



葛仙米多糖对高脂小鼠血脂和肠道微生物的影响

杨丽涛, 刘银路, 张波*

北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191

杨丽涛, 刘银路, 张波. 葛仙米多糖对高脂小鼠血脂和肠道微生物的影响. 微生物学报, 2022, 62(3): 785–796.

Yang Litao, Liu Yinlu, Zhang Bo. Effects of *Nostoc sphaeroides* Kütz polysaccharide on blood lipid and gut microflora in high-fat diet mice. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 785–796.

摘要: 【目的】研究葛仙米多糖对高脂饲料喂养小鼠血脂和肠道微生物的影响。【方法】将健康的 8 周龄雄性小鼠分成 5 组, 每组 10 只: 正常组 C57/6CNC 小鼠(N: 灌胃生理盐水, 喂饲标准饲料), 对照组 ApoE^{-/-}小鼠(C: 灌胃生理盐水, 喂饲标准饲料), 模型组 ApoE^{-/-}小鼠(M: 灌胃生理盐水, 喂饲高脂高胆固醇饲料), 葛仙米多糖低剂量组 ApoE^{-/-}小鼠(L: 灌胃葛仙米多糖 0.4 g/kg BW, 喂饲高脂高胆固醇饲料)以及葛仙米多糖高剂量组 ApoE^{-/-}小鼠(H: 灌胃葛仙米多糖 0.8 g/kg BW, 喂饲高脂高胆固醇饲料)。试验为期 22 周。试验结束后, 采集血清、肝脏和结肠组织、盲肠内容物样本利用生化分析仪测定血脂含量, HE 染色观察组织结构, 油红 O 染色观测肝脏脂肪沉积程度, 16S rRNA 基因高通量测序和生物信息处理技术分析盲肠内容物中肠道菌群的多样性和组成结构。【结果】葛仙米多糖降低了高脂高胆固醇饲料喂养小鼠的血脂, 减少了肝脏组织的脂肪沉积, 改善了肠道微生物的多样性和丰富度。【结论】膳食给予葛仙米多糖可改善高脂小鼠的脂代谢, 调节肠道微生态平衡。

关键词: 葛仙米多糖; 高脂饮食; 肠道菌群

基金项目: 北京联合大学与湖南炎帝生物工程有限公司合作项目(12A803720)

Supported by the Cooperative Project between Beijing Union University and Hunan Yandi Bioengineering Co., Ltd. (12A803720)

*Corresponding author. E-mail: zhangbo_wl@buu.edu.cn

Received: 11 August 2021; Revised: 5 November 2021; Published online: 11 January 2022

Effects of *Nostoc sphaeroids* Kütz polysaccharide on blood lipid and gut microflora in high-fat diet mice

YANG Litao, LIU Yinlu, ZHANG Bo*

Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100191, China

Abstract: [Objective] To study the effects of *Nostoc sphaeroids* Kütz polysaccharide (NSKP) on blood lipid and gut microflora in high fat diet mice. [Methods] The healthy 8-week-old male mice were assigned into 5 groups, with 10 mice in each group. The normal group included the C57/6CNC mice administrated with normal saline by gavaged with standard diet, and the control group consisted of ApoE^{-/-} mice administrated with normal saline by gavaged with standard diet. The model group consisted of the ApoE^{-/-} mice administrated with normal saline by gavage and fed with high-fat and high-cholesterol diet. The ApoE^{-/-} mice in the low-dose and high-dose NSKP groups were fed with high-fat and high-cholesterol diet and received 0.4 g/kg and 0.8 g/kg BW NSKP, respectively. The experiment lasted for 22 weeks, and then the serum, liver, colon tissue, and cecal contents samples were collected from the mice. Serum lipid level was measured by the biochemical analyzer. The tissue structure and fat deposition were observed via HE staining and oil red O staining, respectively. The diversity and composition of gut microflora in cecal contents were analyzed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing and bioinformatics tools. [Results] NSKP reduced the serum lipid level and fat deposition in liver tissue, and improved the diversity and relative abundance of gut microflora in high-fat diet mice. [Conclusion] NSKP can improve lipid metabolism and regulate gut microecological balance in high-fat diet mice.

Keywords: *Nostoc sphaeroids* Kütz polysaccharide; high-fat diet; gut microflora

肠道菌群是人体最大的微生态系统，人体肠道内的微生物数量超过 10^{14} [1]，它们在调节机体能量摄取、肠道通透性、维持肠道免疫屏障等方面发挥着重要作用[2-3]。肠道菌群失调可引起机体能量和肠道屏障功能障碍，以及炎症反应[4-5]。高脂血症可以通过改变肠道微生物的组成，介导宿主慢性疾病的发生，出现血脂紊乱和胰岛素抵抗等症状并且影响糖脂代谢[6]。短链脂肪酸作为肠道菌群的重要代谢产物之一，同样可对宿主的代谢甚至神经系统产生影响[7]。目前代谢综合征患病率在全世界范围内呈现上升趋势，中国居民代谢综合征患病率为21.90%[8]。因此，从天然物质中寻找降脂成分

作为膳食补充剂已成为当前的研究热点。

葛仙米是一种单细胞蓝藻，属于蓝藻门念珠藻科，俗称水木耳，又称“葛仙米”，是一种具有较高营养价值的经济蓝藻[9-10]。葛仙米具有丰富的蛋白质、多糖、氨基酸、脂肪酸和维生素，其中蛋白质和多糖含量最为丰富。葛仙米多糖包含阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和葡萄糖醛酸，主要通过 β -1,3 糖苷键以及 β -1,4 糖苷键组成[11]。团队前期研究发现葛仙米及其多糖可改善高脂引起的脂代谢紊乱，并有润肠通便的作用[12-13]。本试验的主要目的是研究葛仙米多糖对高脂小鼠脂代谢紊乱的改善作用是否与肠道菌群有关系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

葛仙米多糖由湖南炎帝生物工程有限公司提供, 纯度为 96.95%, 其中包含阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和葡萄糖醛酸, 其比例为 1.00:7.20:10.84:4.24:5.05:4.14。标准饲料(70.18%碳水化合物、19.47%蛋白质和 5.00%脂肪)和高脂高胆固醇饲料(53.72%碳水化合物、19.47%蛋白质和 21.46%脂肪)均购于江苏美迪森生物医药有限公司(MD12032)。测量血清中甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)等使用的试剂盒均购于南京建成生物科技有限公司。

