

丁酸梭菌修复肠道屏障治疗肠易激综合征的作用及机制研究

徐婵 杨良俊 方政 刘珊 朱佳杰

【摘要】 目的 探究丁酸梭菌修复肠道屏障治疗肠易激综合征(IBS)的作用及机制。方法 将32只雄性乳鼠和4只母鼠按随机数字表分为对照组、模型组、丁酸钠(NaB)组和丁酸梭菌组,每组8只乳鼠1只母鼠;除对照组外,其余3组建立IBS小鼠模型。饲养至45 d后药物干预2周。记录小鼠体重、4 h排便次数及内脏敏感性;通过16S rRNA测序检测肠道菌群构成,高效液相色谱法检测粪便丁酸水平;采用荧光分光光度计检测血清异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-D)、酶联免疫吸附试验检测血浆二胺氧化酶(DAO)水平,采用免疫组织化学染色和蛋白质印迹法检测紧密连接蛋白[闭合蛋白(Occludin)和小带闭锁蛋白-1(ZO-1)]表达情况以评估肠道屏障功能,采用蛋白质印迹法检测Toll样受体2(TLR2)/髓样分化因子88(MyD88)/核因子- κ B(NF- κ B)通路蛋白活性。人结肠腺癌细胞系Caco-2分为正常组、模型组、NaB组、NaB+沉默组、C29组和NaB+激动剂组,除正常组外,其余5组建立细胞屏障损伤模型。各组予相应试剂处理。采用Transwell法检测细胞FITC-D渗透率,蛋白质印迹法及免疫荧光染色法检测细胞Occludin、ZO-1、TLR2、MyD88、NF- κ B蛋白表达情况。结果 丁酸梭菌和NaB干预后,小鼠IBS症状改善,表现为体重增长、4 h排便次数减少、内脏敏感性降低(均 $P < 0.05$)。丁酸梭菌干预可重塑肠道菌群结构,表现为产丁酸菌丰度增加,粪便丁酸水平上升($P < 0.01$)。丁酸梭菌和NaB干预后血清FITC-D和血浆DAO水平均显著降低(均 $P < 0.01$),Occludin和ZO-1蛋白表达水平和相对表达量均显著升高(均 $P < 0.01$),TLR2、MyD88和NF- κ B相对表达量均显著降低(均 $P < 0.05$)。细胞实验证实NaB通过抑制G蛋白偶联受体109A抑制TLR2/MyD88/NF- κ B通路蛋白表达,促进紧密连接蛋白表达。结论 丁酸梭菌通过代谢产物丁酸抑制TLR2/MyD88/NF- κ B通路活性,修复IBS肠道屏障功能,为IBS的生态制剂治疗策略提供理论依据。

【关键词】 肠易激综合征;丁酸盐类;肠道屏障;胃肠道微生物组;Toll样受体2/髓样分化因子88/核因子- κ B通路

Effect and mechanism of Clostridium butyricum in restoring intestinal barrier function to treat irritable bowel syndrome

XU Chan, YANG Liangjun, FANG Zheng, LIU Shan, ZHU Jiajie

First-author's address: Department of Gastroenterology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China

Corresponding author: ZHU Jiajie, E-mail: a736494076@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect and mechanisms underlying Clostridium butyricum-mediated restoration of intestinal barrier function and alleviation of irritable bowel syndrome (IBS). **Methods** Thirty-two male suckling mice and four female mice were randomly divided into normal, model, sodium butyrate (NaB) and Clostridium butyricum groups according to the random number table, each with eight suckling mice and one female mice. Except for the normal group, the other three groups were used to establish IBS mice model. After 45 days of rearing, the corresponding drug intervention was carried out for 2 weeks. The body weight, defecation frequency within 4 hours, and visceral hypersensitivity quantified through the abdominal withdrawal reflex scoring system were recorded. Gut microbiota composition was analyzed via 16S rRNA sequencing, while fecal butyrate concentrations were quantified using high-performance liquid chromatography. Intestinal barrier function was assessed by measuring serum fluorescein isothiocyanate-labelled dextrose dextran (FITC-D) and plasma diamine oxidase (DAO) concentrations by enzyme linked immunosorbent assay, alongside tight junction protein expressions

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2025.47.24.2025-793

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82004333);浙江省自然科学基金资助项目(LQ21H290002);浙江省中医药科技计划项目(2023ZR005、2023ZF079);国家中医药管理局科技司-浙江省中医药管理局共建郁病防治研究重点实验室项目(GZY-ZJ-SY-2402)

作者单位:310012 杭州,浙江省立同德医院消化内科(徐婵、杨良俊、方政、朱佳杰);浙江中医药大学基础医学院(刘珊)

通信作者:朱佳杰, E-mail: a736494076@126.com

[zonula occludens-1 (ZO-1) and Occludin] by immunohistochemical staining and Western blot. The protein activities of Toll-like receptor 2 (TLR2)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathways were evaluated through Western blot too. Human colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2 was divided into normal group, model group, NaB group, NaB+ silencing group, C29 group and NaB+ agonist group. Except normal group, a cell barrier injury model was established in the other five groups. Each group was treated with the corresponding reagent. The Transwell assay was used to detect the FITC-D permeability of cells, and Western blot as well as immunofluorescence staining were employed to determine the protein expression levels of Occludin, ZO-1, TLR2, MyD88 and NF- κ B. **Results** After *Clostridium butyricum* and NaB intervention, IBS symptoms of mice were improved, manifesting as body weight gain, reduced 4-hour fecal pellet output, and decreased visceral hypersensitivity (all $P < 0.05$). *Clostridium butyricum* reshaped gut microbiota composition, markedly elevating the abundance of butyrate-producing bacteria and fecal butyrate concentrations ($P < 0.01$). Furthermore, *Clostridium butyricum* and NaB interventions significantly reduced serum FITC-D and plasma DAO levels (all $P < 0.01$), upregulated protein expression levels and relative expression quantities of Occludin and ZO-1 (all $P < 0.01$), and decreased relative expression levels of TLR2, MyD88 and NF- κ B (all $P < 0.05$), so that intestinal barrier integrity was restored. Cell experiment confirmed that NaB inhibited protein expression of TLR2/MyD88/NF- κ B signaling via the inhibition of G protein-coupled receptor 109A and enhanced tight junction protein expression. **Conclusion** *Clostridium butyricum* restores intestinal barrier function in IBS by suppressing TLR2/MyD88/NF- κ B pathway hyperactivation through its metabolite butyrate, laying the groundwork for developing microbiota-targeted therapeutics for IBS management.

