

富硒长双歧杆菌抑制乙醇诱导的小鼠肝损伤

易宏伟, 朱笑笑, 黄小莉, 赖玉珠, 唐玥(东南大学医学院药理学系, 南京 210009)

摘要:目的 研究富硒长双歧杆菌对乙醇引起肝损伤的抑制作用及其机制。方法 用体积分数 20% 乙醇造成雌性 C57/BL6 小鼠酒精性肝损伤模型, 分别口服 50, 100 mg · kg⁻¹ 富硒长双歧杆菌治疗 42 d。检测肝脏损伤; 测定小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量; 检测肝脏中丙二醛(MDA) 含量和超氧化物歧化酶(SOD) 活性, 以及 SREBP-1c, AMPK 和 PPAR- α 的 mRNA 水平。结果 摄入 100 mg · kg⁻¹ 富硒长双歧杆菌能明显抑制体积分数 20% 乙醇引起的小鼠肝脂肪变性, 降低肝脏系数, 减轻肝组织病理损伤, 减少肝组织中炎症, 抑制升高的血清 ALT、AST、GGT 以及 TNF- α 水平; 降低肝组织中 MDA 含量, 升高肝组织中 SOD 活性; 抑制 SREBP-1c 的 mRNA 水平, 升高 AMPK 和 PPAR- α 的 mRNA 水平。结论 富硒长双歧杆菌能够抑制乙醇诱导的小鼠肝损伤, 其机制可能与抗氧化应激、抑制炎症及恢复脂质代谢平衡有关。

关键词:富硒长双歧杆菌; 酒精性肝病; 氧化应激; 炎症; 脂质代谢

doi:10.11669/cpj.2019.22.007 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)22-1859-06

Inhibition Effect of Selenium-Enriched *Bifidobacterium longum* on Alcohol-induced Liver Damage in Mice

YI Hong-wei, ZHU Xiao-xiao, HUANG Xiao-li, LAI Yu-zhu, TANG Yue (Department of Pharmacology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of selenium-enriched *Bifidobacterium longum* on alcoholic liver damage and its mechanism. **METHODS** Alcoholic liver damage of female C57/BL6 mice were induced with 20% alcohol for 42 d, at the same time 50 or 100 mg · kg⁻¹ selenium-enriched *Bifidobacterium longum* were administrated respectively. Mice livers were collected for calculating liver index, HE staining and measuring liver tissue malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) level. Serum were collected for measurement of alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyltransferase (GGT) and tumor necrosis factor α (TNF- α) levels. The mRNA levels of liver SREBP-1c, AMPK and PPAR- α were measured with Real-time PCR. **RESULTS** Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* inhibited the increase in liver index and inflammation index induced with alcohol. Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* also inhibited alcohol induced ALT, AST, GGT and TNF- α levels increase; decreased liver MDA levels and increased liver SOD levels. Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* down-regulated SREBP-1c mRNA and up-regulated AMPK and PPAR- α mRNA levels of mice liver. **CONCLUSION** Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* protects mice from alcohol induced liver damage in a dose dependent manner. Its protective mechanism might be anti-oxidation, inflammation inhibition and improvement of lipid metabolism.

KEY WORDS: selenium-enriched *Bifidobacterium longum*; alcoholic liver disease; oxidative stress; inflammation; lipid metabolism

长期大量的饮酒可导致酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD), ALD 的进展包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎, 酒精性肝硬化以及肝细胞肿瘤。根据 WHO 报告^[1], 全球范围内约有 7 630 万人被诊断为酒精滥用, 每年死于酒精滥用的人数已达到 3.2%。ALD 已是一种全球性健康负担。《柳叶刀》发布的最新研究表明, 饮酒是 2016 年度死亡和伤残调整生命年(disability-adjusted life-years, DALYs)的第七大风险因素; 而我国是因饮酒导致死亡人数最多的国

