

研究报告

抗氧化菌株的筛选及其对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用

苏林浩^{1,2}, 杜晓娜^{*1}, 蔡奕贤², 张帮周^{2,3}, 蔡诗容², 李源涛², 徐炜^{2,3}

1 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453000

2 厦门承葛生物科技有限公司, 福建 厦门 361000

3 厦门联合呼吸健康研究院, 福建 厦门 361000

苏林浩, 杜晓娜, 蔡奕贤, 张帮周, 蔡诗容, 李源涛, 徐炜. 抗氧化菌株的筛选及其对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2690-2701.

SU Linhao, DU Xiaona, CAI Yixian, ZHANG Bangzhou, CAI Shirong, LI Yuantao, XU Wei. Screening of antioxidant strains and its protective effect on oxidative stress damage of HepG2 cells[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2690-2701.

摘要: 【背景】机体的氧化损伤会引发多种疾病和机体衰老, 研究发现益生菌可以改善宿主的代谢水平, 提高宿主的抗氧化能力, 为抗氧化产品开发提供新方向。【目的】筛选具有良好抗氧化效果的菌株, 为抗氧化药物以及保健品的开发和研究提供菌种材料。【方法】将从江西省宜春市温汤长寿村地区的健康人群粪便中筛选出的菌株进行 16S rRNA 基因鉴定, 挑取其中 6 株益生菌, 通过测定其培养液上清中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)酶活及 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力, 选取一株抗氧化能力最佳的菌株进行后续细胞实验。建立 HepG2 细胞氧化应激损伤模型, 使用 CCK-8 法评估其培养液上清对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护效果, 通过试剂盒测定培养液上清对细胞中 SOD 酶活的保护作用, 并进一步验证其培养液上清的抗氧化效果。【结果】筛选出的 6 株益生菌培养液上清中, 菌株 H0661 表现出最佳的抗氧化能力, 其培养液上清中 GSH-Px 酶活为 586.11 U/mL ($P<0.01$), SOD 酶活为 1 278.00 U/mL ($P<0.01$), DPPH 自由基的清除能力达到 40.5%。结合 16S rRNA 基因鉴定结果, 将其命名为木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*) TG022。木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清浓度为 15% 时对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护效果最佳($P<0.01$)。此外, 木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清能有效保护 HepG2 细胞氧化应激损伤中 SOD 活性($P<0.01$)。经木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清处理后可以有效提高 HepG2 细胞的抗氧化活性($P<0.05$)。【结论】本研究筛选出一株木糖葡萄球菌 TG022, 其培养液上清表现出良好的抗氧化效果, 为研发抗氧化药物和保健品提供了一个潜在的菌株材料。

资助项目: 国家自然科学基金(U22A20376); 福建省高校产学研联合创新项目(2022Y4007)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U22A20376) and the University Industry-University-Research Joint Innovation Program of Fujian Province (2022Y4007).

*Corresponding author. E-mail: duxiaona_87@163.com

Received: 2023-10-12; Accepted: 2024-01-07; Published online: 2024-03-12

关键词: 菌株筛选; 木糖葡萄糖球菌; 抗氧化

Screening of antioxidant strains and its protective effect on oxidative stress damage of HepG2 cells

SU Linhao^{1,2}, DU Xiaona^{*1}, CAI Yixian², ZHANG Bangzhou^{2,3}, CAI Shirong², LI Yuantao², XU Wei^{2,3}

1 Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan, China

2 Xiamen Chengge Biotechnology Corporation Limited, Xiamen 361000, Fujian, China

3 Xiamen Institutes of Respiratory Health, Xiamen 361000, Fujian, China

Abstract: [Background] The oxidative damage of the body can cause a variety of diseases and body aging. It had been found that probiotics can improve the metabolic level and the antioxidant capacity of the host. This provided a new direction for the development of antioxidant products. **[Objective]** To screen the strains with good antioxidant effects and provide strain materials for the development and research of antioxidant drugs and nutraceuticals. **[Methods]** The strains isolated from the feces of healthy people in Changshou Village, Wentang Town, Yichun City, Jiangxi Province were identified by 16S rRNA gene sequencing. We selected six strains of probiotics and then determined the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity of the culture supernatants of the strains. One strain with the best antioxidant capacity was selected for subsequent cellular experiments. A model of oxidative stress damage in HepG2 cells was established, and the protective effect of the culture supernatant of the selected strain on the cell model was evaluated by the CCK-8 method. The protective effect of the culture supernatant on SOD in the cells was determined by the enzyme assay kit, and the antioxidant effect of the culture supernatant was further verified. **[Results]** Among the six strains of probiotics, strain H0661 had the best antioxidant capacity with GSH-Px activity of 586.11 U/mL ($P<0.01$), SOD activity of 1 278.00 U/mL ($P<0.01$), and DPPH radical scavenging capacity of 40.5%. The strain was identified based on the 16S rRNA gene sequencing results and named *Staphylococcus xylosus* TG022. The culture supernatant of this strain at the concentration of 15% (volume fraction) showed the best protective effect against oxidative stress in HepG2 cells ($P<0.01$). In addition, the culture supernatant of *S. xylosus* TG022 was effective in protecting the SOD activity of the HepG2 cells exposed to oxidative stress ($P<0.01$). Moreover, the antioxidant activity of HepG2 cells was increased after treatment with the culture supernatant of *S. xylosus* TG022 ($P<0.05$). **[Conclusion]** *S. xylosus* TG022 was screened out, and its culture supernatant had strong antioxidant effects. This study provided a candidate strain for the development of antioxidant drugs and nutraceuticals.

