

蓝莓及蓝莓联合益生菌对酒精性脂肪性肝病的保护作用*

沈艳艳, 任婷婷**

(贵州医科大学 医学检验学院 临床生物化学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 分析蓝莓及蓝莓联合益生菌对酒精性脂肪性肝病(AFLD)肝损伤的保护作用及机制。方法: 58 只 C57BL/6J 小鼠分为正常对照组(CG 组)、模型组(MG 组)、蓝莓干预组(BJ 组)、蓝莓联合益生菌干预组(BJB 组)、SIRT1 siRNA 阻断组(SI 组)、蓝莓 + SIRT1 阻断组(BJSI 组)及蓝莓联合益生菌 + SIRT1 阻断组(BJBSI 组),MG 组为 10 只、其余每组 8 只;除 CG 组外,其余 6 组喂饲利伯 DeCarli 82 饲料复制 AFLD 模型(所有小鼠均于造模成功后改喂普通饲料),喂饲造模饲料前 7 d BJ 组、BJB 组小鼠分别进行蓝莓、蓝莓联合益生菌预防灌胃;SI 组造模成功后,给予慢病毒质粒包装 SIRT1 siRNA 腹部肝区注射;BJSI 组、BJBSI 组小鼠造模成功后,分别进行蓝莓、蓝莓联合益生菌干预,同时慢病毒质粒包装 SIRT1 siRNA 腹部肝区注射;造模喂饲 12 周时,采用病理学方法确认造模情况,造模成功后 10 d 时各组小鼠眼眶取血、颈椎脱臼处死后取肝组织,采用病理学方法观察各组小鼠肝组织学改变,生化方法检测血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)水平,ELISA 法检测小鼠肝组织丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)水平及沉默信息调节因子 1(SIRT1)蛋白表达水平。结果: 病理检测结果显示,HE 染色见 MG 组有重度脂肪变性、大小不等的脂滴弥漫沉积在胞浆,油红染色呈现染成红色的脂滴大量沉积,呈重度脂肪肝变,提示造模成功;CG 组、BJ 组、BJB 组肝组织脂质沉积较 MG 组、SI 组、BJSI 组及 BJBSI 组肝组织明显减少,肝损害程度减轻;BJ 组、BJB 组血清 TG、TC、LDL-c、MDA、ALT 及 AST 较 MG 组、SI 组、BJSI 组和 BJBSI 组降低, HDL-c、SOD、GSH 和 SIRT1 蛋白水平较 MG 组、SI 组、BJSI 组和 BJBSI 组升高($P < 0.05$),且 BJB 组变化大于 BJ 组、BJBSI 组变化小于 BJSI 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 蓝莓及蓝莓联合益生菌具有抗氧化活性,能拮抗酒精诱导的脂代谢紊乱和脂质过氧化,减轻氧化应激,从而减轻 AFLD 肝损伤,其机制可能与上调小鼠肝脏 SIRT1 的表达有关。

[关键词] 蓝莓; 益生菌; 酒精性脂肪性肝病; 氧化应激; 脂质过氧化; 沉默信息因子 1

[中图分类号] R575. 5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)11-1241-06

DOI:10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2018. 11. 001

Effects of Dietary Blueberry and Blueberry Combined with Probiotics on Alcoholic Fatty Liver Disease

SHEN Yanyan, REN Tingting

(Department of Clinical Biochemistry, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the protective effects and possible pathogenesis of dietary blueberry and blueberry combined with probiotics on alcoholic fatty liver disease (AFLD). **Methods:** 58 C57BL/6J rats were divided into normal control group (CG group), model group (MG group), blueberry juice group (BJ group), blueberry juice combined probiotics group (BJB group), SIRT1 siRNA blocking group (SI group). Blueberry juice + SIRT1 blocking group (BJSI group) and blueberry juice combined probiotics + SIRT1 blocking group (BJBSI group). There were 10 rats in MG group and 8 rats in

*[基金项目] 国家自然科学基金地区基金资助项目(81560100)

