

肠道菌群与宿主细胞相互作用模型研究进展

陈军奎¹ 陈华海² 王欣³ 尹业师³

¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004; ²湖南科技学院化学与生物工程学院, 永州 425199; ³浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所农产品质量安全国家重点实验室培育基地, 杭州 310021

通信作者: 尹业师, Email: yinyeshi@126.com, 电话: 0746-2382989

【摘要】 肠道微生物在人类健康中扮演着重要角色, 多种临床疾病如肥胖、糖尿病和心血管疾病等的发生发展均与肠道菌群失衡密切相关。随着高通量测序技术的发展, 人们对肠道微生物的认识有了突破性的进展, 宿主肠道上皮细胞与肠道微生物间的相互作用已成为当前研究的热点和难点之一。由于动物试验受到伦理审查、实验成本等因素制约, 人们对开发体外肠道菌群与宿主细胞相互作用模型愈加感兴趣。本文对最新肠道菌(群)-肠道上皮细胞相互作用模型, 以及其工作原理与应用前景进行综述, 希望能为肠道菌(群)功能研究提供新技术和新思路。

【关键词】 肠道菌群; 肠道上皮细胞; 细胞-细菌相互作用模型

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863计划)(2015AA020701)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.06.019

Research progress of interaction models between intestinal microflora and host cells

Chen Junkui¹, Chen Huahai², Wang Xin³, Yin Yeshe³

¹College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; ²College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China; ³Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Corresponding author: Yin Yeshe, Email: yinyeshi@126.com, Tel: 0086-746-2382989

【Abstract】 Intestinal microbes play an important role in human health. The development of various clinical diseases, such as obesity, diabetes and cardiovascular disease, is closely related to the imbalance of intestinal microflora. With the development of high-throughput sequencing technology, there has been a breakthrough in the understanding of intestinal microorganism. The interaction between intestinal epithelial cells and intestinal microbes has become one of the hotspots and difficulties of current research. Because of the constraints of ethical review and experimental cost, people are more interested in the development of interaction models between the intestinal microflora and the host cells. In this paper, interaction models between intestinal microflora and host cells, and its working principle and application prospect are reviewed, hoping to provide new techniques and new ideas for studying functions of intestinal microbes.

【Key words】 Intestinal microbes; Intestinal epithelial cells; Interaction models between intestinal microflora and host cells

Fund program: National High-tech R&D Program (863 Program) (2015AA020701)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.06.019

人体肠道中含有非常多的微生物, 其中包括细菌、病毒和真菌等^[1]。其中肠道细菌被研究的最多, 同时也最能反映肠道微生物的复杂性^[2]。定居在肠道内的微生物群落被视为人体的一个功能器官, 它们能产生一些人体必需的营养或免疫调控因子, 也可以和宿主共同形成一些特殊的代谢通路^[3]。肠道菌群组成复杂, 且在不同的人群和各年龄

段具有高度动态性和特异性, 例如在成人的肠道内, 拟杆菌门和厚壁菌门是肠道菌群中最常见且最重要的组成部分^[3], 而在婴儿肠道内以来自母乳的双歧杆菌、乳酸菌、葡萄球菌和肠球菌等为主^[4]。微生物可以在从口腔到直肠的整个消化道中定植, 并且每个区段微生物的密度和种类差异明显。肠道微生物通过宿主-微生物相互作用来影响宿

主健康,例如肠道微生物可以发酵膳食中难以消化的碳水化合物产生乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸从而为宿主提供能量;肠道微生物可以通过还原反应、水解作用、功能基团转移等参与药物的代谢过程,从而影响其药性和毒性^[5]。

对于肠道微生态的研究来说,除了收集粪便样品做研究外,人体肠道的其他部位取样非常困难。体外连续发酵系统可以通过对粪便样本长达两周的体外培养,很好地模拟肠道菌群的结构组成^[6]。并且通过控制体外连续发酵系统各部位的 pH 值,溶液保留时间等,从而能够分别模拟胃、小肠、升结肠、横结肠和降结肠的发酵活动,也可以在不同的恒化器中加入各部位特有的酶或者特定菌群来模拟特殊部位的生理生化过程^[7]。然而体外连续发酵系统仅能模拟出肠道微生物群落间的相互作用,而肠道相当于一种功能强大的厌氧生物反应器^[8],微生物与肠上皮细胞对发酵底物的利用以及它们之间物质、信息交流,都在这个反应器中有条不紊的进行。此外,两者的交互作用主要发生在肠黏膜和肠上皮细胞的交界面,这种相互作用可以影响宿主的免疫调节和内分泌系统^[9-13]。但其分子作用机制的研究还难度很大,在最近的 20 年中,一些肠道微生物-肠上皮细胞相互作用的体外肠道模型发展迅速,比如宿主-微生物相互作用舱模型、人体肠道芯片等。这些生物反应器不仅可以模拟出肠腔内复杂的微生物群落^[14-16],也可以研究定植在黏液层上的微生物群落以及它们与上皮细胞之间的相互作用^[17-18]。已有文献报道了许多关于肠道上皮细胞和肠道微生物共培养的短期体外模型,他们可以用来研究微生物的黏附^[19]、入侵^[20]、转移^[21]和生物膜形成^[22]等。但是由于微生物的生长和肠道上皮细胞的凋亡及功能的缺失,要将肠上皮细胞和肠道微生物进行体外长期培养难度非常大。基于体外活细胞培养的体外肠道模型可以模拟出人体肠道的生理结构、物质转运、食物运输以及物理特性等,从而可以完整、真实的模拟肠道生态系统,这种体外肠道模型的最大优点就是能直接反映出肠道微生物在肠道健康和疾病中扮演的角色。下面是对最近开发的一些厌氧肠道微生物和需

