

植物乳植杆菌 ZG03 通过其代谢物短链脂肪酸缓解斑马鱼的氧化应激

林淑娴¹, 郭丽娜¹, 马燕², 熊尧³, 何盈犀¹, 许欣筑¹, 盛雯¹, 许素晔¹, 邱峰⁴

¹广东省中医院临床营养科, 广东 广州 510120; ²广东芯选检验检测有限公司研发中心, 广东 广州 510700;

³广东南芯医疗科技有限公司研发中心, 广东 广州 510700; ⁴南方医科大学第七附属医院医学检验科, 广东 佛山 528244

摘要:目的 分析植物乳植杆菌 ZG03 的菌株特性并通过代谢组学结合斑马鱼模式生物探究 ZG03 缓解氧化应激作用机制。方法 测定并绘制 ZG03 生长曲线, 通过场发射扫描电镜观察菌体形态, 进一步通过全基因组测序技术从基因层面评估其安全性和潜在功效。通过异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记植物乳植杆菌 ZG03, 在荧光显微镜下观察其在斑马鱼肠道中的定植情况。运用 2% 葡萄糖溶液诱导斑马鱼建立氧化应激模型, 通过荧光显微镜观察斑马鱼尾部造血组织 (CHT) 处中性粒细胞的生成情况, 和检测斑马鱼体内 SOD 活力、ROS 水平以及 MDA 含量, 评估 ZG03 缓解氧化应激作用。运用液相色谱-质谱技术进行靶向代谢组学检测 ZG03 作用斑马鱼后体内的代谢产物短链脂肪酸 (SCFAs) 含量, 明确抗氧化应激关键代谢物。运用氧化应激模型评价关键代谢物乙酸、丙酸和己酸的缓解氧化应激作用。**结果** 植物乳植杆菌 ZG03 在 MRS 固体培养基上呈圆形、表面光滑、湿润、乳白色单菌落, 菌体呈杆状, ZG03 具有丰富的糖代谢通路基因簇。与空白组相比, 斑马鱼肠球、中肠和后肠部位均清晰可见 FITC 标记植物乳植杆菌 ZG03 的绿色荧光。与模型组相比, ZG03 显著降低葡萄糖诱导氧化应激模型斑马鱼体内的 ROS 水平 ($P < 0.05$)。斑马鱼 CHT 处中性粒细胞的数量 ($P < 0.001$)、升高斑马鱼体内 SOD 活性 ($P < 0.05$), 同时植物乳植杆菌 ZG03 在斑马鱼体内的代谢物 SCFAs 乙酸、丙酸、己酸含量增加 ($P < 0.05$)。SCFAs 乙酸钠、丙酸钠、己酸钠能够提升氧化应激模型斑马鱼体内的 SOD 活性 ($P < 0.001$)。**结论** 植物乳植杆菌 ZG03 通过其代谢物 SCFAs 乙酸、丙酸、己酸改善葡萄糖诱导模型斑马鱼的氧化应激。

关键词: 植物乳植杆菌 ZG03; 短链脂肪酸; 葡萄糖; 氧化应激

Lactobacillus plantarum ZG03 alleviates oxidative stress via its metabolites short-chain fatty acids

LIN Shuxian¹, GUO Lina¹, MA Yan², XIONG Yao³, HE Yingxi¹, XU Xinzhu¹, SHENG Wen¹, XU Suhua¹, QIU Feng⁴

¹Department of Clinical Nutrition, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; ²Research and Development Center, Guangdong Longseek Testing Co., Ltd., Guangzhou 510700, China; ³Guangdong Longsee Biomedical Co., Ltd., Guangzhou 510700, China; ⁴Department of Laboratory Medicine, Seventh Affiliated Hospital of Southern Medical University, Foshan 528244, China

Abstract: Objective To investigate the efficacy of *Lactobacillus plantarum* ZG03 (*L. plantarum* ZG03) for ameliorating oxidative stress in zebrafish. **Methods** We evaluated the growth pattern of *L. plantarum* ZG03, observed its morphology using field emission scanning electron microscopy, and assessed its safety and potential efficacy with whole-genome sequencing for genetic analysis. FITC-labeled ZG03 was used to observe its intestinal colonization in zebrafish. In a zebrafish model of 2% glucose-induced oxidative stress, the effect of ZG03 was evaluated by assessing the changes in neutrophils in the caudal hematopoietic tissue (CHT), superoxide dismutase (SOD) activity, reactive oxygen species (ROS) levels, and malondialdehyde (MDA) content. Liquid chromatography-mass spectrometry-based targeted metabolomics was used for analyzing short-chain fatty acids (SCFAs) in the zebrafish, and the antioxidant effects of the key metabolites (acetate, propionate, and caproate) were tested. **Results** On MRS agar, *L. plantarum* ZG03 formed circular, smooth, moist, and milky-white colonies with a rod-shaped cell morphology. Genomic analysis revealed abundant sugar metabolism gene clusters. After inoculation of FITC-labeled *L. plantarum* ZG03 in zebrafish, green fluorescence was clearly observed in the intestinal bulb, mid-intestine, and hind intestine. In zebrafish with glucose-induced oxidative stress, *L. plantarum* ZG03 significantly reduced ROS levels and the number of neutrophils in the CHT with increased SOD activity. *L. plantarum* ZG03 significantly increased the content of SCFAs including acetic acid, propionic acid, and caproic acid in zebrafish metabolites. In addition, sodium acetate, sodium propionate, and sodium caproate in the SCFAs significantly increased SOD activity in the zebrafish models. **Conclusion** *L. plantarum* ZG03 ameliorates oxidative stress in a glucose-induced zebrafish model through its metabolites, particularly the SCFAs including acetic acid, propionic acid and caproic acid.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* ZG03; short-chain fatty acids; glucose; oxidative stress

氧化应激 (OS) 是指机体内活性氧自由基 (ROS) 和

抗氧化系统失衡导致的氧化损伤过程^[1,2], 与糖尿病、心血管疾病及神经退行性疾病等多种慢性疾病的发生发展密切相关^[3-5]。研究发现, 机体持续高血糖可通过激活晚期糖基化终末产物 (AGEs) 积累、蛋白激酶 C (PKC) 活化及促炎基因过度表达等通路, 诱导 ROS 大量生成,

