



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Microecology—Article

## 功能代谢组学揭示黄芪多糖通过2-羟基丁酸改善肥胖小鼠的脂质代谢

李冰冰<sup>a, #</sup>, 洪颖<sup>a, #</sup>, 顾彧<sup>a</sup>, 叶圣洁<sup>a</sup>, 胡凯莉<sup>a</sup>, 姚建<sup>b</sup>, 丁侃<sup>b</sup>, 赵爱华<sup>c</sup>, 贾伟<sup>c, d</sup>, 李后开<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

<sup>b</sup> Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

<sup>c</sup> Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus and Center for Translational Medicine, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

<sup>d</sup> University of Hawaii Cancer Center, Honolulu, HI 96813, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 December 2019

Revised 16 May 2020

Accepted 25 May 2020

Available online 16 October 2020

#### 关键词

黄芪多糖

功能代谢组学

2-羟基丁酸

肥胖

### 摘要

多糖广泛存在于草本植物中,具有多种活性,特别是具有免疫调节作用和改善代谢紊乱的作用。然而,其潜在机制还没有被很好地诠释。功能代谢组学越来越多地被用于通过鉴定具有特定功能的代谢产物来研究多糖对宿主的系统性影响。本研究采用功能代谢组学策略,探讨黄芪多糖(*Astragalus polysaccharide*, APS)代谢获益的潜在机制。在为期8周的高脂肪饮食(high-fat diet, HFD)喂养的肥胖小鼠中测定了APS的作用。然后,进行基于气相色谱-飞行时间质谱(gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, GC-TOFMS)的非靶向代谢组学分析血清和肝组织,并进行基于液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)的靶向代谢组学分析。使用体外和体内代谢紊乱模型测试了代谢产物的潜在功能。我们的结果首次证实了APS对肥胖小鼠的代谢益处。然后,代谢组学分析显示,补充APS可逆转HFD诱导的代谢变化,并确定2-羟基丁酸(2-hydroxybutyric acid, 2-HB)是APS活性的潜在功能性代谢产物,该代谢物被HFD显著降低,并被APS逆转。进一步研究表明,2-HB可抑制油酸(oleic acid, OA)诱导的甘油三酯(triglyceride, TG)累积。还发现其可刺激肝细胞中脂质降解蛋白的表达和3T3-L1细胞中的TG脂解。此外,在高脂肪和高蔗糖(high-fat and high-sucrose, HFHS)喂养的小鼠中发现2-HB可降低血清TG并调节参与脂质降解的蛋白质。总之,我们的研究表明,APS的代谢益处至少部分归因于2-HB的产生,2-HB在体外和体内均可调节脂质代谢。我们的结果同样证实,功能代谢组学在研究植物多糖系统益处的潜在机制方面是切实可行的。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

肥胖是大多数以脂质代谢失调、炎症和胰岛素(insulin, INS)抵抗为特征的代谢性疾病的基础[1–5]。过多的能量摄入或脂肪酸从头合成的活化加速了肥胖及肥胖相关代谢紊乱的发生[6–7]。世界上超过19亿的成年人超重[8]。不幸的是,只有很少的方案能够安全有效地减肥[9]。

中医在中国和亚洲其他国家已经有数千年的历史[10]。草本多糖是一类具有多种保健和防病功能的活性大分子[11]。Chang等[12]和Wu等[13]报道,从灵芝和中国被毛孢中提取的多糖在高脂饮食(HFD)饲养的小鼠中有明显的抗肥胖作用。黄芪是*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao干根的药用部分[14]。黄芪被中医广泛应用于提高免疫力,以及作为膳食

\* Corresponding author.

E-mail address: [hukai1976@126.com](mailto:hukai1976@126.com) (H. Li).

# These authors contributed equally to this work.

补充剂[15]。黄芪多糖（APS）是从黄芪中提取的，对代谢紊乱的小鼠具有良好的疗效[16–18]。我们最近的研究表明，APS在改善HFD喂养小鼠的肥胖和菌群紊乱方面同样具有很好的效果[19]。然而，APS的潜在机制尚不清楚。

代谢组学是通过测量血液、尿液、粪便或组织等生物样品中代谢产物的相对或绝对水平，监测病理生理条件下宿主代谢状态的组学方法[20]。越来越多的证据表明，许多内源性代谢物不仅是宿主或肠道微生物群的产物，而且是对宿主能量代谢具有强大调节作用的分子，如衣康酸盐、短链脂肪酸和胆汁酸[21–23]。因此，基于非靶向或靶向代谢组学，功能代谢组学正在成为研究已鉴定代谢产物在疾病形成或治疗中的潜在生物学功能的重要策略。

在本研究中，我们采用了非靶向和靶向代谢组学方法来研究APS在HFD喂养的肥胖小鼠中的代谢益处的潜在机制。我们的结果证实，APS可有效减轻体重和肥胖相关疾病。然后，我们在HFD或补充APS的小鼠的血清和肝组织中鉴定出发生显著改变的数十种差异代谢产物，并对其在脂质代谢中的生物学功能进行了进一步检测。我们确定，补充APS会增加细菌相关代谢产物2-羟基丁酸（2-HB）的水平，其体外和体内均可有效改善脂质代谢。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 细胞培养

本研究使用的细胞均由中国科学院上海生命科学研究所以细胞资源中心提供。将HepG2细胞、RAW264.7细胞和分化前后的3T3-L1细胞培养在基础培养基中，即含10%胎牛血清（FBS; Gibco, USA）、青霉素（200单位·mL<sup>-1</sup>）和链霉素（200 mg·mL<sup>-1</sup>）的细胞培养基（DMEM; Gibco, 美国）。AML12细胞在细胞培养基F-12（DMEM/F-12; Invitrogen, 美国）中培养，该培养基补充了10%（V/V）热灭活胎牛血清、1%胰岛素转铁蛋白硒（ITS）液体培养基补充剂（100×; Sigma-Aldrich, 美国）、地塞米松（40 ng·mL<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich公司, 美国）、碳酸氢钠（1.2 g·L<sup>-1</sup>）、青霉素（200单位·mL<sup>-1</sup>）和链霉素（200 mg·mL<sup>-1</sup>）。所有细胞均在保湿细胞培养CO<sub>2</sub>培养箱（Esco Micro Pte. Ltd., 新加坡）中培养，培养条件：37 °C、5% CO<sub>2</sub>。

#### 2.1.1. 胰岛素抗性模型

将HepG2细胞接种到密度约为1.25×10<sup>5</sup>个细胞·cm<sup>-2</sup>的12孔板培养基中，接种后每24 h更换一次培养基，持续2 d，直至培养物达到约80%的聚集。对于胰岛素抗性

模型，添加2.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖胺（GS; 上海碧云天生物技术有限公司）并去除胎牛血清18 h，然后将培养基更换为含GS和2-HB的10%胎牛血清细胞培养基（Sigma-Aldrich, 美国）。24 h后，用胰岛素（甘舒霖重组人胰岛素注射液）处理细胞20 min。最后，收集细胞并提取蛋白用于后续测定。

#### 2.1.2. 脂质聚集模型

将AML12细胞接种到密度约为1.25×10<sup>5</sup>个细胞·cm<sup>-2</sup>的24孔板培养基中。每隔24 h更换一次培养基，直至培养物达到约80%的聚集。用0.2 mmol·L<sup>-1</sup>油酸（OA; Sigma-Aldrich, 美国）建立脂质聚集模型，药物处理组添加不同剂量的2-HB。处理完成后收集细胞用于后续测定。

#### 2.1.3. 炎症模型

将RAW264.7细胞接种到密度为4.0×10<sup>5</sup>个细胞·cm<sup>-2</sup>的24孔板培养基中，每隔24 h更换培养基。对于炎症模型，先用不同剂量的2-HB处理细胞0.5 h，然后用100 ng·mL<sup>-1</sup>脂多糖（LPS, Sigma-Aldrich, 美国）刺激4 h。最后，收集细胞并提取mRNA以测定mRNA含量。

#### 2.1.4. 脂肪细胞培养和处理

将3T3-L1细胞接种到6孔板培养基中，每隔24 h更换培养基，接触抑制48 h后，加入分化液，促进细胞分化为脂肪细胞。首先，将培养基改为分化培养基A，其中含有高糖细胞培养基、10%（V/V）热灭活胎牛血清、胰岛素（10 mg·L<sup>-1</sup>）、地塞米松（1 μmol·L<sup>-1</sup>）和异丁基甲基黄嘌呤（isobutyl methylxanthine, IBMX; 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>）。48 h后，培养基改为分化培养基B，含高糖细胞培养基、10%（V/V）热灭活胎牛血清和胰岛素（10 mg·L<sup>-1</sup>）。48 h后，培养基改为0%胎牛血清的细胞培养基。细胞在基础培养基上培养6~8 d，每48 h更换一次培养基，显微镜下观察细胞。如果细胞形态为圆形，且细胞内有黄色脂滴，则分化成功。用2-HB处理细胞24 h，然后收集细胞用于后续测定。

### 2.2. 黄芪多糖的提取方法

本研究采用成熟的水提醇沉法从黄芪（上海康桥中药饮片有限公司）中提取黄芪多糖[24]。简要描述提取过程，向黄芪中分别加入体积为10倍、8倍、6倍的蒸馏水，各煎1 h。然后将三次过滤的煎液合并，并在低于60 °C的温度下浓缩至三分之一体积。然后加入高达70%的乙醇并沉淀一夜。接下来，在低于60 °C的温度下真空干燥沉淀物。

