油脂营养　　DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003 – 7969.240682

3 种典型不饱和脂肪酸对 Caco – 2 肠上皮细胞机械屏障功能的影响

杜舒梦[1],李　蕊[1],刘元法[1,2],杨　巍[1,2],叶　展[1,2]

(1. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要: 旨在为优化膳食脂肪摄入结构,预防相关慢性代谢类疾病提供一定的理论依据,通过构建 Caco – 2 肠上皮细胞机械屏障模型,考察不同脂肪酸〔油酸(OA)、亚油酸(LA)和 α – 亚麻酸(ALA)〕对 Caco – 2 细胞模型完整性和通透性的影响,以及对 Caco – 2 细胞机械屏障相关基因及关键蛋白表达水平的调控作用。结果表明:在脂肪酸浓度 300 μmol/L、干预时间 24 h 条件下,LA 显著降低跨膜电阻值和碱性磷酸酶比活性,升高表观渗透系数和一氧化氮含量,而 OA 和 ALA 对上述指标无显著影响;LA 显著下调胞质紧密黏连蛋白 1(*ZO1*)基因和闭锁蛋白(*OCLN*)基因表达水平,对封闭蛋白 2(*CLDN2*)基因的表达无显著影响;ALA 显著提高 *ZO1* 基因的表达水平并抑制 *CLDN2* 基因的表达水平,而 OA 对 *ZO1*、*OCLN*、*CLDN2* 基因的表达水平无显著影响;3 种脂肪酸对屏障黏附连接蛋白和桥粒蛋白相关基因的表达均无显著影响;LA 显著降低胞质紧密黏进蛋白 1(ZO – 1)和闭锁蛋白(Occludin)的表达水平,ALA 显著降低封闭蛋白 2(Claudin – 2)的表达水平,OA 对紧密连接蛋白的表达水平无显著影响。综上,3 种典型不饱和脂肪酸对 Caco – 2 细胞屏障功能影响不同,LA 可通过降低紧密连接蛋白表达水平来降低肠屏障的完整性,增加其通透性,而 ALA 则表现出提升肠屏障紧密性的效果,OA 则未见明显影响。

关键词: 不饱和脂肪酸;肠道机械屏障;Caco – 2 细胞模型;营养特性

中图分类号: R151;Q493.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1003 – 7969(2025)12 – 0065 – 09

Influences of three typical unsaturated fatty acids on mechanical barrier function of Caco – 2 intestinal epithelial cells

DU Shumeng[1], LI Rui[1], LIU Yuanfa[1,2], YANG Wei[1,2], YE Zhan[1,2]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In order to provide a theoretical basis for optimizing dietary fat intake structure and preventing related chronic metabolic diseases, by constructing a Caco – 2 intestinal epithelial cell mechanical barrier model, the effects of different fatty acids (oleic acid (OA), linoleic acid (LA), and α – linolenic acid (ALA)) on the integrity and permeability of the Caco – 2 cell model were investigated, as well as their regulatory effects on the expression levels of genes and key proteins related to the mechanical barrier of Caco – 2 cells. The results showed that under the conditions of fatty acid concentration 300 μmol/L and intervention time 24 h, LA significantly reduced the transmembrane resistance value and alkaline phosphatase specific activity, increased the apparent osmotic coefficient and nitric oxide content, while OA and ALA had no significant effect on the above indicators. LA significantly downregulated the expression levels of the tight junction protein 1 (*ZO1*) gene and the occludin

收稿日期: 2024 – 12 – 03; **修回日期:** 2025 – 08 – 22

基金项目: "十四五"国家重点研发计划(2023YFD2100400);国家自然科学基金青年基金(32201936);江苏省自然科学基金青年基金(BK20221076)

作者简介: 杜舒梦(2000),女,硕士研究生,研究方向为食品脂质营养(E-mail)smxdushumeng@126.com。

通信作者: 叶　展,副研究员,硕士生导师,博士(E-mail)yezhan@jiangnan.edu.cn;杨　巍,副教授,硕士生导师,博士(E-mail)weiyang@jiangnan.edu.cn。

(*OCLN*) gene, but had no significant effect on the expression of the claudin 2 (*CLDN2*) gene. ALA significantly increased the expression level of the *ZO1* gene and inhibited the expression level of the *CLDN2* gene, while OA had no significant effect on the expression levels of the *ZO1*, *OCLN*, and *CLDN2* genes. The three fatty acids had no significant effects on the expression of barrier adhesion junction protein and desmosome protein - related genes. LA significantly reduced the expression levels of tight junction protein 1(ZO - 1) and Occludin, ALA significantly reduced the expression level of Claudin - 2, and OA had no significant effect on the expression levels of tight junction proteins. In conclusion, the three typical unsaturated fatty acids have different effects on the barrier function of Caco - 2 cells. LA can reduce the integrity of the intestinal barrier and increase its permeability by lowering the expression level of tight junction proteins, ALA promotes the tightness of the intestinal barrier, while OA has no obvious influence.

Key words: unsaturated fatty acids; intestinal mechanical barrier; Caco - 2 cell model; nutritional attributes

肠道不仅是人体消化吸收的主要场所,也是最大的免疫器官,其健康状态对于维持机体的正常运转至关重要[1]。肠道屏障是一个复杂的防御体系,由机械屏障[2]、化学屏障[3]、免疫屏障[4]和生物屏障[5]等组成,其中由肠道上皮细胞及细胞间致密结构构成的机械屏障作用尤为突出,它不仅能够阻止有害物质和病原体的入侵,还能调节肠道内微生物群落的平衡,维持肠道内环境的稳定[2]。机械屏障作为维持肠道健康的关键防线,其完整性受损,会促使代谢性内毒素如脂多糖(LPS)向周围组织释放,导致肠道其他屏障功能紊乱,进而引发全身性的慢性炎症反应。长期存在低水平炎症是肥胖、2 型糖尿病(T2DM)、心血管疾病等慢性代谢类疾病风险增加的关键因素。因此,维持肠道机械屏障的功能健全对于促进营养物质的有效吸收、防止代谢性内毒素的外泄、维护机体健康、预防慢性疾病具有重要意义[2]。

