

【基础研究】

通信作者:杨晓钟(1968-),男,江苏淮安人,硕士,主任医师,研究方向:消化系统疾病、脂肪肝预防与治疗。

which had statistically significant differences of BL and LM group compared with the control group ($P < 0.05$), but had no statistical significance compared with the model group ($P > 0.05$). There were eight cases (80%) with mild hepatic steatosis in LR group, which had statistically significant difference compared with model group ($P < 0.05$). Compared with control group, SOD and GSH-Px activity decreased significantly while MDA increased significantly in model group ($P < 0.05$); compared with model group, SOD and GSH-Px activity and MDA level in BL group and LM group had no significant difference ($P > 0.05$), while the SOD and GSH-Px activity increased significantly and the MDA level decreased significantly in LR group ($P < 0.05$); there was no statistical significance of SOD and GSH-Px activity and MDA level between BL group and LM group ($P > 0.05$), while SOD and GSH-Px activity in LR group increased significantly and MDA level decreased significantly than those in BL group and LM group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the liver function and liver index were significantly increased in model group ($P < 0.05$); compared with the model group, the index of liver function and liver index had no significant difference in BL group and LM group ($P > 0.05$), and except total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver index in LR group were significantly decreased compared with the model group ($P < 0.05$). There was no significant difference of index of liver function and liver index between BL group and LM group ($P > 0.05$); while in LR group, TG, ALT, AST and liver index were significantly lower compared with BL group and LM group ($P < 0.05$) except TC. **Conclusion** The effect of LR on the enhancement of serum antioxidant activity is significantly correlated to the inhibition of hepatic steatosis in mice.

Key words: *Bifidobacterium longum*; *Leuconostoc mesenteroides*; *Lactobacillus rhamnosus*; anti-oxidant; hepatic steatosis

非酒精性脂肪肝的发病机制尚未清楚,目前普遍认为氧化应激和脂质过氧化损伤起主要作用^[1]。益生菌具有抗氧化活性,人在摄入益生菌后,其总抗氧化水平显著升高,而氧化应激指标明显降低^[2],因此益生菌的摄入可能对脂肪肝的防治有积极作用。长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*, BL)、肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*, LM)及鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, LR)为常见益生菌,容易获得,已应用于食品等行业。本研究旨在观察 BL、LM 和 LR 对小鼠血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平及肝细胞脂肪变性的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种 BL、LM、LR 冷冻真空干燥菌种购于中国普通微生物菌种保藏中心并 -33°C 保存。使用时,将菌种冻粉接种于 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 液体培养基, 37°C 厌氧培养 24 h 后再次接种于新鲜 MRS 培养基进行活化。活化后的菌液作为实验用菌液接种母液置于 4°C 保存。实验前 1 d, 将母液接种于新鲜 MRS 培养基进行培养, 获得新鲜活化菌液用于实验。

1.2 实验动物 5 周龄健康清洁级雄性 Balb/c 小鼠 50 只, 体质量 $(20.0 \pm 2.0) \text{ g}$, 由苏州大学实验动物中心提供, 用基础饲料适应性喂养 1 周后, 随机分成 5 组, 即对照组、高脂饲养组(模型组)、BL 干预组、LM 干预组、LR 干预组, 每组 10 只。

1.3 主要试剂和仪器 SOD 检测试剂盒、GSH-Px

试剂盒和 MDA 水平检测试剂盒购自南京建成工程研究所; Multiskan Spectrum-1500 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); Synchron CX5 全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司)。

1.4 动物模型制备 对照组小鼠继续喂以基础饲料。模型组小鼠每日喂食高脂饲料, 同时给予 1 mL 生理盐水灌胃, 连续 15 周, 以体质量超过对照组的 30% 为标准判断非酒精性脂肪肝造模成功; BL 干预组、LM 干预组和 LR 干预组在给予高脂饲料喂养的同时分别给予 10^{11} L^{-1} BL、LM 和 LR 各 1 mL 灌胃, 连续 15 周。

1.5 血清抗氧化指标及肝功能检测 灌胃 15 周后, 各组小鼠禁食水 12 h, 颈部脱臼法处死小鼠, 迅速打开腹腔, 经腹主动脉取血, 以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 分离血清, 采用黄嘌呤氧化酶法检测血清 SOD 活性, 硫代二硝基苯甲酸法检测 GSH-Px 活性, 硫代巴比妥酸比色法检测 MDA 水平; 使用全自动生化分析仪检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)。

