



分类号 _____

学校代码 10136

密 级 _____

学 号 202100065

内蒙古民族大学

ᠠᠨᠢᠨᠤ ᠮᠣᠩᠭᠣᠯᠠ ᠮᠢᠨᠵᠤ ᠤᠨᠢᠷᠦᠨ

硕士学位论文

PM_{2.5}通过改变小鼠肠道微生物对肝脏脂质代谢的影响研究

Effect of PM_{2.5} on hepatic lipid metabolism through alteration
of intestinal microorganisms in mice

作 者：彭建豪

学科专业：动物营养与饲料科学

研究方向：动物毒理学

学位类别：学术学位

指导教师：高树新教授

论文提交日期：二〇二四年六月

摘 要

空气污染被证实是全球第四大死亡风险因素。环境细颗粒物(PM_{2.5})作为空气污染的主要组成部分之一,已经成为一个较为主要的公共健康问题。脂质代谢的过程包括生物合成和降解脂类物质,脂质代谢紊乱与代谢性疾病和心血管疾病密切相关。肠道微生物群被广泛认为是宿主健康的重要组成部分,对宿主代谢功能发挥着关键的作用。为了探索PM_{2.5}暴露对肠道菌群和肝脏脂质代谢的影响以及PM_{2.5}暴露后肠道微生物变化对调节脂质代谢紊乱的具体机制。本研究以C57BL/6小鼠作为试验动物,先通过鼻腔滴注法建立颗粒物暴露模型。使用16S rDNA测序、试剂盒检测、HE切片染色、荧光定量PCR、Western blot等生物学实验方法,用来研究PM_{2.5}暴露对小鼠肠道菌群和脂质代谢的影响。接着通过菌群灌肠法建立粪菌移植模型。重复上述实验方法,检验粪菌移植是否成功,并探索PM_{2.5}暴露后的肠道微生物与脂质代谢之间的调控关系。主要结果如下:(1)PM_{2.5}暴露会引起小鼠肠道菌群中拟杆菌门细菌与厚壁菌门细菌的比例变化,肠道菌群物种多样性下降。(2)PM_{2.5}暴露会导致肝脏脂肪变性,肝脏和血液中脂质含量显著增加;脂质合成相关因子*Srebp1*, *FASN*和*ACCI*表达水平显著升高,脂质氧化相关因子*PPARα*, *ACOX1*表达水平升高;脂质分解相关因子*ATGL*和*HSL*表达水平无明显变化。(3)粪菌移植后暴露菌群组小鼠的肠道菌群也存在拟杆菌门/厚壁菌门的比例失衡,物种多样性下降等变化趋势,本研究认为粪菌移植成功。并且发现PM_{2.5}暴露后小鼠肠道菌群的脂质代谢功能显著下调。(4)PM_{2.5}暴露后的肠道菌群会导致肝脏脂肪变性,肝脏中脂质含量显著增加;脂质合成因子*Srebp1*和*FASN*表达水平显著升高,脂质氧化因子*PPARα*, *ACOX1*表达水平显著升高;脂质分解因子*ATGL*和*HSL*有下降趋势。

综上所述,本研究初步得出结论,PM_{2.5}暴露先使小鼠肠道菌群中拟杆菌门细菌与厚壁菌门细菌的比例变化,物种多样性下降,肠道菌群的脂质代谢功能下调,进一步导致肝脏内脂质合成因子和脂质氧化因子表达上调引起脂质代谢紊乱,最终导致机体内脂质含量增加引起体重增加。而PM_{2.5}暴露引起肠道菌群变化后具体通过哪些途径影响肝脏脂质合成水平尚不明确,有待后续通过代谢组学进一步研究。

关键词: PM_{2.5}; 肠道菌群; 脂质代谢; 粪菌移植; 小鼠

Abstract

Air pollution has been shown to be the fourth leading risk factor for mortality worldwide. Ambient fine particulate matter (PM_{2.5}), one of the major components of air pollution, has become a more significant public health problem. The process of lipid metabolism involves biosynthesis and degradation of lipids, and disorders of lipid metabolism are closely associated with metabolic and cardiovascular diseases. The gut microbiota is widely recognized as an important component of host health and plays a key role in host metabolic function. To explore the effects of PM_{2.5} exposure on intestinal flora and hepatic lipid metabolism as well as the specific mechanisms by which changes in intestinal microorganisms regulate lipid metabolism disorders after PM_{2.5} exposure. In this study, C57BL/6 mice were used as test animals, and the particulate exposure model was first established by nasal drip method. Biological experimental methods such as 16S rDNA sequencing, kit assay, HE section staining, fluorescence quantitative PCR, and Western blot were used to investigate the effects of PM_{2.5} exposure on intestinal flora and lipid metabolism in mice. Then the fecal bacteria transplantation model was established by colony enema method. The above experimental methods were repeated to test the success of fecal bacteria transplantation and to explore the regulatory relationship between gut microorganisms and lipid metabolism after PM_{2.5} exposure. The main results were as follows: (1) PM_{2.5} exposure caused changes in the ratio of *Bacteroides anomalus* to *Bacteroides thackwarii* bacteria in the intestinal flora of mice, and a decrease in species diversity of the intestinal flora. (2) PM_{2.5} exposure resulted in hepatic steatosis, with a significant increase in the lipid content of the liver and blood; a significant increase in the expression levels of the lipid synthesis-related factors Srebp1, FASN, and ACC1, and an increase in the expression levels of the lipid oxidation-related factors PPAR α , and ACOX1; there were no significant changes in the expression levels of the lipid catabolism-related factors ATGL and HSL. (3) The intestinal flora of mice in the exposed flora group after fecal transplantation also showed an imbalance in the ratio of *Mycobacterium anisopliae*/*Hypococcus* spp. and a decrease in species diversity, and this study concluded that fecal transplantation was successful. And it was found that the lipid metabolism function of the intestinal flora was significantly down-regulated in mice after PM_{2.5} exposure. (4) The intestinal flora after PM_{2.5} exposure leads to hepatic steatosis, with a significant increase in the lipid content of the liver; the expression levels of the lipid synthesizing factors Srebp1 and FASN are significantly increased, and the expression levels of the lipid oxidizing factors

PPAR α , and ACOX1 are significantly increased; and there is a tendency for a decrease in the lipid catabolic factors ATGL and HSL.

In summary, it is concluded that PM_{2.5} exposure firstly caused changes in the ratio of Bacteroides and Bacteroides, decreased species diversity, and down-regulated lipid metabolism in the intestinal flora, which further led to lipid metabolism disorders caused by up-regulation of lipid synthesizing factor (LSF) and lipid oxidizing factor (LOF) in the liver, and ultimately led to the increase of lipid content in the body and body weight gain. The pathways through which the changes in intestinal flora caused by PM_{2.5} exposure affect hepatic lipid synthesis are not clear, and require further study by metabolomics.

Key words: PM_{2.5}; Intestinal flora; Lipid metabolism; Fecal microbiota transplantation; mice

目 录

1 引言.....	1
1.1 PM _{2.5} 对健康的影响.....	1
1.2 PM _{2.5} 的毒理学机制.....	3
1.2.1 氧化应激.....	3
1.2.2 代谢活化.....	3
1.2.3 炎症反应.....	3
1.2.4 遗传毒性.....	3
1.3 PM _{2.5} 对动物肠道菌群的影响.....	4
1.4 PM _{2.5} 对动物肝脏脂质代谢的影响.....	4
1.5 动物肠道菌群变化对肝脏脂质代谢的影响.....	5
1.6 本研究目的与意义.....	6
2 材料与方法.....	7
2.1 试验材料.....	7
2.1.1 小鼠品系的选择.....	7
2.1.2 主要仪器.....	7
2.1.3 主要试剂与耗材.....	8
2.2 试验方法.....	10
2.2.1 试验技术路线.....	10
2.2.2 试验模型构建与菌液制备.....	11
2.2.3 小鼠肝组织病理学 HE 染色切片.....	13
2.2.4 小鼠粪便细菌的 16S rDNA 测序.....	14
2.2.5 小鼠血浆中 HDL-C 和 LDL-C 含量的测定.....	14
2.2.6 小鼠肝组织中甘油三酯含量的测定.....	15
2.2.7 试验小鼠肝脏总 RNA 提取.....	16
2.2.8 试验小鼠肝脏基因表达水平检测.....	16
2.2.9 小鼠肝脏蛋白表达水平检测.....	18
2.2.10 数据处理与统计分析.....	21
3 结果.....	22
3.1 PM _{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群和肝脏脂质代谢的变化.....	22
3.1.1 PM _{2.5} 暴露后小鼠肥胖程度的变化.....	22
3.1.2 PM _{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群变化.....	24
3.1.3 PM _{2.5} 暴露后小鼠肝脏脂质代谢的变化.....	26
3.2 粪菌移植(FMT)后小鼠肠道菌群与肝脏脂质代谢水平的变化.....	30
3.2.1 粪菌移植后小鼠的肠道菌群变化.....	30

3.2.2 粪菌移植后小鼠肥胖的变化.....	34
3.2.3 粪菌移植后小鼠肝脏脂质代谢的变化	36
4 讨论.....	40
4.1 PM _{2.5} 暴露对小鼠肠道菌群的影响.....	40
4.2 PM _{2.5} 暴露对小鼠肝脏脂质代谢的影响.....	41
4.3 PM _{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群的变化对肝脏脂质代谢的影响.....	42
5 结论.....	44
参考文献.....	45

插图和附表清单

图 3.1	PM _{2.5} 暴露后小鼠体重变化.....	22
图 3.2	PM _{2.5} 暴露后小鼠血浆中 HDL-C 和 LDL-C 的变化.....	23
图 3.3	PM _{2.5} 暴露后小鼠肝脏中 TG 的变化.....	23
图 3.4	PM _{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群物种相对丰富度变化.....	24
图 3.5	PM _{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群 α 多样性变化.....	25
图 3.6	PM _{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群 β 多样性变化.....	25
图 3.7	PM _{2.5} 暴露后对照组与暴露组小鼠肠道菌群数量的相对变化.....	26
图 3.8	PM _{2.5} 暴露后小鼠的肝组织切片染色.....	27
图 3.9	PM _{2.5} 暴露后小鼠的肝脏脂质氧化相关因子的基因表达水平变化.....	27
图 3.10	PM _{2.5} 暴露后小鼠的肝脏脂质合成相关因子的基因表达水平变化.....	28
图 3.11	PM _{2.5} 暴露后小鼠的肝脏脂质分解相关因子的基因表达水平变化.....	29
图 3.12	PM _{2.5} 暴露后小鼠的肝脏 PPAR α 的蛋白表达水平变化.....	29
图 3.13	粪菌移植两周内肠道菌群物种丰度变化.....	31
图 3.14	粪菌移植两周内肠道菌群 α 多样性变化.....	32
图 3.15	粪菌移植两周内肠道菌群 β 多样性变化.....	32
图 3.16	粪菌移植前后肠道菌群功能富集差异.....	33
图 3.17	粪菌移植后小鼠的肠道菌群功能差异分析.....	34
图 3.18	粪菌移植后小鼠体重变化.....	35
图 3.19	粪菌移植后小鼠血浆中 HDL-C 和 LDL-C 的变化.....	35
图 3.20	粪菌移植后小鼠肝脏中 TG 的变化.....	36
图 3.21	粪菌移植后小鼠的肝组织切片染色.....	37
图 3.22	粪菌移植后小鼠的肝脏脂质氧化相关因子的基因表达水平变化.....	37
图 3.23	粪菌移植后小鼠的肝脏脂质合成相关因子的基因表达水平变化.....	38
图 3.24	粪菌移植后小鼠的肝脏脂质分解相关因子的基因表达水平变化.....	38
表 1	主要实验仪器.....	7
表 2	主要实验试剂.....	8
表 3	混样表.....	14
表 4	小鼠基因引物序列.....	17

缩略语表

缩写	英文名称	中文名称
PM _{2.5}	Fine particulate matter	细颗粒物
PPAR α	Peroxisome proliferators activated receptor α	过氧化物酶体增殖激活受体 α
ACOX1	Acyl-CoA oxidase 1	酰基辅酶 A 氧化酶 1
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A	肉碱棕榈酰转移酶 1A
Srebp1	Sterol-regulatory element binding proteins	胆固醇调节元件结合蛋白
FASN	Fatty acid synthase	脂肪酸合成酶
ACC1	Acetyl-CoA carboxylase1	乙酰辅酶 A 羧化酶 1
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase1	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1
ATGL	Anti-Adipose triglyceride lipase	脂肪甘油三酯脂酶抗体
HSL	Hormone-sensitive lipase	激素敏感性甘油三酯脂肪酶
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
FMT	Fecal microbiota transplantation	粪菌移植
RTPCR	Real-time polymerase chain reaction	实时荧光定量聚合酶链式反应
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色法
ddH ₂ O	Double distilled H ₂ O	双蒸水
OD	Optical density	光密度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
BCA	Bicinchoninic acid	聚氰基丙烯酸正丁酯
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
DEPC	diethyl pyrocarbonate	二甲基亚硝基乙氧基乙基胺
PMSF	Phenyl methane sulfonyl fluoride	苯甲磺酰氟
RIPA	Radio immunoprecipitation assay lysis buffer	RIPA 裂解液
GO	Gene Ontology	基因本体论
TG	Triacylglycerol	甘油三酯
FFA	Free fatty acid	游离脂肪酸
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
COPD	Chronic obstructive pulmonary diseases	全球慢性阻塞性肺疾病
IL-4	Interleukin-4	白介素-4
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
TGF- β	Transforming growth factor- β	转化生长因子 β

1 引言

自改革开放以来,我国工业化进程加快,经济快速发展,与此相伴而生的环境问题却日益严峻,环境治理受到了越来越多的关注。近年来随着相关政策的出台,我国在大气污染治理方面取得了一定的成就,但空气污染问题依然存在,尤其是在京津冀地区经常出现中度和重度污染天气。 $\text{PM}_{2.5}$ 作为空气污染影响健康的重要环境因素,应该得到重视。而且暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 下会导致不良的健康效应,如影响肺功能和机体代谢,进而加重疾病病情。因此, $\text{PM}_{2.5}$ 对健康的严重影响已经成为政府和民众关注的重大问题,需要持续加强大气污染治理工作。

1.1 $\text{PM}_{2.5}$ 对健康的影响

空气污染是全球日益严重的公共卫生问题一直被认为是诱发多种疾病的重要危险因素。世界公共卫生组织已将空气污染问题列为全球第四大死亡原因,每年因空气污染导致的死亡人数约为 700 万,其中 99% 的人群生活在世卫组织标准认定为空气质量不达标的地区(年均 $\text{PM}_{2.5}$ 浓度 $< 5 \mu\text{g}/\text{m}^3$)^[1]。在我国, $\text{PM}_{2.5}$ 也是最重要的污染物之一,长期危害着国民健康,其健康效应和毒理机制仍是这几年需要关心的重要问题。

作为大气中的首要污染物, $\text{PM}_{2.5}$ 受到了广泛的关注。已有研究发现, $\text{PM}_{2.5}$ 的组成复杂多样,主要由碳、硫酸盐、硝酸盐等无机离子,多环芳烃等有机物,以及硅、铝、铁等地壳元素组成^[2]。 $\text{PM}_{2.5}$ 来源广泛,主要包括由污染源直接排放的一次 $\text{PM}_{2.5}$ 和大气中其前体物经化学转化生成的二次 $\text{PM}_{2.5}$ 。 $\text{PM}_{2.5}$ 能较长时间悬浮于空气中,传输距离长,影响时间久;总表面积大,易吸附空气中游离的多种有毒有害物质,形成气溶胶,降低大气能见度,干扰气候变化,影响生态环境;粒径小,可以深入细支气管和肺泡,或是沉积在肺泡诱导炎症,对呼吸系统和心血管造成不良影响^[3]。2013 年,国际癌症研究机构确定大气污染和颗粒物为致癌污染物,据统计全球每年约 300 万人死于因 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露引起的肺癌^[4]。同时许多流行病学的证据证明, $\text{PM}_{2.5}$ 的长期暴露可引发机体产生多种不良健康结局,影响居民身体健康^[5, 6]。除报道较多的呼吸系统、心血管系统^[7]外, $\text{PM}_{2.5}$ 还通过诱导机体炎症反应或氧化应激,进而导致多个组织器官的健康风险,如阿尔茨海默病等神经退行性疾病^[8-10];胃肠道疾病,肠道菌群紊乱等^[11, 12];打破机体正常代谢循环,导致过度肥胖、糖尿病等^[13]。

研究证据表明,呼吸系统疾病的发病率、住院率和死亡率的增加与 $\text{PM}_{2.5}$ 浓度的上升呈正相关, $\text{PM}_{2.5}$ 浓度每上升 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$,住院率就增加 1.13%^[14]。 $\text{PM}_{2.5}$ 具有颗粒直径小、表面积大、组分复杂和毒性物质吸收能力强等特点,使得它能够进入呼吸道深处,侵入并沉积在肺泡中,造成肺脏损伤。短期或长期暴露于不同浓度的 $\text{PM}_{2.5}$,会导致呼吸

系统不同程度的病理变化。已有研究指出,暴露于 PM_{2.5}可能会导致气道发炎反应^[15],肺功能下降^[16],哮喘和慢性阻塞性肺病的功能和发病率增加,病情恶化^[17],并使肺组织更易受到损伤^[18]。PM_{2.5}被吸入上呼吸道后,在细支气管和肺泡表面堆积,然后进一步被内化进入肺组织细胞,例如上皮细胞和肺泡巨噬细胞,短期暴露于 PM_{2.5}会导致呼吸道炎症和肺功能异常,如咳嗽、哮喘、支气管炎、肺活量降低等;如果长期接触 PM_{2.5},会增加患慢性支气管炎、肺气肿、支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)和肺癌等呼吸系统疾病的风险^[19-21]。PM_{2.5}可以通过增加细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的水平等方式,引发氧化应激反应^[22],导致细胞许多正常功能的受损,甚至通过细胞凋亡、细胞自噬等途径促使细胞死亡^[23]。PM_{2.5}可能引发炎症反应,包括炎症细胞的渗入和炎症介质的释放,造成细胞因子释放的失调,进而可能加剧肺组织的损伤^[24]。Yang 等人的研究结果表明,PM_{2.5}暴露可导致小鼠肺脏损伤,通过与对照组小鼠作比较发现,PM_{2.5}暴露后的小鼠血清和肺脏中白介素 4 (Interleukin-4, IL-4)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)和转化生长因子 β (Transforming growth factor- β , TGF- β)等细胞因子水平显著升高^[25]。与此同时,细胞因子与其受体之间的相互作用有助于促进支气管重塑,减轻支气管壁增厚和组织纤维化,从而进一步恶化肺功能^[26]。

