

益生菌发酵豆乳对高脂血症小鼠降血脂及肝损伤缓解的作用

张晓磊¹, 武岩峰¹, 朴春红^{1,2}, 于寒松^{1,2}, 刘俊梅^{1,2}, 贾冬梅¹, 华晓曼¹, 王雨珊¹, 王心哲¹, 王玉华^{1,2}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118)

(2. 国家大豆产业技术体系加工研究室, 吉林长春 130118)

摘要: 研究干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌在体外降胆固醇能力及三种益生菌混合发酵豆乳对高脂饮食小鼠血脂及肝损伤的影响。采用邻苯二甲醛法评价益生菌体外降胆固醇能力。采用 C57BL/6N 小鼠, 并将其随机分为 7 组, 即对照组; 高脂组; 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组; 植物乳杆菌发酵豆乳干预组; 双歧杆菌发酵豆乳干预组; 三种益生菌混合发酵豆乳干预组; 未发酵豆乳干预组。连续喂养 7 周后, 测定血清和肝脏中相关血脂指标, 并观察肝脏组织病理学变化。结果表明: 干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌在体外降胆固醇能力分别为 43.14%、46.27% 和 40.53%。益生菌混合发酵豆乳显著降低小鼠腹部和肾周脂肪指数, 血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL), 升高高密度脂蛋白 (HDL) 水平, 降低肝脏 TC、TG、丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平, 并明显改善肝脏脂肪堆积。

关键词: 益生菌; 发酵豆乳; 高脂血症; 肝损伤; 降血脂

文章编号: 1673-9078(2016)5-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.5.01

Effects of Probiotic-Fermented Soymilk on the Hypolipidemic Activity and on Ameliorating Liver Injury in Hyperlipidemic Mice

ZHANG Xiao-lei¹, WU Yan-feng¹, PIAO Chun-hong^{1,2}, YU Han-song^{1,2}, LIU Jun-mei^{1,2}, JIA Dong-mei¹, HUA Xiao-man¹, WANG Yu-shan¹, WANG Xin-zhe¹, WANG Yu-hua^{1,2}

(1.College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(2.National Processing Laboratory for Soybean Industry and Technology, Changchun 130118, China)

Abstract: The *in vitro* cholesterol removal ability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, and *Bifidobacterium bifidum* and the effects of probiotic-fermented soymilk on the blood lipid level and liver injury in mice fed a high-fat diet were investigated. The *O*-phthalaldehyde method was used to determine the *in vitro* cholesterol removal ability of probiotics. C57BL/6N mice were randomly divided into seven groups: normal chow group, high-fat group, *L. casei*-fermented soymilk intervention group, *L. plantarum*-fermented soymilk intervention group, *B. bifidum*-fermented soymilk intervention group, probiotic-fermented soymilk intervention group (a mixture of the three types of probiotics), and non-fermented soymilk intervention group. After seven weeks of treatments, the related serum and liver lipid parameters were measured and the histopathological changes in the liver were observed. The *in vitro* cholesterol removal abilities of *L. casei*, *L. plantarum*, and *B. bifidum* were 43.14%, 46.27%, and 40.53%, respectively. The treatment using the soymilk fermented with the three types of probiotics significantly reduced the abdominal and perirenal fat indexes as well as the serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein (LDL) levels, while elevating the serum high-density lipoprotein (HDL) level. The liver TC, TG, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransaminase (AST) levels were also reduced. In addition, the accumulation of fat in the liver was improved significantly.

Key words: probiotics; fermented soymilk; hyperlipidemia; liver injury; hypolipidemic

收稿日期: 2015-07-12

基金项目: 科技部“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD18B07); 吉林省教育厅吉林省高校新世纪科学技术优秀人才项目(201439)

作者简介: 张晓磊(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物与功能性食品

通讯作者: 王玉华(1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物与功能性食品

近 10 年来,以高脂血症为代表的心血管疾病已经占据了死因的首位^[1]。根据流行病学及临床医学统计,全世界每天因高血脂症引发的心脑血管疾病死亡人数近 4000 人之多。世界卫生组织(WHO)预测,心血管疾病将继续成为人类死亡的主要原因,截止到 2030 年,全球近 2300 万人将死于以心脏病、中风为主的心血管疾病^[2]。

高脂血症(hyperlipidemia)以总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白(LDL)水平升高以及高密度脂蛋白(HDL)水平降低为特征,是引起动脉粥样硬化和心血管疾病发展的重要危险因素,严重威胁人类的健康^[3]。有报告称,比正常胆固醇水平高出 1mmol/L (>5.2 mmol/L),患冠状动脉心脏疾病的风险增加了 35%,同时,降低血清中胆固醇水平的 1%,可以将患心脑血管疾病的风险降低 3%^[4]。动脉粥样硬化是诱发心血管疾病的主要原因,而高脂血症是促使动脉粥样硬化的危险因素之一^[5]。由于常见的降血脂药物价格昂贵,具有不确定的疗效和不同程度的副作用,所以开发安全有效的降血脂功能性食品和技术是亟待需要解决的问题。

