

王思航, 李斌, 谭慧, 等. 基于代谢组学探究鼠李糖乳杆菌 GM020 与矢车菊素-3-O-葡萄糖苷代谢物对高脂小鼠肝脏差异代谢物的影响[J]. 食品工业科技, 2025, 46(16): 375–383. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080270

WANG Sihang, LI Bin, TAN Hui, et al. Exploring the Effects of Metabolites from *Lactobacillus rhamnosus* GM020 and Cyanidin-3-O-Glucoside on Differential Metabolites in the High-fat Diet Mice Liver Based on Metabolomics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(16): 375–383. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080270

· 营养与保健 ·

基于代谢组学探究鼠李糖乳杆菌 GM020 与 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷代谢物对高脂 小鼠肝脏差异代谢物的影响

王思航¹, 李 斌¹, 谭 慧¹, 孟宪军¹, 徐永平³, 李淑英³, 刘笑茹⁴, 王月华^{1,*}, 马 岩^{2,*}

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866;

2.沈阳师范大学实验教学中心, 辽宁沈阳 110034;

3.大连赛姆生物工程有限公司, 辽宁大连 116620;

4.辽东学院农学院, 辽宁丹东 118001)

摘 要:目的: 基于非靶向代谢组学探究矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)与鼠李糖乳杆菌 GM020 代谢物(C3G-GM020)调节高脂小鼠胆固醇代谢的作用。方法: 将 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组: 正常对照(NC)组、高脂饮食(HFD)组、低剂量 C3G-GM020 组(50 mg/kg·d)、高剂量 C3G-GM020 组(100 mg/kg·d)、C3G-GM020 饮食干预 6 周高胆固醇模型小鼠。采用广泛靶向代谢组学技术检测小鼠肝脏差异代谢物, 并进行 KEGG 通路富集分析; 利用 PCR 方法和试剂盒分别分析胆汁酸合成途径中关键基因的表达和肝脏胆汁酸含量。结果: 在 NC 组与 HFD 组之间共鉴定出 43 种差异代谢产物, 其中 12(S)-羟基二十烷酸、13,14-二氢-15-酮-前列腺素 E₂、5-氨基戊酸、皮质酮、2-甲氧雌二醇、苏糖酸等代谢物在 C3G-GM020 干预后回调。KEGG 通路富集分析表明 C3G-GM020 可能通过调节胆汁分泌途径调节胆固醇代谢。C3G-GM020 干预可显著($P<0.05$)抑制高脂诱导的胆固醇 7 α -羟化酶(CYP7A1) mRNA 的表达上调, 促进胆固醇 25 α -7-羟化酶(CYP7B1) mRNA 的表达; 增加肝脏胆汁酸含量, 同时显著($P<0.05$)上调肝脏法尼醇 X 受体(FXR)基因表达。结论: C3G-GM020 干预可导致小鼠肝脏代谢物发生改变, 其可能通过调节胆汁分泌途径调节胆固醇代谢, 并促使肝脏胆固醇沿替代途径合成胆汁酸, 改善胆固醇代谢。

关键词:代谢组学, 鼠李糖乳杆菌, 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷, 胆汁酸

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)16-0375-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080270

本文网刊:



Exploring the Effects of Metabolites from *Lactobacillus rhamnosus* GM020 and Cyanidin-3-O-Glucoside on Differential Metabolites in the High-fat Diet Mice Liver Based on Metabolomics

WANG Sihang¹, LI Bin¹, TAN Hui¹, MENG Xianjun¹, XU Yongping³, LI Shuying³, LIU Xiaoru⁴,
WANG Yuehua^{1,*}, MA Yan^{2,*}

(1.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2.Center of Experiment Teaching, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China;

收稿日期: 2024-08-23

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2022YFD1600505); 中国博士后科学基金(2024M760337)。

作者简介: 王思航(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 健康食品营养与创制, E-mail: wangsihang0219@163.com。

* 通信作者: 王月华(1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 健康食品营养与创制, E-mail: wangyuehua20122132@163.com。

马岩(1976-), 女, 硕士, 教授级高级实验师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: ma1976@126.com。

3. Postdoctoral Workstation of Dalian SEM Bio-Engineering Technology Co., Ltd., Dalian 116620, China;

4. College of Agriculture, Liaodong University, Dandong 118001, China)

Abstract: Objective: Investigating the regulatory effects of cyanidin-3-O-glucoside (C3G) and *Lactobacillus rhamnosus* GM020 metabolite (C3G-GM020) on cholesterol metabolism in high-fat diet-fed mice using untargeted metabolomics. Methods: C57BL/6 male mice were randomly divided into four groups: Normal control (NC) group, high-fat diet (HFD) group, low-dose C3G-GM020 group (50 mg/kg·d), and high-dose C3G-GM020 group (100 mg/kg·d). C3G-GM020 diet intervention was administered to high cholesterol model mice for 6 weeks. A widely targeted metabolomics approach was employed to analyze differential metabolites in mice liver. PCR method and reagent kits were employed to analyze the bile acid synthesis pathway key genes expression and liver bile acid content, respectively. Results: A total of 43 different metabolites were identified between the NC and HFD group, among which 12(S)-HpETE, 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂, 5-aminopentanoic acid, corticosterone, 2-methoxyestradiol, threonic acid and other metabolites were reversed after C3G-GM020 intervention. KEGG pathway enrichment analysis showed that C3G-GM020 might regulate cholesterol metabolism by regulating the bile secretion pathway. The upregulation of cholesterol-7 α -hydroxylase (CYP7A1) mRNA expression induced by high-fat diet was significantly ($P<0.05$) inhibited by C3G-GM020 intervention, while the expression of 25-hydroxycholesterol-7 α -hydroxylase (CYP7B1) mRNA was promoted. Additionally, liver bile acid contents were increased, and liver farnesol X receptor (FXR) gene expression was significantly ($P<0.05$) upregulated. Conclusion: Intervention with C3G-GM020 was found to alter liver metabolites in mice, possibly through regulation of the bile acid secretion pathway to modulate cholesterol metabolism. Additionally, synthesis of bile acids via alternative pathways in hepatic cholesterol metabolism was promoted, leading to improved cholesterol homeostasis.

