

鼠李糖乳杆菌GG上清液改善酒精诱导的Caco-2细胞屏障损伤

张敏¹, 马铭泽¹, 卢禹麒¹, 孙巍², 赵静岩², 杨一¹, 刘海峰², 王仁俊^{1*}

(1. 吉林师范大学生命科学学院, 吉林四平 136000)(2. 四平市中心人民医院, 吉林四平 136000)

摘要: 为了研究鼠李糖乳杆菌 GG 上清液 (*Lactobacillus rhamnosus* GG Supernatant, LGGs) 对酒精诱导 Caco-2 细胞屏障损伤的改善作用, 通过构建 Caco-2 细胞屏障损伤模型, 检测分析 Caco-2 细胞屏障完整性、通透性和细菌移位数量, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 分析 LGGs 对紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 表达的影响, 检测活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量, qRT-PCR 分析肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) 和白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 的表达水平变化。结果表明: LGGs 对于酒精所导致的肠上皮细胞屏障损伤和细菌移位具有修复作用, LGGs 干预后 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的 mRNA 表达水平分别提高了 42.02%、45.18% 和 29.84%, 蛋白表达水平分别升高了 72.52%、38.72% 和 31.69%, ROS 和 MDA 含量分别下降了 24.92% 和 30.19%, 此外, LGGs 的处理降低了 TNF- α 、IL-6、MCP-1 的 mRNA 表达水平, 提高了 IL-10 的 mRNA 表达水平。综上所述, LGGs 通过增强紧密连接蛋白表达, 改善氧化应激损伤和炎症反应来修复肠道屏障损伤, 为研发防治酒精性肝损伤的功能性产品提供理论依据。

关键词: 鼠李糖乳杆菌 GG 上清液; Caco-2 细胞; 肠上皮屏障; 紧密连接蛋白; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2026)06-140-148

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0362

Lactobacillus rhamnosus GG Supernatant Ameliorates Barrier Damage of Caco-2 Cells Induced by Alcohol

ZHANG Min¹, MA Mingze¹, LU Yuqi¹, SUN Wei², ZHAO Jingyan², YANG Yi¹, LIU Haifeng², WANG Renjun^{1*}

(1. College of Life Science, Jilin Normal University, Siping 136000, China)

(2. Siping Central People's Hospital, Siping 136000, China)

Abstract: To investigate whether *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant (LGGs) improved the alcohol-induced barrier damage in Caco-2 cells, Caco-2 cells were used to establish intestinal epithelial cell barrier damage model and detect the integrity and permeability of the intestinal epithelial barrier and bacterial translocation. The effects of LGGs on the expression of tight junction proteins ZO-1, Occludin, and Claudin-1 were analyzed using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blot. The contents of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) were detected. The changes of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-

引文格式:

张敏, 马铭泽, 卢禹麒, 等. 鼠李糖乳杆菌GG上清液改善酒精诱导的Caco-2细胞屏障损伤[J]. 现代食品科技, 2026, 42(6): 140-148.

ZHANG Min, MA Mingze, LU Yuqi, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant ameliorates barrier damage of caco-2 cells induced by alcohol [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 140-148.

收稿日期: 2025-03-13; 修回日期: 2025-05-21; 接受日期: 2025-05-29

基金项目: 吉林省自然科学基金项目 (YDZJ202201ZYTS433)

作者简介: 张敏 (1988-), 女, 博士, 实验师, 研究方向: 食品微生物与功能性食品, E-mail: 461171477@qq.com

通讯作者: 王仁俊 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物生理学, E-mail: rjw@jlnu.edu.cn

1), and interleukin-10 (IL-10) were analyzed using qRT-PCR. The results showed that LGGs can prevent alcohol-induced intestinal epithelial cell barrier damage and bacterial translocation. The *ZO-1*, *Occludin*, and *Claudin-1* mRNA expression levels increased by 42.02%, 45.18%, and 29.84%, respectively, after LGGs intervention. The *ZO-1*, *Occludin*, and *Claudin-1* protein expression levels increased by 72.52%, 38.72%, and 31.69% respectively. The ROS and MDA contents decreased by 24.92% and 30.19%, respectively. Moreover, the *TNF- α* , *IL-6*, and *MCP-1* mRNA expression levels were reduced, whereas *IL-10* mRNA expression level was elevated. In conclusion, LGGs can attenuate the intestinal barrier damage by enhancing the expression of tight junction proteins, improving oxidative stress damage, and alleviating the inflammatory response. This can provide a theoretical basis for developing functional products against alcoholic liver injury.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant; Caco-2 cells; intestinal epithelial barrier; tight junction protein; oxidative stress

酒精性肝病主要包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎及由其进展形成的肝纤维化和肝硬化,是一种由于长期饮用过量酒精饮料所产生的有害肝病^[1,2]。研究学者认为,过量酒精导致肠壁对内毒素的渗透能力增加,肠壁对内毒素的清除能力降低,引发肠内毒素血症和内毒素对肝脏巨噬细胞的激活作用,进而造成肝脏产毒^[3,4]。此外,内毒素对肝脏巨噬细胞的激活过程中会释放超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($OH^\cdot$)等自由基,以及白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) 等细胞炎症因子^[5,6],它们对人体正常细胞和组织具有损害作用,从而导致肝细胞受损,并最终形成肝纤维化。

益生菌在调控肠道菌群平衡及肠道上皮细胞之间的连接,以及改善肠道上皮细胞屏障功能方面具有重要作用^[7]。益生菌可以阻断因酒精性肝损伤所致的肠道上皮细胞屏障损伤,并防止肠内毒素渗透进入肝脏。同时,益生菌能够促使肠上皮细胞中黏蛋白的表达量上升。随着黏蛋白表达增加,肠上皮细胞的粘液分泌量也随之增多,这些增多的粘液会逐渐形成保护层,能够有效阻碍致病菌对肠上皮细胞的粘附与侵袭过程^[8]。