Keywords: strain screening; *Staphylococcus xylosus*; antioxidant

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一类包括氧自由基($O\cdot$)、羟自由基($\cdot OH$)及过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)等多种类型的化学物质。线粒体氧化呼吸电子传递链、细胞色素催化循环及哺乳动物体内一些蛋白复合物是胞内 ROS 的主要来源^[1]。ROS 在机体中发挥着重要作用,包括细菌和寄生虫的直接抗菌活性、信号传导及代谢调节等^[2-3]。为了应对 ROS 的产生,细胞内含有多种抗氧化活性因子,例如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等酶类,以及谷胱甘肽、维生素 C 及维生素 E 等非酶物质,它们协同构成了细胞内抗氧化防御屏障^[4]。然而,当细胞内 ROS 过量积累时,细胞自身的抗氧化机制无法有效对抗其对细胞的损害,导致脂质、蛋白质和 DNA 的损伤,这一现象被称为氧化应激^[5]。氧化应激在许多疾病的发病机制中发挥着至关重要的作用,包括神经退行性疾病(如阿尔茨海默病和帕金森病)、癌症、代谢类疾病(如糖尿病和肥胖症)以及心血管疾病等。因此,改善氧化应激损伤对人体的健康具有重要意义。

益生菌是指在适当剂量下能够改善宿主健康的活性微生物^[6]。目前已经鉴定出的益生菌主要包括双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)及一些酵母菌属(*Saccharomyces*)^[7]。益生菌具有抗炎、调节身体代谢、预防癌症的发生等诸多功能。研究表明,益生菌的代谢产物中含有抗氧化活性成分。这些物质可以通过多种方式对宿主产生益处。首先,它们具有 GSH-Px 和 SOD 等抗氧化酶活性,可以清除宿主体内的 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 $O\cdot$ 及 DPPH 自由基等有害物质,从而减少氧化应激对宿主造成的伤害。其次,这些

物质可以激活 Nrf2-Keap1 抗氧化信号通路,提高宿主体内抗氧化能力,进一步保护宿主免受氧化损伤^[8-10]。

益生菌及其代谢产物在抗氧化领域具有巨大的应用潜力。它们可以通过改善宿主体内的氧化状态来维护宿主健康。进一步研究和应用益生菌及其代谢产物有望为人类健康提供有效的抗氧化治疗策略。氧化应激体外细胞模型不仅可以是正常体细胞,也可以是癌细胞^[11],并为大量研究所使用。因此,本研究将通过构建 HepG2 氧化应激损伤模型对益生菌的抗氧化功能进行验证。

本研究通过测定从江西省宜春市温汤长寿村地区的健康人群粪便中分离出的 6 株益生菌培养液上清的 SOD、GSH-Px 酶活及 DPPH 自由基清除能力,并通过建立 HepG2 细胞氧化损伤模型,验证其对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用,以为抗氧化药物以及保健品的开发和研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

本研究所使用的菌株均分离自江西省宜春市温汤长寿村地区的健康人群粪便样本中。人肝癌细胞系 HepG2 由承葛生物科技有限公司细胞库保存。

1.1.2 培养基

Brain heart infusion-supplemented (BHIS)培养基(g/L): BHI 预制粉末 37.0, 酵母提取物 5.0, L-半胱氨酸 0.5, 刃天青 0.001, 血晶素 0.002 5, 维生素 K1 0.005, pH 7.2 \pm 0.2, 1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 20 min。

Luria-Bertani (LB)培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0 \pm 0.2, 1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 20 min。

模拟胃液: HCl (1 mol/L) 16.4 mL, 胃蛋白酶 10 g, 加水定容至 1 000 mL 并完全混合。用 1 mol/L HCl 调整 pH 2.5, 充分溶解后用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

模拟肠液: 磷酸二氢钾 6.8 g, 加水 500 mL, 用 0.4% 的 NaOH 调节 pH 6.8; 另取胰蛋白酶 10 g 加水适量使溶解, 将两液混合后, 加水定容至 1 000 mL。用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 8.0, 然后充分溶解后用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。

H₂O₂ 储备液: 使用超纯水将 11.3 μ L 30% 的 H₂O₂ 原液稀释至 10 mL 得到 10 mmol/L H₂O₂ 储备液, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 储备液: 称取 3.5 mg DCFH-DA 粉末溶于 721 μ L DMSO 中, 得到 10 mmol/L 的 DCFH-DA 储备液, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 [2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH] 储备液: 将 0.543 g 的 AAPH 粉末溶解在 10 mL 的 Hank HBSS 中得到 200 mmol/L 的 AAPH 储备液, 4 $^{\circ}$ C 保存。

DMEM 培养基, 武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

胰酶 EDTA、PBS 和 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS), 武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清, 北京全式金生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 无锡百泰克生物技术有限公司; 青链霉素, 美伦生物科技有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒、GSH-Px 试剂盒、T-SOD 试剂盒、DPPH 自由基清除能力比色法测试盒, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; DCFH-DA 和 AAPH (纯度为 97%), Sigma-Aldrich

公司; 胃蛋白酶和胰蛋白酶, 北京索莱宝生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒, MedChemexpress 公司; 30% H₂O₂、NaOH、磷酸二氢钾 (分析纯), 西陇科学股份有限公司。

生物安全柜, 苏州安泰空气技术有限公司; CO₂ 细胞培养箱和冷冻离心机, 赛默飞世尔科技有限公司; HH 恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; Hirayama 高压灭菌锅, 施都凯仪器设备有限公司; 酶标仪, 帝肯实验器材有限公司; 荧光酶标仪, 伯腾仪器有限公司; 倒置显微镜, 上海普赫光电科技有限公司; 恒温摇床培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 抗氧化菌株的筛选

以江西省宜春市温汤长寿村地区的健康人群粪便为样本, 将样本接种于 pH 7.2 的 BHIS 培养基于 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养箱中培养 24 h 进行富集培养, 吸取富集培养液, 使用无菌生理盐水进行梯度稀释涂布 BHIS 固体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养箱中培养 24 h 后挑取单菌落在 BHIS 固体培养基上进行三区划线纯化。将纯化后的菌液添加 50% 甘油于 -80 $^{\circ}$ C 保藏。

