

# 饲料营养素对鱼类肠道紧密连接蛋白 闭锁小带蛋白-1 影响的研究进展

孔瑶瑶<sup>1</sup> 马秀华<sup>1</sup> 麦康森<sup>1,2</sup> 张彦娇<sup>1,2\*</sup>

(1.中国海洋大学,农业农村部水产动物营养与饲料重点实验室,海水养殖教育部重点实验室,青岛 266003;

2.青岛海洋科学与技术试点国家实验室,海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室,青岛 266237)

**摘要:** 鱼类肠道紧密连接结构是肠道黏膜屏障的重要组成。紧密连接在相邻的上皮细胞之间形成了由跨膜蛋白[如闭合蛋白(Claudin)和闭锁蛋白(Occludin)]和胞质蛋白[如闭锁小带蛋白-1(ZO-1)]所维持的复杂蛋白质结构,其中胞质紧密连接蛋白 ZO-1 属于膜相关鸟苷酸激酶(MAGUK)家族,是紧密连接的重要组成蛋白质之一。ZO-1 在维持细胞极性和紧密连接屏障功能上发挥着重要作用,也与肠道疾病的发生有着密切联系。众所周知,ZO-1 的表达在相当程度上受饲料营养素的影响和调节。因此,本文综述了饲料中蛋白质、脂肪、糖类、维生素和矿物质五大营养素对鱼类肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的影响及作用机制的研究进展,这对于保持鱼类肠道屏障的功能稳定和提高饲料的利用效率有重要意义。

**关键词:** 饲料营养素;紧密连接蛋白;闭锁小带蛋白-1;鱼类

中图分类号:Q959.4

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)11-5081-08

鱼类肠道不仅具有消化吸收营养物质等作用,也可阻止有害物质进一步进入体内从而保护机体健康。肠道屏障功能是指肠道能够强有力地防止病原菌等其他物质向肠内转移,进而保护机体健康。肠道屏障包括机械屏障、化学屏障、免疫屏障和微生物屏障,其中肠道机械屏障是尤为主要的一环<sup>[1-3]</sup>。紧密连接作为各类组织上皮细胞间的主要连接方式在保持肠道屏障机械结构的完整性和功能的正常发挥上扮演关键角色,并因此成为众学者的研究热点<sup>[4-5]</sup>。

胞质紧密连接蛋白闭锁小带蛋白(zonula occludens,ZO)是紧密连接的结构性蛋白,被证实广泛存在于上皮细胞或某些类型的内皮细胞,有助于建立高电阻连接和连续单层细胞间间隙的封闭。研究证明,膜相关鸟苷酸激酶家族成员主

要多基因膜蛋白构成,且在联系细胞内外及参与胞内信号转导、构造细胞骨架系统方面扮演着重要角色。而 ZO 作为首先被证实的紧密连接附着蛋白正是该家族中的一员。该蛋白有 3 个异构体,分别为 ZO-1、ZO-2 和 ZO-3,主要集中在结肠、肾脏等各个器官上皮细胞的紧密连接处<sup>[5-7]</sup>。ZO-1是在 1986 年,由 Stevenson 等<sup>[8]</sup>在小鼠肝脏的上皮细胞紧密连接中发现的分子质量为 220 ku 的磷蛋白,最早被命名为紧密连接蛋白-1。按照有无一段 80 个由单一基因编码的选择性 mRNA 剪接体编码的氨基酸序列( $\alpha$ 基序)分为 ZO-1 $\alpha$ +(含有 $\alpha$ 基序)和 ZO-1 $\alpha$ -(不含有 $\alpha$ 基序)2 个异构体。ZO-2 是分子质量为 160 ku 与紧密连接的胞质表面相关的外围蛋白,最初于 1991 年在 ZO-1 免疫沉淀物中被鉴定。在 ZO-1 免疫沉淀中也发

收稿日期:2020-03-31

基金项目:国家自然科学基金(31872577);青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室渔业科技青年人才计划(2018-MFS-T10);国家海水鱼产业技术体系(CARS 47-G10)

