

LGG 预防油/脂致小鼠肥胖及调控肠道菌群作用

段亮亮, 张世玉, 徐守竹, 张维敏, 张文敏, 商 晋*

(陕西中医药大学公共卫生学院 陕西咸阳 712046)

摘要 选用玉米油(油)与猪油(脂)探究不同油脂导致 BALB/c 小鼠肥胖的差异,分析鼠李糖乳杆菌(ATCC 53103,LGG)对肥胖的预防及肠道菌群的调控作用。50 只 5 周龄 BALB/c 雄性小鼠被分为 5 组,普通饲料的正常组(CT)、猪油高脂饲料组(S)、玉米油高脂饲料组(P)、猪油高脂饲料+LGG 灌胃组(SL)、玉米油高脂饲料+LGG 灌胃组(PL)。喂养 8 周,进行指标检测。结果显示:猪油比玉米油更易引起小鼠肥胖及肠道菌群紊乱。S 组小鼠体质量(41.42 ± 2.30) g,体质量指数(BMI, $4.24\text{ kg/m}^2\pm 0.26\text{ kg/m}^2$)、Lee's 指数(351.44 ± 9.06)、脂肪系数(118.87 ± 3.91) mg/g、血清总甘油三酯(TG, $0.81\text{ mmol/L}\pm 0.08\text{ mmol/L}$)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C, $0.29\text{ mmol/L}\pm 0.01\text{ mmol/L}$)、丙氨酸氨基转移酶(ALT, $53.42\text{ U/L}\pm 0.95\text{ U/L}$)及天门冬氨酸氨基转移酶(AST, $164.65\text{ U/L}\pm 9.35\text{ U/L}$)均高于 P 组($P<0.05$),而 P 组仅肝脏指数(51.07 ± 1.35) mg/g 高于 S 组($47.32\text{ mg/g}\pm 1.93\text{ mg/g}$, $P<0.05$)。小鼠肠道菌群差异菌种中,S 组拟杆菌门(8.69 ± 4.68)%和 *CF231*(0.31 ± 0.19)%相对丰度降低,别样棒菌属相对丰度(2.19 ± 1.47)%升高,且 *F/B* 值(9.15 ± 1.19)高于 P 组(4.25 ± 0.57 , $P<0.05$);而 P 组仅链球菌属丰度(14.41 ± 6.37)%略高于 S 组(4.91 ± 2.23)%。另一方面,LGG 干预对猪油引起的小鼠肥胖的预防作用及肠道菌群紊乱的调控作用更为有效。SL 组小鼠体质量(34.53 ± 1.53) g、脂肪系数(26.10 ± 2.51) mg/g 均低于 PL 组($37.69\text{ g}\pm 2.41\text{ g}$, $65.88\text{ mg/g}\pm 1.98\text{ mg/g}$, $P<0.05$),且 SL 组中 LGG 上调拟杆菌属的效果较为显著($P<0.05$)。PL 组中 LGG 虽下调厚壁菌门显著($P<0.05$),但不能调控脱铁杆菌门相对丰度($P>0.05$)。结论:猪油比玉米油更易引起肥胖,LGG 对其肥胖的预防及肠道菌群的调控更为有效。

关键词 油/脂; BALB/c 小鼠; 肥胖; 鼠李糖乳杆菌 ATCC53103; 肠道菌群

文章编号 1009-7848(2024)09-0155-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.015

肥胖是 21 世纪人类最为流行的慢性疾病,据世界卫生组织统计,截止 2022 年全球约有 16% 的成年人肥胖,而在许多国家肥胖的发生率仍有上升趋势^[1]。近年来我国各年龄阶段肥胖及超重人数也越来越高,截止 2020 年,有超过 50% 的成年居民超重或肥胖,而 6~17 岁儿童青少年有 19% 超重肥胖,6 岁以下儿童有 10.4% 超重或肥胖^[2]。肥胖的产生与饮食中油脂的不合理摄入关系密切。一方面,我国居民油脂的摄入量(42.1 g/d)远高于《中国居民膳食指南(2022)》的推荐摄入量($25\sim 30\text{ g/d}$)^[3],容易诱发肥胖;另一方面,膳食中过多动物油脂的摄入,是引起肥胖的另一重要因素。近年来我国居民动物性食品食用比例的上升,使动物脂肪的摄入量也随之升高^[4-5]。相较于植物油,动物油脂富含

胆固醇及饱和脂肪酸,更易引起肥胖^[6]。

乳酸菌是人体肠道的一类益生菌,如植物乳杆菌^[7]、鼠李糖乳杆菌^[8]、干酪乳杆菌^[9]等,它们能够有效调控宿主脂代谢,防治肥胖。乳酸菌可以通过改变肠道 pH 值,产生中短链脂肪酸,改变肠壁屏障的通透性等方式调控宿主脂代谢,而调控肠道菌群结构是其中一种重要方式^[10]。与健康人群相比,肥胖人群往往肠内有害菌群比例提高,肠道菌群及其代谢紊乱^[11],而有效地补充乳酸菌能够优化肠内菌群结构,减少体质量^[12],抑制宿主吸收脂质,调控脂代谢,促进机体减重,防治肥胖^[12]。鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103, LGG)为从人体分离出的 1 株具有脂代谢调控作用的乳酸菌,可在肠道定殖^[8],而额外的补充 LGG 对不同的油脂代谢的干预效果是否相同,目前还没有答案。

日常饮食中脂质来源包括植物油(油)与动物脂(脂)。植物油中玉米油营养价值较高,富含多不饱和脂肪酸,是一种典型的食用植物油^[13]。动物脂中,猪油一直是最受欢迎的烹调油之一^[14]。乳酸菌

收稿日期: 2023-09-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(82100488);
陕西省科技厅重点研究项目(2018SF-290);陕西省
科技厅自然科学基金基础研究项目(2019JQ-563)

第一作者: 段亮亮,女,博士,讲师

通信作者: 商晋 E-mail: jinjin8404@sina.com

对宿主脂代谢的调控与膳食成分有着密切关系^[15]。油脂种类差异,有可能会影响LGG对肠道菌群结构的调控,进而影响其对肥胖的防治作用。本研究分别采用猪油和玉米油制备高脂饲料,饲喂BALB/c小鼠建立肥胖模型,试验组同时用一定剂量的LGG灌胃小鼠,进行过程干预。通过检测小鼠肥胖相关指标并结合肠道菌群16S rRNA高通量测序分析,探讨不同油脂导致的肥胖差异,同时分析LGG对小鼠肠道菌群的调节及预防肥胖作用,为食用油的选择,以及益生菌的应用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

5周龄雄性SPF级BALB/c小鼠50只,平均体重(25±2)g/只。普通基础饲料成分(%):玉米粉27、麸皮19、大米16、豆饼16、鱼粉13、钙粉3、骨粉3、酵母粉2.3、食盐0.5、复合维生素0.1、微量元素0.1。供热比45%的猪油或玉米油高脂饲料成分(%):胆盐0.2、胆固醇2、白糖16、猪油/玉米油20,其余成分同基础饲料。实验动物及饲料均购自南京盛民科研动物养殖场。实验环境为陕西中医药大学动物实验中心SPF级动物独立通气笼盒系统。

鼠李糖乳杆菌(ATCC53103),中国科学院微生物研究所;MRS培养基(Man Rogosa Sharpe medium),上海博微生物科技有限公司;4%多聚甲醛,北京索莱宝科技有限公司;天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、总甘油三酯(total triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α ,TNF- α)检测试剂盒,南京建成生物研究所。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的培养及提纯 LGG接种于MRS液体培养基(1×10^6 CFU/mL),恒温、恒湿培养箱37℃静置培养16~18 h离心收集菌体,无菌水洗涤菌

