茯砖茶对 APOE$^{-/-}$小鼠肝脂合成和氧化应激影响

张文将[1]，刘圆月[2]，范文涛[1]，段丽芳[1]，李 鑫[1]，刘柏炎[*3]
（1. 陕西中医药大学 基础医学院，陕西 咸阳 712046；2. 益阳医学高等专科学校 基础医学部，湖南 益阳 413000；3. 湖南中医药大学 中西医结合学院，湖南 长沙 410208）

摘要：观察茯砖茶对非酒精性脂肪肝治疗效果及对肝脂合成和氧化应激的影响。选取 2 月龄雄性 APOE$^{-/-}$小鼠 55 只，连续高脂饲料喂养 13 周后随机抽取 5 只进行 HE 染色判断成模率。造模成功后随机分为模型组，阿托伐他汀组，茯砖茶高、中、低剂量组，持续高脂饲料喂养并灌胃干预 8 周。同时选 2 月龄 C57 小鼠作为空白对照组，普通饲料喂养 13 周后予以生理盐水连续灌胃 8 周。实验末取小鼠肝脏组织用于肝功能、氧化应激、HE 染色及 RT-qPCR。病理学显示茯砖茶高、中剂量组小鼠肝脂轻于模型组。与空白对照组比较，模型组肝组织 GSH-PX、SOD 活力较低；MDA 质量摩尔浓度，ALT 活力，AST 活力，NAS 积分，*SCD-1*、*PPAR-γ*、*HMGCR* 基因表达较高（$P<0.05$）。与模型组比较，茯砖茶不同剂量组肝组织 MDA 质量摩尔浓度，ALT、AST 活力，NAS 积分，*SCD-1*、*PPAR-γ*、*HMGCR* 基因表达较低；GSH-PX、SOD 活力较高。茯砖茶通过抑制肝脂合成和减少肝脏氧化应激损伤而达到逆转早期非酒精性脂肪肝的效果。

关键词：茯砖茶；非酒精性脂肪肝；载脂蛋白 E 敲除小鼠；脂质合成；氧化应激损伤
中图分类号：R 285.5；R 967　**文章编号**：1673-1689(2021)03-0103-09　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.03.013

Effect of Fu Brick Tea on Hepatic Lipid Synthesis and Oxidative Stress in APOE$^{-/-}$ Mice with Non-Alcoholic Fatty Liver

ZHANG Wenjiang[1]，*LIU Yuanyue*[2]，*FAN Wentao*[1]，*DUAN Lifang*[1]，*LI Xin*[1]，*LIU Baiyan*[*3]
（1. School of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China；2. Department of Basic Medicine, Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China；3. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China）

Abstract: The effect of Fu brick tea on hepatic lipid synthesis and oxidative stressin jury in APOE$^{-/-}$ mice with non-alcoholic fatty liver was investigated in this study. Fifty-five male APOE$^{-/-}$ mice aged 2 months were continuously fed with high fat diet for 13 week. Five of them were randomly selected for HE staining to estimate the successful development of animal model.The remaining fifty APOE$^{-/-}$ mice were randomly divided into model group,atorvastatin group,and high-, medium- and low-dose groups of Fu brick tea after successful modeling. All of APOE$^{-/-}$ mice were respectively intervened with high fat diet through gavage for 8 weeks. At the same time, 2-month-old C57 mice 2

收稿日期：2020-06-23
基金项目：湖南省科技计划项目(2018JJ2412)；湖南省中医药科研计划项目(201870)；湖南省教育厅科学研究项目(17B271)；陕西中医药大学校级科研项目(2020GP17)。
作者简介：张文将(1986—)，男，讲师，主要从事中医药防治内科疾病的研究。E-mail：1126372680@qq.com
*** 通信作者**：刘柏炎(1970—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事中医药防治内科疾病研究。E-mail：liubaiyan@ 126.com

were selected as the control group and fed with normal diet for 13 weeks and then given saline for 8 weeks. At the end of the experiment, the liver tissues of mice were taken for liver function, oxidative stress, HE staining and RT-qPCR. Pathological morphology showed that the degree of liver steatosis in Fu brick tea of high- and medium-dose groups were lighter than that in the model group. Compared with the control group, the activity of GSH-PX and SOD in the liver of model group decreased, while the content of MDA, the activity of ALT and AST, NAS score, the gene expression of *SCD-1*、*PPAR-γ* and *HMGCR* increased (P<0.05). Compared with the model group, the content of MDA, the activity of ALT and AST, NAS score, the gene expression of *SCD-1*, *PPAR-γ* and *HMGCR* were decreased in different Fu brick tea dose groups, while the GSH-PX and SOD activity increased. Fu brick tea can reverse the early NAFLD by inhibiting hepatic lipid synthesis and reducing hepatic oxidative stress damage.

Keywords: Fu brick tea, non-alcoholic fatty liver, apolipoprotein E knockout mice, lipid synthesis, oxidative stress injury

非酒精性脂肪肝(NAFLD)已发展为我国第一大肝病,呈低龄化和快速增长趋势[1]。该病的发病机制尚不明确,“二次打击学说”被认为是NAFLD形成的经典假说,胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱导致脂类物质在肝细胞内的聚集造成第一次打击;各种原因造成的氧化应激以及脂质过氧化损伤被认为是“二次打击”因素;该病持续发展有演化为肝纤维化,甚至有肝癌变、肝衰竭的风险[2-3]。