益生菌(probiotic)通常被定义为当机体从膳食中摄入足够量时,能够调节并改善肠道菌群,对人体健康具有促进作用的一类具有活性的微生物^[6]。目前主要的益生菌包括乳杆菌、链球菌和双歧杆菌,这些益生菌是人体和动物肠道内微生物的正常组成,在保持肠道内稳态过程中起到重要的作用。大量文献已经证实益生菌不仅能调节肠道菌群结构,还具有抗癌抗肿瘤、抗炎、改善酒精性肝损伤、减轻或防止肠功能紊乱、调节脂质代谢等功效^[7-10],无副作用或较低的副作用,且价格低廉,对机体具有健康的促进作用。研究表明含有益生菌的功能性食品,尤其是以酸乳和酸豆乳为主的益生菌发酵制品不仅可以保持肠道内微生物平衡,而且在人体和动物体内发挥降血脂的作用,从而减少心血管疾病发生的风险。

本研究通过对干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌在体外的降胆固醇能力以及三种益生菌混合发酵豆乳对高脂饮食小鼠降血脂和修复肝损伤的影响进行研究,为益生菌实际生产应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验菌株

干酪乳杆菌 DBTE ZL3-6 (*L. casei* DBTE ZL3-6) (内蒙古农业大学国家乳制品重点实验室提供);植物

乳杆菌 LP1406 (*L. plantarum* LP1406); 双歧杆菌 BB1002 (*B. bifidum* BB1002) (吉林农业大学微生物实验室保存)。

1.1.2 实验动物

清洁级雄性 C57BL/6N 小鼠 70 只,鼠龄 8 周,体质量 (20±2) g,由吉林大学白求恩医学院动物实验中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(吉)2013-0001]。

1.1.3 实验材料

基础饲料由长春亿斯实验动物技术责任有限公司提供。

1.1.4 主要药品与试剂

MRS-THIO-OX-CHOL 培养基:在液体 MRS 培养基中添加 0.2% 巯基乙酸钠,0.3% 牛胆盐,及浓度为 100 μg/mL 胆固醇溶液;胆固醇、胆盐、冰乙酸、浓硫酸、邻苯二甲醛等均由北京鼎国试剂有限公司提供(分析纯);巯基乙酸钠购于东京化成工业株式会社;总胆固醇(TC)测定试剂盒、甘油三酯(TG)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)测定试剂盒、丙氨酸转氨酶(ALT)测定试剂盒和天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.1.5 仪器与设备

TL-18M 高速台式冷冻离心机 上离公司;Infinite M200 多功能酶标仪 瑞士帝肯公司;CM1850 冰冻切片机 美国莱卡公司;985370 手持式超微量组织匀浆机 美国 Biospec 公司;AxioCamMRC 5 倒置显微镜 德国蔡司公司;其它为实验室常用仪器和设备。

1.2 试验方法

1.2.1 邻苯二甲醛方法体外测定三种益生菌降胆固醇能力

1.2.1.1 菌株活化

分别将冻干保存的干酪乳杆菌、植物乳杆菌、双歧杆菌用液体 MRS 培养基在 37 °C 培养 18 h,按照培养液 3% 的接种量进行接菌,连续活化传代三次。

1.2.1.2 菌悬液的制备

将上述活化并扩大培养的种子液 4000 r/min 离心 10 min,用 0.85% 的生理盐水洗涤 2 遍,离心后,弃上清,得到菌体沉淀,悬浮于等体积的生理盐水中,得到 10⁸ CFU/mL 菌悬液。

1.2.1.3 测定样品的 OD 值

将菌悬液以 3% 的接种量接入到装有 10 mL 的 MRS-THIO-OX-CHOL 培养基中,在 37 °C 的条件下恒温稳定培养。然后将培养基以 9000 r/min 离心 10 min,

取 0.25 mL 的上清液, 加入 0.1 mL 浓度为 1 mg/mL 的邻苯二甲醛溶液(邻苯二甲醛溶于无水乙醇), 充分震荡, 静置反应 10 min 后, 加入 2 mL 的混合酸溶液(浓 H₂SO₄ 与冰乙酸 1:1 混匀), 静置 10 min, 用酶标仪在 550 nm 处测定其吸光度值(OD)。样品分别做三个平行, 在培养过程中, 分别在 6、12、24 h 时取样, 利用上述邻苯二甲醛方法测定发酵液 OD 值。然后根据胆固醇的标准曲线拟合的方程确定发酵液中胆固醇的含量, 并根据以下公式测得最终胆固醇的脱除率(%):

$$V = (B - A) / B \times 100\%$$

式中: A 为各实验菌株发酵后上清液中的胆固醇含量(μg); B 为各实验菌株发酵前上清液中的胆固醇含量(μg)。

1.2.2 益生菌发酵豆乳对小鼠体内降血脂能力的测定

1.2.2.1 发酵豆乳的制备

挑选饱满的大豆, 按照大豆:纯水=1:12 加水浸泡 8 h, 磨浆过滤之后进行煮浆, 最后在 115 °C 温度下灭菌 15 min, 完成豆乳的制备, 冷却待用。分别将干酪乳杆菌、植物乳杆菌、双歧杆菌以及以上三种菌株以 3:3:4 的比例混合菌株, 按照 3% 的接种量接种至已经冷却好的豆乳中, 混合均匀, 在 37 °C 条件下发酵至凝乳。

