

黑米花青素对食源性肥胖小鼠脂代谢紊乱及肠道菌群的影响

王蕾, 孙汉巨*, 刘淑芸, 高玲艳, 顾荣莹

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230000)

摘要: 该研究以黑米花青素提取物 (BRE) 为研究对象, 研究其对高脂膳食小鼠的脂代谢及肠道菌群的调节作用。通过开展动物实验, 分别将茶多酚和低、中及高剂量黑米花青素加入高脂饲料中喂养小鼠, 试验周期为 8 周。通过检测小鼠血清中总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL) 及高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 的含量, 结合肝脏基因转录组测序探究黑米花青素改善脂代谢的途径。最后对小鼠盲肠内容物进行 16S 测序, 分析菌群组成及丰度变化。研究发现, 与高脂膳食组相比, 高剂量黑米花青素组血清中 TG、LDL 及 TC 水平分别降低了 42.33%、22.28% 和 11.13%, HDL 则提高了 30.86%。黑米花青素干预对高脂膳食饲喂小鼠肝脏脂代谢相关基因的 mRNA 表达水平也有较显著的影响。此外, 罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*)、毛茛菌属 (*Muribaculaceae*) 和苏黎世杆菌 (*Turicibacter*) 的相对丰度分别降低了 56.40%、64.29% 和 53.53%。而阿克曼氏菌属 (*Akkermansia*)、瘤胃球菌科 (*Rumefaciens*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 等菌的相对丰度分别增加了 53.29%、51.87% 和 23.80%。该研究为黑米花青素改善高血脂症等代谢疾病提供了重要依据。

关键词: 黑米; 花青素; 脂代谢; 肥胖; 高脂膳食

文章编号: 1673-9078(2023)12-1-10

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.0559

Effect of Black Rice Anthocyanins on Lipid Metabolism Disorders and Intestinal Flora in Food-derived Obese Mice

WANG Lei, SUN Hanju*, LIU Shuyun, GAO Lingyan, GU Yingying

(School of Food and Bioengineering, Hefei University of Technology, Hefei 230000, China)

Abstract: The effects of black rice anthocyanin extract (BRE) on the regulation of lipid metabolism and intestinal flora in mice fed a high-fat diet were investigated. In animal experiments, tea polyphenols and low, medium, and high doses of black rice anthocyanin were added to high-fat diets and fed to mice for 8 weeks. Serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL), and high-density lipoprotein (HDL) levels were measured in the mice, and hepatic gene transcriptome sequencing was used to investigate the mechanisms through which black rice anthocyanin improved lipid metabolism. Finally, 16S sequencing of mouse cecum contents was performed to examine the changes in composition and abundance of intestinal flora. It was found that the serum TG, LDL, and TC levels were reduced by 42.33%, 22.28%, and 11.13%, respectively, whereas HDL levels increased by 30.86% in the high-dose black rice anthocyanin group compared to the high-fat diet group. Black rice anthocyanin intervention also had a significant effect on the mRNA expression levels of genes associated with hepatic lipid metabolism in high-fat diet-fed mice. In addition, the relative abundance of *Romboutsia*, *Muribaculaceae*, and *Turicibacter* was reduced by 56.40%, 64.29%, and 53.53%, respectively. In contrast, the relative abundance of bacteria such as *Akkermansia*, *Rumefaciens*, and *Lactobacillus* increased. This study establishes a crucial foundation for understanding the potential of black rice anthocyanins

引文格式:

王蕾,孙汉巨,刘淑芸,等.黑米花青素对食源性肥胖小鼠脂代谢紊乱及肠道菌群的影响[J].现代食品科技,2023,39(12):1-10

WANG Lei, SUN Hanju, LIU Shuyun, et al. Effect of black rice anthocyanins on lipid metabolism disorders and intestinal flora in food-derived obese mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 1-10

收稿日期: 2023-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771974)

作者简介: 王蕾 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 1562177205@qq.com

通讯作者: 孙汉巨 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品综合利用, E-mail: sunhanju@163.com

in ameliorating metabolic diseases such as hyperlipidemia.

Key words: black rice; anthocyanins; lipid metabolism; obesity; high-fat diet

作为一种全球性的流行病,肥胖与健康并发症的风险增加有关,包括高脂血症、2型糖尿病、心血管疾病和某些癌症^[1]。流行病学证据表明,高脂肪饮食(HFD)会促进肥胖和相关代谢紊乱的发展,并且饮食中的脂肪含量与肥胖程度之间存在直接关系^[2]。

脂代谢与肥胖症关系密切,脂代谢紊乱是其发病机制之一。脂代谢紊乱会引起诸如肥胖、高脂血症、非酒精性脂肪肝等多种疾病^[3]。而肥胖症自身又可导致脂类代谢紊乱,从而形成一种恶性循环。此外,肥胖会导致参与脂质代谢的酶和激素的异常表达。肥胖患者脂肪组织中的脂肪酸水解酶及对激素敏感性的脂肪酯酶活力下降,使脂肪组织中的脂肪分解能力下降^[4]。肥胖会造成脂肪细胞激素分泌异常,血浆中甘油三酯和胆固醇的水平升高,脂蛋白代谢异常,从而使脂质转运异常的激素(如瘦素、脂联素等)的水平降低,导致脂代谢异常^[5]。脂代谢异常还与诱导游离脂肪酸的释放有关,游离脂肪酸释放会增加空腹血浆TAG浓度,降低高密度脂蛋白和胆固醇,并改变低密度脂蛋白^[6]。天然植物提取物由于其各种生物活性和无副作用,已被证明在预防和临床管理肥胖及其合并症方面是安全有效的^[7]。

花青素是一类广泛存在于水果和蔬菜中的水溶性黄酮类化合物,通常母体以2-苯基苯并吡喃阳离子的形式呈现,稳定性较差^[8]。花青素具有多种生物活性,如抗氧化性、抗炎、抑菌性、抗肿瘤等^[9,10]。近年来花青素被确定为脂质代谢的调节剂,是降低代谢综合征风险的潜在候选者^[11]。大部分花青素不能在上消化道被吸收,从而到达大肠,在那里它们被肠道微生物群生物转化为其代谢物,然后被吸收^[12]。花青素也被认为是具有益生元活性的物质。它们可促进益生菌的生长,抑制有害细菌的生长,改善肠道微生态^[13]。有充分证据表明,肠道菌群在维持能量平衡和正常物质代谢的过程中也发挥着重要作用^[14]。因此,也有学者认为肠道菌群不仅与脂代谢有密切关系,也和肥胖的发生有潜在联系。目前已有研究比较了超重和体脂偏低个体的拟杆菌门和厚壁菌门的丰度^[15],结果表明超重受试者和体脂偏低受试者之间肠道微生物群有显著差异,与超重组相比,体脂偏低个体的长双歧杆菌和厚壁菌门丰度更高。厚壁菌门与拟杆菌门的比例越增加,肥胖发生的机率越大。有研究表明黑加仑花青素缓解了HFD诱导的肥胖、高脂血症和脂肪肝变性。此外,黑加仑花青素补充剂通过调节与脂质和胆固醇

