

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.06.016

论著·实验研究

二十碳五烯酸对 *E.coli* LF82 感染后肠上皮细胞 紧密连接蛋白 ZO-1 mRNA 的影响

郝丽军 林燕 张薇 田姣 王娅 陈鹏德 虎崇康 曾令超 杨洁 王宝西 江逊

(第四军医大学唐都医院儿科, 陕西 西安 710038)

[摘要] **目的** 探讨二十碳五烯酸(EPA)对黏附侵袭性大肠杆菌(AIEC)LF82感染后肠上皮细胞(Caco-2)紧密连接蛋白(ZO-1)表达的影响。**方法** 用Caco-2细胞株建立体外肠上皮细胞紧密连接模型,分为EPA处理组,EPA 0、25、50、100、200 μmol/L干预96 h;以及EPA(EPA 0、25、50、100、200 μmol/L)+*E.coli* LF82联合处理组,在不同浓度EPA干预96 h的基础上,予*E.coli* LF82分别干预0 h、6 h、12 h。通过细胞形态学观察,MTT法测定细胞生长曲线,以及细胞膜两侧碱性磷酸酶(ALP)活性检测对Caco-2细胞模型进行评价。流式细胞术检测不同浓度EPA对Caco-2细胞凋亡的影响。RT-qPCR检测EPA和/或*E.coli* LF82作用于Caco-2细胞后ZO-1 mRNA的表达情况。酶联免疫吸附法检测Caco-2细胞上清中TNF-α的变化。**结果** EPA25、50 μmol/L处理后,Caco-2细胞存活率均高于0浓度组,且增高呈浓度依赖性($P<0.05$);EPA100、200 μmol/L处理组的细胞存活率下降呈浓度依赖性,均低于0浓度组($P<0.05$)。EPA浓度为100、200 μmol/L时,细胞凋亡率较0浓度组增加($P<0.05$)。单独*E.coli* LF82干预Caco-2细胞6 h、12 h后,ZO-1 mRNA表达随处理时间延长而减少,均低于未处理组($P<0.05$)。EPA 25、50 μmol/L干预联合*E.coli* LF82处理6 h或12 h,Caco-2细胞的ZO-1 mRNA表达随EPA浓度增加而增加,均高于*E.coli* LF82单独处理组($P<0.05$)。单独*E.coli* LF82处理6 h、12 h组的TNF-α分泌随干预时间延长而增加,均高于未处理组($P<0.05$)。EPA25、50 μmol/L联合LF82处理6 h或12 h,细胞上清液中TNF-α分泌量随EPA浓度的增加而减少,均少于单独LF82处理组($P<0.05$)。**结论** EPA能有效预防*E.coli* LF82感染后肠上皮细胞紧密连接的破坏,抑制炎症因子的分泌,对肠黏膜屏障有一定的保护作用。
[中国当代儿科杂志, 2017, 19(6): 693-698]

[关键词] 二十碳五烯酸;粘附侵袭性大肠杆菌 LF82;紧密连接蛋白;炎症因子;肠上皮细胞

Effect of eicosapentaenoic acid on mRNA expression of tight junction protein ZO-1 in intestinal epithelial cells after *Escherichia coli* LF82 infection

HAO Li-Jun, LIN Yan, ZHANG Wei, TIAN Jiao, WANG Ya, CHEN Peng-De, HU Chong-Kang, ZENG Ling-Chao, YANG Jie, WANG Bao-Xi, JIANG Xun. Department of Pediatrics, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China (Jiang X, Email: jiangx@fmmu.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the change in the expression of tight junction protein ZO-1 in intestinal epithelial cells (Caco-2 cells) and the protective effect of eicosapentaenoic acid (EPA) after adherent-invasive *Escherichia coli* (*E.coli*) LF82 infection. **Methods** The Caco-2 cell line was used to establish an *in vitro* model of tight junction of intestinal epithelial cells. Caco-2 cells were divided into EPA treatment groups (0, 25, 50, 100, and 200 μmol/L EPA) and EPA (0, 25, 50, 100, and 200 μmol/L EPA)+*E.coli* LF82 treatment (0, 6, and 12 hours) groups. A microscope was used to observe the morphological characteristics of the cells. MTT assay was used to determine the cell growth curve. The activity of alkaline phosphatase (ALP) at both sides of the cell membrane was compared to evaluate the Caco-2 cell model. MTT assay and flow cytometry were used to investigate the effects of different concentrations of EPA on the survival rate and apoptosis rate of Caco-2 cells. RT-qPCR was used to measure the mRNA expression of ZO-1 in