1.6 肝组织病理学观察 取小鼠肝脏测质量并计算肝指数: 肝指数 = 肝脏湿质量/体质量 $\times 100\%$ 。于左叶肝组织相同部位取材 $(0.4 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm} \times 0.2 \text{ cm})$, 置于 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 中性甲醛液中固定, 常规石蜡包埋、切片, 进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 光学显微镜观察并摄片。参照艾迎春等^[3]的方法对脂肪肝变性程度进行判断, 分为 4 级: 无脂肪变性; 轻度: 脂肪变性在肝小叶 $< 1/3$; 中

度:脂肪变性在肝小叶占 1/3 ~ 1/2;重度:脂肪变性在肝小叶 >1/2。

1.7 统计学处理 应用 SAS 9.1 统计学软件对数据进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝脏病理学变化 对照组小鼠无肝脂肪变性者 8 只(80%),轻度脂肪变性 2 只(20%);而模型组小鼠呈现中、重度肝脂肪变性,分别为 4 只(40%)和 6 只(60%),说明非酒精性肝脂肪变性模型构建成功;干预组小鼠也出现不同程度肝脂肪变性,BL 干预组和 LM 干预组以中、重度肝脂肪变性为主,其中 BL 干预组中、重度脂肪变性分别为 5 只(50%)和 4 只(40%),LM 干预组中、重度肝脂肪变性均为 4 只(分别占 40%),与对照组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),而与模型组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);LR 干预组小鼠则以轻度肝脂肪变性为主,共 8 只(80%),与模型组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.2 各组小鼠血清抗氧化指标比较 结果见表 1。与对照组比较,模型组小鼠 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低(*P* < 0.05),MDA 水平显著升高(*P* < 0.05)。与模型组比较,BL 干预组和 LM 干预组小鼠各项指标差异无统计学意义(*P* > 0.05),而 LR 干预组 SOD

表 2 各组小鼠血清 TC、TG、ALT、AST 及肝指数比较

Tab.2 Comparison of serum TC,TG,ALT,AST and fatty liver index of mice among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TC/(mmol · L ⁻¹)	TG/(mmol · L ⁻¹)	ALT/(mmol · L ⁻¹)	AST/(mmol · L ⁻¹)	肝指数/%
对照组	10	1.60 ± 0.26	0.48 ± 0.13	38.35 ± 8.48	152.31 ± 6.95	2.14 ± 0.12
模型组	10	2.64 ± 0.17 ^a	1.04 ± 0.23 ^a	78.86 ± 17.22 ^a	207.07 ± 10.97 ^a	3.87 ± 0.22 ^a
BL 干预组	10	2.46 ± 0.10 ^a	0.84 ± 0.12 ^{ab}	63.26 ± 8.08 ^{ab}	196.50 ± 13.66 ^{ab}	3.60 ± 0.16 ^{ab}
LM 干预组	10	2.29 ± 0.14 ^a	0.94 ± 0.11 ^{ab}	71.37 ± 6.75 ^{ab}	194.88 ± 13.57 ^{ab}	3.67 ± 0.11 ^{ab}
LR 干预组	10	1.99 ± 0.15	0.72 ± 0.14 ^c	42.17 ± 9.91 ^c	156.85 ± 13.16 ^c	2.45 ± 0.14 ^c

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与 LR 干预组比较^b*P* < 0.05;与模型组比较^c*P* < 0.05。

3 讨论

益生菌是指摄入一定量时能对宿主健康产生有益作用的微生物活体,近年研究表明益生菌对非酒精性脂肪肝的防治也有一定效果^[4]。BL、LM 和 LR 为人类重要益生菌,常应用于乳制品行业。MDA 水平可衡量机体氧化应激水平的高低^[5-6],而 SOD、GSH-Px 是体内重要的抗氧化酶^[7]。本研究结果显示,经 LR 干扰后,小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性较模型组显著提高,而 MDA 水平显著降低,这与 Deabe 等^[8]的研究结果一致,表明 LR 能显著提高小鼠血清抗氧化水平。血清胆固醇等指标是评判脂肪肝