1.3 菌株抗氧化能力评估

选取其中 6 株益生菌接种至 BHIS 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养箱中培养至生长出单菌落, 利用一次性接种环蘸取 BHIS 固体培养基上的单菌落, 接种至 BHIS 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h 后, 使用无菌生理盐水将种子液稀释至 OD₆₀₀ 为 0.8–1.0 之后将种子液接种到 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h 后, 4 $^{\circ}$ C、5 000 \times g 离心 15 min, 取上清, 使用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后, 测定清液的谷胱甘肽过氧化物酶活性, SOD 酶活性以及 DPPH 自由基清除能从而对菌株抗氧化能力进行初步评估。

1.4 菌株 H0661 的分子生物学鉴定^[12]

将单菌落接种至 BHIS 液体培养基中,

37 °C、200 r/min 培养 24–48 h 后, 利用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取菌株基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板, 使用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTT GTTACGACTT-3')进行 PCR。PCR 反应体系 (30 μ L): ddH₂O 11.8 μ L, 引物(上、下游) 1.2 μ L, DNA 模板 2 μ L, 2 \times T5 Direct PCR Mix (plant) 15 μ L。98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 65 °C 10 s, 72 °C 20 s, 30 个循环; 72 °C 3 min; 4 °C 保存。将 PCR 扩增产物送至北京擎科生物科技有限公司进行基因测序。将测序获得的序列经 NCBI 网站 BLAST 比对, 并通过 MEGA 11.0 软件使用邻接法构建系统发育树。

1.5 菌株 H0661 的生理特征

按 1.3 的方法制得种子液。将其分为 3 组, 第 1 组将种子液接种至 pH 为 7.0 的 BHIS 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床进行培养, 每隔 2 h 取出一批样本进行测定 OD_{600} 。第 2 组于不同温度(27、32、37、42 和 47 °C) 200 r/min 摇床进行培养, 并于 10 h (生长曲线进入平台期所需时间)后取出测定 OD_{600} 。第 3 组将种子液接种至不同 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)的 BHIS 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 厌氧培养, 并于 10 h 后取出测定 OD_{600} 。

1.6 菌株 H0661 的耐酸性测试

用 1 mol/L 盐酸将 BHIS 液体培养基的 pH 值分别调为 1.0、2.0 和 3.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。将活化后的菌液按 1%接种量分别接种于上述 BHIS 培养基和普通液体 BHIS (pH 6.5)培养基中, 于 37 °C 恒温培养, 分别在 1、2 和 3 h 后取样, 采用稀释涂布平板法测定活菌数, 以 lg CFU/mL 记, 测定耐受率, 实验重复 3 次, 以接种了菌液的普通液体 BHIS (pH 6.5)培养基作对照组, 实验重复 3 次。根据公式(1)计算菌株的耐酸性:

$$\text{存活率}(\%) = B_1/B_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: B_1 、 B_0 分别为实验组和对照组的活菌数。

1.7 菌株 H0661 在模拟胃肠环境下的耐受性

参考张林奇等^[13]的方法, 将菌株 H0661 菌悬液稀释到 $OD_{600}=0.8-1.0$, 备用, 取 0.4 mL 菌悬液分别接入 10 mL 配制好的 pH 2.5 的模拟人工胃液和 pH 8.0 的模拟人工肠液中混匀, 37 °C 条件下消化, 同时分别吸取 20 μ L 0 h 和 3 h 的肠液, 以及 20 μ L 0 h 和 2 h 的胃液涂布, 48 h 后计数检测活菌数, 并根据公式(2)计算细胞存活率:

$$\text{菌株存活率}(\%) = N_t/N_0 \times 100 \quad (2)$$

式中: N_0 表示菌株 0 h 的活菌数(CFU/mL); N_t 表示菌株 2 h 和 3 h 的活菌数(CFU/mL)。

1.8 菌株 H0661 培养液上清对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

1.8.1 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型的建立

参考 Al-Sheddi 等^[14]的方法, 将 HepG2 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 37 °C 隔夜培养, 弃上清。使用不含 FBS 的 DMEM 培养基将 H₂O₂ 储备液稀释至 0、100、200、300、400、500、800 和 1 000 μ mol/L, 以每个浓度 3 个平行孔进行上样, 每孔加入造模液 100 μ L, 37 °C 培养 4 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂 37 °C 培养 2 h 后检测 OD_{450} , 并根据公式(3)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{药物组均值A} - \text{空白组均值A}}{\text{对照组均值A} - \text{空白组均值A}} \times 100 \quad (3)$$

选取细胞存活率为 50%以上的菌液浓度作为后续实验的上样浓度。

1.8.2 菌株 H0661 培养液上清对 HepG2 细胞毒性影响

参考 Sugimura 等^[15]的方法, 取 OD_{600} 为 0.8–1.0 的菌株种子液接种到 BHIS 液体培养基中 37 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 取 2 mL 菌液

于 EP 管中, 4 °C、5 000×g 离心 15 min 后取上清, 使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤菌液, 用 DMEM 基础培养基将培养液上清浓度稀释到原来的 0%、1%、3%、6%、9%、15%、25%、35%和 45%后, 按照 1.8.1 的条件处理细胞并计算细胞的存活率。

1.8.3 菌株 H0661 对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用

参考吉正梅等^[16]的方法, 使用 DMEM 不完全培养基将培养液上清浓度稀释到合适的体积后, 按照 1.8.1 的方法处理细胞并计算细胞的存活率。

1.8.4 菌株 H0661 对 HepG2 细胞氧化应激损伤 SOD 酶活性的影响

将 HepG2 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 按氧化应激损伤保护实验中所测得的最佳无细胞培养上清液的浓度作为实验组处理细胞, 使用细胞刮刀将细胞收集后, 加入 400 μL 的 PBS 重悬细胞, 在冰浴中进行超声波破碎(150 W 功率, 破碎 5 s, 间隔 3 s, 反复破碎 3 次)。使用 BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白浓度, T-SOD 试剂盒检测细胞中抗氧化酶的活性。

1.8.5 菌株 H0661 对 HepG2 细胞中 DPPH 自由基清除能力的影响

参考 Liao 等^[17]的方法, 将 HepG2 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 37 °C 过夜培养,

