

植物乳杆菌 Lp2 对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

陈奕颖^{1,2}, 张楠^{1,2}, 田圆^{1,2}, 王宇^{1,2}, 李侠^{1,2}, 王玉华^{1,2,3*}

(¹吉林农业大学食品科学与工程学院 长春 130118

²吉林农业大学 吉林省食品生物制造创新中心 长春 130118

³国家大豆产业技术体系加工研究室 长春 130118)

摘要 目的:研究植物乳杆菌 Lp2 对急性肝损伤小鼠的保护作用。方法:从中国传统发酵食品中分离到植物乳杆菌 Lp2, 研究其改善脂多糖(LPS)诱导的小鼠肝脏炎症的作用机制。将 30 只昆明种小鼠随机分为 3 组:对照组、模型组(LPS 组)和干预组(LPS + Lp2 组)。每日对干预组小鼠补充植物乳杆菌 Lp2, 4 周后,对模型组和干预组小鼠腹腔注射 LPS, 构建急性炎症模型。通过对生化指标和肝组织病理学的评价,观察小鼠肝损伤情况。采用 RT-PCR 和免疫印迹分析肠道 mRNA 水平、蛋白表达水平。结果:植物乳杆菌 Lp2 可降低 LPS 诱导的急性炎症小鼠血清、肝脏和回肠组织中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素- 1β (IL- 1β)、白介素-6(IL-6)、一氧化氮(NO)、环氧合酶-2(COX-2)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)和 LPS 水平,升高超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)的水平,明显改善 LPS 诱导的急性肝损伤。RT-PCR 和免疫印迹分析表明,LPS 引起小鼠肠道上皮紧密连接蛋白表达显著下降,植物乳杆菌 Lp2 明显上调紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达,改善 LPS 炎症小鼠的肠道通透性,肝脏 LPS 显著降低。结论:植物乳杆菌 Lp2 通过抑制氧化应激、炎症反应和调节肠道通透性对 LPS 诱导的急性肝损伤具有保护作用。

关键词 植物乳杆菌; 脂多糖; 急性肝损伤; 炎症; 肠道通透性

文章编号 1009-7848(2022)08-0091-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.010

近年来,肝损伤的发病率呈逐年上升的趋势。饮食习惯、药物摄入和环境等因素都会引起肝损伤发生,初期表现为肝细胞脂肪累积,即脂肪变性或脂肪肝,严重的会导致肝脏炎症、纤维化、肝硬化,甚至肝癌^[1]。研究表明,酒精和高脂饮食会导致血液中脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)的增加,从而导致肝损伤^[2-3]。以往的研究也发现,肠源性内毒素与肝损伤有关^[4]。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,由于肠道屏障功能完整,因此通常只能有微量的 LPS 穿透肠上皮^[5]。LPS 过度的泄露可能引发系统性炎症反应,导致肝脏、肠道等多个器官的损伤、休克,甚至死亡^[6]。传统肝损伤治疗方式是使用药物治疗或者肝移植,由于肝供体的缺失以及存在的药物残留、副作用等问题,需要更

安全、高效的方法来减轻肝损伤对人类的危害。

乳酸菌在与人们生活相关的工、农业、医药等方面中有极高的应用价值。乳酸菌作为益生菌,具有多种生物学作用,例如:在宿主肠道中维持肠道平衡^[7],减少与肥胖相关的代谢性疾病的发生率^[8],提高机体免疫力^[9],预防癌症^[10],起到抗炎和抗氧化等作用^[11]。它在缓解机体炎症方面的作用机制包括调节炎症因子的表达,促进抗氧化因子表达,增加机体免疫力,调节肠道菌群平衡,修复机械屏障,降低肠道通透性,保护肠道屏障。先前的研究表明,植物乳杆菌 LP104 可以有效降低高脂引发肝损伤小鼠的 LPS 水平,显著降低炎症因子肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达和增加氧化应激指标的表达^[12]。Wang 等^[11]研究结果显示,鼠李糖乳杆菌 LGG 对急性酒精诱导的小鼠肠道完整性和肝损伤具有缓解作用。

植物乳杆菌 Lp2 (*Lactobacillus plantarum* Lp2)是从东北酸菜中分离、筛选、鉴定得到的一株乳酸菌。前期研究发现,植物乳杆菌 Lp2 具有较好的益生特性,具有较好的耐酸、胆盐能力,在体外

收稿日期: 2021-08-06

基金项目: 国家重点研发计划项目战略性国际科技创新合作重点专项(2017YFE0105400);吉林省科技厅重点研发项目(20200403163SF)

作者简介: 陈奕颖(1994—),女,硕士生

通信作者: 王玉华 E-mail: yuhua-ww@163.com

模拟胃肠液和 Caco-2 细胞中具有较好的生存能力和黏附能力以及抑菌能力;同时在 LPS 诱导的小鼠模型中,植物乳杆菌 Lp2 可以干预机体炎症和氧化应激相关通路蛋白的表达^[13]。为了进一步探讨该菌株缓解 LPS 诱导的急性肝损伤的作用机制,本研究分析植物乳杆菌 Lp2 缓解 LPS 炎症小鼠肝脏与肠道的作用途径,为其应用开发食品、保健品和药品等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

