

体外去除胆固醇菌株的筛选及其作用机理研究*

王一鸣¹ 范小兵² 杭晓敏² 李堃宝¹ 杨虹^{1**}

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)¹

(上海交大昂立股份有限公司生物医药研究所 上海 200030)²

摘要: 从青年人肠道中筛选分离, 鉴定得到 8 株乳杆菌, 进行胆固醇去除、耐酸和耐胆汁盐实验, 发现两株植物乳杆菌 Lp529 和 Lp501 同时具有较高的体外去除胆固醇能力和耐胆汁盐及耐酸性能。通过对它们胆固醇去除过程和胆固醇在相应固液相中分布情况的实验分析, 表明: Lp501 与 Lp529 去除胆固醇的机理有差别, 存在菌株特异性。研究还发现, 被菌株吸收的胆固醇没有被代谢为其他物质, 并可在条件适合时重新释放出来。

关键词: 植物乳杆菌, 胆固醇, 共沉淀

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0043-05

in vitro Selection of Probiotic *Lactobacillus* from the Human Feces and Their Mechanism on Cholesterol-lowering*

WANG Yi-Ming¹ FAN Xiao-Bing² HANG Xiao-Min² LI Kun-Bao¹ YANG Hong^{1**}

(College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)¹

(Shanghai Jiao Da Only Co., Ltd, Shanghai 200030)²

Abstract: 8 strains of *Lactobacillus* isolated from feces of healthy youth and identified by molecular biological methods were studied in the experiments, including removal cholesterol from media, acid-tolerance and bile-tolerance. Two *L. plantarum* strains, Lp529 and Lp501, show higher ability of removal cholesterol, acid-tolerance and bile-tolerance. Analyzed their process of cholesterol removing and cholesterol distributing in the precipitation, their mechanisms on cholesterol removing are different. The study also demonstrated that the cholesterol assimilated into the cell did not transform into other molecule and could be released in some condition.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, Cholesterol, Co-precipitation

胆固醇与冠心病、高血脂等心血管疾病密切相关。国内外不少实验已经证明^[1], 服用乳杆菌 (*Lactobacillus*) 或其制品, 有助于降低血清胆固醇^[1], 但有关降解机理还没有得到明确的结论。研究证明: 一般情况下, 只有在体外具有降胆固醇能力的菌株才有可能在人体内起降低胆固醇的作用, 体外筛选是乳杆菌去除胆固醇研究的重要基础。目前国内也有植物乳杆菌去除胆固醇的报道^[2,3], 但来源于人体的优良菌株方面还是空白。本研究从人体肠道内筛选出了多株具有较高去除胆固醇能力的乳杆菌, 并对其中综合性能最好的两株植物乳杆菌的胆固醇体外去除机理作了初步研究。

*上海交大-昂立 SARS 基金资助项目

上海市重点产业技术产学研联合攻关项目 (No. 沪产学研 06-20)

其他作者: 沈耀氏¹

**通讯作者 Tel: 021-34205343, E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2006-01-23, 修回日期: 2006-02-28

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: GENbox 厌氧培养系统 (bioMérieux), 显微镜 OLYMPUS BH-2, 分光光度计 Spectroquant NOVA60 (Merck)。可溶性胆固醇 (Sigma), 0.3% oxgall (Sigma) 培养基: 改良 MC 琼脂 (上海市疾病预防控制中心); MRSO [pH6 的 MRS 肉汤添加 0.3% oxgall (W/V), Sigma]; BSH (Bile-salt hydrolysis 胆汁盐水解酶) 酶活力筛选培养基: MRSO 琼脂添加 0.37g/L CaCl_2 (分析纯)。

1.1.2 实验菌株: 本研究中分离筛选的 8 株乳杆菌均获自健康青年人肠道。从 8 株菌中再挑选综合性能最好的 2 株菌 Lp529 和 Lp501 用于胆固醇去除机理研究。具体信息见表 1。所有菌株均冷冻保藏, 使用前经 37℃ 厌氧 (使用厌氧盒及试剂: GENbox Jar 2.5L; GENbox anaer bioMérieux sa 69280 Marcy l'Étoile-France) 培养 24 h, 连续转接 3 次, 方用于实验。