鼠李糖乳杆菌 GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) 具有良好的耐酸性和胆盐耐受性,能够调节和改善黏膜免疫和肠道屏障功能^[9-11],对于酒精性肝损伤具有预防和缓解作用^[12,13]。但是 LGG 的应用受到宿主个体差异、疾病状态及药物(尤其是抗生素)的影响,导致效果不稳定。此外,对于肠道功能紊乱或免疫力低下的患者,活菌治疗可能引发菌血症等风险^[14,15]。而鼠李糖乳杆菌 GG 上清液 (*Lactobacillus rhamnosus* GG Supernatant, LGGs) 中含有多重活性成分,包括类外泌体纳米颗粒、免疫调节蛋白等,这些成分可能在

调节肠道屏障功能和改善炎症反应等方面具有重要作用^[16,17]。并且有关 LGGs 在酒精引起的肠道上皮细胞屏障损伤方面的相关机制目前还不清楚。因此,本研究利用一种源于人结直肠癌的 Caco-2 细胞构建细胞单层屏障模型^[18],该细胞在功能及结构方面与人类小肠上皮细胞相似,并用无水乙醇诱导 Caco-2 细胞发生泄漏,探究 LGGs 对酒精诱导的屏障损伤的保护作用,进而揭示 LGGs 改善酒精引起的肠道上皮细胞屏障损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

鼠李糖乳杆菌 ATCC 53103、绿色荧光蛋白标记的大肠杆菌 (Green Fluorescent Protein-*Escherichia coli*, GFP-*E.coli*), 本实验室保存; Caco-2 结肠癌细胞系, 美国 ATCC 公司; EMEM 培养液、0.25% 的胰蛋白酶-EDTA, Gibco 公司; 其它为国产分析纯试剂: 活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 检测试剂盒, 碧云天 (上海) 科技有限公司; 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 分析试剂盒, 优选生物科技 (上海) 有限公司; SPARKeasy Improved Tissue/Cell RNA Kit、SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR、2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix, 思科捷 (山东) 有限公司; qRT-PCR 引物, 生工生物 (上海) 有限公司。

1.2 主要仪器与设备

CKX53 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Spectra Max M2 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 1658033 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; EVOM² 细胞电阻仪, 美国 World Precision Instruments 公司。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	上游引物	下游引物
<i>ZO-1</i>	CAACATACAGTGACGCTTCACA	CACTATTGACGTTTCCCCACTC
<i>Occludin</i>	ACAAGCGGTTTATCCAGAGTC	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT
<i>Claudin-1</i>	CCTCCTGGGAGTGATAGCAAT	GGCAACTAAAATAGCCAGACCT
<i>TNF-α</i>	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
<i>IL-6</i>	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
<i>MCP-1</i>	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
<i>IL-10</i>	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	TCACATGCGCCTTGATGTCTG
<i>β-actin</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.3 试验方法

1.3.1 LGG的培养

将 LGG 于 MRS 培养基中活化传代三次，按照发酵培养液体积分数 3% 的接种量进行接种，在 37 ℃ 条件下培养 24 h 后，4 ℃、6 000 r·min⁻¹ 的条件下离心 20 min，取上清液，用 EMEM 培养液将上清液 pH 值调至 7.2，再次离心，取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤，备用。

1.3.2 单层Caco-2细胞模型的建立

根据赵海洋^[8]的方法，将 Caco-2 细胞在 37 ℃，体积分数 5% CO₂ 的条件下培养 21 d，直到分化成单层完整的上皮结构。通过 MTT 法对不同酒精浓度与处理时间的 Caco-2 细胞活力以及跨上皮细胞电阻 TEER 进行了测定，最终确定了 100 mmol·L⁻¹ 酒精浓度培养 24 h 作为实验条件，在此条件下 Caco-2 细胞屏障功能出现较为明显的损伤，但细胞仍具有一定活力，为后续探究 LGGs 的保护作用提供适宜的病理模型。将 Caco-2 细胞分为对照组（Control，正常培养）；酒精组（EtOH，含浓度 100 mmol·L⁻¹ EtOH 培养 24 h）；LGGs 干预组（EtOH+LGGs，含浓度 100 mmol·L⁻¹ EtOH 和 5% LGGs 培养 24 h）。每组设 3 个复孔，确保结果可重复性。所有细胞于 37 ℃，体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3.3 GFP-*E.coli*的培养

将 GFP-*E.coli* 培养在 LB 培养基中，37 ℃ 振荡过夜培养。之后在 4 ℃、3 000 r·min⁻¹ 的条件下离心 15 min 后收集 GFP-*E.coli*，调整 GFP-*E.coli* 菌落浓度为 1×10⁷ CFU/mL，备用。

1.3.4 细胞单层屏障完整性和通透性的检测

选择在细胞培养小室（BD BiocoatTM Cell Culture Insert, Insert, 0.4 μm）中培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞，

在干预前后使用 EVOM² 对 Caco-2 单层细胞跨上皮细胞电阻（Trans-Epithelial Electrical Resistance, TEER）的变化进行测定，细胞单层 TEER 值变化情况按公式（1）、（2）计算：

$$T_0 = (t_1 - t_0) \times S \tag{1}$$

式中：

- T_0 ——细胞单层 TEER 值，Ω·cm²；
- t_1 ——TEER 实测值，Ω；
- t_0 ——TEER 空白值，Ω；
- S ——Insert 有效膜面积 0.3 cm²。

$$T = \frac{T_2 - T_1}{T} \times 100\% \tag{2}$$

式中：

- T ——干预前后细胞单层 TEER 值变化率，%；
- T_1 ——干预前细胞单层 TEER 值，Ω·cm²；
- T_2 ——干预后细胞单层 TEER 值，Ω·cm²。