Key words: metabolomics; *Lactobacillus*; cyanidin-3-O-glucoside; bile acid

目前因胆固醇水平引发的高脂血症、高胆固醇血症等代谢综合征患病率逐年上升,已成为威胁民众健康的主要问题^[1],因而在饮食结构高脂化的趋势下,通过膳食调节机体胆固醇代谢对维持国民营养健康具有重要意义。饮食干预是一种安全、有效预防胆固醇代谢失衡的措施。

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)是一种自然界中分布和应用最广、活性较高的花色苷单体,近年来屡受关注。C3G存在于多种天然植物中,特别是谷物^[2]、浆果^[3]等,具有多种生物活性,如抗氧化^[4]、抗炎^[5]、降血脂^[6]、改善肠道疾病等^[7]。鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)属于革兰氏阳性菌,是一种乳杆菌属的细菌,被广泛用作功能性食品或膳食补充剂,在调节胆固醇代谢中起着重要作用,可以通过其代谢产物如短链脂肪酸,调节胆固醇合成、代谢和吸收基因的表达,进而降低胆固醇水平^[8]。鼠李糖乳杆菌和发酵乳杆菌有效改善大鼠的血脂水平,可以达到他汀类药物一样的效果,表明其可能具有降血脂潜力^[9],益生菌及其发酵制品的干预有助于缓解高脂饮食诱导的胆固醇代谢紊乱^[10],并通过多靶点调节胆固醇代谢,为预防和治疗与高胆固醇相关的疾病提供了新的研究方向。

鉴于花色苷的生物利用度低,只有小部分可被直接吸收到小肠中,高达 65% 的花色苷不被吸收,因此,大多数花色苷必须进一步代谢。肠道菌群可以产生大量的酶,当花色苷通过肠道菌群发挥作用^[11]。在体外模型中,C3G可促进肠道菌群中有益菌长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)及狄氏副拟杆菌(*Parabacteroides distasonis*)的生长^[12]。研究表明,

摄入花色苷可能会导致特定代谢物的出现,这些代谢物在宿主生理机能中发挥保护作用^[13]。此外,植物乳杆菌 R9 与茯苓发酵液中代谢产物含量,如有机酸及其取代衍生物、氨基酸及其衍生物的含量在发酵后高于发酵前,且玉米须乳酸杆菌发酵液体现出良好的降血脂效果^[14]。

基于课题组前期的研究发现,乳杆菌属是蓝靛果多酚(主要生物活性成分为 C3G)抑制胆固醇吸收的特定肠道微生物^[15],以及明确 C3G 与鼠李糖乳杆菌 GM02 代谢物体内抑制胆固醇吸收的基础,进一步验证 C3G-GM020 的干预对胆汁酸途径的影响^[16]。本研究旨在验证 C3G-GM020 对高脂饮食肝脏组织差异代谢物富集通路,系统探究确定其影响高脂饮食小鼠胆固醇代谢的主要机制以及对胆汁酸合成途径中关键基因的表达;为特色植物 C3G 的开发及其在精准营养领域的应用提供科学依据,同时为开发调节胆固醇吸收的益生产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

矢车菊 3-O-葡萄糖苷(纯度 $\geq 98\%$) 南京源植生物科技有限公司;鼠李糖乳酸杆菌 GM020 景岳生物技术有限公司;MRS 液体培养基、MRS 固体培养基、肝脏胆汁酸试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;cDNA 合成试剂盒 康为世纪生物科技有限公司;C57BL/6 雄性小鼠(6 周龄,24 只) 上海斯莱克公司,合格证号为 202200040015280。

5805 型冷冻台式离心机 德国艾本德公司;Vanquish 液相色谱仪、Q Exactive FOCUS 型质谱仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;170-3930 型

酶标仪 北京普朗公司;JA2003A 型电子天平 上海精天电子仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠李糖乳杆菌 GM020 代谢 C3G 样品制备 取活化鼠李糖乳杆菌 GM020 并传代(5% v/v),在 4 ℃ 和 5500 r/min 下离心 10 min,用 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤 3 次。将 C3G 溶解于无菌水中并通过 0.45 μm 滤膜过滤。将鼠李糖乳杆菌 GM020 与 C3G(50、100 mg/kg·d)溶液于培养箱培养 24 h 后,将 C3G-GM020 在 4 ℃ 和 5500 r/min 下离心 10 min 取上清液用于后续试验。

1.2.2 小鼠分组及给药 适应性喂养 1 周后,将小鼠随机分为 4 组:正常对照组、高脂饮食组、LC3G-GM020 组、HC3G-GM020 组。根据细胞模型获得的数据,参考小鼠体重和每日进食量,同时参考文献[17-18]确定小鼠的给药剂量。饲养与给药方式如下所示:

NC 组(n=6):给予基础饲料喂养,灌胃等量生理盐水;HFD 组(n=6):高脂饲料喂养(10% 猪油、15% 蛋黄粉、1% 胆固醇、0.5% 胆盐),每天用等量生理盐水灌胃;LC3G-GM020 组(n=6):高脂饲料喂养,灌胃等量低剂量 C3G(50 mg/kg·d)与鼠李糖乳杆菌 GM020 代谢物上清液;HC3G-GM020 组(n=6):高脂饲料喂养,灌胃等量高剂量 C3G(100 mg/kg·d)与鼠李糖乳杆菌 GM020 代谢物上清液。

将小鼠饲养于光照/黑暗循环 12 h、恒温 25 ℃、相对湿度 55% 的受控环境中。动物试验遵循沈阳农业大学动物伦理委员会批准的护理指南(批准编号:2023070501)。

在试验过程中,所有小鼠都不受限制地获得食物和水。喂养 6 周后,在 15% 异氟醚麻醉下处死小鼠。用预冷的 PBS 缓冲液清洗肝脏组织,液氮速冻,用于后续试验检测;置于-80 ℃ 存放备用。

