

益生菌对酒精灌胃小鼠血清抗氧化性和肠道菌群的影响

周梦佳, 倪学勤*, 曾东, 张露, 涂腾

(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)

摘要: 目的: 研究益生菌干酪乳杆菌K1和枯草芽孢杆菌JS01对酒精性肝病小鼠肠道菌群及抗氧化性的影响。方法: 选取5周龄雄性昆明小鼠60只, 随机分为5组, 每组12只。第I组: 生理盐水对照组(阴性对照组); 第II组: 酒精对照组(阳性对照组); 第III组: 干酪乳杆菌K1组; 第IV组: 枯草芽孢杆菌JS01组; 第V组: 干酪乳杆菌K1+枯草芽孢杆菌JS01混合组。除第I组外, 其余组分别灌胃白酒和对应受试物8周, 检测肠道菌群数量及血清抗氧化指标。结果: 与阳性对照组相比, 干酪乳杆菌组的丙二醛(MDA)含量显著降低, 超氧化物歧化酶(SOD)的活性显著升高且过氧化氢酶(CAT)活性改变极其显著($P < 0.01$)。枯草芽孢杆菌组的SOD、MDA的改变都很显著($P < 0.05$), 而混合组的MDA含量无明显差异, 但SOD和CAT活性差异均分别达显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)水平。与阳性对照组相比, 干酪乳杆菌组和混合组的乳酸菌、双歧杆菌和总厌氧菌的数量显著增加($P < 0.05$), 枯草芽孢杆菌组的乳酸菌上升显著($P < 0.05$)但双歧杆菌及厌氧菌的变化不明显($P > 0.05$)。结论: 益生菌干酪乳杆菌K1和枯草芽孢杆菌JS01能明显改善酒精性肝病小鼠血清抗氧化能力, 对小鼠肝脏损害和肠道菌群失调有缓解作用。

关键词: 干酪乳杆菌; 枯草芽孢杆菌; 肠道菌群; 抗氧化; 酒精性肝损伤

Effects of Probiotic Bacteria on Serum Antioxidant Capacity and Intestinal Flora of Mice Gavaged with Alcohol

ZHOU Meng-jia, NI Xue-qin*, ZENG Dong, ZHANG Lu, TU Teng

(Animal Microecology Institute, College of Veterinary, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Objective: To study the beneficial effects of the probiotic bacteria *Lactobacillus casei* K1 and *Bacillus subtilis* JS01 on serum antioxidant capacity and intestinal flora of mice gavaged with alcohol. Methods: Sixty 5-week-old male Kunming mice were randomly divided into five groups ($n = 12$). Group I was gavaged with alcohol alone as a positive control and groups II, III, IV and V with alcohol plus normal saline, *Lactobacillus casei* K1 (1×10^8 CFU/mL) alone, *Bacillus subtilis* JS01 (1×10^8 CFU/mL) alone and both probiotic strains, respectively. The mice from each group were gavaged for 8 consecutive weeks. Microbial populations were enumerated in the intestinal flora of mice at the end of the experimental period and some serum antioxidant parameters were examined as well. Results: Compared with group I, the mice from group III showed a significant reduction in MDA content and a significant increase in SOD activity as well as an extremely significant difference in CAT activity ($P < 0.01$), and significant changes in SOD and MDA levels were also observed for those from group V. However, the mice from the group V exhibited no significant difference in MDA level from those from the positive control group, though the differences in SOD and CAT activities were significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$), respectively. In the mice from groups III and V, significantly higher amounts of intestinal lactic acid bacteria, bifidobacteria and anaerobic bacteria were observed as compared with the positive control mice ($P < 0.05$). Similarly, the mice from group IV presented a significant increase in the number of intestinal lactic acid bacteria ($P < 0.05$), although there were no significant differences in bifidobacteria or anaerobic bacteria ($P > 0.05$). Conclusion: *Lactobacillus casei* K1 and *Bacillus subtilis* can not only improve serum antioxidant capacity but also reduce hepatic damage and intestinal flora imbalance in mice gavaged with alcohol.

