

# 枯草芽孢杆菌对 Caco-2 细胞抗氧化功能的影响研究

崔志文 黄 琴 黄 怡 吴红照 文 静 李卫芬\*

(浙江大学动物科学学院,教育部动物分子营养学重点实验室,杭州 310029)

**摘 要:** 本试验旨在研究枯草芽孢杆菌对氧化应激状态下 Caco-2 细胞抗氧化功能的影响。将 Caco-2 细胞分为 4 组,对照 I (空白对照组,0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 和对照 II (氧化应激组,100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ),处理 I 和处理 II 分别在对照 II 条件下添加枯草芽孢杆菌 B1 和 B10 (终浓度为  $0.3 \times 10^8$  CFU/mL),分别于 12、48 h 测定氧化应激状态下 Caco-2 细胞上清液和裂解液的抗氧化活性。结果表明:与空白对照组和氧化应激组相比,添加 2 株枯草芽孢杆菌均极显著提高了 Caco-2 细胞培养上清液 12、48 h 时的总抗氧化能力 ( $P < 0.01$ )。其中,菌株 B1 可显著提高上清液中抗超氧阴离子 ( $\text{O}_2^-$ ) ( $P < 0.01$ )、超氧化物歧化酶 (SOD) ( $P < 0.01$ ) 和过氧化氢酶 (CAT) ( $P < 0.01$ ) 以及 48 h 的过氧化物酶 (POD) 活性 ( $P < 0.01$ ),而菌株 B10 除提高了 Caco-2 细胞上清液中抗  $\text{O}_2^-$ 、SOD 和 CAT 活性 ( $P < 0.01$ ) 外,还提高了细胞抑制羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 能力 ( $P < 0.01$ ) 和 POD 活性 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );添加枯草芽孢杆菌组细胞上清液中 12 h 时的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和丙二醛 (MDA) 含量与氧化应激组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ),48 h 时则均极显著降低 ( $P < 0.01$ )。细胞培养 12 h 时,氧化应激组细胞裂解液中 SOD 活性和 GSH 含量比空白对照组低 ( $P < 0.05$ ) 而 POD 活性高 ( $P < 0.01$ ),48 h 时结果与之相反,此时添加枯草芽孢杆菌组均极显著提高了细胞裂解液中 POD 的活性 ( $P < 0.01$ )。结果提示,2 株枯草芽孢杆菌均提高了氧化应激状态下细胞的抗氧化功能。

**关键词:** Caco-2 细胞;枯草芽孢杆菌;抗氧化活性;氧化应激;作用机制

**中图分类号:** S816.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2011)02-0293-06

自从 Harman 提出自由基理论以来,人们认识到体内氧化产生的自由基与其衰老、癌症等许多疾病有关,尽管机体有抗氧化防御系统,但是这些系统并不能完全有效地抵御或修复氧化作用带来的损伤。已有研究表明,益生菌在促进机体肠道健康和防止疾病中发挥着重要的作用,挖掘潜力巨大;它们的诸多产物,如维生素 C、维生素 E、胡萝卜素、多糖、谷胱甘肽、超氧化物歧化酶 (SOD)、原型辅酶 I (NADH) 及一些未知物质等,都具有很高的抗氧化活性<sup>[1-2]</sup>。芽孢杆菌在不利环境条件下能够以孢子形式存在,在胃酸环境中仍能保持较高的活性,在改善畜禽生产性能、维持肠道菌群平衡、提高消化率等方面均有较好的效果<sup>[3-4]</sup>。

但是国内外关于芽孢杆菌用于体外细胞抗氧化功能方面的研究较少。本试验选取 2 株本实验室前期筛选出的具有较好体外抗氧化特性的枯草芽孢杆菌,分别研究了它们对氧化应激状态下体外培养的人结肠癌细胞系 Caco-2 细胞抗氧化功能的影响,旨在阐明其可能的作用机制,为畜牧生产应用提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株 B1、B10: 由浙江大学饲料科学研究所微生物与基因工程实验室提供和保存。Caco-2 细胞: 购自中国科学院上海

收稿日期: 2010-08-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2009CB118705), 浙江省重大科技专项 (2006C12086)