作者简介:孔瑶瑶(1996—),女,山东潍坊人,硕士研究生,从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: ldukongyao@163.com

\* 通信作者:张彦娇,教授,硕士生导师,E-mail: yanjiaozhang@ouc.edu.cn

现了磷酸化的分子质量为 130 ku 的蛋白,现在被称为 ZO-3<sup>[9-12]</sup>。ZO-1、ZO-2 和 ZO-3 都属于膜相关鸟苷酸激酶家族,均有 Src 同源区 3 (SH3)、鸟苷酸激酶 (GUK) 和 3 个 PDZ 结构域。据报道,ZO-2 可通过 PDZ2/PDZ2 相互作用与 ZO-1 缔合。另外有研究表明,ZO-3 也与 ZO-1 相关,但与 ZO-2 不相关。目前研究指出,ZO-1 是膜相关鸟苷酸激酶家族中唯一可通过第 2 个 PDZ 结构域形成高度稳定二聚体的蛋白。除此之外,利用 PDZ 结构域,ZO-1 还可与其他异构体相互作用。不同于 ZO-2 只在紧密连接中表达,ZO-1 在紧密连接和黏附连接中均可表达。利用对缺乏 ZO-1 表达的小鼠上皮细胞的研究中证实,外源 ZO-1 的添加可以明显缓解紧密连接由于缺乏 ZO-1 表达而受阻的事实,即闭合蛋白 (Claudin) 和闭锁蛋白 (Occludin) 向连接和屏障建立聚集的迟缓现象<sup>[13]</sup>。大鼠黏膜肥大细胞水解酶-1 (rat mast cell protease-1, RMCP-1) 能通过影响紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的重新分配而改变单层细胞的通透性<sup>[14]</sup>。有一些细胞因子如  $\gamma$ -干扰素、肿瘤坏死因子可以通过改变 ZO-1 的正常表达来破坏肠道完整的屏障功能从而危害机体健康<sup>[15]</sup>。因此 ZO-1 无论是在 ZO 蛋白家族中还是在维持细胞间连接上都是十分关键的角色。

## 1 ZO-1 的结构和功能

### 1.1 ZO-1 的结构

ZO-1 的氨基端包括 3 个 PDZ 结构域 (PDZ1、PDZ2、PDZ3)、1 个 SH3 结构域和 1 个 GUK 结构域。PDZ 结构域是具有介导膜上蛋白聚集等生物作用的由 80~100 个氨基酸残基所组成的保守序列。利用 PDZ 结构域不仅可以与 Claudin、紧密连接蛋白连接黏附分子 (JAM) 等其他紧密连接蛋白直接连接,而且可以利用 PDZ2 结构域与另外 2 种异构体结合。SH3 结构域是最初在某癌基因的试验中被证实的可介导蛋白与蛋白之间相互作用的蛋白组件。可通过 SH3 结构域与 Y-box 转录因子 ZO-1 相关性核酸结合蛋白 (ZONAB)、紧密连接相关激酶 (ZAK) 结合。通过 GUK 结构域与 Occludin 结合<sup>[6,8,12]</sup>。

### 1.2 ZO-1 的功能

在紧密连接方面,研究证明,ZO-1 与大部分紧密蛋白联系密切,包括 Ras 靶点 AF6、扣带蛋白

(Cingulin) 和 JAM1<sup>[16-17]</sup>。与上述蛋白的相互作用表明 ZO-1 在紧密连接的结构组成方面发挥重要作用。

在细胞骨架方面,ZO-1 与许多不同组织上皮细胞的紧密连接相关蛋白相互作用,这暗示 ZO-1 在调整细胞骨架上扮演着重要角色,ZO-1 的氨基末端与 Occludin 或 ZO-2、ZO-3 结合,羧基端连接细胞内骨架的肌动蛋白并因此成为紧密连接与细胞内连接的桥梁<sup>[18-19]</sup>。

