

动物双歧杆菌和罗伊氏乳杆菌对肥胖小鼠 体脂分布和血脂的影响

朱梅珍, 郑晗盈, 郭东北, 陈小旋, 潘莉莉, 李红卫*

(厦门大学公共卫生学院, 福建厦门 361100)

摘要: 利用肥胖小鼠模型探讨动物双歧杆菌 CP-9 (*Bifidobacterium animalis* CP-9, CP-9) 和罗伊氏乳杆菌 ADR-1 (*Limosilactobacillus reuteri* ADR-1, ADR-1) 对体质量、体脂分布和血脂的影响。高脂饲料喂养的肥胖小鼠随机分为高脂饮食对照组 (High-fat Diet, HFD)、CP-9 组、ADR-1 组, 正常饮食组 (Normal Diet, ND) 普通饲料喂养, 每组 12 只, 连续灌胃 10 w。测量小鼠体质量、体成分, 观察体脂肪分布、肝组织病理变化, 检测血液生化指标, 测定肝脏组织脂肪酸合成酶 (*Fatty Acid Synthase*, *FAS*) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ* , *PPAR γ*) 基因的蛋白表达。干预结束时, 与 HFD 相比, CP-9 和 ADR-1 组小鼠体质量 (-18.82%, -18.82% vs HFD)、腹腔和皮下脂肪、血清低密度脂蛋白胆固醇 (Low-density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、谷丙转氨酶 (Alanine Aminotransferase, ALT) 显著降低 ($P < 0.05$)。CP-9、ADR-1 组肝脂肪变性及肝损伤较 HFD 组明显改善, 且肝脏 *FAS* 基因的蛋白表达减少 (-53.22%, -53.22% vs HFD), *PPAR γ* 基因的蛋白表达增加 (571.43%, 714.29% vs HFD)。综上, CP-9 和 ADR-1 干预可有效减轻肥胖小鼠体质量、腹腔和皮下脂肪, 改善肝脂肪变性及肝损伤, 可能是通过调节肝脏 *FAS* 和 *PPAR γ* 基因的蛋白表达降低 TG、LDL-C 从而改善脂肪代谢异常。

关键词: 动物双歧杆菌; 罗伊氏乳杆菌; 减重; 脂肪分布; 血脂

文章编号: 1673-9078(2024)01-34-46

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.1543

Effects of *Bifidobacterium animalis* and *Limosilactobacillus reuteri* on Fat Distribution and Blood Fat in Obese Mice

ZHU Meizhen, ZHENG Hanying, GUO Dongbei, CHEN Xiaoxuan, PAN Lili, LI Hongwei*

(School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361100, China)

Abstract: To explore the effects of *Bifidobacterium animalis* CP-9 (CP-9) and *Limosilactobacillus reuteri* ADR-1 (ADR-1) on weight, fat distribution and blood fat in obese mice. The obese mice fed with high fat diet were randomly divided into model control group (High-fat Diet, HFD), CP-9 group, ADR-1 group. The mice in blank control group (Normal Diet, ND) were fed with normal diet. The body weight and body composition of mice were measured, the distribution of body fat and the pathological changes of liver tissue were observed, the blood biochemical indexes were measured, and the protein expressions of *fatty acid synthase (FAS)* and *peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)* in liver tissue were determined. At the end of the intervention, compared with HFD, the body weight (-18.82%, -18.82% vs HFD), abdominal and

引文格式:

朱梅珍, 郑晗盈, 郭东北, 等. 动物双歧杆菌和罗伊氏乳杆菌对肥胖小鼠体脂分布和血脂的影响[J]. 现代食品科技, 2024, 40(1): 34-46.

ZHU Meizhen, ZHENG Hanying, GUO Dongbei, et al. Effects of *Bifidobacterium animalis* and *Limosilactobacillus reuteri* on fat distribution and blood fat in obese mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 34-46.

收稿日期: 2022-12-06

作者简介: 朱梅珍 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 公共卫生, E-mail: 2466786574@qq.com

通讯作者: 李红卫 (1967-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与食品卫生, E-mail: rocque@xmu.edu.cn

subcutaneous fat, serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG) and alanine aminotransferase (ALT) of mice in the CP-9 and ADR-1 groups decreased significantly ($P < 0.05$). Liver steatosis and liver injury in CP-9 and ADR-1 groups were significantly improved compared with HFD group, and the protein expression of FAS gene in liver decreased (-53.22%, -53.22% vs HFD), while the protein expression of PPAR γ gene increased (571.43% vs HFD 714.29%). In summary, the intervention of CP-9 and ADR-1 can effectively reduce the body weight, abdominal and subcutaneous fat of obese mice, improve hepatic steatosis and liver injury, probably by regulating the protein expression of FAS and PPAR γ genes in liver to reduce TG and LDL-C so as to improve the abnormality of fat metabolism.

Key words: *Bifidobacterium animalis*; *Limosilactobacillus reuteri*; weight loss; fat distribution; blood fat

超重或肥胖指体内脂肪过量堆积引起的健康异常状态^[1]。肥胖作为诸多非传染性疾病的主要危险因素，与糖尿病、高血压及心血管疾病等的发生密切相关^[2,3]。另外，脂肪的分布也与诸多疾病紧密联系。体脂肪的分布不仅影响血脂异常^[4]，还与胰岛素抵抗^[5]、胆囊结石^[6]等相关。如今，肥胖率在全球诸多国家均呈现迅速上升状态^[7]，肥胖的防治已成为亟待解决的重要公共卫生问题。当前采用手术和药物等治疗肥胖的方法均有副作用存在^[8,9]，节制饮食和运动减脂又难以坚持^[10,11]，因而迫切需要安全有效的营养解决方案。而益生菌可以通过影响与肥胖症有关的能量调节和慢性炎症状态从而改变宿主的新陈代谢^[12,13]，使得肠道微生物干预成为治疗肥胖的一种可行策略。但益生菌种类繁多，各自所起的作用也不尽相同，其对体质量的作用具有显著的菌株特异。有研究表明双歧杆菌通过影响肠道微生物的生长繁殖，改善肠道代谢，从而治疗高脂饮食引起的肥胖^[14]。而临床随机对照研究表明补充乳双歧杆菌 BS01 (*Bifidobacterium lactis* BS01, BS01) 和嗜酸乳杆菌 LA02 (*Lactobacillus acidophilus* LA02, LA02) 对人体体质量、体脂百分比、手臂皮褶脂肪、腰围等测量指标没有影响^[15]。用三株不同的罗伊氏乳杆菌干预肥胖小鼠的研究发现，罗伊氏乳杆菌 ATCC (*Limosilactobacillus reuteri* ATCC, ATCC) 干预显著抑制了小鼠体质量增长，而补充罗伊氏乳杆菌 L6798 (*Limosilactobacillus reuteri* L6798, L6798) 的小鼠体质量明显增加^[16]。可见，不同菌株干预对高脂饮食诱导的小鼠体质量增加产生了不同的作用。毒理实验表明动物双歧杆菌 CP-9 (*Bifidobacterium animalis* CP-9, CP-9) 可以降低 Caco-2 肠上皮细胞中甘油三酯 (Triglyceride, TG) 的积累^[17]，而罗伊氏乳杆菌 ADR-1 (*Limosilactobacillus reuteri* ADR-1, ADR-1) 可以改善高果糖喂养大鼠的

胰岛素抵抗和肝脂肪变性^[18]，尚未发现这两种益生菌对宿主体质量和脂肪代谢的影响。因此，本研究选取 CP-9、ADR-1 两种益生菌，利用肥胖小鼠模型，探讨其对肥胖小鼠体质量、体脂肪分布、血脂等的影响，并对作用机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57/BL6 周龄小鼠，购自北京维通利华，动物许可证号为：SYXK (闽) 2018-0010，饲养于某大学实验动物中心，饲养条件：温度 22 °C，湿度 40%~60%，12 h 明暗交替照明，自由饮水。适应性喂养 1 周后开始实验。动物伦理号：XMULAC20210010。

1.2 造模与分组

全程普通饲料喂养的 12 只小鼠为正常饮食组 (Normal Diet, ND)，其余小鼠高脂饲料 (Research Diets Inc.D12492) 喂养 8 周。选取肥胖造模成功的 36 只小鼠 (即自身体质量增长大于 40%)^[19]，随机均分为高脂饮食对照组 (High-fat Diet, HFD)，动物双歧杆菌 CP-9 组 (*Bifidobacterium animalis* CP-9, CP-9) 和罗伊氏乳杆菌 ADR-1 组 (*Limosilactobacillus reuteri* ADR-1, ADR-1)。

