

不同阶段 Gao-Binge 模型中游离脂肪酸、三羧酸循环及酮体代谢谱研究

黎安沁¹, 庞陆鑫¹, 柴媛媛¹, 俞沁玮¹, 江振洲^{1*}, 张陆勇^{1,2**}

(¹ 中国药科大学多靶标天然药物全国重点实验室新药筛选中心与药效评价中心, 江苏省药效研究与评价服务中心, 南京 210009; ² 广东药科大学新药研发中心, 广州 510006)

摘要 肝细胞内脂质蓄积是酒精性脂肪肝 (AFLD) 的重要病理学特征, 其形成与游离脂肪酸 (FFAs)、三羧酸 (TCA) 循环、酮体代谢密切相关。为揭示 AFLD 中肝脏脂质蓄积与 FFAs、TCA 循环、酮体代谢的相关性。采用 C57BL/6N 小鼠构建慢性酒精喂养加急性酒精灌胃 (Gao-Binge 模型) 来模拟不同阶段的 AFLD, 运用液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS/MS) 检测小鼠肝组织和血浆中的 FFAs、TCA 循环中间产物和酮体水平, 并进行 Pearson 相关性分析。研究结果显示, 长短期 AFLD 小鼠模型中, 血浆和肝脏中的总 FFAs、饱和 FFAs、短链 FFAs 以及酮体 β -羟丁酸 (HDBT) 水平均显著增加, 提示 FFAs 代谢谱在 Gao-Binge 模型下出现紊乱。此外, 长短期模型中均发现乙酸 (AA)、2-甲基丁酸 (2-meBA)、HDBT 与肝脏损伤指标在血浆和肝脏样本中呈现出显著正相关性 (以短期模型中血浆数据为例, $r = 0.834, 0.699, 0.818, P < 0.05$), 而丙酮酸 (PRA) 表现出显著负相关性 ($r = -0.66, P < 0.05$)。结果表明, 长短期 AFLD 小鼠模型中出现 FFAs、TCA 循环、酮体代谢紊乱, AA、2-meBA、HDBT、PRA 等代谢物可作为 AFLD 的潜在生物标志物, 有助于该疾病的诊断和治疗。

关键词 酒精性脂肪性肝病; 脂肪酸; 三羧酸循环; 动物模型; Gao-Binge 模型; 相关性分析

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2025)02-0196-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024030502

引用本文 黎安沁, 庞陆鑫, 柴媛媛, 等. 不同阶段 Gao-Binge 模型中游离脂肪酸、三羧酸循环及酮体代谢谱研究 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 196–206.

Cite this article as: LI Anqin, PANG Luxin, CHAI Yuanyuan, *et al.* Plasma and hepatic free fatty acid, tricarboxylic acid cycle, and ketone bodies metabolic profiles in progressive Gao-Binge model[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 196–206.

Plasma and hepatic free fatty acid, tricarboxylic acid cycle, and ketone bodies metabolic profiles in progressive Gao-Binge model

LI Anqin¹, PANG Luxin¹, CHAI Yuanyuan¹, YU Qinwei¹, JIANG Zhenzhou^{1*}, ZHANG Luyong^{1,2**}

¹New Drug Screening and Pharmacodynamics Evaluation Center, State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, Nanjing 210009; ²Center for Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract To investigate the correlation between hepatic lipid accumulation and the metabolic profiles of free fatty acids (FFAs), tricarboxylic acid (TCA) cycle, and ketone body in alcoholic fatty liver disease (AFLD), a chronic plus acute alcohol feeding model (Gao-Binge model) was employed using C57BL/6N mice to simulate different stages of AFLD. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was employed to measure the levels of FFAs, TCA cycle intermediates, and ketone bodies in mouse liver tissue and plasma, followed by Pearson correlation analysis. The study revealed that both acute and chronic models showed significant increases in total FFAs, saturated FFAs and short-chain FFAs, as well as β -hydroxybutyric

收稿日期 2024-03-05 通信作者 *Tel: 025-83271043 E-mail: beaglejiang@cpu.edu.cn

**Tel: 025-83271043 E-mail: lyzhang@gdpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 81773827, No. 82304642)

acid(HDBT) in plasma and liver, indicating FFA metabolic profile disturbances in the Gao-Binge model. Moreover, in both models, acetic acid (AA), 2-Methylbutyric acid (2-meBA), and HDBT displayed strong positive correlations with hepatic injury markers in plasma and liver samples (for instance, in the acute model plasma data, $r = 0.834, 0.699, 0.818, P < 0.05$), while pyruvic acid (PRA) showed a strong negative correlation ($r = -0.66, P < 0.05$). These findings suggest that FFAs, TCA cycle, and ketone body metabolism are disrupted in the alcoholic liver disease in mice model, and metabolites such as AA, 2-meBA, HDBT and PRA may serve as potential biomarkers for AFLD, which would be helpful in the diagnosis and treatment of this disease.

Key words alcoholic fatty liver; fatty acids; tricarboxylic acid cycle; animal models; Gao-Binge model; correlation analysis; correlation analysis; Gao-Binge model

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773827, No. 82304642)

长期摄入过量乙醇会干扰肝脏的脂质代谢, 致使肝脏发生脂质蓄积, 形成酒精性脂肪肝 (AFLD)^[1-2]。AFLD 主要以肝脏总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 的水平升高为主要特征^[3]。游离脂肪酸 (FFAs) 不仅是合成 TG 的基础, 也是脂质代谢的重要调节因子^[4-5]。FFAs 在肝内经过 β 氧化生成乙酰辅酶 A, 后者既可进入三羧酸 (TCA) 循环释放能量, 也可转化为酮体, 供身体其他部位使用, 或成为柠檬酸-丙酮酸循环的一部分, 参与新的 FFAs 合成。酮体在肝线粒体内合成, 但肝脏自身无法利用酮体, 需转运到肝外进行供能。研究显示, 酮体生成减少的小鼠在高脂饮食后, 出现严重的肝脏损伤和炎症, 表明酮体在调节脂肪肝疾病中扮演着关键角色^[6-7]。TCA 循环是多种营养物质代谢的关键途径, 与细胞呼吸、自由基产生和炎症反应密切相关。研究发现, 在单纯性脂肪变性中, TCA 循环过程随脂质蓄积速率一起增加, 这一现象在小鼠模型和人类受试者中均有发现^[8-9], 且在非酒精性脂肪肝炎症期间也观察到 TCA 循环的诱导^[10]。

目前国内外已经成功建立多种动物模型以研究酒精性肝病 (ALD), 包括啮齿动物、斑马鱼、猪、恒河猴、豚鼠等^[11-12], 而采用啮齿类动物经口腔急性或慢性酒精处理是广泛采用的方法^[13]。尤其是结合慢性酒精喂养加急性酒精灌胃的小鼠模型, 被称为“Gao-Binge 模型”^[14], 能更好模拟有多年饮酒史以及近期酒精过度摄入背景的 AFLD 患者^[15-16]。

