

喂饲 *Lactobacillus casei* Zhang 对大鼠体内 脂质代谢的影响*

云月英 王立平 张和平** 陈永福 孟和毕力格

(教育部乳品生物技术与工程重点实验室 内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018)

摘要: 从内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗传统酸马奶中分离筛选到 1 株降胆固醇功效较好的乳杆菌 *Lactobacillus casei* Zhang。用 *Lb. casei* Zhang 灌胃高脂血症模型大鼠研究其对血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的影响。结果表明: 灌胃 14 d 后, *Lb. casei* Zhang 热致死菌体组大鼠血清中 TC 浓度较对照组显著降低 ($P < 0.01$), TG 浓度虽有降低但不呈显著性, 同时 HDL-C 浓度显著升高 ($P < 0.05$); *Lb. casei* Zhang 活菌体组大鼠血清中 TC、TG 浓度均有所降低, HDL-C 浓度升高, 但未呈显著性。灌胃 28 d 后, *Lb. casei* Zhang 热致死菌体组大鼠血清中 TC 浓度较对照组显著降低 ($P < 0.05$), *Lb. casei* Zhang 活菌体组 TC 浓度及两组 TG、LDL-C 浓度降低, 但差异不显著, HDL-C 未发生明显的改变。*Lb. casei* Zhang 热致死菌体组和活菌体组粪便中的胆酸含量均增高, 但只有热致死菌体组差异显著 ($P < 0.05$)。通过实验表明 *Lb. casei* Zhang 通过菌体对胆固醇的吸收吸附及减少肝肠循环中的胆酸来达到降血脂的功效。

关键词: *Lb. casei* Zhang, 血清脂质, 粪便中的胆酸

中图分类号: TS252.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0060-05

Effect of Administration of *Lactobacillus casei* Zhang on Serum Lipids and Fecal Steroids in Hypercholesterolemic Rats*

YUN Yue-Ying WANG Li-Ping ZHANG He-Ping** CHEN Yong-Fu MEHE-BiLiGe

(Food Science and Engineering College, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018)

Abstract: Cholesterol-degrading strains was isolated from traditional koumiss. The effects of *Lb. casei* Zhang on the total serum cholesterol (TC)、triglycerid (TG)、high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C)、low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) were investigated in artificially-induced hyperlipemic rats. The results showed that only heat-killed cells of *Lb. casei* Zhang significantly reduced serum TC ($P < 0.01$) and raised HDL-C on d 14 ($P < 0.05$); heat-killed cells of *Lb. casei* Zhang can significantly decreased serum TC on d 28 ($P < 0.05$), while viable cells of *Lb. casei* Zhang can also reduced it but not significantly; TG and LDL-C reduced but not significantly and HDL-C unchanged of two groups. Fecal Steroids of heat-killed cells of *Lb. casei* Zhang group significantly rised ($P < 0.05$). The results showed that the hypocholesterolemic effect of *Lb. casei* Zhang was attributed to its ability to bind and assimilate cholesterol and to suppress the reabsorption of bile acids into the enterohepatic circulation.

Key words: *Lactobacillus casei* Zhang, Serum lipids, Fecal steroids

*教育部科学技术研究重点项目 (No. 205080)

教育部春晖计划项目 (No. Z2004-2-15009)

国家自然科学基金项目 (No. 30560097)

**通讯作者 Tel: 0471-4319940, E-mail: Hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2005-08-09, 修回日期: 2005-09-11

血液中高胆固醇含量通常被认为是诱发心脑血管疾病的危险因素。降低高血脂人群体内总胆固醇和低密度脂蛋白含量能减少患心血管疾病的机率^[1]。服用含有嗜酸乳杆菌等益生菌的乳制品能调节血清胆固醇这一作用被越来越多的研究者所证实^[2]。可能的机理是菌体细胞与膳食中的胆固醇相结合或者是通过小肠中胆盐解共轭作用的结果。然而,也有研究者得出相反的结论^[3]。究其原因可能与酸奶乳酸菌菌种、菌株、实验条件、实验动物种类和实验材料,饲喂期限以及饲料组成等各种因素有密切关系。

