

Trpv4 基因编辑对小鼠肠道屏障及菌群-代谢微环境的影响

阮浩龙^{1,2,3#}, 刘桂福^{1,2,3#}, 阿苏约布木^{1,2,3}, 李广燕^{1,2,3}, 于鸿浩^{1,2,3,4*},
岳鹏鹏^{1,2,3,4*}

- 1 桂林医科大学, 罕见病防治广西高校工程研究中心, 广西 桂林
- 2 桂林医科大学, 广西高校医药生物技术与转化医学重点实验室, 广西 桂林
- 3 桂林医科大学 人工智能医学院, 广西 桂林
- 4 桂林医科大学 检验与生物技术学院, 广西 桂林

阮浩龙, 刘桂福, 阿苏约布木, 李广燕, 于鸿浩, 岳鹏鹏. *Trpv4* 基因编辑对小鼠肠道屏障及菌群-代谢微环境的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2498-2520.

RUAN Haolong, LIU Guifu, ASU Yuebumu, LI Guangyan, YU Honghao, YUE Pengpeng. Effects of *Trpv4* editing on intestinal barrier and flora-metabolic microenvironment in mice[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(5): 2498-2520.

摘要: 【目的】瞬时受体电位香草酸 4 型(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)是由 *Trpv4* 编码的非选择性阳离子通道, 深度参与多器官系统的生理病理调控, 但其突变对动物肠道及肠道菌群的综合影响机制尚未明确。本研究旨在探究 *Trpv4* *exon 8 c.1491+1G>A* 突变对小鼠肠道屏障完整性及菌群-代谢微环境的调控作用, 为解析宿主基因与肠道菌群的互作机制提供实验依据。【方法】以实验室前期构建的 *Trpv4* *exon 8 c.1491+1G>A* 基因编辑小鼠为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)和蛋白质印迹法(Western blotting, WB)技术检测肠组织中 *Trpv4* mRNA 及 TRPV4 蛋白的表达水平; 通过病理切片观察肠道组织结构变化; 结合 16S rRNA 基因高通量测序分析肠道菌群结构差异; 利用 LC-MS 非靶代谢组学技术检测粪便代谢物变化, 并分析菌群与代谢物的相关性。【结果】*Trpv4* 基因编辑导致小鼠肠组织 *Trpv4* mRNA 转录及 TRPV4 蛋白表达异常, 引发肠道组织结构异常及肠屏障功能损伤。肠道菌群分析显示, 基因编辑小鼠肠道菌群稳态失衡, 拟杆菌门(*Bacteroidota*)相对丰度显著升高, 芽孢杆菌门(*Bacillota*)与拟杆菌门比例(F/B)显著下降, 葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等常见共生菌丰度降低。代谢组学分析表明, *Trpv4* 基因编辑小鼠存在脂质代谢紊乱及免疫相关代谢物异常, 其中拟杆菌门相关类群与脂质相关代谢物呈正相关, 而脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等则与部分脂

资助项目: 国家自然科学基金(32160147, 32460152); 广西高等教育本科教学改革工程项目(2023JGA271)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160147, 32460152) and the Guangxi Higher Education Undergraduate Teaching Reform Project (2023JGA271).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: YUE Pengpeng, yue_pengpeng@163.com; YU Honghao, geneyhh@126.com

Received: 2025-08-15; Accepted: 2025-12-26; Published online: 2026-01-14

质代谢物及免疫相关代谢物呈负相关。【结论】 *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* 基因编辑小鼠肠道屏障受损, 肠道菌群结构与代谢微环境发生改变。本研究为解析特定基因突变与肠道菌群的互作提供了基础数据, 也为 *Trpv4* 相关疾病的诊断与治疗策略开发提供了理论支撑。

关键词: *Trpv4* 基因编辑; 肠道菌群; 16S rRNA 基因高通量测序; 非靶代谢组学

Effects of *Trpv4* editing on intestinal barrier and flora-metabolic microenvironment in mice

RUAN Haolong^{1,2,3#}, LIU Guifu^{1,2,3#}, ASU Yuebumu^{1,2,3}, LI Guangyan^{1,2,3}, YU Honghao^{1,2,3,4*}, YUE Pengpeng^{1,2,3,4*}

1 Engineering Research Center of Rare Disease Prevention and Control, University of Guangxi, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China

2 Key Laboratory of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China

3 School of Artificial Intelligent Medicine, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China

4 School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China

Abstract: [Objective] Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4), a non-selective cation channel, is deeply involved in the physiological and pathological regulation of multiple organ systems, while the comprehensive influencing mechanism of its mutation on animal intestines and intestinal flora is not clear. This study explored the regulatory effects of *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* mutation on intestinal barrier integrity and flora-metabolic microenvironment in mice, aiming to provide an experimental basis for analyzing the interaction mechanisms between host genes and intestinal flora. [Methods] *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* gene-edited mice previously constructed in our laboratory were taken as the research objects, and the expression levels of *Trpv4* and TRPV4 in the intestinal tissue were determined by qPCR and Western blotting, respectively. Pathological sections were prepared for observation of the structural changes of the intestinal tissue. The 16S rRNA gene high-throughput sequencing was conducted to reveal the structural differences of intestinal flora. Non-targeted metabolomics based on LC-MS was employed to examine the changes of fecal metabolites, and the correlations between flora and metabolites were analyzed. [Results] *Trpv4* editing led to the abnormal expression of *Trpv4* and TRPV4 in the intestinal tissue of mice, which resulted in the structural abnormality of the intestinal tissue and the impairment of intestinal barrier function. In addition, the gene-edited mice exhibited an imbalance in intestinal flora, with significantly increased relative abundance of *Bacteroidota*, a significantly decreased *Bacillota/Bacteroidota* (F/B) ratio, and reduced abundance of common commensal bacteria such as *Staphylococcus*. Metabolomic analysis indicated that the gene-edited mice presented disordered lipid metabolism and abnormalities in immune-related metabolites. The abundance of *Bacteroidota* was positively correlated with lipid metabolites, while that of *Desulfovibrio* and *Enterobacter* was

negatively correlated with lipid and immune metabolites. **[Conclusion]** *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A gene-edited mice exhibited impaired intestinal barrier function, along with alterations in intestinal flora structure and the metabolic microenvironment. This study provides basic data for elucidating the interactions between specific gene mutations and the gut microbiota and offers theoretical support for the development of diagnostic and therapeutic strategies for *Trpv4*-related diseases.

Keywords: *Trpv4* editing; intestinal flora; 16S rRNA gene high-throughput sequencing; non-targeted metabolomics

瞬时受体电位香草酸 4 型(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)是由 *Trpv4* 基因编码的非选择性阳离子通道蛋白^[1-2], 广泛分布于多种组织和器官^[3-5], 在渗透调节、机械应力等多种生理过程中发挥关键作用^[6-7]。此外, TRPV4 通道与多种疾病相关, 如关节炎、视网膜血管生成、肺水肿等^[8-10]。

近年来, TRPV4 在肠道生理与病理机制方面的研究不断深入。研究表明 TRPV4 的激活会破坏肠上皮细胞的紧密连接, 导致肠道通透性增加, 进而削弱肠道对外界病原体和有害物质的防御能力^[11]。这种通透性的增加不仅影响肠道屏障的物理完整性, 还可能改变肠道菌群的组成和功能。此外, 在肠道炎症性疾病进程中 TRPV4 的异常激活可加剧肠道屏障功能障碍^[12-13], 驱动促炎细胞因子的级联释放, 形成恶性循环, 从而影响肠道菌群的微环境^[14-15]。Mihara 等^[16]和 Ye 等^[17]的研究表明, TRPV4 作为肠上皮机械感受与紧密连接调控通道, 可通过影响肠黏膜屏障的完整性及通透性, 间接调节宿主-菌群互动与肠道微生态稳态。

肠道菌群, 也称为肠道微生物群, 通过影响免疫功能、代谢和消化等各种生理过程, 其代谢产生的氨基酸、脂肪酸、胆酸、胆碱等在维持人体健康方面起着至关重要的作用^[17]。研究发现, 肠道菌群的组成和多样性与全身炎症、肥胖、胰岛素抵抗及血脂异常等病理状态密切相关^[18-20]。此外, 肠道菌群及其代谢产物通过构建肠道免疫屏障, 在抵御病原体入侵、调控肠道黏膜细胞增殖与修复等方面发挥着不可或

缺的作用^[21-23]。随着分子生物学等领域的不断发展, 越来越多的研究者开始聚焦于肠道, TRPV4 在肠道领域的研究也在不断增多。尽管目前尚未有大规模研究将 TRPV4 突变与炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)或代谢综合征等肠道-菌群-代谢疾病明确关联, 但有研究表明 TRPV4 在 IBD 患者结肠组织中的表达显著改变^[24]。

本实验室前期基于一个常染色体显性遗传病家系鉴定了致病性 *TRPV4* exon 8 c.1491+1G>A 新突变, 并利用 CRISPR/Cas9 技术将该突变精准引入小鼠同源位点, 构建了携带 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变的基因编辑小鼠模型, 该模型表现出骨骼异常及肺、肾、肠等多器官病理损伤^[25]。在此基础上, 本研究聚焦于该基因编辑小鼠的肠道微环境, 探究 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变对肠道屏障功能及菌群-代谢互动网络的影响, 识别肠道微生态变化的细菌生物标志物, 并探索潜在的新型治疗策略, 以期对相关疾病的干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取实验室早期通过 CRISPR/Cas9 技术制备的 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 基因编辑小鼠, 包括同窝的纯合子(Hom)、杂合子(Het)和野生型(WT) C57BL/6J 雄性小鼠各 5 只, 15-18 周龄。所有小鼠分笼饲养于桂林医科大学智能医学与生物技术学院动物实验室, 室温为 23-24 °C, 湿度为 40%-60%, 小鼠可自由摄食、饮水, 昼

夜周期各 12 h。本研究所有动物实验获得桂林医科大学实验动物伦理委员会批准, 编号为 GLMC202103279。

1.2 样本采集

将 15 只小鼠按基因型分为 Hom 组、Het 组和 WT 组, 每组 5 只。在经过紫外灭菌的生物安全柜中采用拎尾法收集小鼠粪便样本至无菌 EP 管中。采集完成后, 将样本-80 °C 保存。采集粪便样本后, 将实验小鼠空腹放置 1 d, 随后麻醉并脱颈处死, 进行组织取样, 将收集到的组织置于-80 °C 保存。

1.3 DNA 提取和测序

使用 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek 公司)提取粪便基因组 DNA。然后采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。使用扩增细菌 16S rRNA 基因的通用引物 (338F: 5'-ACTCC TACGGGAGGCAGCAG-3'; 806R: 5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3') 靶向 16S rRNA 基因的 V3-V4 区扩增目标产物。PCR 反应体系 (20 μ L): 5 \times TransStart *FastPfu* 缓冲液 4 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物 (5 μ mol/L) 各 0.8 μ L, DNA 模板 10 ng, ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 27 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。QuantiFluor[™]-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量, 混合样品后, 用 2% 琼脂糖凝胶回收产物完成文库构建, 最后使用 MiSeq 测序仪进行双末端测序。

1.4 qPCR 检测宿主基因及肠道菌属的表达水平

从小鼠肠组织和粪便样本中提取核酸用于 qPCR 分析。肠组织总 RNA 采用 TRIzol 法提取, 并经氯仿、异丙醇及 75% 乙醇纯化; 粪便 DNA 使用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司) 提取。使用 NanoDrop 2000 测定核酸浓度后, 按照 BrightCycle Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG 试剂

盒 (武汉爱博泰克生物科技有限公司) 体系进行扩增。PCR 反应体系 (20 μ L): BrightCycle Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 32 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。相关引物序列见表 1。所有样本均设置 3 次重复, 并通过溶解曲线验证扩增特异性。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算目标基因及拟杆菌门 (*Bacteroidota*) 等的相对表达量。

1.5 蛋白质印迹 (Western blotting, WB) 检测蛋白的表达

将小鼠肠组织样本用含 PMSF 的 Western/IP 裂解液裂解, 冰上孵育 30 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。采用

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 The sequences of primers for qPCR

