综述 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003635

肠道屏障功能评估技术的研究进展

罗芳丽，孙路强，王司琦，侯雨君，李　瑛，周思远
（成都中医药大学针灸推拿学院，成都　610075）

【摘　要】肠道屏障功能对机体健康至关重要，生理状态下，肠道发挥屏障功能可有效防止机体内环境受到有害物质的侵害，保障机体内环境稳定。当各种因素使机体内环境受到侵害，可导致肠道屏障功能受损，肠道通透性增加，从而出现肠道内菌群移位、内毒素吸收等一系列病理改变。本文对相关文献进行检索、整理、归纳发现肠道屏障功能的检测与评价方法较多，通过测定血液、尿液、粪便或肠道组织等标本中的某些指标，从体内、体外2个方面对肠道屏障功能进行评价，总结了肠道屏障功能的评价方法，并分析了每种评价方法的优缺点，以期为后续此领域的研究提供参考。

【关键词】肠道屏障功能；评估技术；研究进展
【中图分类号】R57　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2024-01-21

Research progress on intestinal barrier function assessment techniques

Luo Fangli, *Sun Luqiang*, *Wang Siqi*, *Hou Yujun*, *Li Ying*, *Zhou Siyuan*
(*College of Acupuncture and Massage*, *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*)

【**Abstract**】Intestinal barrier function is very important for overall health. Under physiological conditions, intestinal barrier can effectively prevent the internal environment from being affected by harmful substances and ensure the stability of the internal environment. When the internal environment of the body is damaged by various factors, the intestinal barrier function can be impaired, leading to increased intestinal permeability and thus a series of pathological changes such as intestinal flora shift and endotoxin absorption. By searching, sorting, and summarizing relevant literature, the authors found that there are many methods for detection and evaluation of intestinal barrier function. Indicators measured using blood, urine, stool, or intestinal tissue samples have been used to evaluate intestinal barrier function both *in vivo* and *in vitro*. This paper summarizes the methods of intestinal barrier function evaluation, and analyzes the advantages and disadvantages of each evaluation method, in order to provide a reference for the subsequent research in this field.

【**Key words**】intestinal barrier function; evaluation technique; research progress

肠道屏障构成了机体外部和内部环境之间的界面，它主要由机械屏障、免疫屏障、化学屏障和微生物屏障构成，四者共同维持其功能的完整性。正常情况下，肠道屏障具有维持肠道内环境稳态的功能，它不仅可以选择性地吸收营养物质和电解质[1]，还能防止有害物质如毒素和细菌通过肠壁进入全身脏器和组织。当免疫、生物、理化、应激等各种因素损伤肠道屏障功能时，可导致肠道通透性增加，从而出现肠道内菌群移位、内毒素吸收等一系列病理改变[2]，与消化、免疫、神经、代谢等多系统疾病的发生发展密切相关[3]。肠道通透性的增高是肠道屏障功能受损的标志，目前研究多通过检测肠道通透性来评估肠道屏障功能受损程度。经查阅、整理、归纳文献，发现肠道屏障功能的评价方法主要从体内和体外2个角度入手。因各方法适用情况不同，所以在临床或动物研究的运用中均存在一定的局限性。本文介绍了肠道屏障的组成及功能，综述了不同肠道屏障功能评估技术的运用现状，为肠道屏障功能相关研究的开展提供参考。

作者介绍：罗芳丽，Email：1019058385@qq.com，
研究方向：功能性肠病的临床及机制研究。
通信作者：周思远，Email：zzsy6688@qq.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：82074558）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241206.1116.006（2024-12-09）

1　肠道屏障的组成及功能

肠道屏障主要由机械屏障、免疫屏障、化学屏障和微生物屏障构成。机械屏障由肠上皮细胞、上皮细胞间紧密连接及覆盖在上皮细胞表面的黏液层共同构成，只允许水分子和小分子水溶性物质有选择性通过，能抑制细菌移位，在细胞旁的通透性中起至关重要的作用；化学屏障由肠上皮细胞所分泌的黏液、消化液及正常菌分泌的抑菌物质组成，可以防止病原菌直接接触肠上皮细胞；免疫屏障主要由肠道相关淋巴细胞组织和弥散免疫细胞组成，具有抵御病原微生物入侵、抗过敏反应、抑制免疫应答等功能；微生物屏障是由肠道共生微生物构成，抵抗并排斥病原菌定植、入侵，以维护机体内环境稳定[4-5]。4个屏障之间相互协同，将肠腔内物质与机体内环境相隔离，共同维持肠道屏障功能的完整性；当各种因素损伤肠道屏障功能时，可导致肠道通透性增加，从而出现肠道内菌群移位等一系列病理改变（图1）。

