DOI:10.16016/j.2097-0927.202106020

罗布麻提取物改善小鼠高脂饮食诱导的代谢失调与肠道菌群紊乱

杨 杰[1],付 慧[2,4],张 晋[1],夏 静[1],白小龙[1],李佳珍[3],周思艺[1],刘 威[4] 032200 山西 汾阳,山西医科大学汾阳学院:临床医学系[1],科技中心[2],眼视光学系[3],医学检验系[4]

[**摘要**] **目的** 探讨罗布麻(*Apocynum venetum* L.,AV)对小鼠高脂食物诱导的肥胖、代谢失调及肠道菌群紊乱的作用。**方法** 将18只C57BL/6小鼠随机分为3组($n=6$):对照组(ND组,喂正常食物,正常饮水)、肥胖模型组(HFD组,喂高脂食物,正常饮水)和AV处理组(AV组,喂高脂食物,饮水添加AV提取物)。每周日称量小鼠体质量。12周结束时,称量小鼠皮下脂肪和内脏脂肪;HE染色观察肝脏脂质变性情况;运用生化试剂盒测定血清中葡萄糖、甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)水平;RT-PCR法检测小鼠肠道内IL-6、IL-1β、TNF-α和抵抗素(Resistin)等促炎因子的表达;16S rRNA基因高通量测序分析小鼠肠道菌群的变化。**结果** 与HFD组相比,AV组小鼠体质量明显降低($P<0.05$),内脏及皮下脂肪含量显著减少($P<0.05$),血清中葡萄糖、TC、TG、LDL-C水平显著降低($P<0.05$),肝脏组织脂肪变性程度减轻,肠道内促炎因子IL-6、IL-1β、TNF-α和Resistin的表达显著降低($P<0.05$)。高通量测序结果显示,与ND组相比,HFD组小鼠肠道菌群发生紊乱,菌群整体结构和功能发生变化;与HFD组相比,AV组中AV提取物可改善肠道菌群紊乱,逆转了高脂饮食诱导的菌群整体结构和功能的改变。**结论** AV可改善小鼠高脂诱导性肥胖及代谢失调,并减轻高脂诱导的肠道菌群紊乱。

[**关键词**] 罗布麻;肥胖;代谢失调;肠道菌群紊乱

[**中图法分类号**] R282.71;R372;R589.2 [**文献标志码**] A

Apocynum venetum L. extract ameliorates metabolic dysbiosis and intestinal flora disorder induced by high-fat diet in mice

YANG Jie[1], FU Hui[2,4], ZHANG Jin[1], XIA Jing[1], BAI Xiaolong[1], LI Jiazhen[3], ZHOU Siyi[1], LIU Wei[4] [1]Faculty of Clinical Medicine, [2]Science and Technology Center, [3]Faculty of Ophthalmology and Optometry; [4]Faculty of Laboratory Medicine, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi Province, 032200, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of *Apocynum venetum* L. (AV) on obesity, metabolic dysbiosis and intestinal flora disorder induced by high-fat diet in mice. **Methods** A total of 18 C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups ($n=6$ in each): control group, obesity model group (HFD) and AV treatment group (AV). The mice of the control group were fed with normal diet, those from the other 2 groups with high-fat diet, and those of the last group were concurrently given drinking water containing AV extract. All mice were weighed every Sunday. After 12 weeks of intervention, the subcutaneous and visceral fat of mice were measured; the liver lipid degeneration was observed by HE staining; the serum levels of glucose, triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were tested using biochemical kits. In addition, the expression levels of IL-6, IL-1β, TNF-α and resistin in

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年项目(31501175);山西医科大学汾阳学院校级大学生创新创业训练项目(FDC201905);山西医科大学汾阳学院人才引进启动基金(2019D12)

[**通信作者**] 刘 威,E-mail:liuwei@sxmu.edu.cn

付 慧,E-mail:fuhui132@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the intestinal tract were detected by RT-PCR, and the changes of intestinal microbiota were analyzed using high-throughput sequencing of 16S rRNA gene. **Results** As compared with the HFD group, the AV group showed significantly lighter body weight ($P<0.05$), less visceral and subcutaneous fat contents ($P<0.05$), and lower serum levels of glucose, TC, TG and LDL-C ($P<0.05$). Similarly, the steatosis of liver tissue was alleviated in the AV-treated mice, with remarkably decreased levels of pro-inflammatory factors in the intestine ($P<0.05$). High-throughput sequencing results suggested that HFD notably induced intestinal flora disorder, including alterations of overall distribution and function of the intestinal microbiota, while these changes were reversed by AV extract treatment. **Conclusion** AV extract can ameliorate HFD-induced obesity and metabolic dysbiosis, as well as alleviate intestinal flora disorder in mice.

[**Key words**] *Apocynum venetum* L.; obesity; metabolic dysbiosis; intestinal microbiota disorder

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (31501175), the Innovation and Entrepreneurship Training Projects for College Students of Fenyang College, Shanxi Medical University (FDC201905), and the Talent Introduction Start-up Fund of Fenyang College, Shanxi Medical University (2019D12). Corresponding author: LIU Wei, E-mail: liuwei@sxmu.edu.cn; FU Hui, E-mail: fuhui132@163.com

肥胖已成为世界性公共卫生问题之一。据 WHO 估计,到 2025 年,全世界五分之一成年人将达到或者超过肥胖标准[1]。肥胖可诱发多种疾病,如高胆固醇血症、高甘油三酯血症、胰岛素抵抗、心脏病、2 型糖尿病、动脉粥样硬化和癌症等[2-3]。因此,预防和减少肥胖对机体的健康具有重要意义。肥胖的成因较为复杂,可由遗传、环境、情绪、生活方式等多种因素引起。其根本原因是能量摄入与能量消耗之间的不平衡。最近研究表明,人体肠道菌群参与人体的营养获取和能量调节,肠道菌群结构的变化与肥胖症的发展及其相关的代谢紊乱密切相关[4-5]。肠道菌群改变诱发肥胖的原因可能与厚壁菌门与拟杆菌门的比例改变有关[6-7]。