1.3 受试物与干预

CP-9 (1.5×10^{11} CFU/g) 购自台湾丰华生物有限公司；ADR-1 (5.0×10^{10} CFU/g) 购自景岳生物科技股份有限公司。CP-9 组、ADR-1 组每日分别予以 CP-9、ADR-1 进行灌胃，灌胃剂量参考人体日摄入量分别为 1×10^9 、 1×10^9 CFU/g，灌胃质量浓度分别为 4.952×10^{-5} 、 1.486×10^{-4} g/mL。ND、HFD 组灌以生理盐水，灌胃量为 0.2 mL/10 g，连续干预 10 周。

1.4 指标检测

1.4.1 体质量

每周测量并记录小鼠体质量 (g)。

1.4.2 体成分分析

使用体成分分析仪 EchoMRI-100H (中国, 汇佳生物) 测量小鼠总瘦组织量 (Lean Weight, LW) 和总脂肪量 (Fat Weight, FW), 并计算瘦组织体质量比 (Lean Weight Ratio, LWR) 和脂肪体质量比 (Fat Weight Ratio, FWR)。

$$A = \frac{W_L}{W} \quad (1)$$

$$B = \frac{W_F}{W} \quad (2)$$

式中:

A —瘦组织体质量比 (LWR);

B —脂肪体质量比 (FWR);

W_L —动物瘦组织质量 (LW), g;

W_F —动物脂肪质量 (FW), g;

W —动物体质量, g。

1.4.3 腹腔脂肪、脏器重量及相关指标

干预结束后禁食 12 h, 处死、解剖小鼠, 分离并称量肾脏 (Kidney Weight, KW)、脾脏 (Spleen Weight, SW)、肝脏 (Liver Weight, LW) 和肾周脂肪 (Perirenal Fat Weight, PFW)、附睾周围脂肪 (Epididymal Fat Weight, EFW) 和肠系膜脂肪 (Mesenteric Fat Weight, MFW) 质重, 计算脂肪系数 (Fat Ratio, FR) 和肝脏系数 (Liver Ratio, LR)。

$$C = \frac{W_{PF} + W_{EF}}{W} \quad (3)$$

$$D = \frac{W_{肝}}{W} \quad (4)$$

式中:

C —脂肪系数 (FR);

W_{PF} —肾周脂肪质量 (PFW), g;

W_{EF} —附睾周围脂肪质量 (EFW), g;

D —肝脏系数 (LR);

$W_{肝}$ —肝脏质量 (Liver Weight), g;

W —动物体质量, g。

1.4.4 脂肪面积

小鼠采用体积分数 2% 的异氟烷进行吸入诱导麻醉后, 将小鼠俯卧位固定于动物载床上, 利用小

动物磁共振成像设备 9.4TMRI (德国, Bruke) 对小鼠进行 MRI 成像, 观察小鼠皮下和腹腔的脂肪分布。通过圈定 T1 加权成像、T2 加权成像中各层小鼠脂肪目标区域, 计算小鼠肝脏上边界到肾脏下边界的各层脂肪面积总和。

1.4.5 肝组织切片染色

解剖后取小鼠完整的肝脏用质量分数 4% 的多聚甲醛固定。一部分样品洗涤、脱水、透明、浸蜡包埋后, 使用石蜡切片机 (美国, Leica RM2235) 切割切片, 烘干后按照标准染色程序进行苏木精-伊红 (Hematoxylin-erosin Staining, H&E) 染色。另一部分样品常规冰冻切片后, 进行油红 O (Oil Red O Staining, ORO) 染色。最后使用光学显微镜下观察肝组织病理形态。

1.4.6 生化指标

干预结束后, 小鼠摘眼球取血, 于 4 °C 放置 1 h 后, 2 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, -80 °C 保存, 用于测定生化指标。采用全自动生化分析仪 (中国厦门宝诚, BS-240vet) 检测小鼠血脂和肝功能, 即血清总胆固醇 (Total Cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (High-density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low-density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C)、总甘油三酯 (Total Triglyceride, TG)、谷丙转氨酶 (Alanine Aminotransferase, ALT) 及谷草转氨酶 (Aspartate Transaminase, AST)。

1.4.7 肝组织 FAS、PPAR γ 基因的蛋白表达

解剖后的肝脏组织, 生理盐水清洗、吸干后, 置于冻存管中, -80 °C 保存。采用 Western Blot 法检测肝组织脂肪酸合成酶 (Fatty Acid Synthase, FAS) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ , PPAR γ) 基因的蛋白表达。取 100 mg 样品, 洗涤、裂解、研磨、12 000 r/min 离心 5 min 后取上清; 利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海, 碧云天生物技术) 进行蛋白定量; 灌胶后电泳, 上样液为 20 μ g; 然后转移到 PVDF 膜上, 封闭; 后分别加入 FAS 一抗 (英国, Abcam1:1 000)、PPAR γ 一抗 (英国, Jackson1:1 000) 4 °C 孵育过夜; 洗膜后加入羊抗兔二抗 (英国, Jackson1:2 000)、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗 (英国, Jackson1:2 000) 孵育 2 h; 最后用化学发光检测试剂 (试剂 A: 试剂 B = 1:1) 显影。蛋白质条纹的灰度读取使用 Tanon 化学发光成像系统 (上海, Tanon), 结果表示为 FAS、PPAR γ

蛋白条带与内参 β -actin 条带的 OD 值的比值。

1.5 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 结果表示为均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 或中位数 (四分位数)[Median (IQR)], 组间比较采用方差分析或 Kruskal-Wallis 检验, 两两比较采用 LSD 或 Nemenyi 方法, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 摄食量与体质量

本研究给予小鼠高脂饮食 8 周进行肥胖造模, 造模成功的小鼠根据随机数字表法随机分组后, 各组间体质量均衡 ($P > 0.05$)。表 1 结果显示, 10 周干预期内各组小鼠饲料摄入量差异无统计学意义, 因而可以排除高脂饮食各组因摄食量不同而造成的体质量差异。重复测量方差分析结果表明, 各组小鼠体质量增长趋势不同 ($P < 0.01$)。ND 组体质量增长缓慢, 而高脂饮食组体质量增长迅速, 但其中 CP-9、ADR-1 组较 HFD 组明显减缓。至第 6

周时, CP-9、ADR-1 组体质量均明显低于 HFD 组 (37.35 g、37.46 g vs 42.35 g, $P < 0.05$), 该现象一直持续至干预结束。干预 10 周后, CP-9 组、ADR-1 组体质量分别为 36.80 g、36.63 g, 与 HFD 组 (45.33 g) 相比显著降低 ($P < 0.05$)。CP-9 组、ADR-1 组体质量增长较 HFD 组显著降低 (4.25%、3.31% vs 24.87%, $P < 0.05$), 表明 CP-9 组、ADR-1 两种益生菌能有效缓解高脂饮食引起的体质量增长。