氧肠上皮细胞共培养模型的概述。见表 1。

一、需氧人体细胞和厌氧细菌共培养 (human oxygen-bacteria anaerobic, HoxBan) 系统

HoxBan 系统的优势在于应用时不需要专业的设备。这是一个相对简单的模型,一个 50 ml 的离心管被分为有氧区和无氧区两个部分。厌氧细菌培养在底部含有 1% 琼脂的特殊 YCFAG 培养基 (包含含有酵母膏、酪蛋白、脂肪酸和葡萄糖的培养基) 中,需氧肠上皮细胞培养在上部的玻片上,玻片被细胞培养基覆盖。氧气渗透到下方的琼脂培养基,并由上而下形成了一个氧浓度梯度,类似人体内肠道上皮细胞所形成特殊氧环境。底部培养的严格厌氧菌由于琼脂的保护从而可以隔绝氧气,使细菌生活在一个相对低氧的环境^[23]。在实际操作中,首先在厌氧工作站中把普拉梭杆菌接种到 40 °C 左右的 YCFAG 琼脂培养基中,凝固后将离心管转移到细胞培养箱中,把培养有人结肠细胞株 (Caco-2 细胞) 的玻片倒置在琼脂培养基的上方,然后把杜尔贝科改良鹰培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 倒进离心管的上部,最后将整个离心管放在 37 °C, 体积分数 5% 的 CO₂, 标准湿度的细胞孵化器中培养 18~36 h。在和普拉梭杆菌共培养 24 h 后观察发现 Caco-2 细胞的生存能力并未减弱。事实上,这是第一次观察到需氧的 Caco-2 细胞和普拉梭杆菌可以共生培养,并且普拉梭杆菌的数量有明显的增长,但是这种现象只有和特定的肠上皮细胞培养时才能观察到。

HoxBan 系统可以在 18 h 的培养周期内用于研究共培养系统中的底物、代谢产物或者代谢前体,如短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFA)、烃类化物、脂质和氨基酸等。在 18 h 内,当没有和 Caco-2 细胞共培养时,普拉梭杆菌可以定植在底部整个 40 ml 的 YCFAG 培养基中,但是琼脂培养基的顶部没有普拉梭杆菌定植,这很有可能跟上部氧渗透有关。当有 Caco-2 细胞存在时,能明显看到琼脂培养基顶部出现大量菌落。同样的方法,如果将普拉梭杆菌和人结肠腺癌细胞株 (DLD-1 细胞) 培养时,细胞附近出现大量的

表 1 五种模型的特点与参数比较

培养模型功能指标	Hox Ban 共培养系统	肠道上皮屏障厌氧模型	宿主-微生物相互作用舱	人体-微生物互作微液滴装置	人体肠道芯片
肠道细胞类型	Caco-2; DLD-1; HepG2	Caco-2	Caco-2	Caco-2	Caco-2
微生物-宿主细胞接触类型	直接	直接	间接	间接	直接
黏液层	有(人工添加)	无	有(人工添加)	有(黏蛋白)	有(逐渐形成)
细胞培养基	DEME+10% 胎牛血清	M199+10% 胎牛血清	DEME+10% 胎牛血清	DEME+20% 胎牛血清	DEME+20% 胎牛血清
细菌培养基	YCFAG	厌氧 M199	未提及	厌氧 DEME	DMEM
混合微生物	未提及	未提及	是	是	是
严格厌氧菌	是	是	是	是	未提及
培养周期	36 h 以上	8 h 以上	48 h 以上	24 h	1~2 周
进行干预性研究	是	未提及	是	是	是
疾病模型	有(免疫性疾病)	未提及	未提及	未提及	有(免疫性疾病)

注: Caco-2: 人结肠细胞株; DLD-1: 人类结肠腺癌细胞株; HepG2: 肝癌细胞株; YCFAG: 包含含有含有酵母膏、酪蛋白、脂肪酸和葡萄糖的培养基; FBS: 胎牛血清

