王芳,张滨,张鑫,等.沙棘混合油对小鼠慢性酒精肝损伤及肠道菌群的调节作用[J].山西农业大学学报(自然科学版),2025,45(2):39-49.
Wang F, Zhang B, Zhang X, et al.Regulatory effects of sea buckthorn mixed oil on chronic alcohol-induced liver injury and intestinal microbiota in mice[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2025,45(2):39-49.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202410034

沙棘混合油对小鼠慢性酒精肝损伤及肠道菌群的调节作用

王芳[1,2],张滨[3],张鑫[2,4],赵普润[5],李博文[5],霍乃蕊[5],祁曦槿[1],秦旭巍[1],郭建峰[1,2*]

(1.中北大学 化学与化工学院,山西 太原 030051;2.中国露酒植物提取与健康山西省重点实验室,山西 汾阳 032200;3.国际沙棘协会,北京 100038;4.天津科技大学 生物工程学院,天津 300222;5.山西农业大学 动物医学学院,山西 晋中 030801)

摘　要:[目的]本文旨在研究特定脂肪酸比例的沙棘混合油对小鼠慢性酒精肝损伤和肠道菌群的影响。[方法]沙棘果油和沙棘籽油按一定比例配制成沙棘混合油,其中饱和脂肪酸(SFA):单不饱和脂肪酸(MUFA):多不饱和脂肪酸(PUFA)比例为1:1.41:1.48。小鼠随机分为空白对照(NC)组、乙醇模型(AC)组、混合油高剂量干预(HM)组(750 mg/kg bw)、混合油中剂量干预(MM)组(600 mg/kg bw)和混合油低剂量干预(LM)组(450 mg/kg bw),采用递增乙醇浓度灌胃方式造模6周后,测定肝功能、氧化应激及炎症因子等18个生化指标;苏木精—伊红染色观察肝组织病理学改变;取小鼠粪便进行16S rRNA测序,分析肠道菌群多样性。[结果]与AC组相比,三个剂量沙棘混合油干预均能够显著改善慢性酒精摄入引起的肝脏脂肪变性,降低肝功能标志物谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)水平,降低肝总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL)水平及肝指数水平,降低肝丙二醛(MDA)、过氧化物酶(MPO)等氧化应激标志物及白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等炎症因子水平,降低了肝脏和粪便中总胆汁酸(TBA)水平;提高了肝脏高密度脂蛋白(HDL)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)水平。其中MM组效果最好,HM组次之。肠道微生物组分析表明,慢性酒精暴露能降低小鼠肠道微生物β多样性,改变微生物组成与功能。沙棘混合油干预增加了菌群β多样性,在科水平上提高了*Akkermansia* 、*Ruminococcaceae*等菌群丰度,降低了志贺氏菌病等功能丰度。[结论]SFA:MUFA:PUFA比例为1:1.41:1.48的沙棘混合油可以通过减缓抗氧化水平、炎症因子以及调节调节小鼠肠道菌群等多种方式有效缓解小鼠慢性酒精肝损伤。

关键词:特定饱和度脂肪酸配制; 沙棘混合油; 慢性酒精肝损伤; 肠道菌群; 胆酸
中图分类号:TS201.4;R151.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2025)02-0039-11

Regulatory effects of sea buckthorn mixed oil on chronic alcohol-induced liver injury and intestinal microbiota in mice

Wang Fang[1,2], Zhang Bin[3], Zhang xin[2,4], Zhao Purun[5], Li Bowen[5], Huo Nairui[5], Qi Yanjin[1], Qin Xuwei[1], Guo Jianfeng[1,2*]

(*1.College of Chemistry and Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China; 2.Shanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Lujiu Plant Extraction and Health, Fenyang 030051, China; 3.International Seabuckthorn Association, Beijing, 100038, China; 4.College of biological engineering , University of Science and Technology, Tianjin, 300222, China; 5.College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China*)

Abstract:[Objective]The current study was aimed to investigate the effects of sea-buckthorn mixed oil with a specific fatty acid ratio on chronic alcohol-induced liver injury and intestinal microbiota in mice. [Methods]Sea-buckthorn fruit oil and seed oil were mixed in a specific ratio to prepare sea-buckthorn oil mixtures with a saturated fatty acid (SFA): monounsaturated fatty

收稿日期:2024-10-29　　**修回日期**:2025-01-15
基金项目:吕梁市重点研发项目(2023SHFZ03);吕梁市校地合作重点研发专项(2023XDHZ06)
作者简介:王芳(ORCID:0000-0001-6395-1039),博士,副教授,研究方向:植物提取与功效
*通信作者:郭建峰(ORCID:0000-0003-3473-0450),副教授,硕士生导师,E-mail:Jianfengguo@nuc.edu.cn

acid (MUFA): polyunsaturated fatty acid (PUFA) ratio of 1∶1.41∶1.48. Mice were randomly divided into a normal control (NC) group, an ethanol model (AC) group, a high-dose mixed oil intervention (HM) group (750 mg/kg bw), a medium-dose mixed oil (MM) group (600 mg/kg bw), and a low-dose mixed oil group (LM) (450 mg/kg bw). A chronic alcoholic liver injury (ALD) model was established by increasing ethanol concentration consumption in mice. After six weeks of modeling by incremental ethanol gavage, 18 biochemical indicators, including liver function, oxidative stress, and inflammatory factors, were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe hepatic histopathological changes. Mouse feces were collected for 16S rRNA sequencing to analyze intestinal microbiota diversity. [Results] Compared with the AC group, all three doses of sea buckthorn mixed oil intervention significantly alleviated chronic alcohol-induced hepatic steatosis, reduced liver function markers such as alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), reduced hepatic total triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), and liver index levels, and lowered oxidative stress markers such as malondialdehyde (MDA) and peroxidase (MPO), as well as inflammatory factors such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-α (TNF-α). The intervention also reduced total bile acid (TBA) levels in the liver and feces, while increasing high-density lipoprotein (HDL), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) levels in the liver. The medium-dose intervention (MM) group exhibited the best effects, followed by the HM group. Intestinal microbiota analysis indicated that chronic alcohol exposure reduced β-diversity and altered microbial composition and function in mice. Sea buckthorn mixed oil intervention increased β-diversity, enhanced the abundance of *Akkermansia* and *Ruminococcus* at the family level, and decreased the functional abundance of *Shigella*. [Conclusion] Sea-buckthorn mixed oil with an SFA∶MUFA∶PUFA ratio of 1∶1.41∶1.48 can effectively alleviate chronic alcohol-induced liver injury in mice by mitigating oxidative stress, inflammatory factors, and modulating intestinal microbiota.