1.2.2.2 动物分组及饲喂方法

选择健康成年的 C57BL/6N 雄性小鼠 70 只, 将小鼠随机分配为 7 组, 每组 10 只, 饲喂不同饮食, 分别为正常对照组: 普通饲料; 高脂组: 高脂饲料; 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组: 高脂饲料混合干酪乳杆菌发酵豆乳; 植物乳杆菌发酵豆乳干预组: 高脂饲料混合植物乳杆菌发酵豆乳; 双歧杆菌发酵豆乳干预组: 高脂饲料混合双歧杆菌发酵豆乳; 益生菌混合发酵豆乳干预组: 高脂饲料混合干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌混合发酵豆乳; 未发酵豆乳干预组: 高脂饲料混合未发酵豆乳。干预组需要每天将高脂饲料与相应的干预物混合并搅拌均匀, 干预物按照 50 g/(kg BW d) 的剂量进行给予, 保证干预物的足量摄入。小鼠自由摄食、饮水, 记录各组小鼠每天的摄食量, 食物利用率(%) = (体重增加量/总摄食量) × 100, 连续喂养 7 周。每天光照时间 12 h, 温度控制在 20 ± 2 °C, 湿度 50 ± 5%。小鼠喂养 7 周后, 禁食 12 h, 处死前进行称重, 麻醉后打开小鼠腹腔和胸腔, 立即分离肝脏、心脏、脾、肾、腹部脂肪和肾周脂肪, 进行称重。

脏器指数(mg/g) = 各脏器重量/小鼠处死前的最终体重;

脂肪指数(mg/g) = 各脂肪重量/小鼠处死前的最

终体重

高脂饲料配方组成: 基础饲料 78.8%, 胆固醇 1%, 胆盐 0.2%, 猪油 10%, 蛋黄 10%。

1.2.2.3 小鼠血液样本的制备

采用眼球采血收集血液样本, 常温放置一段时间后, 以 3000 r/min 离心 10 min, 分离出的血清置于 1.5 mL EP 管中, 保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2.2.4 小鼠肝匀浆液的制备

将肝脏加入 9 倍体积的生理盐水, 充分匀浆制得 10% 的肝匀浆, 将其用低温高速离心机以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 置于 -80 °C 冰箱用于分析。

1.2.2.5 肝脏组织油红 O 染色

约 6 μm 的肝脏冰冻切片, FFA 固定液固定 30 min, 蒸馏水洗, 60% 异丙醇浸洗 30 s, 油红 O 染色液浸染 30 min, 然后用 60% 异丙醇分化, 再用蒸馏水进行水洗, 用苏木精复染细胞核 2 min, 最后放在倒置显微镜下照相观察。分析脂肪在肝脏中堆积情况。

1.2.2.6 生化指标的检测

小鼠血清中 TC、TG、HDL 和 LDL 以及肝脏中 TC、TG、LDL、ALT 和 AST 等指标均按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.2.7 数据分析

实验数据均以平均数 ± 标准偏差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 数据用 Excel 和 GraphPad Prism 5.0 软件整理和分析, 组间差异用 T-test 法进行分析, $p < 0.05$ 时, 差异显著, $p < 0.01$ 时, 差异极显著, 具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 三种益生菌体外降胆固醇的效果

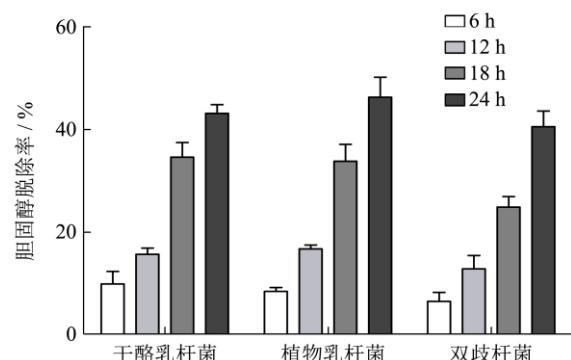


图 1 干酪乳杆菌, 植物乳杆菌和双歧杆菌分别在 6、12、18 和 24 h 时体外胆固醇的脱除率

Fig.1 In vitro cholesterol removal rates of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, and *Bifidobacterium bifidum* at 6, 12, 18, and 24 h, respectively

如图 1 所示, 随着菌体培养时间的延长, 干酪乳

杆菌, 植物乳杆菌和双歧杆菌在体外胆固醇的脱除率逐渐升高, 说明胆固醇的脱除率与菌体的生长状态有一定的关系。菌体在 0~6 h 和 6~12 h 培养阶段, 胆固醇的脱除率缓慢升高; 在 12~18 h 对数阶段时, 干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌的胆固醇脱除率增加较快, 分别达到 34.56%、33.78% 和 24.82%。24 h 时, 干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌在体外的降胆固醇能力分别达到 43.14%、46.27%、40.53%, 表明干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌降胆固醇的作用和细胞生长有一定关系, 并在体外具有良好的降胆固醇效果, 说明以上三种益生菌可以应用到动物体内试验, 进一步测定其在体内的降血脂能力。