大量研究表明,PM_{2.5}暴露不仅导致心血管功能亚临床指标的变化,而且始终与心血管发病率和死亡率相关^[27, 28]。Liu 等人通过一项全球范围内的队列研究发现,暴露于短期内的 PM₁₀ 和 PM_{2.5}与每日全因死亡率以及心血管疾病死亡率之间存在正相关关系。每增加 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的 PM₁₀ 和 PM_{2.5}浓度,每日全因死亡率分别增加 0.44%和 0.68%,每日心血管疾病死亡率增加 0.36%和 0.55%^[29]。许多研究已经证实,PM_{2.5}可以对心脏自主神经系统造成损害,导致心率变异性下降。这一情况被认为是心血管疾病发生和致死率的独立危险因素^[23]。PM_{2.5}的暴露可能导致一系列生理病理反应,进而增加血压,引发高血压相关疾病的发生^[30]。具体机制涉及交感神经张力的增加,全身血管张力的调节,以及伴随的内皮细胞和血管功能障碍^[23]。同时,动脉粥样硬化、心脏组织重塑和功能改变,心脏疾病的发生也认为与 PM_{2.5}暴露相关^[31, 32]。

环境中 PM_{2.5}暴露是影响人体神经系统^[33]、生殖系统、内分泌系统不良结局的重要因素之一,具体疾病如阿尔兹海默症^[34]、妊娠期糖尿病^[35]、以及下丘脑-垂体-肾上腺轴(Hypothalamic pituitary adrenal axis, HPA)激素分泌失衡^[36]等。此外也有研究发现,PM_{2.5}还能影响肺内的微生物群落,进而影响周边组织,影响脂质代谢,导致肥胖或代谢轴的紊乱^[36-38]。

1.2 PM_{2.5} 的毒理学机制

1.2.1 氧化应激

PM_{2.5} 暴露与不良健康效应关系尚未完全阐明,但氧化应激被认为是其中一个重要的机制。研究指出,PM_{2.5} 诱发的氧化应激可能是导致人体发生毒性反应的关键因素之一^[39]。这一机制对于深入理解 PM_{2.5} 对健康的影响至关重要,也为预防和治疗相关疾病提供了新的思路 and 方向。PM_{2.5} 来源广泛,成因复杂,本身可能存在可长时间有活性的自由基和一些有机化学物质,这些物质被代谢激活后,从而生成或增加细胞内的活性氧含量^[40]。PM_{2.5} 还会使细胞的抗氧化系统受损,从而降低暴露于 PM_{2.5} 后细胞的抗氧化能力,改变细胞转录组,影响各种酶的表达水平。此外,由 PM_{2.5} 暴露导致的活性氧的升高还会进一步破坏细胞中的生物大分子,如脂质、核酸等,进而破坏遗传物质的完整性和细胞结构的完整性。过量的 ROS 也有可能激活各种信号通路,如 *mTOR*、*p53*、*NF-κB*、*ASK1*、*JNK* 等,并最终诱导包括自噬、焦亡等,最终导致组织和人体的不良健康结局^[34, 41, 42]。

1.2.2 代谢活化

综上,在 PM_{2.5} 进入细胞之后,PM_{2.5} 中的部分组分,如多环芳烃等挥发性有机物,可能被细胞中的芳基羟受体识别^[42],从而激活这些受体,导致其调控基因的表达上调,例如细胞色素 p450 和一些相关的酶^[43]。随后,生物代谢酶系统代谢激活 PM_{2.5} 释放的部分有机化学物质变为反应性亲电代谢物,进一步对靶向细胞产生各种毒性反应,同时伴随有 ROS 的增加。

1.2.3 炎症反应

PM_{2.5} 引发的健康问题往往与炎症反应密切相关。研究表明,PM_{2.5} 在人类和动物细胞中可以引发炎症反应,并促使促炎介质基因的表达增加,导致相关炎症因子的分泌增加。这种炎症反应对健康造成不良影响^[44]。PM_{2.5} 对气道上皮细胞中的双向调节蛋白、TNF-α 和肝素结合 EGF 样生长因子的 mRNA 表达和蛋白分泌,以及 EGFR 的配体有增强作用,参与了促炎和修复反应^[24]。同时,PM_{2.5} 的暴露介导先天免疫和炎症反应的细胞表面共刺激分子,改变血液中免疫球蛋白的数量分布以及淋巴细胞谱的分布,进而影响免疫功能的正常工作,导致如哮喘、心肌炎、糖尿病等。

1.2.4 遗传毒性

PM_{2.5} 中的部分组分具有诱变性,多环芳烃和硝基化合物被确认为主要致癌化合物。研究还表明,PM_{2.5} 和高温加热分解的 PM_{2.5} 在体外实验中可引起剂量反应致遗传物质突变性,进一步证实了 PM_{2.5} 中某些组分具有诱变特性。这些发现对于了解空气污染对健

康的潜在影响具有重要意义^[45]。同时, 因其产生的活性氧对大分子的攻击, 导致 DNA 在不断的重复氧化损伤与修复, 猜测这一过程中, DNA 的突变频次会因修复次数的增加而急剧增加, 发生可遗传的突变。

1.3 PM_{2.5} 对动物肠道菌群的影响

肠道微生物群在宿主体内扮演着重要的角色, 能够执行一些宿主无法完成自主完成的生物过程。这些生物过程产生的代谢产物对宿主的代谢和健康状况有着重要影响。因此, 肠道微生物群与宿主之间的相互作用对于宿主的整体健康至关重要。通过研究肠道微生物对宿主的影响, 可以更好地理解动物代谢和健康的之间机制, 为未来的相关研究提供重要的参考依据^[46]。脊椎动物的肠道微生物组是一个复杂的微生物生态系统, 包含多样性和丰富性的细菌、古细菌和真菌。这些微生物群落能够增强宿主的代谢能力, 同时提供了一系列有益的影响, 例如促进营养消化、增强免疫功能以及保护宿主免受病原体入侵^[47, 48]。有一些研究发现肠道菌群变化与猪, 鼠等动物的肥胖直接相关^[49, 50]。越来越多的研究发现, 肠道环境的改变和肠道稳态的失衡与胃肠道疾病发展过程中微生物群组成的变化有关, 肠道微生物群失衡能够诱发多种疾病, 包括肥胖、肾病、糖尿病、过敏和炎症性肠病^[51]。

众所周知, 脊椎动物肠道微生物群的结构和组成及其生态功能受到宿主遗传学、生活环境、饮食和系统发育等一系列因素的强烈影响^[52-54]。近年来, 随着越来越多的流行病学研究将空气污染与胃肠道病理联系起来, 空气污染物如何对肠道系统产生影响越来越受到关注。已有研究发现, 空气污染物暴露与许多常见肠道类疾病存在相关, 包括慢性阑尾炎、结肠炎以及结直肠癌等^[55-57]。空气污染物可以通过直接或者间接途径进入胃肠道。研究发现, 空气中的 PM_{2.5} 可以深入肺部, 进入血液循环, 从而遍布全身^[58]。吸入的 PM_{2.5} 通过粘液纤毛运输, 从肺部侵入胃肠道^[58, 59]。此外, PM_{2.5} 还可以通过沉积到食物和水源中直接进入胃肠道^[60]。有研究表明, 一个摄入典型西方饮食的成年人每天摄入约 1012-1014 个微粒, 因此, 肠道和肠道微生物群可通过吸入和直接摄入接触到大量的 PM_{2.5}^[60, 61]。苗利成及其团队的研究表明, PM_{2.5} 会在肠道中堆积。通过转录组测序技术, 他们发现, 即使是微量的 PM_{2.5} 也会导致机体基因表达普遍下调, 在总体上影响不明显, 但一旦积累到一定量, 就会激活机体的免疫相关信号通路^[62]。先前的研究称, 环境 PM_{2.5} 所携带的化学物质可通过口服改变小鼠肠道微生物组^[63]。最近, 一些研究也报道了吸入环境中的 PM_{2.5} 会影响肠道微生物群^[64]。

1.4 PM_{2.5} 对动物肝脏脂质代谢的影响

先前的研究已经证实 PM_{2.5} 暴露会导致许多健康问题, 包括代谢障碍^[65], 脂肪组织炎症^[66] 和肝脏脂质积累^[67]。在这一系列健康问题中都存在脂质代谢紊乱, 并且脂质代谢

是动物营养的重要组成部分,与代谢性疾病密切相关^[68]。在哺乳动物中,多余的能量主要以三酰基甘油(Triglyceride, TG)的形式储存,也被称为甘油三酯,当能量需求超过当前的营养供应时,甘油三酯会被动员消耗^[69]。在能量平衡时期,FFA是大多数组织的主要能量来源,而在某些情况下会产生病理影响^[70, 71]。此外,如果游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA)水平长期升高,如在哺乳或肥胖期间, TG可在肝脏组织中积累,这可能产生脂肪肝等病理后果^[72, 73]。由于肝脏在调节脂质代谢中的关键作用,肝脏被广泛用于探索脂质代谢稳态的干扰。近年来的流行病学研究显示,空气污染与非酒精性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发生,以及其进一步发展存在很强的相关性^[74]。而NAFLD是最常见的肝脏改变,以脂质积累为特征,与代谢综合征密切相关^[68]。它包括广泛的临床组织学谱,包括单纯肝脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎,甚至肝细胞癌^[75]。李明等研究发现,PM_{2.5}引起NAFLD的重要机制可能是,通过肝细胞脂质合成关键蛋白肝X受体 α 和固醇调节元件结合蛋白1c诱导肝细胞脂质堆积,并诱发肝细胞氧化应激^[76]。因此,维持适当的细胞脂质稳态对正常代谢功能是必不可少的,而脂质代谢功能的正常是由脂肪生成和脂肪分解的平衡决定的。在生理条件下,FFA不仅可以产生甘油三酯,脂质的主要成分之一,还可以通过氧化产生能量。由于FFA在脂肪生成和分解过程中的重要作用,它可能成为NAFLD疾病发展的潜在介质之一^[77]。由于FFA和TG的重要作用,肝脏中FFA和TG含量和变量的增加部分反映了代谢功能障碍。然而,肝脏FFA超载,会导致脂肪酸 β 氧化水平上升,并伴随氧化应激增强,可能是单纯脂肪变性发展为脂肪性肝炎的核心原因^[78]。虽然已经有人试图证明PM_{2.5}暴露会导致肝脂质代谢异常^[79],但是PM_{2.5}诱导脂质代谢紊乱的分子机制尚不清楚。由于脂质生成和脂质分解失衡导致了甘油三酯的积累,同时脂肪酸的氧化和与游离脂肪酸相关的代谢也发生了变化。这些代谢变化是了解PM_{2.5}诱导脂肪代谢失调的重要分子机制之一,通过深入研究这些变化,可以更好地理解PM_{2.5}对脂质代谢的影响。

1.5 动物肠道菌群变化对肝脏脂质代谢的影响

肠道微生物群对宿主的能量稳态、糖代谢和脂质代谢起着重要调节作用^[80]。研究表明微生物失衡,即生态失调,与代谢紊乱密切相关,并已证实微生物的功能与代谢紊乱之间存在因果关系^[81, 82]。有相关动物模型的研究表明,肠道微生物群会影响宿主的脂质代谢。一项研究发现,通过对以普通饲料喂养的无肠道菌群小鼠和野生型小鼠进行脂质组学分析,显示肠道微生物群会对宿主组织和血清中的脂质组成产生影响,而且还会降低血液循环中甘油三酯的水平。相反地,对以高脂饮食喂养的无肠道菌群小鼠和野生型小鼠进行脂质组学分析后,发现肠道微生物群却增加了循环甘油三酯、高密度脂蛋白和总胆固醇水平^[83-85]。肠道内的微生物群能够通过刺激肝脏合成单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸来影响宿主的脂质代谢。此外,微生物群产生的醋酸盐也可以作为肝脏合成脂

肪酸的前体^[86]。益生菌干预小鼠研究结果表明，曲线乳杆菌和植物乳杆菌可以降低高脂高胆固醇饮食小鼠的血浆和肝脏内的胆固醇含量，并且能够协同作用促进肝脏甘油三酯的分解。因此，肠道微生物在维持宿主脂质平衡中扮演着重要的角色^[87, 88]。虽然肠道菌群与脂质代谢的紊乱在高脂膳食的影响下存在很强的相关性，但是 PM_{2.5} 作用下的肠道菌群与脂质代谢之间的调控机制尚不清晰，需要进一步研究。

1.6 本研究目的与意义

本研究将在前期研究基础上，研究 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道微生物的变化对脂质代谢造成的影响。具体研究内容为首先通过测定肠道菌群和肝脏脂质代谢的指标，阐明 PM_{2.5} 对小鼠肠道菌群和肝脏脂质代谢的影响。其次通过菌群移植验证实验，阐明 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群的变化对脂质代谢的影响，并测定相关指标研究肠道微生物变化对脂质代谢调控的具体机制。

研究目的：首先是为了确认 PM_{2.5} 暴露对肠道菌群和肝脏脂质代谢的影响。其次是为了阐明 PM_{2.5} 暴露是否会通过改变肠道微生物变化对肝脏脂质代谢造成影响，并分析肠道微生物变化作为中介因素对调节脂质代谢紊乱的具体机制。

研究意义：验证 PM_{2.5} 暴露对肠道菌群和肝脏脂质代谢的毒理学效应，以及肠道菌群作为中介因素对肝脏脂质代谢的影响后，为后续如何缓解这些毒理学效应提供研究基础。

2 材料与方法

选取 C57BL/6 小鼠作为主要的造模研究对象,建立颗粒物暴露和粪菌移植两种模型,通过肝组织病理学切片染色分析、16S rDNA 测序、酶联免疫和荧光定量 PCR 等实验方法,阐明 PM_{2.5}对肠道菌群和脂质代谢的影响,以及 PM_{2.5}通过肠道菌群的变化对脂质代谢的影响机制。

2.1 试验材料

2.1.1 小鼠品系的选择

试验小鼠是目前用于科学研究较为普遍的哺乳类实验模式动物。试验小鼠存在许多种类,如最常见的 BALB/C、C57BL/6、NIH、ICR、KM 等。其中 C57BL/6 繁殖期短,生产性能好,对代谢敏感。常用于生理学和代谢方面的研究。并且为了避免雌性小鼠生理期的影响,本研究选用 C57BL/6 雄性小鼠作为研究对象。

2.1.2 主要仪器

本研究中使用的主要仪器名称、设备型号以及公司见表 2.1

表 1 主要实验仪器
Table 1 Main experimental equipment

仪器名称	公司
实时荧光定量 PCR 仪	美国伯乐
PCR 扩增仪	美国伯乐
核酸浓度检测仪	美国赛默飞
Spectra Max 多功能酶标仪	美国美谷分子
酶标仪	美国伯乐
凝胶电泳成像分析仪	北京六一生物科技
琼脂糖凝胶电泳仪	美国伯乐
组织切片机	德国美康
组织切片包埋机	浙江金华公司

续表 1

仪器名称	公司
全自动组织切片脱水机	浙江金华科迪有限公司
普通光学显微镜	德国徕卡
激光扫描共聚焦显微镜	德国徕卡
小型离心机	德国艾本德
高速离心机	德国艾本德
低温高速离心机	美国赛默飞
超低温真空冷冻干燥仪	上海冠森生物科技
超低温冰箱	青岛海尔股份有限公司
制冰机	北京长流科学仪器有限公司
超净工作台	美国赛默飞
电子移液器	德国艾本德
PCR 八连排管（成套）	美国康宁
离心管	美国康宁
组织匀浆器	美国 BioSpec
涡旋振荡仪	四川蜀科有限公司
液氮储存罐	衡中能源有限公司
电子天平	美国 Ohaus
电热恒温水浴锅	北京市永光明医疗仪器厂
高压蒸汽灭菌锅	日本三洋
灌肠针	上海金畔生物科技

2. 1. 3 主要试剂与耗材

本研究中所用的主要试剂和耗材的名称、类别以及公司见表 2.2

表 2 主要实验试剂

Table 2 Main experimental equipment

试剂名称	公司
C57BL/6J 小鼠	北京赛业生物
Random Primers	美国 Promega

续表 2

试剂名称	公司
------	----

Reverse Transcriptase	美国 Promega
Ribonuclease Inhibitor	美国 Promega
dNTP Mix	美国 Promega
基因引物	北京华大基因
SYBR green	康为世纪生物科技
Bio-red 核酸染料	美国 Biotium
琼脂糖	上海麦克林生化科技有限公司
DNA Maker	宝日医生物技术（北京）有限公司
Loading Buffer	宝日医生物技术（北京）有限公司
PBS 缓冲液	Thermo Fisher Scientific, USA
ELISA 试剂盒	奇松生物科技有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	康为世纪生物科技
RIPA 裂解液	碧云天生物技术
NP-40 组织裂解液	碧云天生物技术
PMSF 蛋白酶抑制剂	碧云天生物技术
PVDF 膜	美国 Milipore
蛋白 Maker	美国赛默飞
苏木精单抗	武汉普健生物科技
TRIzol Reagent	美国赛默飞
蛋白上样缓冲液	北京索莱宝科技
脱脂奶粉	北京索莱宝科技
蛋白第一抗体	苏州博奥龙免疫技术
化学发光底物(ECL)	美国 Milipore
TAE 缓冲液	美国伯乐
Tris 缓冲液	美国伯乐
组织细胞甘油三酯酶法测定试剂盒	北京普利莱基因技术
低密度脂蛋白胆固醇含量检测试剂盒	北京索莱宝科技
高密度脂蛋白胆固醇含量检测试剂盒	北京索莱宝科技

2.2 试验方法

2.2.1 试验技术路线

本研究通过建立颗粒物暴露和粪菌移植模型，探索 PM_{2.5} 通过改变小鼠肠道微生物对脂质代谢的影响。具体路线：

(1) 颗粒物暴露模型。采取鼻腔滴注法对小鼠进行暴露实验。暴露结束后，收取动物血液，并使用相关化学试剂盒检测血浆中脂质水平。收取动物肝脏组织并对其染色，观察形态学变化；Real-time PCR 和 western blot 方法用于检测脂质代谢相关因子表达变化。收取粪便与盲肠内容物，用于 16S rDNA 测序与菌液配置。

(2) 粪菌移植模型。采取灌肠法对小鼠进行移植实验。移植结束后，收取动物血液，并使用相关化学试剂盒检测血浆中脂质水平。收取动物肝脏组织并对其染色，观察形态学变化；Real-time PCR 和 Western blot 方法用于检测脂质代谢相关因子表达变化。收取盲肠内容物，用于 16S rDNA 测序。

