



## 研究报告

## 乳杆菌在 Caco-2 细胞模型中对肠吸收短链脂肪酸的促进作用

陈大卫<sup>1</sup> 任晨瑜<sup>1</sup> 范晨雨<sup>1</sup> 瞿恒贤<sup>1</sup> 陈春萌<sup>1</sup> 张臣臣<sup>1</sup> 关成冉<sup>1</sup> 李启明<sup>2</sup>  
杨锁华<sup>3</sup> 顾瑞霞<sup>\*1</sup>

1 扬州大学食品科学与工程学院 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室 江苏 扬州 225127

2 新希望乳业股份有限公司 四川 成都 610023

3 生合生物科技(扬州)有限公司 江苏 扬州 225100

**摘要:**【背景】短链脂肪酸(Short-Chain Fatty Acids, SCFAs)具有提供能量、调节营养物质代谢、抑制内源性胆固醇合成等广泛的生理活性和生物学效应。【目的】利用建立的 Caco-2 细胞吸收 SCFAs 模型研究乳杆菌对肠吸收 SCFAs 的影响。【方法】通过跨膜电阻值(Transsepithelial Electrical Resistance, TEER)、细胞超微结构、苯酚红通透量及细胞增殖-毒性试验等来综合评价 Caco-2 细胞吸收 SCFAs 模型的完整性和稳定性,并利用气相色谱-质谱联用仪测定乳杆菌干预前后模型中 Caco-2 细胞内丙酸和丁酸的含量。【结果】Caco-2 细胞单层培养至第 11 天时的 TEER 值为  $1\,290.73\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ ,在第 15 天时为  $1\,319.31\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ ,而且细胞间连接紧密并覆盖着一层垂直于细胞表面的微绒毛,苯酚红通透量小于  $1\times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ ,在  $1\ \text{mmol/L}$  丙酸或丁酸分别作用 3 h 后,模型中 Caco-2 细胞的存活率较高,分别为 99.03%和 91.42%。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) P54、P58、P67、P97、P123 及 P198 干预后,模型中 Caco-2 细胞内丙酸含量均显著高于未接菌( $P<0.05$ );而发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) F146 和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) P1 干预后,胞内丁酸含量均显著高于未接菌( $P<0.05$ )。【结论】试验的乳杆菌在模型中能够促进 Caco-2 细胞对丙酸或丁酸的吸收。

**关键词:** 乳杆菌, Caco-2 细胞, 促吸收, 短链脂肪酸

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31701627, 31972094); Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Education Institutions of China (19KJA140004, 17KJB550009); National Key Research and Development Program of China (2019YFF0217602); Chengdu Major Science and Technology Application Demonstration Program (2019-YF09-00055-SN); Yangzhou Social Development Program (YZ2019069)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-514-87978128; E-mail: guruixia1963@163.com

**Received:** 16-08-2020; **Accepted:** 18-09-2020; **Published online:** 18-11-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(31701627, 31972094); 江苏省高等学校自然科学研究项目(19KJA140004, 17KJB550009); 国家重点研发计划(2019YFF0217602); 成都市重大科技应用示范项目(2019-YF09-00055-SN); 扬州市社会发展项目(YZ2019069)

**\*通信作者:** Tel: 0514-87978128; E-mail: guruixia1963@163.com

**收稿日期:** 2020-08-16; **接受日期:** 2020-09-18; **网络首发日期:** 2020-11-18

## Enhancing intestinal short-chain fatty acid absorption by *Lactobacillus* in Caco-2 cell model

CHEN Dawei<sup>1</sup> REN Chenyu<sup>1</sup> FAN Chenyu<sup>1</sup> QU Hengxian<sup>1</sup> CHEN Chunmeng<sup>1</sup>  
ZHANG Chenchun<sup>1</sup> GUAN Chengran<sup>1</sup> LI Qiming<sup>2</sup> YANG Suohua<sup>3</sup> GU Ruixia<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Safety Control of Jiangsu Province, School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China

<sup>2</sup> New Hope Dairy Company Limited, Chengdu, Sichuan 610023, China

<sup>3</sup> Synbiotech Biotechnology (Yangzhou) Company Limited, Yangzhou, Jiangsu 225100, China

**Abstract:** [Background] Short-chain fatty acids (SCFAs) have a wide range of physiological activities and biological effects, such as providing energy, regulating nutrient metabolism, inhibiting endogenous cholesterol synthesis, and so on. [Objective] The model of Caco-2 cell absorption SCFAs was established, which was used to research the effect of *Lactobacillus* on intestinal uptake of SCFAs. [Methods] The integrity and stability of Caco-2 cell model was evaluated by transepithelial electrical resistance (TEER), cell ultrastructure, apparent permeability coefficients of phenol red ( $P_{app}$ ) and cell proliferation toxicity test. The content of propionic acid and butyric acid in the model was determined by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) before and after inoculating with *Lactobacillus*. [Results] The TEER of Caco-2 cell monolayer was  $1\ 290.73\ \Omega\cdot\text{cm}^2$  on the 11th day,  $1\ 319.31\ \Omega\cdot\text{cm}^2$  on the 15th day, and the  $P_{app}$  was less than  $1\times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ , the cells were closely connected and covered with a layer of microvilli perpendicular to the cell surface. The survival rates of Caco-2 cells were 99.03% and 91.42% after treating with 1 mmol/L propionic acid and 1 mmol/L butyric acid for 3 hours respectively. The propionic acid content of Caco-2 cells in the model inoculated with *Lactobacillus plantarum* P54, P58, P67, P97, P123 and P198 was higher than non-inoculate significantly ( $P<0.05$ ), and the butyric acid content of Caco-2 cells in the model inoculated with *Lactobacillus fermentum* F146 and *Lactobacillus plantarum* P1 was higher than non-inoculate significantly ( $P<0.05$ ). [Conclusion] The *Lactobacillus* strains used in this study can promote the absorption of propionic acid or butyric acid by Caco-2 cells in the model.

