



食品与发酵工业

Food and Fermentation Industries

ISSN 0253-990X, CN 11-1802/TS

## 《食品与发酵工业》网络首发论文

题目: 不同乳杆菌缓解慢性酒精性肝损伤的作用比较  
作者: 朱诗雅, 翟齐啸, 赵星, 孙新凯, 路江浩, 李华文, 赵建新, 张灏, 田丰伟, 陈卫  
DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.021066  
收稿日期: 2019-05-11  
网络首发日期: 2019-09-11  
引用格式: 朱诗雅, 翟齐啸, 赵星, 孙新凯, 路江浩, 李华文, 赵建新, 张灏, 田丰伟, 陈卫. 不同乳杆菌缓解慢性酒精性肝损伤的作用比较. 食品与发酵工业. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.021066>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 不同乳杆菌缓解慢性酒精性肝损伤的作用比较

朱诗雅<sup>1,2</sup>, 翟齐啸<sup>1,2</sup>, 赵星<sup>3</sup>, 孙新凯<sup>3</sup>, 路江浩<sup>3</sup>, 李华文<sup>3</sup>, 赵建新<sup>1,2</sup>, 张灏<sup>1,2</sup>, 田丰伟<sup>1,2</sup>✉, 陈卫<sup>1,2</sup>

1 (江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

2 (江南大学 食品学院, 江苏 无锡, 214122)

3 (河北一然生物科技有限公司, 河北 石家庄, 050800)

✉通信作者 田丰伟教授为通讯作者, E-mail: fwtian@jiangnan.edu.cn

**摘要** 目的: 探究不同乳杆菌对小鼠慢性酒精性肝损伤的缓解作用。方法: 利用 C57BL/6 小鼠, 随机分为空白对照组、酒精模型组、阳性对照组和乳杆菌干预组。8 周后, 分析小鼠的血清转氨酶活性、肝脏氧化指标、血清内毒素含量、肝脏炎症因子表达、肠道紧密连接蛋白表达水平等, 并进行肝组织病理学观察, 从而比较不同乳杆菌对慢性酒精性肝损伤的缓解作用。结果: 所选乳杆菌均能够一定程度地改善慢性酒精引起的小鼠肝损伤。其中, 植物乳杆菌 LP45 (*Lactobacillus plantarum* 45, LP45) 和鼠李糖乳杆菌 L519 (*Lactobacillus rhamnosus* 519, L519) 效果最为显著。植物乳杆菌 LP45 和鼠李糖乳杆菌 L519 显著降低了慢性酒精引起的肝脏脂肪积累和氧化应激, 抑制了血液中转氨酶和内毒素的增加, 降低了肝脏中炎症因子的升高, 并改善了肠道紧密连接蛋白表达的降低。结论: 所选乳杆菌中, 植物乳杆菌 LP45 和鼠李糖乳杆菌 L519 可以通过改善氧化应激和增强肠道屏障功能从而有效缓解小鼠慢性酒精性肝损伤。

**关键词** 乳杆菌; 酒精性肝损伤; 氧化应激; 肠道屏障

DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.021066

## Comparison of the Alleviation Effects of Different Lactobacilli on Chronic Alcohol-induced Liver Injury

ZHU Shiya<sup>1,2</sup>, ZHAI Qixiao<sup>1,2</sup>, ZHAO Xing<sup>3</sup>, SUN Xinkai<sup>3</sup>, LU Jianghao<sup>3</sup>, LI Huawen<sup>3</sup>, ZHAO Jianxin<sup>1,2</sup>, ZHANG Hao<sup>1,2</sup>, TIAN Fengwei<sup>1,2</sup>✉, CHEN Wei<sup>1,2</sup>

1 (State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

3 (Hebei Inatural Biological Technology Co.Ltd., Shijiazhuang 050800, China)

**Abstract** Objective: This study investigated the alleviation effect of different Lactobacillus on chronic alcohol-induced liver injury in mice. Methods: C57BL/6 mice were randomly divided into control group, alcohol model group, positive control group and Lactobacillus intervention group. After treatment for 8 weeks, the activity of serum aminotransferase, the oxidation index of liver, the content of serum endotoxin, the expression of liver inflammatory cytokines and intestinal tight junctional protein were analyzed, and the pathological changes of liver tissue were observed. So the effect of different Lactobacillus on chronic alcohol-induced liver injury was observed. Results: The selected Lactobacillus can improve the liver injury of mice caused by chronic alcohol to a certain extent. Among them, *Lactobacillus plantarum* 45 (LP45) and *Lactobacillus rhamnosus* 519 (L519) had the most significant effect. LP45 and L519 significantly reduced liver fat accumulation and oxidative stress caused by chronic alcohol, inhibited the increase of transaminase and endotoxin in the blood, lowered the elevation of inflammatory factors in the liver, and improved the decrease in intestinal tight junction protein expression. Conclusions: Among these Lactobacillus, LP45 and L519 could effectively alleviate chronic alcohol-induced liver injury in mice by improving oxidative stress and improving intestinal barrier function.

