

鸡胆汁酶转化物对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用

邓玉兰¹, 邹泽斌², 胡芳², 梁梓滢², 刘佩瑶², 黎攀², 杜冰², 邱科先^{1*}

(1. 中山丽高生物医药有限公司, 广东中山 528437) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 该实验旨在探究鸡胆汁酶转化物 (CB) 对大鼠酒精性肝病 (ALD) 的保护作用, 并揭示其作用机制。35 只 8 周龄的雄性大鼠适应性喂养一周后, 随机分为正常组、模型组、CB 低中高剂量 (50、100、150 mg/kg)。经过一周 6 mL/kg·bw 的酒精造模及 CB 干预后处死大鼠收集血清及肝脏测定相关指标, 通过 H&E 染色观察肝组织形态。结果表明, 高剂量 CB 具有良好的护肝效果, 改善了大鼠体质量的降低及肝脏指数的升高。高剂量 CB 干预后, 肝脏中乙醇脱氢酶 (ADH)、乙醛脱氢酶 (ALDH) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性分别提高 67.48%、110.07%、34.30%, 细胞色素酶 (CYP2E1) 水平降低 35.02%, 酒精代谢能力显著提高, 同时, 血清中谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 和谷丙转氨酶 (ALT) 活性分别降低 35.62%、38.50%、45.25%, 改善肝脏损伤。另外, 高剂量 CB 干预可降低血清中 51.23% 总胆固醇 (TC) 和 47.12% 甘油三酯 (TG) 的水平, 提高脂质代谢, 同时, 肝脏中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力提高 102.93%, 谷胱甘肽 (GSH) 水平提高 40.69%, 丙二醛 (MDA) 水平降低 35.85%, 减缓肝脏氧化应激。高剂量 CB 干预可下调 TLR4/MyD88/NF- κ B/IKB α 信号通路的基因和蛋白的表达, 且白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平分别降低 31.29%、28.71%、40.48% 和 37.48%, 减缓炎症应激。研究结果表明, CB 具有开发成为护肝功能性食品及保健品的潜力。

关键词: 鸡胆汁酶转化物; 酒精性肝病; 酒精代谢; 氧化应激; 炎症应激

文章编号: 1673-9078(2024)11-68-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1185

Protective Effect of Enzymatically Processed Chicken Bile on Acute Alcoholic Liver Damage in Rats

DENG Yulan¹, ZOU Zebin², HU Fang², LIANG Ziyang², LIU Peiyao², LI Pan², DU Bing², QIU Kexian^{1*}

(1. Zhongshan Ligao Biological Medicine Co. Ltd., Zhongshan 528437, China)

(2. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The protective effects of enzymatically converted chicken bile (CB) on alcoholic liver diseases (ALD) in rats and its potential mechanism were investigated. Thirty-five 8-week-old male rats were randomly divided into a control group; a model group; and low-, medium- and high-dose CB treatment groups (50, 100, and 150 mg/kg, respectively) after adaptive feeding for 1 week. At 1 week after modeling using 6 mL/kg·bw of alcohol and CB intervention, all rats were sacrificed. Serum and liver samples were collected to determine relevant indices, and the liver histology was observed using hematoxylin and eosin staining. The results showed that a high dose of CB was associated with hepatoprotective effects by

引文格式:

邓玉兰, 邹泽斌, 胡芳, 等. 鸡胆汁酶转化物对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(11): 68-78.

DENG Yulan, ZOU Zebin, HU Fang, et al. Protective effect of enzymatically processed chicken bile on acute alcoholic liver damage in rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 68-78.

收稿日期: 2023-10-04

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21)

作者简介: 邓玉兰 (1988-), 女, 学士, 研究方向: 保健品开发, E-mail: 445229515@qq.com

通讯作者: 邱科先 (1968-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品、药品质量研究及生产工艺研究, E-mail: qkx@livgal.com

ameliorating the reduction in body weight and elevated liver index in rats. After high-dose CB intervention, the activities of hepatic alcohol dehydrogenase, acetaldehyde dehydrogenase, and catalase were increased by 67.48%, 110.07%, and 34.30%, respectively, whereas the cytochrome enzyme level decreased by 35.02%, indicating a substantial enhancement in alcohol metabolism. Moreover, the activities of alanine transaminase, alkaline phosphatase, and alanine transaminase in the serum were reduced by 35.62%, 38.50%, and 45.25% respectively, indicating improvements in liver damage. In addition, CB intervention reduces the levels of total cholesterol (by 51.23%) and triglycerides (by 47.12%) in the serum, increased superoxide dismutase activity (by 102.93%) and the glutathione level (by 40.69%), and decreased the malondialdehyde level (by 35.85%) in the liver. These results suggest that lipid metabolism was enhanced and oxidative stress was alleviated. High-dose CB intervention downregulates the expression levels of genes and proteins involved in the TLR4/MyD88/NF- κ B/I κ B α signaling pathway. The expression levels of interleukin 1 β , interleukin 6, interleukin 8, and tumor necrosis factor α were reduced by 31.29%, 28.71%, 40.48%, and 37.48%, respectively, indicating reduced inflammatory stress. Based on these findings, CB shows potential for development as a functional food and health care product for liver protection.

Key words: enzymatically converted chicken bile; alcoholic liver disease; alcohol metabolism; oxidative stress; inflammatory stress

长期过量饮酒导致的酒精性肝病 (Alcohol Liver Disease, ALD), 是目前世界上最为常见的肝脏疾病, 每年在 ALD 的治疗上都会带来较大的经济负担, 这需要引起我们更多的重视^[1]。当酒精摄入超过肝脏酒精代谢能力的范围, 乙醇及乙醛的积累会导致肝脏的损伤^[2]。ALD 最初的特点是酒精性脂肪肝, 主要表现为肝脏的脂肪变性及血清中甘油三酯 (TG) 等血脂的积累^[3], 随着病情的发展, 会发展成肝炎、肝损伤、肝硬化甚至肝癌^[4]。大量的研究表明, 氧化应激是造成 ALD 的主要原因之一, 酒精在代谢过程中会造成活性氧自由基 (ROS) 的大量积累, 进而造成肝脏的氧化应激, 导致肝脏细胞的损伤^[5], 因此提高机体的抗氧化能力是预防 ALD 的高效方式。同时肝脏的炎症应激也是肝损伤的表现^[6], 过量饮酒导致酒精代谢产物的积累, 进而 NF- κ B 信号通路被激活, 促使 NF- κ B 进入细胞核, 引发一系列炎症相关基因的过度表达, 这包括促进炎症细胞的浸润、炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β) 水平升高、增加细胞凋亡和坏死, 以及引发纤维化等病理性变化^[7]。因此抑制 NF- κ B 的信号通路, 及其带来的炎症级联反应, 是治疗肝损伤的新靶点。