将质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的荧光剂 FD-4 加到 Insert 中，在 37 ℃ 培养 90 min，用酶标仪在激发波长 480 nm、发射波长 520 nm 条件下测定吸光度，计算 FD-4 质量浓度。

1.3.5 细菌移位的测量

将菌落浓度为 1×10⁷ CFU/mL 的 GFP-*E.coli* 于收集细胞前加入到 Insert（滤膜孔径为 0.4 μm）中，37 ℃ 培养 90 min 后从底部培养板中取出 100 μL 样品，用 LB 琼脂平板定量培养，测定穿过细胞单层 GFP-*E.coli* 活菌数量，以此确定细菌移位的情况。细菌移位的数量用 log₁₀CFU/mL 表示。

1.3.6 实时荧光定量PCR分析

取培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞，酒精处理后，根据试剂盒说明分别对 RNA 进行提取和逆转录。PCR 扩增体系参照 2×SYBR Green qPCR Mix 试剂盒的操作说明，反应体系总量设定为 20 μL，循环扩增次数为

40 次。实验所采用的引物序列见表 1。

1.3.7 Western blot免疫印迹检测

根据赵海洋^[8]的方法,取培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞,酒精处理后,加入 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白,保存于 -80°C 。Western blot 分析 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的蛋白表达情况。

1.3.8 ROS、SOD和MDA含量分析

取培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞,酒精处理后,收集细胞。分别按照试剂盒说明书进行测定。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism8 软件进行统计学处理,所有数值以 Mean $\pm$ SD 表示,组间比较采用 one-way ANOVA 分析,以 P 值 <0.05 为具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 LGGs对酒精诱导的肠上皮细胞单层屏障完整性和通透性的影响

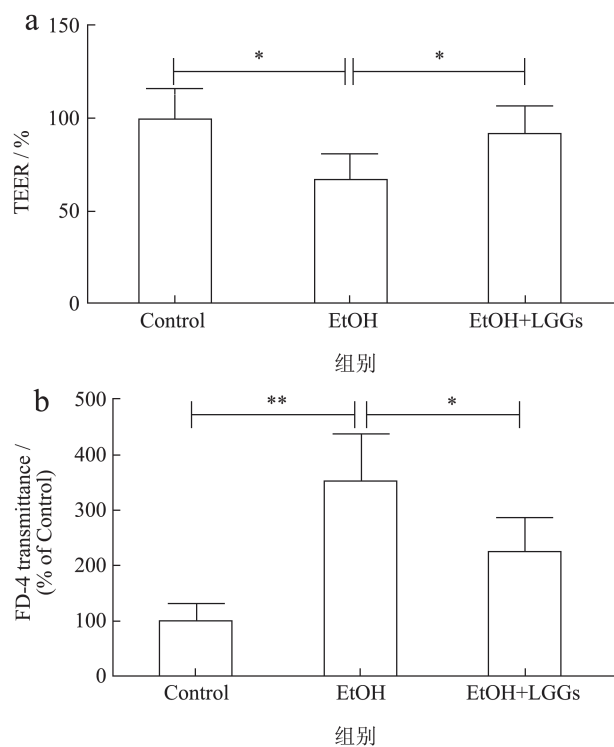


图 1 LGGs 对酒精诱导的肠上皮细胞单层屏障完整性和通透性的影响

Fig. 1 Effects of LGGs on monolayer barrier integrity and permeability of intestinal epithelial cells induced by alcohol

注: a: 肠上皮细胞单层屏障 TEER; b: FD-4 通透性; * 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$ 。

益生菌可以有效地通过调节肠屏障功能,起到避

免肠粘膜受损的作用^[19,20]。在防治酒精性肝损伤方面,益生菌能保护肠屏障完整性,阻断肠道内毒素渗透到肝脏^[11,12]。本研究对酒精和 LGGs 作用后 Caco-2 细胞单层的 TEER 以及 FD-4 透过率的变化进行测量,评价 LGGs 对肠上皮细胞单层屏障完整性和通透性的影响,结果见图 1。与对照组相比,酒精处理 24 h 后细胞单层的 TEER 值下降了 32.84%, 差异显著 ($P<0.05$), 然而 LGGs 干预后,细胞单层的 TEER 值与酒精组相比升高了 36.73%, 差异显著 ($P<0.05$)。在通透性方面,酒精组的 FD-4 透过率与对照组相比明显上调 ($P<0.01$), 而 LGGs 干预组中 FD-4 的透过率明显比酒精组低 ($P<0.05$), 与对照组无显著性差异 ($P>0.05$), 说明 LGGs 对酒精处理后的肠上皮细胞单层屏障完整性和通透性具有明显的保护功能。王玉华等^[21]的研究也表明了相似结果,鼠李糖乳杆菌 B10 上清液能够逆转酒精导致的细胞单层 TEER 下降和通透性升高。类似地研究发现,鼠李糖乳杆菌 KF7 发酵乳上清液对于脂多糖诱导的肠上皮细胞单层屏障完整性和通透性具有保护作用,可显著升高细胞单层的 TEER 以及降低 FD-4 的透过率^[22]。本研究中, LGGs 干预后产生修复作用一方面是由于 LGGs 提高紧密连接蛋白表达,修复受损肠上皮细胞屏障,另一方面是 LGGs 可能通过减轻氧化应激损伤和炎症反应从而降低肠上皮细胞屏障功能的损伤。

