

乳酸菌对 IPEC-J2 细胞黏着斑激酶磷酸化及紧密连接蛋白 Occludin 表达的影响

陈德龙, 朱宏亮, 许光勇, 王 明, 姜金奇, 乔 雨, 任晓明*

(北京农学院动物科学技术学院, 兽医学(中医药)北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要: 本试验旨在探讨嗜酸乳杆菌(LAB1)如何影响黏着斑激酶(FAK)磷酸化及紧密连接蛋白 Occludin 的表达。用高(1.0×10^9 CFU · mL⁻¹)、中(1.0×10^8 CFU · mL⁻¹)、低(1.0×10^7 CFU · mL⁻¹) 3种浓度的致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)和霍乱沙门菌(*Salmonella choleraesuis*, *S. cho*)对猪空肠上皮细胞系(IPEC-J2)进行感染后,用高、中、低3种浓度的LAB1作用于感染后的IPEC-J2(模拟治疗试验),用Western blotting检测FAK第397位酪氨酸磷酸化水平;用ELISA方法检测Occludin表达水平。结果显示:在LAB1模拟治疗*S. cho*感染的试验中,FAK磷酸化水平和Occludin的表达量与LAB1浓度呈正浓度效应,而与*S. cho*浓度呈负浓度效应;3种浓度的LAB1处理中、低浓度*S. cho*感染时,组间相互比较差异显著($P < 0.05$)。在LAB1模拟治疗*E. coli*感染的试验中,FAK磷酸化水平和Occludin表达量与LAB1浓度呈正浓度效应,3种浓度的LAB1处理低浓度*E. coli*感染时,组间相互比较差异显著($P < 0.05$)。结论:LAB1激活受*E. coli*和*S. cho*抑制的FAK磷酸化,并能上调细胞紧密连接蛋白Occludin的表达。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 致病性大肠杆菌; 霍乱沙门菌; IPEC-J2; FAK; Occludin

中图分类号: S852.28

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)02-0283-06

Study of *Lactobacillus* Influence the FAK Phosphorylation and Tight Junction Protein Occludin Expression of IPEC-J2 Cells

CHEN De-long, ZHU Hong-liang, XU Guang-yong, WANG Ming, JIANG Jin-qi,
QIAO Yu, REN Xiao-ming*

(Beijing Key Laboratory of TCVM, Animal Science and Technology College, Beijing
University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the influence of *Lactobacillus acidophilus* (LAB1) on the focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation and tight junction protein occludin expression. IPEC-J2 cells were infected by three concentrations of pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella choleraesuis* (*S. cho*), and then treated with LAB1. Occludin protein level was detected by ELISA, and FAK(Y³⁹⁷) phosphorylation was detected by Western blotting. Results were as follows: In LAB1 treated *S. cho* test, Occludin protein and FAK phosphorylation levels were positive correlated with the LAB1 concentration, but were negative correlated with *S. cho* concentration, and the differences were significant among groups that treated by mid and low concentrations of *S. cho* ($P < 0.05$); In LAB1 treated *E. coli* test, Occludin protein and the level of FAK phosphorylation were positively correlated with LAB1 concentration, and the differences were significant among groups that treated by low concentrations of *E. coli* ($P < 0.05$). Conclusion: LAB1 can activate the phosphorylation of FAK which inhibited by *E. coli* and *S. cho*, and

收稿日期: 2012-06-13

基金项目: 北京市自然科学基金(6072007); 北京市教委项目(KM200910020002)

作者简介: 陈德龙(1984-), 男, 福建龙岩人, 硕士生, 主要从事猪病防控与猪肠道微生态学研究, E-mail: cdl687728@yahoo.com.cn

* 通信作者: 任晓明, 教授, 博士, 主要从事猪病防控与猪肠道微生态学研究, Tel: 010-80795532, E-mail: 13910224882@163.com

raise regulate the cells occludin expression.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; pathogenic *Escherichia coli*; *Salmonella choleraesuis*; IPEC-J2; FAK; occludin