收稿日期: 2025-01-11

基金项目: 广东省自然科学基金 (2023A1515011439)

作者简介: 林淑娴, 主管技师, E-mail: 369207901@qq.com

通信作者: 邱峰, 博士, 主任技师, 博士生导师, E-mail: QFSFL@126.com

加剧氧化应激,是促进糖尿病及其并发症进展的关键机制之一^[6,7]。在中国庞大的高血糖人群背景下,探寻安全有效的抗氧化应激干预策略对延缓代谢性疾病进展具有重要临床意义^[8]。

益生菌作为宿主健康有益的活性微生物,其抗氧化作用已得到广泛关注。乳酸菌通过激活抗氧化酶系统和氧化还原系统,调节肠道菌群平衡及代谢物分泌方式,在缓解氧化应激中发挥显著的抗氧化能力^[9,10]。鼠李糖乳杆菌GG通过提高机体本身的抗氧化功能和免疫防御能力,减轻脂多糖诱导大鼠的肝脏损伤、氧化应激和免疫应激^[11]。发酵乳杆菌CQPC-11通过提高小鼠血清中的T-SOD、GSH-Px、CTA等抗氧化酶水平,降低活性炭冰水诱导的小鼠氧化应激损伤^[12]。植物乳杆菌H8通过上调SIRT1/SIRT3/Nrf2信号通路,促进p53的泛素化和降解,减少ROS的生成,进而改善小鼠的氧化损伤^[13]。Wang等^[14]发现植物乳杆菌DP189通过激活Nrf2/ARE和PGC-1 α 通路,抑制NLRP3炎症小体,提高MPTP诱导帕金森小鼠体内的SOD、GSH-Px和IL-10水平,延缓因 α -SYN在PD小鼠体内积累引起的神经退行性变。上述研究证实,乳酸菌在缓解氧化应激和氧化应激导致的炎症反应中发挥着重要的作用。植物乳杆菌作为乳酸菌的重要成员,其代谢产物短链脂肪酸(SCFAs)被证实参与葡萄糖代谢、脂质稳态及氧化应激应答^[15]。例如,植物乳杆菌MR1通过提高乙酸盐水平促进循环尿苷分泌,改善高碳水化合物饮食诱导的肝脏氧化应激损伤^[16]。然而,益生菌菌株的功能具有高度差异性,筛选高效抗氧化应激的特异性菌株仍需深入研究。

传统哺乳动物模型(如小鼠),存在实验周期长、成本高及通量低等局限,制约了益生菌功效筛选与机制研究效率。斑马鱼因与人类基因同源性高、生理代谢路径保守^[17]、个体透明且繁殖速度快等优势,已成为药物毒理研究和功能评价的模型生物^[18-20]。氧化应激及代谢性疾病研究的理想模式生物^[18]。本研究以分离自健康婴幼儿粪便的植物乳植杆菌ZG03为研究对象,利用2%葡萄糖诱导的斑马鱼氧化应激模型,结合分子生物学与靶向代谢组学技术,系统探究ZG03的抗氧化应激功效,并通过SCFAs回补实验揭示其作用机制,为益生菌在代谢性疾病氧化应激干预中的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

野生型AB系斑马鱼、转基因中性粒细胞绿色荧光斑马鱼Tg(mpx:EGFP)购来自国家斑马鱼资源中心,斑马鱼种鱼进行胚胎繁殖后,胚胎置于斑马鱼养殖水中(5 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.33 mmol/L CaCl₂, 和0.33 mmol/L MgSO₄)。植物乳植杆菌ZG03

(*Lactobacillus plantarum* ZG03)从健康婴幼儿粪便中分离,已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心完成菌种保藏,保藏编号为CGMCC No. 31809。

MRS培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司),异硫氰酸荧光素(FITC Sigma-aldrich),DCFH-DA(SIGMA),总蛋白定量试剂盒(BCA法)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所),葡萄糖、乙酸钠、丙酸钠、己酸钠(上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 植物乳植杆菌ZG03菌株特性测定

取-80℃冻存的植物乳植杆菌ZG03解冻后,接种于MRS肉汤培养基中,放置于37℃恒温培养箱中培养24 h后,4 000×g离心10 min,收集沉淀,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,并重悬于PBS中,调整菌液浓度为1×10⁹ CFU/mL备用。

1.2.1 生长曲线测定 取一定量的菌液接种于MRS固体培养基中,37℃培养24 h,挑取单个菌落接种于MRS液体培养基中继续培养24 h,设置3个平行组,每2 h取样测定A_{600nm}值,绘制生长曲线。

1.2.2 细胞形态测定 收集植物乳植杆菌ZG03菌体,置于2.5%戊二醛中室温固定2 h,转移至4℃保存,然后使用0.1 mol/L磷酸漂洗液漂洗3次,1%钨酸4℃固定2 h,磷酸漂洗液漂洗,乙醇梯度脱水,临界点干燥仪干燥及离子溅射仪镀膜后,置于扫描电镜仪拍照。

1.2.3 菌株全基因组学测序、组装和注释 取一定量植物乳植杆菌ZG03种子液离心并用PBS洗涤菌泥2次,再次离心弃去上清液,将菌体送至苏州金唯智生物科技有限公司进行全基因组测序,基因组测序通过Illumina novaseq 6000和Pacbio sequel II e平台,具体步骤包括提取基因组DNA、基因组打断、末端修复、加测序接头、纯化DNA和上机测序。结果分析包括基因组组装分析、基因组注释、基因功能注释、特殊结果预测等方面,其中基因功能注释使用了非冗余蛋白质(NR)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、基因本体论(GO)、同源蛋白质群(COG)、致病菌毒力因子(VFDB)等数据库。

