

## 红景天苷在制备防治蛋鸡脂肪肝药物和饲料添加剂中的应用

### 技术领域

本发明属于畜禽疾病防治技术领域，具体涉及红景天苷在制备防治蛋鸡脂肪肝药物和饲料添加剂中的应用。

### 背景技术

肝脏在家禽的脂肪沉积及蛋黄的形成过程起着至关重要的作用。鸡脂肪肝综合征（Fatty Liver Syndrome, FLS）是一种代谢性疾病，受到营养、遗传等因素的影响。临床症状是患病鸡过于肥胖，有的超过正常体重的 25%，在下腹部可以摸到突出的皮下脂肪和腹脂垫。鸡往往突然发病，病鸡精神沉郁，食欲减少，肉髯、鸡冠褪色乃至苍白，喜卧，不愿走动，腹部柔软下垂。严重的嗜眠、瘫痪，体温到达 41.5-42.8℃，进而鸡冠、肉髯及脚变冷，可在数小时内死亡。剖检病症是肝脏脂肪变性、脂肪过度沉积、肝脏肿大、呈浅褐色、质地松软易碎、有瘀血、肝细胞坏死、肝包膜破裂而导致内出血或血肿。在集约化饲养条件下，产蛋种鸡呈高发趋势，且多发于产蛋高峰期膘情良好的鸡，尤其是笼养鸡的产蛋高峰期，FLS 会导致产蛋率下降、产蛋高峰期缩短，个别患病鸡会因肝功能障碍或肝破裂而死亡，给养殖业带来极大的经济损失。中草药添加剂无残留、无污染，为治疗药物性肝损伤提供思路。目前，市场上没有针对蛋鸡保肝疗肝的中草药添加剂。

自 1968 年以来，陆续有大量研究表明，蛋鸡在产蛋期极易患肝损伤，严重影响肝脏的生理功能，导致繁殖性能低下，造成巨大的经济损失。Tsai 等（2017）应用转录组与蛋白质组学相结合的方法鉴定蛋鸡脂肪肝的潜在血浆标志物。血浆激素及相关蛋白检测为肝脏修复效果监测提供思路。现有大部分的

报道是关于对产蛋期蛋鸡饲料能量供给的调整，但由于品种差异导致饲料转化能力也不尽相同，产蛋期脂肪肝疾病依然存在。尽管在产蛋期对蛋鸡进行限制饲喂可以有效的防止脂肪肝的出现，但是鸡群发病率有的高达 5%-7%，甚至 15% 以上。并且，限制饲喂在一定程度上违背了动物福利。也有学者使用一些中药配方进行预防取得一定的疗效，比如：有采用五味子、决明子、夏枯草、柴胡等组分复配的中药组合物，也有采用云芝、月见草、石见穿、甘草等组分复配的中药组合物，但这些中药组合物无一例外都是组份多，配方复杂，机理不清，且成本高；多采用拌饲料的方式，就算对蛋鸡脂肪肝有较好的作用，但饲喂过程中的适口性是不得不考虑的常见问题，而且鸡群吸收效率低，起效慢，治疗效果有限。同时，很多中药单体有效成分可以被提取纯化出来，但是由于其活性较强，在体外很容易氧化变质，失去活性。

### 发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明第一方面提供红景天苷作为唯一活性成分在制备防治蛋鸡脂肪肝药物中的应用，并且红景天苷以治疗有效量存在于所述药物中。

进一步地，所述药物的给药途径为口服。

进一步地，所述红景天苷在所述药物中以 10~80mg/kg 的剂量给药。

优选地，所述红景天苷在所述药物中以 20mg/kg 的剂量给药。

进一步地，所述药物剂型为溶液剂、颗粒剂或聚合物胶束。

第二方面，本发明提供一种防治蛋鸡脂肪肝的红景天苷聚合物胶束冻干粉的制备方法，包括：

步骤 1，将红景天苷、载体材料泊洛沙姆 P407、泊洛沙姆 F127 于无水乙醇中超声一段时间，待其溶解后蒸除无水乙醇；

步骤 2，将剩余产品中加入适量去离子水进行水化，于 24~26℃、50~70rpm

## 说明书

---

条件下处理 10~15min, 得到红景天苷聚合物胶束溶液, 经 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤;

步骤 3, 滤液加入蔗糖和壳聚糖作为冻干保护剂, 冷冻干燥 17~19h, 即得。

本发明第三方面, 提供红景天苷作为唯一活性成分在制备防治蛋鸡脂肪肝饲料添加剂中的应用, 并且红景天苷以治疗有效量存在于所述饲料添加剂中。

进一步地, 所述应用包括: 采用上述制备方法获得的聚合物胶束冻干粉制备防治蛋鸡脂肪肝饲料添加剂。

本发明第四方面, 提供一种蛋鸡饲料, 包括上述饲料添加剂和基础饲料。

本发明第五方面, 提供一种防治蛋鸡脂肪肝的蛋鸡饲养方法, 包括: 在蛋鸡产蛋高峰结束时, 或者生长周期 350 天龄以后, 在鸡基础日粮中添加上述制备方法获得的红景天苷聚合物胶束冻干粉。