健全的肠道上皮间紧密连接结构可阻止毒素或微生物代谢产物经肠黏膜进入体循环,降低由毒素等引起的肠道局部感染或脓毒症等全身性反应^[1],有研究表明致病性大肠杆菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)通过激活肌球蛋白轻链激酶(MLCK)引起肌球蛋白轻链(MLC20)磷酸化,导致细胞骨架收缩^[2],同时还能分泌 EspF 使紧密连接(Tight Junction, TJ)结构蛋白 Occludin 去磷酸化,导致跨膜电阻(TER)下降,细胞旁通透性增高^[3],从而损害 TJ 屏障功能,因此,紧密连接在肠上皮免疫屏障功能中发挥重要作用,阐明其功能及相关调控机制对防治肠道疾病具有重要意义。目前研究表明,胞外信号通过跨膜蛋白与黏着斑激酶(Focal Adhesion Kinase, FAK)的 N 端区域结合并激活 FAK,活化的 FAK 通过 Ras-Raf-ERK 信号途径活化胞外信号调节激酶 1/2(Extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK 1/2)^[4]。ERK/MAPK 途径与上皮紧密连接屏障的形成和维护密切相关, S. Basuroy 等通过 Pull-down 试验及 Pair wise 连接试验证实,ERK 同 occludin 蛋白的 c 端区域等直接作用^[5]。在 ERK 表达失调的情况下会影响肠上皮紧密连接蛋白的磷酸化,进一步破坏肠上皮紧密连接,增加肠上皮通透性^[6]。Occludin 是 TJ 中重要的结构蛋白之一,不仅能通过外环以拉链式自组合,进而产生细胞旁封闭,还能与不同的分子结合,调节紧密连接的形成^[7-8]。秦环龙等用植物乳杆菌作用于 Caco-2 细胞,结果表明植物乳杆菌可以提高紧密连接蛋白的表达水平,保护屏障功能并降低肠上皮通透性,减少细菌移位^[9]。

本试验以培养的 IPEC-J2 细胞为体外研究模型,检测 IPEC-J2 经 3 种浓度的 *E. coli* 及 *S. cho* 感染后,再用 3 种浓度的 LAB1 处理之后,IPEC-J2 分泌 occludin 的量及 FAK 磷酸化的变化情况,初步探讨乳酸菌抗致病菌致肠上皮损伤的部分机理。

1 材料和方法

1.1 试验材料和试验设计

菌种:本试验室分离、鉴定,来源于仔猪小肠上皮黏膜的嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*,

LAB1)。猪大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*); 强毒型猪霍乱沙门菌(*Salmonella choleraesuis*, *S. cho*)均购于自国家兽医微生物菌种保藏中心。

细胞系:IPEC-J2 细胞系是培养自出生后 24 h 内仔猪的空肠上皮细胞并建立的细胞系,本试验中所用的该细胞系由克罗地亚马里博尔大学 Avrelija Cencić 博士馈赠。

