

## 传统发酵肉源乳酸菌介导 *NPC1L1*、*ABCG5/G8* 基因表达 对胆固醇代谢的影响

曹凯慧<sup>1</sup>, 张开屏<sup>2</sup>, 马俊杰<sup>1</sup>, 程峰<sup>1</sup>, 杨雪倩<sup>1</sup>, 田建军<sup>1\*</sup>, 靳焯<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018

<sup>2</sup> 内蒙古商贸职业学院餐饮食品系 呼和浩特 010070

**摘要** 过高的胆固醇摄入可能会导致机体心脑血管出现健康问题。通过乳酸菌可以调控小肠中胆固醇代谢相关基因的表达,调节机体内胆固醇的吸收代谢,从而影响体内胆固醇含量。对 15 株传统发酵肉制品中分离筛选的乳酸菌进行体外降胆固醇能力和耐酸耐胆盐能力筛选,将筛选到的乳酸菌用于动物实验。结果表明,15 株乳酸菌中有 4 株乳酸菌(CM6、CM9、CM28、CM42)具有良好的体外降胆固醇能力,平均降解率为 52.92%。对它们进行耐酸和耐胆盐试验,在 pH 2 和 0.3%胆盐添加量的条件下菌株 CM6 活菌数达到 10<sup>6</sup> CFU/mL,选择 CM6 进行后续动物实验。乳酸菌灌胃小鼠 30 d 后,乳酸菌组小鼠血清中总胆固醇含量和甘油三酯含量显著低于对照组( $P<0.05$ );乳酸菌组小鼠小肠中 *NPC1L1* 基因相对表达量显著低于对照组( $P<0.05$ ),*ABCG5/G8* 基因表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )结论:乳酸菌 CM6 具有调控胆固醇代谢相关基因表达的能力,从而降低体内胆固醇含量。

**关键词** 乳酸菌; 胆固醇; *NPC1L1*; *ABCG5/G8*; 基因相对表达量

**文章编号** 1009-7848(2023)05-0096-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.011

胆固醇是人体组织中调节膜流动性的重要功能成分,是类固醇激素、维生素 D 和胆汁酸的前体<sup>[1]</sup>。过高的胆固醇积累,是高胆固醇血症和动脉粥样硬化的主要原因。胆固醇主要在肠道进行吸收和排泄,肠道每天可吸收膳食胆固醇的 50%,其余的膳食胆固醇通过粪便的形式排出体外<sup>[2-3]</sup>。肠道内胆固醇的吸收主要通过多蛋白跨膜蛋白(Niemann-Pick C1 Like 1, NPC1L1)。NPC1L1 蛋白位于小肠上皮细胞<sup>[4]</sup>,负责将胆固醇特异性转运到细胞内,有效吸收肠道中的胆固醇,维持体内胆固醇含量的动态平衡。NPC1L1 分子有两个重要的结构功能区域——N 端和 C 端,N 端结构域可以特异性地结合一个胆固醇分子,C 端内吞信号序列与细胞膜的磷脂内层结合<sup>[5]</sup>,当食物或胆汁来源的胆固醇被运输到小肠上皮细胞的细胞膜表面

后,NPC1L1 朝向肠腔的 N 端就会特异性地与胆固醇结合,致 NPC1L1 构象会发生改变,C 端内吞信号序列与磷脂内层解离,与细胞内的接头蛋白结合,被接头蛋白识别后发生胆固醇内吞,完成对胆固醇的吸收<sup>[6]</sup>。ATP 结合盒转运蛋白家族成员 G5 和 G8 (ATP binding cassette transporter sub-family G member 5/8, ABCG5/G8)ABCG5 和 ABCG8 主要存在于人的小肠和肝脏,作为一种异二聚体发挥作用,对于控制胆固醇的吸收至关重要<sup>[7]</sup>。膳食中的胆固醇只有与小肠上皮细胞中的 ABCG5/G8 蛋白特异性结合才能进入肠腔中,完成小肠对胆固醇的吸收过程。

目前服用他汀类药物具有降低体内胆固醇的能力,然而,副作用大,被认为不是最佳的长期解决方案<sup>[8]</sup>。益生菌是一类达到一定数量时,对宿主产生健康益处的活性微生物<sup>[9]</sup>。乳酸菌广泛存在于人体肠道中,具有调节肠道菌群平衡,抑制肠道中病原体繁殖等作用,对人体健康产生益处。大量研究表明,乳酸菌具有降低胆固醇含量的能力<sup>[10]</sup>。

本文从 15 株传统发酵肉制品中分离筛选到的乳酸菌中选出 1 株具有良好的胆固醇降解率,良好的耐酸、耐胆盐特性的乳酸菌 CM6,研究其对小鼠血清中胆固醇含量、胆固醇吸收相关基因的