1.2.3 小鼠肝脏差异代谢产物非靶向代谢组学分析

取小鼠肝脏样品解冻后,参照杨金梅等^[19]的方法完成小鼠肝脏样本提取,用于检测。色谱条件如下,色谱柱:ACQUITYUPLC®HSST3(2.1×100 mm, 1.8 μm),进样量:2 μL,流速:0.3 mL/min,柱温:40 ℃,质谱条件为:电喷雾离子源(ESI),正、负离子喷雾电压分别为 3.50 kV 和-2.50 kV,毛细管温度 325 ℃,鞘气 40 arb,辅助气 10 arb。一级离子扫描范围 m/z 100~1000,以分辨率 60000、175000 进行一级、二级全扫描,并采用 HCD 进行二级裂解,碰撞能量为 30 eV,采集信号前 3 离子进行碎裂,同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息,正负离子模式分别采集数据。使用上海派森诺公司自建代谢物标准品数据库等谱图数据库进行检索比对(搜库),物质鉴定过程参考雒志新^[20]的方法。通过与数据库中

代谢物的保留时间、分子质量(误差在<10 ppm 内)、二级碎裂谱图、碰撞能等信息进行匹配,对生物样本中的代谢物进行结构鉴定,并对鉴定结果进行严格的人工二次核对、确认。鉴定等级在 Level 2 及以上。

1.2.4 小鼠肝脏代谢物的差异分析 采用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),分析方法参考刘桂君等^[21]的方法。根据模型得到的变量权重值(variable importance for the projection, VIP)区分差异代谢物(VIP>1 且 P<0.05)。

1.2.5 KEGG 通路分析 将预处理过后的数据与 KEGG 数据库中的通路信息进行比对和注释,确定肝脏组织的代谢物在 KEGG 通路中的位置和作用,通过统计学方法(Fisher's Exact Test)对四组小鼠肝脏组织差异代谢物富集度的显著性水平(P<0.05)进行计算,确定其富集的 KEGG 通路,分析 C3G 与鼠李糖乳杆菌 GM020 代谢物调节胆固醇的机制。

1.2.6 测定小鼠肝脏 CYP7A1、CYP8B1 及 FXR 的 mRNA 表达 利用 cDNA 反转录试剂盒进行反转录。RT-qPCR 采用 cDNA 和特异性引物组成的反应混合物进行。按照表 1 反应步骤进行 RT-qPCR 反应。

表 1 PCR 反应步骤
Table 1 PCR reaction steps

反应步骤	反应条件
Stage 1: 预变性	Reps: 循环1次, 95 ℃ 5 min
Stage 2: PCR反应	Reps: 循环40次, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s
Stage 3: 延长反应	Reps: 循环1次, 60 ℃ 2 min 溶解阶段

FXR、CYP7A1 和 CYP7B1 引物序列(表 2)由上海美轩生物科技有限公司合成。

表 2 实时定量 PCR 引物序列
Table 2 Quantitative real-time PCR primer sequences

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
CYP7A1	GGGGATTGCTGTGGTAG	CAGGGAGTTTGTGATGAAG
CYP7B1	CAGCATCATCCGAGAAG	GAGTGGAGGAAAGAGGG
FXR	GCTTGATGTGCTACA AAAGCTG	CGTGGTGATGGTTGA ATGTCC
β-actin	CATCCGTAAAGACCTC TATGCC	ATGGAGCCACCGAT CCACA

反应结束后确认 RT-PCR 的扩增曲线和融解曲线,并计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值。

1.2.7 肝脏总胆汁酸检测 取制备好的 NC 组、HFD 组、LC3G-GM020 组和 HC3G-GM020 组四组小鼠肝脏样本根据试剂盒说明书测定肝脏胆汁酸含量。

1.3 数据处理

结果均以平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 GraphPad Prism 9.5 和 SPSS 27 软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),P<0.05 认为结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 肝脏组织代谢物的 PLS-DA 分析

采用 PLS-DA 分析研究四组小鼠代谢物组成的相似性或相异性,结果如图 1 所示,其中,不同颜色代表不同的小鼠组别,每个散点代表一个个体,NC 组和 HFD 组样品明显地聚为两类,表明高脂饮食导致代谢物发生改变;试验组和 HFD 组样品明显地聚为三类,表明 C3G-GM020 干预可导致代谢物发生改变。对小鼠肝脏组织鉴定到的代谢物进行统计与化学分类,结果如图 2 所示,其中羧酸及其衍生物(Carboxylic acids and derivatives);脂肪酸(Fatty acids)含量较高。