作者简介: 崔志文 (1981—), 男, 山西屯留人, 博士, 主要从事微生物与基因工程研究。E-mail: czw3502002@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 李卫芬, 研究员, 博士生导师, E-mail: wfli@zju.edu.cn

生命科学研究院细胞资源中心。

## 1.2 主要仪器和试剂

HERA cell 150 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱:上海天呈科技有限公司;THZ-C 恒温振荡器:江苏省太仓市实验仪器厂;5804 R 高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司。

DMEM 高糖培养液、D-Hanks 液、0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA):吉诺生物医药技术有限公司;胎牛血清:杭州四季青生物工程材料有限公司;LB-Luria-Bertani)培养基:英国 OXOID 公司;Triton X-100:上海泽衡生物技术有限公司;其他均为国产分析纯。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 Caco-2 细胞培养

Caco-2 细胞于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,DMEM 高糖培养液中含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素。

### 1.3.2 菌液准备

枯草芽孢杆菌经 LB 平板培养基纯化后接种于 LB 试管液体培养基,37 ℃、180 r/min 恒温振荡器中培养 17 h 后,按 1% 的接种量将活化的菌种转接入锥形瓶的 100 mL LB 液体培养基中,180 r/min 恒温振荡器中培养 17 h。培养液 5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体沉淀,用 0.86% 的生理盐水迅速洗涤 2 次,再用生理盐水(0.86%)重悬菌沉淀,调整菌悬液浓度约为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL。

### 1.3.3 试验分组

将 Caco-2 细胞接种于 6 孔板,每孔保持 2 mL 无抗生素培养液。培养至细胞贴壁后开始进行试验。试验分为 4 组,每组 3 个重复。对照 I(空白对照组,0 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 和对照 II(氧化应激组,100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),处理 I 和处理 II 分别在对照 II 条件下添加 B1 和 B10(终浓度约为  $0.3 \times 10^8$  CFU/mL) 1 mL,各组每个重复体积为 3.04 mL(不足的以双蒸水补足),分别培养至 12 和 48 h。

### 1.3.4 样品收集

细胞培养至 12 和 48 h 时,吸取培养上清装入离心管,-80 ℃冻存。每孔用 0.86% 的生理盐水迅速洗涤 3 次,然后每孔加 1 mL 1% 的 Triton X-100 用吸管充分吹匀,2 000 r/min 离心 15 min,收集上清即为细胞裂解液,-80 ℃冻存。

## 1.4 指标测定

培养上清液测定指标:抗超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)活性、抑制羟自由基(·OH)能力、总抗氧化能力(T-

AOC)和 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、乳酸脱氢酶(LDH)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)含量。

细胞裂解液测定指标:SOD、POD 活性和 GSH 含量。

以上指标均按照试剂盒说明书进行检测,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

## 1.5 数据处理

数据分析使用 SPSS 16.0 统计软件处理,采用单因素方差分析。试验数据以“平均值±标准差”表示。

## 2 结 果

### 2.1 枯草芽孢杆菌对 Caco-2 细胞培养上清液抗氧化活性的影响

从表 1 可以看出,与空白对照组(对照 I)相比,氧化应激组(对照 II)细胞培养 12 h 时的总抗氧化能力有所降低,但差异不显著( $P > 0.05$ ),其抑制·OH 能力和 POD 活性分别极显著降低了 9.11% ( $P < 0.01$ ) 和 49.75% ( $P < 0.01$ )。与氧化应激组相比,添加 2 株枯草芽孢杆菌组均使细胞总抗氧化能力极显著升高( $P < 0.01$ ),而且还提高了其上清液的抗 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、SOD 和 CAT 活性( $P < 0.01$ ),此外,枯草芽孢杆菌 B10(处理 II)还能提高抑制·OH 能力( $P < 0.01$ )、LDH 活性( $P < 0.05$ )和 POD 活性( $P < 0.05$ )。处理 I 和处理 II MDA 含量较氧化应激组均有所降低但差异不显著( $P > 0.05$ )。

