU Y, ZHAO S, et al. Anti-inflammatory effects of auranio-obtusin from seed of *Cassia obtusifolia* L. through modulation of the NF- κ B pathway[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3093.
- [13] PAUDEL P, JUNG H A, CHOI J S. Anthraquinone and naphthopyrone glycosides from *Cassia obtusifolia* seeds mediate hepatoprotection via Nrf2-mediated HO-1 activation and MAPK modulation[J]. Arch Pharm Res, 2018, 41(6): 677-689.
- [14] 郑淑娟, 谢子鑫, 方靖靖, 等. 橄榄苦苷改善 db/db 小鼠糖尿病的肝脏转录组学及生物信息学分析[J/OL]. 食品科学. (2021-11-17) [2022-02-07]. <https://www.spkx.net.cn/CN/article/advancedSearch.do>.
- ZHENG Shu-juan, XIE Zi-xin, FANG Jing-jing, et al. Hepatic transcriptomics and bioinformatics analysis of oleuropein alleviating diabetes in db/db mice[J/OL]. Food Science. (2021-11-17) [2022-02-07]. <https://www.spkx.net.cn/CN/article/advancedSearch.do>.
- [15] 牟伊, 宋雨, 文帅, 等. Nrf2 抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 药学报, 2022, 57(2): 321-330.
- MOU Yi, SONG Yu, WEN Shuai, et al. Research progress of Nrf2 inhibitor in tumor ther[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2022, 57(2): 321-330.
- [16] ROJO DE LA VEGA M, CHAPMAN E, ZHANG D D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 34(1): 21-43.
- [17] YANG J, ZHU A, XIAO S, et al. Anthraquinones in the aqueous extract of *Cassia semen* cause liver injury in rats through lipid metabolism disorder[J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153059.
- [18] 江颖倩, 彭梦超, 吴建国, 等. 长片金线兰多糖对四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中草药, 2021, 52(19): 5 932-5 938.
- JIANG Ying-qian, PENG Meng-chao, WU Jian-guo, et al. Protective effect of polysaccharide from *Anoectochilus longilobus* on CCl₄-induced acute liver injury in mice[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(19): 5 932-5 938.
- [19] 谭丽娟, 徐沛演, 俐李. 血清 IL-6、TNF- α 检测对药物性肝损伤严重程度的预测价值研究[J]. 中国当代医药, 2021, 28(10): 71-74.
- TAN Li-juan, XU Pei-yan, LI Li. Study on the predictive value of IL-6 and TNF- α in the severity of drug-induced liver injury[J]. China Modern Medicine, 2021, 28(10): 71-74.
- [20] GANESAN K, JAYACHANDRAN M, XU B. A critical review on hepatoprotective effects of bioactive food components[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(7): 1 165-1 229.