

# 木浆源甾醇对高脂高胆固醇膳食饲喂仓鼠肠道胆固醇调控及菌群的影响

王轶菲<sup>1,2</sup>, 陈见容<sup>2</sup>, 王晓彬<sup>2</sup>, 花尔并<sup>1</sup>, 赵江<sup>2</sup>, 王浩<sup>2,\*</sup>

(1.天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2.天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:**以高脂高胆固醇膳食饲喂仓鼠为动物模型, 研究木浆源甾醇对仓鼠胆固醇调控及肠道菌群的影响。45只实验动物随机分成正常组、高脂组和3个不同剂量木浆源甾醇组(1%、5%、10%)。测定血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平, 应用气相色谱检测粪便固醇排泄量, 应用实时荧光定量聚合酶链式反应分析小肠中胆固醇调控相关基因的表达水平, 应用变性梯度凝胶电泳分析肠道菌群变化。结果显示, 与高脂组相比, 给予木浆源甾醇仓鼠的TC、TG和non HDL-C水平均显著降低( $P < 0.05$ ); 5%和10%组仓鼠肝脏质量极显著降低( $P < 0.01$ ); 木浆源甾醇5%和10%组乙酰辅酶A乙酰基转移酶-2和微粒体甘油三酯转运蛋白mRNA表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ), 10%组羟甲基戊二酰辅酶A还原酶、三磷酸腺苷结合盒转运体G5和G8 mRNA表达水平显著提高( $P < 0.05$ ); 10%组仓鼠中性固醇和酸性固醇排泄量均极显著增加( $P < 0.01$ ); 1%和5%剂量木浆源甾醇能显著降低由高脂高胆固醇膳食引起的肠道菌群异常增殖( $P < 0.05$ )。给予木浆源甾醇可显著降低*Oscillibacter* sp.、*Desulfovibrio* sp.等菌的数量( $P < 0.05$ ), 显著增加*Akkermansia* sp.、*Anaerostipes* sp.及*Roseburia* sp.等菌的数量( $P < 0.05$ )。结果表明, 摄入木浆源甾醇可以增加仓鼠肠道胆固醇的排泄、抑制胆固醇的合成吸收和改善肠道菌群。

**关键词:**木浆源甾醇; 仓鼠; 胆固醇; 肠道菌群

## Effect of Wood Pulp-Derived Sterols on Intestinal Cholesterol Regulation and Microbiota in Hamsters Fed High-Fat and High-Cholesterol Diet

WANG Yifei<sup>1,2</sup>, CHEN Jianrong<sup>2</sup>, WANG Xiaobin<sup>2</sup>, HUA Erbing<sup>1</sup>, ZHAO Jiang<sup>2</sup>, WANG Hao<sup>2,\*</sup>

(1. School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The aim of this research was to investigate the effects of wood pulp-derived sterols on cholesterol regulation and the intestinal microbiota in Golden Syrian hamsters fed a high-fat and high-cholesterol diet. Totally 45 hamsters were randomly divided into normal group, high-fat and high-cholesterol (HFHC) group and three experimental groups given 1%, 5% and 10% of wood pulp-derived sterols, respectively. Serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and high-density-lipoprotein-cholesterol (HDL-C) were detected in all animals. The contents of cholesterol in liver, fecal neutral and acidic sterols were determined by gas chromatography (GC). The expression of cholesterol-regulating genes in the liver and small intestine was assayed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The change of intestinal microbiota was assayed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). TC, TG and non HDL-C in the experimental groups were significantly decreased compared with the HFHC group ( $P < 0.05$ ), and hepatic cholesterol level was significantly decreased with increasing dose of wood pulp-derived sterol ( $P < 0.01$ ). The weight of liver in the 5% and 10% groups was significantly decreased compared with the HFHC group ( $P < 0.01$ ). The mRNA expression levels of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) in the 5% and 10% groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the RNA expression levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase the ATP-binding cassette (ABC) transporters ABCG5 and ABCG8 in the 10% group was significantly increased ( $P < 0.05$ ) compared with the HFHC group. Significantly higher fecal excretion of total fecal neutral sterols and total fecal acidic sterols

收稿日期: 2016-04-18

基金项目: 金龙鱼营养与安全研究基金项目

作者简介: 王轶菲(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品营养学。E-mail: wangyifei.1517@163.com

\*通信作者: 王浩(1979—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品营养学。E-mail: wanghao@tust.edu.cn

were observed in the 10‰ group compared with the HFHC group ( $P < 0.01$ ). Wood pulp-derived sterols at doses of 1‰ and 5‰ significantly decreased intestinal bacterial overgrowth induced by HFHC diet ( $P < 0.05$ ). *Oscillibacter* sp. and *Desulfovibrio* sp. were significantly decreased, while *Akkermansia* sp., *Anaerostipes* sp. and *Roseburia* sp. were significantly increased in the experimental groups ( $P < 0.05$ ). Therefore, wood pulp-derived sterol resulted in increasing intestinal cholesterol excretion and inhibition of cholesterol absorption and synthesis, and improved the intestinal microbiota in hamsters.

