

基于斑马鱼幼鱼肠炎模型探究骨桥蛋白和2'-岩藻糖基乳糖组合对肠屏障功能的协同改善作用

颜雨萌¹, 蔡然¹, 郑雨星², 黄潘钿², 胡瑞标^{1,2}, 刘斐童², 张斌^{1*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 健合集团中国创新与研究中心, 广东广州 510700)

摘要: 母乳中的骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 与 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-Fucosyllactose, 2'-FL) 是调节婴儿肠道免疫及屏障功能的关键活性成分。为了探究 OPN 与 2'-FL 组合对肠屏障功能的改善作用及协同机制, 该研究构建了豆粕饮食诱导的斑马鱼幼鱼肠炎模型, 用 OPN 和 2'-FL 单体及不同比例 (1:18~1:1, *m/m*) 组合物进行干预, 并测定了肠道中性粒细胞和杯状细胞数量、炎症和肠屏障基因表达水平及细胞因子蛋白表达水平。结果显示, OPN 与 2'-FL 组合物比例为 1:9~1:3 (*m/m*) 时, 能显著降低中性粒细胞数量至每条 13.4 个和每条 13.2 个, 并使杯状细胞数量增加至接近正常组水平 (每条 95.5 个), 同时上调紧密连接蛋白-1/3 (Claudin-1/3, CLDN1/3)、闭合小带蛋白-1 (Zonula Occludens-1, ZO-1) 和粘蛋白 5.1 (Mucin5.1, MUC5.1) 基因表达, 表达量均提高 3~4 倍。此外还使 Toll 样受体 4 (Toll-Like Receptor 4, TLR4) 和核因子 κ B (Nuclear Factor- κ B, NF- κ B) 基因表达量分别降低 47.33% 和 57.12%, 并通过调控炎症因子蛋白表达水平, 改善机体免疫稳态。综上, OPN 和 2'-FL 组合应用对改善肠炎斑马鱼肠屏障功能具有显著协同作用, 这为婴幼儿配方食品的设计优化提供了理论基础。

关键词: 骨桥蛋白; 2'-岩藻糖基乳糖; 斑马鱼幼鱼肠炎模型; 肠屏障功能

文章编号: 1673-9078(2026)06-119-128

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0447

Study on the Synergistic Effects of Osteopontin and 2'-Fucosyllactose on Intestinal Barrier Function in a Zebrafish Larval Enteritis Model

YAN Yumeng¹, CAI Ran¹, ZHENG Yuxing², HUANG Pandian², HU Ruibiao^{1,2}, LIU Feitong², ZHANG Bin^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. H&H Group, Global Research and Technology Center, Guangzhou 510700, China)

Abstract: Osteopontin (OPN) and 2'-fucosyllactose (2'-FL) in human milk are important bioactive components that regulate intestinal immunity and barrier function in infants. To investigate the synergistic effects and mechanisms of OPN and 2'-FL combinations on intestinal barrier function, a soybean meal-induced zebrafish larval enteritis model was established. The study intervened with OPN and 2'-FL monomers and combinations at different ratios (1:18~1:1, *m/m*) and measured the number of intestinal neutrophils and goblet cells, expression levels of inflammation- and barrier-related genes, and protein expression levels of key cytokines. The results demonstrated that 1:9~1:3 (*m/m*) OPN:2'-FL ratio significantly reduced the number of neutrophils to 13.4 and 13.2 per larva and increased the number of goblet cells to a level close to that in the normal group (95.5 per larva). Meanwhile,

引文格式:

颜雨萌, 蔡然, 郑雨星, 等. 基于斑马鱼幼鱼肠炎模型探究骨桥蛋白和2'-岩藻糖基乳糖组合对肠屏障功能的协同改善作用[J]. 现代食品科技, 2026, 42(6): 119-128.

YAN Yumeng, CAI Ran, ZHENG Yuxing, et al. Study on the synergistic effects of osteopontin and 2'-fucosyllactose on intestinal barrier function in a zebrafish larval enteritis model [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 119-128.

收稿日期: 2025-03-28; 修回日期: 2025-05-18; 接受日期: 2025-05-25

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2024A1515011121)

作者简介: 颜雨萌 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性碳水化合物, E-mail: Yanyim2001@163.com

通讯作者: 张斌 (1985-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 母婴微生态技术, E-mail: zhangb@scut.edu.cn

the gene expression levels of claudin-1/3, zonula occludens-1, and mucin 5.1 were upregulated by 3~4 fold. Additionally, the gene expression levels of toll-like receptor 4 and nuclear factor- κ B were reduced by 47.33% and 57.12%, respectively. The immune homeostasis of the organism was improved by regulating the inflammatory cytokine protein expression levels. In summary, the combination of OPN and 2'-FL significantly synergistically improve intestinal barrier function in zebrafish larvae with enteritis, providing a theoretical basis for the optimization of infant formula design.

Key words: osteopontin; 2'-fucosyllactose; zebrafish larval enteritis model; intestinal barrier function

母乳能精准适配生命早期不同阶段的营养需求，其中特有的生物活性成分对肠屏障和免疫系统发育均具有关键作用^[1]。骨桥蛋白（Osteopontin, OPN）是母乳中含量丰富的功能蛋白，对生命早期的免疫平衡、肠道健康和神经系统发育具有积极作用^[2]。另一个值得关注的母乳成分——母乳低聚糖（Human Milk Oligosaccharides, HMOs），展现出促进益生菌增殖、发挥抗炎效应、调节免疫功能、维护肠屏障完整性以及促进大脑发育等多重功效^[3]。目前，OPN 和 2'-FL 单体对生命早期肠道健康的益处已得到众多临床前研究和临床实验的证明^[4,5]。

肠道承担着维持机体免疫稳态的核心功能，其主要由上皮细胞层、粘膜免疫系统、肠道微生物及细胞分泌物组成^[6,7]。当屏障完整性受损时，有害物质会进入血液和组织，诱发多种肠道疾病。在婴儿生命早期，肠道屏障和免疫系统尚未发育完全。这种发育滞后性使婴儿易受病原体、环境变化和饮食调整等因素影响，导致屏障功能受损及微生物异常定植^[8]。大量研究表明，母乳喂养的婴儿其肠屏障功能发育更加完善，肠道疾病的易感性和患病率也更低，其中 OPN 和 HMOs 发挥着重要作用^[9,10]。在临床试验中，为婴儿提供添加了 OPN 的配方奶粉，能有效减少血清中炎症细胞因子的表达^[11]。另一方面，HMOs 中的代表性成分 2'-岩藻糖基乳糖（2'-Fucosyllactose, 2'-FL）被证实能显著促进双歧杆菌的生长，并相应地减少大肠杆菌的比例^[12]。

