

黑灵芝多糖对脂多糖诱导的 IEC-6 肠上皮细胞损伤的保护作用

郑冰, 胡晓波, 陈奕, 谢建华, 余强*

(南昌大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室 中加食品科学技术联合实验室(南昌) 南昌 330047)

摘要 目的:探究黑灵芝多糖(PSG-1)对脂多糖(LPS)诱导的 IEC-6 肠上皮细胞损伤的保护作用及其机制。方法:采用 LPS 构建肠上皮细胞 IEC-6 损伤模型,研究 PSG-1 对 IEC-6 细胞的干预效果。采用细胞计数盒(cck-8)法测定 PSG-1 干预对细胞活力的影响。运用 western-blot 技术探究细胞中肠道紧密连接蛋白和环氧化酶 cox-2 表达的变化,基于转录组测序技术分析 PSG-1 潜在的保护机制并对其进行验证。结果:PSG-1 干预可以显著提升 LPS 造成的细胞活力降低和肠道紧密连接蛋白 ZO-1、Claudin-1 和 Occludin 的表达,而且 PSG-1 对 LPS 引起的 cox-2 异常高表达具有抑制效果。转录组测序及划痕试验和蛋白免疫印迹试验结果表明:PSG-1 能显著增强细胞的迁移能力并抑制促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 的表达。结论:PSG-1 对 LPS 诱导的肠上皮细胞 IEC-6 具有显著的保护作用,细胞迁移和凋亡可能是 PSG-1 发挥其保护效应的关键途径。

关键词 黑灵芝多糖; 脂多糖; 肠上皮细胞 IEC-6; 细胞迁移; 凋亡

文章编号 1009-7848(2024)04-0043-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.005

肠道是负责营养吸收和免疫防御的重要器官。肠道屏障由单层肠上皮细胞组成,在维持肠道平衡方面发挥至关重要的作用。这些肠上皮细胞不仅起到物理屏障的作用,还积极参与免疫监视和调节^[1]。肠道上皮相邻细胞之间的紧密连接,形成了一道选择性渗透屏障,允许营养物质的吸收,同时阻止有害微生物和毒素的进入^[2]。然而,当暴露于各种压力或促炎诱因(如微生物菌群失调、高糖高脂饮食和遗传易感性)时,肠道屏障就会受到损害,从而导致肠道炎症^[3]。此外,急性感染或慢性免疫介导的疾病都可能引起肠道炎症,导致肠上皮细胞屏障功能发生改变。这些变化包括紧密连接完整性的破坏、黏液分泌的改变以及肠上皮细胞凋亡或损伤的增加。肠道屏障功能的丧失会使病原体和抗原穿透肠壁,引发以炎症和炎症细胞(如中性粒细胞和淋巴细胞)募集为特征的免疫反应^[4]。

最新研究显示,天然产物中的生物活性成分在维护肠道健康方面发挥关键作用,其中多糖因潜在的健康促进作用而备受关注^[5]。大量研究表明,多糖具有多种生物活性和健康益处。这些天然

化合物被证明具有抗氧化特性,能有效清除自由基,减轻氧化损伤^[6-7]。此外,多糖还通过抑制肿瘤生长,诱导细胞凋亡和调节癌细胞的免疫反应,显示出良好的抗癌活性^[8-9]。同时,多糖还具有免疫调节作用,能增强免疫反应并显示抗炎活性。它们可以刺激各种免疫细胞的产生,调节免疫细胞的功能,调节细胞促炎因子的释放^[10]。本实验室研究人员采用水提醇沉法,从中国传统名贵中草药黑灵芝中成功分离纯化出一种分子质量为 1 013 ku 的水溶性多糖(PSG-1)^[11]。PSG-1 展现出多种生物活性,而目前对其在肠道损伤的保护作用及潜在机制报道甚少^[12-13]。本研究旨在构建 LPS 诱导的 IEC-6 肠道上皮细胞损伤模型,探讨 PSG-1 对 IEC-6 细胞损伤的干预效果,为进一步明确 PSG-1 的肠道健康效应提供数据支撑,并为促进黑灵芝高附加值产品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑灵芝多糖,南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室;IEC-6 细胞,上海酶研生物科技有限公司;DMEN、胰蛋白酶(含 EDTA),中国索莱宝公司;胎牛血清(Fetal calf serum,FPS),以色列 BI 公司;脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS),美国 Sigma 公司;cck-8 试剂盒,上海 Dojindo Molecular

收稿日期:2023-08-17

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81760737)

第一作者:郑冰,男,博士生

通信作者:余强 E-mail: yuqiang8612@163.com

Technologies 公司;抗体(Atg5、Atg7、Beclin-1、LC3、caspase-3、caspase-9、Bax、mTOR、p-mTOR),美国 Cell Signaling Technology 公司;抗体(β -actin、辣根过氧化物酶山羊抗小鼠抗体、辣根过氧化物酶山羊抗兔抗体),北京中杉山金桥生物有限公司;抗体(Occludin、Claudin-1),美国 Santa Cruz 公司;抗体(cox-2),沈阳万类生物科技有限公司;IP 裂解液、PMSF,碧云天生物技术有限公司;彩虹光谱蛋白 Marker、甘氨酸、牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、30%制胶液,索莱宝生物科技有限公司;6 Protein Loading Buffer, 全式金生物科技有限公司;PVDF 膜,美国 Immobilon 公司。

1.2 仪器与设备

电子显微镜,日本 Olympus 公司;超净工作台,吴江净化设备厂;多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;垂直电泳与转膜系统及凝胶成像系统, Bio-Rad 公司;低温高速离心机,德国 Sigma 公司;CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养与传代 向 450 mL DMEM 培养基中添加 50 mL 胎牛血清 FPS, 配制成 IEC-6 细胞的生长培养基, IEC-6 细胞的培养条件:温度 37 °C, CO₂ 浓度 5%。细胞传代条件:细胞生长面积达培养瓶底部 80%左右,进行细胞传代培养(1:3)。