Key words: *Lactobacillus casei*; *Bacillus subtilis*; intestinal flora; antioxidant capacity; alcoholic hepatic injury

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0309-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323062

收稿日期: 2013-06-27

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动资金项目(0835-1); 四川省学术带头人培养基金资助项目;

大学生创新性实验计划项目(111062607)

作者简介: 周梦佳(1992—), 女, 本科, 主要从事动物微生态研究。E-mail: zhoulmengjia1992@163.com

*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

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的发病机制十分复杂，至今尚未完全阐明。目前的研究认为，在ALD的发病过程中，由于肠道屏障功能(intestinal barrier function, IBF)受损形成的肠源性内毒素血症及内毒素激活Kupffer细胞，在肝损伤中具有重要作用^[1-2]。Keshavarzian^[3]、Mathurin^[4]等报道，酒精能使小肠黏膜通透性增加，肠源性内毒素渗漏形成肠源性内毒素血症(IETM)，对肝脏造成“二次攻击”，加重肝损伤^[3-4]。乳酸杆菌是体内常见的益生菌，它既可以与毒素结合，阻止其被肠道吸收，易于排出体外，又可以在体内发挥益生作用^[5]。枯草芽孢杆菌在不利环境条件下能够以孢子的形式存活，并且在胃酸环境中仍能保持较高的活性，在改善畜禽生产性能、维持肠道菌群平衡、提高消化率等方面枯草芽孢杆菌均有较好的效果^[6-7]，且对于肝硬化有较好疗效^[8]。目前尚未见乳酸杆菌和枯草芽孢杆菌对酒精性肝病小鼠的影响报道。本实验拟通过建立小鼠酒精性肝病模型，分析小鼠血清抗氧化能力和肠道微生态环境，探究干酪乳杆菌K1和枯草芽孢杆菌JS01作为益生菌对酒精性肝病小鼠的影响，为益生菌在酒精性肝病治疗中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

56%红星二锅头白酒 北京红星股份有限公司；干酪乳杆菌K1(1.0×10^8 CFU/mL)、枯草芽孢杆菌JS01(1.0×10^8 CFU/mL)由四川农业大学微生物生态研究中心提供。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 动物与饲养管理

昆明雄性小鼠购自达硕生物技术有限公司，饲喂标准日粮，自由饮水，室温平均温度维持在(20.0 ± 0.2)℃。

1.3 实验设计

选择健康的5周龄雄性昆明种小鼠60只，随机分为5组，每组12只，包括：第I组：生理盐水对照组(阴性对照组)；第II组：酒精对照组(阳性对照组)；第III组：干酪乳杆菌K1组；第IV组：枯草芽孢杆菌JS01组；第V组：干酪乳杆菌K1+枯草芽孢杆菌JS01混合组。适应性饲养1周后开始正式实验，I组动物用与阳性对照组等量的生理盐水每日灌胃，持续8周，II组动物在前两周每天用红星二锅头灌胃(2g/(kg·d))，从第3周开始为4g/(kg·d)，持续8周。III、IV、V组动物在II组灌胃酒精的基础上分别灌胃相对应的受试物，剂量为2mL/(kg·d)，每日灌胃且持续8周。

1.4 样品采集及检测

实验期间，每2周称小鼠体质量1次，采集新鲜粪样，用作活菌计数，在最后一次灌胃小鼠后，将其禁食过夜，次日用乙醚麻醉小鼠，眼球采血，室温静置4h后，3500r/min离心10min分离血清，保存在-20℃用于检测抗氧化活性。

1.5 指标检测

1.5.1 血清抗氧化指标

按照试剂盒说明书检测MDA、GSH-Px、CAT和SOD的活性。

1.5.2 粪样活菌计数

在无菌条件下，取1.0g混合均匀的粪样，加入装有99mL无菌生理盐水的三角瓶中，用漩涡振荡器振荡10min，使试样混合均匀，即成 10^{-2} 稀释液，然后10倍递增稀释，分别取适当稀释度的稀释液0.1mL，涂布接种于乳酸菌培养基(MRS)、双歧杆菌培养基(TPY)、肠球菌选择性培养基(EC)、肠道杆菌培养基(EMB)、脑心浸液培养基(BHI)，每个稀释度做3个重复。37℃需氧或厌氧培养至长出菌落后进行计数，计算每克粪样中的活菌数。

