

诺尼果多糖对高脂膳食小鼠胆汁酸代谢和肠道菌群的影响

邹嘉琪, 吴小勇*, 彭紫君, 伍芳芳, 郑传进
(广东药科大学食品科学学院, 广东中山 528453)

摘要: 为探究诺尼果多糖对长期高脂膳食引起的代谢紊乱和肥胖的预防作用及其可能机制, 该研究分别通过饲以高脂饲料建立高脂膳食小鼠模型和灌胃广谱抗生素建立伪无菌小鼠模型, 分析比较诺尼果多糖干预对高脂膳食小鼠体质量、粪便总胆汁酸含量 (Total Bile Acid, TBA) 和肠道菌群组成的影响。结果表明与高脂膳食组相比, 诺尼果多糖组小鼠体质量降低 11.91%, 粪便总胆汁酸含量增加 29.58%。但在伪无菌高脂膳食小鼠中, 诺尼果多糖的上述作用未能有效发挥, 说明肠道菌群在诺尼果多糖抑制高脂膳食小鼠体质量增长, 促进小鼠粪便总胆汁酸排出中发挥关键作用。Spearman 相关性分析结果表明, 粪杆菌 (*Faecalibaculum*)、杜氏乳杆菌 (*Dubosiella*)、鼠杆菌 (*Muribaculaceae*) 等是在第 4 周和第 12 周均发挥促进 TBA 排出, 抑制小鼠体质量增长作用的菌属。该研究结果表明, 诺尼果多糖通过促进上述有益肠道菌的增殖, 发挥促进高脂膳食小鼠 TBA 排出, 抑制高脂膳食小鼠体质量增长的作用。

关键词: 诺尼果多糖; 肥胖; 粪便总胆汁酸; 肠道菌群

文章编号: 1673-9078(2024)06-1-11

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0655

Effects of Noni Fruit Polysaccharide on Bile Acid Metabolism and Gut Microbiota of Mice Fed on a High-fat Diet

ZOU Jiaqi, WU Xiaoyong*, PENG Zijun, WU Fangfang, ZHENG Chuanjin

(School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528453, China)

Abstract: To investigate the preventive effect and potential mechanism of noni fruit polysaccharides (NP) on metabolic disorders and obesity induced by long-term intake of high-fat diet (HFD), an HFD mouse model and a pseudo germ-free (PGF) mouse model were established by providing high-fat feed and intragastric administration of broad-spectrum antibiotics, respectively. The effects of NP intervention on the body weight, fecal total bile acid (TBA) levels, and gut microbiota composition were analyzed and compared. Results showed that the body weight of mice in the NP group decreased by 11.91% and fecal TBA increased by 29.58% compared to mice in the HFD group. However, the beneficial effects of NP were not observed in PGF HFD mice, indicating that the gut microbiota plays a key role in inhibiting body weight gain and promoting fecal TBA excretion by NP in HFD mice. Results of Spearman correlation analysis suggest that *Faecalibaculum*,

引文格式:

邹嘉琪, 吴小勇, 彭紫君, 等. 诺尼果多糖对高脂膳食小鼠胆汁酸代谢和肠道菌群的影响 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(6):1-11.

ZOU Jiaqi, WU Xiaoyong, PENG Zijun, et al. Effects of noni fruit polysaccharide on bile acid metabolism and gut microbiota of mice fed on a high-fat diet [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 1-11.

收稿日期: 2023-06-10

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC3606200); 广东省教育厅项目 (2023KTSCX055)

作者简介: 邹嘉琪 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品研究与开发, E-mail: 745219210@qq.com

通讯作者: 吴小勇 (1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性食品研究与开发, E-mail: perryfe@163.com

Dubosiella, and *Muribaculaceae* among others promoted TBA excretion and inhibited body weight gain in HFD mice at weeks 4 and 12. These findings indicate that NP can promote TBA excretion and inhibit body weight gain in HFD mice by enhancing the proliferation of the beneficial gut bacteria.

Key words: body weight gain; fecal total bile acid; mouse model; obesity

超重和肥胖已成为一个世界性的公共健康问题^[1]。超重和肥胖通常会引发代谢紊乱，进而增加慢性代谢性疾病如心血管疾病、糖尿病、非酒精性脂肪肝等的发病风险^[2]。据统计，与高身体质量指数相关的死亡中，将近 70% 是由心血管疾病引起的，其中 60% 以上的死亡发生在肥胖者中^[3]。世界肥胖联合会预测，按照目前的趋势，到 2035 年，全球 51% 的人口将超重或肥胖。肥胖症按发生的原因可分为继发性肥胖和单纯性肥胖，其中单纯性肥胖（主要是指由于遗传因素或营养过剩所造成的全身性脂肪过量积累）是最常见的一种，约占 95% 以上^[4]。有学者认为，饮食和宿主肠道共生微生物被认为是主要的环境因素^[2]。

越来越多的研究表明，肠道菌群紊乱在肥胖的发生和发展中发挥了关键作用^[5,6]。肥胖患者的肠道菌群中厚壁菌门和拟杆菌门的相对比例上升^[7]。一项人体宏基因组研究表明，肥胖伴随着肠道菌群多样性显著降低且拟杆菌门相对缺失^[8]。因此，通过调节肠道菌群预防或治疗肥胖症显得尤为重要。越来越多的研究表明，多糖能通过调节肠道菌群发挥减肥作用^[9]。

多糖是指由 20 个以上单糖分子经脱水缩合，由醛基和酮基以糖苷键结合形成的长链聚合物^[10,11]。多糖种类繁多，资源量非常丰富。大量研究表明，多糖不仅可以通过调节体内脂质代谢和抑制氧化应激发挥降脂减肥作用，也可通过与宿主肠道微生物共同作用，发挥降脂减肥作用^[12-14]。诺尼 (Noni)，又名海巴戟天 (*Morinda citrifolia* L.)，是一种生长在热带和亚热带地区的茜草科巴戟天属植物，其成熟果实多糖是诺尼果的主要活性成分之一^[15]。课题组前期研究表明，长期高脂膳食不仅会导致实验动物血脂异常和体重快速增长，而且会引起氧化应激和炎症，而诺尼果多糖具有抗氧化、抗炎、改善血脂异常以及改善肠道菌群的组成并经肠道菌群酵解产生短链脂肪酸，发挥保护肠道粘膜屏障完整性和改善非酒精性脂肪肝等作用^[16,17]。进一步的研究表明，诺尼果多糖可以通过调节肠道菌群和胆汁酸代谢发挥降脂减肥作用^[18]，但其具体的作用机制