1.2 试验材料

单克隆兔抗 FAK(Y397 磷酸化)抗体、单克隆兔抗 Occludin 抗体、Occludin 蛋白样品均购自 Abcam 公司,多克隆鼠抗 β -actin 抗体、羊抗兔 IgG 二抗及羊抗鼠 IgG 二抗为北京康为试剂公司产品;胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、DMEM 干粉均购于 Invitrogen 公司;Hanks' 平衡盐干粉为 Sigma 公司产品;青霉素、链霉素为河北远征药业有限公司产品;细胞瓶和 96 孔 ELISA 板为 Corning 公司产品;RIPA 蛋白提取试剂盒为盈信阳光公司产品;其余化学试剂为北京北化公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 细菌培养 将 LAB1 接于 MRS 肉汤中,反复转接活化 3 代,恢复菌种活力。之后于 37 °C,厌氧培养 24 h,用 PBS(pH 7.4)缓冲液洗 2 次,再用不含抗生素的 DMEM 培养液 10 倍稀释成高(1.0×10^9 CFU · mL⁻¹)、中(1.0×10^8 CFU · mL⁻¹)和低(1.0×10^7 CFU · mL⁻¹)3 种浓度的菌液待用。将 *E. coli* 和 *S. cho* 接于营养肉汤中,反复转接活化 3 代,恢复菌种活力。之后于 37 °C,有氧培养 24 h,用 PBS (pH 7.4)缓冲液洗 2 次,再用不含抗生素的 DMEM 培养液 10 倍稀释成高(1.0×10^9 CFU · mL⁻¹)、中(1.0×10^8 CFU · mL⁻¹)和低(1.0×10^7 CFU · mL⁻¹)3 种浓度的菌液待用。

1.3.2 细胞培养 在 25 cm² 细胞培养瓶(Corning, USA)中,采用含有 5% 胎牛血清和 1% 抗生素的 DMEM 培养液培养仔猪空肠上皮细胞系(IPEC-J2),隔 1 d 换 1 次培养液。将培养 24 h 的 IPEC-J2 细胞用 PBS(pH 7.4)缓冲液洗 3 次。设高、中、低浓度 *E. coli* 及 *S. cho* 处理组,每组试验瓶加入稀释好的菌液 5 mL,每组 3 个重复,同时设空白对照 3 瓶,于 37 °C,5% CO₂,95% 湿度的二氧化

碳培养箱中培养 1 h,用 PBS 缓冲液洗 3 次,去除未黏附的细菌,然后每瓶加入 LAB1 菌液 5 mL。

1.3.3 蛋白提取 用 RIPA 蛋白提取试剂盒提取细菌黏附后 IPEC-J2 细胞的蛋白,将蛋白样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.4 ELISA 试验 从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱里取出单克隆兔抗 occludin 抗体包被 96 孔 ELISA 板并 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。经封闭、加样、洗涤、孵育后测 450 nm 处光吸收值。用 BCA 法绘制标准曲线并测定样品中 Occludin 蛋白含量,结果以 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 表示。

1.3.5 Western blotting 试验 每个样本取等量蛋白(约 $50\text{ }\mu\text{g}$)进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电压 100 V ,2 h,电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上,电压 120 V ,2 h,封闭液 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, TBST 洗 $15\text{ min}\times 3$ 次,加入单克隆兔抗 FAK 抗体(Y397 磷酸化) (1:500) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗 $15\text{ min}\times 3$ 次,然后加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:1000)室温 2 h, TBST 洗 $15\text{ min}\times 3$ 次, ECL(底物化学发光)显色。以同一样本的 βactin 作为内参。结果通过 Quantity One 定量分析系统进行分析。

1.3.6 统计分析 对试验得到的原始数据进行归一化处理,用 SAS9.0 统计软件进行组内和组间多重比较,结果用 " $\bar{x}\pm s$ " 表示。

表 1 LAB1 处理 *S. cho* 感染细胞后,对 IPEC-J2 FAK(Y³⁹⁷)磷酸化的影响

Table 1 Effect of LAB1 on FAK (Y³⁹⁷) phosphorylation of FAK(Y³⁹⁷) in *S. cho* infected IPEC-J2

处理分组 Treatment group	LAB1 10 ⁹	LAB1 10 ⁸	LAB1 10 ⁷
<i>S. cho</i> 10 ⁹	2 177.8±105.6 ^{Ab}	1 184.1±75.1 ^{Ab}	949.3±43.3 ^{Ab}
<i>S. cho</i> 10 ⁸	3 430.6±132.8 ^{Ba}	1 829.4±97.4 ^{Bb}	1 423.2±75.3 ^{Bc}
<i>S. cho</i> 10 ⁷	3 073.7±165.8 ^{Ca}	2 416.6±114.7 ^{Cb}	1 854.1±33.9 ^{Cc}