在中国, 鸡肉是继猪肉之后肉类消费品的第二大品类^[8], 较大的产业规模也产生了较多如鸡胆的加工副产品。鸡胆汁主要成分有蛋白质、脂肪酸、矿物质元素^[9]及丰富的以牛磺鹅去氧胆酸和胆酸为主的胆汁酸^[10]。前期研究表明, 鸡胆汁具有多种的药理活性作用, 如免疫调节、抗菌、降脂、抗病毒以及抗癌等作用^[11], 同时非酒精性脂肪肝疾病上,

鸡胆汁的干预表现出良好的治疗效果^[12]。而牛磺鹅去氧胆酸与牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA) 是差向异构体, 可以以鸡胆汁为原料, 生产具有多种功能活性的牛磺熊去氧胆酸^[13]。在本研究中, 将鸡胆汁通过 7 α -羟基类固醇脱氢酶和 7 β -羟基类固醇脱氢酶氧化还原反应后, 再经过脱色、过滤、干燥后得到鸡胆汁酶转化物 (CB)^[14], 主要是由蛋白质、无机元素以及各类胆汁酸组成, 其中牛磺熊去氧胆酸的含量超过 28%。牛磺熊去氧胆酸在治疗结肠炎、心血管疾病、神经保护上具有良好的效益^[15,16], 同时作为一种高效的抗炎物质可用于肝硬化患者的治疗上, 起到减缓肝脏炎症和保护肝脏的效果。因此推测富含 TUDCA 及多种胆汁酸的 CB 对 ALD 治疗上可能也存在一定的有益效果^[17]。

通过测定 CB 的干预对 ALD 大鼠在肝脏的酒精代谢、脂质代谢、氧化应激、炎症应激等方面的影响, 评价其解酒护肝的效益, 并揭示其在缓解 ALD 的具体作用机制。本研究结果可为鸡胆汁的综合利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡胆汁酶转化物, 中山丽高生物医药有限公司提供; 56° 红星二锅头白酒, 北京红星股份有限公司。

BCA 蛋白浓度检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 乙醇脱氢酶 (ADH)、乙醛脱氢酶 (ALDH)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、

碱性磷酸酶 (ALP)、微量还原型谷胱甘肽 (SGH)、过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 测试试剂盒及白细胞介素 -8 (IL-8) ELISA 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 白细胞介素 -6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 -1 β (IL-1 β)、细胞色素 P4502E1 (CYP2E1) ELISA 试剂盒, 武汉华美生物工程有限公司; 33 种胆汁酸标准品, 购自上海甄准生物科技有限公司; 所用试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 仪器与设备

AB Sciex QTRAP 6500 型质谱仪, 上海麦特英杰生物科技有限公司; AB Sciex Exion LCTMAD 型液相色谱, 上海麦特英杰生物科技有限公司; BNR07953 型光栅酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司; H1650R 型台式冷冻离心机, 中国湖南湘仪; ChemiScope610 型化学发光成像系统, 中国勤翔; PIKOREAL96 型荧光定量 RCP 仪, 美国 Thermo。

1.3 实验方法

1.3.1 鸡胆汁酶转化物基本成分鉴定

鸡胆汁酶转化物总糖含量, 参考苯酚硫酸法并稍作修改^[18], 以无水葡萄糖绘制总糖标准曲线, 通过标准曲线计算 CB 中总糖含量。蛋白质含量, 参考 GB5009.5-2016 食品中蛋白质的测定。游离氨基酸含量, 参照《实用食物营养成分分析手册》中游离氨基酸的测定方法^[19]。胆固醇含量, 参考 GB5009.128-2016 中胆固醇的检测方法。无机元素含量测定, 参考 GB5009.268-2016 中各类无机元素的检测方法。各类胆汁酸含量测定, 以 33 种胆汁酸标准品建立标曲, 通过 LC-MS 的方法检测各类胆汁酸的含量^[20]。所有实验均以同一批样品进行测定, 所有实验测定一次。

1.3.2 实验动物

无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 雄性 (Sprague Dawley, SD) 大鼠, 180~220 g (6~8 周龄), 购自广东省医学实验动物中心, 许可证编号: SYXK (粤) 2022-0002, 饲养于华南农业大学实验动物中心 SPF 级屏障环境, 按照实验动物保护和伦理规则饲养, 室温控制在 20~26 °C, 湿度控制在 40%~70% 范围, 明暗交替各 12 h, 保证通风。

1.3.3 实验安排

所有的动物在实验条件下适应性喂养一周后, 将 SD 大鼠随机分为 HC (正常组, 0.9 wt.% 生理盐水)、MC (模型组, 0.9 wt.% 生理盐水)、CBL (CB 低剂量组, 50 mg/kg·bw)、CBM (CB 中剂量组, 100 mg/kg·bw)、CBH (CB 高剂量组, 150 mg/kg·bw), 每组 7 只, 每周称量并记录大鼠体重。所有大鼠在给药 2 h 后, HC 大鼠给予 0.9% 生理盐水, 其他大鼠给予 56° 红星二锅头白酒, 剂量为 6 mL/kg·bw, 每天 1 次, 持续 6 d。第 7 天所有大鼠给药后 30 min 后, HC 大鼠给予 0.9% 生理盐水, 其他大鼠给予 56° 红星二锅头白酒, 剂量为 12 mL/kg·bw, 禁食禁水 2 h 后, 用 10 wt.% 水合氯醛麻醉大鼠, 对大鼠进行腹腔动脉采血并静置后收集血清, 取大鼠肝脏并称重, 并于 -80 °C 条件下冻存备用。

1.3.4 血清和肝脏生化指标测定

将收集的血液置于 4 °C 的冰箱里自然沉降 2 h 后, 经过冷冻离心机 (4 °C, 3 000 r/min, 15 min) 后收集上层血清。TC、TG、AST、ALT、ALP 按照试剂盒说明书进行检测。称取约 0.25 g 肝脏组织, 按照 (质量: 体积) $m/V=1:9$ 的比例加入 0.9 wt.% 的生理盐水, 加入研磨珠在 4 °C, 60 Hz 下研磨 10 min, 离心 (4 °C, 12 000 r/min, 10 min), 取上清待测, 按照 GSH、SOD、CAT、MDA、ADH、ALDH 试剂盒说明书进行检测, 通过 BCA 试剂盒进行蛋白标定。肝脏中 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 、P4502E1 的水平按照酶联免疫吸附试剂盒说明书进行测定。

1.3.5 肝脏组织形态学分析 (H&E 染色)

将大鼠处死并取出整个肝脏组织称重后, 立即选取大鼠肝脏左叶同一位置组织约 1 cm³, 将组织放入 10 wt.% 的多聚甲醛固定, 经过梯度浓度的乙醇洗脱, 进而经过用苏木精 - 伊红染色 (H&E 染色), 通过普通光学显微镜采集图片。