与现有技术相比, 本发明的有益效果为: 本发明对油酸诱导脂肪肝模型的试验结果表明, 红景天苷可以不同程度的增加细胞活力, 对细胞脂质沉积有治疗作用, 有效治疗肝脏的脂肪变性, 并能有效抑制肝细胞凋亡。并且对高脂饲养诱导的蛋鸡脂肪肝的试验结果表明, 红景天苷可减轻高脂饲料诱导的蛋鸡脂肪肝脂肪变性、氧化应激和炎症反应。因此, 红景天苷可作为唯一活性成分应用于制备防治蛋鸡脂肪肝药物或饲料添加剂。

### 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解, 构成本发明的一部分, 本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明, 并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

图 1 为本发明实施例 1 中红景天苷分子结构及纯度检测结果图, 其中, 图 1A 为红景天苷的化学结构; 图 1B、图 1C 和图 1D 分别为高效液相色谱、核磁共振及质谱的检测检测结果图。

图 2 为本发明实施例 1 中红景天苷对油酸诱导脂肪肝模型细胞活力的影响, 利

用 CCK-8 筛选红景天苷的最佳处理浓度和时间。

图 3 为本发明实施例 2 中红景天苷对油酸诱导脂肪肝模型原代肝脏细胞脂质代谢和增殖的影响，其中，图 3A 和 3B 是对照组(NC)、模型组(OA)及红景天苷治疗组(OA+Salidroside)对肝细胞脂质代谢相关基因 mRNA 及蛋白表达量的影响；图 3C、3D 和 3E 是 NC、OA 和 OA+Salidroside 对肝细胞增殖相关基因 mRNA 及蛋白表达量的影响；图 3F 和 3G 为 NC、OA、OA+Salidroside 及 PI3K 通路抑制剂（LY294002）对的 P13K/AKT/Gsk3- $\beta$  通路蛋白表达量的影响。

图 4 为本发明实施例 3 中红景天苷对油酸诱导脂肪肝模型原代肝脏细胞凋亡的影响，其中，图 4A、4B 和 4C 是 NC、OA 和 OA+Salidroside 组对肝细胞凋亡相关基因（Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3）mRNA 和蛋白表达水平的影响；图 4D 和 4E 是通过流式检测 NC、OA 和 OA+Salidroside 组对肝细胞活性氧含量的影响；图 4F 和 4G 是通过流式检测 NC、OA 和 OA+Salidroside 组对肝细胞早期、晚期凋亡细胞数的影响。

图 5 为本发明实施例 4 中红景天苷活体饲喂对脂肪肝疾病的缓解作用。通过肝脏组织形态学观察，HE 和油红 O 染色检测红景天苷对脂肪肝疾病的影响。

### 具体实施方式

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

本发明具体实施例中是采用薄膜分散法制备红景天苷聚合物胶束，具体如下：精密称取一定量的红景天苷及载体材料泊洛沙姆 P407 和泊洛沙姆 F127，置于 100 ml 圆底烧瓶中，加入适量无水乙醇，超声(50W，50kHz) 5 分钟使其充分

溶解，于 45℃ 旋转蒸发将无水乙醇蒸干。然后加入适量去离子水进行水化，水化温度作为影响因素考察，在 60 转/分转速下磁力搅拌 15 分钟，得到红景天苷聚合物胶束溶液，经 0.45μm 微孔滤膜过滤，滤液加入一定量的蔗糖和壳聚糖作为冻干保护剂，冷冻干燥 18h，即得红景天苷聚合物胶束的冻干产品。具体配方为投红景天苷的药量 1g，药物载体中泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 F127 的质量比例为 2:1，即泊洛沙姆 407 取 2g，泊洛沙姆 F127 取 1g；也即红景天苷与载体中泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 F127 混合物的质量比为：1:3，水相体积 2L，水化温度 25℃。同时，得到的红景天苷胶束溶液中加入质量份数为 5% 的蔗糖和 10% 的壳聚糖，然后以 -20℃ 冰箱过夜，冷阱温度在 -45~-50℃ 之间保持 4h，然后迅速将预冻好的样品移至冻干机隔板上，开启真空泵，冻干时间为 18 小时，变制成平均粒径(120.8 ± 12.5) 纳米，包封率(87.38 ± 2.61) %，载红景天苷量为 18.2% 的红景天苷聚合物胶束冻干粉。

### 实施例 1

红景天苷分子结构及纯度检测及对油酸诱导脂肪肝模型细胞活力的影响

#### 一、实验材料

1. 实验动物：35 周龄产蛋期的罗曼粉母鸡，体重 (1.76±0.19) kg，实验动物由四川农业大学科研园区家禽育种场提供。

2. 主要试剂：油酸 (Sigma, Louis, MO, USA)，红景天苷 (南京草本生物科技公司，南京，中国)。

3. 主要仪器：高效液相色谱，核磁共振仪，质谱，细胞培养箱，酶标仪。

#### 二、实验方法

##### 1. 红景天苷分子结构及纯度检测

根据高效液相色谱 (Agilent Technologies Inc., California, USA)，核磁共振仪 (Avance III HD 400, Bruker, Switzerland) 和质谱 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) 的仪器操作说明对红景天苷的分子结构和纯度进行检测。