和 GSH-Px 活性显著升高(*P* < 0.05),MDA 水平显著降低(*P* < 0.05)。BL 干预组与 LM 干预组小鼠比较各项指标差异无统计学意义(*P* > 0.05),而 LR 干预组小鼠 SOD 和 GSH-Px 活性较 BL 干预组、LM 干预组均显著升高(*P* < 0.05),MDA 水平较 BL 干预组、LM 干预组均显著降低(*P* < 0.05)。

表 1 各组小鼠血清 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平比较
Tab.1 Comparison of serum SOD,GSH-Px activity and MDA level of mice among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SOD/ (× 10 ³ U · L ⁻¹)	GSH-Px/ (× 10 ³ U · L ⁻¹)	MDA/ (mmol · L ⁻¹)
对照组	10	114.33 ± 7.80	243.61 ± 21.63	10.88 ± 1.58
模型组	10	65.78 ± 7.49 ^a	203.19 ± 14.44 ^a	17.40 ± 1.89 ^a
BL 干预组	10	79.13 ± 7.16 ^{ab}	223.07 ± 13.16 ^{ab}	15.99 ± 1.70 ^{ab}
LM 干预组	10	75.31 ± 5.97 ^{ab}	221.04 ± 8.54 ^{ab}	14.86 ± 1.35 ^{ab}
LR 干预组	10	103.12 ± 9.46 ^c	235.42 ± 8.23 ^c	12.55 ± 1.11 ^c

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与 LR 干预组比较^b*P* < 0.05;与模型组比较^c*P* < 0.05。

2.3 各组小鼠肝功能指标及肝指数的比较 结果见表 2。与对照组比较,模型组小鼠各项指标均显著升高(*P* < 0.05)。与模型组比较,BL 干预组和 LM 干预组小鼠各项指标差异无统计学意义(*P* > 0.05),而 LR 干预组除 TC 外,TG、ALT、AST 和肝指数均显著降低(*P* < 0.05)。BL 干预组和 LM 干预组之间各项指标比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);而 LR 干预组除 TC 外,TG、ALT、AST 和肝指数均较 BL 干预组和 LM 干预组显著降低(*P* < 0.05)。

的重要指标,本研究中,相对于抗氧化活性较低的 LM 和 BL,LR 干预组小鼠血清 TC、TG、ALT 和 AST 及肝指数都得到显著改善,表明 LR 对血清抗氧化活性的提高与脂肪肝指标的改善密切相关。动物机体体内存在大量不饱和脂肪酸,它们极易受到过氧化作用而产生脂质过氧化物,使得肝脏氧化应激反应增强,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,因此,血清抗氧化水平的提高对防控脂肪肝形成有重要意义。LR 干预组中、重度肝细胞脂肪变性小鼠数目较其他组显著降低,与本研究其他脂肪肝指标检测结果相吻合,进一步证
(下转第 791 页)

3 讨论

基底膜培养可以得到离体培养的耳蜗毛细胞、听神经纤维及螺旋神经节,可以同时观察毛细胞、听神经纤维及螺旋神经节在明确的单纯损伤因素下病理改变规律,并判断各种损伤因素引起的毛细胞与螺旋神经节之间的原发改变和继发改变。基底膜离体培养时螺旋神经节通过神经纤维与毛细胞相连,能持续获得毛细胞的营养支持而长时间存活,有利于获得较多的螺旋神经细胞用于实验研究^[1-2]。基底膜培养为研究毛细胞、听神经损害机理及其修复提供了理想的实验模型。

耳蜗基底膜体外培养的方法大致分为 2 种,即无血清培养法和有血清培养法^[3-8]。应用不同的培养基可以引发不同的细胞分裂,本研究采用有血清培养方法,血清能够提供丰富的营养组分,提供细胞增殖所必需的生长因子,有促进生长的效果。本实验中观察到毛细胞和听神经纤维生长良好。

在将基底膜转移到培养皿的过程中,国内外多数采用的方法是将基底膜分离出来,放入预先滴有胶原凝胶液的培养皿中,胶原凝胶液的配制包括胶原凝胶液为 A 液,10 × Eagle 培养基溶液为 B 液,质量分数 2% 碳酸钠溶液为 C 液,按 A : B : C = 9 : 1 : 1 比例配成^[3-4,6]。这种方法能有效地固定基底膜于培养皿中,易于完好地将培养完成的样品取出并进行免疫荧光及分子生物学等实验,但此种培养法凝胶配制过程成本较高且配制过程复杂。作者的方法是将基底膜接种在已滴加少量培养基的 24 孔细胞培养板中的细胞爬片上,静置 0.3 h 待基底膜成功贴壁后再缓慢加入 1 mL 的培养基继续培养。

