

杜仲叶多糖对慢性酒精性肝损伤小鼠的保护作用

冷雪萍, 高家铭, 梅志婷, 孙佳丽, 罗一鸣, 牛金娥, 周晶晶, 黄丹菲*
(南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西南大创院食品科技有限公司, 江西南昌 330047)

摘要: 为了探讨杜仲叶多糖 (EULP) 对慢性酒精性肝损伤小鼠的保护作用, 该研究以 56% vol 北京红星二锅头灌胃 9 周建立小鼠慢性酒精中毒模型, 并在建模后期给予 EULP 干预 3 周。采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察小鼠肝脏、回肠组织形态, 并测定肝脏组织白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的含量。采集小鼠粪便进行肠道菌群测序, 利用液相色谱-质谱 (LC-MS) 技术开展血清非靶代谢组学。体外结果表明, EULP 质量浓度为 1.6 mg/mL 时, 对 DPPH、 $\cdot$ OH 及 ABTS $\cdot^+$ 的清除率分别约为 64.51%、80.15% 和 93.92%。动物实验表明, 与模型组相比, EULP 中、高剂量组肝脏中 IL-1 β 表达水平显著降低约 34.87%、39.93%, 且能有效改善小鼠肝脏、肠道组织损伤程度。中剂量 EULP 干预后变形菌门和脱铁杆菌门丰度相比于模型组提高约 112.48%、175.07%。代谢组学筛选出 5 个潜在血清生物标志物, 并揭示 EULP 通过调控花生四烯酸代谢通路缓解肝脏损伤。综上, EULP 可以调节肝损伤、炎症反应、肠道菌群及血清代谢, 展现出治疗慢性酒精性肝损伤的潜力, 为开发食源性多糖类解酒产品提供理论依据。

关键词: 杜仲叶多糖; 慢性酒精中毒; 酒精性肝损伤; 肠道菌群; 代谢组学
文章编号: 1673-9078(2025)10-1-12 **DOI:** 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.10.0498

Protective Effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. Leaf Polysaccharides in Mice with Chronic Alcoholic Liver Injury

LENG Xueping, GAO Jiaming, MEI Zhiting, SUN Jiali, LUO Yiming, NIU Jin'e, ZHOU Jingjing,
HUANG Danfei*

(State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Jiangxi NDU-Grandtech Food Technology Co. Ltd., Nanchang 330047, China)

Abstract: A chronic alcohol intoxication mouse model was established to determine the protective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf polysaccharides (EULP) against chronic alcoholic liver injury in mice. The model was established by intragastric administration of 56% vol Beijing Hongxing Erguotou for 9 weeks, with EULP intervention administered via gavage for the final three weeks of modeling. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes in liver and ileum tissues, and the content of interleukin-1 β (IL-1 β) in liver tissues was determined. Fecal samples were collected from the mice for gut microbiota sequencing; serum non-targeted metabolomics was performed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *In vitro* results indicated that when the mass concentration of EULP was 1.6 mg/mL, the scavenging rates for DPPH, $\cdot$ OH, and ABTS $\cdot^+$ were 64.51%, 80.15%, and 93.92%, respectively. In animal experiments, the expression level of IL-1 β in the liver of the medium- and high-dose EULP groups was reduced by 34.87% and 39.93%, respectively, relative to the control, and the extent

引文格式:
冷雪萍,高家铭,梅志婷,等.杜仲叶多糖对慢性酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J].现代食品科技,2025,41(10):1-12.

LENG Xueping, GAO Jiaming, MEI Zhiting, et al. Protective effect of *Eucommia ulmoides* oliv. leaf polysaccharides in mice with chronic alcoholic liver injury [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(10): 1-12.

收稿日期: 2025-02-09; 修回日期: 2025-04-29; 接受日期: 2025-05-06
基金项目: 江西省自然科学基金项目 (20232ACB215010); 国家自然科学基金项目 (32260563); 国家重点研发计划项目 (2023YFD2201304)
作者简介: 冷雪萍 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: lengxueping2105@163.com
通讯作者: 黄丹菲 (1983-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品及药食两用天然产物的活性成分研究, E-mail: huangdanfei@ncu.edu.cn

of injury in mouse liver and intestinal tissues was effectively improved. The abundances of Proteobacteria and Deferribacteres following medium-dose EULP intervention were increased by approximately 112.48% and 175.07%, respectively, compared to the model group. Five potential serum biomarkers were identified using metabolomics analysis, which indicated that liver injury was alleviated by EULP via regulation of the arachidonic acid metabolism pathway. Collectively, EULP was shown to regulate liver injury, inflammatory response, gut microbiota, and serum metabolism, demonstrating potential for the treatment of chronic alcoholic liver injury and providing a theoretical foundation for the development of food-derived, polysaccharide-based detoxification products.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf polysaccharides; chronic alcoholism; alcoholic liver injury; gut flora; metabolomics

酒精被世界卫生组织确定为造成全球疾病负担的十大风险因素之一。根据世界卫生组织最近的一份报告指出, 每年有 300 万人死于酒精相关疾病 (Alcohol-Related Diseases, ARD), 占死亡总人数的 5.3%^[1]。长期过量饮酒可导致酒精中毒, 酒精中毒与酒精性肝病^[2]高度相关。肠道微生物群生态失调是引起如肝病^[3]、胰腺炎^[4]、肺损伤^[5]和脑损伤^[6]等 ARD 的关键基础。

酒精对人体有极大的毒性作用, 目前急需预防和治疗酒精中毒的特效药。市场上预防和治疗酒精中毒的药物匮乏, 西药治疗范围单一且副作用大, 中药毒性小疗效佳, 因而天然活性多糖在治疗酒精中毒方面具有很大的发展潜力。植物多糖在天然多糖中占有重要的位置, 现已被充分证明具有多种有效的健康促进作用, 如抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗疲劳、免疫调节活性等^[7,8]。多项研究表明, 植物多糖可通过调节肠道稳态^[9], 进而调控血清代谢物与宿主的相互作用, 降低 ARD 相关病变的风险。

杜仲是一种杜仲属杜仲科的植物, 现已被列为我国二级保护野生植物^[10]。杜仲的干燥树皮是中医传统药材, 已有两千多年的药用历史, 具有补肝肾、强筋骨的作用^[11]。随着药用需求的不断增长, 人们发现杜仲叶与杜仲皮的功效成分基本相似^[12]。2023 年, 杜仲叶被列入国家药食两用资源名单。杜仲叶中多糖类成分是杜仲叶提取物中主要活性成分之一。多项研究已证明杜仲叶多糖 (*Eucommia ulmoides* Oliv. Leaves Polysaccharides, EULP) 主要的生物活性表现在: 抗氧化、抗补体、抗疲劳、降血糖、增强免疫和抗肿瘤^[12-15]。

本文以慢性酒精中毒模型小鼠的血清为研究对象, 开展代谢组学分析, 进一步整合肠道菌群 16S rRNA 测序数据与代谢组学结果, 探讨肠道菌群在 EULP 发挥生理调节作用中的潜在贡献, 为多糖功能性食品的研究与开发提供理论依据和方法支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇、乙腈、甲酸、L-2-氯苯丙氨酸, 西陇科学股份有限公司; 56% vol 红星二锅头, 北京红星股份有限公司; 联苯双酯滴丸, 北京协和药厂; 白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; 无水乙醇、1,1-二苯基-2-苦基肼 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazine, DPPH)、过氧化氢、水杨酸、硫酸亚铁、过硫酸钾、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic acid) Diammonium Salt, ABTS), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。杜仲叶多糖参照实验室前期方法制得, 该多糖分子质量为 18.6 ku, 多糖含量 75%, 蛋白质 1.64%。其单糖组成包括岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、半乳糖醛酸以及葡萄糖醛酸。

1.2 仪器与设备

Aperio LV1 高分辨率全视野扫描系统, 德国徕卡生物系统有限公司; 3K15 低温冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; Varioskan Flash 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; AL104 电子天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; KZ-II 高速组织研磨仪, 武汉赛维尔生物科技有限公司; Vanquish Flex 超高效液相色谱仪, 美国 Thermo Scientific 公司; Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪, 美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 EULP体外抗氧化活性测定

本实验以抗坏血酸为阳性对照, 评估 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/mL 质量浓度梯度的杜仲叶多糖对 DPPH $\cdot$ 、 $\cdot$ OH 和 ABTS $\cdot^+$ 自由基的清除能力。