FFAs 在酒精诱导的肝脏损害中起重要作用, 通过测定血液及肝脏中的 FFAs 含量, 可揭示体内 FFAs 的种类和代谢状况变化^[17]。肝脏疾病, 如慢性肝炎、肝硬化和脂肪性肝炎患者的 FFAs 谱通常发生紊乱^[18-20]。尽管已有研究关注脂肪肝患者的血清

FFAs 构成情况^[21-22], 但不同动物模型在病理特征上存在显著差异^[23-25], 且鲜有研究报道 Gao-Binge 模型中肝脏和血浆的 FFAs、TCA 循环、酮体共同变化情况。因此, 本研究旨在通过分析 Gao-Binge 模型中血浆和肝脏中 FFAs、TCA 循环、酮体的变化, 探索其与肝脏脂质蓄积的关系, 为理解 AFLD 中 FFAs、TCA 循环、酮体的作用提供理论和实验支持, 并有助于发现 AFLD 诊断和治疗的潜在生物标志物。

1 材料

1.1 试剂

TP 4030C 液体对照饲料、TP 4030D 酒精液体饲料、麦芽糊精 (江苏特洛菲饲料科技有限公司); 无水乙醇 (上海泰坦科技股份有限公司); 丙氨转移酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 测定试剂盒 (南京威特曼生物科技有限公司); 总胆固醇、总甘油三酯测定试剂盒 (南京建成科技有限公司); 苏木素-伊红 (H&E) 染色液、油红 O 染色液 (武汉塞维生物科技股份有限公司)。

1.2 仪器

LC-30AD 超高效液相色谱仪 (日本岛津公司); QTrap 5500 三重四极杆线性离子阱质谱仪 (美国爱博才思公司); 全景组织切片扫描仪 NanoZoomer S60 (日本滨松光子学株式会社)。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠, 体重 18~22 g, 8 周龄, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK(浙)2020-0002。动物实验操作过程严格遵守中国药科大学动物伦理委员会伦理管理要求, 伦理批号: 2022-09-030。

2 方 法

2.1 动物模型的建立

根据文献的方法建立 Gao-Binge 模型^[14]。32 只 C57BL/6N 雄性小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为短期和长期两组,共 4 个亚组:短期高脂液体饲料对照组($n=6$),短期 5% 酒精高脂液体饲料模型组($n=8$),长期高脂液体饲料对照组($n=9$),长期 5% 酒精高脂液体饲料模型组($n=9$)。高脂液体饲料对照组下文简称 Control 组,酒精高脂液体饲料模型组下文简称 Ethanol 组。为减少因造模时间延长导致的小鼠死亡风险,长期模型中的小鼠数量有所增加。造模过程分为 5 个阶段:环境适应期 7 d,液体适应期 5 d,1%~4% 低浓度酒精高脂液体饲料过渡期 6 d,5% 酒精高脂液体饲料慢性喂养期 10 d 或 30 d,慢性酒精喂养结束后的次日晨间 7:00~9:00 时,进行一次 31.5% 高浓度酒精急性灌胃,待 9 h 后体内酒精浓度达到峰值,随后处死小鼠,收集其血液及肝组织进行后续测定,全程禁水。

2.2 动物模型的确认

2.2.1 动物体重及摄食量 小鼠单笼饲养,每日晚 18:00 记录小鼠摄食量。全程 Control 组需保持与 Ethanol 组相同的饮食量。每间隔 2 d 称量体重 1 次。

2.2.2 血生化指标检测 高浓度酒精急性灌胃后 9 h 时,2% 异氟烷麻醉,眼眶后静脉丛采血于 1.5 mL 含肝素钠的离心管中,4000 r/min 离心 10 min 后取上清液,按试剂盒测定血浆 ALT、AST、TC、TG。

2.2.3 肝脏系数测定 颈椎脱臼处死小鼠,解剖游离肝脏,用生理盐水冲洗去肝脏表面残留血液,滤纸吸干,称重,计算肝脏系数(肝重/体重)。

2.2.4 肝脏总胆固醇、总甘油三酯测定 取肝组织样本约 20 mg 于 1.5 mL 离心管中,加入相应肝重 9 倍体积的无水乙醇约 180 μ L,4 $^{\circ}$ C 匀浆,取匀浆液按照 TC、TG 试剂盒说明进行测定。

2.2.5 肝组织病理学检测 切取两块肝大叶中部约 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的肝组织分别置于 4% 多聚甲醛和 OCT 包埋剂中,将固定后的肝组织样本送至中国药科大学病理平台进行 H&E、油红 O 染色,并于 NanoZoomer S60 进行全景明场扫描拍摄。

2.3 LC-MS/MS 测定 FFAs、TCA 循环中间产物及酮体水平

本课题组前期已成功建立一种可以同时测定

40 种 FFAs、TCA 循环中间产物及酮体的 LC-MS/MS 方法,并经方法学验证^[26],采用该方法进行内源性物质的测定。各脂肪酸标准品按碳链长度进行分类。分别为碳链小于 6C 的短链脂肪酸,包括乙酸(AA)、丙酸(PPA)、丁酸(BA)、戊酸(VA)、己酸(HXA)、异丁酸(iso-BA)、2-甲基丁酸(2-me-BA)、4-甲基戊酸(4-meVA)、异戊酸(iso-VA)、3-甲基戊酸(3-mePTA)、2-甲基己酸(2-meHXA);6~12C 的中链脂肪酸,包括辛酸(OTA)、癸酸(DA)、十二酸(DDA)、4-甲基辛酸(4-meOTA);14~20C 的长链脂肪酸,包括十四烷酸(MRA)、棕榈酸(PA)、硬脂酸(SA)、花生酸(ACA)、棕榈油酸(PMA)、油酸(OA)、亚麻油酸(LLA)、亚麻酸(LA)、顺-11-二十碳烯酸(ESA)、花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA);以及大于 22C 的极长链脂肪酸,包括二十二烷酸(BHA)、二十四烷酸(LNA)、芥酸(EA)、二十二碳六烯酸(DHA)、神经酸(NVA)。此外,与 TCA 相关的羧酸分别为柠檬酸(CTA)、L-苹果酸(MLA)、丙酮酸(PRA)、甲羟戊酸(MVA)、乳酸(LTA)、琥珀酸(SCA)、延胡索酸(FMA)以及酮体 β -羟丁酸(HDBT)。

2.4 数据分析

用于代谢组分析的 LC-MS 数据处理采用 Analyst[®] Software Version 1.6.2 进行处理,获得样品浓度信息。采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。正态分布计量资料采用 Student's *t*-test 比较两组间差异,结果以均数 $\pm$ 标准误表示。双变量相关分析采用 Pearson 相关分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 Gao-Binge 酒精性肝病小鼠模型的确立

3.1.1 短期模型 造模结果如图 1 所示,Control 组与 Ethanol 组摄食量变化趋势一致,日均摄食量无显著差异,符合配对喂养。两组体重均缓慢增长,体重增长率差异无统计学意义。肝脏损伤指标显示,相较于 Control 组,Ethanol 组肝脏系数增加、血浆 ALT、AST 水平明显上升、肝脏 TG 含量显著增加,提示肝脏损伤发生($P<0.05$)。血浆 TC、TG,肝脏 TC 在两组间无明显变化。H&E 染色结果显示,Control 组小鼠肝脏组织结构完整,细胞形态规则,边界清晰,胞质仅见轻微的微小脂质空泡。Ethanol