细菌菌落,这说明 DLD-1 细胞对普拉梭杆菌的生长有促进作用。普拉梭杆菌具有在肠上皮表面有氧-无氧相生存的独特能力。Caco-2 细胞在和普拉梭杆菌共培养一夜后,与细胞单独培养时相比,白细胞介素 1 和一氧化氮合酶 mRNA 的水平都显著升高,但是 Caco-2 细胞中的绒毛蛋白(肠上皮的一种标志)、封闭蛋白-1(屏障功能的标志)、多药耐药蛋白-1(细胞保护基泵)的表达水平与有无普拉梭杆菌没有差别。此外还发现,如果普拉梭杆菌和 Caco-2 细胞共培养的话甲酸盐含量会明显提高,然而丁酸盐的含量并没有什么变化。这些结果表明普拉梭杆菌向 Caco-2 细胞扩张并靠近时具有抗炎和抗氧化作用,但肠屏障功能并未被破坏。

HoxBan 模型的简单之处在于使用固体培养基供厌氧肠道细菌生长,并且可以直接用暴露在空气中的细胞培养基进行覆盖。它可以在任何仅具有厌氧设备和组织培养箱的生物实验室中应用^[23]。此外,HoxBan 模型还可以用于普拉梭杆菌对其他细胞的作用,如 DLD-1 和人类肝癌细胞株(HepG2 细胞),同时也可以对其他厌氧菌或复杂混合菌群进行培养。最近,在 HoxBan 模型上开展了一些其他方面的实验,包括研究益生元和维他命对宿主-微生物相互作用的影响,或者应用在炎症性肠病模型中,也可以用来了解肠道微生物和宿主细胞之间的交流等。总之,在 18~36 h 的共培养期间,HoxBan 系统可以用来分析普拉梭杆菌菌落的形成,Caco-2 细胞的转录调节和培养基中的物质代谢等。

二、肠道上皮屏障厌氧模型

这是一个可以用于研究厌氧环境中宿主-微生物相互作用的模型。在该装置的中间插有一个杯状的膜滤器,杯子底部是一张通透性膜,而杯子四壁的材料与普通的孔板材质一样。这样的一个膜滤器将整个装置分为两个基室:膜滤器的内部盛有厌氧培养基,称为厌氧顶舱;外部含有溶氧培养基,称为溶氧室。该装置的上下两端装有上皮电阻电极,以便随时监测上皮电阻值。细胞培养多选用 Caco-2,因为它是肠道上皮细胞屏障研究时使用最广泛的细胞模型,并且具有肠上皮细胞的基本功能和生理特性^[24-25]。具体操作是首先将预培养的 Caco-2 细胞定植在位于膜滤器底部的微孔膜上,待槽内加入溶氧的 M199 细胞培养基后再将膜滤器插入到装置上,接着把无氧的细菌培养基注入进顶部厌氧舱内,使 Caco-2 细胞能充分和培养基接触,无氧培养基里也可以混有普拉梭杆菌,最后把整个装置放到厌氧工作站中培养。在培养的周期内,底部间隔室中的培养基能维持很高的溶氧水平,且底部溶氧培养基中的氧气可以通过微孔膜被细胞吸收,相反,顶部氧含量较低。经检测,培养基中的含氧量从 97% 的溶氧水平以 1.49% 每小时的速率降低,到 12 h 后为 (77.4±1.1)% 的溶氧水平,也就是说这个培养装置可以在厌氧工作站中培养 12 h 以上。氧扩散速率与半透膜的种类和孔径有关,但与细胞层的有无无关^[26]。装置的上下两端装有检测细胞电阻值的装置,允许对细胞的上皮电阻值进行实时测量。

在与 Caco-2 细胞共培养初期,普拉梭杆菌的数量相对

稳定,但是在培养 8 h 后数量大约下降了 10 倍,然而当普拉梭杆菌在 M199 培养基中单独培养时,仅培养 30 min,普拉梭杆菌的数量就下降了 10 000 倍;在与普拉梭杆菌共培养的 8 h 期间,Caco-2 细胞的上皮电阻值与无普拉梭杆菌共培养相比有显著增强,这表明 Caco-2 细胞和普拉梭杆菌在这套共培养系统中短期内可以很好共存。在对 Caco-2 细胞的全基因组表达分析发现,与被紫外线杀死的普拉梭杆菌共培养相比,活的普拉梭杆菌可以抑制宿主细胞在免疫应答中的细胞信号通路,并且免疫细胞迁移也大大增强,最明显的现象就是白介素-10 增加和核转录因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号减弱。除此之外,对上皮电阻值测量发现活的普拉梭杆菌与紫外线杀死普拉梭杆菌相比能改善 Caco-2 的渗透屏障功能。