### 2.3. 黄芪多糖单糖组成的表征

用三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 将提取的 APS 水解为单糖, 然后根据先前报道的方法将 APS 中水解的单糖和真实的单糖标准品乙酰化[25]。然后, 使用 7890B 型气相色谱仪 (Agilent Technologies, 美国) 分析乙酰化样本, 该色谱仪配有 3% OV-225/AW-DMCS-色调剂 W 柱 (3 mm×2.5 m; Shimadzu Global Laboratory Consumables Co., Ltd., 日本)。气相色谱 (gas chromatography, GC) 分析的加热程序如下: 初始温度为 140 °C, 然后以 2 °C·min<sup>-1</sup> 的速度升至 198 °C, 并保持 4 min。然后以 4 °C·min<sup>-1</sup> 的温度梯度升至 214 °C, 以 1 °C·min<sup>-1</sup> 的速度升至 217 °C, 并保持 4 min。最后, 以 3 °C·min<sup>-1</sup> 的速度升至 250 °C, 并保持恒定 5 min。成分测定结果见附录 A 中的图 S1。本研究使用的 APS 由五种单糖组成: 鼠李糖 (1.6%)、阿拉伯糖 (23.39%)、木糖 (0.84%)、葡萄糖 (70.55%) 和半乳糖 (3.61%)。

### 2.4. 动物实验

实验所用小鼠均为 4 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠, 购自上海实验动物研究中心。它们被安置在温度为 23~24 °C、相对湿度为 60%±10% 且光照/黑暗周期为 12 h 的调节屏障系统设施中。适应 1 周后, 将所有小鼠随机分为不同组进行实验。所有动物实验均经上海中医药大学动物实验中心批准, 方案经制度伦理委员会批准。

APS 给药实验: 雄性 C57BL/6J 小鼠 (4 周龄) 用正常饮食 (Con, 对照饲料; 江苏省协同医药生物工程有限责任公司)、含或不含 4% APS 的 HFD (D12492; Research Diets Inc., 美国) 喂养 8 周 (HFD, APS)。

2-HB 灌胃给药实验的小鼠分为三组: 对照组饲喂正常饮食; 高脂肪和高蔗糖 (HFHS) 组饲喂 HFD 并在饮用水中添加 30% 的蔗糖; 2-HB 组饲喂 HFHS 饮食, 同时每日灌胃 2-HB (0.01 mL·g<sup>-1</sup> 体重, 剂量为 250 mg·kg<sup>-1</sup> 体重), 实验持续两周。2-HB 注射给药实验中, 在 2-HB 给药两周 (250 mg·kg<sup>-1</sup> 体重, 腹腔注射) 前, 已向小鼠喂食了 8 周的 HFHS 饮食。使用 25 mg·mL<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 制备 2-HB 溶液。在实验终点, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后处死禁食过夜 (16 h) 的小鼠, 采集肝脏和白色脂肪组织、血液和盲肠内容物。血清样本通过在 4 °C 下以 4000 r·min<sup>-1</sup> 离心血液获得 (5424; REppendorf, 德国)。部分肝脏和白色脂肪组织用 10% 福尔马林固定; 其他组织在液氮中快速冷冻, 然后储存在 -80 °C 冰箱中 (New Brunswick Science u 570-86; Eppendorf, 德国)。

### 2.5. 甘油三酯含量测定

为测定细胞内甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量, 用 4 °C 预冷的 PBS 洗两次细胞, 加入裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司) 使蛋白质完全裂解。将刮下的细胞置于 1.5 mL 的 Eppendorf 微量试管 (EP) 中, 并将磁珠加入研磨机 (上海必横生物科技有限公司) 中进行研磨。从 EP 管中取出 2.5 μL 的混合细胞裂解物, 并加入到 96 孔板培养基中; 向其中加入 200 μL 的工作溶液 (南京建成生物工程研究所)。96 孔板培养基在烘箱中于 37 °C 孵育 10 min (上海福玛实验设备有限公司)。然后使用微孔板读取器 (SPARK 10 m; TECAN 公司, 瑞士), 将剩余的混合细胞裂解液在 4 °C 下以 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。然后取上清液, 用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法 (赛默飞世尔科技公司) 测定蛋白质浓度。使用蛋白质浓度校正 TG 含量。

### 2.6. 蛋白质分析

将速冻组织和处理过的细胞加入到适当的裂解液中, 用磁珠研磨, 并在 4 °C 下以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。然后取上清液, 用 BCA 法测定蛋白质浓度。对于蛋白质印迹, 调整蛋白浓度, 加入加载缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司)。然后, 将每种混合物在 100 °C 下加热 10 min; 之后, 让它自然冷却。在 80 V 或 120 V 电压下, 在浓缩凝胶上分离出等量的蛋白质 (Bio-Rad Laboratories, Inc., 美国)。膜转移时, 电流固定在 380 mA, 转移时间根据分子量进行调整。然后, 将蛋白质转移到聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。使用 5% 脱脂乳将 PVDF 膜密封 90 min。然后加入抗体, 并将每种混合物在 4 °C 下放置在眼眶摇动器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司) 上过夜。然后将印迹与辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 连接的抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 或抗小鼠 IgG 反应, 然后进行增强化学发光分析 (上海碧云天生物技术有限公司)。关于抗体的信息见附录 A 中的表 S1。

### 2.7. 油红染色法

用预冷的 PBS 洗涤处理过的细胞两次; 然后, 加入 10% 中性福尔马林 (国药集团化学试剂有限公司), 并将混合物静置 30 min。然后加入油红 (Sigma-Aldrich, 美国), 并将混合物静置 15 min。油红中含有 40% 的纯水 (Millipore, 美国), 使用微孔膜过滤后备用。移除油红后, 加入已过滤的苏木精 (Sigma-Aldrich, 美国), 并将混合物静置 7 min。最后, 用 PBS 洗涤细胞。

## 2.8. 实时定量聚合酶链反应分析

使用试剂盒（赛默飞世尔科技公司）从细胞或组织中提取RNA，并根据试剂盒步骤采用一步法将RNA逆转录为互补DNA（cDNA）。然后，将靶基因的引物加入cDNA样品中。使用cDNA、聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）主混合物（YEASEN，中国）和水的混合物进行PCR扩增（Bio-Rad Laboratories, Inc., 美国）。基因的引物序列见附录A中的表S2。

## 2.9. 非靶向代谢组学分析

使用非靶向代谢分析平台XploreMET™ [麦特绘谱生物科技（上海）有限公司]对提取的样本进行分析，以获得代谢产物谱，该平台由配有GC（Agilent，美国）和一个机械在线衍生化站的飞行时间质谱仪（TOFMS; Leco，美国）进行测量。在XploreMET中处理原始数据以确定离子峰，然后进行降噪基线校正。具有快速扫描速率的最先进GC-TOFMS技术可通过反卷积算法在一次进样中解析数百个代谢产物峰。生物样本的典型GC-TOFMS色谱产生600~1000个单独的去卷积信号。然而，含有多个活性基团（即OH、NH、SH、NH<sub>2</sub>）的分子可能会形成多个（脞）四甲基硅烷（tetramethyl silane, TMS）衍生物，并为同一代谢产物生成多个衍生物。XploreMET利用现有数据库JiaLib™ 1500+ [麦特绘谱生物科技（上海）有限公司，中国]鉴定所有TMS衍生物，该数据库是根据纯化学标准建立的；计算导数的和；并将其报告为同一代谢物的单一注释代谢物。两种相邻代谢产物的比值是根据已知的代谢关系网络[京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）]计算得出的。XploreMET使用一个模型维度（t1、t2等）的分值。从多元模型[在本例中，在主成分分析（principal component analysis, PCA）中作为控制图y变量]中提取，并基于所有x变量（即代谢产物信号）的组合生成多元控制图（multivariate control chart, MCC）。因此，MCC可显示过程中的实时数据，并可监控一系列实验室程序产生的变化。在测定过程中，所有实际样本均在控制限值范围内，并在x轴上下波动，而质量控制（quality control, QC）样本则与实际样本分离。更多的细节已经在以前的出版物[26]中描述过。

## 2.10. 靶向代谢组学分析

血清、肝脏标本用甲醇去除蛋白质，离心后上清液采用液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）测定。使用高效液相色谱（HPLC；岛津全球实验室耗材有限公司）与

AB Sciex 4500（美国应用生物系统公司）联用进行分析。梯度洗脱，速度为0.3 mL·min<sup>-1</sup>，以乙腈为有机相，0.1%甲酸为水相。前0.8 min有机相比例为3%；然后在0.9 min时增加到50%，并保持0.6 min。最后，在1.6~3.0 min内将有机相的比例保持在3%。注射体积为1 μL。采用负电离模式进行电喷雾。离子喷雾电压设置为-4500 V、加热雾化器温度为550 °C以及气帘气体（N<sub>2</sub>）、雾化气体（N<sub>2</sub>）和加热器气体（N<sub>2</sub>）的压力分别为275.8 kPa、379.225 kPa和413.7 kPa，用于在多反应监测（multiple reaction monitoring, MRM）模式下定量前驱体至产物离子的转变。2-HB的Q1质量/Q3质量为103.0/57.1。介质碰撞激活解离（collision-activated dissociation, CAD）和-16 V碰撞能量（collision energy, CE）、-8 V碰撞池出口电势（cell exit potential, CXP）、-10 V入口电势（entrance potential, EP）和-44 V去聚集电势（declustering potential, DP）用于分析。线性范围为15.625~1000.000 ng·mL<sup>-1</sup>，停留时间为650 ms。对于具有确认身份的2-HB，使用MultiQuant v.2.1（AB SCIEX, USA）对离子色谱图中的相应峰进行积分，以测定曲线下面积（area under the curve, AUC）。为了比较样本之间的代谢产物水平，根据归一化为相应肝脏重量的AUC值计算数据。附录A中的图S2显示了[M-H]离子处2-HB的提取离子色谱图（extracted ion chromatograms, XIC）。

