



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Microbiology—Article

一种基于 Caco-2 细胞单层膜的筛选抵抗特定代谢性疾病益生菌的模型

刘阳^{a,b}, 彭江^{a,b}, 朱诗雅^{a,b}, 于雷雷^{a,b}, 田丰伟^{a,b}, 赵建新^{a,b}, 张灏^{a,b,c,d}, 陈卫^{a,b,c}, 翟齐啸^{a,b,*}

^a State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

^b School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

^c National Engineering Research Center for Functional Food, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

^d Wuxi Translational Medicine Research Center & Jiangsu Translational Medicine Research Institute Wuxi Branch, Wuxi 214122, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2021

Revised 22 February 2022

Accepted 28 February 2022

Available online 6 May 2022

关键词

乳杆菌
肠道屏障
Caco-2 细胞
选模型
代谢性疾病

摘要

最近的研究揭示了益生菌在缓解与肠道屏障功能障碍相关的代谢疾病方面的潜力。然而,目前还没有一种能高效筛选抵抗特定代谢性疾病益生菌菌株的模型。本研究采用肿瘤坏死因子(TNF- α)和酒精处理的 Caco-2 细胞单层膜模型,评价了 139 株乳杆菌在体外对肠道屏障功能的影响。然后,我们选择了 11 株对肠道屏障具有不同调节能力的乳杆菌菌株,进一步在体内评价了它们对卵巢切除引起的骨质疏松症或慢性酒精性肝损伤的作用效果。体外细胞模型和体内动物模型数据的关联性分析显示,两种疾病模型下的 Pearson 系数分别为 0.82 和 -0.97,表明使用体外细胞模型模拟益生菌在体内的保护作用是可可靠的。本研究建立了一种基于 Caco-2 细胞单层膜模型的体外方法,用于高效筛选可以抵抗特定代谢疾病(如骨质疏松症和慢性酒精性肝病)的益生菌。

© 2022 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

肠道屏障在维持宿主肠道稳态中起着至关重要的作用,它将内脏与有害物质分离,并向免疫细胞发出信号使其适应微生物群,从而维持机体的正常功能[1]。肠道屏障完整性的改变可导致胃肠道、自身免疫性和炎症性疾病的发展,以及由肠漏引起的癌症。近期研究表明,肠道屏障功能障碍与肥胖、糖尿病、高血压、动脉粥样硬化等代谢性疾病也密切相关[2–4]。值得注意的是,肠道屏障通透性的增加会导致细菌代谢物或有害分子渗漏到血液循环中,从而激活炎症信号通路,刺激破骨细胞因子的产生,

从而加重骨质疏松症[5]。此外,肠道屏障功能的完整性在酒精性肝病中也起着重要作用。完整性损坏的肠道屏障会使活菌和微生物代谢物易位到肝脏,在那里诱发和促进炎症,并导致肝细胞死亡和纤维化反应[6]。

据报道,益生菌对机体免疫和代谢系统的调节存在益生作用[7]。大量动物研究表明,口服长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) [8]、*Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) [9]和罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*) [10]可显著提高骨密度和骨量。三种乳酸菌的混合物可防止卵巢切除术引起的皮质骨丢失并增加骨吸收[11]。基于临床实验的一些证据表明,单种或多种益生菌补充剂都可以缓解骨质

* Corresponding author.

E-mail address: zhaiqixiao@sina.com (Q. Zhai).

2095-8099/© 2022 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/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 25(6): 222–233

引用本文: Yang Liu, Jiang Peng, Shiya Zhu, Leilei Yu, Fengwei Tian, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Wei Chen, Qixiao Zhai. A Screening Model for Probiotics Against Specific Metabolic Diseases Based on Caco-2 Monolayer Membrane. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.02.014>

疏松症[12-13]。一项针对50例50~72岁骨质减少患者的随机双盲安慰剂对照临床研究表明,含有7种细菌的益生菌补充剂可以通过降低骨碱性磷酸酶(BALP)来抑制骨吸收和骨转换[14]。此外,在酒精性肝病小鼠模型中,补充鼠李糖乳杆菌LGG、VSL#3和阿克曼氏菌(*A. muciniphila*)的上清液可以逆转肠道渗漏、全身炎症和肝脏损伤[15-16]。最近一项综述也表明,益生菌可以通过恢复肠道屏障功能、抑制氧化应激和降低血液中的内毒素水平来缓解肝脏炎症[17]。同时,临床数据也表明,口服益生菌可以减轻肝损伤[18-19]。两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)和植物乳杆菌(*L. plantarum*)的混合物的服用显著改变了酒精性肝病患者血清丙氨酸转氨酶(ALT)、低密度脂蛋白和总胆红素水平[20]。然而,上述功能性菌株的筛选存在一定的局限性,大多数筛选仅仅集中在著名的商业益生菌上,如LGG或VSL#3[15,21]。另外,一般筛选菌株是基于益生菌的常见生物学特性,如抗氧化活性、短链脂肪酸(SCFAs)的产生和胃肠道耐受性,这些特性并不特别适合筛选具有代谢功能障碍保护作用的菌株[22-23]。

益生菌在维持肠道屏障功能方面发挥着重要作用[24-25]。许多基于动物模型的研究表明,补充益生菌,如布拉酵母菌[26]、罗伊氏乳杆菌[27]和副干酪乳杆菌[28],都有助于减轻葡聚糖硫酸钠(DSS)引起的肠道屏障损伤。口服长双歧杆菌对西方饮食化小鼠的肠黏膜损伤具有显著的保护作用[29]。此外,一些临床实验表明,补充特定益生菌可以缓解肥胖[30]、肠易激综合征[31]和坏死性小肠结肠炎[32]患者的肠道屏障功能障碍。我们注意到一些益生菌可以通过直接与肠道屏障相互作用而发挥有益作用。许多微生物相关的分子模式,包括鞭毛蛋白、毛蛋白和肽聚糖,通过激活toll样受体、核苷酸结合和寡聚结构域样受体途径来调节肠道屏障功能[3]。此外,许多研究表明,补充特定益生菌还可以通过调节肠道菌群来缓解多种疾病,包括溃疡性结肠炎、非酒精性脂肪肝和肥胖[33-34]。值得一提的是,具有良好肠道屏障调节能力的益生菌也被报道对代谢性疾病具有保护作用。口服活的或巴氏杀菌后的罗伊氏乳杆菌可显著降低肠道通透性、血清葡萄糖、胰岛素以及血清和肝脏中的脂质分布,从而缓解肥胖和糖尿病[35]。植物乳杆菌299v和乳双歧杆菌Bi07的混合物在体外已被证明能显著恢复肠道屏障功能,并且可减少大鼠心肌梗死面积,改善左心室功能,减轻心血管疾病[36]。

分化后的Caco-2细胞具有微绒毛结构、紧密连接以及与人小肠相似的细胞极性,可在transwell膜上自发形成单层膜[37]。基于transwell膜的Caco-2细胞单层膜模型被认为是评估肠道屏障功能的常用体外方法。许多研究使用

该模型来评估各种营养物质和材料,如植物提取物[38]、乳制品[39]和壳聚糖纳米颗粒[40]对肠道屏障功能的影响。Anderson等[41]基于Caco-2细胞单层膜评价模型比较了8种商业益生菌对肠道屏障功能的不同保护作用。先前一项利用脂多糖(LPS)诱导的Caco-2细胞的研究表明,补充*A. muciniphila*可以恢复肠道屏障的跨上皮电阻(trans-epithelial electrical resistance, TEER),进而逆转肠道屏障损伤[42]。然而,据我们所知,该模型主要用于评估益生菌的肠道屏障调节能力,很少用于进一步筛选针对特定代谢疾病的菌株。

因此,本研究的目的是评估Caco-2细胞单层膜模型在代谢性疾病益生菌筛选中的适用性。选择与肠道屏障功能障碍密切相关的两类代谢性疾病(骨质疏松症和酒精性肝病),确定不同菌种益生菌对体外肠道屏障功能的调节与对代谢性疾病的保护作用之间的相关性。基于这些分析,我们试图建立一个高效的模型来筛选针对特定代谢疾病的益生菌。

2. 材料与方法

2.1. 细胞系和菌株

Caco-2细胞购自上海生物化学与细胞生物研究所。按照先前研究[42]的描述进行培养和传代。139株乳杆菌分属发酵乳杆菌、干酪乳杆菌、格氏乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌8种,均由江南大学食品微生物培养库提供。部分培养菌株在细胞培养基中离心悬浮进行细胞实验,另一部分按照先前研究描述培养冻干进行动物实验[43]。

2.2. 体外实验

在体外进行了三个独立实验。在第一次TEER实验中,将Caco-2细胞接种到12 mm的细胞培养插入物中(孔径为0.4 μm ; Costar, USA),密度为 1×10^5 。单层细胞培养18~21天,直到TEER值稳定,代表细胞分化完成,形成完整单层膜模型。细胞用肿瘤坏死因子(TNF)- α ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)预处理4 h,进一步洗涤,并加入乳杆菌菌株(每孔 1×10^8 CFU),培养4 h。对于第二次TEER实验,按如上所述的培养过程,对分化完成的Caco-2单层用5%酒精处理并加入不同乳杆菌菌株(每孔 1×10^8 CFU)共同孵育24 h。剂量和处理时间根据先前的研究选择[44-45]。为了检测紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin和Claudin-1)的mRNA的表达,按照第二次TEER实验的描述处理细胞(生长在六孔板中),收集细胞并进