【 Key words 】 Irritable bowel syndrome; Butyrates; Intestinal barrier; Gastrointestinal microbiome; Toll-like receptor 2 / myeloid differentiation factor 88 / nuclear factor- κ B signaling pathway

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是临床常见功能性胃肠病, 以腹痛伴排便异常为主要临床表现, 且无可解释症状的器质性病变。可分为腹泻型 (diarrhea-predominant, IBS-D)、便秘型、混合型和未定型 4 个亚型, 以 IBS-D 最为常见^[1]。肠道屏障功能受损被认为是其发生、发展的重要因素^[2], 而改善肠道屏障功能可有效缓解腹痛、腹泻等 IBS 症状^[3-4]。短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 由肠道微生物发酵未消化食物而成, 主要包含乙酸、丙酸和丁酸。丁酸是肠上皮细胞主要的供能物质, 对维持肠道屏障功能具有重要意义^[5]。临床研究发现, IBS 患者产丁酸菌丰度明显下降^[6]; 补充丁酸梭菌后临床症状缓解, 其机制可能与肠道丁酸水平上调、肠道屏障修复有关^[7]。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 在机体内担任识别病原体相关分子的重要角色, 其可通过髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 引发慢性炎症, 是肠道屏障免疫稳态的重要调控因子。在葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导的结肠炎模型中, TLR2 表达明显增加, 促炎因子释放, 肠道屏障受损^[8], 而使用 TLR2 抑制剂可逆转这一现象^[9]。Zhao 等^[10]发现, 靶向抑制 TLR2/NF- κ B 通路可抑制促炎细胞因子释放, 上调肠上皮紧密连接蛋白 [如闭合蛋白 (Occludin) 和密封蛋白-1] 的表达。在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的急性肺受

损模型中, 丁酸盐可通过抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 通路降低促炎因子的积累, 减轻组织病理学损伤^[11]。本研究探讨丁酸梭菌及其代谢产物丁酸在抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 通路、进而修复 IBS 肠道屏障功能中的作用, 旨在为 IBS 治疗提供新的药物选择。

1 材料和方法

1.1 实验动物、细胞及菌株 SPF 级雄性 C57BL/6 乳鼠 (出生后 1 d) 32 只、母鼠 4 只购自杭州医学院, 动物生产许可证号: SCXK (浙) 2019-0002, 饲养于浙江省中医药研究院实验动物中心, 动物试验许可证号: SYXK (浙) 2019-0010。饲养条件: 21~23 °C、相对湿度 (50% ± 5%)、12 h 昼夜交替, 自由饮水进食。本研究经浙江省中医药研究院实验动物福利伦理委员会审查通过 (批准文号: 浙中研动物伦理审字第 [2021] 002 号)。人结直肠腺癌细胞系 Caco-2 购自武汉普诺赛公司 (批号: CL-0050), 培养在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的改良伊格尔培养基中, 37 °C、5% CO₂, 隔天换液, 正常传代。丁酸梭菌购自上海保藏生物技术中心 (批号: ATCC 19398), 使用强化梭菌培养基, 37 °C 厌氧静置培养。

1.2 主要试剂 三硝基苯磺酸 (trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 水溶液 (0.5 g/L)、丁酸钠 (sodium butyrate, NaB) 粉末、LPS 冻干粉和异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-labelled dextrose dextran,

FITC-D)粉末(使用时配制成相应浓度)购自美国 Sigma 公司(批号分别为 P2297、303410、L4391 和 FD4);二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉华美生物(批号:CSB-E10090m);Lipofectamine™3000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher 公司(批号:L3000015);TLR2 激动剂 pam3CSK4、TLR2 抑制剂 C29 购自美国 MedChemexpress 公司(批号分别为 HY-P1180A 和 HY-100461);TLR2、MyD88、NF- κ B、Occludin、闭锁小带蛋白 1(zonula occludens-1, ZO-1)和 β -肌动蛋白(β -actin)一抗均购自英国 Abcam 公司(批号分别为 ab209216、ab28763、ab207297、ab216327、ab276131 和 ab8227);免疫荧光抗体 Occludin 和 ZO-1 购自英国 Abcam 公司(批号分别为 ab216327、ab221547)。

1.3 动物实验

1.3.1 动物分组及处理 32 只乳鼠和 4 只母鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、NaB 组和丁酸梭菌组,每组 8 只乳鼠和 1 只母鼠。除正常组外,其余 3 组乳鼠参考文献[12]采用慢性应激联合 TNBS 法建立 IBS 模型:出生后第 2 天起乳鼠和母鼠每天 9:00—11:00 分离,连续 2 周;出生后第 22 天断奶;出生后第 31 天小鼠腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg),麻醉后倒立位固定,肛门内缓慢注入 0.1 mL TNBS 溶液。正常组注入等量的 0.9%氯化钠溶液。完成后保持倒立位 10 min。第 45 天后开始药物干预,NaB 组予 NaB 溶液(溶于 0.9%氯化钠溶液,浓度为 20 g/L),丁酸梭菌组予丁酸梭菌悬液(以磷酸缓冲液重悬,浓度为 2×10^9 CFU/mL),其余两组予 0.9%氯化钠溶液,灌胃体积为 0.1 mL/10 g 体重,1 次/d,连续 2 周。

