

人参皂苷 Rg₁、Rb₁对脂多糖体外诱导肠上皮屏障损伤的保护作用

陈天¹, 李博野¹, 于渤洋¹, 杨晋宁¹, 胡秦^{1*}, 陈颖^{2*}

(1. 北京工业大学 环境与生命学部, 北京 100124; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 基于人髓系白血病单核细胞(THP-1)与肠上皮细胞(Caco-2)共培养体系, 研究人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 对脂多糖(LPS)诱导的 THP-1 细胞炎症因子释放的影响, 及其对 THP-1 细胞活化致 Caco-2 细胞炎性损伤的保护作用。方法: 首先制备 THP-1 与 Caco-2 细胞共培养微流控芯片, 实验分为空白组、LPS 组和给药组。空白组细胞正常培养; LPS 组在上层 Caco-2 细胞形成单层屏障后, 在下层 THP-1 细胞中加入 LPS (1 mg·L⁻¹); 给药组在 LPS 组的基础上在 THP-1 细胞中分别加入 33 mg·L⁻¹ 的人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁。THP-1 细胞与 Caco-2 细胞共培养 24 h 后采用异硫氰酸荧光素-葡聚糖 (FITC-Dextran) 示踪法检测下层芯片通道中的 FITC-Dextran 荧光值。THP-1 细胞实验分为空白组、LPS 组、给药组。空白组 THP-1 细胞正常培养; LPS 组在 THP-1 细胞中加入 LPS (1 mg·L⁻¹); 给药组在 LPS 组的基础上分别加入相应剂量的人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ (11、33、100 mg·L⁻¹)。细胞培养 24 h 后细胞增殖与活性检测 (CCK-8) 检测 THP-1 细胞活性, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 THP-1 细胞炎症细胞因子白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 表达。Caco-2 细胞实验分为空白组、LPS 组、给药组。空白组 Caco-2 细胞正常培养; 其他组将第二部分 THP-1 细胞实验中对组别的细胞上清置换于 Caco-2 细胞中, 继续培养 24 h 后 CCK-8 检测 Caco-2 细胞活性, Real-time PCR 检测 Caco-2 细胞炎症细胞因子 IL-6、IL-8、TNF-α 及紧密连接蛋白封闭蛋白 (Occludin) 表达, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Caco-2 细胞紧密连接蛋白 Occludin 的表达。结果: 在 THP-1 与 Caco-2 细胞共培养体系中, 与 LPS 组比较, 人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 均能有效保护 LPS 诱导肠上皮屏障通透性升高 (P<0.01)。Rg₁ 和 Rb₁ 拮抗 LPS 诱导的 THP-1 细胞 IL-6、IL-1β、TNF-α 炎症细胞因子表达升高 (P<0.05)。经 Rg₁ 和 Rb₁ 处理的 THP-1 细胞上清与 Caco-2 细胞共培养后, 与 LPS 组比较, 显著降低 Caco-2 细胞 IL-6、IL-8、TNF-α 炎症细胞因子表达 (P<0.01), 上调紧密连接蛋白 Occludin 表达。结论: 在 THP-1 与 Caco-2 细胞共培养体外模拟肠道上皮屏障功能模型中, 人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 通过调节 THP-1 细胞释放炎症细胞因子, 进而调控 Caco-2 细胞的炎症反应和细胞屏障完整性, 在 LPS 诱导的体外肠上皮屏障损伤中发挥保护作用。

[关键词] 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁; 炎症细胞因子; 紧密连接蛋白; 微流控细胞培养芯片

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0064-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220705

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220124.2010.012.html>

[网络出版日期] 2022-01-26 11:38

Protective Effect of Ginsenosides Rg₁ and Rb₁ Against Intestinal Epithelial Barrier Injury Induced by Lipopolysaccharide *in Vitro*

CHEN Tian¹, LI Bo-ye¹, YU Bo-yang¹, YANG Jin-ning¹, HU Qin^{1*}, CHEN Ying^{2*}

(1. Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on the release

[收稿日期] 2021-11-12

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04905); 中国空间站航天医学实验领域第一批项目 (HYZHXM05003)

[第一作者] 陈天, 硕士, 从事微流控器官芯片研究, Tel: 010-67396212, E-mail: chentian@emails.bjut.edu.cn

[通信作者] * 胡秦, 副教授, 从事抗病毒药物研发及相关免疫机制研究, Tel: 010-67396212, E-mail: hq07616@bjut.edu.cn;

