

Mulberry (*Morus alba* L.) leaf polysaccharide ameliorates insulin resistance-and adipose deposition-associated gut microbiota and lipid metabolites in high-fat diet-induced obese mice

Xin Zhao, Zhifei Fu, Minghe Yao, Yu Cao, Tongtong Zhu, Rui Mao, Ming Huang, Yafen Pang, Xianghui Meng, Lin Li, Boli Zhang, Yuhong Li, Han Zhang

Food Science & Nutrition (2022) 10:617–630

<https://doi.org/10.1002/fsn3.2689>

Перевод: Е. Крохмалева Редактура: Н. Готманова (основная), Д. Храброва

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и реагенты

Листья шелковицы были приобретены у компании Tong Ren Tang Co. (Пекин, Китай, серия: 20180605). Стандарты моносахаридов D- манноза (Man), L- рамноза (Rha), D- глюконовая кислота (GlcA), D- галактуроновая кислота (GalA), D- глюкоза (Glc), D- галактоза (Gal), D- ксилоза (Xyl) и L- фукоза (Fuc) были приобретены у Sigma-Aldrich. Фенил-3-метил-5-пиразолон, трифторуксусная кислота, гидроксид натрия (NaOH) и калия дигидрофосфат (K₂HPO₄) были приобретены у Aladdin. Чистота каждого стандарта составляла не менее 98 %. Ацетонитрил для хроматографии и муравьиная кислота были приобретены у Fisher Scientific. Калий-фосфатный буфер (PBS) был приобретен у Solarbio. Другие химические реагенты имели квалификацию «ч.д.а» и приобретались у Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.

2.2. Получение полисахаридов из листьев шелковицы

1,0 кг листьев шелковицы белой высушивали и измельчали в порошок, затем замачивали на ночь в 95% этаноле для удаления хлорофилла. Остаток высушивали и экстрагировали 12 л воды в течение 2 ч при 100°C. Надосадочную жидкость центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин, а остаток повторно экстрагировали 10 л воды в течение 2 ч. Экстракт концентрировали до одной пятой объема на роторном испарителе, затем добавляли 95% этанол, до конечной концентрации этанола 80 % и выдерживали 24 ч при 4°C. Затем осадок, содержащий ПЛШ, собирали и лиофилизировали. Первичный состав ПЛШ характеризовали определением общего содержания сахара и белка (Bitter & Muir, 1962; Bradford, 1976), молекулярной массы (Sun et al., 2009) и моносахаридного компонента (Dai et al., 2010).

2.3. Животные

Шестинедельных мышей-самцов C57BL/6N закупили у компании Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. и содержали в контролируемых условиях (22±2°C, влажность 40 -60% и 12-часовой цикл «свет-темнота»). После 1 недели адаптации мышей случайным образом разделили на контрольную группу (Con), группу ВЖД и группу ПЛШ (n = 8-10). Мышей в группе Con содержали на стандартной диете (13,5% энергии из жира; 1022; Beijing HFК Bioscience Co. Ltd), мышей из группы ВЖД подвергли ВЖД (60% энергии из жира; H10060; Beijing HFК Bioscience Co. Ltd). Мышам в группе ПЛШ вводили высокую дозу раствора ПЛШ (вПЛШ – 100 мг кг⁻¹ день⁻¹) и низкую дозу раствора ПЛШ (нПЛШ – 50 мг кг⁻¹ день⁻¹), мышам из группы Con вводили воду в качестве контроля. Через 20 недель мышей помещали в метаболические клетки, и данные о потреблении пищи собирали в течение 24 часов. Для секвенирования последовательности 16S рРНК собирали фекалии животных. Мыши голодали в течение 10 часов перед эвтаназией, от

животных получали образцы крови и жизненно важных органов. Исследование было одобрено Комитетом по этике лабораторных животных Тяньцзиньского университета традиционной китайской медицины (TCM-LAEC2020049).

2.4. Мониторинг метаболических показателей

2.4.1. Измерение массы тела и веса органов. Гистологические исследования

Во время этого эксперимента еженедельно регистрировали массу тела животных. Также рассчитывали данные суточного потребления калорий. После умерщвления мышей отбирали и взвешивали свежесодержанный бурый жир, околопочечный жир, подкожный жир, эпидидимальный жир и печень. Парафинизированные образцы ткани печени и эпидидимального жира окрашивали с использованием гематоксилина-эозина (H&E) или масляного красного O, как описано ранее (Xu et al., [2019](#)).

