

# 植物乳杆菌 DMDL 9010 制剂 调控 SD 大鼠脂质水平的研究

郭均<sup>1</sup>, 黄燕燕<sup>1</sup>, 刘冬梅<sup>1\*</sup>, 孙丽娜<sup>1</sup>, 冯立科<sup>2</sup>, 杨爱君<sup>2</sup>, 彭小霞<sup>2</sup>, 吴晖<sup>1</sup>, 李理<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640;

2. 广东燕塘乳业股份有限公司, 广东广州 510640)

**摘要:**探讨植物乳杆菌 DMDL 9010 (*Lactobacillus plantarum* DMDL 9010) 对 SD 大鼠脂质水平的影响。以无菌水、1 mg/mL 阿托伐他汀水溶液、高剂量 ( $10^9$  CFU/mL) 和低剂量 ( $10^7$  CFU/mL) *L. plantarum* DMDL 9010 菌悬液连续灌胃 SD 大鼠 10 周, 监测大鼠体重和血清、肝脏、粪便的脂质水平变化。结果显示: 高剂量 ( $10^9$  CFU/mL) *L. plantarum* DMDL 9010 能显著降低大鼠血清总胆固醇 (TC) (23.03%)、低密度脂蛋白 (28.00%) 和动脉硬化指数 (34.04%) ( $p < 0.05$ ), 显著降低大鼠肝脏 TC (33.20%) 和甘油三酯 (TG) (40.86%) ( $p < 0.05$ ), 增加粪便 TC (31.07%) 和胆汁酸 (TBA) (70.18%) 排泄 ( $p < 0.05$ ), 肝脏病理切片观察表明, *L. plantarum* DMDL 9010 能改善肝细胞脂肪变性。得出 *L. plantarum* DMDL 9010 以剂量依赖的方式降低血清和肝脏的 TC 和 TG, 提高粪便 TC 和 TBA 排泄, 从而有效调控其脂质水平, 为开发预防和治疗高胆固醇血症的益生菌制剂提供了可能。

**关键词:** 植物乳杆菌 DMDL 9010, 降胆固醇, 脂质, 高胆固醇血症

## Regulation of *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010 preparation on lipids level of rats

GUO Jun<sup>1</sup>, HUANG Yan-yan<sup>1</sup>, LIU Dong-mei<sup>1\*</sup>, SUN Li-na<sup>1</sup>, FENG Li-ke<sup>2</sup>,  
YANG Ai-jun<sup>2</sup>, PENG Xiao-xia<sup>2</sup>, WU Hui<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

2. Guangdong Yantang Dairy Co., Ltd., Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effects of *Lactobacillus plantarum* DM10 9010 on lipid levels were studied. SD rats fed with high fat diet were randomly divided into normal group, model group, positive group and experimental group. The rats were treated with sterile water, 1 mg/mL aqueous solution of atorvastatin calcium, high dose ( $10^9$  CFU/mL) and low dose ( $10^7$  CFU/mL) *L. plantarum* DMDL 9010 suspension for 10 weeks to measure the level changes of body weight, blood lipid level (total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C)), liver lipid level (TC, TG, pathological sections) and fecal lipid (cholesterol, total bile acid (TBA)). The results showed that high dose of *L. plantarum* DMDL 9010 could significantly decrease serum total cholesterol (23.03%), low density lipoprotein cholesterol (28.00%) and arteriosclerosis index (34.04%) ( $p < 0.05$ ) in hyperlipidemic rats. Liver morphology and pathological section observation showed that *L. plantarum* DMDL9010 could improve liver cell steatosis. In addition, high-dose *L. plantarum* DMDL9010 ( $10^9$  CFU/mL) significantly reduced TC (33.20%) and TG (40.86%) ( $p < 0.05$ ) in the liver of high-fat rats, and increased fecal TC (31.07%) and TBA (70.18%) ( $p < 0.05$ ). To sum up, it showed that *L. plantarum* DMDL 9010 might be effective in inhibiting the accumulation of cholesterol by increases the amount of TC and TBA in the feces. Liver pathology showed that *L. plantarum* DMDL9010 could improve hepatic steatosis. *L. plantarum* DMDL 9010 could reduce TC and TG in serum and liver in a dose-dependent manner, increase the excretion of TC and TBA in the feces, thereby effectively regulate its lipid levels and provide a probiotic preparation for the prevention and treatment of hypercholesterolemia.

