文章编号:1000-5404(2013)05-0447-04

论著

# 小檗碱减轻炎症反应时肠上皮屏障功能损害的实验研究

曹 敏,黄家君 (400016 重庆,重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室)

[摘要] **目的** 研究小檗碱(berberine,BBR)在炎症反应时对肠上皮屏障功能的保护作用。**方法** 建立人肠上皮细胞株 Caco-2 单层培养模型,将单层细胞分为对照组、BBR 组、TNF-α + IFN-γ 组、TNF-α + IFN-γ + BBR 组。用电阻仪测定跨单层肠上皮细胞电阻(TER),测定时相点为处理后 0、6、12、24、36 h 和 48 h;免疫荧光法和蛋白质印迹法检测紧密连接蛋白 Occludin 的分布及表达变化;蛋白质印迹法检测肌球蛋白轻链(MLC)和磷酸化肌球蛋白轻链(pMLC)的蛋白表达。**结果** 对照组与 BBR 组 TER 均无明显变化;TNF-α + IFN-γ 组 TER 逐渐下降,并于 12、24、36 h 及 48 h 显著低于 0 h($P<0.05$);TNF-α + IFN-γ + BBR 组也呈逐渐下降趋势,但降幅小于 TNF-α + IFN-γ 组,并于 12、24、36 h 及 48 h 显著高于 TNF-α + IFN-γ 组($P<0.05$)。各组紧密连接蛋白 Occludin 表达无明显变化($P>0.05$);但 TNF-α + IFN-γ 组 Occludin 形态有明显变化,并发生重分布,而 TNF-α + IFN-γ + BBR 组 Occludin 形态变化则较 TNF-α + IFN-γ 组明显减轻。TNF-α + IFN-γ 组 pMLC 表达显著高于对照组或 BBR 组($P<0.05$),而 TNF-α + IFN-γ + BBR 组 pMLC 表达则明显低于 TNF-α + IFN-γ 组($P<0.05$)。**结论** 小檗碱通过降低 MLC 磷酸化水平,改善紧密连接蛋白定位分布变化,从而减轻炎症反应时肠上皮屏障功能损害。

[关键词] 小檗碱;干扰素 γ;肿瘤坏死因子-α;肠上皮;肌球蛋白轻链;屏障功能
[中图法分类号] R322.45; R966; R975 [文献标志码] A

# Attenuation of intestinal epithelial barrier disruption by berberin during inflammation *in vitro*

Cao Min, Huang Jiajun (Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of berberine (BBR) on intestinal epithelial barrier function during inflammation and the underlying mechanism. **Methods** The intestinal epithelial cell line Caco-2 monolayers were divided into a control group, a BBR group, a TNF-α + IFN-γ group and a TNF-α + IFN-γ + BBR group. Both of TNF-α and IFN-γ were used at the final concentration of 10 ng/mL, and BBR was used at 100 μmol/L. The transepithelial electrical resistance (TER) was measured with a Volt-Ohm Meter at 0, 6, 12, 24, 36 and 48 h after treatment. Both Western blot analysis and immunofluorescence assay were used to analyze the tight junction protein occludin. The protein expression of myosin light chain (MLC) and phosphorylated MLC (pMLC) was analyzed by Western blot analysis. **Results** The TER had no significant change in the control group and BBR group after treatment. In the TNF-α + IFN-γ group, TER decreased gradually after treatment, and was significantly lower at 12, 24, 36 and 48 h than that before treatment ($P<0.05$). In the TNF-α + IFN-γ + BBR group, TER also decreased gradually after treatment, but was significantly higher than that in the TNF-α + IFN-γ group at 12, 24, 36 and 48 h after treatment ($P<0.05$). The protein expression of occludin in each group did not change significantly after treatment ($P>0.05$). However, the remarkable morphological relocalization with expanded intracellular pools of occludin was observed in the TNF-α + IFN-γ group, which was attenuated obviously in the TNF-α + IFN-γ + BBR group. The pMLC protein expression in the TNF-α + IFN-γ group was significantly higher than that in other 3 groups ($P<0.05$). **Conclusion** BBR alleviates intestinal epithelial barrier disruption during inflammation by reducing MLC phosphorylation level and attenuating the morphological relocalization of tight junction protein occludin.

