



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 基于转录组学探究鼠李糖乳酪杆菌促进肠道发育的机制
作者： 尹姝, 裴智慧, 张祖烽, 张腾勋, 张欣, 王楠
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250119
收稿日期: 2025-07-30
网络首发日期: 2026-01-29
引用格式: 尹姝, 裴智慧, 张祖烽, 张腾勋, 张欣, 王楠. 基于转录组学探究鼠李糖乳酪杆菌促进肠道发育的机制[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250119>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250119

基于转录组学探究鼠李糖乳酪杆菌促进肠道发育的机制

尹 姝, 裴智慧, 张祖烽, 张腾勋, 张 欣, 王 楠
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要:为了探讨乳酸菌的早期定植对乳鼠早期生长和肠道发育的影响及机制,将 C57BL/6 新生乳鼠用 100 μ L 10^7 CFU 鼠李糖乳酪杆菌 GG (*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, LGG) 或等体积 PBS 分别干预 14 d, 分析 LGG 在乳鼠肠道的定植及对肠道细胞增殖分化、紧密连接蛋白表达肠道免疫系统发育的影响, 随后利用转录组学探究 LGG 促进肠道发育的作用机制。结果显示: 定植于肠道的 LGG 显著提高小肠绒毛/隐窝比值, 上调紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin、Claudin-3) 及黏蛋白 Muc2 表达, 增加杯状细胞与 Ki67 阳性细胞数量。同时, 血清免疫球蛋白 A (IgA)、白介素-4 (Interleukin-4, IL-4) 和白介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 水平升高。转录组学分析发现 446 个差异表达基因, Wnt 拮抗因子 *Dkk2* 下调, 同时 Wnt 配体 *Wnt3*、受体 *Lrp5* 及 Notch 通路组分 (*Dll1*、*Notch1*) 表达增强, 进一步运用实时荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) 证实 Wnt/Notch 信号通路激活。上述结果表明: 早期 LGG 定植通过激活 Wnt/Notch 通路促进肠道干细胞增殖分化, 进而促进上皮细胞的增殖、肠黏膜屏障的形成以及肠道免疫系统的发育。

关键词: 肠道发育; 转录组学; 鼠李糖乳酪杆菌 GG; Wnt 信号通路

中图分类号: Q939.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Investigating the Mechanisms Underlying Gut Development Promoted by *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG Using Transcriptomics

YIN Shu, PEI Zhihui, ZHANG Zufeng, ZHANG Tengxun, ZHANG Xin, WANG Nan
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effects and mechanisms of early colonization by lactic acid bacteria on neonatal growth and intestinal development in suckling mice. Newborn C57BL/6 suckling mice were administered 100 μ L of 10^7 CFU *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) or an equal volume of phosphate-buffered saline (PBS) for 14 days. The colonization of LGG in the intestines and its effects on intestinal cell proliferation/differentiation, tight junction protein expression, and gut immune system development were analyzed. Subsequently, transcriptomic analysis was employed to explore the mechanism by which LGG promotes intestinal development. Results showed that intestinal-colonized LGG significantly increased the villus-to-crypt ratio in the small intestine, upregulated the expression of tight junction proteins (ZO-1, Occludin, Claudin-3) and the mucin Muc2, and increased the number of goblet cells and Ki67-positive cells. Concurrently, serum levels of immunoglobulin A (IgA), interleukin-4 (IL-4), and interleukin-10 (IL-10) were elevated. Transcriptomic analysis identified 446 differentially expressed genes (DEGs). Notably, the Wnt antagonist *Dkk2* was downregulated, while the Wnt ligand *Wnt3*, receptor *Lrp5*, and Notch pathway components (*Dll1*, *Notch1*) were upregulated. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) further confirmed the activation of the Wnt/Notch signaling pathway. These findings indicate that early LGG colonization promotes the proliferation and differentiation of intestinal stem cells by activating the

收稿日期: 2025-07-30; 修回日期: 2025-10-20

基金项目: 济南市创新团队项目 (202228040); 青海省高端创新创业人才-柔性引进领军人才项目

作者简介: 尹姝 (2001—), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生; 通信作者: 王楠, 教授, wn929@tust.edu.cn

Wnt/Notch pathway, thereby enhancing epithelial cell proliferation, intestinal mucosal barrier formation, and the development of the gut immune system.

Key words: Intestinal development; Transcriptomics; *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG; Wnt signaling pathway

婴幼儿肠道发育不良会引起机体多项功能失调,如杯状细胞分泌黏液能力不足、肠上皮间的紧密连接松弛,从而造成肠道通透性的增加^[1],最终导致坏死性小肠结肠炎、感染性腹泻、先天性巨结肠以及炎症性肠病等多种肠道性疾病的发生^[2]。因此,研发安全可控的婴幼儿肠道发育干预方案具有重要意义。

婴幼儿时期是肠道菌群定植、成熟的关键时期,这一时期肠道菌群的变化对婴幼儿的生长发育、肠道吸收和免疫系统的成熟产生深远影响^[3]。肠道菌群多样性的增加可促使短链脂肪酸的合成水平显著升高,进而促进肠上皮细胞增殖、诱导小肠绒毛生长及隐窝加深,从而增加肠道的吸收面积,显著提升机体营养吸收效率^[4]。肠道菌群的建立可以刺激杯状细胞合成黏蛋白 2 (mucin 2, MUC2),形成内层紧密、外层松散的黏液层,有助于肠黏膜结构的发育^[5]。除此之外,肠道菌群的建立能够刺激树突状细胞,促使 T 细胞向调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg) 细胞分化,进而分泌白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 等细胞因子,这些因子能够抑制对食物抗原或共生菌的过度免疫反应,从而发挥调控肠道免疫和炎症平衡的作用^[6]。因此,针对性干预肠道微生态可能有助于婴幼儿时期肠道发育。

益生菌作为调控肠道微生态的关键生物制剂,可以精准调节菌群结构的动态平衡,加速肠道发育成熟^[7]。已有研究表明,罗伊氏粘液乳杆菌^[8]、唾液联合乳杆菌 YL20^[9]、植物乳植杆菌 PFM105^[10]、副干酪乳酪杆菌 ML-446^[11]等具有刺激肠上皮增殖、维持肠干细胞数量并促进潘氏细胞分化的作用,因此可以促进肠道发育并修复损伤。鼠李糖乳酪杆菌 (*Lactocaseibacillus rhamnosus*) 是一种革兰氏阳性乳酸菌,其可定居于宿主肠道通过改善肠道生态环境、调节肠道菌群结构发挥对宿主的有益作用^[12]。其中,鼠李糖乳酪杆菌 GG (LGG) 的早期定植(出生后 5 d 内)促进了小鼠肠道功能成熟和免疫球蛋白 A 的产生,同时降低了其成年后对结肠炎的易感性^[13]。Suntornsaratoon 等^[14]发现 LGG 通过色氨酸代谢生成甲基烟酰胺激活维生素 B3 通路,增强紧密连接基因 (*Ocln*) 表达,从而修复肠上皮屏障。

综上所述,目前大量研究已证实益生菌在机体

早期肠道屏障形成、免疫发育中具有重要作用,但其具体作用机制尚未完全阐明。鉴于 LGG 在肠道发育调控中的明确作用及广泛研究基础,本研究以鼠李糖乳酪杆菌 GG (*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, LGG) 为模型菌株,基于转录学探究其促进肠道发育的分子机制,以期较为全面地阐释乳酸菌的作用机制,为在婴幼儿时期肠道发育不良等疾病中的预防与治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄、体重 (24±0.5) g 的 SPF 级 C57BL/6 小鼠(雄性和雌性),购自中国食品药品检定研究院。本研究经过天津科技大学实验动物护理和使用委员会批准审核(编号:20200517CB),符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

