

标题	条目 1	探讨高温加工食物诱导非肥胖非酒精性脂肪性肝病的非靶代谢组学特点
摘要	条目 2	<p>研究背景：非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)已成为世界上最常见的慢性肝病之一。在我们对 NAFLD 患者的早期临床资料和问卷分析中发现，部分患者的 BMI 不符合超重或肥胖的诊断标准。食用油炸食品、火锅、烧烤等高温加工食品与非肥胖 NAFLD 的发生密切相关。减少这类食物的摄入可以减轻疾病的严重程度，改善预后。目的：探讨高温加工食物诱导非肥胖非酒精性脂肪性肝病的非靶代谢组学特点方法。方法：54 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠分为三组:对照组给予标准饮食。NDFS 组给予 60%的非干炒大豆和 40%的基础饲料，DFS 组给予 60%的干炒大豆和 40%的基础饲料。各组在第 4、8、12 周处死 6 只大鼠。进行了进食量、体重、Lee's 指数、肝脏指数、血清学指标和肝脏组织病理学检查。非靶向代谢组学特征分析大鼠第 12 周肝脏代谢产物的变化。分析 DFS 组与对照组、DFS 组和 NDFS 组之间代谢产物和病理评分的相关性。我们选取了通路内和不在通路内的部分代谢物，初步解释了三组大鼠肝脏病理的代谢组学差异。结果：DFS 组与对照组相比，进食量、体重、Lee's 指数和血清学指标方面差异无统计学意义($p>0.05$)。第 12 周时，DFS 组肝脏指数最小 (NDFS 组 vs DFS 组, $P<0.05$)。DFS 组脂肪变性评分、炎症评分和纤维化评分均显著高于其他两组($P<0.05$)。KEGG 途径显示，DFS 组和 NDFS 组的主要富集途径包括胆碱代谢、胆汁分泌、甘油磷脂代谢、初级胆汁酸生物合成。DFS 组和 NDFS 组肝脏病理评分及差异代谢物的相关性分析显示，有 10 个强相关物质，5 个正相关物质，5 个负相关物质。正相关物质包括 Taurochenodeoxycholate-3-sulfate, Acetylcarnitine, 20a,22b-Dihydroxycholesterol, 13E-Tetranor-16-carboxy-LTE4, Taurocholic acid。负相关物质包括 Choline, Cholestane-3,7,12,25-tetrol-3-glucuronide, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP+), LysoPC (16:1(9Z)), Glycerol 3-phosphate。DFS 组和对照组的主要富集途径包括一碳单位叶酸代谢、甘油磷脂代谢、胆汁分泌、戊糖和葡萄糖酸互转化、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢。DFS 组与对照组肝脏病理评分及差异代谢物相关性分析显示，强相关物质 13 种，正相关物质 4 种，负相关物质 9 种。正相关的有</p>

4-Hydroxy-6-eicosanone, 3-Phosphoglyceric acid,
13-Hydroxy-9-methoxy-10-oxo-11-octadecenoic acid,
Taurochenodeoxycholate-3-sulfate。负相关物质包括: LysoPC(16:1(9Z)),
S-(9-hydroxy-PGA1)-glutathione, LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)), SM(d18:1/14:0),
Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP+), 5,10-Methylene-THF, Folinic acid,
N-lactoyl-Glycine, 6-Hydroxy-5-methoxyindole glucuronide. 结论: 我们利用特制的高温
处理饲料成功诱导大鼠肝损伤, 并探索其非靶向代谢组学特点。