**收稿日期:** 2022-05-08

**基金项目:** 国家自然科学基金地区项目(31960514);内蒙古自治区科技计划项目(2019GG239);内蒙古自治区科技成果转化项目(2019CG066);内蒙古自然科学基金项目(2021MS03090)

**第一作者:** 曹凯慧,女,硕士生

**通信作者:** 田建军 E-mail: imaut@163.com

影响,并探究其降胆固醇的机理,为乳酸菌的功能应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

总胆固醇(T-CHO)测试盒(试剂编号 A111-1-1)、甘油三酯(TG)测试盒(试剂编号 A110-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒(试剂编号 A112-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测试盒(试剂编号 A113-1-1),南京建成生物工程研究所;小鼠生长基础饲料,北京科澳协力饲料有限公司;Total RNA 提取试剂、去除基因组 DNA 反转录试剂、TB Green 嵌合荧光法实时荧光定量 PCR 试剂,宝生物工程(大连)有限公司;管家基因  *$\beta$ -actin*、*NPC1L1*、*ABCG5/G8* 引物,生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 仪器与设备

SYNERGY H1 型多功能微孔板检测仪,美国伯腾仪器有限公司;PowerPac™Basic 型稳压稳流电泳仪,美国伯乐仪器有限公司;Light Cycler 96 型实时荧光定量 PCR 仪,瑞士罗氏集团有限公司;Eppendorf 5810R 型台式高速冷冻离心机,德国艾本德集团有限公司;KG-SX-500 型立式压力蒸汽灭菌器,日本鹿儿岛制作所。

### 1.3 乳酸菌与培养基

传统发酵肉源乳酸菌,内蒙古农业大学肉品科学与技术创新团队提供。供试菌株在试验前活化与纯化,经 MRS 液体培养基,37℃、24 h 培养,连续传代 3 次,用于后续试验。

MRS 培养基:蛋白胨 10.0 g/L、牛肉浸粉 10.0 g/L、酵母提取物 5.0 g/L、七水合硫酸镁 0.5 g/L、硫酸锰 0.25 g/L、磷酸氢二钾 2.0 g/L、柠檬酸二胺 2.0 g/L、乙酸钠 5.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L、吐温-80 1.0 mL,pH 6.2~6.4。

胆固醇溶液:胆固醇 0.12 g、牛胆盐 0.24 g、蔗糖脂肪酸酯 0.12 g、冰乙酸 10 mL、吐温 1.2 mL,超声振荡至完全溶解。

MRS-CHOL 培养基:上述胆固醇通过细菌过滤器(0.2  $\mu$ m,25 mm)加至 600 mL 灭菌后 MRS 液体培养基中,使用灭菌 NaOH 溶液调 pH 至 6.2~6.4。

## 1.4 方法

### 1.4.1 降胆固醇乳酸菌的筛选

1.4.1.1 绘制胆固醇标准曲线 采用邻苯二甲醛法<sup>[1]</sup>,称量 0.05 g 邻苯二甲醛,用无水乙醇溶解并定容 50.00 mL。称取胆固醇 50.00 mg,用冰乙酸溶解并定容 50.00 mL,制得胆固醇标准液。使用冰乙酸稀释胆固醇标准液,得到质量浓度分别为 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/mL 胆固醇工作液。按硫酸与冰乙酸体积比 1:1 制备混酸溶液。在洁净试管中加入 0.50 mL 胆固醇工作液,0.20 mL 邻苯二甲醛溶液,4.30 mL 混酸,静置 30 min 后测定 OD<sub>550nm</sub>,每组 3 个平行。

1.4.1.2 乳酸菌降胆固醇能力的测定 将活化的菌株(10<sup>10</sup> CFU/mL)以 5.0%(体积分数)的接种量接种在 MRS-CHOL 培养基中,在恒温箱里 37℃ 培养 48 h。以未接种乳酸菌 MRS-CHOL 为空白组。培养 48 h 后,吸 0.50 mL 菌悬液和 4.50 mL 无水乙醇加入离心管中,静置 10 min,3 000 r/min 离心 15 min。取上清液 0.50 mL、邻苯二甲醛液 0.20 mL、混合酸 4.30 mL,为试验组,振荡摇匀。静置 30 min 后于 OD<sub>550nm</sub> 处测定吸光值,计算胆固醇降解率。

$$\text{胆固醇降解率}(\%) = (C - A) / C \times 100$$

式中,C——未接菌培养基的 OD<sub>550nm</sub> 值所对应的胆固醇含量(mg/mL);A——试验菌株 OD<sub>550nm</sub> 值所对应的胆固醇含量(mg/mL)。

1.4.2 乳酸菌耐酸能力的测定 在 MRS 培养基的基础上分别调节 pH 值为 2.0,3.0,4.0,活化的菌株(10<sup>10</sup> CFU/mL)以 4.0%(体积分数)的接种量接种乳酸菌菌株,培养 3 h 后平板计数法计算活菌数,确定乳酸菌的耐酸性能<sup>[12]</sup>。

1.4.3 乳酸菌耐胆盐能力的测定 活化后的乳酸菌(10<sup>10</sup> CFU/mL)以 4.0%(体积分数)的接种量接种在牛胆盐含量 0.1%,0.2%,0.3%(质量分数)的培养基中,培养 12 h 后平板计数法记活菌数,以确定乳酸菌的耐胆盐能力<sup>[12]</sup>。

1.4.4 小鼠分组与饲养 36 只 4 周龄 ICR 雄性小鼠,平均体重 20 g,内蒙古大学实验动物研究中心。实验饲养期间保持饲养房通风、透光和清洁的卫生,饲养房温度(23.0±1.0)℃、相对湿度(50±