## 2.11. 通路富集分析

首先，我们输入了代谢分析中所有24种差异代谢产物的名称<sup>†</sup>。接下来，我们选择Fisher精确检验进行路径富集分析，选择度外中心性进行路径拓扑分析。*p*值通过途径富集分析获得，途径影响值通过途径拓扑分析获得。所有分析均基于KEGG版本途径库。代谢组学视图根据*p*值和途径影响值显示所有匹配的途径（更多信息参见附录A中的表S3）。然后，我们根据*p*值和途径影响选择重要途径。

## 2.12. 统计分析

除非另有说明，数据均以平均值±均数标准误（standard error of mean, SEM）表示。采用独立样本*t*检验确定统计显著性。*p* < 0.05被认为具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. APS抑制HFD喂养小鼠的体重增加和肝脏脂肪变性

雄性C57BL/6J小鼠喂食正常饮食或HFD（补充或不

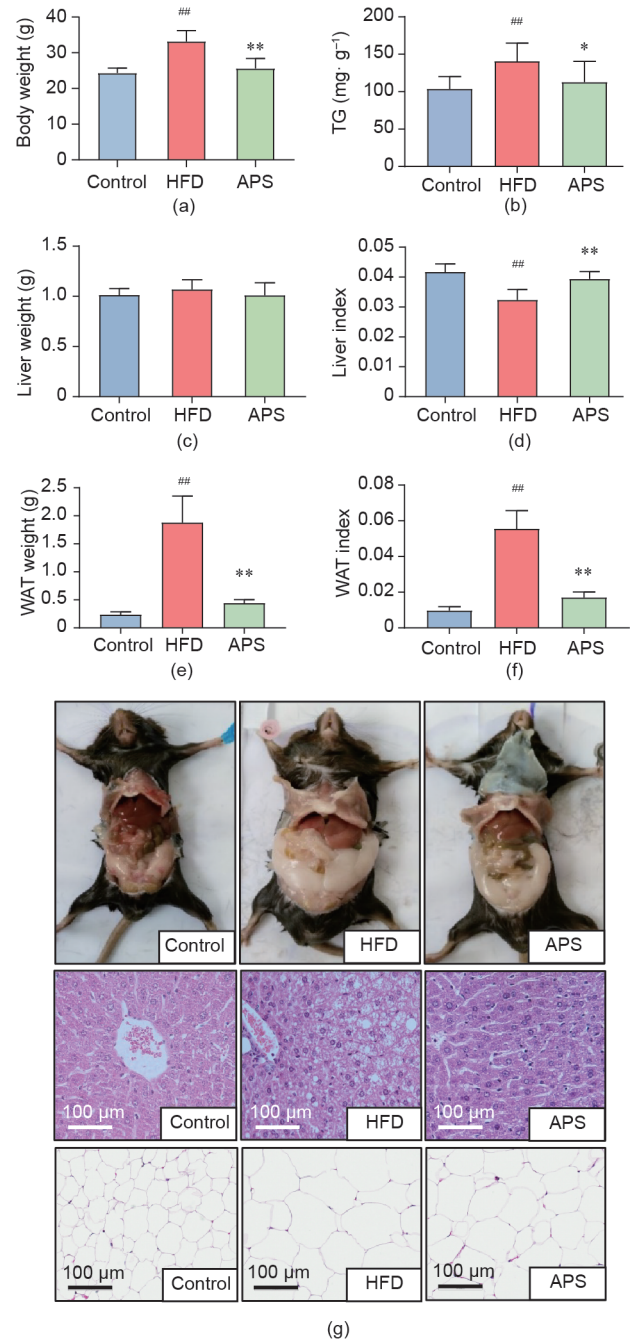
<sup>†</sup> <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>.

补充APS) 8周。首先,我们发现HFD组小鼠的体重显著高于对照组,并且在实验过程中通过补充APS后体重降低。此外,补充APS减弱了HFD诱导的代谢表型,包括肝组织中的TG含量、白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)的重量和指数、肝脂肪变性的程度和脂肪细胞的体积(图1)。结果表明,补充APS可减轻HFD喂养的肥胖小鼠的代谢紊乱。

### 3.2. 血清和肝组织的非靶向和靶向代谢组学分析

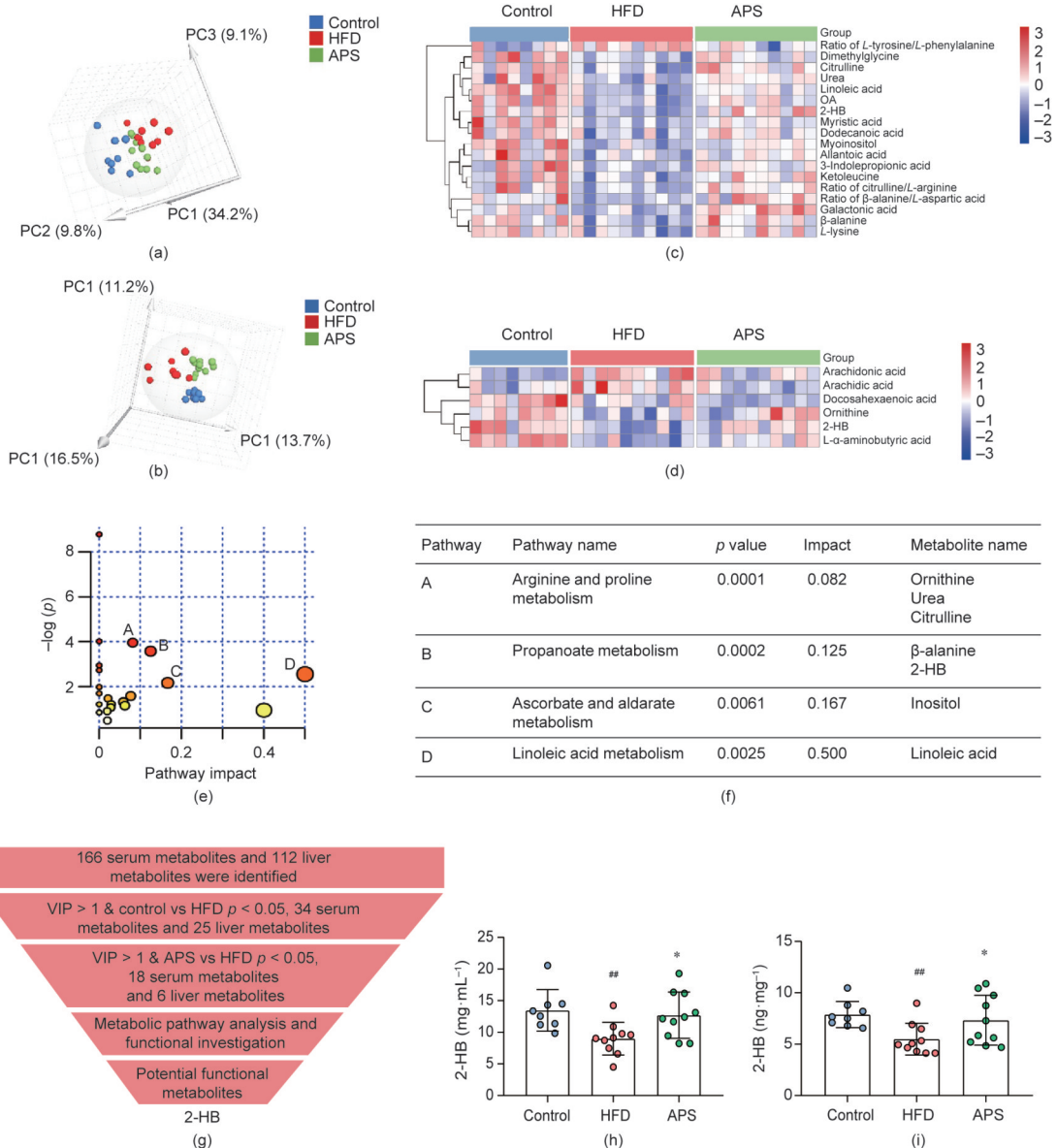
鉴于大多数草药多糖具有非吸收性,我们猜测APS的代谢益处是否与内源性代谢的改善有关。因此,我们对小鼠的血清和肝组织进行了基于GC-TOFMS的非靶向代谢组学研究。总的来说,在血清和肝组织中分别测定了166种和112种代谢产物。这些代谢产物在组间的变化通过热图可视化(附录A中的图S3和图S4)。血清样本中测定的166种代谢产物由34%氨基酸、18%碳水化合物、14%有机酸、12%脂肪酸、7%核苷酸、5%脂质、3%吡啶和7%其他成分组成,而肝组织中的112种代谢产物包含26%氨基酸、21%碳水化合物、18%有机酸、14%脂肪酸、8%核苷酸、4%脂质和9%其他成分。然后根据血清或肝组织中的代谢产物进行PCA建模。各组之间一致观察到清晰的分离,分别具有53.1%和41.4%的解释能力[图2(a)、(b)]。两种PCA模型的累积 $R^2X$ 分别为0.531和0.413, $Q^2$ 模型的累积 $R^2X$ 分别为0.347和0.105。这些结果表明,补充APS显著改变了HFD喂养小鼠的血清和肝组织的代谢特征。

