

# 桑椹低聚半乳糖培养的鼠李糖乳酪杆菌对 LPS 诱导 HT-29 细胞炎症的修复作用

郭晓涵<sup>1</sup>, 李倩<sup>2</sup>, 庞道睿<sup>2</sup>, 邢东旭<sup>2</sup>, 邹宇晓<sup>2</sup>, 万俊<sup>3</sup>, 黎尔纳<sup>2\*</sup>, 高静<sup>4\*</sup>

(1. 广东药科大学公共卫生学院, 广东广州 510000) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州, 510610) (3. 广东农工商职业技术学院热带农林学院, 广东广州, 510507) (4. 广东药科大学食品科学学院, 广东中山 528400)

**摘要:** 为探究桑椹低聚半乳糖 (Mulberry Galacto-Oligosaccharide, MGO) 培养的鼠李糖乳酪杆菌对肠炎细胞的修复作用, 本研究选择脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 HT-29 细胞炎症模型, 通过 CCK-8 法、酶联免疫吸附测定试验、实时荧光定量聚合酶链式反应、蛋白质免疫印迹试验进行检测。结果表明, 经  $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS 处理后, HT-29 细胞促炎因子分泌及 mRNA 水平显著升高, 诱导后模型组一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和核因子  $\kappa$ B p65 亚基 (NF- $\kappa$ B p65) 表达量和对照组相比增加了 347.76%、384.72%、245.55% 和 283.42%。添加  $10^4$  CFU/mL 的鼠李糖乳酪杆菌进行干预, 并以  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  地塞米松溶液作为阳性对照时, 能显著抑制 LPS 诱导促炎因子的表达。在 MGO 培养的鼠李糖乳酪杆菌处理下表现出最佳抗炎效果, 与模型组相比 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 iNOS 的 mRNA 表达下降了 76.39%、81.31%、63.88%、84.63% 及 49.46%, 其抗炎效果与地塞米松相当, 有效缓解 LPS 诱导的 HT-29 细胞炎症损伤。这为桑椹益生元的资源开发及肠炎疾病的临床治疗提供理论基础。

**关键词:** 桑椹低聚半乳糖; 鼠李糖乳酪杆菌; HT-29 细胞; LPS; 炎症模型

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.6.0407

## Repair Effect of *Lactcaseibacillus rhamnosus* Cultured with Mulberry Galacto-oligosaccharides on Inflammation in LPS-treated HT-29 cells

GUO Xiaohan<sup>1</sup>, LI Qian<sup>2</sup>, PANG Daorui<sup>2</sup>, XING Dongxu<sup>2</sup>, ZOU Yuxiao<sup>2</sup>, WAN Jun<sup>3</sup>, LI Erna<sup>2\*</sup>, GAO Jing<sup>4\*</sup>

(1.School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China)

(2.Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)(3.Tropical Agriculture and Forestry College, Guangdong AIB Polytechnic, Guangzhou 510507, China)(4.School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528400, China)

**Abstract:** To investigate the repair effect of *Lactcaseibacillus rhamnosus* cultured with mulberry galacto-oligosaccharide (MGO) on intestinal inflammatory cells, a lipopolysaccharide (LPS)-induced HT-29 cell inflammation model was selected in this study. Detection was performed using CCK-8 assay, enzyme-linked immunosorbent assay, real-time quantitative polymerase chain reaction, and western blotting. The results were shown that after treatment with  $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS, the secretion and mRNA levels of pro-inflammatory cytokines in HT-29 cells were significantly increased. Compared with the control group, the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and nuclear factor  $\kappa$ B p65 subunit (NF- $\kappa$ B p65) in the model group were increased by 347.76%, 384.72%, 245.55%, and 283.42%, respectively. Intervention with  $10^4$  CFU/mL of *Lactcaseibacillus rhamnosus*, using  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dexamethasone solution as a positive control, significantly inhibited the expression of pro-inflammatory factors induced by LPS. The best anti-inflammatory effect was observed under the treatment of *Lactcaseibacillus rhamnosus* cultured with MGO. Compared with the model

收稿日期: 2026-03-17; 修回日期: 2026-05-22; 接受日期: 2026-05-25

基金项目: 广东省自然科学基金-青年提升项目 (2024A1515030093); 广东省教育厅普通高校乡村振兴重点领域专项 (2020ZDZX1088); 国家蚕桑产业技术体系建设专项资助 (CARS-18-ZJ0503)

作者简介: 郭晓涵 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 18333305849@163.com

通讯作者: 黎尔纳 (1988-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品微生物, E-mail: lierna@gdaas.cn; 共同通讯作者: 高静 (1985-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物绿色分离及应用, E-mail: gaojing@gdpu.edu.cn

group, the mRNA expression levels of *IL-6*, *IL-8*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , and *iNOS* were decreased by 76.39%, 81.31%, 63.88%, 84.63%, and 49.46%, respectively. Its anti-inflammatory effect was comparable to that of dexamethasone, effectively alleviating LPS-induced inflammatory damage in HT-29 cells. This study provides a theoretical basis for the resource development of mulberry prebiotics and the clinical treatment of intestinal inflammatory diseases.

**Keywords:** mulberry galacto-oligosaccharide; *Lactocaseibacillus rhamnosus*; HT-29 cells; LPS; inflammatory model

桑椹为桑科落叶乔木桑树的成熟果实, 被中国卫生部列入首批“药食同源”目录。现代研究表明, 桑椹富含花青素、白藜芦醇及多糖等活性成分, 具有降血糖、抗氧化及作为益生元的作用<sup>[1,2]</sup>。桑椹多糖的活性与其分子量密切相关, 降低分子量可提高其生物活性。课题组前期利用定向酶解技术, 从桑椹中分离纯化得到一种新型低聚糖——桑椹低聚半乳糖 (Mulberry Galacto-Oligosaccharide, MGO)。结构表征显示, MGO 为由单一半乳糖构成的均一低聚糖, 平均分子量为 987 Da, 不含蛋白质或核苷酸, 且不具有三股螺旋结构<sup>[3]</sup>。进一步研究发现, MGO 与鼠李糖乳酪杆菌 (*Lactocaseibacillus rhamnosus*) 共培养后, 基于蛋白质组分析, 在终浓度为 4 wt.% MGO 培养条件下, 对具有黏附性质的 LPXTG 细胞壁锚定域蛋白进行了定量测定, 该蛋白表达量上调至对照组的 1.59 倍。益生菌发挥功效的关键因素在于能否在肠道快速增殖且稳定黏附定植, 形成优势菌群, 从而持续产生有益代谢产物。研究发现, 桑椹低聚糖、牛乳来源低聚糖和低聚果糖不仅可促进益生菌的增殖, 还能增强其黏附能力, 从而提高其在肠道内的定植能力。促进益生菌肠道定植能力是保障其发挥益生健康作用的关键<sup>[4-7]</sup>。