行实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 分析, 程序和引物的选择如先前报道[46]。

2.3. 动物

雌性 Sprague Dawley 大鼠 (12 周龄) 和雄性 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 购自上海实验动物中心。饲养条件控制在温度为 23 ~ 25 °C, 湿度为 40% ~ 60%, 光照-黑暗循环 12 h。在适应阶段给所有动物提供干净的水和食物。本研究的动物实验方案经江南大学伦理委员会批准 (JN.No20190315S0750611 和 JN.No20190430c0720714)。

2.4. 卵巢切除术所致骨质疏松症实验

50 只大鼠随机分为对照组、模型组、阿仑膦酸钠组、发酵乳杆菌 (5-1L、L9-10-3-1 和 FZJTZ20M3)、干酪乳杆菌 (F-FJ-ND-D12-L-9 和 HN13-1)、鼠李糖乳杆菌 (LGG) 和植物乳杆菌 (8610) 10 组, 每组 5 只。各组的处理方法如下。

对照组: 假手术后 1 个月灌胃无菌生理盐水。

模型组: 大鼠切除卵巢, 1 个月后灌胃无菌生理盐水。阿仑膦酸钠处理组: 大鼠切除卵巢后, 用阿仑膦酸钠无菌溶液灌胃, 剂量为 1 mg·kg⁻¹。

细菌处理组: 大鼠切除卵巢后, 1 个月后灌胃不同乳杆菌 (5-1L、L9-10-3-1、FZJTZ20M3、F-FJ-ND-D12-L-9、HN13-1、LGG 和 CCFM8610) 的无菌生理盐水悬浮液 (1×10⁹ CFU·mL⁻¹·只⁻¹·d⁻¹)。

灌胃量为 1.5 mL, 连续 4 周。卵巢切除术是指双侧卵巢外化、结扎和切除。接受假手术的大鼠仅仅切除了一块脂肪。阿仑膦酸钠和益生菌的剂量是根据以往的研究选择的[47-48]。整个实验结束后, 将存活大鼠用异氟醚过量处死, 取其股骨、子宫、血液、结肠、粪便。子宫系数=(平均子宫重量/平均体重)×100%。使用微型计算机断层扫描 (micro-CT) 分析股骨的骨密度和其他骨参数, 包括皮质体积 (Ct.V)、骨体积分数 (BV/TV) 和小梁厚度 (Tb.Th), 并将其他股骨固定在 4% 多聚甲醛中进行组织学评估[48]。如前所述, 使用气相色谱-质谱法 (GCMS-QP2010 Ultra 系统, 岛津公司, 日本) 分析短链脂肪酸浓度[49]。总 RNA 通过总 RNA 提取试剂盒 (Vazyme Biotech Co., Ltd, China) 收集和提取。RNA 逆转录采用 qPCR 试剂盒 (Vazyme Biotech Co., Ltd)。使用 RT-PCR 系统 (CFX Connect; Bio-Rad, USA) 检测结肠中 ZO-2、Occludin 和 Claudin-1 mRNA 的表达, 如前所述[50]。采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 试剂盒 (R&D, UK) 检测小鼠雌二醇 (E2)、内皮素 (ET)、酒石酸抗性酸性磷酸酶

(TRACP)、BALP、结肠肿瘤细胞系 (CTX-I)、转化生长因子 (TGF) -β1、TNF-α 和白细胞介素 (IL) -10 的水平。

2.5. 酒精性肝损伤实验

将 70 只小鼠随机分为 7 组[对照组、酒精组、鼠李糖乳杆菌菌株 (LGG)、干酪乳杆菌菌株 (RS8-5 和 V-CQRC7-161-M2)、瑞士乳杆菌菌株 (D-7-S146 和 8M-10)], 每组 10 只。各组的处理方法如下。

对照组: 小鼠给予不含酒精的 Lieber DeCarli 对照饲料 9 周, 其中, 第 5 周后给予无菌生理盐水灌胃。

酒精组: 小鼠给予含 28% 热量酒精的 Lieber DeCarli 酒精饲料 9 周, 其中, 第 5 周后用无菌生理盐水灌胃。

细菌处理组: LGG 组、RS8-5 组、V-CQRC7-161-M2 组、D-7-S146 组、8M-10 组小鼠灌胃含 28% 热量酒精的 Lieber DeCarli 酒精饲料 9 周, 其中, 第 5 周后灌胃乳杆菌无菌盐水悬浮液 (1×10⁹ CFU·200 μL⁻¹·只⁻¹·d⁻¹)。

灌胃量为 0.2 mL, Lieber DeCarli 饲料配方如表 1 所示。整个实验结束后, 用异氟醚过量处死小鼠, 取肝、血、回肠。肝脏指数计算公式为: 肝脏指数=平均肝脏重量 (g) /平均体重 (100 g)。采用 ELISA 试剂盒 (R&D) 检测肝脏中 IL-6、IL-1β 和内毒素水平。采用 RT-PCR 系统 (CFX Connect; Bio-Rad), 如前所述[51]。采用商用检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 检测肝脏中谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 水平。采用全自动生化分析仪 (TBA-40FR, Toshiba Medical, Japan) 检测血清中天冬氨酸转移酶 (AST)、ALT、γ-谷氨酰转肽酶 (γ-GT)、总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 活性。如前所述[52], 将肝脏固定在 4% 多聚甲醛中进行组织学评估。

表 1 小鼠 Lieber DeCarli 饲料热量组成 (%)

Calorie composition	Control liquid feed	Mode liquid feed
Alcohol	0	28
Fat	35	35
Protein	18	18
Carbohydrate	47	19

2.6. 数据分析

数据以均数±标准差 (SD) 表示。采用单因素方差分析对结果进行分析, 然后进行 Tukey's 检验。P < 0.05 有统计学意义, 采用 SPSS 软件 (version 16.0) 对所得数据进行统计分析。使用 Pearson 相关系数评估变量之间的相关性。强相关定义为相关系数 r ≥ 0.8。

3. 结果

3.1. 不同乳酸菌菌株对TNF- α 处理的Caco-2细胞单层屏障功能的影响

与对照组相比, TNF- α 暴露诱导 Caco-2 细胞单层 TEER 显著降低 (图 1)。不同乳酸菌菌株处理对屏障功能的调节作用不同。调节能力较强的菌种 (*L. fermentum* 5-1L、*L. casei* F-FJ-ND-D12-L-9、*L. plantarum* 8610、LGG) 的 TEER 恢复度接近 90%, 其他菌种 TEER 恢复度在 -50% ~ 80% 之间。

3.2. 不同调节能力乳酸菌菌株对大鼠卵巢切除所致骨质疏松症肠道屏障功能的影响

我们选择了 3 株对 TEER 具有不同调节能力的发酵乳杆菌菌株, 进一步评估它们对骨质疏松症的保护作用[图 2 (a)]。补充发酵乳杆菌 5-1L 对 BMD、BV/TV、Ct.V 等骨结构指标均有显著的改善作用 ($P < 0.05$), 而其他发酵乳杆菌菌株 (L9-10-3-1 和 FZJTZ20M3) 处理则没有同样显著的效果[图 2 (b) ~ (d) 和图 S1 (a)、(b)]。与其他测试菌株相比, *L. fermentum* 5-1L 在降低 TRACP、BALP、

CTX-I 和 ET 水平以及增加 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达方面也更有效[图 2 (e) ~ (h) 和图 S1 (d)]。如图 2 (i) 所示, 卵巢切除术导致骨细胞减少, 骨小梁增大。与 L9-10-3-1 和 FZJTZ20M3 相比, 发酵乳杆菌 5-1L 处理对这些变异的恢复效果更显著。与发酵乳杆菌的菌株特异性作用类似, 不同干酪乳杆菌菌株处理的结果也表明, 益生菌对卵巢切除所致骨质疏松的体内保护作用与 Caco-2 细胞单层 TEER 的调节能力有关 (见附录 A 中的图 S2)。

3.3. 乳酸菌体外调节肠道屏障能力与体内骨质疏松缓解作用的相关性分析

如图 3 所示, Pearson 相关分析结果显示, TRACP ($r_{XY} = -0.93$) 和 CTX-I ($r_{XY} = -0.81$) 浓度与 TEER 值呈显著负相关, 而体内实验中的指标 BV/TV ($r_{XY} = 0.85$) 和 Claudin-1 ($r_{XY} = 0.87$) 与 TEER 值呈显著正相关。同时, 主成分分析结果显示, 体内与体外指标具有较强的相关性, $r_{XY} = 0.82$ 。