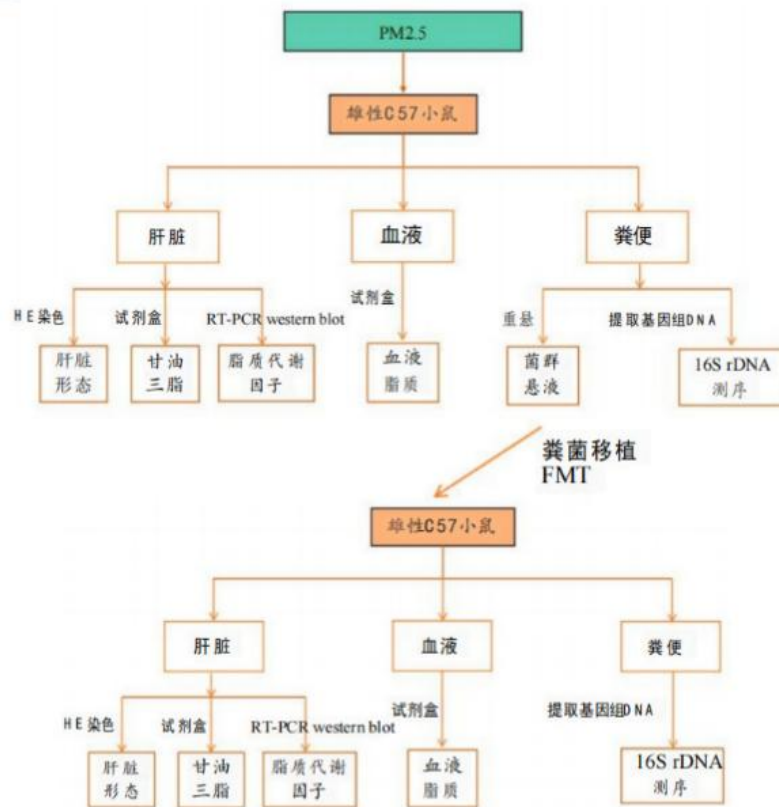


图 2.1 技术路线图

Figure 2.1 Technology roadmap

2.2.2 试验模型构建与菌液制备

2.2.2.1 PM_{2.5} 悬液制备

首先进行 PM_{2.5} 颗粒采集,我们将采集 PM_{2.5} 颗粒物的取样地点设置于北京市朝阳区奥运村街道中国环境科学研究院的大气环境研究所副楼楼顶,该地点周围没有任何建筑物遮挡。所使用的 PM_{2.5} 采样器是在辽宁丹东购买的,仪器参数符合国家对 PM_{2.5} 采样标准的要求。在采集过程中,使用了 Teflon 滤膜。采样时流量设置为每分钟 20 升,采样持续时间为 3 天。采样完成后,将采集到的膜小心取出,标注好采样日期,然后将其放置于 -20℃ 的冰箱中保存。其次进行 PM_{2.5} 干粉的收集与 PM_{2.5} 混悬液的制备,我们将 Teflon 采样滤膜从 -20℃ 冰箱取出后,放入装有超纯水的烧杯中,进行超声振荡 1 小时,然后停 5 分钟,重复这个操作洗脱 Teflon 滤膜上的颗粒物,直至 Teflon 滤膜上的颗粒物基本被洗脱。在这个过程中,使用冰袋或者冰块来保持水温在 0℃ 以下,重复这个操作 3 次后取出滤膜。接下来,将 PM_{2.5} 混悬液倒入 10 厘米玻璃培养皿中,并将其置于 -80℃ 超低温冰箱中进行过夜冷冻。第二天,取出已经完全冰冻的玻璃培养皿,然后放入超低温真空冷冻干燥仪中干燥 1-2 天。等程序结束后,将干燥后的 PM_{2.5} 干粉收集起来,然后根据实验需求称取适量的 PM_{2.5} 干粉后,用生理盐水充分混匀分装,并放回 4℃ 冰箱中备用。使用前用生理盐水将母液稀释成实验所需浓度,超声震荡混匀使用。

2.2.2.2 粪菌悬液制备

(1) 灭菌:佩戴适当的防护设备,如实验手套、口罩和实验室大衣。并确保操作区域和所使用的仪器、培养皿等已进行适当的消毒处理,以防止外界细菌的污染。

(2) 取样:使用无菌勺或无菌探头,从粪便样品中取出约 1 g 的样品,并将其转移到一个无菌试管中。

(3) 稀释:将取样的粪便样品与适量的生理盐水按 1:20 的比例进行稀释。

(4) 搅拌均匀:使用无菌的移液器或振荡器等工具,轻轻地将粪便样品和缓冲液搅拌均匀,以确保样品中的微生物均匀分布。

(5) 沉淀:将混合后的样品静置 30 min,让固体颗粒沉淀到底部。

(6) 取样品上清:使用无菌移液器,小心地将上清液(不含固体颗粒)转移到另一个无菌试管或容器中。这个过程尽量避免带入固体颗粒,以减少后续处理步骤中可能出现的问题。

(7) 过滤:使用 0.22 μm 的无菌滤膜,将上清液过滤到另一个无菌试管中,以去除较大的固体颗粒。

(8) 分装和保存：将提取得到的粪菌菌液分装到无菌的试管中封闭保存好，并储存于适当的温度条件下，以保持其活力和纯度用于后续实验。

2.2.2.3 颗粒物暴露模型构建

前期试验动物采用 16 只雄性 C57BL/6 小鼠，温度：24±1℃。12 h 光暗交替进行，自主饮食饮水，适应性培养一周后，开始颗粒物暴露模型的建立。试验分组如下：

将小鼠分为两组：1.对照组 2.PM_{2.5}暴露组，每组 8 只。暴露组的 PM_{2.5}的暴露方式选用混悬液鼻腔滴注法进行暴露，暴露剂量根据小鼠体重计算其每日肺通气量，公式如下：

正常肺通气量 (mL) = 小鼠体重 (g) × 0.08-1

每分钟肺通气量 (mL) = 正常肺通气量 (mL) × 呼吸频率 (次/min)

每日暴露剂量 (μg) = 每分钟肺通气量 (mL/min) × 60 min × 24 h × μg/m³

对照组则滴注等体积的生理盐水。暴露时间持续四周，避免节律影响，固定每天上午进行暴露操作，每只小鼠每日暴露剂量约为 50 μg。开始暴露前称取体重，收集粪便作为基线，并在接下来的每周都进行称取体重和收集粪便直至暴露结束。

2.2.2.4 粪菌移植模型构建

同前期试验一致，试验动物采用 16 只雄性 C57BL/6 幼龄小鼠，温度：24±1℃。12 小时光暗交替进行，自主饮食饮水，适应性培养一周后，开始粪菌移植模型的建立。试验分组如下：

将试验小鼠两组：1.对照菌群组 2.暴露菌群组；每组 8 只，选用菌群混悬液灌肠法进行粪菌移植 (Fecal microbiota transplantation, FMT)，首先将颗粒物暴露结束后收集的对照组和 PM_{2.5}暴露组的肠道内容物按上述 2.1.3 的试验方法制备成菌群悬液，然后把对照组的菌群悬液和 PM_{2.5}暴露组的菌群悬液通过灌肠法分别移植到对照菌群组和暴露菌群组。具体灌肠操作为：将小鼠笼中取出并将其固定在工作台上，用 75%酒精擦拭小鼠腹股部，以消毒皮肤。取出灌肠针，将其填充好菌群悬液。然后将灌肠针插入小鼠肛门，同时轻轻推动灌肠针，使其顺利进入小鼠直肠，接着缓慢注入灌肠液，注意不要灌注过快，以免造成小鼠过度疼痛或死亡。在完成灌注后，将灌肠针缓慢拔出，随后将小鼠放回笼子中，并观察其生理状况。整个菌群移植时间持续两周，为避免节律影响，我们固定每天上午进行菌群移植操作。开始移植前称取体重，收集粪便作为基线，并在接下来的每周都进行称取体重和收集粪便直至菌群移植结束。

2.2.2.5 动物组织及肠道内容物采集

动物模型构建结束后,将小鼠从笼中取出并将其固定在工作台上,使用适当大小的注射器和针头,在小鼠眼眶窝下搜寻可见的静脉,小心地将针头插入静脉,抽取所需外周血量,将外周血立即转移到预先准备好的采血管。然后将采血管标记好,并根据实验要求进行进一步处理或保存。随后,我们使用4%水合氯醛溶液对小鼠进行了腹腔注射麻醉处理。一旦小鼠被成功麻醉,我们在整洁的实验台上喷洒了适量的75%酒精。然后我们调整小鼠的位置,将其腹部朝上并固定在实验台上。接着小心地剪开小鼠腹部,暴露出肠道和肝脏,并取出肠道内容物和肝脏组织。我们将肝脏组织分为两部分:一部分经过磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后放入福尔马林固定液中以进行肝脏组织学检测;另一部分则迅速冷冻存放在-80℃,以备后续进行核酸和蛋白质的提取,以及一些目标因子的测定;将肠道内容物用于菌群测序。

2.2.3 小鼠肝组织病理学 HE 染色切片

进行HE染色后,对小鼠肝脏组织进行了病理学评价,以研究PM_{2.5}对肝组织形态的影响。同时,本研究还关注了肠道菌群的变化对肝组织形态的影响。切片制作具体步骤如下:

(1) 修剪:取出已经固定在4%组织固定液中的大鼠肝脏,使用剪刀对其形状进行适当修剪。

(2) 清洗:清水冲洗15 min。

(3) 脱水:脱水中使用了不同浓度的乙醇溶液,整个脱水过程通过全自动脱水机进行处理。

(4) 浸蜡:在组织完成脱水后,进行浸蜡处理,包括二甲苯浸泡1 min,乙醇和二甲苯混合溶液浸泡5 min,纯二甲苯浸润5 min。

(5) 包埋:随后,将事先熔化的石蜡倒入容器中,将肝脏组织固定在石蜡里,并等待其冷却凝固。

(6) 切片:将预先包埋好的蜡块放在加热板上加热,使其表面融化并固定在切片机上。调整切片机的厚度为5 μm左右进行切片。随后将切片放入42℃的温水中进行展开,待完全展开后将其转移到载玻片上,最后放入烘干机中干燥。。

(7) HE 染色:对玻片先用二甲苯进行洗涤,5 min;接着使用二甲苯洗涤,5 min;随后使用二甲苯与酒精1:1的混合液,2 min;采用100%乙醇处理,5 min;然后使用100%乙醇洗涤,5 min;接着用80%乙醇洗涤,5 min;再使用蒸馏水处理,5 min;使用苏木精处理,5 min;进行水洗,2 s;接着用1%盐酸乙醇处理,2 s;再次进行水洗,30 s;随后采用蒸馏水洗涤,2 s;使用0.5%伊红液处理,2 min;再次进行蒸馏水洗涤,2 s;

接着使用 80%乙醇处理, 2 s; 采用 95%乙醇处理, 3 s; 然后使用 95%乙醇处理, 5 s; 使用无水乙醇处理, 10 min; 接着使用石炭酸二甲苯处理, 10 min; 用二甲苯处理, 2 min; 再次用二甲苯洗涤, 2 min; 最后一次用二甲苯处理, 2 min。。

(8) 封片: 前面步骤完成后, 在组织中央滴上中性树胶, 小心盖上盖玻片, 等待自然风干。

2.2.4 小鼠粪便细菌的 16S rDNA 测序

(1) 粪便基因组 DNA 提取与样本检测: 使用 CTAB/SDS 方法提取粪便样品中的总基因组 DNA。然后使用 NanoDrop 2000 分光光度计分析 DNA 浓度和纯度, 并用琼脂糖凝胶电泳检测样本质量。

(2) PCR 产物获取: 针对特定区域的引物, 本研究使用 16S V3-V4 区的引物 (515F 和 806R) 来进行细菌多样性鉴定。将所有 PCR 反应混合液中加入 15 μ L PCR Master Mix、0.1 μ M 上游引物、0.1 μ M 下游引物和总量为 10 ng 的基因组 DNA 模板, 然后用 ddH₂O 将总体积补充到 50 μ L。然后通过 PCR 扩增仪进行 95°C 下 1 min 的初始变性, 然后在 95°C (15 s)、56°C (1 min) 和 72°C (30 s) 的条件下进行 30 个循环, 最后保持在 72°C 下 3 min。

(3) PCR 产物的纯化和质检: 对经过合格检测的 PCR 产物进行磁珠纯化, 磁珠纯化后的 PCR 产物经过浓度测量后与缓冲液等量混合并混匀后, 进行琼脂糖凝胶电泳质检, 最后按照需求从凝胶中提取出目标条带。

(4) 文库构建: 使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 按照制造商的协议生成测序文库。文库质量在 Qubit@ 2.0 荧光仪和荧光定量 PCR 仪上评估。

(5) 测序: 文库质检合格后, 使用 NovaSeq6000 测序仪对文库进行上机测序。

2.2.5 小鼠血浆中 HDL-C 和 LDL-C 含量的测定

本研究中采取微量法使用脂蛋白胆固醇含量检测试剂盒测定小鼠血浆中高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇含量。

(1) 实验准备: 将多功能酶标仪调节波长至 546 nm 预热 30 min 以上, 并根据样本量大小取适量试剂一和试剂二 37°C 预热 10 min。

(2) 标准溶液的制备: 将试剂盒中 50 μ mol/mL 胆固醇标准溶液用提取液进行梯度稀释得到 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.0390625 μ mol/mL 等浓度的标准溶液备用。

(3) 在 96 孔板中按下表步骤加样:

表 3 样本检测混样表

Table 3 Sample detection mixing table

试剂名称(μL)	测量管	标准管	空白对照管
样本	5	-	-
标准液	-	5	-
提取液	-	-	5
试剂一	180	180	180
充分混匀, 37°C静置 5 min, 测定 546 nm 处吸光度 Q1, 分别记为 Q1 测量、Q1 标准、Q1 空白。			
试剂二	60	60	60

(4) 数据处理方式: 将试剂按上表充分混匀后, 37°C静置 5 min, 测定 546 nm 处吸光度 Q2, 分别记为 Q2 测量、Q2 标准、Q2 空白, 计算 ΔQ 测量= (Q2 测量-Q1 测量) - (Q2 空白-Q1 空白), ΔQ 标准= (Q2 标准-Q1 标准) - (Q2 空白-Q1 空白)。空白对照管和标准管只需检测 1 次即可。

(5) 样本浓度计算: 根据预设的浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 ΔQ 的标准值 (y , ΔQ 标准), 我们可以建立一条标准曲线。通过这条标准曲线, 我们可以将实际测量的 ΔQ 值 (y , ΔQ 测量) 代入公式, 从而计算出样本的浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$)。

2.2.6 小鼠肝组织中甘油三酯含量的测定

本研究中采用微量法利用组织甘油三酯酶法测定试剂盒测定肝脏组织中甘油三酯的含量。

(1) 肝组织裂解: 采取减量称重法通过离心管精准称量 50 mg 肝脏组织, 接着按每 1 mg 组织加 20 μL 裂解液的比例加入 1 mL 的裂解液。然后利用组织匀浆仪使组织充分匀浆, 匀浆后静置 10 min。

(2) 组织液提取: 取适量上清液转移到 1.5 mL 离心管中, 70°C加热 10 min, 这一过程中若组织添加量过多, 溶液可能出现絮状沉淀, 随后使用 3000 rpm 离心 10 min, 取上清液用于后续酶标仪测定。

(3) 工作液配制: 根据样本数量, 配置适量工作液 1 与工作液 2 的混合溶液, 两者的体积为 4:1。

(4) 标准品稀释: 用蒸馏水或者 PBS 将浓度为 4 mM 甘油标准品按不同的比例稀释为 1000、250、62.5、31.25、15.625、7.8125、0 $\mu\text{mol/L}$ 等浓度的标准溶液。

(5) 上样: 在 96 孔板中每孔加入 5-20 μL 样品/标准品并用工作液补充总体积到 200 μL , 每个样品进行三次技术重复。

(6) 孵育: 将添加完样本的 96 孔板放置在 37°C 或 25°C 下反应 15 min。反应结束后颜色在 60 min 内逐渐稳定。

(7) 检测：使用多功能酶标仪在吸光度 550 nm 处测定各管 OD 值，并根据绘制的标准曲线计算甘油三酯含量。

2.2.7 试验小鼠肝脏总 RNA 提取

本研究中使用 Trizol 法提取肝脏组织中的总 RNA。正式实验开始前需将实验所需的实验耗材，如组织匀浆仪，手术剪刀、镊子、1.5 mL 离心管以及不同大小的枪头等耗材在 0.1% DEPC 水中浸泡过夜，用来去除耗材表面原有的 RNA 酶，浸泡完成后用锡纸密封包裹放入高压灭菌锅中高压灭菌 1 h，进一步去除仪器和耗材表面的 RNA 酶，以减少 RNA 酶的污染对本实验的干扰。最后将实验耗材放入干燥箱中烘干后取出，-20℃冰箱内低温保存备用。

(1) 将 50 mg 小鼠肝脏组织放入 1.5 mL 离心管中，加入适量液氮并使用组织匀浆仪充分匀浆。接着加入 0.5 mL Trizol 溶液，放置于冰上半小时。然后使用离心机以 12,000 r/min 的速度进行 10 min 的离心，弃去沉淀，将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

(2) 往离心管中加入 200 升氯仿，在充分混合后存放在冰上，等待 15 min，之后以 12,000 r/min 的速度进行 20 min 的离心。观察到样品分为三层，RNA 主要存在于上层。然后将上层无色水相转移至新的 1.5 mL 离心管中。

(3) 往上层无色水相中加入 500 μ L 提前预冷好的异丙醇，缓慢混匀溶液，然后冰上放置 30 min 或更长时间，让 RNA 可以充分析出。

(4) 使用高速低温离心机在 4℃环境下以 12,000 r/min 的速度进行 15 min 的离心，离心结束后管底可见透明 RNA 沉淀；小心倒掉上清液，保留离心管的管底沉淀。

(5) 往沉淀中加入 500 μ L 由 DEPC 水配制而成的 75%乙醇溶液，使用移液器缓慢抽打溶液，使沉淀悬浮，随后使用使用高速低温离心机在 4℃环境下以 12,000 r/min 的速度进行 5 min 的离心，弃去上清，重复上述步骤一次；

(6) 室温下将乙醇挥发干净后，用 50 μ L DEPC 水溶解 RNA。

(7) 用 Nanodrop 测定样本 RNA 浓度及 OD_{260/280} 的比值来衡量 RNA 的质量。

(8) 通过琼脂糖凝胶电泳进一步分析提取到的 RNA 样本。通常情况下，应当确保观察到的 28S 和 18S 条带清晰明亮，且 28S 的亮度应该至少是 18S 的两倍，只有这样的 RNA 样品才能进行后续分析。

(9) 将 RNA 置于-80℃冰箱保存，用于后续实验。

2.2.8 试验小鼠肝脏基因表达水平检测

本研究使用荧光定量 PCR 技术分析小鼠肝脏内目的基因的表达水平。荧光定量 PCR 作为一种新型核酸定量检测方法，在生物与医学领域得到广泛应用。相较于传统 PCR，qPCR 引入荧光染色技术，通过荧光信号的释放来实现 DNA 的定量检测。在 PCR 扩增

过程中, 荧光染料与 DNA 双链结合, 随着 DNA 链的合成逐渐增加而产生荧光标记, 荧光信号的强度反映了所含 DNA 的变化。通过监测这些荧光信号, 研究者可以实时监测目标基因的表达水平, 并通过循环阈值 (Cycle threshold Ct) 的变化来计算出目的基因的绝对或相对表达量。