**Keywords:** *Lactobacillus*, Caco-2 cell, promote absorption, SCFAs

丙酸和丁酸作为人体肠道中重要的短链脂肪酸(Short-Chain Fatty Acids, SCFAs), 对人体的健康有着重要的影响, 具有调节机体免疫、保护肠黏膜屏障和维持肠内电解质平衡等功能<sup>[1]</sup>。丙酸经肠上皮细胞吸收后不仅作为肝脏代谢的能量来源, 还能够通过降低肝细胞合成胆固醇过程中的限速酶活性来抑制过多胆固醇的合成, 并通过调节肝脏中碳水化合物和脂肪的代谢来改善血清脂质<sup>[2]</sup>。丁酸作为肠上皮细胞的主要能量来源, 除了用于供能, 也可用于调节细胞的增殖和分化, 促进结肠细胞的增殖<sup>[3]</sup>, 还可以通过稳定 DNA 和修复 DNA 损伤来促进细胞的形成, 在维持肠黏膜屏障的完整性过程中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。

研究表明, SCFAs 不仅仅只作用于肠道, 还

可作为信息分子来调节大脑诱导神经的发生和宿主的行为等, 因此, SCFAs 的缺乏不仅会影响人体肠道的微生态平衡, 还会导致机体的代谢紊乱并引起炎症性肠病<sup>[5-6]</sup>, 并影响机体某些行为的发生<sup>[7-8]</sup>。研究还发现, 非酒精性脂肪性肝的发病与 SCFAs 的缺乏有着密切的关系, 而通过促进肠道吸收 SCFAs 将成为预防非酒精性脂肪性肝的重要手段<sup>[9]</sup>。

虽然膳食纤维有利于 SCFAs 的产生, 但盲目地通过增加膳食纤维的摄入来补充 SCFAs 未必能够很好地被肠道吸收利用<sup>[10]</sup>。然而相比于膳食纤维, 乳杆菌不仅可以通过促进 SCFAs 的产生和吸收来缓解炎症性肠病<sup>[11]</sup>, 还可通过抑制肠道内有害菌的生长和促进有益菌的繁殖来改善肠道的微生态平

衡<sup>[12]</sup>, 而且还具有抗氧化、调节免疫等功能<sup>[13-14]</sup>, 但关于肠上皮细胞吸收 SCFAs 的体外研究较少。Caco-2 细胞来源于人结肠腺癌细胞, 其结构性和生化作用类似于小肠上皮细胞, 可作为研究 SCFAs 吸收的体外筛选工具<sup>[15]</sup>, 因此, 本文以前期筛选获得的来源于长寿人群且耐酸耐胆盐及黏附能力较强的乳杆菌作为研究对象, 通过建立的 Caco-2 单层细胞模型来研究其对肠上皮细胞吸收丙酸和丁酸的影响, 以期筛选促进肠吸收 SCFAs 的乳杆菌及其作用机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及细胞株

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) P1、P54、P58、P67、P97、P123 及 P198, 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) F146 分离自广西巴马长寿人群粪便样品(表 1), 由江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室提供; Caco-2 细胞株由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

MEM (Minimum Essential Medium)培养液、MEM 非必需氨基酸溶液、GlutaMAX 谷氨酰胺添加剂, Gibco 公司; 优质胎牛血清(南美血清), PAN-Seratech 公司; 0.25%胰酶细胞消化液, 上海碧云天生物技术公司; MRS 液体培养基, 青岛海

博生物技术有限公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit 8, CCK-8), 上海东仁化学科技有限公司; 丁酸、丙酸标准溶液, OXEA 公司; 丙酸、丁酸、戊酸、异戊酸, 东京化成工业株式会社; 己酸、异己酸, 阿拉丁控股集团有限公司。

CO<sub>2</sub> 培养箱、透射电子显微镜、全波长酶标仪, Thermo Fisher 公司; 细胞计数仪, 上海睿钰生物科技有限公司; 荧光倒置显微镜, Olympus 株式会社; 细胞电阻仪, Merck Millipore 公司; 气-质联用仪、色谱柱, Agilent Technologies 公司。

1.2 方法

1.2.1 Caco-2 细胞的复苏与传代

从液氮罐中取出 Caco-2 细胞株冻存管, 迅速置于 37 °C 水浴中解冻。将解冻后的细胞悬液转移至 15 mL 离心管中, 加入 3.0 mL 含有 20% (体积分数, 下同)优质胎牛血清、1% MEM 非必需氨基酸溶液、1%丙酮酸钠溶液、1% GlutaMAX 谷氨酰胺及 1% PSN 的 MEM 完全培养液, 于 1 000×g 离心 5 min, 弃上清后加入 2.0 mL 完全培养液重悬细胞, 转入 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶, 另加入 8.0 mL 完全培养液, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及相对湿度为 95%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每隔 1 d 更换一次培养液, 待细胞生长良好时(80%–90%融合), 用 0.25%胰酶消化液进行消化传代, 用荧光倒置显微镜观察传代至第 3 代的细胞形态, 取在 22–30 代之间的细胞进行后续试验。

表 1 样品信息( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm SD$ )

Table 1 The information of samples ( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm SD$ )

菌株名称 Strains	样品来源性别 Gender of samples source	样品来源年龄 Age of samples source	样品采集地点 Location of samples collection
<i>L. plantarum</i> P1	Male	90	Bama county
<i>L. plantarum</i> P54	Female	65	Fengshan county
<i>L. plantarum</i> P58	Female	91	Bama county
<i>L. plantarum</i> P67	Male	62	Bama county
<i>L. plantarum</i> P97	Female	48	Fengshan county
<i>L. plantarum</i> P123	Male	78	Fengshan county
<i>L. fermentum</i> F146	Male	65	Bama county
<i>L. plantarum</i> P198	Female	46	Bama county

### 1.2.2 Caco-2 细胞模型的建立

#### (1) Caco-2 细胞接种

Caco-2 细胞消化后调节密度至  $1.3 \times 10^5$  cells/mL, 取 500  $\mu$ L 接种于 Transwell 板的转运槽肠腔侧(AP 侧), 基底侧(BL 侧)加入 1.5 mL MEM 完全培养液, 前 7 d 每隔 2 d 换液, 培养至第 7 天, 用荧光倒置显微镜观察细胞形态, 7 d 后每天换液, 待细胞长至 15–21 d 后备用。

