

# 枯草芽孢杆菌JS01对高血脂小鼠脂质代谢的影响

曾 东<sup>1,2</sup>, 刘玉芝<sup>1</sup>, 唐 超<sup>1</sup>, 全弘扬<sup>1</sup>, 张海明<sup>1</sup>, 倪学勤<sup>1,2,\*</sup>

(1.四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心, 四川 雅安 625014;

2.动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 雅安 625014)

**摘 要:** 目的: 研究枯草芽孢杆菌JS01对高血脂小鼠脂质代谢的影响。方法: 90只昆明小鼠随机分为正常对照组(I)、高脂饲料组(II)、高脂饲料+枯草芽孢杆菌组(III), 每组于实验15、30、45d随机处死10只, 分别测定其血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量以及肝脏组织激素敏感性脂肪酶(HSL)活性。结果: 1) 实验15、30、45d时, II组小鼠血清TC、LDL-C、HDL-C水平和LDL-C/HDL-C比值均较I组显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。2) 15、30d时, II组小鼠血清TG水平显著高于I组和III组; 30、45d时, III组小鼠血清HDL-C水平较II组显著升高( $P < 0.05$ )。3) 45d时III组小鼠肝脏组织HSL活性显著高于I组和II组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 枯草芽孢杆菌JS01能显著升高高血脂小鼠血清HDL-C水平和肝脏组织HSL活性, 降低血清TC、TG和LDL-C水平, 对小鼠降血脂效果明显。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 高血脂; 脂质代谢; 激素敏感性脂肪酶

## Effect of *Bacillus subtilis* JS01 on Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Mice

ZENG Dong<sup>1,2</sup>, LIU Yu-zhi<sup>1</sup>, TANG Chao<sup>1</sup>, QUAN Hong-yang<sup>1</sup>, ZHANG Hai-ming<sup>1</sup>, NI Xue-qin<sup>1,2,\*</sup>

(1. Research Institute of Microecology, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Key Laboratory for Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** Objective: To explore the effect of *Bacillus subtilis* JS01 on lipid metabolism in hyperlipidemic mice. Methods: Ninety Kunming mice were randomly divided into normal control group (Group I), high-fat model group (Group II) and high-fat + *Bacillus subtilis* group (Group III). Ten mice were selected from each group and killed on the 15<sup>th</sup> (D15), 30<sup>th</sup> (D30) and 45<sup>th</sup> (D45) days of the experiment, respectively. Triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum and hormone-sensitive lipase (HSL) activity level in liver were detected. Results: 1) At the three time points, serum TC, LDL-C, HDL-C and LDL-C/HDL-C ratio in Group II were higher than that in Group I ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 2) At D15 and D30, serum TG in Group II was higher than that in Group I and Group III. At D30 and D45, serum HDL-C in Group III was higher than that in Group II ( $P < 0.05$ ). 3) At D45, liver HSL activity in Group III was higher than that in Group I and Group II ( $P < 0.01$ ). Conclusion: *Bacillus subtilis* JS01 has hypolipidemic effect to some extent by improving HDL-C in serum and HSL activity in liver, while reducing TG, TC and LDL-C in serum of hyperlipidemic mice.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; hyperlipidemia; lipid metabolism; hormone-sensitive lipase

中图分类号: R589.2; TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)13-0262-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201313055

血脂异常是一种常见的慢性代谢性疾病, 高血脂能导致动脉粥样硬化, 诱发冠心病、脑中风、心肌梗塞、偏瘫等各类心脑血管疾病, 甚至影响癌症的发病率, 严重危害人体健康和寿命, 被称作“人体健康的三大杀手之一”<sup>[1]</sup>。随着社会经济的发展、人民生活水平的提高及

生活方式的改变, 高脂血症及与其密切相关的糖尿病、肥胖症、代谢综合征等疾病, 已经成为我国常见的流行病。2002年的全国营养与健康状况调查显示, 我国城市居民的脂肪供能比高达35%, 比1992年增长6.6%, 高于世界卫生组织(WHO)推荐水平5%, 全国18岁以上人群血

收稿日期: 2012-05-02

基金项目: 国家级大学生创新性实验计划项目(101062619); 教育部留学回国人员科研启动基金项目(0835-1);