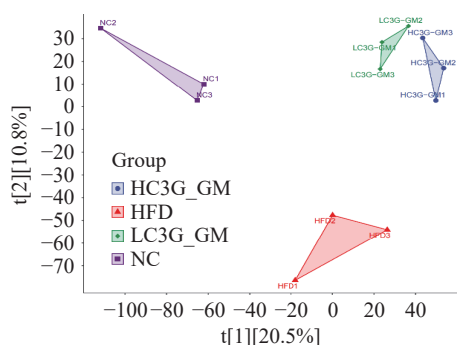


图 1 NC、HFD、LC3G-GM020、HC3G-GM020 组肝脏组织的 PLS-DA 分析

Fig.1 PLS-DA analysis of the NC, HFD, LC3G-GM020, HC3G-GM020 groups

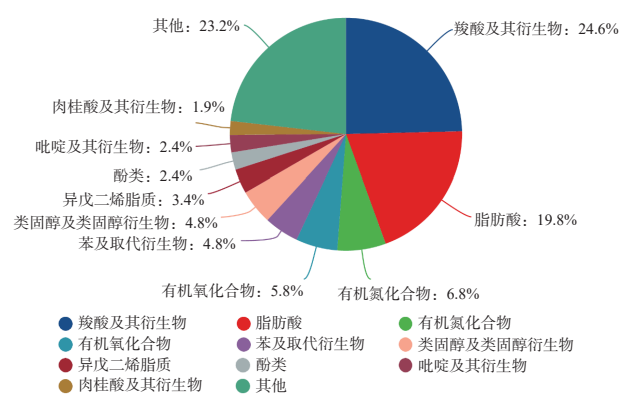


图 2 代谢物主要分类

Fig.2 Main classification of metabolites

2.2 差异代谢物的 KEGG 富集分析

基于 OPLS-DA 结果同时结合 P -value 与差异倍数(FC)筛选出四组小鼠肝脏组织的差异代谢物。四组小鼠肝脏中共鉴定到 1068 种代谢产物,在正负离子合并的条件下 NC 组与 HFD 组之间共鉴定出 43 种差异代谢产物,其中 33 个代谢物的显著上调和 10 个代谢物的下调(表 3);HFD 组与 LC3G-GM020 组之间共鉴定出 16 种差异代谢物,其中 9 个代谢物显著($P<0.05$)上调和 7 个代谢物下调,其中 LC3G-GM020 干预能够回调 4 种差异代谢物,包括 12(S)-羟基二十烷酸、13,14-二氢-15-酮-前列腺素 E2、5-氨基戊酸、皮质酮;HFD 组与 HC3G-GM020

组之间共鉴定出 24 种差异代谢物,其中 20 个代谢物显著($P<0.05$)上调和 4 个代谢物下调,其中 LC3G-GM020 干预能够回调 4 种差异代谢物:包括 2-甲氧雌二醇、皮质酮、5-氨基戊酸、蔗糖酸。皮质酮可以促进糖原分解和葡萄糖产生,同时抑制胰岛素的作用,从而升高血糖,也参与脂肪代谢的调节。黄艳辉等^[22]研究表明,甜菜碱干预可以缓解皮质酮诱导的胆固醇沉积。

KEGG 功能富集分析结果如图 3 所示,HFD 组与 NC 组之间的差异代谢物参与 α -亚麻酸代谢(alpha-Linolenic acid metabolism)、色氨酸代谢(Tryptophan metabolism)、脂肪细胞中脂肪分解的调节(Regulation of lipolysis in adipocytes)、TRP 通道的炎症介质调节(Inflammatory mediator regulation of TRP channels)、谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)、不饱和脂肪酸的生物合成(Biosynthesis of unsaturated fatty acids)、胆汁酸分泌(Bile secretion)、类固醇激素生物合成(Steroid hormone biosynthesis)、嘌呤代谢(Purine metabolism)、氨基酸的生物合成(Biosynthesis of amino acids)等通路。而 HFD 组与试验组之间的差异代谢物参与蛋白质消化吸收(Protein digestion and absorption)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism)、矿物质吸收(Mineral absorption)、ABC 转运蛋白(ABC transporters)、TRP 通道的炎症介质调节(Inflammatory mediator regulation of TRP channels)、辅因子的生物合成(Biosynthesis of cofactors)、苯丙氨酸代谢(Phenylalanine metabolism)、胆汁酸分泌(Bile secretion)、碳代谢(Carbon metabolism)、核苷酸糖的生物合成(Biosynthesis of nucleotide sugars)等通路。HFD 组与 NC 组,HFD 组与试验组之间的差异代谢物均可富集到胆汁酸分泌与 TRP 通道的炎症介质调节途径。这与雒志新^[20]的研究,阿魏酸干预后小鼠肝脏组织差异代谢物富集到胆汁酸分泌途径的结果一致。胆汁是一种重要的分泌物,胆汁酸存在于肠肝循环中,促进胆固醇的乳化,胆汁分泌依赖于肝细胞和胆管细胞膜转运系统的功能,在胆固醇吸收中起重要作用,95% 的 BAs 在小肠内可被重吸收,维持胆汁酸的平衡^[23-24]。调节胆汁酸在体内的平衡,对于可以改善小鼠的胆固醇水平、脂肪代谢具有重要意义。此外,炎症介质可以显著影响 TRP 通道的活性和表达,综上所述,低剂量和高剂量 C3G-GM020 干预均可通过胆汁酸分泌协同 ABC 转运蛋白等途径调控胆固醇代谢。

2.3 小鼠肝脏代谢物中胆汁酸水平

肝脏合成的初级胆汁酸被肠道微生物群转化为次级胆汁酸,其中初级胆汁酸主要是胆固醇合成的产物,而次级胆汁酸是由初级胆汁酸在肠道内经细菌代谢后形成的^[25]。在这个过程中,主要涉及胆汁酸合成途径中多个酶的作用,如 CYP7A1 和 CYP7B1

表 3 NC 组与 HFD 组之间的差异代谢物
Table 3 Different metabolites between NC and HFD groups

NO.	名称	分子式	P值	VIP	变化趋势
1	Dimethylglycine	C ₄ H ₉ NO ₂	0.018045	1.8194032	Up
2	m-Cresol	C ₇ H ₈ O	0.028242	1.7859413	Up
3	5-Aminopentanoic acid	C ₅ H ₁₁ NO ₂	0.004301	1.8004860	Down
4	Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	0.0050194	1.8623784	Down
5	Threonic acid	C ₄ H ₈ O ₅	0.037579	1.6459689	Down
6	Geranic acid	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	0.004084	1.8703144	Up
7	(-)-cis-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.0389380	1.7467171	Up
8	3-Indoleacetonitrile	C ₁₀ H ₈ N ₂	0.0489200	1.6830655	Up
9	D-Alanyl-D-alanine	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	0.0422663	1.6103947	Down
10	Jasmone	C ₁₁ H ₁₆ O	0.0346857	1.8098332	Up
11	3-Dehydroshikimate	C ₇ H ₈ O ₅	0.0101087	1.7899453	Down
12	4-Pyridoxic acid	C ₈ H ₉ NO ₄	0.0283163	1.6452054	Up
13	N-Acetylserotonin	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	0.0343219	1.7259878	Down
14	Spermine	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	0.0151569	1.8187610	Up
15	Methyl jasmonate	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	0.0017567	1.9317782	Up
16	L-Kynurenine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	0.0462111	1.5808901	Up
17	(+)-7-Isojasmonic acid	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	0.0447786	1.6437071	Up
18	Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.0132308	1.7372890	Down
19	Traumatic Acid	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	0.0214838	1.8034407	Up
20	D-Mannose 1-phosphate	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	0.0146796	1.6955418	Up
21	17a-Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	0.0417593	1.5132058	Down
22	Nandrolone	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	0.0021984	1.8945591	Up
23	Alpha-Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	0.0234009	1.7502522	Up
24	Hexadecanedioate	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	0.0085057	1.6954080	Up
25	9-cis-Retinal	C ₂₀ H ₂₈ O	0.0252904	1.8040685	Up
26	Ophthalmate	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₆	0.0168690	1.7845733	Up
27	13(S)-HpOTrE	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	0.0311357	1.7580897	Up
28	Methoprene	C ₁₉ H ₃₄ O ₃	0.0042297	1.8598051	Up
29	9,10-Epoxyoctadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	0.0229672	1.7720259	Up
30	19(S)-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	0.0248180	1.8197664	Up
31	15-KETE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	0.0192920	1.6294995	Up
32	5-KETE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	0.0065459	1.7810766	Up
33	5(S)-HpETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	0.0448960	1.6210119	Up
34	12(S)-HpETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	0.0166870	1.7939936	Up
35	15(S)-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	0.0389450	1.6535335	Up
36	CMP	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	0.0283508	1.5801626	Up
37	Oleylethanolamide	C ₂₀ H ₃₉ NO ₂	0.0136394	1.8261627	Down
38	Adrenic acid	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	0.0357391	1.6196145	Up
39	Corticosterone	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	0.0035832	1.9230412	Up
40	13,14-Dihydro-15-keto-PGE2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	0.0329523	1.7220220	Up
41	GMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	0.0404534	1.6538524	Up
42	2,22-Dideoxy-3-dehydroecdysone	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	0.0148550	1.8679640	Up
43	Cholesterol sulfate	C ₂₇ H ₄₆ O ₄ S	0.04882	1.5234027	Down