1.3 植物乳植杆菌ZG03在斑马鱼肠道定植

取500 μ L植物乳植杆菌ZG03菌液(1×10⁹ CFU/mL)离心(10 000×g, 5 min),弃上清液,加入500 μ L FITC溶液(1 mg/mL),混匀,避光孵育1 h后,离心(10 000×g, 5 min),弃上清液,PBS洗涤3次,重悬于PBS中备用。挑选受精后3 d(3 dpf)健康野生型AB系斑马鱼置于6孔板中,10尾/孔。实验设置空白组(E3养殖水)、植物乳植杆菌ZG03菌组(1×10⁴、1×10⁵、1×10⁶ CFU/mL),置于生化培养箱中28.5℃孵育48 h(每24 h更换溶液)后,E3养殖水洗涤3次,置于荧光显微镜下拍照记录植物乳植杆菌ZG03在斑马鱼肠道中的定植情况。

1.4 斑马鱼缓解氧化应激功效实验

1.4.1 样品配制 使用E3养殖水配制质量分数为2%的葡萄糖溶液,置于4℃备用。用二甲基亚砜(DMSO)配制摩尔浓度为10 mmol/L的DCFH-DA溶液,置于-20℃备用,实验时调整DCFH-DA溶液摩尔浓度为5.0 μmol/L。取1.2节的种子液5 mL,离心弃上清E3养殖水重悬,分别配置成浓度为 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 CFU/mL的植物乳植杆菌ZG03菌液用于后续实验。

1.4.2 模型构建与药品干预 将每组50尾受精后3 dpf的野生型斑马鱼(或每组10尾受精后3 dpf的Tg(mpx:EGFP)转基因斑马鱼)置于6孔板中,空白组加入4 mL E3养殖水,其余组加入4 mL 2%葡萄糖溶液,每组均喂食正常饲料,28.5℃孵育24 h,通过荧光显微镜观察斑马鱼体内ROS荧光强度判定氧化应激模型是否构建成功。完成模型构建后,弃去上述溶液,空白组加入4 mL E3养殖水,模型组加入4 mL 2%葡萄糖溶液,ZG03低浓度组加入4 mL菌液(1×10^4 CFU/mL),ZG03中浓度组加入4 mL菌液(1×10^5 CFU/mL),ZG03高浓度组加入4 mL菌液(1×10^6 CFU/mL)。各组于28.5℃孵育48 h,每孔每天投喂5 mg饲料并更换新鲜溶液。

1.4.3 斑马鱼尾部造血组织(HT)处中性粒细胞生成 孵育结束后,将Tg(mpx:EGFP)转基因斑马鱼幼虫在荧光显微镜下观察并拍照,统计斑马鱼尾部造血组织处中性粒细胞的数量。

1.4.4 活性氧自由基(ROS)测定 实验干预结束后,每组随机挑选10尾斑马鱼幼虫置于6孔板中,E3养殖水清洗2次后,弃上清,每孔加入5 mL DCFH-DA溶液,28.5℃避光孵育1 h。孵育结束后,使用E3养殖水冲洗斑马鱼3次(避光),置于荧光显微镜下观察并拍照。采用ImageJ 6.0软件进行图像分析并采集数据,分析统计斑马鱼荧光强度以评价植物乳植杆菌ZG03的抗氧化作用。

1.4.5 SOD、MDA测定 干预结束后,E3养殖水洗涤2次,将斑马鱼幼鱼转移至2 mL EP管中(40尾/管),加入200 μL PBS,匀浆,10 000 r/min离心10 min后取上清液,按照试剂盒说明书分别测定SOD、MDA含量。

1.4.6 靶向代谢组学分析 干预结束后,E3养殖水洗涤2次,将斑马鱼转移至2 mL EP管中(每组30尾/管),依次加入10 μL内标(L-2-氯-苯丙氨酸,0.3 mg/mL,甲醇配置)、400 μL提取液(甲醇:乙腈:水=2:2:1, V/V/V)和两个小钢珠,在-80℃冰箱中静置5 min后,使用研磨机中研磨(60 Hz, 2 min),冰水浴中超声提取10 min,-20℃静置30 min,低温离心15 min(13 000 r/min, 4℃),上清液与沉淀分开保存后,装入带内衬管的LC-MS进样小瓶中,运用LC-MS检测上清液中短链脂肪酸

乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸的含量。

1.5 短链脂肪酸斑马鱼体内SOD活性的影响实验

构建氧化应激斑马鱼模型,设置空白组(E3养殖水)、模型组(2%葡萄糖溶液)、乙酸钠组(2%葡萄糖溶液+100 μmol/L乙酸钠)、丙酸钠组(2%葡萄糖溶液+400 μmol/L丙酸钠)、己酸钠组(2%葡萄糖溶液+1600 μmol/L己酸钠)和混合液组(100 μmol/L乙酸钠+400 μmol/L丙酸钠+1600 μmol/L己酸钠),各组在28.5℃条件下孵育48 h。干预结束后,收集斑马鱼于2 mL EP管中(每组30尾/管),每管加入200 μL PBS溶液,使用组织均质研磨仪器将斑马鱼匀浆破碎(无明显组织碎块),4℃,10 000 r/min离心10 min后取上清液,按照试剂盒说明书测定SOD活性。

1.6 统计学分析

用GraphPad Prism 10软件统计处理数据,结果用均数±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析加Tukey多重比较检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 植物乳植杆菌ZG03的菌株生长特性

在37℃的培养条件下,植物乳植杆菌ZG03的对数生长期为4~12 h,之后进入稳定期(图1A)。ZG03在MRS固体培养基上呈圆形,表面光滑,湿润,中央向上隆起,边缘整齐,颜色为乳白色的单菌落,场发射扫描电镜下菌体呈杆状(图1B、C)。

2.2 植物乳植杆菌ZG03全基因组测序分析

动物双歧杆菌NX-6的全基因组长度为3 613 757 bp,GC碱基占比为46.42%,含有3 231个编码基因,占总基因数目的80.70%(图2A、表1);非编码RNA共123个,包括16个rRNA和70个tRNA。KEGG数据库基因功能通路进行注释和统计,结果表明ZG03基因主要聚集在新陈代谢、遗传信息处理和环境信息处理,其中新陈代谢通路主要包括碳水化合物代谢(463个基因)、氨基酸代谢(195个基因)、核酸代谢(112个基因)、辅助因子与维生素代谢(105个基因)、脂质代谢(89个基因)、糖的生物合成与代谢(39个基因)等(图2B)。COG数据库注释结果同样表明,代谢相关的基因功能主要集中于氨基酸(262个)、碳水化合物(323个)、脂质的转运与代谢(75个)(图2C)。

