

母乳低聚糖对 Caco-2 肠上皮细胞屏障功能的影响

蔡然¹, 李红叶¹, 郑雨星², 陈桔淳², 刘斐童², 张斌^{1*}

¹华南理工大学食品科学与工程学院 广州 510640

²健合集团中国创新与研究中心 广州 510700)

摘要 母乳低聚糖(HMOs)是母乳中的关键活性成分,具有调节肠道菌群,保护肠道屏障完整性和调节免疫等重要的生理功能。本研究构建 Caco-2 细胞肠上皮屏障及炎症损伤模型,用 2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL)、3'-唾液酸乳糖(3'-SL)和乳糖-N-新四糖(LNnT)3 种分别代表中性岩藻糖基化、唾液酸化和中性非岩藻糖基化的 HMO 进行干预。通过测定细胞跨膜电阻值表征肠屏障完整性,采用酶联免疫吸附法测定炎症因子的分泌水平,以及实时荧光定量 PCR 技术分析紧密连接和炎症相关基因的表达水平,旨在探究 HMO 对肠屏障功能的保护作用及其调控机制。结果表明,与阴性对照组相比,3 种 HMO 均能浓度依赖性地提高跨膜电阻值,降低 IL-6 和 IL-8 的基因表达水平和分泌量,其中 10 mg/mL 的 3'-SL 干预可使其降低至空白组水平;抑制 *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*COX-2* 和 *iNOS* 的基因表达,其中 10 mg/mL 的 HMO 干预组基因表达水平最低。在高质量浓度的 HMO 干预下 *Claudin-1*、*Claudin-3*、*ZO-1*、*ZO-2* 和 *Occludin* 的基因表达水平上调 4 倍,并抑制 NF- κ B 信号通路的激活但该作用未表现出浓度依赖性。3 种 HMO 在高质量浓度下(2.4 mg/mL 和 10 mg/mL)能发挥显著的肠屏障保护作用 and 抗炎活性,研究结果为 HMO 增强肠屏障功能和免疫调节功能的应用提供科学证据。

关键词 母乳低聚糖; 肠屏障功能; 抗炎作用; NF- κ B 信号通路; Caco-2 肠上皮细胞

文章编号 1009-7848(2025)02-0027-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.003

母乳是新生儿营养的“黄金标准”,世界卫生组织建议婴儿出生后的 6 个月应用纯母乳喂养。母乳含有多种营养物质和活性成分,是支持婴儿营养最理想的食物来源^[1-2]。母乳低聚糖(Human milk oligosaccharides, HMOs)是由 200 多种低聚糖组成的结构复杂的混合物,是母乳中含量仅次于乳糖和脂肪的第 3 大营养成分。大量动物实验和临床研究证实 HMO 在生命早期的生长发育中发挥关键作用,具有促进肠道健康、免疫系统成熟、大脑认知发育等重要生理功能^[3-4]。目前,HMO 已在美国、欧盟、中国等多个国家和地区获批上市,并被广泛应用于婴幼儿配方奶粉、膳食补充剂、特殊医疗用途配方食品等,具有重要的研究价值和应用前景。

肠道是人体最大的免疫器官,可形成天然的保护屏障维持机体健康稳态,肠道屏障由化学屏障、生物屏障、物理屏障和免疫屏障 4 部分组成,

任意一部分屏障完整性受到破坏都有可能扰乱肠道稳态,从而引发肠道乃至全身的疾病^[5]。婴儿肠道的免疫系统尚未成熟,容易受到外界刺激引发肠屏障的破坏,导致肠道炎症、感染和过敏的发生^[6]。母乳中的免疫活性成分可以弥补婴儿免疫功能的缺陷,保护肠道免受病原体侵害,其中 HMO 发挥着重要的作用^[7-8]。HMO 不会被上消化道消化和吸收,能完整地到达结肠发挥益生元功能,发挥抵抗肠道病原菌黏附、调节肠道免疫、增强肠屏障功能,从而促进婴儿肠道健康。有研究表明,2'-FL、3'-SL 或 HMO 混合物可使肠道通透性显著降低,细胞黏膜蛋白表达增加,致病菌黏附减少,改善肠道屏障功能^[9-10]。另一些研究则发现,HMO 可以直接作用细胞,调节免疫反应,改变白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、IL-8 和人肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子的表达,发挥抗炎作用^[11-12]。

目前有许多研究关注 HMO 在肠道屏障和免疫调节功能方面的影响,而 HMO 对肠屏障功能的影响未被全面揭示。譬如,不同浓度的中性岩藻糖基化、唾液酸化和中性非岩藻糖基化 HMO 对肠上皮细胞屏障功能和炎症反应的影响和作用机制还

收稿日期: 2024-02-16

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2024A1515011121);
广东省科技计划项目(2023A0505050156)

第一作者: 蔡然,女,硕士生

通信作者: 张斌 E-mail: zhangb@scut.edu.cn

有待进一步研究。本研究选取 2'-FL、3'-SL 和 LNnT 3 种代表性 HMO,用 Caco-2 细胞构建体外肠屏障及其炎症损伤模型,以低聚半乳糖(Galactooligosaccharides, GOS) 和低聚果糖(Fructooligosaccharides, FOS)为阳性对照,研究不同浓度的 3 种 HMO 对肠上皮细胞屏障完整性、紧密连接蛋白和相关炎症介质表达的影响。通过检测细胞内 NF- κ B 信号通路探究其分子机制。本文旨在挖掘 HMO 促进婴儿肠道健康的理论依据,为婴幼儿食品配方设计为提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器、设备

2'-FL (纯度 97.2%)、3'-SL (纯度 92.2%)、LNnT (纯度 97.9%), 丹麦 Glycom A/S 公司; FOS (纯度 >95%), 日本 Meiji 公司; GOS (纯度 71.1%), 荷兰 FrieslandCampina 公司; RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素溶液(100 \times)、非必需氨基酸胰蛋白酶-EDTA, 美国 Gibco 公司; 无核酸酶水、磷酸缓冲盐(PBS), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 重组人 TNF- α 、重组人白 IL-1 β 、重组人干扰素- γ (IFN- γ), 美国 Pepro Tech 公司; 24 孔 Transwell 悬挂式细胞培养皿(3470), 美国 Corning 公司; CCK-8 试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 人 IL-6 酶联免疫吸附检测 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、人 IL-8 ELISA 试剂盒、EZ-10 总 RNA 提取试剂盒、MightyScript 第一链 cDNA 合成试剂盒, 上海生工生物工程有限公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; Caco-2 细胞(YB-ATCC-4672, 代数为 37~40 代), 美国 ATCC 公司。其它化学试剂均为国产分析纯级。