近年来,随着人们生活水平的提高,我国慢性代谢类疾病的发病率呈现暴发式增长[6]。研究表明,当前人群慢性代谢类疾病比例的急剧增加,与居民膳食脂肪的不合理摄入方式密切相关[7-8]。油酸(OA)、亚油酸(LA)和 α - 亚麻酸(ALA)是居民日常膳食中最为典型的 3 种链长相同而饱和度不同的不饱和脂肪酸(UFAs),在肠道内被消化吸收后参与人体正常的生命活动。然而,不同类型的脂肪酸对肠道屏障功能的影响不同。OA 作为一种单不饱和脂肪酸,能够促进有益菌群的生长,抑制有害菌群的繁殖,从而改善肠道形态,避免黏液层中二硫键过量引起的机械屏障损伤[9]。LA 属于 ω - 6 型多不饱和脂肪酸,基于高 LA 的高脂饮食可能通过引起免疫细胞失调、增加肠上皮屏障通透性引发肠道屏障功能障碍,进而导致肠道内分泌系统的紊乱[10]。ALA 则是一种 ω - 3 型多不饱和脂肪酸,其代谢产物二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)被发现可通过调节 NLRP3/ASC 信号通路显著抑制肠道炎症反应,并通过增强胞质紧密黏连蛋白 1(ZO - 1)和闭锁蛋白(Occludin)的表达来维持肠道机械屏障功能[11]。居民长期过量摄入单一油脂,会导致脂肪酸摄入失衡,破坏肠内稳态,进而诱发一系列慢性代谢类疾病[12]。

目前关于典型膳食脂肪酸摄入形式对肠道屏障功能的影响,以及其在慢性代谢类疾病发生发展中的作用机制尚不明确,尤其是在肠道机械屏障功能方面的潜在影响机制仍需进一步研究。基于此,本文以居民日常膳食中最为典型的 3 种不饱和脂肪酸(OA、LA 和 ALA)为研究对象,通过构建人结直肠腺癌(Caco - 2)肠上皮细胞机械屏障模型,研究其对肠道机械屏障功能的影响,并从基因与蛋白质的表达水平探究其潜在作用机制,以期为优化膳食脂肪摄入结构,预防相关慢性代谢类疾病提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

Caco - 2 细胞、MEM 培养基(含非必需氨基酸)、磷酸盐缓冲液(PBS)、Hank's 平衡盐溶液(HBSS),武汉普诺赛生命科技有限公司;OA、LA 和 ALA(纯度均为 99%)标准品,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Gibco 南美胎牛血清(FBS)、Gibco 胰蛋白酶 - EDTA 溶液(0.25%),美国 Thermo Fisher

公司;细胞荧光黄染料,苏州优逸兰迪生物科技有限公司;CCK－8 试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒、一氧化氮检测试剂盒、凝胶试剂盒、蛋白上样缓冲液、蛋白电泳 Marker、ECL 化学发光试剂盒、Tween 20 的 Tris 缓冲盐水(TBST),碧云天生物技术有限公司;牛血清蛋白(BSA)、细胞/组织总 RNA 抽提纯化试剂盒、逆转录试剂、实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT－qPCR)染料,翌圣生物科技(上海)股份有限公司;一抗(ZO－1、Occludin、Claudin－2、α－tubulin)、二抗等,武汉三鹰生物技术有限公司;氢氧化钠(NaOH)、无水乙醇、甲醇等,国药集团化学试剂有限公司。本研究试剂配制和细胞处理所用水均为 Milli－Q 纯化水。

1.1.2　仪器与设备

QuantiStudio 3 RT－qPCR 仪、Multiskan GO 全波长酶标仪、CO_2 培养箱、Sorvall LYNX 4000 离心机,美国 Thermo Fisher 公司;Millicell® ERS 细胞电阻仪、Milli－Q Direct 8 水纯化系统,美国密理博公司;Eppendorf AG PCR 仪,德国艾本德公司;蛋白电泳和转膜整套设备,美国 Bio－Rad 公司;化学发光凝胶成像仪,美国伯乐公司;SpectraMax QuickDrop 超微量分光光度计,美国 Molecular Devices 公司;DM2000 显微镜,德国徕卡公司;超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　Caco－2 细胞培养

使用添加 20%(体积分数)FBS、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 MEM 培养基(细胞培养液),对 Caco－2 细胞进行培养。按照 1×10^4 个/mL 将 Caco－2 细胞接种于 T25 细胞培养瓶内,置于 37 ℃、5%(体积分数)CO_2 的培养箱中培养(后文未特殊说明均为此条件),隔天换液,待细胞融合度达到 80%～90% 时,按 1∶3 的比例进行传代。

1.2.2　脂肪酸处理液的配制

参考文献[13]的方法,将 OA、LA、ALA 溶解在 0.1 mol/L NaOH 溶液中至脂肪酸浓度为 40 mmol/L,在 75 ℃条件下水浴 30 min,与质量分数 30% 的 BSA 溶液等体积混合,得到浓度为 20 mmol/L 的脂肪酸储备液。将储备液过滤灭菌并用细胞培养基稀释后,制得脂肪酸处理液。

1.2.3　脂肪酸对细胞活力的影响

采用 CCK－8 比色法评估不同浓度的 OA、LA、ALA 对 Caco－2 细胞活力的影响。将融合度 80%～90% 的 Caco－2 细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种在 96 孔板中,预培养 20 h,待细胞贴壁,以换液的形式加入不同浓度(150、300 μmol/L 和 600 μmol/L)的 OA、LA、ALA,设置空白组(未接种细胞的细胞培养液)和体积分数 0.225% 的 BSA 对照组,每组设置 3～5 个复孔,分别培养 12、24、36、48 h 和 72 h 后,弃去原培养液,每孔加入 200 μL CCK－8 工作液(细胞培养液与 CCK－8 溶液体积比为 10∶1),37 ℃避光孵育 1.5 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度,根据公式(1)计算细胞活力。