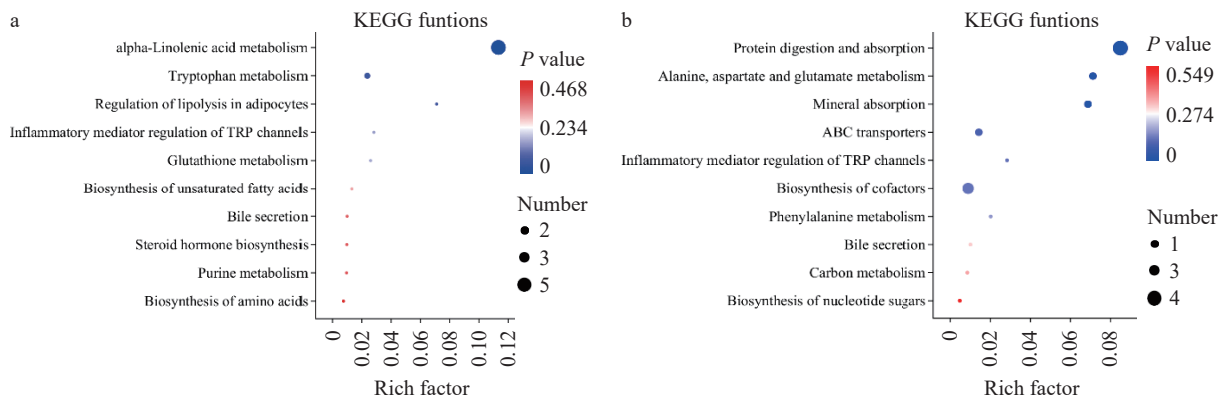


图 3 小鼠肝脏差异代谢物 KEGG 功能富集通路

Fig.3 KEGG functional enrichment pathways of differential metabolites in mice livers

注: a: NC 组 vs. HFD 组; b: HFD 组 vs. C3G-GM020 组。

等^[26]。对四组小鼠肝脏代谢物进行检测,发现2种初级胆汁酸(TCA、GCA)和6种次级胆汁酸(DCA、ICA、LCT、ACA、THC和UDCA),共8种胆汁酸。结果如图4所示,与NC组相比,HFD组小鼠肝脏初级胆汁酸TCA含量升高,GCA含量降低;与HFD组相比,鼠李糖乳杆菌GM020代谢C3G干预导致TCA的含量降低,GCA的含量有所提高。在次级胆汁酸中,与NC组相比,HFD组DCA、ICA、ICT和ACA含量升高,THC、UDCA含量降低;与HFD组相比,试验组中DCA、ICA、LCT和ACA含量降低,THC、UDCA含量有所提高。研究表明,硫酸岩藻聚糖可通过调节胆汁酸的组成和含量,初级胆汁酸/次级胆汁酸比值的变化而抑制小鼠肠道脂肪吸收,发挥降脂作用^[27]。在本研究中,各组之间胆汁酸含量变化并未发生显著性变化,但C3G-GM020干预可改善高脂引起的初、次级胆汁酸含量异常变化。

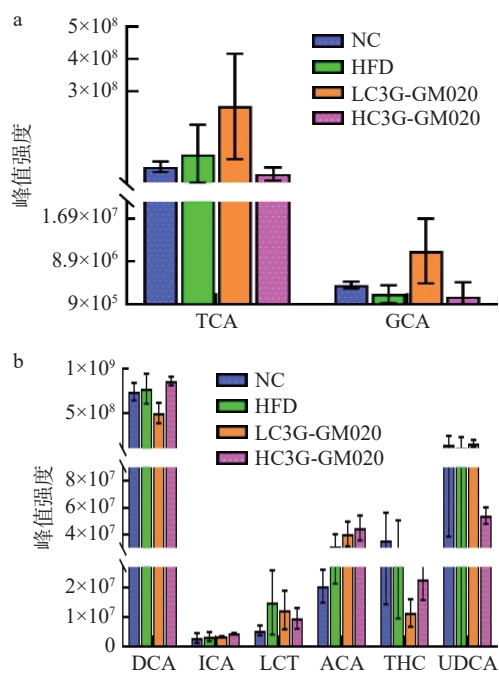


图4 C3G-GM020对小鼠肝脏胆汁酸水平的影响

Fig.4 Effects of ferulic acid on hepatic bile acid level in mice
注: a: 初级胆汁酸水平; b: 次级胆汁酸水平; 牛磺胆汁酸(TCA)、甘胆酸(GCA)、脱氧胆酸(DCA)、异石胆酸(ICA)、石胆酸牛磺酸(LCT)、异胆酸(ACA)、牛磺鹅去氧胆酸(THC)和熊去氧胆酸(UDCA)。