在前期的体外实验中，利用 Caco-2/HT-29 细胞共培养模型研究发现，OPN 和 2'-FL 发酵代谢产物能够显著增强肠屏障功能、降低炎症因子水平，且二者以 1:36~1:3（*m/m*）比例组合时效果最佳^[13]。基于此，该研究采用豆粕饮食诱导构建了斑马鱼幼鱼肠炎模型，进一步探究 OPN 和 2'-FL 组合物在体内模型中的作用。通过对肠道中性细胞粒和杯状细胞的观察定量、组织病理学分析、炎症和肠屏障相关基因的表达水平以及关键细胞因子的蛋白表达水平，系统地评估母乳活性成分的协同应用对肠道炎症的缓解效果和对肠道屏障完整性恢复的作用，旨在为 OPN 和 HMOs 在婴幼儿功能食品中的配方设计及应用优化提供科学的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

2'-FL（纯度 97.2%），丹麦 Glycom A/S 公司；OPN（纯度 >95%），丹麦 Arla 公司；EZ-10 总 RNA 小量提取试剂盒、MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix、斑马鱼白细胞介素-1 β （Interleukin-1 β , IL-1 β ）、白细胞介素-8（Interleukin-8, IL-8）、肿瘤坏死因子- α （Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α ）和白细胞介素-10（Interleukin-10, IL-10）ELISA 试剂盒，上海生工生物工程有限公司；ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix，南京诺唯赞生物科技有限公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

NanoDrop 2000C 超微量分光光度计，美国 Thermo Fisher 公司；Applied Biosystems 2720 PCR 热循环仪，美国 Thermo Fisher 公司；1000 Touch 梯度 PCR 系统，美国 Bio-Rad 公司；CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 系统，美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物与饲料

表 1 斑马鱼鱼粉饲料和豆粕饲料配方
Table 1 Feed formulation of fish meal and soybean meal for zebrafish larvea

成分	鱼粉饲料/(g·kg ⁻¹)	豆粕饲料/(g·kg ⁻¹)
鱼粉	555	250
豆粕	0	500
小麦粉	255	110
玉米淀粉	50	50
鱼油	30	60
矿物质 / 维生素预混料	20	20
纤维素	90	10
总质量	1 000	1 000

注：FM 中含有 45.84% 粗蛋白和 8.21% 粗脂肪，SBM 中含有 44.16% 粗蛋白和 8.63% 粗脂肪。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

引物名称	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')
<i>actb</i>	GCCAACAGAGAGAAGATGACACAG	CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
<i>il1b</i>	CATTTGCAGGCCGTCACA	GGACATGCTGAAGCGCACTT
<i>il8</i>	TGTGTTATTGTTTTCCTGGCATTTC	GCGACAGCGTGGATCTACAG
<i>il10</i>	CACTGAACGAAAGTTTGCCTTAAC	TGGAAATGCATCTGGCTTTG
<i>tnfa</i>	GCGCTTTTCTGAATCCTACG	TGCCCAGTCTGTCTCCTTCT
<i>tgfb</i>	CAAACCAGCAGAGCACGGATA	CGGTGCCAACAGCTCGTCTC
<i>mmp9</i>	CATTAAAGATGCCCTGATGTATCCC	AGTGGTGGTCCGTGGTTGAG
<i>tlr4ba</i>	TGCAAAGGCTTGTTCTTG TG	TGAAGGTGGTCATGAATGGA
<i>nfkb</i>	TTTCCCCACTGATGTCCAC	GCTTTGGTTCGCTACAGTCG
<i>cldn1</i>	CTGCTGTATCTGTGGGAGTGAA	TAATCAGGAGAACAGGCGAAG
<i>cldn3c</i>	GAATGGGCTATTCTGCTCCA	TCACCCTTTTCATCCGTCTT
<i>tjp1a</i>	CCAGGCAGTGAGTACAGTATG	ACCTCATCGTTCAGGGTTTC
<i>muc5.1</i>	TGGCAACTTGGCTGATGATA	TCGTCACACGGACCAGTAGA

该研究选用两种斑马鱼品系：一种为野生型 AB 品系，另一种为携带中性粒细胞绿色荧光蛋白标记的 MPX 品系，标记基因为 *Tg (mpx:GFP)*，由杭州环特生物科技股份有限公司提供。实验鱼饲养于 28 ℃ 的循环水系统中，每日 14 h 光照期与 10 h 黑暗期交替循环，其他饲养条件均遵循相关标准，所有动物实验及其管理流程均已经过实验动物伦理审查委员会（IACUC）的正式批准（伦理审查号：IACUC-2023-7045-01）。

根据 Solis 等^[14]的方法，结合《中国饲料成分及营养价值表》（第 33 版）^[15]和《鱼类与甲壳类营养需要》^[16]设计并配制斑马鱼饲料。鱼粉饲料（Fish Meal, FM）和豆粕饲料（Soybean Meal, SBM）的配方如表 1 所示，所有饲料均由广东联鲲集团生产。

1.2.2 动物实验方案以及斑马鱼幼鱼肠炎模型评价

实验采用 E3 培养液孵化斑马鱼受精卵，于受精（dpf）后 3 d 开始饲喂开口饲料。在 5 dpf 时，将斑马鱼幼鱼随机分为 6 组（*n*=30/组），饲养于 50 mL 烧杯或多孔板中，其中含 20 mL 培养液。各组饲喂方案如下：正常对照组（FM 组）与肠炎模型组（SBM 组）在 5~9 dpf 期间，分别每日早晚饲喂 FM（1 mg·mL⁻¹）和 SBM（1 mg·mL⁻¹），每次饲喂后 30 min 更换为无饲料培养液；2'-FL 组（0.1 g·L⁻¹）在 5~8 dpf 期间，饲喂 SBM 后 30 min 更换为含 0.1 g·L⁻¹ 2'-FL 的干预培养液；OPN 组（0.01 和 0.1 g·L⁻¹）在 5~8 dpf 期间，饲喂 SBM 后 30 min 更换为含 0.01 g·L⁻¹ 或 0.1 g·L⁻¹ OPN 的干预培养液；OPN:2'-FL 组合物则配制总质量浓度为 0.1 g·L⁻¹，比例分别为 1:18、1:9、1:3、1:1（*m/m*）的 OPN 与 2'-FL 混合干预培养液，在 5~8 dpf 期间饲喂

SBM 后 30 min 更换为相应比例的组合干预液。所有组别均在 9 dpf 时取样进行分析。

参考 Hedrera 等^[17]的方法，以斑马鱼肠道中性粒细胞的募集情况和杯状细胞数量的变化作为评价指标。当斑马鱼幼鱼肠道中的中性粒细胞数量增加且杯状细胞数量减少时，即判定肠炎模型构建成功，可用于后续实验分析。

1.2.3 中性粒细胞荧光成像

该实验采用 *Tg (mpx:GFP)* 斑马鱼。干预结束后，将幼鱼用无菌水清洗 2~3 次，随后麻醉，并使用 2%（*m/V*）甲基纤维素溶液包埋固定。荧光显微镜下观察到的绿色荧光为中性粒细胞，利用 ImageJ 软件统计数量，每组随机分析 10 尾幼鱼。

1.2.4 阿尔新蓝染色

该实验采用野生型 AB 品系斑马鱼。用 4% 多聚甲醛固定幼鱼，在 4 ℃ 下过夜后，用 1% 盐酸乙醇冲洗，随后使用阿尔新蓝染液进行全鱼染色（室温 2 h，4 ℃ 过夜）。染色后，通过酸性乙醇进行脱色处理，再用 2% 甲基纤维素固定鱼体。在光学显微镜下观察，并利用 ImageJ 软件统计染色阳性细胞数量，每组随机选取 10 尾幼鱼进行分析。