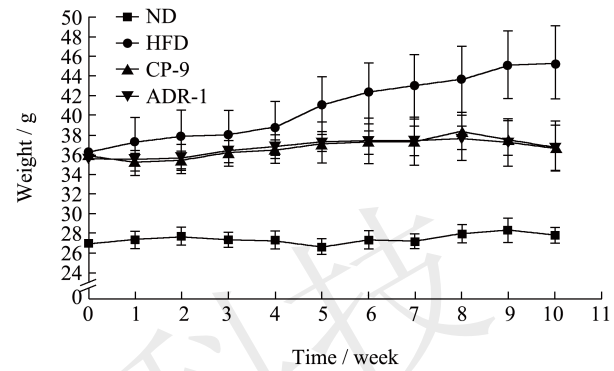


图 1 干预期间小鼠体质量变化

Fig.1 Body weight during intervention

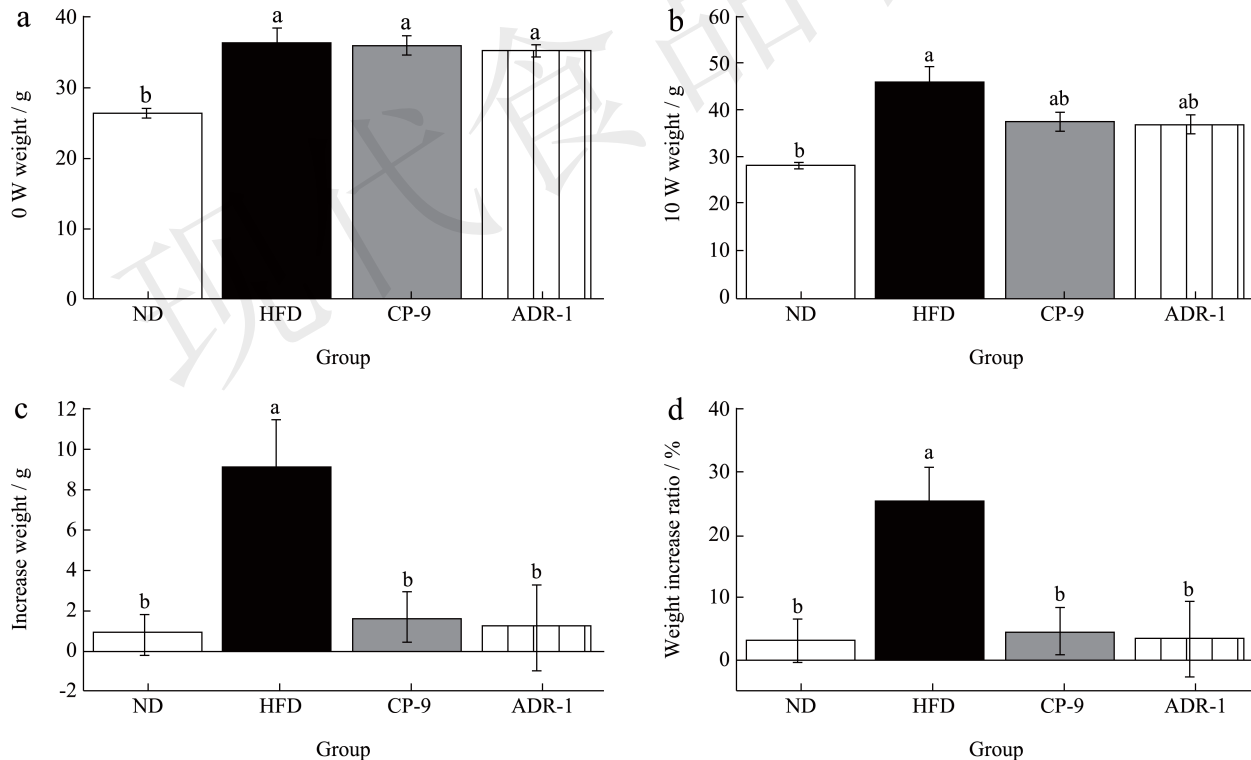


图 2 实验动物第 0 周、第 10 周体质量结果比较

Fig.2 Comparison of body weight of mice at week 0 and week 10

注: $n=12$, (a) 第 0 周体质量, (b) 第 10 周体质量, (c) 0~10 周体质量增长, (d) 0~10 周体质量增长百分比。^a $P < 0.05$: 与 ND 组比较, ^b $P < 0.05$: 与 HFD 组比较。

表 1 实验动物第0周至第10周每周摄食量

Table 1 Weekly food intake of experimental animals from week 0 to week 10 (n=12, g)

| Group | 1 W | 2 W | 3 W | 4 W | 5 W | 6 W | 7 W | 8 W | 9 W | 10 W |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ND | 232.93 | 283.08 | 280.78 | 281.58 | 279.35 | 280.18 | 289.08 | 288.58 | 286.31 | 298.58 |
| HFD | 212.00 | 271.88 | 269.58 | 264.28 | 268.28 | 271.31 | 277.88 | 271.00 | 276.08 | 281.00 |
| CP-9 | 214.18 | 269.98 | 262.68 | 261.48 | 267.38 | 273.31 | 275.98 | 270.48 | 275.18 | 280.48 |
| ADR-1 | 210.00 | 282.97 | 275.67 | 271.37 | 276.13 | 282.87 | 288.97 | 277.37 | 277.93 | 287.37 |

注: ND: 正常饮食组; HFD: 高脂饮食对照组; CP-9: 动物双歧杆菌 CP-9 组; ADR-1: 罗伊氏乳杆菌 ADR-1 组。

Pedret 等^[14]发现动物双歧杆菌亚种 Ba8145 (*Bifidobacterium Animalis* Ba8145, Ba8145) 及其热失活形式均能够降低腹型肥胖者的体质量指数, 改善人体肥胖症的生物标志物。Fåk 等^[16]发现罗伊氏乳杆菌 ATCC 可使小鼠体质量增长显著抑制, 而 L6798 具有相反的作用。本研究选取的动物双歧杆菌亚种 CP-9 和罗伊氏乳杆菌 ADR-1 两种益生菌同样能够显著抑制高脂饮食引起的小鼠体质量增长, 可见这两种益生菌治疗肥胖的巨大潜力。

2.2 体成分分析

研究表明身体成分的改变与健康结局具有相关性, 与身体质量指数 (Body Mass Index, BMI) 相比, 使用体脂百分比对肌少型肥胖进行分类更能预测疾

病的结局^[20]。干预后各组的体成分结果如图 3 所示。各组瘦组织质量接近 ($P>0.05$), 但各组间瘦组织体质量比不同 ($P<0.05$), 高脂饮食组瘦组织体质量比明显低于 ND 组 (0.48 vs 0.85)。高脂饮食组脂肪质量均高于 ND 组 ($P<0.05$)。CP-9 组、ADR-1 与 HFD 组相比, 脂肪质量和脂肪体质量比明显降低 (9.36 g vs 19.51 g, 0.25 vs 0.41), ADR-1 组结果与之相似 (8.53 g vs 19.51 g, 0.24 vs 0.41) ($P<0.05$), 表明高脂饮食小鼠体质量增长的主要原因是脂肪增长, 而这两种益生菌主要作用于脂肪组织, 可以有效降低肥胖小鼠的脂肪质量和脂肪体质量比, 对小鼠瘦组织含量无明显影响。上述 Fåk 等^[16]的研究结果也显示益生菌降低脂肪的显著作用。

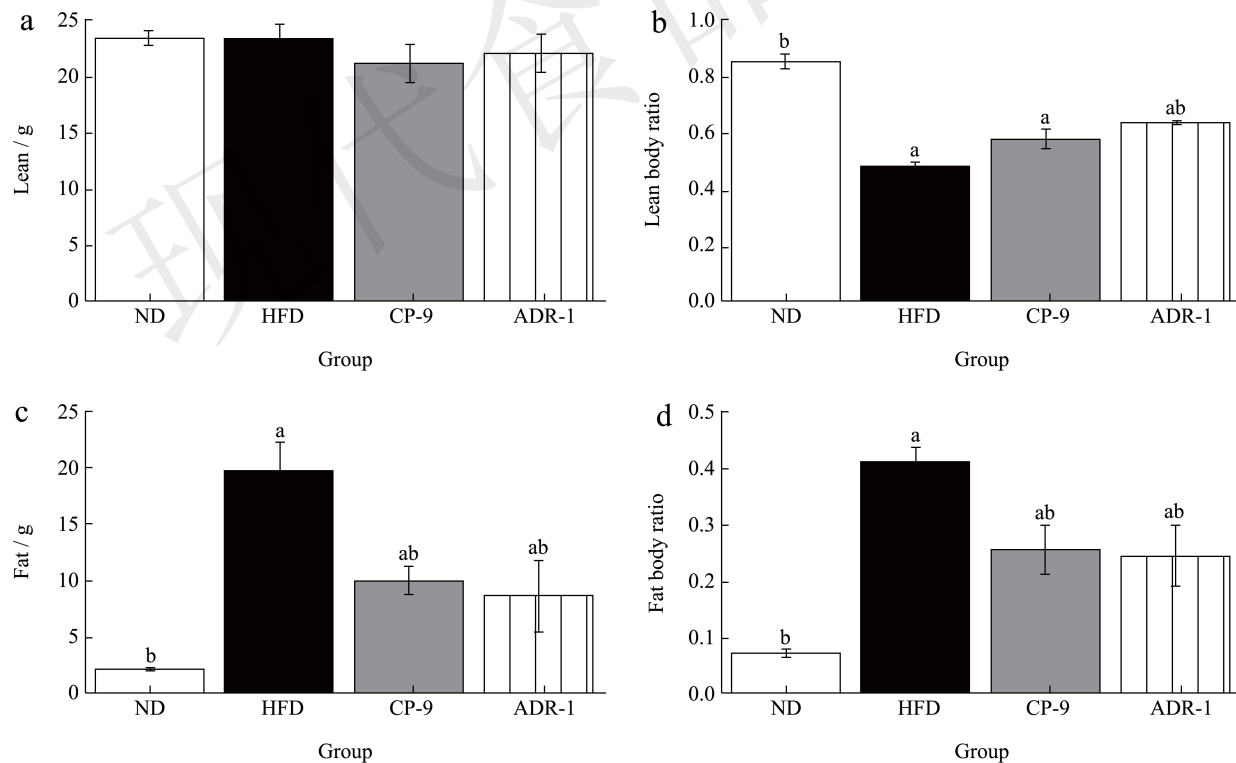


图 3 实验动物体成分结果

Fig.3 Analysis of body composition

注: n=6, (a) 瘦组织质量, (b) 瘦组织体质量比, (c) 脂肪质量, (d) 脂肪体质量比。^aP<0.05: 与 ND 组比较, ^bP<0.05: 与 HFD 组比较。