不同大写字母表示组间差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示组内差异显著($P<0.05$),下同

Different capital letters indicate significant difference among groups($P<0.05$),different small letters indicate significant differences within the group($P<0.05$). The same as below

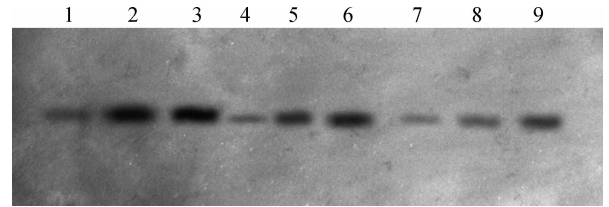
2.2 *E. coli* 感染细胞后 LAB1 对 FAK 磷酸化的影响

在 LAB1 模拟治疗同一浓度 *E. coli* 感染试验中,FAK 磷酸化量与 LAB1 呈正浓度效应,其中模拟治疗低浓度 *E. coli* 感染时,相互比较差异显著($P<0.05$);在同一浓度 LAB1 模拟治疗试验中,FAK 磷酸化量与 *E. coli* 感染量呈负浓度效应,其中高浓度 LAB1 治疗组内相互比较差异显著($P<$

2 结果与分析

2.1 *S. cho* 感染细胞后 LAB1 对 FAK 磷酸化的影响

在同一浓度 LAB1 作用下,FAK 磷酸化量与 *S. cho* 感染量呈负浓度效应,相互比较差异显著($P<0.05$);用中、低浓度的 *S. cho* 感染后,再加入 3 种浓度的 LAB1 时,FAK 磷酸化量与 LAB1 呈正浓度效应,相互比较差异显著($P<0.05$),见图 1、表 1。



1~3. LAB1 10⁹ 组;4~6. LAB1 10⁸ 组;7~9. LAB1 10⁷ 组;1,4,7. *S. cho* 10⁹ 组;2,5,8. *S. cho* 10⁸ 组;3,6,9. *S. cho* 10⁷ 组

1-3. LAB1 10⁹; 4-6: LAB1 10⁸; 7-9: LAB1 10⁷; 1,4,7. *S. cho* 10⁹; 2,5,8. *S. cho* 10⁸; 3,6,9. *S. cho* 10⁷

图 1 Western blot 分析感染 *S. cho* 后,LAB1 对 IPEC-J2 FAK(Y³⁹⁷)磷酸化的影响

Fig. 1 Western blot analysis of effect of LAB1 on phosphorylation of FAK (Y³⁹⁷) in *S. cho* infected IPEC-J2

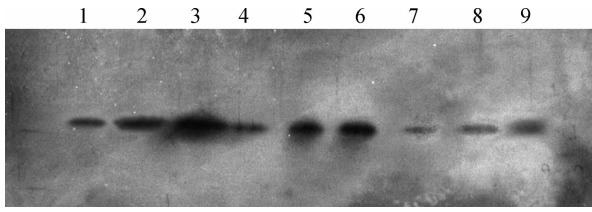
0.05),见图 2、表 2。

LAB1 对内参 βactin 的磷酸化的影响见图 3。

2.3 *S. cho* 感染细胞后,LAB1 对 Occludin 表达的影响

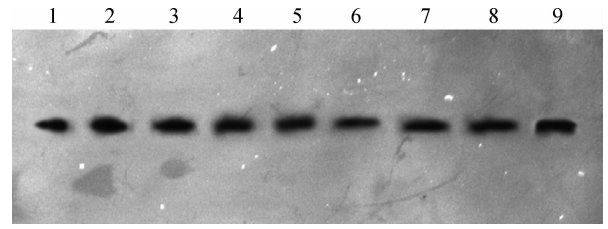
先用中、低浓度的 *S. cho* 感染,后加 3 种浓度的 LAB1 模拟治疗时,用 ELISA 法检测显示 Occludin 的表达量与 LAB1 呈正浓度效应,且相互比较差异显著($P<0.05$)。在同一浓度 LAB1 模拟治疗

