韦博艺, 李冰, 赵浩如, 等. 嗜黏蛋白阿克曼菌改善肠道屏障损伤的作用机制研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(15): 224−236. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090083

WEI Boyi, LI Bing, ZHAO Haoru, et al. Mechanism of *Akkermansia muciniphila* in Ameliorating Intestinal Barrier Damage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(15): 224−236. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090083

·生物工程·

嗜黏蛋白阿克曼菌改善肠道屏障损伤的作用机制研究

韦博艺[1], 李　冰[2], 赵浩如[1], 纪正业[1], 陈如意[1], 裴　斐[1], 杨文建[1], 苏安祥[1,*]

（1.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏南京 210023;
2.昌邑市农业农村发展服务中心, 山东昌邑 261300）

摘　要: 本课题组前期研究发现，猴头菇多肽（Lys-Ser-Pro-Leu-Tyr，KSPLY）能够改善肠道屏障损伤，同时能增加肠道菌嗜黏蛋白阿克曼菌（*Akkermansia muciniphila*）的丰度，为了探讨 *A.muciniphila* 在改善肠道屏障损伤中的作用，本研究采用脂多糖（LPS）诱导 Caco-2 细胞建立屏障损伤细胞模型，分别采用不同浓度 *A.muciniphila*、菌体组分和菌代谢产物处理细胞，结合非靶向代谢组学、CCK-8 法及荧光定量 PCR 技术，评估细胞活力、黏液相关因子表达、炎症因子、凋亡相关因子及 MAPK 信号通路关键蛋白的 mRNA 表达变化。结果显示与 LPS 组相比，当 *A.muciniphila* 浓度为 10^7 和 10^5 CFU/mL 时，Caco-2 细胞 Muc2 mRNA 的相对表达量显著升高，分别增加 16.75% 和 11.57%，TFF3 mRNA 的相对表达量分别增加 12.38% 和 9.71%；*A.muciniphila* 细胞壁处理后，与 LPS 组相比，Caco-2 细胞 Muc2 mRNA 的相对表达量增加 18.71%，TFF3 mRNA 的相对表达量增加 13.28%；*A.muciniphila* 主要代谢产物 L-天冬氨酸（L-aspartic acid）、L-组氨酸（L-histidine）、柠檬酸（Citric acid）和犬尿酸（Kynurenic acid）诱导 Caco-2 细胞 Muc2 mRNA 的相对表达量增加 18.09%、20.29%、23.67%、18.61%；细胞 TFF3 mRNA 的相对表达量分别上升 10.22%、10.21%、10.29%、10.98%。与 LPS 组相比，*A.muciniphila* 及其细胞壁和主要代谢产物处理后，Caco-2 细胞促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-8 mRNA 的相对表达量显著下降；细胞促凋亡因子 Bax、Caspase-3、Caspase-8 以及促凋亡蛋白 p21 和 p27 mRNA 的相对表达量显著降低；MAPK 信号通路中三个关键蛋白 p38、JNK、ERK mRNA 的相对表达量显著下降。综上所述，*A.muciniphila* 可通过细胞壁及主要代谢产物，抑制 MAPK 信号通路激活，修复受损的肠道屏障。本研究为完善 *A.muciniphila* 在改善肠道屏障损伤中的作用物质及作用机制提供了理论基础。

关键词: 阿克曼氏菌, 细胞壁, 代谢产物, 肠道屏障保护

中图分类号: Q939.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)15−0224−13

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090083

本文网刊:

Mechanism of *Akkermansia muciniphila* in Ameliorating Intestinal Barrier Damage

WEI Boyi[1], LI Bing[2], ZHAO Haoru[1], JI Zhengye[1], CHEN Ruyi[1], PEI Fei[1], YANG Wenjian[1], SU Anxiang[1,*]

（1.College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China;
2.Changyi Agricultural and Rural Development Service Center, Changyi 261300, China）

Abstract: Previous research found that *Hericium erinaceus*-derived peptide (Lys-Ser-Pro-Leu-Tyr, KSPLY) ameliorated intestinal barrier injury and increased the abundance of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila*. To investigate the role of *A.muciniphila* in improving intestinal barrier damage, a barrier injury model was established using lipopolysaccharide (LPS)-induced Caco-2 cells. The cells were treated with different concentrations of *A.muciniphila*, its cellular components,

收稿日期: 2025−09−08

基金项目: 江苏省基础研究计划自然科学基金-面上项目（BK20231303）。

作者简介: 韦博艺（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与功能, E-mail: wby050027@163.com。

*** 通信作者:** 苏安祥（1984−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与功能、食品安全控制, E-mail: xiangansu@126.com。

or its metabolic products. Untargeted metabolomics was employed to analyze metabolite profiles, cell viability was assessed by the CCK-8 assay, and mRNA expression levels of mucin-related factors, inflammatory cytokines, apoptosis-related factors, and key MAPK signaling pathway proteins were measured using quantitative real-time PCR. Compared to the LPS group, significant upregulation of Muc2 mRNA relative expression was observed by 16.75% and 11.57% after treatment with *A.muciniphila* at 10^7 and 10^5 CFU/mL, respectively, while TFF3 mRNA relative expression was increased by 12.38% and 9.71%. Treatment with the *A.muciniphila* cell wall resulted in an 18.71% increase in Muc2 mRNA relative expression and a 13.28% increase in TFF3 mRNA relative expression. The major metabolites of *A.muciniphila*—L-aspartic acid, L-histidine, citric acid, and kynurenic acid—were found to enhance Muc2 mRNA relative expression by 18.09%, 20.29%, 23.67%, and 18.61%, respectively, and TFF3 mRNA relative expression by 10.22%, 10.21%, 10.29%, and 10.98%. Furthermore, the mRNA relative expression of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8), pro-apoptotic factors (Bax, Caspase-3, Caspase-8), pro-apoptotic proteins (p21, p27), and key MAPK pathway components (p38, JNK, ERK) was significantly downregulated by *A.muciniphila*, its cell wall, and its key metabolites. In conclusion, *A.muciniphila* and its cell wall components and primary metabolites can alleviate intestinal barrier injury, likely by inhibiting the activation of the MAPK signaling pathway. This study provides a theoretical basis for understanding the active substances and mechanisms by which *A.muciniphila* improves intestinal barrier damage.

Key words: *Akkermansia muciniphila*; cell wall; metabolites; intestinal barrier protection

肠道屏障作为维持机体内环境稳态的关键结构，其完整性对于选择性吸收营养物质、抵御病原体和毒素入侵至关重要。肠道屏障主要由物理屏障（上皮细胞及紧密连接）[1]、化学屏障（黏液及抗菌蛋白）[2]、免疫屏障（肠道相关淋巴组织）[3] 及生物屏障（共生肠道菌群）共同构成[4]。一旦肠道屏障受损，不仅会导致肠道通透性增加、菌群失衡和局部炎症反应，还会诱发系统性免疫激活和代谢紊乱，进而促进炎症性肠病、非酒精性脂肪性肝病及 2 型糖尿病等多种慢性疾病[5]。因此，探索修复和增强肠道屏障功能的策略已成为当前重要的研究方向。

诸多内外因素会干扰肠道屏障稳态，而肠道菌群的组成与功能状态在其中起着关键作用。特定的肠道共生菌或益生菌已被证实能够通过与宿主上皮细胞相互作用，直接或间接地增强肠道屏障功能[6]。嗜黏蛋白阿克曼菌（*Akkermansia muciniphila*），作为一种主要定植于肠道黏液层的革兰氏阴性菌，因其对宿主代谢健康和免疫功能的潜在益处，被视为“下一代益生菌”的候选者[7]。研究表明，*A.muciniphila* 可通过多种机制作用于肠道屏障：增强物理屏障完整性，例如上调紧密连接蛋白（如 Occludin、Claudin-1、ZO-1）的表达，并在体外实验中减轻脂多糖 LPS 诱导的 Caco-2 细胞跨膜电阻下降[7−8]；维护化学屏障功能，一方面利用黏蛋白作为能源，另一方面又能刺激杯状细胞分泌黏蛋白（如 Muc2）和调节因子（如 TFF3），增加黏液层厚度[9]；调控免疫反应，表现为降低促炎细胞因子水平（如 IL-6, TNF-α），增加抗炎因子（如 IL-10），并抑制促凋亡因子表达[10]；通过定植竞争间接影响生物屏障平衡[11]。

猴头菇（*Hericium erinaceus*），作为一种传统药食两用真菌，富含多种生物活性物质，展现出显著的免疫调节、抗炎及肠道保护特性[12]。近年研究发现，其提取物中的功能多肽对肠道屏障具有显著的保护作用。猴头菇多肽 HEPH-A 可抑制 LPS 刺激巨噬细胞中促炎因子 IL-6 的分泌并促进抑炎因子 IL-10 的释放[13]；本课题组前期制备获得猴头菇肽 KSPLY（氨基酸序列为 Lys-Ser-Pro-Leu-Tyr）不仅能激活巨噬细胞调节免疫应答，还能有效修复小鼠肠道损伤，通过上调紧密连接蛋白（ZO-1、Claudin-1、Occludin）的表达显著增强肠黏膜屏障功能并促进免疫恢复[14−15]。前期试验研究发现，KSPLY 在改善肠道屏障损伤的同时，伴随肠道中 *A.muciniphila* 丰度的显著改变。由此推测 KSPLY 的屏障保护效应可能与其调控 *A.muciniphila* 密切相关。

然而，猴头菇多肽引起 *A.muciniphila* 丰度的改变是与肠道屏障损伤改善同步发生的伴随现象，还是 *A.muciniphila* 的变化与改善肠道屏障损伤具有因果关系目前尚不清楚。若具有因果关系，*A.muciniphila* 发挥作用的具体物质是完整菌体、菌体组分，还是其代谢产物尚不明确，下游分子机制亦有待深入阐明。相关机制研究方面，丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）通路是调控细胞增殖、凋亡、炎症反应和紧密连接蛋白表达的核心信号网络[16]。LPS 诱导的肠道上皮屏障损伤常伴随 MAPK 通路的异常激活，而有益菌或益生元通常通过抑制该通路来缓解损伤[17]。

然而，目前关于 *A.muciniphila* 是否能通过调节 MAPK 信号通路来维护肠道屏障尚缺乏直接证据。因此，为深入探究 *A.muciniphila* 在改善肠道屏障损伤中的直接作用、有效成分及其分子机制，探索本课题组提出的猴头菇多肽通过调节 *A.muciniphila* 介导其屏障保护作用假设，本研究采用 LPS 诱导的 Caco-2 细胞屏障损伤模型，分别用不同浓度的 *A.muciniphila* 活菌、菌体组分及关键代谢产物进行处理。通过系统检测细胞活力、黏蛋白 Muc2 及调节因子 TFF3 的表达、细胞凋亡相关基因、炎症因子水平以及 MAPK 信号通路关键基因的 mRNA 表达量等多重指标，旨在明确 *A.muciniphila* 对肠道屏障的修复作用，解析发挥保护作用的具体物质，初步揭示

