

尤斯灌流系统在动物胃肠道屏障及营养物质转运中的应用

孙志洪^{1,2} 贺志雄^{1,2} 张庆丽^{1,3} 谭支良^{1*}

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要: 本文简要介绍了尤斯灌流(Ussing chamber)系统在动物胃肠道屏障及营养物质转运中的应用, 同时提出了在使用 Ussing chamber 过程中发现的一些问题。建议在应用 Ussing chamber 系统过程中应使离体研究环境尽量符合胃肠道生理特征, 使研究结果更为准确并且更具生理意义, 同时通过研究方法的改进使研究材料成本降低。

关键词: 尤斯灌流; 胃肠道屏障; 物质转运

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2010)03-0511-08

20 世纪 40 年代末期至 50 年代初期, 丹麦学者 Hans Ussing 开始利用尤斯灌流(Ussing chamber)方法研究上皮组织的离子转运^[1-2]。目前, 其应用主要集中在药学领域, 通过微电极检测细胞膜离子通道的电流变化, 对肠道药物吸收、通透性和分泌情况进行研究。随着 Ussing chamber 在工艺设计方面的不断完善, 其应用也愈来愈广泛, 并且逐渐在畜禽营养与生理学研究领域得到应用。本文介绍了 Ussing chamber 的基本构造和应用原理, 并在此基础上主要论述了 Ussing chamber 系统在胃肠道屏障功能以及营养物质吸收和转运领域的应用进展, 同时提出了研究过程中存在的问题以及可能的解决方案。

1 Ussing chamber 系统的基本构造

Ussing chamber 系统主要由灌流室、电路系统、数据采集系统以及配套系统组成。常见的灌流室有 2、4、6 和 8 室 4 种类型。根据工艺不同, 又分为循环式和持续式灌流室。循环式灌流室包括 1 个 U 形管道和 2 个半室, 2 个半室中间是 1 个可嵌合组织样本且可移动的插件。持续式灌流室包括 2 个溶液贮器, 通过聚乙烯管道将溶液引入 2 个半室, 并设阀门控制流速。

电路系统包括用于测量跨上皮电压和电流电

极、与电压/电流钳相连的导线以及电压/电流钳。电压/电流钳由灵敏的首级信号采集片、电流和流体阻抗补偿范围、用于电导/电阻测量的脉冲发生器、可通过计算机进行仪器控制和数据采集的远程接口以及 LED 读数显示器组成。

数据采集系统是一套综合的数据采集与分析软件包, 由数据采集硬件、接口电缆及 ACQUIRE 和 ANALYZE(A&A II)软件包组成。A&A II 在 Windows 环境下运行, 可测量电流、电压、电导及阻抗, 可同时对 1~8 个组织进行测量。还包括缩放控制、试验协议、事件标记、数据析取工具及快速数据汇总工具等其他功能。不同于通常的数据采集软件, A&A II 专门为上皮组织研究而设计。例如, 若要测量药剂在 8 个组织中逐步加入对短路电流(I_{sc})的剂量/响应曲线。为此, 可在计算机上监测 I_{sc} 直到基础读数稳定。在文件中设置一个事件标记, 并对 8 个组织进行第 1 次试剂加入, 当电流达到 1 个新的稳定值(或达到 1 个规定时间)时, 再设置另一个事件标记并做第 2 次的试剂加入。

配套系统包括恒温水浴箱、5% CO_2 + 95% O_2 混合气体循环系统和注射器等。恒温水浴箱的技术参数: 功耗为 1 kW, 水泵流速为 6 L/min, 恒温波动小于 0.5 $^{\circ}C$ 。

收稿日期: 2009-11-28

基金项目: 国家自然科学基金(30600436); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-N-051)

作者简介: 孙志洪(1977-), 男, 四川成都人, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事反刍动物营养与生理研究。E-mail: sunzh2002cn@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 谭支良, 研究员, 博士生导师, E-mail: zltan@isa.ac.cn