目前常见的减肥药多为化学药物或激素类药物,具有较大副作用,长期服用会对机体造成严重损害。因此,寻找高效、低毒的替代药物或天然药物非常必要。多种草本植物可有效治疗糖尿病、高脂血症,如罗布麻(*Apocynum venetum* L., AV)、当归、黄芪等[8-9]。AV 是中国民间的一种药食同源性植物,属夹竹桃科,主要生长在沙漠盐碱土壤或河岸沙质土壤中。有研究表明,AV 具有调节血压、降低血脂浓度和增加冠状动脉血流量的作用[10]。AV 可降低小鼠血清总胆固醇(total cholesterol,TC)及甘油三酯(triglyceride,TG)水平,提高高密度脂蛋白胆固醇水平,具有降血脂的功效[11]。AV 提取物是用干燥的 AV 叶在乙醇-水溶液中提取所得,含有多种类黄酮、三萜、有机酸、氨基酸等成分[10,12]。该提取物具有抗高血压、抗低密度脂蛋白氧化、抗脂质过氧化、半胱天冬酶抑制、保肝、强心和抗焦虑样活性等作用[13]。最近的研究表明,AV 提取物在体内改善卵清蛋白诱导的胸膜炎和嗜酸性炎症,其机制为通过 ERK/STAT3 信号通路抑制巨噬细胞,从而发挥抗炎作用[14]。但 AV 提取物是否具有调节肠道菌群的作用,仍是未知的。

鉴于此,本研究采用高脂食物(high-fat diet, HFD)诱导小鼠肥胖模型,探究 AV 提取物是否能减轻小鼠肥胖、改善代谢失调及肠道菌群紊乱,为进一步研究其作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 2 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,购自山西医科大学实验动物中心[生产许可证号:SCXK(晋)2019-0004]。

1.2 主要试剂与仪器

AV 叶购自重庆西爵食品有限公司;葡萄糖检测试剂盒、TC 检测试剂盒、TG 检测试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)检测试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司;HE 染色液购自珠海贝索生物技术有限公司;无水乙醇(≥99.7%)购自天津欧博凯化工有限公司;Trizol、First-Strand cDNA Synthesis Super Mix (Fast King RT)反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;TransStart Tip Green qPCR SuperMix RT-qPCR 试剂盒购自美国 TaKaRa 公司。分光光度仪(UV-1800)购自苏州岛津仪器有限公司;实时荧光定量 PCR 仪(CFX96)购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 高脂食物的制备

实验所用正常食物和高脂食物均为实验室手工制备(小鼠适应期饲喂食物,购自山西医科大学实验动物中心)。正常食物和高脂食物配料及用量见表 1[15]。

表 1 实验所用动物饲料(每 1 kg)配料表

配料	正常食物 (g)	高脂食物 (g)
玉米粉	527	177
酪蛋白	200	250
蔗糖	100	200
麸皮	80	80
麦芽糖糊精	35	35
多维	10	10
半胱氨酸	3	3
猪油	20	220
豆油	25	25

1.4 AV 植物提取液的制备

将 AV 叶放入组织粉碎机中粉碎,取粉末 50 g,加入 300 mL 95%乙醇萃取 2 次。萃取液放入旋转蒸发仪中,85 ℃蒸发,待瓶中液体变为粘稠状时停止蒸发,可获得 AV 提取物(22±1)g。准确称量瓶中内容物质量,按照萃取物∶水=1∶10 的比例稀释,稀释混匀后置于 4 ℃冰箱中保存。

1.5 实验分组及饲养

在独立通气鼠笼中饲养小鼠,普通饲料喂养一周后,选出 18 只体质量 20 g 左右的 C57BL/6 小鼠。将选中小鼠平均分为 3 组,每组 6 只:对照 (ND) 组、肥胖模型 (HFD) 组、AV 处理 (AV) 组。ND 组饲喂正常食物,正常饮水;HFD 组饲喂高脂食物,正常饮水;AV 组饲喂高脂食物,饮水中加入 AV 提取物(AV 提取物的浓度为 100 mg/mL,每只小鼠每日通过饮水的方式摄入 AV 提取物的量为 400 mg)。每周日上午称量小鼠体质量及剩余食物质量,并计算一周食物摄入量。

1.6 实验动物处理

12 周结束时,眼眶静脉采血,CO_2 吸入处死小鼠,血液用于血糖、TC、TG 和 LDL-C 的测定。取小鼠皮下脂肪、内脏脂肪并称量。取小鼠肝脏,用于石蜡切片。取小鼠小肠,液氮速冻,用于 RT-PCR。收集小鼠结肠内容物 1~1.5 mL 于 1.5 mL 无酶 EP 管中,用于 16S rRNA 基因测序,以分析小鼠肠道菌群的变化。

1.7 小鼠血液中葡萄糖、TC、TG、LDL-C 水平的检测

将所取血液放于低温差速离心机中 3 000 r/min 离心 10 min,保留上清液,依照试剂盒所述方法使用酶标仪进行检测。

1.8 小肠组织总 RNA 的提取

将小肠组织放于研钵中加入少量液氮研磨,待组织成粉末状加入 Trizol,吸取混合液于无酶 EP 管中,加入 200 μL 氯仿,静置后 4 ℃ 12 000×*g* 离心 15 min。吸取上层水相,转移至新的 EP 管中,再加入 200 μL 氯仿,吹打混匀,同样条件再离心一次。吸取上清于新 EP 管中,加入等体积异丙醇,静置后 4 ℃ 12 000×*g* 离心 10 min,弃上清。加入 75%乙醇温和震荡,8 000×*g* 4 ℃离心 5 min,弃去上清,室温干燥 5~10 min。

