

四株益生菌对非酒精性脂肪性肝病的改善作用

孙怡兰¹, 苏维敏², 汪亦婷¹, 张磊³, 刘岛^{1,3}, 杨天心³, 张婉怡³, 陈姝丹³, 雷欣怡³, 周永芹^{1,3*}, 刘朝奇^{1,3*}
(1. 天然产物研究与利用湖北省重点实验室(三峡大学), 湖北省老年胃肠癌精准防治临床医学研究中心, 三峡大学第二人民医院, 湖北宜昌 443002) (2. 三峡大学人民医院, 湖北宜昌 443002)
(3. 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室(三峡大学), 湖北宜昌 443002)

摘要: 探究了四株益生菌对非酒精性脂肪性肝病 (Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) 的改善作用。30 只小鼠随机分为正常组 (N)、高脂饮食 (HFD) 模型组 (M) 及益生菌干预组四组: 植物乳杆菌 LP45 (*Lactobacillus plantarum*, LP)、嗜酸乳杆菌 La28 (*Lactobacillus acidophilus*, La)、鼠李糖乳杆菌 LR519 (*Lactobacillus rhamnosus*, LR) 和乳双歧杆菌 BAL531 (*Bifidobacterium lactis*, Bal)。正常组给予常规饲料喂养, 其它组给予 HFD 喂养; 同时益生菌组每天给予对应菌液灌胃 21 d, 对照组给等体量生理盐水; 期间监测小鼠体重和摄食量。检测内脏脂肪、肝脏生化指标、组织病理和炎症因子表达水平。与 N 组相比, M 组摄食量、体重及内脏脂肪均显著增加, 高达 8.74 g/d、33.30 g、0.71 g。较于 M 组, 益生菌干预组小鼠的摄食量和内脏脂肪均明显降低, Bal、La、LR 和 LP 组摄食量分别为 6.97、6.91、5.94 和 6.59 g/d; 内脏脂肪 0.41、0.40、0.27 和 0.36 g; ALT、CHO、TG 和 MDA 水平也显著下降; 肝脂肪变性明显缓解; 炎症因子 ELF3 和 TNF- α 的 mRNA 及 IL-6 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。体外, 四株益生菌也表现出一定抗氧化和降脂活性, 其中 Bal 抗氧化活性最高, 达 16.81%; La 降脂活性最高, 为 46.40%。Bal、La、LP、LR 可有效改善小鼠的 NAFLD, 其机制至少部分归因于其降脂、抗炎、抗氧化和保肝等生物学活性。

关键词: 益生菌; 非酒精性脂肪性肝病; 降脂; 抗炎; 保肝

文章编号: 1673-9078(2023)11-25-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1064

The Ameliorative Effect of Four Probiotic Strains on Non-alcoholic Fatty Liver Disease

SUN Yilan¹, SU Weimin², WANG Yiting¹, ZHANG Lei³, LIU Dao^{1,3}, YANG Tianxin³, ZHANG Wanyi³,
CHEN Shudan³, LEI Xinyi³, ZHOU Yongqin^{1,3*}, LIU Chaoqi^{1,3*}

(1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development (China Three Gorges University), College of Biological and Pharmaceutical Science, Hubei Provincial Clinical Research Center for Precise Prevention and Treatment of Elderly Gastrointestinal Cancer, The Second People's Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

(2. People's Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

(3. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, College of Basic Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: This study aimed to explore the positive effects of four strains of probiotics on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

引文格式:

孙怡兰, 苏维敏, 汪亦婷, 等. 四株益生菌对非酒精性脂肪性肝病的改善作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(11): 25-32

SUN Yilan, SU Weimin, WANG Yiting, et al. The ameliorative effect of four probiotic strains on non-alcoholic fatty liver disease [J].

Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 25-32

收稿日期: 2022-08-25

基金项目: 湖北省老年胃肠癌精准防治临床医学研究中心开放基金项目 (2022EGC-10); 宜昌市医疗卫生科研项目 (A21-2-026; A17-301-24); 天然产物研究与利用湖北省重点实验室 (三峡大学) 开放基金项目 (NPRD-2018012)

作者简介: 孙怡兰 (2001-), 女, 本科在读, 研究方向: 中药药理与益生菌, E-mail: 2219749857@qq.com; 共同第一作者: 苏维敏 (1976-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 小儿骨科与骨感染, E-mail: 931142625@qq.com; 汪亦婷 (2001-), 女, 本科在读, 研究方向: 益生菌与合生元, E-mail: 1816328954@qq.com
通讯作者: 周永芹 (1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物学与免疫药理学, E-mail: zyzyq@163.com; 共同通讯作者: 刘朝奇 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌与代谢性疾病, E-mail: ctgqlcq@163.com