* 陈颖, 研究员, 从事中药药理和药代动力学研究, Tel: 010-64093296, E-mail: ychen@icmm.ac.cn

of inflammatory factors of human myeloid leukemia monocytes (THP-1) induced by lipopolysaccharide (LPS) and their protective effects on the inflammatory injury of intestinal epithelial cells (Caco-2) induced by THP-1 cell activation based on the co-culture system of THP-1 and Caco-2. **Method:** Firstly, the microfluidic chip of co-culture of THP-1 and Caco-2 cells was prepared. In the experiment, a blank group, an LPS group, and drug intervention groups were set up. The cells in the blank group were cultured conventionally. In the LPS group, LPS ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was added to the lower THP-1 cells after the upper Caco-2 cells formed a monolayer barrier. On the basis of the LPS group, $33\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ginsenoside Rg_1 and $33\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ginsenoside Rb_1 were added to THP-1 cells respectively. After the co-culture of THP-1 cells and Caco-2 cells for 24 hours, the fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran fluorescence value in the lower chip channel was detected by FITC-Dextran tracer method. A blank group, an LPS group, and drug intervention groups were set up in the THP-1 cell experiment. THP-1 cells in the blank group were cultured conventionally. In the LPS group, LPS ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was added to THP-1 cells. Ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Rb_1 of the corresponding doses ($11, 33, 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) were added to the drug intervention groups respectively on the basis of the LPS group. After 24 hours of cell culture, the activity of THP-1 cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the expression of inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin- 1β (IL- 1β), and tumor necrosis factor (TNF)- α of THP-1 cells. A blank group, an LPS group, and drug intervention groups were set up in the Caco-2 cell experiment. Caco-2 cells in the blank group were cultured conventionally, and in other groups, the corresponding cell supernatant in the second part of the THP-1 cell experiment was employed in Caco-2 cells. After 24 hours of cell culture, the activity of Caco-2 cells was detected by CCK-8. Real-time PCR was used to detect the expression of IL-6, interleukin-8 (IL-8), TNF- α , and Occludin of Caco-2 cells. The expression of tight junction protein Occludin in Caco-2 cells was detected by Western blot. **Result:** Both ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Rb_1 could effectively protect LPS-induced intestinal epithelial barrier permeability in the co-culture system of THP-1 and Caco-2 cells ($P<0.01$). Ginsenosides Rg_1 and Rb_1 antagonized LPS-induced increased expression of IL-6, IL- 1β , and TNF- α in THP-1 cells ($P<0.05$). When the supernatant of THP-1 cells treated with ginsenosides Rg_1 and Rb_1 was co-cultured with Caco-2 cells, the expression of IL-6, IL-8, and TNF- α in Caco-2 cells was significantly reduced ($P<0.01$), and the expression of tight junction protein Occludin was up-regulated. **Conclusion:** In the co-culture system of THP-1 and Caco-2 cells simulating the intestinal epithelial barrier function *in vitro*, ginsenosides Rg_1 and Rb_1 play a protective role against LPS-induced intestinal epithelial barrier injury by regulating the release of inflammatory cytokines by THP-1 cells, thereby regulating the inflammatory response and cell barrier integrity of Caco-2 cells.

[Keywords] ginsenoside Rg_1 ; ginsenoside Rb_1 ; inflammatory cytokines; tight junction protein; microfluidic cell culture chip

肠道上皮屏障是机体肠道消化吸收、隔绝微生物感染和维持机体内环境稳态的重要免疫屏障。肠道上皮屏障通常由单层肠道上皮细胞(IEC)和上皮间免疫细胞(巨噬细胞、潘氏细胞、固有淋巴细胞等免疫细胞)所组成^[1-2]。在生理条件下,IEC的紧密连接对于微生物侵袭具有免疫防御作用,巨噬细胞等固有免疫细胞参与IEC的增殖、凋亡和损伤修复,维持肠上皮屏障的完整性,IEC与固有层免疫细胞共同维持肠道内稳态。在各种肠道炎症疾病,如炎症性肠病(IBD)中,巨噬细胞异常活化,并向M1型巨噬细胞极化,炎性细胞因子分泌增加,引起IEC

损伤和上皮屏障功能破坏,最终导致免疫紊乱和炎症发生^[3]。

人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 是人参皂苷的主要成分,具有广泛的药理作用,包括抗炎、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤、调节中枢神经系统等^[4-6]。在多种肠道炎症动物模型中,人参皂苷 Rg_1 、 Rb_1 均具有良好的保护作用。有研究表明人参皂苷 Rg_1 在硫酸葡聚糖钠盐(DSS)诱导结肠炎^[7]和肠缺血再灌注损伤小鼠模型^[8]中,通过降低肠道炎性细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)释放,激活Wnt/ β -catenin信号通路等机制,减轻肠损伤诱

导细胞凋亡,降低炎症反应,保护结肠功能。人参皂苷 Rb_1 也可通过降低炎症细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 的表达,增加抗炎因子 $IL-10$ 的表达,抑制核转录因子- κB ($NF-\kappa B$) 活化通路和调节磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/激活核转录因子 E_2 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路等途径,在三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导结肠炎、肠缺血再管损伤等模型中维持肠黏膜屏障的完整性^[9-11]。但人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 保护肠上皮屏障的作用靶点和机制还不明确。本论文利用基于微流控芯片的 THP-1 单核细胞与 Caco-2 上皮细胞共培养模型,观察人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 对脂多糖 (LPS) 引起肠上皮屏障功能损伤的保护作用,并基于细胞炎症细胞因子、紧密连接蛋白表达检测,探讨人参皂苷对肠上皮屏障功能保护作用的机制。

1 材料

1.1 细胞 人髓系白血病单核 THP-1 细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心 (批号 TCHU 57)。人直肠腺癌 Caco-2 细胞购自 American Type Culture Collection (ATCC 公司,批号 HTB-37)。

1.2 药品 对照品人参皂苷 Rg_1 (纯度 HPLC 测试 > 98%,批号 MUST-11041201) 和人参皂苷 Rb_1 (纯度: HPLC 测试 > 98%,批号 MUST-11042801) 均购于成都曼思特科技有限公司。

