



凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏镉含量、 抗氧化能力及炎症反应的影响

常绪路*, 陈永艳, 康美如, 冯军厂, 张建新
(河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 为了探究凝结芽孢杆菌 SCC-19 对镉暴露下鲤肝脏镉含量、抗氧化能力以及炎症反应的影响, 实验选取平均体重为 (34.00 ± 1.16) g 的鲤 450 尾, 随机分为 5 组 (每组 3 个重复, 每个重复 30 尾), 即对照组、0.5 mg/L Cd^{2+} 组、0.5 mg/L $\text{Cd}^{2+} + 10^7$ CFU/g 凝结芽孢杆菌组、0.5 mg/L $\text{Cd}^{2+} + 10^8$ CFU/g 凝结芽孢杆菌组以及 0.5 mg/L $\text{Cd}^{2+} + 10^9$ CFU/g 凝结芽孢杆菌组 (分别记为 DK、D、DA、DB 和 DC), 养殖 8 周。结果显示, 与镉暴露组相比, 凝结芽孢杆菌 SCC-19 能够有效降低鲤肝脏中镉含量, 显著提高金属硫蛋白 (MT) 的水平, 降低血清谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 活性。此外, 凝结芽孢杆菌组鲤肝脏总抗氧化能力 (T-AOC)、抗超氧阴离子自由基能力 (ASA) 和抑制羟自由基能力 (AHA) 水平显著高于镉暴露组, 而活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA) 和过氧化氢 (H_2O_2) 水平显著低于镉暴露组。另外, 凝结芽孢杆菌 SCC-19 可以恢复鲤肝脏因镉暴露造成的肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 (IL-1 β)、转化生长因子- β (TGF- β) 等基因的异常表达。研究表明, 凝结芽孢杆菌 SCC-19 可以减少镉暴露下鲤肝脏镉含量, 缓解氧化应激, 抑制炎症反应。研究结果有助于探索凝结芽孢杆菌做为饲料添加剂缓解水产动物镉毒性的可能性。

关键词: 鲤; 镉; 益生菌; 肝脏; 氧化损伤

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

随着工业的迅速发展, 重金属污染正成为日益严重的环境问题^[1-2]。镉是一类典型的有毒重金属, 也是引起“骨痛病”的罪魁祸首。由于工业化快速发展、农业活动、其他地质和环境变化, 大量的镉随废水及地表径流进入水生生态环境, 造成水生生物圈的污染。目前, 水体中镉污染造成的影响是全世界范围的, 淡水环境中镉离子浓度通常在 0.02~5.00 $\mu\text{g/L}$, 但是在部分镉污染地区, 水体中镉离子浓度已超过 1.00 mg/L^[3]。另外, 原料以及加工过程造成的饲料镉污染状况也不可忽视。水体和饲料中镉污染对鱼类多种器官带来毒

性损伤^[4-5], 其中肝脏是鱼类主要的解毒器官, 因此肝脏是慢性镉暴露后影响最大的器官^[6]。镉暴露可导致镉在鱼类肝脏中积累, 引起肝脏氧化损伤, 诱导肝脏产生炎症反应, 进而影响鱼类繁殖、生长、发育, 诱导鱼类发生病害, 严重时可导致其大量死亡, 这将给水产养殖业及其所带动的产业链造成重大损失^[7-8]。同时, 水体镉污染还会导致鱼体内镉含量增加甚至超标, 人类进食受污染的鱼类后会对自身健康带来损害。因此, 寻找安全有效的缓解鱼类因镉暴露引起的毒性损伤的天然物质的工作迫在眉睫, 这对促进水产养殖行业

收稿日期: 2021-02-23 修回日期: 2021-08-05

资助项目: 国家自然科学基金 (31902361); 河南省重点科技攻关项目 (202102110106)

通信作者: 常绪路 (照片), 从事水产微生物资源与应用研究, E-mail: changxulu@whu.edu.cn



健康发展和减轻食品安全的压力具有重要意义。

近年来, 使用益生菌来保护机体免受镉等重金属物质毒性损伤的研究受到广泛关注^[9-10]。益生菌作为一类能够对宿主健康产生有益作用的活性微生物, 已经在水产养殖过程中广泛应用^[11]。某些种类的益生菌因其细胞壁上含有较多的磷壁酸, 故而可以通过生物吸附的方法吸附环境中的重金属, 以达到清除污染的效果。凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 作为水产养殖业常用益生菌被证实能够在体外吸附和去除污染环境中的重金属^[12-13]。体内实验证实, 凝结芽孢杆菌可以缓解镉暴露导致的机体毒性损伤^[14-16]。本实验室前期从鲤 (*Cyprinus carpio*) 肠道内容物分离获得一株具有体外吸附镉离子的凝结芽孢杆菌 SCC-19^[16], 发现该菌株具有缓解镉暴露导致鲤毒性损伤的潜力。然而, 关于该菌株对镉暴露下鱼类肝脏毒性损伤影响的作用效果尚不明确, 相关研究亟待开展。

