

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00055

## 低聚半乳糖对应激大鼠肠黏膜屏障功能的影响

谢 婷<sup>1</sup>, 夏金荣<sup>1\*</sup>, 高 峻<sup>2</sup>, 李兆申<sup>2</sup>

1. 东南大学附属中大医院消化内科, 南京 210009

2. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 研究肠道补充低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)对冷束缚应激(cold restraint stress, CRS)大鼠肠黏膜紧密连接和屏障功能的影响。**方法** 40只Wistar大鼠随机分成正常对照组、GOS组、CRS组和CRS+GOS组,每组10只,正常对照组仅给予基础饮食,GOS组每天给予GOS(4 g/kg)喂养,共10 d;CRS组大鼠于普通喂养第10天,被束缚固定后置于4℃冰箱3 h,制备CRS模型;CRS+GOS组在每天给予GOS(4 g/kg)喂养的第10天制备CRS模型。建模成功后,各组大鼠经心脏采血,检测血浆二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)浓度;处死大鼠,取回肠组织行病理检查及电镜检查,再采用免疫组化法检测细胞紧密连接蛋白occludin的表达,并以实时定量PCR法检测其在mRNA水平的表达。**结果** 与正常对照组相比,CRS组及CRS+GOS组大鼠血浆DAO浓度均明显增高( $P < 0.01$ );CRS组血浆DAO浓度又明显高于CRS+GOS组( $P < 0.01$ );CRS组及CRS+GOS组大鼠肠黏膜occludin在蛋白和mRNA水平的表达均较正常对照组显著降低( $P < 0.01$ );CRS组上述指标又明显低于CRS+GOS组( $P < 0.01$ ),正常对照组与GOS组间上述指标的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 添加GOS喂养可以降低大鼠血浆DAO浓度,增加回肠occludin在mRNA和蛋白水平的表达,提示GOS可能具有改善紧密连接和维护肠屏障功能的作用。

**[关键词]** 应激;肠黏膜;紧密连接;二胺氧化酶;occludin;低聚半乳糖

**[中图分类号]** R 573.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)01-0055-06

### Effect of prebiotics on intestinal barrier function in stressed rats

XIE Ting<sup>1</sup>, XIA Jin-rong<sup>1\*</sup>, GAO Jun<sup>2</sup>, LI Zhao-shen<sup>2</sup>

1. Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

2. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of the galacto-oligosaccharides (GOS) on the intestinal mucosal tight junction and barrier function of rats with induced cold restraint stress. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into four groups: two cold resistant stress (CRS) groups fed with either a standard diet (CRS group) or 4 g/kg GOS per day (CRS+GOS group) and two sham CRS groups fed with a standard diet (control group) or 4 g/kg GOS per day (GOS group). All the four groups were fed for a total of 10 days, and the CRS and CRS+GOS groups were subjected to cold restraint stress on the 10<sup>th</sup> day. Then the blood samples of all the four groups were collected via cardio puncture for determination of serum diamine oxidase (DAO) activity; finally all the rats were sacrificed and the intestinal tissues were collected for pathological and electronic microscopic examination, with the *occludin* mRNA level measured by real-time PCR and the occludin protein expression by immune-histological method. **Results** Compared with the control, the serum DAO levels of CRS group and the CRS+GOS group were significantly increased ( $P < 0.01$ ); and that in the CRS group was significantly higher than that in the CRS+GOS group ( $P < 0.01$ ). The levels of occludin mRNA and protein expression were significantly decreased in the two CRS groups ( $P < 0.01$ ), and that in the CRS group was significantly lower than that in the CRS+GOS group ( $P < 0.01$ ); the serum DAO levels, the expressions of occludin mRNA and protein were not significantly different between the control and the GOS groups. **Conclusion** Feeding with GOS can decrease plasma level of DAO in rats, increase expression of intestinal occludin mRNA and protein in rat ileum, indicating that GOS can improve the mucosal tight junction and intestinal barrier function.