收稿日期: 2019-05-11

基金项目: 植物乳杆菌肠道定殖特性及其影响因素 (31871773)

作者简介: 第一作者: 硕士研究生

网络首发时间: 2019-09-11 12:36:50 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1802.TS.20190910.1724.009.html>

**Key words** *Lactobacillus*, alcoholic liver disease, oxidative stress, intestinal barrier

酒精性肝病 (Alcoholic Liver Disease, ALD), 是全球慢性肝病的主要原因, 包括从肝脏脂肪变性到酒精性肝炎、纤维化、肝硬化和肝细胞癌发展的一系列肝损伤疾病<sup>[1]</sup>。随着经济水平的提高和社会活动的增多, 全世界范围内尤其发展中国家的人均酒精消耗量逐年上升, 国内外酒精性肝病患者也日益增多。而在我国, 酒精性肝病已经上升成为仅次于乙型病毒性肝炎的导致肝硬化的第二大病因<sup>[2]</sup>。因此, 探讨酒精性肝病的发病机制及防治措施具有十分重要的意义。酒精性肝损伤的发病机制十分复杂, 主要是乙醇及其衍生物乙醛等在代谢过程中直接或间接导致的氧化应激、肠源性内毒素、炎性介质和炎症反应等多种因素相互作用的结果<sup>[3-6]</sup>。其中, 肠道屏障功能受损引起的肠源性内毒素血症及内毒素激活枯否细胞 (Kupffer Cells) 在 ALD 的发生和发展中起着重要的作用<sup>[7,8]</sup>。

益生菌已被证实具有调节生理活性、维持肠道微生态平衡、降低胆固醇水平、提高抗氧化能力、改善机体免疫功能等多种功能, 目前已被广泛应用于发酵乳制品、乳饮料、果汁、婴儿食品以及药品等领域, 并得到广大消费者及医疗工作者的认可<sup>[9]</sup>。已有研究表明, 酒精性肝损伤患者通过服用益生菌, 肠道微生态恢复平衡, 肝脏功能得到明显改善<sup>[10]</sup>。目前虽然已经有许多学者关注到益生菌对慢性酒精性肝损伤的作用, 包括 *Lactobacillus rhamnosus* R0011<sup>[11]</sup>、*Lactobacillus plantarum* LC27<sup>[12]</sup>、*Bifidobacterium longum* LC67<sup>[12]</sup>、*Lactobacillus rhamnosus* CCFM1107<sup>[13]</sup>、*Bifidobacterium animalis subsp. lactis* KV9<sup>[14]</sup>等, 但仍主要集中在利用鼠李糖乳杆菌 LGG (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) 对其机制进行研究, 对其他菌株的筛选及方法研究较少。

乳酸菌具有提高免疫力、降低胆固醇、抗氧化、调节肠道菌群等多种功能<sup>[15]</sup>。因此, 某些乳酸菌可以通过减轻氧化应激、调节肠道菌群、改善肠道通透性等多方面从而缓解酒精引起的肝功能损伤<sup>[16]</sup>。乳杆菌属是目前发酵行业应用较多的一类乳酸菌, 包括鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、瑞士乳杆菌等近 10 个种。有研究显示, 虽然都属于乳杆菌属, 但不同种甚至同一种的乳杆菌其功能也不尽相同<sup>[17,18]</sup>。本研究选取几株不同种类的乳杆菌, 通过小鼠试验研究比较不同乳杆菌对慢性酒精性肝损伤的缓解作用, 并探讨其缓解慢性酒精性肝损伤的机制, 为相关产品的开发提供依据。其中, 植物乳杆菌 LP45 已被证实具有降低胆固醇、提高免疫力、抑制胃肠道致病菌、调节肠道菌群等功能<sup>[19-22]</sup>。此外, 鼠李糖乳杆菌 L519 分离自云南传统发酵乳制品, 瑞士乳杆菌 L551 (*Lactobacillus helveticus* 551, L551) 分离自西藏那曲传统奶制品, 以及副干酪乳杆菌 L577 (*Lactobacillus paracasei* 577, L577), 均为具有较好的体外性能的潜力菌株。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 实验菌株

鼠李糖乳杆菌 L519、植物乳杆菌 LP45、瑞士乳杆菌 L551、副干酪乳杆菌 L577, 河北一然生物技术有限公司; 鼠李糖乳杆菌 LGG, 美国菌种保藏中心 ATCC。

#### 1.1.2 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 80 只, 雄性, 8 周龄, 体重 18~20g, 上海斯莱克实验动物有限公司。

#### 1.1.3 试剂

蛋白胨、酵母粉、葡萄糖、无水乙酸钠、氯化钠、多聚甲醛、无水乙醇等, 国药集团化学试剂有限公司; 脱脂乳粉, 市售, 上海恒天然商贸有限公司; Lieber DeCarli 液体饲料, 南通特洛菲饲料科技有限公司; 葵花牌护肝片, 黑龙江葵花药业股份有限公司; 丙二醛、谷胱甘肽、超氧化物歧化酶的测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 小鼠内毒素、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 6、白细胞介素 1 $\beta$  的 ELISA 试剂盒, 南京森贝伽生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 全自动高压灭菌锅, 上海鼎谦生物科技有限公司; 分

析天平和电子天平, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海森信实验仪器有限公司; 恒温恒湿培养箱, 上海森信实验仪器有限公司; 电热恒温水槽, 上海森信实验仪器有限公司; 高通量组织研磨仪, 上海净信科技公司; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 紫外可见分光光度计, 日本岛津制造所; 微孔板恒温振荡器, 杭州奥盛仪器有限公司; 酶标仪, 美国 Thermo fisher 公司; 等。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株培养及处理