Primer names	Primer sequences (5'→3')
TRPV4-Q-FP ^[25]	GAGACAAGTGGCGTAAGTT
TRPV4-Q-RP	TCCTGTGAAGAGCGTGAT
β -actin-Q-FP ^[25]	GGCTGTATCCCCTCCATCG
β -actin-Q-RP	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
16S-F ^[26]	CCTACGGGNGGCWGCAG
16S-R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
Bact934F ^[27]	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT
Bact1060R	AGCTGACGACAACCATGCGAG
Bac32F ^[28]	AACGCTAGCTACAGGCTT
Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG
Enterobacter cloacae-F	CATGACACCGGTGTTTCCCCAGT
Enterobacter cloacae-R	CGGTCGGTGAAGCCCAGAACCACTA
TNF- α -F	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC
TNF- α -R	GCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA
IL-1 β -F ^[29]	CGTGCTGTCCGACCCATA
IL-1 β -R	GGTGTGCCGTCTTTCATTAC
IL-6-F ^[29]	TTCTTGGGACTGATGCTGGT
IL-6-R	CTCTGGCTTTGTCTTCTTGTT

BCA 法测定蛋白浓度, 统一浓度后加入 SDS-PAGE loading buffer, 95 °C 变性 10 min。取等量蛋白(30 µg)经 10% SDS-PAGE 分离后电转至 PVDF 膜(Millipore 公司), 用快速封闭液封闭 20 min。PVDF 膜分别孵育一抗: Anti-TRPV4 抗体(Abcam 公司, 1:2 000)、Occludin Polyclonal antibody 抗体(Proteintech 公司, 1:5 000)和 β -actin 抗体(Proteintech 公司, 1:5 000)、4 °C 过夜。TBST 洗膜后加入二抗(Abmart 公司, 1:5 000), 室温孵育 2 h。最后使用 ECL 发光试剂显影, 并用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值, 进行定量比较。

1.6 免疫荧光染色检测 Occludin 表达

取小鼠结肠组织石蜡切片, 依次脱蜡至水后, 将切片置于枸橼酸缓冲液中加热进行抗原修复。随后用牛血清白蛋白进行封闭。加入 Occludin 一抗(1:200), 于 4 °C 湿盒中避光孵育过夜; 洗涤后加入山羊抗兔 IgG 二抗, 避光孵育 50 min。接着使用 DAPI 染液对细胞核进行复染, 并淬灭组织自发荧光。封片后采集免疫荧光图像。

1.7 苏木精-伊红(HE)染色

将小鼠肠组织在 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 然后脱水用常规石蜡包埋。组织切片厚 4 µm, 65 °C 烘烤 3–4 h。用二甲苯脱蜡后, 采用梯度乙醇溶液逐步洗涤切片, 用苏木素伊红染色液染色, 脱水, 并用中性树胶密封。

1.8 阿利新蓝(alcian)染色

取小鼠肠组织用 4% 多聚甲醛固定 48 h, 经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后, 切成 4 µm 厚的切片。切片常规脱蜡至水, 随后将切片置于阿利新蓝染液中, 在室温下染色 30 min。染色结束后, 用蒸馏水充分冲洗切片以去除多余染液, 再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 最后用中性树胶封片。

1.9 肠道通透性检测

对小鼠进行 12 h 禁食处理(期间自由饮水),

随后对小鼠进行 FITC-葡聚糖的灌胃处理, 并在灌胃后继续禁食禁水 4 h。通过眼球取血法收集 0.8–1.0 mL 血液样本, 静置 30 min 后, 取上清液按 1:50 (血清:PBS)的比例用 PBS 缓冲液稀释。将稀释后的样本加入 96 孔板, 采用酶标仪检测血液中荧光强度。

1.10 肠道菌群 16S rRNA 基因测序分析

采用 Uparse 算法进行序列分析^[30]。默认以 97% 的同一性聚集成操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。利用 RDP classifier^[31] (<http://rdp.cme.msu.edu/>, version 2.11)结合 Silva 16S rRNA 基因数据库(v138)进行 OTU 物种分类学注释, 置信阈值设置为 70%, 并在不同物种分类水平下统计每个样本的菌群结构组成。采用 mothur 软件 (<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>)计算 Chao1、Shannon 指数等 α 多样性指数^[32], 同时通过 Wilcoxon 秩和检验分析 α 多样性的组间差异; 使用基于 Bray-Curtis 距离算法的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)检验样本间微生物群落结构的相似性, 结合 PERMANOVA 非参数检验判断样本组间微生物群落结构差异的显著性; 采用线性判别分析效应量(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/LEfSe>)^[33], 在 LDA>3 且 $P<0.05$ 的条件下, 于门至属的水平确定不同组间差异显著的肠道菌群, 并使用 PICRUSt2 (v2.2.0)软件进行 16S rRNA 基因功能预测分析^[34]。

1.11 小鼠粪便 LC-MS 非靶代谢组学分析

使用 LC-MS 检测小鼠粪便中的代谢物。色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 µm; Waters 公司); 流动相 A 为 95% 水+5% 乙腈(含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为 47.5% 乙腈+47.5% 异丙醇+5% 水(含 0.1% 甲酸); 流速为 0.40 mL/min, 进样量为 10 µL, 柱温为 45 °C。质谱条件: 样品经电喷雾电离,

分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。数据矩阵用 80% 规则去除缺失值, 即保留至少一组样品中非零值 80% 以上的变量, 再进行填补空缺值(用原始矩阵中最小值填补空缺值), 用总和归一化法对样本质谱峰的响应强度进行归一化, 得到归一化后的数据矩阵。同时删除 QC 样本相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)>30% 的变量, 并进行对数化处理, 得到最终用于后续分析的数据矩阵。具体参数如表 2。利用 R 语言 ropls 包(v1.6.2)对预处理后的数据矩阵进行偏最小二乘法判别分析(partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA)及正交最小偏二乘判别分析分析(orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA)。显著差异代谢物的筛选结合 OPLS-DA 模型计算的变量投影重要度(variable important in projection, VIP)与 Student's *t* 检验 *P* 值来确定, 筛选标准为 VIP>1 且 *P*<0.05。利用 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)对筛选出的差异代谢物进行代谢通路注释, 明确其参与的生物学通路, 同时结合 Python 软件包 scipy.stats 开展通路富集分析, 通过 Fisher 精确检验筛选与实验处理关联最密切的生物学途径。

1.12 统计分析

本研究使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据

表2 质谱参数

Table 2 Mass spectrometer

Description	Parameters
Scan type/(<i>m/z</i>)	50–1 200
Ion source gas 1/(psi)	50
Ion source gas 2/(psi)	50
Curtain gas/(psi)	35
Source temperature/°C	500
IonSpray voltage floating (+)/V	5 500
IonSpray voltage floating (-)/V	-4 500
Interface heater	on
Declustering potential/V	80
Collision energy/eV	40±20

处理、绘图和组间分析, 多组之间比较采用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA), 并结合 Tukey 事后检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。在所有的分析中, *表示 *P*<0.05, **表示 *P*<0.01, ***表示 *P*<0.001, ****表示 *P*<0.000 1, ns (not significant)表示 *P*>0.05。

2 结果与分析

2.1 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变对小鼠肠道的影响

2.1.1 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变对小鼠肠组织 *Trpv4* 表达的影响

从小鼠肠组织中提取到了较为完整的 RNA (图 1A)。qPCR 分析发现, 与 WT 小鼠相比, *Trpv4* 基因编辑组(Het 组和 Hom 组)的 *Trpv4* mRNA 表达水平显著降低(图 1B)。同时, 结合 WB 实验结果可见, TRPV4 蛋白的表达量也呈现出与 mRNA 水平同步下调(图 1C、1D)。上述结果表明, *Trpv4* 基因编辑小鼠肠组织不能转录出正常的 *Trpv4* mRNA, 进而导致正常 TRPV4 蛋白的表达下降。生信分析表明, 基因编辑小鼠 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变破坏了正常的剪接位点, 导致外显子错配和开放阅读框提前终止, 产生一个包含 721 个氨基酸的截短突变蛋白。

2.1.2 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变对小鼠肠组织形态结构和肠屏障的影响

相较于 WT 小鼠, *Trpv4* 基因编辑小鼠的结肠组织呈现出明显的形态学改变, 结肠隐窝形态异常, 黏膜下层增宽且出现水肿现象; 结肠组织中杯状细胞排列紊乱、长度缩短, 数量显著减少(图 2A、2B、2E)。小肠组织的杯状细胞同样受到影响, 表现为数量减少及黏液分泌功能受损(图 2C、2D、2F), 提示肠道黏液屏障功能可能受到干扰。在通透性方面, *Trpv4* 基因编辑小鼠纯合子的肠组织通透性显著增加(图 2G)。

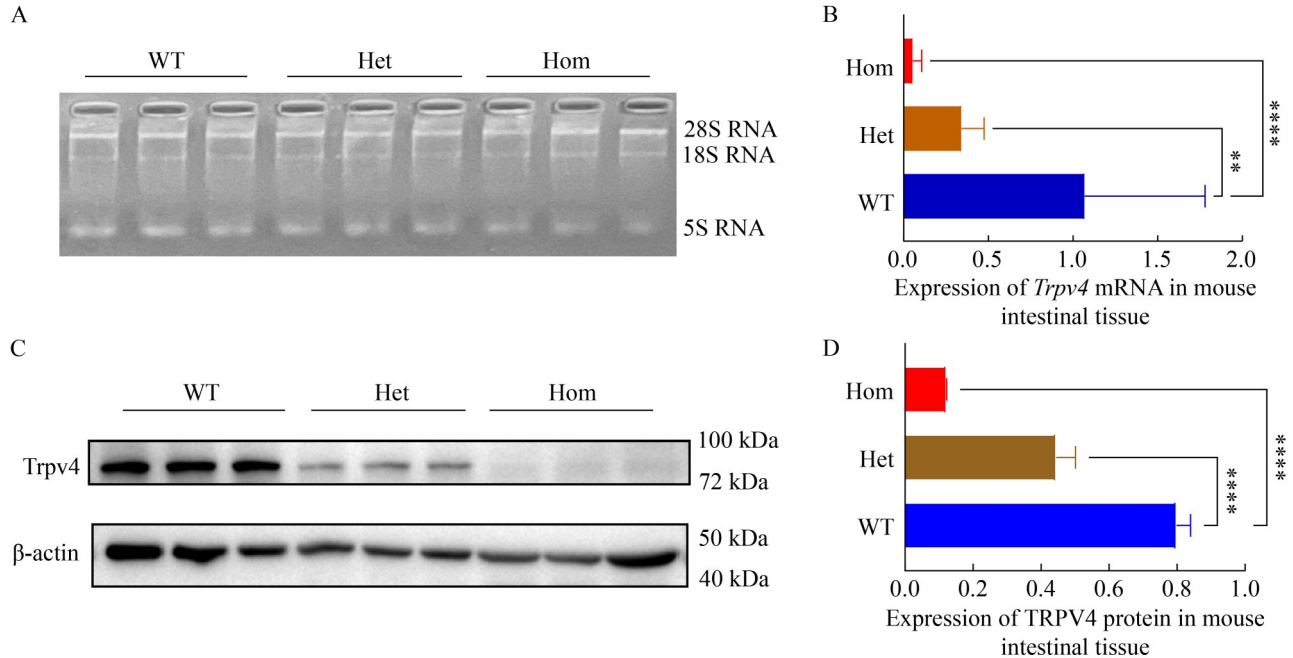


图1 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A突变对小鼠肠组织*Trpv4*表达的影响

Figure 1 Effects of *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A mutation on *Trpv4* expression in intestinal tissues of mice. A: RNA amplification bands (There should be three bands in the complete and nondegradable RNA electrophoresis results); B: Expression of *Trpv4* mRNA in intestinal tissue of mice (**: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$); C: TRPV4 protein bands; D: Expression of TRPV4 protein in intestinal tissue of mice (****: $P < 0.0001$).