乳杆菌是肠道重要共生菌群, 具有维持菌群平衡、促进消化、调节免疫及改善代谢等多种功能<sup>[8,9]</sup>。其益生机制主要包括竞争性抑制病原菌黏附、增强上皮屏障完整性、调节黏蛋白分泌及平衡炎症因子表达等<sup>[10,11]</sup>。例如, Cai 等<sup>[12]</sup>研究发现 Levan 型果聚糖, 能够提高罗伊氏乳杆菌对结肠癌细胞系的黏附能力, 粘附率从 6% 提高到 22%, 有效增强乳杆菌益生效果。这显示益生菌与功能性低聚糖在调节肠道微生态、缓解肠道炎症方面显示出巨大潜力。本研究基于前期 MGO 与鼠李糖乳酪杆菌共培养的基础上, 进一步扩展菌株范围, 选取了干酪乳酪杆菌 Zhang (*Lactocaseibacillus casei* Zhang)、植物乳植杆菌 GDMCC 1.191 (*Lactiplantibacillus plantarum* GDMCC 1.191) 及路氏乳酪杆菌 BNCC 137725 (*Lactocaseibacillus ruminis* BNCC 137725) 作为补充菌株。干酪乳酪杆菌 Zhang 是我国首个完成全基因组测序的乳杆菌菌株, 具有良好的定植能力与免疫调节活性<sup>[13]</sup>; 植物乳植杆菌 GDMCC 1.191 广泛存在于植物及人类肠道中, 具有较强的环境适应性及黏附上皮细胞特性, 是抗炎功能研究的常用对照菌株<sup>[14]</sup>; 路氏乳酪杆菌 BNCC 137725 则作为菌株多样性的补充。通过这四种菌株进行筛选, 挑取最优菌株进行系统评估 MGO 培养对乳杆菌在炎症细胞模型中黏附能力及抗炎活性的影响。

炎症性肠病 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) 是一种慢性、复发性胃肠道疾病, 近年来全球范围内发病率呈逐年上升趋势<sup>[15]</sup>。IBD 的发展, 主要是通过破坏肠道屏障, 刺激免疫反应及改变菌群平衡来进行<sup>[16]</sup>。作为革兰氏阴性菌细胞壁上的主要抗原, 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是引起炎症的关键所在, 主要由 O-特异性侧链、核心多糖和类脂 A3 部分组成<sup>[17]</sup>, 可通过激活 TLR4/NF- $\kappa$ B 等信号通路, 引发肠道炎症与屏障功能损伤。表现为诱导促炎因子释放、肠道通透性升高、紧密连接蛋白被破坏与黏附连接蛋白的表达与分布异常等<sup>[18-20]</sup>。鉴于 LPS 可定量及重复地模拟体内炎症微环境, 被广泛应用于抗炎活性物质的筛选与机制研究<sup>[21]</sup>。在 LPS 诱导的 HT-29 和 SW-620 细胞炎症模型中, 苹果寡半乳糖能显著降低 COX-2 表达及 PGE<sub>2</sub> 生成, 通过改变 TLR4 膜分布降低细胞对 LPS 敏感性, 从而发挥肠道抗炎作用<sup>[22]</sup>。

本研究拟通过 LPS 诱导构建 HT-29 肠道上皮细胞炎症模型, 模拟肠道屏障, 通过细胞活性检测和促炎因子的表达系统评估 MGO 培养的鼠李糖乳酪杆菌的抗炎作用及其可能机制, 旨在明确 MGO 培养的鼠李糖乳酪杆菌炎症调控中的作用, 为其在肠道炎症性疾病中的应用提供理论支持, 并为炎症相关疾病的治疗策略提供新的思路 and 方向。并为桑椹资源的高值化开发及在肠道炎症性疾病中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

鼠李糖乳酪杆菌 EN-08 (*Lactocaseibacillus rhamnosus* EN-08), 保存于广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 课题组在桑椹中分离筛选鉴定; 干酪乳酪杆菌 Zhang (*Lactocaseibacillus casei* Zhang), 内蒙古农业大学王

记成老师提供; 植物乳植杆菌 GDMCC1.191 (*Lactiplantibacillus plantarum* GDMCC 1.191), 广东省微生物研究所菌种保藏中心; 路氏乳酪杆菌 BNCC137725 (*Lactobacillus reuteri* BNCC 137725), 河南省工业微生物菌种工程技术研究中心; MRS 培养基、技术琼脂粉, 广东环凯微生物科技有限公司;  $\beta$ -甘露聚糖酶 ( $50 \text{ U mg}^{-1}$ ), 上海瑞永生物科技有限公司; 人源结肠上皮细胞 HT-29, 赛百慷上海生物技术股份有限公司; McCoy's 5a 完全培养基 (10% ( $\varphi$ ) FBS)、DMEM 基础培养基, 河南省工业微生物菌种工程技术研究中心; 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS), Gibco Life Sciences 公司; 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS), 上海碧云天生物技术有限公司; 地塞米松 (Dexamethasone, Dex), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒, 深圳欣博盛生物科技有限公司; PCR 反转录及 mix 试剂盒试剂盒, 湖南艾科瑞生物工程有限公司

Vortex-Genie 2 型漩涡混匀仪, 美国 SI 公司; Spectra Max plus384 型酶标仪, 美国 MolecularDevices 公司; Centrifuge 5430 R 型高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; MS105DU 型分析天平, 美国 Mettler Toledo 公司; CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 3110 Series 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司; THZ-D 型台式恒温振荡器, 江苏省太仓市华美生化仪器厂。

