



# 大肠杆菌和丁酸梭菌及代谢物对猪肠道上皮细胞线粒体功能影响的研究

侯 玲<sup>1,2</sup>, 吴元霞<sup>1</sup>, 王 洪<sup>1,3</sup>, 樊 欣<sup>1,3</sup>, 李晓开<sup>1,3</sup>, 孙 静<sup>1,3</sup>, 张进威<sup>1,3\*</sup>

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 四川农业大学动物科技学院, 成都 611130; 3. 农业农村部养猪科学重点实验室 养猪科学重庆市重点实验室, 重庆 402460)

**摘 要:** 旨在探讨大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)和丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*, *C. butyricum*)及代谢物对猪肠道上皮细胞(IPEC-J2)线粒体功能及相关代谢途径的影响, 为调控肠道健康提供理论依据。本试验首先通过筛选确定将培养至3 h时处于对数生长期且活性最好的细菌悬液用于后续试验。然后用不同浓度的大肠杆菌、丁酸梭菌、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFAs)去处理 IPEC-J2 细胞, 每组设置3个重复, 分析细胞活力和细胞形态结构筛选出最佳的处理时间和浓度, 测定三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)含量、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位、抗氧化及线粒体功能相关基因表达。结果显示: 1) 筛选出大肠杆菌和丁酸梭菌处理 IPEC-J2 细胞的浓度分别为  $10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 和  $10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 处理时间为1 h, SCFAs 和 LPS 处理时间为1 h; 2) 丙酸和大肠杆菌处理组显著提高了 ROS 含量( $P < 0.05$ ); 丁酸梭菌和 LPS 显著降低了 ROS 含量( $P < 0.05$ ); 3) 丁酸梭菌显著上调了 *ACC1*、*NRF1*、*TFAM*、*HO-1*、*APAF-1*、*PIG3*、*p53* 的表达( $P < 0.05$ ), 大肠杆菌处理组下调了 *TFAM* 和 *CytC* 的表达( $P < 0.05$ ), 上调了 *p53* 的表达( $P < 0.05$ ), 丙酸和乙酸处理对各基因表达均无显著性影响。以上结果表明, SCFAs 促进了细胞代谢, 大肠杆菌和 LPS 激活细胞凋亡和生物氧化应激过程, 丁酸梭菌可以激活 IPEC-J2 细胞线粒体脂质代谢、抗氧化系统和细胞凋亡, 为靶向线粒体的肠道微生态调控策略提供了新视角。

**关键词:** 大肠杆菌; 丁酸梭菌; 猪肠道上皮细胞; 线粒体

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0691-13

## Effects of *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum*, and Their Metabolites on Mitochondrial Function in Porcine Intestinal Epithelial Cells

HOU Ling<sup>1,2</sup>, WU Yuanxia<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1,3</sup>, FAN Xin<sup>1,3</sup>, LI Xiaokai<sup>1,3</sup>, SUN Jing<sup>1,3</sup>, ZHANG Jinwei<sup>1,3\*</sup>

(1. Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China;

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

3. Chongqing Key Laboratory of Pig Science, Key Laboratory of Pig Science of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing 402460, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the effects of *Escherichia coli* (*E. coli*), *Clostridium butyricum* (*C. butyricum*), and their metabolites on mitochondrial function and related metabolic pathways in porcine intestinal epithelial cells (IPEC-J2), providing a theoretical basis for regulating intestinal health. Initially, bacterial suspensions were screened to ensure logarithmic-phase growth (3 h)

收稿日期: 2025-07-07

基金项目: 国家自然科学基金(32302712); 重庆市自然科学基金(CSTB2024NSCQ-MSX0147); 重庆市科研院所绩效激励引导专项(23508J)

作者简介: 侯 玲, 硕士生, 主要从事猪遗传育种与繁殖研究, E-mail: 2949357292@qq.com

\* 通信作者: 张进威, 主要从事实验猪资源创新开发与利用, E-mail: jinweizhang50@163.com

with optimal viability for subsequent experiments. IPEC-J2 cells were then treated with varying concentrations of *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum*, lipopolysaccharide (LPS), and short-chain fatty acids (SCFAs), with 3 replicates per group. Cell viability and morphological integrity were assessed to determine the optimal treatment duration and concentration. Key metrics included ATP levels, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential, and the expression of genes related to antioxidant defense and mitochondrial function. The results showed that: 1) The optimal concentrations for treating IPEC-J2 cells were determined as  $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  for *Escherichia coli* and  $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  for *C. butyricum*, with a treatment duration of 1 h. The treatment duration of SCFAs and LPS were also treated for 1 h. 2) Propionic acid and *E. coli* significantly increased ROS levels ( $P < 0.05$ ), whereas *C. butyricum* and LPS reduced them ( $P < 0.05$ ). 3) *C. butyricum* upregulated the expression of *ACC1*, *NRF1*, *TFAM*, *HO-1*, *APAF-1*, *PIG3*, and *p53* ( $P < 0.05$ ); *E. coli* downregulated the expression of *TFAM* and *CtyC* ( $P < 0.05$ ) but upregulated the expression of *p53* ( $P < 0.05$ ); Propionic acid and acetic acid had no significant effects on genes expression. The results indicated that SCFAs enhanced cellular metabolism, *E. coli* and LPS triggered oxidative stress and apoptotic pathways. *C. butyricum* activated mitochondrial lipid metabolism, antioxidant defenses, and apoptosis in IPEC-J2 cells. These findings offer novel insights into mitochondria-targeted strategies for gut microbiota regulation.

**Keywords:** *Escherichia coli*; *Clostridium butyricum*; IPEC-J2 cells; mitochondrion

**\* Corresponding author:** ZHANG Jinwei, E-mail: jinweizhang50@163.com

肠道微生物对宿主健康有重大影响<sup>[1]</sup>,是代谢物、激素和神经介质的重要来源,这些物质直接参与肠道功能调节,间接调节肝、脑和肾等肠外器官的功能<sup>[2]</sup>。多项研究表明,均衡的肠道菌群对健康至关重要<sup>[3-4]</sup>,调节脂质的代谢、胆汁酸及神经调控,它可以通过 SCFAs 增强粘液产生和促进调节性 T 细胞分化<sup>[5]</sup>。此外,肠道微生物的代谢物可以影响转录组、表观遗传标志和酶活性,调节宿主细胞中线粒体生物发生、代谢和氧化还原反应<sup>[6]</sup>,例如肠道微生物调节线粒体 AMPK 活性和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活剂-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 信号传导,以控制线粒体自噬、氧化应激及炎症<sup>[7]</sup>。大肠杆菌是健康肠道的共生微生物菌种之一,但有些是机会致病菌,可以引起疾病<sup>[8]</sup>。在肖金龙等<sup>[9]</sup>的研究中,致病性大肠杆菌可以通过其高致病性毒力岛 (HPI) 激活 NLRP3/Caspase-1 炎症小体通路,诱导 IPEC-J2 发生焦亡,造成细胞膜和炎症因子释放。丁酸梭菌是动物和人类肠道中存在的天然有益菌,能够产生丁酸,调节肠道 pH,维护肠道健康环境,保护其免受致病菌侵害<sup>[10]</sup>。除了分泌代谢物,丁酸梭菌菌体本身是与宿主细胞直接对话的“名片”,完整的菌体已被证明在塑造肠道抗炎环境方面具有强

