

丙氨酰-谷氨酰胺二肽对仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 定位与表达的影响

邓宸玺 王自蕊 游金明* 瞿明仁 叶亚玲 辛向荣 潘珂

(江西农业大学动物科技学院, 南昌 330045)

摘要: 本试验以分离自仔猪空肠上皮的 IPEC-1 细胞为模型, 探讨丙氨酰-谷氨酰胺二肽 (Ala-Gln) 对仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 定位与表达的影响。试验选取同代 IPEC-1 细胞接种至 6 块 6 孔细胞培养板上, 分别用含 0 (对照组)、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mmol/L Ala-Gln 的 DMEM 高糖培养基进行培养, 待细胞生长融合达 70% 以上时, 对 occludin 进行免疫荧光定位和蛋白质印迹 (Western Blot) 检测。结果表明: 1) 对照组细胞可见其胞质内存在团状的阳性荧光染色, 而细胞间连接处阳性荧光染色不明显; 随着 Ala-Gln 浓度的升高, 细胞间连接处荧光信号逐渐增强, 细胞轮廓更加清晰, 而胞质内荧光信号逐渐减弱。2) 各添加组 IPEC-1 细胞间 occludin 的相对表达量均极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。随着 Ala-Gln 浓度的升高, occludin 的相对表达量呈先增后减的趋势, 添加量为 2.00 mmol/L 时达到峰值, 且极显著高于其他添加量 ($P < 0.01$)。由此可知, Ala-Gln 可以上调仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 的表达, 促进细胞间紧密连接结构的形成, 进而增强仔猪小肠黏膜的屏障功能。

关键词: 仔猪; 小肠上皮细胞; 紧密连接; occludin; 丙氨酰-谷氨酰胺二肽

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2014)03-0694-07

仔猪小肠具有完整的黏膜屏障功能是保证其肠道健康的重要基础, 而小肠上皮细胞间良好的紧密连接结构是维持小肠黏膜发挥正常屏障功能和吸收功能的前提。小肠上皮细胞间的这种紧密连接可封闭细胞旁间隙, 使得上皮细胞仅仅对离子和氨基酸类营养物质选择性通过。研究表明, 紧密连接是依靠一系列跨膜及外周蛋白相互作用形成的复合体, 包括 occludin、claudin、ZO-1 和 JAM 等多种蛋白。其中 occludin 最早被发现, 是紧密连接中最重要的结构蛋白之一, 其分子质量为 64~82 ku, 含有 4 个跨膜结构域、2 个细胞外环和 1 个细胞内环, 可与 ZO-1 等蛋白结合, 共同构成紧密连接的骨架部分。occludin 一旦进入紧密连接, 其连接部位的膜通透性将大大降低, 使大分

子自由出入受阻, 进而达到屏障保护作用^[1]。仔猪早期断奶后, 肠道通透性增加、肠屏障功能破坏可能归因于肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin mRNA 表达量的下降^[2]。在应激状态下, 仔猪肠道几乎完全依赖谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 来支持黏膜细胞和巨噬细胞的生理代谢以维持肠黏膜结构和功能的完整^[3]。在断奶期间, 由于无法获得母源性 Gln, 仔猪容易发生 Gln 缺乏。因此, 通过补充外源性 Gln 对防止仔猪断奶应激具有十分重要的意义。然而, 目前人工合成的 Gln 水溶性差, 易转化为有害的焦谷氨酸和氨, 且吸收率低, 限制了其在生产中的广泛应用^[4], 而以丙氨酰-谷氨酰胺二肽 (alanyl-glutamine dipeptide, Ala-Gln) 作为 Gln 的供体, 则可弥补 Gln 单体的缺陷^[5]。Ala-

收稿日期: 2013-10-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31360554); 江西省青年科学家培养计划项目 (2011BCB23008); 江西省教育厅重点科技项目 (GJJ12216)

作者简介: 邓宸玺 (1989—), 男, 江西南昌人, 硕士研究生, 研究方向为猪的营养及营养调控。E-mail: dcx1989@hotmail.com

* 通讯作者: 游金明, 教授, 硕士生导师, E-mail: youjinm@163.com

Gln 在保护仔猪肠道屏障功能方面已有一些研究,但 Ala-Gln 参与仔猪小肠屏障保护作用是否与小肠上皮细胞间紧密连接的形成有关? Ala-Gln 是否可以上调紧密连接蛋白 occludin 的表达? 目前鲜有报道。本试验旨在通过体外试验,以分离自仔猪空肠上皮的 IPEC-1 细胞为模型,利用免疫荧光定位和蛋白质印迹(Western Blot)方法,探讨 Ala-Gln 对仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 定位与表达的影响,以期揭示 Ala-Gln 促进肠黏膜屏障功能的作用机理提供新的线索。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验试剂