## 1.2 菌株培养

### 1.2.1 菌种活化

-80 °C 保存的菌种以 1% ( $\varphi$ ) 的接种量接种于 10 mL MRS 液体培养基中, 37 °C、180 r min<sup>-1</sup> 震荡培养 18 h。

### 1.2.2 桑椹低聚半乳糖的制备。

生物酶解制备桑椹低聚半乳糖。参考 Li 等<sup>[3]</sup>方法制备 MGO, 桑椹多糖与 5 wt.%  $\beta$ -甘露聚糖酶在 50 °C 下酶解 4 h, 高温灭酶后通过离心除去沉淀 (8 000 r min<sup>-1</sup>, 15 min), 冷冻干燥。将酶解产物固体溶于蒸馏水 ( $0.1 \text{ g mL}^{-1}$ ) 中, 上样量为 5 mL, 装载到纤维素柱 DEAE-52。以蒸馏水为洗脱液, 流速为 1 min mL<sup>-1</sup>, 收集目的组分洗脱液并冷冻干燥。采用 Sephadex G-100 柱, 以蒸馏水为流动相, 上样浓度为  $0.1 \text{ g mL}^{-1}$ , 上样量为 5 mL, 流速为 1 min mL<sup>-1</sup>, 进行体积排阻色谱, 得到单一组分低聚糖, 收集并冻干处理, 通过苯酚-硫酸法测定多糖含量, 经测定 MGO 纯度约为 80%。

### 1.2.3 菌悬液制备

将 MGO 添加到 10 mL MRS 液体培养基中, 使 MGO 终浓度为 4 wt.%。向培养基中接种 1% ( $\varphi$ ) 培养 18 h 的鼠李糖乳酪杆菌菌液 (约  $1 \times 10^9 \text{ CFU/mL}$ ), 以不添加益生元的 MRS 液体培养基作为对照组, 37 °C、180 r min<sup>-1</sup> 震荡培养 18 h。培养结束后取菌液, 平板计数法测定活菌数, 4 °C、6 000  $\times g$  离心 10 min 收集菌体, 无菌 DMEM 重悬并调整至  $1 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ , 4 °C 保存备用。

## 1.3 细胞培养

HT-29 细胞使用含 1% ( $\varphi$ ) 青霉素-链霉素的 McCoy's 5a 完全培养基于 37 °C、5% ( $\varphi$ ) CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养, 每 2 d 换液, 取对数生长期细胞用于实验。

## 1.4 乳酪杆菌黏附率的测定

参考 Ziomek<sup>[23]</sup>的方法并稍作修改。HT-29 细胞以每毫升  $2 \times 10^5$  个的密度接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 37 °C、5% ( $\varphi$ ) CO<sub>2</sub> 培养 24 h 至单层贴壁。弃培养基, PBS 洗 2 次后分别加入 1 mL 不同方式培养 (是否添加 MGO 培养) 的菌悬液 ( $1 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ), 每组 4 复孔, 37 °C、5% ( $\varphi$ ) CO<sub>2</sub> 孵育 2 h。弃菌液, PBS 洗 3 次去除未黏附菌, 加入 1 mL 0.3% ( $\varphi$ ) Triton X-100/PBS 裂解 10 min。裂解液梯度稀释后涂布 MRS 平板, 37 °C 培养 48 h 计数。考察 MRS 培养基中添加 MGO 与否培养的乳酪杆菌, 黏附率的差异, 黏附结果以百分比表示:

$$D = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D——黏附率, %;

$m_0$ ——黏附前菌落数, CFU/mL;

$m_1$ ——黏附后菌落数, CFU/mL。

### 1.5 细胞活性测定

HT-29 细胞以每毫升  $5 \times 10^4$  个的密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h 贴壁后 PBS 洗 2 次。依次加入不同质量浓度 LPS 溶液 (0.50、1.00、10.00、20.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 100  $\mu\text{L}$ 、菌液 ( $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  CFU/mL) 100  $\mu\text{L}$  或不同质量浓度地塞米松溶液 (10、30、50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 100  $\mu\text{L}$ , 每浓度 4 复孔, 并设空白组 (无细胞) 及对照组 (CK)。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% ( $\varphi$ )  $\text{CO}_2$  作用 12 h 后弃上清, PBS 洗 2 次, 每孔加 100  $\mu\text{L}$  含 10% ( $\varphi$ ) CCK-8 的 DMEM 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 2 h, 按照 CCK-8 试剂盒说明, 使用酶标仪在 450 nm 波长处吸光度 A, 按下式计算细胞活力, 确定 LPS、菌液和地塞米松的适宜作用浓度, 确保不会对细胞造成不良反应或损伤。

$$C = \frac{As - Ac}{Ab - Ac} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$C$ ——细胞存活率, %;

$As$ ——实验组吸光值;

$Ab$ ——对照组吸光值;

$Ac$ ——空白组吸光值。

### 1.6 细胞炎症损伤模型构建

取对数生长期的 HT-29 细胞以每毫升  $1.0 \times 10^6$  个的密度接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 培养基, 并在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% ( $\varphi$ )  $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育 24 h, 使其贴壁。依据 1.5 实验结果, 实验组加入 1 mL 质量浓度为 1.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS 溶液, 孵育 12 h, 以诱导细胞的炎症反应。

### 1.7 细胞炎症模型乳酪杆菌黏附率的测定

选择质量浓度为 1.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS 溶液进行细胞炎症模型黏附实验。HT-29 细胞以每毫升  $2 \times 10^5$  个的密度接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% ( $\varphi$ )  $\text{CO}_2$  培养 24 h 至单层贴壁。弃培养基, PBS 洗 2 次后加入 1 mL 1.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 溶液孵育 2 h, 弃去 LPS 溶液, PBS 洗 2 次后, 分别加入 1 mL 经 MGO 处理或对照 MRS 培养的菌悬液 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL), 每组 4 复孔, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% ( $\varphi$ )  $\text{CO}_2$  孵育 2 h。弃菌液, PBS 洗 3 次去除未黏附菌, 加入 1 mL 0.3% ( $\varphi$ ) Triton X-100/PBS 裂解 10 min。裂解液梯度稀释后涂布 MRS 平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 计数。探究 MRS 培养基中添加 MGO 与否培养的乳酪杆菌在 LPS 诱导损伤后的黏附差异, 黏附结果以百分比表示。