其作用机制，为阐明猴头菇多肽 KSPLY 作用的介导菌群发挥健康效应提供关键实验证据，为开发基于 *A.muciniphila* 及其活性成分的肠道屏障保护策略奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Caco-2 细胞　武汉尚恩生物技术有限公司；脂多糖（LPS）、溶菌酶、无酶无菌水　北京索莱宝生物科技有限公司；L-天冬氨酸、L-组氨酸、犬尿酸、柠檬酸　上海麦克林生化科技有限公司；*Akkermansia muciniphila*　广东省微生物菌种保藏中心；胎牛血清（FBS）　上海源培生物科技有限公司；青霉素、链霉素、0.25% 胰酶消化液　美国 Gibico 公司；CCK-8 试剂盒　上海碧云天有限公司；哥伦比亚血琼脂平板、哥伦比亚基础培养基、2.5 L 厌氧产气包　青岛海博生物科技有限公司；Trizol　美国 Thermo Fisher 公司；氯仿、异丙醇、75% 酒精　国药集团化学试剂有限公司；逆转录试剂、荧光定量试剂　南京诺唯赞生物科技有限公司；PCR 合成序列　上海生工生物股份有限公司。

SpectrumMax M2e 多功能酶标仪　美国 Molecular Devices 公司；Axio Vert.A1 倒置式显微镜　德国 ZEISS 公司；Nano Drop Lite 超微量紫外分光光度计　美国 Thermo Fisher 公司；Biometra TAvanced 96SG 梯度 PCR 仪　德国 AnaLytikjena 公司；7500 PCR 实时荧光定量 PCR 仪　美国 AppLied Biosystems 公司；XD 30 倒置式显微镜　北京 Precise 仪器有限公司；CL21R 微量台式冷冻离心机　美国 Thermo Scientific 公司；JY92-II 细胞破碎仪　宁波新艺超声设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌与细胞共培养模型建立

1.2.1.1 细菌悬液制备　参考 Yilmaz 等[18] 的方法稍作修改，制备 *A.muciniphila* 菌悬液，将 *A.muciniphila* 接种到哥伦比亚液体培养基上，在厌氧工作站中 37 ℃ 下培养 48 h，收集菌悬液，离心 10 min（4 ℃，5000 r/min），弃去上清液，菌沉淀用无菌水洗涤后再次离心，重复上述步骤 3 次，得到所需菌泥。将菌泥用不含血清和双抗的 DMEM 细胞培养基吹打均匀，置于 4 ℃ 保存并用于后续细胞实验。

1.2.1.2 CCK-8 法检测菌对细胞活性的影响　参考 Su 等[19] 的方法稍作修改，待原细胞生长至 80%~90% 时，用 PBS 洗去旧培养液，重复两次，向培养皿中加入 2 mL 胰酶，放入培养箱中消化 3~5 min。消化结束后，向培养皿中加入 4 mL 完全培养液，轻轻吹打使细胞脱落，转移细胞至 15 mL 离心管中，1000 r/min 离心 3 min。离心结束后，弃上清加入 1 mL 培养液重悬细胞，制成单细胞悬液。将 Caco-2 细胞以 1×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中，每孔加入 100 μL 细胞悬液，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去旧培养基，用温 PBS 清洗 3 次。吸出培养液后加入 10^8 CFU/mL（H 组）、10^7 CFU/mL（M 组）和 10^5 CFU/mL（L 组）的 *A.muciniphila* 菌液培养 24 h，向每孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂，随后放入培养箱中培养，1 h 后测定 450 nm 下的吸光度。根据公式计算细胞存活率。

$$细胞存活率(\%)=\frac{实验组OD值-空白组OD值}{对照组OD值-空白组OD值}$$

1.2.1.3 菌与细胞共培养　将 Caco-2 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔板中，每孔加 2 mL 细胞悬液，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去旧培养基，用温 PBS 清洗细胞 2 次，将不同浓度的 *A.muciniphila* 细菌与细胞共培养。在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后，用 PBS 清洗 3 次，收集细胞，用于提取 RNA。实验中未做处理的细胞作为空白组（CK 组），参考刘倚帆[20] 的方法加入 1 μg/mL 的 LPS 对细胞处理 4 h 作为模型组（LPS 组），每组 3 个重复（孔）。

1.2.1.4 *A. muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞分泌蛋白、细胞凋亡、细胞表达因子、MAPK 通路的影响　采用实时荧光定量 PCR 检测 Muc2、TFF3、Bax、Bcl-2、Bcl-w、Caspase-3、Caspase-8、p21、p27、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-10、IL-1β、p38、JNK、ERK mRNA 的表达水平，方法在 1.2.4 可见。

1.2.2 菌体组分对 Caco-2 细胞的影响

1.2.2.1 细胞壁制备　参考刘阳[21] 的制备方法。将培养好的 *A.muciniphila* 离心 10 min（4 ℃，5000 r/min），然后用 10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液重悬菌泥，使菌泥浓度达到 1 g/L。使用细胞破碎仪进行超声破碎，超声破碎结束后离心 10 min（4 ℃，3000×g），取上清再离心 20 min（4 ℃，13000×g），沉淀即为细胞壁提取物。

1.2.2.2 胞内容物制备　参考刘阳[21] 的制备方法。将培养好的 *A.muciniphila* 在 4 ℃、5000 r/min 条件下离心 10 min，向菌体沉淀中加入 TMS 溶液（由 0.02 mol/L 的氯化镁，0.01 mol/L 的 Tris-HCl，0.5 mol/L 的蔗糖组成的混合溶液）至终浓度为 30 mg/mL，加入溶菌酶并在 37 ℃ 下孵育 3 h，结束后离心 10 min（4 ℃，3000×g）沉淀即为胞内容物。

1.2.2.3 菌体组分对细胞的影响　将 Caco-2 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔板中，每孔加 2 mL 细胞悬液，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去旧培养基，用温 PBS 清洗细胞 3 次，将 100 μmol/L 提取的细菌组分与细胞共培养。在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后，用 PBS 清洗 3 次，收集细胞，用于提取 RNA。实验中未做处理的细胞作为空白组（CK 组），仅用 LPS 处理的细胞作为模型组（LPS 组），每组 3 个重复（孔）。

1.2.2.4　菌体组分对 Caco-2 细胞分泌蛋白、细胞凋亡、细胞表达因子、MAPK 通路的影响　采用实时荧光定量 PCR 检测 Muc2、TFF3、Bax、Bcl-2、Bcl-w、Caspase-3、Caspase-8、p21、p27、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-10、IL-1β、p38、JNK、ERK mRNA 的表达水平，方法在 1.2.4 可见。

1.2.3　菌代谢产物对 Caco-2 细胞的影响

1.2.3.1　代谢产物的获取和分析鉴定　将培养好的 *A.muciniphila* 菌液混匀后，取 10 mL 的菌液，离心 10 min（4 ℃，3000 r/min）。取全部上清，液氮速冻 15 min，置于−80 ℃ 保存，上述操作在操作台中进行。足量干冰寄送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行非靶向代谢测定，对比代谢产物含量后发现 L-天冬氨酸（Asp）、L-组氨酸（His）、柠檬酸（CA）和犬尿酸（KA）为主要代谢产物。

1.2.3.2　代谢产物对细胞存活率的影响　将 Caco-2 细胞以 1×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中，每孔加入 100 μL 细胞悬液，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去旧培养基，用温 PBS 清洗 3 次。将不含血清和双抗的 DMEM 培养液加入空白组细胞，将 100 μmol/L 代谢产物加入细胞中进行培养。培养 24 h 后，吸出上清液并加入 20 μL MTT，随后放入培养箱中培养，4 h 后加入 150 μL DMSO 并测定 490 nm 下的吸光度。根据 1.2.1.2 中公式计算细胞存活率。

1.2.3.3　代谢产物对细胞的影响　将 Caco-2 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔板中，每孔加 2 mL 细胞悬液，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养；隔天换液，直至细胞长满。弃去旧培养基，用温 PBS 清洗细胞 2 次，将 100 μmol/L 代谢物用 DMEM 基础培养基溶解后加入细胞中。在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后，用 PBS 清洗 3 次，收集细胞，用于提取 RNA。实验中未做处理的细胞作为空白组（CK 组），仅用 LPS 处理的细胞作为模型组（LPS 组），每组 3 个重复（孔）。

1.2.3.4　菌代谢产物对 Caco-2 细胞分泌蛋白、细胞凋亡、细胞表达因子、MAPK 通路的影响　采用实时荧光定量 PCR 检测 Muc2、TFF3、Bax、Bcl-2、Bcl-w、Caspase-3、Caspase-8、p21、p27、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-10、IL-1β、p38、JNK、ERK mRNA 的表达水平，方法在 1.2.4 可见。

1.2.4　细胞 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析

1.2.4.1　提取细胞 RNA　将从培养箱拿出的细胞，用预冷 PBS 清洗，加入 1 mL Trizol 进行消化、裂解后，将溶液移入 1.5 mL Ep 管中，室温静置 5 min，进行 RNA 提取。向无酶离心管中加入 200 μL 氯仿，盖紧离心管，剧烈摇晃离心管 15 s，室温孵育 2~3 min；在 4 ℃ 条件下，12000×g 离心 15 min 后，样品出现分层；吸取上清液转移至新的无酶离心管中，向上清液中加入 500 μL 异丙醇，轻微振荡；4 ℃ 孵育 10 min，孵育结束后，在 4 ℃ 条件下，12000×g 离心 10 min。用微量移液枪将上清液吸出弃掉，按 1∶1 的比例加入 75% 的乙醇，涡旋混匀样品；4 ℃、8000×g 离心 5 min。离心结束弃去上清液，风干 5~10 min；取 20 μL 的无菌无酶水溶解 RNA；55~60 ℃ 金属浴 10 min，金属浴结束后对 RNA 浓度及纯度进行测定。

1.2.4.2　实时荧光定量 PCR　根据 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行操作。qPCR 操作体系总体积为 20 μL，组成如下：2 μL cDNA，0.4 μL Primer 1，0.4 μL Primer 2，7.2 μL ddH_2O，10 μL 2× Taq Pro Universal SYBR qPCR Master。引物序列如表 1 所示。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1　Real-time fluorescent quantitative PCR primer sequence