DMEM 高糖培养基(不含 Gln)购自 Hyclone 公司、胎牛血清购自 Gibco 公司、Ala-Gln、小牛血清白蛋白(BSA)、丙烯酰胺(acrylamide)、过硫酸铵(APS)、N, N, N', N' - 四甲基乙二胺(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷(Tris base)、甘氨酸(Gly)、十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate)购自 Sigma 公司,青霉素、链霉素购自北京索莱宝公司,胰岛素铁硒传递蛋白(ITS)购自 Sciencell 公司,鼠表皮生长因子(mEGF)、脱脂奶粉(skim milk powder)购自 BD 公司,兔抗 occludin C-term 多克隆抗体购自 Invitrogen 公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)购自中杉金桥公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(H+L)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)、鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体购自 Jackson 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)、甲醛、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、甲叉双丙烯酰胺(bis-acrylamide)、吐温-20、溴酚蓝(bromophenol blue)、丽春红 S(ponceau S)、乙苯基聚乙二醇裂解液(NP-40)、细胞组织快速裂解液(RIPA)购自 Amresco 公司,动植物膜蛋白微量制备试剂盒、2 mg/mL 牛血清白蛋白标准品、5 \times 还原样品缓冲液、10 \times Tris-Gly-SDS 电泳缓冲液、考马斯亮蓝、中分子质量预染蛋白 Marker(7 条带)、Stripping Buffer 购自天恩泽,二辛可宁酸(BCA)蛋白质浓度测定试剂盒购自碧云天,免疫印迹化学发光剂(ECL)、0.45 μ m 孔径硝酸纤维素膜购自 Millipore 公司,二硫苏糖醇(DTT)购自 Merck 公司,

蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自 Roche 公司,甲醇、氯化钠购自国药集团,磺基水杨酸购自北京金汇太亚化学试剂公司,三氯乙酸购自上海研拓公司。

1.1.2 试验培养基

基础培养基:95% DMEM 高糖培养基(不含 Gln) + 5% 胎牛血清 + 5 μ g/L mEGF + 1% ITS + 100 U/mL 青霉素 + 100 U/mL 链霉素。

配制 A、B、C、D、E、F 共 6 种试验培养基,即分别在基础培养基中加入 0、0.25、0.50、1.00、2.00 和 4.00 mmol/L(终浓度)的 Ala-Gln。

1.1.3 试验细胞

试验用细胞为分离自仔猪空肠上皮的成熟的 IPEC-1 细胞,由中科院长沙亚热带研究所馈赠。

1.2 试验方法

1.2.1 IPEC-1 细胞培养

取传代稳定的同代 IPEC-1 细胞,同时接种于底部放有盖玻片的分别标记为 A、B、C、D、E、F 的 6 块 6 孔细胞培养板上,并分别加入含 0、0.25、0.50、1.00、2.00 和 4.00 mmol/L(终浓度) Ala-Gln 的试验培养基,置于培养箱中于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 occludin 免疫荧光定位观察

待细胞融合达 70% 以上后,吸去培养基,用 PBS 洗涤 5 次,每次 10 min。加入中性甲醛固定液固定 15 min 后,用 PBS 洗涤。随即加入 0.5% Triton X-100 处理 10 min,经 PBS 洗涤后,再用 100 mL/L BSA 封闭 1 h,然后加入 2 μ g/mL 的兔抗 occludin C-term 多克隆抗体,于 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 h。用 PBS 洗涤后按 1:100 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG,经 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h、PBS 洗涤、蒸馏水冲洗后将盖玻片取出,用甘油封片,在荧光显微镜下观察各组样品 occludin 的定位情况并拍照。

1.2.3 occludin 相对表达量测定

1.2.3.1 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)溶液配制

30% Acr-Bis 储备液:取 29 g 丙烯酰胺和 1 g 甲叉双丙烯酰胺,溶于 100 mL 双蒸水。

1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8):12.1 g Tris base 溶于 80 mL 双蒸水,用浓 HCl 调节 pH 至 6.8,定容至 100 mL。