1.2.5 苏木素-伊红（Hematoxylin and Eosin, H&E）染色

用 4 wt.% 多聚甲醛固定幼鱼 24 h，然后进行脱水和透明化处理，随后依次经过石蜡包埋、切片、烘片和脱蜡操作。使用 H&E 染色，之后再次进行脱水透明处理，最终以中性树脂封固剂实现玻片永久保存。

1.2.6 实时荧光定量PCR (Quantitative Real-Time PCR, qPCR)

使用EZ-10总RNA提取试剂盒,在RNase-free条件下提取斑马鱼全鱼的RNA。通过超微量分光光度计进行浓度测定后,使用逆转录试剂盒将其转录为cDNA,按照说明书操作。qPCR采用SYBR Green检测体系,反应混合液(总体积20 μL)于冰浴下配制,各组分配比如下:2 $\times$ 预混液10 μL (ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix)、正反向引物各0.4 μL 、cDNA模板2 μL ,不足体积以RNase-free水补足至20 μL 。热循环程序设定为:初始变性阶段95 $^{\circ}\text{C}$ 维持30 s,后续循环扩增阶段包含95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s及72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s三个步骤,共进行40个循环。qPCR引物序列见表2,数据标准化处理选取 actb 基因($\beta\text{-actin}$)作为内参照,基于比较阈值循环数法($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)进行目的基因表达量相对定量分析。

1.2.7 酶联免疫吸附法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

按照ELISA试剂盒说明书,对斑马鱼幼鱼IL-1 β 、IL-8、TNF- α 和IL-10的分泌量进行测定。

1.2.8 数据统计与分析

实验数据以均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)的形式展示,确保每个实验至少包含三个平行重复。图像绘制使用GraphPad Prism (version 8.0.2),数据统计分析采用IBM SPSS Statistics (version 19.0)。显著性分析通过单因素方差分析(ANOVA),辅以Turkey多重比较检验,不同的小写字母被用来标示各组数据间存在的统计学显著差异($P<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 豆粕饮食诱导斑马鱼幼鱼肠炎模型的建立与评价

豆粕作为高蛋白资源,被视为鱼类饲料中鱼粉的潜在替代物,但其含有的抗营养因子在过量摄入时可诱发鱼类肠道炎症,甚至导致全身性炎症反应及组织损伤^[18,19]。传统斑马鱼肠炎模型的构建多采用化学诱导剂,但这些方法常伴随非特异性全身炎症反应,掩盖了肠道局部的炎症特征^[20,21]。相比之下,豆粕饮食诱导的肠炎模型更贴近食源性刺激,能准确反映饮食因素对肠道的影[22]。因此,该研究采用豆粕饮食诱导斑马鱼幼鱼(4~8 dpf)建立食源性肠炎模型,并于9 dpf时通过荧光显微镜成像及阿尔新蓝染色技术观察肠道中性粒细胞与杯状细胞(图1)。

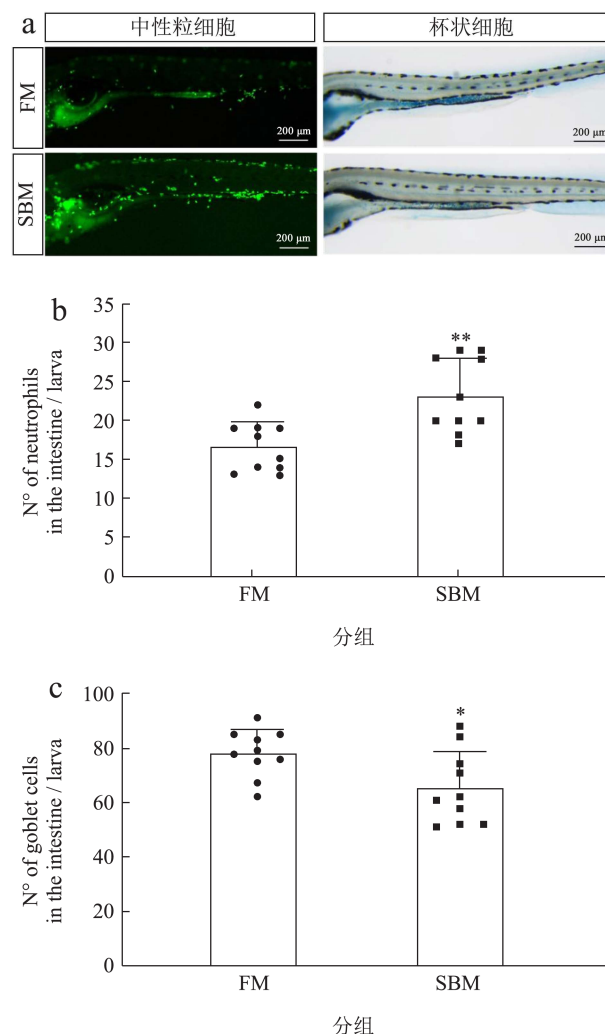


图1 斑马鱼幼鱼肠道中性粒细胞荧光成像和杯状细胞染色图像,中性粒细胞数量和杯状细胞数量

Fig.1 Fluorescence imaging of intestinal neutrophils and goblet cell staining images, neutrophil count and goblet cell count of zebrafish larva

注:(a)中性粒细胞荧光成像和杯状细胞染色图像,(b)中性粒细胞数量,(c)杯状细胞数量。*表示与正常对照组相比具有显著性差异,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

中性粒细胞作为先天性免疫系统的关键执行者,其向肠道的特异性迁移与浸润是肠道炎症早期阶段的重要特征^[23]。肠道黏膜屏障的构建离不开杯状细胞及其产生的粘蛋白,这些成分构成了屏障的基石^[24]。结果显示,相较于FM组,SBM组斑马鱼肠道中性粒细胞数量显著上升至每条23.20个,表明豆粕饮食诱发了肠道炎症反应。同时,SBM组斑马鱼肠道杯状细胞数量显著减少至每条65.30个,阿尔新蓝染色区域缩小,提示豆粕饮食可能改变肠上皮细胞构成,抑制粘液分泌,进而损害肠道黏膜屏障功能。既往研究已指出,豆粕饮食能激活鱼类肠黏膜免疫细胞,导致上皮

