

复合益生菌促进幼鼠生长发育和改善免疫功能的研究

汪梦霞¹, 王园园², 张晓君¹, 金鑫², 陈永雄¹, 马方励², 葛亚中², 谢智勇³, 廖琼峰¹

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510623)

(3. 中山大学药学院, 广东广州 510006)

摘要: 本文为探索益生菌对生长发育和免疫功能的影响及作用机理, 给正常幼鼠灌胃低、中、高剂量益生菌后, 检测各实验动物生长发育和免疫功能相关指标。结果显示与对照组比较, 不同剂量益生菌使幼鼠的体重平均增重率分别增加7.56%、14.45%和1.32%; 采食量平均增加0.31%、0.90%和0.13%, 料重比平均降低3.89%、3.74%和4.47%; 中剂量组和高剂量组股骨长度分别增加1.17%和1.69%; α -淀粉酶活力增加率分别为1.48%、1.28%和1.0%; 免疫器官胸腺和肝脏器官指数分别增加23.65%、24.68%、25.45%和0.34%、6.99%、0.70%; 中剂量组和高剂量组血清中IL-6表达量分别增加5.40%和23.15%; T淋巴细胞转化率和B淋巴细胞转化率分别增加4.55%、6.50%、12.11%和7.90%、9.64%、13.71%; 结肠上皮紧密连接蛋白Claudin1表达均增强, 且随着给药剂量增加而增强。说明益生菌主要通过增强肠道消化酶活力, 增加对营养物质吸收, 促进体重和股骨生长; 同时通过增加免疫因子IL-6表达, 提高T淋巴细胞和B淋巴细胞活力, 增强结肠上皮紧密连接蛋白Claudin1的表达, 促进免疫脏器胸腺和肝的发育与成熟来提高机体免疫功能。

关键词: 益生菌; 幼鼠; 生长发育; 免疫力

文章编号: 1673-9078(2017)6-9-14

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.002

Effects of Composite Probiotics on Promoting Growth and Development of Young Rats and Improving Their Immune Function

WANG Meng-xia¹, WANG Yuan-yuan², ZHANG Xiao-jun¹, JIN Xin², CHEN Yong-xiong¹, MA Fang-li²,
GE Ya-zhong², XIE Zhi-yong³, LIAO Qiong-feng¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

(2. Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510623, China)

(3. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To explore the effects and mechanism of probiotics on growth, development, and immune function, normal young rats were given low, medium, and high doses of probiotics by gavage for 28 days, and then related indicators of growth, development, and immune function were measured. The results showed that, compared with the negative control group, different doses of probiotics had a growth-promoting effect. The rates of weight gain were increased by 7.56% (low-dose group), 14.45% (medium-dose group), and 1.32% (high-dose group), and food intake was increased by 0.31% (low-dose group), 0.90% (medium-dose group), and 0.13% (high-dose group). Feed-weight ratios were decreased by 3.89% (low-dose group), 3.74% (medium-dose group), and 4.47% (high-dose group). Femur lengths were increased by 1.17% (medium-dose group) and 1.69% (high-dose group), and the activity of α -amylase in the jejunum was increased by 1.48% (low-dose group), 1.28% (medium-dose group), and 1.0% (high-dose group). Thymus indices were increased by 23.65% (low-dose group), 24.68% (medium-dose group), and 25.45% (high-dose group), and liver indices were increased by 0.34% (low-dose group), 6.99% (medium-dose group), and 0.70% (high-dose group). The expression of interleukin-6 (IL-6) in the serum was increased by 5.40% (medium-dose group) and 23.15% (high-dose group). T-lymphocyte transformation rates were increased by 4.55% (low-dose group), 6.50% (medium-dose group), and 12.11% (high-dose group); B lymphocyte transformation rates were increased by 7.90% (low-dose group), 9.64% (medium-dose

收稿日期: 2017-02-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473540、81473319); 广东省科技计划项目(2014A020221027、2013B090800011、2014B040404010、2015A030401031)