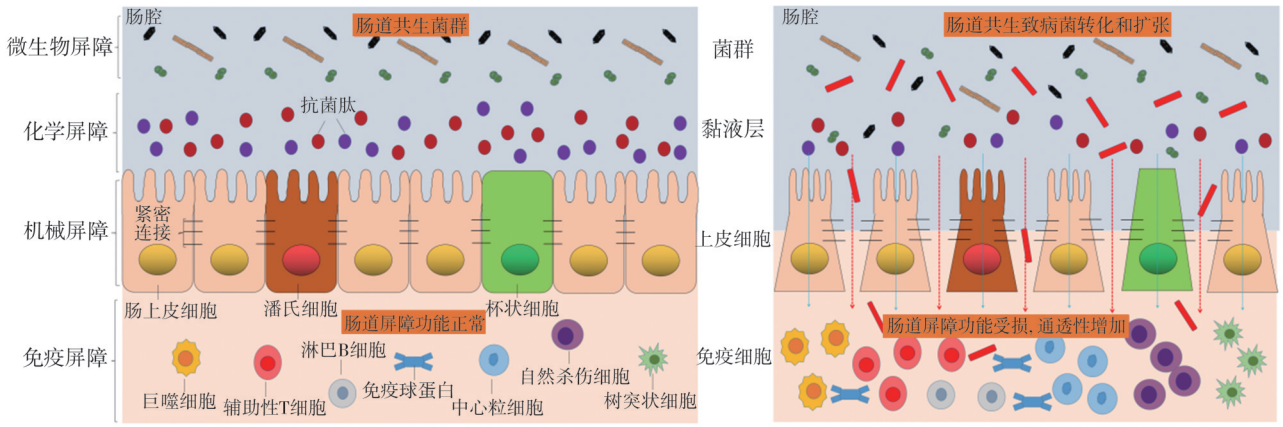


图1　肠道屏障的组成及屏障功能受损后的病理改变

有大量研究表明，肠道屏障功能受损与多种疾病（如自身免疫性疾病、炎症性肠病、1型糖尿病、乳糜泻、多发性硬化症、自闭症谱系障碍、帕金森病、阿尔茨海默病等）的发生发展密切相关，这些疾病不仅占用了大量的医疗资源，还严重影响患者的生活质量，给患者带来沉重的经济负担[3,6-9]。因此，及时、准确、客观地评估肠道屏障功能受损情况，对于疾病的诊断和治疗具有重要意义。

2　体内肠道屏障功能评估技术

2.1　分子探针

目前，分子探针是较为传统的评估肠道屏障功能的方法，它主要从细胞旁途径检测肠道通透性以评估肠道屏障功能，其具有简单、可靠、无创的特点。糖分子探针、同位素探针、聚乙二醇类探针、荧光探针和酚红探针是目前常用的5类分子探针。不同的分子探针反映不同肠段肠道通透性的改变，其分子探针的分类及特点等相关信息，见表1。

2.2　细菌相关标志物

2.2.1　内毒素脂多糖　内毒素脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）是位于革兰阴性细菌外膜中的10~20 kD蛋白质，主要通过跨细胞途径转运穿过上皮，当肠道屏障功能受损时，肠道通透性增高，细菌内毒素（如LPS）可以被转移到循环系统中，增加机体血清中LPS水平。因此，LPS血清水平被认为是肠道通透性增加的潜在标志[18]。但是血液中LPS检测的方法多种多样，检测结果之间可能存在很大的差异[19]，不同方法和个体的LPS水平差异很大，很难解释检测到的LPS的意义[20]。因此，在进行肠屏障功能紊乱的检测时，LPS最好与其他肠道通透性标志物联合使用。

2.2.2　LPS结合蛋白　LPS结合蛋白（lipopolysaccharide binding protein，LBP）是1种急性期蛋白，由肝细胞、脂肪组织和肠细胞产生，并在血流中释放。LBP与革兰阴性菌的外膜结合，被认为是内毒素血症的标志物和肠道通透性增加的生物标志物[21]。相较于LPS，LBP更好测量。在急性和慢性疾病中，循环LBP水平存在不同，且容易受到饮食和感染的影响，为了提高可靠性，常需要反复测量血浆LBP[22]。虽然LBP比LPS更稳定，但LPB水平升高仅表明血液中发生了针对LPS的免疫反应，仍然无法判断体内的LPS的来源。

2.2.3　D-乳酸　D-乳酸是肠道固有细菌的发酵产物，哺乳动物机体的其他组织均不产生D-乳酸，所以血浆中的D-乳酸基本上来源于肠道。在健康个体中D-乳酸水平很低，但在肠屏障功能丧失的情况下，细胞旁路径增加导致肠道通透性增加，肠道中大量D-乳酸通过受损黏膜进入血液循环，导致血中D-乳酸水平增高[23]，因此，血中D-乳酸水平可及时反映肠黏膜损害程度和肠道通透性变化[24]。然而，D-乳酸的特异性较低，其含量的增加也可能与胃肠道中细菌数量的增加有关。因为细菌的增加可能导致未消化的碳水化合物发酵为D-乳酸，导致其含量的增加，当存在细菌过度生长时，应谨慎解释结果。

2.2.4　血清二胺氧化酶　血清二胺氧化酶（diamine oxidase，DAO）是1种位于肠黏膜上的细胞内酶，具有高度的活性。大部分的DAO存在于小肠的黏膜及绒毛上皮细胞内[25]，因此，血液中的DAO可以反映小肠的功能及结构状况[26]。正常情况下，DAO在血清中含量极低，当肠黏膜屏障功能受损时，DAO的释放大量增加，DAO进入细胞外空间、淋巴管和血流，从而提高了血清DAO的水平[27-28]。血清中的DAO活性与肠通透性呈负相关，因此，通过测定血清中的DAO水平可以反映肠黏膜损伤程度。目前，临床上常用DAO活性的测定用于评估克罗恩病、溃疡性结肠炎或急性淋巴细胞白血病患者的肠道通透性。该检测方法具有经济、便捷、重复性好、结果稳定等优点，但也存在一定的弊端，如易受溶血因素影响。考虑到使用商业试剂盒用酶免疫测定法可以很容易地测量血清DAO活性，因此它可能成为未来评估肠道疾病患者肠通透性的一种方便方法。