接下来,在多变量和单变量统计分析中,我们使用投影的可变重要性(VIP) >1和 $p < 0.05$ 双重标准同时筛选组间血清和肝组织中的差异代谢产物。血清或肝组织中分别鉴定出18种和6种差异代谢产物及代谢产物比值,HFD和APS的干预对其进行了反向改变[图2(c)、(d)]。血清中的18种差异代谢产物包括10种氨基酸及氨基酸比值(包括2-HB、二甲基甘氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、瓜氨酸、赖氨酸、 $\beta$ -丙氨酸/天冬氨酸比值、瓜氨酸/精氨酸比值、尿囊酸、尿素、1-酪氨酸/苯丙氨酸比值)、4种脂肪酸(包括亚油酸、OA、肉豆蔻酸、十二烷酸)、4种其他代谢产物[包括3-吡啶丙酸(3-indolepropionic acid, IPA)、肌糖、肌醇、半乳糖酸]。肝组织内的6种差异代谢产物为2-HB、 $\alpha$ -氨基丁酸、鸟氨酸、花生四烯酸、花生酸和二十二碳六烯酸。然后对这24种(血清中18种,肝组织中6种)代谢产物一起进行代谢途径和功能分析。富集分析得到了4条关键代谢途径:精氨酸和脯氨酸代谢途径、丙酸酯代谢途径、抗坏血酸和醛固酮代谢途径、亚油酸代谢途径[图2(e)、(f)]。基于短



**图1.** APS可减轻HFD喂养小鼠的肝脏脂肪变性和WAT脂质累积。雄性C57BL/6J小鼠(4周龄)接受了为期8周的正常饮食(对照组)或HFD饮食(补充或不补充4%APS)。(a)实验结束时的体重(每组 $n=9$ 、10、10);(b)肝脏TG水平(每组 $n=8$ 、9和8);(c)肝脏重量(每组 $n=9$ 、10和10);(d)肝脏指数(每组 $n=9$ 、10和10);(e)WAT重量(每组 $n=9$ );(f)WAT指数(每组 $n=9$ );(g)小鼠体,苏木精-伊红(HE)染色的肝组织代表性显微照片,HE染色的WAT代表性显微照片(每组 $n=3$ )。显著性采用独立样本 $t$ 检验,与对照组比较,<sup>##</sup> $p < 0.05$ ,与HFD比较,<sup>\*</sup> $p < 0.05$ 、<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ 。结果用平均值 $\pm$ SEM表示。

链脂肪酸在代谢性疾病中的既定功能[27],我们重点研究了丙酸酯代谢途径的改变[28–49],其中通过补充APS,血清和肝组织中的2-HB均被一致改变[图2(g)、附录A中的表S3和表S4]。然后,使用靶向代谢组学对血清和肝



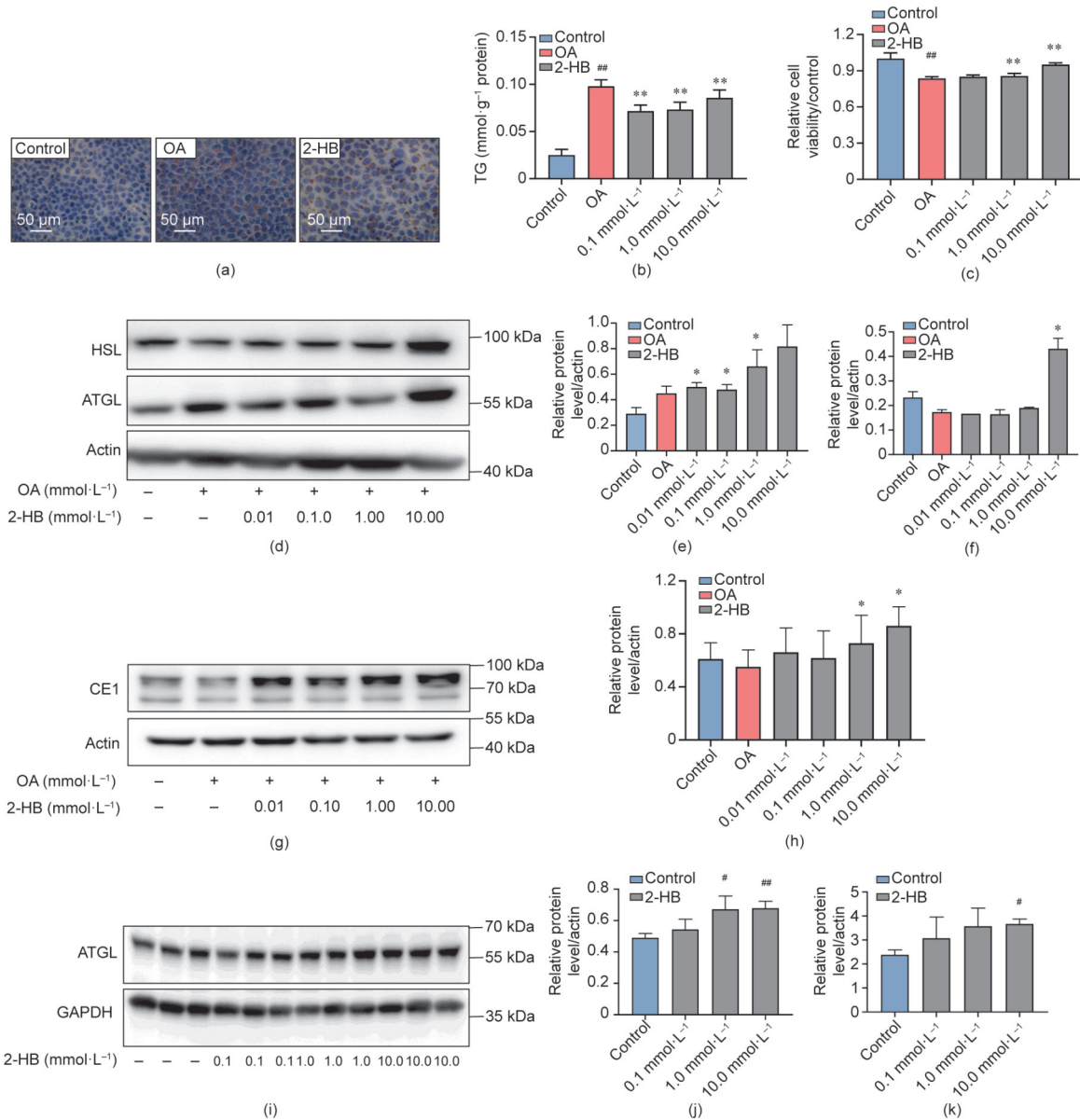
**图2.** 代谢组学结果显示，在补充APS的小鼠中，代谢特征发生改变，2-HB显著升高。血清和肝样本采用GC-TOFMS法测定；研究样本中的非靶向代谢产物使用结合在XploreMET系统中的严格匹配算法并用哺乳动物代谢产物数据库JiaLib进行注释。接下来，使用LC-MS/MS对筛选后获得的关键代谢产物进行验证。(a)使用三维(3D)-PCA评分图对三组患者的血清代谢情况进行展示(每组 $n=8$ 、10和10)。PC:主成分分析。(b)用热图显示三组血清差异代谢产物之间的表达差异。红色和蓝色条目表示在每个样本中分别表现出较多和较少表达的代谢产物。(c)使用3D-PCA评分图概述三组的肝代谢概况(每组 $n=8$ 、10和10)。(d)用热图显示三组肝脏差异代谢产物之间的表达差异。红色和蓝色条目表示在每个样本中分别表现出较多和较少表达的代谢产物。(e)途径分析概述；代谢分析用于在KEGG网站上分析补充APS的小鼠的差异代谢产物的代谢途径。(f)四种代谢途径中所含的差异代谢产物。(g)潜在功能性代谢产物的选择。在鉴定的代谢产物中，选择了组间发生显著改变的代谢产物(VIP > 1和< 0.05)。为了筛选与APS调节脂质代谢作用相关的差异代谢产物，选择了代谢途径富集和功能分析。通过靶向代谢组学LC-MS/MS测定所选关键代谢产物2-HB在血清(h)和肝脏(i)中的表达。通过独立样本 $t$ -检验测定显著性，与对照组相比， $^{###}p < 0.01$ ，与HFD组相比， $^{*}p < 0.05$ 。结果用平均值 $\pm$ SEM表示。

组织中的2-HB含量进行定量分析。结果显示，HFD组中2-HB持续减少，通过补充APS逆转[图2(h)、(i)]。这些结果表明，在HFD喂养的小鼠中，补充APS可以逆转血清和肝组织中的代谢改变。

### 3.3. 2-HB在体外调节脂质代谢、提高胰岛素敏感性和抑制炎症

为了测试APS的代谢益处是否与小鼠中2-HB生成增

加相关，我们首先探索了2-HB对肝细胞和脂肪细胞脂质代谢的影响。在AML12细胞中建立了OA诱导的TG累积模型，OA干预后出现明显的脂滴，细胞TG水平明显升高。在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下，2-HB ( $0.1 \sim 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )干预显著降低了OA诱导的TG累积并提高了细胞存活率[图3(a)~(c)]。此外，我们观察到2-HB处理刺激了AML12细胞中脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)、激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive li-