CB170 二氧化碳培养箱, 德国 Binder 公司; Airstream A2 生物安全柜, 新加坡 ESCO 公司; ERS-2 细胞电阻仪, 美国 Millipore 公司; NanoDrop 2000C 超微紫外分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司; C1000 Touch 梯度 PCR 仪、CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪, 1575 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; LMC-3000 离心机, 英国 Grant 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 Caco-2 细胞于 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS、1%青霉素-链霉素和 1%非必需氨基酸)中培养,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。待细胞融合度达到 70%~90%时进行传代。重复传代 2 次以上,直至细胞生长状态良好用于后续试验。

1.2.2 不同质量浓度母乳低聚糖对细胞的毒性测试 按照 CCK-8 试剂盒说明书进行细胞毒性测试,具体如下:将 Caco-2 细胞以 5 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中培养 24 h,吸去培养液后分别加入 100 μ L 含有相应质量浓度 HMO 的培养基(每种 HMO 的质量浓度均设置为 0.1, 1.0, 2.4, 10 mg/mL 共 4 个梯度), 孵育 24 h 后加入 100 μ L 已稀释的 CCK-8 试剂,继续孵育 1.5 h,最后用酶标仪测定在波长 450 nm 处的吸光值,由式(1)计算细胞活力。每个质量浓度设置 6 个复孔。

$$\text{细胞活力}(\%) = (\text{OD}_{\text{干预}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100 \quad (1)$$

式中:OD_{干预}为干预组吸光值;OD_{对照}为正常组吸光值;OD_{空白}为培养基组吸光值。

1.2.3 体外肠上皮细胞屏障模型建立 参考 Šuligoj 等^[13]的方法用 Caco-2 细胞构建体外肠上皮细胞屏障模型。将 Caco-2 细胞以 3.3 \times 10⁴ 个/孔的密度接种于 24 孔 Transwell 悬挂式细胞培养皿的小室中,培养 20~21 d,前 7 d 隔天更换滤膜顶侧和基底侧的培养基,7 d 后每天换液。细胞培养期间用细胞电阻仪监测并记录电阻值,由式(2)计算单层细胞的跨膜电阻 (Trans-epithelium electrical resistant, TEER)值。TEER 是细胞单层离子流电阻信息,反映细胞间的紧密连接完整性。当 TEER 值达到 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$,表明 Caco-2 细胞已完全分化形成致密单层^[14]。

$$\text{TEER}(\Omega \cdot \text{cm}^2) = (A - A_0) \times S \quad (2)$$

式中:A 为实测电阻值, Ω ;A₀为空白电阻值, Ω ;S 为小室滤膜面积, cm^2 。

1.2.4 肠上皮细胞屏障损伤模型建立 根据 1.2.3 节的方法建立正常的肠上皮细胞屏障模型后,用含 1% FBS 的 RPMI 1640 培养基对细胞进行饥饿处理 24 h。在 Transwell 小室下侧加入混合

促炎因子 (10 ng/mL IL-1 β +20 ng/mL TNF- α +20 ng/mL IFN- γ) 刺激细胞并诱导肠上皮屏障炎症损伤^[15],在 0~60 h 期间监测 Caco-2 细胞单层 TEER 值的变化情况,以测定细胞屏障的完整程度。根据 TEER 值下降的程度确定混合促炎因子的刺激时间,TEER 值变化率计算见式(3)。以未用混合促炎因子处理的细胞为空白对照组。

$$\text{TEER}(\%) = \text{TEER 处理组} / \text{TEER 对照组} \times 100 \quad (3)$$

式中:TEER 处理组为混合促炎因子刺激的细胞跨膜电阻值, $\Omega \cdot \text{cm}^2$;TEER 对照组为无刺激物的细胞跨膜电阻值, $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 。

1.2.5 母乳低聚糖干预炎症损伤肠上皮细胞屏障

根据 1.2.2 节和 1.2.4 节的方法确定 HMO 的干预质量浓度和混合促炎因子刺激的最佳时间。在 Transwell 小室基底侧加入混合促炎因子 (10 ng/mL IL-1 β +20 ng/mL TNF- α +20 ng/mL IFN- γ),使细胞暴露于炎症刺激环境中,小室上侧分别用含有不同质量浓度(0,0.1,1.0,2.4,10 mg/mL)2'-FL、3'-SL、LNnT 和 FOS、GOS 的培养液干预细胞。同时设置仅有促炎因子刺激而无低聚糖干预的阴性对照组,和仅有培养基而无促炎因子刺激和低聚糖干预的空白对照组。干预 60 h 后立即测

定电阻值并计算 TEER 值变化率,收集顶侧细胞的上清液,储存于-80 °C 冰箱待用,裂解细胞提取 RNA。所有组别设置 3 个平行。

1.2.6 细胞炎症因子分泌量的测定 使用 ELISA 试剂盒按照说明书的方法,分别对细胞培养上清液中分泌的炎症因子 IL-6 和 IL-8 进行定量分析。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 测定基因表达水平 使用 EZ-10 总 RNA 提取试剂盒提取 Caco-2 细胞中的 RNA,并用超微紫外分光光度计测定 RNA 浓度,然后使用逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,反应条件为:25 °C 5 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min。用 Real-Time PCR 仪进行荧光定量分析,采用 20 μL 反应体系:2 \times ChamQ Universal SYBR qPCRMaster Mix 10 μL 、正向引物和反向引物各 0.4 μL 、2 μL cDNA 模板、7.2 μL 无核酸酶水。反应条件为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,设置循环数为 40。qPCR 引物序列如表 1 所示,每个样本 3 个平行。以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算目的基因的相对表达水平, ΔCt 为目的基因的 Ct 值减去内参基因平均 Ct 值, $\Delta\Delta\text{Ct}$ 为样本的 ΔCt 减去阴性对照组的 ΔCt 。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
GAPDH	ATTGCCGACAGGATGCAGAA	GCTGATCCACATCTGCTGGA
TNF- α	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
IL-6	AGTCCTGATCCAGTTCCTGC	AAGCTGCGCAGAATGAGATG
IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGT	TCCTTGGCAAAACTGCACCT
IL-1 β	TGAGCACCTTCTTTCCTTC	GTCATTACTTTCTTCTCCTTGATC
COX-2	GCCTTCTCTAACCTCTCC	CTGATGCGTGAAGTGC
iNOS	CCTTACGAGGCGAAGAAGGACAG	CAGTTTGAGAGAGGAGGCTCCG
ZO-1	ATCCCTCAAGGAGCCATTC	CACTTGTTTTGCCAGGTTTTTA
ZO-2	AAAGCAGAGCGAACGAAGAG	TTTAGTTGCCAGACCCGTTTC
Claudin-1	AAGTGCTTGAAGACGATGA	CTTGGTGTTGGGTAAGAGGTT
Claudin-3	AAGGTGTACGACTCGCTGCT	GAAGTCCCGGATAATGGTGT
Occludin	CCAATGTCGAGGAGTGGG	CGCTGCTGTAACGAGGCT
MyD88	TCCTCCACATCCTCCCTTCC	TCCGCACGTTCAAGAACAGA
I κ B- α	CTCCGAGACTTTCGAGGAAATAC	GCCATGTAGTTGGTAGCCTTCA
NF κ B p65	TGCCGAGTGAACCGAAAC	TGGAGACACGCACAGGAG