NAFLD尚无获批的特异性药物治疗,2018年非酒精性脂肪性肝病防治指南建议改善不良的生活方式,适当应用具有降脂和抗氧化的药物进行辅助治疗,并认为适度饮茶有助于NAFLD患者的康复[4]。茯砖茶善解油腻、助消化,被誉为“生命之饮”,其所富含的茶多糖及发花过程中产生的冠突散囊菌具有清除自由基的能力[5]。江南大学生物工程学院研究团队证实茯砖茶中存在类他汀的成分[6]。课题组既往实验证实茯砖茶具有降低高脂喂养载脂蛋白E敲除(APOE$^{-/-}$)小鼠肝质量、肝指数、体质量、脾质量、腹部脂肪质量作用;降低APOE$^{-/-}$小鼠血清中低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、三酰甘油(TG)含量和抑制炎症因子表达的效果[7-8]。茯砖茶能否逆转脂类物质在肝脏的沉积,这在以往的研究中鲜有报道。本实验中检测肝脏HMG-CoA还原酶mRNA(*HMGCR*)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ mRNA(*PPAR-γ*)、硬脂酰辅酶A去饱和酶1 mRNA(*SCD-1*)3个指标来反映小鼠肝脂合成代谢;以肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、丙二醛(MDA)来反映氧化应激损伤;肝组织丙氨转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)来反映肝细胞损伤,从而深入探讨茯砖茶对NAFLD的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 2月龄SPF级雄性APOE$^{-/-}$小鼠55只,南京大学生物模式中心提供,品系名APOE Cas9-KO,遗传背景C57BL/6,配繁信息为-82bp/wt配B6J,动物许可证号SCXK(苏)2015-0001;2月龄雄性C57BL/6J小鼠10只,动物许可证号SYXK(湘)2016-0002,该实验通过动物伦理审查。

1.1.2 药物及试剂 2014年茯砖茶:湖南安化白沙溪茶厂提供;阿托伐他汀:辉瑞制药公司产品;Trizol Reagent:美国invitrogen公司产品(货号:15596026);Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit:美国Thermo Scientific公司产品(货号:00692424);TB Green™ Premix Ex Taq™:日本TaKaRa公司产品(货号:A152172A);BCA蛋白质浓度测定试剂盒:武汉博士德公司产品;MDA、GSH-PX、SOD、ALT、AST试剂盒:南京建成公司产品。

1.1.3 饲料 高脂饲料:北京华阜康公司产品(型号:H10141);普通维持饲料:湖南斯莱克景达实验动物公司产品。

1.1.4 主要仪器 高速冷冻离心机:德国Hermle公司产品;光学显微镜:日本奥林巴斯公司产品;分光光度计:日本岛津公司产品;多功能酶标仪:美国Perkinelmer公司产品;核酸蛋白质浓度测定仪:英

国 Bio-drop 公司产品;PCR 扩增仪:美国 Bio-rad 公司产品;荧光定量 PCR 仪:德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 药物制备 为保证药液的新鲜,每次熬制约一周的量,具体方法如下:准确称量茯砖茶20 g并充分粉碎,用无菌纱布包裹系紧放入无菌烧杯中,茶叶与无菌 III 级水按照 1 g:15 mL 比例进行配备,加水量应没过茶包 2~3 cm,充分浸泡 0.5 h,武火煮开后文火煎煮 30 min,煎煮药液冷却后过滤,取汁另置;药包加 III 级水(与药包齐平)继续煎煮,煮沸后冷却,合并两次熬制的药液并浓缩至 185 mL(高浓度),取适当体积高浓度药液若干,依次稀释为中浓度和低浓度剂量,3 000 g 离心 15 min 后,去渣取上清液放入消毒广口瓶中,于 4 ℃冰箱保存备用。参考茶吸收实验所推荐 60 kg 成人每日摄入量为 10 g 茶,即 166.7 mg/(kg·d),换算小鼠每日需用量为 1.44 g/(kg·d)[9],根据预实验结果设定茯砖茶高、中、低剂量(2.16、1.44、0.72 g/(kg·d))。阿托伐他汀按照 10 mg/(kg·d)剂量予以灌胃,现用现配。

1.2.2 小鼠饲养 小鼠喂养于 SPF 级实验室,IVC 独立送风隔离笼具喂养,每笼 5 只,室内温度(20±5) ℃,室内相对湿度 40%~70%,明暗交替。APOE$^{-/-}$小鼠和 C57 小鼠分别予以等量高脂饲料和普通饲料喂养。小鼠饮用水分别为实验用 III 级水,自由饮水。每 2 d 更换一次垫料,定期对笼具和饮水瓶消毒。

1.2.3 动物分组、造模与给药 动物适应性饲养一周后,将 55 只 2 月龄雄性APOE$^{-/-}$小鼠连续高脂饲料喂养 3 个月,另选用 10 只 2 月龄 C57 小鼠作为正常对照组予以普通饲料连续喂养 3 个月[10],3 个月后随机抽取 5 只雄性 APOE$^{-/-}$小鼠进行解剖,观察各组小鼠肝脏肉眼特征,取肝脏同一部位用多聚甲醛固定后进行 HE 染色。确定造模成功后随机分为茯砖茶高、中、低剂量组,模型组,阿托伐他汀组,每组10 只,以上各组小鼠按照 10 mL/(kg·d)连续灌胃干预 8 周,其中模型组和空白对照组予以 10 mL/(kg·d)生理盐水灌胃干预。

1.2.4 标本收集与处理 各组小鼠连续灌胃 8 周后禁食不禁水 12 h,腹腔麻醉,摘眼球取血后离心获取血清备检,颈椎脱臼法处死动物,迅速打开小鼠腹腔放置冰上操作,用眼科剪摘除小鼠肝脏并进行称质量记录,预冷生理盐水漂洗后剪取相同部位小鼠肝叶,并用 4%(质量分数)多聚甲醛固定后放入 4 ℃冰箱以备 HE 染色。剪取约 100 mg 肝脏组织放入盛有 1 mL 预冷 Trizol 的无酶冻存管中,快速投入液氮中急速冷冻以备 PCR 检测;剪取部分肝脏组织放入无酶冻存管并投入液氮中以备氧化应激及肝功能检测;取材完毕,将液氮中的肝脏组织转移至-80 ℃冰箱,尽快进行后续实验的检测。