Thirty mice were randomly divided into six groups: the normal control group (N), the high-fat diet (HFD)-model group (M), and four probiotic intervention groups (*Lactobacillus plantarum* [LP, 45], *Lactobacillus acidophilus* [La, 28], *Lactobacillus rhamnosus* LR, 519] and *Bifidobacterium lactis* [Bal, 531]). Group N was fed a regular diet, while the other groups were fed the HFD. Additionally, the probiotic intervention groups were fed by gavage daily with the corresponding bacteria solutions for 21 days. The control groups (N and M) received an equal volume of normal saline. Throughout this period, the body weight and food intake of the mice were monitored. Visceral fat, biochemical indices, histopathology, and inflammatory cytokine levels in the liver were examined. Compared to the N group, the M group demonstrated significant increases in food intake, body weight, and visceral fat, with values reaching 8.74 g/d, 33.30 g, and 0.71 g, respectively. The probiotic intervention groups showed marked reductions in food intake and visceral fat compared to the M group. Specifically, the food intake for the Bal, La, LR, and LP groups were 6.97, 6.91, 5.94, and 6.59 g/d, respectively, and the corresponding values for visceral fat were 0.41, 0.40, 0.27, and 0.36 g. Levels of alanine aminotransferase, cholesterol, triglycerides, and malondialdehyde significantly decreased. A notable alleviation in hepatic steatosis was observed. Furthermore, the levels of inflammatory cytokines (ELF3, TNF- α mRNA, and IL-6 protein) significantly decreased ($P < 0.05$). The four probiotic strains also showed certain antioxidant and hypolipidemic activities *in vitro*. Notably, Bal had the highest antioxidant activity (16.81%) and La had the highest hypolipidemic activity (46.40%). The Bal, La, LP, and LR groups showed effective alleviation of NAFLD in mice. Our findings suggest that the hypolipidemic, anti-inflammatory, antioxidative, and liver-protective activities of the probiotic strains are at least partially responsible for the ameliorative effect on NAFLD.

Key words: probiotics; nonalcoholic fatty liver disease; hypolipidemic effects; anti-inflammatory; liver protection

随着社会的发展,人们生活水平的不断提高,长期高脂、高热量饮食导致的超重、肥胖及一系列代谢相关疾病逐年上升^[1]。肝脏作为人体最大的代谢器官,因其受累而引发的多种以代谢紊乱为特征的相关疾病已成为全球严峻的公共卫生问题^[2]。

中国是一个典型的“肝炎”高发大国,除病毒性肝炎外,也常见多种非病毒性肝脏疾病,如脂肪性肝炎、自身免疫性肝炎等。脂肪性肝炎根据病因不同可分为酒精性脂肪肝病及非酒精性脂肪肝病(Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD),其中NAFLD已成为包括中国在内的全球性常见肝脏疾病^[3]。长期高脂和高糖饮食、年龄增长、肥胖、II型糖尿病、遗传易感性、代谢综合征、炎症和肠道菌群紊乱等被鉴定为NAFLD常见的危险因素^[1,4-7]。近来,有学者提出包括肠道菌群失调、肠源性内毒素血症和代谢性炎症为主的“多重打击学说”,该学说从不同角度解释了NAFLD的部分发病机制^[8,9]。

益生菌,指对宿主健康有益的活微生物,当外源性给予一定剂量时能给宿主带来健康益处^[10]。益生菌种属众多,常见的主要有乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)等。研究表明,补充益生菌有助于平衡肠道菌群、调节免疫力等,有效预防和治疗多种代谢、免疫相关疾病,如慢性炎症性肠炎、NAFLD、哮喘,甚至肿瘤等^[10]。益生菌的作用机制除了与病原微生物竞争粘附部位、产生短链脂肪酸、增强黏膜屏障和直接对抗病原体外,还具有调节宿主免疫功能等作用^[9,11,12]。因此,补充益生菌有望成为纠正、改善受损的代谢和免疫功能的治疗新方案^[13,14]。益生

菌的种属、补充方式、剂量、使用者的状态不同,所取得的效果不尽相同^[10]。基于此,本研究团队以不同种属益生菌干预高脂高糖饲料喂养的NAFLD动物模型,研究其对常见的代谢性疾病的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA法)(A003-1-2)、总胆固醇(TC/TCH)测定试剂盒(GPO-PAP法)(A111-1-1)、甘油三酯(TG)测定试剂盒(GPO-PAP法)(A110-1-1)、丙氨酸氨基转移酶(谷丙转氨酶/ALT/GPT)测试盒(赖氏法)(C009-1-1)均购自南京建成生物工程研究所。磷酸二氢钾(KH_2PO_4)(10017608)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)(10020318)、氯化钾(KCl)(10016308)、氯化钠(NaCl)(10019308)均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。MRS琼脂和MRS肉汤培养基(青岛海博生物)。一抗:小鼠白细胞介素6(Interleukin, IL-6)(Cat.#: 66146-1-Ig, Proteintech);二抗:辣根过氧化物酶(Horse Radish Peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠IgG2b(Cat.#: GB23301, Servicebio)。反转录试剂盒[HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)](R312-02, Nanjing Vazyme Biotech Co. Ltd.)、定量PCR检测试剂盒(ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, Q711-02, Nanjing Vazyme Biotech Co. Ltd.)。

所用仪器设备包括:干式恒温箱、电热恒温培养箱、干热消毒箱,中国上海福玛实验设备有限公司;Olympus

CX31 双目生物显微镜、全波长酶标仪, Thermo Electron 公司; Vortex-2 Genie 涡旋振荡混匀器、超薄切片机、摊片机、烤片机, 德国 Leica 公司; AL-104 分析天平、Cascade 超纯水仪、VS-1300L-U 洁净工作台、79-3 型磁力搅拌器, 上海沪西分析仪器厂; ND-2000 NanoDrop 核酸检测仪, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA。

1.2 益生菌及降脂、抗氧化活性分析

河北一然生物科技有限公司生产的商品化冷冻干燥益生菌株: 植物乳杆菌 LP45 (YMC1005) (*Lactobacillus plantarum*, LP)、嗜酸乳杆菌 La28 (*Lactobacillus acidophilus*, La)、鼠李糖乳杆菌 LR519 (*Lactobacillus rhamnosus*, LR)、乳双歧杆菌 BAL531 (*Bifidobacterium lactis*, Bal) 由安琪酵母股份有限公司 (Angel Yeast Co. Ltd.) 友情馈赠。四株益生菌分别以 MRS 肉汤 (青岛海博) 在厌氧罐中初步活化, 再以 MRS 固体琼脂 (青岛海博) 分离划线, 挑取单克隆进行革兰氏染色鉴定后使用。