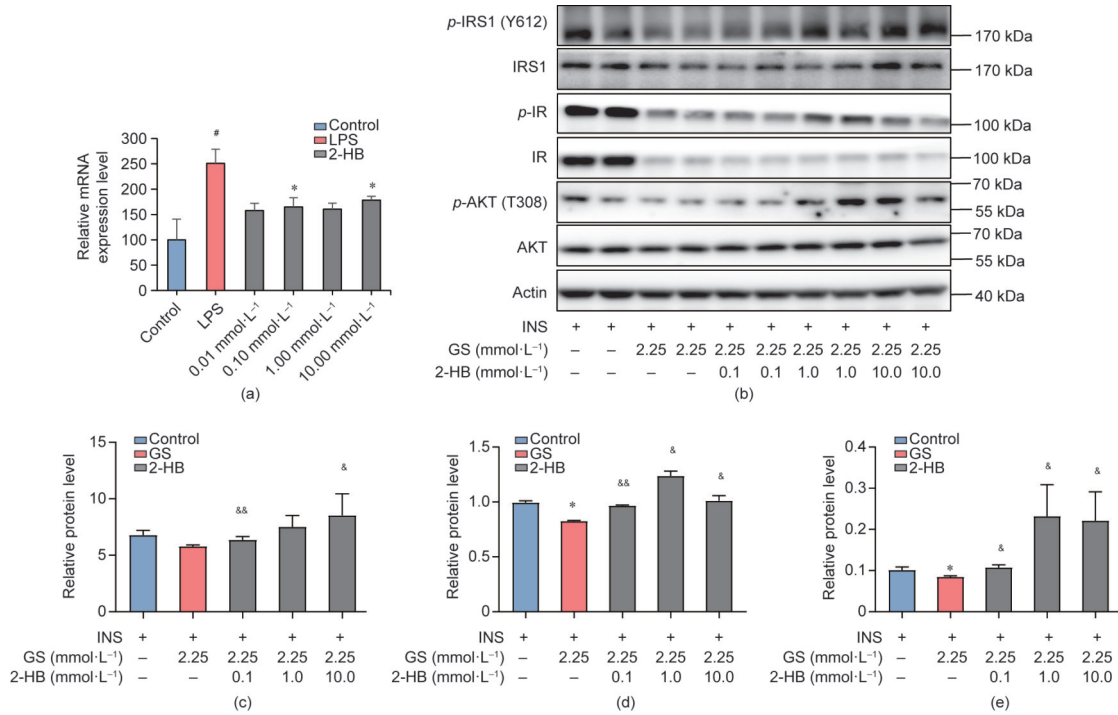


**图3.** 2-HB在体外调节脂质代谢。设计体外实验的目的在于探讨2-HB干预对脂代谢的影响。(a) 油红O染色的AML12细胞代表性显微照片；用2-HB和OA处理细胞24 h ( $\times 400$ )。 (b) 与2-HB和OA孵育24 h后AML12细胞的TG水平 (每组  $n = 4$ )。 (c) AML12细胞在与2-HB和OA孵育24 h后的细胞存活率 (每组  $n = 6$ )。 (d) ~ (h) 2-HB 24 h处理对AML12细胞脂降解蛋白HSL、ATGL和CE1的蛋白表达的影响 (每组  $n = 3-4$ )。 (i)、(j) 2-HB 24 h治疗对3T3-L1细胞上ATGL蛋白表达的影响 (每组  $n = 3$ )。 (k) 用2-HB处理24 h后分化的3T3-L1细胞上的甘油水平 (每组  $n = 3$ )。显著性采用样本独立的  $t$  检验，与对照组比较， $^{\#}p < 0.05$ 、 $^{\#\#}p < 0.01$ ，与OA比较， $^*p < 0.05$ 、 $^{**}p < 0.01$ 。结果用平均值 $\pm$ SEM表示。

pase, HSL) 和羧酸酯酶1 (carboxylesterase 1, CE1) 蛋白的表达[图3 (d) ~ (h)]，这表明2-HB刺激了脂肪分解[50–52]。此外，2-HB增加了3T3-L1细胞中ATGL蛋白的表达和甘油的释放[图3 (i) ~ (k)]。

伴随着脂肪酸代谢的紊乱，炎症反应和胰岛素抗性是代谢性疾病的重要危险因素[53]。为了测试2-HB是否能减轻炎症和胰岛素抗性，将巨噬细胞RAW264.7细胞暴露于经或未经2-HB预处理的LPS (0.01~10.00 mmol·L<sup>-1</sup>) [54]。实时定量PCR (qRT-PCR) 检测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达。本实验结果显示，2-HB预处理显著抑

制LPS诱导的TNF- $\alpha$  mRNA的上调，这表明2-HB具有抗炎作用[图4 (a)]。此外，在HepG2细胞中评估了2-HB对胰岛素敏感性的影响，HepG2细胞先用GS处理，然后用胰岛素刺激，同时进行或不进行2-HB预处理[55–56]。我们的数据显示，在GS培养的情况下，2-HB预处理增加了  $p$ -胰岛素受体 ( $p$ -IR) /IR、 $p$ -胰岛素受体底物1 ( $p$ -IRS1) /IRS1和  $p$ -蛋白激酶B ( $p$ -AKT) /AKT的比值，表明胰岛素敏感性提高[图4 (b) ~ (e)]。总之，这些结果表明，2-HB刺激了肝细胞中的脂解作用，提高了胰岛素的敏感性，并减轻了巨噬细胞的炎症。

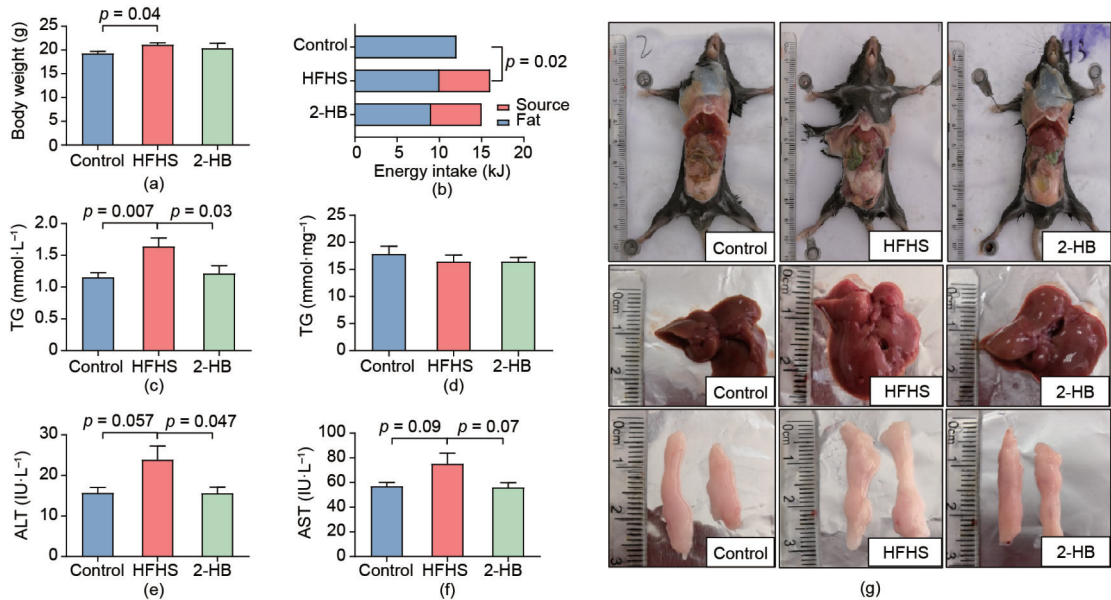


**图4.** 2-HB可在体外抑制炎症水平并增强胰岛素敏感性。分别在巨噬细胞RAW264.7和人肝细胞HepG2上建立炎症模型和胰岛素抗性模型。(a)在2-HB和LPS干预下RAW264.7细胞上促炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 的mRNA表达水平(每组 $n=4$ )。(b)检测了在2-HB、GS和INS干预下HepG2细胞上IRS1、IR和AKT的磷酸化和总蛋白表达水平。(c)~(e)HepG2细胞上IRS1、IR和AKT磷酸化蛋白与总蛋白的比率(每组 $n=4$ )。显著性采用样本独立的 $t$ 检验,与对照组比较, $^{\#}p<0.05$ ,与INS或LPS组比较, $^*p<0.05$ ,与GS组比较, $^{\&}p<0.05$ 、 $^{\&\&}p<0.01$ 。结果用平均值 $\pm$ SEM表示。

### 3.4. 2-HB降低HFHS喂养小鼠的血清TG水平并调节脂质代谢

鉴于2-HB调节代谢紊乱的体外证据,我们接下来研究了口服2-HB对短期HFHS喂养小鼠脂质代谢的影响。HFHS喂养两周后的体重高于对照组,而在HFHS和2-HB

组之间未观察到差异[图5(a)]。有趣的是, HFHS组中血清TG水平显著升高,被2-HB干预而降低[图5(b)]。此外, HFHS组和2-HB组之间的WAT与肝组织的重量、脏器指数无显著差异,肝脏TG水平也无显著差异[图5(c)~(g)]。葡萄糖耐量试验(glucose tolerance test, GTT)结



