



口服丁酸钠经肠-肌轴对抗生素预处理CT26荷瘤小鼠骨骼肌萎缩的影响及机制研究*

张树玲^{1)**} 王军威¹⁾ 胡世亮²⁾ 王土土¹⁾ 李顺昌¹⁾ 范佳¹⁾ 孙君志¹⁾

(¹⁾ 成都体育学院运动医学与健康学院, 成都 641418; (²⁾ 贵州医科大学运动与健康学院, 贵阳 561113)

摘要 目的 探究口服丁酸钠经肠-肌轴对抗生素预处理的CT26荷瘤小鼠骨骼肌萎缩的影响以及其潜在的作用机制。方法 60只8周龄的SPF级BALB/c雄性小鼠, 随机分为对照组(NC组, $n=18$), 抗生素清扫组(ABX组, $n=42$)。ABX组经灌胃给予四联抗生素预处理, NC组则灌胃给予等体积的无菌水(0.2 ml/次, 1次/d, 6 d/周, 持续2周), 四联抗生素混合物由甲硝唑1 g/L、万古霉素0.5 g/L、氨苄西林1 g/L和庆大霉素1 g/L组成。确定预处理成功后, ABX组和NC组中各随机抽取6只(分别命名为Abx组和NC0组)进行肠道菌群测序分析。剩余ABX组背部皮下接种0.2 ml CT26细胞悬液(细胞密度为 1×10^7 /ml)后, 再随机分为对照+荷瘤模型组(0_NaB组, $n=12$)、口服低剂量丁酸钠+荷瘤模型组(L_NaB组, $n=12$)、口服高剂量丁酸钠+荷瘤模型组(H_NaB组, $n=12$), 剩余NC组相同部位接种0.2 ml生理盐水。L_NaB组给药量为0.3 g/(kg·d), H_NaB组给药量为0.5 g/(kg·d), NC组和0_NaB组给予等体积的生理盐水(0.2 ml/次, 1次/d, 6 d/周, 持续4周)。观察小鼠一般状态, 测定各组小鼠前肢抓力、腓肠肌质量及其肌纤维横截面积, 16S rRNA测序技术检测盲肠内容物评估肠道微生物菌群结构变化, 苏木精-伊红(HE)染色观测小肠壁病理结构变化, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清、腓肠肌TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及LPS含量, 蛋白质印迹法检测小肠ZO-1、闭合蛋白(occludin)表达及腓肠肌TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关蛋白的表达。**结果** a. Abx组 α 多样性显著性低于NC0组($P<0.01$), 肠道中绝大部分微生物菌群被清除。b. 与NC组相比, 0_NaB组小鼠皮下荷瘤凸显, 并伴随第3、4周末体重均显著降低($P<0.05$), 腓肠肌质量及肌纤维横截面积显著降低($P<0.01$), 以及第5、6周时前肢抓力亦显著减弱($P<0.01$); 与0_NaB相比, L_NaB组和H_NaB组小鼠荷瘤质量明显降低趋势, 腓肠肌质量及肌纤维横截面积明显增加, 第5、6周时前肢抓力显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。c. 与0_NaB相比, L_NaB组、H_NaB组 α 多样性中Shannon、Observed species指数显著性升高($P<0.05$); 在属水平上, 与0_NaB组相比, L_NaB组 *Paratutterella* 相对丰度显著性降低($P<0.01$), H_NaB组 *Escherichia-Shigella*、*Parasutterella* 相对丰度值显著性降低($P<0.01$)。d. 与0_NaB组相比, L_NaB组、H_NaB组小肠组织结构较完整, 炎性细胞浸润明显减少, 毛细血管轻微扩张。其中, L_NaB组ZO-1、occludin表达量显著升高($P<0.01$)。e. L_NaB组、H_NaB组腓肠肌LPS浓度以及TLR4、MyD88、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65蛋白表达量显著性低于0_NaB组($P<0.05$); H_NaB组血清TNF- α 浓度及L_NaB组、H_NaB组腓肠肌TNF- α 浓度显著性低于0_NaB组($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)。**结论** 口服NaB可通过改善CT26荷瘤小鼠肠道微生物菌群物种 α 多样性, 调整肠道微生物菌群的组成, 改善小肠黏膜屏障功能, 抑制LPS诱导的促炎反应, 进而延缓骨骼肌萎缩, 其潜在机制涉及骨骼肌TLR4/MyD88/NF- κ B信号转导的下调。

关键词 丁酸钠, 抗生素, 荷瘤, 肠道菌群, 骨骼肌萎缩

中图分类号 R363.1, R574, R685

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0469

CSTR: 32369.14.pibb.20250469

恶性肿瘤已成为一项重大的全球公共卫生挑战, 常伴随体重下降和骨骼肌萎缩等症状, 其发病机制涉及全身性炎症反应与胰岛素抵抗, 已知这些都受肠道微生物菌群的影响^[1]。近年来肠道微生物菌群与骨骼肌相互作用已经成为人类健康研究领域的焦点, 肠道微生物菌群结构和功能的改变可能会影响骨骼肌质量和功能^[2-4], 即骨骼肌病理生理

状态在很大程度上依赖于肠道微生物菌群组成及物种丰度的变化^[5]。

肠道微生物菌群的代谢产物, 例如胆汁酸^[6]、

* 四川省科技计划(苗子工程项目)(2022JDRC0137)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 028-86203692, E-mail: 1173054599@qq.com

收稿日期: 2025-10-29, 接受日期: 2026-02-02

短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs)^[5, 7]以及内毒素 (脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS))^[4, 8], 可通过能量代谢、炎症及免疫等多种途径直接或间接影响骨骼肌的质量与功能, 从而构成肠-肌轴^[9-10]。其中, LPS作为革兰氏阴性菌外膜中的一种强效内毒素, 以其显著的促炎特性而备受关注^[4]。肠道微生物菌群紊乱及多样性下降可损害肠黏膜屏障功能, 导致LPS易位进入循环系统, 并通过血液运输至骨骼肌。在骨骼肌中, LPS通过激活Toll样受体 (Toll-like receptors, TLRs)/髓样分化因子88 (myeloid differentiation factor 8, MyD88)/核转录因子 κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路, 促使促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 (interleukin, IL)-6和IL-1 β 的生成与释放, 进而诱发骨骼肌炎症反应, 最终导致骨骼肌萎缩^[4, 8, 10]。

丁酸 (butyric acid)作为一种重要的SCFAs, 是盲肠和结肠内微生物菌群以膳食纤维为底物发酵的主要终末产物之一, 在体内外实验中表现出较好的抗炎作用, 对调节肠道微生物菌群、维持肠道内稳态发挥重要作用^[11]。丁酸钠 (sodium butyrate, NaB)是丁酸的钠盐, NaB在多种疾病模型中具有抗炎和免疫调节的作用^[12-14]。多项研究表明, NaB可通过调节TLRs/NF- κ B信号通路来减轻LPS诱导的炎症, 例如肾损伤^[15]、牛胚胎气管细胞炎症^[16]、坏死性小肠结肠炎体外IEC-6细胞模型^[17]、牛巨噬细胞炎症反应^[18]等。丁酸盐可通过肠道吸收至外周血循环实现对TLRs及其相关信号分子表达的抑制或促进作用, 在治疗慢性炎症、恶性肿瘤等相关疾病中具有巨大潜力^[15, 19]。然而, 在癌症患者或相关动物实验模型中, NaB对肠道微生物菌群与炎症通路之间相互作用的调控机制目前仍不完全明确, 亟待进一步深入研究。

在肿瘤相关研究中, 抗生素 (antibioticcocktail, ABX) 预处理常用于构建伪无菌肠道模型, 有助于排除复杂菌群干扰, 以模拟临床肿瘤患者因治疗或疾病本身所致的肠道微生物菌群失调状态。尽管NaB在肠道炎症和微生物菌群调节中的作用已有报道, 但其在抗生素预处理背景下的肿瘤相关性肌萎缩模型中的作用尚未得到系统研究。本研究创新性地采用四联抗生素预处理模拟临床肿瘤患者常见肠道微生态紊乱状态, 并结合CT26荷瘤小鼠模型, 明确将其与骨骼肌萎缩直接

联系, 通过检测骨骼肌质量与功能、炎症因子及TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路, 系统揭示NaB通过调控肠道菌群-肠道屏障-系统炎症-骨骼肌信号的完整作用路径。本研究不仅拓展了NaB在复杂病理环境下的应用场景, 也为肠-肌轴调控肿瘤相关性肌萎缩提供了新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用BALB/c雄性小鼠, 8周龄, 60只, SPF级, 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 (生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010, 实验动物质量合格证编号: 11032422010828851)。动物饲养及方案经成都体育学院伦理委员会审核 (成体伦理[2022] 7号) 通过, 使用标准啮齿类动物笼饲养于成都体育学院SPF级动物房 [实验动物使用许可证号: SYXK (川) 2018-211], 4只/笼, 高压灭菌玉米芯垫料消毒垫于饲养笼, 2 d更换1次, 自由饮水饮食, 动物实验室自然昼夜节律光照, 保持良好通风, 控制室温21~23℃, 相对湿度40%~60%。

适应性喂养1周后, 将小鼠随机分为对照组 (NC组, $n=18$), 抗生素预处理组 (ABX组, $n=42$)。小鼠经过2周抗生素预处理后, 从NC组和ABX组各随机抽取6只 (分别命名为NC0组和Abx组), 利用16S rRNA测序技术检测盲肠内容物, 验证抗生素清扫小鼠模型。剩余ABX组小鼠接种CT26细胞株后, 随机分为对照+荷瘤模型组 (0_NaB组, $n=12$)、口服低剂量丁酸钠+荷瘤模型组 (L_NaB组, $n=12$)、口服高剂量丁酸钠+荷瘤模型组 (H_NaB组, $n=12$)。再次分组时4组间体重无显著性差异。剩余NC组小鼠在相同部位接种等体积生理盐水。

1.2 抗生素预处理方案

四联抗生素混合物溶于无菌水, 采用灌胃方式, ABX组小鼠每次给予0.2 ml混合物溶液, NC组小鼠每次给予等体积的无菌水, 1次/d, 6 d/周, 共持续2周。四联抗生素混合物由甲硝唑1 g/L (M1547, 美国Sigma-Aldrich)、万古霉素0.5 g/L (SBR00001, 美国Sigma-Aldrich)、氨苄西林1 g/L (A9518, 美国Sigma-Aldrich) 和庆大霉素1 g/L (E003632, 美国Sigma-Aldrich) 组成^[20]。