**Key words:** wood pulp-derived sterols; hamsters; cholesterol; intestinal microbiota

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201709031

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 09-0189-07

引文格式:

王铁菲, 陈见容, 王晓彬, 等. 木浆源甾醇对高脂高胆固醇膳食饲喂仓鼠肠道胆固醇调控及菌群的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(9): 189-195. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201709031. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Yifei, CHEN Jianrong, WANG Xiaobin, et al. Effect of wood pulp-derived sterols on intestinal cholesterol regulation and microbiota in hamsters fed high-fat and high-cholesterol diet[J]. Food Science, 2017, 38(9): 189-195.

(in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201709031. <http://www.spkx.net.cn>

高脂高胆固醇膳食会使体内自由基数量增加, 加剧氧化应激程度, 造成炎症反应<sup>[1]</sup>, 增大高血压、冠心病和糖尿病的患病风险<sup>[2-4]</sup>。植物甾醇在体内具有降胆固醇<sup>[5-6]</sup>、防治前列腺疾病<sup>[7]</sup>、抗癌<sup>[8]</sup>、抗炎<sup>[9]</sup>和延缓衰老<sup>[10]</sup>等作用。植物甾醇在结构上与胆固醇相似, 仅是支链不同, 广泛存在于植物中, 研究显示, 植物甾醇在肠道中会与胆固醇相竞争, 进而减少肠道上皮细胞对胆固醇的吸收<sup>[11-12]</sup>。木浆源甾醇是造纸工业的副产物, 与常见的植物油来源甾醇相比含有更高含量饱和型二氢谷甾醇。我国是木浆生产大国, 每年有大量的木浆副产物产生, 可供开发的木浆源植物甾醇资源丰富。目前, 对于植物甾醇的研究还主要集中于植物油源甾醇, 而对于木浆源甾醇的研究还很少, 且鲜有关于木浆源植物甾醇调控机体胆固醇代谢的报道。

微生物群可以视为人体的器官, 具有高度复杂性, 肠道菌群与宿主的健康情况密切相关, 现今已成为研究热门<sup>[3-4, 13]</sup>。目前, 木浆源甾醇对肠道菌群的作用却鲜有报道。本实验以高脂血症仓鼠为模型, 研究木浆源甾醇对体内胆固醇调控及肠道菌群的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

木浆源甾醇(总甾醇含量>97.4%, 其中豆甾醇0.1%、谷甾醇77.1%、二氢谷甾醇11.2%、菜油甾醇6.6%、其他甾醇1.7%) 西安海斯夫生物科技有限公司; 总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒 中生北控生物科技股份有限公司; Trizol试剂、cDNA反转录试剂盒、SYBR Green 大连宝生物工程

有限公司; 2×Es Taq MasterMix、溶菌酶、pUC-T TA连接试剂盒、焦碳酸二乙酯、聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒 北京康为世纪生物科技有限公司; 引物 苏州金唯智生物科技有限公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、豆甾醇、猪去氧胆酸 美国Sigma公司; 甲酰胺 上海生物化学试剂工程公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

MyCycler聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、MyiQ2实时荧光定量PCR仪、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)突变检测系统 美国Bio-Rad公司; UVmini1240紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; 冷冻离心机 美国Thermo公司; G:box凝胶图像采集分析系统 英国Syngene公司; 7890A气相色谱仪 美国安捷伦公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 动物分组及饲养

仓鼠(*Mesocricetus auratus*), SPF级, 45只, 110~140 g, 雄性, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。适应1周后将仓鼠随机分成5组, 每组9只, 分别为正常组、高脂组、1‰、5‰和10‰木浆源甾醇组。饲料配方具体见表1。

动物饲养条件: 屏障系统动物房, 温度(22±2)℃, 相对湿度40%~60%, 控制照明12 h/12 h昼夜循环。仓鼠饲养6周, 实验期间自由摄食饮水。实验动物每2 d更新新粮。

实验6周后, 仓鼠禁食不禁水12 h, CO<sub>2</sub>麻醉后取血、处死并解剖。血液4℃离心分离血清后-80℃保存。收集脏器, 生理盐水清洗后-80℃保存。结肠内容物装入已灭菌离心管中, -80℃保存。

表1 正常饲料与实验饲料组成  
Table 1 Compositions of control diet and experimental diet

成分	含量/(g/kg)				
	正常组	高脂组	木浆源甾醇组		
			1‰	5‰	10‰
玉米淀粉	508	408	408	408	408
酪蛋白	242	242	242	242	242
蔗糖	119	119	119	119	119
猪油	50	150	150	150	150
矿物质混合物	40	40	40	40	40
维生素混合物	20	20	20	20	20
明胶	20	20	20	20	20
DL-蛋氨酸	1	1	1	1	1
胆固醇		1	1	1	1
木浆源甾醇			1	5	10
蛋白质	251	251	251	251	251
脂肪	50	150	150	150	150
碳水化合物	647	547	547	547	547
总能量/kal	4 041	4 541	4 541	4 541	4 541

### 1.3.2 血清中TC、TG和HDL-C含量的测定

参照试剂盒说明书进行, 分别通过胆固醇氧化酶法、磷酸甘油氧化酶法和磷钨酸-镁沉淀法测定。non HDL-C含量为TC与HDL-C含量的差值。

### 1.3.3 实时荧光定量PCR法检测肝脏和小肠中胆固醇调控相关基因的表达水平

Trizol法提取RNA, 反转录得cDNA,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。SYBR Green法检测基因表达水平, 以3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参基因。实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)程序参照试剂盒具体说明。基因引物信息见表2。表达水平结果以相对表达量(比值)表示。