$$Y=\frac{O_{样品}-O_{空白}}{O_{对照}-O_{空白}}\times100\% \tag{1}$$

式中:Y 为细胞活力;$O_{样品}$ 为样品组的吸光度;$O_{对照}$ 为对照组的吸光度;$O_{空白}$ 为空白组的吸光度。

1.2.4　Caco－2 肠上皮细胞机械屏障模型的建立

参考文献[14]的方法建立 Caco－2 肠上皮细胞机械屏障模型。向 6 孔 Transwell 嵌入式培养板(PET 膜,孔径 0.4 μm)的上、下室分别加入 1.5 mL 和 2.6 mL 细胞培养液,置于细胞培养箱 2 h 以平衡聚酯膜,取对数生长期的 Caco－2 细胞消化、离心,制成细胞悬液,以 5×10^4 个/cm^2 的密度均匀接种在 Transwell 上室,每 48 h 对 Transwell 板进行换液。在每次换液前,使用电阻仪测定跨膜电阻值(TEER),当 TEER 大于 450 Ω·cm^2 并稳定时,表示模型建立成功,可模拟肠屏障进行实验[15]。本研究中,Caco－2 细胞在铺板后的第 21 天完全融合并分化,形成了致密单层结构,可进行后续实验。

1.2.5　脂肪酸对 Caco－2 细胞模型干预实验

Caco－2 细胞在 Transwell 嵌入式培养板培养 21 d 后,弃去上、下室培养基,并用 PBS 洗涤 3 次,在对应孔上室加入不同脂肪酸处理液,下室加入细胞培养液,每组 3 个平行,干预一定时间后测定相关指标。

1.2.6　跨膜电阻值(TEER)的测定

根据说明使用 Millicell® ERS 细胞电阻仪测定 Caco－2 细胞模型的电阻。仪器校正零点后,将细胞电阻仪的电极分别置于 Transwell 嵌入式培养板上、下室,确保电极与液面充分接触,待数值稳定后记录,每孔测定 3 次取平均值,TEER 按式(2)计算。

$$R=(R_{样品}-R_{空白})\times S \tag{2}$$

式中:R 为 TEER,Ω·cm^2;$R_{样品}$ 为样品组的电阻,Ω;$R_{空白}$ 为未接种细胞孔的电阻,Ω;S 为 6 孔 Transwell 板膜有效面积,取 4.46 cm^2。

1.2.7　表观渗透系数(Papp)的测定

参照文献[16]的方法,选择荧光黄作为渗透标志物用以评估 Caco－2 肠上皮细胞机械屏障模型的通透性。在 12 孔 Transwell 嵌入式培养板培养的

Caco－2 细胞经脂肪酸干预后，用预热的 HBSS 清洗 Transwell 的上、下室 2 次，弃去 HBSS，在上室加入 0.5 mL 50 μg/mL 的荧光黄溶液，下室加 1.5 mL HBSS，在细胞培养箱中培养 2 h 后，在每孔下室取样 100 μL，在激发波长 428 nm、发射波长 536 nm 条件下，用酶标仪检测荧光强度。代入以荧光黄标准溶液绘制的标准曲线中，根据式（3）计算表观渗透系数（Papp）。

$$P = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0} \tag{3}$$

式中：P 为 Papp，cm/s；dQ/dt 为单位时间荧光黄透过量，μg/s；A 为 12 孔 Transwell 板膜的有效面积，取 1.12 cm^2；C_0为荧光黄溶液质量浓度，μg/mL。

1.2.8 细胞内碱性磷酸酶（AKP）比活力的测定

在 Transwell 嵌入式培养板培养的 Caco－2 细胞经脂肪酸干预后，弃去各孔上室清液，用 PBS 洗涤细胞 3 次，根据 AKP 检测试剂盒说明书裂解细胞，离心取上清，用酶标仪在 405 nm 波长处检测吸光度，计算细胞内 AKP 的比活力。

1.2.9 一氧化氮（NO）含量的测定

在 Transwell 嵌入式培养板培养的 Caco－2 细胞经脂肪酸干预后，收集各孔上室清液，按照 NO 检测试剂盒说明书，设置标品孔和样品孔，依次进行操作，用酶标仪在 540 nm 波长处测定吸光度，根据 NO 标准品绘制的标准曲线计算 NO 含量。

1.2.10 Caco－2 细胞机械屏障相关基因 mRNA 相对表达量的测定

根据总 RNA 抽提纯化试剂盒说明书提取 Caco－2 肠上皮细胞机械屏障的总 RNA，计算 RNA 的纯度及浓度。根据 cDNA 逆转录试剂盒说明书，将总 RNA 逆转录为 cDNA，并使用 qPCR SYBR Green Master Mix 染料，利用 RT－qPCR 仪对目标基因 mRNA 的表达进行定量检测，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$法计算基因胞质紧密黏连蛋白 1（*ZO*1）、闭锁蛋白（*OCLN*）、封闭蛋白 2（*CLDN*2）、E－钙黏蛋白（*CDH*1）、β－连环蛋白（*CTNNB*1）、桥粒黏蛋白 2（*DSG*2）和桥粒糖蛋白 2（*DSC*2）mRNA 的相对表达水平。RT－qPCR 引物基因序列信息见表 1。

表 1 RT－qPCR 引物基因序列信息

Table 1 RT－qPCR primer sequence information

基因	上游基因序列	下游基因序列
*ZO*1	AACTGGGCTCTTGGCTTGCTATTC	TCCAGAAGTCAGCACGGTCTCC
OCLN	ACTTCGCCTGTGGATGACTTCAG	TTCTCTTTGACCTTCCTGCTCTTCC
*CLDN*2	ACAGAGTGGCGGTAGCAGGTG	CCCATGAAGATTCCAGGCAACAGG
*CDH*1	GCCATCGCTTACACCATCCTCAG	CTCTCTCGGTCCAGCCCAGTG
*CTNNB*1	GGCTCTTGTGCGTACTGTCCTTC	GCTTCTTGGTGTCGGCTGGTC
*DSG*2	GCAGGGAAGCACAGCATGACTC	TCCGCAATGGCACATCAGCAG
*DSC*2	AGGATTGGCGGTGGAGGAGTAC	CCACAGACCAGCGTAAACAGGATG