1.2 试验动物

所有试验动物均为 SPF 级 8 周龄雄性小鼠, 体质量为(22±2) g。正常组(N 组)为 C57/6CNC 小鼠, 其余组均为 ApoE^{-/-}小鼠。购自北京维通利华实验动物技术有限公司[中国北京, 证书编号: SCXK(Jing)2016-0006]。所有试验动物饲养于北京联合大学理化检测分析 SPF 级动物房中, 温度条件为(22±2) °C, 空气相对湿度为 50%–70%, 光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗, 每日更换垫料, 自由摄食和饮水。

1.3 试验方法

试验动物单笼饲养, 适应环境 1 周后, N 组 10 只, 喂饲标准饲料, 灌胃生理盐水。对照组(C 组) 10 只, 喂饲标准饲料, 灌胃生理盐水。模型组(M 组) 10 只, 喂饲高脂高胆固醇饲料, 灌胃生理盐水。葛仙米多糖低剂量组(L 组) 10 只, 喂饲高脂高胆固醇饲料, 灌胃葛仙米多糖 0.4 g/kg BW (生理盐水配制)。葛仙米多糖高

剂量组(H 组) 10 只, 喂饲高脂高胆固醇饲料, 灌胃葛仙米多糖 0.8 g/kg BW (生理盐水配制)。于每天 08:00–10:00 之间对所有小鼠进行灌胃, 连续灌胃 22 周。研究结束时, 所有小鼠禁食 6 h, 并通过腹腔注射巴比妥麻醉, 对试验动物进行拔眼球采血。解剖, 取肝脏、结肠以及盲肠内容物, 按照相应要求保存在 4%多聚甲醛溶液中或者保存在–80 °C 冰箱内, 并且收集 100 mg 小鼠盲肠内容物于 EP 管中, 加入内标溶液(3-甲基戊酸)和乙醚固定, 用于后续试验测定与分析。

1.4 血清生化指标检测

收集的血清样本通过离心分离, 使用试剂盒和 BECKMAN AU480 生化分析仪检测 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C。

1.5 组织病理学检测

每组任意选取 8 个固定的结肠和肝脏样本, 制备 4 μm 的横切片, 通过 HE 染色评估肠道和肝脏组织结构的形态学, 油红 O 染色观察肝脏脂肪沉积程度。

1.6 盲肠内容物的短链脂肪酸含量分析

利用气相色谱法检测盲肠内容物中的乙酸、丙酸、丁酸和戊酸浓度。

1.7 16S rRNA 基因高通量测序和生物信息处理分析

利用各类样本对应的 DNA 提取试剂盒提取盲肠内容物基因组 DNA, 检测 DNA 的纯度和浓度, 选择 16S rRNA 基因 V3–V4 区的通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')/806R (5'-GGACTACHVGGGTWICTAAT-3') 进行 PCR 扩增; 得到的扩增产物经 2%琼脂糖凝胶检测, 切胶回收, 进行定量分析, 构建 Hiseq 文库, 采用 Illumina Hiseq 2500 高通量测序平台对检测合格的文库进行测序。上述工作由中国科学院微生物研究所完成。根据 barcode 序列

区分样本, 提取出的数据以标准的 fastq 格式保存, 根据 Fastq 文件对测序样品进行数据质量评估, 根据 PE reads 之间的 overlap 采用 Flash^[14]软件对数据进行拼接, 分析数据只保留高质量(Q 值 ≥ 25)的碱基比例大于等于 90%的 reads, 采用 QIIME^[15]软件中的 vsearch8.0^[16-17]软件进行嵌合体序列的检测及过滤, 得到有效数据, 基于有效数据按 97%相似性进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类分析, 对 OTU 序列进行物种注释。使用 QIIME 软件计算样本的 Alpha 多样性, 对样本进行物种多样性的分析。基于 unweighted unifracs 距离, 采用偏最小二乘法 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)分析和主坐标分析(PCA)计算 Beta-多样性。经过 Kruskal-Wallis 检验和 Wilcoxon 秩和检验, 使用 LDA effect size 分析方法对肠道菌群进行差异分析, 设置 LDA 值 $> \pm 2$ 表示两组之间差异显著, LDA 值表示生物标志物物种的重要性。原始测序数据已上传至 NCBI 的 Sequence Read Archive (SRA)数据库, 序列号为 NMDC10017873。

1.8 统计学方法

采用 Excel 和 SPSS 20.0 统计软件进行数据整理和分析, 以平均值 \pm 标准差表示符合正态分布的数据, 采用 one-way ANOVA 进行多样本间比较, 采用 Dunnett-*t* 检验进行两两样本比较, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 葛仙米多糖对高脂小鼠体重和摄食量的影响

如表 1 所示, 各组的终体重和总摄食量没有显著性差异, 说明葛仙米多糖对高脂饮食小鼠的体重和总摄食量没有影响。

表 1 葛仙米多糖对高脂小鼠体重和摄食量的影响($n=10$)

Table 1 Effects of *Nostoc sphaeroides* Kütz polysaccharide on body weight and food intake of high-fat diet mice ($n=10$)

Groups	Initial weight/g	Final weight/g	Total food intake/g
N	22.12 \pm 1.09	31.02 \pm 2.72	492.74 \pm 25.78
C	23.26 \pm 0.78	29.79 \pm 1.52	515.73 \pm 31.91
M	23.05 \pm 0.46	30.06 \pm 1.81	463.51 \pm 37.23
L	23.19 \pm 0.72	31.76 \pm 1.78	444.34 \pm 26.27
H	22.72 \pm 0.55	32.79 \pm 2.07	456.65 \pm 18.53