表2 小肠中相关基因qRT-PCR引物  
Table 2 qRT-PCR primers used in this study

基因	登录号	正向引物	反向引物
GAPDH	DQ403055.1	5'-ATGCTGGTCCGAGTATGTTG-3'	5'-CAGAAGGTGCGGAGATGATGAC-3'
HMG-CoA-R	XM003507992.1	5'-CCAATGGCAACAACGGAAGG-3'	5'-GAATCACAAGCAGGAGGAAGC-3'
NPC1L1	XM003500340.1	5'-GCTGGCTGGCTCTCATCATC-3'	5'-GCTGGCTGGCTCTCATCATC-3'
ABCG5	NM001244004.1	5'-GCAGAGACCCGATCTGTGATTG-3'	5'-ACAGAACAACCACTCTCCGTAAG-3'
ABCG8	XM003496233.1	5'-TGACTTCTATGTGGACTTGAC-3'	5'-CGGCTGACTGTATAGGTAAC-3'
ACAT-2	XM003515027.1	5'-TCATCTTCTTCGCCTTCC-3'	5'-CCATAGTCCATCTTGATACAC-3'
MTP	U21102.1	5'-GGCATCTGTGAGGAGTAACC-3'	5'-CAGAGTGGCTGCGATTAGG-3'

注: GAPDH. 磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase); ABC. 三磷酸腺苷结合盒转运体(intestinal ATP binding cassette transporter); ACAT-2. 乙酰辅酶A乙酰基转移酶-2(acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-2); MTP. 微粒体甘油三酯转运蛋白(microsomal triacylglycerol transport protein); HMG-CoA-R. 羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase)。

### 1.3.4 粪中中性及酸性固醇含量的测定

粪样品经冻干, 磨粉, 中性固醇萃取到环己烷层, 三甲基硅烷(trimethylsilylation, TMS)衍生化后使用气相色谱(gas chromatography, GC)检测; 酸性固醇在下层水层, 经皂化、提取后再转化为其TMS衍生物, 其中, 中性固醇以豆甾醇为内标, 酸性固醇以猪去氧胆酸为内标<sup>[14]</sup>。

### 1.3.5 肠道菌群DNA提取及PCR-DGGE检测

结肠内容物由 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出, 参照文献[15]的方法进行菌群总DNA的提取。将提取出的DNA测定吸光度, 计算 $A_{260\text{ nm}}$ 、 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ , 并用琼脂糖凝胶电泳检测所提取总DNA。

16S rDNA V3区PCR扩增通用引物为: GC-F338: 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' (下划线序列为GC夹序列, 未划线序列为引物F338序列)和R518: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'。50  $\mu\text{L}$  PCR反应体系为: 2 $\times$ Es Taq MasterMix 25  $\mu\text{L}$ 、GC-F338 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ 、R518 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ 、DNA模板1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O定容至50  $\mu\text{L}$ 。PCR反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s、55  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 循环35次; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

DGGE丙烯酰胺凝胶体积分数为10%, 变性梯度为40%~65% (100%变性剂为7 mol/L尿素和40%去离子甲酰胺), PCR产物的上样量为每个泳道35  $\mu\text{L}$ 。在120 V、60  $^{\circ}\text{C}$  条件下电泳480 min。电泳后凝胶经EB染色, 凝胶成像系统进行紫外照相。条带使用无菌刀片切下, 使用聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒进行回收。回收DNA使用引物F338和R518进行PCR扩增, PCR产物与pUC-T载体连接。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 进行转化, 阳性克隆子交由苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。所得序列在美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)中进行Blast对比分析。

DGGE凝胶图片采用Quantity One软件对图像中的条带进行灰度值分析。多样性Shannon-Wiener指数( $H'$ )、菌群均匀度Pielou指数( $E$ )和菌群丰富度Margalef指数(dMa)分别按公式(1)~(3)计算。

$$H' = -\sum P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$E = \frac{H'}{H'_{\max}}, H'_{\max} = \ln S \quad (2)$$

$$\text{dMa} = \frac{S-1}{\lg S} \quad (3)$$

式中:  $P_i$ 为泳道中第*i*条带灰度值占该泳道总灰度值的比例;  $H'_{\max}$ 为式(1)中 $H'$ 的最大值;  $S$ 表示每泳道中的条带数量。

### 1.4 数据统计分析

采用SPSS 13.0软件分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用*t*检验法检验,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 木浆源甾醇对仓鼠生长发育的影响

**表3 木浆源甾醇对仓鼠体重、进食量及脏器质量的影响**  
**Table 3 Effect of wood pulp-derived sterols on body weight, food intake and visceral organ weights of hamsters**