鲤作为我国淡水养殖主要鱼类, 现也常常被用作环境污染物的指示生物。本实验以鲤为实验对象, 建立镉暴露实验模型, 通过在基础饲料中添加不同浓度的凝结芽孢杆菌 SCC-19, 测定鲤肝脏镉含量、金属硫蛋白 (MT) 水平、血清谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 活性、肝脏总抗氧化能力 (T-AOC)、抗超氧阴离子自由基能力 (ASA) 和抑制羟自由基能力 (AHA)、活性氧 (ROS) 水平、丙二醛 (MDA) 和过氧化氢 (H₂O₂) 含

量, 以及肝脏炎症因子相关基因 (*TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *TGF- β*) 等指标, 以研究凝结芽孢杆菌 SCC-19 对镉暴露下鲤肝脏镉含量、抗氧化能力以及炎症反应的影响。实验结果将丰富现有的水产动物镉毒性防治理论, 为降低重金属对鱼类的毒性影响的研究提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

实验用凝结芽孢杆菌 SCC-19 分离自鲤肠道内容物^[16]。菌株在 37 °C 条件下 200 r/min 振荡培养 24 h。培养液在 4 °C 下, 8 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用生理盐水溶液重悬制备成菌悬液备用。

1.2 实验设计与饲料制作

以河南通威饲料有限公司鲤商业饲料作为基础饲料, 参考 Feng 等^[17]的方法分别向基础饲料表面喷洒 1 \times 10⁷、1 \times 10⁸ 和 1 \times 10⁹ CFU/g 的凝结芽孢杆菌 SCC-19, 置于室温晾干, 4 °C 储存。凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加量参考 Wang 等^[18]实验, 并经预实验确定。利用平板计数法确定制备饲料中凝结芽孢杆菌的活性和浓度^[19]。前期研究表明 0.5 mg/L 的水体 Cd²⁺对鲤的影响存在显著性差异^[20], 因此本实验选取水体 Cd²⁺浓度为 0.5 mg/L。具体实验设计见表 1。

表 1 实验设计

Tab. 1 Experiment design

分组 groups	实验设计 experimental design	
DK	基础饲料 (对照组)	basic diets (control group)
D	基础饲料 + 0.5 mg/L Cd ²⁺	basic diets + 0.5 mg/L Cd ²⁺
DA	基础饲料 + 0.5 mg/L Cd ²⁺ + 10 ⁷ CFU/g 凝结芽孢杆菌	basic diets + 0.5 mg/L Cd ²⁺ + 10 ⁷ CFU/g <i>B. coagulans</i>
DB	基础饲料 + 0.5 mg/L Cd ²⁺ + 10 ⁸ CFU/g 凝结芽孢杆菌	basic diets + 0.5 mg/L Cd ²⁺ + 10 ⁸ CFU/g <i>B. coagulans</i>
DC	基础饲料 + 0.5 mg/L Cd ²⁺ + 10 ⁹ CFU/g 凝结芽孢杆菌	basic diets + 0.5 mg/L Cd ²⁺ + 10 ⁹ CFU/g <i>B. coagulans</i>

1.3 实验鱼和养殖管理

健康幼鱼购自河南省水产技术推广站水产养殖基地。实验用鱼经袋装充氧运至河南师范大学水产学院养殖基地, 饲养容器为 300 L PVC 桶。暂养 2 周后, 按照实验设计将 450 尾平均体重为 (34.00 \pm 1.16) g 的鲤随机分为 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 30 尾鱼。养殖周期为 8 周, 期间每天按照体重的 8%~10% 表观饱食投喂 2 次, (08:00 和 18:00), 根据天气、摄食和生长情况相应调整投

喂量。养殖条件: 温度 28.0 \pm 0.3 °C, pH 7.2 \pm 0.2, 溶解氧浓度 5~6 mg/L, 氨氮浓度低于 0.05 mg/L。养殖过程中每 2 天换 1 次水, 每次换三分之二, 并补充定量的 CdCl₂·5H₂O 溶液使养殖桶中保持恒定的 Cd²⁺水平。利用膜分离技术处理养殖废水, 使 Cd²⁺浓度达到正常排放标准。

