

鼠李糖乳杆菌对黄曲霉毒素 B₁ 的降解及对肝损伤的保护作用

周旻昱, 周秀芳*

(内蒙古医科大学附属医院, 呼和浩特 010050)

摘要: **目的** 分析鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)对黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)的降解能力, 阐述 LGG 对由 AFB₁ 引起的肝损伤的保护作用。**方法** 利用 LGG 培养液、LGG 上清液组、LGG 菌体、热处理后上清液和热处理后 LGG 菌体处理 AFB₁, 利用高效液相色谱法测定 AFB₁ 的残留量, 分析 LGG 对 AFB₁ 的降解能力。利用低、中和高剂量的 LGG 菌液灌胃由 AFB₁ 引起肝损伤的大鼠, 并以空白和阳性作为对照组, 测定大鼠的血清肝功能及肝组织抗氧化指标, 分析 LGG 对肝损伤的保护作用。**结果** AFB₁ 降解实验表明 LGG 菌液对 AFB₁ 具有显著的降解作用($P < 0.05$), 36 h 能够降解(92.01±2.02)%的 AFB₁。降解作用是由菌体和 LGG 的代谢产物共同作用的结果。大鼠血清肝功能及肝组织抗氧化指标结果表明低、中和高剂量的 LGG 灌胃给药均能显著改善因 AFB₁ 引起的大鼠肝功能和肝组织抗氧化指标异常($P < 0.05$)。**结论** LGG 对 AFB₁ 具有良好的降解作用, 且能够有效抑制因 AFB₁ 引起的肝损伤。

关键词: 鼠李糖乳杆菌; 黄曲霉毒素 B₁; 降解; 肝损伤; 保护作用

Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on degradation of aflatoxin B₁ and the protection of liver injury

ZHOU Min-Yu, ZHOU Xiu-Fang*

(The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on the degradation of aflatoxin B₁ (AFB₁) and reveal the protective effect of LGG on the liver injury caused by AFB₁. **Methods** The AFB₁ was treated with LGG culture, supernatant of LGG, cell of LGG, supernatant of LGG with heat treatment and cell of LGG with heat treatment. The residues of AFB₁ were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), which could analyze the effects of LGG on the degradation of AFB₁. The liver injury rats caused by AFB₁ were lavaged using low, medium and high dose of LGG culture. The serum liver function and liver tissue antioxidant index of rats were determined to reveal the protective effect of LGG on the liver injury. **Results** The degradation experiment of AFB₁ showed that LGG thallus had a significant degradation effect ($P < 0.05$) on AFB₁. With a treatment for 36 h, the degradation rate was (92.01±2.02)%. The degradation was carried out by LGG thallus and metabolites. The serum liver function and liver tissue antioxidant index rats results showed that the dysfunction in liver function and liver tissue antioxidant indicators of rats caused by AFB₁ were significantly improved ($P < 0.05$). **Conclusion** LGG has a good degradation effect on AFB₁, and can effectively inhibit the liver

*通讯作者: 周秀芳, 主任药师, 主要研究方向为药物研究。E-mail: chibu3572432@sohu.com

*Corresponding author: ZHOU Xiu-Fang, Chief Pharmacist, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China. E-mail: chibu3572432@sohu.com

injury caused by AFB₁.

KEY WORDS: *Lactobacillus rhamnosus* GG; aflatoxin B₁; degradation; liver injury; protective effect

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)是一类由黄曲霉寄生曲霉产生的次级代谢产物,主要成分为二氢呋喃香豆素的衍生物,主要存在于发霉的大豆、花生、核桃和无花果等谷物和坚果中^[1-3]。此外,由于饲喂发霉的饲料,牛奶中也可能出现黄曲霉毒素超标的现象,因此如果消费者摄入了上述含有黄曲霉毒素的食物会对身体产生较大的毒害作用^[4,5]。在黄曲霉毒素中,黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)的毒性最强,具有较高的致突变、致畸形和致癌的能力,相比其他器官,对肝脏的损伤最大^[6,7]。