3.4. 肠道屏障调节能力与益生菌缓解骨质疏松作用相关性的验证

根据图 2、图 S1 和图 S2 的结果, 我们发现发酵乳杆

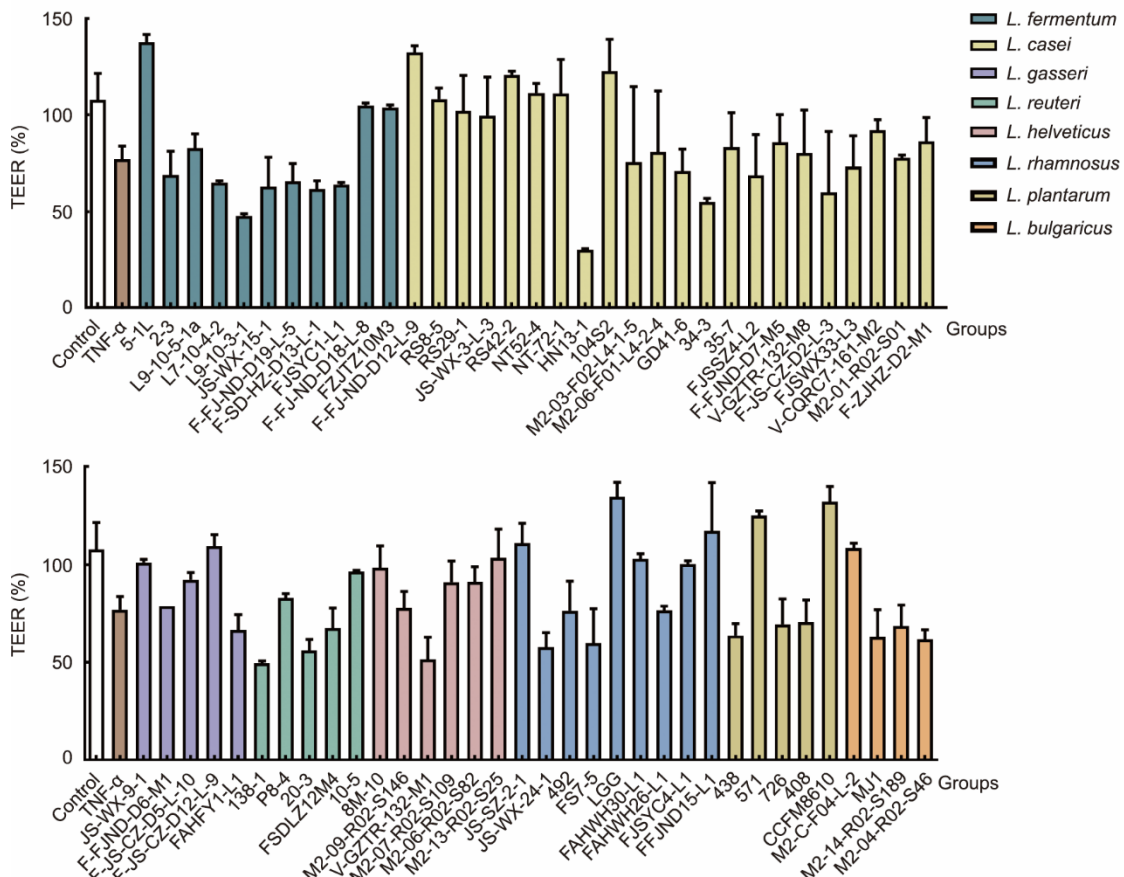


图 1. TNF- α ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理后不同乳酸菌菌株对 Caco-2 细胞单层膜跨上皮电阻 (TEER) 的影响。

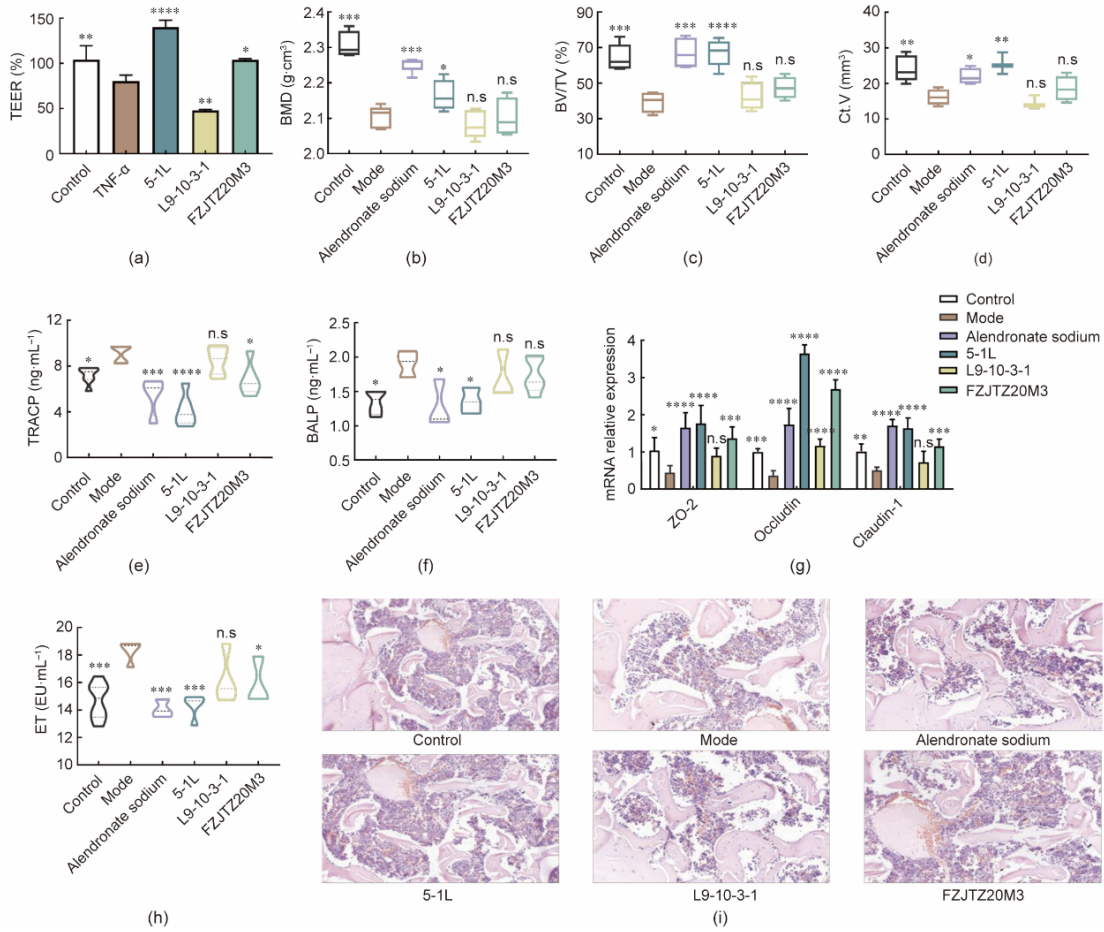


图2. 发酵乳杆菌菌株对大鼠骨质疏松的缓解作用。(a) Caco-2细胞单层膜的TEER；(b) 骨质BMD；(c) 股骨BV/TV；(d) 股骨Ct.v；(e) 血清中TRACP水平；(f) 血清BALP水平；(g) 结肠紧密连接蛋白mRNA表达水平；(h) 血清ET水平；(i) 大鼠股骨H&E染色代表图像的组织学检查。Mode: 进行卵巢切除术。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; n.s.: 与卵巢切除术组相比不显著。EU: ET Unit。

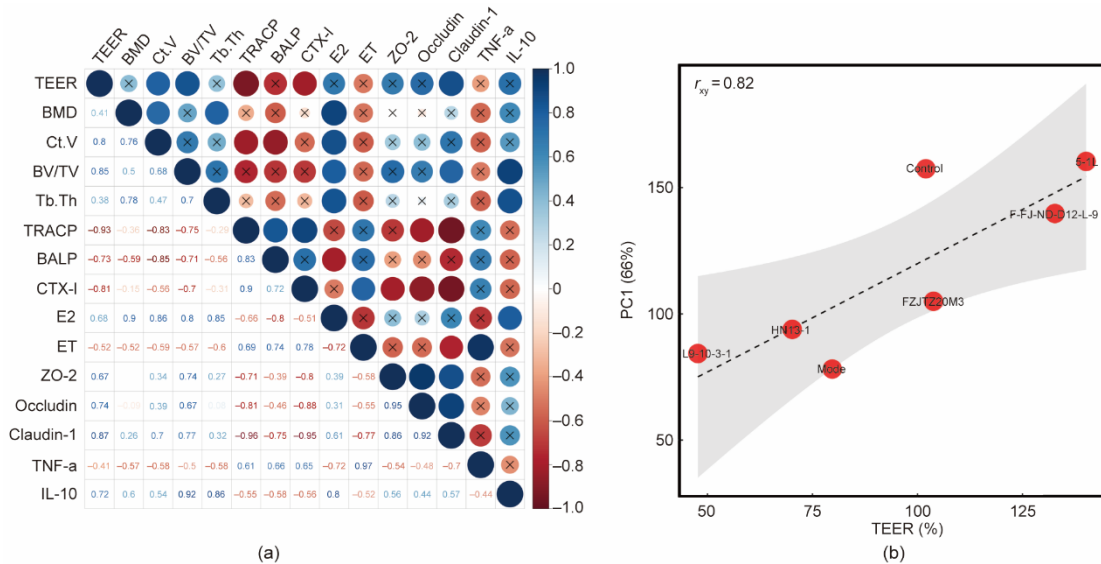


图3. (a) 骨质疏松实验中TEER值与各测试参数的相关性；(b) TEER值与PC1的相关性。PC1: 通过对骨质疏松实验中所有测试参数的主成分分析得出第一主成分。