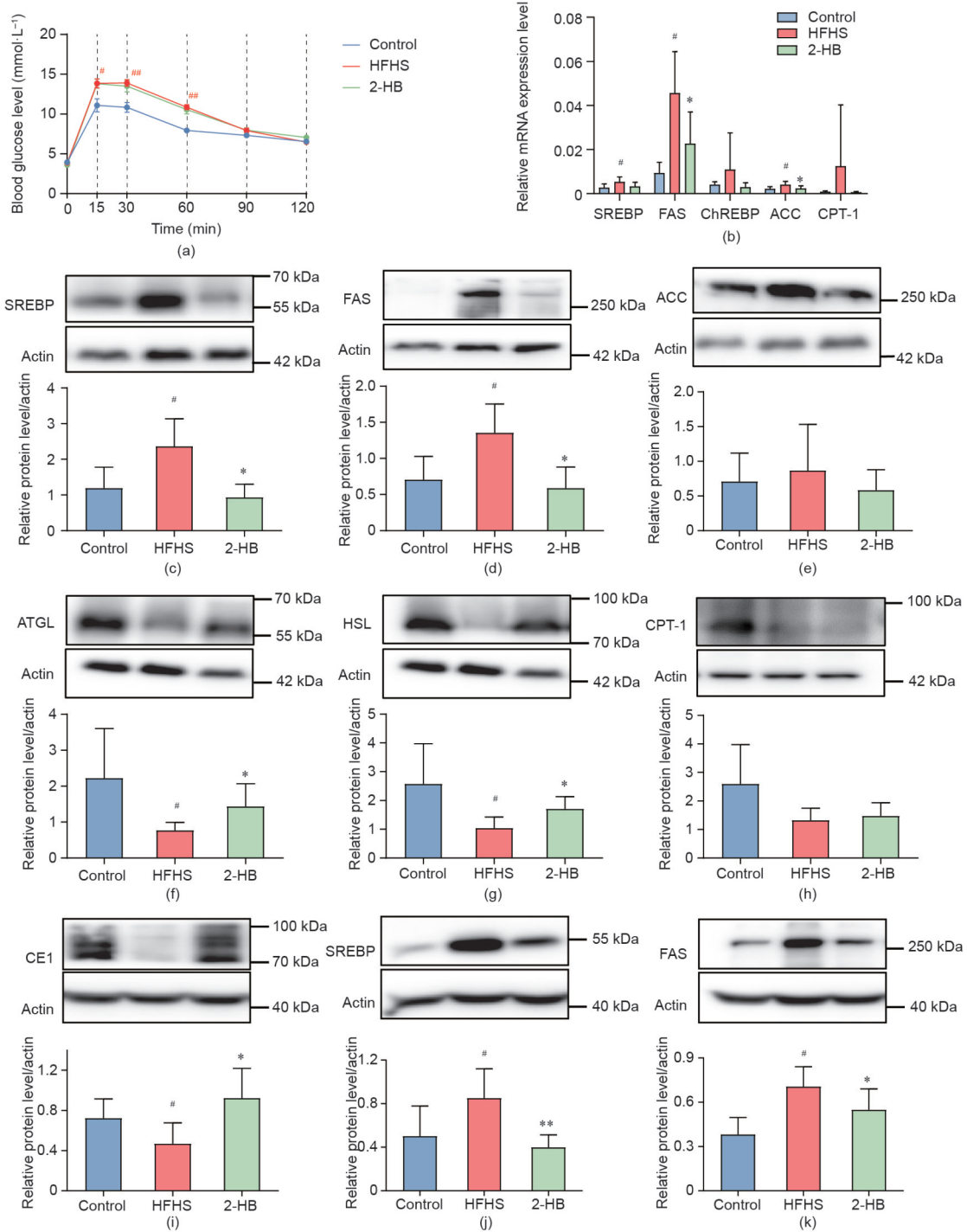
**图5.** 2-HB调节HFHS喂养小鼠的血脂水平和肝脏损伤。雄性C57BL/6J小鼠(4周龄)接受了为期两周的正常饮食(对照)或HFHS(水中补充30%蔗糖,  $g\cdot L^{-1}$ )干预,同时进行或不进行 $250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  2-HB胃灌注干预。(a)实验结束时的体重(每组 $n=10, 12, 10$ )。(b)能量摄入(每组 $n=10, 12, 10$ )。(c)血清TG水平(每组 $n=10, 12$ 和 $10$ )。(d)肝脏TG水平(每组 $n=8, 10$ 和 $10$ )。(e)、(f)血清ALT和AST水平(每组 $n=8, 10$ 和 $9$ )。IU: 国际单位。(g)小鼠体、肝和WAT。显著性采用样本独立 $t$ 检验,结果用平均值 $\pm$ SEM表示。



果显示，短期干预2-HB并未显著改善HFHS喂养小鼠的胰岛素敏感性[图6(a)]。

为了进一步确定2-HB是否能调节小鼠的脂质代谢，在WAT和肝组织中研究了参与脂质代谢的基因的mRNA或蛋白表达，如甾醇调节元件结合蛋白（sterol-regulatory

element-binding protein, SREBP）、脂肪酸合酶（fatty acid synthase, FAS）、碳水化合物反应元件结合蛋白（carbohydrate response element-binding protein, ChREBP）、乙酰辅酶A羧化酶（carbohydrate response element-binding protein, ACC）、ATGL、HSL、CE1和肉碱棕榈酰转移酶-1



**图6.** 2-HB调节HFHS喂养小鼠的脂质代谢。雄性C57BL/6J小鼠（四周大）接受了为期两周的饮食治疗（对照组），或HFHS（水中补充30%蔗糖，g·L<sup>-1</sup>）饮食治疗，同时通过腹腔内注射给予或不给予250 mg·kg<sup>-1</sup> 2-HB干预。(a) GTT曲线（每组n = 6、10和9）。(b) WAT中SREBP、FAS、ChREBP、ACC和CPT-1的mRNA表达水平（每组n = 10、6和10）。(c) ~ (h) WAT中SREBP、FAS、ACC、ATGL、HSL和CPT-1的蛋白表达水平（每组n = 4~7）。(i) ~ (k) 肝组织中CE1、SREBP和FAS的蛋白表达水平（每组n = 6~9）。显著性采用样本独立t检验，与对照组比较，#*p*<0.05，##*p*<0.01，与HFHS组比较，\**p*<0.05，\*\**p*<0.01。结果用平均值±SEM表示。

(carnitine palmitoyltransferase-1, CPT-1)。我们发现, 2-HB 处理抑制了 HFHS 诱导的 WAT 中的基因或蛋白的表达, 包括 FAS 和 ACC 的 mRNA, 以及 SREBP 和 FAS 的蛋白[图 6 (b) ~ (e)]。相反, 2-HB 治疗增加了 WAT 中 ATGL 和 HSL 蛋白的表达[图 6 (f) ~ (h)]。同时, HFHS 喂养导致肝组织中 CE1 抑制以及 SREBP 和 FAS 蛋白上调, 这些都被 2-HB 处理明显逆转[图 6 (i) ~ (k)]。

通过在 HFHS 喂养的小鼠中进行为期两周的腹腔内注射, 我们进一步检测了 2-HB 对脂质代谢的影响。与口服给药结果一致, 数据显示 2-HB 注射液降低了血清 TG 水平, 逆转了肝组织中 SREBP、FAS 和 CE1 蛋白的表达, 但对体重增加无影响(附录 A 中的图 S5)。

总之, 这些结果表明, APS 治疗产生的代谢产物 2-HB 可有效调节体外和体内脂质代谢和胰岛素敏感性, 这可能有助于 APS 的代谢益处。

#### 4. 讨论

本研究表明, APS 可通过减少体重增加量、减轻肝脏脂肪变性和减少肥胖来有效改善肥胖小鼠的代谢紊乱。此外, 非靶向和靶向代谢组学显示, 补充 APS 会引起血清和肝组织中的 2-HB 水平增加。我们进一步证明, 在 HepG2 或 3T3-L1 细胞中, 2-HB 可以调节脂肪酸代谢相关基因的 mRNA 或蛋白表达, 抑制炎症, 提高胰岛素敏感性。2-HB 还能降低 HFHS 喂养小鼠的血清甘油三酯和改善脂质代谢。

大多数植物多糖的代谢益处已得到充分证实。多糖的保护作用机制主要被认为与其对肠道微生物群的调节有关[57], 因为胃肠道不吸收此类多糖[58]。然而, 植物多糖确切的代谢改善机制尚不十分清楚。我们之前的观察表明, APS 的抗肥胖作用与肠道微生物群的调节有关[19]。此外, 我们发现 APS 并未抑制 OA 处理的 HepG2 细胞中的 TG 累积(数据未显示), 这排除了 APS 对脂质代谢产生直接作用的可能性。

越来越多的证据表明, 内源性或微生物群源性代谢产物通常在维持健康、疾病发生和药物活性方面发挥重要作用[59–61]。代谢产物的变化不仅仅是基因或蛋白质水平发生紊乱的结果; 它们还作为信号分子调节病理生理状态[62]。因此, 功能代谢组学对研究已鉴定的差异代谢产物的潜在功能极具价值[63]。由于包括 APS 在内的大多数植物多糖代谢益处的潜在机制尚不清楚, 我们采用了非靶向代谢组学来研究 APS 的代谢益处是否与内源性代谢的调节有关。代谢组学结果显示, 补充 APS 明显恢复了 HFD

诱导的血清和肝组织的代谢变化, 这表明 APS 的代谢益处可能与调节宿主代谢有关。进一步分析显示, 血清和肝组织中分别存在 18 种和 6 种差异代谢产物, 这些代谢产物通过补充 APS 而发生逆转。半数以上的差异代谢产物为氨基酸, 氨基酸在宿主体内可能具有调节细胞信号、基因表达, 作为蛋白质合成或磷酸化的构建模块或促成激素合成等功能[64]。