四川省学术带头人培养基金项目

作者简介: 曾东(1961—), 男, 教授, 博士, 主要从事微生物学研究。E-mail: zend@sicau.edu.cn

\*通信作者: 倪学勤(1968—), 女, 教授, 博士, 主要从事动物微生态研究。E-mail: xueqinni@yahoo.com

脂异常患病率高达18.6%，其持续增长趋势在经济高速增长阶段难以扭转<sup>[2]</sup>。

食疗是应对高脂血症最主要的方法，众多富含VC、共轭亚油酸及某些中草药提取物的功能性食品都有较好的降脂效果<sup>[3]</sup>。众多的报道证实，某些益生菌及其发酵食品也具有降脂、降胆固醇的作用，如双歧杆菌、乳酸杆菌<sup>[4-6]</sup>。但这些细菌容易受到胃酸、胆盐、高温等环境因素的影响，且难以储存<sup>[7]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)则对环境有更强的抵抗力，其芽孢也易于存取，它不仅能分泌多种维生素、消化酶、不饱和脂肪酸等活性物质，还能在拮抗致病菌的同时促进乳酸菌等有益菌的生长，其分泌的纳豆激酶还被证实具有溶血栓、抗炎的作用<sup>[8]</sup>。这表明，枯草芽孢杆菌很可能也具有降脂、降胆固醇的作用，但目前却没有相关的研究或报道，其在人体保健上也没有得到广泛应用。本实验通过研究枯草芽孢杆菌在高血脂小鼠脂质代谢中的影响，来探究其是否具有降脂、降胆固醇的作用，为拓展枯草芽孢杆菌在人体保健中的研究和应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、材料与试剂

实验动物为1周龄SPF级健康雄性昆明小鼠90只，由四川省医院动物实验室提供。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* JS01)由四川农业大学动物微生态研究中心提供，活菌计数 $1 \times 10^9$  CFU/g，菌粉在处理组中的添加比例为0.1%，使饲料中芽孢杆菌含量达 $1.0 \times 10^6$  CFU/g。

激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL)试剂盒，由四川省医院动物实验室提供。

### 1.2 仪器与设备

电子天平 沈阳龙腾电子有限公司；DGW-99台式高速微型离心机 宁波新芝科器研究所；Bio-Rad Model.680酶标仪 美国Bio-Rad公司；东芝TBA-40FR全自动生化仪 日本东芝公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 分组及饲喂方法

将90只小鼠随机分为3组，每组30只。I组设为正常对照组，饲喂基础饲料；II组设为高脂饲料组，饲喂高脂饲料；III组设为高脂饲料+枯草芽孢杆菌组，饲喂含 $1.0 \times 10^6$  CFU/g枯草芽孢杆菌的高脂饲料。饲料配方如表1，高脂饲料依照卫生部2003年颁布的《保健食品检验与评价技术规范》<sup>[9]</sup>配制，所有饲料经饲料机配制。每组小鼠分别于实验第15、30、45天随机抽取10只，禁食16h后进行指标测定<sup>[9]</sup>。

表1 饲料配方

Table 1 Ingredients of the diet for mice

基础饲料		高脂饲料	
成分	含量/%	成分	含量/%
骨粉	2	食盐	0.5
玉米粉	35	菜油	0.5
麦麸	25	微量元素	0.72
豆粕	25	复合维生素	0.03
鱼粉	8	蛋氨酸	0.13
酵母粉	2	赖氨酸	0.07
		基础饲料	78.8
		蛋黄粉	10
		猪油	10
		胆固醇	1
		胆盐	0.2

### 1.3.2 饲养管理

实验前先用基础饲料饲养1周以适应实验环境；实验温度保持18~25℃，每天18:00饲喂1次，自由饮水，每2d换1次垫料，每周对环境及鼠箱等器具清洁、消毒1次；每周配制1次基础饲料及育肥饲料，并置于冰箱中保鲜，适时检测各组饲料中枯草芽孢杆菌的含量，以保证枯草芽孢杆菌的含量和活性。

### 1.4 指标测定

#### 1.4.1 血清脂质含量的测定

摘除小鼠眼球进行眼眶采血，待血液中凝固血块收缩后离心10min(4000r/min)，经全自动生化仪测定小鼠血清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的含量。