** 通信作者 E-mail: 710193651@qq. com

网络出版时间: 2018-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181115.2126.001.html>

each other groups. In addition to the CG group, the other 6 groups were fed DeCarli 82 diet to make AFLD model (all rats were fed normal diet after the model was successfully made). the BJ group and BJB group were fed with blueberry and blueberry plus probiotics respectively 7 days before the model was made. After successful modeling, rats in the BJSI group and BJBSI group were treated with blueberry and blueberry combined with probiotics respectively, and LV-mediated SIRT1 siRNA was injected into abdominal liver of rats in the two groups. After 12 weeks of feeding, the success of modeling was confirmed by pathological methods. The blood was taken from the eye frame of each group 10 days after the model was made, and the liver tissue was taken after death caused by cervical vertebrae dislocation. The histological changes of the liver in each group were observed by pathological method. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) were determined by biochemical method. Malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels, superoxide dismutase (SOD) levels and expressions of silent information regulator 1 (SIRT1) were tested by ELISA. **Results:** Pathological examination indicated that HE staining showed severe steatosis and diffusion and deposit of lipid droplets of varying sizes in the cytoplasm in MG group; oil red staining showed a large amount of deposition of fat droplets dyed red and severe fatty liver degeneration, which demonstrated that the model was successfully established. The lipid accumulation were significantly lower and the degree of liver damage were reduced in CG, BJ and BJB groups than that in MG, SI, BJSI and BJBSI groups. Serum TG, TC, LDL-c, MDA, ALT and AST in BJ group and BJB group were lower than those in MG group, SI group, BJSI group and BJBSI group, but HDL-c, SOD, GSH and SIRT1 protein were higher than those in MG group, SI group, BJSI group and BJBSI group ($P < 0.05$). The change of BJB group was greater than that of BJ group, and the change of BJBSI group was smaller than that of BJSI group; the differences were statically significant ($P < 0.05$). **Conclusions:** Blueberry and blueberry combined probiotics have antioxidant activity, can antagonize lipid metabolism disorder and lipid peroxidation induced by alcohol, alleviate oxidative stress, and reduce AFLD liver injury. The pathogenesis may be related to up-regulation of SIRT1 expression in rats' livers.

[**Key words**] blueberry; probiotics; alcoholic fatty liver disease; oxidativestress; lipid peroxidation; silent information regulator 1

酒精性脂肪性肝病 (alcoholic fatty liver disease, AFLD) 是肝组织中脂肪蓄积过多的一种可逆性病变, 早期防治可恢复正常^[1-2]。乙醇在肝脏中被分解为乙醛, 乙醛进一步被分解为乙酸, 其代谢过程中肝细胞内产生过多的活性氧 (ROS) 和氧自由基, 当 ROS 和氧自由基超过肝脏对抗氧化因子的清除能力时, 将导致肝细胞的脂质过氧化、肝细胞线粒体功能紊乱、细胞脂肪变性, 进而发展为 AFLD^[3]。酒精性肝病 (Alcoholic Liver Disease, ALD) 包括单纯性脂肪肝、酒精性脂肪性肝炎、进行性纤维化及肝硬化, 最终可能发展为肝细胞癌^[4]。随着人民生活水平的提高和酒精消耗的增加, ALD 的发病率和死亡率在世界范围内越来越高^[5]。目前, AFLD 缺乏特效药物和治疗方案^[1,6], 因此, 寻求一种无毒副作用的天然食疗方式, 早期介入防

治, 阻断 AFLD 的发生、发展具有重大意义。蓝莓富含花青素, 具有明确的抗氧化活性, 被称为果蔬中“头号抗氧化剂”^[7-9]。有研究表明益生菌对脂肪肝疗效明确^[10-11], 其主要机制为改善 AFLD 患者肠道屏障功能, 减少对毒素的吸收, 并且益生菌能增强蓝莓的抗氧化活性, 而蓝莓又为这一类益生菌生长提供环境^[12-13], 由此推测蓝莓的抗氧化活性及益生菌对肝脏损伤均有保护作用, 二者联合还可能具有协同作用, 可提高对 AFLD 的防治效果。因此, 本课题拟以动物体内实验的方式, 通过病理学检测证实 AFLD 模型建立情况, 观察蓝莓、蓝莓联合益生菌干预对 AFLD 小鼠肝组织的影响, 同时检测小鼠血清肝损伤生化指标和脂代谢指标, 分析蓝莓联合益生菌对 AFLD 肝损伤的保护作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要材料与仪器