1.3.2 细胞造模 按照 1.0×10^4 个/孔的比例对细胞进行接种(96 孔板),后于培养箱中静置培养 24 h,将正常生长培养基替换为含有 LPS 的培养基,浓度梯度为 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并继续于培养箱中静置培养 24 h,最后加入 cck-8 检测液(10 $\mu\text{L}/\text{孔}$),培养箱中反应 1 h 后,测定其吸光值(450 nm),根据测定结果选取适宜的组别作为造模浓度。

1.3.3 细胞存活率测定 按照 1.0×10^4 个/孔的比例对细胞进行接种(96 孔板),后于培养箱中静置培养 24 h,将正常生长培养基替换为含有 LPS 与 PSG-1 的混合培养基,其中 LPS 的质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PSG-1 的质量浓度设置为 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并继续于培养箱中静置培养 24 h,最后加入 cck-8 检测液(10 $\mu\text{L}/\text{孔}$),培养箱中反应 1 h 后测定其吸光值(450 nm),根据测定结果选取适宜的 3 个组别进行后续研究。

1.3.4 细胞试验设计 按照 1.0×10^5 个/孔的比例对细胞进行接种(6 孔板),后于培养箱中静置培养 24 h,将正常生长培养基替换为含有 LPS 与 PSG-1 的混合培养基,其中 LPS 的质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PSG-1 的质量浓度为 40, 80, 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。设置空白组(NC), LPS 造模组(LPS), PSG-1 低剂量组(LD), PSG-1 中剂量组(MD)和 PSG-1 高剂量组(HD),干预 24 h 后的细胞可用于其它检测,具体分组如图 1 所示。

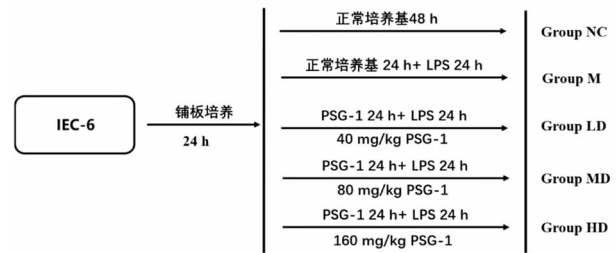


图 1 细胞试验流程图

Fig.1 Flow chart of cell experiment

1.3.5 Western-blot 试验 制备的细胞在 IP 裂解液作用下进行裂解,冰上静置 5 min 后进行离心分离(4 °C, 12 000 $\times g$, 5 min),取上清与 Loading Buffer 混匀后进行金属浴变性(95 °C, 5 min),冷却后进行 western-blot 操作。蛋白经过 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上,在经过 5%BSA 封闭后进行一抗和二抗孵育,最后进行发光检测。

1.3.6 细胞迁移能力检测 按照 1.0×10^5 个/孔的比例对细胞进行接种(6 孔板),后于培养箱中静置培养 24 h,采用枪头划线的方法,在细胞表面划出直线,对直线的宽度进行拍照测量后,更换对应组别的培养基(正常生长培养基,只添加 LPS 的生长培养基以及添加了 LPS 和 PSG-1 的培养基),24 h 后继续拍照测量,通过前、后 2 次划痕的宽度来计算细胞的迁移能力。

1.3.7 转录组测序 细胞的转录组测序委托上海派森诺生物科技股份有限公司完成,试验数据的可视化操作在云平台上完成(<https://www.genescloud.cn>)。

1.3.8 数据分析 本研究的数据分析采用单因素方差分析,并运用 GraphPad Prism 7.01 软件绘图,分析结果以“平均值 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。统计学

差异判定标准为 $P < 0.05$ (# 或 *) 和 $P < 0.01$ (## 或 **))。

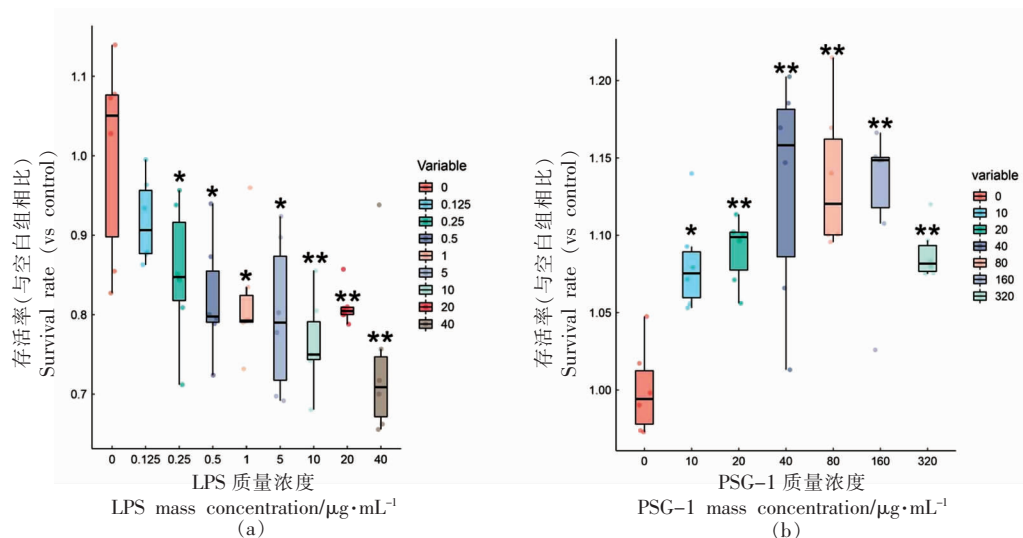
2 结果与分析

2.1 LPS 和 PSG-1 对细胞存活率的影响

细胞存活率是评估外源物质 (例如 LPS 和 PSG-1) 对细胞影响的最直观指标。为了研究不同浓度 LPS 和 PSG-1 对细胞存活率的影响, 本研究进行相关检测。图 2a 的结果显示, IEC-6 细胞的存活率与 LPS 浓度呈负相关, 这表明 LPS 对细胞的损伤与其浓度密切相关。与未添加 LPS 的对照组相比, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 已造成细胞存活率的显著降低。在 LPS 质量浓度为 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