2.2 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变导致小鼠肠道菌群紊乱

2.2.1 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变对肠道菌群多样性的影响

测序分析显示, *Trpv4* 基因编辑小鼠肠道菌群在物种丰富度和多样性方面呈现一定的变化趋势, 但差异不显著(图 3A–3D)。基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)显示, 第一主成分(PC1)可解释 22.55% 的菌群结构变异, *Trpv4* 基因编辑组与 WT 组样本在 PC1 轴上呈现明显分离, 经 ANOSIM 检验证实该分离具有统计学显著性($R=0.36$, $P=0.002$) (图 3E); 同时, 非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)进一步验证了这一结果, 其压力值为 0.155 (< 0.200 , 表明拟合效果可靠) (图 3F), 3 组样本在二维空间中形成清

晰的分组聚集, *Trpv4* 基因编辑组样本集中分布于右侧象限, WT 组则分布于左侧象限, 说明基因编辑小鼠肠道菌群结构相对野生型小鼠发生了改变。

2.2.2 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变对小鼠肠道菌群组成的影响

在门水平上, 芽孢杆菌门(*Bacillota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)是小鼠肠道菌群的优势菌门。其中, *Trpv4* 基因编辑组拟杆菌门的相对丰度高于 WT 组, 而芽孢杆菌门、假单胞菌门(*Pseudomonadota*)和放线菌门(*Actinomycetota*)的相对丰度低于 WT 组(图 4A)。在属水平上, *Trpv4* 基因编辑组中未分类的鼠杆状菌科(unclassified_f_Muribaculaceae)、气球菌属(*Aerococcus*)的相对丰度升高, 而葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的相对丰度则显著下降(图 4B)。进一步采用 LEfSe 分析方法确定组间的标志性

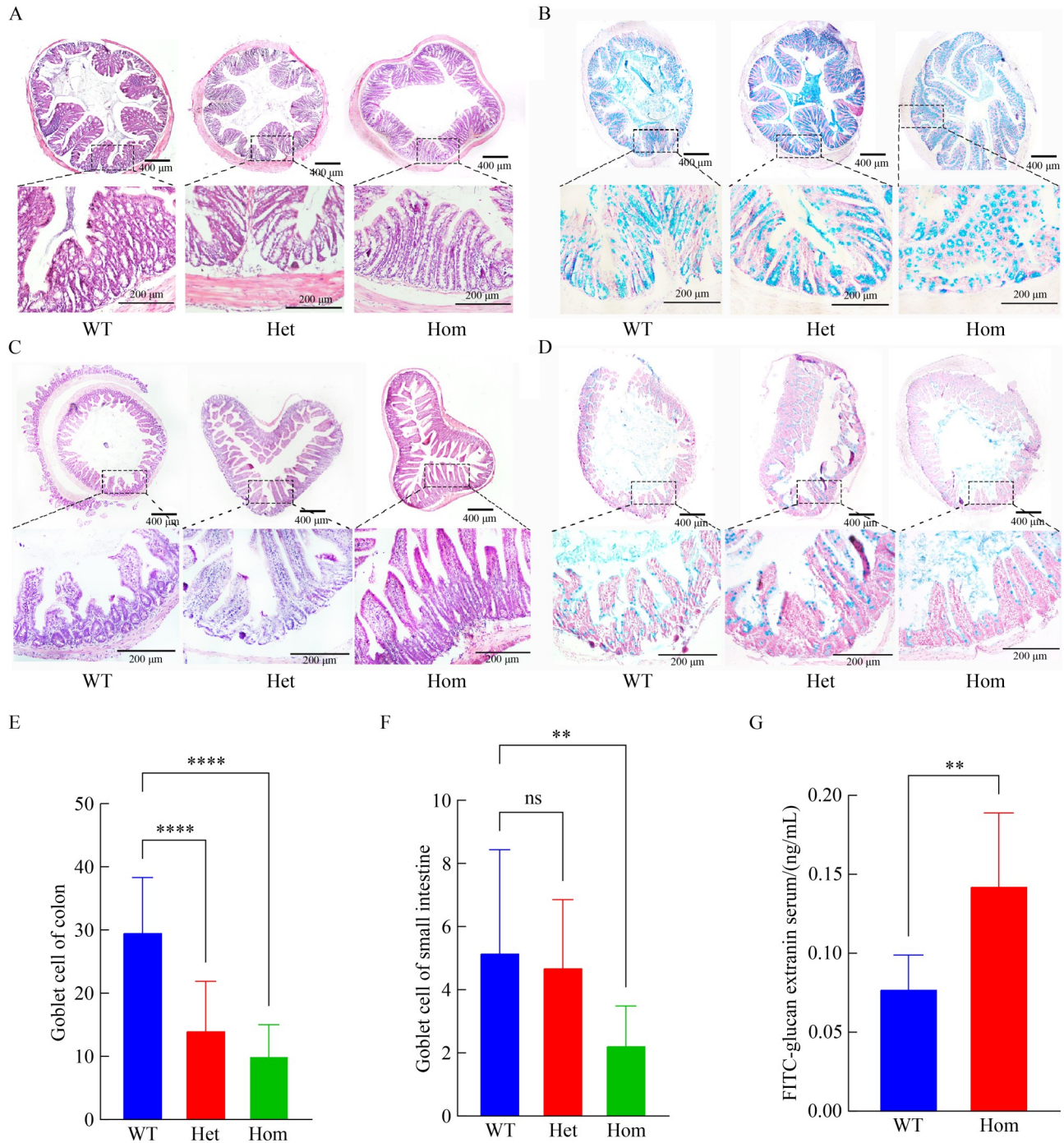


图2 *Trpv4* exon 8 *c.1491+1G>A*突变对小鼠肠组织形态结构和肠屏障的影响

Figure 2 Effects of *Trpv4* exon 8 *c.1491+1G>A* mutation on intestinal tissue morphology and intestinal barrier in mice. A: HE staining of colon tissue; B: Alcian staining of colon tissue; C: HE staining of small intestine tissue; D: Alcian staining of small intestine tissue; E: Number of goblet cells in colon (****: $P < 0.0001$); F: Number of goblet cells in small intestine (**: $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$); G: FITC-glucan content in serum (**: $P < 0.01$).

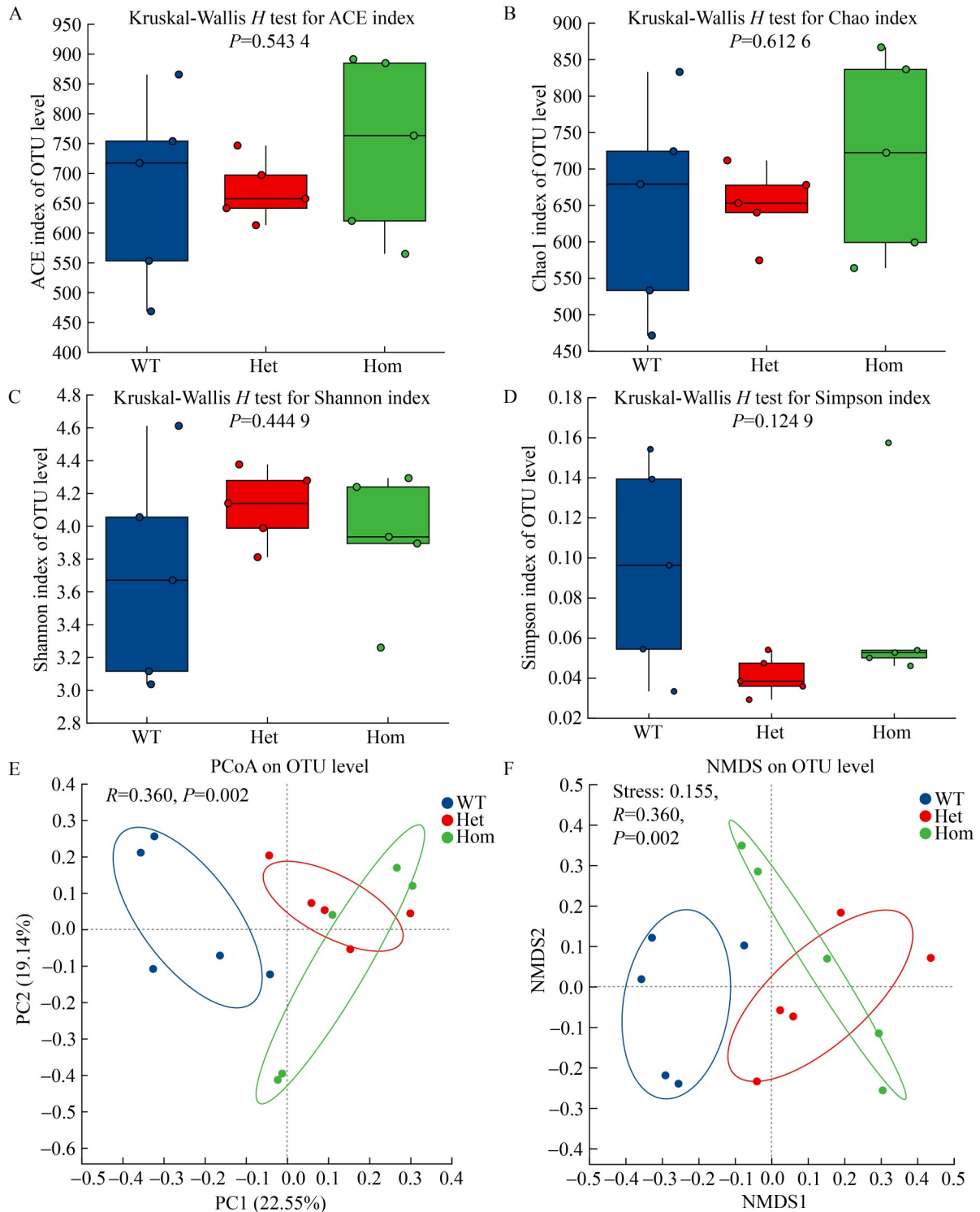
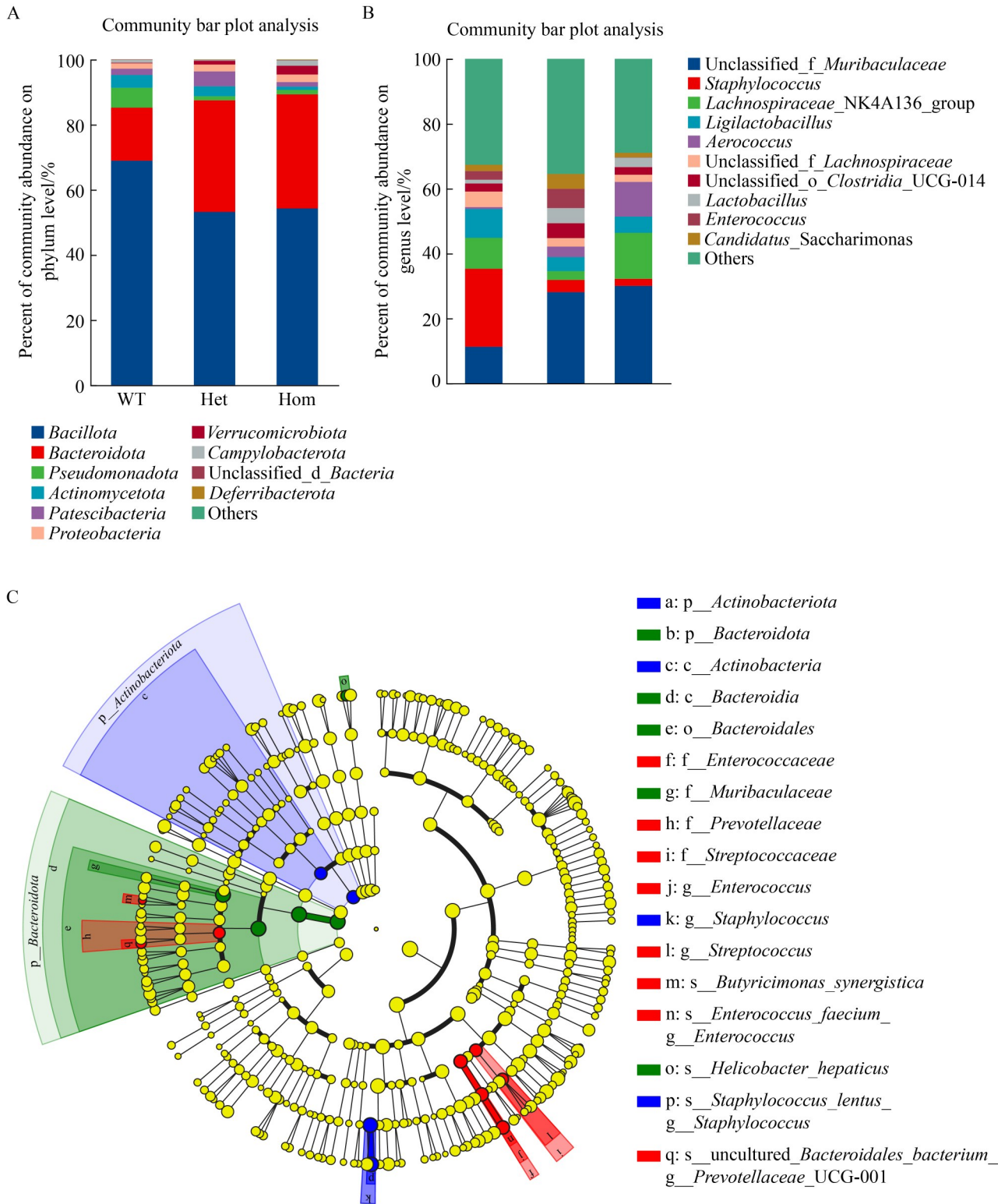


图3 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A突变对肠道菌群多样性的影响

Figure 3 Effects of *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A mutation on the diversity of intestinal flora. A: ACE index histogram; B: Chao1 index histogram; C: Shannon index histogram; D: Simpson index histogram; E: PCoA diagram; F: NMDS analysis diagram.