[**Key words**] berberine; interferon-gamma; tumor necrosis factor-alpha; intestinal epithelia; myosin light chain; barrier function

Corresponding author: Huang Jiajun, Tel: 86-23-68485161, E-mail: huangjiajun1964@163.com

[通信作者] 黄家君,电话:(023) 68485161,E-mail:huangjiajun1964@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1741.018.html(2012-12-19)

肠上皮屏障主要由紧密连接构成,能阻止肠腔内致病性抗原如细菌、内毒素、有毒物质、食物抗原等的侵入,以保持机体内环境的相对稳定。但在多种病理状态(如缺血缺氧性损害、炎症反应)下,肠黏膜上皮屏障功能常受到损害,以致肠腔内细菌等致病性抗原侵入[1-2]。研究表明,肠上皮屏障功能损害与多种疾病如炎症性肠病、重症肝病、脓毒血症、创伤、烧伤等的病理过程密切相关,其中炎性细胞因子在肠上皮屏障功能损害的发生中具有重要作用,但目前针对肠上皮屏障功能损害的治疗措施却不多[1-3]。小檗碱作为一种传统的肠道抗炎药物,在治疗炎症性腹泻中具有确切疗效,但是否能减轻炎症反应时肠上皮屏障功能损害,目前尚不完全清楚。本研究旨在观察小檗碱对炎症反应时肠上皮屏障的保护作用,并探讨其可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

人肠上皮细胞株 Caco-2 购自美国 ATCC;DMEM 培养基和胰蛋白酶分别购自美国 HyClone 和 BBI 公司;Transwell 细胞培养小室购自美国 Corning 公司;小檗碱(berberine,BBR)、鼠尾胶原、MLC 抗体及 β 肌动蛋白抗体购自美国 Sigma 公司;IFN-γ 和 TNF-α 购自美国 R&D 公司;pMLC 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;Occludin 抗体购自美国 Invitrogen 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗为美国 Southern Biotech 公司产品;Alexa Fluor 488 标记二抗及 Slowfade 试剂盒购自美国 Molecular Probe 公司;超敏化学发光试剂盒由美国 GE 公司提供;蛋白测定试剂盒、小型垂直电泳仪、电转仪及 ChemiDoc XRS 型凝胶图像分析系统为美国 Bio-Rad 公司产品;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、Millicell ERS 电阻测定仪购自美国 Millipore 公司;蛋白印迹相关试剂均购自上海生物工程技术服务有限公司;TCS SP5 型激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

### 1.2 细胞培养与单层上皮模型的建立

Caco-2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、1 mmol/L 非必需氨基酸、2 mmol/L 谷氨酰胺、pH 7.4 的 DMEM 培养液培养,当细胞生长至约 80% 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶、0.53 mmol/L EDTA 液消化细胞,按 1∶3 的比例传代。参照文献[4-5]方法建立单层上皮模型,将 Caco-2 细胞以 $5\times10^4/cm^2$ 接种于用 1 g/L 鼠尾胶原包被的 6 孔板或 24 孔板 Transwell 聚碳酸酯膜上常规培养,每 2 天换液 1 次,直到细胞完全融合并形成单层。每次更换培养液前,用 Millicell ERS 电阻测定仪测定跨上皮细胞电阻(TER)以监测细胞单层形成情况,待 TER 稳定即细胞单层形成后,用于各实验。

### 1.3 实验分组与处理

将单层上皮细胞随机数字表法分为对照组、BBR 组、TNF-α + IFN-γ 组以及 TNF-α + IFN-γ + BBR 组。对照组只用 DMEM 培养液,不作其他处理;BBR 组是在 Transwell 底室加入 BBR,BBR 终浓度为 100 μmol/L;TNF-α + IFN-γ 组是在 Transwell 底室同时加入终浓度均为 10 ng/mL 的重组人 TNF-α 及 IFN-γ;TNF-α + IFN-γ + BBR 组则在 Transwell 底室同时加入 TNF-α、IFN-γ 与 BBR,TNF-α 和 IFN-γ 的终浓度为 10 ng/mL,BBR 的终浓度为 100 μmol/L。24 孔板细胞处理 48 h,用于 TER 及紧密连接蛋白的免疫荧光分析;6 孔板细胞处理 24 h 后用于蛋白表达分析。