5.0)%，维持饮水充足及垫料干燥，适应性喂养7 d。按各组间平均体重无明显差异分为3组，乳酸菌组、对照组、空白组各12只(见表1)。

供试菌液通过灌胃形式给予小鼠，将活化3代的乳酸菌以4.0%接种量接种至液体MRS培养基中，37℃培养24 h，4 000 r/min离心10 min，用

生理盐水洗涤3次，将生理盐水重悬稀释至浓度为 $10^6$  CFU/mL。各组小鼠每日9:00-11:00灌胃1次，连续灌胃30 d。

高胆固醇饲料配方<sup>[13]</sup>：基础饲料81.7%、胆固醇3.0%、胆盐0.3%、猪油10.0%、蛋黄粉5.0%。

表1 各组小鼠饲养方案

Table 1 Feeding scheme of mice in each group

| 组别   | 日常饲喂     | 灌胃                                     |
|------|----------|----------------------------------------|
| 乳酸菌组 | 高胆固醇饲料+水 | 0.5 mL 菌液(菌液浓度 $1 \times 10^6$ CFU/mL) |
| 对照组  | 高胆固醇饲料+水 | 0.5 mL 0.8%生理盐水                        |
| 空白组  | 基础饲料+水   | 0.5 mL 0.8%生理盐水                        |

1.4.5 实验动物的处理 灌胃10,20,30 d，分别处死解剖小鼠，处死前12 h断食，测定空腹体重，随后摘眼球采血，血样放入EDTA-K管中暂存，之后将血液4 000 r/min离心1 min，分离血清。将血清保存在-80℃。解剖小鼠取出小肠，放入冻存管中-80℃保存<sup>[14]</sup>。

1.4.6 小鼠血清脂质的测定 依照试剂盒说明书，采用比色法，使用多功能微孔板检测仪测定小鼠血清中总胆固醇(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)含量。

1.4.7 *NPC1L1*、*ABCG5/8* 基因相对表达量的测

定 使用RNAiso Plus提取小肠细胞总RNA，测定其浓度和完整性，使用去除基因组DNA反转录试剂转录合成cDNA。以 $\beta$ -actin为管家基因来确定目标基因的表达水平，目标基因和管家基因 $\beta$ -actin的引物见表2。使用TB Green嵌合荧光法实时荧光定量PCR试剂进行荧光实时定量RQR。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组小鼠小肠中*NPC1L1*的表达水平。

其中， $\Delta Ct$  =待测样品的目的基因Ct均值—对应内参基因的均值， $\Delta\Delta Ct$  =各组 $\Delta Ct$  -空白组 $\Delta Ct$ ，经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算，即相当于校正后，将空白组的基因设为1，其余各组相对正常组的含量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

表2 RT-PCR的引物序列

Table 2 Primer sequence of RT-PCR

| 基因名称                           | 引物序列(5'-3')             |                           |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                                | 上游引物                    | 下游引物                      |
| $\beta$ -actin <sup>[15]</sup> | GTGGGGCGCCCCAGGCACCGGGC | CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC |
| <i>NPC1L1</i> <sup>[16]</sup>  | TCTTCCCCTTCCTTGCCATT    | CGGCAGGCTAATTGTTGAGG      |
| <i>ABCG5</i> <sup>[17]</sup>   | GCAGGGACCGAATTGTGATTG   | AGGGATTGGAATGTTCCAGGACAG  |
| <i>ABCG8</i> <sup>[18]</sup>   | GGCTCAGGATCGGCTTTTAC    | CCTTGACACAGGCATGAAGCA     |

1.4.8 数据分析 每组试验均设置3次重复，试验结果以平均值±标准偏差( $\bar{x} \pm s, n > 3$ )表示。数据统计分析采用IBM SPSS Statistics 26.0，并做显著性差异分析( $P < 0.05$ )，用Microsoft Excel 2016绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 胆固醇标准曲线的绘制

以胆固醇质量浓度为横坐标，以 $OD_{550nm}$ 值为

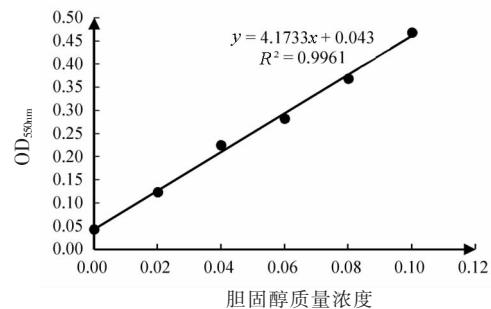


图1 胆固醇标准曲线

Fig.1 Cholesterol standard curve

纵坐标,绘制胆固醇标准曲线,结果如图 1 所示。胆固醇标准曲线的方程为  $y = 4.1733x + 0.043$ ,  $R^2 = 0.9961$ 。回归方程线性关系好,可用于乳酸菌胆固醇降解率的计算。