1 mol/L Tris-HCl(pH 8.8):12.1 g Tris base 溶于 80 mL 双蒸水,用浓 HCl 调节 pH 至 8.8,定

容至 100 mL。

10% SDS:取 10 g 电泳级 SDS,加入 90 mL 双蒸水,加热至 68 ℃ 助溶,再加入几滴浓 HCl 调节溶液的 pH 至 7.2,用双蒸水定容至 100 mL。

10% APS:将 0.1 g APS 溶于 1 mL 双蒸水。

TBST 缓冲液:Tris-base 2.42 g,NaCl 8.77 g,调 pH 至 7.2~7.4,定容至 1 000 mL,再加 2 mL 吐温-20。

5% 脱脂奶粉-TBST 缓冲液:在 100 mL TBST 缓冲液中加入 5 g 脱脂奶粉。

3% BSA-TBST 缓冲液:在 100 mL TBST 缓冲液中加入 3 g BSA。

另外,按照常规方法配制 5% 浓缩胶和 12% 分离胶。

1.2.3.2 细胞膜蛋白抽提及浓度调整

将培养好的各组细胞用 PBS 冲洗 1 遍,加入预冷的裂解液于冰上裂解 10~20 min,将细胞刮下,用 EP 管收集,然后经 100~200 W 超声波破碎细胞 2 次,每次 3 s。于 4 ℃ 下 12 000 × g 离心 5 min,弃去上清,将上述操作重复 3 次。采用动植物膜蛋白微量制备试剂盒提取细胞膜蛋白,于 -80 ℃ 保存待测。

使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒对细胞膜蛋白样品进行定量,以 RIPA 将各组细胞膜蛋白样品调成相同浓度。加入 5 × 还原样品缓冲液后,使样品终浓度为 0.8 mg/mL。

1.2.3.3 目的蛋白电泳及 Western Blot 预试验

将样品水浴煮沸 5 min,上样时每孔目的蛋白量为 8 μg。接好电源,浓缩胶中 90 V 恒压约 20 min。待溴酚蓝跑至分界处,将电压调为 160 V,约 50 min 后溴酚蓝跑出分离胶,终止电泳。小心取下 2 块胶,其中一块以考马斯亮蓝染色。以记号笔在玻璃板上画好标记线,依线小心切去浓缩胶及两边未加样泳道,并在凝胶底部最靠近左边切去一角,以示电泳方向及加样方向。同法操作另一块胶。

SDS-PAGE 后将目的蛋白转至硝酸纤维素膜上,条件为:300 mA 恒流,0.45 μm 孔径硝酸纤维素膜,转膜约 1 h。转膜完成后用丽春红 S 染色,并观察转膜效果。然后将硝酸纤维素膜完全浸没在装有 3% BSA-TBST 缓冲液的封口袋中,室温下轻摇 2 h。弃封闭液,用兔抗 occludin C-term 多克隆抗体(3% BSA-TBST 缓冲液稀释,1:2 000)室

温下孵育 10 min,置于 4 ℃ 冰箱过夜。取出硝酸纤维素膜,室温下孵育 30 min。再使用 TBST 缓冲液(Tris-base 20 mmol/L,NaCl 150 mmol/L,pH 7.4,吐温-20 0.05%)清洗硝酸纤维素膜 5 次,每次 5 min。加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(5% 脱脂奶粉-TBST 缓冲液稀释,1:2 000)后,室温下轻摇 1 h。TBST 缓冲液清洗 5 次,每次 5 min。加入 ECL 2 mL,室温反应 3~5 min,胶片曝光 30~60 s,显影 2 min,最后定影。胶片扫描后结果见图 1。



图 1 目的蛋白 occludin Western Blot 预试验条带

Fig. 1 Western Blot pre-experimental bands of target protein occludin

1.2.3.4 Western Blot 正式试验

SDS-PAGE 后将目的蛋白转至硝酸纤维素膜上,试验步骤与条件参照预试验。然后用 Stripping Buffer 在 37 ℃ 下洗膜 30 min,去离子水洗膜 3 次,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 3 min,将硝酸纤维素膜完全浸没在 3% BSA-TBST 缓冲液中,室温下摇动 0.5 h。将膜装入含有鼠抗 β-actin 单克隆抗体(用 5% 脱脂奶粉-TBST 缓冲液稀释,1:5 000)的封口袋中,室温下孵育 2 h。TBST 缓冲液洗膜,共洗 5 次,每次 5 min。再用 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(5% 脱脂奶粉-TBST 缓冲液稀释,1:10 000)室温下孵育 40 min。TBST 缓冲液洗膜 5 次,每次 5 min。加入 ECL 2 mL,室温反应 3~5 min,胶片曝光 30~60 s,显影 2 min,定影。胶片扫描后结果见图 2。