2.2.5　结肠内黏液细菌　结肠中存在一种黏液层，这层黏液由杯状细胞中产生，可以有效的将肠道寄生菌与肠黏膜上皮细胞分开[29]。正常情况下细菌无法穿透结肠黏膜表面存在的黏液层，但在肠道屏障受损的情况下，管腔细菌进入结肠内黏液[29]。因此，测量活组织检查的结肠内黏液中的细菌可以作为肠屏障功能和通透性的新标志物。在临床中这种检查需要肠镜辅助，具有一定的侵入性、其标准化也限制了其临床应用。与传统的肠道通透性检测相比，细菌相关的标志物作为人类肠道通透性的标志物的研究相对较少，检测方

表1 分子探针的分类及特点

探针分类	代表分子	体内/体外	方法	部位	样本	标志物水平	优缺点	参考文献
糖分子探针	蔗糖、葡萄糖	体内	利用质谱进行双糖定量	胃及十二指肠	尿液	↑	优点：非侵入性、无创伤、快速、准确、重复性好	Vanuytsel T等[10]
	乳果糖、甘露醇、L-鼠李糖	体内	利用质谱进行双糖定量	小肠	尿液	↑	缺点：易受胃肠运动、胃肠黏膜血流量、干扰药物的使用和肾功能等因素影响	Odenwald MA等[11]
	三氯蔗糖、赤藓糖醇	体内	利用质谱进行双糖定量	整个胃肠道	尿液	↑		Bischoff SC等[12]
同位素探针	51 cr-EDTA	体内	51cr-EDTA同位素活性	全肠	尿液	↑	优点：与糖分子探针相比，同位素探针受细菌降解的影响很小，更省时且易于重复 缺点：具有一定的放射性	Odenwald MA等[13]
	99mTc-DTPA	体内	99mTc-DTPA同位素活性	全肠	尿液	↑		Vancamelbeke M等[14]
PEGs探针	PEG4000/400 kDa	体内	利用质谱定量	全肠	尿液	↑	优点：操作简单，方便，重复性好 缺点：检测较耗时，无法用于快速诊断；其兼有水溶性和脂溶性的特性，在肠道吸收时容易受肠道渗透压的影响	Schoultz I等[2]
荧光探针	FITC-dextran	体内或体外	荧光显微镜或流式细胞术	全肠	血清	↑	优点：具有良好的水溶性和稳定性，标记方式简单，易于操作，成本也相对较低	Gilani S等[15]
	荧光黄	体内或体外	荧光显微镜	全肠	血清	↑	缺点：不能准确评估肠屏障功能障碍的位置	Liebe H等[16]
酚红探针	酚红	体内或体外	反相高效液相色谱结合紫外线	全肠	尿液	↑	优点：可在体外环境下结合Caco-2细胞来进行肠道通透性的检测 缺点：体内实验多用于测定各种药物的肠道通透性	Soyseven M等[17]

法有待更加标准化。细菌相关标志物可能反映肠道屏障的不同特征，可在未来相关研究中进一步深入。

2.3 上皮细胞损伤生物标志物

2.3.1 瓜氨酸 瓜氨酸是由小肠细胞产生的以谷氨酰胺为前体的1种不与蛋白质结合的氨基酸，合成后通过肠上皮细胞基底膜释放并进入门静脉[30]，但不经肝脏代谢，大部分在进入体循环后被近端肾小管上皮细胞重吸收并转化为精氨酸，血浆瓜氨酸水平取决于肠上皮细胞合成效率[31]。血清瓜氨酸已成为评估小肠质量和表面积的有价值的生物标志物，血清瓜氨酸水平越低，肠道上皮损伤越重[31]。因此，测定循环瓜氨酸水平能够反映肠道上皮损伤的程度。由于瓜氨酸是1种非蛋白质氨基酸，血浆中的水平将取决于食物的吸收，因此，其结果易受饮食因素影响。还应该注意的是，肾功能对血液中瓜氨酸的浓度有很大的影响，在中度肾损害患者中发现瓜氨酸水平升高，因此在测定瓜氨酸期间应监测肌酐浓度。

2.3.2 脂肪酸结合蛋白 脂肪酸结合蛋白（fatty acid-binding protein，FABP）是1种存在于小肠和大肠的成熟肠细胞中的小细胞质蛋白。FABP根据起源组织不同分为3种类型：肝脏、肾脏和肠道中存在的脂肪酸结合蛋白，回肠中存在的胆汁酸结合蛋白，以及主要存在于空肠中的肠道脂肪酸结合蛋白（intestinal fatty acid-binding protein，I-FABP）。I-FABP是从肠道中分离出来的低分子量胞液蛋白，由于其分子量低且溶解度相对较好，当肠上皮膜受损时，I-FABP容易释放到血液中，并被肾脏迅速清除，它可以在尿液或血浆中测量[32]。I-FABP的生理水平反映了肠上皮细胞的交换率，而I-FABP水平升高可能表明肠屏障受损。因此，I-FABP已成为肠屏障功能障碍的潜在生物标志物。大量研究表明，在患有肠缺血、全身性发炎反应综合征或坏死性小肠结肠炎的人群中发现尿液中I-FABP水平升高[33]。由于FABP的多样性取决于它们起源的组织，测量尿液和/或血浆中的单个蛋白质可以成为定位组织损伤的有价值的工具。目前已有的检测血清或尿液中I-FABP的试剂盒可望在人类肠道疾病中得到更广泛的应用。

