



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Medical and Health—Article

## 多组学联用揭示花粉过敏基于肠道菌的新机制

韩珮<sup>a, #</sup>, 李丽莎<sup>b, #</sup>, 王子熹<sup>b, #</sup>, 锡琳<sup>c, #</sup>, 于航<sup>a</sup>, 丛林<sup>a</sup>, 张正威<sup>a</sup>, 符洁<sup>a</sup>, 彭冉<sup>a</sup>, 潘利斌<sup>a</sup>, 马殊荣<sup>a</sup>, 王学艳<sup>d</sup>,  
王洪田<sup>d</sup>, 王向东<sup>e, \*</sup>, 王琰<sup>a, \*</sup>, 孙劲旅<sup>b, \*</sup>, 蒋建东<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

<sup>b</sup> Department of Allergy, National Clinical Research Center for Dermatologic and Immunologic Diseases, Beijing Key Laboratory of Precision Medicine for Diagnosis and Treatment on Allergic Diseases, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

<sup>c</sup> Department of Allergy & Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery & Key Laboratory of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Ministry of Education, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China

<sup>d</sup> Department of Allergy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

<sup>e</sup> Beijing Key Laboratory of Nasal Diseases, Beijing Institute of Otorhinolaryngology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 December 2020

Revised 24 February 2021

Accepted 29 March 2021

Available online 1 May 2021

#### 关键词

代谢组学  
肠道菌群  
花粉过敏  
过敏性疾病  
肠道屏障功能紊乱

### 摘要

由于过敏性疾病在世界范围内流行且尚无治愈方法,因此有必要探讨其病理生理机制。由于过敏性疾病与肠道菌群失调相关,本研究从宿主与微生物的分子层面,结合代谢组学和微生物组学,寻找可能的机制。本研究对SD大鼠注射青蒿花粉提取物以诱导其对花粉的过敏反应,这种过敏反应降低了血液中的缬氨酸、异亮氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、吡啶丙酸和肌醇浓度,并减少了粪便中的短链脂肪酸(SCFA)。来自于瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)和梭状芽孢杆菌(Clostridiales)的几个有益菌属在模型组中表达减少,而幽门螺杆菌*Helicobacter*和阿克曼氏菌*Akkermansia*仅在模型组中表达。此外,模型组肠道 claudin-3 和肝脏脂肪酸结合蛋白表达下调,与代谢变化和细菌有关。本文的研究结果表明,氨基酸及其衍生物(尤其是缬氨酸和色氨酸的还原产物吡啶丙酸)、短链脂肪酸和肠道微生物(特别是幽门螺杆菌*Helicobacter*和阿克曼氏菌*Akkermansia*)的改变可能通过抑制 claudin 蛋白表达和影响黏液层而破坏肠道屏障功能,进而导致花粉过敏。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

花粉过敏是一种季节性过敏性鼻炎 (allergic rhinitis, AR), 主要影响上呼吸道系统。花粉过敏是由吸入的植物花粉引起的, 仅发生在特定的人群中[1]。据报道, 由风或者昆虫携带的花粉均可引起过敏反应, 并且症状和严重

程度因个人的特定健康状况而有所不同[2–3]。迄今为止, 源自草和树木的 150 多个花粉过敏原已在全球范围内得到认可[4]。北美和欧洲的主要花粉过敏原分别是豚草属 (*Ambrosia*) 和禾本科植物 (Gramineae) 的花粉。在中国, 尤其是在北部, 蒿属植物 (*Artemisia*) 和葎草属植物 (*Humulus*) 的花粉是引起秋季花粉过敏的关键因素[5–6]。

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [entwxd@vip.sina.com](mailto:entwxd@vip.sina.com) (X.-D. Wang), [wangyan@imm.ac.cn](mailto:wangyan@imm.ac.cn) (Y. Wang), [sunjinlv@pumch.cn](mailto:sunjinv@pumch.cn) (J.-L. Sun), [jiang.jdong@163.com](mailto:jiang.jdong@163.com) (J.-D. Jiang).

# These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 15(8): 115–125

引用本文: Pei Han, Li-Sha Li, Zi-Xi Wang, Lin Xi, Hang Yu, Lin Cong, Zheng-Wei Zhang, Jie Fu, Ran Peng, Li-Bin Pan, Shu-Rong Ma, Xue-Yan Wang, Hong-Tian Wang, Xiang-Dong Wang, Yan Wang, Jin-Lyu Sun, Jian-Dong Jiang. Multi-Omics Analysis Provides Insight into the Possible Molecular Mechanism of Hay Fever Based on Gut Microbiota. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.013>

花粉过敏的主流学说是平衡的免疫系统。Wambre等[7]首先发现了一个名为 $T_H2A$ 的2型辅助T细胞亚群,该细胞亚群是过敏性疾病发病机制中涉及的特定细胞。虽然对过敏性疾病中免疫细胞的研究已经进行了二十多年,但仍然没有有效的策略来治疗这种过敏反应[8-9]。研究人员已经开始意识到过敏反应可能不只是一个简单特征的免疫系统紊乱,同样全基因组的关联分析也鉴定出与花粉过敏相关的数十个基因座[10-11]。然而,异常基因并不一定会导致表型的改变,从而降低其预测疾病的能力。其他研究表明,肺上皮缺损与花粉过敏的风险有关[9]。但是,迄今为止,还没有一个全面的理论可以解释花粉过敏的病理过程。因此,对疾病发病机制的深入了解可能有助于改进疾病监测和新的药物策略[12-13]。

哺乳动物体内有10万亿~100万亿个共生细菌,被称为微生物群[14]。这种复杂的微生物群拥有的基因数量是人类基因组编码基因的数百倍,可以参与广泛的代谢活动[15]。然而,由于细菌数量众多,且对宿主-微生物群相互作用的机制研究相对较少,因此确定宿主相关肠道菌群的功能状态非常具有挑战性[16]。组学技术的出现,特别是代谢组学的出现,为肠道细菌功能的研究开辟了新思路[17]。代谢组学用于对生命系统中特定条件下的低分子量代谢物,即代谢组进行分析[18]。从本质上讲,代谢组代表了实时的整体生理状态,反映了基因组修饰和环境刺激对生命系统的相互作用[19]。

肠道菌群失调与免疫介导的疾病如过敏性疾病的发病机制有关。例如,与持续牛奶过敏的儿童相比,在牛奶过敏缓解的儿童粪便中梭状芽孢杆菌和厚壁菌门出现富集[17]。在本研究中,在大鼠模型中结合了非靶向代谢组学分析和微生物多样性分析,更好地确定与花粉过敏相关的肠道菌变化。本研究旨在识别与花粉过敏相关的代谢物和肠道细菌,并深入了解与花粉过敏相关的潜在病理生理机制。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 化学试剂

高效液相色谱级乙腈、甲醇购自赛默飞世尔科技公司(中国)。超纯水购自杭州娃哈哈集团有限公司。色谱级丙酮购自国药集团化学试剂有限公司。 $N,O$ -双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(含1%三甲基氯硅烷)、 $O$ -甲氧基胺盐酸、 $d_4$ -琥珀酸、丙酸和丁酸(99.9%)购自美国Sigma-Aldrich公司。醋酸(100%)购自德国默克公司。氯化钠、碳酸氢钠和氢氧化铝购自北京索莱宝科技有限公司。

苯酚购自阿拉丁控股集团有限公司(中国)。

### 2.2. 动物实验

雄性SD大鼠,体重约200 g,购自中国医学科学院医学实验动物研究所。所有动物都可以自由获取食物和水,温度保持在22~24 °C,光/暗循环12 h。所有操作均经中国医学科学院-北京协和医学院医学实验动物研究所动物伦理委员会批准,符合机构准则和伦理规范。

将青蒿花粉溶于柯卡氏溶液(氯化钠5.00 g、碳酸氢钠2.75 g、苯酚4.00 g、超纯水1000 mL)中,最终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。然后将提取物与氢氧化铝按1:1(体积分数)的比例混合。将大鼠随机分为对照组( $n=8$ )和模型组( $n=8$ )。经过6天适应期后,分别于第7天、第13天和第19天腹腔注射花粉佐剂混合物或生理盐水1 mL。致敏后,在第20~25天对大鼠鼻腔滴注20  $\mu\text{L}$ (每个鼻孔10  $\mu\text{L}$ )的盐水或花粉提取物。实验结束时采集血浆、尿液、粪便和肠道内容物。实验设计如图1(a)所示。

### 2.3. 模型验证

使用酶联免疫吸附测定(ELISA)确定花粉特异性的免疫球蛋白E(IgE)的水平。当使用ELISA试剂盒时,严格遵循制造商的方案(美国BioTSZ公司)。将鼻腔的组织标本固定在4%多聚甲醛溶液中,然后浸入乙二胺四乙酸(EDTA)溶液中进行脱钙化两周。苏木精和曙红染色用于染色组织。