2.3 植物乳植杆菌ZG03在斑马鱼肠道的定植情况

当ZG03浓度为 1×10^5 、 1×10^6 CFU/mL时,在斑马鱼肠球、中肠和后肠部位均清晰可见FITC标记植物乳植杆菌ZG03的绿色荧光(图3)。

2.4 植物乳植杆菌ZG03对斑马鱼HT处中性粒细胞生成的影响

当ZG03浓度为 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 CFU/mL时,斑

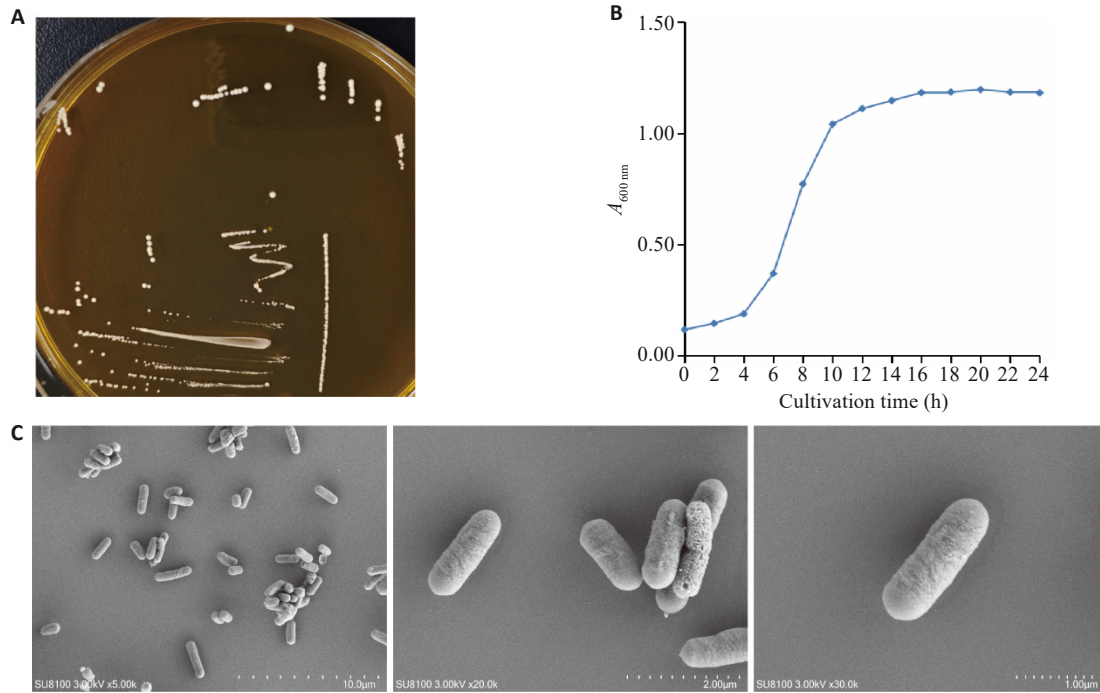


图1 植物乳植杆菌 ZG03 菌株生长特性

Fig.1 Growth characteristics of *L. plantarum* ZG03. **A**: Growth curve of ZG03. **B**: Colony morphology of ZG03. **C**: Field emission scanning electron microscopy (FESEM) images of ZG03.

