

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.10.012

基于肠道菌群测序和粪便代谢组学探讨脾虚对高脂血症模型大鼠血脂代谢的影响

冷雪^{1✉}, 王琦¹, 李阳², 李欣桐¹

1. 辽宁中医药大学中西医结合学院, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路79号, 110847; 2. 辽宁中医药大学实验动物医学院

[摘要] **目的** 从肠道菌群和粪便内源性代谢物角度探讨脾虚对高脂血症血脂代谢影响的可能作用机制。**方法** 18只SD大鼠随机分为空白组、高脂血症组、脾虚高脂血症组, 每组6只。空白组给予普通饲料, 高脂血症组给予高脂饲料建立高脂血症模型, 脾虚高脂血症组在高脂饲料的基础上复合饥饿失常加运动控制建立脾虚高脂血症模型。造模12周后, 检测各组大鼠血清血脂[包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)]水平; 采用16S rRNA基因测序分析粪便样本中肠道菌群组成, 通过液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)检测粪便中代谢物变化, 筛选出差异代谢物和肠道菌群进行代谢途径分析和功能预测分析, 并进行关联分析。**结果** 与空白组比较, 高脂血症组、脾虚高脂血症组大鼠血清TG、TC、LDL-C水平升高, HDL-C水平降低($P<0.01$); 与高脂血症组比较, 脾虚高脂血症组TG、TC、LDL-C水平进一步升高, HDL-C水平进一步降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。肠道菌群结果显示, 空白组特有物种3066个、高脂血症组特有物种2637个、脾虚高脂血症组特有物种1581个。与高脂血症组比较, 脾虚高脂血症组大鼠肠道菌群Chao1指数、Simpson指数和Shannon指数均降低, 厚壁菌门/拟杆菌门升高, 有差异变化的菌属罗姆布茨菌属、乳酸杆菌属、梭菌属、别样棒菌属、嗜木聚糖真杆菌属均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。代谢组学结果显示, 脾虚引起高脂血症大鼠粪便差异代谢物改变为25种, 下调18种, 上调7种, 通路富集发现改变明显的是5-羟色胺能突触、核苷酸代谢、血管平滑肌收缩、花生四烯酸代谢4条通路。Spearman分析证实, 差异改变明显的菌群罗姆布茨菌属、脱硫弧菌属与代谢物双半乳糖二酰甘油(48:5)、单脱水艾蒿黄素、溶血磷脂酰胆碱(26:4)、葡萄糖醛酸二酰甘油(46:5)相对丰度呈显著正相关; 梭菌属与代谢物环西番莲酸E1、双半乳糖二酰甘油(48:5)、溶血磷脂酰胆碱(26:4)相对丰度呈显著正相关; 嗜木聚糖真杆菌属与代谢物双半乳糖二酰甘油(48:5)、单脱水艾蒿黄素、溶血磷脂酰胆碱(26:4)相对丰度呈显著正相关。**结论** 脾虚可以进一步改变高脂血症模型大鼠肠道菌群相对丰度, 引起菌群失衡和代谢物改变, 加重血脂代谢紊乱; 其作用机制可能与参与5-羟色胺能突触、核苷酸代谢、血管平滑肌收缩、花生四烯酸代谢通路变化有关。

[关键词] 高脂血症; 脾虚; 代谢组学; 肠道菌群; 粪便; 血脂

血脂代谢异常是指血脂中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平与正常含量发生相反改变的情况, 是引发动脉粥样硬化等心血管疾

病的启动因素之一^[1]。血脂代谢异常还会加重肝脏代谢异常, 导致脂肪肝等疾病的发生^[2]。有研究^[3]认为, 中医学的“膏脂”与现代医学中的“血脂”相似, 脾失健运, 则水谷精微不能正常运化, 导致膏脂滞留体内, 形成脾虚型高脂血症。目前临床多以他汀类药物治疗血脂代谢异常疾病, 但常伴随肝功能异常、肌肉疼痛等不良反应。针对血脂代谢异常的治疗策略, 降脂中药的挖掘和改良是潜在治疗

基金项目:国家自然科学基金(82104552); 辽宁省教育厅基本科研基金项目(JYTMS20231822); 辽宁省科技计划联合计划自然科学基金(2024-MSLH-293); 辽宁中医药大学中西医结合学院2024年“岐济”人才支撑计划项目(2024QJ02003)

✉ 通讯作者: 290404025@qq.com

血脂异常疾病的关键^[4]，而挖掘的重点是聚焦于脾虚证候调控脂质代谢的作用靶点。

现代研究发现，长期的高脂饮食能够破坏肠道屏障的完整性和影响肠道菌群的结构^[5]，导致脂肪酸在肝脏中的迁移和积累，而肠道菌群的改变对代谢具有重要影响^[6]。目前代谢组学技术是筛选代谢网络中差异代谢物和细胞通路的关键技术之一。本实验以脾虚高脂血症大鼠为模型，应用菌群高通量测序技术检测大鼠肠道内容物变化和非靶向代谢组学技术分析大鼠粪便代谢谱变化，筛选潜在的差异菌群、差异代谢物及关键代谢通路，为进一步探索脾虚高脂血症的发病机制提供数据支持及理论依据。本研究已通过辽宁中医药大学伦理委员会审批（批准号：21000042020058）。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级SD雄性大鼠18只，体质量（200±10）g，7~8周龄，购自辽宁长生生物科技股份有限公司，实验动物许可证号：SCXK（辽）2020-0001。饲养于辽宁中医药大学实验动物中心，温度22~25℃，湿度50%~70%，光照12h，自由饮水和摄食。

1.2 主要试剂及仪器

TC、TG、HDL-C、LDL-C检测试剂盒（批号分别为A110-1-0、A111-1-1、A112-1-1、A113-1-1），南京建成生物工程研究所；NEBNext® Ultra™ II DNA文库制备试剂盒（货号：E7645S），美国New England Biolabs公司；戊巴比妥钠（货号：69020100），美国Sigma公司；MoBio PowerSoil DNA提取试剂盒（货号：12888-100），德国QIAGEN公司。

LC-30型超高效液相仪，日本岛津Shimadzu公司；TripleTOF 5600+高分辨质谱，上海SCIEX公司；5424R型离心机，德国Eppendorf公司；台式冷冻离心机ST16r，美国Thermo公司；PS-60AL型超声仪，深圳雷德邦科技有限公司；CentriVap型冷冻离心浓缩仪，美国LABCONCO公司；Miseq高通量二代基因测序仪，美国Illumina公司；ACQUITY-UPLC-T3色谱柱150×2.1 mm，美国Waters公司。

1.3 动物分组和造模

18只SD大鼠采用随机数字表法分为空白组、高脂血症组、脾虚高脂血症组，每组6只。空白组给予普通饲料，高脂血症组给予高脂饲料（即6%蔗糖、1%谷氨酸钠、5%蛋黄粉、8%花生油、1.5%胆固醇、0.4%甲基硫氧嘧啶、78.1%基础饲