2.3 脂肪质量

脂肪的分布与诸多疾病（如高血压、肝癌、恶性肿瘤等）相关^[21,22]，因此对肥胖的防治不应只关注体脂肪量，更应关注体脂肪的分布规律。小鼠腹腔各处脂肪质量如图4所示。HFD组肾周、附睾周围、肠系膜脂肪质量均高于ND组（ $P<0.05$ ）；CP-9与HFD相比，肾周、附睾周围、肠系膜脂肪质量显著降低（-36.78%、-31.39%、-71.52% vs HFD, $P<0.05$ ），ADR-1组也出现相似的结果（-40.23%、-45.74%、-72.15% vs HFD）。脂肪系数更能清楚的表明腹部脂肪的高低。结果显示各组间脂肪系数不同，高脂饲料喂养组高于ND组（0.07 vs 0.02, $P<0.05$ ），ADR-1组低于HFD组（0.06 vs 0.07, $P<0.05$ ）。该结果表明益生菌干预可有效降低高脂饮食引起的肾周、附睾周围和肠系膜脂肪的堆积，一定程度上降低肥胖小鼠的腹腔脂肪比例。

2.4 腹腔和皮下脂肪面积

本研究进一步通过核磁共振扫描对腹腔和皮

下脂肪进行准确定位。腹部脂肪可作为肥胖危险人群的衡量指标^[23]，其比传统的BMI更能代表心血管疾病的风险^[24]，而皮下脂肪分布与肥胖和血压升高有关^[25]。图5小鼠核磁扫描各层的影像结果显示，HFD组腹腔（十字星所示区域为肾周）和皮下（五角星所示区域）的白色及灰白色的面积明显高于CP-9和ADR-1组，说明益生菌干预能够显著降低小鼠腹腔脂肪和皮下脂肪，结合图4可知，腹部脂肪的降低在肾周、附睾周围及肠系膜周围均有体现，足见益生菌改变脂肪分布的显著作用。如图6所示，HFD组腹腔、皮下脂肪堆积明显高于ND组（479.36%，820.38% vs ND, $P<0.05$ ）。益生菌干预后，CP-9组腹腔、皮下脂肪面积低于HFD组（957.34 mm² vs 1 265.28 mm², 892.56 mm² vs 1 725.98 mm²）；ADR-1组腹腔、皮下脂肪也低于HFD组（923.35 mm² vs 1 265.28 mm², 943.32 mm² vs 1 725.98 mm²），差异均具有统计学意义（ $P<0.05$ ），表明益生菌干预可以降低高脂饮食引起的皮下和腹腔的脂肪堆积，减少小鼠腹腔和皮下脂肪的分布。

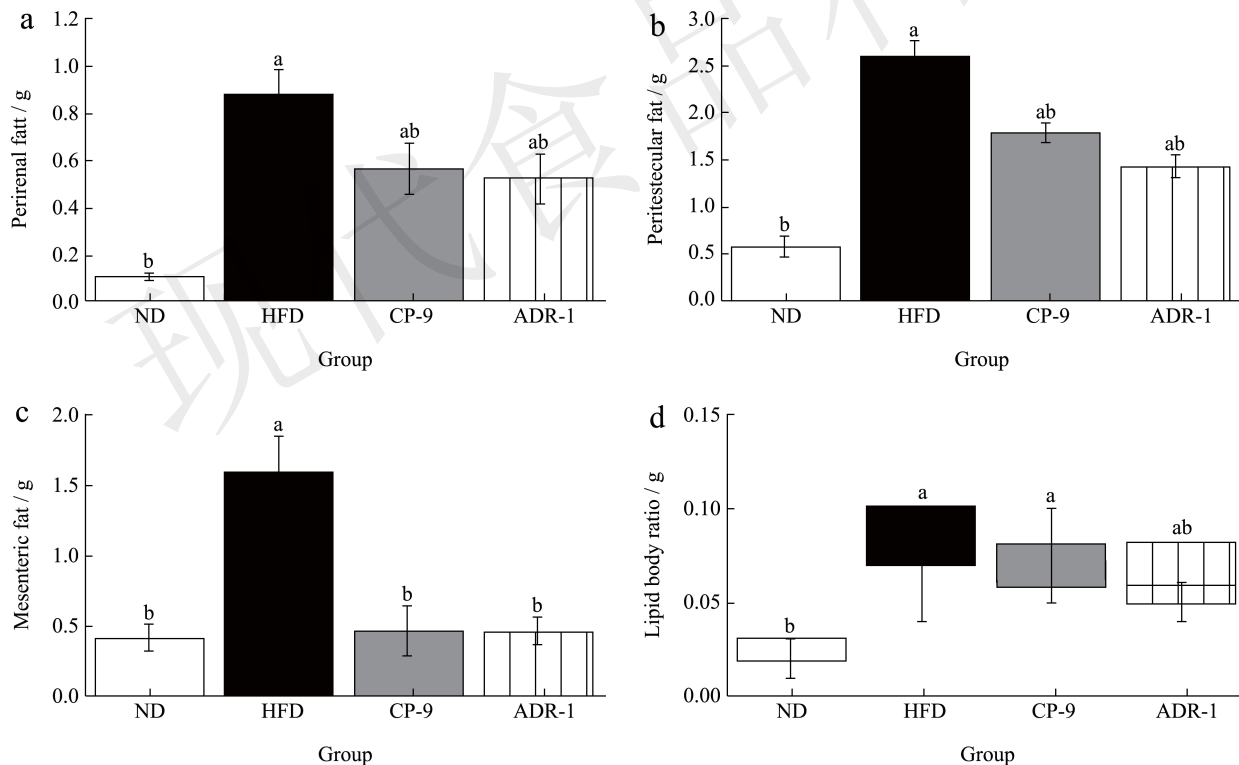


图4 脂肪质量及脂肪系数

Fig.4 Fat mass and fat coefficient

注：n=12，(a) 肾周脂肪，(b) 附睾周脂肪，(c) 肠系膜脂肪，(d) 脂肪系数。^a $P<0.05$ ：与ND组比较，^b $P<0.05$ ：与HFD组比较。

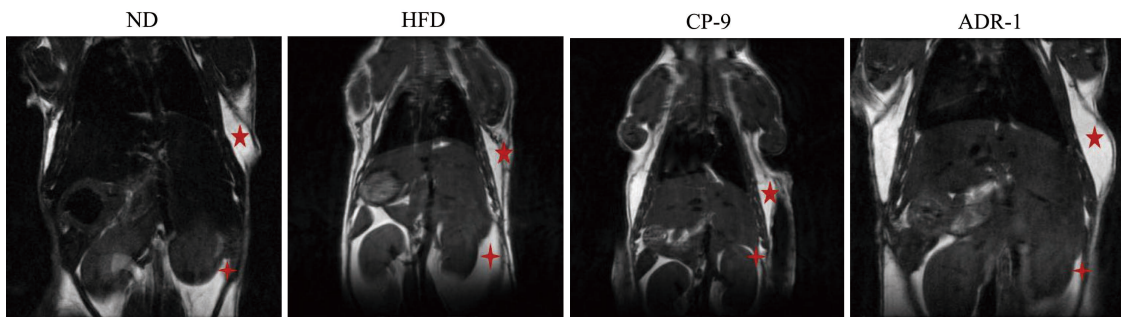


图 5 实验动物核磁共振扫描

Fig.5 Results of nuclear magnetic resonance scanning in mice (n=3)