1.3.6 逆转录聚合酶链式反应

通过 RT-qPCR 检测 TLR4/MyD88/NF- κ B/I κ B α 信号通路的基因表达情况。用 trizol 试剂提取肝脏细胞的总 RNA, 用紫外分光光度计在 260 nm 与 280 nm 处测定吸光度值计算浓度与纯度。用 mRNA 逆转录试剂盒 (康维世纪, 中国北京) 以 RNA 为模板逆转录 cDNA, 后进行实时定量 PCR 扩增。目标基因的引物序列如表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列
R-βactin	5'-ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC
	3'-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC
R-TLR4	5'-GGCTTCTAACCTCAACGACCT
	3'-ATGATTCTTTGCTGAGTTGCTT
R-MyD88	5'-ACTGTATGAACTGAAGACCGCATC
	3'-ACTCCTGTTTCTGCTGGTTGCGTA
R-NF-κB	5'-ACTCTCAGCTCAGTAAGACCG
	3'-CCACAGTCTTCTCATCCTCGT
R-IKBα	5'-CACCAAAGACCCACCTCACCG
	3'-CTTGCTCCAGGTCTCGCTTC

1.3.7 蛋白免疫印迹

取大鼠肝脏组织，加入 RIPA 裂解液，均质化后离心收集上清液。通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质，用 1*PBST 制备的 5 wt.% 脱脂奶粉转移到 NC 膜上，将膜浸入并在室温下放置 90 min。在一抗 (TLR4: Rabbit, 美国 proteintech; MyD88: Rabbit, 美国 proteintech; NF-κB: Rabbit, 英国 abcam; IKBα: Rabbit, 美国 proteintech; β-actin: Mouse, 美国 proteintech) 下在 4 °C 孵育过夜。后经过二抗 (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, 中国 Abiowell; Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, 中国 Abiowell) 孵育，结束后以 1*PBST 洗 3 次，每次 10 min。通过 ECL 显色曝光成像。

1.4 数据处理

实验数据以“平均值 ± 标准差”来表示，采用 GraphPad Prism 8 (版本: v8.0.2.263) 进行作图，通过单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 计算实验组之间的显著性，其中与正常组相比 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与模型组相比 #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001。

2 结果与分析

2.1 CB基本成分鉴定结果

CB 基本成分鉴定结果如下表 2 所示，其中总糖质量分数为 5.01%；蛋白质的质量分数为 25.03%；游离氨基酸的质量分数为 1.72%，其中含量较高的是

丙氨酸及亮氨酸；胆固醇的质量分数为 0.05%；无机元素的质量分数为 8.19%，其中含量较高的为钠和钾，分别为 7.50×10⁴ mg/kg 与 6.94×10³ mg/kg；各类胆汁酸总和的质量分数为 47.94%，值得注意的是其中仅牛磺熊去氧胆酸的质量分数已达到 28.39%；牛磺鹅去氧胆酸的质量分数为 7.54%。

表 2 基本成分汇总

Table 2 Basic component summary

序号	基本成分	含量/%
1	总糖	5.01
2	蛋白质	25.03
3	游离氨基酸	1.72
4	胆固醇	0.05
6	无机元素	8.19
8	胆汁酸	47.94
9	总计	87.94

2.2 CB治疗对体质量及肝脏指数的影响

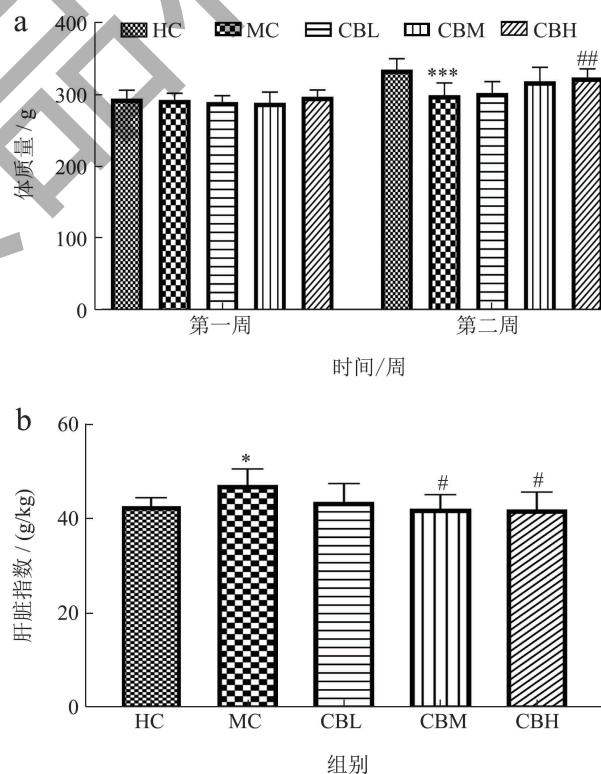


图 1 大鼠体质量及肝脏指数

Fig.1 Body weight and liver index of rats

长期饮酒会引起一系列的肝脏疾病，例如脂肪肝、肝炎、肝脏组织肥大^[21]等。实验中每周记录大鼠体质量，在大鼠处死后取出整个肝脏并称重，计算肝脏指数，如图 1a 所示，实验中大鼠随机分组

之后, 各组之间的体质量没有明显的差异, 在经过一周的酒精灌胃并给予 CB 干预之后, 相较于 HC 大鼠, MC 大鼠的体质量降低了 10.68% ($P < 0.001$), 且 MC 大鼠的肝脏指数显著增加了 8.51% ($P < 0.05$) (图 1b)。这可能是酒精摄入后带来大量热量, 进而减少食物的摄入造成的^[22]。高剂量 CB 的干预缓解了酒精引起的大鼠的体质量的减少, CBH 组大鼠体质量增加 8.23%, 且中、高剂量 CB 降低了由酒精引起的大鼠肝脏指数的增加, 分别降低 10.71% 和 11.02%。朱诗雅^[23]在乳杆菌缓解慢性酒精性肝的研究中, 肝脏指数降低 9.86% 与本研究相似。这些结果表明, CB 可以缓解由酒精引起的大鼠体质量降低及肝脏肥大。