作者简介: 汪梦霞(1990-), 女, 博士, 研究方向: 中药分析与药代动力学、肠道菌群与健康及代谢组学

通讯作者: 廖琼峰(1975-), 女, 教授, 研究方向: 中药分析与药代动力学、肠道菌群与健康及代谢组学

group), and 13.71% (high-dose group). The expression of tight-junction protein claudin-1 in colonic epithelium was enhanced, and showed a positive correlation with doses. The results indicated that probiotics could increase body weight and femur length by enhancing the activities of intestinal digestive enzymes and promoting the absorption of nutrients. Probiotics could also enhance the expression of IL-6, improve the activities of T-cells and B-cells, and strengthen the expression of tight-junction protein claudin-1 to promote the development and maturation of immune system organs (thymus and liver) and improve immunity.

Key words: probiotics; young rats; growth and development; immune function

随着社会经济的发展,在当今独生子女多的时代,儿童的健康成长是每个家庭重点关注的事情。在不同的成长发育阶段,儿童机体的各器官和组织的生理特征也不同,如果儿童的营养需求没有满足,就会对儿童的成长发育和机体健康造成重大的影响。研究表明,儿童严重营养不良或发育迟缓会导致认知功能显著低于正常发育的儿童^[1],因此,早期对儿童干预有助于其生长发育和大脑功能的建立^[2]。

免疫力是人体自身的防御机制,其如同机体的其他系统一样,都在不断进化、发育、完善的过程,而儿童免疫系统处在发育过程中,至青春期才基本完善。中医学认为,人体的正气与肺、脾、肾关系最为密切,肾主藏精,为先天之本;肺主皮毛、主气;脾主运化水谷精微,为后天之本。这从一方面说明先天真元不足及后天失养都会导致机体的正气不足,免疫功能低下^[3]。综上所述,儿童的免疫系统并非“十全十美”,而是处于一个发育健全的阶段,如果适当予以保健食品的辅助,将有益于儿童免疫系统的发育,增强其免疫力,以抵抗各种病原微生物的侵袭。

益生菌是含有活菌或其代谢产物的一类生物制剂,由于其具有安全可靠、无抗药性、无残留和无污染环境等特点而倍受关注。大量研究表明,益生菌在对机体生长性能^[4]、维持肠道微生物平衡^[5]和提高机体免疫功能^[6]等方面具有积极的作用,然而目前对益生菌的研究主要集中在成年大鼠阶段,对生长幼鼠研究较少。故本研究拟用 21 d 幼鼠作为试验对象,通过灌胃益生菌,探讨益生菌对机体生长性能和免疫功能的影响,为益生菌在儿童生长发育和免疫力应用提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

48 只 3 周龄 SPF 级 SD 大鼠(雄性)广东省医学实验动物中心(许可证号:SCXK(粤)2013-0002)。

膳乐星益生菌固体饮料组成:嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07、鼠李糖杆菌 HN001、山楂、山药和菊粉,菌活度为 500 万 CFU/kg(批号:

20160706),无限极(中国)有限公司; α -淀粉酶试剂盒,苏州科铭生物技术有限公司;白介素-6 ELISA 试剂盒,欣博盛生物科技有限公司;脂多糖,美国 Sigma 公司;刀豆蛋白 A,美国 Sigma 公司;CK-8 试剂盒,日本同仁化学研究所;Anti-Claudin1 抗体,英国 Abcam 公司;其他均为生化试剂或分析纯化学试剂。

1.2 实验仪器

超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;恒温培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;水浴锅,江苏宏华仪器厂;匀浆机,宁波分析仪器制造有限公司;MVS-1 涡旋混合器,北京金紫光科技发展有限公司;Multiskan 酶标仪,美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 益生菌的配制

按人体给药剂量的 5 倍、10 倍和 20 倍量称取低、中、高剂量的益生菌 0.05 g、0.1 g 和 0.2 g,用动物饮用水配制浓度分别为 0.05 g/mL、0.10 g/mL 和 0.20 g/mL 的益生菌溶液,动物给药量均为 1 mL/100 g。按菌活度为 500 万 CFU/kg 计算,动物每天给药活菌度分别为 250 CFU/100 g weight、500 CFU/100 g weight 和 1000 CFU/100 g weight。

