

# 桑叶水提物对高脂饮食小鼠粪便中胆固醇代谢产物的影响

贺燕<sup>1</sup>, 邹莉芳<sup>1</sup>, 黄先智<sup>2</sup>, 丁晓雯<sup>1</sup>

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (2. 西南大学科技处, 重庆 400715)

**摘要:** 本文研究了桑叶水提物对高脂饮食小鼠粪便中胆固醇代谢产物的影响, 为桑叶饮料降血脂功能确定提供数据支持。将桑叶水提物按其 DNJ 含量设置成高 (8.0 mg/kg·bw)、中 (4.0 mg/kg·bw)、低 (2.0 mg/kg·bw) 3 个剂量组, 分别灌胃高脂饮食小鼠 4、8、12、16 周, 测定各组小鼠粪便 pH、粪固醇、胆汁酸、短链脂肪酸 (Short Chain Fatty Acids, SCFAs) 含量, 并对 SCFAs 和血清胆固醇 (Total Cholesterol, TC) 水平、动脉粥样硬化指数 (Atherosclerosis Index, AI) 进行相关性分析。与高脂对照组相比, 每天灌胃 8 mg/kg·bw DNJ 的桑叶水提物 16 周, 小鼠粪固醇升高 22.31%, 胆汁酸升高 22.31%, SCFAs 升高 36.76%, 乙酸升高 39.25%, 丙酸升高 96.52%, 丁酸升高 60.43%, 异丁酸升高 68.05%, 戊酸升高 74.21%, 异戊酸升高 23.78%, 粪便 pH 降低 2.05%, 上述指标的变化均具有显著性 ( $p < 0.05$ )。血清 TC、AI 分别与乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸呈极显著负相关 ( $p < 0.01$ )。桑叶水提物可改善高脂饮食小鼠肠道环境, 促进肠道微生物发酵产生 SCFAs, 促进粪固醇、胆汁酸排出, 从而有助于降血脂作用。

**关键词:** 桑叶水提物; 胆固醇代谢; 降血脂

文章编号: 1673-9078(2019)05-37-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.006

## Effects of Mulberry Leaves Water Extract on Cholesterol Metabolites in Feces of High-fat Diet Fed Mice

HE Yan<sup>1</sup>, ZOU Li-fang<sup>1</sup>, HUANG Xian-zhi<sup>2</sup>, DING Xiao-wen<sup>1</sup>

(1. College of Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. Science & Technology Division, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** In order to provide data support for hypolipidemic function of mulberry leaves, the effect of water extract of mulberry leaves on cholesterol metabolites in feces of high-fat diet mice was studied. The water extract of mulberry leaves was set to three dose groups of high (8.0 mg/kg·bw), medium (4.0 mg/kg·bw) and low (2.0 mg/kg·bw) according to their DNJ content. The mice were fed with high-fat diet for 4, 8, 12, and 16 weeks. The serum pH, fecal sterol, bile acid, and short-chain fatty acids (SCFAs) were measured in each group, and correlation analysis between SCFAs and serum cholesterol (Total Cholesterol, TC) levels and atherosclerosis index (AI) were analyzed. Compared with the high-fat control group, the water extract of mulberry leaves (8 mg/kg·bw DNJ) was intragastrically administered for 16 weeks, the fecal sterol increased by 22.31%, the bile acid increased by 22.31%, and the SCFAs increased by 36.76%, acetic acid increased by 39.25%, propionic acid increased by 96.52%, butyric acid increased by 60.43%, isobutyric acid increased by 68.05%, valeric acid increased by 74.21%, isovaleric acid increased by 23.78%, and fecal pH decreased by 2.05%. The changes in the indicators were all significant ( $p < 0.05$ ). Serum TC and AI were significantly negatively correlated with acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid and isovaleric acid ( $p < 0.01$ ). Mulberry leaf water extract can improve the intestinal environment of mice with high-fat diet, promote intestinal microbial fermentation to produce SCFAs, promote the excretion of fecal sterol and bile acid, and thus help reduce blood fat.

**Key words:** mulberry leaves water extract; cholesterol metabolism; hypolipidemic

收稿日期: 2018-12-21

基金项目: 现代农业产业技术体系建立专项 (CARS-18); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201403049); 重庆市科委社会民生重点项目 (CSTS2017shms-zdyfx0054)

作者简介: 贺燕 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与保健食品

通讯作者: 丁晓雯 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与保健食品

随着生活水平提高,膳食结构趋向于高脂高能量<sup>[1]</sup>。长期高脂饮食易导致体内血脂代谢紊乱,血清中胆固醇异常升高,诱发肥胖、动脉粥样硬化、高胆固醇血症等,最终诱发心血管疾病。因此,调控体内胆固醇代谢平衡对高脂血症防控具有积极意义。

当体内胆固醇过高时,人体主要从以下二条途径将多余胆固醇排出:一是未被小肠吸收的胆固醇在小肠下段及结肠被肠道菌还原转化为粪固醇排出<sup>[2]</sup>;二是体内的胆固醇被转化成胆汁酸随粪便排出。近年来越来越多研究表明一些中草药因含较多活性成分而具有显著的降血脂功能<sup>[3]</sup>,如当归多糖能减少高脂饮食引起的脂肪堆积及炎症反应<sup>[4]</sup>;壳聚糖作为阳离子型多糖,能够与脂肪结合,减少能量等摄入,并促进粪便中胆固醇和胆汁酸排出<sup>[5]</sup>。桑叶为药食两用植物,由于其含有多糖、黄酮、生物碱等多种化学成分<sup>[6-8]</sup>,在降血糖、降血脂、抗氧化等方面具有较好作用,已被广泛应用于治疗糖尿病<sup>[9,10]</sup>、高血脂、动脉粥样硬化<sup>[11]</sup>等疾病。桑叶中 1-脱氧野尻霉素(DNJ)是桑叶生物碱的主要成分,是一种 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂,可调节脂肪合成相关基因,减少脂肪合成和积累<sup>[12]</sup>。桑叶中的植物甾醇<sup>[13]</sup>、多糖<sup>[14]</sup>、树皮素等可通过抑制肠道对胆固醇的吸收和促进胆固醇的转化而降低体内胆固醇水平。