大的能力,例如,在结肠炎模型中,丁酸梭菌能够诱导产生抗炎细胞因子白介素-10 (IL-10) 的肠道巨噬细胞增多<sup>[11-12]</sup>,而丁酸梭菌菌体表面物质对细胞的影响研究相对缺乏,因此本研究设计试验组将细胞培养基中加入丁酸梭菌悬液,旨在观察丁酸梭菌表面物质或代谢物成分是否也对 IPEC-J2 细胞产生影响。肠道微生物会对宿主生理功能和代谢产生重大影响,例如,相对于 SPF 小鼠,GF 小鼠结肠中 NADH/NAD 和 ATP 水平显著降低<sup>[13]</sup>,这表明了其在调节宿主结肠代谢方面具有特别重要的作用。线粒体是哺乳动物细胞中能量 (ATP) 来源的工作站并且唯一具有微生物起源的细胞器<sup>[14]</sup>,参与细胞多项生理功能(如控制细胞凋亡、调节细胞钙平衡及免疫系统等)<sup>[15-16]</sup>,对维持细胞正常生理功能起到了不可或缺的作用,且近年来许多研究认为线粒体是微生物调控宿主细胞的重要靶点<sup>[17-18]</sup>。然而,共生微生物如何精细调控肠道线粒体生物学功能从而影响着宿主肠道健康还有待深入研究,现有研究多集中于小鼠或人类细胞模型,且缺乏对微生物-线粒体互作的系统性解析<sup>[19-20]</sup>。IPEC-J2 是源自猪空肠上皮细胞的非转化连续性细胞系<sup>[21]</sup>,可以在培养过程中自发分化,形成具有生理相关性的肠道屏障模型<sup>[22-23]</sup>。

本研究拟结合 IPEC-J2 细胞模型和大肠杆菌、

丁酸梭菌及其代谢物,探究猪肠道微生物代谢物(如丁酸、乙酸)和丁酸梭菌代谢物或菌体表面物质对线粒体细胞活性、形态结构、膜电位和ROS、ATP含量、抗氧化及线粒体功能相关基因表达的影响,以期通过微生物干预改善猪肠道健康提供理论依据。此外,LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,常用于模拟细菌感染或炎症反应,它作为病原相关分子模式,与大肠杆菌的作用机制相似<sup>[24]</sup>,增加LPS处理组,可揭示其与肠道菌群的协同作用机制。最后,猪与人类肠道的相似性<sup>[25]</sup>使本研究的结果可能为人类代谢疾病提供跨物种参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

主要仪器:CO<sub>2</sub>培养箱、厌氧工作站、光学显微镜、倒置荧光显微镜DMI8、NanoDrop2000、分光光度计、酶标仪等。

试剂材料:ATP检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、活性氧检测试剂盒、Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、Western及IP细胞裂解液、强化梭菌培养基(RCM)、改良吉姆萨染色液(20X)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA和LPS购自碧云天生物技术有限公司;总RNA提取试剂盒购自广州美吉生物科技有限公司;乙酸、丁酸、丙酸购自生工生物工程股份有限公司;猪肠道上皮细胞IPEC-J2购自上海通派生物科技有限公司;大肠杆菌来源于重庆市畜牧科学院生物工程研究所自主保种菌,丁酸梭菌购买于北纳生物公司进行了一代测序的保种菌种,保藏编号为DSM10702=ATCC19398。

### 1.2 测定指标和方法

1.2.1 大肠杆菌生长曲线的测定 1)接种环挑取大肠杆菌在LB固体培养基上,经三区划线后,置于37℃恒温培养箱中培养,待长出菌落。2)用接种环挑取3~5个单个菌落的大肠杆菌于含有5 mL LB液体培养基的试管中,置于37℃恒温摇床中200 r·min<sup>-1</sup>培养12 h后,用于生长曲线的测定;3)将菌液按1:20的比例稀释,接种在100 mL的LB液体培养基中,混匀,分装到12支试管中,试管编号分别为0、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、14、25 h,置于37℃恒温摇床上200 r·min<sup>-1</sup>培养,在不同时间点取出,置于4℃冰箱,最后统一用分光光度计在OD<sub>600 nm</sub>处

测定吸光度,绘制生长曲线。4)取1、2、3、4和6 h时的菌液进行涂板计数。

1.2.2 丁酸梭菌生长曲线的测定 1)接种环挑取丁酸梭菌在RCM固体培养基上,经三区划线后,置于37℃恒温厌氧工作站中培养至菌落形成。2)用接种环挑取3~5个单个菌落置于含有5 mL RCM液体培养基的试管中,37℃恒温摇床中200 r·min<sup>-1</sup>培养12 h后,用于生长曲线的测定;3)将菌液按1:20的比例稀释,接种在RCM液体培养基中,混匀,分装到12支试管中,试管编号分别为0、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、14、25 h,丁酸梭菌于37℃恒温厌氧工作站培养25 h,在不同时间点取出,置于4℃冰箱,最后统一用分光光度计在OD<sub>600 nm</sub>处测定吸光度,绘制生长曲线。4)取1、2、3、4和6 h时的菌液进行涂板计数。

1.2.3 大肠杆菌和丁酸梭菌悬液制备 1)将大肠杆菌(丁酸梭菌)培养至对数生长期;2)取出菌液,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,弃上清液,加入10 mL无菌PBS溶液洗涤3次;3)弃掉PBS后,加入DMEM基础培养基,吹打混匀,使用分光光度计在OD<sub>600 nm</sub>处测定吸光度,并配置不同浓度的菌悬液。

1.2.4 IPEC-J2细胞传代 猪肠道上皮细胞培养至达80%~90%汇合度即可传代培养,细胞传代3~4次后,收集细胞并进行细胞计数后用于试验。

1.2.5 细胞培养与处理 细胞接种:96孔板(细胞活性鉴定使用CCK-8):100 μL 2.5×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup> IPEC-J2细胞悬液。12孔板(细胞形态结构、线粒体膜电位):1 mL 2.5×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup> IPEC-J2细胞悬液。24孔板(ATP、ROS、SOD、MDA、基因表达):1 mL 2.5×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup> IPEC-J2细胞悬液。培养条件:37℃、5%、CO<sub>2</sub>培养12 h,显微镜下观察到90%细胞贴壁后,弃掉培养基,PBS清洗2~3次。

分组处理:对照组:100 μL DMEM(CCK-8)、1 mL DMEM(其余检测组)。处理组:CCK-8组分别为1×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>大肠杆菌、1×10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>大肠杆菌、1×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>丁酸梭菌、1×10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>丁酸梭菌、1×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>丁酸梭菌、10 μg·mL<sup>-1</sup> LPS、5 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸、1 mmol·L<sup>-1</sup>丙酸和0.5 mmol·L<sup>-1</sup>丁酸,处理时间为1、3、6、12、24、48 h,每组3个重复。乙酸、丙酸和丁酸浓度参考文献[26]、LPS浓度参考文献[27],用于模拟革兰氏阴性菌的致病效应。

细胞形态结构组分分别为  $1 \times 10^9$  CFU·mL<sup>-1</sup> 大肠杆菌、 $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 大肠杆菌、 $1 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup> 大肠杆菌、 $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 丁酸梭菌、 $1 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup> 丁酸梭菌和  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 丁酸梭菌, 每组 3 个重复, 处理时间为 1、2 和 3 h。

其余各检测指标组分分别为  $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 大肠杆菌、 $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 丁酸梭菌、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙酸和  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  丁酸。每组设 3 个重复, 处理时间为 1 h。

终止处理: 弃掉处理液, PBS 清洗 1 次。

1.2.6 具体检测方法 CCK-8: PBS 处理后, 每孔加入  $90 \mu\text{L}$  DMEM+ $10 \mu\text{L}$  CCK-8,  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。

细胞形态结构: PBS 清洗后用 70% 乙醇固定细胞 10 min, 吸去乙醇, 加入 0.5 mL 改良吉姆萨染色液 ( $1 \times$ ), 染色 1 h, 然后用纯水清洗细胞 3~4 次, 在倒置显微镜下观察细胞形态结构。

ATP 含量测定: 按照 ATP 试剂盒说明书进行操作, 操作结束后, 使用酶标仪的化学发光测定 RLU 值, 并用 Nano Drop 测定裂解细胞上清液测定蛋白浓度。

线粒体膜电位: 按照线粒体膜电位试剂盒说明书进行 JC-1 探针装载, 操作结束后, 在荧光显微镜下观察。

ROS 测定: PBS 清洗后, 收集细胞, 使用荧光酶标仪在激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm, 测定荧光强度。

SOD 活性测定: PBS 清洗后, 吸取  $200 \mu\text{L}$

Western 及 IP 细胞裂解液, 裂解细胞, 然后按照总 SOD 活性试剂盒说明书进行操作, 操作结束后, 在 450 nm 处测定吸光度, 并用 Nano Drop 测定裂解细胞上清液中蛋白浓度。