1.2.8 数据处理与统计分析 试验数据均以平均值±标准差表示。使用 IBM SPSS Statistics 25.0 版本对试验数据进行统计学分析,并用 Graphpad Prism 8.0 版进行绘图分析。采用单因素方差分析和 Turkey 多重比较进行数据的显著性差异分析,其中不同字母(a, b, c, d)或(*. $P<0.05$, **. $P<0.01$, ***. $P<0.001$)表示数据之间具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度母乳低聚糖对细胞活性的影响

为确定在 Caco-2 细胞肠屏障模型中 HMO 的干预浓度,通过 CCK-8 试验探究了不同值浓度的 3 种 HMO 对 Caco-2 细胞毒性作用。根据目前美国和欧盟市场监管规定^[16-17],商业化婴幼儿配方食品中 2'-FL 的最大使用量分别为 2.4 g/L 和 1.2 g/L, LNnT 的最大使用量为 0.6 g/L,设置 0.1, 1.0, 2.4 mg/mL 3 个质量浓度干预组,此外还设置了 10 mg/mL 为高剂量组以探究是否存在剂量效应。结果如表 2 所示,与空白对照组(0 mg/mL)相比,所有质量浓度(0.1~10 mg/mL)的 2'-FL、3'-SL 和 LNnT 干预后,Caco-2 细胞活性均未降低。因此,3 种 HMO 在试验质量浓度范围内对 Caco-2 细胞不具有毒性作用,可以用于后续的干预试验。

2.2 肠上皮细胞屏障损伤模型建立

IL-1 β 、TNF- α 和 IFN- γ 是炎症细胞因子,可由多种类型的细胞分泌,如巨噬细胞、中心粒细胞和上皮细胞,在炎症的急性期参与多种免疫反应^[18]。这 3 种细胞因子体外作用肠上皮细胞会激活细胞内的级联反应,导致 IL-6、IL-8、一氧化氮(NO)和前列腺素 E₂(PGE₂)的转录活性增加,并通过破坏紧密连接增加细胞旁通透性^[15]。因此,为探究不同质量浓度 HMO 的修复肠屏障功能和抗炎作用,本研究用促炎细胞因子混合物(10 ng/mL IL-1 β +20 ng/mL TNF- α +20 ng/mL IFN- γ)刺激肠上皮细胞以构建肠屏障炎症性损伤模型。

将培养至 20~21 d 分化完全的 Caco-2 细胞暴露于混合促炎因子 60 h,每隔 12 h 测定一次 TEER 值以表征细胞单层的完整性。结果如图 1 所示,促炎因子刺激 12~36 h 细胞 TEER 值没有显

表 2 不同质量浓度的 HMO 对 Caco-2 细胞活性的影响
Table 2 Effects of HMO with different mass concentrations on the cell viability of Caco-2 cells

样品	质量浓度/(mg/mL)	细胞活性/%
空白对照组	0.0	100.21 ± 0.06 ^b
2'-FL	0.1	102.19 ± 0.03 ^b
	1.0	102.06 ± 0.10 ^b
	2.4	111.10 ± 0.14 ^a
	10.0	106.71 ± 0.13 ^{ab}
3'-SL	0.1	102.33 ± 0.04 ^a
	1.0	103.43 ± 0.08 ^a
	2.4	104.11 ± 0.14 ^a
	10.0	105.89 ± 0.10 ^a
LNnT	0.1	103.42 ± 0.02 ^b
	1.0	118.50 ± 0.19 ^a
	2.4	105.70 ± 0.03 ^{ab}
	10.0	114.39 ± 0.15 ^a

注:不同小写字母表示样品与空白对照之间具有显著性差异, $P<0.05$ 。

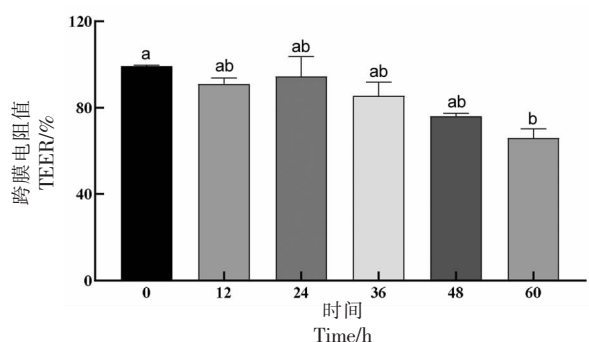
著降低,刺激 60 h 后 TEER 值显著降低至空白对照组的 70%以下($P<0.05$),此时细胞单层受损,肠上皮屏障的完整性被破坏。因此,以混合促炎因子持续刺激细胞 60 h 可构建肠屏障炎症损伤模型。

2.3 母乳低聚糖对炎症损伤肠屏障完整性的影响

为探究不同 HMO 对受损肠屏障的保护作用,将 Caco-2 细胞和 HMO 在炎症刺激下共同孵育 60 h 后,测定 TEER 值的变化情况。

如图 2 所示,用 2'-FL、3'-SL 和 LNnT 干预肠上皮细胞屏障后,细胞单层的 TEER 值相较于阴性对照组均出现一定程度的升高,其中所有质量浓度(0.1~10 mg/mL)的 2'-FL 和 LNnT 均能显著提高 TEER 值,尤其是较高质量浓度(1~10 mg/mL)的 LNnT 可以使 TEER 值恢复至空白对照组水平,且表现出一定的质量浓度依赖性。3'-SL 仅在高质量浓度时(2.4~10 mg/mL)有显著提高效果。与 HMO 不同的是,所有质量浓度(0.1~10 mg/mL)的 FOS 和 GOS 都不能提高炎症损伤肠上皮细胞的 TEER 值。结果表明,HMO 能在一定程度上恢复肠屏障完整性,降低细胞旁通透性,并且 HMO 质量浓度越高缓解肠屏障损伤的效果越好。Natividad 等^[19]构建了体外肠屏障细胞模型(Caco-

2 细胞:HT29-MTX 细胞=76:24), 探究 2'-FL、LNT、LNnT、3'-SL 和 6'-SL 的不同组合对 TNF- α (2.5 ng/mL) 和 IFN- γ (10 ng/mL) 诱导的炎症损伤肠屏障通透性和完整性的影响。该研究发现 5 种