[收稿日期] 2016-12-02; [接受日期] 2017-02-22

[基金项目] 国家自然科学基金(81170331, 81370490);博福-益普生腹泻基金(IDF-2007-04)。

[作者简介] 郝丽军,女,硕士研究生。

[通信作者] 江逊,女,主任医师,副教授。

Caco-2 cells after EPA and/or *E.coli* LF82 treatment. ELISA was used to measure the change in the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in culture supernatant. **Results** After EPA treatment (25 and 50 $\mu\text{mol/L}$), the proliferation of Caco-2 cells was induced in a dose-dependent manner. The survival rates of the cells were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The EPA treatment (100 and 200 $\mu\text{mol/L}$) groups had a significant inhibitory effect on the proliferation of Caco-2 cells in a dose-dependent manner. The survival rates of the cells were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The EPA treatment (100 and 200 $\mu\text{mol/L}$) groups had a significant increase in cell apoptosis rate compared with the control group ($P<0.05$). The 6- and 12-hour *E.coli* LF82 treatment groups had decreasing mRNA expression of ZO-1 in Caco-2 cells over the time of treatment and had significantly lower mRNA expression of ZO-1 than the untreated group ($P<0.05$). The Caco-2 cells treated with *E.coli* LF82 and 25 or 50 $\mu\text{mol/L}$ EPA for 6 or 12 hours showed an increase in the mRNA expression of ZO-1 with the increasing concentration of EPA, as well as significantly higher mRNA expression of ZO-1 than the Caco-2 cells treated with *E.coli* LF82 alone ($P<0.05$). The Caco-2 cells treated with *E.coli* LF82 alone for 6 or 12 hours had increasing secretion of TNF- α over the time of treatment and had significantly higher secretion than the untreated Caco-2 cells ($P<0.05$). The Caco-2 cells treated with *E.coli* LF82 and 25 or 50 $\mu\text{mol/L}$ EPA for 6 or 12 hours showed a reduction in the secretion of TNF- α with the increasing concentration of EPA and had significantly lower secretion than the Caco-2 cells treated with *E.coli* LF82 alone ($P<0.05$). **Conclusions** EPA can effectively prevent the destruction of tight junction of intestinal epithelial cells induced by *E.coli* LF82 infection and inhibit the secretion of inflammatory factors. Therefore, it has a certain protective effect on intestinal mucosal barrier.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(6): 693-698]

Key words: Eicosapentaenoic acid; Adherent-invasive *Escherichia coli* LF82; Tight junction protein; Inflammatory factor; Intestinal epithelial cell

肠上皮细胞紧密连接 (tight junction, TJ) 的完整性是维持肠黏膜屏障功能的必备条件, 肠黏膜屏障功能受损, 肠壁渗透性增高, 肠腔内的致病菌等有害物质进入黏膜组织和循环系统, 导致炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 及全身炎症反应等^[1]。闭锁蛋白 1 (zonula occludens protein-1, ZO-1) 是构成 TJ 的主要结构蛋白, 其表达量和 / 或位置分布的改变均能影响肠黏膜屏障功能^[2]。目前已有多项研究证实, IBD 患者肠道中粘附侵袭性大肠杆菌 (adherent-invasive *Escherichia coli*, AIEC) 明显增多^[3-4]。自 1998 年在克罗恩患者的病变回肠组织中发现具有粘附、侵袭能力的大肠杆菌 (*E.coli*) LF82 之后, 该菌种被广泛用于 AIEC 相关的研究中^[5]。*E.coli* LF82 通过菌毛与黏膜表面受体人癌胚抗原相关细胞粘附分子 6 (CEACAM6) 相结合, 粘附、侵入肠上皮细胞, 在细胞内生存并复制, 介导细胞释放大量炎症因子 TNF- α , 而 TNF- α 又可诱导 CEACAM6 高表达, 导致肠道持续性炎症^[6]。同时, TNF- α 可抑制 ZO-1 mRNA 转录而影响 ZO-1 的表达, 从而破坏肠上皮紧密连接的完整性^[7]。二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 能有效预防紧密连接结构的破坏, 并具有抗炎作用^[8-9]。人结肠癌细胞株 Caco-2 细胞, 在正常培养条件下, 能分化并融合成连续的单层细胞, 具有类似于肠上皮细胞的功能和结构^[10]。因此本研究以 EPA 和 / 或 *E.coli* LF82 菌种作用于 Caco-2 细胞, 旨在探讨 EPA 对

