

黄逸伦,徐芝炫,郭红刚,等. 唾液乳杆菌 Li01 对幽门螺杆菌合并苯并芘致长爪沙鼠 DNA 损伤的改善作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 530–539.

HUANG Y L, XU Z X, GUO H G, et al. Therapeutic effects of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 on DNA damage induced by the combination of *Helicobacter pylori* and Benzo(a)pyrene in Mongolian gerbils [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 530–539.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.007

唾液乳杆菌 Li01 对幽门螺杆菌合并苯并芘致长爪沙鼠 DNA 损伤的改善作用研究

黄逸伦¹, 徐芝炫², 郭红刚³, 张扬帆², 刘慧敏², 谢文迪²,
陈永平⁴, 褚晓峰^{5*}

(1. 温州医科大学阿尔伯特学院, 浙江 温州 325035; 2. 杭州医学院检验医学院、生物工程学院, 杭州 310053; 3. 杭州医学院实验动物中心, 杭州 310053; 4. 温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325035; 5. 杭州医学院附属人民医院, 杭州 310014)

【摘要】 目的 探讨唾液乳杆菌 Li01 (*Ligilactobacillus salivarius* Li01, *L. salivarius* Li01) 对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)、苯并芘 (Benzo(a)pyrene, BaP)、Hp + BaP 共同作用引起的 DNA 损伤的保护作用, 评价 *L. salivarius* Li01 的相关益生特性。**方法** 雄性 SPF 级长爪沙鼠适应性饲养 1 周后, 随机分组进行 Hp、BaP、Hp + BaP 灌胃造模。第 32 周, 确定造模成功后使用 *L. salivarius* Li01 灌胃修复。第 36 周, 取长爪沙鼠眼球血做彗星实验并取肝组织检测细胞色素氧化酶 P4501A1 (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1, CYP1A1) 基因表达水平。**结果** 与对照组相比, Hp、BaP、Hp + BaP 组的彗星尾长、尾部 DNA 含量和肝 *Cyp1a1* 基因表达水平显著升高 ($P < 0.0001$), 其中 Hp + BaP 组的彗星尾长、Olive 尾距、彗星尾部 DNA 含量和肝 *Cyp1a1* 基因表达水平显著高于 Hp 及 BaP 组 ($P < 0.05$)。 *L. salivarius* Li01 干预后, 各组彗星尾长、Olive 尾距、彗星尾部 DNA 含量及肝 *Cyp1a1* 基因表达水平显著减小 ($P < 0.001$)。**结论** Hp、BaP、Hp + BaP 均能引起长爪沙鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤, 且 Hp 和 BaP 具有协同致损伤作用, 而 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 造成的 DNA 损伤具有保护作用。

【关键词】 唾液乳杆菌; 幽门螺杆菌; 苯并芘; 长爪沙鼠模型; DNA 损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0530-10

Therapeutic effects of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 on DNA damage induced by the combination of *Helicobacter pylori* and Benzo(a)pyrene in Mongolian gerbils

HUANG Yilun¹, XU Zhixuan², GUO Honggang³, ZHANG Yangfan², LIU Huimin², XIE Wendi²,
CHEN Yongping⁴, CHU Xiaofeng^{5*}

[基金项目] 2024 年温州医科大学本专科学子科研立项资助课题 (wyx2024101143), 浙江省基础公益项目 (LGD22C040024)。

Funded by 2024 Wenzhou Medical University Undergraduate and Junior College Student Research Funding Projects (wyx2024101143), the Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (LGD22C040024).

[作者简介] 黄逸伦, 男, 在读本科生, 研究方向: 微生物及病原微生物。Email: yilun13@ualberta.ca

[通信作者] 褚晓峰, 男, 学士, 研究员, 研究方向: 实验动物模型开发与比较医学。Email: cxf1001@hmc.edu.cn

(1. Alberta Institute, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 2. School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; 3. Center of Laboratory Animal, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; 4. the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 5. Affiliated People's Hospital, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

Corresponding author: CHU Xiaofeng. E-mail: cxf1001@hmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 (*L. salivarius* Li01) against DNA damage induced by *Helicobacter pylori* (Hp), Benzo(a)pyrene (BaP), and Hp + BaP, and to evaluate the probiotic properties of *L. salivarius* Li01. **Methods** After 1 week of adaptive feeding, specific pathogen-free male Mongolian gerbils were randomly assigned to groups and subjected to intragastric administration of Hp, BaP, and Hp + BaP for model induction. At week 32 post model establishment, therapeutic *L. salivarius* Li01 was administered intragastrically. At week 36, peripheral blood samples were collected from each group for the comet assay, while liver tissues were collected and tested for *Cyp1a1* gene expression levels. **Results** Compared with those in the control group, the comet tail length, % tail DNA, and hepatic *Cyp1a1* expression levels were significantly increased in the Hp, BaP, and Hp + BaP groups ($P < 0.0001$). Among these, the comet tail length, olive tail moment, % tail DNA, and hepatic *Cyp1a1* expression levels were significantly higher in the Hp + BaP group than in the Hp and BaP groups ($P < 0.05$). Following intervention with *L. salivarius* Li01, the comet tail length, olive tail moment, % tail DNA, and hepatic *Cyp1a1* expression levels were significantly reduced in each group ($P < 0.001$). **Conclusions** Hp infection, BaP exposure, and the Hp + BaP combination induced DNA damage in the peripheral lymphocytes of Mongolian gerbils, with the Hp + BaP combination showing synergistic damage. *L. salivarius* Li01 had a protective effect against DNA damage caused by Hp, BaP, and Hp + BaP.