植物乳杆菌 Lp2, 从市售东北酸菜中分离得到的菌株,经鉴定为植物乳杆菌。菌株保藏于中国典型培养物保藏中心(保藏登记号为:CCTCCM 2019935)。

1.2 实验动物

30 只 4 周龄(体质量 20~25 g)清洁级昆明系小鼠【试验动物生产许可证号:SCXK(辽)-2020-0001】,购自辽宁长生生物技术有限公司,进行一星期适应性喂养,动物房温度为 22~25 ℃,相对湿度(55±15)%,动物进行自由饮食喂养。

1.3 试剂与仪器

谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮(Nitric oxide, NO)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)等检测试剂盒,南京建成生物技术公司;小鼠肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,北京索莱宝生物科技有限公司;脂多糖、小鼠髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)ELISA 试剂盒、小鼠环氧合酶 2

(Cyclooxygenase-2, COX-2)ELISA 试剂盒,上海江莱生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限公司;兔抗 ZO-1 抗体、兔抗 Occludin、兔抗 Claudin-1 单克隆抗体,美国 Cell Signaling Technology 公司;山羊抗兔二抗,北京中杉金桥生物技术有限公司;TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒和 PerfectStart™ Green qPCR SuperMix 试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;紧密连接蛋白 ZO-1, Occludin 和 Claudin-1 基因引物合成于吉林省库美生物科技有限公司。

TL-18M 超高速冷冻离心机,上离公司;InfinitelM200 全自动酶标仪,瑞士 TECAN 公司;AE31E 倒置显微镜,中国 Motic 公司;Leica DM IL LED 光学显微镜,德国徕卡;1645050 电泳仪、1703812 电转槽,美国 Bio-Rad 公司,iBright CL1000 免疫印迹显影仪,美国 Thermo fisher 公司;Mx3000P 荧光定量 PCR 仪,美国 Agilent Technoligise 公司。

1.4 方法

1.4.1 菌悬液的制备 传代的菌株按照 3%的接种量,接种到 MRS 液体培养基中 37 ℃培养 18 h,将培养液于 4 ℃在 4 000 r/min 离心 10 min,用 0.85%的生理盐水洗涤 2 次沉淀的菌泥,加入一定体积的无菌生理盐水获得菌悬液,保证活化菌株的活菌数约为 10⁹ CFU/mL。

1.4.2 动物实验设计 动物实验方案见表 1,小鼠适应性喂养后,随机分为 3 组,每组 10 只。分别为:对照组、模型组(LPS)和干预组(LPS+Lp2)。3 组小鼠自由采食、饮水喂养 4 周,干预组饮水中添加 1 mL 植物乳杆菌 Lp2 菌悬液(1.0×10⁹ CFU/mL)。饲养 4 周结束后禁食 12 h,对模型组和干预组小鼠进行腹腔注射 LPS(2.5 mg/mL)构建急性炎症模型,4 h 后,处死小鼠,下腔静脉取血,解剖收集肝脏和回肠等器官,-80 ℃冻存,备用。

表 1 动物实验方案

Table 1 Grouping of experimental animals

组别	给饲情况	处理方法
对照组	基础饲料+饮用水	
模型组(LPS)	基础饲料+饮用水	喂养 4 周后腹腔注射 LPS 1 次
干预组(LPS+Lp2)	基础饲料+饮用水+植物乳杆菌 Lp2 菌悬液	喂养 4 周后腹腔注射 LPS 1 次

1.4.3 血清制备 室温血液自然凝固需 10~20 min,离心 20 min(3 000 r/min)。仔细收集上清,若保存过程中出现沉淀,需再次离心。

1.4.4 肝脏和回肠组织处理 取肝脏或回肠标本后,称重,加入一定量的 PBS(pH7.4),充分匀浆,离心 20 min(3 000 r/min)。仔细收集上清,分装后冷冻备用。

1.4.5 肝脏组织病理学分析 观察肝组织病理学改变,包括肝细胞坏死、炎性细胞浸润和肝内出血。肝组织保存于 10%中性福尔马林缓冲液中,进行肝组织病理学检查。石蜡包埋,切成 5 μm 厚的切片。H&E 染色后,在光学显微镜下观察组织病理学检查。

1.4.6 生化指标分析 血清、肝脏或回肠组织中 ALT, AST, LPS, TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO, SOD, CAT, GSH-Px, MDA, MPO, COX-2 等指标的检测,均按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.7 免疫印迹检测蛋白表达 取各组小鼠回肠 40 mg,加入 700 μL RIPA 细胞裂解液进行匀浆,冰上静止后,离心收集上清后使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定总蛋白质的含量。根据测定的各样品的蛋白质浓度,计算各蛋白样品的上样量,用 4 \times 蛋白上样液将各蛋白质样品稀释到 10 μL 左右,沸水浴加热 5 min,使蛋白充分变性,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏、备用。参照 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒制备不同质量分数的浓缩胶与分离胶,电泳条件为 80 V/120 V。SDS-PAGE 电泳完成后,根据蛋白分子质量不同将胶切开同时切同等大小的硝酸纤维素膜(PVDF 膜),使用 Bio-Rad 的标准湿式转膜装置进行转膜(4 $^{\circ}\text{C}$ 下加冰降温,电压 100 V,90 min),将转换好的 PVDF 膜室温封闭 60 min,封闭结束后,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,以 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;在室温下加入二抗,置于摇床上孵育 1h 后,放入凝胶成像系统中曝光成像,用 Image J 软件进行分析。其中一抗分别为:ZO-1, Claudin-1, Occludin 等抗体,二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(体积稀释比例按说明书配置)。

