

## 母乳婴儿源植物乳杆菌 BF\_15 体外抗氧化活性及缓解 DSS 诱导小鼠结肠氧化损伤的研究

张娜<sup>1,2,5</sup>, 赵丽娜<sup>1,3</sup>, 李晨<sup>1,3,5</sup>, 牛志华<sup>1,3</sup>, 康红艳<sup>4,5</sup>, 田洪涛<sup>1,3,5\*</sup>, 罗云波<sup>6</sup>

<sup>1</sup>河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

<sup>2</sup>保定学院生物化工与环境工程学院 河北保定 071000

<sup>3</sup>国家北方山区农业工程技术研究中心 河北保定 071000

<sup>4</sup>河北新希望天香乳业有限公司 河北保定 071000

<sup>5</sup>河北省益生功能性乳制品技术创新中心 河北保定 071000

<sup>6</sup>中国农业大学食品科技与营养工程学院 北京 100083

**摘要** 以鼠李糖乳杆菌 GG(LGG)为对照菌株,研究了自行分离鉴定的母乳婴儿源益生菌植物乳杆菌 BF\_15 的体外抗氧化活性、安全性与缓解 DSS 诱导小鼠结肠氧化损伤的症状。结果表明:试验菌株植物乳杆菌 BF\_15 能够耐受高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.5 mmol/L)。发酵上清液中,菌株 BF\_15 对 DPPH 的清除能力低于对照菌株 LGG ( $P < 0.01$ );对·OH 清除能力高于 LGG ( $P < 0.05$ );对·O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力高于 LGG ( $P > 0.05$ );抗脂质过氧化能力低于 LGG ( $P < 0.01$ )。菌悬液中,菌株 BF\_15 对 DPPH 和·O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除能力高于对照菌株 LGG ( $P > 0.05$ );对·OH 清除能力高于 LGG ( $P < 0.01$ );抗脂质过氧化能力低于 LGG ( $P < 0.01$ )。试验菌株 BF\_15 与对照菌株 LGG 均不产生有害代谢产物(生物胺、亚硝酸盐、吲哚),不具有溶血性。动物实验中,菌株 BF\_15 通过早期灌胃小鼠,减轻了小鼠肠黏膜损伤及炎症细胞浸润的程度,提高了超氧化物歧化酶(SOD)活性 ( $P < 0.01$ ),降低了丙二醛(MDA)含量 ( $P < 0.01$ ),进而有效缓解了 DSS 诱导小鼠结肠氧化损伤的症状,其效果与对照菌株 LGG 相当 ( $P > 0.05$ )。本研究为来自人体母乳婴儿源益生菌的开发、应用及其早期干预缓解溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)等肠道疾病提供了科学依据,也为氧化应激作为治疗 UC 等肠道疾病的新靶点提供了借鉴指导。

**关键词** 母乳婴儿源益生菌;植物乳杆菌;抗氧化活性;氧化应激;DSS 诱导的溃疡性结肠炎

**文章编号** 1009-7848(2022)01-0067-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.008

人体抗氧化防御系统是保护人体免受自由基和活性氧化损伤,预防慢性疾病发生和延缓机体衰老进程提前启动的重要屏障<sup>[1]</sup>。氧化应激是指生物机体内源性和外源性活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)的水平超出机体自身抗氧化系统的平衡能力,从而导致过量的 ROS 攻击细胞组分,修饰细胞蛋白质、脂质和 DNA,并引发一系列的病变反应,肠道是最易受到自由基攻击而受到氧化损伤的部位,尤其是炎症性肠病与氧化应激密切相关<sup>[2-4]</sup>。

2017 年发表在《The Lancet》的一篇世界范围

内炎症性肠病发病率和患病率的回顾性研究报告显示:欧美的发病率已到达平台期,而非西方国家正处于新病例增长的第 1 阶段<sup>[5]</sup>。据 2014 年中国疾病预防控制中心的数据显示,中国 2005—2014 年间炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)总病例约为 35 万;据估计,到 2025 年,中国的 IBD 患者将达到 150 万人<sup>[6]</sup>。同时国内与国外的研究发现:低年龄组发病率也较高,其中年龄最小为 2 个月,且预后相对较差,而在成人患者中,有 15%~25%可追溯到儿童期起病,该类患者发生癌变率较成年时起病者更高,因此对人体,尤其是在婴幼儿期由氧化应激引发的炎症性肠病要更为重视<sup>[7]</sup>。目前治疗手段仍局限于免疫抑制剂等药物及外科介入治疗,而药物的副作用层出不穷,外科手术带来的身心伤害及经济压力更是很多患者难以承受之重<sup>[8]</sup>。寻找一种安全、高效、经济的溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)治疗方法成为当今的

**收稿日期:** 2021-01-06

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31140065);河北省重点研发计划项目(19227134D);河北省自然科学基金项目(C2017204094)

**作者简介:** 张娜(1983—),女,博士生

**通信作者:** 田洪涛 E-mail: tht631022@163.com

迫切任务。

乳酸菌作为肠道常驻菌群,可以直接在机体氧化损伤的重点部位——肠道发挥抗氧化作用,维持肠道处于氧化-还原平衡状态,并且乳酸菌在肠道定植后还能不断增殖,源源不断地在肠道扮演 ROS 清道夫的角色,其抗氧化作用与传统的抗氧化剂相比有无法比拟的优势<sup>[2]</sup>。据报道,乳杆菌耐受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能力与预防结肠炎活性,降低肠腔 ROS,抑制黏膜通透性升高具有显著相关性<sup>[9]</sup>。通过基因工程手段过量表达超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)可在三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎模型小鼠表现抗炎活性<sup>[10]</sup>。乳杆菌的作用显著改善了 UC 小鼠结肠所有抗氧化酶活力,降低氧化应激标志物的含量,进而促进溃疡性结肠炎的愈合<sup>[11]</sup>。总之,乳杆菌可通过多种途径在肠道发挥抗氧化应激作用。