1.3 皮下注射CT26细胞株

CT26结肠癌细胞系 (CL-0071, Procell) 使用CT26专用培养基 (CM-0071, Procell) 在5% CO₂

培养箱中培养,隔天传代培养。当细胞活力达到95%时,使用0.25%胰酶-EDTA消化细胞3 min,加10%FBS完全培养液终止消化,将细胞悬液调整为细胞密度 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。于10周龄末,腹腔麻醉后,取0.2 ml细胞悬液接种于ABX组小鼠背部皮下,NC组小鼠相同部位接种0.2 ml生理盐水,所有操作均在无菌条件下进行^[21-22]。

1.4 口服NaB方案

采用灌胃给药方式,小鼠接种CT26细胞株次日,即开始口服NaB干预。其中,L_NaB组小鼠给药量为0.3 g/(kgd),H_NaB组小鼠为0.5 g/(kgd),0.2 ml/次,1次/d,6 d/周,共持续4周,而NC组和0_NaB组小鼠每次给予等体积的生理盐水。NaB干预剂量主要参考前期文献^[23-25]在类似动物模型中(如肠道炎症、肠道菌群和代谢紊乱模型)所报道的常用有效剂量范围进行确定。

1.5 动物取材及样本处理

动物实验结束后,禁食12 h,经腹腔注射麻醉后,通过眼球采血并离心获取血清。随后在低温条件下打开腹腔,取出盲肠段,清洗其外表面后,将盲肠内容物挤出至无菌冻存管中,并于 -80°C 保存,用于后续肠道微生物菌群测序分析。另取小肠段,清洗内外表面后,分别置于4%多聚甲醛中固定或 -80°C 保存,以供后续进行苏木精-伊红(HE)染色或蛋白质印迹检测。迅速分离腓肠肌组织,并保存于 -80°C ,以备蛋白质印迹检测。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 一般状态观察

每日观察并记录各组小鼠精神状态、反应情况、进食饮水、体毛颜色、体形状态、荷瘤生长情况等一般状态以及其他特殊情况。

1.6.2 小鼠骨骼肌质量指标检测

固定组织经脱水,石蜡包埋,切片脱蜡至水,苏木精染色10~20 min,自来水冲洗1~3 min,盐酸酒精分化5~10 s,自来水冲洗1~3 min,浸入 50°C 的温水中或弱碱性水溶液返蓝,直到出现蓝色为止,自来水冲洗1~3 min,浸入85%酒精3~5 min,伊红染色3~5 min,水洗3~5 s,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,图像采集,用Image J图像分析软件对骨骼肌横截面积进行测量。

1.6.3 小鼠前肢抓力的测试

利用YLS-13A大小鼠抓力测定仪(济南益延,中国)测量小鼠前肢抓力,每周末以1 min为间隔进行3次连续的测量,取平均值。

1.6.4 肠道微生物菌群测序

a. DNA抽提和PCR扩增

采用MagPure Soil DNA LQ Kit试剂盒对样本的基因组DNA进行提取,利用NanoDrop 2000超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和纯度, -20°C 保存。以提取的基因组DNA为模板,使用带Barcode的特异引物和Takara Ex Taq高保真酶进行细菌16S rRNA基因的PCR扩增。通用引物为343F(5'-TACGGRAGGCAGCAG-3')和798R(5'-AGGGTATCTAATCCT-3'),细菌多样性鉴定区域为16S V3-V4区。

b. 文库构建和测序

PCR扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳检测和AMPure XP beads磁珠纯化,以纯化后PCR扩增产物为二轮PCR模板,并进行二轮PCR扩增,二轮PCR扩增产物再次使用琼脂糖凝胶电泳检测和AMPure XP beads磁珠纯化,Qubit定量,Illumina NovaSeq 6000测序平台测序,生成250 bp双端reads。测序由上海欧易生物医学技术有限公司完成。

c. 生物信息学分析

生物信息学数据分析也由上海欧易生物医学科技有限公司完成。原始数据为FASTQ格式,数据下机后,先使用Cutadapt软件将raw data序列剪切掉引物序列。再使用DADA2将上一步合格的双端raw data按照QIIME 2(2020.11)默认参数进行质量过滤、降噪、拼接及去嵌合体等质控分析,得到代表序列及ASV丰度表格。使用QIIME 2软件包挑选出各个ASV代表序列后,将所有代表序列与Silva(version138)数据库进行比对注释。物种比对注释使用q2-feature-classifier软件默认参数进行分析。采用QIIME 2软件进行 α 多样性分析。 α 多样性又称样本内多样性,Simpson、Shannon指数反映肠道微生物菌群物种多样性(即丰富度和均匀度),Chao1、Observed species指数衡量肠道微生物菌群物种丰度(即物种总数),但不考虑每个物种的占比情况(均匀度)。

操作分类单元(operational taxonomic units, OUT)物种注释后,采用贝叶斯算法对其代表序列进行分类汇总,可得到样本在界(kingdom)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)、种(species)这7个水平上的绝对丰度(abundance)以及相对丰度(relative abundance)数据。由于不同菌株间拷贝

数存在差异,绝对丰度分析结果存在误差,相对丰度能一定程度抵消拷贝数不同和样品间的数量差别,后续一般根据相对丰度结果进行分析。本实验主要进行门、属上的群落结构分析。

1.6.5 小肠黏膜屏障功能指标检测

a. 各组小鼠小肠壁病理形态学的检测

利用HE染色技术检测各组小鼠小肠肠壁病理形态学变化,具体实验步骤同1.6.2中病理切片制作。随后在生物显微镜下,重点观察肠壁各层结构、炎性细胞浸润及黏膜完整性等形态学改变。

b. 各组小鼠小肠黏膜通透负相关蛋白ZO-1、闭合蛋白(occludin)表达的检测

取适量组织称重,总蛋白质提取时按1 mg组织/20 μ l裂解液加入预冷RIPA裂解液(含PMSF),匀浆,静置10 min,低温离心取上清液,BCA法测定总蛋白浓度;将上样缓冲液(2 $\times$ loading buffer)与蛋白质(1:1)在水浴锅加热变性(100 $^{\circ}$ C, 10 min),冷却分装,-20 $^{\circ}$ C保存;SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,湿法转膜,室温下5%脱脂奶粉封闭1 h,4 $^{\circ}$ C封闭过夜孵育一抗,抗ZO-1抗体(21773-1-AP, proteintech)及抗occludin抗体(ET1701-76, huabio)稀释液浓度分别为1:5 000和1:1 000;第2天,TBST液洗涤,室温孵育二抗2 h,抗体HRP-羊抗兔IgG(BA1054, BOSTER)稀释浓度为1:10 000,TBST液再次洗涤;增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)检测,暗室内用VisionWorks系统成像进行显影,使用Image J软件进行灰度值分析,以目的蛋白/ β -actin计算出相对表达量。

1.6.6 小鼠腓肠肌炎症指标检测

严格按照酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒使用说明书检测血清、骨骼肌TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及LPS含量。

采用蛋白质印迹法检测腓肠肌TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关蛋白质表达水平,抗TLR4(AP1504a, abcepta)、抗MyD88(ab219413, abcam)、抗IkB α (ET1603-6, huabio)、抗p-IkB α (ET1609-78, huabio)、抗NF- κ B p65(ET1603-12, huabio)和抗p-NF- κ B p65(YP0191, immunoway)抗体稀释液浓度均为1:1 000,具体实验步骤同1.6.5。

1.7 统计学处理

采用SPSS22.0软件进行统计学处理,所有数

据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)进行分析,若方差齐则采用LSD检验;若方差不齐则采用Tamhane's T2检验;两组间比较采用独立样本 t 检验; α 多样性分析采用Wilcoxon秩和检验进行两两比较。结果以 $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗生素预处理显著清除小鼠肠道中微生物菌群

12例肠道样本经高通量测序后共产生954 042条序列,再经质量过滤、降噪、拼接及去嵌合体等质控分析,共获得726 597条有效序列,最终形成ASV 3 443个。如图1a显示,NC0组和Abx组各有相同的ASV 1个,NC0组特有ASV 3 217个,Abx组特有ASV 224个。肠道微生物群原始测序数据已存入美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)序列读取档案(Sequence Read Archive, SRA)数据库,所提交数据的BioProject登录号为:PRJNA1233653。

如图1b显示,Abx组Simpson、Shannon、Chao1、Observed species 4个指数显著性低于NC0组($P<0.01$)。

如图1c所示,从门水平物种热图可见,抗生素预处理可显著清除小鼠肠道中绝大部分的微生物菌群,模拟无菌鼠的肠道环境。

2.2 口服NaB改善小鼠一般状态

与NC组相比,0_NaB组小鼠呈现精神萎靡、弓背、动作迟缓、食欲下降、体毛无光泽、立毛等一般状态。L_NaB组、H_NaB组小鼠精神状态、食欲、体毛光泽度等一般状态都稍强于0_NaB组。

接种CT26细胞株后,约第9天徒手触摸到小鼠皮下米粒般大小肿块,随后3组小鼠荷瘤体积逐渐增大。取材时,3组小鼠全部形成荷瘤,成瘤率100%。其中,与0_NaB相比,L_NaB组和H_NaB组小鼠荷瘤质量有明显降低趋势。

第3、4周末0_NaB组小鼠体重显著低于NC组,第4周末H_NaB组小鼠体重显著高于0_NaB组($P<0.05$)。值得注意的是,第4~6周末L_NaB组、H_NaB组3组小鼠体重(含荷瘤质量)明显低于NC组,而0_NaB组小鼠体重(含荷瘤质量)增长最快,甚至高于NC组(图2b)。再结合图2a荷瘤质量,提示口服NaB有利于CT26荷瘤小鼠瘦体重保持。