目的基因	引物序列（5'-3'）
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Muc2	F: GCCTTCCAAGCCATCGTCCAC
	R: CAGTCGCACAGCCACCAAGTC
TFF3	F: CTGGTCCTGGCCTTGCTGTC
	R: CGCAGTCCACCCTGTCCTTG
Bax	F: GATGCGTCCACCAAGAAGCTGAG
	R: CACGGCGGCAATCATCCTCTG
Bcl-2	F: TACGAGTGGGATGCGGGAGATG
	R: CCGGGCTGGGAGGAGAAGATG
Bcl-w	F: GCTGACCCGCTGCACCAAG
	R: TGAGCCGCCAGATCAGAGAAGG
Caspase-3	F: GTGGAGGCCGACTTCTTGTATGC
	R: TGGCACAAAGCGACTGGATGAAC
Caspase-8	F: CTTTGACCACGACCTTTGAAGAGC
	R: AGAGGATACAGCAGATGAAGCAGTC
p21	F: CTCTCCCGAAAAGCAGTCCC
	R: GCGAGAACGAGCCAACCTT
p27	F: CAGCACATGACGGAGGTTGT
	R: TCATCCAAATACTCCACACGC
TNF-α	F: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	R: GCTACGACGTGGGCTACAG
IL-6	F: CAGTCGCACAGCCACCAAGTC
	R: GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC
IL-8	F: GGACCACACTGCGCCAACAC
	R: CCCTCTGCACCCAGTTTTCCTTG
IL-10	F: GCCAAGCCTTGTCTGAGATGATCC
	R: GCCTTGATGTCTGGGTCTTGGTTC
IL-1β	F: GACCTGGACCTCTGCCCTCTG
	R: GCCTGCCTGAAGCCCTTGC
p38	F: GTGCCCGAGCGTTACCAGAAC
	R: GGAGAGCTTCTTCACTGCCACAC
JNK	F: ACTACAGAGCACCCGAGGTCATC
	R: TTTCTCCCATGATGCACCCAACTG
ERK	F: TCGCCGAAGCACCATTCAAGTTC
	R: TCCTGGCTGGAATCTAGCAGTCTC

1.3 数据处理

所有实验重复至少三次，数据以平均值±标准差表示。利用 SPSS 27.0 软件通过单因素方差分析（ANOVA）进行数据分析，当 $P<0.05$ 时，差异有统计学意义。用 GraphPad Prism 8.3.0 对分析数据作图。

2 结果与分析

2.1 *A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞的影响

2.1.1 *A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞活性的影响

如图 1 所示，与 CK 组相比，LPS 处理后细胞存活率显著下降（$P<0.05$），加入 *A.muciniphila* 后，Caco-2 活性增加，与 LPS 组相比，H 组和 L 组细胞存活率分别上升了 12.20%、9.79%，但与 LPS 组之间没有显著性差异；M 组显著上升了 16.91%（$P<0.05$），表明 *A.muciniphila* 对 Caco-2 细胞无毒害作用，能够恢复细胞活性，与刘阳[21] 研究结果相似。

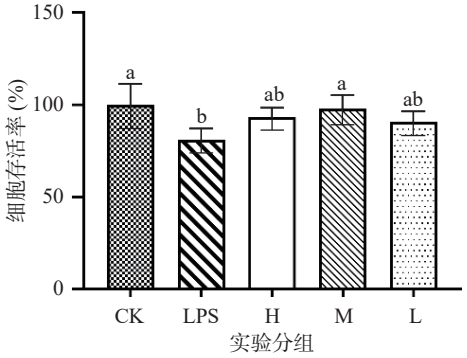


图 1 *A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞活性的影响

Fig.1 Effect of *A.muciniphila* on Caco-2 cell activity

注：H 组为 10^8 CFU/mL；M 组为 10^7 CFU/mL；L 组为 10^5 CFU/mL；不同字母代表有显著性差异（$P<0.05$），图 2~图 14 同。

2.1.2 *A.muciniphila* 菌对细胞分泌 Muc2 和 TFF3 的影响 Muc2 和 TFF3 作为黏蛋白及辅助因子，能清除肠道内容物，隔离并控制肠道微生物入侵和定植，维持肠道内稳态平衡。根据图 1 的结果可知，*A.muciniphila* 与 LPS 共同培养对细胞无毒害作用。为了分析 *A.muciniphila* 的修复作用与细胞分泌的 Muc2 和 TFF3 之间关系，测定各组细胞 Muc2 和 TFF3 的 mRNA 相对表达量。根据图 2A 的实验结果可知，与 CK 组相比，LPS 诱导 Caco-2 细胞分泌的 Muc2 mRNA 相对表达量显著减少（$P<0.05$），降低了 15.22%；与 LPS 组相比，H 组 Muc2 mRNA 的相对表达量无显著性变化，上升 7.64%，M 组和 L 组显著上升，分别上升了 16.75% 和 11.57%。图 2B 的实验结果显示，与 CK 组相比，LPS 处理后 Caco-2 细胞 TFF3 mRNA 的相对表达量显著下降（$P<0.05$），下降了 9.97%；与 LPS 组相比，H 组、M 组和 L 组细胞 TFF3 mRNA 的相对表达量均显著上升（$P<0.05$），分别上升了 7.34%、12.38%、9.71%。

已有研究表明，LPS 诱导 Caco-2 细胞紧密连接蛋白表达量下降，破坏细胞间紧密连接，抑制细胞分泌 Muc2，破坏肠道屏障[22−23]。刘阳[21] 研究发现

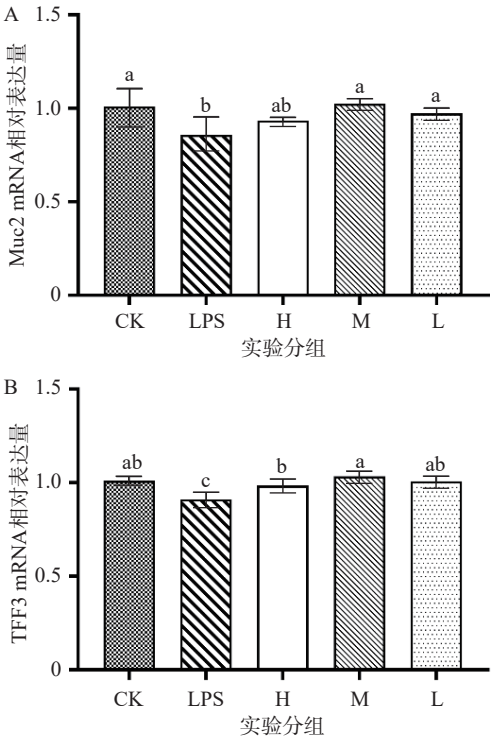


图 2 *A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞分泌 Muc2 和 TFF3 的影响

Fig.2 Effect of *A.muciniphila* on Muc2 and TFF3 secretion by Caco-2 cells

注：（A）Muc2 mRNA 相对表达量；（B）TFF3 mRNA 相对表达量。

A.muciniphila 增加紧密连接蛋白表达量，修复肠道屏障损伤。本研究结果显示，10^7、10^5 CFU/mL *A.muciniphila* 显著增加 Muc2 和 TFF3 mRNA 相对表达量，10^8 CFU/mL *A.muciniphila* 显著增加了 TFF3 mRNA 相对表达量，减轻屏障损伤，保护肠道屏障，说明 *A.muciniphila* 菌对 LPS 诱导造成的肠道屏障损伤有减缓作用，但是没有明确的剂量依赖关系。

2.1.3 *A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞凋亡的影响

为了探究 *A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞凋亡的影响，检测了促凋亡因子（Bax、Caspase-3、Caspase-8）、促凋亡蛋白 p21、p27、抗凋亡因子 Bcl-w mRNA 的相对表达量。图 3A 的结果显示，与 CK 组相比，LPS 处理后细胞 Bax mRNA 的相对表达量显著上升（$P<0.05$）；与 LPS 组相比，M 组和 L 组的 Bax mRNA 的相对表达量显著降低（$P<0.05$），H 组则无显著性差异。图 3B 的结果显示，与 CK 组相比，LPS 诱导细胞抗凋亡因子 Bcl-w mRNA 的相对表达量显著降低（$P<0.05$）；与 LPS 组相比，H 组、M 组和 L 组的 Bcl-w mRNA 的相对表达量显著上升（$P<0.05$）。图 3C 和图 3D 是促凋亡因子 Caspase-3 和 Caspase-8 的 mRNA 的相对表达量，结果显示与 CK 组相比，LPS 显著上调细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 的 mRNA 的相对表达量（$P<0.05$）；与 LPS 组相比，H 组、M 组、L 组的 Caspase-3 mRNA 和 Caspase-8 mRNA 的相对表达量显著降低（$P<0.05$）。图 3E、图 3F 是促凋亡蛋白因子 p21、p27 mRNA 的相对表达量，结果显

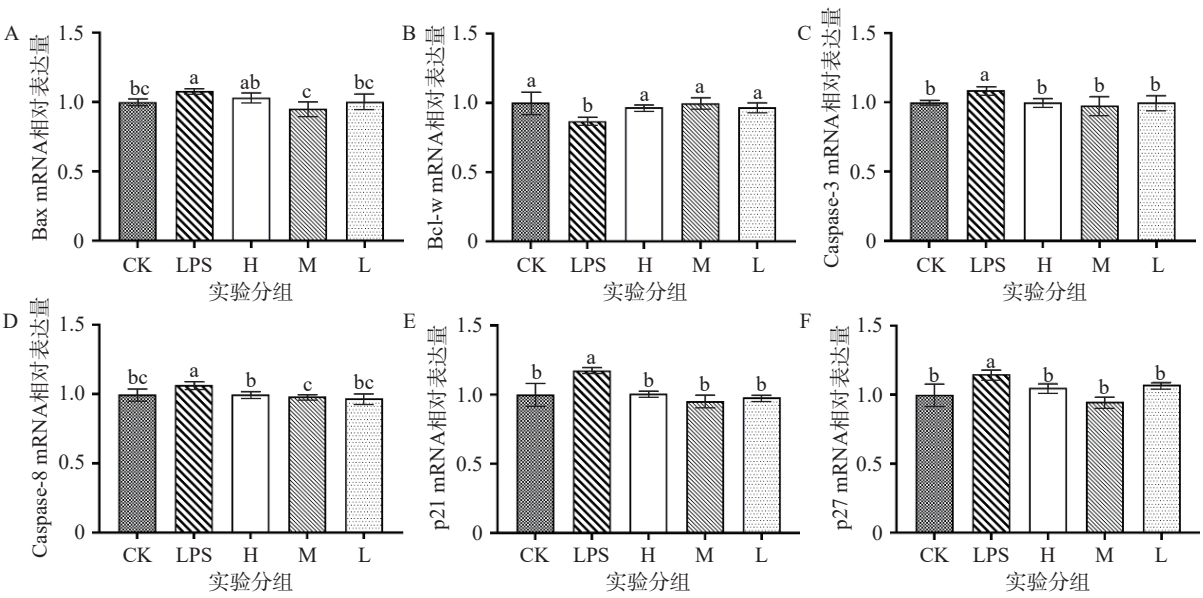


图 3　*A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞凋亡因子 mRNA 水平的影响

Fig.3　Effect of *A.muciniphila* on apoptosis gene mRNA levels in Caco-2 cells

注：(A)Bax mRNA 相对表达量；(B)Bcl-w mRNA 相对表达量；(C)Caspase-3 mRNA 相对表达量；(D)Caspase-8 mRNA 相对表达量；(E)p21 mRNA 相对表达量；(F)p27 mRNA 相对表达量。