细胞培养 48 h 时,与空白对照组相比,氧化应激组细胞培养上清中 MDA 含量和 LDH 活性分别极显著升高了 127.07% 和 352.66% ( $P < 0.01$ ),而且细胞抗 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 活性、抑制·OH 能力和 GSH-Px 活性极显著降低( $P < 0.01$ ),说明此时细胞受到了较为严重的氧化损伤。与氧化应激组相比,添加枯草芽孢杆菌均使细胞总抗氧化能力极显著升高( $P < 0.01$ ),LDH 活性和 MDA 含量极显著降低( $P < 0.01$ ),说明该 2 株枯草芽孢杆菌均具有较明显的增强机体抗氧化的功能。B1 主要通过提高抗 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 活性( $P < 0.01$ )、抑制·OH 能力( $P < 0.01$ )及 SOD ( $P < 0.01$ )、CAT ( $P < 0.01$ ) 和 POD 活性( $P < 0.01$ )来提高总抗氧化能力,而 B10 除了能提高上述抗氧化能力和抗氧化酶外,还能通过提高 GSH-Px 活性( $P < 0.01$ )和 GSH 含量( $P < 0.01$ )来提高细胞总抗氧化能力。

表 1 12 和 48 h 细胞培养上清液中的抗氧化活性  
Table 1 Antioxidative activities of cell supernatant after 12 and 48 h