清洁级 C57BL/6J 小鼠 58 只,雌性,6~8 周龄,体质量 15~18 g [合格证号 SCXK-(黔)2012-0001]。主要材料有利伯 DeCarli 82 对照组饲料(F1259SP)、利伯 DeCarli 82 损伤饲料(F1258SP)、内蒙古双奇药业股份有限公司生产的“金双歧片”(含双歧杆菌、乳酸菌,购自一树药业)、蓝莓(兔眼园兰品种,-20℃冻存,临用时解冻提取原浆)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒、总胆固醇(TC)测定试剂盒、甘油三脂(TG)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(均购自上海科华公司),还原型谷胱甘肽(GSH)酶联免疫分析测定试剂盒、丙二醛(MDA)酶联免疫分析测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)酶联免疫分析测定试剂盒(均购自美国 TSZ 公司)。主要仪器有高速低温离心机(sigma),MSS 全波长酶标仪 ELX808(Bio-Tec),显微镜图像采集系统 Olympus BX41(OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 合成慢病毒质粒包装沉默信息调节因子 1(SIRT1) siRNA 从 SIRT1 起始密码 AUG 开始,以“AA 或者 NA”二连序列下端 3 端的 19 个碱基序列作为 siRNA 设计的潜在靶位点。双链均采用此序列(不含 AA 及 NA 重复)设计。控制 GC 含量为 30%~60%。使用 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)将挑选的序列在公共数据库中进行比较,避免同源性。涉及合成 4 个靶序列的 siRNA,并挑选确定封闭效应最好的序列(GCAGGTTG-CAGGAATCCAAAG),采用载体类型为 LV3(H1/GFP&Puro),采用慢病毒质粒包装,由吉玛技术公司完成。

1.2.2 动物模型制备及分组 将 58 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 7 组:正常对照组(CG 组,8 只)、模型组(MG 组,10 只)、蓝莓干预组(BJ 组,8 只)、蓝莓联合益生菌干预组(BJB 组,8 只)、SIRT1 siRNA 阻断组(SI 组,8 只)、蓝莓 + SIRT1 阻断组(BJSI 组,8 只)及蓝莓联合益生菌 + SIRT1 阻断组(BJB-SI 组,8 只);除 CG 组采用利伯 DeCarli 82 控制饲料(F1259SP)外,其余 6 组均喂饲利伯 DeCarli

82 饲料复制 AFLD 模型^[14],喂饲造模饲料前 7 d BJ 组、BJB 组小鼠分别进行蓝莓(蓝莓原浆为 1.5 mL/100 g,课题组前期摸索出的最佳浓度,1 次/d)、蓝莓联合益生菌(参照文献^[15]给予蓝莓益生菌 1.5 mL 混合液/100 g 体质量,益生菌含量为 10^{11} CFU/L 蓝莓原浆,1 次/d)预防灌胃;SI 组造模成功后,给予慢病毒质粒包装 SIRT1 siRNA 腹部肝区注射(1×10^8 病毒滴度/次,2 次/d);BJSI 组、BJBSI 组小鼠造模成功后,分别进行蓝莓、蓝莓联合益生菌干预(方案同前)同时慢病毒质粒包装 siRNA 腹部肝区注射(方案同前),48 h 取肝脏 ELISA 定量检测 SIRT1,确定封闭效果。MG 组喂饲利伯 DeCarli 82 饲料 12 周时,取 2 只小鼠行病理切片鉴定造模情况,确定造模成功后所有动物都改为普通饲料。

1.2.3 样本采集 所有小鼠均于造模成功后第 10 天采样,采样前 1 d,小鼠禁食 24 h,不控制饮水,采样当日,麻醉状态下摘除小鼠眼球摘取血后脱颈处死;取合适体积、同一部位肝组织,采用甲醛(浓度为 4%)浸泡,病理切片,HE 染色及油红染色进行肝组织病理学检查,其余部分肝脏置于 -80℃低温冰箱保存。

1.2.4 检测指标 (1)肝组织病理学检查:采用 HE 染色及油红染色,光镜下观察肝组织学形态。(2)血清部分肝功能及脂代谢指标:采用全自动生化分析仪检测 ALT 及 AST、TG、TC、LDL-c 及 HDL-c 水平。(3)肝组织:采用 ELISA 定量法,检测肝组织 MDA、GSH、SOD 水平及 SIRT1 蛋白水平。