1.2.11 细胞紧密连接蛋白相对表达量的测定

采用蛋白质免疫印迹法测定不同处理组细胞紧密连接蛋白相对表达量，具体处理流程如下：向分化 21 d 后的 Caco－2 细胞中加入高强度的 RIPA 裂解液，收集后利用超声波细胞破碎仪对其进行匀浆，在 4 ℃、1 000 r/min 的条件下离心 10 min，收集上清备用。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各个样品的蛋白质浓度并进行归一化处理，根据计算结果向各个样品中加入一定量的 SDS－PAGE 上样缓冲液（5X），充分混匀，100 ℃水浴 3 min，观察到样品澄清时完成蛋白质变性。采用凝胶试剂盒制备适宜浓度的分离胶与浓缩胶，经 SDS－PAGE 分离蛋白样品后，采用湿法转膜将凝胶上的蛋白条带转移到聚偏氟乙烯（PVDF）膜上；转膜完成后，将 PVDF 膜放置在无蛋白封闭液中封闭 5～10 min 后，添加一抗于 4 ℃孵育过夜，继而使用 TBST 充分漂洗，置于二抗中于室温孵育 1 h，结束后充分漂洗，添加 ECL 化学发光显影液后在化学发光凝胶成像仪中进行显影，采用 Image J 软件对条带进行灰度值定量。

1.2.12 数据统计与分析

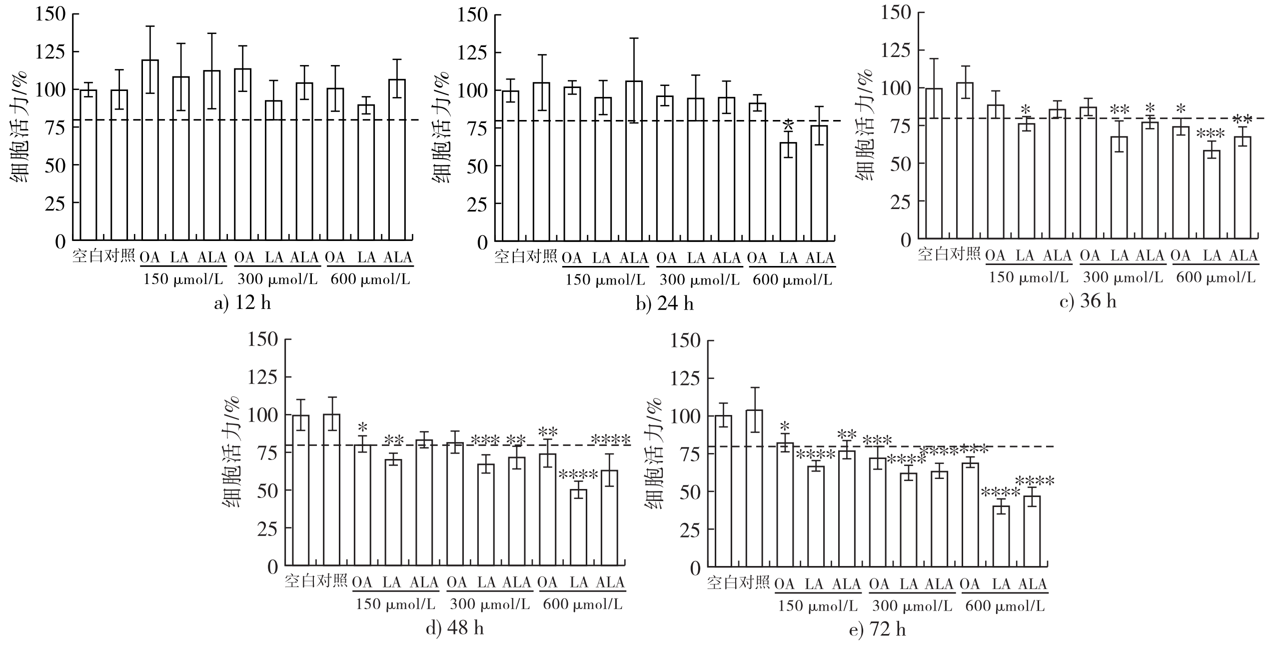
每组实验均进行 3 次平行测定，数据结果经检验符合正态分布，以“平均值 ± 标准差”的形式表示，使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件对实验数据进行差异显著性分析并绘图，数据采用 One－way ANOVA 进行统计学检验，$p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酸干预浓度和干预时间的确定

脂肪酸的干预浓度和干预时间对细胞生长状态有重要影响，长时间或高浓度脂肪酸处理会对

细胞产生毒性作用。研究发现,LA 可以通过调节活性氧(ROS)的生成和改变细胞抗氧化能力调控氧化应激反应,高浓度 LA(300 μmol/L 以上)可抑制细胞生长,而低浓度 LA(100 ~ 200 μmol/L)则又表现出促进细胞增殖的结果[13]。因此,需确定合适的脂肪酸干预浓度和干预时间。OA、LA 和 ALA 的浓度和干预时间对 Caco - 2 细胞活力的影响如图 1 所示。



注:与对照组相比, * 表示 $p<0.05$, ** 表示 $p<0.01$, *** 表示 $p<0.001$, **** 表示 $p<0.000\ 1$。下同

Note:Compared with the control group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.000\ 1$. The same below

图 1　脂肪酸浓度和干预时间对 Caco - 2 细胞活力的影响

Fig. 1　Effects of fatty acid concentration and intervention time on the Caco - 2 cell viability

由图 1 可知,72 h 内对照组(0.225% BSA 组)与空白组的 Caco - 2 细胞活力无显著差异,可排除 BSA 对实验结果的影响,后续实验也均采用 0.225% 的 BSA 处理作为对照。在较短干预时间(12 h)内,各组细胞活力未受到明显影响,均保持在 80% 以上(图中虚线表示细胞活力为 80%),说明脂肪酸对细胞活力无毒性作用,不影响细胞正常生长;干预 24 h 后,高浓度(600 μmol/L)LA 显著降低了 Caco - 2 细胞活力($p<0.05$),这与已有研究结论[13]一致;随着干预时间的延长(36 ~ 72 h),各浓度脂肪酸处理组细胞活力均降低,干预 72 h 时,除 150 μmol/L OA 组外,其余组的细胞活力均低于 80%,这可能是因为长时间脂肪酸干预造成了细胞脂质代谢异常,加剧了细胞内氧化应激反应,使得细胞活力受到影响[17]。综合考虑细胞状态,确定 3 种脂肪酸干预 Caco - 2 细胞浓度为 300 μmol/L,干预时间为 24 h。