益生菌的抗氧化活性检测: 参考文献方法并略修改^[15,16], 将新鲜传代的 LP、Bal、La、LR 分别以 4 000 r/min 离心 5 min 洗涤一次, MRS 肉汤调整菌液浓度使成 2×10^7 CFU/mL, 以每孔 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板中, 三复孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 3~6 h。取新鲜配制的 0.000 05、0.000 5 mmol/L H_2O_2 溶液, 以每孔 50 μ L 加入对应细胞板孔, 继续培养 16~20 h 后测定菌液 OD₆₀₀ 吸光度值 (A)。

益生菌的降脂活性分析: 细菌同上法接种 96 孔板, 再分别将不同浓度的胆固醇 (Cholesterin, CHO) 溶液 (0、0.062 5、0.125、0.25 g/L) 以每孔 100 μ L 加入对应孔板中, 37 $^{\circ}$ C 分别培养 24、48 h。收集培养上清液, 以商品化的试剂盒按照说明测定上清中 CHO 浓度。

1.3 实验动物及处理

30 只 6 周龄、雌雄各半 SPF 级昆明鼠, 由三峡大学 SPF 级动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2017-0012, 动物实验伦理审核编号 2019020Y。小鼠随机分成 6 组 (5 只/组): 正常对照组 (N)、高脂饲料 (High-Fat Diet, HFD) 模型组 (M)、HFD+益生菌实验组: LP、Bal、La 和 LR 共四组。其中 N 组给予普通饲料, 其它组均给予 HFD (以基础饲料: 猪油: 果糖: 胆酸钠: 胆固醇: 食盐: H_2O = 0.43:0.2:0.2:0.02:0.04:0.01:0.1 按比例混合固定成型, 辐照灭菌后备用)^[17], 实验周期 21 d。此外, 根据预实验结果, LP、Bal、La、LR 组小鼠每天给予 MRS 肉汤厌氧条件下培养的 200 μ L 2×10^9 CFU/mL 的对应菌

液灌胃, N 组和 M 组小鼠每天给予 200 μ L 生理盐水灌胃。整个实验期间, 连续监测小鼠一般状况和体质量变化, 并分别记录每组小鼠的日均饮食、饮水量。

1.4 肝脏指数及附睾脂肪测定

实验结束, 小鼠称体质量后断颈处死, 完整摘取肝脏及附睾脂肪等内脏组织, 分别称质量, 并按公式 (1) 计算肝脏指数。一部分肝脏组织置于包埋盒后 4% (m/V) 多聚甲醛固定, 待后续组织切片; 余下部分于 1.5 mL EP 管中迅速置于干冰中, 后转置 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱储存待用。

$$HI = \frac{W_1}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

HI——小鼠的肝脏指数, %;

W_1 ——小鼠的肝脏质量, g;

W_0 ——小鼠的体质量, g。

1.5 肝脏组织病理及免疫组织化学分析

将多聚甲醛固定 24 h 的肝组织用常规方法以梯度酒精进行程序化脱水 22 h、石蜡包埋、切片 (厚度 4 μ m)、HE 染色, 以单盲法由专业病理人员在显微镜 (奥林巴斯) 下观察肝脏组织结构, 进行病理分析并取图。

免疫组织化学分析切片经脱蜡至水, 冷却后以 $\varphi=3\%$ H_2O_2 室温孵育 5~10 min 消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min 后进行抗原修复。滴加小鼠 IL-6 一抗 (1:200) 工作液, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 滴加二抗 (1:500) 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。同前 PBS 洗涤 3 次, 以 DAB 显色剂显色, 镜下观察并及时终止, 苏木素染色后封片、镜检。

1.6 肝组织匀浆生化指标检测

称取 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存的新鲜肝脏组织 50 mg 两份, 冰上置于组织匀浆器中, 加入 1 mL 无水乙醇后备后续总胆固醇 (CHO)、甘油三酯 (TG)、丙二醛 (MDA) 测定, 或 1 mL PBS 用于丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 含量检测。肝组织以 3 000 r/min 离心, 每次 10 s 的条件进行匀浆。将充分研磨后的组织液转移至无菌 1.5 mL EP 管中, 以 5 000 r/min 离心 5 min 收集上清抽提液, 根据试剂盒说明书分别进行上述肝脏生化指标检测。

1.7 RT-PCR 检测肝组织中炎症因子的表达

称取冻存小鼠肝组织 50 mg, 以 Trizol 法提取肝组织总 RNA。经 1% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 100 mA, 20 min) 检测 RNA 的完整性; NanoDrop 分析所提 RNA 纯度和浓度。以反转录试剂盒按说明书

操作获得 cDNA；再以通用型高灵敏度染料法定量 PCR 检测试剂盒进行 RT-PCR 扩增目的基因。PCR 反应体系总体积为 20 μ L：10 μ L PCR Master mix（2 $\times$ ），加入 E74 样 ETS 转录因子 3（E74 Like ETS Transcription Factor 3，ELF3，又名 ESE1、ERT 和 ESX）和肿瘤坏死因子 α （Tumor Necrosis Factor α ，TNF- α ）上下游引

物各 0.4 μ L，加入 cDNA 模板 1 μ L，DEPC 水补齐终体积至 20 μ L， β -actin 作为内参。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s，95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，39 个循环；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，60 $^{\circ}$ C 15 s，共 35 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行定量分析，参照 β -actin 计算目的基因的 mRNA 相对表达量。所用引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