## 2.2 降胆固醇乳酸菌的筛选

Gilliland 等<sup>[19]</sup>最早发现,从猪粪便中分离出的嗜酸乳杆菌可以降低含胆盐的胆固醇培养基中胆固醇的含量。任大勇等<sup>[20]</sup>从中国东北传统发酵食品中分离出乳酸菌 120 株,测定其体外降胆固醇能力,其中降胆固醇清除率最低为 20.70%,最高>85%。表 3 列出 15 株乳酸菌的体外降胆固醇率。不同乳酸菌对胆固醇的降解率存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。15 株乳酸菌对胆固醇的平均降解率为 37.27%,降解率最高的菌株为 CM6,为 59.46%,降解率最低的菌株为 CM33,为 20.86%。降解率在 20.00%~40.00% 的有 8 株菌株,分别是 CM7、CM8、CM13、CM15、CM18、CM23、CM26、CM33,平均降解率为 27.61%;降解率在 40.00%~50.00% 的乳酸菌有 5 株,分别是 CM25、CM28、CM31、CM38、CM42,平均降解率为 44.29%;降解率在高于 50.00% 的有 2 株,CM6、CM9,胆固醇降解率分别为 59.46%、57.18%,且显著高于其它乳酸菌菌株 ( $P < 0.05$ )。选择胆固醇降解率高的 4 株:CM6、CM9、CM28、CM42 进行后续试验。

## 2.3 乳酸菌耐酸能力

人体胃中 pH 值为 3.0 左右,食物在胃中的停留时间在 2 h 左右。乳酸菌需具有一定的耐酸能力,才能通过胃液达到小肠,发挥功能<sup>[21]</sup>。测定乳酸菌在 pH 2.0、3.0、4.0 的 MRS 培养基中培养 3 h

表 3 乳酸菌的体外降胆固醇能力

Table 3 The cholesterol-lowering ability of lactic acid bacteria *in vitro*

| 菌株名称 | 胆固醇降解率/%                   |
|------|----------------------------|
| CM6  | 59.46 ± 0.02 <sup>a</sup>  |
| CM7  | 34.62 ± 0.28 <sup>c</sup>  |
| CM8  | 26.29 ± 0.18 <sup>cd</sup> |
| CM9  | 57.18 ± 0.17 <sup>a</sup>  |
| CM13 | 28.01 ± 0.21 <sup>cd</sup> |
| CM15 | 28.31 ± 0.29 <sup>cd</sup> |
| CM18 | 28.75 ± 0.07 <sup>c</sup>  |
| CM23 | 29.61 ± 0.16 <sup>c</sup>  |
| CM25 | 40.47 ± 0.25 <sup>b</sup>  |
| CM26 | 24.42 ± 0.27 <sup>d</sup>  |
| CM28 | 47.44 ± 0.16 <sup>b</sup>  |
| CM31 | 44.04 ± 0.29 <sup>b</sup>  |
| CM33 | 20.86 ± 0.16 <sup>c</sup>  |
| CM38 | 41.90 ± 0.26 <sup>b</sup>  |
| CM42 | 47.57 ± 0.19 <sup>b</sup>  |

注:不同字母表示数据之间的显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

的活菌数,分析 CM6、CM9、CM28、CM42 4 株菌的耐酸能力。结果见表 4。随着 pH 值的降低,4 株乳酸菌的活菌数都有下降,不同 pH 值对活菌数的影响存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。相同 pH 值环境下,不同乳酸菌的活菌数具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。在 pH 2.0 时 4 株乳酸菌的平均活菌数为 6.44 lg(CFU/mL),其中 CM6 活菌数最高,为 7.49 lg(CFU/mL),表现出较高的耐酸性能;CM28 活菌数最低,仅 3.60 lg(CFU/mL)。

表 4 乳酸菌的耐酸性

Table 4 Acid resistance of lactic acid bacteria

| 菌株名称 | 活菌数/lg(CFU·mL <sup>-1</sup> ) |                           |                           |
|------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|      | pH 2                          | pH 3                      | pH 4                      |
| CM6  | 7.49 ± 0.03 <sup>ab</sup>     | 7.58 ± 0.08 <sup>aA</sup> | 7.72 ± 0.07 <sup>aA</sup> |
| CM9  | 7.23 ± 0.02 <sup>bc</sup>     | 7.33 ± 0.03 <sup>bb</sup> | 7.68 ± 0.03 <sup>aA</sup> |
| CM28 | 3.60 ± 0.04 <sup>cb</sup>     | 6.45 ± 0.1 <sup>cA</sup>  | 6.53 ± 0.05 <sup>bA</sup> |
| CM42 | 7.43 ± 0.01 <sup>ab</sup>     | 7.53 ± 0.06 <sup>ab</sup> | 7.68 ± 0.06 <sup>aA</sup> |

注:小写字母表示同列之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ );大写字母表示同行之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 乳酸菌耐胆盐能力

乳酸菌可在人体小肠中定植发挥益生作用,小肠中胆盐含量通常在 0.03%~0.30% 之间波动,

通过在细胞外产生高渗透压,对菌体造成一定影响,并且胆盐的毒性作用对细胞膜和 DNA 都有一定程度的损伤<sup>[22]</sup>。通过测定乳酸菌在牛胆盐含量

为 0.10%, 0.20%, 0.30% 的 MRS 培养基中培养 12 h 后的活菌数, 反映乳酸菌的耐胆盐能力。结果如表 5 所示, 4 株乳酸菌对牛胆盐均显示出较好的耐受性。培养基中牛胆盐含量与乳酸菌活菌数呈负相关, 乳酸菌对不同浓度的牛胆盐耐受能力存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。在相同牛胆盐浓度下不同乳酸菌的活菌数存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。当牛胆盐含量为 0.30% 时, 4 株乳酸菌的平均活菌数为