【Keywords】 *Ligilactobacillus salivarius*; *Helicobacter pylori*; Benzo(a)pyrene; Mongolian gerbil model; DNA damage

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种革兰阴性微需氧螺旋菌, 通常定植于胃黏膜, 并能通过感染破坏胃肠道菌群和胃上皮细胞结构, 使 DNA 发生损伤, 增加细胞恶变概率^[1-2]。苯并芘 (Benzo(a)pyrene, BaP) 是一组含有五个苯环的多环芳烃^[3], 人类通过接触受污染的食物和空气摄入^[4-5], 其不与人体 DNA 直接反应, 而是通过二醇-环氧途径、邻醌途径和自由基阳离子途径被代谢活化后才与 DNA 形成加合物, 对 DNA 造成损伤, 损伤严重则会导致基因突变甚至诱发癌症^[6]。感染了 Hp 并同时接触到 BaP 是人类活动中较为普遍的现象, 但至今鲜见这两者共同作用于实验动物模型报道。根据文献^[7-8], 相比小鼠, 长爪沙鼠更易感染 Hp, 并在感染 Hp 后会出现与人类相似的疾病过程, 且饲养条件不高、饲养成本较低、易于管理, 寿命较小鼠长, 适合长期观察^[8], 是研究 Hp 感染较为理想的动物模型。而一般 DNA 水平体外实验采用的细菌 (原核) 或细胞 (真核) 培养条件苛刻, 需要特殊的仪器设

备, 对硬件环境要求极高。此外, 部分益生乳杆菌具有潜在的抗 DNA 损伤和抗基因突变活性, 如关于嗜酸乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌等的抗 DNA 损伤作用已有诸多报道^[9-10], 本课题组前期研究发现唾液乳杆菌 Li01 (*Ligilactobacillus salivarius* Li01, *L. salivarius* Li01) 具有优秀的抗炎、减轻组织异常、防止腹泻和体质量减轻等益生功能^[11-12], 但其是否具有抗 DNA 损伤的益生特性尚未见报导。因此, 本研究采用长爪沙鼠动物模型, 观察 *L. salivarius* Li01 在 Hp、BaP、Hp + BaP 引起的 DNA 损伤中的改善和缓解作用, 评价 *L. salivarius* Li01 的相关益生特性, 以期为益生菌资源开发提供候选菌株和实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性长爪沙鼠 72 只, 体质量 (50 ± 10) g, 2 月龄, 购于杭州医学院动物中心

【SCXK(浙)2019-0002】,并于杭州医学院动物中心【SYXK(浙)2019-0011】进行常规饲养(恒温 22 ~ 25 ℃,恒湿 40% ~ 60%,昼夜各半照明),饲料由杭州医学院动物中心提供,实验方案通过杭州医学院实验动物福利伦理委员会批准(2021-115),整个实验操作过程遵守实验动物标准操作规范。

1.1.2 菌种

Hp 国际标准菌株(Sydney strain 1, SS1),购买于杭州致远医学检验所,批号:20220817。*L. salivarius* Li01(1×10^{11} CFU/g),由绍兴同创生物科技有限公司馈赠,批号:20230418。

1.1.3 主要试剂与仪器

BaP(S30595,上海易博远生物科技有限公司);彗星电泳法检测细胞损伤试剂盒(KGA240-50,江苏凯基生物有限公司);小鼠淋巴细胞分离液(GS3702-100 mL,广州顺豪生物科技有限公司);Tris-HCL 缓冲液(3042538,上海尚宝生物科技有限公司);碱性琼脂糖凝胶电泳缓冲液 10 × (ST466-500 mL,上海碧云天生物技术有限公司);PBS 缓冲液 1 × (KGB5001,江苏凯基生物技术有限公司);PBS 缓冲液 10 × (P160220611,深圳逗点生物技术有限公司);总 RNA 提取剂(HKR022,杭州浩克生物技术有限公司);三氯甲烷(20230214,国药集团化学试剂有限公司);异丙醇(20221104,国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(20221214,国药集团化学试剂有限公司);快速总 RNA 提取试剂盒(HKR06,杭州浩克生物技术有限公司);All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(AE341, Trans);2 × SYBR Green qPCR Master Mix(K1070, APEX BIO)。

电子天平(BSA223S,赛多利斯科学仪器有限公司,中国);移液器(G33552D,艾本德股份公司,德国);干式恒温器(GY-2102,精骐有限公司,美国);高速台式离心机(Centrifuge5702,艾本德股份公司,德国);海尔医用冷藏冷冻箱(HYCD-205,海尔生物医疗股份有限公司,中国);玻璃点样毛细管(南通医太玻璃仪器,中国);羽帆牌载玻片(盐城市羽帆实验器材有限公司,中国);微量离心管(上海市求精生化试剂仪器有限公司,中国);水平电泳槽(Mini-sub Cell GT, Bio-Rad, 美国);电泳仪(PowerPac HC, Bio-

Rad, 美国);多管架自动平衡离心机(TDZ5-WS, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 中国);荧光显微镜(80i, 尼康, 日本);匀浆仪(KZ-II, Servicebio, 中国);荧光定量 PCR 仪(IQ5, Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型建立