时, 细胞的致死率之间无显著差异。结合文献中已报道的使用剂量, 本研究确定的造模质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

在明确了造模浓度后, 本研究进一步检测了 PSG-1 干预对 IEC-6 细胞存活率的影响 (图 2b), 结果显示, PSG-1 在质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 显著提升了细胞的存活率, 并随着浓度的增加而增强, 这表明 PSG-1 对于 LPS 造成的 IEC-6 细胞损伤具有显著的保护效果。在质量浓度为 40, 80, 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 3 组的改善能力接近, 因此, 本研究确定了 PSG-1 的干预质量浓度为 40, 80, 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



注: 与质量浓度为 0 的 LPS 或 PSG-1 干预组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 不同质量浓度的 LPS(a) 和 PSG-1(b) 对细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of different mass concentrations of LPS (a) and PSG-1 (b) on cell viability

2.2 PSG-1 对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞分泌的紧密连接蛋白的影响

图 3 蛋白免疫印迹试验结果显示, LPS 组中 claudin-1 和 occludin 的表达被抑制, 这表明 LPS 刺激破坏了上皮屏障的完整性, 而在 PSG-1 干预组中, 这两种蛋白的表达量得到了显著增强。虽然未检测到 NC 与 LPS 组中 zonula occludens-1 (ZO-1) 蛋白的差异表达, 但是 PSG-1 特异性地加速了该蛋白的表达量回升。

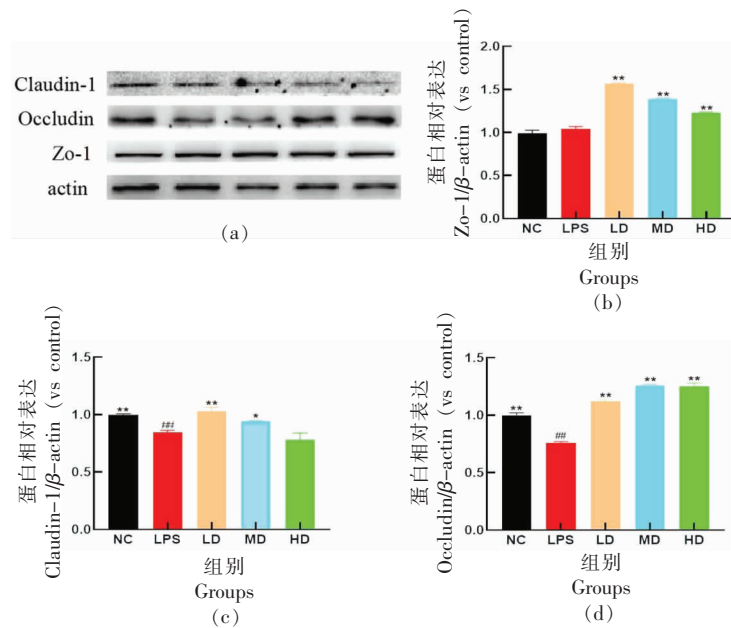
2.3 PSG-1 对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞环氧合酶-2 表达的的影响

与 NC 组相比, LPS 组中 cox-2 蛋白的表达量

显著升高; 与 LPS 相比, LD、MD、HD 组均逆转了这种异常的表达现象, 有效抑制了该蛋白的表达 (图 4)。

2.4 PSG-1 对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞基因表达的影响

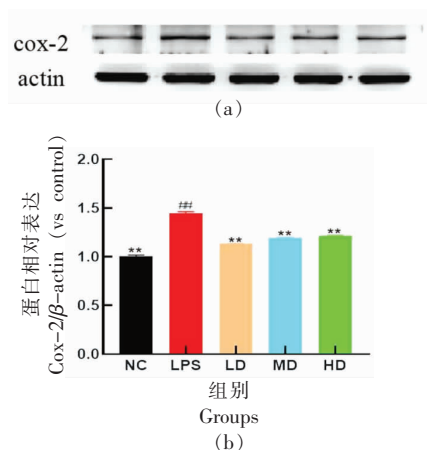
2.4.1 PCA 分析 为了深入研究 PSG-1 对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞的潜在保护机制, 本研究对 3 组细胞 (NC 组、LPS 组和 LD 组) 进行测序分析。主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 是一种被广泛应用于维度降低和数据可视化的统计技术, 其旨在通过保留原始数据的基本变化和结构, 将高维数据表示在降低维度的空间中。图 5 展



注:与LPS组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与NC组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图3 PSG-1干预对肠道紧密连接蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of PSG-1 intervention on intestinal tight junction protein expression



注:与LPS组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与NC组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图4 PSG-1干预对cox-2蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of PSG-1 intervention on cox-2 protein expression

示了3组样本的PCA结果,其中不同颜色代表不同的组别。结果显示,LPS组与NC组之间存在显著差异。而在PC1轴和PC2轴上,PSG-1组的样本更加接近于NC组。

2.4.2 差异表达基因对比分析 差异表达倍数>1.5且具有统计学显著性的基因在本研究中被判

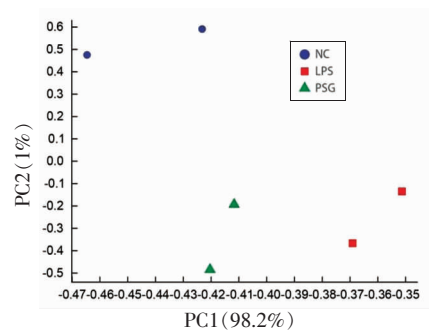


图5 NC组、LPS组和PSG组之间的PCA分析图

Fig.5 PCA analysis between the NC group, LPS group, and PSG group

定为差异基因,对差异基因进行统计分析,并以火山图的形式展现出不同组别之间的差异基因数。LPS处理引起了948个基因的改变(与NC组相比),而PSG-1干预改变了373个基因的表达(与LPS组相比),其中上调和下调的基因数分别为806,152和142,211(图6)。