基因	上游	下游
β -actin	5'-TGGATGACGATATCGCTGCG-3'	5'-AGGGTCAGGATACCTCTCTT-3'
TNF- α	5'-CCCTCAGCAAGGACAGCAGA-3'	5'-AGCCGTGGGTCAGTATGTGAGA-3'
ELF3	5'-GGGTGTGTTCAAGTTTCTTCGC-3'	5'-CAACCTCTTCTTCCTCCAGCC-3'

1.8 统计学分析

所有数值均采用平均值 $\pm$ 标准误表示。所有数据使用 Graphpad Prism 8.0 进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 益生菌抗氧化活性

体外培养结果显示，四株益生菌 La、Bal、LR 和 LP 在与不同浓度 H₂O₂ 共孵育 16-20 h 后，呈现出不同生长浊度，提示其具有一定的抗氧化活性^[15]。其中 Bal 抗氧化能力最强，对 0.000 05 mmol/L 的 H₂O₂ 抗氧化活性达 18.61%，当 H₂O₂ 为 0.000 5 mmol/L 时，抗氧化活性为 11.67%；其余三种益生菌的抗氧化活性依次分别为 LR>La>LP（图 1a）。

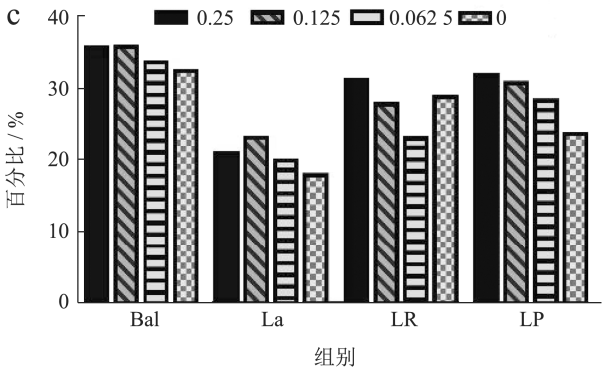
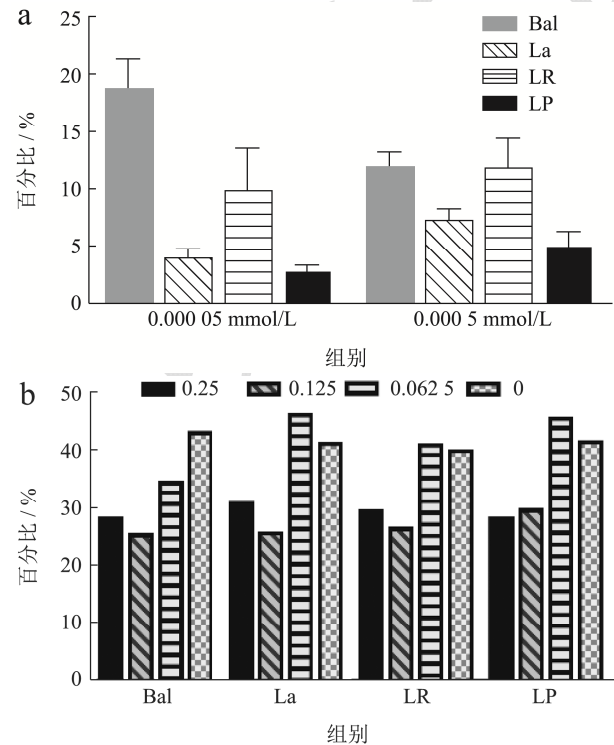


图 1 益生菌体外降脂活性

Fig.1 Lipid-lowering activity of probiotics in vitro

注：a：益生菌 24 h 抗氧化活性；b：益生菌 24 h 降脂活性；c：益生菌 48 h 降脂活性。Bal 表示 BAL531，La 表示 LA28，LR 表示 LR519，LP 表示 LP45。

2.2 益生菌降脂活性

胆固醇含量测定结果表明，四株益生菌体外均具有较强的降脂活性，其中 La 在 CHO 质量浓度为 0.0625 g/L 24 h 的降脂率最高可达 46.4%，其次是 LP（45.75%）；当延长培养时间至 48 h 时，Bal 降脂能力表现相对最强，0.25 g/L 的 CHO 可被有效降脂 35.64%，其余三株菌体外降脂活性也基本达到 20%及以上（图 1b、c）。大量体外和体内研究表明，益生菌可降低胆固醇水平^[18,19]。因此，在本研究中，HFD 诱导的 NAFLD 小鼠被用来进一步探究四株益生菌的体内相应生物学功能。

2.3 益生菌改善 HFD 小鼠一般状态

通过饮食干预以 NAFLD 为主的代谢相关性疾病，已成为近年科学研究中的新热点。研究发现，嗜酸乳杆菌可通过增强细胞免疫、体液免疫，改善巨噬细胞以及 NK 细胞活性等方式提高机体免疫功能^[20]；鼠李糖乳杆菌具有调节肠道微生物群和抑制病原体、

