

Zonulin介导的肠道微生物对肠上皮细胞屏障功能的调节

杜维霞 沈名扬 艾 青 韦 红*

(重庆医科大学附属儿童医院, 重庆 400014)

摘要 利用Caco-2肠上皮细胞单层屏障模型研究四种肠道微生物对肠道屏障的影响。实验设置空白对照组(control)、大肠埃希菌组(Eco)、肺炎克雷伯菌组(Kpn)、粪肠球菌组(Efa)、乳酸杆菌组(Lac)。加入各组细菌共培养, 结果表明大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌均引起单层细胞跨膜电阻值(transepithelial electrical resistance, TEER)明显下降($P<0.001$); Eco组、Kpn组作用后细胞释放zonulin蛋白增加($P<0.01$), Efa组作用于Caco-2细胞单层后, zonulin释放量较对照组升高, 但差异无统计学意义($P>0.05$); Eco组、Kpn组三种紧密连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1表达明显减少, Efa组、Lac组occludin、claudin-1表达与空白对照组相比无明显变化, 胞浆蛋白ZO-1表达降低; 细菌与细胞共培养6 h后免疫荧光观察紧密连接蛋白分布情况, Eco组、Kpn组可见荧光强度减弱, 荧光不连续, 甚至有缺口及裂隙, Efa组、Lac组荧光强度稍减弱, 但仍沿胞膜分布, 条带较清晰, 与空白对照组差异不明显。肠道四种微生物中大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌可能通过zonulin途径降低紧密连接蛋白表达、改变蛋白分布, 最终导致肠道屏障功能受损, 益生菌对肠道屏障无损伤作用。

关键词 Caco-2细胞; 紧密连接; zonulin; 肠道屏障

Regulation of Intestinal Epithelial Barrier Function by Different Microorganisms: the Role of Zonulin

Du Weixia, Shen Mingyang, Ai Qing, Wei Hong*

(Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract In this research, we investigated the effect of four intestinal microorganisms on Caco-2 monolayers and the role of zonulin in this process. This experiment was divided into five groups: control group, *Escherichia coli* group (Eco), *Klebsiella pneumoniae* group (Kpn), *Enterococcus faecalis* group (Efa) and Lactobacilli (Lac) group. After co-culturing with the four bacterias, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* impaired Caco-2 epithelial barrier function in a time-dependent manner with a decrease in TEER. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* induced higher level of zonulin release ($P<0.01$) compared with that of control group. The expressions of tight junction proteins occludin, claudin-1 and zonula occluden-1 (ZO-1) were diminished and tight junction was destroyed and redistributed in *Escherichia coli* group and *Klebsiella pneumoniae* group. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* caused different degrees of barrier function loss, and barrier dysfunction was probably associated with elevated zonulin level, diminished and redistributed tight junction proteins.

Key words Caco-2; tight junction; zonulin; intestinal barrier

收稿日期: 2014-05-08 接受日期: 2014-06-16

国家自然科学基金(批准号: 30200300)和国家临床重点专科建设项目经费基金(批准号: 卫办医政[2011]873)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63633050, E-mail: waehong@sina.com

Received: May 8, 2014 Accepted: June 16, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30200300) and the National Key Clinical Specialties Construction Program of China (Grant No.[2011]873)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63633050, E-mail: waehong@sina.com

网络出版时间: 2014-09-10 16:35 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0158.html>