1.3.2 模型评价 测量出生后第 15、31、45 天(干预前)和 59 天(干预后)时小鼠体重;出生后第 45 和 59 天时,每只小鼠单独饲养 4 h,记录此期间的粪便排出次数;测定出生后第 45、59 天时腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分,记录 AWR 评分=3 分时的水体积,以评估内脏敏感性^[13](水体积与内脏敏感性呈负相关)。排便次数增多、内脏敏感性升高提示造模成功。

1.3.3 样本采集 第 59 天禁食水,使用 25 g/L 的 FITC-D 灌胃,0.2 mL/10 g 体重;4 h 后眼眶静脉丛采集血样,分离血清和血浆,-80 °C 保存。颈椎脱臼法处死小鼠,剖腹,收集结肠内粪便;截取结肠组织,一部分 10%甲醛固定后石蜡包埋,另一部分-80 °C 保存。

1.4 细胞分组及处理 将 Caco-2 按 5×10^5 个/孔的密度接种于 12 孔板,分正常组、模型组、NaB 组、NaB+沉默组、C29 组和 NaB+激动剂组。除正常组外,其他 5 组

以含 LPS(1 mg/L)的培养基培养 6 h 以诱导炎症,模拟屏障损伤^[14]。按 Lipofectamine™3000 转染试剂说明书方法对 NaB+沉默组细胞中 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPR)109A 基因进行沉默表达,引物正向序列:5'-GCTTCCTGGTCATCGTCTTC-3',反向:5'-AGGTAGGCGATGATGGTGAA-3'。NaB 组和 NaB+沉默组以含 5 μ mol/L NaB 的培养基培养,C29 组以含 5 μ mol/L C29 的培养基培养,NaB+激动剂组以含 5 μ mol/L NaB 和 0.6 μ mol/L pam3CSK4 的培养基培养。24 h 后收集各组细胞用于后续检测。

各组细胞另接种于 Transwell 培养板上侧室,正常培养 11 d,待形成单层细胞后,除正常组外,其余 5 组更换为含 LPS(1 mg/L)的培养基,并同样上述药物处理,培养 12 h 后上侧室更换为含 FITC-D(1 g/L)的培养基,下侧室加入 0.6 mL 的 Hank 平衡盐溶液,37 °C 孵育 1 h 后检测 FITC-D 渗透率,以评估单层细胞的通透性^[14]。

1.5 检测指标

1.5.1 小鼠粪便 16S rRNA 序列检测 取各组小鼠粪便样本,使用 Illumina NovaSeq PE250 对 16S rRNA 的 V3-V4 可变区进行扩增子测序,使用 Fastp 软件对原始数据进行质控和过滤,以 97%的一致性阈值进行聚类,序列数据分析采用 QIIME v2.0 平台和 R 4.0.2 软件。统计菌群组成分布和生物多样性,采用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)、主成分分析(posterior communicating artery, PCoA)检测组间差异。

1.5.2 小鼠粪便丁酸水平检测 采用高效液相色谱法。取各组小鼠粪便样本,100 mg/只,加入 1 mL 盐酸溶液(0.1 mol/L),涡旋混合 5 min,超声提取 10 min(功率 300 W, 25 °C),12 000 r/min 离心 15 min,取上清液过 0.22 μ m 有机滤膜。色谱条件:流动相磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L KH₂PO₄, pH 2.5)-乙腈(体积比为 85:15),流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μ L,运行 15 min,检测波长 210 nm。

1.5.3 小鼠肠上皮通透性评估 采用荧光分光光度计检测各组小鼠血清荧光强度,根据 FITC-D 标准曲线计算血清 FITC-D 水平。按 DAO ELISA 试剂盒说明书方法检测各组小鼠血浆 DAO 水平。

1.5.4 小鼠结肠组织病理变化检测 采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。取各组小鼠结肠组织石蜡块,切 5 μ m 厚片,脱蜡、水化后行常规 HE 染色,光学显微镜下观察组织病理变化。

1.5.5 小鼠结肠组织中 Occludin、ZO-1、TLR2 和 MyD88 表达水平检测 采用免疫组织化学染色。取石蜡切

片,5%胎牛血清孵育后,加入一抗4℃孵育过夜,加入二抗37℃孵育30min,二氨基联苯胺显色,光学显微镜成像,计算平均光密度值,以平均光密度值表示Occludin、ZO-1、TLR2和MyD88表达水平。

1.5.6 6组细胞FITC-D渗透率检测 采用Transwell法。使用荧光分光光度计分别测量Transwell上、下侧室中的荧光强度,计算FITC-D渗透率。

1.5.7 6组细胞Occludin和ZO-1表达水平检测 采用免疫荧光染色。各组细胞使用4%多聚甲醛固定,制成10μm冷冻切片后行常规免疫荧光染色,共聚焦激光扫描显微镜测量荧光面积,以荧光面积表示Occludin和ZO-1表达水平。

1.5.8 小鼠和细胞中Occludin、ZO-1、TLR2、MyD88和NF-κB相对表达量检测 采用蛋白质印迹法。各样本加入细胞裂解液,冰上裂解后离心,收集上清液并对蛋白质定量,聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜后,一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育30min,增强型化学发光显色,ImageJ软件测定条带灰度值,以β-actin为参照,计算蛋白相对表达量。

1.6 统计学处理 使用SPSS 26.0和Graphpad Prism 9.4.1统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,同组干预前后比较采用配对样本*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