目前,黄曲霉毒素的消除方法分为物理去除法、化学去除法和生物学脱毒方法,其中生物学脱毒法由于不会造成化学物质的污染,也避免了食品营养的大量损失,得到了研究者的关注^[8,9]。目前,对于利用微生物法降解黄曲霉毒素的研究已经较成熟,据报道,枯草杆菌、醋酸菌、部分乳酸菌、面包酵母和酿酒酵母等都具有较好的降解黄曲霉毒素的能力^[8]。鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)是一种常见的益生菌,具有抗氧化、降血压、降胆固醇、改善肝损伤和维持肠道健康等多种益生功能^[10-14],但是关于 LGG 对黄曲霉毒素降解作用及对肝损伤保护作用的研究并不多见。本研究利用体外试验分析 LGG 对 AFB₁ 的降解作用,利用动物实验分析 LGG 对肝损伤的保护作用,以期拓展 LGG 的应用范围,并为黄曲霉毒素的有效降解提供新方法,为由黄曲霉毒素造成的肝损伤的防治提供新思路。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LC-10Tvp 高效液相色谱仪(上海精密仪器仪表公司); TGL16MC 台式高速冷冻离心机(郑州博科仪器设备有限公司); HF240-360 全自动生化分析仪(海力孚科技有限公司); 丙二醛(MDA)试剂盒(同仁化学研究所); 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(同仁化学研究所); 还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(上海开放生物科技有限公司); 过氧化氢酶(CAT)试剂盒(上海开放生物科技有限公司); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所); 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

鼠李糖乳酸杆菌(东北农业大学食品学院馈赠); AFB₁(Fermentek 公司); 二氯甲烷、甲醇、乙腈(色谱纯,吉林市融信化工有限公司); MRS 培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)。

Wistar 大鼠,年龄 8 周,雄性,体重在(230±10) g,购

自中国医学科学院实验动物研究所。

2.2 试验方法

2.2.1 LGG 的菌体及上清液的制备

取出-20℃甘油保存的 LGG 冻存管,将菌株恢复至室温后,按 3% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中,37℃培养 18 h,连续传代 3 次得到 LGG 培养液。根据李超波等^[8]的报道,取 2 mL 上述菌液,在 5000 r/min 下离心 10 min,小心吸掉上清液,得到沉淀的 LGG 菌体,利用无菌水对 LGG 菌体进行清洗,之后离心,重复 3 次,得到 LGG 菌体。

2.2.2 LGG 对 AFB₁ 的降解作用

为了分析 LGG 对 AFB₁ 的降解作用,分别设置 5 组实验组,分别为(A)LGG 培养液组、(B)LGG 上清液组、(C)LGG 菌体组、(D)上清液热处理组和(E)LGG 菌体加热处理组(100℃, 10 min)。分别向上述 5 组中加入相同含量的 AFB₁ 标准品(最终浓度 2.5 μg/mL),避光充分振荡,在 2、8、12、24、36、48 h 时取样,根据李超波等^[9]的报道,利用高效液相色谱法测定 AFB₁ 的残留量,计算 AFB₁ 的去除率。

2.2.3 LGG 降解 AFB₁ 的验证实验

为了排除 LGG 具体对 AFB₁ 的吸附作用,根据李超波等^[8]的方法对 LGG 进行洗脱萃取实验,按照 2.2.2 中的方法利用 LGG 处理 AFB₁ 后,将作用后的 LGG 菌体沉淀洗脱,并利用 PBS(pH 7.0)和二氯甲烷对 LGG 菌体进行毒素冲洗和萃取,重复 3 次,计算其回收率,并以 AFB₁ 做同等处理作为对照,从而验证 LGG 对 AFB₁ 的降解作用。

2.2.4 动物分组及处理

将 30 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组,分别为(A)空白对照组,灌胃生理盐水、(B)AFB₁ 阳性对照组、(C)LGG 菌液低剂量组 0.2 mL/kg; (D)LGG 菌液中剂量组 1 mL/kg; (E)LGG 菌液高剂量组 5 mL/kg。除空白对照组外,其他 4 组大鼠灌胃 2 mg/kg 的 AFB₁ 诱发肝损伤,之后灌胃 LGG 菌液,空白对照组和阳性组灌胃等体积的生理盐水。给药 3 d 后,对上述 5 组大鼠进行麻醉后断颈处死。

2.2.5 血清肝功能及肝组织抗氧化指标测定

对 2.2.4 中处理后的大鼠进行心脏取血,凝结后,在 4℃条件,5000 r/min 离心 8 min,制备血清,利用全自动生化分析设备测定血清中总胆红素(TBIL)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和碱性磷酸酶(ALP)的活性。之后取适量的大鼠肝脏组织,利用考马斯亮蓝法和试剂盒法对肝脏蛋白中 MDA 含量、GSH 水平及 SOD、CAT、GSH-Px、GST 活力进行测定^[15]。