1.2 菌株分离与鉴定

取 26 名健康青年志愿者的新鲜粪便, 稀释涂布于选择性培养基改良 MC 琼脂平板。厌氧培养 48h 后分离得到菌株。对革兰氏染色为阳性且镜检形态特征符合乳杆菌的菌株, 进行 BSH 酶活力筛选和胆固醇去除实验。选出综合性能较好的 8 株菌并进行分子鉴定: 基因组总 DNA 提取, 16S rDNA PCR 扩增 (引物及扩增条件见文献[4]), PCR 片段测序 (上海申能博彩生物科技有限公司), 在 GenBank 中 Blast 找到最近的系统发育关系并申请 Accession number。分子鉴定结合形态及生理生化鉴定确定 8 株菌分别为植物乳杆菌 6 株 (Accession number DQ235649- DQ235652、DQ235654、DQ235657) 和唾液乳杆菌 2 株 (Accession number DQ235660 - DQ235661)。

BSH 酶活力筛选^[5]: 用直径 10mm 灭过菌的滤纸片浸透菌液后贴在 BSH 酶活力筛选培养基平板上, 厌氧培养 72h 后, 比较白色沉淀圈的大小。BSH 酶活力越高, 白色沉淀圈越大。

1.3 胆固醇的测定

OPA 法 (o-phthalaldehyde 邻苯二甲醛法)^[6]。

1.4 体外降胆固醇实验

实验菌株 1% 接种于 5mL 约含 100μg/mL 可溶性胆固醇的 MRSO 中, 37℃ 厌氧培养 24h。测定终 pH 和 $A_{620\text{nm}}$ 吸光度 (Spectroquant NOVA60, 下同)。4,000r/min 离心 10min, 上清液用于测定胆固醇含量, 菌泥用于沉淀分析。以未接种的胆固醇含量 100μg/mL 的 MRSO 作为空白对照。

a 菌株对胆固醇的去除: 未接种的对照液与实验上清液的胆固醇含量之差, 即为被菌体去除的胆固醇; b 沉淀冲洗 (测定沉淀于细胞外部的被去除胆固醇^[7]): 用 5mL 无菌水重悬菌泥, 吸取部分到已灭菌的 EP 管中用于破壁分析, 剩余部分 4,000r/min 离心 10min, 测定上清液胆固醇含量; c 破壁分析 (测定进入细胞内部的被去除胆固醇): 500μL 重悬菌液 + 10μL 50mmol/L 溶菌酶 (申能博彩) + 50μL 10% SDS 在 EP 管中混匀, 37℃ 水浴 1h。4,000r/min 离心 10min, 测定上清液胆固醇含量。沉淀再用乙醇处理。乙醇处理: 沉淀用 0.5mL 无水乙醇重悬浮后, 4,000r/min 离心 10min, 测定上清液胆固醇含量。以上两个上清液之胆固醇含量之和再减去沉淀冲洗得到的胆固醇即为

进入细胞内部的被去除胆固醇。

重新培养（测定被去除胆固醇在细胞内外的重新分配）：降胆固醇实验后的菌泥加入新鲜的不含胆固醇的 MRSO 5mL，混匀并转移入无菌的试管中 37℃ 培养 24h。同样再进行上清液分析、沉淀冲洗和破壁分析等，方法同上。

以下公式用于计算各部分胆固醇：

a 菌株对胆固醇的去除率 = $(B-S)/B \times 100\%$ ；b 可冲洗的胆固醇% = $A/B \times 100\%$ ；c 细胞内的胆固醇% = $(N+E-A)/B \times 100\%$ ；B：未接种的培养基中胆固醇浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；S：发酵上清液中胆固醇浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；A：沉淀冲洗上清液中胆固醇浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；N：破壁后上清液中胆固醇浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；E：乙醇处理后上清液中胆固醇浓度， $\mu\text{g/mL}$ 。

1.5 耐胆汁盐与耐酸性能实验

采用吸光度法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 降胆固醇菌株的体外筛选

8 株菌株对 MRSO 中胆固醇的去除情况见表 1。由表可知，所有实验菌株都具有一定的去除胆固醇的能力，去除率在 21.9% 至 38.6% 之间，其中的 Lp529、Lp501、LE14 等 3 株菌去除率都超过 35%，效果较好。