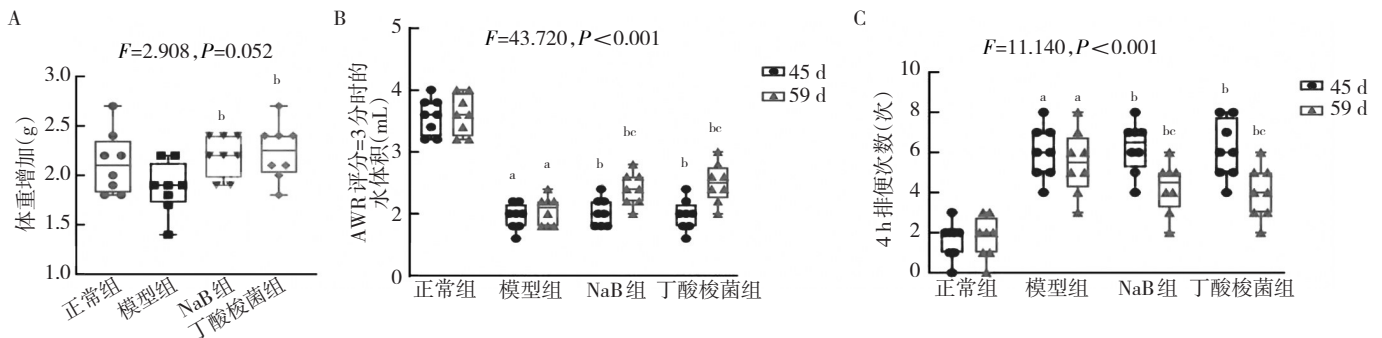
2 结果

2.1 IBS小鼠模型评价及4组小鼠IBS症状比较 相比正常小鼠,45d时模型小鼠体重变化不大[(16.81±1.70)g比(17.98±2.02)g, $t=1.695$, $P=0.118$],4h排便次数显著增多[(6.125±1.296)次比(1.625±0.916)次, $t=$

5.669, $P<0.001$],AWR评分=3分时注水量明显减少[(1.983±0.220)mL比(3.575±0.292)mL, $t=10.820$, $P<0.001$],表明内脏敏感性明显升高,提示造模成功。相比模型组,NaB组和丁酸梭菌组小鼠体重增加量均显著升高,内脏敏感性显著降低,4h排便次数显著减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见图1。

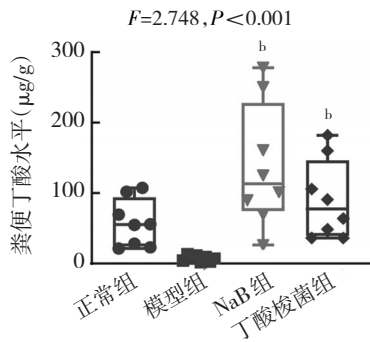
2.2 4组小鼠肠道菌群及粪便丁酸水平比较 相比正常组,模型组小鼠厚壁菌门/拟杆菌门(Firmicutes/Bacteroidota,F/B)降低;可检测到的种下单元(operational taxonomic unit,OTU)数减少,LDA提示有害菌如Streptococcaceae和Enterococcaceae等丰度显著增加;相比模型组,丁酸梭菌组和NaB组F/B升高,OTU数量增加;NaB组产丁酸菌(Ruminococcaceae和Butyricocccaceae)、丁酸梭菌组产丁酸菌(Lachnospiraceae和Butyricococcus)丰度显著增加。PCoA可见模型组与正常组菌群结构存在显著差异,丁酸梭菌组菌群结构向正常转归,见图2(插页24-1)。相比正常组,模型组粪便丁酸水平显著下降;相比模型组,NaB组和丁酸梭菌组粪便丁酸水平显著升高(均 $P<0.01$),见图3。

2.3 4组小鼠肠道屏障功能比较 HE染色结果显示4组小鼠结肠组织均未见显著病理变化,符合IBS功能性疾病的特点,模型组局部隐窝排列稍紊乱。ELISA结果显示,相比正常组,模型组小鼠血清FITC-D水平及血浆DAO水平均显著升高;相比模型组,NaB组、丁酸梭菌组血清FITC-D水平及血浆DAO水平均显著降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见图4A-B。免疫组织化学染色和蛋白质印迹法结果均显示,相比正常组,模型组小鼠Occludin和ZO-1蛋白表达水平和相对表达量均显著下降;相比模型组,NaB组和丁酸梭菌组Occludin和ZO-1蛋白表达水平和相对表达量均显著上升,差异均



注:IBS为肠易激综合征;AWR为腹壁撤退反射;NaB为丁酸钠;与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与同组干预前比较,^{*} $P<0.01$ 。

图1 4组小鼠IBS症状比较(A:干预期间4组小鼠体重增加量比较;B:干预前后4组小鼠内脏敏感性比较;C:干预前后4组小鼠4h排便次数比较)



注: NaB 为丁酸钠; 与正常组比较, ^a*P*<0.01; 与模型组比较, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.01。

图3 4组小鼠粪便丁酸水平比较

有统计学意义(均 *P*<0.05), 见图4C-E。

2.4 4组小鼠 TLR2/MyD88/NF-κB 通路蛋白表达比较 免疫组织化学染色结果显示, 相比正常组, 模型组小鼠结肠组织 TLR2 和 MyD88 蛋白阳性染色面积明显增多(主要见上皮区域), 平均光密度值显著升高, 即蛋白表达水平显著升高; 相比模型组, NaB 组和丁酸梭菌组 TLR2 和 MyD88 蛋白表达水平显著降低, 差异均有统计学意义(均 *P*<0.01), 见图5。蛋白质印迹法结果提示, 相比正常组, 模型组 TLR2、MyD88 和 NF-κB 蛋白相对表达量均显著增加; 相比模型组, NaB 组和丁酸梭菌组 TLR2、MyD88 和 NF-κB 蛋白相对表达量水平均显著