**Key words:** *L. plantarum* DMDL 9010; cholesterol-lowering; lipids; hypercholesterolemia

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)08-0285-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.08.052

收稿日期: 2017-04-28

作者简介: 郭均 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物利用与控制研究, E-mail: guojun901219@163.com。

\* 通讯作者: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物的利用与控制研究, E-mail: liudm@scut.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31771908); 广东省自然科学基金 (S2011010005679); 广东省省级科技计划项目 (2013B020312002, 2014A020208019); 广东燕塘乳业股份有限公司委托项目 (D8133540)。

引文格式:郭均,黄燕燕,刘冬梅,等.植物乳杆菌 DMDL 9010 制剂调控 SD 大鼠脂质水平的研究[J].食品工业科技, 2018,39(6):285-290.

随着人们生活水平的提高,心血管疾病患病率和死亡率正逐年上升,成为当前导致人类死亡的最主要原因之一,占全球总死亡人数的 29%<sup>[1]</sup>。流行病学和临床研究表明,血清中的胆固醇被认为是诱发冠心病动脉粥样硬化等心血管疾病的主要危险因素,血清胆固醇含量每增加 1%,患冠心病等心血管疾病的风险就提高约 3%,相反,血清胆固醇水平下降 1%,患冠心病的几率就可减少 2%~3%<sup>[2]</sup>。高胆固醇血症的特征是血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的增加,其中一个最快的治疗方法是控制血清中胆固醇和甘油三酯<sup>[3-4]</sup>。临床上治疗高胆固醇血症的方法主要包括膳食干预和药物治疗,但他汀类、烟酸类及衍生物、贝特类、胆酸螯合剂等临床常用药物都存在使血清转氨酶升高、造成肝毒性等不良反应,需长期服用药物,费用较高,病情易反复。因此,寻找能够调节血清胆固醇含量,缓解并治疗高胆固醇血症的生物制剂具有十分广阔的应用前景。越来越多的人采用降胆固醇益生菌制剂来降低高胆固醇血症和冠状动脉疾病的风险<sup>[4]</sup>。研究表明,胆盐水解酶(BSH)活性被认为是降低胆固醇的关键因素<sup>[5-6]</sup>。

近年来,研究表明益生菌定植于人体肠道、生殖系统内,可产生确切的健康功效,对机体脂质代谢水平影响成为国内外学者的研究焦点<sup>[7-8]</sup>。Shape 等<sup>[9]</sup>和 Mann 等<sup>[10]</sup>在实验过程中偶然发现非洲人在摄食大剂量野生乳杆菌发酵酸奶后血清胆固醇水平明显下降,调查发现乳酸菌可能具有降低人体血清胆固醇水平的功能。一些研究表明,乳酸益生菌具有降胆固醇的性能,长期食用含有足够量活性乳酸菌的发酵乳制品能降低血清胆固醇水平<sup>[11-12]</sup>,降低心血管疾病的风险。然而,Thompson 等<sup>[13]</sup>和 Gilliland 等<sup>[14]</sup>得到相反的结果,指出含有嗜酸乳酸菌的酸奶没有降低人类血清胆固醇的作用。此外,现有的资料表明,仅限于西方来源的菌株可降低血清胆固醇,当用在具有不同的饮食习惯和肠道生态环境的中国人身上时,可能不表现出相同的生物活性功能<sup>[15-16]</sup>。

*L.plantarum* DMDL 9010 是本课题组从陈年泡菜中分离而得,其降低体内血清胆固醇的能力是未知的。因此,本研究采用体外筛选所得的优良菌株(*L.plantarum* DMDL9010)应用于高脂饲料喂养的 SD 大鼠体内,采用边造模边灌胃乳酸菌悬液的方法来研究高剂量( $10^9$  CFU/mL)<sup>[18]</sup>和低剂量( $10^7$  CFU/mL)乳酸菌悬液对大鼠血脂水平、肝脏大体形态及病理切片、肝脏和粪便脂质水平的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

*L.plantarum* DMDL 9010<sup>[17]</sup> 课题组从陈年泡菜中分离得到的<sup>[17]</sup>,保藏号 CGMCC 5172,于 2011 年其

首次被鉴定为戊糖乳杆菌 DMDL 9010,其 16S rDNA 基因库登录序列号为 KJ 917253。

雄性 SD(Sprague Dawley)大鼠 8 周龄,SPF 级,50 只,体重 160~200 g,南方医科大学动物实验中心,许可证号 SYXK(粤)2012-0081,合格证编号 440021000;基础饲料 蛋白质 20%,脂肪 4.2%,碳水化合物 50%,中山大学动物实验中心提供;高脂饲料 猪油 10%,胆固醇 1%,胆盐 0.2%,基础饲料 88.8%,混匀造粒,在饲喂大鼠之前进行辐照杀菌。

