DOI:10.16016/j.1000-5404.201507127

双歧杆菌通过 Zonulin 影响坏死性小肠结肠炎新生大鼠模型肠道通透性

向 玲,杜维霞,刘依枫,彭玲珑,韦 红 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 探讨双歧杆菌对坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)新生大鼠模型肠道通透性及血清 Zonulin 表达的影响,分析双歧杆菌保护 NEC 可能的机制。**方法** 将 60 只新生 1 d 的 SD 大鼠按随机数字表法分为 3 组($n=20$):对照组、坏死性小肠结肠炎新生大鼠组(NEC 组)及双歧杆菌干预坏死性小肠结肠炎新生大鼠组(NEC + BIF 组)。3 组于第 1、2、3 天固定时间点测量体质量;第 4 天处死大鼠,HE 染色观察回盲部肠组织病理学变化并行病理学评分,异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)示踪法检测肠黏膜通透性,ELISA 检测血清 Zonulin 的水平,Western blot 及免疫组化检测肠组织紧密连接蛋白的表达及分布,将 3 组大鼠血清 Zonulin 水平与肠道通透性及紧密连接蛋白表达量行相关性分析。**结果** 与 NEC 组相比,双歧杆菌干预后大鼠肠上皮损伤明显改善;而与对照组相比,NEC 组肠道通透性显著增高($P<0.05$),血清 Zonulin 表达明显增加($P<0.05$),肠上皮紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin、ZO-1 的表达明显减少($P<0.05$),且分布不连续;与 NEC 组相比,NEC + BIF 组肠道通透性降低($P<0.05$),血清 Zonulin 表达降低($P<0.05$),肠上皮紧密连接蛋白的表达增加($P<0.05$)。相关性分析显示,3 组大鼠血清 Zonulin 水平与肠道通透性呈正相关($r=0.923$,$P<0.01$),而血清 Zonulin 水平与肠组织紧密连接 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达量均呈负相关($r=-0.779$,$P<0.01$;$r=-0.920$,$P<0.01$;$r=-0.619$,$P<0.01$)。**结论** 双歧杆菌可明显改善 NEC 大鼠的肠道通透性,其机制可能与抑制 Zonulin 的表达有关。

[关键词] 坏死性小肠结肠炎;双歧杆菌;Zonulin;肠道通透性;紧密连接
[中图法分类号] R363; R378.994; R574.62 [文献标志码] A

Effect of bifidobacterium on intestinal permeability and expression of zonulin in neonatal rats with necrotizing enterocolitis

Xiang Ling, Du Weixia, Liu Yifeng, Peng Linglong, Wei Hong (Department of Neonatology, Key Laboratory of Department Diseases in Childhood of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of Bifidobacterium on the intestinal permeability and serum expression of zonulin in neonatal rats with necrotizing enterocolitis (NEC), and discuss the protective mechanism of Bifidobacterium from NEC. **Methods** According to random number table, 60 1-day-old Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups: control group, NEC group, and Bifidobacterium intervention group (NEC + BIF group) ($n=20$). The weights of rats were measured in 3 consecutive days at same time. After day 4, all the rats were put to death, and the proximal intestines of ileocecal junction underwent pathological sectioning. HE staining was carried out to observe histological changes and score the tissue damage. The intestinal permeability was analyzed by fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-Dextran)

[基金项目] 国家自然科学基金(30200300);国家临床重点专科建设项目经费基金(卫办医政[2011]873)
[通信作者] 韦 红,E-mail:didi7911@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1310.018.html(2015-12-03)

tracing. The serum zonulin was detected by ELISA. The expression and distribution of tight junction proteins (Claudin-1, Occludin, and ZO-1) were analyzed by Western blotting and immunohistochemical assay. Finally, the correlation analysis between the intestinal permeability, the expression of tight junction proteins and the serum level of zonulin was performed. **Results** Compared with the NEC group, the intestinal injury was obviously alleviated after Bifidobacterium intervention. Compared with the control group, the intestinal permeability and the level of zonulin in the NEC group were significantly increased (both $P<0.05$), and the expression of tight junction proteins (Claudin-1, Occludin, ZO-1) was significantly decreased ($P<0.05$), with discontinuous distribution. Compared with the NEC group, the intestinal permeability was decreased ($P<0.05$), the expression of zonulin was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression of tight junction proteins was increased ($P<0.05$) in the NEC + BIF group. The correlation analysis showed that the level of zonulin was positively correlated with the intestinal permeability ($r=0.923$, $P<0.01$), and negatively correlated with the expression of tight junction proteins (Claudin-1, Occludin, ZO-1) ($r=-0.779$, $P<0.01$; $r=-0.920$, $P<0.01$; $r=-0.619$, $P<0.01$). **Conclusion** Bifidobacterium can improve the intestinal permeability in the neonatal rats with NEC, and the mechanism may be related with inhibition of zonulin expression.