2.2 益生菌发酵豆乳对高脂饮食诱导的高脂血症小鼠肝脏组织病理形态学的影响

为了研究益生菌对高脂饮食引起的小鼠肝脏脂肪堆积情况的影响, 对肝脏组织病理形态学进行了研究。通过对各组小鼠肝脏冰冻切片油红 O 染色, 予以评价益生菌对高脂饮食引起肝脏脂肪堆积的改善作用。结果如图 2 所示, 饲喂高脂饮食的小鼠相对于饲喂普通饲料的小鼠, 肝脏中红色脂滴明显增多, 而且脂滴的形态也明显增大, 脂肪堆积情况严重。相对于高脂组, 各组益生菌发酵豆乳干预组和未发酵豆乳干预组中肝脏脂肪堆积情况明显有所好转, 脂滴数量显著下降。值得注意的是, 尤其是益生菌混合发酵豆乳干预组中脂滴最少, 接近对照组, 明显改善了脂肪在肝脏中的堆积情况。结果表明, 益生菌混合发酵豆乳能够通过降低脂肪的堆积, 从而缓解由高脂饮食引发的肝脏脂质变性, 对修复肝损伤具有一定促进作用。

表 1 各组小鼠的体重增加量、总摄食量和食物利用率 ($\bar{x} \pm SD$, n=10)

Table 1 Body weight gain, total food intake, and efficiency of conversion of ingested food of mice in each group ($\bar{x} \pm SD$, n=10)

组别	初始体重/g	最终体重/g	体重增加量/g	总摄食量/g	食物利用率/(mg/g)
A	21.34±1.16 ^a	27.00±2.35 ^b	5.66±2.78 ^b	521.89±40.30 ^a	1.10±0.54 ^b
B	21.07±1.40 ^a	29.20±1.59 ^a	8.13±1.93 ^a	292.53±24.87 ^c	2.78±0.66 ^a
C	21.17±1.48 ^a	28.15±1.62 ^a	6.98±2.25 ^{a,b}	317.24±39.03 ^b	2.20±0.71 ^a
D	21.12±1.53 ^a	27.26±1.76 ^b	6.09±2.68 ^{a,b}	296.40±34.00 ^c	2.06±0.90 ^a
E	20.99±1.74 ^a	27.98±1.58 ^a	6.99±1.69 ^{a,b}	282.53±32.36 ^c	2.47±0.60 ^a
F	20.96±1.50 ^a	27.61±1.20 ^b	6.65±1.87 ^{a,b}	301.05±41.27 ^{bc}	2.21±0.62 ^a
G	21.17±1.48 ^a	28.02±1.41 ^a	7.06±2.34 ^{a,b}	295.08±51.00 ^c	2.39±0.79 ^a

注: A: 正常对照组; B: 高脂组; C: 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组; D: 植物乳杆菌发酵豆乳干预组; E: 双歧杆菌发酵豆乳干预组; F: 益生菌混合发酵豆乳干预组; G: 未发酵豆乳干预组; 不同上标字母表示组间的显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.4 益生菌发酵豆乳对高脂饮食小鼠脏器指数、腹部指数和肾周指数的影响

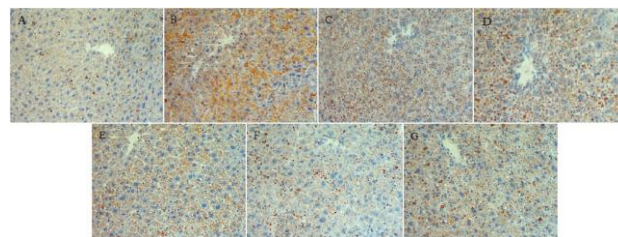


图 2 肝脏组织病理学形态的改变 (油红 O 染色 $\times 20$)

Fig.2 Hepatic pathological changes in the mice (Oil red O staining, $\times 20$)

注: A: 正常对照组; B: 高脂组; C: 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组; D: 植物乳杆菌发酵豆乳干预组; E: 双歧杆菌发酵豆乳干预组; F: 益生菌混合发酵豆乳干预组; G: 未发酵豆乳干预组。

2.3 益生菌发酵豆乳对高脂饮食小鼠体重、总摄食量的影响

由表 1 可知, 相对于高脂组, 植物乳杆菌干预组和益生菌混合发酵豆乳干预组小鼠的最终体重显著降低 ($p < 0.05$), 并且接近于正常组; 相对于正常对照组, 高脂组的摄食量显著降低 ($p < 0.01$), 而其体重增加量显著升高 ($p < 0.05$), 说明高脂饮食能够促进肥胖的发展; 相对高脂组, 各干预组小鼠的总摄食量与之相近, 除了干酪乳杆菌干预组, 而各干预组体重增加量却有所降低, 但差异不显著 ($p > 0.05$); 相对于高脂组, 正常对照组的食物利用率显著降低 ($p < 0.01$), 而干酪乳杆菌干预组、植物乳杆菌干预组和益生菌混合发酵豆乳干预组有较低的食物利用率, 但差异不显著 ($p > 0.05$)。以上数据表明益生发酵豆乳具有降低由高脂饮食引发体重增加的潜在作用。