1.2 菌种、试剂与仪器

鼠李糖乳酪杆菌 GG (*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, LGG) 菌株购自中国工业微生物菌种保藏中心,菌种保藏号为 ATCC 53103。

MRS 培养基, Solarbio 公司;总 RNA 抽提试剂 TRIzol, Invitrogen 公司;SYBR Green qPCR Master mix 预混液, DBI Bioscience 公司;异硫氰酸荧光素 (FITC), Perfemiker 公司;苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒、AB-PAS 染色试剂盒、IgA 试剂盒,北京索莱宝科技有限公司。

ChemiDoc XRS⁺型凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; Veriti 96well thermal cycler 型 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; TGL-16C 型台式离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; JJ200 型精密电子天平, LI-COR Biosciences 公司; CO₂ 培养箱, 美国 Thermo Forma 公司; ECLIPSE TE2000 型倒置显微镜, Nikon 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物的分组及给药

将性成熟的雄鼠与雌鼠按 1 : 2 比例合笼交配,待孕鼠分娩后,随机选取 12 只新生幼鼠均分为 LGG

组与对照组。LGG 组幼鼠 ($n=6$) 每日以 100 μL 体积经口灌胃 1×10^7 CFU 的 LGG 菌悬液, 对照组 (NC 组) 幼鼠 ($n=6$) 则灌胃等体积的无菌 PBS 溶液, 共灌胃干预 14 d。每日灌胃后, 所有幼鼠均由母鼠继续哺乳饲养, 每日定时记录幼鼠体重变化, 以分析 LGG 干预对幼鼠生长的影响。

1.3.2 样本采集

干预 14 d 后采用颈椎脱臼法对小鼠实施安乐死, 取小肠组织及内容物浸没于液氮中快速冷冻, 同步分离脾脏、肾脏、胸腺及肝脏, 称量后同样经液氮速冻处理, 随后转移至 -80°C 冰箱保存备用。此外, 每份小肠组织取约 0.5 cm^3 样本, 浸没于 4% 多聚甲醛固定液中, 用于后续石蜡切片制备及组织病理学分析。

1.3.3 LGG 在乳鼠体内定植的检测

提取乳鼠小肠和结肠内容物基因组 DNA^[15], 以 DNA 为模板, 采用 LGG 特异性引物 (F: 5'-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3' 和 R: 5'-GCGATGCGAATTCTATTATT-3') 进行 PCR 扩增, 并以 LGG 菌株作为对照, 然后通过琼脂糖凝胶电泳检测鼠李糖乳酪杆菌特异性条带。

通过 FITC 荧光染料对 LGG 进行标记饲喂小鼠, 2 d 后在动物活体成像仪下观察肠道中荧光的位置, 以判定 LGG 是否在肠道定植。

1.3.4 免疫球蛋白 A (IgA) 水平检测

取小鼠的眼球血并分离血清, 分离小鼠粪便,

表 1 荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers for fluorescent quantification PCR

基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
<i>GAPDH</i>	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAA	TGGAAGATGGTGATGGGCTT
<i>Ki67</i>	ACCGTGGAGTAGTTTATCTGGG	TGTTTCCAGTCCGCTTACTTCT
<i>Muc2</i>	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC
<i>Lgr5</i>	CCTACTCGAAGACTTACCCAGT	GCATTGGGGTGAATGATAGCA
<i>Lyz1</i>	GAGACCGAAGCACCGACTATG	CGGTTTTGACATTGTGTTCGC
<i>Chga</i>	CGGGCAAGTTTTTGCCCTTC	TGACTTCCAGGACGCACTTC
<i>Zo-1</i>	GTTGGTACGGTGCCCTGAAAGA	GCTGACAGGTAGGACAGACGAT
<i>Claudin-3</i>	TCATCGTGGTGTCCATCCTGCT	AGAGCCGCCAACAGGAAAAGCA
<i>Occludin</i>	TGGCAAGCGATCATACCAGAG	CTGCCTGAAGTCATCCACACTC
<i>Atoh1</i>	GAGTGGGCTGAGGTAAGAGAGT	GGTCGGTGCTATCCAGGAG
<i>Dll1</i>	GCAGGACCTTCTTTCGCGTAT	AAGGGGAATCGGATGGGGTT
<i>Hes1</i>	TCAACACGACACCGGACAAAC	ATGCCGGGAGCTATCTTTCTT
<i>Lrp5</i>	AAGGGTGCTGTGTACTGGAC	AGAAGAGAACCTTACGGGACG
<i>Lrp6</i>	TTGTTGCTTTATGCAAACAGACG	GTTTCGTTTAATGGCTTCTTCGC
<i>Notch1</i>	GATGGCCTCAATGGGTACAAG	TCGTTGTTGTTGATGTCACAGT
<i>Wnt3</i>	TGGAAGTGTACCACCATAGATGAC	ACACCAGCCGAGGCGATG

根据试剂盒说明书步骤操作, 通过 ELISA 测定粪便和血清中的 IgA 水平。

1.3.5 小肠组织病理切片分析

取小肠组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 随后采用石蜡包埋, 切成厚度约 5 μm 的切片, 用苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒对切片进行染色, 显微镜下观察小鼠小肠组织中绒毛长度和隐窝深度等的变化。通过免疫组化法检测肠黏膜组织 Ki67 蛋白水平^[16]。利用 AB/PAS 染色, 检测结肠组织杯状细胞的数量^[17]。

1.3.6 转录组学分析

小肠组织样品交由上海美吉生物医药科技有限公司进行转录组学测序并分析。组织样品经 RNA 提取、富集、片段化、反转录后进行上机测序。测序基于 HiSeq 平台, 采用 Illumina TruseqTM RNA sample prep Kit 方法进行文库构建。

1.3.7 实时荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) 检测

采用 TRIzol 法提取小肠组织总 RNA, 将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 RT-qPCR, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 采用 SYBR Green I 法进行荧光定量 PCR, 反应体系为: 1 μL cDNA、10 μL SybGreen mix、0.4 μL 50 \times ROX Reference Dye、7.6 μL dd H₂O、上下游引物各 0.5 μL ; 40 个 PCR 循环 (95 $^\circ\text{C}$ 30 s; 60 $^\circ\text{C}$ 30 s; 72 $^\circ\text{C}$ 30 s), 以 GAPDH 作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。目的基因的引物序列见表 1。

<i>Ctnnb1</i>	ATGGAGCCGGACAGAAAAGC	CTTGCCACTCAGGGAAGGA
<i>Gsk3β</i>	ACCGAGAACCACCTCCTTTG	TCACAGGGAGTGTCTGCTTG
<i>Myc</i>	TTCATCTGCGATCTGACGAC	CACTGAGGGGTCAATGCACCTC
<i>Dkk1</i>	TGCATGAGGCACGCTATGTG	GCGGCGTTGTGGTCATTAC
<i>Dkk2</i>	ACCCGCTGCAATAATGGAATC	ATGGTTGCGATCTCTATGCCG
<i>Fzd7</i>	CGGGGCTCAAGGAGAGAA	GTCCCCTAAACCGAGCCAG
<i>Cd44</i>	CACCATTGCCTCAACTGTGC	TTGTGGGCTCCTGAGTCTGA
<i>Jagged1</i>	CCTCGGGTCAGTTTGAGCTG	CCTTGAGGCACACTTTGAAGTA
<i>Axin2</i>	ATGGAGTCCCTCCTTACCGCAT	GTTCCACAGGCGTCATCTCCTT
<i>Il-4</i>	CATCGGCATTTTGAACGAG	CGAGCTCACTCTCTGTGGTG
<i>Ifn-γ</i>	ACTGGCAAAGGATGGTGAC	GACCTGTGGGTTGTTGACCT
<i>Il-12</i>	AGTGACATGTGGAATGGCGT	CAGTTCAATGGGCAGGGTCT
<i>Alpi</i>	AGGACATCGCCACTCAACTC	GGTTCAGACTGGTTACTGTCA
<i>Il-10</i>	GTTTGCCAAGCCTTATCGGA	GGGGAGAAATCGATGACAGC

