

# 减味连梅汤诱导脓毒症小鼠粪便上清保护 RAW264.7 细胞炎症与 Caco-2 细胞氧化损伤的作用研究

毛胜敏<sup>1</sup>, 唐 勇<sup>2</sup>, 范嘉瑞<sup>1</sup>, 李昱辰<sup>1</sup>, 白群华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学公共卫生学院, 重庆

<sup>2</sup>重庆市中医骨科医院门诊部, 重庆

收稿日期: 2026年3月21日; 录用日期: 2026年4月16日; 发布日期: 2026年4月22日

## 摘 要

目的: 探讨经减味连梅汤干预后不同组别脓毒症小鼠粪便上清(fecal supernatant, FS)对RAW264.7巨噬细胞炎症模型及Caco-2肠上皮细胞损伤模型的影响, 并初步分析其经肠道微环境介导的体外生物学效应。方法: 收集正常组、脓毒症模型组及减味连梅汤干预组小鼠新鲜粪便, 制备FS。采用CCK-8法筛选FS对RAW264.7和Caco-2细胞的安全作用浓度, 并分别建立LPS诱导的RAW264.7炎症模型和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caco-2氧化损伤模型。以安全浓度FS预处理细胞后进行造模, 检测细胞活力、RAW264.7细胞NO分泌, 并采用RT-qPCR检测炎症因子及肠屏障相关蛋白表达水平。结果: 各组FS在筛选浓度范围内对RAW264.7和Caco-2细胞均未见明显细胞毒性。LPS刺激后, RAW264.7细胞炎症反应被成功激活; 与模型组比较, 不同组FS处理后能一定程度降低NO水平, 但iNOS及IL-6等炎症相关指标未见明显逆转, 提示其对巨噬细胞炎症表型的直接调控作用有限。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激后, Caco-2细胞活力下降并伴随肠屏障相关分子表达受损; 与模型组比较, 减味连梅汤干预组来源FS可在一定程度上改善Caco-2细胞紧密连接蛋白ZO-1等屏障相关指标的表达, 但改善程度有限, 部分指标差异未达到统计学显著。结论: 减味连梅汤干预后小鼠FS对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应调控作用较弱, 但对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caco-2细胞屏障损伤具有一定改善趋势。

## 关键词

减味连梅汤, 脓毒症, 粪便上清, RAW264.7细胞, Caco-2细胞

## Protective Effects of Fecal Supernatant from Jianwei Lianmei Decoction-Treated Septic Mice on Inflammation in RAW264.7 Cells and Oxidative Injury in Caco-2 Cells

\*通讯作者。

文章引用: 毛胜敏, 唐勇, 范嘉瑞, 李昱辰, 白群华. 减味连梅汤诱导脓毒症小鼠粪便上清保护 RAW264.7 细胞炎症与 Caco-2 细胞氧化损伤的作用研究[J]. 临床医学进展, 2026, 16(4): 4269-4280. DOI: 10.12677/acm.2026.1641695

Shengmin Mao<sup>1</sup>, Yong Tang<sup>2</sup>, Jiarui Fan<sup>1</sup>, Yuchen Li<sup>1</sup>, Qunhua Bai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing

<sup>2</sup>Outpatient Department, Chongqing Orthopaedics Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing

Received: March 21, 2026; accepted: April 16, 2026; published: April 22, 2026

## Abstract

**Objective:** To investigate the effects of fecal supernatant (FS) derived from septic mice in different groups after intervention with Jianwei Lianmei Decoction on an inflammatory model of RAW264.7 macrophages and an injury model of Caco-2 intestinal epithelial cells, and to preliminarily explore its *in vitro* biological effects mediated through the intestinal microenvironment. **Methods:** Fresh feces were collected from mice in the normal group, the DSS model group, and the Jianwei Lianmei Decoction intervention group to prepare fecal supernatant (FS). The safe concentration range of FS for RAW264.7 and Caco-2 cells was screened using the CCK-8 assay. An inflammatory response model was constructed in RAW264.7 macrophages using lipopolysaccharide (LPS), while an oxidative damage model in Caco-2 cells was established through stimulation with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Prior to the induction of these models, the cells were pretreated with FS at concentrations verified to be non-cytotoxic. Following treatment, the viability of RAW264.7 cells and the production of nitric oxide (NO) were determined. In addition, the mRNA expression levels of inflammation-associated cytokines as well as proteins related to the intestinal barrier were further evaluated using RT-qPCR analysis. **Results:** Within the tested concentration range, FS from all groups showed no obvious cytotoxicity toward RAW264.7 and Caco-2 cells. After LPS stimulation, inflammatory responses in RAW264.7 cells were successfully induced. Compared with the model group, FS treatment from different groups reduced NO levels to a certain extent; however, inflammatory indicators such as iNOS and IL-6 were not significantly reversed, suggesting that the direct regulatory effect of FS on the macrophage inflammatory phenotype may be limited. Following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation, the viability of Caco-2 cells decreased and the expression of intestinal barrier-related molecules was impaired. Compared with the model group, FS derived from the Jianwei Lianmei Decoction intervention group slightly improved the expression of tight junction proteins such as ZO-1 in Caco-2 cells; however, the improvement was modest, and some indicators did not reach statistical significance. **Conclusion:** FS derived from mice after Jianwei Lianmei Decoction intervention showed a relatively weak regulatory effect on the inflammatory response in LPS-induced RAW264.7 cells, but exhibited a potential trend toward improving barrier injury in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Caco-2 cells.

## Keywords

Jianwei Lianmei Decoction, Sepsis, Fecal Supernatant, RAW264.7 Cells, Caco-2 Cells

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

脓毒症是由感染诱发的宿主反应失调所导致的危及生命的器官功能障碍，其发生发展不仅涉及固有免疫异常激活，还与肠道屏障损伤、菌群失衡及代谢紊乱等多重机制密切相关[1]。近年来研究认为，肠道在脓毒症中不仅是受累器官之一，更可能是推动全身炎症放大与远隔器官损伤的重要枢纽。一方面，

脓毒症状态可造成肠道菌群失衡、肠黏膜缺血缺氧和肠上皮修复能力下降；另一方面，肠屏障受损后细菌组分及内毒素移位，又会反过来加剧全身炎症反应，形成恶性循环[2] [3]。因此，改善肠通透性异常、修复肠屏障功能及调节肠道微生态等，可能是脓毒症的潜在治疗策略。