研究证明,肠道菌群会直接参与脂肪酸和胆固醇代谢<sup>[15]</sup>,因此高脂饮食会影响机体肠道健康和相关菌群组成,同时也会影响短链脂肪酸(Short Chain Fatty Acids, SCFAs)含量。SCFAs 是肠道菌群发酵不能被机体消化的碳水化合物或蛋白质的主要代谢产物<sup>[16]</sup>,可为宿主提供能量。SCFAs 主要包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸等<sup>[17]</sup>,其中乙酸、丙酸和丁酸占肠道 SCFAs 总量的 90%~95%<sup>[18]</sup>。SCFAs(尤其是丁酸盐)可作为结肠上皮细胞能量来源,还可被人体不同细胞的特异受体感知,从而调节能量代谢、胰岛素敏感性和免疫反应<sup>[19-21]</sup>。此外,SCFAs 还能调节体内胆固醇代谢<sup>[22]</sup>。研究表明,SCFAs 可抑制肝脏脂肪酸合成酶(Liver Fat Synthase, FAS)的活性以降低血清中胆固醇含量<sup>[23]</sup>。但若肠道内 SCFAs 代谢紊乱,易造成 SCFAs 积聚,增加能量储存,导致人体肥胖<sup>[24]</sup>。因此,维持体内 SCFAs 代谢平衡对机体健康很重要。

将桑叶开发成食品是延长其产业链的重要手段,而开发成饮料可以较好地克服桑叶固有的不良风味,增加消费者的喜好度。桑叶水提液是桑叶饮料的主要原料。本文主要通过测定经桑叶水提物喂饲的高脂饮食小鼠粪便 pH、粪胆汁酸、粪固醇和粪便中 SCFAs 含量,研究桑叶水提物对小鼠胆固醇代谢相关产物的

影响,为桑叶饮料的降脂功能的确定提供数据支持,为桑叶保健食品的开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

桑叶水提物,采用超声波辅助水提法制得。测得该溶液的多酚含量为(12.77±0.22) mg/mL,黄酮为(5.55±0.02) mg/mL, DNJ 为(2.92±0.01) mg/mL,多糖为(7.35±0.10) mg/mL。

200 只 4 周龄昆明种 SPF 雄性小鼠体重(20±2) g,购于重庆市中药研究院[许可证号 SCXK(渝)2012-0006]。基础饲料,购于重庆滕鑫比尔实验动物有限公司。高脂饲料按照表 1 的配方<sup>[25,26]</sup>由实验室自制。

表 1 高脂饲料配方

Table 1 Composition of the high fat high cholesterol diet

项目	含量/%
胆固醇	1
猪油	10
蛋黄粉	10
胆盐	0.1
基础饲料	78.9

### 1.2 实验试剂

乙酸等有机酸标品,色谱纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司;巴豆酸,色谱纯,上海梯希爱化成有限公司;磷酸盐缓冲液,北京索莱宝生物科技有限公司;总胆汁酸(TBA)测定试剂盒,厦门慧嘉生物科技有限公司;总胆固醇(TC)测定试剂盒,南京建成生物工程工程有限公司。

### 1.3 实验设备

F6/10 匀浆机,上海弗鲁克流体机械制造有限公司;M680 型酶标仪,美国基因有限公司;GC-2010 气相色谱仪,日本岛津(中国)有限公司;ALPAAL-4LSC 冷冻真空干燥机,德国 Chirst 公司;Stabilwax-DA 毛细色谱柱,美国 RESTEK 公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 动物分组及饲养

小鼠适应性喂养 1 周后,随机分成 5 组,每组 40 只,分别是正常组、高脂对照组、桑叶水提物高、中、低剂量组,实验周期为 4 周、8 周、12 周和 16 周。根据本实验室前期的研究结果,将桑叶水提物的灌胃剂

量按 DNJ 含量计, 设计成 DNJ 分别为 8.0、4.0 和 2.0 mg/kg 的 3 种溶液, 按 0.1 mL/10 g/d 小鼠体重灌胃。正常组小鼠喂饲基础饲料+灌胃生理盐水; 高脂对照组小鼠喂饲高脂饲料+灌胃生理盐水; 低、中、高剂量桑叶水提取物组小鼠喂饲高脂饲料的同时分别灌胃剂量 2、4、8 mg/kg·bw DNJ 的桑叶水提取物。

#### 1.4.2 试样的收集

小鼠分别饲养 4、8、12、16 周, 实验周期结束前 4 d 收集新鲜粪便, 真空冷冻干燥, 储存存于干燥环境中待用。

#### 1.4.3 粪便 pH 值的测定

取实验小鼠新鲜粪便于去离子水处理过的离心管中, 加入 10 倍质量的去离子水 ( $V/m$ ), 放于漩涡振荡器上混合均匀, 静置, 用精密 pH 计测定上清液的 pH 值。

#### 1.4.4 粪便中粪固醇的测定

取经冷冻干燥的粪便 1.00 g, 加入 5 倍 PBS 溶液 ( $\text{pH}=7.4$ ) 制成匀浆液, 静止 1 h, 混匀, 离心, 取上清液按试剂盒提供的步骤测定。

#### 1.4.5 粪便中胆汁酸的测定

取粪便匀浆上清液, 按试剂盒提供的步骤测定。

#### 1.4.6 粪便中 SCFAs 的测定<sup>[27,28]</sup>

称取 0.500 g 左右粪便于离心管中, 加入 10 倍体积含有 5 mmol/L 巴豆酸的 10 mmol/L 的 NaOH 浸提液, 旋涡混合仪混匀后静置, 4 °C、4000 r/min 离心 15 min, 将上清液转移至用无氨水处理过的离心管中, 用孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤至进样小瓶中待测。参照贾益群等<sup>[29]</sup>的方法用气相色谱法测定小鼠粪便的乙酸、丙酸、丁酸、戊酸等 SCFAs 含量。总酸含量为以上各种酸含量的总和。气相色谱条件: Stabilwax-DA 毛细色谱柱 (30 m $\times$ 0.53 mm), 氮气为载体, 氢焰离子检测器, 进样量 1  $\mu\text{L}$ ; 进样口温度 220 °C; 柱流速 0.95 mL/min, 柱温 90 °C、平衡时间 0.5 min, 5 °C/min 升温至 150 °C, 保留时间 7 min; 检测器温度 230 °C; 氢气流速 40 mL/min, 空气流速 400 mL/min, 尾吹流