向 96 孔板加入 100 μL 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液及 100 μL 不同质量浓度杜仲叶多糖溶液, 避光静置 30 min, 517 nm 检测吸光度, 计算清除率。

向 96 孔板中依次加入 50 μL 杜仲叶多糖溶液、1 mmol/L 硫酸亚铁溶液、1 mmol/L 水杨酸乙醇溶液及 1 mmol/L 过氧化氢溶液, 避光静置 30 min, 510 nm 检测吸光度, 计算清除率。

将 7.4 mmol/L ABTS 溶液与 2.5 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合, 避光条件下反应 12 h 得到 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 溶液, 用无水乙醇稀释至吸光值为 0.69~0.71 (734 nm); 将 100 μL $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 溶液与 100 μL 多糖溶液加入到 96 孔板中, 避光静置 6 min, 734 nm 检测吸光度, 计算清除率。

1.3.2 动物实验设计

实验动物: 48 只 4 周龄的 SPF 级雄性昆明小鼠, 质量为 24~32 g, 购于浙江维通利华实验动物技术有限公司桐乡分公司, 许可证号: SCXK(浙)2020-0002。所有动物均饲养于南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室符合标准的动物房中, 环境温度为 20~26 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 40%~60%, 明暗交替各 12 h。动物实验与操作经南昌大学动物实验伦理委员会批准 (伦理批准号: No.NCULAE-20250623002)。

动物造模: 将 48 只雄性昆明小鼠适应性喂养 1 周后, 随机选取 8 只作为空白对照组 (Control 组) 以 5 mL/kg·BW 生理盐水灌胃 9 周; 另外 40 只小鼠以 56% vol 北京红星二锅头白酒按每天 5 mL/kg·BW 剂量灌胃, 持续 9 周以建立慢性酒精中毒动物模型。9 周后, Control 组每天先灌胃 5 mL/kg·BW 生理盐水, 1 h 后再灌胃 5 mL/kg·BW 生理盐水, 持续 3 周; 将建模成功的 40 只小鼠随机分为 5 组 (8 只/组), 其中酒精模型组 (Model 组) 每天先灌胃 5 mL/kg·BW 生理盐水, 阳性药物组灌胃 150 mg/kg·BW 联苯双酯 (BP 组), 多糖组分别灌胃 100 mg/kg·BW (EULP-L 组)、200 mg/kg·BW (EULP-M 组)、400 mg/kg·BW (EULP-H 组) 三种不同浓度的杜仲叶多糖, 1 h 后各组均给予 5 mL/kg·BW 二锅头灌胃, 干预持续 3 周。

粪便的收集: 小鼠处死前一天收集粪便, 放入 2 mL 无菌离心管内, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 待后续实验使用。

血清样品的收集: 小鼠眼球取血, 采集后于室温条件下静置 1 h, 随后于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min, 离心 15 min, 得到的上清液即血清, 并在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存。

1.3.3 苏木精-伊红染色

选取小鼠回肠、肝脏组织损伤最严重部位, 切下约 10 mm $\times$ 2 mm 的片段。对片段经固定、脱水、透明

和包埋处理后制备切片, 苏木精和伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色后通过 Aperio LV1 数字病理扫描系统进行显微观察分析。

1.3.4 肝脏相关指标检测

称取 20 mg 肝脏组织, 加入 200 μL 裂解液, 机械匀浆 60 s, -20 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 4 h 后经 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 按试剂盒步骤检测 IL-1 β 表达水平。

1.3.5 粪便肠道菌群分析

采用 OMEGA Soil DNA Kit 试剂盒提取小鼠粪便 DNA, 扩增前经琼脂糖凝胶电泳及 TAE 检测 DNA 浓度和纯度。以引物 ACTCCTACGGGAGGCAGCA (V3-V4 区上游) 和 GGACTACHVGGGTWTCTAAT (下游) 进行 16S rRNA PCR 扩增。文库质控合格后, 通过 Illumina 平台 (上海派森诺生物科技有限公司) 完成双端测序^[16]。

1.3.6 血清代谢组学分析

1.3.6.1 血清前处理

精确移取 50 μL 血清, 加入 200 μL 预冷甲醇-乙腈 (1:1), 涡旋混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 30 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 12 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μL 上清液真空干燥, 复溶于 100 μL $\varphi=50\%$ 甲醇 (含 5 $\mu\text{g/L}$ 2-氯苯丙氨酸), 离心后经 0.22 μm 有机滤膜过滤。取 10~20 μL 各样品滤液等量混合制备质控 (Quality Control, QC) 样本, 用以考察分析系统的稳定性及检测结果的重复性。全过程于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下操作以保证稳定性。

1.3.6.2 液相色谱-质谱仪器条件

采用液相色谱-质谱 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 联用技术对小鼠血清样本进行非靶代谢组学检测分析。采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 $\text{\AA}$, 1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm) 进行分离, 流量为 0.4 mL/min, 柱温设置为 40 $^{\circ}\text{C}$, 自动进样器温度为 8 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 2 μL 。正负模式下, 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈, 洗脱梯度为: 0~1 min 保持 5% B, 1~7 min 线性升至 95% B 并维持至 8 min, 8.1 min 迅速降至 5% B 并保持至 12 min 结束。

Thermo Orbitrap Exploris 120 质谱仪在软件 Xcalibur (版本: 4.7, Thermo) 中进行正负离子 DDA 采集。使用 HESI 源, 喷雾电压 3.5 kV/-3.0 kV, 鞘气流量 12 L/min, 辅助气流量 4.5 L/min, 毛细管温度 325 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 一级分辨率 60 000 (m/z 100~1 000), AGC Target Standard, Max IT 100 ms, 筛选前 4 响应离子进行二级碎裂 (HCD 30%, 二级分辨率 15 000), 动态排除时间为 8 s, AGC Target

Standard, Max IT Auto。QC 样本正式进样前预进样 2~4 针平衡系统, 每 5~10 个样品穿插 QC 样本以监控数据稳定性。

1.3.6.3 代谢组学数据分析

质谱数据经 Proteowizard 转换为 mzXML 后, 通过 XCMS 程序进行特征峰提取、数据过滤及保留时间校正, 生成代谢物定量表; QC 样本经 LOESS 校正消除批次误差, 并过滤 RSD > 30% 的代谢物。代谢物注释整合 HMDB、KEGG 和 LipidMaps 数据库完成。利用 ggplot2 包绘制丰度图及小提琴图, Pheatmap 包分析样本-代谢物关联; Ropls 包构建多变量模型, 经置换检验 (R^2/Q^2) 筛选差异代谢物 ($P < 0.05$ 且 $VIP > 1$), 并通过热图、韦恩图、相关性分析及受试者工作特征曲线进行验证。最后基于 ClusterProfiler 包进行 KEGG 通路富集, 计算通路差异得分以揭示代谢通路的变化趋势。

1.3.7 数据分析

实验数据采用 GraphPad Prism 10.0 和 SPSS 26.0 软件进行统计学处理和图形可视化分析, 并采用单因素方差分析结合 Tukey 事后检验比较组间的差异性, 所有数据均以平均值和标准差表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 EULP的体外抗氧化活性

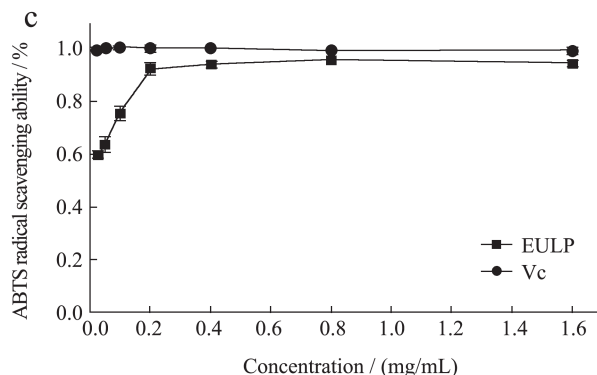
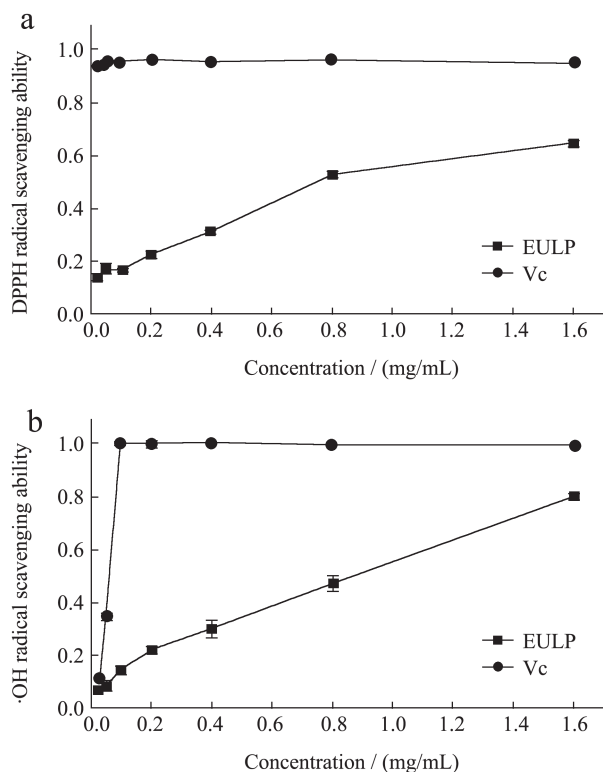