### 1.4 指标检测与方法

1.4.1 单层肠上皮细胞 TER 检测 按照文献[4-5]的方法,用 Millicell ERS 电阻测定仪分别测定各组细胞处理前(0 h)及处理后 6、12、24、36、48 h 的 TER。为利于结果比较,测定结果以各组 0 h 数值的百分数表示。

1.4.2 肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 的检测 参照文献[4-5]报道的免疫荧光方法进行,生长于 24 孔板 Transwell 聚碳酸酯膜上的 Caco-2 细胞用 10 g/L 的多聚甲醛室温固定 30 min,用含 1 mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS 漂洗 5 min,加入含 50 mmol/L $NH_4Cl$ 的 PBS,室温孵育 15 min。PBS 漂洗 2 次 × 5 min,加入含 2.5% BSA 及 0.1% Triton X-100 的 PBS,室温孵育 30 min;每孔加入兔抗人 Occludin(1∶50 稀释)50 μL,4 ℃过夜孵育。PBS 漂洗 4 次 × 5 min,每孔分别加入 50 μL Alexa Fluor 488 标记的二抗(1∶50),室温孵育 1 h。PBS 漂洗 4 次 × 5 min,小心将聚碳酸酯膜切下,置于载玻片上,滴加适量的 Slowfade 液,用指甲油封片,置于激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.4.3 肠上皮细胞 pMLC、MLC 及 Occludin 蛋白表达的检测

参照文献[3-4]报道的蛋白印迹法检测,用 4 ℃预冷 PBS 漂洗生长于 6 孔板 Transwell 聚碳酸酯膜上的 Caco-2 细胞后,加入 300 μL 上样缓冲液裂解细胞并超声破碎,12 000 × *g* 离心 5 min,取上清用 RC DC 蛋白测定试剂盒测定蛋白含量。上清经 100 ℃水浴 5 min 后,进行 7.5% SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜。以 5% 脱脂奶室温封闭 1 h,向 PVDF 膜滴加一抗。pMLC、MLC 及 Occludin 一抗的稀释度均为 1∶1 000;以 β 肌动蛋白作内参,β 肌动蛋白一抗的稀释度为 1∶5 000。4 ℃孵育过夜后,用 TBST 洗膜 4 次,滴加经 1∶5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 或 HRP-羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 4 次后,用超敏化学发光试剂盒检测,经 ChemiDoc XRS 型凝胶图像分析系统采集信号。Quantity One 软件进行相对定量分析,pMLC 的相对表达量是以 pMLC 与 MLC 的比值表示,Occludin 的相对表达量是以 Occludin 蛋白与内参 β 肌动蛋白的比值表示。

### 1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,多组间总体比较用方差分析,两两样本均数比较用 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 单层肠上皮细胞 TER 变化

各组处理前后单层肠上皮细胞 TER 的变化见表 1。对照组及 BBR 组处理前后 TER 均无明显的变化,组内各时相点与 0 h 比较均无显著差异($P>0.05$)。TNF-α + IFN-γ 组 TER 随着处理时间的延长呈逐渐下降趋势,从 12 h 起的各时相点均明显低于 0 h($P<0.05$),并显著低于对照组或 BBR 组($P<0.05$)。TNF-α + IFN-γ + BBR 组 TER 随着处理时间的延长也总体呈逐渐下降趋势,但 TER 降低幅度小于 TNF-α + IFN-γ 组;从 12 h 起的各时相点虽然均较 0 h 略有降低,但均无统计