婴儿时期是机体肠道菌群建立的关键时期,母乳是母婴之间进行肠道菌群有效“垂直传递”的主要介质,最初的肠道组分可显著缓解肠道氧化应激,并对机体健康产生长期影响<sup>[12]</sup>。近年来,随着分子生物学技术的发展,特别是合成生物学与系统生物学(宏基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等)技术的相继问世,益生乳酸菌促进人体健康的生理功能被逐步揭示,然而,目前有关婴儿源益生乳酸菌对机体氧化应激调节作用的研究尚缺少系统性的报道,应用于人体抗氧化调节作用的婴儿源益生乳酸菌菌株也尚不多见<sup>[13]</sup>。研究发现:植物乳杆菌既是健康婴儿肠道定植的优势乳杆菌<sup>[14]</sup>,也是成年人和老年人肠道中定植的优势菌群<sup>[15]</sup>,因此开展母乳婴儿源益生菌,尤其是植物乳杆菌缓解氧化应激的研究,势在必行。

作者前期从母乳婴儿源粪便中分离鉴定获得 1 株植物乳杆菌 BF<sub>15</sub>,研究证实:该菌株具有较强的抗逆性(耐人工胃肠液),较高的黏附性与肠道定植力及免疫调节活力。本文研究植物乳杆菌 BF<sub>15</sub> 的体外抗氧化活性、安全性与缓解 DSS 诱导小鼠结肠氧化损伤的症状,从抗氧化的角度了解植物乳杆菌 BF<sub>15</sub> 预防、改善动物溃疡性结肠炎的功能性,以期为来自人体母乳婴儿源益生菌的开发应用及其早期干预缓解溃疡性结肠炎等肠

道疾病提供科学依据,也为氧化应激作为治疗溃疡性结肠炎等肠道疾病的新靶点提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌株 试验菌株:植物乳杆菌 BF<sub>15</sub>(*Lactobacillus plantarum* BF<sub>15</sub>),自行分离鉴定自母乳源婴儿粪便;对照菌株:鼠李糖乳杆菌 LGG ATCC 53103 (*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103),被公认的典型益生菌株,购自中国微生物种保藏管理委员会普通微生物中心;质控菌株:大肠埃希氏菌 ATCC 25922 (*Escherichia coli* ATCC 25922) 与金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923),购自中国微生物种保藏管理委员会普通微生物中心。上述菌株均由河北农业大学食品科技学院发酵工程实验室保存。

1.1.2 试剂 1,1-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH),上海麦克林;苏木素伊红(HE)染色试剂盒,索莱宝;总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)测定试剂盒,南京建成;30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、FeCl<sub>3</sub>、邻苯三酚、Tris、硫代巴比妥酸(TBA)、三氯乙酸(TCA)均为国产分析纯级。

1.1.3 实验动物 C57BL/6J 雄性小鼠,体重(20±2)g,斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,用于评价母乳婴儿源益生菌:植物乳杆菌 BF<sub>15</sub> 缓解 DSS 诱导结肠氧化损伤的实验动物。

1.1.4 主要仪器及设备 DL-CJ-1N 型超净工作台,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司;SHP-250 型生化培养箱,上海精宏实验设备有限公司;TU-1810 紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;5417R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf。

### 1.2 方法

1.2.1 植物乳杆菌 BF<sub>15</sub> 菌株体外抗氧化能力分析

1.2.1.1 BF<sub>15</sub> 菌株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抵抗能力测定 采用 Li 等<sup>[16]</sup>报道的分光光度法,稍作改进:试验菌株 BF<sub>15</sub> 培养至稳定期,以体积分数 1%接入含有终浓度为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 MRS 液体培养基中,以接入不含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的

MRS 液体培养基为阴性对照组。每隔 1 h 测定培养液 OD<sub>600nm</sub> 的吸光值,表示菌株在不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度下的生长情况,以 LGG 为阳性对照菌株。

1.2.1.2 BF<sub>15</sub> 菌株不同组分(发酵上清和菌悬液)的制备 将供试菌株按体积分数为 1%接种量接种于 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 24 h,4 °C、6 000 r/min 离心 10 min,收集发酵上清液于 4 °C 保藏备用;将菌体用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤 2 次后重悬,调整菌体浓度为 1×10<sup>9</sup> CFU/mL(OD<sub>600nm</sub> ≈ 1.5)备用。

1.2.1.3 BF<sub>15</sub> 菌株清除·OH 能力检测 采用 Gutteridge<sup>[17]</sup>报道的水杨酸法,稍作修改:将 1.0 mL 5 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 和 1.0 mL 3 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与样品混合反应 10 min 后,加入 1.0 mL 5 mmol/L 的水杨酸溶液,然后加入蒸馏水至 10 mL。将混合物在室温下静置反应 30 min 后,6 000 r/min 离心 10 min,在波长 510 nm 处测得吸光值。对照组为等体积蒸馏水代替样品溶液。清除率按公式(1)计算:

$$\cdot\text{OH 清除率} = \left( \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.1.4 BF<sub>15</sub> 菌株清除 DPPH 自由基能力测定

采用 Shimada 等<sup>[18]</sup>报道方法,稍作修改:取 1.0 mL 样品加入到 1.0 mL 0.2 mmol/L 乙醇 DPPH 自由基溶液中,将反应溶液摇匀后,置于室温下遮光反应 30 min,6 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液在波长 517 nm 处测量溶液的吸光度。对照组为等体积的蒸馏水代替样品溶液。空白组包括等量的乙醇代替 DPPH 自由基溶液。清除率按公式(2)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left( 1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

1.2.1.5 BF<sub>15</sub> 菌株清除·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 自由基能力检测

采用 He 等<sup>[19]</sup>报道的邻苯三酚自氧化法,稍作修改:将 3 mL Tris-HCl 缓冲液与 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚混合,25 °C 反应 20 min,加入 1 mL 样品,25 °C 反应 4 min,加 2 滴浓盐酸终止反应。对照组用蒸馏水代替样品。对照组参比为 0.4 mL 10 mmol/L 稀盐酸代替样品,样品组参比为 0.4 mL 10 mmol/L 稀盐酸代替样品,测 OD<sub>420nm</sub> 吸光值。清除率按公式(3)计算:

$$\cdot\text{O}_2^- \text{清除率} = \left( 1 - \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.1.6 BF<sub>15</sub> 菌株抗脂质过氧化能力测定 采用 Kullisaar 等<sup>[20]</sup>的方法,稍作改进:磁力搅拌 10 min 等体积的 PBS(pH 7.4)与蛋黄混合液,再加入同样 pH 值的 PBS,使其成为 PBS:混合液=1:25 (体积比)的蛋黄悬液。取 1 mL 蛋黄悬液,1 mL PBS,1 mL FeSO<sub>4</sub>(25 mmol/L)和 0.5 mL 菌悬液溶液混匀,37 °C 振荡 30 min 后加入 1 mL 质量分数为 20%的三氯乙酸(TCA),静置 10 min 后,3 500 r/min 离心 10 min,取 3 mL 上清液与 2 mL 质量分数为 0.8%的硫代巴比妥酸(TBA)混匀,沸水浴中反应 10 min,冷却后测其在 532 nm 波长处的吸光值。