前言

背景 条目 3

a. 非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的肝损害因素所致的, 以弥漫性肝细胞脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 疾病谱包括单纯性肝脂肪变、脂肪性肝炎、肝硬化和肝细胞癌。NAFLD 现已经成为世界上最常见的慢性肝病之一, 根据国外流行病学调查, NAFLD 在成年人中的患病率可达 20%~30%, 而在 II 型糖尿病的患者中患病率可高达 42%~70%。然而, 并非所有肥胖受试者都发展为 NAFLD, NAFLD 也可以在非肥胖个体中发现。为了更好地理解非肥胖受试者中发生的 NAFLD, 我们建议使用非肥胖 NAFLD 这一术语, 有一些 NAFLD 患者并没有肥胖的症状, 有 8%-19% 的 BMI 正常的非肥胖人群中患有 NAFLD, 非肥胖 NAFLD 患者在亚洲及西方国家可分别定义为 $<28\text{kg/m}^2$ 和 $<30\text{kg/m}^2$ 。NAFLD 被认为是一种复杂的疾病特征, 因此环境与易感多基因宿主背景之间的相互作用决定了疾病表型并影响进展。在全球范围内, 估计有 2000 万人最终会死于 NAFLD 相关的肝病, 而 2 型糖尿病和心血管疾病的风险也会增加。现在研究已经用“多重打击”理论取代“二次打击”理论, 在环境和具有遗传倾向的个体中, 炎症往往先于脂肪变性的发生, 许多因素共同诱导 NAFLD 的发生, 这些因素包括胰岛素抵抗, 从脂肪组织分泌的激素, 营养因子, 由肠道微生物群释放的内毒素 (脂多糖), 氧化应激损伤以及遗传和表观遗传因子。这些因素通过 Toll 样受体作用于肝实质细胞, 以驱动 NASH 的进展。NASH 的发病机制尚不清楚, 从“二次打击理论”到“多重打击理论”, 已经提出了几种理论, 然而, 大家普遍的共识是肠道微生物群、氧化应激和线粒体损伤在 NASH 的发病机制中起关键作用。肠上皮细胞和一些共生细菌之间的相互作用诱导活性氧物质 (ROS) 的快速产生, 有研究表明肝脏的脂肪变性和氧化应激也可能是由肠道微生物群的变化引起的。在非肥胖 NAFLD 患者中, 饮食成分 (即过量摄入胆固醇和减少 PUFA 摄入量) 可能对肝胰岛素抵抗的早期发展产生重大影响, 并可能是 NAFLD 发

展及其后续代谢改变的关键因素。PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, PNPLA3, 又称脂肪细胞营养素或不依赖于钙的磷脂酶 A2 ϵ) 基因多态性对无代谢综合征患者的肝脏脂肪有较大影响。在高加索和日本人群中发现 PNPLA3 的单核苷酸多态性 I148M(rs738409, 异亮氨酸变为甲硫氨酸) 是 NAFLD 最强的遗传决定因素之一, 可影响甘油三酯水解, 从而引起肝细胞中甘油三酯积聚, 发生脂肪性肝和纤维化进展。日本一项研究发现非肥胖 NAFLD 患者有更高的高胆固醇摄入量和更低的多不饱和脂肪酸摄入量, 胆固醇过量可以通过上调肝 X 受体- α 的表达, 并通过增加甾醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 途径中的代谢物氧化甾醇水平来激活脂肪酸合成, 从而刺激脂肪的从头生成。长期摄入含果糖的软饮料可以增加 NAFLD 的风险, 比起肥胖 NAFLD 患者, 非肥胖 NAFLD 患者的患病年龄较轻, 而且年轻人摄入软饮料的量明显高于老年人, 所以果糖的过量摄入对非肥胖 NAFLD 患者可能具有更大的影响作用。高温加工食物诱导人体损伤的研究报道较少, 机制尚未阐明。在我们早期对 NAFLD 患者的临床资料和问卷分析中发现, 部分患者的 BMI 不符合超重或肥胖的诊断标准。食用油炸食品、火锅、烧烤等高温加工食品与非肥胖 NAFLD 的发生密切相关。减少这类食物的摄入可以减轻疾病的严重程度, 改善预后。因此, 我们的研究对 NAFLD 具有重要的意义。

b. SD 大鼠是我国引进最早、使用最广泛, 数量最多的实验动物品种, 具有生长快, 繁育性能好, 大多用于安全性试验及营养与生长发育有关的研究。雌性大鼠的雌激素会对肝脏有一定影响, 因此本实验使用的大鼠均为雄性大鼠。