1.6 数据处理

采用SPSS13.0进行显著性分析，不同处理组间的比较采用方差分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠体质量变化

表1 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对小鼠体质量的影响

Table 1 Effects of *Lactobacillus casei* and *Bacillus subtilis* on body weight in mice

时间/周	阴性对照组	阳性对照组	干酪乳杆菌K1组	枯草芽孢杆菌JS01组	混合组
0	24.35±0.88 ^a	23.60±1.04 ^a	23.38±1.19 ^a	23.94±1.38 ^a	24.22±1.14 ^a
2	28.95±1.19 ^a	28.85±1.53 ^a	29.23±1.59 ^a	29.08±1.50 ^a	29.38±1.07 ^a
4	36.08±2.41 ^a	33.11±2.63 ^b	36.30±2.52 ^a	32.80±2.39 ^b	33.35±2.22 ^b
6	38.68±2.36 ^A	32.58±3.25 ^B	38.57±4.23 ^A	33.31±3.30 ^B	35.43±3.93 ^{AB}
8	38.69±1.38 ^{Aa}	32.64±2.26 ^{Bb}	37.84±3.31 ^{Aa}	34.27±1.85 ^{Bb}	35.87±3.78 ^A

注：同行小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)；同行大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)。下同。

各组小鼠体质量变化见表1，第0~2周时，各组小鼠体质量差异不明显($P > 0.05$)，从第4周开始，与阳性对照组相比，阴性对照组小鼠体质量差异显著($P < 0.05$)，在第6~8周差异极其显著($P < 0.01$)，在实验的中后期，干酪乳杆菌K1组小鼠的体质量极显著高于阳性对照组($P < 0.01$)，而枯草芽孢杆菌JS01组小鼠体质量虽有改变但无统计学意义($P > 0.05$)，混合组小鼠体质量从第6周开始与阳性对照组差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对酒精灌胃小鼠血清抗氧化能力的影响

表2 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对酒精灌胃小鼠血清抗氧化能力的影响

Table 2 Effects of *Lactobacillus casei* and *Bacillus subtilis* on serum antioxidant capacity in mice

项目	阴性对照组	阳性对照组	干酪乳杆菌K1组	枯草芽孢杆菌JS01组	混合组
SOD活力/(U/mL)	103.09±16.78 ^a	101.91±9.76 ^b	113.52±17.57 ^b	114.24±14.42 ^b	112.39±15.97 ^b
MDA含量/(nmol/mL)	14.26±3.17 ^a	15.12±1.82 ^a	11.62±2.38 ^b	12.19±2.69 ^b	14.94±2.38 ^a
CAT活力/(U/mL)	6.70±3.74 ^a	2.77±1.18 ^b	5.59±1.85 ^a	3.89±1.58 ^b	5.83±2.93 ^a
GSH-Px活力/(U/mL)	443.32±17.63 ^a	421.28±9.37 ^b	440.91±15.66 ^a	419.36±1.42 ^b	433.33±5.38 ^a

由表2可知,与阳性对照组小鼠相比,阴性对照组小鼠的血清SOD活性和MDA含量无显著差异($P>0.05$),CAT活性极显著升高了141.9%($P<0.01$),干酪乳杆菌K1组MDA含量降低了23.15%($P<0.05$),SOD活性显著升高11.39%($P<0.05$);枯草芽孢杆菌JS01组MDA含量,SOD活性差异均显著($P<0.05$),CAT活性差异不显著($P>0.05$),混合组的MDA含量和GSH-Px活性无明显改变,但SOD和CAT活性差异均分别达显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)水平。

2.3 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对酒精灌胃小鼠肠道菌群的影响

表3 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对酒精灌胃小鼠肠道菌群数量的影响

Table 3 Effects of *Lactobacillus casei* and *Bacillus subtilis* on intestinal flora in mice