尚未明确，因此本研究旨在初步证实肠道菌群能否参与诺尼果多糖对高脂膳食诱导的肥胖和胆汁酸代谢异常的保护作用。

伪无菌小鼠动物模型被广泛应用于研究肠道菌群和宿主健康之间的关系^[19]。本研究采用广谱抗生素联合高脂饲料建立伪无菌高脂膳食小鼠模型，通过比较诺尼果多糖 (Noni Fruit Polysaccharides, NP) 对小鼠体质量增长、粪便总胆汁酸 (Total Bile Acid, TBA) 含量及肠道菌群组成和丰度的影响，探究肠道菌群在 NP 发挥生理调节作用中的潜在贡献，为多糖功能性食品的研究与开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

诺尼果多糖：以产自海南的诺尼果干片为原料，参照课题组前期方法^[15]制得。分析检测结果表明，诺尼果多糖是由 α -1,4-GalAp (约 70%) 聚合而成的 HG 型果胶多糖，其分子量约为 456 ku。诺尼果多糖的单糖组成为：半乳糖醛酸 (58.44%)、半乳糖 (4.44%)、葡萄糖 (21.13%)、鼠李糖 (4.84%) 和阿拉伯糖 (2.16%)。诺尼果多糖的酸性多糖含量为 50.49%、中性多糖含量为 46.11%、可溶性蛋白含量为 0.66%。硫酸新霉素 (0558) 购自 Amresco (华盛顿，美国)；氨苄西林 (A830931)、甲硝唑 (M813526) 和万古霉素 (V820413) 购自上海麦克林生化科技有限公司 (上海，中国)；总胆汁酸试剂盒 (E003-2-1) 购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物实验

40 只雄性 C57BL/6J 小鼠，SPF 级，购自广东省医学实验动物中心 [许可证编号：SCXK (粤) 2022-0002]。经过为期一周的适应性喂养后，小鼠按体重随机分为 5 组，具体分组及饲养和给药情况见表 1。每天定时按照 0.1 mL/10 g (按体质量计) 进行灌胃给药 1 次，持续 12 周。在整个实验过程中，允许小鼠自由饮水和饮食，定期记录小鼠的摄食和体重情况，每天注意观察小鼠的精神及活动状态。在第 0 周、第 4 周及第 12 周的最后一天，在

灌胃前,采集每只小鼠的粪便,装于已灭菌的离心管中,液氮速冻后,置于 -80°C 超低温冰箱保存,待测。所有实验动物均饲养在广东药科大学实验动物中心[许可证编号:SYXK(粤)2017-0125]SPF级屏障系统内,环境温度为 $(23\pm 1)^{\circ}\text{C}$,湿度为 $50\%\pm 10\%$,12 h光照/12 h黑暗交替。实验经广东药科大学实验动物伦理委员会审查批准(批准号为SPF2017680),符合动物福利伦理及保护相关规定。

1.3 粪便TBA的测定

精确称取小鼠粪便组织约50 mg,加入9倍体积的预冷0.9 wt.%生理盐水,制成10%的匀浆液后按2 500 r/min离心条件,离心10 min,取上清液按照试剂盒说明书进行测定,每个样本重复测定3次,结果均以 $\mu\text{mol/L}$ 表示。

表1 实验动物分组及灌胃情况

Table 1 The grouping and gavage dosages of experimental animals

组别	膳食	灌胃
正常对照 (CON) 组	正常膳食: 11.85% 脂肪 含量, 能量 为 3.40 kcal/g	0.9% 生理盐水
高脂膳食 (HFD) 组		0.9% 生理盐水
抗生素 (AB) 组		广谱抗生素溶液
诺尼果多糖 (NP) 组	高脂膳食: 60% 脂肪含 量, 能量为 5.24 kcal/g	诺尼果多糖溶液 (200 mg/kg, 以体质量计)
诺尼果多糖 + 抗生 素 (NP+AB) 组		诺尼果多糖溶液 (200 mg/kg, 以体质量计) + 广谱抗生素溶液

注:(1)广谱抗生素的组成:1.0 g/L 氨苄西林、1.0 g/L 硫酸新霉素、1.0 g/L 甲硝唑以及 0.5 g/L 万古霉素;(2)200 mg/kg(以体质量计)诺尼果多糖的剂量由前期研究结果^[20]确定。

1.4 粪便肠道菌群分析

根据DNA抽提试剂盒的说明书对小鼠粪便微生物群落总基因组的DNA进行提取,以所得的DNA为模板对16S rRNA基因中V3和V4可变区进行PCR扩增。利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。采用mothur软件(<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>)计算Alpha多样性,采用LEfSe分析(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/LEfSe>)($\text{LDA}>4.0$, $P<0.05$)确定不同组间从门到属水平丰度显著差异的细菌类群。

1.5 数据处理

采用ANOVA和LSD(方差齐性)或Dunnett T3(方差非齐性)事后检验区分不同处理组间的差异,结果 $P<0.05$ 为有统计学差异。所有数据的统计分析使用SPSS 24.0软件,图表绘制和处理使用GraphPad Prism 8.0软件。

2 结果与讨论

2.1 NP抑制高脂膳食小鼠体质量增长

表2 不同时期小鼠体质量情况
Table 2 Body weight of mice at different periods

组别	小鼠体质量/g		
	第0周	第4周	第12周
CON	16.96 ± 0.49	21.47 ± 0.69	24.31 ± 0.52
HFD	17.09 ± 0.63	24.50 ± 0.59**	30.06 ± 0.55**
AB	17.28 ± 0.43	23.88 ± 0.35**	27.81 ± 0.52**##
NP	17.27 ± 0.45	22.37 ± 0.36##	26.48 ± 0.38**##
NP+AB	17.27 ± 0.50	24.53 ± 0.38**aa	29.23 ± 0.56**aa

注:CON:正常对照组,HFD:高脂膳食组,AB:抗生素组,NP:诺尼果多糖组,NP+AB:诺尼果多糖+抗生素组,下同。数据均表示为均值 \pm SEM($n=7\sim 8$),*表示与CON组比较 $P<0.05$,**表示与CON组比较 $P<0.01$,#表示与HFD组比较 $P<0.05$,##表示与HFD组比较 $P<0.01$,a表示与NP组比较 $P<0.05$,aa表示与NP组比较 $P<0.01$,下同。

表2为在实验期间的不同时期,各组实验小鼠平均体质量情况。从表中数据可以看出,在第0周(即干预开始前),各组实验小鼠体质量均介于16~18 g之间,差异没有统计学意义($P>0.05$)。在第4周,CON组小鼠体质量为21.47 g,而HFD组、AB组和(NP+AB)组小鼠体质量分别为24.50、23.88和24.53 g,均显著高于CON组($P<0.01$);NP组小鼠体质量为22.37 g,与CON组无明显差异($P>0.05$),但显著低于HFD组和(NP+AB)组($P<0.01$)。在第12周,CON组小鼠体质量增长至24.31 g,而HFD组小鼠体质量增至30.06 g,显著高于CON组($P<0.01$);NP组小鼠体质量为26.48 g,显著高于CON组($P<0.01$),但显著低于HFD组($P<0.01$);(NP+AB)组小鼠体质量为29.39 g与HFD组无明显差异($P>0.05$),且显著高于NP组($P<0.01$)。