1.9 RT-PCR 法检测小肠组织中炎性细胞因子的表达

使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。用 RT-PCR 试剂盒,以反转录得到的 cDNA 为模板,进行基因扩增。扩增反应条件为:95 ℃预变性 30 s;95 ℃再变性 5 s;60 ℃退火 15 s;72 ℃延伸 10 s,共 40 个循环。β-actin 基因用作内源对照,以标准化每个样品中总 RNA 量的差异。所有值表示为相对于 β-actin 表达的增加或减少的倍数。基因的引物序列[16]见表 2。

表 2 实时 PCR 引物序列

引物	序列(5′→3′)
β-actin	正义:GCCCTGGACTTCGAGCAAGA
	反义:TGCCAGGGTACATGGTGGTG
IL-1β	正义:TCCATGAGCTTTGTACAAGGA
	反义:AGCCCATACTTTAGGAAGACA
IL-6	正义:GTTCTCTGGGAAATCGTGGA
	反义:TGTACTCCAGGTAGCTA
TNF	正义:AGACCCTCACACTCAGATCA
	反义:TCTTTGAGATCCATGCCGTTG
Resistin	正义:GCATCCTTACCCACTGAACCAT
	反义:TCAAGCCTGTCTTTCACCTCTG

1.10 肝脏组织石蜡切片的制备及 HE 染色

将取出的肝脏用 4%多聚甲醛固定 12 h,蒸馏水冲洗 3 次后置于全自动脱水仪中脱水、透明、浸蜡、包埋。切片厚度为 4~6 μm,经过二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后置于苏木精染液中染色 3~5 min,流水冲洗 5 min;用盐酸酒精脱色 30 s;用伊红染液染色 1~3 min;水洗后再经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,晾干后显微镜下观察并拍照。

1.11 16S rRNA 基因高通量测序

在解剖时收集小鼠结肠内容物,液氮速冻后干冰中保存运输,进行肠道菌群的 16S rRNA 基因测序,以对小鼠肠道菌群的变化进行分析。测序的步骤由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

提取细菌总 DNA 后测序。用 515f/806r 引物对(515 正义:5′-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3′, 806 反义:5′-XXXXXXGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)扩增 DNA,该引物针对细菌 16S rDNA 的 V4 区。在 Illumina MiSeq 平台上进行焦磷酸测序(2×250)。样本读取使用 mothur v1.32。使用 USEARCH 软件根据 UCHIME 算法去除嵌合序列。利用 QIIME 软件和 Python 脚本对微生物多样性进行分析。使用从头开始

的运算分类单位(operational taxonomic unit,OTU)挑选流程挑选 OTU,相似性阈值为 97%。根据 16S rRNA 基因的微生物组成预测细菌宏基因组含量,利用 PICRUSt 算法从京都基因和基因组百科全书(KEGG)目录中进行功能推断。

1.12 统计学处理

本次研究所得数据使用 Excel 整理分析数据,用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析并制图,Adobe Illustrator CC 2019 软件修图,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

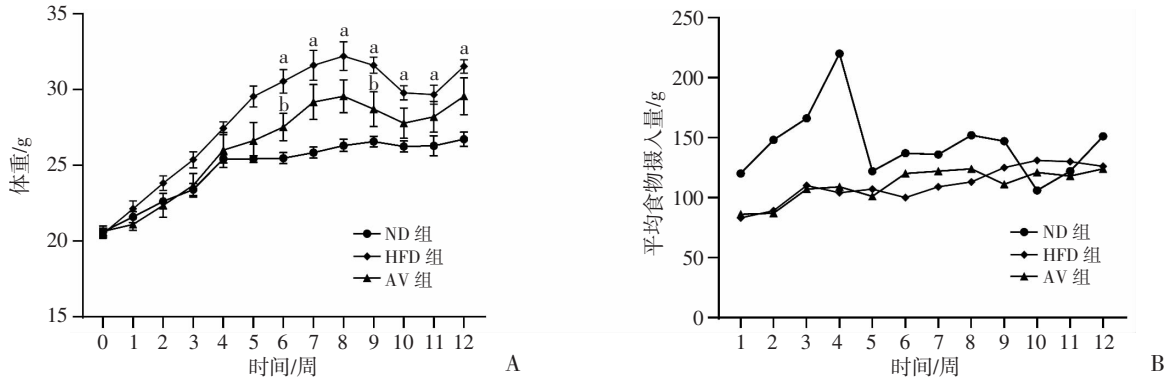
2 结果

2.1 AV 减缓高脂诱导的体质量增加

12 周结束时,与 ND 组相比,HFD 组小鼠体质量平均增加 4.8 g(图 1A),表明成功地建立了高脂食物诱导的肥胖小鼠模型,而摄食总量略降低(图 1B)。与 HFD 组相比,AV 组小鼠体质量平均降低 1.9 g,同时摄食总量无差异,说明 AV 可减缓高脂诱导的体质量增加。