速 40 mL/min。

### 1.5 数据分析

所得结果以 ( $\bar{X}\pm\text{SD}$ ) 表示, 采用 origin 8.6 绘图、Word 2016 制表, 用 SPSS 20.0 对结果进行 one-way ANOVA 方差分析, 采用 Spearmans 进行相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪固醇的影响

维持胆固醇平衡对机体正常代谢至关重要。当体内胆固醇含量过高, 超出生物体合成需要时, 未被小肠吸收的胆固醇在小肠下段及结肠被细菌还原转化为粪固醇排出体外<sup>[30]</sup>。桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪固醇的影响如表 2 所示。

由表 2 可知, 正常组小鼠在实验过程中粪固醇水平保持相对稳定。高脂对照组小鼠粪固醇水平随着饲养时间的延长有所上升, 与正常组相比, 高脂饲料饲养 16 周的小鼠其粪固醇水平显著增加 28.51%。用桑叶水提取物饲养高脂饮食小鼠, 其粪固醇水平进一步提高, 有较明显的剂量效应与时间效应。与高脂对照组相比, 用高剂量桑叶水提取物饲养高脂饮食小鼠 4 周和 16 周, 小鼠的粪固醇水平分别升高 6.44%和 22.31% ( $p<0.05$ )。这可能与桑叶水提取物抑制了饮食中胆固醇的吸收导致其排出增加有关。

### 2.2 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便胆汁酸的影响

粪便胆汁酸是胆固醇代谢的主要产物, 体内胆汁酸水平升高易造成胆固醇积累。因此增加粪便胆汁酸的排出可以使血清中胆固醇水平下降<sup>[31]</sup>。桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪胆汁酸的影响如表 3 所示。

表 2 桑叶水提取物对小鼠粪固醇的影响

Table 2 Effect of MWE on TC in fecal of mice ( $\mu\text{mol/g}$ )

组别	4 周	8 周	12 周	16 周
正常组	12.41 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	12.05 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	13.28 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	13.01 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>
高脂对照组	13.86 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	14.95 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	16.06 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	16.72 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>
低剂量组	13.30 $\pm$ 1.33 <sup>ab</sup>	15.13 $\pm$ 1.72 <sup>b</sup>	15.69 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>	18.37 $\pm$ 0.86 <sup>c</sup>
中剂量组	13.36 $\pm$ 2.05 <sup>ab</sup>	15.26 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	16.49 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	19.34 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>
高剂量组	14.75 $\pm$ 1.11 <sup>c</sup>	16.99 $\pm$ 1.37 <sup>c</sup>	19.64 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>	21.86 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>

注: 同列数字上字母不同表示各组间存在显著差异 ( $p<0.05$ )。下表同。

表 3 桑叶水提取物对小鼠粪便胆汁酸的影响

**Table 3 Effect of MWE on TBA in fecal of mice (mmol/g)**

组别	4 周	8 周	12 周	16 周
正常组	18.12±2.12 <sup>b</sup>	19.98±1.04 <sup>d</sup>	20.67±2.48 <sup>c</sup>	20.55±2.40 <sup>b</sup>
高脂对照组	13.54±1.46 <sup>a</sup>	14.82±1.14 <sup>a</sup>	15.88±1.76 <sup>a</sup>	15.48±1.28 <sup>a</sup>
低剂量组	14.52±0.63 <sup>a</sup>	16.51±1.54 <sup>b</sup>	17.98±1.17 <sup>b</sup>	20.12±0.28 <sup>b</sup>
中剂量组	15.07±0.50 <sup>a</sup>	17.95±1.09 <sup>bc</sup>	18.86±1.72 <sup>b</sup>	20.66±1.35 <sup>b</sup>
高剂量组	17.58±1.63 <sup>b</sup>	19.38±2.30 <sup>cd</sup>	21.24±1.30 <sup>c</sup>	21.78±1.77 <sup>b</sup>

表 4 桑叶水提取物对小鼠粪便 SCFAs 含量的影响

**Table 4 Effect of MWE on total SCFAs in fecal of mice (μmol/g)**

组别	4 周	8 周	12 周	16 周
正常组	109.42±0.66 <sup>c</sup>	113.84±1.83 <sup>c</sup>	113.55±0.80 <sup>c</sup>	113.29±2.54 <sup>c</sup>
高脂对照组	87.11±1.01 <sup>a</sup>	86.39±2.68 <sup>a</sup>	81.59±1.63 <sup>a</sup>	82.03±2.21 <sup>a</sup>
低剂量组	91.60±2.61 <sup>b</sup>	96.82±0.77 <sup>b</sup>	99.93±1.07 <sup>b</sup>	101.72±0.08 <sup>b</sup>
中剂量组	93.20±1.64 <sup>c</sup>	95.40±1.57 <sup>b</sup>	103.55±2.46 <sup>b</sup>	103.37±2.43 <sup>b</sup>
高剂量组	96.50±2.45 <sup>c</sup>	101.05±4.09 <sup>b</sup>	111.07±3.01 <sup>c</sup>	112.18±2.99 <sup>c</sup>

由表 3 可知，正常组小鼠粪便胆汁酸水平从 8 周开始有一定升高，然后一直维持稳定状态。高脂对照组小鼠粪胆汁酸水平与正常组比较有明显降低 ( $p<0.05$ )，可能与高脂饮食吸收的胆汁酸在体内与脂质形成混合胶束<sup>[32]</sup>，不利于排出有关。与高脂对照组比较，高剂量桑叶水提取物饲养小鼠 4 周和 16 周，粪胆汁酸水平分别升高 29.77%和 40.63% ( $p<0.05$ )，可能与桑叶中某些功能性成分能促进胆固醇代谢、有利于胆汁酸排出有关。当饲养到 16 周，桑叶水提取物各剂量组小鼠粪胆汁酸水平无显著差异。