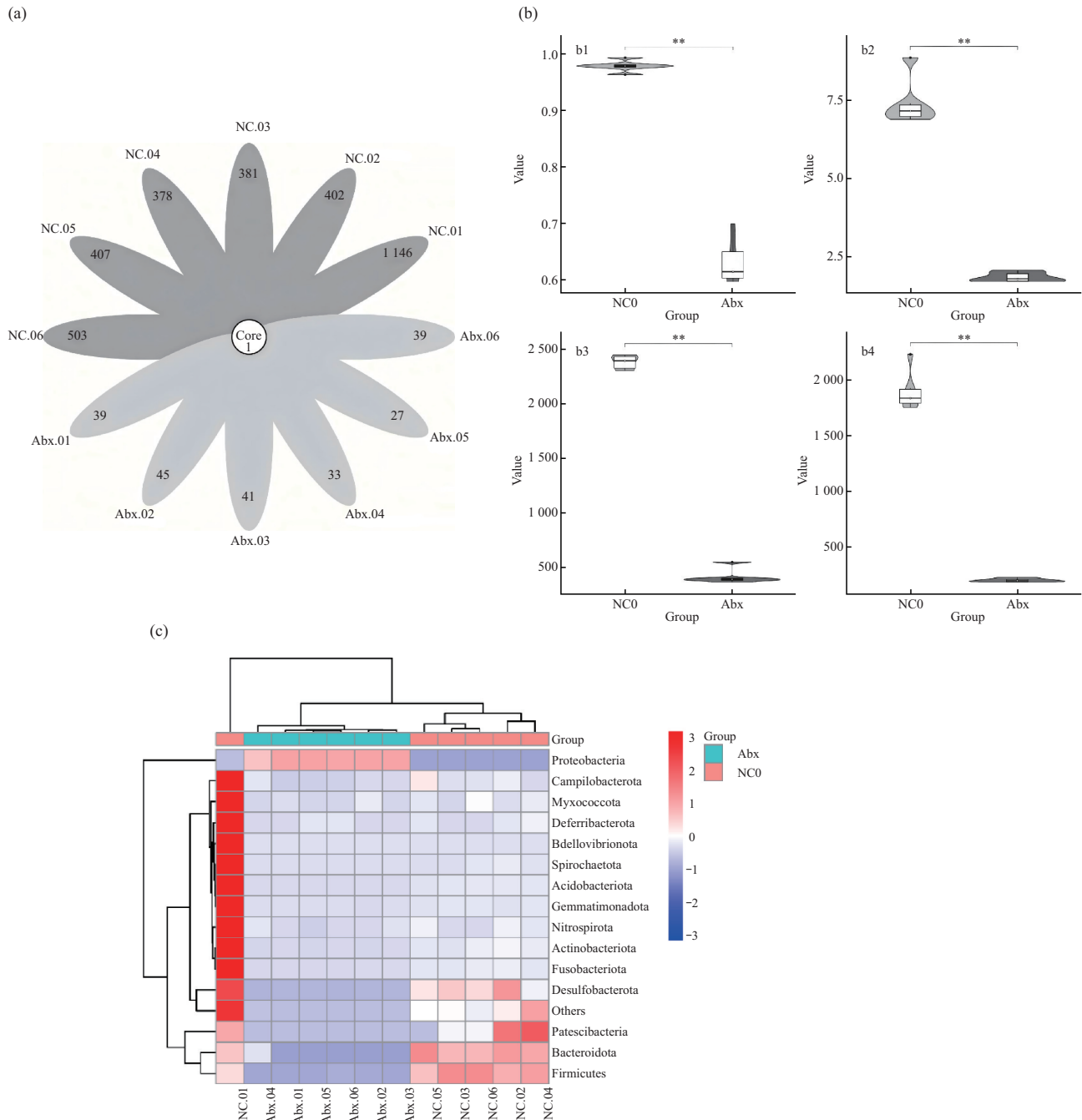


Fig. 1 Changes in the gut microbiota of mice following antibiotic pretreatment

(a) ASV distribution presented in a fan plot. The core number denotes ASVs common to all samples (core ASVs). Each petal number indicates the count of ASVs unique to that sample (total ASVs minus core ASVs). (b) Violin plots of alpha-diversity indices. b1: Simpson, b2: Shannon, b3: Chao1, b4: Observed species. $P < 0.01$. (c) Heatmap of species abundance at the phylum level. Red indicates higher species relative abundance, while blue represents lower relative abundance.

2.3 口服NaB对小鼠骨骼肌质量的保护效应

如图 3a 所示, 与 NC 组相比, 0_NaB 组、L_NaB 组、H_NaB 组腓肠肌湿重显著性降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

如图 3b 所示, 与 NC 组相比, 0_NaB 组、L_NaB 组、H_NaB 组腓肠肌肌纤维横截面积显著减少 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 与 0_NaB 组相比,

L_NaB 组腓肠肌肌纤维横截面积显著增加 ($P < 0.01$)。

如图 3c 所示, NC 组小鼠腓肠肌肌纤维大小、形态、结构基本正常, 未见肌纤维萎缩、变性、坏死, 其他 3 组小鼠腓肠肌肌纤维大小不一、粗细不等, 可见不同程度的肌纤维萎缩、变性、坏死, 其中, 0_NaB 组最为严重。

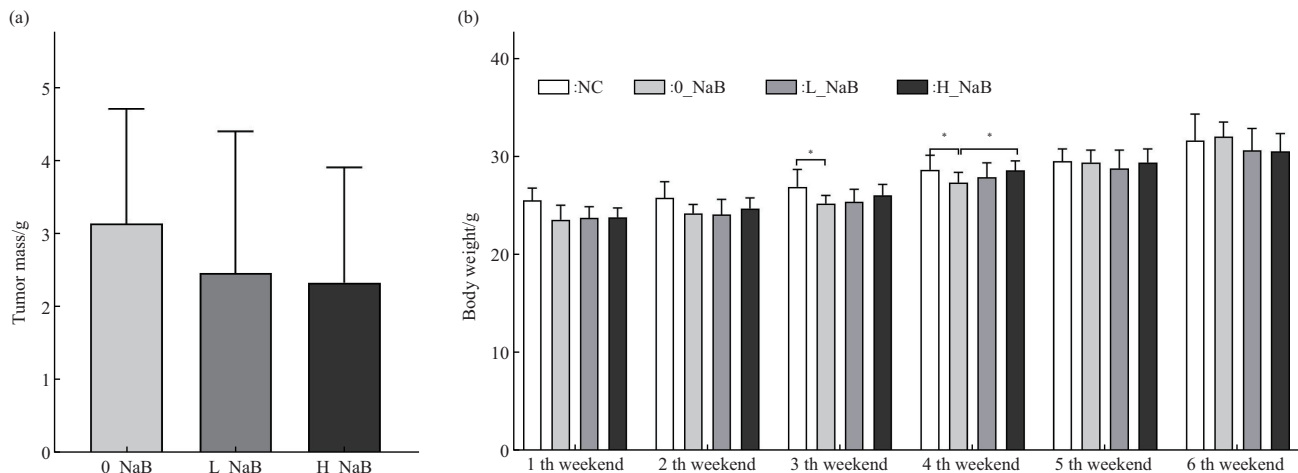


Fig. 2 The general condition

(a) Tumor weight at harvest. (b) Changes in mouse body weight (tumor mass included). * $P < 0.05$.

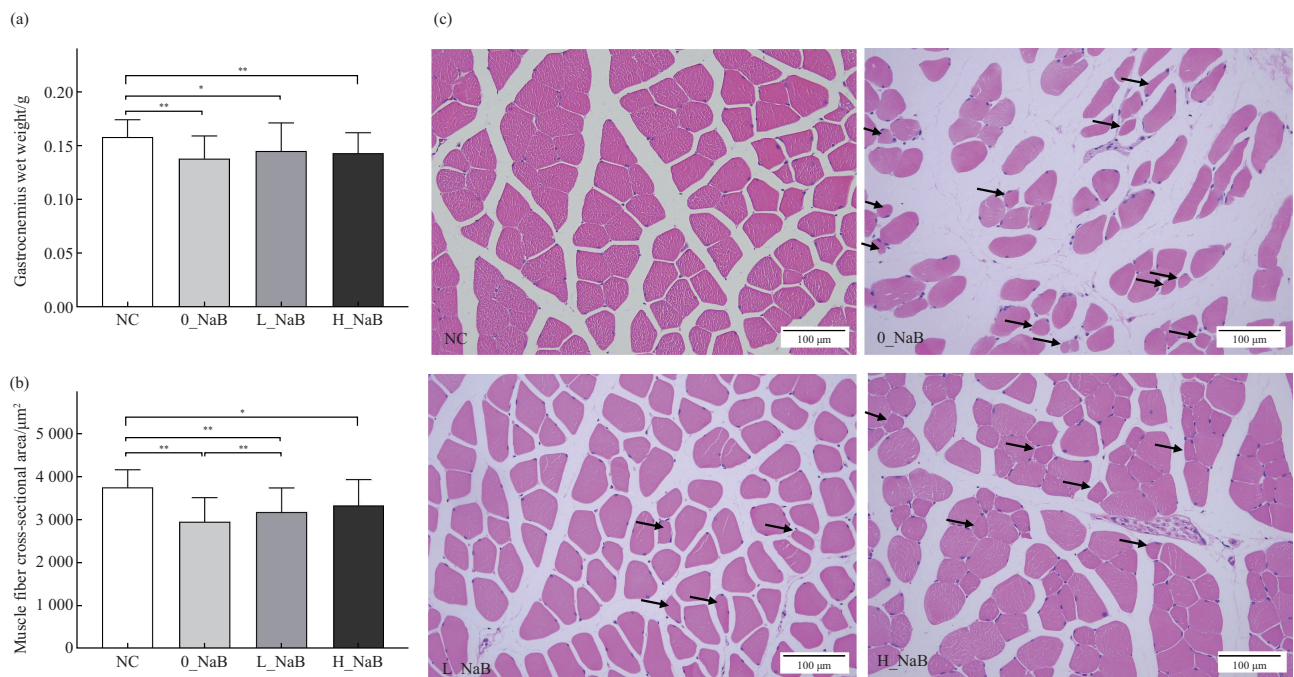


Fig. 3 Change in skeletal muscle mass

(a) The gastrocnemius muscle wet weight changes in mice. (b) The gastrocnemius muscle fibers cross-sectional area in mice. (c) HE staining of gastrocnemius muscle in each group of mice ($\times 200$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 口服NaB对小鼠前肢抓力的保护效应

