

DOI: 10.12264/JFSC2021-0560

垂盆草提取物干预罗非鱼脂肪性肝病作用机制的代谢组学研究

庞琳星¹, 黄凯¹, 于丹³, 汪婷², 于凯¹, 莫翠琴¹, 郭睿婕¹

1. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004;

2. 柳州市柳江区农业科技推广中心, 广西 柳州 545100;

3. 广西百跃农牧发展有限公司, 广西 南宁 530000

摘要: 为探究垂盆草提取物对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)脂肪性肝病的干预作用及机制, 实验配制对照组(0%大豆油, 0%垂盆草提取物)、高脂组(4%大豆油, 0%垂盆草提取物)和垂盆草干预组(4%大豆油, 0.12%垂盆草提取物) 3 种等氮饲料, 饲养初始体重为(11.63±0.66) g 的吉富罗非鱼 8 周后, 取吉富罗非鱼血清和肝脏, 采用非靶向代谢组学检测方法, 并结合肝脏组织透射电镜观察、血清生化指标结果进行分析。结果显示, 高脂组体重、增重率(WGR)和特定生长率(SGR)显著低于对照组与垂盆草干预组($P<0.05$), 肝体比(HSI)、饲料系数(FRC)显著高于对照组与垂盆草干预组($P<0.05$)。透射电镜观察发现高脂组与对照组相比, 肝组织细胞超微结构异常, 垂盆草干预组与高脂组对比有所改善。血清生化指标显示垂盆草干预组较高脂组谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 8 (IL-8)水平显著降低($P<0.05$), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)和白细胞介素 10 (IL-10)水平显著升高($P<0.05$)。肝脏代谢组学检测结果表明, 与对照组相比, 高脂组有 27 个差异代谢产物(DM), 富集到 19 条通路, 主要代谢通路为糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、 β -丙氨酸代谢; 与高脂组相比, 垂盆草干预组有 23 个差异代谢产物, 富集到 9 条代谢途径, 主要代谢通路为 β -丙氨酸代谢和亚油酸代谢。上述结果表明, 垂盆草提取物对于干预吉富罗非鱼因高脂饮食引起的脂肪性肝病有积极作用, 其作用通路与 β -丙氨酸代谢、亚油酸代谢相关。

关键词: 吉富罗非鱼; 垂盆草提取物; 高脂; 代谢组学

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2022)08–1134–13

吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长快, 养殖周期短, 背宽且肉厚, 出肉率和起捕率高^[1], 是罗非鱼养殖业的主要品种。集约化养殖、高密度养殖、饲料营养不均衡及投喂不当等诱发的鱼类脂肪肝病已经成为罗非鱼(*Oreochromis* sp.)、鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等养殖对象的常见疾病^[2], 是限制水产养殖业发展的因素之一^[3]。脂肪性肝疾病导致肝细胞发生脂肪变性、肝细胞损伤、炎症反应、肝脏纤维化, 与胰岛素抵抗、氧化应激、炎症反应等密切相关^[4–5]。以往饲料中通过添加调节代谢、针对氧化应激和

炎症、抗肝纤维化的药物进行防治^[6], 目前尚缺乏明确的药物治疗。较抑制脂肪因子类药物而言, 中草药的安全性和有效性使其成为治疗脂肪肝的研究热点^[7]。

垂盆草(*Sedum sarmentosum* Bunge, SSB)味甘、性凉, 具有解毒护肝、清热利湿的功效, 含有黄酮类、Megastigmanes 类、生物碱类、甾醇类、三萜类等发挥药理作用的化学成分^[8], 药理作用涉及保肝、抗炎、抗氧化、抗纤维化、免疫调节等。林远灿等^[9]和 Lin 等^[10]研究表明垂盆草总黄酮通过干预肝脏 Smads 通路延缓肝纤维化; Bai 等^[11]

收稿日期: 2021-12-19; 修订日期: 2022-02-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160865); 广西自然科学基金重点项目(2018GXNSFDA281001).

作者简介: 庞琳星(1998–), 女, 硕士研究生, 水产动物营养与饲料学研究. E-mail: 971161165@qq.com

通信作者: 黄凯, 教授, 水产动物营养与饲料学研究. E-mail: hkai110@163.com; 于丹, E-mail: 16867982@qq.com

对肾纤维化大鼠研究发现垂盆草提取物通过抑制 *TGF- β 1* 表达、上皮间质转化和细胞外基质积聚发挥抗肾纤维化作用; Hao 等^[12]研究发现垂盆草提取物通过上调 miR-124 的表达水平, 阻断细胞内 Hedgehog 信号通路, 抑制炎症通路的活性, 减轻小鼠的肝脏炎症和肝脏损伤。Wang 等^[13]研究表明垂盆草提取物中的 δ -戊烯酮是通过促进 *Nrf2* 抗氧化防御和抑制 NF- κ B 炎症反应对肝损伤大鼠发挥保护作用的有效成分。垂盆草及其提取物在鱼类中的研究较少, 吴春艳等^[14]发现垂盆草通过促进 CPT-1 和 PPAR- α 的表达, 抑制 TNF- α 表达, 缓解草鱼由高脂饮食造成的脂肪性肝病; Huang 等^[15]研究表明垂盆草提取物减轻罗非鱼脂肪肝症状的机制与抑制 P53 信号通路表达并减少甘油三酯的蓄积有关。代谢组学通过研究生物体的内源性小分子发生的变化来反映机体生物体系的代谢网络, 包括代谢差异物的鉴定和代谢通路分析^[16]。近年来, 利用代谢组学阐明中草药的疗效和机制的研究显著增多^[17], 但借助代谢组学技术研究垂盆草提取物对鱼类脂肪性肝病干预作用的研究还未有报道。因此, 本实验在课题组此前开展的垂盆草提取物对罗非鱼脂肪肝模型的药效作用研究基础上^[18], 进一步研究高脂饲料中添加垂盆草提取物对吉富罗非鱼生长、血清生化指标的影响, 并采用代谢组学方法, 对摄食高脂饲料和在高脂饲料中添加垂盆草提取物后吉富罗非鱼肝脏代谢物的变化进行分析, 寻找主要代谢通路, 探讨垂盆草提取物干预高脂饮食诱导的脂肪性肝病的作用机理, 为中草药防治鱼类脂肪肝病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计及饲养管理

实验鱼购自广西水产科学研究院, 初始体重为 (11.63 ± 0.66) g, 于广西大学动物科学技术学院水产养殖基地的养殖池中暂养 14 d, 期间投喂对照组实验饲料。养殖实验开始前, 停喂 24 h 后选取体格健康且规格均一的吉富罗非鱼幼鱼 540 尾, 随机分为 3 个组, 每组 3 个重复, 每个重复 60 尾鱼, 放入 9 个水泥池(长 1.8 m $\times$ 宽 1.2 m $\times$ 高 1 m)。

每日 09:00 和 18:00 投喂对应实验饲料至表观饱食。实验期间平均水温 (27.5 ± 0.4) $^{\circ}\text{C}$, 溶氧量为 (5.18 ± 0.14) mg/L, 养殖周期为 56 d。

1.2 实验饲料

以鱼粉为蛋白源, 大豆油为主要脂肪源, 玉米淀粉和米糠为糖源配制对照组(0%大豆油, 0%垂盆草提取物)、高脂组(4%大豆油, 0%垂盆草提取物)和垂盆草干预组(4%大豆油, 0.12%垂盆草提取物) 3 种等氮实验饲料, 饲料配方见表 1。准确称量饲料原料并逐级混匀后分别加入大豆油和水混合均匀, 用制粒机压成 2 mm 粒径的颗粒饵料, 自然晾干后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.3 样品采集