### 2. 鸡原代肝细胞分离及培养

麻醉、抗凝及肝细胞采集：禁食 8 小时后，翅静脉注射戊巴比妥钠（50mg/mL；50 mg/kg）麻醉和肝素钠（1400UI/mL；1750 UI/kg）抗凝。待鸡完全麻醉后，仰卧固定在手术台上，酒精消毒后打开腹腔胸腔，取出整个肝脏。用灭菌的 PBS 冲洗干净后放入无菌平皿中，转入细胞室操作。沿肝门静脉以 30mL/min 的速度灌注 37℃ 预热的无菌灌流液，持续 20 分钟。随后以 30mL/min 的速度灌注 37℃ 预热的无菌洗涤液持续 20 分钟。将肝脏放入盛有少量 PBS 的大培养皿中，剔除组织/血管和结缔组织，减去肝脏周边消化不完全的部分，用镊子撕掉肝脏包膜，后将肝脏转入盛有少量 PBS 和双抗的小烧杯中剪碎 10min，将剪碎的肝脏组织转入大离心管中加入 3 倍组织样体积的 0.4g/L 的 IV 型胶原酶，在 37℃ 水浴锅中消化 10min，每 2min 摇晃一次。用等体积的高糖培养基终止消化，并分别过 200 目（75um）和 500 目（30um）细胞筛。所得细胞悬液用高糖培养基洗两次后细胞计数并铺板。

### 3. 建立脂肪肝模型

造模及分组：将肝脏细胞铺在 96 孔板，并分别设置对照组（NC）、造模组（300mg/mL 油酸，OA）及红景天苷治疗组（OA+Salidroside）。将红景天苷粉末溶于肝脏细胞培养基母液中，红景天苷处理浓度为 0.1mg/mL，0.2 mg/mL，0.3 mg/mL 和 0.4 mg/mL，每个处理设置 6 个复孔。在处理后的 12h、24h、36h 和 48h 时间点每孔加入 10uL CCK-8 试剂，在细胞培养箱中孵育 1h 后，用酶标仪测定每孔吸光度值，计算细胞活力。

## 三、实验结果

图 1A 为红景天苷的分子结构式，分子式为  $C_{14}H_{20}O_7$ ，分子量为 300.30；如图 1B 所示，高效液相色谱检测到 14.196 分钟达到峰值，区域面积占 99.81 %；1C 核磁共振仪检测结果显示其化学式结构为  $C_{14}H_{20}O_7$ ；1D 质谱检测结果显示其分子量大小约为 300.30 Da。表 1 和图 2 结果显示，OA 诱导的造模组显著降

## 说明书

低了肝细胞活力，而 0.3 mg/mL 浓度红景天苷在处理肝细胞 36h 后显著增加了细胞活力，效果最佳。所以后续的红景天苷组选择 0.3 mg/mL 浓度处理 36h。

表 1 红景天苷对油酸诱导脂肪肝模型细胞活力的影响

时间 (h)	OD 值					
	NC	Oleic acid (OA)	红景天苷浓度 (mg/mL)			
			0.1	0.2	0.3	0.4
12	0.359±0.028 <sup>a</sup>	0.337±0.017 <sub>b</sub>	0.358±0.036 <sup>a</sup>	0.378±0.046 <sup>a</sup>	0.356±0.017 <sup>a</sup>	0.352±0.02 <sup>a</sup>
24	0.371±0.036 <sup>a</sup>	0.344±0.041 <sub>b</sub>	0.377±0.051 <sup>a</sup>	0.413±0.017 <sup>a</sup>	0.368±0.026 <sup>a</sup>	0.383±0.025 <sup>a</sup>
36	0.427±0.023 <sub>b</sub>	0.344±0.027 <sup>c</sup>	0.441±0.031 <sup>b</sup>	0.458±0.025 <sup>b</sup>	0.517±0.018 <sup>a</sup>	0.461±0.023 <sup>b</sup>
48	0.461±0.025 <sup>a</sup>	0.348±0.018 <sub>b</sub>	0.454±0.03 <sup>a</sup>	0.452±0.031 <sup>a</sup>	0.514±0.036 <sup>a</sup>	0.467±0.038 <sup>a</sup>