项目	阴性对照组	阳性对照组	干酪乳杆菌K1组	枯草芽孢杆菌JS01组	混合组	lg(CFU/g)
总厌氧菌	6.05±0.34 ^b	5.84±0.40 ^b	6.35±0.41 ^a	6.02±0.44 ^b	6.27±0.39 ^a	
乳酸菌	6.17±0.14 ^b	5.73±0.36 ^a	6.28±0.38 ^b	6.26±0.09 ^b	6.32±0.29 ^b	
双歧杆菌	6.09±0.34 ^a	5.72±0.11 ^b	6.19±0.10 ^a	5.93±0.25 ^{ab}	6.24±0.13 ^a	
总需氧菌	6.09±0.13 ^a	5.96±0.36 ^a	6.21±0.54 ^a	6.01±0.47 ^a	6.24±0.28 ^a	
肠杆菌	4.78±0.05 ^a	4.86±0.08 ^a	5.20±0.64 ^a	5.22±0.46 ^b	5.29±1.48 ^b	
肠球菌	4.92±0.18 ^a	4.96±0.03 ^a	5.32±0.55 ^b	4.92±0.09 ^a	5.33±0.62 ^b	

由表3可知,与阴性对照组比,酒精灌胃组小鼠肠道中的双歧杆菌、乳酸菌和总厌氧菌数量均下降($P<0.05$),而肠杆菌、肠球菌变化不明显。与阳性对照组小鼠相比,干酪乳杆菌K1组和混合组的总厌氧菌、乳酸菌、双歧杆菌显著升高($P<0.05$),肠道益生菌群趋向正常数值,枯草芽孢杆菌JS01组小鼠肠道乳酸菌上升明显($P<0.05$),但总厌氧菌和双歧杆菌的数量改变不明显($P>0.05$)。

3 结论

3.1 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对小鼠体质量的影响

酒精能够刺激胃肠道黏膜上皮细胞,Atkinson等^[9]的研究认为酒精及其代谢产物乙醛可以通过降低酪氨酸磷酸酶的活性,使细胞紧密连接蛋白重新分布,最终破坏肠上皮细胞的紧密连接增加其通透性。长期的酒精刺激

可影响食物的消化吸收,使动物体因营养不良而逐渐消瘦,乳酸菌通过磷壁酸与肠黏膜上皮细胞形成一个生理屏障,从而阻止酒精对肠道黏膜的损伤。本实验结果表明,在长期持续灌胃酒精后,小鼠体质量明显下降,而在应用干酪乳杆菌和枯草芽孢杆菌干预后,小鼠体质量有一定的增加,且干酪乳杆菌组效果更好。

3.2 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对酒精灌胃小鼠血清抗氧化能力的影响

动物机体内存在大量的不饱和脂肪酸,这些不饱和脂肪酸极易受到过氧化作用而产生脂质过氧化物,而自由基能够通过氧化作用来攻击所遇到的任何分子,使体内大分子物质产生变性、交联或断裂,从而使机体受到损伤。进入体内的乙醇及其代谢产物可产生大量的自由基而对肝脏等器官造成损伤^[9-10],因此获得有效清除自由基及提高体内清除自由基的酶类活性物质是解酒保肝的重点。机体内存在的酶促防御体系包括SOD、CAT、GSH-Px等,它们可以有效清除ROOH等活性氧并终止自由基链式反应从而防止机体的氧化。而血液中的这些氧化酶活性是反映机体抗氧化能力的重要指标。根据Alexopoulos等^[11]报道,枯草芽孢杆菌可以改善仔猪肠黏膜氧化损伤,减轻腹泻。有学者发现芽孢杆菌通过显著增加机体GSH-Px、SOD等抗氧化酶活性和抗超氧阴离子活性,而使其总抗氧化能力显著提高^[12-13];Lin等^[14-15]的研究也表明乳酸菌具有清除ROS、减少氧化损害的能力。本实验结果表明,干酪乳杆菌、枯草芽孢杆菌可以提高SOD和CAT等抗氧化酶的活性,降低MDA含量,消除自由基对机体的影响。但是,混合组中虽然SOD等酶活显著升高但MDA无明显变化,具体原因尚不清楚。从整体实验结果来看,益生菌具有提高机体抗氧化能力的作用。