养殖结束后, 禁食 24 h。每个重复随机选取 5 尾鱼, 用 MS-222 (200 mg/L)轻微麻醉后称重, 计算生长指标。用 1 mL 无菌注射器从鱼尾椎静脉处取血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 3 h, 3000 r/min 离心 10 min 后取上清置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。在冰盘上解剖并分离出肝脏后用 0.85% 生理盐水冲洗, 擦拭称重后分为 2 份, 一份放入 4% 的戊二醛溶液中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定用于电镜检测, 剩下一份用液氮速冻后放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于代谢组学检测。

1.4 指标测定

1.4.1 饲料营养成分测定 饲料粗蛋白和粗脂肪分别使用凯氏定氮法(GB/T 5009.5-2016)和索氏抽提法(GB/T 5009.6-2016)测定, 总能量用 SDC 系列量热仪(湖南三德)测定。

1.4.2 生长指标测定

增重率(weight gain rate, WGR, %)= $(W_t - W_0)/W_0 \times 100$

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)= $100 \times (\ln W_t - \ln W_0)/t$

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)= $F/(W_t - W_0)$

肝体比(hepatosomatic index, HSI, %)= $W_l/W_t \times 100$ 式中, W_0 为罗非鱼初始平均体重(g); W_t 为鱼体终末平均体重(g); W_l 为罗非鱼肝脏重(g); t 为饲养天数(d); F 为饲料摄食量(g)。

1.4.3 血清生化指标测定 血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、甘

表 1 实验饲料配方及营养组成(干物质)
Tab. 1 Diet formulation and nutritional composition (dry matter)

原料 ingredients	对照组 control group diet	高脂组 high fat group diet	垂盆草干预组 SSB extra group diet
鱼粉 fish meal	3	3	3
豆粕 soybean meal	35	35	35
菜籽粕 rapeseed meal	22	22	22
花生麸 peanut meal	10	10	10
米糠 rice bran	8	8	8
玉米淀粉 corn starch	18.2	14.2	14.08
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1	1	1
氯化胆碱 choline choride	1.5	1.5	1.5
复合维生素 ^a vitamins premix ^a	0.3	0.3	0.3
复合矿物质 ^b mineral premix ^b	0.5	0.5	0.5
食盐 NaCl	0.5	0.5	0.5
大豆油 soybean oil	—	4	4
垂盆草提取物 ^c <i>Sedum sarmentosum</i> Bunge extra ^c	—	—	0.12
合计 total	100	100	100
饲料营养成分 proximate composition			
粗脂肪 crude lipid	2.86	6.86	6.85
粗蛋白 crude protein	33.80	33.79	33.81
总能量 energy (MJ/kg)	11.23	13.18	13.18

注: a. 复合维生素(mg/kg 饲料): 维生素 A 940 mg, 维生素 D 70 mg, 维生素 K₃ 10 mg, 维生素 E 40 mg, 维生素 C 50 mg, 维生素 B₁ 30 mg, 维生素 B₂ 50 mg, 维生素 B₆ 60 mg, 维生素 B₁₂ 0.45 mg, 烟酸 150 mg, 叶酸 1 mg, 泛酸 10 mg, 肌醇 450 mg, 生物素 0.06 mg. b. 复合矿物质(mg/kg 饲料): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, KCl 7 mg, KI 0.15 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg, CuCl_2 0.5 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg, CaCl_2 280 mg. c. 垂盆草提取物购于西安澳瑞特生物科技有限公司.
Note: a. Vitamin premix (mg/kg diet): VA 940 mg, VD 70 mg, VK₃ 10 mg, VE 40 mg, VC 50 mg, VB₁ 30 mg, VB₂ 50 mg, VB₆ 60 mg, VB₁₂ 0.45 mg, nicotinic acid 150 mg, folic acid 1 mg, VB₃ 10 mg, inositol 450 mg, biotin 0.06 mg. b. Mineral premix (mg/kg diet), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, KCl 7 mg, KI 0.15 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg, CuCl_2 0.5 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg, CaCl_2 280 mg. c. The SSB extra was purchased from Xi'an Orient Biotechnology Co., Ltd..

油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 8 (IL-8)和白细胞介素 10 (IL-10)均采用南京建成生物研究所试剂盒测定, 具体实验操作按试剂盒说明书进行。

1.5 组织切片制备与观察

将鱼肝脏切成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块后固定于 2.5%戊二醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)中, 4 ℃固定 4 h 以上。制片时将组织取出, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次 20 min, 再用 4 ℃预冷的 1%锇酸溶液固定 2~3 h, 重复漂洗步骤, 一系列浓度的乙醇脱水后经环氧树脂包埋片, 切片厚度为 60~100 nm, 铅和铀双染色后,

透射电镜观察拍照。

1.6 肝脏代谢组学样品制备及 GC-TOF-MS 分析条件

取 50 mg 罗非鱼肝脏于 2 mL EP 管中, 加 450 μL 预冷提取液($V_{\text{甲醛}}:V_{\text{氯仿}}=3:1$), 混匀, 加 10 μL 内标(L-2-氯苯丙氨酸, 1 mg/mL), 进行 30 s 涡旋后研磨处理 4 min, 冰水浴中超声 5 min, 重复 3 次, 4 ℃、10000 r/min 离心 15 min, 取 200 μL 上清液于 1.5 mL EP 管中, 真空干燥。再各取 50 μL 上清混合成质控(QC)样本。将 60 μL 甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐溶于 20 mg/mL 的吡啶)加到干燥后的代谢物中, 轻混, 置于 80 ℃烘箱中孵育 30 min。每个样品中加 80 μL BSTFA 后孵育(70 ℃, 1.5 h),

静置至与室内等温,加 5 μL FAMES (溶于氯仿)至样本中,上机检测。

样品采用 Agilent 7890 气相色谱仪和飞行时间质谱仪进行分析,进样量为 1 μL,载气为氦气,隔垫吹扫流速为 3 mL/min;色谱柱为 DB-5MS 毛细管柱(30 m×250 μm×0.25 μm),流速为 1 mL/min;柱箱升温程序:初始温度在 50 ℃下保持 1 min,以 10 ℃/min 的速率升高至 310 ℃,保持 8 min。前进样口温度为 280 ℃;传输线温度为 280 ℃;离子源温度为 250 ℃。电离电压为-70 eV;溶剂延迟 6.3 min 后,以每秒 12.5 个光谱的速率在 m/z 范围为 50~500 的全扫描模式下获取质谱数据。

质谱数据分析方法参考 Kind 等^[19],对物质定性使用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库,将质控样本中检出率<50%或相对标准偏差(RSD)>30%的峰去除^[20]。定性定量结果进行 *T* 检验,并采用 SIMCA 软件(V15.0.2)进行多维统计分析,包括主成分分析(principal component, PCA)和正交最小二乘判

别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。通过 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)注释分析鉴定差异代谢物及其参与的通路后,对通路进行综合分析(富集分析和拓扑分析),找到与代谢物差异相关性最高的关键通路,并使用 MetaboAnalyst 3.0 软件进行代谢通路的相关分析。

1.7 数据处理

实验数据采用 SPSS 21.0 统计学软件以最小显著极差法(LSD)进行分析,实验结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 生长指标

