

## 高糖、高脂饮食对小鼠肠道屏障功能及炎症的影响

邵君琳, 田苗新, 王富康, 孙奕炜, 王光强, 艾连中, 夏永军\*

(上海理工大学 上海 200093)

**摘要** 目的:研究高糖、高脂饮食(HSFD)对肠道屏障功能以及炎症水平的影响。方法:选取 SPF 级 C57BL/6J 鼠进行 HSFD 干预 4 周,以低糖、低脂饮食(LFD)作为对照,测定血脂相关指标、肠道通透性、炎症水平以及相关紧密连接蛋白表达变化。结果:与 LFD 相比,HSFD 喂养下,小鼠总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)等血脂指标分别升高 74%,34%,105%( $P<0.05$ ),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量降低 36%( $P<0.01$ ),肝脏病理染色显示脂肪细胞异常聚集,表明 HSFD 干预造成小鼠肝脏脂质代谢紊乱。对小鼠结肠炎症症状分析显示,HSFD 小鼠粪便有带血情况,疾病活动指数评分(DAI)、结肠组织髓过氧化物酶(MPO)活性显著提高( $P<0.05$ ),实时荧光定量 PCR 和酶联免疫(ELISA)法测得结肠组织中肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )炎症因子表达显著提高( $P<0.05$ ),说明 HSFD 小鼠肠道处于轻度炎症状态。对肠道屏障功能分析显示,HSFD 小鼠结肠上皮组织发生炎症性细胞浸润,隐窝结构被破坏,杯状细胞减少,闭合小环蛋白(ZO-1)、咬合蛋白(Occludin)、黏液蛋白(MUC-2)等屏障相关蛋白的基因表达水平显著降低( $P<0.05$ )。免疫荧光结果显示,HSFD 小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 表达水平显著降低( $P<0.05$ )。异硫氰酸荧光素标记葡聚糖(FITC-Dextran)分析显示 HSFD 小鼠肠道通透性显著增加。结论:HSFD 会导致小鼠脂质代谢紊乱,破坏肠道屏障功能,促使肠道处于炎症状态,从而可能引起肠道慢性病变。

**关键词** 高糖、高脂饮食; 肠道炎症; 肠道屏障功能; 慢性结肠炎

文章编号 1009-7848(2023)09-0079-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.09.009

随着生活水平的提高,越来越多的人受肥胖困扰,这与饮食习惯密不可分。高糖、高脂饮食(HSFD)的长期摄入是造成肥胖的元凶之一,同时会伴随一些并发症。HSFD 具有较高能量,短期摄入后会使机体血糖和胰岛素快速上升,脂肪组织积累,而脂肪组织的长期堆积会引起血脂和肝功能异常,进而增加冠心病、肝炎、代谢综合征等发病风险<sup>[1]</sup>。多项研究显示,长期摄入高糖、高脂的饮食会打破机体固有免疫,引起全身慢性炎症、心血管、神经类等疾病的发生,其作用方式主要通过改变微生物群组成,激活或抑制相关受体和细胞以及影响线粒体功能等<sup>[2]</sup>。

炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)是一种严重影响患者生活质量的免疫机制失

衡的慢性胃肠道疾病,临床上主要将 IBD 划分为克罗恩氏病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)两类,其发病机制虽暂未明确,但一致认为遗传、环境、肠道屏障的缺陷是其最主要的致病因素<sup>[3]</sup>。其临床表现为腹泻、黏液脓血便等,该病治愈难度大且易于复发。目前对 UC 常见的药物治疗主要包括抗炎药、免疫抑制药和肾上腺皮质激素等。然而,这些治疗方法具有许多缺点,例如腹部疼痛、高血压和过敏反应等。近年来,益生菌、粪菌移植、多糖、间充质干细胞移植和中医治疗等为研究热点,上述方法有明确的药效和较少的副作用,用来预防和治疗 UC 及其并发症<sup>[4]</sup>。

研究表明,HSFD 与炎症性肠病(IBD)之间存在一定联系,其会引起脂肪过度积累,机体产生炎症反应,肠道菌群紊乱,致病菌破坏黏液层结构并产生相关次级胆汁酸,造成肠上皮细胞功能障碍,从而促进 IBD 的发生<sup>[5]</sup>。肠上皮屏障功能障碍是溃疡性结肠炎的主要致病因素,紧密连接结构作为肠上皮屏障的主要部分,能防止肠腔内的一些致病菌、病毒等进入黏膜固有层和血液循环<sup>[6]</sup>。然而,

收稿日期: 2022-09-18

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604305);上海市科技兴农重点项目(2019-02-08-00-07-F01152);上海市大学生创新创业项目(SH 2020170)

第一作者: 邵君琳,女,博士

通信作者: 夏永军 E-mail: dreamup@163.com

HSFD 对小鼠结肠紧密连接结构以及结肠炎症的影响并不明确。本文考察 HSFD 对小鼠肠道屏障功能、炎症水平以及结肠的影响,为探究 HSFD 与 IBD 的内在联系、发生机制以及选择合适的治疗方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、材料与试剂

实验动物采用 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (3 周龄,雄性,平均体质量  $13 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ ),实验动物使用许可证号:SCXK(沪)2018-0006,购于上海市计划生育科学研究所实验动物经营部。标准饲料购自苏州双狮实验动物饲料科技有限公司,为了探讨过多摄入脂肪和糖类对肠道的具体影响,对照饲料选取低糖、低脂饮食,高糖、高脂饮食 TP26303 和低糖、低脂饮食 TP26342 均购于南通特洛非饲料科技有限公司,成分表如表 1 所示。