[**Key words**] necrotizing enterocolitis; Bifidobacterium; zonulin; intestinal permeability; tight junction

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200300) and the National Clinical Key-discipline Construction Program of China (2011-873). Corresponding author: Wei Hong, E-mail: didi7911@163.com

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC)是新生儿最常见的胃肠道急症,其发病机制十分复杂,至今仍未完全阐明。流行病学研究显示肠道黏膜屏障受损在该病的发生、发展过程中具有重要作用[1]。而Zonulin是2000年Wang等[2]发现的一种封闭带毒素(zonula occludens toxin, ZOT)类似物。研究表明,Zonulin释放入肠腔与Zonulin受体结合,快速调节肠道紧密连接,改变肠道通透性,对肠道黏膜屏障的功能具有重要作用,是目前已知的唯一的肠道通透性的生理性调节蛋白[3-5]。双歧杆菌作为一种常见的益生菌,在调节肠道菌群、维持肠道黏膜屏障、预防或减少NEC的发生率等方面具有重要作用[6-7]。但益生菌通过调节肠道通透性从而防治肠道损伤具体机制目前仍不清楚。本实验建立NEC大鼠模型,观察双歧杆菌对NEC大鼠肠道通透性和肠道紧密连接及血清Zonulin表达的影响,进一步探讨益生菌对NEC保护作用的可能机制,以期为益生菌防治该病提供新思路和理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

60只清洁级新生1 d龄SD大鼠,雌雄不限,体质量6~9 g(重庆医科大学动物中心),雅培加营素蛋白质粉(美国雅培公司),多美滋婴儿配方奶粉(中国多美滋公司),中/长链脂肪乳注射液(C_{6-24})(中国华瑞制药有限公司),双歧杆菌(中国丽珠制药有限公司),*E. coli* O55:B5脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)(美国Sigma公司),兔抗大鼠Claudin-1抗体、Occludin抗体、ZO-1抗体(美国Invitrogen公司),二抗试剂盒及DAB显色试剂盒(中国中杉金桥公司),Zonulin检测试剂盒(中国沪尚生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 60只新生1 d的SD大鼠按随机数字表法分成3组,每组20只。对照组:与母鼠同笼,鼠乳喂养。坏死性小肠结肠炎新生大鼠组(NEC组):与母鼠分开,人工喂养+缺氧、复氧、冷刺激+LPS灌胃,以建立新生鼠NEC动物模型[8]。双歧杆菌干预坏死性小肠结肠炎新生大鼠组(NEC+BIF组):建立新生鼠NEC动物模型,双歧杆菌溶于配方奶中灌胃,每日2次,每次0.5×10^8 CFU,每次0.1 mL,共3 d。

1.2.2 建立NEC大鼠模型[8] 新生1 d的SD大鼠放置在自制保育箱内(控制保育箱内温度28~30 ℃,湿度45%~65%),采用配方鼠乳喂养。代乳品参考文献[9]报道配制,经口插管灌胃喂养,第1天喂养量为0.1 mL/次,每4小时喂养1次,以后每24小时增加0.1~0.3 mL。LPS以5 mg/kg稀释于0.1 mL

灭菌水中,每日灌胃 1 次,连续 3 d。缺氧箱充入纯 N_2,控制 N_2 流量为 15 L/min,测氧仪测得箱内 N_2 浓度达 100% 后,放入新生鼠 3 min 后将其取出,随即将其置于 100% 氧气浓度的氧舱中,3 min 后立即将其置于 4 ℃冰箱中刺激 10 min。每日在早晚 10 点分别进行 1 次缺氧 + 复氧 + 冷刺激,连续 3 d。

