

文章编号:1004-7271(2004)04-0371-04

·研究简报·

乳酸菌对胆固醇降低作用的研究

Studies on cholesterol-reducing by lactic acid bacteria

卜永士¹, 郭本恒²

(1. 上海水产大学食品学院, 上海 200090 2. 光明乳业技术研究中心, 上海 200072)

BU Yong-shi¹, GUO Ben-heng²

(1. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Bright Dairy R & D Center, Shanghai 200072, China)

关键词: 乳酸菌; 胆固醇

Key words: lactic acid bacteria; cholesterol

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

人体内血清胆固醇的升高可以导致患冠状动脉硬化的机率增高^[1,2], 服用药物或者补充膳食添加剂来降低体内血清胆固醇是一种有效的方法。研究结果表明食用含有大量乳酸菌的乳制品可以降低动物和人的血清胆固醇^[3-8], 尽管乳酸菌降低培养基中的胆固醇含量和减少人类和动物血清胆固醇含量的益生作用得到了大量的证实, 但是具体的作用机理至今还没有定论。目前, 国内外研究者的观点集中在以下 3 点: (1) 乳酸菌菌体细胞直接吸收(包埋)胆固醇; (2) 乳酸菌降解结合态转变为游离态胆固醇, 后者由于溶解度下降与胆固醇发生共沉淀; (3) 其他理论。本文试通过动物实验来验证体外模型所筛选的 *L. casei* BD II 在大鼠体内降胆固醇功能, 并试分析其作用的可能机理, 为利用此株乳酸菌开发产品提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种的来源和保存

利用乳酸菌降胆固醇体外模型, 从传统的发酵乳制品中筛选出一株具有降胆固醇能力较强的乳酸菌 *L. casei* BD II, 并以甘油管形式保藏在 -83℃ 的低温冰箱中。

使用前用 MRS-broth 培养基活化, 以 1% 的接种量在 37℃ 培养 14h, 传代两次以备实验使用。

1.2 菌体/上清液溶液的制备

按照 1% 的添加量将活化的菌种在 MRS-broth 37℃ 培养 14h 后, 离心 (2000g, 15min), 分别收集菌体和上清液, 用无菌 PBS7.4 缓冲液将收集到的菌体洗涤两次, 然后取出其中的一半用 10% SKM 悬浮制成两个浓度的活菌体溶液 (1.0×10^6 和 1.0×10^8)。将另一半菌体 100℃ 水浴中灭菌 15min 后制成与活菌体相对应浓度的溶液, 制备的悬浮液和上清液在利用之前保存在 4℃ 冰箱中。

收稿日期: 2004-03-17

基金项目: 上海光明乳业技术中心资助

作者简介: 卜永士 (1978 -) 男, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 专业方向为功能性食品和生物技术研究。E-mail: shysbu@hotmail.com

1.3 大鼠和高血脂动物模型的建立

SPF 级 SD(Sprague-Dawley) 雄性大鼠 8 周龄, 280 ± 10 g 雄性(购买自中科院上海试验动物中心), 大鼠随机分组, 每组是 6 只。动物房条件 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $56 \pm 5\%$, 12h 光照, 12h 黑暗。

为了使大鼠产生高血脂模型, 对大鼠用高脂饲料(93.3% 基础饲料 + 0.25% 猪胆盐 + 1% 胆固醇 + 5% 猪油)饲养, 经过一周饲养后, 采用摘眼球取血, 测量血液中的总胆固醇(total cholesterol, TC), 甘油三酯(triglyceride, TG)和高密度脂蛋白(high densitylipoprotein, HDL-C)和总胆汁酸(total bile acid, TBA), 与对照组相比可以发现用高脂饲料饲养的大鼠 TC 较高, 说明已经形成高血脂模型。

1.4 评价乳酸菌的安全性

关于乳酸菌的安全性问题, 有些研究者发现^[3,9], 动物饲喂高浓度的乳酸菌或含乳酸菌制品后, 会在肝脏部位发现乳酸菌活菌, 这种现象叫乳酸菌的肝肠易位, 会促进肝功能衰竭, 带来严重的后果。