连梅汤是常用于脓毒症治疗的中医药方剂[4]。我们前期研究显示，原方中乌梅、黄连、阿胶组成的减味连梅汤对 DSS 与 LPS 联合应用诱导的肠源性脓毒症模型小鼠肠微生态紊乱有明显改善作用，并对其肠屏障损伤、肠道炎症产生了显著的保护作用。目前研究证实，肠道菌群的代谢物，如丁酸、丙酸和乙酸与等短链脂肪酸、胆汁酸衍生物等，与屏障稳态和免疫调节关系密切[5] [6]。我们推测减味连梅汤可能通过改善脓毒症小鼠的肠道菌群紊乱，促进肠道菌群产生肠屏障修复和抑制免疫过度活化的代谢产物而产生治疗作用。

巨噬细胞作为肠黏膜先天免疫的重要效应细胞，在识别病原相关分子模式、分泌炎症介质、调节上皮修复及维持局部免疫稳态中发挥核心作用[7]。LPS 刺激的 RAW264.7 细胞模型是评价炎症因子释放、NO 生成及炎症相关信号激活的经典体外模型[8] [9]。Caco-2 细胞因能够形成极化的肠上皮样单层并表达紧密连接蛋白，广泛用于肠屏障功能研究，同时 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Caco-2 氧化损伤模型则常用于模拟氧化应激导致的上皮损伤与屏障异常[10]。粪便上清包含肠道菌群代谢产生的短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)、胆汁酸、酚类、吲哚类等生物活性物质，是肠道菌群代谢产物的载体，可用于探究菌群代谢对宿主的影响与机制[11] [12]。本研究利用 RAW264.7 细胞炎症模型和 Caco-2 细胞损伤模型，体外观察减味连梅汤灌胃治疗的脓毒症小鼠粪便上清对细胞模型炎症反应及肠屏障相关指标的影响，以初步探讨减味连梅汤是否通过影响肠道菌群的代谢而产生肠屏障保护和肠道免疫调节作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(美国 Gibco, 批号: C11995500BT); PBS 缓冲液(中国武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: G4202-500 mL); 胎牛血清(FBS, 中国 LONSERA); 青霉素 - 链霉素(P/S, 上海碧云天生物技术有限公司); CCK-8 试剂(上海碧云天生物技术有限公司); 0.25%胰酶(上海碧云天生物技术有限公司); 脂多糖(美国 Sigma, 批号: L2630)、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (中国海氏海诺); 总 RNA 提取试剂盒(北京普洛麦格生物技术有限公司); 异丙醇(重庆川东化工有限公司); DEPC 水(上海碧云天生物技术有限公司); 无水乙醇(重庆川东化工有限公司); Prime Script™ RT Master Mix (日本 Takara); TB Green® Premix Ex Taq™ II (日本 Takara); 超净工作台(美国 AIRTECH, 型号: SW-CJ-2FD); 恒温培养箱(中国海尔, 型号: HCP-80); 酶标检测仪(美国 Thermo scientific); CFX Connect™ Real-Time PCR 仪(美国 Bio-Rad); T100™ Thermo Cycle PCR 仪(美国 Bio-Rad)。

### 2.2. 实验细胞

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞和人结直肠腺癌细胞 Caco-2 细胞均来自 ATCC 细胞库(中国逸漠生物技术有限公司, 编号: IM-M028 和 IM-H092)。

### 2.3. 方法

#### 2.3.1. 细胞培养

RAW264.7 细胞培养于含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 1%双抗(青霉素 - 链霉素)的 DMEM 完全培养基中; Caco-2 细胞培养于含 20% FBS、1%双抗及 1%非必需氨基酸(non-essential amino acids, NEAA)的 DMEM 完全培养基中。两种细胞均置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。待细胞生

长至 80%~90%融合时进行传代。RAW264.7 细胞和 Caco-2 细胞均取对数生长期细胞用于后续实验。

### 2.3.2. 粪便上清(FS)的制备

收集正常组小鼠(FS-CON)、脓毒症模型组小鼠(FS-Model)及减味连梅汤组小鼠(FS-W+H+E)的新鲜粪便,于冰上操作。准确称取各组小鼠粪便 100 mg,加入预冷磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS) 1 mL,充分涡旋混匀,制成粪便匀浆。

随后于 4℃条件下进行两步离心。首先以  $8000 \times g$  离心 10 min,去除大部分未消化纤维及粗颗粒残渣;吸取上清液转移至新的无菌离心管中,再以  $12,000 \times g$  离心 10 min,以进一步去除细小悬浮颗粒。收集二次离心后的上清液,并以无菌 PBS 稀释至目标浓度 10 mg/mL。随后采用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤除菌,获得粪便上清(FS)。制备后的 FS 短期保存于 4℃冰箱,长期保存于 -80℃冰箱备用。使用前于冰上融解,避免反复冻融。

### 2.3.3. FS 对 RAW264.7 和 Caco-2 细胞安全作用浓度的筛选

采用 CellCountingKit-8 (CCK-8)法检测 FS 对 RAW264.7 和 Caco-2 细胞活力的影响,以筛选后续实验所用安全作用浓度。取对数生长期 RAW264.7 和 Caco-2 细胞,制备单细胞悬液后分别以  $1 \times 10^5$  cells/mL 和  $2 \times 10^4$  cells/mL 密度接种于 96 孔板,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,接种后置于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中过夜培养,待细胞贴壁稳定后进行后续处理。每组设 6 个复孔。按 FS 与培养基体积比分别设置不同浓度梯度:1:1000、1:500、1:200、1:100、1:50 和 1:25,对照组加入等体积培养基。继续培养 24 h 后,弃去培养液,以 PBS 轻柔洗涤 2 次。随后每孔加入含 10% CCK-8 试剂的无血清培养基 100  $\mu\text{L}$ ,37℃避光孵育 2 h,于酶标仪 450 nm 波长处测定各孔吸光度(OD)值。根据各组细胞活力结果,筛选对 RAW264.7 和 Caco-2 细胞无明显毒性作用的 FS 浓度用于后续实验。细胞活力按下式计算:

$$\text{细胞活力}(\%) = [(\text{OD 实验孔} - \text{OD 空白孔}) / (\text{OD 对照孔} - \text{OD 空白孔})] \times 100\%$$