MDA 含量测定: PBS 清洗后, 吸取  $200 \mu\text{L}$  Western 及 IP 细胞裂解液, 裂解细胞, 然后按照 MDA 检测试剂盒说明书进行操作, 操作结束后, 随后用酶标仪在 532 nm 测定吸光度, 并用 Nano Drop 测定裂解细胞上清液的蛋白浓度。

相关基因表达检测: PBS 清洗一次后, 使用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 使用 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA 试剂盒进行反转录, 进行实时定量检测。

### 1.3 数据统计

试验数据采用 SPSS 18.0 进行整理和分析, 使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行图片绘制和 t 检验处理, 试验结果以“平均值±标准差”表示, 统计学显著性定义为\*.  $P < 0.05$ ; \*\*.  $P < 0.01$ ; \*\*\*.  $P < 0.001$ 。

## 2 结果

### 2.1 大肠杆菌和丁酸梭菌的生长曲线

结果(图 1A)大肠杆菌在 1.5 h 处开始进入对数生长期, 在 6 h 处进入平台期; 丁酸梭菌在 2 h 处开始进入对数生长期, 在 6 h 处开始进入平台期, 在 22 h 处开始进入衰亡期(图 1B)。因细菌在对数生长期生长情况和活性最好, 所以本次试验丁酸梭菌和大肠杆菌使用培养至 3 h 处的菌悬液进行后续试验。

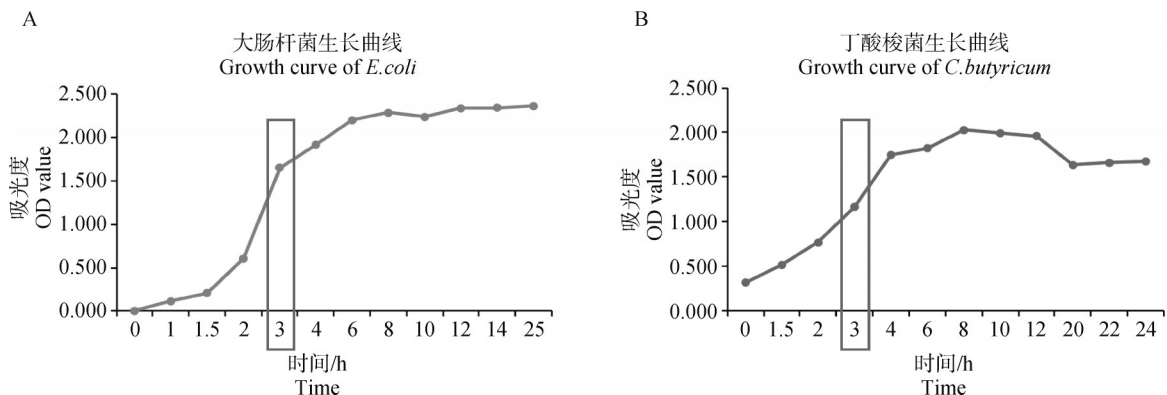


图 1 大肠杆菌和丁酸梭菌的生长曲线图

Fig. 1 Growth curves of *Escherichia coli* and *Clostridium butyricum*

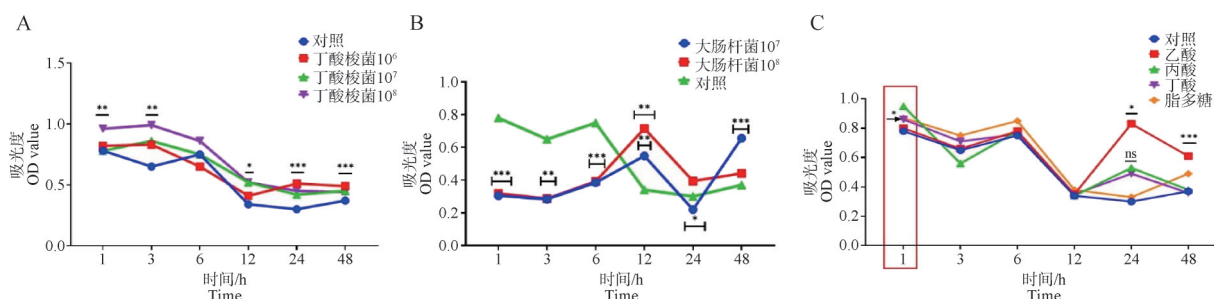
### 2.2 微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞活性的影响

使用 CCK-8 试剂盒评估不同浓度菌对

IPEC-J2 细胞的影响, 得到的结果(图 2)显示, 与对照组相比, 处理 1~6 h,  $10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup> 大肠杆菌和

$10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>大肠杆菌极显著降低 IPEC-J2 细胞活性( $P<0.01$ ,图 2B);与对照组相比,在 0~48 h,  $10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>丁酸梭菌处理组均显著增加 IPEC-J2 细胞活性( $P<0.05$ ),其余丁酸梭菌处理组与对照组无显著性差异;且在 1~48 h 细胞活性呈现下降的

趋势(图 2A);在 1~12 h,乙酸、丙酸、丁酸和 LPS 处理组与对照组细胞活性无显著性差异,但在 24 h 和 48 h,乙酸组显著增加细胞活性,其余时间无显著性影响(图 2C)。



A. IPEC-J2 细胞在丁酸梭菌定植下的 OD<sub>450 nm</sub> 测定值;B. IPEC-J2 细胞在大肠杆菌定植下 OD<sub>450 nm</sub> 的测定值;C. IPEC-J2 细胞在细菌代谢物中 OD<sub>450 nm</sub> 的测定值。\*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ , \*\*\*,  $P<0.001$ ,下同

A. Measurement of OD<sub>450 nm</sub> in IPEC-J2 cells colonized by *C. butyricum*;B. Measurement of OD<sub>450 nm</sub> in IPEC-J2 cells colonized by *E. coli*; C. Measurement of OD<sub>450 nm</sub> in IPEC-J2 cells exposed to bacterial metabolites. \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ , \*\*\*,  $P<0.001$ , the same as below

图 2 微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞活性的影响

Fig. 2 Effect of microorganisms and their metabolites on the activity of IPEC-J2 cells

### 2.3 不同浓度大肠杆菌及丁酸梭菌对 IPEC-J2 细胞形态结构的影响

为了了解不同浓度微生物对 IPEC-J2 细胞形态结构的影响, IPEC-J2 细胞培养后分别加入不同浓度的大肠杆菌和丁酸梭菌处理,用改良的吉姆萨染色后对细胞形态结构进行观察,与对照组相比,随着处理时间增长,大肠杆菌处理组严重损伤 IPEC-J2 细胞,细胞破裂,细胞形态结构受到破坏,并且随着大肠杆菌的浓度增加, IPEC-J2 细胞形态受损情况也随之加重(图 3A);而丁酸梭菌处理组对 IPEC-J2 细胞结构无影响,随着处理时间和处理浓度增加, IPEC-J2 细胞结构保持完整、细胞形态规则,与对照组无明显差异(图 3B)。结合大肠杆菌和丁酸梭菌对 IPEC-J2 细胞活性(图 2)和形态结构的影响,采用  $10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>丁酸梭菌、 $10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>大肠杆菌进行后续试验,处理时间为 1 h。

### 2.4 微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞 ATP 含量和 ROS 的影响

图 4 显示了用 ROS 和 ATP 试剂盒与酶标仪测定微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞 ATP 含量和 ROS 的影响。与对照组相比,丙酸和大肠杆菌处理组显著提高了 ROS 含量( $P<0.05$ );而丁酸梭菌和 LPS 处理组 ROS 含量显著降低( $P<0.05$ );乙酸和