学意义的差异($P>0.05$),且各时相点均显著高于 TNF-α + IFN-γ 组($P<0.05$)。

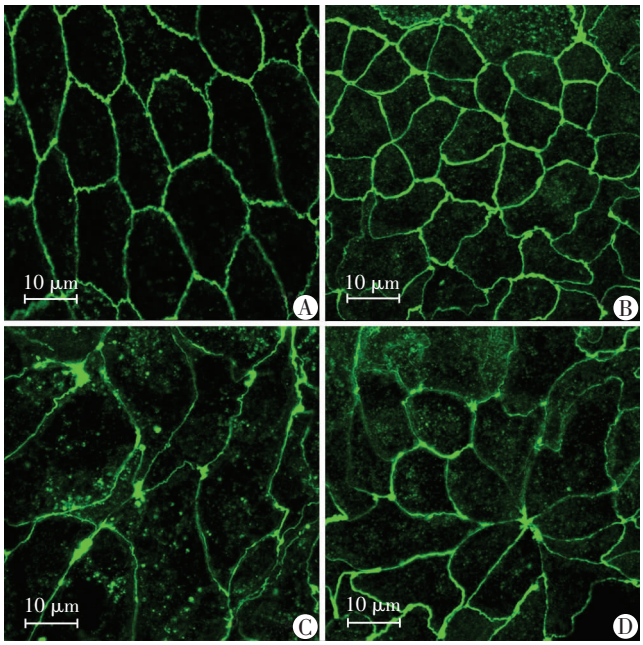
**表 1 各组单层肠上皮细胞不同时间 TER 的变化**(%,$n=10$)

| 组别 | 0 h | 6 h | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 100 | 100.1±1.1 | 100.3±1.3 | 103.9±1.0 | 100.7±2.4 | 101.0±3.3 |
| BBR 组 | 100 | 105.9±3.8 | 107.9±3.2 | 113.4±2.8 | 109.2±3.1 | 110.1±3.5 |
| TNF-α + IFN-γ 组 | 100 | 91.3±3.7 | 84.9±3.4[ab] | 78.1±4.2[ab] | 74.2±5.4[ab] | 72.4±7.8[ab] |
| TNF-α + IFN-γ + BBR 组 | 100 | 105.6±3.4 | 98.5±3.6[c] | 92.7±4.3[c] | 86.8±4.7[c] | 87.2±6.0[c] |

a:$P<0.05$,与 0 h 比较;b:$P<0.05$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与 TNF-α + IFN-γ 组比较

## 2.2 单层肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 的变化

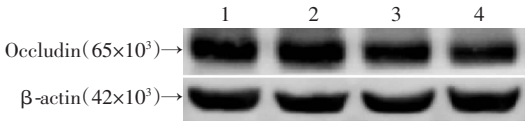
在荧光显微镜下对照组紧密连接蛋白 Occludin 主要靠细胞膜分布,多为圆滑、规则性的连续线状(图 1A)。BBR 组 Occludin 分布与对照组基本相似,也靠细胞膜分布,呈圆滑、规则性的连续分布,但胞浆内偶有少量分布(图 1B)。TNF-α + IFN-γ 组 Occludin 分布则表现为明显的断裂,排列不连续、不规则,并且有明显重分布,表现在胞浆内 Occludin 明显增多(图 1C)。TNF-α + IFN-γ + BBR 组 Occludin 虽未完全恢复到正常分布,但仍主要沿细胞膜分布,排列较 TNF-α + IFN-γ 组明显相对规则,且胞浆内分布也较 TNF-α + IFN-γ 组明显减少(图 1D)。




A:对照组;B:BBR 组;C:TNF-α + IFN-γ 组;D:TNF-α + IFN-γ + BBR 组

**图 1 各组肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 形态分布的变化**(免疫荧光)

用 Western blot 进一步检测 BBR 对单层肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 表达变化的影响,结果见图 2。半定量分析结果显示,对照组、BBR 组、TNF-α + IFN-γ 组及 TNF-α + IFN-γ + BBR 组 Occludin 蛋白表达的相对含量分别为(0.98±0.05)、(0.94±0.04)、(0.99±0.05)及(0.99±0.03),组间比较无显著差异($P>0.05$)。