2.2.8.1 cDNA 合成

根据上述实验所测定的 RNA 溶液浓度, 将 2 μg RNA 溶液加入到八连排中。接着加入 1 μL 的随机引物, 加入 DEPC 水达到总体积为 12.5 μL , 并在 PCR 扩增仪中进行 70°C 反应 10 min, 随后立即置于冰上 5 min。接着依次向离心管中加入 4 μL 5 $\times$ Reaction buffer, 0.5 μL RNase Inhibitor, 2 μL dNTP 以及 1 μL Reverse transcriptase, 反应总体积为 20 μL 。将充分混匀的混合液放入普通 PCR 仪中, 进行 37°C 反应 60 min, 85°C 反应 5 min。反应完成后稀释 30 倍分装, 并存放于 -80°C 备用。

2.2.8.2 小鼠基因引物设计与合成

本研究中的所有基因的上下游引物序列均通过 NCBI 网站中 Gene 模块进行设计并检验, 接着由北京华大基因科技有限公司合成。具体引物序列信息如下表所示。

表 4 小鼠基因引物序列

Table 4 Mouse gene primer sequence

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>PPARα</i>	TGAGGAAGCCGTTCTGTGAC	CACAATCCCCTCCTGCAACT
<i>ACOX1</i>	ATGTTTATCCCTACCTTGCTGAATC	CTCGAAGATGAGTTCCGTGGC
<i>CPT1a</i>	GTCCTGCAACTTTGTGCTGG	CAGGTGCTGGTGCTTTTCAC
<i>Srebp1</i>	ACTGGACACAGCGTTTTTGA	CTCAGGAGAGTTGGCACCTG
<i>Fasn</i>	GCAGCTGTTGGTTTGTCTCTG	GGGGGCAATTCCTTCCATGA
<i>ACCI</i>	ATGTGGCCTGGGTAGATCCT	CGGACAAGGTAAGCCCCAAT
<i>Scd1</i>	CCTCCGGAAATGAACGAGAGA	ATCCCGAAGAGGCAGGTGTA

续表 4

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>ATGL</i>	TTCGCAATCTCTACCGCCTC	AGCAAAGGGTTGGGTTGGTT
<i>HSL</i>	CTGTCGTCTCTGGCCAACAT	GCATCTCAAAGGCCTCAGGT
<i>GAPDH</i>	AGAGTGTTTCCTCGTCCCGT	AATCCGTTTACACCGACCTT

2.2.8.3 实时荧光定量 PCR

(1) 反应体系配制:

2×SYBR Green 染料	10 μL
ddH ₂ O	5 μL
正向引物	0.5 μL
反向引物	0.5 μL
cDNA	4 μL

共 20 μL 的体系。

(2) 仪器反应参数设置

95°C	10 min	预变性
95°C	15 s	变性
57°C	40 s	退火
72°C	30 s	延伸

共 40 个循环; 样品从 65°C 5 s 至 95°C 加热递增形成熔解曲线。

(3) 最终结果计算: 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算基因 mRNA 相对表达量:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-((Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}})}$$

2.2.9 小鼠肝脏蛋白表达水平检测

本研究主要通过蛋白质印迹法检测小鼠肝脏内目的蛋白表达水平。蛋白质印迹法是目前较为常见的分子生物学技术。

2.2.9.1 蛋白质提取

(1) 提前将 RIPA 裂解液放置在室温下溶解, 并用涡旋振荡机振荡确保溶液充分混匀。根据实验需要取适量的裂解液, 在使用前几分钟内添加适量的 100 mM PMSF 原液, 以达到最终 PMSF 浓度为 1 mM。

(2) 用手术剪刀将小鼠肝脏组织切成细小碎片状, 然后按照每 20 mg 组织加入 200 μL 含 PMSF 的 RIPA 裂解液比例混合。使用组织匀浆仪完全匀浆直至完全裂解; 裂解完成后, 以 12,000 rpm/min 的速度离心 5 min, 小心吸取上清液, 即得到肝组织蛋白溶液, 将溶液冷冻保存在 -20°C 用于后续研究。

2.2.9.2 BCA法测定蛋白质浓度

(1) 制备蛋白标准品: 将 0.4 mL 蛋白标准配制液加入到一管含有 10 mg BSA 的蛋白标准中, 轻轻摇晃使其充分溶解。然后将其配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液。取适

量的蛋白标准溶液（10 μL ），加入到 490 μL 的稀释液中，以将其稀释至终浓度为 0.5 mg/mL。

（2）BCA 工作液的配制：根据实际测定样品数量，试剂 1 和试剂 2 按照 50:1 的比例，配制适量的工作液。完成配制后的工作液短时间内可以在室温下保持相对稳定，但需尽快进行测定工作以确保准确性。

（3）样本蛋白浓度测定：将浓度为 25 mg/mL 的蛋白标准溶液依次加入 96 孔板的标准品孔中，加入的体积分别为 0、1、2、4、8、16 和 20 μL 。然后使用标准稀释液补足到每个孔的总体积为 20 μL 。这样蛋白标准品的浓度分别为 0、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2 和 0.25 mg/mL。接下来，将从 2.3.5.1 中提取的蛋白质样品加入相应的样品孔中，加入的体积为 20 μL 。然后向每个加样孔中加入 200 μL 预先配置好的 BCA 工作液，并将板置于恒温箱中，保持在 37°C 下孵育 30 min。孵育结束后，使用 Elx800 酶标仪在 A562 波长下测定吸光度值。根据标准品的吸光度和浓度数据制定标准曲线。最后利用标准曲线以及样品的吸光度和体积信息，计算样品蛋白质的浓度，并进行分装

（4）加热变性储存：一部分蛋白样本加入 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，开水变性 5-10 min，再快速转移至 -20°C 放置 5 min，处理后样品可长期储存。余下蛋白样本 -80°C 冻存。

2.2.9.3 蛋白质印迹法

（1）配制聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）

① 组装电泳仪，并加入清水检查是否漏水，倒掉清水，吸干水分。

② 按照目的蛋白分子量大小制备 5 mL 10% 分离胶，配方如下：

蒸馏水	1.3 mL
30% Acr-Bis (29:1)	1.7 mL
1 M Tris, pH 8.8	1.9 mL
10% SDS	0.05 mL
10% 过硫酸铵 (AP)	0.05 mL
TEMED	0.002 mL

③ 倒入分离胶，异丙醇封液，30 min 左右凝固。

④ 按照配方配制 2 mL 5% 浓缩胶，配方如下：

蒸馏水	2.04 mL
30% Acrylamide	0.51 mL
1 M Tris-HCl 溶液 pH6.8	0.39 mL
10% 过硫酸铵 (AP)	0.03 mL
10% SDS	0.03 mL

TEMED 0.003 mL

⑤ 分离胶凝固后吸走异丙醇，加入浓缩胶，去除气泡后插入梳子，凝固后将胶板取下，可立即用于电泳或者放入电泳液中 4℃ 保存。

(2) 上样及电泳

配制电泳缓冲液，外槽加入电泳缓冲液至相应位置，内槽加满，拔出梳子。电泳缓冲液 (5×) 配方如下：

Tris	15.14 g
Glycine	72.07 g
SDS	5 g
ddH ₂ O	定容至 1000 mL

母液 4℃ 存放，用时稀释为 1×。

根据 BCA 法测定的蛋白质浓度，计算出适当的上样体积并使用 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白质进行分离。选择较好的孔加样，并记录加样位置，每个泳道上样 10-30 μg 总蛋白质（根据目标蛋白质表达量进一步调整），并在泳道两侧加入 5 μL 标准 Marker。将 1× 电泳缓冲液加入电泳槽淹没槽口。完成样品加入后，开始电泳，初始电压可设为 75 V（后续通过浓缩凝胶中的蓝色 Loading Buffer 位置来调整电压，最高可达 110 V）。

(3) 转膜

按如下配方配制转膜液 (10×)：

Tris	30.3 g
Glycine	144 g
ddH ₂ O	定容至 1000 mL

母液 4℃ 存放，使用前加入 ddH₂O 及甲醇（ddH₂O:甲醇体积比为 7:2）稀释为 1×。

电泳结束后，首先需将 10× 转移缓冲液与甲醇以及去离子水按照 1:2:7 的比例稀释，制备成 1× 转移缓冲液。接着，将浓缩胶去除并保留分离胶，随后加入 1× 转移缓冲液完全覆盖分离胶。转膜的过程可以采用湿转膜的方法，设置 110 V 的恒压条件，转膜时间为 120 min，在冰上或 4℃ 的条件下进行。

(4) 封闭：转膜完成后，将 PVDF 膜在 PBS 中浸泡 5 min 后，转移到含有 5% 牛奶的封闭液（牛奶与 TBS-T 的比例为 1:20，即 2.5 g 脱脂奶粉加 50 mL TBS-T）中封闭 2 h。

(5) 一抗孵育：将一抗抗体加入到抗体孵育盒中，然后将膜放入抗体孵育盒中，在 4℃ 下，摇床缓慢摇动孵育 12-16 h。

(6) 洗膜：在一抗孵育结束后，使用 1× TBST 溶液（10× TBS 与去离子水的比例为 1: 9，加入 Tween-20，浓度为 0.05%）对膜进行 3 次洗涤，每次 5-10 min，在摇床上匀速摇动。

(7) 二抗孵育: 根据一抗种属源性, 加入对应源性的二抗抗体到抗体孵育盒中, 然后将洗好的膜放入抗体孵育盒中, 室温摇床缓慢 2 h 孵育。

(8) 显影: 二抗孵育结束后用 $1\times$ TBST 溶液清洗 PVDF 膜三遍以上, 每遍 5-10 min, 然后将显色液 A 和 B 按照 1:1 的比例混合后, 均匀滴加到 PVDF 膜上, 随后用凝胶成像分析仪观察影像, 保存影像结果。

2.2.10 数据处理与统计分析

本研究使用 Excel 对数据进行整理和计算, 数据以平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD) 表示, 并使用 GraphPad 8.0 软件进行数据统计分析和图形绘制。采用单因素方差分析 (One-ANOVA) 方法检验实验组之间差异, 两组之间比较使用 LSD-t 检验, 如果 p 值小于 0.05, 则认为差异具有显著性。

3 结果

3.1 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群和肝脏脂质代谢的变化

为了研究细颗粒物对小鼠肠道菌群和肝脏脂质代谢的影响,本研究对颗粒物暴露组和对照组两组进行了化学试剂盒检测、16S rDNA 测序、肝组织病理学观察、RT-PCR 和 Western Blot 等实验

3.1.1 PM_{2.5} 暴露后小鼠肥胖程度的变化

在本研究中为了验证 PM_{2.5} 暴露对小鼠肥胖的影响,本研究记录小鼠从暴露开始每一周的体重大小,并用化学检测试剂盒测定了小鼠暴露完成后血浆中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量以及肝脏中甘油三脂(TG)的含量。

3.1.1.1 PM_{2.5} 暴露后小鼠体重的变化

如图 3.1 显示,PM_{2.5} 暴露前,暴露组小鼠与对照组小鼠体重无明显差异,随着 PM_{2.5} 开始暴露后,暴露组小鼠体重相比于对照组显著升高。

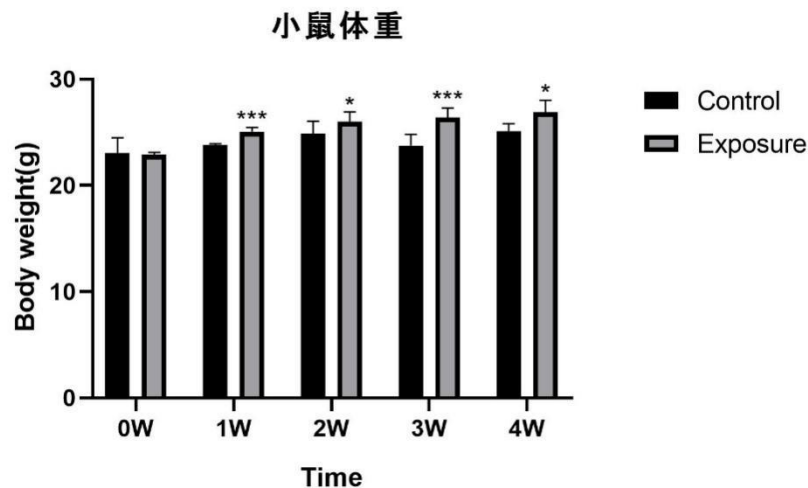


图 3.1 PM_{2.5} 暴露后小鼠体重变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.1 Body weight changes in mice after PM_{2.5} exposure. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.1.1.2 PM_{2.5} 暴露后血浆中HDL-C和LDL-C含量的变化

如图 3.2 的结果显示,PM_{2.5} 暴露后小鼠外周血中 HDL-C 的含量显著下降,其主要作用是将组织细胞的胆固醇经过血液转运至肝脏组织,促进肝脏细胞中胆固醇的积累。

而 PM_{2.5} 暴露后小鼠外周血中的 LDL-C 含量显著升高, 其主要作用是将肝脏组织的胆固醇经过血液转运至其他组织, 促进组织细胞中胆固醇的积累。

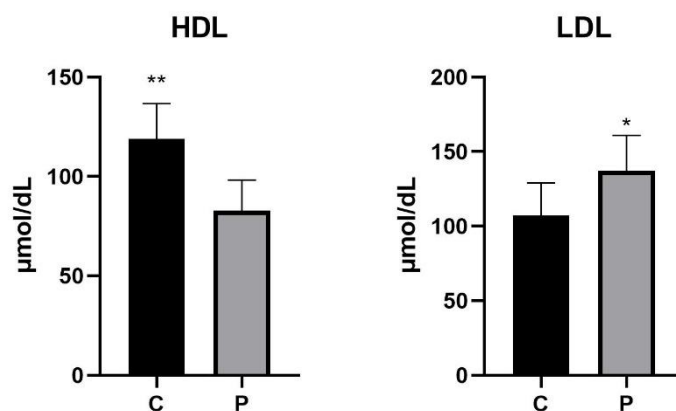


图 3.2 PM_{2.5} 暴露后小鼠血浆中 HDL-C 和 LDL-C 的变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.2 Changes of HDL-C and LDL-C in plasma of mice after PM_{2.5} exposure * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.1.1.3 PM_{2.5} 暴露后肝脏中TG含量的变化

如图 3.3 的结果显示, PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏中 TG 含量显著升高, 甘油三酯是由甘油和脂肪酸酯化而成, 是血脂的主要成分, 通常在肝脏中合成和分解。

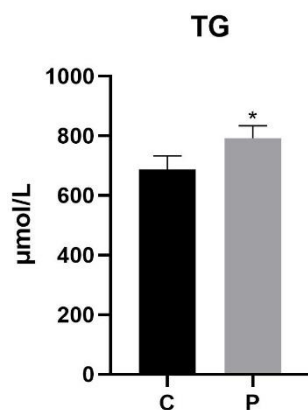


图 3.3 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏中 TG 的变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.3 Changes of TG in the liver of mice after PM_{2.5} exposure. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.1.1.4 小结

通过 PM_{2.5} 暴露后对小鼠体重和其外周血中相关指标的测定分析, 本研究发现 PM_{2.5} 暴露会使小鼠体重升高, 肝脏中甘油三脂以及组织细胞中脂质堆积, 导致小鼠肥胖。

3.1.2 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群变化

为了系统的研究 PM_{2.5} 对小鼠肠道菌群的影响, 本研究借助 16S RDNA 测序观察两组小鼠肠道菌群的变化。

3.1.2.1 PM_{2.5} 暴露后肠道菌群物种相对丰富度变化

如图 3.4 所示, PM_{2.5} 暴露四周后暴露组小鼠肠道菌群中拟杆菌门相对占比减少, 厚壁菌门相对占比增加, 而对照组小鼠肠道菌群中拟杆菌门和厚壁菌门相对占比无显著性变化。

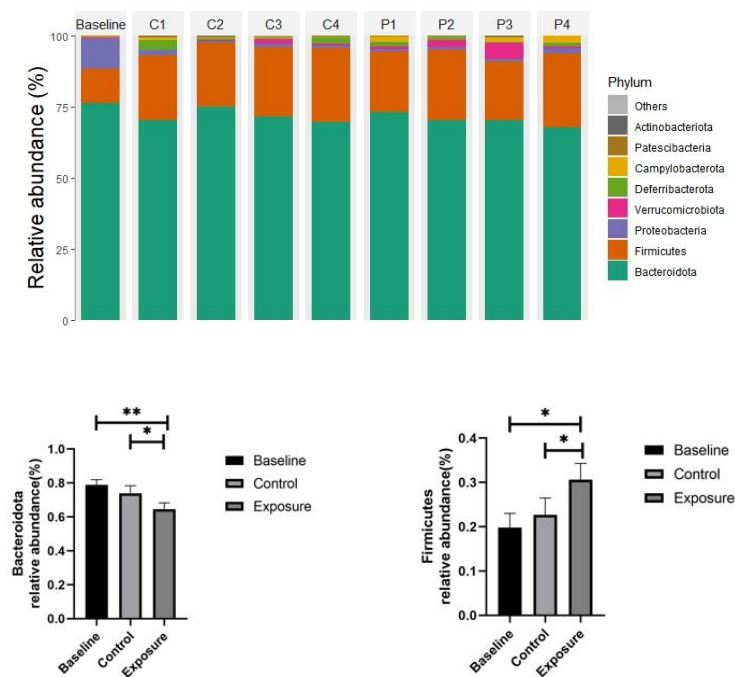


图 3.4 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群物种相对丰富度变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.4 Changes in relative abundance of intestinal flora in mice after exposure to PM_{2.5}. * $P < 0.05$,

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.1.2.2 PM_{2.5} 暴露后肠道菌群 α 多样性变化

如图 3.5 的结果所示, 虽然 PM_{2.5} 暴露后暴露组小鼠的肠道菌群 α 多样性与对照组相比无明显差异, 但是暴露组小鼠的肠道菌群 α 多样性相比于对照组小鼠存在差异($P=0.24$)。

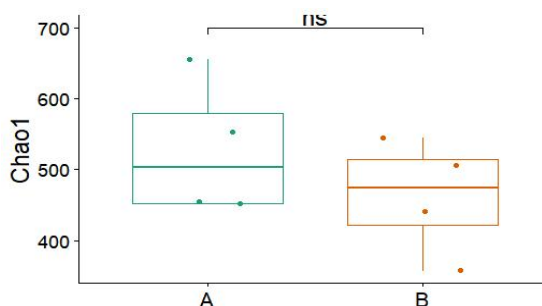


图 3.5 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群 α 多样性变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.5 Changes in α -diversity of intestinal flora in mice after PM_{2.5} exposure. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.1.2.3 PM_{2.5} 暴露后肠道菌群 β 多样性变化

如图 3.6 的结果所示, 虽然 PM_{2.5} 暴露后暴露组小鼠的肠道菌群 β 多样性与对照组相比无明显差异, 但是暴露组小鼠的肠道菌群 β 多样性相比于对照组小鼠存在差异($P=0.06$), 并且在主坐标分析 (PCoA 分析) 上只存在少部分交集。

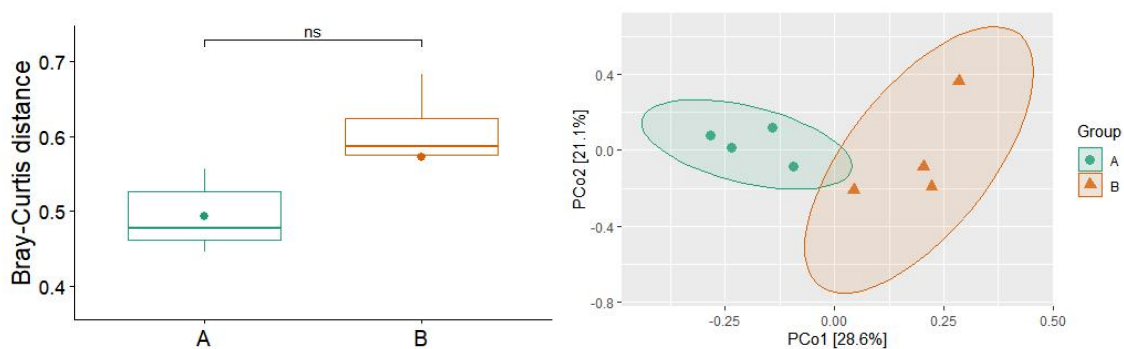


图 3.6 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群 β 多样性变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.6 Changes in beta diversity of intestinal flora in mice after PM_{2.5} exposure. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.1.2.4 PM_{2.5} 暴露后肠道菌群数量相对变化

观察图 3.7 的结果，发现 PM_{2.5} 暴露后暴露组（B）小鼠的肠道菌群数量相比对照组（A）明显减少了。

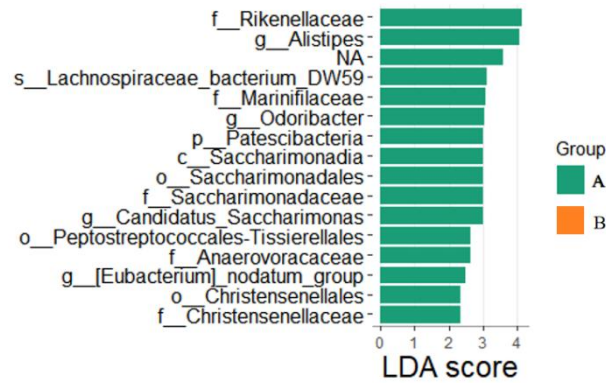


图 3.7 PM_{2.5} 暴露后对照组与暴露组小鼠肠道菌群数量的相对变化.