1.4.8 实时荧光 RT-PCR 检测 按说明书用 Trizol 提取总 RNA,并用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒进行反转录。根

据 NCBI 数据库中已发表的基因序列,利用 PrimerBank PCR 引物的公共数据设计 ZO-1, Occludin 和 Claudin-1 基因引物序列,正向和反向引物序列如表 2 所示。定量实时 PCR 根据 PerfectStartTMGreen qPCR SuperMix 试剂盒说明进行操作,温度梯度如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,40 个循环。根据仪器进行溶解曲线自动设定。对比内参基因 β -actin 对数据进行归一化后,从重复样本中计算出目标转录本的相对数量。PCR 扩增后进行解离曲线分析,验证引物的特异性。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算相对 mRNA 表达量。

表 2 不同基因引物序列

Table 2 The primer of different genes	
基因名称	碱基序列(5'→3')
ZO-1	F-GTAGGCTTTGAGTAGGATTGAGG
	R-AGACTGTCATATCAGAAGCTATAACC
Claudin-1	F-TGCCAGTCTAATATAAAGCAGAAGC
	R-ATGCTTGCTAACAACACTACAATGC
Occludin	F-TGCTTCATCGCTTCCTTAGTAA
	R-GGGTTCCTCCATTATGTACA
β -actin	F-CTACCTCATGAAGATCCTGACC
	R-CACAGCTTCTCTTTGATGTAC

注:F. 上游引物;R. 下游引物。

1.5 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件统计分析与绘图,结果以平均值 \pm 标准误差表示,组间差异应用单因素方差分析(one-way ANOVA),显著性差异应用 Tukeys post hoc 检验比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。其中,运用 Image J 软件对免疫印迹试验的蛋白条带灰度进行定量分析。与模型组比较,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$),****表示差异非常显著($P<0.0001$)。

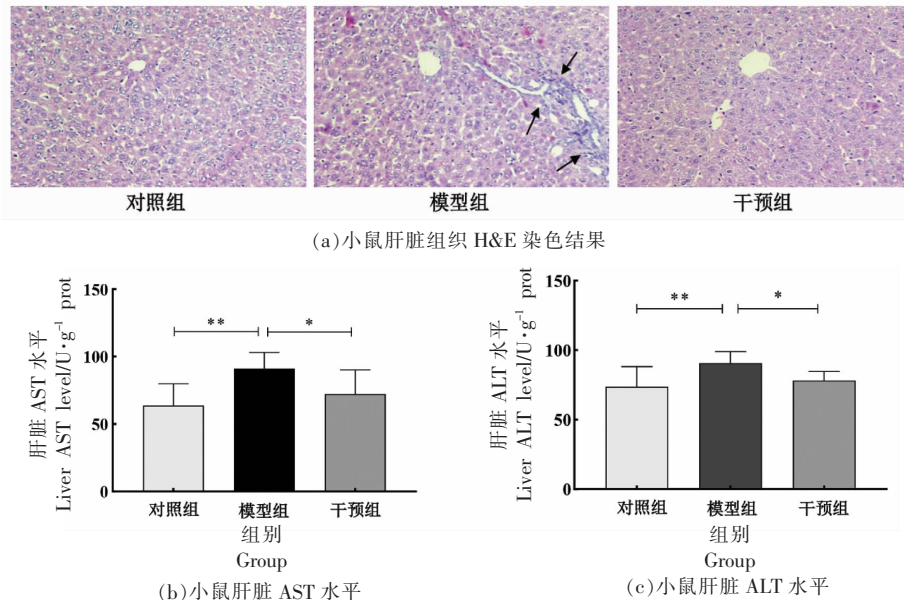
2 结果与分析

2.1 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 急性炎症小鼠肝损伤的作用

肝脏组织收获后,进行 H&E 染色(图 1a)和转氨酶(ALT 和 AST)分析。如图 1a 所示,与对照组比较,模型组肝脏有较重的病变现象:肝门静脉

区域有炎性细胞浸润现象,间质空隙大,细胞核聚集,分布无规则;与模型组相比,干预组病变症状有明显的改善,细胞分布比较均匀,炎性细胞浸润现象减轻。

ALT 和 AST 是肝损伤的关键标志物。与对照组相比,模型组肝脏 ALT 和 AST 水平显著升高 ($P<0.01$),用植物乳杆菌 Lp2 干预可明显抑制 AST 和 ALT 的增加 ($P<0.05$) (图 1)。