2 Ussing chamber 系统的应用原理

2.1 上皮细胞电生理基础

上皮组织由密集排列的上皮细胞和少量细胞间质组成,具有极性和紧密连接,这也是区别于其他组织的两大特征。极性是因为细胞游离面(或顶面)和基底面结构和功能的分布不均造成的;而紧密连接又称闭锁小带,常见于单层柱状上皮和单层立方上皮中,位于相邻细胞间隙的顶端侧面,紧密连接除具机械连接作用外,更重要的是封闭细胞间隙,阻止细胞外的大分子物质经细胞间隙进入组织内。紧密连接的形状和渗透性决定上皮组织的完整性以及对物质的阻抗力(R_t)。上皮组织 R_t 可用以下公式描述: $R_t = r \times L / A$, r 为组织电阻系数, L 为组织长度或厚度,而 A 为组织面积。就一具体组织而言, R_t 可分解为并列电阻器(图 1)。单层上皮细胞总阻抗用基尔霍夫定律可表示为: $R_t = (R_a + R_b) \times R_{shunt} / (R_a + R_b + R_{shunt})$, R_a 为细胞顶膜阻抗, R_b 为基底膜阻抗, R_{shunt} 为并联的分流电阻。根据欧姆定律, R_t 可用如下公式计算, $R_t = \Delta V / \Delta I$ 。向上皮组织施加一个电压,通过电流的变化计算出 R_t ,这就是所谓的电压钳,施加电流则为电流钳。绝大部分 Ussing chamber 系统一般都能进行钳电压和钳电流操作。

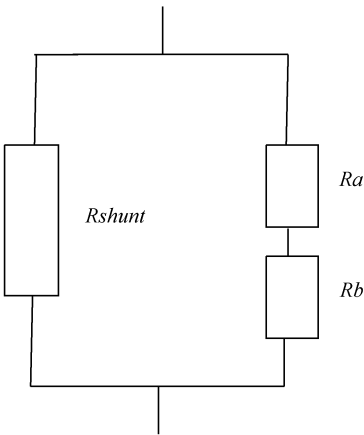


图 1 单层上皮细胞等效电路

Fig.1 Lumped model of the equivalent circuit of a tissue consisting of a single monolayer of cells

上皮细胞膜上的蛋白质逆着离子浓度梯度将离子从膜的一侧转运向另一侧,转运过程中产生跨膜

电势,被称为 V_t 。产生 V_t 的前提是上皮细胞膜顶侧和基底侧离子的分布是非均匀的。细胞膜顶侧电势(V_a)和基底侧电势(V_b)之差即为 V_t 。通过对上皮细胞钳一电流可完成 V_t 的测定,这就是通常所说的断路记录,在研究上皮物质的吸收以及分泌机制方面极为有用。对于吸收组织, V_a 主要由 Na^+ 通道活性决定;而对于分泌组织, V_b 则主要受 Cl^- 导电性能决定,而 Cl^- 导电性能通常是囊性纤维化跨膜调节导体(CFTR)。

I_{sc} 被定义为单位时间通过上皮细胞的电荷流量(如 V_t 被钳为 0 mV 时)。测定 I_{sc} 时,需测定 V_t 在 0 mV 时的电流,以校正 I_{sc} 。然后对上皮细胞钳以不为 0 mV 的 V_t ,根据 V_t 和 I_{sc} 计算出 R_t : $I_{sc} = V_t / R_t$ 。从上面公式可以看出, I_{sc} 可以在断路情况下求得,因为 V_t 和 R_t 在断路情况下为已知^[3]。

上皮细胞顶膜和基底膜结合形式多样,因此在上皮细胞顶膜不易区分出来自于细胞基底膜离子通道和转运载体的 CFTR 功能。采用离子替代品和药物(如制真菌素(Nystatin))以抑制其他转运蛋白的活性可克服这一困难^[4]。Nystatin 属于多烯抗生素,能形成人为亲水通道^[5]。该通道只允许单价阳离子、水以及非电解质的小分子物质渗透。Nystatin 亲水通道也允许阴离子如 Cl^- 渗透,但是通过的阳离子和阴离子之比为 9 : 1^[5]。需要说明的是三磷酸腺苷(ATP)等大分子物质以及二价阳离子不能通过 Nystatin 亲水通道。当研究 ATP 在上皮细胞中的浓度时,需使用金黄色酿脓葡萄球菌 α -毒素以产生较大的亲水通道,使得 ATP 能通过细胞膜。这项技术已经用于研究肠道上皮细胞顶膜的内源 Cl^- 通道^[6],有关详细说明可参考 Li 等^[7]的报道。

2.2 Ussing chamber 系统基础电路

Ussing chamber 系统的基本功能是进行上皮细胞膜离子泵功能和抗渗阻抗测定,Ussing chamber 系统的电路等效图如图 2 所示。从以上叙述中可知上皮细胞膜离子泵在转运离子过程中产生 I_{sc} ,而上皮抗渗阻抗功能使得上皮细胞成为电阻器— R_t 。离子泵将离子从上皮细胞一侧转运向另一侧,并且产生离子电流。上皮细胞本身属于超薄绝缘体,膜两侧由绝缘性能良好的材料构成,形成电容器(C_r)。上皮细胞同时具备电流发生器、 R_t 和 C_r 3 大特征。整个上皮组织的抗渗阻抗被定义为组织电阻。上皮组织被放置在于缓冲液中,同时形成 4 个电阻器,分别定义为 $R_1 \sim R_4$ 。电流电极末端的