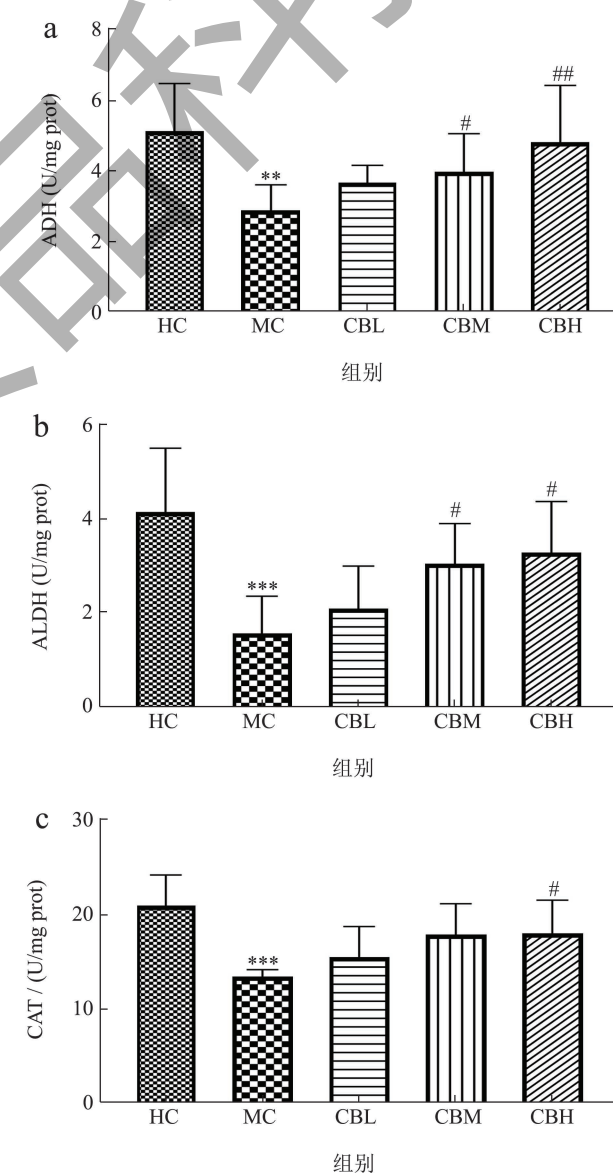
2.3 CB 治疗对酒精代谢酶的影响

肝脏是机体重要的酒精代谢系统, 酒精主要通过肝脏细胞内的 ADH、ALDH、CAT 和 CYP2E1 代谢^[23]。乙醇会直接破坏肝脏细胞造成肝脏组织的损伤^[24], 酒精在摄入后, 会在肝脏细胞中 ADH 及 CAT 的代谢下转化为乙醛, 细胞色素酶 P4502E1 (CYP2E1) 在这个过程中起到重要的作用, 但乙醛的堆积同样对肝脏具有巨大的损伤作用^[25]。因此酒精摄入过量后, 乙醇和乙醛不完全代谢最终造成肝脏损伤。通过测定大鼠肝脏中酒精代谢酶活性以及细胞色素酶含量, 进而评价大鼠肝脏酒精代谢能力, 如图 2a~2c 所示, 本实验中的 MC 大鼠的 ADH、ALDH、CAT 酶活性分别降低了 43.92%、61.96%、35.96%, 低剂量的 CB 干预没有显著的恢复酶活性, 但伴随剂量的提高逐渐显现出明显的恢复效果, 相较于 MC 组, CBH 组的 ADH、ALDH、CAT 酶活分别提高了 67.48%、110.07%、34.30%。MC 组细胞色素酶 P4502E1 (CYP2E1) 的含量显著升高了 16.13% ($P < 0.05$), 且随着 CB 的干预剂量的升高 CBL、CBM 和 CBH 组的 P4502E1 分别降低了 24.97%、31.02%、35.02% ($P < 0.001$) (图 2d)。Zhao 等^[26]在发酵葛根减轻酒精性肝损伤的研究中酒精代谢酶均有显著升高, 进而表现出较强的解酒代谢能力。实验结果表明, CB 的干预提高了酒精代谢酶含量进而提高酒精代谢的能力。

2.4 CB 治疗对肝功能的影响

血清中 AST、ALP、ALT 酶活性升高是肝功能受损的主要表现^[27]。通过测定血清中 AST、ALP、

ALT 酶活性, 评价大鼠肝脏损伤情况, 如图 3a~3c 所示, 发现 MC 大鼠的血清中 AST、ALP、ALT 酶活性显著增加了 70.49%、37.14%、37.02% ($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$), 表明急性酒精干预造成了大鼠的肝脏损伤。而不同剂量的 CB 干预后 CBL、CBM 和 CBH 组的 AST 分别降低 23.22%、34.02%、35.62%, ALP 分别降低 30.61%、33.11%、38.50%, ALT 分别降低 36.08%、44.47%、45.25%。CBH 组的 AST、ALP、ALT 酶活性与正常组相似。山西毛建茶水提物解酒保肝^[1]的研究中, AST 和 ALT 水平同样与正常组相似。胆汁酸在调节乙醇诱导的肝病上具有积极的作用^[28], 尤其以牛磺熊去氧胆酸效果最佳, CB 中胆汁酸的含量丰富, 因此可能是口服 CB 后, 在肝脏中的酒精代谢起到积极的作用, 进而改善了肝脏的损伤。