2.3.3 谷胱甘肽S转移酶 谷胱甘肽S-转移酶（glutathione S-transferase，GST）是1种胞质酶的家族，包括αGST、μGST、πGST和θGST，其中αGST在肠道内广泛分布，通过与谷胱甘肽结合而参与细胞保护、抗氧化和细胞内有毒和外来化合物的解毒。当细胞膜被破坏时，它参与排毒并从多种细胞中释放出来。监测血浆GST浓度可以评估肠道损伤及其严重程

度[34]，因此，αGST已被提议作为肠上皮细胞损伤的标志物。但是，αGST不仅存在于肠中，还在肝脏、肾脏的上皮细胞中均有表达，因此，血浆或尿液中αGST水平升高可提示肠损伤以及肝和肾损伤。所以αGST作为肠道屏障损伤的标志物的1个缺点是其特异性低，并且只有在消除了其他疾病的情况下才有用。

2.4 其他生物标志物

2.4.1 粪钙卫蛋白 粪钙卫蛋白（calprotectin，CP）是肠道黏膜上皮细胞上的1种蛋白质，正常情况下只存在于肠道内中性粒细胞胞质中，不应该进入血液循环系统。如果粪钙卫蛋白浓度升高，说明肠道屏障受损，肠道通透性增加，允许有害物质和细菌穿过屏障进入血液循环系统，引发炎症反应和免疫反应。许多研究已经确定粪钙卫蛋白是肠道炎症的敏感标志物[35]。在临床中，粪便钙卫蛋白检测可用于诊断坏死性肠炎，区分炎症性肠病和肠易激综合征，还可用于监测炎症性肠病治疗和评估治疗反应[36]。粪钙卫蛋白成分较为稳定，有较好的耐热性，不易被细菌和各种酶类破坏，还具有检测无创、患者接受程度高和操作方便等多种优点[37]。

2.4.2 α1-抗胰蛋白酶 α1-抗胰蛋白酶（alpha-1-antitrypsin，AAT）是1种常见的丝氨酸蛋白酶抑制剂，相对分子质量为51.8 kD，主要是由肝脏合成，具有抗蛋白酶活性，可不在胃肠道内发生蛋白质水解并以完整结构出现在粪便中。在急性炎症期间，AAT的浓度可能增加很多倍，当AAT从血液进入肠腔时，由于肠黏膜的炎症和溃疡以及肠通透性的增加，可在粪便中检测到高浓度的AAT。因此，粪便AAT含量表明损失蛋白质进入肠腔，用作肠道蛋白损失的标志物[38]，可反映肠黏膜屏障破坏程度，已被公认为肠道通透性的标志。有一种商业试剂盒可以测量粪便AAT，研究人员正在探索这种检测方法的应用，尤其是在患有肠道疾病的婴儿中[39]。该检测操作简单、方便，但无疾病特异性。

2.4.3 连蛋白 连蛋白是1种在肠道和肝细胞中合成的蛋白质，是人内源性细菌肠毒素闭环带毒素的类似物，通过分解肠上皮中的紧密连接蛋白复合物来调节肠通透性。连蛋白从肠中释放，可在血液样品中测量，血清连蛋白与肠通透性增加相关，是最早被用于肠道通透性血液检测的生物标志物，其水平升高与乳糜泻和肥胖等疾病密切相关[40]。尽管血清连蛋白在人类疾病中的应用还需要进一步的研究，但连蛋白在调节肠道通透性方面的重要作用已经确立，并将在未来的应用中具有很大的前景。

2.5 肠黏膜组织学观察

通过光镜、电镜、共聚焦激光显微内镜等直接观察肠黏膜组织的微细结构及其损伤程度，是评估肠道屏障功能最直接的方法。

光镜可观察绒毛长度、隐窝数量及深度、炎症浸润、杯状细胞的数量及糖胺聚糖的改变等情况，结合相应的指标给出病理评分，以判断肠黏膜损伤的程度[41-42]。电镜可观察上皮细胞间隙、细胞间紧密连接蛋白的结构，上皮细胞内线粒体的密度、细胞器结构改变，杯状细胞的大小和密度等[43-45]。以上这些指标可以从超微结构水平反映肠道黏膜屏障的损伤情况，在一定程度上可以反映肠黏膜屏障的通透性。

共聚焦激光显微内窥镜检查（confocal laser endomicroscopy，CLE）是一种新型内窥镜成像工具，具有复杂的高分辨率技术，通过将共聚焦激光显微镜整合到传统内窥镜的远端，突出消化道上皮细胞结构的异常，可实现肠道黏膜变化的可视化，在检查过程中，使用激光束产生488 nm的激发波，它可以穿透250 μm的黏膜，获得7 μm的光学切片，相当于活体组织学图像，激光束指向组织表面，光被反射到透镜上，然后透镜通过1个水平孔在同一平面上重新聚焦，产生放大图像高达1 000倍，图像可以以数字方式存储[46]。CLE检查时静脉注射或局部喷洒荧光剂，可突出黏膜某些成分，提高实时“光学活检”的灵敏度。肠屏障受损，肠上皮细胞之间的间隙的增强，荧光素渗漏到肠腔中，激光共聚焦探针能直接可视化[46]。通过检测肠上皮内淋巴细胞密度、上皮破裂、腔荧光素渗漏、肠细胞之间存在的荧光素量、紧密连接状态以及绒毛间隙变宽来评价肠屏障破坏的程度[46]。