2.2 葛仙米多糖对高脂小鼠血脂水平的影响

如图 1 所示, 与 N 组小鼠相比, C 组小鼠的 TC、TG、LDL-C 均显著增高, HDL-C 显著降低($P < 0.05$), 此结果表明 ApoE^{-/-}小鼠与 C57/6CNC 小鼠的血脂有明显差异。与 M 组比较, C 组血清 TC、TG 和 LDL-C 均显著性降低, HDL-C 显著升高($P < 0.05$), 葛仙米多糖 L 和 H 组血清 TC、TG 和 LDL-C 均显著降低、HDL-C 显著升高($P < 0.05$)。结果表明, 饲喂高脂饲料的同时摄入葛仙米多糖能显著降低 ApoE^{-/-}小鼠的血脂水平, 即葛仙米多糖对高脂小鼠具有较好的降脂作用。

2.3 葛仙米多糖对高脂小鼠肝脏和结肠结构的影响

用葛仙米多糖灌胃小鼠 22 周后, 观察肝脏组织的形态学变化, 结果如图 2A 和图 2B, M 组小鼠肝脏组织与 C 组比较, 出现大量空泡, 部分细胞核破裂, 伴有炎细胞浸润、脂肪过度沉积等异常情况。灌胃葛仙米多糖的 L 组和 H 组与 M 组比较, 异常现象减少, 细胞核清晰可见, 脂肪沉积减少。由图 2C 所示, M 组与 C 组比较, 结肠内膜损伤, 结肠壁宽度变窄, 隐窝结构不完整。葛仙米多糖的 L、H 组与 M 组相比, 结肠内膜完整, 结肠壁变宽, 隐窝结构明显恢复。结果说明, 葛仙米多糖改善了高脂小鼠肝脏

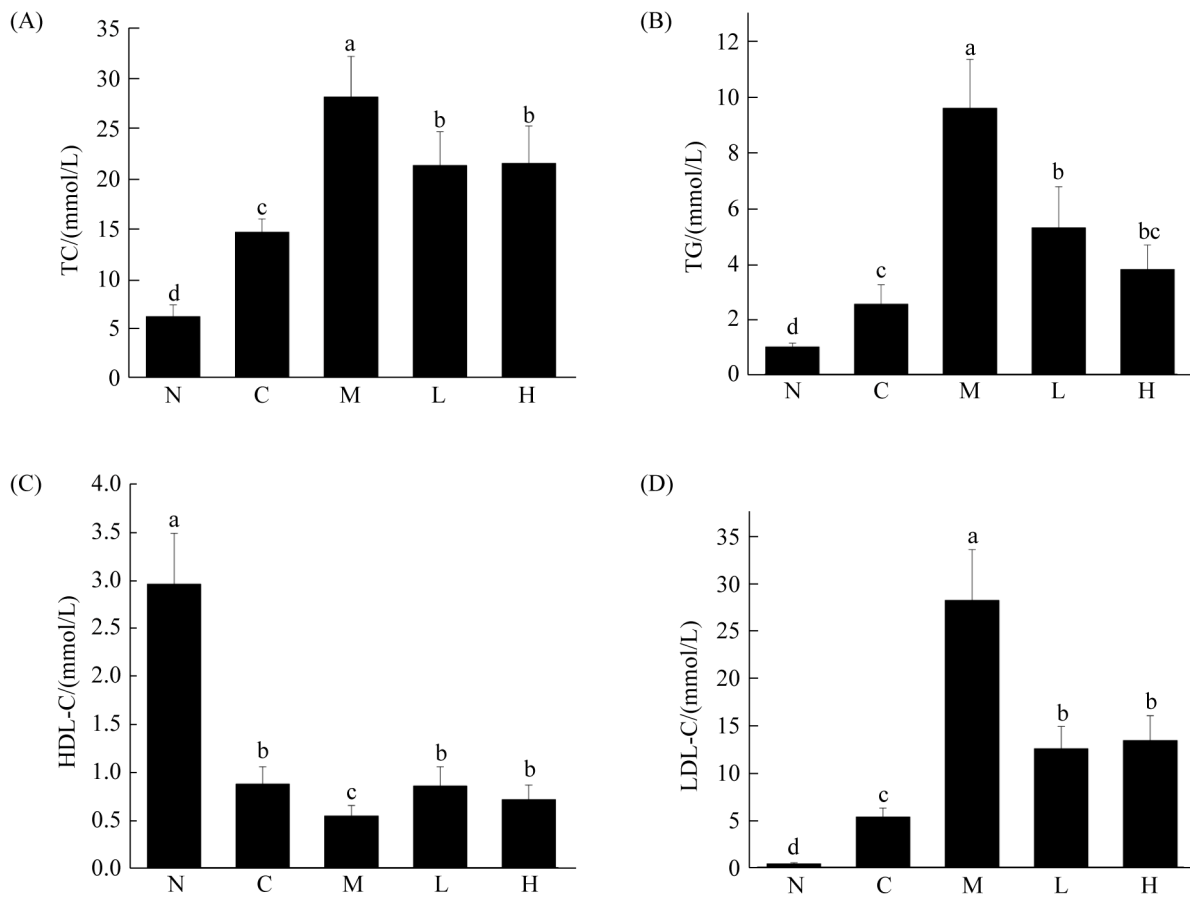


图 1 葛仙米多糖对高脂小鼠血脂水平的影响

Figure 1 Effect of *Nostoc sphaeroids* Kütz polysaccharide on blood lipid level in high-fat diet mice. A: TC; B: TG; C: HDL-C; D: LDL-C. $n=10$. Same letter means $P>0.05$, no significant difference; Different letters means $P<0.05$, significant difference.

