

富硒长双歧杆菌 DD98 对 X 射线所致放射性肝损伤小鼠的保护作用

陆春怡, 高斐, 朱慧, 钱志祥, 杨萍, 李振, 毛文伟, 殷瑜, 陈代杰
(上海交通大学药学院, 上海 201100)

摘要: 本研究旨在讨论富硒长双歧杆菌 DD98 (Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98, Se-DD98) 对 X 射线所致放射性肝损伤小鼠的保护作用。雄性 SPF 级 balb/c 小鼠随机分为 5 组: 正常对照组、辐射对照组、Se-DD98 高剂量组、Se-DD98 低剂量、DD98 对照组, 连续给药 28 d 并监测体重。第 29 d 采用 X 射线全身照射, 实验结束后进行指标检测。与辐射对照组的体重 (24.44 g) 和肝脏指数 (4.49%) 比较, Se-DD98 高剂量组体重 (26.96 g) 及肝脏指数 (5.10%) 显著改善, 血清肝功能指标 (ALT、AST) 和体内氧化压力水平 (MDA、LDH) 显著降低, 抗氧化酶活力 (CAT、SOD、GSH-Px) 显著升高。实时荧光定量 PCR 结果表明, Se-DD98 高剂量组肝脏中 Sod1 (3.58) 和 Gpx1 (7.14) 表达显著上调, 分别上调 16.41、10.19 倍, 促炎因子 IL-1 β 表达 (2.16) 显著下调 1.61 倍, 抑炎因子 IL-10 (7.09) 显著上调 1.40 倍。此外, Se-DD98 高、低剂量组均能减轻 X 射线所致的肝脏损伤。最后, Se-DD98 高剂量组各项指标与正常对照组相比差异不大, 与辐射对照组差异显著。因此, 富硒长双歧杆菌 DD98 可以通过减少氧化压力水平、增强抗氧化酶活力及抑制组织炎症来缓解 X 射线所致的小鼠放射性肝损伤。

关键词: X 射线; 肝损伤; 氧化应激; 抗氧化; 炎症; 富硒长双歧杆菌 DD98

文章编号: 1673-9078(2021)06-10-19

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.0957

Protective Effects of Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 on X-Ray Radiation-induced Hepatic Tissue Injury in Mice

LU Chun-yi, GAO Fei, ZHU Hui, QIAN Zhi-xiang, YANG Ping, LI Zhen, MAO Wen-wei, YIN Yu, CHEN Dai-jie
(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201100, China)

Abstract: The purpose of this study was to examine the protective effects of selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 (Se-DD98) on X-ray-induced hepatic damage in mice were investigated. Male SPF-grade balb/c mice were randomly divided into 5 groups: normal control group, radiation control group, Se-DD98 high-dose group, Se-DD98 low-dose group and DD98 control group. After 28 days of administration, the body weights of mice were monitored. Whole body X-ray irradiation was used on the 29th day, and then relevant indicators were measured after the experiment. Compared with the body weight (24.44 g) and liver index (4.49%) of the radiation control group, the body weight (26.96 g) and liver index (5.10%) of the Se-DD98 high-dose group increased significantly, with the levels of their serum liver function indicators (ALT, AST) and body oxidative stress indicators (MDA, LDH) decreasing significantly, and the activities of their antioxidant enzymes (CAT, SOD, GSH-Px) increasing significantly. Real-time fluorescent quantitative PCR results showed that the expression of Sod1 (3.58) and Gpx1 (7.14) in the liver of the Se-DD98 high-dose group was significantly up-regulated (by 16.41 and 10.19 times, respectively), and the expression of pro-inflammatory factor IL-1 β (2.16) was significantly down-regulated (by 1.61 times). The mRNA levels of hepatic Sod1 (3.58) and Gpx1 (7.14) were significantly up-regulated respectively by 16.41 and 10.19 times in Se-DD98 high-dose group. In addition, both the high- and low-dose groups could significantly reduce the liver damage induced by X-ray radiation. Finally, the Se-DD98 high-dose group showed no significant difference in various indicators compared with the normal control group, and significant difference compared with the radiation control group. Therefore, selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 can reduce oxidative stress levels, enhance antioxidant enzyme activity and inhibit tissue inflammation to alleviate X-ray radiation-induced hepatic damage in mice.

陆春怡,高斐,朱慧,等.富硒长双歧杆菌 DD98 对 X 射线所致放射性肝损伤小鼠的保护作用[J].现代食品科技,2021,37(6):10-19

LU Chun-yi, GAO Fei, ZHU Hui, et al. Protective effects of selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 on X-ray radiation-induced hepatic tissue injury in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 10-19

收稿日期: 2020-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81872775); 上海市科技人才计划项目 (17XD1423200)

作者简介: 陆春怡 (1996-), 女, 硕士在读, 研究方向: 微生物与生化药学

通讯作者: 朱慧 (1993-), 女, 博士在读, 研究方向: 微生物与生药学; 陈代杰 (1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物药物研究

low-dose Se-DD98 groups could reduce X-ray-induced liver damage. Finally, the indices of the Se-DD98 high-dose group differed very little from the normal control group but differed significantly from the radiation control group. Therefore, Se-DD98 can alleviate X-ray-induced hepatic damage in mice through reducing the level of oxidative stress, boosting the activities of the antioxidant enzymes and inhibiting tissue inflammation.

Key words: X-ray; hepatic damage; oxidative stress; anti-oxidation; inflammation; selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98

放射治疗在多种肿瘤的治疗中发挥着重要作用。虽然放射治疗如今已取得了很大的进步,但肿瘤周围的正常组织仍然受到治疗的损伤。电离辐射与细胞相互作用并诱导活性氧(ROS)的产生,从而引发氧化应激状态,导致全身多器官损伤^[1]。其中,电离辐射诱导的生化参数的改变揭示了小鼠的肝功能障碍^[2],表明肝脏对辐射暴露的脆弱性,对辐射损伤极为敏感。

硒是人类和动物必需的微量元素,是主要的抗氧化酶的组成部分,如谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)和硒蛋白P(SelP),它们在抗氧化应激中起着至关重要的作用。此外, Messarah 等^[3] 研究报道了硒的补充降低了砷诱导肝损伤大鼠血清碱性磷酸酶(ALP)、天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)的活性,并改善了肝脏的抗氧化状态,证实了硒对肝脏损伤的保护作用。

另一方面,饮食中补充益生菌可改善肠道屏障、调节免疫能力、降低氧化应激水平、刺激内源抗氧化酶系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等来缓解组织器官的损伤^[4,5]。因此,益生菌也具有调节氧化应激水平作用。一些益生菌,如双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和酵母等能与硒结合,吸收无机硒并将其转化为有机硒,对健康产生益处^[6]。