肠黏膜组织的组织学评估方法可以评估肠道黏膜结构变化的信息，以上所有评估方法需要取肠道活组织，有一定的侵入性，使其在临床上应用相对较少，更多地应用于基础研究。与标准组织学相比，虽然CLE具有动态分析肠屏障功能和形态特征的优势，但因其视野小、成本及技术要求较高，也限制了它的应用。

3 体外肠道屏障功能评估技术

3.1 尤斯室

尤斯室于1951年首次被描述，其通过模拟体内生理环境来测量离子、营养物质和药物等在各种上皮组织中的转运[47]。尤斯室系统由2个半室组成，2个半室中间有1个样本夹可夹持固定组织样本，使得组织的两边分别面对2个半室。在这种结构中，2个半室之间的交流都要通过组织进行的。通过测量探针（异硫氰酸荧光素标记葡聚糖、辣根过氧化物酶等）通过率或经上皮电阻值/细胞跨膜电阻值来检测肠道通透性，高探针通过率和低经上皮电阻值/细胞跨膜电阻值表明通透性增加[48]。尤斯室被广泛用于人体和动物实验的体外研究，是目前较先进的一种评估肠道屏障功能的方法，其主要优点是能够测量胃肠道特定区域的通透性和离子运输，标记的细菌或抗原可以用作生物学相关的探针，可以通过在腔室或单层的顶端侧添加拮抗剂或激动剂来进行机制研究。因其需要活组织检查或手术取肠道组织标本，具有一定侵入性。然而，值得注意的是，活检组织从机体移除后，缺乏与神经和管腔内容物的接触，可能无法反映体内过程的复杂性，所以其并不能完全反映肠屏障功能[49]。此外，活检组织细胞在实验过程中的存活时间受到质疑，细胞培养条件的差异也可能导致数据的显著差异，使研究之间的比较变得困难[49]。

3.2 体外细胞培养

目前常用Caco-2细胞系、T84细胞系、SK-CO15细胞系、HT-29细胞系等体外细胞培养作为评估肠黏膜通透性模型。

Caco-2表达了运输细胞特性，母体细胞系起源于结肠，由人类结肠腺癌发展而来，是研究肠屏障功能时最常用的细胞系之一。虽然是结肠起源，细胞自发分化成一个极化单层

表达肠细胞的几个形态和功能特征。因此，该细胞系具有小肠的共同特征。Caco-2 细胞系提供了小肠上皮模型，可用于研究上皮-颗粒/细菌/探针的相互作用及其对肠道通透性的影响[50]。

与 Caco-2 类似，T84 细胞系也起源于结肠，来源于结直肠腺癌的肺转移。细胞系自发分化为单层，融合后呈现结构和功能成熟的吸收性上皮细胞[51]。然而，与 Caco-2 细胞系相反，T84 细胞在整个分化过程中并没有获得小肠特征，而是保留了许多原有的结肠特征。因此，与 Caco-2 相比，T84 细胞系是研究结肠屏障功能的更好模型。

SK-CO15 细胞系来源于人结肠腺癌，在不渗透细胞培养支架上培养时形成紧密极化上皮，具有顶端连接复合物和圆顶。SK-CO15 细胞系类似于结肠上皮，缺乏常见的小肠分化标志物。目前，SK-CO15 细胞已被用于研究乙醇诱导的结肠屏障破坏[52]，以及通过黏附和紧密连接研究结肠肠屏障功能的调节[53]。

HT29 细胞属于异质性腺癌细胞系，在分化时呈现小肠结构。黏液层是肠屏障的重要组成部分，由于 HT29 细胞能够产生黏液，因此它被广泛用作研究共生菌和致病菌对宿主细胞黏附的模型。HT29 克隆来源于 HT29 的单细胞，并在葡萄糖中的标准条件下自发极化，并显示出通透性研究的重要特征，如微绒毛、紧密连接和高跨膜电阻。因此，这种特定的克隆可以作为一种替代方案，用于模拟肠道屏障[54-55]。

单独的细胞系可视为肠上皮的简单模型，其缺乏与免疫细胞的接触以及来自神经和腔内刺激的信号，因此无法完全模拟正常的肠道内状态，这对肠屏障功能的研究有很大影响。为了建立更真实的体外模型来模拟肠道内的环境，可以建立几种细胞系共培养模型，甚至三重培养模型[56]。

3.3 肠道类器官

为了更准确地模拟体内肠道的结构和微环境，肠道类器官应运而生。肠道类器官模型整合了三维细胞培养技术和干细胞生物学的优势以模拟肠道细胞形态。肠道类器官来源于诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cells，iPSCs）。与类肠一样，iPSCs 衍生的类肠器官在富含生长因子的培养基存在的细胞外支持基质中生长，由此产生的类肠器官具有与类肠相似的形态[57]。由于 iPSCs 衍生的肠类器官保留了肠细胞的特异性和功能，因此肠类器官成为了以活检组织为基础的研究肠道通透性的可行替代方法。目前，多用 Lgr5+干细胞培养出具有完整肠道上皮结构的球状 3D 肠道类器官，其内部为空心，包括了所有种类的肠上皮功能细胞（包括肠上皮的吸收性肠上皮细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞、簇状细胞和 M 细胞），使肠类器官成为研究肠屏障功能的一个非常重要的新模型，该模型与 transwell 系统结合，以促进宿主-微生物相互作用及肠道屏障的功能研究[58-59]。此外，还有研究在肠道类器官中使用离体尤斯室对肠道屏障进行了深入的研究[60-61]。肠道类器官是研究肠道和肠道屏障功能的一个新模型，它在一定程度上代表了体内上皮细胞的复杂性和患者之间的异质性[62]。肠道类器官在技术操作上比细胞系要求更高，目前研究相对较少，其研究技术还有待进一步深入发展。