$$\text{抗脂质过氧化} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (4)$$

1.2.2 植物乳杆菌 BF<sub>15</sub> 菌株体外安全性评价

1.2.2.1 BF<sub>15</sub> 菌株有害代谢产物分析 取-20 °C 保存的菌株于 MRS 固体培养基划线培养 16 h 后,挑取单菌落于 MRS 液体培养基培养 16 h(37 °C),以获得活化待用的菌液。

① BF<sub>15</sub> 菌株硝基还原酶检测 将活化好的供试菌株按体积分数为 3%接种量分别接入至硝酸盐培养基中,37 °C 培养 5 d 后,先滴加质量分数为 5%KI 溶液 10 滴,再滴加质量分数为 5%淀粉溶液 10 滴,观察试验结果,同时做空白试验<sup>[21]</sup>。滴加溶液和淀粉溶液后,培养基溶液变为蓝色是阳性(+)结果,不变色是阴性(-)结果。

② BF<sub>15</sub> 菌株氨基脱羧酶活性测定 将活化的供试菌株接种于 MRS 液体培养基中,加入质量分数为 0.1%的每一种前体氨基酸与质量分数为 0.005%的 5-磷酸吡哆醛,诱导菌体的脱羧酶活性。如此活化 6 次后,将菌株按体积分数 10%分别接种于含酪氨酸、组氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸的 Bover-Cid&Holzapfel 改进的培养基<sup>[22]</sup>中,并在表面加入 1 mL 灭菌石蜡油密封,于 37 °C 温箱培养 3~4 d,观察显色反应。若有淡蓝色或紫色的颜色特征,则表示菌株形成相应氨基酸的生物胺。

③ BF<sub>15</sub> 菌株吲哚试验 采用张丹青<sup>[23]</sup>的方法,将活化好的供试菌株及质控菌株大肠埃希氏菌 ATCC 25922 按体积分数为 3%接种量接入至

靛基质反应检测培养基中,37℃恒温培养72h。然后向培养液中加入少量乙醚,振荡混匀以提取和浓缩靛基质,待乙醚层浮于培养液表面后,缓慢加入 Kovacs 氏试剂 8~10 滴。观察并拍照记录,出现红色圆环则为靛基质反应阳性。

1.2.2.2 BF<sub>15</sub> 菌株溶血活性检测 将活化好的供试菌株以及质控菌株大肠埃希氏菌 ATCC 25923 用灭菌的接菌环划线接种于哥伦比亚血琼脂平板中,37℃培养观察菌落周围有无溶血圈出现并拍照记录<sup>[23]</sup>。

1.2.3 植物乳杆菌 BF<sub>15</sub> 菌株缓解 DSS 诱导结

肠氧化损伤能力分析

1.2.3.1 动物的分组饲养与造模 7 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,饲喂基础饲料,适应环境一周,然后参照 2003 版保健食品检验与评价技术规范<sup>[24]</sup>,对实验动物的数量要求为 10~15 只,按照表 1 进行动物实验分组(每组 10 只)并灌胃,持续 3 周,对除正常组以外的组别进行溃疡性结肠炎造模:采用质量浓度为 0.8 g/mL DSS 溶液,剂量为 0.1 mL/10 g 进行灌胃,持续 7 d,整个期间小鼠自由饮食饮水,12 h 光照,12 h 黑暗。

表 1 小鼠实验组别  
Table 1 Mice experimental group

组别	处理	剂量/ mL·(10g) <sup>-1</sup>
正常组	正常饮水	
模型组	灌胃生理盐水	0.2
BF <sub>15</sub> 菌组	灌胃 BF <sub>15</sub> (1×10 <sup>9</sup> CFU/mL)	0.2
LGG 组	灌胃 LGG(1×10 <sup>9</sup> CFU /mL)	0.2

1.2.3.2 BF<sub>15</sub> 菌株干预下氧化损伤动物模型结肠组织病理切片及 HE 染色观察 取不同处理组小鼠,将小鼠颈椎脱臼处死后,剪取结肠近端约 1 cm 组织,用预冷的生理盐水冲洗肠道内容物,然后将结肠组织浸泡于质量分数为 4% 多聚甲醛过夜,常规石蜡包埋,5 μm 切片,HE 染色后于 200 x 光学显微镜下观察结肠黏膜炎症情况,包括黏膜的完整性、黏膜内炎症细胞的浸润、隐窝结构的改变程度和炎症范围。其余结肠组织及结肠内容物于 -80℃ 保存,备用。

1.2.3.3 BF<sub>15</sub> 菌株干预下氧化损伤动物模型结肠组织 T-SOD 及 MDA 的检测 取不同处理组小鼠结肠匀浆液,测定总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力及丙二醛(MDA)含量,按照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书操作。

1.2.4 统计分析方法 试验数据(n=3)采用 SPSS 17.0 软件,首先进行方差分析即 F 检验(或 t 检验)处理间差异显著性(F=MSA/MS<sub>e</sub>),然后在方差分析处理间差异显著性基础上,用最小极差法即邓肯氏新复极差法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物乳杆菌 BF<sub>15</sub> 菌株体外抗氧化能力分析

2.1.1 BF<sub>15</sub> 菌株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抵抗能力检测 根据 1.2.1.1 节的试验方法,检测 BF<sub>15</sub> 菌株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的耐受能力,结果见图 1。

由图 1 可知,随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度增加,试验菌株 BF<sub>15</sub> 和对照菌株 LGG 细胞生长的延迟期均明显延长,说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 2 株益生菌的细胞生长均产生抑制作用。对于 BF<sub>15</sub> 菌株,当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度达到 4.0 mmol/L 时,细胞生长完全受到抑制而停止生长;而对于 LGG 菌株,在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 2.0 mmol/L 时,细胞生长已完全受到抑制而停止生长。由此表明:BF<sub>15</sub> 和 LGG 两菌株均具有较强抵御 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤的能力,相对于 LGG 菌株,BF<sub>15</sub> 菌株抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤能力更强;然而当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度达到一定高度时,在一定程度上对 BF<sub>15</sub> 和 LGG 两菌株造成细胞的氧化损伤进而导致菌株生长受到抑制。