2.2.6 数据分析

实验结果以平均数±标准偏差表示,并利用 SPSS 18.0

软件对实验数据进行分析, 当 $P < 0.05$ 时可视为具有统计学意义, 差异显著。

3 结果与分析

3.1 LGG 对 AFB₁ 降解作用分析

由图 1 可知, 对 AFB₁ 的降解能力大小排序为(A)LGG 培养液组 > (C)LGG 菌体组 > (B)LGG 上清液组 > (E)LGG 菌体加热处理组 > (D)上清液热处理组, 在 5 组实验室组中, LGG 培养液组对 AFB₁ 的去除率最高, 为(92.01±2.02)%, 同时 LGG 菌体和 LGG 上清液对 AFB₁ 也具有一定的降解能力, LGG 培养液组的主要成分为 LGG 菌体和代谢产物(上清液), 说明 LGG 培养液对 AFB₁ 的降解作用是由菌体和 LGG 的代谢产物共同作用的结果; 经过加热处理后 LGG 菌体和上清液对 AFB₁ 的降解能力几乎为 0, 说明 LGG 菌体和上清液中的有效成分在高温作用下失活。此外, 随着作用时间的增加, AFB₁ 的降解率也随之增加, 36 h 之后趋于恒定。上述结果表明 LGG 菌液对 AFB₁ 有良好的降解能力。

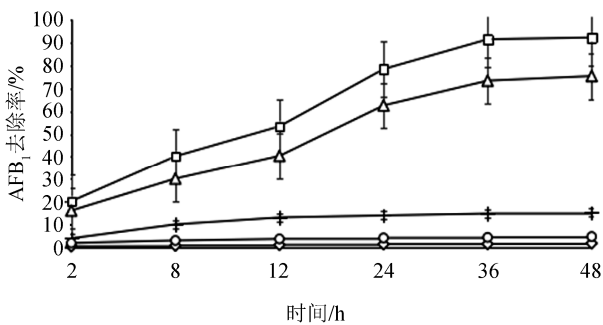


图 1 LGG 对 AFB₁ 的降解作用($n=3$)

Fig. 1 Effects of LGG on the degradation of AFB₁ ($n=3$)

注: A: LGG 培养液组; B: LGG 上清液组; C: LGG 菌体组; D: 上清液热处理组; E: LGG 菌体加热处理组

3.2 LGG 降解 AFB₁ 的验证分析

由表 1 可知, 3 次 PBS 冲洗实验中 AFB₁ 萃取率均为 0;

二氯甲烷萃取实验中, 对照组 AFB₁ 萃取率为(89.32±2.13)%, 这说明二氯甲烷对 AFB₁ 有较好的萃取作用, 在相同的萃取剂下 LGG 菌体中 AFB₁ 的萃取率为(1.94±0.24)%, 说明 AFB₁ 并没有吸附在 LGG 菌体上, 而是被 LGG 降解。

表 1 AFB₁ 洗脱萃取实验

	PBS 萃取			二氯甲烷萃取	
	1 次	2 次	3 次	LGG 菌体	对照组
AFB ₁ 萃取率/%	0	0	0	1.94±0.24	89.32±2.13

3.3 LGG 对大鼠血清肝功能的影响

由表 2 可知, 与空白对照组相比(A), AFB₁ 肝损伤组(B)的大鼠血清生化指标 TBIL 含量、GPT、GOT 和 ALP 活力显著提高($P < 0.05$), 这说明灌胃 AFB₁ 的大鼠肝脏受到严重损伤。而与 B 组相比, 灌胃 LGG 菌液的 C(低剂量组)、D(中剂量组)和 E(高剂量组)组的大鼠的上述指标得到了显著降低($P < 0.05$), 并随着灌胃剂量的增加降低作用也显著增加($P < 0.05$), 说明 LGG 菌液对由 AFB₁ 引起的肝功能异常有良好的改善作用。