琼脂盐起电流桥梁作用,并形成 R_5 和 R_6 ,而整个 电流电极形成的电阻被定义为电流电极电阻。

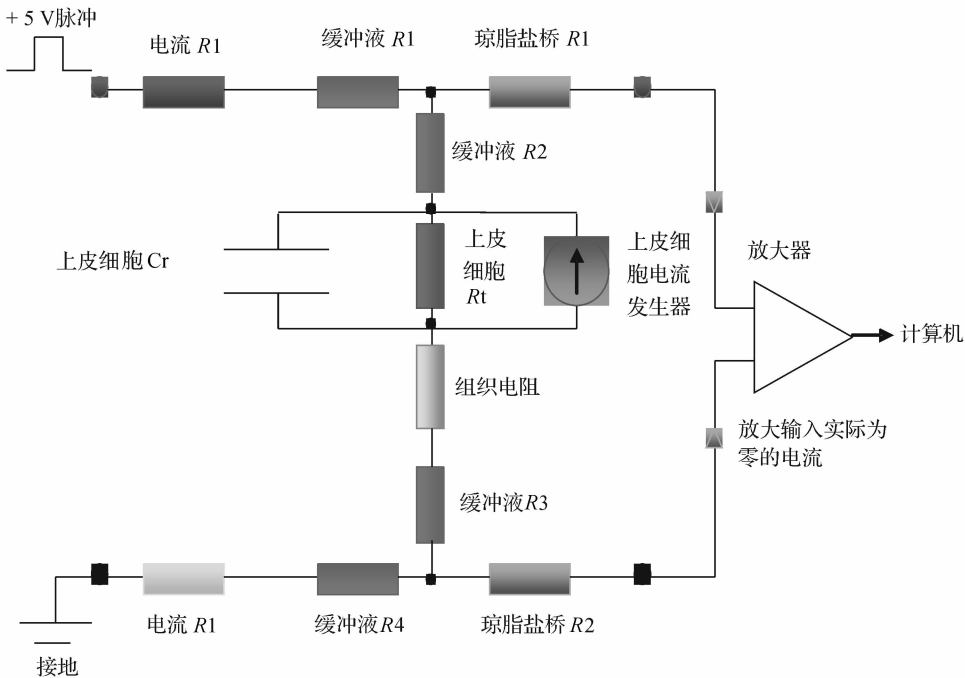


图 2 Ussing chamber 等效电路图

Fig.2 The electrical equivalent to a Ussing chamber pulse setup

2.3 Ussing chamber 系统的操作

使用 Ussing chamber 之前首先进行缓冲液、试验用溶液的配制,同时制好电流电极和电压电极,电极制备过程中注意 2 点:一是电极制备应在 3% 琼脂糖溶液冷却之前;二是电极中避免气泡的存在,若有气泡应用注射器回吸。在固定上皮组织和加入缓冲液之前,将 Ussing chamber 系统各个部件安装好,检测系统是否渗水。接着插入电极,电极电阻会随着时间的变化而变化,进而导致电极电阻的不对称性。因此,试验开始前应检测系统噪声以及补偿电压。目前,多数 Ussing chamber 系统都能补偿溶液阻抗以及电极电压。然后固定好上皮组织以及加入缓冲液,开始电参数记录。上皮组织由于受机械压迫导致电参数 (V_t 、 I_{sc} 和 R_t) 极不稳定,需要 10~30 min 的时间让电参数基线稳定下来。一旦电参数基线稳定下来即可开始目的试验,具体操作程序可参考 Hug^[8]。

3 Ussing chamber 在动物营养与生理中的应用

3.1 胃肠道屏障功能

胃肠道屏障功能是指胃肠道上皮具有防止致病

性抗原侵入的功能。正常情况下,胃肠道可有效阻止 500 多种寄生菌及其毒素向腔外组织和器官移位,防止机体受内源性微生物及其毒素的侵害。胃肠道屏障功能的维持有赖于上皮屏障、胃肠道免疫系统、胃肠道内正常菌群以及胃肠道内分泌和蠕动,其中上皮屏障和黏膜免疫屏障尤为关键。非生理状态包括缺血缺氧^[9]、炎症反应^[10]、营养障碍^[11]以及微生态环境的改变^[4]等将引起胃肠道屏障功能的降低。