1.4 统计学分析

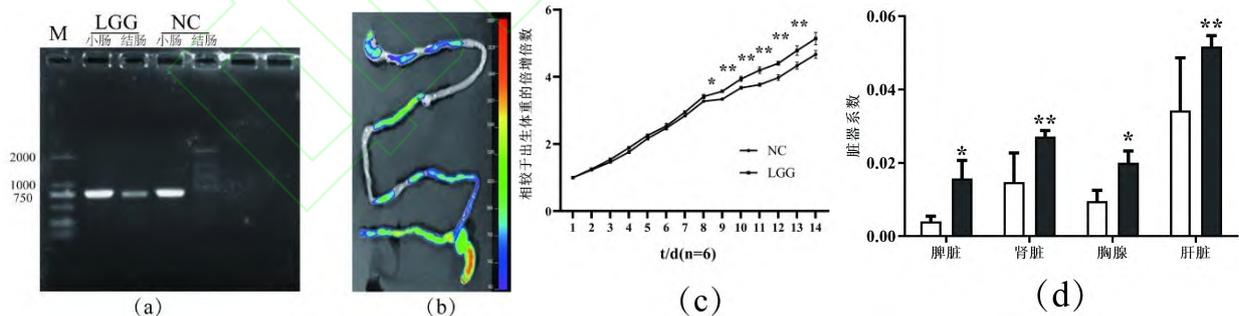
实验结果用 SPSS 12.0 统计学软件进行分析, 结果以“平均值±标准差”表示, 两均值间比较用非配对 *t* 检验, *和**分别表示组间具有显著差异 ($P<0.05$) 和极显著性差异 ($P<0.01$)。

2 结果与分析

2.1 定植于乳鼠肠道的 LGG 促进乳鼠生长

LGG 在体内定植及其对乳鼠体重和脏器系数的影响如图 1 所示。以 LGG 菌株为阳性对照进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 (a) 所示, 小肠和结

肠内容物中均能检测到 LGG 特异性条带, 且结肠样本的条带表达显著高于小肠, 表明 LGG 主要定植于结肠中。由图 1 (b) 可知, 通过活体成像分析仪检测结果进一步表明, LGG 在小肠、结肠及盲肠均有定植, 其中盲肠定植量最高, 结肠次之, 小肠最少, 这与 PCR 检测结果一致, 充分证实 LGG 已成功干预小鼠肠道。由图 1 (c) 可知, 与对照组相比, 给予 LGG 的小鼠在灌胃 9 d 后开始出现体重的显著增加 ($P<0.05$)。并且在灌胃 2 周之后, LGG 组的小鼠的脏器指数 (图 1 (d)) 也出现了显著增加的趋势。



注: (a) PCR 检测 LGG 体内定植 (b) 活体成像仪检测 LGG 定植 (c) LGG 对乳鼠体重的影响 (d) LGG 对乳鼠脏器系数的影响 (** $P<0.01$, * $P<0.05$)

图 1 LGG 在体内定植及其对乳鼠体重和脏器系数的影响

Fig.1 Colonization of LGG *in vivo* and its effects on body weight and organ coefficients of neonatal mice

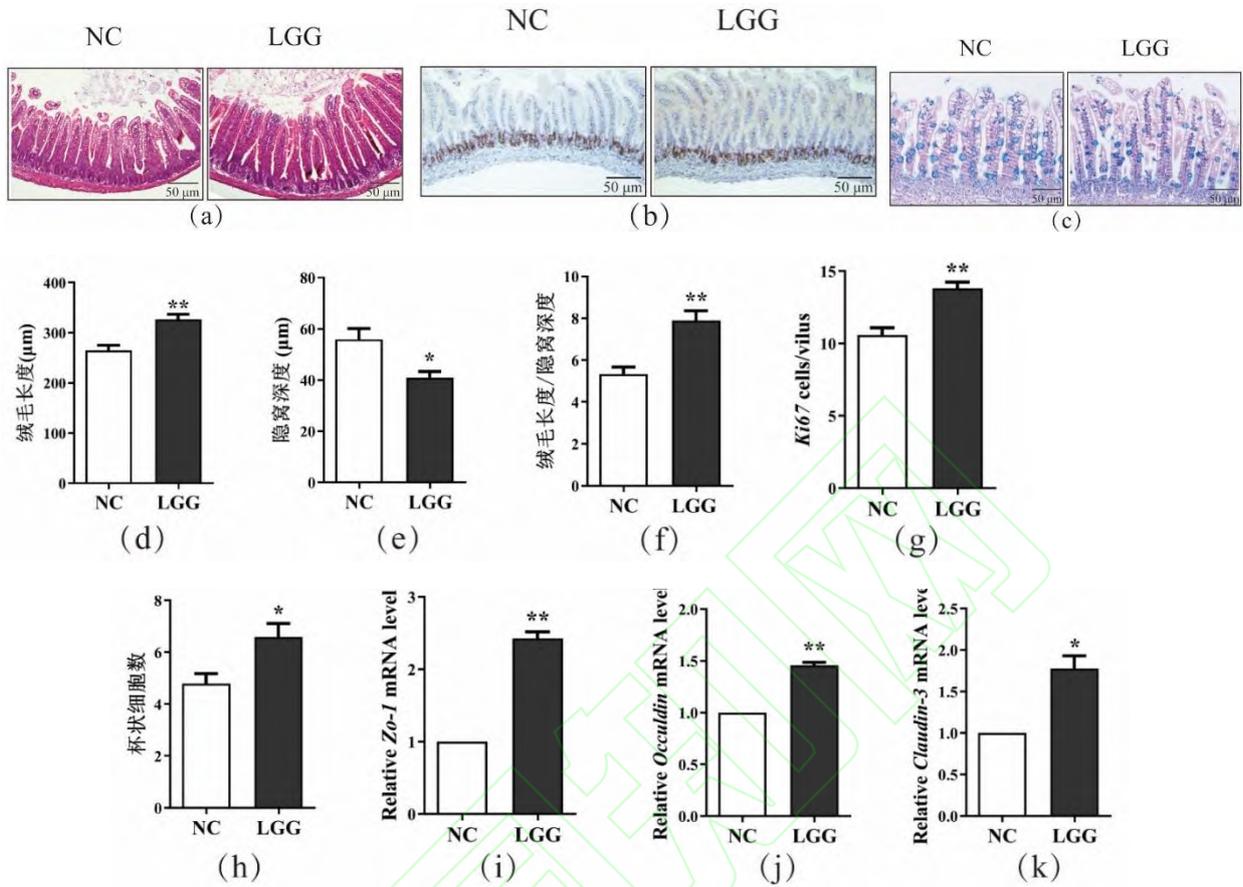
2.2 LGG 促进乳鼠上皮细胞的增殖、分化以及紧密连接蛋白的表达

LGG 对肠道结构及对肠黏膜屏障的影响如图 2 所示。由图 2 (a) 可知, LGG 干预的小鼠的小肠绒毛更长, 且排列较为紧密。LGG 显著促进了绒毛长度的增加 ($P<0.01$) 和隐窝深度 (图 2d) 的显著增