1.2.5 氧化应激指标测定 将肝脏组织从低温冰箱取出,冰生理盐水漂洗后用消毒眼科剪将肝组织剪碎并按 m(肝组织):V(生理盐水)=1 g:9 mL 的比例关系加入生理盐水(全程冰上操作),自动匀浆机匀浆(每 3 s 间歇 1 次,防止产热过多)制成质量分数 10%肝匀浆液,1 000 g(4 ℃)离心 15 min,取上清液加适量生理盐水稀释到合适的浓度范围备测肝组织中 SOD、GSH-PX 活力和 MDA 质量摩尔浓度,测定数值带入公式计算并进行数据分析。

1.2.6 肝功能检测 用 BCA 试剂盒测定 10%(体积分数)肝匀浆中各组样本的浓度,根据说明书步骤进行操作,计算出各组标本 ALT 和 AST 的活力。

1.2.7 病理形态学检测 4%(质量分数)多聚甲醛固定肝组织 48 h 后取材,自动脱水机常规脱水后进行包埋,组织蜡块充分冷却后放入切片机中制备 4 μm 厚度切片,摊片机上晾干后放入烤箱中 70 ℃烤片 1 h,常规 HE 染色、封片后观察组织形态。依据指南对 NAFLD 活动度积分(NAS)进行半定量分析[11]。

1.2.8 RT-qPCR 检测

1) 引物设计 从 NCBI 网站获取小鼠相应 mRNA 序列,引物序列信息见表 1。

2) 组织总 RNA 的提取 采用 Trizol 法提取小鼠肝组织中的总 RNA。研钵、研杵 DEPC 稀释液浸泡过夜,锡箔纸包裹后高压蒸汽灭菌(121 ℃、2 h)后放入烤箱中充分烤干备用。保温杯盛放液氮备用,低温冰箱取出的肝脏组织迅速投入液氮预冷的研钵中,不断倒入液氮促使肝脏组织在低温环境下充分冷冻,研杵快速研磨组织直至成粉末状,倾斜研钵以便于收集粉末,手持 200 μL 吸头尖端,同时用吸头宽端迅速收集研钵中的组织粉末,转移至盛有 1 mL Trizol 的 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管中,室温放置 10 min,按照说明书步骤进行后续操作来获取总 RNA。用移液器吸取 2 μL RNA 提取液滴入核酸蛋白质浓度测定仪中检测并记录吸光度比值($A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$),判断 RNA 提取的质量。吸光度比值

表 1　PCR 引物序列信息

Table 1　PCR primer sequence

小鼠基因		引物序列(5′-3′)	产物长度/bp
β-actin	正向引物	CGTTGACATCCGTAAAGAC	201
	反向引物	TGGAAGGTGGACAGTGAG	
HMGCR	正向引物	TGGCAGGACGCAACCTCTAT	222
	反向引物	TGACGGCTTCACAAACCACA	
PPAR-γ	正向引物	GGAGCCTAAGTTTGCTGTG	147
	反向引物	TGCAGCAGGTTGTCTTGGATG	
SCD-1	正向引物	ACACGCCGACCCTCACAACTC	199
	反向引物	CAGTGTGGGCAGGATGAAGCA	

在 1.8~2.0 之间的组织进行下一步操作。

3)RNA 逆转录为 cDNA　配置 20 μL 反应体系,按照说明书步骤进行操作。RNA 变性:加入 4 μg 总 RNA(模板 RNA),1 μL 引物 Oligo(dT)18,加入 RNase-free water 配置成每管 12 μL 体系, 打开已预热的 PCR 仪器,65 ℃条件下变性 5 min,完毕后迅速取出标本放置于低温冰盒中。RNA 逆转录为 cDNA 第 1 链: 将已变性的 RNA 中加入 8 μL 混合液 (5 ×Reaction Buffer 4 μL、RiboLock RNase Inhibitor 1 μL、10 mmol/L dNTP Mix 2 μL、RvvertAid M-MuLV 逆转录酶 1 μL),用掌式离心机瞬时涡旋混匀后放冰盒中备用,放入PCR 反应仪中进行条件设置 (42 ℃反应 60 min,70 ℃反应 5 min,4 ℃维持),完成 RNA 逆转录为 cDNA 第 1 链。

4)RT-qPCR 扩增　95 ℃预变性 2 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 1 min;循环 40 次。

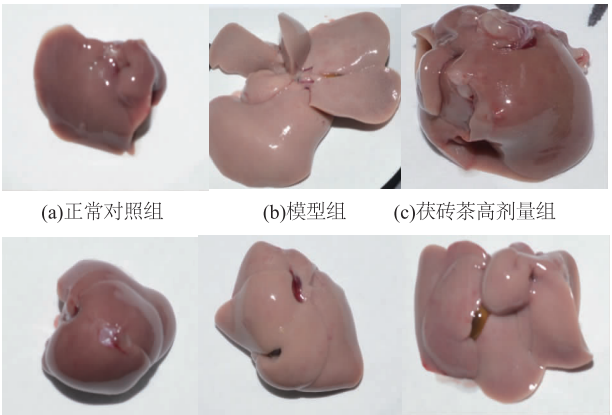
5)结果分析方法　以 *β-actin* 作为内参,各指标基因表达以 $2^{-\Delta\Delta\alpha}$ 值进行相对定量并统计分析。

1.2.9　统计学处理　运用 SPSS 18.0 软件对数据进行分析,结果以均数±标准差($\overline{X}$±SD)来表示。采用单因素方差分析对多组间均数进行比较,LSD 用于分析组间比满足方差齐次性的实验数据,P<0.05 说明差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1　肝脏肉眼观测