Figure 3.7 Relative changes in intestinal flora populations of control and exposed mice after PM_{2.5} exposure.

3.1.2.5 小结

通过颗粒物暴露模型的 16S rDNA 测序的结果分析，本研究发现 PM_{2.5} 暴露会诱导小鼠的肠道菌群相对物种丰度，相对菌群数量以及 α 和 β 多样性发生变化。这些结果进一步说明了 PM_{2.5} 暴露可能会导致小鼠肠道菌群发生紊乱。

3.1.3 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏脂质代谢的变化

为了系统的研究 PM_{2.5} 对小鼠肝脏脂质代谢的影响，本研究借助肝组织病理学观察、RT-PCR 和 Western blot 来研究两组小鼠肝脏脂质代谢的变化。

3.1.3.1 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝组织病理学变化

为了系统的研究 PM_{2.5} 对小鼠肝脏的影响，本研究借助 HE 染色观察两组小鼠肝脏的病理变化。如下图 3.8 结果显示，对照组小鼠肝脏未见明显组织病变异常。PM_{2.5} 暴露后的小鼠（P），其肝细胞间隙变大，同时可以观察到肝细胞胞浆内含有大小不等的小脂滴空泡，细胞核被挤到细胞一边，疑似存在肝脂肪变性。以上结果表明，PM_{2.5} 进入呼

吸系统后可诱导小鼠肝细胞密度变小, 并且长时间 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露小鼠肝脏出现脂滴空泡发生脂肪变性。

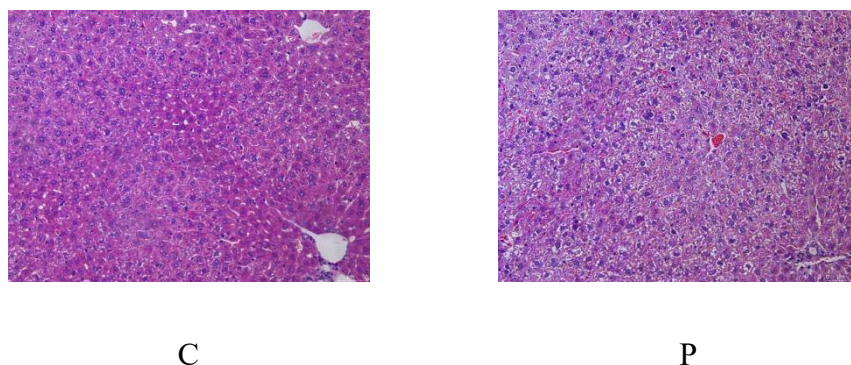


图 3.8 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后小鼠的肝组织切片染色.

Figure 3.8 Liver tissue section staining in $\text{PM}_{2.5}$ -exposed mice.

3.1.3.2 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后肝脏脂质代谢基因表达水平变化

(1) $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后脂质氧化相关基因的表达变化

本研究主要测定了肝脏中主要调控脂肪酸氧化的因子过氧化物酶体增植物激活受体 α ($\text{PPAR}\alpha$) 以及主要调节脂肪酸 β 氧化途径中的一些酶类如酰基辅酶 A 氧化酶 1 (ACOX1), 肉碱棕榈酰转移酶 1A (CPT1A) 等。如图 3.9 所示, $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后小鼠肝脏中 ACOX1 表达水平显著升高, $\text{PPAR}\alpha$ 的表达水平呈上调趋势 ($P=0.06$)。

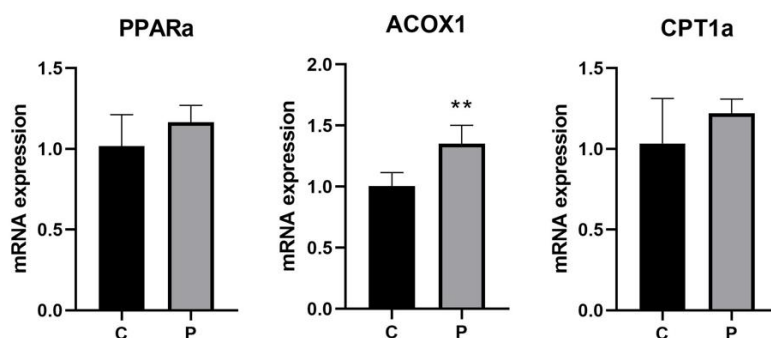


图 3.9 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后小鼠的肝脏脂质氧化相关因子的基因表达水平变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.9 Changes in gene expression levels of hepatic lipid oxidation-related factors in mice after $\text{PM}_{2.5}$ exposure. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(2) $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后脂质合成相关基因的表达变化

关于 PM_{2.5} 对肝脏的脂质合成影响分析, 本研究中主要测定了一些肝脏主要调控脂质合成的因子如甾醇调节元件结合蛋白 1(*Srebp1*), 脂肪酸合成酶(*Fasn*), 乙酰辅酶 A 羧化酶 1(*ACC1*), 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(*SCD1*)等。其结果如图 3.10 所示, PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏中 *Srebp1*, *Fasn*, *ACC1* 等因子表达水平显著升高。

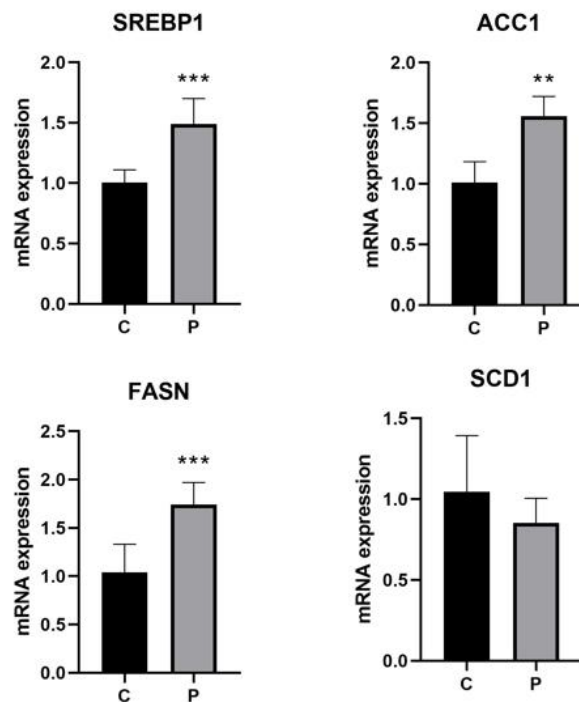


图 3.10 PM_{2.5} 暴露后小鼠的肝脏脂质合成相关因子的基因表达水平变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.10 Changes in gene expression levels of hepatic lipid synthesis-related factors in mice after PM_{2.5} exposure. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(3) PM_{2.5} 暴露后脂质分解相关基因的表达变化

关于 PM_{2.5} 对肝脏的脂质分解影响分析, 本研究中主要测定了一些肝脏主要调控脂质分解的因子如脂肪甘油三酯脂肪酶 (*ATGL*) 和激素敏感性甘油三酯脂肪酶 (*HSL*) 等。其结果如图 3.11 所示, PM_{2.5} 暴露后暴露组小鼠肝脏中脂质分解相关因子的表达水平与对照组无明显差异。

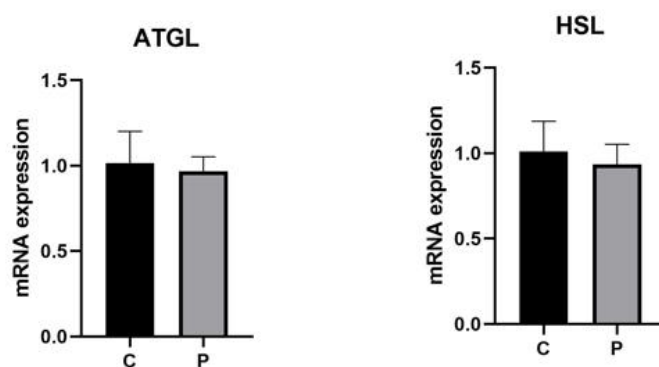


图 3.11 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后小鼠的肝脏脂质分解相关因子的基因表达水平变化. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

Figure 3.11 Changes in gene expression levels of hepatic lipolysis-related factors in mice after $\text{PM}_{2.5}$ exposure. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

3.1.3.3 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后小鼠的肝脏脂质代谢蛋白表达水平变化

为了进一步验证上述基因水平变化的结果，并考虑到 $\text{PPAR}\alpha$ 在脂质代谢中的诸多作用，其中包括脂肪酸的氧化和合成、胆固醇的代谢以及脂肪细胞分化。在本研究采用了 western blot 检测了肝脏中 $\text{PPAR}\alpha$ 的蛋白表达水平变化。如图 3.12 的结果所示， $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后小鼠肝脏中 $\text{PPAR}\alpha$ 蛋白表达水平显著升高。

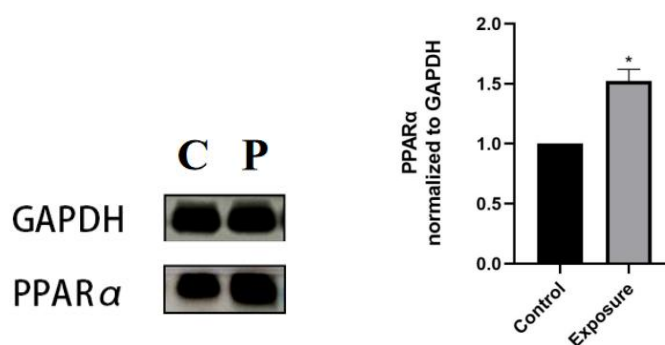


图 3.12 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后小鼠的肝脏 $\text{PPAR}\alpha$ 的蛋白表达水平变化. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

Figure 3.12 Changes in protein expression levels of hepatic $\text{PPAR}\alpha$ in mice after $\text{PM}_{2.5}$ exposure. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

3.1.3.4 小结

通过颗粒物暴露模型的 RT-PCR 和 western blot 的结果分析,我们发现 PM_{2.5} 暴露会引起小鼠肝脏脂质合成水平显著升高,脂质分解水平无明显变化,从而进一步引起脂质氧化水平升高,导致肝脏脂质代谢紊乱。

3.2 粪菌移植 (FMT) 后小鼠肠道菌群与肝脏脂质代谢水平的变化

为了验证 PM_{2.5} 暴露导致的小鼠肠道菌群变化与其肝脏脂质代谢紊乱之间的关系,本研究进行了粪菌移植验证实验。并采用化学试剂盒检测、16S rDNA 测序、肝组织病理学观察、RT-PCR 和 Western Blot 等实验方法进行了验证。

3.2.1 粪菌移植后小鼠的肠道菌群变化

通过比较实施粪菌移植后不同时间段对照菌群组 and 暴露菌群组的 16S rDNA 测序结果分析对照菌群组肠道菌群和暴露菌群组肠道菌群以及粪菌移植前小鼠肠道菌群的差异。

3.2.1.1 粪菌移植后小鼠肠道菌群的物种丰度变化

如图 3.13 所示,移植一周后,暴露菌群组 (ExposureA) 和对照菌群组 (ControlA) 中肠道菌群相对丰度无明显变化;移植两周后,暴露菌群组 (ExposureB) 中的拟杆菌门相对占比变低,厚壁菌门相对占比升高 ($p=0.09$)。而对照菌群组 (ControlB) 中的拟杆菌门和厚壁菌门相对占比无明显变化,这与 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群变化趋势一致。并且 FMT 结束后,暴露菌群组与对照菌群组小鼠的肠道菌群相对丰度存在差异。

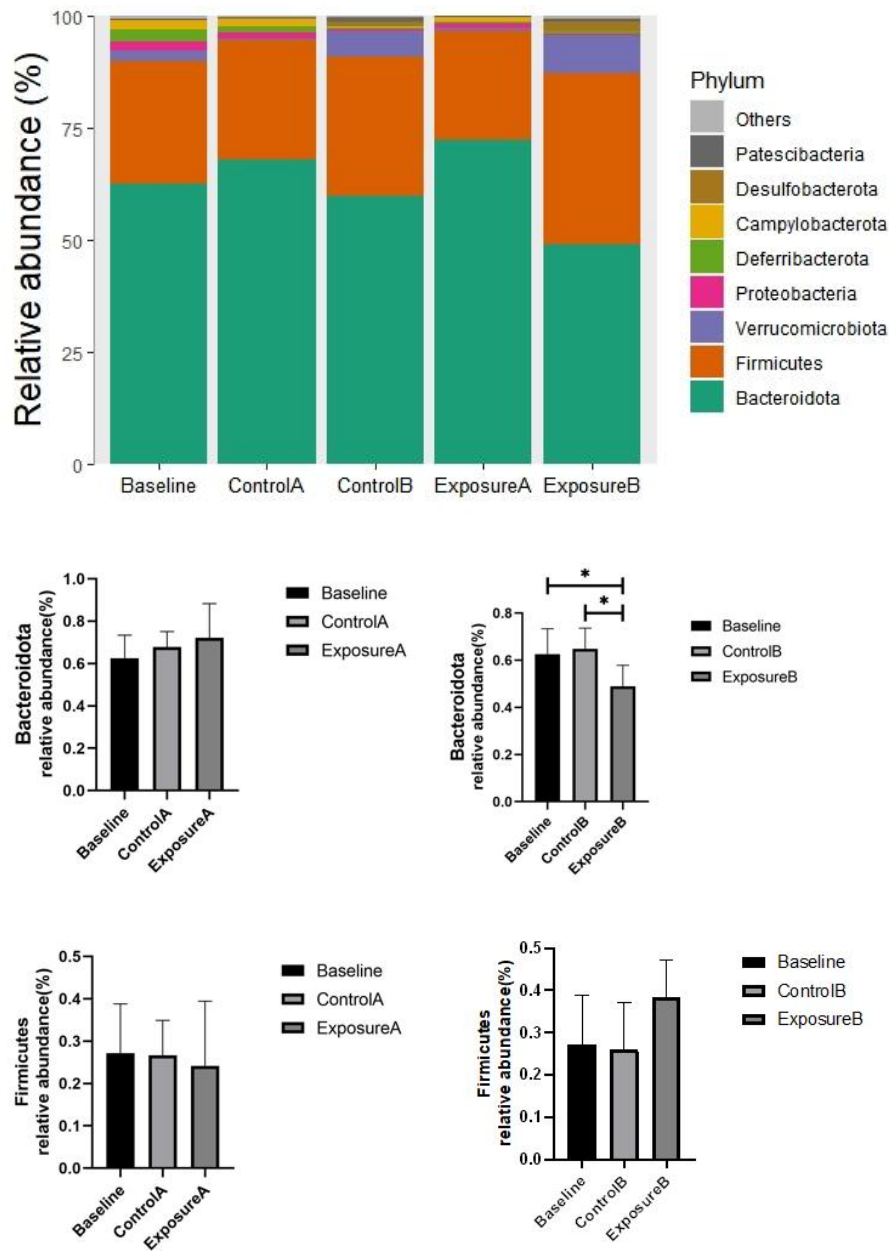


图 3.13 粪菌移植两周内肠道菌群物种丰度变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.13 Changes in intestinal flora species abundance within two weeks of fecal bacteria transplantation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.2.1.2 粪菌移植后小鼠肠道菌群 α 多样性变化

如图 3.14 所示,在粪菌移植一周后暴露菌群组(ExposureA)和对照菌群组(ControlA)

的肠道菌群 α 多样性无明显变化。而在粪菌移植两周后暴露菌群组（ExposureB）的肠道菌群 α 多样性相比于对照菌群组（ControlB）呈下降趋势（ $P=0.13$ ）。

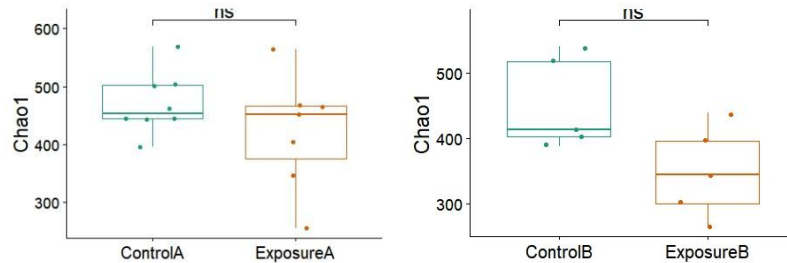


图 3.14 粪菌移植两周内肠道菌群 α 多样性变化. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

Figure 3.14 Changes in the alpha diversity of the intestinal flora within two weeks of fecal bacteria transplantation. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