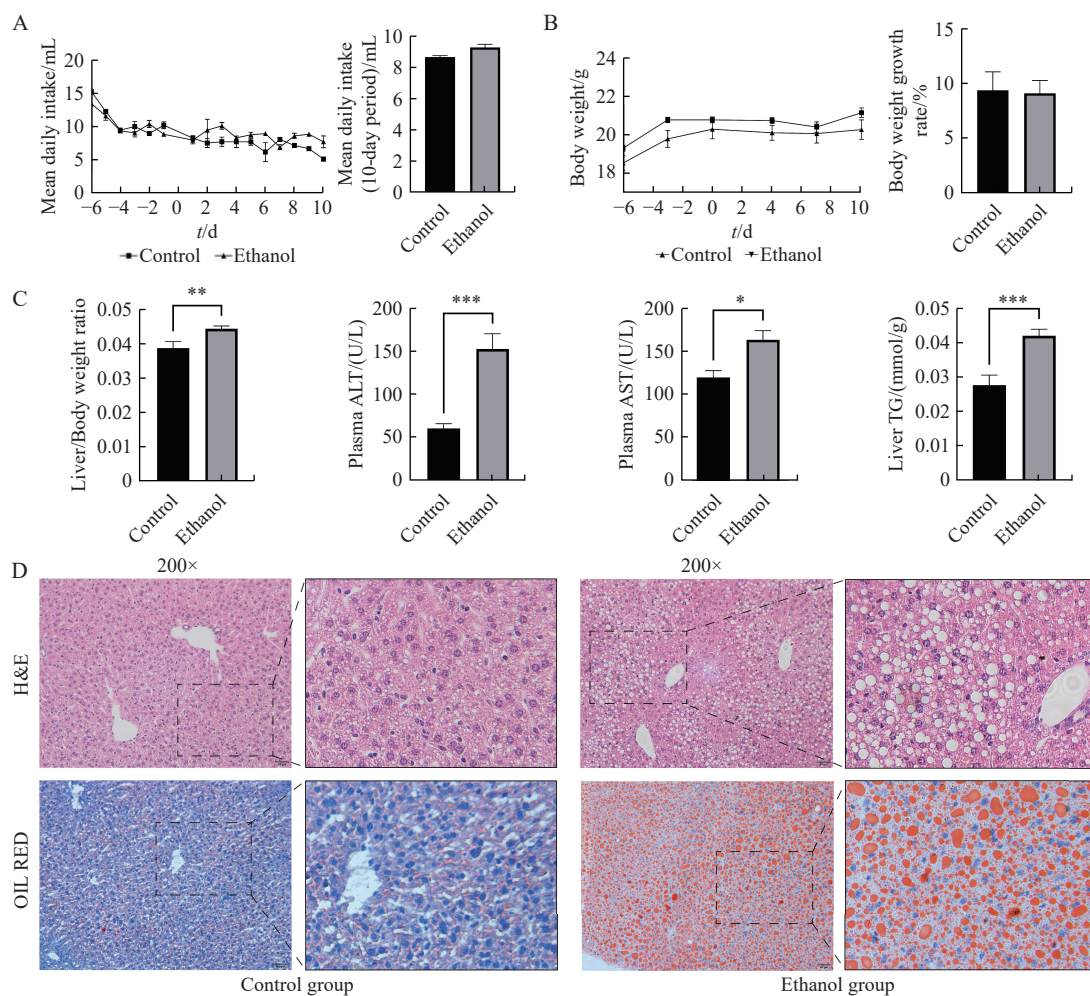


Figure 1 Establishment of a short-term Gao-Binge alcohol-induced liver disease mouse model ($\bar{x} \pm s$, control group: $n = 6$; Ethanol group: $n = 8$)

A: Average daily food intake; B: Daily weight change; C: Liver injury-related markers; D: Pathologic staining results

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

组肝脏组织内可见大量弥漫性的脂质空泡, 未观察到明显的炎性浸润及细胞肿胀现象。油红 O 染色显示, Ethanol 组肝细胞质及细胞间隙中存在大量红色脂肪滴聚集, 发生严重的脂质蓄积。综合上述指标结果, 表明短期 AFLD 模型建立成功。

3.1.2 长期模型 Control 组因小鼠斗殴死亡两只。造模结果如图 2 所示, Control 组与 Ethanol 组摄食量保持相同变化趋势, 日均摄食量两组无显著差异, 符合配对喂养。两组体重增长趋势一致, 增长率差异无统计学意义。相较于 Control 组, Ethanol 组肝脏系数显著增加、血浆 ALT、AST 水平明显上升、肝脏 TG 水平显著升高 ($P < 0.05$), 提示肝损发生。血浆 TC、TG, 肝脏 TC 水平同样无明显变化。长期模型中, Control 组肝脏组织结构和形态轻微变化, 胞质见少许脂质空泡及轻度炎性浸润现象。而

Ethanol 组出现明显胞质丢失, 肝小叶间静脉周围细胞肿胀, 并有大量脂质空洞, 气球样变性现象。油红 O 染色显示, Control 组微小脂滴主要分布于肝小叶周围, 远离肝小叶中央静脉的脂质沉积明显减少。而 Ethanol 组的肝脏组织全域均存在大量脂滴, 表明发生严重脂质蓄积。综上指标所述, 成功建立长期 AFLD 模型。

3.2 Gao-Binge 酒精性肝病小鼠模型中血浆及肝脏中 FAAs、TCA 循环、酮体代谢谱变化

3.2.1 短期模型 将 FFAs 按碳链长度、饱和度进行分类计算。与 Control 组相比, Ethanol 组血浆中总 FFAs、短链、中链、饱和 FFAs 水平显著增加 ($P < 0.05$) (图 3-A); 肝组织中短链、极长链、饱和 FFAs 水平显著上升 ($P < 0.05$) (图 3-D)。进一步观察个别脂肪酸变化, 血浆中 Ethanol 组 AA、PPA、