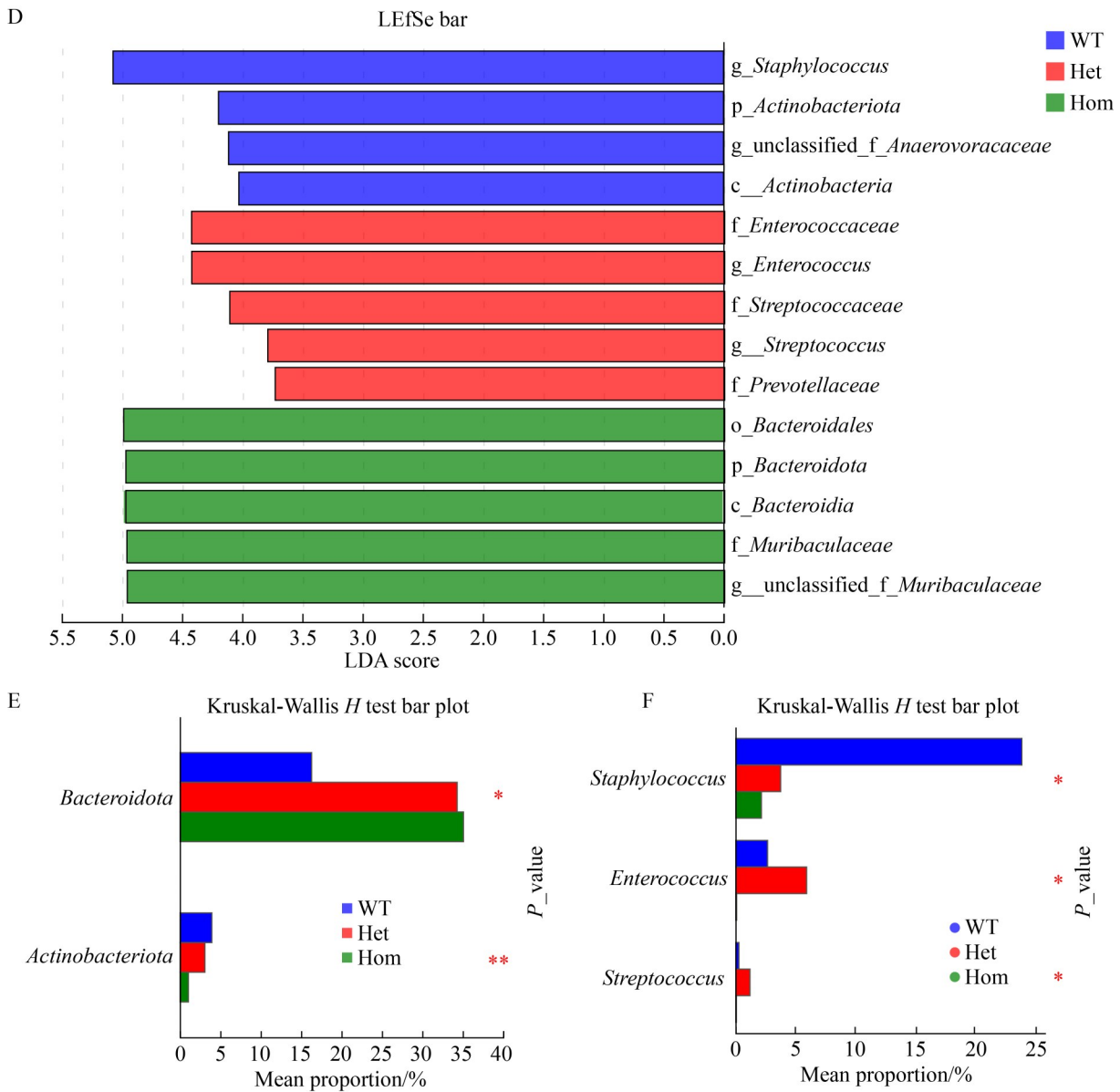


图4 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A突变对小鼠肠道菌群组成的影响

Figure 4 Effects of *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A mutation on the composition of intestinal flora in mice. A: Relative abundance of gut microbiota at the phylum level; B: Relative abundance of gut microbiota at the genus level; C: LefSe analysis showing the cladogram across multiple taxonomic levels; D: Linear discriminant analysis (LDA) score histogram (LDA score>3.0); E: Bar plot of differential analysis at the phylum level (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$); F: Bar plot of differential analysis at the genus level (*: $P<0.05$).

菌属，拟杆菌门相关类群[拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、拟杆菌目(*Bacteroidales*)、鼠杆状菌科等]是 *Trpv4* 基因编辑小鼠 Hom 组肠道特征菌；肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属

(*Streptococcus*) 在 Het 组的肠道菌群结构中发挥关键作用；而葡萄球菌属与 g_unclassified_f_Anaerovoracaceae 则是 WT 组的标志性菌属(图 4C、4D)。通过多组差异检验进一步证实，

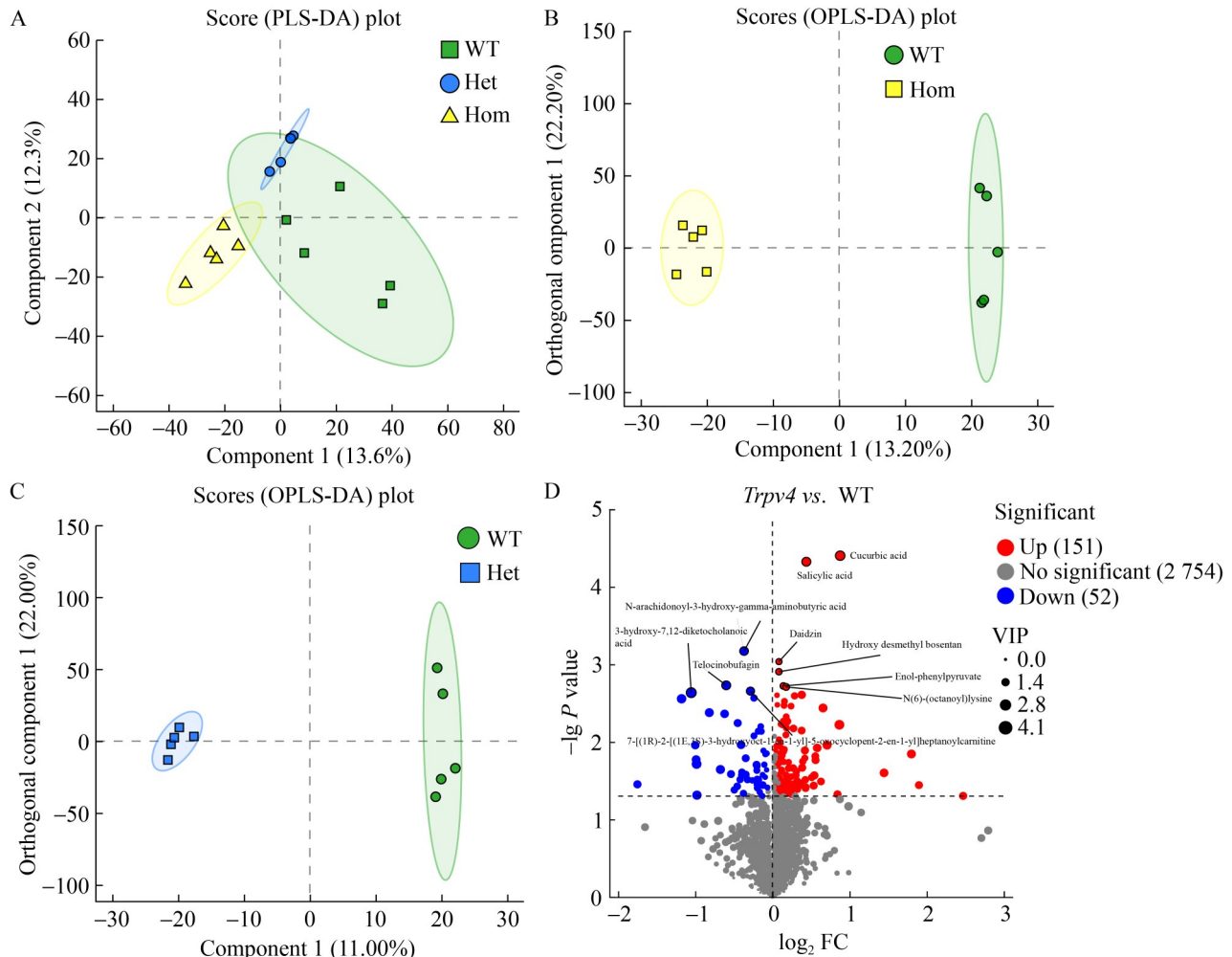
Trpv4 基因编辑组拟杆菌门的相对丰度显著高于 WT 组, 而放线菌门和葡萄球菌属的相对丰度则显著低于 WT 组(图 4E、4F)。

2.3 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变导致小鼠粪便代谢谱发生改变

本研究分析了 QC 样本的特征峰检出情况及代谢物鉴定比率。在正离子模式(pos)下, QC 样本共检测到 5 079 个有效峰, 其中 1 829 个被成功鉴定, 鉴定比例为 36.01%; 在负离子模式(neg)下, 共获得 6 871 个有效峰, 成功鉴定的代谢物为 1 295 个, 鉴定比例为 18.85%。此外, 在混合模式(mix)下共检测到 11 950 个有效峰, 其中 3 124 个被鉴定, 鉴定比例为 26.14%。进一步对 origin 数据进行比对后, 各模式下的有效

峰数量与可鉴定代谢物比例(pos: 35.85%, neg: 19.17%, mix: 26.37%)与 raw 数据保持一致, 仪器运行周期内峰型、峰强及离子响应较为稳定, 代谢组数据质量可用于后续统计分析。

多元统计分析显示, *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A 突变改变了小鼠的粪便代谢谱。在 PLS-DA 与 OPLS-DA 模型中, WT 组与 Het 组、Hom 组样本在代谢特征上呈明显分离(图 5A–5C)。相较 WT 组, *Trpv4* 基因编辑小鼠粪便中共有 203 种代谢物发生变化(图 5D–5F), 其中 151 种上调、52 种下调(VIP>1, $P<0.05$)。上调代谢物主要包括葫芦酸(cucurbitic acid)、水杨酸(salicylic acid)、大豆苷(daidzin)、羟基去甲基博生坦(hydroxy desmethyl bosentan)和烯酮丙酮酸(enol-