1.3 试剂 RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清、磷酸盐缓冲液 (PBS)、青-链霉素 (美国 Gibco 公司,批号分别为 8121071、8121382、2045512CP、8121485、15140-122); LPS、FD40S 异硫氰酸荧光素-葡聚糖 (美国 Sigma 公司,批号分别为 #0000112732、#SLCB8958); 2×TSINGKE Master 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) Mix (SYBR Green I)、逆转录 (RT)-PCR 引物、Goldenstar RT6 cDNA Synthesis Kit Ver.2 (北京擎科新业生物技术有限公司,批号分别为 TSE201、0EB21101); TRIzol (美国 Ambion 公司,批号 317904); 细胞增殖与活性检测 (CKK-8,同仁化学研究所,批号 KM671); RIPA 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白电泳凝胶试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20190125、20211107、20210925); 蛋白酶抑制剂 (美国 Promega 公司,批号 0000376328); 兔抗人 Occludin mAb (美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 8193T); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (中国 Proteintech 公司,批号 80570-1-RR); VeriBlot for IP Detection

Reagent HRP (英国 Abcam 公司,批号 GR3330589-2); QuickBlock Western 封闭液、BeyoECL Moon 极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0252、P0018FS); 聚二甲基硅氧烷 (PDMS,美国道康宁公司,批号 YYZZHC4073); 聚碳酸酯 10 μm 孔径过滤膜 (德国 Merck 公司,批号 R0KB05627)。

1.4 仪器 LABOFUGE400 型低速离心机 (美国 Thermo 公司); 5430R 型低温高速离心机、22331 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); ViiA 7 型 Real-time PCR 仪 (美国 ABI 公司); ZEISS Observer.A1 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); Enspire2300-001M 型酶标仪 (德国 PerkinElmer 公司); Fusion 200 型微量注射泵 (美国 Chemyx 公司); Mini-PROTEAN Tera 型蛋白质电泳仪,Mini Trans-Blot 型转印槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 THP-1 细胞于含 10%FBS、1%PS 的 RPMI 1640 培养基中培养,Caco-2 细胞于含 10%FBS、1%PS 和 0.1% 非必需氨基酸的 DMEM 中培养,培养箱条件为 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 、细胞密度达 80% 时传代培养。

2.2 微流控细胞培养芯片建立肠道细胞共培养模型 微流控细胞培养芯片制作:将清洗干净的硅片放入挥发缸,滴入 1~2 滴修饰剂修饰 3 min。硅片经过甩胶、曝光、显影和坚膜后完成模具制作。将 PDMS 进行比例混合,混合均匀后真空除气泡,浇筑到清洗过后的硅片模具上。PDMS 冷却凝固后从模具上剥离、切割、打孔。打孔完成的 PDMS 放入等离子体中处理 1 min,将上层 PDMS、聚酯多孔膜和下层 PDMS 进行键合。建立肠道细胞共培养模型: Caco-2 细胞以 2×10^6 个/mL 接种至双层微流控芯片上层,细胞培养基流速设定为 $0.5 \mu L \cdot min^{-1}$,连续培养 9 d 至 Caco-2 细胞形成细胞单层,向芯片下层通入 THP-1 细胞悬液,共培养 24 h。LPS 组向芯片下层分别加入含 $1 mg \cdot L^{-1}$ LPS 的培养基,加药组加入含 LPS ($1 mg \cdot L^{-1}$)、人参皂苷 Rg_1 或人参皂苷 Rb_1 ($100 mg \cdot L^{-1}$) 的培养基。

2.3 上皮屏障通透性检测 Caco-2 细胞与 THP-1 细胞共培养 24 h 后,向芯片上层通道内通入 0.1% FD40S (FITC-Dextran 40 000) 溶液,收集 12 h 内的下层通道流出液,酶标仪检测 FD40S 浓度,计算细胞屏障对 FITC-Dextran 的渗透率,计算公式: $P_{app} = Q/Act$ 。其中 P_{app} 为渗透系数; Q 为累计渗透量; A 为

渗透面积; C 为分子浓度; t 为渗透时间。

2.4 建立 THP-1 细胞和 Caco-2 细胞共培养体系

THP-1 细胞中加入 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PMA 处理 72 h,诱导分化为贴壁巨噬细胞。THP-1 细胞实验设空白组、LPS 组和人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 组。LPS 组加入 $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS,人参皂苷 Rg_1 组和人参皂苷 Rb_1 组在 LPS 组的基础上分别加入人参皂苷 Rg_1 或人参皂苷 Rb_1 ,质量浓度分别为 11、33、 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (根据参考文献[12],人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 在 $1\sim 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 均有效果)。细胞培养 24 h 后,裂解细胞用于 RT-PCR 检测,收取上清用于 Caco-2 细胞实验。Caco-2 细胞实验设正常组、LPS 组、人参皂苷 Rg_1 组和人参皂苷 Rb_1 组,正常组 Caco-2 细胞正常培养;其他组将 THP-1 细胞实验中对应组的细胞上清置换于 Caco-2 细胞中,继续培养 24 h 后进行后续检测。

2.5 CCK-8 法测定细胞活力 细胞中分别加入含 CCK-8 溶液的无血清培养基,孵育 2 h 后,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 A 。计算细胞存活率 $= (A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\%$ 。 A_s 为实验孔 A ; A_c 为对照孔 A ; A_b 为空白孔 A 。