胃肠屏障功能通常可从离子分泌、渗透性和黏液分泌等 3 个方面进行评价。可进行活体研究,也可将胃肠段取出,放在 Ussing chamber 中进行离体研究。利用 Ussing chamber 研究胃肠道屏障功能主要集中在胃肠道上皮通透性、内毒素及细菌移位的途径和机制以及谷氨酰胺 (Gln) 和益生菌对肠道屏障功能的改善等方面。

3.1.1 胃肠道上皮通透性

利用 Ussing chamber 系统,通过检测同位素标记或荧光素标记的大分子物质通过胃肠道上皮的比例已成为研究胃肠道通透性的主要途径。Jutfelt 等^[12]利用 Ussing chamber 研究大西洋鲑鱼肠道上

皮对 ^{14}C -甘露醇的通透性,试验中甘露醇表观渗透性根据如下公式计算: $P = dQ/Dt \times 1/(A \times C_0)$, dQ/Dt 为浆膜侧放射性同位素放射活性的稳定出现速率, A 为上皮组织暴露在缓冲液中的面积, C_0 为 ^{14}C -甘露醇在黏膜侧的浓度。Sun 等^[5]利用 Ussing chamber 研究全肠外营养(TPN)对大鼠小肠通透性的影响, ^3H -甘露醇加入到黏膜侧,每隔 15 min 从浆膜侧抽出 1 mL 缓冲液用于分析 ^3H -甘露醇,之后加入 1 mL 新的缓冲液,试验持续 90 min,其试验结果表明 TPN 将提高大鼠小肠对 ^3H -甘露醇的通透率。TPN 增加胃肠道对大分子物质的通透性与胃肠道免疫类物质的下降密切相关。Ferrier 等^[13]利用 Ussing chamber 研究乙醇对大鼠结肠通透性的影响,硫氰酸盐荧光素(FITC)-右旋糖苷加入到黏膜侧,FITC-右旋糖苷通过肠道上皮的流通量表示为 $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$,其研究发现 17 mmol/L 的乙醇将提高大鼠结肠对 FITC-右旋糖苷通透性,其原因在于结肠中微生物将乙醇氧化成乙醛并激活肥大细胞从而改变其通透性。需要强调的 Ferrier 等^[13]是在整个试验过程中**对上皮电阻进行监测,以观测上皮组织活性的变化,这也是此类试验必需考虑的问题。**

3.1.2 细菌及内毒素在胃肠道上皮中的移位

胃肠道细菌及内毒素移位是引起消化道外组织器官产生炎症(如菌血症)和自然性细菌腹膜炎的重要原因^[9]。正因如此,研究细菌及其产生的内毒素在胃肠道上皮的移位和机制对于防治机体消化道外组织产生炎症具有重要意义。随着应用领域的不断拓展,Ussing chamber 已逐渐成为研究胃肠道细菌及其产生的内毒素移位和机制的重要工具。研究过程中通常对细菌或内毒素进行 FITC 标记。

Jutfelt 等^[12]利用 Ussing chamber 研究了杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)在大西洋鲑鱼肠道上皮中的移位,*A. salmonicida* 用 FITC 标记,试验结束时抽取浆膜侧缓冲液进行离心,用酶标仪(Victor 1420 Multilabel counter)在 480/535 nm 下测定细菌荧光。Benoit 等^[14]利用 Ussing chamber 测定 FITC 标记的大肠杆菌(*E. coli*)C-25 和脂多糖(LPS)的在大鼠回肠上皮中的移位。其研究结果显示,重度出血休克组大鼠 FITC 标记的大肠杆菌 C-25 在回肠上皮中的移位显著高于假休克组大鼠,但并未检测到 FITC-LPS 的在回肠上皮中的移位,这也表明**纯化的 LPS 在体外不能通过肠道黏**

膜,体内肠道上皮中的 LPS 可能是已经移位的细菌所释放。Isenmann 等^[15]研究表明聚合物的存在促进粪肠球菌进入结肠黏膜,透过结肠壁入侵腹腔组织。值得一提的是,Isenmann 等^[15]在研究过程中并未使用同位素或 FITC 标记细菌,但同样取得了理想结果,这为今后开展类似研究提供了一条新途径。利用 Ussing chamber 研究胃肠道细菌及其内毒素移位过程中应注意胃肠道中寄生菌以及外界微生物对试验结果的干扰,这就要求对所采集到的胃肠道上皮做无菌处理。单独用 2 倍或 5 倍青链霉素双抗缓冲液冲洗上皮组织达不到理想效果,还应用 2 倍的庆大和两性霉素缓冲液冲洗,因为胃肠道寄生菌除革兰氏阴性菌和阳性菌外,还包括霉菌、酵母菌和真菌等微生物。