示，与 CK 组相比，LPS 处理后细胞 p21、p27 mRNA 的相对表达量显著增加（P<0.05）；与 LPS 组相比，H 组、M 组和 L 组细胞 p21、p27 mRNA 的相对表达量显著降低（P<0.05）。

有研究发现，LPS 处理后促凋亡因子（Bax、Caspase-3、Caspase-8）表达量显著增加[22]。卷曲乳杆菌下调 Caspase-3 和 Caspase-8 表达，抑制 Caco-2 细胞凋亡；枯草芽孢杆菌通过下调 Bax/Bcl-2 表达，提高细胞存活率[24]。本研究结果显示，10^7、10^5 CFU/mL *A.muciniphila* 显著增加 Bcl-w mRNA 的相对表达量，降低 Bax、Caspase-3、Caspase-8、p21 和 p27 mRNA 的相对表达量，10^8 CFU/mL *A.muciniphila* 显著增加 Bcl-w mRNA 的相对表达量，减少 Caspase-3、p21 和 p27 mRNA 的相对表达量，减少细胞凋亡。综合各细胞凋亡因子结果，各指标改善效果最好剂量不一致，*A.muciniphila* 没有明显的剂量依赖关系，Liu 等[25] 的研究发现相似的结果，可能是由于在高黏蛋白下，*A.muciniphila* 才能在基因和代谢物水平上对培养环境产生显著响应，并通过改变对碳水化合物和氨基酸的影响来改变其代谢特性。

2.1.4　*A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞分泌的细胞因子的影响　已有大量研究表明肠道屏障受损会导致促炎因子表达量显著增加，抗炎因子表达量显著降低，从而引起肠道炎症[26]。为进一步研究 *A.muciniphila* 对肠道屏障的影响，对相关因子表达量进行检测。根据图 4 的实验结果可知，与 CK 组相比，LPS 诱导 Caco-2 细胞 TNF-α mRNA、IL-1β mRNA、IL-6 mRNA、IL-8 mRNA 的相对表达量显著上升，IL-10 mRNA 的相对表达量显著下降，其中 M 组细胞 TNF-α mRNA 的相对表达量显著低于 H、L 组（P<0.05）；与 LPS 组相比，H 组、M 组和 L 组细胞 TNF-α mRNA、IL-1β mRNA、IL-6 mRNA 的相对表达量显著下降，M 组和 L 组细胞 IL-8 mRNA 的相对表达量显著下降，H 组、M 组和 L 组细胞 IL-10 mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05）。*A.muciniphila* 通过增加细胞紧密连接蛋白表达量，抑制细胞分泌促炎因子，促进细胞分泌抗炎因子，减轻沙门氏菌侵染细胞引起的肠道屏障损伤[26]。此外，体外培育的类器官模型结果显示 *A.muciniphila* 能改善 TNF-α 引起的类器官炎症[27]。10^8、10^7、10^5 CFU/mL *A.muciniphila* 能显著降低 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-8 mRNA 的相对表达量，显著增加 IL-10 mRNA 的相对表达量，说明 *A.muciniphila* 可以通过抑制促炎因子产生，促进抗炎因子产生，减轻细胞炎症，修复肠道屏障损伤。

2.1.5　*A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞中 MAPK 通路的影响　MAPK 信号通路能将细胞外信号从表面传导至细胞核内部，与细胞增殖、凋亡、分化和应激反应有关[28]，主要由 ERK、p38 和 JNK 三个信号通路组成[29]，现 MAPK 通路中主要的三个蛋白通过调节细胞凋亡和紧密连接蛋白，保护肠道屏障[30]。根据图 5A 的结果可知，与 CK 组相比，LPS 组 Caco-2 细胞 p38 mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05）；与 LPS 组相比，H 组、M 组和 L 组细胞 p38 mRNA 的相对表达量显著下降（P<0.05），分别下降了 14.18%、16.49%、14.78%。图 5B 的结果显示，与 CK 组相比较，LPS 处理后 JNK mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05），上升了 7.2%；与 LPS 组相比，H 组、M 组、L 组细胞 JNK mRNA 的相对表达量显著下降（P<0.05），分别下降了 7.80%、9.69%、9.64%。由

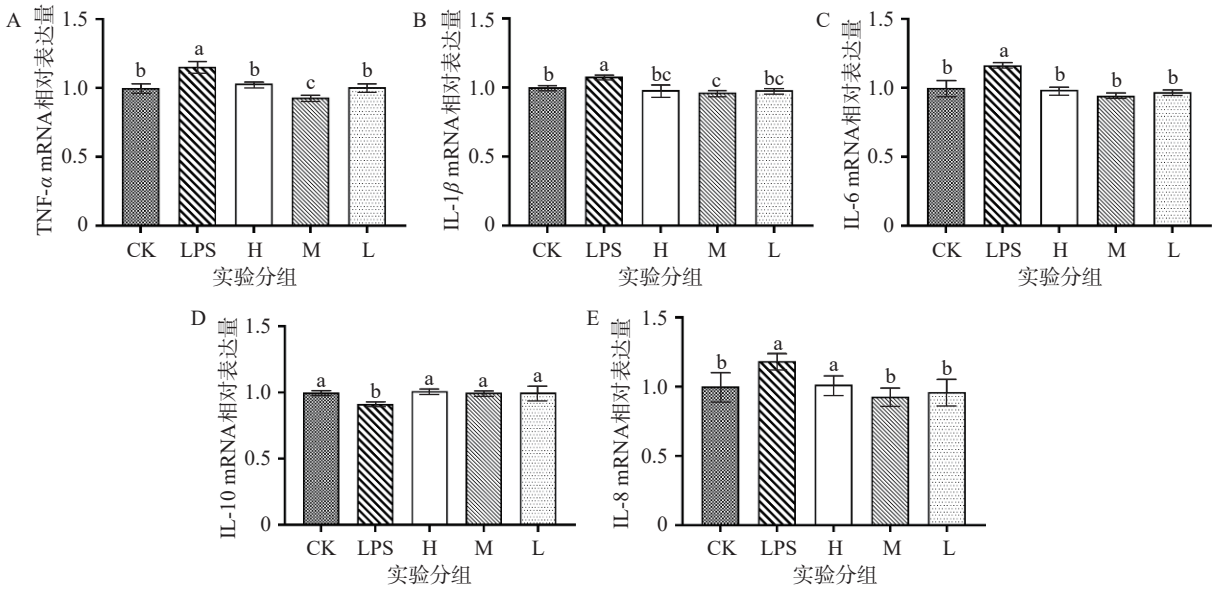


图 4　*A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞分泌细胞因子 mRNA 水平的影响

Fig.4　Effect of *A.muciniphila* on mRNA levels of cytokines secreted by Caco-2 cells

注:(A)TNF-α mRNA 相对表达量;(B)IL-1β mRNA 相对表达量;(C)IL-6 mRNA 相对表达量;(D)IL-10 mRNA 相对表达量;(E)IL-8 mRNA 相对表达量。

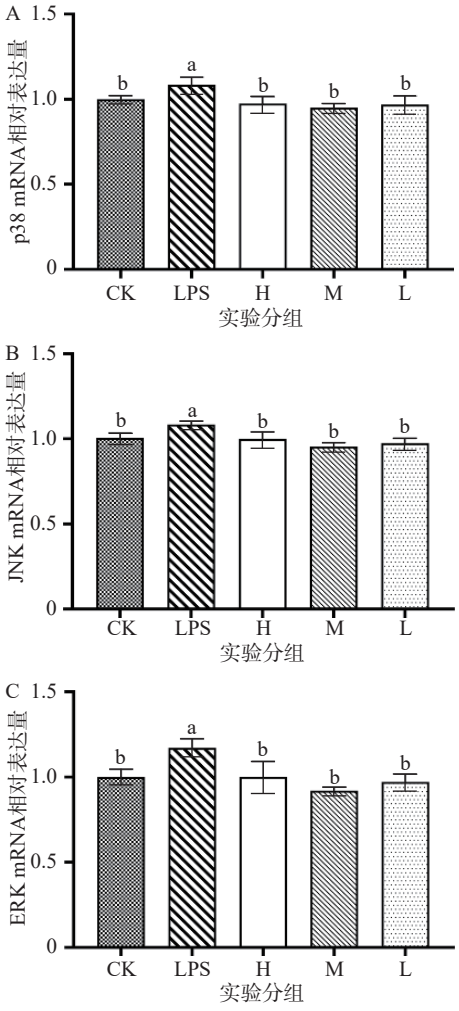


图 5　*A.muciniphila* 菌对 Caco-2 细胞中 MAPK 通路的影响

Fig.5　Effect of *A.muciniphila* on MAPK pathway in Caco-2 cells

注:(A)p38 mRNA 相对表达量;(B)JNK mRNA 相对表达量;(C)ERK mRNA 相对表达量。

图 5C 的结果可知,与 CK 组相比,LPS 处理后 ERK mRNA 的相对表达量显著上升了 17.1%(P<0.05);与 LPS 组相比,H 组、M 组和 L 组细胞 ERK mRNA 的相对表达量显著下降(P<0.05),分别下降了 16.92%、24.29%、19.92%。

Zhu 等[30] 研究发现,LPS 引起仔猪肠道屏障受损,促进 p38 MAPK 和 JNK 磷酸化,而罗乳杆菌则抑制 p38 MAPK 和 JNK 磷酸化,修复受损的肠道屏障。Casula 等[31] 研究发现植物乳杆菌和干酪乳杆菌调节 p38 表达,增加肠道通透性,上调紧密连接蛋白表达。本研究结果显示不同浓度的 *A.muciniphila* 均可抑制 MAPK 信号通路激活,增强肠道屏障的完整性,抑制肠道炎症水平。