注:与模型组相比,*表示有显著性差异($P<0.05$),**表示有极显著性差异($P<0.01$)。

图 1 植物乳杆菌 Lp2 对小鼠肝损伤的保护作用

Fig.1 Protective effect of *L. plantarum* Lp2 on mice liver injury

2.2 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 急性炎症小鼠血清炎症因子的影响

促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 是脂多糖引起的肝损伤的重要介质,为了证明植物乳杆

菌 Lp2 是否对 LPS 急性炎症小鼠血清炎症因子产生影响,本文对血清中 LPS、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平进行了分析(表 3)。

表 3 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 急性炎症小鼠血清炎症因子的影响

Table 3 Effects of *L. plantarum* Lp2 on serum inflammatory factors in LPS-induced acute inflammation in mice

	LPS/EU·L ⁻¹	IL-1 β /pg·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹
对照组	231.94 \pm 8.82	763.88 \pm 74.16	409.39 \pm 39.89	354.34 \pm 14.42
模型组	266.40 \pm 6.82**	1 265.11 \pm 103.30**	898.73 \pm 65.89**	1 031.78 \pm 80.97**
干预组	236.33 \pm 1.81 [#]	878.62 \pm 63.08 ^{##}	554.60 \pm 33.07 ^{##}	545.83 \pm 67.09 [#]

注:*表示模型组与对照组相比有显著性差异($P<0.05$),**表示模型组与对照组相比有极显著性差异($P<0.01$);#表示干预组与模型组相比有显著性差异($P<0.05$),##表示干预组与模型组相比有极显著性差异($P<0.01$)。

由表 3 可以看出,LPS 诱导的小鼠出现炎症反应,与对照组比较,模型组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的水平均有显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);同时,与模型组相比,干预组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的水平均有降

低,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),这说明植物乳杆菌 Lp2 能抑制 LPS 炎症小鼠产生促炎因子,进而缓解机体炎症状态。摄入植物乳杆菌 Lp2 后,与模型组相比,血清 LPS 水平明显降低 ($P<0.05$)。然而,与对照组相比,补充植物乳杆菌

Lp2 组的血清 LPS 水平没有差异(表 3)。

2.3 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 急性炎症小鼠回肠紧密连接蛋白和 mRNA 表达的影响

过量 LPS 会引起肠道细胞紧密连接蛋白表达下降,上皮屏障功能紊乱,导致通透性增加。本文采用免疫印迹和 RT-PCR 对小鼠回肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达情况进行了分析(图 2)。

小鼠回肠上皮细胞间紧密连接蛋白表达如图 2a~b 所示,与模型组相比,干预组小鼠回肠 ZO-

1、Occludin 与 Claudin-1 蛋白的表达量显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明植物乳杆菌 Lp2 能够通过上调肠上皮细胞间紧密连接蛋白表达量,对 LPS 引起的肠道屏障损伤发挥保护作用。由图 2c~e 所示,模型组的 3 种紧密连接蛋白基因 mRNA 表达量与对照组相比均显著下降 ($P<0.01$)。与模型组相比,干预组 ZO-1、Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 表达量均显著上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

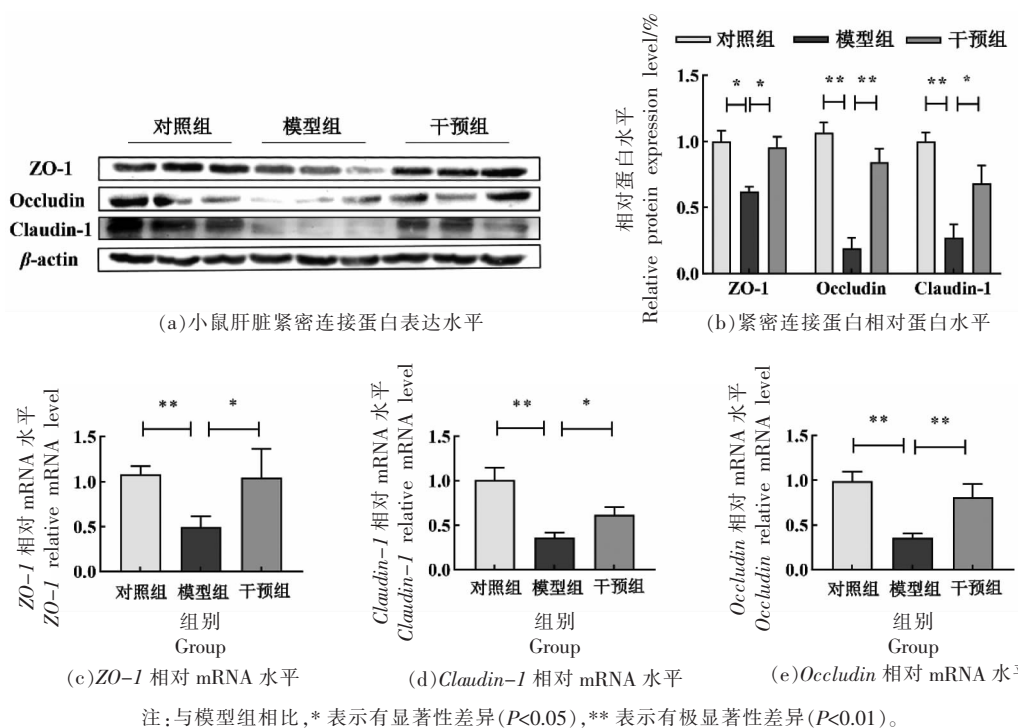


图 2 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 炎症小鼠回肠 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 水平的影响