7.50 lg(CFU/mL), 其中 CM42 在牛胆盐含量为 0.30% 时, 活菌数最高, 活菌数为 7.74 lg(CFU/mL); CM9 在牛胆盐含量为 0.30% 时, 胆盐耐受能力最差, 活菌数为 7.39 lg(CFU/mL), CM6、CM9、CM28 的活菌数间不存在显著性差异 ( $P > 0.05$ )。综合 4 株乳酸菌耐酸能力和耐胆盐能力试验结果, 最终选择乳酸菌 CM6 进行后续动物实验。

表 5 乳酸菌胆盐耐受性  
Table 5 Bile salt resistance of lactic acid bacteria

| 菌株名称 | 活菌数 / lg(CFU · mL <sup>-1</sup> ) |                           |                           |
|------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|      | 0.10%                             | 0.20%                     | 0.30%                     |
| CM6  | 9.38 ± 0.02 <sup>aA</sup>         | 8.92 ± 0.02 <sup>aB</sup> | 7.45 ± 0.01 <sup>bC</sup> |
| CM9  | 9.34 ± 0.06 <sup>aA</sup>         | 8.77 ± 0.01 <sup>bB</sup> | 7.39 ± 0.04 <sup>bC</sup> |
| CM28 | 9.14 ± 0.05 <sup>bA</sup>         | 8.83 ± 0.04 <sup>bB</sup> | 7.41 ± 0.02 <sup>bC</sup> |
| CM42 | 8.95 ± 0.06 <sup>cA</sup>         | 8.74 ± 0.04 <sup>cB</sup> | 7.74 ± 0.04 <sup>cC</sup> |

注: 小写字母表示同列之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 大写字母表示同行之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2.5 乳酸菌 CM6 对高胆固醇小鼠血清脂质的影响

分别测定不同组 10, 20, 30 d 小鼠血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度胆固醇 (LDL-C)、高密度胆固醇 (HDL-C) 浓度, 结果如图 2 所示。饲喂高胆固醇饲料可以诱导实验动物脂类物质代谢紊乱, 从而引起血清脂质浓度升高。灌胃乳酸菌 CM6 对高胆固醇小鼠血清脂质水平有一定影响。

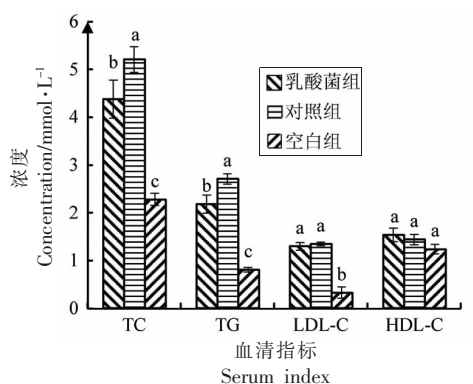
机体内 TC、TG 含量通常保持动态平衡, 体内 TC、TG 含量过高会导致心脑血管疾病的发病率升高<sup>[23]</sup>。乳酸菌组小鼠血清中的 TC、TG 含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 这与 Jeon 等<sup>[15]</sup>和 Li 等<sup>[24]</sup>的研究结果一致。LDL-C 是判断心脑血管健康的重要指标, 其极易被氧化生成氧化态的 LDL-C, 而氧化态的 LDL-C 是导致动脉粥样硬化的主要因子, 被称为坏胆固醇<sup>[25]</sup>。乳酸菌组小鼠血清中的 LDL-C 含量较对照组虽有所下降, 但差异不显著。随着灌胃时间的增加, 乳酸菌组小鼠血清中 TC、TG 含量有所上升, 然而始终低于对照组。HDL-C 是高密度脂蛋白与细胞膜上的胆固醇相结合形成的, HDL-C 可以逆向转运胆固醇至肝脏中, 再由肝脏将胆固醇清除出血液。高 HDL-C 含量可以降低机体动脉粥样硬化的发病率<sup>[26]</sup>。乳酸菌小鼠血清中

的 HDL-C 含量虽高于对照组, 单位差异不明显, 这与 Thakkar 等<sup>[27]</sup>的研究结果一致, 且随着灌胃时间的增长乳酸菌组小鼠血清中 HDL-C 含量升高。以上结果表明灌胃乳酸菌 CM6 能够降低高胆固醇小鼠血清中的 TC、TG、LDL-C 含量, 增加 HDL-C 的含量。

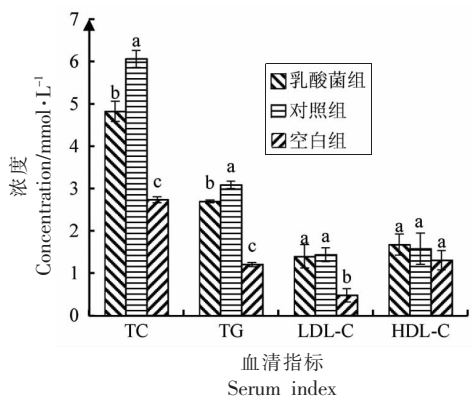
## 2.6 乳酸菌 CM6 对高胆固醇小鼠小肠中胆固醇代谢相关基因表达量的影响