SPF 级雄性长爪沙鼠,起初随机分为 4 组:正常对照(CG)组, Hp 组、BaP 组和 Hp + BaP 组,每组 18 只。Hp 组、Hp + BaP 组分别胃灌注 Hp 混悬液,浓度为 1×10^9 CFU/mL,每只每次 0.5 mL,每周 1 次,连续 5 周^[13]。同时 BaP 组进行 BaP 灌胃,将 BaP 溶于色拉油中,浓度为 5 mg/mL,每只每次 0.5 mL,连续灌胃 4 周,每周 2 次^[14]。Hp + BaP 组在 Hp 灌胃结束后,继续灌胃 BaP,浓度、剂量和频次同 BaP 组。模型建成后,第 32 周进行 *L. salivarius* Li01 灌胃修复:随机选择正常对照组, Hp 组, BaP 组, Hp + BaP 组各 9 例长爪沙鼠,分别组成正常对照组($n = 9$), Hp + Li01 组($n = 9$), BaP + Li01 组($n = 9$)和 Hp + BaP + Li01 组($n = 9$),每次每只长爪沙鼠用 *L. salivarius* Li01(浓度: 5×10^{10} CFU/mL)灌胃 1 mL,连续 4 周,每周 5 次^[12],对照组用 0.9% 的生理盐水代替。第 36 周时长爪沙鼠取血做 DNA 损伤实验及取肝组织检测细胞色素氧化酶 P4501A1(cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1, CYP1A1)基因表达水平。

1.2.2 长爪沙鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤检测(彗星实验)

取各组长爪沙鼠新鲜血液,提取所需淋巴细胞;在细胞计数板上进行计数,用 PBS 重悬使细胞密度为每毫升 10^6 个;载玻片预热,铺胶,总计铺三层,淋巴细胞位于第二层胶;使用配置好的 Lysis Buffer 于 4 ℃ 裂解 1.5 h;然后 DNA 碱解旋 30 min;调整电压 25 V,电泳 25 min;用 PI 染液进行中和染色;镜检拍照;最后各组随机挑选 100 个图片中细胞,通过 CASP 软件分析测量,得出尾长(tail length),Olive 尾距(Olive tail moment),彗星尾部 DNA 含量%(% tail DNA)。根据彗星尾部 DNA 含量%,可将损伤分为 5 个等级^[15],如表 1 所示。

表 1 DNA 损伤分级评定表
Table 1 DNA damage grading scale

等级 Grade	彗星尾部 DNA 含量 %tail DNA	损伤程度 Damage level
0 级 Grade 0	[0% , 5%)	无损伤 No damage
1 级 Grade 1	[5% , 20%)	轻度损伤 Mild damage
2 级 Grade 2	[20% , 40%)	中度损伤 Moderate damage
3 级 Grade 3	[40% , 95%)	高度损伤 High level damage
4 级 Grade 4	[95% , 100%]	重度损伤 Severe damage

1.2.3 长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因表达水平检测

取各组长爪沙鼠的肝组织样本,按照杭州浩克生物技术有限公司的快速总 RNA 提取试剂盒操作步骤提取 RNA,进行反转录。qPCR 条件为 94 ℃、10 min 预变性,40 个循环,具体为 94 ℃、15 s、60 ℃、30 s。采用 *Gapdh* 作为内参。PCR 引

物序列如表 2 所示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 27.0.1 进行统计学分析,GraphPad Prism 10.1.2 进行绘图,实验数据结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,多组间比较应用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 长爪沙鼠外周血淋巴细胞彗星实验形态学观察

2.1.1 Hp、BaP、Hp + BaP 对长爪沙鼠淋巴细胞 DNA 损伤形态学影响

当细胞 DNA 受损伤时,释放出断裂的 DNA 片段,电泳时,形成“彗星”状影像,DNA 损伤越多,进入细胞尾部的 DNA 碎片越多,由此来评价细胞 DNA 损伤情况。图 1 分别为各组外周血淋巴细胞在荧光显微镜下观察到的形态,正常对照组细胞呈圆形,细胞核边缘清楚、整齐,无拖尾现象。Hp + BaP 组,损伤的 DNA 片段从核中移出,

表 2 *Cyp1a1* 基因的引物序列
Table 2 Primer sequences for the *Cyp1a1* gene

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')	扩增片段长度/bp Amplified fragment length/bp
<i>Mou-Gapdh</i>	AACAGCAACTCCCACTCTTCC	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	164
<i>Cyp1a1</i>	GCCAATGTCATCTGTGCCATAT	CAGGTAACGGAGGACAGGAAT	147

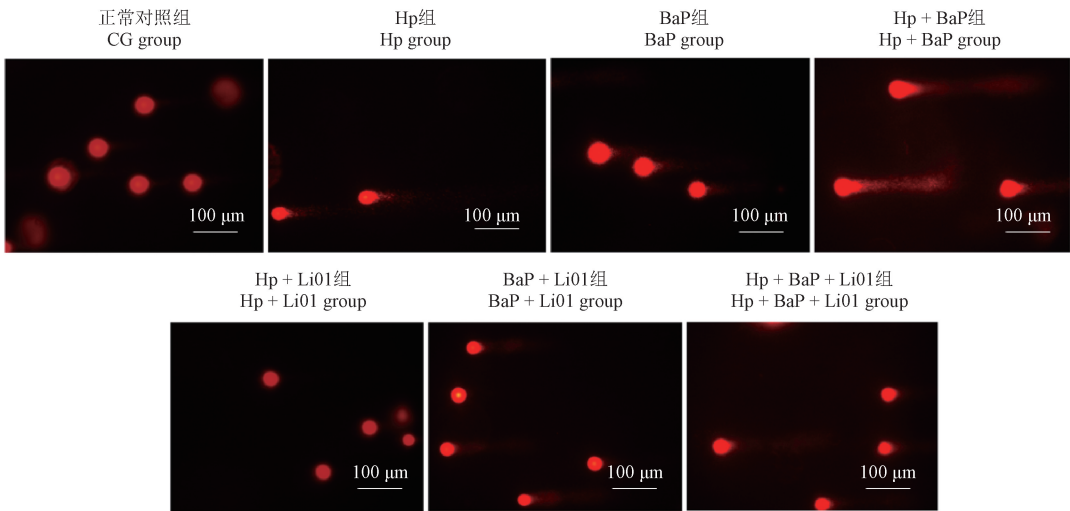


图 1 长爪沙鼠外周血淋巴细胞的 DNA 损伤形态学观察
Figure 1 Morphological observation of DNA damage in peripheral lymphocytes of Mongolian gerbils