### 2.3.4. RAW264.7 细胞 LPS 炎症模型及 Caco-2 细胞 $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化损伤模型的建立

采用 CCK-8 法筛选适宜建模浓度。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)以 PBS 为溶剂配制成 1 mg/mL 母液; $\text{H}_2\text{O}_2$ 配制成 10 mmol/L 母液,均现配现用,并以无血清培养基稀释至所需工作浓度。取对数生长期 RAW264.7 细胞和 Caco-2 细胞,按“2.3.3”中相同密度接种于 96 孔板。过夜培养待细胞贴壁稳定后,弃去旧培养基,以 PBS 轻柔洗涤 1~2 次。RAW264.7 细胞分别加入不同浓度 LPS (10, 25, 50, 75, 100 ng/mL)处理 24 h,以建立炎症模型;Caco-2 细胞分别加入不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800  $\mu\text{mol/L}$ )处理 24 h,以建立氧化损伤模型。处理结束后弃去培养液,每孔加入含 10% CCK-8 试剂的培养基 100  $\mu\text{L}$ ,37℃避光孵育 2 h,于 450 nm 波长处检测 OD 值,并按“2.3.3”中的公式计算细胞活力。根据细胞活力下降程度,结合模型稳定性筛选后续实验所用最佳建模浓度。

### 2.3.5. FS 对模型细胞活力的影响

在确定 FS 安全作用浓度及细胞模型最佳建模浓度后,进一步观察 FS 对炎症及氧化损伤模型细胞活力的影响。RAW264.7 和 Caco-2 细胞按上述条件接种于 96 孔板并培养过夜,待细胞贴壁稳定后,先以筛选出的安全浓度 FS 预处理 4 h,随后分别加入造模浓度的 LPS 或  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续培养至 24 h。处理结束后采用 CCK-8 法检测细胞活力,具体操作同“2.3.3”。通过比较各组细胞活力变化,评价 FS 对 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症模型及  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 Caco-2 氧化损伤模型的干预作用。

### 2.3.6. NO 含量测定

采用 Griess 法检测 RAW264.7 细胞培养上清中一氧化氮(nitric oxide, NO)含量,以评价 FS 对炎症反应的影响。RAW264.7 细胞接种于 24 孔板并培养过夜后,先以筛选出的安全浓度 FS 预处理 4 h,再加入

造模浓度 LPS 继续培养至 24 h。处理结束后, 收集各组细胞培养上清 50  $\mu\text{L}$  于 96 孔板中, 每孔依次加入 50  $\mu\text{L}$  Griess Reagent I 和 50  $\mu\text{L}$  Griess Reagent II, 室温避光反应。以亚硝酸钠标准液绘制标准曲线, 于 540 nm 波长处测定吸光度, 根据标准曲线计算各组 NO 含量。

### 2.3.7. RT-qPCR 检测相关基因表达

采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测各实验组细胞中相关基因 mRNA 的表达水平。取对数生长期 RAW264.7 细胞和 Caco-2 细胞, 制备单细胞悬液后分别以  $2.5 \times 10^5$  cells/mL 和  $2 \times 10^5$  cells/mL 密度接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 接种后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中过夜培养, 待细胞贴壁稳定后, 除对照组外, 其余各组先以筛选出的安全浓度 FS 预处理 4 h, 随后分别加入造模浓度的 LPS 或  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续培养至 24 h。培养结束后, 弃去培养液, 用预冷 PBS 缓冲液清洗两次。随后按照 RNA 提取试剂盒的操作说明提取细胞总 RNA。获得 RNA 样品采用 DEPC 水进行溶解, 并利用核酸/蛋白分析仪测定其  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值, 以评估 RNA 的纯度。选择纯度符合要求的 RNA 作为模板, 依据逆转录试剂盒说明进行反转录反应, 合成 cDNA。以获得的 cDNA 为模板, 按照 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒说明进行实时荧光定量 PCR 扩增。PCR 反应程序设定为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 随后进行 40 个循环, 每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s 以及 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s。实验中以 GAPDH 作为内参基因, 目标基因的引物序列见表 1、表 2。各组基因的相对表达量通过  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法进行计算分析。每组设 3 个重复。

### 2.3.8. 统计学分析

所有实验均独立重复不少于 3 次, 实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 GraphPad Prism10.0 软件进行分析作图。对于两组样本间差异比较, 采用独立样本 t 检验; 当三组及以上数据比较时, 则采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。若差异具有统计学意义, 则进一步进行事后多重比较分析, 以明确各组之间的具体差异。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

**Table 1.** RAW264.7 cells primer sequence of the target gene

**表 1.** RAW264.7 细胞靶基因引物序列

Gene	Forward primer sequences (5'-3')	Reverse primer sequences (5'-3')
<i>GAPDH</i> (mice)	TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA
<i>iNOS</i>	CCACAGTCCCTCTTTGCTA	GTAGTTGCTCCTCTTCCA
<i>IL-6</i>	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
<i>IL-10</i>	CTGGACAACATACTGCTAACC	GGGCATCACTTCTACCAGGTA

**Table 2.** Caco-2 cells primer sequence of the target gene

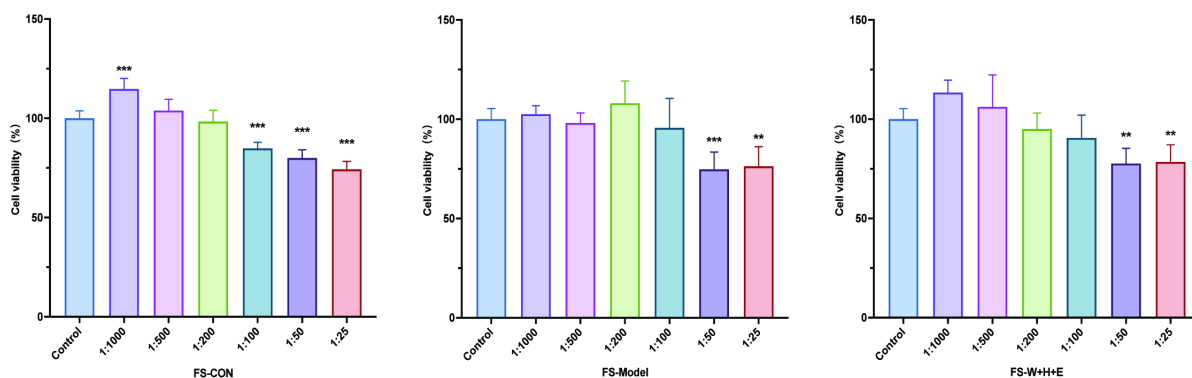
**表 2.** Caco-2 细胞靶基因引物序列

Gene	Forward primer sequences (5'-3')	Reverse primer sequences (5'-3')
<i>GAPDH</i> (Homo sapiens)	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
<i>Occludin</i>	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT
<i>ZO-1</i>	CAACATACAGTGACGCTTCCACA	CACTATTGACGTTTCCCCACTC
<i>NQO1</i>	GAAGAGCACTGATCGTACTGGC	GGATACTGAAAGTTCGCAGGG