富硒长双歧杆菌结合硒和益生菌的优势。本实验室前期研究表明,富硒长双歧杆菌可以通过调节肠道菌群到正常水平来恢复抗生素诱导的肠道菌群失调^[7];富硒长双歧杆菌可以缓解化疗药物5-氟尿嘧啶导致的正常小鼠的肠粘膜炎、降低小鼠死亡率^[8]。然而目前关于富硒双歧杆菌的研究多集中于抗生素和化疗药物引起的胃肠道副作用,而关于缓解放疗副作用的研究还未见报道。

本文对富硒长双歧杆菌DD98对X射线所致小鼠放射性肝损伤的保护作用进行研究,为富硒益生菌在辅助放射治疗方面的开发和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂材料

氯化钠,国药集团化学试剂有限公司;谷丙转氨

酶(ALT)测试盒、谷草转氨酶(AST)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒,南京建成生物工程研究所;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、Beyozol(总RNA抽提试剂),碧云天生物技术有限公司;高效率反转录试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix,日本东洋纺生物科技有限公司。

1.1.2 试验仪器与设备

RS2000系列生物X-射线辐照仪, Rad Source Technologies, Inc.;电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;多功能酶标仪,美国博腾仪器有限公司;流洁净工作台,海尔集团;离心机,Hitachi Koki Co. Ltd.;全自动样品快速研磨仪,上海净信实业发展有限公司;电热鼓风干燥器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;恒温水浴锅;景深拓展正置荧光显微镜,日本奥林巴斯仪器有限公司;全自动血液分析仪,日本希森美康株式会社;荧光测定PCR仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.1.3 试验动物

健康雄性SPF级balb/c小鼠,6~7周,初始体重 18 ± 2 g,购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产动物许可证号:SCXK(沪)2017-0005,饲养于上海交通大学实验动物中心,动物实验计划通过上海交通大学实验动物管理委员会审核(实验计划编号:A2018052)。饲养环境温度 $20\sim 26$ °C,相对湿度40%。适应性喂养一周,此期间小鼠自由饮食饮水。

1.1.4 Se-DD98及DD98制备

将长双歧杆菌DD98接种于RCM培养基中活化24 h,然后接种到种子培养基中 37 °C厌氧培养12 h,将种子液按照5%(V/V)接种到发酵培养基中 37 °C厌氧培养至16 h后,将发酵罐中的发酵液放出部分,然后开始补料(含亚硒酸钠)继续厌氧培养12 h,最终在高硒环境下发酵制备Se-DD98。补料结束后收集Se-DD98菌液,14000 r/min高速离心10 min,弃去上清,离心后菌体用无菌生理盐水(0.9%)清洗三次,得到浓缩的Se-DD98。Se-DD98浓缩菌液放入冻干机中,冷冻干燥48 h后得到冻干Se-DD98菌粉,密封保存于 4 °C^[7]。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The sequences of primers for qRT-PCR

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
GAPDH	GAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC	TAGCCGTATTCATTGTCATACCAG
IL-1 β	CAGAGTTCCCCAACTGGTACATC	GGAAGGCATTAGAAAACAGTCC
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
Sod1	AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC	CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG
Gpx1	AGTCCACCGTGTATGCCTTCT	GAGACGCGACATTCTCAATGA

使用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 测定菌粉 Se-DD98、DD98 的硒含量分别为 0.502 mg/g、0.002 mg/g (硒重量/菌粉重量)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验动物分组及处理

适应期后, 将小鼠随机分成 5 组, 正常对照组、辐射对照组、Se-DD98 高剂量组、Se-DD98 低剂量组、DD98 对照组, 每组 6 只, 并进行组内和组间标记。

Se-DD98 高剂量组: 0.2 mg Se/kg, 活菌数 5.4×10^8 CFU/kg;

Se-DD98 低剂量组: 0.1 mg Se/kg, 活菌数 2.7×10^8 CFU/kg;

DD98 对照组: 活菌数 5.4×10^8 CFU/kg。

NC 组和 IR 组灌胃等体积的无菌生理盐水, 连续灌胃 28 d, 第 29 d 进行 X-射线照射 (NC 组不照射, 其余组小鼠进行一次全身照射), 剂量率为 1 Gy/min, 辐照时间 3 min, 皮源照射距离为 100 cm, 剂量为 3.0 Gy, 辐照后第 2 d 麻醉处死小鼠。

1.2.2 肝脏指数分析

辐射后第 2 d, 采血完毕后, 颈椎脱臼处死小鼠, 迅速剥离小鼠的肝, 称重, 计算脏器指数。肝脏指数计算方法:

$$\text{肝脏指数}/\% = \frac{\text{肝脏质量}/\text{g}}{\text{体质量}/\text{g}} \times 100\%$$

1.2.3 血清指标检测

辐射后第 2 d, 眼眶取血, 3000 r/min, 10 min 离心备用。血清中的 ALT、AST、MDA、LDH, 按照试剂盒说明书进行测定。

1.2.4 组织指标测定

取小鼠肝脏适量, 按质量 (g): 体积 (mL) = 1:9, 加入 9 倍体积的匀浆介质, 全自动样品快速研磨仪进行匀浆, 2500 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 备用。组织中的 MDA、LDH、GSH-Px、CAT、SOD, 按照试剂盒说明书进行测定。BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定组织蛋白浓度。

1.2.5 组织 HE 染色

取部分小鼠肝脏立即浸泡于组织固定液中保存备用。将组织梯度脱水, 浸蜡, 包埋。取 5~7 μm 厚的横切面, 用苏木精和伊红 (H&E) 染色, 在光学显微镜下观察组织学变化。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (qPCR) 法测定相关因子表达

取适量小鼠肝组织, 用总 RNA 抽提试剂提取组织总 RNA, 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增反应, 测定肝组织中 Sod1、Gpx1、IL-1 β 、IL-10 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.7 统计与分析

实验数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, 数据用 GraphPad Prism 8.0 软件整理和分析, 组间差异用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 法进行分析, $p < 0.05$, 具有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 Se-DD98 对 X 射线辐射损伤小鼠体重的影响

由图 1 可见, 各组小鼠的初始体重没有存在显著差异, 呈缓慢上升的趋势。灌胃给药 28 d 后, 各给药组与 NC 组之间的体重没有显著变化, 表明 Se-DD98 和 DD98 在选取剂量下对小鼠没有急性毒性。

照射后第 2 d, 与 NC 组体重 (26.91 ± 0.53 g) 相比, IR 组小鼠体重 (24.44 ± 0.45 g) 显著降低了 2.47g ($p < 0.05$), 且出现精神不振, 竖毛, 少动, 身体蜷曲等症状, 表明 3Gy X 射线辐射剂量足以导致小鼠体重短时间内迅速下降。与 IR 组比较, DD98 组体重 (25.22 ± 1.22 g) 有一定程度升高, 但无显著性差异。值得注意的是, SeH 组小鼠体重 (26.96 ± 1.43 g) 相较于 IR 组小鼠升高了 2.52g ($p < 0.05$) 且与 NC 组比较无显著差异, 同时小鼠的精神状态良好, 表明 Se-DD98 相较单纯 DD98 可以更好地缓解 X 射线辐射导致小鼠体重异常降低的症状。在 SeL 组 (25.71 ± 1.02 g) 中也观察到相似的结果, 但无显著差异。本结果表明 0.2 mg/kg Se-DD98 在一定程度上缓解了 X 射线辐射导致的小鼠体重降低, 同时可以改善小鼠精神状态且效果