空白对照组小鼠肝脏大小适中、颜色暗红、边缘锐利(见图 1)。模型组小鼠肝脏体积变大、色黄油腻、边缘变钝。高剂量组小鼠肝脏体积变大、颜色暗红、色稍黄。中剂量组小鼠肝脏色暗红、大小适中。低剂量组小鼠肝脏色黄油腻、体积变大,边缘钝。阿托伐他汀组小鼠肝脏色黄油腻、体积变大、边缘变钝。



(a)正常对照组　(b)模型组　(c)茯砖茶高剂量组

(d)茯砖茶中剂量组　(e)茯砖茶低剂量组　(f)阿托伐他汀组

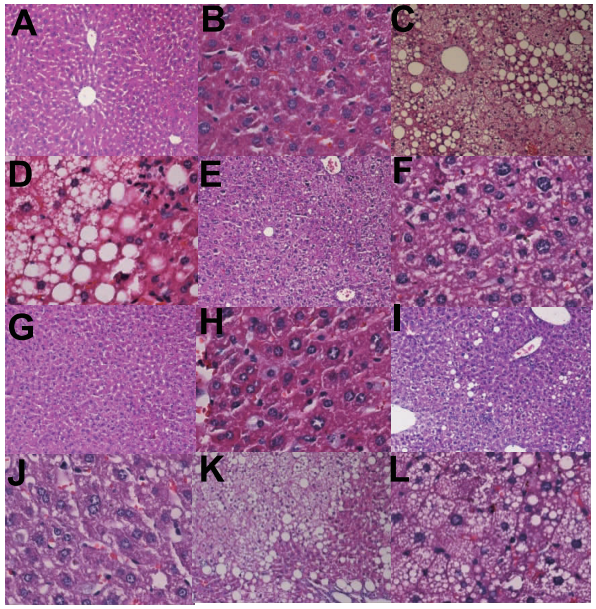
图 1　不同组别小鼠肝脏肉眼观测结果

Fig. 1　Macroscopic changes of liver in different micegroups

2.2　肝脏显微镜观测

正常对照组低倍镜下肝小叶结构清晰,中央静脉居中,肝索呈现放射状,肝血窦清晰;高倍镜下肝细胞大小正常,核居中,胞质均质红染。模型组低倍镜下肝小叶轮廓模糊,肝索未呈现典型的放射状排列,肝血窦纹理不清;高倍镜下大量大小不等的空泡形成,细胞核偏位,胞浆淡染疏松化。茯砖茶高剂量组低倍镜下肝小叶结构完整, 中央静脉居中,肝索呈放射状,肝血窦基本清晰;高倍镜下肝细胞大小基本一致,细胞核居中,大部分细胞胞浆红染,部分细胞胞浆淡染,部分细胞有少量的空泡形成。茯砖茶中剂量组低倍镜下肝小叶结构完整,中央静脉居中,肝索呈现放射状,肝血窦清晰;高倍镜下肝细胞大小基本一致,细胞核居中,胞浆红染均质,有少量小空泡形成。茯砖茶低剂量组低倍镜下肝小叶轮廓欠清晰,中央静脉居中,肝血窦纹理不清晰;高倍镜下细胞核居中,胞浆淡染疏松化,有大量小空泡形成。阿托伐他汀组低倍镜肝小叶轮廓欠清晰,中

央静脉居中，肝血窦纹理不清晰；高倍镜显示细胞核偏位，胞浆淡染疏松化，有大小不等的空泡形成（见图 2）。模型组 NAS 积分最高，各用药组 NAS 积分下降，其中茯砖茶高、中剂量组 NAS 积分最低，结果见表 2。



A 与 B：空白对照组；C 与 D：模型组；E 与 F：茯砖茶高剂量组；G 与 H：茯砖茶中剂量组；I 与 J：茯砖茶低剂量组；K 与 L：阿托伐他汀组（A，C，E，G，I，K：低倍镜（100 倍）观察；B，D，F，H，J，L：高倍镜（400 倍）观察）

图 2　不同组别小鼠肝组织镜下观图片

Fig. 2　Liver tissues of mice in different groups observed under microscope

表 2　NAS 积分在各组间的比较

Table 2　NAS integral comparisons between groups

组别	NAS 积分
空白对照组	0^{bcd}
模型组	6.7 ± 0.48^{acd}
阿托伐他汀组	4.4 ± 0.51^{abd}
茯砖茶高剂量组	3.3 ± 0.49^{abc}
茯砖茶中剂量组	3.2 ± 0.42^{abc}
茯砖茶低剂量组	4.3 ± 0.48^{abd}

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b，与模型组比较，$P<0.05$；c，与阿托伐他汀组比较，$P<0.05$；d，与茯砖茶中剂量组比较，$P<0.05$；下同。

2.3　茯砖茶对小鼠肝脏氧化应激水平的影响

与空白对照组相比，模型组小鼠肝组织 MDA 质量摩尔浓度较高、GSH-PX 与 SOD 活力较低（$P<0.05$）；与模型组相比，各用药组小鼠肝组织 GSH-PX 和 SOD 活力较高，MDA 质量摩尔浓度较低，其中茯砖茶高剂量组 SOD 活力最高，阿托伐他汀组 GSH-PX 活力最高，茯砖茶中剂量组 MDA 质量摩尔浓度最低（$P<0.05$），结果见表 3。