的合成和降解相关的基因的表达来改善肝脂代谢。微生物分析表明,补充黑加仑花青素显著改变了肠道微生物群的整体结构和组成^[16]。因此花青素可能通过影响肠道菌群的组成来调节脂质代谢。本研究旨在研究黑米花青素(BRE)对HFD喂养小鼠脂代谢紊乱的调节机制及肠道菌群组成的影响。

1 材料与方法

1.1 原料

黑米花青素粗提物(矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的质量分数>35%),购于天津康友生物有限公司。茶多酚购于山东思扬生物科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

全波长扫描酶标仪,美国 Thermo 公司;高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;数显恒温水浴锅,金坛市荣华仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黑米花青素的鉴定

黑米提取物中花青素的鉴定采用安捷伦 1260 UPLC 系统(安捷伦,美国)和 LC-ESI-MS/MS 电喷雾电离串联质谱(安捷伦,美国)进行鉴定。二极管阵列检测器为 520 nm。花青素使用 Agilent Eclipse Plus C18 (2.1 mm×50 mm) 分离,流速为 0.2 mL/min。流动相由 A(水:甲酸=90:10, V/V) 和 B(乙腈) 组成。0~5 min, 95%~90% A; 5~10 min, 90% A; 10~17 min, 90%~76% A; 17~27 min, 76%~10% A; 27~30 min, 10% A; 30~35 min, 10%~95% A; 35~40 min, 95% A。质量分析在 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统进行,扫描间隔为 200~1 000 *m/z*。温度为 310 °C, N₂ 流速为 11.0 psi。毛细管电压为 4 kV,干燥气体流速为 5 L/min。数据用 Agilent MassHunter 软件进行处理。

1.3.2 动物实验设计

雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只,6 周龄,平均质量为 (19.34±0.84) g,自由饮食饮水 1 周后随机分为五组,每组 10 只。五组分别命名为高脂膳食组(HFD)、低剂量 BRE 处理组(LBRE)、中剂量 BRE 组(MBRE)、高剂量 BRE 组(HBRE)及阳性对照茶多酚组(TP),每组 10 只。高脂饲料由质量分数为 34.89%脂肪、26.23%蛋白质、31.50%碳水化合物、5.81%矿物质、1.57%的

维生素组成(每 100 g 饲料中能量为 2 192.42 kJ)。低、中、高剂量黑米花青素组小鼠分别喂食含有 200、400 及 600 mg/kg 黑米花青素的高脂膳食。阳性对照茶多酚组小鼠给予含有 240 mg/kg 茶多酚(质量分数>90%)的高脂膳食。总试验周期 8 周,并将体质量变化每周记录在册。

1.3.3 血清生化指标检测

将小鼠禁食 12 h, CO₂ 窒息后立即从眼眶取血并收集。将取得的血液迅速在 4 000 r/min、4 °C 条件下离心 15 min, 分离出上层血清, 4 °C 下保存。通过使用全自动生化分析仪测定各组小鼠血清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平^[17]。

1.3.4 肝脏组织病理形态观察

用灭菌后的工具剪取肝脏组织,经质量分数 4% 多聚甲醛溶液进行浸泡固定,再依次进行包埋、切片、脱蜡、HE 染色等操作,完成肝脏组织切片的制作,在 400 倍光学显微镜下进行观察并拍照记录^[18]。

1.3.5 肝脏组织中脂代谢相关基因表达水平分析

取新鲜的小鼠肝脏组织,用消毒后的刀片将肝脏组织切割成绿豆大小,所切组织块的长宽高≤0.5 cm,然后用预冷的 RNase-free 水快速冲洗肝脏组织^[19]。将处理后的肝脏组织迅速放入 RNase-free 的螺旋冻存管中并标记,全部操作过程在冰浴下进行。将螺旋管置于液氮迅速冷却 1 h 后,于-80 °C 保存,避免反复冻融。本研究样品送至苏州帕诺米克生物医药科技有限公司作宏基因组分析。通过分析各组小鼠肝脏脂代谢相关基因的 mRNA 表达水平,并以此为依据推测黑米花青素改善高脂膳食饲喂小鼠脂代谢紊乱的途径^[20,21]。

1.3.6 肠道内容物肠道菌群差异性分析

将各组小鼠麻醉后处死,分别取小鼠肠道内容物 2 g 并标记,即将将样品放入冻存管中,液氮冷冻 1 h 后,放入-80 °C 保存,在干冰保存条件下寄送至苏州帕诺米克生物医药科技有限公司。处死小鼠后取出盲肠,在超净台中用干净的镊子取盲肠内容物于 1.5 mL 管中,密封后迅速放入液氮中冻存。并从中提取细菌 DNA,将 DNA 样品在 Illumina 平台上进行扩增、纯化和测序。对测序后得到的原始数据进行过滤筛选,确认其有效性和准确性后再进行分析^[22]。将各组小鼠肠道菌群进行对比,筛选出差异菌群。最后总结分析黑米花青素对小鼠肠道菌群的丰度、结构、功能等产生的影响。

(1) OTU 分析

使用 QIIME2 软件,将相似性大于 97% 的序列进

行 OTU 聚类分析,再通过 RDP 数据库(Release 11.1 <http://rdp.cme.msu.edu/>)注释。

(2) 组间相似性分析

基于主坐标分析(PCoA)评估组间物种的 β-多样性及肠道微生物差异性。

(3) 肠道群落组成分析

通过 QIIME 2 软件,对肠道微生物进行物种分类学注释,并在门、属水平上进行分析,明确黑米花青素对高脂膳食小鼠肠道微生物组成和结构的影响。

1.3.7 肠道内容物短链脂肪酸含量检测

取禁食 12 h 后的小鼠粪便 200 mg 于 5 mL 离心管中,加入 2 mL 磷酸充分混匀。再将样本在 4 °C、10 000 r/min 下离心 15 min,吸取 0.3 mL 上清液移入离心管中,加入 0.1 mL 质量分数为 50% 的 H₂SO₄ 和 0.8 mL 内标 2-乙基丁酸,涡旋振荡 10 min 后离心 15 min (4 °C, 10 000 r/min)。最后,将上清液转移至-20 °C 保存,以备后续检测^[23]。Agilent 7890 气相色谱质谱联用仪配备 Agilent HP-5 毛细管柱(30 m×0.25 mm ID×0.25 μm)检测样品中短链脂肪酸含量。进样口温度为 220 °C,溶剂延迟 6 min,进样量 1 μL,离子源温度 230 °C,传输线温度 280 °C;程序升温起始温度 80 °C,保持 1 min,然后以 40 °C/min 的速率升温至 100 °C,保持 5 min,再以 20 °C/min 的速率升温至 210 °C,保持 30 min;载气为氦气,载气流速 1.0 mL/min。质谱条件:电子撞击模式,电子能量为 70 eV。小鼠粪便中短链脂肪酸含量通过公式 1 计算。

$$C_{con} = \frac{C_s \times V_1 \times V_3}{M \times V_2} \times 1000 \quad (1)$$