优于单纯 DD98。

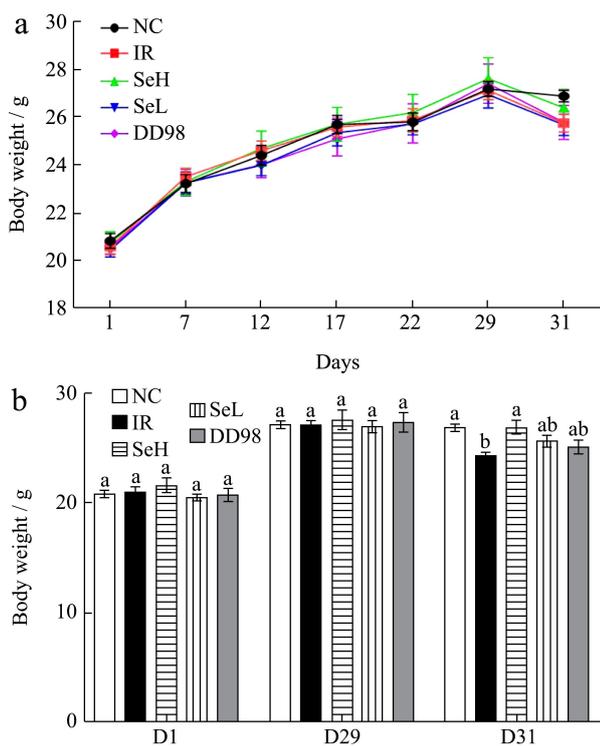


图1 X射线辐射损伤各组小鼠体重动态变化

Fig.1 The changes of body weight of X-ray irradiated mice in experimental period

注：同一指标中，不同字母的组别表示组间具有显著性差异 ($p < 0.05$)，相同字母组别表示组间无显著性差异 ($p > 0.05$)。D1，实验第1 d；D29，实验第29 d；D31，实验第31 d。NC 正常对照组；IR，辐射对照组；SeH，Se-DD98 高剂量组；SeL，Se-DD98 低剂量组；DD98，DD98 对照组。

2.2 Se-DD98 对 X 射线辐射小鼠肝脏指数的影响

影响

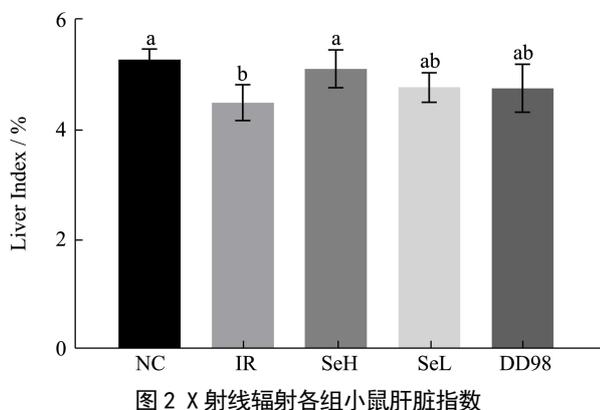


图2 X射线辐射各组小鼠肝脏指数

Fig.2 Liver index of X-ray irradiated mice in each group

注：同一指标中，不同字母的组别表示组间具有显著性差异 ($p < 0.05$)，相同字母组别表示组间无显著性差异 ($p > 0.05$)。下图 3~6、图 8 同。

由图2可见，照射后第2 d，IR 组肝脏指数(4.49%)相较于 NC 组 (5.27%) 显著降低了 14.7% ($p < 0.05$)，表明 3Gy X 射线剂量足以引起小鼠肝脏损伤。与 IR 组比较，DD98 组肝脏指数 (4.75%) 有一定程度升高，但无显著差异。SeH 组肝脏指数 (5.10%) 显著高于 IR 组，提高了 13.6% ($p < 0.05$)，且与 NC 组比较无显著性差异。在 SeL 组 (4.77%) 可以观察到相似的结果，但与 IR 组比较无显著差异。本结果表明了 0.2 mg/kg Se-DD98 在一定程度上能够缓解 X 射线照射后的小鼠肝脏指数降低且效果优于单纯 DD98。

2.3 Se-DD98 对 X 射线辐射小鼠血清肝功能

指标的影响

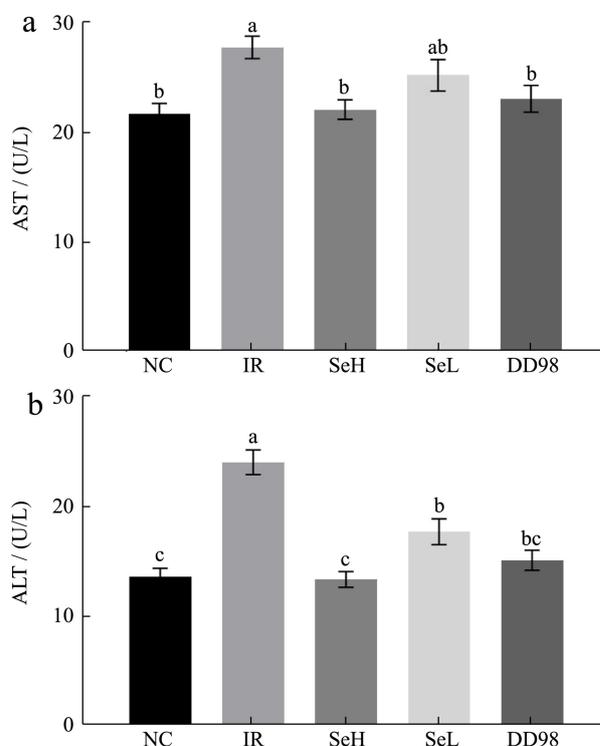


图3 X射线辐射损伤各组小鼠血清 AST 和 ALT 水平变化

Fig.3 The activity of AST and ALT of X-ray irradiated mice in each group

血清中 ALT 和 AST 肝功能酶活性升高，提示细胞通透性增强或膜破裂，所以血清 ALT 和 AST 水平常作为临床肝损伤生化指标^[9]。由图 3 可见，照射后第 2 d，IR 组小鼠血清 AST (27.94 U/L) 和 ALT (24.01 U/L) 水平显著升高，分别升高了 27.81%、76.54% ($p < 0.05$)，说明电离辐射显著改变了肝脏的血清生化指标，这与先前研究一致^[10]。与 IR 组比较，DD98 组小鼠血清的 AST (23.23 U/L) 和 ALT (15.11 U/L) 显著降低，分别降低了 16.86%和 37.07% ($p < 0.05$)，表明单纯 DD98 能够缓解 X 射线辐射导致的小鼠肝损