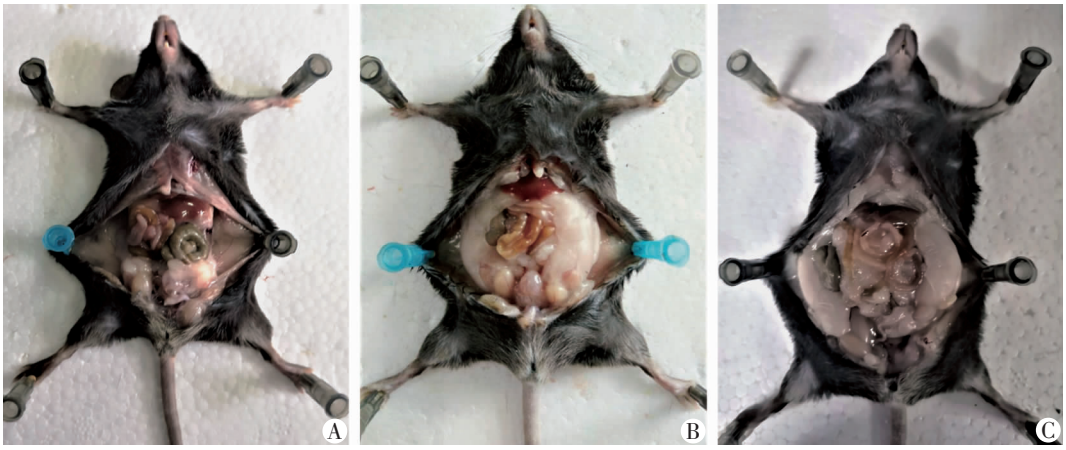
2.2 AV 减少内脏脂肪和皮下脂肪质量

分别对 3 组小鼠进行解剖,称量其内脏脂肪和皮下脂肪的质量。HFD 组小鼠内脏脂肪体积明显大于 ND 组,与高脂诱导体质量增加的结果一致。与 HFD 组相比,AV 组小鼠内脏脂肪体积减小,然而其内脏脂肪体积仍大于 ND 组(图 2)。内脏脂肪定量结果显示,ND 组[(0.517±0.098) g]、HFD 组[(2.734±0.478)g]、AV 组[(1.042±0.109) g],其中 HFD 组比 ND 组内脏脂肪质量平均增加 425 %;与 HFD 组相比,AV 组内脏脂肪质量平均减少 61.9 %($P<0.05$)。皮下脂肪定量结果显示,ND 组、HFD 组、AV 组皮下脂肪质量平均值分别为(0.280±0.077) g、(2.139±0.426) g 和(0.399±0.058) g,其中 HFD 组比 ND 组内脏脂肪质量平均增加 664 %;与 HFD 组相比,AV 组内脏脂肪质量平均下降 81.3 %($P<0.05$),说明 AV 提取物能减少小鼠内脏和皮下脂肪质量。



a:$P<0.05$,与 ND 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较

图 1 各组小鼠实验中体质量(A,$\bar{x}\pm s$)与平均摄食量(B)的变化($n=6$)



A:ND 组;B:HFD 组;C:AV 组

图 2 AV 减少小鼠内脏脂肪和皮下脂肪质量动物模型大体观察

2.3 AV 降低小鼠血糖与血脂水平

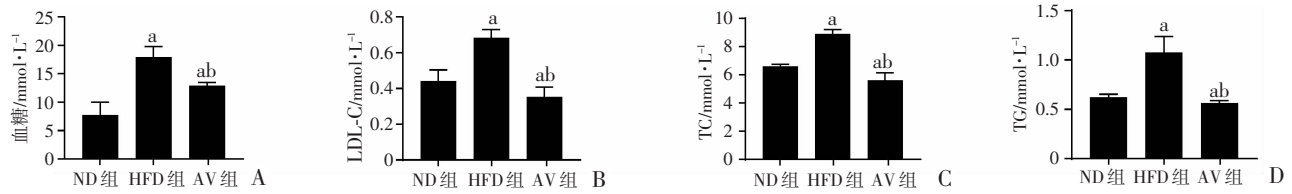
本研究检测了小鼠血液中相关的生化指标,以验证 AV 提取物改善小鼠高脂食物诱导的代谢失调。血糖水平检测结果显示(图 3A),与 ND 组相比,HFD 组小鼠血糖水平明显升高($P<0.05$)。与 HFD 组相比,AV 组血糖水平平均降低 28.1%,说明 AV 提取物可降低高脂小鼠的血糖。血浆 LDL-C 水平检测结果显示(图 3B),HFD 组[(0.683±0.046) mmol/L]比 ND 组[(0.442±0.062) mmol/L]平均升高 54.5%,AV 组[(0.352±0.055) mmol/L]比 HFD 组平均降低 48.5%($P<0.01$),AV 组与 ND 组无明显差异($P>0.05$)。血浆 TC 和 TG 水平检测结果(图 3C、D),AV 处理组[(5.595±0.553) mmol/L]TC 水平比 HFD 组[(8.902±0.320) mmol/L]降低了 37.1%,AV 组的 TG 水平[(0.564±0.025) mmol/L]比 HFD 组[(1.007±0.162) mmol/L]降低了 44.0%($P<0.01$)。说明 AV 提取物可以降低高脂小鼠的血糖和血脂水平。

2.4 AV 减轻小鼠肝脏脂肪变性

HE 染色结果显示,ND 组小鼠肝细胞内无脂滴分布,肝窦清晰可见,肝索排列整齐(图 4)。HFD 组小鼠肝细胞增大,细胞质内出现大量大小不一的空泡状脂滴,将细胞核挤向细胞边缘,肝窦受压变窄,肝索排列紊乱。与 HFD 组相比,AV 组的小鼠肝细胞细胞质内脂滴空泡减少,脂滴泡变小。结果表明,AV 能够降低高脂血症小鼠的肝脏组织脂肪变性程度。