料），连续喂养12周。脾虚高脂血症组在高脂饲料喂养的基础上复合饥饿失常加运动控制进行造模：单日饲喂上述高脂饲料不限量，并予精炼猪油灌胃，每次3 ml、每日2次，双日饲喂干燥甘蓝压制的蔬菜饼不限量，大鼠予单笼小笼饲养以减少活动，持续12周^[7]。若大鼠血脂水平较空白组出现明显差异且具有统计学意义，即为高脂血症模型造模成功；若大鼠出现少动、精神差、毛色枯黄、无光泽、肛周有黏着的粪便等症状，且各项症状评分较高脂血症组大鼠明显升高，差异具有统计学意义，即为脾虚高脂血症模型造模成功^[7]。本研究大鼠均造模成功。

1.4 血脂检测

喂养12周结束后，用3%戊巴比妥钠5 g/kg麻醉大鼠，腹主动脉取血，静置30 min，室温、3500 r/min离心25 min（离心半径5.0 cm），采集血清，-80℃保存。检测各组大鼠TC、TG、HDL-C、LDL-C水平，严格按照试剂盒说明书要求进行操作。

1.5 肠道菌群的16S rRNA测序

取血后，取大鼠粪便放置于无菌EP管内，-80℃保存。实验时取适量大鼠粪便，根据试剂盒提示进行肠道内容物DNA提取，根据测序区域的选择，使用NEB Next®Ultra™DNA建库试剂盒进行文库构建，构建好的文库通过Miseq高通量二代基因测序仪上机测序，对V3~V4可变区进行扩增和测序，并利用线性判别分析效应大小。利用QIIME1（v1.8.0）软件进行Alpha多样性指数分析（包括Shannon指数、Simpson指数和Chao1指数）。基于物种注释及相对丰度结果，使用R（v3.6.0）软件进行物种组成柱状图分析。并基于Weighted Uni-frace距离使用R（v3.6.0）软件进行主坐标分析（PCoA）分析。使用Mothur（v.1.34.4）软件进行metastats分析；使用Phyton（v2.7）软件进行LEfSe分析，以线性判别分析（LDA）得分≥3为筛选标准^[8]，比较各组大鼠肠道菌群相对丰度在各物种分类水平上的差异。利用PICRUST2（v2.3.0-b）软件对测序所得的操作分类单元（OTU）丰度表进行标准化，并对OTU进行京都基因和基因组百科全书（KEGG，<https://www.kegg.jp/>）功能注释，获得OTU在KEGG功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的相对丰度信息。

1.6 粪便非靶向代谢组学检测

取50 mg大鼠粪便样本于冰上缓慢解冻，用50%甲醇水溶液（含同位素内标）提取样本中代谢

物,制备成质量控制样本,所有待检测样本在液相仪器内依序排列,经 ACQUITY-UPLC-T3 色谱柱进行预分离,从色谱柱流出的样本代谢分析物经高分辨率质谱进行正离子模式和负离子模式各采集 1 次,用常规超高效液相仪检测。将质谱数据导入 Simca-p 14.0 软件建立主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA),初步对各组样本进行差异区分,最终用 S 图 (S-plot) 结合 $P<0.05$, 变量投影重要度 (VIP) >1 来筛选具有显著差异性的代谢物,随后通过在线网站 Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 用于代谢通路分析。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.0.0 软件进行统计分析,计量资料均符合正态分布且方差齐性,以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间数据采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。粪便代谢标志物与肠道菌群的关联分析采用 SPSS 19.0 软件,运用双变量相关分析计算肠道菌群相对丰度与相应的内源性代谢物峰强度的 Pearson 系数。

2 结果

2.1 各组大鼠血脂水平比较

表 1 示,与空白组比较,高脂血症组、脾虚高脂血症组大鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平均升高, HDL-C 水平降低 ($P<0.01$)。与高脂血症组比较,脾虚高脂血症组大鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平进一步升高, HDL-C 水平进一步降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 各组大鼠肠道菌群多样性分析

空白组、高脂血症组、脾虚高脂血症组共有物

种 3318 个,空白组特有物种 3066 个、高脂血症组特有物种 2637 个、脾虚高脂血症组特有物种 1581 个。Alpha 多样性指数分析结果显示,测序深度指数 Coverage 在所有样本中均 >0.99 ,各样本曲线趋向平坦,物种累计曲线结果显示其趋于平缓,此时群落中的 OTU 总数将不再随着新样本的加入而显著增加,说明测序数据量足够大,几乎覆盖所有物种,实验取样合理。表 2 示,与空白组比较,脾虚高脂血症组 Chao1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数均降低,高脂血症组 Shannon 指数、Simpson 指数降低 ($P<0.01$);与高脂血症组比较,脾虚高脂血症组各项指数均进一步降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。上述结果表明,高脂血症大鼠肠道菌群的丰富度和多样性有减少趋势,而脾虚会进一步引起大鼠肠道菌群丰富度和多样性的减少。图 1 示,空白组、高脂血症组、脾虚高脂血症组的肠道菌群组成分布均明显分开。综合分析可知,脾虚高脂血症大鼠的肠道菌群丰富度和多样性的变化最大。

2.3 各组大鼠肠道菌群群落组成分析

2.3.1 门水平比较结果 基于门水平的菌群群落组成分析显示,各组大鼠肠道菌群主要由厚壁菌门、拟杆菌门、脱硫杆菌门、放线菌门及变形菌门组成。表 3 示,与空白组比较,高脂血症组和脾虚高脂血症组大鼠粪便中厚壁菌门相对丰度升高,拟杆菌门、脱硫杆菌门、放线菌门、变形菌门相对丰度降低 ($P<0.01$)。与高脂血症组比较,脾虚高脂血症组大鼠粪便中厚壁菌门、放线菌门相对丰度升高,拟杆菌门、变形菌门相对丰度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),脱硫杆菌门相对丰度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。对于大鼠肠道菌群物种门

表 1 各组大鼠血脂水平比较

Table 1 Comparison of blood lipid levels among groups of rats (mmol·L ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	TG	TC	HDL-C	LDL-C
空白组	6	1.461 $\pm$ 0.015	1.623 $\pm$ 0.056	0.682 $\pm$ 0.018	0.389 $\pm$ 0.014
高脂血症组	6	1.569 $\pm$ 0.048 ^{a)}	1.781 $\pm$ 0.053 ^{a)}	0.594 $\pm$ 0.005 ^{a)}	0.489 $\pm$ 0.008 ^{a)}
脾虚高脂血症组	6	1.853 $\pm$ 0.058 ^{a) b)}	1.959 $\pm$ 0.054 ^{a) b)}	0.530 $\pm$ 0.181 ^{a) b)}	0.510 $\pm$ 0.019 ^{a) c)}

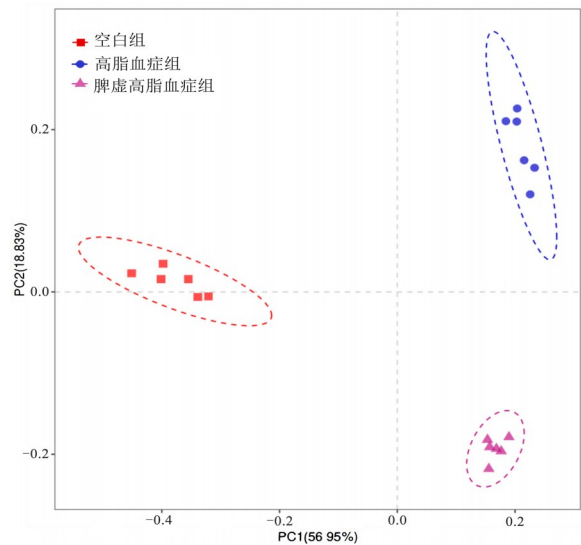
注: TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与高脂血症组比较, $P<0.01$; c) 与高脂血症组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠肠道菌群多样性指数比较

