

# 藜麦麸皮皂苷的抗氧化活性及基于代谢组学探究其改善非酒精性脂肪肝的作用机制

余远<sup>1</sup>, 陶飞燕<sup>1</sup>, 纪雪莹<sup>1</sup>, 宋林梦<sup>1</sup>, 张若愚<sup>1</sup>, 冯静<sup>2</sup>, 薛鹏<sup>1\*</sup>

(1. 潍坊医学院公共卫生学院, 山东潍坊 261053) (2. 潍坊医学院康复学院, 山东潍坊 261200)

**摘要:** 探究藜麦麸皮总皂苷的体外抗氧化活性; 建立 SD 大鼠非酒精性脂肪肝 (Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) 模型, 经藜麦麸皮总皂苷干预后, 通过肝脏油红染色和检测肝脏胆固醇 (Total Cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglyceride, TG) 以及血清谷丙转氨酶 (Alanine Aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (Aspartate Aminotransferase, AST)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和还原性谷胱甘肽 (Glutathione, GSH), 探究对脂质堆积和氧化损伤的影响。采用超高效液相色谱-质谱 (Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, UPLC-MS) 对尿液代谢物进行代谢组学分析, 揭示皂苷预防 NAFLD 的机理。体外结果表明, 皂苷质量浓度为 0.1~10 mg/mL 时, DPPH 自由基清除能力和总还原力分别最高可达 86.25% 和 0.49; 动物实验表明, 藜麦麸皮总皂苷有效减少肝脏脂质堆积, 降低肝脏 TC、TG 和血清 ALT、AST 与 MDA ( $P<0.05$ ), 升高 GSH ( $P<0.05$ ); 尿液代谢物谱发生明显变化, 主要改善了甘氨酸和丝氨酸代谢和甜菜碱代谢等通路。综上, 藜麦麸皮总皂苷具有良好的体外抗氧化活性; 对高脂饮食诱导的 NAFLD 有显著的降脂护肝作用, 可能与通过调节内源性代谢物, 改善多条代谢途径有关。

**关键词:** 藜麦麸皮皂苷; 抗氧化; 非酒精性脂肪肝; 代谢组学; 超高效液相色谱-质谱

文章编号: 1673-9078(2023)12-70-77

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1615

## Antioxidant Activity of Quinoa Husks Saponins and Metabolomics-based Investigation of Their Mechanisms of Alleviating Non-alcoholic Fatty Liver Disease

YU Yuan<sup>1</sup>, TAO Feiyan<sup>1</sup>, JI Xueying<sup>1</sup>, SONG Limmeng<sup>1</sup>, ZHANG Ruoyu<sup>1</sup>, FENG Jing<sup>2</sup>, XUE Peng<sup>1\*</sup>

(1.School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

(2.School of Recure, Weifang Medical University, Weifang 261200, China)

**Abstract:** The *in vitro* antioxidant activity of total saponins from quinoa husks was explored. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) was induced in male SD rats by providing a high-fat diet, and the effects of different doses of crude saponins from husks on hepatic pathology, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) were investigated. The mechanisms of quinoa saponins in preventing NAFLD were revealed by metabolomics studies of urine and liver using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). The results showed that DPPH radical scavenging capacity and ferric ion reducing power of quinoa crude saponins was 86.25% and 0.49, respectively with administration of 0.1~10 mg/mL crude saponin. Animal experiments showed that liver lipids were significantly reduced by supplementation with quinoa crude

引文格式:

余远,陶飞燕,纪雪莹,等.藜麦麸皮皂苷的抗氧化活性及基于代谢组学探究其改善非酒精性脂肪肝的作用机制[J].现代食品科技,2023,39(12):70-77

YU Yuan, TAO Feiyan, JI Xueying, et al. Antioxidant activity of quinoa husks saponins and metabolomics-based investigation of their mechanisms of alleviating non-alcoholic fatty liver disease [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 70-77

收稿日期: 2022-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32102106); 泰山学者工程专项经费资助 (tsqn202211232); “山东省高等学校青创科技计划”创新团队 (2022KJ343)

作者简介: 余远 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生; E-mail: yuyuanfun05@163.com

通信作者: 薛鹏 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与安全; E-mail: jplxp26@126.com

saponins. TC, TG, ALT, AST, and MDA levels were significantly reduced ( $P<0.05$ ), and GSH increased ( $P<0.05$ ). The urine and liver metabolite profiles were altered by quinoa saponins, leading to changes in metabolic pathways, including those associated with glycine and serine metabolism as well as betaine metabolism. In summary, quinoa husk saponins demonstrated notable antioxidant activity *in vitro*, and significantly reduced hepatic lipid accumulation and antioxidative stress induced by a high-fat diet, suggesting a potential correlation with improvement in multiple metabolic pathways via endogenous metabolite regulation.

**Key words:** quinoa saponins; antioxidation; non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); metabolomics; ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-fMS)

长期高脂饮食会使机体能量摄入超过能量消耗,从而导致脂质代谢紊乱,引发高脂血症、肥胖及二型糖尿病等代谢综合征。非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是代谢综合征在肝脏的局部表现,以甘油三酯在肝脏蓄积和肝脂肪变性为特征性病理改变,包括单纯非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪肝炎<sup>[1]</sup>。目前还未有治疗 NAFLD 的特效药物,寻找植物源性化合物进行预防和治疗该疾病具有重大意义<sup>[2]</sup>。NAFLD 的发病机制复杂且尚不清楚,被广泛接受的“二次打击”学说认为,脂肪堆积及其引起的氧化应激水平升高是导致 NAFLD 的重要机制<sup>[1,3]</sup>。

