

绞股蓝皂苷饮食干预小鼠肥胖及肠道菌群研究

刘嘉平¹, 王博¹, 张晓伟¹, 张亚琼^{1*}, 俞良莉²

¹上海交通大学农业与生物学院 上海 200240

²马里兰大学营养与食品科学系 美国马里兰 20742)

摘要 绞股蓝皂苷是绞股蓝中主要的生物活性成分。采用高脂饮食喂食 C57BL/6J 小鼠,同时给予 12 周的绞股蓝皂苷灌胃处理,研究绞股蓝皂苷干预对控制小鼠肥胖的作用,同时探究其调节小鼠肠道菌群多样性和组成的作用。结果表明:绞股蓝皂苷饮食干预(600 mg/kg bw/d)能够显著降低因喂食高脂饲料而导致的小鼠体重、体脂率的增加,以及脂肪细胞体积的增大;同时降低血清中低密度脂蛋白-胆固醇、谷丙转氨酶和瘦素的含量,提高高密度脂蛋白-胆固醇的含量。对小鼠粪便进行 16S rRNA 高通量测序分析结果表明:绞股蓝皂苷干预组可以提高小鼠肠道菌群的 α -多样性,并在属水平上提高肠道菌群中颤螺旋菌科属、别普雷沃菌属、狄氏副拟杆菌属、毛螺菌属和伯克氏菌属的相对丰度。

关键词 绞股蓝皂苷; 饮食干预; 肥胖; 肠道菌群

文章编号 1009-7848(2022)07-0088-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.07.009

肥胖被定义为脂肪堆积过多,是机体能量摄入和消耗不平衡的结果^[1],会大幅增加罹患 II 型糖尿病、脂肪肝、高血压等疾病的风险^[2]。肠道微生物组是微生物及其代谢产物的动态组合^[3],在体内发挥一系列重要的生物功能,包括免疫调节,宿主代谢调节,平衡营养素的吸收等^[4]。近年来,众多研究表明,与正常个体相比,肥胖个体的肠道菌群组成和结构均发生了显著的变化^[5-6],因此如何通过饮食干预肠道菌群以及控制肥胖成为近年国内外的研究热点。

绞股蓝是一种多年生匍匐植物,广泛分布于中国、日本以及东南亚等国家,在世界范围内绞股蓝茶被广泛认为具有降血糖、血脂的功效^[7]。绞股蓝皂苷是绞股蓝中主要的活性成分^[8],Liu 等^[9]研究发现绞股蓝皂苷可以在细胞水平上抑制 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞的分化,从而抑制脂肪的生成,然而在体内水平研究绞股蓝皂苷对控制动物肥胖,以及对动物体内肠道菌群的调节作用还鲜有报道。本研究采用高脂饮食喂食 C57BL/6J 小鼠,同时给予不同剂量的绞股蓝皂苷干预,探究绞股蓝皂苷对小鼠肥胖及小鼠肠道菌群多样性和组成的影响,为绞股蓝资源的深度开发提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验动物采用 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,6 周龄,雄性,平均体重(21±2)g,实验动物使用许可证号:SCXK(沪)2017-0012,购于上海吉辉实验动物饲养有限公司。

四倍体绞股蓝叶片购于陕西省平利县;动物标准饲料、高脂饲料,江苏省协同医药生物工程有限公司;多聚甲醛,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;苏木素染液、伊红染液,武汉谷歌生物科技有限公司;甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇、高密度脂蛋白-胆固醇、谷丙转氨酶、谷草转氨酶检测试剂盒,上海罗氏制药有限公司;瘦素检测试剂盒,赛默飞世尔科技公司;实验用水为超纯水(18.2 M Ω),其它化学试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

BSA4202S-CW 电子天平,德国赛多利斯公司;Milli-Q 纯水仪,美国密理博公司;Centrifuge 5415R 低温高速离心机,德国艾本德公司;涡旋仪,德国艾卡公司;高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Infinity M2000 Pro 全波长多功能酶标仪,瑞士帝肯公司;-80℃超低温冰箱,赛默飞世尔科技公司;生物样本匀浆机,法国 Bertin 公司;病理切片机,上海徠卡仪器有限公司;倒置荧

收稿日期:2021-07-15

作者简介:刘嘉平(1997—),女,硕士生

通信作者:张亚琼 E-mail: yqzhang2006@sytu.edu.cn

光显微镜、成像系统,日本尼康公司;Illumina NovaSeq6000 测序仪,美国 Illumina 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 绞股蓝皂苷的提取与分离 采用乙醇热提法获得绞股蓝皂苷的粗提物浸膏,然后经石油醚和乙酸乙酯萃取后,使用大孔树脂进一步除杂获得绞股蓝皂苷粗提物粉末,再经半制备型 HPLC 分离后获得绞股蓝总皂苷(得率约为 7.43 mg/g 绞股蓝干叶片)^[10]。