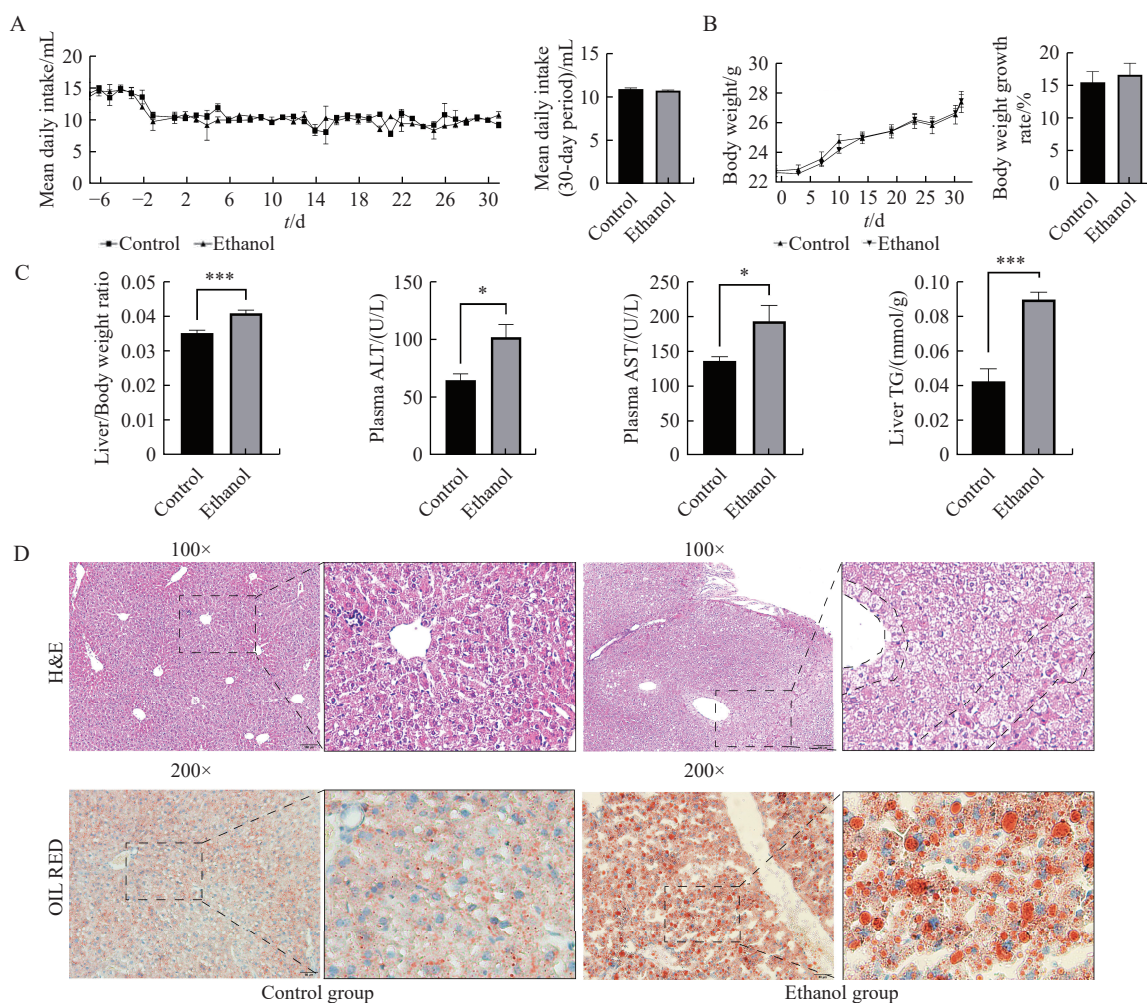


Figure 2 Establishment of a long-term Gao-Binge alcohol-induced liver disease mouse model ($\bar{x} \pm s$, control group: $n = 7$; Ethanol group: $n = 9$)

A: Average daily food intake; B: Daily weight change; C: Liver injury-related markers; D: Pathologic staining results

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

iso-BA、2-me-BA、OTA、LA 的含量显著提高, ARA 含量显著减少 ($P < 0.05$) (图 3-C), VA、4-meVA、iso-VA、3-mePTA、2-meHXA、LNA、ACA、4-meOTA 的含量低于定量下限, 不纳入计算; 肝脏中, AA、PPA、iso-BA、DA、DDA、MRA、EPA、DHA 的含量显著提高, 而 HXA、OTA 的含量显著减少 ($P < 0.05$) (图 3-F), 2-meHXA、4-meVA、3-mePTA 的含量低于定量下限, 不纳入计算。TCA 循环相关羧酸含量如图 3-B、3-E, 血浆及肝脏中 HDBT 含量均显著上升 ($P < 0.05$), 尽管 TCA 循环相关羧酸的总含量在血浆中未有明显变化, 但 MLA、FMA 的含量显著增加, PRA 含量显著减少, 而肝脏中 TCA 循环相关羧酸含量均下降, CTA 含量低于定量下限, 不纳入计算。

3.2.2 长期模型 Ethanol 组血浆中总 FFAs、短

链、中链、饱和 FFAs 含量均显著增加 (图 4-A); 肝脏中的总 FFAs、中链、长链、饱和、不饱和 FFAs 均显著增加 ($P < 0.05$) (图 4-D)。进一步观察个别脂肪酸变化, 血浆中 Ethanol 组 AA、iso-BA、2-me-BA、iso-VA、OTA 含量显著增加, HXA 的含量显著减少 ($P < 0.05$) (图 4-C), PPA、VA、3-mePTA、4-meVA 脂肪酸含量低于定量下限, 不纳入计算; 肝脏中, DDA、MRA、PA、PMA、LA、EPA 含量显著增加, VA、BHA、NVA 含量显著降低 ($P < 0.05$) (图 4-F), iso-BA、iso-VA、4-meVA 含量低于定量下限, 不纳入计算。TCA 循环相关羧酸含量如图 4-B、4-E, 与短期模型结果一致的是, 血浆及肝脏中 HDBT 含量均上升。血浆中 TCA 循环相关的羧酸总量显著增加 ($P < 0.05$); 与血浆情况相反, 肝脏中 TCA 循环相关的羧酸总量下降, 具体表现为 SCA 含量增多, LTA 含量减少 ($P < 0.05$)。