髓过氧化物酶(MPO)试剂盒、总胆固醇(total cholesterol,TC)试剂盒、甘油三酯(triglyceride,TG)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(highdensity lipoprotein cholesterol,HDL-C)试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)试剂盒,南京建成生物工程研究所;便隐血试剂盒,贝索企业;阿利新蓝、苏木素,Sigma;伊红 Y、包埋石蜡、中性树胶,国药集团;Trizol、DEPC 处理水,上海生工生物有限公司;异丙醇、三氯甲烷、无水乙醇(分析纯),Thermo Fisher Scientific;反转录试剂盒、HiScript III RT SuperMix for qPCR,南京诺唯赞生物科技有限公司;qPCR SYBR Green Master Mix,翊圣生物有限公司;引物由华大基因合成异硫氰酸荧光素标记葡聚糖(FITC-Dextran)(分子质量 40 000),上海源叶生物科技有限公司;Occludin 抗体、ZO-1 抗体,Abcam;ELISA 试剂盒,上海通蔚。

### 1.2 仪器与设备

SpectraMax i3x 型酶标仪,奥地利美谷分子仪器有限公司;GT 200 研磨仪,北京格瑞德曼仪器设备有限公司;3-18K 冷冻离心机,德国 Sigma 公司;Bio-rad S1000 梯度 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪,美国伯乐 Bio-rad 生命医学产品上海有限公司;NanoDrop 2000 分光光度计,美国 Thermo

Scientific;Light Cycler 实时荧光定量 PCR 仪,罗氏制药有限公司;病理切片机,德国 Leica RM 2016 轮转式切片机;组织摊烤片机,武汉俊杰 JK-6 生物组织摊烤片机;显微镜,尼康 E100 型生物显微镜;数码单反相机,佳能 550 D。

### 1.3 动物分组和处理

小鼠生长环境温度控制在  $(22 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ,湿度为  $(50 \pm 10)\%$ ,自由饮食、饮水,以  $4 \text{ g/d}$  进食量为参考,每 12 h 昼夜交替。在整个实验期间,动物实验的程序严格按照中国有关实验动物的相关饲养规范和法律规定进行,本研究遵循动物试验委员会所制订的伦理学标准,批准文号为伦审-KYSB-2016-97,许可号:SCXK-(沪)-2013-0006。

小鼠经过 1 周的适应性饲养后,随机分为高糖、高脂饮食(HSFD)组,低糖、低脂(LFD)组两组,每组 8 只,饮食干预 4 周。实验过程中,每周记录小鼠体重。第 5 周末,小鼠禁食过夜,第 2 天采用眼球取血的方式处死,立刻收集血液样品,置于 1.5 mL 的无菌离心管中,室温静置 30~40 min 左右,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下  $4\ 500 \text{ r/min}$  离心 10 min,小心分离血清,放入  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  环境冷藏备用,避免反复冻融。迅速解剖小鼠,收集肝脏、结肠组织用于后续实验检测。

表 1 饮食成分表

成分组成	高糖、高脂饮食	低糖、低脂饮食
酪氨酸/g	195	154
淀粉/g	133	491
糊精/g	—	126
蔗糖/g	342	95
植物油/g	—	10
黄油/g	210	29
纤维素/g	60	48
矿物质和维生素/g	58	46
胆固醇/g	1.5	—
TBHQ/g	0.042	0.01
总计/g	1 000	1 000
能量/kCal·g <sup>-1</sup>	4.5	3.6
蛋白质/%	15.5	15.5
碳水化合物/%	42.5	74.5
脂肪/%	42	10
总计/%	100	100

## 1.4 实验方法

1.4.1 小鼠疾病活动指数(DAI)评分 为了评估实验期间结肠炎症症状的发展,每天对小鼠 DAI 进行监测<sup>[7]</sup>。DAI 包括体重变化、便血情况和粪便形态。隐血试剂盒测量粪便中的潜血,评分标准见表 2。

1.4.2 血清生化指标测定 小鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 含量按照试剂盒要求测定<sup>[8]</sup>。

1.4.3 肝脏和结肠病理学检测 肝脏进行油红 O 和 HE 染色,结肠采用 HE 和阿利新兰染色。油红 O 是一种偶氮染料,作为一种强脂溶剂和染脂剂,溶于细胞和组织中的脂质,用于显示组织中脂质的聚集情况<sup>[9]</sup>。HE 染色能够使细胞核呈蓝紫色,细胞质则呈橙红色。阿利新蓝是一种大分子共轭染料,能将黏液层的黏蛋白染成蓝色,肠道黏蛋白的变化用阿利新蓝进行评估<sup>[10]</sup>。肝脏和结肠组织采用多聚甲醛固定 24 h 后,常规脱水处理、浸蜡包埋、切片,烤片并脱蜡,结肠和肝脏采用苏木精伊红染色,另取一份同样操作的结肠切片进行阿利新蓝(pH 2.5)染色处理,然后在显微镜下观察炎症情况和黏膜损伤情况。

1.4.4 结肠长度的测定 解剖后快速取小鼠结肠部位,卡尺测量盲肠末端至肛门的长度。

1.4.5 髓过氧化物酶活性 准确称量结肠组织质量,按照试剂盒要求进行样品前处理,检测小鼠结肠组织 MPO 活性<sup>[11]</sup>。

1.4.6 FITC-葡聚糖检测小鼠肠道通透性 小鼠禁食、禁水 4 h 后,用异硫氰酸荧光素标记葡聚糖(FITC-Dextran)(100 mg/mL,无菌 PBS 配制,分子量 40 000),120  $\mu$ L/只,灌胃小鼠。灌胃 4 h 后眼球取血,血液样品静置 30~40 min,4 500 r/min 离心 15 min,收集 100  $\mu$ L 血清。将 100 mg/mL 异硫氰酸荧光素标记葡聚糖(FITC-Dextran)稀释为标准品。在激发波长为 485 nm,发射波长为 535 nm 的条件下,用酶标仪读取吸光度值(OD 值)<sup>[15]</sup>。