图 1 EULP 的体外抗氧化活性 ($n=3$)

Fig.1 *In vitro* antioxidant activity of EULP

由图 1 可知, 杜仲叶多糖质量浓度在 0.025~1.6 mg/mL 时, 均具有清除 DPPH、·OH 和 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基的能力, 且清除能力随浓度升高呈显著的剂量依赖效应。当杜仲叶多糖质量浓度为 1.6 mg/mL 时, 对 DPPH、·OH 及 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基的清除率分别约为 64.51%、80.15% 和 93.92%。Liu 等^[17]从杜仲叶中分离纯化得到三种不同分子量的多糖组分, 研究显示这 3 种组分均表现出较强的 DPPH 及 ·OH 自由基清除能力, 且其自由基清除能力与浓度呈现出显著的剂量依赖性关系, EULP 对 DPPH 自由基的清除率最高可达 74.5%。该结果说明 EULP 通过发挥抗氧化活性缓解肝脏脂肪堆积以及氧化应激水平的升高。

2.2 EULP对肝脏组织形态和炎症水平的影响

通过组织病理学切片观察, 能够直接评估肝脏的病理损伤程度^[18]。镜下观察显示 (图 2a), Control 组肝小叶结构完整, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状有序排列, 细胞核形态学特征未见异常。与 Control 组形成鲜明对比, Model 组肝细胞呈现显著肿胀及胞质疏松化, 部分肝细胞出现核固缩, 细胞排列紊乱且肝索结构消失。Chen 等^[19]研究也发现长期过量饮酒后肝细胞广泛肿胀, 排列紊乱, 证实长期酒精暴露可导致肝实质损伤。经干预后, BP 组及 EULP 组肝组织形态较 Model 组明显改善, 肝小叶结构与肝细胞轮廓基本完整, 肝索排列趋于整齐, 仅见少量的细胞核固缩现象, 提示 EULP 干预措施对酒精性肝损伤具有一定修复作用。长期酒精暴露会刺激库普弗细胞分泌促炎细胞因子, 造成肝脏细胞炎症损伤, 加剧酒精性肝损伤的病理进程^[20]。由图 2b 可知, 与 Control 组相比, Model 组小鼠肝脏中 IL-1 β 水平显著提高约 47.61% ($P < 0.001$), 经阳性药物联苯双酯或杜仲叶多糖各剂量处理后, IL-1 β 水平相比于 Model 组分别降低约 20.72% ($P < 0.01$)、11.42%、34.87% ($P < 0.001$)、39.93% ($P < 0.001$)。说明 EULP 可以保

护长期酒精暴露小鼠的肝脏组织结构，减轻肝脏炎症反应。

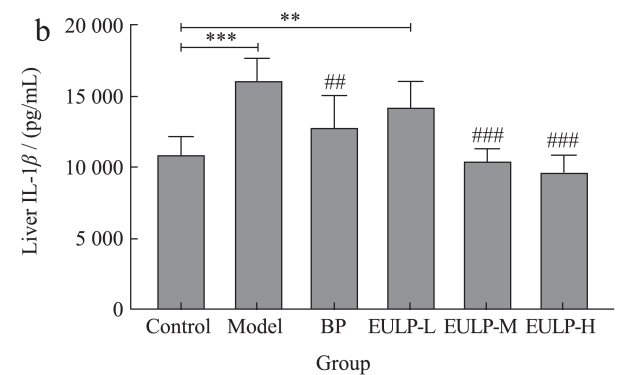
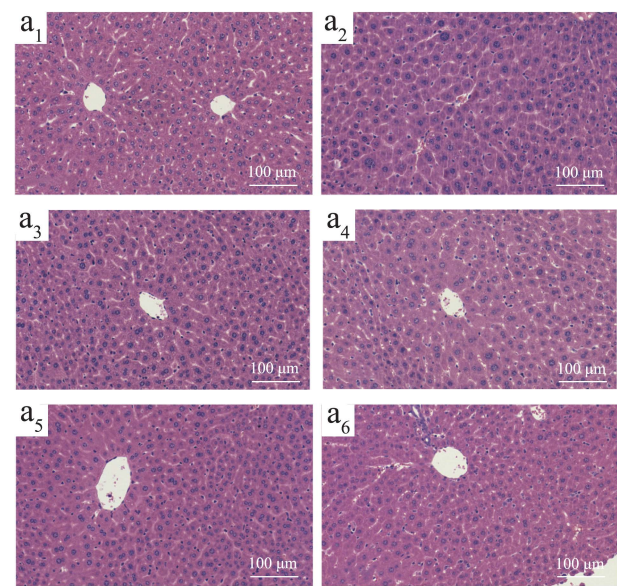


图2 EULP对慢性酒精中毒小鼠肝脏组织形态和炎症水平的影响

Fig.2 Effect of EULP on liver tissue morphology and inflammation levels in mice with chronic alcoholism

注：(a) HE染色，400×，其中a₁为Control，a₂为Model，a₃为BP，a₄为EULP-L，a₅为EULP-M，a₆为EULP-H。(b) IL-1β。****P* < 0.01，****P* < 0.001与对照组比较；##*P* < 0.01，###*P* < 0.001与模型组比较。*n* = 6。

2.3 EULP对回肠组织形态的影响

Xue等^[21]对长期酒精暴露大鼠小肠组织进行HE染色，观察发现模型组小鼠绒毛结构出现明显的萎缩现象。如图3所示，Control组肠绒毛细长，肠粘膜结构完整。Model组观察到Xue等^[21]研究的类似现象，肠道绒毛萎缩和断裂，排列紊乱，肠绒毛上皮间隙明显，且有局部炎症浸润现象。相比于模型组，BP组和EULP低剂量组肠道绒毛仍有断裂，EULP中、高剂量组肠道绒毛长度、炎症浸润现象有所改善，排列整齐。

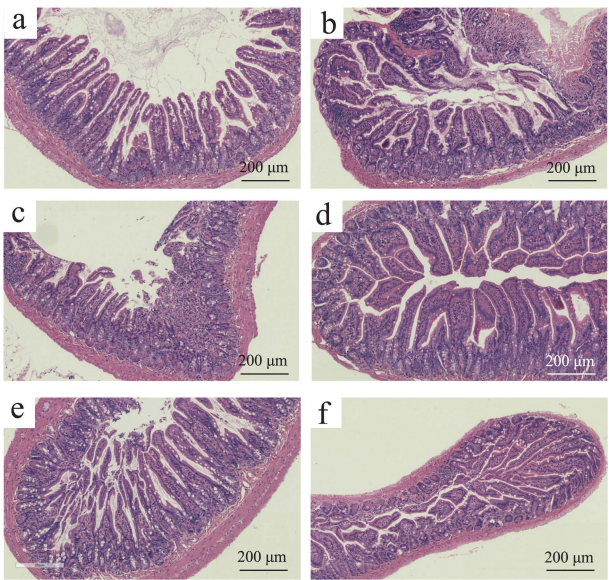


图3 EULP对慢性酒精中毒小鼠回肠组织形态的影响

Fig.3 Effect of EULP on ileal tissue morphology in mice with chronic alcoholism

注：回肠组织HE染色，200×。a为Control；b为Model；c为BP；d为EULP-L；e为EULP-M；f为EULP-H。

2.4 EULP对门、科水平菌群相对丰度的影响

在Control组、Model组、EULP-M组（即C、M、Z组）中各取6个样品进行肠道菌群检测。如图4a~4c所示，在门水平分析中，各组样本选取相对丰度前20的优势菌门（其余归为“Others”），丰度较高的菌门包括厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）等。Model组中变形菌门（Proteobacteria）和脱铁杆菌门（Deferribacteres）丰度较Control组显著降低约72.43%（*P* < 0.05）、95.05%（*P* < 0.05），中剂量EULP干预后二者丰度提高约112.48%、175.07%。其余菌门丰度变化不显著。李文丽^[22]的研究中模型组相比于正常组变形菌门丰度显著下降（*P* < 0.01），给予护肝片或药食同源中药复方后变形菌门和脱铁杆菌门的丰度明显上升。虽然两种菌门常被视为肠道致病菌，与健康呈负相关，但也有研究表明其丰度降低未必代表机体更健康^[22,23]。例如，高水平的缬氨酸饮食在改善肠道功能、降低脱铁杆菌门丰度的同时，会加速非酒精性脂肪肝的发生^[24]。