2.4 C3G-GM020对胆汁酸合成关键基因表达的影响

胆汁酸合成主要发生在肝脏,其合成途径包括以CYP7A1为关键酶的经典途径和以CYP7B1为关键酶的替代途径^[28]。胆固醇是CYP7A1、CYP7B1的底物,这两种酶在胆汁酸合成途径中发挥协同作用,共同调节胆固醇代谢和合成。人体内一半以上的胆固醇通过CYP7A1转化为胆汁酸,而不同的胆汁酸介导的信号转导机制已被证明有助于胆固醇代谢变化,胆固醇和胆汁酸的平衡与它们的活性和表达水平密切相关^[29-30]。本研究结果如图5所示,与NC

组相比,HFD组肝脏CYP7A1 mRNA的表达显著提高($P<0.0001$),CYP7B1 mRNA表达显著降低($P<0.01$),C3G-GM020干预可显著抑制高脂诱导的CYP7A1 mRNA表达上调以及CYP7B1 mRNA表达下调。牛磺猪去氧胆酸与黄芪多糖在上调肝脏CYP7B1和下调CYP7A1基因方面显示出相似的作用^[31]。这与本研究中的结果相一致。值得注意的是,牡蛎多糖改善胆汁酸代谢,降低血清胆汁酸谱中游离胆汁酸(CDCA、DCA、CA),并上调CYP7A1、CYP27A1和CYP8B1蛋白表达来加速胆汁酸代谢,改善高脂小鼠肝脏氧化应激和炎症^[32],表明牡蛎多糖可以通过胆汁酸合成经典和替代途径协同促进胆汁酸合成。与该研究相比,本研究结果表明C3G-GM020能够促使肝脏BAs合成途径由经典途径向替代途径转变。综上所述,鼠李糖乳杆菌GM020代谢C3G干预可以有效逆转高脂小鼠肝脏中CYP7A1、CYP7B1 mRNA表达,促使肝脏BAs合成由经典途径向替代途径转变,使胆固醇沿替代途径合成BAs,维持胆汁酸池的平衡,防止胆固醇在体内过多积累。

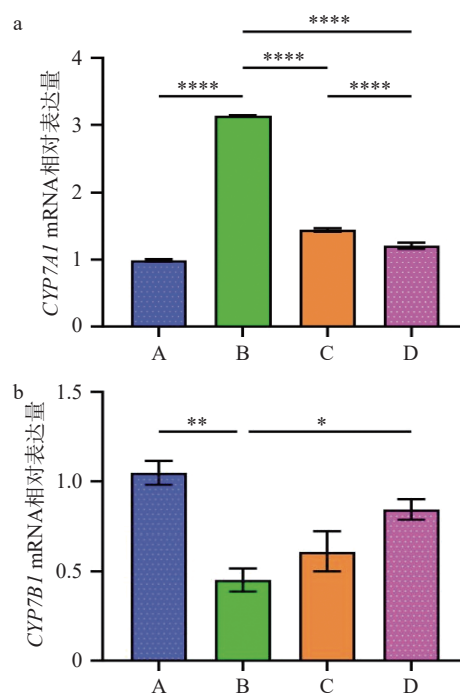


图5 C3G-GM020对肝脏胆汁酸合成关键基因的表达的影响

Fig.5 Effects of C3G-GM020 on the expression of genes critical for liver bile acid synthesis

注: a: CYP7A1; b: CYP7B1 (A为对照组, B为模型组, C为LC3G-GM020组, D为HC3G-GM020组); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.0001$;图6-图7同。

2.5 C3G-GM020对肝脏FXR表达的影响

FXR是BAs的核受体,在调节BAs合成和胆固醇吸收中起着关键作用^[33]。FXR信号作为胆汁酸合成限速酶的反馈调节机制关键靶点,主要表达于肠道和肝脏组织,激活FXR基因,可调节肝脏胆汁酸合成^[33]。研究表明,高脂饮食可导致FXR mRNA表

达下降,进而导致机体脂代谢紊乱。FXR 表达或胆汁酸池组成的任何紊乱都可能导致肝肠疾病以及相关代谢问题^[34]。利用 PCR 技术检测肝脏 FXR mRNA 表达,结果如图 6 所示,与 NC 组相比,小鼠高脂饮食后,肝脏 FXR mRNA 显著降低($P<0.01$),经过 LC3G-GM020 干预可改善高脂诱导肝脏 FXR mRNA 的表达水平下调,但无统计学差异($P>0.05$),而 HC3G-GM020 组肝脏 FXR mRNA 的表达水平与 HFD 组相比显著上调($P<0.05$)。苹果多酚显著增加肝脏 FXR 的表达,调节 BAs 代谢来改善高脂饮食小鼠的胆固醇水平^[35],这与本研究结果一致。Kuang 等^[36]研究证明猪去氧胆酸可以通过调节肠道 FXR 和上调肝脏 CYP7B1 表达,通过脂肪酸-肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)信号传导增强脂质分解代谢,进而上调肝脏 FXR。这与本研究结果一致。结果表明,C3G-GM020 可以激活肝脏 FXR mRNA 表达,调控 HFD 小鼠胆固醇水平。

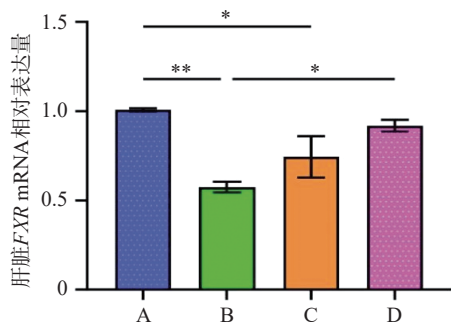


图 6 C3G-GM020 对肝脏 FXR mRNA 的影响
Fig.6 Effects of C3G-GM020 on the expressions of liver FXR mRNA