体3次,重悬于磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS,pH 7.2)溶液中,于600 nm波长下测量吸光度,调整浓度至 1×10^9 CFU/mL($OD_{600nm}=0.54$)^[10]。

1.2.2 动物模型建立与分组 实验动物在适应环境1周后随机分为5组,每组10只。正常组(CT组)喂养普通饲料,S组及SL组饲喂猪油高脂饲料,P组及PL组饲喂玉米油高脂饲料,SL组及PL组小鼠每日用PBS配制的LGG菌液进行灌胃(0.2 mL/只),其余组每日灌胃PBS缓冲溶液0.2 mL/只,干预处理8周。

1.2.3 小鼠体质量及肥胖指标的测定 小鼠定时称重并记录数据,精确至0.01 g,干预结束分别测量小鼠最终体质量和体长(鼻至肛门),根据公式(1)、(2)分别计算Lee's指数和体质量指数(body mass index,BMI)。

$$\text{Lee's 指数} = \frac{\sqrt[3]{\text{最终体质量/g}}}{\text{体长/cm}} \times 10 \quad (1)$$

$$\text{BMI}/(\text{kg/m}^2) = \frac{\text{最终体质量/kg}}{(\text{体长/m})^2} \quad (2)$$

1.2.4 肝脏指数与脂肪系数 小鼠饲养末期禁食12 h后,眼球取血,离心后取上清液备用。解剖分离肝脏、附睾脂肪、腹股沟脂肪、肾周脂肪及肩胛间脂肪组织^[11],分别称重并记录,按下列公式计算肝脏指数及脂肪系数。

$$\text{肝脏指数}(\text{mg/g}) = \text{肝脏质量}(\text{mg})/\text{体质量}(\text{g}) \quad (3)$$

$$\text{脂肪系数}(\text{mg/g}) = \text{脂肪质量}(\text{mg})/\text{体质量}(\text{g}) \quad (4)$$

1.2.5 血脂4项、血清肝损伤指标测定 取小鼠血清,按照相关试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行操作测定。

1.2.6 肝脏组织病理学分析 处死后小鼠的肝脏组织置于4%质量分数多聚甲醛溶液中固定、石蜡包埋、切片、脱蜡后采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色,光学显微镜下观察小鼠肝脏组织结构变化。

1.2.7 肠道内容物菌群分析 收集处死小鼠的盲肠内容物,置于2 mL无菌离心管中,送于上海派森诺生物科技股份有限公司进行DNA提取、扩增及肠道菌群16S rRNA基因高通量测序分析。

1.3 数据处理与分析

数据分析采用SPSS 25.0软件进行,数据以平均值±标准差表示,采用单因素方差分析(Anal-

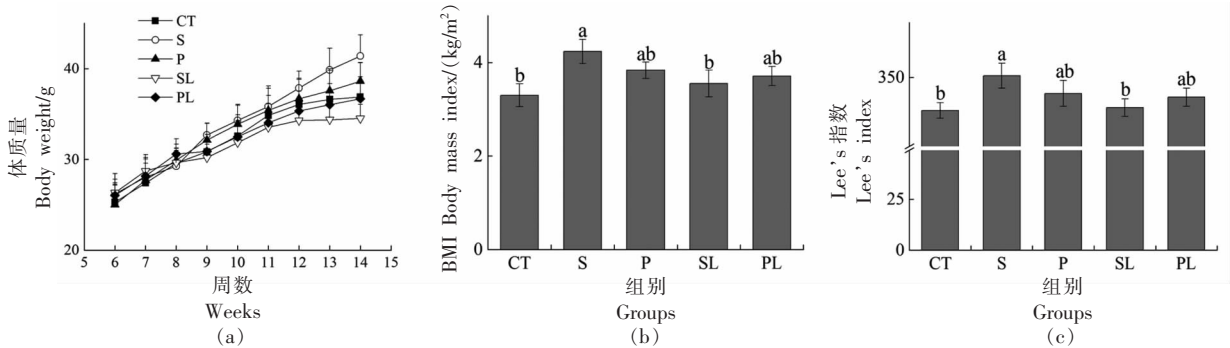
ysis of Variance,ANOVA) 进行组间差异比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 小鼠体质量、BMI、Lee's 指数

相较于玉米油,猪油更易引起小鼠体质量和肥胖指标的增加,而摄入 LGG 能有效抑制该过程。如图 1a 所示,小鼠体质量从第 9 周(干预后第 3 周)开始出现差异,S 组增长最快,其次为 P 组、

CT 组、PL 组、SL 组。相对应的,饲养 8 周后,S 组的 BMI 及 Lee's 指数为组间最高(图 1b 和 1c, $P<0.05$),而 SL 组这两指标均显著低于 S 组($P<0.05$),且与 CT 无差异,LGG 对猪油引起的肥胖有较好的防治作用。此外,P 组及 PL 组 BMI 及 Lee's 指数均略高于 CT 组,同时略低于 S 组,说明玉米油与猪油相比较,诱发小鼠肥胖程度较轻,且 LGG 对该两指标影响不显著(图 1b 和 1c)。



注:图中小写字母 a、b 代表差异显著性分析($P<0.05$),下同。

图 1 小鼠体质量变化(a)及饲养结束 BMI(b)和 Lee's 指数(c)的差异

Fig.1 Weight change of mice(a), and difference in BMI (b) and Lee's index (c) after feeding

2.2 小鼠脂肪系数

如图 2 所示,小鼠脂肪系数以 S 组最高($P<0.05$),相较于玉米油,猪油更易引起小鼠体内脂肪组织积累;而 SL 组脂肪系数显著低于 S 组($P<0.05$),且与 CT 组无差异,说明 LGG 干预能够有效预防猪油引起的小鼠体内脂肪积累。P 组与 PL 组脂肪系数无差异,均高于 CT 组($P<0.05$),说明玉米油也会诱发小鼠体内脂肪积累,但 LGG 干预

效果不明显。

2.3 小鼠肝脏指数

S 组、SL 组与 CT 相比均无差异,说明猪油、“猪油+LGG”均不会对小鼠肝脏指数造成影响;P 组小鼠肝脏指数显著高于 PL 组(图 3, $P<0.05$),表明玉米油容易引起小鼠肝脏质量的增加,而 LGG 干预能够有效预防作用。

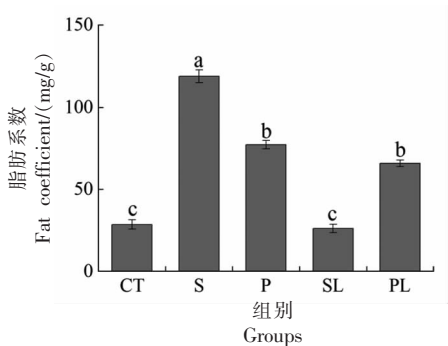


图 2 小鼠脂肪系数的差异

Fig.2 Difference in the fat coefficient in mice

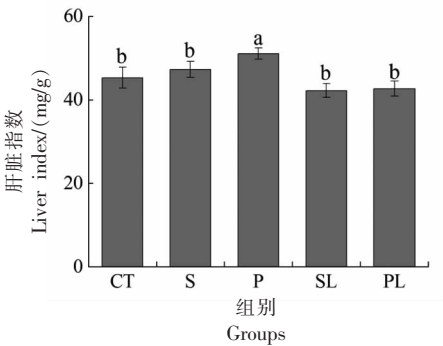


图 3 小鼠肝脏指数的差异

Fig.3 Difference in liver index of mice

2.4 小鼠血脂四项指标

血脂四项指标中仅 TG、LDL-C 表现出组间差异,且 S 组均显著高于其余组(图 4b、4c, $P<0.05$),说明相较于玉米油,猪油更易诱发血脂异常。此外,玉米油也会引起 LDL-C 一定程度的升高,P