3.2.1.3 粪菌移植后小鼠肠道菌群 β 多样性变化

如图 3.15 所示，在粪菌移植一周后暴露菌群组 and 对照菌群组的肠道菌群 β 多样性无明显变化。而在粪菌移植两周后暴露菌群组的肠道菌群 β 多样性相比于对照菌群组呈上升趋势（ $P=0.06$ ）。通过主坐标分析发现粪菌移植一周后暴露菌群组 and 对照菌群组的肠道菌群在主坐标分析上存在较小差异，而粪菌移植两周后暴露菌群组 and 对照菌群组的肠道菌群在主坐标分析上存在较大差异。

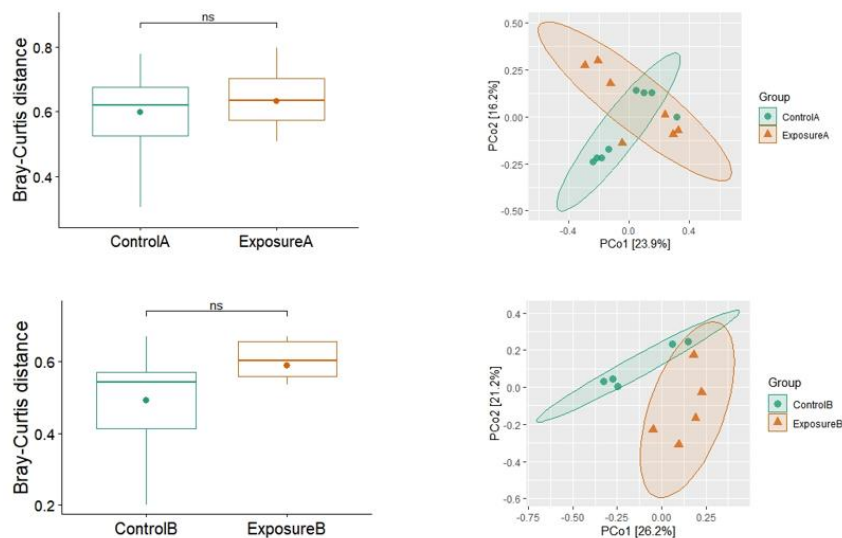


图 3.15 粪菌移植两周内肠道菌群 β 多样性变化. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

Figure 3.15 Changes in beta diversity of intestinal flora within two weeks of fecal bacteria transplantation. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

3.2.1.4 粪菌移植前后小鼠的肠道菌群功能差异分析

如图 3.16 所示, 暴露菌群组在粪菌移植后 (P.CN) 相比于未进行菌群定植前 (P.Baseline), 其小鼠的肠道菌群脂质代谢功能下调。而对照菌群组小鼠的肠道菌群 (C.CN 和 C.Baseline) 脂质代谢功能无明显变化。

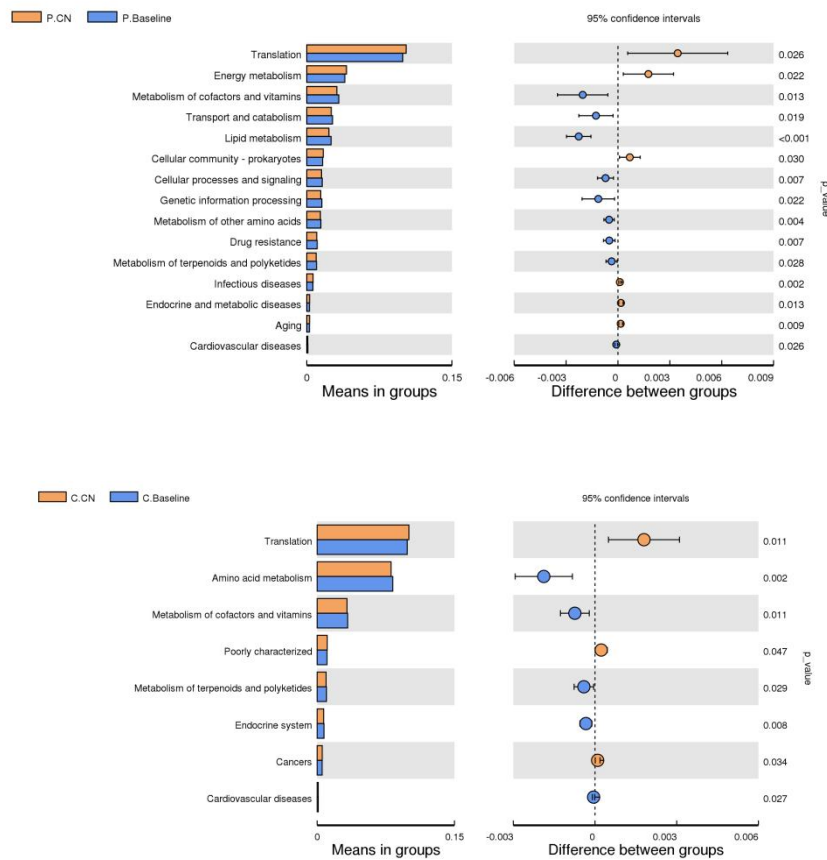


图 3.16 粪菌移植前后肠道菌群功能富集差异. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.16 Differences in functional enrichment of intestinal flora before and after fecal bacteria transplantation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.2.1.5 粪菌移植后不同组别小鼠的肠道菌群功能差异分析

如图 3.17 所示, 粪菌移植后, 暴露菌群组小鼠的肠道菌群脂质代谢功能 (P.CN) 相比于对照菌群组 (C.CN) 显著下调。

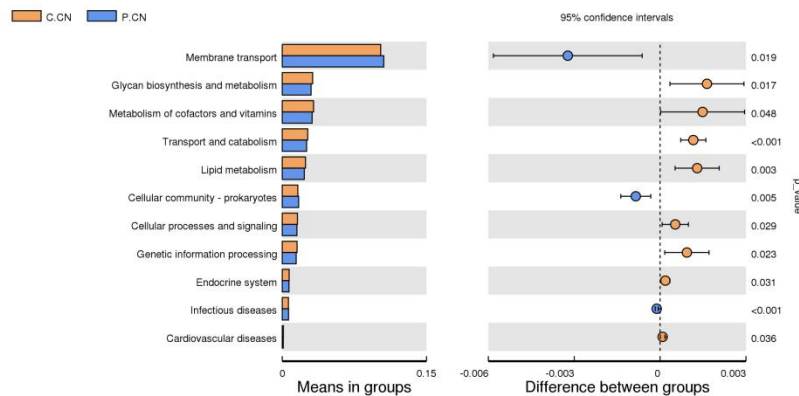


图 3.17 粪菌移植后小鼠的肠道菌群功能差异分析. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.17 Differential analysis of intestinal flora function in mice after fecal bacteria transplantation.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.2.1.6 小结

通过粪菌移植暴露模型的 16S rDNA 测序的结果分析,发现移植 PM_{2.5} 暴露后肠道菌群的小鼠其肠道菌群相对丰度, α 多样性和 β 多样性变化趋势与 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群变化趋势一致。因此我们认为粪菌移植模型构建成功。并且我们发现暴露菌群组的肠道菌群脂质代谢功能相比于对照组显著下调。

3.2.2 粪菌移植后小鼠肥胖的变化

在本研究中为了验证颗粒物暴露后的肠道菌群对小鼠肥胖的影响,本研究记录小鼠从粪菌移植开始每一周的体重大小,并用化学检测试剂盒测定了小鼠粪菌移植完成后血浆中 HDL-C 和 LDL-C 的含量。

3.2.2.1 粪菌移植后小鼠体重的变化

如图 3.18 显示,粪菌移植前,两组小鼠体重无明显差异。粪菌移植两周后暴露菌群组小鼠体重相比于对照菌群组呈上升趋势 ($P=0.069$)。这一现象说明颗粒物暴露后的肠道菌群可能会诱导小鼠肥胖。

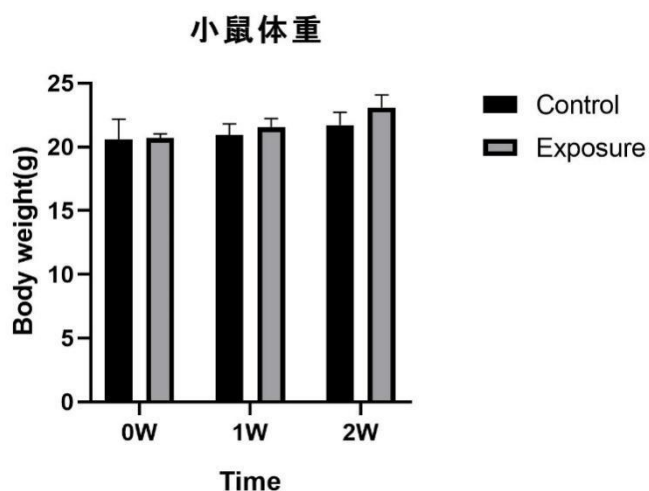


图 3.18 粪菌移植后小鼠体重变化. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

Figure 3.18 Changes in body weight of mice after fecal transplantation. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

3.2.2.2 粪菌移植后小鼠血浆中HDL-C和LDL-C含量的变化

如图 3.19 的结果显示, 粪菌移植后小鼠外周血中 HDL-C 的含量显著下降。而粪菌移植后小鼠外周血中 LDL-C 的含量呈上升趋势 ($p=0.09$), 这些结果进一步说明颗粒物暴露后的肠道菌群可能会导致其他组织中胆固醇的堆积。

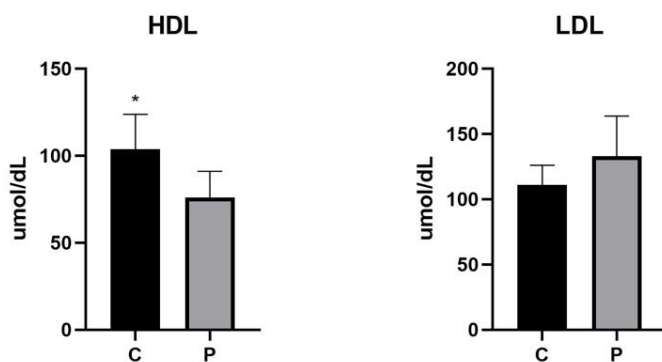


图 3.19 粪菌移植后小鼠血浆中 HDL-C 和 LDL-C 的变化. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

Figure 3.19 Changes in plasma HDL-C and LDL-C in mice after fecal bacteria transplants. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

3.2.2.3 粪菌移植后小鼠肝脏中TG含量的变化

如图 3.20 的结果显示, 粪菌移植后小鼠肝脏中 TG 的含量显著下降。这一结果进一步说明颗粒物暴露后的肠道菌群可能会导致肝脏中甘油三酯的堆积。

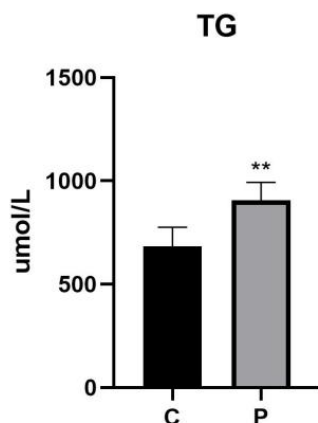


图 3.20 菌群移植后小鼠肝脏中 TG 的变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.20 Changes of TG in the liver of mice after fecal bacteria transplants. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.2.2.4 小结

通过粪菌移植后对小鼠体重和其外周血中相关指标的测定分析, 本研究发现颗粒物暴露后的肠道菌群会使小鼠体重升高以及组织细胞中脂质堆积, 导致小鼠肥胖。

3.2.3 粪菌移植后小鼠肝脏脂质代谢的变化

为了系统的研究 PM_{2.5} 对小鼠肠道菌群的影响, 本研究借助肝组织病理学观察、RT-PCR 和 Western Blot 来研究两组小鼠肝脏脂质代谢的变化。

3.2.3.1 粪菌移植后小鼠肝组织病理性变化

为了系统的研究颗粒物暴露后的肠道菌群对小鼠肝脏的影响, 本研究借助 HE 染色观察两组小鼠肝脏的病理变化。如下图 3.21 结果显示, 对照菌群组小鼠肝脏 (C) 未见明显组织病变异常。暴露菌群组的小鼠 (P), 其肝细胞间隙变大, 同时可以观察到肝细胞胞浆内含有大小不等的小脂滴空泡, 细胞核被挤到细胞一边, 疑似存在肝脂肪变性。

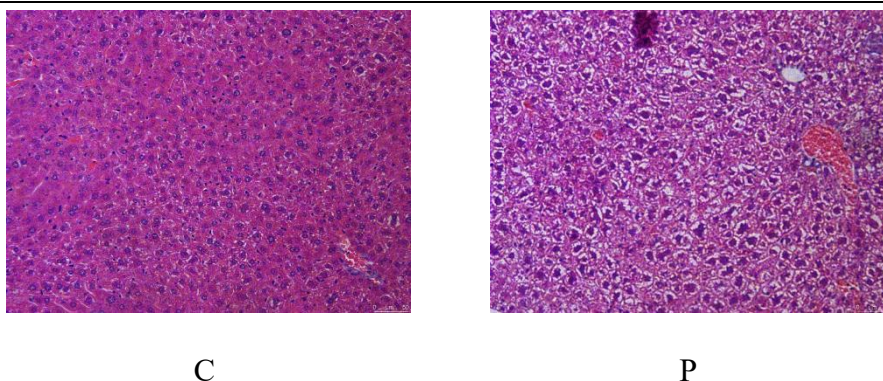


图 3.21 粪菌移植后小鼠的肝组织切片染色.

Figure 3.21 Liver tissue section staining in mice after faecal bacteria transplantation.

3.2.3.2 粪菌移植后小鼠肝脏脂质代谢基因表达水平的变化

(1) 粪菌移植后脂质氧化相关基因的表达变化

如图 3.22 所示, 粪菌移植后暴露菌群组小鼠肝脏中 *PPARα* 和 *ACOX1* 表达水平显著升高, *CPT1a* 的表达水平呈上调趋势 ($P=0.055$)。

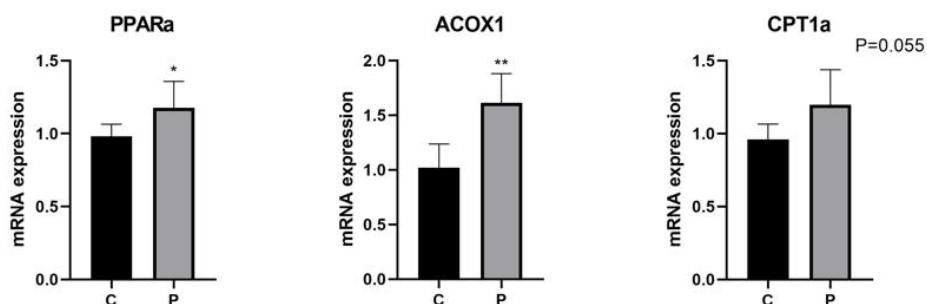


图 3.22 粪菌移植后小鼠的肝脏脂质氧化相关因子的基因表达水平变化. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.22 Changes in gene expression levels of hepatic lipid oxidation-related factors in mice after fecal bacteria transplants. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(4) 粪菌移植后脂质合成相关基因的表达变化

结果如图 3.23 所示, 粪菌移植后小鼠肝脏中 *Srebp1* 和 *Fasn* 表达水平显著升高, *ACC1* ($p=0.077$) 和 *SCD1* ($p=0.12$) 的表达水平呈上调趋势。

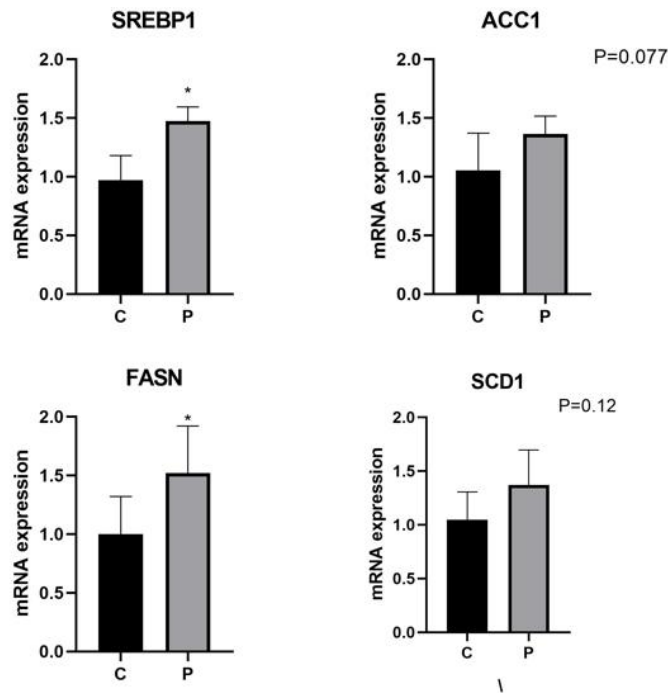


图 3.23 粪菌移植后小鼠的肝脏脂质合成相关因子的基因表达水平变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.23 Changes in gene expression levels of hepatic lipid synthesis-related factors in mice after fecal bacteria transplants. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(5) 粪菌移植后脂质分解相关基因的表达变化

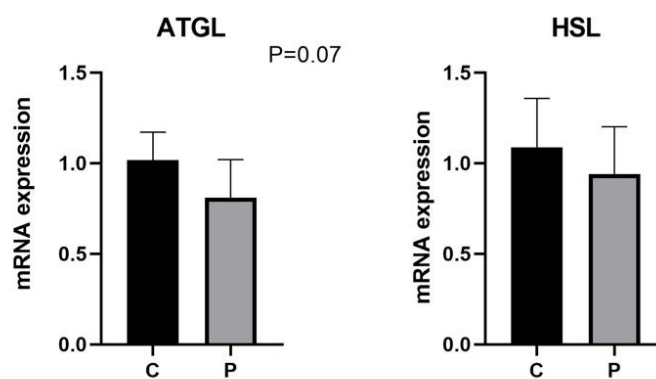


图 3.24 粪菌移植后小鼠的肝脏脂质分解相关因子的基因表达水平变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3.24 Changes in gene expression levels of hepatic lipolysis-related factors in mice after fecal bacteria transplants. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

结果如图 3.24 所示, 菌群移植后暴露菌群组小鼠肝脏中 ATGL 的表达水平呈下调趋势 ($p=0.07$), 而 HSL 的表达水平与对照菌群组无明显差异。

3.2.3.3 小结

通过粪菌移植模型的 RT-PCR 的结果分析, 暴露菌群组相比对照菌群组小鼠肝脏脂质合成和脂质氧化水平显著升高, 脂质分解水平呈下降趋势。这些结果进一步说明了颗粒物暴露后小鼠的肠道菌群会导致小鼠肝脏脂质代谢发生紊乱。