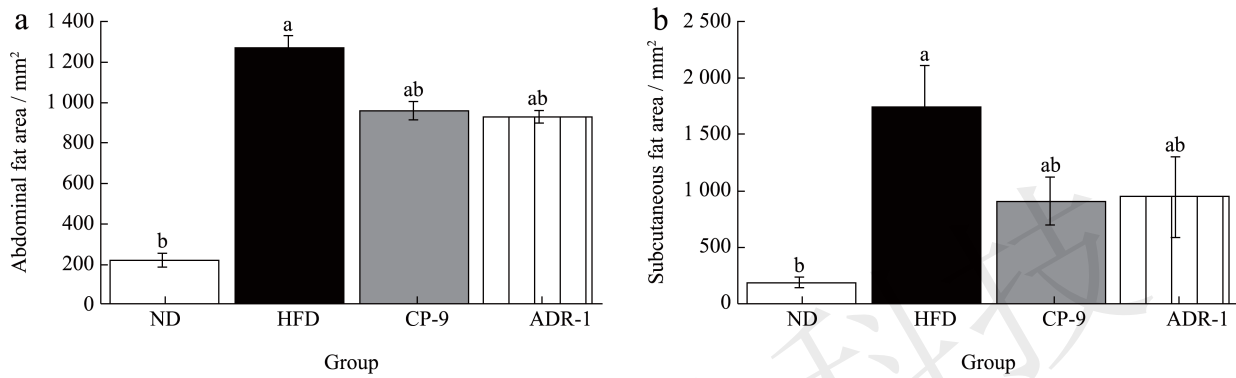


图 6 实验动物脂肪面积

Fig.6 Fat area in mice in mice

注: n=3, (a) 腹腔脂肪面积, (b) 皮下脂肪面积。^aP<0.05: 与 ND 组比较, ^bP<0.05: 与 HFD 组比较。

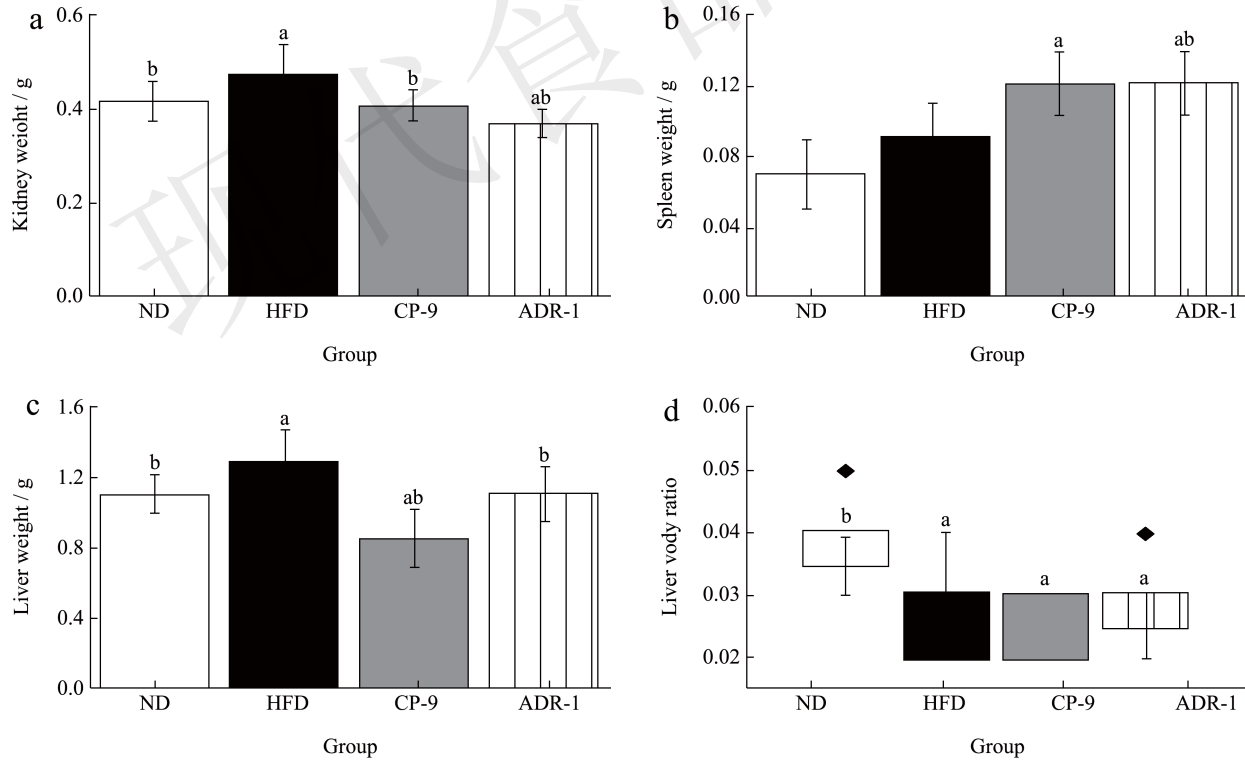


图 7 脏器质量及肝脏系数

Fig.7 Organ mass and liver coefficient

注: n=12, (a) 肾脏质量, (b) 脾脏质量, (c) 肝脏质量, (d) 肝脏系数。◆表示异常值, ^aP<0.05: 与 ND 组比较, ^bP<0.05: 与 HFD 组比较。

2.5 脏器质量及肝脏系数

如图7所示, 各组间肾脏、脾脏、肝脏质量、肝脏系数不同 ($P < 0.05$)。HFD组肾脏、肝脏质量均高于ND组 (14.63%, 17.43% vs ND, $P < 0.05$)。CP-9组、ADR-1组肾脏、肝脏质量低于HFD组, 其中, CP-9组、ADR-1组肝脏质量较HFD组分别降低35.16%和14.06% ($P < 0.05$), 表明高脂饮食可引起腹腔脏器质量发生变化, 而益生菌干预对肝脏质量增长有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。肝脏作为营养物质代谢的重要器官, 对脂代谢调节和葡萄糖稳态具有重要作用^[26], 因而本研究进一步探讨肝脏质量的变化是否伴随其结构和功能的改变。

2.6 肝组织病理切片

2.6.1 肝脏H&E染色

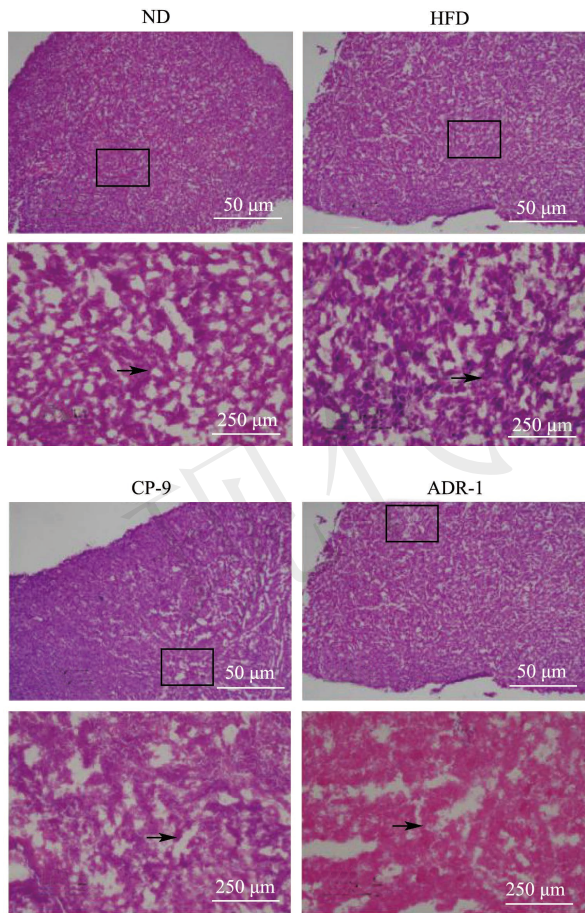


图8 肝脏H&E染色

Fig.8 Representative histopathological findings in the liver of mice (H&E)

如图8所示, ND组小鼠肝脏结构完整, 肝索以中央静脉为中心呈放射状排列 (图8中黑色框形所示即为某一中央静脉及肝索), 肝细胞形态正常, 未见脂质空泡。HFD组小鼠肝脏发生脂肪变性, 细

胞体积增大且细胞核因脂肪空泡的出现发生位置偏离 (图8中黑色箭头所示为细胞核); 肝小叶结构受损, 肝窦受压变窄甚至消失, 肝索排列紊乱。HFD组与ND组间差异显著, 可见高脂饮食造成明显的肝内细胞脂肪变性及肝损伤。而CP-9、ADR-1干预对肝脂肪变性及肝损伤有明显的改善作用, 肝细胞结构得到一定程度的恢复。