2.5 AV 减轻小鼠肠道内促炎因子的表达

在本研究中,我们用 RT-PCR 法检测了小鼠小肠组织中 IL-1β、IL-6、Resistin、TNF-α 这几种重要的促炎因子的表达水平,结果显示,与 ND 组相比,HFD 组 IL-1β 的相对表达量升高 64.6%($P<0.05$)。AV 组 IL-1β 的相对表达量比 HFD 组降低了 73.2%(图 5A,$P<0.01$)。AV 组 IL-6 的相对表达量比 HFD 组降低 96.8%,AV 组 TNF-α 相对表达量比 HFD 组降低 92.1%(图 5B、C,$P<0.001$)。HFD 组 Resistin 的相对表达量比 ND 组升高 62.9%,AV 组 Resistin 的相对表达量比 HFD 组降低 74.3%(图 5D,$P<0.01$)。这些结果表明,AV 减轻了肥胖引起的系统性炎症。



a:$P<0.05$,与 ND 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组比较

A:血糖;B:LDL-C;C:TC;D:TG

图 3 AV 对小鼠血糖、血脂水平的影响($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

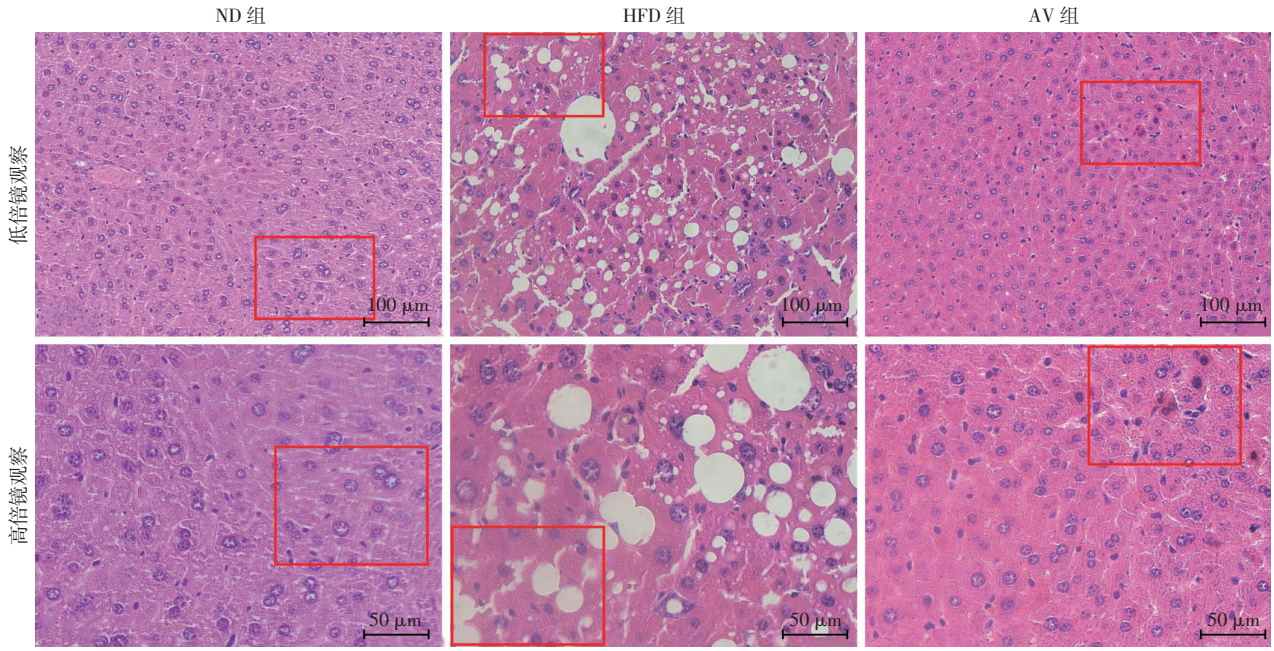
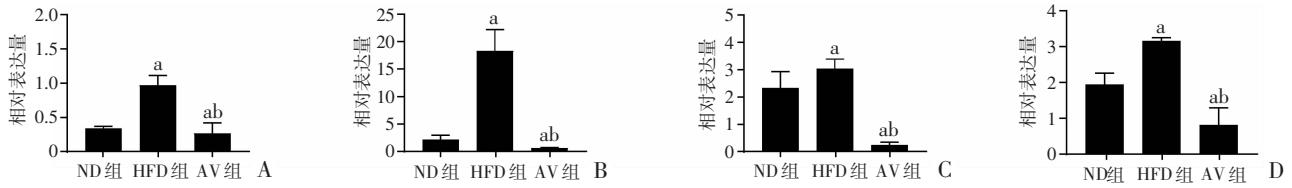