表 1 菌株去除培养基中的胆固醇实验结果及抗酸抗胆盐能力

Strains of <i>Lactobacillus</i> ¹	Accession No.	BSH precipitation zone diameter (mm)	Final pH	A ₆₂₀	R ² (%)	Acid restrain LT ³ (h)	Bile restrain LT ⁴ (h)
<i>L. plantarum</i> Lp5293	DQ235649	14	3.89 ± 0.02	2.72 ± 0.2	37.2 ± 2.2	1.42	0.44
<i>L. plantarum</i> Lp5013	DQ235650	26	3.86 ± 0.02	2.75 ± 0.2	38.6 ± 2.6	1.58	0.68
<i>L. plantarum</i> LS12	DQ235651	15	3.86 ± 0.02	2.90 ± 0.2	31.0 ± 4.0	2.44	1.42
<i>L. plantarum</i> LH11	DQ235652	22	3.83 ± 0.01	3.00 ± 0.3	21.9 ± 2.3	4.26	2.70
<i>L. plantarum</i> LH22	DQ235654	12	3.94 ± 0.02	2.90 ± 0.1	23.4 ± 3.6	1.62	0.56
<i>L. plantarum</i> LE14	DQ235657	15	3.90 ± 0.02	2.93 ± 0.3	37.8 ± 4.3	5.88	1.38
<i>L. salivarius</i> LN41	DQ235660	24	3.97 ± 0.02	2.89 ± 0.2	25.9 ± 1.8	1.74	0.28
<i>L. salivarius</i> LN62	DQ235661	18	3.99 ± 0.03	2.88 ± 0.2	27.0 ± 2.6	2.34	3.80

1 Identification based on sequence homology of the 16S rDNA bacterial gene, 2 Cholesterol removal rate, the mean results of at least three different experiments, 3 Acid restrain LT: Lag time (LT) means the difference between times required for the culture treated with pH2.0 media for 120min and for 0 min, to reach absorbance at 620nm (A₆₂₀) by 0.3 units, 4 Bile restrain LT: Lag time (LT) means the differences between times required for the cultures to reach absorbance at 620nm (A₆₂₀) by 0.3 units in the media MRS and MRSO

BSH（胆汁盐水解酶）可以将结合型胆汁盐降解为去结合型胆汁盐^[5]，并会在 Ca²⁺ 条件下沉淀。在本试验所有 8 菌株中，Lp501 的沉淀圈是最大的，而 Lp529 和

LE14 的则较小, 前者的 BSH 酶活力明显大于后两者, 但它们的胆固醇去除能力相当 (去除率分别为 38.6%、37.2%、37.8%)。LN41 和 LH22 的沉淀圈都大于 20mm, 但去除胆固醇能力仅分别为 25.9% 和 21.9%, 在 8 株菌中是较低的。根据 BSH 酶活力大小作为筛选标准的方法在本实验中并未得到有规律的结果。

在人体胃肠道的实际环境中, 乳酸菌需具备对胆汁盐和低 pH 的耐受性, 耐酸实验表明, LE14 和 LH11 是耐酸性最差的 2 株菌。而所有株菌都具有较强的耐胆汁盐能力。Usman, Hosono 等人的研究认为菌株的胆汁盐水解酶活力与胆汁盐耐受能力并不是正相关的^[10], 本研究中胆汁盐水解酶活力更强的菌也不代表它具有更强的胆汁盐耐受能力, 比如 LH11 和 LN62。

Lp529 和 Lp501 生长稳定, 同时具有较强的耐酸、耐胆汁盐和去除胆固醇能力, 是综合性能最好的 2 株菌, 故作为潜力菌株进行胆固醇去除机理的研究。

2.2 胆汁盐对胆固醇去除效果的影响

Klaver 提出^[7], 去结合型胆汁盐在较低的 pH 条件下 (<6), 可以同胆固醇共同沉淀析出。胆汁盐的存在是共沉淀的必要条件。表 2 中, 在没有添加胆汁盐的条件下, Lp529 和 Lp501 对胆固醇的去除率都有了明显降低, Lp501 受到的影响更大, 但两者的生长量和终 pH 与存在胆汁盐时相比, 并没有什么显著变化。说明胆汁盐的存在只影响胆固醇的去除, 而与菌株生长之间没有直接关系。

表 2 胆汁盐对胆固醇去除率的影响

Strain	MRSO	A ₆₂₀	Final pH	MRS	A ₆₂₀	Final pH
Lp529	37.5%	2.74	3.88	20.8%	2.71	3.88
Lp501	38.4%	2.76	3.82	12.9%	2.80	3.83

1 - Cholesterol concentration is about 100 μg/mL

2.3 共沉淀作用与吸收作用

研究发现, Lp529 与 Lp501 对胆固醇的去除, 是共沉淀与吸收作用的共同结果 (表 3), 但它们在去除胆固醇机理方面有一定差异: Lp529 去除胆固醇总量的 65% 被吸收入细胞内部, 33.3% 沉淀于细胞外; 而 Lp501 去除的胆固醇则有 44.6% 被吸收入细胞内部, 55.4% 沉淀于细胞外。