### 2.6.1 乳酸菌 CM6 对高胆固醇小鼠小肠中 NPC1L1 基因表达量的影响

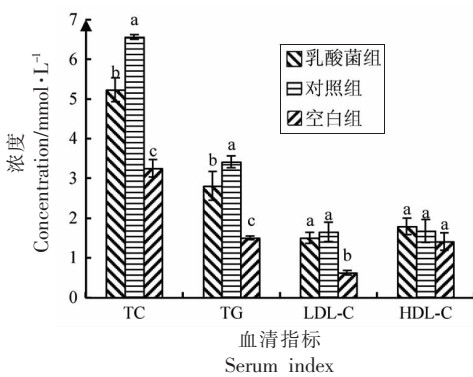
位于小肠上皮细胞的 NPC1L1 蛋白在胆固醇的吸收过程中起重要作用, 降胆固醇药物依泽替米贝就是通过抑制 NPC1L1 mRNA 表达, 起到降低胆固醇的效果<sup>[28]</sup>。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算各组小鼠小肠中 NPC1L1 基因相对表达量, 经  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算, 将空白组的基因相对表达量设为 1, 其余各组相对空白组的相对表达量即  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。乳酸菌组的 NPC1L1 相对表达量在 10, 20, 30 d 时分别为  $0.96 \pm 0.01$ ,  $0.91 \pm 0.01$ ,  $0.89 \pm 0.02$ , 与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。随着灌胃时间的增加, 乳酸菌组的 NPC1L1 基因相对表达量下降, 表明乳酸菌 CM6 可以降低 NPC1L1 基因相对表达量, 起到调控 NPC1L1 基因的作用, 降低小肠上皮细胞对胆固醇的吸收, 从而影响体内胆



(a)10 d 小鼠血清指标



(b)20 d 小鼠血清指标



(c)30 d 小鼠血清指标

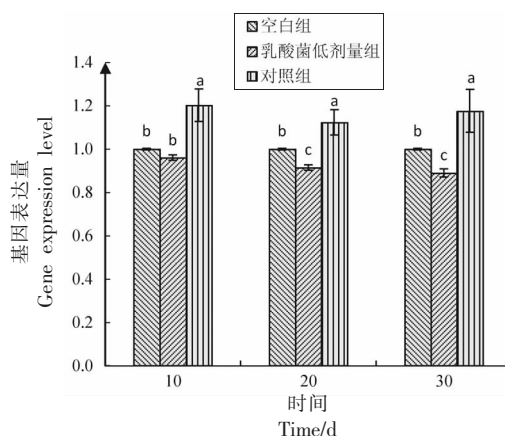
注:不同小写字母间表示存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图 2 小鼠血清指标

Fig.2 Serum indexes of mice

固醇含量,这与 Heo 等<sup>[29]</sup>的研究结果一致。

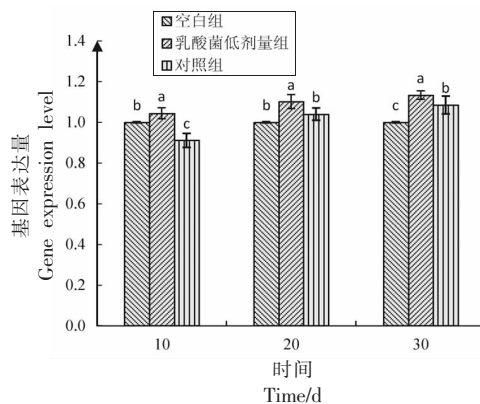
2.6.2 乳酸菌 CM6 对高胆固醇小鼠小肠中 *ABCG5/ABCG8* 基因表达量的影响 *ABCG5/ABCG8* 蛋白于小肠上皮表达,其可以通过阻止胆固醇吸收和促进胆固醇分泌到胆汁中来介导胆固醇逆向转运(RCT)的最后一步,而提高 *ABCG5/ABCG8* mRNA 的表达可以增加胆固醇的排出<sup>[30]</sup>。



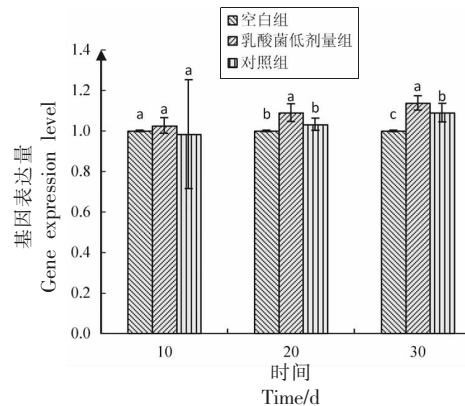
注:不同小写字母间表示存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图 3 小鼠 *NPC1L1* 基因相对表达量

Fig.3 Relative expression level of *NPC1L1* gene of mice



(a)小鼠 *ABCG5* 基因相对表达量



(b)小鼠 *ABCG8* 基因相对表达量

注:不同小写字母间表示存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图 4 小鼠 *ABCG5* 基因和 *ABCG8* 基因的相对表达量