E.coli LF82 感染后的 ZO-1 mRNA 的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

粘附侵袭性大肠杆菌 LF82 菌株 (*E.coli* LF82, 法国克莱蒙费朗第一大学 Darfeuille-Michaud 教授馈赠); Caco-2 细胞 (ATCC); DMEM 高糖培养基、胰酶 (Hyclone, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); 酵母提取物、胰蛋白酶、琼脂糖 (OXOID, 英国); 细胞培养瓶、细胞培养板、细菌培养皿 (Corning, 美国); 插入式细胞培养皿 (6.5 mm 直径, 0.4 μm 孔径)、玻璃细胞培养小室 (Millicell® EZ SLIDE, 8 孔) (Millipore, 美国); 氨苄青霉素、EPA (相对分子量 302, Sigma, 美国); Trizol (Life Technologies, 美国); 反转录试剂盒 (Thermo Scientific, 美国); 2 \times Realstar Green Power Mixture (GenStar, 北京); 人 TNF- α ELISA 试剂盒 (ExCell Biotech, 上海); 碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天生物技术研究所); PCR 引物由上海生工合成。

1.2 细菌培养及计数

新鲜配置并高压灭菌 LB 培养基, 在无菌培养板 (含氨苄青霉素 50 $\mu\text{g/mL}$) 中挑取 *E.coli* LF82 菌株单克隆, 接种于 LB 培养液, 放入振荡孵箱, 以 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养约 14 h 至生长平台期。吸取 100 μL , 连续梯度稀释, 分光光度计 600 nm 处

测定吸光值。当 OD=1 时，细菌培养液的浓度为 1×10^9 CFU/mL。

1.3 Caco-2 细胞培养

DMEM 中加入 10% 胎牛血清、1% 双抗（青霉素和链霉素），在 37℃，含 5%CO₂ 条件下培养 Caco-2 细胞，隔天换液，当细胞生长至 80%~90% 融合时，用 0.25% 的胰酶-EDTA 常规消化、传代。将 2×10^4 个细胞（200 μL）接种于 Transwell 细胞培养小室内，将细胞小室放入 24 孔板内（含 1.3 mL 细胞培养液），隔天换液，并在倒置显微镜下观察细胞形态，21 d 左右形成单层，即可用于后续实验。

1.4 细胞干预

Caco-2 细胞接种于 96 孔板，每孔约 2×10^4 细胞，培养 24 h。分 5 组：对照组（EPA 0 浓度），EPA 25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L 和 200 μmol/L 组，每组 5 个复孔，实验重复 3 次。孵育 96 h 后收集细胞及上清，检测细胞存活率、凋亡率、ZO-1 mRNA 及 TNF-α 表达。

EPA 处理 96 h 后，加入无血清细胞培养液和 *E.coli* LF82（MOI=100:1），培养 6 h、12 h，收集细胞及上清，检测 ZO-1 mRNA 及 TNF-α 的表达。

1.5 MTT 法检测 Caco-2 细胞的细胞存活率

消化处于对数生长期的各组 Caco-2 细胞，制成单细胞悬液并计数，调整细胞浓度至 1×10^5 /mL，以每孔 2×10^4 （200 μL）细胞接种于 96 孔板。分别于接种后第 3、6、9、12、16、19 和 21 天取 5 个孔，PBS 清洗，每孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL，37℃ 孵育 4 h，弃去上清液，每孔加入 150 μL DMSO，室温避光震荡 10 min，使紫色结晶物充分溶解。以空白孔调零，在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定吸光度 A 值，绘制细胞生长曲线；并检测各组吸光度（A）值。