### 1.8 细胞炎症因子含量测定

根据 1.6 构建细胞炎症损伤模型, 分别加入 1 mL 经 MGO 处理或对照 MRS 培养的菌悬液 ( $1 \times 10^4$  CFU/mL) 和地塞米松溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% ( $\varphi$ )  $\text{CO}_2$  孵育 12 h, 收集上清液, 1 000  $\times g$ 、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, -80  $^{\circ}\text{C}$  冻存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清液的中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-10 含量。

### 1.9 炎症因子基因表达量测定

细胞处理参照 1.8, 弃上清液后, 利用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒提取细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度及纯度并通过 1 wt.% 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性。利用 Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR Ver.2 试剂盒进行反转录, 测定 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、iNOS 及 IL-10 mRNA 水平。以 GAPDH 为内参进行定量分析。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法来比较目的基因相对表达量。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

| Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR |                                  |                                  |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 引物                                                      | Forward(5'-3')                   | Reverse(5'-3')                   |
| GAPDH                                                   | ACCCAGAAGACTGTGGATGG             | TTCTAGACGGCAGGTCAGGT             |
| IL6                                                     | CATGTGTGAAAGCAGCAAAG             | GGCAAGTCTCCTCATTGAATC            |
| IL8                                                     | CTGTGGTATCCAAGAATCAGTGAA         | GCATCTGGCAACCCTACAA              |
| IL-1β                                                   | GACTTGTTCTTTGAAGCTGATG           | TAGTGGTGGTCGGAGATT               |
| TNF-α                                                   | GCTGCACTTTGGAGTGAT               | GGTTCGAGAAGATGATCTGAC            |
| IL10                                                    | AAAGAAGGCATGCACAGCTC             | AAGCATGTTAGGCAGGTTGC             |
| iNOS                                                    | CGGTGCTGTATTTCTTACGAGGCGAA GAAGG | GGTGCTGCTTGTTAGGAGGTCAAGTAAAGGGC |

1.10 炎症相关蛋白表达水平测定

细胞处理参照 1.6，分组处理后收集细胞，使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解物在冰上裂解细胞 30 min。完全裂解后在 4℃、12 000 r min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min，收集上清液，得细胞的总蛋白溶液。BCA 法检测总蛋白质量浓度。调整蛋白样品上样量为每孔 15 μg。使用制胶试剂盒配置胶板，全程电压 150 V，约 60 min。利用半干法转膜，恒压 25 V，时间 14 min，快速封闭液封闭条带 15 min。4℃孵育一抗过夜。室温孵育二抗 1 h。发光成像系统显影条带，条带使用 ImageJ 软件进行灰度值分析。测定 iNOS、COX-2、IL-1β 及 NF-κB p65 蛋白的表达水平。以目的蛋白条带灰度值与内参 β-actin 蛋白条带灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

1.11 统计学分析

所有数据以均值±标准差 (Mean±SD) 表示，采用 IBM SPSS Statistics 31.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，方差齐时以 LSD-t 检验进行两两比较，方差不齐则采用 Dunnett's T3 法。以双侧 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MGO 培养不同乳酪杆菌对细胞黏附率的影响

由于不同乳酪杆菌间存在固有生物学特性差异，在添加 MGO 共培养后，其黏附、代谢与活力等生理能力也呈现显著的菌株特异性。如图 1 所示，乳酪杆菌与 MGO 共培养后，干酪乳酪杆菌与鼠李糖乳酪杆菌黏附率显著提高 (P<0.05)，黏附率分别从 11.37%和 10.07%上升至 24.9%和 27.97%，较未共培养前提高 2~3 倍。因此，挑选黏附能力最优的鼠李糖乳酪杆菌作为后续实验对象。