弃上清, 用 PBS 清洗一遍细胞。以 15% 的菌液为实验组, 对照组和无细胞的板孔作为空白组加入基础培养基。向各组分中加入 DCFH-DA 原液, 使各组分的 DCFH-DA 终浓度为 25 μmol/L, 37 °C 培养 1 h, 弃上清, 使用 PBS 清洗 2 遍。在各组中加入 100 μL 含 600 μmol/L 的 AAPH 的无血清培养基, 以不加 AAPH 的无血清培养基作为空白, 37 °C 培养 1 h, 将 96 孔板放入荧光酶标仪中, 设置温度为 37 °C, 激发波长 538 nm, 测定波长 485 nm, 进行荧光强度测定。

1.9 统计学分析

结果用平均数和标准差表示。数据统计分析采用 GraphPad Prism 8.0。采用 one-way ANOVA 分析检验比较组别大于 3 组以上的数据。

2 结果与分析

2.1 抗氧化菌株的筛选结果

2.1.1 培养液上清 GSH-Px、SOD 酶活及 DPPH 自由基的清除能力

测试所选取的 6 株菌株培养液上清 GSH-Px、SOD 酶活及 DPPH 自由基的清除能力, 结果如表 1 所示。与其他菌株培养液上清相比, 菌株 H0661 培养液上清 GSH-Px 酶活为 586.11 U/mL ($P < 0.01$), SOD 酶活为 1 278.00 U/mL ($P < 0.01$), DPPH 自由基的清除率为 40.5%, 证明该菌株具有良好的抗氧化能力。

表 1 培养液上清 GSH-Px、SOD 酶活及 DPPH 自由基清除能力

Table 1 GSH-Px, SOD activity and DPPH radical scavenging ability of culture supernatant.

Strain screening number	GSH-Px activity (U/mL)	SOD activity (U/mL)	DPPH radical scavenging rate (%)
H0661	586.11±17.27**	1 278.00±24.89**	40.50±1.20
H662	32.78±2.32	937.27±17.65	29.14±0.01
H678	255.56±0.79	947.00±8.07	26.09±2.48
H2105	212.22±1.21	1 164±17.88	39.17±1.30
H2362	156.11±0.75	972.00±12.61	36.34±0.49
H2546	198.34±7.4	1 067.00±31.49	37.48±0.77

$n=3$; **: $P < 0.01$.

2.1.2 菌株 H0661 的 16S rRNA 基因鉴定

将测序获得的序列经 NCBI 网站 BLAST 比对, 发现该菌株与已知的木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*) KL162 相似性达 99.93% 以上, 因此, 将该菌株命名为木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*) TG022。为进一步了解该菌株在系统发育关系上的位置, 通过邻接法 (neighbor-joining, NJ) 结合已有的木糖葡萄球菌序列构建系统发育树, 其中以 *Lactococcus lactis* RGM327 作为外群菌株, 其 16S rRNA 基因的

GenBank 登录号为 PP130112.1 (图 1)。

2.1.3 木糖葡萄球菌 TG022 的生理特征

探究木糖葡萄球菌 TG022 的生理特征, 包括其生长曲线和最适生长条件, 结果如图 2 所示。木糖葡萄球菌 TG022 的生长曲线呈现出明显的阶段性变化。1–9 h 是菌株对数生长期, 菌群数量迅速增加。随后, TG022 在 10 h 左右进入生长的平台期, 在此期间细菌数量相对稳定, 随后菌群数量趋于稳定。此外, 发现 TG022 最适生长温度为 42 °C, 并且当 pH 值为 8.0 时生长最为迅速。