**[收稿日期]** 2013-09-26

**[接受日期]** 2013-12-20

**[作者简介]** 谢 婷, 硕士. E-mail: xt1609@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 025-83262281, E-mail: xjr049540@163.com

[Key words] stress; intestinal mucosa; tight junctions; diamine oxidase; occludin; galacto-oligosaccharides

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(1): 55-60]

应激性生活事件被认为与消化系统最常见的慢性疾病,如功能性胃肠道病症(FGID)、炎症性肠病(IBD)、胃食管反流病(GERD)和消化性溃疡(PU)等的发病或症状加重相关;急、慢性应激可以引起肠道显著的病理生理改变<sup>[1]</sup>。迄今为止应激引起肠道功能障碍的具体机制尚不清楚,但肠黏膜屏障功能障碍是其可能的一种机制<sup>[2]</sup>。二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)在人类小肠黏膜上层绒毛中有较高的含量和活性,肠黏膜细胞受损、坏死后可被释放入血或随坏死脱落的细胞进入肠腔内,导致其活性在血浆和肠腔增高而在肠黏膜内降低,故 DAO 浓度在外周血中的变化可间接反映肠黏膜屏障的完整性和损伤程度<sup>[3]</sup>。上皮细胞紧密连接(tight junction, TJ)位于上皮细胞膜外侧的顶部,分隔细胞顶面与基侧面,防止上皮细胞间隙中的物质溢出和大分子在细胞间隔中穿行;细胞间的 TJ 破坏可能导致肠上皮对大分子物质的通透性增加<sup>[4]</sup>。在炎症、肠缺血-再灌注损伤、细菌毒素、应激等作用下, TJ 会产生迅速的调节反应<sup>[6-7]</sup>。Occludin 是第一个被发现的组成 TJ 的蛋白,是 TJ 的主要成分<sup>[8]</sup>,在维持上皮细胞屏障功能方面具有重要作用。本实验主要通过观察微生物制剂低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)早期干预对冷束缚应激(cold restrain stress, CRS)大鼠肠黏膜通透性及肠黏膜上皮 TJ 蛋白 occludin 表达的影响,初步探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量 150~160 g,由中国科学院上海实验动物中心提供[SCXK(沪)2002-0006]。GOS(西安德施普生物制品有限公司),冷束缚大鼠固定器(苏杭实验动物仪器厂),日立 H800 透射电镜(第二军医大学电镜室),TaKaRa RNA PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司],兔抗 occludin 一抗(Zymed 公司),鼠兔通用型二抗(上海增健生物科技有限公司),RNA-direct SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix[东洋纺(上海)生物科技有限公司],DAO 试剂购自 Sigma 公司。

1.2 实验动物分组 40 只雄性 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周,自由饮水及进食,随后被随机分为 4 组:正常对照组、GOS 组、CRS 组和 CRS+GOS 组,每组 10 只。实验开始前大鼠禁食 24 h,自由饮水。正常对照组大鼠在笼中自由活动,仅接受基础饮食(basal diet)、无菌水饲养;GOS 组大鼠每天的饮水中添加 GOS (4 g/kg)<sup>[2,9]</sup>,共 10 d,余处理同对照组;CRS 组大鼠于普通喂养第 10 天,在乙醚轻度麻醉状态下被固定于专门的器具中,活动受限,置于 4℃ 冰箱,3 h 后解除束缚,将大鼠放回鼠笼;CRS+GOS 组大鼠每天的饮水中添加 GOS (4 g/kg),于喂养后第 10 天,采用与 CRS 组相同的方法制备模型。实验结束后予 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,心脏取血 2 mL,分离血清待测;取血后处死大鼠,取回肠组织待测。

1.3 血浆 DAO 浓度检测 配制 DAO 标准品后,进行标本检测。在试管中依次加入 0.2 mol/L PBS 3.0 mL、0.004% 辣根过氧化物酶(HRP)0.1 mL、0.5% 二盐酸邻联茴香胺(o-dianisidine)0.1 mL、血浆 0.5 mL、0.175% 戊二胺 0.1 mL。空白管用 PBS 液代替样本。置 37℃ 水浴 30 min,在 DU-7 型紫外可见分光光度计波长 436 nm 处测定光密度值,以 DAO 标准品倍比稀释建立标准曲线,将检测结果与之对比,计算 DAO 含量<sup>[5]</sup>。