1.3.2 动物饲养和分组 小鼠经外包装灭菌处理立即转入上海交通大学实验动物中心,SPF 级屏障系统内进行饲养,温度和相对湿度分别控制在(22±2)℃和 50%±10%,12 h 光照和 12 h 黑暗交替循环,小鼠自由饮食饮水。在整个实验期间,所有涉及动物的程序均严格按照中国有关实验动物的相关饲养规范和法律规定进行。

小鼠经过 1 周的适应性饲养后,每组 10 只,随机分为 4 组:正常对照组(NC 组)、高脂组(HF 组)、低剂量绞股蓝皂苷干预组(JS300 组)和高剂量绞股蓝皂苷干预组(JS600 组)。NC 组用动物标准饲料喂养,HF 组、JS300 组、JS600 组均用高脂饲料喂养。绞股蓝皂苷干预方式:称取一定量的绞股蓝皂苷溶解于生理盐水中,按 300 mg/kg bw/d 或 600 mg/kg bw/d 的剂量对小鼠进行灌胃处理,每日 1 次,共持续 12 周。为了保持组别间小鼠处理的一致性,每日给予 NC 组和 HF 组小鼠同时灌胃等体积生理盐水。每周记录 1 次小鼠的体重,并计算其平均值。

1.3.3 动物处死及样本收集 小鼠饲养 12 周后,提前 1 d 用代谢笼收集小鼠粪便用于肠道菌群分析。禁食 12 h 后通过颈椎脱臼处死小鼠,立即收集血液样本,并在 4℃下 3 500×g 离心 10 min,取上层血清用于生化指标的测定。迅速解剖小鼠,取皮下脂肪、肾周脂肪和附睾脂肪,经生理盐水清洗、称重后,用 4%多聚甲醛固定,用于病理切片的制作和 H&E 染色。

1.3.4 血清生化指标测定 血清中甘油三酯、总胆固醇、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、低密度脂蛋白-胆固醇、高密度脂蛋白-胆固醇和瘦素含量的测定均按照试剂盒说明书操作。

1.3.5 脂肪细胞形貌观察 将脂肪组织在 4%多

聚甲醛溶液中固定 24 h,脱水、石蜡包埋、切片后,用 H&E 染料染色,在光学显微镜(400 倍)下观察脂肪细胞形貌,并用 IPP 6.0 软件对细胞数目进行计数。

1.3.6 粪便肠道菌群 16S rRNA 测序 采用 CTAB 方法提取小鼠粪便菌群的 DNA,之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,取适量的样本 DNA 于离心管中,使用无菌水稀释样本至 1 ng/μL。以 16S 高变区中的 V3+V4 区为目标测序片段,采用带 Barcode 的特异引物 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3') 对目标片段进行 PCR 扩增,每个样品进行 3 次重复。PCR 扩增产物通过质量分数 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行回收、纯化。对纯化后的 PCR 产物使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,文库合格后,在 NovaSeq6000 进行上机测序。

根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据,截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH 软件对每个样本的 reads 进行拼接,然后采用 Qiime 软件过滤嵌合体,得到最终的有效数据(Effective tags)。利用 Uparse 软件对所有样本的全部有效数据进行聚类,默认以 97%的一致性将序列聚类成为 OTUs(Operational taxonomic units)。用 Mothur 方法与 SILVA138 的 SSUrRNA 数据库进行物种注释分析,获得分类学信息并在门、科、属分类水平上统计各样本的群落组成。使用 R 软件计算 Shannon 指数、Simpson 指数、InvSimpson 指数。

1.4 统计分析

所有实验均做 3 次平行,结果表示为“平均值±标准差”。使用 SPSS 22.0 进行显著性分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较, $P<0.05$ 则认为具有统计学显著差异。

2 结果与分析

2.1 绞股蓝皂苷干预对小鼠体重、脂肪组织质量及体脂率的影响

绞股蓝皂苷干预对小鼠体重、脂肪组织质量

及体脂率的影响见表1。首先,4组小鼠(NC组、HF组、JS300组、JS600组)的初始体重值均为21~23 g,各组间无显著差异($P>0.05$)。喂养12周后,NC组小鼠体重增加到27.07 g,而HF组小鼠体重与NC组相比增加更明显,为31.46 g,且这2组小鼠体重之间有显著性差异($P<0.05$)。经绞股蓝皂苷干预12周后,JS300、JS600组小鼠最终体重值较HF组有所降低,分别为29.78 g和27.86 g,其中,JS600组小鼠体重降低更为明显,与HF组相比有显著性差异($P<0.05$)。

此外,还对4组小鼠脂肪组织(皮下脂肪、肾周脂肪、附睾脂肪)的质量以及体脂率进行测定和计算。与NC组相比,喂食12周高脂饲料的HF组小鼠皮下、肾周和附睾脂肪质量显著提高,分别从

