

长双歧杆菌 DD98 对 2 型糖尿病及肥胖小鼠的改善作用

赵丹¹, 朱慧¹, 毛文伟¹, 殷瑜¹, 纪瑞², 王桃², 张旭东², 陈代杰¹

(1. 上海交通大学药学院, 上海 201100) (2. 上海医药工业研究院, 上海 201200)

摘要: 研究长双歧杆菌 DD98 对高脂诱导的 2 型糖尿病及肥胖小鼠症状的缓解作用。糖尿病实验: 采用 C57BL/6N 小鼠, 将其随机分为正常对照组给予普通饲料; 模型对照组, 长双歧杆菌 DD98 干预组, 空白培养基干预组给予高脂饲料, 每组 6 只。4 周后, 链脲佐菌素 (STZ) 注射建模, 给予受试物 3 周, 实验结束后进行口服糖耐量实验和指标检测。与糖尿病模型组和空白培养基干预组相比, DD98 干预组小鼠空腹血糖值 (18.66 ± 1.84 mmol/L) 显著降低, 并且 DD98 干预组小鼠葡萄糖耐量、血清和肝脏脂质水平 (TG、TC、LDL-C) 均得到显著改善。肥胖实验: 采用 C57BL/6N 小鼠, 将其随机分为正常对照组给予普通饲料; 模型对照组, 长双歧杆菌 DD98 干预组, 空白培养基干预组给予高脂饲料, 每组 6 只。同时给予受试物 5 周, 进行指标检测。与高脂饲养组和空白培养基干预组小鼠相比, DD98 干预组小鼠空腹体重值 (20.89 ± 2.51 g)、脏器指数、血清和肝脏脂质 (TG、TC、LDL-C) 水平均显著降低, 肝脏脂质堆积情况得到明显改善。因此, 长双歧杆菌 DD98 可以有效缓解 2 型糖尿病和肥胖症状, 进一步改善由 2 型糖尿病和肥胖引起的血脂紊乱以及肥胖引起的轻度肝损伤。

关键词: 长双歧杆菌; 2 型糖尿病; 肥胖

文章编号: 1673-9078(2019)11-7-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.11.002

Ameliorating Effect of *Bifidobacterium longum* DD98 on Type 2 Diabetes and Obesity in Mice

ZHAO Dan¹, ZHU Hui¹, MAO Wen-wei¹, YIN Yu¹, JI Rui², WANG Tao², ZHANG Xu-dong², CHEN Dai-jie¹

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201100, China)

(2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201200, China)

Abstract: The ameliorating effects of *Bifidobacterium longum* DD98 on high fat diet-induced type 2 diabetes mice and obesity in mice were investigated. Type 2 diabetes experiments: C57BL/6N mice were randomly divided into four groups (6 mice per group): the normal chow group given a normal chow diet; the model control group, *Bifidobacterium longum* DD98 intervention group, and blank culture medium intervention group fed a high-fat diet. After four weeks, model mice with diabetes was established using streptozotocin (STZ). The mice were given the tested samples for 3 weeks, before glucose tolerance test and measurements of various indicators. Compared with the of the model group and the blank culture medium intervention group, the DD98 intervention group had a significantly decreased fasting blood-glucose (FBG) (18.66 ± 1.84 mmol/L), along with significantly improved glucose tolerance and reduced serum/liver total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels. Obesity experiments: C57BL/6N mice were randomly divided into four groups (6 mice per group): the normal chow group given a normal chow diet; the model control group, *Bifidobacterium longum* DD98 intervention group, blank culture medium intervention group with a high-fat diet. After five weeks of treatments, various indicators were measured. Compared with the high-fat diet group and the blank culture medium intervention group, the DD98 group had significantly lowered fasting body weight (20.89 ± 2.51 g) and serum/liver TC, TG and LDL-C levels with significantly reduced fat accumulation in the liver. Therefore, *Bifidobacterium longum* DD98 could effectively ameliorate the symptoms of type 2 diabetes and obesity, and further alleviate dyslipidemia caused by type 2 diabetes and obesity, and liver injury caused by obesity.

Key words: *Bifidobacterium longum*; type 2 diabetes; obesity

收稿日期: 2019-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573329); 上海市自然科学基金项目 (16ZR1435400)

作者简介: 赵丹 (1994-), 女, 硕士在读, 研究方向: 益生菌开发; 通讯作者: 陈代杰 (1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌开发

糖尿病是全球性健康问题之一。其中 2 型糖尿病是体内胰岛素受体敏感性下降导致空腹血糖升高的一种慢性代谢疾病, 约占糖尿病的 90%^[1]。目前, 全球约有 3.8 亿糖尿病患者, 已经严重威胁到人类的健康。社会的进步和生活方式的变化导致了饮食习惯的改变, 包括糖尿病在内的非传染疾病与饮食习惯的改变有关, 长期高热饮食会增加患 2 型糖尿病的风险, 因此寻求有效的膳食干预措施成为了研究者关注的热点^[2]。近年来, 有研究表明 2 型糖尿病与人体内肠道微生物菌群的组成结构有关^[3], 2 型糖尿病患者体内厚壁菌门相对比例较低, 而拟杆菌门和变形菌门的比例较高^[4]。同时, 肠道菌群失衡会导致内毒素增加, 引发慢性炎症^[5]。炎症细胞因子的释放会导致氧化应激, 最终使胰岛细胞受损, 引发糖尿病。此外, 有研究发现, 双歧杆菌等益生菌的摄入可以降低肠道的通透性, 减缓全身炎症反应^[6]。

肥胖是目前全世界重要的健康问题, 是导致糖尿病、心血管疾病和癌症发生发展的主要因素之一, 其形成原因是体内白色组织异常过剩^[7]。世界卫生组织将体重超重定义为体重指数 (BMI) 在 25.0~29.9 kg/m², 将肥胖定义为 BMI 大于或等于 30.0 kg/m²^[8]。近年来, 肠道菌群作为外界和宿主之间的代谢通道, 在调节炎症、能量代谢和平衡体重方面的作用越来越受到重视^[9]。有研究认为, 益生菌产生的活性化合物可以减少脂肪的储存, 降低血脂水平, 从而可以缓解肥胖^[10]。也有研究报道, 益生菌可以通过减少促炎细胞因子的表达刺激饱腹感肽的产生, 减少能量的摄取, 从而缓解肥胖^[11]。