呈现尾形分布,出现明显拖尾现象,形似“彗星”。Hp 组和 BaP 组也有拖尾现象。

2.1.2 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠淋巴细胞 DNA 损伤形态学方面的影响

如图 1 所示,经 *L. salivarius* Li01 修复后,与 Hp 组相比,Hp + Li01 组细胞核拖尾现象有明显改善,甚至部分逆转为正常;与 BaP 组相比,BaP + Li01 组细胞核拖尾现象有明显减轻;与 Hp + BaP 组相比,Hp + BaP + Li01 组的细胞损伤同样得到显著改善和修复。

2.2 各组长爪沙鼠外周血淋巴细胞彗星实验结果

2.2.1 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤结果

依据随机原则,对正常对照组、Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组分别计数外周血淋巴细胞约 100 个,对每个细胞分别进行彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量的测量。从图 2 可以看出,Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组的彗星尾长和尾部 DNA 含量均大于正常对照组,具有极显著差异性 ($P < 0.0001$);Hp + BaP 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均大于 Hp 或者 BaP 组,具有显著性差异性 ($P < 0.05$, $P < 0.0001$),根据

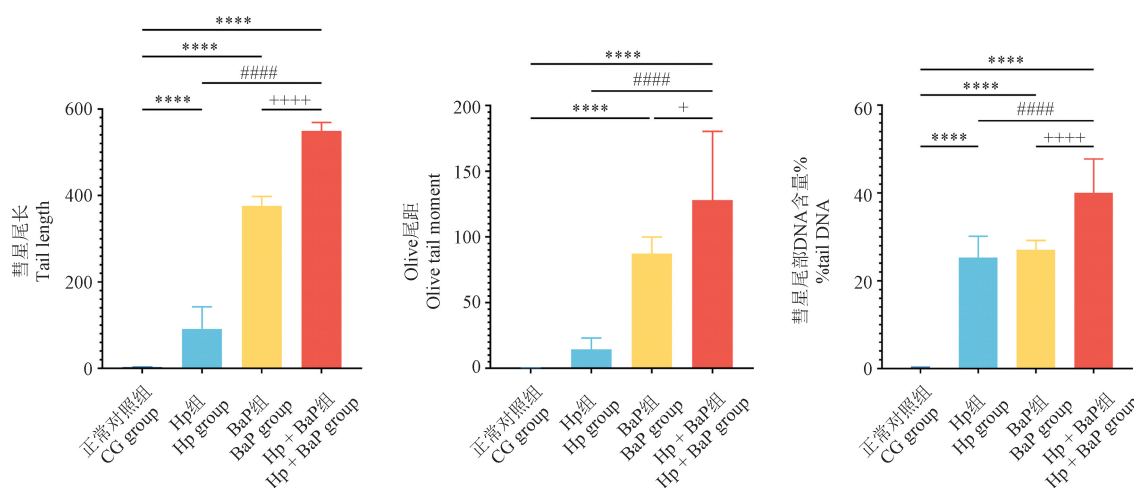
表 3,正常对照组无损伤,Hp、BaP 组均为中度损伤,Hp + BaP 组则为高度损伤。

2.2.2 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤的改善和修复作用结果

依据随机原则,对各实验组分别计数约 100 个外周血淋巴细胞,对每个细胞分别进行彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量的测量。从图 3 及表 3 可以看出,Hp + Li01 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均小于 Hp 组,具有极显著性差异性 ($P < 0.001$);BaP + Li01 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均小于 BaP 组,具有极显著差异性 ($P < 0.0001$);Hp + BaP + Li01 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均小于 Hp + BaP 组,具有极显著差异性 ($P < 0.0001$)。根据表 3,正常对照组无损伤,Hp 组为中度损伤,Hp + Li01 组逆转为无损伤;BaP 组为中度损伤,BaP + Li01 组改善和减轻为轻度损伤;Hp + BaP 组为高度损伤;Hp + BaP + Li01 组修复为轻度损伤。

2.3 长爪沙鼠肝 *cyp1a1* 基因表达水平

如图 4 所示,与正常对照组相比,Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量均升高,且具有极显著性差异 ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P <$