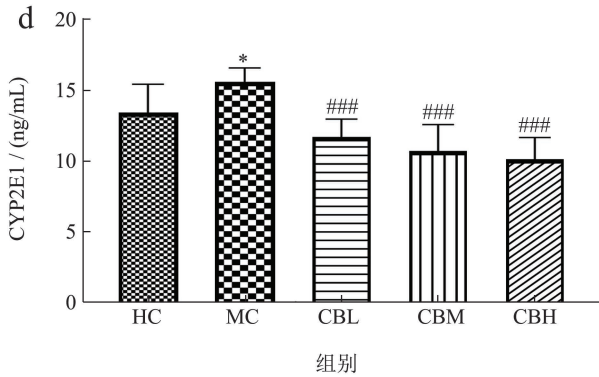


图2 大鼠肝脏酒精代谢酶水平

Fig.2 Alcohol metabolising enzyme levels in rat liver

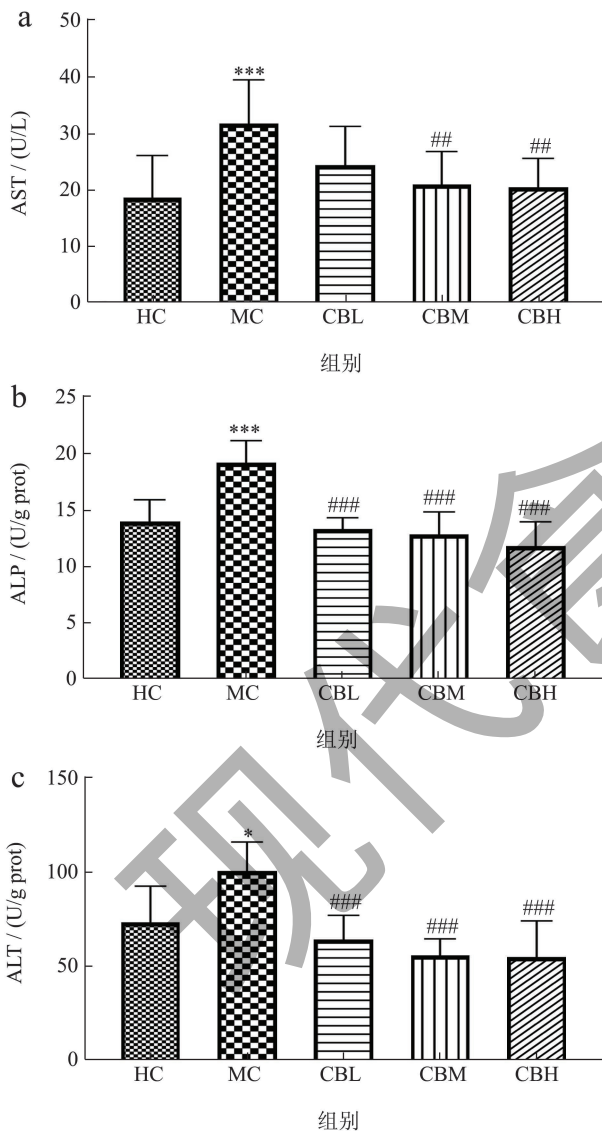


图3 大鼠血清肝损伤指标

Fig.3 Indicators of liver damage in rat serum

2.5 CB治疗对脂质代谢的影响

酒精代谢的紊乱及肝脏的损伤，会打破肝脏细

胞内的氧化还原状态的平衡，干扰糖脂代谢，促进脂肪酸的合成，造成脂肪的积累已早有报道^[29]。通过测定血清中血脂水平，观察大鼠脂质代谢强弱，如图4所示，MC大鼠血清中TC、TG的水平显著提高30.25%和47.52%，但经过CB干预之后脂质代谢能力有所提高，TC在CBL、CBM和CBH组分别降低32.29%、38.90%、51.23%，TG分别降低31.20%、37.41%、47.12%。研究表明胆汁酸经过肠肝循环，在肝脏中调节脂质代谢的作用上表现出积极的效果^[30]。这些结果表明，CB的干预在加强肝脏的脂质代谢上表现出良好的效果。

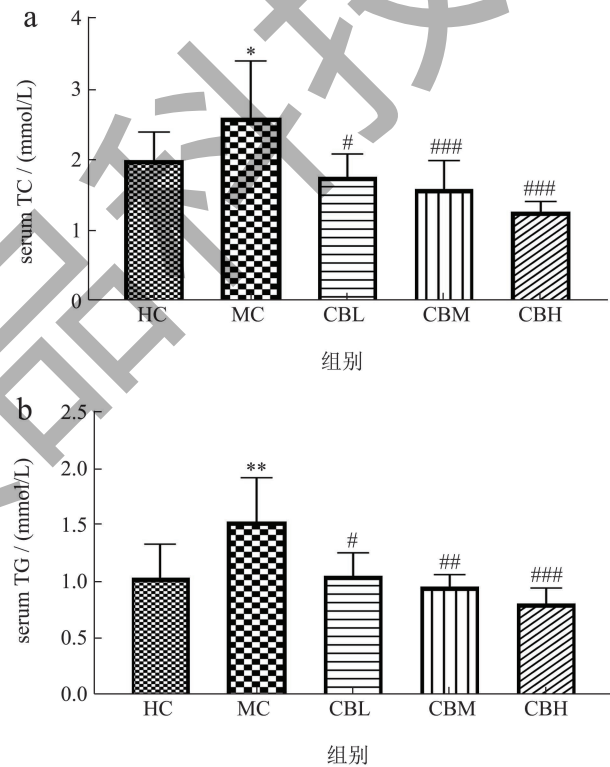


图4 大鼠血清中血脂水平

Fig.4 Serum lipid levels in rats

2.6 组织病理学观察

为了进一步验证CB对肝脏的保护作用，通过H & E染色观察各组肝脏病理变化情况，如图5所示。HC组肝细胞结构完整，均质，呈放射状分布，无明显细胞坏死，而MC组肝细胞损伤明显，如脂滴和细胞坏死，肝脏细胞的空泡化严重。在经过CB的干预治疗后细胞损伤和空泡化有明显的改善，值得注意的是CBH组在改善肝细胞空泡化上具有更好的效果。

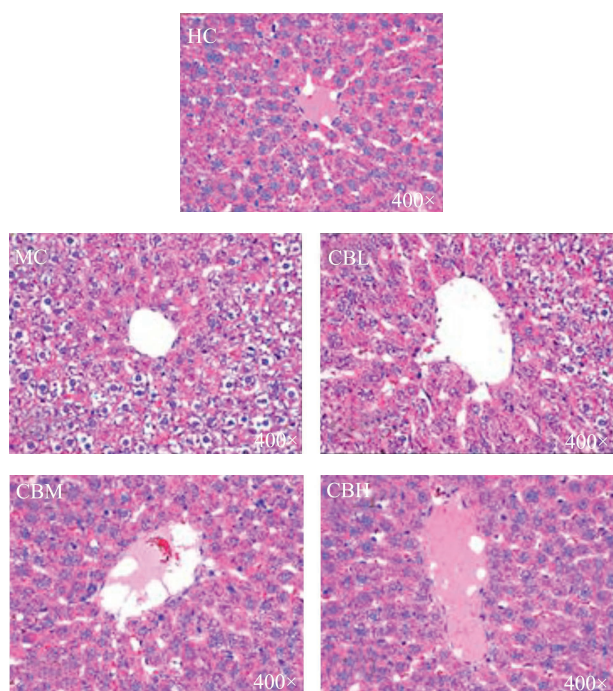


图5 肝脏组织病理学观察 (HE 染色)

Fig.5 Histopathological observations of the liver

2.7 CB干预对抗氧化酶的影响

研究表明, ROS 的过量积累造成的氧化应激是造成 ALD 的关键^[6], 正常生理条件下肝脏细胞产生的活性氧自由基 (ROS) 会被抗氧化系统消除, 但是过量的 ROS 积累超过机体的抗氧化酶系统 (SOD、MDA、GSH) 的清除范围, 则会造成氧化应激损伤。测定肝脏中抗氧化酶活性及 MDA 含量, 进而观察大鼠肝脏氧化应激水平, 如图 6 所示, 酒精引起了 MC 大鼠肝脏内 SOD 和 GSH 酶的含量分别下降 52.86% 和 33.28%, 同时造成丙二醛 (MDA) 酶的水平上升 115.35%, 而经过 CB 的干预, CBL、CBM 和 CBH 组的 SOD 分别升高 37.94%、49.45%、102.93%, GSH 分别升高 31.03%、39.94%、40.69%, MDA 分别降低 26.60%、36.78%、35.85%。研究表明膳食补充胆汁酸能够增加抗氧化的能力^[31], 这可能是 CB 降低 ROS 积累改善肝损伤上有积极表现的原因。

2.8 CB干预炎症因子的影响

大量文献报道称, 肝脏的炎症应激是造成肝损伤甚至引发肝炎和肝损伤的关键因素^[32]。机体的氧化应激以及细胞膜通透性改变引起的脂质过氧化,

会进一步的造成炎症反应^[33]。测定肝脏中炎症因子水平, 观察大鼠肝脏炎症应激情况, 如图 7 所示, MC 大鼠肝脏组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 的含量分别升高 29.15%、58.10%、42.90%、23.47%, 而 CB 的干预在炎症因子水平的降低上则表现出剂量依赖式的降低, 其中 CBL、CBM 和 CBH 组的 IL-1 β 分别降低 23.69%、24.59%、31.29%, IL-6 分别降低 18.75%、23.54%、28.71%, IL-8 分别降低 27.31%、35.03%、40.48%, TNF- α 分别降低 21.05%、26.43%、37.48%。这些结果表明 CB 在降低肝脏炎症应激的作用上表现出积极的作用。