3.3 干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌对酒精灌胃小鼠肠道菌群的影响

正常肠道菌群以双歧杆菌、乳酸菌等专性厌氧菌为主,这些益生菌可促进厌氧革兰氏阳性菌的生长,抑制革兰氏阴性菌的生长,促进IgA分泌,从而增强细胞免疫功能^[16]。由于来自肠道的血流必须先经过门脉系统才能进入肝脏,作为门静脉的首过器官,肝脏不断接收肠道血液进入门脉系统。因此,肝脏的功能改变与肠道菌群的动态变化联系十分密切。有学者研究发现^[17],肠道菌群失调时,其内源性乙醇和LPS增多,随后肠上皮细胞和肝巨噬细胞相继释放相关炎性细胞因子,激活转化生长因子-β(TGF-β),促炎性细胞因子的增加使抗炎因子及抑肝细胞因子减少,促使肝脏接收更多的肠源性内毒素,使得肝脏内氧化应激增强,引起肝纤维化及脂质过氧化,最终使脂肪沉积的肝细胞变性坏死,慢性肝病常伴随着肠道微生物的失调,当肝脏发生病变时,肠道

菌群会出现相应的菌群失调症，其益生菌将会减少而有害的肠杆菌过度繁殖。有研究证实^[18]，乳酸菌具有较强的抑制肠道内致病菌的作用，并产生多种活性物质，抑制腐生菌的定殖与繁殖，从而减少内毒素、胺类等有毒物质的产生，防止其对肝脏的毒害，起到一定的保护肝脏作用。本实验也发现，酒精灌胃小鼠使小鼠肝脏受损时，常见益生菌双歧杆菌、乳酸杆菌和总厌氧菌的数量降低，而肠杆菌和肠球菌的数量均上升，引起肠道内微生态失调。在灌胃干酪乳杆菌及枯草芽孢杆菌后，其肠道益生菌均趋于恢复到正常水平。

参考文献：

- [1] ADACHI Y, MOORE L E, BRADFORD B U, et al. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol[J]. Gastroenterology, 1995, 108(1): 218-224.
- [2] EWASCHUK J, ENDERSBY R, THIEL D, et al. Probiotic bacteria prevent hepatic damage and maintain colonic barrier function in a mouse model of sepsis[J]. Hepatology, 2007, 46(3): 841-850.
- [3] KESHAVARZIAN A, HOLMES E W, PATEL M, et al. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage[J]. The American Journal of Gastroenterology, 1999, 94(1): 200-207.
- [4] MATHURIN P, DENG Q G, KESHAVARZIAN A, et al. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats[J]. Hepatology, 2000, 32(5): 1008-1017.
- [5] 郭兴华. 益生菌基础与应用[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [6] WANG Y, CHO J H, CHEN Y J, et al. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs[J]. Livestock Science, 2009, 120(1): 35-42.
- [7] LI Ke, ZHENG Tianling, TIAN Yun, et al. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4): 525-530.
- [8] 陈诗焕. 益生菌制剂对预防和治疗肝硬化患者发生并发症的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(3): 277.
- [9] ATKINSON K J, RAO R K. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2001, 280(6): 1280-1288.
- [10] BODE C, BODE J C. Effect of alcohol consumption on the gut[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2003, 17(4): 575-592.
- [11] ALEXOPOULOS C, GEORGULAKIS I E, TZIVARA A, et al. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2004, 88(11/12): 381-392.
- [12] 余东游, 毛翔飞, 秦艳, 等. 枯草芽孢杆菌对肉鸡生长性能及其抗氧化和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(3): 24-25.
- [13] 崔志文, 黄琴, 黄怡, 等. 枯草芽孢杆菌对Caco-2 细胞抗氧化功能的影响研究[J]. 动物营养学报, 2011, 23(2): 293-298.
- [14] LIN M Y, YEN C L. Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 1629-1634.
- [15] LIN M Y, CHANG F J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2000, 45(8): 1617-1622.
- [16] ZHANG Wei, GU Yurong, CHEN Youming, et al. Intestinal flora imbalance results in altered bacterial translocation and liver function in rats with experimental cirrhosis[J]. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2010, 22(12): 1481-1486.
- [17] 贺杰, 吴小平. 肠道菌群失调与慢性肝病[J]. 国际消化病杂志, 2012, 3(1): 4-7.
- [18] 肖丽霞, 王慧晶, 顾瑞霞, 等. 乳酸菌对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 29(4): 37-41.