为了确定可能与 APS 活性相关的代谢产物, 我们使用 24 种鉴定的代谢产物(18 种来自血清, 6 种来自肝组织)和文献研究进行了代谢途径富集。然后, 我们获得了因补充 APS 而发生显著改变的四种主要代谢途径, 包括精氨酸和脯氨酸代谢、丙酸酯代谢、亚油酸代谢以及抗坏血酸和醛固酮代谢途径。我们非常关注含有  $\beta$ -丙氨酸和 2-HB 的丙酸酯代谢途径, 因为除了含有丙酸的短链脂肪酸在代谢性疾病中的既定作用外, 该途径还具有低  $p$  值和较高的途径影响值[65–66]。选择代谢产物 2-HB 的原因如下: 首先, 2-HB 的化学结构类似于  $\beta$ -HB 和丁酸, 它们在影响代谢性疾病的发展方面具有重要作用[67–68]; 其次, 尽管在糖尿病、肥胖或代谢综合征患者中观察到 2-HB 水平升高, 表明 2-HB 可能是代谢综合征或糖尿病的生物标志物[69–70], 但 2-HB 在代谢性疾病中的生物学功能尚不明确; 再次, 细菌除了从 3-HB、2-氨基丁酸、 $\alpha$ -酮丁酸、2-氧代丁酸等前体以及蛋氨酸、苏氨酸、高丝氨酸等氨基酸中内源性产生 2-HB 外[71–72], 还可通过乳酸脱氢酶(LDH)产生 2-HB [73–77]。此外, 我们之前的研究观察到, 万古霉素改变肠道微生物群会增加 2-HB 的产生[78]。鉴于补充 APS 对肠道微生物群的调节作用[19], 我们认为补充 APS 的代谢益处可能与 2-HB 的产生有关。尽管在当前研究中无法明确 2-HB 的来源, 但在补充 APS 小鼠中 2-HB 生成量增加可能源于宿主代谢或 APS 调节的肠道微生物群。

脂质代谢失调是代谢性疾病发生发展的基础[79]。前期研究表明 2-HB 可抑制大鼠大脑皮层脂质合成[80]。ATGL 和 HSL 的蛋白质主要在脂肪细胞以及肝细胞中催化 TG 的水解[81], 而 CE1 在肝细胞中特异性表达以进行 TG 水解[82]。我们的体外实验表明, 2-HB 刺激肝细胞中 HSL、ATGL 和 CE1 蛋白的表达以及 3T3-L1 细胞中甘油的释放, 这表明 2-HB 促进脂质降解。

胰岛素抗性和炎症是代谢性疾病的重要危险因素[53, 83–86]。2-HB 治疗可抑制巨噬细胞中促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达, 提高肝细胞对胰岛素的敏感性。体外结果表明, 2-HB 可能有利于减轻代谢紊乱。在 2-HB 和 HFHS 组之间, 未观察到 WAT 和肝组织的重量或指数, 或肝组织中的 TG 水平没有观察到显著差异。但结果表明, 在

HFHS 喂养的小鼠中，无论是灌胃还是腹腔内注射 2-HB 两周后，都可降低血清 TG 水平，抑制 FAS 和 SREBP 蛋白表达，刺激 WAT 和肝组织中 ATGL、HSL 和 CE1 表达。体外和体内实验结果表明，2-HB 可有效调节脂质代谢，尤其是在 mRNA 或蛋白水平上调节参与脂肪酸合成或脂解的关键基因的表达。需要注意的是，在本研究中，2-HB 的生物学功能仅在短期 HFHS 喂养的小鼠中进行检测，这些小鼠的变化特征是血清 TG 而不是肝脏 TG 水平明显升高。在为期两周的干预后，发现 2-HB 降低了 HFHS 喂养小鼠的血清中的 TG 水平，并逆转了 WAT 或肝组织中脂质代谢密切相关的基因和蛋白质的表达。尽管在 2-HB 治疗两周后未观察到肝脏 TG 降低，但对脂肪酸合成和氧化密切相关的基因和蛋白质表达的显著调节表明，如果进行 2-HB 的长期干预，预计 2-HB 会对肝脏脂质代谢产生更全面的影响。

总之，本研究证实了 APS 在 HFD 喂养小鼠中的代谢益处，并确定了一种功能性代谢产物 2-HB，通过补充 APS 可使血清和肝组织中的 2-HB 含量增加。进一步研究发现，2-HB 在体外和体内均可调节脂质代谢，尤其是通过抑制或刺激参与从头脂肪酸合成或脂质降解的蛋白质的表达。我们的结果表明，APS 在 HFD 喂养小鼠中的代谢益处可能至少部分是通过在小鼠中产生 2-HB 实现的。有必要进行进一步研究，以确认 2-HB 在长期 HFD 喂养动物中的功能，并确定 2-HB 在补充 APS 的小鼠中的确切来源。

## 致谢

本工作得到了国家自然科学基金项目(81873059, 81673662)、国家重点研发计划(2017YFC1700200)、上海高校特聘教授(东方学者)和曙光学者(16SG36)的资助。

## Compliance with ethics guidelines

Bingbing Li, Ying Hong, Yu Gu, Shengjie Ye, Kaili Hu, Jian Yao, Kan Ding, Aihua Zhao, Wei Jia, and Houkai Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## References

- [1] Ford ES, William WHG. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults. *JAMA Cardiol* 2002;287(3):356–9.
- [2] Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 1989;38(12):1595–601.
- [3] Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *New Engl J Med* 2004;350:2362–74.
- [4] Robert HE, Scott MG, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365(9468):1415–28.
- [5] Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest* 1995;1(95):158–66.
- [6] McCarthy EM, Rinella ME. The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic fatty liver disease. *J Acad Nutr Diet* 2012;112(3):401–9.
- [7] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011;332(6037):1519–23.
- [8] Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease—a global public health perspective. *J Hepatol* 2019;70(3):531–44.
- [9] Narayanaswami V, Dwoskin LP. Obesity: current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacol Therapeut* 2017;170:116–47.
- [10] Chan K, Zhang H, Lin Z. An overview on adverse drug reactions to traditional Chinese medicines. *Br J Clin Pharmacol* 2015;80(4):834–43.
- [11] Lu Y, Jiang Y, Ling L, Zhang Y, Li H, Chen D. Beneficial effects of *Houttuynia cordata* polysaccharides on “two-hit” acute lung injury and endotoxemic fever in rats associated with anti-complementary activities. *Acta Pharm Sin B* 2018;8(2): 218–27.
- [12] Chang C, Lin C, Lu C, Martel J, Ko Y, Ojcius DM, et al. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat Commun* 2015;6(1):7489.
- [13] Wu T, Lin C, Chang C, Lin T, Martel J, Ko Y, et al. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutiella sinensis*. *Gut* 2019;68(2):248–62.
- [14] Fu J, Wang Z, Huang L, Zheng S, Wang D, Chen S, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi). *Phytother Res* 2014;28(9):1275–83.
- [15] Liu P, Zhao H, Luo Y. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): a well-known Chinese tonic. *Aging Dis* 2017;8(6):868–86.
- [16] Mao X, Yu F, Wang N, Wu Y, Zou F, Wu K, et al. Hypoglycemic effect of polysaccharide enriched extract of *Astragalus membranaceus* in diet induced insulin resistant C57BL/6J mice and its potential mechanism. *Phytomedicine* 2009;16(5):416–25.
- [17] Huang Y, Tsay H, Lu M, Lin C, Yeh C, Liu H, et al. *Astragalus membranaceus*-polysaccharides ameliorates obesity, hepatic steatosis, neuroinflammation and cognition impairment without affecting amyloid deposition in metabolically stressed APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2746–63.
- [18] Liu M, Qin J, Hao Y, Liu M, Luo J, Luo T, et al. *Astragalus polysaccharide* suppresses skeletal muscle myostatin expression in diabetes: involvement of ROS-ERK and NF-κB pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:1–10.
- [19] He X, He J, Zheng N, Wang S, Li H. Study on the relationship between weight reduction and intestinal bacterial regulation of *Astragalus polysaccharide* in obese mice. *World J Tradit Chin Med* 2016;11(11):2379–84.
- [20] Newgard CB. Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand? *Cell Metab* 2017;25(1):43–56.
- [21] Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2017;7(152):1679–94.
- [22] Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, et al. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab* 2016;24(1):158–66.
- [23] McNabney S, Henagan T. Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: a focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. *Nutrients* 2017;9(12):1348.
- [24] Koh GY, Chou G, Liu Z. Purification of a water extract of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by alcohol precipitation. *J Agric Food Chem* 2009;57(11):5000–6.
- [25] Lin L, Wang P, Du Z, Wang W, Cong Q, Zheng C, et al. Structural elucidation of a pectin from flowers of *Lonicera japonica* and its antipancreatic cancer activity. *Int J Biol Macromol* 2016;88:130–7.
- [26] Ni Y, Su M, Qiu Y, Jia W, Du X. ADAP-GC 3.0: improved peak detection and deconvolution of co-eluting metabolites from GC/TOF-MS data for metabolomics studies. *Anal Chem* 2016;88(17):8802–11.
- [27] Gijb Den B, Aycha B, Albert G, Karen Van E, Rick H, Theo H, et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR  $\gamma$ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes* 2015;64: 2398–408.

