

嗜黏蛋白阿克曼菌对大鼠胰岛细胞瘤细胞增殖、 凋亡及胰岛素分泌功能的影响^{*}

刘曼妮, 张玲, 董新燕, 刘敏, 成果, 张翔凌, 何方, 王国庆[△]

四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院 卫生检验与检疫系(成都 610041)

【摘要】目的 探讨嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*, *A. muciniphila*)对大鼠胰岛细胞瘤细胞(INS-1)增殖、凋亡及胰岛素分泌功能的影响。**方法** 将INS-1细胞分为正常组、修复组和保护组,每组均用3种*A. muciniphila*干预物(活菌、灭活菌和分泌物)处理48 h,并设不干预的空白对照。正常组INS-1细胞直接干预;修复组INS-1细胞先用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)造模再加干预物;保护组INS-1细胞先用干预物作用再加STZ造模。干预结束,用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测细胞增殖;使用葡萄糖刺激,用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测胰岛素分泌水平;实时荧光定量PCR技术检测胰岛素分泌相关基因和凋亡基因表达,Western blot检测Bax凋亡蛋白的表达。**结果** *A. muciniphila*干预物对INS-1细胞作用48 h后,其细胞形态无明显变化。*A. muciniphila*活菌干预的修复组INS-1细胞增殖活性较空白对照降低($P<0.005$)。*A. muciniphila*干预物对正常组、修复组和保护组INS-1细胞的胰岛素分泌没有影响($P>0.05$)。*A. muciniphila*分泌物可促进正常组、修复组和保护组INS-1细胞葡萄糖转运蛋白2基因(glucose transporter 2, *Glut2*)和修复组葡萄糖激酶基因(glucokinase, *GCK*)的表达($P<0.05$)。3种*A. muciniphila*干预物处理后的正常组INS-1细胞Bcl₂-associated X基因(*Bax*)的表达量减少($P<0.001$),*A. muciniphila*死菌干预的修复组INS-1细胞*Bax*基因表达量减少($P<0.05$)。*A. muciniphila*干预物处理的细胞Bax蛋白表达减少。**结论** *A. muciniphila*可促进INS-1细胞胰岛素分泌相关基因的表达,抑制凋亡基因和凋亡蛋白Bax的表达,为研究如何用*A. muciniphila*改善2型糖尿病提供了新的方向。

【关键词】 嗜黏蛋白阿克曼菌 2型糖尿病 胰岛素 肠道菌群

Effects of *Akkermansia muciniphila* on the Proliferation, Apoptosis and Insulin Secretion of Rat Islet Cell Tumor Cells LIU Man-ni, ZHANG Ling, DONG Xin-yan, LIU Min, CHENG Guo, ZHANG Xiang-ling, HE Fang, WANG Guo-qing[△]. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: huaxiwgq@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) on the proliferation, apoptosis and insulin secretion of rat pancreatic islet cell tumor cells (INS-1). **Methods** INS-1 cells were divided into three groups, normal, repair, and protect groups, and subsequently every group was subjected with *A. muciniphila* metabolites, live *A. muciniphila* or pasteurized *A. muciniphila* for 48 h. A group that did not treat with anything was set as blank control. After intervention, the cell viability was determined by MTT method, the insulin secretion level stimulated by glucose was determined by ELISA, the expressions of the genes involved in insulin secretion and apoptosis were tested by qRT-PCR, and the expression of apoptosis related protein Bax was evaluated by Western blot. **Results** There was no significant change in INS-1 cell morphology after co-incubation with 3 types of *A. Muciniphila* interventions for 48 h. The proliferative activity of INS-1 cells was decreased in the repair group that treated with live *A. muciniphila* than that of control ($P<0.005$). *A. muciniphila* intervention had no effect on insulin secretion in INS-1 cells in normal, repair or protection group ($P>0.05$). *A. muciniphila* secretions promoted the expression of glucose transporter 2 (*Glut2*) in 3 groups and the expression of glucokinase (*GCK*) in repair group ($P<0.05$). The expression of *Bax* of the INS-1 cell in the normal group was decreased after intervened with 3 kinds of *A. muciniphila* intervention materials ($P<0.001$). The expression of *Bax* gene of the INS-1 cell in the repair group that treated with dead *A. muciniphila* was decreased ($P<0.05$). The expression of Bax protein of INS-1 cells that treated with *A. muciniphila* interventions was decreased. **Conclusion** *A. muciniphila* can promote the expression of insulin secretion-related genes in INS-1 cells, inhibit the expression of apoptotic genes and apoptosis protein Bax. This research provides a new direction for applying *A. muciniphila* in improving type 2 diabetes.