项目 Items		对照 I Control I	对照 II Control II	处理 I Treatment I	处理 II Treatment II
12 h 细胞 培养上清 液中的 抗氧化活性 Antioxidative activities of cell supernatant after 12 h	总抗氧化能力 T-AOC/( U/mL)	3. 17 ± 0. 63 <sup>Bb</sup>	2. 92 ± 0. 76 <sup>Bb</sup>	45. 00 ± 9. 01 <sup>Aa</sup>	45. 17 ± 6. 52 <sup>Aa</sup>
	抗超氧阴离子活性 Anti-superoxide anion activity/( U/L)	51. 67 ± 9. 21 <sup>Bb</sup>	61. 17 ± 0. 81 <sup>Bb</sup>	142. 21 ± 12. 86 <sup>Aa</sup>	159. 88 ± 26. 82 <sup>Aa</sup>
	抑制羟自由基能力 Inhibit hydroxy radical capacity/( U/mL)	4 519. 43 ± 166. 53 <sup>B</sup>	4 107. 61 ± 123. 39 <sup>C</sup>	3 080. 92 ± 179. 74 <sup>D</sup>	5 856. 22 ± 141. 56 <sup>A</sup>
	超氧化物歧化酶活性 SOD activity/( U/mL)	121. 16 ± 6. 97 <sup>Cc</sup>	114. 66 ± 1. 50 <sup>Cc</sup>	1 145. 52 ± 11. 08 <sup>Aa</sup>	964. 31 ± 27. 04 <sup>Bb</sup>
	谷胱甘肽过氧化物酶活性 GSH-Px activity/( U/mL)	62. 84 ± 6. 20 <sup>Bb</sup>	121. 57 ± 16. 78 <sup>Aa</sup>	75. 90 ± 6. 71 <sup>Bb</sup>	35. 51 ± 2. 28 <sup>Cc</sup>
	还原型谷胱甘肽含量 GSH content/( mg/L)	10. 72 ± 0. 79 <sup>Aa</sup>	9. 78 ± 0. 96 <sup>ABa</sup>	8. 30 ± 0. 48 <sup>BCb</sup>	7. 57 ± 0. 96 <sup>Cb</sup>
	过氧化氢酶活性 CAT activity/( U/mL)	11. 86 ± 0. 71 <sup>Cc</sup>	10. 24 ± 0. 52 <sup>Cc</sup>	17. 80 ± 1. 01 <sup>Bb</sup>	73. 61 ± 7. 70 <sup>Aa</sup>
	过氧化物酶活性 POD activity/( U/mL)	86. 44 ± 6. 68 <sup>Aa</sup>	43. 44 ± 3. 34 <sup>Bc</sup>	31. 22 ± 5. 06 <sup>Cd</sup>	52. 22 ± 1. 92 <sup>Bb</sup>
	乳酸脱氢酶活性 LDH activity/( U/L)	332. 60 ± 10. 20 <sup>ABb</sup>	329. 91 ± 6. 82 <sup>ABb</sup>	271. 48 ± 28. 32 <sup>Bb</sup>	410. 47 ± 17. 74 <sup>Aa</sup>
	丙二醛含量 MDA content/( nmol/mL)	1. 15 ± 0. 22 <sup>a</sup>	1. 10 ± 0. 08 <sup>ab</sup>	0. 93 ± 0. 15 <sup>ab</sup>	0. 89 ± 0. 14 <sup>b</sup>
	总抗氧化能力 T-AOC/( U/mL)	11. 00 ± 1. 00 <sup>Cc</sup>	7. 17 ± 1. 04 <sup>Cc</sup>	96. 00 ± 2. 00 <sup>Bb</sup>	122. 00 ± 5. 29 <sup>Aa</sup>
	抗超氧阴离子活性 Anti-superoxide anion activity/( U/L)	68. 98 ± 6. 10 <sup>Bb</sup>	20. 68 ± 1. 41 <sup>Cc</sup>	310. 76 ± 24. 06 <sup>Aa</sup>	85. 68 ± 7. 13 <sup>Bb</sup>
	抑制羟自由基能力 Inhibit hydroxy radical capacity/( U/mL)	1 114. 61 ± 299. 95 <sup>Cc</sup>	443. 82 ± 29. 31 <sup>Cd</sup>	6 834. 7 ± 900. 22 <sup>Aa</sup>	2 939. 44 ± 125. 00 <sup>Bb</sup>
	超氧化物歧化酶活性 SOD activity/( U/mL)	132. 12 ± 6. 58 <sup>Cc</sup>	119. 55 ± 5. 50 <sup>Cc</sup>	1 405. 73 ± 53. 16 <sup>Aa</sup>	848. 52 ± 18. 04 <sup>Bb</sup>
	谷胱甘肽过氧化物酶活性 GSH-Px activity/( U/mL)	140. 12 ± 12. 32 <sup>Aa</sup>	66. 64 ± 7. 91 <sup>Bb</sup>	57. 56 ± 5. 67 <sup>Bb</sup>	151. 69 ± 4. 52 <sup>Aa</sup>
48 h 细胞 培养上清中的 抗氧化活性 Antioxidative activities of cell supernatant after 48 h	还原型谷胱甘肽含量 GSH content/( mg/L)	13. 35 ± 0. 96 <sup>ABab</sup>	12. 93 ± 0. 66 <sup>Bb</sup>	12. 20 ± 0. 32 <sup>Bb</sup>	14. 40 ± 0. 83 <sup>Aa</sup>
	过氧化氢酶活性 CAT activity/( U/mL)	15. 52 ± 1. 83 <sup>Cc</sup>	9. 79 ± 2. 49 <sup>Cc</sup>	106. 57 ± 8. 57 <sup>Bb</sup>	130. 79 ± 12. 58 <sup>Aa</sup>
	过氧化物酶活性 POD activity/( U/mL)	36. 67 ± 3. 33 <sup>Bb</sup>	43. 33 ± 3. 33 <sup>Bb</sup>	104. 78 ± 1. 71 <sup>Aa</sup>	103. 33 ± 3. 33 <sup>Aa</sup>
	乳酸脱氢酶活性 LDH activity/( U/L)	190. 45 ± 14. 91 <sup>Cd</sup>	862. 09 ± 58. 24 <sup>Aa</sup>	282. 04 ± 32. 02 <sup>Bb</sup>	109. 60 ± 1. 09 <sup>Bc</sup>
	丙二醛含量 MDA content/( nmol/mL)	1. 33 ± 0. 29 <sup>Bbc</sup>	3. 02 ± 0. 11 <sup>Aa</sup>	1. 60 ± 0. 29 <sup>Bb</sup>	1. 15 ± 0. 08 <sup>Bc</sup>

同行数据肩标不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0. 01$ ), 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0. 05$ ), 含相同字母表示差异不显著 ( $P > 0. 05$ )。下表同。

In the same row, values with different capital letter superscripts mean significant difference ( $P < 0. 01$ ), and with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0. 05$ ), while with the same letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0. 05$ ). The same as below.