家, 男性约 65 万人, 女性约 5.9 万人^[2]。

治疗 ALD 的措施主要包括禁酒、营养支持以及药物治疗。营养支持的目的是给肝细胞修复、再生提供足够的热量、蛋白质及其他营养素等。尽管目前尚无药物被美国食品和药品管理局批准用于治疗 ALD, 但是皮质类固醇、己酮可可碱、抗肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 抗体、抗氧化剂等药物已经被用于临床^[3]。由于上述药物的疗效有限, 有效率低, 因此需要寻找更好的治疗药物或

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(81741164, 81872917)

作者简介: 易宏伟, 男, 博士, 讲师 研究方向: 代谢性疾病药理学 Tel: (025)83272525 E-mail: hwyi@seu.edu.cn

措施。

乙醇可导致 ALD 患者肠道屏障破坏及菌群失调,未患肝脏疾病的饮酒者,酒精性肝炎及酒精性肝硬化患者血浆中内毒素的水平都高于正常人^[4],触发机体炎症反应。添加益生菌可改善机体肠道菌群平衡,有利于对 ALD 的治疗^[5]。硒是一种人体必需的重要微量元素,饮食中补充硒能够通过减少氧化应激来促进大鼠生长,增强免疫功能^[6]。富硒乳酸杆菌综合了微量元素硒和益生菌的优势,能够缓解四氯化碳引起的小鼠肝纤维化^[7];改善高脂饮食导致的小鼠脂代谢紊乱及肝损伤^[8]。关于富硒益生菌的研究多集中于乳酸杆菌,对于富硒长双歧杆菌的研究还未见报道。本实验发现富硒长双歧杆菌能抑制体积分数 20% 乙醇引起的小鼠肝损伤,其作用与抗氧化应激,抑制炎症及平衡脂质代谢相关。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 C57/BL6 小鼠[南京医科大学医药实验动物中心,6~8 w,雌性。动物合格证号 SCXK(苏)2016-0002]。在(21±2)℃、12 h 昼夜交替的条件下饲养,不限饮食。常规适应性饲养 3 d 后使用。

1.2 药物与试剂

富硒长双歧杆菌(菌号:DD98,江苏德禧生物科技有限公司,批号:170925)。每 1 mg 富硒长双歧杆菌制剂中含有活菌数约为 10⁶ 个。体积分数 20% 乙醇由 42 度红星二锅头酒(北京红星股份有限公司,批号:20170705)加入纯净水配制而成。血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyltransferase, GGT)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20180118)。小鼠 TNF- α 检测试剂盒(R&D Systems 公司)。TRIzolTM Reagent(Invitrogen 公司)。RevertAid First Strand cDNA Synthesis 反转录试剂盒及 PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix 定量 PCR 试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 动物分组

C57/BL6 雌性小鼠按体重随机分为 4 组,分别为对照组、模型组及 50 或 100 mg·kg⁻¹富硒长双歧杆菌治疗组,每组 6 只。小鼠灌胃富硒长双歧杆菌的剂量按体重为 60 kg 的成人每日补充 100~200 μ g 硒计算。本批次富硒长双歧杆菌的硒含量为 0.352 mg·g⁻¹,则小鼠灌胃的剂量富硒长双歧杆菌

的剂量为 50~100 mg·kg⁻¹。除对照组饮用灭菌水外,其余各组均饮用体积分数 20% 乙醇;治疗组分别每日灌胃 50、100 mg·kg⁻¹富硒长双歧杆菌水溶液。造模 42 d,给药期间观察并记录小鼠的毛色、饮食、行为及死亡情况。

1.4 样本采集及测定

各组小鼠禁食 12 h 后摘眼球取血,常温静置后待其凝固,3 000×g 离心 15 min,取血清,-80℃保存待测。采血后,迅速剖取肝脏,称取肝脏湿重,计算肝脏系数(肝脏系数=肝质量/体质量×100%)。取小鼠肝左叶制备 10% 肝匀浆,将匀浆液 2 500×g 离心 20 min,4℃,取上清。按试剂盒说明书分别测定血清 ALT,AST,GGT,TNF- α 水平及肝匀浆中 MDA 和 SOD 的水平。