1.4.7 小鼠结肠组织紧密连接蛋白和黏液蛋白基因表达测定 取结肠约 1 cm,Trizol 法提取 RNA,根据反转录试剂盒反转录为 cDNA,将制备好的 cDNA 置于-20℃中保存备用,可长期保存于-80℃。根据 qPCR SYBR Green Master Mix 使用要求对 ZO-1、Occludin、MUC-2 等基因进行 PCR 的扩增。

表 2 疾病活性指数评分标准

体重下降/%	大便性状	隐血/肉眼	分数
		血便	
0	正常	隐血阴性	0
1~5	松散	隐血阴性	1
6~10	松散	隐血阳性	2
11~15	稀便	隐血阳性	3
>15	稀便	肉眼血便	4

HPRT1 作为内参基因,引物信息如表 3 所示,2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算基因的相对表达量。

1.4.8 结肠组织中 ZO-1、Occludin、Muc-2、TNF- $\alpha$ 、IL-10 基因相对表达量的测定 同 1.3.8 节的方法,测定结肠中 ZO-1、Occludin、Muc-2、TNF- $\alpha$  和 IL-10 的基因相对表达量,引物序列见表 3。

1.4.9 免疫荧光法观察及测定结肠组织中 ZO-1、Occludin 的表达 取 1~2 cm 结肠组织进行同 1.3.4 节的组织包埋、切片后进行室温脱蜡,柠檬酸抗原修复液微波进行修复,自然冷却后 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,甩干水分,加山羊血清封闭液,室温 30 min,甩掉封闭液,分别加入按一定比例配好的一抗,4℃孵育过夜,室温复温 30 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,蒸馏水洗涤 3 次,每次 5 min。加入荧光标记的二抗,室温避光孵育 30 min 后 PBS 及蒸馏水进行洗涤。荧光显色液中显色 10 min,PBS 及蒸馏水进行洗涤。再重复以上步骤更换一抗进行第 2 次孵育完成荧光双标。随后,DAPI 核复染避光孵育 10 min、封片、镜检,在不同染料的激发波长下进行拍照(紫外激发波长 330~380 nm,发射波长 420 nm;FITC 绿光激发波长 465~495 nm,发射波长 515~555 nm;CY3 红光激发波长 510~560 nm,发射波长 590 nm<sup>[13]</sup>)。随后用 Image J 进行荧光强度的测定。

1.4.10 ELISA 检测小鼠结肠组织中 IL-10、TNF- $\alpha$  的水平 取 2~3 cm 结肠准确称重后添加组织匀浆液,一般采用预冷的 PBS(pH 7.4),研磨充分后 10 000 g 离心 10 min,随后按照 ELISA 说明书取上清进行检测<sup>[14]</sup>。

## 1.5 数据统计分析

所有实验均进行 3 次平行实验,数据结果为平均值 $\pm$ 标准差。运用 Excel 进行基础数据处理,

统计软件 SPSS 25.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 当  $P \leq 0.05$  时, 使用 Duncan 检验来比较各组间差异,  $P \leq 0.05$  有统计学差异。

表 3 qPCR 引物序列  
Table 3 Primer sequence

基因	引物	
HPRT1	F: GAAGGAGATGGGAGGCAATCACATT	R: AATCCAGCAGGTCAGCAAAGAAGCTT
ZO-1	F: CTTCTCTGCTGGCCCTAAAC	R: TGGCTTCACTTGAGGTTTCTG
Occludin	F: TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA	R: CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG
MUC-2	F: ATGCCACCTCCTCAAAGAC	R: GTAGTTTCCGTTGGAACAGTAA
TNF- $\alpha$	F: AGGGTCTGGCCATAGAAGT	R: CCACCAGCTCTTCTGTCTAC
IL-10	F: ACAGCCGGGAAGACAATAAC	R: CAGCTGGTCCTTTGTTTGAAG

## 2 结果与分析

### 2.1 高糖、高脂饮食对小鼠体重及肝脏影响

动物实验设计如图 1a 所示, 经过 1 周适应性喂养后进行 HSF 干预 4 周。图 1c 结果显示, 较 LFD 组, HSF 干预组整个周期的体重显著增加 ( $P < 0.01$ )。由图 1b 肝脏图片可知, HSF 干预组小鼠肝脏颜色偏黄, 较脆弱, 容易出现撕裂现象, 这可能是甘油三酯的过度积累造成的<sup>[15]</sup>。肝脏油红 O

染色显示, HSF 小鼠肝脏出现了较多红色脂滴, 且脂质液滴发生积聚, LFD 对照组只能观察到少数的红色脂滴, 这可能是 HSF 后, 肝脂质代谢功能障碍导致脂肪沉积在肝脏中, 造成大面积脂滴生成。肝脏 HE 染色显示, HSF 小鼠肝脂肪变性, 且出现炎症性细胞局灶性浸润 (如图 1b 黑色箭头所示) 细胞出现膨胀, 脂肪变性 (图 1b 黄色箭头所示), 肝索和肝血窦位置无明显边界, 而 LFD 对照