### 3. 结果

#### 3.1. FS 对 RAW264.7 和 Caco-2 细胞的安全浓度筛选结果

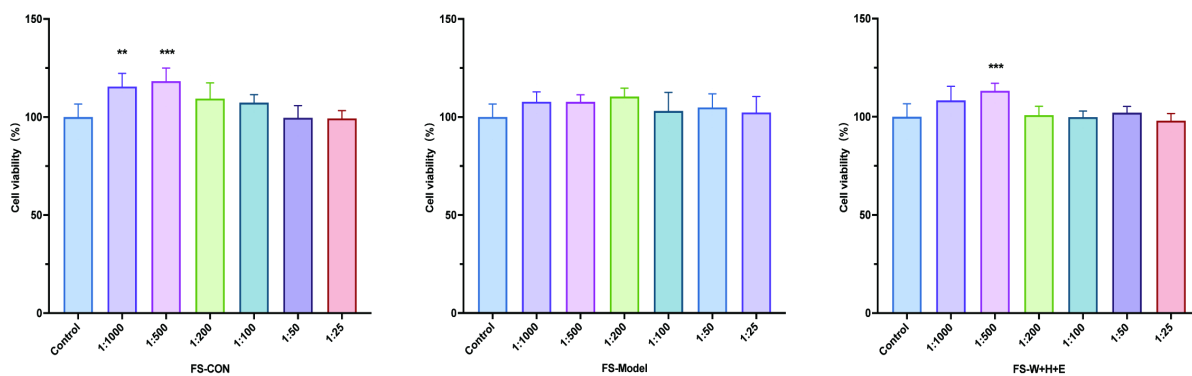
采用 CCK-8 法检测不同浓度 FS 对 RAW264.7 细胞活力的影响。结果如图 1 所示, 与对照组相比, 低浓度 FS 处理后细胞活力未见明显下降。其中 1:1000 至 1:200 浓度范围内细胞活力基本维持在正常水平, 提示 FS 在该浓度范围内对 RAW264.7 细胞无明显毒性作用。当浓度进一步升高时, 细胞活力略有下降。结果表明, FS 在 1:200 及以上稀释倍数条件下对 RAW264.7 细胞无明显细胞毒性。进一步检测 FS 对 Caco-2 细胞活力的影响, 结果如图 2 所示, 与对照组相比, 各浓度 FS 处理后 Caco-2 细胞活力总体变化不明显, 在 1:1000 至 1:25 浓度范围内细胞活力基本维持稳定。结果提示, 在所筛选浓度范围内 FS 对 Caco-2 细胞也未表现出明显毒性作用。因此, 后续实验中将采用 1:200 和 1:25 浓度的 FS 分别作用于 RAW264.7 细胞和 Caco-2 细胞。



与对照组(Control)比较, \*表示差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ )。

**Figure 1.** Effect of different concentrations of fecal supernatant (FS) on the viability of RAW264.7 cells

**图 1.** 不同浓度粪便上清(FS)对 RAW264.7 细胞活力的影响



与对照组(Control)比较, \*表示差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ )。

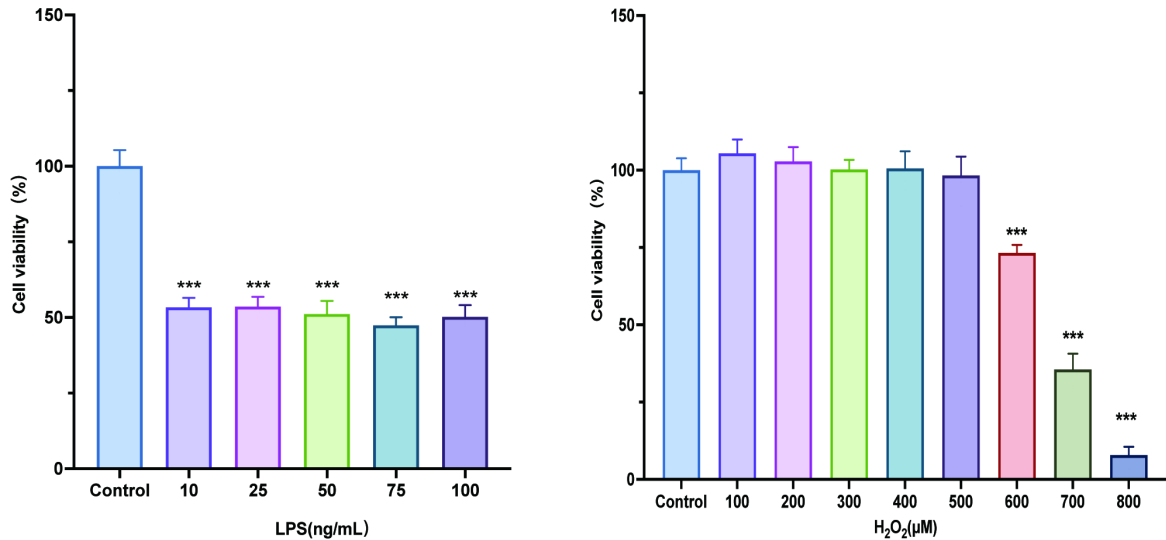
**Figure 2.** Effect of different concentrations of fecal supernatant (FS) on the viability of Caco-2 cells

**图 2.** 不同浓度粪便上清(FS)对 Caco-2 细胞活力的影响

#### 3.2. RAW264.7 细胞 LPS 炎症模型和 Caco-2 细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型的筛选结果

为建立稳定的细胞模型, 分别检测不同浓度 LPS 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞活力的影响(图 3)。在 RAW264.7 细胞中, LPS 处理后细胞活力明显下降, 各浓度组均显著低于对照组( $P < 0.001$ ), 细胞活力维持在约 50%左

右。综合考虑模型稳定性,本研究选择 10 ng/mL LPS 作为炎症模型诱导浓度。在 Caco-2 细胞中,低浓度  $H_2O_2$  (100~500  $\mu M$ )对细胞活力影响较小,而 600  $\mu M$  及以上浓度可明显降低细胞活力,其中 800  $\mu M$  时细胞活力降至最低( $P < 0.001$ )。因此选择 600  $\mu M H_2O_2$  作为氧化损伤模型浓度。