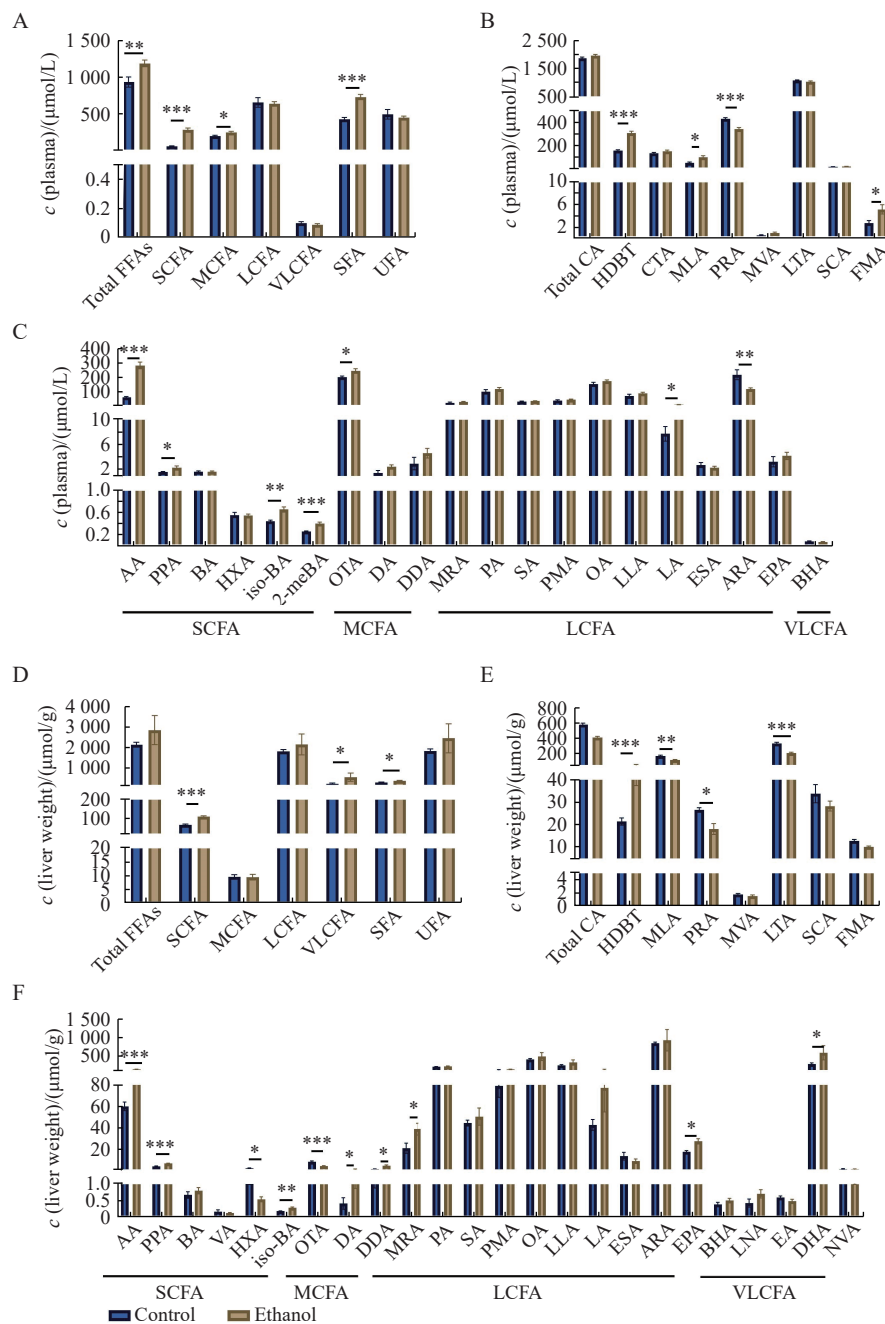


Figure 3 Changes in endogenous substances in short-term models

A: Levels of different classes of fatty acids in plasma; B: Levels of energy-related carboxylic acids in plasma; C: Specific levels of fatty acids in plasma; D: Levels of different classes of fatty acids in liver; E: Levels of energy-related carboxylic acids in liver; F: Specific levels of fatty acids in liver ($\bar{x} \pm s$, control group: $n = 6$; Ethanol group: $n = 8$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group)

Total FFAs: Total free fatty acids; SCFA: Short-chain fatty acids; MCFA: Medium-chain fatty acids; LCFA: Long-chain fatty acids; VLCFA: Very-long-chain fatty acids; SFA: Saturated fatty acids; UFA: Unsaturated fatty acids; Total CA: Total carboxylic acids of energy-related; HDBT: β -Hydroxybutyric acid; CTA: Citric acid; MLA: Malic acid; PRA: Pyruvic acid; MVA: Mevalonic acid; LTA: Lactic acid; SCA: Succinic acid; FMA: Fumaric acid; AA: Acetic acid; PPA: Propionic acid; BA: Butyric acid; VA: Valeric acid; HXA: Hexanoic acid; iso-BA: Isobutyric acid; 2-meBA: 2-methylbutyric acid; iso-VA: Isovaleric acid; 3-mePTA: 3-methylpentanoic acid; OTA: Octanoic acid; DA: Decanoic acid; DDA: Dodecanoic acid; MRA: Myristic acid; PA: Palmitic acid; SA: Stearic acid; PMA: Palmitoleic acid; OA: Oleic acid; LA: Linolenic acid; LLA: Linoleic acid; ESA: Eicosenoic acid; ARA: Arachidonic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; LNA: Lignoceric acid; BHA: Behenic acid; EA: Erucic acid; DHA: Docosahexaenoic acid; NVA: Nervonic acid