菌和干酪乳杆菌缓解骨质疏松的作用与其体外肠道屏障调节呈正相关。为了进一步说明这种相关性是否也存在于其

他物种中，我们选择了另外两种乳酸杆菌（鼠李糖乳杆菌LGG和植物乳杆菌8610）来验证肠道屏障调节能力与益

生菌对骨质疏松症的保护之间的相关性(图4和图S3)。综合图4所示的所有测试指标, LGG和8610对骨质疏松症状均有显著的保护作用($P < 0.05$)。

3.5. 不同乳酸菌菌株对酒精处理Caco-2细胞单层屏障功能的影响

如图5所示, 与对照组相比, 酒精处理显著降低了Caco-2细胞单层的TEER值。添加所测益生菌后, 恢复率在10%~110%之间。

3.6. 不同调节能力乳酸菌菌株对小鼠慢性酒精性肝损伤肠道屏障功能的影响

选择对肠道屏障功能具有较强调节能力的干酪乳杆菌RS8-5菌株(TEER值恢复率为110%, 对紧密连接蛋白表达有显著影响)和对肠道屏障保护作用不显著的干酪乳杆

菌V-CQRC7-161-M2菌株[图6(a)和(b)], 评估其对酒精性肝损伤的缓解作用。用干酪乳杆菌V-CQRC7-161-M2治疗对肝功能和ALT、AST、 γ -GT、TG、TC等血脂指标无明显影响, 而补充RS8-5和LGG对上述指标的恢复有明显影响[图6(c)~(e)和图S4]。与干酪乳杆菌V-CQRC7-161-M2相比, RS8-5通过增加SOD($P < 0.01$)和谷胱甘肽($P < 0.001$)的表达, 使MDA生成降低($P < 0.001$) [图6(f)、(g)和图S4]。与V-CQRC7-161-M2相比, RS8-5处理对血清内毒素和TNF- α 水平的调节也更有效[图6(h)和图S4]。我们注意到LGG和RS8-5均能显著减轻酒精性肝脏病理损伤, 而V-CQRC7-161-M2不能提供类似的保护作用[图6(j)]。此外, 补充RS8-5可以显著降低慢性酒精暴露小鼠的肝脏指数(表S1)。不同的瑞士乳杆菌菌株处理也表明, 益生菌对Caco-2细胞单层TEER的调节能力与酒精诱导的慢性酒精性肝损伤的

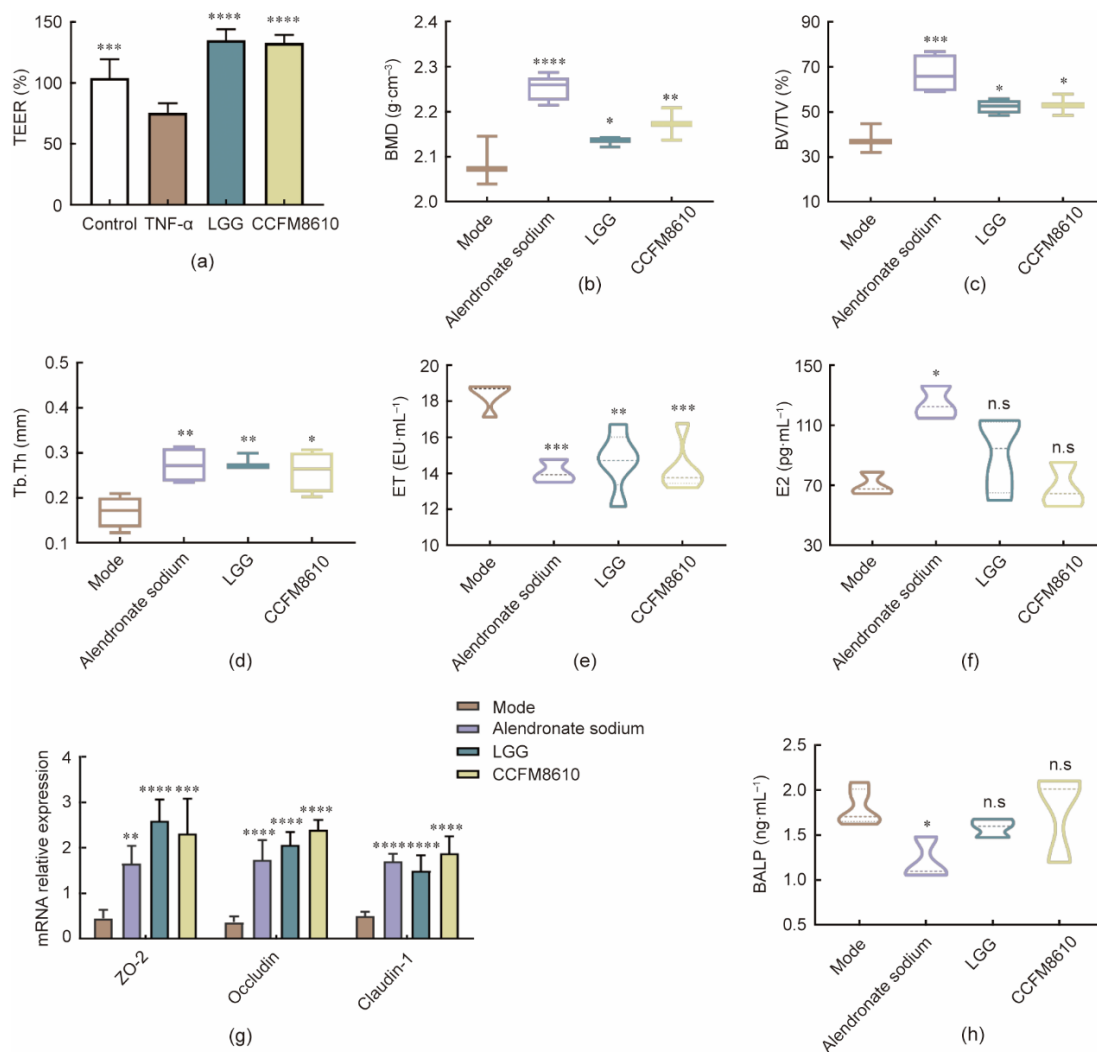


图4. 乳酸菌菌株LGG和8610对大鼠骨质疏松症的缓解作用。(a) Caco-2细胞单层膜的TEER; (b) 股骨BMD; (c) 股骨BV/TV; (d) 血清BALP水平; (e) 血清ET水平; (f) 血清E2水平; (g) 结肠紧密连接蛋白mRNA表达水平; (h) 血清ET水平。Mode: 进行卵巢切除术。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; n.s: 与卵巢切除术组相比不显著。