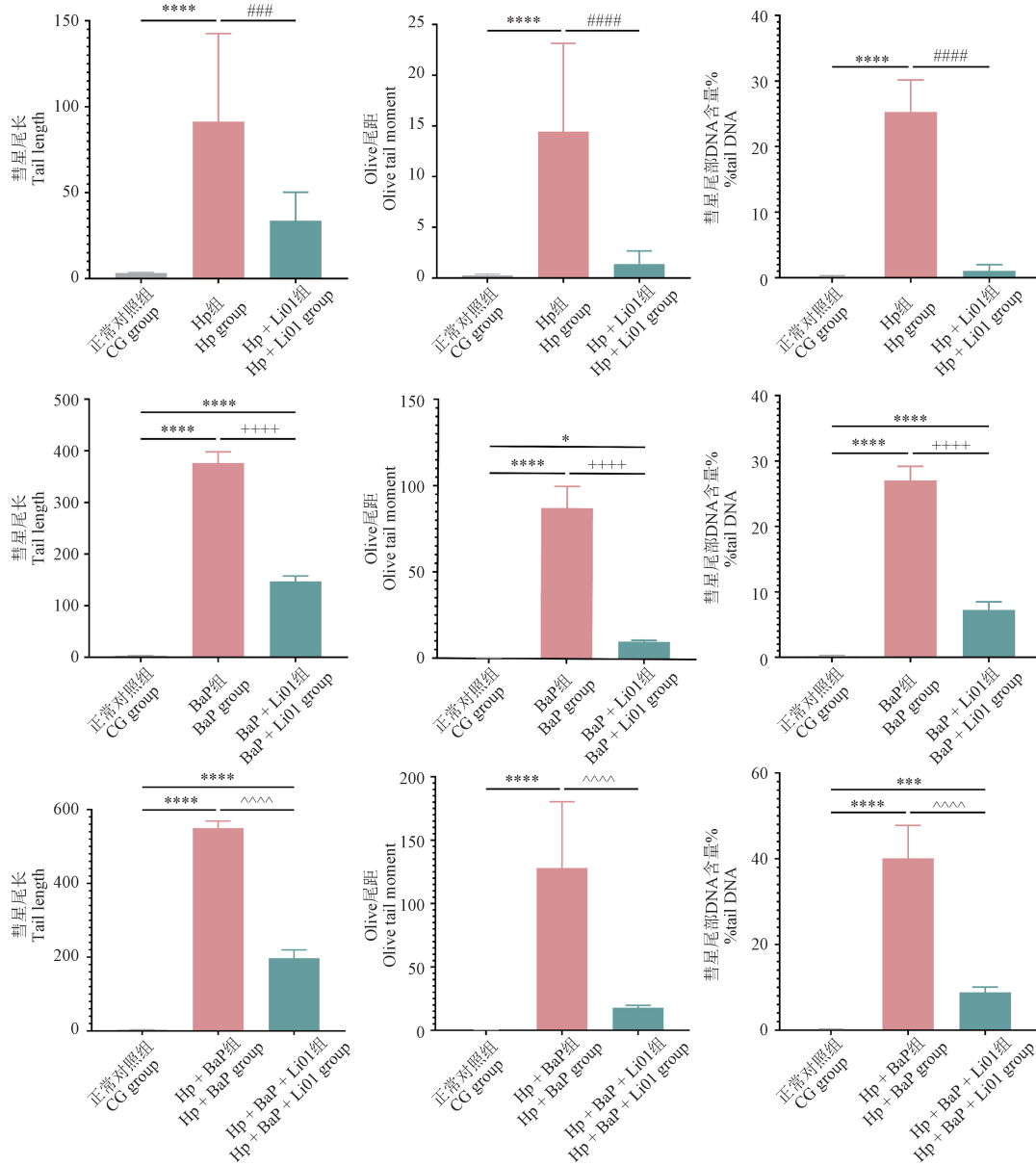


注:与正常对照组相比,**** $P < 0.0001$;与 Hp 组相比,#### $P < 0.0001$;与 BaP 组相比,+ $P < 0.05$,**** $P < 0.0001$ 。(下图/表同)

图 2 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤结果 ($n = 9$)

Note. Compared with CG group, **** $P < 0.0001$. Compared with Hp group, #### $P < 0.0001$. Compared with BaP group, + $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 DNA damage caused by Hp, BaP and Hp + BaP in peripheral lymphocytes of Mongolian gerbils ($n = 9$)



注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与 Hp 组相比,### $P < 0.001$;与 Hp + BaP 组相比,~~~ $P < 0.0001$ 。(下图/表同)

图 3 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤的作用结果($n = 9$)

Note. Compared with CG group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with Hp group, ### $P < 0.001$. Compared with Hp + BaP group, ~~~ $P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 3 Effects of *L. salivarius* Li01 on peripheral blood lymphocyte DNA damage in Mongolian gerbils induced by Hp, BaP, and Hp + BaP ($n = 9$)

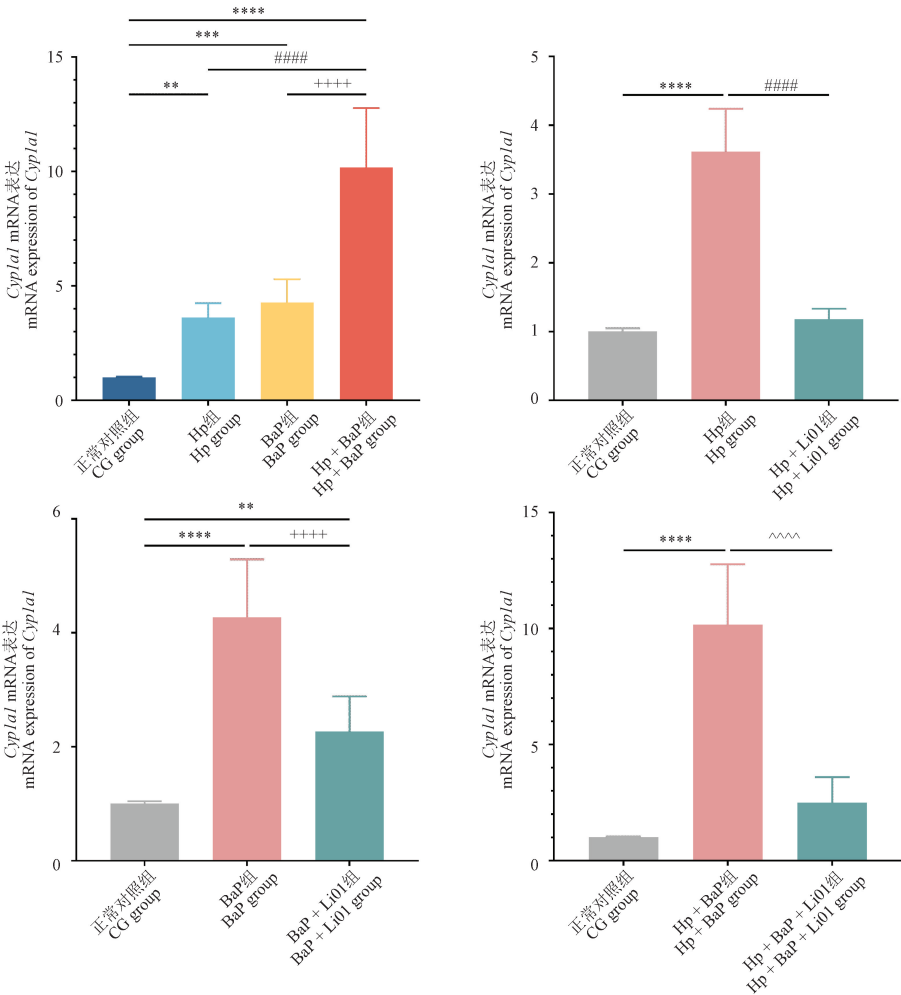
0.0001);与 Hp 组或者 BaP 组相比,Hp + BaP 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著升高 ($P < 0.0001$);与 Hp 组相比,Hp + Li01 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著下降 ($P < 0.0001$);与 BaP 组相比,BaP + Li01 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著下降 ($P < 0.0001$);与 Hp + BaP 组相比,Hp + BaP + Li01 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著