3.1.3 胃肠道上皮屏障功能的调控

目前,研究已证实某些营养成分或益生菌对维持和改善胃肠道的屏障功能具有重要作用^[13]。Gln 是肠道黏膜细胞代谢必需的营养物质,对维持肠道黏膜上皮结构的完整性起着十分重要的作用^[13],而且是肠道上皮细胞和免疫细胞的主要呼吸基质^[16-17]。此外,Gln 具有保持和改善胃肠道屏障功能的独特作用^[18-20]。近年来,有学者利用 Ussing chamber 进行了此方面的研究工作,研究方法和检测指标同胃肠道上皮通透率以及细菌和内毒素移位基本一致,但也考虑了一些新的元素。Kozar 等^[21]比较了 Gln 和葡萄糖(在肠道代谢)与丙氨酸(不在肠道代谢)对大鼠肠道上皮通透性的影响差异,其主要目标集中在肠道黏膜组织中 ATP 水平的变化上,因为 ATP 水平同细胞骨架的 F-肌动蛋白(F-actin)和 G-肌动蛋白(G-actin)两者间的动态平衡密切相关,F-actin 比例升高,细胞骨架得以保护,上皮细胞紧密性得以维持。Lutgendorff 等^[22]利用 Ussing chamber 研究了抗生素在防止患急性胰腺炎的大鼠肠道屏障功能不良方面的作用,试验过程中同时进行了 ^{51}Cr -乙二胺四乙酸(^{51}Cr -EDTA)的通透率以及 FITC-*E. coli* K12 的移位研究,其研究结果表明抗生素通过诱导回肠黏膜谷胱甘肽的生物合成以维持大鼠肠道屏障功能。Schroeder 等^[23]利用 Ussing chamber 研究了饲喂益生菌(*Saccharomyces boulardii*,是一种非致病性酵母菌)对猪空肠屏障功能的影响,研究结果显示饲喂益生菌 8 d 后,空肠上皮 *Isc* 下降达 26%,但在使用 16 d 后,*Isc* 重新恢复到正常值。其研究结果表明

Saccharom yces boulardii 对猪空肠黏膜上皮细胞的分泌性作用是和时间密切相关。总体而言, 益生菌可减少肠上皮细胞的分泌作用, 即便使用了促分泌剂, 仍可减少分泌, 这对腹泻等消化性疾病的防治会起到积极作用。

3.2 Ussing chamber 在胃肠道黏膜物质转运的研究

经食道而来的物质在胃和小肠内被降解, 葡萄糖、小肽、游离脂肪酸和氨基酸等物质通过胃肠道上皮细胞基顶膜转运载体进入胃肠壁内, 再通过基底膜转运载体转出, 进入血液循环供肠道和其他组织利用(图 3)。提高畜禽胃肠道上皮细胞的分泌作用对营养物质的吸收转运效率对于减少饲养成本、促进动物生长具有重要意义。

Ussing chamber 为研究胃肠道物质转运效率提供了快捷且有效的途径, 研究主要集中在葡萄糖、氨基酸以及矿物元素等物质的转运方面。Millar 等^[24]利用 Ussing chamber 研究了表皮生长因子(EGF)对空肠葡萄糖转运的影响, 其结果表明 EGF 促进了 3-O-甲基葡萄糖的转运。出于不同目的, Gäbel 等^[25]、Ducroc 等^[26]、Albin 等^[27] 以及 Awad 等^[28] 分别利用 Ussing chamber 对葡萄糖转运进行了研究。Matthews 等^[29] 利用 Ussing chamber 研究了小肽和氨基酸在绵羊瘤胃和皱胃上皮的转运, 其研究结果表明反刍动物皱胃上皮细胞对小肽和游离氨基酸的转运能力显著高于瘤胃上皮细胞。Maresca 等^[30] 和 Albin 等^[27] 先后用 Ussing chamber 研究了胃肠道上皮对氨基酸的转运。