#### (2) Caco-2 细胞单层模型跨膜电阻值 (Trans epithelial Electrical Resistance, TEER) 的测定

将细胞电阻仪的电极在 70% 乙醇中浸泡 15 min, 干燥后放入 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 溶液中平衡 15 min。然后将电极两端依次垂直插入 12 孔 Transwell 培养板中, 其中电极短端浸入培养板 AP 侧, 长端浸入培养板 BL 侧, 分别测定 2 个空白小室(未放细胞)及含有样品小室的电阻, TEER 值计算公式为:

$$\text{电阻值}(\Omega \cdot \text{cm}^2) = (R_{\text{样品孔}} - R_{\text{空白孔}}) \times 1.12。$$

#### (3) Caco-2 细胞单层模型苯酚红通透性的测定

利用 HBSS 缓冲溶液(预热到 37 °C)配制质量浓度为 1 g/L 的苯酚红母液, 稀释至 0.5、1.0、2.0、5.0 和 10.0 mg/L, 分别取 0.5 mL 不同浓度的苯酚红溶液, 加入 5.0 mL 浓度为 1 mol/L NaOH 溶液, 摇匀后分别取 200.0  $\mu$ L 加入至 96 孔板中, 560 nm 处测吸光度。根据测得的  $OD_{560}$  与对应的苯酚红浓度作标准曲线, 计算回归方程及相关系数。

细胞在 Transwell 板培养 15–21 d 后, 选取跨膜电阻值达到要求的 Transwell 小室, 吸弃两侧培养液, PBS 溶液(pH 7.2)洗涤后, AP 侧加入 0.5 mL 浓度为 5.0 mg/L 的苯酚红溶液, BL 侧加入 1.5 mL 空白的 PBS 缓冲溶液。在 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h; 取 BL 侧溶液 0.5 mL, 加入 5.0 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液显色, 560 nm 处测其吸光度, 计算表观渗透系数  $P_{\text{app}}$  (Apparent Permeability Coefficients) 值<sup>[16]</sup>, 具体计算公式如下:

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{A\rho}$$

其中,  $dQ/dt$  为单位时间苯酚红转运量,  $A$  为转运膜面积(1.12 cm<sup>2</sup>),  $\rho$  为苯酚红初始浓度。

#### (4) Caco-2 细胞超微结构的观察

细胞在 Transwell 板培养 15–21 d 后, 选取跨膜电阻值达到要求的 Transwell 小室, 吸弃两侧培养液, PBS 溶液(pH 7.2)洗涤后加入 2.5% 戊二醛固定液(用磷酸缓冲液配制, pH 7.2), 4 °C 固定过夜, 剪下 Transwell 培养板上的多聚碳酸酯膜, 切成 0.3 cm×0.3 cm 大小正方形, 用 0.1 mol/L PBS (pH 7.2)洗涤 4 次, 45 min/次, 1% 锇酸固定 4 h, 再用 PBS 洗 3 次, 15 min/次; 30% (体积分数, 下同)、50%、70%、90% 乙醇、90% 乙醇:90% 丙酮(1:1)、90% 丙酮、100% 丙酮依次脱水, 用 618 环氧树脂包埋液浸透, 浸透后将细胞转移至专用的包埋板中, 37 °C 过夜后 60 °C 48 h, 使包埋剂聚合。使用超薄切片机切片, 厚度为 70 nm。最后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染, 在透射电子显微镜下观察, 加速电压为 80 kV<sup>[17]</sup>。

#### (5) Caco-2 细胞增殖-毒性试验

取  $3 \times 10^5$  cells/mL 的 Caco-2 细胞接种于 96 孔板, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及相对湿度为 95% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 然后分别加入 10.0  $\mu$ L 不同浓度(0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 mmol/L)的丙酸或丁酸, 于 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 3 h 后, 加入 10.0  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液继续孵育 2 h, 以不加丙酸或丁酸和不含有细胞的溶液为空白组, 不加丙酸或丁酸、含有细胞的为对照组, 每组设 3 个复孔, 在 450 nm 处测其吸光度, 计算细胞存活率, 具体计算公式为:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

其中,  $A_s$  为试验组的  $OD_{450}$  值,  $A_b$  为空白组的  $OD_{450}$  值,  $A_c$  为对照组的  $OD_{450}$  值。

### 1.3 Caco-2 细胞内 SCFAs 含量的测定

#### 1.3.1 乳杆菌的干预及细胞处理

将乳杆菌按 3% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 18 h, 活化 2 代后 4 °C、3 000×g 离心 20 min 收集菌体, PBS 洗涤 2 次后,



用不含抗生素的 MEM 完全培养液重悬, 调整菌体浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 并加入细胞增殖-毒性试验中得到的最佳浓度的丙酸或丁酸, 混匀后取 0.5 mL 至 Transwell 板的 AP 侧, 于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 3 h。收集孵育后的细胞单层, 用 4 °C 的无菌 PBS 清洗 2 次, 再用 4 °C 的无菌生理盐水洗一次, 最后加入 1.0 mL 甲醇:乙腈:水(2:2:1, 体积比), -80 °C 保存备用。

### 1.3.2 SCFAs 标准品配制

称量乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸和己酸的标准品, 用乙酸乙酯分别配置成 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 µg/mL 共 8 个混合标准浓度梯度。

### 1.3.3 细胞内 SCFAs 含量的测定

取 800 µL 细胞处理后的混合物于 2 mL 玻璃离心管中, 加入 900.0 µL 0.5% 的磷酸重悬, 振荡 2 min 混匀, 14 000×g 离心 10 min。取 800.0 µL 上清液, 加入等量的乙酸乙酯提取, 振荡 2 min 混匀, 14 000×g 离心 10 min。取 600.0 µL 上层有机相, 加入终浓度为 500.0 µmol/L 的 4-甲基戊酸作为内标, 混匀加入进样瓶, 进入 GC-MS 系统 (Gas Chromatography Mass Spectrometry) 进行检测, 进样量为 1.0 µL, 分流进样, 分流比为 10:1。