2.2　脂肪酸对 Caco - 2 细胞模型完整性和通透性的影响

TEER 可直接反映细胞间紧密连接和屏障功能完整性,是评估 Caco - 2 肠上皮细胞机械屏障模型是否建立成功的主要标志之一[15];Papp 能够量化物质通过细胞层的速率,反映肠屏障的通透性,常用于验证 Caco - 2 肠上皮细胞机械屏障模型的通透性[18];AKP 通常存在于肠上皮细胞的刷状缘,其活力水平可反映细胞的分化和成熟程度,是肠道黏膜通透性的主要调节因子,良好的 AKP 活力可以通过调节肠上皮细胞间紧密连接蛋白的磷酸化状态,进而提高 ZO - 1、胞质紧密黏连蛋白 2(ZO - 2)的表达水平以维持机械屏障的致密与完整[19];NO 是一种重要的信号分子,其在肠道中的含量变化与肠屏障的功能调节密切相关,适量的 NO 有助于维持肠道正常的生理功能和血管舒张,保障肠黏膜的血液供应,但过高浓度的 NO 会导致肠屏障功能受损、通透性增加,还可能引起氧化应激反应,进一步破坏肠屏障的稳定性[20]。对不同脂肪酸处理后细胞的 TEER 变化率(脂肪酸干预后 TEER 与干预前 TEER 的比值)、Papp、AKP 比活力和 NO 含量进行检测,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,OA、LA 均能降低细胞模型的 TEER,而 ALA 能升高细胞模型的 TEER,其中 LA 对细胞模型 TEER 的影响与对照组相比有显著差异($p<0.01$),说明 LA 破坏了肠屏障模型的完整性。LA

显著升高了细胞模型对荧光黄的透过率($p<0.01$)，说明 LA 处理组的肠屏障模型通透性增加，可能会对肠屏障功能的正常发挥产生不利影响，而 OA 和 ALA 对细胞模型的 Papp 无显著影响($p>0.05$)。OA 和 ALA 对细胞模型 AKP 比活力无明显影响($p>0.05$)，而 LA 显著降低了 Caco－2 细胞模型的 AKP 比活力($p<0.05$)，说明 LA 可能抑制了 Caco－2 细胞的正常分化，从而损伤肠道模型屏障的功能。OA 和 ALA 对细胞模型的 NO 含量无明显影响($p>0.05$)，而 LA 显著增加了 Caco－2 细胞模型中 NO 的含量($p<0.01$)，可能是由于 LA 促进了 NO 的生成，而过量的 NO 会造成肠屏障功能的破坏。

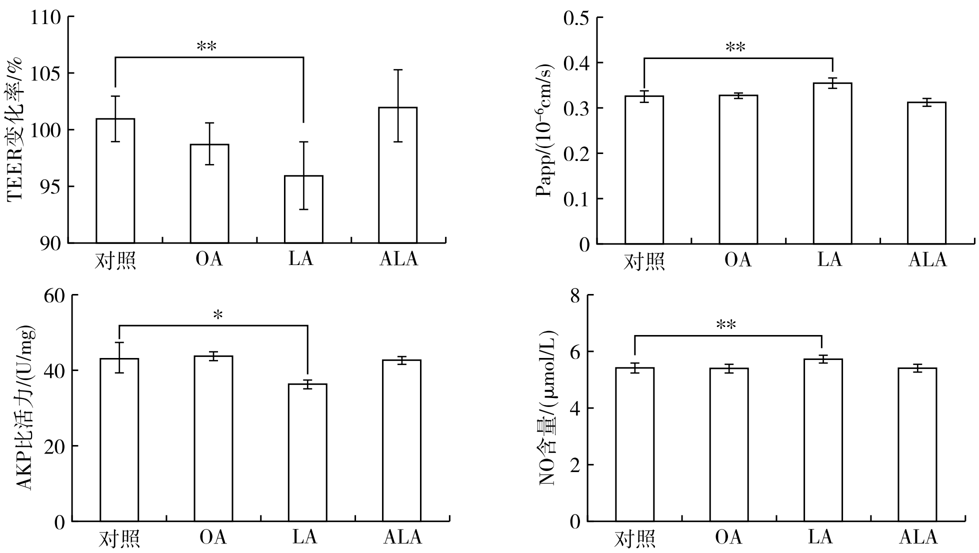


图 2　不同脂肪酸处理对 Caco－2 细胞模型完整性、通透性的影响

Fig. 2　Effects of different fatty acids on integrity and permeability of Caco－2 cell model

2.3　脂肪酸对 Caco－2 细胞模型机械屏障相关基因表达水平的影响

2.3.1　对 Caco－2 细胞模型紧密连接蛋白相关基因表达水平的影响

已有研究表明，*ZO*1 编码的紧密连接相关蛋白 ZO－1，*OCLN* 编码的 Occludin，以及 *CLDN*2 编码的封闭蛋白 2(Claudin－2)的正常表达是肠道机械屏障功能维持的重要标志[21]。ZO－1 是构成肠屏障紧密连接的主要结构蛋白，其表达量的改变会影响肠屏障功能的发挥[22]；Occludin 为紧密连接提供结构完整性，是肠道机械屏障抵御有害物质入侵的重要组成部分，其表达水平与体外和体内的屏障特性密切相关[23]；Claudin－2 是一种形成孔隙的封闭蛋白，其表达水平可调控机体对 Na^+、K^+、Li^+ 等阳离子和水的渗透性，进而影响肠道屏障功能[24]。ZO－1 作为紧密连接结构的重要支撑，它将 Occludin 和 Claudin－2 等跨膜蛋白与肌动蛋白细胞骨架相连，确保紧密连接的稳定性。不同脂肪酸处理对 Caco－2 细胞模型 *ZO*1、*OCLN* 和 *CLDN*2 的 mRNA 表达水平的影响如图 3 所示。