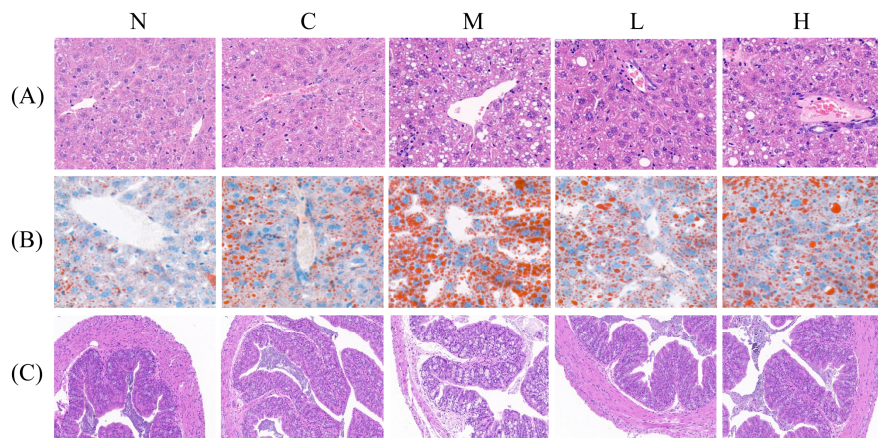


图 2 葛仙米多糖对高脂饮食小鼠肝脏组织和结肠组织的影响

Figure 2 Effects of *Nostoc sphaeroids* Kütz polysaccharide on liver and colon of high-fat diet mice. A: HE staining of the liver (×200); B: oil red O staining of the liver (×200); C: HE staining of the colon (×100). $n=6$.

组织结构,减轻了高脂造成的脂肪沉积,缓解了高脂引起的结肠组织损伤。

2.4 葛仙米多糖对高脂小鼠短链脂肪酸的影响

检测盲肠内容物中短链脂肪酸的含量,如表 2 所示, M 组的乙酸、丙酸和丁酸的含量与 C 组相比均显著性降低($P<0.05$)。葛仙米多糖 L 组和 H 组在丁酸水平上有增加的趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。结果表明葛仙米多糖对短链脂肪酸没有显著影响。

2.5 葛仙米多糖对高脂小鼠肠道微生物的影响

2.5.1 肠道微生物多样性

Alpha-多样性分析见表 3,各组中的 Coverage 平均值为 0.977,说明数据代表了样品中 97.7%以上的细菌类型,测序的深度和广度都符合要求。由表 3 显示,每组之间的物种数目和其他指数均无显著性差异。只是葛仙米多糖 L 组和 H 组与高脂 M 组相比有增加的趋势。结果表明,葛仙米多糖对高脂小鼠肠道中物种的影响不显著。

通过分类操作单元(OTUs)韦恩图(图 3A),研究了不同组之间的 OTU 组成的相似性和重叠性。全部样本共 1 299 个 OTU,5 组(N、C、M、L、H)的 OTU 总数分别为 738、770、719、712 和 744,独有的 OTU 个数分别为 8、10、1、2 和 1。M 组的 OTU 总数较 C 组降低了 6.62% (C 组: 770; M 组: 719)。与 M 组相比,葛仙米多糖 L 组没有增加(M 组: 719; L 组: 712),但

表 2 葛仙米多糖对高脂小鼠短链脂肪酸的影响 ($\mu\text{mol/g}$, $n=6$)

Table 2 Effects of *Nostoc sphaeroides* Kütz polysaccharide on short-chain fatty acids in high-fat diet mice ($\mu\text{mol/g}$, $n=6$)

Groups	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Valeric acid
N	25.82±7.24 ^b	6.73±1.60 ^b	4.91±1.52 ^a	0.88±0.30
C	44.03±6.68 ^a	10.45±1.18 ^a	5.98±1.58 ^a	1.23±0.47
M	25.62±5.80 ^b	7.12±1.38 ^b	3.68±0.76 ^b	0.78±0.51
L	23.10±3.37 ^b	6.74±1.62 ^b	4.49±1.01 ^b	0.80±0.17
H	21.02±5.89 ^b	6.99±1.06 ^b	3.93±0.92 ^b	0.74±0.12

Same letter means $P>0.05$, no significant difference; Different letters means $P<0.05$, significant difference.

是 H 组的 OTU 总数增加了 3.48% (M 组: 719; H 组: 744)。Beta-多样性分析是 OTUs 的丰富度信息比较肠道微生物群落之间的相似程度。由图 3B 可知, M 组与 C 组分布距离较远,说明群落结构的分布明显不同。葛仙米多糖的 L 组与 M 组没有重叠,说明两组的群落结构具有一定的差异性。由图 3C 可知, PC1 的贡献度是 36.13%, PC2 的贡献度是 16.60%, M 组与 C 组之间距离较远;在 C 组与 M 组之间 L 组与 H 组发生聚类。结果表明葛仙米多糖能够改善高脂小鼠肠道菌群的物种丰富度。

2.5.2 肠道菌群结构

在门水平上,如图 4A 所示,各组的肠道菌群均以厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)为主。对于厚壁菌门, M 组的厚壁菌门相对丰富度与 C 组比较呈降低趋势,表明高脂饮食可降低 ApoE^{-/-}

表 3 肠道菌群的 Alpha-多样性分析($n=3$)

Table 3 Alpha-diversity analysis of gut microbial ($n=3$)

Groups	OTUs	Chao1 index	Shannon index	Simpson index	Coverage
N	577.333±38.526	635.407±34.366	6.907±0.285	0.979±0.007	0.997±0.000
C	613.333±19.669	671.345±15.751	6.793±0.327	0.969±0.016	0.997±0.000
M	559.667±23.214	629.910±22.765	6.469±0.193	0.971±0.005	0.997±0.000
L	569.333±26.512	629.706±21.764	6.702±0.170	0.975±0.004	0.997±0.000
H	566.000±35.506	624.138±26.275	6.510±0.159	0.972±0.006	0.997±0.000