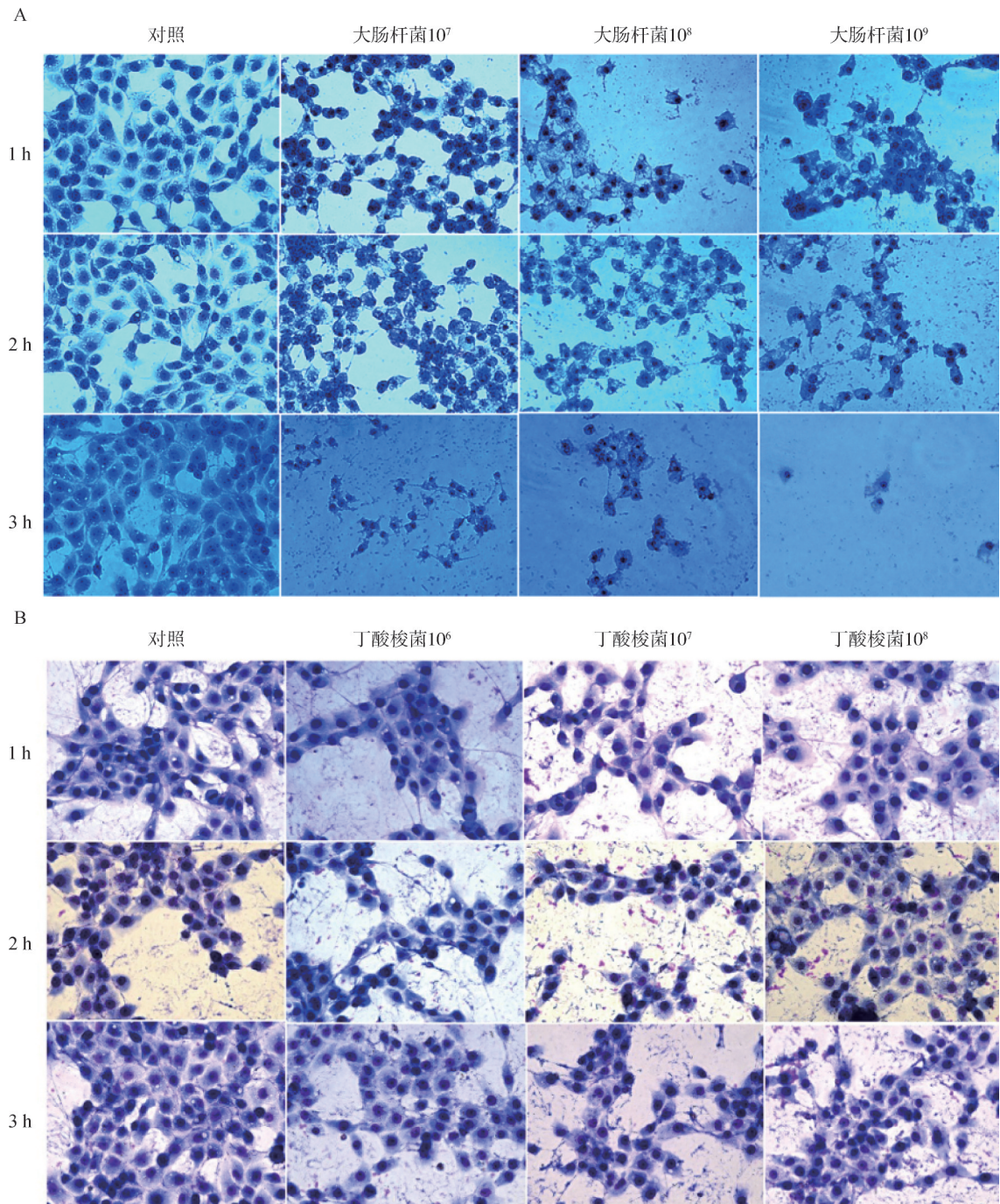
丁酸对 ROS 含量无显著影响(图 4A)。ATP 含量检测结果显示(图 4B),与对照组相比,乙酸、丙酸、丁酸和 LPS 处理组均显著提高了 ATP 含量( $P<0.05$ );而大肠杆菌和丁酸梭菌处理组均显著降低了 ATP 含量( $P<0.05$ )。

### 2.5 微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞线粒体膜电位的影响

由图 5 可知,与对照组相比,大肠杆菌和 LPS 处理组的线粒体膜电位降低,丁酸梭菌处理组的线粒体膜电位有略微的降低;乙酸和丙酸处理组线粒体膜电位与对照组无明显差异,而丁酸处理组增加了线粒体膜电位,以上表明了致病菌或病原相关分子模式通过损伤线粒体功能,导致细胞走向凋亡反应,而有益菌及短链脂肪酸则维持了线粒体功能(图 5)。

### 2.6 微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞抗氧化的影响

由图 6 可知,与对照组相比,丙酸、丁酸、LPS 和大肠杆菌的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力均显著低于对照组( $P<0.05$ ),乙酸和丁酸梭菌的 SOD 显著高于对照组( $P<0.05$ )。此外,大肠杆菌和 LPS 的丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量显著高于对照组( $P<0.05$ ),丁酸梭菌的 MDA



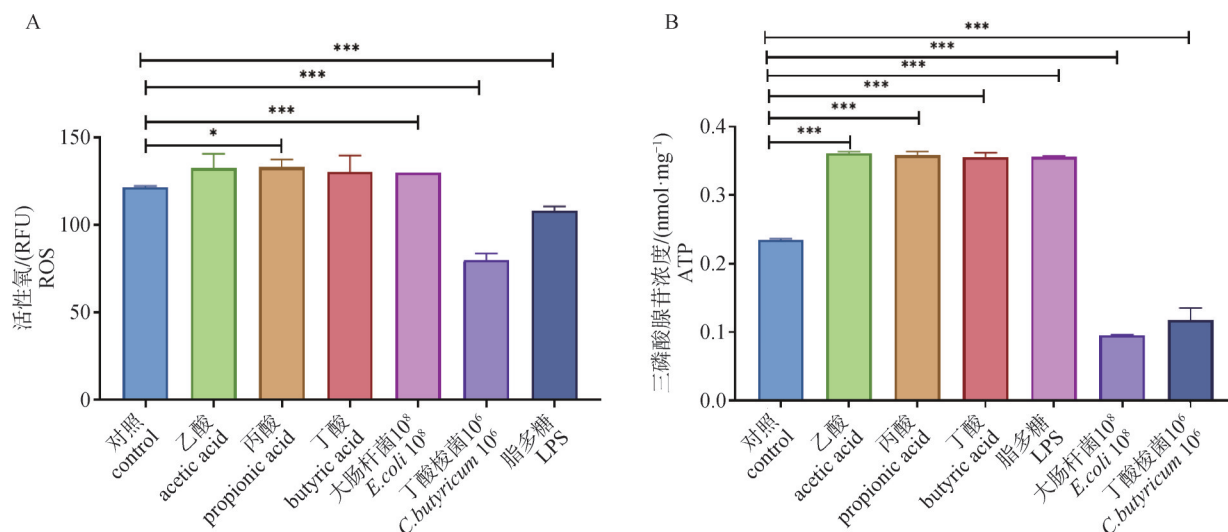
A. 大肠杆菌定植下 IPEC-J2 细胞的生长情况;B. 丁酸梭菌定植下 IPEC-J2 细胞的生长情况  
A. Growth status of IPEC-J2 cells colonization by *E. coli*;B. Growth status of IPEC-J2 cells colonization by *C. butyricum*  
图 3 不同浓度微生物对 IPEC-J2 细胞形态结构的影响(400×)

Fig. 3 Effect of different concentrations of microorganisms on the morphological structure of IPEC-J2 cells (400×)

含量显著低于对照组( $P<0.05$ ),乙酸、丙酸和丁酸的MDA含量无显著影响。以上结果表明,大肠杆菌和LPS促进了脂质氧化过程,并抑制细胞的抗氧化系统;丁酸梭菌抑制了脂质氧化过程,激活了抗氧化系统。

2.7 微生物及代谢物对线粒体介导的 IPEC-J2 细胞脂质代谢、氧化应激及细胞凋亡相关基因表达的影响

为了进一步探究大肠杆菌、丁酸梭菌、SCFAs 和 LPS 对 IPEC-J2 细胞线粒体功能相关的基因及



A. IPEC-J2细胞活性氧水平的测定;B. IPEC-J2细胞ATP浓度的测定

A. Measurement of ROS levels in IPEC-J2 cells; B. Determination of ATP concentration in IPEC-J2 cells

图4 微生物及代谢物对IPEC-J2细胞中ATP含量和ROS水平的影响

Fig. 4 Effect of microorganisms and their metabolites on ATP content and ROS level in IPEC-J2 cells