2.1.2 BF<sub>15</sub> 菌株其它体外抗氧化(清除·OH、DPPH、·O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基、抗脂质过氧化)能力测定 根

据 1.2.1.2~1.2.1.6 节的试验方法, 进行 BF\_15 菌株体外抗氧化——清除自由基 ( $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 和  $\cdot\text{O}_2^-$ )、抗脂质过氧化能力测定, 结果见表 2。

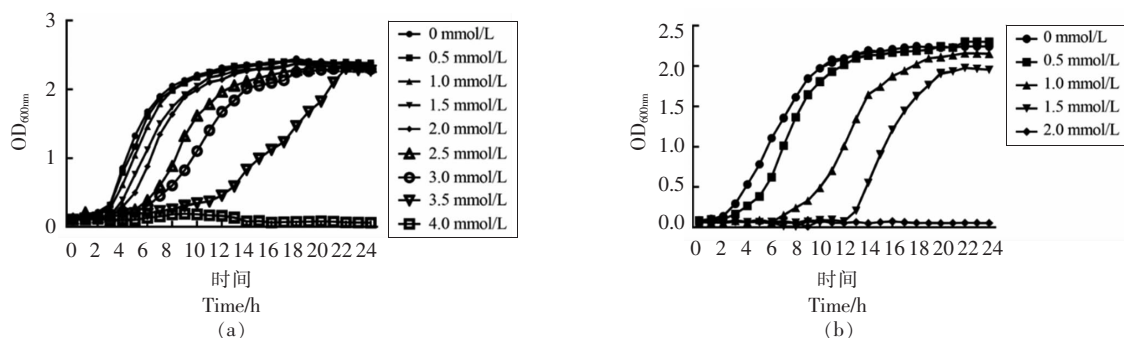


图 1 试验菌株 BF\_15(a)与对照菌株 LGG(b)对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的耐受能力  
Fig.1 Tolerance of test strain BF\_15 (a) and control strain LGG (b) to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

表 2 试验菌株 BF\_15 与对照菌株 LGG 不同组分综合抗氧化能力分析

Table 2 Analysis of comprehensive antioxidant ability of different components of test strain BF\_15 and control strain LGG

存在形式	DPPH 自由基清除率/%		$\cdot\text{OH}$ 清除率/%		$\cdot\text{O}_2^-$ 清除率/%		抗脂质过氧化能力/%	
	BF_15	LGG	BF_15	LGG	BF_15	LGG	BF_15	LGG
发酵上清液	71.58 ± 3.79 <sup>BbXx</sup>	84.00 ± 4.47 <sup>AaXx</sup>	37.53 ± 1.99 <sup>AaXx</sup>	15.69 ± 2.99 <sup>AbYy</sup>	40.49 ± 2.63 <sup>AaXx</sup>	35.45 ± 1.70 <sup>AaXx</sup>	76.48 ± 2.42 <sup>BbYy</sup>	85.40 ± 2.58 <sup>AaXx</sup>
	菌悬液							
	38.56 ± 1.91 <sup>AaYy</sup>	31.83 ± 3.66 <sup>AaYy</sup>	31.54 ± 1.77 <sup>AaXx</sup>	23.49 ± 2.44 <sup>BbXx</sup>	16.42 ± 2.44 <sup>AaYy</sup>	10.60 ± 1.95 <sup>AaYy</sup>	85.63 ± 1.56 <sup>AaXx</sup>	81.54 ± 1.92 <sup>BaXy</sup>

注:不同处理组相比,  $n=3, \bar{x} \pm s$ ; 表中上标为邓肯氏新复极差测验结果(小写字母  $\alpha=0.05$ ; 大写字母  $\alpha=0.01$ ); 上标字母 A/a~B/b 表示同一抗氧化指标、同一组分下不同菌株之间数值的差异显著性, 上标字母 X/x~Y/y 表示同一抗氧化指标同一菌株不同组分之间数值的差异显著性。

对同一抗氧化指标、同一组分下, 不同菌株之间的抗氧化能力比较, 结果表明, 发酵上清液中, 试验菌株 BF\_15 对 DPPH 的清除能力显著低于对照菌株 LGG ( $P<0.01$ ); 对  $\cdot\text{OH}$  清除能力显著高于 LGG ( $P<0.05$ ); 对  $\cdot\text{O}_2^-$  清除能力高于 LGG, 而差异不显著 ( $P>0.05$ ); 抗脂质过氧化能力显著低于 LGG ( $P<0.01$ )。菌悬液中, 试验菌株 BF\_15 对 DPPH 的清除能力高于对照菌株 LGG, 而差异不显著 ( $P>0.05$ ); 对  $\cdot\text{OH}$  清除能力显著高于 LGG ( $P<0.01$ ); 对  $\cdot\text{O}_2^-$  清除能力高于 LGG, 而差异不显著 ( $P>0.05$ ); 抗脂质过氧化能力显著低于 LGG ( $P<0.01$ )。综合以上数据间的比较结果可知, 无论以  $\cdot\text{OH}$  清除率作为优先考察指标还是综合评价, 试验菌株 BF\_15 的抗氧化能力均优于对照菌株 LGG。

对同一抗氧化指标、同一菌株下, 不同组分之

间的抗氧化能力比较, 结果表明, 试验菌株 BF\_15 中发酵上清液对 DPPH 和  $\cdot\text{O}_2^-$  清除能力显著高于菌悬液 ( $P<0.01$ ); 对  $\cdot\text{OH}$  清除能力高于菌悬液, 而差异不显著 ( $P>0.05$ ); 对抗脂质过氧化能力显著低于菌悬液 ( $P<0.01$ )。对照菌株 LGG 中发酵上清液对 DPPH 和  $\cdot\text{O}_2^-$  清除能力显著高于菌悬液 ( $P<0.01$ ); 对  $\cdot\text{OH}$  清除能力显著低于菌悬液 ( $P<0.01$ ); 对抗脂质过氧化能力显著低于菌悬液 ( $P<0.05$ )。综合以上数据间的比较结果可知, 无论以  $\cdot\text{OH}$  清除率作为优先考察指标还是综合评价, 试验菌株 BF\_15 和对照菌株 LGG 发酵上清液的抗氧化能力均优于菌悬液。