海藻糖 广州卯林试剂有限公司;福尔马林、无水乙醇、二甲苯、盐酸 天津市科密欧化学试剂开发中心;抗坏血酸 广州齐云生物技术有限公司;甘油三酯 TG、总胆固醇 TC、高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C、低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C 试剂盒 中生北控生物技术股份有限公司;总胆汁酸 TBA 试剂盒 南京建成生物工程研究所有限公司;其他试剂 分析纯。

YXQ-LS-18SI 立式压力蒸汽灭菌锅 上海博迅公司;氮吹仪 EFGC-11155 Organo-mation Associates, Inc;全自动生化分析仪 HITACHI 7180 Hitachi high-Tech Science Systems Co., Ltd.

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种冻干粉制备 *L.plantarum* DMDL9010 菌株于 37 °C、pH6.8 的条件下在盛有 MRS 肉汤培养基的发酵罐中生长 18 h。通过 8000 r/min(4 °C)离心 15 min 后倒去上清液收集菌泥,在无菌操作条件下,按海藻糖(10%, m/V)与菌泥的体积比为 1.5:1 的比例加入,于 -40 °C 条件下预冻 5 h,使其均匀冻结在容器内壁上,进行真空冷冻干燥 18~20 h 后,复水测定其活菌数为  $9.30 \times 10^9$  CFU/g。

1.2.2 动物实验与分组 50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠自由摄食饮水,适应性喂养 7 d 后按照体质量分为 5 组,饲料喂养及灌胃按照表 1 所示。大鼠饲喂 70 d,每天上午 9 点灌胃,保证充足的食物和饮水。每 7 d 对 50 只大鼠称质量并收集大鼠粪便样品,计算食物消耗量,根据体质量调整给药容积。取 1.2.1 所制备的 *L.plantarum* DMDL 9010 冻干粉按照 1:1 (g/mL)溶解于经灭菌处理后的生理盐水中制得含  $10^9$  CFU/mL 菌量的 *L.plantarum* DMDL 9010 悬浮液。同理,取 1.2.1 所制备的 *L.plantarum* DMDL 9010 冻干粉按照 1:100 (g/mL)溶解于经灭菌处理后的生理盐水中制得含  $10^7$  CFU/mL 菌量的 *L.plantarum* DMDL 9010 悬浮液。

1.2.3 大鼠食物摄取和体质量指标 70 d 动物实验期间,每天观察受试小鼠的生长状态,每 7 d 称量大鼠体体重 1 次,并分别在实验第 7、14、21、28、35、42、49、56、63、70 d 称重喂食量和剩余食量,计算日摄食量,并计算饲料利用率,如公式(1)所示:

$$\text{饲料利用率}(\%) = \frac{\text{日体重增加量}}{\text{日均摄食量}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.4 样本采集 分别在实验开始后第 28、56、70 d,禁食不禁水 12 h 后,每组大鼠随机抽取 5 只,28、

表1 实验动物分组及饲养方式  
Table 1 Experiment animal grouping and feeding

组别	饲料	灌胃(1 mL(100 g bw·d))
正常组	基础饲料	0.9%生理盐水
模型组	高脂饲料	0.9%生理盐水
阳性组	高脂饲料	1 mg/mL阿托伐他汀钙片水溶液
DMDL 9010 高组	高脂饲料	含 10 <sup>9</sup> CFU/mL 菌量的 <i>L.plantarum</i> DMDL 9010 悬浮液
DMDL 9010 低组	高脂饲料	含 10 <sup>7</sup> CFU/mL 菌量的 <i>L.plantarum</i> DMDL 9010 悬浮液

56 d 的大鼠剪尾取血,70 d 的大鼠处死后腹腔取血,以上血样均 37 °C 放置 1 h,4 °C 放置 2 h,于 4 °C、3000 r/min 离心 10 min,制备血清,-20 °C 保存。

1.2.5 大鼠脂质水平的测定

1.2.5.1 大鼠血脂水平的检测 按照试剂盒说明书要求测定血清中总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量,并计算动脉粥样硬化指数(atherosclerotic index, AI),如公式(2)所示:

$$AI = \frac{TC \text{ 含量} - (HDL-C) \text{ 含量}}{(HDL-C) \text{ 含量}} \quad \text{式(2)}$$