如图4所示, 与NC组相比, 0_NaB组小鼠前肢抓力在第5、6周显著降低 ($P < 0.01$), L_NaB组和H_NaB组小鼠前肢抓力在第6周也显著降低 ($P < 0.05$), 与0_NaB组相比, L_NaB组和H_NaB组小鼠前肢抓力在第5、6周显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.5 口服NaB改善小鼠肠道菌群多样性并调节其结构组成

24例肠道样本经高通量测序后共产生1 917 382条序列, 再经质量过滤、降噪、拼接及去嵌合体等质控分析, 共获得1 180 238条有效序列, 最终形成ASV 2 470个。如图5a所示, NC组、0_NaB组、L_NaB组、H_NaB组各有相同的ASV

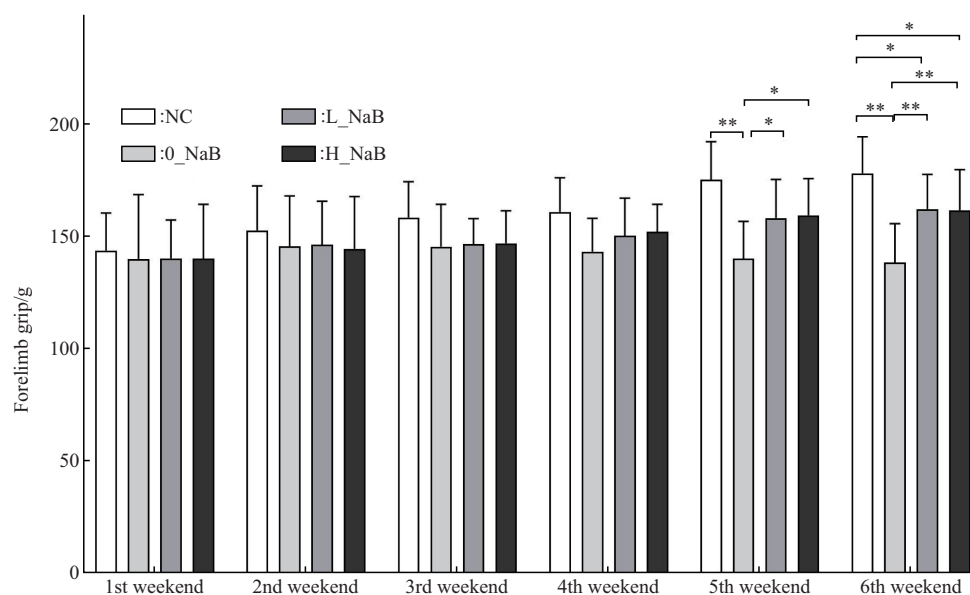


Fig. 4 Changes in forelimb grip strength

* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

4个, NC组特有ASV 1 399个, 0_NaB组特有ASV 325个, L_NaB组特有ASV 369个, H_NaB组特有ASV 361个。肠道微生物群原始测序数据已存入NCBI SRA数据库, 所提交数据的BioProject登录号为: PRJNA1233653。

如图5b所示: 与NC组相比, 0_NaB组、L_NaB组、H_NaB组Simpson、Shannon、Chao1、Observed species指数显著性降低 ($P<0.01$); 与0_NaB组相比, L_NaB组Simpson、Shannon、Observed species指数显著性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$); H_NaB组Shannon、Chao1、Observed species指数显著性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)。

如图5c所示, 在门水平包括拟杆菌门 (Bacteroidota)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、弯曲杆菌门 (Campilobacterota) 4种优势菌门; 与NC组相比, 0_NaB组拟杆菌门 (Bacteroidota)、变形菌门 (Proteobacteria) 相对丰度值显著性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), L_NaB组拟杆菌门 (Bacteroidota) 相对丰度值显著性升高 ($P<0.05$), H_NaB组拟杆菌门 (Bacteroidota)、厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度值显著性升高 ($P<0.05$)。在属水平上, 与NC组相比, 0_NaB组、L_NaB组和H_NaB组拟杆菌属 (*Bacteroides*)、副拟杆菌属 (*Parabacteroides*) 相对丰度值显著性升

高 ($P<0.01$), 而 *Muribaculaceae*、毛螺菌属 NK4A136 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*) 相对丰度值显著性降低 ($P<0.01$), 以及0_NaB组、H_NaB组副萨特氏菌属 (*Parasutterella*) 相对丰度值显著性升高 ($P<0.01$); 与0_NaB组相比, H_NaB组埃希氏菌-志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*) 相对丰度值显著性降低 ($P<0.01$), 以及L_NaB组、H_NaB组副萨特氏菌属 (*Parasutterella*) 相对丰度值显著性降低 ($P<0.01$)。

2.6 口服NaB增强小鼠小肠黏膜屏障功能

如图6a所示: NC组小肠组织结构完整、清晰, 未见明显炎症细胞浸润和增生; 0_NaB组小肠组织结构较完整, 局部见黏膜层变性坏死, 少量炎症细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 部分纤维组织增生, 可见核呈长椭圆形的成纤维细胞, 毛细血管轻微扩张; L_NaB组小肠组织结构较完整, 局部见黏膜层变性坏死, 少量炎症细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 少量纤维组织增生, 可见成纤维细胞; H_NaB组小肠组织结构较完整, 见极少量炎症细胞浸润, 毛细血管轻微扩张。

如图6b所示, 与NC组相比, 0_NaB组ZO-1、occludin表达量显著降低 ($P<0.01$), 与0_NaB组相比, L_NaB组ZO-1、occludin表达量显著升高 ($P<0.01$)。

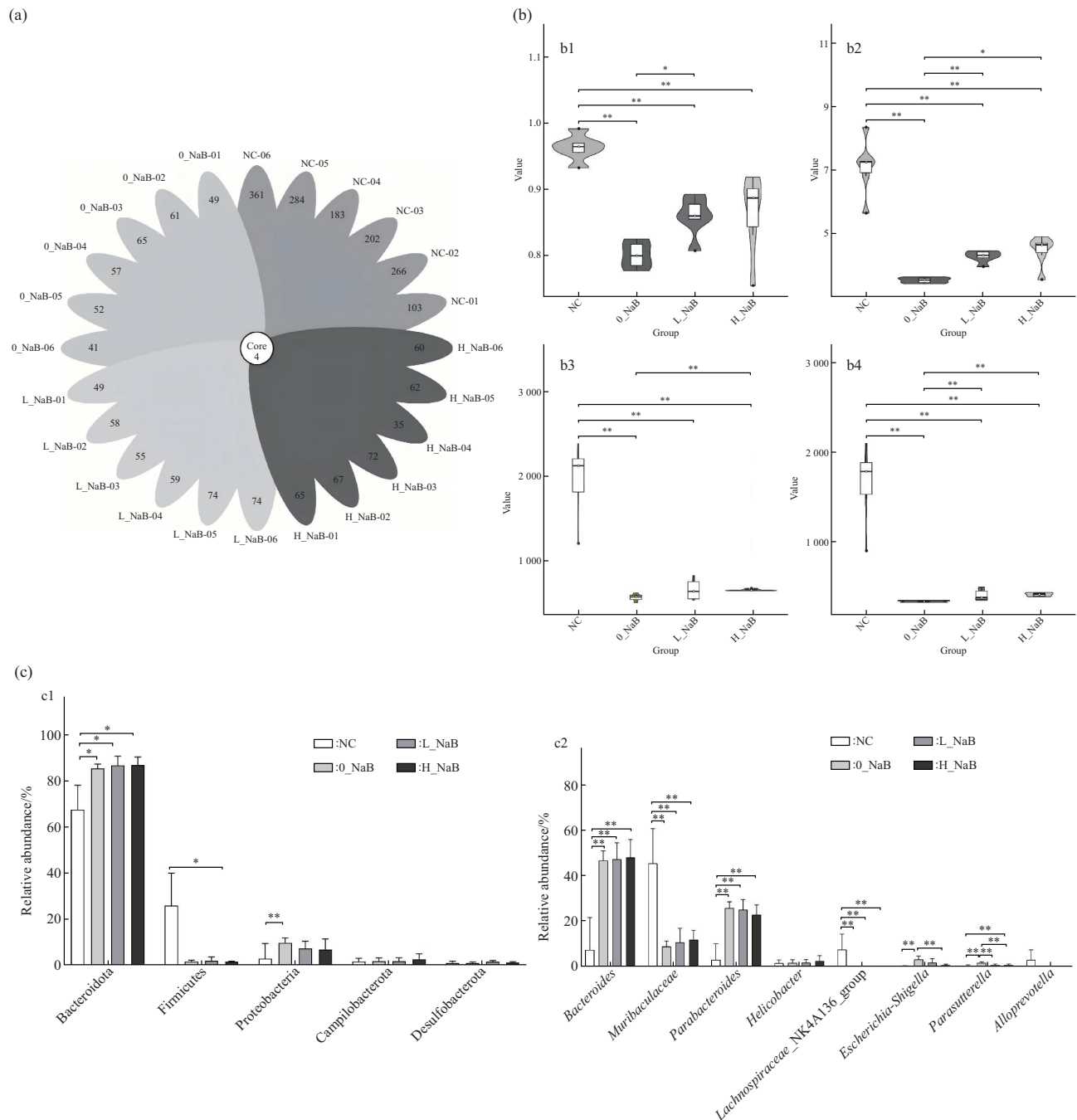


Fig. 5 Changes in the gut microbiota

(a) ASV distribution presented in a fan plot. The core number denotes ASVs common to all samples (core ASVs). Each petal number indicates the count of ASVs unique to that sample (total ASVs minus core ASVs). (b) Violin plots of alpha-diversity indices. b1: Simpson, b2: Shannon, b3: Chao1, b4: Observed species. (c) The bar plot of gut microbiota community structure. c1: phylum-level community structure bar plot of mouse gut microbiota, c2: genus-level community structure bar plot of mouse gut microbiota. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.7 口服NaB抑制小鼠腓肠肌炎症信号通路

如图7a所示, 与NC组相比, 0_NaB组血清、腓肠肌LPS浓度显著性升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), L_NaB组腓肠肌LPS浓度显著性升高 ($P < 0.01$), 与0_NaB组相比, L_NaB组和H_NaB组腓肠肌

LPS浓度显著性降低 ($P < 0.01$)。

如图7b所示, 各组小鼠腓肠肌TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关蛋白表达量变化趋势为0_NaB组>L_NaB组>H_NaB组>NC组。与NC组相比, 0_NaB组TLR4、MyD88、I κ B α 、p-I κ B α 、

