

乳酸菌对高脂血症小鼠血脂和肠道菌的影响*

王武华¹ 王翠萍² 岳寿松^{2,3}

摘要

目的:研究功能乳酸菌制剂的降血脂作用及对肠道菌的影响。

方法:建立小白鼠高脂血症动物模型;模型小鼠30只,随机分为:生理盐水组、复合乳酸菌组和辛伐他汀组,每组10只。采取灌胃处理,分别灌服生理盐水、复合乳酸菌制剂(等比例混合的植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌)和降血脂药物辛伐他汀。

结果:与生理盐水比较,乳酸菌和辛伐他汀药物处理显著降低了小鼠血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量($P < 0.05$);乳酸菌处理和药物处理间TC、TG和HDL-C无显著差异。与降血脂药物相比,乳酸菌处理显著增加小鼠粪便乳酸菌数量($P < 0.05$),降低了大肠杆菌($P < 0.05$)和肠球菌数量($P < 0.01$)。

结论:乳酸菌制剂具有降低血脂、增加肠道有益菌数量、降低肠道有害菌数量的作用。

关键词 乳酸菌;胆固醇;甘油三酯;肠道菌

中图分类号:Q935, R589.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2017)-09-0989-05

Effects of lactobacillus on cholesterolemia and gut flora in hyperlipidemia mice/WANG Wuhua, WANG Cuiping, YUE Shousong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(9): 989—993

Abstract

Objective: To test the effects of natural lactobacillus bio-products on lipid metabolism and intestinal microflora.

Method: A hyperlipidemia mouse model system was developed. 30 hyperlipidemia mice were randomly divided into three equal groups, i.e., saline water (control treatment), lactobacillus cocktail, and simvastatin. Mice were injected daily with saline water, lactobacillus (*L. plantarum*, *L. acidophilus* and *L. casei*, mixture in equal volume), and simvastatin solution, respectively.

Result: Significant lower total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were found in the blood serum from mice treated with lactobacillus and pharmaceutical simvastatin. CFUs (colony forming unity) of lactobacillus were much higher ($P < 0.05$), whereas CFUs of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were much lower ($P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively) in mice feces of treated by lactobacillus compared to pharmaceutical simvastatin.

Conclusion: Lactobacillus probiotics reduced levels of cholesterolemia, increased CFUs of lactobacillus and reduced CFUs of *E. coli* and *E. faecalis* in gut.

Author's address Clinical Laboratory, Linyi Luozhuang Central Hospital, Linyi, Shandong Province, 276017

Key word *Lactobacillus*; cholesterol; triglyceride; gut flora

高脂血症是一种高发代谢疾病,指血中总胆固醇(total cholesterol, TC)和/或甘油三酯(triglyceride, TG)过高或高密度脂蛋白胆固醇(high density

lipoprotein-cholesterol, HDL-C)过低。高脂血症是脑卒中、冠心病、心肌梗死、猝死的危险因素。此外,高脂血症也是促进高血压、糖耐量异常、糖尿病的一

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.09.004

*基金项目:国家科技支撑计划(2012BAK17B00);山东省科技发展计划(2012GGC02026)

1 山东临沂罗庄中心医院检验科,临沂,276017; 2 山东省农业科学院生物技术研究中心; 3 通讯作者

作者简介:王武华,女,主管检验师; 收稿日期:2016-10-12

个重要危险因素^[1]。他汀类药物被广泛用于降血脂、糖尿病等代谢疾病的治疗,但由于该类化合物具有肌肉疲劳、腹泻、记忆力损失和神经损害等严重不良反应,最终可能甚于病症的有害程度^[2]。乳酸菌是最早被发现并应用的益生菌,现在已广泛应用于食品工业、医疗保健和疾病防治等领域^[3]。乳酸菌对血脂的影响早就引起关注,Mann等^[4]发现,非洲Masai人大量饮用由乳杆菌发酵的乳制品,其体内胆固醇含量普遍较低。陈大卫等^[5]从广西巴马长寿人群肠道中分离得到51株乳酸菌,通过体外试验筛选出16株降胆固醇及甘油三酯能力较强的菌株,降解率均分别大于30.0%和5.0%。人和动物试验均已证明,乳酸菌能够降低血清中的血脂水平^[6]。但关于乳酸菌降血脂条件下肠道菌群变化的研究较少。本研究通过对高脂血症小鼠灌服复合乳酸菌及降血脂药物,研究乳酸菌对血脂水平的影响,并分析了乳酸菌和药物处理小鼠肠道菌的变化,为乳酸菌降血脂机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)SD65、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)SD07和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)SD02由山东省农业科学院生物技术研究中心微生物研究室保存。各菌株分别活化、液体培养,离心收集菌体,用生理盐水悬浮菌体,配成10⁹CFU/ml。三种乳酸菌按等比例混合为复合乳酸菌,冷藏保存供试验用。具体过程参照Yue等^[7]。