1.2.5.2 大鼠肝脏脂质水平的检测 实验 70 d 处死大鼠分离肝脏,称重后取肝左叶,经脱水,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,用 LEICA DM5000B 普通光学显微镜观察(×400)。根据 Folch 等<sup>[19]</sup>方法提取肝脏脂质。将一片肝(50 mg)置于试样瓶中,加入 10 mL 氯仿:甲醇(2:1, V/V)混合液,振荡混匀,37 °C 保温 30 min,离心(80000 r/min, 10 min, 4 °C),收集氯仿层至新 EP 管中,加 6 mL 生理盐水,离心(80000 r/min, 10 min, 4 °C)。重复 1 次上述步骤后,收集底层氯仿层液体,用氮吹仪吹干,加入异丙醇:Triton-100(9:1, V/V)混合液 0.8 mL 复溶,漩涡振荡 2 min,加 1.2 mL 蒸馏水,再漩涡振荡 2 min 所得溶液为提取的肝组织总脂。按照试剂盒说明书要求测定大鼠肝脏 TC、TG 含量。

1.2.5.3 大鼠粪便中脂质水平的检测 在第 70 d 连续 3 d 收集大鼠的粪便并干燥至恒重,大鼠粪便中总脂肪提取方法同 1.2.5.2 所示。参照 Carr 等<sup>[20]</sup>方法提取大鼠粪便中胆汁酸(TBA):称取 0.5 g 干粪用 10 mL 无水乙醇 80 °C 提取 3 次,蒸干后加 10 mL 石油醚溶解,弃上清,将沉淀用 10 mL 含 2% Triton X-100 的乙醇溶解,振荡 15 min,取上层液于 90 °C 下蒸干得沉淀,最后用 10 mL 蒸馏水溶解,所得溶液为提取的粪便总胆汁酸。按照试剂盒说明书要求测定大鼠粪便中 TC、TBA 含量。

1.3 统计分析

实验结果表示为均值 ± 标准偏差( $\bar{x} \pm SD$ ) 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,数据间的分析采用单因素方差分析(one way ANOVA)和 Duncan 多重比较法,显著性水平均设定为  $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *L.plantarum* DMDL 9010 对大鼠生长状态和体重的影响

从表 2 可以看出,大鼠的初始体重和血脂差异不显著( $p > 0.05$ ),大鼠的日体重增加在 3.34~3.85 g/d 之间,日均摄食量在 24.19~26.36 g/d,饲料利用率在 13.89~15.13% 之间,各实验组之间无显著性差异( $p > 0.05$ )。相比模型组,DMDL 9010 高组的日均体重增加量和饲料利用率都较低,而 DMDL 9010 低组的日均摄食量和饲料利用率都较高,原因可能是灌胃的高剂量的乳酸菌增加了肠道菌群,改善了肠道环境,从而减轻了大鼠的肥胖程度,而灌胃低剂量的乳酸菌增加了肠道蠕动,增强了食欲。Lee 等<sup>[21]</sup>研究发现植物乳杆菌具有良好的耐酸、耐胆盐和胆盐水解酶活性的能力,这表明该菌株通过胃通道并到达小肠中能够生存,从而表明实验动物呈现出类似的生长发育模式,也说明 *L.plantarum* DMDL 9010 对大鼠并没有毒副作用,与 Park 等<sup>[22]</sup>的研究结果一致。

2.2 *L.plantarum* DMDL 9010 对大鼠血脂水平的影响

在 70 d 实验期间,血清中的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平变化示于表 3 所示。

28 d 时 DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组的血清 TC 均介于模型组和正常组之间,且 DMDL 9010 高组的 TC 相对模型组具有显著性降低( $p < 0.05$ ); 56 d 时 DMDL 9010 高组的血清 TC 相对模型组降低了 23.03%,并且差异显著( $p < 0.05$ );70 d 时 DMDL 9010 高组血清 TC 水平稍低于模型组( $p < 0.05$ )。结果说明:一定剂量的 *L.plantarum* DMDL 9010 可以显

表2 各组实验大鼠的摄食量和饲料利用率(M ± SD, n = 10)

Table 2 Food intake and food efficiency of experimental rats

组别	初始体重	初始血脂	日均体重增加(g/d)	日均摄食量(g/d)	饲料利用率(%)
正常组	226.50 ± 16.13 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.68 <sup>a</sup>	24.19 ± 4.55 <sup>a</sup>	14.05 ± 3.21 <sup>a</sup>
模型组	223.70 ± 14.09 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.83 ± 0.66 <sup>a</sup>	25.61 ± 3.52 <sup>a</sup>	15.13 ± 2.95 <sup>a</sup>
阳性组	229.10 ± 18.38 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	3.54 ± 0.61 <sup>a</sup>	25.60 ± 3.33 <sup>a</sup>	14.09 ± 3.32 <sup>a</sup>
DMDL 9010 高组	236.90 ± 15.89 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.51 ± 0.77 <sup>a</sup>	25.55 ± 3.25 <sup>a</sup>	13.89 ± 3.42 <sup>a</sup>
DMDL 9010 低组	223.40 ± 16.34 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.61 <sup>a</sup>	3.85 ± 0.92 <sup>a</sup>	26.36 ± 2.86 <sup>a</sup>	15.02 ± 4.68 <sup>a</sup>