如表 2 所示,各组间初始体重无显著差异,高脂组终末体重、增重率和特定生长率显著低于对照组与垂盆草干预组($P < 0.05$),肝体比、饲料系数显著高于对照组和垂盆草干预组($P < 0.05$)。

表 2 吉富罗非鱼的生长性能
Tab. 2 The growth performance of *Oreochromis niloticus*

<i>n</i> =5; $\bar{x} \pm SD$			
项目 item	对照组 control group	高脂组 high fat group	垂盆草干预组 SSB extra group
初始体重/g W_0	11.49±0.72	11.44±0.56	11.57±0.71
终末体重/g W_t	143.49±1.84 ^a	121.17±1.23 ^c	138.87±2.67 ^b
肝体比/% HSI	1.06±0.03 ^c	1.37 ± 0.34 ^a	1.14 ± 0.01 ^b
特定生长率/% SGR	4.45±0.07 ^a	4.21±0.08 ^b	4.42±0.12 ^a
增重率/% WGR	1148.82±58.52 ^a	960.46±43.69 ^c	1104.04±85.52 ^b
饲料系数 FRC	1.21±0.03 ^c	1.41±0.05 ^a	1.33±0.08 ^b

注:同行数据上标不同表示组间存在显著差异($P < 0.05$).
Note: Values in the same line with different superscripts are significantly different($P < 0.05$).

2.2 血清生化指标

由表 3 可知,与对照组比较,高脂组血清 AST、ALT、TG、T-CHO、LDL-C、MDA、IL-8 和 TNF-α 水平显著升高($P < 0.05$),T-SOD、CAT、IL-10 水平显著降低($P < 0.05$);与高脂组相比,垂盆草干预组血清 AST、ALT、TG、T-CHO、LDL-C、MDA、IL-8 和 TNF-α 水平显著降低($P < 0.05$),T-SOD、HDL-C、CAT 和 IL-10 水平显著升高($P < 0.05$)。

2.3 肝脏组织电镜观察

对照组肝组织细胞整体结构正常,核内染色

质丰富,核仁明显,细胞质内可见线粒体呈圆形或长圆形,未见线粒体嵴明显断裂消失,内质网完整,未见明显脂滴,无明显肿胀扩张(图 1a)。高脂组肝组织细胞整体结构异常,细胞核固缩、溶解、消失,细胞质内细胞器稀疏,大量脂滴及糖原堆积,大部分线粒体嵴明显断裂、消失(图 1b)。与高脂组对比,垂盆草干预组的肝组织细胞整体结构改善,有边界模糊细胞核,细胞质内细胞器较多,只见少量线粒体嵴轻微断裂,脂滴减少且变小,糖原堆积减少(图 1c)。

表 3 吉富罗非鱼血清生化指标
Tab. 3 Serum biochemical indexes of *Oreochromis niloticus*

<i>n</i> =3; $\bar{x}\pm SD$			
项目 item	对照组 control group	高脂组 high fat group	垂盆草干预组 SSB extra group
肝功能指标 liver function index			
谷草转氨酶/(U/L) AST	8.12±0.35 ^b	14.03±0.60 ^a	8.77±0.72 ^b
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	7.67±0.60 ^b	17.34±1.47 ^a	9.24±1.96 ^b
脂质指标 lipid index			
甘油三酯/(mmol/L) TG	0.60±0.07 ^c	1.23±0.06 ^a	0.89±0.18 ^b
总胆固醇/(mmol/L) T-CHO	4.10±0.25 ^b	6.19±0.67 ^a	4.12±0.50 ^b
低密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L) LDL-C	0.42±0.02 ^b	0.81±0.11 ^a	0.39±0.04 ^b
高密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L) HDL-C	0.78±0.06 ^a	0.61±0.08 ^b	0.76±0.03 ^a
抗氧化指标 antioxidant index			
丙二醛/(nmol/mL) MDA	3.29±0.41 ^b	9.65±1.47 ^a	3.06±0.81 ^b
过氧化氢酶/(U/mL) CAT	62.48±1.30 ^a	21.08±1.30 ^c	56.46±2.26 ^b
超氧化物歧化酶/(U/mL) T-SOD	109.85±3.68 ^a	81.51±4.03 ^c	102.28±2.28 ^b
炎症指标 inflammation index			
白细胞介素 8/(pg/mL) IL-8	100.02±6.38 ^b	113.9±5.96 ^a	102.24±2.53 ^b
白细胞介素 10/(ng/L) IL-10	195.97±9.02 ^a	175.64±0.78 ^b	191.67±7.94 ^a
肿瘤坏死因子 α /(ng/L) TNF- α	457.77±8.44 ^c	538.66±6.09 ^a	475.35±5.31 ^b

注：同行数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Values in the same line with different superscripts are significantly different($P<0.05$).

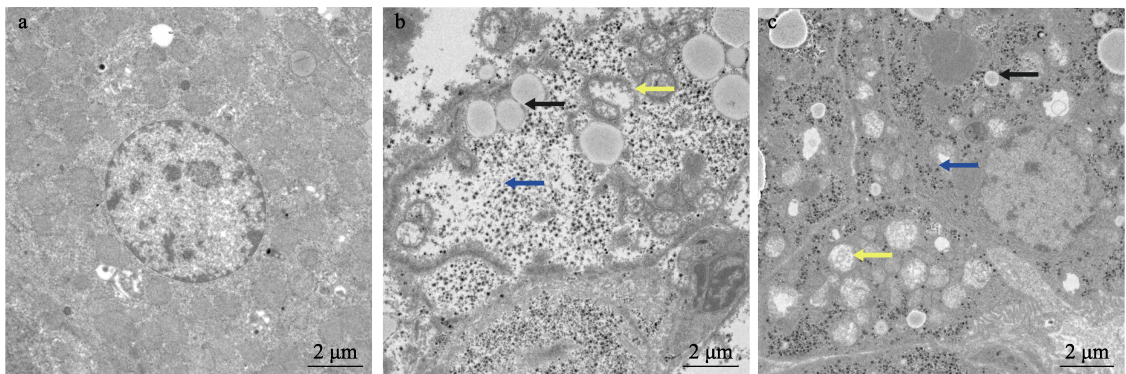


图 1 吉富罗非鱼的肝脏组织细胞超微结构(透射电镜)
a. 对照组肝脏组织细胞; b. 高脂组肝脏组织细胞; c. 垂盆草干预组肝脏组织细胞. 黑色箭头示脂滴, 蓝色箭头示糖原, 黄色箭头示线粒体.
Fig. 1 Ultrastructure of liver tissue of *Oreochromis niloticus* (transmission electron microscope)
a. Ultrastructure of liver tissue of control group; b. Ultrastructure of liver tissue of high fat group; c. Ultrastructure of liver tissue of SSB extra group. Black arrow shows lipid droplet, blue arrow shows glycogen, yellow arrow shows mitochondria.