【Key words】 *Akkermansia muciniphila* Type 2 diabetes Insulin Intestinal flora

^{*} 成都市科技惠民项目(No. 2015-HM01-00498-SF)资助

[△] 通信作者, E-mail: huaxiwgq@163.com

2型糖尿病(T2DM)是一种以长期高血糖水平为特征的代谢性疾病,其病因通常为胰岛素抵抗引起的胰岛素

相对不足^[1-2]。T2DM可导致严重的并发症,如失明、心血管疾病甚至死亡^[3]。因此,研究如何有效控制T2DM迫在眉睫。T2DM的发展与肠道微生物密切相关^[4]。肠道细菌嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*, *A. muciniphila*)属疣微菌门,卵圆形,严格厌氧,能特异性分解黏蛋白^[5]。研究证明,*A. muciniphila*与T2DM的几项生化指标如全身脂肪含量和瘦素的循环水平呈负相关,提示*A. muciniphila*可能减少脂肪堆积^[6]。研究^[7]还发现*A. muciniphila*可以减少糖尿病大鼠的葡萄糖毒性和脂毒性,降低氧化应激和炎症的损害,并使肠道微生物群正常化。2017年,DUBOURG等^[8]从血培养样品中分离出了*A. muciniphila*。基于此,我们假设*A. muciniphila*或其分泌物可能转移到胰腺等器官,并调节胰岛β细胞的代谢。为探讨*A. muciniphila*对胰岛素分泌的影响,本研究用大鼠胰岛细胞瘤细胞(INS-1)作为正常细胞代表正常人群,用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的INS-1细胞损伤模型代表T2DM患者,采用*A. muciniphila*活菌、灭活菌和分泌物干预细胞,研究*A. muciniphila*对INS-1细胞的影响及其作用机制,进而探寻*A. muciniphila*与T2DM的关系。

1 材料和方法

1.1 主要材料

A. muciniphila(DSM 22959),由南京农业大学刘丽教授惠赠;大鼠胰岛细胞瘤细胞(INS-1细胞),购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

脑心浸液培养基购自北京陆桥公司,RPMI 1640培养基、青霉素-链霉素溶液购自Hyclone公司,四季青胎牛血清购自浙江天杭公司,β-巯基乙醇、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自Amresco公司,STZ、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Sigma公司;胰岛素检测试剂盒购自北京冬歌公司,RIPA裂解液、TRIzol总RNA提取试剂盒购自北京康为世纪公司,Goldenstart RT6 cDNA Synthesis Kit、2×T5 Fast qPCR Mix(SYBRGreenI)购自北京擎科公司;苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)蛋白酶抑制剂、抗β-actin鼠单克隆抗体、抗Bax兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔IgG抗体、HRP标记山羊抗小鼠IgG抗体、电化学发光(ECL)显色液,购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Thermo MULTISKAN GO型酶标仪购自Thermo Fisher Scientific公司,CF×96实时定量PCR仪购自Bio-Rad公司。

1.2 干预物制备

*A. muciniphila*活菌制备:*A. muciniphila*标准菌按1:10的体积比接种于脑心浸液肉汤培养基中,在37℃条

件下用亨盖特厌氧技术培养48 h,用无菌生理盐水调整浓度至 10^8 CFU/mL。*A. muciniphila*灭活菌制备:将上述活菌液进行巴氏灭活(60℃加热30 min)。*A. muciniphila*分泌物制备:*A. muciniphila*活菌涂布于脑心浸液固体培养基,厌氧培养48 h,用1 mL无菌生理盐水冲洗菌苔,离心取上清。