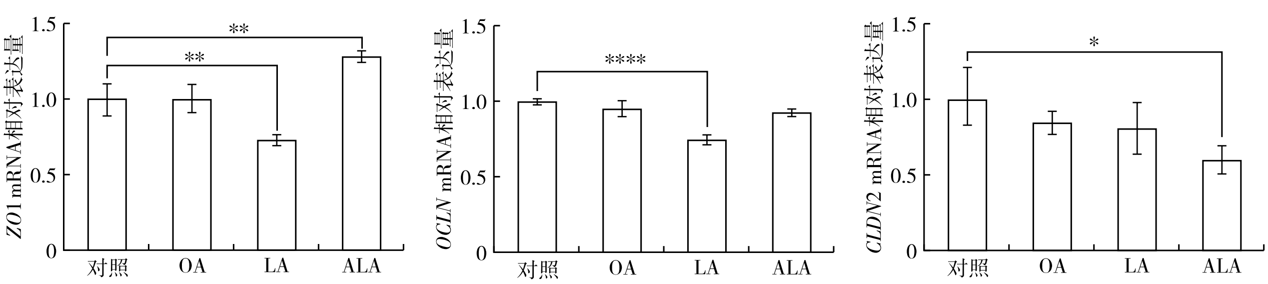


图 3　不同脂肪酸处理对 Caco－2 细胞模型紧密连接蛋白相关基因表达水平的影响

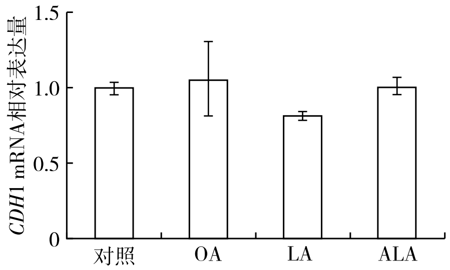
Fig. 3　Effects of different fatty acids on the expression levels of tight junction protein－related genes in the Caco－2 cell model

由图 3 可知，OA 组细胞模型 *ZO*1 基因的表达水平无明显变化($p>0.05$)，LA 组 *ZO*1 基因的表达水平显著降低($p<0.01$)，而 ALA 组细胞模型 *ZO*1 基因的表达水平显著升高($p<0.01$)，这与文献[25]的结果一致。OA 和 ALA 对细胞模型 *OCLN* 基因的表达水平无明显影响($p>0.05$)，而 LA 显著降低了细胞模型 *OCLN* 基因的表达水平($p<0.0001$)。OA 和 LA 对细胞模型 *CLDN*2 基因的表达水平无明显

显影响($p>0.05$),而 ALA 显著降低了细胞模型 *CLDN*2 基因的表达水平($p<0.05$)。结果表明,LA 和 ALA 会影响 Caco－2 肠上皮细胞机械屏障模型紧密连接相关基因的表达,其中 LA 组细胞模型呈现出屏障完整性降低的趋势,而 ALA 则可能促进屏障紧密连接结构的稳定。

2.3.2　对 Caco－2 细胞黏附连接蛋白相关基因表达水平的影响

*CDH*1 编码的 E－钙黏蛋白(E－cadherin)可促进细胞与细胞之间黏附,形成连续的细胞层,限制物质非特异性通透,其正常表达是维持肠屏障完整性,防止有害物质侵入的前提,而其表达异常会影响肠屏障的通透性[26]。*CTNNB*1 基因编码的 β－连环蛋白(β－catenin)参与多种信号通路,能通过与其他蛋白相互作用,调节细胞的增殖、分化和黏附,与 E－cadherin 等蛋白结合,有助于稳定细胞间的黏附连接,对维持肠屏障的结构和功能起着重要作用[27]。不同脂肪酸处理对 Caco－2 细胞模型 *CDH*1 和 *CTNNB*1 的 mRNA 表达水平的影响如图 4 所示。



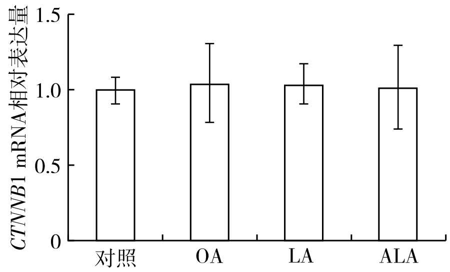


图 4　不同脂肪酸处理对 Caco－2 细胞模型黏附连接蛋白相关基因表达水平的影响

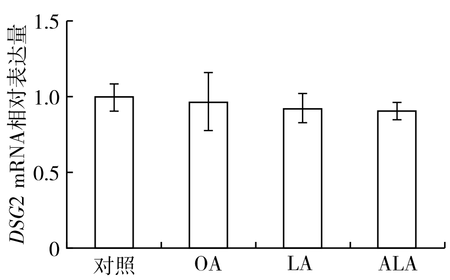
Fig. 4　Effects of different fatty acids on the expression levels of adhesion junction protein－related genes in the Caco－2 cell model

由图 4 可知,OA、LA 和 ALA 对 Caco－2 细胞模型黏附连接相关基因 *CDH*1 和 *CTNNB*1 的表达水平均无显著影响($p>0.05$)。这表明 3 种脂肪酸处理并不会在基因转录水平上对细胞黏附连接水平造成显著影响。

2.3.3　对 Caco－2 细胞桥粒蛋白相关基因表达水平的影响

*DSG*2 和 *DSC*2 基因编码的蛋白是桥粒的重要组成部分[28]。桥粒为细胞间提供黏附作用,有助于维持屏障细胞的致密性和黏膜层稳定性,桥粒蛋白的正常表达表明细胞发挥正常的机械屏障功能,有利于抵御不良条件刺激[29]。不同脂肪酸处理对 Caco－2 细胞模型 *DSG*2 和 *DSC*2 的 mRNA 表达水平的影响如图 5 所示。