Fig.2 Effect of *L. plantarum* Lp2 on the expression level of ileum ZO-1, Occludin and Claudin in LPS-induced inflammation in mice

2.4 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 急性炎症小鼠回肠 MPO 和 COX-2 的影响

MPO 和 COX-2 是评价机体炎症反应的关键酶,为了证明植物乳杆菌 Lp2 是否对 LPS 急性炎症小鼠回肠炎症反应影响,本文对血清中 MPO 和 COX-2 进行了分析(图 3)。如图 3 所示,与对照组相比,模型组的 COX-2 和 MPO 含量显著增加 ($P<0.01$ 或 $P<0.0001$),与模型组相比,植物乳杆菌 Lp2 干预组的 COX-2 和 MPO 表达量显著降低 ($P<0.01$)。

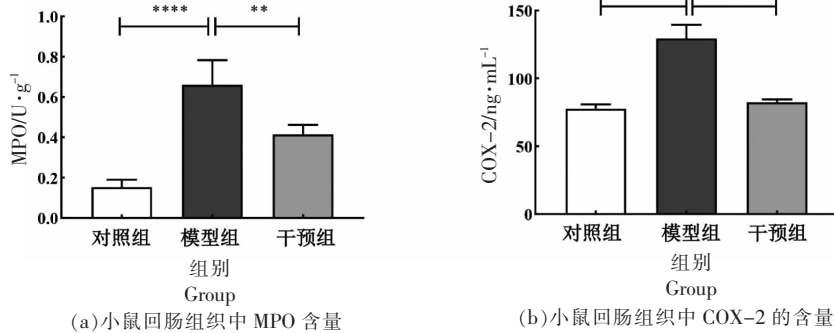
2.5 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 炎症小鼠回肠抗氧化功能的影响

SOD、CAT、GSH-Px、MDA 和 NO 是评价机体氧化应激的关键指标,为了证明植物乳杆菌 Lp2 是否对 LPS 急性炎症小鼠回肠氧化应激的影响,本文对血清中 SOD、CAT、GSH-Px、MDA 和 NO 活性或水平进行了分析(图 4)。

如图 4 所示,模型组 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性与对照组相比显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.0001$);与模型组相比,植物乳杆菌 Lp2 干预

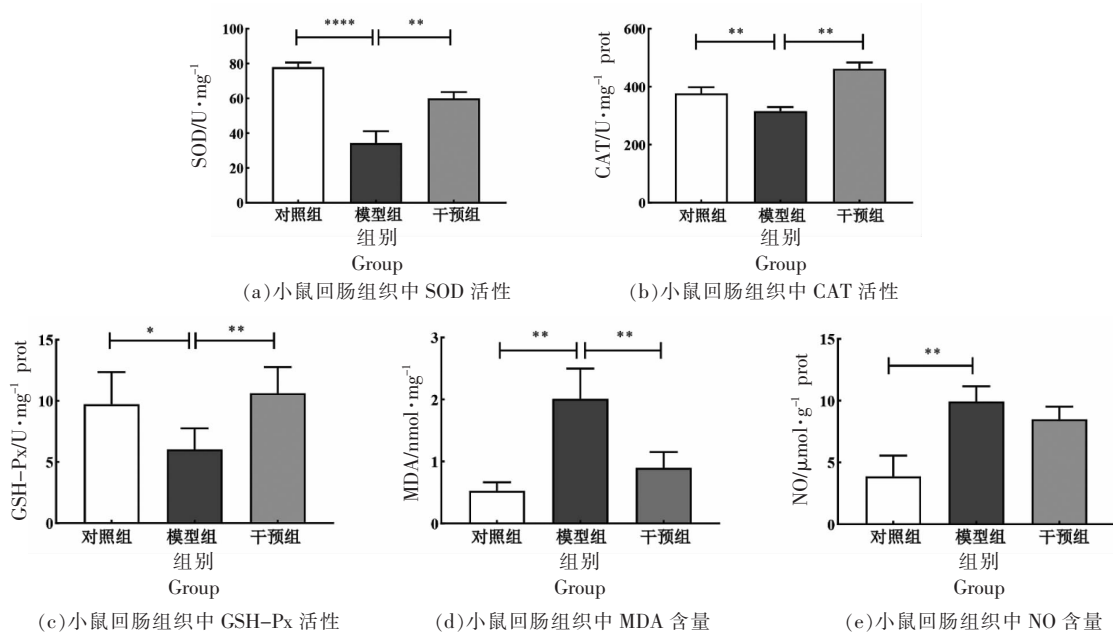
组的活性显著增强($P<0.01$)。同时,与对照组相比,模型组的 MDA 和 NO 含量显著增强($P<$

0.01), 干预组的含量有所降低, 与模型组相比 MDA 的差异具有统计学意义($P<0.01$)。



注:与模型组相比,**表示有极显著性差异($P<0.01$),****表示差异非常显著($P<0.0001$)。

图3 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 急性炎症小鼠回肠 MPO 和 COX-2 表达水平的影响
Fig.3 Effect of *L. plantarum* Lp2 on the expression levels of ileum MPO and COX-2 in LPS-induced acute inflammation in mice