1.2.3 大鼠肠组织大体形态、病理学形态观察及病理学评分 第 4 天空腹后,断头处死大鼠,取出十二指肠下端至回盲部肠管,观察肠组织大体形态变化。近回盲部肠组织 2 ~ 3 cm 立即固定于 4% 的多聚甲醛,石蜡包埋、切片、HE 染色,行组织病理学观察及病理学评分。采用双盲法行肠组织损伤评分,参照 Nadler 等[9]报道的标准,评分≥2 分确定为 NEC。每例新生鼠回盲部肠组织标本观察 3 个视野,取其平均值。

1.2.4 异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)示踪法[10]检测肠道通透性 第 4 天空腹后,经胃管喂入 FITC-dextran 40 mg/100 g,4 h 后取血,肝素抗凝,3 000 r/min 离心 10 min。取血浆 25 μL 加入 100 μL PBS,用荧光分光光度计测定其荧光强度,激发光波长为 480 nm,发射光波长为 520 nm,制作标准曲线并计算样品浓度。

1.2.5 ELISA 检测 Zonulin 释放量 取血,室温静置 2 h 后,4 ℃ 2 000 r/min 离心 20 min,取血清,-20 ℃保存备用。采用酶联免疫吸附实验检测 Zonulin 的释放量,严格根据说明书操作。

1.2.6 Western blot 检测肠组织紧密连接 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达 取 -80 ℃冻存的肠组织,组织匀浆,14 000 r/min 离心 10 min,提取胞浆总蛋白,BCA 法行蛋白定量。取 50 μg 总蛋白样品凝胶电泳,电转印至 PVDF 膜,用 5 % 脱脂牛奶封闭后,孵育抗体,一抗(抗 Claudin-1、Occludin、ZO-1 抗体稀释浓度为 1∶400,抗 β-actin 抗体稀释浓度为 1∶2 000)4 ℃ 冰箱孵育过夜,羊抗兔二抗(稀释浓度为 1∶2 000)室温震荡孵育 1 h,ECL 化学发光显影。ImageJ 软件进行图像分析,以目的条带与 β-actin 的灰度值的比值代表 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白的表达水平。

1.2.7 免疫组化分析肠组织紧密连接 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白的分布及表达 石蜡切片常规脱蜡、水化;0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)抗原修复;3% 双氧水室温 15 min 阻断内源性过氧化物酶;一抗(抗 Claudin-1、Occludin、ZO-1 抗体稀释度为 1∶50)4 ℃冰箱孵育过夜;二抗 37 ℃温箱孵育 15 min;过氧化物酶标记的链霉亲和素 37 ℃温箱孵育 15 min;DAB 显色约 30 s,苏木精复染,透明,干燥后中性树胶封片观察。应用 Image-Pro Plus 软件进行图像分析,分别测定紧密连接 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白的累积光密度(integrated optical density, IOD)。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较行单因素方差分析法。相关性分析行一元线性回归分析法。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况及体质量变化

NEC 组于建模第 2 天出现明显胃潴留、灌胃受阻、腹胀、腹泻,甚至血便、黑便、活动明显减少、倦怠嗜睡、外观瘦小、体质量明显减轻。与 NEC 组相比,NEC + BIF 组上述表现出现较晚而且较轻,体质量增长较缓慢;对照组进食及排便正常、活动好、皮下脂肪丰满、体质量增长明显。各组新生鼠体质量测量结果见表 1。

表 1 各组大鼠实验前后体质量变化(g, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	实验前	实验后
对照组	7.01 ± 0.18	9.01 ± 0.39
NEC 组	7.00 ± 0.17	6.09 ± 0.26[a]
NEC + BIF 组	6.97 ± 0.21	7.27 ± 0.25[b]