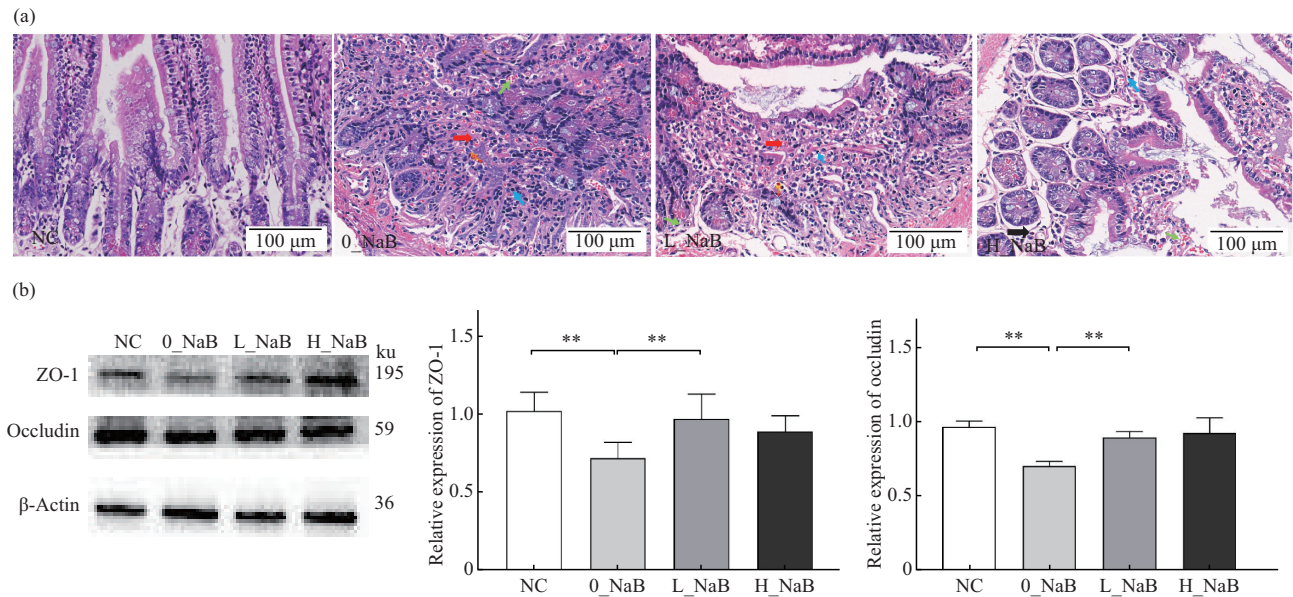


Fig. 6 Changes in the small intestinal barrier function

(a) HE staining of the mouse small intestine ($\times 400$). The red arrow indicates focal mucosal degeneration and necrosis, the yellow arrow points to a fibroblast, the green arrow denotes dilated capillaries, the blue arrow highlights lymphocytes, and the black arrow identifies neutrophils. (b) Expression of ZO-1 and occludin in the mouse small intestine: a comparison of tight junction proteins negatively correlated with intestinal permeability. ** $P < 0.01$.

p-NF- κ B p65 蛋白表达量显著性升高 ($P < 0.01$), L_NaB 组 TLR4、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达量显著性升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), H_NaB 组 p-NF- κ B p65 蛋白表达量也显著性升高 ($P < 0.05$); 与 0_NaB 组相比, L_NaB 组 TLR4、MyD88、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达量显著性降低 ($P < 0.05$), H_NaB 组 TLR4、MyD88、I κ B α 、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达量显著性降低 ($P < 0.05$); 与 L_NaB 组相比, H_NaB 组 p-I κ B α 蛋白表达量显著性降低 ($P < 0.05$)。

如图 7c 所示, 0_NaB 组、L_NaB 组血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 浓度显著性高于 NC 组 ($P < 0.05$), H_NaB 组血清炎症因子 TNF- α 浓度显著性低于 NC 组和 0_NaB 组 ($P < 0.05$)。L_NaB 组、H_NaB 组腓肠肌炎症因子 TNF- α 浓度低于 0_NaB 组 ($P < 0.01$); 0_NaB 组、L_NaB 组、H_NaB 组腓肠肌炎症因子 IL-6、IL-1 β 浓度高于 NC 组 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

3.1 抗生素预处理模拟小鼠无菌肠道环境及 CT26 荷瘤小鼠模型的验证

对于肠道微生物菌群的功能研究常用 ABX 预

处理来模拟无菌肠道环境, 常通过灌胃或饮水从而清除大部分肠道微生物菌群, 有助于更好地了解肠道微生物与宿主相互作用。在某些疾病模型中, 应用 ABX 所产生的伪无菌肠道环境可消除其他微生物影响、促进干预细菌的定植, 从而替代无菌小鼠用于疾病研究^[26]。本研究采用三联抗生素预处理法, 探究口服 NaB 对 CT26 荷瘤小鼠的肠道微生物菌群结构、肠黏膜屏障功能、骨骼肌炎症的影响并探索其初步机制。结果表明, 经抗生素灌胃预处理后, Abx 组小鼠肠道 ASV 数量急剧减少, 肠道微生物菌群 α 多样性显著性降低 ($P < 0.01$), 有效清除小鼠肠道内绝大部分肠道微生物菌群, 成功模拟了无菌肠道环境。

在肿瘤研究的多种模型中, 皮下荷瘤模型因其操作简便、重复性高而成为应用最为普遍的实验体系之一^[27]。该模型通常将小鼠或人类来源的肿瘤细胞移植至免疫缺陷或免疫正常小鼠的皮下, 使其形成局部肿瘤, 便于观察与干预^[27]。目前已有多种细胞系被用于构建疾病状态, 包括 CT26^[28-29] 或 C26^[29] 细胞诱导的结直肠癌模型、LLC 细胞^[30] 构建的 Lewis 肺癌模型, 以及 B16F10 细胞^[31] 诱导的黑色素瘤模型等。其中, CT26^[28] 或 C26^[32] 细胞诱导的结直肠癌皮下荷瘤小鼠模型可稳定再现肿瘤

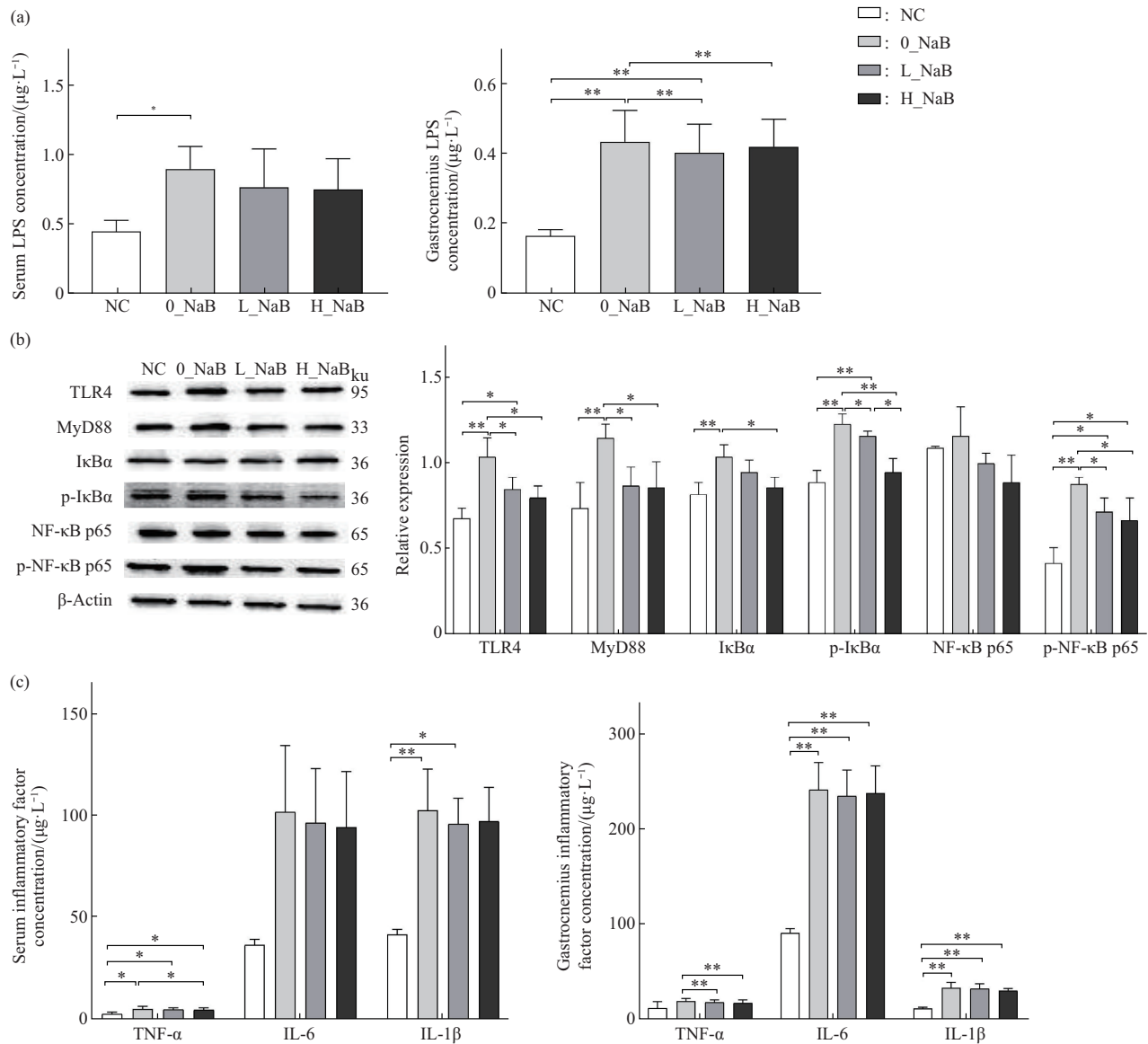


Fig. 7 Change of the gastrocnemius muscle inflammation in mice

(a) Comparison of LPS concentrations in mouse serum and gastrocnemius muscle. (b) Comparison of TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway protein expression in the mouse gastrocnemius muscle. (c) Comparison of inflammatory cytokine concentrations in mouse serum and gastrocnemius muscle. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