试验用小白鼠购自山东大学实验动物中心(许可证号SCXK鲁20090001)。50只雄性小鼠(体重范围20.0—22.0g)随机分成5组,每组10只。其中1组饲喂普通饲料(购自山东大学实验动物中心)作为对照,其余4组均喂食高脂饲料(购自山东大学实验动物中心)。隔天称体重,至小鼠平均体重大约40g,眼球取血,测定血清甘油三酯及胆固醇含量,与喂食普通饲料组对比,其显著升高($P < 0.05$),表示建模成功(表1)。各组模型小鼠混合,选取体重相近的小鼠30只,重新随机平均分成3组,进行试验处理。分别为生理盐水组(对照处理组)、复合乳酸菌

表1 高脂血症小鼠血清TC、TG和LDL-C含量(mmol/L)

组别	例数	TC	TG	LDL-C
对照组(普通饲料)	10	2.22	1.44	1.55
模型组(高脂饲料)	40	4.40 ^①	1.51 ^①	2.23 ^①

与对照比较:① $P < 0.05$

组和辛伐他汀药物组。对照处理组每只小鼠灌胃生理盐水0.3ml/只;乳酸菌处理每只小鼠每天灌胃0.3ml复合乳酸菌剂(等比例混合的嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌和植物乳杆菌生理盐水悬浮液);辛伐他汀处理为市售降血脂药物,按使用说明剂量换算成每公斤体重,用生理盐水溶解至0.3ml灌胃。对照组和试验组小鼠均饲喂普通饲料(购自山东大学实验动物中心)。每天上午9:00—10:00灌胃,自由饮水与采食。隔天称小鼠体重,取小鼠粪便样品,放入无菌离心管,立即于-20℃存放备用。灌胃15d,空腹24h,小鼠眼球取血,取血后立即处死,进行解剖取附睾脂肪垫、肾周脂肪垫、肾脏、脾脏、肝脏、胰腺,分别称重并计算脏器系数。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠血清TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和HDL-C测定用试剂盒。试剂盒购自Beckman Coulter, Inc。比色法测定,操作步骤按使用说明书进行。

1.2.2 培养基。MRS培养基:蛋白胨10g,牛肉膏10g,酵母膏5g,CH₃COONa·3H₂O 5g,柠檬酸氢二胺2g,葡萄糖20g, Tween-80 1ml, K₂HPO₄·3H₂O 2g, MgSO₄·7H₂O 0.58g, MnSO₄·H₂O 0.22g, CaCO₃ 2g加蒸馏水至1000ml, pH 7.2。116℃灭菌。

TPY半固体培养基:水解酪蛋白10g,大豆胨5g,酵母浸粉2g,葡萄糖5g, L-半胱氨酸0.5g, K₂HPO₄·3H₂O 2g, MgCl₂·6H₂O 0.5g, ZnSO₄·7H₂O 0.25g, CaCl₂ 0.15g, FeCl₃·6H₂O 1g, 琼脂0.3%—0.4%, Tween-80 1ml, 加蒸馏水至1000ml, pH值6.4—6.6。116℃灭菌。

大肠杆菌培养计数:EMB平板涂布法,把培养基倒入培养皿中,冷却。取0.1ml样品稀释液均匀涂布。3次重复。37℃,倒置培养48h计数,大肠杆菌菌落带有金属光泽。

胆盐—七叶苷—叠氮钠琼脂:牛肉浸粉3g,胰

酪蛋白胨 17g,酵母粉 5g,牛胆粉 10g,NaCl 5g,七叶苷 1g,柠檬酸铁铵 0.5g,叠氮化钠 0.25g,柠檬酸钠 ($C_6H_5Na_3O_7$) 1g,2%琼脂,加蒸馏水至 1000mL,pH 值 7.1。116℃灭菌。