表 2 各组小鼠的脏器指数、腹部指数和肾周指数 ($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)Table 2 Indexes of organ fat, abdominal fat, and perirenal fat of mice in each group ($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)

组别	肝脏指数 /(mg/g)	心脏指数 /(mg/g)	脾脏指数 /(mg/g)	肾脏指数 /(mg/g)	腹部脂肪指数 /(mg/g)	肾周脂肪指数 /(mg/g)
A	44.30±3.66 ^b	5.25±0.62 ^a	3.14±0.90 ^a	6.58±0.74 ^a	13.68±4.27 ^{bc}	2.56±0.76 ^d
B	49.26±3.18 ^a	5.54±0.85 ^a	3.43±0.39 ^a	6.80±1.52 ^a	18.46±3.29 ^a	4.18±1.19 ^a
C	48.49±5.90 ^a	5.30±0.46 ^a	3.28±0.48 ^a	6.40±0.51 ^a	17.17±3.49 ^{ab}	3.88±1.12 ^{abc}
D	48.37±3.39 ^a	5.21±0.43 ^a	3.53±0.60 ^a	6.28±0.60 ^a	16.59±3.84 ^{abc}	3.94±0.97 ^{ab}
E	48.65±2.31 ^a	5.05±0.99 ^a	3.52±0.80 ^a	6.28±0.46 ^a	14.87±2.61 ^{bc}	3.42±1.42 ^{abc}
F	46.72±1.69 ^b	5.49±1.15 ^a	3.40±0.51 ^a	6.35±0.47 ^a	13.48±3.05 ^c	2.24±0.78 ^d
G	47.59±4.62 ^a	5.52±0.49 ^a	3.53±0.60 ^a	6.37±0.66 ^a	16.31±3.92 ^{abc}	3.04±0.74 ^c

注: A: 正常对照组; B: 高脂组; C: 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组; D: 植物乳杆菌发酵豆乳干预组; E: 双歧杆菌发酵豆乳干预组; F: 益生菌混合发酵豆乳干预组; G: 未发酵豆乳干预组; 不同上标字母表示组间的显著性差异 ($p<0.05$)。

结果如表 2, 饲喂高脂饮食的小鼠相对于饲喂普通饲料的小鼠, 心脏指数、肾脏指数和脾脏指数有所升高, 但差异没有统计学意义 ($p>0.05$); 相对于高脂组, 四组益生菌发酵豆乳干预组和未发酵豆乳干预组, 除了个别组脾脏指数升高, 心脏指数和肾脏指数都有降低的趋势, 但差异没有统计学意义 ($p>0.05$)。这三组数据说明益生菌发酵豆乳和未发酵豆乳对小鼠的心脏、肾脏和脾脏没有毒副作用。从图中可以得到, 饲喂高脂饮食的小鼠相对于饲喂普通饲料的小鼠, 肝脏指数显著增高 ($p<0.01$), 从 44.30 mg/g 升到 49.26 mg/g。相比较于高脂组, 只有益生菌混合发酵豆乳干预组的肝脏指数显著下降 5.16% ($p<0.05$), 并且与对照组没有显著性差异 ($p>0.05$)。表明益生菌混合发酵豆乳能够改善高脂饮食引起的脏器指数变化。

结果如表 2 所示, 相对于正常对照组, 高脂组小鼠的腹部脂肪指数 ($p<0.05$) 和肾周脂肪指数 ($p<0.01$) 明显升高; 相对于高脂组, 双歧杆菌干预组 ($p<0.05$) 和益生菌混合发酵豆乳干预组 ($p<0.01$) 腹部脂肪指数分别降低 19.45% 和 26.98%, 益生菌混合发酵豆乳干预组肾周脂肪降低 46.41% ($p<0.01$), 而且益生菌混合发酵豆乳干预组的腹部脂肪指数和肾周脂肪指数甚至低于正常对照组, 这可能与小鼠体重下降有着紧密的关系。表明益生菌混合发酵豆乳能够有效地缓解高脂饮食引起腹部脂肪和肾周脂肪的累积, 对肥胖症的发展具有潜在抑制作用, 从而可以降低由肥胖引起的心血管疾病的发病几率。

2.5 益生菌发酵豆乳对高脂饮食小鼠血清血脂水平的影响

由高脂饮食引起的高水平 TC、TG 和 LDL 是诱发动脉粥样硬化和心血管疾病的重要危险因素。本文

通过对小鼠血清血脂水平分析评价对益生菌发酵豆乳降血脂作用。由表 3 可知, 与正常对照组相比, 高脂组 TC ($p<0.01$)、TG ($p<0.05$) 和 LDL ($p<0.01$) 水平显著升高, 说明造模成功; 相对于高脂组, 植物乳杆菌发酵豆乳干预组、双歧杆菌发酵豆乳干预组和未发酵豆乳干预组 TG 和 LDL 水平显著下降 ($p<0.05$), 表明植物乳杆菌发酵豆乳、双歧杆菌发酵豆乳和未发酵豆乳具有降低由高脂饮食引起血清中 TG 和 LDL 水平的升高 ($p<0.05$); 然而益生菌混合发酵豆乳干预组的 TC、TG 和 LDL 水平相对于高脂组下降更为显著 ($p<0.01$), 分别下降 20.85%、48.24% 和 30.97%, TC 和 LDL 接近于正常组水平, 而 TG 水平甚至低于正常对照组, 表明益生菌混合发酵豆乳能够更有效地降低血清 TC、TG 和 LDL 的水平, 对高脂饮食引起的高脂血症发挥更强的代谢作用, 从而降低动脉粥样硬化和心血管疾病发展的风险。