藜麦原产于南美安第斯地区,是印加人的主要食物,被联合国粮农组织认为是“全营养食品”<sup>[4]</sup>。它不仅富含氨基酸、维生素和饱和脂肪酸,并且含有多糖、多酚和皂苷等生物活性物质,是一种很有前途的功能性和药用食品<sup>[5]</sup>。藜麦皂苷存在于藜麦的各个部位,如根、茎叶、种子等,在藜麦的加工副产物藜麦麸皮中含量最丰富,为 3%~8% 左右<sup>[6]</sup>。经化学结构鉴定,藜麦皂苷主要为五环三萜皂苷,齐墩果酸、美商陆酸是其主要皂苷元构型<sup>[7]</sup>。研究证明,皂苷能降低血脂,预防肝细胞脂肪变性,可作为天然降脂药物的候选物之一<sup>[8]</sup>。日常膳食添加藜麦能降低体重和改善脂质代谢紊乱,而含有藜麦皂苷的藜麦的作用更加明显<sup>[4]</sup>。藜麦总皂苷能减少 3T3-L1 前脂肪细胞中与脂质合成有关的基因和蛋白表达水平<sup>[9]</sup>。但是在长期高脂饮食刺激下,藜麦麸皮总皂苷体内抗氧化活性和对代谢组学的影响尚未被研究。

代谢组学是利用高分辨率和高灵敏度的测量分析仪器对待测物中的内源性小分子代谢物进行定性定量分析,可用于发现与疾病发生发展有关的代谢物质和代谢途径变化,从而有助于揭示机体发病机制及改善机制<sup>[10]</sup>。内源性代谢产物可以改变机体表型<sup>[11,12]</sup>。待测物质具有多样性,尿液、粪便、血清和组织匀浆皆可用于代谢组学分析。研究长期高脂饮食下藜麦麸皮总皂苷对尿液内源性代谢物的影响,利于探究降脂作用机制<sup>[13,14]</sup>。

本文旨在探究藜麦麸皮总皂苷体外抗氧化活性,以及通过尿液多组学研究藜麦总皂苷对 NAFLD 的影

响,阐述藜麦麸皮总皂苷预防肝脏脂质堆积的机理,为藜麦麸皮总皂苷用于 NAFLD 防治的研究提供实验和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

藜麦麸皮,内蒙古益稷生物科技有限公司;甲醇、乙醇(质谱级),Thermo Fisher Scientific;乙腈(质谱级),Thermo Fisher Scientific;纯净水,娃哈哈公司;瑞伐他汀钙片(批号:501109),阿里斯康药业;高脂饲料(成分含量以质量分数表示):10%猪油、4%胆固醇、10%蛋黄粉、0.4%胆酸钠和 75.5%普通标准动物饲料,购自济南朋悦实验动物公司;TC(96T,批号:A111-1-1)、TG(96T,批号:A110-1-1)、ALT(96T,批号:C009-2-1)、AST(96T,批号:C010-2-1)、MDA(96T,批号:A003-1-2)和 GSH(96T,批号:A006-2-1)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;抗坏血酸(Vc),购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 主要仪器

U3000 型 UPLC-Q-Exactive-MS (Thermo Fisher Scientific, 美国),配 Amide column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, Waters, 德国)分析柱;低温高速离心机,德国 Sigma;酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific Oy;倒置显微镜,日本 OLYMPUS。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 藜麦麸皮总皂苷的提取

参考赵雷等<sup>[15]</sup>的方法对藜麦麸皮皂苷进行提取。准确称量藜麦麸皮 100 g,用 φ=75%的乙醇进行超声提取( $V:V=8:1$ ),取上清液,旋蒸浓缩除去乙醇后,依次通过石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,正丁醇部位干燥后即得藜麦总皂苷。

#### 1.3.2 藜麦麸皮总皂苷体外抗氧化活性测定

##### 1.3.2.1 DPPH 自由基清除率的测定

参照傅钰等<sup>[16]</sup>的方法,分别配置 0.1、1、5、8 和

10 mg/mL 的藜麦麸皮总皂苷溶液和 Vc 溶液, Vc 作为阳性对照物, 测定藜麦麸皮总皂苷的 DPPH·清除率。

### 1.3.2.2 还原力的测定

分别配置 0.1、1、5、8 和 10 mg/mL 的藜麦麸皮总皂苷溶液和 Vc 溶液, Vc 作为阳性对照物。取样品溶液 0.5 mL, 分别加入 0.2 mmol/L PBS 0.5 mL 和 10 mg/mL 铁氰化钾溶液 0.5 mL, 涡旋混匀, 水浴 20 min, 后加入 100 mg/mL 三氯乙酸 0.5 mL, 离心 (3 000 r/min, 10 min)。取上清液 0.5 mL, 加入超纯水 2.5 mL 和 1 mg/mL 三氯化铁 0.5 mL, 涡旋混匀, 室温静置 10 min 后, 用酶标仪在波长 700 nm 处测定吸光度值。

### 1.3.3 实验动物分组与给药

雄性 SD 大鼠, 体质量 (220±10) g, 购自济南朋悦实验动物公司, 生产许可证号: SCXK (鲁) 20190003, 动物实验及操作经潍坊医学院伦理委员会批准 (2020SDL183)。通风笼中饲养, 自由饮水摄食, 明暗交替条件为 12 h/12 h。适应性喂养一周后, 分成体重无差异性的 2 组: 空白组 CON ( $n=6$ )、高脂饮食组 ( $n=36$ ), 2 周后, 剔除高脂饲料不耐受、体重不升的大鼠。CON 组予持续实验动物标准饲料饲养, 高脂饮食组予持续高脂饲料饲养。高脂饮食组大鼠随机分成 5 组 ( $n=6$ ), 模型组 (HFD)、HFD+藜麦麸皮皂苷低剂量 (25 mg/(kg·d), LQS)、HFD+藜麦麸皮皂苷中剂量 (100 mg/(kg·d), MQS)、HFD+藜麦麸皮皂苷高剂量 (400 mg/(kg·d), HQS) 和阳性药物瑞伐他汀钙片对照组 (10 mg/(kg·d), Statins)。分组后, CON、HFD 组予蒸馏水灌胃, 其他组予不同剂量藜麦麸皮总皂苷进行等体积灌胃, 10 mL/(kg·d), 实验周期 8 weeks。实验结束前一天, 将大鼠置于代谢笼中, 每两只一笼, 收集 24 h 尿液, -80 °C 冻存。