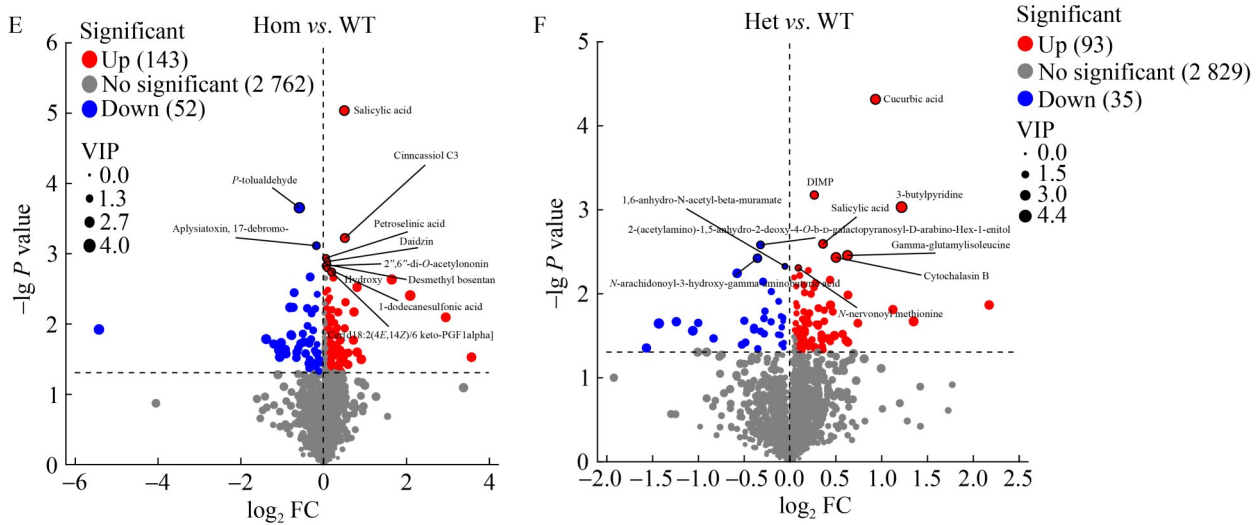


图5 *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* 突变导致小鼠肠道菌群代谢谱发生改变

Figure 5 *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* mutation causes changes in the metabolic spectrum of intestinal flora in mice. A: Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score plot of fecal metabolites from the three groups of mice (The plot shows the overall separation trends among the three groups); B: Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) score plot comparing the WT group with the Hom group; C: OPLS-DA score plot comparing the WT group with the Het group; D: Volcano plot of differential metabolites comparing all gene-edited groups (Het+Hom) with the WT group; E: Volcano plot of differential metabolites comparing the Hom group with the WT group; F: Volcano plot of differential metabolites comparing the Het group with the WT group.

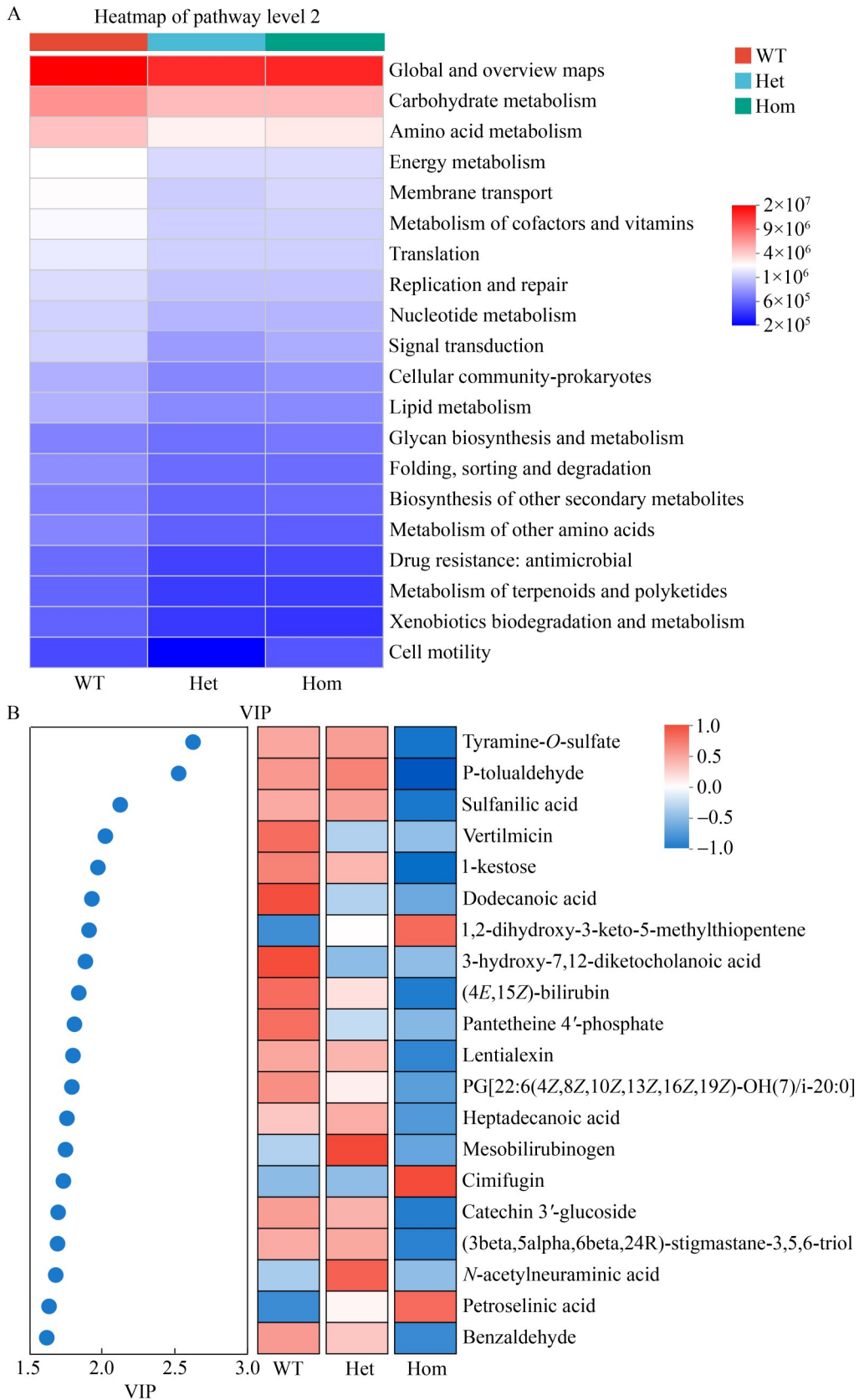
phenylpyruvate)等, 涉及脂质代谢、芳香族化合物降解及药物代谢通路, 提示与炎症反应及氧化应激相关的代谢网络被激活。下调代谢物如 3-羟基-7,12-二酮胆烷酸(3-hydroxy-7,12-diketocholanoic acid)、*N*-花生四烯酰-3-羟基- γ -氨基丁酸(*N*-arachidonoyl-3-hydroxy- γ -aminobutyric acid)和七羟基去氧蟾蜍配基(telocinobufagin)等, 主要参与胆汁酸代谢、鞘脂代谢等。这些变化表明, *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* 基因编辑后脂质氧化与免疫代谢异常, 肠道能量代谢与屏障功能可能受损。整体而言, *Trpv4* 基因编辑重塑了肠道菌群的代谢微环境。

2.4 *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* 突变对肠道菌群功能及代谢途径的影响

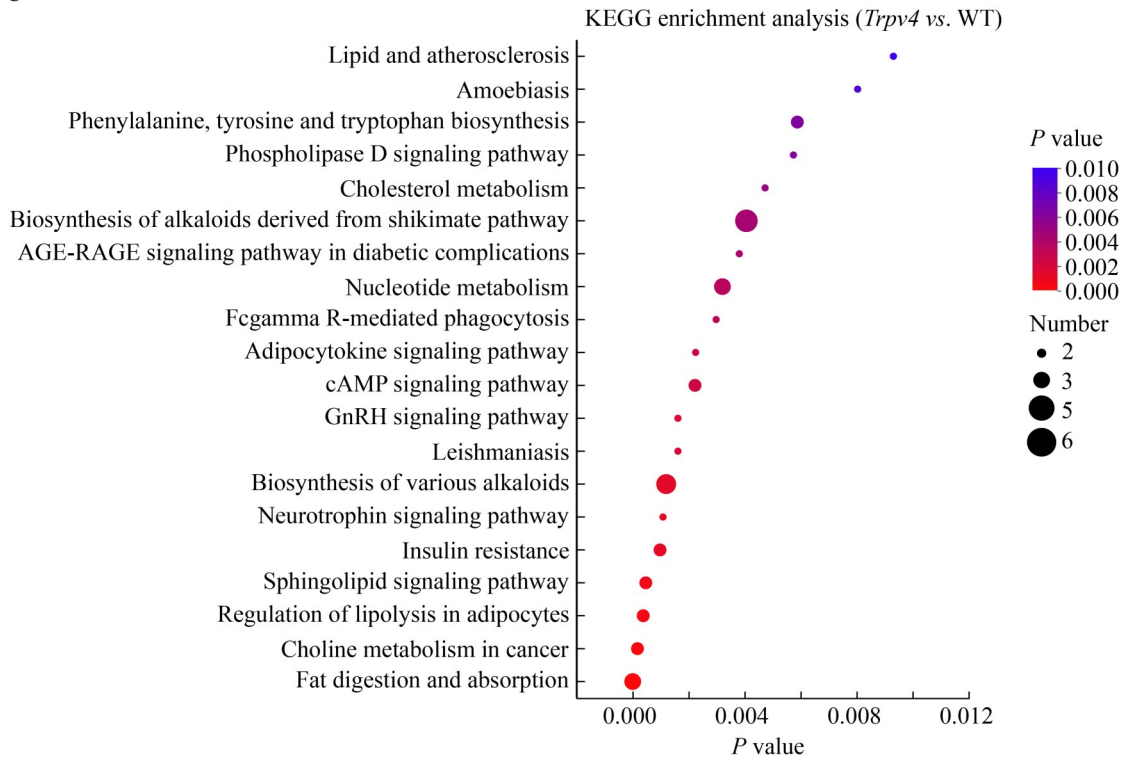
为揭示 *Trpv4* 基因编辑对肠道菌群功能的影

响, 本研究基于 PICRUSt2 功能预测与 KEGG 代谢通路注释结果进行了综合分析。相对于 WT 小鼠, *Trpv4* 基因编辑小鼠的肠道菌群在碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、能量代谢(energy metabolism)等关键功能通路的相对丰度均降低(图 6A)。与营养吸收及物质转运相关的通路, 如膜转运(membrane transport)和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)同样出现下降, 表明 *Trpv4* 突变可能削弱了菌群的基础代谢功能。

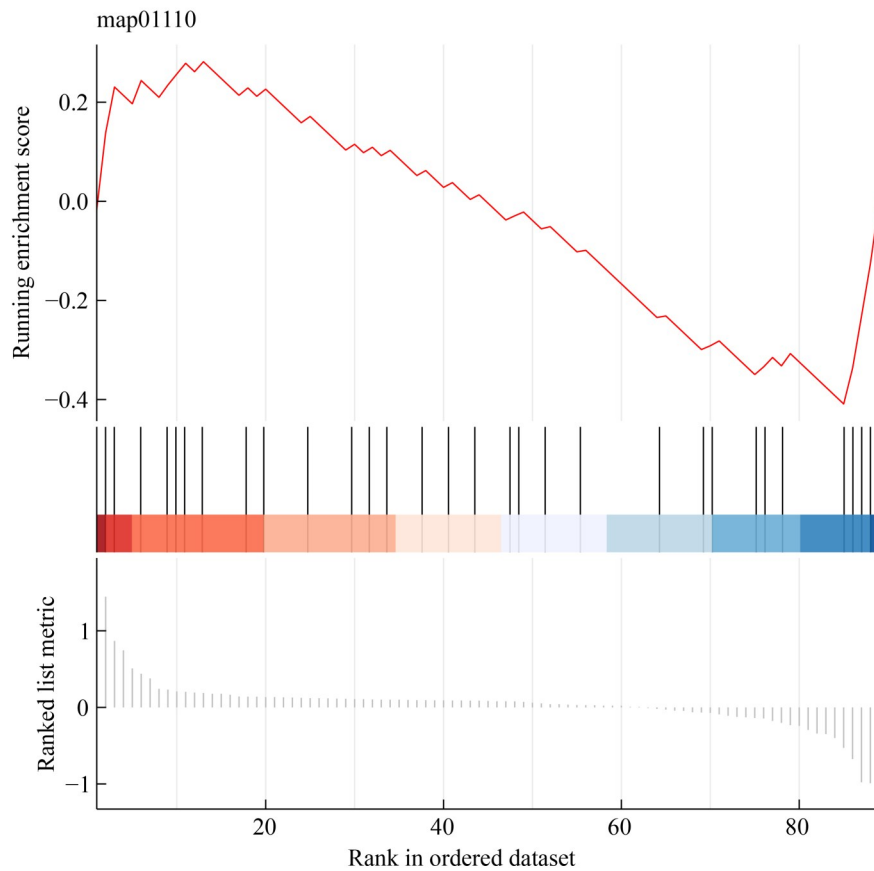
依赖于肠道菌群的代谢微环境重塑在关键的菌群相关代谢物上得到了具体体现。肠道菌群的代谢物分析发现 *Trpv4* 基因编辑组中脂质氧化及免疫相关的代谢物相对量明显改变(图 6B), 其中, 升麻素(cimifugin)与岩芹酸(petroselinic