组该指标略高于 CT 组。LGG 干预后,SL 组和 PL 组的 LDL-C 浓度均分别显著低于 S 组和 P 组($P<0.05$),且与 CT 无差异,说明 LGG 干预能够有效预防不同油脂引起的血脂异常。

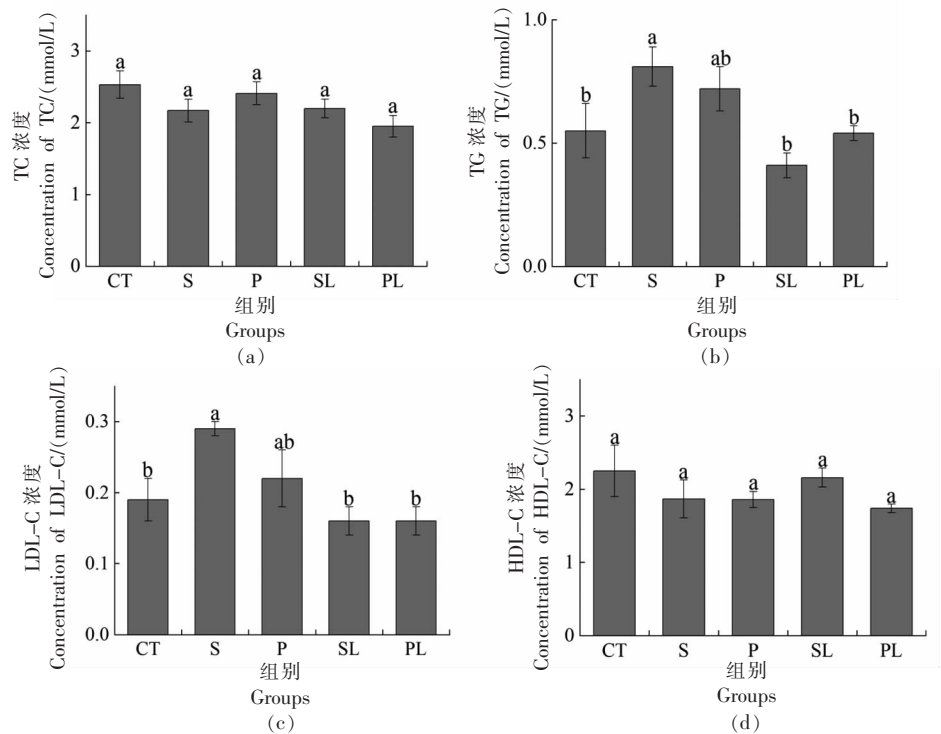


图 4 小鼠血脂四项指标差异
Fig.4 Difference in four indexes of blood lipid in mice

2.5 小鼠血清肝指标

如图 5 所示,S 组 ALT 及 AST 均显著高于 P 组($P<0.05$),与玉米油相比,猪油易诱发 ALT 及

AST 异常。PL 及 SL 组该两个指标均显著降低(与 CT 无差异或小于 CT 组, $P<0.05$),这说明 LGG 能够有效预防高脂带来的肝损伤。

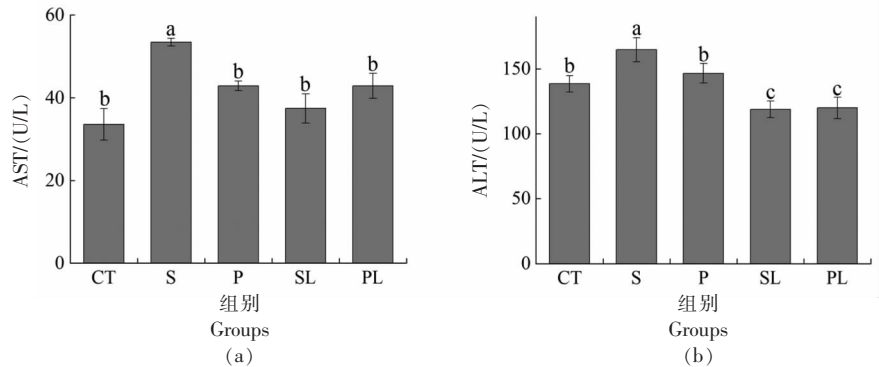


图 5 小鼠血清肝指标差异
Fig.5 Difference in serum liver indexes in mice

2.6 小鼠血清炎症因子

S 和 P 组 LPS 水平及 TNF- α 质量浓度均显

著高于 CT 组,而 SL 组这两项指标显著低于 S 组,且与 CT 组无差异,P 组与 PL 组相比较结果类似

(图 6, $P<0.05$),LGG 干预可以有效预防高脂饲料引起的炎症反应。

2.7 小鼠肝脏组织病理学分析

如图 7 所示,CT 组小鼠肝小叶结构清晰完整,肝细胞排列较整齐,未见明显病理改变。S 与 CT 组比较,肝组织结构及肝细胞排列紊乱,大部分肝细胞脂肪变性,细胞内可见大量白色脂肪积聚,部分肝细胞核变小、固缩。SL 与 S 组相比较,

细胞排列紊乱明显改善,细胞脂肪性病变不明显。P 与 CT 组比较,肝组织排列较紊乱,同时可见大小不一脂滴在肝细胞内沉积,但沉积状况较 S 组轻。与 P 组相比,PL 组肝细胞排列、肝脏细胞内脂滴沉积所有改善,但细胞内依然有少量脂肪沉积。相比较于玉米油,猪油更易引起小鼠肝细胞脂质沉积,而 LGG 干预能够有效减轻肝脏脂肪的沉积,但其对猪油组的影响更为明显。