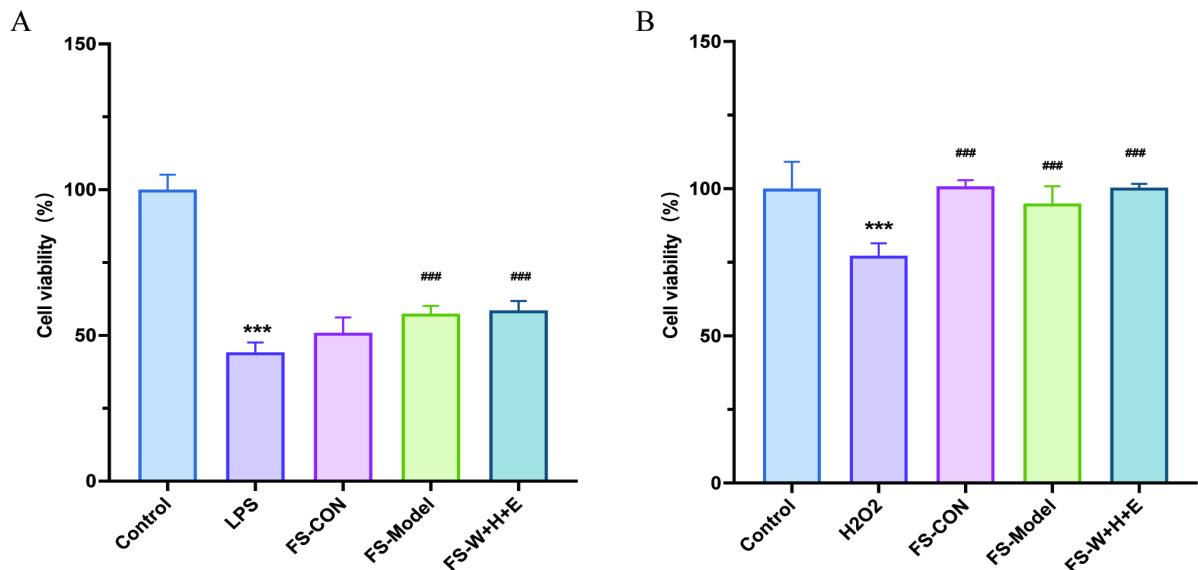


与对照组(Control)比较, \*表示差异具有统计学意义( $^{***}P < 0.001$ )。

**Figure 3.** Screening of LPS-induced inflammatory model in RAW264.7 cells and  $H_2O_2$ -induced oxidative injury model in Caco-2 cells

**图 3.** RAW264.7 细胞 LPS 炎症模型及 Caco-2 细胞  $H_2O_2$  氧化损伤模型浓度筛选

### 3.3. FS 对模型细胞活力的影响



(A) RAW264.7 细胞 LPS 炎症模型; (B) Caco-2 细胞  $H_2O_2$  氧化损伤模型。与对照组(Control)比较, \*表示差异具有统计学意义( $^{***}P < 0.001$ ); 与模型组(LPS 或  $H_2O_2$  组)比较, #表示差异具有统计学意义( $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$ )。

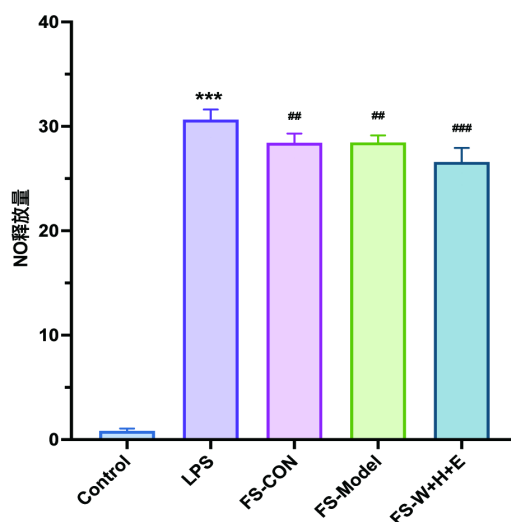
**Figure 4.** Effects of fecal supernatant (FS) on the viability of inflammatory and oxidative injury model cells

**图 4.** 粪便上清(FS)对炎症及氧化损伤模型细胞活力的影响

在确定 FS 处理浓度及模型造模条件后,进一步观察 3 组 FS 对模型细胞活力的影响,结果见图 4。在 RAW264.7 细胞 LPS 炎症模型中,与对照组比较,LPS 组细胞活力明显下降( $P < 0.001$ );与 LPS 组比较,FS-Model 组和 FS-W+H+E 组细胞活力均明显升高(均  $P < 0.001$ ),FS-CON 组呈升高趋势,但改善程度相对有限,提示不同来源 FS 均可在一定程度上缓解 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力下降,其中 FS-Model 组和 FS-W+H+E 组作用较为明显(图 4(A))。在 Caco-2 细胞  $H_2O_2$  氧化损伤模型中,与对照组比较, $H_2O_2$  组细胞活力显著下降( $P < 0.001$ );与  $H_2O_2$  组比较,FS-CON、FS-Model 及 FS-W+H+E 组细胞活力均明显升高(均  $P < 0.001$ ),且 FS-CON 组与 FS-W+H+E 组恢复幅度相对更高,上述结果表明,FS 处理对  $H_2O_2$  诱导的 Caco-2 细胞氧化损伤具有一定保护作用(图 4(B))。

### 3.4. FS 对 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响

为进一步评价 FS 对 RAW264.7 细胞炎症反应的影响,检测各组细胞培养上清中 NO 水平,结果见图 5。与对照组比较,LPS 组 NO 释放量明显升高( $P < 0.001$ ),提示炎症模型构建成功。与 LPS 组比较,FS-CON 组及 FS-Model 组均可降低 NO 释放水平(均  $P < 0.01$ ),FS-W+H+E 组下降更为明显( $P < 0.001$ )。提示不同来源 FS 均可在一定程度上抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 过度生成,其中 FS-W+H+E 组作用最为明显。



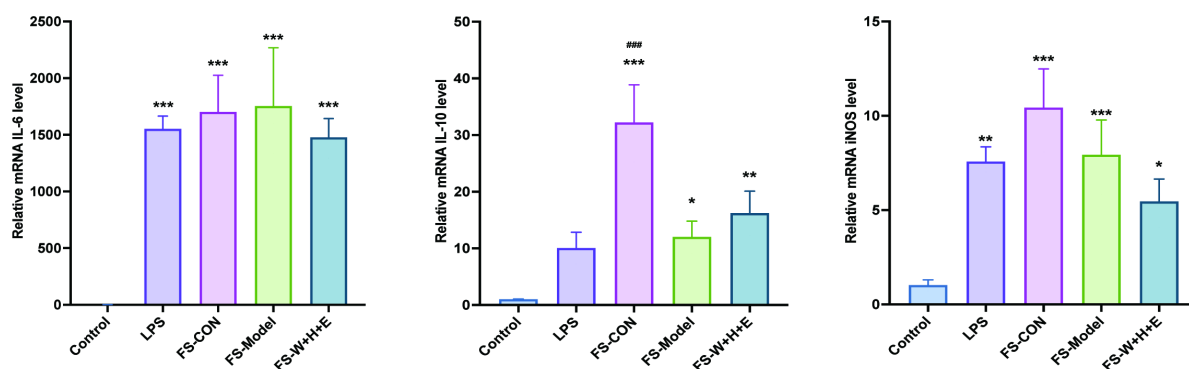
与对照组(Control)比较,\*\*\*表示  $P < 0.001$ ;与 LPS 组比较,#表示差异具有统计学意义(## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ )。