增强免疫应答等功能^[21]。为进一步探究益生菌对代谢性疾病的影响,在本研究中,我们评估了四株益生菌对 HFD 诱导的小鼠 NAFLD 的缓解作用。

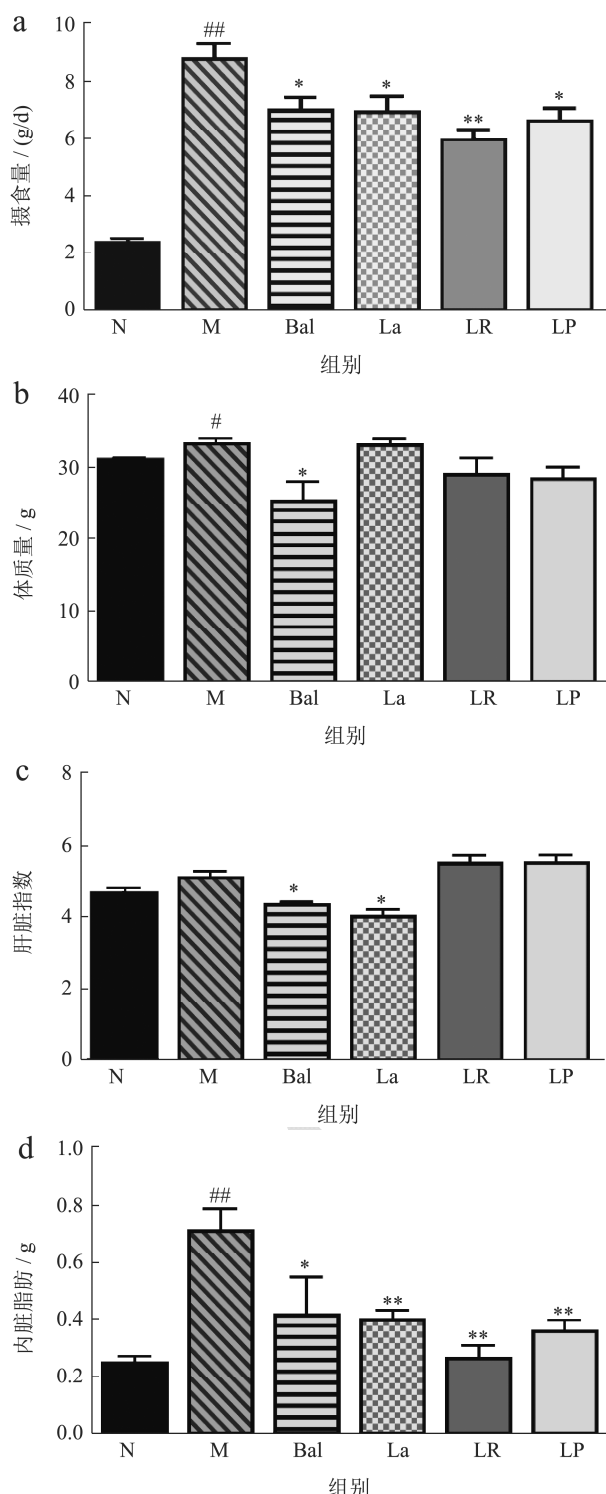


图2 小鼠一般状态

Fig.2 General states of mice

注: a: 摄食量; b: 小鼠体质量; c: 肝脏指数; d 内脏脂肪。N 表示正常组, M 表示模型组, Bal 表示 BAL531, La 表示 LA28, LR 表示 LR519, LP 表示 LP45。vs 正常对照组, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs 模型组, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=5$ 。

实验期间小鼠一般状态观察, N 组小鼠毛发顺滑, 有光泽, 活动迅速; M 组小鼠饮水量增加明显, 但毛发并不如 N 组光泽性好, 活动也不如 N 组多; 益生菌干预组小鼠饮水量低于 M 组, 活动较多, 毛发较 M 组顺滑有光泽。其中 N 组摄食量为 2.51 g/d, M 组摄食量最高, 达 8.74 g/d, 与 N 组相比具有统计学意义 ($P<0.01$); 益生菌干预组小鼠摄食量均较 M 组低, Bal、La、LR、LP 组分别为 6.96、7.12、5.94、6.59 g/d, 与 M 组相比具有统计学意义 (图 2a)。同时, 干预组小鼠体质量虽有降低但并不都很显著, 说明食物摄入量减少与体质量减轻无严格对应关系, 与 Wang 研究团队^[9]的结果一致。

实验期间连续监测小鼠体质量, 结果显示 M 组小鼠体质量增长明显, 与 N 组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。益生菌干预组小鼠体质量较 M 组有降低, 其中 Bal 组差异显著 (图 2b)。

肝脏指数分析显示, M 组小鼠肝指数 (5.10) 高于 N 组小鼠肝指数 (4.64), 但差异无统计学意义; 给予益生菌 Bal、La、LR、LP 干预组的小鼠肝指数分别为 4.33、4.00、5.49、5.51, 其中 Bal、La 组较 M 组差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2c)。

内脏脂肪与肥胖的关系密切^[22,23], 体内脂肪过度沉积是导致肝细胞脂肪变性甚至发展为脂肪性肝炎的重要病因^[24]。结果显示, N 组内脏脂肪含量最低 (0.25 g), M 组最高 (0.71 g), 差异具有显著性 ($P<0.01$); 益生菌干预组小鼠的内脏脂肪质量相较 M 组均有降低趋势, Bal、La、LR、LP 组分别为 0.42、0.40、0.27、0.36 g, 差异显著 (图 2d)。