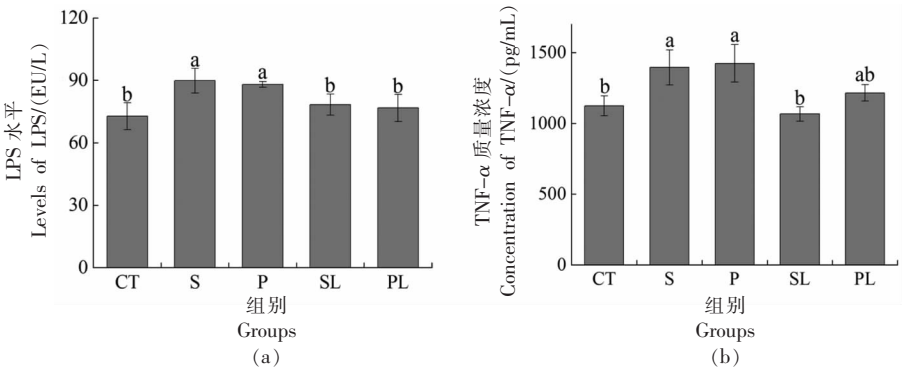


图 6 小鼠血清炎症因子差异
Fig.6 Difference in serum inflammatory factors in mice

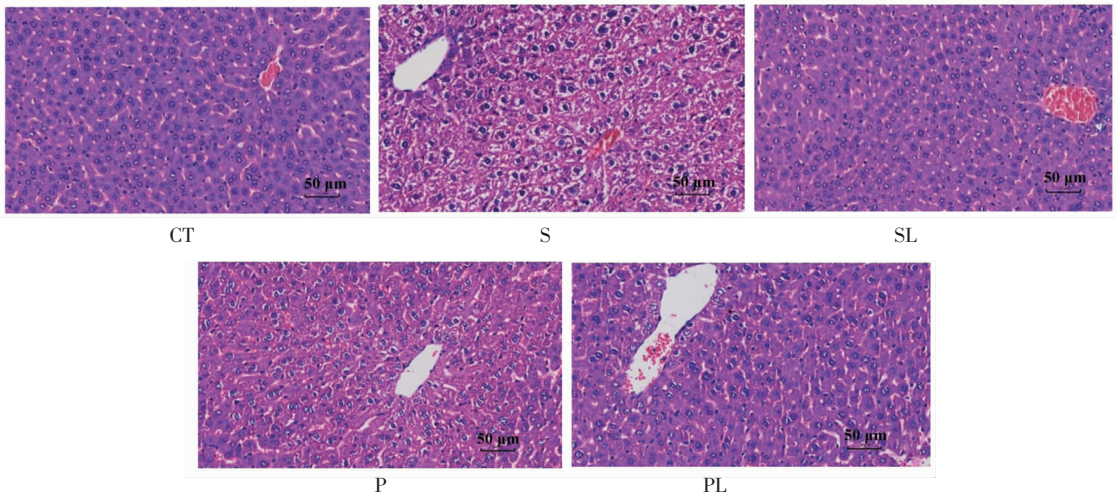


图 7 小鼠肝脏组织结构(400×)
Fig.7 Morphology of liver tissues in mice(400×)

2.8 LGG 干预对不同高脂饲料饲喂小鼠肠道菌群的影响

2.8.1 小鼠肠道菌群 Alpha 多样性 使用未抽平的 OTUs, 计算 Alpha 多样性相关指标。表 1 中, Chao1 指数表征肠道菌群的丰富度,Shannon 和 Simpson 指数表征多样性。S 组 Chao1 指数、

Shannon 指数、Simpson 指数均显著低于 CT 组,P 组也展示类似结果,虽 Simpson 指数与 CT 差异不显著;同时 SL 和 PL 相关指标与 CT 无差异,说明摄入 LGG 能够起到有效纠正小鼠因摄入大量猪油及玉米油引起的肠道菌群丰富度与多样性降低。

表 1 小鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析

Table 1 Alpha diversity analysis of intestinal flora in mice			
组别	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
CT	2 217.73 ± 129.86 ^a	8.46 ± 0.74 ^a	0.99 ± 0.01 ^a
S	1 090.84 ± 122.58 ^b	5.47 ± 1.10 ^b	0.83 ± 0.08 ^b
P	1 228.31 ± 115.14 ^b	6.26 ± 0.72 ^b	0.90 ± 0.08 ^{ab}
SL	1 892.95 ± 177.12 ^a	7.66 ± 0.55 ^a	0.98 ± 0.01 ^a
PL	1 931.40 ± 274.62 ^a	7.86 ± 0.65 ^a	0.97 ± 0.02 ^a

注:不同字母 a、b 表示差异显著($P<0.05$)。

2.8.2 小鼠肠道菌群 OTUs 数 图 8 所示 Ven 图表示不同组间检出的 OTUs 数丰富度与相似性,CT 组 OTUs 数(4 736 个)检出最高,其次为 SL 组(4 456 个),PL 组(4 218 个),P 组(3 013 个),S 组(2 659 个);图中重叠部分代表组间共有的 OTUs 数,S、P、SL、PL 分别与 CT 组共有的 OTUs 数为

489,548,958,984 个,以上说明 SL 与 PL 与正常组 CT 相似度更高。S 组和 P 组共有 OTUs 数 495 个(图 8c),SL 与 PL 共有 OTUs 数为 1 101 个(图 8d),但分别仅为 SL 总检出的 24.71%,PL 的 26.10%,说明即使有 LGG 的干预调节,油脂种类仍对小鼠肠道菌群影响较大。

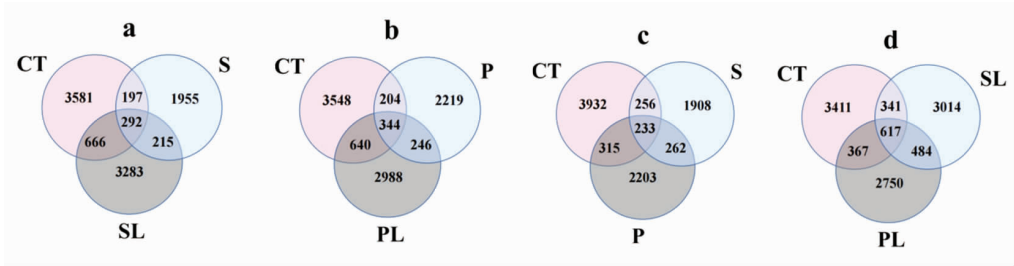


图 8 小鼠肠道菌群检出 OTUs 数

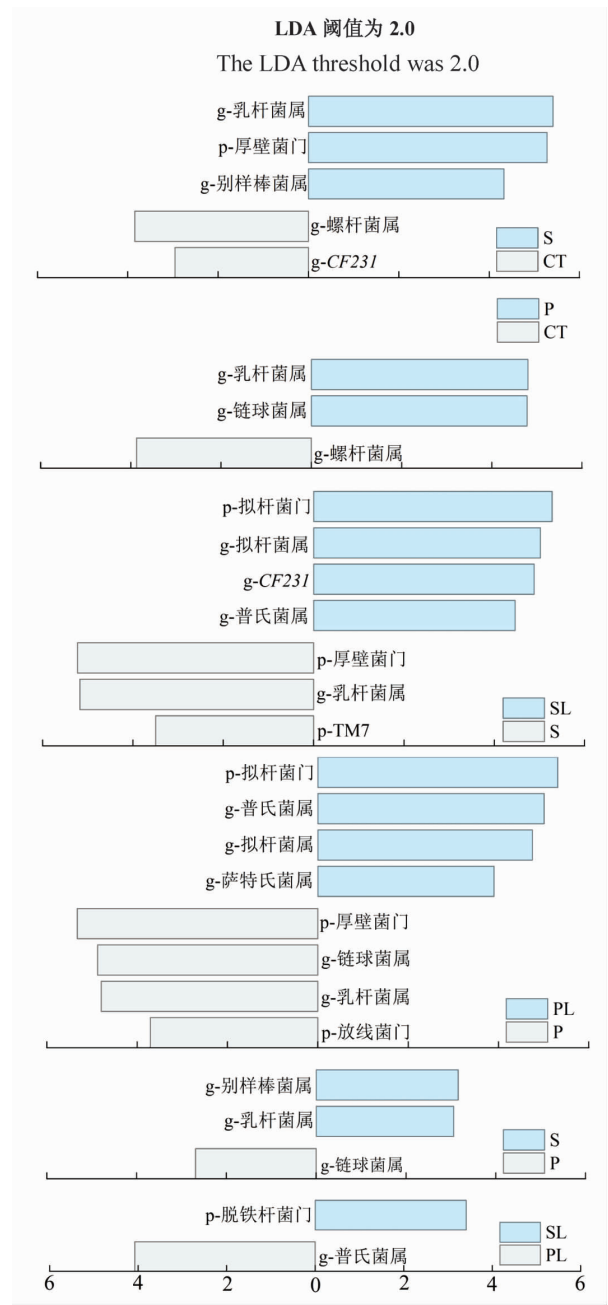
Fig.8 The number of OTUs detected by intestinal flora in mice