新生儿刚出生时肠道是无菌的, 出生后在外界环境、饮食等条件影响下逐步建立形成一个多功能、动态的微生态系统, 人体和这些微生物相互作用形成一个互惠互利的共生复合体^[1]。机体和肠道微生物间的动态平衡促进和维持人体的健康状态, 如果机体内环境改变引起平衡失调则导致各种疾病的发生发展。研究表明, 肠道菌群失调与肥胖、炎症性肠病、癌症、过敏以及新生儿坏死性小肠结肠炎等疾病相关^[2]。新生儿坏死性小肠结肠炎(neonatal necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期一种严重的消化道疾病, 易发生于早产儿, 病死率高, 其病因及发病机制至今仍不完全清楚。目前的观点认为, NEC是一种多因素所致疾病, 与遗传易感性、早产及低出生体重、人工喂养、肠道细菌异常定植有关^[3]。目前, 报道的与NEC相关细菌包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、凝固酶阴性葡萄球菌、肠球菌属等^[4-9]。临床实验证明, 益生菌可预防NEC发生, 减轻NEC疾病严重程度, 对NEC有较好的治疗效果^[10]。各种肠道致病菌作用机制研究很多, 但NEC相关肠道微生物对肠道细胞屏障的具体作用仍不清楚。Zonulin蛋白是近年来发现的一种蛋白, 作用于肠道上皮细胞间紧密连接快速、可逆调节肠道通透性, 是目前已知的唯一的肠道通透性的生理性调节蛋白^[11]。本研究利用Caco-2细胞建立肠上皮细胞单层屏障模型, 研究肠道微生物大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、乳酸杆菌对肠道屏障功能的影响, 以及zonulin、紧密连接蛋白在其中的作用, 为肠道菌群失衡相关疾病的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Caco-2细胞由第三军医大学高敏惠赠, 来自ATCC; 大肠杆菌(ATCC 25922)、肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)、粪肠球菌(ATCC 29212)由重庆医科大学儿童医院临床检验中心提供; 乳酸杆菌6005购于广州微生物菌种库。DMEM培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司, LB、MRS培养基购自青岛日水生物技术有限公司; Millicell悬挂式培养皿、Millicell-ERS电阻测定仪购于美国Millipore公司; Zonulin检测试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司; Occludin抗体、claudin-1抗体、ZO-1抗体购自美国Invitrogen公司, HRP标记二抗购自美

国Abcam公司, FITC标记二抗购自美国Invitrogen公司。

1.2 细胞培养

Caco-2细胞用DMEM培养基加入10%胎牛血清、50 U/mL青霉素、50 U/mL链霉素在5% CO₂ 37 °C培养箱中培养, 每2~3 d换液。当细胞生长至80%~90%融合时, 用0.25%胰酶加0.03% EDTA液消化细胞, 按1:3传代培养, 实验所用细胞在10~30代。将细胞按 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于Millicell悬挂式培养皿14 d后进行后续实验, 或接种于孔板、无菌玻片生长融合后进行后续实验。

1.3 细菌培养

按1%的比例接种于新鲜配制的LB或MRS液体培养基中, 置于37 °C恒温摇床200 r/min震荡12~20 h, 或厌氧罐(90% N₂+10% CO₂)培养48~72 h, 菌液测定D值后用无抗生素无血清的DMEM培养基调整浓度为 1×10^8 CFU/mL待用。

1.4 实验分组

实验分为5组, 即空白对照组(control)、大肠埃希菌组(Eco)、肺炎克雷伯菌组(Kpn)、粪肠球菌组(Efa)、乳酸杆菌组(Lac)。当细胞生长融合形成单层屏障后, 将计数后的细菌按感染复数100:1的比例加入小室顶侧或者孔板、灭菌玻片。根据实验要求分别在实验开始后的1, 3, 6, 12 h测定TEER, 6 h后测zonulin释放量、紧密连接蛋白表达和分布。

1.5 单层肠上皮细胞跨膜电阻值TEER的测定

单层细胞跨上皮电阻值与单层细胞完整性有关。测定方法参照Millicell ERS-2操作说明书进行, 测量时电极垂直于单层细胞, 两极分别在细胞的顶侧和基底侧, 长极在外, 短极在内, 注意勿与细胞接触。每次分别在悬挂培养皿周围三个方向测量, 取三孔测量值的均值为实际TEER, 不接种细胞培养皿为的空白对照, 测得的电阻值为空白TEER, 细胞单层TEER=(实测TEER-空白TEER)×Transwell有效膜面积, 单位用 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 表示。

1.6 Zonulin释放量检测

标本采集和保存: 在各实验组作用时间点结束后, 取Millipore悬挂培养皿顶室液1 000 r/min离心15 min, 取上清液立即检测; 或进行分装, 将标本保存于-80 °C冰箱, 避免反复冻融。用酶联免疫吸附实验检测zonulin含量, 根据说明书具体操作。