2.2 LGGs对酒精诱导的GFP-*E.coli*移位的影响

人体内正常的肠道微生物菌群含有 500 多种不同类型的细菌,它们通过与宿主相互作用来获取营养并维持消化道平衡^[23,24]。然而当这种平衡在应激条件下发生失衡时,肠道内的细菌就会进入到肠道外组织,出现细菌定位转移^[19]。肠道微生态的内平衡被打破会损害机体免疫力和肠屏障功能,增加细菌移位数量。因此,肠道稳态的维持和避免机体受到病原性微生物的影响变得非常重要。由图 2 可知,与对照组相比,酒精作用 24 h 后 GFP-*E.coli* 定位转移数量增加了 $2.39 \log_{10}\text{CFU/mL}$, 差异极显著 ($P<0.01$), 采用 LGGs 干预后, GFP-*E.coli* 定位转移数量与酒精组相比下降了 $1.54 \log_{10}\text{CFU/mL}$, 差异显著 ($P<0.05$)。由以上结果可知,酒精会引起肠上皮细胞屏障通透性和细菌移位数量增加,而 LGGs 的加入可以部分阻断酒精对肠上皮屏障的损伤作用。孙凌霜等^[25]研究发现,在尿毒症大鼠模型中,益生菌能够改善肠道巨噬细胞介导的细菌移位,对肠道屏障功能具有保护作用。表明不同应激条件下益生菌可能通过相似的机制发挥作用。酒精破坏肠上皮细胞屏障,使细菌更容易穿透上

皮细胞进入循环系统, LGGs 可能通过调节肠上皮细胞的紧密连接结构, 增强屏障功能, 减少细菌移位的机会。尽管本研究证实了 LGGs 在体外细胞模型中对酒精诱导的细菌移位具有抑制作用, 但在体内环境中, 肠道屏障和菌群的相互作用更为复杂, 未来将结合体内动物实验进一步探究 LGGs 对细菌移位的影响及作用机制。

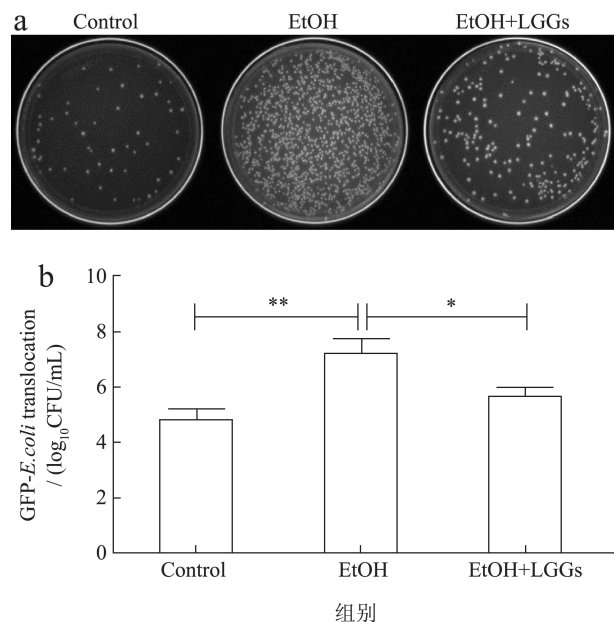


图2 LGGs对酒精诱导的GFP-*E.coli*移位的影响

Fig.2 Effects of LGGs on alcohol-induced GFP-*E.coli* translocation

注: *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。

2.3 LGGs对酒精诱导的紧密连接蛋白mRNA和蛋白表达水平的影响

肠上皮细胞屏障分为紧密连接和粘附连接, 在调控肠粘膜屏障的通透性、阻止内毒素和外源性病原体入侵过程中, 紧密连接具有重要的作用^[26]。ZO-1是紧密连接的主要功能调节蛋白, 在肠粘膜屏障形成时, Occludin、Claudins能够与ZO-1相互作用封闭细胞间隙。由图3可知, Caco-2细胞ZO-1的mRNA表达水平在加入酒精24 h后显著下调 ($P < 0.05$), 而Occludin和Claudin-1的mRNA表达水平没有显著变化 ($P > 0.05$)。但LGGs干预组中ZO-1、Occludin和Claudin-1的mRNA表达水平明显升高, 与酒精组相比分别增加了42.02%、45.18%和29.84%。进一步对ZO-1、Occludin和Claudin-1蛋白的表达量进行了分析, 由图4可知, 在加入酒精24 h后, ZO-1和Occludin的蛋白表达水平分别下降了51.51%和26.41%, 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), Claudin-1的蛋白表达水平与对照组相比下降了23.26%, 差异显著 ($P < 0.05$), 重要的是, LGGs加入后, ZO-1、Occludin和Claudin-1的蛋白表达水平与酒精组相

比明显升高了72.52%、38.72%和31.69%。酒精组中Occludin和Claudin-1的mRNA和蛋白水平变化趋势存在一定的差异, 可能是由于酒精虽然影响mRNA转录, 但由于mRNA结合蛋白的作用维持了mRNA的稳定性, 所以变化不明显。而在蛋白水平上, 酒精通过抑制翻译起始因子活性(如eIF4E), 明显降低了蛋白合成效率^[27]。而LGGs可能通过激活翻译促进因子(如mTOR通路), 提高翻译效率^[28]。这表明LGGs对紧密连接蛋白的调控不仅发生在转录水平, 还涉及翻译及翻译后修饰等复杂过程。因此, 评价LGGs对肠道屏障功能的保护作用时, 需要综合考虑mRNA和蛋白质两个层面的变化。