伴随的肌肉萎缩表型, 已成为研究肿瘤相关性肌萎缩最常用且最具有代表性的动物模型。本研究在利用抗生素预处理模拟无菌肠道环境的基础上, 采用皮下注射 CT26 细胞株建立荷瘤小鼠模型, 取材时 0_NaB 组、L_NaB 组和 H_NaB 组小鼠全部形成皮下荷瘤, 成瘤率 100%。由此可见, 实验成功构建了 CT26 荷瘤小鼠模型。

与 0_NaB 组相比, L_NaB 组和 H_NaB 组小鼠前肢抓力在第 5、6 周显著增加, 腓肠肌湿重及其肌纤维横截面积明显增加, 提示口服 NaB 有利于

CT26 荷瘤小鼠骨骼肌质量和功能保持。但遗憾的是, 本研究未设置“无抗生素+CT26+NaB 组”及“无抗生素+NaB 组”作为对照组, 从而难以完全排除 2 周抗生素预处理本身对骨骼肌产生的独立影响, 尤其在炎症状态、代谢水平、肌肉质量与功能等方面的具体效应。值得指出的是, 在抗生素处理结束后, 各组小鼠体重并未表现出显著性差异, 这提示在后续实验阶段, 抗生素预处理本身可能并未对机体基础代谢状态造成显著影响。此外, 本研究发现, 经口服 NaB 4 周后 L_NaB 组和 H_NaB 组小

鼠荷瘤质量明显低于0_NaB组,并且精神状态、食欲、体毛光泽度等一般状态得到显著改善。

3.2 口服NaB对荷瘤小鼠肠道微生物菌群的影响

丁酸盐在维持肠道健康方面发挥着关键作用^[13, 33]。研究表明,外源性丁酸盐可通过增加有益菌群^[13, 34]和减少有害菌群来调节肠道微生物菌群组成,并刺激具有抗炎潜力的SCFAs生成菌的增殖,从而调节肠道微生物菌群^[33]。刘华缓等^[35]在炎症相关结直肠癌小鼠模型中发现,NaB干预可一定程度恢复 α 多样性和群落构成变化,并在不同水平改变物种构成比。Sun等^[13]利用口服NaB干预可减轻坏死性小肠结肠炎小鼠的肠道炎症并部分纠正肠道微生物菌群紊乱。Wei等^[36]实验发现,补充NaB能有效缓解肠道微生物菌群的失调,从而改善肠道微生态的完整性。另外,粪便丁酸水平可能成为评估粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)对溃疡性结肠炎疗效的生物标志物,添加产丁酸细菌通过改变肠道微生物菌群可能延长FMT对溃疡性结肠炎的治疗效果^[37]。本研究发现,口服NaB能使得CT26荷瘤小鼠肠道微生物 α 多样性呈现上升趋势,一定程度上趋向正常组,H_NaB组更加明显。进一步进行肠道微生物菌群群落结构分析发现,0_NaB组 *Proteobacteria* 相对丰度值显著性高于NC组 ($P<0.05$),而明显低于L_NaB和H_NaB组 ($P>0.05$),H_NaB组 *Escherichia-Shigella* 相对丰度值显著性低于0_NaB组 ($P<0.01$),L_NaB组、H_NaB组 *Parasutterella* 相对丰度值显著性降低 ($P<0.01$)也显著低于0_NaB组 ($P<0.01$)。其中, *Proteobacteria* 是胃肠道中一类适应性强、具有潜在致病性的常见菌,其丰度升高可作为哺乳动物结肠肠道菌群失调的一个潜在的微生物标志^[38], *Escherichia-Shigella* 分类群同时涵盖共生菌与病原体,其相对丰度的显著升高均应视作肠道微生态失衡的潜在标志, *Parasutterella* 作为革兰氏阴性菌,其细胞壁成分LPS可因肠道黏膜屏障功能受损而易位进入体循环,进而通过激活TLR4/NF- κ B信号通路,诱发局部肠道及全身性的固有免疫炎症反应。*Proteobacteria*、*Escherichia-Shigella*、*Parasutterella* 相对丰度值的变化提示口服NaB可有效地降低CT26荷瘤小鼠肠道微生物致病菌群。

3.3 口服NaB对荷瘤小鼠小肠黏膜屏障功能的影响

肠黏膜屏障(intestinal mucosal barrier, IMB)

是机体阻止肠腔内有害物质如致病微生物、抗原和促炎因子等入侵血液循环的重要屏障,包括机械、生物、化学以及免疫屏障,其中,以机械屏障最为重要^[39]。众所周知,丁酸盐是肠道微生物菌群代谢产生的关键SCFAs,在维持IMB功能方面具有重要作用^[12]。研究表明,丁酸盐也是调控紧密连接蛋白表达的重要信号分子,可显著上调claudin-1和ZO-1的表达水平,增强肠上皮细胞间的紧密连接结构,进而对维持肠道屏障完整性发挥关键作用^[40-41]。本研究中L_NaB组小鼠小肠壁ZO-1、occludin蛋白表达量显著高于0_NaB组 ($P<0.01$),与上述文献^[40-41]结果一致。丁酸盐还能够通过其抗炎特性调节肠道局部免疫,有效抑制TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-8等促炎细胞因子的表达,并促进抗炎因子IL-10的释放,从而维持肠道免疫稳态^[42]。本研究病理形态学观察到,与NC组相比,0_NaB组小肠组织局部见黏膜层变性坏死,少量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,部分纤维组织增生,可见经抗生素预处理的CT26荷瘤小鼠小肠组织炎性细胞增多,提示其小肠黏膜屏障功能可能被破坏,经为期4周NaB口服干预后,L_NaB组和H_NaB组小肠组织炎性细胞浸润明显减少,其中,H_NaB组仅见极少量炎性细胞浸润。此外,Liu等^[43]体内实验结果表明,丁酸盐可显著改善C26恶病质小鼠的肠道屏障功能,有效抑制LPS易位,并降低机体氧化应激水平;进一步的体外细胞实验表明,丁酸盐可能通过调节氧化应激反应参与肌细胞萎缩的调控过程。

3.4 口服NaB对荷瘤小鼠骨骼肌炎症的影响

研究表明,TLRs/MyD88/NF- κ B信号通路在全身性炎症反应中起着重要作用,与糖尿病肾病^[44]、胰岛炎症诱导的 β 细胞功能障碍^[45]等疾病进程显著相关。而肠道微生物菌群代谢产物LPS在肠道内主要发挥负性调节作用,能够通过识别并激活TLR4相关信号通路,进而参与多种炎症性疾病的调控。有研究表明,慢性肾病状态下肠道微生态失调可引起循环LPS水平升高,并通过LPS/TLR/NF- κ B信号通路促进骨骼肌萎缩^[46]。张玄^[47]实验发现,NaB可显著抑制甲状腺癌细胞增殖,减少促炎因子TNF- α 、IL-6的释放,并诱导细胞凋亡与G0/G1期周期阻滞,其作用机制可能与调控TLR4/NF- κ B信号通路有关。

对比各组小鼠血清与腓肠肌中LPS的浓度观察到,腓肠肌LPS浓度普遍低于血清水平,这可能与

肠道微生物菌群代谢产物LPS进入血液循环,并随之转运至骨骼肌^[48]、肝脏^[49]、大脑^[50]等诸多外周器官有关。其中,L_NaB组和H_NaB组腓肠肌LPS浓度显著性低于0_NaB组($P<0.01$)。随血液运输至骨骼肌LPS激活腓肠肌TLR4/MyD88/NF- κ B信号相关通路,L_NaB组和H_NaB组TLR4、MyD88、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65蛋白表达量显著性低于0_NaB组($P<0.05$),且H_NaB组p-I κ B α 蛋白表达量显著性低于L_NaB组($P<0.05$),提示p-I κ B α 可能在该信号通路调控中具有重要作用,可能在H_NaB组中这一作用更为明显。炎症因子结果显示,CT26荷瘤小鼠血清炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)、腓肠肌炎症因子(IL6、IL-1 β)浓度显著高于正常健康小鼠,经为期4周NaB口服干预后,口服高剂量丁酸钠小鼠血清、腓肠肌及口服低剂量丁酸钠小鼠腓肠肌TNF- α 浓度显著低于CT26荷瘤小鼠水平,尤以口服高剂量丁酸钠小鼠血清、腓肠肌TNF- α 浓度下降幅度明显。上述结果提示,口服NaB显著抑制了骨骼肌内LPS诱导的促炎反应,可能与下调其TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路有关。

3.5 口服NaB经肠-肌轴的作用及可能机制分析

肠道微生物菌群的代谢产物是肠-肌轴调节骨骼肌炎症的关键介质。肠道微生物菌群紊乱及多样性下降可损害IMB功能,导致有害代谢产物LPS等易位进入循环系统,激活炎症通路,损害骨骼肌,导致骨骼肌质量和功能下降^[51]。本研究在利用抗生素预处理模拟无菌肠道环境的基础上,发现口服NaB使得CT26荷瘤小鼠肠道微生物 α 多样性一定程度上趋向正常组,调整了肠道微生物菌群的组成,降低了*Proteobacteria*、*Escherichia-Shigella*、*Parasutterella*等潜在致病菌的相对丰度值。这一改变进一步增强了小肠黏膜屏障功能,有效抑制LPS诱导的促炎反应。进一步研究表明,上述效应可能通过下调骨骼肌中TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路而实现,从而为NaB经由肠-肌轴延缓肌肉萎缩提供了关键分子依据。

3.6 本研究的不足

a. 本研究设计存在一定局限性,未设置“无抗生素+CT26+NaB组”及“无抗生素+NaB组”作为对照组,本研究系初步探索性工作,未来研究将在此基础上开展进一步对照实验,以明确NaB在有无抗生素背景下的独立效应,深入验证相关机制。

b. 本研究仅设置了低、高两个剂量NaB

0.3 g/(kg·d)与0.5 g/(kg·d)进行干预,未能通过多梯度浓度实验系统评估其量效关系并明确最佳作用剂量。未来研究有必要设立更细致的剂量梯度,以进一步阐明NaB量效特征并确定其最优干预浓度。

c. 本研究未对来自肠道菌群微生物代谢产物LPS进行追踪定位,未能证明来自肠道菌群微生物代谢产物LPS与腓肠肌上TLR4相结合,下一步拟进行肠道黏膜、骨骼肌、血清代谢组学以及转录组学的检测,试着从代谢组学或转录组学角度去验证或进一步揭示机制。