2.6.2 肝脏油红O染色

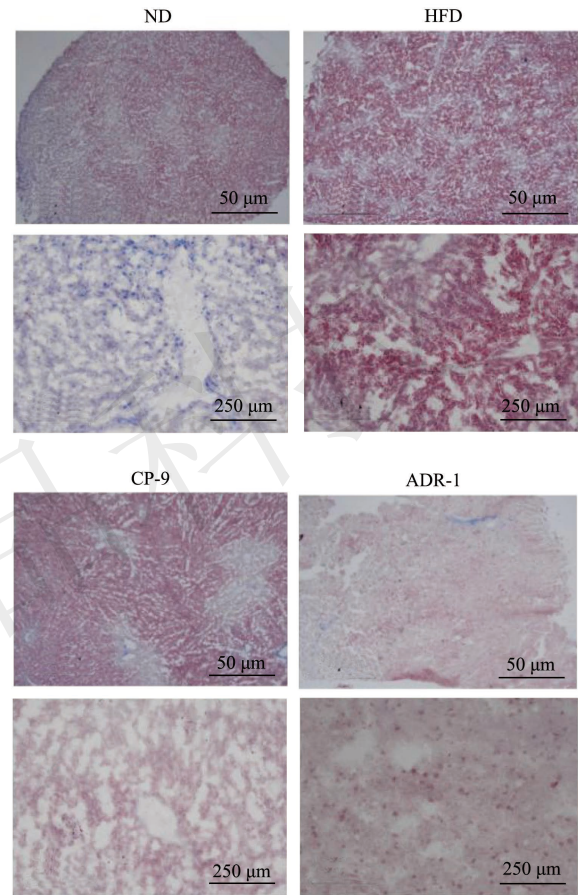


图9 肝脏ORO染色

Fig.9 Representative histopathological findings in the liver of mice (ORO)

如图9所示, ND组小鼠肝小叶结构相对完整, 基本未观察到红色脂肪滴。HFD组小鼠肝小叶结构紊乱, 能观察到大量红色脂肪滴。HFD组与ND组间差异显著, 可见高脂饮食造成明显肝内细胞脂肪变性及肝损伤。CP-9、ADR-1组小鼠肝细胞结构得到一定程度的恢复, 较HFD组能观察到红色脂肪滴的数量明显减少。

肝脏是维持机体脂质合成与分解平衡的重要场所, 但高脂饮食会打破这种平衡, 使肝脏脂质过度积累 (即肝脏脂肪变性) 和氧化应激^[27], 脂肪肝又可进一步导致肝脏发生实质性损伤, 导致血

脂升高。结合肝脏质量和肝脏组织病理切片结果可知, HFD 组肝脏存在大量脂滴, 提示高脂饮食引起肝脏质量增加和脂肪变性。而益生菌干预在降低肝脏质量的同时, 对肝脂肪变性及肝损伤也有明显的改善作用。有研究显示补充动物双歧杆菌乳酸杆菌亚种 LKM512 (*Bifidobacterium Animalis* Subsp. *lactis* lkm512, LKM512) 可改善肝脏脂质蓄积, 减轻肝脏和脂肪组织炎症^[28], 这在本研究中也体现。

2.7 肝功能指标结果

如图 10 所示, HFD 组血清中 ALT (78.70 U/L

vs 34.52 U/L) 和 AST (193.15 U/L vs 147.75 U/L) 水平显著高于 ND 组 ($P < 0.05$), 表明高脂饮食对小鼠肝脏功能造成一定程度的损伤。CP-9 干预显著降低了血清 ALT 水平 (-42.88% vs HFD, $P < 0.05$), ADR-1 干预显著降低了血清 ALT 和 AST 水平 (-67.51%, -26.58% vs HFD, $P < 0.05$), 说明 CP-9、ADR-1 对高脂饮食造成的肝脏功能损伤具有一定的修复作用, 能够在一定程度上缓解肝损伤, 这与先前的研究结果相同^[29]。综合来说, CP-9、ADR-1 益生菌干预可以减少高脂饮食导致的肝内脂肪分布, 抑制肝脂肪变性及肝损伤, 改善甚至恢复肝功能。

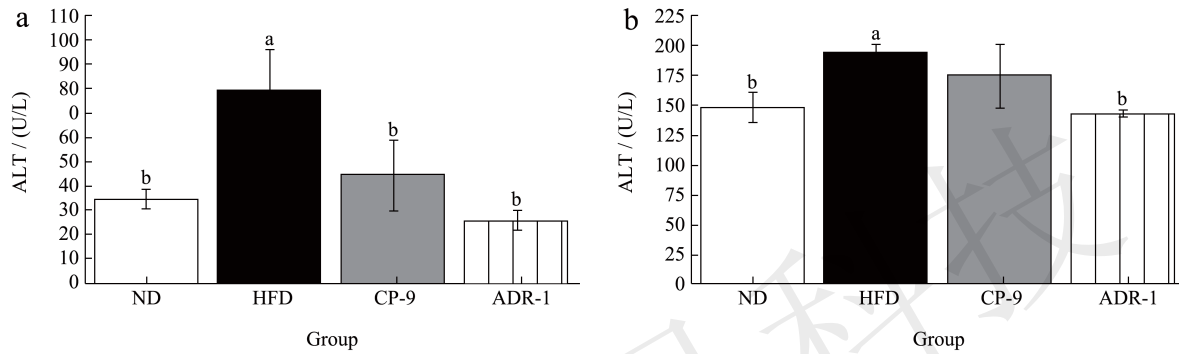


图 10 肝功能指标

Fig.10 The serum parameters of liver function

注: $n=6$, U/L, (a) 谷丙转氨酶, (b) 谷草转氨酶, ^a $P < 0.05$: 与 ND 组比较, ^b $P < 0.05$: 与 HFD 组比较。

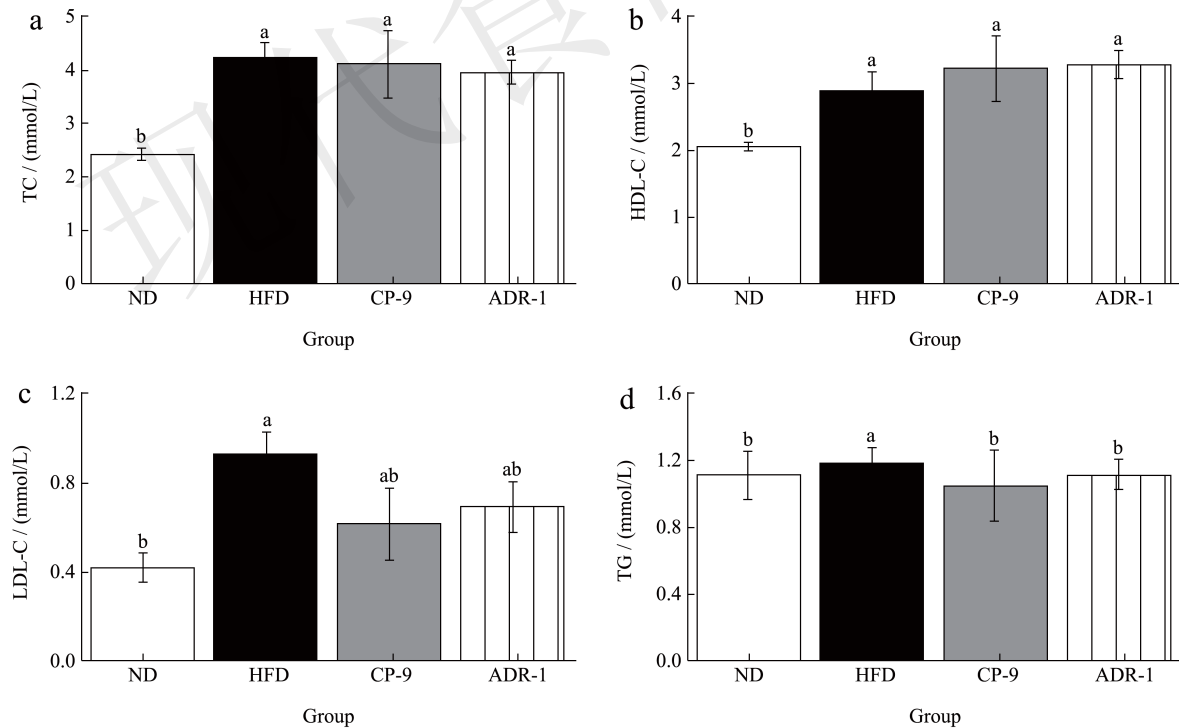


图 11 实验动物血脂结果

Fig.11 Analysis of blood lipid in mice

注: $n=6$, mmol/L, (a) 总胆固醇, (b) 高密度脂蛋白胆固醇, (c) 低密度脂蛋白胆固醇, (d) 甘油三酯, ^a $P < 0.05$: 与 ND 组比较, ^b $P < 0.05$: 与 HFD 组比较。