Danielson、Gilliland 和 Taranto 等认为,在体外介质中降胆固醇量高的菌株在体内试验中也具有较好的降胆固醇功效^[4~6]。我们先前已对 *Lb. Zhang* 体外降胆固醇作用和胆盐解共轭作用进行了研究,该菌株在生长过程中显现了较高的降胆固醇特性,并具有一定的胆盐水解酶活性且其热灭活菌体也具有一定脱除介质中胆固醇的作用。

本研究的目的是确定喂饲含有 *Lb. casei Zhang* 活菌体和热致死菌体的脱脂乳对饲喂高脂饲料的大鼠血清胆固醇和粪便中排泄的胆酸含量的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

本研究所选菌株 *Lb. casei Zhang* 分离自内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗以传统方法酿制的酸马奶。经传统鉴定方法及 16S rDNA 序列同源性分析,将其判定为 *Lb. casei* subsp. *casei*^[7]。

1.2 培养基

MRS 液体培养基: Bacto peptone 10 g, Lab-lemco-powder 10 g, Yeast extract 5 g, D-葡萄糖 20 g, Tween-80 1 g, K_2HPO_4 2 g, 醋酸钠 5 g, 柠檬酸三钠 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 mg, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 54 mg, pH 6.5, 定容至 1,000 mL。BCP 琼脂培养基: 酵母粉 2.5 g, 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 1 g, Tween-80 1 g, L-半胱氨酸 0.1 g, 溴甲酚紫 0.04 g, 琼脂 15 g, pH 6.9, H_2O 定容至 1,000 mL。

1.3 实验菌液的制备

将乳杆菌 *Lb. casei Zhang* 接种于 MRS 培养液, 37℃ 培养 18 h, 经离心收集菌体, 加入 10% 灭菌脱脂乳液, 并调整其菌数约为 2.0×10^9 cfu/mL, 混匀后用 BCP 琼脂培养基 (Plate Count Agar with Brom Cresol Purple, Japan Nissui) 倾注培养计活菌数。将脱脂乳菌悬液分为两等份, 其中一份置于 50℃ ~ 55℃, 2 h 后转到 100℃ 加热 10 min 灭活制成热致死菌体脱脂乳液; 另一份作为活菌脱脂乳液, 然后按每日喂饲量分装于灭菌冷冻瓶中置 -85℃ 冰柜保存。

1.4 实验动物及饲养条件

雄性 wistar 系断乳大白鼠 44 只, 4 周龄, 体重 103.49 ± 17.83 g (购自内蒙古大学实验动物研究中心)。大鼠购入后逐个称体重, 在室温 18℃ ~ 20℃、相对湿度 $50 \pm 5\%$ 的环境中自由采食水和普通营养饲料, 饲养至第 7 d。再次称体重, 按平均体重约相等分为 4 组。实验分组、饲料配方详见表 1、表 2 和表 3。

从第 8d 开始, 各实验组按照表 3 所设方式以每只大鼠 20 g/日饲料量, 随体重增加而增量饲养。并在每日早晨供饲料 1 h 后, 分别将已制备好的活菌脱脂乳液、热致死菌体脱脂乳液、灭菌 10% 脱脂乳液和灭菌生理盐水按 2 mL/只进行灌服。在试验的第 14d 和 28d, 各试验组分别取 6 只大鼠采用尾静脉采血用于血清脂质指标测定。

表 1 基础饲料配方

成分	面粉	米粉	玉米	麸皮	豆科	骨粉	鱼粉	食盐	维生素	合计
含量%	20.0	10.0	20.0	25.0	20.0	2.0	2.0	0.9	0.1	100