表 3　肝脏氧化应激指标的比较（$\bar{X}\pm SD$，$n=10$）

Table 3　Comparison of hepatic oxidative stress indexes（$\bar{X}\pm SD$，$n=10$）

组别		SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)	GSH-PX/(U/mg)
空白对照组		169.5 ± 18.2^{bcd}	6.64 ± 0.21^{bcd}	817.4 ± 16.7^{bcd}
模型组		100.3 ± 12.5^{acd}	9.95 ± 0.49^{acd}	622.7 ± 51.5^{acd}
阿托伐他汀组		122.9 ± 11.3^{ab}	8.26 ± 0.47^{abd}	751.7 ± 27.1^{ab}
茯砖茶	高剂量组	151.7 ± 16.1^{abc}	8.21 ± 0.46^{ab}	746.8 ± 15.7^{ab}
	中剂量组	139.4 ± 11.2^{abc}	7.88 ± 0.43^{abc}	738.6 ± 21.2^{ab}
	低剂量组	141.3 ± 13.5^{abc}	8.31 ± 0.22^{abd}	724.1 ± 13.6^{abc}

2.4　茯砖茶对小鼠肝功能的影响

与空白对照组相比，模型组肝组织 ALT、AST 活力较高（$P<0.05$）；与模型组相比，各用药组肝组织 ALT、AST 活力较低，其中茯砖茶中剂量组 ALT、高剂量组 AST 活力最低（$P<0.05$），结果见表 4。

表 4　肝脏匀浆转氨酶活力的比较（$\bar{X}\pm SD$，$n=10$）

Table 4　Comparison of transaminase activity in liver homogenate（$\bar{X}\pm SD$，$n=10$）

组别	ALT 活力/(U/g)	AST 活力/(U/g)
空白对照组	7.92 ± 1.03^{bcd}	17.30 ± 1.56^{bcd}
模型组	30.80 ± 1.41^{acd}	36.90 ± 4.15^{acd}
阿托伐他汀组	27.20 ± 2.57^{abd}	27.00 ± 2.82^{abd}
茯砖茶高剂量组	22.60 ± 2.98^{abc}	20.40 ± 3.06^{abc}
茯砖茶中剂量组	20.95 ± 1.33^{abc}	21.80 ± 2.42^{abc}
茯砖茶低剂量组	25.20 ± 2.6^{abd}	25.60 ± 3.06^{abd}

2.5　对脂类物质合成相关指标的影响

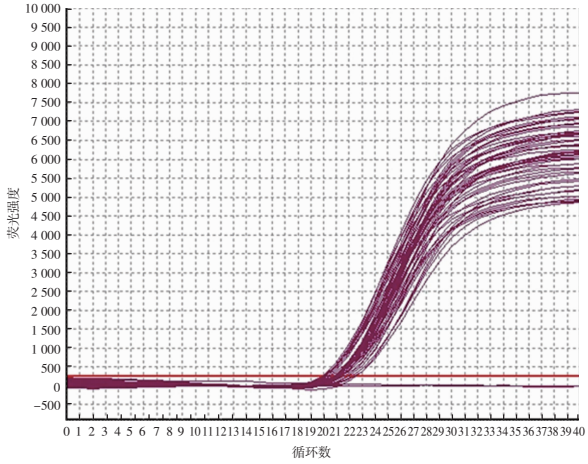
2.5.1　*HMGCR* 基因表达　与空白对照组相比，模型组肝组织 *HMGCR* 基因表达升高（$P<0.05$）；与模型组相比，各用药组肝组织 *HMGCR* 基因表达降低（$P<0.05$），其中阿托伐他汀组和茯砖茶不同剂量组之间 *HMGCR* 基因表达无差别（$P>0.05$），结果见表 5 和图 3。

2.5.2　*PPARγ* 基因表达　与空白对照组相比，模型组肝组织 *PPARγ* 基因表达较高（$P<0.05$）；与模型组相比，各用药组肝组织 *PPARγ* 基因表达降低（$P<0.05$），其中茯砖茶不同剂量组 *PPARγ* 基因表达低于阿托伐他汀组（$P<0.05$），结果见表 6 和图 4。

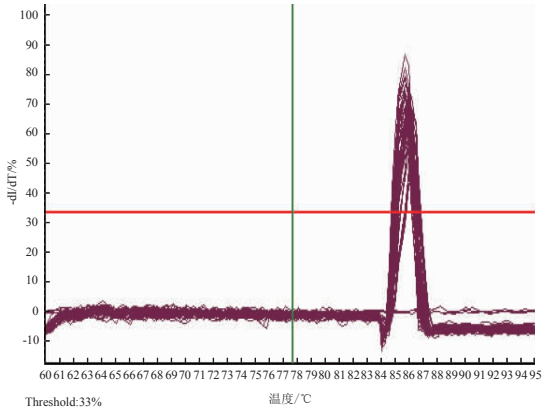
表 5　肝脏 *HMGCR* 数据($\bar{X}$±SD,n=10)

Table 5　Liver *HMGCR* data($\bar{X}$±SD,n=10)

组别	数量/只	*HMGCR* 基因相对表达量
空白对照组	10	1.07±0.08^{bd}
模型组	10	3.16±0.67^{acd}
阿托伐他汀组	10	1.45±0.26^{b}
茯砖茶高剂量组	10	1.32±0.13^{b}
茯砖茶中剂量组	10	1.64±0.12^{ab}
茯砖茶低剂量组	10	1.45±0.11^{b}



(a)



(b)