注:在同列字母不同表示差异显著( $p < 0.05$ ),表 3 同。

著降低机体血清 TC 含量,并随摄入时间的延长,该作用更稳定。

28 d 时,模型组的血清 TG 相比于正常组有所增加,而阳性组、DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组的血清 TG 水平与正常组类似;56 d 和 70 d 喂养后 DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组的 TG 与模型组有较轻微的降低且无太大的差别,DMDL 9010 高组的血清 TG 含量最低,但是各组之间并无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。结果说明,*L.plantarum* DMDL 9010 的摄入随着摄入时间的延长降低机体血清 TG 含量的作用具有一定的效果,但效果并不显著。

28 d 时各实验组的血清 HDL-C 结果差异不显著 ( $p > 0.05$ )。56 d 时相对于模型组,DMDL 9010 低组的血清 HDL-C 含量下降 10.91%,但差异并不显著 ( $p > 0.05$ )。70 d 时相对正常组,模型组的血清 HDL-C 含量具有显著性降低,阳性组、DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组相对模型组的 HDL-C 有一定程度的升高,但没有显著性差异 ( $p > 0.05$ )。结果说明:摄入 *L.plantarum* DMDL 9010 未能引起 HDL-C 水平的显著变化,这可能与该菌的降胆固醇机制有关,但摄入一定量的 *L.plantarum* DMDL 9010 可能对维持机体 HDL-C 水平具有一定作用。这与 Fukushima 等<sup>[23]</sup> 和 Chiu 等<sup>[24]</sup> 的研究结果一致,Fukushima 和 Chiu 研究植物乳杆菌、干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌均具有降低 HDL-C 的作用。28 d 时模型组血清 LDL-C 相对正常组具有显著性升高 ( $p < 0.05$ ),相对于模型组、DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组的血清 LDL-C 含量有所下降,但无显著性差异。56 d 和 70 d 时 DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组的血清 LDL-C 均介于模型组和正常组之间,血清 LDL-C 相对于模型组分别降低 37.31% 和 28.00% ( $p < 0.05$ )。结果说明:摄入 *L.plantarum* DMDL 9010 短期内可以降低机体血清 LDL-C 水平,尽管随着时间的延长效果并不明显,重要的是 *L.plantarum* DMDL 9010 可控制血清 LDL-C 水平。

按照 1.2.5.1 的公式计算五组大鼠的动脉粥样硬化指数 (AI),分析其随灌胃时间变化情况,结果如图

1 所示。实验开始前和实验第 28 d 时,各实验组大鼠的 AI 没有显著差异。但随着实验继续进行,第 56 d 和第 70 d 时,各高脂饮食喂养组的 AI 均明显高于普通饲料喂养组,且有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),说明长期饲喂高脂饲料可能会增加 SD 大鼠动脉硬化的几率。比较发现,在实验第 56 d 和第 70 d 时,灌胃高剂量 *L.plantarum* DMDL 9010 菌悬液的 AI 低于高脂模型组。结果说明,*L.plantarum* DMDL 9010 的摄入可能具有一定的调节动脉硬化的功效,从而降低机体动脉粥样硬化的风险,且具有持续性。

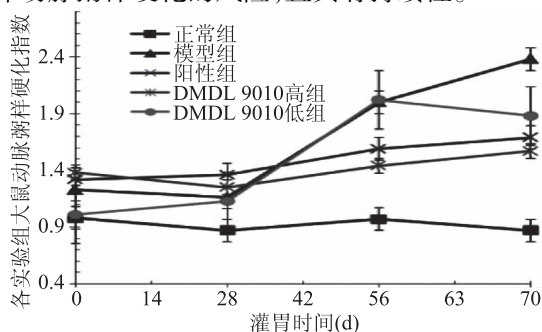


图1 植物乳杆菌 DMDL 9010

对实验组大鼠的动脉粥样硬化指标的影响

Fig.1 Effect of *L.plantarum* DMDL 9010 on the atherosclerosis index of experimental rats