2.4 益生菌调节 HFD 小鼠的肝脏脂肪代谢

益生菌作为肠道微生物菌群的重要组成部分, 近年来吸引了大量科技工作者的研究兴趣。肝细胞受损时 ALT 水平显著升高^[25]。TG、CHO^[26]以及脂质过氧化反应的终产物 MDA^[27]都与体内脂肪代谢密切相关, 其含量改变提示脂质沉积和代谢异常。高胆固醇血症、高甘油三酯血症是肝脂肪变性患者中最常见的脂质代谢紊乱指标^[28]。实验结果显示 M 组小鼠肝脏组织匀浆中 ALT 水平 (48.79 U/L) 显著高于 N 组 (29.92 U/L), 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。此外, M 组的 CHO (0.54 mmol/L)、MDA (14.35 mmol/L) 和 TG (2.39 mmol/L) 含量也都明显升高, 差异具有显著性 ($P<0.01$)。给予益生菌干预组小鼠的 ALT 均显著低于 M 组 ($P<0.05$), 提示肝功能受损状态有所缓解。与之类似, Bal、La 和 LR 组的 CHO、MDA 及 TG 含量相较于 M 组均显著降低 ($P<0.01$), 而 LP 组的 CHO

含量与 M 组相比差异不具显著性 (图 3)。

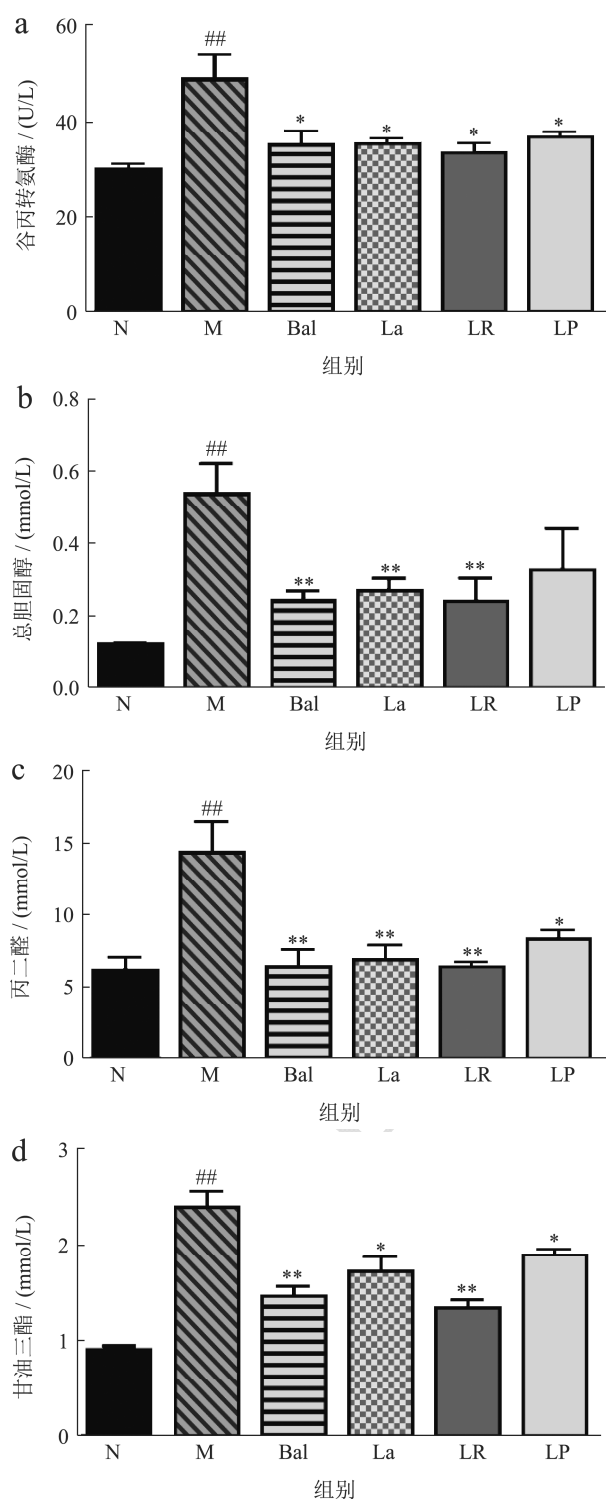


图 3 ALT、MDA、TG 和 CHO 含量测定

Fig.3 ALT, MDA, TG and CHO contents in mice

注: a: 小鼠肝脏 ALT 含量; b: 小鼠肝脏 CHO 含量; c: 小鼠肝脏 MDA 含量; d: 小鼠肝脏 TG 含量。N 表示正常组, M 表示模型组, LP 表示 LP45, Bal 表示 BAL531, La 表示 LA28, LR 表示 LR519。vs 正常对照组, ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$; vs 模型组, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$; $n = 5$ 。

2.5 益生菌有效缓解肥胖小鼠的肝组织病理

损伤

肝细胞受损、广泛的肝脏炎症是 NAFLD 患者另一重要临床表现^[29]。肝组织切片 HE 染色结果显示, N 组小鼠肝细胞大小均一, 肝小叶结构清晰完整, 肝索沿中央静脉放射状整齐排列; 而 M 组小鼠肝细胞形态不均一, 且肝细胞中出现了明显空泡, 肝索结构破坏、排列紊乱, 说明 NAFLD 小鼠疾病模型造模成功^[30]。给予益生菌干预组小鼠的肝组织病理变化得到有效改善, 肝细胞空泡数量明显减少, 肝索、肝小叶结构有所恢复, 提示脂肪变性缓解。上述结果共同说明益生菌可有效改善 NAFLD 小鼠的肝脏脂肪变性, 提供肝脏保护作用 (图 4)。