多糖能缓解高脂饮食导致的肥胖^[21,22]。本研究结果也表明,每天补充一定剂量的诺尼果多糖

(200 mg/kg, 以体质量计), 能降低常规高脂膳食小鼠体质量增长速度, 但对伪无菌高脂膳食小鼠体质量增长则没有明显抑制作用, 说明 NP 抑制高脂膳食小鼠体质量增长需要肠道菌群的帮助。伪无菌小鼠能够抵抗高脂、高糖的西式饮食所致的肥胖^[23, 24], 但也有研究得出不同结论^[25, 26]。本研究结果表明, AB 和 (NP+AB) 组小鼠体质量与 HFD 组无显著差异, 且均高于 CON 组和 NP 组, 说明在实验条件下, 高脂膳食同样会导致伪无菌小鼠体质量快速增长。

2.2 NP促进高脂膳食小鼠粪便TBA排出

各组小鼠粪便 TBA 含量情况见表 3, 从表中数据可以看出, 在第 0 周时, 各组小鼠的粪便 TBA 水平没有显著差异 ($P>0.05$); 而在第 4 周和第 12 周, NP 组小鼠粪便 TBA 水平显著高于 CON 组和 HFD 组 ($P<0.01, P<0.05$), 而 AB 组和 (NP+AB) 组小鼠粪便 TBA 水平显著低于 CON 组、HFD 组和 NP 组 ($P<0.01$)。值得注意的是, 不同时期 CON 组小鼠粪便 TBA 水平基本相同; 而 HFD 组和 NP 组小鼠粪便 TBA 含量随实验时间的延长而逐渐升高。

表 3 不同时期小鼠粪便TBA含量情况

组别	粪便 TBA 水平/($\mu\text{mol/L}$)		
	第 0 周	第 4 周	第 12 周
CON	53.11 \pm 5.24	69.49 \pm 4.97	66.81 \pm 2.21
HFD	59.89 \pm 5.43	72.06 \pm 4.57	103.77 \pm 6.00**
AB	59.50 \pm 5.73	1.02 \pm 0.11***	1.12 \pm 0.19***
NP	50.18 \pm 2.75	113.43 \pm 7.29***	134.47 \pm 4.86***
NP+AB	53.22 \pm 6.16	1.14 \pm 0.04***aa	1.54 \pm 0.15***aa

胆汁酸 (Bile Acid, BA) 具有较强的乳化能力, 能够促进脂质的消化和吸收^[27]。越来越多的研究表明, 多糖可以调节 BA 代谢^[28, 29], 发挥降脂减肥作用。课题组此前的研究表明, NP 可以通过与 BA 结合, 促进 BA 通过粪便排出, 发挥降脂减肥作用^[18, 20]。本研究的实验结果也表明, NP 组小鼠粪便 TBA 水平明显高于 HFD 组, 这可能是 NP 发挥抑制高脂膳食小鼠体重过快增长的原因之一。值得注意的是, (NP+AB) 组小鼠粪便 TBA 含量明显低于 NP 组, 说明 NP 干预不能提高伪无菌高脂膳食小鼠粪便 TBA 水平。这可能是由于抗生素的使用, 严重破坏了小鼠的肠道菌群, 导致乳酸杆菌等胆盐水解酶来源菌的丰度大大降低所致^[30-32]。据此可以推测, 肠道菌群在 NP 促进高脂膳食小鼠粪便 TBA

排出中发挥了关键作用。

2.3 NP对高脂膳食小鼠肠道菌群的影响

2.3.1 肠道菌群多样性

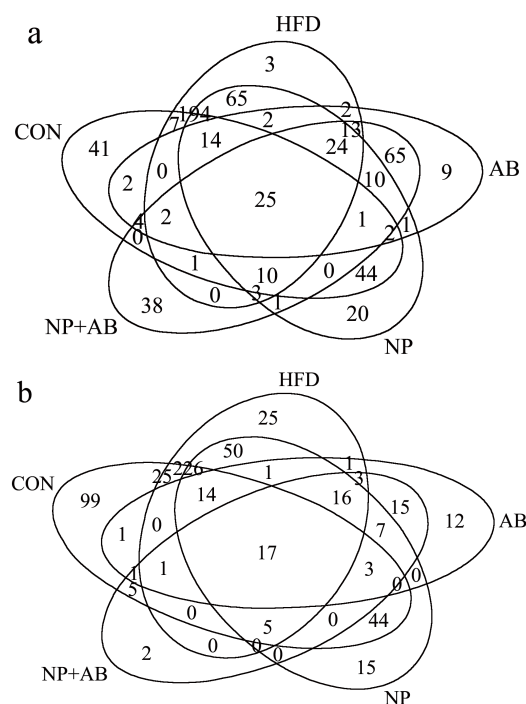


图 1 不同时期小鼠肠道菌群韦恩图

Fig.1 Venn diagram of mice intestinal microbiota at different periods

注: (a) 第 4 周韦恩图; (b) 第 12 周韦恩图。

通过 16S rRNA 测序, 将相似度在 97% 水平以上的序列进行聚类并命名为 OTU, 每个 OTU 代表一个物种, OTU 值越高, 说明小鼠肠道内细菌的多样性越好。从图 1 的结果可以看出, 在第 4 周, CON 组、HFD 组、AB 组、NP 组和 (NP+AB) 组小鼠肠道菌群的 OTU 数目分别为 347、365、176、416 和 197。在第 12 周, 上述各组小鼠肠道菌群的 OTU 数目分别为 441、384、92、398 和 75。从上述结果可以看出, 在第 4 周, HFD 组小鼠肠道菌的 OTU 数目稍高于 CON 组, 而在第 12 周, 则明显低于 CON 组, 说明长时间高脂膳食会导致小鼠肠道菌群的物种数有所下降^[33]。NP 组小鼠肠道菌群总 OTU 数目在第 4 周和第 12 周均高于 HFD 组, 而 AB 组和 (NP+AB) 组小鼠肠道菌群的总 OTU 数目则明显低于其他组, 且第 12 周比第 4 周更低。上述实验结果表明, 广谱抗生素的使用会导致小鼠肠道菌总 OTU 数目明显下降, 且随着干预时间的延长, 总 OTU 数目下降更明显; NP 给药在一定程度上能增加高脂膳食小鼠肠道菌群的总 OTU 数目, 但对

伪无菌高脂膳食小鼠肠道菌群的总 OTU 数目的恢复没有明显作用。

此外, 从图 1 结果可以看出, 第 4 周和第 12 周 (见图 1a 和图 1b), 各组中共有的 OTU 数目分别为 25 和 17, 呈下降趋势。在第 4 周, CON 组、HFD 组、