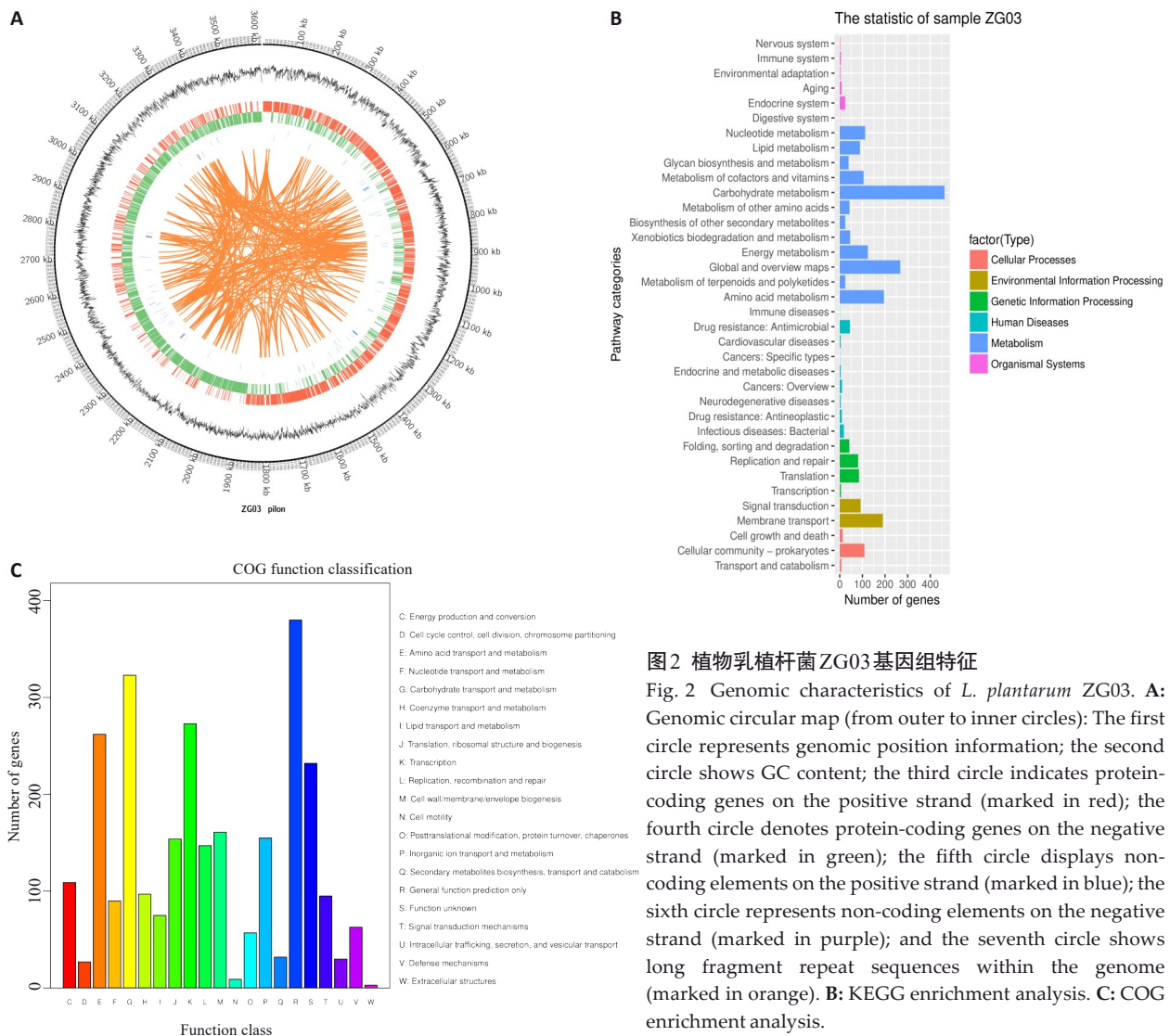


图2 植物乳植杆菌 ZG03 基因组特征

Fig. 2 Genomic characteristics of *L. plantarum* ZG03. **A**: Genomic circular map (from outer to inner circles): The first circle represents genomic position information; the second circle shows GC content; the third circle indicates protein-coding genes on the positive strand (marked in red); the fourth circle denotes protein-coding genes on the negative strand (marked in green); the fifth circle displays non-coding elements on the positive strand (marked in blue); the sixth circle represents non-coding elements on the negative strand (marked in purple); and the seventh circle shows long fragment repeat sequences within the genome (marked in orange). **B**: KEGG enrichment analysis. **C**: COG enrichment analysis.

表1 植物乳植杆菌 ZG03 基因组信息

Tab.1 Genomic information of *L. plantarum* ZG03

Feature	Value
Size (bp)	3 613 757
G+C content (%)	46.42
Coding region (%)	80.70
Total genes	3 354
RNA genes	123
rRNA genes	16
tRNA genes	70
Protein-coding genes	3 231
Protein coding genes with enzymes	1 099
Genes with signal peptides	176
Genes with transmembrane helices	911

斑马鱼 CHT 处中性粒细胞数量分别为 26.50±4.53 个、24.40±2.55 个、22.70±2.31 个,随着 ZG03 浓度的增加,斑马鱼体内中性粒细胞数量减少,与模型组 33.30±3.80 相

比数量显著降低($P<0.001$,图 4A、B)。

2.5 植物乳植杆菌 ZG03 对斑马鱼体内 ROS 水平、SOD 活性、MDA 含量的影响

当 ZG03 浓度为 1×10^5 、 1×10^6 CFU/mL 时,斑马鱼体内的荧光强度降低,测得斑马鱼体内的 ROS 水平分别为 $(105.10\pm 12.95)\%$ 、 $(103.74\pm 17.67)\%$,与模型组 $(132.93\pm 18.66)\%$ 相比显著降低($P<0.05$),且随着植物乳杆菌浓度的升高,ROS 水平呈现降低的趋势(图 5A、B)。当 ZG03 浓度为 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 CFU/mL 时,斑马鱼体内超氧化物歧化酶(SOD)活性分别为 27.80 ± 0.31 、 30.44 ± 1.04 、 $(33.39\pm 1.62$ U/mg),显著高于模型组 $[23.70\pm 0.33$ U/mg], $P<0.01$],且随着 ZG03 的浓度增加,SOD 活性升高(图 5C)。脂质氧化代谢物 MDA 含量分别为 0.19 ± 0.06 、 0.11 ± 0.01 、 $(0.89\pm 0.02$ $\mu\text{mol/g}$),与模型组 $(0.16\pm 0.05$ $\mu\text{mol/g}$) 相比差异无统计学意义(图 5D)。

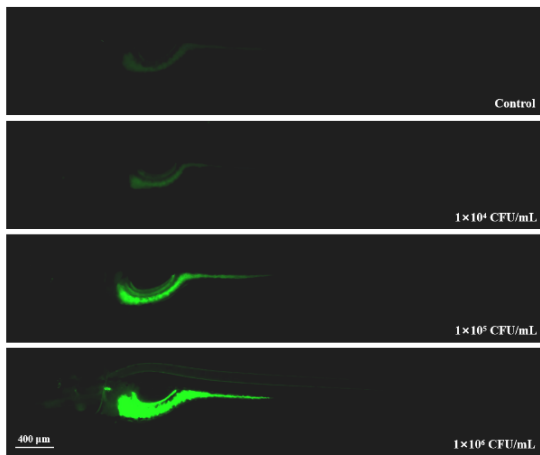


图3 植物乳植杆菌 ZG03 在斑马鱼肠道定植情况

Fig.3 Colonization by *L. plantarum* ZG03 in the intestinal tract of zebrafish. $***P<0.001$ vs control group.