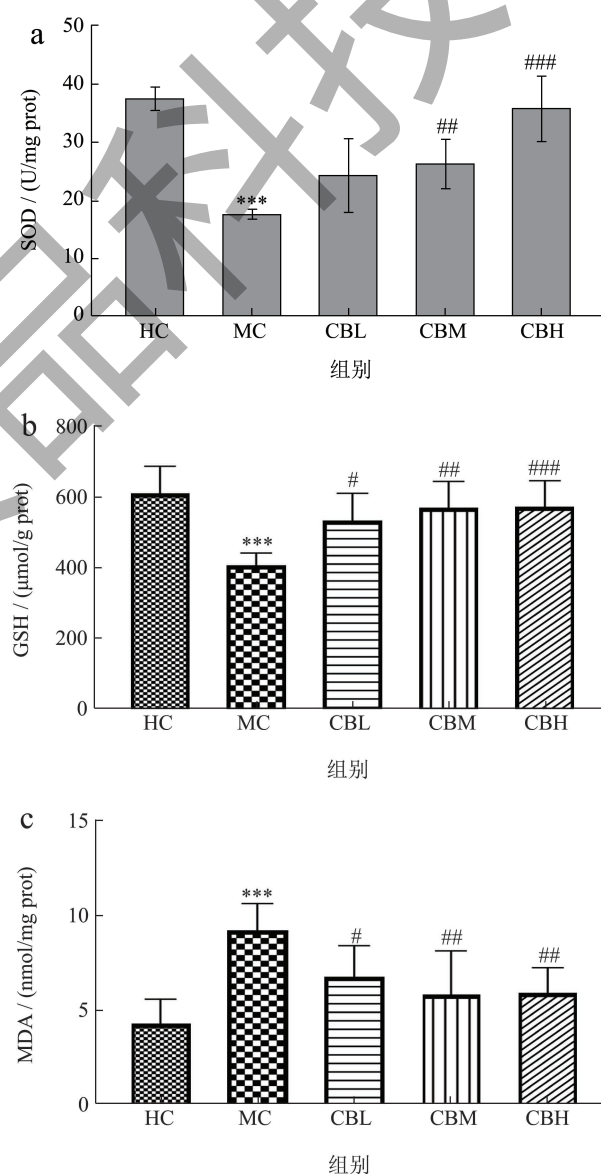


图6 大鼠肝脏氧化应激水平

Fig.6 Oxidative stress levels in rat liver

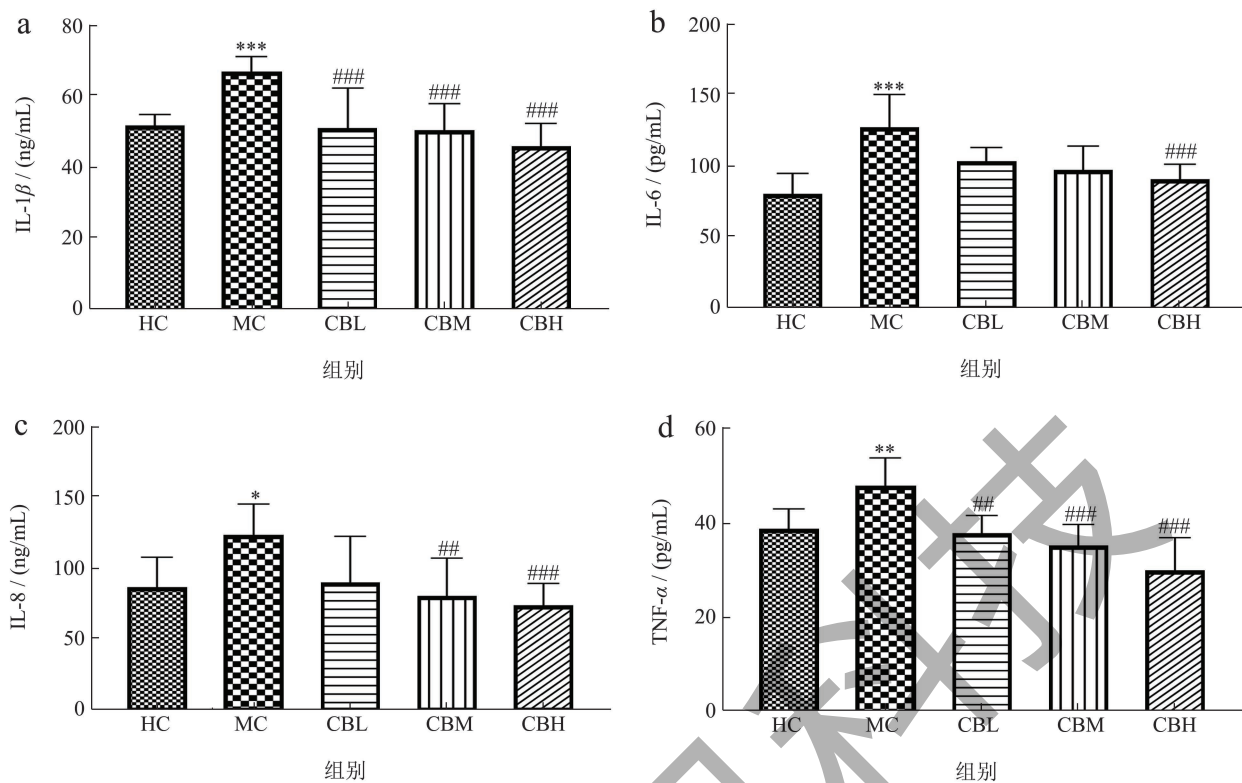
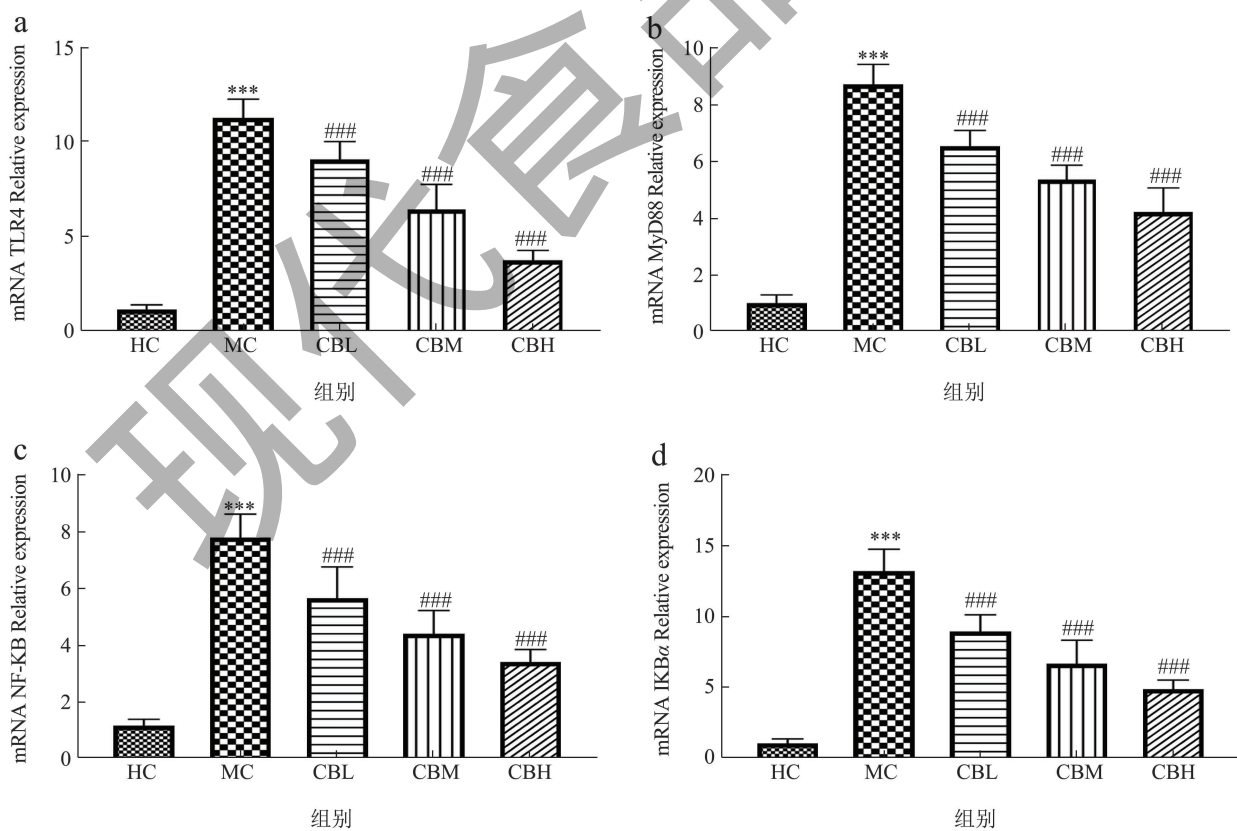