另外,ZO-1 作为膜相关鸟苷酸激酶家族中的一员利用固有结构域在作用胞内通路的信号传输方面发挥关键作用。SH3 结构域可以与 Y-box 转录因子结合,影响相关基因表达,作用于细胞增殖并与一系列增殖蛋白(细胞周期蛋白、增殖细胞核抗原)相互影响。有研究证实 ZO-1 的功能发挥对  $\text{Ca}^{2+}$  的存储具有促进作用,而  $\text{Ca}^{2+}$  又是细胞肌醇磷脂信号通路的关键物质蛋白激酶 C 的重要刺激因子,这表明 ZO-1 可能作为细胞骨架在该通路中存在<sup>[20-21]</sup>。

## 2 饲料营养素对鱼类肠道紧密连接的影响

目前,关于饲料中不同营养素对鱼类肠道组织结构和功能的研究日益增多,饲料中不同成分在动物肠道上既扮演着关键营养供给角色,又是可能破坏其屏障结构的罪魁祸首,营养素对肠道屏障结构的影响机制也因此成为研究热点。研究结果表明,肠道屏障结构和功能与紧密连接蛋白密切相关。Beutheu 等<sup>[22]</sup>研究精氨酸和谷氨酰胺对紧密连接蛋白的影响发现,经过甲氨蝶呤 (MTX) 处理的人 Caco-2 细胞,ZO-1 的 mRNA 表达水平显著降低,而在 MTX 处理之前添加精氨酸或谷氨酸能够防止 Caco-2 细胞上 ZO-1 的 mRNA 表达水平的降低。上述研究表明营养素会通过一定的作用方式影响肠道紧密连接蛋白的表达。

饲料主要由可被动物消化吸收的必需营养素:蛋白质、脂类、糖类、维生素、矿物质和水组成。不过,水由于其某种程度上取之不尽、用之不竭的特点不作为营养素来研究。因此,本次主要选取另外 5 种营养素对鱼类肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的作用及机制进行综述。

### 2.1 蛋白质对鱼类肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的影响

蛋白质是生命的物质基础,且在养殖动物生

长发育和繁殖等生长历程中扮演重要角色。一直以来,鱼粉一直作为水产养殖者们挑选优良蛋白质源的第一选择。然而,与水产养殖高速发展相反的是,由于全球渔业的过度开发和海洋生态系统的破坏使得优质鱼粉资源严重受限,造成鱼粉价格居高不下,研究和应用可以部分或完全替代鱼粉的蛋白质源是热点也是难点。植物蛋白质源中的大豆蛋白质源因为具有蛋白质含量高、氨基酸丰富、来源广等优势成为水产养殖者们用以替代鱼粉的首要选择。此外,其他植物性蛋白质诸如棉仁饼粕或菜籽饼粕等均被人们作为蛋白质源广泛利用<sup>[23]</sup>。

研究人员在断奶仔猪的研究中分别以鱼粉和大豆浓缩蛋白为蛋白质源,并各自设置低含量(19%)和高含量(23%)2个梯度,研究发现,无论哪种蛋白质源,ZO-1 在高含量组的表达量都显著低于低含量组,这表明蛋白质含量的变化可以显著影响 ZO-1 的表达量<sup>[24]</sup>;有学者在大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)上研究发现,添加 40% 的豆粕可以显著降低大菱鲆肠道 ZO-1 和其他紧密连接蛋白的表达量从而引发肠炎反应<sup>[25-27]</sup>,且 ZO-1 的表达量在豆粕饲料中添加 1% 精氨酸后显著提高<sup>[27]</sup>,推测 ZO-1 的表达量在一定程度上受体内氨基酸含量影响。相似结果也在其他鱼类上获得,有学者研究发现,补充 8 g/kg 的谷氨酸可以显著提高建鲤(*Cyprinus carpio* Jian)肠道内 ZO-1 的表达量<sup>[28]</sup>。而缬氨酸的缺乏可以显著降低草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肠道内 ZO-1 的表达量<sup>[29]</sup>。另外,在断奶仔猪中的研究还发现 ZO-1 的表达量在鱼粉组和大豆浓缩蛋白组间没有显著差异,表明在断奶仔猪研究中 ZO-1 的表达量不受蛋白质源的影响<sup>[24]</sup>;然而在大西洋鲑(*Salmo salar* L.)的研究中对其提供豆粕混合小麦面筋和家禽粉 2 种蛋白质源,ZO-1 在后者中的表达量与前者相比显著提高,这可能由于豆粕中存在的抗营养因子影响了 ZO-1 的正常表达<sup>[30]</sup>。