0.26,0.12,0.42 g提高至0.45,0.35,0.85 g($P<0.05$)。此外,HF组的这3种脂肪占体重的比率(体脂率)也较NC组有显著提高,皮下脂肪率从0.96%提高至1.43%,肾周脂肪率从0.22%提高至1.09%,附睾脂肪率从1.55%提高至2.70%($P<0.05$)。然而,绞股蓝皂苷干预组(JS300和JS600组)小鼠的脂肪组织质量和体脂率均有所下降,特别是JS600组小鼠,其肾周、附睾脂肪的质量以及3种体脂率均较HF组有显著性下降($P<0.05$)。上述研究结果表明绞股蓝皂苷饮食干预可以降低喂食高脂饲料所导致的小鼠体重、脂肪组织质量及体脂率的升高,并且这种干预作用与绞股蓝皂苷的剂量有相关性。

表1 绞股蓝皂苷干预对小鼠体重、脂肪组织质量和体脂率的影响

Table 1 Effects of gypenosides on the body weight, adipose tissue mass and body fat percentage in mice

组别	体重/g		脂肪组织质量/g			体脂率/%		
	初始体重	最终体重	皮下脂肪	肾周脂肪	附睾脂肪	皮下脂肪/ 体重	肾周脂肪/ 体重	附睾脂肪/ 体重
NC	22.20 ^a ± 1.19	27.07 ^a ± 1.20	0.26 ^a ± 0.06	0.12 ^a ± 0.05	0.42 ^a ± 0.09	0.96 ^a ± 0.18	0.22 ^a ± 0.44	1.55 ^a ± 0.30
	22.11 ^a ± 1.09	31.46 ^c ± 2.34	0.45 ^b ± 0.15	0.35 ^b ± 0.14	0.85 ^b ± 0.29	1.43 ^b ± 0.45	1.09 ^b ± 0.43	2.70 ^b ± 0.84
JS300	22.10 ^a ± 0.86	29.78 ^{bc} ± 1.37	0.33 ^{ab} ± 0.11	0.21 ^{ab} ± 0.14	0.59 ^a ± 0.18	1.11 ^{ab} ± 0.39	0.73 ^{ab} ± 0.46	2.00 ^{ab} ± 0.62
	21.66 ^a ± 1.18	27.86 ^{ab} ± 1.54	0.33 ^{ab} ± 0.09	0.18 ^a ± 0.08	0.55 ^a ± 0.15	0.95 ^a ± 0.31	0.46 ^a ± 0.16	1.55 ^a ± 0.57

注:数据以“平均值±标准偏差”表示,数据上不同字母上标(a-c)表示同一列不同组别在 $P<0.05$ 水平上的差异显著性。

2.2 绞股蓝皂苷干预对小鼠血清生化指标的影响

血清中甘油三酯和总胆固醇水平是反映机体血脂代谢水平最常用的2个生化指标。此外,低密度脂蛋白-胆固醇和高密度脂蛋白-胆固醇分别是运输胆固醇到肝外组织和将胆固醇从肝外组织转运到肝脏进行代谢的主要运载工具。前期研究表明,肥胖对于机体血脂代谢各项生化指标水平有显著影响^[11]。由于本研究中观察到绞股蓝皂苷的饮食干预可以降低喂食高脂饲料所导致的小鼠体重、脂肪组织质量及体脂率的升高,因此,为了进一步探究绞股蓝皂苷干预对小鼠血脂代谢相关生化指标的影响,本研究分别对各组小鼠血清中甘

油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇和高密度脂蛋白-胆固醇的含量进行了测定(表2)。与NC组相比,HF组小鼠血清中甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇的含量显著提高,分别从0.27 mmol/L提高至0.74 mmol/L,0.51 mmol/L提高至1.47 mmol/L,0.06 mmol/L提高至0.20 mmol/L($P<0.05$),而血清中高密度脂蛋白-胆固醇的含量无显著性差异。此外,经过12周绞股蓝皂苷干预后,JS300和JS600组总胆固醇含量与HF组相比均有所下降,总胆固醇含量从1.47 mmol/L分别降至1.20 mmol/L和1.33 mmol/L;2种载脂蛋白低密度脂蛋白-胆固醇和高密度脂蛋白-胆固醇含量也发生了显著性变化,分别从HF组的0.2

mmol/L 降低至 0.16 mmol/L (JS300 和 JS600 组), 以及从 0.46 mmol/L 上升至 0.59 (JS300 组) 和 0.54 mmol/L (JS600 组) ($P < 0.05$); 然而绞股蓝皂苷干预对血清中甘油三酯的含量却无显著性影响。陈桂林^[12]研究发现对肥胖昆明小鼠进行为期 4 周的绞股蓝 (50% 乙醇浸提物) 干预后, 可显著降低小鼠血清中甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇的含量, 并同时升高高密度脂蛋白-胆固醇的含量。本研究未观察到绞股蓝皂苷干预对小鼠血清中甘油三酯含量的影响, 这可能是由于实验所用小鼠品系不同, 以及绞股蓝的 50% 乙醇浸提物与本实验所用的绞股蓝皂苷成分不同导致。

此外, 谷丙转氨酶和谷草转氨酶是两种肝脏转氨酶, 肥胖、血脂代谢紊乱与血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平的升高也密切相关^[13]。与 NC 组相比, HF 组小鼠谷丙转氨酶和谷草转氨酶的含量显著上升, 血清中谷丙转氨酶的含量从 7.10 U/L 上升至 12.20 U/L, 谷草转氨酶的含量从 31.40 U/L