将冻存的四株乳杆菌复苏、活化两代后, 接入 MRS 液体培养基中, 37℃ 培养 18 h, 在 4℃ 下 6000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 所得菌体用灭菌的生理盐水洗涤并离心三次后, 以质量分数为 12% 的脱脂乳作为保护剂, 冻干浓缩成菌粉。灌胃小鼠前, 用质量分数为 0.9% 的生理盐水重悬, 调整菌液浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL, 在 37℃ 水浴中复苏 30 min 后使用。

#### 1.3.2 动物模型的建立

SPF 级健康 C57BL/6 雄性小鼠 80 只, 8 周龄, 适应性喂养一周后, 随机分成 8 组, 每组 10 只。采用含 35% 热量酒精 (alcohol-fed, AF) 或等热量麦芽糊精 (pair-fed, PF) 的 Lieber DeCarli 液体饲料饲喂, 连续喂养 8 周<sup>[23]</sup>。第 1 组: 空白对照组 (PF); 第 2 组: 酒精模型组 (AF); 第 3 组: 阳性药物对照组 (AF+药); 第 4 组: LGG 阳性对照组 (AF+LGG); 第 5 组: 鼠李糖乳杆菌 L519 干预组 (AF+L519); 第 6 组: 植物乳杆菌 LP45 干预组 (AF+LP45); 第 7 组: 瑞士乳杆菌 L551 (AF+L551); 第 8 组: 副干酪乳杆菌 L577 干预组 (AF+L577)。第 1 组, 摄食量与第 2 组等量喂养 (以等热量麦芽糊精代替酒精)。第 3、4、5、6、7、8 组, 最后 2 周添加护肝片溶液或菌悬液。所有样品按照 10 mg/kg 体重进行灌胃<sup>[16]</sup>。每天测定小鼠的食物摄入量, 每周测定小鼠体重 1 次。小鼠喂养 8 周后, 禁食 12 h, 麻醉后摘眼球取血, 辅以颈椎脱臼法处死, 收集血液和组织样本。

#### 1.3.3 分析方法

##### 1.3.3.1 肝组织病理学观察

取小鼠肝脏左叶同一位置的组织, 用质量分数为 10% 的多聚甲醛溶液固定后, 经过石蜡包埋、切片、苏木精和伊红染料染色后, 在切片扫描仪下扫片观察。

##### 1.3.3.2 相关生化指标测定

小鼠血清中谷草转氨酶、谷丙转氨酶的活性, 均利用全自动血清生化分析仪进行测定。肝匀浆中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和丙二醛的测定, 均按照相应试剂盒具体操作说明进行。

##### 1.3.3.3 血清内毒素含量测定

血清中内毒素的含量测定采用酶联免疫分析法, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

##### 1.3.3.4 肝脏炎症因子表达测定

肝脏中炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$ 、白细胞介素 6 的表达水平均采用 ELISA 试剂盒检测。

##### 1.3.3.5 肠道紧密连接蛋白 mRNA 表达水平测定

采用 Trizol 法提取肠道组织中总 RNA, 然后利用反转录试剂盒进行 RNA 逆转录, 最后对肠道中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin、Claudin-1 的 mRNA 表达水平进行实时定量聚合酶链反应 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析。

##### 1.3.3.6 统计学分析

所有实验数据均以平均值  $\pm$  均值标准误差 (mean  $\pm$  SEM) 表示。两组数据间的统计分析采用独立样本 T 检验, 多组数据间的统计分析采用 one-way ANOVA 单因素方差分析。当 P 值  $< 0.05$  时, 视为组间具有显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肝脏组织病理损伤的影响

长期大量饮酒导致的慢性酒精性肝损伤，初期通常表现为酒精性脂肪肝。如图 1 所示，慢性酒精暴露对小鼠肝脏造成了严重的病理损伤。对照组肝细胞结构较完整，有明显的界线且胞浆均匀，有轻微脂肪空洞，无炎性浸润；而造模组脂肪变性明显，有大片的脂肪空洞，肝细胞肿胀变形，有网状结构，出现炎性细胞浸润；乳杆菌干预则有效地缓解了这些病理损伤，表现为脂肪泡减少，炎症细胞浸润减轻。其中，鼠李糖乳杆菌 L519、植物乳杆菌 LP45 和瑞士乳杆菌 L551 效果较为显著，肝细胞恢复正常，而副干酪乳杆菌 L577 效果较差，肝细胞仍肿胀变形，存在脂肪空泡。