2.2　*A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞的影响

2.2.1　*A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞分泌 Muc2 和 TFF3 的影响　上述实验证实了 *A.muciniphila* 菌可以抑制 MAPK 信号通路激活,保护肠道屏障的完整性,为进一步探讨发挥作用的具体物质,对 *A.muciniphila* 菌体组分剥离,从细胞壁和胞内容物两个部分对 *A.muciniphila* 菌体组分的屏障保护作用进行研究。由图 6 的实验结果可知,与 LPS 组相比,*A.muciniphila* 菌细胞壁组细胞 Muc2 和 TFF3 mRNA 的相对表达量显著上升(P<0.05),*A.muciniphila* 菌胞内容物 Muc2 和 TFF3 mRNA 的相对表达量与模型组并无显著性差异,说明 *A.muciniphila* 菌细胞壁对 LPS 导致的肠道屏障损伤具有缓解作用,而胞内容物无缓解作用。有研究表明,*A.muciniphila* 胞内容物对 DSS 造成的屏障损伤并无修复作用,*A.muciniphila* 细胞壁能上调 Caco-2 细胞紧密连接蛋白表达,恢复 DSS 造成的肠道屏障损伤,*A.muciniphila* 菌细

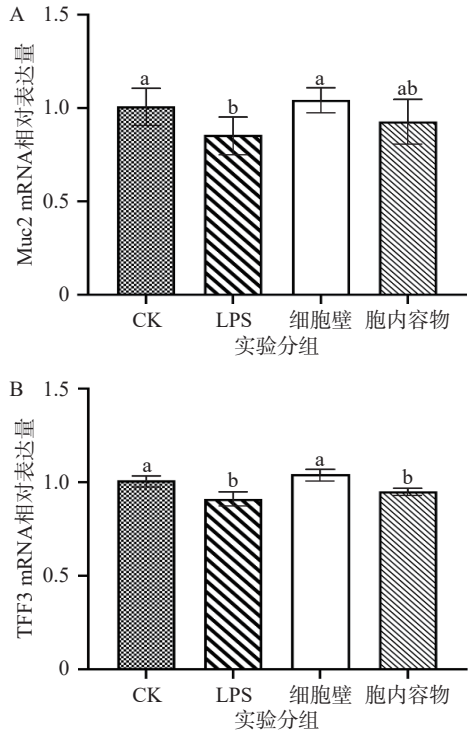


图 6　*A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞分泌 Muc2 和 TFF3 的影响

Fig.6　Effect of *A.muciniphila* components on Muc2 and TFF3 secretion by Caco-2 cells

注：(A)Muc2 mRNA 相对表达量；(B)TFF3 mRNA 相对表达量。

胞壁调节肠道屏障的作用可能与菌体表面物质有关[30−32]。

2.2.2　*A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞凋亡的影响　根据图 7 的实验结果可知，*A.muciniphila* 菌体组分可以减轻 LPS 引起的 Caco-2 细胞凋亡。图 7 的结果显示，与 CK 组相比，LPS 处理后，细胞促凋亡因子 Bax、Caspase-3、Caspase-8 mRNA 的相对表达量显著上升，促凋亡蛋白因子 p21、p27mRNA 的相对表达量显著增加（P<0.05）；与 LPS 组相比，*A.muciniphila* 菌细胞壁和胞内容物组细胞 Bax、Caspase-3、Caspase-8 mRNA 的相对表达量显著降低，*A.muciniphila* 细胞壁和胞内容物组细胞 p21、p27 mRNA 的相对表达量显著降低（P<0.05）；与 CK 组相比，LPS 诱导细胞 Bcl-w mRNA 的相对表达量显著降低；与 LPS 组相比，*A.muciniphila* 细胞壁组细胞的 Bcl-w mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05），*A.muciniphila* 胞内容物组则无显著性差异。与图 6 分析对 Caco-2 细胞分泌黏蛋白的影响结果相似，相较于细胞内容物，*A.muciniphila* 细胞壁是保护肠道屏障的主要物质。

2.2.3　*A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞细胞因子表达的影响　为进一步研究 *A.muciniphila* 菌体组分对肠道屏障的影响，对相关细胞因子表达量进行检测。根据图 8 的实验结果可知，与 CK 组相比，LPS 诱导 Caco-2 细胞分泌的 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05）；与 LPS 组相比，*A.muciniphila* 细胞壁和胞内容物组细胞 TNF-

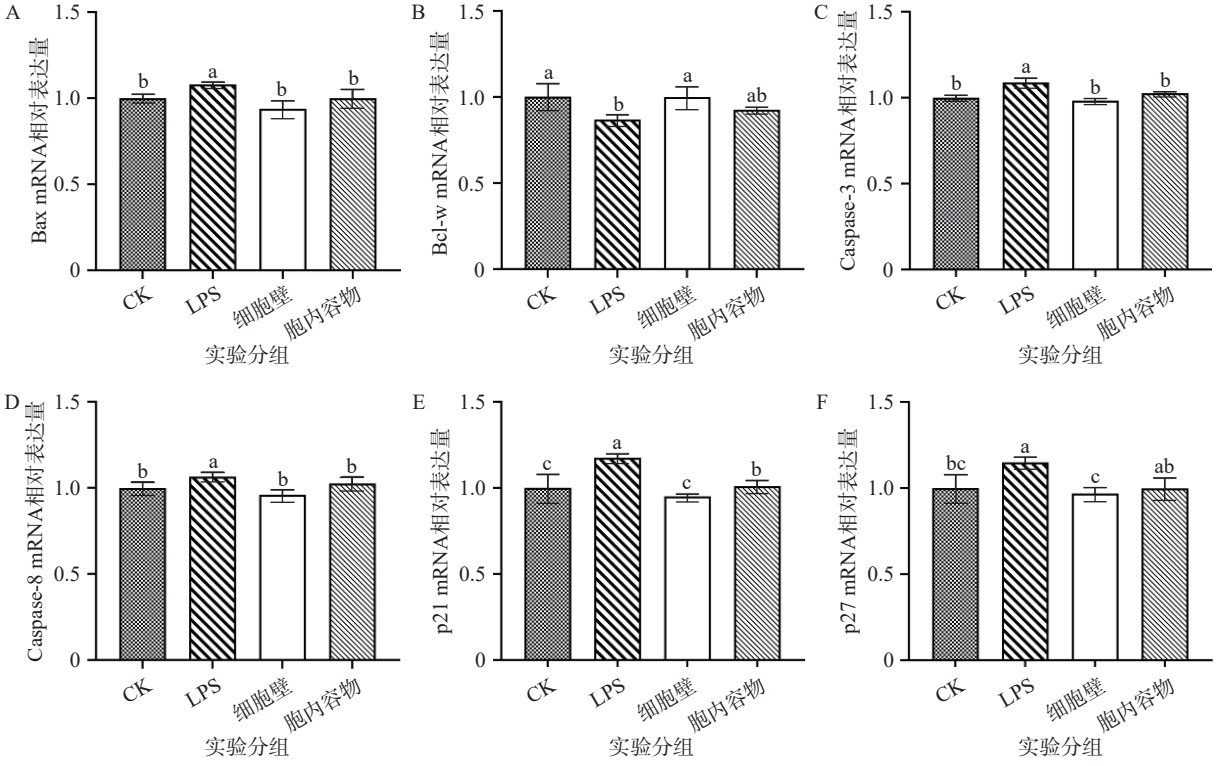


图 7　*A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞凋亡的影响

Fig.7　Effect of cellular components of *A.muciniphila* on apoptosis of Caco-2 cells

注：(A)Bax mRNA 相对表达量；(B)Bcl-w mRNA 相对表达量；(C)Caspase-3 mRNA 相对表达量；(D)Caspase-8 mRNA 相对表达量；(E)p21 mRNA 相对表达量；(F)p27 mRNA 相对表达量。

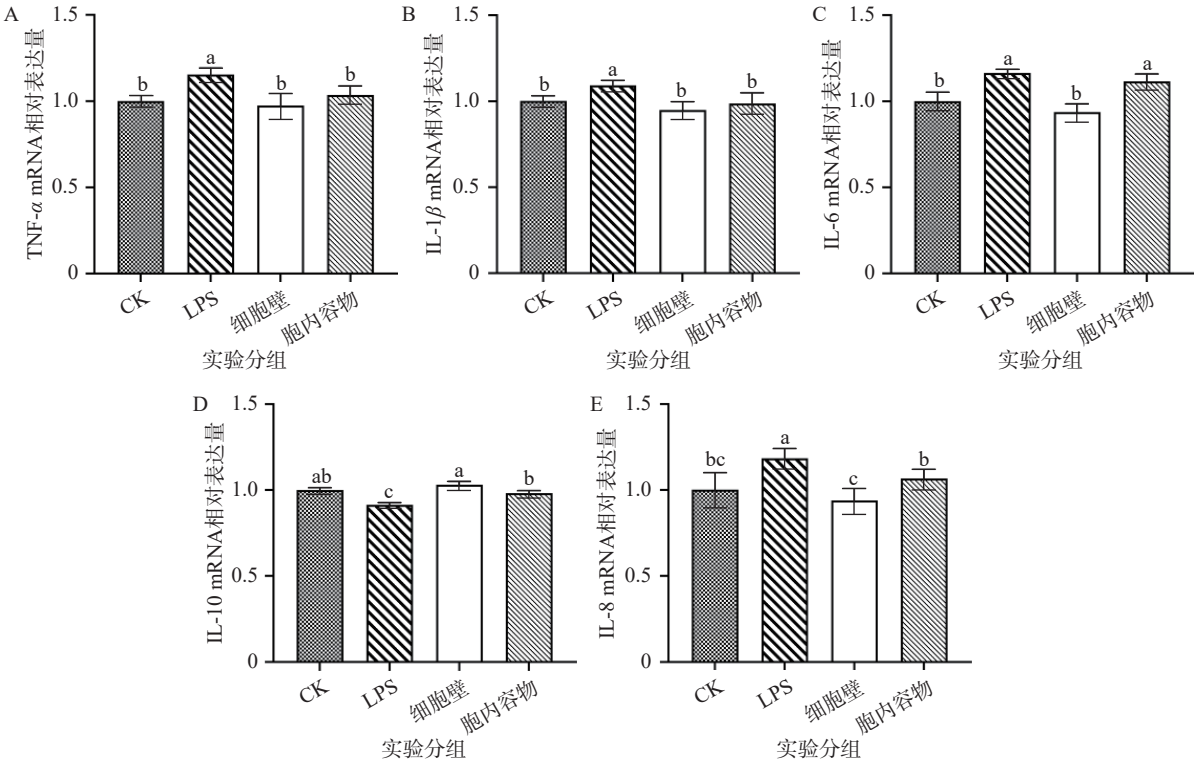


图 8 *A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞分泌细胞因子的影响

Fig.8 Effect of *A.muciniphila* components on cytokine secretion by Caco-2 cells

注:(A)TNF-α mRNA 相对表达量;(B)IL-1β mRNA 相对表达量;(C)IL-6 mRNA 相对表达量;(D)IL-10 mRNA 相对表达量;(E)IL-8 mRNA 相对表达量。