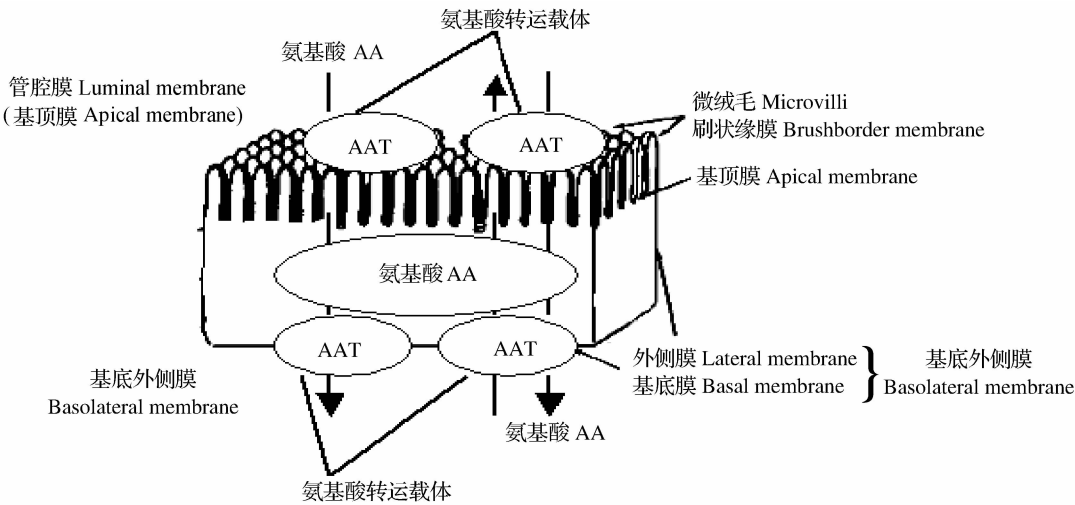


图 3 氨基酸在肠道的转运过程
Fig.3 The process of amino acids transport in intestinal tract

利用 Ussing chamber 在研究胃肠道物质转运的过程中, 发现已转运到浆膜侧的物质会回流到黏膜侧, 这无疑降低了对体内物质转运评估的准确性。Aschenbach 等^[31] 以及 Gäbel 等^[25] 将所转运的物质分别加到黏膜侧和浆膜侧, 计算出从黏膜侧到浆膜侧以及从浆膜侧到黏膜侧的物质流量, 然后对试验结果进行校正, 该方法极大程度上提高了 Ussing chamber 研究物质转运试验结果的准确度。

反刍动物瘤胃上皮是挥发性脂肪酸和葡萄糖吸收的重要场所, 同时也能吸收小肽和氨。一部分营养物质在转运过程进行代谢, 代谢产物进入血液循环系统。瘤胃上皮易剥离, 组织完整性得到保证。

因此, 瘤胃上皮较其他组织更适合进行物质吸收、转运以及代谢研究, 今后应利用 Ussing chamber 系统加强此方面的研究工作, 为阐明瘤胃上皮对营养物质的吸收与转运机制提供更为详实的科学依据。

3.3 Ussing chamber 系统在其他研究领域的应用

Ussing chamber 系统的研究对象为上皮组织, 而上皮组织广泛分布在身体表面和体内各种囊、管、腔的内表面。上皮组织具有保护、分泌、吸收和排泄等功能, 不同部位的不同上皮, 其功能各有差异。如分布在身体表面的上皮以保护功能为主; 体内各管腔面的上皮, 除具有保护功能外, 尚有分泌和吸收等功能; 某些上皮组织, 从表面生长到深部结缔组织中

去,分化成为具有分泌功能的腺上皮。因此,Ussing chamber 的研究对象可扩展到机体任一上皮组织。就某一具体上皮组织而言,可研究的内容也多样化,从药物筛选到屏障功能、免疫功能、物质吸收与代谢以及分泌和排泄等。

4 存在的问题及解决方案

胃肠道上皮离体后组织形态学和生理活性都会在一定时间之后迅速改变或下降。Söderholm 等^[32]研究表明,肠道上皮离体 90~120 min 后,大部分标本都出现了组织形态学的改变,生理活性无明显异常;离体 240 min 后,ATP 降低至正常值的 30%,上皮通透性明显提高。因此,上皮组织的离体试验必须在一定时间内迅速完成。此类试验中通常会采集 3 头以上动物的胃或肠道上皮,样品采样、样品从动物房到实验室的运输以及仪器调试通常需要近 1 h。解决样品组织形态学变化以及生理活性下降与时间的矛盾是提高试验准确性的关键,能否在转运溶液中通过添加组织活性保鲜剂以保持或减缓胃肠道上皮组织形态学和生理活性的下降是今后应用 Ussing chamber 值得探讨的重要问题。