Table 2 Comparison of gut microbiota diversity indices among groups of rats ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
空白组	6	4382.68 $\pm$ 763.75	8.37 $\pm$ 0.65	0.99 $\pm$ 0.01
高脂血症组	6	4056.61 $\pm$ 672.82	7.48 $\pm$ 0.31 ^{a)}	0.95 $\pm$ 0.01 ^{a)}
脾虚高脂血症组	6	3021.06 $\pm$ 807.39 ^{a) b)}	6.77 $\pm$ 0.50 ^{a) b)}	0.92 $\pm$ 0.02 ^{a) c)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与高脂血症组比较, $P<0.05$; c) 与高脂血症组比较, $P<0.01$ 。



注：PC1、PC2 分别代表对于两组样本肠道菌群组成发生偏移的疑似影响因素，需要结合样本特征信息归纳总结。

图 1 各组大鼠肠道菌群主坐标分析(PCoA)图
Figure 1 Principal coordinate analysis (PCoA) of gut microbiota among groups of rats

水平厚壁菌门/拟杆菌门，空白组为 (4.08±0.81)，高脂血症组为 (20.88±3.70)，脾虚高脂血症组为 (154.39±14.42)。与空白组比较，高脂血症组和脾虚高脂血症组厚壁菌门/拟杆菌门升高 ($P<0.01$)；与高脂血症组比较，脾虚高脂血症组厚壁菌门/拟杆菌门进一步升高 ($P<0.01$)。

2.3.2 属水平比较结果 各组大鼠粪便中都由罗姆布茨菌属、未培养菌属、毛螺菌属 NK4A136 组、穆里细菌属、乳酸杆菌属、苏黎世杆菌属、别样棒

菌属、梭菌属、脱硫弧菌属、嗜木聚糖真杆菌属等菌属构成，且相同菌属的相对丰度也不一致。选取占比较多的前十种菌属进行比较（见表 4），与空白组比较，高脂血症组大鼠粪便中罗姆布茨菌属、脱硫弧菌属、嗜木聚糖真杆菌属相对丰度升高，穆里细菌属、别样棒菌属相对丰度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，未培养菌属、乳酸杆菌属、苏黎世杆菌属、梭菌属、毛螺菌属 NK4A136 组差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；脾虚高脂血症组大鼠粪便中罗姆布茨菌属、苏黎世杆菌属、梭菌属、脱硫弧菌属、嗜木聚糖真杆菌属相对丰度升高，穆里细菌属、别样棒菌属相对丰度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，未培养菌属、毛螺菌属 NK4A136 组、乳酸杆菌属相对丰度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与高脂血症组比较，脾虚高脂血症组大鼠粪便中罗姆布茨菌属、梭菌属、别样棒菌属、嗜木聚糖真杆菌属相对丰度升高，乳酸杆菌属相对丰度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，毛螺菌属 NK4A136 组、穆里细菌属、苏黎世杆菌属、未培养菌属、脱硫弧菌属相对丰度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

空白组共鉴定出 32 个细菌类群，其中梭菌纲、消化链球菌目、蒂西埃菌目、消化链球菌科、罗姆布茨菌属、回肠罗姆布茨菌的相对丰度占比较高，为优势菌群；高脂血症组中共鉴定出 36 个细菌类群，显著富集的前五位为脱硫杆菌门、脱硫弧菌目、脱硫弧菌纲、脱硫弧菌科、颤螺菌科；脾虚高脂血症组中共鉴定出 52 个细菌类群，其中相对丰

表 3 各组大鼠肠道菌群物种前五门水平相对丰度比较

Table 3 Comparison of relative abundance at the phylum level for the top five species of gut microbiota among groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	厚壁菌门	拟杆菌门	脱硫杆菌门	放线菌门	变形菌门
空白组	6	0.711 4±0.030 8	0.179 2±0.029 9	0.019 6±0.007 0	0.052 0±0.007 6	0.034 9±0.003 9
高脂血症组	6	0.864 6±0.005 9 ^{a)}	0.042 5±0.007 6 ^{a)}	0.057 3±0.006 7 ^{a)}	0.031 1±0.004 2 ^{a)}	0.002 9±0.000 6 ^{a)}
脾虚高脂血症组	6	0.900 2±0.017 9 ^{a) b)}	0.005 9±0.000 6 ^{a) c)}	0.051 8±0.015 2 ^{a)}	0.038 1±0.003 0 ^{a) b)}	0.001 6±0.000 3 ^{a) c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与高脂血症组比较， $P<0.05$ ；c) 与高脂血症组比较， $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠肠道菌群物种前十种属水平相对丰度比较

Table 4 Comparison of relative abundance at the genus level for the top ten species of gut microbiota among groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	罗姆布茨菌属	未培养菌属	毛螺菌属 NK4A136 组	穆里细菌属	乳酸杆菌属
空白组	6	0.068 1±0.019 5	0.113 5±0.036 4	0.117 6±0.027 3	0.171 5±0.032 3	0.045 0±0.011 1
高脂血症组	6	0.186 3±0.027 8 ^{a)}	0.147 0±0.039 7	0.108 3±0.040 5	0.040 0±0.009 1 ^{a)}	0.061 0±0.035 4
脾虚高脂血症组	6	0.229 6±0.200 0 ^{a) c)}	0.130 6±0.008 2	0.138 6±0.013 8	0.040 0±0.007 1 ^{a)}	0.030 9±0.010 2 ^{d)}
组别	鼠数	苏黎世杆菌属	别样棒菌属	梭菌属	脱硫弧菌属	嗜木聚糖真杆菌属
空白组	6	0.035 5±0.014 4	0.065 6±0.019 2	0.018 5±0.004 5	0.011 1±0.003 9	0.015 3±0.003 9
高脂血症组	6	0.046 4±0.009 2	0.002 2±0.000 7 ^{a)}	0.020 4±0.001 9	0.036 4±0.010 3 ^{a)}	0.022 5±0.004 6 ^{b)}
脾虚高脂血症组	6	0.053 1±0.014 8 ^{b)}	0.017 5±0.004 2 ^{a) d)}	0.043 8±0.007 1 ^{a) c)}	0.033 1±0.003 3 ^{a)}	0.033 2±0.004 7 ^{a) c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与高脂血症组比较， $P<0.01$ ；d) 与高脂血症组比较， $P<0.05$ 。

度占比较高的前五位分别为拟杆菌门、拟杆菌纲、拟杆菌目、穆里细菌科、穆里细菌属。

2.3.3 肠道菌群功能预测结果 图2示,所有样本的KEGG相关功能主要集中在代谢方面,而进一步分析发现在代谢方面中前六位相对丰度较高的为碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素的代谢、萜类和聚酮类化合物的代谢、其他氨基酸代谢、脂质代谢。图3示,本研究重点关注了与血脂代谢密切相关的脂质代谢,进一步分析发现KEGG相关功能主要集中在脂肪酸生物合成和次级胆汁酸生物合成中。