α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达量显著下降(P<0.05);与 CK 组相比,LPS 处理后细胞 IL-10 mRNA 的相对表达量显著下降(P<0.05);与 LPS 组相比,*A.muciniphila* 细胞壁组和胞内容物组细胞 IL-10 mRNA 的相对表达量显著上升(P<0.05)。

A.muciniphila 菌细胞壁相较于 *A.muciniphila* 菌胞内容物更能影响抗炎因子 mRNA 的相对表达量,减缓炎症损伤。已有研究发现,暹罗芽孢杆菌细胞壁显著上调抗炎因子表达,降低促炎因子表达,对 β-伴大豆蛋白造成的细胞损伤具有缓解作用[33]。双歧杆菌细胞壁显著降低促炎因子表达水平,升高抗炎因子表达水平,参与免疫反应,防止炎性后遗症[34]。这与本研究结果相似,说明 *A.muciniphila* 菌细胞壁减轻细胞炎症损伤,保护肠道屏障。

2.2.4 *A.muciniphil*a 菌体组分对 Caco-2 细胞 MAPK 通路的影响 根据图 9A 的结果可知,与 CK 组相比,LPS 组 Caco-2 细胞 p38 mRNA 的相对表达量显著上升(P<0.05);与 LPS 组相比,*A.muciniphila* 细胞壁组和胞内容物组细胞 p38 mRNA 的相对表达量显著下降(P<0.001),分别下降了 15.77% 和 9.42%。根据图 9B 的结果可知,与 CK 组相比,LPS 处理后 JNK mRNA 的相对表达量显著上升(P<0.05),上升了 7.2%;与 LPS 组相比,*A.muciniphila* 细胞壁组和胞内容物组 JNK mRNA 的相对表达量显著下降(P<0.05),分别下降了 15.2%、4.8%。根据图 9C 的结果可知,与 CK 组相比,LPS 处理后 ERK mRNA

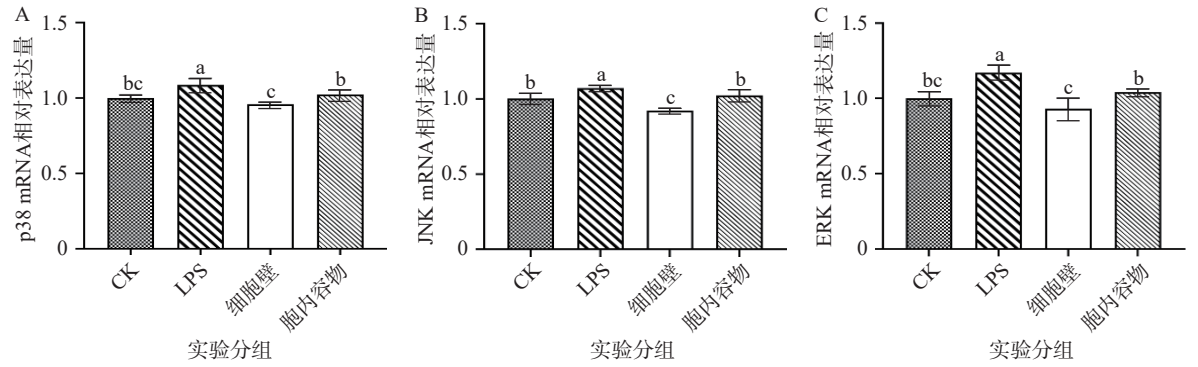


图 9 *A.muciniphila* 菌体组分对 Caco-2 细胞 MAPK 信号通路的影响

Fig.9 Effect of *A.muciniphila* components on MAPK signaling pathway of Caco-2 cells

注:(A)p38 mRNA 相对表达量;(B)JNK mRNA 相对表达量;(C)ERK mRNA 相对表达量。

的相对表达量显著上升了 17.1%（P<0.05）；与 LPS 组相比，*A.muciniphila* 菌细胞壁组和胞内容物组细胞 ERK mRNA 的相对表达量显著下降（P<0.05），分别下降了 23.77% 和 12.97%。上述结果说明，*A.muciniphila* 菌细胞壁相较于 *A.muciniphila* 胞内容物更能显著抑制 MAPK 信号通路的激活，减轻肠道屏障损伤。以往研究发现，嗜酸乳杆菌 S 层蛋白下调 ERK、JNK 和 p38 表达，抑制 MAPK 信号通路激活，减轻细胞损伤[35]。暹罗芽孢杆菌细胞壁抑制 p38 表达，抑制 MAPK 信号通路激活[33]。说明 *A.muciniphila* 菌细胞壁能够抑制 MAPK 信号通路激活。

2.3　*A.muciniphila* 菌代谢产物对 Caco-2 细胞的影响

2.3.1　*A.muciniphila* 菌代谢产物对 Caco-2 细胞活性的影响　采用 MTT 法测定代谢产物对细胞活性的影响，结果如图 10 所示，与 CK 组相比，LPS 诱导细胞活性显著降低，降低 18.23%；与 LPS 组相比，柠檬酸（CA）和犬尿酸（KA）组细胞活性显著上升，分别上升 19.70%、19.25%，L-天冬氨酸（Asp）和 L-组氨酸（His）细胞存活率分别上升 13.83%、15.06%。上述结果说明，*A.muciniphila* 菌主要代谢产物 Asp、His、CA 和 KA 与 LPS 共同作用后对细胞无毒害作用。

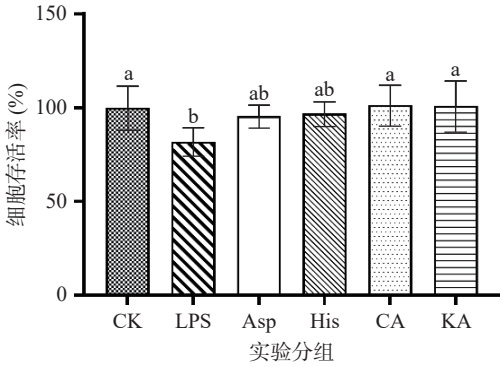


图 10　*A.muciniphila* 菌主要代谢产物对 Caco-2 细胞活性的影响

Fig.10　Effect of main metabolites of *A.maciniphila* on the activity of Caco-2 cells

2.3.2　*A.muciniphila* 菌代谢产物对 Caco-2 细胞分泌 Muc2 和 TFF3 的影响　由图 11A 的结果可知，与 CK 组相比，LPS 组细胞 Muc2 mRNA 的相对表达量显著下降（P<0.05），与 LPS 组相比，Asp、His、CA 和 KA 组 mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05），分别上升 18.09%、20.29%、23.67%、18.61%，说明这几种代谢产物对 LPS 诱导细胞造成的黏蛋白表达量减少有减缓作用。图 11B 的结果显示，与 LPS 组相比，四种代谢产物处理后细胞的 TFF3 mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05），分别上升 10.22%、10.21%、10.29%、10.98%。上述结果说明 Asp、His、CA 和 KA 能减缓 LPS 造成的 Caco-2 细胞 Muc 2 和 TFF3 mRNA 的相对表达量降低，减轻肠道屏障损伤。已有研究发现，CA、Asp、His 和

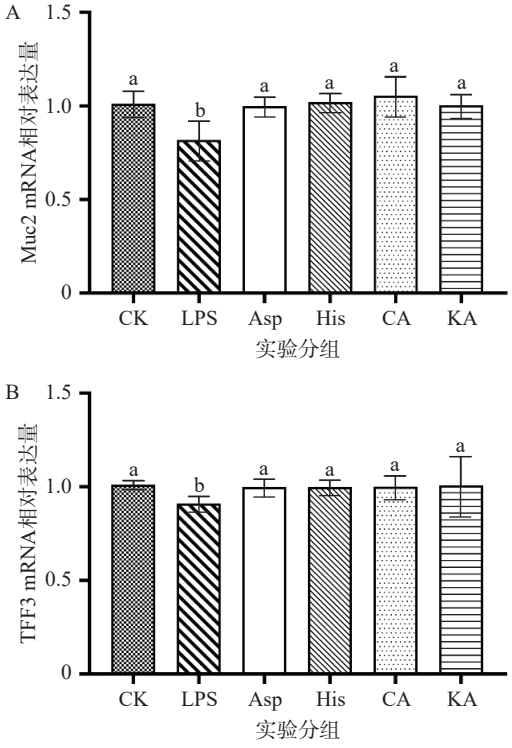


图 11　*A.muciniphila* 菌主要代谢产物对 Caco-2 细胞分泌 Muc2 和 TFF3 的影响

Fig.11　Effect of main metabolites of *A.maciniphila* on Muc2 and TFF3 secretion by Caco-2 cells

注：（A）Muc2 mRNA 相对表达量；（B）TFF3 mRNA 相对表达量。

KA 通过上调紧密连接蛋白表达，减轻肠道屏障损伤，促进肠道屏障的稳定[36−38]。说明 *A.muciniphila* 菌主要代谢产物 Asp、His、CA 和 KA 可以通过上调 Muc2 和 TFF3 mRNA 的相对表达量，抑制 LPS 对肠道屏障的损伤。

2.3.3　*A.muciniphila* 菌代谢产物对 Caco-2 细胞凋亡的影响　图 12 为不同处理对 Bax、Bcl-w、Caspase-3、Caspase-8、p21、p27 mRNA 的相对表达量的影响，与 CK 组相比，LPS 处理后细胞 Bax、Caspase-3、Caspase-8、p21、p27 mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05）；与 LPS 组相比，Asp、His、CA 和 KA 组细胞 Bax、Caspase-3、Caspase-8、p21、p27 mRNA 的相对表达量显著降低（P<0.05）；图 12B 是各组细胞 Bcl-w mRNA 的相对表达量，与 CK 组相比，LPS 组 Bcl-w mRNA 的相对表达量显著下降（P<0.05）；与 LPS 组相比，Asp、His、CA 和 KA 组 Bcl-w mRNA 的相对表达量显著上升（P<0.05）。本研究结果显示，Asp、His、CA 和 KA 减少促凋亡因子 mRNA 的相对表达量，增加抗凋亡因子 mRNA 的相对表达量，减少细胞凋亡，修复受损的肠道屏障。已有研究发现，CA 通过上调 Bcl/Bax 抗凋亡比率，抑制肠道上皮细胞凋亡，维持肠道完整性，保护肠道屏障[37]。Asp 能显著降低肠道细胞中 Caspase-3 和 Caspase-8 表达量，减轻细胞凋亡，维持肠道屏障完整性，缓解肠道损伤[38]。这与本研究结果相似，说明这四种代谢产物可以通过增加抗凋亡因子 mRNA 的相对表达