指标	正常组	高脂组	木浆源甾醇组		
			1‰	5‰	10‰
初始体重/g	128.16±6.17	127.56±13.41	130.91±13.03	122.06±6.76	129.85±10.53
最终体重/g	158.13±15.89	161.98±14.51	168.26±20.69	160.37±6.88	166.43±12.44
进食量/g	8.57±0.91	8.13±0.93	8.07±0.93	7.73±0.12	7.99±0.05
心脏质量/g	0.31±0.03	0.31±0.03	0.30±0.02	0.33±0.03	0.30±0.04
肝脏质量/g	3.19±0.27**	3.93±0.35	3.71±0.40	3.28±0.38**	3.29±0.29**
肾脏质量/g	0.80±0.07	0.73±0.03	0.78±0.08	0.81±0.13	0.75±0.03
肾周脂肪质量/g	1.61±0.31	1.79±0.36	2.02±0.49	2.06±1.02	2.09±0.56
睾丸质量/g	2.50±0.25	2.42±0.31	2.33±0.29	2.43±0.21	2.39±0.23
附睾脂肪质量/g	2.80±0.40	3.04±0.44	3.22±0.56	2.97±0.53	3.17±0.40

注：\*、与高脂组相比有显著差异（ $P < 0.05$ ）；\*\*、与高脂组相比有极显著差异（ $P < 0.01$ ）。下同。

由表3可知，实验期间，各组仓鼠生长状况良好，毛柔顺有光泽，未出现不适及自然死亡；饲喂高脂高胆固醇膳食仓鼠的进食量略低于正常组仓鼠进食量，但各组仓鼠初始体重、终体质量及进食量均无显著性差异（ $P > 0.05$ ）。高脂组仓鼠肝脏质量较正常组极显著增加（ $P < 0.01$ ）；与高脂组相比，木浆源甾醇5‰和10‰组仓鼠肝脏质量极显著降低（ $P < 0.01$ ）。

## 2.2 木浆源甾醇对仓鼠血脂水平的影响

**表4 木浆源甾醇对仓鼠血脂指标的影响**  
**Table 4 Effect of wood pulp-derived sterols on serum lipid indices of hamsters**

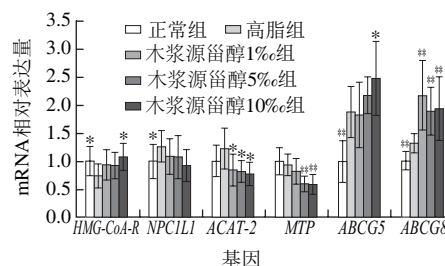
饲喂时间/周	血脂指标	含量/(mg/dL)				
		正常组	高脂组	木浆源甾醇		
				1‰	5‰	10‰
0	TC	119.72±9.78	121.42±10.96	121.81±9.92	125.43±6.93	122.31±8.83
	TG	254.27±51.83	259.15±43.89	357.81±41.95	252.37±46.43	255.79±40.05
	HDL-C	73.89±7.42	71.56±11.29	74.91±10.43	74.79±10.77	73.63±10.73
	non HDL-C	57.57±14.05	50.67±8.17	52.95±5.45	52.26±6.42	49.27±9.22
3	TC	125.56±9.88**	188.64±12.80	166.17±8.06**	138.10±11.80**	129.53±8.70**
	TG	240.76±54.57**	391.00±55.10	346.63±47.62*	277.78±56.01**	240.76±55.55**
	HDL-C	73.94±9.25**	91.89±9.04	95.46±10.48	92.72±8.80	88.69±14.31
	non HDL-C	52.18±6.04**	95.93±8.52	76.25±6.91**	47.10±8.86**	40.72±7.76**
6	TC	120.47±6.74**	187.78±11.99	163.98±8.32**	131.00±11.39**	128.88±10.89**
	TG	235.81±41.68**	389.56±48.71	344.08±55.77*	275.19±48.30**	262.73±49.60**
	HDL-C	70.78±6.64**	92.33±10.59	89.13±6.70	90.56±8.80	91.75±8.29
	non HDL-C	52.77±6.58**	95.08±7.24	74.55±5.24**	48.69±10.70**	37.02±5.59**

由表4可知，0周时，各组仓鼠血清中TC、TG、HDL-C和non HDL-C水平均无显著差异（ $P > 0.05$ ）。饲喂木浆源甾醇6周后，木浆源甾醇组仓鼠血清中TC、TG和non HDL-C水平较显著降低（ $P < 0.05$ ）。

## 2.3 木浆源甾醇对仓鼠小肠中基因HMG-CoA-R、NPC1L1、ACAT-2、MTP、ABCG5及ABCG8 mRNA表达的影响

由图1可知，木浆源甾醇5‰和10‰组ACAT-2

和MTP mRNA相对表达量均显著降低（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），10‰组HMG-CoA-R、ABCG5及ABCG8 mRNA相对表达量显著提高（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）。

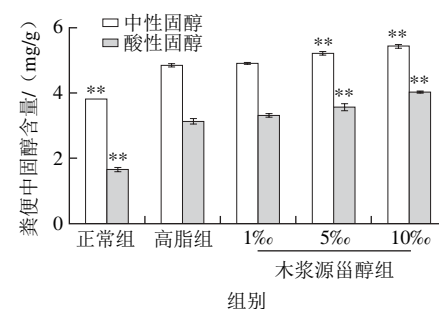


\*、与高脂组相比有显著差异（ $P < 0.05$ ）；\*\*、与高脂组相比有极显著差异（ $P < 0.01$ ）。下同。

**图1 木浆源甾醇对仓鼠小肠中基因HMG-CoA-R、NPC1L1、ACAT-2、MTP、ABCG5及ABCG8 mRNA表达的影响**

**Fig. 1 Effect of wood pulp-derived sterols on the mRNA expression levels of genes related to cholesterol metabolism in small intestine**