1.3 统计分析

仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 的相对表达量以样本与兔抗 occludin C-term 多克隆抗体结合后的灰度值与同一样本与鼠抗 β-actin 单克隆抗体结合后的灰度值的比值表示。各组

occludin 相对表达量数据采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,差异显著者用 LSD 法进行多重比较,

结果以“平均值 \pm 标准差”表示。 $P < 0.05$ 为差异显著判断标准, $P < 0.01$ 为差异极显著判断标准。

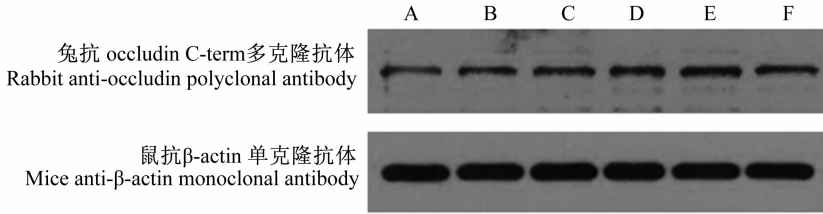


图 2 目的蛋白 occludin Western Blot 试验条带

Fig.2 Western Blot experimental bands of target protein occludin

2 结果与分析

2.1 Ala-Gln 对仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 定位的影响

由图 3 可知,对照组 (A) IPEC-1 细胞的胞质内存在明显的团状阳性荧光染色(实线箭头指示处),而细胞间连接处缺乏阳性荧光染色(虚线箭头指示处)。当培养基中加入 Ala-Gln 后发现, IPEC-1 细胞间连接处的荧光信号明显增强,且随着 Ala-Gln 浓度的升高, IPEC-1 细胞轮廓更加清晰,胞质内荧光信号逐渐减弱,细胞间连接处的荧光信号越发增强。而细胞核的荧光信号并无肉眼

可见变化。

2.2 Ala-Gln 对仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 表达的影响

由表 1 可知,培养基中加入 Ala-Gln 后,小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 的相对表达量均较对照组极显著升高($P < 0.01$)。随着 Ala-Gln 浓度的升高, occludin 的相对表达量呈现先增后减的趋势,在添加量为 2.00 mmol/L 时达到峰值,极显著高于其他添加量($P < 0.01$)。这表明, Ala-Gln 可以上调仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 的表达,进而促进细胞间紧密连接结构的形成。

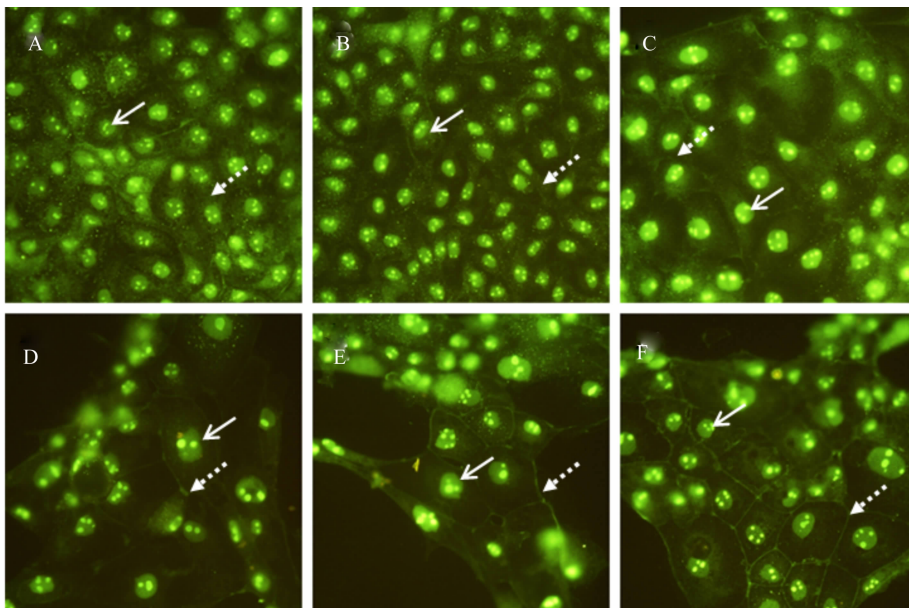


图 3 仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 免疫荧光定位

Fig.3 Immunofluorescence localization of tight junction protein occludin in small intestinal epithelial cells from piglets