2.4.2. Измерения уровня глюкозы в крови натощак (ГКН), инсулина натощак (ИН), лептина натощак и тест на толерантность к глюкозе (ТТГ)

Предварительно мыши голодали в течение ночи при наличии свободного доступа к воде. ГКН определяли с помощью глюкометра ACCU-CHEK® Performa и тест-полосок. ТТГ проводили после внутрибрюшинного введения глюкозы (2,0 г кг⁻¹ массы тела). Концентрацию глюкозы измеряли в крови хвостовой вены спустя 0, 15, 30, 60, 90, и 120 мин после введения, и была рассчитана площадь под кривой (ППК) зависимости концентрации глюкозы от времени (ТТГ-ППК). Уровни инсулина (ИН) и лептина натощак измеряли с помощью наборов MILLIPLEX® MAP (Merck Milliplex). Индекс резистентности к инсулину рассчитывали по следующим формулам: HOMA-IR = ИН × ГКН (мМ)/22,5.

2.4.3. Прочие биохимические показатели

Общий холестерин (ОХ) и триглицериды (ТГ) в плазме крови измеряли с помощью автоматического биохимического анализатора (Hitachi 7020) согласно инструкциям производителя. Уровень свободных жирных кислот (FFA) в плазме определяли химическим колориметрическим методом. Уровень липополисахаридов (LPS) в плазме крови определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ELISA) от Linc Research (Shanghai Huyu Biotechnology Co., Ltd).

2.5. Определение проницаемости толстой кишки

После умерщвления мышей вырезали сегменты толстой кишки животных, фиксировали образцы раствором формалина в фосфатном буфере и парафинизировали. Затем срезы окрашивали H & E (Song et al., 2018). Изменения содержания зонулина-1 (белок плотных контактов-1, ZO-1) в ткани толстой кишки определяли методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Парафинизированные срезы ткани толстой кишки подготавливали и инкубировали с антителами в соответствии с методикой, описанной в работе Xie et al. (2021). Срезы окрашивали DAPI и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (Nikon). Полученные изображения объединяли и анализировали с использованием программы Image J.

2.6. Анализ разнообразия микробиоты кишечника

2.6.1. Сбор образцов кала, выделение ДНК и секвенирование

Свежие образцы фекалий мышей (по 200 мг каждого) собирали в стерильных условиях и немедленно замораживали при -80°C перед эвтаназией. После этого геномную ДНК экстрагировали методом ЦТАБ/SDS и доводили концентрацию каждого образца ДНК до 1 нг мкл^{-1} . Библиотеку области V4 гена 16S рРНК (праймер: 515F-806R) сконструировали, квалифицировали и секвенировали (Novogene) на платформе Illumina HiSeq 250 в соответствии с методикой, описанной в работе Fu et al. (2020).

2.6.2. Анализ состава кишечной микробиоты путем секвенирования

Исходные риды, полученные из фрагментов ДНК микробиоты, качественно отсортировывали и объединяли с помощью FLASH (Magoč & Salzberg, 2011). Последовательности ДНК анализировали с использованием пакета программ Qiime (Caporaso et al., 2010). Операционные таксономические единицы (ОТЕ) выбирали путем выравнивания последовательностей (отсечение по сходству $\geq 97\%$) с использованием скрипта `de_novo_otus.py`, а затем аннотировали по базе данных SILVA. Индекс альфа-разнообразия `chao1` и оценка охвата на основе численности (`abundance-based coverage estimator`, ACE) оценивают численность видов. Наблюдаемые виды определяют количество уникальных ОТЕ, обнаруженных в каждом образце. На основе этих трех показателей с использованием Qiime (версия 1.9.1) сгенерировали индекс Шеннона. Взвешенное метрическое пространство UniFrac для проведения анализа базовых координат (Principal Coordinates Analysis, PCoA) рассчитывали для оценки бета-разнообразия с использованием пакетов R `ggcorrplot` (версия 2.15.3). Корреляции между ключевыми микробными флотипами и параметрами, связанными с метаболизмом, рассчитывали с помощью корреляционного анализа Спирмена с использованием пакетов R `rpsych` (версия 2.15.3).