2014 年, 国际益生菌和益生元科学协会 (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) 明确了“益生菌”的普遍定义是一种表达特定外源性酶的天然或转基因微生物, 其能够在胃酸和胆汁中存活, 增加结肠内有益菌的数量, 产生健康益处^[12]。Majid Mohamadshahi 等人的实验表明, 活菌数为 3.7×10⁶ cfu/g 的益生菌酸奶可以缓解 2 型糖尿病患者的症状, 有效控制糖尿病的并发症^[13]。Majed S Alokail 等人的研究证实了, 活菌数为 2.5×10⁹ cfu/g 的益生菌产品可以降低 2 型糖尿病患者的炎症反应, 缓解胰岛素抵抗^[14]。Savcheniuk, Oleksandr A 等人的研究也证实, 给予大鼠 10⁹ cfu/kg 益生菌可以改善大鼠的肥胖症状^[15]。除此之外有大量的研究也证实了摄入活菌数在 10⁶~10¹⁰ cfu 之间的益生菌, 会对人体产生有益的作用。因此, 许多的保健类产品中都添加有益生菌, 其中双歧杆菌和乳酸菌是最为普遍且应用最多的益生菌^[16]。益生菌添加饲料可以减轻小鼠模型中的

肥胖和糖尿病, 其机制可能是益生菌通过改变肠道微生物群产生丁酸盐, 刺激了 GLP-1 的产生, 最终减少食物摄入量、提高葡萄糖耐量和减少肥胖^[17]。据报道, 通过摄入益生菌, 可以增加紧密连接蛋白的表达, 维持肠道的完整性, 减少肠道失衡, 从而改善糖尿病和肥胖^[18]。也有研究表明, 益生菌可以降低体内脂多糖水平, 提高肠道通透性, 改善代谢内毒素血症, 从而缓解糖尿病和肥胖^[19]。

本研究以长双歧杆菌 DD98 为研究对象, 旨在探讨长双歧杆菌 DD98 菌株在缓解慢性代谢疾病如 2 型糖尿病和肥胖方面是否具有普遍应用价值, 为益生菌临床应用的潜在价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

长双歧杆菌 DD98 菌株分离自健康人的粪便, 经进一步筛选, 得到生长优势菌株 DD98。该菌株目前保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏编号 CGMCC No.16573。该菌株目前已申请专利, 申请号 20190022003.8。

1.2 试验动物

SPF 级 C57BL/6N 小鼠, 4 周, 雄性 80 只, 初始体重 16~19 g, 购买于上海灵畅生物科技有限公司, 生产许可 SCXK (沪) 2018-0003, 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 20~26 °C, 相对湿度 40%。

1.3 饲料

小鼠 40% 高脂饲料由上海普路腾生物科技有限公司提供, 饲料均为柱状灭菌饲料。高脂饲料配方为: 繁殖鼠料 54.6%、猪油 16.9%、蔗糖 14%、酪蛋白 10.2%、预混料 2.1%、麦芽糊精 2.2%。

1.4 试验试剂

链脲菌素 (streptozocin, STZ), 上海克拉玛尔生物试剂有限公司; 柠檬酸、柠檬酸钠, 上海凌峰化学试剂有限公司; 氯化钠、氯化氢、氢氧化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 总胆固醇 (T-CHO) 测试盒、甘油三酯 (TG) 测试盒、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 测试盒, 南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型), 碧云天生物技术有限公司; 安稳免调码血糖试纸, 三诺生物传感股份有限公司。

1.5 试验仪器与设备

血糖仪, 三诺生物传感股份有限公司; 1 mL 无菌注射器, 上海康德莱企业发展集团股份有限公司; 电子天平、全自动 pH/mV 计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 冰箱、垂直层流洁净工作台, 海尔集团; 离心机, Hitachi Koki Co. Ltd.; TGrinder 第三代高速组织研磨器, TIANGEN BIOTECH (BEIJING) Co. Ltd.; 电热鼓风干燥器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.6 方法

1.6.1 长双歧杆菌 DD98 的制备

以牛奶和玉米浆干粉作为基底发酵, 制备长双歧杆菌 DD98。双歧杆菌 DD98 按活菌数为 10^7 cfu/mL 的接种量接入发酵罐, 控制发酵温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 搅拌速度为 300 r/min , 控制 pH 为 6.5, 培养 16~20 h。放罐所得菌液即为双歧杆菌 DD98 样品, 经平板计数法测定其活菌数为 5×10^9 cfu/mL。发酵培养基成分为: 脱脂奶粉 80 g/L , 玉米浆干粉 5 g/L , 用氢氧化钠溶液和稀盐酸调节 pH 6.50 ± 0.1 。空白培养基为未接种长双歧杆菌 DD98 的发酵培养基。

1.6.2 高脂诱导的 2 型糖尿病小鼠实验

选用 C57 小鼠, 雄性 24 只, 随机分为正常对照组和模型组(糖尿病对照组, 空白培养基干预组和 DD98 干预组), 每组 6 只。正常对照组小鼠采用正常饲料饲养, 模型组小鼠采用高脂饲料饲养 4 周。小鼠禁食不禁水 15 h, 模型组小鼠按 100 mg/kg 的剂量腹腔注射 1% 链脲佐菌素溶液, 持续 3 次, 正常对照组小鼠采用同方法同样剂量注射柠檬酸盐缓冲液, 持续 3 次。禁食不禁水 12 h, 测定小鼠的空腹血糖值, 小鼠空腹血糖值高于 11.1 mmol/L , 则认定造模成功。造模未成功小鼠腹腔补注射 1% 链脲佐菌素溶液 70 mg/kg , 并隔日测定小鼠空腹血糖。挑选建模成功的小鼠随机分为 3 组: 长双歧杆菌 DD98 干预组小鼠灌胃双歧杆菌, 0.15 mL/d/只 , 活菌数为 5×10^9 cfu/mL; 空白培养基干预组灌胃等体积无菌培养基; 糖尿病对照组和正常对照组小鼠灌胃等体积生理盐水, 持续 21 d^[20]。

1.6.3 高脂诱导的 2 型糖尿病指标检测

1.6.3.1 空腹血糖的测定

给予长双歧杆菌 DD98 21 d 后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 割尾采血, 用血糖仪测定小鼠的空腹血糖值。