1.3.2 动物分组及饲养

48 只 3 周龄幼鼠用基础饲料适应性喂养 1 周后,随机分为 4 组(每组 12 只):对照组(C)、益生菌低剂量组(L)、益生菌中剂量组(M)和益生菌高剂量组(H)。持续用基础饲料喂养 28 d,同时对照组以 1 mL/(100 g/d)灌胃动物饮用水,低、中、高剂量组分别以 0.05 g/(100 g/d)、0.1 g/(100 g/d)和 0.2 g/(100 g/d)剂量灌胃益生菌。动物随意进食、自由饮水,记录每天体重和进食量,控制环境温度 20 °C~22 °C,相对湿度 35%~75%,光照 12 h,黑暗 12 h。

1.3.3 实验样品收集及处理

幼鼠灌胃 28 d 后,禁食 12 h 后,眼眶取血,离心,血清-80 °C 保存备用;解剖,完整摘取胃到直肠末端的消化道,生理盐水冲洗肠道内容物,滤纸吸

干, 称重, -80 °C 保存; 取结肠用 4% 多聚甲醛固定, 进行石蜡切片; 取右腿股骨, 去除肌肉, 用生理盐水冲洗干净, 滤纸吸干, 用游标卡尺测量其长度; 取胸腺和肝脏组织, 生理盐水冲洗净表面血污, 滤纸吸干, 称重。取脾用 PBS 研磨红细胞裂解, 收集淋巴细胞, 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱培养。

1.3.4 生长指标测定

1.3.4.1 体重变化率与平均周进食量测定

根据下列公式计算:

$$\text{体重变化率(\%)} = \frac{\text{终体重(g)} - \text{初始体重(g)}}{\text{初始体重(g)}} \times 100\%$$

$$\text{平均周进食量(g)} = \frac{\text{周总进食量(g)}}{12 \times 7}$$

1.3.4.2 股骨长度测量

取右腿股骨, 去除肌肉, 用生理盐水冲洗干净, 滤纸吸干, 用游标卡尺测量, 记录其长度。

1.3.4.3 α -淀粉酶活力测定

取上述保存的空肠, 于相同位置称取约 0.1 g 组织, 匀浆, 于酶标仪下检测, 按照试剂盒的方法测定 α -淀粉酶的活力。

1.3.5 免疫指标检测

1.3.5.1 免疫器官指数检测

根据下列公式计算:

$$\text{胸腺脏器指数(\%)} = \frac{\text{胸腺重量(g)}}{\text{体重(g)}} \times 100\%$$

$$\text{肝脏脏器指数(\%)} = \frac{\text{肝脏重量(g)}}{\text{体重(g)}} \times 100\%$$

1.3.5.2 血清 IL-6 检测

取上述保存的血清于酶标仪下检测, 按照试剂盒方法测定血清中 IL-6 的含量。

1.3.5.3 脾淋巴细胞转化率检测

取上述培养的淋巴细胞, 将脾细胞调成 5×10^5 的细胞悬液后, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 90 μ L (每只动物加 9 个孔)。加入 10 μ L ConA (50 μ g/mL) 溶液使其终浓度为 5 μ g/mL (B 细胞增殖加入刺激物 LPS (200 μ g/mL) 10 μ L 使其终浓度为 20 μ g/mL), 设空白培养基孔和细胞对照孔, 各样本设置 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱孵育 48 h, 孵育结束前 4 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8, 继续培养 4 h。酶标仪 450 nm 检测, 计算 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增值率。

1.3.5.4 免疫荧光观察结肠上皮细胞紧密连接蛋白 Claudin1 的表达

取上述 4% 多聚甲醛固定的结肠组织, 进行石蜡切片。依次进行脱蜡、抗原修复和通透, 然后用 1 \times PBS 冲洗 3 次, 5% 羊血清封闭 1 h, 加入抗大鼠 Claudin-1 抗体, 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 加入 Alexa 488 标记的抗大鼠 IgG 抗体, 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 加入 DAPI, PBS 冲洗 3 次, 封片, 荧光显微镜观察。