上升至 69.00 U/L ($P < 0.05$)。经绞股蓝皂苷干预后的 JS300 和 JS600 组小鼠血清中谷丙转氨酶的含量显著下降, 分别下降至 9.60 U/L 和 9.57 U/L ($P < 0.05$), 而谷草转氨酶的含量无显著性改变。Lee 等^[14]研究发现采用绞股蓝皂苷 300 mg/kg bw/d 剂量干预 C57BL/6J 小鼠 8 周, 可以显著降低小鼠血清中谷丙转氨酶的含量, 这与本研究所观察到的结果相一致。

瘦素是一种由脂肪细胞分泌的细胞因子样循环激素, 大部分肥胖个体会产生瘦素抵抗, 表现为瘦素水平升高和敏感性降低^[15]。与 NC 组相比, HF 组小鼠血清中瘦素的含量显著上升, 从 1 667.93 pg/mL 上升至 21 037.08 pg/mL ($P < 0.05$); 而经绞股蓝皂苷干预后, JS300 和 JS600 组小鼠血清中瘦素含量分别显著下降至 575.33 pg/mL 和 336.83 pg/mL ($P < 0.05$)。Ahmed 等^[16]研究发现高脂饲料喂养的 CD-1 小鼠血清中瘦素的含量也显著上升, 而经阿拉伯胶饮食干预后瘦素的含量又显著下降。

表 2 绞股蓝皂苷干预对小鼠血清生化指标的影响

Table 2 Effects of gypenosides on serum biochemical indices in mice

组别	甘油三酯/ mmol·L ⁻¹	总胆固醇/ mmol·L ⁻¹	低密度脂蛋白-胆固醇/ mmol·L ⁻¹	高密度脂蛋白-胆固醇/ mmol·L ⁻¹	谷丙转氨酶/ U·L ⁻¹	谷草转氨酶/ U·L ⁻¹	瘦素/pg·mL ⁻¹
NC	0.27 ^a ± 0.04	0.51 ^a ± 0.06	0.06 ^a ± 0.01	0.39 ^a ± 0.03	7.10 ^a ± 1.10	31.40 ^a ± 5.52	1 667.93 ^a ± 884.84
HF	0.74 ^b ± 0.10	1.47 ^c ± 0.16	0.20 ^c ± 0.02	0.46 ^a ± 0.02	12.20 ^c ± 1.92	69.00 ^b ± 16.11	21 037.08 ^b ± 2197.97
JS300	0.63 ^b ± 0.04	1.20 ^b ± 0.21	0.16 ^b ± 0.02	0.59 ^b ± 0.05	9.60 ^b ± 1.67	59.67 ^b ± 12.56	575.33 ^a ± 74.38
JS600	0.65 ^b ± 0.09	1.33 ^b ± 0.11	0.16 ^b ± 0.02	0.54 ^b ± 0.06	9.57 ^b ± 0.98	66.14 ^b ± 4.88	336.83 ^a ± 177.48