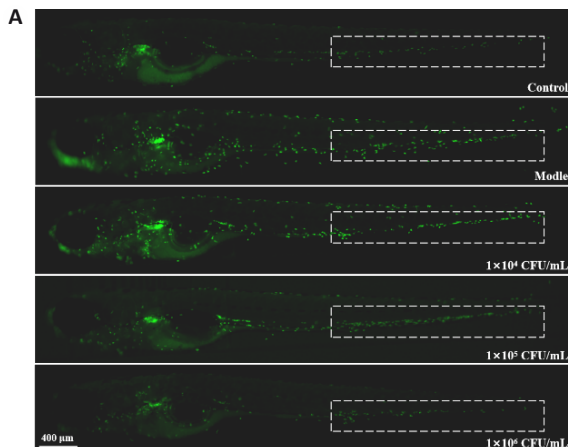
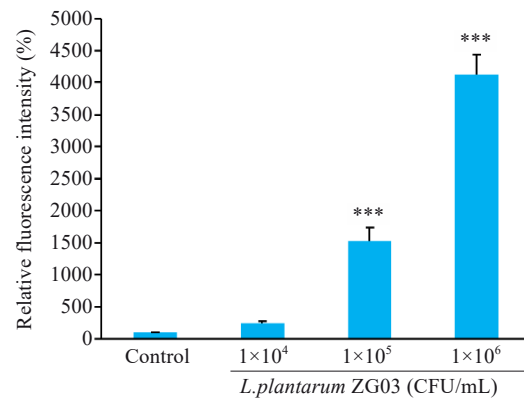
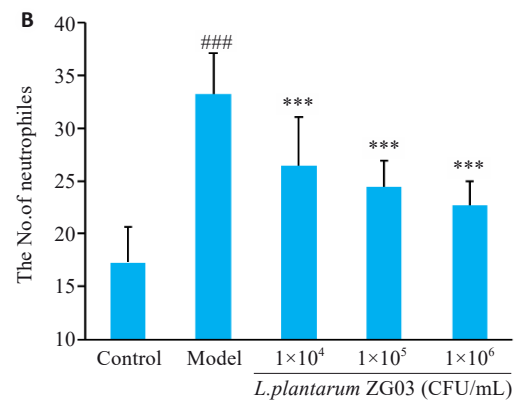


图4 斑马鱼尾部造血组织中中性粒细胞的生成情况

Fig.4 Number of neutrophils in the caudal hematopoietic tissue of zebrafish ($n=10$). A: Representative images of neutrophils (dashed box) in zebrafish. B: Quantitative analysis of neutrophil numbers in zebrafish. $***P<0.001$ vs control group; $***P<0.001$ vs model group.



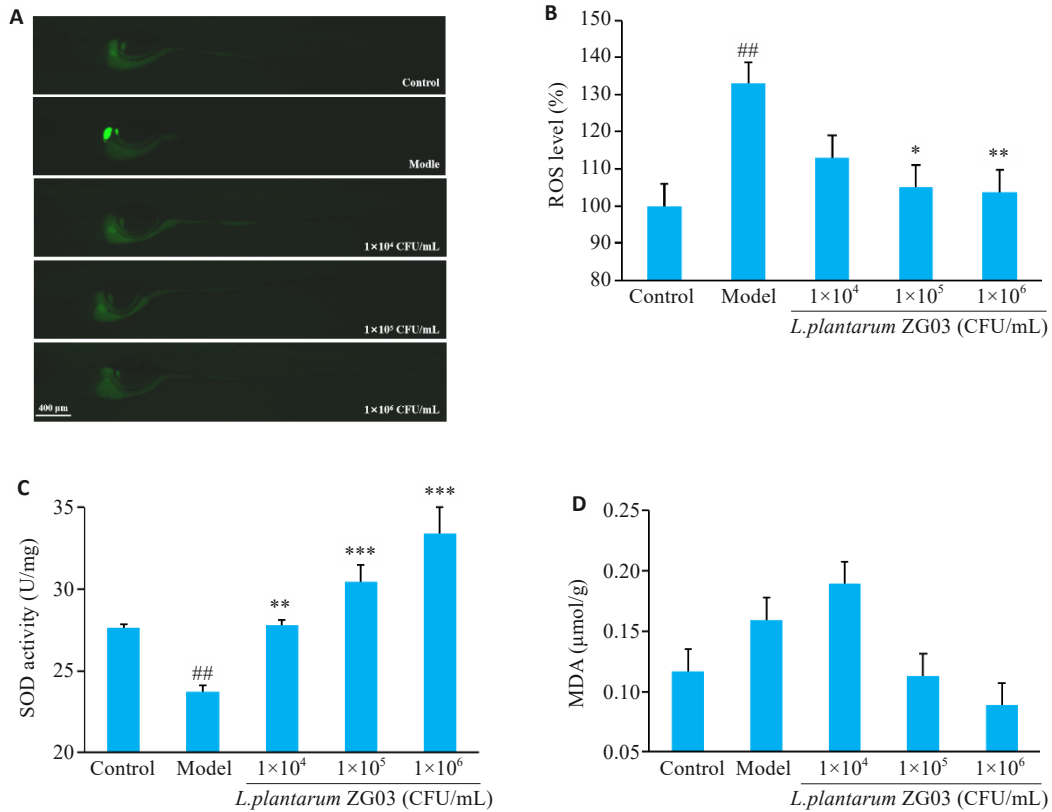


图5 植物乳植杆菌ZG03缓解葡萄糖诱导斑马鱼体内的氧化应激

Fig.5 Effect of *L. plantarum* ZG03 on glucose-induced oxidative stress in zebrafish. A: Representative images of ROS staining in zebrafish. B: Statistical analysis of relative ROS levels ($n=6$). C: SOD activity in zebrafish ($n=3$). D: MDA levels in zebrafish ($n=3$). ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ vs model group.

2.6 植物乳植杆菌ZG03对斑马鱼体内短链脂肪酸含量的影响

靶向测定ZG03干预后氧化应激模型斑马鱼体内的短链脂肪酸含量(图6),当植物乳植杆菌ZG03浓度为 1×10^6 CFU/mL时,斑马鱼体内的短链脂肪酸乙酸含

量为 (4323.70 ± 63.15) ng/mL、丙酸含量为 (143.94 ± 3.43) ng/mL、己酸含量为 (8.52 ± 0.07) ng/mL,与模型组((3989.13 ± 77.25) 、 (135.10 ± 3.85) 、 (7.88 ± 0.30) ng/mL)相比,均显著增加($P<0.05$)。