2.2 枯草芽孢杆菌对 Caco-2 细胞裂解液抗氧化活性的影响

从表 2 可以看出,细胞培养 12 h 时,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要通过降低 Caco-2 细胞内 SOD 活性( $P < 0.05$ )和 GSH 含量( $P < 0.01$ )而引起细胞氧化损伤;与氧化应激组相比,添加枯草芽孢杆菌 B1 后,细胞内 POD 活性显著提高( $P < 0.05$ ),而 SOD 活性极显著降低( $P < 0.01$ ),添加 B10 后则 POD 活性极显著降低( $P < 0.01$ ),而 SOD 活性略有增高但差异不显著( $P > 0.05$ ),且两者的 GSH 含量差异也不显著( $P >$

0.05),这可能因 2 株枯草芽孢杆菌诱导 Caco-2 胞内抗氧化酶的表达调控机制不同而引起。

细胞培养 48 h 时,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要通过极显著降低细胞内 POD 活性( $P < 0.01$ )引起氧化应激;添加枯草芽孢杆菌 B1、B10 均能极显著提高细胞内 POD 的活性( $P < 0.01$ ),但 GSH 含量和 SOD 活性比氧化应激组均极显著降低或有降低的趋势( $P < 0.01$ 或 $P > 0.05$ )。说明此时细胞内发挥抗氧化作用的物质主要是 POD。

表 2 12 和 48 h 细胞裂解液中的抗氧化活性  
Table 2 Antioxidative activities of cell lysate after 12 and 48 h

项目 Items		对照 I Control I	对照 II Control II	处理 I Treatment I	处理 II Treatment II
12 h 细胞裂解液 中的抗氧化活性 Antioxidative activities of cell lysate after 12 h	总超氧化物歧化酶活性 SOD activity/(U/mL)	284.73 ±30.90 <sup>Aa</sup>	225.07 ±13.20 <sup>Ab</sup>	89.45 ±4.04 <sup>Bc</sup>	249.75 ±16.78 <sup>Aab</sup>
	过氧化物酶活性 POD activity/(U/mL)	11.33 ±0.89 <sup>Bc</sup>	20.39 ±3.09 <sup>Ab</sup>	25.00 ±2.03 <sup>Aa</sup>	5.73 ±0.35 <sup>Cd</sup>
	还原型谷胱甘肽含量 GSH content/(mg/L)	7.80 ±0.65 <sup>Aa</sup>	4.02 ±0.09 <sup>Bb</sup>	3.64 ±0.58 <sup>Bb</sup>	3.66 ±0.40 <sup>Bb</sup>
	总超氧化物歧化酶活性 SOD activity/(U/mL)	666.85 ±35.33 <sup>Cc</sup>	1 418.37 ±185.72 <sup>Aa</sup>	1 070.76 ±172.61 <sup>Bb</sup>	580.05 ±47.67 <sup>Cc</sup>
	过氧化物酶活性 POD activity/(U/mL)	13.12 ±1.41 <sup>Cc</sup>	7.02 ±1.66 <sup>Dd</sup>	252.82 ±23.45 <sup>Aa</sup>	109.89 ±4.75 <sup>Bb</sup>
48 h 细胞裂解液 中的抗氧化活性 Antioxidative activities of cell lysate after 48 h	还原型谷胱甘肽含量 GSH content/(mg/L)	4.83 ±0.73 <sup>Cc</sup>	16.67 ±2.28 <sup>Aa</sup>	15.34 ±1.45 <sup>Aa</sup>	9.58 ±0.20 <sup>Bb</sup>

3 讨 论

机体中清除自由基的系统主要包括 SOD、GSH-Px 和 POD 等抗氧化酶以及维生素 C、维生素 E 等非酶类,机体内的过氧化物大部分能被这些抗氧化物质捕捉而清除<sup>[5]</sup>,因此,总抗氧化能力包括酶与非酶在内的全部抗氧化物,是一个能够全面反映抗氧化能力的指标。Alexopoulos 等<sup>[6]</sup>报道,地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌可以改善仔猪肠黏膜氧化损伤,减轻腹泻。但是 Salinas 等<sup>[7]</sup>报道,饲喂枯草芽孢杆菌能够显著降低乌颊鱼鲷第 3 周到第 4 周 POD 的活性。余东游等<sup>[8]</sup>发现枯草芽孢杆菌通过显著增加肉鸡血清及肝脏 GSH-Px、SOD 等抗氧化酶活性和抗超氧阴离子活性,而使其总抗氧化能力显著提高;沈文英等<sup>[9]</sup>在养殖水体中添加了 0、0.5×10<sup>6</sup>、1.0×10<sup>6</sup>、2.0×10<sup>6</sup> CFU/mL 地衣芽孢杆