1.4 样品采集

实验结束前将实验鱼禁食 24 h, 每桶随机捞取 6 尾, 用 MS-222 麻醉后采用一次性无菌注射

器 (1 mL) 于尾静脉取血液, 4 °C 静置 6 h, 而后离心 (4 °C, 4 000 × g, 30 min) 分离收集血清, 保存在 -80 °C 超低温冰箱中备用。用无菌镊子及剪刀取出鲤肝脏, 置于无 RNA 酶离心管中, 液氮速冻, -80 °C 保存备用。每桶再取 6 尾鱼的肝脏经磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 漂洗后, 滤纸拭干, 按 1 g 肝脏样品加入 9 mL 生理盐水制备 10 % 组织匀浆, 在 4 °C 下 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液分装到 1.5 mL 离心管中, -80 °C 冻存待用。

实验过程中操作人员严格遵守河南师范大学动物实验伦理审查委员会实验动物伦理规范, 并按照河南师范大学动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

1.5 肝脏中的镉浓度测定

肝脏组织利用混合酸 (浓硝酸 : 高氯酸 = 4 : 1) 在 180 °C 条件下消解 24 h。随后利用火焰原子吸收分光光度计 (AA-7000, 岛津, 日本) 测定肝脏组织中镉含量。肝脏镉含量以组织湿重表示。

1.6 生理生化指标测定

利用南京建成生物工程技术有限公司提供的试剂盒检测肝脏中金属硫蛋白水平、血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性、肝脏中总抗氧化能力、活性氧自由基、丙二醛含量、抗超氧阴离子自由基、抑制羟自由基能力、过氧化氢等指标。具体方法参照相应的试剂盒说明书。

1.7 肝脏细胞因子检测

用 TRIzol 试剂 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 从鲤肝脏中提取总 RNA, 具体操作方法严格参照说明书执行。利用 NanoDrop 2000c 分光光度计 (Thermo, 美国) 检测 RNA 的质量与含量, 用 1.5 % 变性琼脂糖凝胶检测其完整性。随后利用 Prime Script™ RT Reagent 试剂盒 [宝生物 (大连) 有限公司] 将提取到的总 RNA 进行反转录, 合成 cDNA。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 [宝生物 (大连) 有限公司] 的说明书进行细胞因子相关基因定量 PCR 检测。细胞因子相关基因特异性引物及 β -actin 内参基因具体序列见表 2。目的基因 mRNA 表达结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[21], 以相对表达量表示。

1.8 数据的处理与分析

实验结果表示为平均值±标准差 (mean ± SD)。

表 2 定量 PCR 引物

基因 genes	引物名 primers name	序列(5'-3') sequences(5'-3')
<i>TNF-α</i>	TNF-F	GCTGTCTGCTTCACGCTCAA
	TNF-R	CCTTGGAAAGTGACATTGCTTTT
<i>IL-1β</i>	IL1-F	GAGTGAAGTGCACCAAACAAC
	IL1-R	GTCGGCACTGTCAGAGTAAAT
<i>TGF-β</i>	TGF-F	ACGCTTTATTCCCAACCAAA
	TGF-R	GAAATCCTTGCTCTGCCTCA
β -actin	ACT-F	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG
	ACT-R	CCGTCAGGCAGCTGATAGCT

用 SPSS 22.0 软件对结果进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 当 $P < 0.05$ 时认为有显著性差异, 随后利用 Duncan 氏法进行多重比较。

2 结果

2.1 凝结芽孢杆菌 SCC-19 对镉暴露下鲤肝脏镉含量的影响

研究结果显示, 与对照组相比, 镉暴露组鲤肝脏中镉积累水平显著升高 ($P < 0.05$)。然而随着饲料中凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加量的提高, 鲤肝脏中镉积累水平呈下降趋势。但是, 当凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加量为 1×10^9 CFU/g 时, 鲤肝脏中镉积累水平仍然显著高于对照组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏镉积累水平的影响

组别 groups	镉含量(μ g/g) Cd content
DK	0.059 ± 0.005 ^e
D	31.80 ± 1.03 ^d
DA	23.80 ± 1.24 ^c
DB	11.70 ± 1.02 ^b
DC	1.10 ± 0.04 ^a

注: 同一列中不同小写字母代表存在显著性差异 ($P < 0.05$); 下同。
Notes: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$); the same below.