## 四、结论

根据以上结果，油酸处理肝细胞后导致细胞活力下降，而红景天苷可以不同程度的增加细胞活力，0.3 mg/mL 浓度红景天苷处理肝细胞 36h 后细胞活力最高。

## 实施例 2

红景天苷对油酸诱导脂肪肝模型原代肝脏细胞脂质代谢和增殖的影响

### 一、实验材料

1. 实验动物：35 周龄产蛋期的罗曼粉母鸡，体重（1.76±0.19）kg，实验动物由四川农业大学科研园区家禽育种场提供。

2. 主要试剂：油酸（Sigma, Louis, MO, USA），红景天苷（南京草本生物科技公司，南京，中国），PI3K 通路抑制剂（LY294002, Houston, Texas, United States）。抗体 PCNA（ABclonal Technology, Wuhan, China），CDK2（Zen-Bio, Chengdu, China），β-Tubulin（Zen-Bio）（Western Blot 的内参），PDK1 [Cell

Signaling Technology (CST), USA], p-PDK1 (CST), AKT 和 p-AKT (CST), Gsk3- $\beta$  和 p-Gsk3- $\beta$  (ABclonal)。山羊抗鼠和山羊抗兔 (Zen-Bio) (Western Blot 的二抗)。

3.主要仪器：细胞培养箱，荧光显微镜，Western Blot 仪，荧光定量仪。

## 二、实验方法

1. 鸡原代肝细胞分离及培养（同实施例 1 实验方法）

2. 建立脂肪肝模型

造模及分组（同实施例 1 实验方法）。

3. RNA 提取及实时荧光定量

红景天苷处理 36h 后，弃掉培养液，PBS 清洗 2-3 次，每孔加入 1mL Trizol 充分裂解 15min，参照 RNA Trizol (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) 说明书中的步骤提取所有肝脏细胞样品总 RNA。核酸蛋白分光光度计仪器 (IMPLEN) 检测 RNA 纯度；Qubit®2.0 Fluorometer (Life Technologies) 定量分析 RNA 浓度；采用成都天泰生物技术有限公司试剂盒逆转录。实时荧光定量 10 微升体系如下：5 $\mu$ L TB Green™ Premix (Takara), 0.5 $\mu$ L forward and reverse primers, 1 $\mu$ L cDNA, and 3 $\mu$ L DNase/RNase-Free Deionized Water (Tiangen, Beijing, China).

4. 细胞总蛋白提取及 Western Blot 检测

采用蛋白提取试剂盒 (BestBio Biotech Co. Ltd., Shanghai, China) 提取肝脏细胞总蛋白。BCA 蛋白检测试剂盒 (BestBio) 用来检测蛋白浓度和纯度。根据标准曲线调整蛋白浓度，按体积比例 4: 1 加入还原性上样缓冲液，蛋白 marker 作为标准蛋白标记，进行两步骤电泳分离蛋白。

a. 灌胶：根据蛋白的分子量大小，配制所需浓度的分离胶，混匀后即可灌胶。表面加一层异丙醇压平胶面，室温环境下静置 40min 待胶凝固，用水清洗 3 遍，滤纸擦拭干净。再配 5%的浓缩胶，灌满后将梳子插入胶板中，待浓缩胶



凝固后，拔出梳子。冲洗浓缩胶，最后放入电泳槽中使用。

b. 上样：按照 25 mg 总蛋白进行上样，加入 25% 体积的上样缓冲液混匀，在 PCR 仪器上 95℃ 变性 5 min，5  $\mu$ L 白 marker 点在边孔和中央。

c. 电泳：浓缩胶 20-30 min，电压为 90V，分离胶约 1-1.2 h，电压 110 V。根据溴酚兰带可判断电泳进行程度，刚跑完即终止电泳。

d. 转膜：使用甲醇浸泡 PVDF 膜 1min（活化），再用半干转方法在 25V 电压下转膜，把蛋白质从胶中转移到 PVDF 膜上。

e. 封闭：膜正面朝上在 37℃ 封闭液中摇动孵育 2 小时。后使用 TBST 快速清洗。

f. 一抗孵育和洗涤：一抗稀释液稀释一抗，PVDF 膜正面朝上 4℃ 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次（每次 10 min）。

g. 二抗孵育和洗涤：二抗稀释液稀释二抗，PVDF 膜正面朝上 37℃ 孵育 1 h，TBST 洗涤 5 次（每次 10 min）。滴 0.5 mL ECL 显色剂进行照胶检测。

### 三、实验结果

与对照组相比，油酸诱导的造模组增加了肝细胞脂质沉积，0.3 mg/mL 浓度红景天苷处理肝细胞 36h 后显著减少脂肪生成相关基因的表达，增加脂质转运及脂肪分解相关基因的表达（图 3 A 和 3B）。此外，油酸诱导脂肪肝造模组细胞增殖相关基因（PCNA，CDK2 和 cyclinD1）mRNA 表达量显著降低（ $P < 0.01$ ），PCNA 和 CDK2 蛋白表达量也显著降低。红景天苷处理 36h 后，PCNA，CDK2 和 cyclinD1 的 mRNA 表达量显著升高，PCNA 和 CDK2 蛋白表达量也显著升高（图 3C，3D 和 3E）。与对照组相比，OA 组肝细胞的 p-PDK1/PDK1，p-AKT/AKT 和 p-Gsk3- $\beta$ /Gsk3- $\beta$  显著降低（ $P < 0.01$ ）；红景天苷处理后，相较于 OA 组，p-PDK1/PDK1，p-AKT/AKT 和 p-Gsk3- $\beta$ /Gsk3- $\beta$  显著升高（ $P < 0.01$ ），与 NC 组差异不显著；后加入 PI3K 通路抑制剂（LY294002），相较于红景天苷治疗组（OA+Salidroside），p-PDK1/PDK1，p-AKT/AKT 和 p-Gsk3- $\beta$ /Gsk3- $\beta$  显