## 2.4 木浆源甾醇对仓鼠固醇排泄量的影响



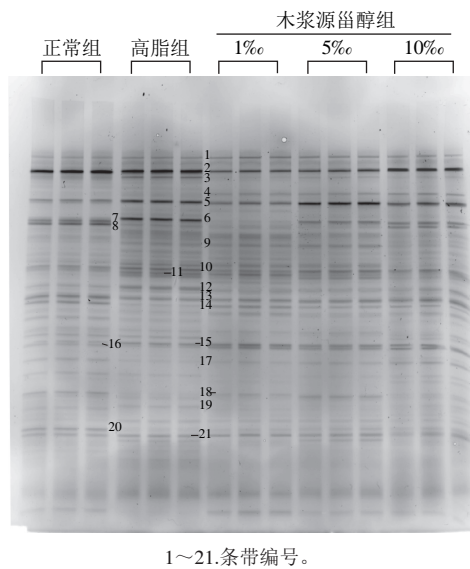
**图2 木浆源甾醇对仓鼠粪便中固醇排泄的影响**

**Fig. 2 Effect of wood pulp-derived sterols on fecal excretions of neutral and acidic sterols of hamsters**

由图2可知，与正常组相比，高脂组仓鼠粪便中中性和酸性固醇排泄量均极显著增加（ $P < 0.01$ ）；与高脂组相比，木浆源甾醇5‰和10‰组中性固醇和酸性固醇排泄量均极显著增加（ $P < 0.01$ ）。

## 2.5 木浆源甾醇对肠道菌群的影响

由DGGE图谱（图3）显示，不同组别的条带数量和亮度不同，条带灰度值见表5。与正常组相比，高脂组中条带3、4、5、6、9、10、11、12、15、19和21灰度值显著增加（ $P < 0.05$ ），条带7、8、13、14、16、17、18、20灰度值显著降低（ $P < 0.05$ ）。测序结果主要以拟杆菌属和梭菌属为主，正常组、高脂组、木浆源甾醇1‰、5‰和10‰组中灰度值总和占比分别为（56.56±3.33）%、（49.12±1.15）%、（50.03±0.36）%、（63.3±0.45）%和（58.57±1.34）%，具体测序结果见表6。



1~21.条带编号。  
图3 DGGE图谱结果

Fig. 3 DGGE profile for intestinal microbiota composition

表5 DGGE条带灰度值结果

Table 5 Results of gray value of DGGE bands

条带编号	正常组	高脂组	木浆源甾醇		
			1%	5%	10%
1	29.44±8.30	31.62±8.10	46.69±8.35	37.23±1.49	28.98±3.19
2	187.53±21.14	152.93±9.27	96.02±7.23**	121.36±17.34*	133.72±4.75*
3	35.70±4.73**	51.77±2.65	9.60±1.31**	16.50±1.46**	6.56±0.29**
4	4.70±1.52*	7.60±0.69	22.37±1.67**	20.54±0.10**	28.98±0.60**
5	45.29±8.44**	111.93±8.32	57.86±9.21**	157.24±12.35**	98.63±2.14
6	3.33±0.95**	120.03±5.69	3.13±0.17**	49.97±11.99**	3.08±0.62**
7	61.95±11.90**	3.84±0.51	3.34±0.36	8.48±1.56**	50.02±9.10**
8	78.20±15.95**	17.22±1.53	13.21±1.22*	14.85±5.54	27.98±1.91**
9	4.39±1.36**	14.57±0.53	13.30±2.57	26.17±1.06**	7.47±0.89**
10	26.87±5.75*	44.34±4.82	23.26±3.21**	40.32±2.36	34.20±0.99*
11	16.78±1.60**	40.95±5.84	35.92±5.15	22.36±1.05**	19.85±3.90**
12	16.33±2.26**	39.69±1.12	16.34±3.34**	14.07±1.09**	19.58±5.61**
13	49.77±9.15*	33.15±1.29	36.27±7.18	41.50±4.56*	46.05±8.58
14	37.44±6.27**	7.32±0.48	28.25±4.57**	18.19±1.46**	19.72±5.25*
15	13.26±3.75**	31.91±1.08	46.28±7.55*	39.80±2.69**	38.23±1.05**
16	15.59±1.71**	5.31±0.78	37.40±4.93**	33.92±2.27**	42.63±1.44**
17	14.19±1.83**	6.19±0.68	8.83±1.92	11.93±0.84**	22.87±3.84**
18	21.36±4.33**	6.46±0.51	11.97±1.16**	22.59±0.24**	8.11±1.81
19	7.25±0.89**	11.34±0.85	4.48±1.23**	4.51±1.32**	5.87±1.77**
20	23.38±2.80**	4.74±0.35	8.64±1.28**	9.91±2.64*	12.85±4.25*
21	16.20±1.41**	23.08±1.12	28.81±2.53*	24.9±3.70	18.49±7.86

注:条带编号与图3对应,表6同。

由表7多样性指数分析显示,与高脂组相比木浆源甾醇1%和10%组均匀度显著增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );高脂组肠道菌群丰富度和多样性显著高于正常组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),木浆源甾醇组丰富度较高脂组均极显著降低( $P<0.01$ )。