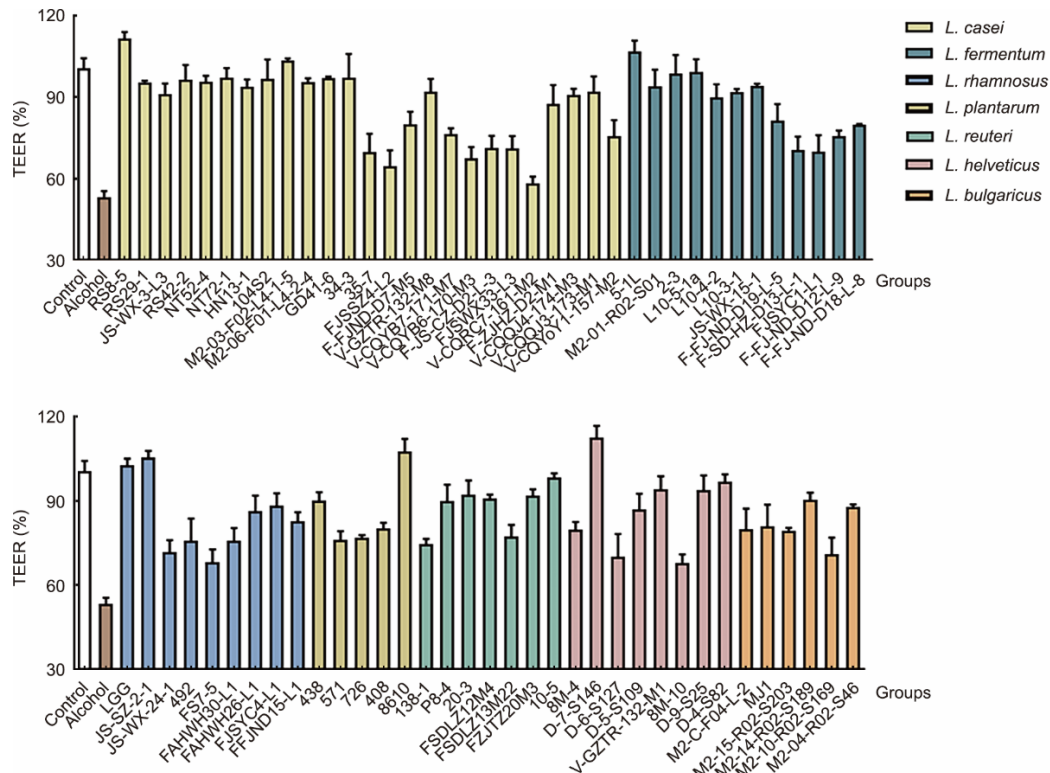


图5. 不同乳酸菌菌株对5%酒精处理Caco-2细胞单层膜跨上皮电阻 (TEER) 的影响。

体内保护作用有关 (图S5)。

3.7. 乳酸菌体外调节肠道屏障能力与体内酒精性肝损伤缓解作用的相关性分析

Pearson 相关分析结果显示, 紧密连接蛋白、SOD、GSH 等体外指标与体内 TEER 值呈显著正相关 ($r > 0.9$)。其他与酒精性肝损伤严重程度相关的指标, 如内毒素、ALT、AST、TC、MDA 与 TEER 值呈显著负相关 ($r < -0.9$) [图7 (a)]。此外, 主成分分析结果显示, 体内和体外指标具有很强的相关性, $r_{XY} = -0.97$ [图7 (b)]。

4. 讨论

4.1. 肠屏障功能障碍模型的选择

本研究通过测定 Caco-2 细胞单层的 TEER, 探讨乳酸菌菌株对肠道屏障功能的调节作用。我们进一步评估了益生菌对肠道屏障功能的调节能力与对特定代谢疾病的保护之间的相关性。Caco-2 细胞是人上皮性结直肠腺癌细胞, 其结构和功能与分化的小肠上皮细胞相似, 可在 transwell 膜上自发形成单层[37]。因此, 我们利用培养的 Caco-2 细胞单层作为体外模型来检测肠道屏障功能。TEER 测量是一种常用的电生理方法, 用于量化基于细胞单层阻抗的紧密结渗透率。据报道, 肠上皮细胞可通过测量 TEER 反映

肠道屏障功能; 该方法的优点是无创, 可用于实时监测活细胞[53]。TNF- α 已被报道在骨质疏松症的发病机制中起重要作用, 在骨质疏松患者中观察到 TNF- α 水平升高, 另一项研究表明缺乏 TNF- α 受体的小鼠不发生骨质流失[54-55]。潜在的机制可能是 TNF- α 通过激活 NF- κ B 和 PI3K/Akt 信号, 协同促进 RANKL [核因子 (NF) - κ B 配体] 诱导的破骨细胞形成[56]。也有报道称 TNF- α 在 2~10 ng·mL⁻¹ 时, 以剂量依赖性的方式显著降低 Caco-2 单层的 TEER, 这表明它是增加肠通透性的重要因素[44]。卵巢切除术可导致体内雌激素水平降低, 是公认的诱发动物骨质疏松的常用方法[14]。雌激素缺乏可诱导 T 细胞产生 TNF- α , 通过激活 TNF- α 受体 p55 增强巨噬细胞集落刺激因子和 RANKL 诱导的破骨细胞生成[57]。然而, 卵巢切除术仅在体内受到限制, 我们选择 TNF- α 在细胞模型中模拟骨质疏松症。由于本研究的主要目的是建立一种体外模型, 以高效筛选潜在的益生菌对抗特定代谢疾病, 因此我们只考虑了细菌对屏障的作用, 而没有详细研究益生菌调节屏障的作用模式。临床常用药物阿仑膦酸钠通过诱导破骨细胞失活抑制骨吸收来缓解骨质疏松症, 本动物实验选择阿仑膦酸钠作为阳性对照[58]。在酒精性肝病的体外模拟中, 我们注意到, 大剂量酒精治疗会导致肠道屏障受损, 增加肠道通透性, 进一步破坏肠道菌群平衡, 诱发内毒素血症, 最终导致酒精性肝损伤[59]。既往研究表明,

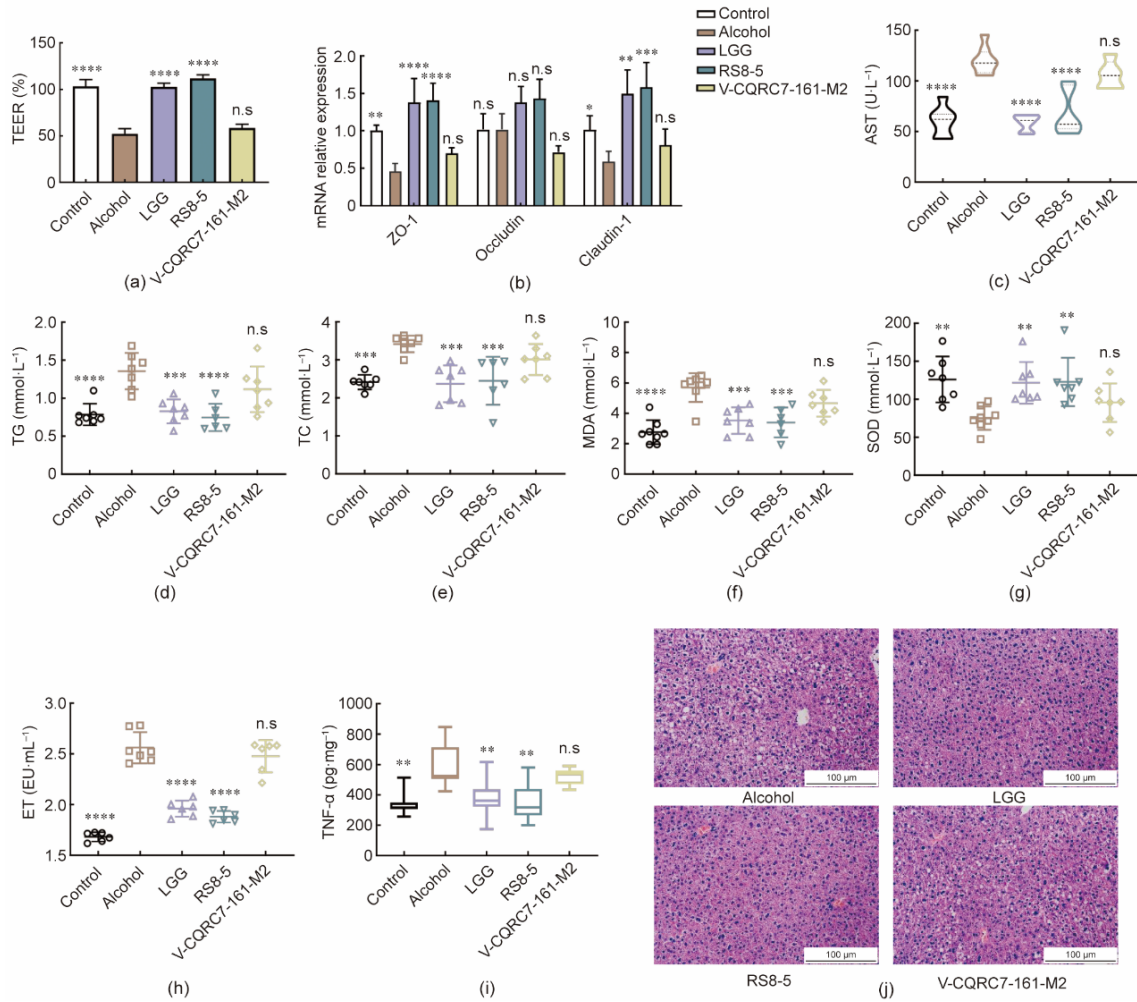


图6. 干酪乳杆菌菌株减轻小鼠酒精性肝损伤的作用。(a) Caco-2细胞单层膜的TEER; (b) Caco-2细胞紧密连接蛋白mRNA表达水平; (c) 血清中AST水平; (d) 血清中TG水平; (e) 血清TC水平; (f) 血清中MDA水平; (g) 血清SOD水平; (h) 血清内毒素水平; (i) 肝脏中TNF-α水平; (j) 小鼠肝脏H&E染色代表性图像的组织学检查。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; n.s.: 与酒精处理组相比不显著。