a:$P < 0.05$,与对照组比较;b:$P < 0.05$,与 NEC 组比较

2.2 大鼠肠组织大体形态、病理学形态及病理学评分

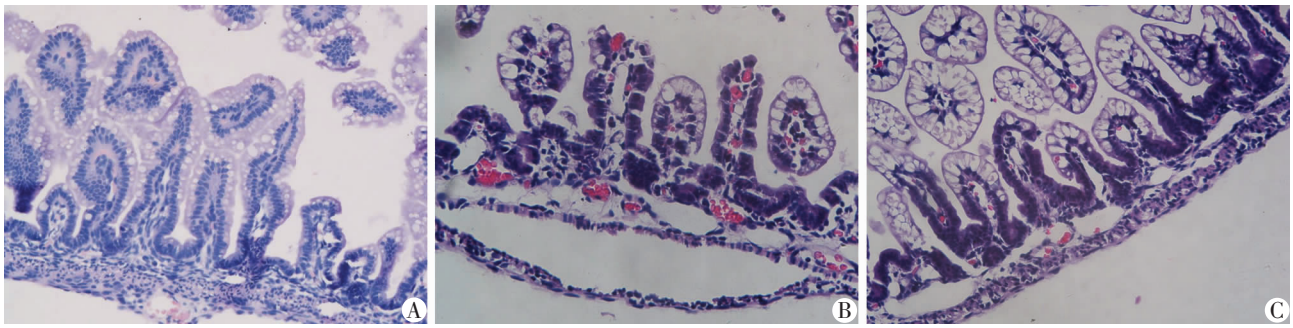
肉眼观察显示:对照组大鼠肠组织,可见其肠管色泽粉嫩,呈淡黄色,弹性佳,无积气、出血等表现(图 1A);NEC 组大鼠肠组织,可见其回盲部近端肠管呈黑红色改变,弹性差,肠腔可见不同程度积气,严重者呈串珠样,有出血表现(图 1B);NEC + BIF 组大鼠肠组织,可见其肠管主要呈黄色,有红色改变,但未见明显黑红色改变,肠腔可见轻中度积气,无出血表现(图 1C)。

光镜观察显示:对照组肠组织结构清晰正常,上皮完整连续,腺体排列规则,绒毛高耸,黏膜层、黏膜下层及固有层无充血水肿及断裂分离(图 2A);NEC 组肠组织坏死严重,腺体排列紊乱、消失,绒毛变性水肿,参差不齐,部分绒毛坏死、脱落或消失,肌层变薄甚至断裂,固有层与黏膜下层重度水肿(图 2B);NEC + BIF 组肠黏膜及黏膜下层可见轻中度充血水肿,绒毛水肿,腺体结构稍紊乱(图 2C)。双盲法肠组织病理评分:NEC 组明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 NEC 组比较,NEC + BIF 组评分值明显降低($P < 0.05$,表 2)。



A:对照组;B:NEC 组;C:NEC + BIF 组

图 1 3 组大鼠肠组织肉眼观察



A:对照组;B:NEC 组;C:NEC + BIF 组

图 2 3 组大鼠肠组织病理形态学改变 (HE ×200)

2.3 各组大鼠肠道通透性

与对照组相比,NEC 组血浆 FITC-D 含量明显增加($P<0.05$);与 NEC 组相比,NEC + BIF 组血浆 FITC-D 含量降低,差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

2.4 Zonulin 释放量的检测

对照组 Zonulin 呈低水平释放,平均为(3.48 ± 1.05)ng/mL;NEC 组[(13.30 ± 5.08)ng/mL]与对照组比较,Zonulin 在血液中的释放量显著升高($P<0.05$);而与 NEC 组相比,NEC + BIF 组 Zonulin 的释放量降低,差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

表 2 各组大鼠肠组织病理学评分、Zonulin 的释放量及肠道通透性($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	病理评分	FITC-D 含量(μg/mL)	Zonulin 释放量(ng/mL)
对照组	0.36 ± 0.50	49.67 ± 10.13	3.48 ± 1.05
NEC 组	3.64 ± 0.49[a]	159.17 ± 14.29[a]	13.30 ± 5.08[a]
NEC + BIF 组	1.82 ± 0.61[ab]	108.89 ± 11.79[ab]	8.40 ± 2.27[ab]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 NEC 组比较

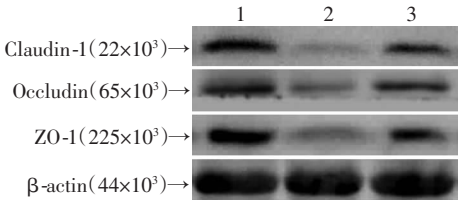
2.5 各组大鼠肠组织中 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白的表达

与对照组相比,NEC 组 3 种紧密连接蛋白表达明显减少($P<0.05$);与 NEC 组相比,NEC + BIF 组 3 种紧密连接蛋白表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$,表 3、图 3)。

表 3 各组大鼠肠组织 Claudin、Occludin、ZO-1 的表达($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	Claudin-1	Occludin	ZO-1
对照组	0.56 ± 0.17	0.60 ± 0.13	0.78 ± 0.23
NEC 组	0.14 ± 0.10[a]	0.12 ± 0.07[a]	0.26 ± 0.09[a]
NEC + BIF 组	0.31 ± 0.11[ab]	0.36 ± 0.20[ab]	0.50 ± 0.29[ab]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 NEC 组比较