## 2.2 植物乳杆菌 BF\_15 菌株体外安全性评价

2.2.1 BF\_15 菌株有害代谢产物(生物胺、亚硝酸盐、吲哚) 分析 根据 1.2.2.1 节①~③的试验方法, 进行 BF\_15 菌株有害代谢产物(生物胺、亚硝

酸盐、吲哚)检测分析,结果见表3和图2。

表3和图2显示试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG的氨基脱羧酶活性和硝基还原酶活性检测结果均为阴性(-);吲哚试验的靛基质反应检测中,质控菌株大肠杆菌ATCC 25922培养液出现红色圆环,反应呈阳性(+),而试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG培养液均未出现红色圆环,反应均呈阴性(-)。表明:试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG在代谢过程中均不产生生物胺、亚硝酸盐、吲哚等有害代谢产物。

2.2.2 BF<sub>15</sub>菌株溶血活性检测 根据1.2.2.2节试验方法,检测BF<sub>15</sub>菌株溶血活性,结果见图3。

表3 试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG氨基脱羧酶和硝基还原酶活性检测

Table 3 Detection of amino decarboxylase and nitroreductase activity of test strain BF<sub>15</sub> and control strain LGG

菌株编号	生物胺						硝基还原酶
	酪胺	组胺	尸胺	色胺	鲱精胺	苯乙胺	
BF <sub>15</sub>	-	-	-	-	-	-	-
LGG	-	-	-	-	-	-	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

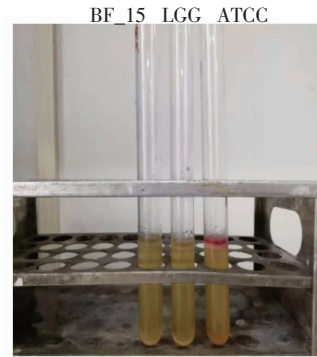


图2 试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG及质控菌株大肠杆菌的靛基质反应检测

Fig.2 Indigo substrate reaction detection of test strain BF<sub>15</sub> with control strain LGG and quality control strain *E. coli*



图3 试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG及质控菌株大肠杆菌ATCC 25923的溶血活性检测

Fig.3 Detection of hemolytic activity of test strain BF<sub>15</sub> with control strain LGG and quality control strain *E. coli* ATCC 25923

由图3可知,质控菌株金黄葡萄球菌ATCC 25923菌落周围出现溶血圈,表现为溶血阳性(+),而试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG的菌落周围没有溶血圈,均为溶血阴性(-)。结果表明:试验菌株BF<sub>15</sub>与对照菌株LGG均无溶血活性。

### 2.3 植物乳杆菌BF<sub>15</sub>菌株对DSS诱导小鼠结肠氧化损伤的影响

2.3.1 BF<sub>15</sub>菌株干预下小鼠结肠氧化损伤模型组织病理切片及HE染色观察分析 根据1.2.3.1

和1.2.3.2节的实验方法,对BF<sub>15</sub>菌株干预下小鼠结肠氧化损伤模型组与其它对照组小鼠的结肠组织进行病理切片及HE染色观察,结果见图4。

由图4可知,正常对照组小鼠的结肠黏膜上皮组织完整且结构清晰,上皮细胞排列紧密整齐,隐窝腺体明显完整,杯状细胞丰富,无炎性细胞浸润,无溃疡发生;DSS模型组小鼠的结肠黏膜组织遭到破坏,上皮细胞排列紊乱,隐窝结构局部消失或变形,杯状细胞丢失,大量炎性细胞浸润,呈典

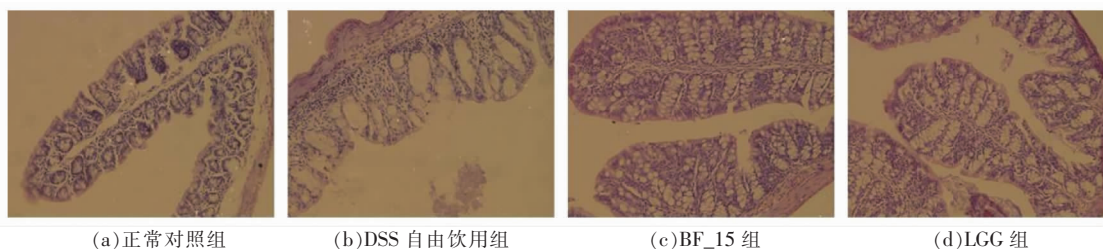


图 4 不同处理组小鼠结肠组织 HE 染色 (H&E×200)

Fig.4 Colon tissue HE staining of mice in different treatment groups (H & E×200)

型炎症病变,溃疡形成,造模成功。与模型组相比,试验菌株 BF\_15 和对照菌株 LGG 干预组,结肠粘膜上皮组织比较完整,上皮细胞排列较为整齐,隐窝腺体比较完整,杯状细胞较为丰富,少量炎性细胞浸润,未出现大面积溃疡。结果表明:2 株益生菌(即试验菌株 BF\_15 和对照菌株 LGG)的早期干预对 DSS 诱发的小鼠结肠氧化损伤均具有一定的预防缓解和保护作用。

2.3.2 BF\_15 菌株干预下小鼠结肠氧化损伤模型组织 T-SOD 和 MDA 检测 根据 1.2.3.3 节实验方法,对 BF\_15 菌株干预下小鼠结肠氧化损伤模型组与其它对照组小鼠的结肠组织进行 T-SOD 活力及 MDA 含量测定,结果见表 4。

由表 4 可知,相对于正常对照组,DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型组结肠组织中 T-SOD 活性显著降低( $P < 0.01$ ),MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ )。2 株益生菌干预组(即试验菌株 BF\_15 干预组和对照菌株 LGG 干预组)的 DSS 诱导小鼠溃疡性结肠炎结肠组织中 T-SOD 活性均显著高于模型组 ( $P < 0.01$ )、MDA 含量均显著低于模型组 ( $P < 0.01$ ); 试验菌株 BF\_15 干预组与对照菌株 LGG 干预组相比,无论是 T-SOD 活性指标,还是 MDA 含量指标,差异均不显著( $P > 0.05$ )。结果表明,益生菌的早期灌胃干预即试验菌株 BF\_15 早期灌胃干预或对照菌株 LGG 早期灌胃干预,均可明显缓解 DSS 诱导小鼠结肠的氧化损伤。