### 2.3 肝脏病理切片观察

各实验组大鼠肝脏病理切片经 HE 染色,在光学显微镜 ( $\times 400$ ) 下观察结果如图 2 所示。正常组大鼠肝细胞无脂肪变性,肝组织结构完整、清晰,细胞界限清楚,呈索状排列。高脂模型组出现中到重度程度的小泡性脂肪变性,肝脏内脂肪含量增高,细胞排列紊乱。DMDL 9010 高组大鼠肝脏变性有一定程度上地减轻,表现为脂变肝细胞数量减少,脂滴减少或消失,其中 DMDL 9010 低组与阳性组的类似,DMDL 9010 高组脂肪变性的修复最为明显。结果表明 1 mL (100 g bw d) 的阿托伐他汀和  $10^9$  CFU/mL 的 *L.plantarum* DMDL 9010 悬浮液对高脂饮食大鼠的脂肪变性具有良好的改善作用。

表3 实验 SD 大鼠血脂水平的比较 (mmol/L)

Table 3 Comparison of the serum lipid levels in experimental SD rats (mmol/L)

组别	TC			TG		
	28 d	56 d	70 d	28 d	56 d	70 d
正常组	1.18 ± 0.19 <sup>c</sup>	1.18 ± 0.19 <sup>c</sup>	1.18 ± 0.16 <sup>c</sup>	0.88 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.20 <sup>a</sup>
模型组	1.47 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.65 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.23 <sup>a</sup>
阳性组	1.51 ± 0.32 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.26 <sup>abc</sup>	1.40 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.28 <sup>a</sup>
DMDL 9010 高组	1.26 ± 0.37 <sup>bc</sup>	1.27 ± 0.30 <sup>bc</sup>	1.36 ± 0.43 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.35 <sup>a</sup>
DMDL 9010 低组	1.30 ± 0.27 <sup>abc</sup>	1.48 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.50 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.21 <sup>a</sup>

组别	HDL-C			LDL-C		
	28 d	56 d	70 d	28 d	56 d	70 d
正常组	0.63 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.60 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>c</sup>
模型组	0.68 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.07 <sup>a</sup>
阳性组	0.64 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.54 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.52 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.12 <sup>bc</sup>
DMDL 9010 高组	0.56 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.53 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.42 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.22 <sup>b</sup>
DMDL 9010 低组	0.61 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.55 ± 0.28 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>a</sup>

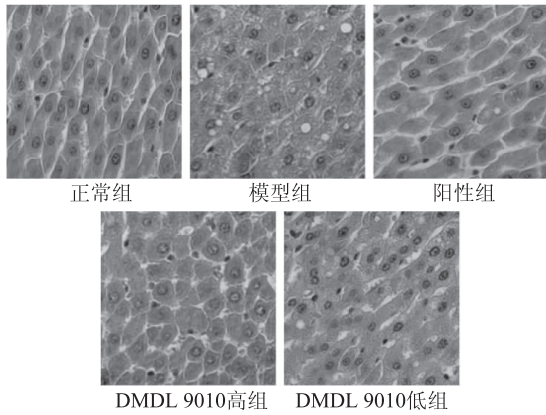


图2 各实验组大鼠肝脏病理切片观察(×400)

Fig.2 Pathological examination of hepatic tissue slices from experimental rats

## 2.4 *L.plantarum* DMDL 9010 对大鼠肝脏和粪便中血脂水平的影响

2.4.1 *L.plantarum* DMDL 9010 对大鼠肝脏血脂水平的影响 各实验组大鼠的肝脏脂质检测结果如图3所示。高脂饲料喂养的模型组大鼠肝脏中 TC 和 TG 水平高于普通饲料喂养的正常组,具有显著性差异( $p < 0.05$ ),说明饮食来源中过高的胆固醇会在肝脏中蓄积。乳酸菌组的 TC 较模型组有所降低,其中阳性组、DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组大鼠肝脏 TC 含量较模型组分别降低了 20.57%、33.20% 和 24.48% ( $p < 0.05$ ),说明阿托伐他汀和 *L.plantarum* DMDL 9010 都能有效抑制肝脏中 TC 的蓄积。阳性组和乳酸菌组的 TG 较模型组有所降低,其中 DMDL 9010 高组的 TG 较模型组降低 40.86%,具有显著性差异( $p < 0.05$ ),说明高剂量 DMDL 9010 对降低肝脏中甘油三酯的效果较为明显。