1.7 Western blot检测肠上皮细胞紧密连接occludin、claudin-1、ZO-1蛋白表达水平

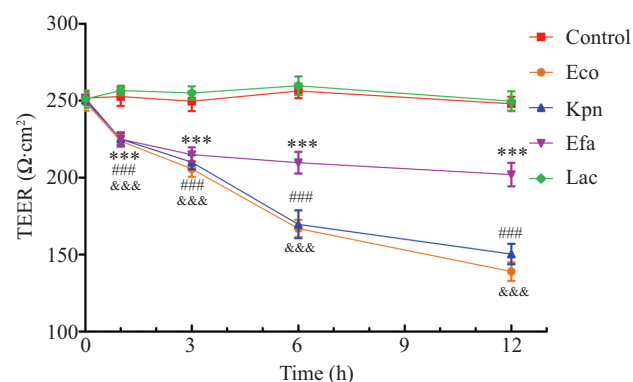
细胞培养在6孔板中培养至10~15 d, 换无抗生素无血清培养液培养24 h, 加入不同种类细菌, 时间点结束后提取总蛋白。蛋白进行电泳、转膜, 孵育抗体, 一抗(抗occludin、claudin-1、ZO-1抗体, 稀释度均为1:400, 抗 β -actin抗体稀释度为1:5 000)室温振荡孵育膜1~2 h或者4 °C冰箱孵育过夜, 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(抗体稀释度为1:10 000)室温震荡孵育1 h, ECL化学发光显像。

1.8 免疫荧光检测肠上皮细胞紧密连接occludin、claudin-1、ZO-1的分布和形态变化

将细胞培养在24孔板内的灭菌盖玻片上, 培养融合至70%左右, 换无抗生素无血清培养液培养24 h, 加入不同种类细菌, 时间点结束时, 用预热PBS漂洗5 min $\times$ 3次。4%多聚甲醛固定20 min, 0.5% Triton X-100通透10 min, 0.3% BSA室温下封闭30 min, 兔抗人occludin抗体(抗体稀释度1:50)、兔抗人claudin-1抗体(抗体稀释度1:50)、兔抗人ZO-1抗体(抗体稀释度1:50), 分别滴加于玻片上覆盖细胞, 37 °C孵育1 h或4 °C过夜, 羊抗兔FITC标记二抗(抗体稀释度1:100), 37 °C避光孵育1 h。DAPI室温避光孵育2 min。封片后激光共聚焦显微镜观察, 紧密连接蛋白呈绿色。

1.9 统计学分析

应用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析, 多组间比较用方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。所用统计结果为三次独立重复实验。统计学处理计



*** $P<0.001$, Efa组与对照组比较; ### $P<0.001$, Kpn组与对照组比较; &&& $P<0.001$, Eco组与对照组比较。

*** $P<0.001$ Efa group vs control group; ### $P<0.001$ Kpn group vs control group; &&& $P<0.001$ Eco group vs control group.

图1 肠道微生物对细胞单层TEER的影响

Fig.1 Effect of intestinal microorganisms on TEER

量资料结果用mean $\pm$ S.D.表示。

2 结果

2.1 肠道微生物对Caco-2肠上皮细胞单层TEER值的影响

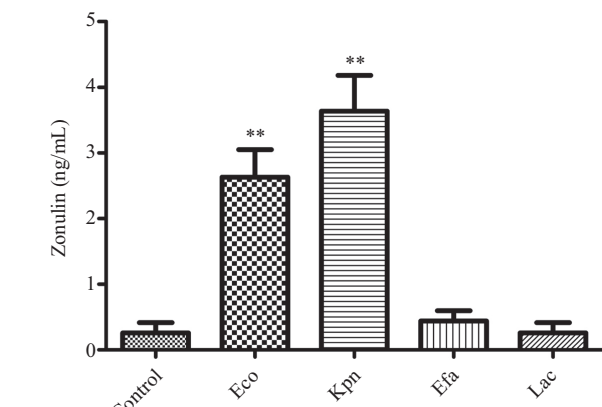
Caco-2细胞单层培养14 d, 电阻值TEER值稳定在250 $\Omega\cdot\text{cm}^2$, 表明模型建立可用于后续实验。加入细菌共培养12 h, 各组TEER值随时间变化如图1所示。空白对照组TEER无明显变化, 各细菌组均有不同程度下降, 共培养至6 h时明显。12 h内大肠埃希菌组和肺炎克雷伯菌组下降幅度最大, 与对照组相比差别均有显著性($P<0.001$)。粪肠球菌组下降趋势不如前两组细菌组明显, 但差别仍具有统计学意义($P<0.001$)。乳酸杆菌组与对照组相比无显著差异。