2.8.3 小鼠肠道菌群物种组成 对 CT、S、P、SL 和 PL 组菌群相对丰度两两比较,通过 LEfSe 多级物种差异筛选显示组间物种差异,柱长越长表示相关分类单元差异越显著,本次分析 LDA 阈值设定为 2.0(图 9),共筛出门水平差异菌种 5 个,包括脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、糖细菌(TM7);属水平差异菌种 9 个,包括 CF231、黏液杆菌属(*Mucispirillum*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、别样棒菌属(*Allobaculum*)、链球菌属(*Streptococcus*)、萨特氏菌属(*Sutterella*)、普氏菌属(*Prevotella*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)。

2.8.3.1 门水平菌群组成与差异 如图 10 所示,门水平 5 个差异性物种中厚壁菌门和拟杆菌门相对丰度(82.68%~91.79%)较高,S 组中厚壁菌门高

于 CT 而拟杆菌门低于 CT ($P<0.05$),SL 组中二者与 CT 无差异,LGG 干预能够有效控制其丰度的变化。PL 组厚壁菌门显著低于 CT 和 SL($P<0.05$),LGG 对玉米油组该菌种丰度影响更显著。F/B 值一定程度上可以反映肠道紊乱性,S 和 P 组 F/B 值均显著高于 CT 组,且以 S 组比值最高,说明其肠道紊乱性最高,其次为 P 组($P<0.05$),SL 和 PL 与 CT 组均无差异,说明 LGG 干预能够有效调控这种紊乱。

TM7、脱铁杆菌门和放线菌门为相对丰度较低的差异菌种。S 组和 P 组中 TM7 均高于 CT,脱铁杆菌门均低于 CT,而 SL 中两种菌相对丰度与 CT 无差异 ($P<0.05$),PL 中脱铁杆菌门依然低于 CT。此外,LGG 干预导致 SL 和 PL 中放线菌门相对丰度显著低于 CT($P<0.05$)。



注:LDA 得分(lg);g:属水平菌种;P:门水平菌种。

图 9 小鼠肠道菌群 LEfSe 多级物种差异判别分析

Fig.9 LEfSe multilevel species discriminant analysis of gut microbiota of mice

2.8.3.2 属水平菌群组成与差异 图 11 所示,S 组和 P 组属水平差异菌种中乳杆菌属相对丰度均高于 CT 组,且 S 组高于 P 组;CF231 相对丰度均低于 CT,在 S 组中下降更为显著;同时别样棒菌属仅在 S 组中高于 CT 组,而链球菌属仅在 P 组中高于 CT($P<0.05$)。LGG 干预能够有效调节该 4 种

菌的相对丰度变化,同时 SL 中拟杆菌属上调显著($P<0.05$)。此外,普氏菌属虽在 SL 组和 PL 组中存在差异,但均与 CT 差异不显著($P>0.05$);萨特氏菌属在 SL 和 PL 中均上调;黏液杆菌属和螺杆菌属在所有组中均低于 CT($P<0.05$)。

2.9 小鼠肠道菌群与肥胖指标相关性分析

图 12 所示为小鼠肠道菌群(门/属水平相对丰度前 20)与临床指标的 Pearson 相关分析。门水平上,厚壁菌门、放线菌门及 TM7 主要显示出与 BMI、Lee's、TC、TG、LDL-C、ALT、AST、LPS、TNF- α 正相关($P<0.05$, $P<0.01$),而拟杆菌门和脱铁杆菌属与 Lee's、TG、LDL-C、ALT、AST、TNF- α 负相关($P<0.05$, $P<0.01$)。属水平上,链球菌属及别样棒菌属与 BMI、Lee's、TG、LDL-C、ALT、AST、LPS、TNF- α 正相关($P<0.05$, $P<0.01$),而拟杆菌属、CF231 及萨特氏菌属与这些指标负相关($P<0.05$, $P<0.01$)。可见厚壁菌门、放线菌门、TM7、链球菌属及别样棒菌属可能为诱发小鼠肥胖及相关指标异常的关键菌种,而拟杆菌门、脱铁杆菌属、拟杆菌属、CF231 及萨特氏菌属可能为预防肥胖产生及相关指标异常的关键菌种。

3 讨论

本研究选用玉米油与猪油制备高脂饲料,探究不同油脂导致 BALB/c 小鼠肥胖的差异,并采用 LGG 进行灌胃干预,分析其对小鼠肥胖预防及肠道菌群调控的作用。结果表明,相较于玉米油,猪油更易诱发小鼠肥胖,主要表现为升高小鼠体质量、BMI、Lee's 指数、脂肪系数,同时其也易引起小鼠血脂指标(TG、LDL-C)及血清肝指标(ALT、AST)异常,该结果与前人研究基本一致^[6]。相比之下,玉米油更易引起小鼠肝脏指数的增加,这种差异可能与玉米油更易增加小鼠胆汁酸(bile acid, BA)的分泌和排泄有关^[6],BA 代谢物石胆酸可激活肝脏的孕烷 X 受体(pregnane X receptor, PXR)^[17],活化的 PXR 可与肝脏大小调节信号因子 Yes-相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)相互作用,能够诱导肝脏增大^[18]。另一方面,摄入 LGG 能有效预防小鼠肥胖的发生,对猪油组预防效果更为明显,主要体现为能够显著降低小鼠脂肪系数及体重。这种差异可能是由于相比较于玉米油,