**Figure 5.** Effect of fecal supernatant (FS) on nitric oxide production in RAW264.7 cells

**图 5.** 粪便上清(FS)对 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响

### 3.5. FS 对炎症及肠屏障相关基因表达的影响

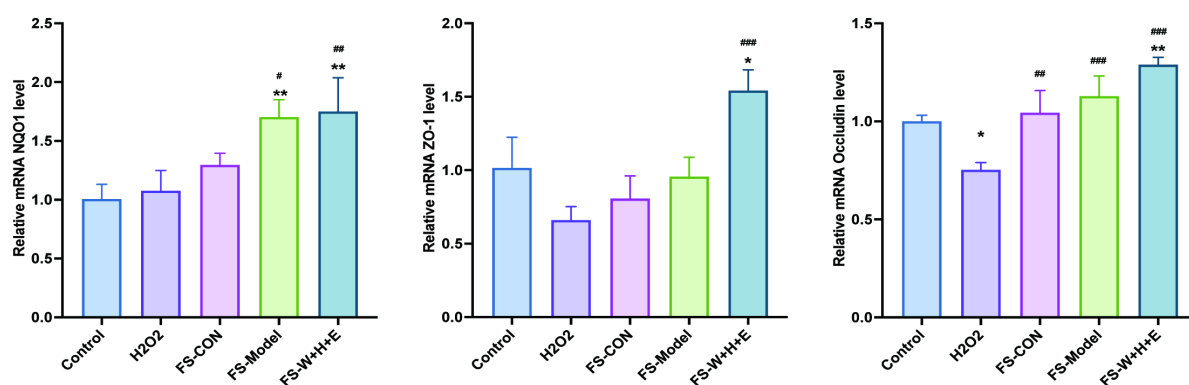
RAW264.7 细胞炎症相关基因的 RT-qPCR 结果见图 6。与 Control 组比较,LPS 刺激后 IL-6、IL-10 和 iNOS 表达均升高。FS 处理后,各炎症基因表达水平呈现不同程度变化。与 FS-Model 组比较,IL-10 表达在 FS-CON 组进一步升高,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ );而 IL-6 及 iNOS 在其余各 FS 组中变化相对较小。Caco-2 细胞氧化损伤及肠屏障相关基因的 RT-qPCR 结果见图 7。与 Control 组比较, $H_2O_2$  处理后 Caco-2 细胞紧密连接蛋白相关基因表达下降,其中 Occludin 表达显著降低( $P < 0.05$ )。经 FS 干预后,NQO1、ZO-1 和 Occludin 表达呈现不同程度升高,其中 FS-W+H+E 组对 ZO-1 和 Occludin 改善最明显,提示 FS 可能对氧化损伤导致的肠屏障功能下降具有一定改善作用。



与对照组(Control)比较, \*表示  $P < 0.05$ ; \*\*表示  $P < 0.01$ ; \*\*\*表示  $P < 0.001$ ; 与 LPS 组比较, #表示差异具有统计学意义( $##P < 0.01$ ,  $###P < 0.001$ )。

**Figure 6.** Effects of fecal supernatant (FS) on inflammatory gene expression in RAW264.7 cells

**图 6.** 粪便上清(FS)对 RAW264.7 细胞炎症相关基因表达的影响



与对照组(Control)比较, \*表示差异具有统计学意义( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ); 与  $H_2O_2$  组比较, #表示差异具有统计学意义( $#P < 0.05$ ,  $##P < 0.01$ ,  $###P < 0.001$ )。

**Figure 7.** Effects of fecal supernatant (FS) on intestinal barrier-related gene expression in Caco-2 cells

**图 7.** 粪便上清(FS)对 Caco-2 细胞肠屏障相关基因表达的影响

## 4. 讨论

近年来, 越来越多研究表明, 脓毒症不仅是一种感染性疾病, 同时也是涉及免疫系统、肠道屏障以及肠道菌群相互作用的复杂综合征[13]。肠道被认为是脓毒症的重要靶器官之一, 其屏障功能破坏可能导致细菌及其代谢产物进入血液循环, 从而加重全身炎症反应[14]。

在本研究中, 我们采用不同组别脓毒症小鼠来源的粪便上清分别作用于 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症模型和  $H_2O_2$  诱导的 Caco-2 氧化损伤模型, 以从体外层面探讨肠道来源因素对炎症反应及肠屏障功能的影响。结果显示, 在一定稀释范围内, 各组 FS 对 RAW264.7 细胞和 Caco-2 细胞均未表现出明显细胞毒性, 提示实验后续观察到的生物学效应并非由非特异性细胞损伤引起。巨噬细胞作为机体先天性免疫反应的重要组成部分, 可在感染早期能快速识别病原相关分子模式并启动炎症反应, 当其受到 LPS 刺激时, 巨噬细胞可通过激活 TLR4 信号通路诱导产生大量炎症介质, 其中 NO 是重要的炎症效应分子之一[15][16]。本研究结果发现, LPS 刺激后 RAW264.7 细胞 NO 释放显著升高, 而不同来源 FS 处理均能够在一定程度上降低 NO 水平, 其中减味连梅汤干预组来源 FS 下降更为明显, 提示粪便上清中可能含有调节炎症反应的活性成分。然而, 不同组别 FS 对 iNOS 的 mRNA 表达抑制作用未呈现出与 NO 相似的趋势,