### 3 讨论

前期从纯母乳喂养婴儿的新鲜粪便中筛选出一株能够在肠道定植并且具有通过调节肠道菌群增强机体免疫调节能力的益生菌:植物乳杆菌 BF\_15, 进一步开展该菌株的体外抗氧化活性、安

表 4 不同处理组小鼠结肠组织中 MDA 含量及 T-SOD 活力水平

Table 4 The MDA content and T-SOD activity level in colon tissue of mice in different treatment groups

试验动物分组	T-SOD/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mg <sup>-1</sup>
	蛋白	蛋白
正常组	135.11 ± 3.75 <sup>Aa</sup>	0.55 ± 0.12 <sup>Cc</sup>
DSS 模型组	100.79 ± 9.84 <sup>Cc</sup>	1.99 ± 0.21 <sup>Aa</sup>
BF_15 组	110.41 ± 10.77 <sup>Bcb</sup>	1.11 ± 0.17 <sup>Bb</sup>
LGG 组	115.59 ± 10.68 <sup>Bb</sup>	1.08 ± 0.24 <sup>Bb</sup>

注:不同处理组相比, $n=3, \bar{x} \pm s$ ;表中上标字母为邓肯氏新复极差测验结果(小写字母  $\alpha=0.05$ ;大写字母  $\alpha=0.01$ );上标字母 A/a——C/c 表示同一列数值的差异显著性。

全性与缓解肠道氧化损伤的研究。结果表明,BF\_15 具有较强的体外抗氧化能力:能够耐受高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(3.5 mmol/L),并且菌株及其代谢产物均可以有效清除环境中 DPPH·、·O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH 等氧自由基;进一步以 DSS 诱导的小鼠结肠氧化损伤为动物模型,发现:通过早期灌胃小鼠,菌株 BF\_15 可显著减轻小鼠肠黏膜损伤及炎症细胞浸润的程度,提高了 T-SOD 活性,降低了 MDA 含量,进而有效缓解了 DSS 诱导小鼠结肠氧化损伤的症状。体内外实验结果综合表明:菌株 BF\_15 具有较强的体外抗氧化和体内缓解肠道氧化应激益生功能,且水平与对照菌株 LGG 相当。

由于缺乏过氧化氢酶(CAT)活性,乳杆菌通常对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有较差的抗性,研究表明:具有潜在抗氧化能力的乳酸菌,对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 均具有一定的耐受能力:Kullisjar 等<sup>[25]</sup>发现具有抗氧化活性的发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)E-3 和 E-8 在浓度为 1 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中存活的时间分别为 180 min 和 150 min,而无抗氧化活性的发酵乳杆菌

(*Lactobacillus fermentum*)E-338-1-1 的存活时间仅为 90 min; Tang 等<sup>[26]</sup>筛选出一株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)MA2 能够耐受浓度 2.0 mmol/L 的  $H_2O_2$ , 高于目前的相关报道。本研究中的植物乳杆菌 BF\_15 菌株可耐受  $H_2O_2$  的浓度高达 3.5 mmol/L, 明显高于 MA2 与本试验对照菌株 LGG (对照菌株 LGG 可耐受  $H_2O_2$  的浓度仅为 1.5 mmol/L)。结果表明: 植物乳杆菌 BF\_15 菌株具有较强的体外抗氧化应激潜力。

活性氧自由基(ROS)中·OH 是肠腔内容物攻击性最强的自由基, 在细胞代谢过程具有很强的化学活性, 可以与任何生物分子以极快的反应速率反应, 是对生物体危害最大的 ROS<sup>[27]</sup>。本研究表明: 无论以·OH 清除率作为优先考察指标还是综合评价, 植物乳杆菌 BF\_15 菌株的抗氧化能力均高于本试验对照菌株 LGG。Su 等<sup>[28]</sup>从婴儿粪便中分离的高抗氧化菌株鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)4B15 和格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)4M13 的菌悬液对 DPPH 的清除能力为 37.0%, 低于本研究的试验菌株(母乳婴儿源植物乳杆菌 BF\_15 对 DPPH 的清除能力为 38.56%); 马爽等<sup>[29]</sup>同样以 LGG 为对照菌株, 从新生儿肠道中筛选出一株高抗氧化菌株: 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)MGSHC4302, 对·OH 和 DPPH 清除率均低于对照菌株 LGG; 本研究中的试验菌株 BF\_15 各项抗氧化指标(清除·OH、DPPH、 $O_2^-$  自由基和抗脂质过氧化能力)均高于 LGG。由此表明, 母乳婴儿源植物乳杆菌 BF\_15 具有作为高抗氧化菌株的潜力。体外抗氧化活性只是对乳酸菌缓解氧化应激能力的初步评价和参考指标, 乳酸菌是否具有缓解氧化应激能力, 尚需通过体内氧化应激干预试验验证。

食源性乳酸菌可能代谢产生一些有害酶, 如脱羧酶、硝基还原酶、偶氮还原酶等, 其代谢产物对人类的健康带来很大的安全隐患<sup>[30]</sup>; 具有潜在溶血活性的菌株侵入机体后可能引起局部或全身性的感染<sup>[22]</sup>。因此, 产生有害代谢产物能力及溶血活性的分析是安全性评价必不可少的部分。本团队之前进行了 BF\_15 菌株的药敏性试验与质粒检测, 结果表明: BF\_15 具备固有耐药性, 还对苯唑西林、头孢噻吩具有耐药性, 然而不存在抗性质

粒, 即不存在耐药因子传递的危险。本试验 BF\_15 菌株的靛基质试验、硝酸盐还原酶试验、氨基脱羧酶试验均为阴性, 且无溶血现象发生。综合以上结果可判定 BF\_15 菌株属于安全菌株。尚有待下一步进行体内遗传毒性实验、传统致畸试验、相关血液学指标检验和人体试验验证。