### 2.3 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便 SCFAs 的影响

SCFAs 标品的气相色谱图见图 1。

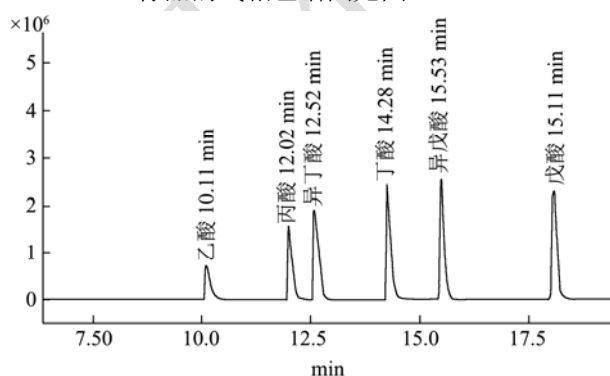


图 1 短链脂肪酸标准品气相色谱图

Fig.1 The standard of SCFAs in GC

从图中可看出 6 种 SCFAs 所对应的色谱峰分离清晰，峰型较理想，基线平稳，表明色谱分离条件合适。

#### 2.3.1 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便 SCFAs

#### 含量的影响

SCFAs 可为宿主提供能量并参与胆固醇代谢。桑叶水提取物对小鼠粪便 SCFAs 的影响如表 4 所示。

由表 4 可知，正常组小鼠粪便 SCFAs 水平在饲养期间基本保持稳定。与正常组相比，高脂对照组小鼠饲养到 16 周时，粪便 SCFAs 水平降低 27.59% ( $p<0.05$ )。经桑叶水提取物干预后，高脂饮食小鼠粪便中 SCFAs 含量有所提高，表现出明显的剂量效应与时间效应。与高脂对照组相比，高剂量桑叶水提取物组小鼠喂饲到 4 周和 16 周时，其粪便 SCFAs 水平分别升高 10.78%和 36.76% ( $p<0.05$ )，其 SCFAs 水平接近于正常组，表明桑叶水提取物能促进 SCFAs 排泄，有利于调节体内 SCFAs 代谢平衡。

#### 2.3.2 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便中乙酸含量的影响

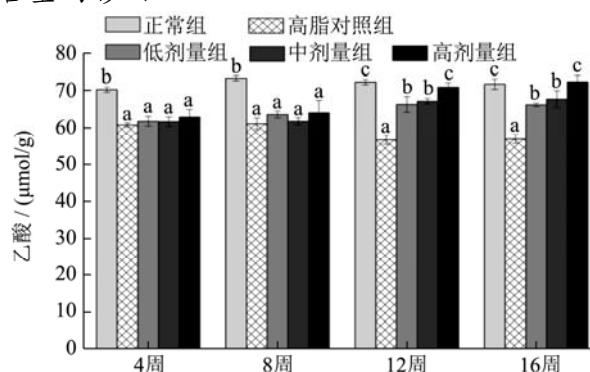


图 2 桑叶水提取物对小鼠粪便乙酸的影响

Fig.2 Effect of MWE on acetic acid in fecal of mice

注：同一时间字母不同表示各组间存在显著性差异 ( $p<0.05$ )。下图同。

乙酸是胆固醇合成的最主要底物<sup>[33]</sup>，降低体内乙

酸水平可抑制胆固醇合成。桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便中乙酸含量的影响如图2所示。

由图2可知，正常组小鼠粪便中乙酸水平保持相对稳定。高脂对照组小鼠粪便乙酸水平随饲养时间的延长而下降，喂饲到16周，高脂对照组小鼠粪便乙酸水平较正常组降低20.78% ( $p < 0.05$ )。与高脂对照组比较，桑叶水提取物高剂量组小鼠饲养到12周和16周，粪便乙酸水平增加11.21%和39.25% ( $p < 0.05$ )；与正常组比，桑叶水提取物高剂量组小鼠饲养12周，粪便乙酸水平无显著差别 ( $p > 0.05$ )，表明桑叶水提取物可以促进高脂饮食小鼠乙酸排泄并逐渐使之恢复正常水平。

### 2.3.3 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便丙酸含量的影响

丙酸作为肝脏代谢的能源并能够抑制胆固醇的合成<sup>[21]</sup>。但当体内含量过高时，过量的丙酸会在肝脏中直接转化为甘油三酯<sup>[34]</sup>，增加肝脏脂肪的积累。桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便丙酸含量的影响如图3所示。

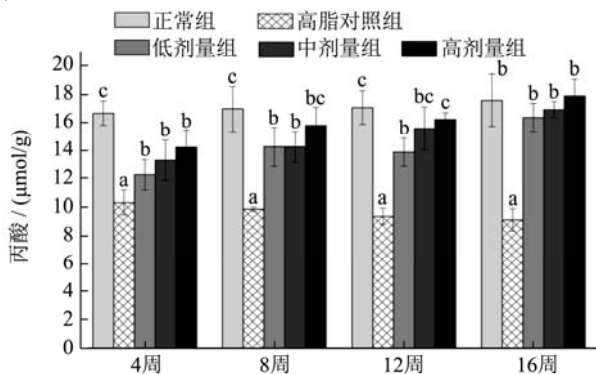


图3 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便丙酸的影响

Fig.3 Effect of MWE on propionic acid in fecal of mice

由图3可知，正常组小鼠粪便中丙酸水平保持相对稳定。高脂对照组小鼠饲养到16周时，粪便中丙酸水平与正常组相比降低了39.89% ( $p < 0.05$ )。而桑叶水提取物饲喂高脂小鼠8周和16周，其粪便丙酸水平与高脂对照组小组的相比分别提高了37.63%和96.52% ( $p < 0.05$ )；喂饲12周后，高剂量桑叶水提取物组小鼠粪便丙酸水平与正常组相比无显著差异 ( $p > 0.05$ )，表明桑叶水提取物有助于促进高脂饮食小鼠丙酸的排出并使之恢复到正常水平。

### 2.3.4 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便丁酸含量的影响

丁酸可以作为结肠细胞的主要能源，在结肠细胞增殖、分化和基因表达中发挥重要作用<sup>[23]</sup>。但丁酸过高时会造成能量过剩，易转化为脂肪储存在体内。桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便丁酸的影响如图4所示。