细胞凋亡及肠道组织形态变化^[25,26]。由此说明, 该研究利用豆粕饮食成功构建了斑马鱼幼鱼食源性肠炎模型, 可用于后续研究。

2.2 OPN和2'-FL组合物对肠炎斑马鱼肠道中性粒细胞的影响

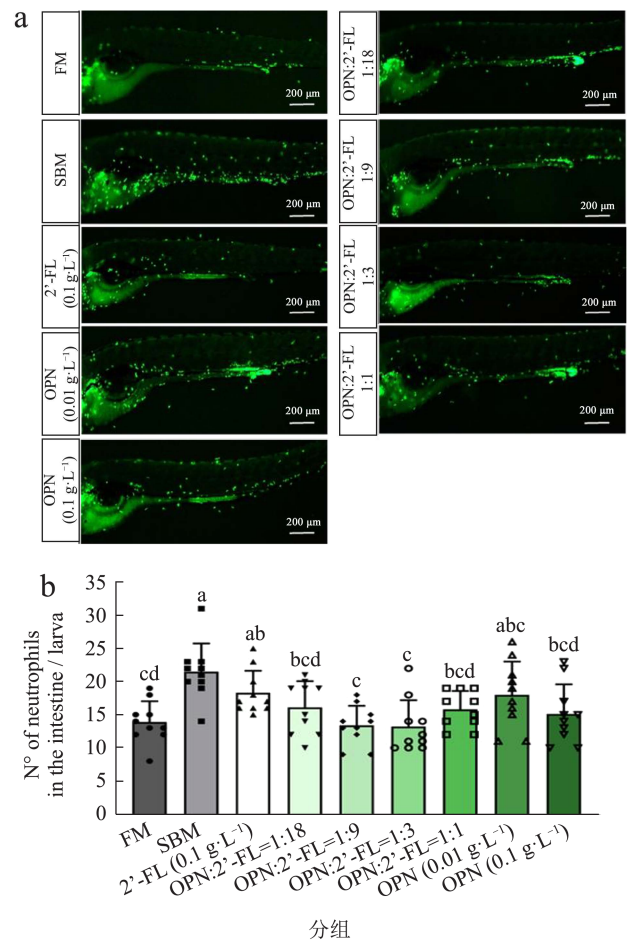


图2 斑马鱼幼鱼肠道中性粒细胞成像和中性粒细胞数量

Fig.2 Enteric neutrophil imaging and neutrophil count of zebrafish larva

注: (a) 中性粒细胞成像, (b) 中性粒细胞数量。不同小写字母表示数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

本部分实验通过观察肠道中性粒细胞的动态变化, 来探究 OPN 和 2'-FL 单体及其不同比例组合物对食源性肠炎斑马鱼幼鱼肠道屏障功能的影响 (图2)。结果显示, 相较于 FM 组, SBM 组斑马鱼中性粒细胞显著激活且浸润增加至每条 21.50 个, 证实了豆粕饮食诱导的炎症反应。而与 SBM 组相比, 不同比例的组合物干预均在不同程度上抑制了中性粒细胞向肠道炎症部位的迁移和聚集, 而 OPN:2'-FL=1:9 和 1:3 (m/m) 的组合物表现出最为显著的抑制作用, 中性粒细胞数量分别减少至每条 13.4 个和每条 13.2 个, 与 FM 组水平 (每条 13.90 个) 相当。

此外, 在相同干预质量浓度 ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 下, OPN:2'-FL 的组合物 (1:18~1:1, m/m) 相较于 2'-FL 单体具有更好的抗炎效应, 表现为前者的中性粒细胞数量更低。值得注意的是, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 OPN:2'-FL=1:9 (m/m) 组合物中 OPN 质量浓度为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 而该组别的中性粒细胞数量要显著低于质量浓度同为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 OPN 单体组, 这提示 OPN 和 2'-FL 之间存在协同作用。另外对于 OPN 单体组来说, 高质量浓度 ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组的中性粒细胞数量少于低质量浓度 ($0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 说明存在一定的剂量效应。综上, 相较于单一干预, 在抑制肠炎斑马鱼幼鱼的先天免疫细胞浸润方面, OPN 与 2'-FL 的联合使用表现出显著的协同效果, 其中比例为 1:9~1:3 (m/m) 时效果最佳。

2.3 OPN和2'-FL组合物对肠炎斑马鱼肠道杯状细胞的影响

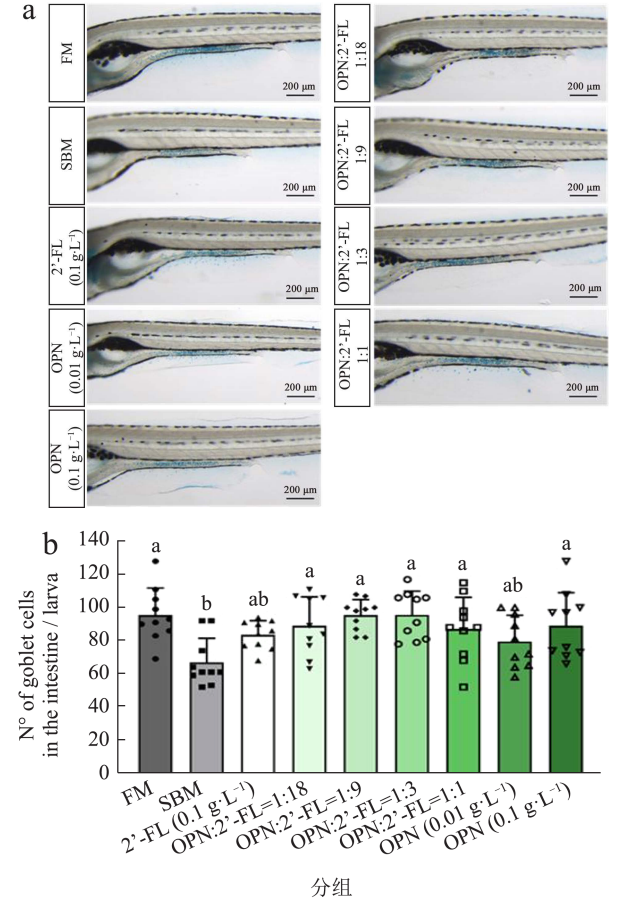


图3 斑马鱼幼鱼杯状细胞阿尔新蓝染色图像和杯状细胞数量

Fig.3 Alcian blue staining image of goblet cells and goblet cell number of zebrafish larva

注: (a) 阿尔新蓝染色图像, (b) 杯状细胞数量。不同小写字母表示数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

斑马鱼在调控上皮细胞向杯状细胞分化的机制及基因表达上与哺乳动物具有高度的保守性^[27], 且其

黏蛋白分泌等关键功能也显示出显著的同源性^[28]。这说明,杯状细胞在斑马鱼肠屏障中的重要性与哺乳动物中的角色极其相似。如图3所示,相较于FM组,SBM组斑马鱼肠道中的杯状细胞数量大幅下降至每条66.90个,这一结果暗示豆粕饮食对肠上皮细胞的完整性造成了损害,而不同比例的OPN和2'-FL组合物干预能显著逆转该现象。尽管OPN和2'-FL组合物干预在相同质量浓度($0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)下相较于2'-FL单体组展现出协同效应,各组杯状细胞数量增加至与FM组接近的水平(每条95.50个),但组间无显著性差异。这一结果表明,不同比例(1:18~1:1, m/m) OPN和2'-FL组合物干预能显著恢复食源性肠炎斑马鱼幼鱼肠上皮细胞向杯状细胞的分化,增加杯状细胞的数量,改善肠屏障功能。然而,OPN、2'-FL单独使用或不同比例组合的效果在统计学上无显著差异。