2.4.3 基因表达聚类分析 基因聚类分析是研究基因协调行为和发现潜在基因调控机制的重要工具,能够有助于深入理解共调基因网络、生物通路或分子功能。本研究利用基因聚类分析对NC组与LPS组以及LPS组与PSG-1组进行比较,结果

显示对比组之间的基因表达差异显著,同时组内基因表达趋于相似。这为后续的富集分析奠定了

良好的基础,进一步探究和观察与基因表达模式相关的功能富集情况。

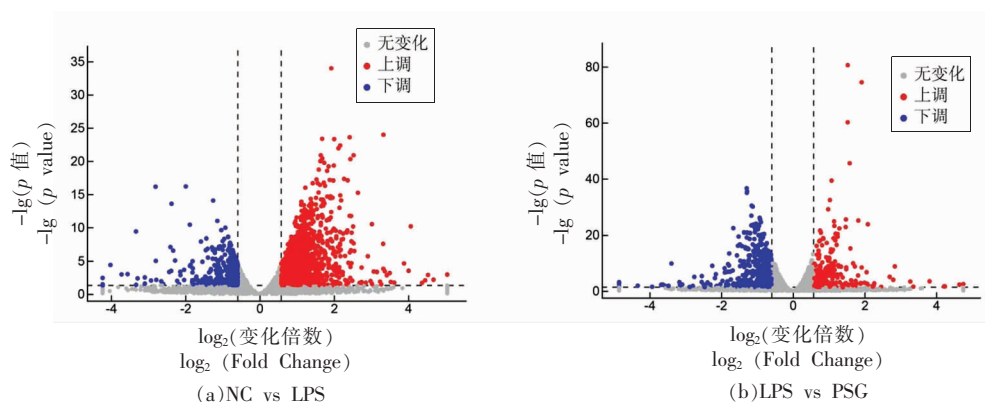


图 6 NC vs LPS(a)和 LPS vs PSG(b)的差异基因火山图

Fig.6 Differential gene volcano plots for NC vs LPS (a) and LPS vs PSG (b)

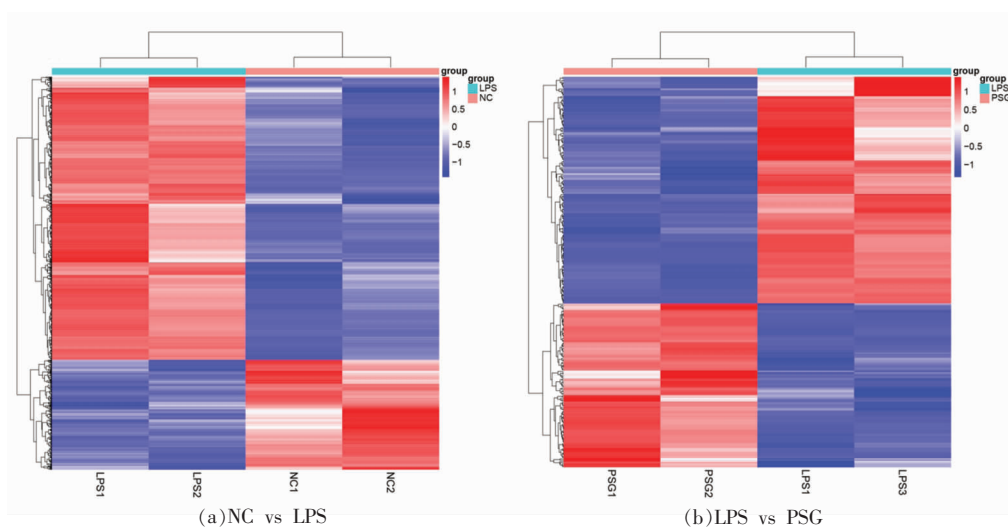


图 7 NC vs LPS(a)和 LPS vs PSG(b)的差异表达基因聚类分析图

Fig.7 Cluster analysis plot of differentially expressed genes for NC vs LPS (a) and LPS vs PSG (b)

2.5 LPS 诱导和 PSG-1 干预后 IEC-6 细胞基因富集分析

2.5.1 GO 功能分析 Gene ontology(GO)是一种广泛使用的生物信息学工具,有助于对基因和基因产物进行功能注释和分析。本研究采用双 GO 比较方法,同时比对 LPS 处理组(与 NC 组相比)与 PSG-1 处理组(与 LPS 组相比)的 GO 分析结果(图 8)。其中,一些相同的生物过程被富集,这包括细胞迁移和凋亡进程。

2.5.2 KEGG 富集分析 京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,

KEGG)分析结果如图 9 所示,LPS 导致了巨自噬、自噬、凋亡、mTOR 等途径的变化(与 NC 组相比),而在 PSG-1 组中,细胞周期、凋亡、p53 等信号通路被特异性富集,双 KEGG 结果中均存在细胞凋亡信号通路。

2.6 PSG-1 对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞迁移能力的影响

基于 GO 结果中富集的细胞迁移生物过程的变化,本研究采用划痕试验进行验证和探究,结果如图 10 所示,对比前、后 2 次的划痕宽度,与初始划痕宽度相比,LPS 组中划痕宽度变化显著低于