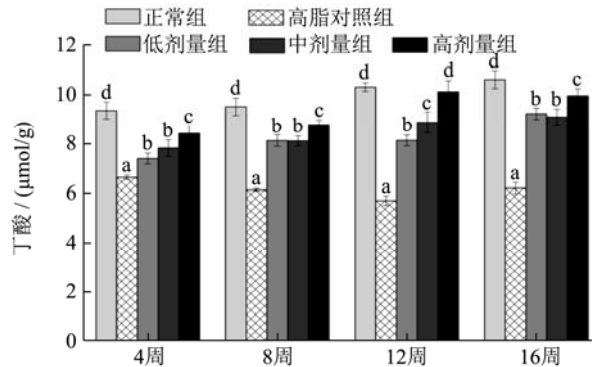


图4 桑叶水提取物对小鼠粪便丁酸的影响

Fig.4 Effect of MWE on butyric acid in fecal of mice

由图4可知，正常组小鼠粪便的丁酸水平随喂饲时间延长有一定的上升。与正常组相比，高脂对照组小鼠喂饲到16周时，其粪便丁酸水平显著降低了41.50% ( $p < 0.05$ )。与高脂对照组相比，高剂量桑叶水提取物灌胃小鼠4周和16周，其粪便中丁酸水平分别增加26.85%和60.43% ( $p < 0.05$ )，表明桑叶水提取物有助于促进高脂饮食小鼠体内多余丁酸的排出。

### 2.3.5 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便戊酸的影响

戊酸主要由蛋白质经肠道菌群发酵产生<sup>[35]</sup>，其排出增多可加快体内蛋白质消化吸收，有利于维持机体肠道环境健康。桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便戊酸含量的影响如图5所示。

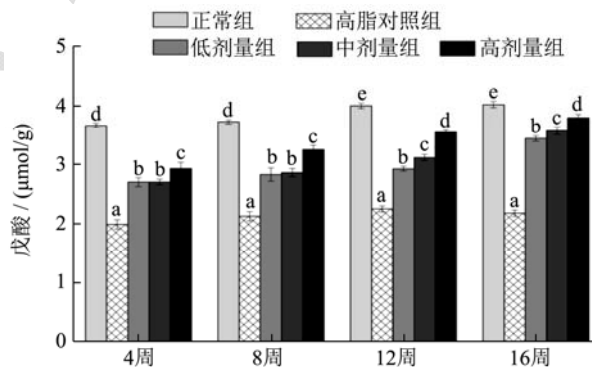


图5 桑叶水提取物对小鼠粪便戊酸含量的影响

Fig.5 Effect of MWE on valeric acid in fecal of mice

由图5所知，正常组小鼠粪便戊酸含量随喂饲时间延长呈上升趋势，可能是粪便中残留有未消化的蛋白质，经粪便中细菌发酵产生戊酸所致。高脂饮食可以降低粪便戊酸含量，与正常组相比，高脂饮食饲养16周，小鼠粪便戊酸含量降低45.76% ( $p < 0.05$ )。与高脂对照组相比，高剂量桑叶水提取物饲喂小鼠4周和16周，其粪便戊酸水平升高47.38%和74.21% ( $p < 0.05$ )，表明桑叶水提取物有助于促进高脂饮食小鼠体内戊酸的排出，有利于机体肠道环境健康。

### 2.3.6 桑叶水提取物对高脂饮食小鼠粪便异丁酸

含量的影响

异丁酸属于支链脂肪酸(BCFAs),是肠道内支链氨基酸的发酵产物。沈冰蕾等<sup>[36]</sup>报道称 BCFAs 在肠道菌群生长、繁殖过程中发挥重要作用。但若在体内浓度过高会影响蛋白质的消化吸收,不利于维持肠道微生态平衡。桑叶水提物对高脂饮食小鼠粪便异丁酸的影响如图 6 所示。

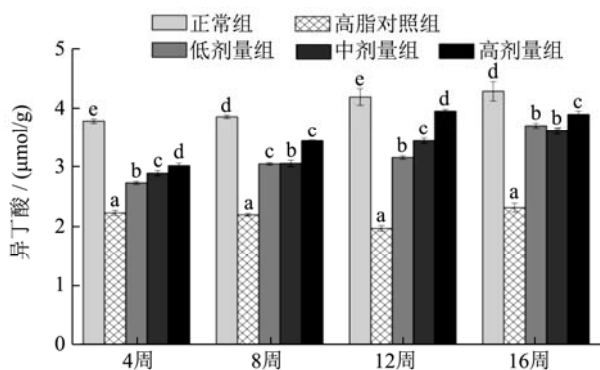


图 6 桑叶水提物对小鼠粪便异丁酸的影响

Fig.6 Effect of MWE on isobutyric acid in fecal of mice

由图 6 所知,正常组小鼠粪便异丁酸水平随喂饲时间延长呈上升趋势。高脂饮食可以降低粪便中异丁酸含量,与正常组相比,高脂对照组小鼠饲养到 16 周,粪便异丁酸降低 45.95% ( $p<0.05$ )。经桑叶水提物干预后,高脂饮食小鼠粪便异丁酸含量呈逐渐增加的趋势,有比较明显的时间效应与剂量效应。与高脂对照组相比,高剂量桑叶水提物组小鼠饲养 4 周和 16 周,粪便异丁酸水平分别升高 35.23%和 68.05% ( $p<0.05$ ),表明桑叶水提物有助于促进高脂饮食小鼠异丁酸的排出。

2.3.7 桑叶水提物对粪便异戊酸的影响

异戊酸属于支链脂肪酸(BCFAs),是氨基酸经氧化脱氨基和脱羧基后的产物<sup>[36]</sup>。桑叶水提物对高脂饮食小鼠粪便异戊酸含量的影响如图 7 所示。