1.4 组织病理学改变(H-E 染色法) 回肠组织经生理盐水冲洗后按以下步骤进行病理检测:4% 甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,石蜡包埋,组织切片机切成 3~4 μm 切片,37℃ 烤片 4 h,石蜡切片脱蜡至水,苏木精染色 5~10 min,自来水冲洗 3~4 min,75% 乙醇盐酸分化,温热水 5~10 min 显蓝,95% 乙醇冲洗 1 min,伊红复染 2 min,脱水透明(95% 乙醇和纯乙醇脱水,二甲苯各 2 次,每次 2 min),树脂封固,镜检观察。

1.5 透射电镜检测 对切取的大鼠回肠组织,先用 4% 多聚甲醛固定 24 h,再切成 1 mm×2 mm 大小,放入固定液中;0.1 mol/L 的 PBS 液漂洗,1% 四氧化锇固定液 4℃ 下固定 2 h,再以 PBS 液漂洗;梯度乙醇、丙酮脱水,再用 1:1 丙酮/包埋剂浸透 2 h,1:2 丙酮/包埋剂浸透过夜,纯包埋剂浸透 1 h;聚合

(37℃ 12 h, 60℃ 36 h);切片经饱和醋酸铀、柠檬酸铅染色,在光镜下半薄切片定位观察,再用超薄切片机切片,常规染色后在透射电镜下观察、拍照。

### 1.6 小肠黏膜 occludin 在蛋白及基因水平的表达检测

1.6.1 免疫组织化学染色 回肠组织标本经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化, PBS 洗 3 次,微波抗原修复;再以 PBS 漂洗, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 5 min, PBS 漂洗, 1% 小牛血清孵育 20 min;滴加兔抗 occludin 一抗 (1:400 稀释), 4℃ 孵育过夜; PBS 漂洗, 滴加鼠兔通用型二抗 50 μL, 室温静置 30 min; PBS 漂洗, DAB 显色 1 min; 苏木精复染、盐酸乙醇分化; 晾干、滴加树脂封片、镜检。将免疫组化染色片在 0.5 cm×1.0 cm 样品截面上, 用计算机图像处理系统进行定量灰度扫描, 200 倍放大系数下, 每个切片随机挑选 5 个视野, 求出给定面积的灰度值。灰度值范围为 0~255, 染色越深, 灰度越低。运用 ImaginPro Plus 软件计算并比较各自表达量所对应的灰度值, 用于反映 occludin 蛋白的相对表达水平(灰度值低代表蛋白表达水平高)。

1.6.2 实时荧光定量 PCR 检测 取回肠组织进行 RNA 抽提, 取 5 μg 行电泳以检测 RNA 纯度和浓度。使用 TaKaRa RNA PCR 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 保存于 4℃ 冰箱。使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物序列, 由上海生化生物工程公司合成, 分别是: *βactin*, 引物序列为 5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3'、5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3', 退火温度 56℃, 产物长度 211 bp; *occludin*: 引物序列为 5'-AAA CCC GAA GAA AGA TGG AC C-3'、5'-TCA CTT TGC CGT TGG AGG AG-3', 退火温度 58℃, 产物长度 198 bp。建立 25 μL 的实时 PCR 反应体系, 用 ABI 7500 PCR 仪进行扩增。荧光定量 PCR 的结果以 Ct 值显示, 采用相对定量 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法比较各基因表达的差异。

1.7 统计学处理 数据采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。所有实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组之间的比较采用方差分析, 两组间比较采用配对 *t* 检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 血浆 DAO 浓度 CRS 组、CRS+GOS 组大鼠血浆 DAO 浓度分别为 (24.75 ± 2.73) U/mL、