表6 DGGE条带测序结果

Table 6 Blast analysis of DGGE bands

条带编号	细菌名称	相似度/%	登录号
1	<i>Bacteroides</i> sp.	98	AB730710.1
2	<i>Bacteroides</i> sp.	98	AB714287.1
3	<i>Clostridium</i> sp.	100	AB622828.1
4	<i>Clostridiales</i> sp.	99	AB702928.1
5	<i>Bacteroides</i> sp.	98	AB714283.1
6	<i>Ruminococcus</i> sp.	99	AB064904.1
7	<i>Clostridiales</i> sp.	98	HM099644.1
8	<i>Ruminococcus</i> sp.	98	FJ889653.1
9	<i>Clostridiales</i> sp.	98	HM099644.1
10	<i>Clostridiaceae</i> sp.	98	HF952920.1
11	<i>Lactobacillus</i> sp.	100	KC561120.1
12	<i>Oscillibacter</i> sp.	99	HM626173.1
13	<i>Clostridium</i> sp.	100	AF157053.1
14	<i>Anaerostipes</i> sp.	98	JX629261.1
15	<i>Desulfovibrio</i> sp.	96	NR_074858.1
16	<i>Marvinbryantia</i> sp.	97	NR_042152.1
17	<i>Porphyromonadaceae</i> sp.	99	EU728718.1
18	<i>Akkermansia</i> sp.	99	KR364731.1
19	<i>Desulfovibrio</i> sp.	99	AF056090.1
20	<i>Roseburia</i> sp.	99	NR_042832.1
21	<i>Bacteroides</i> sp.	99	JQ317252.1

表7 DGGE图谱多样性指数分析

Table 7 Diversity index of DGGE profiles

指标	正常组	高脂组	木浆源甾醇		
			1%	5%	10%
均匀度 $E$	0.86±0.02	0.86±0.01	0.92±0.00**	0.87±0.01	0.89±0.02*
丰富度 $dMa$	4.48±0.05**	4.89±0.08	4.57±0.09**	4.46±0.07**	4.27±0.13**
多样性 $H'$	2.94±0.06*	3.04±0.01	3.15±0.01**	2.98±0.03*	3.00±0.05

### 3 讨论

流行病学调查和动物实验表明,膳食干预,尤其是食物中含有的天然活性物质的摄入能够有效降低机体的胆固醇水平,减少心脑血管疾病的发生<sup>[16]</sup>。

植物甾醇泛指多种形式的混合甾醇,广泛存在于植物油、坚果和种子中,也存在于其他植物性食物中如蔬菜、水果<sup>[11-12,17]</sup>。自20世纪50年代以来已发现植物甾醇在降血脂方面的功效<sup>[18]</sup>。从2000年开始,欧盟不再限制购买添加商业植物甾醇的食品<sup>[12]</sup>,例如富含植物甾醇的奶制品<sup>[19-20]</sup>、营养饮料<sup>[21]</sup>和人造黄油<sup>[22]</sup>。本研究结果也表明摄入木浆源甾醇可以降低血脂水平,这与很多研究的结果一致<sup>[5-6,23-25]</sup>。

机体内胆固醇代谢平衡稳态,主要通过调控胆固醇的吸收、合成、排泄等途径来实现。本实验结果显示木浆源甾醇提高HMG-CoA-R mRNA表达水平。HMG-CoA-R是合成胆固醇过程中的限速酶,抑制HMG-CoA-R能阻碍胆固醇内源合成。饲喂膳食胆固醇,仓鼠从转录水平上调节内源性胆固醇的合成,以应对因外源性植物甾醇添加而受到抑制的肠道胆固醇吸收,是机体胆固醇

合成的补偿性增加<sup>[26]</sup>,但其对翻译水平和酶活的调节还有待深入研究。NPC1L1是肠道胆固醇吸收的关键蛋白,在肠道中膳食来源胆固醇在NPC1L1的调控下进入小肠绒毛上皮细胞,并在ACAT-2的调控下由胆固醇转化为胆固醇酯,后者被MTP转移至乳糜微粒,最终经由淋巴系统进入血液循环。另外,小肠上皮细胞中ABCG5/8负责将未吸收的少量胆固醇清除回肠道。qRT-PCR结果显示木浆源甾醇在一定程度上抑制小肠中胆固醇吸收相关基因的表达水平。