Caco-2 细胞存活率 (%) = $(A_{EPA} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白})$ 。

1.6 Caco-2 细胞单层极性的变化

分别在接种于 Transwell 细胞小室内的各组细胞培养至第 5、9、13、17、19、21 天，取 Caco-2 细胞单层顶端（AP 侧）及底侧（BL 侧）适量培养基。按 ALP 检测试剂盒说明书操作，酶联免疫检测仪测定各组吸光度值，根据标准曲线计算 ALP 含量。

1.7 流式细胞技术检测 Caco-2 细胞凋亡情况

细胞接种于 6 孔板，每孔约 1×10^5 个细胞，

培养 24 h 后分 5 组予以 EPA 干预：对照组（不含 EPA），EPA 25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L 和 200 μmol/L 组，每组 5 个复孔，实验重复 3 次。不同浓度 EPA 与 Caco-2 细胞孵育 96 h，流式细胞仪检测各组细胞凋亡，操作按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行。

1.8 RT-qPCR 检测 ZO-1 mRNA 的表达

按照 TRIzol 试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA，逆转录 cDNA，-20℃ 保存。采用三步法 Real-time Q-PCR 检测 ZO-1 mRNA。反应体系为 25 μL，预变性：95℃，10 min；变性：95℃，15 s；退火：53℃，30 s；延伸：72℃，35 s；循环次数：40 次。ZO-1 上游引物：5'-CAGAACCAAAGCCTGTG-TATG-3'，下游引物：5'-TTAGGTAGGACACCAT-CAGATGGA-3'。内参 GAPDH 上游引物：5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'，下游引物：5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'。以 GAPDH mRNA 的 CT 值标准化 ZO-1 mRNA 的 CT 值，得到 ZO-1 mRNA 相对 CT 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.9 酶联免疫吸附法检测 TNF-α 的表达

收集各组的的上清液，采用人 TNF-α ELISA 试剂盒，以标准品浓度 1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.25 pg/mL、15.62 pg/mL、0 pg/mL 的 OD 值作标准曲线，根据标准曲线计算待测样品 TNF-α 含量。

1.10 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Caco-2 细胞形态学观察及生长曲线

在细胞接种后第 2 天，倒置显微镜观察 Transwell 小室内的细胞：细胞呈多边形、贴壁；第 5 天，细胞呈上皮样形态，融合成片，细胞与细胞之间有清晰的边界且排列整齐；一周后，由于聚碳酸酯膜的影响，镜下很难清楚地观察到细胞形态。见图 1。

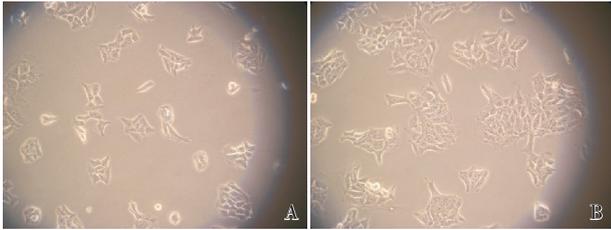


图1 Caco-2细胞形态观察(10×20) A: 培养第2天, 细胞贴壁, 呈多边形; B: 培养第5天, 细胞融合成片, 边界清晰。

MTT结果显示, 细胞接种后的前6 d生长较慢, 6~16 d生长迅速, 至19~21 d时细胞生长基本平稳。见图2。

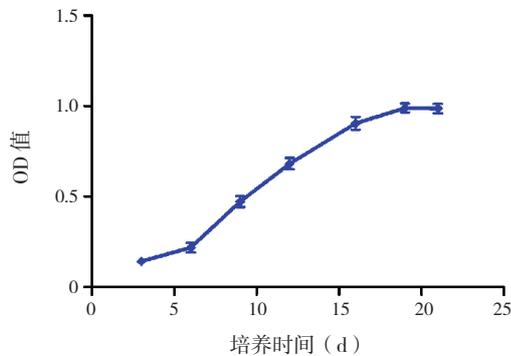


图2 Caco-2细胞生长曲线图

2.2 Caco-2细胞单层极性检测结果

细胞单层AP侧及BL侧的碱性磷酸酶含量随培养时间延长而增加, 第21天两侧碱性磷酸酶含量的比值达3.8:1。见表1。

表1 Caco-2细胞AP侧与BL侧碱性磷酸酶含量的动态变化 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