4 讨论

大气颗粒物是空气污染导致健康和环境风险增加的主要因素^[89]。已有相关研究证实大气颗粒物在影响健康方面扮演着重要角色, 其对健康的负面影响主要涉及呼吸系统疾病^[89, 90]、心血管疾病^[91-93]、肥胖症^[94-96]、神经性疾病^[9, 97]和癌症^[98-100]等。还有一些毒理学方面的研究则发现大气颗粒物能够引发炎症反应^[101]、氧化应激^[102]、遗传毒性^[103]、致突变性以及致癌性等^[104-107]。目前已有相关报道证实大气颗粒物对机体的消化系统造成一定的影响, 导致代谢障碍和肥胖^[36-38]。然而, 大气颗粒物在宿主体内对肠道菌群和脂质代谢的具体调控和作用机制仍不清楚。因此本研究的目的是探讨 PM_{2.5} 暴露对小鼠肠道菌群和脂质代谢的影响以及这两者之间的调节机理。通过构建颗粒物暴露模型和粪菌移植暴露模型, 发现 PM_{2.5} 暴露可显著上调小鼠肝脏脂质合成和脂质氧化水平, 并伴随着小鼠肠道菌群发生改变。且小鼠肠道菌群变化在小鼠肝脏脂质代谢紊乱中起关键作用。

4.1 PM_{2.5} 暴露对小鼠肠道菌群的影响

肠道微生物群被广泛认为是宿主健康的重要组成部分, 对宿主功能发挥着关键的作用。肠道微生物群的平衡与宿主健康密切相关, 不仅影响身体的新陈代谢和免疫调节, 还与一些疾病的发生和发展有关^[108]。已有相关研究表明, PM_{2.5} 可以通过黏液纤毛系统从肺部传输到肠道^[109]。因此, 最新的研究报告指出, PM_{2.5} 暴露影响了动物模型中的肠道微生物群^[110, 111]。此外, 还有报道称, 吸入 PM_{2.5} 三周会改变 C57BL/6 小鼠的肠道组成和肠道微生物多样性^[112]。本研究将 PM_{2.5} 暴露四周后的小鼠盲肠内容物进行 16S rDNA 测序, 共鉴定出 8 个常见细菌门, 包括拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、脱铁杆菌门、髌骨菌门、热脱硫杆菌门和疣微菌门, 并且发现暴露组和对照组小鼠肠道微生物群中拟杆菌门和厚壁菌门为主要菌门, 其次是变形菌门, 这一结果与之前的研究结果一致^[113, 114]。Wang 等人报道, 暴露于环境中的 PM_{2.5} 会导致肠道生态失调, 这与粪便细菌 Chao 值降低相关^[115]。因此本研究对暴露组和对照组的肠道微生物 OTUs 物种注释结果进行了层次聚类分析, 发现暴露组小鼠肠道微生物中拟杆菌门微生物相比于对照组小鼠相对丰度降低, 而厚壁菌门微生物相对丰度升高。许多现有的出版物报道了肠道中两种优势门共生关系的比例 (>90%), 拟杆菌门/厚壁菌门的比例变化与肠道生态失调有关^[116]。在本研究中 PM_{2.5} 暴露后小鼠体重显著升高。一些相关的动物模型研究发现, 拟杆菌门/厚壁菌门的比例的下降被广泛认为与肥胖呈正相关^[117, 118]。有相关研究提出, 肥胖与厚壁菌门的增加和拟杆菌门的减少有关, 因为厚壁菌门细菌的能量提取效率高于拟杆菌门, 从而促进了卡路里的吸收, 然后增加了体重^[119, 120]。肥胖菌群的说法正好解释了 PM_{2.5} 暴露后小鼠体重变化趋势与肠道菌群中拟杆菌门和厚壁菌门细菌的变化趋势存在相关。通过肠道菌群多样性分析发现暴露于 PM_{2.5} 小鼠的肠道菌群 Alpha 多样性和 Beta 多样性相比于对

照组, 其肠道菌群 Alpha 多样性呈下降趋势, Beta 多样性呈上调趋势。由于 Alpha 多样性和 Beta 多样性通常用于分别描述相同空间位点的多样性和不同不同空间位点之间的多样性^[121], 并且这些变化可能会影响微生物的功能模块。通过 PCA 分析, 发现暴露组小鼠肠道微生物和对照组微生物在空间分布上仅存在较小交集。尽管这些结果没有统计学意义, PM_{2.5} 暴露也显著改变了整个肠道菌群的相对组成, 使一些细菌类群优于其他细菌。

4.2 PM_{2.5} 暴露对小鼠肝脏脂质代谢的影响

新出现的证据表明, 空气污染的有害影响, 特别是 PM_{2.5} 与代谢紊乱, 包括胰岛素抵抗、脂质积累和高血糖^[122-124]。由于肝脏在调节物质代谢中的关键作用, 肝脏被广泛用于探索代谢稳态的靶点。非酒精性脂肪肝是最常见的肝脏改变, 其以脂质积累为特征, 与代谢综合征密切相关^[125]。这些与肝脏脂质积累有关的健康问题已严重威胁到公众健康。为了进一步了解 PM_{2.5} 对肝脏脂质代谢的影响, 本研究首先测定了 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏脂质合成相关基因 Srebp1, FASN, ACC1 和 SCD1 的表达水平。Srebp1 是一种位于内质网的细胞内胆固醇传感器, 为胆固醇调节提供反馈。Srebp1 参与调控 FASN、ACC1 和 SCD1 的表达^[126, 127]。FASN 是脂肪酸从头合成的关键酶^[128]。ACC1 是脂肪从头生成(DNL)过程中的第一个限速酶, 在脂肪酸合成中起着重要作用^[129]。SCD1 是一种限速酶, 可以催化单饱和脂肪酸的合成^[130]。本研究的结果显示 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏中 Srebp1, Fasn, ACC1 等因子表达水平显著升高, 而 SCD1 无明显变化。这一结果表明, PM_{2.5} 暴露会诱导小鼠肝脏脂质合成。

为了了解 PM_{2.5} 暴露是否会导致肝脏脂质代谢紊乱, 而脂质代谢功能的正常是由脂肪生成和脂肪分解的平衡决定的。因此本研究后续测定了 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏脂质分解相关基因 ATGL、HSL 和脂质氧化基因 PPAR α 、ACOX1、CPT1A 的表达水平。脂类分解是指在细胞脂滴中储存的三酰基甘油发生连续水解的过程, 在脂类代谢中具有重要作用^[131]。ATGL 和 HSL 脂肪酶被认为是脂解的主要调节因子^[132]。ATGL 是催化脂解的第一步, 将三酯甘油分解成为脂肪酸和二酰基甘油。激酶 HSL 水解二酰基甘油生成单酰基甘油和游离脂肪酸(FFAs), 其主要受 ATGL 的控制^[133, 134]。三酯甘油水解产生的脂肪酸主要进行 β -氧化代谢, 此过程主要发生在线粒体和过氧化物酶体内^[135]。这些脂肪酸氧化途径中的几个关键酶受 PPAR 调控。线粒体内脂肪酸氧化的程度受 CPT1 调节, 而 ACOX1 是一种限速酶, 它通过催化过氧化物酶体脂肪酸氧化的起始步骤来主要调控过氧化物酶体脂肪酸的氧化^[136]。在本研究, 发现 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝脏中脂质分解相关基因 ATGL 和 HSL 表达水平无明显变化, 脂质氧化相关基因 ACOX1 表达水平显著性上调, PPAR α 的表达水平呈上调趋势 ($P=0.06$)。这些结果显示, PM_{2.5} 暴露会诱导小鼠肝脏脂质氧化, 而对肝脏脂质分解无明显改变。脂质代谢的平衡主要受脂质合成和脂质分解的调控,

PM_{2.5} 暴露会引起小鼠肝脏内脂质合成表达上升而脂质分解水平无明显变化, 说明 PM_{2.5} 暴露会引起小鼠肝脏脂质代谢紊乱。而脂质氧化相关因子表达的上调我们推测可能是机体为了维持肝脏脂质代谢稳态将脂质的增量部分氧化分解做出的调节。

为了验证 PM_{2.5} 暴露导致小鼠肝脏脂质代谢紊乱最终是否会导致小鼠肝脏脂质堆积, 本研究又测定了 PM_{2.5} 暴露后小鼠血浆中 HDL-C 和 LDL-C 以及小鼠肝脏中 TG 的含量, 并分析了肝脏组织切片 HE 染色结果。HDL-C 的主要作用是将组织细胞的胆固醇经过血液转运至肝脏组织, 促进肝脏细胞中胆固醇的积累, LDL-C 主要作用是将肝脏组织的胆固醇经过血液转运至其他组织, 促进组织细胞中胆固醇的积累^[137]。肝脏中 TG 含量和通量的增加部分反映了代谢功能障碍并且肝脏 TG 含量超载, 会导致脂肪酸 β 氧化水平升高^[78]。组织切片结果显示 PM_{2.5} 暴露后小鼠肝内含有大小不等的小脂滴空泡, 细胞核被挤到细胞一边, 肝脏疑似存在肝脂肪变性, 检测结果显示 PM_{2.5} 暴露后小鼠血浆中 HDL-C 含量显著降低, LDL-C 含量显著升高, 肝脏中 TG 含量显著升高。这些结果表明, PM_{2.5} 暴露会引起肝脏脂质代谢紊乱导致小鼠肝脏脂质堆积发生脂肪变性, 并引起血浆中 HDL-C 和 LDL-C 改变, 将肝脏堆积的脂肪转运至其他组织引起肥胖。

4.3 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群的变化对肝脏脂质代谢的影响

一些研究发现, 针对肠道微生物群的治疗可以改善人类代谢功能。此外, 研究还发现, 从肥胖、脂肪变性或 2 型糖尿病患者植入的粪便微生物群可以在小鼠受体中部分复制供体的代谢表型^[119, 138-140]。因此本研究采取灌肠的方式将 PM_{2.5} 暴露后的小鼠肠道菌群移植到一批未经任何处理的小鼠中, 来研究 PM_{2.5} 暴露后的小鼠肠道菌群对肝脏脂质代谢的影响。通过分析菌群移植前后小鼠粪便 16S rDNA 测序结果, 发现菌群移植一周后, 暴露菌群组小鼠肠道微生物中拟杆菌门与厚壁菌门相对丰度均无明显变化, 并且小鼠肠道菌群 Alpha 多样性和 Beta 多样性也未发生显著改变。而菌群移植两周后, 发现暴露菌群组相比于对照菌群组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性存在下降趋势, Beta 多样性存在升高趋势, 而且暴露菌群组小鼠肠道微生物相对丰度相比对照菌群组, 其拟杆菌门相对占比显著减少, 厚壁菌门相对占比呈上升趋势。这些变化与 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群的变化大致相似, 因此本研究判断粪菌移植模型构建成功。随后通过肠道菌群功能 GO 分析, 分析结果发现暴露菌群组小鼠肠道菌群在菌群移植后脂质代谢功能显著下调, 而对照菌群组小鼠肠道菌群在脂质代谢功能上无明显变化, 且暴露菌群组小鼠肠道菌群脂质代谢功能相比于对照菌群组仍显著降低。为了进一步验证 PM_{2.5} 暴露后小鼠肠道菌群的变化对脂质代谢的影响, 本研究对菌群移植后小鼠肝脏进行了切片 HE 染色, 并检测了肝脏脂质代谢相关指标和外周血脂质含量。检测结果表明, 暴露菌群组相比于对照菌群组小鼠肝脏脂质合成基因 Srebp1 和 FASN 显著上调, 脂质分解基因 ATGL 有一定下调趋势, 脂质氧化基因 PPAR α 和 ACOX1 显著上调。并且与对照菌群组相比, 暴露菌群组小鼠肝

脏中 TG 含量显著增加，血浆中 HDL-C 含量显著减少。HE 染色结果也表明，暴露菌群组小鼠肝脏存在一定的脂肪变性。这些结果表明 PM_{2.5} 暴露后小鼠的肠道菌群会引起小鼠肝脏脂质代谢紊乱并导致肥胖。

本研究的研究结果表明，PM_{2.5} 暴露会使小鼠肠道菌群中拟杆菌门/厚壁菌门的比例失衡，物种多样性下降，进一步导致肝脏内脂质合成因子和脂质氧化因子表达上调引起脂质代谢紊乱，最终导致小鼠肝脏脂质含量增加引起肥胖。

5 结论

该研究以 C57BL/6 小鼠作为研究材料，通过颗粒物暴露模型和粪菌移植模型，并从 16S rDNA 测序以及基因表达和蛋白表达水平探究 PM_{2.5} 暴露对肠道菌群和脂质代谢的影响以及 PM_{2.5} 暴露后肠道菌群和脂质代谢之间的调控机理。所得结论如下：

PM_{2.5} 暴露通过引起小鼠肠道菌群中拟杆菌门/厚壁菌门的比例失衡、物种多样性下降，导致肠道菌群紊乱；这一结果可能会间接引起小鼠肝脏脂质合成水平升高，进而导致肝脏和血浆脂质含量增加，引起肝脏脂质氧化水平升高，从而使得小鼠体重增加。

参考文献

- [1] WORLD HEALTH O. World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals [M]. Geneva: World Health Organization, 2022.
- [2] VINCENT R, BJARNASON S G, ADAMSON I Y, et al. Acute pulmonary toxicity of urban particulate matter and ozone [J]. The American journal of pathology, 1997, 151(6): 1563-70.
- [3] HILL W, LIM E L, WEEDEN C E, et al. Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants [J]. Nature, 2023, 616(7955): 159-67.
- [4] FOROUZANFAR M H, ALEXANDER L, ANDERSON H R, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2015, 386(10010): 2287-323.
- [5] BROOK R D, RAJAGOPALAN S, POPE C A, 3RD, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association [J]. Circulation, 2010, 121(21): 2331-78.
- [6] WEI Y, ZHANG J J, LI Z, et al. Chronic exposure to air pollution particles increases the risk of obesity and metabolic syndrome: findings from a natural experiment in Beijing [J]. FASEB Journal, 2016, 30(6): 2115-22.
- [7] YANG B Y, GUO Y, MARKEVYCH I, et al. Association of Long-term Exposure to Ambient Air Pollutants With Risk Factors for Cardiovascular Disease in China [J]. JAMA network open, 2019, 2(3): e190318.
- [8] THIANKHAW K, CHATTIPAKORN N, CHATTIPAKORN S C. PM2.5 exposure in association with AD-related neuropathology and cognitive outcomes [J]. Environmental Pollution, 2022, 292(Pt A): 118320.
- [9] SHOU Y, HUANG Y, ZHU X, et al. A review of the possible associations between ambient PM2.5 exposures and the development of Alzheimer's disease [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 174: 344-52.
- [10] WANG J, MA T, MA D, et al. The Impact of Air Pollution on Neurodegenerative Diseases [J]. Therapeutic drug monitoring, 2021, 43(1): 69-78.
- [11] FENG J, CAVALLERO S, HSIAT T, et al. Impact of air pollution on intestinal redox lipidome and microbiome [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 151: 99-110.
- [12] BAILEY M J, NAIK N N, WILD L E, et al. Exposure to air pollutants and the gut microbiota: a potential link between exposure, obesity, and type 2 diabetes [J]. Gut microbes, 2020, 11(5): 1188-202.
- [13] Estimates, trends, and drivers of the global burden of type 2 diabetes attributable to PM(2·5) air pollution, 1990-2019: an analysis of data from the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. The Lancet Planetary health, 2022, 6(7): e586-e600.
- [14] QIU H, TIAN L W, PUN V C, et al. Coarse particulate matter associated with increased risk of

- emergency hospital admissions for pneumonia in Hong Kong [J]. *Thorax*, 2014, 69(11): 1027-33.
- [15] WANG G, JIANG R, ZHAO Z, et al. Effects of ozone and fine particulate matter (PM(2.5)) on rat system inflammation and cardiac function [J]. *Toxicology letters*, 2013, 217(1): 23-33.
- [16] WU S, DENG F, HAO Y, et al. Chemical constituents of fine particulate air pollution and pulmonary function in healthy adults: the Healthy Volunteer Natural Relocation study [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 260: 183-91.
- [17] HABERZETTL P, LEE J, DUGGINENI D, et al. Exposure to ambient air fine particulate matter prevents VEGF-induced mobilization of endothelial progenitor cells from the bone marrow [J]. *Environmental health perspectives*, 2012, 120(6): 848-56.
- [18] PSOTER K J, DE ROOS A J, MAYER J D, et al. Fine particulate matter exposure and initial *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in cystic fibrosis [J]. *Annals of the American Thoracic Society*, 2015, 12(3): 385-91.
- [19] SUGIYAMA T, UEDA K, SEPOSO X T, et al. Health effects of PM(2.5) sources on children's allergic and respiratory symptoms in Fukuoka, Japan [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 709: 136023.
- [20] ZHANG Y, DING Z, XIANG Q, et al. Short-term effects of ambient PM(1) and PM(2.5) air pollution on hospital admission for respiratory diseases: Case-crossover evidence from Shenzhen, China [J]. *International journal of hygiene and environmental health*, 2020, 224: 113418.
- [21] LI J, LU X, LIU F, et al. Chronic Effects of High Fine Particulate Matter Exposure on Lung Cancer in China [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2020, 202(11): 1551-9.
- [22] 徐贞贞, 张志红, 马晓燕, 等. PM_{2.5}通过氧化应激对人支气管上皮细胞 JAK/STAT 信号通路的影响[J]. *卫生研究*, 2015, 44(03): 451-455.
- [23] WANG Y, ZHONG Y, LIAO J, et al. PM_{2.5}-related cell death patterns [J]. *International journal of medical sciences*, 2021, 18(4): 1024-9.
- [24] ZHAO C, PU W, WAZIR J, et al. Long-term exposure to PM_{2.5} aggravates pulmonary fibrosis and acute lung injury by disrupting Nrf2-mediated antioxidant function [J]. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 2022, 313: 120017.
- [25] YANG J, CHEN Y, YU Z, et al. The influence of PM(2.5) on lung injury and cytokines in mice [J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2019, 18(4): 2503-11.
- [26] ZAISS D M W, GAUSE W C, OSBORNE L C, et al. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair [J]. *Immunity*, 2015, 42(2): 216-26.
- [27] 孙凤霞, 先兆娟, 韦丽, 等. 南京市大气 PM_{2.5} 污染控制对循环系统疾病的健康收益评估 [J]. *现代预防医学*. 2023: 1970-4+2002.
- [28] HAYES R B, LIM C, ZHANG Y, et al. PM_{2.5} air pollution and cause-specific cardiovascular disease mortality [J]. *International journal of epidemiology*, 2020, 49(1): 25-35.
- [29] LIU C, CHEN R, SERA F, et al. Ambient Particulate Air Pollution and Daily Mortality in 652 Cities [J]. *The New England journal of medicine*, 2019, 381(8): 705-15.
- [30] YING Z, XU X, BAI Y, et al. Long-term exposure to concentrated ambient PM_{2.5} increases mouse