图 7 大鼠肝脏炎症因子水平
Fig.7 Inflammatory factors levels in rat liver



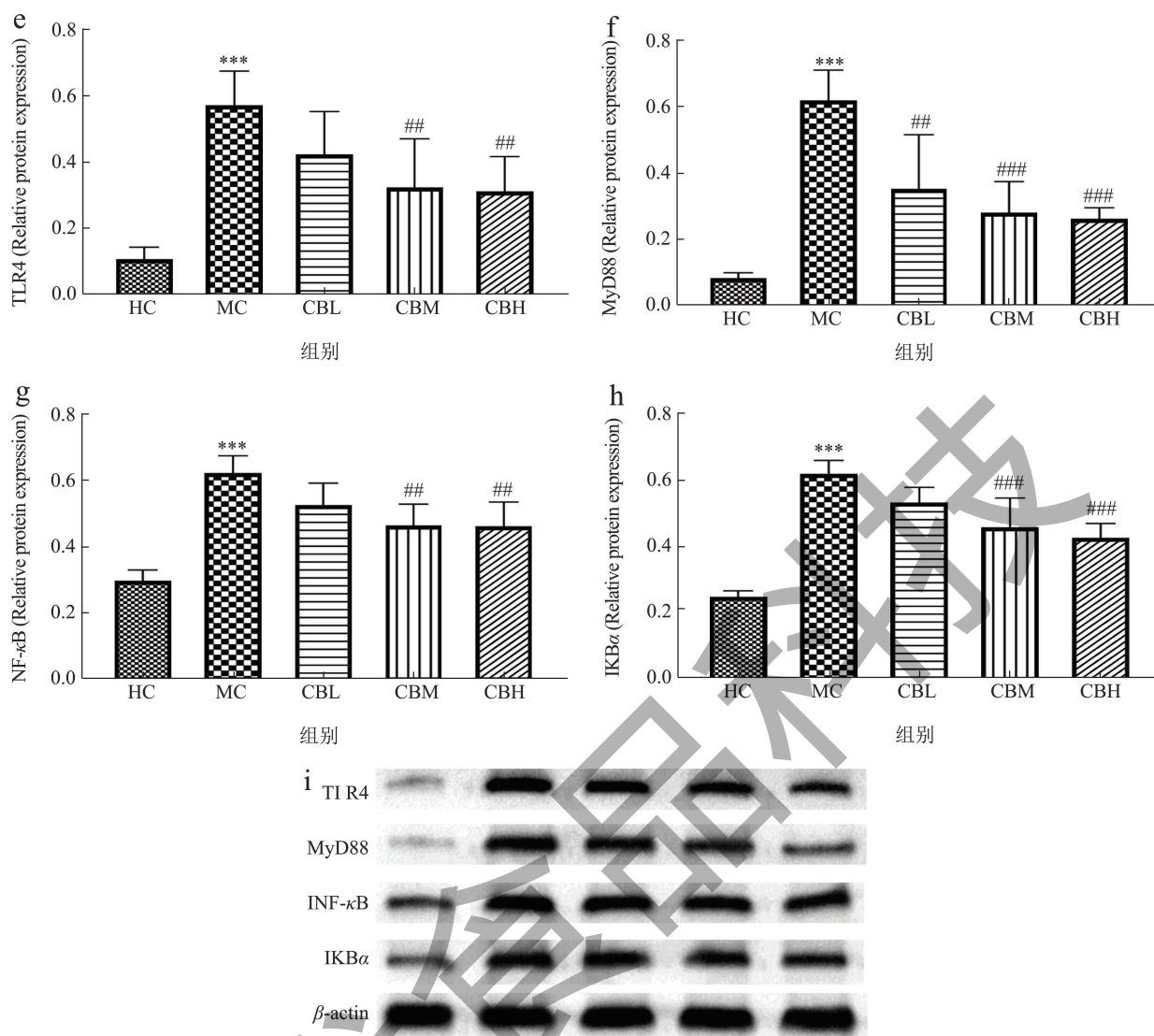


图8 大鼠肝脏 TLR4/MyD88/NF-κB/IkBα 炎症信号通路表达水平

Fig.8 Expression levels of TLR4/MyD88/NF-κB/IkBα inflammatory signalling pathway in rat liver

2.9 CB干预对TLR4/MyD88/NF-κB/IkBα炎症通路基因和蛋白表达的影响

TLR4 信号传导与 MyD88 连接蛋白结合，激活 Kupffer 细胞，进而激活 NF-κB 信号，释放内源性致炎因子 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 等，最终诱导肝细胞坏死和凋亡，NF-κB 通常以非活性形式存在于细胞质中，可与 IKBα 相互作用，IKBα 的表达是 NF-κB 活化的重要步骤，也是导致炎症应激反应发生的重要信号通路^[7]。测定 TLR4/MyD88/NF-κB/IkBα 信号通路基因与蛋白表达水平，揭示 CB 减缓肝脏炎症效益，如图 8a~8d 所示，酒精造成了大鼠 TLR4/MyD88/NF-κB/IkBα 炎症通路的基因表达出现极显著的增加 ($P < 0.001$)，CB 的干预显著的降低了通路基因表达水平，本实验通过蛋白免疫印迹技术检测通路的蛋白表达水平，如图 8e~8i 所示，