4 结语与展望

肠道屏障构成机体外部环境和内部环境之间的界面，对机体健康至关重要。肠道屏障功能损伤可使肠道内菌群移位、内毒素吸收，导致多种慢性病症[2]的发生，其损伤程度的轻重往往与疾病的病情和预后密切相关。肠道通透性是肠道屏障的一种功能特征，其增高是肠道屏障功能受损的标志，因此，监测肠道屏障功能损伤情况对于疾病的诊断和治疗具有重要意义。目前，用于检测肠道通透性的方法较多，本研究对其具体运用及未来研究方向进行了如下探讨。

分子探针类检测方法都是非侵入性的，耗时较长，可允许动物在实验后进行其他实验指标的检测。然而，因其检测样本为尿液，实验中需要专门的设备（如代谢笼）来精确收集动物的尿液。虽然使用不同的探针可以明确屏障损伤（即小肠与大肠）的总体位置，但很难确定其确切位置。值得注意的是，胃肠道运动、血流量、肾功能、微生物组成等会影响探针的吸收和药代动力学，并影响体内检测结果。因此，特别是在基础动物研究中，不建议单独使用这些检测方法，可以结合其他可能的体外或离体方法。此外，由于没有标准化的检测方案，研究之间存在巨大差异，很难进行比较研究。在今后的研究中，研究者可以将使用的探针、测试持续时间和禁食时间都保持一致，尽量减少一些混杂因素，这样可以帮助减少研究间的差异。

生物标志物的检测因其不需要事先给药，相对来说更节省时间。大多数生物标志物检测方法相对简单，可使用酶联免疫吸附法检测。然而，这些生物标志物与慢性疾病中大分子的功能通透性之间的相关性尚未得到很好的验证，这可能是未来研究的一个主要领域。迄今为止，大部分生物标志物的评估仅限于检测急性肠道损伤，而这些方法是否可以作为慢性疾病中肠通透性增加的可靠标志物，或作为屏障靶向治疗的临床终点，还有待检验。组织学检查需要取肠道活组织，有一定的侵入性，临床上需结合内镜检查，在一定程度上限制了其应用，目前更多用于基础研究。新的成像技术，如 CLE 可实现肠道黏膜变化的可视化，为在体评估肠道上皮屏障变化提供了可能[46]，甚至还可以预测内镜检查结果正常的炎症性肠病患者的复发[63-64]。

与体内方法相比，体外技术为研究人体肠道屏障和个体细胞的机械过程提供了可能性。传统的细胞单层系统通常用于跨肠腔的药物渗透性的高通量评估，然而，因其缺乏药物代谢酶，这限制了它们的应用。尤斯室系统利用新鲜分离的人类肠道组织片段，有效地维持药物代谢酶和转运蛋白的表达和功能，从而能够更全面地评估肠道吸收。然而，该系统仍有一些局限性，如切除组织的生存能力相对较弱，并且需要多个供体样本来解释个体间和实验间的差异，这限制了其在常规药物筛选中的应用。与 Caco-2 细胞等传统模型相比，肠道类器官以更接近体内条件的方式更好地复制器官功能，更好地模拟了人体肠道中药代动力学相关因子的表达和功能。该系统克服了尤斯室系统的主要局限性，为常规药物筛选和候选药物选择方面提供了巨大的前景[65]。然而，肠道类器官维护的成本较高和技术也较为复杂，目前研究相对较

少，缺乏全面的研究数据，未来需要进一步的研究来评估该系统运输/代谢活性的内在个体间变化的能力。此外，该系统有望成为研究肠道药物吸收物种差异的有价值工具，需要在这方面进行进一步的研究。

目前，许多研究通常单独采用一种方法来测量肠道通透性。虽然在临床实践中可能存在一定的困难，但仍建议多种方法联合使用，如功能成像方法与生物标志物分析相结合。在基础研究中，用体外方法或形态学分析补充体内功能检测结果，可以加强数据的可靠性并为机制研究提供线索。当使用和解释得当，肠通透性检测可以为研究人员提供有关肠道屏障完整性状态及靶向治疗的依据。未来的研究还可以从以下几方面着手：①努力使临床检测标准化，混杂因素最小化；②验证通透性生物标志物与慢性疾病中大分子的功能通透性之间的相关性，并将其与体内大分子转运进行关联，可能开发疾病治疗的靶点；③对肠道通透性检测与预测疾病复发方面进行相关性研究，可能为疾病防治提供一定依据。

参 考 文 献

[1] Stalla FM, Astegiano M, Ribaldone DG, et al. The small intestine: barrier, permeability and microbiota[J]. Minerva Gastroenterol, 2022, 68(1): 98-110.

[2] Schoultz I, Keita ÅV. The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability[J]. Cells, 2020, 9(8): 1909.