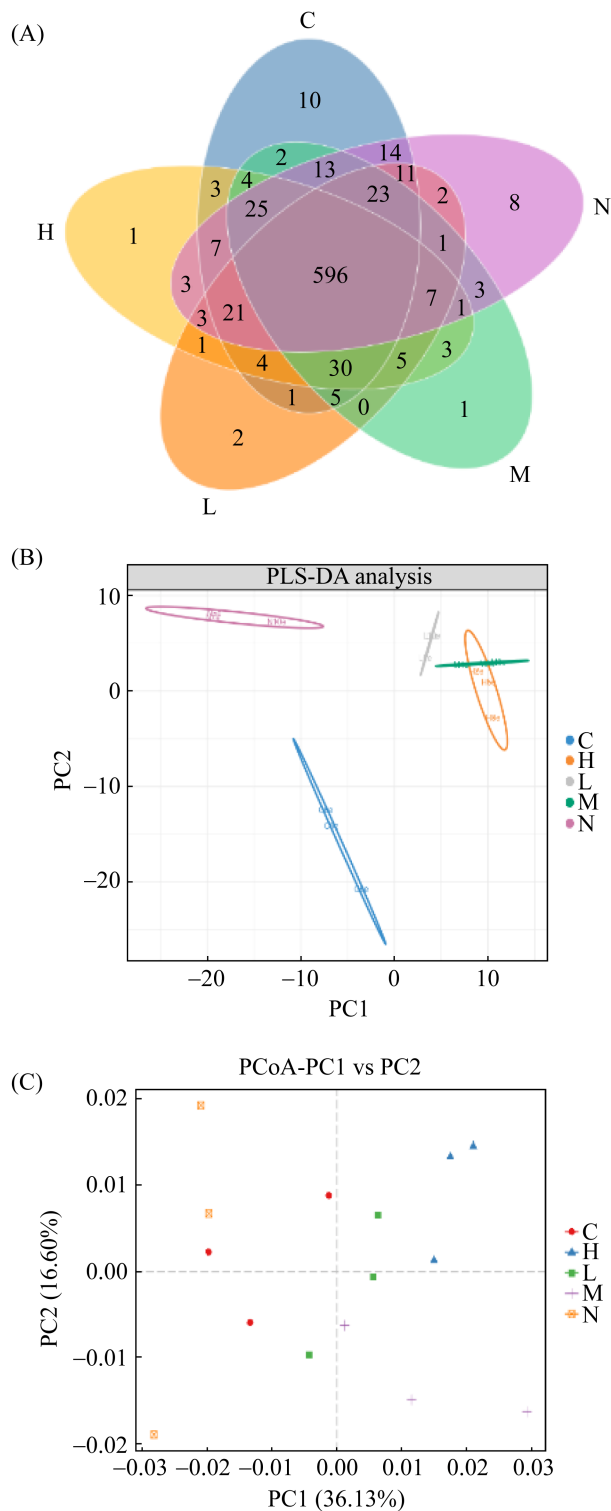


图 3 肠道微生物多样性分析

Figure 3 Diversity analysis of gut microbial. A: Venn diagram based on OTUs; B: PLS-DA analysis; C: PCoA analysis. $n=3$.

小鼠厚壁菌门的相对丰度。葛仙米多糖的 L 和 H 组的厚壁菌门的相对丰度较 M 组呈升高的趋势。表明葛仙米多糖可以增加高脂小鼠肠道厚壁菌门的相对丰度。对于变形菌门, M 组的变形菌门相对丰度与 C 组比较呈升高趋势, 而 H 组的变形菌门相对丰度与 M 组比较呈降低趋势。表明高脂饲料增加了 ApoE^{-/-} 小鼠变形菌门的相对丰度, 而摄入葛仙米多糖可使变形菌门的相对丰度降低。拟杆菌门的相对丰度在各组之间没有呈现差异。

在属水平上, 选取相对丰度超过 5% 的菌群进行分析。由图 4B 所示, 各组之间的 *Faecalibaculum* 相对丰度没有明显的变化。M 组的 *Blautia*、*Peptoclostridium*、*Akkermansia*、*Mucispirillum*、*Coriobacteriaceae* UCG-002 等的相对丰度较 C 组的呈升高趋势。葛仙米多糖 L 与 H 组与模型组 M 组比较均有不同程度的降低。比如: M 组的 *Blautia* 相对丰度较 C 组的呈升高趋势, 葛仙米多糖 L 组和 H 组相比于 M 组 *Blautia* 的相对丰度降低了, 表明葛仙米多糖可以降低高脂饮食小鼠肠道微生物中 *Blautia* 的相对丰度; M 组的 *Peptoclostridium* 相对丰度较 C 组的呈升高趋势, 葛仙米多糖 L 组和 H 组 *Peptoclostridium* 的相对丰度降低了, 表明葛仙米多糖可以降低 *Peptoclostridium* 的相对丰度; M 组的 *Akkermansia* 相对丰度较 C 组的呈升高趋势, 葛仙米多糖 L 组和 H 组 *Akkermansia* 的相对丰度降低了, 表明葛仙米多糖可以降低 *Peptoclostridium* 的相对丰度; 同时 M 组的 *Alistipes*、*Allobaculum*、*Ruminiclostridium* 9、*Desulfovibrio* 相对丰度较 C 组有降低的趋势, 葛仙米多糖 L 组和 H 组与 M 组相比增加了其相对丰度, 表明葛仙米多糖可以增加高脂饮食小鼠肠道微生物的有益菌。结果显示葛仙米多糖对高脂饮食小鼠的肠道微生物的菌群丰度有一定的影响。

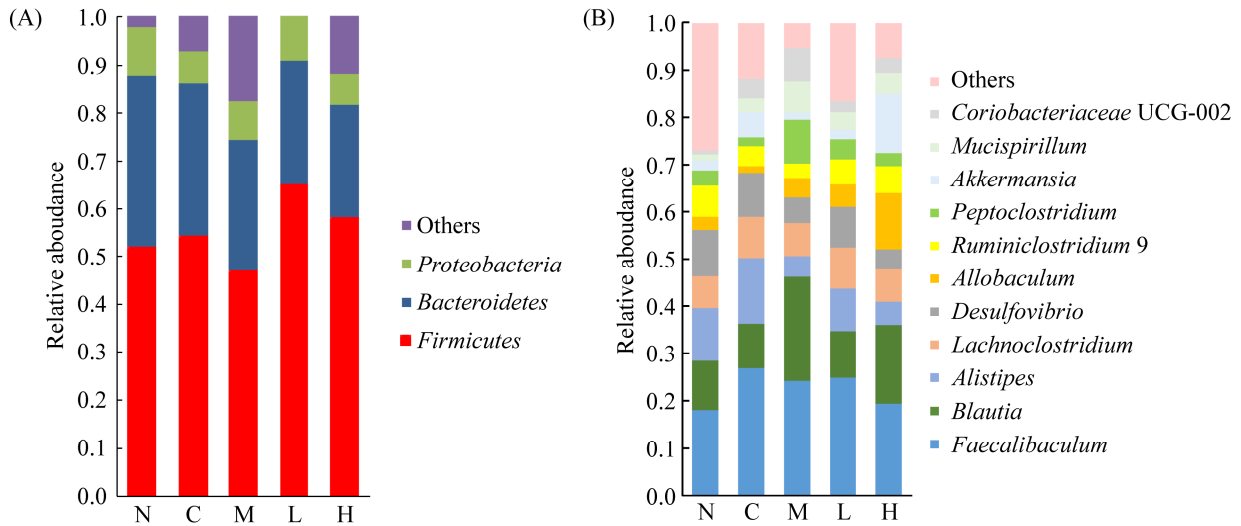


图 4 门水平(A)和属水平(B)的肠道菌落组成

Figure 4 The gut microbiota composition at the phylum level (A) and genus level (B). $n=3$.