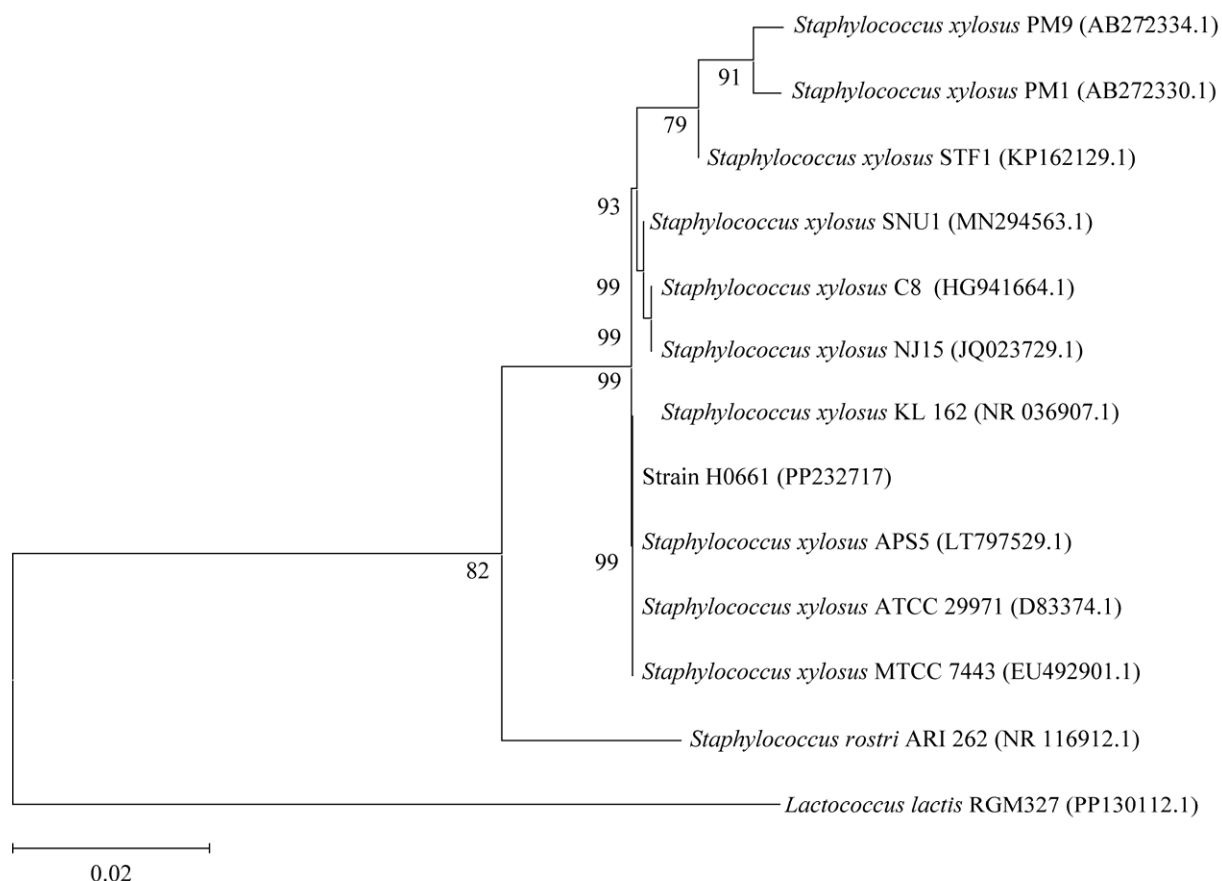


图 1 基于菌株 H0661 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic Tree based on 16S rRNA gene sequence of strain H0661. The serial number in brackets indicates the GenBank accession number of the strain. The branch point value represents the credibility of the evolutionary relationship. The scale indicates that the genetic relationship between the strains at this distance differs by 2%.

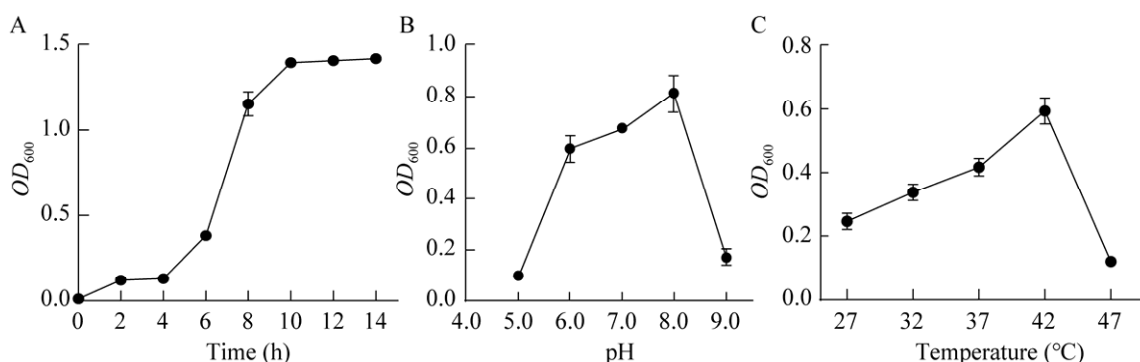


图 2 木糖葡萄球菌 TG022 的生长曲线(A)、最适 pH (B)和最适温度(C)

Figure 2 Determination of growth curve (A), optimal pH (B) and optimal temperature (C) of *Staphylococcus xylosus* TG022.

2.1.4 木糖葡萄球菌 TG022 的耐酸性测试结果

探究木糖葡萄球菌 TG022 对酸性环境的适应能力,结果如图 3 所示。与正常 BHIS 培养基的生长情况相比,木糖葡萄球菌 TG022 在 pH 1.0 的酸性培养基培养 1 h 后,存活率急剧下降,并且在 3 h 后存活率为 0。然而,在 pH 2.0 和 3.0 的培养基中,菌株显示出良好的生长状况,证明该菌株具有很好的酸耐受性。

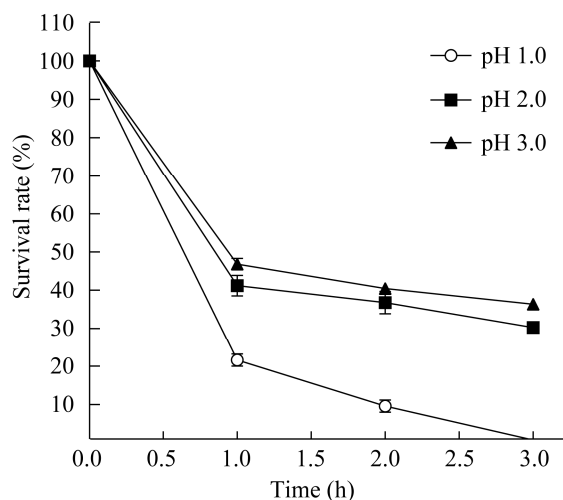


图 3 木糖葡萄球菌 TG022 在酸性环境中的生长情况($n=3$)

Figure 3 The growth of *Staphylococcus xylosus* TG022 in acidic environment ($n=3$).

2.1.5 木糖葡萄球菌 TG022 在模拟胃肠环境下的耐受性结果

人体胃环境为酸性,肠液中含有胆盐等成分,这些严苛的条件对菌株的存活提出了极大的挑战,为了探究木糖葡萄球菌 TG022 是否能够成功地在肠道中定殖,本研究对木糖葡萄球菌 TG022 在模拟胃肠液环境中的存活能力进行测定。结果如表 2 所示,木糖葡萄球菌 TG022 在胃液中的存活率为 47.29%,在肠液中的存活率为 91.78%,表明该菌株可以稳定地定殖到肠道中。

2.2 木糖葡萄球菌 TG022 改善 HepG2 细胞氧化应激损伤

2.2.1 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型

H₂O₂ 的浓度与细胞的存活率成反比,为了确定其对 HepG2 细胞活性的影响,选用不同浓度的 H₂O₂ 处理细胞 24 h,并使用 CCK-8 法测定细胞活力,结果如图 4 所示。当 H₂O₂ 浓度在 500 μmol/L 及以下时,细胞的存活率≥73.68%,此浓度下 H₂O₂ 对细胞的作用效果较差,细胞未达到氧化应激的状态。当 H₂O₂ 浓度为 600 μmol/L 时,细胞存活率为 43.41%,且随着 H₂O₂ 浓度增加 HepG2 细胞大量凋亡。因此后续选择 600 μmol/L 的 H₂O₂ 进行实验。