伊红美蓝培养基(EMB):蛋白胨 10g,乳糖 10g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2g,琼脂 20g,加蒸馏水至 1000ml,2%伊红水溶液 20ml,0.5%美蓝水溶液 13ml,pH 值 7.2—7.4。116℃灭菌。

乳酸菌用 MRS 平板倾注法,37℃,培养 48h。

双歧杆菌用 TYP 半固体培养法。无菌小试管,加入 9ml 热的半固体培养基,待培养基温度大约降至 50℃,迅速加入 1ml 样品稀释液,轻轻混匀(注意不能混入空气),表面覆盖 1—2mm 厚灭菌的液体石蜡,试管口密封。3 次重复。37℃培养,48h 后计数。

肠球菌平板涂布法,胆盐—七叶苷—叠氮钠培养基倒入培养皿中,冷却。取 0.1ml 样品稀释液,均匀涂布。3 次重复。37℃,倒置培养 48h 计数,肠球菌菌落周围培养基变黑色。

大肠杆菌用 EMB 平板涂布法,37℃,培养 48h。大肠杆菌菌落带有金属光泽。

菌数测定:

菌落计数:样品菌数(CFU/克粪样) = 菌落数 × 稀释倍数/取样体积

2 结果

2.1 高脂血症小鼠脏器系数变化

实验小白鼠饲喂高脂饲料 20 天后,血清胆固醇、甘油三酯显著升高($P < 0.05$),表明小鼠高脂血症建模成功。高脂血症小鼠脏器系数结果表明,小鼠体重增加主要是脂肪增加,与对照相比,高脂血症

小鼠附睾脂肪系数和肾周脂肪系数增加显著(表 2),说明体内脂肪积累或肥胖是引起高脂血症的重要原因。

2.2 乳酸菌对高脂血症小鼠血清胆固醇及甘油三酯等含量的影响

测定了各处理小鼠血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 含量。结果表明,乳酸菌处理和辛伐他汀药物均显著降低了血清 TC、TG 和 LDL-C 水平。乳酸菌和药物处理间差异不显著,说明服用乳酸菌能达到与药物相同的降血脂效果(表 3)。

2.3 乳酸菌对小鼠粪便主要菌群的影响

2.3.1 乳酸菌数量:乳酸菌为人和动物肠道最重要的益生菌之一,人们最早对益生菌的认识源于乳酸菌。研究结果表明,辛伐他汀处理试验期小鼠粪便乳酸菌数量呈下降趋势,由 4.5×10^7 CFU/g 降为 3.7×10^6 CFU/g,而乳酸菌处理明显升高,由 6.6×10^7 CFU/g 升高到 9.5×10^8 CFU/g。同一处理试验开始与试验结束小鼠粪便乳酸菌含量表现为:生理盐水处理无显著差异,辛伐他汀试验结束比试验开始显著降低,乳酸菌处理试验结束比试验开始显著提高。不同处理间小鼠粪便乳酸菌数量,复合乳酸菌处理最高,其次是生理盐水,辛伐他汀处理最低,处理间差异均达到显著水平(表 4)。说明他汀类药物对小鼠肠道有益菌产生不良影响,而乳酸菌处理通过增加肠道有益菌数量而改善了肠道微生物菌群。

2.3.2 双歧杆菌数量:双歧杆菌为大肠内最重要的益生菌,对机体抗衰老和抗癌等均具有重要作用。研究结果表明,试验开始和试验结束生理盐水和复合乳酸菌处理粪便双歧杆菌数量无显著差异,辛伐他汀处理试验结束粪便中双歧杆菌数量显著降

表 2 高脂血症小鼠脏器系数

($\bar{x} \pm s$, g/100g)

组别	例数	肾脏系数	肝脏系数	脾脏系数	胰腺系数	肾周脂肪系数	附睾脂肪系数
对照组	10	1.6±0.14	4.9±0.41	0.39±0.081	0.18±0.042	0.73±0.17	2.49±0.32
模型组	40	1.3±0.13	4.7±0.68	0.34±0.096	0.19±0.043	1.02±0.26 ^①	4.56±0.73 ^②

与对照比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

表 3 不同处理小鼠血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 含量

($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
生理盐水组	4.37±0.31	1.53±0.11	2.23±0.11	0.89±0.062
辛伐他汀组	3.23±0.22 ^①	0.87±0.051 ^①	2.08±0.04 ^①	0.97±0.085
复合乳酸菌组	3.17±0.15 ^①	0.93±0.062 ^①	2.02±0.05 ^①	1.03±0.082