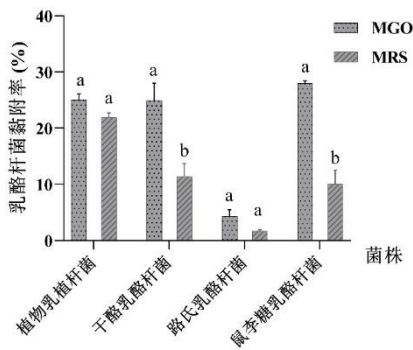


图 1 添加 MGO 后对四种乳杆菌菌株黏附率的影响

Fig.1 Effect of adding MGO on the adhesion rates of four *Lactobacillus* strains

注：不同字母表示差异显著 (P<0.05)，相同字母表示差异不显著 (P>0.05)。图 1~5 同。

## 2.2 细胞活力检测及 LPS 诱导后黏附

采用 CCK-8 法以细胞活力为指标, 筛选出 LPS、菌液及 Dex 的最佳浓度, 以建立稳定的 HT-29 细胞炎症模型。如图 2a 所示, 当 LPS 处理质量浓度在  $0.5 \sim 20 \mu\text{g mL}^{-1}$  范围内时, 细胞活力呈剂量依赖性下降。与空白对照组 (细胞活力约为 100%) 相比,  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  LPS 显著抑制细胞活力 ( $P < 0.05$ ); 当 LPS 质量浓度达到  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  时细胞活力降至 38.92% ( $P < 0.05$ )。当质量浓度在  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 效果与  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 所以 LPS 质量浓度为  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  时, 可诱导显著炎症损伤的同时保留足够活细胞, 符合体外炎症模型建立标准<sup>[24]</sup>。当菌液质量浓度在  $10^4 \sim 10^6 \text{ CFU/mL}$  时 (图 2b), MRS 组细胞活力呈先升后降趋势。其中,  $10^4 \text{ CFU/mL}$  与  $10^5 \text{ CFU/mL}$  质量浓度组的细胞活力无显著统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 且显著高于  $10^6 \text{ CFU/mL}$  组 ( $P < 0.05$ )。该结果提示该浓度区间无细胞毒性并可能通过增强屏障功能发挥保护作用, 与 Lee 等<sup>[25]</sup>报道的鼠李糖乳酪杆菌可通过调节细胞增殖与凋亡相关通路增强肠上皮屏障相印证。MGO 培养组中  $10^4 \text{ CFU/mL}$  组和  $10^5 \text{ CFU/mL}$  组细胞活力均大于 100%, 其中  $10^4 \text{ CFU/mL}$  组活力最高为 140.59%, 优于  $10^5 \sim 10^6 \text{ CFU/mL}$  高浓度组, 这可能是由于 MGO 通过改变菌株的表面电荷及自动聚集能力等生长状态, 进而影响菌株与细胞间的相互作用, 导致高浓度下细胞活力的抑制效应增强。综合评估,  $10^4 \text{ CFU/mL}$  在两种培养体系中表现出较高的细胞活力, 均高于 95%, 无明显毒性风险, 因此被选定为后续实验的最优菌液干预浓度。图 2c 中, 阳性药物 Dex 质量浓度在  $10 \sim 50 \mu\text{g mL}^{-1}$  时, 随着药物浓度的升高, 细胞活力呈先上升再下降趋势, 其中  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  组的细胞活力最高。因此, 选择  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  LPS 建立 HT-29 细胞炎症模型, 以  $10^4 \text{ CFU/mL}$  菌液进行干预, 并以  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Dex 作为阳性对照, 进行后续的细胞实验。

添加  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  LPS 构建细胞炎症模型, 发现 MRS 培养基中添加 MGO 培养的鼠李糖乳酪杆菌, 在炎症模型中的黏附率显著高于 MRS 培养组 ( $P < 0.05$ , 图 2d)。

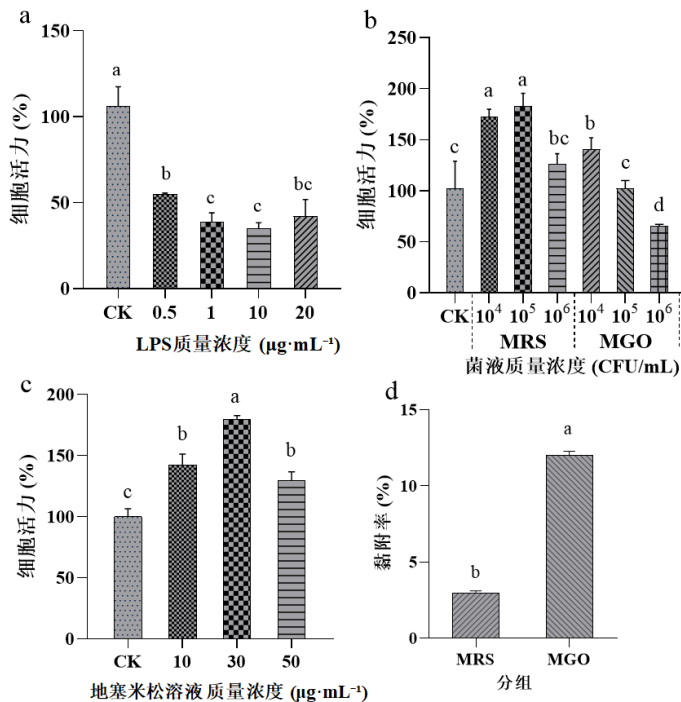


图 2 细胞活力测定图和细胞炎症模型黏附率

Fig.2 Cell viability assay graph and Cell adhesion rate in inflammation model

注: (a) 不同 LPS 质量浓度对 HT-29 细胞活力影响; (b) 不同菌液质量浓度对 HT-29 细胞活力影响; (c) 不同地塞米松质量浓度对 HT-29 细胞活力的影响; (d) 细胞炎症模型黏附率。CK: 对照组; MRS: 普通 MRS 培养组; MGO: 桑椹低聚半乳糖培养组。

## 2.3 MGO 促鼠李糖乳酪杆菌黏附后对细胞炎症因子含量的影响

ELISA 结果显示, LPS 诱导后细胞上清中促炎因子 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平较 CK 组分别升高了

59.72%、71.55%、76.69%、65.94%，差异显著 ( $P<0.05$ ，图 3a~d)，证实炎症模型建立成功。干预实验表明，MRS 组与 MGO 组均可逆转 LPS 诱导的炎症失衡：两种处理与模型组相比均显著抑制 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  分泌并上调 IL-10 含量 ( $P<0.05$ ，图 3e)。其中，MGO 组对 TNF- $\alpha$  的抑制效果最为突出，相比模型组下降了 81.58%，提示其代谢产物可能通过特异性机制增强肠道上皮炎症调控。Dex 组为阳性对照进行比较，该药属于糖皮质激素类，可通过抑制炎症信号通路核心分子的激活，发挥强效、广谱的抗炎效应，是评价新型抗炎物质活性的重要参照<sup>[26,27]</sup>。实验结果显示，MGO 组在 IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等关键指标上与 Dex 组差异不明显，展现出等效的抗炎活性。综上，MGO 培养的鼠李糖乳酪杆菌可显著缓解 LPS 诱导的 HT-29 细胞炎症损伤，其效力与临床阳性药物相当，优于普通 MRS 培养组。