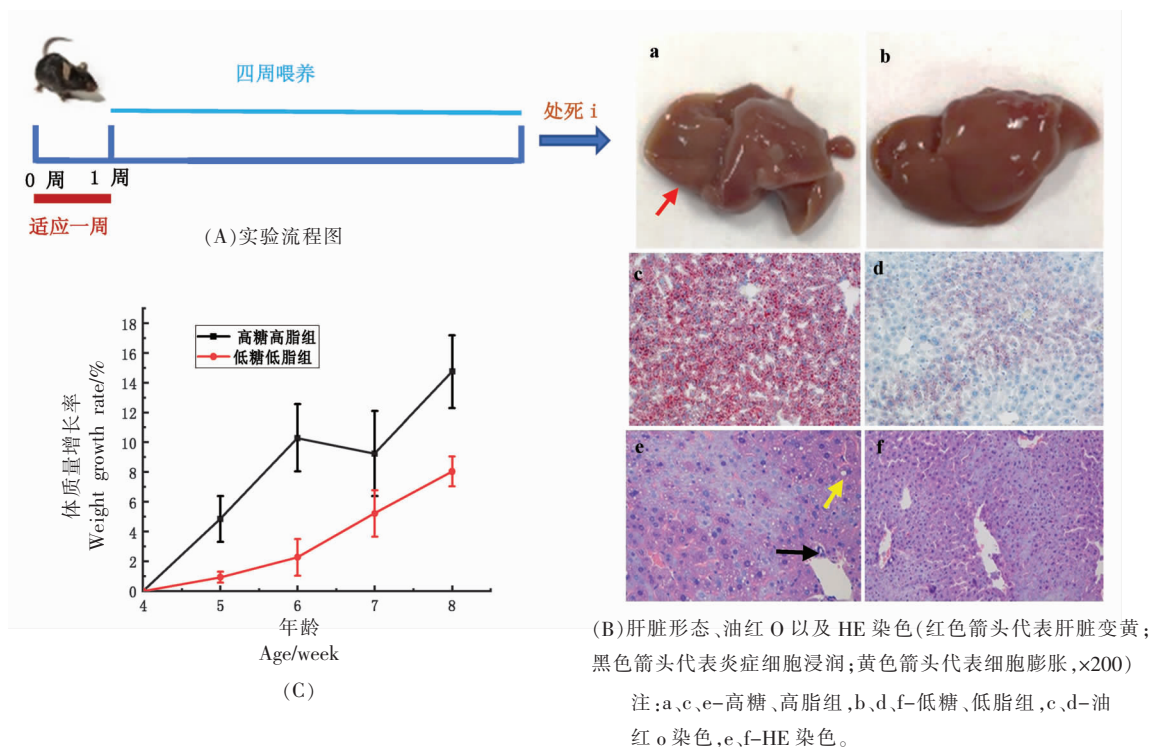


图 1 动物喂养周期及高糖、高脂饮食对小鼠体重及肝脏影响

Fig.1 Effects of animal feeding cycle and high-sugar and high-fat diet on weight and liver of mice

组肝细胞排列整齐,形态完整,可以清晰观察到肝索位置。总的来说,HSFD 会引起小鼠食欲亢进,导致体重迅速增加,对肝脏细胞造成损伤,肝脏部位脂肪的过度积累可能会引起脂肪酸组成变化并影响肝肠轴,进而影响肠道细胞<sup>[16]</sup>。

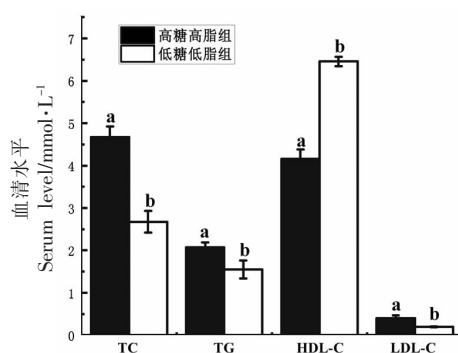
## 2.2 高糖、高脂饮食对小鼠血脂指标的影响

经过 4 周的饮食干预之后,对小鼠血脂指标进行测定。结果显示,与 LFD 组相比,HSFD 干预组小鼠血清中 TC、TG ( $P<0.05$ )、LDL-C 含量显著提高 ( $P<0.01$ ),HDL ( $P<0.01$ ) 含量显著下降(图 2),其中 HSFD 小鼠 TC、TG、LDL-C 含量分别显著升高 74%,34%,105%,HDL-C 含量显著降低 36%,说明 HSFD 饮食 4 周后显著影响小鼠血脂状态。HSFD 干预后能够导致脂肪积累、脂质代谢异常,进一步可能诱发高血脂症,并可能演变为动脉粥样硬化<sup>[17]</sup>。

## 2.3 高糖、高脂饮食对小鼠结肠炎状况及肠道通透性的影响

接下来,研究 HSFD 是否会对小鼠结肠造成影响。DAI 评分能够在一定程度上表征结肠炎症状。MPO 是一种主要存在于嗜中性粒细胞的溶酶体蛋白,当病原体侵入时,中性粒细胞将病原体吞噬,从而保证机体的正常运行,其活性作为中性粒细胞浸润组织和急性炎症的重要生物标志物之一,酶活的降低代表中性粒细胞积聚得到抑制<sup>[18]</sup>。肠道通透性增加是结肠炎发生的促进因素之一,利用 FITC-Dextran 可以直接测定肠道屏障的完整状况。

对小鼠结肠进行测定,结果显示,HSFD 干预后,DAI 评分、结肠组织 MPO 活性显著提高(图

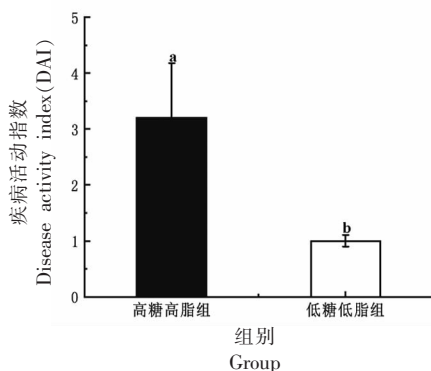


注:字母不同表示显著性差异( $P<0.05$ ),字母相同表示无显著性差异。

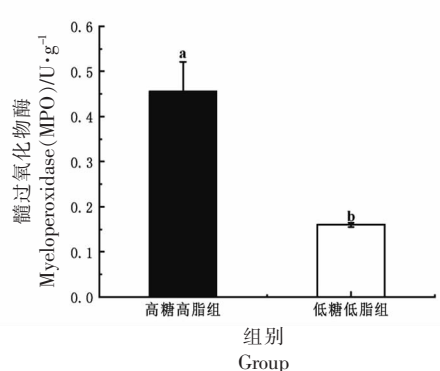
图 2 高糖、高脂饮食对血清中 TC、TG、HDL、LDL 的影响

Fig.2 The influence of high-sugar and high-fat diet on the concentration of TC, TG, HDL-C and LDL-C in serum