1.5 肝组织病理学检查

取小鼠肝脏右叶置于 10% 中性福尔马林中进行固定,常规取材,脱水,石蜡包埋,制片(4 μ m 厚),HE 染色,由病理专业人员在光学显微镜下阅片,检查肝脏有无下列病变:①有无肝细胞变性;②有无肝细胞坏死及其范围;③有无肝窦扩张、淤血,肝小叶内有无炎细胞浸润;④中央静脉周围有无细胞浸润;⑤门管区有无细胞浸润及纤维组织增生。根据病变由轻到重的程度标记为 0 分(基本正常),0.5(极轻度),1 分(轻度),2 分(中度),3 分(重度)和 4 分(极重度)。

1.6 实时定量 PCR 检测

按试剂盒说明分别提取小鼠肝脏总 RNA,反转录为 cDNA。使用 ABI 7300 定量 PCR 仪检测 SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1c),PPAR- α (peroxisome proliferator-activating receptor α)及 AMPK (5'adenosine monophosphate-activated protein kinase)的 mRNA 水平。测定引物序列分别为: β -actin,正向 5'-GGCTGTATCCCCTC-CATCG-3',反向 5'-CCAGTTGTAACAATGCCATGT-3';SREBP-1c,正向 5'-TGACCCGGCTATCCGTGA-3',反向 5'-CTGGGCTGAGCAATACAGTTC-3';PPAR- α ,正向 5'-AGAGCCCCATCTGTCTCTC-3',反向 5'-ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA-3';AMPK,正向 5'-GTCAAAGCCGACCCAATGATA-3',反向 5'-CGTACACGCAAATAATAGGGGTT-3'。

1.7 数据处理

实验结果以 mean±SEM 表示。先用单因素方差进行统计分析,再以 Student-Newman-Keuls 来检验各组间的差异。

2 结果

2.1 富硒长双歧杆菌改善体积分数 20% 乙醇引起的肝细胞内损伤并减少肝脏内脂质沉积

摄入体积分数 20% 乙醇 42 d 后的小鼠毛色缺少光泽,摄食下降,活动减少、未见小鼠死亡。和模型组相比,富硒长双歧杆菌治疗组的小鼠摄食及活动都有所改善。实验室组织学结果见图 1。正常组小鼠肝细胞条索排列整齐,炎症细胞浸润少;模型组肝细胞变性坏死增多,脂泡小而密集,伴有炎性细胞浸润(图 1A-b),损伤显著($P < 0.001$)(图 1B); $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌组的小鼠肝损伤减轻,肝细胞破损及坏死程度降低,炎症细胞浸润减少,肝组织中脂肪变性得到缓解(图 1A-d,1B); $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌能部分缓解体积分数 20% 乙醇引起的小鼠肝脏病理性改变,对酒精性肝损伤的保护作用稍弱(图 1A-c)。体积分数 20% 乙醇造成小鼠肝脏受损肿大,质量增加,肝脏系数升高; $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌显著降低小鼠肝脏系数(图 1C)。上述结果表明,富硒长双歧杆菌对体积分数 20% 乙醇引起的肝损伤具有一定的保护作用,并呈现出剂量依赖性。

2.2 富硒长双歧杆菌降低小鼠血清 ALT、AST 和 GGT 水平

摄入体积分数 20% 乙醇后,模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著升高。 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌显著降低血清 ALT 和 AST 水平;而 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌仅能显著降低 AST 水平(图 2A)。 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌也能够显著降低体积分数 20% 乙醇引起的 GGT 水平升高(图 2B)。结果表明,富硒长双歧杆菌能剂量依赖性地抑制体积分数 20% 乙醇引起的小鼠肝细胞损伤。