由图 5 可知,OA、LA 和 ALA 对 Caco－2 细胞模型黏附连接相关基因 *DSG*2 和 *DSC*2 的表达水平均无显著影响($p>0.05$)。这表明 3 种脂肪酸处理不会在基因转录水平上对细胞桥粒表达造成显著影响。



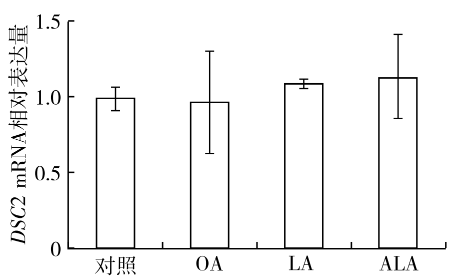


图 5　不同脂肪酸处理对 Caco－2 细胞模型桥粒蛋白相关基因表达水平的影响

Fig. 5　Effects of different fatty acids on the expression levels of desmosome protein－related genes in the Caco－2 cell model

2.4　脂肪酸对 Caco－2 细胞模型紧密连接蛋白相对表达量的影响

为进一步在分子层面分析脂肪酸对肠屏障紧密连接水平的影响,对各组细胞模型的紧密连接相关蛋白的表达水平进行了分析。蛋白免疫印迹条带图及 ZO－1、Occludin 和 Claudin－2 的相对表达量如图 6 所示。

由图 6 可知:OA 和 ALA 组 ZO－1 的表达水平无显著变化($p>0.05$),而 LA 处理会显著降低细胞模型 ZO－1 的表达水平($p<0.05$);OA 和 ALA 对细胞模型 Occludin 相对表达量无显著影响($p>0.05$),而 LA 处理显著降低了细胞模型 Occludin 的表达水平($p<0.01$),说明 LA 可能破坏了肠屏障模型紧密连接结构的完整性;OA 和 LA 对 Claudin－2

的相对表达量无显著影响($p>0.05$),而 ALA 处理能显著降低细胞模型 Claudin－2 的相对表达量($p<0.01$),有可能减少肠屏障孔道的形成,这与 2.3.1中 ALA 处理显著增加 *ZO*1 基因表达水平的结果存在一致性,表明 ALA 在维持紧密连接结构的完整性方面可能发挥有利作用。

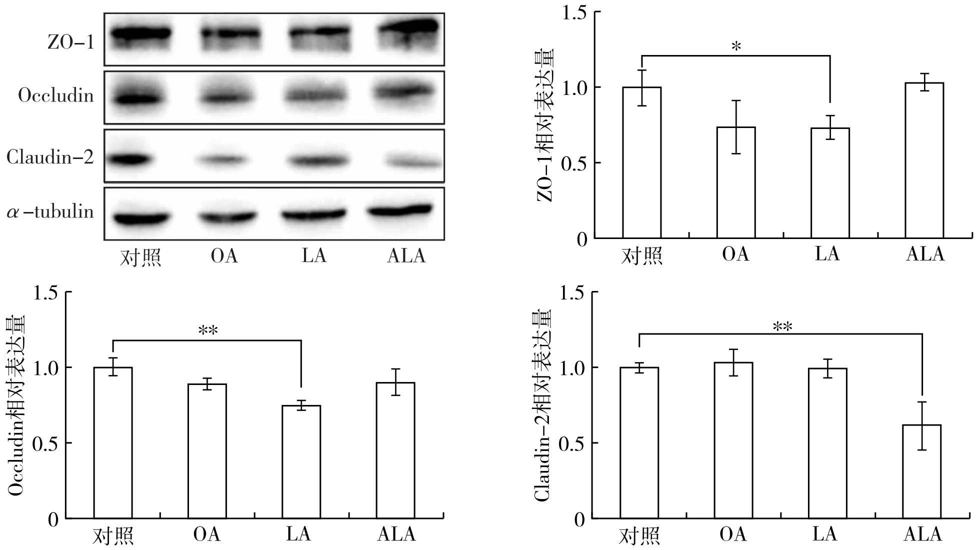


图 6 蛋白免疫印迹条带图及紧密连接蛋白的相对表达量

Fig. 6 Protein immunoblotting strip diagram and expression levels of tight junction proteins

3 结 论

本研究通过构建 Caco－2 肠上皮细胞机械屏障模型,探讨了 3 种典型不饱和脂肪酸(OA、LA 和 ALA)对肠道屏障功能的影响。结果表明:在脂肪酸浓度 300 μmol/L、干预时间 24 h 条件下,LA 组 TEER 变化率和 AKP 比活力显著降低,而 Papp 和 NO 含量显著增加,OA 组和 ALA 组与对照组相比未见显著差异;3 种脂肪酸对于黏附连接蛋白和桥粒蛋白相关基因的表达水平均无显著影响,但在紧密连接蛋白相关基因的表达水平上出现差异,OA 对紧密连接蛋白相关基因的表达无显著影响,LA 可显著降低紧密连接蛋白相关基因 *ZO*1、*OCLN* 及其蛋白 ZO－1、Occludin 的表达水平,而 ALA 可显著提升 *ZO*1 基因表达水平的同时,明显抑制了 *CLDN*2 基因和 Claudin－2 的表达水平。总之,3 种脂肪酸对肠屏障功能的影响存在明显差异,LA 可能通过下调肠细胞紧密连接蛋白表达水平来降低肠屏障的完整性,而 ALA 则可通过降低致孔相关蛋白的表达来提升肠屏障的紧密性,OA 未见明显影响。关于不同类型脂肪酸及其比例对肠屏障功能影响的具体调控通路机制仍有待挖掘,本研究可从维持肠道屏障功能的角度,为倡导膳食脂肪酸合理平衡摄入提供一定的理论参考依据。

参考文献:

[1] ADOLPH T E, ZHANG J. Diet fuelling inflammatory bowel diseases: Preclinical and clinical concepts [J]. Gut, 2022, 71(12): 2574－2586.

[2] FUKUI H. Increased intestinal permeability and decreased barrier function: Does it really influence the risk of inflammation? [J]. Inflamm Intest Dis, 2016, 1(3): 135－145.