#### 1.4.2 肝脏组织中激素敏感性脂肪酶(HSL)活性的测定

取出小鼠肝脏，称取肝脏质量，将肝脏组织以10倍生理盐水稀释并制成匀浆后离10min(3000r/min)，取上清液后使用试剂盒经ELISA法测定肝脏组织中HSL的活性。

### 1.5 数据分析

实验数据采用SPSS19.0软件进行分析，用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较用配对 $t$ 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 血清TG、TC含量的变化

表2 枯草芽孢杆菌对血清TG、TC的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of *Bacillus subtilis* on TG and TC in serum ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	TG含量/(mmol/L)			TC含量/(mmol/L)		
	15d	30d	45d	15d	30d	45d
正常对照组(I)	1.04±0.13	1.79±0.04	1.65±0.58	4.75±0.35	5.99±0.20	4.93±0.31
高脂饲料组(II)	3.26±0.81 <sup>a</sup>	6.09±0.84 <sup>a</sup>	0.99±0.08	9.23±0.75 <sup>b</sup>	10.76±0.08 <sup>A</sup>	10.91±0.17 <sup>A</sup>
高脂饲料+枯草芽孢杆菌组(III)	1.38±0.12 <sup>b</sup>	1.28±0.09 <sup>b</sup>	0.98±0.05	8.58±0.08	10.39±0.47	10.35±0.46 <sup>b</sup>

注：a. 与I组相比有显著性差异( $P < 0.05$ )；A. 与I组相比有极显著性差异( $P < 0.01$ )；b. 与II组相比有显著性差异( $P < 0.05$ )；B. 与II组相比有显著性差异( $P < 0.01$ )。下同。

由表2可知，实验15、30d时，II组小鼠的血清TG水平高于I组，而III组小鼠的血清TG水平低于II组，均呈显著性差异( $P < 0.05$ )。实验15、30d时，II组小鼠的血清TC水平高于I组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；实验45d时，II

表3 枯草芽孢杆菌对血清LDL-C、HDL-C、LDL-C/HDL-C比值的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 3 Effect of *Bacillus subtilis* on LDL-C, HDL-C, and LDL-C/HDL-C ratio in serum ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	LDL-C含量/(mmol/L)			HDL-C含量/(mmol/L)			LDL-C/HDL-C比值		
	15d	30d	45d	15d	30d	45d	15d	30d	45d
正常对照组(I)	1.20 $\pm$ 0.11	1.67 $\pm$ 0.13	1.83 $\pm$ 0.09	0.74 $\pm$ 0.17	0.75 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.08	1.62 $\pm$ 0.14	2.23 $\pm$ 0.10	2.01 $\pm$ 0.08
高脂饲料组(II)	3.26 $\pm$ 0.31 <sup>A</sup>	3.46 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	4.85 $\pm$ 0.22 <sup>A</sup>	1.42 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.30 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.98 $\pm$ 0.03 <sup>A</sup>	2.30 $\pm$ 0.24 <sup>A</sup>	2.66 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.12 <sup>A</sup>
高脂饲料+枯草芽孢杆菌组(III)	3.01 $\pm$ 0.34	3.47 $\pm$ 0.26	4.64 $\pm$ 0.04	1.76 $\pm$ 0.40	2.10 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.18 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.71 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	1.65 $\pm$ 0.12 <sup>B</sup>	2.13 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>

表4 枯草芽孢杆菌对小鼠肝质量肝脏组织HSL活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 4 Effect of *Bacillus subtilis* on the weight of liver and HSL activity in liver tissue ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	肝质量/g			HSL活力/(IU/g)		
	15d	30d	45d	15d	30d	45d
正常对照组(I)	1.15 $\pm$ 0.12	1.46 $\pm$ 0.14	1.36 $\pm$ 0.15	3.54 $\pm$ 0.21	3.71 $\pm$ 0.30	3.52 $\pm$ 0.08
高脂饲料组(II)	1.56 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	2.02 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	3.87 $\pm$ 0.04	3.33 $\pm$ 0.05	3.64 $\pm$ 0.18
高脂饲料+枯草芽孢杆菌组(III)	1.37 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	1.67 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.63 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	3.65 $\pm$ 0.20	3.59 $\pm$ 0.24	4.14 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>