Keywords: Fatty acid preparation with specific saturation ratio, Sea-buckthorn oil mixture, Chronic alcoholic liver injury, Intestinal microbiota, Bile acid

酒精摄入造成的伤害在世界范围内是重要的死亡原因,占到全球疾病的5.1%[1-2]。到2013年,中国已成为全球第二大饮酒大国,酒精性肝病发病率和死亡率也随之增加[3-4]。肝脏是乙醇代谢的主要器官,机体大量摄入乙醇后,其代谢产物会影响脂肪代谢,发生肝细胞脂肪沉积及肝细胞膜的脂质过氧化。酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD)包括从无症状的肝脏脂肪变性到炎症、纤维化、硬化及酒精性肝炎[5-6]。

肠肝轴是ALD发生和发展的主要途径。肝脏通过多种方式,包括胆汁酸的产生和肠肝循环、门静脉的营养输送等来影响肠道微生物群及其功能。研究表明,在长期酒精摄入引起的肝脏病变过程中,肠道及肠道微生物组成和功能均发生改变,而肠道微生物群落失调又经由肠肝轴进一步影响酒精性肝病进程[7-8]。针对酒精摄入导致的肝损伤,研究者进行了多种饮食干预的研究。一个思路是基于肝肠轴的互作,通过膳食纤维来调节肠道菌群[9],从而干预酒精性肝病的进展。例如,可溶性膳食纤维[10]、花青素[11]等可以通过调节小鼠肠道微生物群及肠肝轴作用减轻酒精肝损伤[12]。

膳食脂肪对肝脏健康及ALD也又影响,研究表明,富含饱和脂肪酸(SFA)的油脂,尤其是中链饱和脂肪酸,对酒精肝损伤具有保护作用;而富含多不饱和脂肪酸(PUFA)的油脂对酒精肝损伤效果比较复杂。如富含PUFA的玉米油会加重酒精引起的肝损伤[13],但也有研究报道富含n-3 PUFA的亚麻籽油[14]和核桃油[15]则改善了酒精性肝病。与PUFA类似,富含单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids,MUFAs)膳食油脂对ALD影响的报道也比较复杂[16-17]。目前来看,油脂对酒精引起的肝损伤的影响取决于饱和脂肪酸还是不饱和脂肪酸尚不能得到准确的结论。推断其作用不仅与油脂中所含脂肪酸的饱和程度有关,还与不同饱和度脂肪酸之间的比例有关。

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是一种药食同源植物,具有抗氧化、抗菌、抗癌、抗糖尿病、护肝等功效,广泛应用于中医、藏医及蒙医。沙棘全果富含油脂,从果浆和种子中可以分别分离出果油和籽油。沙棘果油和沙棘籽油天然富含SFA、MUFA、PUFA,从脂肪酸种类上来说,MUFA(如棕榈油酸)和SFA(如棕榈酸)是沙棘果油中的主要脂肪酸;PUFA如亚油酸和α-亚麻酸是沙棘籽油中的主要脂肪酸[18]。沙棘果油和籽油的抗氧化、抗辐射等功效已经得到证实[19-20],然而,沙棘

油,尤其是籽油和果油混合后对酒精引起的肝损伤尚未见报道。本研究旨在探讨籽油和果油合理配比后对酒精引起的肝损伤的作用,其作用与摄入剂量的关系以及其与肠道菌群的相互影响。

1　材料与方法

1.1　动物与试验材料

试验动物为50只6～8周龄SPF级昆明小鼠,雄性,北京市昌扬西山养殖场提供,许可证号:SCXK(京)2021-0008。小鼠饲养于山西农业大学实验动物中心SPF级屏障环境。实验室设施条件以及动物日常护理工作依照GB 14925-2023《实验动物 环境及设施》实施,饲养温度为(24.0±2.0) ℃,环境相对湿度为40%～60%,12 h光照循环按动物中心实际情况进行,小鼠自由饮水。所有操作遵守山西农业大学实验动物伦理委员会要求(IACCU审查号:SXAU-EAW-2020SD0201)。

沙棘混合油由沙棘果油和沙棘籽油按比例混合。沙棘混合油SFA:MUFA:PUFA为1:1.41:1.48,含β胡萝卜素(6.350±0.658) mg/100g,VE(47.500±2.252) mg/100g,阿勒泰太阳石健康产业发展有限公司提供。

无水乙醇,分析纯,购自天津市方大同正化工有限公司;二甲苯、甲醛、苏木精、多聚甲醛等用于病理切片染色与制作的化学试剂,购自国药集团化学试剂有限公司。小鼠低密度脂蛋白(LDL)ELISA检测试剂盒、小鼠高密度脂蛋白(HDL)ELISA检测试剂盒、谷丙转氨酶/丙氨酸氨基转氨酶(GPT/ALT)试剂盒、谷草转氨酶/天冬氨酸氨基转氨酶(GOT/AST)试剂盒、总胆固醇(TC)含量试剂盒、甘油三酯(TG)含量试剂盒、总胆汁酸(TBA)(酶循环比色法)含量检测试剂盒,购自上海江莱生物科技有限公司。小鼠肿瘤坏死因子TNF-alpha ELISA试剂盒、小鼠白介素-1(lL-1)ELISA试剂盒、小鼠白介素-1(lL-6)ELISA试剂盒购自武汉三鹰生物技术有限公司。丙二醛(MDA)含量检测试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒、髓过氧化物酶(MPO)活性检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒购自北京盒子生工科技有限公司。

1.2　仪器与设备

-80 ℃超低温冰箱(型号DW-86L626 海尔)、MultiskanTM Sky全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific公司美国),RM2016病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),Eclipse C1倒置荧光显微镜、DS-U3成像系统(尼康公司日本),ProFlex三头梯度基因扩增聚合酶链式反应(polymerase chainreaction,PCR)仪(应用生物系统公司美国),实时荧光定量PCR仪(耶拿公司德国)。

1.3　试验方法

1.3.1　慢性ALD小鼠模型的建立及动物分组

SPF级雄性昆明小鼠50只,体重18～22 g,每组10只,每笼5只。考虑到试验动物意外死亡,试验开始前每组多准备2～3只小鼠。试验开始前各组小鼠体重无显著差异。将小鼠随机分为空白对照组(NC)、模型对照组(AC)和沙棘混合油干预高、中、低3个剂量组,分别为HM(0.75 g/kg bw)、MM(0.6 g/kg bw)、LM(0.45 g/kg bw)。

小鼠适应性饲养1周后,NC组灌胃凉白开。模型组AC及3个干预组按12 mL/kg bw乙醇的量灌胃小鼠,乙醇浓度从25%开始,按5%递增。所有小鼠均饲喂标准饲料,期间每周测定小鼠体重。持续6周后,NC组给予蒸馏水,其它组1次灌胃50%乙醇。摘除眼球采血,脊椎脱臼处死小鼠。摘取肝脏,称重后,部分组织用于制备切片,剩余部分制成10%组织匀浆液,离心取上清液,-20 ℃保存。