3.4 LGG 对大鼠肝组织抗氧化指标的影响

由表 3 可知, 与空白对照组(A)相比, AFB₁ 肝损伤组(B)的大鼠组织抗氧化指标 MDA 和 GSH 含量显著增加($P < 0.05$), 而 SOD、CAT、GSH-Px 和 GST 活力明显下降($P < 0.05$)。通过灌胃 LGG, 肝脏受到 AFB₁ 损伤的大鼠上述指标得到了显著的改善, 其中 MDA 和 GSH 的含量得到显著降低($P < 0.05$), SOD、CAT、GSH-Px 和 GST 的活力得到了显著提高, 并且高剂量的 LGG 菌液给药可以使受 AFB₁ 损伤的大鼠肝脏组织中的 SOD 和 GSH-Px 活力恢复到正常值, 中剂量的 LGG 菌液给药能够使 CAT 和 GST 的活力恢复到正常水平。

表 2 LGG 对大鼠血清肝功能的影响($n=3$)

Table 2 Effects of LGG on serum liver function of rat ($n=3$)

组别	TBIL($\mu\text{mol/L}$)	GPT 活力(U/L)	GOT 活力(U/L)	ALP 活力(U/L)
A	1.02±0.34 ^a	45.32±3.21 ^a	204.33±14.24 ^a	163.93±12.02 ^a
B	46.33±3.83 ^b	632.24±10.34 ^b	1820.89±33.25 ^b	379.39±18.33 ^b
C	33.83±4.92 ^c	321.79±8.92 ^c	782.28±13.93 ^c	290.93±16.45 ^c
D	20.32±2.38 ^d	298.23±11.42 ^d	629.38±22.81 ^d	247.02±18.23 ^d
E	12.77±3.22 ^e	237.84±10.51 ^e	382.78±17.72 ^e	187.93±13.29 ^e

注: A: LGG 培养液组; B: LGG 上清液组; C: LGG 菌体组; D: 上清液热处理组; E: LGG 菌体加热处理组
同一列不同字母代表差异显著, $P < 0.05$

表3 LGG对大鼠肝组织抗氧化指标的影响($n=3$)
Table 3 Effects of LGG on antioxidant indicators of rat liver tissue ($n=3$)

组别	MDA (nmol/mg pro)	GSH (nmol/mg pro)	SOD (U/mg pro)	CAT 活力 (U/mg pro)	GSH-Px 活力 (U/mg pro)	GST 活力 (U/mg pro)
A	1.62±0.66 ^a	45.32±3.21 ^a	334.73±17.24 ^a	37.46±3.42 ^a	504.31±16.21 ^a	63.73±5.02 ^a
B	2.36±0.33 ^b	632.24±10.34 ^b	220.78±33.25 ^b	20.62±2.46 ^b	220.32±9.28 ^b	39.39±3.15 ^b
C	2.09±0.22 ^c	321.79±8.92 ^c	252.55±17.95 ^c	28.44±3.47 ^c	347.62±11.64 ^c	47.88±2.45 ^c
D	1.82±0.36 ^d	298.23±11.42 ^d	291.53±17.58 ^d	36.54±3.27 ^a	429.57±12.91 ^d	67.02±4.27 ^a
E	1.60±0.22 ^a	237.84±10.51 ^c	332.98±19.22 ^a	47.56±4.09 ^d	522.57±12.89 ^a	87.33±2.25 ^d

注: A: LGG 培养液组; B: LGG 上清液组; C: LGG 菌体组; D: 上清液热处理组; E: LGG 菌体加热处理组
同一列不同字母代表差异显著, $P<0.05$

4 结论

综上所述, LGG 菌液对黄曲霉毒素具有良好的降解作用, 作用 36 h 以上可以降解(92.01±2.02)%的 AFB₁ 毒素, 且降解作用是由 LGG 菌体和代谢产物共同作用的结果。低、中和高剂量的 LGG 菌液均能够显著改善因 AFB₁ 引起的大鼠肝功能和肝组织抗氧化指标异常, 对大鼠肝损伤具有保护作用。本研究结果可以为研发治疗或改善由 AFB₁ 引起的肝损伤提供新思路, 为 LGG 功能性的开发提供理论依据。