ZO-1 的表达量能随鱼类饲料中蛋白质的来源或添加量的改变而改变,因为 ZO-1 在紧密连接中的特殊连接作用以及与其他紧密连接蛋白的密切联系,所以是否会由于 ZO-1 的变化而引起与它相关的紧密连接蛋白的变化最终引发不同程度的肠炎反应,这一连锁反应机制还有待进一步研究。

## 2.2 脂类对鱼类肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的影响

脂肪是存在于天然饲料中的主要营养物质,同样是配合饲料中不可缺少的能量原料。由于目前全球鱼油产量和资源分布不均的情况日益严峻导致鱼油市场早已出现供不应求的现象,使得鱼油资源越来越紧张,在保证必需脂肪酸得到满足的情况下可以用植物油等其他油脂代替海水鱼油以节约成本。在水产饲料中油脂的使用量以及使用种类,应根据养殖动物对必需脂肪酸和能量的需求而定。否则也会对包括鱼类肠道紧密连接等方面带来不良影响<sup>[31]</sup>。

饲料中的脂肪水平可以影响 ZO-1 表达,有学者检测正常饮食组和高脂饮食组大鼠小肠黏膜 ZO-1 的表达量发现,与正常饮食组相比,高脂饮食组大鼠的 ZO-1 表达量显著减低<sup>[32]</sup>。类似结论在肠炎小鼠上也被证实,高脂饲料喂养小鼠的回肠上皮中 ZO-1 的表达量同样明显降低,加剧小鼠肠炎症状<sup>[33]</sup>。相似结论在鱼类上也得到验证,有学者在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)中添加过量(23.41 g/kg)的花生四烯酸,发现其显著降低河豚肠道内 ZO-1 的表达量<sup>[34]</sup>。在草鱼中同时添加鱼油和豆油作为其脂肪源,分别设置 0、15、30、45、60 和 75 g/kg 6 种浓度,研究发现,草鱼肠道 ZO-1 的表达量随着脂肪水平的升高呈现先上升继而下降的趋势,表明低脂和高脂都可能会显著抑制 ZO-1 的表达<sup>[35]</sup>。不同脂肪源是指油脂中各类脂肪酸的比例不同从而对不同的鱼有着不同功能。研究发现,仅在小鼠饮食中单独添加不饱和脂肪(玉米油)与添加饱和脂肪(牛油)相比其会显著降低 ZO-1 的表达量<sup>[36]</sup>。在鱼类上,有学者用豆油、鱼油、氧化鱼油作为饲料脂肪源饲喂草鱼,添加氧化鱼油组 ZO-1 的表达量显著降低,进一步破坏了草鱼肠道的健康状态。学者推测可能是因为饲料氧化鱼油削弱了胞浆蛋白 ZO 对紧密连接“锁扣”结构的“闭合”调控,通过打开紧密连接“锁扣”的结构从而导致肠道上皮细胞间紧密连接结构的破坏和增加肠道黏膜通透性,并最终损伤肠道黏膜屏障<sup>[37]</sup>。

## 2.3 糖类对鱼类肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的影响

糖类,又叫做碳水化合物,与其他饲料营养素相比具有价格便宜、来源广泛等优点。鱼类由于胰岛素的分泌速度滞后于鱼类对糖类的吸收速度、缺少糖酵解过程中的关键酶等一系列原因,使

其不能充分利用食物中的糖类。与陆生动物相比,水产动物糖代谢的速率是非常慢的,水产动物并不能有效调节体内葡萄糖吸收及糖原储存过饱和或血糖过高等生理胁迫效应。但可消化糖在水产动物中依旧具有参与鱼体细胞的构成、提供能量、脂质及非必需氨基酸转化的作用<sup>[38]</sup>。