用这个模型可以证明活的普拉梭杆菌对 Caco-2 细胞功能的影响。毫无疑问这个模型相比传统的体外模型可以更好地模拟肠道在厌氧环境下的生理条件,且增强了 Caco-2 细胞和普拉梭杆菌在体外的存活能力。此外,这个模型不仅简单易操作并且具有肠道屏障完整性的自动检测功能。正因为如此,这个模型才可以用于研究专性厌氧菌普拉梭杆菌对肠上皮细胞的完整性(肠道屏障)和基因表达的影响。利用这个肠道模型可以进一步研究改善肠道屏障的策略,进而保护那些敏感人群的肠道屏障和预防系统性疾病。

三、宿主-微生物相互作用舱(the host-microbiota interaction, HMI™)

这个模型具有肠道的许多特征,它主要用于定植在黏液层的肠道微生物研究。培养室被一个功能性的双层膜分为了两个腔室,上层腔室里培养的是肠道微生物,下层腔室培养的是宿主细胞,如 Caco-2 细胞等。这种功能性的双层膜是由上层的黏液层和下层的半透聚酰胺膜组成,这种结构使它具有多种功能:(1)提供一个较大的黏液层面积供肠道微生物定植;(2)允许双向转运低分子量的代谢产物;(3)允许氧气从膜的下层向上层扩散以便在下层腔室内形成微需氧环境;(4)避免宿主细胞直接暴露在复杂的微生物群落及其毒素的环境中。这个模型一般和简化的人体肠道微生物生态系统的模拟系统(simulator of the human intestinal microbial ecosystem, SHIME)连用^[27-28]。SHIME 系统包括胃、小肠和升结肠三部分。将健康人的粪便样品接种到 SHIME 系统后,流经三个反应容器后进入 HMI™ 的肠道微生物腔室内,同时下层宿主细胞腔室内的半连续流动的 DMEM 向相反的方向流动。在这个模型系统中,对肠道环境的模拟非常接近人体肠道内环境,如剪应力、渗透性、氧扩散以及微生物定植在黏液层中的可能性等。在 SHIME 系统中,直接暴露在细菌发酵液中的 Caco-2 细胞在培养 2 h 后细胞的生存能力下降了 80%,然而在经 SHIME 系统流入下游的 HMI™ 模型中,Caco-2 细胞的生存能力可以维持 48 h 以上,这说明 HMI™ 模型对 Caco-2 细胞有很好的保护作用。

研究者使用一种在体外和体内都被证明具有免疫调

节和抗炎作用的酵母发酵液提取物对 HMI 模型进行了测试^[29-32]。在 HMI™ 模型中, 尽管随着时间的推移(0、24、48 h), 细菌数量会逐渐递减, 但是 Caco-2 细胞的存在并没有严重影响腔内不同微生物群体的数量和相对丰度。在测试中, 酿酒酵母提取物能明显提高从 SHIME 系统流入 HMI™ 模型中发酵液的短链脂肪酸含量。在添加酿酒酵母提取物之后, 经由 Caco-2 细胞定植的 HMI™ 模型流出的发酵液中拟杆菌、厚壁菌和双歧杆菌的相对丰度显著提高。有趣的是和正常的 SHIME 系统流出液共培养 48 h 后, 检测不到 Caco-2 细胞产生的促炎因子 IL-8, 这表明 Caco-2 细胞的抗炎应答机制被完全抑制, 这个结果与之前报道的这种物质具有免疫调节和抗炎作用相一致^[29-31]。促炎因子 IL-8 的减少与 SHIME 系统中丁酸盐含量的增加有关^[32], 经测量酿酒酵母提取物的干预导致 HMI 模型中丁酸盐含量升高了 31%。此外通过对上皮电阻值的测量, HMI™ 模型可以用于细菌定植黏液层情况分析, 也可以评估细菌定植黏液层的能力和肠道上皮细胞暴露在复杂微生物环境下的生存能力。在实验中可以看到肠道微生物定植黏液层的情况, 如严格厌氧的双歧杆菌定植在黏液层表面, 普拉梭杆菌主要定植在黏液层的下半部分。

总之, HMI™ 模型可以在体外模拟复杂的肠道环境, 并且可以模拟特定的肠道部位。它可以对定植于肠道黏液层的微生物进行功能研究, 也可以研究肠道固有菌对宿主的影响, 还可以进行一些肠道微生物的干预性研究。这个新模型具有三个优势: (1) 模拟出肠道微生物定植黏液层的能力以及肠道微生物间接影响肠上皮细胞的情况; (2) 可以使复杂的微生物和肠上皮细胞共培养超过 48 h; (3) 和 SHIME 系统结合形成一个连续动态发酵系统。

四、人体-微生物互作微液滴装置 (human-microbial crosstalk modular microfluidic device, HuMiX)