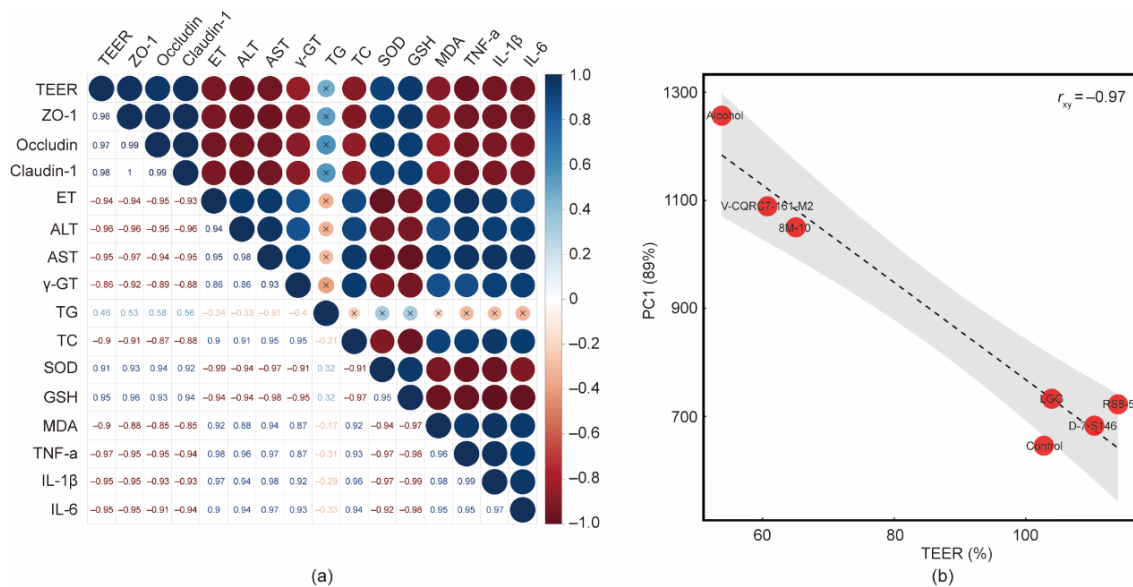


图7. (a) 酒精性肝损伤实验TEER值与各实验指标的相关性; (b) TEER值与PC1的相关性, PC1: 通过对酒精性肝损伤实验中所有测试参数的主成分分析得出第一主成分。

仅2.5%浓度的酒精暴露就能破坏Caco-2细胞的微管蛋白,且酒精浓度与Caco-2细胞单层膜通透性增加呈剂量依赖关系[60–61]。在动物实验中,Lieber-DeCarli饮食法通常用于模拟慢性酒精滥用[62]。大量证据表明,LGG治疗可调节黏膜免疫系统,增强肠道屏障功能,抑制内毒素产生,减轻酒精性肝损伤[44,63–64]。因此,本研究以该益生菌菌株作为阳性对照。

4.2. 菌株依赖性的体外调节肠屏障功能障碍

根据我们的体外实验数据,不同的乳杆菌菌株对肠道屏障调节能力表现出显著的菌株特异性,但没有物种特异性(图1和图5)。与我们的结果一致,在Caco-2细胞单层模型上,与其他7种商业使用的益生菌菌株相比,鼠李糖乳杆菌HN001处理对TEER值的影响更为显著[41]。动物研究表明,脆弱拟杆菌FSHCM14E1对DSS诱导的肠屏障损伤的恢复效果最优,该菌株短链脂肪酸分泌能力优于其他脆弱拟杆菌菌株[65]。益生菌产生的特定分子,如有机酸、细胞外囊泡和分泌蛋白,可能与在增强肠道屏障功能中起重要作用的信号通路(如NF- κ B、肌球蛋白轻链激酶、丝裂原活化蛋白激酶和蛋白激酶A途径)发生不同的相互作用[66]。这可能部分解释了不同益生菌对Caco-2细胞单层屏障功能的菌株特异性调节作用。不同乳酸菌在遗传构成、葡萄糖利用和环境抗性等生理特性上存在显著差异[67]。以往的研究表明,属于同一物种的益生菌,如双歧杆菌[68]、拟杆菌[65]和阿克曼氏菌[69],对肠道健康的调节作用存在差异。然而,一些研究表明,益生菌对便秘或非酒精性脂肪肝的保护作用存在种间差异[70–71]。益生菌的功能可能与细菌的生物学特性、菌株和宿主的相互作用、益生菌在体内的作用方式等复杂因素有关[72]。这些因素可能导致益生菌对宿主的种间效应的结果存在争议。因此,为了避免不同菌种的干扰,更全面地评价乳杆菌对肠道屏障功能的调节能力,我们选择了三种乳杆菌(发酵乳杆菌、干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌)分别进行动物实验。在本研究中,上述三种益生菌的测试菌株数量相对于其他益生菌种类要多。同时,这三种动物对肠道屏障的调节能力也存在巨大差异。此外,先前几项基于动物实验的研究表明,用这三种菌治疗可显著逆转肠屏障功能障碍[73–74]。

4.3. 菌株依赖性的体内调节肠屏障功能障碍

骨结构指标包括BMD、Ct.V、BV/TV以及紧密连接蛋白指标,在整体评价中权重高于其他指标,可视为与骨质疏松缓解呈正相关的参数。因此,通过主成分分析

(PCA),这些参数的综合指标为正。主成分分析法是将原有的多个指标通过线性组合成为一个新的综合指标的方法[75]。由于相关系数是通过分析TEER与动物实验综合指标的相关程度得出的,因此骨质疏松模型实验中的相关系数为0.82(图2、图S1、图S2)。早前的一份报告提供了直接的体内证据,证明发酵乳杆菌能够预防应激性肠屏障功能障碍,并对调节全身免疫反应发挥有益作用[76]。据报道,发酵乳制品可改变骨代谢相关标志物的基因表达水平,下调卵巢切除术刺激的骨凋亡相关基因[77]。此外,用干酪乳杆菌治疗可以通过降低去卵巢大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶的活性来预防骨质流失[78]。在体外实验中,通过鼠李糖乳杆菌LGG和植物乳杆菌CCFM8610对TNF- α 具有显著的保护作用,进一步验证了肠道屏障调节能力与益生菌对骨质疏松症的保护作用之间的相关性。这些结果与先前的研究一致,表明口服LGG可以通过刺激产生丁酸盐的肠道细菌(如梭状芽胞杆菌)的生长来增加雌性小鼠的骨形成,并通过肠道微生物依赖的抗炎机制减弱富马酸替诺福韦酯引起的雄性小鼠骨丢失[9,21]。虽然CCFM8610缓解骨质疏松的研究未见报道,但该菌株的治疗已被证明在重金属引起的肠道损伤和DSS诱导的肠道炎症中发挥重要作用。进一步的结果表明,其潜在机制与紧密连接蛋白的恢复和肠上皮细胞凋亡的抑制有关[51,79]。除了骨质疏松模型外,我们还通过测定大鼠的紧密连接蛋白表达、肝脏病理组织病理学、氧化应激水平、肝功能指标和炎症因子,评估了干酪乳杆菌和瑞士乳杆菌菌株对酒精性肝病的保护作用,证实了肠道屏障调节能力与益生菌的体内保护作用之间存在类似的正相关关系(图6和图S5)。

4.4. 强相关性:在体外人体细胞模型中模拟/预测体内效果。

相当多的研究证实了益生菌对代谢性疾病的保护作用。然而,目前还缺乏一种高效的筛选这些有益菌株的方法。基于特定模型的动物实验已被认为是模拟人类代谢功能障碍的可靠方法。然而,这些模型在效率和费用上都存在不足。卵巢切除所致骨质疏松大鼠模型的建立需要30天以上,而Lieber-DeCarli饮食法小鼠模型模拟慢性酒精性肝损伤进行益生菌筛选的实验周期总是超过50天[62,80]。与基于微生物学和细胞生物学技术的体外实验相比,动物饲养和手术的成本相对较高。更重要的是,动物研究是一个严重的伦理挑战,替换、减少和细化(3R)被认为是强制性的规则[81]。相关分析被认为是衡量两个或多个可变因素之间相关程度的常用方法。许多研究使用这种

方法来评估益生菌与体内生理功能之间的关系，如双歧杆菌与排便急迫性的关系[82]、益生菌发酵的中草药与肠道内稳态的关系[83]、益生菌定植与艰难梭菌感染的关系[84]。为了说明体外肠道屏障调节能力与体内特定代谢性疾病缓解之间的相关性，我们选择了相关性分析方法。在本研究中，Caco-2细胞单层模型被证明是一种可行的体外代谢性疾病益生菌筛选方法。Pearson相关系数 r_{XY} 在统计学上被定义为两个变量之间的关系强度及其相互关联的度量[85]。Pearson相关系数返回的值介于-1和1之间， r_{XY} 的绝对值 ≥ 0.8 表示 X 和 Y 之间有很强的相关性[86]。与我们的研究类似，在对体外渗透的溶剂累积数量和利用共聚焦拉曼光谱（CRS）测量的相应体内皮肤摄取进行线性回归后，发现了很强的体内外相关性（ $r_{XY} = 0.82$ ），这表明CRS是分析皮肤配方中药物和载体传递的有力工具[87]。根据本研究的结果，骨质疏松症和酒精性肝损伤的细胞实验与动物实验的Pearson相关系数分别为0.82和-0.97（图3和图7），表明该细胞模型模拟益生菌在体内的保护作用是可可靠的。与动物模型相比，Caco-2细胞单层模型在实验周期、成本和通量方面具有优势。我们的结果可能为筛选针对特定代谢性疾病的益生菌提供一种潜在的方法。

5. 结论

综上所述，本研究表明具有良好肠道屏障调节能力的乳杆菌菌株对代谢性疾病具有保护作用。我们开发了一种基于Caco-2细胞单层模型的体外筛选方法，用于鉴定针对特定代谢疾病（如骨质疏松症和酒精性肝病）的潜在益生菌。

致谢

本研究得到国家自然科学基金项目（32122067和31820103010）、江苏省自然科学基金项目（BK20200084）以及江苏省食品安全与质量控制协同创新中心的资助和支持。

Authors' contributions

Yang Liu: methodology, software, formal analysis, writing original draft. Jiang Peng: visualization, methodology. Shiya Zhu: methodology, software. Leilei Yu: formal analysis, investigation. Fengwei Tian: formal analysis,

investigation. Jianxin Zhao: validation, investigation. Hao Zhang: validation, investigation. Wei Chen: project administration, funding acquisition. Qixiao Zhai: conceptualization, writing review and editing, supervision, funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Compliance with ethical guidelines

Yang Liu, Jiang Peng, Shiya Zhu, Leilei Yu, Fengwei Tian, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Wei Chen, and Qixiao Zhai declare that they have no conflicts 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.2022.02.014>.