1.6.3.2 葡萄糖耐量试验

在给予长双歧杆菌 DD98 第 7 d 和第 21 d 时, 小

鼠禁食不禁水 12 h, 按 2 g/kg 的剂量给小鼠灌胃葡萄糖溶液, 分别于灌胃葡萄糖的 0 h、0.5 h、1 h 和 2 h 后割尾测定小鼠的空腹血糖值, 并记录^[21]。以时间为横坐标, 血糖值为纵坐标, 做时间-血糖值曲线, 并计算血糖曲线下面积 (Area under curve of glucose, AUC)。

1.6.3.3 血清指标试验

给予长双歧杆菌 DD98 21 d 后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 眼眶取血, 离心取血清, 备用^[22]。血清中的总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 指标, 按试剂盒说明书进行测定。

1.6.3.4 肝脏指标试验

CO_2 麻醉处死小鼠后, 取肝脏 $100\sim 200\text{ mg}$, 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质 (生理盐水), 高速组织研磨器进行匀浆, 2500 r/min , 离心 10 min, 取上清液, 备用^[23]。

用上述测定血清的方法, 测定小鼠肝脏中 TC、TG 和 LDL-C 水平, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定肝脏蛋白浓度。

1.6.4 高脂诱导的肥胖小鼠实验

选用 C57 小鼠, 雄性 24 只, 随机分为 4 组: 正常对照组, 单纯高脂饲养组, 空白培养基干预组, 长双歧杆菌 DD98 干预组, 每组 6 只。正常小鼠采用正常饲料饲养, 单纯高脂饲养组, 空白培养基干预组, 长双歧杆菌 DD98 干预组小鼠采用高脂饲料饲养, 同时长双歧杆菌 DD98 干预组小鼠每天灌胃活菌数为 5×10^9 cfu/mL 的长双歧杆菌 DD98, 0.15 mL/只 , 空白培养基干预组小鼠灌胃等体积无菌培养基, 单纯高脂饲养组和正常对照组小鼠灌胃等体积生理盐水, 持续喂养 5 周后, 禁食 12 h, 测定小鼠最终空腹体重值。

1.6.5 肥胖小鼠实验指标检测

1.6.5.1 脏器指数分析

给予长双歧杆菌 DD98 5 w 后, 禁食 12 h, CO_2 麻醉处死小鼠, 摘取小鼠肝脏和腹部脂肪, 称重, 计算小鼠脏器指数^[24]。

1.6.5.2 血清指标试验

给予长双歧杆菌 DD98 5 w 后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 眼眶取血, 离心取血清, 备用。血清中的 TC、TG、LDL-C 指标, 按试剂盒说明书进行测定。

1.6.5.3 肝脏指标试验

取肝脏 $100\sim 200\text{ mg}$, 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质 (生理盐水), 高速组织研磨器进行匀浆, 2500 r/min , 离心 10 min, 取上清液, 备用。

用上述测定血清的方法, 测定小鼠肝脏中 TC、

TG 和 LDL-C 水平, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定肝脏蛋白浓度。

1.6.5.4 肝脏 HE 染色

取一部分小鼠肝脏浸泡于福尔马林中保存, 备用。取浸泡过的小鼠肝脏石蜡包埋, 切片染色, 用于测定小鼠肝脏病变程度^[25]。

1.7 数据统计分析

实验数据以平均数±标准偏差 ($\bar{x}\pm SD$) 表示, 数据用 Excel 和 GraphPad Prism 7.0 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 高脂诱导的 2 型糖尿病实验

2.1.1 体重及空腹血糖值变化

小鼠空腹体重变化量如表 1 所示, 各组小鼠的初始体重无显著性差异, 从第 2 周开始, 高脂饲养的模型组小鼠的空腹体重值开始显著高于正常对照组, 比正常对照组小鼠空腹体重值高出 2.02 g ($p<0.05$), 第 3 周后高脂饲养的模型组小鼠的空腹体重值进一步高于正常对照组 2.20 g ($p<0.05$)。高脂饲养结束后, 模型组小鼠的空腹体重值平均比正常对照组升高了

2.89 g ($p<0.05$), 表明高脂饲养导致小鼠空腹体重值的增加, 此结果与本文另一肥胖小鼠模型结果一致。建模成功后, 模型组小鼠的空腹体重值平均比正常对照组降低了 3.17 g ($p<0.05$)。此结果与 2 型糖尿病症状“三多一少”中的体重下降一致。造模成功后, 模型组小鼠相继出现多饮, 多食, 多尿现象, 在表型方面表明 2 型糖尿病小鼠模型建成功。

小鼠空腹血糖变化量如表 2 所示, 高脂饲养结束后, 各组小鼠的初始血糖无显著性差异。造模后, 三组造模组小鼠的空腹血糖值均高于 11.1 mmol/L, 分别比正常对照组升高了 6.88 mmol/L, 6.70 mmol/L, 6.83 mmol/L, 且各组之间没有明显差异, 表明 2 型糖尿病小鼠模型建立成功。实验结束后, DD98 干预组小鼠的空腹血糖值 (18.66 mmol/L) 比单纯糖尿病对照组 (22.16 mmol/L) 和空白培养基干预组小鼠 (23.58 mmol/L) 降低了 3.5 mmol/L 和 4.92 mmol/L, 且有显著性 ($p<0.05$)。但 DD98 干预组小鼠与正常对照组小鼠相比, 空腹血糖值 (6.06 mmol/L) 仍显著升高了 12.6 mmol/L, 说明长双歧杆菌 DD98 可以减慢因 2 型糖尿病导致的小鼠空腹血糖值的升高, 但不能使其恢复到正常小鼠的空腹血糖水平。表明长双歧杆菌 DD98 在一定程度上可以缓解 2 型糖尿病血糖的升高, 但达不到治愈的效果。

表 1 高脂诱导的 2 型糖尿病各组小鼠的体重变化

Table 1 Body weight change in type 2 diabetic mice fed a high-fat diet ($\bar{x}\pm sd, n=6$)

组别	初始体重/g	饲养 1 w 后体重/g	饲养 2 w 后体重/g	饲养 3 w 后体重/g	饲养 4 w 后体重/g	建模后体重/g
A	16.11±1.3	17.37±1.36	18.68±1.98	19.92±1.44	20.78±1.62	21.78±0.96
B	16.03±1.58	18.22±1.98	20.45±2.68*	21.87±1.70*	23.67±1.53*	18.59±2.01*
C	16.48±1.44	18.52±1.79	20.98±1.78*	21.91±2.07*	23.57±1.75*	18.61±2.38*
D	16.09±2.00	18.02±2.22	21.00±1.66*	22.12±1.37*	23.61±1.89*	18.37±1.86*