在采血结束后, 在无菌条件下取老鼠的肝脏进行活菌计数, 分析乳酸菌在肝肠间的转移情况。

1.5 评价乳酸菌功能体系的划分

在实验中, 针对乳酸菌可能起的作用进行分组处理, 对于已经形成高血脂模型的组别分别用不同剂量的活性乳酸菌、死乳酸菌和上清液对大鼠进行灌胃, 每日每只 3mL 连续灌胃 21d, 在试验结束后按照上述的方法采血检测。

1.6 数据统计与分析

所有数据均采用以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 组间 t 检验, 以 SAS 软件处理, 检验其平均值之间是否有显著性差异。

2 结果

2.1 肝脏乳酸菌的检测

本实验大鼠肝脏组织无菌转移到 MRS 平板, 72h 厌氧培养, 未发现菌落形成, 证实本实验中的 *L. casei* BD II 在机体内不会发生菌体的肝肠易位现象, 说明 *L. casei* BD II 是安全的。

2.2 HDL-C 和 LDL-C 以及 AI 的检测

从表 2 可以看出, 高脂对照组 B 的 HDL-C 含量比空白对照组 A 下降 29.11%, 差异显著 ($P < 0.05$), LDL-C 含量上升了 365.78%, 差异非常显著 ($P < 0.001$) 动脉粥样硬化因子 AI 上升了 486.84%, 差异非常显著 ($P < 0.001$)。可以看出, 高脂饲料诱发了大鼠的脂蛋白代谢紊乱, HDL-C 含量下降和 LDL-C 含量升高, 而且 AI 危险因子值升高非常明显, 同时说明高脂饲料造出的高脂模型效果很好。

组 C 饲喂 SKM 的大鼠血清 HDL-C 和 LDL-C 含量分别比高脂对照组 2 升高 16.45% 和降低了 14.12%, 差异不显著 ($P < 0.05$), AI 因子的差别也不显著。说明 SKM 对脂蛋白代谢没有调节作用。

表 1 不同组别的饲喂成分

Tab.1 Diets fed to the different groups

组别	饲料和安慰剂
A. 常规对照组	常规饲料 + 水
B. 高脂饲料组	高脂饲料 + 水
C. 高脂对照组	高脂饲料 + SKM ¹
D. 高剂量活菌	高脂饲料 + 悬浮 2×10^8 cfu/mL SKM
E. 低剂量活菌	高脂饲料 + 悬浮 2×10^6 cfu/mL SKM
F. 死菌	高脂饲料 + 悬浮 2×10^8 cfu/mL SKM(热灭活)
G. 上清液	高脂饲料 + 上清液

注: SKM¹ 脱脂牛奶

表 2 大鼠 HDL-C 和 LDL-C 的含量

Tab.2 The Concentration of HDL-C, LDL-C and AI

组别 ¹	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	AI ²
A	1.02 ± 0.21^3	0.38 ± 0.16^5	0.37 ± 0.18^5
B	0.79 ± 0.04	1.77 ± 0.20	2.24 ± 0.19
C	0.92 ± 0.10	1.52 ± 0.41	1.65 ± 0.58
D	0.90 ± 0.12	1.35 ± 0.56	1.50 ± 0.48^4
E	0.83 ± 0.17	1.11 ± 0.34^4	1.33 ± 0.52^4
F	0.84 ± 0.09	1.19 ± 0.45	1.41 ± 0.50^4
G	0.82 ± 0.04	1.56 ± 0.45	1.90 ± 0.52

注: 1. 实验分组见表 1

2. AI-动脉粥样硬化危险因子, AI = LDL-C/HDL-C

3. $P < 0.01$; 4. $P < 0.05$; 5. $P < 0.001$ 和组 C 比较

组 D、组 E 大鼠血清 LDL-C 含量分别比高脂 SKM 对照组 C 和组 B 低,说明降低血脂功能较为明显,且低剂量组 E 的效果较高剂量组 D 的效果好,而在高密度脂蛋白这一块,高剂量组 D 较低剂量组 E 高,从 AI 因子方面也可看出低剂量组比较明显。