1.3 统计学方法

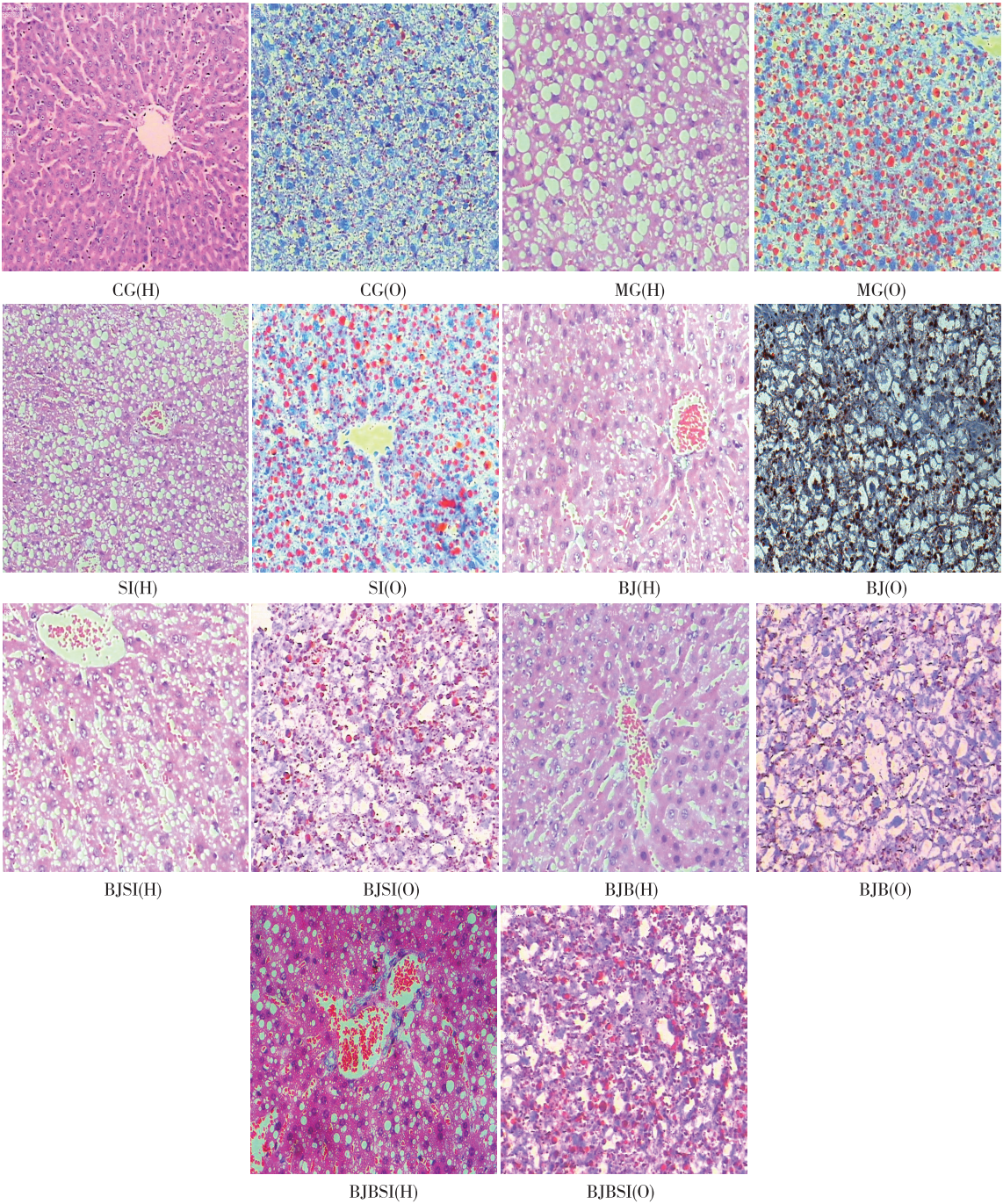
数据应用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏组织学