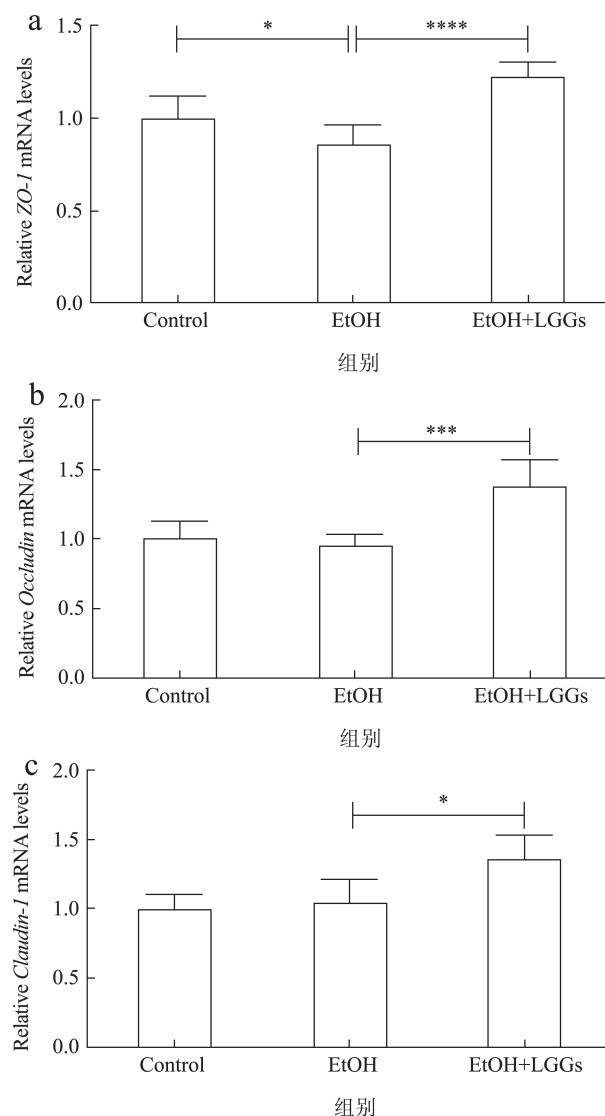


图3 LGGs对酒精诱导的紧密连接蛋白ZO-1、Occludin和Claudin-1的mRNA表达影响

Fig. 3 Effects of LGGs on the mRNA expression of alcohol-induced tight junction proteins ZO-1, Occludin and Claudin-1

注: a: ZO-1 mRNA表达水平变化; b: Occludin mRNA表达水平变化; c: Claudin-1 mRNA表达水平变化; *表示 $P < 0.05$; ***表示 $P < 0.001$; ****表示 $P < 0.0001$ 。

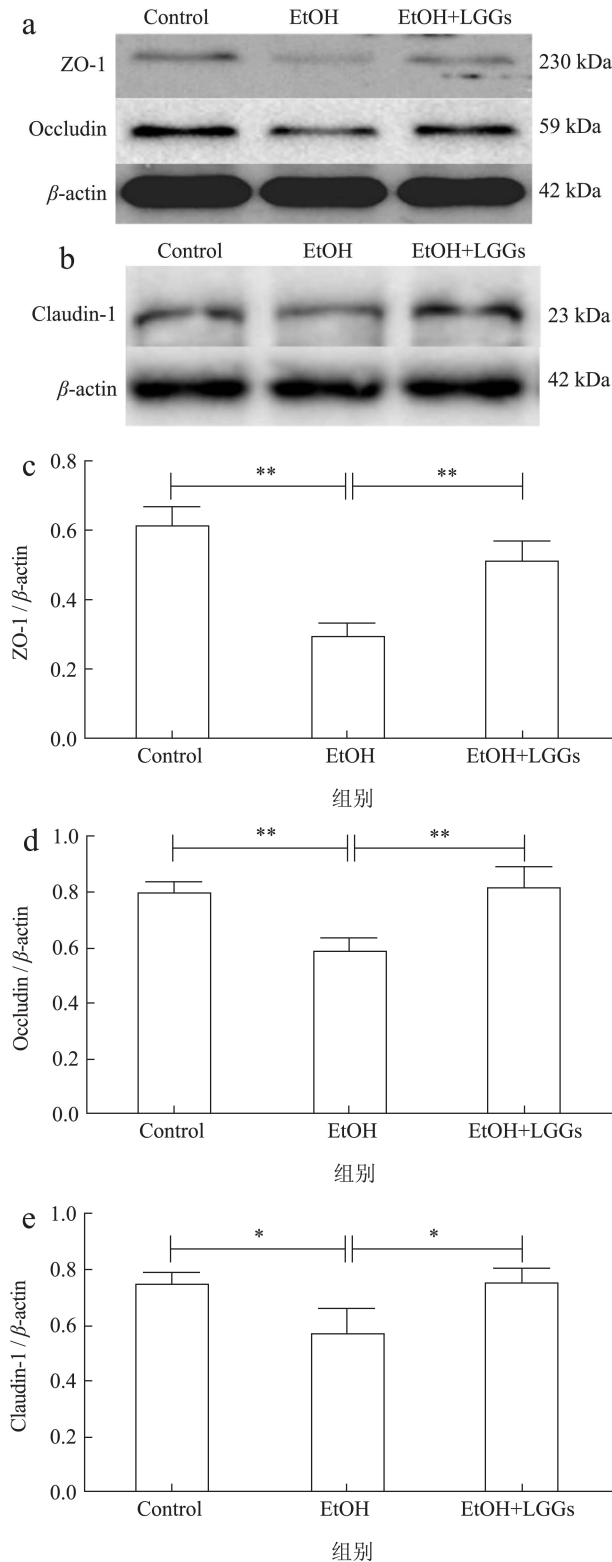


图4 LGGs对酒精诱导的ZO-1、Occludin和Claudin-1蛋白表达水平的影响

Fig.4 Effects of LGGs on alcohol-induced ZO-1, Occludin and Claudin-1 protein expression

注：a：ZO-1和Occludin蛋白水平变化；b：Claudin-1蛋白水平变化；c：ZO-1相对表达量；d：Occludin相对表达量；e：Claudin-1相对表达量；*表示 $P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.01$ 。

研究表明，特定双歧杆菌菌株作用于Caco-2细胞单层后，其跨上皮电阻TEER上升，肠屏障通透性下降，然而紧密连接蛋白的表达水平并未发生显著改变^[29]。鼠李糖乳杆菌B10上清液能够使Caco-2细胞单层中Occludin蛋白表达量升高^[21]。然而本研究发现，LGGs能够同时上调紧密连接蛋白ZO-1、Occludin和Claudin-1在转录和翻译水平的表达，肠屏障修复能力更具有优势，这种差异可能由于不同菌株所分泌的代谢产物特异性导致的。LGG分泌的类外泌体纳米颗粒能够改善酒精引起的肠道屏障功能损伤，有效调节肠道屏障通透性^[16]。