2.5.3 LDA effect size 分析

属水平的差异由图 5A 所示, M 组的 *Alloprevotella* 与 C 组相比显著性增加, *Odoribacter*、*Prevotellaceae* UCG_001、*Lactococcus*、*Ruminococcaceae* UCG_014、*Ruminococcaceae* UCG_009、*Ruminiclostridium*、*Lachnospiraceae* UCG_006 显著性降低。

如图 5B 所示, 葛仙米多糖的 L 组 *Helicobacter*、*Alloprevotella*、*Escherichia*、*Shigella* 与 M 组相比显著性降低, *Marvinbryantia*、*Lactococcus*、uncultured、Family XIII UCG_001、*Bifidobacterium*、*Oscillibacter*、*Ruminiclostridium*、*Ruminococcaceae* UCG_009、*Bilophila* 显著性增加。

如图 5C 所示, H 组的 *Coriobacteriaceae* UCG_002、*Helicobacter*、*Turicibacter* 与 M 组相比显著性降低, *Christensenellaceae* R_7 group、uncultured bacterium、*Ruminococcaceae* NK4A214 group、*Lactococcus*、*Bifidobacterium*、*Prevotellaceae* UCG_001、*Ruminococcaceae* UCG_009、*Ruminiclostridium* 9 显著性增加。

综上所述, 葛仙米多糖增加了部分有益菌属的丰富度, 进而改善了高脂小鼠的肠道菌群生态环境。

3 讨论与结论

影响肠道的因素有很多种, 饮食被认为是影响肠道微生物的最重要的因素之一^[18-19]。肠道微生物的多样性和丰富度的改善可以缓解血脂紊乱导致的各种并发症^[20-21]。16S rRNA 基因高通量测序技术现已广泛应用于肠道菌群研究等多个领域, 可以通过研究粪便菌群变化分析出肠道菌群的状态。

随着人们生活水平的提高, 高脂饮食导致的饮食不当严重影响着肠道菌群。有研究表明, 小鼠高脂肪饮食会导致肠道微生物丰富度的降低和多样性的丧失, 并且移植这种高脂肪摄入的肠道菌群也会导致正常小鼠的肠道菌群的多样性降低^[22]。近年来, 随着对葛仙米的深入研究, 发现葛仙米具有较好的抗氧化、抗炎和抗肿瘤的作用^[23-25]。本实验室前期研究证实了葛仙米可以通过调节肠道微生物的变化来改善高