1.4 数据分析

数据采用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验, 使用统计软件 SPSS 19.0 进行统计分析, 以 $p < 0.05$ 为有统计学显著性差异。

2 结果与分析

2.1 益生菌对幼鼠体重和进食量的影响

表 1 益生菌对幼鼠体重的影响

Table 1 Effect of probiotics on the weight of young rats

组别	初始体重/g	终体重/g	体重增加量/g	体重变化率/%
对照组	62.58 \pm 8.41	209.74 \pm 25.25	147.15 \pm 19.52	235.14
益生菌低剂量组	58.22 \pm 9.36	205.47 \pm 21.84	147.25 \pm 18.44	252.93
益生菌中剂量组	57.32 \pm 7.10	211.56 \pm 15.39	154.25 \pm 11.89	269.12
益生菌高剂量组	63.87 \pm 9.62	211.83 \pm 26.66	152.17 \pm 15.11	238.24

表 2 各组幼鼠平均周增重、周平均耗料及平均料重比的变化

Table 2 Changes in weekly weight gain, food intake, and feed-weight ratio for all rat groups

组别		0~7 d	7~14 d	14~21 d	21~28 d
对照组	周增重	25.1	37.73	41.21	43.11
	周平均耗料	14.71	18.07	20.30	23.05
	料重比	58.61	47.91	49.27	53.48
益生菌低剂量组	周增重	25.05	37.26	43.95	47.32

转下页

接上页

	周平均耗料	14.77	18.40	20.24	22.95
	料重比	58.97	49.40	46.06	48.51
益生菌中剂量组	周增重	27.73	40.47	43.77	42.28
	周平均耗料	14.56	18.47	20.44	23.35
	料重比	52.53	45.63	46.71	55.23
益生菌高剂量组	周增重	27.42	38.73	43.75	44.34
	周平均耗料	14.68	18.90	19.45	23.21
	料重比	53.54	48.81	44.46	52.34

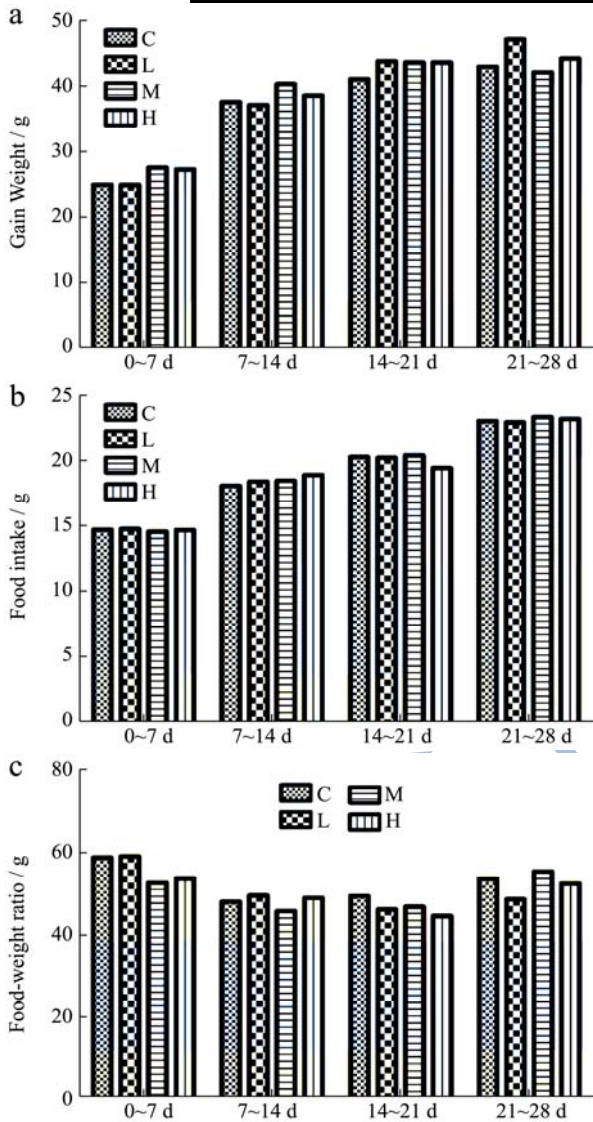


图1 各试验组幼鼠周增重、周平均耗料和周料重比的比较

Fig.1 Comparison of weekly weight gain, food intake, and feed-weight ratio at each stage for all rat groups