2.4 罗非鱼肝组织代谢组学研究

2.4.1 多元统计分析 PCA 得分散点图中显示所有样本都处于 95%置信区间内(图 2a), OPLS-DA 图中可见对照组样本与高脂组样本完全分离, 垂盆草干预组样本与高脂组样本有明显的区别并趋向于对照组(图 2b, 2c)。

2.4.2 差异代谢物的筛选 本实验共有 15 个样本, 经 GC-TOF-MS 检测到 811 个色谱峰, 利用内标(IS)进行归一化处理后保留 655 个色谱峰, 结合 KEGG、PubChem、HMDB 数据库查询, 分析鉴定出 255 个代谢物。从上述代谢物中筛选出有显著差异($P<0.05$, $VIP>1$)的代谢物并绘制差异代谢

物火山图(图 3), 在此基础上剔除不知名差异代谢物后构建差异代谢物聚类分析热图。结果显示, 高脂组对比对照组中共有 27 个差异代谢物, 13 种代谢物上调, 14 种代谢物下调(图 4a)。垂盆草干预组对比高脂组中共有 23 个差异代谢物, 1 种代谢物上调, 22 种代谢物下调(图 4b)。

2.4.3 差异代谢物的代谢通路分析 对筛选到的差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析, 代谢通路影响因子(*Impact*)> 0.1 时为主要代谢通路。与对照组相比, 高脂组富集到 19 条代谢途径, 主要代谢通路为糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、 β -丙氨酸代谢(图 5a); 与高脂组相比, 垂盆草干预组富集

到 9 条代谢途径, 主要代谢通路为 β -丙氨酸代谢和亚油酸代谢(图 5b)。主要代谢通路内对应的差异代谢物的变化趋势见表 4。

3 讨论

3.1 垂盆草提取物对罗非鱼生长性能的影响

当鱼体摄入的脂肪含量超出其需求范围时, 脂肪会在肝脏等组织中沉积, 鱼体的正常生长代谢被抑制^[21]。付旭等^[22]对淡黑镊丽鱼(*Labidochromis caeruleus*)研究发现投喂高脂饲料的鱼体终末体质量显著下降, 肝体比显著上升($P<0.05$)。本实验中高脂组吉富罗非鱼较对照组终末体重、增重率

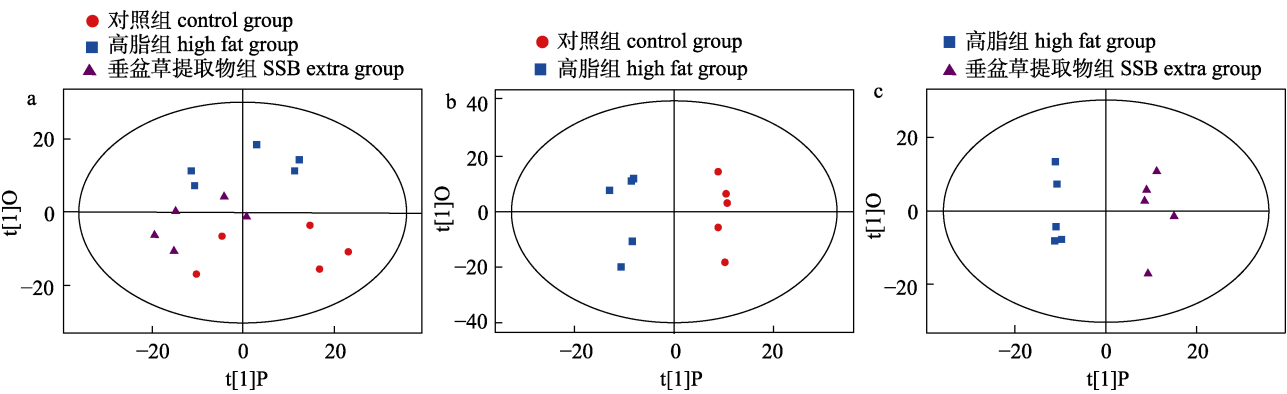


图 2 PCA 得分散点图和 OPLS-DA 得分散点图
Fig. 2 The PCA graph and OPLS-DA graph

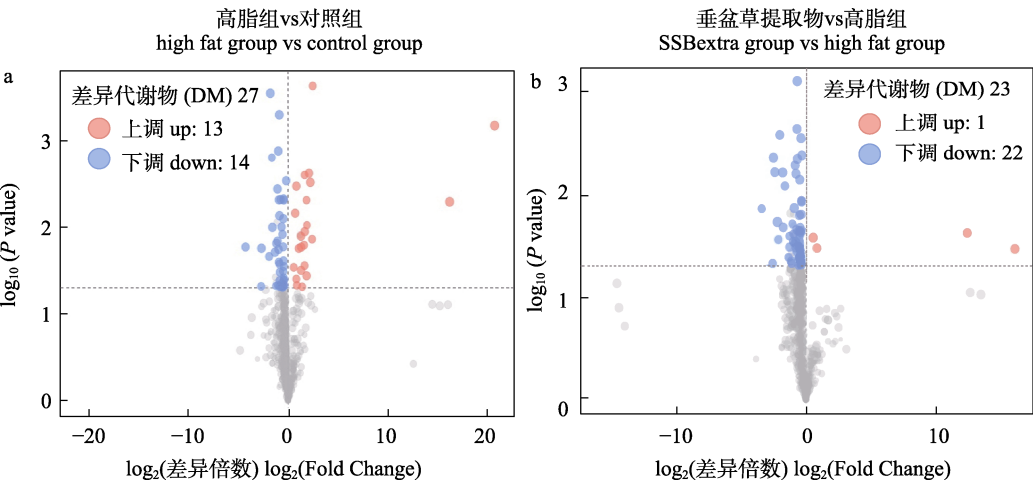


图 3 差异代谢物火山图

每个点代表一种代谢物, 灰色表示非显著差异, 红色表示显著上调($P<0.05$), 蓝色表示显著下调($P<0.05$)。

Fig. 3 Volcano plot of differential metabolites

Each point represents a metabolite, and the gray dots indicate no significant difference between the two groups, red dots indicate significantly ($P<0.05$) up-regulated metabolites, and blue dots indicate significantly ($P<0.05$) down-regulated metabolites.