Fig.4 Relative expression level of *ABCG5* gene and *ABCG8* gene of mice

乳酸菌组的 *ABCG5* 相对表达量在 10,20,30 d 时分别为  $1.04\pm 0.03$ ,  $1.10\pm 0.03$ ,  $1.13\pm 0.02$ , 乳酸菌组

的 *ABCG8* 相对表达量在 10, 20, 30 d 时分别为  $1.02 \pm 0.04$ ,  $1.09 \pm 0.04$ ,  $1.14 \pm 0.04$ , 与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。随着灌胃时间的增长, 乳酸菌组的 *ABCG5/ABCG8* 基因相对表达量逐渐上升, 从而增加胆固醇的排出, 降低小肠对胆固醇的吸收。

### 3 结论

乳酸菌 CM6 可以清除胆固醇培养基中 59.46% 的胆固醇, 且具有良好的耐酸、耐胆盐特性。乳酸菌 CM6 在高胆固醇小鼠中表现出降低血清中 TC、TG、LDL-C 含量, 升高血清中 HDL-C 含量的能力, 且乳酸菌 CM6 可以下调高胆固醇小鼠小肠中 *NPC1L1* 基因的表达, 提高 *ABCG5/ABCG8* 基因的表达 ( $P < 0.05$ ), 从而调节高胆固醇小鼠体内胆固醇含量, 为乳酸菌的功能应用提供理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] DING Z T, HANI A, LI W Y, et al. Influence of a cholesterol-lowering strain *Lactobacillus plantarum* LP3 isolated from traditional fermented yak milk on gut bacterial microbiota and metabolome of rats fed with a high-fat diet[J]. *Food & Function*, 2020, 11(9): 8342-8353.
- [2] GRUNDY S M, METZGER A L. A physiological method for estimation of hepatic secretion of biliary lipids in man[J]. *Gastroenterology*, 1972, 62(6): 1200-1217.
- [3] 李权威, 张开屏, 赵艳红, 等. 乳酸菌调控胆固醇代谢关键因子的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(1): 341-350.  
LI Q W, ZHANG K P, ZHAO Y H, et al. Research progress of regulatory key factors involved in cholesterol metabolism by lactic acid bacteria[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(1): 341-350.
- [4] IYER S P N, YAO X, CRONA J H, et al. Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2005, 1722(3): 282-292.
- [5] LI P S, FU Z Y, ZHANG Y Y, et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(1): 80-86.
- [6] ZHANG J H, GE L, QI W, et al. The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(28): 25088-25097.
- [7] YU L, HAMMER R E, LI-HAWKINS J, et al. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(25): 16237-16242.
- [8] AMINLARI L, SHEKARFOROUSH S S, HOSSEIN-ZADEH S, et al. Effect of probiotics *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on lipid profile and feces bacteria of rats fed cholesterol-enriched diet[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(4): 1163-1171.
- [9] MASOOD M I, QADIR M I, SHIRAZI J H, et al. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011, 37(1): 91-98.
- [10] 田建军, 张开屏, 李权威, 等. 乳酸菌调控胆固醇代谢的物质基础研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(19): 334-339.  
TIAN J J, ZHANG K P, LI Q W, et al. Recent progress in understanding the substance basis for the regulation of cholesterol metabolism by lactic acid bacteria[J]. *Food Science*, 2019, 40(19): 334-339.
- [11] 蒲博. 降胆固醇乳酸菌制剂的制备及应用[D]. 成都: 西华大学, 2015.  
PU B. Preparation and application of cholesterol-lowering lactic acid bacteria preparation[D]. Chengdu: Xihua University, 2015.
- [12] 郭均. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其体内降胆固醇作用[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.  
GUO J. The screening of *Lactobacillus* with cholesterol-lowering ability and its application *in vivo*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.
- [13] 靳娟. 植物乳杆菌 KLDS1.0386 体内降胆固醇作用机制的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.  
JIN D. Mechanism for *in vivo* cholesterol-lowering effect by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0386 [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018.