组小鼠的血清TC水平高于I组( $P<0.01$ ),而III组小鼠的血清TC水平低于II组( $P<0.05$ )。

## 2.2 血清LDL-C、HDL-C含量的变化

由表3可知,实验15、30、45d时,II组小鼠的血清LDL-C水平高于I组,差异显著( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。实验15、30、45d时,II组小鼠的血清HDL-C水平高于I组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),且实验30、45d时,III组小鼠的血清HDL-C水平高于II组( $P<0.05$ )。实验15、30、45d时,II组小鼠的血清LDL-C/HDL-C比值均高于I组,而III组小鼠的血清LDL-C/HDL-C比值均低于II组,有显著性差异( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

## 2.3 小鼠肝质量及肝脏组织HSL活性变化

由表4可知,实验15、30、45d时,II组小鼠的肝脏质量高于I组,而III组小鼠的肝脏质量低于II组,差异显著( $P<0.05$ )。实验45d时,III组小鼠的肝脏组织HSL活性高于II组,差异显著( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

除45d时,II组小鼠的血清TG值低于I组(无显著性差异,可能与年龄渐增、肝功能严重低下有关),15、30、45d时,II组小鼠的血清TG、TC和LDL-C值均明显高于I组,说明高脂模型的建立较成功。15、30、45d时,II组小鼠的血清HDL-C值均明显高于I组,这可能与小鼠自身对高脂膳食的代偿性反应有关<sup>[10]</sup>;但II组小鼠比I组具有更高的血清LDL-C/HDL-C比值,而III组小鼠的LDL-C/HDL-C比值明显低于II组,且与I组无显著性差异,说明II组小鼠血液中胆固醇较I组和III组更多地依靠LDL-C进行转运。此外,III组小鼠的血清TG、TC和LDL-C值总体上低于II组,而血清HDL-C值明显高于II组,且III组小鼠的血清TG含量在15、30、45d时均与I组无显著性差异。结果表明,小鼠饲喂枯草芽孢杆菌后可以加速血液中胆固醇向肝外的转运,并降低血脂的含量,从而抑制高脂血症的发生。

HSL是动物体内脂肪动员和TG分解代谢的限速酶,能促进全身脂质的降解,在肝脏等组织中可检测到有活性的HSL的含量<sup>[11]</sup>。在15、30、45d时,II组小鼠的肝脏组织在色泽上比I组和III组更淡,尤其肝尖表现为黄白色,其肝质量也显著高于I组和III组,表明其有部分肝脏脂肪变性;同时,在45d时,III组小鼠的肝脏组织HSL活性明显高于I组和II组( $P<0.01$ ),说明枯草芽孢杆菌能通过升高肝脏组织HSL活性来促进脂肪的分解代谢,抑制脂肪肝的发生。但在15d和3d时,I组、II组和III组的肝脏组织HSL活性均无显著性差异,而此时3组间的血脂差异却很显著,推测某些其他活性因子也在促进脂质降解的过程中起到了重要作用。最新的研究也证明,敲除了HSL基因的动物也能在某些甘油三酯脂肪酶(ATGL)的作用下分解TG,某些活性肽如CGI-58肽,也在脂质降解的过程中有重要作用<sup>[12-13]</sup>。

益生菌是一类对人体有益的微生物,研究证明其能从多个方面对人体产生降脂、抗氧化、防癌等广泛的保健作用<sup>[14]</sup>。枯草芽孢杆菌作为益生菌的一种,具有耐酸、耐盐、耐高温及耐挤压的特点,其能有效调节肠道菌群平衡,并在夺氧夺氮的过程中产生多种对人体有益的有机酸、短链脂肪酸、酶及维生素等活性物质<sup>[15]</sup>。由此推断,本实验结果显示的枯草芽孢杆菌的降脂功能,可能通过以下几个方面发挥作用:1)影响肠道菌群。众多研究证实乳酸菌等有益菌具有降脂的功效<sup>[4-6]</sup>,而枯草芽孢杆菌能通过生物夺氧促进乳酸杆菌等厌氧微生物的生长繁殖,这一过程可能间接起到促进脂肪代谢的作用。2)分泌酶类代谢产物。枯草芽孢杆菌可分泌多种脂肪酶及蛋白酶,其中一些人体自身不能合成。枯草芽孢杆菌分泌的某些脂肪酶可与肠道中的脂类作用,生成多不饱和脂肪酸,而多不饱和脂肪酸已被证实能促进HSL基因的表达、减少脂肪的合成而促进脂质的分解<sup>[16]</sup>;抗脂质过氧化作用是某些中草药如山楂,起到降脂功能的重要机制<sup>[17]</sup>,枯草芽孢杆菌分泌的某些蛋白酶可催化生