2.7. Липидомный анализ

2.7.1. Подготовка образцов плазмы

Образцы плазмы мышей готовили по методу Сарафиана с некоторыми модификациями (Sarafian et al., 2014). 100 мкл образца плазмы помещали на лед, затем экстрагировали добавлением 300 мкл холодного изопропанола и перемешивали в течение 5 мин. Эмульсии оставляли на -20°C в течение 1 ч, затем центрифугировали при $13\ 200 \text{ g}$ в течение 10 мин. Верхний слой изопропанола собирали в отдельную пробирку типа Эппендорф и отбирали 2 мкл пробы для анализа методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (уВЭЖХ) с последующей масс-спектрометрией. Для оценки воспроизводимости и надежности инструментальной системы проводили контроль качества: 10 мл образца принимали за контрольный образец вместе с утвержденными стандартами.

2.7.2. Условия использования прибора и анализ данных

Разделение липидов плазмы проводили методом уВЭЖХ. Для сбора данных использовался масс-спектрометр AB SCIEX QTRAP (6500+, AB Sciex). Подробные условия уВЭЖХ-QTRAP- MS / MS описаны ранее в работе (Tan et al., 2021).

Для обработки исходных данных использовалось программное обеспечение SCIEX OS. Анализ базовых компонент (Principal Component Analysis, PCA), частичный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (Partial Least

Squares-Discrimination Analysis, PLS-DA) и ортогональный PLS-DA (OPLS-DA) были выполнены с помощью программного обеспечения SIMCA-P (версия 14.1; Umetrics AB). Для нормализации данных перед многомерным анализом использовали PAR-нормализацию. Потенциальные липидные биомаркеры выбирали в соответствии с показателем переменной прогнозируемой значимости (Variable Importance in the Projection, VIP > 1) на основе модели PLS-DA и t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

2.8. Статистическая обработка данных

Данные представляли в виде среднего значения \pm стандартная погрешность измерений. Все статистические анализы выполняли с помощью программного обеспечения SPSS 17.0. Для сравнений между несколькими группами использовали односторонний ANOVA с post hoc-тестом Тьюки или тестом Крускала -Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна. Для сравнения двух групп использовали t-критерий Стьюдента. Различия при $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Для графического представления данных использовали GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bitter, T., & Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4, 330– 334. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7)
2. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248– 254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
3. Caesar, R., Reigstad, C. S., Bäckhed, H. K., Reinhardt, C., Ketonen, M., Lundén, G. Ö., Cani, P. D., & Bäckhed, F. (2012). Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut*, 61(12), 1701– 1707. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301689>
4. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335– 336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
5. Chambers, E. S., Byrne, C. S., Morrison, D. J., Murphy, K. G., Preston, T., Tedford, C., Garcia-Perez, I., Fountana, S., Serrano-Contreras, J. I., Holmes, E., Reynolds, C. J., Roberts, J. F., Boyton, R. J., Altmann, D. M., McDonald, J., Marchesi, J. R., Akbar, A. N., Riddell, N. E., Wallis, G. A., & Frost, G. S. (2019). 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*, 68(8), 1430– 1438. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318424>

6. Chen, M., Hui, S., Lang, H., Zhou, M., Zhang, Y., Kang, C., Zeng, X., Zhang, Q., Yi, L., & Mi, M. (2019). SIRT3 deficiency promotes high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in correlation with impaired intestinal permeability through gut microbial dysbiosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(4), e1800612. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800612>

7. Chen, M., Xiao, D., Liu, W., Song, Y., Zou, B., Li, L., Li, P., Cai, Y., Liu, D., Liao, Q., & Xie, Z. (2020). Intake of *Ganoderma lucidum* polysaccharides reverses the disturbed gut microbiota and metabolism in type 2 diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 890– 902. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.047>

8. Chen, N., Lei, T., Xin, L., Zhou, L., Cheng, J., Qin, L., Han, S., & Wan, Z. (2016). Depot-specific effects of treadmill running and rutin on white adipose tissue function in diet-induced obese mice. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72(3), 453– 467. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0493-5>

9. Chen, X., & Devaraj, S. (2018). Gut microbiome in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Current Diabetes Reports*, 18(12), 129. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1104-3>

10. Chen, X., Yang, H., Jia, J., Chen, Y., Wang, J., Chen, H., & Jiang, C. (2021). Mulberry leaf polysaccharide supplementation contributes to enhancing the respiratory mucosal barrier immune response in Newcastle disease virus-vaccinated chicks. *Poultry Science*, 100(2), 592– 602. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.039>