### 1.3.4 标本采集与处理

实验结束前, 大鼠禁食不禁饮 12 h。予乙醚麻醉后, 眼眶后静脉丛采血至无抗凝分离胶管中, 室温静置一小时后, 3 500 r/min 离心 (4 °C, 10 min), 取上清, 分装后冻存于 -40 °C 备用。迅速取出新鲜肝脏, 予 4 °C 生理盐水清洗后, 用吸水纸吸干水分, 取各组大鼠肝脏相同部位固定于质量分数为 4% 的多聚甲醛组织固定液中。肝脏固定后 24 h 后, 送至武汉赛维尔生物科技有限公司, 行石蜡包埋, 油红染色。

### 1.3.5 尿液代谢组学分析

#### 1.3.5.1 尿液前处理

因为尿液中多为水溶性物质, 因此使用亲水柱 Amid 进行分离。尿液原液放置常温复溶后, 取 200  $\mu$ L, 加入 600  $\mu$ L 冰甲醇 ( $V:V=1:3$ ), 旋 30 s 后冰箱静置

1 h, 12 500 r/min 离心 5 min, 取上清 200  $\mu$ L 常温中待干, 1 mL 质谱级甲醇复溶后稀释 50 倍, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 备用<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.5.2 UPLC-MS 条件

采用 UPLC-AMIDE-Q-Exactive MS 进行检测的条件。参考张若愚等<sup>[18]</sup>的方法, 流动相 A 为 100 mmol/L 醋酸铵水溶液, 流动相 B 为乙腈, 线性梯度洗脱 (0~10 min, 99% B; 10~15 min, 40% B; 15~20 min, 99% B; 20~30 min, 1% B), 进样量 4  $\mu$ L, 流速 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 紫外波长 220 nm。质谱方法: 鞘气流速 30 Arb; 辅助气流速 8 Arb; 喷雾电压 3.2 kV; 离子传输管温度 320 °C; 载气为氮气, Full MS-ddMS 模式下采用电喷雾离子源 (ESI) 正、负离子模式进行扫描, 质荷比采集范围 50~1 200  $m/z$ 。

#### 1.3.5.3 代谢组学数据和分析

利用 Xcalibur 软件获得含保留时间 (Rt)、峰面积和碎片分子量的图谱, 使用 Compound Discover 3.2.0 软件检索数据库鉴定代谢产物, 最终获得含有 Rt、精确分子量、分子式和相对含量的序列列表。采用 SIMCA-P14.1 对数据进行无监督主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法 (Orthogonal Partial Least-squares Discrimination Analysis, OPLS-DA) 等多维度统计分析, 进行差异化化合物的筛选。PCA 和 OPLS-DA 常被用来分析和比较代谢组学中获得的高通量、多维度的数据。PCA 是忽略每个样本的分组, 单纯对每个样本进行分析, 该模型能反应整体代谢物谱的分离趋势; OPLS-DA 是建立在有明确分组的基础之上对样本进行分析, 该模型能缩小组内差异, 将组间差异最大化, 利于获得使两组间差异化合物, 提供更多的生物学信息。差异代谢物通过 MetaboAnalyst 5.0 和 SMPDB 数据库进行代谢通路拓扑分析, 最终得出差异代谢产物富集出的代谢通路。通过阐述其生物学意义, 评价藜麦麸皮皂苷对机体代谢的影响。

#### 1.3.6 数据处理与分析

生化实验结果以均值±标准差表示 ( $\bar{X}\pm SD$ ), 采用 SPSS 25.0 软件对多组数据进行 One-way ANOVA 统计学分析, 方差齐性用 LSD 检验, 方差不齐用 Dunnett's 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 藜麦麸皮总皂苷的抗氧化活性

#### 2.1.1 DPPH 自由基的清除能力

由图 1a 可知, 藜麦麸皮总皂苷质量浓度在 0.1~

10 mg/mL 时, 均具有清除 DPPH· 的能力, 并呈现出量效关系, 随着质量浓度的增加, 清除能力变强。当皂苷质量浓度为 10 mg/mL 时, 对 DPPH· 的清除率为 86.25%, 对照品 Vc 的 DPPH· 清除率较高。

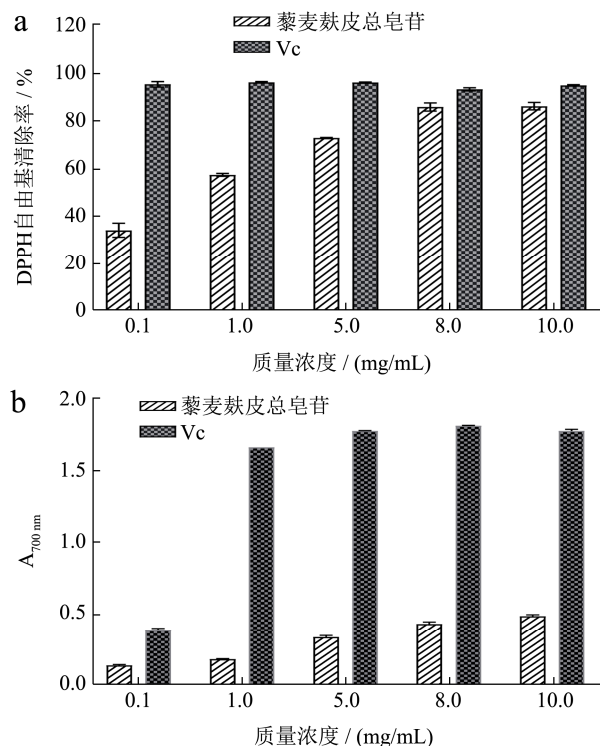


图 1 藜麦麸皮总皂苷的体外抗氧化活性

Fig.1 In vitro antioxidant activity of quinoa saponins in quinoa husks

注: a 为对 DPPH· 的清除能力, b 为总还原力。

### 2.1.2 总还原力

还原力可用于评价天然化学物质抗氧化能力。还原力的大小和 700 nm 处溶液的吸光度成正比。如图 1b 所示, 藜麦麸皮总皂苷具有还原力。当皂苷质量浓度为 10 mg/mL 时, 还原力为 0.49, 对照品 Vc 的还原力较高。