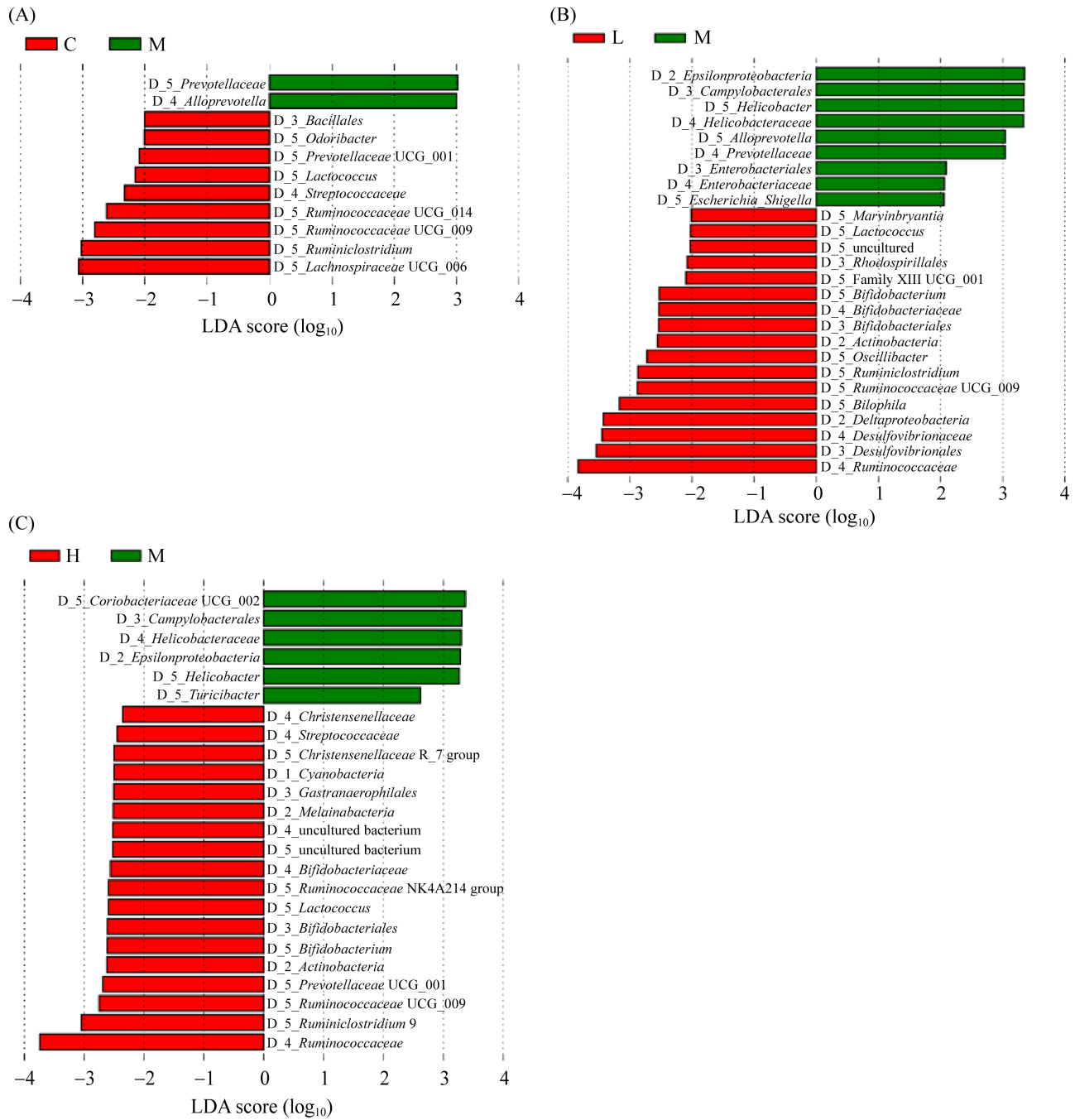


图 5 LefSe 分析图

Figure 5 LefSe analysis. A: C and M; B: M and L; C: M and H. $n=3$ (LDA $\geq\pm 2$ means significant difference).

脂血症^[26]。葛仙米多糖是葛仙米的主要成分，其特殊的糖苷键不容易在胃、小肠内发生消化分解，使得多糖进入结肠内提供能量，起到类似于益生元的活性。本试验结果表明，葛仙米

多糖对高脂饮食小鼠导致的血脂水平的紊乱有改善作用，也缓解了高脂饮食导致的肝脏中的脂肪沉积，改善了结肠组织的结构。血清中的 HDL-C 水平可以作为判断动脉粥样硬化性的

血管疾病发展程度的指标,而葛仙米多糖在一定程度上调节了高脂小鼠体内的血脂水平,降低了心血管疾病的患病风险和非酒精性脂肪肝的发生。

肠道微生物的代谢产物短链脂肪酸,如乙酸、丙酸及丁酸等在为机体提供能量的同时也能够促进脂肪的合成及储存。李子靖^[27]发现,肠道中乙酸的含量会随着高脂饮食而不断变化。丁酸盐在肠道生理学中发挥关键作用,是结肠细胞的主要碳源,在肠蠕动、黏液生成、上皮屏障和免疫稳态等方面具有重要的调控作用^[28],本研究在葛仙米多糖的干预下,高脂小鼠的肠道内丁酸的含量有增加的趋势,其余效果均无影响,有待后期进一步研究。肠道微生物的多样性和丰富度对肠道功能起着重要的作用。本研究结果显示,喂养高脂小鼠葛仙米多糖 22 周后,OTUs 以及 Beta 多样性分析结果表明,葛仙米多糖增加了高脂小鼠肠道菌群的多样性,对肠道微生物的组成有一定的影响。肠道微生物的结构组成分析显示,葛仙米多糖可增加厚壁菌门的相对丰富度,降低变形菌门的相对丰富度,并且葛仙米多糖增加了具有健康人标志性的菌属(如 *Alistipes*)。LEfSe 差异性 LDA effect size 分析中,部分有益菌有显著增加。比如:双歧杆菌是肠道中有益微生物,也是产生丁酸盐的主要菌群之一,可以抑制肠道中有害菌的生长,调节肠道菌群平衡^[29]。Liang 等^[30]研究表明,双歧杆菌能够改善肠道屏障功能并减少血清中毒素的水平,从而降低非酒精性脂肪肝的发展进程。本试验中葛仙米多糖增加了 *Bifidobacterium* 的丰富度,达到了减轻脂肪肝的作用,并且喂养高脂饮食后肠道菌群中丁酸明显降低,在同时喂养葛仙米多糖后丁酸含量有增加的趋势。此外,高脂饮食造成的瘤胃球菌 *Ruminococcaceae* UCG_014、*Ruminococcaceae*

UCG_009 的大量减少,但摄入葛仙米多糖后得以恢复,这与一些报道一致,如黄芩苷通过增加高脂小鼠肠道微生物中瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 缓解了高脂饮食造成的肠道菌群的失调,说明葛仙米多糖可能与黄芩苷有同样的效果。*Helicobacter* 被认为与哺乳动物胃炎和肝炎等疾病密切相关^[31]。而葛仙米多糖显著降低了 *Helicobacter* 相对丰富度。以上结果说明葛仙米多糖对高脂小鼠的肠道菌群失调具有改善作用。

综上所述,膳食补充葛仙米多糖可改善高脂小鼠的脂代谢,调节肠道微生态平衡。这为葛仙米多糖的研究和应用提供了新的思路。

参考文献

- [1] 郭丽璇,胡琼英,熊大迁. 肠道菌群调控 2 型糖尿病发生发展的研究进展. 实用医学杂志, 2020, 36(9): 1142-1147.
Guo LX, Hu QY, Xiong DQ. Research progresses of intestinal flora regulating the occurrence and the development of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Practical Medicine*, 2020, 36(9): 1142-1147. (in Chinese)
- [2] Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: Targets & Therapy*, 2011, 5: 71-86.
- [3] Fluitman KS, de Clercq NC, Keijser BJB, Visser M, Nieuwdorp M, IJzerman RG. The intestinal microbiota, energy balance, and malnutrition: emphasis on the role of short-chain fatty acids. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 2017, 12(3): 215-226.
- [4] Chen L, Zhang LY, Wang WD, Qiu W, Liu L, Ning AH, Cao J, Huang M, Zhong MT. Polysaccharides isolated from *Cordyceps sinensis* contribute to the progression of NASH by modifying the gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0232972.
- [5] 耿妍,鲁晓岚,耿燕,史海涛. 肠道菌群紊乱在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用机制. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(12): 1626-1630.
Geng Y, Lu XL, Geng Y, Shi HT. Mechanism of intestinal flora disturbance in nonalcoholic fatty liver