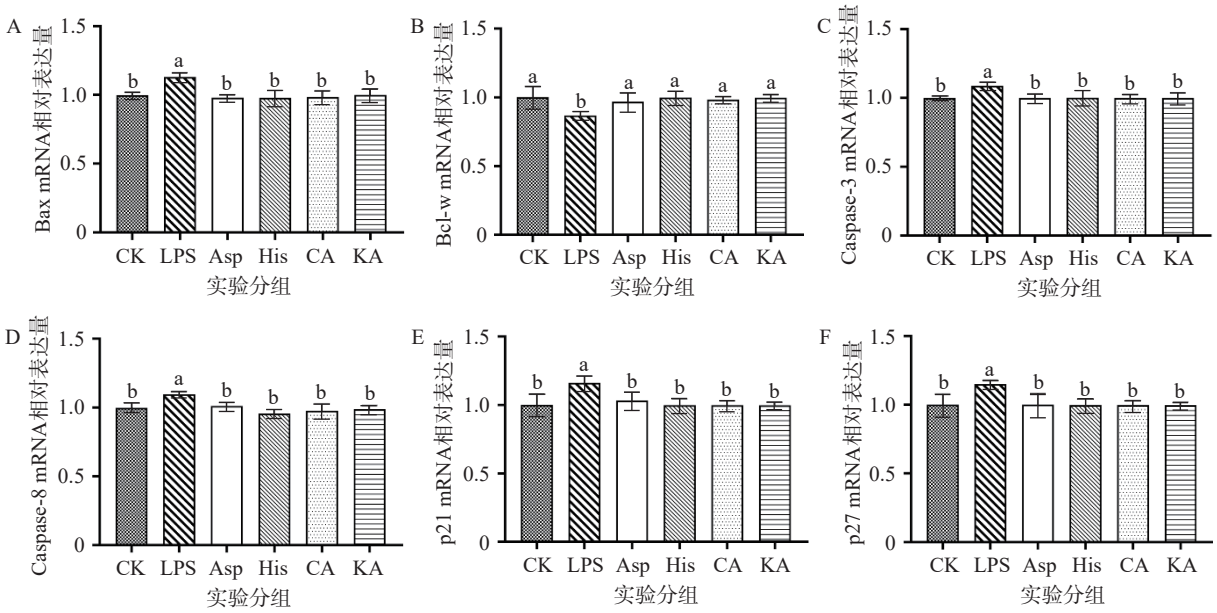


图 12 *A.muciniphila* 菌主要代谢产物对 Caco-2 细胞凋亡因子 mRNA 水平的影响

Fig.12 Effect of main metabolites of *A.maciniphila* on mRNA levels of apoptosis genes in Caco-2 cells

注:(A)Bax mRNA 相对表达量;(B)Bcl-w mRNA 相对表达量;(C)Caspase-3 mRNA 相对表达量;(D)Caspase-8 mRNA 相对表达量;(E)p21 mRNA 相对表达量;(F)p27 mRNA 相对表达量。

量,降低促凋亡因子 mRNA 的相对表达量,减少细胞凋亡,减轻 LPS 对肠道屏障的损伤,保护肠道屏障。

2.3.4 *A.muciniphila* 菌代谢产物对 Caco-2 细胞细胞因子表达的影响 图 13 是各组细胞的细胞因子表达量,由图可知,与 CK 组相比,LPS 组细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达量显著上升(P<0.05),IL-10 mRNA 的相对表达量显著下降(P<0.05);与 LPS 组相比,Asp、His、CA 和 KA 组细胞显著降低 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达量(P<0.05),Asp、His、CA 和 KA 组细胞 IL-10 mRNA 的相对表达量显著上升(P<0.05)。上述结果说明 LPS 显著增加 Caco-2 细胞促炎因子 mRNA 的相对表达量,显著降低抗炎因子 mRNA 的相对表达量,破坏肠道屏障,引起肠道炎症;而 Asp、His、CA 和 KA 则与之相反,通过上调抗炎因子,下调促炎因子保护和修复受损的肠道屏障,减轻肠道炎症。CA 处理能显著抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的产生,减轻肠道炎症损伤[37];His 可以显著降低肠道 IL-8 和 TNF-α 的表达量,增加 IL-10 表达量,减缓了肠道炎症,保护肠道屏障功

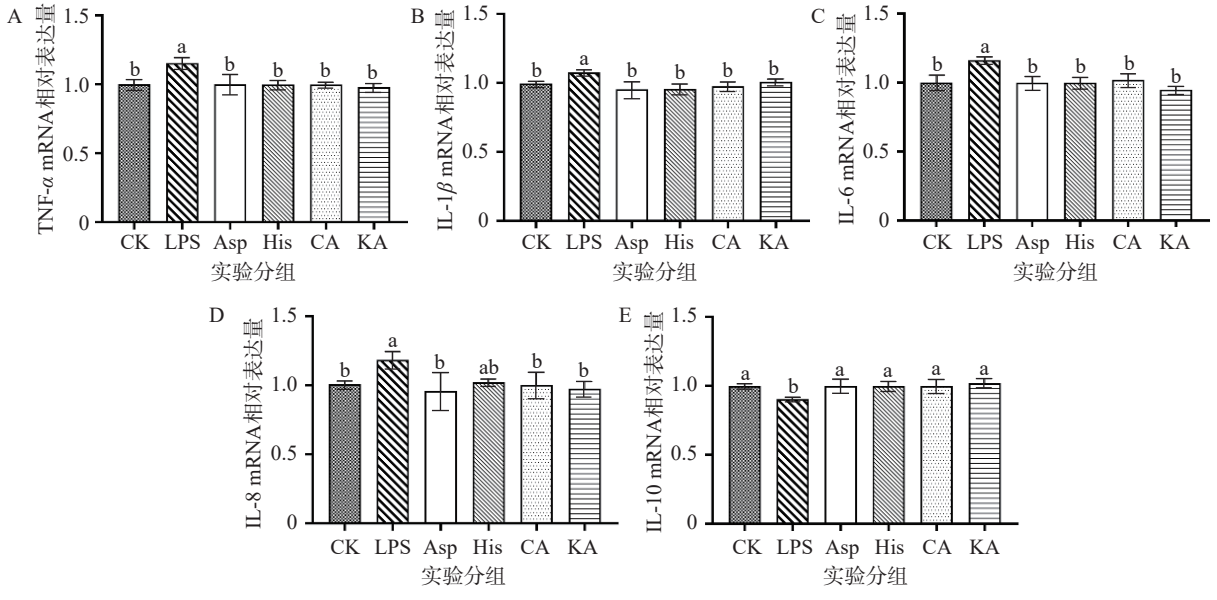


图 13 *A.muciniphila* 菌主要代谢产物对 Caco-2 细胞细胞因子 mRNA 水平的影响

Fig.13 Effect of main metabolites of *A.maciniphila* on cytokine mRNA levels in Caco-2 cells

注:(A)TNF-α mRNA 相对表达量;(B)IL-1β mRNA 相对表达量;(C)IL-6 mRNA 相对表达量;(D)IL-8 mRNA 相对表达量;(E)IL-10 mRNA 相对表达量。

能[39]；犬尿酸通过降低促炎因子表达量，缓解肠道炎症，保护肠道屏障[37]。本研究结果与上述研究结果相似，说明 Asp、His、CA 和 KA 能上调 IL-10 表达，下调 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 表达，减轻肠道炎症，降低 LPS 对肠道屏障的损伤，保护肠道屏障。

2.3.5　*A.muciniphila* 菌代谢产物对 Caco-2 细胞 MAPK 通路的影响　MAPK 信号通路与调控炎症、细胞增殖、分化和死亡等过程有关，主要由 JNK、ERK 和 p38 MAPK 途径组成[28]。图 14 是不同处理 MAPK 通路表达情况，与 CK 组相比，LPS 诱导细胞 p38、JNK、ERK mRNA 的相对表达量显著上调（P<0.05）；与 LPS 组相比，Asp、His、CA 和 KA 组细胞 p38、JNK、ERK mRNA 的相对表达量显著下降（P<0.05）。已有研究发现，菌群代谢产物 CA 显著降低肠道炎症因子表达量，抑制 NF-κB 通路激活，减缓炎症发展[40]；L-His 能降低促炎因子的表达量，抑制 MAPK 信号通路激活，改善免疫效果[41]；KA 抑制细胞 MAPK 信号通路激活，抑制 HT-29 增殖，减轻细胞炎症[42−43]，这与本研究结果相似，说明 *A.muciniphila* 菌代谢产物能够抑制 MAPK 信号通路激活，保护肠道屏障。

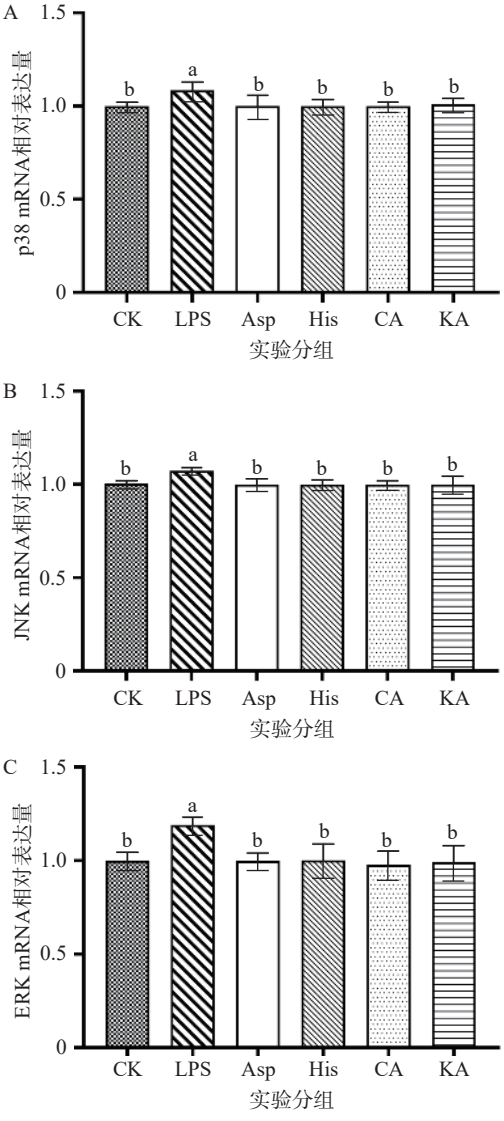


图 14　*A.muciniphila* 菌主要代谢产物对 Caco-2 细胞中 MAPK 通路的影响

Fig.14　Effect of main metabolites of *A.maciniphila* on MAPK pathway in Caco-2 cells