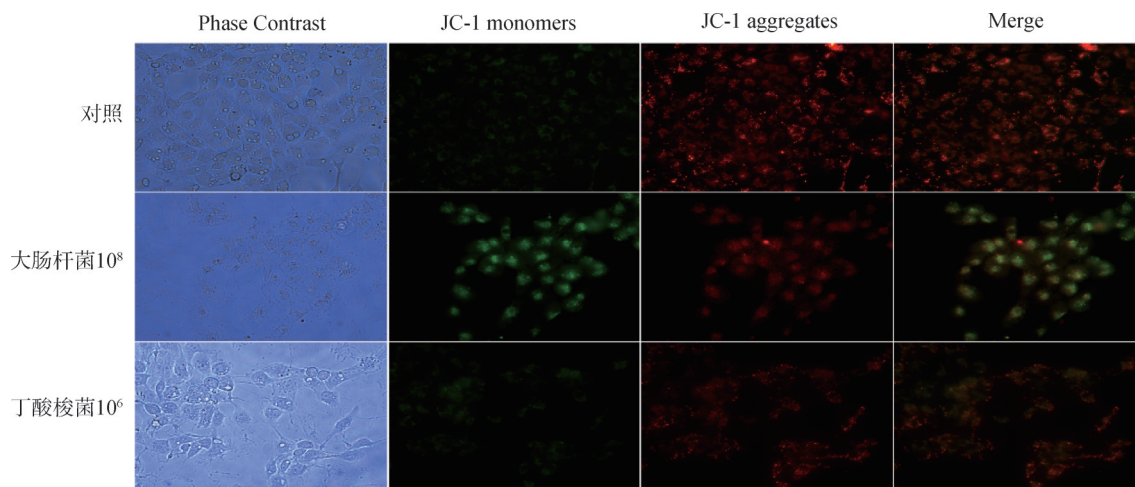
通路的调控,通过对线粒体介导的脂质代谢、氧化应激和细胞凋亡的关键基因进行定量分析,结果显示(图7),与对照组相比,丁酸梭菌处理组显著均上调 *ACC1*、*NRF1*、*TFAM*、*HO-1*、*APAF-1*、*PIG3*、*p53* 的表达( $P<0.05$ ),但对 *CtyC* 的表达量无显著性影响;大肠杆菌处理组下调了 *TFAM* 和 *CtyC* 的表达( $P<0.05$ ),上调了 *p53* 的表达( $P<0.05$ ),其余无显著性影响;丁酸下调了 *NRF1*、*TFAM*、*APAF-1* 和 *CtyC* 的表达( $P<0.05$ ),上调了 *p53* 的表达( $P<0.05$ )。上述结果表明,丁酸抑制了线粒体介导的细胞凋亡,而丁酸梭菌激活了IPEC-J2细

胞抗氧化系统和细胞凋亡系统;大肠杆菌处理使IPEC-J2细胞抗氧化系统下调。

### 3 讨 论

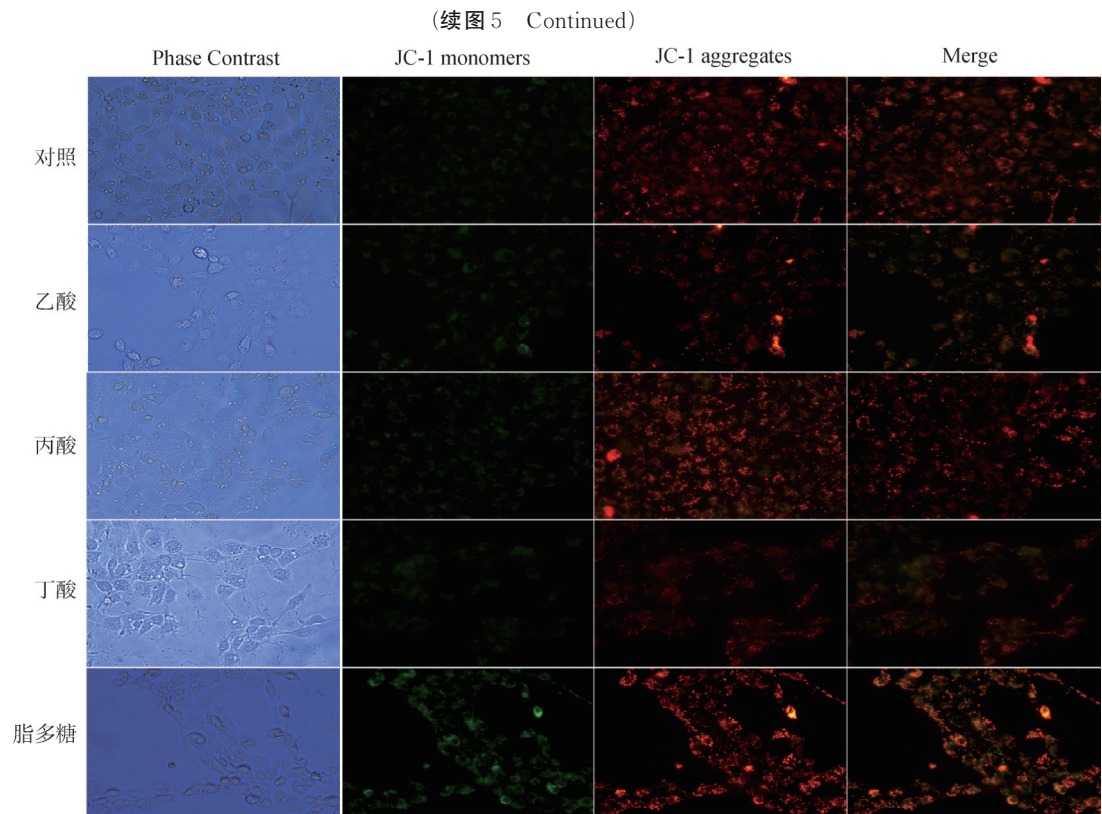
#### 3.1 不同浓度微生物对IPEC-J2细胞形态结构和活性的影响

微生物浓度的增加可能使细胞的形态结构发生诸如细胞形状变长、不规则化或破坏的变化,并伴随细胞功能损伤<sup>[28-29]</sup>,低浓度时则可能只引起轻微变化<sup>[30]</sup>。在本研究中大肠杆菌破坏了IPEC-J2细胞结构,丁酸梭菌对细胞结构无损害。在对细胞



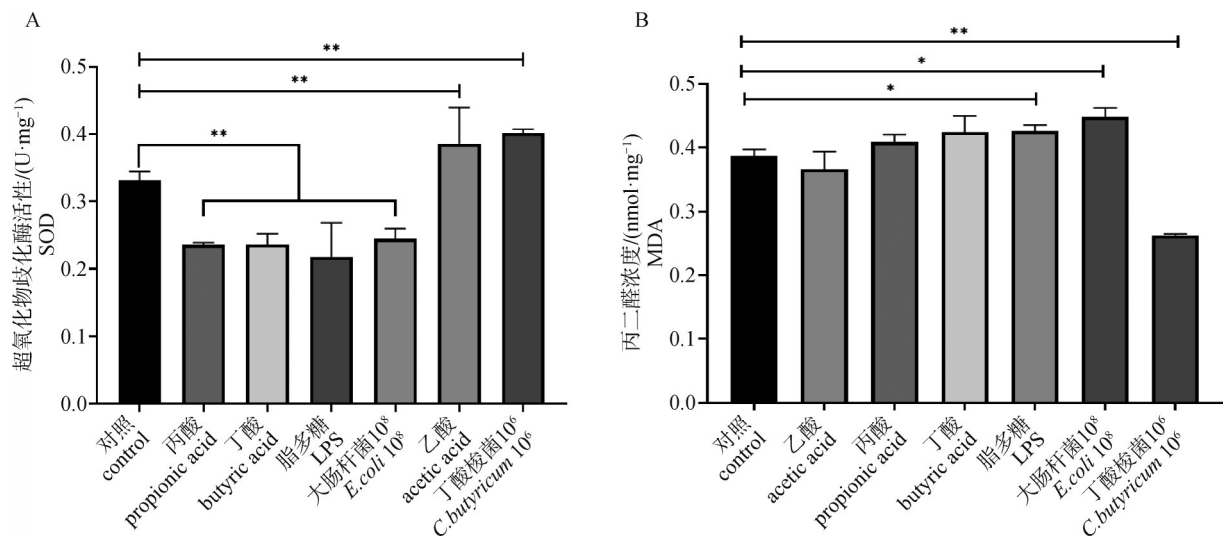
(图5 Fig.5)