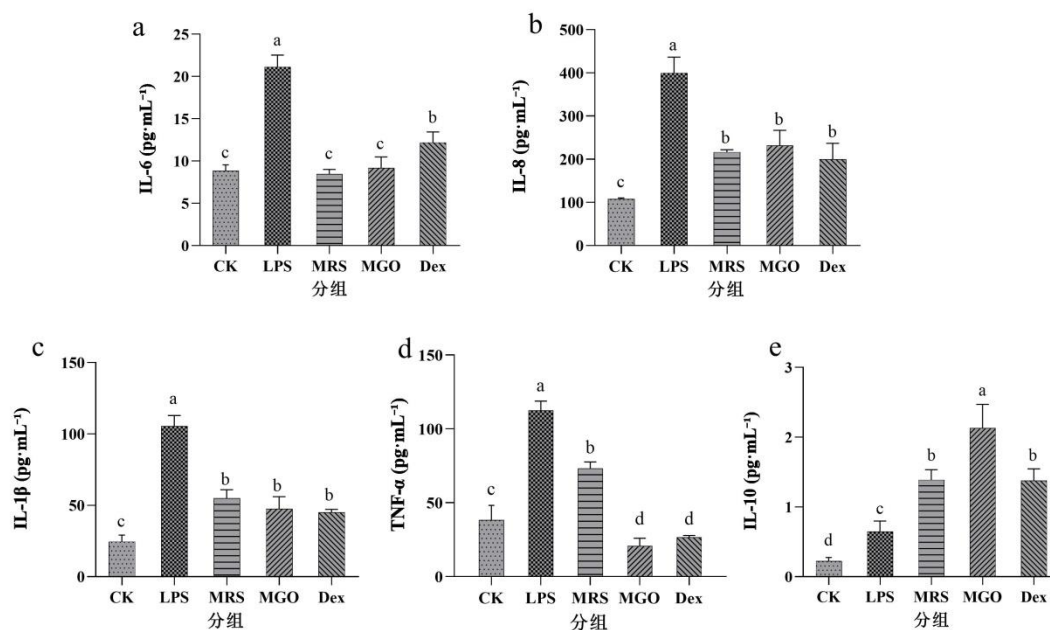


图 3 MGO 培养鼠李糖乳酪杆菌对 HT-29 细胞炎症因子含量的影响

Fig.3 Effect of MGO-cultured *L. rhamnosus* on the content of inflammatory factors in HT-29 cells

注: CK: 对照组; LPS: 模型组; MRS: 普通 MRS 培养组; MGO: 桑椹低聚半乳糖培养组; Dex: 阳性药物组。

## 2.4 MGO 促鼠李糖乳酪杆菌黏附后对相关炎症指标 mRNA 表达的影响

qPCR 结果显示，LPS 显著上调 HT-29 细胞 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 iNOS 的 mRNA 水平 ( $P<0.05$ ，图 4a~e)，与 ELISA 结果趋势一致，提示 LPS 诱导的促炎反应在转录和翻译水平上呈现同步升高。IL-6 作为 TLR4 信号的核心下游靶点，其 mRNA 在 LPS 处理后上升约 9 倍 (图 4a)，可能通过激活 JAK/STAT3 通路形成正反馈，持续放大肠道黏膜炎症反应<sup>[28]</sup>。IL-8 在 LPS 组中上调最高，较 CK 组上升约 9.2 倍 (图 4b)，推测其作为中性粒细胞趋化因子和 ROS 诱导核心介质的强烈炎症驱动作用，表明其在急性炎症反应中处于核心位置<sup>[29]</sup>。IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分别较 CK 组升高约 4 倍和 6 倍 (图 4c、d)，对应其在诱导上皮细胞凋亡、破坏紧密连接以及增强肠道通透性中的功能<sup>[30,31]</sup>。

诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 作为炎症反应的关键效应分子，可通过催化一氧化氮 (NO) 过量生成加剧肠道上皮细胞损伤，其表达水平常作为评估炎症程度的重要分子标志<sup>[32]</sup>。iNOS mRNA 升高近 5 倍 (图 4e)，进一步说明 NO 过量生成可能加剧上皮细胞损伤。相反，IL-10 是拮抗 LPS 信号的关键负调控因子，通过抑制 NF- $\kappa$ B p65 核转位及 ERK1/2 磷酸化，阻断促炎因子转录并促进黏膜修复<sup>[33]</sup>。实验中 LPS 组 IL-10 mRNA 水平与 CK 组无显著差异，呈现低表达状态。而 MGO 组及 Dex 组均可使 IL-10 的 mRNA 表达量较 LPS 组分别上调 320.77% 和 159.66%，差异显著 ( $P<0.05$ ，图 4f)。与 LPS 组相比，MGO 组可使 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 iNOS mRNA 分别下降 76.39%、63.88%、84.63% 和 49.46%，显示 MGO 可系统性抑制核心促炎基因，并且在 IL-10 上表现出独特的增强作用，IL-10 mRNA 上调高于 Dex 组的 1.6 倍，提示 MGO 不仅抑制促炎，还能强化抗炎因子的转录活性，实现双向调控。

综上, MGO 培养的鼠李糖乳酪杆菌不仅能通过抑制促炎信号通路的转录激活发挥抗炎作用, 还能特异性增强抗炎因子 *IL-10* 的基因表达, 通过抑制促炎因子、增强抗炎因子的协同模式实现更全面的炎症调控, 后续将聚焦 NF- $\kappa$ B 通路的特异性靶点验证。

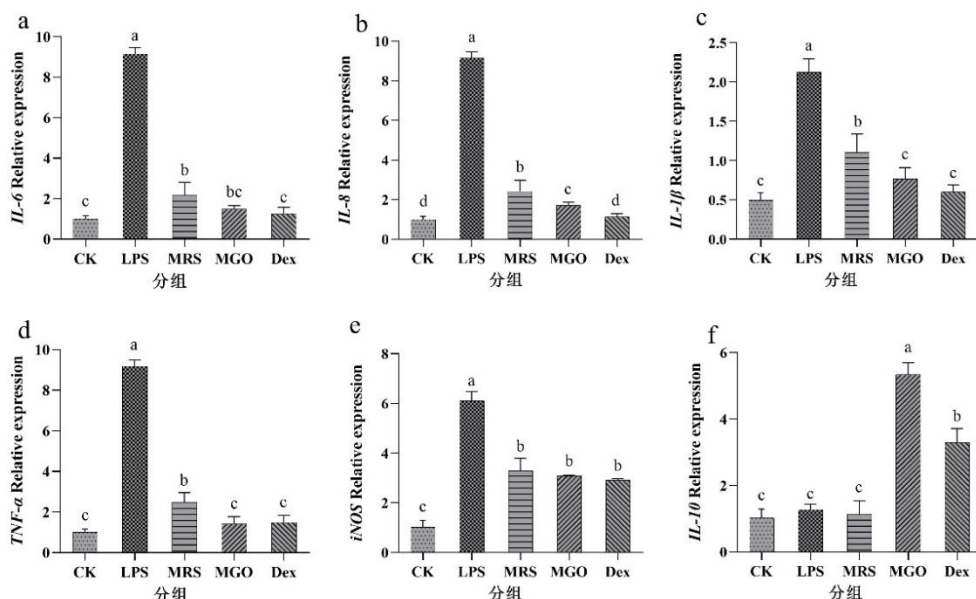


图 4 MGO 培养鼠李糖乳酪杆菌对细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

Fig.4 Effect of MGO-cultured *L. rhamnosus* on the mRNA expression of cellular inflammatory factors