2.4 OPN和2'-FL组合物对肠炎斑马鱼肠道组织形态的影响

为探究豆粕饮食以及OPN和2'-FL组合物干预对斑马鱼肠道组织形态的影响,本部分实验通过H&E染色进行肠道组织病理学分析。图4结果显示,FM组斑马鱼前肠肠腔结构完整,固有层边界清晰,肠褶皱数量丰富且高度适中,呈现正常的肠道组织形态。相比之下,SBM组斑马鱼肠道组织发生显著的形态学改变,包括肠褶皱数量锐减、粘膜层局部变薄、肠道外观趋于光滑以及肠上皮细胞核排列紊乱等,这些观察结果均指向肠道组织结构的严重损伤以及肠上皮屏障的炎症性破坏^[20,29]。

经OPN和2'-FL单体以及不同比例组合物干预后,斑马鱼的肠道组织形态呈现不同程度的恢复趋势。与SBM组相比,干预组在肠道组织层面展现出了多项积极变化:肠褶皱数量明显提升,其高度增加或宽度拓宽,肠上皮细胞的细胞核排列变得规整,同时粘膜层的部分区域出现了增厚现象。不同比例的OPN和2'-FL组合物干预相较于单体组表现协同增效,其中比例以1:9~1:3 (m/m)效果最佳。这一结果与前文中OPN和2'-FL组合物干预对杯状细胞数量的影响趋势一致,进一步验证了OPN与2'-FL组合物在保护与改善食源性肠炎斑马鱼幼鱼肠道组织中的重要作用。Molinari等^[30]曾用二肽膳食干预豆粕诱导的斑马鱼肠炎模型,结果显示斑马鱼肠褶皱绒毛形态恢复完整,且长宽比显著增加。另一项关于益生菌的研究也发现,给高糖饮食诱导的斑马鱼肠炎模型饲喂乳双歧杆菌后,斑马鱼肠道组织形态恢复至与正常健康组相似的水平^[31]。综上,OPN和2'-FL组合物干预能有效恢复食源性肠炎斑马鱼幼鱼的肠道组织形态,保护肠道粘膜屏障,并缓解肠炎症状,其中OPN:2'-FL=1:9~1:3 (m/m)时效果最好。

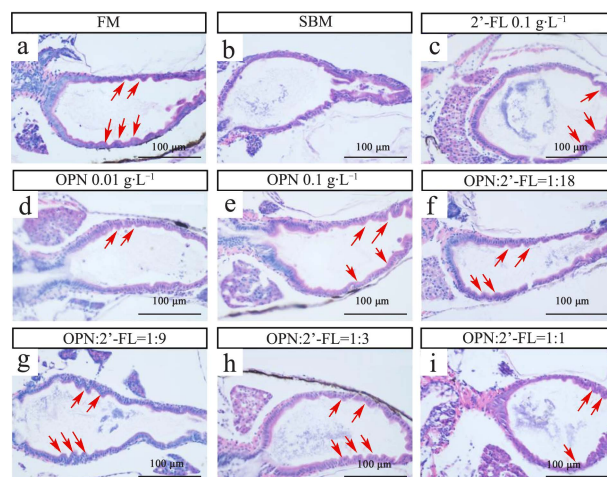


图4 斑马鱼幼鱼肠道组织形态

Fig.4 Intestinal morphology of zebrafish larva

2.5 OPN和2'-FL组合物对肠炎斑马鱼炎症相关基因表达的影响

本部分实验测定了各组斑马鱼中炎症因子(IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-10)、基质金属蛋白酶9(Matrix Metalloproteinase-9, MMP-9)、转化生长因子(Transforming Growth Factor, TGF- β),以及炎症信号通路相关因子Toll样受体4(Toll-Like Receptor 4, TLR4)和核因子 κ B(Nuclear Factor- κ B, NF- κ B)的基因(*il1b*、*il8*、*tnfa*、*il10*、*mmp9*、*tgfb*、*tlr4ba*、*nfkb*)表达水平(图5)。这些炎症相关因子在斑马鱼与人类中均为直系同源基因,功能高度保守^[32]。结果表明,豆粕饮食显著上调了斑马鱼体内IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、TGF- β 、TLR4和NF- κ B的mRNA表达水平,分别上调了2.05、2.50、2.07、2.03、2.19和2.41倍。同时,豆粕饮食下调了抗炎因子IL-10和MMP-9的mRNA表达水平。这说明斑马鱼的免疫稳态被破坏,体内炎症水平升高。相比之下,OPN、2'-FL单体及不同比例的组合物干预均能够抑制这些炎症相关基因的异常表达,使其趋于正常水平,展现出显著的免疫调节作用。对于IL-1 β 和IL-8,OPN:2'-FL=1:9 (m/m)组的mRNA表达水平低于其他比例的干预组;而对于TNF- α 和NF- κ B,OPN:2'-FL=1:9~1:1(m/m)组的表达抑制效果更好,且相较于单体组表现出明显的协同作用。对于所有干预组中表达均显著下调的TGF- β 、TLR4和显著上调的IL-10,组间不存在统计学上的显著差异。而对于表达上调的MMP-9,组合物比例为1:18~1:3 (m/m)时,效果显著好于OPN单体组和OPN:2'-FL=1:1(m/m)组,表明这两者组合能增强OPN对MMP-9表达的上调作用。上述结果提示,OPN和2'-FL组合物干预能减轻食源性肠炎斑马鱼幼鱼的过度免疫反应,抗炎作用的发挥可能通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路的激活,综合来说OPN:2'-FL=1:9~1:3 (m/m)效果最好。