式中:

C_{con} ——样本中目标化合物的含量, mg/kg;

C_s ——提取液中目标物质量浓度, mg/L;

V_1 ——加入内标溶液体积, mL;

V_2 ——取出纯水上清液体积, mL;

V_3 ——加入纯水体积, mL;

M ——称样量, mg。

1.3.8 数据分析

使用 Origin Pro 2021 软件对取得数据进行作图,实验重复至少 3 次,数值以平均值±SD 表示。当 $P<0.05$ 时为显著, $P<0.01$ 为极显著。

2 结果与讨论

2.1 黑米提取物中花青素的组成

如图 1 所示,黑米提取物中花青素所占比例为

88.24%，共有 5 个峰，其中峰 2 为主要花青素单体。然后，通过 HPLC-ESI-MS/MS 对各峰进行表征，花青素的质谱和化学结构如图 2 所示。

如图 2a 所示，峰 1 在 m/z 611 处有一个分子离子 $[M]^+$ ，在 m/z 287 处有一个片段离子。由于花青素-3,5-二葡萄糖苷的理论数据为 m/z 611，分子离子损失 162 个，表明在峰的结构中存在葡萄糖部分，峰 1 的 m/z 数据 (m/z 611) 为矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷。如图 2b 所示，观察到 m/z 449 处的分子离子 $[M]^+$ ，并且分子离子可以在 m/z 287 处碎裂成一个离子 $[M-162]^+$ ，表明一个葡萄糖部分的损失。因此，峰 2 为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷。在 m/z 595 处存在分子离子 $[M]^+$ ，在 m/z 287 $[M-308]$ 处显示初级碎片离子⁺，对应一个芸香苷部分的分子离子损失。因此，峰 3 (图 2c) 可以鉴定为矢车菊素-3-O-芸香糖苷。由于 m/z 463 的分子离子和 m/z 301 $[M-162]^+$ 的分子离子的特征碎裂模式，峰 4 中 (图 2d) 成分为芍药素-3-O-葡萄糖苷。峰 5 的 MS 图谱 (图 2e) 在 m/z 609 处存在分子离子 $[M]^+$ ，在 m/z 301 $[M-308]$ 处显示初级碎片离子，对应一个芸香苷部分的分子离子损失。因此，峰 5 为芍药素-3-O-芸香糖苷。

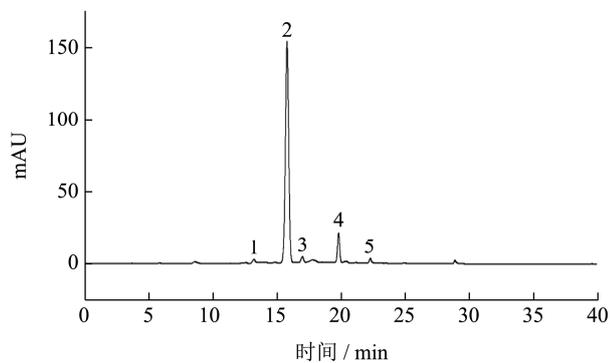


图 1 黑米提取物在 520 nm 处的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of the black rice extract detected at 520 nm

注:峰 1 为矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷;峰 2 为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷;峰 3 为矢车菊素 3-O-芸香糖苷;峰 4 为芍药素-3-O-葡萄糖苷;峰 5 为芍药素-3-O-芸香糖苷。

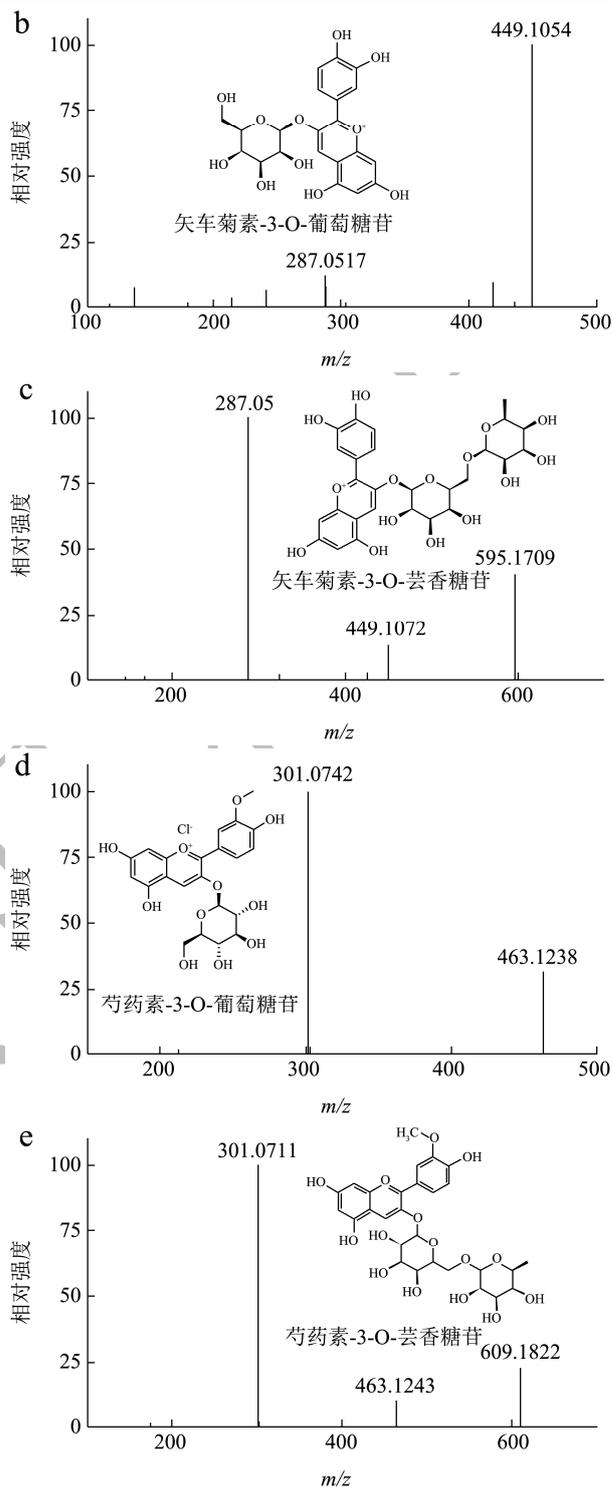
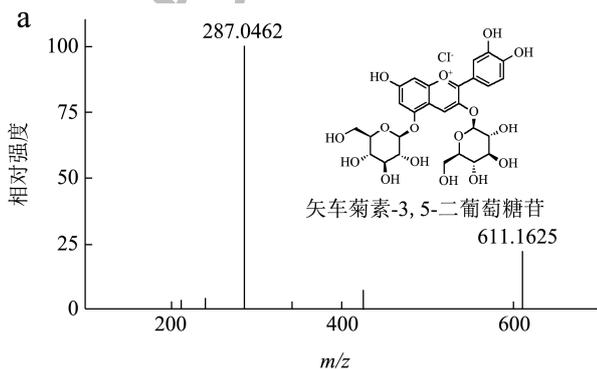