2.6 C3G-GM020 对肝脏总胆汁酸水平

检测 CYP7B1 基因激活后对肝脏总胆汁酸水平的影响,非靶向代谢组学无法鉴定肝脏组织代谢物的准确含量,因此采用胆汁酸试剂盒检测肝脏总胆汁酸水平,如图 7 所示,小鼠高脂饮食后,肝脏胆汁酸水平下降,与 NC 组无显著性差异($P>0.05$)。肝脏 FXR mRNA 表达上调可以促进胆汁酸合成上调,胆汁酸的含量包括体内胆汁酸的合成、转运和排泄,C3G-GM020 干预可能不仅仅通过一条途径对胆汁酸含量产生影响,因此出现 LC3G-GM020 的干预提高总胆汁酸水平效果更高的情况。LC3G-GM020 干预可提高肝脏总胆汁酸水平($P<0.05$)。HC3G-GM020 干预对胆汁酸水平的下调无显著性差异。阿魏酸通过激活肝脏 BAs 生物合成中经典途径关键酶表达,从而促进肝脏 BAs 的合成,并增加粪便中 BAs 的排泄^[37],这与本研究结果相一致。研究表明,C3G 与 *Lactobacillus* 菌代谢物通过激活胆汁酸合成基因 CYP7B1 的表达,促进胆固醇向胆汁酸转化,进而降低肝脏、血清胆固醇水平。

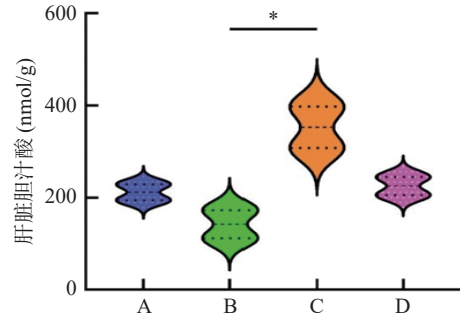


图 7 C3G-GM020 对肝脏 BAs 水平的影响
Fig.7 Effects of C3G-GM020 on liver BAs levels

3 结论

C3G-GM020 干预后,可以回调 12(S)-羟基二十烷酸、13,14-二氢-15-酮-前列腺素 E2、5-氨基戊酸、皮质酮、2-甲氧雌二醇、苏糖酸差异代谢物;KEGG 通路功能富集分析显示,C3G-GM020 可能通过胆汁酸分泌通路调节胆固醇代谢。此外,其显著抑制胆汁酸合成经典途径关键基因 *CYP7A1* 的表达,促进胆汁酸合成替代途径关键基因 *CYP7B1* 的表达,表明 C3G-GM020 促使肝脏胆固醇沿替代途径合成胆汁酸,激活肝脏 FXR mRNA 表达,促进肝脏胆汁酸合成,维持胆汁酸池的平衡,进而调节胆固醇代谢。本研究为特色植物 C3G 的开发及其在精准营养领域的应用提供科学依据,为鼠李糖乳杆菌 GM020 开发调节胆固醇吸收的益生产品提供理论依据,对维持机体胆固醇代谢平衡、改善国民营养健康具有重要的指导意义。未来将结合基因敲除和转录组学,深入研究 C3G-GM020d 对调节胆固醇代谢方面的作用机制。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(03): 209-220. [HU S T, GAO R L, LIU L S, et al. Summary of the 2018 Report on Cardiovascular Diseases in China[J]. *China Circulation Journal*, 2019, 34(3): 209-220.]
- [2] PACE E, JIANG Y Y, CLEMENS A, et al. Impact of thermal degradation of cyanidin-3-O-glucoside of haskap berry on cytotoxicity of hepatocellular carcinoma HepG2 and breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. *Antioxidants*, 2018, 7(2): 24.
- [3] GUO L C, QIAO J L, ZHANG L J, et al. Critical review on anthocyanins in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) and their function[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 204: 108090.
- [4] ZHAO Y, KONG X Y, HU X Q, et al. Black rice anthocyanins as an effective antioxidant of inhibition of oil oxidative based on molecular modification[J]. *Journal of Oleo Science*, 2024, 73(5): 657-664.
- [5] MA Z L, DU B, LI J, et al. An insight into anti-inflammatory