注: CK: 对照组; LPS: 模型组; MRS: 普通 MRS 培养组; MGO: 桑椹低聚半乳糖培养组; Dex: 阳性药物组。

## 2.5 MGO 促鼠李糖乳酪杆菌黏附后对相关蛋白表达的影响

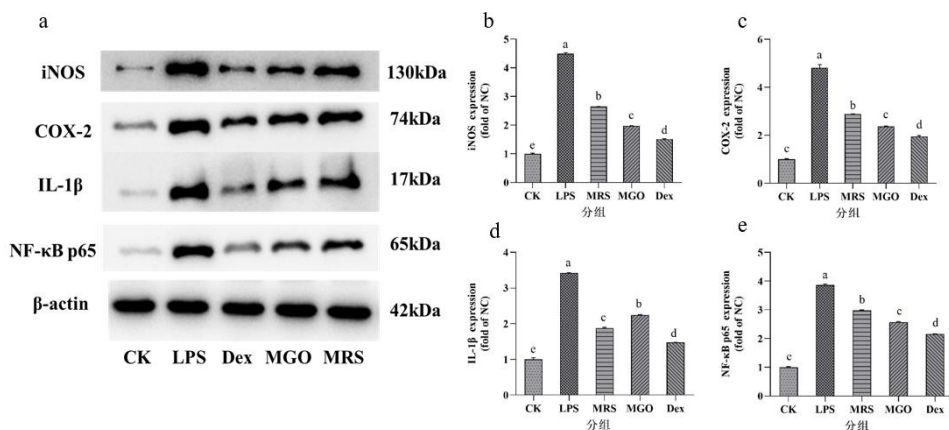


图 5 MGO 培养鼠李糖乳酪杆菌对相关蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of MGO cultivation of *L. rhamnosus* on the expression of related proteins

注: CK: 对照组; LPS: 模型组; MRS: 普通 MRS 培养组; MGO: 桑椹低聚半乳糖培养组; Dex: 阳性药物组。

蛋白免疫印迹分析结果显示, 与对照组相比, LPS 刺激显著上调了 HT-29 细胞中 iNOS、COX-2、IL-1 $\beta$  及 NF- $\kappa$ B p65 的蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ , 图 5b~e), 相对表达量分别增加了 347.76%、384.72%、245.55%和 283.42%, 结果从蛋白层面再次验证了 LPS 诱导 HT-29 细胞炎症模型的成功。上述 4 个指标涵盖 NF- $\kappa$ B 炎症信号通路关键节点, NF- $\kappa$ B p65 作为 LPS-TLR4 信号的核心转录因子, 其蛋白表达上调及核转位是启动促炎基因转录的分子开关, 表达水平直接反映通路的激活状态<sup>[34]</sup>。iNOS 和 COX-2 作为 NF- $\kappa$ B 下游的关键诱导型酶, 分别催化 NO 和前列腺素  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>) 的过量生成, 二者协同介导氧化应激、增加血管通透性增加, 是肠道炎症损伤的主要效应分子<sup>[35]</sup>。IL-1 $\beta$  作为 NF- $\kappa$ B 通路激活后释放的核心促炎细胞因子, 不仅直接破坏肠上皮紧密连接完整性, 还可通过正反馈回路进一步放大炎症级联反应<sup>[32]</sup>。四者能够系统评估 LPS 诱导的炎症激活程度及干预措施的靶向作用环节。

与LPS组相比,不同处理的鼠李糖乳酪杆菌干预均能显著抑制上述炎症蛋白的表达,其中MGO组对iNOS、COX-2、IL-1 $\beta$ 和NF- $\kappa$ B p65的抑制效果均优于MRS组。该结果表明,MGO培养处理可显著增强鼠李糖乳酪杆菌的抗炎功能,其机制可能与抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活、减少下游促炎介质产生有关。揭示了MGO培养的鼠李糖乳酪杆菌调控肠道上皮炎症的分子机制,为其作为天然功能组分应用于肠道炎症疾病的辅助治疗奠定研究基础。

### 3 结论

研究中从4株乳杆菌中筛选出高黏附率的鼠李糖乳酪杆菌,构建1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  LPS诱导的HT-29炎症模型。从蛋白、mRNA与基因层面联合证实,MGO培养的菌体能同步抑制IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及iNOS的蛋白分泌与mRNA表达,并显著上调IL-10转录。其抑制促炎基因效力与Dex无差异,而增强IL-10表达高于Dex组1.62倍,进一步验证了对LPS诱导的HT-29细胞的抗炎活性作用机制表现在抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活方面。在细胞水平明确了MGO培养的鼠李糖乳酪杆菌多维抗炎活性,与传统培养的鼠李糖乳酪杆菌相比,这种特异性作用可能源于MGO作为益生元底物可通过优化菌株代谢表型、增强黏附相关蛋白表达,提升菌体对HT-29细胞的定植能力与免疫调节活性从而增强TLR4/NF- $\kappa$ B通路的负向调控。为其作为肠道健康功能配料的开发提供了系统的体外循证基础。后续将通过动物模型进一步验证其体内的抗炎效果与安全性。