伤。SeL 组 (25.38、17.70 U/L) 也表现出类似的缓解效果。相较于 DD98 和 SeL 组, SeH 组小鼠血清 AST (22.24 U/L) 和 ALT (13.31 U/L) 水平则进一步降低, 与 IR 组比较, 分别降低了 20.40% 和 44.56% ($p < 0.05$), 且恢复到正常水平。已有文献报道, Se-DD98 能够降低由高脂饮食引起的肝损伤小鼠血清 ALT、AST 水平^[11]; 富硒益生菌 (嗜酸乳杆菌和酿酒酵母) 能够降低 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠显著血清 ALT、AST 水平^[12]。本研究同样发现预防性给予 Se-DD98 能够剂量依赖性地显著抑制 X 射线辐射导致的放射性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 异常升高, 缓解肝脏损伤。

2.4 Se-DD98 对 X 射线辐射小鼠氧化应激指标的影响

MDA 含量表示脂质过氧化水平, LDH 含量表示细胞毒性, 指示细胞或组织损伤水平^[13,14]。由图 4 可见, 与 NC 组比较, IR 组小鼠血清和肝脏中 MDA 和 LDH 水平显著升高, 血清中的 MDA (9.08 nmol/L) 和 LDH (10351.48 U/L) 分别升高了 62.44% 和 25.41% ($p < 0.05$)、肝脏中的 MDA (2.03 nmol/mg prot) 和 LDH (4.63 U/mg prot) 分别升高了 31.82% 和 44.51% ($p < 0.05$), 表明 3GyX 射线照射后导致小鼠肝脏脂质过氧化, 造成机体氧化损伤。文献报道电离辐射会导致小鼠血清和肝脏中 MDA 含量和 LDH 活性显著增加^[15], 这与本研究结果一致。与 IR 组相比, DD98 组小鼠血清和肝脏中的 MDA 水平有一定程度降低, 但无显著差异。Se-DD98 对血清 MDA 含量的降低同样也具有一定的效果, 但与 IR 组相比无显著差异。但值得注意的是, SeH 组小鼠肝脏中的 MDA 水平 (1.56 nmol/mg prot) 显著降低, 降低了 23.15% ($p < 0.05$), 且与 NC 组无显著差异, 表明 Se-DD98 可以降低放射性肝损伤小鼠的肝脏 MDA 水平且效果优于单纯 DD98 菌粉。

与 MDA 水平相类似, DD98 组小鼠血清和肝脏中的 LDH 水平有一定程度的降低, 但无显著差异。而 SeH 组血清 LDH 水平 (8310.66 U/L) 和肝脏中的 LDH 水平 (4.64 U/mg prot) 显著降低, 分别降低了 19.72% 和 30.64% ($p < 0.05$), 其中肝脏中 LDH 水平显著低于 DD98 组 ($p < 0.05$), 表明 Se-DD98 降低 X 射线诱导的小鼠肝脏 LDH 含量异常升高的作用强于单纯的 DD98。在 SeL 组也观察成类似的结果, 但与 IR 组相比无显著差异, 说明 Se-DD98 可以剂量依赖性降低放射性肝损伤小鼠的血清和肝脏 LDH 水平且效果优于单纯 DD98。

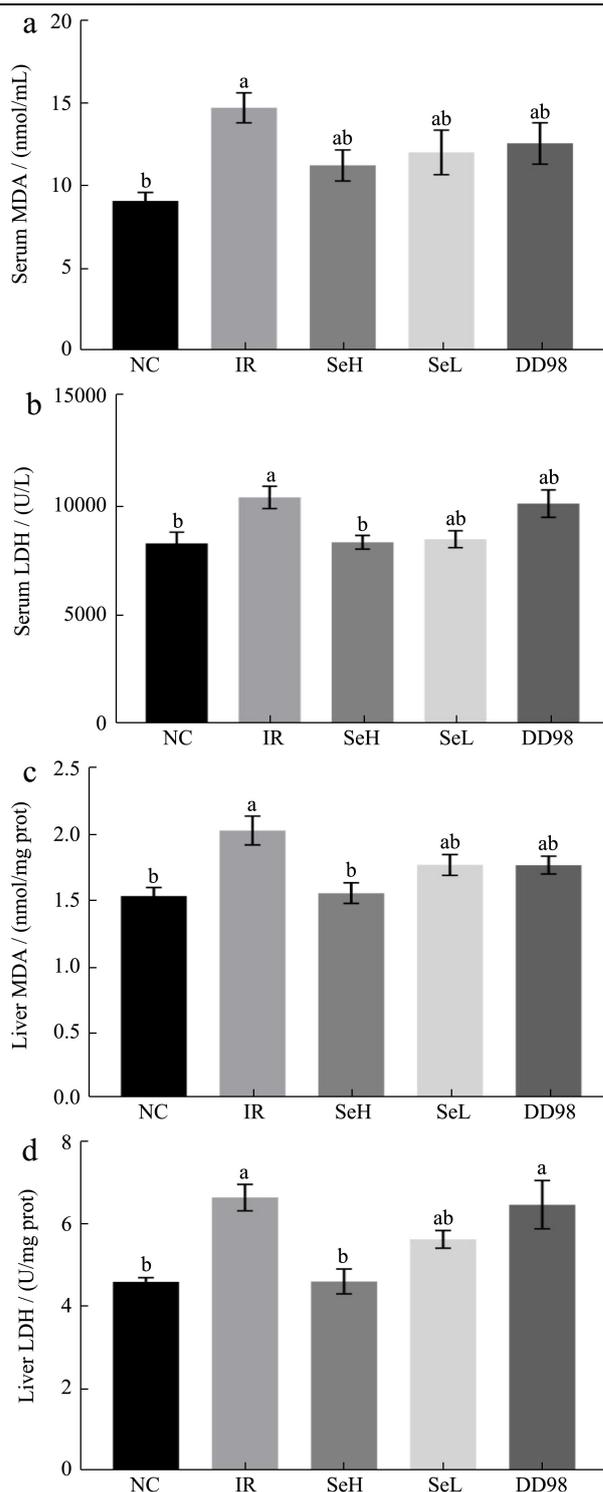


图 4 X-射线辐射各组小鼠 MDA 和 LDH 含量

Fig.4 The content of MDA and LDH of X-ray irradiated mice in each group

在本研究中, 电离辐射可引起肝脏严重氧化损伤, 表现为血清和肝脏 MDA 和 LDH 显著升高, 这一结果与血清肝生化指标 ALT 和 AST 升高的相互印证。与 IR 和 DD98 组相比, Se-DD98 大大降低了血清和肝脏中 LDH 活性和肝脏中 MDA 含量的异常升高, 进一步缓解因 X 射线辐射所致的肝脏脂质过氧化, 对放射性