注: 数据以“平均值±标准偏差”表示, 数据上不同字母上标 (a-c) 表示同一列不同组别在 $P < 0.05$ 水平上的差异显著性。

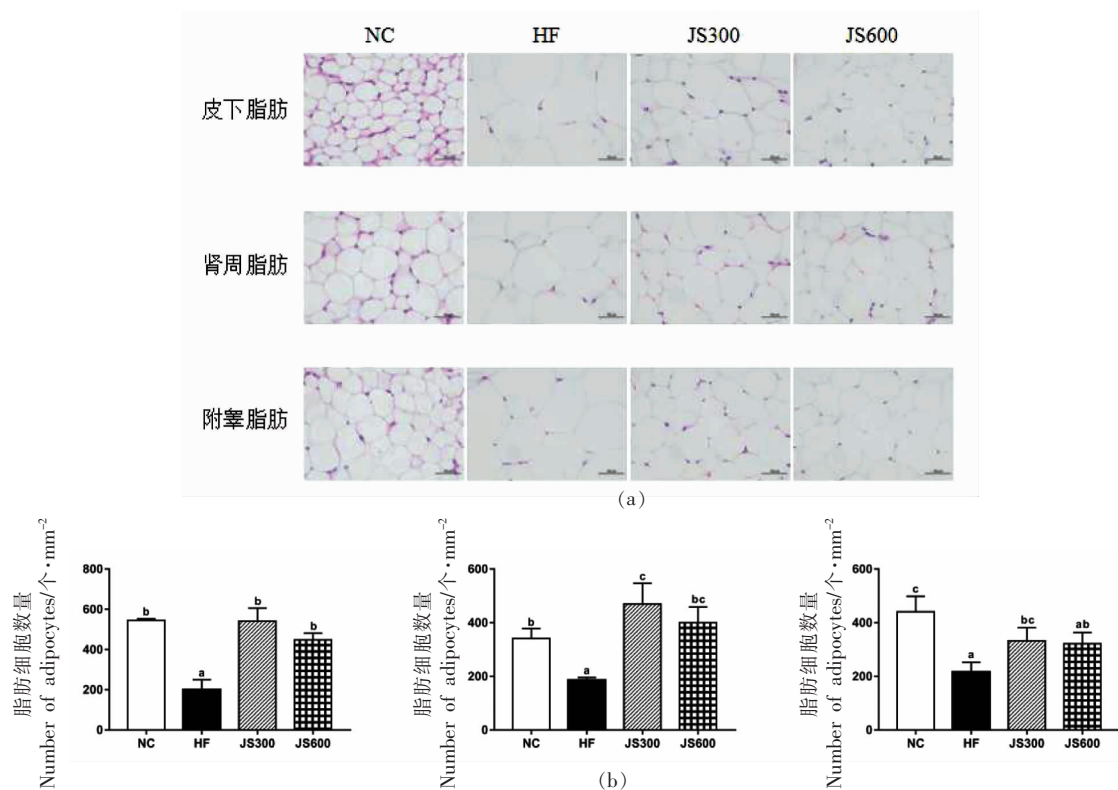
2.3 绞股蓝皂苷干预对小鼠脂肪细胞形貌的影响

从表 1 可知绞股蓝皂苷干预可以降低喂食高脂饲料所导致的小鼠脂肪组织质量及体脂率的升高, 为了更直观地观察绞股蓝皂苷干预对小鼠脂肪细胞形貌的影响, 本研究采用 H&E 染色法对各组小鼠的皮下、肾周和附睾脂肪组织切片进行观察。由图 1a 可知, 在相同放大倍数下, 与 NC 组小鼠的皮下、肾周和附睾脂肪细胞相比, HF 组小鼠

这 3 种脂肪部位的脂肪细胞体积均明显增大。而经绞股蓝皂苷干预后, JS300 和 JS600 组小鼠这 3 种脂肪部位的脂肪细胞体积较 HF 组均明显减小, 这与本研究中所观察到的这 2 组小鼠脂肪组织质量和体脂率下降的结果相一致 (表 1)。Guo 等^[17]研究发现, 脂肪细胞体积大小可以反映个体肥胖的程度。与正常个体相比, 肥胖个体的脂肪细胞体积更大, 这主要是由于其脂肪细胞中存在更多的脂肪滴导致。此外, 本研究还对该放大倍数

下,可视区域内不同组小鼠的3种脂肪细胞进行细胞计数,比较脂肪细胞数量上的差异。从图1b可知,与NC组相比,HF组小鼠3种脂肪部位的脂肪细胞数量均显著下降($P<0.05$),皮下、肾周和附睾脂肪的细胞数量分别从54个/ mm^2 下降至199个/ mm^2 ,从341个/ mm^2 下降至185个/ mm^2 ,以

及从440个/ mm^2 下降至215个/ mm^2 。而经绞股蓝皂苷干预后的JS300和JS600组小鼠,这3种脂肪部位的脂肪细胞数量又均显著上升($P<0.05$),说明这2组小鼠脂肪细胞体积较HF组显著减小。上述结果进一步证明了绞股蓝皂苷干预对控制高脂饲料所导致的小鼠肥胖的积极作用。



注:数据以“平均值±标准偏差”表示,柱上不同字母上标(a~c)表示不同组别在 $P<0.05$ 水平上的差异显著性。

图1 绞股蓝皂苷干预对小鼠皮下、肾周和附睾脂肪细胞形貌(a)和数量(b)的影响

Fig.1 Effects of gypenosides on the morphology (a) and number (b) of subcutaneous, perirenal and epididymal adipocytes in mice

2.4 绞股蓝皂苷干预对小鼠肠道菌群多样性和组成结构的影响

肠道菌群的 α -多样性可以反映肠道中物种的丰富度和均匀度^[18],表3为绞股蓝皂苷干预对小鼠肠道菌群 α -多样性指数影响的结果。其中,Shannon和Simpson指数是衡量物种多样性的推荐指标^[19],Shannon指数更侧重于物种丰富度,而Simpson指数更侧重于物种均匀度^[20]。InvSimpson指数是Simpson指数的逆,更侧重于物种丰富度^[21]。由表中可知,在物种丰富度方面,与NC组相比,HF组小鼠肠道菌群的Shannon和InvSimpson

指数分别从2.88下降至0.73,从5.58下降至1.30($P<0.05$)。而经绞股蓝皂苷干预后,JS300和JS600组小鼠肠道菌群的Shannon指数均较HF组显著增加($P<0.05$),分别从0.73增加至3.11和3.68,而InvSimpson指数却没有显著性变化($P>0.05$)。在物种均匀度方面,与NC组相比,HF组小鼠肠道菌群的Simpson指数从0.81下降至0.22($P<0.05$),而经绞股蓝皂苷干预后,JS300和JS600组小鼠肠道菌群的Simpson指数均较HF组没有显著差异($P>0.05$),上述结果说明高脂饲料喂养会降低小鼠肠道菌群的丰富度和均匀度,而绞股蓝