利用 Ussing chamber 研究物质转运过程中存在转运溶液渗漏情况,溶液是从安插组织样品固定夹片的位置渗漏,这严重影响试验结果的准确性。组织样品固定夹片与尤斯室都是固体,因此密封性不好。如果在两者的接触位置,在任意一方能加上密封性能更好的配件,将改善尤斯室溶液渗漏现象。Kottra 等^[33]专门进行过 Ussing chamber 边缘渗漏的定量与校正研究,其得出的校正公式具有较好的参考意义。

查阅过去的研究文献发现,利用 Ussing chamber 研究胃肠道营养物质转运时,研究对象往往是单一的,要么是葡萄糖,要么是氨基酸或者是矿物元素。而动物机体内胃肠道营养物质的转运通常存在协同和拮抗等复杂关系,这使得以单一研究对象获得的试验结果缺乏一定生理意义。因此,转运溶液应更符合胃肠道内的生理环境,包括 pH、渗透压、离子平衡常数以及营养成分等。

在物质转运研究中,Ussing chamber 研究体系通常采用放射性同位素标记的营养物质进行转运研究。放射性同位素价格高,限制了研究对象的种类和数量。Albin 等^[27]曾使用非同位素物质进行营养物质转运研究,这为 Ussing chamber 研究胃肠道物

质转运提供了一个新的途径。但是,胃肠道能代谢多种营养素,同时**上皮组织会释放一定营养素到尤斯室**,浆膜侧溶液中能检测到未添加的转运物质,这就影响了研究结果的准确性。本文作者尝试通过检测尤斯室中未添加的营养物质,同时根据上皮组织营养物质组成来校正转运物质的数量,这对提高试验结果的准确性具有一定作用。

5 小 结

Ussing chamber 具有快捷、简便等特点,开展畜禽胃肠道屏障功能和营养物质转运研究,将有助于深刻分析和理解胃肠道屏障功能以及营养物质转运过程与机制。建议在应用 Ussing chamber 过程中应进一步优化胃肠道离体生理环境,改进研究方法,降低研究材料成本,使试验研究结果更为准确且更符合生理特征。

参考文献:

- [1] Ussing H H, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short-circuited isolated frog skin[J]. Acta Physiologica Scandinavica, 1951, 23: 110-127.
- [2] Ussing H H. The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies[J]. Acta Physiologica Scandinavica, 1949, 19: 43-56.
- [3] Mall M, Bleich M, Greger R, et al. Theamiloride-inhibitable Na^+ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways[J]. Journal of Clinical Investigation, 1998, 102: 15-21.
- [4] McNamara B P, Koutsouris A, O'Connell C B, et al. Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function[J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(5): 621-629.
- [5] Sun X Y, Yang H, Nose K, et al. Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2008, 94: G139-G147.
- [6] Cirera I, Bauer T M, Navasa M, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis[J]. Journal of Hepatology, 2001, 34(1): 32-37.