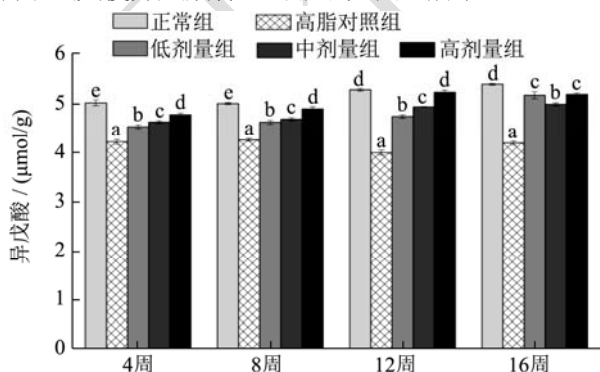


图 7 桑叶水提物对小鼠粪便异戊酸的影响

Fig.7 Effect of MWE on isovaleric acid in fecal of mice

由图 7 所知,正常组小鼠粪便异戊酸水平随喂饲时间的增加呈上升。高脂饮食可以降低小鼠粪便戊酸

水平,与正常组相比,小鼠喂饲高脂饲料 16 周,粪便异戊酸降低了 22.29% ( $p<0.05$ )。与高脂对照组相比,用高剂量桑叶水提物预 4 周和 16 周,小鼠粪便异戊酸水平分别升高了 13.26%和 23.78% ( $p<0.05$ ),表明桑叶水提物有助于促进高脂饮食小鼠异戊酸的排出。

2.4 桑叶水提物对高脂饮食小鼠粪便 pH 值的

影响

粪便 pH 值可作为肠道微生态平衡的指标。大量研究证明,腹泻患者体内肠道菌群失调并伴有粪便 pH 值上升<sup>[37]</sup>。桑叶水提物对高脂饮食小鼠粪便 pH 值的影响如图 8 所示。

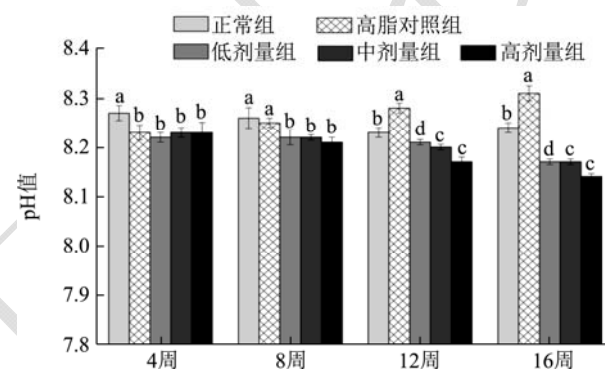


图 8 桑叶水提物对小鼠粪便 pH 值的影响

Fig.8 Effect of MWE on pH in fecal of mice

如图 8 所示,正常组小鼠粪便 pH 值在实验阶段基本保持稳定。与正常组相比,高脂对照组小鼠饲养 16 周,其粪便 pH 值上升 0.81% ( $p<0.05$ )。桑叶水提物喂饲高脂饮食小鼠到 8 周开始,可显著降低小鼠粪便的 pH 值,高剂量桑叶水提物喂饲到 8 周和 16 周时,小鼠粪便 pH 值分别降低 0.48%和 2.05% ( $p<0.05$ ),这与玉米油甾醇使酸性胆固醇排泄量极显著增加的结果一致<sup>[38]</sup>。

2.5 高脂饮食小鼠粪便 SCFAs 与血清胆固醇

TC 和动脉粥样硬化指数 (AI) 的相关性分析

SCFAs 是肠道菌群的代谢产物。AI 是综合反应血脂水平的指标。高脂饮食小鼠粪便中 SCFAs 与 TC 及 AI 的相关性分析结果如表 5 所示。

由表 5 可知,血清 TC、AI 分别与粪便中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸呈极显著负相关 ( $p<0.01$ ),即粪便中乙酸、丙酸等 SCFAs 增加,可使高脂饮食小鼠血清 TC 和 AI 值降低。以上结果表明桑叶水提物可以通过促进粪便中 SCFAs 的排出而降低血清 TC 和 AI,预防动脉粥样硬化。

表5 粪便 SCFAs 与血清 TC 和动脉粥样硬化指数的相关性

Fig 5 Correlation between short chain fatty acids with TC and AI distribution

相关系数	乙酸	丙酸	丁酸	异丁酸	戊酸	异戊酸
TC r	-0.97*	-0.96*	-0.92*	-0.85*	-0.91*	-0.78*
AI r	-0.96*	-0.93*	-0.87*	-0.93*	-0.94*	-0.90*

注:  $-1 < r < 1$ ,  $r$  为负值表示负相关,  $r$  为正值表示正相关,  $r=0$  表示零相关; \*表示  $p < 0.01$ 。

### 3 结论

3.1 饮食中摄入过多胆固醇是引发高胆固醇血症的主要原因, 可通过检测粪便中胆固醇和胆汁酸含量变化来判断体内胆固醇的代谢水平。研究表明, 燕麦蛋白能通过促进粪便中胆固醇和胆汁酸的排泄降低体内胆固醇水平<sup>[39]</sup>。在本研究中, 桑叶水提物可使高脂饮食小鼠粪便中胆固醇和胆汁酸含量显著升高, 表明桑叶水提物可能具有降低体内胆固醇水平的功效。

3.2 在试验周期内, 与正常组相比, 高脂饮食小鼠胆固醇水平显著提高; 经桑叶水提物干预后可使小鼠胆固醇含量进一步增加, 与 Huang 等<sup>[40]</sup>发现桑叶可促进小鼠胆固醇排出结果一致, 他们进一步发现桑叶干预后可显著降低肝脏及血清胆固醇含量, 表明桑叶可通过促进胆固醇排出而降低体内胆固醇水平。与我们的研究结果基本一致。研究表明, 具有降胆固醇作用的益生菌可通过将结合型胆酸盐降解为游离型胆酸盐并随粪便排出<sup>[41,42]</sup>, 推测肠道菌群参与了胆固醇排出体外的过程, 但具体机理有待进一步研究。