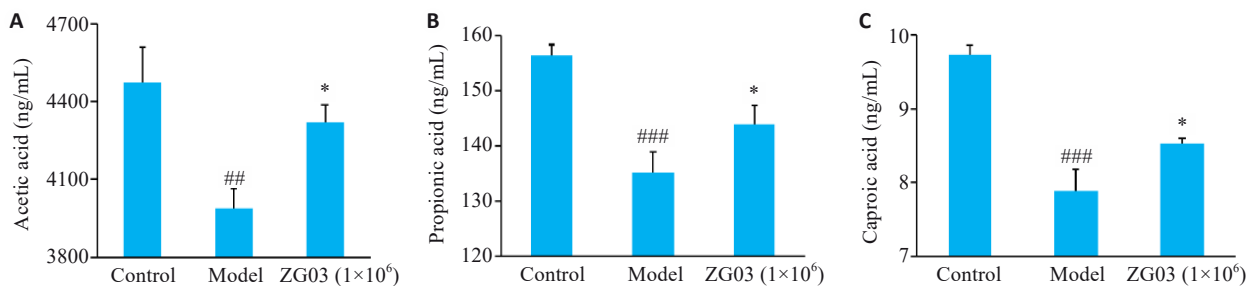


图6 斑马鱼体内代谢物短链脂肪酸含量

Fig.6 Content of short-chain fatty acid metabolites in zebrafish ($n=3$). A: Acetic acid content in zebrafish. B: Propionic acid content in zebrafish. C: Hexanoic acid content in zebrafish. ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group.

2.7 短链脂肪酸对斑马鱼体内SOD活性的影响

当乙酸钠浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 、丙酸钠浓度为 $400 \mu\text{mol/L}$ 、己酸钠浓度为 $1600 \mu\text{mol/L}$ 和3种盐混合时,斑马鱼体内的SOD活性分别为 (36.64 ± 0.62) 、 (34.21 ± 0.72) 、 (35.60 ± 0.98) 、 (39.58 ± 0.99) U/mg,均显著高于模型组($P<0.001$,图7)。

3 讨论

斑马鱼作为氧化应激研究模型已有大量文献报道^[21-23],本研究采用2%葡萄糖溶液浸泡斑马鱼幼鱼构建氧化应激模型,该模型能成功诱导斑马鱼体内ROS水平及中性粒细胞数量升高,为探究植物乳植杆菌ZG03的功能提供了可靠的实验基础。为了更好地探究

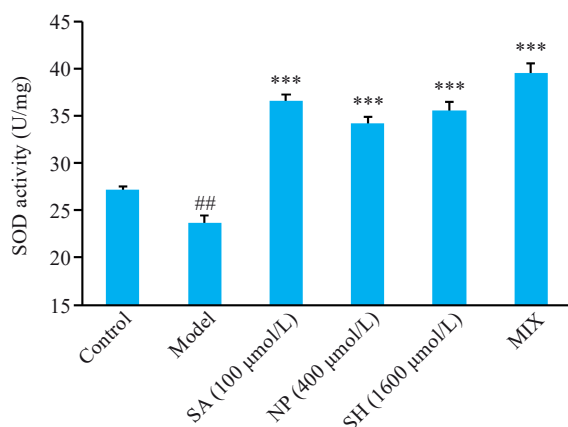


图7 斑马鱼体内SOD活性统计图

Fig. 7 Statistical chart of superoxide dismutase (SOD) activity in zebrafish ($n=3$). ## $P<0.001$ vs control group, *** $P<0.001$ vs model group.

ZG03的功能,我们对其全基因组展开分析,结果发现该菌株具有丰富的糖合成与代谢基因簇和新陈代谢通路基因簇。这一基因组特征提示,ZG03可能具备较强的代谢调节能力,有望通过调控机体的糖代谢及相关生理过程,在缓解氧化应激中发挥作用。

实验发现,植物乳植杆菌 ZG03 可定植在斑马鱼肠道内,且当其浓度为 1×10^6 CFU/mL 时,降低了葡萄糖诱导的氧化应激模型斑马鱼体内的中性粒细胞数量、同时使 ROS 水平下降 20.9%,SOD 活性升高 40.9%,充分展现其缓解氧化应激的能力。进一步研究表明,ZG03 降低斑马鱼体内的中性粒细胞数量,提示该菌株可能通过减轻中性粒细胞聚集从而缓解葡萄糖诱导的斑马鱼体内炎症反应,而炎症反应与氧化应激紧密相关^[24],ZG03 对炎症的缓解可能协同促进了氧化应激的改善。尽管脂质过氧化标志产物 MDA 含量有所降低,但未达到统计学意义,这可能与实验条件、检测灵敏度或其他未明确的调节机制有关。不过,综合来看,ZG03 的这些作用表现与 KEGG、COG 数据库分析预测结果相吻合,表明其缓解氧化应激的能力与其基因组所蕴含的功能特征相符。

多项研究证明,肠道微生物发酵膳食纤维和抗性淀粉产生的代谢产物短链脂肪酸,可以通过影响抗菌蛋白、血清素、黏蛋白等物质的含量,参与机体碳水化合物代谢和脂质利用,进而缓解糖尿病和肥胖症状,限制炎症发展并抑制肿瘤细胞生长^[25-29]。WANG 等^[30]探讨了植物乳杆菌、乳球菌、副干酪乳杆菌等 14 种益生菌可能的抗糖尿病机制,这些益生菌还通过提高 SCFAs(丙酸和丁酸)的水平以及 claudin-1 和 mucin-2 的表达来改善肠道菌群的功能并降低大肠杆菌和脂多糖水平。TONUCCI 等研究发现食用含嗜酸乳杆菌 La-5 和动物双歧杆菌 BB-12 的发酵牛奶后,增加了机体乙酸的含

量,降低了糖化血红蛋白含量,改善了受试者的血糖控制^[31],提示益生菌发酵产物可能通过调节 SCFAs 水平影响糖代谢。为探索 SCFAs 是否为植物乳植杆菌 ZG03 缓解葡萄糖诱导斑马鱼氧化应激的关键物质,我们对 ZG03 干预斑马鱼后的代谢产物进行检测,发现相比于模型组,斑马鱼体内的乙酸、丙酸、己酸水平升高,由此推测乙酸、丙酸和己酸可能是缓解斑马鱼炎症和氧化应激的关键代谢物质。为了验证此假说,我们继续利用斑马鱼氧化应激模型,通过回补乙酸钠、丙酸钠、己酸钠和短链脂肪酸盐混合物,发现斑马鱼体内的 SOD 活性显著上升,为短链脂肪酸在抗氧化应激中的直接作用提供了实验依据。