样品采用 Agilent DB-WAX 毛细管柱(30 m×0.25 mm ID×0.25 µm)气相色谱系统进行分离。程序升温: 初始温度 90 °C, 以 10 °C/min 升温至 120 °C; 再以 5 °C/min 升温至 150 °C; 最后以 25 °C/min 升

温至 250 °C, 并维持 2 min, 载气为氦气, 载气流速 1.0 mL/min。样本队列中每间隔一定数量的实验样本设置一个质控(QC)样本, 用于检测和评价系统的稳定性及重复性。

采用 Agilent 7890A/5975C 气-质联用仪进行质谱分析。进样口温度 250 °C, 离子源温度 230 °C, 传输线温度 250 °C, 四极杆温度 150 °C; 电子轰击电离(EI)源, 全扫及 SIM 扫描方式, 电子能量 70 eV。采用 MSD ChemStation 软件提取色谱峰面积及保留时间, 绘制标曲曲线, 计算样品中 SCFAs 的含量。

## 1.4 数据的统计与处理

采用 SPSS 21.0、Origin 9.1 软件对试验数据进行统计和分析, 各组结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示,  $P < 0.05$  判定为有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 Caco-2 细胞的形态观察

取在细胞培养瓶中呈膜状贴壁生长和 Transwell 培养板中培养至第 7 天的 Caco-2 细胞, 用荧光倒置显微镜分别观察其形态, 结果见图 1。由图 1A 可知, Caco-2 细胞在培养瓶中传代 3 次后, 可观察到细胞呈现铺路石状, 细胞致密, 生长状态良好, 消化后可接种于 Transwell 细胞培养板中; 由图 1B 可知, 细胞在 Transwell 培养板上生长至第 7 天时, 已形成致密的单层膜且细胞形态良好, 边界清晰, 可用于后续试验。

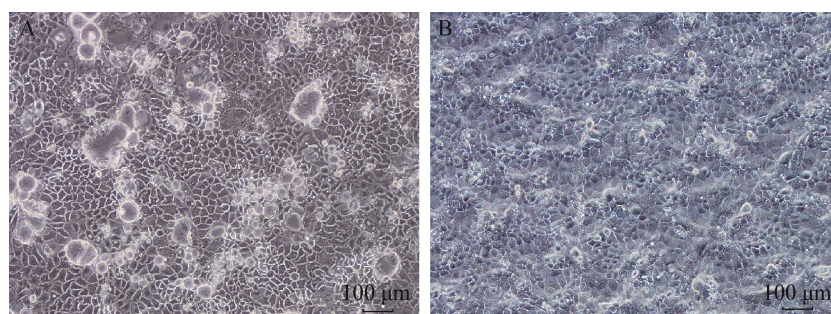


图 1 荧光显微镜下的 Caco-2 细胞形态(100×)

Figure 1 Morphology of Caco-2 cells by fluorescence microscope (100×)

注: A: 细胞培养瓶中 Caco-2 细胞的形态; B: Transwell 培养板中 Caco-2 细胞的形态

Note: A: The morphology of Caco-2 cells in cell culture bottle; B: The morphology of Caco-2 cells in Transwell culture plate

## 2.2 Caco-2 细胞单层模型的致密性

利用细胞电阻仪测定 Transwell 培养板上不同培养时间 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值, 观察其变化情况, 结果见图 2。由图 2 可知, 在培养第 11 天时, 细胞单层模型的 TEER 值为  $1\,290.73\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ ; 第 13 天时达到顶峰, 为  $1\,320.48\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ ; 第 15 天时略有下降, 为  $1\,319.31\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ ; 第 17 天为  $1\,319.45\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ ; 第 11–17 天的电阻值较为稳定, 而且无显著性差异 ( $P>0.05$ )。当 TEER 值稳定在  $500\text{--}1\,500\ \Omega\cdot\text{cm}^2$  之间时, 则表明其单层膜达到致密性, 具有转运和吸收功能<sup>[18]</sup>, 因此, 本试验建立的 Caco-2 细胞单层模型具有致密性。

## 2.3 Caco-2 细胞单层模型的通透性

苯酚红为水溶性物质, 分子量较大, 难以跨细胞通道转运, 可作为标志物检测其在细胞单层模型的通透量以判定细胞单层模型的完整性,  $P_{\text{app}}$  值的大小反映了苯酚红透过单层细胞的能力以及吸收的程度<sup>[19]</sup>。因此, 试验以苯酚红为标志物, 在第 15 天时测定其通透量以判定 Caco-2 细胞模型的完整性, 结果见表 2。由表 2 可知, 苯酚红的  $P_{\text{app}}$  为  $0.39\times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ , 小于  $1.00\times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ , 表明建立的细胞单层模型具有良好的完整性。

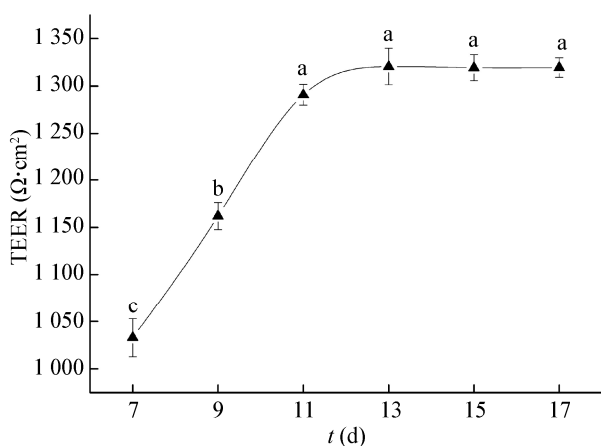


图 2 Caco-2 细胞单层模型的跨膜电阻值

Figure 2 TEER value of Caco-2 cell monolayer model

注: 不同字母表示不同时间的电阻值具有显著性差异 ( $P<0.05$ )

Note: Different letters denote that there are significant differences in TEER at different times ( $P<0.05$ )

表 2 苯酚红的表观渗透系数 ( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm\text{SD}$ )

Table 2  $P_{\text{app}}$  of phenol red ( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm\text{SD}$ )

Item	Result
回归方程	$y=0.009\,8x+0.060\,8$
Regression equation	
相关系数	0.999 5
Correlation coefficient ( $R^2$ )	
表观渗透系数	$0.39\times 10^{-6}$
$P_{\text{app}}$ (cm/s)	
参考值	$<1\times 10^{-6}$
Reference value (cm/s)	