2.4 LGGs对酒精诱导的Caco-2细胞氧化应激的影响

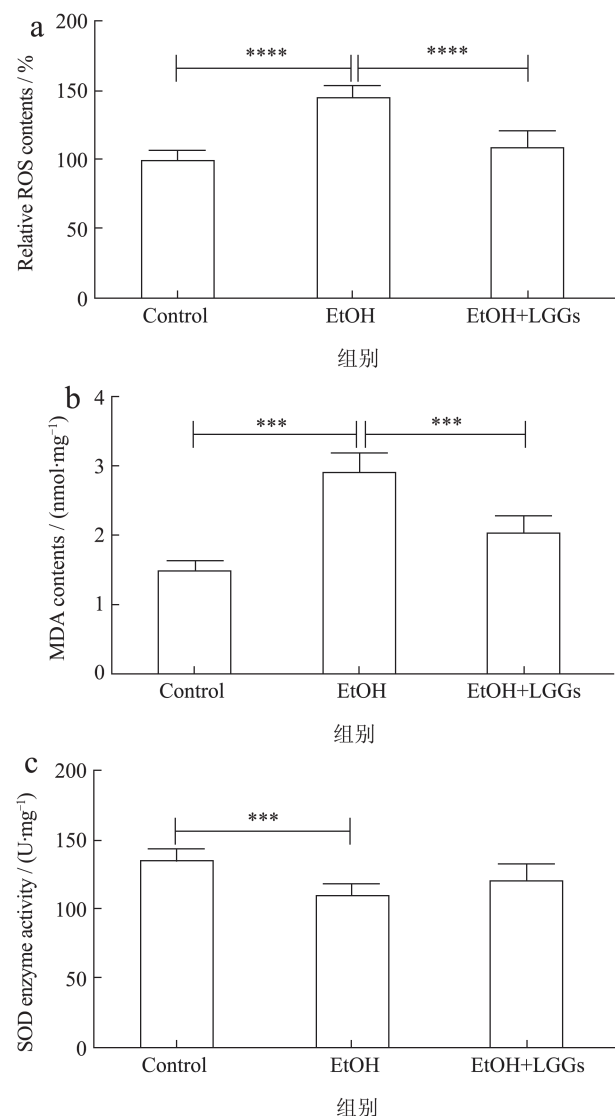


图5 LGGs对酒精诱导的Caco-2细胞氧化应激的影响

Fig. 5 Effects of LGGs on alcohol-induced oxidative stress in Caco-2 cells

注：a：ROS含量；b：MDA含量；c：SOD酶活。***表示 $P < 0.001$ ；****表示 $P < 0.0001$ 。

氧化应激的形成是由过量的 ROS 造成氧化发生失衡所引起的。当氧化应激轻微时, 抗氧化防御系统会自动通过清除自由基的方式保护机体维持氧化平衡。但是当氧化应激过量时, 机体本身的调控能力无法完成自由基的清除, 自由基与抗氧化防御系统就会发生失衡, 导致机体氧化损伤加剧从而引起多种疾病^[30]。通过提升抗氧化酶的活力能够加强机体抵抗氧化应激。其中抗氧化酶 SOD 在清除自由基、阻止胞内脂质氧化方面具有重要的调节作用, 增强机体抗氧化能力^[31,32]。此外, ROS 与脂质容易发生过氧化反应形成过氧化物 MDA, 因此通过分析 ROS、MDA 含量以及 SOD 酶活变化评价 LGGs 对受损细胞的保护作用。

如图 5 所示, ROS 和 MDA 的含量在加入酒精 24 h 后分别上调了 45.35% 和 95.05%, 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.0001$), 加入酒精 24 h 后 SOD 酶活与对照组相比明显下调了 18.61%, 差异极显著 ($P < 0.001$)。然而 ROS 和 MDA 的含量在加入 LGGs 后显著下降, 分别为 24.92% 和 30.19%, SOD 酶活有升高趋势, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。研究发现, LGG 可以减少酒精导致的氧化应激, 改善肠屏障功能并防治酒精性肝病^[33]。植物乳杆菌 BF1-13 的上清液对于过氧化氢所导致的 Caco-2 细胞单层出现的氧化应激损伤具有明显的修复作用^[34]。氧化应激和炎症反应存在协同激活作用, 共同损伤肠道紧密连接, 而 LGGs 能够增强紧密连接蛋白表达, 进而改善氧化应激损伤。以上结果表明在抑制酒精引起的氧化应激损伤和保护 Caco-2 细胞单层屏障功能方面, LGGs 具有正向调节作用。

2.5 LGGs对酒精诱导的Caco-2细胞炎症反应的影响

TNF- α 和 IL-6 在炎症反应及肿瘤细胞增殖时具有促进作用^[35]。MCP-1 对炎症反应引起的巨噬细胞和单核细胞具有激活作用。IL-10 能够限制和终止炎症反应, 调节肠道紧密连接蛋白的表达, 维持肠道稳态^[36]。如图 6a~6c 所示, TNF- α 、IL-6、MCP-1 的 mRNA 表达水平在酒精处理 24 h 后与对照组相比明显升高, 分别升高了 25.09%、33.30% 和 32.26%, 而 LGGs 的加入明显逆转了由酒精导致的 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.05$), MCP-1 的 mRNA 表达水平同样具有下降趋势, 但与酒精组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。如图 6d 所示, 酒精作用 24 h 后 IL-10 的 mRNA 表达水平明显降低了 18.58%, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 重要的是, LGGs 干预后 IL-10 的 mRNA 表达水平显著升高了 33.60%, 与酒精组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。以上结果表明 LGGs 能有效调节 Caco-2 细胞的促炎和抗炎反应, 恢复损伤的肠屏障功能。研究发现鼠李糖乳酪杆菌 KF7 上清液可以明显