著降低 ( $P<0.01$ )，与 OA 组差异不显著 (图 3F 和 3G)。

### 四、结论

红景天苷对油酸诱导脂肪肝模型细胞脂质沉积有治疗作用，有效治疗肝脏的脂肪变性。油酸诱导脂肪肝模型组肝细胞抑制增殖，而红景天苷通过靶向 P13K/AKT/Gsk3- $\beta$  通路促进肝细胞增殖。

### 实施例 3

红景天苷对油酸诱导脂肪肝细胞凋亡的影响

#### 一、实验材料

1. 实验动物：35 周龄产蛋期的罗曼粉母鸡，体重 ( $1.76\pm0.19$ ) kg, 实验动物由四川农业大学科研园区家禽育种场提供。

2. 主要试剂：油酸 (Sigma, Louis, MO, USA)，红景天苷 (南京草本生物科技公司，南京，中国)；抗体 Caspase-8 (Abcam, Cambridge, UK; 1:1000)，Caspase-9 (Abcam)，Caspase-3 (Abcam)， $\beta$ -Tubulin (Zen-Bio)；Annexin V-FITC (Invitrogen, Australian)，PI (Invitrogen)。

3. 主要仪器：细胞培养箱，流式细胞仪，Western Blot 仪，荧光定量仪，荧光分光光度计。

#### 二、实验方法

1. 鸡原代肝细胞分离及培养 (同实施例 1 实验方法)；

2. 建立脂肪肝模型；

造模及分组 (同实施例 1 实验方法)。

3. RNA 提取及实时荧光定量 (同实施例 2 实验方法)；

4. 细胞总蛋白提取及 Western Blot 检测 (同实施例 2 实验方法)；

5. 流式细胞仪检测肝细胞凋亡；

肝细胞用 PBS 洗涤 2 次，调整浓度至  $10^6/\text{mL}$ 。将 100mL 细胞悬浮液在 250g 离心 5 分钟，弃上清液，加入 20mL 结合缓冲液重悬细胞。用 5 $\mu\text{L}$  的

AnnexinV-FITC 对细胞进行染色 10 分钟，然后加入 10 $\mu$ L 的 PI 在室温避光染色 5 分钟。使用流式细胞仪(CytoFLEX, Beckman, USA)和 Kaluza 2.1 软件分析细胞凋亡。

### 6. 细胞活性氧含量 (ROS) 检测;

用 10  $\mu$ M 浓度的 DCFH-DA (2, 7-Dichlorofluorescein; Sigma) 室温处理细胞 20 分钟，细胞使用 Shimadzu RF-3501 荧光分光光度计在激发波长 488 nm 和发射波长 525 nm 分析细胞活性氧含量。

## 三、实验结果

与对照组相比，OA 造模组细胞促凋亡相关基因 (Caspase-8, Caspase-9 和 Caspase-3) mRNA 表达量显著升高 ( $P<0.01$ )，Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达量也显著升高。红景天苷处理 36h 后，Caspase-8, Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 表达量显著降低，Caspase-8, Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达量也显著降低 (图 4A, 4B 和 4C)。肝细胞 ROS 含量检测发现，油酸诱导脂肪肝造模组肝脏细胞 ROS 含量显著升高；红景天苷处理后，肝脏细胞 ROS 含量显著降低 ( $P<0.01$ ) (图 4D 和 4E)。肝细胞凋亡细胞数检测发现，油酸诱导脂肪肝造模组肝脏细胞早期和晚期凋亡数量显著上升；红景天苷处理后，肝脏细胞早期和晚期凋亡数量显著减少 ( $P<0.01$ ) (图 4F 和 4G)。

## 四、结论

油酸诱导的脂肪肝模型组肝细胞凋亡增加，而红景天苷能有效抑制肝细胞凋亡。

## 实施例 4

红景天苷对高脂饲喂诱导的蛋鸡脂肪肝的治疗作用 (活体饲喂试验)，添加的是红景天苷聚合物胶束冻干粉。

### 一、实验材料

1. 实验动物：35 周龄产蛋期的罗曼粉母鸡，体重 ( $1.76\pm0.19$ ) kg, 饲喂于

四川农业大学科研园区家禽育种场。

2. 主要试剂：苏木精染色液，油红 O 染色液（索莱宝），RNA Trizol，TB Green<sup>TM</sup> Premix (Takara)，RNA 反转录试剂盒，多聚甲醛，异丙醇等。