目的 条目 4 主要目的: 探讨高温加工食物诱导大鼠非肥胖非酒精性脂肪性肝病的发生, 次要目的: 探讨非肥胖非酒精性脂肪性肝病的非靶代谢组学特点。

方法

伦理声明 条目 5 已通过医院伦理申请, 批准号: 190201

研究设计 条目 6

a. 三组, 每组 18 只大鼠

b. 54 只雄性 SD 大鼠, 200-220g 6-8 周, 适应性喂养 1 周后随机分成 3 组, 每组 18 只大鼠, 3 组间大鼠体质量差异无显著性 ($P > 0.05$)。正常组 (对照组 1) 18 只大鼠, 未炒黄豆组 (对照组 2) 18 只大鼠, 炒黄豆组 18 只大鼠。

c. 每笼饲养 3 只大鼠, 共 18 笼。于第 4、8、12 周每组各解剖 6 只大鼠 (6 只大鼠为最少生物学重复数量)。

实验步骤 条目 7 a. 对照组 1 饲喂正常饲料、对照组 2 饲喂 40% 基础饲料+60% 未炒黄豆、炒黄豆组饲喂 40% 基

础饲料+60%高温干炒黄豆。于第 4、8、12 周每组各解剖 6 只大鼠。实验步骤：(1)大鼠处死前 12 小时禁食，自由饮水，第二天上午 8:00 称重，用电子天平连续称取 3 次体重，取平均值。10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后，将大鼠迅速固定在解剖板上，测量大鼠体长(体长为大鼠麻醉状态下鼻尖至肛门的长度)；随后沿腹部中线依次切开皮肤，皮下组织和腹膜，以露出腹腔。(2)腹主动脉采集大鼠血液，静置后在 3000 rpm 下离心 10 分钟，收集血清进行血清学检查，测量 ALT、AST、TC、TG 等指标。游离肝脏，剪下肝脏，用 0.9%生理盐水清洗一遍，纱布擦干、称重并拍照。将肝脏组织放置于培养皿内，并置于冰上保持低温，取大鼠肝右叶、左外侧叶、左内侧叶、左中叶、尾状叶、乳头叶距边缘 5mm 处 $1 \times 1 \times 0.5 \text{cm}^3$ 大小肝组织，置于 10%福尔马林中浸泡固定，石蜡包埋，用于 HE 染色、Masson 染色和免疫组化。(4)每叶留取 $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{cm}^3$ 肝组织 5 块，置入液氮中储存，用于非靶代谢组学检测。(5)每叶另取 $1 \times 1 \times 0.5 \text{cm}^3$ 大小肝组织制备冰冻切片，用于油红 O 染色。

b. 解剖前一天晚禁食，第二天早 8:00 开始实验。

c. 动物饲养及解剖均在中日友好医院临床研究所

d. 前期 10%水合氯醛麻醉大鼠效果较好，较少不良反应，腹腔注射容易操作。

实验动物 条目 8 a. 雄性 SD 大鼠，200-220g 6-8 周。

b. 实验动物购自北京华阜康生物科技股份有限公司

饲养场所和饲养 条目 9 a. 饲养场所在中日动物房，SPF 级动物，无特定病原，实验动物设施为屏障系统。同笼 3 只同品系大鼠。

b. 饲养环境温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ，12:12 h 明暗循环。自由进食饲料及水。特殊饲料由北京斯贝福生物技术有限公司制作并提供。

c. 动物福利包括生理福利，环境福利，卫生福利，行为福利，心理福利。我们在实验过程中一直秉持这 5 个原则，使动物获得较好的福利。

样本量 条目 10 a. 共 54 只，每组 18 只。

b. 每组每次解剖 6 只（6 只为最少生物学重复，我们尽量减少对动物的过多伤害）

c. 每个实验独立重复 6 次。

动物实验分组 条目 11 a.分组采用随机数字表法进行分组。

b.分别给每个大鼠编号。

实验结果 条目 12 a.主要结果指标：肝脏病理学为金标准

b.次要结果指标：一般情况（包括进食量、体重、体长等），肝重，血清学指标。

统计学方法 条目 13 a.代谢组结果分析：上机完成之后，LC-MS 原始数据导入代谢组学处理软件 Progenesis Q1

(Waters Corporation, Milford, USA) 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐，最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵，数据矩阵用 80% 规则来去除缺失值，即保留至少一组样品中非零值 80% 以上的变量，再进行填补空缺值（原始矩阵中最小值填补空缺值），为减小样品制备及仪器不稳定带来的误差，用总和归一化 法对样本质谱峰的响应强度进行归一化，得到归一化后的数据矩阵。同时删除 QC 样本相对标准偏差 (RSD) >30% 的变量，并进行 log₁₀ 对数化处理，得到最终用于后续分析的数据矩阵。