注: A: 正常对照组; B: 单纯糖尿病对照组; C: 长双歧杆菌 DD98 干预组; D: 空白培养基干预组。图中*表示与 A 组相比有显著性差异($p<0.05$)。

表 2 实验前后高脂诱导的 2 型糖尿病各组小鼠的空腹血糖 FBG 变化

Table 2 Fasting glucose of type 2 diabetic mice fed a high-fat diet before and after the experiment ($\bar{x}\pm sd, n=6$)

组别	建模后 FBG 值/(mmol/L)	1 w 后 FBG 值/(mmol/L)	2 w 后 FBG 值/(mmol/L)	3 w 后 FBG 值/(mmol/L)
A	5.95±1.75	5.08±0.92	6.43±1.37	6.06±1.75
B	12.83±1.17*	17.04±1.86*	19.47±2.57*	22.16±1.24*#
C	12.65±2.10*	16.57±2.33*	18.46±2.34*	18.66±1.84*
D	12.78±2.25*	16.62±1.78*	19.32±1.88*	23.58±2.88*#

注: A: 正常对照组; B: 单纯糖尿病对照组; C: 长双歧杆菌 DD98 干预组; D: 空白培养基干预组。图中*表示与 A 组相比有显著性差异($p<0.05$); #表示与 C 组相比有显著性差异($p<0.05$)。表 3 同。

2.1.2 葡萄糖耐量结果

在给予长双歧杆菌 DD98 7 d 和 21 d 时分别进行葡萄糖耐量试验, 结果如图 1 所示。各造模组小鼠的

血糖-时间曲线在正常对照组之上, 造模组小鼠的 AUC 均在 2000~3000 之间, 显著高于正常对照组小鼠的 AUC, 且造模组各组之间无显著性差异。但 DD98

干预组小鼠的血糖-时间曲线在单纯糖尿病对照组和空白培养基干预组之下,说明 0.5 h、1 h、2 h 任一时间点的血糖值均比单纯糖尿病对照组和空白培养基干预组低。进一步计算 AUC, 结果表明 DD98 干预组小鼠的 AUC (2637) 较单纯糖尿病对照组 AUC (2891) 和空白培养基干预组 AUC (2929) 分别降低了 8.78% 和 9.97%, 且有显著性 ($p < 0.05$)。有文献报道, 口服糖耐量实验中小鼠的 AUC 与小鼠体内胰岛素的敏感性呈负相关, AUC 越低表示体内胰岛素敏感性越好 [26]。本实验证实长双歧杆菌 DD98 能显著降低小鼠 AUC, 表明其在一定程度上可以提高小鼠体内胰岛素的敏感性。2 型糖尿病是由体内胰岛素敏感性降低, 导致胰岛素分泌进一步增多, 引发胰岛素抵抗, 从而使血糖升高的一种疾病。长双歧杆菌 DD98 可以有效提高小鼠体内胰岛素的敏感性, 从而在一定程度上可以缓解因胰岛素敏感性降低导致的 2 型糖尿病小鼠血糖的升高。

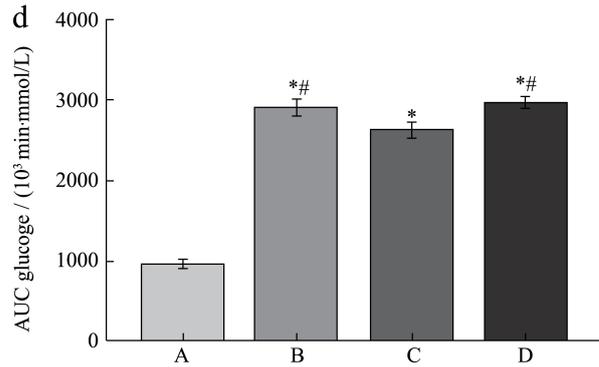
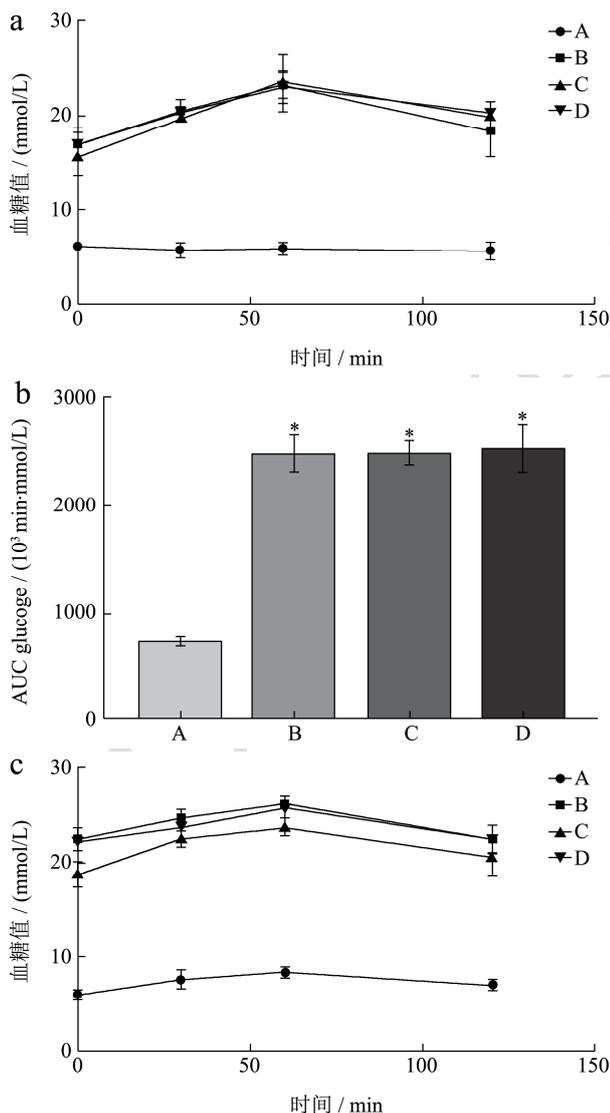