降低 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平^[22]。LGGs 调节炎症反应的机制可能涉及 LGG 分泌的代谢产物 p40 蛋白通过 EGFR 通路提高肠道屏障功能, 改善炎症反应^[17]。尽管本研究结果表明 LGGs 在肠道紧密连接和炎症反应中起着积极的调节作用, 但 LGGs 的具体代谢成分及其协同作用机制仍需继续研究。

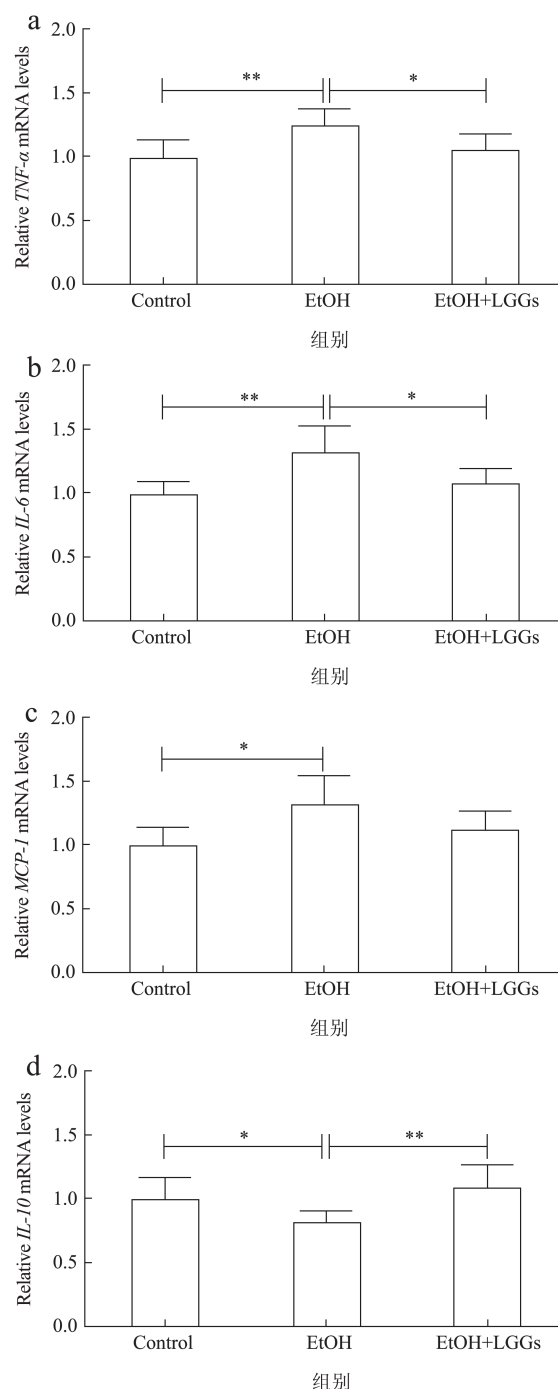


图 6 LGGs 对酒精诱导的 Caco-2 细胞炎症反应的影响

Fig. 6 Effects of LGGs on alcohol-induced inflammatory response in Caco-2 cells

注: a: TNF- α mRNA 表达水平变化; b: IL-6 mRNA 表达水平变化; c: MCP-1 mRNA 表达水平变化; d: IL-10 mRNA 表达水平变化; * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

3 结论

综上所述,酒精能够降低 Caco-2 细胞单层 TEER, 增加 FD-4 的透过率和 GFP-*E.coli* 定位转移数量, 而 LGGs 能够有效缓解酒精导致的细胞屏障通透性和细菌移位的作用, 其作用机制涉及 LGGs 通过上调细胞间紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的 mRNA 表达水平, 以及 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的蛋白表达水平, 下调 ROS 和 MDA 的含量, 降低促炎因子 *TNF- α* 、*IL-6*、*MCP-1* 的基因表达, 升高抗炎因子 *IL-10* 的基因表达, 从而增强紧密连接蛋白表达, 改善氧化应激损伤和炎症反应。表明 LGGs 能够通过多靶点干预“氧化-炎症-紧密连接”互作机制, 重建肠道屏障稳态。研究结果为揭示酒精性肝损伤的发病机制提供了新视角, 并且为研发防治酒精性肝损伤的非活菌型功能性产品提供了理论基础。本研究中没有设置 LGGs 对照和阳性对照组, 不能排除 LGGs 本身对细胞屏障的潜在影响。在后续研究中将更完整地设计实验, 提高结果的科学性和严谨性。后续研究包括对 LGGs 进行更深入的分离和纯化, 通过体外和体内实验探究其活性成分在防治酒精性肝损伤中的具体作用机制, 为酒精性肝损伤的预防和治疗提供新的治疗靶点。