### 2.4. 代谢组学

血浆、尿液、粪便和肠道内容物立即保存在-80 °C冰箱直至用于分析。血浆和粪便代谢组学分析采用日本岛津公司的GC-2010 Plus气相色谱系统与GCMS-QP2020单四极杆型气相色谱质谱联用仪。样品处理和气相色谱-质谱(GC-MS)分析都遵循补充方法中总结的既定规程。

### 2.5. 肠道屏障功能标志物的测定

采用尿 claudin-3 的 ELISA 试剂盒(目录号 KL-CLDN3-Ra; 上海康朗生物科技有限公司)、L-FABP 的 ELISA 试剂盒(目录号 ARB12324; 北京百奥莱博科技有限公司); I-FABP 的 ELISA 试剂盒(目录号 ARB14534; 北京百奥莱博科技有限公司)测定尿中 claudin-3、肝脏和肠道脂肪酸结合蛋白(L-FABP和I-FABP)水平。

### 2.6. 实时定量聚合酶链反应测定 claudin-3 和 L-FABP 的表达

采用实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肠道中 claudin-3 和 L-FABP 的表达。用 NucleoZOL 试剂(Mach-

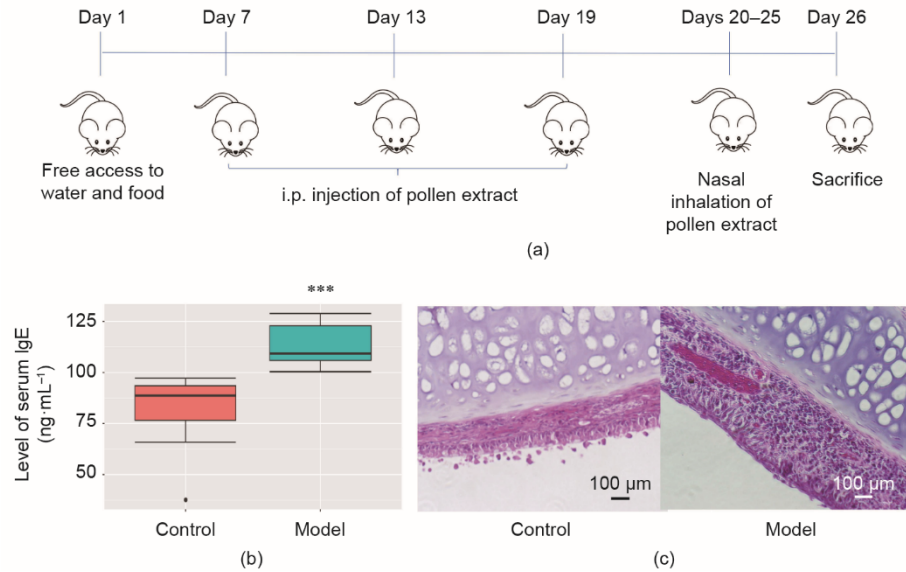


图1. 动物模型的建立与评价。(a) 动物实验设计；(b) 血清特异性IgE水平；(c) 鼻黏膜粒细胞密度。数据为每组8只大鼠的均值±标准差(SD)。\*\*\* $P < 0.001$ ，采用Mann-Whitney检验。

ery Nagel, 德国) 分离提取总 RNA (每 100 mg 组织加 1 mL NucleoZOL), 并使用 QuantScript RT 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]逆转录成 cDNA。将所得 cDNA 用作模板。RT-qPCR 引物来自于已发表的参考文献[20–21], 如表 1 所示。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参。使用 ABI 7500 实时聚合酶链反应 (PCR) 系统 (Applied Biosystems, 美国) 进行 RT-qPCR。反应条件如下: 95 °C 预变性 30 s, 然后进行 40 个溶解循环 (95 °C, 10 s) 和退火/延伸 (60 °C, 30 s)。每个模板的 PCR 反应在 96 孔板中重复三次。将循环阈值 (Ct) 用于比较对照组和模型组之间的基因表达水平。

表1 本研究中使用的引物序列

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Claudin-3 (forward)	CATCCTGCTGCCGCCTTCG
Claudin-3 (reverse)	CCTGATGATGGTGTGGCCGAC
L-FABP (forward)	CCTCATTGCCAATGAAGTCTCCGG
L-FABP (reverse)	AGCGGATCCTAAATCTCTTGCTGACTC
GAPDH (forward)	GCCACATCGCTCAGACACCA
GAPDH (reverse)	CTCAGCCTTGACGGTGCCAT

## 2.7. 微生物多样性分析

根据制造商的说明, 使用 E.Z.N.A.® 土壤 DNA 试剂盒 (Omega Bio-tek, 美国) 从粪便样本中分离微生物 DNA。用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 区。然后从 2% 的琼脂糖凝胶中提取 PCR 产物, 使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒 (Axy-

gen Biosciences, 美国) 进行纯化。对纯化后的扩增子进行 Illumina MiSeq 测序分析。

## 2.8. 粪便中短链脂肪酸的靶向分析

该方法参考了先前发表的研究[22]。将所选短链脂肪酸 (SCFA) 的储备溶液溶解在丙酮中, 乙酸的浓度为 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 丙酸和丁酸的浓度为 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。通过将三种短链脂肪酸标准品混合在一起制备校准曲线 (乙酸浓度: 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、250  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、5000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、12 500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、25 000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 50 000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 丙酸和丁酸浓度: 2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、4  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、20  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、40  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 2000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。称量每个粪便样品, 并在室温 (20~25 °C) 下在 8 倍 ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 丙酮中浸泡 3 h。对样品进行涡旋: 4 °C、2450  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min。收集上清液用于气相色谱 (GC) 分析 (GC-2014; 日本岛津公司), 用于分离短链脂肪酸, 仪器参数与之前发表的研究 [22] 相同。

## 2.9. 统计分析

将获得的 GC-MS 数据在 R Studio 的 “XCMS” 包中进行处理 (峰值拾取和校准)。在 R 中分别归一化后, 将质量控制 (QC) 样本中相对标准偏差低于 30% 且 70% 的样本存在的特征纳入后续多变量分析。在经过对数变换和帕累托优化之后, 对数据进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。然后利用由 OPLS-DA 模型得到的 S 图, 基



于协方差  $P[1]$  和  $P_{\text{corr}}$  值 ( $P[1] > 0.05$ ,  $P_{\text{corr}} > 0.8$ , 或  $P[1] < -0.05$ ,  $P_{\text{corr}} < -0.6$ ) 进行筛选。所有多变量分析均采用 SIMCA (版本 14; MKS Umetrics AB, 瑞典) [23] 进行。选择最具差异表达的特征在原始数据中进行半量化, 特征水平用峰面积与内部标准峰面积的比值进行表征。通过对比美国国家标准与技术研究院 (National Institute of Standards and Technology, NIST) 数据库, 对代谢物进行鉴定。为了比较对照组和模型组, 本研究使用单变量非参数 Mann-Whitney 检验 (双侧) 检测代谢特征水平。

为了研究每种代谢物和细菌菌株与花粉过敏之间的关联, 采用了 Spearman 相关性分析。使用免费在线 Majorbio 云平台 (上海美吉生物医药科技有限公司) 进行生物多样性分析。

### 3. 结果

#### 3.1. SD大鼠的花粉过敏特征

在激发阶段 (从第 20 天到第 25 天), 在模型组中观察到明显的花粉诱导的鼻炎症状。大鼠在受到花粉提取物的刺激后不久开始打喷嚏和挠鼻子。为了进一步证实花粉过敏的发展, 在大鼠被安乐死后测量血清特异性 IgE 水平。与预期结果一致, 模型组大鼠的 IgE 水平显著增加 (增加约 1.5 倍;  $P < 0.001$ ), 表明建立的模型成功。此外, 在激发阶段结束后, 模型组鼻黏膜中的粒细胞密度也高于对照组 [见图 1 (b)、(c) 以及附录 A 中的图 S1]

#### 3.2. 花粉过敏大鼠血浆代谢组学的变化

在确认该模型建立成功后, 对血浆样本进行代谢组学分析, 以寻找与花粉过敏相关的代谢物。OPLS-DA 模型显示, 对照组和模型组血浆代谢谱有明显差异, 生化指标发生改变 [图 2 (a)]。为了确定哪个代谢物是对照组和模型组之间最明显的鉴别特征, 使用相应的相关 S 图 [图 2 (b)] 根据本文第二节方法部分所述的标准进行处理。选择了 14 个代谢物。在检查原始数据和对比 NIST 数据库后, 有 12 个代谢物的相似性指数超过 85, 即缬氨酸、胆固醇、柠檬酸盐、苏氨酸、尿素、异亮氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、吡咯丙酸 (IPA) 和肌醇。然后, 在原始数据中测量这些代谢物的峰值面积 (标准化为内标), 以进行单变量分析。胆固醇、柠檬酸盐、苏氨酸和尿素不在分析范围之内, 因为这些差异没有统计学意义。支链氨基酸亮氨酸在模型组中未显示出实质性改变。缬氨酸和异亮氨酸在模型组中均显著降低, 分别下降为原来的 57% 和 52%, 因此, 不排除亮氨酸。模型组血浆天

冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、IPA 和肌醇水平下降 [ $P < 0.05$ ; 图 2 (c)]。其中, IPA 是肠道微生物衍生的代谢物 (减少为原来的 50%), 如图 2 (c) 所示。

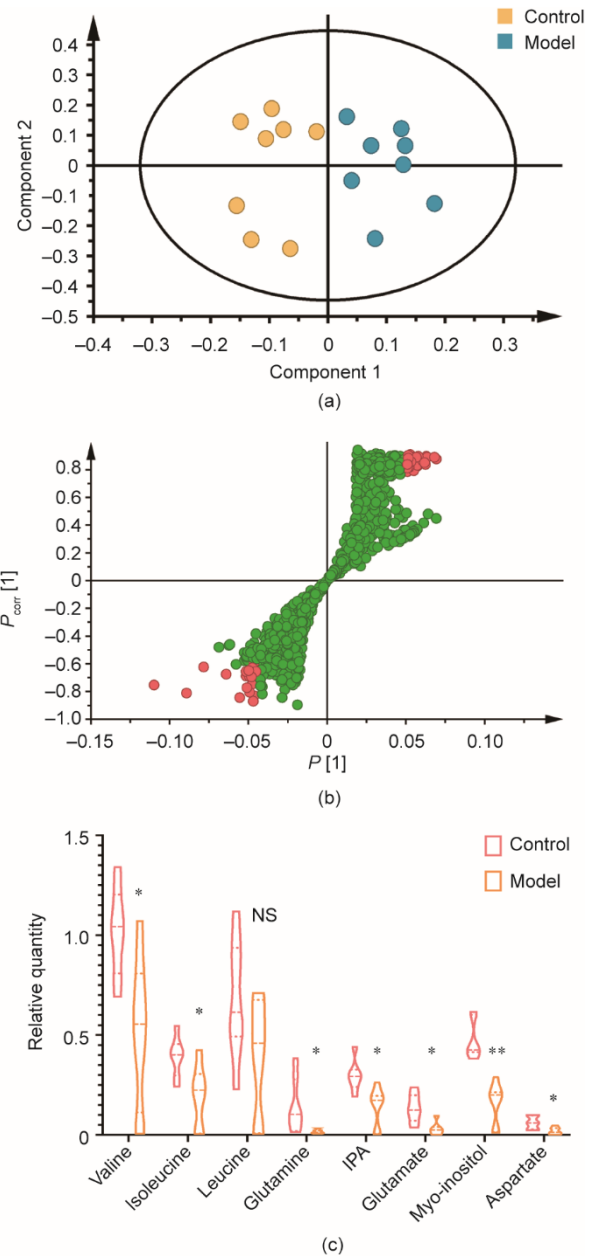


图 2. 对照组和模型组大鼠血浆样本的代谢组学分析。(a) OPLS-DA 模型图。(b) S-plot 模型图。每个点代表一个特征, 红色的点是基于本文第二节方法部分所述的标准选择的点。(c) 小提琴图显示对照组和模型组之间的代谢特征水平。数据为每组 8 只大鼠的均值  $\pm$  标准差。采用 Mann-Whitney 检验, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。NS: 无统计学意义。

#### 3.3. 粪便微生物群的生态多样性

由于肠道菌群失调与过敏性疾病有关, 并且在本研究中观察到肠道菌代谢物的变化, 因此对粪便微生物群组成进行了分析, 以探索组成差异, 以及模型组中改变的微生物群与宿主血液中代谢物相关的程度。将粪便样品进行

16S rRNA 测序，如下所述：共分析了 998 342 个读数，并将其聚类为 835 个操作分类单元 (OTU)。与对照组大鼠相比，模型组大鼠 OTU 的 OPLS-DA 图显示出明显的变化 [图 3 (a)]。

为了研究花粉过敏大鼠体内微生物群的具体变化，本研究评估了模型组和对照组在不同菌群水平上的相对丰度。在大鼠粪便样本确定的门中，疣微菌门仅存在于模型组。厚壁菌和拟杆菌是主要的门；模型组中厚壁菌与拟杆菌的比例低于对照组，为 0.67，表明厚壁菌门中的生物丰度较低 [图 3 (b)]。在科水平上，模型组中瘤胃球菌科 (Ruminococcaceae) 和毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 的相对丰度降低，而普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae) 和疣微菌科 (Akkermansiaceae) 的相对丰度增加 [图 3 (c)]。

在属水平上，还观察到模型组和对照组之间的显著变化，模型组包含更少的细菌菌株 [图 3 (d)]。来自瘤胃球菌科的有益菌属，以及毛螺菌科中的 *Blautia*、梭菌科中的 *Romboutsia* 和 *Clostridium* 的相对丰度显著减少或消失。这些有益属可能产生短链脂肪酸。在瘤胃球菌科中，*Ruminococcaceae\_UCG-005* 的相对丰度从 10% 降至 3%，

*Ruminococcaceae\_UCG-009* 的相对丰度从 0.075% 降至 0.025%，*Ruminococcaceae\_NK4A214\_group* 的相对丰度从 1.1% 下降至 0.03%。在毛螺菌科中，*Lachnospiraceae\_FCS020\_group* 和 *Blautia* 的相对丰度分别从 0.05% 和 2% 降至 0.02% 和 0.1%。*Unclassified\_o\_Clostridiales* 和 *Romboutsia* 相对丰度分别降低 (变为原来的 15% 和 26%) ( $P < 0.05$ , 图 4)。梭菌属 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 在模型组中几乎消失。有趣的是，阿克曼氏菌、普雷沃氏菌属 *Prevotellaceae\_Ga6A1\_group* 和幽门螺杆菌 (*Helicobacter*) 仅在模型组中检测到，而在对照组中未检测到 (图 4)。除这些差异外，对照组中的真杆菌属 (*Eubacterium\_nodatum\_group*) 丰度也较高，是模型组的 4 倍。

### 3.4. 短链脂肪酸的变化和上皮细胞的完整性测定

之前研究发现模型组大鼠产短链脂肪酸菌群减少，为了验证这一发现，测定了粪便中三种短链脂肪酸 (乙酸、丙酸和丁酸) 的水平。还检测了由粪便代谢组学检测到的单糖，已知这些单糖被细菌代谢，产生短链脂肪酸。粪便中短链脂肪酸和单糖的浓度差异显著。如图 5 (a)、(b)