2.4 各组大鼠粪便代谢组学分析结果

2.4.1 各组大鼠粪便中的非靶向代谢物 采用OPLS-DA对各组大鼠粪便代谢数据进行分析,得到了各组正负离子模式下的OPLS-DA得分图,并

进行模型验证。当OPLS-DA得分图中的 $Q^2 > 0.5$ 时,认为模型有效。图4示,空白组 vs 高脂血症组($R^2Y=0.99$, $Q^2=0.894$),空白组 vs 脾虚高脂血症组($R^2Y=0.992$, $Q^2=0.848$),高脂血症组 vs 脾虚高脂血症组($R^2Y=0.998$, $Q^2=0.868$),空白组与高脂血症组、空白组与脾虚高脂血症组、高脂血症组与脾虚高脂血症组间的代谢物存在显著差异。

2.4.2 各组大鼠粪便差异代谢物的筛选 以VIP>1结合单变量分析的 $P < 0.05$ 对各组进行差异代谢物分析,与空白组比较,高脂血症组共鉴定出601个差异代谢物,上调差异代谢物272个,下调差异代谢物329个。与空白组比较,脾虚高脂血症组共鉴定出304个差异代谢物,上调差异代谢物134个,下调差异代谢物170个;与高脂血症组比较,脾虚高脂血症组共鉴定出555个差异代谢物,



图2 各组大鼠肠道菌群功能预测分析

Figure 2 Functional prediction analysis of gut microbiota among groups of rats

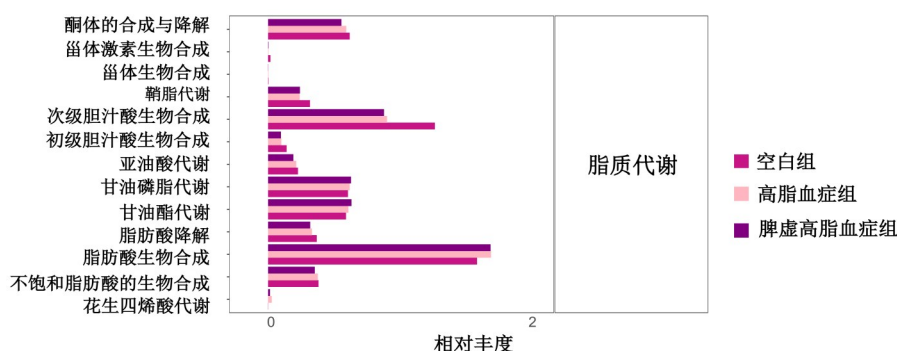
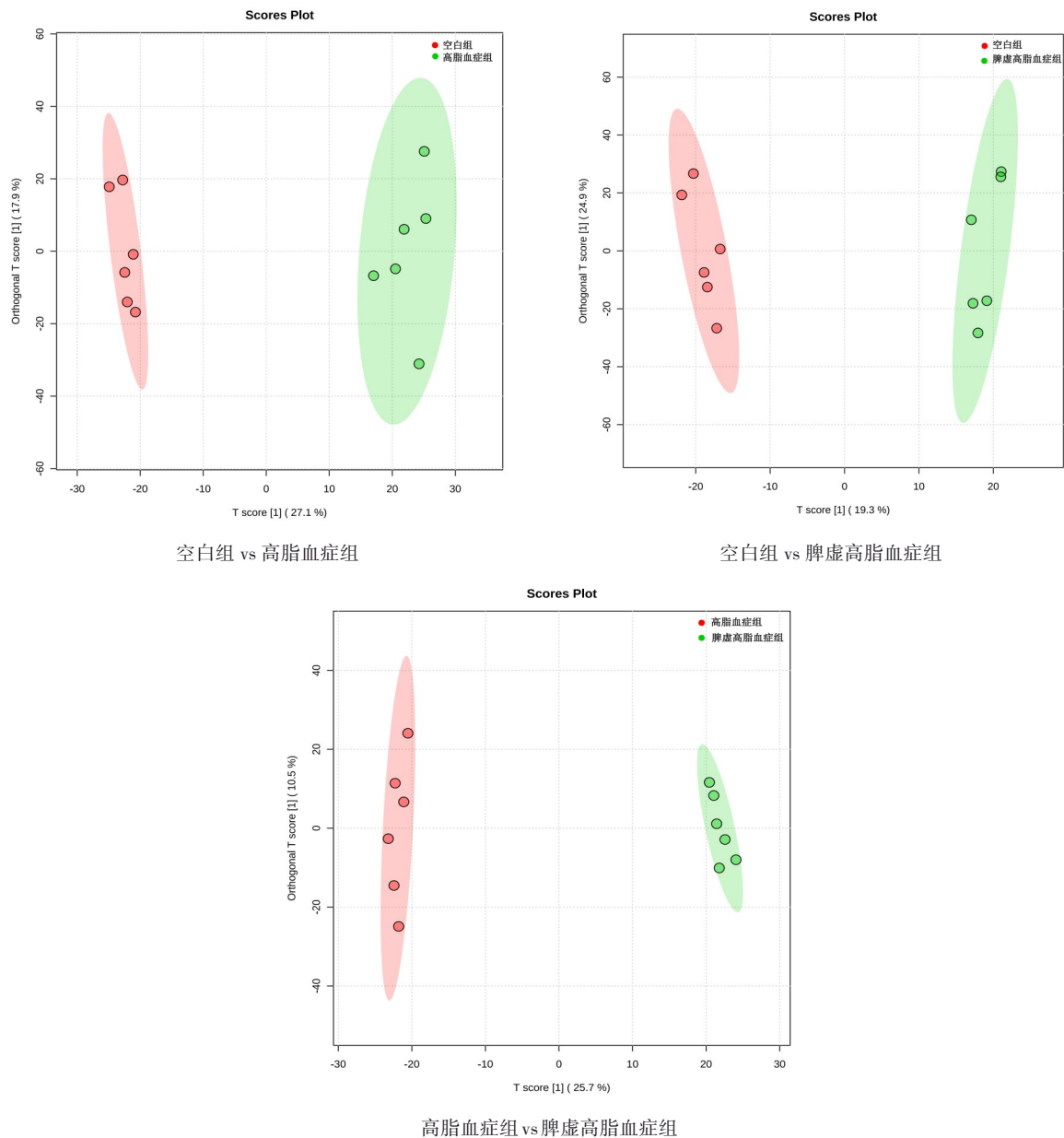


图3 各组大鼠肠道菌群脂代谢相关通路预测分析

Figure 3 Prediction analysis of lipid metabolism-related pathways in gut microbiota among groups of rats



注：图中横坐标 T score 表示第一主成分的预测主成分得分，纵坐标 Orthogonal T score 表示正交主成分得分。

图4 各组大鼠粪便代谢物水平变化的偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）得分图
 Figure 4 Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) score plot of fecal metabolite level changes among groups of rats