- disease in rats. *Journal of Molecular Diagnostics and Therapy*, 2020, 12(12): 1626–1630. (in Chinese)
- [6] Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47713.
- [7] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 2016, 165(6): 1332–1345.
- [8] 李文敏, 高凯. 2014–2017 年我国居民代谢综合征患病率的 meta 分析. *慢性病学杂志*, 2018, 19(11): 1476–1480.
Li WM, Gao K. The prevalence of metabolic syndrome in China from 2014 to 2017: a meta-analysis. *Chronic Pathematology Journal*, 2018, 19(11): 1476–1480. (in Chinese)
- [9] Wei FF, Liu YL, Bi CC, Zhang B. *Nostoc sphaeroides* Kütz powder ameliorates diet-induced hyperlipidemia in C57BL/6j mice. *Food & Nutrition Research*, 2019, 63: 3618.
- [10] Li HF, Su LN, Chen S, Zhao LB, Wang HY, Ding F, Chen H, Shi RN, Wang YL, Huang ZB. Physicochemical characterization and functional analysis of the polysaccharide from the edible microalga *Nostoc sphaeroides*. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2018, 23(2): 508.
- [11] Liu YF, Su PF, Xu JF, Chen S, Zhang JS, Zhou S, Wang YT, Tang QJ, Wang YL. Structural characterization of a bioactive water-soluble heteropolysaccharide from *Nostoc sphaeroides* Kütz. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 200: 552–559.
- [12] 刘银路, 毕萃萃, 魏芬芬, 陈盛, 王玉兰, 张波. 葛仙米对大鼠的润肠通便作用研究. *食品工业科技*, 2020, 41(16): 292–296.
Liu YL, Bi CC, Wei FF, Chen S, Wang YL, Zhang B. Effect of *Nostoc sphaeroides* on laxative in rats. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(16): 292–296. (in Chinese)
- [13] Liu YL, Yang LT, Bi CC, Tang K, Zhang B. *Nostoc sphaeroides* Kütz polysaccharide improved constipation and promoted intestinal motility in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021: 5596531.
- [14] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [15] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [16] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194–2200.
- [17] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [18] Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1716–1724.e2.
- [19] Daniel H, Gholami AM, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot S, Lepage P, Rothballer M, Walker A, Böhm C, Wenning M, Wagner M, Blaut M, Schmitt-Kopplin P, Kuster B, Haller D, Clavel T. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME Journal*, 2014, 8(2): 295–308.
- [20] 李天翔, 李素娟, 郝祥宇, 祝志波, 郭建强. 肠道菌群及代谢与载脂蛋白 E 在动脉粥样硬化中的相互作用. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(9): 993–997.
Li TX, Li SJ, Hao XY, Zhu ZB, Guo JQ. Intestinal flora and metabolism interact with apolipoprotein in atherosclerosis. *Chinese Journal of Microecology*, 2020, 32(9): 993–997. (in Chinese)
- [21] Nehra V, Allen JM, Mailing LJ, Kashyap PC, Woods JA. Gut microbiota: modulation of host physiology in obesity. *Physiology: Bethesda, Md*, 2016, 31(5): 327–335.
- [22] Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 2016, 529(7585): 212–215.
- [23] 方倩. 葛仙米对小鼠生长和免疫功能的影响. 河南师范大学硕士学位论文, 2015.
- [24] Ninomiya M, Satoh H, Yamaguchi Y, Takenaka H, Koketsu M. Antioxidative activity and chemical constituents of edible terrestrial alga *Nostoc commune* vauch. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*,

- 2011, 75(11): 2175–2177.
- [25] 汤俊, 毕永红, 万能, 胡征宇. 葛仙米提取物诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的活性研究. *安徽农业科学*, 2010, 38(33): 18643–18645, 18656.
- Tang J, Bi YH, Wan N, Hu ZY. Induction of apoptosis in HepG2 cells by *Nostoc sphaeroides* extract. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(33): 18643–18645, 18656. (in Chinese)
- [26] Wei FF, Liu YL, Bi CC, Chen S, Wang YL, Zhang B. *Nostoc sphaeroides* Kütz ameliorates hyperlipidemia and maintains the intestinal barrier and gut microbiota composition of high-fat diet mice. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(5): 2348–2359.
- [27] 李子靖. 肠道菌群与肥胖发生和治疗的关系研究进展. *现代商贸工业*, 2019, 40(8): 84–87.
- [28] Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, Glover LE, Kominsky DJ, Magnuson A, Weir TL, Ehrentraut SF, Pickel C, Kuhn KA, Lanis JM, Nguyen V, Taylor CT, Colgan SP. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(5): 662–671.
- [29] 王家妮, 程如越, 罗雅亭, 周青青, 蒋丰岭, 沈曦, 吴晓娜, 何方. 高脂饲料诱导小鼠代谢综合征及对肠道发育、肝脏功能和肠道菌群的影响. *卫生研究*, 2021, 50(1): 93–99.
- Wang JN, Cheng RY, Luo YT, Zhou QQ, Jiang FL, Shen X, Wu XN, He F. High-fat diet induces metabolic syndrome in mice and its influence on intestinal development, liver function and intestinal microbiota. *Journal of Hygiene Research*, 2021, 50(1): 93–99. (in Chinese)
- [30] Liang YJ, Lin CL, Zhang YP, Deng YJ, Liu C, Yang QH. Probiotic mixture of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* alleviates systemic adiposity and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rats through Gpr109a and the commensal metabolite butyrate. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(4): 1051–1055.
- [31] Ma QT, Li YQ, Wang JK, Li PF, Duan YH, Dai HY, An YC, Cheng L, Wang TS, Wang CG, Wang T, Zhao BS. Investigation of gut microbiome changes in type 1 diabetic mellitus rats based on high-throughput sequencing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109873.

(本文责编 李磊)



张波, 博士, 北京联合大学教授。主要从事食药物质以及提取物的安全性毒理学评价与毒作用机制研究、生物活性物质对糖脂代谢以及相关疾病的预防和干预研究。主持多项国家级和省部级科研课题, 获得省级科学技术奖 1 等奖、中国高校科学技术奖 2 等奖等。在国内外重要杂志发表科研论文 50 余篇。同时担任国家市场监督管理总局保健食品审评专家; 国家卫健委新食品原料审评专家; 北京联合大学保健食品检测中心技术负责人/授权签字人。