下降 ($P < 0.0001$)。 *Cyp1a1* mRNA 检测结果分析说明 Hp、BaP、Hp + BaP 均能使长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因表达水平升高,且与 Hp 或 BaP 单因素相比,Hp + BaP 能更显著地提高长爪沙鼠肝组织中 *Cyp1a1* 基因的表达量,而 *L. salivarius* Li01 干预后,Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组的 *Cyp1a1* 基因的表达量均明显下降。

表 3 L. salivarius Li01 干预前后,各实验组长爪沙鼠细胞 DNA 损伤情况($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 DNA damage status of Mongolian gerbil cells in each group before and after intervention with L. salivarius Li01 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别 Groups	彗星尾长 Tail length	Olive 尾距 Olive tail moment	彗星尾部 DNA 含量% %tail DNA	损伤级别 Damage level
正常对照组 CG group	3.20 ± 0.42	0.26 ± 0.12	0.16 ± 0.16	无损伤 No damage
Hp 组 Hp group	91.40 ± 48.55****	14.43 ± 8.26****	25.30 ± 4.85****	中度损伤 Moderate damage
Hp + Li01 组 Hp + Li01 group	33.70 ± 16.56###	1.37 ± 1.30####	1.04 ± 0.96####	无损伤 No damage
BaP 组 BaP group	376.20 ± 21.77****	87.37 ± 12.59****	27.05 ± 2.15****	中度损伤 Moderate damage
BaP + Li01 组 BaP + Li01 group	170.73 ± 10.55****	10.15 ± 0.80****	7.24 ± 1.22****	轻度损伤 Mild damage
Hp + BaP 组 Hp + BaP group	549.50 ± 19.23**** #### +	128.06 ± 52.29**** #### +	40.08 ± 7.30**** #### +	高度损伤 High level damage
Hp + BaP + Li01 组 Hp + BaP + Li01 group	197.00 ± 22.57***	17.80 ± 1.91***	8.83 ± 1.23***	轻度损伤 Mild damage



注:与正常对照组相比,** $P < 0.01$ 。

图 4 各组长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因表达水平($n = 9$)

Note. Compared with CG group, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Expression levels of the *Cyp1a1* gene in the liver tissues of Mongolian gerbils in each group($n = 9$)

3 讨论

L. salivarius Li01 作为一种潜在的益生菌,其益生特性已有少量相关报导。根据文献,使用 *L. salivarius* Li01 和白藜芦醇能治疗葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎,并且两者具有良好的协同作用^[16]。此外,有研究表明 *L. salivarius* Li01 具有通过调节 5-羟色胺信号通路来改善和治疗小鼠便秘的作用^[17],并可能通过抑制细菌易位、重塑肠道微生物群和降低促炎细胞因子水平等机制改善小鼠急性肝损伤等^[11]。

本研究彗星实验结果显示,单一因素 Hp、BaP 均能致长爪沙鼠细胞 DNA 损伤,而 Hp、BaP 联合使用引起的损伤更加严重。根据相关文献,这是因为 Hp 感染导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和引起细胞氧化应激,细胞氧化应激导致 DNA 链断裂,进而引起氧化性 DNA 损伤^[18-19],DNA 损伤在 Hp 感染后胃组织从胃炎向胃癌演变过程中发挥了重要的作用^[20]。另有研究表明,BaP 也可以通过影响 ROS 的形成来诱导氧化应激^[21],并导致细胞 DNA 发生损伤。此外,BaP 进入机体后,在 CYP450 酶系的作用下,经过一系列代谢活化反应生成终致癌物 BPDE,直接作用于 DNA,导致 DNA 受损伤,释放出断裂的 DNA 片段^[22]。因本研究在灌胃之前,长爪沙鼠免疫力强,Hp、BaP 暴露的量较低,所以单一作用组属于中度损伤,而同样的暴露量,Hp 和 BaP 协同作用组达到高度损伤,从分子水平说明,Hp 和 BaP 两者具有协同作用。*L. salivarius* Li01 干预后,各模型组细胞 DNA 损伤减轻、甚至有的逆转至基本恢复正常。以上结果说明 *L. salivarius* Li01 可能具有修复某些因素引起的 DNA 损伤的益生特性。这与 LIU 等^[23]的研究结果一致,益生乳杆菌能使 BaP 诱导的小鼠 DNA 损伤大大减轻。ZHANG 等^[24]的研究结果同样发现,用 Li 及其分泌物饲灌胃多环芳烃类化合物造模的舌癌大鼠,发现其改善了大鼠 DNA 损伤及抑制了肿瘤的产生。一般认为益生菌对致癌物的脱基因毒性功能主要通过两种途径实现,一种是通过菌体对有毒物质的吸附来实现,另一种是通过菌体及其分泌物将有毒物质转化为无毒物质的代谢、降解过程来实现^[25-26]。本研究推测是以上两种情