菌后,三角帆蚌血清中的总抗氧化能力和 SOD 活性均显著升高。本试验结果与之相似,研究证实细胞分别培养 12、48 h 时,添加芽孢杆菌能够提高细胞培养上清液抗 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、SOD 和 CAT 活性,而且使总抗氧化能力极显著升高,这可能与芽孢杆菌不但影响 Caco-2 细胞的抗氧化酶系统,而且对非酶的抗氧化系统也有激活作用有关。此外,B10 通过提高细胞上清液抑制·OH 能力和 POD 活性来增强细胞抗氧化能力,随时间的延长提高其 GSH-Px 活性和 GSH 含量而提高细胞抗氧化能力;B1 随时间的延长则通过促进 POD、GSH-Px 活性及 GSH 含量和抑制·OH能力的提高来增强细胞抗氧化能力,推测这可能由 2 株芽孢杆菌的抗氧化机制不同引起的。

LDH 是机体能量代谢过程中的重要酶,能催化乳酸脱氢生成丙酮酸,一般存在于细胞浆内,细胞膜受损时则会溢出胞外至培养上清中。MDA 是自由基与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂

脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应形成的脂质过氧化产物。因此,检测上清中 LDH 活性和脂质过氧化产物 MDA 含量可以反映细胞膜的损伤程度。Xu 等<sup>[10]</sup>用 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 PC12 细胞 10 h,发现细胞凋亡率、LDH、MDA 和活性氧 (ROS) 均极显著升高。Xu 等<sup>[11]</sup>报道,200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 12 h 使 PC12 细胞外的 LDH 活性显著升高,而没药甙酮可有效降低其含量。本试验在 12 h 时氧化应激组与对照组及添加枯草芽孢杆菌组的 LDH 活性和 MDA 含量差异时有高低,48 h 时则极显著增高。该结果与上述研究结果不完全一致,提示这可能是因为添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  或芽孢杆菌对细胞来说都是一种应激,所以在短时间内会加重细胞膜损伤,因此 12 h 时细胞上清液中 LDH 活性和 MDA 含量都较高,但这种损伤在 48 h 时已恢复,表现为此时添加有 B1、B10 组的 LDH 活性与空白对照组和氧化应激组比均极显著降低,且添加有 B10 组的 MDA 含量与氧化应激组比极显著降低,与空白对照组比差异不显著,这也证实芽孢杆菌能增强细胞的抗氧化功能,降低细胞受脂质过氧化造成的损伤。

本试验中,Caco-2 细胞内的抗氧化作用开始时主要通过胞内 POD 和 SOD 活性来提高总抗氧化能力,随氧化应激时间的延长,细胞内抗氧化作用逐渐转向为以 POD 活性为主,SOD 和 GSH 为辅,这与 Frei 等<sup>[12]</sup>认为菌体细胞内抗氧化的主要成分可能是 GSH 和一些抗氧化酶,如 SOD、GSH-Px 等的结果部分一致。不同之处可能在于细胞机体在遭受氧化应激时引起的主动调控机制差异造成的。

## 4 结 论

2 株枯草芽孢杆菌均提高了氧化应激状态下细胞的抗氧化功能。

### 参考文献:

- [ 1 ] KULLISAAR T, ZILMER M, MIKELSAAR M, et al. Two antioxidative *Lactobacilli* strains as promising probiotics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 72:215–224.
- [ 2 ] TALWALKER A, KAILASAPATHY K, HOURIGAN J, et al. An improved method for the determination of NADH oxidase in the presence of NADH peroxidase in lactic acid bacteria[J]. Journal of Microbi-