傅钰等<sup>[16]</sup>用三种不同颜色藜麦的混合皂苷进行 DPPH· 清除率和还原力测量实验, 结果表明三种藜麦皂苷均具有抗氧化活性, DPPH· 清除率和还原力分别最高可达 80% 和 0.35。韦兴英等<sup>[19]</sup>测得藜麦总皂苷的 DPPH· 清除率和还原力分别最高可达 76.5% 和 0.6。本研究发现, 藜麦麸皮总皂苷具有良好的体外抗氧化效果, 和之前研究结果一致。DPPH 是一种以氮为中心的自由基。除了活性氧自由基外, 活性氮自由基也能促进 NAFLD 的发生发展<sup>[20]</sup>。

## 2.2 藜麦麸皮总皂苷对肝脏组织病理形态的影响

肝脏组织脂质沉积是非酒精性脂肪肝特征性病理

变化。图 2 为肝脏组织切片油红染色结果, 和空白组相比, 模型组肝脏脂滴明显增多, 肝细胞索排列紊乱, 说明大鼠 NAFLD 模型成功建立; 藜麦麸皮总皂苷能不同程度的减少肝脏脂滴沉积, 肝细胞索排列较为整齐, 效果呈浓度依赖关系, 瑞伐他汀组几乎没有脂质沉积。切片结果和生化结果一致。因此, 藜麦麸皮总皂苷能降低肝脏脂质沉积, 且呈剂量依赖性。

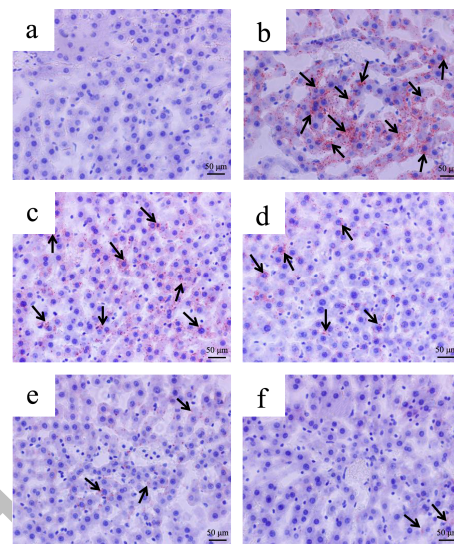


图 2 藜麦麸皮总皂苷对肝脏脂质的影响

Fig.2 Effect of quinoa saponins on the pathological morphology of rats' liver

注: 油红 O 染色, 400×, 箭头代表脂质染色区域。a: CON; b: HFD; c: LQS; d: MQS; e: HQS; f: Statins。

## 2.3 藜麦麸皮总皂苷对肝脏脂质、肝功能指标和氧化损伤的影响

和空白组对比, 模型组肝脏 TC、肝脏 TG、AST 和 ALT 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 说明高脂饮食已导致肝脏脂肪堆积和肝损伤 (表 1); 和模型组相比, 藜麦麸皮总皂苷组和瑞伐他汀组的肝脏脂质、ALT 和 AST 明显下降 ( $P < 0.05$ ), 不同剂量的藜麦麸皮总皂苷呈现出不同的降脂保肝效果, 剂量越高, 对肝脏脂质和肝功能指标的改善作用越明显, 高剂量组效果比他汀组更好, 该结果说明藜麦麸皮总皂苷能改善由高脂饮食引起的 NAFLD。和空白组比较, 模型组 MDA 显著增加 ( $P < 0.05$ ), GSH 显著降低 ( $P < 0.05$ ); 和模型组比较, 皂苷干预组的 MDA 降低 ( $P < 0.05$ ), 血清 GSH 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ), 表明藜麦麸皮总皂苷改善 NAFLD 可能与降低高脂饮食引起的氧化应激有关。

氧化应激水平升高是 NAFLD 的重要发病机制之一。机体存在天然的抗氧化系统。高脂饮食使机体

自由基增加,当超过机体清除率的时候,会造成抗氧化系统失调,使脂质过氧化物堆积,导致肝细胞膜和线粒体的损伤<sup>[3]</sup>。长链脂肪酸的氧化分解在肝细胞线粒体内进行,线粒体内膜上含有转运长链脂肪酸的肉毒碱棕榈酰转移酶,是脂肪酸分解氧化的限速酶,因此,损伤线粒体会加重脂质代谢紊乱<sup>[21]</sup>。MDA 是脂质过氧化的最终产物之一,常用来衡量机体氧化损伤程度。GSH 机体内最重要的非酶性抗氧化物,能够

清除自由基。藜麦麸皮总皂苷能降低 MDA,增加 GSH,说明皂苷能够提高抗氧化能力,减轻脂质堆积导致的氧化应激。正常情况下,ALT 和 AST 主要存在于肝细胞内,血清中浓度较低。肝细胞损伤时,血清中 ALT 和 AST 会异常升高。藜麦皂苷和瑞伐他汀干预后,ALT 和 AST 明显降低;和他汀组相比,高剂量藜麦皂苷组肝损伤指标下降更明显,说明具有更好的降脂护肝效果。

表 1 藜麦麸皮总皂苷对肝脏脂质和肝功能指标的影响 (n=6)