3 讨论

小肠黏膜具有屏障功能的一个重要解剖学基础是小肠上皮细胞间具有完整的紧密连接。一般来说,这种紧密连接可封闭细胞旁间隙,使得肠上皮细胞仅仅对离子和氨基酸类营养物质选择性通过。但在特殊情况(如断奶应激)下,紧密连接往

往受到破坏,细菌、内毒素等有害物质通过肠黏膜屏障进入血液循环系统,引起机体炎症反应甚至多器官功能衰竭。occludin 是构成小肠上皮紧密连接的主要结构蛋白之一,occludin 一旦进入紧密连接,其连接部位的膜通透性将大大降低,使大分子自由出入受阻,进而达到屏障保护作用^[6]。

表 1 Ala-Gln 对仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 表达的影响

Table 1 Effects of Ala-Gln on the expression of tight junction protein occludin in small intestinal epithelial cells from piglets

项目 Item	Ala-Gln 浓度 Ala-Gln concentration/(mmol/L)						P 值 P-value
	0	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	
occludin 相对表达量 Relative expression level of occludin	0.52 ±0.04 ^{Cd}	0.68 ±0.03 ^{Bc}	0.67 ±0.02 ^{Bc}	0.73 ±0.01 ^{Bb}	0.86 ±0.01 ^{Aa}	0.73 ±0.02 ^{Bb}	<0.01

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),相同字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

occludin 是一种跨膜蛋白,也是最早发现的细胞间紧密连接蛋白^[7]。occludin 含有 2 个细胞外环,其中一个细胞外环对屏障功能有调节作用,是紧密连接的最重要结构蛋白之一。occludin 存在磷酸化和非磷酸化 2 种形式,磷酸化 occludin 为活性形式,主要集中于紧密连接纤维内,有一小部分 occludin 沿着细胞侧膜分布,不进入纤维内^[8],连接相邻的细胞,封闭细胞间的空隙^[9]。而非磷酸化 occludin 集中在细胞质中^[10]。研究表明,Gln 或其二肽通过上调肠上皮细胞紧密连接蛋白 occludin 的表达而降低肠上皮的通透性被认为是其发挥肠道屏障功能的一个可能机制。小肠黏膜对大分子物质的通透性是评价小肠黏膜屏障功能的一项重要指标^[11]。在临床上,要直接观察细菌移位(bacterial translocation)比较困难,因此大多采用小肠对大分子的通透性来间接反映细菌易位的发生。据报道,Gln 或其二肽可降低小肠对二乙烯三胺戊乙酸(DTPA)的通透率,其机理可能在于其可维护小肠黏膜屏障的完整性及小肠绒毛的形态,从而减少 DTPA 与腺凹细胞间的紧密连接及通透肠黏膜屏障的机会^[12]。Gln 或其二肽是目前应用非常广泛的肠黏膜保护剂,是维持肠道黏膜代谢、结构和功能的必需营养成分,对维护肠黏膜细胞的生长、分化和增殖具有重要的意义^[13-17]。体内

试验表明,Gln 缺乏可使肠道黏膜萎缩,绒毛变稀变矮,屏障功能下降,而补充 Gln 后能明显增加大鼠肠黏膜质量、恢复绒毛高度、黏膜表面积和陷窝深度,加快肠上皮细胞更新速度,阻止肠黏膜萎缩及炎症所致的通透性增加,从而恢复并维持肠黏膜屏障功能^[18-19]。Potsic 等^[20]利用胃造口术研究大鼠后发现,Gln 缺乏可引起大鼠肠上皮细胞间紧密连接结构的破坏。崔巍等^[21]在对人的结肠癌细胞系 Caco-2 细胞试验中进一步表明,Gln 缺乏会降低紧密连接蛋白 occludin 的相对表达量,增加肠上皮细胞屏障通透性,而补充 Gln 能够阻断这些改变。近来,有人利用 Caco-2 细胞建立缺氧/复氧模型,模仿肠缺血再灌注,然后用含有不同浓度 Gln 的培养基培养,研究了 Gln 对肠黏膜的保护作用。结果证实,Gln 可上调紧密连接蛋白 occludin 的表达^[22]。根据临床医学的研究进展,本试验应用 IPEC-1 细胞建立体外小肠上皮细胞屏障,探讨 Ala-Gln 对仔猪小肠上皮细胞间紧密连接相关蛋白 occludin 表达的影响,在对仔猪小肠上皮细胞进行免疫荧光定位后发现,培养基中不含 Ala-Gln 时仔猪小肠上皮细胞间的连接处荧光信号微弱,而细胞质的荧光信号较强。由此推测,对照组小肠上皮细胞中非磷酸化 occludin 含量较高,而起活性作用的磷酸化 occludin 含量较低。随着培养基中