11. Choi, S., & Snider, A. J. (2015). Sphingolipids in high fat diet and obesity-related diseases. *Mediators of Inflammation*, 2015, 520618. <https://doi.org/10.1155/2015/520618>

12. Dai, J., Wu, Y., Chen, S., Zhu, S., Yin, H., Wang, M., & Tang, J. (2010). Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate Polymers*, 82, 629– 635. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.029>

13. Del Chierico, F., Manco, M., Gardini, S., Guarrasi, V., Russo, A., Bianchi, M., Tortosa, V., Quagliariello, A., Shashaj, B., Fintini, D., & Putignani, L. (2021). Fecal microbiota signatures of insulin resistance, inflammation, and metabolic syndrome in youth with obesity: A pilot study. *Acta Diabetologica*, 58(8), 1009– 1022. <https://doi.org/10.1007/s00592-020-01669-4>

14. Eisinger, K., Liebisch, G., Schmitz, G., Aslanidis, C., Krautbauer, S., & Buechler, C. (2014). Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2991– 3002. <https://doi.org/10.3390/ijms15022991>
15. Fu, Z., Han, L., Zhang, P., Mao, H., Zhang, H., Wang, Y., Gao, X., & Liu, E. (2020). Cistanche polysaccharides enhance echinacoside absorption in vivo and affect the gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 732– 740. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.216>
16. Ge, Q., Chen, L., Tang, M., Zhang, S., Liu, L., Gao, L., Ma, S., Kong, M., Yao, Q., Feng, F., & Chen, K. (2018). Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 833, 50– 62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.021>
17. Gu, W., Wang, Y., Zeng, L., Dong, J., Bi, Q., Yang, X., Che, Y., He, S., & Yu, J. (2020). Polysaccharides from *Polygonatum kingianum* improve glucose and lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109910. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109910>
18. He, X., Fang, J., Ruan, Y., Wang, X., Sun, Y., Zhao, Z., Chang, Y., Ning, N., Guo, H., & Huang, L. (2018). Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. *Food Chemistry*, 245, 899– 910. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.084>
19. Hu, T. G., Wen, P., Shen, W. Z., Liu, F., Li, Q., Li, E. N., Liao, S. T., Wu, H., & Zou, Y. X. (2019). Effect of 1-deoxynojirimycin isolated from mulberry leaves on glucose metabolism and gut microbiota in a streptozotocin-induced diabetic mouse model. *Journal of Natural Products*, 82(8), 2189– 2200. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00205>
20. Hu, T., & Zhang, J. L. (2018). Mass-spectrometry-based lipidomics. *Journal of Separation Science*, 41(1), 351– 372. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700709>
21. Jakobsson, H. E., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G. C., & Johansson, M. E. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Reports*, 16(2), 164– 177. <https://doi.org/10.15252/embr.201439263>

22. Ke, X., Walker, A., Haange, S. B., Lagkouvardos, I., Liu, Y., Schmitt-Kopplin, P., von Bergen, M., Jehmlich, N., He, X., Clavel, T., & Cheung, P. (2019). Symbiotic-driven improvement of metabolic disturbances is associated with changes in the gut microbiome in diet-induced obese mice. *Molecular Metabolism*, 22, 96– 109. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.012>
23. Khan, M. S., Chen, C., & Fu, X. (2019). The effect of geographic variation on chemical composition, antioxidant and hypoglycemic activities of *Morus alba* L. polysaccharides. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, e14206. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14206>
24. Kim, J. H., Doh, E. J., & Lee, G. (2020). Quantitative comparison of the marker compounds in different medicinal parts of *Morus alba* L. using high-performance liquid chromatography-diode array detector with chemometric analysis. *Molecules*, 25(23), 5592. <https://doi.org/10.3390/molecules25235592>
25. Li, Q., Liu, F., Liu, J., Liao, S., & Zou, Y. (2019). Mulberry leaf polyphenols and fiber induce synergistic antiobesity and display a modulation effect on gut microbiota and metabolites. *Nutrients*, 11(5), 1017. <https://doi.org/10.3390/nu11051017>
26. Li, Y. G., Ji, D. F., Zhong, S., Lv, Z. Q., Lin, T. B., Chen, S., & Hu, G. Y. (2011). Hybrid of 1-deoxynojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3), 961– 970. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.009>
27. Liu, C. G., Ma, Y. P., & Zhang, X. J. (2017). Effects of mulberry leaf polysaccharide on oxidative stress in pancreatic β -cells of type 2 diabetic rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(10), 2482– 2488.
28. Lown, M., Fuller, R., Lightowler, H., Fraser, A., Gallagher, A., Stuart, B., Byrne, C., & Lewith, G. (2017). Mulberry-extract improves glucose tolerance and decreases insulin concentrations in normoglycaemic adults: Results of a randomised double-blind placebo-controlled study. *PloS One*, 12(2), e0172239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172239>
29. Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957– 2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>