2.3 富硒长双歧杆菌抑制体积分数 20% 乙醇引起的肝细胞内氧化应激

小鼠肝匀浆 MDA 和 SOD 含量结果显示,模型组小鼠 MDA 水平显著升高,而 SOD 水平显著低于对照组。 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌均能显著降低肝脏 MDA 水平, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌显著升高肝脏 SOD 水平(图 3)。结果表明,体积分数 20% 乙醇能增加肝细胞内氧化应激水平,造成肝细胞氧化性损伤;富硒长双歧杆菌通过降低肝脏 MDA 水平并升高 SOD 水平以抑制肝细胞内氧化应激,改善体积分数 20% 乙醇引起的小鼠肝损伤。

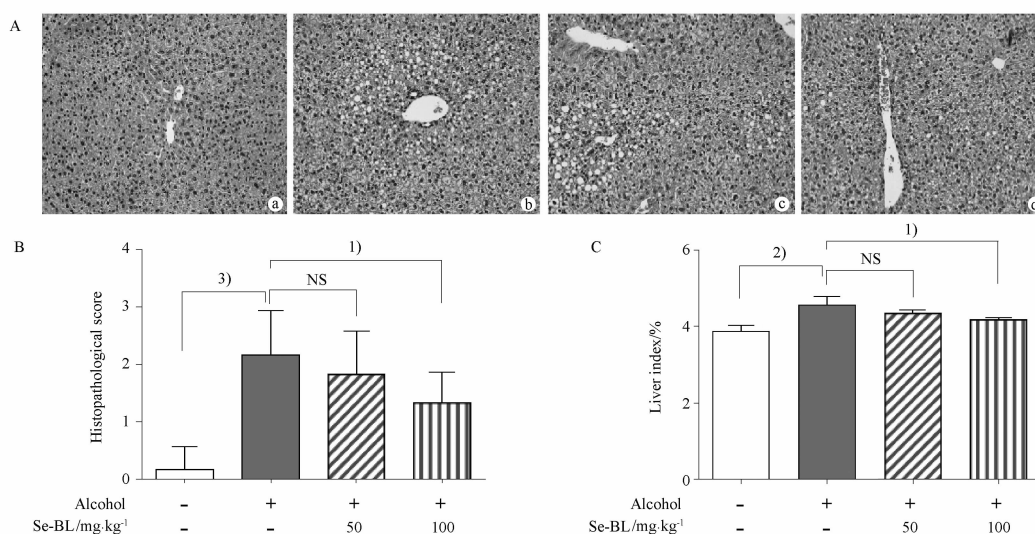


图 1 富硒长双歧杆菌(Se-BL)改善体积分数 20% 乙醇引起的小鼠肝脏损伤。 $n = 6, \bar{x} \pm \text{SEM}$

小鼠摄入乙醇 42 d,同时采用富硒长双歧杆菌治疗;A - HE 染色检测小鼠肝脏损伤,a - 对照组;b - 酒精性肝损伤模型组;c - $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌治疗组;d - $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 富硒长双歧杆菌治疗组;图片选自随机的 5 个视野,每组动物数 $n = 6$;B - 肝脏组织学评分;C - 肝脏指数;¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$;NS - 没有统计学差异

Fig. 1 Selenium-enriched *Bifidobacterium longum*(Se-BL) improved alcohol-induced liver injury in mice. $n = 6, \bar{x} \pm \text{SEM}$

Mice were treated with alcohol and different dosage of *Bifidobacterium longum* for 42 d, and the mice liver were collected; A - mice liver injury was checked with H&E staining; a - control; b - alcohol intake; c - $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ selenium-enriched *Bifidobacterium longum* administration; d - $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ selenium-enriched *Bifidobacterium longum* administration; Representative images of the liver tissues from five random field of each treatment group are shown, $n = 6$; B - liver histopathological score; C - liver index. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; NS - none significant