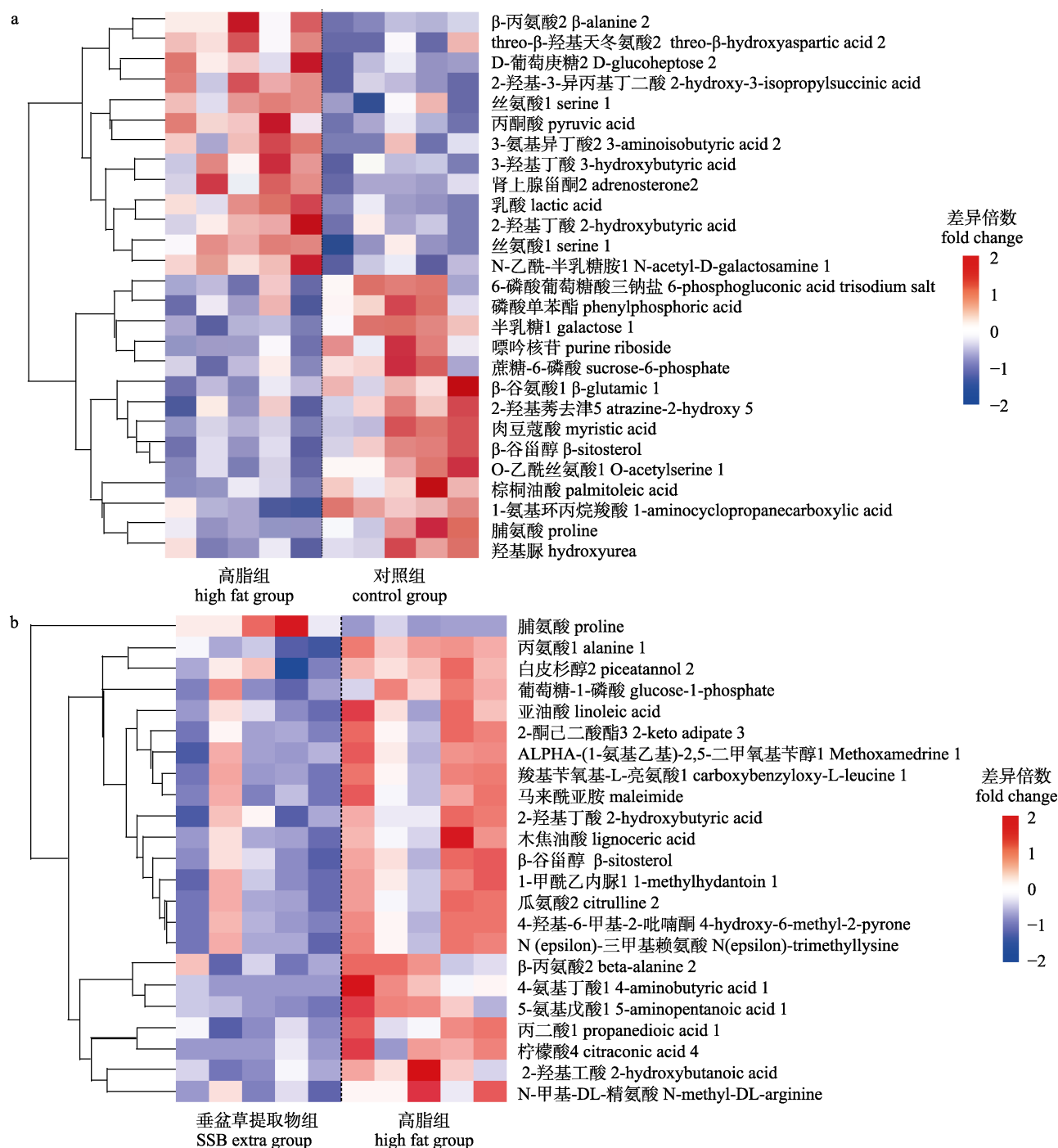


图 4 差异代谢物的层次聚类分析热图

纵坐标为差异代谢物，每一行代表一种差异代谢物；红色和蓝色分别表示上调和下调。

Fig. 4 Hierarchical clustering analysis thermal maps

The ordinate is the differential metabolite. Each line represents a kind of differential metabolite; red and blue indicate up regulation and down regulation respectively.

和特定生长率显著降低($P < 0.05$)，肝体比显著上升($P < 0.05$)，垂盆草干预组与之相反，说明饲料中过高的脂肪含量会使脂质主要沉积在肝脏中，

肝脏脂肪积累明显增加^[23]，代谢失衡，鱼体的生长受到抑制。加入垂盆草提取物后在透射电镜观察到罗非鱼肝组织脂滴减少，说明垂盆草提取物

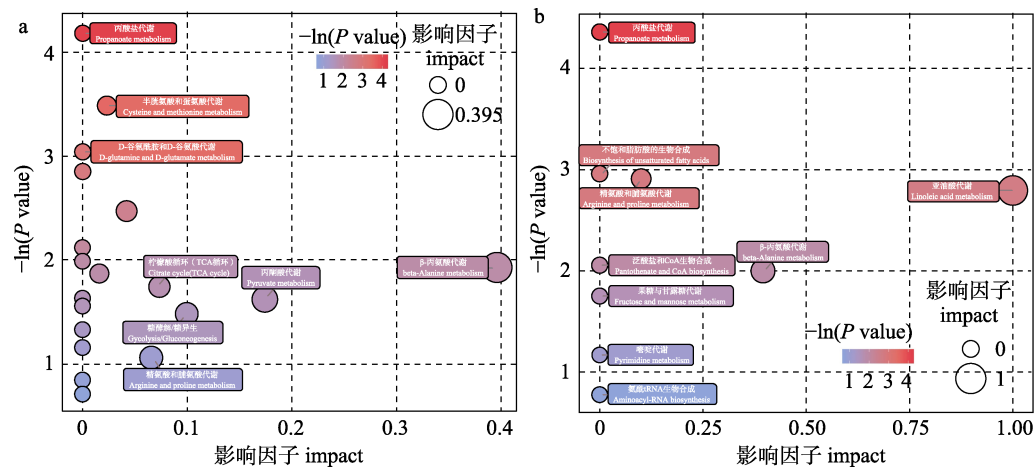


图 5 差异代谢物的 KEGG 通路富集散点图

a. 高脂组 vs 对照组差异代谢物 KEGG 通路富集散点图; b.垂盆草干预组 vs 高脂组差异代谢物 KEGG 通路富集散点图。横坐标与气泡大小表示该通路在拓扑分析中的影响因子大小, 气泡越大表明影响因子越大; 纵坐标与气泡颜色代表富集分析的 P 值 $[-\ln(P \text{ value})]$, 颜色越深代表富集程度越显著。

Fig. 5 Statistical scatter plot of pathway enrichment of differential metabolites

a. high fat group vs control group; b. SSB extra group vs high fat group. Abscissa and bubble size represent the influence factor size of the path in topology analysis, the larger the bubble the greater influence. The ordinate and bubble color represent the P value $[-\ln(P \text{ value})]$ of enrichment analysis, the darker the color the more significant of the enrichment degree.

表 4 主要差异代谢通路及其差异代谢物变化趋势

Tab. 4 Key differential metabolic pathways and their differential metabolites change trend

代谢通路 pathway	通路的 KEGG pathway 数据库 ID KEGG pathway ID	对应差异代谢物 corresponding differential metabolites
高脂组 vs 空白组 high fat group vs control group		
β-丙氨酸代谢 β-alanine metabolism	onl00410	β-丙氨酸 2 (β-alanine 2)↑
丙酮酸代谢 pyruvate metabolism	onl00640	丙酮酸(pyruvic acid)↑
糖酵解/糖异生 glycolysis/gluconeogenesis	onl00010	乳酸(lactic acid)↑
垂盆草干预组 vs 高脂组 SSB extra group vs high fat group		
β-丙氨酸代谢 β-alanine metabolism	onl00410	β-丙氨酸 2 (β-alanine 2) ↓ 丙氨酸 1 (alanine 1)↓
亚油酸代谢 linoleic acid metabolism	onl00591	亚油酸(linoleic acid)↓

注: ↑ 和 ↓ 分别表示差异代谢物的上调和下调。
Note: ↑ and ↓ indicate up-regulation and down-regulation respectively.