如图4d~4f所示，在科水平分析中，丰度较高的菌科包括拟杆菌门S24-7（Bacteroidetes_S24-7）、乳杆菌科（Lactobacillaceae）、毛螺菌科（Lachnospiraceae）、普雷沃氏菌科（Prevotellaceae）等。酒精干预使毛螺菌科（Lachnospiraceae）和脱硫弧菌科（Desulfovibrionaceae）的丰度较对照组显著降低约58.18%（*P* < 0.01）、

76.72% ($P < 0.05$), 中剂量 EULP 处理使二者丰度提高约 42.99%、50.83%。其余菌科丰度无显著变化。*Lachnospiraceae* 科具备生产短链脂肪酸的能力, 其下属的 *Blautia* 和 *Roseburia* 等物种更是短链脂肪酸的主要生产者^[25,26]。以上结果说明长期饮酒会引起小鼠肠道菌群物种组成的严重失调, EULP 干预能够通过增加有益菌的丰度有效缓解以上紊乱状态。

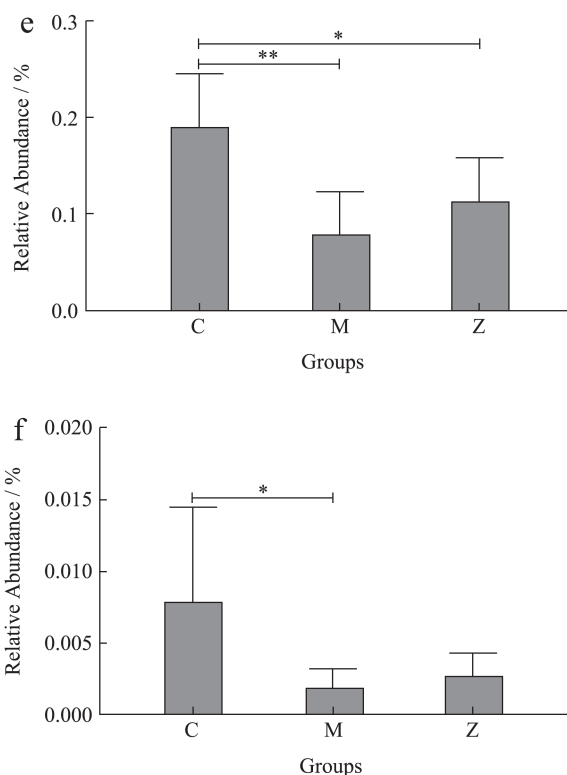
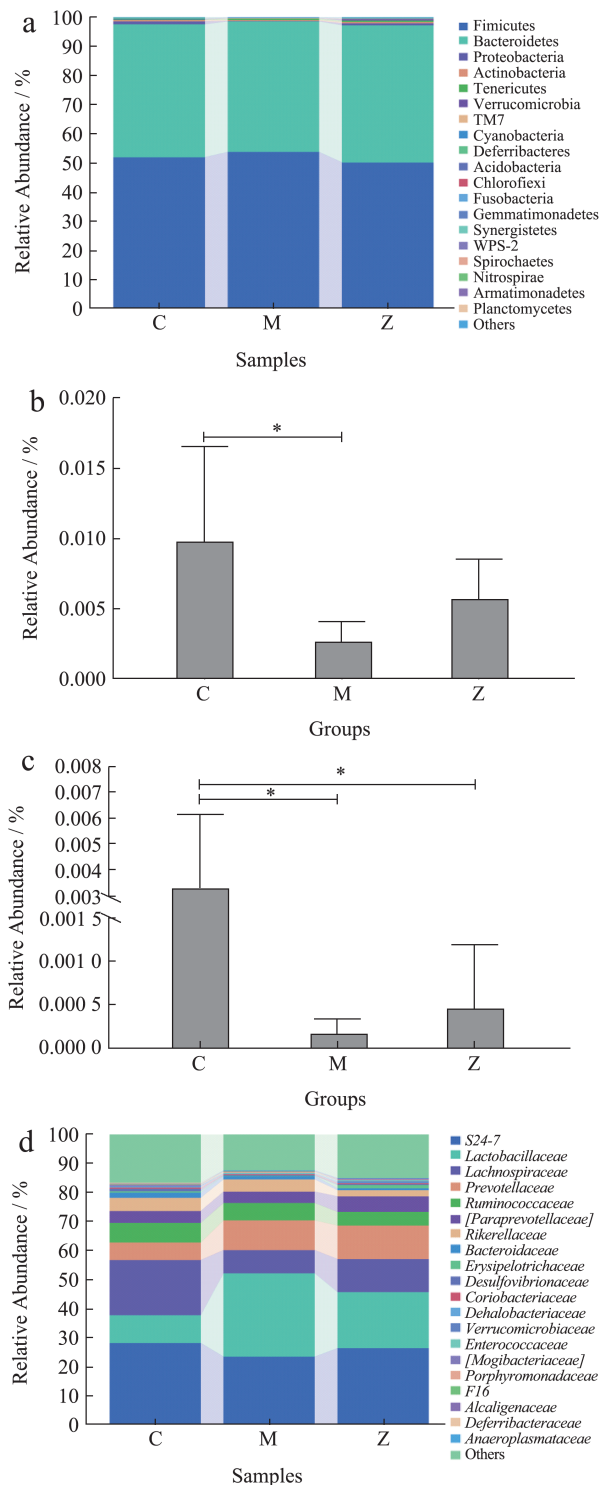


图 4 EULP 对慢性酒精中毒小鼠门、科水平菌群相对丰度的影响

Fig.4 Effect of EULP on the relative abundance of phylum and family level flora in mice with chronic alcoholism

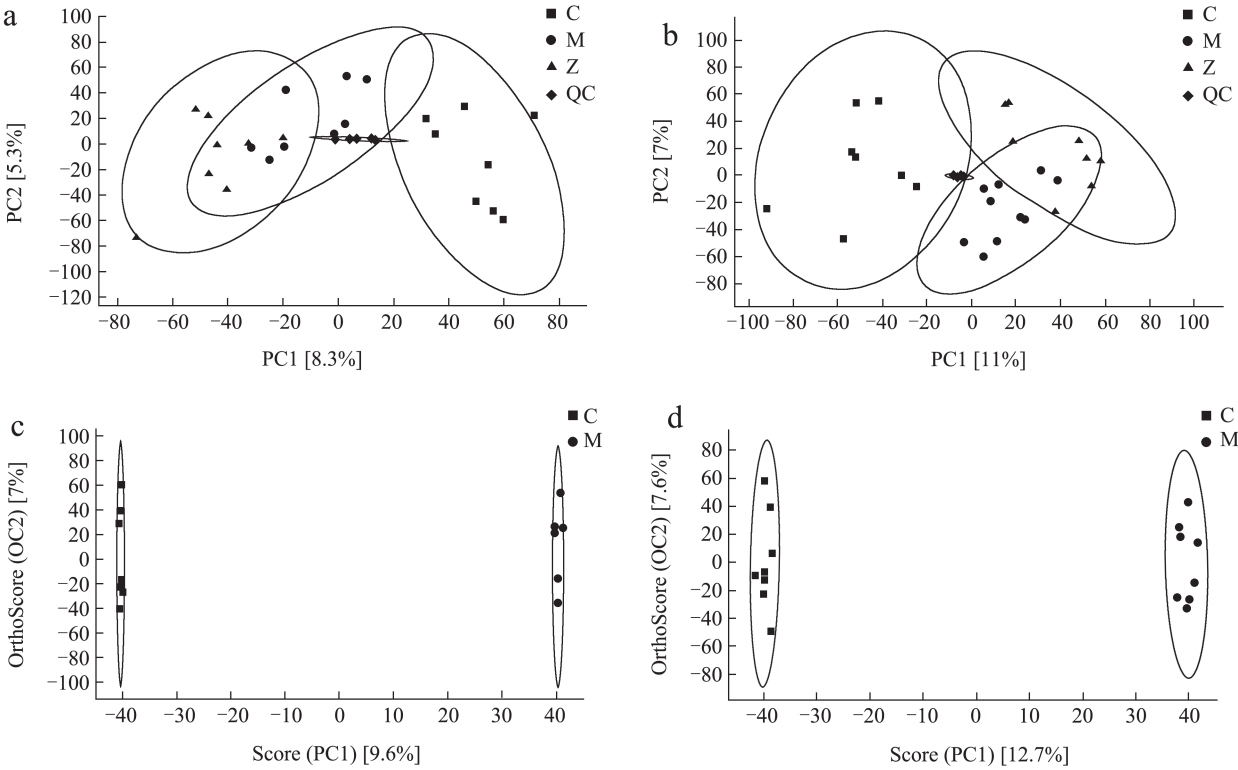
注: (a) 门水平菌群组成; (b) Proteobacteria; (c) Deferribacteres; (d) 科水平菌群组成; (e) Lachnospiraceae; (f) Desulfovibrionaceae. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组比较; $n=6$ 。