C

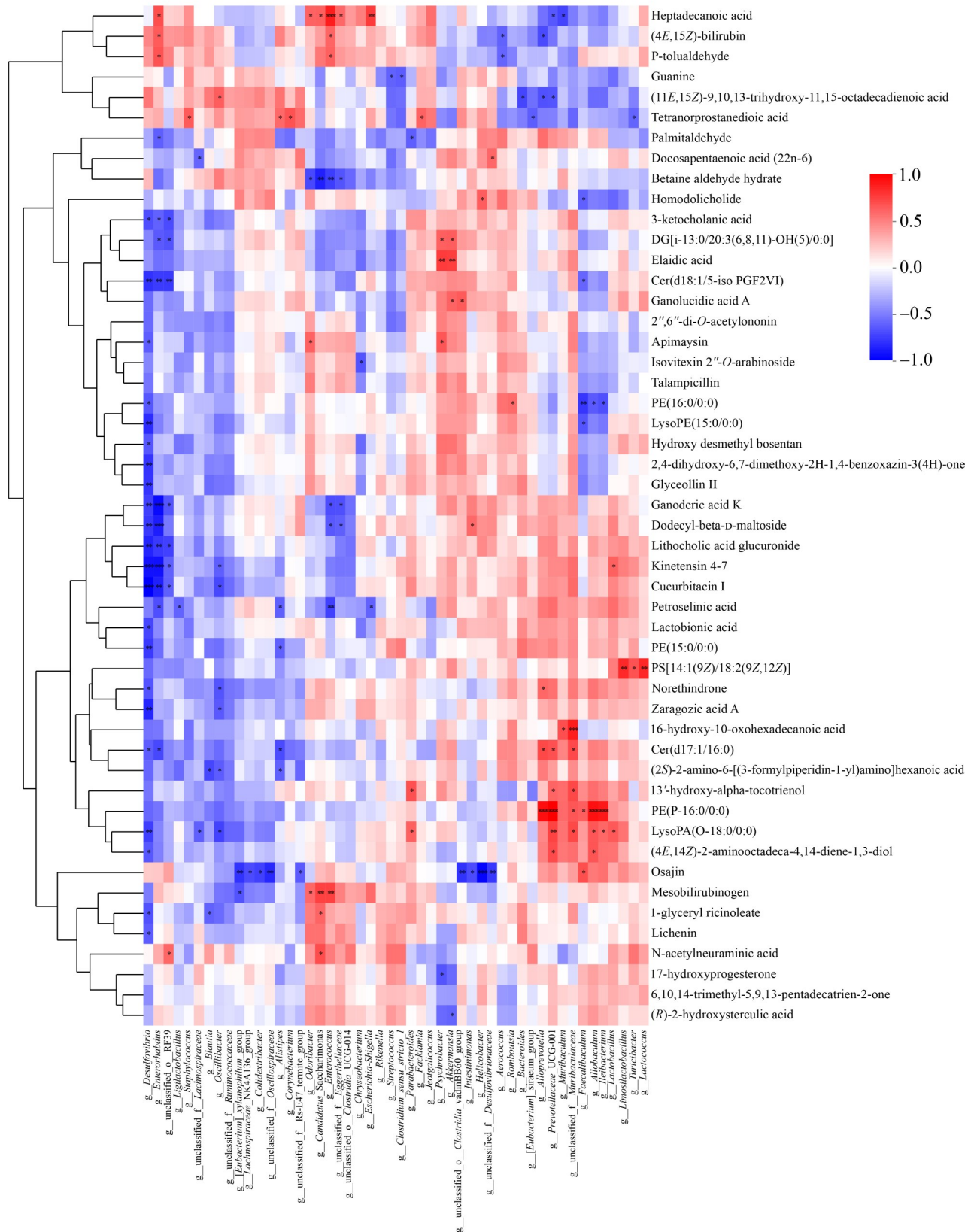


D



E

Correlation between metabolites and flora



F

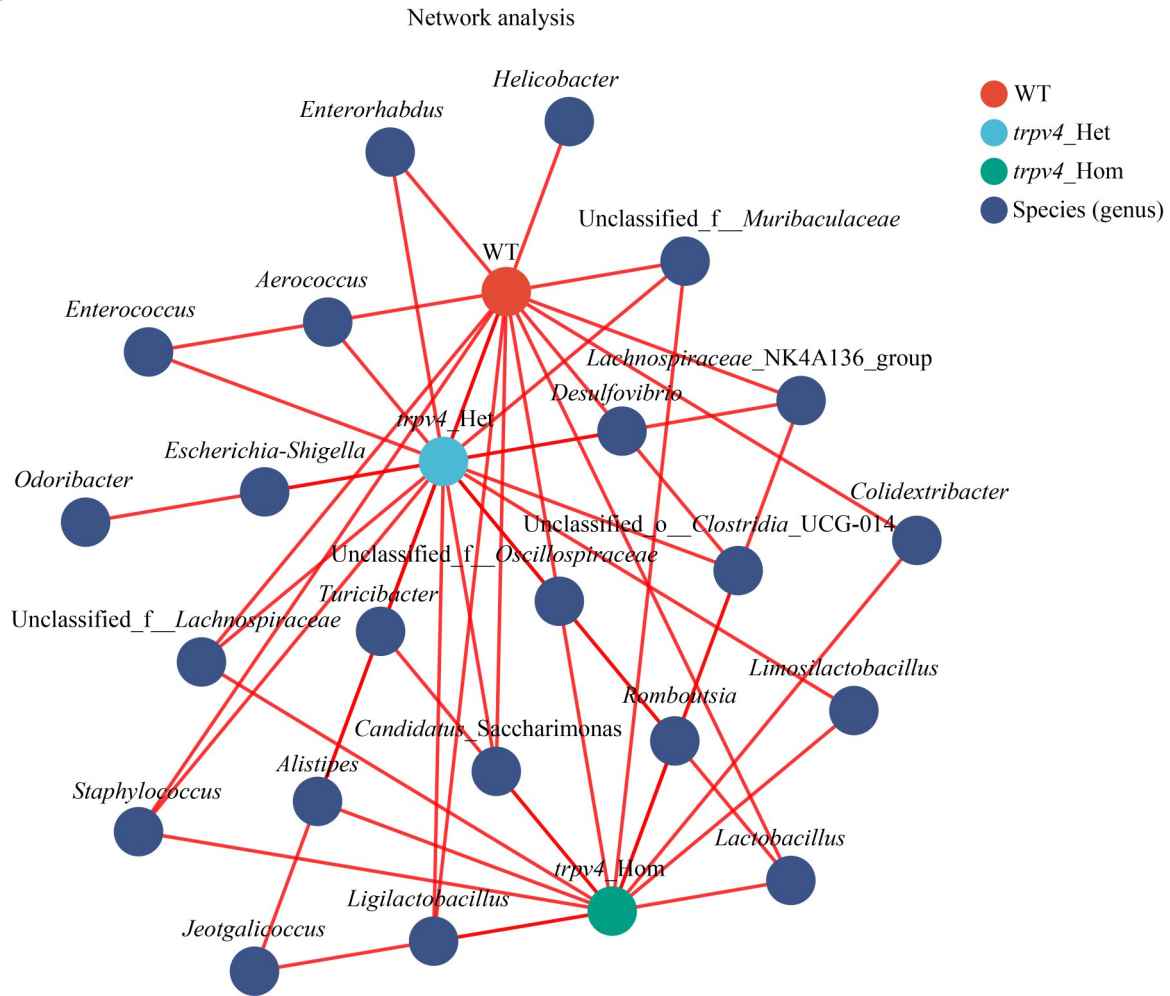


图6 *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A突变对肠道菌群功能及代谢途径的影响

Figure 6 Effects of *Trpv4* exon 8 c.1491+1G>A mutation on the function and metabolic pathway of intestinal flora. A: Prediction and analysis of intestinal flora function; B: Analysis of differential metabolites between *Trpv4* gene editing mice and WT mice; C: KEGG pathway enrichment analysis; D: GSEA enrichment analysis based on metabolomics data; E: Spearman's rank correlation analysis between significantly different genera and significantly different metabolites; F: Co-occurrence network analysis of intestinal microbiota at the genus level.

acid)在 *Trpv4* 基因编辑小鼠中上调,前者为具有抗炎和抗氧化活性的植物源苯丙素类化合物,后者为单不饱和脂肪酸,参与脂质稳态调节和膜结构重塑。对甲基苯甲醛(*p*-tolualdehyde)、磺胺酸(sulfanilic acid)、月桂酸(dodecanoic acid)、扁豆苷素(lentialexin)等代谢物显著下调,这些分子主要涉及芳香族化合物代谢、含硫代谢及中链脂肪酸氧化过程。它们的减少说明 *Trpv4* 基因

编辑小鼠存在菌群失衡与屏障功能障碍。

与此同时,KEGG 通路富集分析揭示 *Trpv4* 基因编辑组的代谢扰动显著集中于能量代谢及相关疾病通路(图 6C)。其中,与能量代谢相关的脂质代谢途径,如脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、脂肪的消化和吸收(fat digestion and absorption)、胆固醇代谢(cholesterol metabolism)以及脂肪细胞脂解的调

控(regulation of lipolysis in adipocytes)等通路均发生明显改变。这从通路层面证实了该基因编辑会引发脂代谢紊乱。除此之外, 疾病相关的代谢途径, 如癌症的胆碱代谢(choline metabolism in cancer)、fc- γ R-介导的吞噬作用(fc gamma R-mediated phagocytosis)、胰岛素抵抗(insulin resistance)等通路也呈现出变化。

基于代谢组学的 GSEA 通路富集分析(图 6D)显示, 正相关代谢物在排列图的前端聚集分布, 表明基因编辑小鼠发生了系统性的代谢改变。Spearman 秩相关分析显示(图 6E), 16-羟-10-氧-十六烷酸(16-hydroxy-10-oxohexadecanoic acid)、神经酰胺[cer(d17:1/16:0)]、溶血磷脂酸[lysoPA(O-18:0/0:0)]等与拟杆菌属显著正相关。十七烷酸(heptadecanoic acid)、胆红素同分异构体[(4E,15Z)-bilirubin]、对甲基苯甲醛(p-tolualdehyde)与肠杆菌属、肠球菌属(*Enterococcus*)显著正相关, 灵芝酸 K(ganoderic acid K)、岩芹酸与肠杆菌属、肠球菌属显著负相关。鸟嘌呤(guanine)与葡萄菌属、链球菌属呈显著正相关。亚油酸反式异构体(linoelaidic acid)、灵芝酸 A(ganolucidic acid A)、(2'',6''-di-O-acetylnonin)与嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、嗜黏阿克曼菌(*Akkermansia*)显著正相关。溶血磷脂酸、黄豆苷素 II(glyceollin II)等与脱硫弧菌属负相关。同时, 属水平肠道菌群共现性网络分析(图 6F)显示 *Trpv4* 基因编辑导致肠道菌群种属间的生态互作网络改变, 从复杂、稳定的共生状态(WT 组)演变为正连接较少的紊乱状态(Hom 组)。总体而言, 这些代谢物与菌群的相关性主要集中在脂质代谢及氧化应激与炎症反应通路上。*Trpv4* 基因编辑重塑了肠道菌群与代谢微环境。