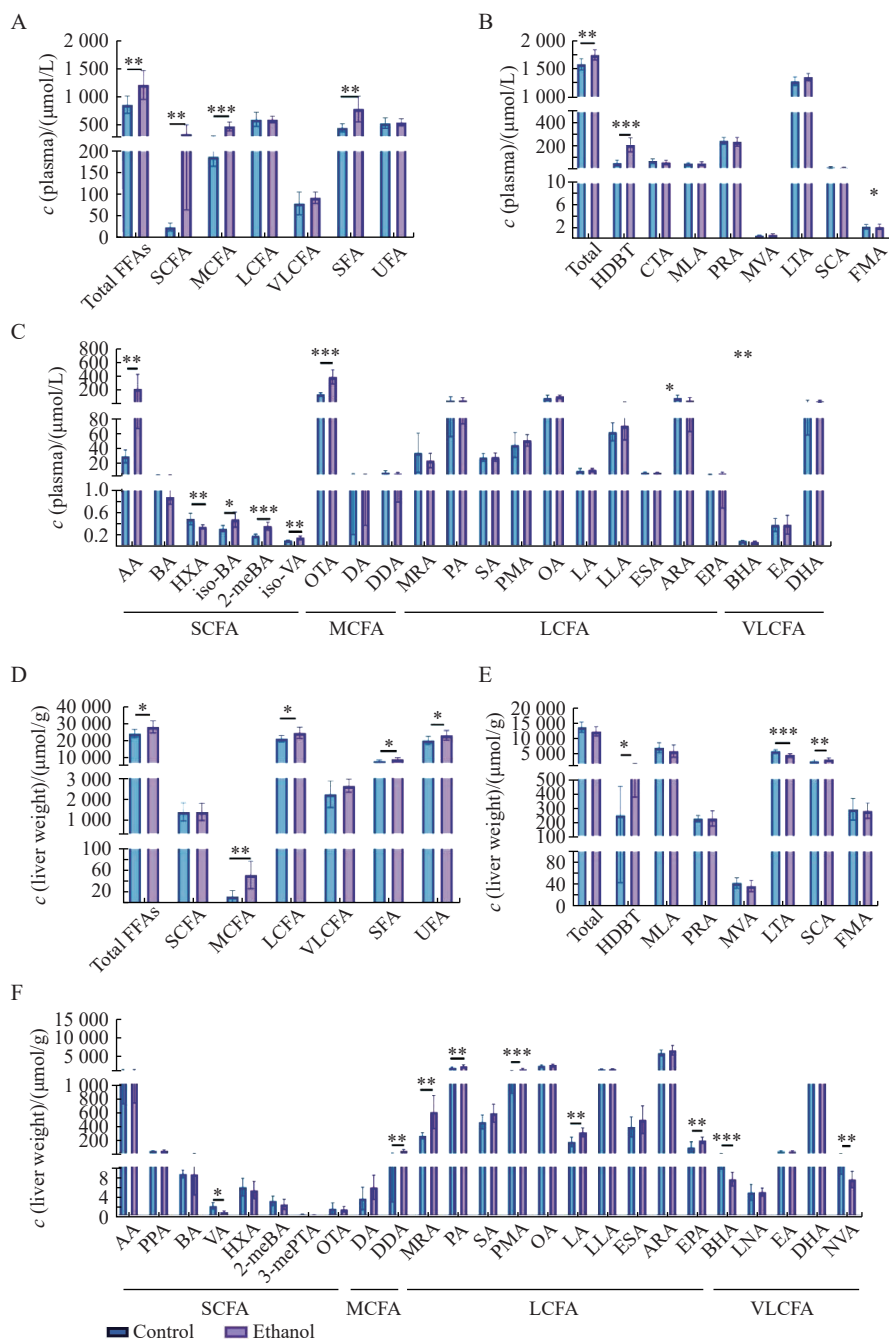


Figure 4 Changes in endogenous substances in long-term models

A: Levels of different classes of fatty acids in plasma; B: Levels of energy-related carboxylic acids in plasma; C: Specific levels of fatty acids in plasma; D: Levels of different classes of fatty acids in liver; E: Levels of energy-related carboxylic acids in liver; F: Specific levels of fatty acids in liver ($\bar{x} \pm s$, control group: $n = 7$; Ethanol group: $n = 9$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group)

3.3 肝脏损伤指标与 FFAs、TCA 循环、酮体代谢谱的 Pearson 相关性分析

根据《统计学》第七版^[27], 可将 $0.8 \leq |r| < 1$ 视为高度相关、 $0.5 \leq |r| < 0.8$ 视为中度相关、 $0.3 \leq |r| < 0.5$ 视为低度相关、 $|r| < 0.3$ 视为不相关。短期模型中, 肝脏损伤指标与脂肪酸等内源性物质的

Pearson 相关分析结果如图 5-A、5-B 所示, AA、iso-BA、2-meBA、HDBT、LA、PPA、DHA 在血浆和肝脏中均呈中度正相关。而 PRA 呈中度负相关; 肝脏中, MLA、LTA 和 OTA 也表现出中度负相关 ($P < 0.05$), 相关性系数 r 见图。长期模型相关性分析结果见图 5-C 和图 5-D, 肝脏与血浆中的

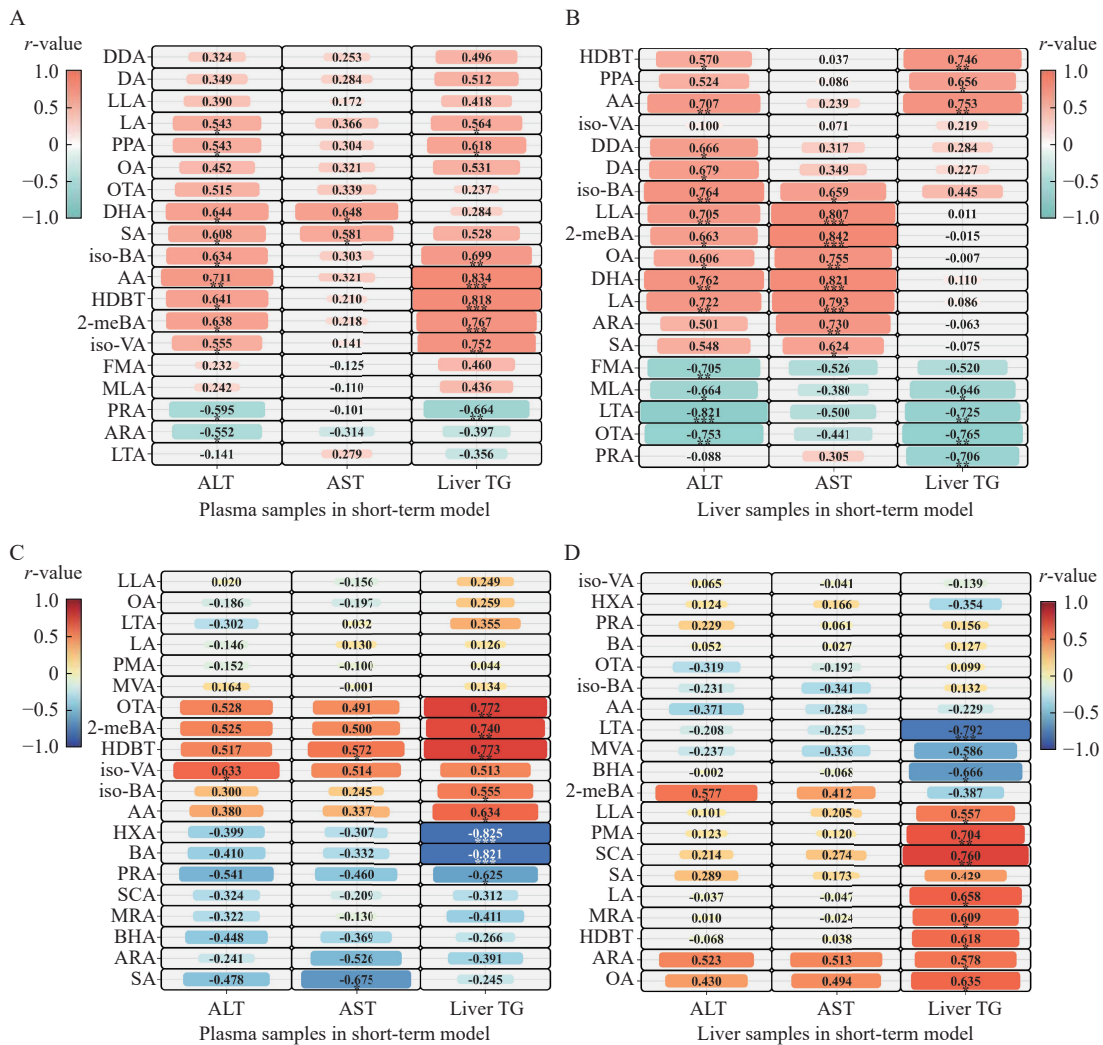


Figure 5 Pearson correlation analysis of liver injury biomarkers with FFAs, TCA cycle, and ketone body metabolic profiles

A: Plasma samples in short-term model; B: Liver samples in short-term model; C: Plasma samples in long-term model; D: Liver samples in long-term model

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

HDBT 均显示中度正相关。血浆中, 短中链脂肪酸(如 AA、2-meBA、OTA)表现为中度正相关, 而 BA、HXA 为高度负相关, PRA 为中度负相关; 在肝脏样本中, 长链脂肪酸和 TCA 循环相关羧酸(如 MRA、PMA、OA、LA、SCA)呈现为中度正相关, BHA 和 LTA 则表现为中度负相关 ($P < 0.05$), r 见图。

4 讨论

AFLD 是 ALD 发展的早期阶段, 超过 90% 的过度饮酒者会展现脂肪肝特征^[28]。大量研究表明, 乙醇会显著促进肝脏 TG 的生成并诱使脂肪变性。TG 主要由甘油和脂肪酸组成, 正常情况下, 游离脂肪酸库整体水平低且稳定, 但乙醇会破坏