2.6 Real-time PCR 检测 mRNA 表达 细胞加入 TRIzol 试剂反复吹打。将裂解液转移到 RNase-free 的离心管中,加入三氯甲烷,振荡静置后, $4\ ^\circ\text{C}$ $12\ 000\times g$ 离心 15 min。取上层水相 1:1 加入异丙醇,室温静置 10 min 后, $4\ ^\circ\text{C}$, $12\ 000\times g$ 离心 10 min (离心半径 10 cm)。加入 75% 乙醇沉淀干燥, RNA 溶解于无核酸酶水中。按照 Goldenstar RT6 cDNA Synthesis Kit Ver. 2 说明书将 mRNA 逆转录为 cDNA。使用三步法进行 Real-time PCR 检测 ($95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 60 s, 1 个循环; PCR 反应 $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 10 s; $65\ ^\circ\text{C}$ 退火 10 s; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 15 s, 40 个循环; 溶解曲线分析 $95\ ^\circ\text{C}$, 15 s; $60\ ^\circ\text{C}$, 60 s, 1 个循环) 分别检测 THP-1 细胞 IL-6、IL- 1β 、TNF- α 及 Caco-2 细胞表达 IL-6、IL-8、TNF- α 、Occludin mRNA 表达,以 GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达

THP-1 细胞上清与 Caco-2 细胞培养 24 h 后,每孔加入 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂), $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,提取细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后,蛋白样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,在 200 mA 恒定电流下与 PVDF 膜进行湿转移。加入封闭液封闭 30 min,将 1:500 稀释的

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL- 1β	上游 AGCTACGAATCTCCGACCAC	733
	下游 CGTTATCCCATGTGTCGAAGAA	
IL-6	上游 AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA	1 895
	下游 TGTCTGTCAGCCACTGGTTC	
IL-8	上游 ACACTGCGCCAACACAGAAATTA	872
	下游 TTTGCTTGAAGTTTCACTGGCATC	
TNF- α	上游 GAGGCCAAGCCCTGGTATG	91
	下游 CGGGCCGATTGATCTCAGC	
Occludin	上游 CGAGGAGTGGGTAAAAATGTGTCT	122
	下游 GCTTGTCAATCACTTTGCCATT	
GAPDH	上游 TCGGAGTCAACGGATTGGT	271
	下游 TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	

Occludin mAb 添加到 PVDF 膜中, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜。清洗后加入山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 辣根过氧化物酶 (HRP) (1:1 000) 室温孵育 1 h,化学发光试剂盒进行显影,观察蛋白条带,实验采用 GAPDH 作为内参。用 Image J 1.48 软件分析目标条带的灰度值。

2.8 统计学分析 数据采用 GraphPad prism 8 软件处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 One-way ANOVA 进行统计学分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 THP-1 细胞活力的影响 在 Caco-2 细胞与 THP-1 细胞中分别加入人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 ,培养 24 h 后,采用 CCK-8 法检测人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 对细胞增殖抑制的影响。与正常组比较, $1\sim 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 对 THP-1 和 Caco-2 细胞的增殖均无显著性影响,表明人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 在 $<100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度无明显细胞增殖抑制,可用于后续实验。见表 2 和表 3。

3.2 对 LPS 诱导上皮屏障通透性改变的影响 采用微流控细胞培养芯片 (见图 1) 进行 Caco-2 与 THP-1 细胞共培养。上层微通道培养 Caco-2 细胞形成单层屏障后,在下层微通道中接种 THP-1 细胞。下层通道中分别加入 LPS、LPS/人参皂苷 Rg_1 和 LPS/人参皂苷 Rb_1 溶液共培养 24 h。向上层通道加入 FITC-Dextran (FD40S) 溶液,取 2 h 后下层通道中的流出液检测荧光值。实验结果表明, LPS 显著上调上皮细胞对 FD40S 的透过率 ($P<0.01$),提示细胞屏障通透性改变,屏障功能损伤。加入人参皂苷

表2 人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁对THP-1细胞活力的影响
($\bar{x}\pm s, n=13$)

Table 2 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on viability of THP-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=13$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活力/%
正常组		100.00±8.87
人参皂苷Rg ₁ 组	3.125	96.04±6.21
	6.25	113.60±13.00
	12.5	85.81±4.89
	25	88.53±4.42
	50	90.58±7.84
	100	85.08±4.20
人参皂苷Rb ₁ 组	3.125	107.50±1.19
	6.25	105.20±4.28
	12.5	90.31±3.50
	25	89.56±8.24
	50	86.80±7.98
	100	90.30±8.31

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表3-表10同)

表3 人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁对THP-1细胞活力的影响
($\bar{x}\pm s, n=13$)

Table 3 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on viability of Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s, n=13$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活力/%
正常组		107.80±7.57
人参皂苷Rg ₁ 组	3.125	102.80±6.90
	6.25	138.50±10.57
	12.5	136.50±2.80
	25	153.60±14.54
	50	116.90±8.26
	100	110.30±4.15
人参皂苷Rb ₁ 组	3.125	127.10±7.58
	6.25	118.60±10.19
	12.5	111.90±15.87
	25	146.60±17.79
	50	116.70±8.08
	100	112.80±8.00