注:不同小写字母表示数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

图 1 Caco-2 细胞的 TEER 值随混合促炎因子刺激时间的变化

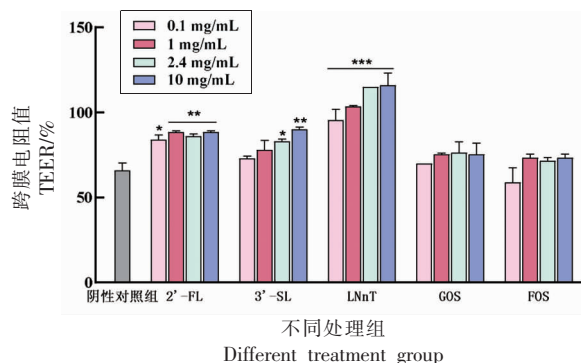
Fig.1 Changes in TEER value of Caco-2 cell monolayers over time under the stimulation of pro-inflammatory factors

2.4 母乳低聚糖影响受损细胞紧密连接蛋白的基因表达

紧密连接是肠上皮屏障中的重要结构, 对肠道通透性具有关键影响^[20]。研究表明, 细胞因子等刺激不仅影响紧密连接蛋白的表达, 还影响其与细胞骨架重排或细胞旁通透性的关联^[21]。为深入探究 HMO 对肠屏障功能的影响及其缓解肠道炎症的机制, 本研究对 HMO 干预后 Caco-2 细胞中多种紧密连接蛋白的基因表达水平进行分析。

结果如图 3 所示, 与空白对照组相比, 混合促炎因子持续刺激 60 h 后, Caco-2 细胞紧密连接蛋白 *Claudin-1*、*Claudin-3*、*ZO-1*、*ZO-2* 和 *Occludin* 的基因相对表达水平降低, 其中 *ZO-1* 的水平降低显著。相比阴性对照组, 一定质量浓度的 HMO 干预提高了这些紧密连接蛋白的基因表达水平即上调其转录活性, 且呈现出一定的质量浓度依赖性。低聚糖的质量浓度越高特别是在高质量浓度时 (10 mg/mL), 紧密连接蛋白的基因表达水平显著上调至阴性对照组的 4 倍, 而 HMO 和 GOS、FOS 在低质量浓度 (0.1 mg/mL) 下都不能调节这 6 种紧密连接蛋白的基因表达。这一结果与 HMO 对 Caco-2 细胞单层跨膜电阻值的影响规律相一致, 由此推测, 2'-FL、3'-SL 和 LNnT 3 种 HMO 在一

HMO 的混合物能以质量浓度依赖的方式提高 TEER 值, 这与本研究中 3 种 HMO 单体能质量浓度依赖性地提高 Caco-2 细胞 TEER 值的结果相似。



注:与阴性对照组相比, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ 。

图 2 不同低聚糖影响细胞 TEER 值

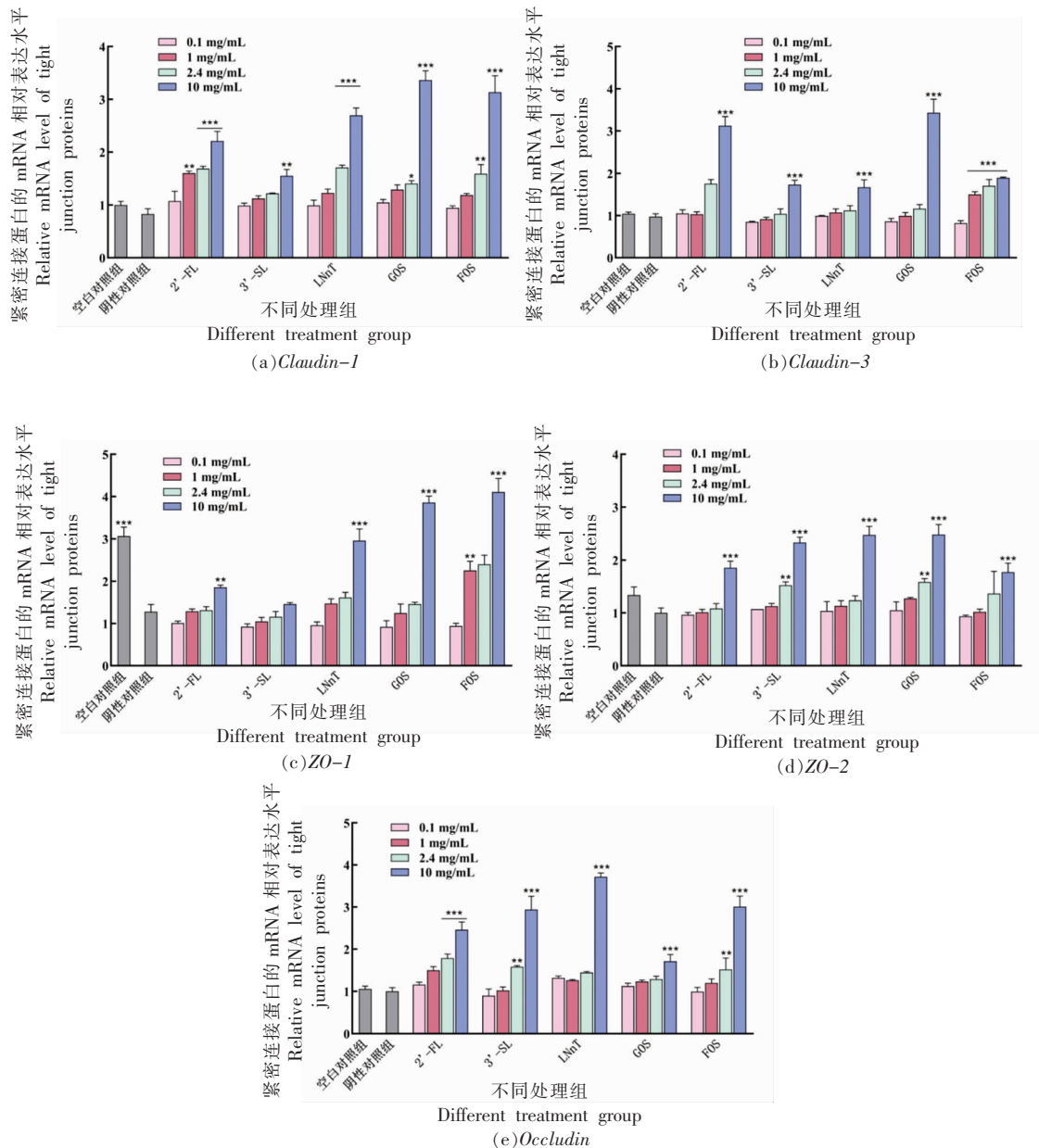
Fig.2 Effects of oligosaccharides on TEER in Caco-2 cell monolayers

定质量浓度下能通过促进紧密连接蛋白的表达来增加肠上皮屏障的紧密度和完整性, 从而发挥保护肠道屏障作用。Wang 等^[22]在脂多糖诱导小鼠肠炎模型中验证了 GOS 能上调紧密连接蛋白 *Claudin*、*ZO-1* 和 *Occludin* 的基因表达水平, 缓解肠屏障损伤和抑制炎症反应, 与本研究的细胞试验结果相似。