- [7] Li H, Sheppard D N. Measurements of apical CFTR Cl⁻ currents in polarised epithelia[EB/OL]. [2003-09-30]. <http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr/vr/physiology.html>.
- [8] Hug M J. Transepithelial measurements using the Ussing chamber[EB/OL]. [2002-03-12]. <http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr/vr/physiology.html>.
- [9] Secchi A, Ortanderl J M, Schmidt W, et al. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats[J]. *Journal of Surgery Research*, 2000, 89(1): 26-30.
- [10] Mitsuoka H S, Schonbein G W. Mechanisms for blockade of *in vivo* activator production in the ischemic intestine and multiorgan failure[J]. *Shock*, 2000, 14(5): 522-527.
- [11] Yang H, Finaly R, Teitelbaum D H. Alteration in epithelial permeability and ion transport in a mouse model of total parenteral nutrition[J]. *Critical Care Medicine*, 2003, 31(4): 1 118-1 125.
- [12] Jutfelt F, Olsen R E, Björnsson B T, et al. Parr-smolt transformation and dietary vegetable lipids affect intestinal nutrient uptake, barrier function and plasma cortisol levels in Atlantic salmon[J]. *Aquaculture*, 2007, 273: 298-311.
- [13] Ferrier L, Bérard F, Debrauwer L, et al. Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents [J]. *American Journal of Pathology*, 2006, 168: 1 148-1 154.
- [14] Benoit R, Rowe S, Watkins S C, et al. Pure endotoxin does not pass across the intestinal epithelium *in vitro*[J]. *Shock*, 1998, 10(1): 43-48.
- [15] Isenmann R, Schwarz M, Rozdzinski E, et al. Aggregation substance promotes colonic mucosal invasion of enterococcus faecalis in an ex vivo model[J]. *Journal of Surgical Research*, 2000, 89: 132-138.
- [16] Ulshen M H, Rollo J L. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man; another mechanism[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1980, 302: 99-101.
- [17] Rothbaum R, McAdams A J, Giannella R, et al. A clinicopathological study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*; a cause of protracted diarrhea in infants[J]. *Gastroenterology*, 1982, 83: 441-454.
- [18] Houdijk A P J, Rijnsburger E R, Jansen J, et al. Randomized trial of glutamine enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma[J]. *Lancet*, 1998, 352(9 130): 772-776.
- [19] Novak F, Heyland D K, Avenell A, et al. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence[J]. *Critical Care Medicine*, 2002, 30(9): 2 002-2 029.
- [20] Garrel D, Patenaude J, Nedelec B, et al. Decreased mortality and infectious morbidity in adult burn patients given enteral glutamine supplements: a prospective, controlled, randomized clinical trial[J]. *Critical Care Medicine*, 2003, 31(10): 2 444-2 449.
- [21] Kozar R A, Schultz S G, Bick R J, et al. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Shock*, 2004, 21(5): 433-437.
- [22] Lutgendorff F, Nijmeijer R M, Sandström P A, et al. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(2): 1-13.
- [23] Schroeder B, Winckler C, Failing K, et al. Studies on the time course of the effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on electrolyte transport in pig jejunum[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2004, 49(7/8): 1 311-1 317.
- [24] Millar G A, Hardin J A, Johnson L R, et al. The role of PI 3-kinase in EGF-stimulated jejuna glucose transport[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2002, 80: 77-84.
- [25] Gäbel G, Aschenbach J R. Influence of food deprivation on the transport of 3-O-methyl- α -D-glucose across the isolated ruminal epithelium of sheep[J]. *Journal of Animal Science*, 2002, 80: 2 740-2 746.
- [26] Ducroc R, Voisin T, Firar A E, et al. Control intestinal glucose transport by distinct neuronal, endocrine, and direct epithelial pathways[J]. *Diabetes*, 2007, 56: 2 494-2 500.
- [27] Albin D M, Wubben J E, Rowlett J M, et al. Changes in small intestinal nutrient transport and barrier function after lipopolysaccharide exposure in two pig breeds[J]. *Journal of Animal Science*, 2007, 85: 2 517-2 523.
- [28] Awad W A, Razzazi-Fazeli E, Böhm J, et al. Effects of *B-trichothecenes* on luminal glucose transport across the isolated jejunal epithelium of broiler chickens[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2008, 92(3): 225-230.
- [29] Matthews J C, Webb K E. Absorption of *L*-carnosine,

L-methionine, and *L*-methionylglycine by isolated sheep ruminal and omasal epithelial tissue[J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73: 3 464-3 475.

[30] Maresca M, Mahfoud R, Garmy N, et al. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Nutrition*, 2002, 132: 2 723-2 731.

[31] Aschenbach J R, Gäbel G. Effect and absorption of histamine in sheep rumen; significance of acidotic epithelial damage[J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78: 464-470.

[32] Söderholm J D, Hedman L, Artursson P, et al. Integrity and metabolism of human ileal mucosa *in vitro* in the Ussing chamber[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1998, 162(1): 47-56.

[33] Kottra G, Weber G, Frömter E. A method to quantify and correct for edge leaks in Ussing chambers[J]. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 1989, 415: 235-240.

Applications of Ussing Chamber in Studying Gastrointestinal Barrier and Nutrient Transport

SUN Zhihong^{1,2} HE Zhixiong^{1,2} ZHANG Qingli^{1,3} TAN Zhiliang^{1*}

(1. *Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, CAS, Changsha 410125, China*; 2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039*; 3. *Northwest Sci-tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China*)

Abstract: This article introduced the basal components and structures of Ussing chamber and its applications in the field of gastrointestinal barrier function and nutrient transport research. During the process of applying Ussing chamber system, some problems had been found and the solutions had been proposed. It was suggested that *in vitro* environment needed to be accorded with gastrointestinal physiological characteristics for accurate experimental results and meaningful physiological simulation, simultaneously, material cost was decreased by improvement of methods. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(3): 511-518]

Key words: Ussing chamber; Gastrointestinal barrier; Nutrient transport