Rg₁和人参皂苷Rb₁,均可有效的降低上皮细胞对FD40S透过率($P<0.01$),表明Rg₁和Rb₁对Caco-2细胞屏障完整性具有一定的保护作用。见表4。

3.3 对LPS诱导THP-1细胞炎症的影响 为探讨人参皂苷Rg₁和Rb₁保护LPS诱导上皮屏障损伤的作用机制,在LPS诱导THP-1细胞中,分别加入不同浓度人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁。作用24 h后,采

表4 人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁对肠上皮细胞屏障通透性的影响
($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 4 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on barrier permeability of intestinal epithelial cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	透过率/cm·s ⁻¹
正常组		$6.02\times 10^{-7}\pm 3.53\times 10^{-9}$
LPS组		$1.43\times 10^{-6}\pm 7.07\times 10^{-8\ 1)}$
人参皂苷Rg ₁ 组	33	$3.79\times 10^{-7}\pm 2.47\times 10^{-8\ 2)}$
人参皂苷Rb ₁ 组	33	$4.40\times 10^{-7}\pm 4.80\times 10^{-8\ 2)}$

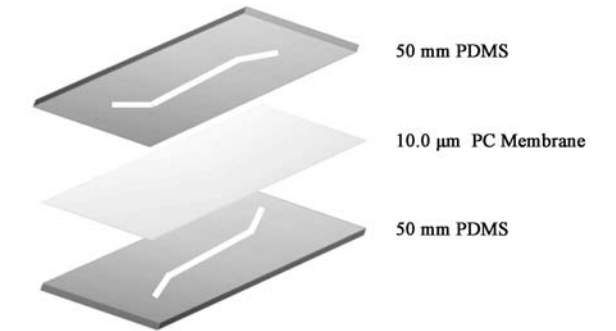


图1 微流控芯片设计

Fig. 1 Microfluidic chip design

用CCK-8检测细胞增殖抑制,结果发现LPS对THP-1细胞活性差异无统计学意义,人参皂苷Rg₁和Rb₁对LPS诱导后THP-1细胞活性无显著影响,见表5。采用Real-time PCR检测THP-1的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA表达,结果发现,与LPS组比较,人参皂苷Rg₁(11 mg·L⁻¹)可显著抑制TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA表达($P<0.05$, $P<0.01$);人参皂苷Rb₁33、100 mg·L⁻¹组对IL-1 β 和IL-6表达均具有显著抑制作用。见表6。

表5 人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁对LPS诱导THP-1细胞活性的影响
($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on LPS induced THP-1 cell activity ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活性/%
正常组		110.30±3.25
LPS组		167.40±13.80
人参皂苷Rb ₁ 低质量浓度组	11	151.00±12.86
人参皂苷Rb ₁ 中质量浓度组	33	144.30±6.96
人参皂苷Rb ₁ 高质量浓度组	100	160.60±6.90
人参皂苷Rg ₁ 低质量浓度组	11	157.90±30.69
人参皂苷Rg ₁ 中质量浓度组	33	160.50±14.45
人参皂苷Rg ₁ 高质量浓度组	100	184.70±41.72

3.4 对Caco-2细胞炎症的影响 将LPS作用THP-1细胞后的细胞上清与Caco-2细胞共培养,培养24 h

表 6 人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rg₁ 对 LPS 诱导 THP-1 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of ginsenoside Rb₁ and ginsenoside Rg₁ on TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression levels of LPS induced inflammatory factor in THP-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常组		1.00±0.03	1.75±0.08	—
LPS 组		31.73±3.33 ¹⁾	1 766.81±100.50 ¹⁾	1.00±0.07
人参皂苷 Rb ₁ 低质量浓度组	11	29.29±1.59	1 590.36±59.38	0.85±0.01
人参皂苷 Rb ₁ 中质量浓度组	33	31.64±0.19	1 267.58±40.75 ²⁾	0.57±0.05 ²⁾
人参皂苷 Rb ₁ 高质量浓度组	100	30.79±1.11	1 530.06±85.16 ²⁾	0.73±0.01 ¹⁾
人参皂苷 Rg ₁ 低质量浓度组	11	26.63±0.29 ²⁾	1 451.41±10.34 ²⁾	0.83±0.07 ¹⁾
人参皂苷 Rg ₁ 中质量浓度组	33	34.65±0.78	1 655.75±74.51	0.76±0.10
人参皂苷 Rg ₁ 高质量浓度组	100	37.87±1.77	1 687.04±3.71	1.07±0.04

后,采用 CCK-8 检测细胞毒性,结果显示 LPS 刺激对 Caco-2 细胞增殖无明显影响,见表 7。采用 Real-time PCR 检测 Caco-2 细胞中 IL-8、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达,结果显示,与正常组比较,LPS 诱导的 THP-1 细胞上清显著上调 Caco-2 细胞 IL-6、IL-8 和 TNF- α mRNA 表达($P<0.01$)。加入不同浓度人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 后,对细胞增殖无明显影响,但均可大幅降低细 Caco-2 细胞中 IL-6、IL-8 和 TNF- α mRNA 表达($P<0.01$)。结果提示,人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 可通过抑制 LPS 诱导 THP-1 后的炎性因子释放,降低 Caco-2 细胞的炎性细胞因子表达。见表 8。