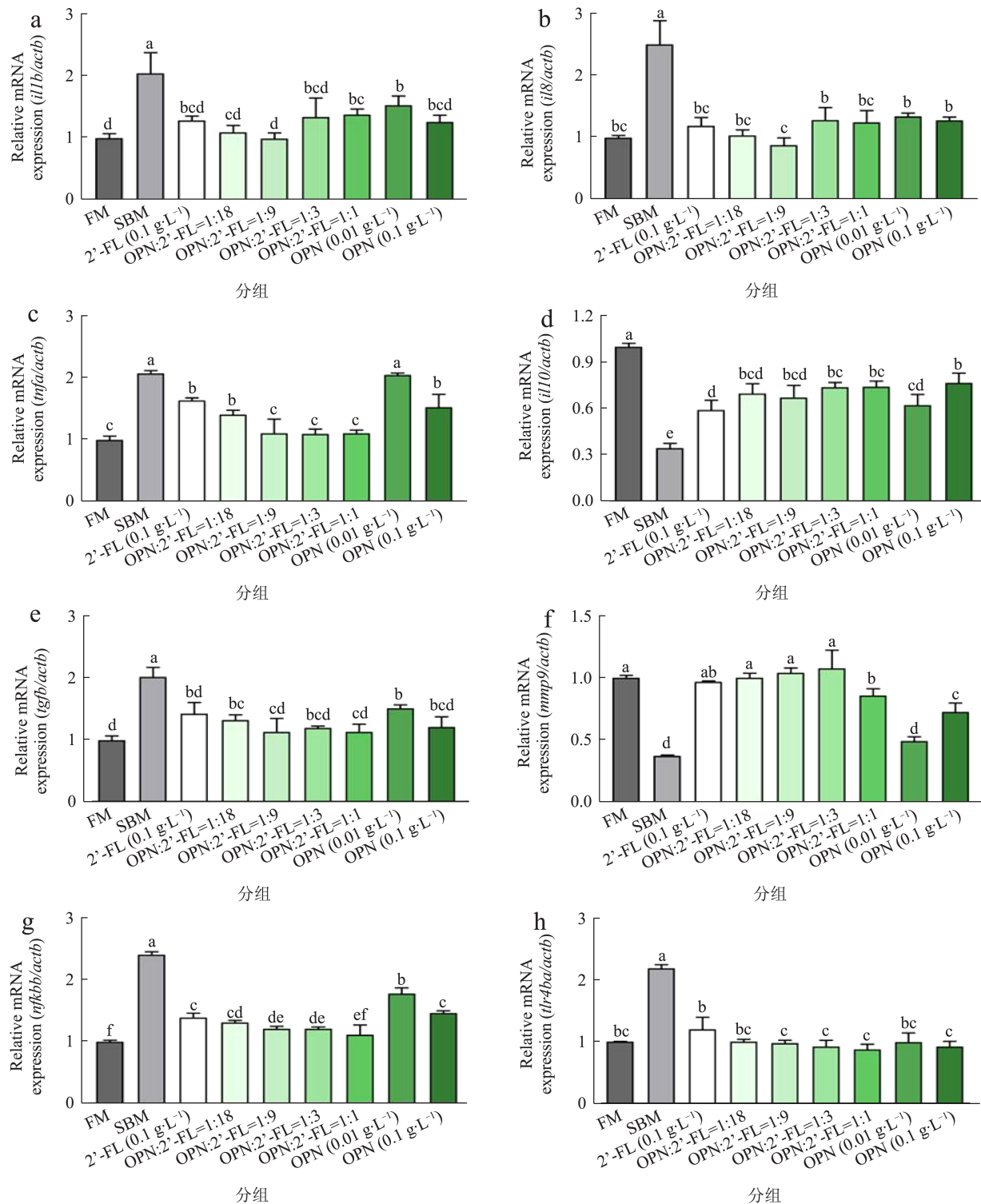


图5 斑马鱼幼鱼炎症相关基因表达

Fig.5 Inflammation-related gene expression in zebrafish larva

注: 不同小写字母表示数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

2.6 OPN和2'-FL组合物对肠炎斑马鱼肠屏障功能相关基因表达的影响

斑马鱼紧密连接 (Tight Junction, TJ) 蛋白的基因 (*cldn1*、*cldn3c*、*tjp1a*) 和粘蛋白基因 (*muc5.1*) 分别与人肠上皮细胞中紧密连接蛋白-1 (Claudin-1,

CLDN1)、紧密连接蛋白-3 (Claudin-3, CLDN3)、闭合小带蛋白-1 (Zonula Occludens-1, ZO-1) 和粘蛋白 5.1 (Mucin 5.1, MUC5.1) 的基因同源^[33]。结果显示, 相较于FM组, SBM组斑马鱼体内 Claudin-1、Claudin-3、ZO-1 以及 MUC5.1 的 mRNA 表达水平均

显著降低,表明豆粕饮食破坏了肠上皮 TJ 结构,并抑制了粘蛋白的分泌活动,从而削弱了肠上皮屏障的功能完整性,致使肠道通透性有所增强(图6)。相关研究指出,当断奶仔猪被喂食豆粕饲料后,观察到其肠上皮 ZO-1 的表达水平出现下降,与此同时,肠道通透性呈现出显著的上升趋势,这说明豆粕饮食对肠道屏障的结构完整性及其通透性有着负面影响^[34]。与 SBM 组相比,OPN、2'-FL 单体以及不同比例组合物干预均显著促进了上述蛋白的基因表达,其中 OPN:2'-FL=1:9~1:1 (*m/m*) 组的 *cldn3c* 和 *muc5.1* 表达水平显著较高,展现出优于其他组的协同增强效果,这与肠道杯状细胞数量增加的结果相吻合(图3)。体外实验曾表明,OPN 和 2'-FL 发酵代谢产物能恢复炎症性损伤的肠上皮细胞屏障中 TJ 蛋白表达,维持 TJ 结构的完整性^[13]。此外,有文献报道,发酵麦麸多糖饮食干预能显著增强斑马鱼的肠屏障功能,其中描述与该部分实验结果相似^[35]。这些结果进一步说明了 OPN 和 2'-FL 组合物对肠炎斑马鱼肠屏障的显著改善作用。

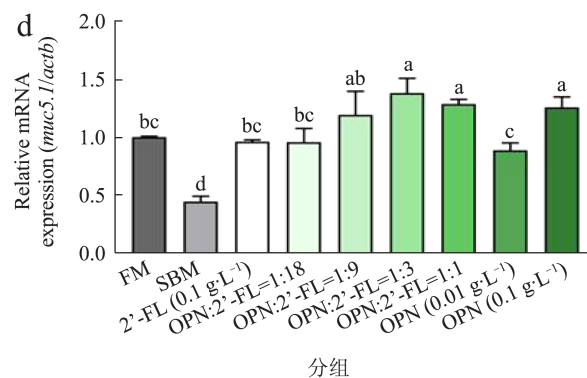
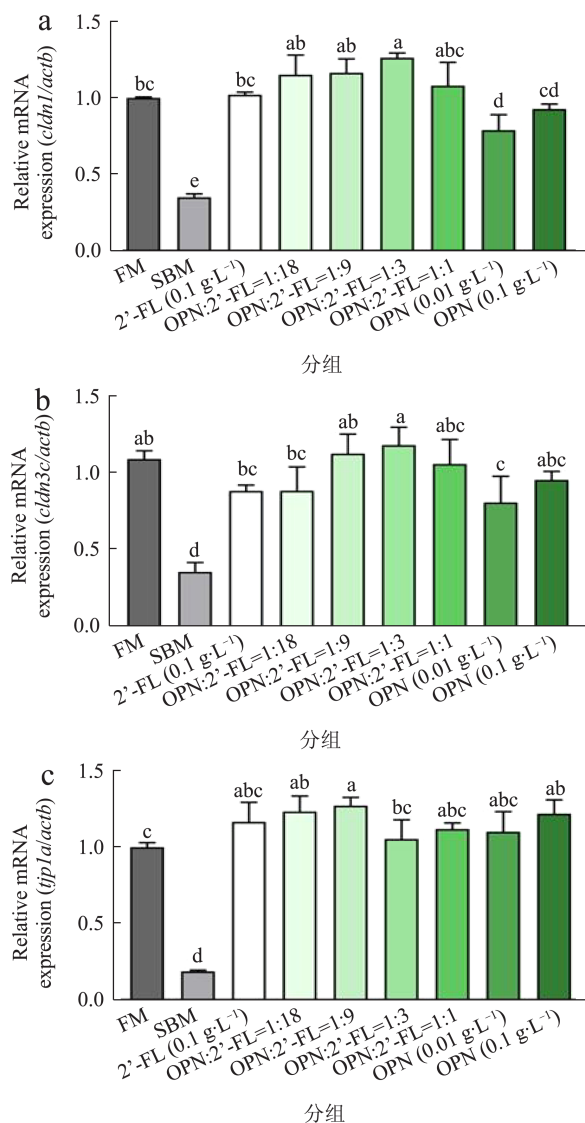