由表1和图1a可看出:与对照组相比,益生菌低、中、高剂量组均不同程度地提高了幼鼠的体重,分别增加7.56%、14.45%和1.32%,但无显著性差异,其中中剂量对幼鼠体重增长的效果最好。随着给药剂量的延长,幼鼠周增重逐渐增大且高于对照组。结果说明较长时间喂食益生菌可有效促进幼鼠体重的增加,

促进生长发育。

由表2和图1b和c可看出:与对照组相比,益生菌各组料重比均有所降低,说明益生能在一定程度上改善饲料效率。0~7 d和7~14 d,益生菌中剂量料重比低于益生菌低剂量和益生菌高剂量;14~21 d和21~28 d,整体上益生菌高剂量料重比低于益生菌低剂量和益生菌中剂量。从0~28 d整个试验期看,与对照组相比,益生菌低、中、高剂量组幼鼠采食量平均提高7.56%、14.45%和1.32%,料重比平均降低3.89%、3.74%和4.47%,说明在改善饲料效率方面,益生菌高剂量组优于益生菌中剂量组和益生菌低剂量组。

2.2 益生菌对幼鼠股骨长度发育的影响

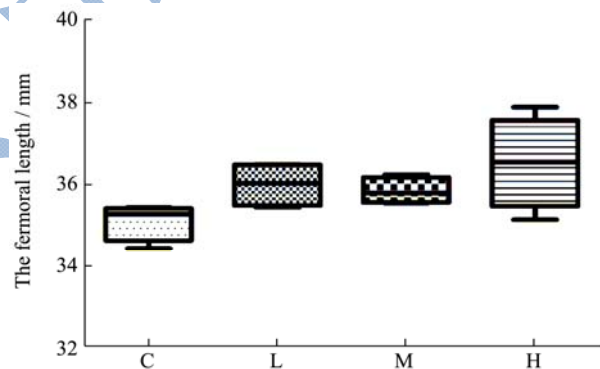


图2 各试验组幼鼠股骨比较

Fig.2 Comparison of femur length among all rat groups

与对照组相比,益生菌中剂量组和益生菌高剂量组股骨长度分别增加1.17%和1.69%,但没有显著性差异。实验表明,益生菌能增加骨骼肌生长,且呈剂量依赖性。股骨长度增加表明益生菌能促进骨骼生长发育,有利于儿童的生长。

2.3 益生菌对 α -淀粉酶活力的影响

与对照组相比,益生菌低、中、高剂量组 α -淀粉酶活力均增加,但无显著性差异。淀粉水解酶,包括 α -淀粉酶和 β -淀粉酶。 α -淀粉酶随机催化淀粉中 α -1,4-糖苷键水解,生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和糊精等还原糖,同时使淀粉的粘度降低,是消化系

统中的一个关键酶^[7,8]。益生菌能促进 α -淀粉酶的活力，有利于淀粉的水解，促进营养物质的吸收，从而促进机体生长发育。

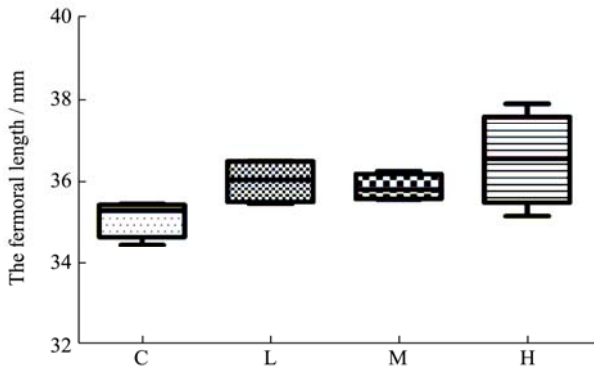


图3 各试验组幼鼠 α -淀粉酶活力的比较

Fig.3 Comparison of α -amylase activity among all rat groups

2.4 益生菌对免疫脏器指数的影响

与对照组相比，益生菌低、中、高剂量组胸腺和肝脏指数分别增加 23.65%、24.68%、25.45% 和 0.34%、6.99%、0.70%。结果表明，益生菌能促进免疫器官胸腺和肝的发育与成熟，促进机体免疫功能，增强机体免疫力。