1.3.2　样本采集及肝指数测定

给予受试样品结束时,采集新鲜小鼠粪便,装入灭菌离心管,液氮快速冷冻,并立即置于-80 ℃冰箱备用。小鼠采血后血浆于4 ℃冰箱静置1 h后3 000×g离心15 min,小心收集上层血清,并立即置于-80 ℃冰箱备用,进行ALT、AST指标的检测。对完整的肝组织取样并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,吸干水分后测定湿质量,肝指数为肝脏湿质量与体质量之比。

肝脏拍照,根据脏器形态,从每组中统一取相同部位的肝脏样品固定于4%多聚甲醛溶液中制备切片,进行组织病理学观察分析。另取部分肝脏组织直接包埋于OCT冷冻切片包埋剂中备用,剩余的肝组织-80 ℃保存用于制备肝匀浆,进行各项指标的检测。

1.3.3　小鼠肝脏组织病理学观察

将肝脏组织在4%多聚甲醛溶液中固定24 h

后,进行苏木精-伊红(Hematoxylin and eosin,H&E)染色以评估肝脏脂肪变性和炎症程度。用显微镜观察以上染色组织切片。肝脏组织病理损伤分级评价标准参考《保健食品功能检验与评价方法 2023年版》,将肝脏组织病理学改变按照脂肪变性和炎细胞浸润程度进行评分。

1.3.4 小鼠肝功能生化指标的测定

使用相应检测试剂盒并根据说明书测定。

取部分冷冻的小鼠肝脏组织称质量,按一定比例加入缓冲液,冰上匀浆,4 ℃离心,收集上清液,根据相应检测试剂盒说明书测定肝脏TC、TG、HDL、LDL指标。

1.3.5 小鼠肝脏氧化指标的测定

按1.3.4节步骤制备肝匀浆,离心收集上清液,根据相应试剂盒说明测定MDA、MPO、GSH和SOD水平。

1.3.6 小鼠肝脏炎症因子水平的测定

按1.3.4节步骤制备肝匀浆,离心收集上清液,根据相应试剂盒说明测定炎症因子TNF-α、IL-6和IL-1水平。

1.3.7 小鼠粪便微生物组分析

按1.3.2节步骤收集粪便样品,送广州基迪奥科技服务有限公司进行肠道菌群分析。取小鼠粪便进行DNA提取,然后通过PCR扩增细菌16S rDNA的高变V3~V4区域,正向引物为341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'),反向引物为 806R (5' -GGACTACHVGGGTWTCTAA-3'),对PCR产物进行纯度检测后进行荧光定量分析。基于分类学信息进行肠道菌群门、纲、科水平上的群落结构物种组成分析、指示物种分析、α-多样性分析、β-多样性分析及功能预测。生信分析基于Omicsmart平台(http://www.omicsmart.com)进行。

1.4 数据处理与分析

采用Origin Pro 2021软件对数据进行统计分析,结果均表示为平均值±标准差。多重比较之间的差异采用单因素方差分析和Fisher's LSD检验进行分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠体质量和肝指数的影响

表1为各组小鼠0、3、6周体质量及肝脏情况。从表1可以看出,与NC组相比,酒精暴露导致小鼠体质量显著降低($P<0.05$)。从第3周的体重数据来看,沙棘混合油中剂量(MM)干预显著缓解了乙醇引起的小鼠体质量减轻,高剂量组(HM)和低剂量组(LM)尽管也缓解了体重降低的趋势,但是与模型组(AC组)相比,差异不显著。到第6周,3个干预组小鼠体重仍然高于模型组,但差异不显著。与NC组相比,AC组肝指数显著升高($P<0.05$),干预后MM与LM组肝指数显著降低,与NC组无显著差异,说明中剂量和低剂量沙棘混合油能完全逆转慢性酒精摄入带来的肝指数的变化。HM组肝指数低于AC组,但差异不显著。此外,以上结果说明沙棘混合油摄入可以有效改善慢性酒精摄入引起的体重降低、肝脏肿大及肝脏组织病理损伤,但是保护效果与剂量相关,中剂量综合效果最好。

2.2 沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏形态和病理损伤的影响

图1A为小鼠肝脏表型图。从图1A中可以看出,NC组小鼠肝脏为正常的暗红色,AC组小鼠肝脏显色为鲜红色,此外肝脏表面分布有大量出血点,肝脏边缘发白,显示长期慢性酒精暴露使小鼠肝脏表型发生明显改变。与AC组形成显著对比的是MM组,从图中可以看出MM组肝脏无论从颜色还是出血点发生情况来看,明显更接近于NC组,说明沙棘混合油中剂量干预可以在很大程度上缓解酒精对肝脏的损伤。整体来说,中剂量组>低剂量组>高剂量组。

基于小鼠肝脏表型的变化,进一步通过HE染色分析肝脏组织病理情况(见图1B)。如图所示,NC组肝细胞形态正常,肝索结构清晰;AC组基本上看不到肝索和完整的肝细胞结构;胞质中可见较多大小不一的白色圆形泡,说明出现严重的脂肪变性和脂滴积累;中央静脉周围肝细胞肿胀变形,并可见到炎性细胞点状浸润,说明长达6周的慢性酒精暴露后酒精肝损伤模型造模成功。沙棘混合油干预组,中剂量MM组肝索和肝细胞结构清晰,胞质中脂滴积累大大减少,其状态与空白对照NC组更接近,说明中剂量干预有效缓解了乙醇引起的小鼠肝脏脂肪变性。HM组LM组小鼠肝细胞内脂肪空泡和脂滴数量和炎症细胞浸润较模型组少。对各组小鼠肝脏组织病理损伤进行评分(表1),结果显示,沙棘混合油干预均可有效缓解

酒精引起的小鼠肝脏病理改变,并且相较于LM组,MM组和HM组干预具有更好的修复作用。

表1　沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠体质量、肝指数和肝脏病理损伤评分的影响

Table 1　Effects of sea-buckthorn oil mixture on body weight, liver index and liver pathological injury score of mice exposed to chronic alcohol intake

组别 Group	体重(0周) Body weight(0 week)	体重(3周) Body weight(3 week)	体重(6周) Body weight(6 week)	肝指数 Liver index	肝脏病理损伤评分 Liver pathological injury score
NC	30.35±1.29	41.95±3.09a	46.55±2.63a	3.87±0.16b	0.55±0.07d
AC	29.35±1.81	34.11±5.91c	39.81±3.61b	4.61±0.54a	3.60±0.14a
HM	29.60±1.33	35.90±1.56bc	43.00±3.66ab	4.06±0.20ab	1.30±0.14c
MM	29.55±1.54	37.71±2.51b	43.30±3.77ab	3.83±0.27b	1.15±0.07c
LM	29.25±3.30	36.29±3.31bc	42.75±3.57ab	3.92±0.68b	2.15±0.08b

注:NC为空白对照组,AC为模型对照组,HM、MM、LM分别为沙棘混合油高、中、低剂量干预组。各列进行LSD多重比较,不同字母表示同列数据差异显著($P<0.05$)。

Note:NC is a normal control group, AC is an ethanol model group, HM is a high-dose mixed oil intervention group, MM is a medium-dose mixed oil group, and LM is a low-dose mixed oil group. LSD multiple comparisons were performed for each column, and different letters indicated significant differences($P<0.05$).