2.5 母乳低聚糖影响受损细胞促炎因子的分泌

IL-6 和 IL-8 是 2 种典型的促炎细胞因子, IL-6 在急性和慢性炎症的发生中起重要作用^[23-24], IL-8 由免疫细胞和肠上皮细胞产生, 能将中性粒细胞聚集到炎症部位并激活^[24], IL-1 β 、TNF- α 和 IFN- γ 在体外刺激肠上皮细胞会促进二者的分泌^[15]。通过 ELISA 法对炎症损伤及不同质量浓度 HMO 干预后的 Caco-2 细胞培养上清液中 IL-6 和 IL-8 的质量浓度进行定量分析, 测定受损肠上皮细胞内及干预后的炎症水平。

结果如图 4a 和 4b 所示, 相比空白对照组, 混合促炎因子刺激后细胞 IL-6 分泌量增加近 42 倍 [(523.84 \pm 12.87)pg/mL], IL-8 的分泌量增加近 4.6 倍 [(528.16 \pm 11.06)pg/mL]。不同质量浓度 2'-FL、3'-SL、LNnT、GOS 和 FOS 干预均能显著减少 IL-6 的分泌量, 并且 2'-FL、3'-SL、LNnT 抑制作用



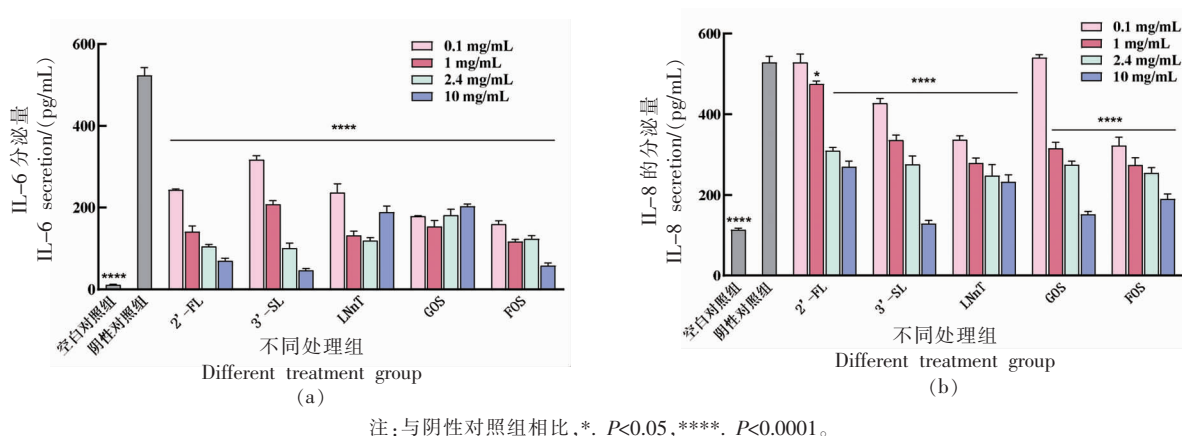
注:与阴性对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图3 不同质量浓度低聚糖影响Caco-2细胞紧密连接蛋白的mRNA相对表达水平

Fig.3 Effects of oligosaccharides with different mass concentrations on the relative mRNA expression levels of tight junction proteins in Caco-2 cells

表现出明显的质量浓度依赖性,其中10 mg/L的3'-SL抑制效果最好,能降低IL-6的分泌量使其接近空白对照组水平。与对IL-6的影响相似,HMO和GOS、FOS也以质量浓度依赖的方式抑制了炎症损伤的肠上皮细胞IL-8的分泌。低质量浓度(0.1 mg/mL)的2'-FL和GOS干预不能减少IL-8的分泌,而3'-SL、LNnT和FOS则可以显著抑制

IL-8的分泌。随着各种低聚糖的质量浓度增加,对IL-8分泌的抑制效果越来越明显,其中10 mg/L的3'-SL抑制效果最好,能将IL-8的分泌恢复至空白对照组水平。在一项随机对照试验中,给婴儿喂食含有2'-FL的配方奶粉,结果发现单独补充2'-FL可以降低血清中炎症因子TNF- α ,IL-1 α ,IL-1 β 和IL-6的水平^[4],该结果与本研究的体外



注:与阴性对照组相比,* $P < 0.05$,**** $P < 0.0001$ 。

图 4 不同质量浓度低聚糖影响 Caco-2 细胞炎症因子 IL-6 和 IL-8 的分泌

Fig.4 Effects of oligosaccharides with different mass concentrations on the cytokines IL-6 and IL-8 secretion of Caco-2 cells

细胞试验中 HMO 干预能降低 IL-6 和 IL-8 分泌水平的结果相一致。

2.6 母乳低聚糖影响受损细胞炎症相关基因的表达

炎症因子异常表达时会影响免疫反应导致炎症性疾病的发生。为测定 Caco-2 细胞受混合促炎因子刺激和不同质量浓度 HMO 干预后的炎症程度,通过 qPCR 分析检测了相关炎症介质 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2 和 iNOS 的表达。

如图 5 所示,与空白对照组相比,混合促炎因子暴露使 Caco-2 细胞内 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2 和 iNOS 的基因高表达,说明刺激了细胞炎症反应的发生。相较于阴性对照组,在不同质量浓度的 HMO 和 GOS、FOS 干预后,促炎因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 的基因表达水平以质量浓度依赖性的方式出现不同程度的下降,且 IL-6 和 IL-8 的基因表达水平下降规律与其分泌量减少的结果相符。在试验质量浓度范围内,10 mg/mL 的 2'-FL、3'-SL、LNnT、GOS 和 FOS 对 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 的基因表达水平下调程度最大,而低质量浓度(0.1 mg/mL)的 GOS 和 FOS 则不能显著降低 IL-1 β 和 TNF- α 的基因表达水平。有研究称,不同 HMO 能通过不同调节作用抑制在炎症急性期介导的细胞因子如 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 的基因表达,同时提高参与组织修复和稳态的细胞因子水平,发挥免疫调节作用^[1],上述试验结果也证实了该结论。Zenhom 等^[25]

的研究也发现了相似的结果,FOS 和 3'-SL 能显著降低炎症因子 IL-8、IL-12、TNF- α 的基因表达水平。

COX-2 和 iNOS 已被证明可以在促炎因子刺激下生成释放,二者分别介导 PGE₂ 和 NO 的合成,其过度表达会导致细胞损伤和通透性增加,在各种肠道炎症性疾病的发病机制中起重要作用^[26-27]。如图 5e 所示,相较于阴性对照组,各低聚糖质量浓度依赖性地抑制了 COX-2 的基因表达,其中所有质量浓度的 2'-FL 对 COX-2 基因表达水平的下调程度最大,而低质量浓度(0.1 mg/mL)的 3'-SL 和 FOS 则不能起到显著抑制 COX-2 基因表达的作用。如图 5f 所示,所有质量浓度的 2'-FL、3'-SL 和 LNnT 干预均降低了 iNOS 的基因表达水平,尤其是 10 mg/mL 的 2'-FL 对 iNOS 基因表达表现出最好的抑制效果。特别地,低质量浓度(0.1~1 mg/mL)的 GOS 和 FOS 未表现出下调 iNOS 基因表达水平的作用。