上调差异代谢物 261 个，下调差异代谢物 294 个。进一步对差异代谢物前二十位进行分析，与空白组比较，高脂血症组粪便中有 5 种差异代谢物显著上调，排名前三位的为神经酰胺磷酸酯（27：0）、磷脂酰甘油（35：0）、环西番酸 E；有 15 种差异代谢物显著下调，排名前三位的为双半乳糖二酰甘油（48：5）、单脱水埃施霍茨黄素、溶血磷脂酰胆碱（26：4）。与空白组比较，脾虚高脂血症组粪便中有 2 种差异代谢物显著上调，分别是二酰甘油（34：4）、17 α ，21-二羟基孕烯醇酮；有 18 种差异代谢物显

著下调，排名前三位的为双半乳糖二酰甘油（48：5）、葡萄糖醛酸二酰甘油（46：5）、单脱水埃施霍茨黄素。与高脂血症组比较，脾虚高脂血症组粪便中有 6 种差异代谢物显著上调，排名前三位的是 2-（甲氧羰基）-5-甲基-2,4-双（3-甲基-2-丁烯基）-6-（2-甲基-1-氧代丙基）-5-（4-甲基-3-戊烯基）环己酮、17 α ，21-二羟基孕烯醇酮、苄基-NCC-2；有 14 种差异代谢物显著下调，排名前三位的是神经酰胺磷酸酯（27：0）、环西番酸 E、磷脂酰甘油（35：0）。与空白组比较，高脂血症组和脾虚高脂血症组大鼠粪

便中前二十位差异代谢物中共同下调的差异代谢物有 13 种, 分别是磷脂酰乙醇胺 (17 : 0/22 : 1)、拉坦前列素-d4、双半乳糖二酰甘油 (46 : 5)、葡萄糖醛酸二酰甘油 (44 : 5)、二酰甘油三甲基高丝氨酸 (37 : 5)、磷脂酰丝氨酸 (21 : 0/21 : 0)、磷脂酰丝氨酸 (22 : 0/22 : 0)、磷脂酰乙醇胺 (19 : 0/22 : 1)、三酰甘油 (59 : 6)、酰基葡萄糖醛酸二酰甘油 (48 : 4)、双半乳糖二酰甘油 (48 : 5)、单脱水埃施霍茨黄素、溶血磷脂酰胆碱 (26 : 4), 无共同上调差异代谢物, 且前三位下调差异代谢物中有 2 个差异代谢物相同为双半乳糖二酰甘油 (48 : 5)、单脱水埃施霍茨黄素。

分析 2 个比较组 (高脂血症组 vs 空白组、脾虚高脂血症组 vs 高脂血症组) 结果交叉 ($P < 0.05$ 结合 $VIP > 1$), 共筛选出 324 个差异代谢物, 进一步经过该物质在该组对比两组实验间的倍数关系 ($FOLD\ CHANGE > 3$ 及 $FOLD\ CHANGE < 0.2$ 筛选后, 发现脾虚引起高脂血症大鼠粪便中差异代谢物改变为 25 种, 下调 18 种, 上调 7 种 (见表 5)。

2.4.3 大鼠粪便差异代谢物的富集 在获取差异代谢物的匹配信息后, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 对物种通路 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/>) 进行检索和代谢通路分析, 与空白组比较, 高脂血症组中富集通路程度显著的前 7 条通路分别为核苷酸代谢、5-羟色胺能突触、血管平滑肌收缩、花生四烯酸代谢、神经活性配体-受体相互作用、逆行内源性大麻素信号传导; 与空白组比较, 脾虚高脂血症组中富集通路程度显著的前 7 条通路分别为核苷酸代谢、乳腺癌、卵母细胞减数分裂、孕酮介导的卵母细胞成熟、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路、醛缩酯酮的合成与分泌、产热作用; 与高脂血症组比较, 脾虚高脂血症组中富集通路程度显著的前 7 条通路分别为 5-羟色胺能突触、亚油酸代谢、核苷酸代谢、血管平滑肌收缩、花生四烯酸代谢、PPAR 信号通路、催产素信号通路。通过两个交叉组 (高脂血症组 vs 空白组, 脾虚高脂血症组 vs 高脂血症组) 比较发现, 在前 7 条富集通路程度明显的代谢通路中共有 4 个相同的富集通路, 分别是 5-羟色胺能突触、核苷酸代谢、血管平滑肌收缩、花生四烯酸代谢。

2.5 肠道差异菌群与粪便差异代谢物的相关性分析 为进一步探讨大鼠粪便中肠道菌群与代谢组学是否有关联性, 本实验采用 Spearman 相关性分析, 选取 $r \geq 0.8$ 且 $P < 0.05$ 的数据对大鼠肠道菌群与代

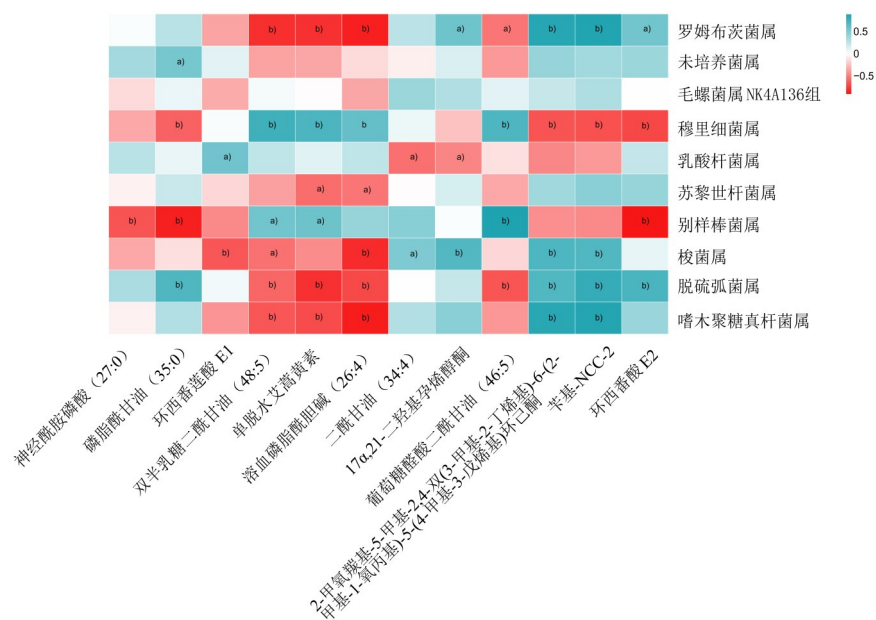
表 5 脾虚高脂血症组和高脂血症组模型大鼠粪便差异代谢物调控信息

Table 5 Regulation of differential fecal metabolites in spleen-deficiency hyperlipidemia group and hyperlipidemia group model rats