1:对照组;2:NEC 组;3:NEC + BIF 组

图 3 Western blot 检测双歧杆菌对肠组织紧密连接 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达的影响

2.6 各组大鼠肠组织中 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白的表达及分布

紧密连接位于相邻细胞顶侧部,Claudin-1、Occludin 主要分布于细胞膜外,ZO-1 位于细胞膜内,胞浆内也可见分布,免疫组化染色后棕褐色都沿膜连续分布。对照组可见大量深棕褐色颗粒沿膜连续分布,且边界清晰;NEC 组可见棕褐色颗粒染色明显变淡、减少,呈

弱阳性,分布不连续,且细胞结构不清,紧密连接蛋白表达明显减少;NEC + BIF 组与 NEC 组比较,棕褐色颗粒增多,阳性染色增强,见图 4。半定量分析 IOD 值,NEC 组 3 种紧密连接蛋白都明显低于对照组($P < 0.05$);而 NEC + BIF 组与 NEC 组相比,3 种紧密连接蛋白都明显增高($P < 0.05$,表 4)。

表 4 各组大鼠肠组织 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达的比较($\times 10^4$, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Claudin-1	Occludin	ZO-1
对照组	37.11 ± 2.47	30.39 ± 1.61	42.24 ± 1.73
NEC 组	20.37 ± 2.08[a]	18.79 ± 2.19[a]	21.33 ± 2.03[a]
NEC + BIF 组	29.73 ± 2.11[ab]	24.11 ± 0.81[ab]	33.85 ± 2.23[ab]

a:$P < 0.05$,与对照组比较;b:$P < 0.05$,与 NEC 组比较

2.7 血清 Zonulin 水平与肠组织紧密连接 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达和肠道通透性的相关性

将 3 组大鼠血清 Zonulin 水平分别与肠道通透性及 Western blot 检测肠组织紧密连接蛋白表达量行相关性分析,结果显示血清 Zonulin 水平与肠道通透性呈正相关($r = 0.923$, $P < 0.01$),而血清 Zonulin 水平与肠组织紧密连接 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达量均呈负相关($r = -0.779$, $P < 0.01$; $r = -0.920$, $P < 0.01$; $r = -0.619$, $P < 0.01$)。提示血清 Zonulin 水平越高,肠组织紧密连接蛋白表达越少,肠道通透性越高。

3 讨论

肠道黏膜屏障发育不成熟在新生儿坏死性小肠结肠炎发病机制中起关键作用[1]。肠上皮紧密连接是肠道黏膜屏障的重要组成部分,在肠腔和肠道黏膜间建立起了电荷与大小选择性屏障,从而在调节肠上皮细胞的通透性方面起重要作用[11]。肠上皮紧密连接主要由跨膜蛋白 Occludin,Claudins,JAMs,胞质附着蛋白 ZO 家族(ZO-1、ZO-2 和 ZO-3)及与其相连的细胞骨架蛋白等组成。紧密连接蛋白减少、缺失或移位,肠道通透性增加,引起 NEC[12]、乳糜泻[13-14]、糖尿病[15]、炎症性肠病[16]等疾病。本研究显示,NEC 大鼠肠组织明显缺血坏死,严重炎症反应,且肠道通透性明显增加,