AB 组、NP 组和 (NP+AB) 组小鼠肠道菌群的特有 OTU 数目分别为 41、3、9、20 和 38。在第 12 周, 上述各组小鼠肠道菌群的特有 OTU 数目分别为 99、25、12、15 和 2。以上实验结果表明, 随着实验时间的延长, 组间肠道菌群差异逐渐增大。

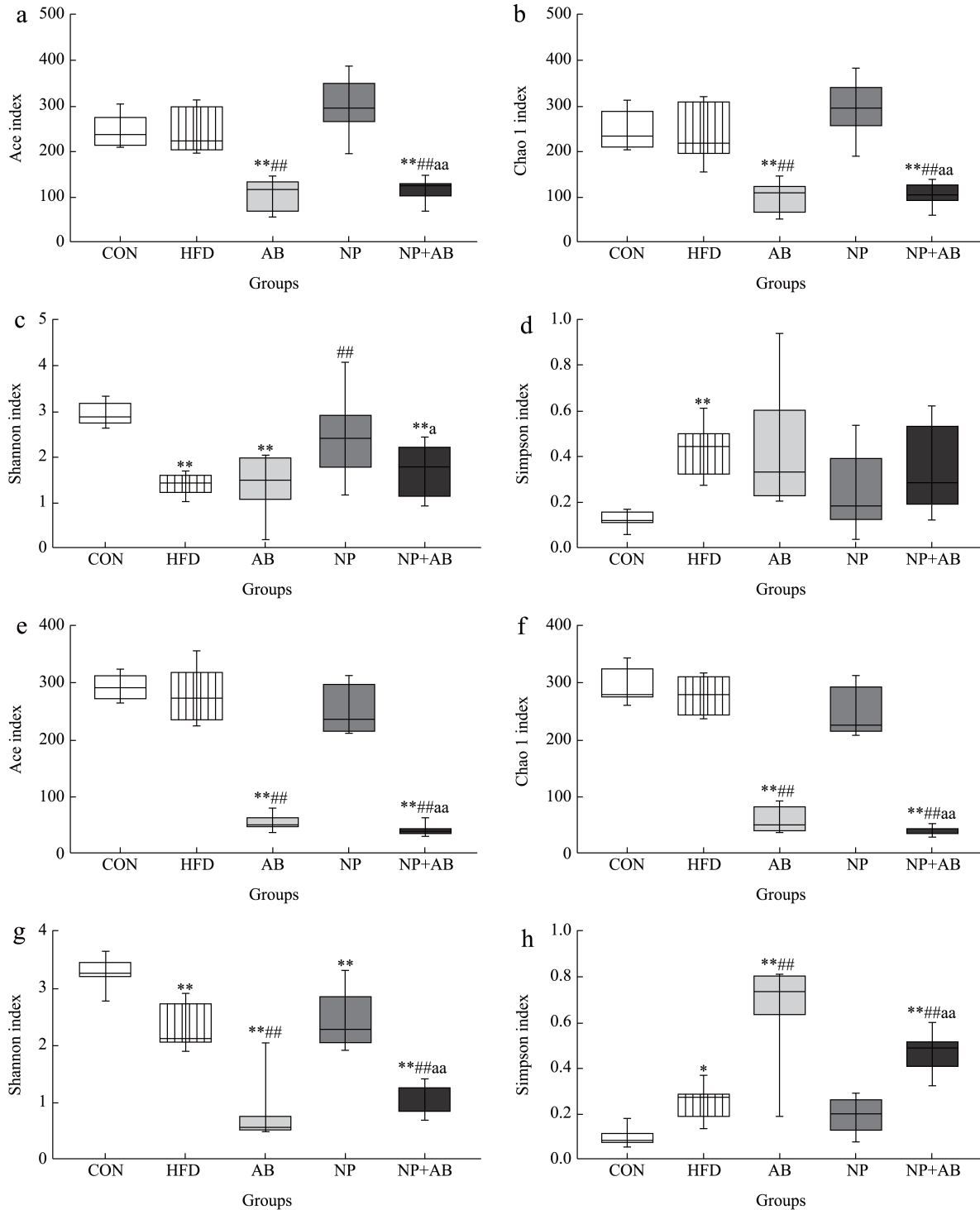


图 2 不同时期小鼠肠道菌群的 α -多样性比较

Fig.2 Comparison of intestinal microbiota α -diversity of mice at different periods

注: (a) 第 4 周 Ace 指数, (b) 第 4 周 Chao 1 指数, (c) 第 4 周 Shannon 指数, (d) 第 4 周 Simpson 指数, (e) 第 12 周 Ace 指数, (f) 第 12 周 Chao 1 指数, (g) 第 12 周 Shannon 指数, (h) 第 12 周 Simpson 指数。

图2为各组小鼠肠道菌群 α -多样性指数统计分析结果,从图示结果可以看出,在第4周,与CON组相比,HFD组Shannon指数(图2c)水平显著降低($P<0.01$),Simpson指数(图2d)水平显著升高($P<0.01$)。与HFD组相比,NP组Ace指数(图2a)、Chao 1指数(图2b)和Shannon指数(图2c)稍高,Simpson指数稍低,其中Shannon指数差异具有统计学意义($P<0.01$)。AB组小鼠的Ace指数、Chao 1指数均显著低于CON组和HFD组($P<0.01$),Shannon指数显著低于CON组($P<0.01$);(NP+AB)组小鼠Ace指数、Chao 1指数显著低于CON组、HFD组和NP组($P<0.01$),Shannon指数显著低于CON组($P<0.01$),也显著低于NP组($P<0.05$)。在第12周,各组小鼠肠道菌群的Ace指数(图2e)、Chao 1指数(图2f)组间差异与第4周基本相同;但纵向来看,与第4周相比,在第12周,CON组和HFD组小鼠的Ace指数、Chao 1指数和Shannon指数(图2g)有所升高,Simpson指数(图2h)有所降低,但差异无统计学意义($P>0.05$);NP组的上述指数变化不大,而AB组和(NP+AB)组的Ace指数、Chao 1指数和Shannon指数有所下降,Simpson指数有所升高。

多糖能够一定程度缓解长期高脂膳食对小鼠肠道菌群多样性和丰富度的破坏^[34]。本研究结果也表明,NP给药能够在一定程度上改善高脂膳食导致的小鼠肠道菌群 α -多样性的下降,但是随着给药时间的延长,NP给药没有进一步改善高脂膳食小鼠肠道菌群的 α -多样性。在广谱抗生素的作用下,高脂膳食小鼠肠道菌群的 α -多样性受到了显著破坏,且随着干预时间的延长,广谱抗生素对高脂膳食小鼠肠道菌群 α -多样性的破坏作用进一步加深。在抗生素的干预下,NP给药未能发挥改善小鼠肠道菌群 α -多样性的作用。