HuMiX 由两个聚碳酸酯外壳和被夹在中间的弹性橡胶垫圈组成, 且每一个垫圈都有一个明显的螺旋形微孔道。这个模型共有 3 层微通道: 上层是一个微生物培养室, 中间是一个肠上皮细胞培养室, 底层是一个介质灌注通道。上层微生物培养室和中层细胞培养室由一个纳米多孔膜(孔隙直径 50 nm)隔开^[33-34]。细胞培养室内培养的 Caco-2 细胞可以在底部形成肠上皮屏障。底层的灌注室和中层的细胞培养室被一张微孔膜(孔隙直径 1 μm)隔开。每一个微管通道都有专门的入口和出口, 入口可以进行细胞的接种和理化参数的控制, 专用的出口可以用来收集单个微室的洗脱液。细胞培养基从灌注室通过微孔膜渗透进细胞培养室, 这样可以模拟肠道血液供应并且提供剪应力, 从而加速肠道细胞的生长。通过不断地向微生物腔室内灌注无氧培养基, 再加上 Caco-2 细胞和兼性厌氧菌对氧气的消耗共同形成了 HuMiX 模型中的氧浓度梯度。通过对氧气的消耗, 无氧环境逐渐形成, 专性厌氧菌才得以生长和定植^[34]。HuMiX 模型具有以下功能: (1) 可以模拟出一个健康完整的肠道上皮屏障; (2) 模型内集成的氧气传感器可以实时监测

装置内的氧扩散浓度; (3) 在装置内通过检测 Caco-2 细胞层的跨膜上皮电阻来评估细胞的分化情况; (4) 可以通过显微镜观察到紧密结合蛋白的表达。

在这个模型中, 第一次可以让 Caco-2 细胞在体外培养和正常生长长达 7 d, 且分化形成良好的肠上皮细胞单层。与其他培养设备相比, HuMiX 培养的 Caco-2 可以形成更高的上皮电阻, 并且用免疫荧光显微镜能更清晰的观察到细胞膜表面紧密结合蛋白的表达。当 Caco-2 细胞层形成后, 将鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnoides* GG strain, LGG) 和细胞共培养。LGG 是从人体肠道中分离的兼性厌氧菌, 属于厚壁菌门^[35-37], 已有大量数据表明它影响哺乳动物黏膜组织生理指标^[38-40]。随后, 细菌被接种到细菌培养室里共培养 24 h。共培养之后, 所有的细胞都可以被评估和检测。此外, 这个装置还可以用来研究专性厌氧菌对 Caco-2 细胞的作用^[41], 它的另一大亮点是还允许额外接种免疫细胞 (CD4⁺T) 到灌注腔室内, 以便用于免疫学研究。利用 HuMiX 系统, 可以检测到肠上皮细胞和细菌共培养时转录和代谢反应的变化^[34], 并且体外厌氧环境下维持肠道细菌的生存能力也是 HuMiX 系统的一个重要功能。鉴于这个模型具有培养多种细胞类型的模块化和灵活性, 在未来它可以用于对脑-肠轴控制的分子机制研究。由于模块构架可拆卸特点, 共培养后可以获取所有的细胞, 一部分用来对其进行微观检测, 另一部分则可以用来对细胞内生物分子进行提取以便后续高分辨率的分子研究^[42]。总之, HuMiX 模型是模拟人体肠道-微生物界面的典型代表, 特别是在证明肠道微生物和人体疾病因果关系方面可发挥重要作用。此外, 它还可以应用于包括药物筛选、药物发现、药物动力学和营养学方面的研究。

五、人体肠道芯片

肠道微环境是模拟正常器官生理学的关键^[43], 而现存的肠道模型除了 HMI™ 模型外几乎都不能模拟出肠道的机械微环境, 但是 HMI™ 模型的缺点是培养周期较短。体外肠道模型的另一个限制就是在长期培养的过程中, 一些模型不能将微生物培养在细胞培养腔的内表面^[44], 这些都是限制体外模型发展的重要因素。人体肠道芯片相较于以上几种模型具有许多肠道的生理特点, 包括肠道蠕动、液体流动等特点, 并在不损害人体细胞生存能力的同时可长期培养微生物。这个装置包含了上下两个微腔室, 分别模拟肠腔和血管, 这两个微腔室被一张富有弹性的多孔膜隔开, 且 Caco-2 细胞排列在涂有胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的多孔膜上^[44]。除了连续的介质流对细胞提供低的剪应力外, 微腔室两侧各有一个连接着多孔膜的真空室, 通过培养基的流动和循环真空气流共同做出有规律的机械运动, 从而可以对膜进行拉伸和放松以模拟出肠道蠕动的功能。缓慢流动的培养基和剪应力可以加速肠道上皮细胞的分化、3D 绒毛状结构的形成和肠道屏障功能的提升^[44]。Caco-2 细胞可以分化成四种不同的肠道上皮细胞, 如吸收性的肠上皮细胞、分泌黏液的杯状细胞、肠内分泌细胞和潘