1.3 细胞培养

INS-1细胞复苏后培养于含有100 mL/L小牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、50 μmol/L β-巯基乙醇的RPMI 1640培养基,置于37℃、体积分数为5% CO₂饱和湿度的恒温箱。根据细胞生长情况,每1~2 d进行换液,待细胞覆盖瓶底70%~80%时,弃去培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,加入1 mL完全培养基吹落贴壁细胞,将细胞悬液按1:3传代,取第2代用于实验。

1.4 实验分组

将生长状态良好的INS-1细胞按5 000/孔的密度接种于96孔板中,培养24 h后,将INS-1细胞分为正常组、修复组和保护组,每组细胞都分别用*A. muciniphila*分泌物、活菌和死菌干预,每种干预物做6个重复孔,并设立不干预的空白对照。正常组INS-1细胞直接干预48 h;修复组INS-1细胞先用3 mmol/L STZ造模4 h,再加入干预物作用48 h;保护组INS-1细胞先用干预物作用48 h,再加3 mmol/L STZ造模4 h。干预结束后,光镜下观察正常组细胞形态。

1.5 MTT法检测细胞增殖

干预结束后,每孔加入0.5% MTT溶液20 μL(同时另设立培养基对照),37℃孵育4 h,吸弃上清,每孔加150 μL DMSO,低速充分振荡10 min,用酶联免疫检测仪检测各孔在波长570 nm处的光密度值,以反映细胞增殖水平。

1.6 葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)检测

干预结束弃培养液,PBS洗涤后加含16.7 mmol/L葡萄糖的Hanks液,37℃孵育1 h,收集上清,根据ELISA检测试剂盒说明书,测定各组细胞胰岛素分泌水平。

1.7 实时荧光定量PCR检测胰岛素分泌和细胞凋亡相关基因

干预结束后,收集细胞,按TRIzol试剂说明书提取细胞总RNA。测定样品RNA浓度与纯度后,参照RT-PCR试剂盒说明书,将RNA逆转录为cDNA。逆转录反应体系为:5×Goldenstar Buffer 4 μL, dNTP Mix 1 μL, Goldenstar Randomer 1 μL, DTT 1 μL, Goldenstar RT6 1 μL, RNA template 2 μL, RNase-free water 10 μL。逆转录反应条件为:25℃ 10 min; 50℃ 15 min; 85℃ 5 min。

参考文献^[9-11]设计引物*Glut2-f/r*、*GCK-f/r*、*Insulin-*

f/r、Bax-f/r和 β -actin-f/r,对胰岛素分泌基因*Glut2*、*GCK*、*Insulin*、细胞凋亡相关基因*Bax*和内参基因 β -actin进行RT-PCR扩增。以 β -actin为内部参照,以对照组各基因相对表达量为1,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达量。重复3次。反应程序:95℃ 1 min;95℃ 10 s,60℃ 15 s。重复40个循环,60℃采集荧光。并制作熔解曲线,以确保扩增产物的特异性。

1.8 Western blot定性检测细胞凋亡相关蛋白Bax的表达

干预结束后,用PBS冲洗细胞2~3次,吸弃残留液,加入适量体积含蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA裂解液,将细胞悬液收集到1.5 mL离心管中。冰浴30 min,反复吹打裂解细胞,离心收集上清。用BCA蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度,根据测定结果进行调整,使SDS-PAGE各孔上样量相同。加入蛋白上样缓冲液,沸水浴变性15 min。用120 g/L聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,再将蛋白转至硝酸纤维素膜,5 g/100 mL脱脂牛奶封闭1 h后,与一抗4℃孵育过夜。用TBST冲洗3次,与二抗室温下孵育30 min,用

TBST冲洗3次后加ECL溶液显色,以 β -actin为内对照进行比较。

1.9 统计学方法

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间差异性采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A. muciniphila与正常INS-1细胞共培养后的形态学观察