皂苷的干预可以提高小鼠肠道菌群的丰富度,对均匀度没有显著影响。王家妮等^[22]也发现经高脂饲料喂养后,小鼠肠道菌群的 Shannon 和 Simpson

指数显著下降,肠道菌群多样性降低,这与本研究结果相一致。

表 3 绞股蓝皂苷干预对小鼠肠道菌群多样性的影响

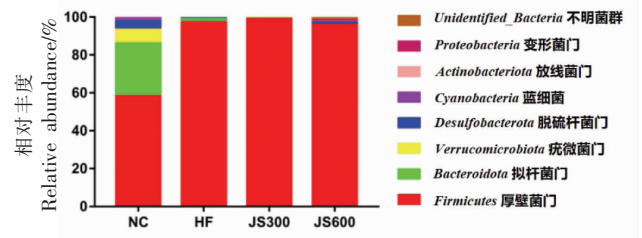
Table 3 Effects of gypenosides on the α diversity indices of gut microbiota in mice

组别	物种丰富度		物种均匀度
	Shannon	InvSimpson	Simpson
NC	2.88 ^b ± 0.57	5.58 ^b ± 2.20	0.81 ^b ± 0.14
HF	0.73 ^a ± 0.27	1.30 ^a ± 0.15	0.22 ^a ± 0.09
JS300	3.11 ^b ± 0.63	1.32 ^{ab} ± 0.28	0.22 ^a ± 0.16
JS600	3.68 ^b ± 0.10	1.25 ^a ± 0.05	0.20 ^a ± 0.03

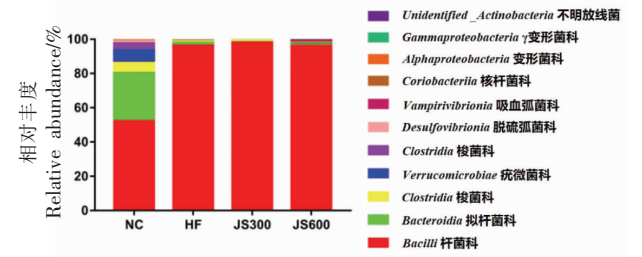
注:数据以“平均值±标准偏差”表示,数据上不同字母上标(a~b)表示同一列不同组别在 $P < 0.05$ 水平上的差异显著性。

为了进一步分析绞股蓝皂苷干预对小鼠肠道菌群组成结构的影响,本研究对不同组小鼠肠道菌群在不同分类水平上优势菌的相对丰度进行统计分析。由门水平的聚类柱状图(图 2a)可知,NC 组小鼠肠道菌群中的优势菌群为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和脱硫菌门(Desulfobacterota),其中厚壁菌门占 58.10%,拟杆菌门占 27.72%,疣微菌门占 7.34%,脱硫菌门占 4.31%。而 HF 组小鼠肠道菌群中厚壁菌门的相对丰度增加至 97.28%,拟杆菌门、疣微菌门和脱硫菌门的相对丰度分别降低至 1.49%,0.08%,0.33%。小鼠肠道菌群在科水平上的相对丰度如图 2b 所示,NC 组小鼠肠道菌群中的优势菌群为杆菌科(Bacilli)、类杆菌科(Bacteroidia)、梭状芽胞杆菌科(Clostridia)和疣微菌科(Verrucomicrobiae)。HF 组小鼠肠道菌群中杆菌科的相对丰度提高了,而类杆菌科、梭状芽胞杆菌科和疣微菌科的相对丰度却降低了。经绞股蓝皂苷干预后,JS300 和 JS600 组小鼠的肠道菌群在门、科水平上的相对丰度较 HF 组变化不显著。

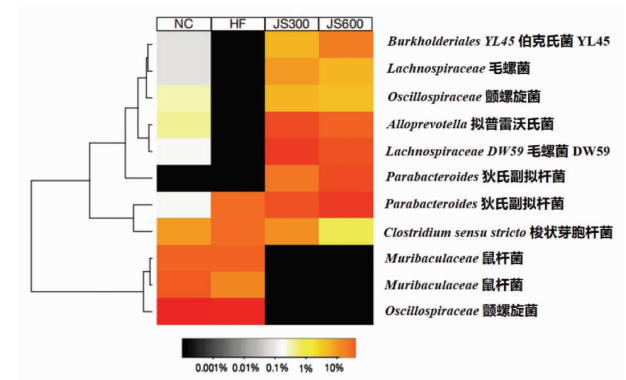
图 2c 是通过热图来比较属水平上各个菌属的相对丰度变化。NC 组小鼠肠道菌群中的优势菌群为颤螺旋菌科属(*Oscillospiraceae*)、鼠杆菌属(*Muribaculaceae*)、梭状芽胞杆菌属(*Clostridium sensu strict*)和别普雷沃菌属(*Alloprevotella*),而 HF 组小鼠肠道菌群中颤螺旋菌科属和别普雷沃菌属的相对丰度降低了。经绞股蓝皂苷干预后,颤螺旋菌科属、别普雷沃菌