成一些活性肽,这些活性肽很可能通过类似的抗氧化作用起到降脂的效果<sup>[18]</sup>。3)分泌非酶类代谢产物。枯草芽孢杆菌分泌的某些非酶类代谢产物,如维生素、有机酸,很可能也具有一定的降脂作用。四甲基吡嗪是中草药川芎根茎中得主要活性生物碱成分,能有效改善微血管、降脂抗氧化,具有防治心脑血管疾病的药理作用;它同时也可由枯草芽孢杆菌在白酒酿造过程中代谢产生的乙偶姻与环境中的氨发生非酶促反应而生成,是白酒具有独特风味及保健功能的重要原因;此外,日本传统发酵食品纳豆的保健功能也与枯草芽孢杆菌代谢产生四甲基吡嗪密切相关<sup>[19-20]</sup>。人体肠道中的枯草芽孢杆菌可能通过类似的代谢过程,产生四甲基吡嗪,从而改善微循环,抑制高血脂引起的动脉粥样硬化,对心脑血管疾病起到防治作用。

#### 参考文献:

- [1] 夏峰. 浅析高血脂可诱发多种疾病对人体的危害[J]. 医学信息, 2011(9): 4341-4342.
- [2] 李立明, 饶克勤, 孔灵芝, 等. 中国居民2002年营养与健康状况调查[J]. 中国流行病学杂志, 2005, 26(7): 478-484.
- [3] HAMER M, OWEN G, KLOEK J, et al. The role of functional foods in psychobiology of health and disease[J]. Nutrition Research Reviews, 2005, 18(1): 77-88.
- [4] 傅念, 卢放根, 阳学凤, 等. 四株双歧杆菌对高脂饮食大鼠肥胖形成的影响[J]. 中国消化杂志, 2009, 29(2): 126-128.
- [5] LARKIN T A, ASTHEIMER L B, PRILE W E, et al. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2009, 63(2): 238-245.
- [6] RABOT S, RAFTER J, RIJKERS G T, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism<sup>1-3</sup>[J]. The Journal of Nutrition, 2010, 140(3): 677-689.
- [7] FAYE T, TAMBURELLO A, VEGARUD G E, et al. Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an *in vitro* digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenal juice[J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(2): 558-566.
- [8] 李明, 双宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(9): 111-114.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003.
- [10] 陈慧敏, 高南南, 杨澜梅, 等. 高脂饮食豚鼠高密度脂蛋白代谢的特点[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 109-203.
- [11] LAFONTAN M, LANGIN D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue[J]. Progress in Lipid Research, 2009, 48(5): 275-297.
- [12] ZECHNER R, MADED F. Another way to get rid of fat[J]. Nature, 2009, 458: 1118-1119.
- [13] 李德深, 陈彩珍, 卢健. 脂解新关键酶: ATGL研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2011, 30(9): 878-881.
- [14] VIJ S, HATI S, YADAV D. Biofunctionality of probiotic soy yoghurt[J]. Food and Nutrition Sciences, 2011, 2(5): 502-509.
- [15] ZOKAEIFAR H, BALCÁZAR J L, SAAD C R, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 683-689.
- [16] SUN Chao, WEI Zhouwen, LI Yan. DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 731-737.
- [17] 隋宇. 降脂中药的作用机理探讨[J]. 中国民间疗法, 2010, 18(12): 59-60.
- [18] 陈浩, 胡晓赞. 蛋白水解物的抗氧化研究与展望[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 111-119.
- [19] YUTAKA K, SUN Jianfeng, SAKUYA T, et al. Growth characteristics of *Bacillus subtilis* (natto) in milk[J]. International Journal of Dairy Technology, 2010, 63(3): 418-422.
- [20] 徐岩, 吴群, 范文来, 等. 中国白酒中四甲基吡嗪的微生物产生途径的发现和证实[J]. 酿酒科技, 2011(7): 37-40.