### 参考文献

- [1] 王朝宇,王婷婷,丁成新,等.桑椹花青素高抗氧化营养片剂的制备及理化性质研究[J].中国食品学报,2025,25(6):166-177.
- [2] 闫子轩,陈海洋,胡云飞,等.桑葚化学成分、药理活性及产品开发研究进展[J].中南药学,2025,23(3):690-699.
- [3] LI E, ZHU Q, PANG D, et al. Analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Mulberry Galacto-Oligosaccharide Medium by Comparative Transcriptomics and Metabolomics [J]. Front Nutr, 2022, 9: 853271.
- [4] LI E, YANG H, ZOU Y, et al. In-vitro digestion by simulated gastrointestinal juices of *Lactobacillus rhamnosus* cultured with mulberry oligosaccharides and subsequent fermentation with human fecal inocula [J]. LWT, 2018, 101: 61-68.
- [5] 覃军瑶,周东来,邹宇晓,等.桑椹低聚糖制备工艺优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2025,46(14):83-90.
- [6] NIU Z, ZOU M, BEI T, et al. Effect of fructooligosaccharides on the colonization of *Lactobacillus rhamnosus* AS 1.2466T in the gut of mice [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(2): 607-613.
- [7] MARSAUX B, VAN DEN ABBEELE P, GHYSELINCK J, et al. Synbiotic Effect of *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 and Bovine Milk-Derived Oligosaccharides on Infant Gut Microbiota [J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2268.
- [8] YANG G, JIANG Y, YANG W, et al. Effective treatment of hypertension by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing angiotensin converting enzyme inhibitory peptide [J]. Microb Cell Fact, 2015, 14: 202.
- [9] SINGH T P, MALIK R K, KATKAMWAR S G, et al. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus reuteri* LR6 in rats fed on high-cholesterol diet [J]. Int J Food Sci Nutr, 2015, 66(1): 71-75.
- [10] SANCHEZ B, DELGADO S, BLANCO-MIGUEZ A, et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease [J]. Mol Nutr Food Res, 2017, 61(1): 1600240.
- [11] CANI P D, VAN HUL M. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome [J]. Curr Opin Biotechnol, 2015, 32: 21-27.
- [12] CAI G, WU D, LI X, et al. Levan from *Bacillus amyloliquefaciens* JN4 acts as a prebiotic for enhancing the intestinal adhesion capacity of *Lactobacillus reuteri* JN101 [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 146: 482-487.
- [13] 张文羿.益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 全基因组序列的测定及比较分析[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
- [14] GUO Q, WANG G, ZHENG L, et al. A WYL domain transcription factor regulates *Lactiplantibacillus plantarum* intestinal colonization via perceiving c-di-GMP [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 2193.
- [15] JIHYE P, HEE C J. Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease across Asia [J]. Yonsei medical journal, 2021, 62(2): 199-208.
- [16] ANDERS H, HENRIK S, MORTEN F. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood [J]. Gut, 2011, 60(1): 49-54.
- [17] GORMAN A, GOLOVANOV A P. Lipopolysaccharide Structure and the Phenomenon of Low Endotoxin Recovery [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2022, 180: 289-307.

- [18] MAJID K, MOHAMMAD B, MAHDIYEH H, et al. Effects of Herbs and Derived Natural Products on Lipopolysaccharide-Induced Toxicity: A Literature Review [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2023, 2023: 7675183.
- [19] RUCHIKA B, SHIKHA S, KUMAR B S, et al. Lactic Acid Bacterial Supplementation Ameliorated the Lipopolysaccharide-Induced Gut Inflammation and Dysbiosis in Mice [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 930928.
- [20] LI C, YANG F, WU Z, et al. Coptisine alleviates intestinal barrier dysfunction and inflammation in TNBS-induced colitis rats and LPS-stimulated human intestinal Caco-2 cells [J]. *International Immunopharmacology*, 2025, 167: 115697.
- [21] LU D, YU M, CHEN L, et al. EB1089 promotes the expression of vitamin D receptor in the intestinal epithelial cell line HT-29 and reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory response [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(8): 476.
- [22] LI Y, FAN L, SUN Y, et al. An apple oligogalactan suppresses endotoxin-induced cyclooxygenase-2 expression by inhibition of LPS pathways [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 75-81.
- [23] ZIOMEK A, KLEPACKA A, SZEWCZYK K, et al. Adhesion and aggregation properties of Lactobacillaceae strains as protection ways against enteropathogenic bacteria [J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(5): 285.
- [24] NEURATH M F. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(8): 970-979.
- [25] LEE S K, YANG K M, CHEON J H, et al. [Anti-inflammatory mechanism of Lactobacillus rhamnosus GG in lipopolysaccharide-stimulated HT-29 cell] [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2012, 60(2): 86-93.
- [26] NAKAO S, HATA Y, MIURA M, et al. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced corneal neovascularization: role of nuclear factor-kappaB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(3): 1058-1065.
- [27] ROCKSEN D, LILLIEHOOK B, LARSSON R, et al. Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122(2): 249-256.
- [28] GREENHILL C J, ROSE-JOHN S, LISSILAA R, et al. IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3 [J]. *J Immunol*, 2011, 186(2): 1199-1208.
- [29] C R R, C G C, M T M, et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases [J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2014, 10(5): 593-619.
- [30] WU B, SU S, LI Y, et al. Dysregulated programmed cell death of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis: Molecular mechanisms and novel therapeutic interventions (Review) [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2025, 56(6): 152.
- [31] FRÉDÉRIC M, DANIEL W, CÉLINE D, et al. Cytokines and intestinal epithelial permeability: A systematic review [J]. *Autoimmunity reviews*, 2023, 22(6): 103331.
- [32] FARAHANI A, FARAHANI A, KASHFI K, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS): More than an inducible enzyme? Rethinking the classification of NOS isoforms [J]. *Pharmacological Research*, 2025, 216: 107781.
- [33] SANDIP B, PRADIP S, MARK W, et al. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity [J]. *Blood*, 2004, 104(4): 1100-1109.
- [34] CHOI Y, LEE M K, LIM S Y, et al. Inhibition of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1β by torilin is mediated by mitogen-activated protein kinases in microglial BV2 cells [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 156(6): 933-940.
- [35] ANIL K, GURLEEN K, PANKAJ C, et al. Novel alantolactone derivative AL-04 exhibits potential anti-inflammatory activity via modulation of iNOS, COX-2 and NF-κB [J]. *Cytokine*, 2022, 158: 155978.