代谢物	P 值	FOLD CHANGE	趋势
磷脂酰甘油	0.000 64	0.120 11	↓
环西番酸	0.001 25	0.134 76	↓
神经酰胺磷酸酯	0.003 65	0.146 05	↓
磷脂酰甘油	0.000 18	0.148 89	↓
5-(12-十九碳烯基)-1,3-苯二酚	0.000 15	0.154 47	↓
磷脂酰乙醇胺	0.000 71	0.155 22	↓
虾青素	0.002 49	0.160 10	↓
细菌红黄素醛	0.007 77	0.165 06	↓
11'-羧基- γ -生育三烯酚	0.012 23	0.170 18	↓
常春藤皂苷元	0.004 07	0.178 16	↓
二酰甘油 (34 : 7)	0.002 01	0.179 58	↓
紫花苷	0.012 69	0.194 74	↓
羧基脂肪酸脂肪酯 (36 : 4)	0.000 35	0.120 11	↓
沃卡明	0.002 94	0.134 76	↓
辛巴辛	0.000 59	0.146 05	↓
磷脂酰肌醇 (34 : 2)	0.028 94	0.148 89	↓
单半乳糖二酰甘油 (32 : 8)	0.001 72	0.154 47	↓
磷脂酰甘油 (17 : 0/20 : 2)	0.002 51	0.155 22	↓
牛磺猪胆酸	0.000 14	3.057 20	↑
灵芝酸 C2	0.017 72	3.062 30	↑
3E,8Z-十四碳二烯醇乙酸酯	0.029 50	3.158 00	↑
二苯并 [h, rst] 戊芬	0.000 14	3.207 90	↑
17-苯基三去甲前列腺素 F2 α 环丙酰胺	0.044 86	3.625 20	↑
磷脂酰甘油 (33 : 2)	0.001 90	7.176 00	↑
反式异丁香酚-O-葡萄糖醛酸苷	0.000 64	7.416 50	↑

注: FOLD CHANGE, 该物质在该组对比两组实验间的倍数关系。

谢组学进行关联分析, 绘制网络图 (图 5)。脾虚高脂血症组调控肠道菌群的关键菌属为罗姆布茨菌属、未培养菌属、毛螺菌属 NK4A136 组、穆里细菌属、乳酸杆菌属、苏黎世杆菌属、别样棒菌属、梭菌属、脱硫弧菌属、嗜木聚糖真杆菌属。图 5 示, 罗姆布茨菌属、脱硫弧菌属与代谢物双半乳糖二酰甘油 (48 : 5)、单脱水艾蒿黄素、溶血磷脂酰胆碱 (26 : 4)、葡萄糖醛酸二酰甘油 (46 : 5) 相对丰度呈显著正相关; 嗜木聚糖真杆菌属与代谢物双半乳糖二酰甘油 (48 : 5)、单脱水艾蒿黄素、溶血磷脂酰胆碱 (26 : 4) 相对丰度呈显著正相关; 穆里细菌属与代谢物磷脂酰甘油 (35 : 0)、2-(甲氧羰基)-5-甲基-2,4-双(3-甲基-2-丁烯基)-6-(2-甲基-1-氧代丙基)-5-(4-甲基-3-戊烯基)环己酮、苜蓿基-NCC-2、环西番酸 E2 相对丰度呈显著正相关; 乳酸杆菌属与



注：a)， $P<0.05$ ；b)， $P<0.01$ 。

图 5 大鼠肠道差异菌群和差异代谢物的关联分析

Figure 5 Correlation analysis between differential gut microbiota and differential metabolites in rats

代谢物二酰甘油（34：4）、17 α ,21-二羟基孕烯醇酮相对丰度呈显著正相关；苏黎世杆菌属与代谢物单脱水艾蒿黄素、溶血磷脂酰胆碱（26：4）相对丰度呈显著正相关；别样棒菌属与代谢物神经酰胺磷酸（27：0）、磷脂酰甘油（35：0）、环西番酸 E2 相对丰度呈显著正相关；梭菌属与代谢物环西番莲酸 E1、双半乳糖二酰甘油（48：5）、溶血磷脂酰胆碱（26：4）相对丰度呈显著正相关。

3 讨论

中医学认为，脾为后天之本，主运化水谷精微，脾失健运，痰浊内生，易导致膏脂转输障碍^[3]。肠道菌群是人体的第二大器官，与多种疾病的发生发展有重要关联，在多种脂质代谢紊乱疾病中常为重要致病因素。代谢物是机体内参与新陈代谢重要的小分子物质，目前已成为找到疾病早期发生发展的关键标志物^[9]。本研究主要从肠道菌群变化和内源性代谢物变化角度分析，并对结果进行关联分析，结合脾主运化理论，深入探讨脾虚对血脂代谢作用的机制。

本研究发现，高脂饲料喂养后大鼠的血脂水平出现明显异常，脾虚进一步加剧这一现象，这也表明脾虚对膏脂转输具有一定的影响，与前期研究结果^[7, 10]一致。有研究指出，高脂饲料喂养的小鼠体内肠道菌群比例失调^[11]，本研究亦发现高脂血症模型大鼠肠道菌群多样性及丰富度均明显降低，

厚壁菌门和拟杆菌门是 2 个最主要的优势菌门。因厚壁菌门含有较多有害菌，而拟杆菌门通常含有较多有益菌，厚壁菌门/拟杆菌门常被用作评价肠道菌群失衡的标志^[12]。在门水平上，与单纯高脂血症比较，脾虚高脂血症大鼠菌群中厚壁菌门相对丰度进一步升高、拟杆菌门相对丰度进一步降低，进一步升高了厚壁菌门/拟杆菌门比值，表明脾虚导致脂转输障碍会加重菌群紊乱变化。在属水平上，有研究^[13]显示，罗姆布茨菌属与脂肪堆积存在正相关关联；苏黎世杆菌属与高脂小鼠的胰岛素抵抗、黏膜屏障能力相关，且与 TC 含量呈正相关^[14]；乳酸杆菌属于一种益生菌，对改善肠道屏障功能及参与肠道免疫反应和调节代谢紊乱具有积极影响^[15]。本研究发现，高脂血症组和脾虚高脂血症组中罗姆布茨菌属、苏黎世杆菌属相对丰度均增加明显，且占比较多，而脾虚进一步增加了罗姆布茨菌属和苏黎世杆菌属的相对丰度，而脾虚高脂血症组中有益菌群乳酸杆菌属相对丰度进一步下降。可见，脾虚导致血脂异常加重很有可能与罗姆布茨菌属、苏黎世杆菌属相对丰度增加，以及乳杆菌属相对丰度下降相关。

本实验代谢组学技术检测结果显示，分析 2 个比较组（高脂血症组与空白组比较、脾虚高脂血症组与高脂血症组比较）结果交叉（ $P<0.05$ 结合 VIP>1），共筛选出 324 个差异代谢物，经过进一