图 2 黑米提取物在 520 nm 处的质谱图

Fig.2 Mass spectrum of black rice extract at 520 nm

注: a 为矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷; b 为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; c 为矢车菊素 3-O-芸香糖苷; d 为芍药素-3-O-葡萄糖苷; e 为芍药素-3-O-芸香糖苷。

2.2 黑米花青素对高脂小鼠体质量的影响

小鼠每周体质量变化随时间增长逐渐增大，符合小鼠生长发育的一般规律。8 周试验周期结束后，HFD

组小鼠平均体质量为 28.24 g, LBRE、MBRE 及 HBRE 组小鼠平均体质量分别为 26.22、25.94 及 24.72 g。而阳性对照组 (TP 组) 小鼠体质量为 25.23 g (图 3)。显然, 与 HFD 组相比, 黑米花青素和茶多酚干预后的小鼠体质量显著降低, 且具有剂量效应。随着黑米花青素的添加量越多, 体质量降低的趋势也越显著。

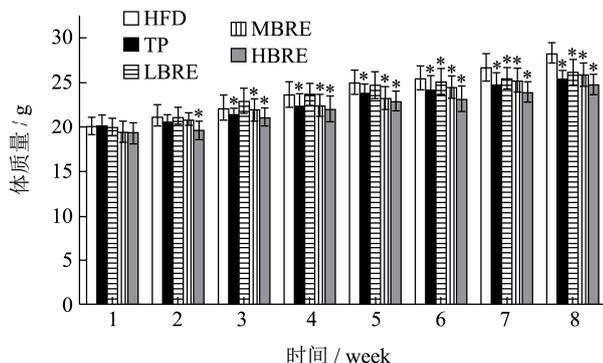


图 3 黑米花青素对小鼠体质量增长的影响

Fig.3 Effect of black rice anthocyanins on body weight gain in mice

注: * $P < 0.05$, 与 HFD 组比较。

2.3 黑米花青素对高脂小鼠血清生化指标的影响

当 TP 及不同剂量黑米花青素干预 8 周后, 五组小鼠血脂水平发生不同变化。采用生化分析仪对小鼠血清中总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 和甘油三酯 (TG) 的含量进行检测, 结果如图 4 所示。与 HFD 组相比, HBRE 组血清 TG、TC 和 LDL 水平显著降低, 与阳性对照组 (TP 组) 变化趋势相似。

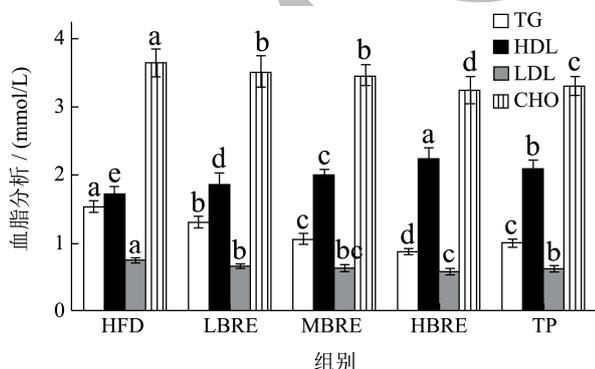


图 4 黑米花青素对小鼠血脂异常的影响

Fig.4 Effect of black rice anthocyanin on dyslipidemia in mice

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

如图 4 所示, HFD 喂养小鼠的 TG、TC、LDL-C 水平显著高于其他组 ($P < 0.05$), 而添加黑米花青素显著降低了上述升高参数的水平。与 HFD 组相比,

LBRE 组的 TG、LDL 及 TC 水平分别降低了 14.30%、12.75% 及 3.73%, 而 HDL 水平则提高了 16.28%。HBRE 组血清中 TG、LDL 及 TC 水平分别降低了 42.33%、22.28% 及 11.13%, 而 HDL 水平则提高了 30.86%。这表明高剂量的黑米花青素干预降血脂效果更显著。结果表明, 与 TP 效果相似, 黑米花青素能够有效降低 HFD 小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 水平, 增加血清 HDL-C 水平, 其降脂作用明显, 并呈量效关系。

2.4 黑米花青素对高脂小鼠肝脏组织形态的影响

小鼠肝脏组织的病理学变化如图 5 所示。HFD 组小鼠肝脏有明显的脂肪泡, 部分细胞形态出现肿大, 并伴有炎性浸润。不同剂量黑米花青素组不同程度的改善了肝脏组织的病理学结构变化, 随着黑米花青素剂量的增加, 改善作用越大。与 HFD 组相比, HBRE 及 TP 组的小鼠肝组织细胞结构完整、清晰、没有明显变性, 以中央静脉为中心, 周围呈放射状分布, 肝小叶结构正常。研究发现, 黑米花青素对高脂饲料诱导的小鼠肝内脂质沉积有明显的抑制作用, 且在 8 周内, BRE 对高脂饲料诱导的小鼠肝内脂肪的含量明显降低, 炎症细胞的浸润减少。经不同剂量黑米花青素干预 8 周, 肝组织细胞界限更加清楚, 无明显退行性改变, 脂肪空泡减少。这些现象不仅表明黑米花青素可以有效预防高脂膳食小鼠肝脏中脂质沉积, 同时可以缓解小鼠肝脏组织炎症。

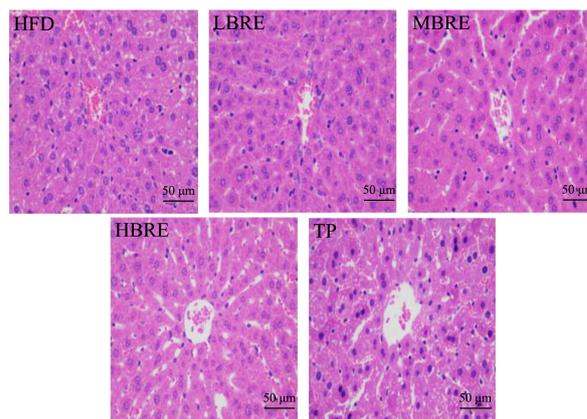


图 5 BRE 及 TP 摄入对小鼠肝脏的影响

Fig.5 The effects of BRE and TP intake on mouse liver

2.5 肝脏中基因表达差异分析

在图 6 中, 以 $FC \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准筛选显著差异表达基因。显著差异的基因中上调基因被显示为红色, 下调基因则为蓝色。由图 6 可知, 通过 LBRE/HFD 比较, 发现了 422 个上调和 225 个下调的

显著差异表达基因。而 MBRE 组与 HFD 组相比,发现 419 个上调基因, 286 个基因显著下调。而 HBRE 组中显著差异基因中上调了 770 个, 下调了 296 个。与 HFD 组相比, TP 组中被上调的显著差异基因数目