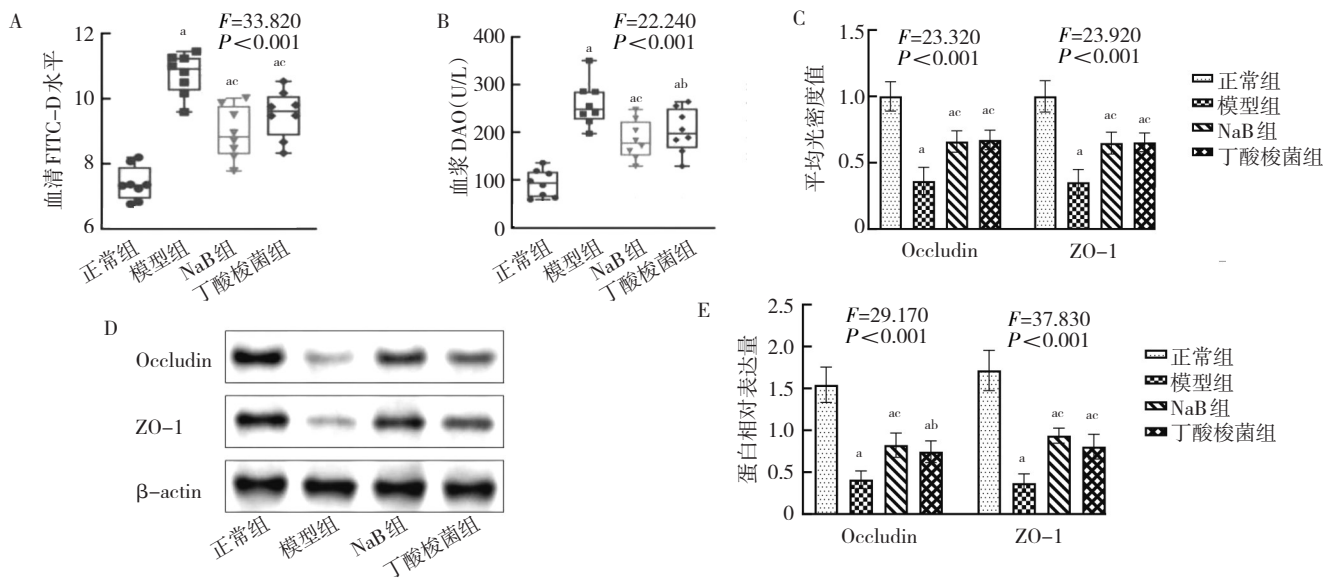
降低, 差异均有统计学意义(均 *P*<0.01), 见图6。

2.5 6组细胞上皮屏障功能比较 相比正常组, 模型组 FITC-D 渗透率显著升高(*P*<0.01), Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平均显著下降(均 *P*<0.01); 相比模型组, NaB 组和 C29 组 FITC-D 渗透率均显著降低(均 *P*<0.05), Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平均显著上升(均 *P*<0.05), 提示 NaB 和 C29 可能逆转 LPS 导致的炎症刺激; 相比 NaB 组, NaB+沉默组和 NaB+激动剂组 FITC-D 渗透率显著升高(均 *P*<0.05), Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平均下降(均 *P*<0.05), 提示沉默 GPR109A 基因或使用 pam3CSK4 后, NaB 对紧密连接蛋白的促表达作用被削弱。见图7。

2.6 6组细胞 TLR2/MyD88/NF-κB 通路蛋白相对表达量比较 相比正常组, 模型组 TLR2、MyD88 和 NF-κB 蛋白相对表达量均显著上升(均 *P*<0.01); 相比模型组, NaB 组和 C29 组 TLR2、MyD88、NF-κB 蛋白相对表达量均显著降低(均 *P*<0.01); 相比 NaB 组, NaB+沉默组和 NaB+激动剂组 TLR2、MyD88、NF-κB 蛋白相对表达量均显著升高(均 *P*<0.01), 提示 NaB 的抑制作用被显著削弱, 见图8。

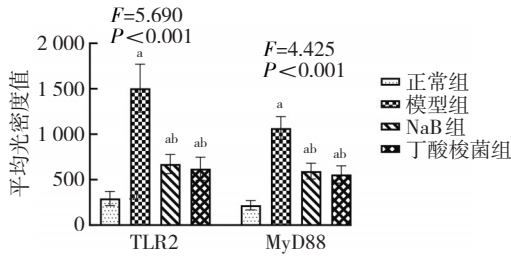
3 讨论

消化道作为机体与外部环境相互作用的广泛界面, 其表面积高达 40 cm², 而肠道屏障在保护内部环



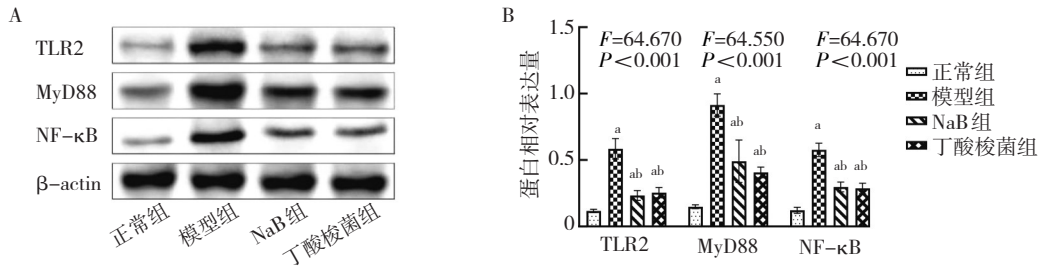
注: NaB 为丁酸钠; FITC-D 为异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖; DAO 为二胺氧化酶; Occludin 为闭合蛋白; ZO-1 为闭锁小带蛋白 1; β-actin 为 β-肌动蛋白; 与正常组比较, ^a*P*<0.01; 与模型组比较, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.01。