[3] Martel J, Chang SH, Ko YF, et al. Gut barrier disruption and chronic disease[J]. Trends Endocrinol Metab, 2022, 33(4): 247-265.

[4] González-González M, Díaz-Zepeda C, Eyzaguirre-Velásquez J, et al. Investigating gut permeability in animal models of disease[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1962.

[5] Drabińska N, Jarocka-Cyrta E. Crosstalk between resveratrol and gut barrier: a review[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15279.

[6] Citi S. Intestinal barriers protect against disease[J]. Science, 2018, 359(6380): 1097-1098.

[7] Pellegrini C, Fornai M, D'Antongiovanni V, et al. The intestinal barrier in disorders of the central nervous system[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(1): 66-80.

[8] di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal barrier in human health and disease[J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(23): 12836.

[9] Santilli A, Stefanopoulos S, Cresci GAM. The gut barrier and chronic diseases[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2022, 25(3): 178-185.

[10] Vanuytsel T, Tack J, Farre R. The role of intestinal permeability in gastrointestinal disorders and current methods of evaluation[J]. Front Nutr, 2021, 8: 717925.

[11] Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat?[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013, 11(9): 1075-1083.

[12] Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability: a new target for disease prevention and therapy[J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 189.

[13] Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(1): 9-21.

[14] Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 11(9): 821-834.

[15] Gilani S, Howarth GS, Kitessa SM, et al. New biomarkers for increased intestinal permeability induced by dextran sodium sulphate and fasting in chickens[J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 2017, 101(5): e237-e245.

[16] Liebe H, Schlegel C, Cai X, et al. Determining Intestinal Permeability using *Lucifer* Yellow in an Apical-Out Enteroid Model[J]. J Vis Exp, 2022(185): e64215.

[17] Soyseven M, Kaynak MS, Çelebier M, et al. Development of a RP-HPLC method for simultaneous determination of reference markers used for *in situ* rat intestinal permeability studies[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1147: 122150.

[18] Hollander D, Kaunitz JD. The "leaky gut": tight junctions but loose associations?[J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(5): 1277-1287.

[19] Munford RS. Endotoxemia-menace, marker, or mistake?[J]. J Leukoc Biol, 2016, 100(4): 687-698.

[20] Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. Chasing a ghost?: issues with the determination of circulating levels of endotoxin in human blood[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2016, 53(3): 197-215.

[21] Vanslembrouck B, Chen JH, Larabell C, et al. Microscopic visualization of cell-cell adhesion complexes at micro and nanoscale[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 819534.

[22] Citronberg JS, Wilkens LR, Lim U, et al. Reliability of plasma lipopolysaccharide-binding protein (LBP) from repeated measures in healthy adults[J]. Cancer Causes Control, 2016, 27(9): 1163-1166.

[23] Vemuri R, Gundamaraju R, Eri R. Role of lactic acid probiotic bacteria in IBD[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(16): 2352-2355.

[24] Remund B, Yilmaz B, Sokollik C. D-lactate: implications for gastrointestinal diseases[J]. Children, 2023, 10(6): 945.

[25] Fukuda T, Tsukano K, Nakatsuji H, et al. Plasma diamine oxidase activity decline with diarrhea severity in calves indicating systemic dysfunction related to intestinal mucosal damage[J]. Res Vet Sci, 2019, 126: 127-130.

[26] Cai JR, Chen H, Weng ML, et al. Diagnostic and clinical significance of serum levels of D-lactate and diamine oxidase in patients with Crohn's disease[J]. Gastroenterol Res Pract, 2019, 2019: 8536952.

[27] Izquierdo-Casas J, Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, et al. Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine[J]. J Physiol Biochem, 2018, 74(1): 93-99.

[28] Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: shaping our immune responses throughout life[J]. Tissue Barriers, 2017, 5(4): e1373208.

[29] Johansson ME, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis[J]. Gut, 2014, 63(2): 281-291.

[30] Maric S, Flüchter P, Guglielmetti LC, et al. Plasma citrulline correlates with basolateral amino acid transporter LAT4 expression in human small intestine[J]. Clin Nutr, 2021, 40(4): 2244-2251.

[31] Curis E, Nicolis I, Moinard C, et al. Almost all about citrulline in mammals[J]. Amino Acids, 2005, 29(3): 177-205.

[32] Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 312(3): G171-G193.

[33] Derikx JP, Blijlevens NM, Donnelly JP, et al. Loss of enterocyte

mass is accompanied by diminished turnover of enterocytes after myeloablative therapy in haematopoietic stem-cell transplant recipients[J]. Ann Oncol, 2009, 20(2): 337-342.

[34] Grootjans J, Thuijls G, Verdam F, et al. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut[J]. World J Gastrointest Surg, 2010, 2(3): 61-69.

[35] Malcomson FC, Willis ND, McCallum I, et al. Effects of supplementation with nondigestible carbohydrates on fecal calprotectin and on epigenetic regulation of SFRP1 expression in the large-bowel mucosa of healthy individuals[J]. Am J Clin Nutr, 2017, 105(2): 400-410.

[36] D'Amico F, Nancey S, Danese S, et al. A practical guide for faecal calprotectin measurement: myths and realities[J]. J Crohns Colitis, 2021, 15(1): 152-161.

[37] Damms A, Bischoff SC. Validation and clinical significance of a new calprotectin rapid test for the diagnosis of gastrointestinal diseases [J]. Int J Colorectal Dis, 2008, 23(10): 985-992.

[38] Schwiertz A, Spiegel J, Dillmann U, et al. Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2018, 50: 104-107.