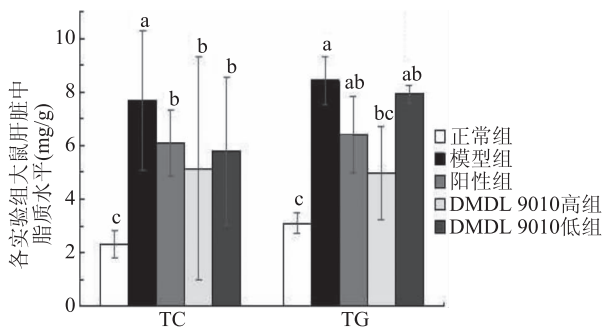


图3 实验组大鼠肝脂肪含量

Fig.3 Hepatic lipid content in experimental rats

2.4.2 *L.plantarum* DMDL 9010 对大鼠粪便血脂水平的影响 各实验组大鼠粪便中 TC 和 TBA 含量如图4所示。各高脂饲料喂养的实验组大鼠的粪便胆固醇含量均明显高于普通饲料喂养的正常组,且有显著性差异( $p < 0.05$ ),说明饮食中含量过高的胆固醇无法被吸收,随粪便排出体外。阳性组和 DMDL 9010 高组相对模型组显著升高,阳性组和 DMDL 9010 高组由粪便排出的胆固醇分别高出模型组 18.82%、23.70%,说明阿托伐他汀和高剂量植物乳杆菌 DMDL9010 能够促进胆固醇的排泄。由于胆固

醇是合成 TBA 的前体物质,促进 TBA 在肠道的排泄是降低体内胆固醇代谢的主要途径。比较发现高脂饲料喂养的大鼠粪便的胆汁酸含量均高于普通饲料喂养的正常组,且乳酸菌组大鼠 TBA 的排泄量比模型组都显著升高( $p < 0.05$ ),其中 DMDL 9010 高组 TBA 代谢量较模型组高出 70.18%,说明灌胃高剂量 DMDL9010 菌悬液能有效增加大鼠 TBA 的排泄量,从而减少血清中胆固醇含量。

在我们的研究中,DMDL 9010 高组大鼠的粪便 TC 和 TBA 的变化可能是 *L.plantarum* DMDL 9010 抑制胆汁盐的在肝肠中循环吸收引起的。饮食中补充胆固醇会导致其在肝脏中的积累,从而导致增加动脉粥样硬化指数和心血管疾病的风险。此外,*L.plantarum* DMDL 9010 可浸润肝细胞的脂肪,并一定程度的降低囊泡脂肪变性,该发现与 Xie 等<sup>[25]</sup>的研究是一致的。病理切片清楚地指出肝细胞的脂质在减少(图2),而且 DMDL 9010 高组和 DMDL 9010 低组肝脏中 TC 和 TG 水平显著下降(表3)( $p < 0.05$ )。粪便中 TC 和 TBA 的排泄变化指出与摄入 *L.plantarum* DMDL 9010 有显著关系(图4),过多的胆固醇主要是消除通过转化为胆汁酸。该结果表明,*L.plantarum* DMDL 9010 可能在通过增加粪便的 TC 和 TBA 的含量从而有效抑制胆固醇的积累。肝脏中 TC 可促进血清胆固醇的进入,从而降低血清胆固醇(见图1)。之后胆固醇转化成胆汁酸,借助于肝肠循环,大多数结合 TBA 重吸收,而未结合的则排入粪便。如果 TBA 重吸收时由于 *L.plantarum* DMDL 9010 而受阻,那么更多的 TBA 会在粪便排出体外,而少量将被回收到肝脏。因此,*L.plantarum* DMDL 9010 降低胆固醇水平可能是由于在肝肠循环过程中 TBA 重吸收被抑制,从而成为游离 TBA 在粪便中排出体外。*L.plantarum* DMDL 9010 的降胆固醇效果可能是由于增加了粪便 TC 和 TBA,而不是将胆固醇从血液转移到肝脏,这些结果与 Park 等<sup>[22]</sup>研究相似。

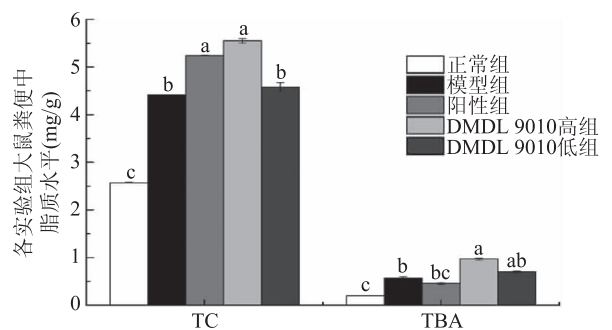


图4 实验组大鼠粪便中胆固醇和胆汁酸含量

Fig.4 Fecal lipid content and total bile acid in experimental rats

## 3 结论

*L.plantarum* DMDL 9010 是一种通过在 SD 大鼠中降低血清 TC 和 LDL-C 的浓度并增加肝胆固醇和粪便 TBA 的排出,从而降低与胆固醇有关的心血管疾病的风险的益生菌。因此,SD 大鼠的肝脏形态学变化和肝组织病理学切片观察可以验证该效果。植