Ala-Gln 浓度的增加,仔猪小肠上皮细胞胞质中的荧光信号逐渐减弱,并最终转为阴性。与此相反的是,细胞膜紧密连接处的荧光信号则随 Ala-Gln 浓度的增加而逐渐增强。此结果表明,Ala-Gln 可以促进 occludin 的磷酸化及细胞间紧密连接结构的形成。在 occludin 功能的调节中,丝/苏氨酸的磷酸化状态较为重要,其主要受蛋白激酶 C (PKC) 的影响。PKC 是一类磷脂依赖性蛋白激酶,通过催化多种蛋白质磷酸化,调节细胞的代谢、生长和分化。丝/苏氨酸磷酸化的 occludin 聚集在紧密连接处,而磷酸化残基较少的 occludin 则多分布在细胞质的基底膜侧^[23]。而 Ala-Gln 对 occludin 磷酸化的促进作用可能源于其对 PKC 活性的促进作用。试验进一步提取了仔猪小肠上皮细胞膜蛋白,分析了其中 occludin 的相对表达量。结果证实,随着 Ala-Gln 浓度的增大,occludin 的相对表达量也逐渐增加,这与前面免疫荧光定位试验中所观察到的紧密连接结构越来越明显相吻合。由此表明,Ala-Gln 可促进仔猪小肠上皮细胞膜上 occludin 的磷酸化,有效促进细胞间紧密连接结构的形成,进而降低仔猪小肠黏膜的通透性,增强小肠黏膜的屏障功能。

4 结 论

Ala-Gln 可以上调仔猪小肠上皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 的表达,促进细胞间紧密连接结构的形成,进而增强仔猪小肠黏膜的屏障功能。

参考文献:

- [1] FURUSE M, SASAKI H, FUJIMOTO K, et al. A single gene product, claudin-1 or 2, reconstitutes tight junction strands and recruits occluding in fibroblasts [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 143 (2): 391 - 401.
- [2] 刘海萍,胡彩虹,徐勇. 早期断奶对仔猪肠通透性和肠上皮紧密连接蛋白 Occludin mRNA 表达的影响 [J]. *动物营养学报*, 2008, 20 (4): 442 - 446.
- [3] 马永贤,蒋朱明,白满喜,等. 创伤后肠黏膜屏障改变分子生物学机制的研究 [J]. *中华外科杂志*, 1995, 33 (6): 371 - 373.
- [4] MURAKAMI A E, SAKAMOTO M I, NATALIM R M, et al. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 2007, 86 (3): 488 - 495.
- [5] 袁雪波,马黎,陈克磷,等. 丙氨酰谷氨酰胺二肽对哺乳仔猪生长性能、小肠形态学和血清生化指标的影响 [J]. *动物营养学报*, 2011, 23 (1): 94 - 101.
- [6] 刘铁民,吴衍忠. 谷氨酰胺对过度运动大鼠肠黏膜屏障功能变化的干预机制 [J]. *四川体育科学*, 2007 (4): 55 - 58.
- [7] TSUKITA S, FURUSE M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players [J]. *Trends in Cell Biology*, 1999, 9 (7): 268 - 273.
- [8] 高志光,秦环龙. 肠上皮细胞紧密连接的生物学功能及在肠屏障中的作用 [J]. *肠外与肠内营养*, 2005, 11 (2): 299 - 302.
- [9] KUBOTA K, FURUSE M, SASAKI H, et al. Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions [J]. *Current Biology*, 1999, 9 (18): 1035 - 1038.
- [10] SAKAKIBARA A, FURUSE M, SATIOU M. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, 137 (6): 1393 - 1401.
- [11] BJARNASON I, MACPHERSON A, HOLLANDER D. Intestinal permeability: an overview [J]. *Gastroenterology*, 1995, 108 (5): 1566 - 1581.
- [12] 蒋建文,黎介寿,李幼生,等. 甘氨酰谷氨酰胺二肽对猪自体移植小肠的营养作用 [J]. *中华外科杂志*, 1999, 37 (11): 677 - 679.
- [13] SHIMIZU M, SON D O. Food-derived peptides and intestinal functions [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13 (19): 885 - 895.
- [14] WU X Q, SHU L H, SUN M, et al. Effect of glutamine on apoptosis of the small intestine in young rats with endotoxemia and its mechanism [J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2006, 8 (6): 496 - 498.
- [15] MARGARITIS V G, FILOS K S, MICHALAKI M A, et al. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice [J]. *World Journal of Surgery*, 2005, 29 (10): 1329 - 1334.
- [16] DE-SOUZA D A, GREENE L J. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine [J]. *Critical Care Medicine*, 2005, 33 (5): 1125 - 1135.
- [17] ASSIMAKOPOULOS S F, NIKOLOPOULOU V N,