图 1 实验前后小鼠空腹血糖-时间曲线及曲线下面积

Fig.1 Fasting glucose and the area under curve of glucose in type 2 diabetic mice fed a high-fat diet before and after the experiment ($\bar{x} \pm s.d$, n=6)

注: 图 a 是长双歧杆菌 DD98 干预 7 d 时各组小鼠血糖-时间图; 图 b 是长双歧杆菌 DD98 干预 7 d 时各组小鼠血糖-时间曲线下面积(AUC)值; 图 c 是长双歧杆菌 DD98 干预 21 d 时各组小鼠血糖-时间图; 图 d 是长双歧杆菌 DD98 干预 21 d 时各组小鼠血糖-时间曲线下面积(AUC)值。图中的各组表示为 A: 正常对照组; B: 单纯糖尿病对照组; C: 长双歧杆菌 DD98 干预组; D: 空白培养基干预组。图中*表示与 A 组相比有显著性差异($p < 0.05$); #表示与 C 组相比有显著性差异($p < 0.05$)。

2.1.3 血清指标变化

表 3 高脂诱导的 2 型糖尿病小鼠血清血脂水平变化

Table 3 The change of serum lipid levels in mice fed a high-fat diet ($\bar{x} \pm s.d$, n=6)

组别	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)
A	1.18±0.32	0.23±0.26	1.11±0.51
B	2.16±0.62*#	0.71±1.53*#	3.07±0.82*#
C	1.72±0.41*	0.42±0.14*	1.26±0.27
D	1.89±0.29*	0.79±0.13*#	3.92±0.13*#

各组之间的血清指标对比情况如表 3 所示。单纯糖尿病组小鼠, DD98 干预组小鼠和空白培养基干预组小鼠的血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 和低密度脂蛋白 (LDL-C) 浓度比正常对照组均显著升高 ($p < 0.05$)。说明本研究所致 2 型糖尿病模型会引起小鼠血清脂质指标变化。经 3 周干预治疗后, DD98 干预组小鼠血清 TC 浓度 (1.72±0.41 mmol/L) 较单纯糖尿病组 (2.16±0.62 mmol/L) 和空白培养基干预组 (1.89±0.29 mmol/L) 低, 但没有显著性差异。同时, 单纯糖尿病组小鼠 TG 浓度为 0.71 mmol/L, 空白培养基干预组小鼠 TG 浓度为 0.79 mmol/L, 而 DD98 干预组小鼠 TG 浓度为 0.42 mmol/L, 比单纯糖尿病组和空白培养基干预组分别降低了 40.84% 和 46.83% ($p < 0.05$)。而小鼠血清的 LDL-C 水平, 单纯糖尿病

组小鼠的 LDL-C 浓度为 3.07 mmol/L, 空白培养基干预组为 3.92 mmol/L, DD98 干预组小鼠的 LDL-C 浓度仅为 1.26 mmol/L, 比上述两组分别降低了 1.81 mmol/L 和 2.66 mmol/L, 且有显著性 ($p < 0.05$)。上述结果说明, 长双歧杆菌 DD98 对于糖尿病小鼠的血脂水平异常升高, 具有缓解效果。

2 型糖尿病会增加患冠心病、动脉粥样硬化等心血管类疾病的风险, 这主要与 2 型糖尿病患者体内的血脂水平升高有关。本研究发现长双歧杆菌 DD98 能显著降低糖尿病小鼠的血脂水平, 在一定程度上表明其可以防御由 2 型糖尿病引发的心血管类疾病。Wang Z 等人的研究进一步地表明益生菌产品是通过抑制膳食脂肪吸收和调节肠道细菌介导的粪便脂肪排泄来发挥相关作用的^[27]。

2.1.4 肝脏脂质含量分析

各组之间肝脏脂质的含量变化结果如 3 所示, 造模组小鼠肝脏脂质 TG、TC、LDL-C 浓度均显著高于正常对照组 ($p < 0.05$)。说明本研究所致 2 型糖尿病模型会引起小鼠肝脏脂质指标变化。

经 3 周干预治疗后, DD98 干预组小鼠的肝脏脂质 TG、TC、LDL-C 浓度均显著低于单纯糖尿病组(分别降低 43.75%、45.83% 和 44.44%) 和空白培养基干预组(分别降低 47.05%、44.93% 和 28.47%) ($p < 0.05$)。本实验的结果表明长双歧杆菌 DD98 对由 2 型糖尿病引起的肝损伤有明显的改善作用。一项临床研究指出, 细菌的产物如脂多糖 (LPS)、乙醇和短链脂肪酸 (SCFAs) 的易位导致它们从肠道腔到达肝脏。SCFAs 可以刺激肝脏脂质的合成和储存, 导致肝脏脂质的积累, 从而增加脂肪肝的严重程度, 而益生菌可以恢复因 2 型糖尿病破坏的肠道菌群结构, 降低肠道通透性, 缓解宿主体内代谢性内毒素血症, 改善受损的肝脏^[28]。本研究中的 DD98 是否也是通过该途径发挥对肝脏的保护作用, 还需进一步的研究和证实。

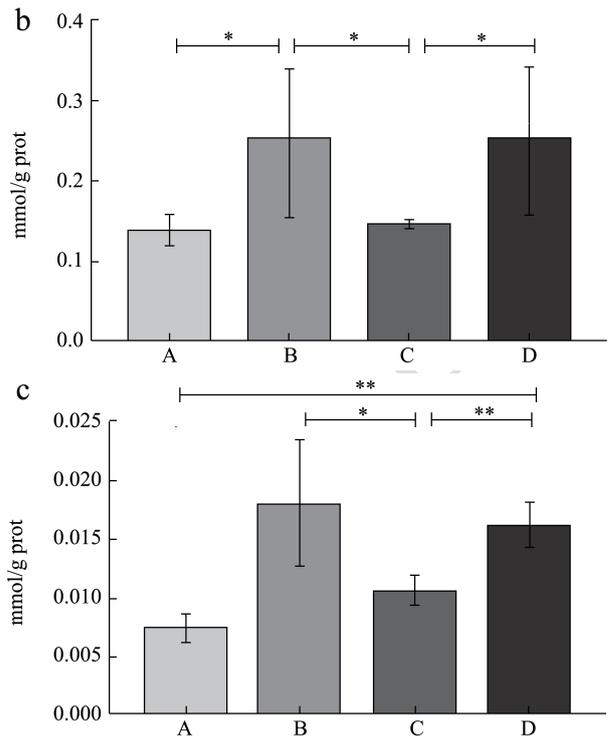
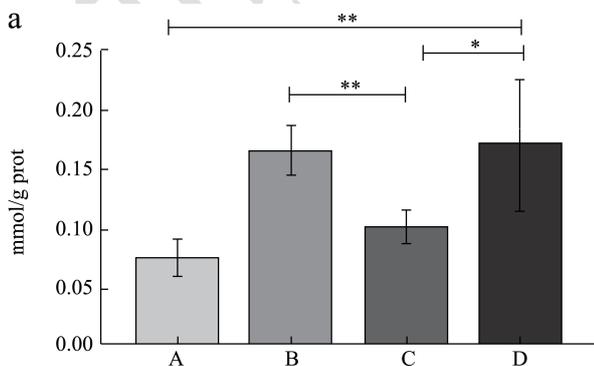