| 培养时间(d) | AP侧 | BL侧 | AP/BL |
|---------|------------|-----------|-----------|
| 5 | 5.6 ± 1.4 | 3.1 ± 1.3 | 2.1 ± 0.5 |
| 9 | 9.1 ± 1.4 | 4.7 ± 1.1 | 2.1 ± 0.8 |
| 13 | 11.5 ± 1.6 | 5.0 ± 1.4 | 2.0 ± 0.9 |
| 17 | 17.1 ± 1.8 | 6.3 ± 1.4 | 2.8 ± 0.9 |
| 19 | 24.3 ± 2.0 | 8.5 ± 1.4 | 2.9 ± 0.7 |
| 21 | 35.6 ± 2.0 | 9.5 ± 1.4 | 3.8 ± 0.7 |
| F值 | 71.15 | 47.15 | 10.57 |
| P值 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注: [AP]细胞单层顶端; [BL]细胞单层底侧。

2.3 MTT法检测细胞存活率

EPA浓度为25、50 μmol/L时, 细胞存活率较0 μmol/L组增加 ($P < 0.05$), 其中50 μmol/L EPA组的细胞存活率高于25 μmol/L组 ($P < 0.05$); EPA浓度为100、200 μmol/L时, 细胞存活率随浓度增高而降低, 并且均低于0浓度组和EPA 25 μmol/L组、50 μmol/L组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 不同浓度EPA作用后的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, %)

| EPA浓度(μmol/L) | 存活率 |
|---------------|-------------------------------|
| 0 | 100 |
| 25 | 104.8 ± 0.9 ^a |
| 50 | 110.2 ± 1.0 ^{a,b} |
| 100 | 84.0 ± 1.4 ^{a,b,c} |
| 200 | 63.3 ± 1.6 ^{a,b,c,d} |
| F值 | 918.2 |
| P值 | <0.001 |

注: a示与0浓度组比较, $P < 0.05$; b示与25 μmol/L组比较, $P < 0.05$; c示与50 μmol/L组比较, $P < 0.05$; d示与100 μmol/L组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

EPA浓度为0、25、50、100、200 μmol/L时, 细胞凋亡率分别为6.8% ± 0.9%、8.3% ± 0.9%、10.7% ± 2.0%、25.4% ± 1.8%、45.5% ± 1.3%, EPA浓度为25、50 μmol/L时, 细胞凋亡率与0浓度组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$); EPA浓度为100、200 μmol/L时, 凋亡率随浓度而增加, 均高于0浓度组 ($P < 0.05$)。见图3。

2.5 RT-qPCR检测ZO-1 mRNA的表达

单独*E.coli* LF82处理6 h或12 h, Caco-2细胞的ZO-1 mRNA表达随处理时间延长而减少, 均少于空白处理组 ($P < 0.05$)。EPA 25、50 μmol/L干预联合LF82处理6 h或12 h, Caco-2细胞的ZO-1 mRNA表达随EPA浓度增加而增加, 均高于单独LF82处理组 ($P < 0.05$); 但ZO-1 mRNA表达不随LF82处理时间延长而变化 ($P > 0.05$)。见图4。