有研究发现,与对照组相比,添加 300 mg/kg 的壳聚糖显著提高仔猪肠道 ZO-1 的表达量,防止肠道屏障功能受损<sup>[39]</sup>。相似结论在小鼠中也有发现,乌贼墨多糖可以通过调节 ZO-1 的表达,逆转化疗对其带来的肠道屏障损伤,推测多糖的促紧密连接蛋白表达作用可能与 Toll 样受体 2 (TLR2) 有关<sup>[40-41]</sup>。除了乌贼墨多糖,高浓度葡萄糖透析液同样可以破坏大鼠细胞间的紧密连接并抑制 ZO-1 的表达<sup>[42]</sup>。在鱼类中,有学者研究发现,饲料中无论添加 1.25% 还是 5.00% 的水苏糖均可以显著提高大菱鲂肠道内 ZO-1 的表达量<sup>[43]</sup>,但在饲料中添加木聚糖对大菱鲂肠道内 ZO-1 的表达量没有显著影响<sup>[44]</sup>。相似结论在真鲷 (*Sparus aurata* L.) 研究中也得出,菊粉作为植物中的储备性多糖添加到真鲷饲料中却并未对 ZO-1 的表达量产生显著影响<sup>[45]</sup>。但 0.2% 熟地黄多糖的添加显著提高大鳞鲃 (*Luciobarbus capito*) 肠道 ZO-1 的表达量,增强其肠道屏障功能<sup>[46]</sup>。上述结果表明,不同糖源及其添加量对动物肠道造成的各种影响可能是通过影响 ZO-1 的表达实现的。

## 2.4 维生素对鱼类肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的影响

维生素是养殖动物在日常生活中为了维持正常生理功能所必需的微量小分子有机化合物,在动物的生长历程中发挥关键作用,属于必需的微量营养素。其主要作用是作为辅酶参与物质代谢和能量代谢的调控、作为生理活性物质直接参与生理活动、作为生物体内的抗氧化剂保护细胞和器官组织的正常结构和生理功能,还有部分维生素作为细胞和组织的结构成分。对于多数维生素,动物本身没有全程合成的能力或合成量不足以满足营养需要,主要依赖于食物的供给<sup>[47]</sup>。

研究发现不同种类或浓度的维生素都会影响 ZO-1 表达。用维生素 E 处理 IPEC-J2 细胞系和 Caco-2 细胞系,在 0~160  $\mu\text{mol/L}$  浓度中均检测到 ZO-1 的表达上调,在 IPEC-J2 细胞系中,在 20~40  $\mu\text{mol/L}$  浓度中 ZO-1 的表达最佳;在 Caco-2 细

胞系中,此浓度范围内的维生素 E 表现出对 ZO-1 表达的上调作用随浓度呈依赖性增加<sup>[48]</sup>。在维生素 A 的研究上,其他学者也有类似发现,在乳糖诱导的腹泻大鼠中,维生素 A 缺乏组中 ZO-1 的表达量显著下降,而在维生素 A 补充组中其表达量又显著增加<sup>[49]</sup>。这说明维生素 A 的补充可以调节 ZO-1 的表达来减轻肠黏膜损伤,缓解腹泻的严重程度。在淡水鱼上,有学者在草鱼饲料中添加不同水平维生素 C 发现,草鱼前肠中 ZO-1 的表达量随着维生素 C 水平的增加而增加,直至达到平台期<sup>[50]</sup>。关于维生素 E 对草鱼肠道中 ZO-1 的影响,学者研究认为,ZO-1 的表达量随着维生素 E 水平的不断增加而呈现先上升后下降的趋势,侧面反映出维生素过量添加会降低紧密连接蛋白的表达量,成为引发鱼类肠炎的一个重要的因素<sup>[51]</sup>。除此之外,草鱼肠道中 ZO-1 的表达量也随饮食中维生素 A 水平的升高而逐渐上调,直至 1 798 IU/g 时下调<sup>[52]</sup>。B 族维生素如吡哆素、肌醇和烟酸的缺乏均会导致草鱼肠道中 ZO-1 表达的下调,破坏其肠道屏障,诱发肠炎<sup>[53-55]</sup>。