提示其对炎症反应的调控可能具有选择性,并不通过单一信号通路实现。研究表明,NO水平不仅取决于iNOS的转录水平,还受mRNA稳定性、翻译效率、蛋白降解、酶活性状态、底物与辅因子供给以及细胞氧化还原状态等多层级因素影响[17][18]。在翻译后调控层面,Wu等[19]人发现E3泛素连接酶MDM2(Mouse Double Minute 2 homolog)可通过介导SPSB2(SPRY domain-containing SOCS box protein 2)的泛素化降解来稳定iNOS蛋白,从而增加NO产量,这一过程并不依赖iNOS mRNA表达的变化。Sakai等[20]的研究则揭示了辅因子供应的重要性,该研究发现PI3K信号通路通过调控GTP环化水解酶1(GTP Cyclohydrolase 1, Gch1)的诱导,影响四氢生物蝶呤(BH<sub>4</sub>, tetrahydrobiopterin)的合成,进而控制iNOS二聚化和NO产生,但iNOS mRNA水平并无显著改变。Won等[21]人发现在RAW264.7巨噬细胞中,cAMP激活剂不影响iNOS mRNA转录水平,而是通过抑制iNOS蛋白泛素化、减少蛋白酶体降解,显著提高iNOS蛋白的稳定性,从而上调iNOS蛋白水平,增加NO生成。该研究证实了iNOS存在转录后及翻译后调控机制。以上证据提示减味连梅汤干预后来源FS的作用可能更偏向于调节酶活性、辅因子可用性或酶蛋白稳定性,而非直接抑制iNOS基因转录。

本研究还发现,经不同组别FS处理后RAW264.7细胞的IL-6 mRNA较LPS组未见显著下降,提示FS对IL-6转录水平的逆转作用有限。这一结果可能与IL-6在该模型中的表达特性有关。已有研究表明,在LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症模型中,IL-6的表达水平易受多种实验条件影响,包括细胞接种密度、LPS刺激浓度、孵育时长及检测时间点等。这些因素使得IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等细胞因子在不同研究之间呈现出较高的异质性,结果稳定性也相对较弱[22]。更为重要的是,与其他单一明确代谢物或标准化发酵体系为对象的研究不同,本研究所使用的FS属于复杂混合体系,其中可能含有保护性代谢物,也可能残留促炎成分,其净效应存在相互抵消的可能。同时研究表明,菌群来源代谢物的免疫调节作用受代谢物种类、局部浓度及炎症状态共同影响,并非在所有模型和指标上均表现为相同的抑炎效应[23]。以上结果提示,本研究在当前处理条件下,FS可能更倾向于影响NO生成、氧化应激或代谢调节等过程,而不足以引起IL-6转录水平的显著改变。

此外,本研究观察了脓毒症小鼠FS对肠上皮细胞屏障相关基因表达的影响。肠上皮屏障主要由紧密连接蛋白维持,其完整性对于防止细菌及毒素进入机体具有重要意义。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为常用的氧化应激刺激物,可破坏肠上皮紧密连接结构,并降低ZO-1、Occludin等屏障相关分子的表达[24]。Zhu等[25]人研究发现在550  $\mu$ M浓度下,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>即可显著破坏Caco-2细胞的屏障功能,并使ZO-1、Claudin-1和Occludin表达水平下降。本研究结果与此基本一致,600  $\mu$ M浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理Caco-2细胞后,其细胞活力下降,并伴随ZO-1、Occludin等屏障相关分子表达受损;而经脓毒症小鼠FS干预后,NQO1、ZO-1和Occludin表达出现不同程度回升,其中减味连梅汤干预组来源FS改善趋势相对更明显。该结果提示,FS的作用位点可能更偏向于上皮屏障稳态,而不是强效抑制巨噬细胞炎症转录程序。近年来研究认为,肠道微生物代谢产物在维持肠屏障功能及调节免疫反应方面发挥重要作用。例如短链脂肪酸等微生物代谢产物能够通过多种信号通路调节紧密连接蛋白表达并增强肠屏障功能[26]。有研究表明,经药物干预后的结肠炎小鼠粪便上清能够在Caco-2模型中降低LPS诱导的IL-6、TNF- $\alpha$ 分泌,减少FITC-dextran通透性,并恢复ZO-1和Occludin表达;进一步分析发现,丁酸、去氧胆酸、熊去氧胆酸等菌群代谢物可能参与其中[12]。因此,本研究观察到的脓毒症小鼠FS对肠上皮细胞的调节作用,可能与其中含有的微生物来源代谢物有关。

综上所述,本研究发现经减味连梅汤干预后脓毒症小鼠的FS对RAW264.7细胞直接抑炎作用相对有限,而对Caco-2细胞氧化损伤及屏障相关基因表达具有更明显的改善趋势,提示减味连梅汤经肠道微生态介导的保护作用,可能更偏向于维持肠上皮屏障稳态。但本研究仍存在一定的局限性,仅采用体外细胞模型进行实验,尚不能完全反映体内复杂的生理环境。同时,本研究尚未对粪便上清中的具体活性

成分进行分析。未来可结合代谢组学技术进一步鉴定其中的关键分子，并深入探讨其作用机制。

## 5. 结论

综上，该研究初步表明脓毒症小鼠来源的粪便上清能够在一定程度上调节巨噬细胞炎症反应，并改善氧化损伤条件下肠上皮细胞紧密连接蛋白相关基因表达，这些发现提示肠道菌群来源的代谢产物可能在脓毒症相关炎症及肠屏障损伤过程中发挥重要作用。