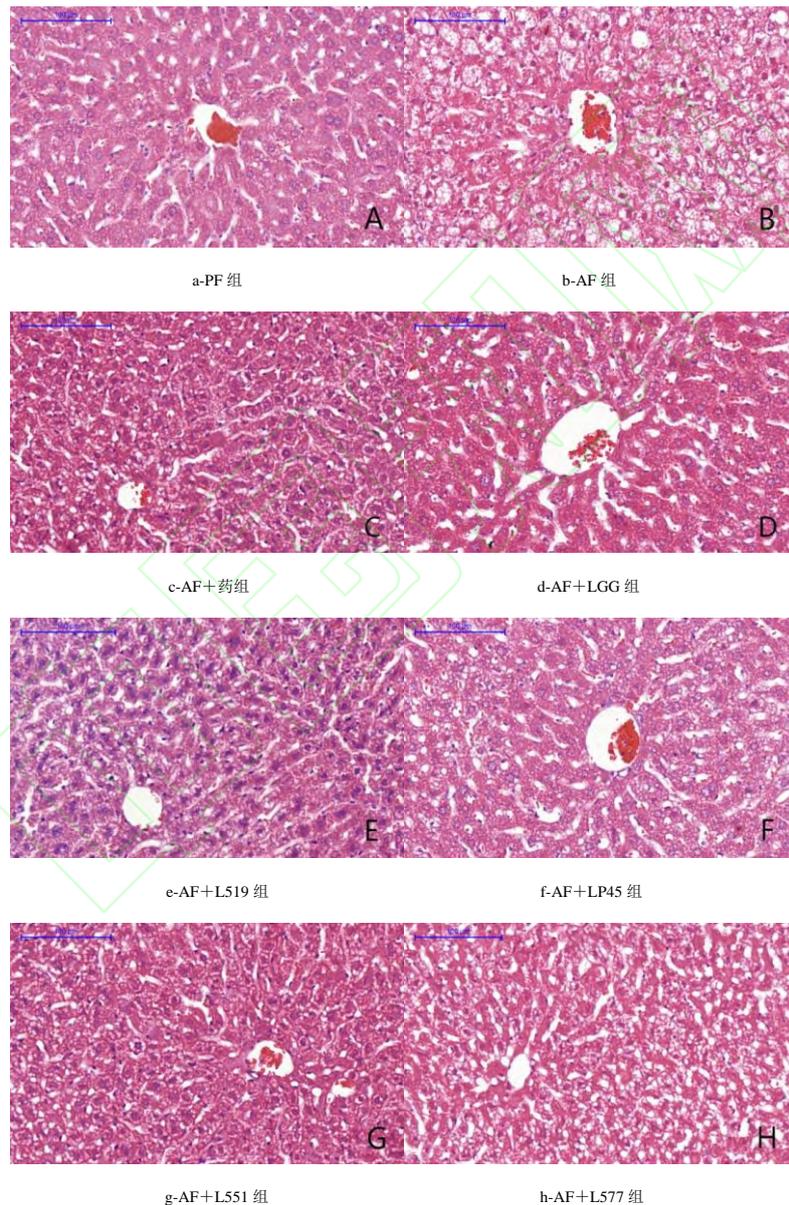


图 1 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肝脏组织病理损伤的影响 (H&E,  $\times 200$ )

Fig.1 Effects of *Lactobacillus* treatment on pathological injury of liver tissue in mice exposed to chronic alcohol(H&E,  $\times 200$ )

## 2.2 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠血清中转氨酶含量的影响

谷丙转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT) 和谷草转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST) 主要存在于肝细胞胞浆内, 当肝脏受到损伤时, 细胞胞浆内的转氨酶进入血液, 导致血液中 ALT 和 AST 的含量升高<sup>[24]</sup>。对小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性进行分析, 结果如图 2 所示, 慢性酒精暴露导致小鼠血清中 ALT 和 AST 活性显著升高, 且 AST 的含量大幅上升, 明显高于 ALT, 而乳杆菌干预后可以有效恢复 ALT、AST 的活性。其中, 植物乳杆菌 LP45 和瑞士乳杆菌 L551 效果最为显著。表明植物乳杆菌 LP45 和瑞士乳杆菌 L551 能够有效抑制慢性酒精肝损伤小鼠血清转氨酶的升高。

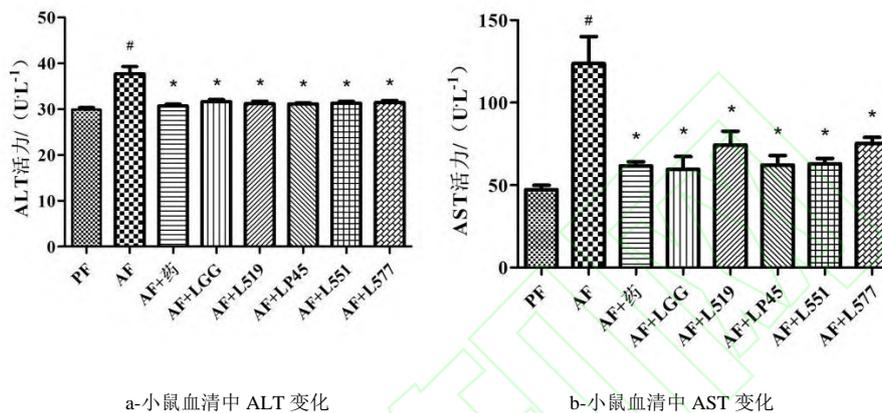


图 2 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠血清中 ALT 和 AST 变化的影响  
Fig.2 Effects of *Lactobacillus* treatment on serum ALT and AST levels in mice exposed to chronic alcohol