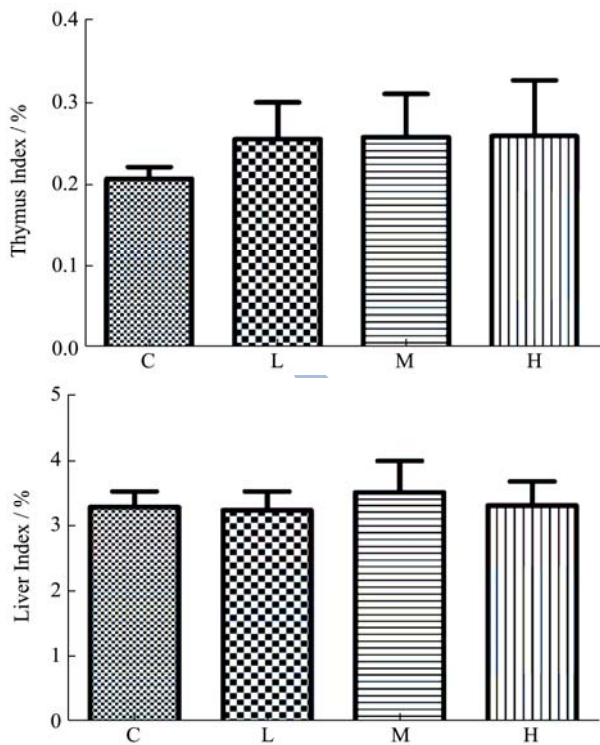


图4 各试验组胸腺和肝脏指数的比较

Fig.4 Comparison of thymus and liver indices among all rat groups

2.5 益生菌对血清中 IL-6 表达的影响

与对照组相比，益生菌中、高剂量组血清中 IL-6

水平分别增加 5.40% 和 23.15%，但无显著性差异。IL-6 主要由巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞等多种细胞产生。它可调节多种细胞的生长与分化，具有调节免疫应答、急性期反应及造血功能，并在机体的抗感染免疫反应中起重要作用^[9]。益生菌能促进 IL-6 的表达，表明益生菌能提高机体免疫力。