培养结束后取出细胞爬片进行免疫荧光染色,实验中可得到较高的基底膜贴壁成功率,贴壁成功后基底膜附着牢固不易从细胞爬片上脱落,取出细胞爬片可以得到完整培养的基底膜,从而有利于后续的实验研究。本实验所建立的方法省去了配置鼠尾凝胶的过程,操作简便易行,同样能取得稳定良好的培养结果。建立耳蜗基底膜培养的模式同时观察毛细胞、神经纤维及螺旋神经节细胞的变化,有利于开展耳蜗相关损伤的病理及病理生理机制的研究。

参考文献:

[1] 丁大连,蒋涛. 内耳科学[M]. 北京:中国科学技术出版社,2010:39-40.

[2] 王苹,杜波,丁大连,等. Caspase3 激活在庆大霉素所致螺旋神经节延迟性死亡过程中的作用[J]. 中国老年医学杂志,2007,27(19):1883-1885.

[3] 宣伟军,丁大连. 小鼠耳蜗毛细胞体外培养研究方法[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2005,13(3):121-122.

[4] Ding D L, Wang J, Yu Z P, et al. Spontaneous proliferation in organotypic cultures of mouse cochleae[J]. J Otol,2008,3(2):76-83.

[5] Gross J, Maehulik A, Amarjargal N, et al. Expression of prestin mRNA in the organotypic culture of rat cochlea[J]. Hear Res,2005,204(1/2):183-190.

[6] Ding D, Qi W, Yu D, et al. Addition of exogenous NAD⁺ prevents mefloquine-induced neuroaxonal and hair cell degeneration through reduction of caspase-3-mediated apoptosis in cochlear organotypic cultures[J]. PLoS One,2013,8(11):e79817.

[7] 原红艳,李树华,李兴启. 新生大鼠耳蜗柯替器体外培养的初步报告[J]. 听力学及言语疾病杂志,2005,13(1):53-54.

[8] 侯秋来,丁大连,蒋海燕,等. 庆大霉素对小鼠耳蜗毛细胞损害的离体培养试验模型[J]. 中华耳科学杂志,2005,3(3):191-193.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

(上接第 788 页)

明 LR 干预组小鼠血清抗氧化活性的提高与小鼠肝细胞脂肪变性的抑制作用紧密相关。

本研究提示,LR 能显著增加小鼠血清抗氧化水平并能显著抑制小鼠肝细胞脂肪变性,其对小鼠非酒精性肝细胞脂肪变性的抑制作用与对小鼠血清抗氧化活性的加强有关。

参考文献:

[1] Lirussi F, Azzalini L, Orlando S, et al. Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis[J]. Cochrane Database Syst Rev,2007(1):CD004996.

[2] Ejtahed H S, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients[J]. Nutrition,2012,28(5):539-543.

[3] 艾迎春,杜井峰,周海瑞,等. 中药复方对非酒精性脂肪肝大鼠

血清 TC、TG、HDL 的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2011,32(18):2913-2914.

[4] Kelishadi R, Farajian S, Mirlohi M. Probiotics as a novel treatment for non-alcoholic fatty liver disease; a systematic review on the current evidences[J]. Hepat Mon,2013,13(4):e7233.

[5] 陈芳,徐珊,吕伟红,等. 糖尿病大鼠视网膜氧化应激损伤及葛根素的干预作用[J]. 眼科新进展,2012,32(1):15-19.

[6] 喻小龙,谭钢,刘二华,等. 罗格列酮对高糖诱导视网膜神经节细胞损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2013,33(2):101-105.

[7] 段东印. 炎症因子和自由基在诱导缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经细胞凋亡中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(23):1825-1827.

[8] Deabe M M, Darwish H R, Abdel-Aziz K B, et al. Protective effects of Lactobacillus rhamnosus GG on aflatoxins-induced toxicities in male albino mice, deabes[J]. J Environment Analytic Toxicol, 2012,2:1-9.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)