本研究首先发现植物乳植杆菌 ZG03 具有丰富的糖代谢基因簇,借助斑马鱼模型发现其可降低斑马鱼体内中性粒细胞数聚集、ROS 水平和升高 SOD 活性,表现出了缓解炎症和氧化应激的能力,且乙酸、丙酸和己酸水平增加;回补短链脂肪酸盐后斑马鱼体内的 SOD 活性升高。这一结果说明 ZG03 可通过提高乙酸、丙酸和己酸的含量缓解氧化应激,但本研究未能明确其降低斑马鱼体内血糖水平、未确定乙酸、丙酸和己酸降低 ROS 水平的具体作用靶点和分子机制,在蛋白组和转录层面存在着不足,需要进一步研究。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine [J]. Redox Biol, 2015, 4: 180-3.
- [2] Sies H. Oxidative stress: concept and some practical aspects [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(9): 852.
- [3] Shaito A, Aramouni K, Assaf R, et al. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction in cardiovascular diseases [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2022, 27(3): 105.
- [4] Mani S, Dubey R, Lai IC, et al. Oxidative stress and natural antioxidants: back and forth in the neurological mechanisms of Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2023, 96(3): 877-912.
- [5] Houldsworth A. Role of oxidative stress in neurodegenerative disorders: a review of reactive oxygen species and prevention by antioxidants [J]. Brain Commun, 2024, 6(1): fcad356.
- [6] Ryan A, Murphy M, Godson C, et al. Diabetes mellitus and apoptosis: inflammatory cells [J]. Apoptosis, 2009, 14(12): 1435-50.
- [7] Zhang PJ, Li T, Wu XY, et al. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies [J]. Front Med, 2020, 14(5): 583-600.
- [8] Tabák AG, Herder C, Rathmann W, et al. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development [J]. Lancet, 2012, 379(9833): 2279-90.
- [9] Liu YY, Tran DQ, Rhoads JM. Probiotics in disease prevention and treatment [J]. J Clin Pharmacol, 2018, 58(Suppl 10): S164-79.
- [10] Feng T, Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review [J]. Gut

- Microbes, 2020, 12(1): 1801944.
- [11] 尹龙杰, 张雨, 陈舒焕, 等. 鼠李糖乳杆菌GG对大鼠脂多糖应激下抗氧化能力、免疫功能和肠道健康的影响[J]. 饲料工业, 2024, 45(9): 93-100.
- [12] 周先容, 谭仟, 母健菲, 等. 泡菜源乳酸菌的分离筛选及其对小鼠氧化应激水平的改善作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(9): 17-25.
- [13] 李月, 闫薇, 姜斌, 等. 植物乳植杆菌H8对小鼠氧化损伤的作用机制[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(5): 93-103.
- [14] Wang L, Zhao ZJ, Zhao L, et al. *Lactobacillus plantarum* DP189 reduces α -SYN aggravation in MPTP-induced Parkinson's disease mice via regulating oxidative damage, inflammation, and gut microbiota disorder[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(4): 1163-73.
- [15] He J, Zhang PW, Shen LY, et al. Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6356.
- [16] Xu R, Wang T, Ding FF, et al. *Lactobacillus plantarum* ameliorates high-carbohydrate diet-induced hepatic lipid accumulation and oxidative stress by upregulating uridine synthesis[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(7): 1238.
- [17] Li ZH, Shi YQ, Zhang XH, et al. Screening immunoactive compounds of *Ganoderma lucidum* spores by mass spectrometry molecular networking combined with *in vivo* zebrafish assays[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 287.
- [18] Zhao WC, Chen YN, Hu N, et al. The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an *in vivo* model for toxicological studies: a review based on bibliometrics[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 272: 116023.
- [19] Hu CW, Sun L, Chen JQ, et al. Advantages of the zebrafish tumor xenograft model: the evaluation of efficacy in cancer therapy and the application to the study of lncRNAs[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1483192.
- [20] Zhang Y, Xia Q, Wang JB, et al. Progress in using zebrafish as a toxicological model for traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 282: 114638.
- [21] Chowdhury S, Saikia SK. Use of zebrafish as a model organism to study oxidative stress: a review[J]. Zebrafish, 2022, 19(5): 165-76.
- [22] Subba R, Fasciolo G, Geremia E, et al. Simultaneous induction of systemic hyperglycaemia and stress impairs brain redox homeostasis in the adult zebrafish[J]. Arch Biochem Biophys, 2024, 759: 110101.
- [23] Li YQ, Chen QQ, Liu YN, et al. High glucose-induced ROS-accumulation in embryo-larval stages of zebrafish leads to mitochondria-mediated apoptosis[J]. Apoptosis, 2022, 27(7/8): 509-20.
- [24] Weinberg Sibony R, Segev O, Dor S, et al. Overview of oxidative stress and inflammation in diabetes[J]. J Diabetes, 2024, 16(10): e70014.
- [25] He BL, Hu TG, Wu H. Phenotypic screening of novel probiotics with potential anti-neuroinflammation activity based on cell and zebrafish models[J]. Food Biosci, 2023, 55: 102949.
- [26] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. Gut Microbes, 2016, 7(3): 189-200.
- [27] Jeong JJ, Ganesan R, Jin YJ, et al. Multi-strain probiotics alleviate loperamide-induced constipation by adjusting the microbiome, serotonin, and short-chain fatty acids in rats[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1174968.
- [28] Cuciniello R, Di Meo F, Filosa S, et al. The antioxidant effect of dietary bioactives arises from the interplay between the physiology of the host and the gut microbiota: involvement of short-chain fatty acids[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(5): 1073.
- [29] Mann ER, Lam YK, Uhlig HH. Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2024, 24(8): 577-95.
- [30] Wang YM, Dilidaxi D, Wu YC, et al. Composite probiotics alleviate type 2 diabetes by regulating intestinal microbiota and inducing GLP-1 secretion in db/db mice[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109914.
- [31] Tonucci LB, Olbrich Dos Santos KM, Licursi de Oliveira L, et al. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Clin Nutr, 2017, 36(1): 85-92.

(编辑:余诗诗)