注: #  $P < 0.05$ , 表示与 PF 组比较, 具有显著差异; \*  $p < 0.05$ , 表示与 AF 组比较, 具有显著差异。

## 2.3 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肝脏中氧化指标的影响

自由基及其诱导的脂质过氧化是造成肝脏组织损伤的重要原因之一。正常情况下, 细胞内存在超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (Glutathione, GSH)、过氧化氢酶、和维生素 E 等抗氧化剂, 可以有效清除自由基, 维持体内的抗氧化防御系统平衡<sup>[25]</sup>。但大量饮酒会破坏这种平衡, 诱发氧化应激, 导致脂质过氧化, 抗氧化物质 SOD、GSH 等大量消耗, 脂质过氧化产物丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 增高, 从而导致肝脏发生病变, 各种生化指标出现异常<sup>[26,27]</sup>。对小鼠肝脏中氧化指标进行分析, 结果如图 3 所示, 慢性酒精处理后, 与对照组相比, 酒精模型组小鼠肝脏中 MDA 浓度明显升高, 而 GSH 含量和 SOD 活性显著降低。相对于模型组, 乳杆菌干预可以有效地降低 MDA 浓度, 并恢复了 GSH 含量和 SOD 活性。其中, 植物乳杆菌 LP45 表现最为突出。表明植物乳杆菌 LP45 能够有效抑制慢性酒精引起的氧化损伤。

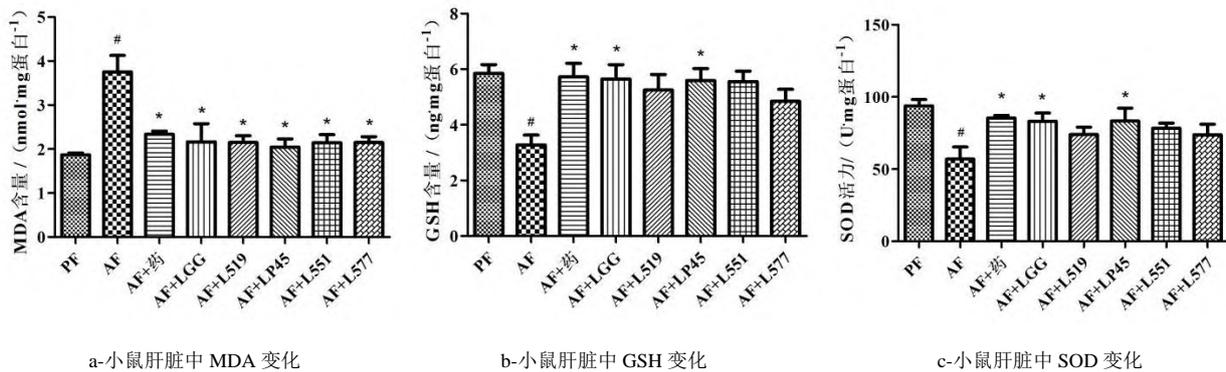


图3 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肝脏中MDA、GSH、SOD变化的影响  
Fig.3 Effects of *Lactobacillus* treatment on liver MDA, SOD and GSH levels in mice exposed to chronic alcohol

注: #  $P < 0.05$ , 表示与PF组比较, 具有显著差异; \*  $p < 0.05$ , 表示与AF组比较, 具有显著差异。

#### 2.4 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠血清内毒素含量的影响

内毒素是来自肠道革兰氏阴性细菌细胞壁外膜上的脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 成分, 具有十分广泛的生物活性, 过量时能够引起严重的炎症反应<sup>[28]</sup>。研究表明, 酒精导致肠道屏障受损, 大量肠源性 LPS 进入肝脏与 Kupffer 细胞结合, 引发一系列炎症反应, 从而导致肝脏损伤<sup>[29]</sup>。对小鼠血清中 LPS 含量进行分析, 由图 4 可知, 慢性酒精处理后, 酒精模型组小鼠血清中 LPS 含量明显升高, 而乳杆菌摄入后显著降低了 LPS 含量。同时, 本研究使用的 Lieber-DeCarli 标准型酒精液体模型饲料是一种高脂肪的酒精液体饲料, 其中, 脂肪热量高达 35%<sup>[30]</sup>。对照液体饲料和酒精液体饲料等热量喂养, 因此, 长期喂养后对照组可能出现轻微的非酒精性脂肪肝, 导致血清中 LPS 水平略高于正常水平, 而乳杆菌摄入后显著降低了 LPS 水平, 甚至恢复略低于对照组的正常水平。表明所选乳杆菌均能够有效抑制慢性酒精引起的血清中 LPS 含量的升高。

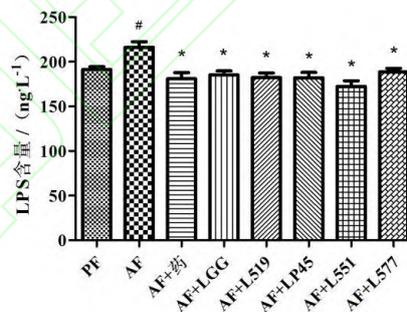


图4 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠血清中LPS变化的影响  
Fig.4 Effects of *Lactobacillus* treatment on serum LPS levels in mice exposed to chronic alcohol