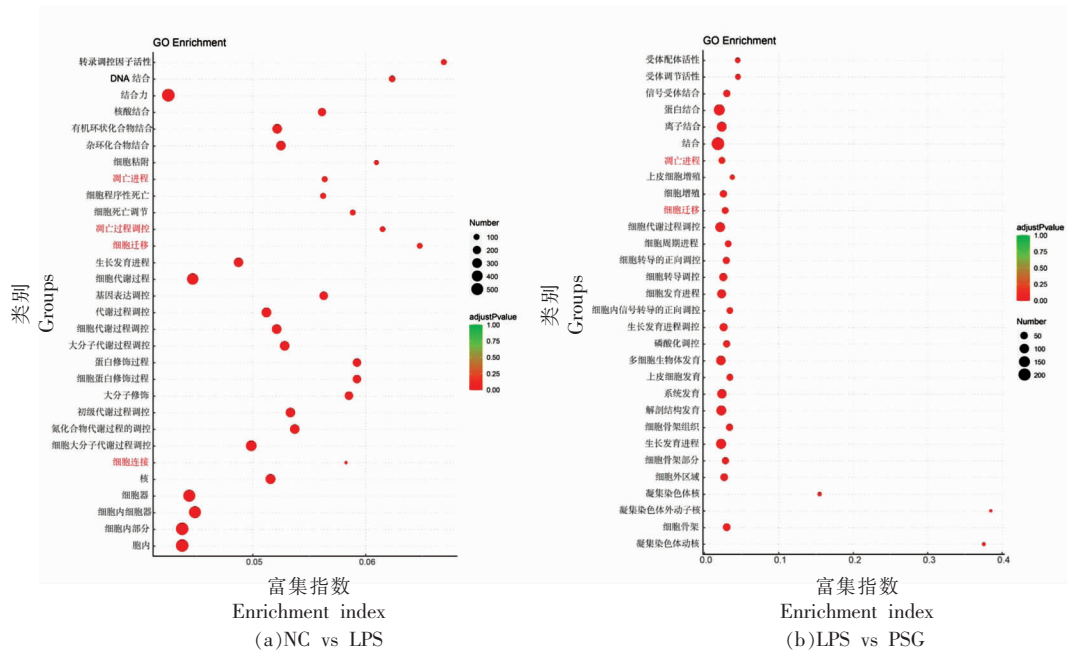


图 8 NC vs LPS(a)和 LPS vs PSG(b)的 GO 富集分析图

Fig.8 GO enrichment analysis plots for NC vs LPS (a) and LPS vs PSG (b)

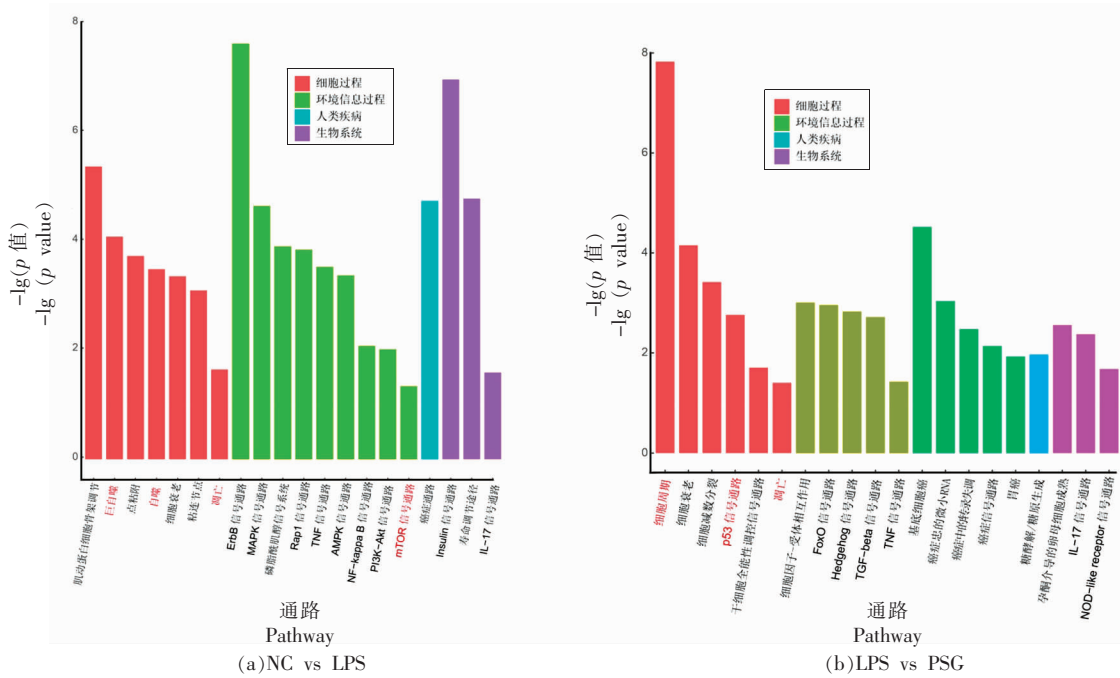


图 9 NC vs LPS(a)和 LPS vs PSG(b)的 KEGG 富集分析图

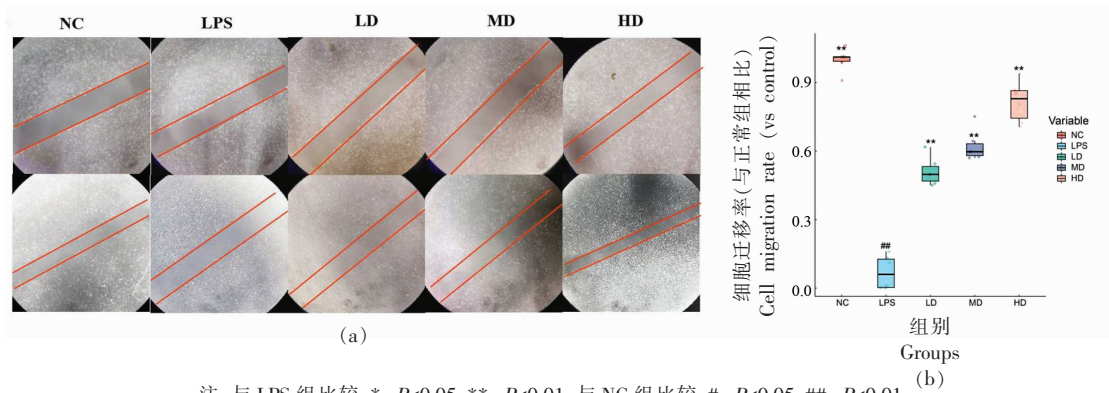
Fig.9 KEGG enrichment analysis plots for NC vs LPS (a) and LPS vs PSG (b)