加 ($P<0.05$), 以及显著增加绒毛与隐窝比值 ($P<0.01$)。由图 2 (b) 和图 2 (c) 的免疫组化和 PAS 染色结果可知, LGG 定植的小鼠中 *Ki67* 阳性细胞数量和杯状细胞数量明显增加。荧光定量 PCR 的结果显示, LGG 定植的小鼠肠上皮组织中紧密连接蛋白 *Zo-1* ($P<0.01$)、*Occludin* ($P<0.01$) 以及闭合蛋白

Claudin-3($P<0.05$)的 mRNA 表达显著上调。这表明 LGG 的干预可推动肠道屏障成熟过程, 促进肠道结

构和屏障的发育。



注: (a) 小肠组织 HE 染色 (b) 免疫组化检测 Ki67 的表达 (c) PAS 染色检测 Muc2 阳性细胞数 (d) 绒毛长度 (e) 隐窝深度 (f) 绒毛/隐窝 (g) Ki67 阳性细胞数量 (h) 杯状细胞数量 (i) *Zo-1* (j) *Occludin* (k) *Claudin-3* (** $P<0.01$, * $P<0.05$)

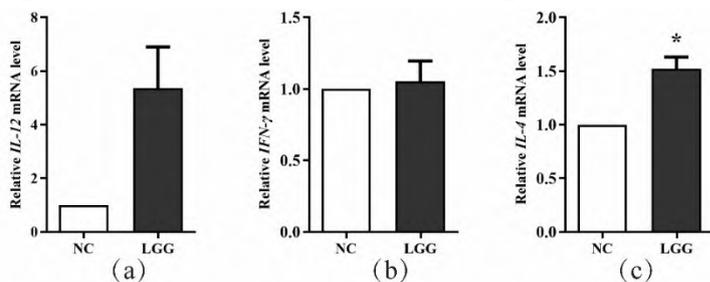
图 2 LGG 对肠道结构及对肠黏膜屏障的影响

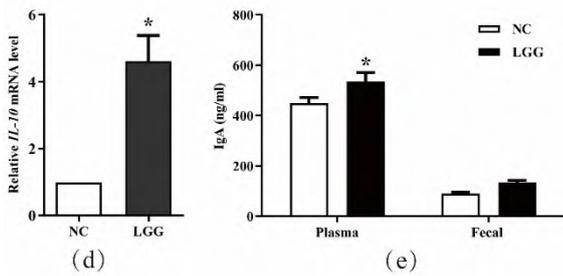
Fig. 2 Effects of LGG on intestinal structure and intestinal mucosal barrier

2.3 LGG 的定植促进了肠道免疫系统的发育

LGG 对肠黏膜细胞因子 mRNA 水平及对 IgA 分泌的影响如图 3 所示。与对照组相比, LGG 组 Th1 细胞因子 IL-12 表达上调, IFN- γ 的表达水平也出现上调, 但并没显著性的变化, IL-4 和 IL-10 的表达显著增加($P<0.05$)。LGG 干预的小鼠中血清型 IgA 和分泌型 IgA 的含量均高于对照组, 其中血清型 IgA 发

生了显著性的变化 ($P<0.05$)。结果表明, LGG 的干预在促进 Th2 介导的体液免疫应答的同时, 促进了树突细胞表达 IL-12 从而促进早期 T 细胞向 Th1 细胞分化, 增强了 Th1 介导的免疫应答, LGG 的定植也能够调节 IgA 的分泌, 从而促进全身代谢免疫系统的发育。





注: (a) IL-12 (b) IFN- γ (c) IL-4 (d) IL-10 (e) 乳鼠血清和粪便的 IgA 水平 (*P<0.05)

图3 LGG 对肠黏膜细胞因子 mRNA 水平及对 IgA 分泌的影响

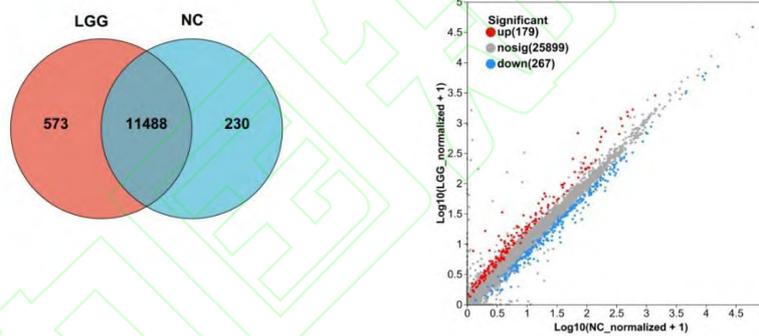
Fig. 3 Effects of LGG on intestinal mucosal cytokine mRNA levels and IgA secretion

2.4 转录组学测序分析 LGG 干预对小肠组织基因表达的影响

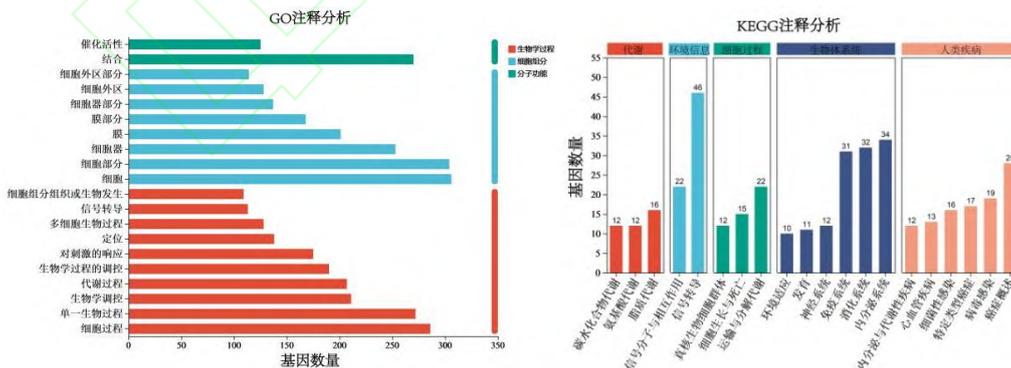
2.4.1 转录组学分析

转录组学分析结果如图 4 所示。由图 4 (a) 可知, 对照组中有 230 个特异性表达基因, LGG 组有 573 个特异性表达基因, 两者共有的交集基因 11488 个。

同时通过样本间相关性分析验证了实验设计的合理性。由图 4 (b) 可知, 对照组和 LGG 处理组的小肠转录组共有显著差异基因 446 个, 其中显著上调的差异基因有 179 个, 显著下调的差异基因有 267 个。



(a) 独立基因的韦恩图 (b) 差异表达基因散点图



(c) 各组差异表达基因的 Gene Ontology 的分析 (d) 差异表达基因的 KEGG 功能注释

图4 转录组学分析

Fig. 4 Transcriptomic analysis

转录组差异基因的筛选阈值设定为 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $FDR < 0.05$, 结合 GO 数据库和 KEGG 数据库分析差异基因的主要功能。对显著差异表达的 446 个基因

进行 GO 功能注释分析 (图 4 (c)), 与生物过程 (BP) 相关的差异基因主要富集在生物过程、单细胞生物过程、生物调节等; 与细胞成分 (CC) 相关的

主要富集于细胞、细胞部分、细胞器等; 与分子功能 (MF) 相关的主要富集在结合功能和催化活性功能。差异基因分别注释到 5 类 KEGG 通路(图 4(d)): 代谢通路、遗传信息处理、细胞过程、生物体系统及人类疾病。在代谢通路中, 有 12 个基因与氨基酸代谢有关, 12 个与碳水化合物代谢有关、另外有 16 个基因参与了脂质代谢。在细胞过程通路中, 15 个基因参与了细胞的增殖和凋亡。在生物体系统通路中, 11 个基因与发育有关, 32 个基因与消化系统有关, 34 个基因与分泌系统有关, 31 个基因与免疫系统有关。结果表明, 差异表达基因富集的功能与 LGG 介导的肠道发育调控细胞增殖分化、屏障结构重塑及信号通路激活等关键生物学过程显著关联, 为阐释其促进肠道发育的分子机制提供了功能维度的直接佐证。