同时将 MS 和 MSMS 质谱信息与代谢公共数据库 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>) 和 Metlin(<https://metlin.scripps.edu/>) 数据库进行匹配,得到代谢物信息。预处理后的数据上传美吉生物云平台上(<https://cloud.majorbio.com>) 进行数据分析。R 软件包 ropls(Version1.6.2) 进行主成分分析 (PCA) 和正交最小偏二乘判别分析 (OPLS-DA)，并使用 7 次循环交互验证来评估模型的稳定性。此外，进行 student's t 检验和差异倍数分析。显著差异代谢物的选择基于 OPLS-DA 模型得到的变量权重值 (VIP) 和 student's t 检验 p 值来确定，VIP>1, p<0.05 的代谢物为显著差异代谢物。通过 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) 进行的代谢通路注释，获得差异代谢物参与的通路。Python 软件包 scipy.stats 进行通路富集分析，并通过 Fisher 精确检验获得与实验处理最相关的生物学途径。

其他数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行记录及统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$) 表示。多样本均值的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，条件是各样本均值符合

正态分布和方差齐性。如果不符合正态分布和方差齐性，则采用多样本非参数检验。 $P < 0.05$

为差异有统计学意义， $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

b. 代谢组学用来分析第 12 周 3 组大鼠肝脏样本。其他指标均为第 4、8、12 周的检测数据。

c. 关于描述如何评估数据是否满足统计学方法的假设。我们请教了统计学老师帮助我们评估。

结果

基线数据 条目 14 对于每个实验组，报告处理或测试前动物的体重和健康状况等基线数据均在正常范围。

数字分析 条目 15 a. 报告绝对数为 17/18，其他分析中绝对数均为 18/18。

b. 因为代谢组结果的偏移性，代谢组学分析中剔除了 N2。

结果和评估 条目 16 我们对于血清检测指标、肝脏病理学均进行了两次重复检测，前后结果一致，因此我们认为 我

们的结果具有一定的准确性。代谢组学中使用 R 软件包 `ropls` (Version 1.6.2) 进行主成分分

析 (PCA) 和正交最小偏二乘判别分析 (OPLS-DA)， 并使用 7 次循环交互验证来评估模型

的稳定性。为了防止模型过拟合，采用 200 次排列检验对模型进行了检验。

不良反应 条目 17 本研究中大鼠为正常进食，无不良反应的发生。

讨论

诠释/科学内涵 条目 18 a. 我们用 60%干炒黄豆加入到 40%大鼠正常饲料中，模拟大鼠高温加工饮食，成功诱导了

大鼠脂肪肝的发生， 这与我们的假设一致，同时我们从代谢组学探讨了可能的发生机制，

并得到了可靠的结果。同时，我们的研究补充了既往研究的不足，对大鼠肝脏的损伤进行

了研究。

b. 我们的研究也具有一定的局限性，例如我们没有探讨将其他高温加工食物加入到饲料中

对大鼠肝脏的影响；我们只是重点研究了大鼠的肝脏，没有对其他脏器进行评估。

c. 我们遵循“3R”原则中的减少原则，每组每次解剖老鼠数量为 6 只，为最小生物学重复，

并获得可靠的实验结果。我们遵循“3R”原则中的优化原则，在动物麻醉状态下取血后使动物死亡，减少了动物的痛苦。

概况/转化 条目 19 临床上我们会记录病人进食高温加工食物（例如干炒瓜子、火锅、烧烤等）的种类、频次、量等，根据患者的症状、肝功等评价进食高温加工食物对病情的影响。

基金支持 条目 20 北京市科委 G20 工程创新研究项目十病十药研发：清肝化瘀颗粒治疗原发性肝癌的主要药效学研究与安全性评价(Z171100001717008)