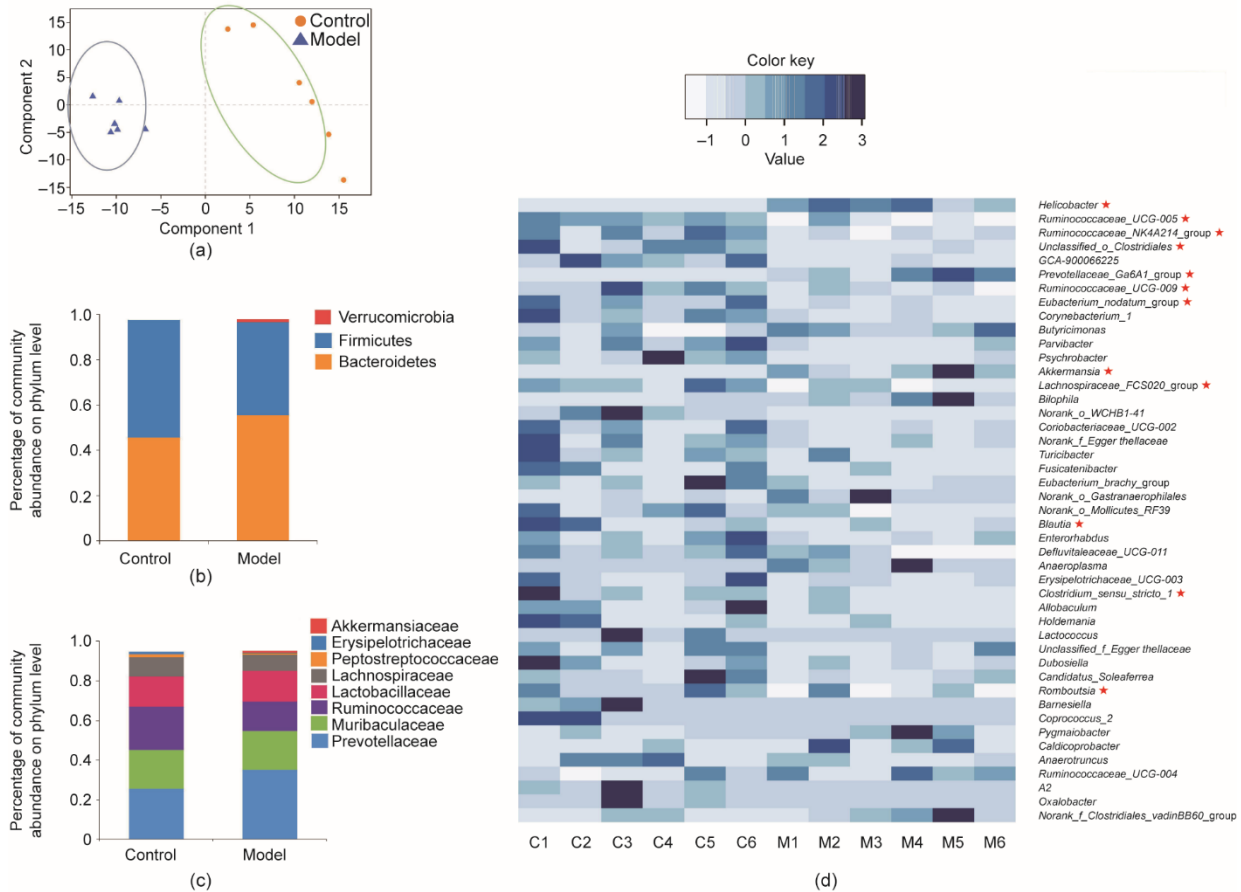


图 3. 不同水平的微生物群多样性分析。(a) OPLS-DA 模型图；(b) 基于门水平的群落分析；(c) 基于科水平的群落分析；(d) 显示前 45 个属的热图。

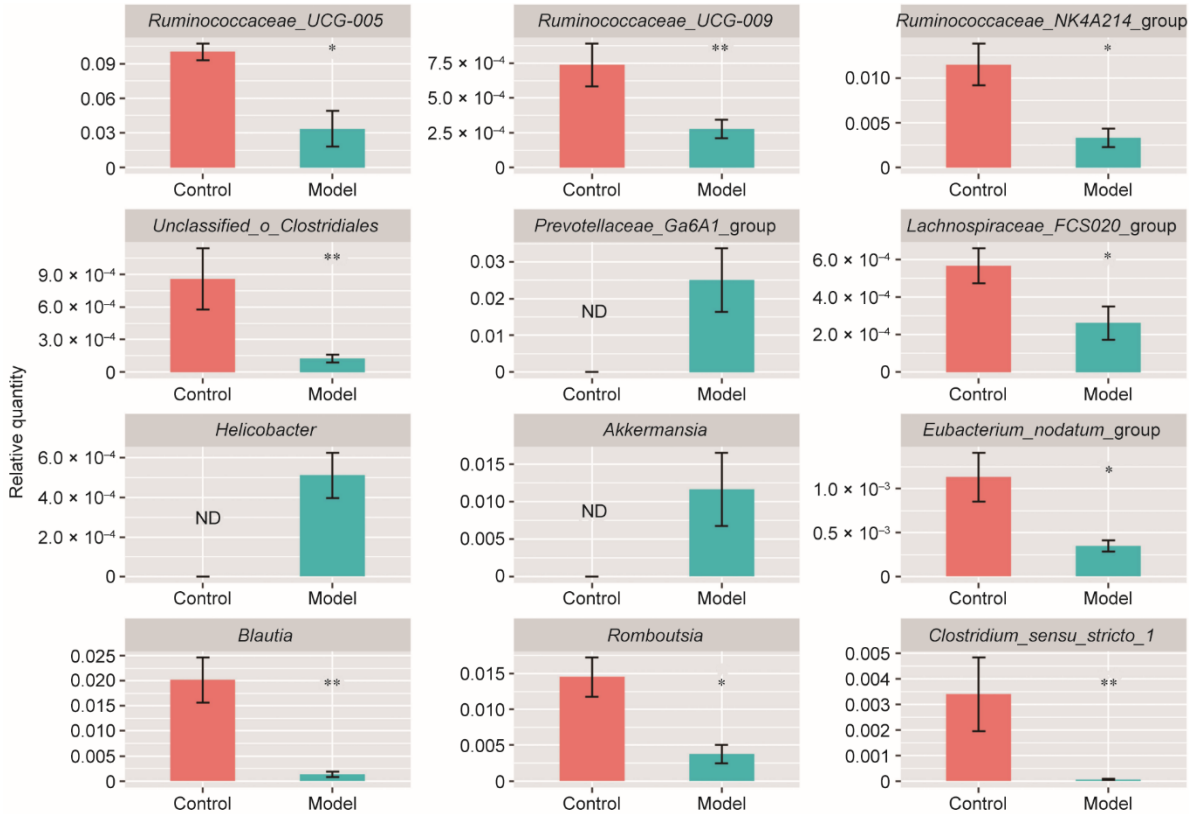


图4. 变化细菌菌株的单变量分析。数据为每组6只大鼠的均值±标准差，使用Mann-Whitney检验，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。ND：未检测到。

所示，模型组中乙酸、丙酸和丁酸水平显著降低。因此，模型组中测定的两种单糖均有积累。该分析表明，由于肠道生态失调，模型组的短链脂肪酸水平降低。这证实了对照组和模型组大鼠产短链脂肪酸菌群丰度的差异。

先前的研究已经表明短链脂肪酸和其他菌群代谢物可以维持上皮屏障，因此本研究对模型组和对照组的肠道完整性进行了评估。L-FABP和I-FABP是上皮细胞完整性的生物标志物，claudin-3属于紧密连接蛋白，因此，本研究首先在蛋白质水平上对它们进行测量。结果显示，模型组大鼠尿中claudin-3和L-FABP水平较低，claudin-3和L-FABP分别下降为原来的50.76%和81.97%，而I-FABP水平无明显变化[图5(c)]。然后，研究了肠道claudin-3和L-FABP在转录水平上的含量。与预期一致，模型组中claudin-3和L-FABP表达下调，其转录水平下调幅度甚至高于蛋白水平，claudin-3和L-FABP下降为原来的30.40%和0.10% [图5(d)]。这些观察结果表明肠道的完整性受到了破坏。

### 3.5. 代谢组学、肠道菌群和生物学指标测定

为了确定代谢物的相对数量、肠道细菌的相对丰度和生物学指标之间是否存在相关性，本研究计算了Spearman相关系数。三种细菌菌株，即幽门螺杆菌、真杆菌属

和梭菌属 (*Clostridium\_sensu\_stricto\_1*) 与血清IgE水平显著相关。在三种细菌中，幽门螺杆菌与几乎所有血浆代谢物显著相关。虽然未检测到*Lachnospiraceae\_FCS020\_group*与血清IgE之间的相关性，但其与异亮氨酸、IPA和肌醇呈正相关。至于代谢物，只有IPA和血清IgE呈负相关(图6)。

claudin-3与血清IgE水平呈负相关[ $r = -0.77$ ,  $P = 0.013$ ; 图7(a)]，与缬氨酸、谷氨酸、IPA、天冬氨酸和肌醇呈正相关[图7(b)]。值得注意的是，claudin-3与幽门螺杆菌之间存在强烈的相关性，幽门螺杆菌是唯一与claudin-3显著相关的属[ $r = -0.79$ ,  $P = 0.009$ ; 图7(c)]。L-FABP与*Blautia*呈正相关，与阿克曼氏菌和*Prevotellaceae\_Ga6A1\_group*。L-FABP水平与血清IgE或血浆代谢物水平之间无相关性。

## 4. 讨论

在7种下调的氨基酸或其代谢物中，支链氨基酸(BCAA)缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸是必需的，不能由人类合成，因此，它们来源于摄入的食物或由肠道微生物合成。由于对照组和模型组的大鼠接受相同的食物喂养，