注: #  $P < 0.05$ , 表示与PF组比较, 具有显著差异; \*  $p < 0.05$ , 表示与AF组比较, 具有显著差异。

#### 2.5 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肝脏中炎症因子含量的影响

促炎性细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白细胞介 1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 是诱导酒精性肝损伤的关键因素之一, 参与肝脏炎症反应、脂肪变性和细胞凋亡过程<sup>[31]</sup>。对小鼠肝脏中炎症因子含量进行分析, 由图 5 可知, 慢性酒精处理后, 小鼠肝脏中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量明显增加, 而乳杆菌处理后大大降低了 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的含量。同时, 本研究使用的 Lieber-DeCarli 标准型酒精液体模型饲料, 对照组可能出现轻微的非酒精性脂肪肝, 对照组可能出现轻微的非酒精性脂肪肝, 导致组织中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平略高于正常水平, 而乳杆菌摄入后显著降低了 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平, 甚至恢复略低于对照组的正常水平。其中, 鼠

李糖乳杆菌 L519 效果最为显著。表明鼠李糖乳杆菌 L519 能够显著抑制慢性酒精引起的肝脏中炎症因子含量的升高。

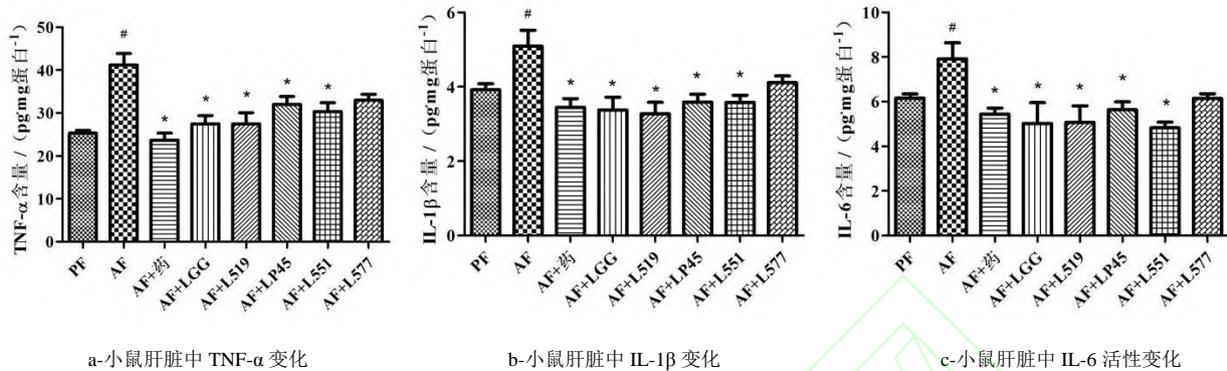


图 5 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肝脏中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 变化的影响  
Fig. 5 Effects of *Lactobacillus* treatment on liver TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 levels in mice exposed to chronic alcohol  
注: #  $P < 0.05$ , 表示与 PF 组比较, 具有显著差异; \*  $p < 0.05$ , 表示与 AF 组比较, 具有显著差异。

## 2.6 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肠道紧密连接蛋白表达水平的影响

紧密连接 (tight junction, TJ) 是肠黏膜上皮细胞间最重要的连接方式, 对维持黏膜上皮细胞极性及调节肠屏障的通透性发挥着重要作用, 用以维持机体内环境的稳定<sup>[32]</sup>。其中, 外周蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1)、密封蛋白 1 (Claudin-1)、闭合蛋白 (Occludin) 是构成紧密连接的重要成分<sup>[33]</sup>。对 ZO-1、Claudin-1、Occludin 的 mRNA 表达情况进行分析, 由图 4 可知, 慢性酒精处理后, 小鼠肠道中 ZO-1、Claudin-1、Occludin 的 mRNA 表达水平明显降低, 而乳杆菌处理后得到恢复。其中, 鼠李糖乳杆菌 L519 和植、物乳杆菌 LP45 效果最为显著。表明鼠李糖乳杆菌 L519 和植物乳杆菌 LP45 能够有效改善慢性酒精引起的肠道紧密连接蛋白表达水平的降低。

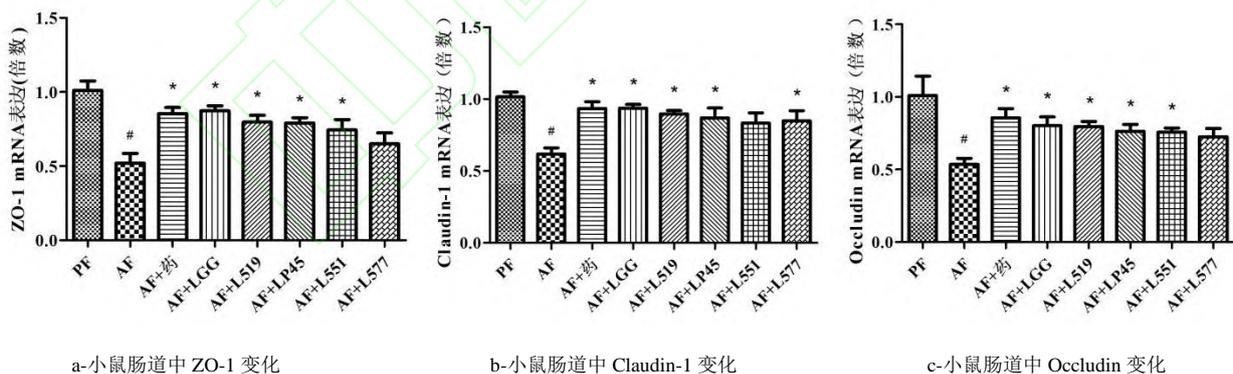


图 6 乳杆菌对慢性酒精暴露小鼠肠道紧密连接蛋白表达水平的影响  
Fig. 6 Effects of *Lactobacillus* treatment on intestinal tight junction protein expression levels in mice exposed to chronic alcohol  
注: #  $P < 0.05$ , 表示与 PF 组比较, 具有显著差异; \*  $p < 0.05$ , 表示与 AF 组比较, 具有显著差异。