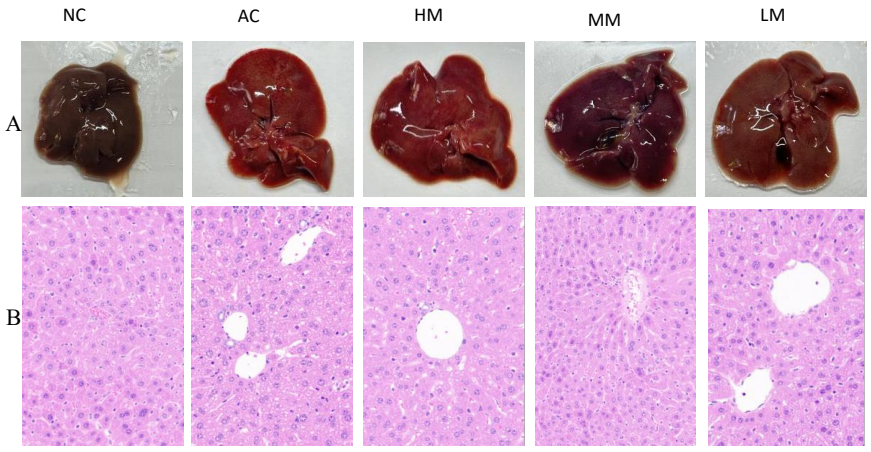


图1　(A)沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏表型的影响;(B)肝脏组织代表性H&E染色切片(×200)

Fig.1　(A) Effect of sea-buckthorn oil mixture on liver phenotype in mice exposed to chronic alcohol intake;(B)Representative H&E staining sections of liver tissue(×200)

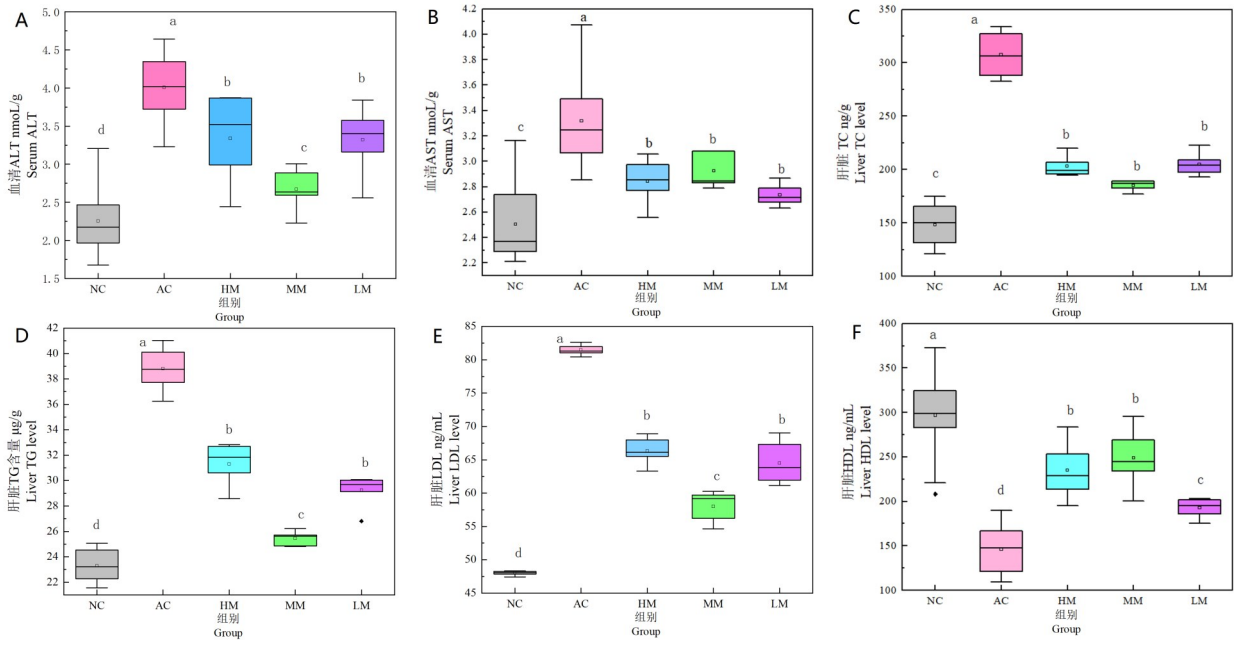
2.3　沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝功能的影响

血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)以及肝脏总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)是临床常用的肝功能指标。如图2A和图2B所示,与NC组相比,AC组小鼠血清中ALT和AST显著升高($P<0.05$)。沙棘混合油干预后,3个剂量组小鼠血清AST水平均较AC组显著下降($P<0.05$),组间无显著差异。对于ALT来讲,沙棘混合油干预均可显著降低小鼠血清ALT水平,但中剂量(MM)效果比高剂量(HM)和低剂量(LM)更优,差异显著($P<0.05$)。

图2C和图2D分别表示肝脏中TC和TG水平。与NC组相比,AC组TC和TG水平均显著升高($P<0.05$),表明长期摄入乙醇引起小鼠肝脏总胆固醇和甘油三酯水平显著升高。经沙棘混合油干预后,干预组小鼠肝脏TC水平均显著下降,3个剂量组无显著差异,说明沙棘混合油可以降低肝脏胆固醇水平。对甘油三酯水平来讲,沙棘混合油干预均可显著降低小鼠肝脏TG水平,但中剂量(MM)效果比高剂量(HM)和低剂量(LM)更优,

差异显著($P<0.05$)。

图2E和图2F分别是肝脏中LDL和肝脏HDL水平,与NC组相比,AC组LDL水平显著增加($P<0.05$),HDL水平显著降低($P<0.05$)。经沙棘混合油干预后,总体上3个剂量组较AC组小鼠肝脏LDL水平显著下降($P<0.05$),HDL水平显著升高($P<0.05$)。具体对于LDL来说,中剂量效果更优于高剂量和低剂量,差异显著($P<0.05$);对于HDL来说,高剂量和中剂量保护效果优于低剂量,差异显著($P<0.05$)。结合血清ALT、AST以及肝脏TC、TG的结果分析,可以得出,沙棘混合油摄入对小鼠慢性酒精摄入导致的肝损伤有保护作用,总体与剂量呈U形相关,中剂量最优,过高或过低剂量可能在某一方面降低护肝效果。