- activities and inflammation related diseases of anthocyanins; a review of both *in vivo* and *in vitro* investigations[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 11076.
- [6] KONGTHITLERD P, BARRAS E, RONG W Q, et al. Cyanidin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by activating the PLC-IP3 pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 162: 114677.
- [7] WU B N, COX A D, CHANG H T, et al. Maize near-isogenic lines with enhanced flavonoids alleviated dextran sodium sulfate-induced murine colitis via modulation of the gut microbiota[J]. *Food & Function*, 2023, 14(21): 9606–9616.
- [8] CAO K H, ZHANG K P, MA M R, et al. *Lactobacillus* mediates the expression of NPC1L1, CYP7A1, and ABCG5 genes to regulate cholesterol[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(12): 6882–6891.
- [9] ZAFAR H, UL AIN N, ALSHAMMARI A, et al. *Lactis-eibacillus rhamnosus* FM9 and *Limosilactobacillus fermentum* Y57 are as effective as statins at improving blood lipid profile in high cholesterol, high-fat diet model in male wistar rats[Z]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1654.
- [10] GU Y G, BAI J, ZHANG J Y, et al. Transcriptomics reveals the anti-obesity mechanism of *Lactobacillus plantarum* fermented barley extract[J]. *Food Research International*, 2022, 157, 111285.
- [11] TIAN L M, TAN Y S, CHEN G W, et al. Metabolism of anthocyanins and consequent effects on the gut microbiota[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(6): 982–991.
- [12] 高彬河. 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对肠道菌群的影响及其作用机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023. [GAO B H. Study on the effect and mechanism of cyanidin-3-O-glucoside on gut microbiota[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2023.]
- [13] CHEN Y, LI Q, ZHAO T, et al. Biotransformation and metabolism of three mulberry anthocyanin monomers by rat gut microflora[J]. *Food Chemistry*, 2017: 887–894.
- [14] 李敏, 刘畅. 不同益生菌发酵玉米须产物对体内外降糖作用的影响[J]. *安徽农学通报*, 2021, 27(2): 16–17, 23. [LI M, LIU C. Effects of different probiotics fermented corn whisker products on *in vivo* and *in vitro* hypoglycemic[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2021, 27(2): 16–17, 23.]
- [15] WANG Y H, GAO N X, NIETO-VELOZA A, et al. *Lonicera caerulea* polyphenols inhibit fat absorption by regulating Nrf2-ARE pathway mediated epithelial barrier dysfunction and special microbiota[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12(4): 1309–1322.
- [16] WANG S H, LI B, TAN H, et al. Cyanidin-3-O-glucoside magic: Unveiling the power to inhibit cholesterol absorption via the intestinal farnesoid X receptor–bile acids pathway with *Lactobacillus marvel*[J]. *Food Frontiers*, 2024: 1–16.
- [17] GAN, Y. R., FU, Y., YANG, L. P., CHEN, J. N., LEI, H., LIU, Q. (2020). Cyanidin-3-O-Glucoside and Cyanidin protect against intestinal barrier damage and 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis [J]. *Journal of Medicinal Food*, 23(1), 90–99.
- [18] YAO Y, ZHANG X, XU Y, et al. Cyanidin-3-O- β -glucoside attenuates platelet chemokines and their receptors in atherosclerotic inflammation of ApoE–/– mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(27): 8254–8263.
- [19] 杨金梅, 李云嵌, 何霞红, 等. 4种真菌发酵对三七叶化学成分及药理活性的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(20): 198–211. [YANG J M, LI Y Q, HE X H, et al. Effects of fermentation of four fungi on chemical constituents and pharmacological activities of *Panax Notoginseng* leaves[J]. *Food Science*, 2023, 44(20): 198–211.]
- [20] 雒志新. 阿魏酸改善高脂诱导小鼠胆固醇代谢紊乱及作用机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2022. [LUO Z X. Study on the improvement of cholesterol metabolism disorder induced by high lipid with ferulic acid and its mechanism[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2022.]
- [21] 刘桂君, 乔宇琛, 周思静, 等. 基于代谢组学的蛹虫草菌株虫草素合成途径研究[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(7): 16–25. [LIU G J, QIAO Y C, ZHOU S J, et al. Synthesis pathway of cordycepin from *Cordyceps* pupa strain based on metabolomics[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2023, 49(7): 16–25.]
- [22] 黄艳辉, 胡云. 甜菜碱缓解皮质酮诱导的鸡肝脏胆固醇沉积的分子机制研究[J]. *现代畜牧科技*, 2022(12): 8–10. [HUANG Y H, HU Y. Betaine alleviates corticosterone-induced hepatic cholesterol accumulation in chickens and its mechanisms[J]. *Modern animal husbandry technology*, 2022(12): 8–10.]
- [23] FREIRE M O D, DO N L C P, DE O K A R, et al. Effects of a Mixed *limosilactobacillus fermentum* formulation with claimed probiotic properties on cardiometabolic variables, biomarkers of inflammation and oxidative stress in male rats fed a high-fat diet[J]. *Foods*, 2021, 10(9): 2022.
- [24] WANG Y, XING X Y, MA Y X, et al. Prevention of high-fat-diet-induced dyslipidemia by *Lactobacillus plantarum* LP104 through mediating bile acid enterohepatic axis circulation and intestinal flora[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(19): 7334–7347.
- [25] JIANG M W, LI F Y, LIU Y H, et al. Probiotic-derived nanoparticles inhibit ALD through intestinal miR194 suppression and subsequent FXR activation[J]. *Hepatology*, 2023, 77(4): 1164–1180.
- [26] ZHU H J, ZHAO F, ZHANG W J, et al. Cholesterol-lowering effect of bile salt hydrolase from a *Lactobacillus johnsonii* strain mediated by FXR pathway regulation[J]. *Food & Function*, 2022, 13(2): 725–736.
- [27] SONG J, LU X, LIU D, et al. Fucogalactan Sulfate (FS) from *Laminaria japonica* regulates lipid metabolism in diet-induced humanized dyslipidemia mice via an intestinal FXR-FGF19-CYP7A1/CYP8B1 pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023: 14027–14037.
- [28] CHU Z X, HU Z M, LUO Y, et al. Targeting gut-liver axis by dietary lignans ameliorate obesity: evidences and mechanisms [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023: 2272269.
- [29] LI T G, CHIANG J Y L. Bile acids as metabolic regulators: an update[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2023, 39(3): 249–255.
- [30] SONG M, YE J Y, ZHANG F L, et al. Chenodeoxycholic Acid (CDCA) protects against the lipopolysaccharide-induced impairment of the intestinal epithelial barrier function via the FXR–

- MLCK pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(32): 8868–8874.
- [31] ZHENG N N, WANG H, ZHU W Z, et al. Astragalus polysaccharide attenuates nonalcoholic fatty liver disease through THDCA in high-fat diet-fed mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 320: 117401.
- [32] 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.
- [33] SUN L L, CAI J, GONZALEZ F J. The role of farnesoid X receptor in metabolic diseases, and gastrointestinal and liver cancer[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(5): 335–347.
- [34] LI H S, XI Y F, LIU H L, et al. Gypenosides ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis via farnesoid X receptor activation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 914079.
- [35] CUI Y, YIN Y, LI S L, et al. Apple polyphenol extract modulates bile acid metabolism and gut microbiota by regulating the circadian rhythms in daytime-restricted high fat diet feeding C57BL/6 male mice[J]. *Food & Function*, 2022, 13(5): 2805–2822.
- [36] KUANG J L, WANG J Y, LI Y T, et al. Hyodeoxycholic acid alleviates non-alcoholic fatty liver disease through modulating the gut-liver axis[J]. *Cell Metabolism*, 2023, 35(10): 1752–1766.
- [37] LUO Z X, LI M Q, YANG J C, et al. Ferulic acid attenuates high-fat diet-induced hypercholesterolemia by activating classic bile acid synthesis pathway[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 9: 976638.