气相色谱结果表明木浆源甾醇能促进高血脂仓鼠固醇的排泄,这可能与胆固醇内源合成减少、胆固醇排泄量增加有关。

DGGE结果表明,高脂组多样性增加,而木浆源甾醇组多样性降低趋于正常组,这可能与肥胖个体肠道内细菌过度生长、肠道稳态失衡有关。Evans等<sup>[27]</sup>的研究也显示给予12周高脂饮食的小鼠肠道菌群多样性显著高于低脂饮食组。有报道显示多种炎症与细菌过度生长有关。肥胖母亲分娩的幼儿肠道菌群具有较高的多样性<sup>[28]</sup>。多余的细菌也可能影响胃肠道的临床表现,而净化细菌过度生长可改善胃肠道症<sup>[29-30]</sup>。肠道细菌过度生长的同时革兰氏阴性菌和机会致病菌的数量也可能增加,而革兰氏阴性菌的脂多糖可引起炎症反应,已有报道显示经抗生素治疗后肠道菌群的减少可降低盲肠内脂多糖含量并缓解代谢内毒素血症<sup>[31]</sup>。肠道中“细菌”*Oscillibacter* sp. (条带12)在高脂组极显著增加( $P<0.01$ ),这与Duca等<sup>[32]</sup>的研究结果一致,其研究发现具有较高身体质量指数(body mass index, BMI)的儿童体内*Oscillibacter* sp.数量较多<sup>[28]</sup>,而木浆源甾醇组*Oscillibacter* sp.数量极显著降低( $P<0.01$ )。本实验高脂组中*Akkermansia* sp. (条带18)、*Anaerostipes* sp. (条带14)及*Roseburia* sp. (条带20)数量显著减少,补充木浆源甾醇后均有恢复,其中*Akkermansia* sp.在木浆源甾醇1%组和5%组极显著增加( $P<0.01$ ),*Anaerostipes* sp.在1%、5%组极显著增加( $P<0.01$ ),10%组显著增加( $P<0.05$ );*Roseburia* sp.在1%组中极显著增加( $P<0.01$ ),在10%组中显著增加( $P<0.05$ )。有研究显示,在饮食诱导的肥胖小鼠中增加*Akkermansia* sp.能改善代谢混乱,提高回肠中内源性大麻素的水平,改善肥胖中饮食引起的结肠黏膜屏障的功能紊乱<sup>[33]</sup>。*Anaerostipes* sp.和*Roseburia* sp.均为产丁酸菌,丁酸是一种结肠上皮细胞的首选能量来源,对维护人类结肠的健康有重要作用。在高脂膳食中补充丁酸可以防止胰岛素抵抗和肥胖的发展<sup>[34-35]</sup>。这表明木浆源甾醇对于高脂诱导的肠道菌群紊乱有一定改善作用。高脂组中*Desulfovibrio* sp.

(条带19)数量极显著增加( $P<0.01$ ),木浆源甾醇组中极显著减少( $P<0.01$ ),*Desulfovibrio* sp.在大肠中可将硫酸盐转化成硫化物,后者对结肠上皮有细胞毒作用<sup>[36]</sup>。但*Lactobacillus* sp. (条带11)在高脂组中极显著增加( $P<0.01$ ),补充木浆源甾醇后恢复,其中5%和10%组具有极显著差异( $P<0.01$ )。在艰难梭菌腹泻病人和自发性高血压患者肠道内均有较高丰度的乳酸菌<sup>[37-38]</sup>,这可能与菌群整体丰度或部分乳酸菌致病性有关<sup>[39]</sup>。

综上所述,木浆源甾醇可能是通过增加胆固醇的排泄量、抑制胆固醇的吸收合成和改善肠道菌群实现改善高脂高胆固醇膳食饲喂仓鼠健康水平的作用。

#### 参考文献:

- [1] PFLUGER P T, DANIEL H, SUSANA V M, et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 2008, 105(28): 9793-9798. DOI:10.1073/pnas.0802917105.
- [2] TSAI W, LI Y, LIN C, et al. Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal[J]. Clinical Science, 2004, 106(3): 315-319. DOI:10.1042/CS20030227.
- [3] MARTINEZ I, WALLACE G, ZHANG C, et al. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(12): 4175-4184. DOI:10.1128/AEM.00380-09.
- [4] QIAO Y, SUN J, XIA S, et al. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity[J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1241-1249. DOI:10.1039/c3fo60630a.
- [5] ABUMWEIS S S, MARINANGELI C P, FROHLICH J, et al. Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: overview of efficacy, effectiveness, and safety[J]. Canadian Journal of Cardiology, 2014, 30(10): 1225-1232. DOI:10.1016/j.cjca.2014.04.022.
- [6] ANDERSSON S W, SKINNER J, ELLEGÅRD L, et al. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study[J]. European journal of Clinical Nutrition, 2004, 58(10): 1378-1385. DOI:10.1038/sj.ejcn.1601980.
- [7] BERGES R R, WINDELER J, TRAMPISCH H J, et al. Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. Beta-sitosterol Study Group[J]. Lancet, 1995, 345: 1529-1532. DOI:10.1016/S0140-6736(95)91085-9.
- [8] AWAD A B, DOWNIE A, FINK C S, et al. Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice[J]. Anticancer Research, 1999, 20(2): 821-824.
- [9] MICALLEF M A, GARG M L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals[J]. Atherosclerosis, 2009, 204(2): 476-482. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.020.
- [10] RUDKOWSKA I. Plant sterols and stanols for healthy ageing[J]. Maturitas, 2010, 66(2): 158-162. DOI:10.1016/j.maturitas.2009.12.015.
- [11] NES W D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols[J]. Chemical Reviews, 2011, 111(10): 6423-6451. DOI:10.1021/cr200021m.