试验中, Occludin 的表达量与 *S. cho* 感染量呈负浓度效应, 且相互比较差异显著 ($P < 0.05$), 见图 4。



1~3. LAB1 10^9 组; 4~6. LAB1 10^8 组; 7~9. LAB1 10^7 组; 1,4,7. *E. coli* 10^9 组; 2,5,8. *E. coli* 10^8 组; 3,6,9. *E. coli* 10^7 组
1-3. LAB1 10^9 ; 4-6. LAB1 10^8 ; 7-9. LAB1 10^7 ; 1,4,7. *E. coli* 10^9 ; 2,5,8. *E. coli* 10^8 ; 3,6,9. *E. coli* 10^7
图 2 Western blotting 分析感染 *E. coli* 后, LAB1 对 IPEC-J2 FAK(Y³⁹⁷) 磷酸化的影响

Fig. 2 Western blotting analysis of effect of LAB1 on phosphorylation of FAK (Y³⁹⁷) in *E. coli* infected IPEC-J2



1~3. LAB1 10^9 组; 4~6. LAB1 10^8 组; 7~9. LAB1 10^7 组
1-3. LAB1 10^9 ; 4-6. LAB1 10^8 ; 7-9. LAB1 10^7
图 3 Western blotting 分析 LAB1 对 IPEC-J2 β -actin 磷酸化的影响

Fig. 3 Western blotting analysis of effect of LAB1 on β -actin phosphorylation in IPEC-J2

2.4 *E. coli* 感染细胞后, LAB1 对 Occludin 表达的影响

在 LAB1 模拟治疗同一浓度 *E. coli* 试验中, 用 ELISA 法检测显示 Occludin 的表达量与 LAB1 呈

表 2 LAB1 处理 *E. coli* 感染细胞后对其 IPEC-J2 FAK(Y³⁹⁷) 磷酸化值的影响

Table 2 Effect of LAB1 on FAK (Y³⁹⁷) phosphorylation of FAK(Y³⁹⁷) in *E. coli* infected IPEC-J2

处理分组 Treatment group	LAB1 10^9	LAB1 10^8	LAB1 10^7
<i>E. coli</i> 10^9	947.2 ± 25.1 ^{Aa}	958.3 ± 31.7 ^{Aa}	826.6 ± 50.2 ^{Ab}
<i>E. coli</i> 10^8	1665.6 ± 81.3 ^{Ba}	1505.9 ± 16.4 ^{Ba}	943.5 ± 48.2 ^{Bb}
<i>E. coli</i> 10^7	2818.3 ± 146.8 ^{Ca}	1633.2 ± 104.2 ^{Bb}	1028.7 ± 46.9 ^{Bc}

正浓度效应; 在同一浓度 LAB1 模拟治疗试验中, Occludin 的表达量与 *E. coli* 感染量呈负浓度效应, 相互比较差异显著 ($P < 0.05$), 见图 5。

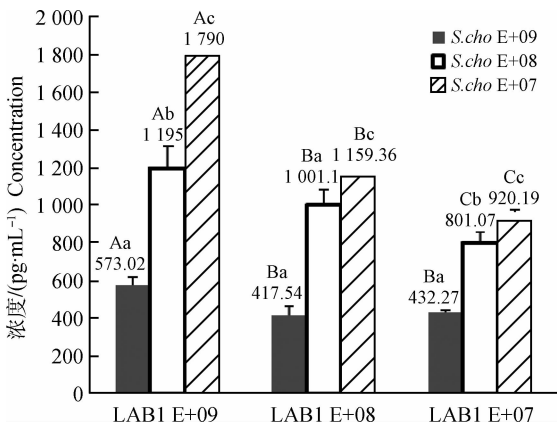


图 4 LAB1 处理 *S. cho* 感染细胞后对其 Occludin 表达量的影响
Fig. 4 Effect of LAB1 on occludin expression after cells infected by *S. cho*