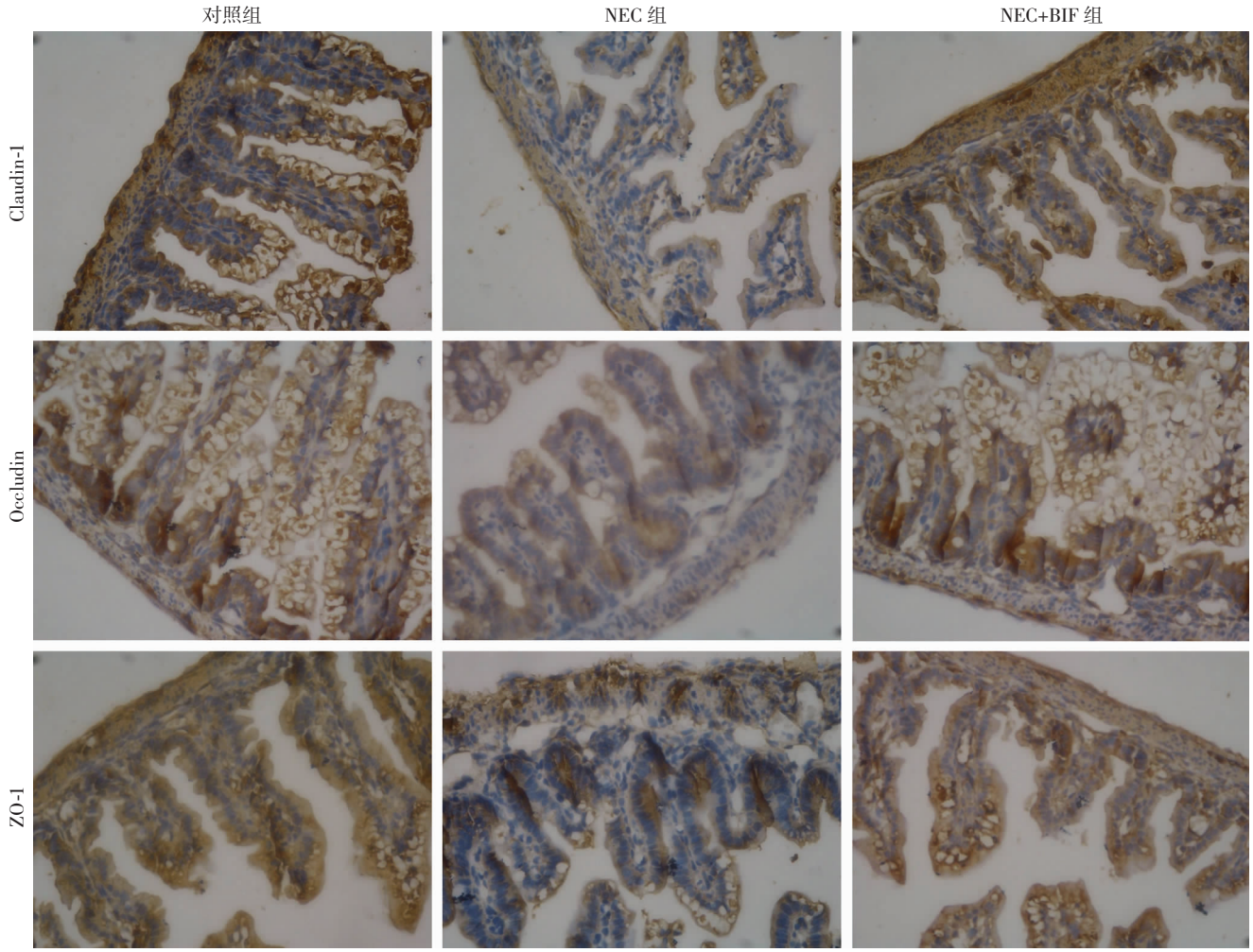


图 4 免疫组化检测双歧杆菌对大鼠肠组织 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达及分布的影响 (×400)