## 2.4 Caco-2 细胞单层模型的超微结构

Caco-2 细胞单层模型培养至 15 d 时的 TEER 值达到  $1\,319.31\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ , 表明细胞之间已形成紧密连接, 在透射电镜下进行形态学观察, 结果见图 3。由图 3A 和图 3B 可知, Caco-2 细胞单层生长至第 15 天时, 细胞单层模型形成紧密连接。由图 3C 和 3D 可知, 细胞腔侧面覆盖着一层垂直于细胞表面的微绒毛, 而微绒毛是反映 Caco-2 细胞单层模型功能状态的一个重要指标。结合细胞单层模型的 TEER 值和  $P_{\text{app}}$  值, 表明该 Caco-2 细胞单层模型构建成功, 可用于后续 SCFAs 吸收试验。

## 2.5 肠吸收模型中 SCFAs 的添加量

较高浓度的 SCFAs 会影响 Caco-2 细胞的活性, 因此利用细胞增殖-毒性试验检测了不同浓度的丙酸和丁酸对 Caco-2 细胞存活率的影响, 结果见图 4。由图 4 可知, 当丙酸浓度分别为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时, Caco-2 细胞存活率无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 分别为 96.86% 和 99.03%; 当丁酸浓度为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时, Caco-2 细胞存活率也无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 分别为 91.81% 和 91.42%; 当丙酸或丁酸的浓度高于 5.0 mmol/L 时, 细胞的存活率开始下降; 当浓度大于 50 mmol/L 时, 细胞的存活率均显著低于 1.0 mmol/L ( $P<0.05$ ), 表明高浓度的 SCFAs 会损害机体的肠上皮细胞, 造成 SCFAs 中毒。同时, 也超过了机体肠道中所含有的 SCFAs 浓度<sup>[20]</sup>。因此, 选取 1.0 mmol/L 的丙酸或丁酸进行后续细胞吸收试验。

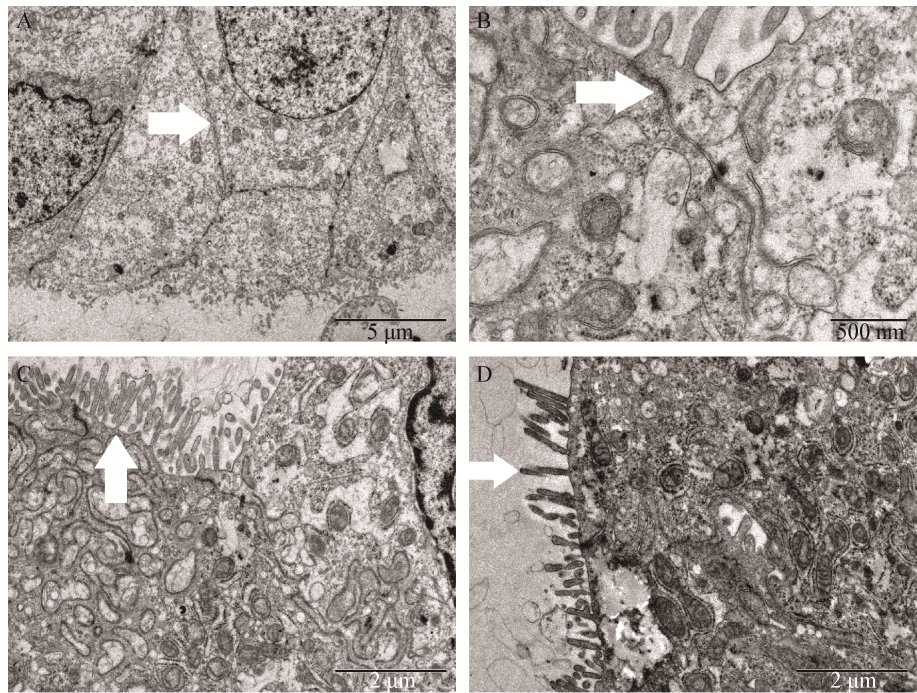


图 3 Caco-2 细胞单层模型透射电镜图

Figure 3 Transmission electron microscope images of Caco-2 cells monolayer model

注：A 和 B：细胞之间紧密连接(箭头标注)；C 和 D：垂直于细胞单层表面的微绒毛(箭头标注)

Note: A and B: The cells are closely connected (arrow mark); C and D: The microvilli perpendicular to the surface of the cell monolayer form a brush like edge (arrow mark)

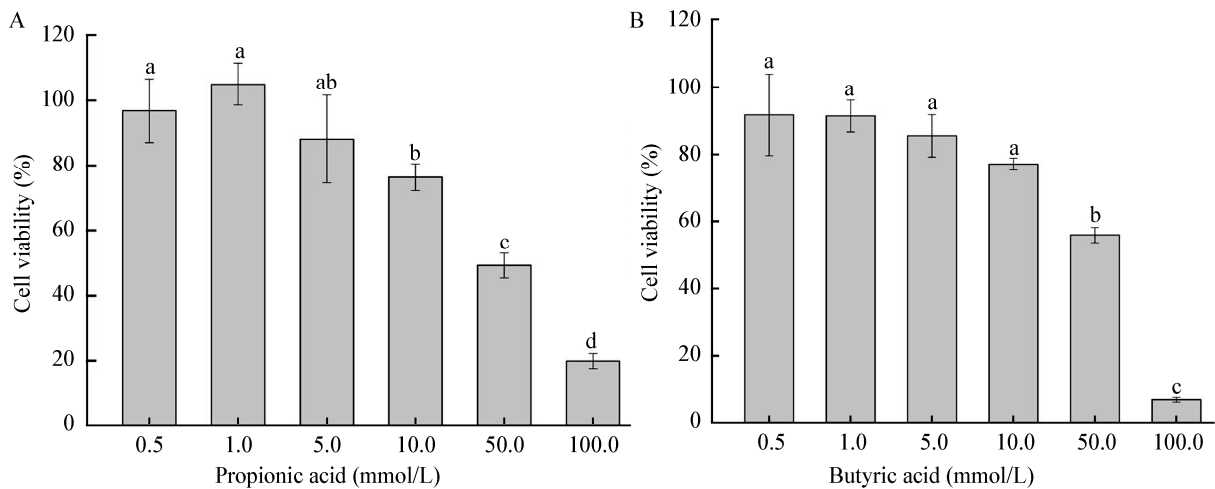


图 4 不同浓度的丙酸(A)和丁酸(B)对细胞存活率的影响

Figure 4 Effect of different concentration of propionic acid (A) and butyric acid (B) on the survival rate of cells