(17.36 ± 1.50) U/mL, 均明显高于正常对照组 (8.42 ± 2.58) U/mL,  $P < 0.01$ , CRS 组血浆 DAO 浓度又明显高于 CRS+GOS 组 ( $P < 0.01$ ), 但血浆 DAO 浓度在正常对照组和 GOS 组 (9.10 ± 2.31) U/mL 之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.2 小肠组织病理学改变的光镜观察 小肠黏膜损伤以 Chiu 分级法<sup>[10]</sup>为评分标准。各组大鼠小肠壁层次清楚, 其中正常对照组和 GOS 组大鼠肠道黏膜上皮结构完整, 无明显充血和异常淋巴细胞浸润, 评分 0 级。CRS 组大鼠肠黏膜变薄、萎缩, 浅层有部分坏死, 上皮细胞脱落, 部分绒毛顶端固有层有明显充血水肿, 肠黏膜上皮细胞与固有层间距离增宽, 评分 3 级; CRS+GOS 组大鼠肠黏膜变薄, 无明显细胞脱落、坏死, 充血水肿不明显, 评分 1 级。结果如图 1 所示。

2.3 小肠绒毛顶端超微结构的透射电镜观察 正常对照组和 GOS 组肠黏膜上皮细胞表面微绒毛排列整齐, 柱状上皮细胞结构完整; 细胞器结构未见异常; 细胞间紧密连接、中间连接、桥粒及缝隙连接清楚, 无增宽。CRS 组大鼠肠段主要表现为上皮细胞微绒毛稀疏、排列不整、呈倒伏状、部分缺如; 上皮细胞连接增宽、部分紧密连接增宽或开放; 线粒体肿胀, 内质网扩张。CRS+GOS 组大鼠肠段部分上皮细胞微绒毛结构完整, 细胞间连接稍增宽, 有轻微溶解现象, 但较之 CRS 组大鼠肠段超微结构的改变要微小。结果如图 2 所示。

2.4 小肠黏膜 occludin 在蛋白及基因水平的表达 免疫组化染色结果显示, occludin 蛋白细胞表面、细胞间、胞质内均有表达, 阳性染色呈棕黄色, 正常对照组(图 3A)和 GOS 组(图 3B)较 CRS 组(图 3C)和 CRS+GOS 组(图 3D)染色深。相对定量分析结果显示, CRS 组和 CRS+GOS 组平均灰度值均显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), CRS 组又高于 CRS+GOS 组 ( $P < 0.01$ ), 但正常对照组和 GOS 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3E)。说明 CRS 组和 CRS+GOS 组大鼠小肠上皮细胞间 occludin 蛋白表达较正常对照组均明显降低, 但 CRS+GOS 组的表达水平较 CRS 组有所增加。与此相对应的是, 在 *occludin* mRNA 表达水平方面, CRS 组和 CRS+GOS 组也较正常对照组降低 ( $P < 0.01$ ), 且 CRS+GOS 组表达水平高于 CRS 组 ( $P < 0.01$ ); 正常对照组与 GOS 组之间差异也无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3F)。

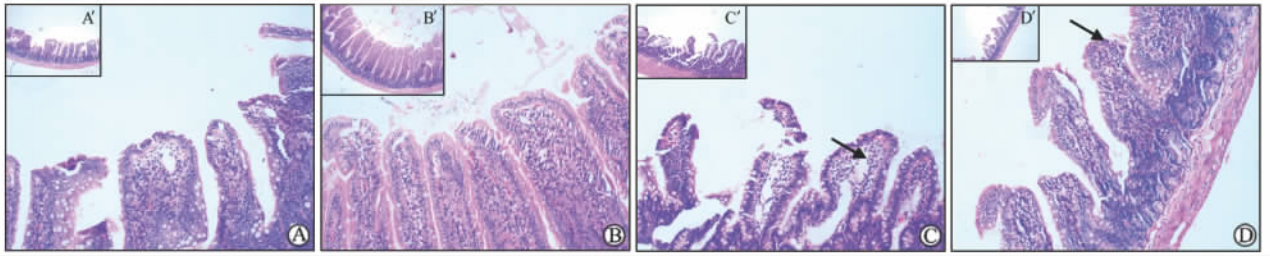


图 1 各组大鼠小肠组织 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining of the small intestinal tissue of rats in each group