Table 1 Effects of quinoa saponin on liver lipids and liver function (n=6)

组别	肝脏 TC/( $\mu\text{mol/g}$ )	肝脏 TG/( $\mu\text{mol/g}$ )	血清 AST/(U/L)	血清 ALT/(U/L)	血清 MDA/(nmol/mL)	血清 GSH/(nmol/mL)
CON	8.70 $\pm$ 0.54	12.53 $\pm$ 1.86	9.38 $\pm$ 0.91	9.07 $\pm$ 6.06	3.59 $\pm$ 0.36	41.51 $\pm$ 7.31
HFD	11.45 $\pm$ 1.48**	20.38 $\pm$ 5.31**	72.73 $\pm$ 14.73**	15.96 $\pm$ 4.09*	4.96 $\pm$ 0.77**	22.22 $\pm$ 8.92**
LQS	10.08 $\pm$ 0.90###	13.72 $\pm$ 2.61#	36.55 $\pm$ 9.84###	13.87 $\pm$ 1.68	3.03 $\pm$ 0.50###	36.36 $\pm$ 4.10###
MQS	8.38 $\pm$ 0.70###	10.43 $\pm$ 2.80###	23.64 $\pm$ 7.75###	9.23 $\pm$ 3.38#	2.88 $\pm$ 0.13###	36.74 $\pm$ 2.58###
HQS	9.5 $\pm$ 1.02###	11.57 $\pm$ 2.90###	22.96 $\pm$ 9.01###	9.83 $\pm$ 4.01#	2.50 $\pm$ 0.57###	37.62 $\pm$ 2.23###
Statins	8.8 $\pm$ 0.96###	8.02 $\pm$ 2.44###	23.87 $\pm$ 7.32###	11.10 $\pm$ 3.21#	3.08 $\pm$ 0.79###	35.45 $\pm$ 8.40###

注:与空白组比较,\*表示  $P < 0.05$ ,\*\*表示差异极显著  $P < 0.01$ ;与模型组比较,#表示  $P < 0.05$ ,##表示  $P < 0.01$ 。

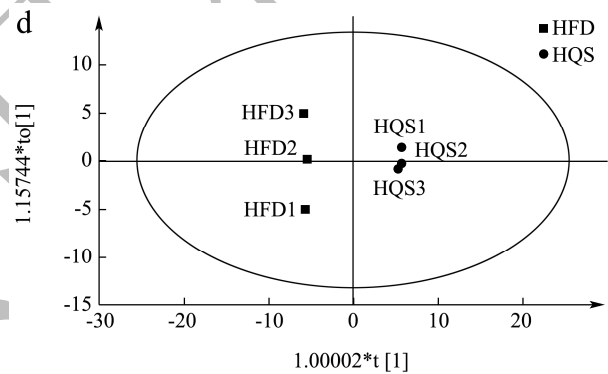
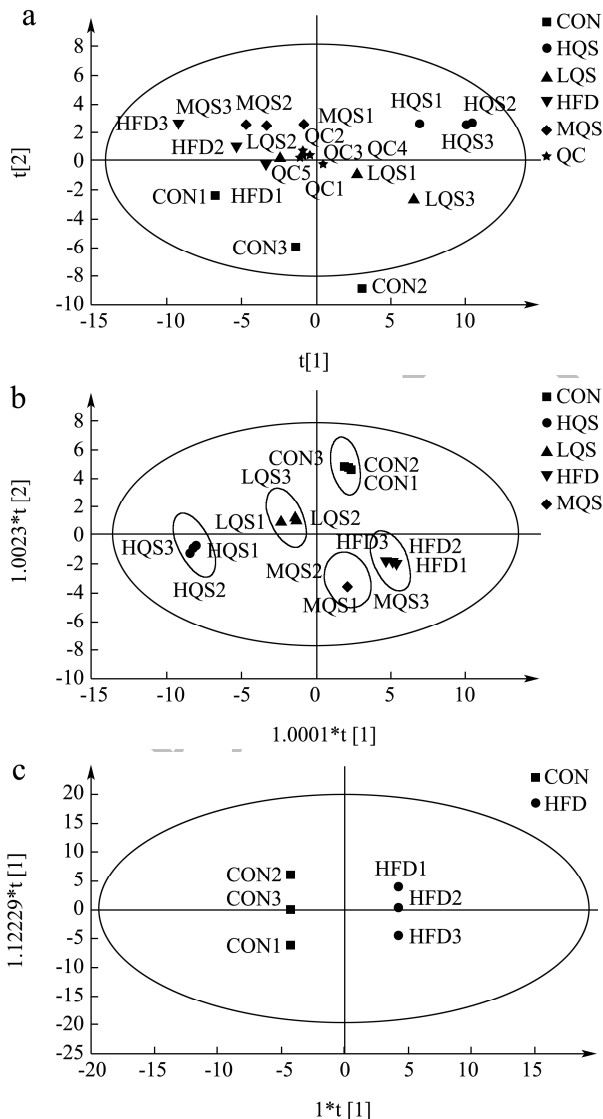


图 3 尿液代谢物轮廓分析图

Fig.3 Urine metabolites analysis

注: a: 尿液代谢物 PCA 图; b: 尿液代谢物 OPLS-DA 图(尿液代谢模型参数:  $R^2X=0.929$ ,  $R^2Y=0.982$ ,  $Q^2=0.776$ ); c: 正常组和模型组的 OPLS-DA 图; d: 模型组和高剂量皂苷组的 OPLS-DA 图。