注：内蒙古大学实验动物研究中心提供

表 2 高脂饲料配方

成分	基础饲料	维 生 素	猪 油	胆 固 醇	牛磺胆酸钠
含量%	88.375	1.000	10.000	0.500	0.125

注：根据内蒙古大学实验动物研究中心高脂饲料配方和桥本（1998）介绍的配方配制

表 3 实验分组及饲养方式

实 验 组	大白鼠数量（只）	饲养方式
<i>Lb. casei</i> Zhang 热致死菌体组	10	高脂饲料 + <i>Lb. casei</i> Zhang 活菌液
<i>Lb. casei</i> Zhang 活菌组	11	高脂饲料 + <i>Lb. casei</i> Zhang 热致死菌液
高脂饲料组	11	高脂饲料 + 灭菌 10% 脱脂乳液
普通营养饲料组	11	普通营养饲料 + 灭菌生理盐水

1.5 血液样品采集与分析

在正式实验开始前和实验后第 14d，对禁食一夜后的大鼠采用尾静脉采血，凝血后离心（3,000 r/min、10 min）分离血清，用 Pronto Evolution 全自动生化仪（意大利）测定血清总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）含量。实验后第 28d 经禁食一夜，采用心脏采血，重复以上指标的测定。

1.6 粪便中胆酸含量的测定

在实验的最后 3 d，每天随机收集各处理组的粪便，将其真空冷冻干燥后，分别称取样品 0.5 g，加入 5 mL 去离子水研磨离心（4,000 r/min、10 min），取上清液用 Pronto Evolution 全自动生化仪测定总胆汁酸含量^[6]。

1.7 数据处理

采用最小显著性方差分析（ $P=0.05$ ）

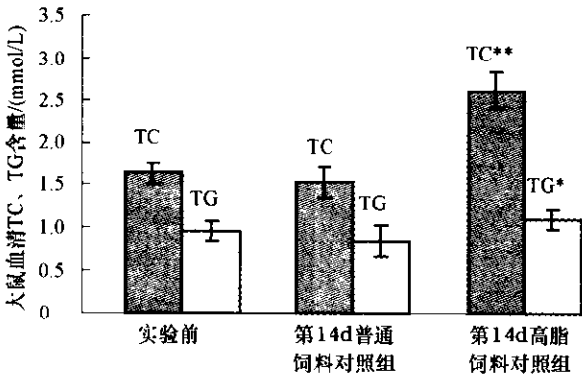


图 1 各对照组血清 TC、TG 含量变化情况
n=6, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

2 结果分析

2.1 高血脂动物模型的建立

在实验开始前及实验后第 14 d 时投喂高脂饲料组和普通营养饲料组大鼠血清总胆固醇和甘油三酯含量测定结果，如图 1 所示。

实验前大鼠血清 TC、TG 含量与实验后第 14 d 的普通营养饲料组相比较无显著相差异，而投喂高脂饲料对照组大鼠血清 TC、TG 含量与普通营养饲料组比较显著升高（ $P<0.01$ ， $P<0.05$ ），

说明已经形成高血脂模型。

2.2 实验第 14d 和第 28d 大鼠血清脂质的测定结果

本实验中选用的乳杆菌经过人工消化耐受性、体外胆汁酸耐受性和胆固醇吸附作用实验选择，在体外实验中均表现良好的耐受性和吸附胆固醇的能力。灌胃 14 d 后，*Lb. casei* Zhang 活菌组和 *Lb. casei* Zhang 热致死菌组与高脂饲料对照组相比，大鼠血清中的 TC 浓度均有所下降，同时 HDL-C 浓度有所上升，但只有 *Lb. casei* Zhang 热致死菌组与高脂饲料对照组之间的差异显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)，两组的 TG 浓度虽有下降但都不显著。灌胃 28 d 后，*Lb. casei* Zhang 热致死菌组大鼠血清中的 TC 浓度与高脂饲料对照组相比，呈现显著降低趋势 ($P < 0.05$)；*Lb. casei* Zhang 活菌体组大鼠血清中的 TC 浓度及各组的 TG 浓度和 LDL-C 浓度虽略有下降，但与高脂饲料对照组相比，差异并不显著；同时各组间血清中 HDL-C 含量差异不显著。结果如表 4、表 5 所示。