NC 组，而 PSG-1 干预组的划痕宽度均显著高于 LPS 组。

2.7 PSG-1 对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞凋亡水平的影响

基于前期发现的凋亡途径的特异性富集,本

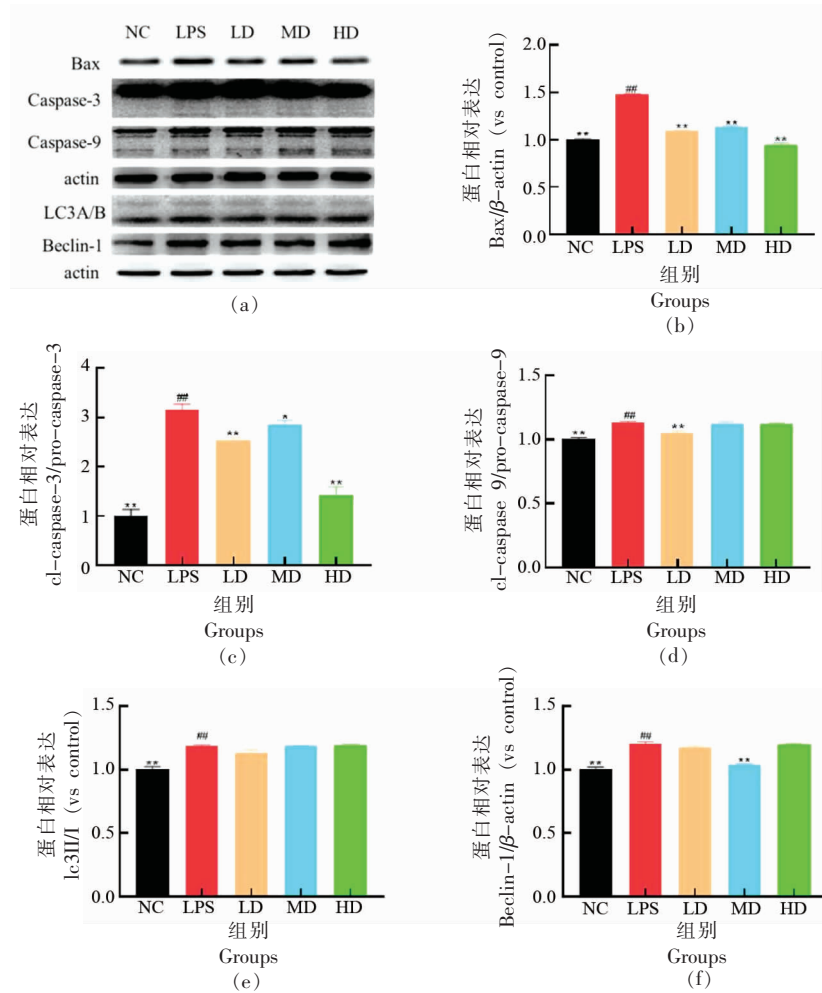
研究采用 western-blot 方法对 IEC-6 中的凋亡相关蛋白进行分析,图 11 结果显示促凋亡蛋白 Bax 在 LPS 组高表达,并且 cl-caspase-3/pro-caspase-3 和 cl-caspase-9/pro-caspase-9 的比值也显著高于 NC 组,LPS 显著下调了 Bax 和 cl-caspase-3/



注:与 LPS 组比较,*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$;与 NC 组比较,#, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$ 。

图 10 细胞迁移试验图

Fig.10 Experimental diagram of cell migration



注:与 LPS 组比较,*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$;与 NC 组比较,#, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$ 。

图 11 PSG-1 干预对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞的凋亡和自噬水平的影响

Fig.11 Effect of PSG-1 intervention on LPS-induced apoptosis and autophagy levels in IEC-6 cells

pro-caspase-3 的表达,LD 组中 cl-caspase-9/pro-caspase-9 的比值也显著低于 LPS 组。此外,本研

究在 LPS 组的 KEGG 分析中也富集到了许多与自噬相关的信号通路,基于此,对自噬相关蛋白

(LC3 和 Beclin-1)进行检测,结果显示 LPS 可提升这 2 种蛋白的表达水平,然而在 PSG-1 干预组中,LC3 和 Beclin-1 蛋白的抑制效果并不显著,这与 PSG-1 组中的 KEGG 分析结果一致。

3 讨论与结论

本研究探讨了 PSG-1 对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞损伤的保护作用,并基于 RNA-seq 测序技术对其潜在的保护机制进行研究。结果表明 PSG-1 对于肠道屏障的完整性具有积极的保护效果。肠道屏障的关键组成部分之一是细胞间的紧密连接,紧密连接是封闭相邻上皮细胞间隙的多蛋白复合物^[14]。肠道紧密连接蛋白,如 Claudins、Occludin 和 ZO 蛋白,对于紧密连接结构的正确组装和调节至关重要^[15]。Claudins 是一个膜蛋白家族,是紧密连接的骨架。它们有助于细胞旁通路的选择渗透性,并调节包括离子和溶质在内的各种分子在肠上皮细胞中的移动^[16]。Occludin 是另一种整体膜蛋白,是紧密连接的关键结构成分。它与 Claudins 和其它紧密连接蛋白相互作用,形成复杂的蛋白-蛋白相互作用网络^[17]。ZO 蛋白(包括 ZO-1、ZO-2 和 ZO-3)是细胞质适配蛋白,可将紧密连接复合物锚定在肌动蛋白细胞骨架上。它们为紧密连接提供结构支持,并负责将跨膜蛋白(如 Claudins 和 Occludin)与肌动蛋白细胞骨架连接起来^[18]。许航等^[19]研究发现 LPS 破坏了 IEC-6 细胞中紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 的表达,而维生素 D 受体预处理能显著维持 Occludin 和 Claudin-1 的表达,这与本研究中观察到的 PSG-1 提升肠道紧密连接蛋白的表达结果是一致的。