- SCOPA C D, et al. Beneficial effects of glutamine on intestinal barrier function in obstructive jaundice [J]. *World Journal of Surgery*, 2005, 29(7): 935–936.
- [18] BOELENS P G, HOUDIJK A P, HAARMAN H J, et al. Glutamine-enriched enteral nutrition decreases infectious complications in trauma patients [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 76(1): 253–254.
- [19] KARINCH A M, PAN M, LIN C M, et al. Glutamine metabolism in sepsis and infection [J]. *Journal of Nutrition*, 2001, 131(9): 2535S–2538S, 2550S–2551S.
- [20] POTSIC B, HOLLIDAY N, LEWIS P, et al. Glutamine supplementation and deprivation: effect on artificially reared rat small intestinal morphology [J]. *Pediatric Research*, 2002, 52(3): 430–436.
- [21] 崔巍, 闻颖, 董亚路, 等. 谷氨酰胺对体外培养肠上皮细胞屏障通透性的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(33): 3729–3733.
- [22] 潘璠, 刘成霞. 谷氨酰胺对体外肠上皮细胞缺血再灌注损伤后 occludin 蛋白表达的影响 [J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(10): 2624–2627.
- [23] 张宇飞, 嵇武, 黎介寿. Occludin 蛋白调控机制及临床意义的研究进展 [J]. *肠外与肠内营养*, 2010, 17(3): 175–178.

Effects of Alanyl-Glutamine Dipeptide on Localization and Expression of Tight Junction Protein Occludin in Small Intestinal Epithelial Cells from Piglets

DENG Chenxi WANG Zirui YOU Jinming* QU Mingren YE Yaling XIN Xiangrong PAN Ke
(College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: This experiment was conducted to evaluate the effects of alanyl-glutamine dipeptide (Ala-Gln) on localization and expression of tight junction protein occludin in small intestinal epithelial cells from piglets using IPEC-1 cells isolated from jejunal epithelium as the model. The IPEC-1 cells of the same generation were planted into 6-six-well cell culture plates and were incubated with DMEM high-glucose medium containing 0 (control group), 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mmol/L Ala-Gln, respectively. When the cell fusion had reached more than 70%, the immunofluorescence localization and Western Blot of occludin were detected. The results showed as follows: 1) the positive fluorescence staining clouds in cytoplasm of cells were observed in the control group, but that was not obvious among the junction of cells. The fluorescence signals among the junction of cells appeared to be strengthen gradually and the cell outline appeared clearer with the increase of Ala-Gln concentration. Contrarily, the fluorescence signals in cytoplasm of cells were weakened gradually. 2) Compared with the control group, the relative expression level of occludin in IPEC-1 cells in supplemental groups was significantly increased ($P < 0.01$) and a trend from increase to decrease was observed with the increase of Ala-Gln concentration. The relative expression level of occludin in 2.00 mmol/L group was significantly higher than that in other supplemental groups ($P < 0.01$). Therefore, Ala-Gln can up-regulate the expression of tight junction protein occludin in small intestinal epithelial cells from piglets, and promote the formation of intercellular tight junction structure, and then strengthen the barrier function of intestinal mucosa in piglets. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(3): 694-700]

Key words: piglet; intestinal epithelial cell; tight junction; occludin; Ala-Gln