[3] SURIANO F, NYSTRÖM E E L, SERGI D, et al. Diet, microbiota, and the mucus layer: The guardians of our health[J/OL]. Front Immunol, 2022, 13: 953196[2024－12－03]. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.953196.

[4] 刘坤慧, 颜伟慧, 蔡威. 肠屏障功能与肠外营养相关肝损伤关系研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2022, 29(6): 370－374.

[5] DE VOS W M, TILG H, VAN HUL M, et al. Gut microbiome and health: Mechanistic insights [J]. Gut, 2022, 71(5): 1020－1032.

[6] 中国居民营养与慢性病状况报告(2020 年)[R]. 北京: 国家卫生健康委员会,2020.

[7] CHRIST A, LAUTERBACH M, LATZ E. Western diet and the immune system: An inflammatory connection [J]. Immunity, 2019, 51(5): 794－811.

[8] GUASCH－FERRÉ M, WILLETT W C. The Mediterranean diet and health: A comprehensive overview[J]. J Int Med, 2021, 290(3): 549－566.

[9] SANT'ANA C T, VEREDIANO T A, GRANCIERI M, et al. Macauba (*Acrocomia aculeata*) pulp oil has the potential to enhance the intestinal barrier morphology, goblet cell proliferation and gut microbiota composition in mice fed a high－fat diet[J]. Br J Nutr, 2024, 131(6): 987－996.

[10] DEOL P, RUEGGER P, LOGAN G D, et al. Diet high in

linoleic acid dysregulates the intestinal endocannabinoid system and increases susceptibility to colitis in mice[J/OL]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2229945[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 1080/19490976. 2023. 2229945.

[11] WANG X Y, HE S S, ZHOU M M, et al. EPA and DHA alleviated chronic dextran sulfate sodium exposure - induced depressive - like behaviors in mice and potential mechanisms involved[J/OL]. Mar Drugs, 2024, 22(2): 76[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 3390/md22020076.

[12] GONZÁLEZ - BECERRA K, RAMOS - LOPEZ O, BARRÓN - CABRERA E, et al. Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: A systematic review[J/OL]. Lipids Health Dis, 2019, 18(1): 178[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 1186/s12944 - 019 - 1120 - 6.

[13] LU X, YU H, MA Q, et al. Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction[J/OL]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 106[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 1186/1476 - 511x - 9 - 106.

[14] WANG Y, LIN Q, ZHENG P, et al. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on chylomicron and VLDL synthesis and secretion in Caco - 2 cells[J/OL]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 684325 [2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 1155/2014/684325.

[15] POLEWSKI M A, ESQUIVEL - ALVARADO D, WEDDE N S, et al. Isolation and characterization of blueberry polyphenolic components and their effects on gut barrier dysfunction[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(10): 2940 - 2947.

[16] 赵安鹏，牟宏芳，姚菀腾，等. 低氧对 Caco - 2 细胞 P - gp表达及功能的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2023, 48(4): 491 - 498.

[17] OH Y S, BAE G D, BAEK D J, et al. Fatty acid - induced lipotoxicity in pancreatic *beta* - cells during development of type 2 diabetes[J/OL]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9: 384[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 3389/fendo. 2018. 00384.

[18] PIRES C L, PRAÇA C, MARTINS P A T, et al. Re - use of Caco - 2 monolayers in permeability assays - validation regarding cell monolayer integrity[J/OL]. Pharmaceutics, 2021, 13(10): 1563[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 3390/pharmaceutics13101563.

[19] LIU W, HU D, HUO H, et al. Intestinal alkaline phosphatase regulates tight junction protein levels[J]. J Am Coll Surg, 2016, 222(6): 1009 - 1017.

[20] CHO Y E, KIM D K, SEO W, et al. Fructose promotes leaky gut, endotoxemia, and liver fibrosis through ethanol - inducible cytochrome P450 - 2E1 - mediated oxidative and nitrative stress[J]. Hepatology, 2021, 73(6): 2180 - 2195.

[21] JATANA S, ABBADI A, WEST G A, et al. Hyperglycemic environments directly compromise intestinal epithelial barrier function in an organoid model and hyaluronan (~35 kDa) protects via a layilin dependent mechanism [J]. Matrix Biol, 2024, 133: 116 - 133.

[22] 郝丽军，林燕，张薇，等. 二十碳五烯酸对 *E. coli* LF82 感染后肠上皮细胞紧密连接蛋白 ZO - 1 mRNA 的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(6): 693 - 698.

[23] CHELAKKOT C, GHIM J, RYU S H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(8): 1 - 9.

[24] OAMI T, ABTAHI S, SHIMAZUI T, et al. Claudin - 2 upregulation enhances intestinal permeability, immune activation, dysbiosis, and mortality in sepsis[J/OL]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(10): e2217877121 [2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 1073/pnas. 2217877121.

[25] YANG Y, XIAO Y, JIANG Y, et al. *Alpha* - lipoic acid promotes intestinal epithelial injury repair by regulating MAPK signaling pathways[J/OL]. Mediators Inflamm, 2022, 2022: 1894379[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 1155/2022/1894379.

[26] YU T X, GU B L, YAN J K, et al. CUGBP1 and HuR regulate E - cadherin translation by altering recruitment of E - cadherin mRNA to processing bodies and modulate epithelial barrier function[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 310(1): C54 - C65.

[27] HUANG S, XIE Z, HAN J, et al. Protocadherin 20 maintains intestinal barrier function to protect against Crohn's disease by targeting ATF6[J/OL]. Genome Biol, 2023, 24(1): 159[2024 - 12 - 03]. https://doi. org/10. 1186/s13059 - 023 - 02991 - 0.

[28] KAMEKURA R, KOLEGRAFF K N, NAVA P, et al. Loss of the desmosomal cadherin desmoglein - 2 suppresses colon cancer cell proliferation through EGFR signaling[J]. Oncogene, 2014, 33(36): 4531 - 4536.

[29] ROXAS J L, VEDANTAM G, VISWANATHAN V K. Epithelial maturity influences EPEC - induced desmosomal alterations[J]. Gut Microbes, 2019, 10(2): 241 - 245.