2.7 母乳低聚糖对受损肠上皮细胞炎症信号通路的影响

为进一步探究不同质量浓度的 3 种 HMO 对肠屏障保护和抗炎作用的潜在机制,调控方式是否存在结构和质量浓度特异性,测定了细胞内 NF- κ B 信号通路中 3 个关键蛋白 MyD88、I κ B- α 和 NF- κ B p65 的基因表达水平。NF- κ B 通路是经典的细胞炎症信号通路,在肠道炎症的发病机制中起着关键作用。MyD88 是细胞内信号转导的分

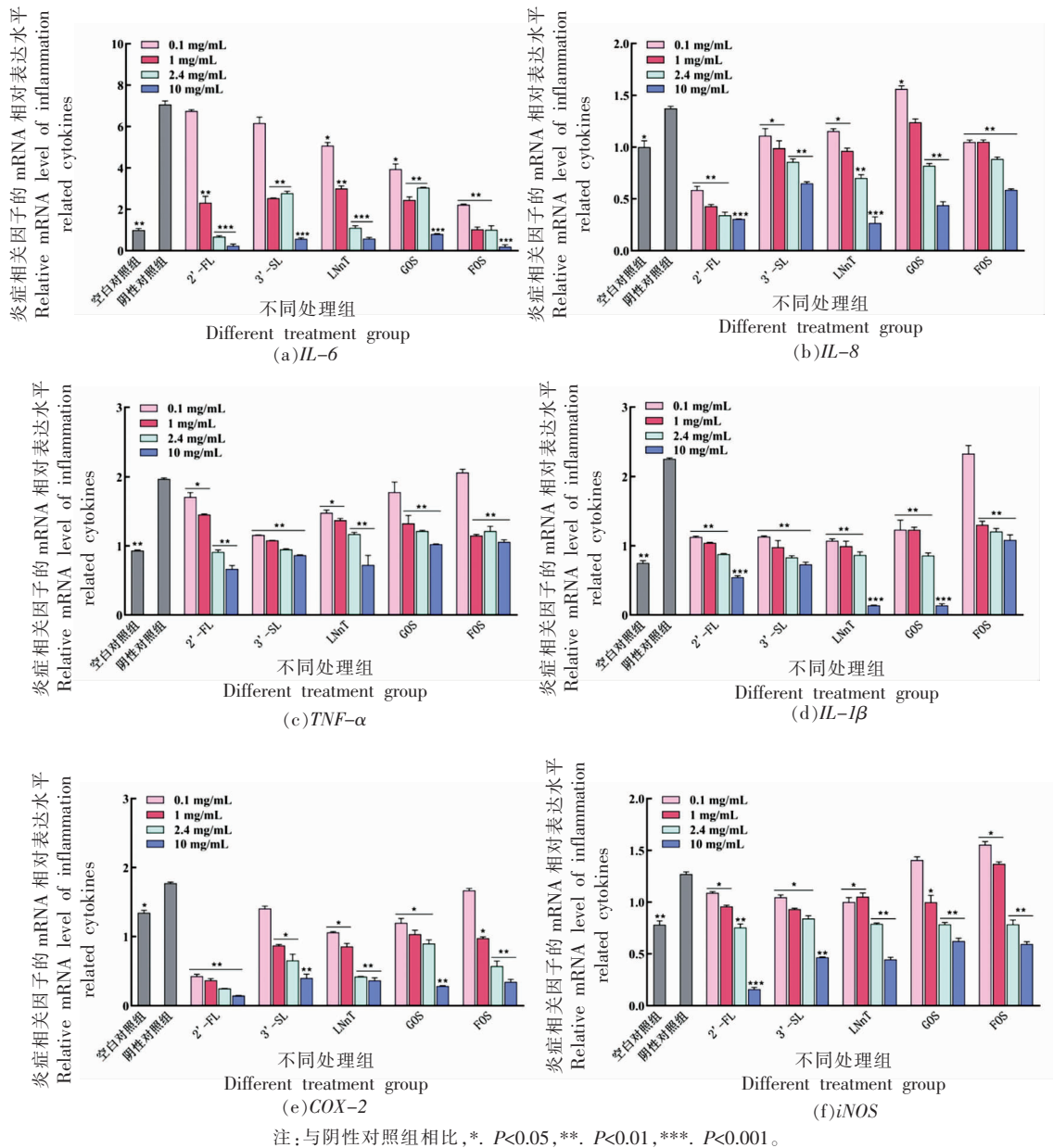


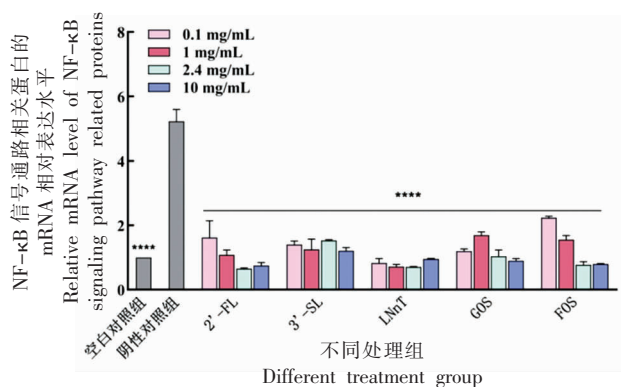
图 5 不同质量浓度低聚糖影响 Caco-2 细胞炎症相关因子的 mRNA 相对表达水平

Fig.5 Effects of oligosaccharides with different mass concentrations on the relative mRNA expression levels of inflammation related cytokines in Caco-2 cells

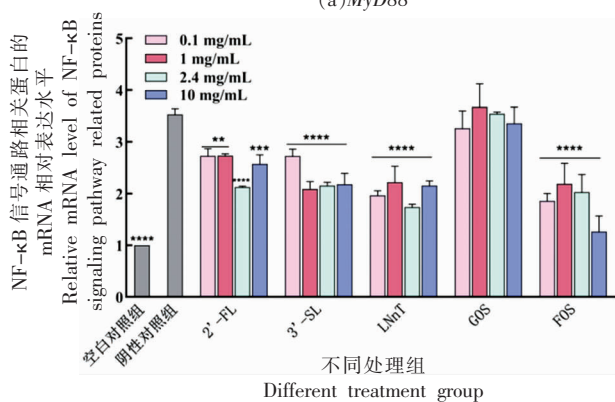
子开关,当 MyD88 在刺激下激活后,通过级联反应调控下游信号因子如抑制蛋白 I κ B 和 NF- κ B 亚基(p50、p65 等)的相关转录,引起免疫应答导致炎症发生^[28]。