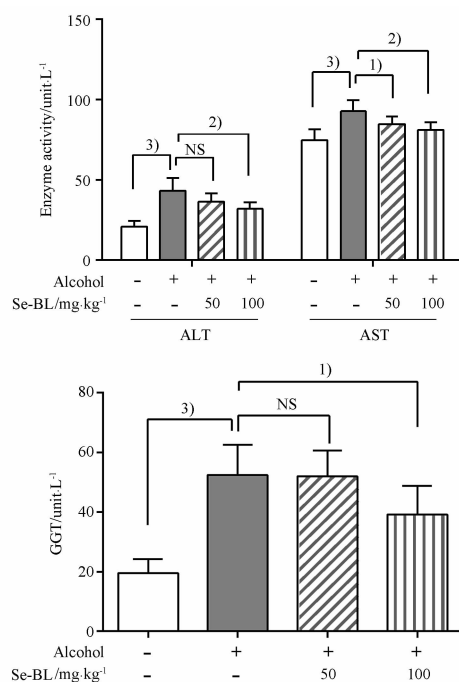


图2 Se-BL抑制体积分数20%乙醇引起的小鼠血清ALT、AST和GGT水平升高。n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

Fig. 2 Se-BL inhibited mice serum ALT, AST and GGT increase after alcohol treatment. n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

2.4 富硒长双歧杆菌抑制体积分数20%乙醇引起的小鼠血清TNF- α 水平升高

小鼠血清炎症因子水平检测显示,体积分数20%乙醇处理后小鼠血清TNF- α 水平显著升高。表明体积分数20%乙醇可以引起体内炎症反应,对肝细胞造成损伤。50和100 mg·kg⁻¹富硒长双歧杆菌均能显著降低血清TNF- α 水平,并呈现出剂量依赖性。表明富硒长双歧杆菌能通过减轻体积分数20%乙醇引起的炎症反应而保护肝细胞(图4)。

2.5 富硒长双歧杆菌改善体积分数20%乙醇引起的小鼠肝脏脂代谢相关基因水平紊乱

SREBP-1c, PPAR- α 和AMPK与脂质代谢密切相关,体积分数20%乙醇可引起小鼠肝脏脂质沉积,因此我们检测了小鼠肝脏中上述基因mRNA的表达情况。结果表明,摄入体积分数20%乙醇42d后,小鼠肝脏中SREBP-1c表达上调,而PPAR- α 和AMPK表达下调。肝脏脂质合成增加而脂肪分解减少,这与肝脏病理改变相一致。100 mg·kg⁻¹富硒长双歧杆菌能够降低SREBP-1c的水平,相应地增加PPAR- α 和AMPK的mRNA水平(图5)。说明

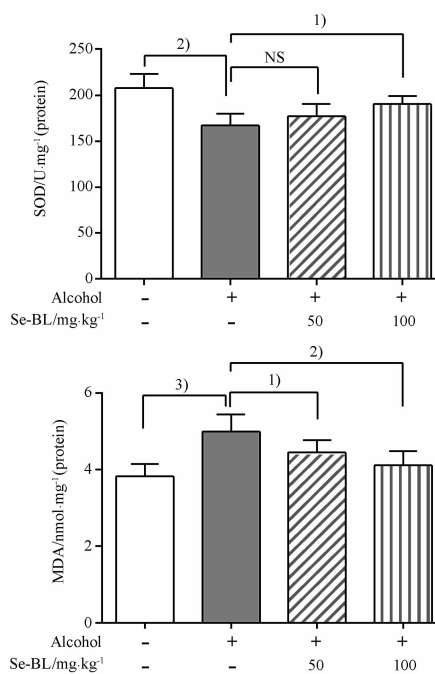


图3 Se-BL改善体积分数20%乙醇引起的氧化应激。n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

Fig. 3 Se-BL increase mice liver SOD levels and inhibited mouse liver MDA levels. n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