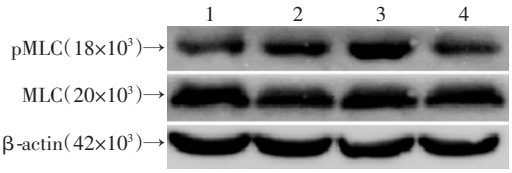



1:对照组;2:BBR 组;3:TNF-α + IFN-γ 组;4:TNF-α + IFN-γ + BBR 组

**图 2 Western blot 检测各组紧密连接 Occludin 蛋白表达变化**

## 2.3 单层肠上皮细胞 MLC 磷酸化的变化

以磷酸化型 MLC(pMLC)与总 MLC 的比值(pMLC/MLC)来反映单层肠上皮细胞 MLC 磷酸化程度,结果见图 3。定量分析结果显示,对照组 pMLC/MLC 比值为(0.27±0.07),BBR 组为(0.39±0.10),两组间无显著差异($P>0.05$)。TNF-α + IFN-γ 组 pMLC/MLC 比值为(1.36±0.26),较对照组或 BBR 组显著升高($P<0.05$),即 MLC 磷酸化水平明显增加。TNF-α + IFN-γ + BBR 组 pMLC/MLC 比值为(0.50±0.09),显著低于 TNF-α + IFN-γ 组($P<0.05$),且与对照组或 BBR 组无明显统计学差异($P>0.05$)。




1:对照组;2:BBR 组;3:TNF-α + IFN-γ 组;4:TNF-α + IFN-γ + BBR 组

**图 3 Western blot 检测各组单层肠上皮细胞 pMLC 蛋白表达变化**

## 3 讨论

多种严重的病理状态如创伤、烧伤、休克等常常伴有全身失控性炎症反应,体内炎性细胞因子含量急剧升高[6-7]。此外,肠道局部的急性或慢性炎症时,肠黏膜各免疫细胞也分泌产生大量炎性细胞因子,如 TNF-α、IFN-γ、IL-1、IL-6 等。过去的体内外研究资料均表明[1,3-5,8-10],TNF-α 及 IFN-γ 等细胞因子能通过多种信号通路,引起肠上皮屏障功能损害。尽管对肠上皮屏障功能损害的防治取得了一些进展,但目前针对炎性细胞因子导致的肠上皮屏障功能损害的防治措施仍相对缺乏[11]。小檗碱作为一种传统的抗炎药物,临床上常用于治疗急性肠道炎症反应引起的腹泻等。最近有研究[12]表明,小檗碱能维护正常肠上皮细胞的屏障完整性,但是否对炎症反应引起的肠上皮屏障功能损害也具有保护作用尚未完全清楚。因此,我们将肠上皮细胞种植于 Transwell 建立单层肠上皮细胞模型,研究小檗碱对炎性细胞因子 TNF-α 及 IFN-γ 所引起的肠上皮屏障功能损害的保护作用及其分子机制。我们的结果表明,小檗碱对正常肠上皮细胞屏障功能无明显影响,表现在广泛用于反映肠上皮屏障功能完整性的指标 TER 无显著变化;但小檗碱能明显减轻 TNF-α 与 IFN-γ 处理所引起的肠上皮屏障功能损害,表现在小檗碱能显著减轻 TNF-α 与 IFN-γ 所致的 TER 降低,

但不能使TER完全恢复正常。我们的结果提示,小檗碱可减轻炎性细胞因子所致的肠上皮屏障功能损害,对炎症反应时肠上皮屏障功能具有一定的保护作用。

小檗碱是通过何种机制发挥肠上皮屏障功能保护作用的呢?众所周知,维持肠上皮屏障功能完整性的结构基础是上皮细胞间的紧密连接及其相关蛋白如ZO-1、Occludin以及Claudin家族蛋白等,其中Occludin蛋白在维持上皮细胞旁路通透性、细胞间的跨上皮电阻以及离子等的定向转运中具有重要意义[1-3,13]。研究[1-3,14]表明,紧密连接相关蛋白表达及定位的异常在肠上皮屏障功能损害的发生中均具有重要作用。为进一步探讨小檗碱保护肠上皮屏障功能的机制,我们进一步观察了小檗碱对TNF-α与IFN-γ处理后肠上皮细胞连接蛋白Occludin定位分布及蛋白表达变化的影响。免疫荧光结果表明,TNF-α与IFN-γ能引起Occludin定位分布发生明显改变,这与既往文献[4-5,8-10]结果相似;但小檗碱能明显减轻TNF-α与IFN-γ所引起的Occludin定位分布发生改变。此外,我们的结果还表明,TNF-α与IFN-γ处理前后肠上皮细胞Occludin蛋白表达无显著变化,与过去文献[8-10]报道一致;而小檗碱对Occludin蛋白表达也无明显影响。这些结果提示,小檗碱对炎症反应时肠上皮屏障功能的保护作用可能不是通过影响紧密连接蛋白表达,而是通过改善紧密连接蛋白的定位分布。