2.5 血清代谢物数据稳定性评估

对 Control 组、Model 组、EULP-M 组 (即 C、M、Z 组) 各 8 例样本进行血清非靶代谢组学检测。主成分分析结果显示, 在正、负离子模式下 QC 样本均呈现高度聚集性 (图 5a、5b), 表明实验方法稳定性良好且数据可靠性较高。通过正交偏最小二乘法判别分析 (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA) 发现, C 组与 M 组在正、负离子模式下 R^2Y 分别为 100% 和 99.9%, Q^2 分别为 50.5% 和 70.8% (图 5c、5d), 组间样本呈显著分离状态, 证实慢性酒精暴露引发小鼠血清代谢轮廓的显著改变。进一步分析 M 组与 Z 组发现, 正、负离子模式下的 OPLS-DA 模型 R^2Y 分别为 100% 和 99.9%, Q^2 分别为 34.9% 和 45.4% (图 5e、5f), 置换检验显示两种模式中原始 Q^2 值均高于置换后随机分布的 Q^2 点, 验证了模型的稳健性与预测能力。

表 1 血清差异代谢物
Table 1 Serum differential metabolites

代谢物名称	类别	P 值		VIP 值		Regulation	
		M/C	Z/M	M/C	Z/M	M/C	Z/M
(+/-)11-HETE	脂类及其衍生物	0.001 676 702	0.013 140 776	2.10	1.98	Up	Down
L-Glutamic acid	有机酸及其衍生物	0.018 694 499	0.003 938 076	1.70	2.21	Up	Down
Carbocyclic 3-deazaadenosine	有机杂环化合物	0.000 000 000 218	0.015 945 575	2.74	1.93	Up	Down
5-OxoETE	脂类及其衍生物	0.001 170 995	0.044 834 159	2.09	1.65	Up	Down
12-OxoETE	脂类及其衍生物	0.001 015 421	0.031 296 06	2.11	1.76	Up	Down
12S-HETE	脂类及其衍生物	0.001 825 555	0.008 615 646	2.08	2.07	Up	Down
1-phenethyl-5-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-2-thione	有机杂环化合物	0.003 750 416	0.013 358 815	1.96	2.07	Up	Down
Diethyl 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylphosphonate	苯类化合物	0.003 758 408	0.002 172 194	2.01	2.32	Up	Down
Thromboxane B2	苯类化合物	0.004 521 314	0.040 888 45	2.00	1.70	Up	Down
3-oxo lithocholic acid	其他	0.000 223 056	0.012 493 785	2.30	1.96	Up	Down
5-HETE lactone	其他	0.007 112 857	0.012 209 427	2.10	2.13	Up	Down
Salviol	其他	0.005 180 083	0.008 456 692	2.17	2.21	Up	Down
10,13-Eicosadiynoic acid	脂类及其衍生物	0.000 984 433	0.038 760 155	2.41	1.82	Up	Down
20-carboxy Arachidonic Acid	脂类及其衍生物	0.001 246 617	0.025 590 613	2.40	1.94	Up	Down
Trospectomycin	其他	0.000 097 218 242	0.010 188 514	2.73	2.16	Up	Down
2-Ethylbut-2-enedioic acid	有机酸及其衍生物	0.038 110 174	0.039 597 719	1.75	1.82	Up	Down



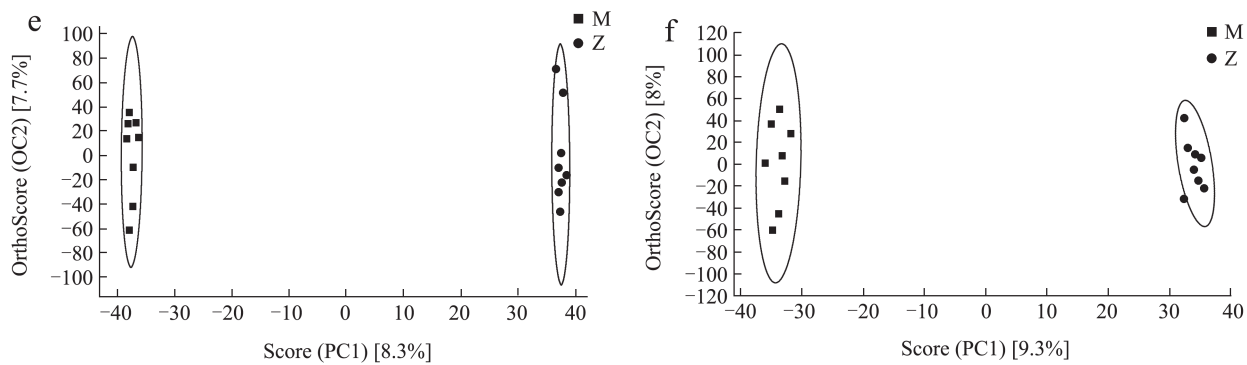
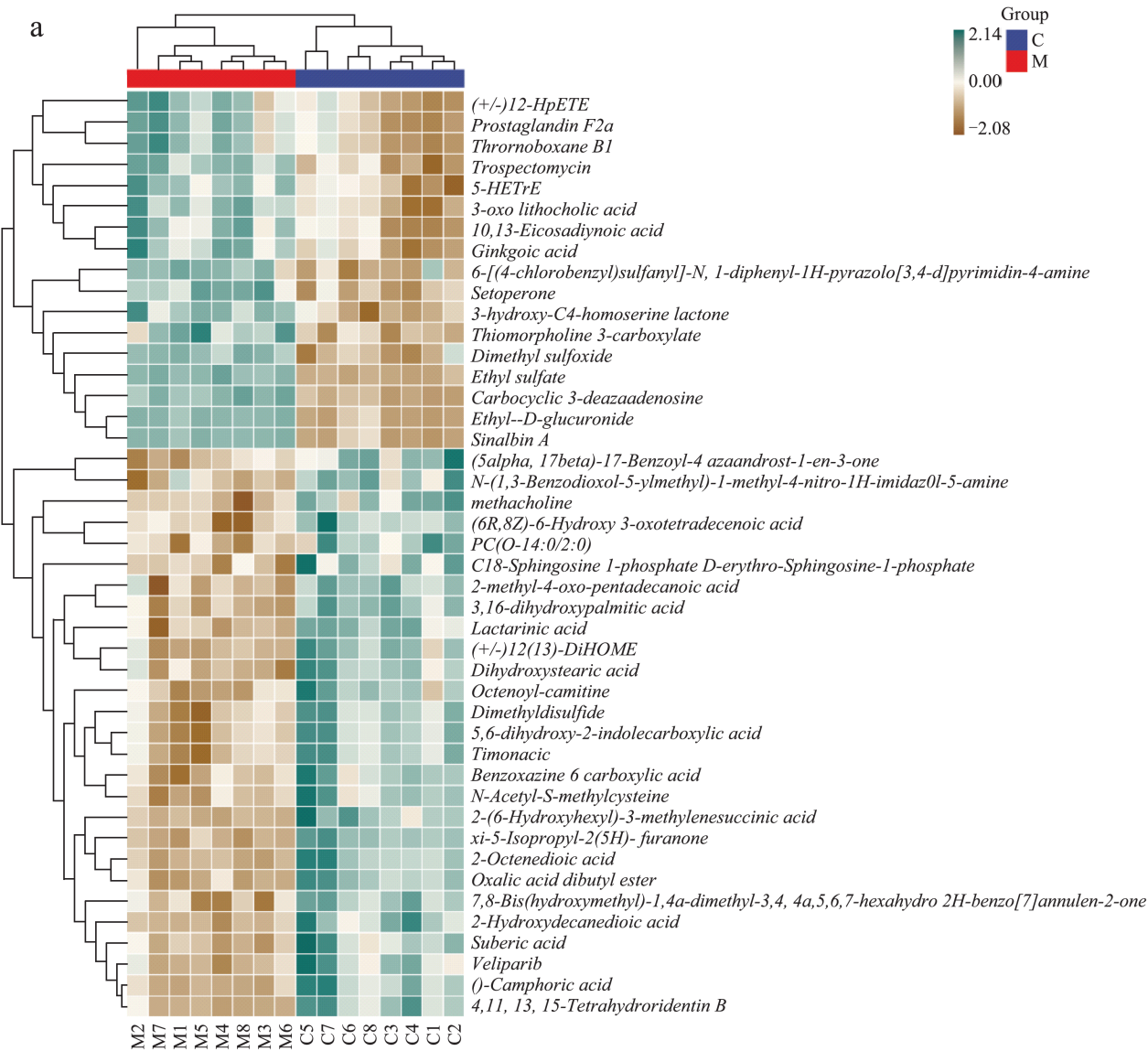