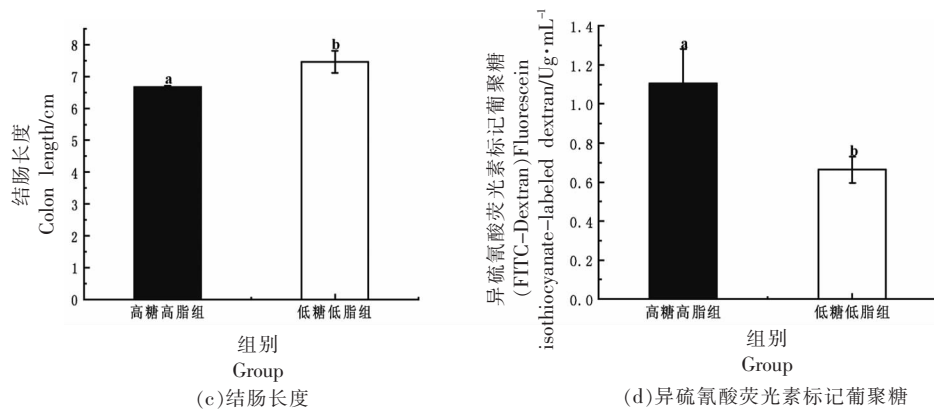
3a、3b,  $P<0.01$ )、结肠长度缩短(图 3c,  $P<0.05$ )证明 HSFD 能够导致小鼠结肠炎的发生。接着为了探究高糖、高脂引发结肠炎症状是否和小鼠肠道通透性有关,利用 FITC-Dextran 对小鼠肠道屏障的通透性进行测定,结果显示,HSFD 干预组小鼠血清中 FITC-Dextran 的质量浓度为  $(0.066 \pm 0.006) \mu\text{g/mL}$ ,约为 LFD 饮食组的 1.73 倍( $P<0.05$ ),这证明 HSFD 干预后显著提高了小鼠肠道屏障通透性(图 3d)。HSFD 的摄入通过提高结肠部分 MPO 活性以及肠道屏障通透性,这可能是肠道菌群失衡导致有害菌进入肠腔,导致黏液降解和紧密连接结构遭到破坏,肠道免疫系统失衡,进而导致结肠部位炎症的发生<sup>[19]</sup>。



(a) 疾病活动指数评分



(b) 髓过氧化物酶



注:字母不同表示显著性差异( $P<0.05$ ),字母相同表示无显著性差异。

图3 高糖、高脂饮食对小鼠结肠炎症状及肠道通透性影响

Fig.3 Effects of high-sugar and high-fat diet on the symptoms of colitis and intestinal permeability in mice

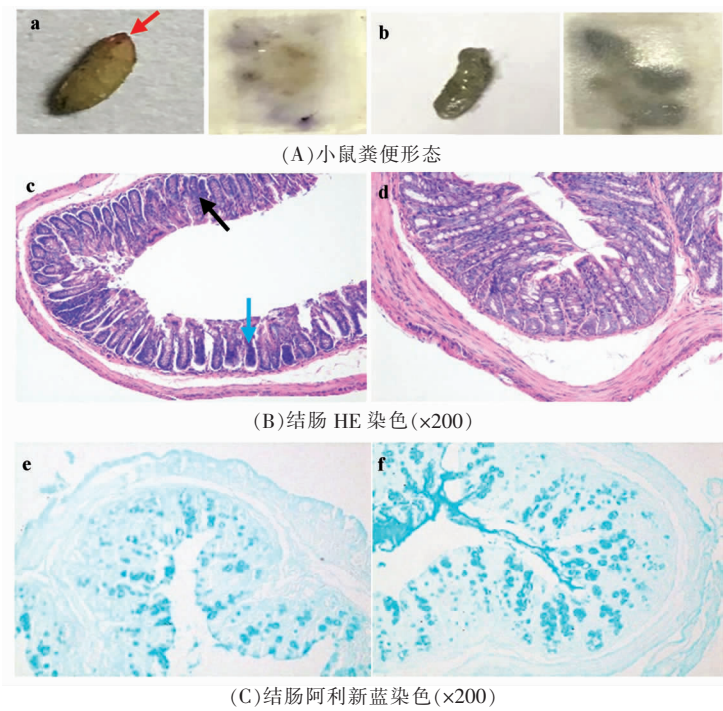
## 2.4 高糖、高脂饮食对小鼠粪便形态及结肠上皮组织影响

由于小鼠肠道通透性发生了显著变化,因此进一步探究HSFD干预是否对小鼠的结肠上皮组织和黏液层造成了损伤。首先对小鼠粪便进行观察,如图4A所示,HSFD干预组小鼠粪便较为干燥并可观察到血便情况(图4A红色箭头所示),便隐血测试颜色较深,(蓝紫色越深,便血情况越严重)LFD组小鼠粪便色泽与形态较好,经便隐血测试没有便血情况,与上述试验结果一致,HSFD干预导致了小鼠结肠炎的发生。对结肠进行病理学染色,由HE染色可知,HSFD干预组小鼠结肠黏膜出现炎症性细胞浸润(图4B蓝色箭头所示)、部分隐窝结构改变(图4B黑色箭头所示)、中性粒细胞增多、上皮结构被破坏、杯状细胞减少,LFD组小鼠肠上皮结构和隐窝完整富含杯状细胞,没有炎症性细胞浸润或黏膜损伤,具有完整的肠上皮结构。黏液降解的增加可以作为IBD的生物标记。由阿利新兰染色可知(图4C),与LFD组相比,HSFD干预组小鼠黏蛋白的分泌量明显减少,黏液层结构被破坏,这与杯状细胞大量损伤有关,黏液层的破坏会导致细菌穿透渗入,侵袭上皮细胞引起肠黏膜损伤<sup>[9]</sup>。结合以上结果可知,HSFD的摄入会破坏结肠正常组织结构,导致肠上皮细胞损伤,影响结肠黏液层的生长速度和渗透性导致结肠黏液层迅速恶化。可能是肠道致病菌利用上皮细胞谱系、分泌酶降解黏液并破坏紧密连接结构,从而导致肠道完整性遭到破坏<sup>[19]</sup>。