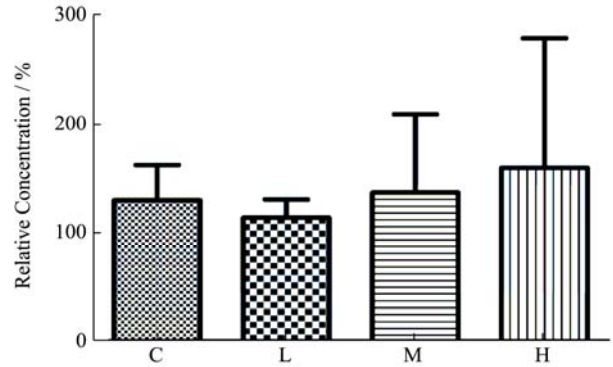


图5 各试验组 IL-6 表达的比较

Fig.5 Comparison of the expression of IL-6 among all rat groups

2.6 益生菌对 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞转化率的影响

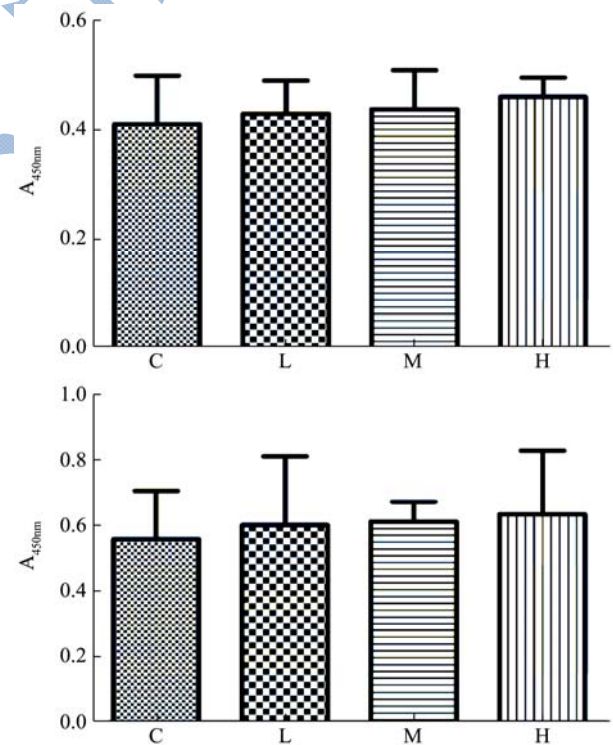


图6 各试验组 T、B 淋巴细胞转化率的比较

Fig.6 Comparison of the transformation rates of T- and B-cells among all rat groups

与对照组相比，益生菌低、中、高剂量组 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增值率分别增加 4.55%、6.50%、

12.11%和 7.9%、9.64%、13.71%。

T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面有多种受体，在体外培养中加入特异性抗原或非特异性促有丝分裂原的刺激下，细胞代谢和形态可发生一系列变化，如能转化成体积较大的原淋巴细胞。转化细胞数量可反映机体细胞免疫功能，测定 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的应答能力，诊断细胞免疫缺陷病^[10-12]。益生菌能促进 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞转化率，表明益生菌能促进免疫力的提高。

2.7 益生菌对幼鼠结肠紧密连接蛋白 Claudin1 表达的影响

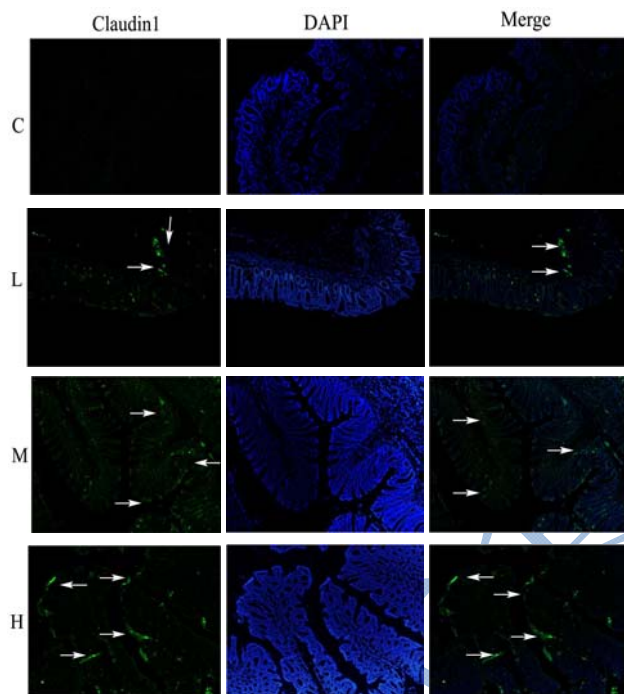


图 7 各试验组 Claudin1 表达的比较

Fig.7 Comparison of the expression of claudin-1 among all rat groups

对照组大鼠还处于生长期，免疫系统不够完善，结肠上皮紧密蛋白 Claudin1 表达不强；益生菌低、中、高剂量组与对照组相比，上皮紧密蛋白 Claudin1 表达均增强，各组之间随着给药剂量增加，Claudin1 表达逐渐增强。

肠道中存在大量菌群，难免有条件致病菌及病原菌，正常状况下肠粘膜屏障能够阻挡有害物质入血，起保护作用，利于内环境稳态^[13]。机械屏障是肠道的上皮细胞相互之间的完整的连接。机械屏障主要包括肠上皮细胞及其紧密连接 (tight junction, TJ)、肠粘膜表面分泌的粘液、缝隙连接、黏膜下固有层。紧密连接是限制肠上皮细胞旁路途径转运速度的物质基础，