A: Normal control group; B: GOS (galacto-oligosaccharides,  $4\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $\times 10\text{ d}$ ) group; C: CRS (cold restrain stress) group, arrow showed the rats' intestinal mucosa became thinned with atrophy, partial necrosis of the superficial mucosal, epithelial cells shedding and obvious edema at the lamina propria of villi top; the gap between the intestinal epithelial cells and the lamina propria became wider; D: CRS+GOS group, arrow showed the rats' intestinal mucosa became thinner with no obvious cell shedding, necrosis or edema. A', B', C', D': Corresponding to A, B, C, and D, respectively. Original magnification:  $\times 100$  (A-D);  $\times 40$  (A'-D')

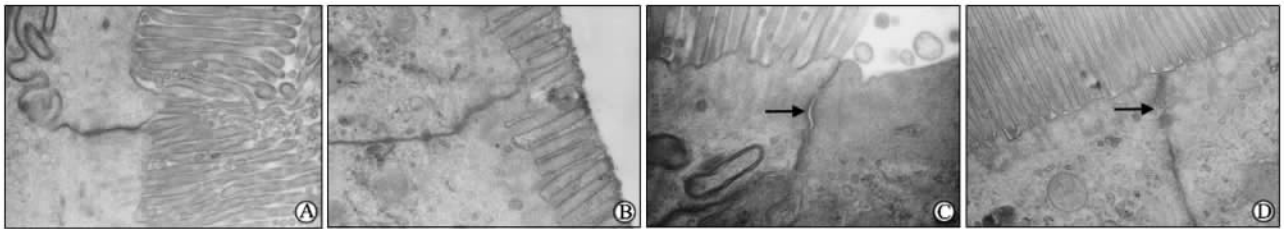


图 2 各组大鼠小肠绒毛顶端超微结构改变

Fig 2 Ultrastructure changes of the small intestinal villus tip of rats in each group

A: Normal control group; B: GOS (galacto-oligosaccharides,  $4\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $\times 10\text{ d}$ ) group; C: CRS (cold restrain stress) group, arrow showed that the junctions between epithelial cells were widened and some tight junctions were widened; D: CRS+GOS group, arrow showed the cellular junctions became slightly widened, with slight dissolution phenomena. Original magnification:  $\times 20\ 000$

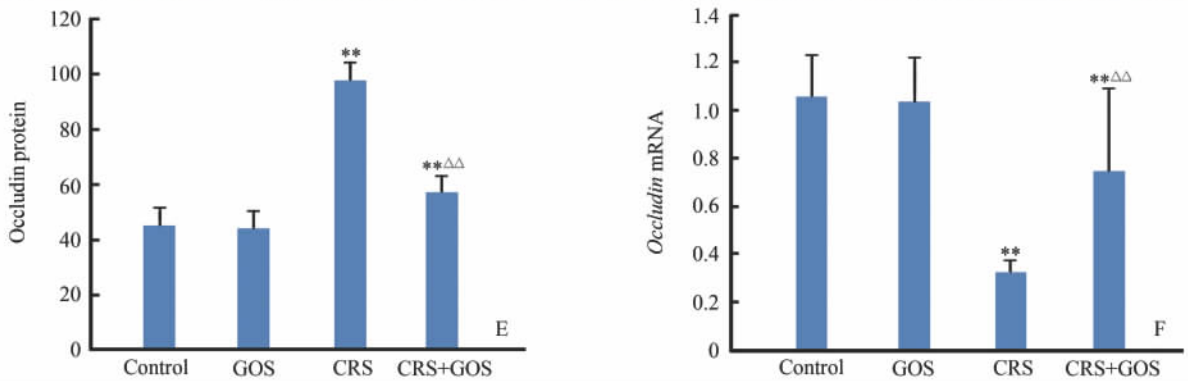
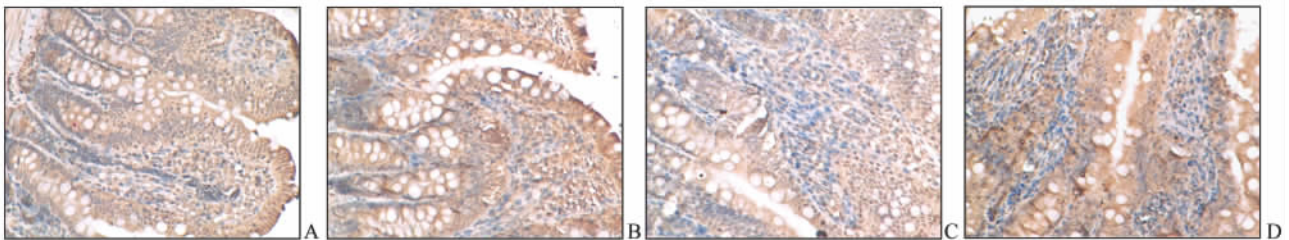