性肝损伤有一定的缓解作用。已有研究报道, Se-DD98 可以显著降低高脂饮食诱导的肥胖小鼠肝脏 MDA 水平, 这与本实验结果一致^[11]。

2.5 Se-DD98 对 X 射线辐射小鼠氧化防御系统的影响

上述结果已经表明了 X 射线可以引起小鼠肝脏脂质的过氧化, 从而导致抗氧化防御机制失效和组织损伤^[16]。而抗氧化酶如 SOD、CAT 和 GSH-Px 可以通过一系列反应催化超氧自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$) 转化为 H_2O 和 O_2 来中和 ROS, 发挥抗氧化活性从而保护组织免受损伤。由图 5 可见, 与 NC 组比较, IR 组肝脏中 CAT (16.22 U/mg prot)、SOD (34.28 U/mg prot) 和 GSH-Px (1658.22 U/mg prot) 活力明显降低, 分别降低了 17.71%、40.00%、31.32% ($p < 0.05$), 表明 3Gy X 射线辐射会引起小鼠肝脏中 CAT、SOD、GSH-Px 活力的显著降低, 导致抗氧化防御机制失效, 进一步导致肝损伤。虽然放射性肝损伤发病的具体机制还没有完全阐明, 但普遍认为是体内的氧化剂超过抗氧化防御系统承受能力而导致的。电离辐射通过 ROS 的产生诱发氧化应激, 从而导致细胞中氧化剂和抗氧化剂的失衡, 而且抗氧化酶如 CAT、SOD 等容易被脂质过氧化物和 ROS 灭活, 从而导致这些酶的在体内活性降低^[17]。本研究中, 经益生菌或富硒益生菌预防后, 与 IR 组比较, DD98 组小鼠肝脏中 CAT (18.66 U/mg prot) 和 GSH-Px (2479.10 U/mg prot) 活力显著升高, 分别升高了 15.04%、49.50% ($p < 0.05$), 而 SOD 活力 (18.66 U/mg prot) 没有显著改善, 表明单纯 DD98 能够缓解因 3Gy X 射线辐射引起的 CAT 和 GSH-Px 活力异常降低, 但不能显著缓解 SOD 活力的降低。SeH 组小鼠肝组织 CAT、SOD 和 GSH-Px 活力 (19.94、52.55、2499.45 U/mg prot) 均显著升高, 分别升高了 22.93%、53.30%、53.41% ($p < 0.05$), 且恢复到正常水平, 而且 SeH 组小鼠肝组织中 SOD 活力水平显著高于 DD98 组 33.89 U/mg prot ($p < 0.05$), 表明预防性给予 Se-DD98 可以保护小鼠肝脏免受因放射性肝损伤所致的 CAT、SOD 和 GSH-Px 活力降低。我们之前的研究也有类似的发现, Se-DD98 能够显著提高了因乙醇和高脂饲养诱导的小鼠肝损伤中肝脏 SOD 和 GSH-Px 的活性^[11,18]。此外, 有研究用富硒益生菌喂养肉鸡, 结果表明富硒益生菌的补充增加了血液中 GSH-Px 和 SOD, 降低了 GSH 和 MDA 水平^[19]。尽管益生菌能够增加 GSH-Px 和 SOD 的机制还不清楚, 但这些研究足以说明给予富硒益生菌有助于增强机体内的抗氧化防御系

统, 从而缓解肝脏脂质的过氧化, 但具体通过何种机制, 这值得进一步研究。

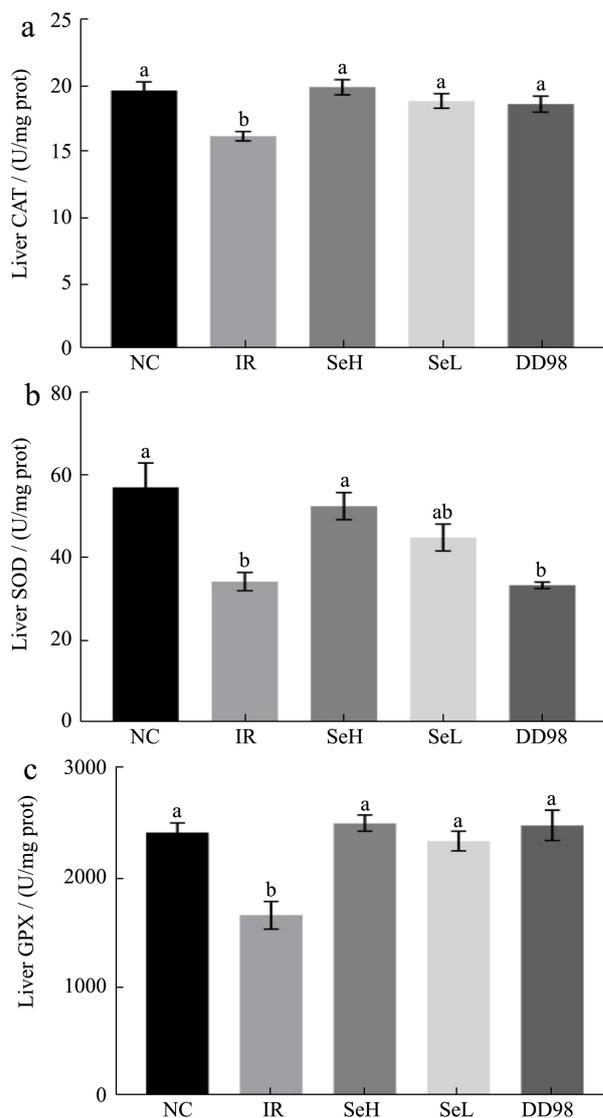


图 5 X 射线辐射各组小鼠肝脏 CAT、SOD 和 GSH-Px 水平变化

Fig.5 The activity of hepatic CAT, SOD and GSH-Px of X-ray irradiated mice in each group

2.6 Se-DD98 对 X 射线辐射引起的小鼠肝脏 Sod1 和 Gpx1 变化的影响

已知 GSH-Px 以 7 种不同的异构体 (Gpx1-7) 存在, 其中 Gpx1 被报道为含硒的抗氧化酶, 占据 GSH-Px 活性大部分, 因此可以对整个 GSH-Px 活力做出贡献^[20]。SOD 抗氧化酶有 3 种亚型 (Sod1-3), 其中 Sod1 亚型占据 85%, Sod1 在治疗和预防自由基引起的多种疾病中起重要的作用^[21]。如图 6 所示, 与 NC 组比较, IR 组肝脏中 Sod1 (0.32) 和 Gpx1 (0.41) mRNA 相对表达水平有一定程度降低, 但无显著性差异。与 IR 组比较, DD98 组 Sod1 和 Gpx1 mRNA 相对