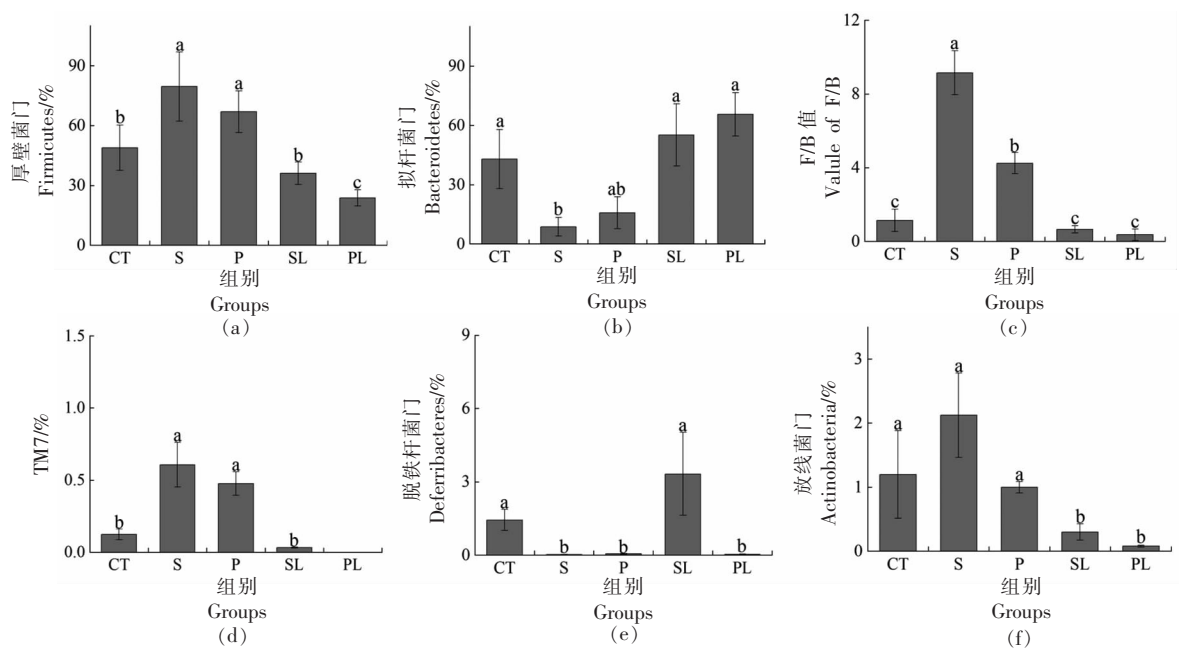


图 10 小鼠肠道菌群门水平差异物种

Fig.10 Difference in intestinal microflora among groups at phylum level in mice

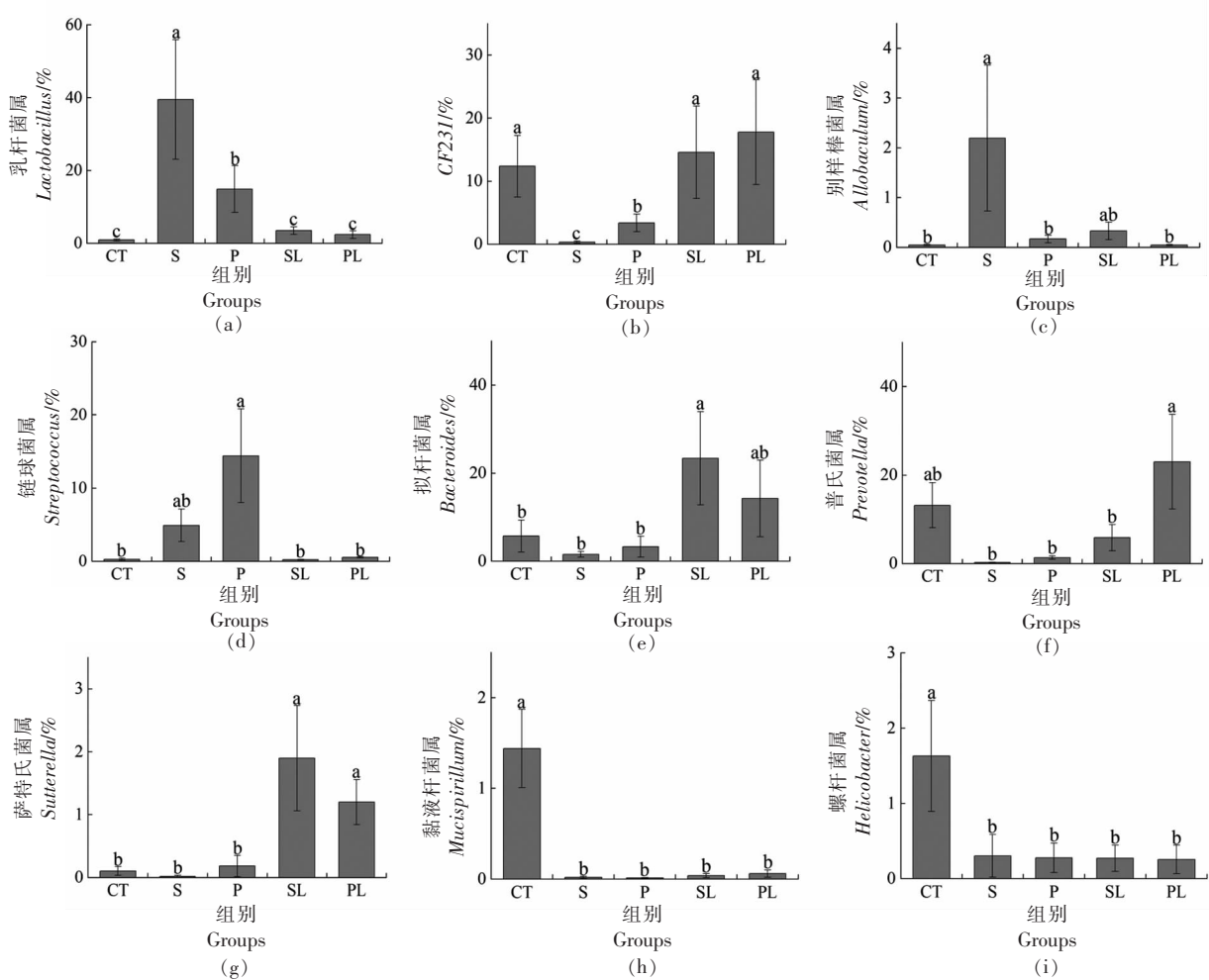


图 11 小鼠肠道属水平差异物种

Fig.11 Difference in intestinal microflora at genus level in mice

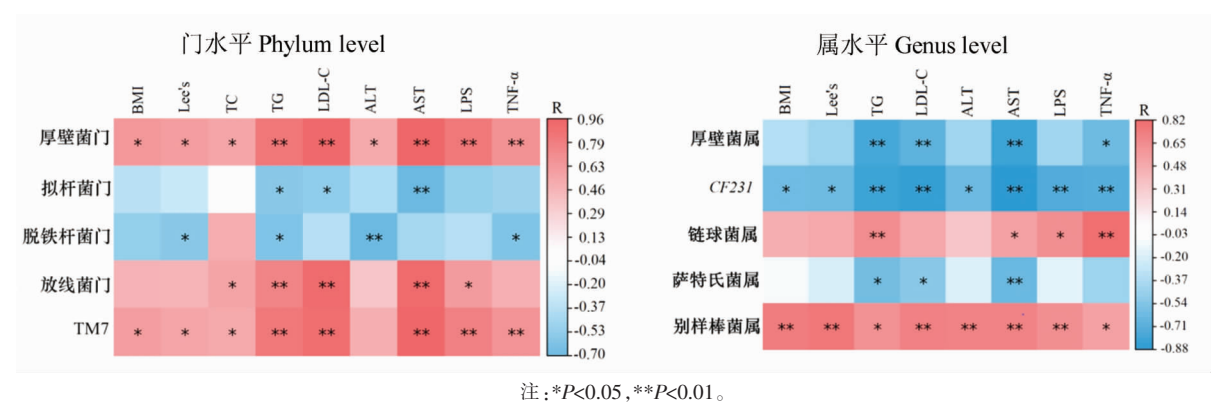


图 12 小鼠肠道菌群与肥胖指标相关性分析

Fig.12 Pearson correlation analysis of gut microbiota with obesity related indexes in mice

猪油中富含饱和脂肪酸^[13-14],具有脂代谢调控作用的 LGG 更易利用饱和脂肪酸进行生长繁殖^[10],推测其在 SL 组中更为丰富,因此表现为更显著的肥胖预防效果。

肠道生态系统的紊乱是诱发肥胖的重要因素^[11],Alpha 多样性分析显示猪油与玉米油均会引起小鼠肠道菌群丰富度与多样性的降低,而 LGG 干预能够减轻这种变化。另一方面,SL 和 PL 之间检出的 OTUs 依然存在较大差异,表明不同油脂对 LGG 的干预效果存在较大影响。进一步采用 LEfSe 分析筛选出组间两个分类学水平上差异菌种。门水平上 S 和 P 组厚壁菌门均升高,而 S 组拟杆菌门降低,肠道紊乱性相关的 F/B 值随之增大,这将导致小鼠更易从食物中吸收能量,体内脂肪更易积累,诱发肠道炎症^[19-20],这可能是猪油比玉米油更易诱发小鼠肥胖的重要原因之一。拟杆菌门与临床相关因子 TG、LDL-C、AST 显著负相关,更加有力地说明了这一点。相对应的,厚壁菌门的降低和拟杆菌门的升高能够有效减少小鼠体内脂肪积累,预防肥胖^[20]。SL 和 PL 组中 LGG 均能够上调拟杆菌门和下调厚壁菌门,而 PL 组厚壁菌门下调更为显著。这种差异可能与玉米油含有较高抑菌化合物黄酮类物质,以及肠道微生态环境如 pH 值等的改变有关^[21-22],然而具体原因有待进一步探究。此外,玉米油和猪油均表现出上调 TM7 和下调脱铁杆菌门相对丰度。TM7 是寄生在宿主细菌表面的专性附生生物,其丰度升高往往伴随肥胖发生^[23-24];下调的脱铁杆菌门常常引起铁代谢异常,诱发肥胖^[25-26],本研究结果与此相对应。SL 中