HDL 具有抗动脉粥样硬化的作用, HDL 与外周细胞中的游离胆固醇结合, 经过多种生化反应完成胆固醇逆转运 (Reverse cholesterol transport, RCT), RCT 是机体排出多余胆固醇的最主要途径^[11]。相对于正常组, 高脂组的 HDL 水平显著下降 ($p<0.01$), 说明高脂饮食能够引起 HDL 水平的降低; 相对于高脂组, 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组和益生菌混合发酵豆乳干预组的 HDL 水平显著升高 ($p<0.05$), 植物乳杆菌发酵豆乳干预组、双歧杆菌发酵豆乳干预组和未发酵豆乳组的 HDL 水平无显著变化 ($p>0.05$)。表明益生菌混合发酵豆乳能够改善由高脂饮食引起的 HDL 水平的下降, 防止胆固醇的沉淀, 维持血液中胆固醇水平的平衡, 预防或缓解动脉粥样硬化的发生。

迄今为止, 国内外有大量文献报道了不同益生菌具有降低血脂的作用, 然而, 关于益生菌降血脂的机制尚不十分明确, 国内外有不同的假说, 主要包括益

生菌对胆固醇的吸收；胆固醇对菌体的黏附；菌体产生的胆盐水解酶与胆固醇共沉淀；菌体产生的盐类抑制合成胆固醇的关键酶3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A (HMG-CoA) 还原酶的活性。Fukushima^[12]证实嗜酸

乳杆菌能够抑制HMG-CoA还原酶的活性，从而降低胆固醇的合成量。Li^[13]将植物乳杆菌降低胆固醇水平的原因为分解代谢胆固醇的相关表达基因CYP7a1显著上调。

表3 益生菌混合发酵豆乳对高脂饮食小鼠血清血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=10$)

Table 3 Effect of probiotic-fermented soymilk on serum lipid levels in mice fed a high-fat diet ($\bar{x} \pm SD, n=10$)

组别	TC/(mmol/mL)	TG/(mmol/mL)	HDL/(mmol/mL)	LDL/(mmol/mL)
A	2.03±0.39 ^d	0.59±0.12 ^{bc}	1.74±0.15 ^a	2.00±0.62 ^b
B	3.55±0.60 ^a	0.85±0.27 ^a	0.85±0.16 ^{cd}	3.10±0.57 ^a
C	3.43±0.17 ^{ab}	0.70±0.12 ^{ab}	1.02±0.23 ^{bc}	2.91±0.19 ^a
D	3.22±0.45 ^{abc}	0.61±0.12 ^b	0.87±0.21 ^{bcd}	2.43±0.42 ^b
E	3.21±0.43 ^{abc}	0.61±0.13 ^b	0.85±0.16 ^{cd}	2.39±0.62 ^b
F	2.81±0.48 ^c	0.44±0.12 ^d	1.09±0.26 ^b	2.14±0.59 ^b
G	3.16±0.49 ^{abc}	0.47±0.14 ^{cd}	0.79±0.21 ^d	2.28±0.41 ^b

注: A: 正常对照组; B: 高脂组; C: 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组; D: 植物乳杆菌发酵豆乳干预组; E: 双歧杆菌发酵豆乳干预组; F: 益生菌混合发酵豆乳干预组; G: 未发酵豆乳干预组; 不同上标字母表示组间的显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.6 益生菌发酵豆乳对高脂饮食小鼠肝脏血

脂水平的影响

由图3可知,与正常组相比,高脂组中的肝脏TC、TG和LDL水平显著升高 ($p < 0.01$),在四种不同益生菌发酵豆乳干预后,肝脏TC、TG和LDL水平均显著降低 ($p < 0.05$)。但在益生菌混合发酵豆乳干预组中,肝脏TC、TG和LDL水平降低程度尤为显著 ($p < 0.01$),相对于高脂组分别下降62.86%、52.63%和52.38%,TC和LDL水平接近于正常对照组,TG水平甚至显著低于正常对照组。未发酵豆乳干预组中TC和TG水平相对于高脂组有所降低 ($p < 0.05$),但降低程度不及益生菌混合发酵豆乳干预组(图3a和图3b),而LDL水平相对于高脂组没有显著差别(图3c) ($p > 0.05$)。以上结果与小鼠肝脏组织形态学和血清指标测定的结果一致。各组中肝脏HDL水平没有显著差别(数据中没有表明)。综合以上数据,说明益生菌混合发酵豆乳能够有效降低由高脂饮食导致的肝脏中血脂水平的升高,从而降低患有心血管疾病的风险。