3.3 在试验周期内, 与正常组相比, 高脂对照组小鼠粪便中胆汁酸水平下降, 与梁婷婷等<sup>[43]</sup>研究发现高脂饮食小鼠粪便中胆汁酸含量显著低于植物蛋白干预组结果一致。研究证实多糖中葡聚糖<sup>[44]</sup>、壳聚糖<sup>[45]</sup>、半乳糖<sup>[32]</sup>等能与胆汁酸结合, 促进胆固醇转化为胆汁酸排出体外。在本实验中, 与高脂对照组相比, 桑叶水提物组小鼠粪便中胆汁酸排出显著增加并呈剂量依赖性, 可能与桑叶水提物中的一些活性成分如生物碱、多糖、黄酮等能与胆汁酸结合, 增加其排出量有关。有研究表明肠道微生物能够很大程度的影响胆汁酸的排泄<sup>[46]</sup>。Boulangue 等<sup>[47]</sup>研究发现肠道微生物能减少肠道胆汁酸重吸收, 使粪便胆汁酸排泄增加。梁婷婷等<sup>[43]</sup>的研究表明, 摄入植物蛋白能促进小鼠粪便中胆汁酸排泄, 排泄水平与双歧杆菌 (*Bifidobacteriaceae*)、疣微菌科 (*Ruminococcaceae*) 等有益菌呈显著正相关。推测桑叶水提物促进胆汁酸排出可能与其对肠道菌群的调节作用有关, 但具体作用机制有待深入研究。

3.4 SCFAs 在胆固醇代谢中具有重要作用。因此, 维持 SCFAs 在体内的正常水平对胆固醇代谢至关重要。丙酸、乙酸和丁酸等均可在肠道内被吸收, 作为能量

底物参与代谢; 但过多的能量摄入容易引起机体代谢失衡, 导致脂肪的累积和肥胖等代谢疾病的发生<sup>[34]</sup>。

本实验结果表明, 桑叶水提物干预可促进体内 SCFAs 排出, 使其接近正常组水平。Giorgio 等<sup>[48]</sup>研究榛果对原发性高脂血症的改善作用时得到相似结果, 他们发现饮食榛果的患者体内胆固醇水平显著降低, 表明榛果可通过促进粪便 SCFAs 排出达到降低体内胆固醇的功效。出现以上结果还可能与高脂饮食改变了肠道微生态有关。研究表明, 高脂血症患者体内产 SCFAs 的菌数量减少, 而大肠杆菌等有害菌明显增加<sup>[49]</sup>。李丽<sup>[50]</sup>发现乳杆菌能够通过调节肠道菌群结构, 使产 SCFAs 菌比例增加, 经乳杆菌干预后高脂小鼠粪便 SCFAs 含量增多, 体内胆固醇水平下降。这为探索桑叶水提物是否通过调节肠道微生态, 从而缓解高脂饮食引起的高胆固醇血症提供了参考。

3.5 通过本次研究发现, 桑叶水提物可以促进高脂饮食小鼠粪便中胆固醇、胆汁酸、SCFAs 排出。研究表明胆汁酸和 SCFAs 是肠道菌群的主要代谢产物, 将对桑叶水提物是如何通过改变肠道微生态来达到降低血清胆固醇的相关机理将做进一步研究, 为开发桑叶降脂保健产品提供了理论依据。

### 参考文献

- [1] 杨瑞丽. 高脂氧化应激对生长抑素分泌及肠、肝基因表达的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2008  
YANG Rui-li. Effects of high-fat oxidative stress on somatostatin secretion and intestinal and liver gene expression [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008
- [2] Davis J H, Zhu L J, Hoos L M, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(32): 33586-33592
- [3] Chu S M, Shih W T, Yang Y H, et al. Use of traditional Chinese medicine in patients with hyperlipidemia: A population-based study in Taiwan [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 168: 129-135
- [4] Wang K, Cao P, Shui W, et al. Angelica sinensis polysaccharide regulates glucose and lipid metabolism

- disorder in prediabetic and streptozotocin-induced diabetic mice through the elevation of glycogen levels and reduction of inflammatory factors [J]. *Food & Function*, 2015, 6(3): 902-909
- [5] Zhang J, Zhang W, Mamadouba B, et al. A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(4): 504-508
- [6] 高欣妍,王海英,刘志明.桑叶化学成分及药用功效研究进展[J].*广东化工*,2017,44(6):82-83  
GAO Xin-yan, WANG Hai-ying, LIU Zhi-ming. Research progress on chemical constituents and medicinal effects of mulberry leaves [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2017, 44(6): 82-83
- [7] 贺胜,周杏子,何海,等.桑叶生物碱类成分研究概况[J].*中国实验方剂学杂志*,2015,13:222-226  
HE Sheng, ZHOU Xing-zi, HE Hai, et al. Survey of alkaloids in mulberry leaves [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2015, 13: 222-226
- [8] 张宇思,周昊,颜新培,等.桑叶多酚的研究进展[J].*中国野生植物资源*,2015,5:35-37  
ZHANG Yu-si, ZHOU Hao, YAN Xin-pei, et al. Research progress of polyphenols in mulberry leaves [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2015, 5: 35-37
- [9] Wilson R D, Islam M S. Effects of white mulberry (*Morus alba*) leaf tea investigated in a type 2 diabetes model of rats [J]. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2015, 72(1): 153-160
- [10] Zhang Y, Ren C, Lu G, et al. Anti-diabetic effect of mulberry leaf polysaccharide by inhibiting pancreatic islet cell apoptosis and ameliorating insulin secretory capacity in diabetic rats [J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 22(1): 248-257
- [11] Chan K C, Yang M Y, Lin M C, et al. Mulberry leaf extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and in cultured aortic vascular smooth muscle cells [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(11): 2780-2788
- [12] Do H J, Chung J H, Hwang J W, et al. 1-Deoxynojirimycin isolated from *Bacillus subtilis* improves hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in high-fat-fed mice [J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2015, 75: 1-7
- [13] 李勇,苗敬芝.桑叶的功能性成分及保健制品的开发[J].*中国食物与营养*,1999,3:25  
LI Yong, MIAO Jing-zhi. Functional components of mulberry leaves and development of health products [J]. *Chinese Journal of Food and Nutrition*, 1999, 3: 25
- [14] 杨夏,冯颖淑,童珊珊,等.降血脂多糖活性机理及构效关系研究进展[J].*中国中药杂志*,2018,1-7  
YANG Xia, FENG Ying-shu, TONG Shan-shan, et al. Active lipid-lowering mechanism and structure-activity relationship of polysaccharides progress [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 1-7
- [15] Resta S C. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: Implications for nutrient handling [J]. *Journal of Physiology*, 2010, 587(17): 4169-4174
- [16] Goffredo M, Mass K, Parks E J, et al. Role of gut microbiota and short chain fatty acids in modulating energy harvest and fat partitioning in youth [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2016, 101(11): jc20161797
- [17] Morita T, Kasaoka S, Ohhashi A, et al. Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch [J]. *Journal of Nutrition*, 1998, 128(7): 1156-1164
- [18] arcia A, Olmo B, Lopez-Gonzalvez A, et al. Capillary electrophoresis for short chainorganicacids in faeces reference values in a mediterraneanelderly population [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(2): 356-361
- [19] Brown J M, Hazen S L. The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases [J]. *Annual Review of Medicine*, 2014, 66(1): 343-359
- [20] Ikuo Kimura, Kentaro Ozawa, Daisuke Inoue, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43 [J]. *Nature Communications*, 2013, 4(11): 1829
- [21] Goncalves D. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits [J]. *Cell*, 2014, 156(1-2): 84-96
- [22] Ting X U, Liu L, Zhang J D, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2014
- [23] Larkin T A, Astheimer L B, Price W E. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects [J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 63(2): 238-245
- [24] 刘倩,陈成,辛鑫,等.短链脂肪酸对高脂饮食诱导肥胖小鼠糖脂代谢紊乱的影响[J].*肝脏*,2018,7:591-595  
LIU Qian, CHEN Cheng, XIN Xin, et al. Effects of short-chain fatty acids on glucose and lipid metabolism disorders in obese mice induced by high-fat diet [J]. *Journal of Lice*, 2018, 7: 591-595