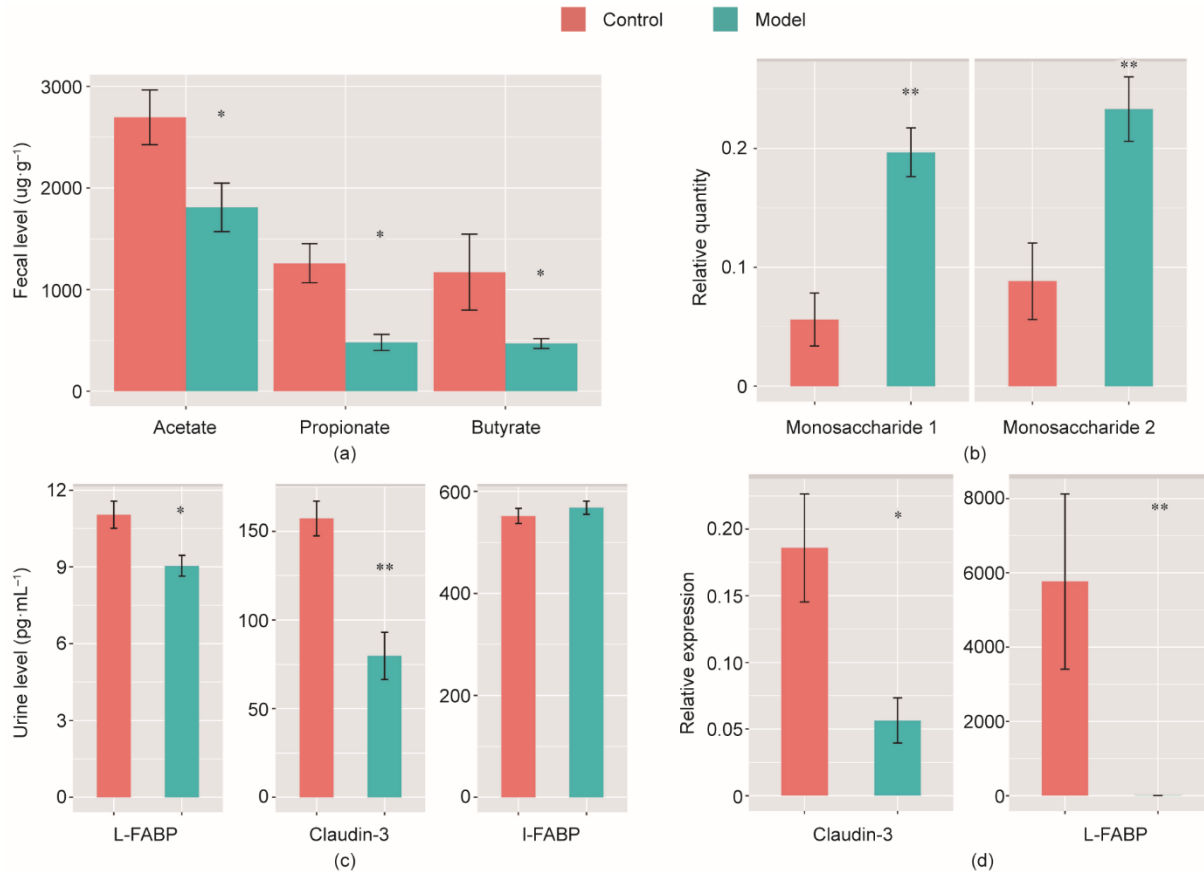


图5. 粪便短链脂肪酸 (a), 粪便单糖 (b), 蛋白质水平的 claudin-3、L-FABP 和 I-FABP (c), 以及转录水平的 claudin-3 和 L-FABP (d) 的测定。使用 Mann-Whitney 检验, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

BCAA 的下降趋势有可能是由花粉过敏引起的肠道微生物群的异常蛋白质代谢引起的。然后, 本文分析了春季花粉过敏所致鼻炎患者的数据, 所有 BCAA 在花粉过敏发作阶段表现出类似的减少趋势, 亮氨酸显著减少为原来的 87.72% [24]。IPA 是色氨酸的细菌衍生代谢物[25]。色氨酸也是一种必需氨基酸。与 BCAA 类似, 不同水平的 IPA 也可能是肠道微生物代谢能力改变的结果。通过 16S rRNA 测序检测到的肠道微生物群的失调证实了这些变化, 异亮氨酸与 *Lachnospiraceae\_FCS020\_group* 呈正相关, 而缬氨酸与幽门螺杆菌呈负相关。据报道, 一些细菌菌株可产生 IPA。在本研究中没有发现这些细菌菌株; 相反, 研究发现 IPA 与 *Ruminococcaceae\_UCG-005*、*Helicobacter*、*Lachnospiraceae\_FCS020\_group* 和 *Eubacterium\_nodatum\_group* 的相对丰度密切相关。其中, *Ruminococcaceae\_UCG-005*、*Lachnospiraceae\_FCS020\_group* 和 *Eubacterium\_nodatum\_group* 均属于梭菌目, 可将色氨酸代谢为 IPA [26]。此外, 在人体血清样本中发现 IPA 水平与瘤胃球菌科菌株之间呈正相关[27]。因此, 这些肠道细菌数量的减少可能是 IPA 水平降低的原因。

IPA 已被发现通过激活孕烷 X 受体来调节小鼠肠道屏障功能, 该受体进一步上调紧密连接蛋白 (如 claudins 和 occludins) 的表达[28]。IPA 是唯一与 IgE 水平呈显著相关的代谢物, IPA 与 claudin-3 呈正相关。这可能在一定程度上解释了模型组 claudin-3 表达的抑制。谷氨酰胺是哺乳动物生物体液中丰富的非必需氨基酸, 已被证明是肠黏膜屏障功能的重要营养物质[29–30]。作为细胞快速分裂的主要底物, 谷氨酰胺可以调节紧密连接蛋白[包括 claudin-1、occludin 和 zonula occludens-1 (ZO-1)] 的表达。谷氨酰胺的减少可能导致这些蛋白的减少和肠绒毛的萎缩[29–31]。谷氨酰胺主要通过激活  $Ca^{2+}$ /钙调素-依赖性的蛋白激酶激活蛋白激酶信号通路来增加紧密连接蛋白的水平, 改善肠道屏障完整性[30]。

BCAA 也有助于肠道屏障功能。BCAA 的缺乏, 尤其是异亮氨酸的缺乏, 可能导致免疫功能受损和病原体易感性增加[32–33]。异亮氨酸可诱导上皮细胞和免疫细胞中  $\beta$ -防御素的表达, 在哺乳动物先天免疫中发挥作用[34]。此外, 异亮氨酸可能为动物组织中谷氨酰胺的合成提供氮, 缺乏异亮氨酸会抑制上述紧密连接蛋白的表达[35]。



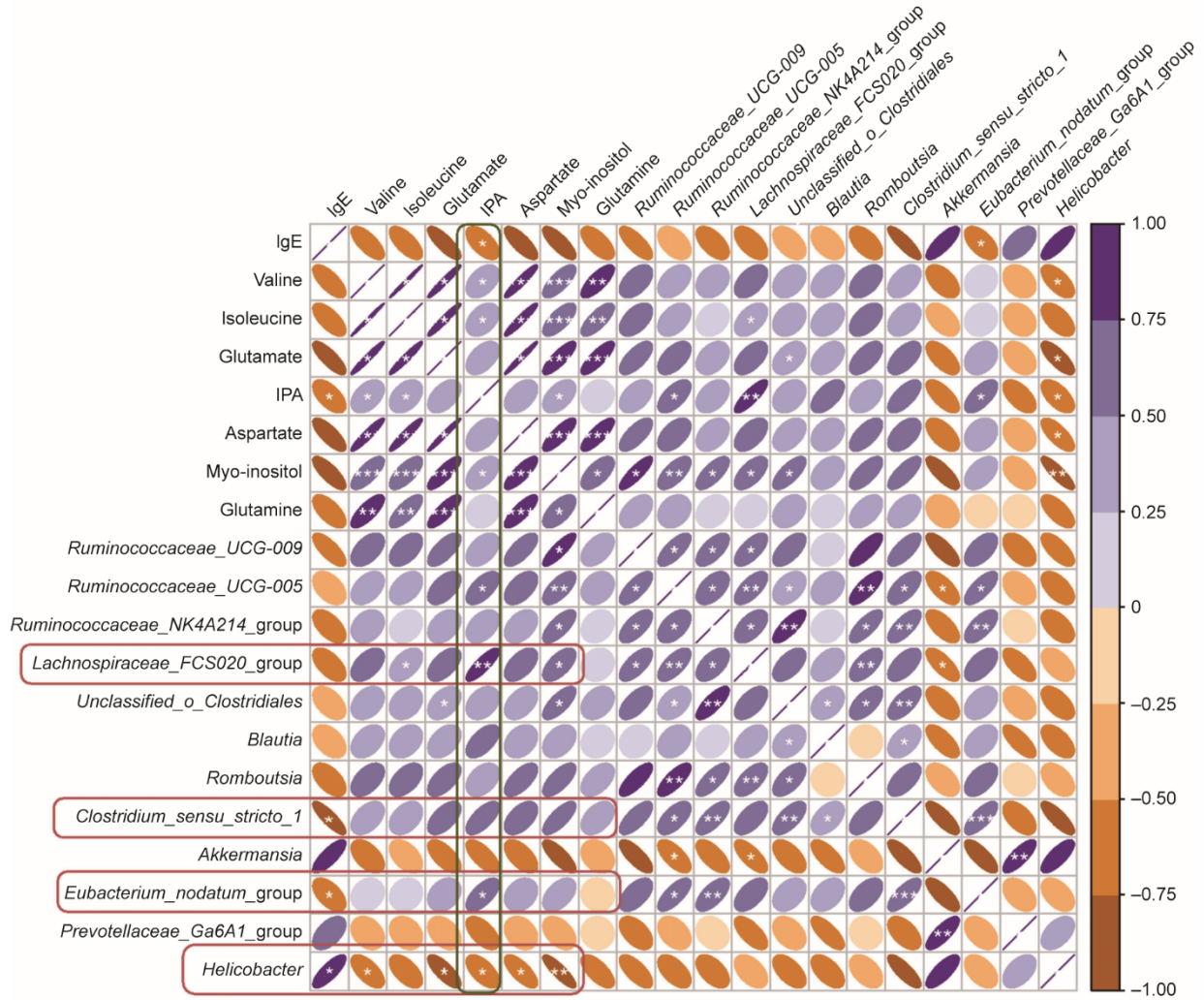


图6. 血浆代谢物、IgE水平和肠道细菌菌株之间的相关性分析。

在本研究中，异亮氨酸和谷氨酰胺之间存在着显著的正相关关系，这在一定程度上证明了它们之间的相互作用。缬氨酸的缺乏也会通过促进促炎细胞因子，同时阻止抗炎细胞因子而损害肠道的免疫屏障。同时，缬氨酸的缺乏会通过抑制 occludin、claudin-3 和 ZO-1 的转录，从而降低肠道的屏障功能[36]。因此，缬氨酸水平的降低也可能导致 claudin-3 表达的抑制，因为在本研究中观察到缬氨酸和 claudin-3 之间存在显著的正相关关系。屏障完整性的破坏可能导致肠道通透性增加，导致细菌易位以及过敏原和蛋白渗透的增加[29,37–38]。因此，这些结果提示肠道屏障功能障碍可能参与花粉过敏的病理改变。