3.5 对 Caco-2 细胞紧密连接蛋白表达的影响 与正常组比较,LPS 处理的 THP-1 细胞上清并不能显著诱导 Caco-2 细胞 Occludin mRNA 表达变化,不同浓度的人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 处理的 THP-1 细胞上清不改变 Caco-2 细胞 Occludin mRNA 表达,见表 9。与正常组比较,LPS 处理的 THP-1 细胞上清并显著降低 Caco-2 细胞 Occludin 蛋白表达($P<0.01$),不同

表 7 人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 对 Caco-2 细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 7 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on Caco-2 cell activity ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活性/%
正常组		100.00±15.63
LPS 组		112.60±6.18
人参皂苷 Rb ₁ 低质量浓度组	11	143.20±6.94
人参皂苷 Rb ₁ 中质量浓度组	33	142.20±4.43
人参皂苷 Rb ₁ 高质量浓度组	100	127.00±24.24
人参皂苷 Rg ₁ 低质量浓度组	11	119.10±32.23
人参皂苷 Rg ₁ 中质量浓度组	33	122.80±17.72
人参皂苷 Rg ₁ 高质量浓度组	100	105.60±27.19

浓度的人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 处理的 THP-1 细胞上清均可提高紧密连接蛋白 Occludin 的蛋白表达($P<0.01$)。见表 10 和图 2。

4 讨论

肠道上皮屏障是宿主固有免疫防御的第一道防线,对于维持肠道内环境稳态具有重要作用,对

表 8 人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 对 Caco-2 细胞炎症细胞因子 TNF- α 、IL-8 和 IL-6 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 8 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on TNF- α , IL-8 and IL-6 mRNA expression levels of inflammatory factor in Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF- α	IL-8	IL-6
正常组		1.00±0.11	1.00±0.14	1.00±0.13
LPS 组		622.30±30.25 ¹⁾	161.80±6.76 ¹⁾	1 533.00±212.60 ¹⁾
人参皂苷 Rb ₁ 组	11	777.60±28.95	55.37±6.03 ²⁾	246.60±5.47 ²⁾
	33	174.90±6.62 ²⁾	53.16±2.88 ²⁾	266.70±3.99 ²⁾
	100	497.70±22.52 ²⁾	39.58±7.13 ²⁾	160.60±35.11 ²⁾
人参皂苷 Rg ₁ 组	11	351.10±29.97 ²⁾	78.10±5.58 ²⁾	257.50±20.19 ²⁾
	33	56.35±0.98 ²⁾	53.30±2.16 ²⁾	223.70±8.82 ²⁾
	100	36.41±2.88 ²⁾	107.3±14.52 ²⁾	770.50±42.59 ²⁾

表 9 人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 对 Caco-2 细胞紧密连接蛋白 Occludin mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

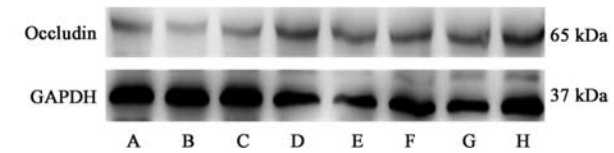
Table 9 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on Occludin mRNA expression level of tight junction protein in Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Occludin
正常组		1.00±0.11
LPS 组		1.56±0.16
人参皂苷 Rb ₁ 低质量浓度组	11	0.83±0.10
人参皂苷 Rb ₁ 中质量浓度组	33	0.73±0.02
人参皂苷 Rb ₁ 高质量浓度组	100	1.34±0.05
人参皂苷 Rg ₁ 低质量浓度组	11	0.86±0.01
人参皂苷 Rg ₁ 中质量浓度组	33	0.94±0.02
人参皂苷 Rg ₁ 高质量浓度组	100	2.04±0.08

表 10 人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 对 Caco-2 细胞紧密连接蛋白 Occludin 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ on Occludin expression level of tight junction protein in Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Occludin/GAPDH
正常组		0.23±0.03
LPS 组		0.10±0.01 ¹⁾
人参皂苷 Rb ₁ 低质量浓度组	11	0.23±0.01 ²⁾
人参皂苷 Rb ₁ 中质量浓度组	33	0.45±0.02 ²⁾
人参皂苷 Rb ₁ 高质量浓度组	100	0.56±0.03 ²⁾
人参皂苷 Rg ₁ 低质量浓度组	11	0.28±0.01 ²⁾
人参皂苷 Rg ₁ 中质量浓度组	33	0.52±0.04 ²⁾
人参皂苷 Rg ₁ 高质量浓度组	100	0.54±0.01 ²⁾



A. 正常组; B. LPS 组; C. 人参皂苷 Rb₁ 组低质量浓度组; D. 人参皂苷 Rb₁ 组中质量浓度组; E. 人参皂苷 Rb₁ 组高质量浓度组; F. 人参皂苷 Rg₁ 低质量浓度组; G. 人参皂苷 Rg₁ 中质量浓度组; H. 人参皂苷 Rg₁ 高质量浓度组

图 2 各组 Caco-2 细胞紧密连接蛋白 Occludin 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of expression of tight junction protein Occludin in Caco-2 cells