注:与模型组相比,*表示有显著性差异($P<0.05$),**表示有极显著性差异($P<0.01$),****表示差异非常显著($P<0.0001$)。

图4 植物乳杆菌 Lp2 对 LPS 急性炎症小鼠回肠氧化应激的影响

Fig.4 Effects of *L. plantarum* Lp2 on ileum oxidative stress in LPS-induced acute inflammation in mice

3 讨论

肠屏障功能受损、肠道菌群变化、肝脏炎症反应、肝脏氧化应激和肝脂代谢紊乱都与肝损伤的发生和发展有着复杂的联系^[14-16]。大量研究表明,肝脏损伤与饮食有密切关系,如酒精和高脂饮食都会导致肝损伤,主要原因是饮食的变化引起肠

道革兰氏阴性菌增加,使得肠道内容物中 LPS 增加,LPS 和酒精等因素会引起肠道屏障紊乱,进而导致肠道 LPS 泄露引起血液中 LPS 增加,LPS 在肝脏中过度累积^[2-3]。乳酸菌作为益生菌是一种安全和实用的生物剂,可以增加机体免疫力、调节代谢异常、抗炎和调节肠道菌群等,并成为一种潜在

的预防和治疗方法^[17]。近年来研究表明,乳酸菌可以有效改善酒精和高脂等因素导致的肝损伤^[11,12]。血清肝酶水平(ALT 和 AST)常作为评价肝功能损害的指标^[18]。本试验从东北酸菜中分离的植物乳杆菌 Lp2 可以显著抑制由 LPS 引起的小鼠肝脏 ALT 和 AST 水平提高。肝切片 HE 染色显示植物乳杆菌 Lp2 干预组炎性细胞浸润明显减轻,细胞分布均匀。Lee 等^[19]的研究表明植物乳杆菌 A41 也有类似的保护肝脏的作用。

肠道是维持人体正常生理活动的重要器官之一,参与机体物质代谢、防御屏障、细胞体液免疫、分泌活性物质等重要功能,是机体最强大的“工厂”与“免疫基地”^[20]。大量证据表明肠上皮通透性在肝损伤发病机制中起着至关重要的作用^[21]。紧密连接蛋白位于肠上皮细胞的最顶端,是肠上皮细胞屏障通透性的主要决定因素。紧密连接蛋白由跨膜蛋白(如 Claudins 和 Occludin)、外周膜蛋白(如 ZO-1)和调节蛋白组成^[22]。本研究结果表明,LPS 显著降低了 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达水平,说明肠上皮通透性可能增加。然而,补充植物乳杆菌 Lp2 可以防止这些蛋白减少,这与血清 LPS 结果一致。另一项研究表明,鼠李糖 LGG 处理还能显著抑制酒精诱导的回肠 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 表达水平的降低,这与本研究结果是一致的^[5]。

较弱的肠道屏障可以导致内毒素移位,导致血清 LPS 水平升高,从而引发肝脏炎症^[23],LPS 介导的肝脏炎症也是肝损伤的重要病因^[24]。LPS 诱导炎症的病理学特征是机体释放多种促炎细胞因子,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等^[25-27]。本文发现 LPS 诱导的急性炎症小鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 LPS 水平明显高于对照组,经植物乳杆菌 Lp2 干预后显著降低,说明植物乳杆菌 Lp2 具有改善 LPS 引起的炎症反应功能。MPO 含量的增加直接影响机体中性粒细胞浸润程度,作为炎症生物标志物,可评价肠道炎症反应的损害程度^[28]。COX-2 作为诱导炎症因子的关键酶,其含量的增加伴随着肠道通透性的增加,可促进炎症反应的发生^[29]。本研究结果表明,模型组的 MPO 和 COX-2 的含量显著高于对照组,经植物乳杆菌 Lp2 干预后,其含量明显下降,说明植物乳杆菌 Lp2 确实

具有抗炎效果,同时解释了其抗炎途径。上述研究表明,植物乳杆菌 Lp2 可以改善、预防 LPS 引起的小鼠肝脏损伤。植物乳杆菌 Lp2 显著提高了紧密连接蛋白基因的表达,改善了小鼠肠道屏障功能,达到保护 LPS 诱导肝脏损伤的作用。Jang 等^[30]也发现植物乳杆菌 LC27 和长双歧杆菌 LC67 的混合物能显著降低小鼠血清 LPS 水平和肝组织中的 MDA、TNF- α 和 MPO 的水平。