通路蛋白表达情况与其基因表达情况表现出一致性 ($P < 0.001$)。有报道表明胆汁酸是治疗炎症性疾病的良好药剂^[17]。这些结果说明 CB 可能是通过影响 TLR4/MyD88/NF-κB/IkBα 通路的基因和蛋白的表达来影响大鼠肝脏炎症应激。

3 结论

综上所述，CB 对大鼠急性酒精性肝损伤具有良好的保护作用，主要是通过提高大鼠的酒精代谢和脂质代谢，减缓肝脏的氧化应激，降低 TLR4/MyD88/NF-κB/IkBα 信号通路的基因和蛋白表达，减缓肝脏的炎症应激，从而发挥改善急性酒精性肝损伤的作用。这表明，CB 在酒精性肝损伤的治疗上展现出有益的效果。本研究可为以鸡胆汁为原料，开发具有显著解酒护肝功效的鸡胆酶转化物功能原

料及相关健康产品的开发提供理论基础。

参考文献

- [1] 李会芳,郎霞,程生辉,等.山西毛建茶水提物解酒保肝作用研究[J].食品工业科技,2022,43(10):372-377.
- [2] GAO B, AHMAD M F, NAGY L E, et al. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis [J]. *Journal of Hepatology*, 2019, 70(2): 249-259.
- [3] 韩敏,易旭,游绍伟.酒精性脂肪肝小鼠肝组织蛋白表达谱检测及白藜芦醇干预作用机制的探讨[J].中国比较医学杂志,2023,33(1):16-25.
- [4] PAUL B, LEWINSKA M, ANDERSEN J B. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer [J]. *Jhep Reports*, 2022, 4(6): 100479
- [5] CICHOSZ L H, MICHALAK A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(25): 8082-8091.
- [6] LOUVET A, MATHURIN P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(4): 231-242.
- [7] LIU Z N, WU X, FANG Q, et al. CD73 attenuates alcohol-induced liver injury and inflammation via blocking TLR4/MyD88/NF-kappa B signaling pathway [J]. *Journal of Inflammation Research*, 2022, 15: 53-70.
- [8] 韩春元,姚建楠,张琳璐,等.我国肉鸡加工业的现状与发展建议[J].家禽科学,2022,7:64-70.
- [9] TANCHAROENRAT P, ZAEFARIAN F, RAVINDRAN V. Composition of chicken gallbladder bile [J]. *British Poultry Science*, 2022, 63(4): 548-551.
- [10] 臧臻臻.鸡胆汁中鹅去氧胆酸的提取及熊去氧胆酸合成[D].天津:天津科技大学,2017.
- [11] 陆有飞,谢江,谢燕妮.鸡胆汁的成分及药理作用研究进展[J].广西农学报,2022,37(4):32-35,40.
- [12] 陈达鑫.不同动物胆汁的成分差异分析及对非酒精性脂肪肝的作用研究[D].福州:福建中医药大学,2017.
- [13] JI Q Z, WANG B C, LI C, et al. Co-immobilised 7 alpha- and 7 beta-HSDH as recyclable biocatalyst: high-performance production of TUDCA from waste chicken bile [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(60): 34192-34201.
- [14] 邱科先,张和平,邓玉兰,等.一种发酵鸡胆酶转化物及其制备方法和应用:中国,202310949370.9[P].22023-07-31.
- [15] ZANGEROLAMO L, VETTORAZZI J F, ROSA L, et al. The bile acid TUDCA and neurodegenerative disorders: An overview [J]. *Life Sciences*, 2021, 272(1): 119252.
- [16] SETCHELL K D, RODRIGUES C M, PODDA M, et al. Metabolism of orally administered tauroursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Gut*, 1996, 38(3): 439-446.
- [17] JOHN Y L, JESSICA M F, Bile acids as metabolic regulators and nutrient sensors [J]. *Annual Review of Nutrition*, 2019, 39: 175-200.
- [18] 黄俊源,袁晚晴,苏艺,等.酶解糖化滇黄精多糖的结构表征及其免疫活性[J].现代食品科技,2024,40(4):104-112.
- [19] 彭东,赖玉健,田东昕,等.黄鱼鱼鳔肽分离及其诱导前列腺癌DU-145细胞凋亡的机制[J].中国食品学报,2023, 23(2):72-82.
- [20] 王杰,熊爱珍,程绒绒,等.不同来源引流熊胆粉的化学成分系统分析[J].中国中药杂志,2018,43(11):2326-2332.
- [21] OSNA N A, DONOHUE T M, KHARBANDA K K, et al. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management [J]. *Alcohol Research: Current Reviews*, 2017, 38(2): 147-161.
- [22] CHEN X, ZHANG Z, CUI B, et al. Combination of chronic alcohol consumption and high-salt intake elicits gut microbial alterations and liver steatosis in mice [J]. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 2020, 68(6): 1750-1759.
- [23] 朱诗雅.具有缓解慢性酒精性肝损伤功能的乳杆菌筛选与功效评价[D].无锡:江南大学,2020.
- [24] BERTOLA A, MATHEWS S, KI S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(3): 627-637.
- [25] JO S L, BAEK J, KO J W, et al. Hepatic progesterone receptor membrane component 1 attenuates ethanol-induced liver injury by reducing acetaldehyde production and oxidative stress [J]. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2023, 324(6): G442-G451.
- [26] ZHAO W J, PENG D, LI W J, et al. Probiotic-fermented *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi alleviates alcoholic liver injury by enhancing antioxidant defense and modulating gut microbiota [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(15): 6877-6888.
- [27] GUO W L, XIANG Q R, MAO B Y, et al. Protective effects of microbiome-derived Inosine on lipopolysaccharide-induced acute liver damage and inflammation in mice via mediating the TLR4/NF-kappa B pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(27): 7619-7628.
- [28] HARTMANN P, HOCHRATH K, HORVATH A, et al. Modulation of the intestinal bile acid/farnesoid X receptor/fibroblast growth factor 15 axis improves alcoholic liver

- disease in mice [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2150-2166.
- [29] 金璨, 邓颖, 曹楠, 等. 茶多酚对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病预防作用的研究进展 [J]. *食品科学*, 2023, 44(7): 295-302.
- [30] LI T G, CHIANG J Y L. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy [J]. *Pharmacological Reviews*, 2014, 66(4): 948-983.
- [31] YIN P, XIE S, ZHUANG Z, et al. Dietary supplementation of bile acid attenuate adverse effects of high-fat diet on growth performance, antioxidant ability, lipid accumulation and intestinal health in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735864
- [32] BALA S S, PETRASEK J, MUNDKUR S, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases [J]. *Hepatology*, 2012, 56(5): 1946-1957.
- [33] TU W J, WANG H, LI S, et al. The Anti-Inflammatory and anti-Oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases [J]. *Aging and Disease*, 2019, 10(3): 637-651.