## 2.5 矿物质对鱼类肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的影响

矿物质元素是构成动物机体组织、维持正常生理功能的各种必需元素的总称。众所周知,由于生活环境和条件的不同决定了水产动物除了从饲料中获得矿物质外,还可以从水环境中吸收矿物质。研究证实,由于身处环境不同导致淡水鱼和海水鱼不同的吸收方式使其分别通过鳃或肠及体表吸收。矿物质元素的生理功能在水产动物和陆生动物之间的重大区别在于渗透压调节的不同,鱼、虾、贝等水产动物体液需要维持和周围水环境之间的渗透压平衡。

因为水产动物对矿物质吸收的复杂性,对 ZO-1 影响的早期研究多集中在细胞层次或畜禽上。有试验证明,Caco-2 细胞在铜暴露的条件下受浓度和时间的改变会发生明显变化,其细胞间的跨膜电阻值会随着试验处理呈线性降低<sup>[56]</sup>。这表明矿物质离子可以对细胞间的通透性产生显著影响,但是 ZO-1 并不因此发生明显变化,表明铜对 ZO-1 的表达量与其本身添加剂量确切相关<sup>[56]</sup>。锌是生物膜脂蛋白组成成分之一,且在维持细胞膜的完整性中扮演着重要角色。锌可通过显著提高仔猪紧密连接蛋白 ZO-1 的表达量来保证肠道

上皮细胞的紧密连接作用的发挥,从而缓解由赭曲霉毒素引起的肠道损伤<sup>[57]</sup>。有学者在肾小管上皮细胞试验中发现,草酸钙晶体会通过下调 ZO-1 的表达来破坏细胞间的紧密连接,最终导致细胞极性的破坏,随后细胞利用负反馈调节恢复 ZO-1 的正常表达以达到自我调整的目的<sup>[58]</sup>。除此之外,在微量元素铁方面,有学者发现在饲料中添加不同浓度的葡萄糖酸亚铁均可使黄羽肉鸡肠道中 ZO-1 含量显著降低,引起肠道的氧化损伤,且损伤程度与铁的添加剂量相关<sup>[59]</sup>。在鱼类研究中发现,无论是锰过量或是缺乏都会导致草鱼肠道中 ZO-1 的表达量降低<sup>[60]</sup>,这表明饮食中矿物质含量的高低可以通过影响 ZO-1 的表达来破坏草鱼肠道的物理屏障。此外,研究表明乳酸锌和硫酸锌的缺乏同样下调草鱼肠道 ZO-1 的表达<sup>[61]</sup>,表明锌缺乏对草鱼 ZO-1 的表达调控并不会受其添加形式的影响。上述研究表明,矿物质的添加形式或添加剂量对动物造成的氧化损伤可通过影响 ZO-1 的表达完成。而对于多种矿物质元素的相互联系及其共同对 ZO-1 的影响机制尚不清楚,需要进一步的研究。

### 3 小结与展望

ZO-1 作为紧密连接结构中的重要成分并因其特殊的脚手架样作用使其在紧密连接复合物中所扮演的角色不可替代。饲料中各类营养素的添加形式或是添加量会对动物肠道具有不同程度的影响,大量研究证明 ZO-1 在其中发挥一定的作用。但目前,饲料中各类营养素对 ZO-1 的影响在水产动物上的研究还较为欠缺,因此还需要进一步研究。除此之外,ZO-1 由于其与其他紧密连接蛋白特殊的连接关系,在受到外界刺激时如何变化并进而引发一系列连锁反应,其具体响应机理还需要继续深入研究。此外,ZO-1 作为紧密连接重要组成部分参与细胞间的信号传导,在维持各类细胞生物学功能的过程时,其具体存在的信号调节通路和调控的相关基因还需要进一步研究。

### 参考文献:

[ 1 ] 刘红宾,田祥宇,王忠.肠道黏膜紧密连接与通透性研究进展[J].饲料研究,2015(2):18-23.  
[ 2 ] 吴国豪.肠道屏障功能[J].肠外与肠内营养,2004,11(1):44-47.