肠道上皮屏障的研究有助于揭示肠道炎症疾病发生的复杂机制和作用网络。迄今已在多种急性和慢性肠道炎症损伤动物模型如右旋糖酐硫酸钠 (DSS) 或 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导结肠炎模型中,观察到肠道上皮屏障的破坏和通透性改

变^[13-14]。近年来,多种体外细胞培养方式,如 Transwell、微流控芯片、类器官培养被应用于肠道上皮屏障功能研究^[15-17]。微流控芯片技术可将多种细胞培养于不同微通道,实现多种细胞共培养,并通过控制液体流动和剪切应力,能更好的模拟细胞体内生理环境,为肠道上皮屏障功能研究提供了一种良好的体外模型^[18-20]。采用人白血病单核细胞 THP-1 细胞和人结直肠腺癌细胞株 Caco-2 进行共培养实验。THP-1 是研究单核细胞和巨噬细胞的常用细胞模型,人结直肠腺癌细胞株 Caco-2 细胞被广泛用于研究肠道上皮细胞功能。Caco-2 细胞与 THP-1 细胞分别培养于微流控芯片的上下两层通道,细胞间无混合干扰,但可溶性细胞因子和炎性介质可通过培养溶液在两种细胞间扩散。研究结果表明,当细胞暴露于 LPS 后, Caco-2 细胞对于葡聚糖的透过率提高,表明肠道细胞通透性升高,提示细胞单层完整性可能被破坏。当加入人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 后,肠道渗透性较 LPS 组下降,表明肠道上皮屏障功能正常。实验结果提示人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ (33 mg·L⁻¹) 对 LPS 诱导肠道上皮屏障损伤具有保护作用,但其作用机制还不明确。

为进一步探究人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 保护肠道上皮屏障的作用机制,首先检测人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 对 LPS 诱导 THP-1 细胞炎症的作用。THP-1 经 PMA 诱导,从单核细胞分化为 M0 型巨噬细胞,可模拟单核细胞来源的组织巨噬细胞。巨噬细胞分泌多种促炎细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等,参与对微生物的杀伤吞噬。但在病理条件下,炎性介质的过度释放加剧组织损伤,引起肠道上皮屏障破坏,从而引起或加重组织炎症反应^[21]。实验结果表明,1 mg·L⁻¹ LPS 不影响 THP-1 细胞活性,但显著上调 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子表达,加入人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 后,可不同程度抑制 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 细胞因子表达。其中 Rg₁ 和 Rb₁ 对不同细胞因子表达的作用存在差异,低浓度人参皂苷 Rg₁ (11 mg·L⁻¹) 对 TNF- α 和 IL-1 β 有较好的抑制作用,而 Rb₁ 对 IL-6 和 IL-1 β 的抑制作用更为显著。结果提示人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 可抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞因子表达上调。

以往研究对 LPS 是否能直接诱导 Caco-2 细胞释放炎性细胞因子也存在争议^[22-24]。因此,推测在 Caco-2 细胞与 THP-1 细胞共培养模型中, LPS 诱导肠道上皮屏障损伤可能是通过调控 THP-1 细胞的炎性介质释放。为验证这一假设,将 LPS 处理 THP-1

细胞后的细胞上清与Caco-2细胞共培养。与以往研究结果一致^[25],LPS刺激THP-1细胞后,上清诱导Caco-2细胞炎性细胞因子的表达显著上调,结果提示LPS通过调控THP-1细胞的炎性介质释放,从而介导Caco-2细胞的炎症反应。

肠上皮细胞表达咬合蛋白Occludin、闭合蛋白Claudin和ZO-1等,形成紧密连接结构,是维持肠上皮细胞物理屏障的结构基础^[26-27]。紧密连接蛋白的表达下调或活性降低会影响细胞间紧密连接结构的形成,是导致肠上皮通透性改变的重要因素^[28-29]。实验结果发现,LPS刺激THP-1细胞上清与Caco-2细胞共培养后,紧密连接蛋白Occludin的基因表达没有显著改变,但蛋白表达显著降低。以上结果提示,LPS诱导肠上皮细胞屏障的功能改变是通过调控THP-1细胞的炎性细胞因子释放,从而介导Caco-2细胞的炎性细胞因子释放和紧密连接蛋白表达变化。经过人参皂苷Rg₁和Rb₁处理THP-1细胞后,取细胞上清与Caco-2细胞共培养,结果发现含Rg₁和Rb₁细胞上清组均可显著抑制Caco-2细胞中炎性细胞因子IL-6、IL-8和TNF- α 的表达,上调Occludin蛋白表达,维持屏障的完整性,因此结果证明人参皂苷Rg₁和Rb₁通过调控THP-1巨噬细胞释放可溶性炎性介质,进而调控Caco-2细胞的炎症反应和细胞屏障完整性。

综上所述,本实验利用THP-1和Caco-2细胞共培养体系,初步探讨了人参皂苷Rg₁和Rb₁对LPS诱导肠上皮屏障损伤的作用及可能机制。结果发现Rg₁和Rg₁可拮抗LPS诱导的肠上皮屏障通透性降低。其作用可能是通过抑制THP-1巨噬细胞表达炎性细胞因子,进而调控Caco-2上皮细胞的炎症细胞因子和紧密连接蛋白表达,维持肠上皮细胞屏障的完整性。人参皂苷Rg₁/Rb₁对肠上皮屏障的保护作用,将为进一步探究人参皂苷治疗肠道炎症性疾病的作用和机制提供参考。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] HERBERT T, ALEXANDER R M. Food, immunity, and the microbiome-sciencedirect [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(6): 1107-1119.
- [2] KAUR H, MOREAU R. Role of mTORC1 in intestinal epithelial repair and tumorigenesis[J]. *J Struct Biol X*: CMLS, 2019, 76(13): 2525-2546.
- [3] PETERSON C T, SHARMA V, ELMÉN L, et al. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic

modulation of the gut microbiota [J]. *J Clin Exp Immunol*, 2015, 179(3): 363-377.