## 2.4 尿液非靶向代谢组学分析

### 2.4.1 代谢轮廓分析

图 3a 是尿液代谢物 PCA 得分图,由图可知,中、高藜麦麸皮总皂苷干预组和模型组的无相交重叠部分,呈现出明显的聚类特征,说明藜麦麸皮总皂苷对整体代谢物谱产生了影响;6 个质量控制样本(Quality Control, QC)基本重合,说明检测仪器在整个检测分析过程中有高度的精确性和稳定性。图 3b 是尿液代谢物 OPLS-DA 得分图,每组样本分离更明显,模型的参数  $R^2X > 0.5$ 、 $R^2Y > 0.5$  和  $Q^2 > 0.5$ ,表明建立的模型具有较好的拟合优度和预测度。图 3c 和 3d 分别是

正常组和模型组以及模型组和高剂量藜麦皂苷组的 OPLS-DA 图, 组间明显分开, 说明 NAFLD 和藜麦麸皮总皂苷使尿液代谢物产生了明显改变。

#### 2.4.2 差异代谢物鉴定与分析

OPLS-DA 模型中每一个代谢物的权重值 (Variable Importance in the Project, VIP) 大小代表该化合物对模型区分的贡献值。以  $VIP \geq 1$ ,  $P < 0.05$  和  $|\log_2(\text{fold change})| \geq 0.32$  作为标准, 鉴定出差异代谢物<sup>[22]</sup>。筛选出正常组和模型组以及高剂量藜麦皂苷组和模型组之间的差异代谢物后, 分析它们的变化趋势,

藜麦皂苷干预后出现回调的代谢物可作为潜在的生物标志物。最终确定藜麦皂苷可能通过调节 7 种潜在生物标志物改善 NAFLD, 如表 2。与正常组相比, 模型组 Betaine、Paracetamol、N,N-Dimethylglycine、2-Amino-4-[(3-Aminopropyl)amino]Butanoic Acid、Apigenin、L-Proline 和 L-Glutamic Acid 含量明显下降; 和模型组相比, 高剂量藜麦皂苷组中该 7 种潜在生物标志物明显升高, 说明藜麦皂苷对 NAFLD 引起的异常代谢物水平有逆转作用, 能改善机体代谢紊乱。

表 2 尿液差异代谢物

Table 2 The differential metabolites in urine

差异代谢物	分子式	保留时间/min	分子量	VIP		$\log_2(\text{FC})$	
				H/C	QS/H	H/C	QS/H
Betaine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	14.97	117.07	1.55	1.21	-0.88↓**	1.16↑###
Paracetamol	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	13.18	151.06	1.55	1.17	-1.70↓**	2.03↑###
N,N-Dimethylglycine	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	15.66	103.06	1.52	1.18	-1.01↓**	2.13↑###
2-Amino-4-[(3-aminopropyl)amino]butanoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	14.98	175.13	1.41	1.20	-0.40↓**	0.68↑###
Apigenin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	2.38	270.05	1.33	1.12	-1.04↓*	1.24↑###
L-Proline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	15.74	115.06	1.30	1.19	-0.43↓*	1.40↑###
L-Glutamic acid	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	17.97	147.05	1.45	1.02	-0.51↓**	2.06↑#

注: 与空白组比较, \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示差异极显著  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, #表示  $P < 0.05$ , ###表示  $P < 0.01$ ; ↑表示含量增加; ↓表示含量下降; C 为 CON, 正常组; H 为 HFD, 模型组; QS 为藜麦皂苷组。

#### 2.4.3 代谢通路分析

采用 Metabo Analyst 5.0 工具, 对表 2 中差异代谢物进行富集通路分析。如图 4 所示, 柱子越长表示差异代谢物在该条代谢通路上出现的个数越多, 颜色越深代表该条通路的影响值越高。差异代谢物主要影响的通路是甘氨酸和丝氨酸代谢 (Glycine and Serine Metabolism)、甜菜碱代谢 (Betaine Metabolism)、蛋氨酸代谢 (Methionine Metabolism) 与精氨酸和脯氨酸代谢 (Arginine and Proline Metabolism) 等。

差异代谢物谷氨酸 (L-Glutamic Acid)、甜菜碱 (Betaine) 和二甲基甘氨酸 (N,N-Dimethylglycine) 富集在甘氨酸和丝氨酸代谢通路上, 表明藜麦麸皮总皂苷对此代谢通路产生影响。张燕等<sup>[13]</sup>的研究表明, 银耳多糖通过增加 NAFLD 大鼠肝脏组织中内源性甘氨酸的产生改善甘氨酸和丝氨酸代谢通路, 改善机体的氧化损伤, 从而保护肝脏和降低肝脏脂肪堆积。单蕊<sup>[14]</sup>的研究表明, 参苓白术散能通过甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路改善 NAFLD 大鼠脂质代谢紊乱。甘氨酸、谷氨酸和半胱氨酸是体内抗氧化剂 GSH 的重要组成部分。藜麦皂苷能增加血清 GSH 水平。改善甘氨酸和丝氨酸代谢途径可能是藜麦皂苷提高机体抗氧化能力、降低肝脏脂质沉积的内在机制。值得一

提的是, 甜菜碱、二甲基甘氨酸、谷氨酸和甘氨酸是 NAFLD 的生物标志物<sup>[23]</sup>。谷氨酸可作为治疗高脂血症的生物标志物和靶点<sup>[24]</sup>。在本次实验建立的 NAFLD 大鼠模型尿液中, 生物标志物甜菜碱、二甲基甘氨酸和谷氨酸均出现了下调, 高剂量藜麦皂苷使之上调。因此, 藜麦麸皮总皂苷可能通过增加谷氨酸的排泄和提高机体甜菜碱和二甲基甘氨酸代谢水平改善甘氨酸和丝氨酸代谢通路改善机体脂质代谢。