参考文献

- [1] Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment [J]. Environ Health Persp, 2010, 118(6): 818–824.
- [2] Smela ME, Currier SS, Bailey EA, et al. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(4): 535–545.
- [3] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 乳与乳制品中黄曲霉毒素 M1 研究进展[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(04):490–491.
Deng XL, Lai WH, Xu Y. Research progress of aflatoxin M1 in milk and dairy products [J]. J Public Health China, 2006, 22(04): 490–491.
- [4] Sklan D, Klipper E, Friedman A, et al. The effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and aflatoxin on performance, health, and antibody production in chicks [J]. J Appl Poul Res, 2015, 3(53): 79–85.
- [5] Mahfouz ME, Sherif AH. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on Oreochromis niloticus, health status [J]. J Basic Appl Zool, 2015, 71: 48–59.
- [6] Liu Y, Chang CCH, Marsh GM, et al. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis [J]. Eur J Cancer, 2012, 48(14): 2125–36.
- [7] Nakai VK, Rocha LDO, Gonzalez E, et al. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety [J]. Food Chem, 2008, 106(1): 285–290.
- [8] 李超波, 李文明, 杨文华, 等. 降解黄曲霉毒素微生物筛选中降解与吸附结合作用的区分[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(05): 17–21.
Li CB, Li WM, Yang WH, et al. Distinguishing degradation from binding of AFB₁ in screening of aflatoxin-degrading microorganisms [J]. J Food Ferment Ind, 2012, 38 (05): 17–21.
- [9] 李超波, 李文明, 杨文华, 等. 黄曲霉毒素 B1 降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1129–1136.
Li CB, Li WM, Yang WH, et al. Isolation and characterisation of an aflatoxin B₁ - degrading Bacterium [J]. J Microbiol, 2012, 52(9): 1129–1136.
- [10] Singh CK, George J, Duster M, et al. Abstract 235: Combination of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG with grape antioxidant resveratrol for the management of colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2014, 74(19 Suppl): 235.
- [11] Jorjão AL, de Oliveira FE, Leão MV, et al. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 may induce modulatory cytokines profiles on macrophages RAW 264.7 [J]. Sci World J, 2015, (2 Suppl): 1–6.
- [12] Yoon HS, Ju JH, Kim H, et al. *Lactobacillus rhamnosus*, BFE 5264 and *Lactobacillus plantarum*, NR74 Promote cholesterol excretion through the up-regulation of ABCG5/8 in Caco-2 cells [J]. Prob Antimicro Prot, 2011, 3(3–4): 194–203.
- [13] Wang Y, Liu Y, Sidhu A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury [J]. Am J Physiol Gastroint Liver Physiol, 2012, 303(1): 32–41.
- [14] De Groote MA, Frank DN, Dowell E, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome [J]. Ped Infect Dis J, 2005, 24(3): 278–280.
- [15] 崔燕, 凌建刚, 姚卫蓉, 等. 库拉索芦荟对黄曲霉毒素 B1 致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2016, 37(07): 175–181.
Cui Y, Ling JG, Yao WR, et al. Protective effect of aloe vera against aflatoxin B₁-induced acute hepatotoxicity in rats [J]. Food Sci, 2016, 37(7): 175–181.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介

周旻昱, 主管药师, 主要研究方向为
药物管理。
E-mail: wei81416475@sohu.com

周秀芳, 主任药师, 主要研究方向为
药物研究。
E-mail: chibu3572432@sohu.com

《食品中农兽药残留检测与监控技术专题》征稿函

农药残留、兽药残留是目前食品安全最大的风险,也一直是食药监管部门监管的重点。近几年快速、高通量、多组分残留同时检测及未知化合物的农/兽药残留筛查技术取得了一定突破。

鉴于此,本刊特别策划了“农兽药残留检测与监控技术”专题,由华南农业大学食品学院孙远明教授担任专题主编。专题将围绕(1)国内国际农药兽药残留管理动态与风险评估新进展;(2)痕量农兽药残留多组分高通量的样品制备新技术,包括固相萃取、离子交换、凝胶渗透、加速溶剂萃取、衍生化、酶化学等;(3)痕量农兽药残留多组分高通量的检测新技术,包括液相色谱、气相色谱、色谱质谱联用、免疫亲和色谱、新型快速检测技术等;(4)重要农兽药残留的毒性、控制、分析技术及其各种仪器设备技术应用;(5)农兽药残留的监测抽样和风险管理控制;(6)农兽药残留能力验证的操作技巧等多方面展开讨论,计划在 2017 年 1 月出版。

鉴于您在该领域的成就,孙远明教授和主编吴永宁研究员特邀请您为本专题撰写稿件,综述、研究论文、研究简报均可,以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2016 年 12 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部