References

- [1] Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 2018;50(8):1–9.
- [2] Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend your fences: the epithelial barrier and its relationship with mucosal immunity in inflammatory bowel disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;4(1):33–46.
- [3] Ghosh S, Whitley CS, Haribabu B, Jala VR. Regulation of intestinal barrier function by microbial metabolites. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2021;11(5):1463–82.
- [4] Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell* 2018;33(4):570–80.
- [5] Jones RM, Mülle JG, Pacifici R. Osteomicrobiology: the influence of gut microbiota on bone in health and disease. *Bone* 2018;115:59–67.
- [6] Sarin SK, Pande A, Schnabl B. Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease. *J Hepatol* 2019;70(2):260–72.
- [7] Yan F, Polk DB. Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27(6):496–501.
- [8] Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Irie K, Endo Y, Yamamoto T, et al. Supplementation of broccoli or *Bifidobacterium longum*-fermented broccoli suppresses serum lipid peroxidation and osteoclast differentiation on alveolar bone surface in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutr Res* 2012;32(4):301–7.
- [9] Tyagi AM, Yu M, Darby TM, Vaccaro C, Li JY, Owens JA, et al. The microbial metabolite butyrate stimulates bone formation via T regulatory cell-mediated regulation of WNT10B expression. *Immunity* 2018;49(6):1116–1131.e7.
- [10] Schepper JD, Collins FL, Rios-Arce ND, Raecht S, Schaefer L, Gardinier JD, et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* prevents postantibiotic bone loss by reducing intestinal dysbiosis and preventing barrier disruption. *J Bone Miner Res* 2019;34(4):681–98.
- [11] Ohlsson C, Engdahl C, Fåk F, Andersson A, Windahl SH, Farman HH, et al. Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS ONE* 2014;9(3):e92368.
- [12] Nilsson AG, Sundh D, Bäckhed F, Lorentzon M. *Lactobacillus reuteri* reduces bone loss in older women with low bone mineral density: a randomized, placebo-controlled, double-blind, clinical trial. *J Intern Med* 2018;284(3):307–17.

- [13] Jansson PA, Curicac D, Lazou Ahrén I, Hansson F, Martinsson Niskanen T, Sjögren K, et al. Probiotic treatment using a mix of three *Lactobacillus* strains for lumbar spine bone loss in postmenopausal women: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Rheumatol* 2019;1(3): e154–62.
- [14] Jafarnejad S, Djafarian K, Fazeli MR, Yekaninejad MS, Rostamian A, Keshavarz SA. Effects of a multispecies probiotic supplement on bone health in osteopenic postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled trial. *J Am Coll Nutr* 2017;36(7):497–506.
- [15] Chang B, Sang L, Wang Y, Tong J, Zhang D, Wang B. The protective effect of VSL#3 on intestinal permeability in a rat model of alcoholic intestinal injury. *BMC Gastroenterol* 2013;13(1):151.
- [16] Grander C, Adolph TE, Wieser V, Lowe P, Wrzosek L, Gyongyosi B, et al. Recovery of ethanol-induced *Akkermansia muciniphila* depletion ameliorates alcoholic liver disease. *Gut* 2018;67(5):891–901.
- [17] Chopyk DM, Grakoui A. Contribution of the intestinal microbiome and gut barrier to hepatic disorders. *Gastroenterology* 2020;159(3):849–63.
- [18] Gu Z, Liu Y, Hu S, You Y, Wen J, Li W, et al. Probiotics for alleviating alcoholic liver injury. *Gastroenterol Res Pract* 2019;2019:1–9.
- [19] Hong M, Han DH, Hong J, Kim DJ, Suk KT. Are probiotics effective in targeting alcoholic liver diseases? *Probiotics Antimicro Prot* 2019;11(2):335–47.
- [20] Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008;42(8):675–82.
- [21] Liu H, Gu R, Li W, Zhou W, Cong Z, Xue J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates tenofovir disoproxil fumarate-induced bone loss in male mice via gut-microbiota-dependent anti-inflammation. *Ther Adv Chronic Dis* 2019;10.
- [22] AEMMRAfify, Romeilah RM, Sultan IM, Hussein M. Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *Int J Acad Res* 2012;4(6): 131–9.
- [23] Liu Y, Li Y, Yu X, Yu L, Tian F, Zhao J, et al. Physiological characteristics of *Lactobacillus casei* strains and their alleviation effects against inflammatory bowel disease. *J Microbiol Biotechnol* 2021;31(1):92–103.
- [24] La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the gut immune system: indirect regulation. *Probiotics Antimicro Prot* 2018;10(1):11–21.
- [25] Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16(10):605–16.
- [26] Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Garrido-Mesa J, Vezza T, Utrilla MP, Chueca N, et al. Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: impact on microRNAs expression and gut microbiota composition. *J Nutr Biochem* 2018;61:129–39.
- [27] Hou Q, Ye L, Liu H, Huang L, Yang Q, Turner JR, et al. *Lactobacillus* accelerates ISCs regeneration to protect the integrity of intestinal mucosa through activation of STAT3 signaling pathway induced by LPLs secretion of IL-22. *Cell Death Differ* 2018;25(9):1657–70.
- [28] Pan T, Guo HY, Zhang H, Liu AP, Wang XX, Ren FZ. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* alleviates clinical symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium salt in BALB/c mice. *Benef Microbes* 2014; 5(3): 315–22.
- [29] Schroeder BO, Birchenough GMH, Ståhlman M, Arike L, Johansson MEV, Hansson GC, et al. *Bifidobacteria* or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration. *Cell Host Microbe* 2018; 23(1):27–40.e7.
- [30] Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med* 2019;25(7): 1096–103.
- [31] Giannetti E, Staiano A. Probiotics for irritable bowel syndrome: clinical data in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;63(1S):S25–6.
- [32] AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;4(4):CD005496.
- [33] Xue L, He J, Gao N, Lu X, Li M, Wu X, et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. *Sci Rep* 2017;7(1):45176.
- [34] Kang Y, Kang X, Yang H, Liu H, Yang X, Liu Q, et al. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability. *Pharmacol Res* 2022;175:106020.
- [35] Hsieh FC, Lan CC, Huang TY, Chen KW, Chai CY, Chen WT, et al. Heat-killed and live *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 exhibit similar effects on improving metabolic functions in high-fat diet-induced obese rats. *Food Funct* 2016;7(5): 2374–88.
- [36] VyLam, Su J, Koprowski S, Hsu A, Tweddell JS, Rafiee P, et al. Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. *FASEB J* 2012; 26(4):1727–35.
- [37] Roh TT, Chen Y, Rudolph S, Gee M, Kaplan DL. *In vitro* models of intestine innate immunity. *Trends Biotechnol* 2021;39(3):274–85.
- [38] Wu XX, Huang XL, Chen RR, Li T, Ye HJ, Xie W, et al. Paeoniflorin prevents intestinal barrier disruption and inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in Caco-2 cell monolayers. *Inflammation* 2019;42(6):2215–25.
- [39] Putt KK, Pei R, White HM, Bolling BW. Yogurt inhibits intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cells by increasing tight junctions. *Food Funct* 2017;8(1): 406–14.
- [40] Tu J, Xu Y, Xu J, Ling Y, Cai Y. Chitosan nanoparticles reduce LPS-induced inflammatory reaction via inhibition of NF- κ B pathway in Caco-2 cells. *Int J Biol Macromol* 2016;86:848–56.
- [41] Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiol Lett* 2010;309(2):184–92.
- [42] 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).
- [43] Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Narbad A, Chen YQ, et al. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(13):4063–71.
- [44] Li BR, Wu J, Li HS, Jiang ZH, Zhou XM, Xu CH, et al. *In vitro* and *in vivo* approaches to determine intestinal epithelial cell permeability. *J Vis Exp* 2018; 140:e57032.
- [45] Wang Y, Kirpich I, Liu Y, Ma Z, Barve S, McClain CJ, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. *Am J Pathol* 2011;179(6):2866–75.
- [46] Akbari P, Braber S, Alizadeh A, Verheijden KAT, Schoterman MHC, Kraneveld AD, et al. Galacto-oligosaccharides protect the intestinal barrier by maintaining the tight junction network and modulating the inflammatory responses after a challenge with the mycotoxin deoxynivalenol in human Caco-2 cell monolayers and B6C3F1 mice. *J Nutr* 2015;145(7):1604–13.
- [47] Salazar M, Hernandez L, Ramos AL, BdoSalazar, Micheletti KR, Paranhos LR, et al. Effect of alendronate sodium on tooth movement in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol* 2015;60(5):776–81.
- [48] Parvaneh M, Karimi G, Jamaluddin R, Ng MH, Zuriati I, Muhammad SI. *Lactobacillus helveticus* (ATCC 27558) upregulates *Runx2* and *Bmp2* and modulates bone mineral density in ovariectomy-induced bone loss rats. *Clin Interv Aging* 2018;13:1555–64.
- [49] Zhang C, Zhao Y, Jiang J, Yu L, Tian F, Zhao J, et al. Identification of the key characteristics of *Bifidobacterium longum* strains for the alleviation of ulcerative colitis. *Food Funct* 2021;12(8):3476–92.
- [50] Eor JY, Tan PL, Son YJ, Lee CS, Kim SH. Milk products fermented by *Lactobacillus* strains modulate the gut–bone axis in an ovariectomized murine model. *Int J Dairy Technol* 2020;73(4):743–56.
- [51] Zhai Q, Tian F, Zhao J, Zhang H, Narbad A, Chen W, et al. Oral administration of probiotics inhibits absorption of the heavy metal cadmium by protecting the intestinal barrier. *Appl Environ Microbiol* 2016;82(14):4429–40.
- [52] Liu Y, Chen R, Li L, Dong R, Yin H, Wang Y, et al. The triterpenoids-enriched extracts from *Antrodia cinnamomea* mycelia attenuate alcohol-induced chronic liver injury via suppression lipid accumulation in C57BL/6 mice. *Food Sci Hum Wellness* 2021;10(4):497–507.
- [53] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J Lab Autom* 2015; 20(2):107–26.
- [54] Kim DE, Kim JK, Han SK, Jang SE, Han MJ, Kim DH. *Lactobacillus plantarum* NK3 and *Bifidobacterium longum* NK49 alleviate bacterial vaginosis and osteoporosis in mice by suppressing NF- κ B-linked TNF- α expression. *J Med Food* 2019;22(10):1022–31.
- [55] Yu H, Zhou W, Yan W, Xu Z, Xie Y, Zhang P. LncRNA CASC11 is upregulated in postmenopausal osteoporosis and is correlated with TNF- α . *Clin Interv Aging* 2019;14:1663–9.
- [56] Zha L, He L, Liang Y, Qin H, Yu B, Chang L, et al. TNF- α contributes to postmenopausal osteoporosis by synergistically promoting RANKL-induced osteoclast formation. *Biomed Pharmacother* 2018;102:369–74.
- [57] Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF α . *J Clin Invest* 2000;106(10):1229–37.