- [25] Afrose S, Hossain M S, Maki T, et al. Karaya root saponin exerts a hypocholesterolemic response in rats fed a high-cholesterol diet [J]. *Nutrition Research*, 2009, 29(5): 350-354
- [26] Yu C H, Dai X Y, Chen Q, et al. Hypolipidemic and antioxidant activities of polysaccharides from *Rosae laevigatae* Fructus, in rats [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94(1): 56-62
- [27] Brown K C, Witte T R, Hardman W E, et al. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models *via* the E2F pathway [M]. *Biochemistry and Microbiology*, 2010
- [28] Peng J, Lia Y J. The vanilloid receptor TRPV1: Role in cardiovascular and gastrointestinal protection [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 627(1): 1-7
- [29] 贾益群,叶福媛,王双,等.生物样品中短链脂肪酸的快速提取与分析方法[J].*实验室研究与探索*,2012,31(7):262-264  
JIA Yi-qun, YE Fu-yuan, WANG Shuang, et al. Rapid extraction and analysis of short-chain fatty acids in biological samples [J]. *Laboratory Research and Exploration*, 2012, 31(7): 262-264
- [30] Davis J H, Zhu L J, Hoos L M, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(32): 33586-33592
- [31] Weingarden A R, Chen C, Bobr A, et al. Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology*, 2014, 306(4): G310
- [32] Sathivel A, Srinivasan P, Devaki T. Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of  $\alpha$ -Galactosamine induced hepatitis in rats [J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2008, 46(10): 3262-3267
- [33] 王子花,申瑞玲,李文全.短链脂肪酸的产生及作用[J].*畜牧兽医科技信息*,2007,2:12-13
- [34] Kamada N, Seo S U, Chen G Y, et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(5): 321-335
- [35] 赵晓亚,江振作,王跃飞.人的粪便、血浆、唾液、呼出气体中短链脂肪酸的分析[J].*中国微生态学杂志*,2015,27(2): 130-134  
ZHAO Xiao-ya, JIANG Zhen-zuo, WANG Yue-fei. Analysis of short-chain fatty acids in human feces, plasma, saliva and exhaled gases [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2015, 27(2): 130-134
- [36] 沈冰蕾,苗树君,王长远.支链脂肪酸对反刍动物消化代谢和生产性能的影响[J].*草食家畜*,2003,3:50-52  
SHEN Bing-lei, MIAO Shu-jun, WANG Chang-yuan. Tree seedlings king, the king of the long branched fatty acid metabolism and digestion performance of ruminants [J]. *Herbivore*, 2003, 3: 50-52
- [37] 廖卫,张敏,孙政敏,等.新鲜粪便pH和涂片检查小儿肠道菌群失调[J].*中国微生态学杂志*,2007,19(1):72-73  
LIAO Wei, ZHANG Min, SUN Zheng-min, et al. Fresh stool pH and smear examination of intestinal flora imbalance in children [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2007, 19(1): 72-73
- [38] 王铁菲.玉米油甾醇对高脂高胆固醇膳食仓鼠胆固醇代谢调控及肠道菌群的影响[D].天津:天津科技大学,2016  
WANG Yi-fei. Effects of corn sterol on cholesterol metabolism and intestinal flora in high-fat and high-cholesterol diet hamsters [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016
- [39] Tong L T, Guo L, Zhou X, et al. Effects of dietary oat proteins on cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2016, 96(4): 1396-1401
- [40] Huang J, Wang Y, Ying C, et al. Effects of mulberry leaf on experimental hyperlipidemia rats induced by high-fat diet [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2018, 16(2):547-556
- [41] Rababah T M, Awaisheh S S, Al-Tamimi H J, et al. The hypocholesterolemic and hormone modulation effects of isoflavones alone or co-fermented with probiotic bacteria in hypercholesterolemic rats model [J]. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 2015, 66(5): 546-552
- [42] Nido S A, Shituleni S A, Mengistu B M, et al. Effects of selenium-enriched probiotics on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in mice fed a high-fat diet [J]. *Biological Trace Element Research*, 2016, 171(2): 399-409
- [43] 梁婷婷.基于肠道微生态改善的植物蛋白脂质代谢调节机制[D].西安:陕西科技大学,2018  
LIANG Ting-ting. Regulation mechanism of plant protein lipid metabolism based on intestinal microecology improvement [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2018

现代食品科技