图 3 各组大鼠小肠黏膜 occludin 蛋白的免疫组化检测及 occludin mRNA 的相对含量

Fig 3 Expression of occludin mRNA and protein in the small intestinal mucosa of rats in each group

A-D: Immunohistochemical staining, original magnification:  $\times 200$ . A: Normal control group; B: GOS (galacto-oligosaccharides,  $4\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $\times 10\text{ d}$ ) group; C: CRS (cold restrain stress) group; D: CRS+GOS group; E: Average gray scale value of small intestinal occludin protein; F: Expression of *occludin* mRNA. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs CRS group.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

动物研究显示,大鼠急性束缚模型(acute restraint stress)建立成功后,在肠黏膜组织形态学方面尚未有明显改变时,即出现旁细胞通路(paracellular pathway)通透性的增高,细胞 TJ 开放,说明细胞间 TJ 的破坏是早期肠屏障功能受损,通透性增高的主要原因<sup>[11]</sup>。

Occludin 蛋白作为 TJ 的主要成分,具有 4 次跨膜结构,与 claudin1、claudin2 及其他一些外周膜蛋白等连接共同构成上皮的紧密连接结构<sup>[12-13]</sup>,在维持上皮细胞屏障功能方面具有重要作用。肠黏膜 occludin 蛋白及其 mRNA 水平的变化可以在一定程度上反映肠黏膜紧密连接及肠屏障的破坏情况。在许多炎症性肠疾病中,均发现有肠黏膜 occludin 水平的下降<sup>[14-15]</sup>。许多肠致病菌及其毒素也会破坏肠上皮的 TJ 结构、减少 occludin 含量,并可能与激活宿主的细胞信号转导通路有关<sup>[16-18]</sup>。在一项大型临床研究发现胃肠炎水样泻后,肠易激综合征(IBS)组的肠道通透性比对照组明显增高<sup>[19]</sup>。

改善肠道的屏障功能可能是预防或改善应激诱导的肠道功能障碍的新对策,目前在肠屏障功能方面,很重要的一个研究领域就是对微生态制剂的研究。微生态制剂主要包括益生菌(probiotics)、益生元(prebiotics)及两者共同构成的合生素(synbiotics)等一系列微生态物质,它们在保护肠屏障功能方面的作用既有共性,又有区别。长期以来,国内外学者对益生菌的研究较多,而关于益生元的研究才刚起步,很多研究还处于空白。常见的益生元有各种低聚糖类,如:低聚果糖、低聚木糖、GOS、低聚麦芽糖等。研究表明,益生元可能通过抑制病原微生物、免疫调节、促进有机酸生成、营养上皮细胞的机制来保护肠道屏障<sup>[20-21]</sup>。