物乳杆菌 DMDL 9010 也显著地表现出亚硝酸盐降解能力,这表明 *L.plantarum* DMDL 9010 与健康的肠道环境息息相关。该微生物的亚硝酸降解产物有参与胃肠系统,包括保持血管张力、参与免疫反应、传递神经信号和放松肠平滑肌的许多生理功能。因此,我们可以推断,*L.plantarum* DMDL 9010 是提高肝肠循环的益生菌,同时将需要进一步的研究验证 *L.plantarum* DMDL 9010 在人体中的作用。此外,潜在的机制可能是不同的,并需要通过探索转录因子、胆固醇受体、参与这一脂质稳态关键酶来验证可能的机制。

### 参考文献

- [1] Moodie D S. The global burden of cardiovascular disease [J]. *Congenital heart disease*, 2016, 11(3): 213-213.
- [2] Durán J, Peloquin C, Zhang Y, et al. Primary prevention of myocardial infarction in rheumatoid arthritis using sspirin: A case-crossover study and a propensity score - matched cohort study [J]. *The Journal of Rheumatology*, 2017, 44(4): 418-424.
- [3] Aazmi S, Teh L K, Ramasamy K, et al. Comparison of the anti-obesity and hypocholesterolaemic effects of single *Lactobacillus casei* strain Shirota and probiotic cocktail [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015, 50(7): 1589-1597.
- [4] Richardson D P, Eggersdorfer M. Opportunities for product innovation using authorised European Union health claims [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015, 50(1): 3-12.
- [5] Xiong Z Q, Wang Q H, Kong L H, et al. Improving the activity of bile salt hydrolases in *Lactobacillus casei* based on in silico molecular docking and heterologous expression [J]. *Journal of dairy science*, 2017, 100(2): 975-980.
- [6] Zhang F, Qiu L, Xu X, et al. Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats [J]. *Journal of dairy science*, 2017, 100(3): 1618-1628.
- [7] Wan L Y M, Chen Z J, Shah N P, et al. Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria [J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2016, 56(16): 2628-2641.
- [8] Fong F L Y, Shah N P, Kirjavainen P, et al. Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells [J]. *International reviews of immunology*, 2016, 35(3): 179-188.
- [9] Shaper A G, Jones K W, Jones M, et al. Serum lipids in three nomadic tribes of northern Kenya [J]. *The American journal of clinical nutrition*, 1963, 13(3): 135-146.
- [10] Mann G V, Spoerry A. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1974, 27(5): 464-469.
- [11] Kaya Y, Kök M Ş, Öztürk M. Molecular cloning, expression and characterization of bile salt hydrolase from *Lactobacillus rhamnosus* E9 strain [J]. *Food Biotechnology*, 2017, 31(2): 128-140.
- [12] Huang Y, Wu F, Wang X, et al. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(5): 2816-2825.
- [13] Thompson L U, Jenkins D J, Amer M A, et al. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol [J]. *The American journal of clinical nutrition*, 1982, 36(6): 1106-1111.
- [14] Gilliland S E, Walker D K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans [J]. *Journal of Dairy Science*, 1990, 73(4): 905-911.
- [15] Hongpattarakere T, Rattanabun P, Buntin N. Improvement of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* survival using water extracts and crude fibers from food crops [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(8): 1885-1896.
- [16] Jones M L, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. The gut microbiome, probiotics, bile acids axis, and human health [J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(6): 306-308.
- [17] Fei Y, Liu D, Luo T, et al. Molecular characterization of *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010, a strain with efficient nitrite degradation capacity [J]. *Plos one*, 2014, 9(11): e113792.
- [18] Lee D K, Jang S, Baek E H, et al. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2009, 8(1): 1.
- [19] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [20] Carr T P, Andresen C J, Rudel L L. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts [J]. *Clinical Biochemistry*, 1993, 26(1): 39-42.
- [21] Lee Y K, Salminen S. The coming of age of probiotics [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 6(7): 241-245.
- [22] Park Y H, Kim J G, Shin Y W, et al. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(4): 655-662.
- [23] Fukushima M, Nakano M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet [J]. *British Journal of Nutrition*, 1996, 76(6): 857-867.
- [24] Chiu C H, Lu T Y, Tseng Y Y, et al. The effects of *Lactobacillus*-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(2): 238-245.
- [25] Xie N, Cui Y, Yin Y N, et al. Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 11(1): 53.