2.3.2 肠道菌群组成

图3显示在门水平和属水平上各组小鼠肠道菌群的分布情况。从图3a和图3c所示结果可以看出,不论是在第4周,还是在第12周,厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidota)都是CON组、HFD组、NP组相对丰度最高的2个菌门,而变形杆菌门(Proteobacteria)和Firmicutes则是AB组和(NP+AB)组相对丰度最高的2个菌门。从图3a和图3c所示结果还可以看出,不论是在第4周,还是在第12周,HFD组和NP组Firmicutes

的相对丰度均显著高于CON组($P<0.01$),而Bacteroidota的相对丰度均显著低于CON组($P<0.01$),说明高脂膳食会导致Firmicutes相对丰度上升,Bacteroidota相对丰度下降。此外,从图3a和图3c所示结果还可以看出,随实验时间延长,AB组和(NP+AB)组Firmicutes和Bacteroidota的相对丰度均在显著下降,其中Bacteroidota的相对丰度降为0,而Proteobacteria的相对丰度在显著上升(由50%左右上升至90%左右),说明广谱抗生素的使用削弱了绝大部分Firmicutes和Bacteroidota,但对Proteobacteria没有削弱作用。

在属水平上,从图3b和图3d结果可以看出,在第4周,与CON组比较,HFD组和NP组鼠杆菌属(*norank_f_Muribaculaceae*)相对丰度显著低于CON组($P<0.01$),而粪杆菌属(*Faecalibaculum*)、杜氏乳杆菌(*Dubosiella*)的相对丰度均显著高于CON组($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。与第4周相比,在第12周,HFD组和NP组*norank_f_Muribaculaceae*的相对丰度有明显升高,但仍显著低于CON组($P<0.01$)。在第12周,HFD组回肠杆菌(*Ileibacterium*)相对丰度显著高于CON组($P<0.01$),NP组*Ileibacterium*的相对丰度也明显高于CON组,但差异无统计学意义($P>0.05$);NP组乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)相对丰度明显高于CON组和HFD组,但差异无统计学意义($P>0.05$);NP组双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的相对丰度明显高于CON组和HFD组($P<0.01$),说明NP具有促进*Bifidobacterium*增殖的作用。值得注意的是,无论是在第4周,还是在第12周,*norank_f_Muribaculaceae*、*Faecalibaculum*、*Dubosiella*在AB组和(NP+AB)组的相对丰度均接近0,而志贺氏埃希氏菌(*Escherichia-Shigella*)是AB组和(NP+AB)组相对丰度最高的菌属,且第12周明显高于第4周,而在CON组、HFD组和NP组中该菌属的相对丰度几乎为0,说明广谱抗生素对*norank_f_Muribaculaceae*、*Faecalibaculum*、*Dubosiella*具有削弱作用,但不能削弱*Escherichia-Shigella*。

长期高脂饮食会导致小鼠肠道菌群多样性降低,Bacteroidota丰度下降,Firmicutes丰度升高,进而诱导小鼠血脂异常和肥胖^[35-37]。膳食多糖可以通过调节肠道菌,发挥降脂减肥作用^[38,39]。*Lactobacillus*和*Bifidobacterium*等有益菌具有增强肠道屏障,维持肠道微环境稳态等作用^[40]。

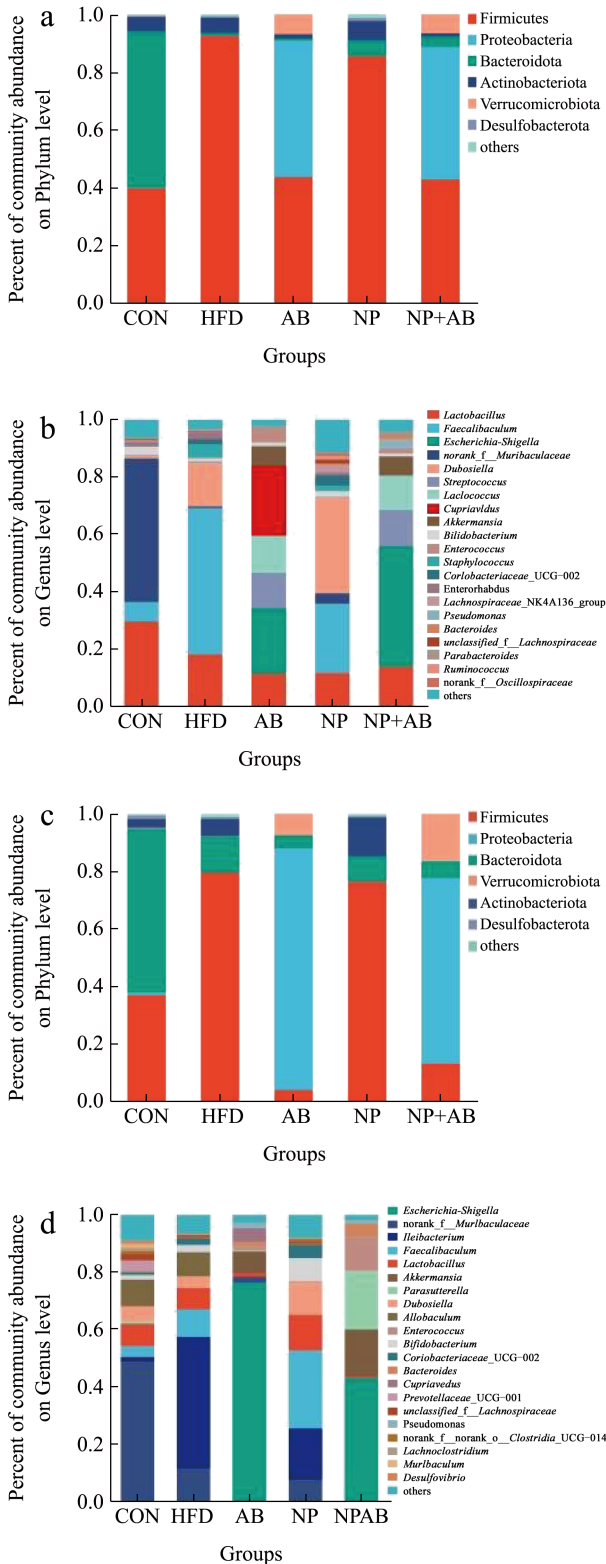


图 3 不同时期小鼠肠道菌群组成情况

Fig.3 Composition situations of mice intestinal microbiota at different periods

注：(a) 第 4 周门水平菌群组成，(b) 第 4 周属水平菌群组成，(c) 第 12 周门水平菌群组成，(d) 第 12 周属水平菌群组成。

本研究结果表明，补充 NP 能够显著增加 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 相对丰度。此外，本研究发现伪无菌高脂膳食小鼠肠道菌群中 Proteobacteria 相对丰度显著升高，而在属水平，*Escherichia-Shigella* 和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 的相对丰度显著升高。Proteobacteria 的增加是菌群失调和疾病风险的潜在迹象^[23]，*Escherichia-Shigella* 与脂多糖的产生有关，非酒精性脂肪肝和脂肪肝纤维化患者肠道中该菌的相对丰度通常明显增加^[41]；*Akkermansia* 能加速肥胖的发展^[25]。本研究结果表明，广谱抗生素对 Firmicutes 和 Bacteroidota 具有削弱作用，但对 Proteobacteria 却没有明显削弱作用。可见，广谱抗生素的使用导致了肠道菌群严重失调，进一步加重了高脂膳食对小鼠健康的负面影响。