为 504 个, 下调的基因为 322 个。随着黑米花青素剂量增大, 显著差异基因中上调和下调的基因数目也增多, 这表明摄入黑米花青素对高脂膳食小鼠的基因转录图谱产生了较大影响, 且与剂量呈现正相关的关系。

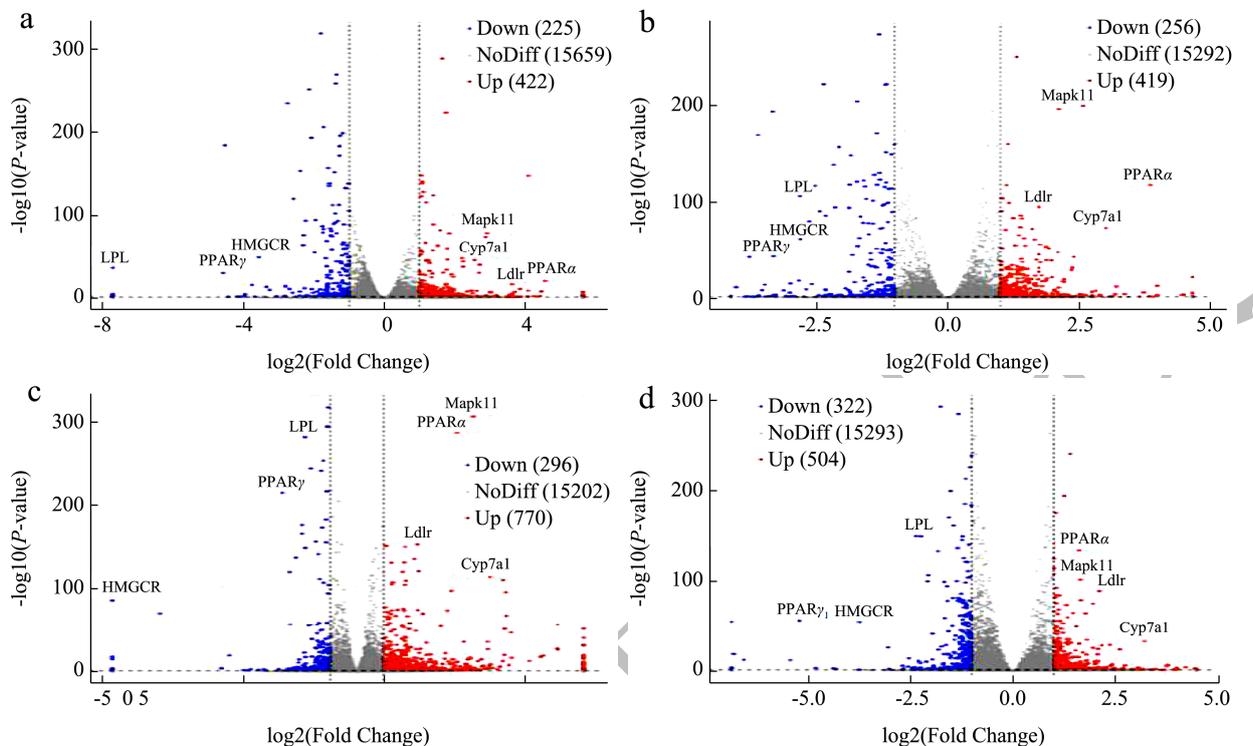


图 6 不同剂量黑米花青素对 HFD 小鼠肝脏的显著差异基因的影响

Fig.6 The effect of different doses of black rice anthocyanins on significantly different genes in the liver of HFD mice

注: a: LBRE 和 HFD; b: MBRE 和 HFD; c: HBRE 和 HFD; d: TP 和 HFD。

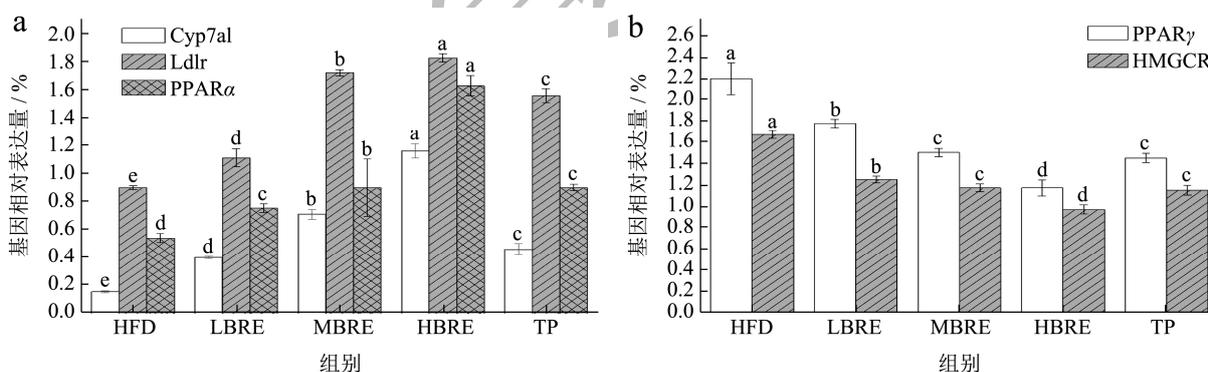


图 7 BRE 对高脂膳食饲喂小鼠肝脏脂代谢相关 mRNA 表达水平的影响

Fig.7 Effect of BRE on the expression levels of mRNA related to liver lipid metabolism in high-fat diet-fed mice

注: a: 上调基因; b: 下调基因。不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.6 黑米花青素对高脂小鼠肝脏脂代谢相关基因表达的影响

肝脏是代谢过程的主要场所, 如脂质的合成、组装、重塑和分解。因此, 肝脏是研究肥胖模型的一个重要目标。人体胆固醇的主要来源是甲羟戊酸的生物合成。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (*HMGCR*)

作为从头合成胆固醇的限速酶, 同时也是内源性胆固醇合成的关键调节酶^[24]。*Cyp7a1* 可以催化胆固醇向胆汁酸生物转化, 促进体内胆固醇的分解代谢^[25]。*Ldlr* 是 LDL-c 的受体, 参与胆固醇从血浆到细胞质的转运与胆固醇的分解过程^[26]。*PPARs* 是一类过氧化物酶体增殖激活受体, 包括三种亚型: *PPARα*、*PPARβ/δ* 和 *PPARγ*^[27]。其中, *PPARγ* 参与脂肪生成、能量平衡和脂质生物合成等脂代谢途径。已有研究表明, *PPAR-γ*