甜菜碱代谢和蛋氨酸代谢在脂质代谢中扮演着重要角色。差异代谢产物甜菜碱和二甲基甘氨酸均富集在这两条主要通路中 (图 4)。二甲基甘氨酸是甜菜碱去甲基化的下游产物。甜菜碱是一种有效的甲基供体, 可促进同型半胱氨酸转化为蛋氨酸, 以改善蛋氨酸代谢。蛋氨酸是人体重要的甲基来源之一, 它为磷脂酰乙醇胺提供甲基, 形成磷脂酰胆碱, 可促进 TG 以 VLDL 的形式从肝脏排出, 从而防止肝脏脂肪变性<sup>[8]</sup>。肝脏是脂质合成和代谢的主要场所, 预防肝脏脂肪堆积和减少脂毒性对维持正常的脂质代谢具有重要作用。固醇调节元件结合蛋白 (Sterol Regulatory Element Binding Protein, SREBP-1c) 是机体调节胆固醇代谢和脂肪合成代谢的重要脂质转录因子, 能够促进脂肪酸合成酶 (Fatty Acid Synthetase, FAS) 的表达, 促进

脂肪生成。蛋氨酸代谢异常会增加 SREBP-1c 的表达,提高血脂水平<sup>[25,26]</sup>。蛋氨酸-胆碱缺乏饮食常用来诱导非酒精脂肪肝动物模型。

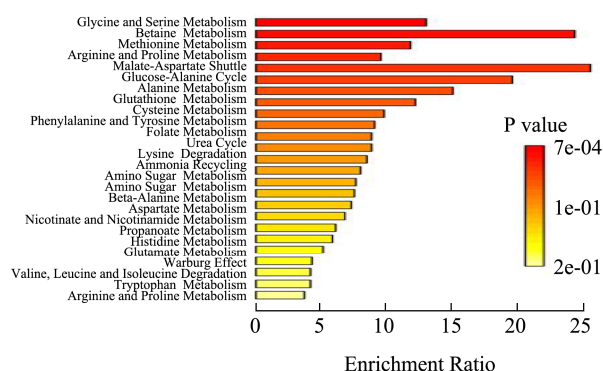


图4 差异代谢物代谢途径分析

Fig.4 Analysis of the metabolic pathways of differential metabolites

研究表明,甜菜碱可以通过铁代谢和脂质代谢相关基因的 DNA 甲基化改善降低肝脏脂质沉积<sup>[27]</sup>。除了作为机体重要的甲基供体以外,甜菜碱可以通过改变肠道菌群,预防高脂饮食引起的肥胖和肝细胞脂肪变性<sup>[28]</sup>。甜菜碱本身也作为一种脂质化合物,参与 TG 的分解<sup>[8]</sup>。因此,藜麦麸皮总皂苷可能通过改变内源性代谢物二甲基甘氨酸和甜菜碱水平改善甜菜碱代谢和蛋氨酸代谢通路,从而预防 NAFLD。

精氨酸和脯氨酸代谢途径的变化和肝损伤进展有关。精氨酸是脯氨酸(L-Proline)和肌酸的前体物质。脯氨酸代谢会产生活性氧,增加机体氧化应激水平,从而引起细胞凋亡和自噬<sup>[29]</sup>。杨璐等<sup>[22]</sup>证明栀子苷通过降低血清中脯氨酸含量,影响精氨酸和脯氨酸代谢途径,从而改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化。肌酸能够降低 S-腺苷甲硫氨酸的消耗和减少同型半胱氨酸的积累,降低肝损伤<sup>[25,30]</sup>。在本次实验研究中,藜麦皂苷降低 NAFLD 大鼠尿液中脯氨酸含量,表明皂苷可能通过促进脯氨酸的排泄,改善机体精氨酸和脯氨酸代谢通路。

NAFLD 患者(大鼠模型)和正常个体(大鼠模型)相比,尿液会呈现不同的代谢谱特征,本次实验结果和之前研究一致<sup>[31-33]</sup>。多靶点和多途径是植物化学物质防治代谢性疾病的重要特点。NAFLD 的发病机制与胰岛素抵抗、炎症、肠道菌群和脂质代谢紊乱等有关。藜麦皂苷能抑制炎症、抑制体外胰脂肪酶活性和改善肠道菌群,可作为防治脂质代谢综合征的候选物<sup>[34,35]</sup>。除了将尿液非靶向代谢组学作为藜麦皂苷降脂机制的研究内容,未来还会对大鼠肝脏、血清以及粪便中内源性代谢物进行靶向代谢组学的探究,如脂质代谢组学、粪便短链脂肪酸检测和胆汁酸代谢等,从而获得更全面的生物学信息<sup>[11,36]</sup>。

### 3 结论

本研究利用藜麦麸皮为原料获取天然产物藜麦皂苷,其在体外具有良好的 DPPH 自由基清除能力和还原力,并在体内表现出良好的抗氧化和降脂护肝作用,能减轻高脂饮食引起的肝脏脂肪病变。同时,采用基于 UPLC-MS 的代谢组学研究方法,发现了正常组、NAFLD 模型组和藜麦皂苷干预组不同的代谢特征,确定了 7 个潜在生物标志物在藜麦皂苷干预后,恢复或接近至正常代谢水平。这 7 个差异代谢物主要与甘氨酸和丝氨酸代谢、甜菜碱代谢、蛋氨酸代谢和精氨酸和脯氨酸代谢途径有关,可能是藜麦皂苷的内在降脂机制。本实验为藜麦麸皮皂苷的后续利用和非酒精性脂肪肝的防治提供理论支持。