- ological Methods, 2003, 52(3):333–339.
- [ 3 ] WANG Y, CHO J H, CHEN Y J, et al. The effect of probiotic BioPlus 2B<sup>®</sup> on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs[J]. Journal of Livestock Science, 2009, 120(1/2):35–42.
- [ 4 ] LI K, ZHENG T L, TIAN Y, et al. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Biotechnology Letters, 2007, 29(4):525–530.
- [ 5 ] KO Y H, YANG H Y, JANG I S. Effect of conjugated linoleic acid on intestinal and hepatic antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in broiler[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 2004, 17:1162–1167.
- [ 6 ] ALEXOPOULOS C, GEORGOULAKIS I E, TZIVARA A, et al. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2004, 88(11/12):381–392.
- [ 7 ] SALINAS I, CUESTA A, ESTEBAN M A, et al. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead sea-bream cellular innate immune responses[J]. Journal of Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(1):67–77.
- [ 8 ] 余东游,毛翔飞,秦艳,等. 枯草芽孢杆菌对肉鸡生长性能及其抗氧化和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志,2010,46(3):24–25.
- [ 9 ] 沈文英,余东游,李卫芬,等. 地衣芽孢杆菌对三角帆蚌消化酶活性,免疫指标和抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报,2009,21(1):95–100.
- [ 10 ] XU D H, ZHOU C H, WU T, et al. Inhibitory effect of peanol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2008, 22(6):401–405.
- [ 11 ] XU H B, LI L, LIU G Q. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by guggulsterone[J]. Journal of Acta Pharmaceutica Sinica, 2008, 43(12):1190–1197.
- [ 12 ] FREI B, STOCKER R, AMES B N. Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma[J]. Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 85:9748.

## Effects of *Bacillus subtilis* on Antioxidative Function of Caco-2 Cells

CUI Zhiwen HUANG Qin HUANG Yi WU Hongzhao WEN Jing LI Weifen\*

(Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition of China Ministry of Education, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the effects of *Bacillus subtilis* on antioxidative function of Caco-2 cells under oxidative stress. Caco-2 cells were randomly divided into 4 groups, control I ( $0 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$ ) and group II (oxidative stress group,  $100 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$ ), treatment I and treatment II added with *B. subtilis* B1 and B10 (at final concentration of  $0.3 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ) in the condition of oxidative stress group, respectively, whose antioxidative activities at 12 and 48 h were measured in culture supernatant and lysate. The results showed as follows: compared with the control I and the oxidative stress group, the two groups added with *B. subtilis* increased significantly the total antioxidative capacity (T-AOC) in cultured supernatant of Caco-2 cells at 12 and 48 h ( $P < 0.01$ ); B1 increased the anti-superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) ( $P < 0.01$ ), superoxide dismutase (SOD) ( $P < 0.01$ ), catalase (CAT) activities ( $P < 0.01$ ), and the peroxidase (POD) activity at 48 h ( $P < 0.01$ ), while B10 not only increased the activities of anti  $\text{O}_2^-$ , SOD, and CAT ( $P < 0.01$ ), but also increased the inhibition capacity of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) ( $P < 0.01$ ) and the POD activity ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); compared with the oxidative stress group, there were no significant differences in the lactate dehydrogenase (LDH) activity and malondialdehyde (MDA) content of the cells culture supernatant in the groups added with *B. subtilis* at 12 h ( $P > 0.05$ ), but they were significantly lower at 48 h ( $P < 0.01$ ). Compared with the control I, there were lower SOD activity ( $P < 0.05$ ), less GSH content ( $P < 0.05$ ) and higher POD activity ( $P < 0.01$ ) of the cells lysate in the oxidative stress group at 12 h, while the results were the contrary at 48 h, but adding *B. subtilis* increased POD activity significantly ( $P < 0.01$ ). These results indicate that the two strains of *B. subtilis* can increase the antioxidative function of Caco-2 cells under oxidative stress. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(2):293-298]

**Key words:** Caco-2 cell; *B. subtilis*; antioxidative activities; oxidative stress; mechanism

\* Corresponding author, professor, E-mail: wfli@zju.edu.cn

(编辑 何丽霞)