- [12] WONG A. Chemical and microbiological considerations of phytosterols and their relative efficacies in functional foods for the lowering of serum cholesterol levels in humans: a review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 6(1): 60-72. DOI:10.1016/j.jff.2013.10.023.
- [13] BAQUERO F, NOMBELA C. The microbiome as a human organ[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(Suppl 4): 2-4. DOI:10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x.
- [14] WANG H, ZHANG Z, GUO Y, et al. Hawthorn fruit increases the antioxidant capacity and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice[J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 232(5): 743-751. DOI:10.1007/s00217-011-1435-7.
- [15] 郑刚, 陈己任, 胡博文, 等. 基于DGGE分析的大鼠粪便及肠道细菌DNA提取方法研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(17): 215-218.
- [16] DO K A, GREEN A, GUTHRIE J R, et al. Longitudinal study of risk factors for coronary heart disease across the menopausal transition[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2000, 151(6): 584-593. DOI:10.1093/oxfordjournals.aje.a010246.
- [17] WANG F, WEI D, YAO K. From soybean phytosterols to steroid hormones[J/OL]. (2011-09-12)[2016-04-18]. <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/from-soybean-phytosterols-to-steroid-hormones>.
- [18] POLLAK O J. Reduction of blood cholesterol in man[J]. *Circulation*, 1953, 7(5): 702-706. DOI:10.1161/01.CIR.7.5.702.
- [19] CASAS-AGUSTENCH P, SERRA M, PÉREZ-HERAS A, et al. Effects of plant sterol esters in skimmed milk and vegetable-fat-enriched milk on serum lipids and non-cholesterol sterols in hypercholesterolaemic subjects: a randomised, placebo-controlled, crossover study[J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 107(12): 1766-1775. DOI:10.1017/S0007114511005162.
- [20] SZYMAŃSKA E, van DORSTEN F A, TROOST J, et al. A lipidomic analysis approach to evaluate the response to cholesterol-lowering food intake[J]. *Metabolomics*, 2012, 8(5): 894-906. DOI:10.1007/s11306-011-0384-2.
- [21] KARL M, RUBENSTEIN M, RUDNICK C, et al. A multicenter study of nutraceutical drinks for cholesterol (evaluating effectiveness and tolerability)[J]. *Journal of Clinical Lipidology*, 2012, 6(2): 150-158. DOI:10.1016/j.jacl.2011.09.004.
- [22] RUDZIŃSKA M, PRZYBYLSKI R, WĄSOWICZ E. Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines[J]. *Food Chemistry*, 2014, 142: 294-298. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.07.041.
- [23] KLINGBERG S, ELLEGÅRD L, JOHANSSON I, et al. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 87(4): 993-1001. DOI:10.3945/ajcn.112.043893.
- [24] WANG P, CHEN Y, HE L, et al. Association of natural intake of dietary plant sterols with carotid intima-media thickness and blood lipids in Chinese adults: a cross-section study[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): 32736. DOI:10.1371/journal.pone.0032736.
- [25] RAS R T, GELEIJNSE J M, TRAUTWEIN E A. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomised controlled studies[J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 112(2): 214-219. DOI:10.1017/S0007114514000750.
- [26] 刘静, 吴春福, 李锐. 食物植物甾醇的代谢, 活性及副作用[J]. *国外医药: 植物药分册*, 1996, 11(3): 111-116.
- [27] EVANS C C, LEPARD K J, KWAK J W, et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): 92193. DOI:10.1371/journal.pone.0092193.
- [28] GALLEY J D, BAILEY M, DUSH C K, et al. Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): 16. DOI:10.1371/journal.pone.0113026.
- [29] SANCHEZ E, CASAFONT F, GUERRA A, et al. Role of intestinal bacterial overgrowth and intestinal motility in bacterial translocation in experimental cirrhosis[J]. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 2005, 97(11): 805-814. DOI:10.4321/S1130-01082005001100005.
- [30] LAURITANO E C, BILOTTA A L, GABRIELLI M, et al. Association between hypothyroidism and small intestinal bacterial overgrowth[J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007, 92(11): 4180-4184. DOI:10.1210/jc.2007-0606.
- [31] CANI P D, BIBILONI R, KNAUF C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice[J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-1481. DOI:10.2337/db07-1403.
- [32] DUCA F A, SAKAR Y, LEPAGE P, et al. Replication of obesity and associated signaling pathways through transfer of microbiota from obese-prone rats[J]. *Diabetes*, 2014, 63(5): 1624-1636. DOI:10.2337/db13-1526.
- [33] EVERARD A, BELZER C, GEURTS L, et al. Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 2013, 110(22): 9066-9071. DOI:10.1073/pnas.1219451110.
- [34] HATZIOANO D, MAYER M J, DUNCAN S H, et al. A representative of the dominant human colonic Firmicutes, *Roseburia faecis* M72/1, forms a novel bacteriocin-like substance[J]. *Anaerobe*, 2013, 23: 5-8. DOI:10.1016/j.anaerobe.2013.07.006.
- [35] GAO Z G, YIN J, ZHANG J, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice[J]. *Diabetes*, 2009, 58(7): 1509-1517. DOI:10.2337/db08-1637.
- [36] ZINKEVICH V V, BEECH I B. Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 34(2): 147-155. DOI:10.1016/S0168-6496(00)00086-6.
- [37] YANG T, SANTISTEBAN M M, RODRIGUEZ V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension[J]. *Hypertension*, 2015, 65(6): 1331-1340. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315.
- [38] LING Z, LIU X, JIA X, et al. Impacts of infection with different toxigenic *Clostridium difficile* strains on faecal microbiota in children[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7485. DOI:10.1038/srep07485.
- [39] 刘小青, 万翠香, 徐锋, 等. 乳酸菌的安全性研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2009, 21(10): 952-955.