此外,Hu 等^[20]在构建的 LPS 诱导 RAW364.7 细胞损伤模型中,观察到环氧化酶 *cox-2* 的特异性高表达。*cox-2* 是一种催化花生四烯酸转化为前列腺素的酶,而前列腺素是炎症和免疫反应的重要脂质介质^[21]。接触到 LPS 后,巨噬细胞和单核细胞等免疫细胞会产生并释放 *cox-2*,导致前列腺素合成增加。*cox-2* 的这种上调和随后的前列腺素生产促成了 LPS 诱导的炎症级联反应^[22]。本研究中观察到了与 Hu 等^[20]研究类似的结果,LPS 引发了 *cox-2* 的特异性高表达,这提示 IEC-6 细胞的高炎症损伤水平,而 PSG-1 组中 *cox-2* 的表达远低于

于 LPS 组,特别是 LD 组,其表达量最低,这有利于细胞正常功能的行使。

转录组测序结果提示了一些潜在的 PSG-1 保护作用途径,这包括细胞迁移和细胞凋亡。本研究中 LPS 降低了 IEC-6 细胞的迁移能力,而细胞迁移能力是肠道上皮细胞 (IECs) 的一个关键特征,它使肠上皮得以不断更新,当 IECs 从隐窝向绒毛顶端迁移时,它们会经历分化和成熟,最终脱落到肠腔中^[23]。这一迁移过程由各种信号通路和细胞黏附分子介导,确保了肠上皮的不断补充,有助于维持肠道屏障的完整性和功能性,这与本研究中观察到的肠道紧密连接蛋白的变化是一致的^[24]。而 PSG-1 组中的划痕宽度显著减少,表明这种损伤在 PSG-1 干预后得到了有效改善,这表明 PSG-1 可有效提升 IEC-6 细胞的迁移能力。

凋亡在肠道发育和肠上皮细胞群的维持中起着至关重要的作用。在成人肠道中,细胞凋亡以可控的方式发生,这促进了肠上皮细胞的更替^[25]。这种更替对于清除受损或衰老细胞至关重要,并受到促凋亡因子和抗凋亡因子之间平衡的严格调节^[26]。Meng 等^[27]的研究表明 LPS 可诱导牛乳腺上皮细胞 BMEC 凋亡,并增加小鼠肺组织中促凋亡蛋白 Bax 的表达;Yu 等^[28]的研究也证实 LPS 会引发 IEC-6 特异性凋亡,并伴随着细胞周期蛋白表达的变化。本研究中 LPS 组中促凋亡蛋白的表达水平远高于 NC 组,这表明 LPS 诱导了 IEC-6 细胞的过度凋亡。此外,细胞凋亡失调会破坏细胞死亡和再生之间的平衡,损害健康 IEC 的更新,加剧肠道上皮损伤^[29]。有研究报道凋亡的 IEC 会表现出膜通透性改变和细胞-细胞连接间的紊乱,导致上皮屏障完整性受损。这种屏障功能障碍会进一步增加管腔内容物(包括病原体和抗原)的细胞旁渗漏,引发炎症反应,导致肠道炎症^[30-31]。PSG-1 表现出显著的凋亡蛋白调控能力,对于 3 种蛋白的表达水平具有优异的抑制效果,有效地改善了细胞内凋亡水平,这表明凋亡信号途径可能是 PSG-1 发挥抗炎效应的关键通路。

综上所述,本研究证实 PSG-1 对 LPS 造成的 IEC-6 肠上皮细胞损伤具有显著的改善效果,这表现在细胞活力和肠道紧密连接蛋白 (ZO-1、Claudin-1 和 Occludin) 分泌的提升和 *cox-2* 蛋白

表达的抑制上。基于转录组测序分析和划痕试验以及蛋白免疫印迹试验,提示 PSG-1 可能对 IEC-6 细胞中的部分基因产生干扰调控或二次调控,其中细胞迁移能力和细胞凋亡途径可能是 PSG-1 发挥其保护效应的关键通路。本研究的结果可为进一步理解 PSG-1 的肠道健康效应提供新的试验证据,并为促进黑灵芝高附加值产品的开发提供依据。

参 考 文 献

- [1] FAN J, YANG Y, MA C M, et al. The effects and cell barrier mechanism of main dietary nutrients on intestinal barrier[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2022, 48: 100942.
- [2] SPALINGER M R, SAYOC-BECERRA A, SANTOS A N, et al. PTPN2 regulates interactions between macrophages and intestinal epithelial cells to promote intestinal barrier function[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(5): 1763-1777.
- [3] SHIMIZU M. Multifunctions of dietary polyphenols in the regulation of intestinal inflammation[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017, 25(1): 93-99.
- [4] BLANDER J M. Death in the intestinal epithelium—basic biology and implications for inflammatory bowel disease[J]. *FEBS Journal*, 2016, 283(14): 2720-2730.
- [5] LEE H B, KIM Y S, PARK H Y. Pectic polysaccharides: Targeting gut microbiota in obesity and intestinal health[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 287: 119363.
- [6] FERNANDES P A R, COIMBRA M A. The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 314: 120965.
- [7] ZHANG Y X, DAI L, KONG X W, et al. Characterization and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(3): 259-265.
- [8] LI J, WANG Y F, SHEN Z C, et al. Recent developments on natural polysaccharides as potential anti-gastric cancer substance: Structural feature and bioactivity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 232: 123390.
- [9] ZHENG B, ZHOU X T, HU X B, et al. Advances in the regulation of natural polysaccharides on human health: The role of apoptosis/autophagy pathway[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(19): 3931-3942.
- [10] XU L, HE D, ZHANG C L, et al. The regulate function of polysaccharides and oligosaccharides that with sulfate group on immune-related disease[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 88: 104870.
- [11] ZHANG H, LI W J, NIE S P, et al. Structural characterisation of a novel bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(3): 1047-1054.
- [12] ZHENG B, YING M X, XIE J H, et al. A *Ganoderma atrum* polysaccharide alleviated DSS-induced ulcerative colitis by protecting the apoptosis/autophagy-regulated physical barrier and the DC-related immune barrier[J]. *Food & Function*, 2020, 11(12): 10690-10699.
- [13] YING M X, ZHENG B, YU Q, et al. *Ganoderma atrum* polysaccharide ameliorates intestinal mucosal dysfunction associated with autophagy in immunosuppressed mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 138: 111244.
- [14] DING X M, HU X Y, CHEN Y, et al. Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 107: 455-465.
- [15] ISAYAMA K, RINI D M, YAMAMOTO Y, et al. Propionate regulates tight junction barrier by increasing endothelial-cell selective adhesion molecule in human intestinal Caco-2 cells[J]. *Experimental Cell Research*, 2023, 425(2): 113528.
- [16] GUNZEL D, FROMM M. Claudins and other tight junction proteins[J]. *Comprehensive Physiology*, 2012, 2(3): 1819-1852.
- [17] FELDMAN G J, MULLIN J M, RYAN M P. Occludin: Structure, function and regulation[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(6): 883-917.
- [18] HARTMANN C, SCHWIETZER Y A, OTANI T, et al. Physiological functions of junctional adhesion molecules (JAMs) in tight junctions[J]. *Biochimica et*