图 5 血清代谢物数据稳定性评估

Fig.5 Stability assessment of serum metabolite data

注：正离子模式：(a) QC 样本与 C、M、Z 组的 PCA 图；(c) C 组与 M 组的 OPLS-DA 图；(e) M 组与 Z 组的 OPLS-DA 图。负离子模式：(b) QC 样本与 C、M、Z 组的 PCA 图；(d) C 组与 M 组的 OPLS-DA 图；(f) M 组与 Z 组的 OPLS-DA 图。



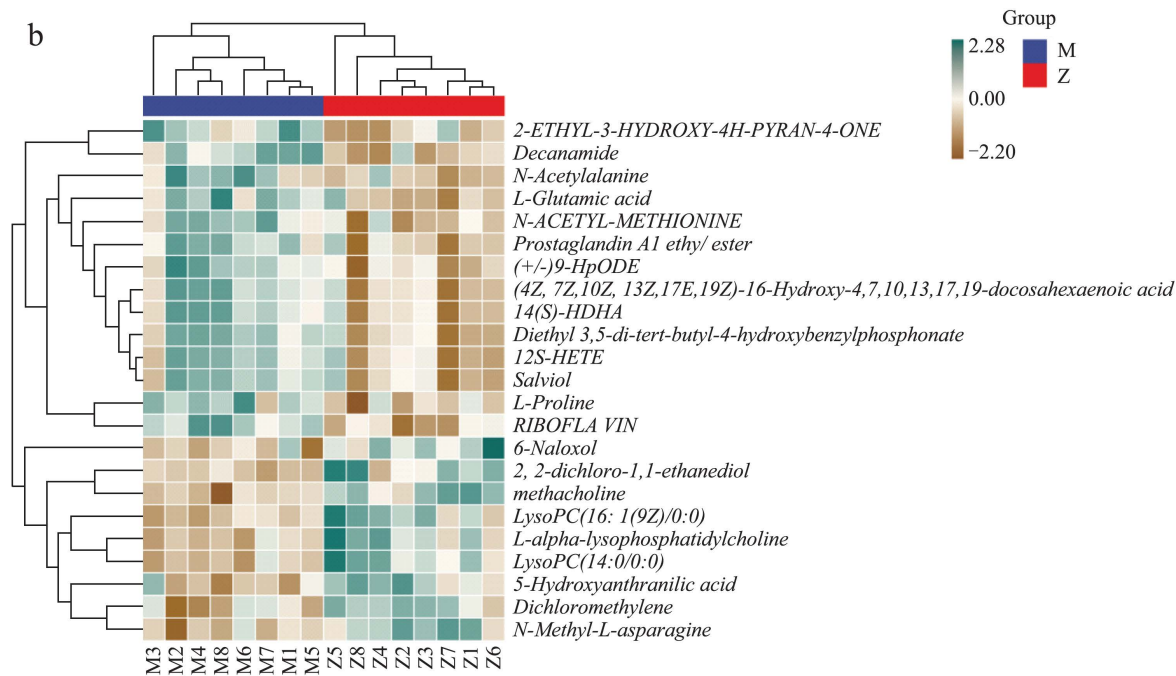


图 6 差异代谢物热图分析

Fig.6 Differential metabolite thermography analysis

注：（a）C 组和 M 组差异代谢物 44 种；（b）M 组和 Z 组差异代谢物 23 种。

2.6 差异代谢物鉴定与分析

在 OPLS-DA 模型中，代谢物的权重值（Variable Importance in the Project, VIP）大小用于量化该化合物对组间差异区分的贡献度。通过设置 VIP > 1 联合 *T* 检验显著性阈值（*P* < 0.05）的筛选标准，筛选出具有生物学意义的差异代谢物。其中，差异代谢物主要涉及脂类及其衍生物，有机酸及其衍生物，有机杂环化合物和苯类化合物。而后，进一步筛选 Control 组和 Model 组以及 Model 组和 EULP-M 组之间共同表达的差异代谢物。最终得出了 18 个差异代谢物，如表 1 所示。与 Control 相比，Model 组中 (+/-)11-HETE、5-OxoETE、12-OxoETE、12S-HETE、5-HETE lactone 的含量显著上调（*P* < 0.01），这些物质是花生四烯酸的代谢产物，通过环氧合酶和脂氧合酶途径生成，直接促进炎症反应^[27]；与 Model 组相比，EULP-M 组中该 5 种潜在生物标志物显著降低（*P* < 0.05），说明 EULP 对慢性酒精中毒引起的异常血清代谢物水平有逆转作用，能改善机体紊乱。

接着选取差异极显著的代谢物绘制热图。如图 6a 所示，与 C 组相比，M 组存在 44 种差异代谢物，其中有 27 种差异代谢物含量呈现下降趋势，而有 17 种差异代谢物含量升高，其中，模型组相比于正常组 Prostaglandin F2α 和 12-HpETE 表达显著升高。Prostaglandin F2α 作为花生四烯酸环氧合酶途径代谢

产物，通过相应受体激活促炎因子表达^[28]，与阿尔茨海默病、糖尿病等炎症性疾病相关^[29,30]；12-HpETE 由 12-脂氧合酶催化生成^[31]，在糖尿病等氧化应激状态下因 12-脂氧合酶活性降低而蓄积，通过促进血栓素 A2 合成、血小板活化及活性氧积累，加剧炎症和氧化损伤，共同驱动炎症病理进程^[32]。如图 6b 所示，与 M 组相比，Z 组差异代谢物 23 种，其中有 14 种差异代谢物含量降低，有 9 种差异代谢物含量升高。

2.7 血清代谢物与肠道菌群相关性分析

肠道菌群通过肠-肝轴调控代谢途径，其代谢产物经循环系统影响血清代谢物组成。Pearson 相关性分析表明（图 7），血清差异代谢物与菌属水平物种高度相关，有害菌 *Mucispirillum* 与促炎介质 Trimethylamine N-oxide 呈显著正相关（*P* < 0.01），而益生菌 *Anaeroplasm* 与免疫调节介质 Niacinamide 呈显著正相关（*P* < 0.05）。已有研究表明，Trimethylamine N-oxide 激活转录因子 NF-κB，进而触发细胞因子的产生^[33]；Niacinamide 可抑制细胞因子介导的诱导型一氧化氮合酶表达，从而减轻多种细胞类型的炎症反应，其在骨关节炎治疗中已被证实具有潜在益处^[34]。以上结果说明，酒精中毒通过改变菌群代谢物导致血清代谢失衡，EULP 治疗通过增加益生菌丰度调节血清免疫调节介质的表达水平，从而改善机体炎症状态。