Lp529 吸收的胆固醇更多 (吸收作用占第一位), 而 Lp501 对胆固醇的去除是以共沉淀作用占第一位。本研究表明, 菌株对胆固醇的去除机理存在着菌株的特异性。

将细胞内部与冲洗沉淀得到的两部分胆固醇相加, 发现只是 Lp529 有极少量 (1.7%) 胆固醇“消失”, 证明菌株吸收的胆固醇并没有被降解为小分子, Tahri 等^[10]在研究双歧杆菌、Kimoto 等^[11]在研究 *Lactococcus lactis* 时也得到过相似的结论。

表 3 共沉淀作用与吸收作用对菌株去除胆固醇的影响¹

Strain	Lp529			Lp501		
Removed cholesterol	Precipitated ²	Absorbed ³	Add up	Precipitated	Absorbed	Add up
Concentration (μg/mL)	12.4	24.2	36.6	21.4	17.2	38.6
Percentage ⁴ (%)	33.3	65.0	98.3	55.4	44.6	100

¹ Mean result of three different tests, ² Washed by distilled water. ³, Subtrahends between after and before breaking up the cell wall, ⁴ Taking cholesterol removal of Lp529/Lp501 (37.2 μg/mL / 38.6 μg/mL) as 100%

2.4 重新培养后胆固醇的重新分配

在加入不含胆固醇的 MRS 培养基重新培养 24h 后, 2 株菌的上清液中重新出现了胆固醇, 分别占 46% 和 54%, 数量上恰恰与各部分减少的胆固醇相当。其中 Lp501 原先在沉淀于细胞外的胆固醇从 55.4% 减少到了 19.1%, 变化最为明显 (表 4)。

Tahri 等曾经证明了在 pH7 的条件下, 共沉淀出的胆固醇会重新溶解^[10]。这是本实验重培养后上清液中胆固醇的来源之一。被细胞吸收的胆固醇的重新析出, 是上清液中胆固醇的另一来源, 这样的析出很可能与细胞内外的胆固醇浓度差有关。

表 4 重新培养 24h 后胆固醇分布的变化

Strains	Lp529				Lp501			
	Final pH	In spent broth	Precipitated	Absorbed	Final pH	In spent broth	Precipitated	Absorbed
Before re-incubation	6	0%	33.3%	65.0%	6.0%	55.4%	44.6%	
After re-incubation	5.46	46.0%	12.9%	41.0%	5.38	54.0%	19.1%	26.9%

3 结论

实验筛选到了 2 株源于健康人体肠道的植物乳杆菌 Lp501 和 Lp529, 有较强的去除胆固醇能力、耐低 pH 和耐胆汁盐特性, 具有较好的应用潜力。

胆汁盐的存在只影响上述 2 株菌胆固醇的去除, 而与菌株生长之间没有直接关系。

2 株植物乳杆菌对胆固醇去除都是共沉淀作用与吸收作用的共同结果: Lp501 去除的胆固醇, 有 45% 进入其细胞内部, 55% 沉淀于细胞外部; Lp529 去除的胆固醇则有 65% 被吸收入其细胞内部, 33% 沉淀于细胞外部, 但两者去除的胆固醇总量相当。两者的胆固醇去除机理存在菌株特异性。

研究同时发现, 吸收到细胞内部的胆固醇并没有被降解, 重新析出现象可能与细胞内外的胆固醇浓度差有关。

参 考 文 献

[1] Ekelund L G, Suchindran C M. J Am Med Assoc, 1984, 251: 351 ~ 363.
[2] 王荫楠, 陈丽珊, 贾士芳, 等. 微生物学通报, 2005, 31 (2): 60 ~ 64.
[3] 张 灏, 华 伟. 工业微生物, 2003, 33 (2): 23 ~ 25.
[4] Heilig H G, Zoetendal E G, Vaughan E E, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (1): 114 ~ 123.
[5] Toit M, Franz C, Dicks L, et al. International Journal of Food Microbiology, 1998, 40: 93 ~ 104.
[6] Gilland S E, Nelson C R, Maxwell C. Appl Environ Microbiol, 1985, 49: 377 ~ 381.
[7] Klaver F A, Meer R. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 1120 ~ 1124.
[8] 赵佳锐, 范晓兵, 杭晓敏, 等. 微生物学报, 2005, 45 (6): 920 ~ 924.
[9] Usman, Hosono A. J Dairy Sci, 1999, 82: 243 ~ 248.
[10] Tahri K, Grill J P, Schneider F. Current Microbiology, 1996, 33: 187 ~ 193.
[11] Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. J Dairy Sci, 2002, 85: 3182 ~ 3188.