表 4 灌服乳杆菌第 14d 时的大鼠血清脂质浓度测定结果

项 目	热致死菌体组	活菌体组	高脂饲料对照组	普通饲料对照组
TC	2.11 ± 0.24 **	2.40 ± 0.28	2.59 ± 0.21	1.54 ± 0.18
TG	0.86 ± 0.07	0.99 ± 0.15	1.03 ± 0.13	0.85 ± 0.20
HDL-C	0.56 ± 0.08 *	0.49 ± 0.05	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.02

注：n=6, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 高脂饲料对照对乳杆菌实验组

表 5 灌服乳杆菌第 28d 时的大鼠血清脂质浓度测定结果

项 目	热致死菌体组	活菌体组	高脂饲料对照组	普通饲料对照组
TC	1.82 ± 0.26 *	1.86 ± 0.16	2.09 ± 0.26	1.70 ± 0.16
TG	0.87 ± 0.13	0.93 ± 0.09	0.96 ± 0.11	0.90 ± 0.06
HDL-C	0.42 ± 0.06	0.40 ± 0.07	0.44 ± 0.06	0.51 ± 0.05
LDL-C	1.36 ± 0.18	1.44 ± 0.28	1.52 ± 0.19	1.23 ± 0.14

注：n=6, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 高脂饲料对照对乳杆菌实验组

本实验中，采用 Wawase^[5]报道的动脉硬化指数计算方法，计算了实验后 14 d 和 28 d 的各组大鼠动脉硬化指数及 HDL-C/TC 比值，其结果见表 6。

表 6 灌服乳杆菌对小鼠动脉硬化指数与 HDL-C/TC 比值的影响

处理组	动脉硬化指数 AI = (TC-HDL-C) / HDL-C		HDL-C/TC	
	14d	28d	14d	28d
普通饲料对照组	2.19 ± 0.33	2.37 ± 0.14	0.31 ± 0.07	0.30 ± 0.02
高脂饲料对照组	4.51 ± 0.45	3.87 ± 1.59	0.18 ± 0.03	0.21 ± 0.06
<i>Lb. casei</i> Zhang 活菌体组	4.32 ± 1.30 *	3.75 ± 1.24	0.20 ± 0.05	0.22 ± 0.07
<i>Lb. casei</i> Zhang 热致死菌体组	2.63 ± 0.51 **	3.35 ± 0.58	0.26 ± 0.07 *	0.23 ± 0.05

注：n=6, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 高脂饲料对照对乳杆菌实验组

动脉硬化指数 (The atherogenic index AI) 是反映心血管疾病易患程度的一个指标。AI 越高，心血管疾病的易患程度越高。表 6 表明，高脂饲料饲喂的大鼠的 AI 值大大增加。而灌胃 *Lb. casei* Zhang 菌 (活菌和死菌) 14 d 后，AI 值显著下降 ($P < 0.05$ $P < 0.01$)；灌胃第 28d 后，各组间 AI 值差异不显著 ($P > 0.05$)。

HDL-C 被誉为机体内“好”胆固醇的象征。它可以防止脂类物质在血管壁的沉积，从而对心血管系统起到保护作用。HDL-C/TC 比值反映了 HDL-C 在 TC 中的比例，该比