表达水平无显著差异。但 SeH 和 SeL 组的 Sod1 (3.58、2.42) 和 Gpx1 (7.14、2.73) 相对表达含量均显著高于 IR 组和 DD98 组 ($p < 0.05$), 表明预防性给予 Se-DD98 可以剂量依赖性地通过上调肝脏中 Sod1 和 Gpx1 水平缓解电离辐射导致的肝损伤, 且效果优于单纯 DD98。曾有类似研究发现, 在饮食中补充富硒益生菌能诱导肝脏 Gpx1、Gpx4 和 Sod1 mRNA 表达的显著上调^[22-24]。我们之前的研究发现 Se-DD98 中 87% 的硒以硒代甲硫氨酸 (SeMet) 的形式存在^[7]。而 SeMet 可以通过直接充当抗氧化剂或者作为硒的来源以合成含硒的抗氧化酶, 如 GSH-Px、TrxR、SelP, 在抗氧化防御系统中起着关键作用。有研究表明, 慢性肝病患者血清 Se 水平显著降低^[25]。这进一步说明 Se-DD98 对于放射性肝损伤的保护作用, 至少部分是通过增强肝细胞抗氧化御系统, 抑制氧化应激而发挥肝脏细胞保护作用。这一结果与肝脏中抗氧化物酶 SOD 和 GSH-Px 活力升高的结论相互印证。此外, 有研究发现 SeMet 可以通过激活细胞内转录因子 p53 从而调节细胞下游 Gadd4a 和 p48XPE 基因, 参与到了核苷酸切除修复反应 (NER) 从而缓解对紫外线辐射的诱导 DNA 损伤^[26]。在本研究中, Se-DD98 是否会通过激活细胞内转录因子 p53 从而缓解对放射性肝细胞 DNA 的损伤, 这值得进一步去研究。

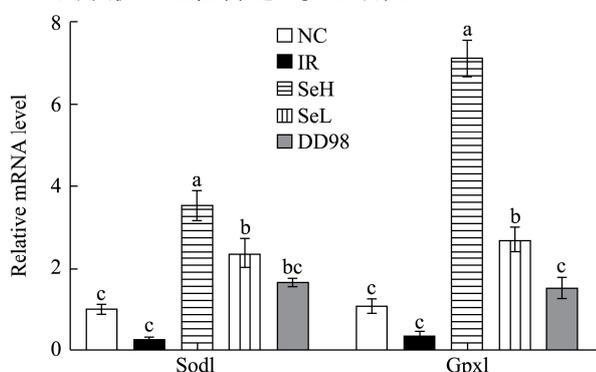


图 6 X 射线辐射损伤各组小鼠肝脏 Sod1 和 Gpx1 表达变化
Fig.6 The mRNA levels of hepatic Sod1 and Gpx1 of X-ray irradiated mice in each group

2.7 X 射线辐射小鼠肝脏病理学检查

小鼠肝脏病理学形态变化结果如图 7 所示, NC 组肝脏细胞排列紧密、形态正常。IR 组肝中央静脉 (CV) 扩张充血, 内皮层破裂, 从中央静脉放射出来的血管通道明显; 周围肝可见明显扩张; 少量肝小叶和汇管区周围可见胆管细胞和纤维细胞增生; 胞质疏松淡染, 肝细胞胞质溶解、消失, 有的胞核固缩变小或消失。早期曾报道过电离辐射后肝脏组织结构的类似变化^[27,28], 并与肝损伤有关。表明 3Gy X 射线辐射

会引起小鼠肝脏组织病理损伤。与 IR 组比较, DD98 组小鼠肝组织的病理损伤有所减轻, 但中央静脉仍见明显的扩张充血, 表明单纯 DD98 具有缓解放射性肝损伤的作用。SeH 和 SeL 组小鼠肝脏细胞排列紧密, 中央静脉未见明显的扩张充血, 炎性细胞浸润减轻, 显示正常的肝组织结构。该结果表明了预防性给予 Se-DD98 在保护组织免受 X 射线诱导的肝组织结构损伤中的潜力, 暗示了其辐射防护的潜力。

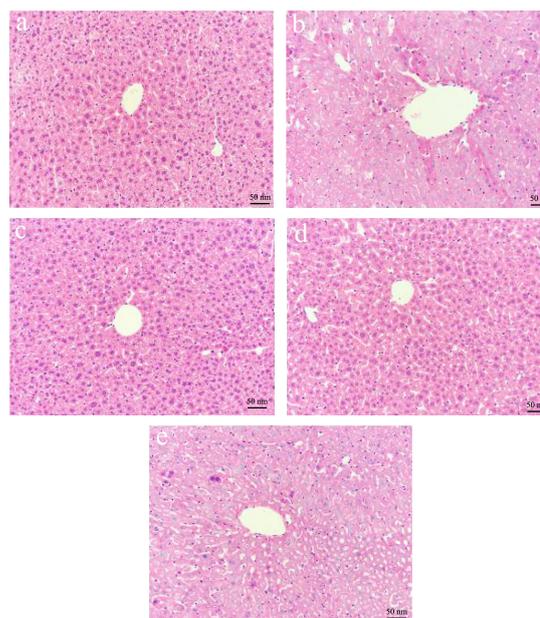


图 7 X-射线辐射损伤各组小鼠肝脏病理学形态变化

Fig.7 Hepatic pathological changes of X-ray irradiated mice in each group

注: a: NC, 正常对照组; b: IR, 辐射对照组; c: SeH, Se-DD98 高剂量组; d: SeL, Se-DD98 高剂量组; e: DD98, DD98 对照组。

2.8 Se-DD98 对 X 射线辐射小鼠肝脏炎症因子

表达水平的影响

炎症与肝损伤密切相关。肝脏炎症的主要病理特征之一是炎症因子浸润肝脏, 炎症因子主要负责抵抗病原体入侵和维持健康组织, 然而当失去控制时, 反过来可能导致严重的组织损伤。如图 8 所示。与 NC 组比较, IR 组肝脏中 IL-1 β 相对含量显著升高了 5.63 倍 ($p < 0.05$), 表明 X 射线辐射会引起小鼠肝脏中促炎因子 IL-1 β 含量升高。与 IR 组比较, DD98 组肝脏中 IL-1 β 有一定程度地降低, 无显著差异。SeH、SeL 组肝脏中 IL-1 β 水平 (2.16、3.14) 显著低于 IR 组和 DD98 对照组, 表明 Se-DD98 相较于单纯 DD98 能够更显著地缓解小鼠肝脏 IL-1 β 异常升高 ($p < 0.05$)。除了 IL-1 β , SeH 组还可以显著提高 IL-10 水平, 与 NC