(A)血清ALT、(B)血清AST、(C)肝脏TC、(D)肝脏TG、(E)肝脏LDL、(F)肝脏HDL。各组进行LSD多重比较,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),以下同

(A)serum AST, (B)ALT, (C)liver TC, (D)liver TG, (E)liver LDL, (F) liver HDL. LSD multiple comparisons were performed for each group, and different lowercase letters indicated significant differences($P<0.05$). The same as below

图2 沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠的影响

Fig.2 Effects of sea buckthorn oil mixture on mice exposed to chronic alcohol intake

2.4 沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏氧化应激水平的影响

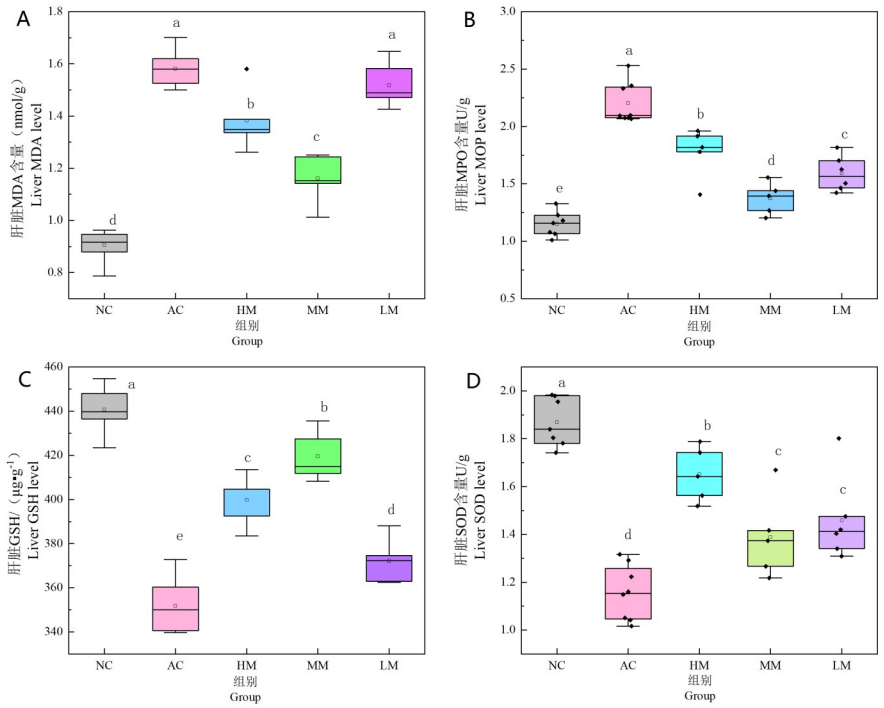
丙二醛(MDA)和过氧化物酶(MPO)是膜脂过氧化的终产物之一,其含量可以作为细胞受胁迫严重程度的指标之一。从图3A和图3B可以看出,AC组MDA、MPO含量远高于NC组,差异显著,说明长期酒精暴露使肝细胞膜脂氧化程度增大,肝细胞受损。MM组小鼠较AC组肝脏MDA和MOP水平显著降低,且MM组降低水平与HM组、LM组差异显著,说明中剂量沙棘混合油可以显著降低酒精引起的氧化损伤,且效果显著优于高剂量和低剂量。HM组和LM组相比,前者在MDA降低方面更有优势,后者在MPO指标降低表现更好。

还原型谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶SOD是细胞针对氧化胁迫产生的抗氧化物质,可以抵抗氧化损伤。从图3C和图3D可以看出,AC组GSH和SOD含量显著低于其它各组,说明酒精暴露使小鼠抗氧化能力降低。沙棘混合油3个剂量组均可显著提高小鼠SOD和GSH含量。3个剂量组之间表现层次,具体来说,GSH活力表现为MM>HM>LM,各组差异显著;SOD活力表现为HM优于MM和LM组,差异显著。以上结果表明,沙棘混合油干预均总体上可以提高抗氧化物质水平,从而有效抑制长期酒精暴露引起的小鼠肝脏氧化应激水平的提高,且抗氧化效果与沙棘

油干预剂量相关。

本研究混合沙棘油配制时重点考虑了SFA、MUFA、PUFA三者的配比,以上结果表明了这一特定脂肪酸配比的保护效果。然而,在抗氧化方面,混合沙棘油中天然存在丰富的脂溶性抗氧化物质β-胡萝卜素和VE(表1),这2种物质有可能在抗氧化方面发挥较大的作用。为此分析了MOD、MPO这2个氧化应激指标以及SOD和GSH这2个抗氧化指标,发现只有在SOD指标中,HM显著优于MM和LM组,其它3个指标中均为MM组最优,与HM组差异显著。以上结果说明沙棘油中天然抗氧化剂β-胡萝卜素和VE在酒精性肝病的抗氧化过程中发挥一定的作用,但不与剂量成正比。表明还有其它物质,比如本研究中的主要物质特定比例不饱和度的脂肪酸与其协同发挥抗氧化作用。

综上,与NC组相比,AC组小鼠肝脏MDA、还原型GSH和TG这3项阳性,病理组织学检查结果阳性,根据《保健食品功能检查与评价方法2023年版》,表明本试验酒精肝损伤造模成功。沙棘混合油干预后,3项指标及病理组织学检查与模型组相比显著改善,表明沙棘混合油对酒精肝损伤具有辅助保护作用,其中中剂量保护效果最佳。



MDA(A);MPO(B);GSH(C)和SOD(D)

MDA(A),MPO(B),GSH(C) and SOD(D)

图3　沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏氧化应激水平的影响

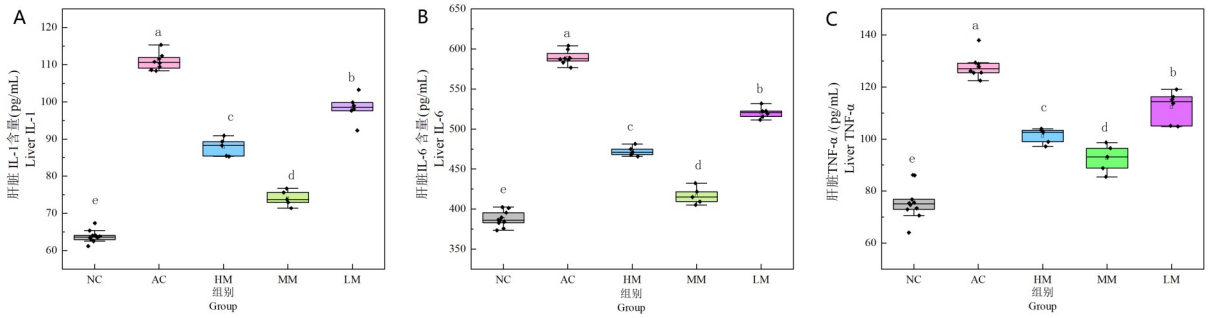
Fig.3　Effects of sea buckthorn mixed oil on oxidative stress levers in liver of mice exposed to chronic alcohol intake