通过减少脂质在肝脏的累积, 减轻高脂摄食带来的负面影响。

3.2 垂盆草提取物对罗非鱼肝功能、血脂水平、抗氧化能力和炎症反应的影响

AST 和 ALT 是反应肝损伤的指标, 吴春艳等^[14]研究发现投喂高脂饲料会引起草鱼脂肪性肝组织损伤而造成血清中 AST、ALT 含量增加; Lin 等^[10]的研究表明垂盆草中的黄烷酮类化合物能降低四环素诱导的肝纤维化小鼠血清中的 ALT、AST 含量, 与本实验结果一致。由此可知,

吉富罗非鱼因长期摄食高脂饲料出现肝功能障碍, 添加垂盆草提取物后鱼体血清 AST 和 ALT 水平降低, 避免肝细胞损伤导致肝脏变性和坏死, 对吉富罗非鱼肝脏有一定的保护作用。

TC、T-CHO、LDL-C 和 HDL-C 常用作评判机体患脂肪性肝病的指标^[24], 本实验高脂组罗非鱼血清中 TC、T-CHO 和 LDL-C 水平较对照组均显著升高, HDL-C 显著降低, 与沈黄冕等^[25]对高脂血症罗非鱼研究的结果一致, 说明高脂组罗非鱼机体负荷增加, 高血脂现象明显。垂盆草中含有

DFV、槲皮素、异鼠李素、木犀草素和 β -谷甾醇等治疗肝损伤的生物活性成分^[26], 其中 β -谷甾醇能通过自身酯化作用使血清胆固醇水平降低^[27]。本实验罗非鱼在垂盆草提取物的干预下血脂水平降低, 因长期高脂饮食造成的机体脂质代谢异常得以改善, 这主要与垂盆草提取物中的 β -谷甾醇有关, 代谢组学研究中垂盆草干预组的 β -谷甾醇下调进一步证实这个推论。

SOD 主要清除活性氧物质(ROS), CAT 可将过氧化氢转化为水, 从而避免机体产生氧化损伤^[28]。MDA 是脂质过氧化损伤标志物, 其含量可以衡量机体氧化损伤的程度。蒋志涛等^[29]对 APAP 诱导小鼠的研究表明垂盆草总黄酮可以提高肝组织 SOD 活性, 降低 MDA 水平, 减少氧化应激和炎症反应。本实验高脂组罗非鱼血清中 SOD、CAT 含量较对照组显著降低, MDA 显著升高($P<0.05$), 且从透射电镜中观察到肝细胞线粒体损伤的现象, 表明饲料中脂肪含量过高导致鱼体肝细胞中发生氧化应激反应, 使线粒体受损, 从而减弱机体消除自由基的能力, 降低机体抗氧化能力^[30]。研究发现垂盆草提取物中的 δ -戊烯酮通过降低 ROS 水平并提高肝组织抗氧化活性来减轻氧化应激反应^[13], 本实验垂盆草干预组罗非鱼的 SOD、CAT 活性显著提高($P<0.05$), MDA 含量显著降低($P<0.05$), 可能是由于垂盆草提取物通过避免线粒体膜脂发生氧化磷酸化, 减少罗非鱼自由基的产生, 从而提高机体抗氧化能力, 改善机体生理状况。

TNF- α 是促进炎症反应发生的细胞因子, Trasino 等^[31]和 Kačarević 等^[32]研究发现高脂诱导的肥胖动物模型血清及细胞中 TNF- α 含量会显著升高。IL-8 会激活和趋化中性粒细胞, 从而加重肝脏的炎症反应; IL-10 具有减轻肝脏炎症损伤和肝纤维化的作用^[33-34]。肝脏内的脂质累积是炎症反应的促进因素, 也是炎症反应的结果, 即炎症因子在促进肝内炎症反应时, 也诱导肝脏脂质累积引发肝细胞死亡^[35-36]。肝脏对 FFA 摄取的增加使线粒体 β 氧化超载, ROS 水平上升, 引起脂质过氧化反应导致细胞发生炎症、坏死^[37]。乔艺^[38]对大鼠研究发现长期投喂高脂饲料会增强其 TNF- α 、IL-8 细胞因子的分泌, 抑制 IL-10 的表达,

与本实验高脂组结果一致。经垂盆草提取物干预后, 罗非鱼血清中 TNF- α 和 IL-8 的含量降低, IL-10 的含量升高, 结合透射电镜中垂盆草提取物改善肝组织细胞中线粒体体嵴断裂、减少脂滴的现象, 一定程度上说明垂盆草提取物通过减少肝脏脂质的累积和过氧化反应、抑制促炎因子的分泌从而缓解罗非鱼的肝脏损伤。

3.3 垂盆草提取物干预高脂诱导罗非鱼脂肪肝病的肝脏代谢组学研究

从筛选出的重要差异代谢物和 KEGG 通路富集分析的结果看, 高脂投喂主要影响吉富罗非鱼肝脏中的 β -丙氨酸代谢、丙酮酸代谢和糖酵解或糖异生, 垂盆草提取物主要通过调控 β -丙氨酸代谢和亚油酸代谢的通路发挥干预作用。

糖酵解主要的生理功能是为机体提供能量, 其代谢过程是葡萄糖分解成丙酮酸后, 丙酮酸转变为乳酸。丙酮酸是生物体维持正常生理功能的关键的代谢物^[39], 经过脱羧反应转变为乙酰辅酶 A, 有氧条件下进入三羧酸循环为机体供能^[40], 此时有氧代谢抑制糖酵解。缺氧时丙酮酸则进行糖酵解反应, 在细胞质中转变成乳酸。动物体内的 β -丙氨酸主要在肝脏中合成, 来源于嘧啶的降解代谢, 是组成泛酸、辅酶 A 等的成分^[41]。张蕾等^[42]研究高脂血症小鼠发现模型组小鼠乳酸明显升高, 表明脂代谢紊乱会影响糖代谢进而导致糖脂代谢紊乱。还有研究表明高脂饲料在部分物种中对糖酵解具有促进作用^[43]。本实验高脂组中丙酮酸、乳酸和显著上调, 且血清中 TC、T-CHO 和 LDL-C 水平较对照组显著升高, 说明罗非鱼机体已出现糖脂代谢紊乱。结合透射电镜中线粒体受损的现象推测, 糖代谢产生的丙酮酸主要进行糖酵解反应形成乳酸, 有氧氧化过程被抑制, 丙酮酸无法进入线粒体进行三羧酸循环氧化生成乙酰辅酶 A, 机体代谢紊乱。垂盆草干预组中丙氨酸和 β -丙氨酸下调, 且电镜观察到线粒体损伤得到缓解, 表明垂盆草提取物通过回调 β -丙氨酸来恢复机体的糖代谢紊乱, 但具体原因有待进一步研究。

亚油酸(LA)是 6-不饱和脂肪酸(n-6 PUFAs)的母体, 研究显示, 高含量的 n-6 PUFAs 会促使鱼

体炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达量升高^[44], 姚林杰等^[45]研究发现饲料中过高的亚油酸可能会对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的肝脏代谢产生一定的干扰, Zhu 等^[46]研究表明高剂量亚油酸可上调大鼠 JAK2-STAT3 通路下游蛋白(IL-6、TNF- α 和 FAS)的表达, 本实验中高脂饮食罗非鱼肝组织细胞受损, 炎症因子 TNF- α 和 IL-8 表达量上升, 与前人研究结果相吻合。在垂盆草提取物的干预下亚油酸代谢通路中的亚油酸下调, TNF- α 和 IL-8 含量下降并趋近对照组, 说明垂盆草提取物能抑制肝脏组织炎症反应, 避免肝脏进一步损伤, 其机制可能与回调的亚油酸通过 PUFA 抑制肝脏中编码脂肪合成酶和糖酵解酶的基因转录, 并促进脂肪酸的 β -氧化, 从而减少肝脏中脂类的合成和加强脂类的分解有关。

4 结论

在高脂饲料中添加垂盆草提取物可以改善吉富罗非鱼的生长性能, 减轻高脂投喂引起的炎症反应, 提高机体抗氧化能力, 调节血脂水平。罗非鱼肝脏代谢组学结果表明, 垂盆草提取物通过调节机体糖代谢功能和抑制炎症反应从而对高脂饲料引起的脂肪性肝病发挥干预作用, 其调控机制与 β -丙氨酸代谢通路的丙氨酸、亚油酸代谢通路的亚油酸相关。