(a) 门水平的相对丰度条形图



(b) 科水平的相对丰度条形图



(c) 属水平的相对丰度热图

图 2 小鼠肠道微生物群在不同分类水平的相对丰度

Fig.2 The relative abundance of gut microbiota in mice at different taxonomic levels

属的相对丰度有所上升,同时狄氏副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae* DW59)和伯克氏菌属(*Burkholderiales* YL45)的相对丰度也都增加了,鼠杆菌属的相对丰度却降低了,绞股蓝皂苷的干预剂量对小鼠肠道菌群在属水平的影响不大。前期研究发现颤螺旋菌科属的相对丰度与血清胆固醇含量呈负相关,在肥胖个体中,颤螺旋菌科属的相对丰度较低^[23]。别普雷沃菌属、毛螺菌属是肠道短链脂肪酸(如乙酸、丙酸和丁酸)的产生菌,而作为肠道内的代谢产物,短链脂肪酸具有调节肝脏脂质代谢,抑制体重增加的作用^[24-26]。绞股蓝皂苷干预可以提高颤螺旋菌科属、别普雷沃菌属和毛螺菌属的相对丰度,这与本研究中观察到的绞股蓝皂苷干预对小鼠体重和血脂水平的积极作用相吻合(表2)。此外,肥胖通常还会导致炎症的发生^[27],狄氏副拟杆菌属是可以发挥抗炎作用的菌属,它通过作用于调节性T细胞和白细胞介素-10抑制全身性炎症反应^[28]。除此之外,在一项儿童肥胖与肠道菌群组成关系的研究中发现,伯克氏菌属与体重呈负相关,在健康儿童中观察到较高比例的伯克氏菌属^[29]。本研究发现绞股蓝皂苷干预可以提高小鼠肠道内上述2种菌属的相对丰度,这可能也与其控制小鼠肥胖的积极作用有所关联。

3 结论

本研究发现绞股蓝皂苷饮食干预能够显著降低因喂食高脂饲料导致的小鼠体重、体脂率的增长以及脂肪细胞体积的增大;同时降低小鼠血清中低密度脂蛋白-胆固醇、谷丙转氨酶和瘦素的含量,提高高密度脂蛋白-胆固醇的含量。此外,绞股蓝皂苷饮食干预还提高了小鼠肠道内肠道菌群的 α -多样性,并在属水平上提高了颤螺旋菌科属(*Oscillospiraceae*)、别普雷沃菌属(*Alloprevotella*)、狄氏副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae* DW590)和伯克氏菌属(*Burkholderiales* YL45)的相对丰度。因此,绞股蓝皂苷具有潜在的减肥、降脂和调节肠道菌群的积极作用,在功能性食品开发方面具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] LEY R E, BACKHED F, TURNBAUGH P, et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(31): 11070-11075.
- [2] BLUHER M. Obesity: Global epidemiology and pathogenesis[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2019, 15(5): 288-298.
- [3] QIN J J, LI R Q, RAES J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [4] VALDES A M, WALTER J, SEGAL E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. BMJ (Online), 2018, 361: 36-44.
- [5] 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.
- [6] LEY R E, TURNBAUGH P J, KLEIN S, et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [7] YANG F, SHI H M, ZHANG X W, et al. Two novel anti-inflammatory 21-nordammarane saponins from tetraploid Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(51): 12646-12652.
- [8] GAUHAR R, HWANG S L, JEONG S S, et al. Heat-processed *Gynostemma pentaphyllum* extract improves obesity in ob/ob mice by activating AMP-activated protein kinase[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(9): 1607-1616.
- [9] LIU J, YANG P Y, SHI H M, et al. A novel *Gynostemma pentaphyllum* saponin and its adipogenesis inhibitory effect through modulating Wnt/ β -catenin pathway and cell cycle in mitotic clonal expansion[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17: 552-562.
- [10] WANG B, LI M, GAO H, et al. Chemical composition of tetraploid *Gynostemma pentaphyllum* gypenosides and their suppression on inflammatory response by NF- κ B/MAPKs/AP-1 signaling pathways[J]. Food Science and Nutrition, 2020, 8(2): 1197-1207.