注：不同字母表示数据存在显著性差异(P<0.05)

Note: Data with different superscript letters mean significant differences (P<0.05)

## 2.6 Caco-2 细胞内 SCFAs 的含量

### 2.6.1 SCFAs 标准品的总离子流图(Total Ion Chromatography, TIC)

SCFAs 标准品的 GC-MS TIC 图见图 5。由图 5 可知, SCFAs 色谱分离较好, 峰形尖锐对称, 能够对 SCFAs 进行质谱定量。

### 2.6.2 系统适应性及 SCFAs 标准曲线

将 50  $\mu\text{g/mL}$  的各标准品混合后, 在 GC-MS 上连续进样 6 次, 对每种组分与内标的峰面积比计算相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD), 并以标准品各组分与内标的浓度之比为横坐标, 峰面积之比为纵坐标, 以此来考察测试方法的系

统适应性和标准品溶液的线性, 结果见表 3。由表 3 可见, 丙酸和丁酸标品溶液的 RSD 较小, 表明试验所用的色谱系统能够满足丙酸和丁酸的测试分析要求, 而且测定的方法精密度较高; 表 3 还表明, 各待测物在线性范围内的线性良好, 相关系数均大于 0.999, 可用于细胞内 SCFAs 含量的测定。

### 2.6.3 质控(Quality Control, QC)样本评价

所有样品等量混合制备成 QC 样本, 采用 QC 样本对检测过程的稳定性进行考察, 结果见图 6。由图 6 可见, 丙酸和丁酸的 QC 样本 RSD 均小于 30%, 说明试验所用方法测得的实验数据稳定可靠。

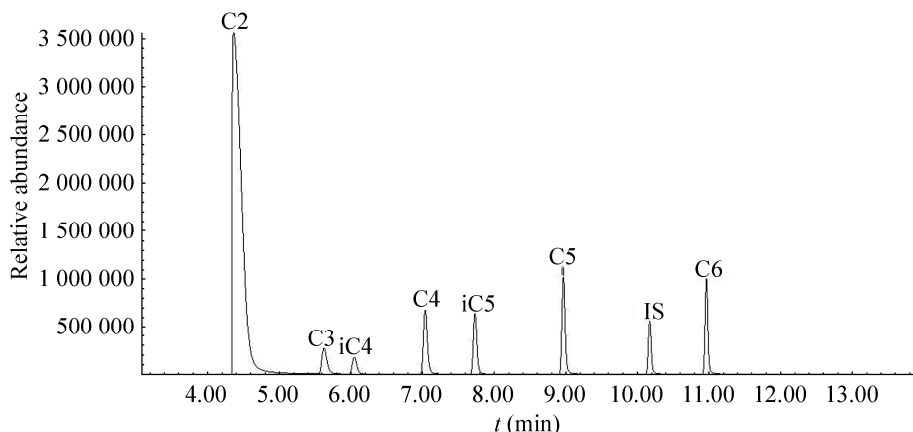


图 5 标准品混合物 TIC 图谱

Figure 5 TIC chromatogram of standard mixture

表 3 系统适应性和 SCFAs 标准曲线

Table 3 System adaptability and standard curve of SCFAs

短链脂肪酸 SCFAs	相对标准偏差 RSD (%)	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient ( $R^2$ )	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )
乙酸 Acetic acid	4.000 8	$y=0.767\ 536x-0.006\ 844$	0.999 7	2.5–5 000
丙酸 Propionic acid	2.164 5	$y=0.987\ 741x-7.742\ 174\text{E}-004$	0.999 9	0.05–100
异丁酸 Isobutyric acid	3.814 6	$y=0.969\ 444x-0.001\ 862$	0.999 9	0.05–100
丁酸 Butyric acid	1.266 5	$y=2.460\ 559x-0.004\ 217$	1.000 0	0.05–100
异戊酸 Isovaleric acid	0.737 8	$y=2.691\ 826x-0.003\ 388$	1.000 0	0.05–100
戊酸 Valeric acid	0.539 8	$y=2.913\ 375x-0.004\ 521$	1.000 0	0.05–100
己酸 Hexanoic acid	0.345 8	$y=2.527\ 640x+4.270\ 208\text{E}-004$	0.999 9	0.05–100



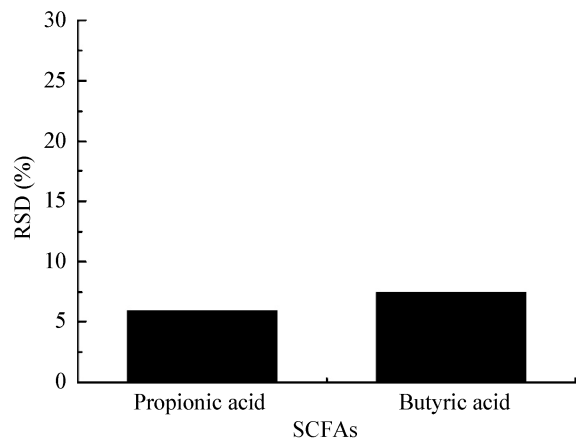


图 6 QC 样本的 RSD 分布图  
Figure 6 RSD distribution map of QC samples

2.6.4 Caco-2 细胞内 SCFAs 的含量

以未接菌的含有 SCFAs 的 Caco-2 细胞模型为对照, 将乳杆菌接入含有 SCFAs 的细胞模型中干预 3 h, 细胞内的 SCFAs 含量见表 4。由表 4 可知, *L. plantarum* P54、P58、P67、P97、P123 及 P198 干预的 Caco-2 细胞内丙酸的含量均大于 0.282  $\mu\text{g/mL}$ , 显著高于对照组的 0.156  $\mu\text{g/mL}$  ( $P<0.05$ ); 而 *L. plantarum* P1、*L. fermentum* F146 干预的 Caco-2 细胞内丙酸的含量与对照组则无显著性差异 ( $P>0.05$ )。 *L. plantarum* P1、*L. fermentum* F146 干预的 Caco-2 细胞内丁酸的含量均大于 0.092  $\mu\text{g/mL}$ , 显著高于对照组的 0.087  $\mu\text{g/mL}$  ( $P<0.05$ ); 而 *L.*