对于死菌组 F,虽然血清 HDL-C 有所升高和 LDL-C 降低,但是差异不明显($P > 0.05$),但 AI 因子有显著性差异($P < 0.01$)这说明死菌体还是具有一定的作用。上清液组 G 中和组 B、组 C 的数据结果比较发现,上清液数据差异不明显($P > 0.05$),说明上清液对脂蛋白代谢没有调节作用。

2.3 总胆酸的检测

从表 3 可以看出,组 B 和组 A 比较发现,饲喂高脂饲料后血清总胆酸(TBA)含量升高 38.75%,差异显著($P < 0.05$),可见高脂饲料明显影响了大鼠血清 TBA 的含量。组 B 和组 C 相比较,差异不明显($P > 0.05$),说明饲喂 SKM 对大鼠 TBA 含量没有影响。饲喂菌体的组和 D-G 中,组 E 大鼠 TBA 含量最低,和组 C 相比差异显著($P < 0.05$)。组 D、组 F 和组 G 的 TBA 含量较组 B 都有变化,其中组 D 和组 F 的均值较组 B 小,但差异不显著($P > 0.05$)。组 G 的 TBA 总量升高。结果说明,本实验筛选的 *L. casei* BD II 活菌有降低血清 TBA 的功能,并且效果和活菌浓度成反比。

表 3 饲喂实验结束测定血清总胆酸的含量

Tab.3 The Concentration of TBA in rats

组别	A	B	C	D	E	F	G
TBA ($\mu\text{mol/L}$)	47.33 \pm 11.52 ¹	63.33 \pm 9.29	55.67 \pm 15.36	53.00 \pm 12.39	50.50 \pm 9.07 ¹	58.25 \pm 9.37	68.00 \pm 13.42

注:¹ $P < 0.01$ 和组 C 比较

3 讨论

据报道,一些地区的居民由于食用含有微生物的发酵乳制品,从而延年益寿,该现象引起对此类产品中微生物的研究,在研究其有益方面的同时,也考虑其安全性。通常认为乳酸菌是安全的,然而也有一些报道指出了特殊情况^[3,9],发现乳酸菌可以从人体的肠道转入到人体的肝脏甚至血液中去。

试验中可以发现活菌体对血清胆固醇的降低有明显的作用,而且低剂量(10^6 cell/d)较高剂量更有利于降低老鼠体内的血清胆固醇,这与体外试验的结果相反。Rodas 等人研究乳酸菌对猪的高血脂症试验中发现高剂量的(10^{12} cells/d)*L. acidophilus* 效果是低剂量(10^4 cells/d)的几倍,Grünwald 利用发酵乳饲养小鼠也发现了类似的结果^[5],然而 Gilliland 和 Walker 在一项临床试验中却没有发现任何益生效果。这些相反的结论可以部分地说明在利用乳酸菌过程中,不同的菌株要不同对待,而且即使对同一菌株也要调整菌体的剂量以便达到最佳的疗效^[6]。

H. Kimoto, S. Ohmomo 等人试验表明热致死的菌株 N7 具有降低培养基中的胆固醇作用,他们还推测能够降低动物体内的血清胆固醇^[10]。这主要是由于死菌体在通过人体肠道时,利用其表面吸附胆固醇,将胆固醇携带出体内,降低体内的一部分血清胆固醇含量。在本试验中,结果表明死菌体对于降低大鼠体内的胆固醇有一定作用。