失调与肥胖、2 型糖尿病、动脉粥样硬化和其他疾病的发展有关，而 *PPAR γ* 表达下调已被证明具有抗肥胖作用^[28]。由图 7 可知，BRE 干预对高脂膳食饲喂小鼠肝脏脂代谢相关基因的 mRNA 表达水平有较显著的影响，与 HFD 组相比，*PPAR γ* 、*HMGCR* 的表达量分别下调了 46.82%和 41.92%，*Cyp7a1*、*Ldlr*、*PPAR α* 的表达量分别上调了 189.41%、102.42%和 197.80%。说明黑米花青素可减少机体因高脂膳食机体肝脏胆固醇的合成，降低脂肪酸从头合成速率。这表明黑米花青素可能会减少高脂肪饮食诱导的肝脏内大量胆固醇的合成，并减少脂肪酸的从头合成。

2.7 黑米花青素对高脂小鼠肠道菌群的影响

2.7.1 OTU 分析

基于 OTU 绘制韦恩图，统计多组样品中所共有和独有的 OTU 数目^[29]，比较各组小鼠间肠道菌群的 OTU 数目组成相似性及特异性差异，结果如图 8 所示。通过 Venn 图分析了高脂组、低中高剂量黑米花青素组和茶多酚组五组间共有和独有的 OTU 数目。五组小鼠盲肠内容物样品中总 OTU 数目为 10 033 个，共有的 OTU 数目为 136 个，约为总 OTU 数目的 1.36%。五组样品独有的 OTU 数目如下：HFD 组 2 551 个 (25.43%)、LBRE 组 1 609 个 (16.04%)、MBRE 组 722 个 (7.20%)、HBRE 组 1 090 个 (10.86%) 及 TP 组 2 024 个 (20.17%)，各组特有的 OTU 数目所占比例较大，说明各组间细菌群落组成存在较大的差异性。去除共有的 OTU 数目后，HFD 组中特异性的 OUT 数目显著高于低中高剂量花青素组，表明摄入黑米花青素的小鼠与 HFD 组小鼠的菌群分布具有显著差异性。

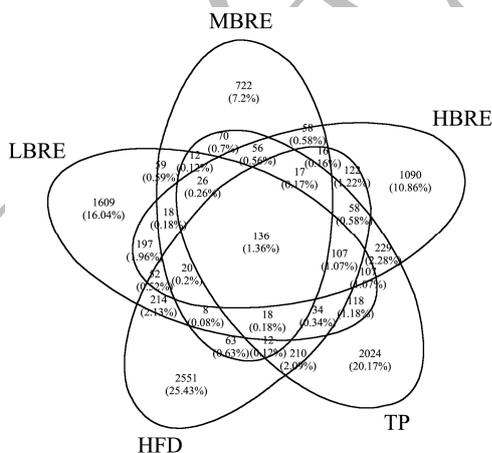


图 8 各组肠道菌群 OTU 数目的韦恩图

Fig.8 Venn diagram of the number of OTUs of each group of intestinal flora

2.7.2 多样本聚类分析

PCoA 图可表明样本间差异性，距离与差异呈正

比。如图 9 所示，样本层次聚类与主成分分析均显示，组间物种组成相似性呈现较大差异。HFD 组菌群与其余各组的距离较远，表明摄入黑米花青素后菌群结构产生显著差异。结果表明 BRE 干预对高脂小鼠的肠道微生物群有调节作用。

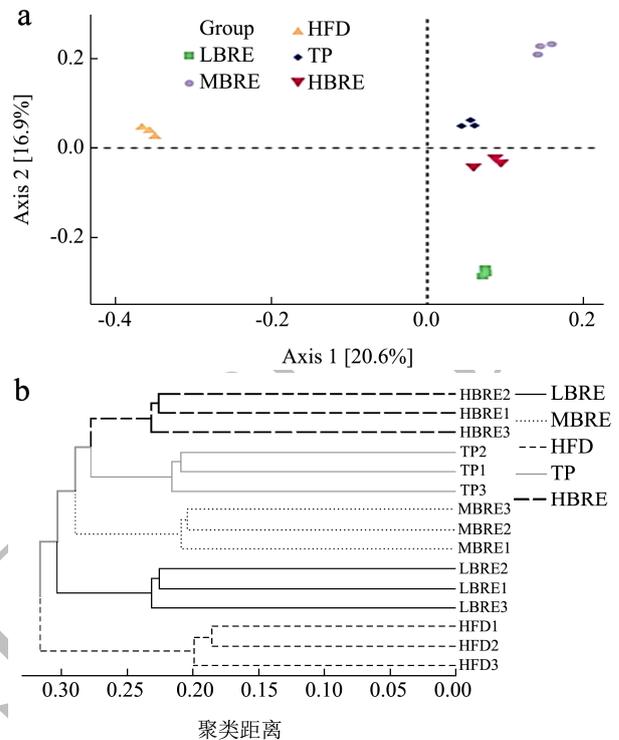


图 9 基于主成分分析 (a) 和聚类分析 (b) 的微生物群落结构差异

Fig.9 Diference of microbial community structure based on principal component analysis (a) and cluster analysis (b)

2.7.3 肠道群落组成分析

根据物种注释结果，门和属水平下相对丰度的物种及其比例见图 10 和图 11。肠道菌群中可检出的占主导地位的门水平下细菌种类分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)。其中，物种相对丰度排名前三的分别是厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门。厚壁菌门和拟杆菌门在肠道菌群中参与能量代谢。厚壁菌门与拟杆菌门的比值 (F/B) 是反应肠道菌群紊乱的重要指标，比值增加表明体内出现炎症，而肥胖者肠道中这两种菌的比值较高。

如图 10 所示，在门水平上，与 HFD 组相比，BRE 组均降低了厚壁菌门/拟杆菌门的比值。HBRE 组厚壁菌门相对丰度下降 (13.16%) 拟杆菌门相对丰度增加 (26.92%)。与 HFD 组相比，L-BRE 组中拟杆菌门的相对丰度降低了 19.23%，厚壁菌门/拟杆菌门比值为 1.29，而变形菌门升高 18.18%。在物种分类学分析结

果中, BRE 干预在各个分类水平上调节了高脂小鼠肠道微生物组成。与高脂组相比, LBRE、MBRE、HBRE 组和 TP 组在门水平上均降低了变形菌门的数量, 增加了拟杆菌门的数量。