干预48 h,倒置显微镜下,正常组中未干预的空白对照INS-1细胞贴壁生长,呈多边形,有多个触手,胞内含少量颗粒,有融合生长趋势(图1A)。分泌物干预的INS-1细胞未见形态改变(图1B)。活菌干预的INS-1细胞形状呈现轻微圆钝(图1C),灭活菌干预的INS-1细胞有少量细胞漂浮(图1D),但总体来说,分别用分泌物、活菌和灭活菌干预的正常组INS-1细胞均未见细胞状态有明显异常改变如大量变圆漂浮、贴壁不稳、形态变化。

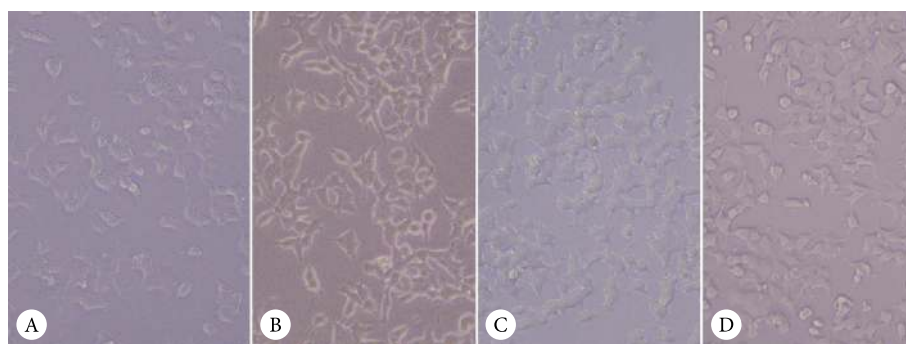


图1 光镜下正常组INS-1细胞形态。 $\times 200$

Fig 1 Morphology of INS-1 cells under light microscope. $\times 200$

A: Unintervention control INS-1 cells; B: INS-1 cells incubated with *A. muciniphila* metabolites; C: INS-1 cells incubated with live *A. muciniphila*; D: INS-1 cells incubated with pasteurized *A. muciniphila*

2.2 A. muciniphila对INS-1细胞增殖的影响

由图2可以看出,正常组和保护组中,各干预物处理的细胞增殖水平与空白对照的差异无统计学意义;修复组中,*A. muciniphila*活菌干预的细胞与空白对照增殖水平的差异有统计学意义($P<0.005$)。

2.3 A. muciniphila对INS-1葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能的影响

由图3可见,相比于正常组细胞,修复组和保护组细胞的胰岛素分泌功能受到抑制,差异无统计学意义。各组内用3种干预物处理INS-1细胞后,与相应组内空白对照相比,胰岛素分泌量差异无统计学意义。

2.4 A. muciniphila对胰岛素分泌相关基因表达的影响

由图4可见,正常组中,分泌物处理细胞的*Glut2*基因表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$),*Insulin*基因

表达增加但差异无统计学意义;修复组中,分泌物处理细

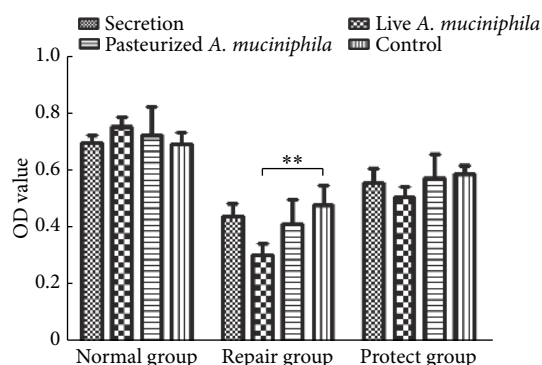


图2 MTT法检测*A. muciniphila*对INS-1细胞增殖的影响

Fig 2 The effect of *A. muciniphila* on the viability of INS-1 cells by MTT assay