脂肪酸库的平衡^[3, 29]。FFAs 除根据碳链长度分类外, 还可根据饱和度分为饱和脂肪酸 (SFA) 和不饱和脂肪酸 (UFA)^[30-31]。部分 FFAs 具有细胞毒性^[32-33], 如一些 UFA 可通过增强脂质过氧化反应造成细胞损害^[34-35]。

本研究发现, Gao-Binge 模型中血浆及肝脏 FFAs 构成发生异常变化, 总脂肪酸、SFA、SCFA、HDBT 含量显著高于 Control 组。

SFAs 因缺乏不饱和键, 具有较高的稳定性和抗氧化能力。然而, 其过量摄入是导致血液 TC、TG 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 升高的主要原因^[36-37]。有研究指出, SFAs 可以通过调控与脂质代谢相关的转录因子(如 SREBPs、LXR/RXR、HNF4、NF- κ B)影响血液 TC、TG 和 FFAs 的合成。尤其

是 DDA、MRA 和 PA 等不饱和脂肪酸可增加血液 TC 和 LDL-C 的浓度,并引起炎症反应和胰岛素抵抗,进一步增加患 AFLD 的风险^[4,38],这与本研究结果相一致。

乙醇代谢产物 AA 的增加导致 SCFA 含量上升。乙醇在肝细胞中经由醇脱氢酶、细胞色素 P450 和过氧化物酶体中的过氧化氢酶代谢为有毒的乙醛。乙醛与蛋白质和 DNA 结合形成加合物,引发谷胱甘肽消耗、脂质过氧化和线粒体损伤。乙醛分解生成的 AA 迅速从肝脏释放到循环中,经过心脏、骨骼肌和大脑的三羧酸循环代谢为 CO₂^[39–40]。虽然 AA 自身没有直接的肝毒性^[41],但有研究表明它可通过上调巨噬细胞中的促炎因子来调节酒精性肝炎患者的炎症反应^[42–43]。

酮体是肝脏对 FFAs 进行正常分解时产生的一类特殊中间代谢产物,其主要由乙酰乙酸(约占 30%)、HDBT(约占 70%)以及少量的丙酮构成。正常情况下,血液酮体浓度维持在较低水平,反映脂肪酸的正常氧化。然而,在特定生理状态(如长时间禁食或饥饿)以及病理条件下,由于糖类的供应或氧化受限,体内脂肪分解加剧,使脂肪酸成为主要的能量来源。当肝脏内酮体合成速率超过外周组织的利用速率时,体内代谢平衡被打破,导致血液酮体水平异常升高^[44],在本研究中,HDBT 含量显著增加可能提示脂肪氧化过程的异常状态。

在长短期的 Gao-Binge 模型中,FFAs 的组成变化存在差异。短期模型中,血浆和肝脏中的 SCFA 和 SFA 明显升高,血浆 MCFA 亦增加。同时,肝脏中的 VLCFA 和 EPA 和 DHA 等常见的 ω -3 PUFA 在肝脏中的含量显著上升。 ω -3 PUFA 是一类富含天然生物活性的脂肪酸,由于其易受氧化的特性,可能会导致体内脂质过氧化物的积聚。这些脂质过氧化物无法被机体有效吸收和利用,是引发血脂异常的主要原因之一^[45]。正如本研究所测定的那样,EPA 和 DHA 含量显著上升,可能促进肝脏脂质积聚。LCFA 在与脂肪蓄积相关疾病中扮演关键角色^[46]。在高糖饮食的环境下,这些脂肪酸对身体代谢产生显著影响^[47]。长期模型中,Ethanol 组肝脏中 LCFA 含量显著增加。其中棕榈油酸是一种常见的 ω -7 型 LCFA,广泛分布于膳食脂肪和油中^[38]。高水平的棕榈油酸与血脂异常、肥胖及心衰风险增加有关^[48]。

线粒体基质是 TCA 循环活动的主要场所。在 Gao-Binge 模型研究中,测得肝脏能量代谢相关羧酸水平普遍降低,提示三羧酸循环可能受到抑制。结果显示,短期模型中的 PRA 与 LTA、FMA 含量降低,而长期模型中,除 SCA 含量上升外,其他相关羧酸含量整体降低。PRA 是糖代谢过程中的关键物质,参与乙酰辅酶 A 从线粒体转运至细胞质的丙酮酸-柠檬酸循环途径,其减少提示代谢途径可能受抑制。LTA 是 TCA 循环的主要能量来源^[49],LTA 的代谢和糖酵解过程均需烟酸腺嘌呤二核苷酸(NAD)作为必需的底物。LTA 与 PRA 的比率通常反应细胞内 NADH/NAD 比值,而该比值是细胞氧化还原状态的指标,影响组织的健康状态。因此,LTA 与 PRA 的减少可能提示肝脏内氧化还原平衡受到了破坏。

此外,在利用 Pearson 相关性分析进行肝功能指标与 FFAs、TCA 循环、酮体代谢谱的相关性时,发现短期和长期 ALFD 研究模型的肝脏与血浆中,均存在 AA、2-meBA、HDBT 与肝功能指标中度正相关,PRA 表现出中度负相关,脂肪酸含量发生显著变化。这一结果提示着这些特定脂肪酸与 AFLD 之间存在关联,有可能作为潜在疾病生物标志物,辅助 AFLD 的诊断和治疗。而在未来的研究中需要深入探讨这些脂肪酸与 AFLD 之间的具体关联机制。

综上所述,本研究发现 Gao-Binge 模型中出现脂肪酸、三羧酸循环、酮体代谢紊乱,AA、2-meBA、HDBT、PRA 是 AFLD 潜在疾病生物标志物,有助于 AFLD 的诊断和治疗。

References

- [1] Kourkoumpetis T, Sood G. Pathogenesis of alcoholic liver disease: an update[J]. *Clin Liver Dis*, 2019, 23(1): 71-80.
- [2] Osna NA, Donohue TM Jr, Kharbanda KK. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management[J]. *Alcohol Res*, 2017, 38(2): 147-161.
- [3] You M, Arteel GE. Effect of ethanol on lipid metabolism[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(2): 237-248.
- [4] Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004, 41(1): 41-78.
- [5] Wrzosek M, Zawadzka Z, Sawicka A, et al. Impact of fatty acids on obesity-associated diseases and radical weight reduction[J]. *Obes Surg*, 2022, 32(2): 428-440.