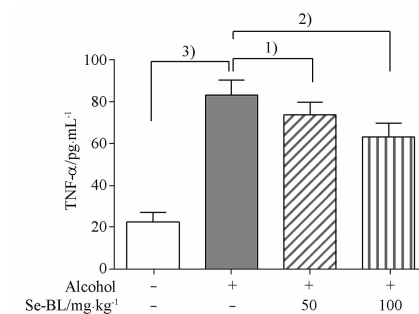


图4 Se-BL抑制体积分数20%乙醇引起的小鼠血清TNF- α 水平升高。n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

Fig. 4 Se-BL inhibited mice serum TNF- α levels. n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

富硒长双歧杆菌能够调节肝脏的脂质合成及分解,恢复脂质代谢平衡。

3 讨论

乙醇导致的常见肝脏损伤包括酒精性脂肪肝,酒精性肝纤维化,酒精性肝炎等。这些损伤可以在同一病人身上单独出现,也可能同时或相继出现。重度饮酒者也会出现和肝脏无关的损伤如感染,

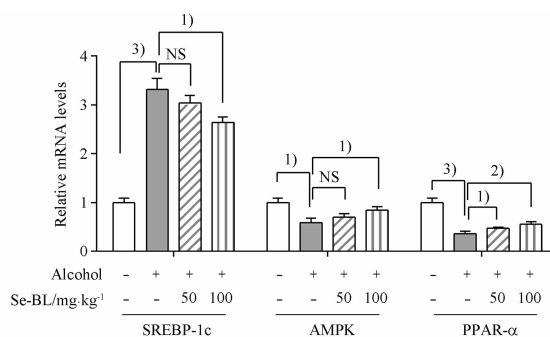


图5 Se-BL改善体积分数20%乙醇引起的小鼠肝脏中与脂质代谢相关的基因表达。n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

Fig. 5 Se-BL improved mice liver mRNA levels of lipid metabolism related genes. n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001

恶性肿瘤,心血管意外以及神经系统,胰脏和肾脏疾病^[9]。本实验显示,富硒长双歧杆菌能够抑制体积分数20%乙醇引起的小鼠肝脂肪变性及肝脏指数增加,降低血清ALT、AST、GGT及TNF- α 水平并恢复肝脏中脂质代谢相关基因表达平衡。本实验拓展了治疗ALD的新方法,有助于改观ALD的治疗现状。

对ALD的基础研究还比较困难。人们进行了半个多世纪的研究,仍然没有找到能够完全模拟人类ALD特征的动物模型^[10];对ALD的诊断也不容易,因为无法得知准确的饮酒史,并且缺乏精确的生物化学检测指标以及确定肝脏疾病严重程度的物理检查方法。研究报道雌性的大鼠或近交系小鼠C57BL/6对乙醇更为敏感^[11-12];血清ALT和AST水平可作为检验肝脏损伤的重要指标;碳水化合物缺乏转铁蛋白(carbohydrate-deficient transferrin, CDT)和GGT是检测乙醇过量摄入的可靠指标^[13]。因此,本实验采用C57BL/6近交系雌性小鼠,以血清AST、ALT和GGT为检测指标,结合病理学检查来考察富硒长双歧杆菌的作用。结果显示,体积分数20%乙醇能显著引起小鼠肝损伤,导致血清ALT、AST以及GGT水平升高。富硒长双歧杆菌能够剂量依赖性地抑制酒精性肝损伤,显示出其对肝脏的保护作用(图1,2)。

乙醇容易穿过细胞膜进入细胞内,约90%是通过生物转化被机体所代谢。在体内的代谢过程中,产生了过氧化氢和超氧阴离子等活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[14]。由于参与乙醇代谢的乙醇脱氢酶,乙醛脱氢酶和细胞色素P₄₅₀ 2E1