3. 主要仪器：冰冻切片机，光学显微镜，Lightcycle96 荧光定量仪。

## 二、实验方法

1. 180 只 35 周龄的罗曼粉母鸡用于预试验，母鸡平均分为 6 个组，每组 30 只。分别为对照组（Con）和红景天苷饲喂组（5, 10, 20, 40, and 80 mg/kg/天，这儿的药量指的是红景天苷），连续饲喂 4 周，进行血液生化指标，肝脏脂质代谢和免疫因子相关基因表达量的检测。

### 2. 建立脂肪肝模型

利用高脂饲喂（大豆油）造模，基础饲料配方见表 2。144 只罗曼粉母鸡用于正式试验，母鸡平均分为 4 个组，每组 36 只。分别为对照组（Con）、对照组加红景天苷组（Con+SDS）、模型组（Model）和模型组加红景天苷组（Model+SDS），连续饲喂 4 周，进行血液生化指标检测，肝脏形态学组织学监测，肝脏脂质代谢和免疫因子相关基因表达量的检测。

表 2 基础饲料配方

成分 (%)	对照组	模型组
玉米	62.5	62.5
豆粕	20.09	20.09
玉米麸粉	1.5	1.5
玉米酒糟	3	3
大豆油	1	5
磷酸氢钙	1.04	1.04
石粉	9	9
氯化钠	0.25	0.25

## 说 明 书

微生物制剂	0.05	0.05
胆碱	0.1	0.1
植酸酶	0.02	0.02
预混料	1.45	1.45
总计	100	104
营养水平		
ME/(MJ/kg)	11.291	11.953
粗蛋白 (%)	16.234	15.61
粗脂肪 (%)	2.261	2.174
蛋氨酸 (%)	0.234	0.225
赖氨酸 (%)	0.769	0
AP (%)	0.306	0.739
TCa (%)	3.567	0.294
TP (%)	0.5	3.43

预混料:

维生素预混料 (饮食/千克): 维生素 A, 6000 IU; 维生素 D3, 1500 IU; 维生素 K3, 4.2 mg; 维生素 B1, 3 mg; 维生素 B2, 10.2 mg; 叶酸, 0.9 mg; 泛酸钙, 15 mg; 烟酸, 45 mg; 维生素 B6, 5.4 mg; 维生素 B12, 24 µg; 维生素 H, 150 µg。

矿物质预混料 (饮食/千克): Cu ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 6.8 mg; Fe ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 66 mg; Zn ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 83 mg; Mn ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 80 mg; I (KI), 1 mg; Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), 0.3 mg; AP: 有效磷; TCa: 总钙; TP: 总磷。

### 3. 油红 O 染色观察

红景天苷处理 36h 后, 弃掉培养液, PBS 清洗 2-3 次, 用 10%多聚甲醛固

## 说 明 书

定 30min，弃固定液，用 PBS 清洗 2-3 次，每孔加入油红 O 染液 1mL，室温染色 12-15min，弃染液，苏木素染料复染 30s，弃染液后用 PBS 清洗 2-3 次。显微镜下观察并拍照。

### 三、实验结果

预实验的结果显示，血液中的 TC、TG、ALT、AST 含量在 20 mg/kg 浓度 SDS 饲喂组显著下降（表 3）。此外，PPAR $\alpha$  和 MTTP 的表达量在 20 mg/kg 浓度 SDS 饲喂组的肝脏组织中显著上升，PPAR $\gamma$ ，FASN, IL-6 和 IL-1 $\beta$  的表达量在 20 mg/kg 浓度 SDS 饲喂组的肝脏组织中显著下降（表 4）。因此，我们选择 20 mg/kg 作为最佳的饲喂浓度用于后续实验。

表 3SDS 饲喂对血清生化指标的影响

生化指标	Control	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
TC (mmol/L)	17.36 $\pm$ 2.28 <sup>a</sup>	16.08 $\pm$ 2.18 <sup>ab</sup>	9.8 $\pm$ 1.89 <sup>cd</sup>	4.74 $\pm$ 1.19 <sup>d</sup>	8.04 $\pm$ 2.37 <sup>cd</sup>	10.85 $\pm$ 1.69 <sup>bc</sup>
TG (mmol/L)	26.93 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup>	27.78 $\pm$ 3.92 <sup>a</sup>	18.76 $\pm$ 3.14 <sup>ab</sup>	7.85 $\pm$ 2.52 <sup>c</sup>	13.34 $\pm$ 4.07 <sup>bc</sup>	18.22 $\pm$ 3.37 <sup>abc</sup>
ALT (U/L)	9.81 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>	14.06 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>	4.15 $\pm$ 1.55 <sup>cd</sup>	3.72 $\pm$ 0.56 <sup>d</sup>	5.64 $\pm$ 0.92 <sup>cd</sup>	7.08 $\pm$ 0.58 <sup>bc</sup>
AST (U/L)	1214.36 $\pm$ 121.67 <sup>a</sup>	60.52 $\pm$ 9.24 <sup>b</sup>	78.74 $\pm$ 9.8 <sup>b</sup>	41.91 $\pm$ 8.24 <sup>b</sup>	56.28 $\pm$ 5.14 <sup>b</sup>	47.55 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>
SOD (U/mL)	22.46 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	17.92 $\pm$ 2.41 <sup>b</sup>	23.09 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	24.1 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	21.99 $\pm$ 1.32 <sup>ab</sup>	25.17 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>