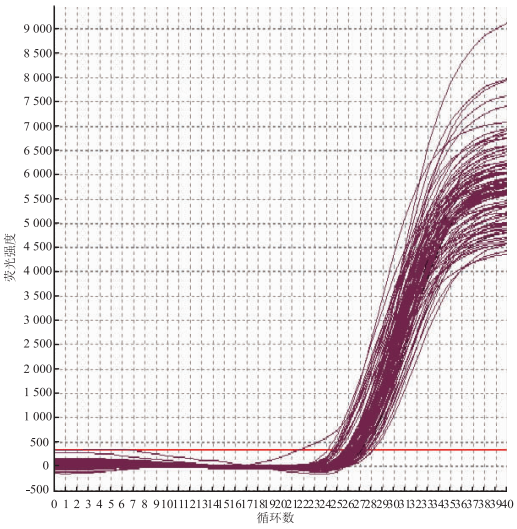
图 3　肝脏 *HMGCR* 基因表达扩增曲线和溶解曲线

Fig. 3　Expression and dissolution curves of *HMGCR* gene in liver

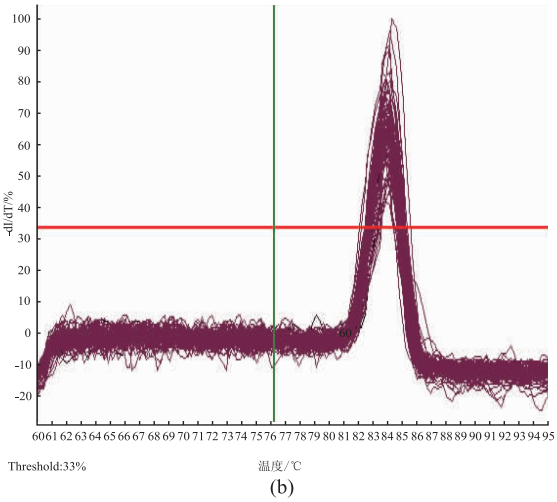
表 6　肝脏 *PPAR-γ* 数据($\bar{X}$±SD,n=10)

Table 6　Liver *PPAR-γ* data($\bar{X}$±SD,n=10)

组别	数量/只	*PPAR-γ* 基因相对表达量
空白对照组	10	1.03±0.15^{bc}
模型组	10	4.10±0.88^{acd}
阿托伐他汀组	10	2.74±0.22^{abd}
茯砖茶高剂量组	10	1.47±0.30^{bc}
茯砖茶中剂量组	10	1.45±0.24^{bc}
茯砖茶低剂量组	10	1.60±0.19^{abc}



(a)



(b)

图 4　肝脏 *PPAR-γ* 基因表达扩增曲线和溶解曲线

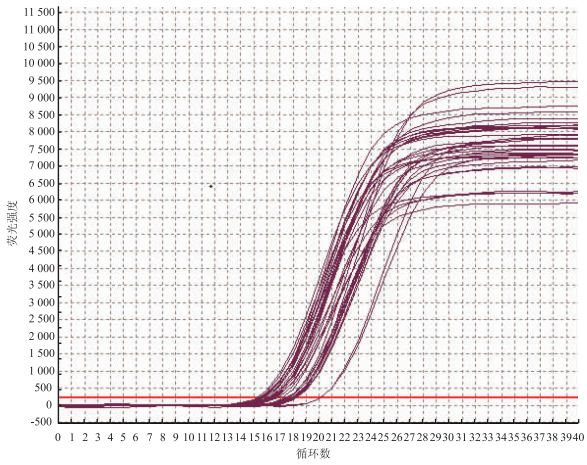
Fig. 4　Amplification curve and dissolution curve of *PPAR-γ* gene expression in liver

2.5.3　*SCD-1* 基因表达　与模型组相比,各用药组小鼠肝脏 *SCD-1* 基因表达较低(P<0.05),阿托伐他汀组和各用药组之间的 *SCD-1* 基因表达无差别(P>0.05),茯砖茶高、中剂量组 *SCD-1* 基因表达低于茯砖茶低剂量组(P<0.05),结果见表 7 和图 5。

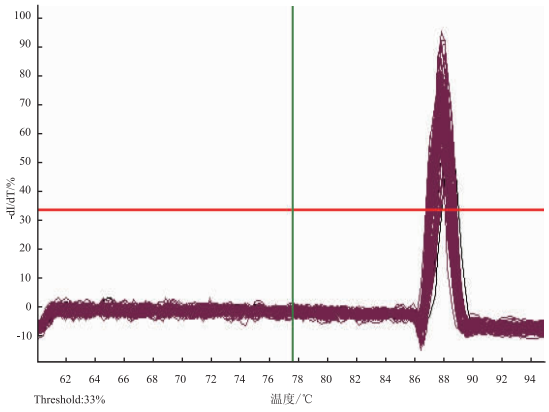
表 7　肝脏 *SCD-1* 数据($\bar{X}$±SD,n=10)

Table 7　Liver *SCD-1* data($\bar{X}$±SD,n=10)

组别	数量/只	*SCD-1* 基因相对表达量
空白对照组	10	1.04±0.04^{bcd}
模型组	10	9.36±1.55^{acd}
阿托伐他汀组	10	2.15±0.27^{ab}
茯砖茶高剂量组	10	1.43±0.28^{b}
茯砖茶中剂量组	10	1.97±0.43^{ab}
茯砖茶低剂量组	10	3.02±0.67^{abd}



(a)



(b)

图 5　肝脏 *SCD-1* 基因表达扩增曲线和溶解曲线

Fig. 5　Expression amplification curve and dissolution curve of liver *SCD-1* gene

2.6　讨论

理想的动物模型是研究疾病至关重要的因素,APOE$^{-/-}$小鼠血浆中乳糜微粒、LDL、VLDL 等物质清除受损,导致肝脏有大量的脂类物质的沉积,APOE$^{-/-}$小鼠可以较好地模拟人类 NAFLD 发生发展过程,是研究 NAFLD 较好的模型之一[12-13]。病理形态学显示模型组小鼠肝脏有大量脂类物质的沉积,茯砖茶高、中剂量组灌胃治疗给药起到很好的逆转脂类物质在肝脏的沉积的效果,但是茯砖茶低剂量组抑制脂类物质在肝脏沉积效果较差,说明茯砖茶必须达到一定剂量才可以有效地发挥抑制脂类物质沉积的效果。阿托伐他汀治疗性给药抑制脂类物质形成的效果差于茯砖茶高、中剂量组,说明茯砖茶是通过多种途径发挥抑制脂类物质沉积的效果。本次实验中选择了 *SCD-1*、*PPAR-γ*、*HMGCR* 3 个指标来观察茯砖茶用药对肝脂合成代谢的影响。