(转下页 Carried forward)



绿色荧光表示线粒体低电位,红色荧光表示线粒体高电位  
Green fluorescence show mitochondrial low potential, and red fluorescence show mitochondrial high potential

图5 微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞线粒体膜电位的影响 (400×)  
Fig. 5 Effect of microorganisms and their metabolites on mitochondrial membrane potential in IPEC-J2 cells (400×)

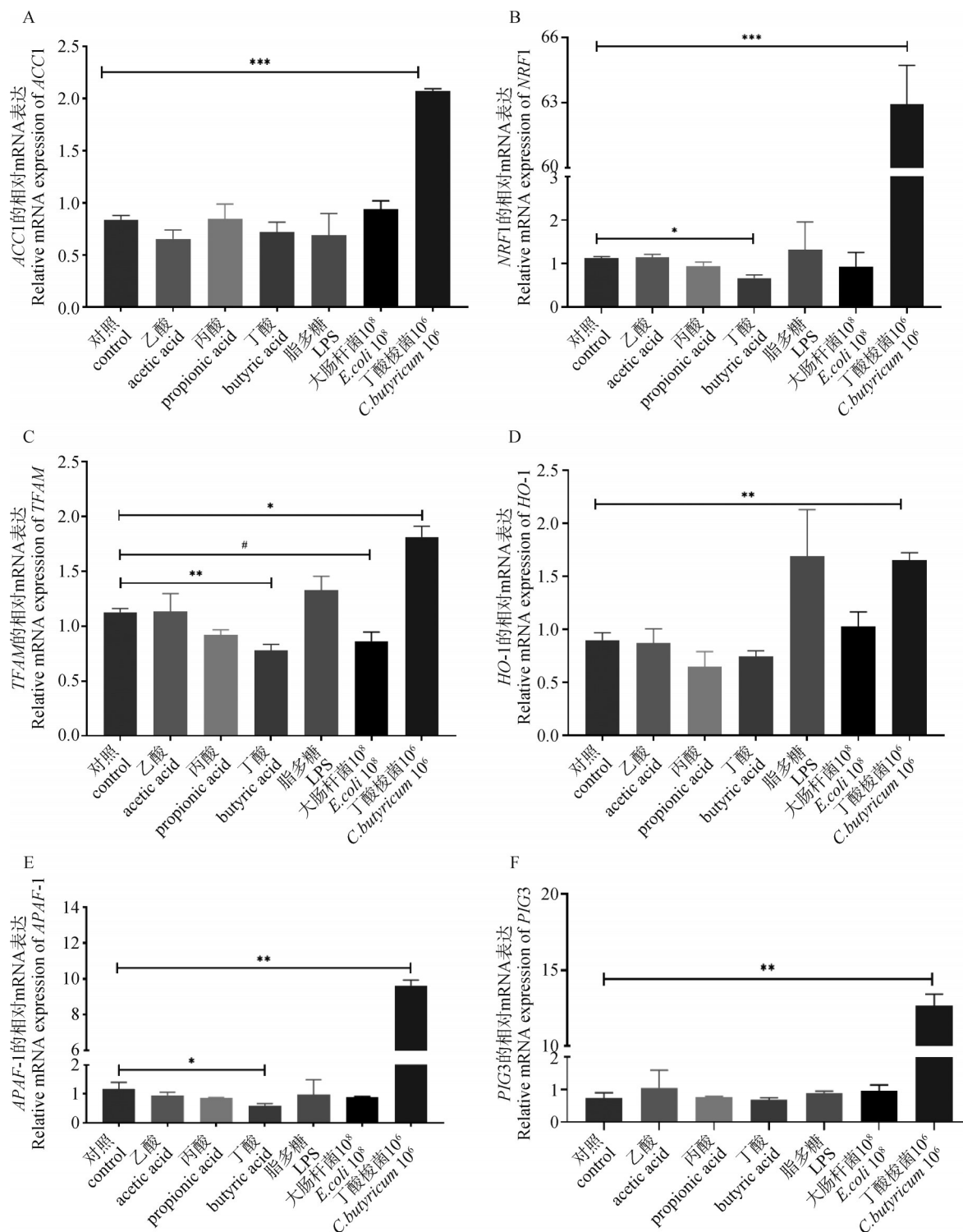


A. IPEC-J2 细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性测定; B. IPEC-J2 细胞丙二醛(MDA)含量测定  
A. Assay of SOD activity in IPEC-J2 cells; B. Quantification of MDA content in IPEC-J2 cells

图6 微生物和代谢物对 IPEC-J2 细胞抗氧化性能的影响  
Fig. 6 Effect of microorganisms and their metabolites on the antioxidant properties of IPEC-J2 cells

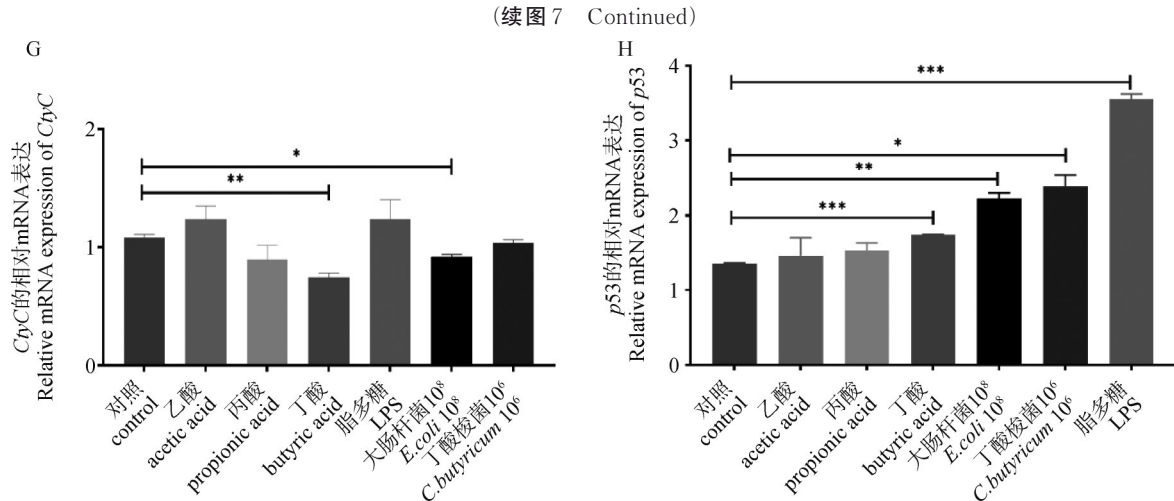
活性影响的数值上(图 2A),  $10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 丁酸梭菌处理组高于对照组, 培养时间 12 h 显著性高于对照组, 更利于长时间培养的稳定性, 结合大肠杆菌和丁酸梭菌对 IPEC-J2 细胞活性结果的影响, 决定

采用  $10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 大肠杆菌、 $10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 丁酸梭菌继续后续试验。大肠杆菌代表有害菌、丁酸梭菌代表有益菌、短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸)代表代谢物和 LPS 代表革兰氏阴性菌表面抗原, 利用这



(图 7 Fig.7)

(转下页 Carried forward)



A. 脂质代谢相关基因; B-D. 氧化应激相关基因; E. 细胞凋亡相关基因; F-H. 氧化应激、细胞凋亡相关基因

A. Genes related to lipid metabolism; B-D. Genes related to oxidative stress; E. Genes related to apoptosis; F-H. Genes related to oxidative stress and apoptosis