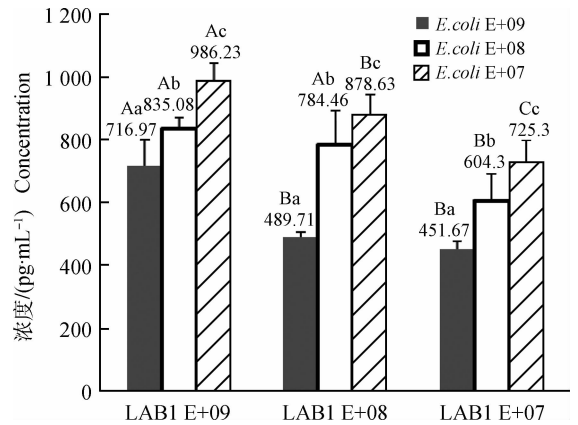


图 5 LAB1 处理 *E. coli* 感染细胞对其 occludin 表达量的影响
Fig. 5 Effect of LAB1 on occludin expression after cells infected by *E. coli*

3 讨论

目前认为肠道致病菌影响 TJ 功能的途径: (1)

改变宿主细胞 TJ 蛋白结构及功能;(2)破坏细胞骨架结构;(3)影响其他细胞信号通路,如 PKC 途径等^[10]。已有研究表明,大肠杆菌黏附于肠道上皮细胞后,可分泌效应分子,并通过各种途径作用于细胞,引起肠黏膜功能紊乱,如电解质分泌紊乱,TJ 屏障被破坏,细菌异位感染等,或诱导细胞凋亡^[11]。D. E. Shifflett 等用致病性大肠杆菌(EPEC)感染 T84 细胞时发现:EPEC 可作用于 TJ 蛋白,导致 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白的表达减少^[12]。而 S. Resta-Lenert 等人将乳酸菌、双歧杆菌和肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)一起与肠上皮细胞共培养,发现可明显减缓 EIEC 导致的肠道上皮通透性增加,而且益生菌试验组的 TJ 结构 ZO-1 蛋白的表达量也较感染组增多,提示益生菌对肠道致病菌的感染宿主细胞具有保护作用^[13]。这种作用机理之一是益生菌加强了肠上皮细胞紧密连接蛋白的结构和功能,本试结果验证了这个观点。

对于 TJ 相关蛋白的表达研究,目前大多集中在图像分析和蛋白定量方面。笔者采用 ELISA 和 Western blotting 方法的结果表明,乳酸菌在抵抗 *E. coli* 及 *S. cho* 对肠上皮细胞的感染过程中,与减少致病菌对 IPEC-J2 细胞的黏附有关。即乳酸菌黏附于肠道上皮细胞后,可阻止 *E. coli* 及 *S. cho* 对 IPEC-J2 细胞的黏附,从而减轻肠上皮的被感染的程度,缓解 TJ 的损伤和降低肠上皮细胞的通透性,进而降低肠道炎症发生的可能性。在 LAB1 模拟治疗 *S. cho* 和 *E. coli* 感染的试验中,Occludin 的表达量与 LAB1 浓度有很强的正浓度效应,和 *S. cho* 与 *E. coli* 感染量呈负浓度效应。同样,FAK 磷酸化量与 Occludin 的表达量的变化情况一致。这些结果表明,*S. cho* 与 *E. coli* 可能的致病机理之一是造成被感染细胞紧密连接的变化,从而使内毒素等致病因子容易侵入内皮细胞引发炎症反应。Shin 等研究发现,肠致病性大肠杆菌可使 Occludin 去磷酸化,导致 Occludin 位置改变,跨膜电阻值降低^[14]。该结果和笔者试验结果的意义是一致的。