LGG 能够有效调控该两种菌相对丰度的变化,而 PL 组中脱铁杆菌门依然低于 CT 组,这种差异可能源于玉米油可被部分肠道微生物转化产生共轭脂肪酸,其对脱铁杆菌门生长有抑制作用^[26],而 LGG 对这种抑制作用调控不明显。

属水平中,与 P 组相比较,S 组 CF231 较低而别样棒菌属较高,相关性分析表明 CF231 与主要临床指标负相关,而别样棒菌属与这些指标正相关,这两株菌与 S 组肥胖的产生及脂代谢异常有着密切关系。CF231 与胆汁酸代谢有关,其相对丰度的降低伴随宿主脂质吸收的加强^[27],预示 S 组小鼠脂质吸收能力可能更强;别样棒菌属能够通过上调宿主肝脏血管生成素样蛋白 4 诱发机体脂肪沉积^[28],S 组小鼠较高的脂肪系数及肝脏病理切片中较多的细胞脂肪沉积与此相对应。此外,益生菌乳杆菌属也表现为 S 组高于 P 组,乳杆菌属中大多数菌种具有脂代谢调节作用,但也有部分菌株常伴随肥胖的发生而升高^[12],机体在处于代谢异常状态下菌群也会产生代偿作用,通过自我调节并逐步逆转紊乱状态^[29],预示 S 组小鼠肠道菌群自我调节作用更为明显。P 组与 S 组相比较,仅链球菌属相对丰度较高,该菌与 TG、AST、LPS、TNF-α 正相关,其不仅引起宿主脂代谢异常,也会引起肝脏及血清炎症,其上调常与肥胖的发生有关^[29-30]。另一方面,LGG 干预能有效改善不同油脂引起的肠道菌群失调,但促使 SL 组中拟杆菌属上调更为显著。拟杆菌属占据拟杆菌门的绝大多数,是脂肪沉积的重要生物标识之一,其丰度上调能够有效降低宿主脂肪沉积^[31],其在 SL 组中的丰度

高于CT,且实验结果证实SL组小鼠体质量略低于CT,其与TG、LDL-C、AST、TNF- α 显著负相关,这说明LGG通过上调拟杆菌属可能是预防猪油引起肥胖、高血脂、肝脏及血清炎症的重要途径。

研究中还发现门水平放线菌门,以及属水平萨特氏菌属、黏液杆菌属和螺杆菌属并未受油脂种类的影响。其中门水平放线菌门和属水平萨特氏菌属仅表现为受LGG的影响,前者在SL及PL组中均下调,后者均上调,前者与维护肠道微生态平衡的重要菌种^[32],后者与糖代谢调控、降脂减肥关系密切^[33],二者可能为LGG调控宿主脂代谢的重要菌种;粘液杆菌属和螺杆菌属在所有处理组中均下调,这两株菌均与胃肠道炎症有一定的相关性,不仅为诱发炎症的重要菌种,也为抵抗肠道炎症的重要菌种^[34-35],这预示较高油脂的摄入与肠道炎症关系密切,而采用LGG干预也不易纠正这种影响。

4 结论

猪油比玉米油更易诱发小鼠肥胖,小鼠体质量、BMI、Lee's指数、脂肪系数、TG、LDL-C、ALT、AST升高,而玉米油更易引起小鼠肝脏指数升高。两者相比较,猪油引起小鼠肠道菌群拟杆菌门与CF231相对丰度的降低、别样棒菌属相对丰度的升高,而玉米油易引起链球菌属相对丰度升高。LGG干预能有效预防肥胖,但对猪油诱发的肥胖预防更为有效,小鼠体质量、脂肪系数均低于LGG玉米油干预组,这与其肠道菌群中拟杆菌属的上调关系密切,而玉米油组LGG干预虽厚壁菌门上调,但不能调控脱铁杆菌门的变化,其对小鼠肥胖的预防作用较小。

参 考 文 献

- [1] WHO. Obesity and overweight[EB/OL]. (2024-03-01) [2014-09-21]. <https://www.who.int/>.
- [2] PAN X F, WANG L, PAN A. Epidemiology and determinants of obesity in China[J]. The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2021, 9(6): 373-392.
- [3] 孔欠文,卫克昭,张世瑜,等.花生油、橄榄油和猪油对小鼠血脂水平、肥胖及糖尿病易感性的影响研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 96-101.
- [4] KONG Q W, WEI K Z, ZHANG S Y, et al. Effects of peanut oil, olive oil and lard on serum lipid level, obesity and diabetes susceptibility in mice[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(8): 96-101.
- [5] LIU X T, WU W D, MAO Z X, et al. Prevalence and influencing factors of overweight and obesity in a Chinese rural population: The Henan rural cohort study[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 13101.
- [6] ZHOU Y P, WANG S T, ZHANG Q, et al. Prevalence of overweight and obesity among children and adolescents increased rapidly in Chinese rural regions while level off in urban areas[J]. International Journal of Cardiology, 2016, 223: 61-62.
- [7] D'ANGELO S, MOTTI M, MECCARIELLO R. ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids, obesity and cancer[J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2751.
- [8] MA Y, FEI Y, HAN X B, et al. *Lactobacillus plantarum* alleviates obesity by altering the composition of the gut microbiota in high-fat diet-fed mice[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 947367.
- [9] MEKKES M C, WEENEN T C, BRUMMER R J, et al. The development of probiotic treatment in obesity: A review[J]. Beneficial Microbes, 2014, 5(1): 19-28.
- [10] HE Q W, ZHANG Y, MA D, et al. *Lactobacillus casei* Zhang exerts anti-obesity effect to obese glut1 and gut-specific-glut1 knockout mice via gut microbiota modulation mediated different metagenomic pathways[J]. European Journal of Nutrition, 2022, 61(4): 2003-2014.
- [11] 段亮亮,张蒙,冯洁,等.乳酸菌胆盐水解酶和共轭脂肪酸产生及对宿主脂代谢影响的研究进展[J].微生物学通报, 2022, 49(9): 3890-3905.
- [12] DUAN L L, ZHANG M, FENG J, et al. Production of bile salt hydrolase and conjugated fatty acids by lactic acid bacteria and their effects on host lipid metabolism: A review[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3890-3905.
- [13] 李瑶,王国盼,郝占西,等.低聚果糖对C57BL/6小鼠肥胖预防及其肠道菌群的调节作用[J].食品科学, 2022, 43(15): 150-157.
- [14] LI Y, WANG G P, HAO Z X, et al. Dietary eructooligosaccharides prevent obesity and regulate the gut microbiota in C57BL/6 mice[J]. Food Science, 2022, 43(15): 150-157.