数据表述为平均值 $\pm$ 标准差。同行不同上标字母表示各处理组间差异显著（P<0.05）。

表 4SDS 饲喂对鸡肝脏脂质代谢和免疫因子表达量的影响

基因	Control	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
----	---------	---------	----------	----------	----------	----------

# 说明书

<i>PPARα</i>	1.02±0.06 <sup>c</sup>	1.79±0.13 <sup>bc</sup>	1.83±0.19 <sup>bc</sup>	2.26±0.20 <sup>a</sup>	2.12±0.52 <sup>a</sup>	1.78±0.26 <sup>bc</sup>
<i>PPARγ</i>	1.01±0.20 <sup>b</sup>	1.24±0.12 <sup>ab</sup>	1.15±0.23 <sup>ab</sup>	1.63±0.28 <sup>a</sup>	0.33±0.07 <sup>c</sup>	0.34±0.03 <sup>c</sup>
<i>MTTP</i>	1.02±0.15 <sup>c</sup>	3.29±0.65 <sup>ab</sup>	2.73±0.45 <sup>abc</sup>	4.00±0.89 <sup>a</sup>	2.06±0.23 <sup>bc</sup>	1.70±0.19 <sup>bc</sup>
<i>FASN</i>	0.99±0.11 <sup>a</sup>	0.35±0.04 <sup>b</sup>	0.79±0.08 <sup>a</sup>	0.42±0.03 <sup>b</sup>	0.31±0.11 <sup>b</sup>	0.46±0.12 <sup>b</sup>
<i>IL-6</i>	1.01±0.13 <sup>a</sup>	0.6±0.07 <sup>bc</sup>	0.74±0.06 <sup>b</sup>	0.37±0.11 <sup>c</sup>	0.54±0.04 <sup>bc</sup>	0.54±0.1 <sup>bc</sup>
<i>IL-1β</i>	1.01±0.07 <sup>a</sup>	1.00±0.09 <sup>a</sup>	0.38±0.03 <sup>bc</sup>	0.57±0.1 <sup>b</sup>	0.33±0.07 <sup>c</sup>	0.43±0.05 <sup>bc</sup>

数据表述为平均值±标准差。同行不同上标字母表示各处理组间差异显著（P<0.05）。

正式实验结果显示，蛋鸡体重，肝脏重和腹脂重。模型组（Model）显著高于对照组（Con），而 Con+SDS 和 Model+SDS 组显著低于对照组（表 5）。HE 染色切片结果显示，Con 组胞浆轻度染色，出现少量脂肪小空泡。油红 O 染色显示肝内有小脂滴，提示轻度脂肪变性。模型组可见大量脂肪空泡，肝索紊乱，鼻窦闭锁，油红 O 染色显示肝脏内出现大量脂滴，提示严重脂肪变性。Con + SDS 组和 Model + SDS 组肝细胞排列整齐清晰，细胞核位于细胞中央（灰褐色，彩图中显示为蓝色），胞浆均匀分布（深灰色，颜色比细胞核略浅，彩图中显示为粉红色）。油红 O 染色显示 Con + SDS 和 Model + SDS 组的脂肪滴均少于 Con 组（图 5），图 5 中，白色箭头所示为蛋鸡脂肪肝出血综合征的严重病理改变。黑色箭头为脂肪空泡和脂滴。

表 5SDS 饲喂对高脂饲喂诱导的蛋鸡脂肪肝体重、肝脏中和腹部脂肪重的影响

重量 (g)	Con	Con + SDS	Model	Model + SDS
体重 (0 d)	1760±190 <sup>a</sup>	1740±190 <sup>a</sup>	1730±140 <sup>a</sup>	1740±130 <sup>a</sup>
体重 (28 d)	1770±110 <sup>b</sup>	1650±110 <sup>c</sup>	1920±150 <sup>a</sup>	1700±90 <sup>c</sup>
肝脏	50.67±7.52 <sup>b</sup>	33.53±3.62 <sup>c</sup>	58.72±6.88 <sup>a</sup>	26.17±1.82 <sup>c</sup>
腹部脂肪	72.34±15.35 <sup>b</sup>	33.05±12.52 <sup>c</sup>	94.98±16.12 <sup>a</sup>	40.97±13.02 <sup>c</sup>