## 2.5 高糖、高脂饮食对结肠屏障相关蛋白表达的影响

作者研究发现HSFD破坏肠上皮完整性,接下来探究相关紧密连接蛋白的表达是否会受到影响。肠道通透性的主要决定因素之一是细胞间紧密连接(TJs),能维持上皮细胞的完整性,同时发挥其屏障功能,防止肠腔内的致病菌进入肠道<sup>[9]</sup>。ZO蛋白家族是最早被研究的蛋白,ZO-1是紧密连接的骨架蛋白,呈蜂窝或点状均匀分布在肠上皮细胞周围,在TJs中起核心连接作用。研究表明,ZO-1表达的下调先于肠道炎症的发生,其表达的下调意味着TJs功能极可能受到影响,而TJs功能障碍可能是IBD发病的起始因素<sup>[20]</sup>。Occludin在TJs的屏障功能和调控大分子物质进入肠道中起着重要作用,能维持和调节肠黏膜的通透性并抑制炎症因子的释放。MUC-2由肠道上皮组织的杯状细胞分泌,遍布小肠和大肠,其水平降低可能与多种肠道疾病有关,敲除MUC-2的小鼠会导致结肠炎的发生<sup>[21]</sup>。

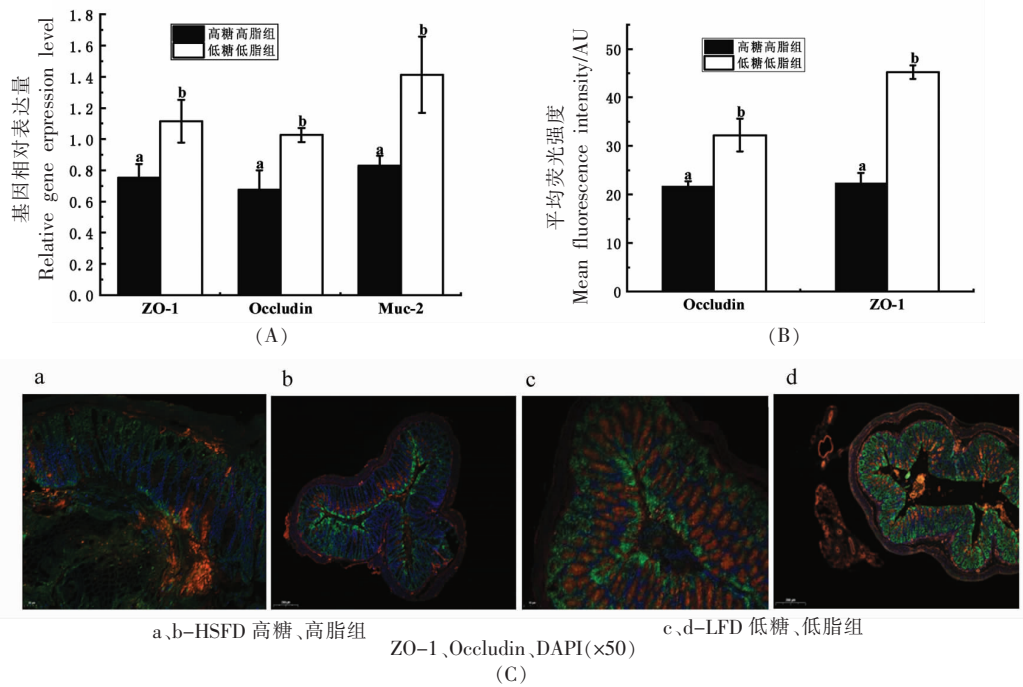
为研究在蛋白表达水平上,HSFD对肠道通透性的影响,对结肠相关蛋白进行了测定。如图5A所示,与LFD对照组相比,HSFD干预组ZO-1、Occludin、Muc-2这3种屏障蛋白基因的相对表达量均下调且差异显著( $P<0.05$ )。HSFD对小鼠结肠MUC-2基因相对表达量的影响与阿利新蓝染色结果一致。免疫荧光结果如图5B和图5C所示,HSFD干预组,这两种紧密连接蛋白表达出现明显减少,且结肠完整形态被破坏,LFD组ZO-1、Oc-



注：a、c、e-高糖、高脂组，b、d、f-低糖、低脂组，c、d-结肠 HE 染色，e、f-结肠阿利新蓝染色；图 A 红色箭头代表粪便中带血，图 B 黑色箭头代表结肠隐窝结构改变，图 B 蓝色箭头代表炎症性细胞浸润。

图 4 高糖、高脂饮食对小鼠粪便形态及结肠上皮组织影响

Fig.4 Influence of high-sugar and high-fat diet on fecal morphology and colonic epithelial tissue of mice



注：字母不同表示显著性差异 ( $P < 0.05$ )；红色荧光标记 ZO-1；绿色荧光标记 Occludin；蓝色标记细胞核。

图 5 结肠组织中 ZO-1、Occludin、MUC-2 基因相对表达量以及 ZO-1、Occludin 免疫荧光蛋白染色及定量  
Fig.5 The relative expression of ZO-1, Occludin, and MUC-2 genes in colon tissue, as well as the staining and quantification of ZO-1 and Occludin immunofluorescent protein