2.2 肠道微生物作用于Caco-2细胞单层时zonulin释放量的检测

大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌作用于Caco-2单层细胞顶侧6 h后, 顶侧上清液中zonulin释放量明显增多, 与对照组相比有统计学差异($P<0.01$)。粪肠球菌作用于Caco-2细胞单层后, zonulin释放量较对照组升高, 但差异无统计学意义($P>0.05$)。乳酸杆菌作用于Caco-2细胞zonulin释放量与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。同时, 检测各组细菌培养液和millicell培养皿基底侧培养液zonulin含量, 结果无明显zonulin蛋白释放(图2)。

2.3 Western blot检测紧密连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1的表达变化

通过Western blot检测各组细菌作用6 h后紧密



** $P<0.01$, 与对照组比较。

** $P<0.01$ vs control group.

图2 肠道微生物作用后Caco-2细胞zonulin表达量

Fig.2 Zonulin levels after co-culture with intestinal microorganisms

连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1表达变化如图3所示。大肠埃希菌组、肺炎克雷伯菌组三种紧密

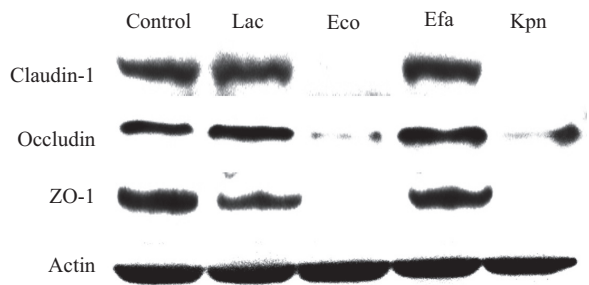


图3 肠道微生物作用下肠上皮细胞紧密连接蛋白claudin-1、occludin、ZO-1表达变化
Fig.3 Expression of tight junction proteins claudin-1, occludin and ZO-1 after co-culture with intestinal microorganisms

连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1表达明显减少。粪肠球菌组、乳酸杆菌组细胞跨膜蛋白occludin、claudin-1表达与空白对照组相比无明显变化,胞浆蛋白ZO-1表达降低。

2.4 免疫荧光观察紧密连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1的分布和形态

紧密连接位于相邻细胞顶侧部,正常情况下紧密连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1沿膜连续分布。各组细菌作用6 h后进行荧光染色,在激光共聚焦显微镜下观察其分布, FITC激发呈绿光。对照组细胞occludin、claudin-1、ZO-1蛋白沿细胞膜连续分布,结构完整,边界清楚。大肠埃希菌组、肺炎克雷伯菌组可见荧光较正常组松散,不连续,甚至有缺口及裂隙,荧光强度减弱。粪肠球菌组、乳酸菌组荧光