组相比上调了 7.09 倍。有研究报道 IL-10 是一种有效的抗炎细胞因子, 在天然防御有害的炎症反应中起着关键作用^[29]。本结果表明, Se-DD98 可以降低肝脏中促炎因子 IL-1 β , 并上调肝脏中抗炎细胞因子 IL-10 含量 ($p < 0.05$), 且效果优于单纯 DD98。先前的研究表明, Se-DD98 能够通过降低肝脏中 IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 从而缓解小鼠肝损伤^[11,18]。本研究同样发现, Se-DD98 可以显著降低肝脏中促炎因子水平, 上调肝脏中内源性抗炎细胞因子水平, 这一结果与肝脏病理学形态变化结果一致, 暗示了 Se-DD98 缓解 X 射线所致放射性肝损伤的机制可能与抑制炎症反应有关。

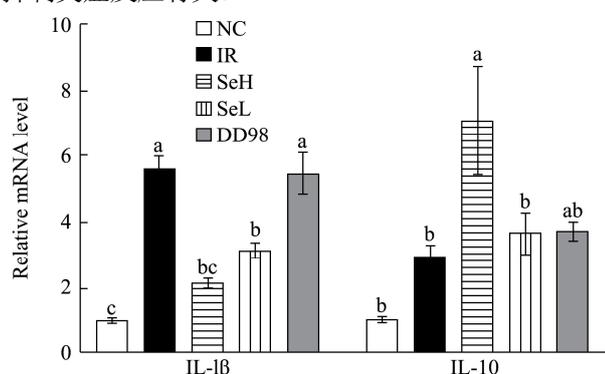


图 8 Se-DD98 对肝脏炎症相关基因表达的影响

Fig.8 Effects of Se-DD98 on hepatic inflammation-related gene expressions

益生菌与肝脏疾病最相关的作用是改变肠道屏障功能和预防肠道细菌易位。Loguercio 等^[30]使用“肠肝轴”一词, 认为肠道菌群紊乱可能会诱导慢性肝损伤。肠道中革兰氏阴性细菌过度生长、通透性增加、免疫功能受损均导致肠道细菌易位增高, 肠道细菌易位率与肝硬化严重程度有很强的相关性^[31]。临床研究报道, 接受化疗和放射治疗的患者肠道微生物群发生明显变化, 最常见的是双歧杆菌、梭状芽孢杆菌 XIVa、普氏粪杆菌为代表有益菌减少, 而致病菌如肠杆菌和拟杆菌增加^[32]。一旦肠道屏障功能受损, 通透性增加, 细菌和细菌代谢产物就会转移到血液中, 随后大量肝脏 Kupffer 细胞聚集和在肝脏 Kupffer 细胞表面的 Toll 样受体 (TLRs) 结合内毒素激活增殖蛋白激酶 (MAPK) 和核因子 κ B (NF- κ B), 产生炎症细胞因子, 包括 TNF- α 和白介素细胞因子 (IL-6、IL-1)^[5]。

益生菌能够通过促进肠道上皮细胞的生存和生长从而增强肠道屏障功能^[33]。同时, 益生菌也能够调节免疫系统, 抑制肝脏中促炎因子的释放, 如 TNF- α 和诱导保护性细胞因子 IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β) 等^[34]。鼠李糖乳杆菌 GG 通过抑制 TLR-4 和 TLR-5 介导的内毒素激活, 降低了酒精诱导的

TNF- α 的产生。Hye 等^[35]研究发现长双歧杆菌 LC67 可以降低 HFD 诱发肥胖的小鼠血液和肝脏中脂多糖 (LPS) 的水平, 抑制了 HFD 诱导的 NF- κ B 活化并增加了肠道紧密连接蛋白 claudin-1 和 occludin 在结肠中的表达, 从而减轻了肝脏脂肪变性, 肥胖和结肠炎。此外, Qu 等^[36]研究发现 SeMet 也能够通过抑制 TLR4-NF- κ B-NLRP3 信号通路从而抑制 LPS 诱导的鸡肝组织炎症。在本研究中, 我们发现 Se-DD98 能够抑制肝脏中促炎因子 IL-1 β 的释放, 诱导抑炎因子 IL-10 的释放, 与单纯的 DD98 治疗相比具有更大的潜在保护作用, 但具体通过何种机制, 这值得我们进一步去研究。

3 结论

本文研究了富硒长双歧杆菌 DD98 (Se-DD98) 对 X 射线所致放射性肝损伤小鼠的保护作用。Se-DD98 可以缓解小鼠的体重及肝脏指数的降低、改善血清肝功能指标, 通过降低血清和肝脏氧化应激水平、增强肝脏抗氧化酶活性、降低肝脏促炎因子水平和增强肝脏抑炎因子水平从而减轻肝脏病理损伤, 说明富硒长双歧杆菌 DD98 对 X 射线所致放射性肝损伤具有良好的改善效果, 且作用效果优于单纯 DD98 益生菌治疗, 但具体的作用机制还不明确, 还需进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Riley P A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation [J]. International Journal of Radiation Biology, 1994, 65(1): 27-33
- [2] El-shennawy H M, Shahat A N, Ahmed A G, et al. Ameliorative effect of Silymarin against radiation-induced oxidative stress in the liver of male rats [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2016, 48: 1905-1909
- [3] Messarah M, Klibet F, Boumendjel A, et al. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2012, 64(3): 167-174
- [4] Wang J, Ji H F, Wang S X, et al. *Lactobacillus plantarum* ZLP001: *in vitro* assessment of antioxidant capacity and effect on growth performance and antioxidant status in weaning piglets [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2012, 25(8): 1153-1158
- [5] Gu Z, Liu Y, Hu S, et al. Probiotics for alleviating alcoholic liver injury [J]. Gastroenterology Research and Practice, 2019, 2019: 9097276
- [6] Pophaly S D, Poonam, Singh P, et al. Selenium enrichment of