图 4 HE 染色观察 AV 减轻小鼠肝脏细胞脂肪变性



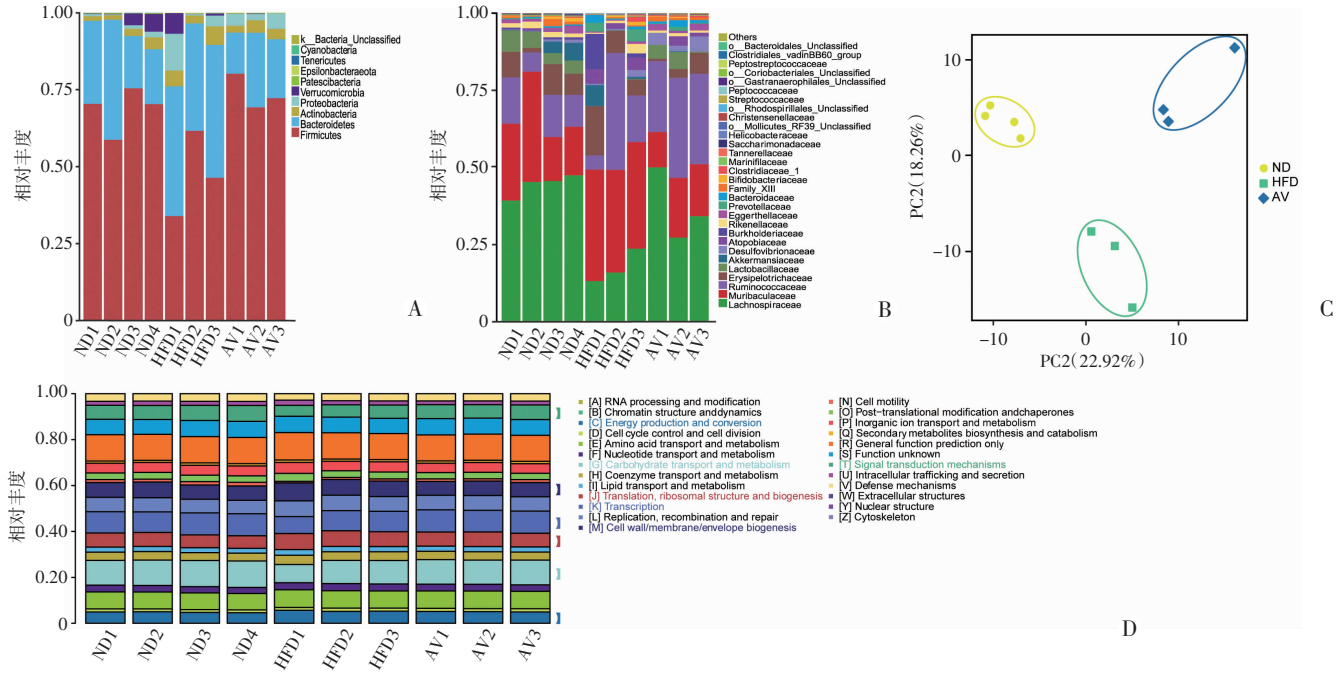
a:$P<0.05$,与 ND 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组比较

A:IL-1β;B:IL-6;C:TNF-α;D:Resistin

图 5　RT-PCR 检测小鼠肠道内促炎因子的表达($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.6　AV 改善高脂诱导的小鼠肠道菌群紊乱

为了评估 AV 提取物诱导的肠道菌群的变化,我们对小鼠肠道内容物进行了 16S rRNA 基因测序。在门水平上,厚壁菌门是所有样本中最丰富的门,占总细菌序列的 68%(ND 组),43%(HFD 组)和 73%(AV 组)(图 6A)。与 ND 组相比,HFD 组厚壁菌门的丰度降低。与 HFD 组相比,AV 组厚壁菌门的丰度显著增加,而拟杆菌门的丰度降低。在科水平上,肠道菌群主要包括毛螺菌科、Muri 菌科、瘤胃球菌科和韦荣球菌科等。与 ND 组相比,HFD 组毛螺菌科与瘤胃球菌科的丰度降低,Muri 菌科、韦荣球菌科的丰度增高。与 HFD 组相比,AV 组毛螺菌科与瘤胃球菌科的丰度有所增高,Muri 菌科、韦荣球菌科丰度有所降低(图 6B)。基于 UniFrac 的主坐标分析(PCoA)结果显示,每组微生物群聚成一簇(图 6C),说明相同处理的小鼠肠道菌群结构相近。ND 组与 HFD 组距离最远,AV 组介于 ND 组与 HFD 组之间,说明高脂饮食诱导了肠道菌群紊乱,而 AV 提取物可改善肠道菌群紊乱。此外,我们利用 PICRUSt 预测菌群整体的功能。与 ND 组相比,在 HFD 组中,与能源生产与转化(C)、核糖体结构和生物发生(J)、细胞壁/膜/包膜的发生(M)等代谢相关的信号通路增强,而与碳水化合物的运输和代谢(G)、转录(K)、信号转导机制(T)等相关的代谢通路减弱。与 HFD 组相比,AV 提取物逆转了高脂饮食诱导的有关转录(K)、细胞壁/膜/包膜的发生(M)、信号转导机制(T)等通路的改变(图 6D)。



A:粪便中微生物群落的门级分布, B:粪便中微生物群落的科级分布, C:粪便中微生物 16S rRNA 序列的主坐标分析, D:每个样本的 COG 注释分析

图 6　16S rRNA 基因高通量测序检测小鼠肠道菌群的变化

3 讨论

肥胖和代谢综合征是由多种因素共同引起的,包括缺乏运动、压力、饮食和遗传因素等[17]。各种治疗手段可用于控制肥胖,例如药物、天然化合物和改变生活方式等。越来越多的证据表明,一些植物提取物(槲皮素、青钱柳多糖、姜黄素等)[18-20]有助于治疗肥胖与代谢综合征。饮用 AV 茶能有效降低高脂饮食小鼠血胆固醇、TG,表明它对高脂食物诱导的代谢综合征患者有潜在治疗作用,特别是对患有高脂血症和非酒精性脂肪肝的肥胖患者[12]。有研究表明,AV 提取物可减轻动脉粥样硬化和小鼠结肠炎,并减少高脂小鼠血胆固醇和 TG 水平[12,14],但从肠道菌群角度进行的研究却鲜见报道。