而代谢产物降低体内胆固醇的作用一直以来被认为是某些酶在这过程中起作用^[11,12],但 Richardoson 对此提出了疑问,发酵乳中的 HMG 的量是否足以抑制 HMG-CoA 的还原酶的活性^[13],1979 年 Lupien 通过检测发现发酵乳中存在的 HMG 的量远低于抑制胆固醇合成所需要的量^[6,8,13],同时一些研究发现,并非所有的发酵乳都能降低血清胆固醇的含量,他们认为这可能是只有某种乳酸菌才能产生类似的“乳因子”,在试验中这些物质的作用没有体现出来,因此可以推测此株乳酸菌不是利用代谢产物来达到降低胆固醇作用。

就肠道环境而言,游离态的胆酸没有结合态的胆酸容易吸收,而且游离态的胆酸分泌更快,更容易结合到膳食成分后菌体细胞上引起膳食胆固醇沉淀而不被机体吸收,随粪便排泄出^[10]。在肝肠循环过程中,肝脏必须利用胆固醇来合成新的胆酸以分泌到肠道部位,从而降低 TC 的含量。本实验总胆酸的

检测结果表明,活菌体具有一定的降低胆酸的作用,而且随着剂量的减少,降低的量也增加。按照上面的解释,菌体的剂量和总胆酸减少的量应该成正比,当然不排除部分菌体降解了体内总胆酸的可能^[14,15]。

对于本试验中研究的 *L. casei* BD II 而言,一方面胆酸的降低说明部分乳酸菌将结合胆酸转化成游离胆酸,将胆固醇沉淀下来,从而导致环境中的胆固醇含量降低;另外一方面由于菌体本身也可以吸附部分胆固醇带出体外。因此,本实验中的这株乳酸菌降低胆固醇是两个方面的共同作用的结果。

参考文献:

- [1] Barr D P , Russ A M , Eder H A . protein-lipid relationship in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions[J]. Am J Med , 1951 , 11 :480 - 493 .
- [2] Brown M S , Goldstein J L . How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis[J]. scientific American , 1984 251 :223 - 234 .
- [3] Berg R D . Bacterial translation from the intestine[J]. Exp Anim , 1979 34 :1 - 16 .
- [4] Derek K , Walker D K , Gilliland S E . Relationships among bile tolerance , bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by lactobacillus acidophilus[J]. J Dairy SCI , 1993 76 :956 - 961 .
- [5] Grunewald K K . Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*[J]. J Food SCI , 1982 47 :2078 - 2079 .
- [6] Gilliland S E , Walker D K . Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans[J]. J Dairy SCI , 1990 47 :905 - 911 .
- [7] Hepner G , Fried R , Jeor S S , et al . Hypocholesterolaemic effects of yoghurt and milk[J]. Am J Clin Nutr , 1979 32 :19 - 24 .
- [8] Kawase M , Hashimoto H , Hosoda M , et al . Effect of administration of fermented milk containing when protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressur[J]. J Dairy SCI , 2000 83 :255 - 263 .
- [9] Schiff E R , Small N C , Dietschy J W . Characterization of the kinetics of the possible and active transport mechanisms fog bile absorption in the small intestine and colon of the ra[J]. J Clin Nutri , 1990 52 :457 - 469 .
- [10] Kimoto H , Ohmomo S , Okamoto T . Cholesterol removal from media by Lactococcc[J]. J Dairy SCI , 2002 85 :3182 - 318 .
- [11] Hepner G , Fried R , Jeor S S . Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk[J]. Am J Clin Nutr . 1979 , 32 :19 - 24 .
- [12] Mann G V . A factor in yoghurt which lowers cholesterol in man Atherosclerosis[M]. 1977 26 :335 - 340 .
- [13] Lupien P J , Moorjani S , Brun D , et al . Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid on plasma and low density lipoprotein cholesterol levels in familial hypercholesterolemia[J]. J Clin Pharmacol , 1979 , 19(2) :120 - 126 .
- [14] Rodas B Z , Gilliland S E , Maxwell C V . Hypocholesteremic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by die[J]. J Dairy SCI , 1996 79 :2121 - 2128 .
- [15] 李兰娟 . 肝病肠道微生态研究进展 . 全国微生态学第八届学术讨论会论文集 C] . 2002 , 10 :16 - 28 .