HE 染色可见 MG 组有重度脂肪变性、大小不等的脂滴弥漫沉积在胞浆,油红染色呈现染成红色的脂滴大量沉积、呈重度脂肪肝变,提示造模成功;CG 组、BJ 组、BJB 组 HE 染色肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝索排列整齐;SI 组肝组织损伤及脂质沉积表现严重,CG 组、BJ 组、BJB 组肝组

织脂质沉积较 MG 组、SI 组、BJSI 组及 BJBSI 组肝组织明显减少,肝损害程度减轻;沉默 SIRT1 后, BJSI 组及 BJBSI 组肝组织有较多脂质沉积,出现中度脂肪肝变(见图 1)。



注:H 为 HE 染色,O 为油红染色
图 1 各组小鼠肝脏组织 HE 及油红染色 (×200)

Fig. 1 HE and oil red staining in liver tissue of rats in each group

2.2 脂代谢指标

BJ 组、BJB 组 TG、TC、LDL-c、MDA 水平较 MG 组、SI 组、BJSI 组降低, HDL-c 较 MG 组、SI 组、BJSI 组增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$); BJB 组与 BJ 组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。采

用阻断剂封闭 SIRT1 后, SI 组与 MG 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$), BJSI 组与 BJ 组检测结果比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$), BJBSI 组变化小于 BJSI 组,结果比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 蓝莓及蓝莓联合益生菌干预对 AFLD 小鼠脂代谢指标的影响
Tab.1 Changes of lipid metabolism indexes in rats of each group

组别	TG (nmol/L)	TC (nmol/L)	HDL-c (nmol/L)	LDL-c (nmol/L)	MDA (mmol/L)
CG	0.73 ± 0.25	1.97 ± 0.57	1.42 ± 0.22	0.89 ± 0.34	0.676 ± 0.332
MG	1.78 ± 0.19 ⁽¹⁾	3.39 ± 0.68 ⁽¹⁾	0.77 ± 0.30 ⁽¹⁾	1.45 ± 0.33 ⁽¹⁾	1.556 ± 0.276 ⁽¹⁾
SI	1.82 ± 0.32 ⁽¹⁾	3.25 ± 0.64 ⁽¹⁾	0.79 ± 0.44 ⁽¹⁾	1.57 ± 0.52 ⁽¹⁾	1.532 ± 0.394 ⁽¹⁾
BJ	0.86 ± 0.37 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	2.18 ± 0.31 ⁽²⁾⁽³⁾	1.07 ± 0.43 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	1.03 ± 0.18 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	0.783 ± 0.403 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
BJSI	1.88 ± 0.28 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	3.56 ± 0.55 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	0.80 ± 0.28 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	1.33 ± 0.36 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	1.474 ± 0.472 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
BJB	0.77 ± 0.23 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	1.88 ± 0.44 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	1.23 ± 0.24 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	0.86 ± 0.23 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	0.525 ± 0.367 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾
BJBSI	1.63 ± 0.14 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	2.93 ± 0.68 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	0.92 ± 0.30 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	1.26 ± 0.28 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	1.104 ± 0.325 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

⁽¹⁾与 CG 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 MG 组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与 SI 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾与 BJ 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁵⁾与 BJSI 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁶⁾与 BJB 组比较, $P < 0.05$

2.3 肝功能及肝脏组织抗氧化酶活性

与 MG 组、SI 组、BJSI 组比较, BJ 组、BJB 组 ALT 及 AST 水平降低, SOD 及 GSH 水平增高 ($P < 0.05$), BJB 组变化大于 BJ 组 ($P < 0.05$)。采用阻

断剂封闭 SIRT1 后, SI 组与 MG 组检测结果比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); BJSI 组变化小于 BJ 组、BJBSI 组变化小于 BJSI 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 蓝莓及蓝莓联合益生菌干预对 AFLD 小鼠肝功能及抗氧化酶的影响
Tab.2 Effects of blueberry and blueberry combined with probiotics intervention
on liver functions and antioxidase in rats with AFLD