** $P<0.005$

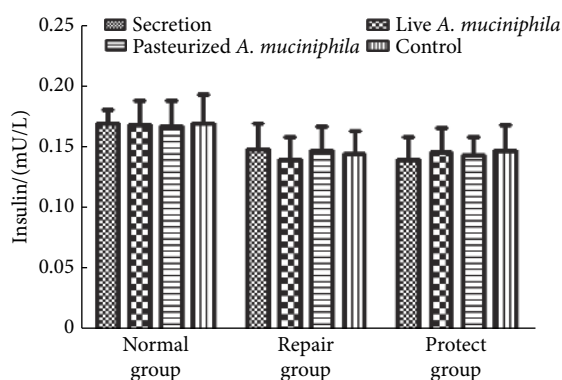


图 3 *A. muciniphila*对INS-1细胞胰岛素分泌的影响

Fig 3 The effect of *A. muciniphila* on insulin secretion of INS-1 cells

胞的GCK基因和Glut2基因表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$ 和 $P < 0.005$);保护组中,分泌物处理细胞的Glut2基因表达增加,差异有统计学意义($P < 0.005$)。正常

组、修复组和保护组中未干预的空白对照3种基因的表达差异无统计学意义。

2.5 *A. muciniphila*对Bax基因和蛋白表达的影响

由图5可见3种干预物处理的正常组细胞Bax基因表达量均较空白对照减少,差异有统计学意义($P < 0.001$)。灭活菌处理的修复组细胞Bax基因表达较空白对照减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。保护组细胞Bax基因表达较空白对照减少,但差异无统计学意义。由图6可见,正常组细胞中,3种*A. muciniphila*干预物处理的细胞Bax蛋白表达较空白对照减少;修复组细胞中,*A. muciniphila*分泌物处理的细胞Bax蛋白表达较空白对照减少,*A. muciniphila*活菌和灭活菌处理的细胞Bax蛋白表达较空白对照无明显变化;保护组细胞中,*A. muciniphila*分泌物和灭活菌处理的细胞Bax蛋白表达较空白对照减少,*A. muciniphila*活菌处理的细胞Bax蛋白表达较空白对照无明显变化。

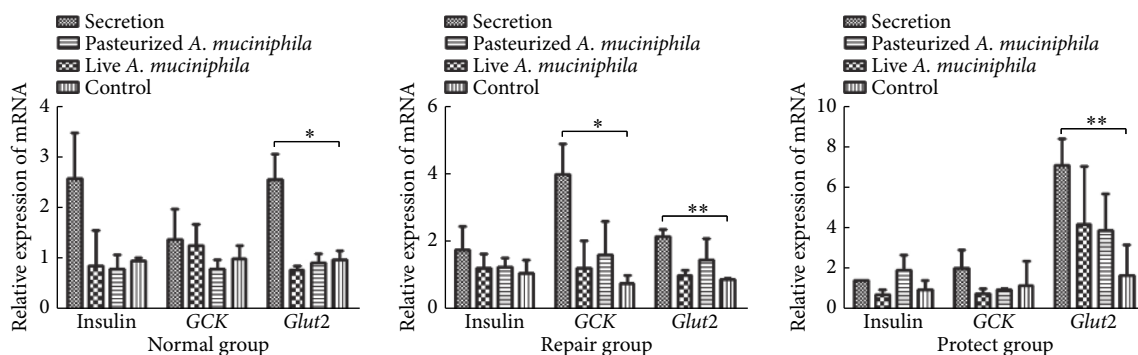


图 4 经*A. muciniphila*干预后INS-1细胞胰岛素分泌相关基因的表达

Fig 4 The expression of insulin secretion-related genes in INS-1 cells after intervention by *A. muciniphila*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$

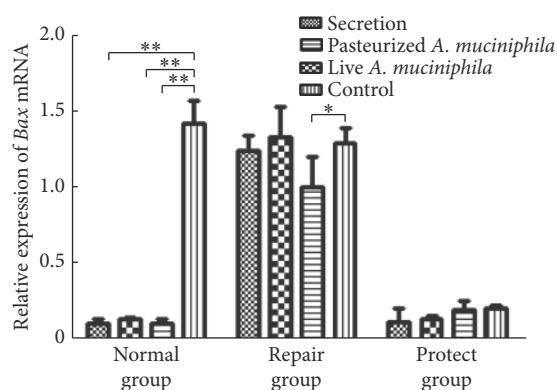


图 5 经*A. muciniphila*干预后INS-1细胞凋亡基因Bax的表达

Fig 5 The expression of apoptosis gene Bax in INS-1 cells after intervention by *A. muciniphila*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