(CYP2E1)主要存在于肝细胞,因此过量的乙醇可升高肝细胞内ROS水平,损伤肝细胞。Kirpich发现,和单纯的标准治疗(禁酒和补充维生素)相比较,患者口服双歧杆菌和乳酸杆菌5d后血清ALT和AST水平显著降低^[15]。长双歧杆菌通过抑制NF- κ B活化以恢复肠道菌群,降低血脂,血清ALT, AST, TNF- α 水平进而缓解乙醇诱导的小鼠肝脏脂肪变性^[16]。这些研究均表明双歧杆菌具有抑制体积分数20%乙醇引起的肝损伤作用。在本实验中,富硒长双歧杆菌的DD98菌株同样具有抑制肝脏脂肪变性的作用,能够抑制体积分数20%乙醇引起的ALT, AST, GGT和TNF- α 水平升高;同时该菌株还具有抗氧化应激作用,其机制与富含硒元素有关。

硒是谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidases, GSH-Px)的辅因子, GSH-Px能还原过氧化氢并减少乙醇引起的脂质过氧化,在ROS代谢中具有重要作用^[17]。硒还可通过掺入到硒蛋白中发挥抗氧化、抗炎等作用。Zhang等^[18]报道硒可以抑制游离脂肪酸诱导大鼠原代培养的肝细胞氧化应激及凋亡。我们前期研究发现,单次摄入富硒长双歧杆菌的大鼠,血浆中硒浓度于8h达到最高;连续口服富硒长双歧杆菌30d后,大鼠心、肝、脾、肺及肾中均检测到硒,浓度高于摄入同等量的Na₂SeO₃(结果未显示,待发表)。小鼠灌胃富硒长双歧杆菌后,也能升高肝脏中的硒含量。富硒长双歧杆菌还能够升高小鼠肝脏中SOD水平,降低肝细胞匀浆中的MDA水平(图3),表明富硒长双歧杆菌可能是通过降低肝细胞内ROS水平,抑制氧化应激而发挥保护作用,其机制可能与补充硒、增强肝细胞抗氧化应激作用有关。

乙醇摄入可导致炎症反应,表现为促炎因子释放。含有乳酸杆菌,长双歧杆菌和嗜热链球菌的制剂能通过降低肝脏中TNF- α ,升高IL-10水平以抑制体积分数20%乙醇引起的小鼠肝脏脂肪变性^[19]。炎症因子参与了ALD的发病及进展,抑制促炎因子并升高抗炎因子的水平有助于缓解ALD。而富硒长双歧杆菌对体积分数20%乙醇引起的肝脏炎症作用还未见报道。在本实验中我们发现体积分数20%乙醇处理后,小鼠血清的TNF- α 水平显著升高,而富硒长双歧杆菌能够降低血清中TNF- α 水平(图4)。

慢性饮酒可导致肝脏脂肪变性,主要是通过下调AMPK,进而刺激SREBP-1c表达并抑制PPAR- α 表达^[20]。SREBP-1c可增加脂肪酸生物合成^[21],而

PPAR- α 可抑制体积分数 20% 乙醇诱导的脂肪变性^[22]。益生菌能够降低 SREBP-1c 水平, 升高 PPAR- α 水平发挥肝细胞保护作用^[23]。因此, 在本实验中也证实了富硒长双歧杆菌能通过调节 SREBP-1c 及 PPAR- α 水平而改善体积分数 20% 乙醇引起的肝细胞脂肪变性(图 5), 但是其详细的作用机制还有待进一步的研究。

综上所述, 富硒长双歧杆菌通过增加体内硒的水平, 抑制体积分数 20% 乙醇引起的肝细胞内氧化应激; 并可能通过长双歧杆菌来改善肠道菌群, 减少炎症因子释放及降低肝细胞内脂质沉积而发挥肝细胞保护作用。通过补充硒及益生菌的双重作用可起到更好的治疗效果。本实验也为治疗 ALD 提供了一个新的治疗措施。