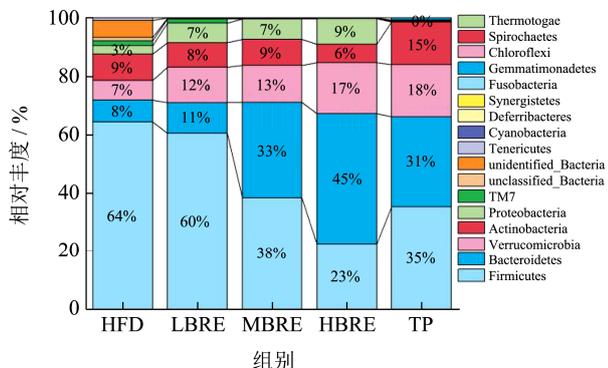


图 10 门水平微生物组成柱状图

Fig.10 Column diagram of microbial composition at phylum level

如图 11 所示, 与 HFD 组相比, 不同剂量 BRE 组及 TP 组, 尤其是 HBRE 组, 显著提高了益生菌(如乳杆菌属、嗜黏蛋白阿克曼菌属、瘤胃球菌、双歧杆菌属和拟杆菌属)的相对丰度。阿克曼氏菌属 (*Akkermanni*) 可以降低与小鼠高脂肪饮食相关的内毒素水平, 并通过降解肠道中的黏蛋白, 调节肠道内粘液厚度和维持肠道屏障完整性进而调节机体代谢。因此, 阿克曼菌属在调节肠道代谢功能和改善免疫反应方面都起着重要作用。苏黎世杆菌属 (*Turicibacter*) 与宿主体内胆汁酸水平密切相关, 胆汁酸浓度升高会导致苏黎世杆菌细菌生长被抑制。双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 可粘附于肠上皮细胞作为肠道黏膜屏障稳定剂, 改善肠道微环境, 增强肠道屏障。瘤胃球菌代谢后产生丁酸盐, 发挥抗炎作用, 维持肠道健康。

其中, 阿克曼氏菌属 (*Akkermanni*)、瘤胃球菌属

(*Ruminococcaceae*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的相对丰度分别增加了 53.29%、51.87%、23.80%、54.28%及 69.38%。同时 BRE 也能显著下调致病菌属的丰度, 如罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*)、毛茛菌属 (*Muribaculacea*) 和苏黎世杆菌 (*Turicibacter*) 的丰度分别降低了 56.40%、64.29%及 53.53%。上述结果表明, 添加 BRE 对高脂膳食引起的肠代谢紊乱有显著的调节作用并能显著提高肠道菌群的多样性。黑米花青素具有促进益生菌及抑制有害菌的作用, 可作为一种潜在的益生元物质。

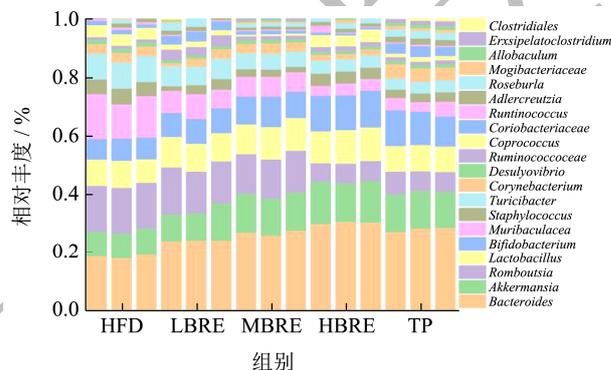


图 11 不同剂量 BRE 对肠道菌群属水平相对丰度的影响

Fig.11 Effect of different doses of BRE on the relative abundance of gut flora genus levels

2.7.4 黑米花青素对高脂小鼠肠道短链脂肪酸的影响

BRE 在胃肠道中几乎不被消化吸收, 通常也被认为是有效的益生元^[30]。但肠道微生物可以利用 BRE, 产生短链脂肪酸等代谢产物。短链脂肪酸可以维持肠道黏膜屏障完整性和免疫功能^[31]、调节肠道抗炎反应^[32,33]、促进肠道蠕动、降低血糖和胆固醇水平、参与脂肪代谢和能量供应^[34]。

表 1 各组小鼠粪便中 SCFAs 的含量 (mg/kg)

Table 1 Contents of SCFAs in feces of mice in each group (mg/kg)

短链脂肪酸种类	HFD	LBRE	MBRE	HBRE	TP
乙酸	12.86±4.53 ^d	14.28±3.82 ^c	15.68±4.74 ^b	17.43±5.60 ^a	16.25±4.92 ^b
丙酸	2.82±0.63 ^d	4.75±1.56 ^c	5.72±2.69 ^b	6.54±2.27 ^a	6.83±2.41 ^a
丁酸	1.23±0.89 ^d	2.28±1.37 ^c	3.89±1.76 ^a	3.81±1.94 ^a	3.21±1.31 ^b
异丁酸	0.02±0.01 ^d	0.03±0.01 ^c	0.04±0.01 ^b	0.06±0.03 ^a	0.06±0.02 ^a
戊酸	0.04±0.02 ^d	0.06±0.02 ^c	0.07±0.03 ^b	0.09±0.03 ^a	0.09±0.04 ^a
异戊酸	0.02±0.01 ^c	0.03±0.02 ^b	0.03±0.01 ^b	0.04±0.02 ^a	0.03±0.02 ^b
总酸	16.97±3.62 ^e	21.57±5.13 ^d	25.64±5.46 ^c	28.38±6.27 ^a	26.70±4.92 ^b

注: 与 HFD 组相比, 同行右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$); HFD 为高脂膳食组; LBRE 为低剂量黑米花青素组; MBRE 为中剂量黑米花青素组; HBRE 为高剂量黑米花青素组。

表 1 中显示了 HFD、LBRE、MBRE、HBRE 与 TP 组小鼠粪便中短链脂肪酸浓度,并将各组小鼠粪便中短链脂肪酸浓度进行对比分析。乙酸(12~18 mg/kg)是小鼠粪便中的主要短链脂肪酸,其次是丙酸(2~7 mg/kg)和丁酸(1~4 mg/kg)。还检测到少量的戊酸(0.04~0.09 mg/kg),异戊酸(0.02~0.04 mg/kg)和异丁酸(0.02~0.06 mg/kg)。与 HFD 组相比, LBRE、MBRE 及 HBRE 组干预均提高了小鼠粪便中乙酸、丙酸及丁酸的浓度。其中, HBRE 组对小鼠肠道内产生短链脂肪酸的促进作用最显著。阳性对照组(TP 组)也与 BRE 组的变化趋势相似。因此,摄入 BRE 可以提高肠道短链脂肪酸含量,增强肠道屏障功能,也有助于改善机体代谢稳态。

3 结论

本研究通过开展动物实验,探究黑米花青素对高脂膳食小鼠体内脂质代谢及肠道菌群的影响。黑米花青素显著降低高脂膳食小鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 的浓度,并提高了 HDL-C 浓度。结果表明黑米花青素可以降低高脂膳食诱导的小鼠血脂水平。通过对小鼠肝脏转录组进行分析,低、中及高剂量黑米花青素组均提高了小鼠肝脏中 *PPAR α* 的表达水平, *Hmgcr* 和 *Cyp7a1* 基因的表达也被调节,这些基因与 *PPAR α* 相关并参与脂质代谢。同时,黑米花青素干预也显著影响了氧化应激相关通路,这表明其具有调节脂代谢紊乱的作用。通过分析不同组小鼠盲肠组织中的肠道菌群丰度差异性,可知不同剂量 BRE 及阳性对照组均可显著提高小鼠肠道中益生菌丰度,如双歧杆菌、拟杆菌属、乳酸杆菌及嗜黏蛋白阿克曼菌等。其中, HBRE 组与 HFD 组差异最为显著。除此之外,不同剂量 BRE 组及 TP 组均降低了苏黎世杆菌、罗姆布茨菌及毛茛菌等有害菌属的丰度,表明对有害菌具有抑制作用。本研究表明, BRE 对高脂膳食诱导的肥胖小鼠具有调节肠道菌群,增强肠道屏障等有益作用。

综上所述,本研究通过动物实验探究了黑米花青素对高血脂症的影响,并探讨了黑米花青素改善脂代谢紊乱及调节肠道菌群的作用机制。研究发现不同剂量黑米花青素均能显著抑制高脂饮食下小鼠的体质量增加,降低血脂并改善脂代谢。此外,黑米花青素也对肠道菌群产生了较显著的影响,提高了小鼠体内短链脂肪酸含量。因此,黑米花青素被证明可能通过改善脂代谢及肠道菌群组成从而改善高血脂症。

参考文献

[1] Chooi Y C, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity

[J]. *Metabolism*, 2019, 92: 6-10.