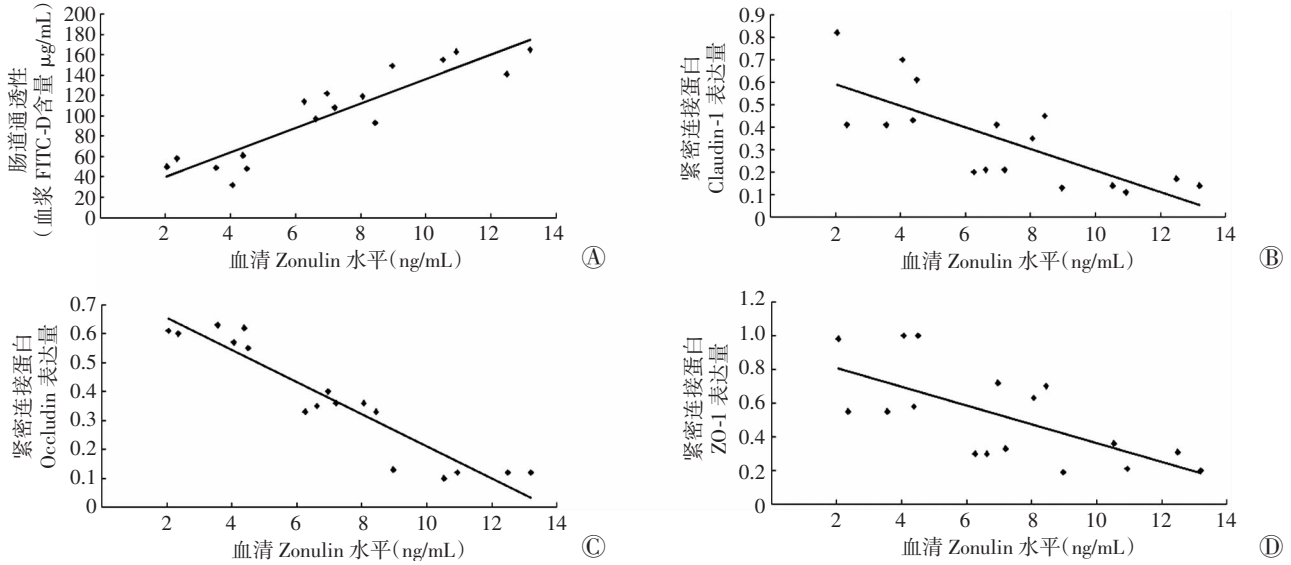


图 5　3 组大鼠肠道通透性(A),肠组织 Claudin-1(B)、Occludin(C)、ZO-1(D)蛋白表达分别与血清 Zonulin 水平的相关性分析

紧密连接蛋白的表达明显减少。提示肠道通透性的改变与 NEC 的发生有密切关系。

在肠道屏障通透性的研究中表明,肠道紧密连接可通过 Zonulin 途径调节机制起选择性屏障作用[3]。Zonulin 是目前已知的唯一的肠道通透性的生理性调节蛋白,在细菌和抗原的刺激下,Zonulin 大量释放入肠腔,与 Zonulin 受体结合,从而下调紧密连接蛋白的表达,破坏紧密连接复合体的完整性,增加肠道通透性[4-5]。我们前期体外实验已证实用致病菌干预肠上皮单层屏障可降低紧密连接蛋白表达、改变其分布、增加肠上皮屏障通透性,同时伴有 Zonulin 释放量明显增高[17]。Sapone 等[18]对Ⅰ型糖尿病患者研究发现,40%患者血清 Zonulin 水平增高,且血清 Zonulin 水平增高的患者 Claudin-1、Claudin-2 基因表达改变,肠道通透性增高。同样在腹腔疾病和胰岛素抵抗相关的肥胖的研究中也发现,血清 Zonulin 水平增高,肠道通透性增高[14,19]。提示肠腔及血清 Zonulin 水平均可反应肠道通透性的变化。本研究发现,与对照组相比,NEC 大鼠肠组织紧密连接蛋白表达明显减少,肠道通透性明显增加,同时伴有血清 Zonulin 水平明显增高;相关性研究表明,血清 Zonulin 水平与肠道通透性呈正相关,而与紧密连接蛋白的表达量呈负相关,表明 NEC 大鼠肠损伤可能与 Zonulin 信号通路有关。但是由于新生大鼠肠腔较小,肠壁较脆弱,小肠较短,我们未能提取到新生大鼠肠腔灌洗液,肠腔 Zonulin 的变化未能证实,有待进一步研究。

目前益生菌已被广泛用于治疗 NEC,临床试验表明益生菌降低了 NEC 的发生率及死亡率,但益生菌保护 NEC 的机制尚不完全明确[6-7]。前期研究表明,益生菌可降低 NEC 动物模型肠道炎症反应,维持肠道紧密蛋白完整性,降低肠道通透性,从而保护 NEC 肠损伤[20-21]。Liu 等[22]的一个临床随机对照试验证实对结直肠手术术后的患者给予益生菌治疗可降低其肠道通透性,增强肠道屏障功能,且患者血清 Zonulin 水平与肠道通透性呈正相关,同时提出益生菌可能是通过抑制 P38MAPK 的表达来调控 Zonulin 的表达。本研究中,双歧杆菌干预 NEC 后,肠损伤明显改善,且肠道通透性降低,肠上皮紧密连接蛋白表达增加,同时伴有血清 Zonulin 水平显著下降,提示双歧杆菌可能通过抑制血清 Zonulin 的表达而改善 NEC 大鼠肠道损伤程度,也为益生菌的临床应用提供了一定理论基础。