- [28] Whelan J, Fritsche K. Linoleic acid. *Adv Nutr* 2013;4(3):311–2.
- [29] Gooda Sahib Jambocus N, Saari N, Ismail A, Khatib A, Mahomoodally MF, Abdul HA. An investigation into the antiobesity effects of *Morinda citrifolia* L. leaf extract in high fat diet induced obese rats using a <sup>1</sup>H NMR metabolomics approach. *J Diabetes Res* 2016;2016:1–14.
- [30] Drenick EJ, Alvarez LC, Tamasi GC, Brickman AS. Resistance to symptomatic insulin reactions after fasting. *J Clin Invest* 1972;51(10):2757–62.
- [31] Werner E, Froehlich R. The potential role for myoinositol in the prevention of gestational diabetes mellitus. *Am J Perinatol* 2016;13(33):1236–41.
- [32] Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n–6/n–3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* 2004;106(6):635–43.
- [33] Wada Y, Sakiyama S, Sakai H, Sakane F. Myristic acid enhances diacylglycerol kinase d-dependent glucose uptake in myotubes. *Lipids* 2016;51(8):897–903.
- [34] Magnusson M, Wang TJ, Clish C, Engström G, Nilsson P, Gerszten RE, et al. Dimethylglycine deficiency and the development of diabetes. *Diabetes* 2015;64:3010–6.
- [35] Carvalho VH, Oliveira AHS, de Oliveira LF, Da Silva RP, Di Mascio P, Gualano B, et al. Exercise and b-alanine supplementation on carnosine–acrolein adduct in skeletal muscle. *Redox Biol* 2018;18:222–8.
- [36] Saitoh W, Takada S, Hirao J, Shirai M, Iguchi T, Tsuji M, et al. Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats. *Toxicol Lett* 2018;295:416–23.
- [37] Wei P, Rui T, Ruilan W. Clinical application of plasma citrulline in intestinal damage. *J Clin Emerg Med* 2018;04(19):274–8.
- [38] Elliott P, Posma JM, Chan Q, Garcia-Perez I, Wijeyesekera A, Bictash M, et al. Urinary metabolic signatures of human adiposity. *Sci Transl Med* 2015;7(285):285ra62.
- [39] Judith LF, Peter AS, Joseph V, Mark DW, Qian G. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab* 2010;7:30.
- [40] Zhang LS, Davies SS. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med* 2016;8(1):46.
- [41] Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(10):3698–703.
- [42] Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. *BMJ* 2006;333(7571):733–7.
- [43] Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2003;77(5):1146–55.
- [44] Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 2008;11(3):266–77.
- [45] Irino Y, Toh R, Nagao M, Mori T, Honjo T, Shinohara M, et al. 2-Aminobutyric acid modulates glutathione homeostasis in the myocardium. *Sci Rep* 2016;1(6):36749.
- [46] Arthur L, Weber I, Stanley LM, Abdul HA. Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acid. *J Mol Evol* 1981;17:273–84.
- [47] Nelson GJ, Schmidt PC, Bartolini G, Kelley DS, Kyle D. The effect of dietary arachidonic acid on platelet function, platelet fatty acid composition, and blood coagulation in humans. *Lipids* 1997;32(4):421–5.
- [48] Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, et al. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(2):439–46.
- [49] Yan C, Yusha W, Bing W. Research progress on the neuroprotective effect of docosahexaenoic acid. *Pract Med Clin* 2015;06(18):721–4.
- [50] Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, et al. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes* 2008;57(8):2037–45.
- [51] Hsiao P, Chiou HC, Jiang H, Lee M, Hsieh T, Kuo K. Pioglitazone enhances cytosolic lipolysis, b-oxidation and autophagy to ameliorate hepatic steatosis. *Sci Rep* 2017;1(7):9030.
- [52] He W, Xu Y, Ren X, Xiang D, Lei K, Zhang C, et al. Vitamin E ameliorates lipid metabolism in mice with nonalcoholic fatty liver disease via Nr2f/CES1 signaling pathway. *Dig Dis Sci* 2019;64(11):3182–91.
- [53] Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science* 2013;339(6116):172–7.
- [54] Yang SZQQ. MicroRNA-124 negatively regulates LPS-induced TNF- $\alpha$  production in mouse macrophages by decreasing protein stability. *Chin J Pharmacol* 2016;7(37):889–97.
- [55] Zhu D, Wang Y, Du Q, Liu Z, Liu X. Cichoric acid reverses insulin resistance and suppresses inflammatory responses in the glucosamine-induced HepG2 cells. *J Agric Food Chem* 2015;63(51):10903–13.
- [56] Mi Y, Qi G, Gao Y, Li R, Wang Y, Li X, et al. (–)-Epigallocatechin-3-gallate ameliorates insulin resistance and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells: involvement of Bmal1. *Mol Nutr Food Res* 2017;12(61):1700440.
- [57] Wu T, Lin C, Chang C, Lin T, Martel J, Ko Y, et al. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutiella sinensis*. *Gut* 2019;2(68):248–62.
- [58] Porter NT, Martens EC. The critical roles of polysaccharides in gut microbial ecology and physiology. *Annu Rev Microbiol* 2017;1(71):349–69.
- [59] Ussher JR, Elmariash S, Gerszten RE, Dyck JRB. The emerging role of metabolomics in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2016;25(68):2850–70.
- [60] Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, et al. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab* 2016;1(24):158–66.
- [61] Garaycoechea JI, Crossan GP, Langevin F, Daly M, Arends MJ, Patel KJ. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature* 2012;7417(489):571–5.
- [62] Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, et al. The metabolite acetoglutamate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* 2014;510(7505):397–401.
- [63] Min Y, Guowang X. Current and future perspectives of functional metabolomics in disease studies—a review. *Anal Chim Acta* 2018;1037:41–54.
- [64] Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009;37(1):1–17.
- [65] Chambers ES, Byrne CS, Morrison DJ, Murphy KG, Preston T, Tedford C, et al. Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over trial. *Gut* 2019;68(8):1430–8.
- [66] Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 2015;64(11):1744–54.
- [67] Newman JC, Verdin E.  $\beta$ -Hydroxybutyrate: a signaling metabolite. *Annu Rev Nutr* 2017;37(1):51–76.
- [68] Zhou D, Chen YW, Zhao ZH, Yang RX, Xin FZ, Liu XL, et al. Sodium butyrate reduces high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis through upregulation of hepatic GLP-1R expression. *Exp Mol Med* 2018;50(12):157.
- [69] Ferrannini E, Natali A, Camastra S, Nannipieri M, Mari A, Adam KP, et al. Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes* 2013;62(5):1730–7.
- [70] Lin Z, Vicente Gonçalves CM, Dai L, Lu H, Huang J, Ji H, et al. Exploring metabolic syndrome serum profiling based on gas chromatography mass spectrometry and random forest models. *Anal Chim Acta* 2014;827:22–7.
- [71] Landaas S. The formation of 2-hydroxybutyric acid in experimental animals. *Clin Chim Acta* 1975;58(1):23–32.
- [72] Adams SH. Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. *Adv Nutr* 2011;2(6):445–56.
- [73] Chaillou S, Champomier-Vergès M, Cornet M, Crutz-Le Coq A, Dudez A, Martin V, et al. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotechnol* 2005;23(12):1527–33.
- [74] Gao C, Zhang W, Ma C, Liu P, Xu P. Kinetic resolution of 2-hydroxybutanoate racemic mixtures by NAD-independent l-lactate dehydrogenase. *Bioresour Technol* 2011;102(7):4595–9.
- [75] Heidelberg JF, Seshadri R, Haveman SA, Hemme CL, Paulsen IT, Kolonay JF, et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nat Biotechnol* 2004;22(5):554–9.
- [76] Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 2002;184(7):2005–18.
- [77] Monot M, Boursaux-Eude C, Thibonnier M, Vallenet D, Moszer I, Medigue C, et al. Reannotation of the genome sequence of *Clostridium difficile* strain 630. *J Med Microbiol* 2011;60(Pt 8):1193–9.
- [78] Zheng N, Gu Y, Hong Y, Sheng L, Chen L, Zhang F, et al. Vancomycin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury through 2-hydroxybutyric acid. *J Pharm Anal*. In press.
- [79] Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the

- pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007;87(2):507–20.
- [80] Silva AR, Ruschel C, Helegda C, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, et al. Inhibition of *in vitro* CO<sub>2</sub> production and lipid synthesis by 2-hydroxybutyric acid in rat brain. *Braz J Med Biol Res* 2001;34(5):627–31.
- [81] Schott MB, Rasineni K, Weller SG, Schulze RJ, Sletten AC, Casey CA, et al.  $\beta$ -Adrenergic induction of lipolysis in hepatocytes is inhibited by ethanol exposure. *J Biol Chem* 2017;292(28):11815–28.
- [82] Quiroga AD, Li L, Trötz Müller M, Nelson R, Proctor SD, Köfeler H, et al. Deficiency of carboxylesterase 1/esterase-x results in obesity, hepatic steatosis, and hyperlipidemia. *Hepatology* 2012;56(6):2188–98.
- [83] Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and  $\beta$ -cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5(4):219–26.
- [84] Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab* 2012;15(5):635–45.
- [85] Lee HY, Birkenfeld AL, Jornayvaz FR, Jurezak MJ, Kanda S, Popov V, et al. Apolipoprotein CIII overexpressing mice are predisposed to diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Hepatology* 2011;54(5):1650–60.
- [86] Shoelson SE. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116(7):1793–801.