转录组学中的通路富集和关键基因变化如图 5 所示。将所筛的差异基因进行 GO 富集分析(图 5(a)), 将结果以气泡图可视化, 排名前五位的分别为: 脂蛋白脂肪酶活性的调控、甘油三酯分解代谢过程的调控、磷脂流出、血浆脂蛋白颗粒清除、脂质代谢过程的调控。通过 KEGG 富集分析(图 5(b)) 发

现差异表达基因在环境信息处理 (EIP)、细胞过程 (CP)、生物体系统 (OS)、人类疾病 (HD) 大类下的多条通路显著富集, 其中在 EIP 中显著富集到 Wnt 和 Notch 等信号通路。这些通路肠道细胞的屏障功能及代谢调控维持密切相关, 共同参与肠道细胞功能稳态塑造, 为解析肠道生理病理过程提供关键通路分子线索。

通过对转录组数据分析, 潘氏细胞标志基因 *Lyz1* 及其表达的金属蛋白酶 7 (Mmp7) 发生了显著上调 ($P < 0.05$), 相关防御素基因 *Defa5*、*Defa21*、*Defa29*、*Defa30*、*Defa32*、*Defa33*、*Defa34* 也发生了显著上调 ($P < 0.05$) (图 5(c))。Wnt 信号通路的关键基因 *Lgr5* 表达上调, *Gpc3*、*Lrp2*、*Myc*、*Bmp3*、*Wnt2* 等 Wnt 相关基因及其靶基因 *Atoh1* 发生了显著上调, Notch 信号通路的关键基因 *Notch1* 表达上调 (图 5(d))。这些基因的变化表明了 LGG 的定植促进了潘氏细胞的增殖, 同时促进潘氏细胞分泌各种防御素来维持机体健康, Wnt 与 Notch 信号通路受到了 LGG 定植的影响, LGG 的干预可能对 Wnt 与 Notch 信号起到了激活作用。

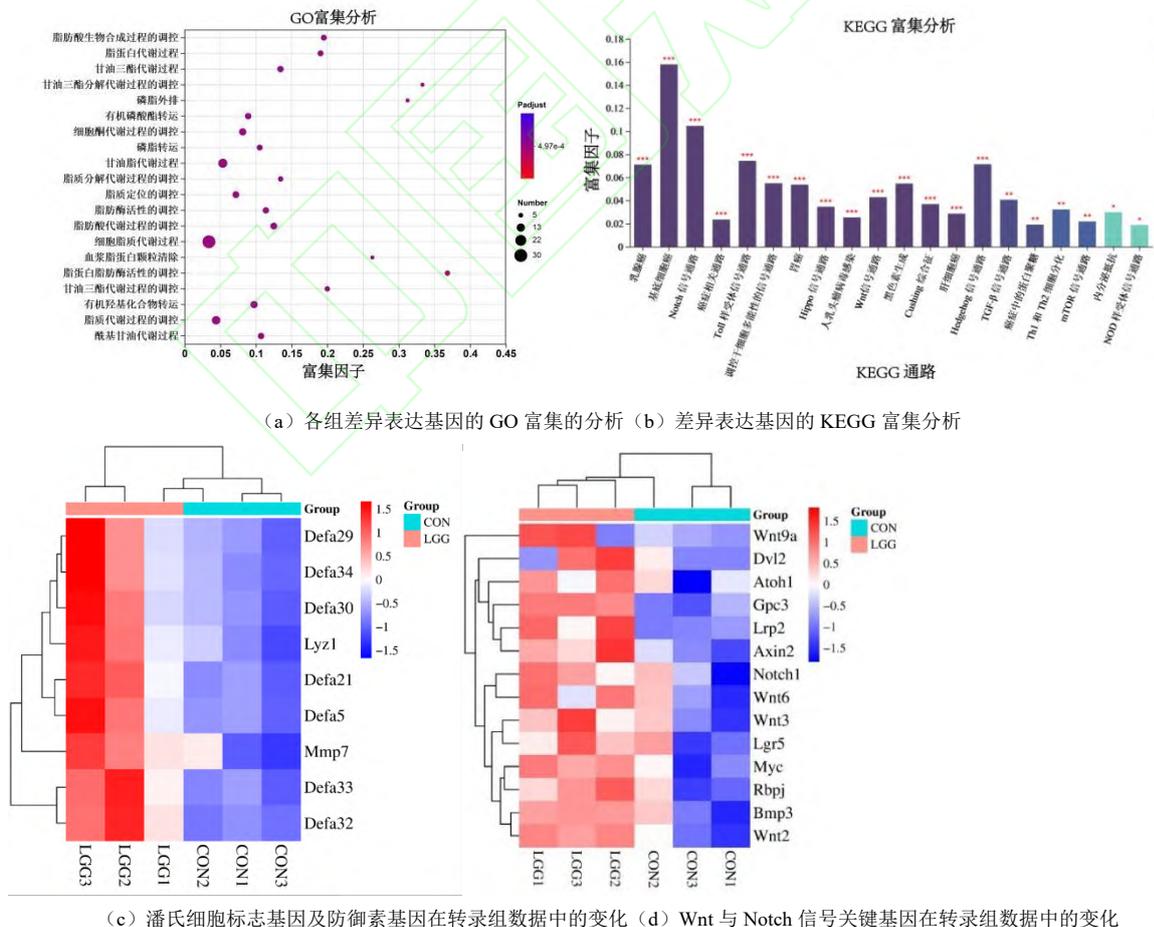


图 5 转录组学中的通路富集和关键基因变化

Fig. 5 Pathway Enrichment and Changes in Key Genes in Transcriptomics

2.4.2 LGG 激活 Wnt 信号和 Notch 信号通路

通过检测 Wnt 信号通路的相关基因, 结果如图 6 所示, LGG 显著降低了 Wnt 拮抗因子 *Dkk2* 的表达 ($P<0.01$), 显著提高了 *Dkk1* 的表达 ($P<0.05$); 同时, Wnt 配体 *Wnt3* 基因的表达明显升高 ($P<0.05$), Wnt 受体 *Lrp5* 基因 ($P<0.01$) 和 *Lrp6* 基因 ($P<0.05$) 的表达显著上调, 但 Wnt 受体 *Fzd7* 基因的表达没有显著变化。这表明 LGG 可通过降低了拮抗因子 *Dkk2* 的表达, 使 Wnt 配体 *Wnt3* 与相关 Wnt 受体的结合, 进而激活 Wnt 信号。