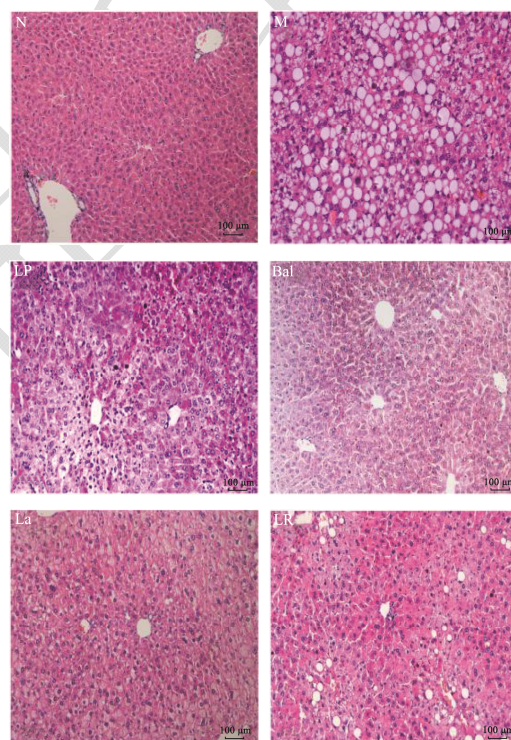


图 4 小鼠肝脏组织病理改变 (10×)

Fig.4 Pathological changes of liver tissue from NAFLD mice

注: N 表示正常组, M 表示模型组, LP 表示 LP45, Bal 表示 BAL531, La 表示 LA28, LR 表示 LR519。

2.6 益生菌降低 NAFLD 小鼠肝脏炎症反应

与炎症相关的重要细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 被认为是促成脂肪性肝炎的因素^[33]。 $\text{TNF-}\alpha$ 介导了脂肪肝疾病的早期以及向晚期肝病的过渡, 并进一步刺激 IL-6 等炎性细胞因子的释放、招募炎症细胞、破坏肝细胞并启动愈合反应, 包括纤维生成等^[31]。ELF3 是

ETS 转录因子家族成员,参与炎症、上皮分化和肿瘤发生等多种生理、病理过程^[32]。有研究结果显示,益生菌可改善肥胖人群的体质量和健康问题,可降低患者体内的血脂和炎症水平等^[33-35]。在本研究中,基因表达水平分析显示,M组小鼠肝组织中炎症相关因子 ELF3 和 TNF- α 均显著高于正常对照组,提示 NAFLD 小鼠肝脏呈现炎症反应状态。与之相反,益生菌干预组 Bal、LP 的 ELF3 明显降低 ($P<0.05$); La、LR 和 LP 的 TNF- α 显著下调,差异具有显著性 ($P<0.05$) (图 5a、b)。与之类似,肝脏切片免疫组织化学分析显示,炎症细胞因子 IL-6 在 M 组显著升高,益生菌干预组呈现不同程度的降低,其中以 Bal 组下降最为明显,LP 组次之 (图 5c)。

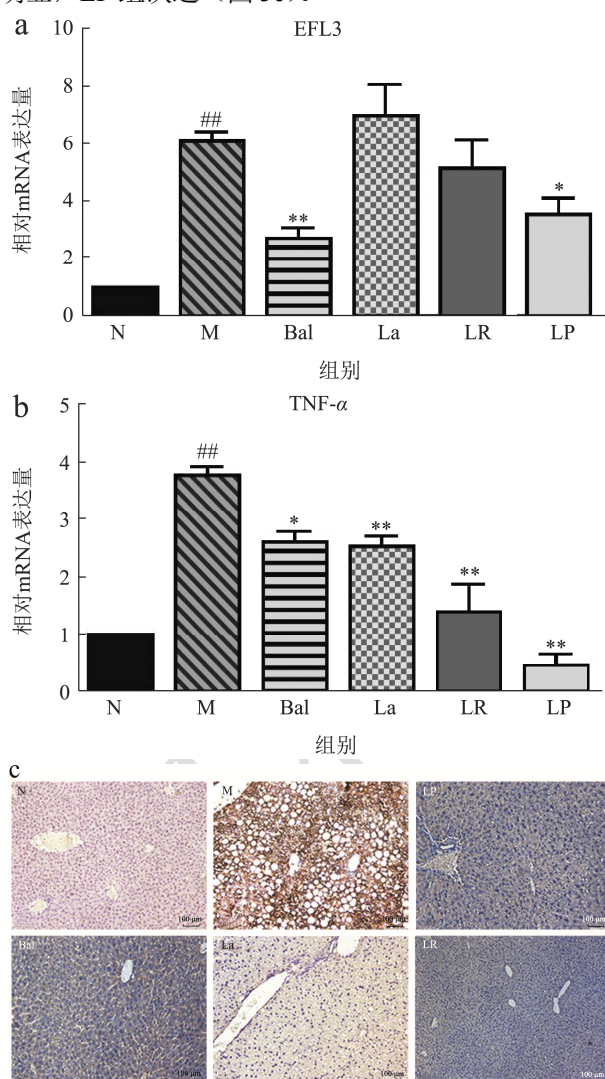


图5 肝脏炎症因子的表达

Fig.5 Expressions of hepatic inflammatory factors at mRNA level

注: a: ELF3 的 mRNA 表达水平; b: TNF- α 的 mRNA 表达水平; c: IL-6 的蛋白表达水平 (10 $\times$)。N 为正常组, M 为模型组, LP 为 LP45, Bal 为 BAL531, La 为 LA28, LR 为

LR519。vs 正常对照组, $^{##}P<0.01$, $^{#}P<0.05$; vs 模型组, $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$ 。