结果如图 6 所示,混合促炎因子刺激后,3 种信号因子的基因表达水平显著升高,说明 Caco-2 细胞内 NF- κ B 信号通路被激活,炎症反应发生。相较于阴性对照组,用不同质量浓度的 HMO 干预

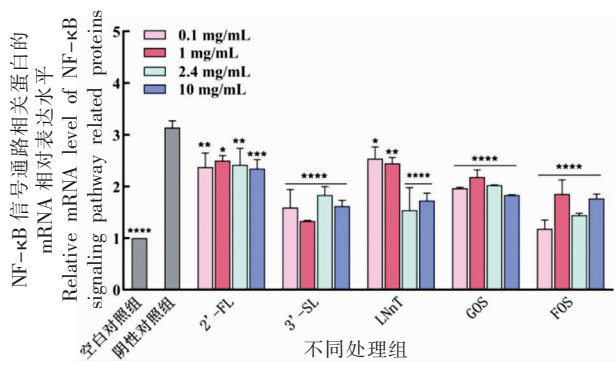
后,所有干预组的 MyD88 基因表达水平均显著下调,而在试验质量浓度范围内并未表现出明显的质量浓度依赖性,不同低聚糖之间也无显著性差异。如图 6b 和 6c 所示,在 2'-FL、3'-SL 和 LNnT 干预下,下游信号分子 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B- α 和亚基 p65 的基因表达水平显著降低,且在高质量浓度时表达水平下调更明显,而不同低聚糖之间则是 3'-SL 和 LNnT 具有相对更好的表达抑制效



(a) MyD88



(b) IκB-α



(c) NF-κB p65

注: 与阴性对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 不同质量浓度低聚糖对 Caco-2 细胞中 NF-κB 信号通路相关蛋白 mRNA 相对表达水平的影响

Fig.6 Effects of oligosaccharides with different mass concentrations on the relative mRNA expression levels of NF-κB signaling pathway related proteins in Caco-2 cells

果。特别地,各试验质量浓度的 GOS 均未表现出对 IκB-α 基因表达的抑制作用。由此可以推测, HMO 可以通过抑制细胞内 NF-κB 信号通路的激

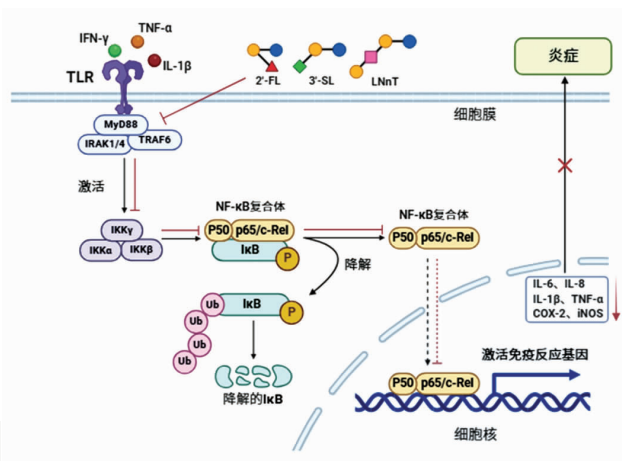


图 7 HMO 对 Caco-2 细胞发挥抗炎作用的 NF-κB 信号通路示意图

Fig.7 Schematic diagram of HMO exerting anti-inflammatory effects by inhibiting NF-κB signaling pathway in Caco-2 cells

活进而抑制炎症反应。一项关于 3'-SL 在 Caco-2 细胞中的抗炎机制研究表明,3'-SL 能通过剂量和时间依赖性地抑制 NF-κB 介导的炎症反应来发挥抗炎作用^[25]。He 等^[29]的研究也发现,混合 HMO 和 2'-FL 单体可直接抑制 NF-κB 的转录因子激活来抑制脂多糖诱导的肠上皮细胞炎症反应。这些研究结果均与本试验的结论相一致。

由上述结果,联系细胞内信号通路讨论 HMO 缓解肠屏障炎症损伤可能的作用机制。如图 7 所示,MyD88 是信号通路上游关键的接头蛋白,当促炎因子刺激细胞膜上相应的受体,MyD88 随之被激活,向下游进行信号转导。活化的 IκB 激酶 (IKK) 对与 NF-κB 二聚体结合的抑制蛋白 IκB (IκB-α、IκB-β 和 IκB-ε) 进行磷酸化和泛素化并迅速降解,从而活化并释放 NF-κB 的两个亚基 p50 和 p65。随后,NF-κB 亚基从细胞质转移至细胞核内,启动炎症细胞因子转录,诱导炎症反应。基因表达具体表现为 MyD88、IκB 和 NF-κB 亚基的水平升高。用不同质量浓度的 HMO 干预细胞后,MyD88、IκB-α 和 NF-κB p65 3 种信号因子的基因表达水平在一定程度上降低,说明 HMO 抑制了 MyD88/NF-κB 信号通路的激活,从而减少炎症相关细胞因子的产生和分泌,缓解炎症损伤导致的肠屏障破坏。