炎症与氧化应激是双向的反应,炎症因子的过量产生会导致机体发生氧化应激反应,引起活性氧(Reactive oxygen species, ROS)增加^[31]。已有文献证明,过量的 ROS 与抗氧化防御系统不足之间存在失衡,随之氧化应激将会增加,并通过直接或间接途径对细胞造成损害^[32]。LPS 也可以促进机体中促氧化剂的产生,抑制抗氧化剂的产生,导致氧化应激^[33]。相反,SOD 可以保护宿主细胞免受氧化损伤,被认为是一种关键的活性氧清除剂。另一项研究表明,植物乳杆菌 DSM15313 的补充能显著提高谷胱甘肽的产生^[34],谷胱甘肽是一种维持细胞内氧化还原平衡并消除异源生物和 ROS 的物质^[1]。体内 MDA 的含量是氧化应激的一个重要指标,反映机体过氧化程度,间接反映细胞损伤的程度已得到临床共识^[35]。因此,本研究通过分析 SOD、CAT、GSH-Px、NO 和 MDA 等抗氧化剂指标来评估小鼠的氧化应激。结果表明,模型组动物的肝脏样本中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的水平显著降低,而 MDA 和 NO 的含量呈相反的趋势。而被植物乳杆菌 Lp2 干预后,其结果均得到抑制,说明机体的氧化应激得到缓解。

综上所述,植物乳杆菌 Lp2 可通过降低机体血清中炎症因子水平、提高机体抗氧化能力,上调肠上皮细胞间紧密连接蛋白的表达,维持肠道屏障的完整性,进而缓解 LPS 诱导的急性炎症。

参 考 文 献

- [1] WANG Y H, KIRPICH I, LIU Y L, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury [J]. *The American Journal of Pathology*, 2011, 179 (6): 2866-2875.

- [2] NAN B, LIU Y L, YOU Y, et al. Protective effects of enhanced minor ginsenosides in *Lactobacillus fermentum* KP-3-fermented ginseng in mice fed a high fat diet[J]. Food & Function, 2018, 9(11): 6020-6028.
- [3] WANG Y, YOU Y, TIAN Y, et al. *Pediococcus pentosaceus* PP04 ameliorates high-fat diet-induced hyperlipidemia by regulating lipid metabolism in C57BL/6N mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(51): 15154-15163.
- [4] SUN Z Y, LI H H, LI Y P, et al. *Lactobacillus salivarius*, a potential probiotic to improve the health of LPS-challenged piglet intestine by alleviating inflammation as well as oxidative stress in a dose-dependent manner during weaning transition[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 547425.
- [5] WANG Y H, LIU Y L, SIDHU A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury [J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2012, 303(1): G32-G41.
- [6] MIURA K. Role of gut microbiota and toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(23): 7381.
- [7] DAMODHARAN K, PALANIYANDI S A, SUH J, et al. Probiotic characterization of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* KNI9 inhibiting adherence of *Yersinia enterocolitica* on Caco-2 cells *in vitro*[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(2): 600-607.
- [8] MIYOSHI M, OGAWA A, HIGURASHI S, et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice[J]. European Journal of Nutrition, 2014, 53(2): 599-606.
- [9] GU Z L, LIU Y L, HU S M, et al. Probiotics for alleviating alcoholic liver injury[J]. Gastroenterology Research and Practice, 2019, 2019: 1-8.
- [10] KUMAR M, KUMAR A, NAGPAL R, et al. Cancer-preventing attributes of probiotics: An update[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2010, 61(5): 473-496.
- [11] WANG Y, WU Y P, WANG Y B, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 alleviates the oxidative stress of IPEC -1 via modulating Nrf2/Keap1 signaling pathway and decreasing ROS production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(7): 3015-3026.
- [12] TENG Y, WANG Y, TIAN Y, et al. *Lactobacillus plantarum* LP104 ameliorates hyperlipidemia induced by AMPK pathways in C57BL/6N mice fed high-fat diet[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103665.
- [13] 王玉华, 陈奕颖, 王宇, 等. 一株植物乳杆菌 Lp2 及其应用: CN111925961A[P]. 2020-11-13[2021-04-06].
WANG Y H, CHEN Y Y, WANG Y, et al. A *Lactobacillus plantarum* Lp2 and its application: CN111925961A[P]. 2020-11-13[2021-04-06].
- [14] ZHAO Z J, CHEN L, ZHAO Y J, et al. *Lactobacillus plantarum* NA136 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by modulating gut microbiota, improving intestinal barrier integrity, and attenuating inflammation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(12): 5273-5282.
- [15] LEE J H, HA S J, LEE H J, et al. Protective effect of *Tremella fuciformis* Berk extract on LPS-induced acute inflammation via inhibition of the NF- κ B and MAPK pathways [J]. Food & Function, 2016, 7(7): 3263-3272.
- [16] PARK J E, OH S, CHA Y. *Lactobacillus Brevis* OPK-3 from kimchi prevents obesity and modulates the expression of adipogenic and pro-inflammatory genes in adipose tissue of diet-induced obese mice [J]. Nutrients, 2020, 12(3): 604.
- [17] SEFIDGARI-ABRASI S, ROSHANGAR L, KARIMI P, et al. From the gut to the heart: *L. plantarum* and inulin administration as a novel approach to control cardiac apoptosis via 5-HT2B and TrkB receptors in diabetes[J]. Clinical Nutrition, 2021, 40(1): 190-201.
- [18] RIEDL J M, POSCH F, PRAGER G, et al. The AST/ALT (De Ritis) ratio predicts clinical outcome in patients with pancreatic cancer treated with first-line nab-paclitaxel and gemcitabine: post hoc analysis of an Austrian multicenter, noninterventional study[J]. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2020, 12: 11-30.
- [19] LEE C S, KIM S H. Anti-inflammatory and anti-osteoporotic potential of *Lactobacillus plantarum* A41