2.2 凝结芽孢杆菌 SCC-19 对镉暴露下鲤血清生理生化指标的影响

与对照组比较, 镉暴露组鲤血清 AST 和 ALT 活性均显著升高 ($P < 0.05$); 与镉暴露组比较, 凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加组鲤血清 AST 和 ALT 活

性均显著回降 ($P < 0.05$), 并且当凝结芽孢杆菌添加量达到 1×10^9 CFU/g 时, 鲤血清 AST 和 ALT 活

性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 1)。

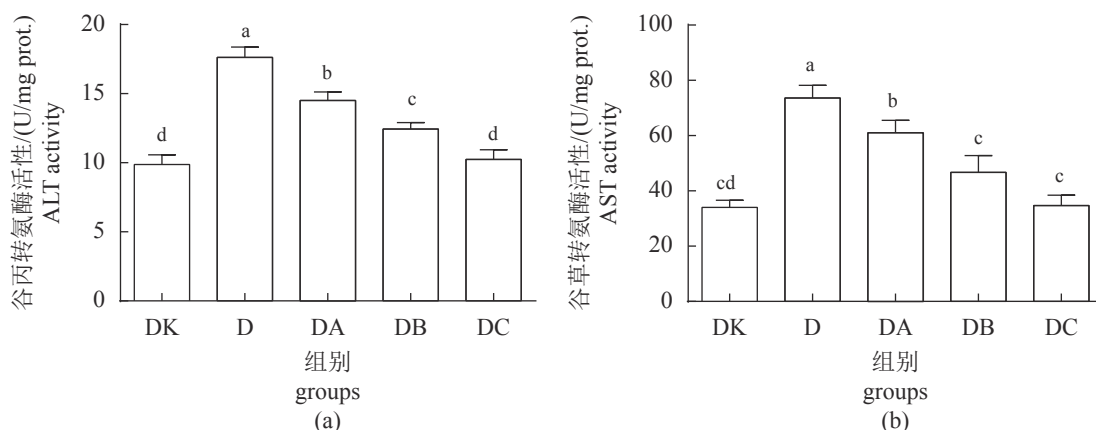


图 1 凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤血清谷丙转氨酶 (a) 和谷草转氨酶 (b) 活性的影响

柱子上的不同小写字母代表存在显著性差异 ($P < 0.05$); 下同。

Fig. 1 Effects of *B. coagulans* on the activities of ALT (a) and AST (b) in *C. carpio* exposed to Cd

Bars with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$); the same below.

2.3 凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏金属硫蛋白水平的影响

镉暴露组和凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加组鲤肝脏金属硫蛋白水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。同时, 镉暴露组和凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加组鲤肝脏金属硫蛋白水平无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

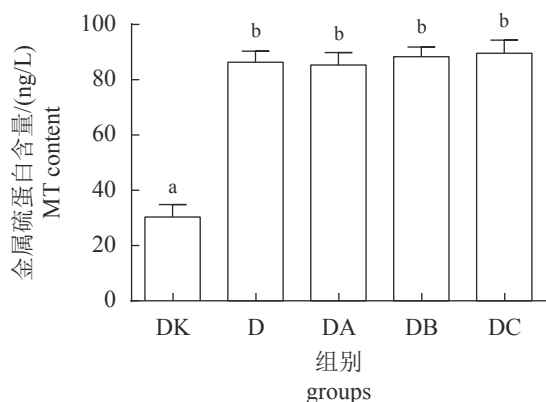


图 2 凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏金属硫蛋白水平的影响

Fig. 2 Effects of *B. coagulans* on the level of MT in the liver of *C. carpio* exposed to Cd

2.4 凝结芽孢杆菌 SCC-19 对镉暴露下鲤肝脏抗氧化能力的影响

凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏抗氧化能力影响的结果显示, 镉暴露组鲤肝脏中 ROS、MDA

和 H_2O_2 的水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与镉暴露组比较, 凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加组鲤肝脏中 ROS、MDA 和 H_2O_2 的水平均显著回降 ($P < 0.05$)。而且当凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加量为 1×10^9 CFU/g 时, 鲤肝脏 MDA 和 H_2O_2 的水平与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 镉暴露组鲤肝脏 T-AOC、ASA 和 AHA 水平显著降低 ($P < 0.05$), 随着凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加量的逐渐增多鲤肝脏 T-AOC、ASA 和 AHA 水平显著回升 ($P < 0.05$), 并且 ASA 和 AHA 水平已经达到正常水平 (图 3)。

2.5 凝结芽孢杆菌 SCC-19 对镉暴露下鲤肝脏炎症反应的影响

凝结芽孢杆菌对镉暴露下细胞因子相关基因表达有不同的影响 (表 4)。结果显示, 养殖 8 周后镉暴露组鲤肝脏抑炎细胞因子基因 $TGF-\beta$ 的表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。与镉暴露组相比, 随着凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加量逐渐增多鲤肝脏抑炎细胞因子基因 $TGF-\beta$ 的表达量显著回升 ($P < 0.05$), 但均低于对照组 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 镉暴露组鲤肝脏促炎细胞因子基因 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 表达量显著升高 ($P < 0.05$)。随着凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加量的逐渐增多, 鲤肝脏促炎细胞因子基因 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 表达量显著回降 ($P < 0.05$), 但均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