参考文献

- [1] SOFAIR A N, BARRY V, MANOS M M, et al. The epidemiology and clinical characteristics of patients with newly diagnosed alcohol-related liver disease: results from population-based surveillance [J]. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2010, 44(4): 301-307.
- [2] FRAZIER T H, STOCKER A M, KERSHNER N A, et al. Treatment of alcoholic liver disease [J]. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2011, 4(1): 63-81.
- [3] THURMAN R G. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin [J]. *American Journal of Physiology*, 1998, 275(4): G605-611.
- [4] WHEELER M D. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Research Health*, 2003, 27(4): 300-306.
- [5] NANJI A A, KHETTRY U, SADRZADEH S M, et al. Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandin E₂, leukotriene B₄, and thromboxane B₂ [J]. *American Journal of Pathology*, 1993, 142(2): 367-373.
- [6] HINES I N, WHEELER M D. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis [J]. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004, 287(2): G310-314.
- [7] LOPEZ-SANTAMARINA A, GONZALEZ E G, LAMAS A, et al. Probiotics as a possible strategy for the prevention and treatment of allergies. A narrative review [J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2021, 10 (4): 701.
- [8] 赵海洋. 鼠李糖乳杆菌对酒精性肝病的预防作用及分子机制研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2016.
- [9] FRIEDRICH A D, LEONI J, PAZ M L, et al. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates dendritic cells and T Cells in the gut [J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 723.
- [10] LIU Q, YU Z M, TIAN F W, et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier [J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 23.
- [11] REN C C, CHENG L H, SUN Y, et al. Lactic acid bacteria secrete toll like receptor 2 stimulating and macrophage immunomodulating bioactive factors [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 66: 103783.
- [12] WANG Y H, KIRPICH I, LIU Y L, et al. *Lactobacillus rhamnosus* gg treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury [J]. *American Journal of Pathology*, 2011, 179(6): 2866-2875.
- [13] WANG Y H, LIU Y L, SIDHU A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* gg culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury [J]. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012, 303(1): G32-41.
- [14] TANDON P, MONCRIEF K, MADSEN K, et al. Effects of probiotic therapy on portal pressure in patients with cirrhosis: a pilot study [J]. *Liver International*, 2009, 29(7): 1110-1115.
- [15] PEREG D, KOTLIROFF A, GADOTH N, et al. Probiotics for patients with compensated liver cirrhosis: a double-blind placebo-controlled study [J]. *Nutrition*, 2011, 27(2): 177-181.
- [16] GU Z L, LI F Y, LIU Y H, et al. Exosome-like nanoparticles from *Lactobacillus rhamnosus* GG protect against alcohol-associated liver disease through intestinal aryl hydrocarbon receptor in mice [J]. *Hepatology Communications*, 2021, 5(5): 846-864.
- [17] YANG L Y, HIGGINBOTHAM J N, LIU L P, et al. Production of a functional factor, p40, by *Lactobacillus rhamnosus* GG is promoted by intestinal epithelial cell-secreted extracellular vesicles [J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(7): e00113-19.
- [18] 孟云, 徐宇航, 吴龙, 等. Caco-2 单细胞模型及共培养模型的应用进展[J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(14): 1271-1275.
- [19] FARQUHAR M G, PALADE G E. Junctional complexes in various epithelia [J]. *Journal of Cell Biology*, 1963, 17(2): 375-412.
- [20] CRUZ B C D S, MORAES L F D S, MARCON L D N, et al. Evaluation of the efficacy of probiotic VSL#3 and synbiotic VSL#3 and yacon-based product in reducing oxidative stress and intestinal permeability in mice induced to colorectal carcinogenesis [J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(4): 1448-1462.
- [21] 王玉华, 华晓曼, 贾冬梅, 等. 鼠李糖乳杆菌 B10 上清液改善酒精所致 Caco-2 细胞屏障功能紊乱的机制[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(2): 37-43.

- [22] 董奇奇,张怡琳,游春苹.鼠李糖乳酪杆菌KF7发酵乳上清对脂多糖诱导的Caco-2细胞单层屏障损伤的保护作用及其机制研究[J].食品与发酵工业,2024,50(24):191-200.
- [23] XUE J J, AJUWON K M, FANG R J. Mechanistic insight into the gut microbiome and its interaction with host immunity and inflammation [J]. Animal Nutrition, 2020, 6(4): 421-428.
- [24] ZHANG D D, LIU J, CHENG H, et al. Interactions between polysaccharides and gut microbiota: a metabolomic and microbial review [J]. Food Research International, 2022, 160: 111653.
- [25] 孙凌霄,刘华,梁珊珊,等.益生菌改善尿毒症大鼠肠道巨噬细胞介导的细菌移位[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2019,28(1):30-35.
- [26] 吴雪芹,陈秀梅,王桂芹,等.紧密连接蛋白在鱼类肠道屏障损伤中的研究进展[J].饲料工业,2023,44(6):56-62.
- [27] LANG C H, KIMBALL S R, FROST R A, et al. Alcohol myopathy: impairment of protein synthesis and translation initiation [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2001, 33(5): 457-473.
- [28] LEVITT D E, LUK H Y, VINGREN J L. Alcohol, resistance exercise, and mTOR pathway signaling: an evidence-based narrative review [J]. Biomolecules, 2022, 13(1): 2.
- [29] AL-SADI R, DHARMAPRAKASH V, NIGHOT P, et al. *Bifidobacterium bifidum* enhances the intestinal epithelial tight junction barrier and protects against intestinal inflammation by targeting the toll-like receptor-2 pathway in an NF- κ B-independent manner [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 8070.
- [30] WANG Y Z, ZHAO Y Q, WANG Y M, et al. Antioxidant peptides from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) hydrolysate: preparation, identification and cytoprotection on H₂O₂-induced oxidative stress [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104701.
- [31] MOUSAVI A, POURAKBAR L, MOGHADDAM S S. Effects of malic acid and EDTA on oxidative stress and antioxidant enzymes of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) exposed to cadmium stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 248: 114320.
- [32] ZHENG Q H, TAN W J, FENG X L, et al. Protective Effect of flavonoids from mulberry leaf on AAPH-induced oxidative damage in sheep erythrocytes [J]. Molecules, 2022, 27(21): 7625.
- [33] FORSYTH C B, FARHADI A, JAKATE S M, et al. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis [J]. Alcohol, 2009, 43(2): 163-172.
- [34] 刁小真.深海乳酸菌代谢产物保护Caco-2细胞紧密连接的研究[D].上海:上海海洋大学,2018.
- [35] AL-RASHED F, AHMAD Z, SNIDER A J, et al. Ceramide kinase regulates TNF- α -induced immune responses in human monocytic cells [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):8259.
- [36] MINSHAWI F, LANVERMANN S, MCKENZIE E, et al. The generation of an engineered interleukin-10 protein with improved stability and biological function [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1794.