REFERENCES

- [1] MALHI H, GORES G J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6):1641-1654.
- [2] GBD 2016 ALCOHOL COLLABORATORS. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet (London, England)*, 2018, 392(10152):1015-1035.
- [3] SUK K T, KIM M Y, BAIK S K. Alcoholic liver disease: treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(36):12934-12944.
- [4] PARLESIAK A, SCHAFER C, SCHUTZ T, et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(5):742-747.
- [5] BAJAJ J S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota[J]. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(4):235-246.
- [6] WANG D, YANG B, WEI G, et al. Efficient preparation of selenium/glutathione-enriched *Candida utilis* and its biological effects on rats[J]. *Biol Trace Element Res*, 2012, 150(1-3):249-257.
- [7] LIU Y, LIU Q, YE G, et al. Protective effects of selenium-enriched probiotics on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(1):242-249.
- [8] NIDO S A, SHITULENI S A, MENGISTU B M, et al. Effects of selenium-enriched probiotics on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in mice fed a high-fat diet[J]. *Biol Trace Element Res*, 2016, 171(2):399-409.
- [9] GAO B, SEKI E, BRENNER D A, et al. Innate immunity in alcoholic liver disease[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(4):516-525.
- [10] GAO B, XU M J, BERTOLA A, et al. Animal models of alcoholic liver disease: pathogenesis and clinical relevance[J]. *Gene Express*, 2017, 17(3):173-186.
- [11] IIMURO Y, FRANKENBERG M V, ARTEEL G E, et al. Female rats exhibit greater susceptibility to early alcohol-induced liver injury than males[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(5 Pt 1):1186-1194.
- [12] BELKNAP J K, CRABBE J C, YOUNG E R. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains[J]. *Psychopharmacology*, 1993, 112(4):503-510.
- [13] HIETALA J, KOIVISTO H, ANTTILA P, et al. Comparison of the combined marker GGT-CDT and the conventional laboratory markers of alcohol abuse in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers[J]. *Alcohol Alcohol*, 2006, 41(5):528-533.
- [14] CEDERBAUM A I. Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(S3):22-25.
- [15] KIRPICH I A, SOLOVIEVA N V, LEIKHTER S N, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study [J]. *Alcohol (Fayetteville, NY)*, 2008, 42(8):675-682.
- [16] KIM W G, KIM H I, KWON E K, et al. *Lactobacillus plantarum* LC27 and *Bifidobacterium longum* LC67 mitigate alcoholic steatosis in mice by inhibiting LPS-mediated NF-kappaB activation through restoration of the disturbed gut microbiota[J]. *Food Function*, 2018, 9(8):4255-4265.
- [17] RAYMAN M P. Selenium and human health[J]. *Lancet*, 2012, 379(9822):1256-1268.
- [18] ZHANG Z, LI S, JIANG H, et al. Effects of selenium on apoptosis and abnormal amino acid metabolism induced by excess fatty acid in isolated rat hepatocytes[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(9). doi: 10.1002/mnfr.201700016.
- [19] CHIU W C, HUANG Y L, CHEN Y L, et al. Synbiotics reduce ethanol-induced hepatic steatosis and inflammation by improving intestinal permeability and microbiota in rats[J]. *Food Funct*, 2015, 6(5):1692-1700.
- [20] LOUVET A, MATHURIN P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(4):231-242.
- [21] YOU M, FISCHER M, DEEG M A, et al. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32):29342-29347.
- [22] NAKAJIMA T, KAMIJO Y, TANAKA N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against alcohol-induced liver damage[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2004, 40(4):972-980.
- [23] REN T, ZHU J, ZHU L, et al. The combination of blueberry juice and probiotics ameliorate non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by affecting SREBP-1c/PNPLA-3 pathway via PPAR-alpha[J]. *Nutrients*, 2017, 9(3). doi: 10.3390/nu9030198.

(收稿日期:2018-11-26)