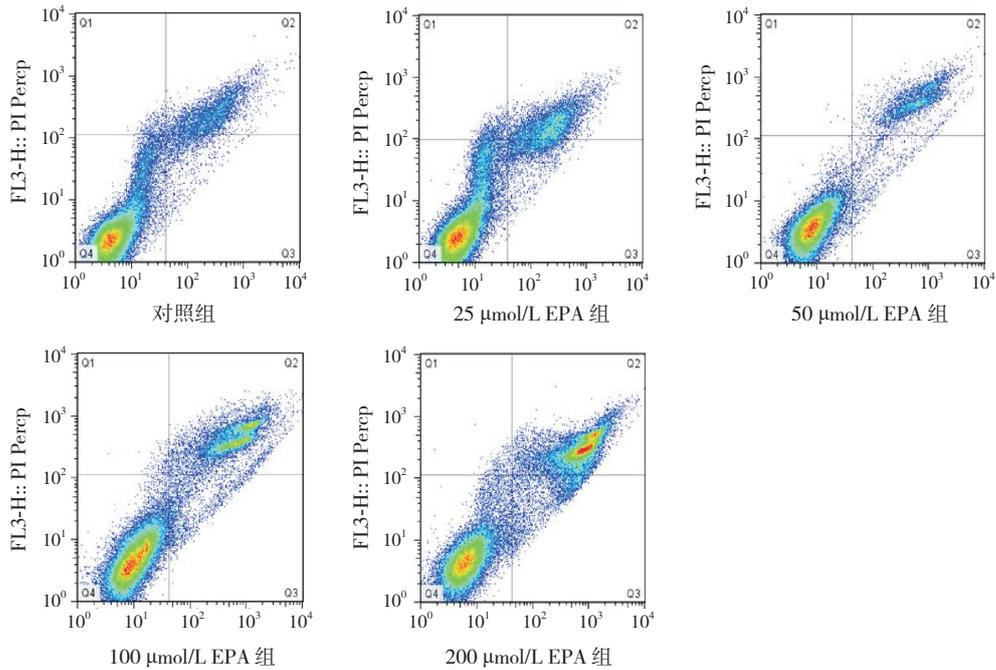


图3 不同浓度EPA处理后的Caco-2细胞凋亡情况 Q2象限细胞为晚期凋亡和坏死细胞。

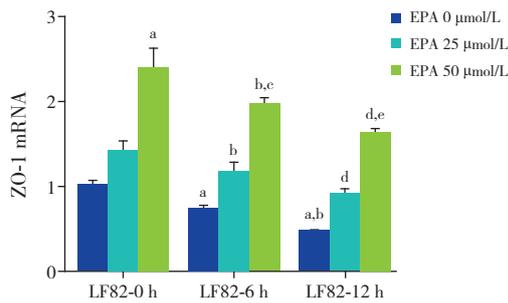


图4 不同处理组Caco-2细胞的ZO-1 mRNA表达

a 示与未处理的Caco-2细胞比较, $P < 0.05$; b 示与单独LF82处理6 h组比较, $P < 0.05$; c 示与EPA 25 $\mu\text{mol/L}$ +LF82处理6 h组比较, $P < 0.05$; d 示与单独LF82处理12 h组比较, $P < 0.05$; e 示与EPA 25 $\mu\text{mol/L}$ +LF82处理12 h组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 ELISA 检测培养上清中TNF- α 的分泌量

单独LF82处理6 h、12 h组的TNF- α 表达随处理时间延长而增加,均高于空白处理组 ($P < 0.05$)。EPA 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 干预联合LF82处理6 h或12 h,细胞上清中TNF- α 的表达随EPA浓度增加而减少,均少于单独LF82处理组 ($P < 0.05$);但TNF- α 表达不随处理时间延长而变化 ($P > 0.05$)。见图5。

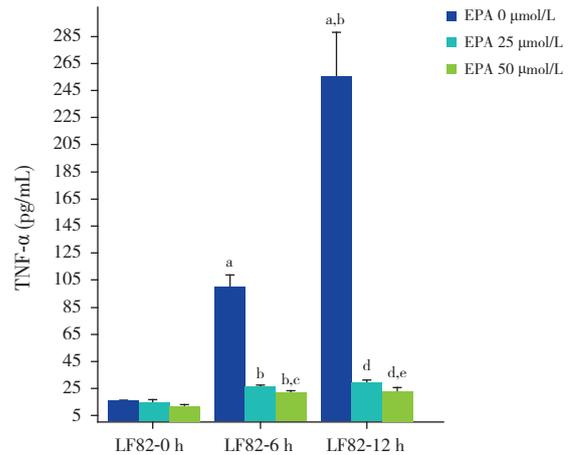


图5 不同处理组Caco-2细胞的TNF- α 表达 a 示与未处理Caco-2细胞比较, $P < 0.05$; b 示与单独LF82处理6 h组比较, $P < 0.05$; c 示与EPA 25 $\mu\text{mol/L}$ +LF82处理6 h组比较, $P < 0.05$; d 示与单独LF82处理12 h组比较, $P < 0.05$; e 示与EPA 25 $\mu\text{mol/L}$ +LF82处理12 h组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