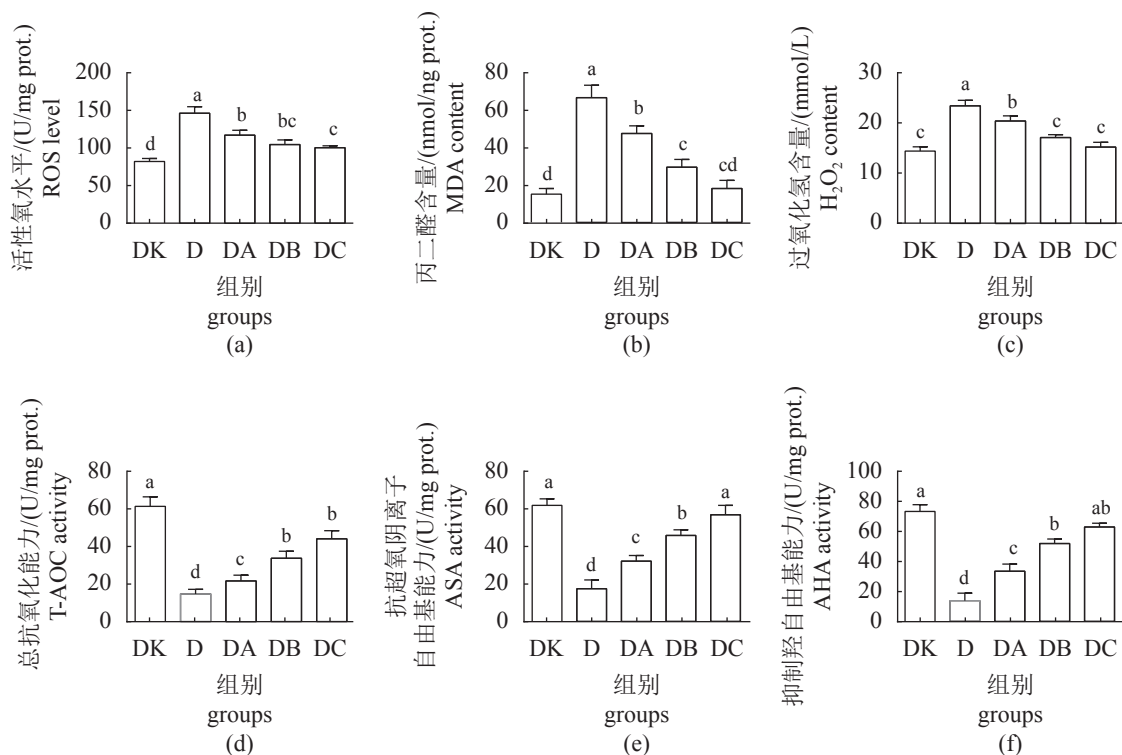


图3 凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏活性氧水平 (a)、丙二醛含量 (b)、过氧化氢含量 (c)、总抗氧化能力 (d)、抗超氧阴离子自由基能力 (e) 和抑制羟自由基能力 (f) 的影响

Fig. 3 Effect of *B. coagulans* on the ROS level (a), MDA content (b), H_2O_2 content (c), T-AOC (d), ASA (e) and AHA activities (f) of *C. carpio* exposed to Cd

表4 凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏细胞因子相关基因表达水平的影响

Tab. 4 Effect of *B. coagulans* on the expression of cytokine-related genes in *C. carpio* exposed to Cd

分组 groups	<i>IL-1β</i>	<i>TNF-α</i>	<i>TGF-β</i>
DK	1.00±0.11 ^c	1.00±0.05 ^e	1.00±0.06 ^a
D	3.16±0.12 ^a	5.01±0.02 ^a	0.20±0.03 ^b
DA	2.53±0.11 ^b	4.37±0.052 ^b	0.41±0.14 ^c
DB	1.79±0.20 ^c	3.58±0.05 ^c	0.56±0.04 ^d
DC	1.37±0.07 ^d	2.25±0.05 ^d	0.77±0.04 ^e

3 讨论

近年来, 随着工业的快速发展, 水体和饲料镉污染现象日益严重, 对水产养殖鱼类的生存和繁衍构成了危害。镉污染严重影响水产养殖业的健康发展, 给水产养殖户带来严重的经济损失。同时, 食用受镉污染的水产品会严重影响到人类的身体健康。近年来, 使用益生菌来保护机体免受镉等重金属物质毒性的研究受到广泛关注。研究发现, 凝结芽孢杆菌具有乳酸菌和芽孢杆菌的