3 结论

本研究通过构建促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IFN- γ 混合物诱导的体外肠上皮细胞屏障损伤模型,探究了不同质量浓度下 2'-FL、3'-SL 和 LNnT 3 种代表性 HMO 对肠上皮屏障和肠道炎症的影响及其可能的调控机制。试验发现,HMO 能以质量浓度依赖的方式保护肠屏障完整性,降低 IL-6 和 IL-8 的分泌和基因表达水平,并抑制 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2 和 iNOS 的表达,同时促进了紧密连接蛋白 *Claudin-1*、*Claudin-2*、*ZO-1*、*ZO-2* 和 *Occludin* 的基因表达。另外,HMO 保护肠屏障的效果好于 GOS 和 FOS,而不同 HMO 之间没有显著性差异。进一步探究 HMO 影响肠屏障功能的作用机制,HMO 能通过抑制由 MyD88 介导的 NF- κ B 信号通路,抑制炎症因子的产生,在一定程度上减轻肠屏障损伤。研究结果验证了 HMO 增强肠屏障功能和缓解肠道炎症的生理功能及其作用机制,为 HMO 在婴幼儿配方食品改善肠道健康功能的应用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] AGOSTONI C, BRAEGGER C, DECSI T, et al. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009, 49(1): 112-125.
- [2] CHENG L, AKKERMAN R, KONG C, et al. More than sugar in the milk: Human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(7): 1184-1200.
- [3] AUTRAN C A, SCHOTERMAN M H, JANTSCHER-KRENN E, et al. Sialylated galacto-oligosaccharides and 2'-fucosyllactose reduce necrotizing enterocolitis in neonatal rats[J]. *Br J Nutr*, 2016, 116(2): 294-299.
- [4] GOEHRING K C, MARRIAGE B J, OLIVER J S, et al. Similar to those who are breastfed, infants fed a formula containing 2'-fucosyllactose have lower inflammatory cytokines in a randomized controlled trial [J]. *J Nutr*, 2016, 146(12): 2559-2566.
- [5] LEWIS S M, WILLIAMS A, EISENBARTH S C. Structure and function of the immune system in the spleen[J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(33): eaau6085.
- [6] NEU J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants[J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85(2): 629S-634S.
- [7] PARIGI S M, ELDH M, LARSEN P, et al. Breast milk and solid food shaping intestinal immunity[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 415.
- [8] GILA-DIAZ A, ARRIBAS S M, ALGARA A, et al. A review of bioactive factors in human breast-milk: A focus on prematurity[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1307.
- [9] CHLEILAT F, KLANCIC T, MA K, et al. Human milk oligosaccharide supplementation affects intestinal barrier function and microbial composition in the gastrointestinal tract of young sprague dawley rats[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1532.
- [10] WU R Y, LI B, KOIKE Y, et al. Human milk oligosaccharides increase mucin expression in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(3): e1800658.
- [11] HE Y, LIU S, LEONE S, et al. Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine[J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(6): 1326-1339.
- [12] TRIANTIS V, BODE L, VAN NEERVEN R. Immunological effects of human milk oligosaccharides [J]. *Front Pediatr*, 2018, 6: 190.
- [13] ŠULIGOJ T, VIGSN?S L K, ABBEELE P V D, et al. Effects of human milk oligosaccharides on the adult gut microbiota and barrier function [J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2808.
- [14] CHEN T, KIM C Y, KAUR A, et al. Dietary fibre-based SCFA mixtures promote both protection and repair of intestinal epithelial barrier function in a Caco-2 cell model[J]. *Food & Function*, 2017, 8(3): 1166-1173.
- [15] VAN DE WALLE J, HENDRICKX A, ROMIER B, et al. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation[J]. *Toxicol in Vitro*, 2010, 24(5): 1441-1449.
- [16] BYCH K, MIKS M H, JOHANSON T, et al. Production of HMOs using microbial hosts - from cell engineering to large scale production [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 130-137.

- [17] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Statement on the safety of lacto-N-neotetraose and 2'-O-fucosyllactose as novel food ingredients in food supplements for children[J]. EFSA Journal, 2015, 13(11): 4299.
- [18] BÖCKER U, DAMIAO A, HOLT L, et al. Differential expression of interleukin 1 receptor antagonist isoforms in human intestinal epithelial cells[J]. Gastroenterology, 1998, 115(6): 1426-1438.
- [19] NATIVIDAD J M, RYTZ A, KEDDANI S, et al. Blends of human milk oligosaccharides confer intestinal epithelial barrier protection *in vitro*[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 3047.
- [20] FASANO A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: Diagnostic and therapeutic implications [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10 (10): 1096-1100.
- [21] BRUEWER M, LUEGERING A, KUCHARZIK T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms[J]. J Immunol, 2003, 171(11): 6164-6172.
- [22] WANG G, SUN W J, PEI X, et al. Galactooligosaccharide pretreatment alleviates damage of the intestinal barrier and inflammatory responses in LPS-challenged mice[J]. Food Funct, 2021, 12(4): 1569-1579.
- [23] MUDTER J, NEURATH M F. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2007, 13(8): 1016-1023.
- [24] HOFFMANN E, DITTRICH-BREIHZOL O, HOLT-MANN H, et al. Multiple control of interleukin-8 gene expression[J]. J Leukoc Biol, 2002, 72(5): 847-855.
- [25] ZENHOM M, HYDER A, DE VRESE M, et al. Prebiotic oligosaccharides reduce proinflammatory cytokines in intestinal Caco-2 cells via activation of PPARgamma and peptidoglycan recognition protein 3 [J]. J Nutr, 2011, 141(5): 971-977.
- [26] CAO S G, CHEN R, WANG H, et al. Cryptotanshinone inhibits prostaglandin E2 production and COX-2 expression via suppression of TLR4/NF-kappaB signaling pathway in LPS-stimulated Caco-2 cells[J]. Microb Pathog, 2018, 116: 313-317.
- [27] KEKLIKOGU N, KORAY M, KOCAELLI H, et al. iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(6): 1437-1442.
- [28] HAYDEN M S, WEST A P, GHOSH S. NF-kappaB and the immune response[J]. Oncogene, 2006, 25(51): 6758-6780.
- [29] HE Y, LIU S, KLING D E, et al. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation[J]. Gut, 2016, 65(1): 33-46.

Effects of Human Milk Oligosaccharides on the Barrier Function of Caco-2 Intestinal Epithelial Cells

CAI Ran¹, LI Hongye¹, ZHENG Yuxing², CHEN Juchun², LIU Feitong², ZHANG Bin^{1*}

¹School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640

²H&H Group, Global Research and Technology Center, Guangzhou 510700

Abstract Human milk oligosaccharides (HMOs), a key active ingredient in human milk, have important physiological functions such as regulating intestinal microbiota, protecting intestinal barrier integrity, and regulating immunity. This study constructed the Caco-2 intestinal epithelial barrier dysfunction model by the treatment of the pro-inflammatory cytokines mixture. Three HMOs including neutral fucosylated, sialylated and neutral non-fucosylated HMOs, namely 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) and lacto-N-neotetraose (LNnT), were used for treatment. In order to explore the protective effect of HMOs on intestinal barrier function and the regulatory mechanism, this study characterized the intestinal barrier integrity by measuring transepithelial electrical resistance (TEER), determined the secretion of inflammatory factors by enzyme-linked immunosorbent assay, and analyzed the expression level of tight junction and inflammation related genes by quantitative real-time PCR. The results showed that all three HMOs could increase TEER in

a concentration dependent manner. All HMO treatments could reduce the secretion of IL-6 and IL-8, inhibit the gene expression level of *IL-6*, *IL-8*, *IL-1 β* , *TNF- α* , *COX-2* and *iNOS*, enhance the transcriptional activity of *Claudin-1*, *Claudin-3*, *ZO-1*, *ZO-2*, and *Occludin*, and inhibit the activation of NF- κ B signaling pathway without concentration dependence. All HMO treatments could exert significant intestinal barrier protection and anti-inflammatory activity at high mass concentrations (2.4 mg/mL and 10 mg/mL). Our results provided scientific evidence for the HMO application to enhance intestinal barrier function and immunomodulatory function.

Keywords human milk oligosaccharides; intestinal barrier function; anti-inflammatory effect; NF- κ B signaling pathway; Caco-2 intestinal epithelial cells