3.1 肠道菌群与肥胖、炎症的关系

肠道是一个复杂的微生态系统,肠道菌群与宿主之间的相互作用,参与多个关键的生理、病理过程,包括炎症反应、物质代谢等[21]。肠道也是人体最大的免疫器官之一。近年来,大量研究表明炎症会改变肠道菌群及其代谢产物,而受影响的肠道与肠道微生物又会激发免疫应答和代谢活动,从而形成慢性炎症,最终导致慢性疾病[22]。肠道厌氧菌的主要代谢产物短链脂肪酸(SCFA)、醋酸盐(C2)、丙酸盐(C3)和丁酸盐(C4)是参与肠道菌群影响肠道免疫功能的潜在介质[23]。如 C3 和 C4 可抑制刺激诱导的黏附分子表达及趋化因子的产生,从而抑制单核细胞/巨噬细胞和中性粒细胞的募集,产生抗炎作用;SCFA 可通过减少促炎因子和趋化因子的分泌、减少局部巨噬细胞浸润而产生抗炎作用[24]。

同时,有研究表明,高脂饮食可导致肠道菌群乙酸分泌增加,乙酸通过激活副交感神经系统而增加饥饿感,同时增加由葡萄糖刺激的胰岛素分泌,这一过程会形成正反馈循环,由食欲增强导致食物摄入和体质量增加,导致脂肪肝和胰岛素抵抗[25]。

脂肪细胞是产生促炎因子的重要场所,促炎因子分泌增加是代谢性炎症反应发生的基础[26]。过多的促炎因子不仅会导致动脉粥样硬化,还造成器官组织变性和功能障碍[27]。脂肪细胞内的慢性炎症在代谢紊乱相关疾病(高血脂、2 型糖尿病、代谢综合征等)的发生发展中起关键作用[28-29]。

3.2 AV 与肥胖

在本研究中,以高脂食物喂养的方法成功构建了肥胖小鼠模型。12 周结束时,称量各组小鼠体质量,结果显示,AV 提取物可减缓高脂食物引起的肥胖,但不能完全抑制高脂食物诱导的体质量增加,说明 AV 提取物具有潜在的抗肥胖作用。与 ND 组相比,AV 组小鼠摄食总量无明显差异;HFD 组小鼠摄食总量略降低,可能由于高脂食物含有更多能量。解剖小鼠后称量内脏及皮下脂肪组织质量,AV 组小鼠内脏与皮下脂肪堆积明显少于 HFD 组,说明 AV 提取物的摄入可调节小鼠的能量代谢。对小鼠血液中生化指标的检测结果显示,AV 提取物显著降低小鼠的血糖、血脂水平,说明 AV 提取物可改善高脂食物引起的代谢失调。由肝脏组织的 HE 染色结果可知,AV 提取物可减轻小鼠肝脏的脂肪变性。

肥大细胞在肥胖的发生和发展过程中分泌多种炎性细胞因子。有研究表明,高脂喂养诱导的肥胖小鼠,其肠道组织中可表达更高水平的促炎因子,因此我们检测了小鼠肠道中 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 Resistin 等促炎因子的表达。结果显示,与 HFD 组相比,AV 提取物降低了这些促炎因子的表达,表明 AV 提取物可减轻小鼠肠道内的炎症反应。

在小鼠粪便中可检出与人类相同的 4 种主要细菌菌门(拟杆菌、厚壁菌、放线菌和变形杆菌),这表明小鼠是研究饮食对肠道菌群影响的良好模型[20]。有研究表明,厚壁菌门和拟杆菌门可调节肥胖患者的能量代谢[30]。本研究中 16S rRNA 基因测序结果显示,高脂食物喂养后小鼠肠道菌群在门和科的水平上丰度都发生改变,肠道菌群参与的代谢相关信号通路的强弱也有所变化,说明高脂食物可改变肠道菌群结构组成及功能,使小鼠肠道菌群发生紊乱,而 AV 提取物逆转了高脂食物诱导的菌群整体结构和功能的改变,说明 AV 提取物可改善高脂诱导的肠道菌群紊乱。有研究证实,针对肠道菌群的治疗方法可用于改善代谢性疾病,如高脂血症[31-32]。

3.3 总结与展望

综上所述,AV 提取物可改善小鼠高脂诱导性肥胖及代谢失调,减轻肝脏脂肪变性和肠道内炎症反应,并改善高脂诱导的小鼠肠道菌群紊乱。AV 提取物对肠道菌群的调节作用可能是减轻肠道炎症和代谢综合征的关键。因此,AV 提取物对高脂诱导性肥胖及相关代谢性疾病如:高血糖、高血脂、脂肪肝等的防治具有潜在的应用价值。但其具体的作用机制还需要进一步的探索和研究。

参考文献:

[1] MOHAMMED M S, SENDRA S, LLORET J, *et al*. Systems and WBANs for controlling obesity[J]. J Healthc Eng, 2018, 2018: 1-21. DOI:10.1155/2018/1564748.

[2] WU L F, MENG J, SHEN Q, *et al*. Caffeine inhibits hypothalamic A1R to excite oxytocin neuron and ameliorate dietary obesity in mice[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15904. DOI:10.1038/ncomms15904.

[3] LI J Y, GONG L, LIU S Z, *et al*. Adipose HuR protects against diet-induced obesity and insulin resistance[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2375. DOI:10.1038/s41467-019-10348-0.

[4] RIDAURA V K, FAITH J J, REY F E, *et al*. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. Science, 2013, 341(6150): 1241214. DOI:10.1126/science.1241214.

[5] CHANG C J, LIN C S, LU C C, *et al*. Corrigendum: Ganoderma lucidum reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota[J]. Nat Commun, 2017, 8: 16130. DOI:10.1038/ncomms16130.

[6] KONG C, YAN X B, LIU Y Q, *et al*. Ketogenic diet alleviates colitis by reduction of colonic group 3 innate lymphoid cells through altering gut microbiome[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 154. DOI:10.1038/s41392-021-00549-9.