双重特性, 并且具有体外吸附多种重金属的能力, 本研究主要探究了在饲料中添加凝结芽孢杆菌对镉暴露下鲤肝脏镉含量、抗氧化性能以及炎症反应的影响。

研究发现, 鱼类通过摄食受污染的水体或者饲料而将镉等重金属吸入到体内, 通过消化道摄入体内的镉随着血液循环被运送到多种组织器官中, 并持续积累, 其中肝脏是镉主要毒性靶器官之一^[6]。研究表明, 具有体外吸附镉离子功能的益生菌可以在消化道内结合镉离子, 从而减少其进入血液循环, 降低机体肝脏镉含量^[21]。本研究发现, 饲料中添加凝结芽孢杆菌 SCC-19 能够减少鲤肝脏中的镉含量。前期研究发现, 凝结芽孢杆菌 SCC-19 具有体外吸附镉离子的能力^[16], 因此推测, 凝结芽孢杆菌 SCC-19 随饲料进入鲤消化道后, 通过吸附减少镉进入血液循环的量, 从而减少其在肝脏中的积累。然而, 由于养殖水体中保持一定的镉浓度, 所以镉暴露组鲤鱼肝脏中镉水平难以降低到对照组水平。

金属硫蛋白 (MT) 是广泛存在于动物体内参与机体重金属解毒作用的重要蛋白。研究表明,

环境压力(包括重金属)、饥饿或细菌感染等因素可能导致包括鱼类在内的动物体内 MT 水平升高^[23]。MT 与镉等重金属专性结合,减轻重金属对机体细胞的毒性作用,是机体内重金属中毒的保护机制^[24]。本研究发现,镉暴露组与凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加组鲤肝脏 MT 水平显著高于对照组,而镉暴露组与凝结芽孢杆菌 SCC-19 添加组间 MT 含量无显著差异,表明镉暴露可诱导鲤产生较多的 MT,从而减轻镉离子对鲤的毒性损伤,而凝结芽孢杆菌 SCC-19 对 MT 表达无显著影响。

血清中 AST 和 ALT 活性是反映机体肝功能的重要指标。当鱼类肝脏组织损伤或者肝细胞通透性增高时,会导致大量的 AST 和 ALT 释放到血液中,引发血清 AST 和 ALT 活性升高^[15]。本研究中,镉暴露组鲤血清 AST 和 ALT 活性显著升高,表明镉暴露对鲤肝脏造成了毒性损伤。研究表明镉暴露主要通过破坏机体抗氧化酶活性,促进机体活性氧自由基($O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$)产生,造成机体因大量自由基堆积,进而导致组织氧化损伤^[25]。T-AOC、ROS、MDA、ASA、AHA 和 H_2O_2 等已被广泛用作氧化应激评估的标志物^[26]。其中,T-AOC 是用于衡量抗氧化能力的综合指标,可以反映机体氧化代谢的状态。ASA 和 AHA 能间接反映出 $O_2\cdot^-$ 和 $\cdot OH$ 的含量,当机体内 $O_2\cdot^-$ 和 $\cdot OH$ 的含量升高时,ASA 和 AHA 降低。结果显示,镉暴露导致鲤肝脏 T-AOC、ASA 和 AHA 水平显著低于对照组,而 ROS、MDA 和 H_2O_2 的水平均显著高于对照组。综合血清 AST 和 ALT 活性结果,本研究表明镉暴露导致鲤肝脏产生了氧化损伤。凝结芽孢杆菌的抗氧化能力可以修复各种因素对机体造成的氧化损伤^[27]。实验结果显示,饲料中添加凝结芽孢杆菌 SCC-19 能够修复鲤肝脏因镉暴露造成的 T-AOC、ASA、AHA、ROS、MDA 和 H_2O_2 等指标的异常,同时降低鲤血清 AST 和 ALT 活性,说明凝结芽孢杆菌 SCC-19 可以缓解鲤肝脏因镉暴露引起的氧化应激与氧化损伤。有研究同样表明益生菌可通过恢复抗氧化酶活性来缓解重金属暴露对机体肝脏造成的氧化损伤。例如,Yu 等^[28]研究表明,植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)通过恢复超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性来缓解铝暴露导致的莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)肝脏氧化损伤;另外,Wang 等^[9]发现蜡芽孢杆菌(*B. cereus*)可以通过恢复超氧化物

<https://www.china-fishery.cn>

歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活性缓解镉暴露导致的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)肝脏氧化损伤。

机体暴露于重金属环境会导致炎症反应的发生^[29],从而激活炎症细胞,释放出 TNF- α 、IL-1 β 和 TGF- β 等细胞因子^[30]。本研究结果显示,镉暴露组鲤肝脏抑炎细胞因子基因 TGF- β 的表达量显著低于对照组,而促炎细胞因子基因 TNF- α 和 IL-1 β 表达量显著高于对照组,表明镉暴露导致鲤肝脏发生了炎症反应。已有研究表明,包括凝结芽孢杆菌在内的多种益生菌可以减轻机体肝脏的炎症反应^[31-32]。本研究发现,凝结芽孢杆菌 SCC-19 可以恢复鲤肝脏因镉暴露造成的细胞因子基因 TNF- α 、IL-1 β 和 TGF- β 等表达量的异常,表明凝结芽孢杆菌 SCC-19 可以减轻镉暴露导致的鲤肝脏炎症反应。