3 结论

综上所述,四株益生菌 Bal、La、LP、LR 可有效保护 HFD 诱导的 NAFLD 小鼠的肝组织损伤,其机制与抗氧化、降脂、调节肝细胞脂肪代谢、抗炎和肝脏保护等活性相关;提示益生菌在未来新药和食品研发中的潜在应用价值。因此,基于益生菌的饮食干预有望成为 NAFLD 管理中的一种富有前景的新方法。

参考文献

- [1] Zhong Y, Zhu Y, Li Q, et al. Association between Mediterranean diet adherence and colorectal cancer: A dose-response meta-analysis [J]. Am J Clin Nutr, 2020, 111(6): 1214-1225.
- [2] Farrell G, Schattenberg J M, Leclercq I, et al. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis toward optimization of their relevance to human nonalcoholic steatohepatitis [J]. Hepatology, 2019, 69(5): 2241-2257.
- [3] Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact [J]. J Hepatol, 2018, 68(2): 268-279.
- [4] Tilg H, Zmora N, Adolph T E, et al. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(1): 40-54.
- [5] Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family - Cancer Database [J]. Int J Cancer, 2002, 99(2): 260-266.
- [6] Samuel V T, Liu Z X, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32345-53.
- [7] Tilg H, Moschen A R, Roden M. NAFLD and diabetes mellitus [J]. Nat Rev Gastro Hepat, 2016, 14(1): 32-42.
- [8] Spencer C N, McQuade J L, Gopalakrishnan V, et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response [J]. Science, 2021, 374(6575): 1632-1640.
- [9] Wang W, Xu A, Li Z, et al. Combination of probiotics and *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide alleviates hepatic steatosis via gut microbiota modulation and insulin resistance improvement in high fat-induced NAFLD mice [J]. Diabetes Metab J, 2020, 44(2): 336-348.
- [10] Suez J, Zmora N, Segal E, et al. The pros, cons, and many

- unknowns of probiotics [J]. Nat Med, 2019, 25(5): 716-729.
- [11] Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(8): 1541-1558.
- [12] Leung C, Rivera L, Furness J B, et al. The role of the gut microbiota in NAFLD [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(7): 412-425.
- [13] Chen J, Vitetta L. Gut microbiota metabolites in NAFLD pathogenesis and therapeutic implications [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5214.
- [14] Perumpail B J, Li A A, John N, et al. The therapeutic implications of the gut microbiome and probiotics in patients with NAFLD [J]. Diseases, 2019, 7(1): 27.
- [15] Hong H, Bae K S, Lee Y. New bacteria *Bacillus nitroreducens* PLC9 with hydrogen peroxide-degrading activity with high survival rate in hydrogen peroxide [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169(3): 701-711.
- [16] Výrostková J, Pipová M, Semjon B, et al. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and caprylic acid on selected foodborne bacteria [J]. Pol J Vet Sci, 2020, 23(3): 439-446.
- [17] 李聪,熊海容,彭晓蔓,等.木瓜提取物对小鼠脂肪肝的保护作用[J].现代食品科技,2018,34(7):28-34.
- [18] Zheng Z, Cao F, Wang W, et al. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* E680 and its effect on hypercholesterolemic mice [J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 239.
- [19] Azat R, Liu Y, Li W, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2016, 17(8): 597-609.
- [20] Lv L, Yao C, Yan R, et al. *Lactobacillus acidophilus* LA14 alleviates liver injury [J]. BMC Microbiology, 2021, 6(3): e0038421.
- [21] Petrova M I, Reid G, Haar J A T. *Lacticaseibacillus rhamnosus* GR-1, a.k.a. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 past and future perspectives [J]. Trends Microbiol, 2021, 29(8): 747-61.
- [22] Cheng L, Wang J, Dai H, et al. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus [J]. Adipocyte, 2021, 10(1): 48-65.
- [23] Corvera S. Cellular heterogeneity in adipose tissues [J]. Annu Rev Physiol, 2021, 83: 257-278.
- [24] Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil G S, et al. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues [J]. Diabetes, 2014, 63(3): 900-911.
- [25] Liu H, Zha X, Ding C, et al. Crystal structure of L-aspartate aminotransferase from *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Angiology, 2021, 72(10): 916-922.
- [26] Rioja J, Ariza M-J, García-Casares N, et al. Evaluation of the chylomicron-TG to VLDL-TG ratio for type I hyperlipoproteinemia diagnostic [J]. Eur J Clin Invest, 2020, 50(12): e13345.
- [27] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges [J]. Anal Biochem, 2017, 524: 13-30.
- [28] Rodríguez-Pastén A, Pérez-Hernández N, Añorve-Morga J, et al. The activity of prebiotics and probiotics in hepato gastrointestinal disorders and diseases associated with metabolic syndrome [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7229.
- [29] Brown G T, Kleiner D E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. Metabolism, 2016, 65(8): 1080-1086.
- [30] Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters [J]. Drug Metab Rev, 2017, 49(2): 197-211.
- [31] Lesmana C R A, Hasan I, Budihusodo U, et al. Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis [J]. J Dig Dis, 2009, 10(3): 201-206.
- [32] Agarkar V B, Babayeva N D, Wilder P J, et al. Crystal structure of mouse Elf3 C-terminal DNA-binding domain in complex with type II TGF-beta receptor promoter DNA [J]. J Mol Biol, 2010, 397(1): 278-289.
- [33] Brandi G, De Lorenzo S, Candela M, et al. Microbiota, NASH, HCC and the potential role of probiotics [J]. Carcinogenesis, 2017, 38(3): 231-240.
- [34] Hayes S R, Vargas A J. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea [J]. Explore (NY), 2016, 12(6): 463-466.
- [35] Gibson G R, Hutkins R, Sanders M E, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(8): 491-502.