3 讨论

REUNANEN等^[12]的研究表明,*A. muciniphila*可显著

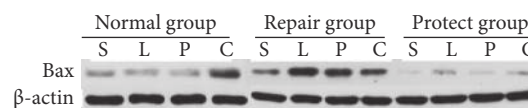


图 6 *A. muciniphila*干预后INS-1细胞Bax蛋白的表达

Fig 6 Bax protein expression in INS-1 cells after *A. muciniphila* intervention

S: Secretion; L: Live *A. muciniphila*; P: Pasteurized *A. muciniphila*; C: Control

提高肠上皮细胞Caco-2的单层细胞完整性。本实验中,*A. muciniphila*分泌物、活菌和死菌对正常INS-1细胞的形态和增殖活力未产生影响,但用STZ造模的细胞与*A. muciniphila*活菌共培养后,细胞增殖活力显著降低,可能的原因是INS-1细胞在受到STZ损伤后,细胞活力本身就有所下降,再加上活菌与之竞争营养物质和生存空间,活力进一步受到抑制。

为了研究*A. muciniphila*是否能直接影响INS-1细胞

的胰岛素分泌功能,本实验采用16.7 mmol/L葡萄糖模拟高血糖浓度的病理环境,但在此条件下,*A. muciniphila*干预对INS-1细胞的胰岛素分泌没有影响。EVERARD等^[13]的研究表明肥胖和患T2DM的大鼠体内*A. muciniphila*的丰度减少;PLOVIER等^[14]的动物实验显示,*A. muciniphila*活菌能改善高脂饮食大鼠的葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗。本实验结果提示,*A. muciniphila*改善胰岛素分泌的途径不是直接作用于INS-1细胞,可能是通过其他途径实现,但仍需要进行相关的实验验证。

*Glut2*基因编码的蛋白是调节胰岛素释放的葡萄糖传感器,其活性由葡萄糖浓度直接或间接调节,进而改变胰岛β细胞内葡萄糖的代谢,调节胰岛素的分泌。GCK在调节碳水化合物的代谢中至关重要,而碳水化合物的代谢又是胰岛素释放的信号。Bax是一种促凋亡蛋白,能结合线粒体膜并介导细胞色素C的释放^[15]。在本研究中,*A. muciniphila*分泌物可以促进INS-1细胞*Glut2*基因的表达,提示*A. muciniphila*调节胰岛素分泌的途径之一可能是分泌物中的某种成分作用于INS-1细胞,促进*Glut2*基因的表达。但在本次GSIS实验中,*A. muciniphila*分泌物并未改变INS-1细胞胰岛素的分泌量,可能是*Glut2*基因调节胰岛素分泌的作用受到了体外实验的限制,毕竟人体远比微孔板环境复杂得多。下一步可用*A. muciniphila*分泌物进行动物实验,以研究其在体内能否通过刺激*Glut2*基因的表达来调节胰岛素的分泌。本次结果还提示*A. muciniphila*分泌物也可促进由STZ导致损伤的INS-1细胞GCK基因的表达,进而作为信号,调节细胞功能和代谢以应对血糖水平的升高。

本研究发现,*A. muciniphila*可减少正常INS-1细胞Bax基因的表达,抑制凋亡。另外,对于未干预的INS-1细胞,STZ造模对GCK、*Glut2*、Insulin基因的表达影响不大,但会增加凋亡基因Bax的表达,推测STZ能促进INS-1细胞的凋亡。