4 结 论

口服NaB可通过改善CT26荷瘤小鼠肠道微生物菌群物种 α 多样性,调整肠道微生物菌群的组成,改善小肠黏膜屏障功能,抑制LPS诱导的促炎反应,进而延缓骨骼肌萎缩,其潜在机制涉及骨骼肌TLR4/MyD88/NF- κ B信号转导的下调。

参 考 文 献

- [1] Ziemons J, Smidt M L, Damink S O, *et al.* Gut microbiota and metabolic aspects of cancer cachexia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021, **35**(3): 101508
- [2] Chen S, Zhang P, Duan H, *et al.* Gut microbiota in muscular atrophy development, progression, and treatment: New therapeutic targets and opportunities. *Innovation*, 2023, **4**(5): 100479
- [3] Kang L, Li P, Wang D, *et al.* Alterations in intestinal microbiota diversity, composition, and function in patients with sarcopenia. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 4628
- [4] Chew W, Lim Y P, Lim W S, *et al.* Gut-muscle crosstalk. A perspective on influence of microbes on muscle function. *Front Med*, 2023, **9**: 1065365
- [5] 史益凡,王新颖.肠道菌群对骨骼肌的影响及SCFAs介导“肠-肌轴”的机制研究进展. *解放军医学杂志*, 2021, **46**(9): 849-854
Shi Y F, Wang X Y. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2021, **46**(9): 849-854
- [6] Mancin L, Wu G D, Paoli A. Gut microbiota-bile acid-skeletal muscle axis. *Trends Microbiol*, 2023, **31**(3): 254-269
- [7] 徐磊,倪震,张纓.运动、肠道菌群代谢物——短链脂肪酸与骨骼肌代谢调控. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, **38**(1): 1-7
Xu L, Ni Z, Zhang Y. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2022, **38**(1): 1-7
- [8] Gong J Y, Ren H, Chen H Q, *et al.* Magnesium isoglycyrrhizinate attenuates anti-tuberculosis drug-induced liver injury by enhancing intestinal barrier function and inhibiting the LPS/TLRs/NF- κ B signaling pathway in mice. *Pharmaceuticals*, 2022, **15**(9): 1130
- [9] Zhao J, Huang Y, Yu X. A narrative review of gut-muscle axis and

- sarcopenia: the potential role of gut microbiota. *Int J Gen Med*, 2021, **14**: 1263-1273
- [10] Li G, Jin B, Fan Z. Mechanisms involved in gut microbiota regulation of skeletal muscle. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, **2022**: 2151191
- [11] Zhang M, Wang Y, Zhao X, *et al.* Mechanistic basis and preliminary practice of butyric acid and butyrate sodium to mitigate gut inflammatory diseases: a comprehensive review. *Nutr Res*, 2021, **95**: 1-18
- [12] Kaźmierczak-Siedlecka K, Marano L, Merola E, *et al.* Sodium butyrate in both prevention and supportive treatment of colorectal cancer. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, **12**: 1023806
- [13] Sun Q, Ji Y C, Wang Z L, *et al.* Sodium butyrate alleviates intestinal inflammation in mice with necrotizing enterocolitis. *Mediators Inflamm*, 2021, **2021**: 6259381
- [14] de Lazari M G T, Pereira L X, Orellano L A A, *et al.* Sodium butyrate downregulates implant-induced inflammation in mice. *Inflammation*, 2020, **43**(4): 1259-1268
- [15] Dou X, Yan D, Ma Z, *et al.* Sodium butyrate alleviates LPS-induced kidney injury *via* inhibiting TLR2/4 to regulate rBD2 expression. *J Food Biochem*, 2022, **46**(7): e14126
- [16] Liu J, Chang G, Huang J, *et al.* Sodium butyrate pretreatment mitigates lipopolysaccharide-induced inflammation through the TLR4/NF- κ B signaling pathway in bovine embryo trachea cells. *Anim Biotechnol*, 2022, **33**(7): 1571-1581
- [17] Gao Y, Yang L, Wu H, *et al.* Sodium butyrate attenuates experimental neonatal necrotizing enterocolitis by suppressing TLR4-mediated NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis. *Food Funct*, 2025, **16**(9): 3508-3524
- [18] Jiang L, Wang J, Liu Z, *et al.* Sodium butyrate alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulation of NF- κ B, NLRP3 signaling pathway, and activating histone acetylation in bovine macrophages. *Front Vet Sci*, 2020, **7**: 579674
- [19] Hao H, Xiao-Jiang L, Zhen-Jun L, *et al.* Regulation of Toll-like receptors and their downstream factors by butyrate. *Acta Physiologica Sinica*, 2022, **74**: 827-836
- [20] 赵振国. 经肠道的抗生素预处理对小鼠急性慢性放射性肠损伤的保护作用及其机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2018
- Zhao Z G. The Effects and Mechanisms of Antibiotic Pretreatment on Acute and Chronic Radiation-induced Intestinal Injury in mice [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2018
- [21] Mori T, Ohmori H, Luo Y, *et al.* Giving combined medium-chain fatty acids and glucose protects against cancer-associated skeletal muscle atrophy. *Cancer Sci*, 2019, **110**(10): 3391-3399
- [22] Fernandes L G, Tobias G C, Paixão A O, *et al.* Exercise training delays cardiac remodeling in a mouse model of cancer cachexia. *Life Sci*, 2020, **260**: 118392
- [23] 王慧琴. 丁酸钠对DSS诱导的实验性结肠炎小鼠IL-21、IL-10表达变化的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2020
- Wang H Q. Effect of Sodium Butyrate on the Expression of IL-21 and IL-10 in DSS-induced Experimental Colitis Mice[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2020
- [24] 卞中博, 张秋玉, 秦勇, 等. 丁酸钠对DSS诱导小鼠炎症性肠病的作用及对Nrf2/NF κ B表达影响. *营养学报*, 2022, **44**(1): 72-78
- Bian Z B, Zhang Q Y, Qin Y, *et al.* *Acta Nutr Sin*, 2022, **44**(1): 72-78
- [25] Huang Y, Wang Z, Ye B, *et al.* Sodium butyrate ameliorates diabetic retinopathy in mice *via* the regulation of gut microbiota and related short-chain fatty acids. *J Transl Med*, 2023, **21**(1): 451
- [26] Panyod S, Wu W K, Lee Y P, *et al.* Refining antibiotic cocktail regimens for pseudo-germ-free mice and their impact on gut microbiome and pancreatic tumor proteomics. *J Adv Res*, 2025: S2090-1232(25)00603-4
- [27] Stribbling S M, Ryan A J. The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. *Nat Protoc*, 2022, **17**(9): 2108-2128
- [28] Song G, Choi M, Park W Y, *et al.* *Chrysanthemum indicum* L. ameliorates muscle atrophy by improving glucose tolerance in CT26-induced cancer cachexia. *Front Pharmacol*, 2024, **15**: 1455805
- [29] Sato Y, Fu Y, Liu H, *et al.* Tumor-immune profiling of CT-26 and Colon 26 syngeneic mouse models reveals mechanism of anti-PD-1 response. *BMC Cancer*, 2021, **21**(1): 1222
- [30] 刘相良. 肿瘤相关肌肉减少症的危险因素识别与营养治疗的转化研究[D]. 长春: 吉林大学, 2025
- Liu X L. Identification of Risk Factors for Cancer-related Sarcopenia and Translational Research on Nutritional Therapy [D]. Changchun: Jilin University, 2025
- [31] Mîndrilă I, Osman A, Mîndrilă B, *et al.* Phenotypic switching of B16F10 melanoma cells as a stress adaptation response to Fe₃O₄/salicylic acid nanoparticle therapy. *Pharmaceuticals*, 2021, **14**(10): 1007
- [32] Cardaci T D, Bastian A V, Roark K, *et al.* Profibrotic immune cells and fibro-adipogenic progenitors contribute to skeletal muscle extracellular matrix remodeling and fibrosis in cancer cachexia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2025, **329**(4): C1283-C1299
- [33] Facchin S, Vitulo N, Calgaro M, *et al.* Microbiota changes induced by microencapsulated sodium butyrate in patients with inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, **32**(10): e13914
- [34] Li X, Lei S, Liu L, *et al.* Synergistic effect of lotus seed resistant starch and short-chain fatty acids on mice fecal microbiota *in vitro*. *Int J Biol Macromol*, 2021, **183**: 2272-2281
- [35] 刘华缓, 曹誉, 肖志鹏, 等. 丁酸钠对AOM/DSS炎症相关性结肠癌小鼠模型及其肠道菌群的影响. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, **28**(18): 1368-1377
- Liu H H, Cao Y, Xiao Z P, *et al.* *Chin J Cancer Prev Treat*, 2021, **28**(18): 1368-1377
- [36] Wei H, Yu C, Zhang C, *et al.* Butyrate ameliorates chronic alcoholic central nervous damage by suppressing microglia-mediated neuroinflammation and modulating the microbiome-gut-brain axis. *Biomed Pharmacother*, 2023, **160**: 114308
- [37] Xu H M, Huang H L, Xu J, *et al.* Cross-talk between butyric acid