巧合的是，本研究观察到的肠道生态失调也可能导致肠道屏障功能异常。与对照组相比，模型组厚壁菌门的相对丰度较低。这种减少在气道过敏儿童中也有报道[39]。在厚壁菌门中，减少的细菌大多数是能够通过代谢膳食纤维而产生短链脂肪酸的菌株，包括 *Eubacterium\_noda-*

*tum\_group* 以及来自瘤胃球菌科和毛螺菌科及梭菌属的菌种。瘤胃球菌科和毛螺菌科是丁酸的主要生产者[40]。梭菌属主要产生丙酸[41]。肠道微生物群落的这种变化与三种最丰富的短链脂肪酸（乙酸、丙酸和丁酸）水平的下降以及单糖积累水平相一致。来源于瘤胃球菌科和毛螺菌科的物种已被证明与鸡蛋过敏有关，但在这些研究中，毛螺菌科和瘤胃球菌科中某些属的丰度增加与儿童鸡蛋过敏有关，这与本研究的观察结果不同[42]。

短链脂肪酸是肠道上皮细胞的重要养料，尤其是丁酸，是结肠上皮细胞的首选能量来源，对维持肠道健康至关重要[43–44]。短链脂肪酸也是肠道免疫反应和上皮细胞保护功能的重要介质[45–46]。短链脂肪酸刺激肠内紧密连接蛋白的表达，增加黏蛋白的表达，改善肠道形态。它们还能降低凋亡细胞的百分比，减弱脂多糖诱导的细胞旁通透性的增加，最终促进上皮细胞的完整性和修复[47–48]。具体来说，微生物产生的丁酸盐主要在肠道中发挥



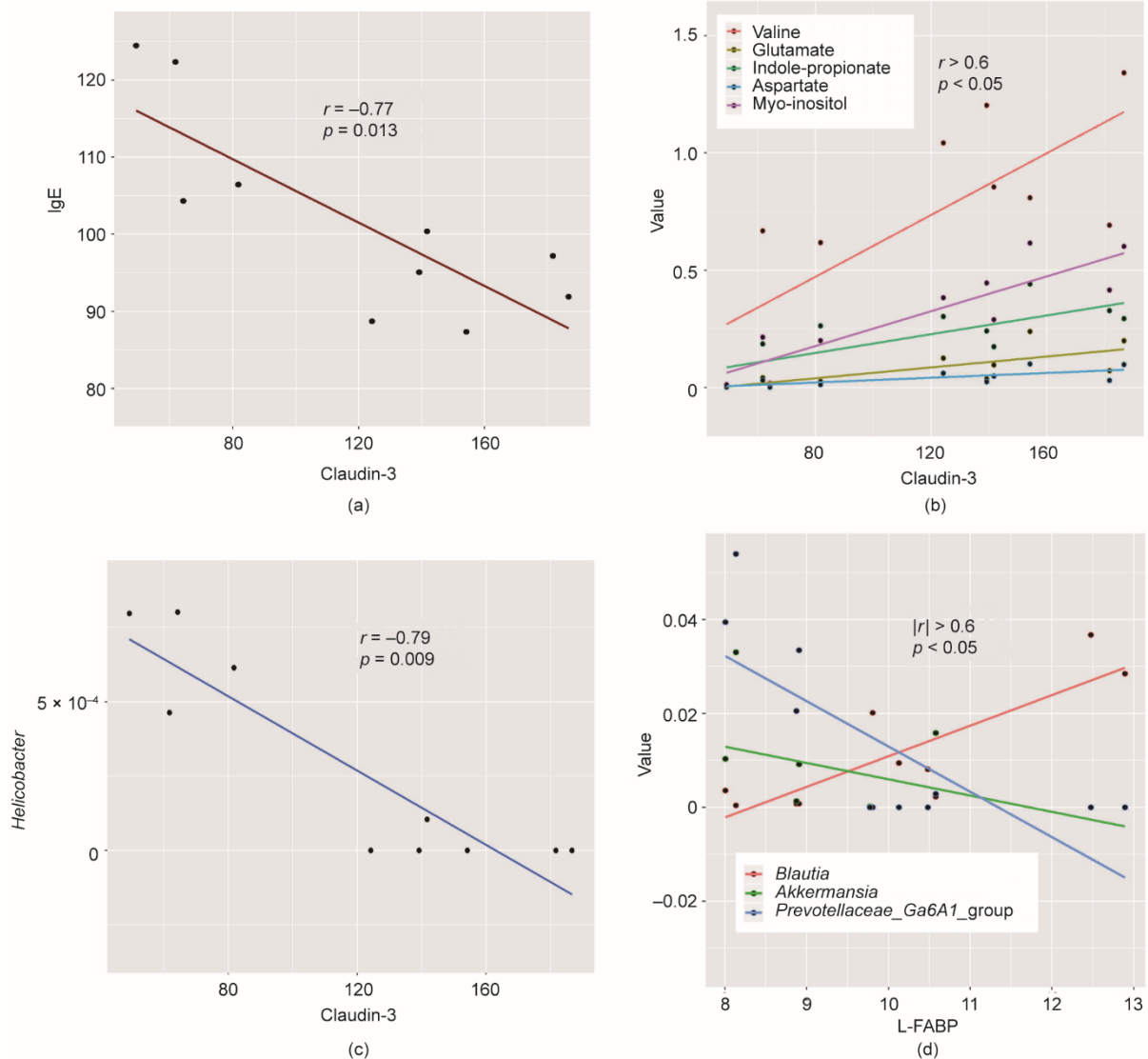


图7. claudin-3与IgE水平 (a)、Claudn-3与血浆代谢物 (b)、Clauden-3与幽门螺杆菌 (c)、L-FABP与肠道细菌菌株 (d) 之间的相关性分析。

关键作用。它增加了上皮细胞对氧气的消耗，参与协调屏障保护功能[44,49–50]。乙酸通过减少炎症细胞因子的合成而具有抗炎作用[51]。除了产生短链脂肪酸外，这些菌株还在维持肠道和全身免疫稳态中发挥作用。研究发现，来自健康人体样本的梭状芽孢杆菌菌株可增强调节性T细胞丰度，并可阻断对食物过敏原的致敏作用，减轻过敏性腹泻[52–53]。

除了产生短链脂肪酸的细菌，幽门螺杆菌也引起了本文研究人员的注意，因为该菌株与IgE和claudin-3水平都呈现出显著的负相关。研究表明，幽门螺杆菌会抑制胃上皮细胞紧密连接处claudin分子的表达，导致小分子和大分子通过消化上皮的通道增加[54]。幽门螺杆菌还会改变胃上皮结构，导致胃屏障功能受损；许多其他种类的幽门螺杆菌也会导致人类疾病[55–56]。鉴于幽门螺杆菌属定

植在肠道黏膜，本研究中出现的模型组幽门螺杆菌菌株可能对肠上皮细胞claudin-3表达产生抑制作用，导致肠道的通透性增加[57]。最近，有几篇报道显示幽门螺杆菌可能与过敏性疾病的发生有关。例如，Dautriche等[58]描述了一种独特的现象：持续性皮肤超敏反应与幽门螺杆菌感染之间存在关联。

另一个值得注意的属是阿克曼氏菌属，该菌仅在模型组中被检测到，与L-FABP呈负相关。阿克曼氏菌被认为是一种有前途的“下一代益生菌”。研究表明，阿克曼氏菌的降低与年龄诱导的肠道通透性有关，其给药可通过增加肠道内大麻素水平来调节肠道屏障功能[59–60]。此外，阿克曼氏菌衍生的细胞外小泡已被证明是控制肠道通透性的功能部分[61]。然而，在本研究中，模型组中阿克曼氏菌的丰度增加。最近一项基于来自5个国家的数据集的荟