参考文献:

- [1] Mu X Q. Study on growth models of gift tilapia pedigrees and related indicators of immunity[D]. Nanning: Guangxi University, 2014. [穆秀琼. 吉富罗非鱼家系生长模型及免疫相关指标研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014.]
- [2] Li D, Liu L T. Introduction to diagnosis and treatment of fish fatty liver disease[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(1): 114-117. [李丹, 刘龙腾. 养殖鱼类脂肪肝病的诊断和防治研究概况[J]. 动物医学进展, 2016, 37(1): 114-117.]
- [3] Du Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: A review and new perspectives[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1628-1638. [杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1628-1638.]
- [4] Guo L, Tang Q Q. Research progress of the mechanism and therapy of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(11): 1165-1172. [郭亮, 汤其群. 非酒精性脂肪肝病发病机制和治疗的研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(11): 1165-1172.]
- [5] Mantovani A, Gatti D, Zoppini G, et al. Association between nonalcoholic fatty liver disease and reduced bone mineral density in children: A meta-analysis[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2019, 70(3): 812-823.
- [6] Zhou Z T, Deng L M, Hu L J, et al. Recent advances in research on targets and drugs for treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2020, 29(12): 1363-1374. [周宗涛, 邓利明, 胡丽君, 等. 非酒精性脂肪肝病药物治疗靶点及药物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(12): 1363-1374.]
- [7] Ding J, Zhang B, Wang P J. Analysis on mechanisms and medication rules of herbal prescriptions for nonalcoholic fatty liver disease based on methods of data mining and biological information[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(8): 1689-1695. [丁静, 张斌, 王培劼, 等. 基于数据挖掘和生物信息分析探讨非酒精性脂肪肝病用药规律及作用机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1689-1695.]
- [8] Yang Y Y, Wan X H, Liu Y N, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Sedum sarmentosum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(18): 4341-4348. [杨迎迎, 万新焕, 刘英男, 等. 垂盆草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(18): 4341-4348.]
- [9] Lin Y C, Luo H Y, Liu H F, et al. Anti-fibrotic mechanism of *Sedum sarmentosum* total flavanones in inhibiting activation of HSC by regulating Smads[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(3): 631-635. [林远灿, 骆海莺, 刘慧芳, 等. 垂盆草总黄酮调控 Smads 通路抑制肝星状细胞活化的抗肝纤维化机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 631-635.]
- [10] Lin Y C, Luo H Y, Wang X, et al. Flavanones from *Sedum sarmentosum* bunge alleviate CCl₄-induced liver fibrosis in rats by targeting TGF- β 1/T β R/smad pathway in turn inhibiting epithelial mesenchymal transition[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018: 3080837.
- [11] Bai Y H, Lu H, Zhang G, et al. *Sedum sarmentosum* Bunge extract exerts renal anti-fibrotic effects in vivo and in vitro[J]. Life Sciences, 2014, 105(1-2): 22-30.
- [12] Hao L, Liu M W, Gu S T, et al. *Sedum sarmentosum* Bunge extract ameliorates lipopolysaccharide- and D-galactosamine-induced acute liver injury by attenuating the hedgehog signaling pathway via regulation of miR-124 expression[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2020, 20(1): 88.
- [13] Wang G W, Zhang X L, Wu Q H, et al. The hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* extract and its isolated major

- constituent through Nrf2 activation and NF- κ B inhibition[J]. *Phytomedicine*, 2019, 53: 263-273.
- [14] Wu C Y, Wang K Y, Ren S Y, et al. Therapeutic effects of *Sedum sarmentosum* water extraction on *Ctenopharyngodon idellus* with fatty liver injury[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 901-908. [吴春艳, 汪开毓, 任思宇, 等. 垂盆草(*Sedum sarmentosum*)水提物对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)脂肪性肝损伤治疗效果研究[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 901-908.]
- [15] Huang L D, Cheng Y, Huang K, et al. Ameliorative effect of *Sedum sarmentosum* Bunge extract on Tilapia fatty liver via the PPAR and P53 signaling pathway[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8456.
- [16] Liu Q Y, He Y S, Deng Y J, et al. Progress of application of metabonomics in the acute liver injury[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2021, 37(13): 1732-1735, 1748. [刘奇越, 何燕珊, 邓颖嘉, 等. 代谢组学技术在急性肝损伤的应用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(13): 1732-1735, 1748.]
- [17] Chen K L, Qiu X J. Application of metabolomics in Chinese herbal medicine researches[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2017, 37(19): 1993-1996, 2004. [陈克利, 邱相君. 代谢组学在中草药研究中的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(19): 1993-1996, 2004.]
- [18] Zhang M C. Under the condition of high fat to establish the model of fatty liver of genetic improvement of farmed tilapia and the pharmacodynamic function study of *Sedum sarmentosum* bunge[D]. Nanning: Guangxi University, 2017. [张梦慈. 高脂条件下吉富罗非鱼脂肪肝病的模型建立及垂盆草药效作用的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2017.]
- [19] Kind T, Wohlgemuth G, Lee D Y, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(24): 10038-10048.
- [20] Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(7): 1060-1083.
- [21] Mu X P, Lin X T, Zhu Z M, et al. Effects of upstream-swimming exercise and dietary lipid level on growth and muscle nutritional components of genetic improvement of farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(5): 1411-1420. [穆小平, 林小涛, 朱志明, 等. 逆流运动及饲料脂肪水平对吉富罗非鱼生长和肌肉营养成分的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(5): 1411-1420.]
- [22] Fu X, Cui Q J, Chen B, et al. Effects of dietary lipid levels on growth and carotenoid accumulation of freshwater fish cichlid *Labidochromis caeruleus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(1): 56-62. [付旭, 崔前进, 陈冰, 等. 饲料脂肪水平对淡水黑颧丽鱼生长及色素蓄积的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 56-62.]
- [23] Wang X X, Li Y J, Hou C L, et al. Physiological and molecular changes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.) with high-fat diet-induced fatty liver disease[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(2): 272-282.
- [24] Lin X, Li F J, Lin S M, et al. Effects of n-3 fatty acids with different carbon chain lengths and lipid levels on growth, liver function and postprandial blood indices of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 775-784. [林鑫, 李法见, 林仕梅, 等. 不同碳链长度 n-3 脂肪酸及脂肪水平对罗非鱼生长、肝功能和餐后血液指标的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(3): 775-784.]
- [25] Shen H M, Peng X H, Lin S M, et al. Regulation of fermented mulberry leaves on serum lipid and blood glucose levels of hyperlipidemia tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(4): 1250-1256. [沈黄冕, 彭祥和, 林仕梅, 等. 发酵桑叶对高脂血症罗非鱼血脂、血糖水平的调节作用[J]. 动物营养学报, 2016, 28(4): 1250-1256.]
- [26] Chen M Z, Sun Q. Systemic pharmacology understanding of the key mechanism of *Sedum sarmentosum* Bunge in treating hepatitis[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2021, 394(2): 421-430.
- [27] Chen S N, Wang R Q, Cheng M Y, et al. Serum cholesterol-lowering activity of β -sitosterol laurate is attributed to the reduction of both cholesterol absorption and bile acids reabsorption in hamsters[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(37): 10003-10014.
- [28] Li R, Zhou X Q, Liu D, et al. Enhancing the activity and stability of Mn-superoxide dismutase by one-by-one ligation to catalase[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 129: 138-145.
- [29] Jiang Z T, Wang X, Han Y, et al. Protective effects of *Sedum sarmentosum* total flavonoids on acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2021, 43(2): 349-355. [蒋志涛, 王雪, 韩怡, 等. 垂盆草总黄酮对 APAP 诱导小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中成药, 2021, 43(2): 349-355.]
- [30] Lu K L, Xu W N, Liu W B, et al. Association of mitochondrial dysfunction with oxidative stress and immune suppr-