*plantarum* P54、P58、P67、P97、P123、P198 干预的 Caco-2 细胞内丁酸的含量显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。

3 讨论与结论

目前有多种方法可用于评价 Caco-2 细胞单层模型是否建立成功, 其中 TEER 值是公认的一种简单而具有权威性的评价方法<sup>[21]</sup>。然而我们在培养 Caco-2 细胞时发现, 当 TEER 值达到顶峰后再继续培养时, 其 TEER 值会迅速下降, 肉眼可见细胞间出现许多空泡, 对下一步的实验结果产生了较大的影响, 因此, 在 TEER 达到峰值后应尽快进行后续实验。苯酚红通透量能较好地反映 Caco-2 细胞空隙及其连接程度<sup>[22]</sup>, 同时, 单层微绒毛长度和密度等形态上的差异对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白的外排活性产生较大的影响, 是衡量单层模型建立是否成功的一个重要指标<sup>[23]</sup>。因此, 我们通过 TEER 值、苯酚红通透量、细胞超微结构等来综合判定此模型的完整性。目前大多数 Caco-2 单层细胞模型的建立主要注重于其完整性, 欠缺对其稳定性的考察, 考虑到较高浓度的 SCFAs 会对细胞产生毒性<sup>[19]</sup>, 我们还进行了 CCK-8 细胞毒性试验, 优化了模型的稳定性。

MCT1 和 SMCT1 共转运 SCFAs 是一类靠间接消耗 ATP 提供能量完成的主动运输方式, 在  $\text{H}^+$  泵和  $\text{Na}^+$  泵的作用下,  $\text{H}^+$  和  $\text{Na}^+$  在细胞膜外的浓度要

表 4 乳杆菌干预对 Caco-2 细胞吸收丙酸和丁酸的影响

Table 4 Effect of *Lactobacillus* intervention on the absorption of propionic acid and butyric acid by Caco-2 cells

菌株 Strains	细胞内丙酸含量 The content of propionic acid in the cell ( $\mu\text{g/mL}$ )	细胞内丁酸含量 The content of butyric acid in the cell ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>L. plantarum</i> P1	0.120 $\pm$ 0.031b	0.104 $\pm$ 0.004a
<i>L. plantarum</i> P54	0.290 $\pm$ 0.035a	0.022 $\pm$ 0.006d
<i>L. plantarum</i> P58	0.335 $\pm$ 0.071a	0.024 $\pm$ 0.005d
<i>L. plantarum</i> P67	0.282 $\pm$ 0.029a	0.024 $\pm$ 0.003d
<i>L. plantarum</i> P97	0.305 $\pm$ 0.010a	0.018 $\pm$ 0.003d
<i>L. plantarum</i> P123	0.306 $\pm$ 0.041a	0.022 $\pm$ 0.003d
<i>L. fermentum</i> F146	0.163 $\pm$ 0.015b	0.092 $\pm$ 0.002b
<i>L. plantarum</i> P198	0.311 $\pm$ 0.022a	0.021 $\pm$ 0.007d
Control	0.156 $\pm$ 0.015b	0.087 $\pm$ 0.002c

注: 同列比较, 不同字母表示数据存在显著性差异( $P<0.05$ )

Note: The difference between data with different letters is significant in the same column ( $P<0.05$ )

高于膜内,并形成了电化学浓度梯度,借助于电化学浓度梯度的作用,转运蛋白的构象发生变化,结合在转运蛋白上的 SCFAs 由膜外转运至膜内,进而实现肠上皮细胞对 SCFAs 的吸收<sup>[24-25]</sup>。但当肠道菌群紊乱或发生炎症时,肠上皮细胞中的 MCT1 和 SMCT1 转运体的表达受到了抑制,阻碍了机体对 SCFAs 的吸收;乳杆菌不仅可以通过减弱肠道致病菌和炎症因子对细胞吸收 SCFAs 的抑制作用,还可以通过增强 SMCT1 和 MCT1 转运体的表达和活性来改善机体对 SCFAs 的吸收<sup>[26-28]</sup>,而这些作用的发挥与乳杆菌的细胞成分及其代谢产生的益生因子有着密切的联系<sup>[29-30]</sup>。

本研究发现,能促进 Caco-2 细胞吸收丙酸的乳杆菌不能促进细胞对丁酸的吸收,而能促进丁酸吸收的乳杆菌不能促进对丙酸的吸收,表明试验菌株不能同时促进 Caco-2 细胞对丙酸和丁酸的吸收,可能是由于试验菌株对 Caco-2 细胞的不同 SCFAs 转运体及其表达水平的调控差异造成的<sup>[25,27]</sup>,关于是否存在能够同时促进细胞吸收丙酸和丁酸的乳杆菌,我们将在后续的试验中进行进一步研究。在试验中我们还发现,乳杆菌干预后,细胞模型培养液的 pH 值由干预前的 8.4 降低为 6.8,也有利于细胞对 SCFAs 的吸收<sup>[31]</sup>。本研究建立的 Caco-2 细胞单层模型不仅可作为促进肠上皮细胞吸收 SCFAs 的益生菌体外筛选模型,也为促肠上皮细胞吸收其他活性物质的益生菌筛选模型提供参考依据。