- [12] CROVESY L, OSTROWSKI M, FERREIRA D, et al. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials[J]. International Journal of Obesity, 2017, 41(11): 1607–1614.
- [13] BARRERA-ARELLANO D, BADAN-RIBEIRO A P, SERNA-SALDIVAR S O. Corn-Chapter 21 - Corn oil: Composition, processing, and utilization [M]. New York: AACC International Press, 2019: 593–613.
- [14] WANG J, YAN S S, XIAO H S, et al. Anti-obesity effect of a traditional Chinese dietary habit - blending lard with vegetable oil while cooking [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1–10.
- [15] WU H Q, MA Z L, ZHANG D X, et al. Sequential extraction, characterization, and analysis of pumpkin polysaccharides for their hypoglycemic activities and effects on gut microbiota in mice [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 769181.
- [16] 叶展. 典型膳食油脂胃肠道消化吸收特性及其对肠道健康的影响研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- YE Z. Studies on characteristics of typical dietary oil gastrointestinal digestion and absorption, and their influences on gut health [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [17] WAN Y J Y, SHENG L L. Regulation of bile acid receptor activity [J]. Liver Research, 2018, 2(4): 180–185.
- [18] JIANG Y M, FENG D C, MA X C, et al. Pregnane X receptor regulates liver size and liver cell fate by yes - associated protein activation in mice [J]. Hepatology, 2019, 69(1): 343–358.
- [19] KOLIADA A, SYZENKO G, MOSEIKO V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population [J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 1–6.
- [20] BENÍTEZ-PÓEZ A, GÁMEZ DEL PULGAR E M, SANZ Y. The glycolytic versatility of *Bacteroides uniformis* CECT 7771 and its genome response to oligo and polysaccharides [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 383.
- [21] REICHARDT N, VOLLMER M, HOLTROP G, et al. Specific substrate-driven changes in human faecal microbiota composition contrast with functional redundancy in short-chain fatty acid production [J]. The ISME Journal, 2018, 12(2): 610–622.
- [22] MUROTA K, NAKAMURA Y, UEHARA M. Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 82(4): 600–610.
- [23] CHIPASHVILI O, UTTER D R, BEDREE J K, et al. Episymbiotic *Saccharibacteria* suppresses gingival inflammation and bone loss in mice through host bacterial modulation [J]. Cell Host & Microbe, 2021, 29(11): 1649–1662.
- [24] WANG Y, WU Y P, WANG B K, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 protects mice against high-fat diet-induced obesity and liver injury via regulating host metabolism and gut microbiota [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1161.
- [25] LI Y M, LUAN Y P, YUE X G, et al. Effects of *Codonopsis bulleyana* forest ex diels on *Deferribacteres* in constipation predominant intestine tumor: Differential analysis [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(2): 395–401.
- [26] MIYAMOTO J, IGARASHI M, WATANABE K, et al. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4007.
- [27] PARK T, MA L, MA Y, et al. Dietary energy sources and levels shift the multi-kingdom microbiota and functions in the rumen of lactating dairy cows [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2020, 11: 66.
- [28] ZHENG Z B, LYU W T, REN Y, et al. *Allobaculum* involves in the modulation of intestinal ANGPTL4 expression in mice treated by high-fat diet [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 690138.
- [29] 严宝飞, 袁鹏, 刘圣金, 等. 黄芩汤对非酒精性脂肪肝大鼠肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 162–175.
- YAN B F, YUAN P, LIU S J, et al. Effects of Huangqin Decoction on gut microbiota in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(1): 162–175.
- [30] DAS U N. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: A review [J]. Journal of Advanced Research, 2018, 11: 57–66.
- [31] DREYER J L, LIEBL A L. Early colonization of the gut microbiome and its relationship with obesity [J]. Human Microbiome Journal, 2018, 10: 1–5.

- [32] BINDA C, LOPETUSO L R, RIZZATTI G, et al. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis[J]. Digestive and Liver Disease, 2018, 50(5): 421–428.
- [33] WANG C, ZHANG H, LIU H J, et al. The genus *Sutterella* is a potential contributor to glucose metabolism improvement after Roux–en–Y gastric bypass surgery in T2D[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2020, 162: 108116.
- [34] HERP S, DURAI RAJ A C, SALVADO SILVA M, et al. The human symbiont *Mucispirillum schaedleri*: Causality in health and disease[J]. Medical Microbiology and Immunology, 2021, 210(4): 173–179.
- [35] CHEN L W, KUO S F, CHEN C H, et al. A community–based study on the association between *Helicobacter pylori* infection and obesity[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1–10.

Prevention of Obesity Induced by Oil/Fat and Regulation of Intestinal Flora in mice by LGG

Duan Liangliang, Zhang Shiyu, Xu Shouzhu, Zhang Weimin, Zhang Wenmin, Shang Jin*
(College of Public Health, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi)

Abstract Lard and corn oil were used to explore the difference of obesity in BALB/c mice caused by oil and fat. And the effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) on prevention of obesity and regulation of mice intestinal flora were analyzed. A total of 50 5-week-old BALB/c male mice were randomly divided into 5 groups included control check (CT), high-lard fed group (S), high-corn oil fed group (P), high-lard fed + LGG gavage group (SL) and high-corn oil fed + LGG gavage group (PL). The experiment lasted for 8 weeks and the related indexes were detected. The results showed that obesity was much easier to be caused by excessive lard compared with excessive corn oil. The body weight (41.42 ± 2.30) g, body mass index (BMI, $4.24 \text{ kg/m}^2 \pm 0.26 \text{ kg/m}^2$), Lee's index (351.44 ± 9.06), fat coefficient (118.87 ± 3.91) mg/g, total triglyceride (TG, $0.81 \text{ mmol/L} \pm 0.08 \text{ mmol/L}$), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C, $0.29 \text{ mmol/L} \pm 0.01 \text{ mmol/L}$), alanine aminotransferase (ALT, $53.42 \text{ U/L} \pm 0.95 \text{ U/L}$) and aspartate aminotransferase (AST, $164.65 \text{ U/L} \pm 9.35 \text{ U/L}$) were all significantly higher in mice in group S than in group P while only the liver index was higher in mice in group P (51.07 ± 1.35) mg/g than in group S ($47.32 \text{ mg/g} \pm 1.93 \text{ mg/g}$, $P < 0.05$). Amongst the changed intestinal flora in mice, the relative abundance of Bacteroidetes (8.69 ± 4.68)% and CF231 (0.31 ± 0.19)% decreased while *Allobaculum* (2.19 ± 1.47)% increased in group S. And the *F/B* ratio was higher in group S (9.15 ± 1.19) than that in group P (4.25 ± 0.57 , $P < 0.05$). Comparatively, only the relative abundance of *Streptococcus* was slightly higher in mice in group P (14.41 ± 6.37)% than in group S (4.91 ± 2.23)%. However, LGG intervention was more effective in preventing obesity and regulating intestinal flora disorder in mice caused by lard. The body weight and fat coefficient of mice were lower in group SL ($34.53 \text{ g} \pm 1.53 \text{ g}$, $26.10 \text{ mg/g} \pm 2.51 \text{ mg/g}$) compared with in group PL ($37.69 \text{ g} \pm 2.41 \text{ g}$, $65.88 \text{ mg/g} \pm 1.98 \text{ mg/g}$, $P < 0.05$). And the up-regulation of *Bacteroides* was more obviously in group SL. The down-regulation of Firmicutes was observed, but the regulation of *Deferribacteres* could not be conducted by LGG in group PL ($P > 0.05$). In conclusion, obesity was more likely to be caused by lard than by corn oil. But LGG was more effectively in preventing obesity and regulating intestinal flora disorder caused by lard.

Keywords different oil/fat; BALB/c mice; obesity; *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103; intestinal flora