肠上皮细胞间的紧密连接是肠黏膜屏障的基础,其受损可引起肠壁通透性增高,肠腔内毒性

物质及微生物进入黏膜组织和循环系统，导致免疫紊乱及炎症反应^[1]。

Caco-2 细胞株来源于人结肠癌细胞，培养 21 d 后可形成发达的紧密连接、类小肠微绒毛结构及小肠刷状缘水解酶，能有效模拟肠黏膜屏障，被广泛作为肠黏膜屏障模型^[10]。本研究显示，培养 19~21 d 时，Caco-2 细胞分裂已趋于饱和，细胞与细胞之间形成紧密连接；第 21 天的细胞单层 AP 侧及 BL 侧的 ALP 含量比值为 3.8:1，接近文献报道的 3:1。表明 ALP 已经聚集于刷状缘侧（AP 侧），细胞单层出现了明显的极化现象，与体外肠上皮细胞极性相似，说明 Caco-2 细胞在培养 21 d 左右可用于模拟肠上皮细胞。

EPA 可通过抑制 NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用，还能有效预防热休克诱导的肠黏膜屏障损伤^[8-11]。本研究显示，EPA 浓度为 25、50 μ mol/L 时，Caco-2 细胞增殖呈浓度依赖性；而浓度为 100、200 μ mol/L 时，Caco-2 细胞增殖明显受抑；并且 EPA 浓度为 100、200 μ mol/L 时细胞凋亡。说明小剂量 EPA 能诱导 Caco-2 细胞增殖，大剂量则诱导凋亡，可能与大剂量 EPA 的毒性有关。

ZO-1 是第一个被确定的紧密连接相关蛋白，是紧密连接复合物中的支架蛋白，当 ZO-1 受到破坏，紧密连接的屏障功能随之受损^[12]。本研究结果显示，EPA 处理组的 ZO-1 mRNA 表达量增高；而在 EPA 预处理 96 h 后加入 LF82，ZO-1 mRNA 的表达高于单独 LF82 处理组。说明 EPA 能有效预防 LF82 感染后肠上皮细胞紧密连接的损伤；并发现单独 LF82 干预后 TNF- α 的表达增高，而 EPA 联合 LF82 干预的 TNF- α 的分泌量降低，说明 EPA 能抑制 LF82 感染诱导的炎症因子分泌。

综上所述，EPA 能有效预防 *E.coli* LF82 感染后肠上皮细胞紧密连接的破坏，抑制炎症因子的分泌，对肠黏膜屏障有一定的保护作用。

[参 考 文 献]

- [1] Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases[J]. *Intest Res*, 2015, 13(1): 11-18.
- [2] Tokuda S, Higashi T, Furuse M. ZO-1 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104994.
- [3] Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, et al. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E.coli* (AIEC) in Crohn's disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15(6): 872-882.
- [4] Chassaing B, Darfeuille Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1720-1728.
- [5] Ossa JC, Ho NK, Eytan W, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* blocks interferon- γ -induced signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 in human intestinal epithelial cells[J]. *Cell Microbiol*, 2013, 15(3): 446-457.
- [6] Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E.coli*, pathotype associated with Crohn's disease[J]. *Int J Med Microbiol*, 2002, 292 (3-4): 185-193.
- [7] Aveleira CA, Lin CS, Ambrosio AF, et al. TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability[J]. *Diabetes*, 2010, 59(11): 2872-2882.
- [8] Xiao GZ, Tang LQ, Yuan FF, et al. Eicosapentaenoic acid enhances heat stress-impaired intestinal epithelial barrier function in Caco-2 cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73571.
- [9] Davidson J, Higgs W, Rotondo D. Eicosapentaenoic acid suppression of systemic inflammatory responses and inverse up-regulation of 15-deoxy Δ 12,14 Prostaglandin J2 production[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(5): 1130-1139.
- [10] Smetanová L, Stětinová V, Svoboda Z, et al. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and bio waiver[J]. *Acta Medica*, 2011, 54(1): 3-8.
- [11] Moberaten K, Haug TM, Kleiveland CR, et al. Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells[J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12(1): 101.
- [12] Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1165: 113-120.

(本文编辑: 俞燕)