维持肠粘膜上皮屏障功能的完整性，紧密连接可以高效的抑制存在于肠道内的炎症产物，细菌及其内毒素等各种物质的胞旁转运^[14,15]。Claudin1 是结肠上皮紧密连接蛋白，位于粘膜上皮细胞，Claudin1 表达增强，能够增加肠上皮粘膜屏障，使有害物质不易于进入血液。益生菌能增加 Claudin1 蛋白的表达，表明益生菌能增加肠道粘膜免疫力，抑制有害物质的侵入，增强机体固有免疫。

3 结论

该研究采用 21 d 幼鼠作为对照组，通过 28 d 灌胃低、中、高剂量的益生菌，观测不同剂量的益生菌对幼鼠生长发育和免疫功能的促进作用，并以幼鼠体重、进食量、股骨长度和 α -淀粉酶活力作为生长指标，以胸腺指数、肝指数、血清中 IL-6、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 Claudin1 作为免疫质变进行评价，较为全面的分析了益生菌的促生长发育和提高免疫力的活性。从实验结果可以得出如下结论：益生菌能在一定程度上能促进生长发育和提高免疫力，且从整体评估高剂量效果优于中剂量优于低剂量。因此，本实验益生菌具有良好的促生长发育和提高免疫力的作用，并为益生菌的使用提供理论依据。

参考文献

- [1] 王金子,李宏亮,赵艾,等.出生体重对 3~6 岁儿童生长发育的影响[J].中国妇幼保健,2014,29(36):6039-6041
WANG Jin-zi, LI Hong-liang, ZHAO Ai, et al. Effect of birth weight on the growing developemt for 3~6 years children [J]. Chinese Maternal and Health Care, 2014, 29(36): 6039-6041
- [2] Yousafzai A K, Obradovi J, Rasheed M A, et al. Effects of responsive stimulation and nutrition interventions on children's development and growth at age 4 years in a disadvantaged population in Pakistan a longitudinal follow-up of a cluster-randomised factorial effectiveness trial [J]. Lncet Glob Health, 2016, 4(8): e548-e558
- [3] 赵炎声.中医学的“正气”与现代免疫学[J].甘肃中医,1993, 6(2):5-7
ZHAO Yan-sheng. "Integrity" of traditional Chinese medicine and modern immunology [J]. Gansu Traditional Chinese Medicine, 1993, 6(2): 5-7
- [4] Bomba A, Nemcova R, Mudronova D, et al. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics [J]. Trends in Food Science & Technology, 2002, 13(4): 121-126
- [5] 辛娜,张乃锋,刁其玉,等.芽孢杆菌制剂对断奶仔猪生长性能胃肠道发育的影响[J].畜牧兽医学报,2012,43(6):901-908

-
- XIN Na, ZHANG Nai-feng, DIAO Qi-yu, et al. Effect of Bacillus on growing development and gastrointestinal development in weaned pigs [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 43(6): 901-908
- [6] Chesson A. Probiotics and other intestinal mediators [M]. Loughborough: Nottingham University Press, 1994
- [7] Dong Jing. Studies on regulatory mechanism of supplementing L-carnitine on fatty acids metabolism in juvenile common carp [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014
- [8] Cai Xin, Yu Jian-an, Xu Li-man. The mechanism study in the interactions of sorghum procyanidins trimer with porcine pancreatic α -amylase [J]. *Food Chemistry*, 2015, 174: 291-298
- [9] Koca S S, Bahcecioglu I H, Poyrazoglu O K, et al. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatophepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet [J]. *Inflammation*, 2008, 31: 91-98
- [10] Klinker M W, Lundy S K. Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes [J]. *Molecular Medicine*, 2012, 18: 123-137
- [11] Zhang Y, Luo F, Cai Y, et al. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells [J]. *J. Immunol.*, 2011, 186(4): 1963-1969
- [12] La Cava A, Van Kaer L, Fu Dong S. CD4⁺CD25⁺Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(7): 322-327
- [13] Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148: 30-36
- [14] Turner J R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(11): 799-809
- [15] Wang H, Zhang W, Zuo L, et al. Intestinal dysbacteriosis contributes to decreased intestinal mucosal barrier function and increased bacterial translocation [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 58(4): 384-392