萃分析显示,阿克曼氏菌在人类肠道中的过度表达与帕金森病的进展相关,因为该菌增加了肠道通透性,并使肠道神经从易受氧化应激[62]。阿克曼氏菌是一种黏蛋白降解细菌,在2型糖尿病患者中检测到其增加[63]。

黏液蛋白是黏液层的组成部分,黏液层是形成肠道防御系统的第一道物理屏障,保护上皮细胞免受化学、酶和微生物的损伤[64]。因此,模型组中丰富的阿克曼氏菌可能通过降解黏液层和使上皮细胞容易被过敏原接触而导致上皮完整性的丧失。在肠道缺血的大鼠中也观察到这种由黏蛋白紊乱引起的肠功能受损[65]。但是,阿克曼氏菌与肠道完整性之间的关系需要进一步研究。

*Prevotellaceae\_Ga6A1\_group* 是普雷沃氏菌科相关菌株,在炎症黏膜中具有较高的转录活性[66]。有报道称,普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)中一些未知的成员具有较高的炎症易感性,普雷沃氏菌属可能加剧肠道炎症[67–68]。*Prevotellaceae\_Ga6A1\_group* 的丰度增高可能与过敏性炎症有关。

claudin 蛋白是紧密连接链的主要成分。紧密连接蛋白形成紧密连接链,在上皮细胞中封闭细胞旁通路,防止腔内抗原摄取[69]。在 claudin 蛋白中, claudin-3 是紧密连接的核心成分,可作为肠道屏障完整性的标志[70]。因此, claudin-3 在肠道部位的表达明显减少,表明模型组动物在花粉过敏后,肠道上皮完整性被破坏。此外, claudin-3 水平的下降也与血清 IgE 水平的升高密切相关,提示 claudin-3 的变化可能对花粉过敏的发展产生影响。claudins 已被证明是哮喘患者气道上皮屏障功能障碍的生物标志物,但其渗漏的确切机制有待进一步研究[71]。特应性皮炎患者体内 claudin 表达紊乱。Yamaga 等[72]描述了 claudin-3 表达异常降低在特应性皮炎发病机制中的作用。L-FABP 主要定位于小肠,在肠上皮细胞中表达。L-FABP 已被证明是肠黏膜损伤的非侵入性生物标志物[73–74]。此外,数据显示 L-FABP 有助于黏膜的完整性和细胞形态的保存,脂肪酸结合蛋白与肠细胞质量损失相关[75]。本文的研究结果表明,检测到的幽门螺杆菌和阿克曼氏菌可能通过影响 claudin-3 蛋白表达或黏液层,从而破坏肠道屏障功能,增加对花粉过敏的易感性。同时,肠道菌群失调导致缬氨酸、丁酸等营养代谢物的缺乏,进一步驱动肠道屏障功能障碍,从而导致花粉过敏。

## 5. 结论

总之,肠道屏障完整性的破坏被认为与花粉过敏的病理机制有关,特别是缬氨酸、IPA、短链脂肪酸的减少以

及幽门螺杆菌和阿克曼氏菌种类的增加可能抑制肠道内紧密连接蛋白的表达和黏液层的形成,从而导致肠道上皮防御功能障碍(漏肠),使宿主容易发生花粉过敏。在此条件下,其他肠道上皮细胞营养代谢物和产短链脂肪酸菌株的变化进一步增强了肠道通透性。这些发现不仅为微生物在花粉过敏发生过程中的作用提供了重要信息,而且表明逆转肠道渗漏可能是预防和管理花粉过敏的有效策略。此外,建议在生化、细胞和临床水平上进一步探索因果关系。

## 致谢

本研究由国家自然科学基金项目(81971515、81973290)、中国医学科学院医学科学创新基金项目(2016-I2M-3-011、2016-I2M-1-003)、北京市药物非临床代谢与PK/PD 研究重点实验室(Z141102004414062)、国家创新药物大工程项目(2018ZX09711001-002-002)、北京市自然科学基金重点项目(7181007)、北京协和医学院中央高校基本科研业务费专项资金(3332020037)、北京市医院临床医学发展专项资金(ZYLX201826)资助。感谢岛津(中国)有限公司提供的技术支持。

## Compliance with ethics guidelines

Pei Han, Li-Sha Li, Zi-Xi Wang, Lin Xi, Hang Yu, Lin Cong, Zheng-Wei Zhang, Jie Fu, Li-Bin Pan, Shu-Rong Ma, Ran Peng, Xue-Yan Wang, Hong-Tian Wang, Xiang-Dong Wang, Yan Wang, Jin-Lyu Sun, and Jian-Dong Jiang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.013>.

## References

- [1] B W. Hay fever. *Nature* 1923;111(2798):812–4.
- [2] Victorio Puche L, Somoza ML, López-Sánchez JD, Garrido-Arandia M, DiazPerales A, Blanca M. Peach tree pollen and prunus persica 9 sensitisation and allergy in children and adolescents. *Int Arch Allergy Immunol* 2019;180(3): 212–20.
- [3] Voukantsis D, Berger U, Tzima F, Karatzas K, Jaeger S, Bergmann KC. Personalized symptoms forecasting for pollen-induced allergic rhinitis sufferers. *Int J Biometeorol* 2015;59(7):889–97.