- Biophysica Acta - Biomembranes, 2020, 1862 (9): 183299.
- [19] 许航, 王海久, 姚丹华, 等. 维生素 D 受体对 LPS 诱导的大鼠小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 炎症模型的保护机制[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2019, 40 (2): 94-98.
- XU H, WANG H J, YAO D H, et al. Protective mechanisms of vitamin D receptor on the LPS-induced inflammatory model in rat intestinal crypt epithelial cells IEC-6[J]. Chinese Journal of Plateau Medicine and Biology, 2019, 40(2): 94-98.
- [20] HU X Y, YU Q, HOU K Y, et al. Regulatory effects of *Ganoderma atrum* polysaccharides on LPS-induced inflammatory macrophages model and intestinal-like Caco-2/macrophages co-culture inflammation model [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 140: 111321.
- [21] INOUE H, TANABE T. Transcriptional role of the nuclear factor kappa B site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 244(1): 143-148.
- [22] PIRKER T, PFERSCHY-WENZIG E M, BAMPALI E, et al. Glycolipid-enriched fraction of inhibits LPS-induced expression of inflammatory genes, COX-2, E-selectin, and Interleukin-8[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 309: 116328.
- [23] ZHANG D, ZHU Y P, LI Z J, et al. The role of *Astragalus* polysaccharides in promoting IEC-6 cell migration from polyamine-mediated Ca regulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 207: 179-192.
- [24] ZHANG D L, JIANG L, WANG M L, et al. Berberine inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction in colon caused by peritoneal dialysis fluid by improving cell migration[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 264: 113206.
- [25] GUNTHER C, NEUMANN H, NEURATH M F, et al. Apoptosis, necrosis and necroptosis: Cell death regulation in the intestinal epithelium[J]. Gut, 2013, 62(7): 1062-1071.
- [26] ZHU L J, YU T, YANG L, et al. Polysaccharide from *Cordyceps cicadae* inhibit mitochondrial apoptosis to ameliorate drug-induced kidney injury Bax/Bcl-2/Caspase-3 pathway[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 97: 105244.
- [27] MENG M J, HUO R, WANG Y, et al. Lentinan inhibits oxidative stress and alleviates LPS-induced inflammation and apoptosis of BMECs by activating the Nrf2 signaling pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222: 2375-2391.
- [28] YU C, WANG D, LI Q, et al. Trans-anethole ameliorates LPS-induced inflammation via suppression of TLR4/NF- κ B pathway in IEC-6 cells[J]. International Immunopharmacology, 2022, 108: 108872.
- [29] ZHANG J, CEN L, ZHANG X F, et al. MPST deficiency promotes intestinal epithelial cell apoptosis and aggravates inflammatory bowel disease via AKT [J]. Redox Biology, 2022, 56: 102469.
- [30] HAN H R, HE N A, PAN E Z, et al. Disruption of the intestinal barrier by avermectin in carp involves oxidative stress and apoptosis and leads to intestinal inflammation[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2023, 195: 105531.
- [31] LI T, WANG Y X, FANG Y, et al. Longjing green tea (*Camellia sinensis*) extract dose-dependently influences intestinal barrier and liver inflammation in autoimmune hepatitis[J]. Journal of Functional Foods, 2023, 107: 105623.

Protective Effect of *Ganoderma atrum* Polysaccharide on Lipopolysaccharide-induced Damage in Intestinal Epithelial Cell IEC-6

Zheng Bing, Hu Xiaobo, Chen Yi, Xie Jianhua, Yu Qiang*

(State Key Laboratory of Food Science and Resources, China-Canada Joint Lab of Food Science and Technology (Nanchang), Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract Objective: To investigate the protective effect of *Ganoderma atrum* polysaccharide (PSG-1) against lipopolysaccharide (LPS)-induced damage in intestinal epithelial cell (IEC-6) and its underlying mechanisms. Methods:

The intervention effects of PSG-1 on IEC-6 cells were investigated using a LPS-induced intestinal epithelial cell IEC-6 injury model, and the effect of PSG-1 intervention on cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Western blot technology was employed to investigate the alterations in the expression of intestinal tight junction proteins and cyclooxygenase-2 (cox-2) in the cells. Transcriptome sequencing analysis was conducted to explore the potential protective mechanisms of PSG-1, followed by experimental validation. Results: Intervention with PSG-1 significantly enhanced cell viability and the expression of intestinal barrier proteins, including ZO-1, Claudin-1, and Occludin. Moreover, PSG-1 exhibited an inhibitory effect on the abnormal upregulation of cox-2 induced by LPS. Transcriptome sequencing analysis, scratch assay, and western blot experiments validation demonstrated that PSG-1 significantly enhanced cell migration ability while suppressing the expression of pro-apoptotic proteins, including Bax, Caspase-3, and Caspase-9. Conclusion: PSG-1 exhibited significant improvement in LPS-induced damage in IEC-6 cell. Cell migration and apoptosis might be key mechanisms through which PSG-1 exerted its protective effects.

Keywords *Ganoderma atrum* polysaccharide; lipopolysaccharide; intestinal epithelial cells (IEC-6); cell migration; apoptosis