既往的研究[1,3]表明,MLC的磷酸化在肠上皮紧密连接屏障功能的调控中起着至关重要的作用,也可以说MLC磷酸化是屏障功能损害的分子基础。当MLC发生磷酸化后,可活化肌球蛋白重链头部的ATP酶,所产生的能量引起细胞骨架肌动蛋白微丝滑动,细胞发生收缩,导致紧密连接的结构与功能损害。因此,MLC磷酸化水平升高被认为是TNF-α与IFN-γ引起肠上皮屏障功能损害的重要分子机制之一[1,3,14]。既往的研究[8-9,15-16]表明,TNF-α与IFN-γ通过TNFR2介导的信号通路引起肠上皮细胞MLC激酶(MLCK)蛋白表达及MLC磷酸化水平增加,MLCK介导的MLC磷酸化增加即可通过引起肠上皮细胞紧密连接蛋白Occludin及ZO-1胞内定位分布改变,导致肠上皮屏障功能损害,而抑制MLCK介导的MLC磷酸化则能减轻紧密连接蛋白的定位分布变化及屏障功能损害。本研究的结果也表明,TNF-α与IFN-γ能引起肠上皮细胞MLC磷酸化水平明显升高,而小檗碱则能显著抑制TNF-α与IFN-γ所引起的MLC磷酸化水平增加。综合上述结果,我们认为小檗碱通过抑制TNF-α与IFN-γ所引起的MLC磷酸化增加,改善紧密连接蛋白定位分布变化,从而减轻炎症反应时肠上皮屏障功能损害。是否还有其他分子机制参与,有待进一步研究。

**参考文献:**


[1] Turner J R. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application[J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 1901-1909.

[2] Blikslager A T, Moeser A J, Gookin J L, *et al*. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa[J]. Physiol Rev, 2007, 87(2): 545-564.

[3] Turner J R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(11): 799-809.

[4] 刘行, 王裴, 王凤君. γ干扰素与肿瘤坏死因子α对肠上皮屏障功能影响的实验研究[J]. 中华烧伤杂志, 2011, 27(2): 145-149.

[5] Liu H, Li M, Wang P, *et al*. Blockade of hypoxia-inducible factor-1α by YC-1 attenuates interferon-γ and tumor necrosis factor-α-induced intestinal epithelial barrier dysfunction[J]. Cytokine, 2011, 56(3): 581-588.

[6] Finnerty C C, Herndon D N, Chinkes D L, *et al*. Serum cytokine differences in severely burned children with and without sepsis[J]. Shock, 2007, 27(1): 4-9.

[7] Orman M A, Nguyen T T, Ierapetritou M G, *et al*. Comparison of the cytokine and chemokine dynamics of the early inflammatory response in models of burn injury and infection[J]. Cytokine, 2011, 55(3): 362-371.

[8] Wang F, Graham W V, Wang Y, *et al*. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression[J]. Am J Pathol, 2005, 166(2): 409-419.

[9] Wang F, Schwarz B T, Graham W V, *et al*. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction[J]. Gastroenterology, 2006, 131(4): 1153-1163.

[10] Liu H, Wang P, Cao M, *et al*. Protective role of oligomycin against intestinal epithelial barrier dysfunction caused by IFN-γ and TNF-α[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(5/6): 799-808.

[11] Catalioto R M, Maggi C A, Giuliani S. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(3): 398-426.

[12] Gu L, Li N, Li Q, *et al*. The effect of berberine *in vitro* on tight junctions in human Caco-2 intestinal epithelial cells[J]. Fitoterapia, 2009, 80(4): 241-248.

[13] Feldman G J, Mullin J M, Ryan M P. Occludin: structure, function and regulation[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(6): 883-917.

[14] Shen L, Weber C R, Raleigh D R, *et al*. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo[J]. Annu Rev Physiol, 2011(73): 283-309.

[15] Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, *et al*. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in *in vitro* models of intestinal disease[J]. Gastroenterology, 2002, 123(1): 163-172.

[16] Shen L, Black E D, Witkowski E D, *et al*. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 10): 2095-2106.


(**收稿**:2012-09-13;**修回**:2012-10-26)

(编辑 张 维)