体外采用单层肠上皮细胞进行研究显示,在受 *E. coli* 作用的小肠上皮细胞反应体系中加入乳酸杆菌等益生菌可以避免 TJ 破坏,增加 occludin 及细胞骨架蛋白的表达<sup>[22]</sup>。我们的研究结果显示,与对照组相比,各 CRS 组大鼠小肠上皮细胞间 occludin 蛋白表达和 mRNA 水平均明显降低,CRS+GOS 组

的 occludin 蛋白表达和 mRNA 水平均高于 CRS 组,提示添加 GOS 可以增加 occludin mRNA 和蛋白表达水平,从而改善紧密连接和维护肠屏障功能。

目前的研究发现应激与一些消化道常见疾病密切相关,但具体机制不明确,预防和治疗仍缺乏有效的手段。因此,与此相关的研究是目前研究的热点。微生态制剂用于应激反应性疾病的防治还有许多亟待解决的问题,其应用前景值得观察和期待。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Konturek P C, Brzozowski T, Konturek S J. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2011, 62: 591-599.
- [2] Cameron H L, Perdue M H. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-Like peptide-2 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314: 214-220.
- [3] Tsunooka N, Maeyama K, Hamada Y, Imagawa H, Takano S, Watanabe Y, et al. Bacterial translocation secondary to small intestinal mucosal ischemia during cardiopulmonary bypass. Measurement by diamine oxidase and peptidoglycan [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25: 275-280.
- [4] Soderholm J D, Perdue M H. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280: G7-G13.
- [5] 黎君友, 于燕, 郝军, 晋桦, 许惠君. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性 [J]. *氨基酸和生物资源*, 1996, 18: 28-30.
- [6] Fasano A, Nataro J P. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 795-807.
- [7] Inoue K, Oyamada M, Mitsufuji S, Okanoue T, Takamatsu T. Different changes in the expression of multiple kinds of tight-junction proteins during ischemia-reperfusion injury of the rat ileum [J]. *Acta Histochem*

- Cytochem, 2006, 39: 35-45.
- [8] González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo B E. Tight junction protein[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81: 1-44.
- [9] Rahman S H, Ammori B J, Holmfield J, Larvin M, McMahon M J. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis[J]. J Gastrointest Surg, 2003, 7: 26-36.
- [10] Chiu C J, McArdle A H, Brown R, Scott H J, Gurd F N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. Arch Surg, 1970, 101: 478-483.
- [11] Mazzon E, Sturniolo G C, Puzzolo D, Frisina N, Fries W. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum[J]. Gut, 2002, 51: 507-513.
- [12] Anderson J M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport[J]. News Physiol Sci, 2001, 16: 126-130.
- [13] Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2: 285-293.
- [14] Ara N, Iijima K, Asanuma K, Yoshitake J, Ohara S, Shimosegawa T, et al. Disruption of gastric barrier function by luminal nitrosative stress: a potential chemical insult to the human gastro-oesophageal junction [J]. Gut, 2008, 57: 306-313.
- [15] Ivanov A I, Nusrat A, Parkos C A. The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption[J]. Novartis Found Symp, 2004, 263: 115-124.
- [16] Howe K L, Reardon C, Wang A, Nazli A, McKay D M. Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7-induced increased permeability[J]. Am J Pathol, 2005, 167: 1587-1597.
- [17] Chen M L, Ge Z, Fox J G, Schauer D B. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni* [J]. Infect Immun, 2006, 74: 6581-6589.
- [18] Shifflett D E, Clayburgh D R, Koutsouris A, Turner J R, Hecht G A. Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure *in vivo* [J]. Lab Invest, 2005, 85: 1308-1324.
- [19] Marshall J K, Thabane M, Garg A X, Clark W, Meddings J, Collins S M, et al. Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004, 20 (11-12): 1317-1322.
- [20] Ouwehand A C, Derrien M, de Vos W, Tiihonen K, Rautonen N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality[J]. Curr Opin Biotechnol, 2005, 16: 212-217.
- [21] 杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14: 953-957.
- [22] Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of lactobacillus rhamnosus on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro* [J]. Microbiol Immunol, 2003, 47: 405-409.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群