组别	SOD (U/mL)	GSH (ng/L)	ALT (U/mL)	AST (U/mL)
CG	27.42 ± 4.08	22.415 ± 2.152	57.37 ± 11.68	98.34 ± 25.47
MG	14.26 ± 5.26 ⁽¹⁾	14.325 ± 1.794 ⁽¹⁾	99.84 ± 10.48 ⁽¹⁾	326.24 ± 35.26 ⁽¹⁾
SI	16.21 ± 3.17 ⁽¹⁾⁽²⁾	14.320 ± 1.663 ⁽¹⁾⁽²⁾	106.21 ± 5.17 ⁽¹⁾⁽²⁾	346.32 ± 32.79 ⁽¹⁾⁽²⁾
BJ	25.67 ± 4.84 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	20.362 ± 1.773 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	72.41 ± 12.58 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	126.49 ± 22.21 ⁽²⁾⁽³⁾
BJSI	18.31 ± 4.36 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	13.432 ± 1.586 ⁽¹⁾⁽⁴⁾	104.25 ± 14.48 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	308.24 ± 35.26 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
BJB	29.79 ± 5.79 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	24.278 ± 2.667 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	67.37 ± 8.53 ⁽²⁾⁽³⁾⁽¹⁾⁽⁵⁾	107.63 ± 34.2 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁵⁾
BJBSI	21.26 ± 5.26 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	16.356 ± 1.666 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	86.58 ± 7.4 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾	148.66 ± 28.66 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

⁽¹⁾与 CG 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 MG 组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与 SI 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾与 BJ 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁵⁾与 BJSI 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁶⁾与 BJB 组比较, $P < 0.05$

2.4 SIRT1 蛋白水平

与 MG 组比较, BJ 组、BJB 组 SIRT1 表达显著增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MG 组、SI 组、BJBSI 组和 BJSI 组 SIRT1 表达水平较 CG 组、BJ 组、BJB 组显著减弱, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); SI 组、BJBSI 组和 BJSI 组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 siRNA 封闭后, SIRT1 表达明显减弱。见表 3。

表 3 蓝莓及蓝莓联合益生菌干预对 AFLD 小鼠肝组织 SIRT1 蛋白水平的影响

Tab.3 Effects of blueberry and blueberry combined with probiotics intervention on protein levels of SIRT1 in livers of rats with AFLD

组别	SIRT1 (ng/L)
CG	87.56 ± 9.33
MG	21.22 ± 2.78 ⁽¹⁾
SI	18.54 ± 2.54 ⁽¹⁾⁽²⁾
BJ	80.36 ± 11.36 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
BJSI	15.58 ± 1.57 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾
BJB	84.21 ± 8.63 ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
BJBSI	17.74 ± 2.46 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁶⁾

⁽¹⁾与 CG 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 MG 组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与 SI 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾与 BJ 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁵⁾与 BJSI 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁶⁾与 BJB 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

饮酒后酒精诱产生活性氧物质, 从而导致氧化应激物质和脂肪在肝脏中堆累^[16], 进而形成脂肪肝。本研究发现, BJ 组及 BJB 组小鼠肝组织 HE 染色和油红染色中肝细胞脂滴沉积明显少于 MG 组, 血清 ALT、AST、TG、TC、LDL-c 水平明显低于

MG 组、HDL-c 明显高于 MG 组 ($P < 0.05$), 提示蓝莓、蓝莓联合益生菌能减轻肝细胞脂肪变性, 拮抗脂代谢紊乱及肝脏损伤。同时, BJ 组及 BJB 组小鼠肝组织 MDA 含量明显低于 MG 组, 而抗氧化酶指标 SOD 和 GSH 明显高于 MG 组 ($P < 0.05$), 提示蓝莓及蓝莓联合益生菌能增强机体的抗氧化能力, 减轻氧化应激及肝脏损伤, 从而改善肝功能。