2.3.3 特征肠道菌

采用 LEfSe (LDA>4.0) 方法对各组小鼠肠道菌群相对丰度进行统计分析，以寻找组间特有的、具有代表性的差异物种。图 4 显示了所有组别小鼠中肠道菌群的富集和变化。从图示结果可以看出，在第 4 周、第 12 周，分别共有 45 个和 48 个不同丰度的分类分支被认为是特征细菌表型，其丰度在高脂膳食、广谱抗生素和 NP 的干预下有很大的改变。在第 4 周、第 12 周，Bacteroidota、Firmicutes、Proteobacteria 和放线菌门 (Actinobacteriota) 分别是 CON 组、HFD 组、AB 组和 NP 组的特征菌门。在第 12 周，疣菌门 (Verrucomicrobiota) 为 (NP+AB) 组的特征菌门。在属的水平上，在第 4 周和第 12 周，来自 Bacteroidota 的 *norank_f_Muribaculaceae* 为 CON 组的特征菌属；在第 4 周，来自 Bacteroidota 的 *Faecalibaculum* 为 HFD 组的特征菌属，而在第 12 周，没有发现 HFD 组的特征菌属；对于 AB 组，在第 4 周，来自 Firmicutes 的乳球菌属 (*Lactococcus*) 为特征菌属，在第 12 周，来自 Proteobacteria 的 *Escherichia-Shigella* 为特征菌属；对于 NP 组，在第 4 周，来自 Firmicutes 的 *Dubosiella* 为特征菌属，而在第 12 周，来自 Firmicutes 的 *Lactobacillus* 和来自 Actinobacteriota 的 *Bifidobacterium* 为特征菌属；对于 (NP+AB) 组，在第 4 周，来自 Proteobacteria 的 *Escherichia-Shigella* 为特征菌属，而在第 12 周，来自 Proteobacteria 的寄生菌属 (*Parasutterella*) 和来自 Verrucomicrobiota 的 *Akkermansia* 为特征菌属。

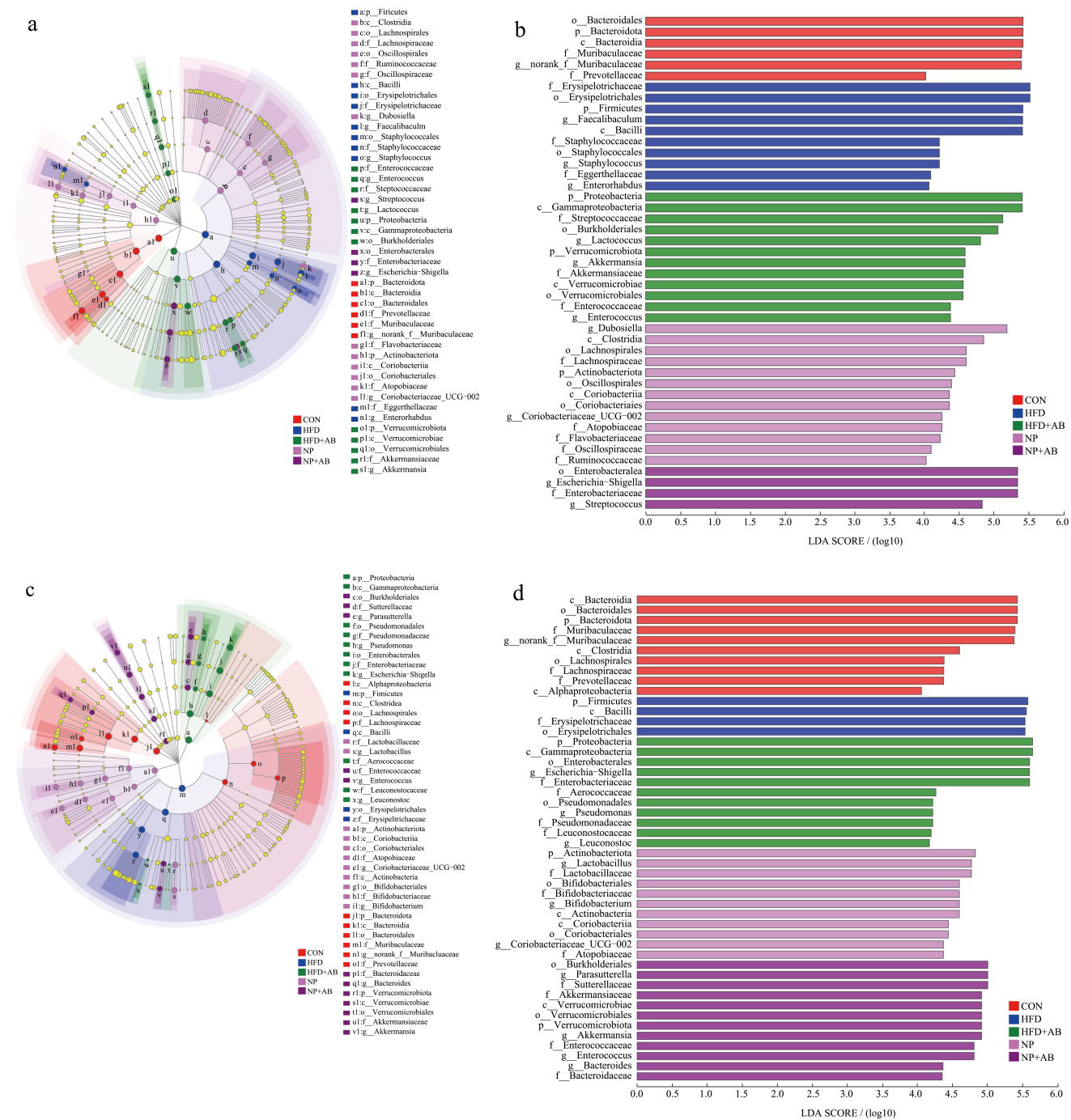


图 4 不同时期小鼠的特征肠道菌群情况

Fig.4 Situations of characteristic intestinal microbiota of mice at different periods