- blood pressure through abnormal activation of the sympathetic nervous system: a role for hypothalamic inflammation [J]. *Environmental health perspectives*, 2014, 122(1): 79-86.
- [31] LEE H, KIM J H, KIM M, et al. Cumulative exposure amount of PM(2.5) in the ambient air is associated with coronary atherosclerosis - Serial coronary CT angiography study [J]. *Journal of cardiovascular computed tomography*, 2022, 16(3): 230-8.
- [32] YUE W, TONG L, LIU X, et al. Short term Pm2.5 exposure caused a robust lung inflammation, vascular remodeling, and exacerbated transition from left ventricular failure to right ventricular hypertrophy [J]. *Redox biology*, 2019, 22: 101161.
- [33] 李慧敏, 王健, 卢银忠, 等. PM2.5 对中枢神经系统功能及脂质代谢紊乱的影响 [J] *环境与职业医学*. 2020: 1022-9.
- [34] YANG L, WAN W, YU C, et al. Associations between PM(2.5) exposure and Alzheimer's Disease prevalence Among elderly in eastern China [J]. *Environmental health : a global access science source*, 2022, 21(1): 119.
- [35] ZHANG H, WANG Q, HE S, et al. Ambient air pollution and gestational diabetes mellitus: A review of evidence from biological mechanisms to population epidemiology [J]. *The Science of the total environment*, 2020, 719: 137349.
- [36] FENG S, GAO D, LIAO F, et al. The health effects of ambient PM2.5 and potential mechanisms [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2016, 128: 67-74.
- [37] LI J, HU Y, LIU L, et al. PM2.5 exposure perturbs lung microbiome and its metabolic profile in mice [J]. *The Science of the total environment*, 2020, 721: 137432.
- [38] ZHAO L, FANG J, TANG S, et al. PM2.5 and Serum Metabolome and Insulin Resistance, Potential Mediation by the Gut Microbiome: A Population-Based Panel Study of Older Adults in China [J]. *Environmental health perspectives*, 2022, 130(2): 27007.
- [39] HE Z, ZHANG H, SONG Y, et al. Exposure to ambient fine particulate matter impedes the function of spleen in the mouse metabolism of high-fat diet [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 423(Pt B): 127129.
- [40] LONGHIN E, HOLME J A, GUTZKOW K B, et al. Cell cycle alterations induced by urban PM2.5 in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10: 63.
- [41] CHEN S, CHEN L, YE L, et al. PP2A-mTOR-p70S6K/4E-BP1 axis regulates M1 polarization of pulmonary macrophages and promotes ambient particulate matter induced mouse lung injury [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 424(Pt C): 127624.
- [42] REN F, JI C, HUANG Y, et al. AHR-mediated ROS production contributes to the cardiac developmental toxicity of PM2.5 in zebrafish embryos [J]. *The Science of the total environment*, 2020, 719: 135097.
- [43] GUALTIERI M, LONGHIN E, MATTIOLI M, et al. Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5 [J]. *Toxicology letters*, 2012, 209(2): 136-45.
- [44] CORSINI E, BUDELLO S, MARABINI L, et al. Comparison of wood smoke PM2.5 obtained from

- the combustion of FIR and beech pellets on inflammation and DNA damage in A549 and THP-1 human cell lines [J]. Archives of toxicology, 2013, 87(12): 2187-99.
- [45] ABBAS I, SAINT-GEORGES F, BILLET S, et al. Air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model [J]. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA, 2009, 23(1): 37-46.
- [46] DANG A T, MARSLAND B J. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis [J]. Mucosal immunology, 2019, 12(4): 843-50.
- [47] BIRD A R, CONLON M A, CHRISTOPHERSEN C T, et al. Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics [J]. 2010, 1(4): 423-31.
- [48] VIAUD S, SACCHERI F, MIGNOT G, et al. The Intestinal Microbiota Modulates the Anticancer Immune Effects of Cyclophosphamide [J]. Science, 2013, 342(6161): 971-6.
- [49] PEDERSEN R, ANDERSEN A D, MøLBAK L, et al. Changes in the gut microbiota of cloned and non-cloned control pigs during development of obesity: gut microbiota during development of obesity in cloned pigs [J]. 2013, 13(1): 1-9.
- [50] LEY R E, BACKHED F, TURNBAUGH P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. 2005, 102(31): 11070-5.
- [51] DELZENNE N M, CANI P D, EVERARD A, et al. Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2015, 58(10): 2206-17.
- [52] LEY R E, HAMADY M, LOZUPONE C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes [J]. 2008, (5883).
- [53] MUEGGE B D, KUCZYNSKI J, KNIGHTS D, et al. Diet Drives Convergence in Gut Microbiome Functions Across Mammalian Phylogeny and Within Humans [J]. 2011, 332(6032): 970.
- [54] SCOTT, K. P, GRATZ, et al. The influence of diet on the gut microbiota [J]. 2013.
- [55] KAPLAN G G, DIXON E, PANACCIONE R, et al. Effect of ambient air pollution on the incidence of appendicitis [J]. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne, 2009, 181(9): 591-7.
- [56] ANANTHAKRISHNAN A N, MCGINLEY E L, BINION D G, et al. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis [J]. Inflammatory bowel diseases, 2011, 17(5): 1138-45.
- [57] LÓPEZ-ABENTE G, GARCÍA-PÉREZ J, FERNÁNDEZ-NAVARRO P, et al. Colorectal cancer mortality and industrial pollution in Spain [J]. BMC public health, 2012, 12: 589.
- [58] APTE J S, MARSHALL J D, COHEN A J, et al. Addressing Global Mortality from Ambient PM_{2.5} [J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(13): 8057-66.
- [59] LI R, YANG J, SAFFARI A, et al. Ambient Ultrafine Particle Ingestion Alters Gut Microbiota in Association with Increased Atherogenic Lipid Metabolites [J]. Scientific reports, 2017, 7: 42906.
- [60] VALACCHI G, MAGNANI N, WOODBY B, et al. Particulate Matter Induces Tissue OxInflammation:

- From Mechanism to Damage [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2020, 33(4): 308-26.
- [61] WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee [M]. WHO global air quality guidelines: Particulate matter (PM(25) and PM(10)), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. Geneva; World Health Organization
- © World Health Organization 2021. 2021.
- [62] 苗成利, 孙春艳, 黄梅, 等. 转录组测序分析 PM2.5 与小鼠肠道疾病发生的关系 [J] *中国老年学杂志*. 2019: 2995-9
- [63] MUTLU E A, ENGEN P A, SOBERANES S, et al. Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8: 19.
- [64] RAN Z, AN Y, ZHOU J, et al. Subchronic exposure to concentrated ambient PM2.5 perturbs gut and lung microbiota as well as metabolic profiles in mice [J]. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 2021, 272: 115987.
- [65] NING X, JI X, LI G, et al. Ambient PM(2.5) causes lung injuries and coupled energy metabolic disorder [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 170: 620-6.
- [66] SUN Q, YUE P, DEIULIIS J A, et al. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity [J]. *Circulation*, 2009, 119(4): 538-46.
- [67] LIU C, XU X, BAI Y, et al. Air pollution-mediated susceptibility to inflammation and insulin resistance: influence of CCR2 pathways in mice [J]. *Environmental health perspectives*, 2014, 122(1): 17-26.
- [68] KULKARNI H, MAMTANI M, BLANGERO J, et al. Lipidomics in the Study of Hypertension in Metabolic Syndrome [J]. *Current hypertension reports*, 2017, 19(1): 7.
- [69] NAKAMURA M T, YUDELL B E, LOOR J J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids [J]. *Progress in Lipid Research*, 2014, 53: 124-44.
- [70] RUKKWAMSUK T, WENSING T, BREUKINK H J J K J-N S. Clinical-biochemical Observations in Periparturient Dairy Cows with Experimentally Induced Fatty Liver [J]. 2007, 41(4).
- [71] VERNON R G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver [J]. *Journal of Dairy Research*, 2005, 72(4): 460-9.
- [72] WATHES, D. C, CLEMPSON, et al. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow [J].
- [73] GROSS J J, SCHWARZ F J, EDER K, et al. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction [J]. 2013, 96(8): 5008-17.
- [74] TARANTINO G, CAPONE D, FINELLI C. Exposure to ambient air particulate matter and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(25): 3951-6.
- [75] COHEN J C, HORTON J D, HOBBS H H. Human fatty liver disease: old questions and new insights [J]. *Science (New York, NY)*, 2011, 332(6037): 1519-23.
- [76] 李明, 谢菁菁, 吴彤, 等. PM2.5 对肝细胞脂质代谢和氧化应激的影响 [J] *中国当代医药*. 2016: 9-11

- [77] ZHANG Y, CUI Y, WANG X L, et al. PPAR α / γ agonists and antagonists differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatic rats [J]. *Cytokine*, 2015, 75(1): 127-35.
- [78] LIU J, HAN L, ZHU L, et al. Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats [J]. *Lipids in health and disease*, 2016, 15: 27.
- [79] SUN Q, ZHANG G, CHEN R, et al. Central IKK2 Inhibition Ameliorates Air Pollution-Mediated Hepatic Glucose and Lipid Metabolism Dysfunction in Mice With Type II Diabetes [J]. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2018, 164(1): 240-9.
- [80] SONNENBURG J L, BÄCKHED F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 56-64.
- [81] VRIEZE A, NOOD E V, HOLLEMAN F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE): Type Dissertation Title The role of gut microbiota in human metabolism [J]. 2012, 143(4): 913.
- [82] KOUTNIKOVA H, GENSER B, MONTEIRO-SEPULVEDA M, et al. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(3).
- [83] BÄCKHED F, MANCHESTER J K, SEMENKOVICH C F, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(3): 979-84.
- [84] VELAGAPUDI V R, HEZAVEH R, REIGSTAD C S, et al. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice [J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(5): 1101-12.
- [85] RABOT S, MEMBREZ M, BRUNEAU A, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism [J]. *The FASEB Journal*, 2010, 24(12): 4948-59.
- [86] KINDT A, LIEBISCH G, CLAVEL T, et al. The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1).
- [87] YOO S R, KIM Y J, PARK D Y, et al. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in Combination Alter Hepatic Lipid Metabolism and Suppress Diet-Induced Obesity [J]. *Obesity*, 2013, 21(12): 2571-8.
- [88] AN H M, PARK S Y, LEE D K, et al. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2011, 10(1).
- [89] KELLY F J, FUSSELL J C. Air pollution and airway disease [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2011, 41(8): 1059-71.
- [90] CORTEZ-LUGO M, RAMÍREZ-AGUILAR M, PÉREZ-PADILLA R, et al. Effect of Personal Exposure to PM_{2.5} on Respiratory Health in a Mexican Panel of Patients with COPD [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015, 12(9): 10635-47.
- [91] KIRRANE E F, LUBEN T J, BENSON A, et al. A systematic review of cardiovascular responses

- associated with ambient black carbon and fine particulate matter [J]. *Environment International*, 2019, 127: 305-16.
- [92] LIANG F, LIU F, HUANG K, et al. Long-Term Exposure to Fine Particulate Matter and Cardiovascular Disease in China [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2020, 75(7): 707-17.
- [93] YIN P, GUO J, WANG L, et al. Higher Risk of Cardiovascular Disease Associated with Smaller Size-Fractioned Particulate Matter [J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2020, 7(2): 95-101.
- [94] BAHREYNIAN M, MANSOURIAN M, MOZAFFARIAN N, et al. The Association Between Exposure to Ambient Particulate Matter and Childhood Obesity: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. *Journal of Pediatrics Review*, 2019: 1-14.
- [95] BOWE B, GIBSON A K, XIE Y, et al. Ambient Fine Particulate Matter Air Pollution and Risk of Weight Gain and Obesity in United States Veterans: An Observational Cohort Study [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2021, 129(4).
- [96] GUO Q, XUE T, JIA C, et al. Association between exposure to fine particulate matter and obesity in children: A national representative cross-sectional study in China [J]. *Environment International*, 2020, 143.
- [97] BORISOVA T. Nervous System Injury in Response to Contact With Environmental, Engineered and Planetary Micro- and Nano-Sized Particles [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9.
- [98] 陈威, 郭新彪, 邓芙蓉, 等. 大气细颗粒物对 A549 细胞炎症因子分泌影响 [J] *中国公共卫生* [J]. 2007, (09): 1080-1.
- [99] ARGACHA J F, MIZUKAMI T, BOURDREL T, et al. Ecology of the cardiovascular system: Part II – A focus on non-air related pollutants [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2019, 29(5): 274-82.
- [100] SUN Q, HONG X, WOLD L E. Cardiovascular Effects of Ambient Particulate Air Pollution Exposure [J]. *Circulation*, 2010, 121(25): 2755-65.
- [101] LIU C, CAI J, QIAO L, et al. The Acute Effects of Fine Particulate Matter Constituents on Blood Inflammation and Coagulation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(14): 8128-37.
- [102] DENG X, ZHANG F, RUI W, et al. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27(6): 1762-70.
- [103] OH S M, KIM H R, PARK Y J, et al. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells) [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2011, 723(2): 142-51.
- [104] RAASCHOU-NIELSEN O, BEELEN R, WANG M, et al. Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer [J]. *Environment International*, 2016, 87: 66-73.
- [105] TURNER M C, KREWSKI D, POPE C A, et al. Long-term Ambient Fine Particulate Matter Air Pollution and Lung Cancer in a Large Cohort of Never-Smokers [J]. *American Journal of Respiratory*

- and Critical Care Medicine, 2011, 184(12): 1374-81.
- [106] HAMRA G B, GUHA N, COHEN A, et al. Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Environmental Health Perspectives, 2014, 122(11).
- [107] HU H, DAILEY A B, KAN H, et al. The effect of atmospheric particulate matter on survival of breast cancer among US females [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2013, 139(1): 217-26.
- [108] DANG A T, MARSLAND B J. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis [J]. Mucosal Immunology, 2019, 12(4): 843-50.
- [109] SALIM S Y, KAPLAN G G, MADSEN K L. Air pollution effects on the gut microbiota [J]. Gut Microbes, 2013, 5(2): 215-9.
- [110] CHEN L, ZHANG W, HUA J, et al. Dysregulation of Intestinal Health by Environmental Pollutants: Involvement of the Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(4): 2323-30.
- [111] ZHANG L, WANG J, COETZER M, et al. One-Step Ligation on RNA Amplification for the Detection of Point Mutations [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2015, 17(6): 679-88.
- [112] MUTLU E A, COMBA I Y, CHO T, et al. Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome [J]. Environmental Pollution, 2018, 240: 817-30.
- [113] WANG W, ZHOU J, CHEN M, et al. Exposure to concentrated ambient PM 2.5 alters the composition of gut microbiota in a murine model [J]. 2018, 15(1): 17.
- [114] DU H, ZHAO A, WANG Q, et al. Supplementation of Inulin with Various Degree of Polymerization Ameliorates Liver Injury and Gut Microbiota Dysbiosis in High Fat-Fed Obese Mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(3): 779-87.
- [115] WANG W, QIN X, ZHENG C, et al. Comfort Evaluation Model for Gesture Motion based on Mechanical Energy Expenditure and Efficiency [J]. Procedia CIRP, 2018, 78: 13-8.
- [116] MAGNE F, GOTTELAND M, GAUTHIER L, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? [J]. Nutrients, 2020, 12(5).
- [117] LEY R E, TURNBAUGH P J, KLEIN S, et al. Human gut microbes associated with obesity [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-3.
- [118] MULLIN, GERARD, E., et al. The Gut Microbiome and Obesity [J]. 2016.
- [119] TURNBAUGH P J, LEY R E, MAHOWALD M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027-31.
- [120] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. Nature, 2008, 457(7228): 480-4.
- [121] WHITTAKER R H. Evolution and Measurement of Species Diversity [J]. Taxon, 2019, 21(2-3): 213-51.
- [122] SUN Q, ZHANG G, CHEN R, et al. Central IKK2 Inhibition Ameliorates Air Pollution-Mediated Hepatic Glucose and Lipid Metabolism Dysfunction in Mice With Type II Diabetes [J]. Toxicological Sciences, 2018, 164(1): 240-9.

- [123] LI F, XIANG B, JIN Y, et al. Dysregulation of lipid metabolism induced by airway exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in C57BL/6 mice [J]. 2019, (Feb.): 245.
- [124] MAO S, CHEN G, LIU F, et al. Long-term effects of ambient air pollutants to blood lipids and dyslipidemias in a Chinese rural population [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 256.
- [125] KIM D, TOUROS A, KIM W R. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome [J]. *Clinics in Liver Disease*, 2018, 22(1): 133-40.
- [126] YUAN H, SHYY J Y, MARTINS-GREEN M. Second-hand smoke stimulates lipid accumulation in the liver by modulating AMPK and SREBP-1 [J]. *J Hepatol*, 2009, 51(3): 535-47.
- [127] VESTERDAL L K, DANIELSEN P H, FOLKMANN J K, et al. Accumulation of lipids and oxidatively damaged DNA in hepatocytes exposed to particles [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274(2): 350-60.
- [128] ABDEL-MAGID A F. Fatty Acid Synthase (FASN) Inhibitors as Potential Treatment for Cancer, Obesity, and Liver Related Disorders [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6(8): 838-9.
- [129] PANG Y, XU X, XIANG X, et al. High Fat Activates O-GlcNAcylation and Affects AMPK/ACC Pathway to Regulate Lipid Metabolism [J]. *Nutrients*, 2021, 13(6).
- [130] AMACHER D E. The mechanistic basis for the induction of hepatic steatosis by xenobiotics [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(8): 949-65.
- [131] BOLSONI-LOPES A, ALONSO-VALE M I. Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update [J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2015, 59(4): 335-42.
- [132] QUIROGA A D, LEHNER R. Pharmacological intervention of liver triacylglycerol lipolysis: The good, the bad and the ugly [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 155: 233-41.
- [133] SCHWEIGER M, SCHREIBER R, HAEMMERLE G, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(52): 40236-41.
- [134] ZIMMERMANN R, STRAUSS J G, HAEMMERLE G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase [J]. *Science*, 2004, 306(5700): 1383-6.
- [135] MUSSO G, GAMBINO R, CASSADER M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Progress in Lipid Research*, 2009, 48(1): 1-26.
- [136] NGUYEN P, LERAY V, DIEZ M, et al. Liver lipid metabolism [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2008, 92(3): 272-83.
- [137] BARTER P, BITTNER V, FRUCHART J C, et al. On-treatment Levels of HDL-C and the Ratio of LDL-C/HDL-C as Predictors of Cardiovascular Events in the Treating to New Targets (TNT) Study [J]. 2006.
- [138] RIDAURA V K, FAITH J J, REY F E, et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice [J]. *Science*, 2013, 341(6150).
- [139] ZHOU D, PAN Q, SHEN F, et al. Total fecal microbiota transplantation alleviates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice via beneficial regulation of gut microbiota [J]. *Scientific Reports*,

2017, 7(1).

- [140] TREMAROLI V, KARLSSON F, WERLING M, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation [J]. Cell Metabolism, 2015, 22(2): 228-38.