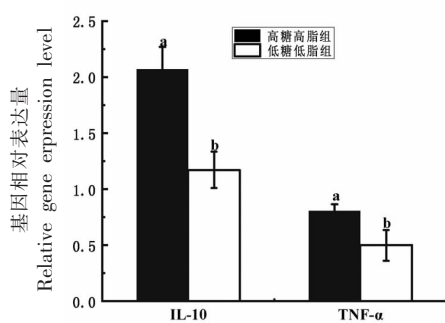
cludin 蛋白排列整齐且表达量高,进一步证明 HSFD 影响肠道相关紧密连接蛋白的表达,对小鼠肠道屏障具有一定的破坏性,肠道渗透性的增加,可能是由于过量的脂质积累导致内质网应激从而激活免疫细胞产生炎症反应引起的<sup>[19]</sup>。

## 2.6 高糖、高脂饮食对小鼠结肠组织炎症因子表达的影响

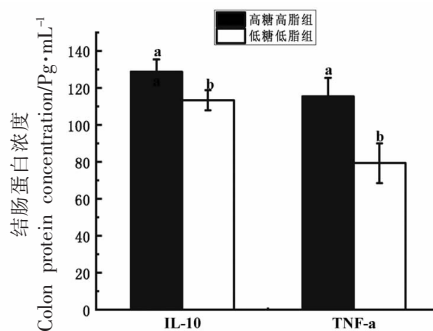
已经了解 HSFD 的摄入会使机体产生炎症反应,接下来探究肠道部位的炎症因子表达情况。机体正常情况下免疫系统处于稳态,当受到外界干扰时,先天免疫信号会被激活。促炎因子与抑炎因子之间失衡会导致炎症的发生。白细胞介素对免疫细胞的增殖、分化起关键性作用。IL-10 又称细胞因子合成抑制因子,可激活 JAK1/STAT3 通路,主要通过调节一些免疫细胞消除微生物的入侵来发挥抑炎作用,与 UC 的发生有关<sup>[22]</sup>。肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  是主要的炎症驱动因素之一,也是结肠炎发病机制中的一种重要促炎因子,它可以聚集

中性粒细胞从而导致炎症的发生,在炎症性肠病的发生中起重要作用<sup>[23]</sup>。

作者从 mRNA 以及蛋白水平方面测定小鼠结肠组织炎症因子。由图 6a,RT-PCR 结果可知,与 LFD 对照组相比,HSFD 干预组,IL-10 基因表达上调,差异极显著( $P<0.01$ ),TNF- $\alpha$  基因水平也有一定的上调( $P<0.05$ )。虽然 IL-10 被认为是一种抗炎因子,但其功能是多方面的。研究表明它是饮食诱导肥胖中产热的一种特殊调节剂。因此 HSFD 小鼠 IL-10 的上调可能是 HSFD 的二次反馈效应<sup>[24]</sup>。图 6b,ELISA 法检测结肠组织,HSFD 干预组显著提高了 TNF- $\alpha$  水平( $P<0.05$ ),显著增加了 IL-10 水平( $P<0.01$ )。HSFD 干预会促进 TNF- $\alpha$  抗炎因子的表达,抑制抑炎因子 IL-10 的表达。这与肠道屏障功能失衡的实验结果相对应,HSFD 会引起小鼠肠道通透性增加,使得更多的炎症因子通过肠道屏障,进而引起肠道的炎症反应。



(a)小鼠结肠组织 IL-10、TNF- $\alpha$  基因相对表达量



(b)小鼠结肠组织 IL-10、TNF- $\alpha$  表达水平

注:字母不同表示显著性差异 ( $P<0.05$ ),字母相同表示无显著性差异。

图 6 高糖、高脂饮食对小鼠结肠组织炎症因子表达的影响

Fig.6 The effect of high-sugar and high-fat diet on the expression of inflammatory factors in mouse colon

## 3 结论

随着健康意识的逐渐增强,合理及科学的饮食结构和生活方式逐渐受到人们的重视。长期的单一高糖、高脂饮食模式除了导致代谢综合征、糖尿病、神经系统疾病之外,还能增加 IBD 的易感性。然而低脂饮食、生酮饮食和地中海饮食等被证明可以治疗肥胖和高脂血症,增强抵抗力减轻体内炎症反应<sup>[25-26]</sup>。本试验通过高糖、高脂干预以及低糖、低脂饮食作为对照,研究了高糖、高脂饮食对小鼠肥胖、肠道屏障功能、炎症水平以及结肠炎

的影响,本次实验结果显示,高糖、高脂饮食在一定程度上会导致小鼠血脂异常、促炎因子分泌增多、肠道屏障被破坏,最终导致肠道炎症的发生,为日常合理膳食,选择结肠炎的治疗方向以及对 IBD 患者的饮食干预提供了一定的理论指导。

## 参 考 文 献

- [1] CHANG D C, XU X, FERRANTE A W, et al. Reduced plasma albumin predicts type 2 diabetes