## 3 讨论

长期大量饮酒引起的酒精性肝损伤, 包括从酒精性脂肪肝到酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌发展的一系列肝损伤疾病<sup>[1]</sup>。先前的大量研究已表明, 氧化应激在酒精性肝损伤的发病过程中发挥着极为重要的作用<sup>[25,34]</sup>。近来, 研究也表明, 肠道屏障功能受损引起的肠源性内毒素血症是导致酒

精性肝损伤的关键因素之一<sup>[35]</sup>。临床研究发现,酒精性肝损伤患者血浆中的内毒素水平显著高于正常人<sup>[8]</sup>,酒精、内毒素和肝损伤之间的关系日趋明显。同时,大量研究表明,酒精会导致肠道屏障功能受损,肠道对内毒素的通透性增加<sup>[36]</sup>,导致内毒素从肠道转移到肝脏,从而激活 Kupffer 细胞,引发一系列导致炎症反应和肝损伤的事件<sup>[37]</sup>。本研究结果同样显示,慢性酒精暴露引起小鼠肝脏中形成大量的脂肪积累,肝脏氧化损伤增加,肠道通透性显著增加,血液中内毒素含量显著上升,肝脏炎症水平增加。

益生菌具有抗氧化、提高免疫力、调节肠道菌群平衡、改善肠道屏障功能等功能。研究表明,益生菌可以通过调节肠道菌群平衡,刺激肠道生长和黏膜免疫活性,增强肠黏膜上皮细胞间的紧密连接<sup>[38]</sup>,改善肠道屏障功能<sup>[39]</sup>,从而减轻肠源性内毒素血症,缓解酒精性肝损伤。同时,已有研究表明鼠李糖乳杆菌 LGG 处理能够显著抑制广谱产生内毒素的革兰氏阴性菌的生长,从而降低酒精引起的内毒素增加<sup>[40]</sup>,抑制肝脏炎症反应<sup>[41,42]</sup>。

本研究结果表明,所选乳杆菌均能够一定程度地改善慢性酒精引起的小鼠肝损伤。其中,植物乳杆菌 LP45 能够有效抑制慢性酒精引起的氧化损伤以及肝脏炎症反应,并有效改善肠道紧密连接,这可能与其已被证实的降低胆固醇、提高免疫力、抑制胃肠道致病菌、调节肠道菌群等功能有关<sup>[19-22]</sup>。同样,鼠李糖乳杆菌 L519 也能够显著抑制慢性酒精引起的肝脏炎症反应,并有效改善肠道紧密连接。同时,本研究结果也进一步验证,所选乳杆菌尤其鼠李糖乳杆菌 L519 和植物乳杆菌 LP45,能够通过改善肠道紧密连接蛋白表达的降低,修复肠上皮屏障功能受损,同时降低酒精引起的内毒素增加,进而阻止肠道内毒素泄漏,减轻肠源性内毒素血症,缓解小鼠肝脏氧化损伤以及炎症反应,从而改善酒精性肝损伤。