## 声明

本研究获得了重庆医科大学伦理委员会审批(批准号：IACUC-CQMU-2023-09035)。

## 基金项目

重庆市科卫联合中医药科研项目基金(编号 2026ZYB022); 重庆市渝中区科技局自然科学基金(编号 20240122)。

## 参考文献

- [1] Cheng, L., Cao, Y., Liu, S., Lv, L., Zhang, J., Bao, J., *et al.* (2025) Unveiling the Research Advances of Sepsis: Pathogenesis, Precise Intervention and Clinical Perspective. *International Journal of Surgery*, **111**, 6260-6289. <https://doi.org/10.1097/js9.0000000000002668>
- [2] Chanchaoenthana, W., Kamolratanakul, S., Schultz, M.J. and Leelahavanichkul, A. (2023) The Leaky Gut and the Gut Microbiome in Sepsis—Targets in Research and Treatment. *Clinical Science*, **137**, 645-662. <https://doi.org/10.1042/cs20220777>
- [3] Oami, T., Shimazui, T., Yumoto, T., Otani, S., Hayashi, Y. and Coopersmith, C.M. (2025) Gut Integrity in Intensive Care: Alterations in Host Permeability and the Microbiome as Potential Therapeutic Targets. *Journal of Intensive Care*, **13**, Article No. 16. <https://doi.org/10.1186/s40560-025-00786-y>
- [4] 马灵莉, 李迎丽, 李施慧, 等. 连梅汤对 LPS 诱导的脓毒症小鼠的保护作用研究[J]. 临床医学进展, 2025, 15(3): 1035-1043.
- [5] Mann, E.R., Lam, Y.K. and Uhlig, H.H. (2024) Short-Chain Fatty Acids: Linking Diet, the Microbiome and Immunity. *Nature Reviews Immunology*, **24**, 577-595. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01014-8>
- [6] Zhang, D., Jian, Y., Zhang, Y., Li, Y., Gu, L., Sun, H., *et al.* (2023) Short-Chain Fatty Acids in Diseases. *Cell Communication and Signaling*, **21**, Article No. 212. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01219-9>
- [7] Selvakumar, B., Sekar, P. and Samsudin, A.R. (2024) Intestinal Macrophages in Pathogenesis and Treatment of Gut Leakage: Current Strategies and Future Perspectives. *Journal of Leukocyte Biology*, **115**, 607-619. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad165>
- [8] Moore, T., Pinkerton, T. and Petro, T. (2025) IRF3 Promotes Production of IL-6 and Nitric Oxide but Represses CCL22 in RAW264.7 Macrophage Cells Exposed to Lipopolysaccharides in Culture. *Journal of Inflammation Research*, **18**, 1255-1265. <https://doi.org/10.2147/jir.s496930>
- [9] Kim, M., An, J., Shin, S., Moon, S.Y., Kim, M., Choi, S., *et al.* (2024) Anti-Inflammatory Effects of TP1 in LPS-Induced Raw264.7 Macrophages. *Applied Biological Chemistry*, **67**, Article No. 16. <https://doi.org/10.1186/s13765-024-00873-y>
- [10] Miao, T., Song, G. and Yang, J. (2023) Protective Effect of Apple Polyphenols on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress Damage in Human Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **71**, 262-268. <https://doi.org/10.1248/cpb.c22-00348>
- [11] Kono, G., Yoshida, K., Kokubo, E., Ikeda, M., Matsubara, T., Koyama, T., *et al.* (2023) Fermentation Supernatant of Elderly Feces with Inulin and Partially Hydrolyzed Guar Gum Maintains the Barrier of Inflammation-Induced Caco-2/HT29-MTX-E12 Co-Cultured Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **71**, 1510-1517. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06232>
- [12] Wang, Z., Jiang, Y., Duan, B., Zhang, H., Li, A., Yang, J., *et al.* (2025) Isoorientin Modulates Gut Microbes and Their Metabolites to Alleviate Caco-2 Cell Monolayer Inflammation by Reducing Intestinal Permeability via P-Gp/eCBs. *Journal of Inflammation Research*, **18**, 14365-14379. <https://doi.org/10.2147/jir.s530562>
- [13] Tao, Y., Wang, J., Liu, M., Liu, Y., Zhang, J., Zhou, Y., *et al.* (2024) Progress in the Study of the Correlation between

- Sepsis and Intestinal Microecology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **14**, Article 1357178. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1357178>
- [14] Tian, Z. and Li, C. (2025) The Role of Gut Microbiota in the Onset and Development of Sepsis and Its Therapeutic Potential: Mechanisms and Research Progress. *Frontiers in Microbiology*, **16**, Article 1718549. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1718549>
- [15] Luo, R., Yao, Y., Chen, Z. and Sun, X. (2025) An Examination of the LPS-TLR4 Immune Response through the Analysis of Molecular Structures and Protein-Protein Interactions. *Cell Communication and Signaling*, **23**, Article No. 142. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02149-4>
- [16] Meng, E.X., Verne, G.N. and Zhou, Q. (2024) Macrophages and Gut Barrier Function: Guardians of Gastrointestinal Health in Post-Inflammatory and Post-Infection Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article 9422. <https://doi.org/10.3390/ijms25179422>
- [17] Kim, M.E. and Lee, J.S. (2025) Advances in the Regulation of Inflammatory Mediators in Nitric Oxide Synthase: Implications for Disease Modulation and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, **26**, Article 1204. <https://doi.org/10.3390/ijms26031204>
- [18] Rao, K.M.K. (2000) Molecular Mechanisms Regulating iNOS Expression in Various Cell Types. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, **3**, 27-58. <https://doi.org/10.1080/109374000281131>
- [19] Wu, K.K., Xu, X., Wu, M., Li, X., Hoque, M., Li, G.H.Y., *et al.* (2024) MDM2 Induces Pro-Inflammatory and Glycolytic Responses in M1 Macrophages by Integrating Inos-Nitric Oxide and HIF-1 $\alpha$  Pathways in Mice. *Nature Communications*, **15**, Article No. 8624. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53006-w>
- [20] Sakai, K., Suzuki, H., Oda, H., Akaike, T., Azuma, Y., Murakami, T., *et al.* (2006) Phosphoinositide 3-Kinase in Nitric Oxide Synthesis in Macrophage: Critical Dimerization of Inducible Nitric-Oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 17736-17742. <https://doi.org/10.1074/jbc.m601896200>
- [21] Won, J., Im, Y., Singh, A.K. and Singh, I. (2004) Dual Role of Camp in iNOS Expression in Glial Cells and Macrophages Is Mediated by Differential Regulation of p38-MAPK/ATF-2 Activation and iNOS Stability. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 1834-1844. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.017>
- [22] Facchin, B.M., dos Reis, G.O., Vieira, G.N., Mohr, E.T.B., da Rosa, J.S., Kretzer, I.F., *et al.* (2022) Inflammatory Biomarkers on an LPS-Induced RAW 264.7 Cell Model: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflammation Research*, **71**, 741-758. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01584-0>
- [23] Mukhopadhyay, I. and Louis, P. (2025) Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Their Role in Human Health and Disease. *Nature Reviews Microbiology*, **23**, 635-651. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01183-w>
- [24] Cha, H. (2025) Tight Junction Proteins at the Crossroads of Inflammation, Barrier Function, and Disease Modulation. *International Journal of Molecular Sciences*, **26**, Article 8115. <https://doi.org/10.3390/ijms26178115>
- [25] Zhu, Y.Y., Wu, M.M.H., Zhao, Z.C., Gu, F.T., Huang, L.X., Kwok, K.W.H., *et al.* (2025) An Antioxidative Exopolysaccharide-Protein Complex of Cordyceps Cs-HK1 Fungus and Its Epithelial Barrier-Protective Effects in Caco-2 Cell Culture. *Antioxidants*, **14**, Article 1501. <https://doi.org/10.3390/antiox14121501>
- [26] Yao, Y., Zhang, Y., Song, M., Fan, J., Feng, S., Li, J., *et al.* (2024) *Lactobacillus* Alleviates Intestinal Epithelial Barrier Function through GPR43-Mediated M2 Macrophage Polarization. *Animal Diseases*, **4**, Article No. 20. <https://doi.org/10.1186/s44149-024-00125-y>