4 结论

总之,本研究表明凝结芽孢杆菌 SCC-19 可以降低镉暴露条件下鲤肝脏镉含量,提高金属硫蛋白水平,降低血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性,恢复肝脏抗氧化能力,减轻炎症反应,从而改善鲤因镉暴露导致的毒性损伤。结果有助于探索凝结芽孢杆菌 SCC-19 作为一种饲料添加剂缓解水产动物镉毒性的可能性,丰富现有的鱼类重金属毒性防治理论。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Marrugo-Negrete J, Pinedo-Hernández J, Díez S. Assessment of heavy metal pollution, spatial distribution and origin in agricultural soils along the Sinú River Basin, Colombia[J]. *Environmental Research*, 2017, 154(4): 380-388.
- [2] Yang Q Q, Li Z Y, Lu X N, et al. A review of soil heavy metal pollution from industrial and agricultural regions in China: pollution and risk assessment[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 642(15): 690-700.
- [3] Ma W L, Wang L, He Y J, et al. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium[J]. *Environmental Toxicology*, 2008, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 23(3): 393-400.
- [4] Olmedo P, Pla A, Hernández A F, *et al.* Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers[J]. *Environment International*, 2013, 59: 63-72.
- [5] Yeşilbudak B, Erdem C. Cadmium accumulation in gill, liver, kidney and muscle tissues of common carp, *Cyprinus carpio*, and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, 92(5): 546-550.
- [6] Costa P M, Caeiro S, Costa M H. Multi-organ histological observations on juvenile Senegalese soles exposed to low concentrations of waterborne cadmium[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(2): 143-158.
- [7] Mehinto A C, Prucha M S, Colli-Dula R C, *et al.* Gene networks and toxicity pathways induced by acute cadmium exposure in adult largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 152: 186-194.
- [8] Zemanová V, Pavlík M, Pavlíková D. Cadmium toxicity induced contrasting patterns of concentrations of free sarcosine, specific amino acids and selected microelements in two *Noccaea* species[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): 177-186.
- [9] Wang N, Jiang M, Zhang P J, *et al.* Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and intestinal microbiota by *Bacillus cereus* in *Carassius auratus gibelio*[J]. *Chemosphere*, 2020, 245(4): 125613.
- [10] Xing S C, Huang C B, Mi J D, *et al.* *Bacillus coagulans* R11 maintained intestinal villus health and decreased intestinal injury in lead-exposed mice by regulating the intestinal microbiota and influenced the function of faecal microRNAs[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 255(10): 113139.
- [11] Wang A R, Ran C, Wang Y B, *et al.* Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 734-755.
- [12] Srinath T, Verma T, Ramteke P W, *et al.* Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria[J]. *Chemosphere*, 2002, 48(4): 427-435.
- [13] Lei D Y, Liu Z, Peng Y H, *et al.* Biosorption of copper, lead and nickel on immobilized *Bacillus coagulans* using experimental design methodologies[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(3): 1371-1384.
- [14] Jafarpour D, Shekarforoush S S, Ghaisari H R, *et al.* Impact of synbiotic diets including inulin, *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbiota of rat exposed to cadmium and mercury[J]. *Veterinary Science Development*, 2015, 5(2): 130-135.
- [15] Jafarpour D, Shekarforoush S S, Ghaisari H R, *et al.* Protective effects of synbiotic diets of *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum* and inulin against acute cadmium toxicity in rats[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 12960.
- [16] Chang X L, Chen Y Y, Feng J C, *et al.* Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and immune damage by probiotic *Bacillus coagulans* in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100678.
- [17] Feng J C, Chang X L, Zhang Y R, *et al.* Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 73-81.
- [18] Wang N, Gao C S, Zhang P J, *et al.* Effect of *Bacillus cereus* against cadmium induced hematological disturbances and immunosuppression in *Carassius auratus gibelio*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 141-148.
- [19] Amoah K, Huang Q C, Tan B P, *et al.* Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 796-808.
- [20] Chang X L, Li H, Feng J C, *et al.* Effects of cadmium exposure on the composition and diversity of the intestinal microbial community of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 92-98.
- [21] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [22] Zhai Q X, Yu L L, Li T Q, *et al.* Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure[J]. *Ant-*