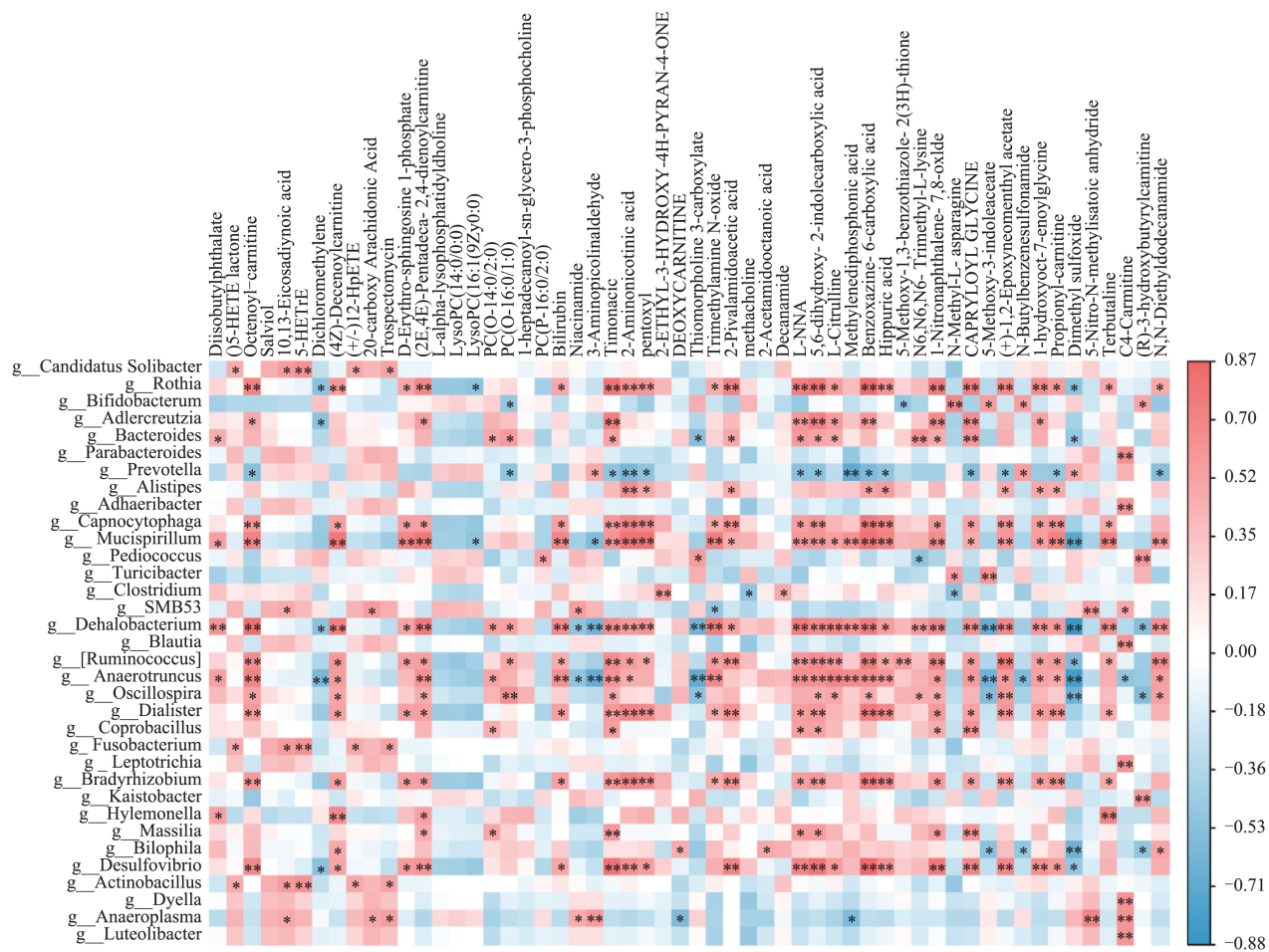
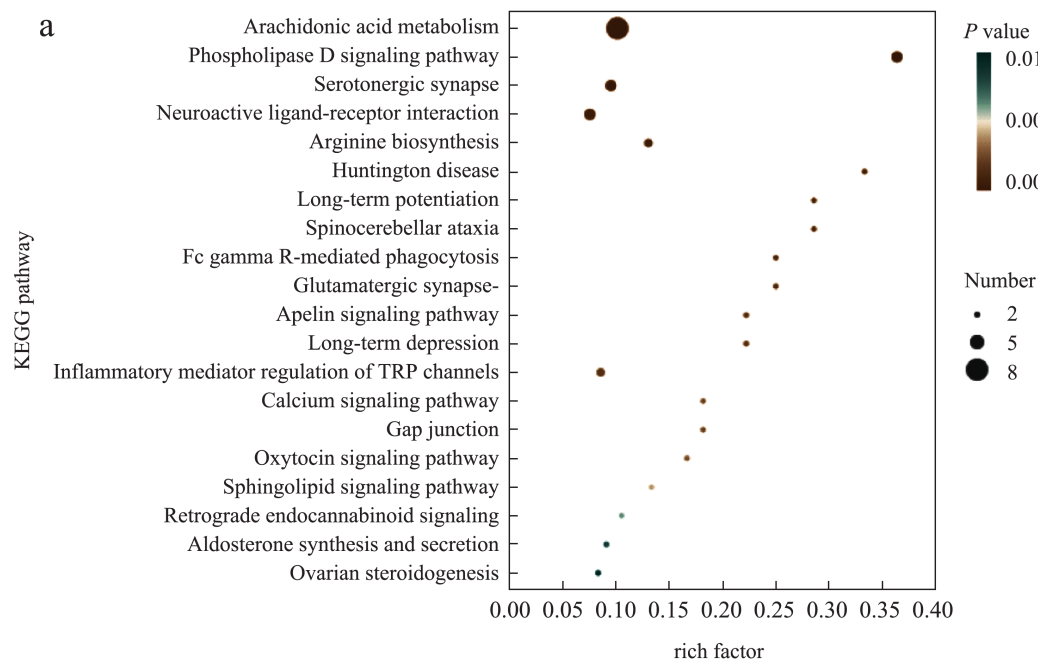


图 7 血清差异代谢物与属水平上肠道菌群间的相关性分析

Fig.7 Correlation analysis between serum differential metabolites and gut flora at the genus level

注：* 标识代表有显著相关性。（* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ）。



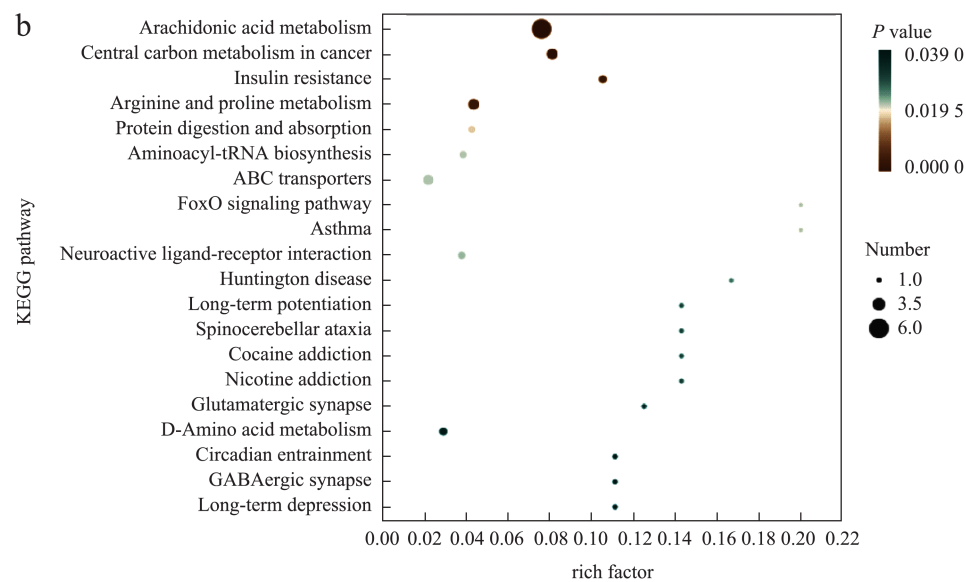


图 8 三组间代谢通路图

Fig.8 Metabolic pathway diagrams between the three groups

注: (a) C 组和 M 组的代谢通路图; (b) M 组和 Z 组的代谢通路图。

2.8 EULP对血清代谢通路的影响

KEGG 通路分析表明 (图 8), 长期酒精暴露显著扰乱小鼠体内花生四烯酸代谢 (Arachidonic Acid Metabolism)、磷脂酶 D 信号通路 (Phospholipase D Signaling Pathway)、5- 羟色胺能突触 (Serotonergic Synapse); 而 EULP 干预后, 花生四烯酸代谢 (Arachidonic Acid Metabolism)、癌症中的中心碳代谢 (Central Carbon Metabolism in Cancer)、胰岛素抵抗 (Insulin Resistance) 得到改善, 其中花生四烯酸代谢为各组共同表达的核心通路。研究表明, 花生四烯酸 (Arachidonic Acid, AA) 代谢通路的异常活化与肝脏炎症反应密切相关, 当病原体入侵时, 单核细胞和巨噬细胞向肝脏趋化聚集并被激活, 释放 AA 衍生物及自由基, 导致肝细胞损伤^[35,36]。再次基于 AA 代谢通路关注血清差异代谢物的表达, Model 组中 Prostaglandin F2 α ($P<0.001$)、Thromboxane B1 ($P<0.001$) 相比于 Control 组显著上调, 而 EULP-M 组中 12S-HETE ($P<0.01$)、Prostaglandin A1 ethyl ester ($P<0.01$) 相比于 Model 组显著下调, 提示 EULP 通过调节该代谢通路减轻慢性酒精中毒导致的肝脏炎症损伤。