况都有:(1)已有文献报导,膳食中的致癌物 BaP、黄曲霉素 B₁ 等益生乳杆菌抑制的机理是细菌的吸附作用^[27-28];(2)葛绍阳等^[29]已明确 *L. salivarius* 菌体分泌物中存在的 H₂O₂ 在分解多环芳烃类化合物的过程中起关键性作用。关于 *L. salivarius* Li01 具有脱基因毒性的机理研究正在进行中。

Cyp1a1 基因是 CYP1 家族的一部分,主要在肝、肺和肠中表达^[30]。根据文献,*Cyp1a1* 在 BaP 的代谢、解毒中起着不可或缺的作用^[31]。经口暴露的 BaP 通过消化道在肠壁被吸收入血,再进入肝,最终参与全身血液循环^[32]。在肝,BaP 可与芳烃受体结合,导致芳烃受体转移至细胞核,诱发 *Cyp1a1* 的转录和表达,促使与突变密切相关的二氢二羟环氧苯并(a)芘(Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide, BPDE)-DNA 加合物的形成,BPDE-DNA 导致基因 DNA 序列中 G 到 T 的碱基突变^[33],使 DNA 在细胞分裂过程中不能正常复制,基因无法正确的翻译成蛋白质,促使细胞突变和 DNA 损伤,导致炎性细胞因子的表达增加,进而引发炎症,甚至癌变^[34-35]。本研究中 Hp 感染合并 BaP 摄入(Hp + BaP 组)能诱导长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因的表达量显著高于单纯 Hp 感染组或者单纯 BaP 诱导组。同时,*L. salivarius* Li01 能显著降低各模型组 *Cyp1a1* 基因表达量,这一结论在一定程度上揭示了 Hp 和 BaP 协同导致长爪沙鼠更严重的 DNA 损伤,以及 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 引起的 DNA 损伤具有保护作用的可能机制。然而,关于 Hp 单独感染与合并 BaP 摄入上调 *Cyp1a1* 基因表达的机制还有待进一步的研究。

综上所述,Hp、BaP、Hp + BaP 均能引起长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤,其中 Hp 和 BaP 具有协同作用,而 *L. salivarius* Li01 在 Hp、BaP、Hp + BaP 引起的 DNA 损伤中具有良好的改善、修复、甚至逆转的益生作用,是益生菌资源开发优秀的候选菌株。

参 考 文 献 (References)

- [1] WU L, JIANG F, SHEN X. Helicobacter pylori CagA protein regulating the biological characteristics of gastric cancer through the miR-155-5p/SMAD2/SP1 axis [J]. Pathogens, 2022, 11(8): 846.

- [2] 董海滨. 幽门螺杆菌 *cagA* 和 *vacA* 基因型对胃上皮细胞 DNA 损伤修复的影响 [D]. 郑州: 郑州大学; 2018.
DONG H B. Effect of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genotypes on DNA damage repairing gastric epithelial cells. [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2018.
- [3] BUKOWSKA B, MOKRA K, MICHAŁOWICZ J. Benzo [a] pyrene-environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (11): 6348.
- [4] 管融资, 吴航利, 王佳, 等. 苯并[a]芘污染现状及其生物毒性效应 [J]. 延安大学学报(自然科学版), 2019, 38 (3): 49-54.
GUAN R Z, WU H L, WANG J, et al. Status of benzopyrene pollution and its biotoxic effects [J]. *J Yanan Univ Nat (Sci Ed)*, 2019, 38(3): 49-54.
- [5] BUKOWSKA B, SICIŃSKA P. Influence of benzo (a) pyrene on different epigenetic processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13453.
- [6] 王珠琳, 袁莉, 张萌. 苯并[a]芘及其代谢产物与 DNA 加合物检测方法的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 287-293.
WANG Z L, YUAN L, ZHANG M. Research progress on the detection methods of benzo [a] pyrene and its metabolites and DNA adducts [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(14): 287-293.
- [7] MISHRA K K, SRIVASTAVA S, AAYYAGARI A, et al. Development of an animal model of *Helicobacter pylori* (Indian strain) infection [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2019, 38(2): 167-172.
- [8] NOTO J M, ROMERO-GALLO J, BLANCA PIAZUELO M, et al. The Mongolian gerbil: a robust model of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 263-280.
- [9] 汪雪, 陈颖, 崔省委, 等. 乳杆菌属益生菌在家畜疾病防治中的应用 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2022, 52(6): 17-20, 29.
WANG X, CHEN Y, CUI S W, et al. Application of *Lactobacillus* probiotics in prevention and treatment of livestock diseases [J]. *Gansu Anim Husb Vet Med*, 2022, 52(6): 17-20, 29.
- [10] 李海龙, 丁小玲, 李吕木. 唾液乳杆菌的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 94-97.
LI H L, DING X L, LI L L. Advances in saliva *Lactobacillus* (*Lactobacillus salivarius*) [J]. *J Microbiol*, 2015, 35(5): 94-97.
- [11] YANG L, BIAN X, WU W, et al. Protective effect of *Lactobacillus salivarius* Li01 on thioacetamide-induced acute liver injury and hyperammonaemia [J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(6): 1860-1876.
- [12] YAO M, LU Y, ZHANG T, et al. Improved functionality of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 in alleviating colonic inflammation by layer-by-layer microencapsulation [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2021, 7(1): 58.
- [13] CRAFA P, RUSSO M, MIRAGLIA C, et al. From sidney to OLGA: an overview of atrophic gastritis [J]. *Acta Biomed*, 2018, 89(8-S): 93-99.
- [14] 党海珍, 魏品康, 张霄峰. 冰盐水对苯并(a)芘诱发小鼠前胃组织癌变过程的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(11): 1266-1267.
DANG H Z, WEI P K, ZHANG X F. Influence of ice brine on the process of B (a) P inducing anterior stomach neoplasms in mice [J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2006, 27(11): 1266-1267.
- [15] 朱燕萍, 金念祖, 周建伟, 等. 槲皮素在苯并芘致小鼠 DNA 损伤中的作用 [J]. 中国公共卫生, 2004, 20(11): 1333-1335.
ZHU Y P, JIN N Z, ZHOU J W, et al. Effect of quercetin on benzo [a] pyrene-induced DNA damage in mice [J]. *China Public Health*, 2004, 20(11): 1333-1335.
- [16] FEI Y, ZHANG S, HAN S, et al. The role of dihydroresveratrol in enhancing the synergistic effect of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 and resveratrol in ameliorating colitis in mice [J]. *Research (Wash D C)*, 2022, 2022: 9863845.
- [17] QIU B, ZHU L, ZHANG S, et al. Prevention of loperamide-induced constipation in mice and alteration of 5-hydroxytryptamine signaling by *Ligilactobacillus salivarius* Li01 [J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 4083.
- [18] GOBERT A P, WILSON K T. Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: a blessing in disguise [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 105: 16-27.
- [19] SALVATORI S, MARAFINI I, LAUDISI F, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: pathogenetic mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2895.
- [20] KALISPERATI P, SPANOU E, PATERAS I S, et al. Inflammation, DNA damage, *Helicobacter pylori* and gastric tumorigenesis [J]. *Front Genet*, 2017, 8: 20.
- [21] GAO M, ZHENG A, CHEN L, et al. Benzo (a) pyrene affects proliferation with reference to metabolic genes and ROS/HIF-1 α /HO-1 signaling in A549 and MCF-7 cancer cells [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(2): 741-749.
- [22] REED L, MRIZOVA I, BARTA F, et al. Cytochrome b5 impacts on cytochrome P450-mediated metabolism of benzo [a] pyrene and its DNA adduct formation: studies in hepatic cytochrome b5/P450 reductase null (HBRN) mice [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(4): 1625-1638.
- [23] LIU J, HE H, XU M, et al. Detoxification of oral exposure