- lactic acid bacteria and *bifidobacteria*: a functional food perspective [J]. Trends Food Sci Technol, 2014, 39(2): 135-145
- [7] Zhu H, Zhou Y, Qi Y, et al. Preparation and characterization of selenium enriched - *Bifidobacterium longum* DD98, and its repairing effects on antibiotic-induced intestinal dysbacteriosis in mice [J]. Food Funct, 2019, 10(8): 4975-4984
- [8] Qiu Y, Zhang J, Ji R, et al. Preventative effects of selenium-enriched *Bifidobacterium longum* on irinotecan-induced small intestinal mucositis in mice [J]. Beneficial Microbes, 2019, 10(5): 569-77
- [9] McGill M R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers [J]. Excli Journal, 2016, 15: 817-828
- [10] Rehab M. Evaluation of the effect of spirulina against gamma irradiation induced oxidative stress and tissue injury in rats [J]. International Journal of Applied Science and Engineering Research, 2012, 1(2): 152-164
- [11] Zhao D, Gao F, Zhu H, et al. Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 relieves metabolic alterations and liver injuries associated with obesity in high-fat diet-fed mice [J]. J Funct Food, 2020, 72: 104051
- [12] Liu Y, Liu Q, Ye G, et al. Protective Effects of selenium-enriched probiotics on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(1): 242-249
- [13] Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, et al. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney [J]. Biochemistry Research International, 2016, 2016: 2645237
- [14] Wu J, Yan Z, Schwartz D E, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury [J]. The Journal of Immunology, 2013, 190(7): 3590-3599
- [15] Barshishat-kupper M, Tipton A J, McCart E A, et al. Effect of ionizing radiation on liver protein oxidation and metabolic function in C57BL/6J mice [J]. International Journal of Radiation Biology, 2014, 90(12): 1169-1178
- [16] Ismail A F M, Salem A A M, Eassawy M M T. Hepatoprotective effect of grape seed oil against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver of gamma-irradiated rat [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2016, 160: 1-10
- [17] He L, He T, Farrar S, et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 44(2): 532-553
- [18] Yi H W, Zhu X X, Huang X L, et al. Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* protected alcohol and high fat diet induced hepatic injury in mice [J]. Chin J Nat Med, 2020, 18(3): 169-177
- [19] Khan A Z, Kumbhar S, Liu Y, et al. Dietary supplementation of selenium-enriched probiotics enhances meat quality of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) raised under high ambient temperature [J]. Biological Trace Element Research, 2018, 182(2): 328-38
- [20] Verma P, Kunwar A, Priyadarsini K I. Effect of low-dose selenium supplementation on the genotoxicity, tissue injury and survival of mice exposed to acute whole-body irradiation [J]. Biological Trace Element Research, 2017, 179(1): 130-139
- [21] 李亨,石家愿,邱爽,等.SOD1 抑制与活性氧信号转导的调控[J].化学进展,2018,30(10):1475-1486
LI Xiang, SHI Jiayuan, QIU Shuang, et al. SOD1 inhibition regulates the ROS signaling transduction [J]. Prpgress in Chemistry, 2018, 30(10): 1475-1486
- [22] Gan F, Ren F, Chen X, et al. Effects of selenium-enriched probiotics on heat shock protein mRNA levels in piglet under heat stress conditions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(10): 2385-2391
- [23] Gan F, Chen X, Liao S F, et al. Selenium-enriched probiotics improve antioxidant status, immune function, and selenoprotein gene expression of piglets raised under high ambient temperature [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(20): 4502-4508
- [24] Khan A Z, Kumbhar S, Hamid M, et al. Effects of selenium-enriched probiotics on heart lesions by influencing the mRNA expressions of selenoproteins and heat shock proteins in heat stressed broiler chickens [J]. Pakistan Veterinary Journal, 2016, 36(4): 460-464
- [25] Thuluvath P J, Triger D R. Selenium in chronic liver disease [J]. Journal of Hepatology, 1992, 14(2): 176-182
- [26] Seo Y R, Kelley M R, Smith M L. Selenomethionine regulation of p53 by a Ref1-mediated redox mechanism [J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2002, 99(22): 14548-14553
- [27] Nada A S, Hawas A M, Abd Elmageed Z Y, et al. Protective value of aloe vera extract against γ -irradiation-induced some biochemical disorders in rats [J]. Journal of Radiation

- Research and Applied Sciences, 2013, 6(2): 31-37
- [28] Xu J Y, Zhao L, Chong Y, et al. Protection effect of sanguinarine on whole-body exposure of X radiation in BALB/c mice [J]. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 50(1): 101-106
- [29] Yao Y, Wang L, Jin P, et al. Methane alleviates carbon tetrachloride induced liver injury in mice: anti-inflammatory action demonstrated by increased PI3K/Akt/GSK-3 β -mediated IL-10 expression [J]. Journal of Molecular Histology, 2017, 48(4): 301-310
- [30] Loguercio C, De Simone T, Federico A, et al. Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage? [J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(8): 2144-2146
- [31] Sheth A A, Garcia-tsoa G. Probiotics and liver disease [J]. J Clin Gastroenterol, 2008, 42(6): S80-S84
- [32] Touchefeu Y, Montassier E, Nieman K, et al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis-current evidence and potential clinical applications [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2014, 40(5): 409-422
- [33] Isolauri E, Salminen S. Probiotics, gut inflammation and barrier function [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2005, 34(3): 437-450
- [34] Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation [J]. Nutrients, 2011, 3(6): 637-682
- [35] In Kim H, Kim J-K, Kim J-Y, et al. *Lactobacillus plantarum* LC27 and *Bifidobacterium longum* LC67 simultaneously alleviate high-fat diet-induced colitis, endotoxemia, liver steatosis, and obesity in mice [J]. Nutrition Research, 2019, 67: 78-89
- [36] Qu J, Wang W, Zhang Q, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation of chicken liver tissue by selenomethionine via TLR4-NF- κ B-NLRP3 signaling pathway [J]. Biological Trace Element Research, 2020, 195(1): 205-214

(上接第 42 页)

- [14] 赵日霞.睡眠剥夺对大鼠脑组织氨基酸类神经递质含量的影响[D].昆明:云南中医学院,2016
ZHAO Ri-xia. The effect of sleep deprivation on the content of amino acid neurotransmitters in rat brain tissue [D]. Kunming: Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 2016
- [15] 林炳岐,李峰,马捷,等.基于 GABA 能系统通路探讨失眠的机制[J].现代生物医学进展,2018,18(3):565-567
LIN Bing-qi, LI Feng, MA Jie, et al. Explore the mechanism of insomnia based on the GABAergic system pathway [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018, 18(3): 565-567
- [16] Wang S, Wang C H, Peng D Q, et al. Agarwood essential oil displays sedative-hypnotic effects through the GABAergic system [J]. Molecules, 2017, 22(12): 2190-2207
- [17] Sookoian S, Gemma C, Giantti T F, et al. Serotonin and serotonin transporter gene variant in the rotating shift workers [J]. Sleep, 2007, 30(8): 1049
- [18] Holst S C, Valomon A, Landolt H P. Sleep pharmacogenetics: personalized sleep-wake therapy [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2016, 56: 577-603
- [19] 段宙位,谢辉,窦志浩,等.复合型沉香茶饮料的制备研究[J].食品科技,2016,41(12):62-65
DUAN Zhou-wei, XIE Hui, DOU Zhi-hao, et al. Study on the preparation of compound agarwood tea beverage [J]. Food Science and Technology, 2016, 41(12): 62-65
- [20] 韩卫娟.沉香茶保护 DNA 氧化损伤的活性及其机制研究[D].广州:广州中医药大学,2013
HAN Wei-juan. Study on the activity and mechanism of agarwood tea in protecting DNA from oxidative damage [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2013
- [21] 陈地灵,吴祎,林励,等.沉香茶提取物的体外抗氧化和体内降血脂作用评价[J].现代食品科技,2013,29(6):1198-1242
CHEN Di-ling, WU Yi, LIN Li, et al. Evaluation of *in vitro* antioxidant and *in vivo* hypolipidemic effects of agarwood tea extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1198-1242