图4 4组小鼠肠道屏障功能比较(A: 4组小鼠血清 FITC-D 水平; B: 4组小鼠血浆 DAO 水平; C: 4组小鼠结肠组织 Occludin 和 ZO-1 表达水平; D: 蛋白电泳图; E: 4组小鼠结肠组织 Occludin 和 ZO-1 相对表达量)



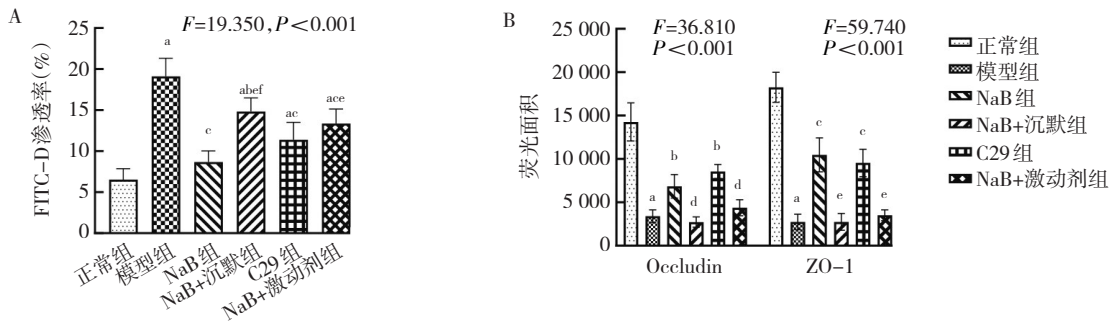
注: NaB为丁酸钠; TLR2为Toll样受体2; MyD88为髓样分化因子88; 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$ 。

图5 4组小鼠结肠组织TLR2、MyD88蛋白表达水平比较



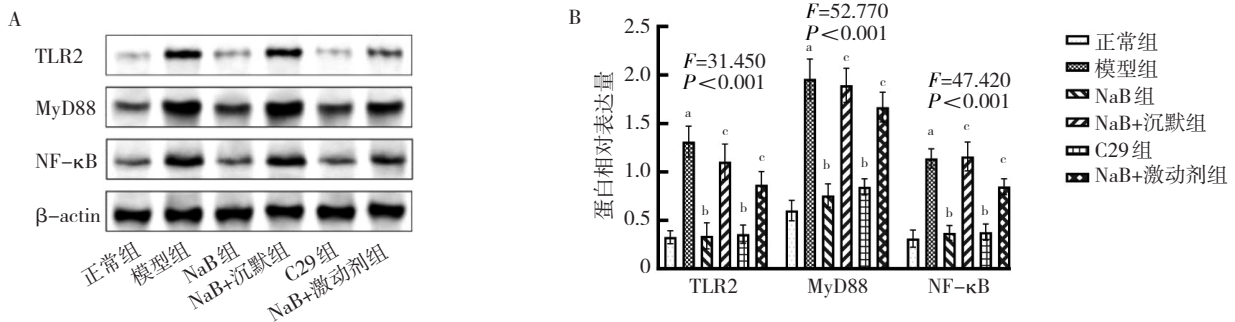
注: NaB为丁酸钠; TLR2为Toll样受体2; MyD88为髓样分化因子88; NF-κB为核因子-κB; β-actin为β-肌动蛋白; 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$ 。

图6 4组小鼠结肠组织TLR2/MyD88/NF-κB通路蛋白表达比较(A: 蛋白电泳图; B: TLR2、MyD88、NF-κB蛋白相对表达量)



注: NaB为丁酸钠; C29为Toll样受体2抑制剂; FITC-D为异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖; Occludin为闭合蛋白; ZO-1为闭锁小带蛋白1; 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与NaB组比较, ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$ 。

图7 6组细胞上皮屏障功能比较(A: 6组细胞FITC-D渗透率; B: 6组细胞Occludin和ZO-1荧光面积)



注: NaB为丁酸钠; TLR2为Toll样受体2; MyD88为髓样分化因子88; NF-κB为核因子-κB; β-actin为β-肌动蛋白; C29为TLR2抑制剂; 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$; 与NaB组比较, ^c $P < 0.01$ 。

图8 6组细胞TLR2/MyD88/NF-κB通路蛋白表达比较(A: 蛋白电泳图; B: 6组细胞TLR2、MyD88、NF-κB蛋白相对表达量)

境免受病原体和抗原的侵袭方面起着关键作用。多项研究证实IBS与屏障功能障碍有关,透射电镜下IBS患者存在肠上皮黏附连接扩张、微绒毛长度和微绒毛间距离改变^[15]; IBS-D和感染后IBS患者中分别有37%~62%和16%~50%存在肠上皮通透性升高^[16],且屏障功能损伤程度与腹泻严重程度呈正相关;补充谷氨酰胺能降低通透性,改善IBS症状^[17],提示修复肠道屏障功能可作为IBS治疗靶点。

本研究通过检测肠道菌群及其代谢物丁酸以探索丁酸梭菌修复肠道屏障的机制。16S rRNA测序结果显

示 IBS 模型肠道菌群失调, 表现为 F/B 降低、生物多样性下降、有害菌丰度增加; 丁酸梭菌干预后上述菌群失调状况得到有效改善, 表现为粪便丁酸水平上升, 肠上皮通透性降低, 紧密连接蛋白表达上调。F/B 变化是肠道菌群失调的标志, F/B 降低与结肠炎^[18]、抑郁症^[19]等有关, 可能与 SCFAs 尤其是丁酸的生成减少以及 LPS 积累引起的免疫炎症反应相关^[20]。厚壁菌门是人类肠道微生物群中的重要组成, 在 SCFAs 生成中具有关键作用。丁酸盐是肠上皮细胞的主要能量来源, 对维持肠道屏障完整性至关重要^[5]。临床研究发现 IBS 患者粪便丁酸水平较低, 粪菌移植治疗后其粪便丁酸水平升高、IBS 症状改善^[21]。此外, 调节肠道菌群结构促进丁酸盐产生, 可调节炎症因子表达, 从而增加肠道跨上皮电阻、改善肠屏障功能^[22]。因此, 推测丁酸梭菌通过其代谢产物丁酸盐发挥修复 IBS 肠道屏障功能的作用。