[7] PATTERSON E, RYAN P M, CRYAN J F, *et al*. Gut microbiota, obesity and diabetes[J]. Postgrad Med J, 2016, 92(1087): 286-300. DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133285.

[8] LI X X, QU L, DONG Y Z, *et al*. A review of recent research progress on the Astragalus genus[J]. Molecules, 2014, 19(11): 18850-18880. DOI: 10.3390/molecules191118850.

[9] ZHOU J W, LI X, DENG P Y, *et al*. Chinese herbal formula, modified Danggui buxue tang, attenuates apoptosis of hematopoietic stem cells in immune-mediated aplastic Anemia mouse model[J]. J Immunol Res, 2017, 2017: 9786972. DOI:10.1155/2017/9786972.

[10] YUAN Y, ZHOU J H, ZHENG Y F, *et al*. Beneficial effects of polysaccharide-rich extracts from Apocynum venetum leaves on hypoglycemic and gut microbiota in type 2 diabetic mice[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 127: 110182. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110182.

[11] WANG W Q, LIANG X Y, FU D, *et al*. Apocynum venetum leaf attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(1): 71-85. DOI: 10.1142/S0192415X15500056.

[12] LÜ L, ZHANG D, SUN B, *et al*. Apocynum leaf extract inhibits the progress of atherosclerosis in rats via the AMPK/mTOR pathway[J]. Pharmazie, 2017, 72(1): 41-48. DOI:10.1691/ph.2017.6703.

[13] LI X T, WU T, YU Z H, *et al*. Apocynum venetum leaf extract reverses depressive-like behaviors in chronically stressed rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis[J]. Biomedecine Pharmacother, 2018, 100: 394-406. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.137.

[14] DU S Y, HUANG H F, LI X Q, *et al*. Anti-inflammatory properties of uvaol on DSS-induced colitis and LPS-stimulated macrophages[J]. Chin Med, 2020, 15: 43. DOI:10.1186/s13020-020-00322-0.

[15] ANHÊ F F, NACHBAR R T, VARIN T V, *et al*. Treatment with camu camu (Myrciaria dubia) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice[J]. Gut, 2019, 68(3): 453-464. DOI:10.1136/gutjnl-2017-315565.

[16] GAO X Y, XIE Q H, LIU L, *et al*. Metabolic adaptation to the aqueous leaf extract of Moringa oleifera Lam.-supplemented diet is related to the modulation of gut microbiota in mice[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(12): 5115-5130. DOI:10.1007/s00253-017-8233-5.

[17] SHIMIZU T, MORI K, KOBAYASHI H, *et al*. Japanese mushroom consumption alters the lipid metabolomic profile of high-fat diet-fed mice[J]. Heliyon, 2020, 6(7): e04438. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e04438.

[18] ZHAO L, ZHANG Q, MA W N, *et al*. A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota[J]. Food Funct, 2017, 8(12): 4644-4656. DOI:10.1039/c7fo01383c.

[19] ANAND P, KUNNUMAKKARA A B, NEWMAN R A, *et al*. Bioavailability of curcumin: problems and promises[J]. Mol Pharm, 2007, 4(6): 807-818. DOI:10.1021/mp700113r.

[20] YAO Y, YAN L J, CHEN H, *et al*. Cyclocarya paliurus polysaccharides alleviate type 2 diabetic symptoms by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids[J]. Phytomedicine, 2020, 77: 153268. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153268.

[21] VIEIRA-SILVA S, FALONY G, BELDA E, *et al*. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis[J]. Nature, 2020, 581(7808): 310-315. DOI:

10.1038/s41586-020-2269-x.

[22] BAI Y F, WANG S W, WANG X X, *et al*. The flavonoid-rich Quzhou Fructus Aurantii extract modulates gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed mice [J]. Nutr Diabetes, 2019, 9(1): 30. DOI:10.1038/s41387-019-0097-6.

[23] VINOLO M A, RODRIGUES H G, NACHBAR R T, *et al*. Regulation of inflammation by short chain fatty acids[J]. Nutrients, 2011, 3(10): 858-876. DOI:10.3390/nu3100858.

[24] SAAD M J, SANTOS A, PRADA P O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance [J]. Physiology (Bethesda), 2016, 31(4): 283-293. DOI:10.1152/physiol.00041.2015.

[25] PERRY R J, PENG L, BARRY N A, *et al*. Acetate mediates a microbiome-brain-β-cell axis to promote metabolic syndrome[J]. Nature, 2016, 534(7606): 213-217. DOI:10.1038/nature18309.

[26] OUCHI N, PARKER J L, LUGUS J J, *et al*. Adipokines in inflammation and metabolic disease[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(2): 85-97. DOI:10.1038/nri2921.

[27] SUZUKI K. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise[J]. Biomolecules, 2019, 9(6): 223. DOI:10.3390/biom9060223.

[28] KOJTA I, CHACIŃSKA M, BŁACHNIO-ZABIELSKA A. Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance[J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1305. DOI:10.3390/nu12051305.

[29] GRANDL G, WOLFRUM C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome[J]. Semin Immunopathol, 2018, 40(2): 215-224. DOI:10.1007/s00281-017-0666-5.

[30] TURNBAUGH P J, LEY R E, MAHOWALD M A, *et al*. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027-1031. DOI:10.1038/nature05414.

[31] KOUTNIKOVA H, GENSER B, MONTEIRO-SEPULVEDA M, *et al*. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. BMJ Open, 2019, 9(3): e017995. DOI:10.1136/bmjopen-2017-017995.

[32] SCHOELER M, CAESAR R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2019, 20(4): 461-472. DOI:10.1007/s11154-019-09512-0.

(收稿:2021-06-20;修回:2021-09-26)

(编辑 张艺霖)