步筛选后,发现脾虚引起高脂血症大鼠粪便组织差异代谢物改变为 25 种,下调 18 种,上调 7 种。其中筛选出与脂代谢和炎症有关的代谢物主要为前列腺素、脑磷脂、虾青素、常春藤皂苷元、脂肪酸羟基脂肪酸 (FAHFA)、磷脂酰肌醇、牛磺猪胆酸等。其中脑磷脂是生物膜的主要成分,属于第二大磷脂,细胞内脑磷脂的含量与氧化磷酸化反应和线粒体功能相关,而氧化磷酸化与线粒体的正常运作都与心血管疾病的病理及生理过程密切相关^[16-17]。本研究结果显示,高脂血症大鼠粪便中脑磷脂(42:4)含量降低,脾虚状态下会进一步降低脑磷脂(42:4)的含量,表明脾虚引起血脂代谢紊乱的原因可能与氧化磷酸化反应和线粒体功能有关。此外,由不饱和脂肪酸所衍生的前列腺素是一种非常重要的脂质调节介质,并与炎症发生发展相关^[18]。本研究发现多种前列腺素参与了代谢过程,高脂血症大鼠粪便中前列腺素(35:0)、前列腺素(17:0/20:2)、前列腺素(17:1/20:1)下调,前列腺素(33:2)上调,而脾虚会进一步加重改变,这也说明了不同种类的前列腺素与血脂代谢紊乱密切相关。有研究报道,FAHFA 与小鼠和人类的胰岛素敏感性呈正相关,可以防止葡萄糖刺激的胰岛素分泌的损伤,增加胰岛 β 细胞的增殖和活力^[19-20],并改善小鼠的葡萄糖耐量^[21],而 FAHFA 与内脏脂肪量呈负相关^[22]。本研究发现,高脂血症大鼠粪便中 FAHFA(36:4)下调,而脾虚高脂血症大鼠粪便中 FAHFA(36:4)进一步下调,可见脾虚可能会进一步降低 FAHFA(36:4)水平来加重血脂代谢紊乱。此外,虾青素是一种富含红色色素的类胡萝卜素,具有显著的抗氧化、抗炎、抗增殖和抗凋亡特性,其抗炎性在多种疾病中发挥着重要的作用^[23]。虾青素在治疗糖脂代谢紊乱疾病糖尿病相关的心血管并发症中显示出疗效,其参与血管收缩的抗炎和抗氧化调节^[24]。常春藤皂苷元具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种药理特性,对油酸诱导的肝脏 HepG2 细胞有降脂作用^[25]。本研究发现,与高脂血症组比较,脾虚会引起粪便中虾青素和常春藤皂苷元的含量进一步下降,这可能与抗炎性和抗氧化下降有关。研究显示,高脂血症大鼠小肠中牛磺猪胆酸含量增加,HDL-C 水平与结合型次级胆汁酸牛磺猪胆酸含量呈负相关性^[26]。本研究发现,高脂血症大鼠粪便代谢物牛磺猪胆酸含量也出现了增加,此外脾虚加重了这一现象,表明脾虚对胆汁酸代谢存在一定的影响。

分析 KEGG 通路发现,脾虚高脂血症组与高脂血症组比较,富集较明显的前 7 个通路中有 4 个通路相同分别是 5-羟色胺能突触、核苷酸代谢通路、血管平滑肌收缩、花生四烯酸代谢相同。5-羟色胺属于一种生物胺,其可以调节肝脏脂质平衡^[27]。核苷酸是生物体内一种极其重要的低分子化合物,核苷酸代谢在许多生物学过程中起着关键作用^[28]。研究表明,口服外源性 5'-核苷酸,对小鼠非酒精性肝损伤具有潜在保护作用^[29]。血管平滑肌细胞具有高度的可塑性特点,病理状态下血管平滑肌细胞收缩能力变低,增殖、迁移和分泌细胞外基质的能力增强,这些变化与动脉粥样硬化性疾病的发生发展密切相关^[30]。花生四烯酸是一种多不饱和脂肪酸,在细胞膜上以磷脂形式存在^[31],其可以通过前列腺素 G/H 合酶途径、不含有血红素的双加氧酶途径和细胞色素 P450 (CYP450) 途径参与肝脏糖脂代谢稳态的调控^[32]。此外脾虚高脂血症大鼠中富集较明显的通路还包括亚油酸代谢、PPAR 信号通路,亚油酸在控制体内炎症和抗炎症、血管舒张和血管收缩、支气管收缩和支气管扩张、血小板聚集和抗聚集等稳态中起着关键作用^[33]; PPAR 通常参与调控脂质代谢和炎症相关基因的表达,目前多数中药以 PPAR 为靶点,参与对高脂血症、动脉粥样硬化性疾病的防治^[34]。因此,发现上述通路都参与了对脂质代谢及代谢炎症的调控,这些通路主要提示了脾虚可以进一步影响高脂血症脂代谢,其机制可能是参与了 PPAR 信号通路、亚油酸代谢通路等与脂质代谢及代谢炎症相关的调控通路,可见脾虚对血脂代谢等的重要影响作用。

另外,本研究通过肠道菌群和代谢组学关联分析发现,大鼠粪便差异代谢物和肠道微生物之间有非常密切的关系,表明脾虚可能通过调控肠道菌群丰度多样性,改变肠道菌群相关的代谢产物引起血脂代谢紊乱的现象。本研究虽阐明脾虚对血脂代谢的影响,但是因代谢物较多,还需要深入挖掘,以期将来从脾治疗高脂血症提供一定支持。

参考文献

- [1] NAVAR-BOGGAN AM, PETERSON ED, D'AGOSTINO RS, et al. Hyperlipidemia in early adulthood increases long-term risk of coronary heart disease [J]. *Circulation*, 2015, 131(5):451-458.
- [2] 张玉昆,袁茵,冯月男,等. 补阳还五汤对高脂血症模型大鼠脂质代谢及肝组织的影响[J]. *中国药房*, 2020, 31(10):1203-1207.