与对照比较:① $P < 0.05$

低,而且与另外两个处理的降低的差异亦有显著性意义(表 4)。

2.3.3 肠球菌数量:肠球菌是人类和温血动物肠道的正常栖居菌,以前曾认为肠球菌是对人类无害的共栖菌,但近年来的研究已证实了它的致病潜力。

表4 不同处理对小鼠粪便主要菌类数量的影响 (CFU, log10,n=10)

组别	乳酸菌		双歧杆菌		肠球菌		大肠杆菌	
	试验开始	试验结束	试验开始	试验结束	试验开始	试验结束	试验开始	试验结束
生理盐水组	7.58±0.064	7.39±0.087	7.73±0.056	8.17±0.045	5.06±0.340	4.15±0.052	6.86±0.340	6.57±0.12
辛伐他汀组	7.65±0.074	6.57±0.066 ^{①②}	7.64±0.090	6.67±0.160 ^{①③}	5.45±0.280	5.16±0.037 ^②	7.01±0.300	6.89±0.09
复合乳酸菌组	7.82±0.029	8.98±0.048 ^{①②}	7.71±0.100	7.82±0.045	5.65±0.017	2.34±0.026 ^{④⑤}	7.01±0.065	5.39±0.07 ^{①⑥}

试验结束与试验开始比较:① $P < 0.05$;与生理盐水比较:② $P < 0.05$;与生理盐水和乳酸菌处理比较:③ $P < 0.05$;试验结束与试验开始比较:④ $P < 0.01$;与生理盐水比较:⑤ $P < 0.01$;与生理盐水和辛伐他汀比较:⑥ $P < 0.05$

除可引起多种社区感染外,目前在革兰氏阳性球菌中,肠球菌是仅次于葡萄球菌属细菌的重要医院感染病原菌。研究表明,试验结束复合乳酸菌处理小鼠粪便肠球菌数量显著降低(表4)。

2.3.4 大肠杆菌数量:大肠杆菌为主要肠道菌群,也是一类重要的潜在有害菌。试验结果表明,小鼠粪便大肠杆菌数量试验结束与试验开始比较,生理盐水组和辛伐他汀处理也略有降低,复合乳酸菌处理显著下降,由 1.02×10^7 CFU/g 粪便下降为 4.0×10^4 CFU/g。不同处理间比较分析,乳酸菌处理显著低于生理盐水和辛伐他汀药物(表4)。说明乳酸菌处理显著降低了肠道有害菌大肠杆菌的数量。

3 讨论

乳酸菌是人和动物肠道最重要的生理菌群之一,对发挥肠道功能具有重要作用。研究表明,某些乳酸菌具有降低血清胆固醇的作用^[5,8-9]。乳酸菌对胆固醇的去除作用具有复杂的机制,研究表明,在乳酸菌产生的特殊酶系中,有降低胆固醇的酶系,可以抑制胆固醇的合成;乳酸菌发酵生成短链脂肪酸,可以阻断胆固醇的自体合成,从而降低血液胆固醇的含量^[10]。乳酸菌产生的胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH)可以使结合胆酸分解为游离胆酸,游离胆酸与胆固醇形成复合物共同沉淀下来,从而导致环境中胆固醇含量的降低^[8,11]。乳酸菌菌体可以和肠道内的胆固醇相结合,减慢胆固醇的吸收,降低血液中脂蛋白的形成速度,减少循环系统中存在的胆固醇的含量^[12]。Gilliland等^[13]发现,嗜酸乳杆菌菌体细胞可以同化胆固醇到自身的细胞膜中去,而且细胞总的脂肪酸含量上升,说明胆固醇与菌体细胞结合改变了细胞膜结构^[14]。胆固醇结合或黏附到细胞膜上可降低小肠中被吸收进入血液的胆固醇含量,