体内实验评估益生菌缓解结肠氧化损伤的功能, 首先通过结肠组织切片观察结肠组织的炎症变化情况(肠道黏膜完整性、通透性等), 能够直观判断肠黏膜的损伤程度; 其次, 丙二醛(MDA)作为氧化应激过程中的脂质过氧化物, 可引起组织细胞损伤, 其含量常用来评估氧化应激的程度; 超氧化物歧化酶(SOD)是机体清除氧自由基的重要酶类, 能够清除氧自由基, 从而抑制肠组织中的脂质过氧化反应, 其活力间接反映了机体清除氧自由基的能力<sup>[31]</sup>。本研究结果发现: 试验菌株 BF\_15 可以明显缩小结肠溃疡范围, 减少中性粒细胞为主的炎性细胞浸润、减轻杯状细胞缺失和隐窝结构破坏; 显著提高结肠组织中 T-SOD 的酶活力, 抑制 MDA 的过量生产, 并且作用效果与对照菌株 LGG 相当。首先, 基于 LGG 改善炎症性肠作用的相关研究结果, 本研究选用 LGG 作为对照菌株<sup>[32-33]</sup>, 确保菌株 BF\_15 缓解 UC 能力评价的可信度; 其次, 根据陈宏辉<sup>[34]</sup>对不同益生菌作用炎症性肠病的结果(双歧杆菌加重了 UC 的结肠黏膜氧化损伤, 乳杆菌减轻了 UC 的结肠黏膜氧化损伤), 相对于 Wang 等<sup>[35]</sup>筛选出的通过提高机体抗氧化酶活性达到缓解小鼠结肠炎症源的双歧杆菌, 从应用于炎症性肠病病人的安全性角度考虑, 本研究的植物乳杆菌 BF\_15 除了具有缓解 UC 的功能外, 安全性更高; 最后, 鉴于人源益生菌与人体肠道菌群之间存在着特异性相互选择的关系<sup>[36]</sup>, 本研究筛选的植物乳杆菌 BF\_15 对缓解我国炎症性肠病病人更具有真正的应用价值。

综上所述, 本研究探明: 来自母乳婴儿源植物乳杆菌 BF\_15 菌株具有较强的抗  $H_2O_2$  活力以及其它体外抗氧化活性; 不产生有害代谢产物, 不具有溶血性, 具备一定的安全性; 通过早期灌胃小鼠, BF\_15 菌株能够有效缓解 DSS 诱导小鼠结肠氧化损伤的症状。然而, BF\_15 菌株抗氧化特别是体内抗氧化的作用机制, 还有待进一步深入研究。



在理论研究方面,本研究为来自人体母乳婴儿源益生菌的开发应用及其早期干预缓解炎症性肠病提供了科学依据,为氧化应激作为治疗 UC 等肠道疾病的新靶点提供了借鉴指导;在产业实践方面,有助于新型功能性乳酸菌的开发,进而促进乳酸菌产业高速发展。

### 参 考 文 献

- [1] 王新民. 人体抗氧化防御系统浅谈[J]. 卫生职业教育, 2011, 29(14): 156-158.  
WANG X M. A brief talk on human body's antioxidant defense system[J]. Health Vocational Education, 2011, 29(14): 156-158.
- [2] 赵吉春. 植物乳杆菌抗氧化评价及抗氧化机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.  
ZHAO J C. Evaluation of antioxidative abilities of *Lactobacillus plantarum* and the antioxidative mechanisms[D]. Wuxi: Jiangna University, 2018.
- [3] 赵晓军. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜中  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的表达及意义[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2008.  
ZHAO X J. The expression and role of  $\gamma$ -GCS in colonic mucosa of ulcerative[D]. Beijing: Chinese PLA Postgraduate Medical School, 2008.
- [4] HALA E H, SOHA S Z, SABER A I, et al. P53 antibodies, metallothioneins, and oxidative stress markers in chronic ulcerative colitis with dysplasia[J]. World Journey of Gastroenterology, 2011, 17(19): 2417-2423.
- [5] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies[J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [6] KAPLAN G G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2015, 12(12): 720-727.
- [7] MAMULA P, TELEGA G W, MRKOWITZ J E, et al. Inflammatory bowel disease in children 5 years of age and younger[J]. The American Journal of Gastroenterology, 2002, 97(8): 2005-2010.
- [8] 杨泽云. 溃疡性结肠炎的发病机制与治疗进展[J]. 临床合理用药杂志, 2015(30): 180-181.  
YANG Z Y. Progress in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis[J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2015(30): 180-181.
- [9] 李焱清. 乳杆菌预防 DSS 诱导肠道黏膜氧化损伤的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.  
LI Y Q. A study on *Lactobacilli* preventing mucosa oxidation injury induced by DSS[D]. Wuxi: Jiangna University, 2011.
- [10] HAN W, MERCENIER A, AIT-BELGNAOUI A, et al. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2010, 12(11): 1044-1052.
- [11] EL -BAZ A M, KHODIR A E, ADEL EL -SOKKARY M M, et al. The protective effect of *Lactobacillus* versus 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis model by modulation of gut microbiota and Nrf2/Ho-1 pathway[J]. Life Sciences, 2020, 256: 117927.
- [12] PALMER C, BIK E M, DI GIULIO D B, et al. Development of the human infant intestinal microbiota[J]. Plos Biology, 2007, 5(7): e177.
- [13] 陈卫, 田丰伟, 赵鑫, 等. 乳酸菌干预氧化应激的研究进展[J]. 中国食品学报, 2012, 12(11): 1-7.  
CHEN W, TIAN F W, ZHAO X, et al. Recent advance on intervention of LAB in oxidative stress[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(11): 1-7.
- [14] MARTIN R, LANGA S, REVIRIEGO C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut[J]. Journal of Pediatrics, 2003, 143(6): 754-758.
- [15] JELENA S, SEPP E, KOLK H, et al. Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly[J]. British Journal of Nutrition, 2011, 105(8): 1235-1244.
- [16] LI S, ZHAO Y, ZHANG L, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1914-1919.
- [17] GUTTERIDGE J M C. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA[J]. Biochemical Journal, 1987, 243(3): 709-714.
- [18] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the anti-oxi-