注：（A）p38 mRNA 相对表达量；（B）JNK mRNA 相对表达量；（C）ERK mRNA 相对表达量。

3　结论

本研究通过构建 LPS 诱导的 Caco-2 细胞肠道屏障损伤模型，系统探讨了 *A.muciniphila* 及其菌体组分和代谢产物对肠道屏障功能的保护作用，发现其作用机制可能与抑制 MAPK 信号通路的激活，提升黏液因子（Muc2、TFF3）的表达，并有效抑制炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8）和促凋亡因子（Bax、Caspase-3/8）的表达有关。研究结果为开发改善肠道屏障功能的 *A.muciniphila* 益生菌制剂提供了理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] GAO Yanan, MENG Lu, LIU Huimin, et al. The compromised intestinal barrier induced by mycotoxins[J]. Toxins, 2020, 12(10): 619.
[2] OKUMURA R, TAKEDA K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers[J]. Inflammation and Regeneration, 2018, 38: 5.
[3] CHEN Yongyan, CUI Wenwen, LI Xiao, et al. Interaction between commensal bacteria, immune response and the intestinal barrier in inflammatory bowel disease[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 761981.
[4] UNTERSMAYR E, BRANDT A, KOIDL L, et al. The intestinal barrier dysfunction as driving factor of inflammaging[J]. Nutrients, 2022, 14(5): 949.
[5] di TOMMASO N, GASBARRINI A, PONZIANI F R. Intestinal barrier in human health and disease[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(23): 12836.
[6] MA Teng, SHEN Xin, SHI Xuan, et al. Targeting gut microbiota and metabolism as the major probiotic mechanism-An evidence-based review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 178−198.
[7] GHOTASLOU R, NABIZADEH E, MEMAR M Y, et al. The metabolic, protective, and immune functions of *Akkermansia muciniphila*[J]. Microbiological Research, 2023, 266: 127245.
[8] ZHANG Hongyan, PAN Yue, JIANG Ying, et al. *Akkermansia muciniphila* ONE effectively ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice[J]. Npj Science of Food, 2024, 8: 97.
[9] YAO Qianqian, FAN Linlin, ZHENG Nan, et al. 2'-Fucosyllactose ameliorates inflammatory bowel disease by modulating gut microbiota and promoting MUC2 expression[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 822020.
[10] CANI P D, DEPOMMIER C, DERRIEN M, et al. *Akkermansia muciniphila*: Paradigm for next-generation beneficial microorganisms[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2022, 19(10): 625−637.
[11] HONG M G, SONG E J, YOON H J, et al. Clade-specific extracellular vesicles from *Akkermansia muciniphila* mediate competitive colonization via direct inhibition and immune stimulation [J]. Nature Communications, 2025, 16: 2708.

[12] QIU Yue, LIN Genglan, LIU Weiming, et al. Bioactive compounds in *Hericium erinaceus* and their biological properties: A review[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(4): 1825−1844.
[13] 于弋涵, 杜伟宁, 胡秋辉, 等. 酶法水解猴头菇多肽的生物活性[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 119−127. [YU Yihan, DU Weining, HU Qiuhui, et al. Bioactivities of peptides derived from *Hericium erinaceus* proteins by enzymatic hydrolysis[J]. Food Science, 2021, 42(21): 119−127.]
[14] 于弋涵. 猴头菇活性肽的制备及其免疫调节作用研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2021. [YU Yihan. Study on the preparation of *Hericium erinaceus* active peptide and its immunoregulatory effect[D]. Nanjing: Nanjing University of Finance & Economics, 2021.]
[15] WANG Weiwei, HAN Tongtong, DU Hengjun, et al. Research on the immunological activity of a bioavailable active peptide KSPLY from *Hericium erinaceus* under different immune scenarios [J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 521: 166675.
[16] GUO Yanjun, PAN Weiwei, LIU Shengbing, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review)[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 19(3): 1997−2007.
[17] GHOSH S S, WANG J, YANNIE P J, et al. Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development[J]. Journal of the Endocrine Society, 2020, 4(2): bvz039.
[18] YILMAZ O, OKULLU S O, CATAKCI M, et al. *Akkermansia muciniphila* improves chronic colitis-induced enteric neuroinflammation in mice[J]. Neurogastroenterology & Motility, 2024, 36(3): e14745.
[19] SU Z Z, UNIVERSITY S, LI W Z, et al. Harnessing *Akkermansia muciniphila* membrane coating for probiotic therapy in inflammatory bowel disease[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2025, 17(8): 11653−11666.
[20] 刘倚帆. 动物源抗菌肽的分子改良及其对猪肠道上皮屏障功能的保护作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012. [LIU Yifan. Molecular design of animal antimicrobial peptides and study their protective effects on intestine epithelial barrier function[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.]
[21] 刘阳. *Akkermansia muciniphila* 菌对肠道屏障的调节作用及相关基因研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [LIU Yang. The research on the regulation of *Akkermansia muciniphila* strains on intestinal barrier and related functional genes[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
[22] QI Lili, LU Xiaohui, MAO Haiguang, et al. *Clostridium butyricum* induces the production and glycosylation of mucins in HT-29 cells[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 668766.
[23] LIU Hanhan, WANG Sijiao, GONG Linjing, et al. SIRT6 ameliorates LPS-induced apoptosis and tight junction injury in ARDS through the ERK1/2 pathway and autophagy[J]. International Journal of Medical Sciences, 2023, 20(5): 581−594.
[24] 杨鑫. 山羊 *Akkermansia muciniphila* 的分离鉴定及其对肠道免疫的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2022. [YANG Xin. Isolation and identification of *Akkermansia muciniphila* from goats and its effect on intestinal immunity[D]. Chongqing: Southwest University, 2022.]
[25] LIU Xinyue, ZHAO Fan, LIU Hui, et al. Transcriptomics and metabolomics reveal the adaption of *Akkermansia muciniphila* to high mucin by regulating energy homeostasis[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 9073.
[26] 纪漫萍. *Akkermansia muciniphila* 对肠黏膜屏障的保护作用及机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2021. [JI Manping. The protective effect and mechanism of *Akkermansia muciniphila* on the intestinal mucosal barrier[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2021.]
[27] QI M S, ELION E A. MAP kinase pathways[J]. Journal of Cell Science, 2005, 118(16): 3569−3572.
[28] MARTÍNEZ-LIMÓN A, JOAQUIN M, CABALLERO M, et al. The p38 pathway: From biology to cancer therapy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 1913.
[29] 冷来福, 黄金秀, 陈志华, 等. MAPK 信号通路对动物肠道紧密连接的调控研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(11): 62−68. [LENG Laifu, HUANG Jinxiu, CHEN Zhihua, et al. Research progress of MAPK signaling pathway on the regulation of intestinal tight junction in animals[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2024, 60(11): 62−68.]
[30] ZHU Tao, MAO Jiangdi, ZHONG Yifan, et al. *L. reuteri* ZJ617 inhibits inflammatory and autophagy signaling pathways in gut-liver axis in piglet induced by lipopolysaccharide[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2021, 12: 110.
[31] CASULA E, PISANO M B, SERRELI G, et al. Probiotic lactobacilli attenuate oxysterols-induced alteration of intestinal epithelial cell monolayer permeability: Focus on tight junction modulation[J]. Food and Chemical Toxicology, 2023, 172: 113558.
[32] 李可欣. 阿克曼氏菌外膜囊泡的抗肿瘤免疫效应及其作用机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2022. [LI Kexin. The antitumor immune responses and mechanism study of outer membrane vesicles from *Akkermansia muciniphila*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2022.]
[33] LIU Ziyan, YANG Hongling, LI Sha, et al. Probiotic components of *Bacillus siamensis* LF4 mitigated *β*-conglycinin caused cell injury via modulating TLR2/MAPKs/NF-*κ*B signaling in *Lateolabrax maculatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 141: 109010.
[34] GROEGER D, SCHIAVI E, GRANT R, et al. Intranasal *Bifidobacterium longum* protects against viral-induced lung inflammation and injury in a murine model of lethal influenza infection[J]. EBioMedicine, 2020, 60: 102981.
[35] ABRAMOV V M, KOSAREV I V, PRIPUTNEVICH T V, et al. S-layer protein 2 of *Lactobacillus crispatus* 2029, its structural and immunomodulatory characteristics and roles in protective potential of the whole bacteria against foodborne pathogens[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 400−412.
[36] 刘明明. 柠檬酸介导黑水虻虫粉对 ETEC 诱导仔猪肠道屏障损伤和炎症反应的保护作用[D]. 长春: 吉林大学, 2022. [LIU Mingming. Citric acid mediate the protective effects of *Hermetia illucens* larvae powder in ETEC induced piglets intestinal barrier damage and inflammatory response[D]. Changchun: Jilin University, 2022.]
[37] 石海峰. 天冬氨酸对脂多糖刺激断奶仔猪肠道损伤的调控作用[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2013. [SHI Haifeng. Regulatory effect of aspartic acid on intestinal injury in piglets after lipopolysaccharide challenge[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2013.]
[38] 魏庆, 魏朝阳, 王克玮, 等. 植物精油和柠檬酸复合物对肉鸡肠道屏障功能及炎症反应的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(11): 4014−4024. [WEI Qing, WEI Chaoyang, WANG Kewei, et al. Effects of plant essential oil-citric acid complex on intestinal barrier function and inflammatory response of broilers[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(11): 4014−4024.]
[39] 郭丽. 菊粉通过肠道菌群调节色氨酸代谢干预精神分裂症小鼠神经炎症的作用及机制研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2022. [GUO Li. Effects and mechanism of inulin on neuroinflammation in schizophrenia mice by regulating tryptophan metabolism via gut microbiota[D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2022.]
[40] THOMAS C M, HONG T, van PIJKEREN J P, et al. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF *via* modulation of PKA and ERK signaling[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31951.
[41] CSÁTI A, EDVINSSON L, VÉCSEI L, et al. Kynurenic acid modulates experimentally induced inflammation in the trigeminal ganglion[J]. The Journal of Headache and Pain, 2015, 16: 99.
[42] WALCZAK K, TURSKI W A, RAJTAR G. Kynurenic acid inhibits colon cancer proliferation *in vitro*: Effects on signaling pathways[J]. Amino Acids, 2014, 46(10): 2393−2401.
[43] JIANG Lai, YUAN Chunchun, YE Wenxin, et al. *Akkermansia* and its metabolites play key roles in the treatment of campylobacteriosis in mice[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 13: 1061627.