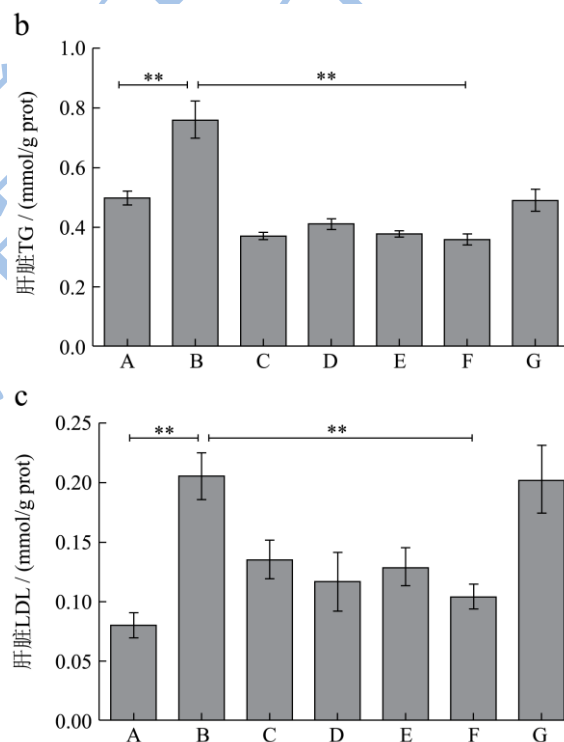
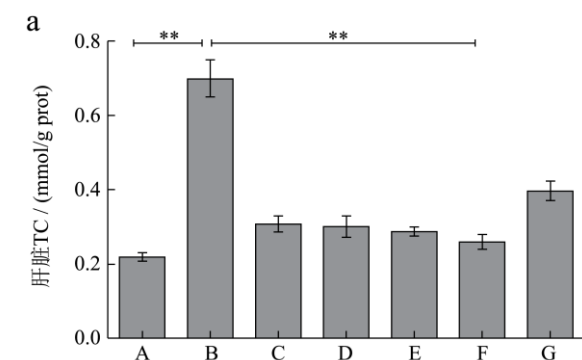


图3 益生菌混合发酵豆乳对高脂饮食引起肝脏中TC (a)、TG (b)和LDL (c)水平升高的影响

Fig.3 Effects of probiotic-fermented soymilk on the increases in the liver TC (a), TG (b), and LDL (c) levels induced by a high-fat diet

注: A: 正常对照组; B: 高脂组; C: 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组; D: 植物乳杆菌发酵豆乳干预组; E: 双歧杆菌发酵豆乳干预组; F: 益生菌混合发酵豆乳干预组; G: 未发酵豆乳干预组。图中**表示A组与B组、B组与F组组间差异显著 ($p < 0.01$)。



2.7 在益生菌发酵豆乳对高脂饮食小鼠肝脏

ALT 和 AST 水平的影响

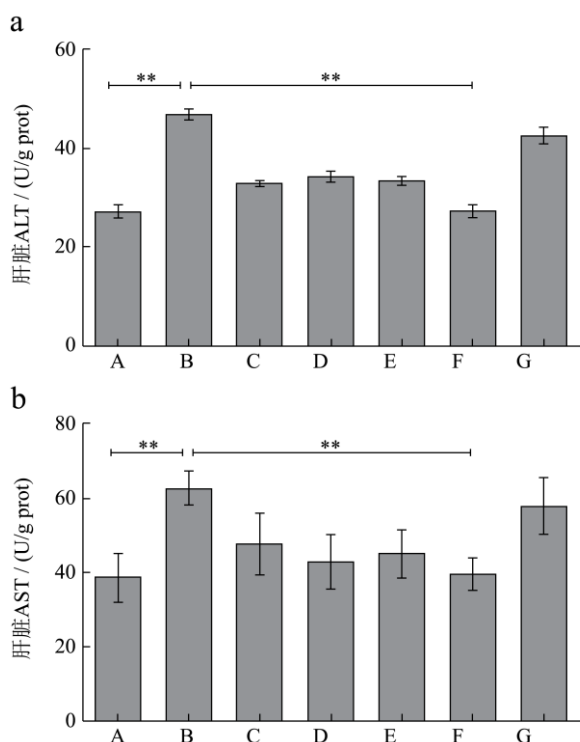


图4 益生菌混合发酵豆乳对高脂饮食引起肝脏中 ALT (a) 和 AST (b) 水平升高的影响

Fig.4 Effects of probiotic-fermented soymilk on the increases in ALT (a) and AST (b) levels induced by a high-fat diet

注: A: 正常对照组; B: 高脂组; C: 干酪乳杆菌发酵豆乳干预组; D: 植物乳杆菌发酵豆乳干预组; E: 双歧杆菌发酵豆乳干预组; F: 益生菌混合发酵豆乳干预组; G: 未发酵豆乳干预组。图中**表示A组与B组、B组与F组组间差异显著 ($p < 0.01$)。