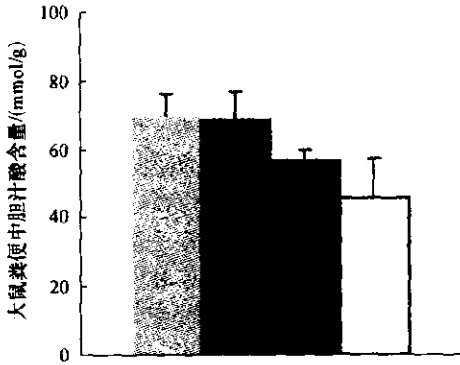


图2 3d内大鼠粪便中胆汁酸含量测定结果

泄量虽高于高脂饲料组,但不呈显著性。

3 讨论

在本研究中, *Lb. casei* Zhang 活菌体和热致死菌体均能减少喂饲高脂饲料大鼠血清中总胆固醇和低密度脂蛋白含量。同时, *Lb. casei* Zhang 热致死菌体较活菌体更早、更好的显现降血脂功效,说明 *Lb. casei* Zhang 热致死菌体主要通过吸附肠道内的胆固醇、胆酸,减少其吸收量从而达到降血脂的功效。而 *Lb. casei* Zhang 活菌体是通过同化吸收及胆盐解共轭作用进行的,因此,降胆固醇的效果显现的较慢。在本试验中,菌株 *Lb. casei* Zhang 对胆盐的解共轭作用使用使得脱结合的胆酸量增加,减少了肝肠循环中的胆酸从而达到降血脂的功效。

另外 Jhon (1997) 报道,只要喂某种高脂饲料的期限达到一定水平,各种动物的胆固醇代谢能达到一个新的稳态。小鼠的这个期限为3周,大鼠为4周^[4]。本实验中,在整个试验期内未改变灌服剂量的情况下,实验进行至第28d时菌株 *Lb. casei* Zhang 对大鼠血清胆固醇等脂质含量的影响效果呈减弱趋势。这可能是实验组大鼠在持续长时间摄入高脂饲料的状态下,其机体脂质代谢活动达到了一个新的稳定状态,从而减弱了乳酸菌对大鼠血清脂质含量上升的抑制效果。实验中每只大鼠灌服固定量的菌悬液,未进行随体重增加而调整灌服剂量的试验,因此对实验的菌体剂量与大鼠体重及降血脂功效之间是否存在联系有待进一步探讨。同时该菌株的其它特性,如在肠道中的粘附和定植、对其他微生物的拮抗作用及对抗生素的敏感性是否对其发挥降胆固醇的功效存在影响也有待进一步研究。

参考文献

- [1] 韩俊华,盛晓付. 中国乳品工业, 2002, 30 (3): 18-20.
- [2] Schaarmann G, Schneider J, Zorn A, et al. American Clinical Nutrition, 2001, 73: 496S.
- [3] Deroos N M, Schouten G, Katan M B. European Clinical Nutrition, 1999, 53: 277-280.
- [4] Danielson A D, Peo K M, Shahani A J, et al. Animal Science, 1989, 67: 966-974.
- [5] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Applied Environmental Microbiology, 1985, 33: 15-18.
- [6] Taranto M P, Medici M, Perdigon G, et al. Dairy Science, 2000, 83: 401-403.
- [7] 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 中国乳品工业, 2005, 33 (6): 4-9.
- [8] Kim M, Shin H K. Nutrition, 1998, 128: 1731-1736.
- [9] Kawase M, Hashimoto H, Hsoda M, et al. Dairy Science, 2000, 83: 255-263.
- [10] Jhon M. American Clinical Nutrition, 1997, 65: 1581-1589.

值越高对健康越有利。从表6可以看出,喂饲大鼠高脂饲料14d后 HDL-C/TC 值显著降低,喂饲 *Lb. casei* Zhang 菌体后, HDL-C/TC 比值有所回升,但只有 *Lb. casei* Zhang 热致死菌体组与高脂饲料对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。灌胃第28d后,各组间 HDL-C/TC 比值差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 大鼠粪便中胆汁酸的测定结果

大鼠粪便中胆汁酸的测定结果见图2。*Lb. casei* Zhang 热致死菌体组粪便中胆汁酸的排泄量显著高于高脂饲料组 ($P < 0.05$), *Lb. casei* Zhang 活菌体组粪便中胆汁酸的排泄量虽高于高脂饲料组,但不呈显著性。