氏细胞。此外,也可以形成类似于绒毛的3D结构^[44-45]。完整的肠上皮细胞层是由单个细胞上的紧密结合蛋白连接形成的^[46],并且可以通过免疫荧光聚焦显微镜和测量跨膜上皮电阻来检测单细胞层。试验的具体操作是首先用胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)将培养的Caco-2细胞制成细胞悬液,然后将细胞悬液用无菌注射器注射到上层肠腔内,在1 h内细胞之间相互黏合形成肠上皮细胞层,1 h后用注射泵将DEME培养基以缓慢的速度注射进上层腔室,1 d之后当确定细胞已经建立了一个完整的单层细胞膜之后,再以相同的速率对上下两层腔室灌注培养基^[47]。

人体肠道芯片模型能够将细胞和细菌共培养长达数天至两周,并且也能够对上皮电阻值进行实时监测。在静置培养或有、无循环机械拉力三种情况下,对细胞层的上皮电阻值进行测量^[44]后发现,在前6 d的时间内细胞都在大量增殖形成细胞单层,且在之后的4~5 d内保持稳定的增长,有趣的是在这种微流体装置中不论有无循环机械拉力,其上皮电阻值都相较于在静置培养时高出3~4倍。同时在测量肠上皮细胞的渗透率时发现,机械循环拉力可以使微流体装置中肠上皮细胞的渗透率提高4倍,这些结果与文献报道的结果一致^[48-50]。模拟出的肠道蠕动和宿主-微生物的相互作用有很大的相关性,如循环的机械运动有助于大肠杆菌定植在肠道上皮细胞表面。鼠李糖乳杆菌在Caco-2细胞表面形成小的群落,并且提高上皮电阻值。Caco-2细胞和多种益生菌的混合物VSL#3共培养72 h后,转录组更接近人体回肠。此外,VSL#3和抗生素的治疗可以抑制由致病性大肠杆菌引起的肠绒毛损伤和上皮电阻值降低,但是在人体肠道芯片模型实验中,从致病性大肠杆菌中分离获得的脂多糖并没有直接影响到上皮电阻值和肠绒毛损伤。

与以上其他模型相比,人体肠道芯片模型能很好地模拟出人体肠道的理化特点,且大大提高了体外肠道微生物和肠上皮细胞共培养时间。它主要用于LGG等肠道益生菌和肠道宿主细胞共培养,益生菌的存在不仅可以提供一个正常的肠道微生物环境,同时也可以增强肠上皮细胞的功能。人体肠道芯片模型有效地模拟了正常人体肠道许多复杂的功能,可以用来研究宿主-微生物的共生和进化,也可以成为药物筛选和毒理学测试的重要平台。

六、小结与展望

肠道菌群的失调与许多疾病相关,然而在使用动物模型对两者之间的相关性进行研究时受到诸多因素的限制,如实验周期长、经费昂贵、道德伦理审查等。体外模型在一定程度上可以克服传统肠道研究的方法学局限性,因为它们相较于动物模型具有实验成本低,科研时间自由,人力和物力需要更少以及实验重复性更好等优点。肠道微生物-宿主细胞相互作用模型克服了两者在体外共培养时存在的问题,有些模型甚至可以共培养长达两周。这些生理模型可以在体外通过调节流加速度、剪应力、机械运动等生理机械条件来探究宿主-微生物的功能和相关性,它们已经

成为相关研究领域的首选实验方案。近几年来越来越多的微流控装置被开发出来,很多已被用于特定疾病模型的研究。但是每种装置都有一定的局限性,随着肠道共培养模型技术的完善,未来应进一步改善肠道生理条件的模拟,提高模型的应用范围,建立更多的肠道疾病模型。最终,个性化的体外模型将会代替昂贵且效率低下的无菌动物实验或人体试验,加快人们对宿主-微生物相互作用的研究,加速药物的开发进程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W, et al. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2011, 35(4): 681-704. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00270.x.
- [2] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The human microbiome project[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 804-810. DOI: 10.1038/nature06244.
- [3] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638. DOI:10.1126/science.1110591.
- [4] Watkins C, Stanton C, Ryan CA, et al. Microbial Therapeutics Designed for Infant Health[J]. *Front Nutr*, 2017, 4: 48. DOI: 10.3389/fnut.2017.00048.
- [5] Koppel N, Maini RV, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota[J]. *Science*, 2017, 356(6344). DOI:10.1126/science.aag2770.
- [6] 陈波,王宇,雷芳,等. 肠道微生物体外模型研究进展[J]. *中国微生物生态学杂志*, 2012, 24(8): 766-768, 封3.
- [7] 支梓鉴,俞邱豪,程焕,等. 肠道微生物体外发酵模型研究进展及其在食品中的应用[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(14): 353-358. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.14.062.
- [8] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915. DOI: 10.1126/science.1104816.
- [9] Blaser MJ, Kirschner D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 843-849. DOI:10.1038/nature06198.
- [10] Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W, et al. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2011, 35(4): 681-704. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00270.x.
- [11] Li XJ, Yue LY, Guan XF, et al. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 104(4): 1082-1091. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03636.x.
- [12] Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2008, 42(8): S142-S143. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03636.x.
- [13] 李世荣,杨欣艳. 肠黏膜屏障与疾病[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(39): 2796-2797. DOI: 10.3760/j.issn.0376-2491.2005.39.018.
- [14] Molly K, Vande WM, Verstraete W. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 39