图 7 微生物及代谢物对线粒体功能相关基因表达的影响

Fig. 7 Effect of microorganisms and their metabolites on the expression of genes related to mitochondrial function

些微生物和代谢物刺激 IPEC-J2 细胞,通过测定线粒体功能相关指标,探究微生物及代谢物对猪肠道细胞线粒体功能的影响,进一步了解肠道微生物对线粒体作用的具体机制。

### 3.2 微生物及代谢产物对 IPEC-J2 细胞 ATP 含量和 ROS 水平的影响

ROS 主要由线粒体、过氧化物酶体和内质网中发生的代谢反应产生<sup>[31-33]</sup>。过量的 ROS 攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化并产生多种氧化产物,造成细胞损伤<sup>[34-35]</sup>,细胞内 ROS 水平的调节对于细胞内稳态至关重要<sup>[36-37]</sup>。Li<sup>[38]</sup>等的研究证实了丁酸通过 AMPK 通路缓解氧化应激,降低 ROS 生成。本研究结果也显示,丙酸和大肠杆菌处理组显著提高了 ROS 含量( $P < 0.05$ );丁酸梭菌和 LPS 显著降低了 ROS 含量( $P < 0.05$ )。乙酸、丙酸、丁酸和 LPS 处理组均显著提高了 ATP 含量( $P < 0.05$ ),大肠杆菌和丁酸梭菌处理组均显著性降低 ATP 含量( $P < 0.05$ )。表明了 SCFAs 和 LPS 促进细胞代谢,加快了 ATP 的合成,而微生物降低了细胞代谢,ATP 含量降低。

### 3.3 微生物及代谢产物对 IPEC-J2 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位是反映线粒体功能的指标之一,它的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件,是一个不可逆的过程<sup>[39-40]</sup>。本研究通过对线粒体膜电位

测定发现,大肠杆菌和 LPS 均使 IPEC-J2 细胞线粒体膜电位降低,而丁酸梭菌和丁酸对线粒体膜电位无显著影响,表明了大肠杆菌和 LPS 促进 IPEC-J2 细胞的凋亡,提示大肠杆菌可能通过 LPS 介导线粒体损伤,这一发现为靶向 LPS 的肠道微生物调控提供了新思路。此外,LPS 对 IPEC-J2 细胞线粒体影响结果与大肠杆菌一致,丁酸与丁酸梭菌对 IPEC-J2 细胞影响一致,这表明了大肠杆菌可能是通过 LPS 抑制了 IPEC-J2 细胞的抗氧化能力,而丁酸梭菌主要通过其代谢物(丁酸)提高了 IPEC-J2 细胞的抗氧化能力。

### 3.4 微生物及代谢物对 IPEC-J2 细胞抗氧化的影响

SOD 是细胞专门用于清除细胞内的超氧阴离子自由基的抗氧化酶,可减少细胞氧化应激作用<sup>[41]</sup>。MDA 是脂质过氧化的产物,可用作氧化应激的指标<sup>[42]</sup>。丁酸梭菌的代谢产物可以缓解由醛类物质引起的氧化应激,增强抗氧化酶的活性,提高机体的抗氧化能力<sup>[43]</sup>。Dou 等<sup>[44]</sup>的研究发现,一种致病性大肠杆菌诱导的氧化损伤模型中,丁酸梭菌处理可以降低 MDA 水平,增加 SOD 活性,从而缓解大肠杆菌对 IPEC-J2 细胞的损伤,证实了这一结论。本研究中,乙酸和丁酸梭菌的 SOD 显著高于对照组( $P < 0.05$ ),大肠杆菌和 LPS 的 MDA 含量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),乙酸、丙酸和丁酸的

MDA 含量无显著影响。这表明大肠杆菌和 LPS 促进了脂质氧化过程,并抑制细胞的抗氧化系统;丁酸梭菌抑制了脂质的氧化过程,激活了抗氧化系统。

### 3.5 微生物及代谢物对线粒体介导的 IPEC-J2 细胞脂质代谢、氧化应激及细胞凋亡相关基因表达的影响

Mach 等<sup>[45]</sup>对肠道细胞线粒体基因集进行分析,结果显示了肠道微生物(尤其是丁酸盐)对线粒体功能基因的显著调控,本研究结果表明,丁酸梭菌显著上调了 *ACC1*、*NRF1*、*TFAM*、*HO-1*、*APAF-1*、*PIG3*、*p53* 的表达( $P < 0.05$ ),大肠杆菌处理组下调了 *TFAM* 和 *CtyC* 的表达( $P < 0.05$ ),上调了 *p53* 的表达( $P < 0.05$ ),丙酸和乙酸处理对各基因表达均无显著影响。表明短链脂肪酸可以促进细胞代谢<sup>[46]</sup>,大肠杆菌和 LPS 激活细胞凋亡生物和氧化应激过程,丁酸梭菌激活 IPEC-J2 细胞线粒体脂质代谢、抗氧化系统和细胞凋亡,其具体的机制需要通过代谢组学做进一步研究。

综上所述,大肠杆菌破坏了 IPEC-J2 细胞结构,使 MDA 和 ROS 的含量增加, SOD 含量降低,细胞活力降低,这表明 IPEC-J2 可能通过提高 ROS 含量,导致脂质过氧化,破坏 IPEC-J2 细胞的细胞膜,最终致使细胞凋亡<sup>[44]</sup>。丁酸梭菌对细胞结构无损害,且使 SOD 含量增加,细胞活力提高,MDA 和 ROS 含量降低;对 IPEC-J2 细胞线粒体影响结果与大肠杆菌一致,丁酸与丁酸梭菌对 IPEC-J2 细胞影响一致。丁酸梭菌和 SCFAs 主要是通过调节信号通路降低 ROS 的生成,从而改善 SOD 的活性和减少 MDA 的产生<sup>[47-48]</sup>,本研究初步揭示了菌群对线粒体的相关影响,但本研究仍然存在一定的局限,未来的试验可以从以下几个方面深入探讨其生物学意义:通过动物体内试验验证丁酸梭菌对线粒体功能的调控作用;设计更长时间梯度的试验,评估菌群对细胞产生的长期效应;分离和鉴定丁酸梭菌的表面蛋白、多糖等关键分子,在体外细胞模型上细致研究菌体表面物质与宿主模式识别受体的相互作用,填补该方面的研究空白。

## 4 结 论

总之,本研究证明了短链脂肪酸促进细胞代谢,大肠杆菌和 LPS 激活 IPEC-J2 细胞凋亡和生物氧化应激过程,丁酸梭菌激活 IPEC-J2 细胞线粒体

介导的脂质代谢、抗氧化系统和细胞凋亡。

### 参考文献(References):

- [1] JANDHYALA S M, TALUKDAR R, SUBRAMANYAN C, et al. Role of the normal gut microbiota[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(29): 8787-8803.
- [2] PARK W. Gut microbiomes and their metabolites shape human and animal health[J]. *J Microbiol*, 2018, 56(3):151-153.
- [3] FENG Q, CHEN W D, WANG Y D. Gut microbiota: an integral moderator in health and disease[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:151.
- [4] DAHIYA D, NIGAM P S. The gut microbiota influenced by the intake of probiotics and functional foods with prebiotics can sustain wellness and alleviate certain ailments like gut-inflammation and colon-cancer[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(3):665.
- [5] FURUSAWA Y, OBATA Y, FUKUDA S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells[J]. *Nature*, 2013, 504(7480):446-450.
- [6] WU Y, WANG C Z, WAN J Y, et al. Dissecting the interplay mechanism between Epigenetics and gut microbiota: health maintenance and disease prevention[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13):6933.
- [7] TANG B L. Sirt1 and the mitochondria[J]. *Mol Cells*, 2016, 39(2):87-95.
- [8] PAWLAK A, BELBEKHOUICHE S. Controlling the growth of *Escherichia coli* by layer-by-layer encapsulation[J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2021, 206:111950.
- [9] 肖金龙,王 浩,万 全,等. 撒坝猪源 *E. coli* 高致病性毒力岛通过 NLRP3/ASC/Caspase-1 途径诱导 IPEC-J2 细胞焦亡[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(12): 5218-5227.
- XIAO J L, WANG H, WAN Q, et al. Induction of IPEC-J2 pyroptosis by *E. coli* HPI from Saba pig via NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(12): 5218-5227. (in Chinese)
- [10] CHEN L, LI S, ZHENG J, et al. Effects of dietary *Clostridium butyricum* supplementation on growth performance, intestinal development, and immune response of weaned piglets challenged with lipopolysaccharide[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2018, 9(1):62.
- [11] ZHAO J, JIANG L, HE W, et al. *Clostridium*