3 结论

本研究以杜仲叶为原料获取天然产物杜仲叶多糖, 其在体外具有良好的自由基清除能力, 基于其良好的抗氧化活性在体内表现出良好的降脂护肝作用, 能减轻慢性饮酒引起的肝脏炎症与肠道病变。小鼠粪便 16S rRNA 高通量测序分析显示, EULP 可以调节模型

组小鼠门、科水平上菌群组成结构的紊乱。同时, 采用基于 LC-MS 的代谢组学研究方法, 筛选出 Control 组和 Model 组以及 Model 组和 EULP-M 组之间共同表达的差异代谢物, 共鉴定出 5 个潜在生物标志物, 在 EULP 干预后会显著调节代谢物的紊乱水平。再采用聚类热图进一步可视化两组之间的独有、共有代谢物表达。最后依据 KEGG 富集通路分析, 发现两组之间共同富集了 AA 代谢通路, 且 EULP 通过调控血清中 AA 代谢通路治疗慢性酒精中毒引起的肝脏损伤。本研究可为杜仲叶多糖防治慢性酒精中毒及相关功能食品的研究与开发提供依据。

参考文献

[1] GRISWOLD M G, FULLMAN N, HAWLEY C, et al. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. The Lancet, 2018, 392(10152): 1015-1035.

[2] YAN C, HU W, TU J, et al. Pathogenic mechanisms and regulatory factors involved in alcoholic liver disease [J]. Journal of Translational Medicine, 2023, 21(1): 300.

[3] HSU C L, SCHNABL B. The gut-liver axis and gut microbiota in health and liver disease [J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21(11): 719-733.

[4] ZHOU R, WU Q, YANG Z, et al. The role of the gut microbiome in the development of acute pancreatitis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(2): 1159.

[5] MA P J, WANG M M, WANG Y. Gut microbiota: a new insight into lung diseases [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 155: 113810.

- [6] LI X, CHEN L M, KUMAR G, et al. Therapeutic interventions of gut-brain axis as novel strategies for treatment of alcohol use disorder associated cognitive and mood dysfunction [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2022, 16: 820106.
- [7] XU D, WU Q, LIU W, et al. Therapeutic efficacy and underlying mechanisms of *Gastrodia elata* polysaccharides on dextran sulfate sodium-induced inflammatory bowel disease in mice: modulation of the gut microbiota and improvement of metabolic disorders [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 248: 125919.
- [8] ZHANG J, CHEN H, LUO L, et al. Structures of fructan and galactan from *Polygonatum cyrtoneura* and their utilization by probiotic bacteria [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 267: 118219.
- [9] LI Y, WANG S, SUN Y, et al. Apple polysaccharide protects ICR mice against colitis associated colorectal cancer through the regulation of microbial dysbiosis [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 230: 115726.
- [10] 刘聪,郭非非,肖军平,等.杜仲不同部位化学成分及药理作用研究进展[J].*中国中药杂志*,2020,45(3):497-512.
- [11] 龚桂珍,宫本红,张学俊,等.杜仲叶和杜仲皮中化学成分的比较[J].*西南大学学报(自然科学版)*,2010,32(7):167-172.
- [12] 王景祥,张黎明,楚万照.杜仲叶和杜仲皮的成分比较[J].*中草药*, 1987,18(3):11.
- [13] 闫芝茜.杜仲叶多糖提取、结构表征及抗肿瘤活性研究[D].天津:天津科技大学,2022.
- [14] 陈雪花.杜仲叶多糖的提取分离、结构表征与HT-29结肠癌细胞抑制活性研究[D].吉首:吉首大学,2021.
- [15] 晏媛,郭丹.杜仲叶的化学成分及药理活性研究进展[J].*中成药*,2003,6:61-62.
- [16] ZHENG C, ZHONG Y, ZHANG W, et al. Chlorogenic acid ameliorates post-infectious irritable bowel syndrome by regulating extracellular vesicles of gut microbes [J]. *Advanced Science*, 2023, 10(28): 2302798.
- [17] LIU M, WANG Y, WANG R, et al. Structural characterization, physicochemical property, and antioxidant activity of polysaccharide components from *Eucommia ulmoides* leaves [J]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2023, 10(1): 122.
- [18] 李园园,郝海波,刘加洪,等.益生菌补充改善吡嗪酰胺致大鼠肝损伤及肠道菌群紊乱的效果[J].*食品科学*,2018, 39(13):159-165.
- [19] CHEN H, PENG L, ZHAO C, et al. Protective mechanism of *Polygonum perfoliatum* L. extract on chronic alcoholic liver injury based on UHPLC-QExactive Plus mass spectrometry lipidomics and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry imaging [J]. *Foods*, 2022, 11(11): 1583.
- [20] GAO B, AHMAD M F, NAGY L E, et al. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis [J]. *Journal of Hepatology*, 2019, 70(2): 249-259.
- [21] XUE M, LIU Y, LYU R, et al. Protective effect of aplysin on liver tissue and the gut microbiota in alcohol-fed rats [J]. *Plos One*, 2017, 12(6): e0178684.
- [22] 李文丽.药食同源中药复方防治酒精性肝损伤的作用及机制研究[D].南昌:江西中医药大学,2023.
- [23] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496-503.
- [24] JIAN H, MIAO S, LIU Y, et al. Dietary valine ameliorated gut health and accelerated the development of nonalcoholic fatty liver disease of laying hens [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021(1): 4704771.
- [25] KOH A, DE VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345.
- [26] LA ROSA S L, LETH M L, MICHALAK L, et al. The human gut Firmicute *Roseburia intestinalis* is a primary degrader of dietary β -mannans [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 905.
- [27] SOUNDARARAJAN R, MAURIN M M, RODRIGUEZ-SILVA J, et al. Integration of lipidomics with targeted, single cell, and spatial transcriptomics defines an unresolved pro-inflammatory state in colon cancer [J]. *Gut*, 2025, 74(4): 586-602.
- [28] ZHUANG J, ZHANG H, ZHOU R, et al. Regulation of prostaglandin F_{2 α} against β amyloid clearance and its inflammation induction through LXR/RXR heterodimer antagonism in microglia [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2013, 106: 45-52.
- [29] CASADESUS G, SMITH M A, BASU S, et al. Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease [J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2007, 2(1): 1-8.
- [30] BASU S, LARSSON A, VESSBY J, et al. Type 1 diabetes is associated with increased cyclooxygenase-and cytokine-mediated inflammation [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28(6): 1371-1375.
- [31] SIEGEL M I, MCCONNELL R T, PORTER N A, et al. Arachidonate metabolism via lipoxygenase and 12L-hydroperoxy-5,8,10,14-icosatetraenoic acid peroxidase sensitive to anti-inflammatory drugs [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77(1): 308-312.
- [32] LAGARDE M, GUICHARDANT M, BERNOUD-HUBAC N, et al. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids and oxidative stress within blood platelets [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2018, 1863(6): 651-656.
- [33] CONSTANTINO-JONAPA L A, ESPINOZA-PALACIOS Y, ESCALONA-MONTAÑO A R, et al. Contribution of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) to chronic inflammatory and degenerative diseases [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(2): 431.
- [34] SAHIN K, KUCUK O, ORHAN C, et al. Niacinamide and undenatured type II collagen modulates the inflammatory response in rats with moniodoacetate-induced osteoarthritis [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 14724.
- [35] LI J, SU W W, WANG Z L, et al. Identification and verification of biomarkers associated with arachidonic acid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 8521.
- [36] MENG J, MA N, LIU H, et al. Untargeted and targeted metabolomics profiling reveals the underlying pathogenesis and abnormal arachidonic acid metabolism in laying hens with fatty liver hemorrhagic syndrome [J]. *Poultry Science*, 2021, 100(9): 101320.