本试验中还发现,在 LAB1 分别模拟治疗同一浓度的 *S. cho* 和 *E. coli* 的感染时,Occludin 的表达量与 LAB1 呈正浓度效应,其中在 3 种浓度 LAB1 作用下,中、低浓度 *S. cho* 和低浓度 *E. coli* 组间相比较显著差异($P < 0.05$)。同时 FAK 磷酸化量也与 LAB1 的呈正浓度效应。说明嗜酸乳杆菌黏附于 IPEC-J2 细胞后,可以抑制 *S. cho* 和 *E. co-*

li 对细胞的黏附、破坏,同时 TJ 相关蛋白和 FAK 磷酸化的表达增多,减轻炎症的发生。张中伟等人研究了乳酸菌对 EIEC 感染 Caco-2 细胞后 TJ 结构和相关蛋白的变化,结果认为乳酸菌抑制 EIEC 破坏单层细胞的完整性,并改善 TJ 的结构变化和 Related 蛋白的表达分布^[15]。

在本试验中,随着 FAK 磷酸化水平的升高,紧密连接蛋白 Occludin 的水平也出现相应的升高,从一个方面证明了 FAK 能够调控紧密连接蛋白 Occludin 的水平。

4 结 论

LAB1 激活被 *E. coli* 和 *S. cho* 抑制的 FAK 磷酸化,并上调细胞紧密连接蛋白 Occludin 的表达。

致谢:本试验过程中北京农学院本科生张学文、仇晶晶等同学在培养细菌工作上给予很大帮助,在此对她们表示感谢。

参考文献:

- [1] SAWADA N, MURATA M, KIKUCHI K, et al. Tight junctions and human diseases [J]. *Med Electron Microsc*, 2003, 36(3): 147-156.
- [2] YUHAN R, KOUTSOURIS A, SAVKOVIC S D, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability[J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(6): 1873-1882.
- [3] MUZA-MOONS M M, SCHNEEBERGER E E, HECHT G A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells[J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6(8): 783-793.
- [4] KATAYAMA H, YAMANE Y, FURUKAWA Y, et al. Activation of focal adhesion kinase in detached human epidermal cancer cells and their long-term survival might be associated with cell surface expression of laminin-5 [J]. *Acta Derm Venereol*, 2008, 88: 100-107.
- [5] BASUROY S, SETH A, ELIAS B, et al. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide [J]. *Biochem J*, 2006, 393: 69-77.
- [6] WANG Y, ZHANG J, YI X J, et al. Activation of ERK 1/2 MAPkinase pathway induces tight junction

- disruption in human corneal epithelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78:125-136.
- [7] SCHNEEBERGER E E, LYNCH R D. The tight junction: a multifunctional complex [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286: C1213-C1228.
- [8] CHEN Y H, LU Q, GOODENOUGH D A, et al. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occluding during tight junction formation in canine kidney epithelial cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 1227-1237.
- [9] 杨俊, 张中伟, 秦环龙. 乳酸菌对肠上皮细胞侵袭性大肠杆菌损伤的保护作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16: 3394-3399.
- [10] JOHNSON L G. Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(1): 111-121.
- [11] 姜伟伟, 张文远. 紧密连接蛋白与炎症性肠病 [J]. *国际消化病杂志*, 2010, 30(2): 99-100.
- [12] SHIFFLETT D E, CLAYBURGH D R, KOUTSOURIS A, et al. Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo [J]. *Lab Invest*, 2005, 85: 1308-1324.
- [13] RESTA-LENERT S, BARRETT K E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) [J]. *Gut*, 2003, 52(8): 988-997.
- [14] SHIN K, FOGG V C, MARGOLIS B. Tight junctions and cell polarity [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 207-235.
- [15] 张中伟, 秦环龙. 乳酸菌对感染肠上皮细胞通透性及紧密连接蛋白表达的影响 [J]. *肠外与肠内营养*, 2007, 14(4): 193-196.

(编辑 白永平)