2.5 实验验证菌群丰度、肠道炎症状态与紧密连接蛋白表达

为进一步确认关键菌群和肠道分子变化, 本研究进行了 qPCR、WB 和免疫荧光染色验

证。qPCR 结果显示(图 7A-7C) *Trpv4* 基因编辑组小鼠肠道拟杆菌门、拟杆菌目显著上调, 与 16S rRNA 基因测序结果一致。同时, 阴沟肠杆菌等条件致病菌也在 *Trpv4* 基因编辑组显著富集。*Trpv4* 基因编辑组炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 与 IL-6 的表达显著升高(图 7D-7F), 这与粪便代谢组分析中代谢和免疫紊乱结果相呼应。WB 及免疫荧光结果均显示肠道紧密连接蛋白 Occludin 显著下调(图 7G-7I), 其中免疫荧光观察到 Hom 组结肠上皮中 Occludin 信号减弱且连续性受损, 而 WT 组呈现连续完整的表达分布。上述结果进一步表明, *Trpv4* 基因编辑导致肠道紧密连接受损, 肠道屏障功能下降, 条件致病菌增多, 肠道存在炎症反应和菌群紊乱。

3 讨论

近年来, 肠道菌群作为人体中生物多样性最为丰富的共生系统, 通过复杂的代谢网络深度参与能量代谢、营养吸收及免疫调控等关键生理过程, 不仅为宿主提供必需的能量与营养物质, 还在维持免疫稳态、抵御病原体入侵等方面发挥核心作用, 已成为生命科学领域的前沿研究热点^[35-36]。既往对于 *Trpv4* 基因的研究多聚焦于离子通道功能调控、疼痛感知及机械敏感性等方面的作用机制, 而关于其与肠道菌群之间的交互作用及潜在调控机制的相关研究较少^[9,37]。本研究利用 *Trpv4* 基因编辑小鼠模型研究了 *Trpv4* 基因编辑对小鼠肠道屏障及菌群-代谢微环境的影响。

在本研究中, *Trpv4* 基因编辑导致小鼠肠组织无法转录正常的 *Trpv4* mRNA, 进而无法表达正常的 TRPV4 蛋白。HE 染色发现, *Trpv4* 基因编辑小鼠的肠组织中杯状细胞数量显著减少, 且杯状细胞染色深度变浅, 同时伴有黏膜下层水肿。Chen 等^[38]、Mandile 等^[39]和 Peng 等^[40]的研究表明, 杯状细胞的减少会对肠黏膜屏障造成破坏, 并且这一变化与 IBD 息息相关。结合本研究中肠通透性增加和连接蛋白 Occludin 下

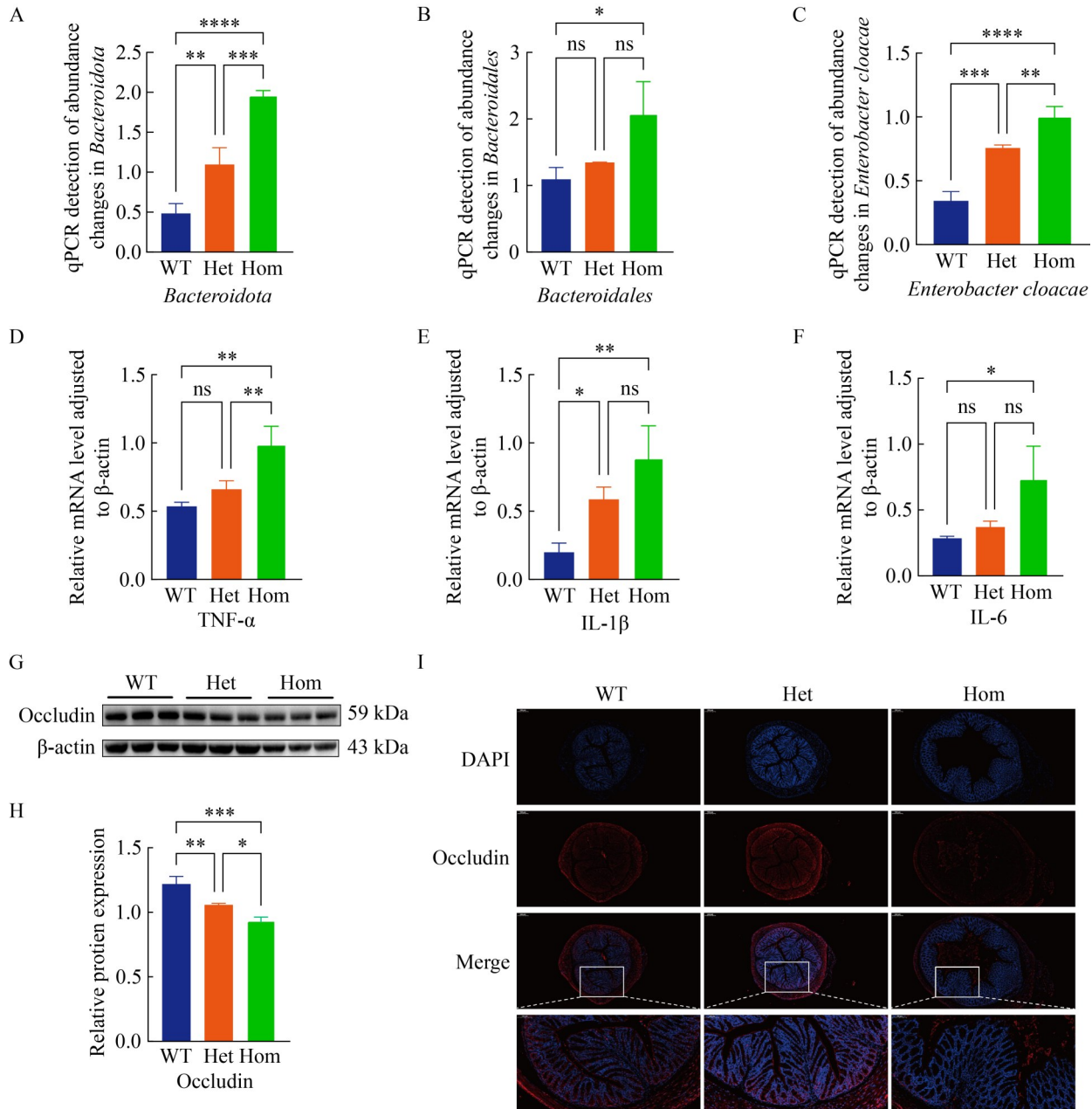


图7 qPCR、Western blotting与免疫荧光验证*Trpv4*基因编辑对肠道菌群、炎症因子及屏障蛋白的影响

Figure 7 The effects of *Trpv4* gene editing on intestinal flora, inflammatory factors and barrier proteins were verified by qPCR, Western blotting and immunofluorescence. A – C: The relative abundance changes of representative genera *Bacteroidota*, *Bacteroidales* and *Enterobacter cloacae* in fecal samples; D – F: mRNA expression levels of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 in intestinal tissues show significant differences among groups; G, H: Western blotting analysis shows that the tight junction protein Occludin is significantly downregulated in the Het and Hom groups, with β -actin used as the internal control; I: Immunofluorescence staining of Occludin in colonic tissues. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: $P > 0.05$.

调的结果, 认为 *Trpv4* 基因编辑会导致小鼠的肠屏障受损。

在肠道菌群结构方面, *Trpv4* 基因编辑小鼠的芽孢杆菌门、脱硫菌门和放线菌门相对丰度下降, 而拟杆菌门的丰度上升。传统上, 芽孢杆菌门与拟杆菌门的比例(F/B)常被用于评估肠道菌群是否失调^[41]。本研究中 *Trpv4* 基因编辑小鼠肠道菌群的 F/B 比值减小, 并且该 F/B 比值的变化趋势与 IBD 患者所表现出的变化相一致^[42], 表明 *Trpv4* 基因编辑可导致小鼠肠道菌群稳态紊乱, 可能增加 IBD 的发病风险。值得注意的是, 已有研究证实 TRPV4 离子通道的异常激活能够破坏肠道屏障完整性, 加速 IBD 的病理进程^[43], 这与本研究结果一致, 表明 *Trpv4* 基因编辑引发的肠道菌群紊乱与 TRPV4 通道功能异常可能存在协同作用, 共同推动 IBD 的发生发展。此外, *Trpv4* 基因编辑小鼠肠拟杆菌门相关类群、阴沟肠杆菌的丰度显著上升, 在肠道菌群失衡时这些细菌可能转变为条件致病菌, 通过破坏肠道屏障完整性、增加肠道通透性等机制, 引发尿路感染、炎症等疾病^[44-46]。本研究推测 *Trpv4* 基因编辑后条件致病菌过度生长、菌群代谢紊乱的微生态状态可能进一步加剧肠道炎症和损伤, 从而形成炎症与屏障损伤的正反馈循环。

粪便的非靶代谢组学分析结果显示, *Trpv4* 基因编辑小鼠的脂质代谢通路受到抑制, 其中月桂酸及扁豆昔素等关键代谢物的相对表达量显著降低。这一结果提示, 脂肪酸代谢从“合成、氧化、修饰”的全过程均受到抑制, 可能导致能量代谢效率下降^[47-48]。然而, 免疫相关代谢物如岩芹酸、西凤参素等的相对表达水平升高, 这些代谢物具有抑制炎症反应、改善肠道屏障功能障碍的潜在作用^[49-51], 可能是机体对基因编辑诱导的肠道微生态失衡的代偿性调节机制。结合 KEGG 通路富集分析进一步发现, *Trpv4* 基因编辑小鼠脂质代谢和免疫代谢相关通路呈现富集状态, 表明其体内这两大代谢过程

发生了系统性重塑^[52]。脂质作为生物膜的重要组成部分, 同时参与能量储存与信号传导过程^[53], 其代谢异常可能引发一系列生理功能紊乱。Cătoi 等^[54]的研究已证实, 肠道菌群可通过分泌胆汁酸代谢酶、短链脂肪酸等代谢产物直接调控宿主脂质代谢过程。本研究通过整合差异肠道菌群与代谢物数据, 鉴定出拟杆菌门相关属、脱硫弧菌属、肠杆菌属、肠球菌属等受 *Trpv4* 基因编辑影响显著的关键菌群, 拟杆菌门相关类群的丰度与 16-羟-10-氧-十六烷酸等多种脂质及类脂分子代谢物波动显著正相关, 脱硫弧菌属与脂质代谢物及黄豆昔素 II 等免疫相关代谢物显著负相关, 肠杆菌属和肠球菌属与十七烷酸等部分脂肪酸及免疫相关分子变化呈正相关, 而与灵芝酸 K 等部分代谢物变化负相关。上述结果表明 *Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A* 基因突变诱导了肠道菌群紊乱, 重塑菌群代谢网络。

尽管本研究揭示了 *Trpv4* 基因编辑所引发的肠道屏障破坏、菌群结构变化和代谢异常, 但仍有若干问题值得进一步深入研究。首先, 当前证据主要基于多组学关联与共现分析, 尚需通过时间序列与功能验证实验来明确因果关系。未来可在不同发育阶段追踪突变小鼠的屏障功能与菌群演替过程, 或借助粪菌移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) 模型解析菌群在代谢重塑中的直接作用机制。其次, 菌群代谢物 (如短链脂肪酸) 是否通过 TRPV4 介导的上皮钙信号参与屏障稳态调控, 有待在体外上皮细胞模型中进一步验证。此外, 后续研究可通过 TRPV4 药理调控试验确认表型的特异性与可逆性, 并结合血清及组织代谢组学实现多层次代谢通路整合, 从而更全面地揭示宿主-菌群-代谢网络的动态互作和深入分子机制。考虑到饲养环境与饮食因素可能对菌群组成产生潜在影响, 未来研究将引入标准化饲养程序与交叉笼设计实验, 进一步提高实验组间的可比性与结果的可靠性。

4 结论

Trpv4 exon 8 c.1491+1G>A 基因编辑导致小鼠肠组织无法转录正常的 *Trpv4* mRNA, 进而使 TRPV4 蛋白表达异常, 引发肠道组织结构异常与肠屏障功能损伤。与此同时, 该基因编辑致使小鼠肠道菌群稳态失衡, 拟杆菌门丰度显著升高, 芽孢杆菌门与拟杆菌门比例(F/B)下降, 葡萄球菌属等常见共生菌相对丰度降低。*Trpv4* 基因编辑小鼠还存在肠道菌群脂质代谢异常与免疫代谢物紊乱, 其中拟杆菌门相关类群与脂质及类脂分子代谢物正相关, 而脱硫弧菌属、肠杆菌属和肠球菌属则与部分脂质代谢物及免疫相关代谢物呈负相关。