图 2 高脂诱导的 2 型糖尿病小鼠肝脏血脂水平变化

Fig.2 The change in the liver TC (A), TG (B), and LDL (C) levels in type 2 diabetic mice fed a high-fat diet ($\bar{x} \pm s.d$, n=6)

注: 图 a 是各组小鼠肝脏总胆固醇浓度变化图; 图 b 是各组小鼠肝脏甘油三酯浓度变化图; 图 c 是各组小鼠肝脏低密度脂蛋白浓度变化图。图中的各组表示为 A: 正常对照组; B: 单纯糖尿病对照组; C: 长双歧杆菌 DD98 干预组; D: 空白培养基干预组。图中*表示与 A 组相比有显著性差异($p < 0.05$); #表示与 C 组相比有显著性差异($p < 0.05$)。

2.2 高脂诱导的肥胖

2.2.1 小鼠空腹体重及脏器指数分析

如表 4 所示, 各组小鼠之间的初始空腹体重值没有显著差异, 高脂饲养 5 周后, 单纯高脂饲养组小鼠, DD98 干预组小鼠和空白培养基干预组小鼠的空腹体重值比正常对照组小鼠的空腹体重值高出 17.37%, 4.29% 和 14.63%, 表明高脂饲养会导致小鼠空腹体重的升高, 进一步导致肥胖, 此结果表明高脂饲养诱导肥胖小鼠模型成功建立。经干预治疗后, DD98 干预组小鼠的空腹体重值比单纯高脂饲养组和空白培养基干预组小鼠降低了 11.14% 和 6.28%, 且有显著性 ($p < 0.05$), 与正常对照组小鼠相比, 没有显著性差异, 说明双歧杆菌 DD98 可以有效缓解高脂饲养引起的肥胖小鼠体重的增加, 并可以使其恢复至正常水平。

在脏器指数方面,造模组各组小鼠的肝脏指数和脂肪指数均显著高于正常对照组 ($p<0.05$),但 DD98 干预组小鼠的肝脏指数 (37.21 ± 3.50 mg/g) 和脂肪指数 (14.51 ± 3.18 mg/g) 均显著低于单纯高脂饲养组小鼠 (肝脏指数为 40.02 ± 3.43 mg/g, 脂肪指数为 18.89 ± 3.14 mg/g) 和空白培养基干预组小鼠 (肝脏指数 39.53 ± 4.03 mg/g, 脂肪指数为 19.69 ± 5.21 mg/g), 肝脏指数分别降低了 7.55% 和 6.23%, 脂肪指数分别

降低了 23.18% 和 26.31%, 且有显著性 ($p<0.05$)。说明长双歧杆菌 DD98 可以有效降低肥胖小鼠的肝脏和腹部脂肪指数。已有研究表明,益生菌可以显著降低由高脂饮食引起的肥胖小鼠肝、腹部脂肪指数的增加,本实验结果与其相一致^[29]。同时,本研究结果说明长双歧杆菌 DD98 缓解高脂饮食导致的肥胖小鼠体重的增长,可能与减少其腹部脂肪有关。同时,长双歧杆菌 DD98 也在一定程度改善了肥胖引发的肝脏肥大。

表 4 高脂诱导的肥胖各组小鼠体重、肝脏指数和腹部指数变化

Table 4 Indexes of organ fat, abdominal fat and body weight of obese mice fed a high-fat die in each group ($\bar{x}\pm sd, n=6$)

组别	初始体重/g	高脂饲养 5 w 后体重/g	肝脏指数(mg/g)	腹部脂肪指数(mg/g)
A	17.80±1.50	20.03±2.22	34.37±2.57	11.46±1.90
B	17.86±1.07	23.51±2.81 [#]	40.02±3.43 ^{*#}	18.89±3.14 [#]
C	17.88±1.86	20.89±2.51	37.21±3.50 [*]	14.51±3.18 [*]
D	17.60±1.56	22.96±3.69 [#]	39.53±4.03 [#]	19.69±5.21 [#]

注: A: 正常对照组; B: 单纯高脂饲养组; C: 长双歧杆菌 DD98 干预组; D: 空白培养基干预组。图中*表示与 A 组相比有显著性差异($p<0.05$); #表示与 C 组相比有显著性差异($p<0.05$)。表 5 同。

2.2.2 血清指标变化

表 5 高脂诱导的肥胖小鼠血清血脂水平变化

Table 5 The change of serum lipid levels in mice fed a high-fat diet ($\bar{x}\pm sd, n=6$)

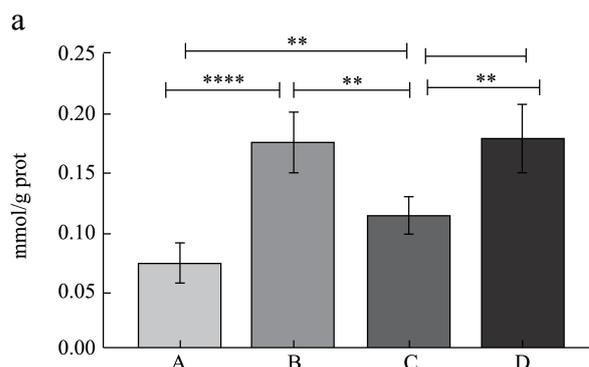
组别	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)
A	1.21±0.11	0.13±0.05	0.95±0.61
B	1.98±0.91 [#]	0.29±0.09 [#]	2.14±0.48 [#]
C	1.25±0.52	0.14±0.05 [*]	1.62±0.72 [*]
D	1.80±0.11 [#]	0.26±0.11 [#]	2.71±0.53 [#]