SCD-1 是脂质代谢的核心,催化酰基辅酶 A 底物从头合成不饱和脂肪酸的限速步骤[14]。*SCD-1* 在肝脏和脂肪组织中表达丰富,在脂肪生成中发挥重要作用。有研究显示,*SCD-1* 可以调控甘油三酯和胆固醇等脂类物质的合成与吸收,其异常表达将会导致脂类物质代谢紊乱,从而导致肝脂变的形成[15]。从实验结果可见,模型组小鼠由于脂类物质合成过多,导致大量 *SCD-1* 的基因表达,结合病理形态学可见 *SCD-1* 的表达和肝脏脂肪变性呈正相关。而茯砖茶不同剂量组和阿托伐他汀组小鼠用药之后可以起到很好抑制 *SCD-1* 表达的效果,从而有效地抑制脂类物质的合成与吸收,改善了脂类物质代谢紊乱。

PPAR-γ 在糖脂代谢形成过程中发挥着至关重要的作用[16]。NAFLD 小鼠肝脏中 *PPAR-γ* 基因和蛋白质表达升高,从而促进了 NAFLD 的发生,并认为血液中 FFA 的升高激活了 *PPAR-γ* 信号通路 [17-19]。模型组小鼠肝脏 *PPAR-γ* 基因表达升高,促进了脂肪组织在肝脏的合成,而茯砖茶不同剂量组和阿托伐他汀组小鼠治疗给药可以起到很好地抑制 *PPAR-γ* 表达的效果,从而抑制脂肪组织在肝脏的沉积。

HMGCR 活性对控制从头合成胆固醇有重要作用,表达上调则体内胆固醇合成增加,临床多应用他汀类药物抑制 *HMGCR* 表达来降低胆固醇,故调控 *HMGCR* 表达是维持体内胆固醇稳态的关键步骤[20]。模型组小鼠肝脏 *HMGCR* 基因表达升高,反映 APOE$^{-/-}$小鼠长期高脂饮食促进了胆固醇合成。阿托伐他汀组小鼠肝脏 *HMGCR* 基因表达下降,茯砖茶不同剂量组也可以抑制 *HMGCR* 的基因表达,从而达到抑制胆固醇合成效果。

氧化应激在 NAFLD 发生发展过程中起着至关重要的作用[21],当动物摄取外源性脂类物质过多时,便会导致肝细胞中多余的游离脂肪酸脂质过氧化,产生大量活性氧(ROS),当生成量超过机体的清除能力便会导致氧化应激损伤。大量 ROS 的生成导致线粒体功能受损,脂代谢障碍,肝脂变的形成[22-23]。氧化应激的持续激活有诱发肝纤维化、肝硬化的风险,针对氧化应激及炎症的治疗是延缓 NAFLD 进一步发展的有效措施[24-25]。本实验中结果显示模型组由于过剩的游离脂肪酸脂质过氧化,产生大量脂质过氧化产物 MDA,同时消耗了 SOD、GSH-PX 等

抗氧化酶。而茯砖茶用药组和阿托伐他汀组小鼠由于用药治疗后抑制了氧化应激，抑制了 ROS 的产生，改善了脂代谢障碍，减轻了肝脏脂肪变性，由此可见茯砖茶具有很好的抗氧化能力。

正常人体中 AST 和 ALT 含量极低，当各种原因破坏肝细胞之后，便会导致肝细胞膜破裂，胞浆中的酶类物质入血。因此，AST 和 ALT 含量是反映肝细胞损伤比较敏感的指标[26]。本次实验中模型组小鼠肝脏受损程度重于用药组，说明茯砖茶和阿托伐他汀治疗性给药可以起到保护肝细胞的效果。

3 结 语

由实验结果可知，茯砖茶逆转 NAFLD 形成是多方面的，其可能机制为通过抑制 *PPAR-γ*、*HMGCR*、*SCD-1* 基因表达来抑制肝脏脂类物质的合成，从而减轻肝脏脂肪变性，减轻脂质过氧化所造成的肝脏氧化应激损伤，有效保护了肝细胞，防止 NAFLD 的进一步演化发展。NAFLD 至今尚无很好的药物治疗方法，茶作为一种天然抗氧化剂，同时作为我国古老的药用本草。茯砖茶良好的临床及动物实验效果为临床实践用药提供新的思路，具有非常重要的应用价值。实验结果证实了茯砖茶在抑制脂类物质合成和抗氧化方面具有很好的效果，近年来研究表明，肠道菌群和胆汁酸代谢异常与 NAFLD 的形成密切相关，茯砖茶作为后发酵茶，已证实具有很好的调节肠道菌群的作用[27]，但是否通过调节肠道菌群和胆汁酸的代谢还不得而知。后续实验将以“胆汁酸和肠道菌群-肠-肝轴”为主线展开茯砖茶治疗性给药对 NAFLD 的系统研究，以期为茯砖茶的临床应用提供科学依据。