本研究还发现, NaB 干预下 TLR2、MyD88、NF- κ B 等通路蛋白表达下调, 紧密连接蛋白表达上调, 其效果与 TLR2 抑制剂 C29 相当; 沉默 GPR109A 或使用 TLR2 激动剂 pam3CSK4 可阻断 NaB 的屏障修复作用。因此推测 NaB 可能通过 GPR109A 抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 通路发挥肠道屏障修复作用。TLR2/MyD88/NF- κ B 通路是肠道免疫稳态的重要调控因子。研究发现 IBS-D 患者肠道 TLR2 及其下游 MyD88 水平明显高于健康者^[23]; 伴有抑郁的 IBS 患者 TLR2/4 水平显著高于无抑郁者和对照组, 可能与低度炎症相关^[24]。在镉引起的肠道损伤模型中, TLR2/NF- κ B 通路被激活, 白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 表达升高, Occludin 表达受抑^[25]。在 LPS 诱导的肠炎模型中, 抑制 TLR2/NF- κ B 通路可上调 IL-10, 下调 TNF- α 、IL-8, 恢复 ZO-1 和 Occludin 的表达, 修复肠道屏障^[26]。因此, TLR2/MyD88/NF- κ B 通路可能是修复肠道屏障的潜在靶点。

丁酸是 GPR109A 的天然配体, 通过结合 GPR109A, TLR4/NF- κ B 激活受到抑制, Occludin 表达上调, 肠道屏障得到显著改善^[27]。在肠炎模型中, NaB 可通过 GPR109A 抑制组蛋白去乙酰化酶 3/NF- κ B 炎症信号, 上调紧密连接蛋白, 修复肠道屏障^[28]。在肠缺血/再灌注损伤模型中, 丁酸通过抑制高迁移率族蛋白 B1/TLR4/MyD88 通路, 上调紧密连接蛋白、减少黏膜损伤^[29]。此外, NaB 还可通过下调 TLR-2/NF- κ B/活性氧/ND 样受体热蛋白结构域蛋白 3 信号抑制炎症, 减少细胞焦亡^[30]。

综上所述, IBS 模型小鼠存在内脏敏感性异常、排便次数增加以及肠道屏障功能障碍, 经丁酸梭菌治疗后

IBS 相关症状改善、受损的肠道屏障得以修复, 证明了靶向肠道屏障作为 IBS 治疗策略的可行性, 为临床干预提供了新的调控靶点。本研究系统阐明了丁酸梭菌通过代谢产物丁酸激活 GPR109A 受体, 抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 通路异常活化, 进而上调紧密连接蛋白表达、维持肠上皮通透性, 修复肠道屏障功能、改善 IBS 的分子机制, 为 IBS 的微生物制剂研发提供了理论依据。

4 参考文献

- [1] Bafghi MSF, Rad NK, Roostaei G, et al. The reality of modeling irritable bowel syndrome: progress and challenges[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2025, 20(4):433–445. DOI:10.1080/17460441.2025.2481264.
- [2] Matar A, Damianos JA, Jencks KJ, et al. Intestinal barrier impairment, preservation, and repair: an update[J]. *Nutrients*, 2024, 16(20):3494. DOI:10.3390/nu16203494.
- [3] Grover M, Vanuytsel T, Chang L. Intestinal permeability in disorders of gut–brain interaction: from bench to bedside[J]. *Gastroenterology*, 2025, 168(3):480–495. DOI:10.1053/j.gastro.2024.08.033.
- [4] Zhou Q, Verne ML, Fields JZ, et al. Randomised placebo–controlled trial of dietary glutamine supplements for postinfectious irritable bowel syndrome[J]. *Gut*, 2019, 68(6):996–1002. DOI:10.1136/gutjnl–2017–315136.
- [5] Hays KE, Pfaffinger JM, Ryznar R. The interplay between gut microbiota, short–chain fatty acids, and implications for host health and disease[J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1):2393270. DOI:10.1080/19490976.2024.2393270.
- [6] Molino S, Lerma–Aguilera A, Piskorz MM, et al. Tannin–based supplementation influences gut microbiota composition and activity in IBS–D patients with a potential impact on symptoms: a pilot study[J]. *Food Funct*, 2024, 15(17):8893–8903. DOI:10.1039/d4fo02236j.
- [7] Li M, Xu R, Li Y. Sequential laxative–probiotic usage for treatment of irritable bowel syndrome: a novel method inspired by mathematical modelling of the microbiome[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):19291. DOI:10.1038/s41598–020–75225–z.
- [8] Zhang G, Raheem A, Xu X, et al. Immunomodulatory effects of *Lactiplantibacillus plantarum* strain RW1 during *Salmonella* infection in murine intestinal epithelial cells and dextran sulfate sodium–induced murine colitis[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2025, 17(4):2197–2211. DOI:10.1007/s12602–024–10411–3.
- [9] Shen X, Guan J, Lu D, et al. *Peptostreptococcus anaerobius* enhances dextran sulfate sodium–induced colitis by promoting Nf- κ B–NLRP3–dependent macrophage pyroptosis[J]. *Virulence*, 2024, 15(1):2435391. DOI:10.1080/21505594.2024.2435391.
- [10] Zhao L, Zhao C, Miao Y, et al. Theabrownin from Pu–erh tea