2.5　沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏炎症因子水平的影响

如图4A～4C所示,与NC组相比,AC组小鼠的白细胞介素IL-1、IL-6以及肿瘤坏死因子TNF-α水平显著升高($P<0.05$),表明长期酒精暴露诱发了小鼠肝脏的炎症反应。沙棘混合油干预3个剂量组均可显著降低酒精暴露小鼠肝脏中较高的炎症因子($P<0.05$),但剂量对抗炎效果有影响,整体上3个指标表现为MM>HM>LM,各剂量之间差异显著($P<0.05$)。

2.6　沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏总胆汁酸水平的影响

图5A和图5B分别为肝脏和粪便中总胆汁酸水平。从图5可以看出,与NC组相比,AC组肝脏和粪便胆汁酸水平均显著升高($P<0.05$)。摄入沙棘混合油小鼠肝脏TBA水平显著降低($P<0.05$),降低水平受剂量影响,总体上MM组显著优于HM和LM组。

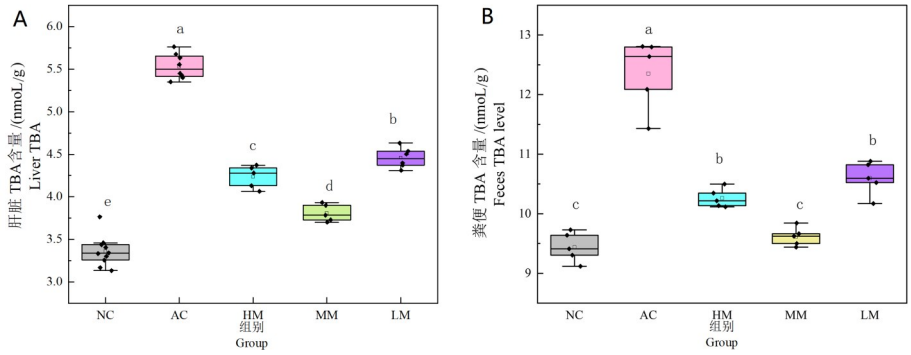


肝脏IL－1水平(A)；肝脏IL－6水平(B)；肝脏TNF－α水平(C)

Liver IL－1 level(A), liver IL－6 level(B), and liver TNF－α level(C)

图4 沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏炎症因子水平的影响

Fig.4 Effects of sea buckthorn mixed oil on inflammatory factor level in liver of mice exposed to chronic alcohol intake



肝脏TBA水平(A)；粪便(B)TBA水平

TBA level of liver (A), and TBA level of feces (B)

图5 沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏和粪便TBA水平的影响

Fig.5 Effects of sea buckthorn mixed oil on TBA level of liver and feces in mice exposed to chronic alcohol intake

2.7 沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏影响综合评价

以上检测了血清、肝脏、粪便中18项生化指标，分别表征了慢性酒精暴露及沙棘油干预对小鼠肝功能、氧化、炎症等方面的影响。总体上AC组ALD发展明显，经沙棘油干预后表现出不同程度保护作用，但各个细分指标中3个剂量组保护效果不一致。为了从整体上定量评估3个剂量组的保护作用，对各指标效果进行了归一化数学分析。首先对18项生化指标的单因素方差分析多重比较结果统一编制为NC组为a，如NC组原来从a开始标号的指标，如HDL指标，其编码不变；如果某项指标，比如LDL，其AC组编号为a，则反转编号，重编为NC为a，以后各组依据原差异显著性的多重比较结果依次编号。然后赋值a为1，b为2，依次类推(表2)。按照多重比较差异性赋值后，各组加和18项指标得分，得到该组ALD综合得分。得分越低，ALD程度越小，肝脏越健康。各组综合评分结果见图6。

表2 指标LDL单因素方差分析多重比较结果归一化处理

Table 2 Normalization of index LDL one－way ANOVA multiple comparison results

组别 Group	NC	AC	HM	MM	LM
原多重比较编号 Original multiple comparison number	d	a	b	c	b
反转编号 Reverse numbering	a	d	c	b	c
数字化编号 Digital numbering	1	4	3	2	3

从表6可以看出，NC组分数最低，为基础分18分，肝脏健康状况最好；AC组71分，分数最高，与前面分指标结论一致，对应其ALD发展程度最大，说明建模成功。沙棘混合油3个剂量组HM、MM、LM得分分别为46、34.5、53.5。依据得分情况来看，沙棘混合油干预综合效果为：MM组＞

HM组>LM组,即中剂量最好,高剂量次之,低剂量再次之。为了考察各剂量组是否效果差异,按18为差值计算各组对NC的倍数,得到HM、MM、LM各组倍数值为:1.56、0.92、1.97。可以总体上推断,沙棘油干预组能显著缓解酒精造成的ALD,其中MM组效果显著优于其它两组,HM组优于LM组,但后二者差异不显著。

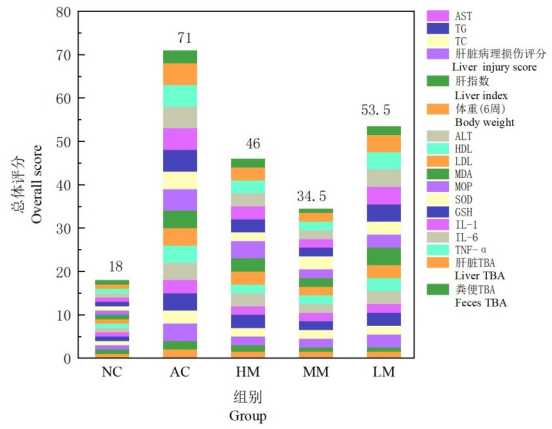


图6　18项指标综合评分

Fig.6　Comprehensive score of 18 indicators

2.8　沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肠道菌群的影响

酒精暴露和沙棘混合油干预对小鼠粪便微生物α多样性无显著影响($P>0.05$),但对β多样性产生影响($P=0.001$)(图7)。与NC组相比,AC组β多样性下降,沙棘油干预后β多样性回调,回调效果与沙棘油摄入剂量呈负相关。说明酒精暴露和沙棘油干预均对小鼠肠道菌群组成造成了一定扰动。