## 参 考 文 献

- [1] Gao B, Bataller R. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1572-1585.
- [2] 高潇雪, 刘立新. 酒精性肝病流行病学及发病机制研究进展[J]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2016, 6(2): 62-65.
- [3] 窦慧馨, 张得钧. 酒精性肝病分子发病机制研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 7: 1643-1647.
- [4] 邱萍, 李相等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(2): 160-163.
- [5] 刘国涛, 朱玉翠, 张涛等. 酒精性肝病研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(15): 1382-1388.
- [6] Sugimoto K, Takei Y. Pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. *Hepatology Research*, 2017, 47(1): 70-79.
- [7] Purohit V, Bode J C, Bode C, et al. Alcohol, Intestinal Bacterial Growth, Intestinal Permeability to Endotoxin, and Medical Consequences: Summary of a Symposium[J]. *Alcohol*, 2008, 42(5): 349-361.
- [8] Parlesak A, Schafer C, Schutz T, et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease[J]. *Journal of Hepatology*, 2000, 32(5): 742-747.
- [9] 张娟, 陈坚. 益生菌功能开发及其应用性能强化[J]. *科学通报*, 2019, 3: 246-259.
- [10] Kirpich I A, Solovieva N V, Leikhter S N, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study[J]. *Alcohol*, 2008, 42(8): 675-682.
- [11] Hong M, Kim S W, Han S H, et al. Probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* R0011 and *acidophilus* R0052) Reduce the Expression of Toll-Like Receptor 4 in Mice with Alcoholic Liver Disease[J]. *Plos One*, 2015, 10(2): e0117451.
- [12] Won-Gyeong Kim, Kim H I, Kwon E K, et al. *Lactobacillus plantarum* LC27 and *Bifidobacterium longum* LC67 mitigate alcoholic steatosis in mice by inhibiting LPS-mediated NF- $\kappa$ B activation through restoration of the disturbed gut microbiota[J]. *Food & Function*, 2018, 9.
- [13] Fengwei T, Feifei C, Gang W, et al. *Lactobacillus rhamnosus* CCFM1107 treatment ameliorates alcohol-induced liver injury in a mouse model of chronic alcohol feeding[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(12):856-863.
- [14] Zhe Z; Hui Z; Lu B; et al. Protective effects of probiotics on acute alcohol-induced liver injury in mice through alcohol metabolizing enzymes activation and hepatic TNF- $\alpha$  response reduction [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 59:234-241.
- [15] 赵红霞, 詹勇, 许梓荣. 乳酸菌的研究及其应用[J]. *江西饲料*, 2003(1).
- [16] Forsyth C B, Farhadi A, Jakate S M, et al. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis[J]. *Alcohol*, 2009, 43(2): 163-172.
- [17] 黄亚娟, 宋萌萌, 孙琳. 不同来源乳酸杆菌生物学特性的比较[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(9): 193-199.
- [18] 蒙月月, 赵莉, 霍贵成. 体外评估十株乳杆菌对免疫细胞活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(1).
- [19] 赵林森, 齐世华, 马新颖, et al. 一种植物乳杆菌及其应用: 中国, 201310587738. 8[P]. 2014-03-19.
- [20] 益生菌剂调整肠道疾病人群菌群结构丰度水平的研究[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 133-143.
- [21] 沈曦, 何方, 张玲琳. 植物乳杆菌 LP45 对 OVA 致敏小鼠的抗敏作用研究[C]// 营养与食品科技学术年会暨"营养食品安全健康"成都论坛, 2014.
- [22] 蒲芳芳, 万群, 张瑜杰, et al. 植物乳杆菌 LP45 缓解抗生素对生命早期小鼠免疫及肠道菌群的影响[C]// 益生菌: 技术及产业化——第十三届益生菌与健康国际研讨会, 2018.
- [23] Wang Y, Liu Y, Kirpich I, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces hepatic TNF alpha production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, 24(9): 1609-1615.

- [24] 吕圭源, 陈素红, 张丽丹, et al. 铁皮石斛对小鼠慢性酒精性肝损伤模型血清 2 种转氨酶及胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 192-193.
- [25] Wu D, Cederbaum A I. Oxidative Stress and Alcoholic Liver Disease[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2009, 29(2):141-154.
- [26] Draper H. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 186.
- [27] 龙建纲, 王学敏, 高宏翔, 等. 丙二醛对大鼠肝线粒体呼吸功能及相关脱氢酶活性影响[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(10): 1131-1135.
- [28] 于洋, 吴高峰, 胡建民. 酒精性肝病的内毒素信号通路研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(11): 000042-44.
- [29] 冯彩珠, 朱肖鸿. 酒精性肝病 LPS 信号通路与治疗的研究进展[J]. 浙江医学, 2016, 38(8).
- [30] Feifei G, Kang Z, Benedé-Ubieto Raquel, et al. The Lieber-De Carli diet - a flagship model for experimental Alcoholic Liver Disease (ALD)[J]. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2018.
- [31] McClain C, Barve S, Deaciuc I, et al. Cytokines in Alcoholic Liver Disease[J]. *Seminars in Liver Disease*, 1999, 19(2):205-219.
- [32] 陈意, 李方方, 张勇, 等. 肠黏膜上皮组织紧密连接的生物学功能和作用机理[J]. 动物营养学报, 2017, 29(9): 3068-3074.
- [33] 王希, 廖吕钊, 江荣林. 肠上皮细胞紧密连接蛋白的结构功能及其调节[J]. 浙江医学, 2018, 40(8): 119-122.
- [34] 氧化应激在酒精性肝病中作用机制的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2017(10).
- [35] Purohit V, Bode J C, Bode C, et al. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium[J]. *Alcohol*, 2008, 42(5): 349-361.
- [36] Zhong W, McClain C J, Cave M, et al. The role of zinc deficiency in alcohol-induced intestinal barrier dysfunction[J]. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 298(5): G625-G633.
- [37] Wang Y, Kirpich I, Liu Y, et al. Lactobacillus rhamnosus GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury[J]. *The American Journal of Pathology*, 2011, 179(6): 2866-2875.
- [38] Madsen K, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function[J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(3): 580-591.
- [39] Fabia R, Ar"Rajab A, Johansson M L, et al. The Effect of Exogenous Administration of Lactobacillus reuteri R2LC and Oat Fiber on Acetic Acid-Induced Colitis in the Rat[J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1993, 28(2): 8.
- [40] Nanji A A, Khettry U, Sadrzadeh S M H. Lactobacillus Feeding Reduces Endotoxemia and Severity of Experimental Alcoholic Liver (Disease)[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine Society for Experimental Biology & Medicine*, 1994, 205(3): 243-247.
- [41] Miyauchi E, Morita H, Tanabe S. Lactobacillus rhamnosus alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(6): 2400-2408.
- [42] Wang Y, Liu Y, Sidhu A, et al. Lactobacillus rhamnosus GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012, 303(1): 32-41.