- improves DSS-induced colitis via restoring gut homeostasis and inhibiting TLR2&4 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 132:155852. DOI:10.1016/j.phymed.2024.155852.
- [11] Shen J, Wang S, Xia H, et al. Akkermansia muciniphila attenuated lipopolysaccharide-induced acute lung injury by modulating the gut microbiota and SCFAs in mice[J]. *Food Funct*, 2023, 14(23):10401–10417. DOI:10.1039/d3fo04051h.
- [12] Hasegawa R, Nakaya K, Kanazawa M, et al. Corticotropin-releasing hormone receptor-1 antagonist attenuates visceral hypersensitivity induced by trinitrobenzene sulfonic acid colitis and maternal separation in rats[J]. *Biopsychosoc Med*, 2025, 19(1):5–10. DOI:10.1186/s13030-025-00324-0.
- [13] Zhou Y, Zhang F, Mao L, et al. Bifico relieves irritable bowel syndrome by regulating gut microbiota dysbiosis and inflammatory cytokines[J]. *Eur J Nutr*, 2023, 62(1):139–155. DOI:10.1007/s00394-022-02958-0.
- [14] Yang Y, Sheng Y, Wang J, et al. Aureusidin derivative CNQX inhibits chronic colitis inflammation and mucosal barrier damage by targeting myeloid differentiation 2 protein[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15):7257–7269. DOI:10.1111/jcmm.16755.
- [15] Miglietta S, Borghini R, Relucanti M, et al. New insights into intestinal permeability in irritable bowel syndrome-like disorders: histological and ultrastructural findings of duodenal biopsies[J]. *Cells*, 2021, 10(10):2593. DOI:10.3390/cells10102593.
- [16] Nikita H, Adam LE, Hannah C, et al. Intestinal barrier dysfunction in irritable bowel syndrome: a systematic review[J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2021, 14:1756284821993586. DOI:10.1177/1756284821993586.
- [17] Zhou Q, Verne ML, Fields JZ, et al. Randomised placebo-controlled trial of dietary glutamine supplements for postinfectious irritable bowel syndrome[J]. *Gut*, 2019, 68(6):996–1002. DOI:10.1136/gutjnl-2017-315136.
- [18] Yang Y, Chen C, Zheng Y, et al. Fucoxanthin alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis and gut microbiota dysbiosis in mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(8):4142–4154. DOI:10.1021/acs.jafc.3c08811.
- [19] Chan HHY, Siu PLK, Choy CT, et al. Novel multi-drain E3 probiotic formulation improved mental health symptoms and sleep quality in Hong Kong Chinese[J]. *Nutrients*, 2023, 15(24):5037. DOI:10.3390/nu15245037.
- [20] Huang M, He Y, Tian L, et al. Gut microbiota-SCFAs-brain axis associated with the antidepressant activity of berberine in CUMS rats[J]. *J Affect Disord*, 2023, 325:141–150. DOI:10.1016/j.jad.2022.12.166.
- [21] El-Salhy M, Valeur J, Hausken T, et al. Changes in fecal short-chain fatty acids following fecal microbiota transplantation in patients with irritable bowel syndrome[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2021, 33(2):e13983. DOI:10.1111/nmo.13983.
- [22] Ammar RM, Pferschy-Wenzig EM, van den Abbeele P, et al. Possible role of the gut microbiome in mediating the beneficial effects of the six-herbal formulation STW 5-II on digestive health[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119:154996. DOI:10.1016/j.phymed.2023.154996.
- [23] Koçak E, Akbal E, Köklü S, et al. The colonic tissue levels of TLR2, TLR4 and nitric oxide in patients with irritable bowel syndrome[J]. *Intern Med*, 2016, 55(9):1043–1048. DOI:10.2169/internalmedicine.55.5716.
- [24] Song JZ, Wang QM, Wang C, et al. Corticotropin-releasing factor and Toll-like receptor gene expression is associated with low-grade inflammation in irritable bowel syndrome patients with depression[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2016:7394924. DOI:10.1155/2016/7394924.
- [25] Zhang D, Liu JY, Liu JR, et al. Exercise antagonizes cadmium-caused liver and intestinal injury in mice via Nrf2 and TLR2/NF-κB signalling pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2025, 294:118100. DOI:10.1016/j.ecoenv.2025.118100.
- [26] Kerezoudi EN, Saxami G, Zervakis GI, et al. Effects of in vitro fermented *Pleurotus eryngii* on intestinal barrier integrity and immunomodulation in a lipopolysaccharide-induced colonic model[J]. *Biomedicines*, 2025, 13(2):430. DOI:10.3390/biomedicines13020430.
- [27] Wei H, Yu C, Zhang C, et al. Butyrate ameliorates chronic alcoholic central nervous damage by suppressing microglia-mediated neuroinflammation and modulating the microbiome-gut-brain axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160:114308. DOI:10.1016/j.biopha.2023.114308.
- [28] He XQ, Liu D, Liu HY, et al. Prevention of ulcerative colitis in mice by Sweet Tea (*Lithocarpus litseifolius*) via the regulation of gut microbiota and butyric-acid-mediated anti-inflammatory signaling[J]. *Nutrients*, 2022, 14(11):2208. DOI:10.3390/nu14112208.
- [29] Rong Y, Xu M, Hu T, et al. Effects of butyrate on intestinal ischemia-reperfusion injury via the HMGB1-TLR4-MyD88 signaling pathway[J]. *Aging*, 2024, 16(9):7961–7978. DOI:10.18632/aging.205797.
- [30] Chen S, Zhang YY, Zhang H, et al. Anti-inflammatory effects of NaB and NaPc in *Acinetobacter baumannii*-stimulated THP-1 cells via TLR-2/NF-κB/ROS/NLRP3 pathway[J]. *Acta Pharm*, 2022, 72(4):615–628. DOI:10.2478/acph-2022-0036.

(收稿日期:2025-03-22)

(本文编辑:沈亚芳)