表 2 木糖葡萄球菌 TG022 在胃肠液中的存活率
Table 2 Survival rate of *Staphylococcus xylosus* TG022 in gastrointestinal fluid

Gastrointestinal environment	Survival rate (%)
Artificial gastric juice	47.29
Artificial intestinal juice	91.78

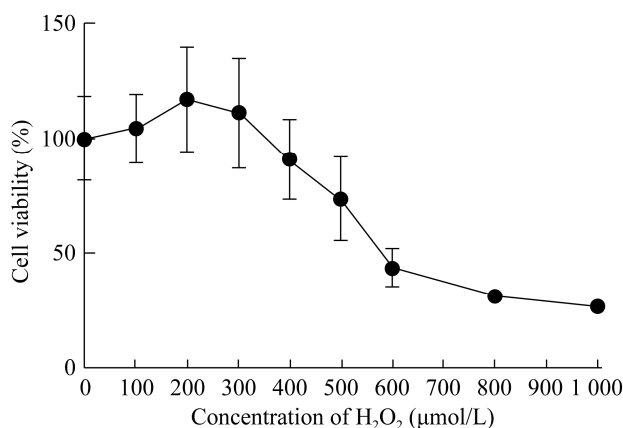


图 4 不同浓度 H₂O₂ 对 HepG2 细胞活性的影响 (n=6)

Figure 4 The effect of different concentrations of H₂O₂ on the activity of HepG2 cells. The error bar represents the standard deviation (n=6).

2.2.2 木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清对 HepG2 细胞毒性的影响结果

分别选取浓度为 0%、1%、3%、6%、9%、15%、25%、35%和 45%的木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清,探究其对 HepG2 细胞毒性的影响,结果如图 5 所示,当菌液浓度为 0%–35%时,细胞的存活大于 95%,证明木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清对细胞无毒性作用。

2.2.3 木糖葡萄球菌 TG022 对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用

探究不同培养液上清浓度的木糖葡萄球菌 TG022 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用,结果如图 6 所示,菌液浓度为 15% 时细胞存活率最高,与低浓度(0、1%和 3%)处理组相比细胞的存活率显著上升($P<0.01$),与对照组相比细胞的存活率无显著性差异($P>0.05$),

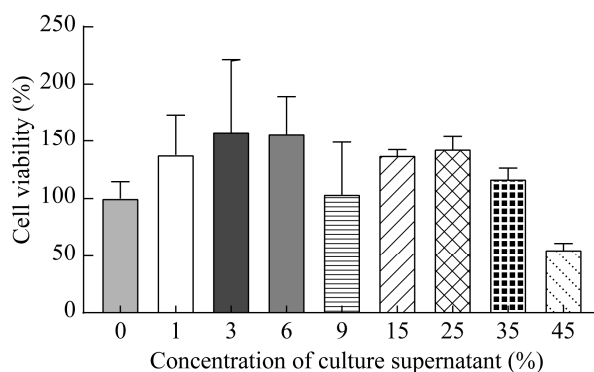


图 5 木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清的细胞毒性测试(n=3)

Figure 5 Cytotoxicity test of *Staphylococcus xylosus* TG022 culture supernatant. The error bar represents the standard deviation (n=3).

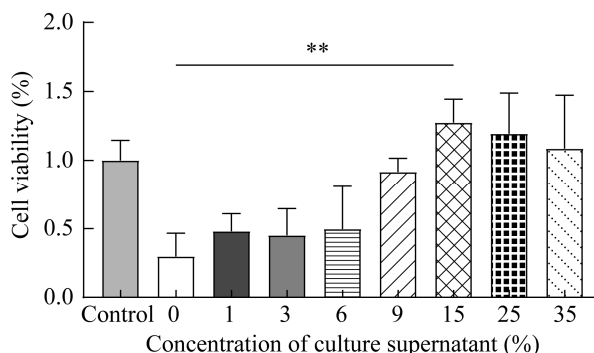


图 6 木糖葡萄球菌 TG022 对 HepG2 氧化应激损伤细胞的保护作用(n=3)

Figure 6 Protective effect of *Staphylococcus xylosus* TG022 on HepG2 cells injured by oxidative stress. The error bar represents the standard deviation (n=3). **: $P<0.01$.

证明在此浓度下菌液具对细胞氧化应激损伤保护效果最好。

2.2.4 木糖葡萄球菌 TG022 对 HepG2 细胞氧化应激损伤 SOD 酶活性的影响结果

SOD 是需氧细胞中最重要的抗氧化酶,通过清除超氧自由基,保证细胞中的 DNA 等生物活性分子免受损伤^[18]。探究木糖葡萄球菌 TG022 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化应激损伤中 SOD 酶活性的影响,结果如图 7 所示。在加入 15% 木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清后,细胞中 SOD 的活性与对照组相比显著上升($P<0.01$),与

空白组无显著性差异($P>0.05$)。

2.2.5 木糖葡萄球菌 TG022 对 HepG2 细胞中 DPPH 自由基清除能力的影响

AAPH 是一种自由基发生试剂,可诱导细胞内部产生 DPPH 自由基, DPPH 自由基与 DCFH-DA 发生反应后会产生荧光物质,细胞中 DPPH 自由基含量与荧光强度成正比。探究木糖葡萄球菌 TG022 对 HepG2 细胞中 DPPH 自由基清除能力的影响,结果如图 8 所示。与对照组相比, 15%木糖葡萄球菌 TG022 菌液上清荧光值

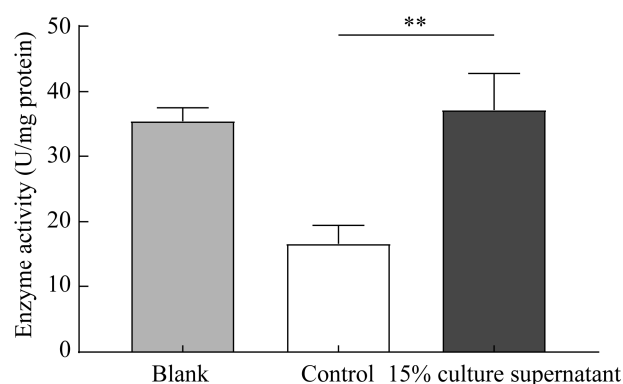


图 7 木糖葡萄球菌 TG022 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞中 SOD 酶活性的影响($n=3$)

Figure 7 The effect of *Staphylococcus xylosus* TG022 on the activity of SOD in HepG2 cells induced by H_2O_2 . The error bar represents the standard deviation ($n=3$). **: $P<0.01$.