注:a:第4周的LEfSe多级物种层次树,b:第4周的LDA判别结果表(LDA>4.0),c:第12周的LEfSe多级物种层次树,d:第12周的LDA判别结果表(LDA>4.0)。

2.4 特征肠道菌与小鼠体质量和粪便TBA水平间的相关性分析

采用 Spearman 相关分析对在属水平上排名前 20 的菌属与小鼠体质量和粪便 TBA 之间的相关性进行分析。从图 5a 可以看出,在第 4 周时,小鼠粪便 TBA 水平与 *Faecalibaculum*、*Dubosiella*、

Coriobacteriaceae_UCG-002、*Enterorhabdus*、*Candidatus_Saccharimonas*、*Lachnospiraceae_NK4A134_group*、*unclassified_f_Lachnospiraceae*、*Parabacteroides*、*norank_f_Muribaculaceae* 和 *Bacteroides* 等菌属的丰度成正相关关系,而与 *Streptococcus*、*Lactococcus*、*Escherichia-Shigella*、*Akkermansia*、

Enterococcus、*Cupriavidus* 和 *Pseudomonas* 等菌属的丰度成负相关关系；而小鼠的体质量与上述菌属之间的相关关系却与小鼠粪便 TBA 含量与上述菌属之间的相关关系正好相反。从图 5b 可以看出，在第 12 周，小鼠粪便 TBA 水平与 *Ileibacterium*、*Faecalibaculum*、*Coriobacteriaceae_UCG-002*、*Dubosiella*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Enterorhabdus*、*unclassified_f_Lachnospiraceae*、*Bacteroides*、*Allobaculum*、*Prevotellaceae_UCG-001*、*norank_f_Muribaculaceae* 和 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 等菌属的丰度呈正相关关系，却与 *Escherichia-Shigella*、*Pseudomonas*、*Enterococcus*、*Cupriavidus* 和 *Akkermansia* 等菌属的丰度成负相关关系，但小鼠的体质量与上述菌属之间的相关关系却与小鼠粪便 TBA 含量与上述菌属之间的相关关系正好相反，规律与第 4 周基本相同，只是随着干预时间的延长，由于小鼠肠道菌群组成结构的变化，发挥作用的菌属与第 4 周稍有不同。值得注意的是：*Faecalibaculum*、*Dubosiella*、*norank_f_Muribaculaceae* 是在第 4 周和第 12 周均发挥促进粪便 TBA 排出，抑制小鼠体质量增长作用的菌属，而 *Escherichia-Shigella* 和 *Akkermansia* 是在第 4 周和第 12 周均发挥减少粪便 TBA 排出，促进小鼠体质量增长作用的菌属。

本研究通过相关关系分析表明，与小鼠粪便 TBA 含量成正相关的菌属却与小鼠体质量成负相关，说明促进粪便 TBA 排出的肠道微生物，与抑制高脂膳食小鼠体质量增长是一致的，进一步证明 NP 是通过促进上述有益肠道菌的增殖，发挥促进高脂膳食小鼠粪便 TBA 排出，抑制高脂膳食小鼠体质量增长的作用，这可能是 NP 发挥降脂减肥作用的主要机制。

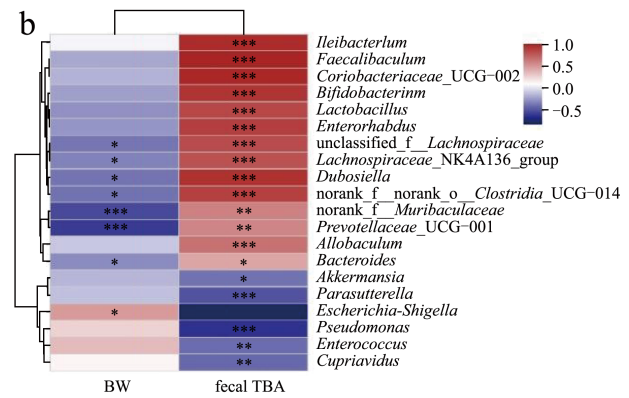
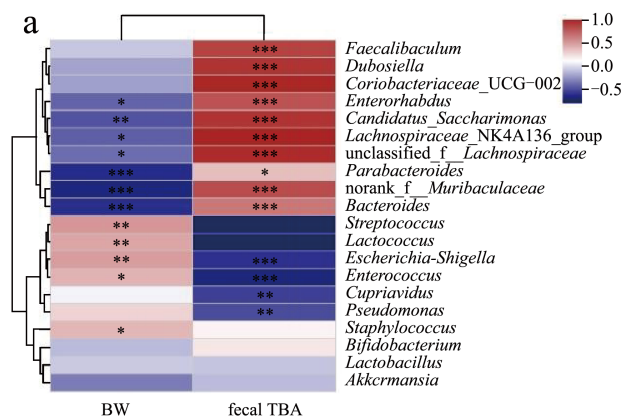


图 5 小鼠体质量、粪便 TBA 与小鼠特征肠道菌群（属）相对丰度之间的关联热图

Fig.5 Correlation heatmap among mice body weight, fecal TBA and relative abundance of characteristic intestinal microbiota at phylum and genus level

注：a：第 4 周关联热图，b：第 12 周关联热图。P<0.05 标记为*，P<0.01 标记为**，P<0.001 标记为***。BW：体重，fecal TBA：粪便总胆汁酸。

3 结论

本研究结果表明，补充一定剂量（200 mg/kg，以体质量计）的 NP，能够促进高脂膳食小鼠粪便 TBA 的排出和抑制小鼠体质量增长的作用，显著增加高脂膳食小鼠乳酸杆菌和双歧杆菌的相对丰度。本研究通过相关关系分析表明，与小鼠粪便 TBA 含量成正相关的菌属却与小鼠体质量成负相关，说明促进粪便 TBA 排出的肠道微生物，与抑制高脂膳食小鼠体质量增长是一致的，证明 NP 是通过促进上述有益肠道菌的增殖，发挥促进高脂膳食小鼠粪便 TBA 排出，抑制高脂膳食小鼠体质量增长的作用，这可能是 NP 发挥降脂减肥作用的主要机制。本研究为多糖降脂减肥作用及机制研究提供了新证据，为肠道菌在代谢病防治及相关天然产物的研究与开发提供了新思路。

参考文献

- [1] SELASSIE M, SINHA A C. The epidemiology and aetiology of obesity: a global challenge [J]. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2011, 25(1): 1-9.
- [2] 孙长颢,凌文华,黄国伟.营养与食品卫生学[M].北京:人民卫生出版社,2014.
- [3] AFSHIN A, FOROUZANFAR M H, REITSMA M B, et al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years [J]. New England Journal of Medicine, 2017,