- [4] 李千会,葛卓望,田丁,等. 人参皂苷Rg₁对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(6): 1460-1466.
- [5] JANG M, LEE M J, CHOI J H, et al. Ginsenoside Rb₁ attenuates acute inflammatory nociception by inhibition of neuronal ERK phosphorylation by regulation of the Nrf2 and NF- κ B pathways[J]. *J Pain*, 2016, 17(3): 282-297.
- [6] 周亚兵,蒋思韵,王利维,等. PM2.5对哮喘大鼠IL-17/IL-23炎症介质的影响及人参皂苷Rg₁干预研究[J]. *世界中医药*, 2021, 16(10): 1520-1525.
- [7] RHULE A, NAVARRO S, SMITH J R, et al. Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells [J]. *J Intercult Ethnopharmacol*, 2006, 106(1): 121-128.
- [8] WU C F, BI X L, YANG J Y, et al. Differential effects of ginsenosides on NO and TNF-alpha production by LPS-activated N9 microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(3): 313-320.
- [9] JOH E H, LEE I A, JUNG I H, et al. Ginsenoside Rb₁ and its metabolite compound K inhibit IRAK-1 activation-the key step of inflammation [J]. *Biochem Pharmacol.*, 2011, 82(3): 278-286.
- [10] ZHOU F, ZHANG P, CHEN X, et al. Ginsenoside Rb₁ protects the intestinal mucosal barrier following peritoneal air exposure [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2563-2567.
- [11] SU F, CHEN X, WANG Y L, et al. Ginsenoside Rb₁ attenuates intestinal ischemia/reperfusion-induced inflammation and oxidative stress via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 3633-3641.
- [12] 胡楚璇,刘洁,郭小东. 人参皂苷Rg₁镇痛抗炎实验研究[J]. *中药材*, 2013, 36(3): 464-467.
- [13] ZU G, GUO J, CHE N, et al. Protective effects of ginsenoside Rg₁ on intestinal ischemia/reperfusion injury-induced oxidative stress and apoptosis via activation of the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38480.
- [14] 郑萍,牛凤丽,彭延申,等. 氧化苦参碱对葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎影响的初步研究[J]. *胃肠病学*, 2001, 6(4): 209-210, 222.
- [15] 高永健,朱峰,钱家鸣. 黄芪多糖对2,4,6-三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎的作用[J]. *中华临床营养杂志*, 2010, 18(4): 6.
- [16] KIM H J, LI H, COLLINS J, et al. Contributions of

- microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip[J]. PNAS, 2015, 113(1):22193.
- [17] SCHWERDTFEGER L A, RYAN E P, TOBET S A. An organotypic slice model for *ex vivo* study of neural, immune and microbial interactions of mouse intestine [J]. AJP, 2015, 310(4):299.
- [18] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, BARKER N, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. Nature, 2009, 459:262-265.
- [19] YE N, QIN J, SHI W, et al. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device [J]. Lab Chip, 2007, 7(12):1696-1704.
- [20] GALIE P A, NGUYEN D H, CHOI C K, et al. Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(22):7968-7973.
- [21] MENG M, KLINGENSMITH N J, COOPERSMITH C M. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure [J]. Curr Opin Crit Care, 2017, 23(2):143-148.
- [22] 张涛, 苏晓兰, 毛心勇. 生物制剂在炎症性肠病治疗中的应用与展望[J]. 转化医学杂志, 2021, 10(2):112-115.
- [23] CHANPUT W, MES J, WICHES H J. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(1):37-45.
- [24] SCHLOTTMANN K, WACHS F P, GROSSMANN J, et al. Interferon gamma downregulates IL-8 production in primary human colonic epithelial cells without induction of apoptosis [J]. Int J Colorectal Dis, 2004, 19(5):421-429.
- [25] MARTIN G R, WALLACE J L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair [J]. Exp Biol Med, 2006, 231(2):130-137.
- [26] HUANG L, CUI K, MAO W, et al. *Weissella cibaria* attenuated LPS-induced dysfunction of intestinal epithelial barrier in a Caco-2 cell monolayer model [J]. Front Microbiol, 2020, 11:2039.
- [27] VAN De WALLE J, HENDRICKX A, ROMIER B, et al. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation [J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(5):1441-1449.
- [28] HU X, YU Q, HOU K, et al. Regulatory effects of *Ganoderma atrum* polysaccharides on LPS-induced inflammatory macrophages model and intestinal-like Caco-2/macrophages co-culture inflammation model [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 140:111321.
- [29] BRUEWER M, LUEGERING A, KUCHARZIK T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms [J]. J Immunol, 2003, 171(11):6164-6172.
- [责任编辑 周冰冰]