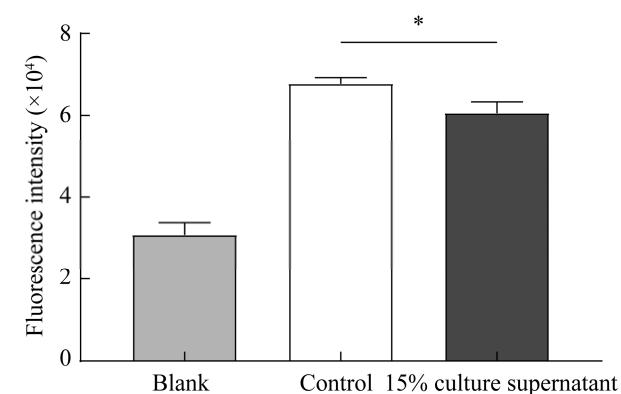


图 8 木糖葡萄球菌 TG022 对 HepG2 细胞中 DPPH 自由基清除能力的影响($n=3$)

Figure 8 The effect of *Staphylococcus xylosus* TG022 on DPPH radical scavenging capacity in HepG2 cells. The error bar represents the standard deviation ($n=3$). *: $P<0.05$.

显著降低($P<0.05$), 证明木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清可以有效提高细胞对于 DPPH 自由基的清除能力。

3 讨论与结论

目前,越来越多的研究表明疾病的发生发展与机体的氧化损伤密切相关。包括治疗心力衰竭、缓解皮肤损伤和衰老、预防早发冠心病和阿尔茨海默病,以及抑制肿瘤的发生^[19-22]。因此抗氧化产品对于疾病的预防及治疗具有重要的意义。

益生菌代谢产物中含有多种生物活性因子,这些因子通过与肠道淋巴组织的相互作用来刺激免疫系统的应答,从而提高人体的免疫力。还有一些因子则会被吸收进入血液循环,最终到达身体其他部位发挥作用。诸多研究提供的菌株材料被证实通过抗氧化机制,改善了间歇性低氧暴露诱导的肥胖、肝脏脂肪堆积和损伤、胰岛素抵抗、全身能量消耗、诱导结直肠癌细胞的凋亡以及缓解顺铂诱导的小鼠的慢性肾病^[23-26]。

本研究发现木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清具有 GSH-Px 和 SOD 活性,其在体外的 DPPH 自由基清除能力高达 40%,显著高于 Li 等^[27]研究所提到的清酒乳杆菌 MS103 的 24.96%,并且菌液显著提高了细胞的活性甚至高于对照组,该现象同样存在于清酒乳杆菌 MS103 的实验结果,证明这种现象具有普遍性。同时,本研究也证明木糖葡萄球菌 TG022 对细胞的氧化应激损伤具有缓解作用。菌液浓度为 45%时,细胞的存活率呈断崖式下降,其原因可能是菌液浓度过高导致培养液的培养条件,如 pH、渗透压等因素与细胞最适生长条件相差过大所致。木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清可以保护细胞中 SOD 活性,与对照组相比其活性提高了 123.8%,显著高于陈佩等^[28]在其研究中报道的戊糖片球菌

P36 的 43.79%。细胞 DPPH 自由基清除能力实验结果表明,木糖葡萄球菌 TG022 培养液上清可以有效降低 AAPH 诱导的细胞中 DPPH 自由基的含量,从活细胞层面验证了培养液上清的抗氧化效应。

综上所述,本研究分离筛选出一株抗氧化效果较好的 H0661 菌株,结合分子学鉴定结果,将其命名为木糖葡萄球菌 TG022,并证明其培养液上清能够在细胞水平上缓解氧化应激损伤。未来可以通过转录组学分析和 Nrf2-Keap1 信号通路基因表达的研究进一步探索其抗氧化和抗衰老作用的分子机制,并通过构建动物模型来验证其在体内的抗氧化和抗衰老能力。