综上所述,本研究表明,NEC 大鼠肠道通透性明显增高伴随血清 Zonulin 水平显著增高,而双歧杆菌干预后改善 NEC 大鼠肠损伤的同时血清 Zonulin 水平也明显降低,且相关性分析表明,血清 Zonulin 水平与肠道通透性呈正相关,而与肠组织紧密连接蛋白表达量均呈负相关,由此我们推断 NEC 的发生发展及双歧杆菌改善 NEC 大鼠的肠道通透性的作用机制之一可能是与 Zonulin 信号通路的激活与抑制有关。但双歧杆菌通过 Zonulin 通路改善 NEC 肠道损伤的具体机制和临床意义仍有待进一步的研究。

参考文献：

[1] Neu J, Walker W A. Necrotizing enterocolitis[J]. N Engl J

Med, 2011, 364(3): 255 – 264. DOI: 10.1056/NEJMra1005408

[2] Wang W, Uzzau S, Goldblum S E, *et al*. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 24): 4435 – 4440.

[3] Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10(10): 1096 – 1100. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.08.012

[4] Tripathi A, Lammers K M, Goldblum S, *et al*. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(39): 16799 – 16804. DOI: 10.1073/pnas.0906773106

[5] Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer[J]. Physiol Rev, 2011, 91(1): 151 – 175. DOI: 10.1152/physrev.00003.2008

[6] Embleton N, Berrington J E. Probiotics reduce the risk of necrotising enterocolitis (NEC) in preterm infants[J]. Evid Based Med, 2013, 18(6): 219 – 220. DOI: 10.1136/eb-2013-101260

[7] Fernandez-Carrocera L A, Solis-Herrera A, Cabanillas-Ayon M, *et al*. Double-blind, randomised clinical assay to evaluate the efficacy of probitics in preterm newborns weighing less than 1500 g in the prevention of necrotising enterocolitis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2013, 98(1): F5 – F9. DOI: 10.1136/archdischild-2011-300435

[8] 李金纯, 韦红, 贾盛华, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎动物模型建立方法改进与比较[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(3): 313 – 317.

[9] Nadler E P, Dickinson E, Knisely A, *et al*. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis[J]. J Surg Res, 2000, 92(1): 71 – 77. DOI: 10.1006/jsre.2000.5877

[10] Cani P D, Bibiloni R, Knauf C, *et al*. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1470 – 1481. DOI: 10.2337/db07-1403

[11] Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease[J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130(1): 55 – 70. DOI: 10.1007/s00418-008-0424-9

[12] Rentea R M, Liedel J L, Welak S R, *et al*. Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model[J]. J Pediatr Surg, 2012, 47(6): 1135 – 1142. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.03.018

[13] Hollon J, Puppa E L, Greenwald B, *et al*. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity [J]. Nutrients, 2015, 7(3): 1565 – 1176. DOI: 10.3390/nu7031565

[14] Fasano A, Not T, Wang W, *et al*. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease[J]. Lancet, 2000, 355(9214): 1518 – 1519. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02169-3

[15] Horton F, Wright J, Smith L, *et al*. Increased intestinal permeability to oral chromium (51 Cr) -EDTA in human Type 2 diabetes[J]. Diabet Med, 2014, 31(5): 559 – 563. DOI: 10.1111/dme.12360

[16] Camilleri M, Madsen K, Spiller R, *et al*. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2012, 24(6): 503 – 512. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x

[17] 杜维霞, 沈名扬, 艾青, 等. Zonulin 介导的肠道微生物对肠上皮细胞屏障功能的调节[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(10): 1362 – 1367.

[18] Sapone A, de-Magistris L, Pietzak M, *et al*. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives[J]. Diabetes, 2006, 55(5): 1443 – 1449. DOI: 10.2337/db05-1593

[19] Moreno-Navarrete J M, Sabater M, Ortega F, *et al*. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37160. DOI: 10.1371/journal.pone.0037160

[20] Bergmann K R, Liu SX, Tian R, *et al*. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis [J]. Am J Pathol, 2013, 182(5): 1595 – 1606. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.01.013

[21] Khailova L, Dvorak K, Arganbright K M, *et al*. Bifidobacterium bifidum improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(5): G940 – G949.

[22] Liu Z H, Huang M J, Zhang X W, *et al*. The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial[J]. Am J Clin Nutr, 2013, 97(1): 117 – 126. DOI: 10.3945/ajcn.112.040949

(**收稿**:2015-07-22;**修回**:2015-09-13)

(编辑 黄 超)