- [58] Cosman F, Cummings S, Lindsay R. How long should patients with osteoporosis be treated with bisphosphonates? *J Womens Health Gend Based Med* 2000;9 (2):81–4.
- [59] Mutlu E, Keshavarzian A, Engen P, Forsyth CB, Sikaroodi M, Gillevet P. Intestinal dysbiosis: a possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33 (10):1836–46.
- [60] Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol* 1999;276(4):G965–74.
- [61] Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(3):997–1008.
- [62] Guo F, Zheng K, Benedé-Ubieto R, Cubero FJ, Nevzorova YA. The Lieber–DeCarli diet—a flagship model for experimental alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2018;42(10):1828–40.
- [63] Miyauchi E, Morita H, Tanabe S. *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase *in vivo*. *J Dairy Sci* 2009;92(6):2400–8.
- [64] Wang Y, Liu Y, Sidhu A, Ma Z, McClain C, Feng W. *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303(1):G32–41.
- [65] Wang C, Li S, Hong K, Yu L, Tian F, Zhao J, et al. The roles of different *Bacteroides fragilis* strains in protecting against DSS-induced ulcerative colitis and related functional genes. *Food Funct* 2021;12(18):8300–13.
- [66] Grosheva I, Zheng D, Levy M, Polansky O, Lichtenstein A, Golani O, et al. Highthroughput screen identifies host and microbiota regulators of intestinal barrier function. *Gastroenterology* 2020;159(5):1807–23.
- [67] Xiao Y, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. Mining *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* for organisms with long-term gut colonization potential. *Clin Nutr* 2020;39(5):1315–23.
- [68] Wang L, Hu L, Xu Qi, Yin B, Fang D, Wang G, et al. *Bifidobacterium adolescentis* exerts strain-specific effects on constipation induced by loperamide in BALB/c mice. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):318.
- [69] Kim S, Shin YC, Kim TY, Kim Y, Lee YS, Lee SH, et al. Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* accelerates intestinal stem cell-mediated epithelial development. *Gut Microbes* 2021;13(1):1892441.
- [70] Wang L, Hu L, Xu Q, Jiang T, Fang S, Wang G, et al. *Bifidobacteria* exert species-specific effects on constipation in BALB/c mice. *Food Funct* 2017;8(10):3587–600.
- [71] Wang G, Jiao T, Xu Y, Li D, Si Q, Hao J, et al. *Bifidobacterium adolescentis* and *Lactobacillus rhamnosus* alleviate non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat, high-cholesterol diet through modulation of different gut microbiota-dependent pathways. *Food Funct* 2020;11(7):6115–27.
- [72] Macshut M, Kaido T, Yao S, Miyachi Y, Sharshar M, Iwamura S, et al. Visceral adiposity is an independent risk factor for high intra-operative blood loss during living-donor liver transplantation; could preoperative rehabilitation and nutritional therapy mitigate that risk? *Clin Nutr* 2021;40(3):956–65.
- [73] Bhat MI, Kapila S, Kapila R. *Lactobacillus fermentum* (MTCC-5898) supplementation renders prophylactic action against *Escherichia coli* impaired intestinal barrier function through tight junction modulation. *Lebensm Wiss Technol* 2020;123:109118.
- [74] Jang YJ, Kim WK, Han DH, Lee K, Ko G. *Lactobacillus fermentum* species ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis by regulating the immune response and altering gut microbiota. *Gut Microbes* 2019;10(6):696–711.
- [75] Mallappa RH, Singh DK, Rokana N, Pradhan D, Batish VK, Grover S. Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. *Lebensm Wiss Technol* 2019;105:272–81.
- [76] Vanhaecke T, Aubert P, Grohard PA, Durand T, Hulin P, Paul-Gilloteaux P, et al. *L. fermentum* CECT 5716 prevents stress-induced intestinal barrier dysfunction in newborn rats. *Neurogastroenterol Motil* 2017;29(8):e13069.
- [77] Lee CS, Kim JY, Kim BK, Lee IO, Park NH, Kim SH. *Lactobacillus*-fermented milk products attenuate bone loss in an experimental rat model of ovariectomy-induced post-menopausal primary osteoporosis. *J Appl Microbiol* 2021;130(6):2041–62.
- [78] Kim JG, Lee E, Kim SH, Whang KY, Oh S, Imm JY. Effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product on bone metabolism in ovariectomized rats. *Int Dairy J* 2009;19(11):690–5.
- [79] Liu Y, Xiao W, Yu L, Tian F, Wang G, Lu W, et al. Evidence from comparative genomic analyses indicating that *Lactobacillus*-mediated irritable bowel syndrome alleviation is mediated by conjugated linoleic acid synthesis. *Food Funct* 2021;12(3):1121–34.
- [80] Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J* 2020;19:89–107.
- [81] Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther* 2004;11(S1):S64–6.
- [82] Han K, Wang J, Seo JG, Kim H. Efficacy of double-coated probiotics for irritable bowel syndrome: a randomized double-blind controlled trial. *J Gastroenterol* 2017;52(4):432–43.
- [83] Wang Y, Xie Q, Sun S, Huang B, Zhang Y, Xu Y, et al. Probiotics-fermented *Massa Medicata Fermentata* ameliorates weaning stress in piglets related to improving intestinal homeostasis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102 (24):10713–27.
- [84] Li X, Chu Q, Huang Y, Xiao Y, Song L, Zhu S, et al. Consortium of probiotics attenuates colonization of *Clostridioides difficile*. *Front Microbiol* 2019; 10: 2871.
- [85] Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesth Analg* 2018;126(5):1763–8.
- [86] Nahler G. Pearson correlation coefficient. In: Nahler G, editor. *Dictionary of pharmaceutical medicine*. Vienna: Springer Vienna; 2009.
- [87] Patel A, Iliopoulos F, Caspers PJ, Puppels GJ, Lane ME. *In vitro – in vivo* correlation in dermal delivery: the role of excipients. *Pharmaceutics* 2021; 13(4):542.