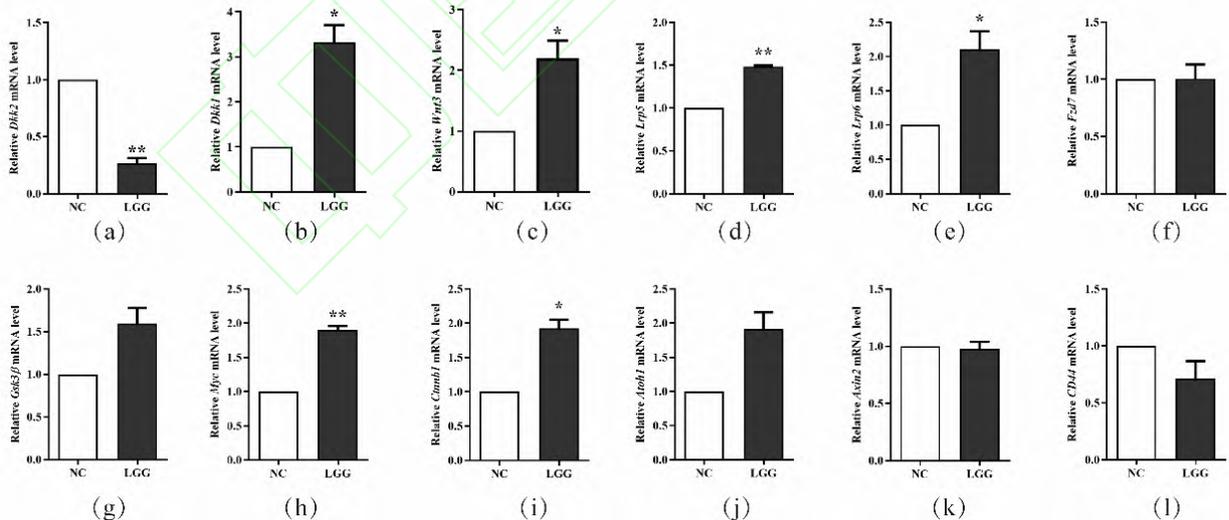
Wnt 信号的相关靶基因 *Gsk3β*、*Myc*、*Ctnnb1* 和 *Atoh1* 都发生了上调, 其中 *Ctnnb1* 的变化具有显著性 ($P<0.05$); Wnt 信号的负反馈调节因子 *Gsk3β* 也发生了明显的上调, 然而 *Axin2* 没有发生明显的变化。此外, 调控细胞周期, 刺激细胞增殖的基因 *Myc* 的表达显著上调 ($P<0.01$), 促进肿瘤迁移的基因 *CD44* 的表达出现了下调, 但并不显著。这说明 LGG 的定植激活了 Wnt 信号, 进而调控肠道干细胞的分化。

通过荧光定量 PCR 检测了 Notch 配体 *Dll1*、*Jagged1* 和 Notch 受体 *Notch1* 及 Notch 靶基因 *Hes1* 的表达变化, 结果如图 7 所示, *Dll1* 的表达显著上

调 ($P<0.05$), *Jagged1* 的表达也出现了上调, 但并不显著。同时 *Notch1* 的表达明显上调 ($P=0.051$), 然而 *Hes1* 下调, 这可能是 *Atoh1* 的表达抑制了 *Hes1* 的表达。结果表明 LGG 的定植激活了 Notch 信号, 从而促进了肠道干细胞的增殖。

2.4.3 LGG 促进肠道干细胞的增殖和分化

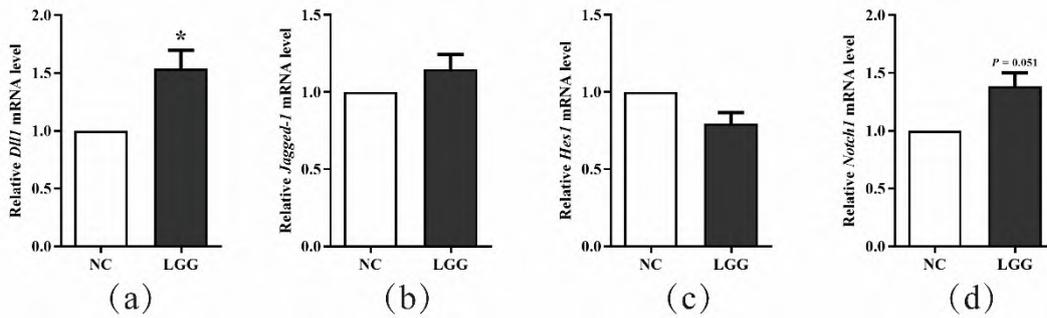
为深入研究 LGG 影响对肠道干细胞的特异性分化的影响, 进一步检测吸收性细胞和分泌性细胞两大谱系各种细胞的转录因子及标志基因 (干细胞 *Lgr5*、肠吸收细胞 *Rac1* 和 *Alpi*、杯状细胞 *Spdef* 和 *Muc2*、潘氏细胞 *Gfi1* 和 *Lyz1*、内分泌细胞 *Neurog3* 和 *Chga*、干细胞增殖 *Ki67*) 的表达变化。结果如图 8 所示, LGG 定植的小鼠 *Lgr5* 的表达显著上调 ($P<0.05$), *Rac1* 和 *Alpi* 基因的表达出现了显著下调 ($P<0.05$), *Spdef* ($P=0.07$) 和 *Muc2* ($P<0.05$) 均出现了明显上调, *Gfi1* ($P<0.05$) *Lyz1* ($P<0.05$) 和 *Ki67* ($P<0.01$) 的表达也显著上调, *Neurog3* 和 *Chga* 的也表达出上调的趋势, 但并没有统计学显著。这些结果与转录组测序的实验结果一致。结果表明, LGG 的定植促进了干细胞的增殖并促使干细胞向分泌性肠上皮细胞分化。



注: (a) *Dkk2* (b) *Dkk1* (c) *Wnt3* (d) *Lrp5* (e) *Lrp6* (f) *Fzd7* (g) *Gsk3β* (h) *Myc* (i) *Ctnnb1* (j) *Atoh1* (k) *Axin2* (l) *CD44* (** $P<0.01$, * $P<0.05$)

图 6 LGG 对 Wnt 信号拮抗因子及配体、受体和相关靶基因的影响

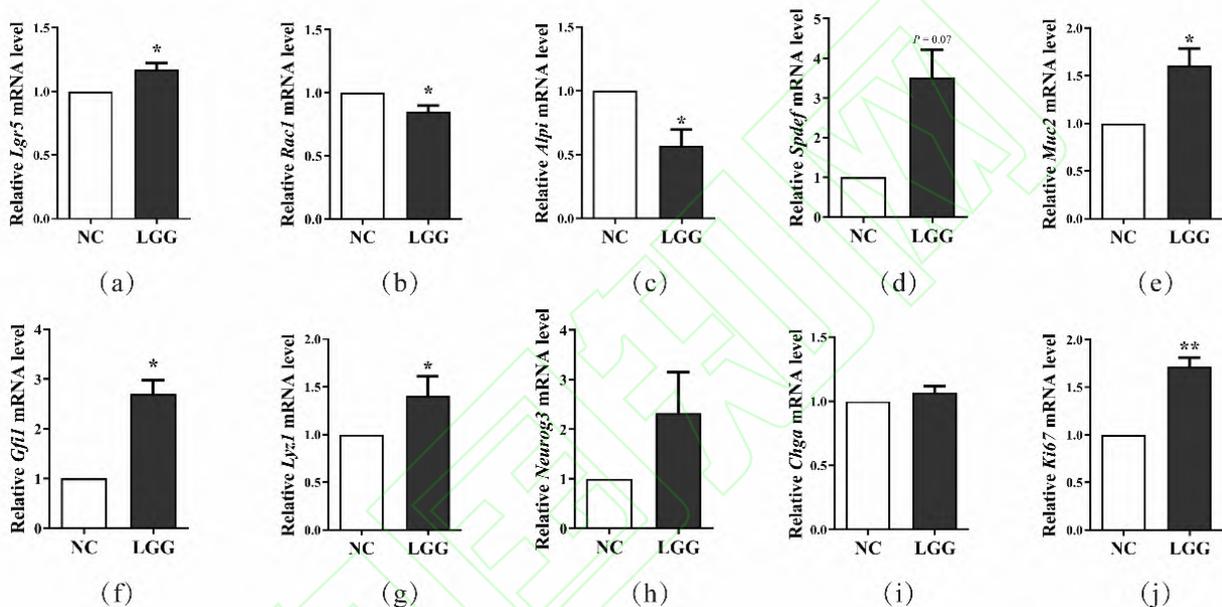
Fig. 6 Effect of LGG on Wnt signaling antagonists, as well as ligands, receptors, and related target genes