[ 3 ] 钮凌颖,李宁.肠上皮细胞的紧密连接与肠道疾病[J].肠外与肠内营养,2009,16(1):56-59.  
[ 4 ] 韦志坤,程爱国.肠黏膜细胞的紧密连接与肠壁通透性的研究进展[J].世界华人消化杂志,2011,19(4):394-399.  
[ 5 ] SUZUKI T.Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions[J].Cellular and Molecular Life Sciences,2013,70(4):631-659.  
[ 6 ] 李秋霞,罗茂林,李茹柳,等.紧密连接蛋白 ZO-1 研究概述[J].广州中医药大学学报,2007,24(6):523-526.  
[ 7 ] FUNKE L,DAKOJI S,BREDT D S.Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions[J].Annual Review of Biochemistry,2005,74:219-245.  
[ 8 ] STEVENSON B R,SILICIANO J D,MOOSEKER M S, et al. Identification of ZO-1; a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia[J].The Journal of Cell Biology,1986,103(3):755-766.  
[ 9 ] FANNING A S,JAMESON B J,JESAITIS L A, et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton[J].Journal of Biological Chemistry,1998,273(45):29745-29753.  
[ 10 ] QIAO X M, ROTH I, FÉRAILLE E, et al. Different effects of ZO-1, ZO-2 and ZO-3 silencing on kidney collecting duct principal cell proliferation and adhesion[J].Cell Cycle,2014,13(19):3059-3075.  
[ 11 ] GONZALEZ-MARISCAL L,BAUTISTA P,LECHUGA S, et al.ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis[J].Annals of the New York Academy of Sciences,2012,1257(1):133-141.  
[ 12 ] 王木.闭锁小带蛋白-1 及其在癌发生发展中的作用[J].口腔颌面外科杂志,2013,23(1):67-71.  
[ 13 ] UMEDA K, MATSUI T, NAKAYAMA M, et al. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1[J].Journal of Biological Chemistry,2004,279(43):44785-44794.  
[ 14 ] SCUDAMORE C L, JEPSON M A, HIRST B H, et al.The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-11, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin[J].European Journal of Cell Biology,1998,75(4):321-330.  
[ 15 ] YOUAKIM A,AHDIEH M.Interferon-gamma decrea-