- butyricum, a future star in sepsis treatment[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1484371.
- [12] LI H, LIU X, SHANG Z, et al. Clostridium butyricum helps to alleviate inflammation in weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 683863.
- [13] DONOHOE D R, GARGE N, ZHANG X, et al. The microbiome and Butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(5): 517-526.
- [14] DIETRICH L, AGIP A N A, KUNZ C, et al. In situ structure and rotary states of mitochondrial ATP synthase in whole polytomella cells[J]. *Science*, 2024, 385(6713): 1086-1090.
- [15] GEIGER O, SANCHEZ-FLORES A, PADILLA-GOMEZ J, et al. Multiple approaches of cellular metabolism define the bacterial ancestry of mitochondria [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(32): eadh0066.
- [16] POPOV L D. Mitochondria as intracellular signalling organelles. an update [J]. *Cell Signal*, 2023, 109: 110794.
- [17] CLARK A, MACH N. The crosstalk between the gut microbiota and mitochondria during exercise[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 319.
- [18] PAN Q, ZHANG Y, YANG Y, et al. The *Puccinia striiformis* effector Pst11215 manipulates mitochondria to suppress host immunity by promoting TAVDIP1-mediated ubiquitination of TAVDAC1 [J]. *New Phytol*, 2024, 244(5): 1961-1978.
- [19] HAN B, LIN C J, HU G, et al. 'Inside out'-a dialogue between mitochondria and bacteria[J]. *FEBS J*, 2019, 286(4): 630-641.
- [20] BAJPAI P, DARRA A, AGRAWAL A. Microbe-mitochondrion crosstalk and health: an emerging paradigm[J]. *Mitochondrion*, 2018, 39: 20-25.
- [21] BERNARDINI C, ALGIERI C, MANTIA L D, et al. Relationship between serum concentration, functional parameters and cell bioenergetics in IPEC-J2 cell line [J]. *Histochem Cell Biol*, 2021, 156(1): 59-67.
- [22] SHOKR S M, KAHLERT S, KLUSS J, et al. Modeling of culture conditions by culture system, glucose and propionic acid and their impact on metabolic profile in IPEC-J2[J]. *PLoS One*, 2024, 19(7): e0307411.
- [23] PI G, SONG W, WU Z, et al. Comparison of expression profiles between undifferentiated and differentiated porcine IPEC-J2 cells [J]. *Porcine Health Manag*, 2022, 8(1): 4.
- [24] HE L, ZHOU X, WU Z, et al. Glutamine in suppression of lipopolysaccharide-induced piglet intestinal inflammation: The crosstalk between AMPK activation and mitochondrial function[J]. *Anim Nutr*, 2022, 10: 137-147.
- [25] SALCEDO J, FRESE S A, MILLS D A, et al. Characterization of porcine milk oligosaccharides during early lactation and their relation to the fecal microbiome [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(10): 7733-7743.
- [26] SALERI R, BORGHETTI P, RAVANETTI F, et al. Effects of different short-chain fatty acids (SCFA) on gene expression of proteins involved in barrier function in IPEC-J2[J]. *Porcine Health Manag*, 2022, 8(1): 21.
- [27] YAN H, AJUWON K M. Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179586.
- [28] XU N, DU L H, CHEN Y C, et al. *Lonicera japonica* Thunb. as a promising antibacterial agent for *Bacillus cereus* ATCC14579 based on network pharmacology, metabolomics, and *in vitro* experiments[J]. *RSC Adv*, 2023, 13(23): 15379-15390.
- [29] KOKOREVA A S, ISAKOVA E P, TERESHINA V M, et al. The effect of different substrates on the morphological features and polyols production of *Endomyces magnusii* yeast during long-lasting cultivation[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1709.
- [30] RIBEIRO A L, BASSAI L W, ROBERT A W, et al. Bismuth-based nanoparticles impair adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2021, 77: 105248.
- [31] JIMENEZ-MORENO N, LANE J D. Autophagy and redox homeostasis in Aarkinson's: a crucial balancing act[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8865611.
- [32] GORRINI C, HARRIS I S, MAK T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(12): 931-947.
- [33] HWANG I, UDDIN M J, PAK E S, et al. The impaired redox balance in peroxisomes of catalase knockout mice accelerates nonalcoholic fatty liver disease through endoplasmic reticulum stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 148: 22-32.
- [34] ZHIGACHEVA I V, RUSINA I F, KRIKUNOVA N I, et al. Resveratrol and 2-Ethyl-6-Methyl-3-

- Hydroxypyridine N-Acetyl Cysteinate as protecting agents upon the stress exposure [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17):13172.
- [35] CHEN Y, LUO G, CHEN S, et al. The potential of Prodigiosin for control of *Prorocentrum donghaiense* blooms: algicidal properties and acute toxicity to other marine organisms at various trophic levels [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 228:112913.
- [36] 郭旭亮. 基于细胞内活性氧及氧化还原稳态调控的抗癌纳米胶束的研究[D]. 天津:天津大学, 2020.
- GUO X L. Engineering anticancer micelles for the regulation of intracellular reactive oxygen species and redox homeostasis [D]. Tianjin: Tianjin University, 2020. (in Chinese)
- [37] KONG H, CHANDEL N S. Regulation of redox balance in cancer and T cells[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(20):7499-7507.
- [38] LI X, WANG C, ZHU J, et al. Sodium butyrate ameliorates oxidative stress-induced intestinal epithelium barrier injury and mitochondrial damage through AMPK - Mitophagy pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022(1):3745135.
- [39] SUN X, GAO S, LUO S, et al. Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1 (MCUR1) relieves mitochondrial damage induced by Lipopolysaccharide by mediating mitochondrial  $Ca^{2+}$  homeostasis in bovine mammary epithelial cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(19): 7278-7288.
- [40] DUAN C, QIN M, LIU L, et al. An exploration of the interaction, structural characterization and anti-oxidative properties of proanthocyanidin and beta-lactoglobulin complex [J]. *Food Res Int*, 2025, 202: 115760.
- [41] MIAO L, CLAIR D K S. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(4):344-356.
- [42] SIES H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress[J]. *Redox Biol*, 2017, 11:613-619.
- [43] LI J, SHEN H, ZHAO Z, et al. Protective effects of *Clostridium butyricum* against oxidative stress induced by food processing and lipid-derived aldehydes in Caco-2 cells[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(21):9343-9361.
- [44] DOU C, SHANG Z, QIAO J, et al. *Clostridium butyricum* protects IPEC-J2 Cells from ETEC K88-induced oxidative damage by activating the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Oxi Med Cell Longev*, 2021, 2021(1):4464002.
- [45] MACH N, MOROLDO M, RAU A, et al. Understanding the Holobiont: crosstalk between gut microbiota and mitochondria during long exercise in horse[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:656204.
- [46] HE J, ZHANG P, SHEN L, et al. Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6356.
- [47] WEN B, HUANG Y, DENG G, et al. Gut microbiota analysis and LC-MS-based metabolomics to investigate AMPK/NF- $\kappa$ B regulated by *Clostridium butyricum* in the treatment of acute pancreatitis[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1):1072.
- [48] LI H, LIU S, CHEN H, et al. Gut dysbiosis contributes to SCFAs reduction-associated adipose tissue macrophage polarization in gestational diabetes mellitus[J]. *Life Sci*, 2024, 350:122744.

(编辑 郭云雁)