- (2): 254-258.
- [15] Li XJ, Yue LY, Guan XF, et al. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 104(4): 1082-1091. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03636.x.
- [16] Li XJ, Yue LY, Guan XF, et al. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 104(4): 1082-1091. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03636.x.
- [17] Cinquin C, Blay GL, Fliss I, et al. New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, 57(2): 324-336. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00117.x.
- [18] Van den Abbeele P, Roos S, Eeckhaut V, et al. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli[J]. *Microb Biotechnol*, 2012, 5(1): 106-115. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00308.x.
- [19] Chauvière G, Coconnier M H, Kernéis S, et al. Adhesion of human Lactobacillus acidophilus strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells[J]. *J Gen Microbiol*, 1992, 138(Pt 8): 1689-1696. DOI: 10.1099/00221287-138-8-1689.
- [20] Coconnier MH, Bernet MF, Kernéis S, et al. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by Lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 110(3): 299-305. DOI:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06339.x.
- [21] Harvey P, Battle T, Leach S. Different invasion phenotypes of Campylobacter isolates in Caco-2 cell monolayers[J]. *J Med Microbiol*, 1999, 48(5): 461-469. DOI:10.1099/00222615-48-5-461.
- [22] Kim J, Hegde M, Jayaraman A. Co-culture of epithelial cells and bacteria for investigating host-pathogen interactions[J]. *Lab Chip*, 2010, 10(1): 43-50. DOI:10.1039/b911367c.
- [23] Sadaghian SM, von MJZ, Khan MT, et al. A simple coculture system shows mutualism between anaerobic faecalibacteria and epithelial Caco-2 cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17906. DOI: 10.1038/srep17906.
- [24] Simons K, Fuller SD. Cell surface polarity in epithelia[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1985, 1: 243-288. DOI: 10.1146 / annurev.cb.01.110185.001331.
- [25] Pinto M. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture[J]. *Biol Cell*, 1983, 47. DOI:10.1007/s13539-011-0026-6.
- [26] Ulluwishewa D, Anderson RC, Young W, et al. Live Faecalibacterium prausnitzii in an apical anaerobic model of the intestinal epithelial barrier[J]. *Cell Microbiol*, 2015, 17(2): 226-240. DOI:10.1111/emi.12360.
- [27] JZH VM, Sadaghian SM, Bourgonje AR, et al. The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut[J]. *Anaerobe*, 2017, 44: 3-12. DOI:10.1016/j.anaerobe.2017.01.001.
- [28] Marzorati M, Vanhoecke B, De Ryck T, et al. The HMI™ module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro[J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 133. DOI:10.1186/1471-2180-14-133.
- [29] Jensen GS, Redman KA, Benson KF, et al. Antioxidant bioavailability and rapid immune-modulating effects after consumption of a single acute dose of a high-metabolite yeast immunogen: results of a placebo-controlled double-blinded crossover pilot study[J]. *J Med Food*, 2011, 14(9): 1002-1010. DOI:10.1089/jmf.2010.0174.
- [30] Moyad MA, Robinson LE, Kittelsrud JM, et al. Immunogenic yeast-based fermentation product reduces allergic rhinitis-induced nasal congestion: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Adv Ther*, 2009, 26(8): 795-804. DOI: 10.1007/s12325-009-0057-y.
- [31] Moyad MA, Robinson LE, Zawada ET, et al. Immunogenic yeast-based fermentate for cold / flu-like symptoms in nonvaccinated individuals[J]. *J Altern Complement Med*, 2010, 16(2): 213-218. DOI:10.1089/act.2010.16407.
- [32] Possemiers S, Pinheiro I, Verhelst A, et al. A dried yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota and protects against inflammation, as studied in an integrated in vitro approach[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(39): 9380-9392. DOI:10.1021/jf402137r.
- [33] Tomas J, Wrzosek L, Bouznad N, et al. Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization[J]. *FASEB*, 2013, 27(2): 645-655. DOI: 10.1096/fi.12-216861.
- [34] Shah P, Fritz JV, Glaab E, et al. A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11535. DOI:10.1038/ncomms11535.
- [35] Zotta T, Ricciardi A, Ianniello RG, et al. Assessment of aerobic and respiratory growth in the Lactobacillus casei group[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99189. DOI: 10.1371 / journal.pone.0099189.
- [36] Brooijmans R, Smit B, Santos F, et al. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria[J]. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 28. DOI:10.1186/1475-2859-8-28.
- [37] Ianniello RG, Ricciardi A, Parente E, et al. Aeration and supplementation with heme and menaquinone affect survival to stresses and antioxidant capability of Lactobacillus casei strains[J]. *LWT -Food Science and Technology*, 2015, 60(2): 817-824. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.10.020.
- [38] Van BP, Troost F, Van d MC, et al. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 Suppl 1(11): 4562. DOI: 10.1073/pnas.1000079107.
- [39] Di CS, Tao H, Grillo A, et al. Effects of Lactobacillus GG on genes expression pattern in small bowel mucosa[J]. *Dig Liver Dis*, 2005, 37(5): 320-329. DOI:10.1016/j.dld.2004.12.008.
- [40] Kumar A, Vlasova AN, Liu Z, et al. In vivo gut transcriptome responses to Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus acidophilus in neonatal gnotobiotic piglets[J]. *Gut Microbes*, 2014, 5(2): 152-164. DOI:10.4161/gmic.27877.
- [41] Martels JZHV, Sadabad MS, Bourgonje AR, et al. The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut[J]. *Anaerobe*, 2017, 44(3). DOI: 10.1016 / j.anaerobe.2017.01.001.
- [42] Roume H, Muller EE, Cordes T, et al. A biomolecular isolation framework for eco-systems biology[J]. *ISME J*, 2013, 7(1): 110-121. DOI:10.1038/ismej.2012.72.
- [43] Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine[J]. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69(5): 1028S. DOI: 10.1093/ajcn/69.5.1028s.
- [44] Kim HJ, Huh D, Hamilton G, et al. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(12):