参考文献：

[1] FAN J G,KIM S U,WONG V W. New trends on obesity and NAFLD in Asia[J]. **Journal of Hepatology**,2017,67(4):862-873.
[2] FUJII J,HOMMA T,KOBAYASHI S,et al. Mutual interaction between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of diseases specifically focusing on nonalcoholic fatty liver disease[J]. **World Journal of Biological Chemistry**,2018,9(1):1-15.
[3] JAVADI L,KHOSHBATEN M,SAFAIYAN A,et al. Proand prebiotic effects on oxidative stress and inflammatory markers in nonalcoholic fatty liver disease[J]. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**,2018,27(5):1031-1039.
[4] 中华医学会肝病学分会脂肪和酒精性肝病学组，中华医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. 实用肝脏病杂志,2018,21(2):177-186.
[5] CHEN G,WANG M,XIE M,et al. Evaluation of chemical property,cytotoxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from Fuzhuan brick teas[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,116:120-127.
[6] 谢春生,谢知音. 黑茶类降脂成分他汀化合物的新发现[J]. 食品安全导刊,2016(30):95-96.
[7] 张文将,易健,贾平,等. 安化黑茶对载脂蛋白 E 敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(4):77-82.
[8] 张文将,易健,刘圆月,等. 安化黑茶预防性给药对 APOE$^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国新药杂志,2019,28(19):116-123.
[9] 吴香兰,刘仲华,曹丹,等. 茯砖茶对小鼠肠道免疫功能调节作用的研究[J]. 茶叶科学,2013,33(2):125-130.
[10] ZHONG F,ZHOU X,XU J,et al. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease[J]. **Digestion**,2020,101(5):522-535.
[11] KLEINER D E,BRUNT E M,VAN-NATTA M,et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. **Hepatology**,2005,41(6):1313-1321.
[12] SCHIERWAGEN R L,MAYBUCHEN S,ZIMMER S,et al. Seven weeks of western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis[J]. **Scientific Reports**,2015,5:1-14.
[13] 张文将,易健,贾平,等. 载脂蛋白 E 基因敲除(APOE$^{-/-}$)小鼠基因的鉴定方法及模型应用[J]. 中国组织工程研究,2019,23(7):1103-1108.
[14] LOUNIS M A,BERGERON K F,BURHANS M S,et al. Oleate activates SREBP-1 signaling activity in SCD-1 deficient hepatocytes[J]. **Americal Journal of Physiology-Endocrinology and Metababolism**,2017,313(6):710-720.
[15] MARCHIORO L,HELLMUTH C,UHL O,et al. Associations of maternal and fetal SCD-1 markers with infant anthropometry and maternal diet:findings from the ROLO study[J]. **Clinical Nutrition**,2020,39(7):2129-2136.

[16] ZHANG L，VIRGOUS C，SI H. How does ginsenoside Rh2 mitigate adipogenesis in cultured cells and obese mice? [J]. **Molecules**，2020，25(10)：2412.

[17] HALL A M，SOUFI N，CHAMBERS K T，et al. Abrogating monoacylglycerol acyltransferase activity in liver improves glucose tolerance and hepatic insulin signaling in obese mice[J]. **Diabetes**，2014，63(7)：2284-2296.

[18] SATOH H，IDE N，KAGAWA Y，et al. Hepatic steatosis with relation to increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ in insulin resistant mice[J]. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**，2013，36(4)：616-623.

[19] LISS K H，FINCK B N. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease[J]. **Biochimie**，2017，136：65-74.

[20] FOX K M，TAI M H，KOSTEV K，et al. Treatment patterns and low-density lipoprotein cholesterol （LDL-C） goal attainment among patients receiving high or moderate-intensity statins[J]. **Clinical Research in Cardiology**，2018，107(5)：380-388.

[21] HAN J，WANG Y，YUAN Z，et al. Nonalcoholic fatty liver disease represents a greater metabolic burden in patients with atherosclerosis：a cross-sectional study[J]. **Medicine**，2019，98(11)：1-9.

[22] HEIDARI R，NIKNAHAD H，SADEGHI A，et al. Betaine treatment protects liver through regulating mitochondrial function and counteracting oxidative stress in acute and chronic animal models of hepatic injury[J]. **Biomed Pharmacother**，2018，103：75-86.

[23] SHINTO S，MATSUOKA Y，YAMATO M，et al. Antioxidant nitroxides protect hepatic cells from oxidative stress-induced cell death[J]. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**，2018，62(2)：132-138.

[24] MASARONE M，ROSATO V，DALLIO M，et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease [J]. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**，2018，2018：1-14.

[25] HO G M，HO S L，JENG Y M，et al. Accumulation of free cholesterol and oxidized low-density lipoprotein is associated with portal and oxidized low-density lipoprotein is associated with portal inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease [J]. **Journal of Inflammation**，2019，2(16)：1-8.

[26] LU Y，LI W，YANG X. Soluble soybean polysaccharides enhance the protective effects of genistein against hepatic injury in high L-carnitine-fed mice[J]. **Food & Function**，2017，8(12)：4364-4373.

[27] RUI Y，WAN P，CHEN G，et al. Analysis of bacterial and fungal communities by Illumina MiSeq platforms and characterization of *Aspergillus cristatus* in Fuzhuan brick tea[J]. **LWT–Food Science and Technology**，2019，110：168-174.

科　技　信　息

欧盟批准一种 6–植酸酶制剂作为蛋鸡和其他产蛋禽类的饲料添加剂

据欧盟官方公报消息，2020 年 11 月 30 日，欧盟委员会发布法规(EU)2020/1799 号条例，根据欧洲议会和理事会法规(EC) No. 1831/2003，批准一种 6–植酸酶制剂(6–phytase)作为蛋鸡和其他产蛋禽类的饲料添加剂。

据条例，该制剂是由一种转基因巴斯德毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)产生。根据附件中规定的条件，该添加剂所属类别为“动物技术添加剂”。功能组别为“消化增强剂”。授权结束日期为 2030 年 12 月 21 日。本条例自发布之日起第 20 天生效。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟批准一种 6–植酸酶制剂作为蛋鸡和其他产蛋禽类的饲料添加剂 [EB/OL]. (2020–12–3). http://news.foodmate.net/2020/12/578887.html