图6 斑马鱼幼鱼紧密连接蛋白和粘蛋白基因表达水平

Fig.6 Tight junction protein and mucin gene expression levels in zebrafish larva

注:(a~c) 紧密连接蛋白,(d) 粘蛋白。不同小写字母表示数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

2.7 OPN和2'-FL组合物对肠炎斑马鱼细胞因子分泌的影响

在炎症反应初期,IL-1 β 和TNF- α 作为两种关键的促炎细胞因子被释放^[36],趋化因子IL-8则扮演着引导中性粒细胞向炎症部位迁移的重要角色^[37],而抗炎因子IL-10则起到促进炎症反应结束的作用^[38]。如图7所示,各组斑马鱼幼鱼体内IL-1 β 、IL-8、TNF- α 和IL-10的分泌量均呈现出不同差异。与FM组相比,SBM组显著刺激了促炎因子IL-1 β 、IL-8和TNF- α 的分泌,相关分泌量分别急剧增加至35.04、102.30和72.80 pg·mL⁻¹,其中IL-8的分泌水平最高,表明肠炎斑马鱼体内的炎症加重。经OPN和2'-FL组合物干预后,各促炎因子的分泌量均出现不同程度的减少,其中各干预组IL-1 β 和IL-8的分泌水平显著降低,但组别间未表现出显著性差异。值得注意的是,OPN:2'-FL=1:3~1:1 (*m/m*)组和0.1 g·L⁻¹的OPN单体组在TNF- α 的分泌水平上略低于其他组别。虽然SBM组的IL-10分泌量未发生显著变化,但各干预组的IL-10分泌量相比FM组大幅增加3~4倍,其中OPN:2'-FL=1:18~1:1 (*m/m*)组的IL-10分泌水平显著高于OPN单体组和2'-FL单体组,这一结果充分说明OPN和2'-FL组合物在协同促进IL-10表达方面展现出显著优势。体外细胞实验曾证明OPN和2'-FL单体及不同比例组合物的发酵代谢产物均能显著降低炎症因子水平,恢复细胞的免疫稳态,这说明OPN和2'-FL具有抗炎潜力^[13]。综上,本部分实验在蛋白表达水平上进一步证实了OPN和2'-FL组合物干预能有效调控肠炎斑马鱼中的炎症因子表达,缓解肠道炎症,其中OPN和2'-FL比例为1:9~1:1 (*m/m*)时综合抗炎效果最好。

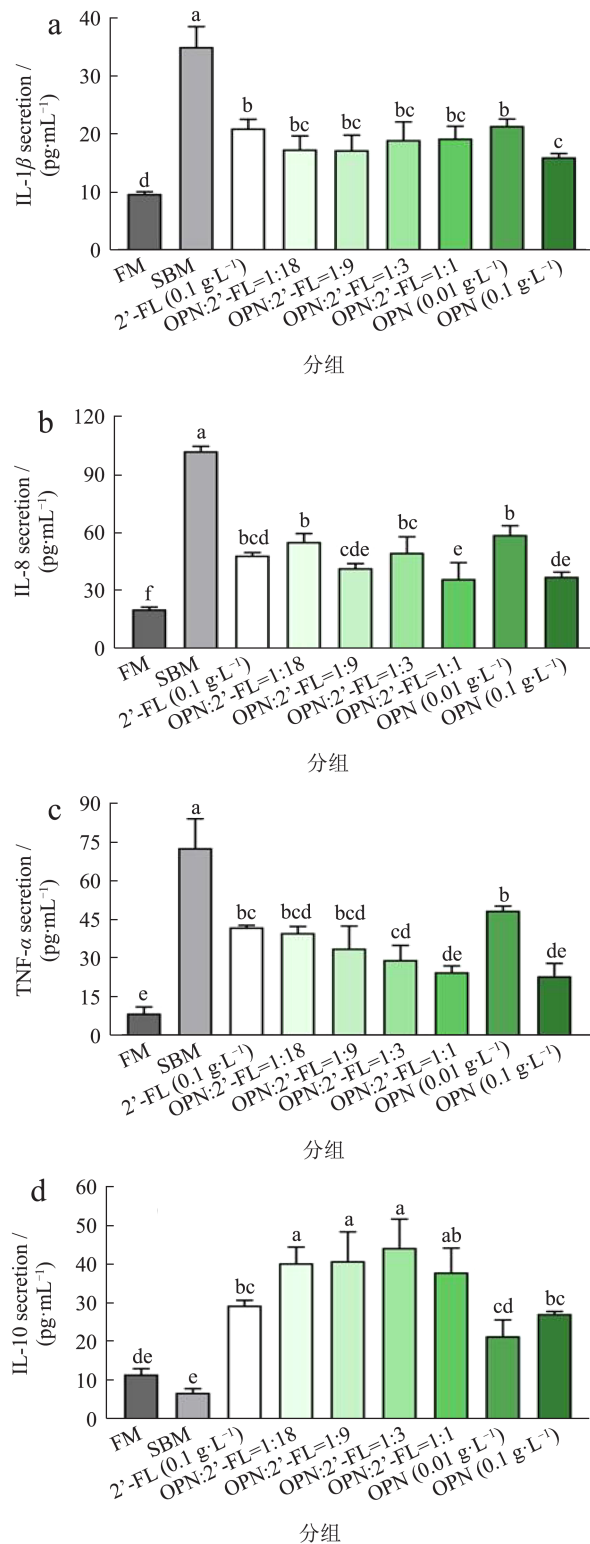


图7 斑马鱼幼鱼细胞因子分泌水平

Fig.7 Cytokine secretion levels of zebrafish larva

注: 不同小写字母表示数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

3 结论

该研究利用豆粕饮食诱导的斑马鱼幼鱼肠炎模型, 深入探究了 OPN 和 2'-FL 单体及其不同比例组

合物在减轻肠道炎症和维护肠屏障完整性方面的效果及其潜在作用机制。实验结果显示, OPN:2'-FL=1:9~1:3 (m/m) 的组合物显著抑制了中性粒细胞的肠道募集, 同时各组别 (1:18~1:1, m/m) 均增加了杯状细胞数量, 有助于保护肠粘膜屏障。在病理水平上, OPN 和 2'-FL 组合物修复了炎症损伤的肠道组织, 肠褶皱数量增加且形态结构完整, 其中以比例 1:9~1:3 (m/m) 的组合物协同效果最好。此外, OPN 和 2'-FL 组合物还通过上调促炎相关因子 IL-1 β 、TGF- β 、IL-8、TNF- α 、TLR4 和 NF- κ B 的基因表达, 并下调抗炎相关因子 IL-10 和 MMP9 基因表达, 来促进 TJ 蛋白 Claudin-1/3、ZO-1 和粘蛋白 MUC5.1 的基因表达, 使恢复正常值, 发挥显著的抗炎活性和屏障修复作用, 其中以 OPN:2'-FL=1:9~1:1 (m/m) 组合物的综合抗炎效果最好。综上所述, 当 OPN 和 2'-FL 以 1:9~1:3 (m/m) 组合时, 在改善食源性肠炎斑马鱼肠屏障功能的各个方面均表现出优异效果, 这为 OPN 和 2'-FL 组合物促进肠道健康的生理功能提供了有力的数据支持, 有望推动其在婴幼儿功能食品领域的进一步应用。