## 说 明 书

数据表述为平均值±标准差。同行不同上标字母表示各处理组间差异显著（ $P<0.05$ ）。

血液生化指标检测结果显示，与 Con 组比较，Model 组血清 TC、TG 水平均显著升高，Con+SDS 和 Model+SDS 组血清 TC、TG 水平均显著降低。Con+SDS 组和 Model+SDS 组 ALT、AST 水平均显著低于 Model 组。此外，我们发现 Con+SDS 组 SOD 活性高于 Con 组和模型组（表 6）。与 Con 组相比，Con+SDS 组和 Model+SDS 组 PPAR $\alpha$  和 MTTP mRNA 表达丰度显著升高。PPAR $\gamma$ 、SCD、FAS mRNA 表达丰度在 Model 组显著升高，在 Con+SDS 和 Model+SDS 组显著降低。Model 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 mRNA 表达显著升高，Con+SDS 和 Model+ SDS 组 mRNA 表达降低（表 7）。综上所述，本研究结果表明 SDS 可减轻高脂饲料诱导的体内肝脏脂肪变性、氧化应激和炎症反应。

表 6 SDS 饲喂对高脂饲喂诱导的蛋鸡脂肪肝血清生化指标的影响

生化指标	Con	Con + SDS	Model	Model + SDS
TC (mmol/L)	6.12±0.3 <sup>b</sup>	3.68±0.18 <sup>c</sup>	12.49±1.43 <sup>a</sup>	4.03±0.11 <sup>bc</sup>
TG (mmol/L)	15.65±0.7 <sup>b</sup>	11.31±0.27 <sup>c</sup>	23.25±0.59 <sup>a</sup>	11.48±0.62 <sup>c</sup>
ALT (U/L)	100.1±9.05 <sup>a</sup>	63.06±11.05 <sup>b</sup>	119.24±14.41 <sup>a</sup>	65.64±8.28 <sup>b</sup>
AST (U/L)	35.26±4.01 <sup>b</sup>	10.82±1.59 <sup>c</sup>	102.3±9.22 <sup>a</sup>	14.03±1.32 <sup>c</sup>
GSH (mgGSH/L)	10.82±1.15 <sup>a</sup>	7.12±0.51 <sup>b</sup>	13.4±1.87 <sup>a</sup>	5.86±0.49 <sup>b</sup>
SOD (U/mL)	119.66±4.12 <sup>bc</sup>	149.78±7.43 <sup>a</sup>	107.72±7.63 <sup>c</sup>	130.57±4.14 <sup>b</sup>

数据表述为平均值±标准差。同行不同上标字母表示各处理组间差异显著（ $P<0.05$ ）。

表 7 SDS 饲喂对高脂饲喂诱导的蛋鸡脂肪肝脂质代谢和免疫反应的影响

基因	Con	Con + SDS	Model	Model + SDS
PPAR $\alpha$	1.02±0.08 <sup>b</sup>	2.16±0.12 <sup>a</sup>	0.74±0.15 <sup>b</sup>	2.13±0.48 <sup>a</sup>



## 说明书

<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	1.02±0.13 <sup>b</sup>	0.26±0.07 <sup>c</sup>	1.61±0.05 <sup>a</sup>	0.25±0.05 <sup>c</sup>
<i>FASN</i>	1.00±0.07 <sup>b</sup>	0.37±0.05 <sup>c</sup>	1.53±0.16 <sup>a</sup>	0.47±0.06 <sup>c</sup>
<i>SCD</i>	0.99±0.03 <sup>b</sup>	0.21±0.08 <sup>c</sup>	2.14±0.27 <sup>a</sup>	0.47±0.09 <sup>c</sup>
<i>MTTP</i>	0.99±0.12 <sup>b</sup>	2.91±0.49 <sup>a</sup>	0.20±0.02 <sup>b</sup>	2.04±0.31 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$	1.01±0.16 <sup>b</sup>	0.35±0.04 <sup>c</sup>	1.89±0.35 <sup>a</sup>	0.39±0.04 <sup>c</sup>
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	0.99±0.04 <sup>b</sup>	0.29±0.06 <sup>d</sup>	1.78±0.18 <sup>a</sup>	0.60±0.07 <sup>c</sup>
<i>IL-6</i>	1.00±0.09 <sup>b</sup>	0.47±0.05 <sup>c</sup>	2.61±0.23 <sup>a</sup>	0.56±0.09 <sup>c</sup>
<i>IL-8</i>	1.02±0.06 <sup>b</sup>	0.61±0.09 <sup>c</sup>	1.87±0.19 <sup>a</sup>	0.74±0.04 <sup>bc</sup>

数据表述为平均值±标准差。同行不同上标字母表示各处理组间差异显著（ $P<0.05$ ）。

### 四、结论

综上所述，本研究结果表明 SDS 可减轻高脂饲料诱导的蛋鸡脂肪肝脂肪变性、氧化应激和炎症反应。

综上，本发明对油酸诱导脂肪肝模型的试验结果表明，红景天苷可以不同程度的增加细胞活力，对细胞脂质沉积有治疗作用，有效治疗肝脏的脂肪变性，并能有效抑制肝细胞凋亡。并且对高脂饲料诱导的蛋鸡脂肪肝的试验结果表明，红景天苷可减轻高脂饲料诱导的蛋鸡脂肪肝脂肪变性、氧化应激和炎症反应。因此，红景天苷可作为唯一活性成分应用于制备防治蛋鸡脂肪肝药物或饲料添加剂。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。