- dation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948.
- [19] HE Z, WANG X, LI G, et al. Antioxidant activity of prebiotic ginseng polysaccharides combined with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* C88 [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(7): 1673-1682.
- [20] KULLISAAR T, SONGISEPP E, MIKELSAAR M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects [J]. British Journal of Nutrition, 2003, 90(2): 449-456.
- [21] 黄燕燕, 何嘉敏, 赵珊, 等. 植物乳杆菌 DMDL9010 培养基优化及其安全性评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 130-140.
- HUANG Y Y, HE J M, ZHAO S, et al. Medium optimization and its safe assessment of *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 130-140.
- [22] BOVER -CID S, HOLZAPFEL W H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53(1): 33.
- [23] 张丹青. 潜在应用乳酸菌安全性的初步评价 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- ZHANG D Q, Preliminary safety assesment of lactic acid bacteria strains for potential use in industrial [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.
- [24] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 2-3.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standards for testing & assessment of health food[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 2-3.
- [25] KULLISAAR T, ZILMER M, MIKELSAAR M, et al. Two antioxidative *Lactobacilli* strains as promising probiotics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 72(3): 215-224.
- [26] TANG W, XING Z, LI C, et al. Molecular mechanisms and *in vitro* antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1642-1649.
- [27] 胡晓丽. 乳酸菌抗氧化性及其对小鼠结肠氧化还原状态调节的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- HU X L. Study an antioxidant of *Lactobacillus* and its adjusting an antioxidant redox state in colon[D]. Wuxi: Jiangna University, 2009.
- [28] SU O N, YEON J J, YOUNG L J, et al. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces[J]. Plos One, 2018, 13(2): e0192021.
- [29] 马爽, 张雪, 张莉, 等. 益生性植物乳杆菌的体外抗氧化活性研究[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(4): 10-14.
- MA S, ZHANG X, ZHANG L, et al. *In vitro* study on antioxidative ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum*[J]. China Dairy Industry, 2013, 41(4): 10-14.
- [30] BERNARDEAU M, VERNOUX J P, HENRI-DUBERNET S, et al. Safety assessment of diary microorganisms: The *Lactobacillus* genus[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(3): 278-285.
- [31] 谭悦. 山姜素对溃疡性结肠炎肠上皮屏障作用的影响[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- TAN Y. Effects of alpinetin on intestinal epithelial barrier in ulcerative colitis [D]. Shenyang: China Medical University, 2018.
- [32] PAGNINI C, CORLETO V D, MARTORELLI M, et al. Mucosal adhesion and anti-inflammatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human colonic mucosa: A proof-of-concept study[J]. 世界胃肠病学杂志(英文版), 2018, 24(41): 4652-4662.
- [33] 田春雨. 乳酸杆菌对 DSS-诱导的小鼠溃疡性结肠炎的抑制作用[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- TIAN C Y. *Lactobacillus* inhibits DSS-induced ulcerative colitis in mice[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018.
- [34] 陈宏辉. 不同肠道益生菌株治疗急性溃疡性结肠炎小鼠模型的作用及其机制[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- CHEN H H. The effect and mechanism of various probiotics strains in mice ulcerative colitis [D]. Changsha: Central South University, 2007.
- [35] WANG Y, GUO Y, CHEN H, et al. Potential of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 in relieving colitis by gut microbiota, immune, and anti-oxidative stress[J]. Cana-

- dian Journal of Microbiology, 2018, 64(5): 327–337.
- [36] 郭飞翔, 陈大卫, 瞿恒贤, 等. 人源益生菌研究与应用开发进展[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(8): 27–31, 41.
- GUO F X, CHEN D W, QU H X. Review on research and application of probiotics origin from human[J]. China Dairy Industry, 2014, 42(8): 27–31, 41.

### Studies on the *in Vitro* Antioxidant Activity and Alleviation of DSS-induced Oxidative Damage in Mice Colon of *Lactobacillus plantarum* BF\_15 Derived from Breast Milk

Zhang Na<sup>1,2,5</sup>, Zhao Lina<sup>1,3</sup>, Li Chen<sup>1,3,5</sup>, Niu Zhihua<sup>1,3</sup>, Kang Hongyan<sup>4,5</sup>, Tian Hongtao<sup>1,3,5\*</sup>, Luo Yunbo<sup>6</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, Hebei

<sup>2</sup>College of Biochemistry & Environmental Engineering, Baoding University, Baoding 071000, Hebei

<sup>3</sup>National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071000, Hebei

<sup>4</sup>New Hope Hebei Tianxiang Dairy Co., Ltd., Baoding 071000, Hebei

<sup>5</sup>Hebei Technology Innovation Center of Probiotic Functional Dairy Product, Baoding 071000, Hebei

<sup>6</sup>College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

**Abstract** In this study, with *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) as control strain, probiotic probiotic *Lactobacillus plantarum* BF\_15, isolated from breast milk infant, was used as the research object to evaluate its antioxidant activity *in vitro*, safety and alleviation of the DSS-induced oxidative damage in the colon of mice. The results show that the test strain *Lactobacillus plantarum* BF\_15 could tolerate high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.5 mmol/L). In the fermentation supernatant, the scavenging ability of strain BF\_15 on DPPH was lower than that of the control strain LGG ( $P < 0.01$ ); the scavenging ability of  $\text{oOH}$  was higher than LGG ( $P < 0.05$ ); the scavenging ability of  $\cdot\text{O}_2^-$  was higher than LGG ( $P > 0.05$ ); anti-lipid peroxidation ability was lower than LGG ( $P < 0.01$ ). In the bacterial suspension, the scavenging ability of strain BF\_15 on DPPH and  $\cdot\text{O}_2^-$  was higher than that of the control strain LGG ( $P > 0.05$ ); the scavenging ability on  $\cdot\text{OH}$  was higher than LGG ( $P < 0.01$ ); the anti-lipid peroxidation ability was lower than LGG ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, Neither the test strain BF\_15 nor the control strain LGG produced harmful metabolites (bioamine, nitrite, indole), and had hemolytic properties. In animal experiments, the strain BF\_15 could reduce the degree of intestinal mucosal damage and inflammatory cell infiltration, increase the activity of superoxide dismutase (SOD) ( $P < 0.01$ ), and reduce the level of malondialdehyde (MDA) content ( $P < 0.01$ ) through early intragastric administration, which effectively alleviated the symptoms of DSS-induced oxidative damage in the colon of mice; its effect was equivalent to that of the control strain LGG ( $P > 0.05$ ). This study provided a scientific basis for the development and application of probiotics derived from human breast milk infants and their early intervention to relieve intestinal diseases such as ulcerative colitis (UC). This study laid a solid foundation for probiotics in the prevention of intestinal diseases such as ulcerative colitis (UC), and provided a reference guide for oxidative stress as a new therapeutic target.

**Keywords** breast-milk infant-derived probiotics; *Lactobacillus plantarum*; antioxidant activity; oxidative stress; DSS-induced ulcerative colitis (UC)