2.8 血脂结果

高脂饮食不仅引起小鼠体质量增加,还会造成血脂异常,通常表现为血清 TC、TG、LDL-C 水平的升高和 HDL-L 水平的降低^[30]。如图 11 所示, HFD 组 TC、HDL-C、LDL-C、TG 水平显著高于 ND 组 (76.15%, 40.39%, 124.39%, 6.36% vs ND, $P < 0.05$)。与 HFD 组相比, CP-9 组、ADR-1 组 LDL-C (-33.70%, -25.00% vs HFD)、TG (-11.11%, -5.98% vs HFD) 水平显著降低 ($P < 0.05$), TC 水平有降低趋势, HDL-C 水平有升高趋势 ($P > 0.05$)。本研究中 HFD 组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平均增高,提示了高脂饮食所致的肥胖小鼠体内存在血脂异常和脂质代谢紊乱。但未见 HDL-C 显著降低,这在其它研究中也存在。有学者通过高脂饮食建立代谢综合征小鼠模型,发现 HDL-C 水平出现显著增高,认为可能原因是由于处于代谢综合征的早期^[31]。CP-9、ADR-1 干预后,血清 LDL-C、TG 显著降低,TC 呈现降低趋势, HDL-C 呈增加趋势,这意味着血脂异常和脂质代谢得到一定改善。小鼠体内 TC 主要以 HDL-C 形式存在,本研究采用的益生菌干预对 LDL-C 有明显降低作用,但由于 LDL-C 在 TC 中占比较低,因此未观察到 TC 出现明显的降低。Li 等^[32]发现长双歧杆菌 BORI (*Bifidobacterium Longum* BORI, BORI) 和双歧杆菌 BGN4 (*Bifidobacterium Bifidum* BGN4, BGN4) 能够抑制高脂饮食引起的小鼠体质量增长,同时能够改善脂肪代谢及相关生化指标,这与本研究研究结果相似。

2.9 肝脏 FAS、PPAR γ 基因蛋白表达

FAS 对动物长链脂肪酸的合成具有关键作用,其催化丙二酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 转化为饱和的十六碳脂肪酸棕榈酸^[33],该催化途径是内源性合成十六碳以内的饱和脂肪酸的唯一途径。阻断 FAS 基因的表达或抑制 FAS 活性可减少体内脂肪酸的合成、阻断脂肪细胞的分化并减少其数量^[34]。此外, FAS 还可以通过下丘脑途径,调节促进进食作用的神经肽 Y 的分泌,从而影响食欲和食物摄入量^[35]。因而 FAS 基因具有调节脂肪代谢,降低体内脂肪的作用。图 12 显示,各组间 FAS、PPAR γ 基因的蛋白表达不同 ($P < 0.05$)。HFD 组 FAS 表达高于 ND 组,结合上述体成分、核磁扫描及解剖各部位的脂肪质量结果(图 3~6),可以印证 HFD 组小鼠体内脂肪大量沉积^[36],进而引起体质量(图 1、2)的升

高。FAS 表达的上调往往随着脂类物质摄入的增加而上调,这是对内源性脂肪酸合成和细胞增殖的一个适应表现,因而 HFD 组呈现体质量、体脂和 FAS 表达升高的状态。通过上调 FAS 的转录水平和活性引起脂肪酸合成增多,进而在肝细胞中过量沉积形成脂肪肝^[37],肝脏发生实质性变化,在病理上表现为上述图 8、9 中 HFD 组的肝细胞脂肪变性和结构损伤,同时出现上述图 10 所示的肝功能紊乱和图 11 中的血脂代谢紊乱表现,即 TG、TC 升高。

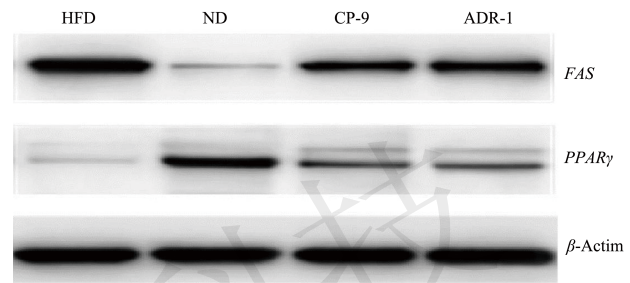


图 12 FAS、PPAR γ 基因蛋白表达结果

Fig.12 Expression of FAS and PPAR γ genes

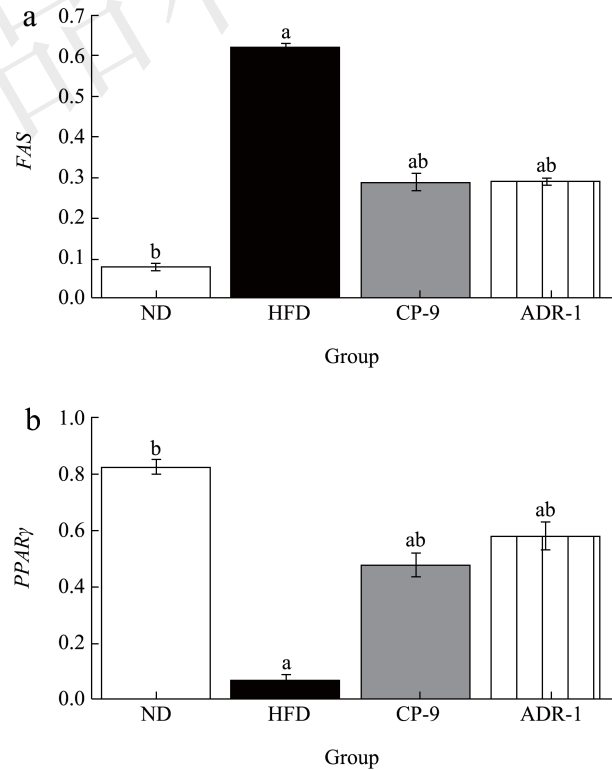


图 13 FAS、PPAR γ 基因蛋白表达结果

Fig.13 Expression of FAS and PPAR γ genes

注: $n=6$, (a) 脂肪酸合成酶, (b) 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ , ^a $P < 0.05$: 与 ND 组比较, ^b $P < 0.05$: 与 HFD 组比较。

肝脏 *FAS* 除了在脂肪酸从头合成中发挥关键作用外, 还参与 *PPARα*、*PPARγ* 激活的信号传导过程^[38,39]。*PPARγ* 是调控脂肪代谢的必要转录因子, 其信号通路对脂质代谢的调控发挥重要作用^[40]。*PPARγ* 广泛分布于肝组织、脂肪组织中, 可以控制脂肪氧化, 是影响前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化的重要因素。有研究发现高脂饮食小鼠 *PPARγ* 基因的表达可以有效减轻脂质代谢紊乱^[41]。皮下脂肪选择性地缺乏 *PPARγ* 与肥胖增加有关^[42]。*PPARγ* 通过调控与脂肪酸转运有关的酶类, 刺激肝细胞摄取脂肪酸并转化为脂酰辅酶 A, 从而调节小鼠血脂水平, 起到调控脂质代谢的作用。同时, *PPARγ* 还参与白色脂肪棕色化, 并激活棕色脂肪特异性产热基因的表达^[43]。本研究结果显示, HFD 组 *PPARγ* 基因的蛋白表达低于 ND 组 (-91.46% vs ND, $P < 0.05$), 高脂饮食显著抑制了 *PPARγ* 的表达。而经过两种益生菌干预后, CP-9、ADR-1 组 *FAS* 的蛋白表达显著低于 HFD 组 (-53.22%, -53.22% vs HFD, $P < 0.05$), *PPARγ* 基因蛋白表达显著高于 HFD 组 (571.43%, 714.29% vs HFD, $P < 0.05$), 同时血清 TG、LDL-C 水平降低, 肝脂肪变性改善, 脂质沉积减少, 因而体质量和体脂肪质量表现为降低。故推测 CP-9、ADR-1 这两种益生菌是通过调节肝脏 *FAS*、*PPARγ* 基因的蛋白表达降低 LDL-C、TG 从而缓解肝功能受损, 改善脂肪代谢异常, 降低脂质沉积起到降低体质量和体内脂肪的作用。

3 结论

综上, 高脂饮食可以引发小鼠肥胖, CP-9、ADR-1 干预能够有效缓解高脂饮食所致的小鼠体质量增加, 减少全身脂肪, 尤其降低了皮下和腹腔内脏脂肪的分布, 而不改变体内瘦组织含量。同时干预改善了肝脏脂肪变性及肝损伤, 调节肝功能和血脂代谢紊乱, 潜在机制可能是通过调节肝脏 *FAS* 和 *PPARγ* 基因蛋白的表达降低 LDL-C、TG 从而缓解肝功能受损, 改善脂肪代谢异常, 降低脂质沉积起到降低体质量和体内脂肪的作用。