各组之间的血清指标对比情况如表 5 所示。造模组小鼠血清脂质指标 TG、TC、LDL-C 浓度均显著高于正常对照组($p<0.05$),表明高脂饲养所致肥胖会引起小鼠血清脂质指标的变化。经干预治疗后,长双歧杆菌 DD98 干预组小鼠血清 TC 浓度比单纯高脂饲养组和空白培养基干预组分别降低了 36.86% 和 30.56% ($p<0.05$),且与正常对照组小鼠血清 TC 浓度(1.21 mmol/L)相比无显著性差异。同时,长双歧杆菌 DD98 干预组小鼠血清 TG 浓度比单纯高脂饲养组和空白培养基干预组降低了 51.72% 和 46.15% ($p<0.05$),但未恢复到正常小鼠水平。长双歧杆菌 DD98 干预组小鼠 LDL-C 浓度比单纯高脂饲养组和空白培养基干预组降低了 24.29% 和 40.22% ($p<0.05$)。说明长双歧杆菌 DD98 对于肥胖相关的血清脂质指标异常升高,具有缓解效果。Zhang 等人研究表明,益生菌可以显著降低高脂饮食诱导的肥胖小鼠的血清 TG、TC 和 LDL-C 水平,从而改善肥胖,本实验结果与其一致。该研究还阐述了大多数益生菌,特别是双歧杆菌和乳酸菌,可以产生大量胆盐水解酶(BSH),BSH 可以水解结合

的胆盐,从而降低血清脂质水平^[30]。本研究中,DD98 可以降低肥胖引发的血清脂质水平升高,但其机制是否与胆盐水解酶的产生有关,仍需要进一步研究。

2.2.3 肝脏脂质变化

各组之间肝脏脂质的含量变化结果如图 3 所示,造模组小鼠肝脏中 TG、TC、LDL-C 浓度均显著高于正常对照组 ($p<0.05$),表明肥胖引起了小鼠肝脏脂质指标的变化。经干预给药后,予长双歧杆菌 DD98 干预组小鼠的肝脏中 TG、TC、LDL-C 浓度均显著低于单纯高脂饲养组(分别降低了 35.29%、29.03% 和 41.93%) 和空白培养基干预组(分别降低了 38.76%、26.61% 和 35.28%) ($p<0.05$)。此结果表明长双歧杆菌 DD98 对由肥胖引起的肝损伤有明显的改善作用。有研究表明,益生菌可以通过降低肝脏 LPS、TNF- α 和氧化应激的产生,诱导脂肪瘦素的表达,从而降低肥胖引起肝损伤^[31]。本研究中的 DD98 是否也是通过该途径发挥对肝脏的保护作用,但还需进一步的研究和证实。



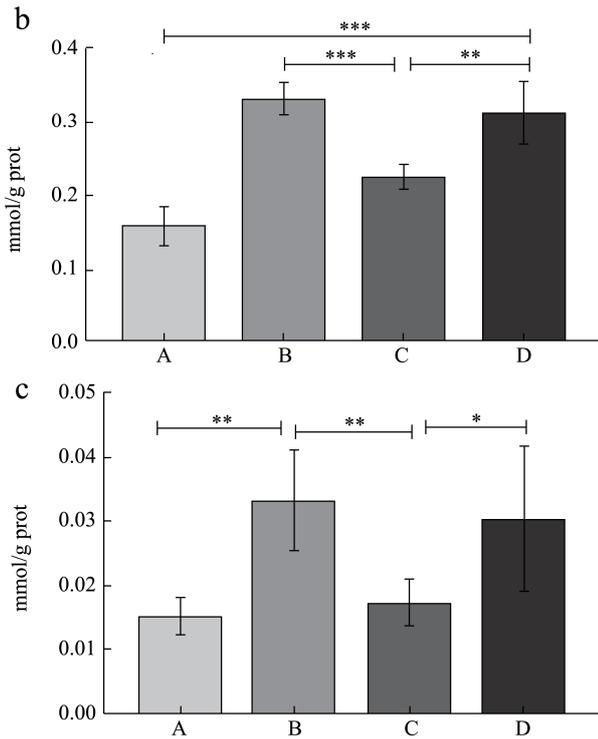


图3 高脂诱导的肥胖小鼠肝脏血脂水平变化

Fig.3 The change in the liver TC (a), TG (b), and LDL (c) levels in obese mice fed a high-fat diet ($\bar{x}\pm sd, n=6$)

注：图 a 是各组小鼠肝脏总胆固醇浓度变化图；图 b 是各组小鼠肝脏甘油三酯浓度变化图；图 c 是各组小鼠肝脏低密度脂蛋白浓度变化图。图中的各组表示为 A：正常对照组；B：单纯高脂饲养组；C：长双歧杆菌 DD98 干预组；D：空白培养基干预组。图中*表示与 A 组相比有显著性差异($p<0.05$)；#表示与 C 组相比有显著性差异($p<0.05$)。

2.2.4 病理组织切片

各组肝脏组织病理学形态的改变如图 4 所示，对各组小鼠肝脏石蜡切片 HE 染色进行对比：正常对照组小鼠肝细胞排列规则，形态正常；单纯高脂饲养组和空白培养基干预组小鼠肝脏与正常对照组小鼠肝组织相比，局部汇管区周围可见少量椭圆形细胞增生，并伴有少量炎性细胞浸润，肝小叶内可见一处小灶性的炎性细胞浸润，周围亦可见少量肝细胞水肿变性，胞质疏松；给予长双歧杆菌 DD98 干预组的小鼠，肝组织肝细胞排列规则，形态正常，少量肝细胞胞质内可见圆形空泡。说明长双歧杆菌 DD98 对于肥胖所致的肝脏病变具有缓解作用，其机制可能是通过改善肝脏炎症程度而发挥作用的，但仍需要进一步研究。