- [6] Cotter DG, Ercal B, Huang XJ, *et al.* Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia[J]. *J Clin Invest*, 2014, **124**(12): 5175-5190.
- [7] Pan A, Sun XM, Huang FQ, *et al.* The mitochondrial β -oxidation enzyme HADHA restrains hepatic glucagon response by promoting β -hydroxybutyrate production[J]. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 386.
- [8] Satapati S, Sunny NE, Kucejova B, *et al.* Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver[J]. *J Lipid Res*, 2012, **53**(6): 1080-1092.
- [9] Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, *et al.* Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Cell Metab*, 2011, **14**(6): 804-810.
- [10] Patterson RE, Kalavalapalli S, Williams CM, *et al.* Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, **310**(7): E484-E494.
- [11] Lamas-Paz A, Hao FJ, Nelson LJ, *et al.* Alcoholic liver disease: utility of animal models[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, **24**(45): 5063-5075.
- [12] Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, *et al.* Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men[J]. *Alcohol*, 2012, **46**(8): 715-725.
- [13] Liu X, Zhang QQ, Wang SX, *et al.* Influencing factors and research progress of establishing animal models of rodent alcohol drinking[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2017, **31**(6): 607-614.
- [14] Bertola A, Mathews S, Ki SH, *et al.* Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)[J]. *Nat Protoc*, 2013, **8**(3): 627-637.
- [15] Alcohol consumption among young adults ages 18–24 in the United States: results from the 2001–2002 NESARC survey[J]. *Alcohol Res Health*, 2004, **28**(4): 269-280.
- [16] Aroor AR, Jackson DE, Shukla SD. Elevated activation of ERK1 and ERK2 accompany enhanced liver injury following alcohol binge in chronically ethanol-fed rats[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2011, **35**(12): 2128-2138.
- [17] Zhang JW, Zhao Y, Xu CF, *et al.* Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study[J]. *Sci Rep*, 2014, **4**: 5832.
- [18] Walle P, Takkunen M, Männistö V, *et al.* Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity[J]. *Metabolism*, 2016, **65**(5): 655-666.
- [19] Yang LL, Yang X, Kong XL, *et al.* Covariation analysis of serumal and urinary metabolites suggests aberrant Glycine and fatty acid metabolism in chronic hepatitis B[J]. *PLoS One*, 2016, **11**(5): e0156166.
- [20] Yoo HJ, Jung KJ, Kim M, *et al.* Liver cirrhosis patients who had normal liver function before liver cirrhosis development have the altered metabolic profiles before the disease occurrence compared to healthy controls[J]. *Front Physiol*, 2019, **10**: 1421.
- [21] Gao ZH, Shen YQ. Analysis of serum free fatty acid levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Chin Prac Med* (中国实用医药), 2015, **10**(28): 43-44.
- [22] Gou XJ, Feng Q, Hu YY. Effects of qushi Huayu formula on serum free fatty acid profile in non-alcoholic fatty liver disease model rats[J]. *China Pharm* (中国药房), 2018, **29**(24): 3330-3335.
- [23] Ueno A, Lazaro R, Wang PY, *et al.* Mouse intragastric infusion (iG) model[J]. *Nat Protoc*, 2012, **7**(4): 771-781.
- [24] Leung TM, Lu YK, Yan W, *et al.* Argininosuccinate synthase conditions the response to acute and chronic ethanol-induced liver injury in mice[J]. *Hepatology*, 2012, **55**(5): 1596-1609.
- [25] Gorica E, Calderone V. Arachidonic acid derivatives and neuroinflammation[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2022, **21**(2): 118-129.
- [26] Chai YY. Research on the effect and mechanism of disrupted metabolic profiling in liver injury induced by co-administration of valproic acid and acetaminophen(丙戊酸和对乙酰氨基酚联合用药致小鼠肝脏损伤的代谢轮廓改变及其机制研究)[D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2022.
- [27] Jia JP. Statistics[M]. 7th ed. Beijing: China Renmin University Press, 2018: 240.
- [28] Lefkowitz JH. Morphology of alcoholic liver disease[J]. *Clin Liver Dis*, 2005, **9**(1): 37-53.
- [29] Zhao ZW, Yu MG, Crabb D, *et al.* Ethanol-induced alterations in fatty acid-related lipids in serum and tissues in mice[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2011, **35**(2): 229-234.
- [30] Zhao ZH, Shi AM, Wang Q. Research progress and development trend of high-oleic acid peanuts[J]. *Cereals Oils* (粮食与油脂), 2019, **32**(9): 1-4.
- [31] Chaaba R, Bouaziz A, Ben Amor A, *et al.* Fatty acid profile and genetic variants of proteins involved in fatty acid metabolism could be considered as disease predictor[J]. *Diagnostics*, 2023, **13**(5): 979.
- [32] Gunduz F, Aboulnasr FM, Chandra PK, *et al.* Free fatty acids induce ER stress and block antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus in cell culture[J]. *Virol J*, 2012, **9**: 143.
- [33] Oscarsson J, Önnérhag K, Risérus U, *et al.* Effects of free omega-3 carboxylic acids and fenofibrate on liver fat content in patients with hypertriglyceridemia and non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled

- study[J]. *J Clin Lipidol*, 2018, **12**(6): 1390-1403. e4.
- [34] Zhao X, Zhang XY, Ye B, *et al*. Effect of unsaturated fatty acids on glycation product formation pathways[J]. *Food Res Int*, 2021, **143**: 110288.
- [35] Mortensen MS, Ruiz J, Watts JL. Polyunsaturated fatty acids drive lipid peroxidation during ferroptosis[J]. *Cells*, 2023, **12**(5): 804.
- [36] Lawman HG, D Fryar C, Gu QP, *et al*. The role of prescription medications in the association of self-reported sleep duration and obesity in U. S. adults, 2007—2012[J]. *Obesity*, 2016, **24**(10): 2210-2216.
- [37] Takeuchi T, Kameyama K, Miyauchi E, *et al*. Fatty acid overproduction by gut commensal microbiota exacerbates obesity[J]. *Cell Metab*, 2023, **35**(2): 361-375. e9.
- [38] Calder PC. Functional roles of fatty acids and their effects on human health[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2015, **39**(1 Suppl): 18S-32S.
- [39] Setshedi M, Wands JR, de la Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, **3**(3): 178-185.
- [40] Kendrick SFW, O'Boyle G, Mann J, *et al*. Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis[J]. *Hepatology*, 2010, **51**(6): 1988-1997.
- [41] Liangpunsakul S, Rahmini Y, Ross RA, *et al*. Imipramine blocks ethanol-induced ASMase activation, ceramide generation, and PP2A activation, and ameliorates hepatic steatosis in ethanol-fed mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, **302**(5): G515-G523.
- [42] Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, *et al*. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF- α production in cultured macrophage cell lines[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, **296**(5): G1047-G1053.
- [43] Chang BX, Wang H, Zou ZS, *et al*. Pathogenesis and novel therapeutic targets of alcoholic liver disease[J]. *J Clin Hepatol* (临床肝胆病杂志), 2014, **30**(2): 113-117.
- [44] Puchalska P, Crawford PA. Metabolic and signaling roles of ketone bodies in health and disease[J]. *Annu Rev Nutr*, 2021, **41**: 49-77.
- [45] Tao L. Oxidation of polyunsaturated fatty acids and its impact on food quality and human health[J]. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J*, 2015, **1**(6): 135-142.
- [46] Morigny P, Boucher J, Arner P, *et al*. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, **17**(5): 276-295.
- [47] Brestoff JR, Wilen CB, Moley JR, *et al*. Intercellular mitochondria transfer to macrophages regulates white adipose tissue homeostasis and is impaired in obesity[J]. *Cell Metab*, 2021, **33**(2): 270-282.
- [48] Xu X, So JS, Park JG, *et al*. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP[J]. *Semin Liver Dis*, 2013, **33**(4): 301-311.
- [49] Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, *et al*. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate[J]. *Nature*, 2017, **551**(7678): 115-118.