为了评价益生菌混合发酵豆乳对高脂饮食造成肝损伤的影响, 本文对丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 进行了分析。转氨酶是催化氨基酸和酮酸之间氨基转移的一类酶, 临床上, 通常将 ALT 和 AST 水平作为评价肝功能的指标, 当肝脏组织受到损伤时, 由于细胞膜通透性增加, 肝细胞浆内的 ALT 和 AST 释放到血液中, 导致肝脏和血清中转氨酶水平有所升高^[14]。由图 4 可知, 相对于正常对照组, 高脂饮食引起了肝脏 ALT 和 AST 水平显著升高 ($p < 0.01$), 四组益生菌发酵豆乳组 (C、D、E 和 F 组) 均显著降低了肝脏 ALT 水平和 AST 水平的上升 ($p < 0.05$), 但益生菌混合发酵豆乳的抑制作用更为显著 ($p < 0.01$) 并且接近于正常组水平, 分别降低 41.88% 和 36.97%。未发酵豆乳干预组的肝脏 ALT 和 AST 水平与高脂组

没有显著性差异 ($p > 0.05$)。以上结果说明益生菌混合发酵豆乳比单一益生菌发酵豆乳能够更有效地降低高脂饮食导致肝脏 ALT 和 AST 水平的上升, 从而有效预防或缓解由高脂饮食诱导的肝损伤。这一结果与肝脏组织病理形态学结果一致。对于益生菌混合发酵豆乳降低肝脏 ALT 水平和 AST 水平的原因, 推测可能是因为益生菌本身或其产生的代谢产物通过某种路径抑制了胆固醇的合成, 减少胆固醇在肝脏中积累, 缓解肝脏的损伤, 从而促使肝细胞浆内的 ALT 和 AST 释放量有所降低。

4 结论

本文研究了干酪乳杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌在体外的降胆固醇效果和益生菌混合发酵豆乳对高脂饮食引发高脂血症小鼠降低血脂和缓解肝损伤的作用。三种益生菌在体外具有良好的降胆固醇效果, 动物实验结果也表明三种益生菌发酵豆乳在体内呈现安全有效的降血脂作用, 但益生菌混合发酵豆乳相对于单一益生菌发酵豆乳和未发酵豆乳在调整脂质水平和改善肝脏组织形态有更为显著的效果。本研究无论从肝脏组织病理学, 还是血清和肝脏中脂质水平的分析, 益生菌混合发酵豆乳能够有效地改善由高脂饮食引发高脂血症小鼠的脂质代谢, 并对肝脏脂肪变性和脂肪堆积具有明显的缓解作用, 对预防或修复肝损伤具有很好的促进作用, 其作用机理有待进一步的深入研究。总之, 本文的三种益生菌混合发酵豆乳为降血脂及缓解肝损伤功能性食品的研究提供了依据, 并为大豆的综合利用提供了数据基础。

参考文献

- [1] Fuster V, Voute J, Hunn M, et al. Low priority of cardiovascular and chronic diseases on the global health agenda: a cause for concern [J]. *Circulation*, 2007, 116(17): 1966-1970
 - [2] Napoli C, Crudele V, Soricelli A, et al. Primary prevention of atherosclerosis: A clinical challenge for the reversal of epigenetic mechanisms [J]. *Circulation*, 2012, 125(19): 2363-2373
 - [3] 刘连亮, 吴聪俊, 苗亮, 等. 竹叶黄酮和决明子复配与维生素 C、E 协同调节高脂血症大鼠脂代谢及抗氧化应激的研究 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30(11): 12-16
- LIU Lian-liang, WU Cong-jun, MIAO Liang, et al. Regulation of lipid metabolism and oxidative stress by bamboo leaf flavonoid and cassia seed compound associated with ascorbyl palmitate and vitamin e succinate in

- hyperlipidemia rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(11): 12-16
- [4] Al-Sheraji S H, Ismail A, Manap M Y, et al. Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536 [J]. Food Chemistry, 2012, 135: 356-361
- [5] Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis [J]. Science, 1976, 193(4285): 1094-1100
- [6] Vidhyasagar V, Jeevaratnam K. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 235-243
- [7] Ishikawa H, Akedo I, Otani T, et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors [J]. International Journal of Cancer, 2005, 116(5): 762-767
- [8] Kirpich I, Feng W, Wang Y H, et al. Ethanol and dietary unsaturated fat (corn oil/linoleic acid enriched) cause intestinal inflammation and impaired intestinal barrier defense in mice chronically fed alcohol [J]. Alcohol, 2013, 47(3): 257-264
- [9] Wang Y H, Liu Y L, Kirpich I, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces hepatic TNF- α production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(9): 1609-1615
- [10] 王海波,马微,钱程,等.益生菌的研究现状及发展趋势[J].现代食品科技,2006,22(3):286-288
- WANG Hai-bo, MA Wei, QIAN Cheng, et al. The current research and development trend of probiotic [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(3): 286-288
- [11] Hill S A, McQueen M J. Reverse cholesterol transport-a review of the process and its clinical implications [J]. Clinical Biochemistry, 1997, 30(7): 517-525
- [12] 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
- [13] Li Chuan, Nie Shao-ping, Ding Qiao, et al. Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in a hyperlipidaemic rat model [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 8: 340-347
- [14] 康莉娜,马婷婷,赵珮,等.黄参茎叶多酚对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].现代食品科技,2015,3:18-26
- KANG Li-na, MA Ting-ting, ZHAO Pei, et al. Hepatoprotective effect of *Sphallerocarpus gracilis* stem leaves polyphenol against CCl₄ induced hepatic damage in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 3: 18-26