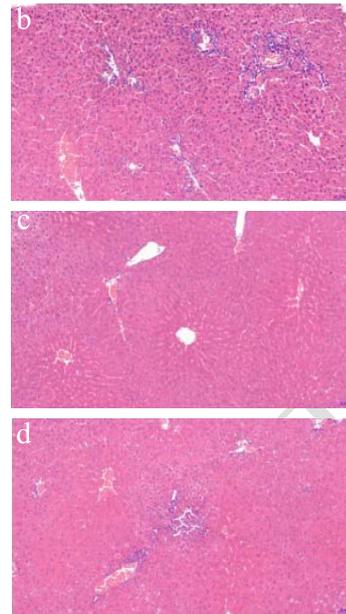
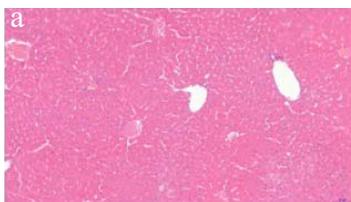


图 4 肝脏组织病理学形态的改变 (HE 染色 $\times 20$)

Fig.4 Hepatic pathological changes in the mice (HE $\times 20$)

注：a：正常对照组；b：单纯高脂饲养组；c：长双歧杆菌 DD98 干预组；d：空白培养基干预组。

3 结论

本文研究了长双歧杆菌 DD98 对于高脂饲养诱导的小鼠 2 型糖尿病及肥胖相关症状的缓解作用。结果表明，长双歧杆菌 DD98 对高脂诱导+STZ 注射的 2 型糖尿病小鼠的空腹血糖、葡萄糖耐量、血脂水平及肝脏损伤具有明显的改善作用，对高脂诱导的肥胖小鼠的空腹体重、脏器指数、血脂水平和肝脏损伤也具有明显的缓解效果。说明长双歧杆菌 DD98 对糖尿病及肥胖等慢性代谢疾病具有较好而普遍的改善作用。本研究为开发辅助降血糖、降血脂、缓解肝损伤的益生菌类保健食品提供了重要的理论依据，为慢性代谢疾病的辅助治疗和药物研发提供了思路和途径。

参考文献

- [1] Agarwal C, Bansal K, Pujani M, et al. Association of coagulation profile with microvascular complications and glycemic control in type 2 diabetes mellitus—a study at a tertiary care center in Delhi [J]. Hematology Transfusion & Cell Therapy, 2019, 41(1): 31-36
- [2] Ramadas A, Chan C K Y, Oldenburg B, et al. A web-based dietary intervention for people with type 2 diabetes: development, implementation, and evaluation [J]. Int J Behav Med, 2014, 22(3): 1-9
- [3] Mcfarland L V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics [J]. Clinical

- Infectious Diseases, 2015, 60(2): S85
- [4] Plaza-Díaz J, Fernández-Caballero J Á, Chueca N, et al. Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains [J]. *Nutrients*, 2015, 7(6): 3999-4015
- [5] Harsh P, Hogarehalli Mallappa R, Virender Kumar B, et al. Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes-prospects and perspectives [J]. *Diabetes*, 2013, 29(2): 103-112
- [6] Han J L, Lin H L. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(47): 17737-17745
- [7] Hulston C J, Churnside A A, Venables M C. Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects [J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 113 (4): 596-602
- [8] Mohamadshahi M, Veissi M, Haidari F, et al. Effects of probiotic yogurt consumption on inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes [J]. *Bioimpacts Bi*, 2014, 4(2): 83
- [9] Samah S, Ramasamy K, Lim S M, et al. Probiotics for the management of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Research & Clinical Practice*, 2016, 118: 172-182
- [10] Sáez-Lara M J, Robles-Sanchez C, Ruiz-Ojeda F J, et al. Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: A review of human clinical trials [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(6): 928
- [11] Iacomino G, Russo P, Marena P, et al. Circulating microRNAs are associated with early childhood obesity: Results of the I. family study [J]. *Genes & Nutrition*, 2019, 14(2): 1-13
- [12] Laetitia K, Denise M, Denis F. Probiotics and chronic kidney disease [J]. *Kidney International*, 2015, 88(5): 958-966
- [13] Mohamadshahi M, Veissi M, Haidari F, et al. Effects of probiotic yogurt consumption on inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes [J]. *Bioimpacts Bi*, 2014, 4(2): 83-88
- [14] Alokail M S, Sabico S, Al-Saleh Y, et al. Effects of probiotics in patients with diabetes mellitus type 2: Study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Trials*, 2013, 14(1): 195
- [15] Savcheniuk O A, Virchenko O V, Falalyeyeva T M, et al. The efficacy of probiotics for monosodium glutamate-induced obesity: Dietology concerns and opportunities for prevention [J]. *EPMA Journal*, 2014, 5(1): 2
- [16] Kobyliak N, Conte C, Cammarota G, et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: A critical view [J]. *Nutrition & Metabolism*, 2016, 13(1): 14
- [17] Dahiya D K, Puniya A K. Isolation, molecular characterization and screening of indigenous lactobacilli for their abilities to produce bioactive conjugated linoleic acid (CLA) [J]. *Journal of Food Science & Technology*, 2017, 54(3): 1-10
- [18] Hariom Y, Ji-Hyeon L, John L, et al. Beneficial metabolic effects of a probiotic *via* butyrate-induced GLP-1 hormone secretion [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(35): 25088-25097
- [19] Lim S M, Jeong J J, Woo K H, et al. *Lactobacillus sakei* OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression [J]. *Nutrition Research*, 2016, 36(4): 337-348
- [20] Marta T, Manuel G G, Rosario J, et al. The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and proinflammatory status in obese mice [J]. *Clinical Science*, 2014, 127(1): 33-45
- [21] Manaer T, Yu L, Zhang Y, et al. Anti-diabetic effects of shubat in type 2 diabetic rats induced by combination of high-glucose-fat diet and low-dose streptozotocin [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 169: 269-274
- [22] Dang F, Jiang Y, Pan R, et al. Administration of *Lactobacillus paracasei* ameliorates type 2 diabetes in mice [J]. *Food & Function*, 2018, 10(7): 3630-3639
- [23] He J, Zhang F, Han Y. Effect of probiotics on lipid profiles and blood pressure in patients with type 2 diabetes [J]. *Medicine*, 2017, 96 (51): e9166
- [24] GKhan S, Mehmet Bilgehan P, Halit Bugra K, et al. Resveratrol improves hepatic insulin signaling and reduces the inflammatory response in streptozotocin-induced diabetes [J]. *Gene*, 2015, 570(2): 213-220

(下转第 198 页)