注: (a) Notch 配体 *Dll1* (b) Notch 配体 *Jagged1* (c) Notch 靶基因 *Hes1* (d) Notch 受体 *Notch1* (* $P < 0.05$)

图7 LGG对Notch信号的影响

Fig. 7 Effect of LGG on Notch signal



注: (a) *Lgr5* (b) *Rac1* (c) *Alpi* (d) *Spdef* (e) *Muc2* (f) *Gfi1* (g) *Lyz1* (h) *Neurog3* (i) *Chga* (j) *Ki67* (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

图8 LGG对相关分化因子及相关细胞标志基因的表达影响

Fig. 8 Effect of LGG on the expression of related differentiation factors and related cell marker genes

3 讨论

肠道作为机体与外界环境接触的第一道屏障,其发育成熟及屏障功能维持对宿主健康至关重要^[18],然而新生儿肠道因发育不完善,易受多种因素干扰^[19],先天性肠道畸形等问题不仅阻碍营养吸收、导致生长发育迟缓,还因屏障功能薄弱增加病原体侵入,严重威胁机体健康^[20]。当前,益生菌因可调节肠道微生态、促进肠道发育中的作用已成为研究热点^[21]。其中LGG作为备受关注的益生菌,已有研究证实其可在肠道长时间定植、抑制有害菌生长、维持菌群平衡^[22],且在婴幼儿研究中显示能缓解肠道不适、增强营养吸收,为新生儿肠道发育提供了新干预方向^[23]。然而LGG促进肠道发育的分子机制尚未完全明确,因此本研究基于转录组学,探究LGG

促进肠道发育的分子机制,为乳酸菌促进肠道发育提供理论基础。

本研究在乳鼠动物模型中确定灌胃乳鼠LGG菌悬液可促进了绒毛长度和隐窝深度的增加、促进Ki67阳性细胞数量和杯状细胞数量增加,并且显著上调紧密连接蛋白Zo-1、Occludin以及闭合蛋白Claudin-3的表达,表明LGG的定植加速了肠道屏障成熟过程,促进了肠道结构和屏障的发育。已有研究证实副干酪乳酪杆菌Glory LP16^[24]、婴儿源鼠李糖乳酪杆菌SW-02^[25]、枯草芽孢杆菌RZ001^[26]等益生菌也能通过调节紧密连接蛋白表达、增加杯状细胞分泌黏蛋白等方式增强肠道屏障功能。本研究结果与上述报道相一致,进一步证实了益生菌在维护肠道屏障完整性方面的普遍价值。然而,不同益生菌的作用机制与效应强度存在差异。与上述研究相

比, 本研究的转录组学分析揭示了 LGG 的独特作用模式: 其不仅上调肠道屏障结构蛋白的表达, 更通过对 Wnt/ β -catenin 与 Notch 两条核心信号通路的协同调控, 精确平衡肠道干细胞的自我更新与定向分化。这一精细调控机制赋予 LGG 在促进肠道组织发育与功能成熟方面更高的特异性与效率, 从而在维护肠道屏障完整性中发挥关键作用。

随后通过检测血清中细胞因子及免疫球蛋白的表达, 结果表明, LGG 的定植在促进 Th2 介导的体液免疫应答的同时也促进了树突细胞表达 IL-12, 从而促进早期 T 细胞向 Th1 细胞分化, 增强了 Th1 介导的免疫应答, 并且能够调节 IgA 的分泌。转录组学结果表明 LGG 的定植促进了潘氏细胞的增殖, 同时促进其分泌各种防御素通过信号通路菌群、免疫细胞联动, 来维持机体健康。潘氏细胞主要由肠道干细胞分化而来, 同时又能分泌相关因子维持干细胞的增殖和分化, 这些机制相互协同, 确保其在增殖与功能上的动态平衡, 通过防御素等抗菌物质的分泌抵御病原体, 保护肠道黏膜完整性, 从而促进免疫系统的成熟^[27-28]。

在转录组学分析 LGG 促进肠道发育的作用机制中, KEGG 显著富集到 Wnt 和 Notch 等信号通路。差异基因的变化表明了 Wnt 和 Notch 信号通路受到了 LGG 定植的影响, 推测其可能对该信号通路起到了激活作用。在早期肠道发育过程中, Wnt 与 Notch 信号通路的协同调控是维持上皮屏障稳态和微环境平衡的核心机制。Wnt 通路驱动隐窝基底部的干细胞持续增殖, 为快速生长的肠黏膜提供细胞来源^[29]; 同时, Wnt 通路关键靶基因 *Axin2* 的负反馈作用可防止干细胞过度扩增, 保障隐窝-绒毛结构的正常形态发生。另一方面, 经典的 Notch 信号通路通过调节其靶基因 *Hes1* 的表达促进 *Atoh1* 的转录^[30]。由于 *Atoh1* 是促进分泌谱系细胞 (如杯状细胞、内分泌细胞) 分化的关键转录因子, *Hes1* 的抑制作用促进吸收性肠上皮细胞的分化。此外, Wnt 信号也可直接诱导 *Atoh1* 的表达, 在干细胞向分泌谱系分化的启动过程中发挥作用。另外, *Atoh1* 并非被动接受调控^[31], 其作为关键效应分子, 还可通过多重机制反向影响 Notch-*Hes1* 轴: 一方面可直接结合 Notch 激活型配体 *Dll1* 的启动子并抑制其转录, 从信号源头削弱 Notch 通路激活; 另一方面能与 *Hes1* 蛋白直接结合形成无活性复合物, 中和 *Hes1* 的功能活性, 同时还可促进 Notch 抑制性配体 *Jag2* 的表达, 通过竞争性结合进

一步降低 Notch 信号传导效率, 最终共同下调 *Hes1* 表达。因此, Wnt 与 Notch 信号通路通过在 *Atoh1* 这一关键分子节点上的协同调控, 共同平衡了肠道干细胞的自我更新与定向分化, 确保了隐窝-绒毛的正常形态发生与细胞谱系构成。在坏死性小肠结肠炎中, Wnt 和 Notch 信号通路受到干扰, 导致肠道上皮细胞的异常分化和炎症反应^[32]。在肠道受损状态下, Wnt 和 Notch 信号通路通过调控干细胞的自我更新和分化, 促进肠组织的修复^[33]。二者共同维护婴儿肠道在快速生长、菌群定植和免疫成熟三重挑战下的动态平衡, 这种分化调控对早期肠道营养吸收和物质转运至关重要^[34]。因此进一步通过动物模型验证了 Wnt 信号及 Notch 信号通路的相关基因, 结果表明 LGG 定植显著下调 Wnt 拮抗因子 *Dkk2* 并上调配体 *Wnt3* 及受体 *Lrp5/Lrp6* 激活 Wnt 信号通路, 上调 Wnt 相关靶基因 *Gsk3 β* 、*Myc*、*Cttnb1* 和 *Atoh1* 表达; 同时, LGG 上调 Notch 配体 *Dll1* 及受体 *Notch1*。这些变化共同调控了肠道干细胞的增殖与分化^[35]。综上所述, LGG 定植可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路驱动干细胞和潘氏细胞分化, 同时协同 Notch 信号通路调控细胞谱系分化, 进而共同维持肠道发育稳态与微环境平衡。