- 377(1): 13-27.
- [4] MALIK V S, WILLET W C, HU F B. Global obesity: trends, risk factors and policy implications [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2013, 9: 13-27.
- [5] YE J, ZHAO Y, CHEN X M, et al. Pu-erh tea ameliorates obesity and modulates gut microbiota in high fat diet fed mice [J]. *Food Research International*, 2021, 144: 110360.
- [6] 彭喜春,黄嘉成.肠道梭菌在机体能量过度摄入中的作用[J].现代食品科技,2014,30(3):262-265.
- [7] GERARD P. Gut microbiota and obesity [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016,73(1):147-162.
- [8] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [9] SANG T T, GUO C J, GUO D D, et al. Suppression of obesity and inflammation by polysaccharide from sporoderm-broken spore of *Ganoderma lucidum* via gut microbiota regulation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 256: 117594.
- [10] 谢明勇,殷军艺,聂少平.天然产物来源多糖结构解析研究进展[J].中国食品学报,2017,17(3):1-19.
- [11] 陈亚洁,时连根.生物多糖药理作用的研究概况[J].蚕桑通报,2017,48(3):15-27.
- [12] ZENG S J, CAO J, WEI C, et al. Polysaccharides from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jackfruit) pulp alleviate obesity by modulating gut microbiota in high fat diet-induced rats [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 139: 108521.
- [13] MA Y Y, LIU X, LIU D F, et al. Oyster (*Crassostrea gigas*) polysaccharide ameliorates high-fat-diet-induced oxidative stress and inflammation in the liver via the bile acid-FXR-AMPK α pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(28): 8662-8671.
- [14] 姬妍茹,张正海,杨庆丽,等.黑菊芋多糖的润肠通便和调节肠道菌群作用[J].现代食品科技,2022,38(7):33-39.
- [15] JIN M Y, WANG Y X, YANG X B, et al. Structure characterization of a polysaccharide extracted from noni (*Morinda citrifolia* L.) and its protective effect against DSS-induced bowel disease in mice [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 189-197.
- [16] YANG X B, LIN C R, CAI S, et al. Therapeutic effects of noni fruit water extract and polysaccharide on oxidative stress and inflammation in mice under high-fat diet [J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 1133-1145.
- [17] YANG X B, MO W J, ZHENG C J, et al. Alleviating effects of noni fruit polysaccharide on hepatic oxidative stress and inflammation in rats under a high-fat diet and its possible mechanisms [J]. *Food & Function*, 2020, 11(4): 2953-2968.
- [18] MO W J, ZOU J Q, WU M, et al. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit polysaccharide ameliorated high-fat diet-induced obesity by modulating gut microbiota and improving bile acid metabolism [J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 101: 105408.
- [19] HUSSAIN K, YANG Y Y, WANG J, et al. Comparative study on the weight loss and lipid metabolism by tea polyphenols in diet induced obese C57BL/6J pseudo germ free and conventionalized mice [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(3): 697-710.
- [20] 邹嘉琪,莫文静,吴小勇,等.诺尼果多糖促进胆汁酸排出改善高脂膳食小鼠脂质堆积和血脂异常[C]//健康食品研发与产业技术创新高峰论坛暨2022年广东省食品学会年会论文集,广东潮州,2023:1-7.
- [21] GHANEMI A, MELOUANE A, YOSHIOKA M, et al. Exercise and high-fat diet in obesity: functional genomics perspectives of two energy homeostasis pillars [J]. *Genes*, 2020, 11(8): 875.
- [22] LEE H B, KIM Y S, PARK H Y. Pectic polysaccharides: targeting gut microbiota in obesity and intestinal health [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 287: 119363.
- [23] RABOT S, MEMBREZ M, BRUNEAU A, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism [J]. *FASEB Journal*, 2010, 24(12): 4948-4959.
- [24] BACKHED F, DING H, WANG T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [25] 俞月.基于肠道菌群的荷叶碱降脂作用机制研究[D].北京:北京协和医学院药用植物研究所,2021.
- [26] MORETTI C H, SCHIFFER T A, LI X C, et al. Germ-free mice are not protected against diet-induced obesity and metabolic dysfunction [J]. *Acta Physiologica*, 2021, 231(3): e13581.
- [27] HOFMANN A F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease [J]. *Archives of Internal Medicine*, 1999, 159(22): 2647-2658.
- [28] SHI L L, WANG J, WANG Y, et al. MDG-1, an Ophiopogon polysaccharide, alleviates hyperlipidemia in mice based on metabolic profile of bile acids [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 150: 74-81.
- [29] HUANG S M, PANG D R, LI X, et al. A sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* regulates cholesterol and bile acid metabolism in high-fat diet mice [J]. *Food & Function*, 2019, 10(6): 3224-3236.
- [30] SAYIN S I, WAHLSTROM A, FELIN J, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist [J]. *Cell Metabolism*, 2013, 17(2): 225-235.

- [31] MARASCA E, BOULOS S, NYSTROM L. Bile acid-retention by native and modified oat and barley beta-glucan [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 236: 116034.
- [32] ZHANG Z H, FAN S T, HUANG D F, et al. Polysaccharides from fermented *Asparagus officinalis* with *Lactobacillus plantarum* NCU116 alleviated liver injury via modulation of glutathione homeostasis, bile acid metabolism, and SCFA production [J]. Food & Function, 2020, 11(9): 7681-7695.
- [33] 张亚萍,袁亚宏,岳田利.富硒红曲米对高脂饮食小鼠脂代谢和肠道菌群的改善作用[J].现代食品科技,2022, 38(2):1-11.
- [34] CHEN Y F, JIN L, LI Y H, et al. Bamboo-shaving polysaccharide protects against high-diet induced obesity and modulates the gut microbiota of mice [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 20-31.
- [35] 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.
- [36] GOMES A C, HOFFMANN C, MOTA J F. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity [J]. Gut Microbes, 2018, 9(4): 308-325.
- [37] WANG B T, KONG Q M, LI X, et al. A high-fat diet increases gut microbiota biodiversity and energy expenditure due to nutrient difference [J]. Nutrients, 2020,12(10): 3197.
- [38] WANG Y T, LI L L, YE C Q, et al. Alginate oligosaccharide improves lipid metabolism and inflammation by modulating gut microbiota in high-fat diet fed mice [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(8): 3541-3554.
- [39] LAN Y, SUN Q Y, MA Z Y, et al. Seabuckthorn polysaccharide ameliorates high-fat diet-induced obesity by gut microbiota-SCFAs-liver axis [J]. Food & Function, 2022, 13(5): 2925-2937.
- [40] FJÆRE E, MYRMEL L S, LÜTZHØFT D O, et al. Effects of exercise and dietary protein sources on adiposity and insulin sensitivity in obese mice [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2019, 66: 98-109.
- [41] SUN J Y, DING X F, LIU S H, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate acute lung injury and improve the gut microbiota in septic rats [J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2020, 11(1): 384.