- onie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(4): 501-513.
- [23] Kovarova J, Kizek R, Adam V, *et al.* Effect of cadmium chloride on metallothionein levels in carp[J]. *Sensors*, 2009, 9(6): 4789-4803.
- [24] Li X Y, Chen H N, Epstein P N. Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(1): 765-771.
- [25] Tzirogiannis K N, Panoutsopoulos G I, Demonakou M D, *et al.* Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis[J]. *Archives of Toxicology*, 2003, 77(12): 694-701.
- [26] Shekh K, Tang S, Kodzhahinchev V, *et al.* Species and life-stage specific differences in cadmium accumulation and cadmium induced oxidative stress, metallothionein and heat shock protein responses in white sturgeon and rainbow trout[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 673: 318-326.
- [27] Yu Y B, Wang C H, Wang A M, *et al.* Effects of various feeding patterns of *Bacillus coagulans* on growth performance, antioxidant response and Nrf2-Keap1 signaling pathway in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 75-83.
- [28] Yu L L, Zhai Q X, Zhu J M, *et al.* Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 143: 307-314.
- [29] Sun Y C, Zhang J, Song W T, *et al.* Vitamin E alleviates phoxim-induced toxic effects on intestinal oxidative stress, barrier function, and morphological changes in rats[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(26): 26682.
- [30] Chang X L, Wang X F, Feng J C, *et al.* Impact of chronic exposure to trichlorfon on intestinal barrier, oxidative stress, inflammatory response and intestinal microbiome in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 259: 113846.
- [31] Fu R Q, Chen D W, Tian G, *et al.* Effect of dietary supplementation of *Bacillus coagulans* or yeast hydrolysates on growth performance, antioxidant activity, cytokines and intestinal microflora of growing-finishing pigs[J]. *Animal Nutrition*, 2019, 5(4): 366-372.
- [32] Dong H L, Rowland I, Tuohy K M, *et al.* The effect of different probiotic strains on immune function *in vitro*[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2010, 69(OCE6): E399.

Effects of *Bacillus coagulans* on the cadmium content, antioxidant capacity and inflammatory response in the liver of *Cyprinus carpio* under cadmium exposure

CHANG Xulu*, CHEN Yongyan, KANG Meiru, FENG Junchang, ZHANG Jianxin

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Cadmium (Cd) is one of the heavy metal contamination sources and can be released into the aquatic environment through agriculture, industry and other human activities. In most contaminated aquatic environments, the fish are often threatened by excessive accumulation of Cd, which may cause oxidative stress, immune damage, growth inhibition and even death of fish. In addition, Cd exposure can promote the metal bioaccumulation in fish, thereby continuously affecting human health through the food chain. Thus, identifying a safe and effective natural substance against Cd toxicity is of great importance for the effective management of aquatic animal health and alleviation of the pressure on food safety. The use of probiotics to protect the human body from the toxicity of heavy metals has become a hot research topic in recent years. The purpose of this test is to explore the effects of *Bacillus coagulans* SCC-19 on the cadmium content, antioxidant capacity and inflammatory response in the liver of *Cyprinus carpio* under cadmium exposure. The 450 *C. carpio* with an average weight of (34.00±1.16 g) were selected and randomly divided into 5 groups (control group, 0.5 mg/L Cd²⁺ group, 0.5 mg/L Cd²⁺+10⁷ CFU/g *B. coagulans* group, 0.5 mg/L Cd²⁺+10⁸ CFU/g *B. coagulans* group and 0.5 mg/L Cd²⁺+10⁹ CFU/g *B. coagulans* group), with 3 replicates in each group and 30 fish in each replicate. The results indicated that compared with the cadmium exposure group, *B. coagulans* SCC-19 could effectively reduce the cadmium content in the liver of *C. carpio*, and reduce the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, and significantly increase the level of metallothionein (MT) in the liver of *C. carpio*. In addition, the total antioxidant capacity (T-AOC), anti-superoxide anion free radical activity (ASA) and anti-free radical hydroxyl ability (AHA) of in the liver of *C. carpio* in the *B. coagulans* SCC-19 groups were significantly higher than the those in control group, while the levels of reactive oxygen species (ROS), malonaldehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in the *B. coagulans* SCC-19 groups were significantly lower than those in the control group. Moreover, the results showed that *B. coagulans* SCC-19 could alleviate the genes of tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), interleukin-1 β (*IL-1 β*) and transforming growth factor- β (*TGF- β*) abnormal expression. The results of the study show that *B. coagulans* SCC-19 can reduce the cadmium content, relieve oxidative stress, and inhibit inflammation in the liver of *C. carpio* under cadmium exposure.

Key words: *Cyprinus carpio*; cadmium (Cd); probiotics; liver; oxidative damage

Corresponding author: CHANG Xulu. E-mail: changxulu@whu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31902361); the Key Technology Research Project of Henan Province (202102110106)