从门水平丰度分析菌群变化,发现与NC相比,AC组小鼠粪便微生物菌群中*Firmicutes*(厚壁菌门)丰度降低,*Bacteroidota*(拟杆菌门)丰度增加;此外,*Proteobacteria*(变形菌门)丰度增加。变形菌门包括很多病原菌,如大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、幽门螺杆菌等。沙棘油干预后,变形菌门丰度普遍下调。此外,HM组*Verrucomicrobiota*(疣微菌门)丰度增加。疣微菌门是肠道微生物群落的重要组成部分,它们可能参与了宿主代谢和免疫反应等多种生理过程,近年研究较多的新一代益生菌*Akkermansia muciniphila*(嗜黏蛋白阿克曼氏菌)属于疣微菌门。

图8为各组小鼠粪便科水平菌落丰度相关性

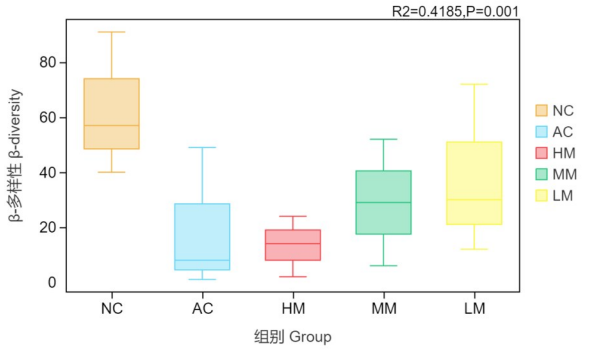


图7　沙棘油干预对小鼠粪便微生物群落β-多样性的影响

Fig.7　Effects of sea buckthorn mixed oil on fecal microbial community β-diversity in mice exposed to chronic alcohol intake

热图。从图中可以看出,相对于NC组,AC组*Lachnospiraceae*(毛螺菌科)、*Desulfovibrionaceae*(脱硫弧菌科)、*Planococcaceae*(动球菌科)、*Oscillospiraceae*(颤螺菌科)、*Ruminococcaceae*(瘤胃球菌科)丰度下降;沙棘油干预后,以上各科微生物不同程度回升。同时,与NC对比,酒精暴露后,AC组*Lactobacillaceae*(乳杆菌科)、*Moraxellaceae*(莫拉氏菌科)、*Sutterellaceae*、*Erysipelotrichaceae*(丹毒丝菌科)丰度增加。沙棘混合油干预后,3个剂量组*Moraxellaceae*丰度均下降回调至NC组近似水平,对于*Erysipelotrichaceae*,只有中剂量沙棘油(MM)干预组表现出丰度下降回调至接近NC水平。此外,与门水平的分析一致,高剂量沙棘混合油表现出对*Akkermansiaceae*菌特别的增殖作用,指示物种分析也将*Akkermansiaceae*作为HM组的指示物种。

酒精和沙棘油的干预不仅调节肠道菌群组成,同时对肠道菌群微生物功能丰度产生影响。在PICRUSt2 level 3分析中,酒精暴露后,与NC组相比,AC组Shigellosis功能丰度差异显著($P=0.015$),其次为II型聚酮主链的生物合成($P=0.058$)、倍半萜类和三萜类生物合成($P=0.059$)。Shigellosis与志贺氏菌病相关,经沙棘油干预后,志贺氏菌病功能丰度均显著下调,表明沙棘油有可能通过降低志贺氏菌病伤害功能减缓酒精肝损伤。II型聚酮主链的生物合成以及倍半萜类和三萜类生物合成与微生物有益的次级代谢物生物合成相关,AC组显著下调,沙棘油干预后略有上调,但差异不显著。

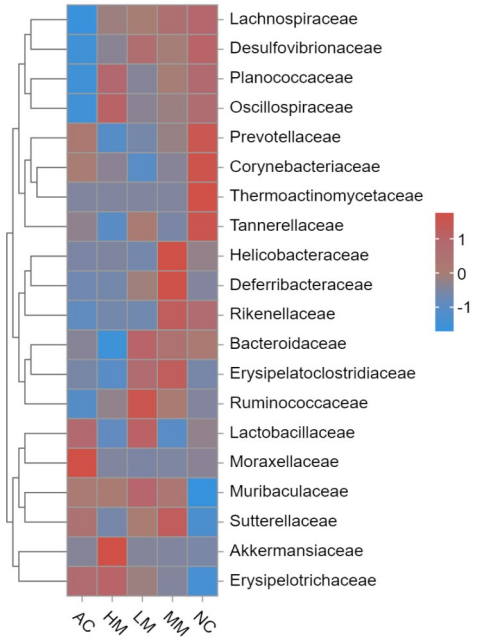


图8 各组小鼠粪便微生物群科水平丰度相关性热图

Fig.8 Correlation heat map of fecal microbiota abundance on family level in each group

3 讨论

本研究中为了考察特定比例脂肪酸对酒精肝损伤的影响,将沙棘果油与沙棘籽油按一定比例混合配制为沙棘混合油,其SFA∶MUFA∶PUFA为1∶1.41∶1.48。配比中包含了饱和、单不饱和以及多不饱和脂肪酸,且饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸比例为1∶2.9,接近1∶3。研究显示整体上这一比例的混合油在所有指标中均显著优于AC组,表明这一比例在保护酒精肝损伤方面是有效的。这一结果可以为后期油脂的护肝作用研究提供一个新思路。但这一比例是否是最优的配比,沙棘混合油对酒精肝损伤的保护效果是否是由这3类脂肪酸的不同比例引起的,还需要开展进一步的机制研究。

酒精性肝病发病(ALD)机制及进程复杂,表现在多个方面,包括但不限于ALT、AST、TC、TG、LDL升高,MDA、MOP等氧化损伤指标升高,IL-1、IL-6、TNF-α等炎症因子水平升高,SOD、GSH等抗氧化指标下降等。本研究中,不同剂量的沙棘混合油保护作用对不同指标的效果参差不齐,这种剂量效应的参差在其它文献中也有报道[21-22]。为了能够量化比较不同剂量沙棘混合油的整体效果,本研究对18项指标的单因素方差分析多重比较结果进行了数字归一化处理,以NC和AC为对照进行了量化比较,为沙棘混合油剂量的选取提供了更整合的数据,也为后期它他效应物的研究探索一种综合比较的思路。

近年来肠道微生物研究发现肠肝轴在ALD发生、发展中产生重要影响。肠道微生物,尤其是与胆汁酸代谢相关的微生物,可以影响体内胆汁酸代谢从而影响ALD进程。肠道微生物的变动可以影响初级胆汁酸及次级胆汁酸的比例,进而通过肠肝轴影响肝癌的进展[7]。多项研究表明酒精摄入可导致肠道屏障及微生物群组成发生变化,促进炎症细胞因子和内毒素进入肝脏,这个过程可以进一步增强胆汁酸合成和全身炎症,从而导致恶性循环[7-8]。本文研究了沙棘混合油对慢性酒精暴露小鼠肝脏和粪便中胆汁酸的影响,发现酒精暴露使小鼠肝脏和粪便中总胆汁酸同时上升。