30. Matey-Hernandez, M. L., Williams, F., Potter, T., Valdes, A. M., Spector, T. D., & Menni, C. (2018). Genetic and microbiome influence on lipid metabolism and dyslipidemia. *Physiological Genomics*, 50(2), 117– 126. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00053.2017>
31. Meng, Q., Qi, X., Fu, Y., Chen, Q., Cheng, P., Yu, X., Sun, X., Wu, J., Li, W., Zhang, Q., Li, Y., Wang, A., & Bian, H. (2020). Flavonoids extracted from mulberry (*Morus alba* L.) leaf improve skeletal muscle mitochondrial function by activating AMPK in type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 248, 112326. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112326>
32. Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio, M., & Alfenas, R. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *The British Journal of Nutrition*, 108(5), 801– 809. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001213>
33. Razquin, C., Toledo, E., Clish, C. B., Ruiz-Canela, M., Dennis, C., Corella, D., Papandreou, C., Ros, E., Estruch, R., Guasch-Ferré, M., Gómez-Gracia, E., Fitó, M., Yu, E., Lapetra, J., Wang, D., Romaguera, D., Liang, L., Alonso-Gómez, A., Deik, A., Martínez-González, M. A. (2018). Plasma lipidomic profiling and risk of type 2 diabetes in the PREDIMED trial. *Diabetes Care*, 41(12), 2617– 2624. <https://doi.org/10.2337/dc18-0840>
34. Ren, C., Zhang, Y., Cui, W., Lu, G., Wang, Y., Gao, H., Huang, L., & Mu, Z. (2015). A polysaccharide extract of mulberry leaf ameliorates hepatic glucose metabolism and insulin signaling in rats with type 2 diabetes induced by high fat-diet and streptozotocin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 951– 959. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.060>
35. Riche, D. M., Riche, K. D., East, H. E., Barrett, E. K., & May, W. L. (2017). Impact of mulberry leaf extract on type 2 diabetes (Mul-DM): A randomized, placebo-controlled pilot study. *Complementary Therapies in Medicine*, 32, 105– 108. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2017.04.006>
36. Ryan, D. H., Ravussin, E., & Heymsfield, S. (2020). COVID 19 and the patient with obesity – the editors speak out. *Obesity*, 28(5), 847. <https://doi.org/10.1002/oby.22808>
37. Sarafian, M. H., Gaudin, M., Lewis, M. R., Martin, F. P., Holmes, E., Nicholson, J. K., & Dumas, M. E. (2014). Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 86(12), 5766– 5774. <https://doi.org/10.1021/ac500317c>

38. Sheng, Y., Liu, J., Zheng, S., Liang, F., Luo, Y., Huang, K., Xu, W., & He, X. (2019). Mulberry leaves ameliorate obesity through enhancing brown adipose tissue activity and modulating gut microbiota. *Food & Function*, 10(8), 4771–4781. <https://doi.org/10.1039/c9fo00883g>
39. Shi, L. L., Li, Y., Wang, Y., & Feng, Y. (2015). MDG-1, an Ophiopogon polysaccharide, regulate gut microbiota in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 576–583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.057>
40. Song, C. H., Kim, N., Sohn, S. H., Lee, S. M., Nam, R. H., Na, H. Y., Lee, D. H., & Surh, Y. J. (2018). Effects of 17 β -estradiol on colonic permeability and inflammation in an azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *Gut and Liver*, 12(6), 682–693. <https://doi.org/10.5009/gnl18221>
41. Stewart, L. K., Soileau, J. L., Ribnicky, D., Wang, Z. Q., Raskin, I., Poulev, A., Majewski, M., Cefalu, W. T., & Gettys, T. W. (2008). Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*, S39–S46. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.003>
42. Sun, L., Wang, C., Shi, Q., & Ma, C. (2009). Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.03.013>
43. Tan, Y., Wang, L., Gao, J., Ma, J., Yu, H., Zhang, Y., Wang, T., & Han, L. (2021). Multiomics integrative analysis for discovering the potential mechanism of dioscin against hyperuricemia mice. *Journal of Proteome Research*, 20(1), 645–660. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00584>
44. Vallianou, N., Stratigou, T., Christodoulatos, G. S., & Dalamaga, M. (2019). Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in obesity and obesity-associated metabolic disorders: Current evidence and perspectives. *Current Obesity Reports*, 8(3), 317–332. <https://doi.org/10.1007/s13679-019-00352-2>
45. Wang, H., Shen, Y., Zhao, L., & Ye, Y. (2021). 1-Deoxynojirimycin and its derivatives: A mini review of the literature. *Current Medicinal Chemistry*, 28(3), 628–643. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200114112728>