- and *L. fermentum* SRK414 as probiotics[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(2): 623–634.
- [20] GANGARAPU V, YILDIZ K, TUZUN INCE A, et al. Role of gut microbiota: Obesity and NAFLD[J]. The Turkish Journal of Gastroenterology, 2014, 25(2): 133–140.
- [21] FIGLIUOLO V R, COUTINHO-SILVA R, COUTINHO C. Contribution of sulfate-reducing bacteria to homeostasis disruption during intestinal inflammation[J]. Life Sciences, 2018, 215: 145–151.
- [22] DENG B, WU J, LI X H, et al. Probiotics and probiotic metabolic product improved intestinal function and ameliorated LPS-induced injury in rats[J]. Current Microbiology, 2017, 74(11): 1306–1315.
- [23] CENI E, MELLO T, GALLI A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(47): 17756–17772.
- [24] LIU Y J, GAO Y, MA F L, et al. The ameliorative effect of *Lactobacillus plantarum* Y44 oral administration on inflammation and lipid metabolism in obese mice fed with a high fat diet[J]. Food & Function, 2020, 11(6): 5024–5039.
- [25] XING Z, GAULDIE J, COX G, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses[J]. Journal of Clinical Investigation, 1998, 101(2): 311–320.
- [26] BEG A A, BALTIMORE D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death[J]. Science, 1996, 274(5288): 782–784.
- [27] WANG T, YAN H, LU Y Y, et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 and *Lactobacillus crustorum* MN047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation[J]. European Journal of Nutrition, 2020, 59(6): 2709–2728.
- [28] YU P J, WAN L M, WAN S H, et al. Standardized myrtol attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(12): 3211–3216.
- [29] PALÓCZ O, PÁSZTI-GERE E, GÁLFI P, et al. Chlorogenic acid combined with *Lactobacillus plantarum* 2142 reduced LPS-induced intestinal inflammation and oxidative stress in IPEC-J2 cells[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e166642.
- [30] JANG S, JEONG J, KIM J, et al. Simultaneous amelioration of colitis and liver injury in mice by *Bifidobacterium longum* LC67 and *Lactobacillus plantarum* LC27[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 7500–7514.
- [31] HAN K J, LEE J, LEE N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU15149 derived from Korean homemade diced-radish kimchi[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(4): 591–598.
- [32] DUAN C C, ZHAO Y J, HUANG C, et al. Hepatoprotective effects of *Lactobacillus plantarum* C88 on LPS/D-GalN-induced acute liver injury in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 43: 146–153.
- [33] KWON D H, CHA H J, CHOI E O, et al. Schisandrin A suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW264.7 macrophages by suppressing the NF- κ B, MAPKs and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(1): 264–274.
- [34] AHRÉN I L, XU J, ÖNNING G, et al. Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats[J]. Clinical Nutrition, 2015, 34(4): 719–726.
- [35] GAN Y, CHEN H, ZHOU X R, et al. Regulating effect of *Lactobacillus plantarum* CQPC03 on lipid metabolism in high-fat diet-induced obesity in mice[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(11): e13495.

Protective Effect of *Lactobacillus plantarum* Lp2 on Acute Liver Injury Induced by LPS in Mice

Chen Yiyi^{1,2}, Zhang Nan^{1,2}, Tian Yuan^{1,2}, Wang Yu^{1,2}, Li Xia^{1,2}, Wang Yuhua^{1,2,3*}

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

²Jilin Province Innovation Center for Food Biological Manufacture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118

³National Processing Laboratory for Soybean Industry and Technology, Changchun 130118)

Abstract Objective: To study the protective effects of *Lactobacillus plantarum* Lp2 on acute liver injury in mice. Methods: The effect and mechanism of *L. plantarum* Lp2 isolated from traditional Chinese fermented foods on improving lipopolysaccharide (LPS) induced liver inflammation in mice were studied. Male KM mice were randomly assigned into three groups: Control group, model group (LPS group), and intervention group (LPS + Lp2 group). The mice in the LPS+Lp2 group were supplemented with *L. plantarum* Lp2 every day. After 4 weeks, the mice in the LPS group and the LPS+Lp2 group were injected intraperitoneally with LPS to construct acute inflammation model. The liver injury of LPS-induced mice was observed through the evaluation of biochemical indexes, liver histopathology, mRNA and protein expression level. Result: *L. plantarum* Lp2 treatment reduced significantly the levels of aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and LPS in serum, liver and ileum tissue of mice with acute inflammation induced by LPS, and increased the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT). RT-PCR and western-blotting analysis showed that *L. plantarum* Lp2 pretreatment reduced ileum protein expression of ZO-1, Occludin and Claudin-1. Conclusion: *L. plantarum* Lp2 ameliorates LPS-induced acute liver disease by improving intestinal barrier integrity, inhibiting oxidative stress and attenuating inflammation.

Keywords *Lactobacillus plantarum*; LPS; acute liver injury; inflammation; intestinal permeability