- [3]贾连群, 杨关林, 张哲, 等. 从“脾主运化”理论探讨血脂转输与胆固醇逆向转运[J]. 中医杂志, 2013, 54(20):1793-1795.
- [4]余一鸣, 胡永慧, 张莉野, 等. 中药调血脂的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(17):3636-3644.
- [5]ROHR MW, NARASIMHULU CA, RUDESKI-ROHR TA, et al. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: a review [J]. *Adv Nutr*, 2020, 11(1): 77-91.
- [6]YAMAGISHI R, KAMACHI F, NAKAMURA M, et al. Gasdermin D-mediated release of IL-33 from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(72):eabl7209.
- [7]李静, 贾连群, 李宁, 等. 一种新型小动物脾虚高脂血症模型的建立[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(2):503-505.
- [8]SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60.
- [9]田菁, 王宇哲, 闫世雄, 等. 代谢组学技术发展及其在农业动植物研究中的应用[J]. 遗传, 2020, 42(5): 452-465.
- [10]冷雪, 曹媛, 王莹, 等. 香砂六君子汤通过调控 miR-182/FOXO1 对脾虚高脂血症大鼠肝脏脂质沉积的影响及可能的机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(7):2677-2683.
- [11]ZHOU YF, NIE J, SHI C, et al. Lysimachia christinae polysaccharide attenuates diet-induced hyperlipidemia via modulating gut microbes-mediated FXR-FGF15 signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 248: 125725. doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2023. 125725.
- [12]杨澜, 刘明飞, 孙成宏, 等. 基于肠道菌群与肠道代谢探究脉络舒通丸对大鼠股骨骨折引起的后肢肿胀的治疗作用及机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(17): 4711-4721.
- [13]尹洪刚, 黄俊豪, 胡敏. 运动干预对肥胖者肠道微生物组成的影响研究进展:以 Romboutsia 为例[C]//广州体育学院, 中国体育科学学会运动生理生化分会, 中国体育科学学会运动医学分会. 2022 年第七届广州运动与健康国际学术研讨会论文集. 广州:广州体育学院, 2022:395-360.
- [14]党红阳, 李欣悦, 齐策, 等. 凝结芽孢杆菌 BC2000 联合鞣花酸改善高脂饮食诱导的小鼠胰岛素抵抗[J]. 食品科学, 2023, 44(5):85-95.
- [15]SLATTERY C, COTTER PD, O'TOOLE PW. Analysis of health benefits conferred by lactobacillus species from kefir[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6):1252.
- [16]PATEL D, WITT SN. Ethanolamine and phosphatidylethanolamine: partners in health and disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4829180. doi: 10.1155/2017/4829180.
- [17]TASSEVA G, BAI HD, DAVIDESCU M, et al. Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(6): 4158-4173.
- [18]韩慕天. 不饱和脂肪酸代谢产物前列腺素(PG)对树突状细胞的调控以及机制研究[D]. 镇江:江苏大学, 2015.
- [19]BREZINOVA M, CAJKA T, OSEEVA M, et al. Exercise training induces insulin-sensitizing PAHSAs in adipose tissue of elderly women [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(2):158576.
- [20]ZHOU P, SANTORO A, PERONI OD, et al. PAHSAs enhance hepatic and systemic insulin sensitivity through direct and indirect mechanisms [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(10):4138-4150.
- [21]SYED I, RUBIN DCM, MOHAN JF, et al. PAHSAs attenuate immune responses and promote beta cell survival in autoimmune diabetic mice [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9):3717-3731.
- [22]NELSON AB, CHOW LS, STAGG DB, et al. Acute aerobic exercise reveals that FAHFs distinguish the metabolomes of overweight and normal-weight runners [J]. *JCI Insight*, 2022, 7(7):e158037.
- [23]KOHANDEL Z, FARKHONDEH T, ASCHNER M, et al. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145:112179. doi: 10.1016/j.biopha. 2021. 112179.
- [24]LANDON R, GUEGUEN V, PETITE H, et al. Impact of astaxanthin on diabetes pathogenesis and chronic complications [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(7):357.
- [25]YANG M, WANG J, WANG Q. Hederagenin exerts potential antilipemic effect via p38MAPK pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and in hyperlipidemic rats [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2022, 94(4):e20201909.
- [26]雷素珍. 莲子抗性淀粉调控肠道菌群介导胆汁酸代谢的分子机制[D]. 福州:福建农林大学, 2023.
- [27]NAMKUNG J, SHONG KE, KIM H, et al. Inhibition of serotonin synthesis induces negative hepatic lipid balance [J]. *Diabetes Metab J*, 2018, 42(3):233-243.
- [28]李解. 外源核苷酸对斑马鱼脂代谢和免疫的调控和相关机理研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2019.
- [29]高丽芳, 罗葵, 崔淑香. 外源性核苷酸对小鼠非酒精性肝损伤保护作用初探 [J]. 首都医科大学学报, 2016, 37(3):356-359.
- [30]帕力旦·赛买提, 姚伟娟. 血管平滑肌细胞收缩的分

- 子机制研究进展[J]. 生理科学进展, 2021, 52(3): 217-221.
- [31] SONNWEBER T, PIZZINI A, NAIRZ M, et al. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11):3285.
- [32] 李沙, 苏文, 张晓燕, 等. 花生四烯酸代谢与肝脏糖脂代谢稳态调控[J]. 生理学报, 2021, 73(4):657-664.
- [33] 杨瑞, 钱文娟, 彭琳秀, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 的桔梗汤治疗小鼠急性肺损伤的磷脂组学研究[J]. 药学学报, 2019, 54(1):144-150.
- [34] 吴莹, 张雪莹, 郭守东. 传统中药作为 PPAR 调节剂在动脉粥样硬化治疗中的应用[J/OL]. 中国动脉硬化杂志. (2024-06-27)[2024-12-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1262.R.20240625.1622.002.html>.

Effects of Spleen Deficiency on Lipid Metabolism in Hyperlipidemia Model Rats Based on Gut Microbiota Sequencing and Fecal Metabolomics

LENG Xue¹, WANG Qi¹, LI Yang², LI Xintong¹

1. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110847; 2. School of Laboratory Animal Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanisms by which spleen deficiency affects lipid metabolism in hyperlipidemia, from the perspective of gut microbiota and fecal endogenous metabolites. **Methods** Eighteen Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, hyperlipidemia group, and spleen-deficiency with hyperlipidemia group, with 6 rats in each group. The control group was fed with standard diet; the hyperlipidemia group was given high-fat diet to induce hyperlipidemia model; and the spleen-deficiency with hyperlipidemia group received combination of high-fat diet, irregular feeding, and exercise restriction to induce the model. After 12 weeks of modeling, serum lipid levels including total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured. 16S rRNA gene sequencing was used to analyze gut microbiota composition in fecal samples, and fecal metabolites were analyzed using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). Differential metabolites and microbial taxa were screened for pathway enrichment and functional prediction analysis, followed by correlation analysis. **Results**

Compared with the control group, rats in the hyperlipidemia and spleen-deficiency with hyperlipidemia groups showed significantly increased serum TG, TC, and LDL-C levels, and decreased HDL-C levels ($P < 0.01$). Compared with the hyperlipidemia group, the spleen-deficiency with hyperlipidemia group showed further increases in TG, TC, and LDL-C and further decrease in HDL-C ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Gut microbiota analysis revealed 3,066 unique species in the control group, 2,637 in the hyperlipidemia group, and 1,581 in the spleen-deficiency group. Chao1, Simpson, and Shannon indices were significantly reduced in the spleen-deficiency group compared with the hyperlipidemia group, with an increased Firmicutes/Bacteroidetes ratio. Differentially abundant genera such as Romboutsia, Lactobacillus, Clostridium, Allobaculum, and Xylanibacter were significantly upregulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Metabolomics identified 25 differential metabolites in feces of spleen-deficient rats, with 18 downregulated and 7 upregulated. Key enriched pathways included serotonergic synapse, nucleotide metabolism, vascular smooth muscle contraction, and arachidonic acid metabolism. Spearman correlation analysis showed significant positive correlations between Romboutsia and Desulfovibrio and metabolites such as digalactosyldiacylglycerol (48:5), dehydrated artemetin, lysophosphatidylcholine (26:4), and glucuronosyldiacylglycerol (46:5); Clostridium was positively correlated with cyclopasifloric acid E1, digalactosyldiacylglycerol (48:5), and lysophosphatidylcholine (26:4); Xylanibacter was positively correlated with digalactosyldiacylglycerol (48:5), dehydrated artemetin, and lysophosphatidylcholine (26:4). **Conclusion** Spleen deficiency can further alter gut microbiota composition in hyperlipidemia model rats, leading to microbial dysbiosis and metabolic disturbances that aggravate lipid metabolism disorders. This mechanism may be associated with changes in pathways such as serotonergic synapse, nucleotide metabolism, vascular smooth muscle contraction, and arachidonic acid metabolism.

Keywords hyperlipidemia; spleen deficiency; metabolomics; gut microbiota; feces; blood lipids

(收稿日期: 2024-12-11; 修回日期: 2025-02-25)

[编辑: 邓媛]