参考文献

- [1] GHANEMI A, MELOUANE A, YOSHIOKA M, et al. Exercise and high-fat diet in obesity: functional genomics perspectives of two energy homeostasis pillars [J]. *Genes*, 2020, 11(8): 875-890.
- [2] LANTING S M, WAY K L, SABA A, et al. Degree of adiposity and obesity severity is associated with cutaneous microvascular dysfunction in type 2 diabetes [J]. *Microvascular Research*, 2021, 136: 104149.
- [3] TORRES-DE LA ROCHE LUZ A, STELJES I, JANNI W, et al. The Association between obesity and premenopausal breast cancer according to intrinsic subtypes - a systematic review [J]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2020, 80(6): 601-610.
- [4] 赵仲刚, 冯锐. 1639例农村成人脂肪分布与血脂水平的关系[J]. *宁夏医学杂志*, 2022, 44(10): 934-936.
- [5] MCLAUGHLIN T, LAMENDOLA C, LIU A, et al. Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity [J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2011, 96(11): E1756-1760.
- [6] ZHANG Y, CHEN T W, ZHANG X M, et al. Abdominal regional fat distribution on MRI correlates with cholecystolithiasis [J]. *Plos One*, 2014, 9(10): e109776.
- [7] AFSHIN A, FOROUZANFAR M H, REITSMA M B, et al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years [J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(1): 13-27.
- [8] VALLADALES-RESTREPO L F, SÁNCHEZ-RAMÍREZ N, USMA-VALENCIA A F, et al. Effectiveness, persistence of use, and safety of orlistat and liraglutide in a group of patients with obesity [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2023, 24(4): 535-543.
- [9] 王勇, 王存川, 朱晒红, 等. 中国肥胖及2型糖尿病外科治疗指南(2019版) [J]. *中国实用外科杂志*, 2019, 39(4): 301-306.
- [10] 苏艳华. 成功与失败限制性饮食者抑制控制力的脑机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [11] KAIKKONEN K M, KORPELAINEN R, VANHALA M L, et al. Long-term effects on weight loss and maintenance by intensive start with diet and exercise [J]. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 2023, 33(3): 246-256.
- [12] CANI P D, OSTO M, GEURTS L, et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity [J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 279-288.
- [13] LI Y, LIU Q, PENG C, et al. Both gut microbiota and differentially expressed proteins are relevant to the development of obesity [J]. *Biomed Research International*, 2020, 2020: 5376108.
- [14] PEDRET A, VALLS R M, CALDERÓN-PÉREZ L, et al. Effects of daily consumption of the probiotic *bifidobacterium animalissub sp. lactis* CECT 8145 on anthropometric adiposity biomarkers in abdominally obese subjects: a randomized controlled trial [J]. *International Journal of Obesity*, 2019, 43(9): 1863-1868.

- [15] CZAJECZNY D, KABZIŃSKA K, WÓJCIAK R W. Does probiotic supplementation aid weight loss? A randomized, single-blind, placebo-controlled study with *bifidobacterium lactis* BS01 and *Lactobacillus acidophilus* LA02 supplementation [J]. Eat Weight Disord, 2021, 26(6): 1719-1727.
- [16] FÁK F, BÄCKHED F. *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe^{-/-} Mice [J]. Plos ONE, 2012, 7(10): 1-8.
- [17] TSAI H Y, WANG Y C, LIAO C A, et al. Safety and the probiotic potential of *bifidobacterium animalis* CP-9 [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(5): 2211-2228.
- [18] HSIEH F C, LEE C L, CHAI C Y, et al. Oral administration of *lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats [J]. Nutrition & Metabolism, 2013, 10(1): 35.
- [19] MIAO Z, ZHENG H, LIU W H, et al. *Lacticaseibacillus paracasei* K56 attenuates high-fat diet-induced obesity by modulating the gut microbiota in mice [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2023, 15: 844-855.
- [20] FENGNING C, SIYU C, XIN Y, et al. Sarcopenic obesity predicts negative health outcomes among older patients with type 2 diabetes: the ageing and body composition of diabetes (ABCD) cohort study [J]. Clinical Nutrition, 2022, 41(12): 2740-2748.
- [21] MONICA C, PAMELA C A, TAEHYUNG K, et al. Fat-containing adnexal masses on MRI: solid tissue volume and fat distribution as a guide for O-RADS score assignment [J]. Abdominal Radiology, 2022, 48(1): 358-366.
- [22] LI Z Y, TAN Y T, WANG J, et al. Dose-response relationship between fat distribution and liver cancer incidence: a prospective cohort study in Chinese men [J]. Cancer Epidemiology, 2022, 76: 102191.
- [23] DOROTHEA K, JOSEFINE L, TIBOR K. The weight problem: overview of the most common concepts for body mass and fat distribution and critical consideration of their usefulness for risk assessment and practice [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(21): 11070-11083.
- [24] TANAKA M, OKADA H, HASHIMOTO Y, et al. Distinct associations of intraperitoneal and retroperitoneal visceral adipose tissues with metabolic syndrome and its components [J]. Clinical Nutrition, 2021, 40(5): 3479-3484.
- [25] ZHANG Y X, WANG S R, ZHAO J S, et al. Truncal pattern of subcutaneous fat distribution is associated with obesity and elevated blood pressure among children and adolescents [J]. Blood Press, 2018, 27(1): 25-31.
- [26] EDUARDO G, LORENA M, BLANCA R, et al. Grape seed extract supplementation modulates hepatic lipid metabolism in rats. Implication of *PPARβ/δ* [J]. Food & Function, 2022, 21: 11353-11368.
- [27] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. Nature Medicine, 2018, 24(7): 908-922.
- [28] MA L, ZHENG A, NI L, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* lkm512 attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance through the modification of gut microbiota in high-fat diet-induced obese mice [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2022, 66(3): e2100639.
- [29] JOUNG H, CHU J, KIM B-K, et al. Probiotics ameliorate chronic low-grade inflammation and fat accumulation with gut microbiota composition change in diet-induced obese mice models [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(3): 1203-1213.
- [30] LI H Z, LIU F, LU J J, et al. Probiotic mixture of *lactobacillus plantarum* strains improves lipid metabolism and gut microbiota structure in high fat diet-fed mice [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 512-528.
- [31] 郑富莉. 罗伊氏乳杆菌对高脂饮食诱导的代谢综合征小鼠的干预研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [32] LI Z P, JIN H, OH S Y, et al. Anti-obese effects of two *lactobacilli* and two *bifidobacteria* on ICR mice fed on a high fat diet [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 480(2): 222-227.
- [33] ANGELES T S, HUDKINS R L. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors [J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2016, 11(12): 1187-1199.
- [34] LIU L H, WANG X K, HU Y D, et al. Effects of a fatty acid synthase inhibitor on adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2004, 25(8): 1052-1057.
- [35] CHA S H, HU Z, LANE M D. Long-term effects of a fatty acid synthase inhibitor on obese mice: food intake, hypothalamic neuropeptides and UCP3 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 317(2): 301-308.
- [36] ZHANG M, WANG C, WANG C, et al. Enhanced AMPK phosphorylation contributes to the beneficial effects of *lactobacillus rhamnosus* GG supernatant on chronic-alcohol-induced fatty liver disease [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2015, 26(4): 337-344.
- [37] SHU Z, GAO Y, ZHANG G, et al. A functional interaction between *Hippo-YAP* signalling and SREBPs mediates hepatic steatosis in diabetic mice [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(5): 3616-3628.

- [38] JENSEN-URSTAD A P, SENENKOVICH C F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(5): 747-753.
- [39] LODHI I J, YIN L, JENSEN-URSTAD A P, et al. Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and *PPAR γ* activation to decrease diet-induced obesity [J]. *Cell Metabolism*, 2012, 16(2): 189-201.
- [40] ZHAO Y, MA D X, WANG H G, et al. Lycopene prevents DEHP-induced liver lipid metabolism disorder by inhibiting the HIF-1 α -Induced *PPAR α /PPAR γ /FXR/LXR* System [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2020, 68(41): 11468-11479.
- [41] ZHANG M, SHAO Y, GAO B, et al. Erchen decoction mitigates lipid metabolism disorder by the regulation of *PPAR γ* and *LPL* gene in a high-fat diet C57BL/6 mice model [J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2020: 9102475-9102482.
- [42] XU L, MA X, VERMA N K, et al. Ablation of *PPAR γ* in subcutaneous fat exacerbates age-associated obesity and metabolic decline [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(2): e12721.
- [43] BARGUT T C L, SOUZA-MELLO V, AGUILA M B, et al. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models [J]. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2017, 31(1):20160051-20160063.