- [2] Duan R Q, Guan X, Huang K, et al. Flavonoids from whole-grain oat alleviated high-fat diet-induced hyperlipidemia via regulating bile acid metabolism and gut microbiota in mice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(27): 7629-7640.
- [3] Cheng C, Zhuo S, Zhang B, et al. Treatment implications of natural compounds targeting lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease, obesity and cancer [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2019, 15(8): 1654.
- [4] Zareie R, Yuzbashian E, Rahimi H, et al. Dietary fat content and adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase gene expressions in adults' subcutaneous and visceral fat tissues [J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2021, 165: 102244.
- [5] Qin H, Xu H Y, Yu L, et al. Sesamol intervention ameliorates obesity-associated metabolic disorders by regulating hepatic lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice [J]. *Food & Nutrition Research*, 2019, 63: 3637-3647.
- [6] Magalhaes R, Martins N, Fontinha F, et al. Effects of dietary arachidonic acid and docosahexanoic acid at different carbohydrates levels on gilthead sea bream growth performance and intermediary metabolism [J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737233.
- [7] Liu J H, Hao W J, He Z Y, et al. Blueberry and cranberry anthocyanin extracts reduce bodyweight and modulate gut microbiota in C57BL/6J mice fed with a high-fat diet [J]. *European Journal of Nutrition*, 2021, 60: 2735-2746.
- [8] Minh A T P, Bucknaall M, Arcot J. Interactive effects of beta-carotene and anthocyanins on cellular uptake, antioxidant activity and anti-inflammatory activity *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 45: 129-137.
- [9] Qi Q Q, Chu M J, Yu X T, et al. Anthocyanins and proanthocyanidins: chemical structures, food sources, bioactivities, and product development [J]. *Food Reviews International*, 2022, 2: 4581-4609.
- [10] Duan Y B, Chen F, Yao X C, et al. Protective effect of lycium ruthenicum murr. against radiation injury in mice [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015, 12(7): 8332-8347.
- [11] Akaberi M, Hosseinzadeh H. Grapes (*Vitis vinifera*) as a potential candidate for the therapy of the metabolic syndrome [J]. *Phytotherapy Research*, 2016, 30(4): 540-556.

- [12] 周彤彤. 蓝莓花青素改善 TNBS 诱导结肠炎大鼠的作用机制初探及其对肠道菌群的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- [13] Wang M W, Zhang Z Y, Sun H J, et al. Research progress of anthocyanin prebiotic activity: A review [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154145.
- [14] Sun Q Y, Cheng L, Zeng X X, et al. The modulatory effect of plant polysaccharides on gut flora and the implication for neurodegenerative diseases from the perspective of the microbiota-gut-brain axis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 1484-1492.
- [15] 郭虹雯, 许翔雨, 陈莹婕, 等. 绿茶茶汤对肥胖相关肠道菌群的影响[J]. *茶叶科学*, 2016, 36(4): 354-362.
- [16] Song H Z, Shen X C, Wang F, et al. Black current anthocyanins improve lipid metabolism and modulate gut microbiota in high-fat diet-induced obese mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021, 65(6): 2001090.
- [17] 张子琪. 魔芋精粉对高脂高果糖膳食诱导的小鼠糖脂代谢紊乱及肠道菌群的影响[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2022.
- [18] Song H Z, Shen X C, Zhou Y, et al. Black rice anthocyanins alleviate hyperlipidemia, liver steatosis and insulin resistance by regulating lipid metabolism and gut microbiota in obese mice [J]. *Food & Function*, 2021, 12(20): 10160-10170.
- [19] Wu T, Yang L, Guo X Q, et al. Raspberry anthocyanin consumption prevents diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and modulating hepatic lipid metabolism [J]. *Food & Function*, 2018, 9(4): 2112-2020.
- [20] 潘珊珊. 基于多组学策略研究金丝桃苷影响小鼠脂代谢的作用机制[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2021.
- [21] 孙零寒. 木犀草素对高脂血症 SD 大鼠的降脂作用及机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [22] 陈贵杰. 茯砖茶及其多糖调节脂代谢及肠道微生物活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [23] 王远徽. 辣椒素对肥胖小鼠肠道菌群的影响及其降脂机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [24] Li J W, Tang X F, Xu J J, et al. Variation in HMGCR and NPC1L1 and inflammatory biomarkers [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2022, 79(9): 10-12.
- [25] Zhang Y C, Lickteig A J, Csanaky I L, et al. Editor's highlight: Clofibrate decreases bile acids in livers of male mice by increasing biliary bile acid excretion in a PPAR α -dependent manner [J]. *Toxicological Sciences*, 2017, 160(2): 351-360.
- [26] Singh A B, Liu J W. Berberine decreases plasma triglyceride levels and upregulates hepatic TRIB1 in LDLR wild type mice and in LDLR deficient mice [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 15641.
- [27] Janani C, Kumari B R. PPAR gamma gene - A review [J]. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2015, 9(1): 46-50.
- [28] Imam M U, Ismail M, Ithnin H, et al. Effects of germinated brown rice and its bioactive compounds on the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene [J]. *Nutrients*, 2013, 5(2): 468-477.
- [29] 姚亮亮. 高脂饲料诱导的肥胖型 2 型糖尿病高危期大鼠粪便代谢组及葛根苓连汤干预的机制研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [30] Ana F, Iva F, Sonia N, et al. Interplay between anthocyanins and gut microbiota [J]. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(29): 6898-6902.
- [31] Yue X, Wen S, Long-Kun D, et al. Three important short-chain fatty acids (SCFAs) attenuate the inflammatory response induced by 5-FU and maintain the integrity of intestinal mucosal tight junction [J]. *BMC Immunology*, 2022, 23(1): 1-13.
- [32] 杨雪, 高亚男, 王加启, 等. 短链脂肪酸的功能研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 42(2): 1-16.
- [33] 薛俊敏. 茶多酚对小鼠肠道菌群、肠道酶活性及短链脂肪酸的影响[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [34] He J, Zhang P W, Shen L Y, et al. Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6356.