- and gut microbiota in ulcerative colitis following fecal microbiota transplantation. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 658292
- [38] 郭仕辉, 余永涛, 万佳宏, 等. 变形菌门与哺乳动物结肠肠道菌群失调相关研究进展. *中国微生态学杂志*, 2022, **34**(4): 479-484
- Guo S H, Yu Y T, Wan J H, *et al.* *Chin J Microecol*, 2022, **34**(4): 479-484
- [39] 戴伟, 吴海兰, 赵明, 等. COPD大鼠肠粘膜屏障功能障碍的观察研究. *肠外与肠内营养*, 2022, **29**(1): 18-23
- Dai W, Wu H L, Zhao M, *et al.* *Parenter Enter Nutr*, 2022, **29**(1): 18-23
- [40] Fu L, Wang M, Li D, *et al.* Microbial metabolites short chain fatty acids, tight junction, gap junction, and reproduction: a review. *Front Cell Dev Biol*, 2025, **13**: 1624415
- [41] Hajjar R, Richard C S, Santos M M. The role of butyrate in surgical and oncological outcomes in colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, **320**(4): G601-G608
- [42] Mohamed Elfadil O, Mundi M S, Abdelmagid M G, *et al.* Butyrate: more than a short chain fatty acid. *Curr Nutr Rep*, 2023, **12**(2): 255-262
- [43] Liu H, Xi Q, Tan S, *et al.* The metabolite butyrate produced by gut microbiota inhibits cachexia-associated skeletal muscle atrophy by regulating intestinal barrier function and macrophage polarization. *Int Immunopharmacol*, 2023, **124**(Pt B): 111001
- [44] Zhou Y, Ma X Y, Han J Y, *et al.* Metformin regulates inflammation and fibrosis in diabetic kidney disease through TNC/TLR4/NF- κ B/miR-155-5p inflammatory loop. *World J Diabetes*, 2021, **12**(1): 19-46
- [45] Liu Y, Tian Y, Dai X, *et al.* Lycopene ameliorates islet function and down-regulates the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in diabetic mice and Min6 cells. *Food Funct*, 2023, **14**(11): 5090-5104
- [46] 唐刚, 杜怡, 贾洁爽, 等. 肠道微生物对慢性肾脏病患者骨骼肌代谢的影响及干预策略. *中华内科杂志*, 2020, **59**(4): 326-328
- Tang G, Du Y, Jia J S, *et al.* *Chin J Intern Med*, 2020, **59**(4): 326-328
- [47] 张玄. 丁酸钠通过 TLR4/NF- κ B 信号通路诱导甲状腺癌细胞凋亡的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2024
- Zhang X. Study on the Induction of Apoptosis in Thyroid Cancer Cells by Sodium Butyrate Through the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway[D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2024
- [48] Ono Y, Maejima Y, Saito M, *et al.* TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice. *Sci Rep*, 2020, **10**: 694
- [49] Wang X, Ji D, Zhu B, *et al.* Contribution of endotoxin to Th17 bias in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Microb Pathog*, 2020, **142**: 104009
- [50] Zhao X, Yu J, Xu B, *et al.* Gut-derived bacterial vesicles carrying lipopolysaccharide promote microglia-mediated synaptic pruning. *Alzheimers Dement*, 2025, **21**(8): e70331
- [51] 郭文雅, 向施佳, 张小丽, 等. 肠道微生物在骨骼肌萎缩中作用的研究进展. *生命科学*, 2026, **38**(1): 207-217
- Guo W Y, Xiang S J, Zhang X L, *et al.* *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2026, **38**(1): 207-217

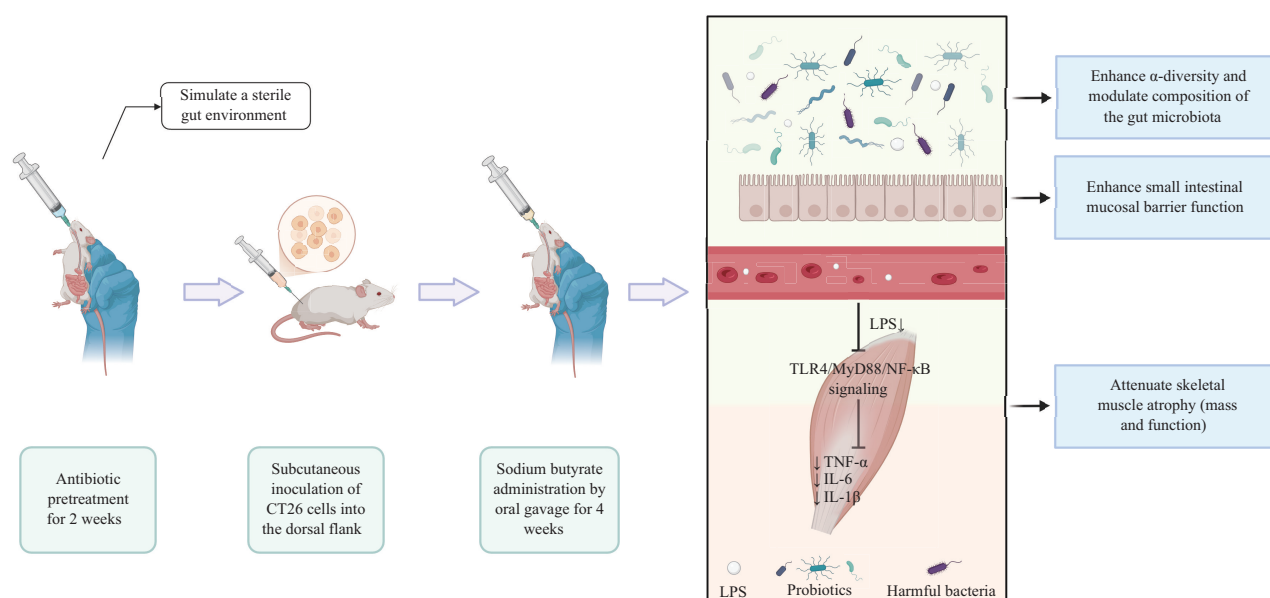
Effect of Oral Sodium Butyrate on Skeletal Muscle Atrophy *via* The Gut-muscle Axis in Antibiotic-pretreated CT26 Tumor-bearing Mice and Its Mechanism*

ZHANG Shu-Ling^{1)**}, WANG Jun-Wei¹⁾, HU Shi-Liang²⁾, WANG Tu-Tu¹⁾, LI Shun-Chang¹⁾,
FAN Jia¹⁾, SUN Jun-Zhi¹⁾

⁽¹⁾School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 641418, China;

⁽²⁾School of Sports and Health, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To explore the effect of oral sodium butyrate on skeletal muscle atrophy in CT26 tumor mice through the gut microbiota-skeletal muscle axis and its potential mechanism. **Methods** Sixty SPF BALB/c male mice aged 8 weeks were randomly divided into a normal control group (NC, $n=18$) and a ABX-depleted group (ABX, $n=42$). The ABX mice were pretreated with a quadruple antibiotic cocktail *via* oral gavage (0.2 ml per administration, once daily, 6 d per week, for 2 weeks), whereas NC received an equal volume of sterile water. The quadruple antibiotic cocktail consisted of metronidazole (1 g/L), vancomycin (0.5 g/L), ampicillin (1 g/L), and gentamicin (1 g/L). Following successful pretreatment, six mice from each group were randomly selected for gut microbiota sequencing analysis and designated as the Abx group and the NC0 group, respectively.

* This work was supported by a grant from Sichuan Provincial Science & Technology Program (Seedling Project Cultivation) (2022JDRC0137).

** Corresponding author.

Tel: 86-28-86203692, E-mail: 1173054559@qq.com

Received: October 29, 2025 Accepted: February 2, 2026

The remaining mice in ABX were subcutaneously inoculated in the dorsum with 0.2 ml of CT26 cell suspension (at a cell density of $1 \times 10^7/\text{ml}$). Then these mice were randomly allocated into three subgroups: a control tumor bearing model group (0_NaB, $n=12$), a tumor-bearing model group receiving low-dose oral sodium butyrate (L_NaB, $n=12$), a tumor-bearing model group receiving high-dose oral sodium butyrate (H_NaB, $n=12$). And mice in NC were inoculated at the same site with 0.2 ml of normal saline. The administration dose for L_NaB was 0.3 g/(kg·d), that for H_NaB was 0.5 g/(kg·d), while NC and 0_NaB were given the same volume of normal saline (0.2ml per time, once daily, 6 d per week, for 4 weeks). The general condition of mice was monitored, and forelimb grip strength gastrocnemius muscle mass and its muscle fiber cross-sectional area were measured for each group. The structural changes in gut microbiota were assessed by 16S rRNA sequencing of cecal contents. Pathological alterations in the intestinal wall were examined *via* HE staining. Serum and gastrocnemius muscle levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and LPS were quantified using ELISA. The protein expression of ZO-1 and occludin in the small intestine, as well as proteins associated with the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in the gastrocnemius muscle, were detected by Western blot analysis. **Results** (1) The alpha-diversity in Abx was significantly lower than that in NC0 ($P<0.01$), a significant decrease of the mass and muscle fiber cross-sectional area of the gastrocnemius ($P<0.01$), with the majority of gut microbiota being effectively depleted. (2) Compared with NC, the subcutaneous tumors of mice in 0_NaB were prominent, a significant increase of the mass and muscle fiber cross-sectional area of the gastrocnemius, accompanied by a significant decrease in body weight at the end of the 3th and 4th week ($P<0.05$), and a significant weakening of the forelimb grasping strength at the 5th and 6th week ($P<0.01$). Compared with 0_NaB, the tumor mass of mice in L_NaB and H_NaB showed a significant decreasing trend, and the grip strength of the forelimbs significantly increased at the 5th and 6th week ($P<0.05$, $P<0.01$). (3) Compared with 0_NaB, the Shannon and Observed species indices in α diversity of L_NaB and H_NaB were significantly increased ($P<0.05$). At the genus level, compared with 0_NaB, L_NaB exhibited a significant decrease in the relative abundance of *Parasutterella* ($P<0.01$), while H_NaB showed significant reductions in the relative abundances of both *Escherichia-Shigella* and *Parasutterella* ($P<0.01$). (4) Compared with 0_NaB, the small intestinal tissue structure in L_NaB and H_NaB was more intact, the infiltration of inflammatory cells was significantly reduced, and the capillaries were slightly dilated. The expression levels of ZO-1 and occludin proteins in L_NaB were significantly increased ($P<0.01$). (5) The LPS concentration in the gastrocnemius muscle and the protein expression levels of TLR4, MyD88, p-I κ B α , and p-NF- κ B p65 in L_NaB and H_NaB were significantly lower than those in 0_NaB ($P<0.05$). The serum TNF- α concentration in H_NaB and TNF- α concentration in the gastrocnemius muscle of the L_NaB and H_NaB were significantly lower than those in 0_NaB ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). **Conclusion** Oral administration of NaB can improve gut microbiota α diversity, adjusting its composition, improving intestinal mucosal barrier function, reducing the LPS-induced pro-inflammatory response, and delaying skeletal muscle atrophy. The underlying mechanism may involve down regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling in skeletal muscle.

Key words sodium butyrate, antibiotic, tumor-bearing, gut microbiota, skeletal muscle atrophy

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0469

CSTR: 32369.14.pibb.20250469