- to benzo(a)pyrene by *Lactobacillus plantarum* CICC 23121 in mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2021, 65(12): e2001149.
- [24] ZHANG M, WANG F, JIANG L, et al. *Lactobacillus salivarius* REN inhibits rat oral cancer induced by 4-nitroquinoline 1-oxide [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(7): 686–694.
- [25] 张明, 孙二娜. 脱基因毒性乳酸菌的筛选 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(13): 123–125.
ZHANG M, SUN E N. Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by HPLC [J]. Food Res Dev, 2014, 35(13): 123–125.
- [26] 王晓. 利用乳杆菌脱除伏马毒素的研究 [D]. 北京: 北京林业大学; 2015.
WANG X. Study on the removal of fumonisin toxins using *Lactobacillus* [D]. Beijing: Beijing Forestry University; 2015.
- [27] 李扬扬, 张晓瑞, 郭玉蓉, 等. 乳酸菌对棒曲霉素的脱除作用 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(10): 40–44.
LI Y Y, ZHANG X R, GUO Y R, et al. Removal of patulin by lactic acid bacteria [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(10): 40–44.
- [28] 张珺雯. 双歧杆菌缓解苯并芘 (BaP) 基因毒性研究 [D]. 北京: 北京林业大学; 2017.
ZHANG J W. Study on the amelioration of Bifidobacteria on Benzo(a)pyrene (BaP) genotoxicity [D]. Beijing: Beijing Forestry University; 2017.
- [29] 葛绍阳, 张明, 侯彩云, 等. 唾液乳杆菌分泌物脱基因毒性活性物质分析 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 48–53.
GE S Y, ZHANG M, HOU C Y, et al. Analysis of antigenotoxicity substance of the secretion of *Lactobacillus salivarius* Ren [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, 16(1): 48–53.
- [30] KLOMP F, WENZEL C, DROZDZIK M, et al. Drug-drug interactions involving intestinal and hepatic CYP1A enzymes [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(12): 1201.
- [31] XIA G, ZHOU G, JIANG W, et al. Attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced carcinogenesis and tumorigenesis by omega-3 fatty acids in mice in vivo [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(7): 3781.
- [32] WANG L, XU W, MA L, et al. Detoxification of benzo[a]Pyrene primarily depends on cytochrome P450, while bioactivation involves additional oxidoreductases including 5-lipoxygenase, cyclooxygenase, and aldo-keto reductase in the liver [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2017, 31(7): e21902.
- [33] MESCHER M, HAARMANN-STEMMANN T. Modulation of CYP1A1 metabolism: from adverse health effects to chemoprevention and therapeutic options [J]. Pharmacol Ther, 2018, 187: 71–87.
- [34] WILLIS A J, INDRA R, WOHAK L E, et al. The impact of chemotherapeutic drugs on the CYP1A1-catalysed metabolism of the environmental carcinogen benzo[a]Pyrene: Effects in human colorectal HCT116 TP53(+/+), TP53(+/-) and TP53(-/-) cells [J]. Toxicology, 2018, 398/399: 1–12.
- [35] LI W, HU J, ADEBALI O, et al. Human genome-wide repair map of DNA damage caused by the cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(26): 6752–6757.

[收稿日期] 2024-09-23