本研究结果显示,*A. muciniphila*分泌物能促进3组细胞中INS-1细胞*Glut2*基因的表达以及修复组细胞中GCK基因的表达。同时,*A. muciniphila*分泌物能抑制正常组细胞中凋亡基因和蛋白的表达。可见3种*A. muciniphila*干预物中,分泌物在促进胰岛素分泌相关基因表达及抑制凋亡基因和蛋白表达方面的作用优于活菌和灭活菌,并且其修复性效果比保护性效果更好。

*A. muciniphila*具有作为益生菌的潜质,有进一步研究与开发利用的价值。但有少数研究结果不支持*A. muciniphila*对代谢性疾病与免疫性疾病的积极作用。例如在一项干预实验中,*A. muciniphila*在*Apc*基因缺失小鼠

体内的定植会促进肿瘤发展,并增加黏液和杯状细胞数量^[16]。这种差异可能是所采取的研究对象、研究方法等不同所致。这也说明,关于该细菌对人体健康的影响还远未清楚,需要开展更广泛和更深入的研究。本研究提示*A. muciniphila*对INS-1细胞没有损伤性,有一定的抗凋亡作用,并可能促进胰岛素分泌相关基因的表达来改善血糖,为研究如何用*A. muciniphila*改善T2DM提供了新的方向。

参 考 文 献

- [1] RHODES C J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science*, 2005, 307(5708): 380-384.
- [2] BUTLER A E, JANSON J, SOELLER W C, et al. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes*, 2003, 52(9): 2304-2314.
- [3] KITABCHI A E, UMOIERREZ G E, MILES J M, et al. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care*, 2009, 32(7): 1335-1343.
- [4] CANI P D, BIBILONI R, KNAUF C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-1481.
- [5] DERRIEN M, VAUGHAN E E, PLUGGE C M, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5): 1469-1476.
- [6] AXLING U, OLSSON C, XU J, et al. Green tea powder and *Lactobacillus plantarum* affect gut microbiota, lipid metabolism and inflammation in high-fat fed C57BL/6J mice. *Nutr Metab (Lond)*, 2012, 9(1): 105[2019-04-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3538623/pdf/1743-7075-9-105.pdf>. doi: 10.1186/1743-7075-9-105.
- [7] ZHANG L, QIN Q, LIU M, et al. *Akkermansia muciniphila* can reduce the damage of gluco/lipotoxicity, oxidative stress, and inflammation and normalize intestine microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathog Dis*, 2018, 76(4)[2019-04-09]. <https://academic.oup.com/femspd/article/76/4/fty028/4972761>. doi: 10.1093/femspd/fty028.
- [8] DUBOURG G, CORNU F, EDOUARD S, et al. First isolation of *Akkermansia muciniphila* in a blood culture sample. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(9): 682-683.
- [9] 邓浩, 丁振宇, 王椿. VEGF对大鼠胰岛瘤细胞增殖、凋亡及胰岛素分泌功能的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(1): 33-38.
- [10] 张学军, 尹长江, 杨坤宝, 等. 枸杞多糖通过抑制H2O2诱导的INS-1细胞凋亡促进胰岛素分泌. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(9): 1215-1217.
- [11] 王丽, 陈卡, 刘凯, 等. S-雌马酚改善高糖培养条件下INS-1细胞胰岛素分泌功能的研究. *第三军医大学学报*, 2015, 37(5): 386-391.
- [12] REUNANEN J, KAINULAINEN V, HUUSKONEN L, et al. *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(11): 3655-3662.
- [13] EVERARD A, BELZER C, GEURTS L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [14] PLOVIER H, EVERARD A, DRUART C, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*, 2016, 23(1): 107-116.
- [15] DLUGOSZ P J, BILLEN L P, ANNIS M G, et al. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J*, 2006, 25(11): 2287-2296.
- [16] DINGEMANSE C, BELZER C, VAN HIJUM S A F T, et al. *Akkermansia muciniphila* and *Helicobacter typhlonius* modulate intestinal tumor development in mice. *Carcinogenesis*, 2015, 36(11): 1388-1396.

(2019-04-10收稿, 2019-09-16修回)

编辑 吕 熙