- [11] 鞠秀丽, 裴冬梅. 健康体检人群超重、肥胖流行特点与相关因素分析[J]. 中国基层医药, 2020, 27(13): 1628–1633.
- JU X L, PEI D M. Epidemiological characteristics and related factors of overweight and obesity among healthy people[J]. Primary Medicine in China, 2020, 27(13): 1628–1633.
- [12] 陈桂林. 绞股蓝降血脂、抗氧化及保肝作用有效部位的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2013.
- CHEN G L. Antihyperlipidemic, antioxidant and hepatoprotective effects of bioactive fractions from *Gynostemma pentaphyllum* in hyperlipidemic mice[D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2013.
- [13] 肖娟. 基于某医院纵向体检资料的血清肝脏转氨酶与代谢综合征关系的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- XIAO J. Longitudinal change in liver aminotransferase predicts metabolic syndrome—a health check-up cohort based study[D]. Jinan: Shandong University, 2016.
- [14] LEE H S, LIM S M, JUNG J I, et al. *Gynostemma pentaphyllum* extract ameliorates high-fat diet -induced obesity in C57BL/6N mice by upregulating SIRT1 [J]. Nutrients, 2019, 11 (10): 2475.
- [15] PAN H T, GUO J, SU Z Q. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity[J]. Physiology and Behavior, 2014, 130: 157–169.
- [16] AHMED A A, ADAM E M E, MOLLIKA A, et al. Gum Arabic modifies anti-inflammatory cytokine in mice fed with high fat diet induced obesity [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2021, 25: 100258.
- [17] GUO C Y, YANG S L, WANG J, et al. Regulation mechanism of compound Yihe Tea on improving insulin resistance in obesity mice [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2020, 51(1): 68–75.
- [18] 王方杰, 吴祖芳, 翁佩芳, 等. 胡柚黄酮对高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型肠道菌群的调节作用[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 140–146.
- WANG F J, WU Z F, WENG P F, et al. Regulatory effect of flavonoids from *Citrus paradisi* cv. Changshanhuoyou on gut microbiota of high fat diet-induced obese mouse model[J]. Food Science, 2020, 41(21): 140–146.
- [19] HAEGEMAN B, HAMELIN J, MORIARTY J, et al. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice[J]. ISME Journal, 2013, 7(6): 1092–1101.
- [20] KIM B R, SHIN J, GUEVARRA R B, et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27 (12): 2089–2093.
- [21] QUORESHI A M, SULEIMAN M K, KUMAR V, et al. Untangling the bacterial community composition and structure in selected Kuwait desert soils[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 138: 1–9.
- [22] 王家妮, 程如越, 罗雅亭, 等. 高脂饲料诱导小鼠代谢综合征及对肠道发育、肝脏功能和肠道菌群的影响[J]. 卫生研究, 2021, 50(1): 93–99.
- WANG J N, CHENG R Y, LUO Y T, et al. High-fat diet induces metabolic syndrome in mice and its influence on intestinal development, liver function and intestinal microbiota [J]. Journal of Hygiene Research, 2021, 50(1): 93–99.
- [23] MAYA-LUCAS O, MURUGESAN S, NIRMALKAR K, et al. The gut microbiome of Mexican children affected by obesity[J]. Anaerobe, 2019, 55: 11–23.
- [24] WANG G L, ZHANG Y L, ZHANG R G, et al. The protective effects of walnut green husk polysaccharide on liver injury, vascular endothelial dysfunction and disorder of gut microbiota in high fructose-induced mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 92–106.
- [25] CHEN H T, ZHANG F, ZHANG J, et al. A holistic view of berberine inhibiting intestinal carcinogenesis in conventional mice based on microbiome-metabolomics analysis [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 588079.
- [26] ZHANG X W, YAO Z C, SUN X J, et al. Cross-linked arabinoxylan in a Ca²⁺-alginate matrix reversed the body weight gain of HFD-fed C57BL/6J mice through modulation of the gut microbiome [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 176: 404–412.
- [27] BURCELIN R, SERINO M, CHABO C, et al. Gut microbiota and diabetes: From pathogenesis to therapeutic perspective[J]. Acta Diabetologica, 2011, 48(4): 257–273.

- [28] WANG S, LV Z Y, ZHAO W D, et al. Collagen peptide from *Walleye pollock* skin attenuated obesity and modulated gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 74: 104194.
- [29] MBAKWA C A, HERMES G D A, PENDERS J, et al. Gut microbiota and body weight in school-aged children: The koala birth cohort study [J]. *Obesity*, 2018, 26(11): 1767-1776.

Effect of Gypenosides Diet Intervention on Obesity Control and Gut Microbiota Regulation in Mice

Liu Jiaping¹, Wang Bo¹, Zhang Xiaowei¹, Zhang Yaqiong^{1*}, Yu Liangli²

(¹*School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

(²*Department of Nutrition and Food Science, University of Maryland, College Park, Maryland 20742, United States*)

Abstract Gypenosides are the main bioactive components in *Gynostemma pentaphyllum*. This study investigated whether gypenosides diet intervention could reduce the development of overweight and regulate the gut microbiota in C57BL/6J mice, which were fed with a high-fat diet for 12 weeks. The results showed that gypenosides diet intervention at 600 mg/kg bw/d significantly reduced body weight gain, body fat percentage and adipocyte size in mice, compared with the high-fat diet group. Meanwhile, it also reduced low-density lipoprotein cholesterol, alanine aminotransferase and leptin, and increased high-density lipoprotein cholesterol. Moreover, the results of 16S rRNA high-throughput sequencing showed that gypenosides diet intervention increased the α diversity and relative abundance of *Oscillospiraceae*, *Alloprevotella*, *Parabacteroides*, *Lachnospiraceae* DW59 and *Burkholderiales* YL45 at genus level.

Keywords gypenosides; diet intervention; obesity; gut microbiota