参考文献

- [1] MARTIN C R, LING P R, BLACKBURN G L. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula [J]. *Nutrients*, 2016, 8(5): 279.
- [2] 中国食品科学技术学会. 乳源性骨桥蛋白的科学证据(2024年版)[J]. *中国食品学报*, 2025, 25(1): 469-474.
- [3] 杨宝雨, 赵军英, 乔为仓, 等. 母乳低聚糖的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(8): 369-390.
- [4] CHLEILAT F, KLANCIC T, MA K, et al. Human milk oligosaccharide supplementation affects intestinal barrier function and microbial composition in the gastrointestinal tract of young sprague dawley rats [J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1532.
- [5] ZHANG B, LI L Q, LIU F, et al. Human milk oligosaccharides and infant gut microbiota: Molecular structures, utilization strategies and immune function [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 276: 118738.
- [6] MOWAT A M, AGACE W W. Regional specialization within the intestinal immune system [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(10): 667-685.
- [7] LEWIS S M, WILLIAMS A, EISENBARTH S C. Structure and function of the immune system in the spleen [J]. *Science Immunology*, 2019, 4(33): eaau6085.
- [8] NEU J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 85(2): 629S-634S.
- [9] CATASSI C, BONUCCI A, COPPA G V, et al. Intestinal permeability changes during the first month: Effect of natural versus artificial feeding [J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology*

- and Nutrition, 1995, 21(4): 383-386.
- [10] DEWEY K G, HEINIG M J, NOMMSEN-RIVERS L A. Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants [J]. The Journal of Pediatrics, 1995, 126(5 Pt 1): 696-702.
- [11] LOENNERDAL B, KVISTGAARD A S, PEERSON J M, et al. Growth, nutrition, and cytokine response of breast-fed infants and infants fed formula with added bovine osteopontin [J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2016, 62(4): 650-657.
- [12] VANDENPLAS Y, BERGER B, CARNIELLI V P, et al. Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and Lacto-N-Neotetraose (LNNT) in infant formula [J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1161.
- [13] CAI R, ZHENG Y, LANE J A, et al. *In vitro* infant fecal fermentation metabolites of osteopontin and 2'-fucosyllactose support intestinal barrier function [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 73(2): 1642-1655.
- [14] SOLIS C J, HAMILTON M K, CARUFFO M, et al. Intestinal inflammation induced by soybean meal ingestion increases intestinal permeability and neutrophil turnover independently of microbiota in zebrafish [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1330.
- [15] 中国饲料成分及营养价值表(2022年第33版)(续)[J].中国饲料, 2022,24:63-68.
- [16] JOBLING M. National research council (nrc): Nutrient requirements of fish and shrimp [J]. Aquaculture International, 2011, 20(3): 601-602.
- [17] HEDRERA M I, GALDAMES J A, JIMENEZ-REYES M F, et al. Soybean meal induces intestinal inflammation in zebrafish larvae [J]. Plos One, 2013, 8(7): 610.
- [18] CORONADO M, SOLIS C J, HERNANDEZ P P, et al. Soybean meal-induced intestinal inflammation in zebrafish is T cell-dependent and has a Th17 cytokine profile [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 1619-1637.
- [19] URAN P A, GONCALVES A A, TAVERNE-THIELE J J, et al. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 751-760.
- [20] FLEMING A, JANKOWSKI J, GOLDSMITH P. *In vivo* analysis of gut function and disease changes in a zebrafish larvae model of inflammatory bowel disease: A feasibility study [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2010, 16(7): 1162-1172.
- [21] REHMAN S, GORA A H, SIRIYAPPAGOUDE P, et al. Zebrafish intestinal transcriptome highlights subdued inflammatory responses to dietary soya bean and efficacy of yeast β -glucan [J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(10): 1619-1637.
- [22] BRUGMAN S. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2016, 64: 82-92.
- [23] WITKO-SARSAT V, RIEU P, DESCAMPS-LATSCHA B, et al. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects [J]. Laboratory Investigation, 2000, 80(5): 617-653.
- [24] WALLACE K N, PACK M. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish [J]. Developmental Biology, 2003, 255(1): 12-29.
- [25] KNUDSEN D, URAN P, ARNOUS A, et al. Saponin-containing subfractions of soybean molasses induce enteritis in the distal intestine of atlantic salmon [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2261-2267.
- [26] KROGDAHL Å, BAKKE-MCKELLEP A M, BAEVERFJORD G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Aquaculture Nutrition, 2003, 9(6): 361-371.
- [27] CROSNIER C, VARGESSON N, GSCHMEISSNER S, et al. Delta-notch signalling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine [J]. Development, 2005, 132(5): 1093-1104.
- [28] JEVTOV I, SAMUELSSON T, YAO G, et al. Zebrafish as a model to study live mucus physiology [J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6653.
- [29] LI J, PROCHASKA M, MANEY L, et al. Development and organization of the zebrafish intestinal epithelial stem cell niche [J]. Developmental Dynamics, 2020, 249(1): 76-87.
- [30] MOLINARI G S, WOJNO M, MCCracken V J, et al. The use of dipeptide supplementation as a means of mitigating the negative effects of dietary soybean meal on zebrafish danio rerio [J]. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology, 2021, 257: 110958.
- [31] CHEN M, LIU C, DAI M, et al. Bifidobacterium lactis bl-99 modulates intestinal inflammation and functions in zebrafish models [J]. Plos One, 2022, 17(2): e0262942.
- [32] ZOU J, SECOMBES C J. The function of fish cytokines [J]. Biology, 2016, 5(2): 23.
- [33] WALLACE K N, AKHTER S, SMITH E M, et al. Intestinal growth and differentiation in zebrafish [J]. Mechanisms of Development, 2005, 122(2): 157-173.
- [34] ZHAO Y, QIN G, SUN Z, et al. Effects of soybean agglutinin on intestinal barrier permeability and tight junction protein expression in weaned piglets [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(12): 8502-8512.
- [35] CHEN Q, MAO J, WANG Y, et al. Fermented wheat bran polysaccharides improved intestinal health of zebrafish in terms of intestinal motility and barrier function [J]. Fermentation-Basel, 2023, 9(3): 293.
- [36] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. Nature Reviews Immunology, 2013, 13(3): 159-175.
- [37] DE OLIVEIRA S, REYES-ALDASORO C C, CANDEL S, et al. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response [J]. Journal of Immunology, 2013, 190(8): 4349-4359.
- [38] ENGELSMA M Y, HUISING M O, VAN MUISWINKEL W B, et al. Neuroendocrine-immune interactions in fish: A role for interleukin-1 [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 87(3-4): 467-479.