关于肠道菌群与酒精肝损伤的研究越来越受重视。膳食纤维、花青素等对肠道菌群的调节作用报道较多[11-12]。油脂,尤其是沙棘油与ALD进程中肠道菌群的关系报道相对较少。我们的研究发现酒精暴露后,肠道菌群组成在门、目、科等水平发生变化。从科的水平来看,酒精暴露导致*Ruminococcaceae*(瘤胃球菌科)、*Lachnospiraceae*(毛螺菌科)等丰度下降。*Lachnospiraceae*(毛螺菌科)可产生乙酸和丁酸等短链脂肪酸,是潜在的益生菌。这与生化指标结果一致,表明酒精长期摄入使肠道菌群中部分潜在益生菌下调,并通过肠肝轴影响了肝脏健康。此外,酒精暴露还引起小鼠肠道微生物中某些菌群丰度上调,主要包括*Lactobacillaceae*(乳杆菌科)、*Moraxellaceae*(莫拉氏菌科)、*Muribaculaceae*、*Sutterellaceae*、*Erysipelotrichaceae*(丹毒丝菌科)。值得注意的是,高剂量沙棘混合油组使*Akkermansia muciniphila*丰度显著上调,而且成为该组的标志微生物。

4 结论

为了研究特定脂肪酸组成对酒精肝损伤的影响,由沙棘果油和沙棘籽油混合配制成沙棘混合油,其SFA∶MUFA∶PUFA比例为1∶1.41∶1.48。研究结果表明,沙棘混合油可以通过减少炎症因子、维持机体抗氧化平衡、降低总胆汁酸的增加和

调整肠道平衡,来有效缓解长期慢性酒精暴露引起的肝脏损伤,提示这一比例的沙棘混合油未来可用作缓解酒精肝损伤的功能性食品补充剂。综合血清AST、ALT、肝脏TG、TC、SOD、MDA、GSH和炎症因子等18项生化指标,定量评价3个剂量沙棘混合油对酒精肝损伤的保护水平,发现中剂量沙棘油的保护效果显著优于高剂量和低剂量。结果可以为后期油脂的护肝作用研究提供一个新思路。

参　考　文　献

[1]Wang W J, Xiao P, Xu H Q, et al. Growing burden of alcoholic liver disease in China: A review [J]. World Journal of Gastroenterology, 2019, 25(12): 1445-1456.

[2]Danpanichkul P, Suparan K, Cheng H N, et al. Global and regional burden of alcohol-associated liver disease and alcohol use disorder in the elderly [J]. JHEP Reports, 2024, 6(4): 101020.

[3]Wu M, Qin S, Tan C, et al. Estimated projection of incidence and mortality of alcohol-related liver disease in China from 2022 to 2040: a modeling study [J]. BMC Medicine, 2023, 21(1): 277.

[4]Tang Z, Ding Y, Zhang W, et al. Epidemiological characteristics of alcohol-related liver disease in China: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Public Health, 2023, 23(1): 1276.

[5]Osna N A, Rasineni K, Ganesan M, et al. Pathogenesis of alcohol-associated liver disease [J]. Journal of Clinical and Experimental Hepatology, 2022, 12(6): 1492-1513.

[6]Davis B C, Bajaj J S. Effects of alcohol on the brain in cirrhosis: beyond hepatic encephalopathy [J]. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2018, 42(4): 660-667.

[7]Ma C, Han M, Heinrich B, et al. Gut microbiome - mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells [J]. Science,2018, 360: 876

[8]Bajaj J S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(4): 235-246.

[9]Shen H. Dietary fiber alleviates alcoholic liver injury via Bacteroides acidifaciens and subsequent ammonia detoxification [J]. Cell Host & Microbe, 2024, https://doi.org/10.1016/j.chom.2024,32(8):23

[10]张荣彬, 杨懿, 周志磊, 等. 甘露低聚糖和部分水解瓜尔胶对小鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 95-105.
Zhang R B, Yang Y, Zhou Z L, et al. Protective effects of mannan oligosaecharides and partially hydrolyzed guar gum on chronic alcoholic liver injury in mice[J]. Food Science. 2023.44(11): 95-105

[11]Zhu L, Cao F, Hu Z, et al. Cyanidin-3-O-glucoside alleviates alcoholic liver injury via modulating gut microbiota and metabolites in mice[J]. Nutrients, 2024, 16(5): 694.

[12]Kwan S Y, Gonzales K A, Jamal M A, et al. Protection against fibrosis by a bacterial consortium in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis and the role of amino acid metabolism[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2399260.

[13]Zhong W, Li Q, Xie G, et al. Dietary fat sources differentially modulate intestinal barrier and hepatic inflammation in alcohol-induced liver injury in rats[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2013, 305(12): G919-G932.

[14]Zhang X, Wang H, Yin P, et al. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice[J]. Lipids in Health and Disease, 2017, 16(1): 44.

[15]Miao F, Shan C, Yang W, et al. Protective effect of walnut oil on alcoholic liver disease in mice [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2022, 54(3):1123-1131.

[16]Guo R, Chen L, Zhu J, et al. Monounsaturated fatty acid-enriched olive oil exacerbates chronic alcohol-induced hepatic steatosis and liver injury in C57BL/6J mice [J]. Food & Function,14: 1573-1583.

[17]Guo R, Zhu J, Chen L, et al. Dietary camellia seed oil attenuates liver injury in mice chronically exposed to alcohol [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1026740.

[18]Ma Y, Yao J, Zhou L, et al. Comprehensive untargeted lipidomic analysis of sea buckthorn using UHPLC-HR-AM/MS/MS combined with principal component analysis[J]. Food Chemistry, 2024, 430: 136964.

[19]Sanwal N, Mishra S, Sahu J K, et al. Effect of ultrasound-assisted extraction on efficiency, antioxidant activity, and physicochemical properties of sea buckthorn (Hippophae salicipholia) seed oil[J]. LWT, 2022, 153: 112386.

[20]Shi J, Wang L, Lu Y, et al. Protective effects of seabuckthorn pulp and seed oils against radiation-induced acute intestinal injury[J]. Journal of Radiation Research, 2017, 58(1): 24-32.

[21]李涛, 韩雪梅, 许效群, 等. 苦荞叶黄酮对糖尿病小鼠的肝肾保护效果及机制[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2021, 41(1): 81-87.
Li T, Han X M, Xu X Q, et al. Protective effect and mechanism of *Fagopyrum tataricum* leaf flavonoids on liver and kidney in diabetic mice[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2021,41(1):81-87.

[22]Feng J, Wang S, Chen F, et al. Effects of triglyceride and ethyl ester forms of EPA on hepatic lipid metabolism in mice with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Journal of Functional Foods, 2024, 116: 106179.

(编辑:韩志强)