- [14] HOANG M H, HOUNG S J, JUN H J, et al. Barley intake induces bile acid excretion by reduced expression of intestinal ASBT and NPC1L1 in C57BL/6J mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(12): 6798–6805.
- [15] JEON Y B, LEE J J, CHANG H C. Characterization of juice fermented with *Lactobacillus plantarum* EM and its cholesterol-lowering effects on rats fed a high-fat and high-cholesterol diet[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(11): 3622–3634.
- [16] MICHAEL D R, MOSS J W E, CALVENTE D L, et al. *Lactobacillus plantarum* CUL66 can impact cholesterol homeostasis in Caco-2 enterocytes [J]. Beneficial Microbes, 2016, 7(3): 443–451.
- [17] QU T M, YANG L, WANG Y H, et al. Reduction of serum cholesterol and its mechanism by *Lactobacillus plantarum* H6 screened from local fermented food products[J]. Food & Function, 2020, 11(2): 1397–1409.
- [18] LIU M J, LIU C H, CHEN H, et al. Prevention of cholesterol gallstone disease by schaftoside in lithogenic diet-induced C57BL/6 mouse model [J]. European Journal of Pharmacology, 2017, 815(22): 1–9.
- [19] GILLILAND S E, NELSON C R, MAXWELL C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(2): 377–381.
- [20] 任大勇, 曲天铭, 杨柳, 等. 东北传统发酵食品中降胆固醇乳酸菌的筛选及其降解机制[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 199–206.
- REN D Y, QU T M, YANG L, et al. Screening of lactic acid bacterial isolates from traditional fermented foods in northeast China for cholesterol-lowering property and mechanism of action analysis[J]. Food Science, 2019, 40(22): 199–206.
- [21] 云月英, 徐娟, 张小利. 4株乳酸菌对模拟胃肠环境的耐受性及生长特性研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(3): 53–56.
- YUN Y Y, XU J, ZHANG X L. Tolerance to simulated gastrointestinal environment and growth characteristics of four strains of lactic acid bacteria[J]. China Brewing, 2018, 37(3): 53–56.
- [22] 胡爱华, 敖晓琳, 陈岑, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 380–383.
- HU A H, AO X L, CHEN C, et al. Research progress on mechanism of lactic acid bacteria acid and bile salt resistance[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 380–383.
- [23] 丁玲, 肖波涛, 邹晓倩. 他汀类联合心血管药物治疗心血管疾病的效果[J]. 中国继续医学教育, 2020, 12(7): 128–130.
- DING L, XIAO B T, ZOU X Q. Effects of statins combined with cardiovascular drugs in the treatment of cardiovascular diseases[J]. China Continuing Medical Education, 2020, 12(7): 128–130.
- [24] LI X P, XIAO Y C, SONG L Q, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* HT121 on serum lipid profile, gut microbiota, and liver transcriptome and metabolomics in a high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia rat model[J]. Nutrition, 2020, 79(12): 110966.
- [25] 赵洁, 李淑英, 张英, 等. 低密度脂蛋白胆固醇与中青年冠心病患者冠状动脉病变程度的相关性分析[J]. 河北医科大学学报, 2021, 42(3): 278–280, 285.
- ZHAO J, LI S Y, ZHANG Y, et al. Correlation between low-density lipoprotein and coronary artery disease in young and middle-aged patients with coronary heart disease[J]. Journal of Hebei Medical University, 2021, 42(3): 278–280, 285.
- [26] LEIVA A, VERDEJO H, BENÍTEZ M L, et al. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism[J]. Atherosclerosis, 2011, 217(2): 299–307.
- [27] THAKKAR P N, PATEL A, MODI H A, et al. Hypocholesterolemic effect of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* strains isolated from traditional fermented foods in Wistar rats[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(3): 1002–1011.
- [28] 谢琳刚, 周林, 蒋利. NPC1L1在高脂血症和动脉粥样硬化中的表达分析[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(11): 31–33.
- XIE L G, ZHOU L, JIANG L. Analysis of NPC1L1 expression in the hyperlipemia and atherosclerotic[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2006, 6(11): 31–33.
- [29] HEO W, LEE E S, CHO H T, et al. *Lactobacillus plantarum* LRCC 5273 isolated from Kimchi ameliorates diet-induced hypercholesterolemia in C57BL/6 mice[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(11): 1964–1972.



- [30] ZEIN A A, KAUR R, HUSSEIN T O K, et al. the hepatobiliary cholesterol secretion[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(5): 1259–1268.  
ABCG5/G8: A structural view to pathophysiology of

### Effect of Traditional Fermented Meat-derived Lactic Acid Bacteria Mediated *NPC1L1* and *ABCG5/G8* Gene Expression on Cholesterol Metabolism

Cao Kaihui<sup>1</sup>, Zhang Kaiping<sup>2</sup>, Ma Junjie<sup>1</sup>, Cheng Feng<sup>1</sup>, Yang Xueqian<sup>1</sup>, Tian Jianjun<sup>1\*</sup>, Jin Ye<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

<sup>2</sup>Department of Cooking & Food Processing, Inner Mongolia Business and Trade Vocational College, Hohhot 010070)

**Abstract** Excessive cholesterol intake may lead to cardiovascular and cerebrovascular health problems. Lactic acid bacteria can regulate the absorption and metabolism of cholesterol in the body by regulating the expression of cholesterol metabolism related genes in the small intestine, thus affecting the cholesterol content in the body. In this study, 15 lactic acid bacteria isolated from traditional fermented meat products were screened for cholesterol-lowering ability, acid and bile salt tolerance *in vitro*, and the screened lactic acid bacteria were used in animal experiments. The results showed that 4 of the 15 lactic acid bacteria (CM6, CM9, CM28, CM42) had good cholesterol-lowering ability *in vitro*, and the average degradation rate was 52.92%. Acid and bile salt tolerance tests were carried out on these four lactic acid bacteria strains, among which strain CM6 could reach 10<sup>6</sup> CFU/mL at pH 2 and 0.3% bile salt addition. Finally, CM6 was selected for subsequent animal experiments. After 30 days of intragastric administration of lactic acid bacteria, the contents of total cholesterol and triglyceride in serum of mice in the lactic acid bacteria group were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of *NPC1L1* gene in the small intestine of the lactic acid bacteria group was significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ), and the expression of *ABCG5/G8* gene was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The results showed that lactic acid bacteria CM6 had the ability to regulate the expression of cholesterol metabolism-related genes, thereby reducing the cholesterol content in the body.

**Keywords** *Lactobacillus*; cholesterol; *NPC1L1*; *ABCG5/G8*; relative gene expression