- [4] Pablos I, Wildner S, Asam C, Wallner M, Gadermaier G. Pollen allergens for molecular diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;16(4):31.
- [5] Wang XY, Ma TT, Wang XY, Zhuang Y, Wang XD, Ning HY, et al. Prevalence of pollen-induced allergic rhinitis with high pollen exposure in grasslands of northern China. *Allergy* 2018;73(6):1232–43.
- [6] Xie ZL, Guan K, Yin J. Advances in the clinical and mechanism research of pollen induced seasonal allergic asthma. *Am J Clin Exp Immunol* 2019;8(1):1–8.
- [7] Wambre E, Bajzik V, DeLong JH, O'Brien K, Nguyen QA, Speake C, et al. A phenotypically and functionally distinct human T<sub>H</sub>2 cell subpopulation is associated with allergic disorders. *Sci Transl Med* 2017;9(401):eaam9171.
- [8] Wahn U. Considering 25 years of research on allergy prevention—have we let ourselves down? *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24(4):308–10.
- [9] Bernard A, Nickmilder M, Dumont X. Airway epithelium defects and risks of allergic diseases: multiple associations revealed by a biomarker study among adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191(6):714–7.
- [10] Åsa J, Mathias RA, Torgny K, Ek WE. Genome-wide association analysis of 350 000 Caucasians from the UK Biobank identifies novel loci for asthma, hay fever and eczema. *Hum Mol Genet* 2019;28(23):4022–41.
- [11] Ferreira MA, Matheson MC, Tang CS, Granell R, Ang W, Hui J, et al.; Australian Asthma Genetics Consortium Collaborators. Genome-wide association analysis identifies 11 risk variants associated with the asthma with hay fever phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(6):1564–71.
- [12] Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat Immunol* 2017;18(10):1076–83.
- [13] Crestani E, Harb H, Charbonnier LM, Leirer J, Motsinger-Reif A, Rachid R, et al. Untargeted metabolomic profiling identifies disease-specific signatures in food allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2020;145(3):897–906.
- [14] Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* 2012;70(Suppl 1):S38–44.
- [15] Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(10):3698–703.
- [16] Marcobal A, Kashyap PC, Nelson TA, Aronov PA, Donia MS, Spormann A, et al. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *ISME J* 2013;7(10):1933–43.
- [17] Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Front Microbiol* 2016; 7:1144.
- [18] Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001;2(3):155–68.
- [19] Bundy JG, Davey MP, Viant MR. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 2008;5(1):3–21.
- [20] Wang F, Daugherty B, Keise LL, Wei Z, Foley JP, Savani RC, et al. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(1):62–70.
- [21] Guthmann F, Hohoff C, Fechner H, Humbert P, Borchers T, Spener F, et al. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific metabolism. *Eur J Biochem* 1998;253(2):430–6.
- [22] Feng R, Zhao ZX, Ma SR, Guo F, Wang Y, Jiang JD. Gut microbiota-regulated pharmacokinetics of berberine and active metabolites in beagle dogs after oral administration. *Front Pharmacol* 2018; 9:214.
- [23] Pan L, Han P, Ma S, Peng R, Wang C, Kong W, et al. Abnormal metabolism of gut microbiota reveals the possible molecular mechanism of nephropathy induced by hyperuricemia. *Acta Pharm Sin B* 2020;10(2):249–61.
- [24] Zhou YJ, Li LS, Sun JL, Guan K, Wei JF. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study of metabolic profiling for pollinosis. *World Allergy Organ J* 2019;12(1):100005.
- [25] Jennis M, Cavanaugh CR, Leo GC, Mabus JR, Lenhard J, Hornby PJ. Microbiota-derived tryptophan indoles increase after gastric bypass surgery and reduce intestinal permeability *in vitro* and *in vivo*. *Neurogastroenterol Motil* 2018;30(2):e13178.
- [26] Drabin'ska N, Krupa-Kozak U, Abramowicz P, Jarocka-Cyrta E. Beneficial effect of oligofructose-enriched inulin on vitamin D and E status in children with celiac disease on a long-term gluten-free diet: a preliminary randomized, placebo-controlled nutritional intervention study. *Nutrients* 2018;10(11):1768.
- [27] Menni C, Hernandez MM, Vital M, Mohney RP, Spector TD, Valdes AM. Circulating levels of the anti-oxidant indolepropionic acid are associated with higher gut microbiome diversity. *Gut Microbes* 2019;10(6):688–95.
- [28] Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun* 2018;9(1):3294.
- [29] Li N, Lewis P, Samuelson D, Liboni K, Neu J. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287(3):G726–33.
- [30] Wang B, Wu Z, Ji Y, Sun K, Dai Z, Wu G. L-glutamine enhances tight junction integrity by activating CaMK kinase 2-AMP-activated protein kinase signaling in intestinal porcine epithelial cells. *J Nutr* 2016;146(3):501–8.
- [31] Bertrand J, Ghouzali I, Guérin C, Bôle-Feyssot C, Gouteux M, Déchelotte P, et al. Glutamine restores tight junction protein claudin-1 expression in colonic mucosa of patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Parenter Enteral Nutr* 2016;40(8):1170–6.
- [32] Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol* 2012;30(1):39–68.
- [33] Ma N, Guo P, Zhang J, He T, Kim SW, Zhang G, et al. Nutrients mediate intestinal bacteria–mucosal immune crosstalk. *Front Immunol* 2018; 9:5.
- [34] Mao X, Qi S, Yu B, He J, Yu J, Chen D. Zn<sup>2+</sup> and L-isoleucine induce the expressions of porcine β-defensins in IPEC-J2 cells. *Mol Biol Rep* 2013;40(2):1547–52.
- [35] Beutheu S, Ghouzali I, Galas L, Déchelotte P, Coëffier M. Glutamine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells. *Clin Nutr* 2013;32(5):863–9.
- [36] Luo JB, Feng L, Jiang WD, Liu Y, Wu P, Jiang J, et al. The impaired intestinal mucosal immune system by valine deficiency for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with decreasing immune status and regulating tight junction proteins transcript abundance in the intestine. *Fish Shellfish Immunol* 2014;40(1):197–207.
- [37] Wang B, Wu G, Zhou Z, Dai Z, Sun Y, Ji Y, et al. Glutamine and intestinal barrier function. *Amino Acids* 2015;47(10):2143–54.
- [38] Ree R, Hummelshøj L, Plantinga M, Poulsen LK, Swindle E. Allergic sensitization: host-immune factors. *Clin Transl Allergy* 2014;4(1):12.
- [39] Chiu CY, Chan YL, Tsai MH, Wang CJ, Chiang MH, Chiu CC. Gut microbial dysbiosis is associated with allergen-specific IgE responses in young children with airway allergies. *World Allergy Organ J* 2019;12(3):100021.
- [40] Bach Knudsen KE, Lærke HN, Hedemann MS, Nielsen TS, Ingerslev AK, Gundelund Nielsen DS, et al. Impact of diet-modulated butyrate production on intestinal barrier function and inflammation. *Nutrients* 2018;10(10):1499.
- [41] Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* 2018;57(1):1–24.
- [42] Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A, Wood RA, Burks AW, Dawson P, et al. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* 2018;73(7):1515–24.
- [43] Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 2016;16(10):639–49.
- [44] Li Y, Faden HS, Zhu L. The response of the gut microbiota to dietary changes in the first two years of life. *Front Pharmacol* 2020; 11:334.
- [45] Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol* 2019; 10:277.
- [46] Meng J, Banerjee S, Zhang L, Sindberg G, Moidunny S, Li B, et al. Opioids impair intestinal epithelial repair in HIV-infected humanized mice. *Front Immunol* 2020; 10:2999.
- [47] Feng Y, Wang Y, Wang P, Huang Y, Wang F. Short-chain fatty acids manifest stimulative and protective effects on intestinal barrier function through the inhibition of NLRP3 inflammasome and autophagy. *Cell Physiol Biochem* 2018;49(1):190–205.
- [48] Jirsova Z, Heczko M, Dankova H, Malinska H, Videnska P, Vespalcova H, et al. The effect of butyrate-supplemented parenteral nutrition on intestinal defence mechanisms and the parenteral nutrition-induced shift in the gut microbiota in the rat model. *BioMed Res Int* 2019; 2019:7084734.
- [49] Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe* 2015;17(5):662–71.
- [50] Diao H, Jiao AR, Yu B, Mao XB, Chen DW. Gastric infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal barrier function in weaned piglets. *Genes Nutr* 2019;14(1):4.
- [51] Yang H, Meng L, Ai D, Hou N, Li H, Shuai X, et al. Acetic acid alleviates the inflammatory response and liver injury in septic mice by increasing the expression of TRIM40. *Exp Ther Med* 2019;17(4):2789–98.
- [52] Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(36):13145–50.



- [53] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 2013;500(7461):232–6.
- [54] Caron TJ, Scott KE, Fox JG, Hagen SJ. Tight junction disruption: *Helicobacter pylori* and dysregulation of the gastric mucosal barrier. *World J Gastroenterol* 2015;21(40):11411–27.
- [55] Terrés AM, Pajares JM, Hopkins AM, Murphy A, Moran A, Baird AW, et al. *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators. *Infect Immun* 1998;66(6):2943–50.
- [56] Solnick JV, Solnick JV. Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. *Clin Infect Dis* 2003;36(3):349–54.
- [57] O’Rourke JL, Grehan M, Lee A. Non-pylori *Helicobacter* species in humans. *Gut* 2001;49(5):601–6.
- [58] Dautriche CN, Zaba LC, Kim R, Marmon S. A persistent dermal hypersensitivity reaction associated with *Helicobacter pylori* infection. *JAAD Case Rep* 2020;6(2):156–8.
- [59] Bodogai M, O’Connell J, Kim K, Kim Y, Moritoh K, Chen C, et al. Commensal bacteria contribute to insulin resistance in aging by activating innate B1a cells. *Sci Transl Med* 2018;10(467):eaat4271.
- [60] Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(22):9066–71.
- [61] Chelakkot C, Choi Y, Kim DK, Park HT, Ghim J, Kwon Y, et al. *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Exp Mol Med* 2018;50(2):e450.
- [62] Nishiwaki H, Ito M, Ishida T, Hamaguchi T, Maeda T, Kashihara K, et al. Metaanalysis of gut dysbiosis in parkinson’s disease. *Mov Disord* 2020;35(9):1626–35.
- [63] Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012;490(7418):55–60.
- [64] Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* 2008;1(3):183–97.
- [65] Chang M, Alsaigh T, Kistler EB, Schmid-Schönbein GW. Breakdown of mucin as barrier to digestive enzymes in the ischemic rat small intestine. *PLoS ONE* 2012;7(6):e40087.
- [66] Moen AEF, Lindstrøm JC, Tannæs TM, Vatn S, Ricanek P, Vatn MH, et al. IBD Character Consortium. The prevalence and transcriptional activity of the mucosal microbiota of ulcerative colitis patients. *Sci Rep* 2018;8(1):17278.
- [67] Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 2011;145(5):745–57.
- [68] Iljazovic A, Roy U, Gálvez EJC, Lesker TR, Zhao B, Gronow A, et al. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunol* 2021;14(1):113–24.
- [69] Nakamura S, Irie K, Tanaka H, Nishikawa K, Suzuki H, Saitoh Y, et al. Morphologic determinant of tight junctions revealed by claudin-3 structures. *Nat Commun* 2019;10(1):816.
- [70] Sikora M, Chraba-szcz M, Was’kiel-Burnat A, Rakowska A, Olszewska M, Rudnicka L. Claudin-3—a new intestinal integrity marker in patients with psoriasis: association with disease severity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019;33(10):1907–12.
- [71] Jin HJ, Park HS. Claudin may be a potential biomarker for epithelial barrier dysfunction in asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2018;10(1):4–5.
- [72] Yamaga K, Murota H, Tamura A, Miyata H, Ohmi M, Kikuta J, et al. Claudin-3 loss causes leakage of sweat from the sweat gland to contribute to the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2018;138(6):1279–87.
- [73] Gonçalves FLL, Soares LMM, Figueira RL, Simões ALB, Gallindo RM, Sbragia L. Evaluation of the expression of I-FABP and L-FABP in a necrotizing enterocolitis model after the use of *Lactobacillus acidophilus*. *J Pediatr Surg* 2015;50(4):543–9.
- [74] Derikx JP, Vreugdenhil AC, Van den Neucker AM, Grootjans J, van Bijnen AA, Damoiseaux JG, et al. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol* 2009;43(8):727–33.
- [75] Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(7):1096–116.