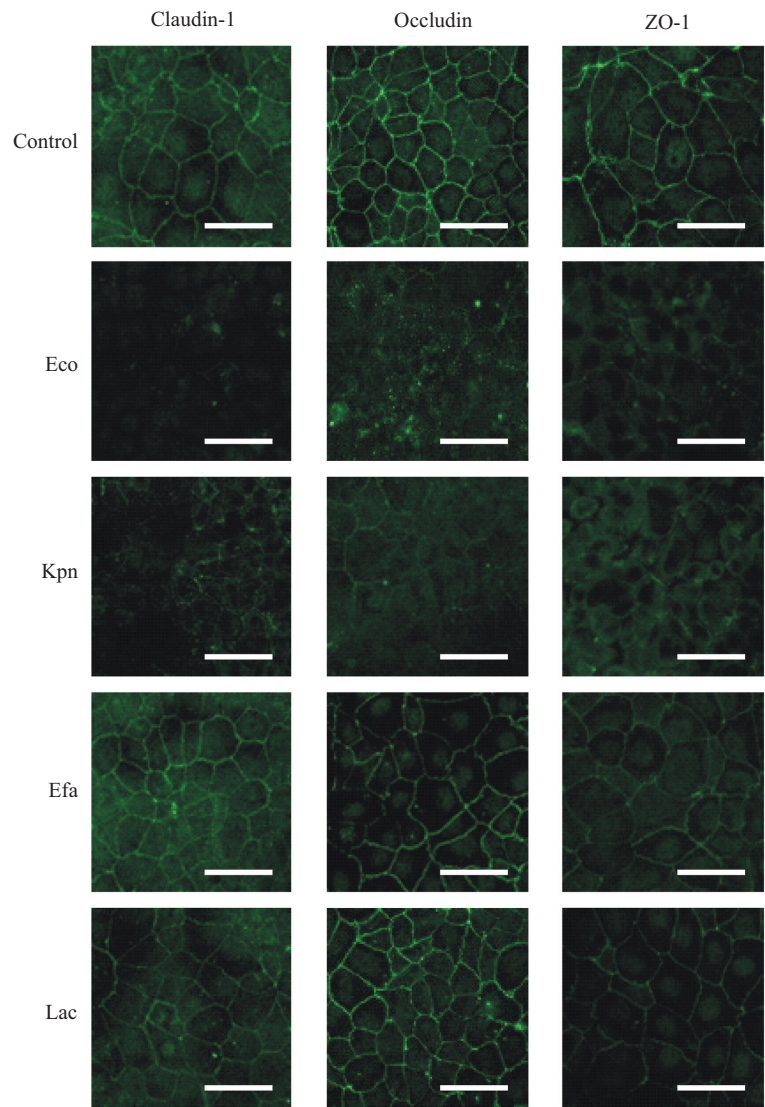


图4 肠道微生物作用下肠上皮细胞claudin-1、occludin、ZO-1分布与形态变化(标尺=20 μ m)
Fig.4 Distribution of tight junction proteins claudin-1, occludin and ZO-1 after co-culture with intestinal microorganisms (Scale bars=20 μ m)

强度稍减弱,但仍沿胞膜分布,条带较清晰,变化不如前两组细菌显著。

3 讨论

新生儿刚出生时肠道为无菌状态,出生后立即被多种微生物定植,定植模式与分娩方式、母亲体表菌群、产前产后抗生素使用、喂养方式以及病房环境等因素有关,健康足月经阴道分娩新生儿生后一周肠道主要菌群为专性厌氧菌,剖宫产新生儿主要定植细菌为克雷伯菌、肠杆菌、芽孢杆菌等;母乳喂养新生儿肠道优势菌群为双歧杆菌、乳酸杆菌,配方奶喂养新生儿则为肠杆菌、芽孢杆菌、拟杆菌等^[1-2]。新生儿坏死性小肠结肠炎(NEC)是新生儿期一种多因素共同作用导致的胃肠道急症,易发生于早产儿,在尚未接触到细菌的宫内环境下不发生,异常的细菌定植是公认的危险因素,但是众多关于NEC肠道黏膜、粪便的微生物学研究未能发现与NEC有特定关联的病原菌,NEC患儿肠道优势菌群包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、梭状芽孢杆菌等^[6,8]。尽管关于肠致病性大肠杆菌、肠道侵袭性大肠杆菌、沙门氏菌、志贺杆菌等侵害肠黏膜屏障的研究已经很多,但有关肠道相对的“正常”的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、肠球菌等在肠道细菌过度生长时迅速增殖转变为肠道优势菌群而致病的细菌还没有充分研究。