从而降低血清胆固醇含量。

本试验利用高脂血症小鼠模型,研究了乳酸菌制剂和降血脂药物对血清总胆固醇、甘油三酯等指标的影响。结果表明,乳酸菌处理和辛伐他汀药物显著降低了血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平。乳酸菌和药物处理间差异不显著,说明服用乳酸菌能达到与药物相同的降血脂效果(见表2)。肠道微生物与脂肪代谢密切相关,乳酸菌处理小鼠粪便乳酸菌数量比辛伐他汀药物处理显著升高,对小鼠血脂降低起到重要作用。乳酸菌及菌体代谢物有抗胆固醇因子,乳酸菌的代谢能显著减少肠管对胆固醇的吸收,同时,乳酸菌吸收部分胆固醇并将其转变为胆酸盐从体内排出。

Yadav等^[15]研究表明,以一定比例混合嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌能够有效降低血浆总胆固醇等指标。Akalin等^[16]给小鼠饲喂含有嗜酸乳杆菌的酸奶和鲜奶,发现嗜酸乳杆菌可以显著降低小鼠血清总胆固醇和低密度脂蛋白含量。乳酸菌对大鼠灌胃研究表明,具有胆盐水解酶活性的乳酸菌可显著降低血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯含量($P < 0.05$)^[17]。本研究得出的结论与上述报道一致。复合乳酸菌处理还显著降低了小鼠粪便中肠球菌数量(见表4)。他汀类药物作为临床广泛应用的降脂药,其不良反应如相关性肌病、肝损害、过敏反应、眼外肌麻痹、关节痛等日益引起关注^[18-19],但还未有关于他汀类药物对肠道菌群影响的报道。本研究发现,辛伐他汀药物降低了小鼠粪便有益菌乳酸菌和双歧杆菌数量。近年来快速发展的肠道微生物组学技术已证实代谢相关疾病如高脂血症^[7]、肥胖和糖尿病^[21-22],甚至癌症^[23-24]均与肠道微生物组密切相关。他汀类药物引起的肠道菌群变化是否与某些不良反应具有相关性,有待进一步探索。

参考文献

- [1] Chaput JP, Doucet E, Tremblay A. Obesity: a disease or a biological adaptation? An update[J]. *Obes Rev*, 2012, 13(8): 681—691.
- [2] Pedersen TR, Tobert JA. Simvastatin: a review[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2004, 5(12):2583—2596.
- [3] 张刚.乳酸细菌—基础技术和应用[M].北京:化学工业出版社, 2007.
- [4] Mann GV, Spoerry A. Study of a surfactant and cholesterolemia in the Massi[J]. *Am J Clin Nutr*, 1974, 27(5):464—469.
- [5] 陈大卫,郭飞翔,顾瑞霞,等.人源降血脂乳酸菌的筛选及其功能性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(4):23—29.
- [6] 郭本恒.益生菌[M].北京:化学工业出版社, 2004.
- [7] Yue S, Chinnapandi B, Ge H. et al. A lactobacillus cocktail changes gut flora and reduces cholesterolemia and weight gain in hyperlipidemia mice[J]. *SOJ Microbiol Infect Dis*, 2014, 2(2): 1—16.
- [8] Begley M, Hill C, Gahan CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3):1729—1738.
- [9] Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci[J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85(12): 3182—3188.
- [10] Pereira DI, Gibson GR. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002, 37(4):259—281.
- [11] Tanaka H, Hashiba H, Kok J, et al. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6):2502—2512.
- [12] Brashears MM, Gilliland SE, Buck LM. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*[J]. *J Dairy Sci*, 1998, 81(8):2103—2110.
- [13] Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49(2):377—381.
- [14] Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains[J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88(1):55—66.
- [15] Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats[J]. *Nutrition*, 2007, 23(1): 62—68.
- [16] Akalin AS, Gönç S, Düzel S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice[J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80(11):2721—2725.
- [17] 王俊国,孟和毕力格,包秋华,等.具有胆盐水解酶活性的乳酸菌对高血脂症大鼠血脂的调节作用[J]. *食品科学*, 2013, 34(01): 257—262.
- [18] 温晓娜.他汀类药物的不良反应[J]. *药学服务与研究*, 2010, 10(5):357—359.
- [19] Bruckert E, Hayem G, Dejager S, et al. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients-- the PRIMO study[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2005, 19(6):403—414.
- [20] Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(9):639—647.
- [21] Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control[J]. *Nature*, 2013, 498(7452):99—103.
- [22] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418):55—60.
- [23] Viaud S, Saccheri F, Mignot G, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide[J]. *Science*, 2013, 342(6161):971—976.
- [24] Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota[J]. *Science*, 2012, 338(6103):120—123.