综上所述, 早期定植于肠道的鼠李糖乳酪杆菌 GG 显著促进了乳鼠肠道形态结构的完整与肠道免疫功能的发育和成熟, 促进了上皮细胞的增殖、肠黏膜屏障的形成及肠道免疫系统的发育, 其作用机制可能与激活 Wnt 和 Notch 信号通路进而促进肠道干细胞的增殖及肠道各谱系细胞的分化有关。

参考文献:

- [1] 陈桔淳, 陆泽荣, 黄潘钿, 等. 益生菌滴剂对婴幼儿肠道菌群的调节作用及其健康效应[J]. 现代食品科技, 2025, 41(05): 19-27.
- [2] 金歌, 刘响, 谢润祥, 等. 生命早期补充鼠李糖乳杆菌 GG 保护子代肠道屏障的研究[J]. 中华临床营养杂志, 2019, 27(2): 101-106.
- [3] 汪姝敏, 翟齐啸. 婴幼儿肠道菌群的发育、成熟及影响因素研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(1): 38-47.
- [4] 谢美珠, 王芳, 蒋谦, 等. 鼠李糖乳杆菌调控宿主肠道健康的作用方式及机制研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2025, 61(7): 29-35.
- [5] YAO Q Q, FAN L L, ZHENG N, et al. 2'-Fucosyllactose ameliorates inflammatory bowel disease by modulating gut microbiota and promoting MUC2 expression[J]. Frontiers in

- nutrition, 2022, 9: 822020.
- [6] 杨宇翔, 王朋朋, 李斌, 等. 益生菌在犬肠道疾病中作用及机制的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(8): 3610-3620.
- [7] LEE S A, LIM J Y, KIM B S, et al. Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing[J]. Nutrition research and practice, 2015, 9(3): 242-248.
- [8] WU H Q, XIE S, MIAO J, et al. *Lactobacillus reuteri* maintains intestinal epithelial regeneration and repairs damaged intestinal mucosa[J]. Gut microbes, 2020, 11(4): 997-1014.
- [9] WANG W M, GENG M, ZHU C X, et al. Protective effects and mechanism of a novel probiotic strain *Ligilactobacillus salivarius* YL20 against *Cronobactersakazakii*-induced necrotizing enterocolitis in vitro and in vivo[J]. Nutrients, 2022, 14(18): 3827.
- [10] WANG T W, TENG K L, LIU Y Y, et al. *Lactobacillus plantarum* PFM 105 promotes intestinal development through modulation of gut microbiota in weaning piglets[J]. Frontiers in microbiology, 2019, 10: 90.
- [11] LYU L, ZHOU X, ZHANG M, et al. Lactobacillus derived from breast milk facilitate intestinal development in IUGR rats[J]. Journal of applied microbiology, 2022, 133(2): 503-514.
- [12] 岑秋宇, 庞日朝, 崔艳如, 等. 鼠李糖乳杆菌对炎症性肠病的影响机制研究进展[J]. 中国全科医学, 2022, 25(36): 4595-4600.
- [13] YAN F, LIU L, CAO H, et al. Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood[J]. Mucosal immunology, 2017, 10(1): 117-126.
- [14] SUNTORNSARATOON P, ANTONIO M J, FLORES J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG stimulates dietary tryptophan-dependent production of barrier-protecting methylnicotinamide[J]. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology, 2024, 18(2): 101346.
- [15] 秦文飞, 宋馨, 夏永军, 等. 乳酸菌在肠道定植的影响因素及研究方法[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 275-283.
- [16] 江桂英, 江沂, 刘婉. 结直肠癌组织 Ki67、P53、CK20、CerbB-2、Bcl-2 免疫组化染色前处理技术的探讨[J]. 临床医学工程, 2016, 23(10): 1320-1321.
- [17] 李奎武, 储浩然, 邹玲, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠小肠黏膜免疫屏障的影响[J]. 中国针灸, 2025, 45(7): 935-944.
- [18] VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease[J]. Frontiers in immunology, 2017, 11(9): 821-834.
- [19] WESTROM B, AREVALO SUREDA AUREDA E, PIERZYNOWSKA K, et al. The immature gut barrier and its importance in establishing immunity in newborn mammals[J]. Frontiers in immunology, 2020, 11: 1153.
- [20] DMYTRIV T R, STOREY K B, LUSHCHAK V I. Intestinal barrier permeability: the influence of gut microbiota, nutrition, and exercise[J]. Frontiers in immunology, 2024, 15: 1380713.
- [21] YAN F, POLK D B. Probiotics and probiotic-derived functional factors: mechanistic insights into applications for intestinal homeostasis[J]. Frontiers in microbiology, 2020, 11: 1428.
- [22] KORPELA K, SALONEN A, VIRTA L J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG intake modifies preschool children's intestinal microbiota, alleviates penicillin-associated changes, and reduces antibiotic use[J]. Frontiers in microbiology, 2016, 11(4): e0154012.
- [23] SHULMAN R J, CHICHLAWSKI M, GUTIERREZ OROZCO F et al. Infant behavioral state and stool microbiome in infants receiving *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG in formula: randomized controlled trial[J]. Frontiers in microbiology, 2022, 22 (1): 580.
- [24] 马微微, 吴金富, 赵伊阳, 等. 副干酪乳酪杆菌 Glory LP16 减轻抗生素引起小鼠肠道菌群失调并改善肠道屏障功能研究[J]. 中国乳品工业, 2025, 53(6): 15-20+39.
- [25] 盖赛伦, 陈晓洁, 凌涛, 等. 婴儿源鼠李糖乳杆菌的筛选及其促肠道类器官生长的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 167-175.
- [26] LI Y R, ZHANG T X, GUO C C, et al. *Bacillus subtilis* RZ001 improves intestinal integrity and alleviates colitis by inhibiting the Notch signalling pathway and activating ATOH-1[J]. Pathogens and disease, 2020, 78(2): ftaa016.
- [27] 丁莹莹, 张嘉芸, 唐龙轩, 等. 肠道共生生物对肠道干细胞的调节机制研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(3): 1019-1026.
- [28] 李梁岚, 李维勤. 潘氏细胞及其分泌的抗菌肽与肠道功能稳定和疾病的关系[J]. 中国细胞生物学学报, 2024, 46(10): 1801-1809.
- [29] CHEN X, CHU Q F, SHI Q M, et al. Wnt signaling pathways in biology and disease: mechanisms and therapeutic advances[J]. Signal transduction and targeted

therapy, 2025, 10(1): 106.

- [30] SHI Q M, CHEN X, ZENG Y F, et al. Notch signaling pathway in cancer: from mechanistic insights to targeted therapies[J]. Signal transduction and targeted therapy, 2024, 9(1): 128.
- [31] GREGORY P, AURELIE D, WULFRAN C, et al. Complex interplay between β -catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis[J]. Gut, 2011, 60(2): 166-76.
- [32] AZHDARI M, HAUSEN Z A. Wnt/ β -catenin and notch signaling pathways in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutics approaches[J]. Pharmacological research, 2025, 211: 107565.
- [33] OU W, XU W, WANG Y, et al. Cooperation of Wnt/ β -catenin and Dll1-mediated Notch pathway in Lgr5-positive intestinal stem cells regulates the mucosal injury and repair in DSS-induced colitis mice model[J]. Gastroenterology report, 2024, 12: goae090.
- [34] DIETRICH B, HAIDER S, MEINHARDT G, et al. WNT and NOTCH signaling in human trophoblast development and differentiation[J]. Cellular and molecular life sciences 2022, 79 (6): 292.
- [35] HAYWARD P, KALMAR T, MARTINEZ ARIAS A. Wnt/Notch signalling and information processing during development[J]. Development, 2008, 135(3): 411-424.