[39] Kosek M, Haque R, Lima A, et al. Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants[J]. Am J Trop Med Hyg, 2013, 88(2): 390-396.

[40] Ajamian M, Steer D, Rosella G, et al. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: may not be what it seems[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210728.

[41] Zhang C, Zhu HP, Jie H, et al. Arbutin ameliorated ulcerative colitis of mice induced by dextran sodium sulfate (DSS) [J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 11707-11715.

[42] Wang JL, Han X, Li JX, et al. Differential analysis of intestinal microbiota and metabolites in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(43): 6109-6130.

[43] Cabinian A, Sinsimer D, Tang M, et al. Gut symbiotic microbes imprint intestinal immune cells with the innate receptor SLAMF4 which contributes to gut immune protection against enteric pathogens[J]. Gut, 2018, 67(5): 847-859.

[44] Cortez V, Boyd DF, Crawford JC, et al. Astrovirus infects actively secreting goblet cells and alters the gut mucus barrier[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2097.

[45] Rusticeanu M, Zimmer V, Lammert F. Visualising and quantifying intestinal permeability-where do we stand[J]. Ann Hepatol, 2021, 23: 100266.

[46] Chiriac S, Sfarti CV, Minea H, et al. Impaired intestinal permeability assessed by confocal laser endomicroscopy-a new potential therapeutic target in inflammatory bowel disease[J]. Diagnostics, 2023, 13 (7): 1230.

[47] Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin[J]. Acta Physiol Scand, 1951, 23(2/3): 110-127.

[48] Biskou O, Jauregi-Miguel A. Measuring intestinal permeability in celiac disease *ex vivo* , using Ussing chambers[J]. Methods Cell Biol, 2023, 179: 21-38.

[49] Galipeau HJ, Verdu EF. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science[J]. Neurogastroenterol Motil, 2016, 28(7): 957-965.

[50] Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, et al. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers[J]. Gut, 2010, 59(10): 1331-1339.

[51] Devriese S, van den Bossche L, van Welden S, et al. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes[J]. Histochem Cell Biol, 2017, 148(1): 85-93.

[52] Chopyk DM, Kumar P, Raeman R, et al. Dysregulation of junctional adhesion molecule-a contributes to ethanol-induced barrier disruption in intestinal epithelial cell monolayers[J]. Physiol Rep, 2017, 5 (23): e13541.

[53] Naydenov NG, Brown B, Harris G, et al. A membrane fusion protein αSNAP is a novel regulator of epithelial apical junctions[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34320.

[54] Sun L, Cao XL, Lechuga S, et al. A septin cytoskeleton-targeting small molecule, forchlorfenuron, inhibits epithelial migration via septin-independent perturbation of cellular signaling[J]. Cells, 2019, 9(1): 84.

[55] Wang DD, Naydenov NG, Feygin A, et al. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 have unique and overlapping functions in regulating intestinal epithelial junctions and mucosal inflammation[J]. Am J Pathol, 2016, 186(4): 844-858.

[56] Dosh RH, Jordan-Mahy N, Sammon C, et al. Tissue engineering laboratory models of the small intestine[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2018, 24(2): 98-111.

[57] Rahmani S, Breyner NM, Su HM, et al. Intestinal organoids: a new paradigm for engineering intestinal epithelium *in vitro*[J]. Biomaterials, 2019, 194: 195-214.

[58] 林晓宇，李　琛，张婷，等. 肝硬化门静脉高压症患者肠壁屏障功能的改变及其与易发感染的关系[J]. 中华肝脏病杂志，2023，31 (1)：70-76.

Lin XY, Li C, Zhang T, et al. Changes of intestinal wall barrier function and its correlation with susceptibility to infection in patients with cirrhotic portal hypertension[J]. Chin J Hepatol, 2023, 31(1): 70-76.

[59] Holthaus D, Kraft MR, Krug SM, et al. Dissection of barrier dysfunction in organoid-derived human intestinal epithelia induced by *Giardia* duodenalis[J]. Gastroenterology, 2022, 162(3): 844-858.

[60] Tse CM, In JG, Yin JY, et al. Enterohemorrhagic E. *coli* (EHEC) -secreted serine protease EspP stimulates electrogenic ion transport in human colonoid monolayers[J]. Toxins, 2018, 10(9): 351.

[61] Moorefield EC, Blue RE, Quinney NL, et al. Generation of renewable mouse intestinal epithelial cell monolayers and organoids for functional analyses[J]. BMC Cell Biol, 2018, 19(1): 15.

[62] van Dooremalen WTM, Derksen M, Roos JL, et al. Organoid-derived epithelial monolayer: a clinically relevant *in vitro* model for intestinal barrier function[J]. J Vis Exp, 2021(173): e6207.

[63] Santacroce G, Zammarchi I, Tan CK, et al. Present and future of endoscopy precision for inflammatory bowel disease[J]. Dig Endosc, 2024, 36(3): 292-304.

[64] Sturm A, Maaser C, Calabrese E, et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects[J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(3): 273-284.

[65] Michiba K, Watanabe K, Imaoka T, et al. Recent advances in the gastrointestinal complex *in vitro* model for ADME studies[J]. Pharmaceutics, 2023, 16(1): 37.

（责任编辑：曾　玲）

本文引用格式：

罗芳丽，孙路强，王司琦，等. 肠道屏障功能评估技术的研究进展[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(1)：23-29.