肠道黏膜屏障是人体重要的一道防御屏障,能够防止肠腔内微生物、抗原、有毒大分子物质侵入机体,是人体抵御外部环境的第一道防线。肠上皮紧密连接是肠黏膜屏障的重要组成部分,位于相邻细胞顶侧部,是由50多种紧密连接蛋白组成的复杂结构,包括跨膜蛋白和胞浆蛋白,前者包括claudin蛋白、occludin蛋白、JAM(junctional adhesion molecules)等,是构成选择性屏障功能的结构蛋白,后者有ZO-1、ZO-2、ZO-3、cingulin等,能与多种蛋白质结合,起连接膜蛋白与细胞骨架或传递信号分子的作用^[12]。生理情况下,肠道内大量的微生物与肠上皮细胞之间相互作用保持动态平衡,肠道紧密连接通过包括zonulin途径在内的多种调节机制起选择性屏障作用^[11]。紧密连接一旦减少或缺失,细胞间隙通透性就会增加,细菌及各种大分子物质就可通过紧密连接进入体循环,引起机体疾病,包括NEC、炎症性肠病、乳糜泻、糖尿病、HIV相关性

腹泻、食物过敏等^[1,13]。

本实验利用Caco-2肠上皮细胞屏障模型研究了大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、乳酸杆菌对肠道屏障完整性的影响。实验结果表明,大肠埃希菌组、肺炎克雷伯菌组细菌刺激后TEER值明显下降,下降过程随时间变化,具有时间依赖性。说明这两种细菌对单层细胞的完整性造成损伤,有利于细菌转位发生。粪肠球菌组TEER值也呈下降趋势,但下降幅度不如前两组显著,说明粪肠球菌对肠道屏障损伤作用较前两组轻。乳酸杆菌组对细胞单层TEER值无明显影响,说明益生菌对肠道无损伤作用,为临床应用益生菌防治NEC等胃肠道疾病提供了理论支持。

Zonulin是最近发现的一种蛋白,能可逆、快速地调节肠道紧密连接,改变肠道通透性,是目前已知的唯一一种肠道通透性生理性调节蛋白^[11]。研究表明,在麦胶蛋白或者细菌刺激下,肠道黏膜可以分泌zonulin进入肠腔,与肠上皮细胞zonulin受体结合传导信号,最终作用于肠道紧密连接,使其开放,增加肠道通透性^[14]。很多疾病如乳糜泻、胰岛素依赖的糖尿病、自身免疫性肝炎、结缔组织疾病早期就有zonulin水平的升高、紧密连接的开放和肠道通透性改变,其具体机制可能是zonulin介导的肠道紧密连接开放时肠腔内抗原物质进入黏膜下,触发了自身免疫反应^[15]。Asmar等^[16]研究了三种来源的大肠杆菌及沙门氏菌对肠道屏障功能的影响,体外肠道组织和肠上皮细胞模型均表明四种细菌均能引起zonulin的释放、细胞旁通透性的增高、紧密连接蛋白ZO-1的重新分布。

本研究检测到大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌诱发了Caco-2细胞zonulin的释放增加,粪肠球菌和乳酸杆菌作用相同时间后顶侧上清液中zonulin含量与对照组相比无明显变化,这一趋势与细菌对肠道完整性通透性的影响相符合,提示不同细菌作用于肠道上皮细胞引起不同水平的zonulin分泌,导致了肠道屏障功能的不同改变,表现了机体对肠道通透性的精细调节。通过Western blot、免疫荧光检测各组细菌作用6 h后紧密连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1表达变化,其中大肠埃希菌组、肺炎克雷伯菌组紧密连接蛋白occludin、claudin-1、ZO-1表达明显减少,免疫荧光下见分布不连续,甚至有缺口及裂隙,荧光强度减弱。而粪肠球菌组、乳酸杆菌组

occludin、claudin-1蛋白表达水平与对照组相比无明显变化,仅ZO-1轻度下降,荧光染色见三种紧密连接蛋白沿细胞膜分布,条带清晰。该变化趋势与zonulin趋势一致,提示zonulin可能影响了紧密连接细胞膜蛋白和胞浆蛋白的表达和分布,大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌与肠上皮细胞接触后肠上皮细胞分泌zonulin使完整的紧密连接蛋白从紧密连接复合物处解离,蛋白表达量下降,肠道通透性升高,从而使肠道的屏障功能受损。