本研究结果显示 BJ 组和 BJB 组 SIRT1 蛋白水平明显高于 MG 组 ($P < 0.05$), 提示蓝莓、蓝莓联合益生菌拮抗酒精引起脂肪肝的机制可能与上调 SIRT1 蛋白的表达、进而提高机体的抗氧化能力有关。SIRT1 是一种脱乙酰基酶, 其强大的脱乙酰基活性依赖 NAD^+ 而作用于组蛋白及其他众多底物, 参与众多细胞过程, 其表达和活性受 NAD^+ 与 NADH 比例的调节^[17-18]。而蓝莓的抗氧化活性可以抑制氧化损伤所致的 NAD^+ 与 NADH 比例的降低^[19], 此外, 蓝莓含有的多酚类物质白藜芦醇, 能显著增加 SIRT1 的表达^[20]。由此可见, SIRT1 一方面与 AFLD 发病机制密切相关, 另一方面受到蓝莓抗氧化活性及所含成份的调控, SIRT1 如同“桥梁”连接起了蓝莓对 AFLD 肝损伤的保护作用。为证实蓝莓及蓝莓联合益生菌是否主要通过影响 SIRT1 进而调节肝脏抗氧化体系, 拮抗脂代谢紊乱及肝损伤, 本研究采用 siRNA 沉默 SIRT1 基因, 结果显示, 采用 siRNA 沉默 SIRT1 基因后, 蓝莓及蓝莓联合益生菌对于 AFLD 肝损伤、脂代谢紊乱的调节作用减弱; 同时, SI 组、BJSI 组和 BJBSI 组 SOD、GSH、MDA 的检测结果均与 MG 组相当, 提示 SIRT1 可能为蓝莓及蓝莓联合益生菌影响 AFLD 的关键作用因子。BJSI 组比较 BJ 组也有显著差异, 证实 SIRT1 通路为蓝莓影响脂肪肝的主要通路。且 BJ 与 BJB 组间比较, 差异具有统计学意义, 说明蓝莓联合益生菌干预对肝损伤的保护作用优于单独应用蓝莓。而 BJBSI 组与 BJSI 组比较也有一定差异, 说明在 SIRT1 通路被阻断后, 联合干预对 AFLD 肝损伤依然有保护作用, 但效果显著低于未阻断组 (即 BJB 组), 推测益生菌可能经其他途径影响 AFLD。

综上所述, 蓝莓及蓝莓联合益生菌均能对 AFLD 肝损伤具有保护作用, 并调节 AFLD 脂代谢紊乱, 且联合应用的拮抗效果更明显。蓝莓及蓝莓联合益生菌的抗氧化活性及蓝莓所含活性成分可以通过提高 SIRT1 水平进而提高肝细胞抗氧化酶系的活性, 有效地清除氧自由基, 减少毒性物质

的生成, 有效地阻止脂质过氧化, 从而减轻 AFLD 肝损伤, 调节脂代谢紊乱, 且益生菌可能通过其他途径影响 AFLD。

4 参考文献

- [1] HE Q, DIAO Y, ZHAO T T, et al. SREBP1c mediates the effect of acetaldehyde on Cidea expression in Alcoholic fatty liver Mice[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):1200.
- [2] CHEN H Q, SHEN F, SHERBAN A, et al. DEP domain-containing mTOR-interacting protein suppresses lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis and acute-on-chronic liver injury in alcoholic liver disease [J]. Hepatology, 2018, 68(2):496-514.
- [3] LIU J. Ethanol and liver: Recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver[J]. World J Gastroenterol, 2014(40):14672-14685.
- [4] SINGH S, OSNA N A, KHARBANDA K K. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(36):6549-6570.
- [5] SHEN F, WANG Z H, LIU W, et al. Ethyl pyruvate can alleviate alcoholic liver disease through inhibiting Nrf2 signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5):4223-4228.
- [6] ZHANG X X, WANG H, YIN P P, et al. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1):44.
- [7] CUTLER B R, PETERSEN C, ANANDH BABU P V. Mechanistic insights into the vascular effects of blueberries: Evidence from recent studies [J]. Mol Nutr Food Res, 2017, 61(6):Article 1600271.
- [8] KIM M, NA H, KASAI H, et al. Comparison of Blueberry (*Vaccinium* spp.) and Vitamin C via Antioxidative and Epigenetic Effects in Human [J]. J Cancer Prev, 2017, 22(3):174-181.
- [9] SUNG H, KIM S W, HONG M, et al. Microbiota-based treatments in alcoholic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(29):6673-6682.
- [10] HONG M, HAN D H, HONG J, et al. Are Probiotics Effective in Targeting Alcoholic Liver Diseases [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2018, 12602:1-13.
- [11] BRANNING C, HAKANSSON A, AHRNE S, et al. Blueberry husks and multi-strain probiotics affect colonic fermentation in rats [J]. Br J Nutr, 2009, 101(6):859-870.