- and is associated with greater adipose tissue macrophage content and activation[J]. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2019, 11(1): 1–8.
- [2] CHEN S, CHE S, LI S, et al. High-fat diet exacerbated decabromodiphenyl ether-induced hepatocyte apoptosis via intensifying the transfer of  $\text{Ca}^{2+}$  from endoplasmic reticulum to mitochondria[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 292: 118297.
- [3] BINIENDA A, FICHNA J, SALAGA M J E J O P S. Recent advances in inflammatory bowel disease therapy[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *Journal of Functional Foods*, 2020, 155: 105550.
- [4] SILVA D R, SARDI J D C O, DE SOUZA PITANGUI N, et al. Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 73: 104080.
- [5] LIU T C, KERN J T, JAIN U, et al. Western diet induces Paneth cell defects through microbiome alterations and farnesoid X receptor and type I interferon activation[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(6): 988–1001. e6.
- [6] 谭悦, 郑长清. 整肠生对溃疡性结肠炎小鼠肠上皮屏障的保护作用[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(8): 13–19, 26.
- TAN Y, ZHENG C Q. Effect of Zheng Chang Sheng on intestinal epithelial barrier function in mice with ulcerative colitis[J]. *China J Microecol*, 2018, 30(8): 13–19, 26.
- [7] SAWA Y, OSHITANI N, ADACHI K, et al. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2003, 11(2): 175–179.
- [8] ALEX P, ZACHOS N C, NGUYEN T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009, 15(3): 341–352.
- [9] ZHANG X, LIU S, ZHANG C, et al. The role of AMPK $\alpha$ 2 in the HFD-induced nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Molecular Basis of Disease*, 2020, 1866(10): 165854.
- [10] VINOD E, KACHROO U, AMIRTHAM S M, et al. Comparative analysis of fresh chondrocytes, cultured chondrocytes and chondroprogenitors derived from human articular cartilage[J]. *Acta Histochemical*, 2020, 122(1): 151462.
- [11] DUTRA N L S, DE B T V, DE A M D, et al. Sulfated polysaccharide extracted from seaweed *Gracilaria caudata* attenuates acetic acid-induced ulcerative colitis[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106221.
- [12] KAWANO M, MIYOSHI M, OGAWA A, et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet[J]. *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5: e23.
- [13] MATEI D E, MENON M, ALBER D G, et al. Intestinal barrier dysfunction plays an integral role in arthritis pathology and can be targeted to ameliorate disease[J]. *Med*, 2021, 2(7): 864–883. e9.
- [14] LIU G, FENG S, SUN Y, et al. Colonic macrophage-targeted curcumin nanoparticles alleviate DSS-induced colitis in mice through the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Food Bioscience*, 2021, 41: 101089.
- [15] BUTLER T, ASHFORD D, SEYMOUR A–M J N, et al. Western diet increases cardiac ceramide content in healthy and hypertrophied hearts[J]. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2017, 27(11): 991–998.
- [16] LEAMY A K, EGNATCHIK R A, YOUNG J D J P I L R. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(1): 165–174.
- [17] SANTANA M N S, DE MELO V U, MACEDO F N, et al. Resistance training improves cardiovascular autonomic control and biochemical profile of rats exposed to a Western diet in the perinatal period[J]. *Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)*, 2019, 38(5): 337–345.
- [18] CHAMI B, MARTIN N J, DENNIS J M, et al. Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 645: 61–71.
- [19] MARTENS E C, NEUMANN M, DESAI M S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(8): 457–470.

- [20] TAN Y, GUAN Y, SUN Y, et al. Correlation of intestinal mucosal healing and tight junction protein expression in ulcerative colitis patients [J]. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2019, 357(3): 195–204.
- [21] VAN D S M, DE K B A E, DE B A C J M, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(1): 117–129.
- [22] WEI H, YANG M, ZHAO T, et al. Functional expression and characterization of grass carp IL-10: an essential mediator of TGF- $\beta$ 1 immune regulation in peripheral blood lymphocytes [J]. *Molecular Immunology*, 2013, 53(4): 313–320.
- [23] BOUMA G, STROBER W J N R I. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(7): 521–533.
- [24] LI S, LIANG T, ZHANG Y, et al. Vitexin alleviates high-fat diet induced brain oxidative stress and inflammation via anti-oxidant, anti-inflammatory and gut microbiota modulating properties[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021, 171: 332–344.
- [25] YANCY JR W S, OLSEN M K, GUYTON J R, et al. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2004, 140(10): 769–777.
- [26] MILO I, BEDORA-FAURE M, GARCIA Z, et al. The immune system profoundly restricts intratumor genetic heterogeneity[J]. *Science Immunology*, 2018, 3(29): eaat1435.

### Effect of High Sugar and High Fat Diet on Intestinal Barrier Function and Inflammation in Mice

Shao Junlin, Tian Miaoxin, Wang Fukang, Sun Yiwei, Wang Guangqiang, Ai Lianzhong, Xia Yongjun\*  
(University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093)

**Abstract** Objective: The way of eating has an important influence on the intestinal immunity and inflammatory environment. This article examines the effects of high-sugar and high-fat diet (HSFD) on the intestinal barrier function and the level of inflammation. Methods: In the experiment, SPF grade C57BL/6J mice were selected for HSFD intervention for 4 weeks. At the same time, low-sugar and low-fat diet (LFD) was used as a control to determine blood lipid-related indicators, intestinal permeability, inflammation levels, and related tight junction protein expression changes. Results: Under HSFD conditions, the total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG) and other blood lipid indexes of mice increased significantly ( $P<0.05$ ), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) The content was significantly reduced ( $P<0.01$ ), and the pathological staining of the liver showed abnormal accumulation of adipocytes, indicating that the intervention of HSFD caused the disorder of lipid metabolism in the liver of mice. Further analysis of the symptoms of colon inflammation in mice showed that HSFD mice had blood in the stool, disease activity index (DAI) and colon tissue myeloperoxidase (MPO) activity were significantly increased ( $P<0.05$ ), real-time fluorescent quantitative PCR (Quantitative Real-time PCR) and enzyme-linked immunoassay (ELISA) methods showed that the expression of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) inflammatory factors in colon tissue was significantly increased ( $P<0.05$ ), indicating that the intestinal tract of HSFD mice is in a mildly inflammatory state. The analysis of the intestinal barrier function showed that inflammatory cell infiltration occurred in the colonic epithelial tissue of HSFD mice, the crypt structure was destroyed, the goblet cells were reduced, the occluding protein (ZO-1), the occluding protein (Occludin), and the mucus protein (the gene expression levels of barrier-related proteins such as MUC-2) were significantly reduced ( $P<0.05$ ). The immunofluorescence results showed that the expression levels of ZO-1 and Occludin in the colon tissue of HSFD mice were significantly reduced ( $P<0.05$ ). Fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-Dextran) analysis showed that the intestinal permeability of HSFD mice was significantly increased. Conclusion: HSFD can cause lipid metabolism disorders in mice, destroy the intestinal barrier function, and promote the intestinal tract to be in a state of inflammation, which may cause chronic intestinal lesions.

**Keywords** high-sugar and high-fat diet; intestinal inflammation; intestinal barrier function; chronic colitis