Zonulin的分泌增多可以导致肠道功能受损,但生理情况下的zonulin同时也是机体固有免疫的一部分。机体小肠近端细菌含量少,远端肠道的细菌移位时,即使无病原菌释放毒素,也不发生明显肠道黏膜损伤,但仍会导致小肠通透性增高,其机制可能与肠道内细菌作用于肠上皮细胞导致zonulin释放有关,zonulin快速、可逆的调节紧密连接开放,使肠腔内液体分泌增多,阻止细菌在近端小肠的定植^[16]。目前,已有多种疾病早期即出现zonulin水平的增高。Watts等^[17]利用糖尿病大鼠模型研究发现,有糖尿病倾向的老鼠在发病前25 d肠腔内zonulin即明显升高,阻断zonulin受体可以降低糖尿病发病率。而两个临床试验显示,口服益生菌可以降低血清zonulin水平,增强屏障功能,防止相关感染的发生^[18-19]。我们的研究表明,肠道条件致病菌和生理性共生菌诱导肠上皮细胞产生不同水平zonulin,这可能是肠道菌群紊乱引起通透性增高导致相关疾病发生的机制,为相关疾病提供了新的治疗靶点,也为临床益生菌的应用提供了理论基础,但关于机体产生不同水平zonulin的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol* 2013; 21(4): 167-73.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5(7): e177.
- Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 2011; 364(3): 255-64.
- Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Casella G, *et al.* Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PLoS One* 2011; 6(6): e20647.
- Smith B, Bodé S, Petersen BL, Jensen TK, Phipper C, Kloppenborg J, *et al.* Community analysis of bacteria colonizing intestinal tissue of neonates with necrotizing enterocolitis. *BMC Microbiol* 2011; 11(1): 73.
- Smith B, Bodé S, Skov TH, Mirsepasi H, Greisen G, Krogfelt KA. Investigation of the early intestinal microflora in premature infants with/without necrotizing enterocolitis using two different methods. *Pediatr Res* 2012; 71(1): 115-20.
- Stewart CJ, Marrs EC, Magorrian S, Nelson A, Lanyon C, Perry JD, Embleton ND, *et al.* The preterm gut microbiota: Changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. *Acta Paediatr* 2012; 101(11): 1121-7.
- Bizzarro MJ, Ehrenkranz RA, Gallagher PG. Concurrent Bloodstream Infections in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2014; 164(1): 61-6.
- 郑树芳, 徐艳珍, 艾青, 余加林. PCR-DGGE 对新生儿坏死性小肠结肠炎肠道菌落结构及其动态性研究. *重庆医学*(Zheng Shufang, Xu Yanzhen, Ai Qing, Yu Jialin. Intestinal microbial community diversity in neonatal necrotizing enterocolitis analyzed by PCR-DGGE. *Chongqing Medicine*) 2012; 41(29): 3026-9.
- Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, Lien RI, *et al.* Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: A multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2008; 122(4): 693-700.
- Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: Diagnostic and therapeutic implications. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10(10): 1096-100.
- Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 2008; 130(1): 55-70.
- Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: Pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23(4): 379-83.
- Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* 2011; 91(1): 151-75.
- Ventura A, Magazzù G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1999; 117(2): 297-303.
- El Asmar R, Panigrahi P, Bamford P, Berti I, Not T, Coppa GV, Catassi C, *et al.* Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology* 2002; 123(5): 1607-15.
- Watts T, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R, *et al.* Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(8): 2916-21.
- Liu ZH, Huang MJ, Zhang XW, Wang L, Huang NQ, Peng H, *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. *Am J Clin Nutr* 2013; 97(1): 117-26.
- Lamprecht M, Bogner S, Schippinger G, Steinbauer K, Fankhauser F, Hallstroem S, *et al.* Probiotic supplementation affects markers of intestinal barrier, oxidation, and inflammation in trained men; a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr* 2012; 9(1): 45.