作者贡献声明

阮浩龙: 研究技术支持、试验实施与验证、论文修改与讨论; 刘桂福: 试验操作、数据收集处理、论文撰写和修改; 阿苏约布木: 协助试验操作、验证; 李广燕: 协助试验操作、方法讨论; 于鸿浩: 技术指导、论文讨论与修改; 岳鹏鹏: 提出概念、研究构思与设计、论文修改与讨论。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Espadas-Álvarez H, Martínez-Rendón J, Larre I, Matamoros-Volante A, Romero-García T, Rosenbaum T, Rueda A, García-Villegas R. TRPV4 activity regulates nuclear Ca^{2+} and transcriptional functions of β -catenin in a renal epithelial cell model[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(5): 3599-3614.
- [2] Kumar H, Lee SH, Kim KT, Zeng X, Han I. TRPV4: a sensor for homeostasis and pathological events in the CNS[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(11): 8695-8708.
- [3] Berglund L, Björling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Al-Khalili Szgyarto C, Persson A, Ottosson J, Wernérus H, Nilsson P, Lundberg E, Sivertsson Å, Navani S, Wester K, Kampf C, Hober S, Pontén F, Uhlén M. A gene-centric human protein atlas for expression profiles based on antibodies[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008, 7(10): 2019-2027.
- [4] Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szgyarto CA, Amini B, Andersen E, Andersson AC, Angelidou P, Asplund A, Asplund C, Berglund L, Bergström K, Brumer H, Cerjan D, Ekström M, Elobeid A, Eriksson C, Fagerberg L, Falk R, Fall J, et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, 4(12): 1920-1932.
- [5] Jiang DS, Guo RJ, Dai RX, Knoedler S, Tao J, Machens HG, Rinkevich Y. The multifaceted functions of TRPV4 and calcium oscillations in tissue repair[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(2): 1179.
- [6] Hartmannsgruber V, Heyken WT, Kacik M, Kaistha A, Grgic I, Harteneck C, Liedtke W, Hoyer J, Köhler R. Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression[J]. *PLoS One*, 2007, 2(9): e827.
- [7] Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(10): 695-702.
- [8] Denadai-Souza A, Martin L, de Paula MAV, de Avellar MCW, Muscará MN, Vergnolle N, Cenac N. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2012, 64(6): 1848-1858.
- [9] Kuebler WM, Jordt SE, Liedtke WB. Urgent reconsideration of lung edema as a preventable outcome in COVID-19: inhibition of TRPV4 represents a promising and feasible approach[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2020, 318(6): L1239-L1243.
- [10] O'Leary C, McGahon MK, Ashraf S, McNaughten J, Friedel T, Cincolà P, Barabas P, Fernandez JA, Stitt AW, McGeown JG, Curtis TM. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in retinal angiogenesis[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2019, 60(10): 3297-3309.
- [11] Yamawaki H, Mihara H, Suzuki N, Nishizono H, Uchida K, Watanabe S, Tominaga M, Sugiyama T. Role of transient receptor potential vanilloid 4 activation in indomethacin-induced intestinal damage[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2014, 307(1): G33-G40.
- [12] Lin L, Li X, Wu AJ, Xiu JB, Gan YZ, Yang XM, Ai ZH. TRPV4 enhances the synthesis of fatty acids to drive the progression of ovarian cancer through the calcium-mTORC1/SREBP1 signaling pathway[J]. *iScience*, 2023, 26(11): 108226.
- [13] Liu DD, Mao ML, Liu WJ, Xie LH, Zhong XL, Cao WY, Chen L. The role of the TRPV4 channel in intestinal physiology and pathology[J]. *Journal of Inflammation Research*, 2024, 17: 9307-9317.
- [14] Tian YW, Jian T, Li J, Huang LS, Li S, Lu H, Niu GT, Meng XH, Ren BR, Liao HR, Ding XQ, Chen J. Phenolic acids from Chicory roots ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by targeting TRP signaling pathways and the gut microbiota[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155378.

- [15] Vergnolle N. TRPV4: new therapeutic target for inflammatory bowel diseases[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2014, 89(2): 157-161.
- [16] Mihara H, Suzuki N, Boudaka AA, Muhammad JS, Tominaga M, Tabuchi Y, Sugiyama T. Transient receptor potential vanilloid 4-dependent calcium influx and ATP release in mouse and rat gastric epithelia[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(24): 5512-5519.
- [17] Ye XW, Wang AQ, Lin WT, Xu YW, Dong XY, Zhou Y, Tian KW, Xu XL. The role of intestinal flora in anti-tumor antibiotic therapy[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2022, 27(10): 281.
- [18] Bergot AS, Giri R, Thomas R. The microbiome and rheumatoid arthritis[J]. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2019, 33(6): 101497.
- [19] Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AHK, Vasconcelos AC, Cunha LD, Mayer AE, Shen Y, Wu WL, Kambal A, Targan SR, Xavier RJ, Ernst PB, Green DR, McGovern DPB, Virgin HW, Mazmanian SK. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Science*, 2016, 352(6289): 1116-1120.
- [20] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin JJ, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li JH, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 541-546.
- [21] Li MJ, Shao DT, Zhou JC, Gu JH, Qin JJ, Chen W, Wei WQ. Signatures within esophageal microbiota with progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2020, 32(6): 755-767.
- [22] Zhang W, Jiang KW. Role of gut microbiota in carcinogenesis and treatment for colorectal cancer[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2020, 23(5): 516-520.
- [23] Zou XL, Wu JJ, Ye HX, Feng DY, Meng P, Yang HL, Wu WB, Li HT, He Z, Zhang TT. Associations between gut microbiota and asthma endotypes: a cross-sectional study in South China based on patients with newly diagnosed asthma[J]. *Journal of Asthma and Allergy*, 2021, 14: 981-992.
- [24] Morita T, Mitsuyama K, Yamasaki H, Mori A, Yoshimura T, Araki T, Morita M, Tsuruta K, Yamasaki S, Kuwaki K, Yoshioka S, Takedatsu H, Torimura T. Gene expression of transient receptor potential channels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(8): 2643.
- [25] 季子涵. *Trpv4* 基因编辑小鼠模型构建及表型分析[D]. 桂林: 桂林医学院, 2024.
- Ji ZH. Construction and phenotypic analysis of *Trpv4* gene-edited mouse model[D]. Guilin: Guilin Medical University, 2024 (in Chinese).
- [26] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): e1.
- [27] Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K. Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(5): 367-373.
- [28] Mieszkina S, Furet JP, Corthier G, Gourmelon M. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(10): 3045-3054.
- [29] 任晓敏, 秦明珍, 张少龙, 张帆, 严芬. 褐藻胶寡糖调节肠道菌群稳态及短链脂肪酸代谢并改善炎症性肠病[J]. *食品科学*, 2025, 46(15): 224-231.
- Ren XM, Qin MZ, Zhang SL, Zhang F, Yan F. Alginate oligosaccharides regulate gut microbiota homeostasis and short-chain fatty acid metabolism, and ameliorate inflammatory bowel disease[J]. *Food Science*, 2025, 46(15): 224-231 (in Chinese).
- [30] Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, Ciulla D, Tabbaa D, Highlander SK, Sodergren E, Methé B, DeSantis TZ, Consortium THM, Petrosino JF, Knight R, Birren BW. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504.
- [31] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [32] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [33] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [34] Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(6): 685-688.
- [35] Biradar SP, Tamboli AS, Khandare RV, Pawar PK. Chebulinic acid and Boeravinone B act as anti-aging and anti-apoptosis phyto-molecules during oxidative stress[J]. *Mitochondrion*, 2019, 46: 236-246.
- [36] Seif El-Din SH, Salem MB, El-Lakkany NM, Hammam OA, Nasr SM, Okasha H, Ahmed LA, Saleh S, Botros SS. Early intervention with probiotics and metformin alleviates liver injury in NAFLD rats *via* targeting gut microbiota dysbiosis and p-AKT/mTOR/LC-3II pathways[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2021, 40(9): 1496-1509.

- [37] Ottolini M, Hong K, Cope EL, Daneva Z, DeLalio LJ, Sokolowski JD, Marziano C, Nguyen NY, Altschmied J, Haendeler J, Johnstone SR, Kalani MY, Park MS, Patel RP, Liedtke W, Isakson BE, Sonkusare SK. Local peroxynitrite impairs endothelial transient receptor potential vanilloid 4 channels and elevates blood pressure in obesity[J]. *Circulation*, 2020, 141(16): 1318-1333.
- [38] Chen Y, Chen HQ, Ding JH, Stanton C, Ross RP, Zhao JX, Zhang H, Yang B, Chen W. *Bifidobacterium longum* ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by producing conjugated linoleic acid, protecting intestinal mechanical barrier, restoring unbalanced gut microbiota, and regulating the Toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(48): 14593-14608.
- [39] Mandile R, Maglio M, Mosca C, Marano A, Discepolo V, Troncone R, Auricchio R. Mucosal healing in celiac disease: villous architecture and immunohistochemical features in children on a long-term gluten free diet[J]. *Nutrients*, 2022, 14(18): 3696.
- [40] Peng YJ, Yan YM, Wan P, Chen D, Ding Y, Ran LW, Mi J, Lu L, Zhang ZJ, Li XY, Zeng XX, Cao YL. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 136: 96-108.
- [41] Wei SD, Bahl MI, Baunwall SMD, Hvas CL, Licht TR. Determining gut microbial dysbiosis: a review of applied indexes for assessment of intestinal microbiota imbalances[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(11): e00395-21.
- [42] Tsai YC, Tai WC, Liang CM, Wu CK, Tsai MC, Hu WH, Huang PY, Chen CH, Kuo YH, Yao CC, Chuah SK. Alternations of the gut microbiota and the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio after biologic treatment in inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 2025, 58(1): 62-69.
- [43] Zhang MT, Chen XY, Zhang LY, Li JH, Sun C, Zhou GL, Wan HX, Lu W, Dong H. Zinc pyrithione ameliorates colitis in mice by interacting on intestinal epithelial TRPA1 and TRPV4 channels[J]. *Life Sciences*, 2024, 358: 123090.
- [44] Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. Urinary tract infection: pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Molecular Immunology*, 2019, 108: 56-67.
- [45] García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 32(2): e00058-18.
- [46] O'Malley D, Julio-Pieper M, Gibney SM, Dinan TG, Cryan JF. Distinct alterations in colonic morphology and physiology in two rat models of enhanced stress-induced anxiety and depression-like behaviour[J]. *Stress*, 2010, 13(2): 114-122.
- [47] Clugston RD, Jiang HF, Lee MX, Piantedosi R, Yuen JJ, Ramakrishnan R, Lewis MJ, Gottesman ME, Huang LS, Goldberg IJ, Berk PD, Blaner WS. Altered hepatic lipid metabolism in C57BL/6 mice fed alcohol: a targeted lipidomic and gene expression study[J]. *Journal of Lipid Research*, 2011, 52(11): 2021-2031.
- [48] Liu H, Wang S, Wang JH, Guo X, Song YJ, Fu K, Gao ZJ, Liu DF, He W, Yang LL. Energy metabolism in health and diseases[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2025, 10: 69.
- [49] Lee JH, Kim YG, Lee J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence factor production by petroselinic acid and other unsaturated C18 fatty acids[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e01330-22.
- [50] Wang XR, Zhong H, Ma SS, Huang YH, Xu WH, Wang Y. Discovery of petroselinic acid with *in vitro* and *in vivo* antifungal activity by targeting fructose-1,6-bisphosphate aldolase[J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155948.
- [51] Zhang H, Xiong ZK, He YS, Su HX, Jiao YL. Cimifugin improves intestinal barrier dysfunction by upregulating SIRT1 to regulate the NRF2/HO-1 signaling pathway[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2025, 398(3): 2897-2908.
- [52] Orsini EM, Roychowdhury S, Gangadhariah M, Cross E, Abraham S, Reinhardt A, Grund ME, Zhou JY, Stuehr O, Pant B, Olman MA, Vachharajani V, Scheraga RG. TRPV4 regulates the macrophage metabolic response to limit sepsis-induced lung injury[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2024, 70(6): 457-467.
- [53] Mutlu AS, Duffy J, Wang MC. Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(10): 1394-1407.
- [54] Cătoi AF, Corina A, Katsiki N, Vodnar DC, Andreicuț AD, Stoian AP, Rizzo M, Pérez-Martínez P. Gut microbiota and aging—a focus on centenarians[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2020, 1866(7): 165765.