REFERENCES

- [1] HAJAM YA, RANI R, GANIE SY, SHEIKH TA, JAVAID D, QADRI SS, PRAMODH S, ALSULIMANI A, ALKHANANI MF, HARAKEH S, HUSSAIN A, HAQUE S, RESHI MS. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 552.
- [2] BODEGA G, ALIQUÉ M, PUEBLA L, CARRACEDO J, RAMÍREZ RM. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2019, 8(1): 1626654.
- [3] HERB M, SCHRAMM M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 313.
- [4] MISHRA V, SHAH C, MOKASHE N, CHAVAN R, YADAV H, PRAJAPATI J. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(14): 3615-3626.
- [5] WANG Y, WU YP, WANG YY, XU H, MEI XQ, YU DY, WANG YB, LI WF. Antioxidant properties of probiotic bacteria[J]. *Nutrients*, 2017, 9(5): 521.
- [6] ARAUJO LDC, FURLANETO FAC, Da SILVA LAB, KAPILA YL. Use of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in oral diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(16): 9334.
- [7] PIQUÉ N, BERLANGA M, MIÑANA-GALBIS D. Health benefits of heat-killed (tyndallized) probiotics: an overview[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(10): 2534.
- [8] AMARETTI A, Di NUNZIO M, POMPEI A, RAIMONDI S, ROSSI M, BORDONI A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(2): 809-817.
- [9] WANG LL, LIU QH, CHEN YW, ZHENG XL, WANG CN, QI YN, DONG YC, XIAO Y, CHEN C, CHEN TH, HUANG QY, ZHAI ZZ, LONG CM, YANG HS, LI JZ, WANG L, ZHANG GH, LIAO P, LIU YX, HUANG P, et al. Antioxidant potential of *Pediococcus pentosaceus* strains from the sow milk bacterial collection in weaned piglets[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 83.
- [10] SAFRONOVA LS, SKOROCHOD IA, ILYASH VM. Antioxidant and antiradical properties of probiotic strains *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(6): 1585-1597.
- [11] 张业尼, 钱磊, 陈雪, 张志军, 刘金福. 过氧化氢诱导 HepG2 细胞氧化应激模型的建立[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(5): 160-164.
ZHANG YN, QIAN L, CHEN X, ZHANG ZJ, LIU JF. Establishment of hydrogen peroxide induced oxidative stress model in HepG2 cells[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(5): 160-164 (in Chinese).
- [12] 靳海洋, 王慧, 张燕辉, 胡天龙, 林志斌, 刘本娟, 蔺兴武, 谢祖彬. 基于基因组的一株土壤固氮菌分离菌株鉴定及其促生作用[J]. *微生物学报*, 2021, 61(10): 3249-3263.
JIN HY, WANG H, ZHANG YH, HU TL, LIN ZB, LIU BJ, LIN XW, XIE ZB. Genome-based identification and plant growth promotion of a nitrogen-fixing strain isolated from soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3249-3263 (in Chinese).
- [13] 张林奇, 王晓蕊, 史畅, 彭禹熙, 杜丽平. 益生菌粉中活菌稳定性及其耐受模拟胃肠液的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(13): 36-42.
ZHANG LQ, WANG XR, SHI C, PENG YX, DU LP. Stability and tolerance to simulated gastrointestinal fluids of probiotics in powder preparation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(13): 36-42 (in Chinese).
- [14] AL-SHEDDI ES, FARSHORI NN, AL-OQAIL MM, MUSARRAT J, AL-KHEDHAIRY AA, SIDDIQUI MA. Protective effect of *Lepidium sativum* seed extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver cells (HepG2)[J].

- Pharmaceutical Biology, 2016, 54(2): 314-321.
- [15] SUGIMURA N, LI Q, CHU ESH, LAU HCH, FONG W, LIU WX, LIANG C, NAKATSU G, SU ACY, COKER OO, WU WKK, CHAN FKL, YU J. *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis[J]. Gut, 2021, 71(10): 2011-2021.
- [16] 吉正梅, 张晓春, 彭钰迪, 王树林, 布丽君, 解华东. 鸭胚源抗氧化肽 TD12 对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 141-148. JI ZM, ZHANG XC, PENG YD, WANG SL, BU LJ, XIE HD. Protective effect of duck embryo-derived antioxidant peptide TD12 on oxidative stress damage in HepG2 cells[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 141-148 (in Chinese).
- [17] LIAO CY, WU LY, ZHONG WT, ZHENG QH, TAN WJ, FENG KX, FENG XL, MENG FX. Cellular antioxidant properties of *Ischnoderma resinosum* polysaccharide[J]. Molecules, 2022, 27(22): 7717.
- [18] STRYCHARZ-DUDZIAK M, FOLTYN S, DWORZAŃSKI J, KIELCZYKOWSKA M, MALM M, DROP B, POLZ-DACEWICZ M. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) in oropharyngeal cancer associated with EBV and HPV coinfection[J]. Viruses, 2020, 12(9): 1008.
- [19] van der POL A, van GILST WH, VOORS AA, van der MEER P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future[J]. European Journal of Heart Failure, 2019, 21(4): 425-435.
- [20] SREEDHAR A, AGUILERA-AGUIRRE L, SINGH KK. Mitochondria in skin health, aging, and disease[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11: 444.
- [21] BUTTERFIELD DA, HALLIWELL B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2019, 20: 148-160.
- [22] REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 49(11): 1603-1616.
- [23] LIU Q, LIU YH, LI FY, GU ZL, LIU M, SHAO T, ZHANG LH, ZHOU GY, PAN CW, HE LQ, CAI J, ZHANG X, BARVE S, McCLAIN CJ, CHEN YP, FENG WK. Probiotic culture supernatant improves metabolic function through FGF21-adiponectin pathway in mice[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 75: 108256.
- [24] JIAO YH, YANG H, SHIGWEDHA N, ZHANG S, LIU F, ZHANG LW. Probiotic effects and metabolic products of *Enterococcus faecalis* LD33 with respiration capacity[J]. Foods, 2022, 11(4): 606.
- [25] JIANG MX, DENG K, JIANG CL, FU MG, GUO CL, WANG XL, WANG X, MENG FJ, YANG SG, DENG KY, CHEN TT, XIN HB. Evaluation of the antioxidative, antibacterial, and anti-inflammatory effects of the *Aloe* fermentation supernatant containing *Lactobacillus plantarum* HM218749.1[J]. Mediators of Inflammation, 2016, 2016: 2945650.
- [26] GHOLAMI A, MONTAZERI-NAJAFABADY N, ASHOORI Y, KAZEMI K, HEIDARI R, OMIDIFAR N, KARIMZADEH I, OMMATI MM, ABOOTALEBI SN, GOLKAR N. The ameliorating effect of *Limosilactobacillus fermentum* and its supernatant postbiotic on cisplatin-induced chronic kidney disease in an animal model[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2023, 23(1): 243.
- [27] Li H, Chen CL, Li YX, Li ZQ, CHEN L, CHANG L. Antioxidant effects and probiotic properties of *Latilactobacillus sakei* MS103 isolated from sweet pickled garlic[J]. Foods, 2023, 12(23): 4276.
- [28] 陈佩, 党辉, 郭红军, 翟彩宁. 戊糖片球菌 P36 对 HepG2 细胞抗氧化能力影响的初步研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39 (12): 98-102. CHEN P, DANG H, GUO HJ, ZHAI CN. Preliminary study on the effect of *Pediococcus pentosaceus* P36 on the antioxidant capacity of HepG2 cells[J]. Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 98-102 (in Chinese).