### 参考文献

- [1] 马池发.营养与氧化应激在非酒精性脂肪肝发生机制中的作用[D].北京:北京协和医学院,2021.
- [2] Friedman S L, Neuschwander-Tetri B A, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. Nature Medicine, 2018, 24(7): 908-922.
- [3] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Metabolism, 2016, 65(8): 1038-1048.
- [4] Wang T Y, Tao S Y, Wu Y X, et al. Quinoa reduces high-fat diet-induced obesity in mice via potential microbiota-gut-brain-liver interaction mechanisms [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(3): e003292.
- [5] Cao Y, Zou L, Li W, et al. Dietary quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) polysaccharides ameliorate high-fat diet-induced hyperlipidemia and modulate gut microbiota [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 55-65.
- [6] Sun X, Yang X, Xue P, et al. Improved antibacterial effects of alkali-transformed saponin from quinoa husks against halitosis-related bacteria [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2019, 19(1): 46.
- [7] 林冰洁,荆金金,张若愚,等.藜麦皂苷生物活性与化学结构研究进展[J].食品与发酵工业,2020,46(24):300-306.
- [8] Fardet A, Chardigny J M. Plant-based foods as a source of lipotropes for human nutrition: A survey of *in vivo* studies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(6): 535-590.
- [9] Yao Y, Zhu, Y, Gao Y, et al. Suppressive effects of saponin-enriched extracts from quinoa on 3T3-L1 adipocyte

- differentiation [J]. Food & Function, 2015, 6(10): 3282-3290.
- [10] Feng J, Yu Y, Song L M, et al. Comparison of the anti-inflammatory effects of different polar ginsenosides on rheumatoid arthritis [J]. Industrial Crops and Products, 2022, 181: 114845.
- [11] Zhang Q, Fan X Y, Guo W L, et al. The protective mechanisms of macroalgae *Laminaria japonica* consumption against lipid metabolism disorders in high-fat diet-induced hyperlipidemic rats [J]. Food & Function, 2020, 11(4): 3256-3270.
- [12] Yang X, Wu R, Qi D, et al. Profile of bile acid metabolomics in the follicular fluid of PCOS patients [J]. Metabolites, 2021, 11(12): 845.
- [13] 张艳,王爽,李永哲,等.基于代谢组学方法研究银耳多糖对非酒精性脂肪肝大鼠的干预作用[J].食品工业科技,2020,41(11):310-315,293.
- [14] 单蕊.参苓白术散干预非酒精性脂肪肝大鼠的肝脏代谢组学研究[D].云南:云南中医药大学,2020.
- [15] 赵雷,丁葵英,郑星,等.藜麦麸皮不同极性部位的抑菌及酪氨酸酶抑制活性研究[J].食品工业科技,2019,40(6):82-88.
- [16] 傅钰,张禾,符群.3种藜麦皂苷的超声提取及抗氧化活性比较[J].中国粮油学报,2020,35(11):40-47.
- [17] Want E J, Wilson I D, Gika H, et al. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS [J]. Nature Protocols, 2010, 5(6): 1005-1018.
- [18] 张若愚,闫菲,李雪宁,等.藜麦皂苷灌胃后大鼠尿液代谢及肠道菌变化[J].现代食品科技,2022,38(8):1-9.
- [19] 韦兴英,郭晓农,韦良贞,等.藜麦总皂苷的提取及其抗氧化活性研究[J].中兽医医药杂志,2020,39(3):16-20.
- [20] Reiniers M J, van Golen R F, van Gulik T M, et al. Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: A molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 21(7): 1119-1142.
- [21] 何惊婧.二黄祛脂方治疗非酒精性脂肪性肝病的系统药理学及机制研究[D].石河子:石河子大学,2022.
- [22] Yang L, Bi L, Jin L, et al. Geniposide ameliorates liver fibrosis through reducing oxidative stress and inflammatory response, inhibiting apoptosis and modulating overall metabolism [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 772635.
- [23] 李云.非酒精性脂肪肝病生物标志物的研究[D].武汉:武汉轻工大学,2020.
- [24] Liu R, Hong J, Xu X, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention [J]. Nature Medicine, 2017, 23(7): 859-868.
- [25] Esfandiari F, You M, Villanueva J A, et al. S-adenosylmethionine attenuates hepatic lipid synthesis in micropigs fed ethanol with a folate-deficient diet [J]. Alcoholism, Clinical and Experimental Research, 2007, 31(7): 1231-1239.
- [26] Wang H, Wu Y, Tang W. Methionine cycle in nonalcoholic fatty liver disease and its potential applications [J]. Biochemical Pharmacology, 2022, 200: 115033.
- [27] Li Y, Jiang W, Feng Y, et al. Betaine alleviates high-fat diet-induced disruption of hepatic lipid and iron homeostasis in mice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(11): 6263.
- [28] Du J, Zhang P, Luo J, et al. Dietary betaine prevents obesity through gut microbiota-driven microRNA-378a family [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-19.
- [29] Selen E S, Bolandnazar Z, Tonelli M, et al. NMR metabolomics show evidence for mitochondrial oxidative stress in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(8): 3284-3291.
- [30] Barcelos R P, Stefanello S T, Mauriz J L, et al. Creatine and the liver: metabolism and possible interactions [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2016, 16(1): 12-18.
- [31] Troisi J, Pierri L, Landolfi A, et al. Urinary metabolomics in pediatric obesity and NAFLD identifies metabolic pathways/metabolites related to dietary habits and gut-liver axis perturbations [J]. Nutrients, 2017, 9(5): 485.
- [32] Babu A F, Csader S, Männistö V, et al. Effects of exercise on NAFLD using non-targeted metabolomics in adipose tissue, plasma, urine, and stool [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 6485.
- [33] 魏佳迪.基于代谢组学的滇黄精抗脂代谢紊乱作用机制研究[D].昆明:云南中医学院,2018.
- [34] Yao Y, Yang X, Shi Z, et al. Anti-inflammatory activity of saponins from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(5): H1018-H1023.
- [35] Navarro Del Hierro J, Casado-Hidalgo G, Reglero G, et al. The hydrolysis of saponin-rich extracts from fenugreek and quinoa improves their pancreatic lipase inhibitory activity and hypocholesterolemic effect [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128113.
- [36] Rao Y, Wen Q, Liu R, et al. PL-S2, a homogeneous polysaccharide from *Radix Puerariae lobatae*, attenuates hyperlipidemia via farnesoid X receptor (FXR) pathway-modulated bile acid metabolism [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165(Pt B): 1694-1705.



现代食品科技