- 2165-2174. DOI: 10.1039/c2lc40074j.
- [45] Kim HJ, Li H, Collins JJ, et al. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(1): E7-15. DOI: 10.1073 / pnas. 1522193112.
- [46] Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions[J]. J Cell Biol, 1993,123(6 Pt 2):1777. DOI: 10.1083/jcb.123.6.1777.
- [47] Kim HJ, Lee J, Choi JH, et al. Co-culture of Living Microbiome with Microengineered Human Intestinal Villi in a Gut-on-a-Chip Microfluidic Device[J]. J Vis Exp, 2016, (114). DOI:10.3791/54344.
- [48] Avdeef A, Tam KY. How well can the Caco-2/Madin-Darby canine kidney models predict effective human jejunal permeability?[J]. J Med Chem, 2010, 53(9): uu3566-3584. DOI: 10.1021/jm901846t.
- [49] Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, et al. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo[J]. Int J Pharm, 1996, 127(1): 103-107. DOI: 10.1016/0378-5173 (95)04204-0.
- [50] Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth[J]. Pharm Res, 1997, 14(6): 763-766.

(收稿日期:2019-02-18)

(本文编辑:梁明修)

·文献速览·

成年人肥胖、体力活动与高血压发病关联的前瞻性队列研究

Stenehjem JS, Hjerkind KV, Nilsen TIL, et al. Adiposity, and risk of hypertension: prospective data from the population-based HUNT Study, Norway [J]. J Hum Hypertens, 2018, 32 (4) : 278-286. DOI: 10.1038/s41371-018-0042-5.

已有研究证实,肥胖和低水平的体力活动可以增加高血压发病风险。但是,关于二者联合作用对高血压影响的研究较少,且二者之间交互作用的机制也不清晰。本研究采用前瞻性队列研究的方法分析体重指数(BMI)、体力活动以及二者联合作用与高血压发病的关联。研究对象来自于挪威的诺德-德拉格健康研究队列,包括男性 11 238 名和女性 15 301 名,根据 BMI,将研究对象分为 3 组,偏瘦和正常(14.5~23.9 kg/m²)、超重(24.0~27.9 kg/m²)和肥胖(≥ 28.0 kg/m²)。根据每周运动的频率、持续时间和强度计算得分,将研究对象分为 3 组,低水平体力活动(≤1)、中等水平体力活动(男性 1~2.08,女性 1~1.83)和高水平体力活动(男性 ≥2.08,女性 ≥1.83)。采用泊松回归分析体重指数和体力活动与高血压发病的关联,并计算调整后的 RR(95%CI)值。结果显示,

体质指数是高血压的危险因素($P < 0.001$),但是体力活动与高血压的发病无关联。与正常体重且体力活动水平高的男性相比,肥胖且体力活动水平低的男性高血压发病的 RR(95%CI)值为 1.50(1.27~1.77),而肥胖且体力活动水平高的男性高血压发病的 RR(95%CI)值 1.16(0.79~1.70)。与正常体重且体力活动水平高的女性相比,肥胖且体力活动水平低的女性高血压发病的 RR(95%CI)值 1.55(1.35~1.77),而肥胖且体力活动水平高的女性高血压发病的 RR(95%CI)值为 1.41(1.18~1.69)。高水平的体力活动能在一定程度上减弱肥胖对高血压的不利影响,该效应在男性人群中尤为显著。

(支晨曦编译 新乡医学院公共卫生学院)