- ession in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high-fat diet[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2014, 26(2): 100-112.
- [31] Trasino S E, Tang X H, Jessurun J, et al. A retinoic acid receptor $\beta 2$ agonist reduces hepatic stellate cell activation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 2016, 94(10): 1143-1151.
- [32] Kačarević Ž P, Grgić A, Šnajder D, et al. Different combinations of maternal and postnatal diet are reflected in changes of hepatic parenchyma and hepatic TNF- α expression in male rat offspring[J]. *Acta Histochemica*, 2017, 119(7): 719-726.
- [33] Zimmermann H W, Seidler S, Gassler N, et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21381.
- [34] Chou W Y, Lu C N, Lee T H, et al. Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006, 27(4): 469-476.
- [35] Csak T, Ganz M, Pespisa J, et al. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2011, 54(1): 133-144.
- [36] Igoillo-Estève M, Marselli L, Cunha D A, et al. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2010, 53(7): 1395-1405.
- [37] Wei D L. Effects of blood-pricking therapy on inflammatory cytokines IL-6, IL-18 and TNF- α of nonalcoholic fatty liver disease[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018. [魏丹蕾. 刺络泻血对非酒精性脂肪肝相关炎症因子 IL-6、IL-18、TNF- α 的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.]
- [38] Qiao Y. The effect of oxidative stress induced by high fat diet on changes of gut microbiota and inflammation in mice[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014. [乔艺. 高脂诱导的氧化应激对小鼠肠道菌群改变与炎症反应的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2014.]
- [39] Sousa J, Westhoff P, Methling K, et al. The absence of pyruvate kinase affects glucose-dependent carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolites*, 2019, 9(10): 216.
- [40] Li A X, Yuan X C, Liang X F, et al. Adaptations of lipid metabolism and food intake in response to low and high fat diets in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 457: 43-49.
- [41] Qi B, Wu S G, Wang J, et al. Physiological function and its application in animal feeding of β -alanine[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(4): 1027-1034. [齐博, 武书庚, 王晶, 等. β -丙氨酸的生理功能及其在动物生产中的应用[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(4): 1027-1034.]
- [42] Zhang L, Zhang Q, You Y, et al. Investigation of evolution rules of phlegm and blood stasis syndrome in hyperlipidemia and atherosclerosis by NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2015, 35(7): 823-833. [张蕾, 张琪, 游云, 等. 基于代谢组学技术探讨高脂血症及动脉粥样硬化痰瘀证候的演变规律[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(7): 823-833.]
- [43] Yang L P, Qin C B, Zheng W J, et al. Progress in research on the regulation of glucose sensing and carbohydrate metabolism in fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1639-1649. [杨丽萍, 秦超彬, 郑文佳, 等. 鱼类的葡萄糖感知与糖代谢调节研究进展[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1639-1649.]
- [44] Montero D, Mathlouthi F, Tort L, et al. Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 1073-1081.
- [45] Yao L J, Ye Y T, Cai C F, et al. Optimal dietary α -linolenic acid and linoleic acid contents of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 766-774. [姚林杰, 叶元土, 蔡春芳, 等. 团头鲂幼鱼饲料中 α -亚麻酸、亚油酸的适宜含量[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 766-774.]
- [46] Zhu F, Guan Y, Zhang R. High-dose linoleic acid activated JAK2-STAT3 signaling pathway involved in cytokine production and lipogenesis in pancreatic exocrine cells[J]. *Current Molecular Medicine*, 2016, 16(7): 668-676.

Potential mechanism of *Sedum sarmentosum* Bunge extract in the intervention effects of *Oreochromis niloticus* fed with high fat based on liver metabonomics

PANG Linxing¹, HUANG Kai¹, YU Dan³, WANG Ting², YU Kai¹, MO Cuiqin¹, GUO Ruijie¹

1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Liujiang Agricultural Science and Technology Extension Center, Liuzhou 545100, China;

3. Guangxi Baiyue Agriculture and Animal Husbandry Development Co., Ltd., Nanning 530000, China

Abstract: *Oreochromis niloticus* is one of the most important cultivated species of tilapia. Fatty liver disease induced by large-scale intensive culture, high stocking density, unbalanced nutrition feeds, and improper feeding have become a common disease in fish, but there is no specific drug to treat fatty liver disease at present. Many studies have shown that *Sedum sarmentosum* Bunge (SSB) extract has a positive effect on the treatment of fatty liver disease. Research clarifying the efficacy of Chinese herbal medicine and exploring its mechanism using metabonomics has increased significantly in recent years. However, research on the therapeutic effect of SSB extract on fatty liver disease of fish from the perspective of metabolomics has not been reported. Therefore, to explore the intervention and mechanism of SSB extract on fatty liver of *Oreochromis niloticus*, three isonitrogenous diets were formulated: control group (0% soybean oil, 0% SSB extract), high fat group (4% soybean oil, 0% SSB extract), and SSB extract group (4% soybean oil, 0.12% SSB extract). After eight weeks of feeding tilapias with an initial body mass of (11.63±0.66) g, their serum and livers were taken by using non-targeted metabonomics, combined with the observation of liver tissue by transmission electron microscope and the results of serum biochemical indices for analysis. The results indicate that: (1) The body weight, weight gain rate, and specific growth rate in the high fat group were significantly lower than those in the control group and SSB extra group ($P<0.05$), while the hepatosomatic index and feed conversion ratio were significantly higher than those in the control group and SSB extra group ($P<0.05$). (2) Transmission electron microscopy showed that the overall structure of liver tissue in the control group was normal, and the overall structure of liver tissue in the high fat group was abnormal. Compared with the high fat group, the overall tissue structure of the SSB extra group was improved. (3) Serum biochemical indexes showed that SSB extract could significantly reduce ALT, AST, TG, T-CHO, LDL-C, TNF- α , and IL-8 ($P<0.05$), while the levels of HDL-C, T-SOD, CAT and IL-10 were significantly increased ($P<0.05$). (4) The results of metabolomics of liver tissue showed that there were 27 differential metabolites in the high fat group compared with the control group, mainly involving three pathways; while compared with the high fat group, there were 23 differential metabolites in the SSB extra group, mainly involving two pathways. These results show that SSB extract has a positive effect in alleviating fatty liver injury caused by high-fat diet, and beta-alanine metabolism and linoleic acid metabolism were related to its regulatory mechanism. This study can reveal the mechanism of adding SSB extra to feed in the treatment of fatty liver diseases of fish at the molecular level. It also provides a theoretical basis for in-depth discussion on the mechanism of adding Chinese herbal medicine to the diet of fish for the treatment of fatty liver diseases.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Sedum sarmentosum* Bunge extract; high fat; metabonomics

Corresponding author: HUANG Kai. E-mail: hkai110@163.com; Yu Dan. E-mail: 16867982@qq.com