46. Wang, Y., Shao, S., Guo, C., Zhang, S., Li, M., & Ding, K. (2020). The homogenous polysaccharide SY01-23 purified from leaf of *Morus alba* L. has bioactivity on human gut *Bacteroides ovatus* and *Bacteroides cellulosilyticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 698– 707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.009>
47. Wu, S. (2019). Mulberry leaf polysaccharides suppress renal fibrosis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 1090– 1093. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.029>
48. Xie, Y., Zhan, X., Tu, J., Xu, K., Sun, X., Liu, C., Ke, C., Cao, G., Zhou, Z., & Liu, Y. (2021). *Atractylodes* oil alleviates diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by regulating intestinal inflammation and intestinal barrier via SCF/c-kit and MLCK/MLC2 pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 272, 113925. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113925>
49. Xu, J., Wang, X., Cao, K., Dong, Z., Feng, Z., & Liu, J. (2017). Combination of β -glucan and *Morus alba* L. leaf extract promotes metabolic benefits in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, 9(10), 1110. <https://doi.org/10.3390/nu9101110>
50. Xu, L., Nagata, N., Chen, G., Nagashimada, M., Zhuge, F., Ni, Y., Sakai, Y., Kaneko, S., & Ota, T. (2019). Empagliflozin reverses obesity and insulin resistance through fat browning and alternative macrophage activation in mice fed a high-fat diet. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 7(1), e000783. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000783>
51. Yang, Q., Vijayakumar, A., & Kahn, B. B. (2018). Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(10), 654– 672. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0044-8>
52. Yuan, Y., Zhou, J., Zheng, Y., Xu, Z., Li, Y., Zhou, S., & Zhang, C. (2020). Beneficial effects of polysaccharide-rich extracts from *Apocynum venetum* leaves on hypoglycemic and gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110182>
53. Zhai, L., Ning, Z. W., Huang, T., Wen, B., Liao, C. H., Lin, C. Y., Zhao, L., Xiao, H. T., & Bian, Z. X. (2018). *Cyclocarya paliurus* leaves tea improves dyslipidemia in diabetic mice: A lipidomics-based network pharmacology study. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 973. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00973>

54. Zhang, L., Su, S., Dai, X., Wei, D., Zhu, Y., Qian, D., & Duan, J. (2019). Regulatory effect of mulberry leaf components on intestinal microflora in db/db mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 54, 867– 876.
55. Zhang, X., Coker, O. O., Chu, E. S., Fu, K., Lau, H., Wang, Y. X., Chan, A., Wei, H., Yang, X., Sung, J., & Yu, J. (2021). Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. *Gut*, 70(4), 761– 774.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319664>
56. Zhang, Y., Ren, C., Lu, G., Cui, W., Mu, Z., Gao, H., & Wang, Y. (2014). Purification, characterization and anti-diabetic activity of a polysaccharide from mulberry leaf. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(3), 687– 695. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.10.006>
57. Zhang, Z., Li, L., Li, Z. K., Wu, F., Hang, B. Y., Cai, B. Y., Weng, Z. F., Zhao, L., Ding, C. F., & Du, Y. G. (2018). Effect and mechanism of mulberry leaf polysaccharide on type 1 diabetic nephropathy in rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 98(22), 1792– 1796.
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.22.01358>. Zhao, X., Yang, R., Bi, Y., Bilal, M., Kuang, Z., Iqbal, H., & Luo, Q. (2019). Effects of dietary supplementation with mulberry (*Morus alba* L.) leaf polysaccharides on immune parameters of weanling pigs. *Animals*, 10(1), 35. <https://doi.org/10.3390/ani10010035>