## REFERENCES

- [1] Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism[J]. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(9): 2325-2340
- [2] Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults[J]. *Gut*, 2015, 64(11): 1744-1754
- [3] Liu WS, Yang YO, Zhang JL, Gatlin DM, Ringø E, Zhou ZG. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil[J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 112(1): 15-29
- [4] Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2008, 27(2): 104-119
- [5] Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2015, 11(10): 577-591
- [6] Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, De Coppet P, Bourreille A, Segain JP. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010, 16(4): 684-695
- [7] Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation[J]. *Nutrients*, 2015, 7(4): 2839-2849
- [8] Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control[J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 99-103
- [9] Liang YJ, Lin CL, Wang SN, Zhang YP, Han L, Wang GL, Li YY, Deng YJ, He YF, He QY, et al. New targets for prevention and treatment of obesity related NAFLD: short-chain fatty acids and short-chain fatty acid receptors signaling pathways[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2016, 41(6): 628-631 (in Chinese)  
梁荫基, 林琛莅, 王少娜, 张玉佩, 韩莉, 王观龙, 李媛媛, 邓远军, 何毅芳, 何亲羽, 等. 肥胖相关非酒精性脂肪性肝病防治的新靶点: 短链脂肪酸及其受体信号通路的保护作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(6): 628-631
- [10] Zhao LP, Zhang F, Ding XY, Wu GJ, Lam YY, Wang XJ, Fu HQ, Xue XH, Lu CH, Ma JL, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes[J]. *Science*, 2018, 359(6380): 1151-1156
- [11] Vanderpool C, Yan F, Polk BD. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008, 14(11): 1585-1596
- [12] Wu SR, Liu YL, Duan YL, Wang FY, Guo FS, Yan F, Yang XJ, Yang X. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by supplementation with *Lactobacillus plantarum* JM113 and consequentially altered gut microbiota in broiler chickens[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9(1): 74
- [13] Xue M. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* LV108 on intestinal flora and metabolism in immunocompromised rats[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University,

- 2016 (in Chinese)  
薛梅. 鼠李糖乳杆菌 LV108 对免疫低下大鼠肠道菌群及代谢的影响研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2016
- [14] Palomar MM, Galdeano CM, Perdigon G. Influence of a probiotic *Lactobacillus* strain on the intestinal ecosystem in a stress model mouse[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2014, 35: 77-85
- [15] Yee SY. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man: fact or myth[J]. Pharmaceutical Research, 1997, 14(6): 763-766
- [16] Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, Torr EE, Ahmed F, Steele JC, Steven NM, Kerr DJ, Young LS, Adams DH. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(1): 124-132
- [17] Lu M, Sun YQ, Yuan L, Hu N, Lin M, Zhong XY, Diao QL, Li S, Fang LJ, Jiang Y, et al. Observation of Caco-2 cell monolayer model with electron microscopy[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2018, 37(4): 371-375 (in Chinese)  
陆敏, 孙银强, 袁琳, 胡娜, 林敏, 钟霄毓, 刁琪龙, 李硕, 方龙娟, 姜逸, 等. Caco-2 细胞单层模型形态学的电镜评价[J]. 电子显微学报, 2018, 37(4): 371-375
- [18] Noach ABJ, Kurosaki Y, Blom-Roosemalen MCM, De Boer AG, Breimer DD. Cell-polarity dependent effect of chelation on the paracellular permeability of confluent Caco-2 cell monolayers[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1993, 90(3): 229-237
- [19] Ming X, Thakker DR. Role of basolateral efflux transporter MRP4 in the intestinal absorption of the antiviral drug adefovir dipivoxil[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 79(3): 455-462
- [20] Hu JM, Lin SL, Zheng BD, Cheung PCK. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(8): 1243-1249
- [21] Yang HT, Wang GJ. Caco-2 cell monolayers model and its application in pharmacy[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2000, 35(10): 797-800 (in Chinese)  
杨海涛, 王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用[J]. 药学报, 2000, 35(10): 797-800
- [22] Guan S, Zhao LZ, Chen J, Chen X, Huang M. Establishment and value of Caco-2 cell model[J]. Shandong Medical Journal, 2005, 45(26): 1-3 (in Chinese)  
关溯, 赵立子, 陈杰, 陈孝, 黄民. Caco-2 细胞模型的建立及意义[J]. 山东医药, 2005, 45(26): 1-3
- [23] Meng Z, Le Marchand S, Agnani D, Szapacs M, Ellens H, Bentz J. Microvilli morphology can affect efflux active P-glycoprotein in confluent MDCKII-hMDR1-NKI and Caco-2 cell monolayers[J]. Drug Metabolism and Disposition, 2017, 45(2): 145-151
- [24] Halestrap AP, Meredith D. The *SLC16* gene family: from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond[J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2004, 447(5): 619-628
- [25] Coady MJ, Wallendorff B, Bourgeois F, Charron F, Lapointe JY. Establishing a definitive stoichiometry for the  $\text{Na}^+$ /monocarboxylate cotransporter SMCT1[J]. Biophysical Journal, 2007, 93(7): 2325-2331
- [26] Thibault R, De Coppet P, Daly K, Bourreille A, Cuff M, Bonnet C, Mosnier JF, Galmiche JP, Shirazi-Beechey S, Segain JP. Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation[J]. Gastroenterology, 2007, 133(6): 1916-1927
- [27] Kumar A, Alrefai WA, Borthakur A, Dudeja PK. *Lactobacillus acidophilus* counteracts enteropathogenic *E. coli*-induced inhibition of butyrate uptake in intestinal epithelial cells[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2015, 309(7): G602-G607
- [28] Borthakur A, Anbazhagan AN, Kumar A, Raheja G, Singh V, Ramaswamy K, Dudeja PK. The probiotic *Lactobacillus plantarum* counteracts TNF- $\alpha$ -induced downregulation of SMCT1 expression and function[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2010, 299(4): G928-G934
- [29] Petrof EO, Claud EC, Sun J, Abramova T, Guo YE, Waypa TS, He SM, Nakagawa Y, Chang EB. Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NF-kappaB pathways and inhibits proteasome function[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2009, 15(10): 1537-1547
- [30] Raheja G, Singh V, Ma K, Boumendjel R, Borthakur A, Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. *Lactobacillus acidophilus* stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism[J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 2010, 298(3): G395-G401
- [31] Thwaites DT, Kennedy DJ, Raldua D, Anderson CMH, Mendoza ME, Bladen CL, Simmons NL.  $\text{H}^+$ /dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger[J]. Gastroenterology, 2002, 122(5): 1322-1333