- ses barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin[J]. *The American Journal of Physiology*, 1999, 276(5): G1279-G1288.
- [16] YAMAMOTO T, HARADA N, KANO K, et al. The ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, 139(3): 785-795.
- [17] ZHADANOV A B, PROVANCE D W, SPEER C A, et al. Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development [J]. *Current Biology*, 1999, 9(16): 880-890.
- [18] FANNING A S, VAN ITALLIE C M, ANDERSON J M. Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23(4): 577-590.
- [19] NAGAOKA K, UDAGAWA T, RICHTER J D. CPEB mediated ZO-1 mRNA localization is required for epithelial tight junction assembly and cell polarity [J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 675.
- [20] BALDA M S, MATTER K. Tight junctions and the regulation of gene expression [J]. *Biochimica et Biophysica Acta; Biomembranes*, 2009, 1788(4): 761-767.
- [21] OMEROVIC J, PRIOR I A. Compartmentalized signaling: ras proteins and signalling nanoclusters [J]. *FEBS Journal*, 2009, 276(7): 1817-1825.
- [22] BEUTHEU S, GHOUZALI I, GALAS L, et al. Glutamine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells [J]. *Clinical Nutrition*, 2013, 32(5): 863-869.
- [23] 钟国防, 周洪琪, 华雪铭. 玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀消化酶活性的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(2): 227-236.
- [24] WU, JIANG Z Y, ZHENG C T, et al. Effects of protein sources and levels in antibiotic-free diets on diarrhea, intestinal morphology, and expression of tight junctions in weaned piglets [J]. *Animal Nutrition*, 2015, 1(3): 170-176.
- [25] 刘洋. 谷氨酰胺和丁酸钠对摄入高剂量豆粕的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼肠道健康的保护作用研究 [D]. 硕士学位论文. 青岛: 中国海洋大学, 2017.
- [26] ZHAO S F, CHEN Z C, ZHENG J, et al. Citric acid mitigates soybean meal induced inflammatory response and tight junction disruption by altering TLR signal transduction in the intestine of turbot, *Scophthalmus maximus* L. [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 181-187.
- [27] CHEN Z C, LIU Y, LI Y X, et al. Dietary arginine supplementation mitigates the soybean meal induced enteropathy in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. [J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(4): 1535-1545.
- [28] JIANG J, YIN L, LI J Y, et al. Glutamate attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative damage and mRNA expression changes of tight junction and defensin proteins, inflammatory and apoptosis response signaling molecules in the intestine of fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 473-484.
- [29] LUO J B, FENG L, JIANG W D, et al. The impaired intestinal mucosal immune system by valine deficiency for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with decreasing immune status and regulating tight junction proteins transcript abundance in the intestine [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 197-207.
- [30] HU H B, KORTNER T M, GAJARDO K, et al. Intestinal fluid permeability in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is affected by dietary protein source [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167515.
- [31] 胡海滨, 钱雪桥, 解缓启, 等. 中成鱼阶段卵形鲳鲆对饲料蛋白质和脂肪的适宜需求量 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 566-576.
- [32] 吴云, 李春苗, 刘喃喃, 等. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肠粘膜紧密连接蛋白 ZO-1 及肌球蛋白轻链激酶的变化 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(30): 5832-5836.
- [33] MURAKAMI Y, TANABE S, SUZUKI T. High-fat diet-induced intestinal hyperpermeability is associated with increased bile acids in the large intestine of mice [J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(1): H216-H222.
- [34] YU G J, OU W H, LIAO Z B, et al. Intestinal homeostasis of juvenile tiger puffer *Takifugu rubripes* was sensitive to dietary arachidonic acid in terms of mucosal barrier and microbiota [J]. *Aquaculture*, 2019, 502: 97-106.
- [35] FENG L, NI P J, JIANG W D, et al. Decreased enteritis resistance ability by dietary low or excess levels of lipids through impairing the intestinal physical and immune barriers function of young grass carp (*Cteno-*

- pharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 493-512.
- [36] KIRPICH I A, FENG W K, WANG Y H, et al. The type of dietary fat modulates intestinal tight junction integrity, gut permeability, and hepatic Toll-like receptor expression in a mouse model of alcoholic liver disease [J]. *Alcoholism Clinical & Experimental Research*, 2012, 36(5): 835-846.
- [37] 黄雨薇, 叶元土, 蔡春芳, 等. 饲料氧化鱼油引起草鱼肠道黏膜结构屏障损伤 [J]. *水产学报*, 2015, 39(10): 1511-1520.
- [38] 乔洪金, 胡冬雪, 胡文靖, 等. 饲料中添加鼠尾藻粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分、抗氧化和非特异免疫参数的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 28(1): 109-116.
- [39] 肖定福, 唐志如, 印遇龙, 等. 壳聚糖对仔猪肠黏膜通透性及 Occludin 和 ZO-1 表达的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(6): 894-900.
- [40] HINO S, SONOYAMA K, BITO H, et al. Low-methoxyl pectin stimulates small intestinal mucin secretion irrespective of goblet cell proliferation and is characterized by jejunal *Muc2* upregulation in rats [J]. *The Journal of Nutrition*, 2013, 143(1): 34-40.
- [41] 朱怡卿, 刘玮, 王虹, 等. 多糖对肠道功能调节作用的研究进展 [J]. *药学进展*, 2015, 39(4): 293-299.
- [42] 王怡, 舒静. 不同含糖浓度腹透液对腹膜细胞紧密连接影响的实验研究 [C] // 第四届国际中西医结合肾脏病学术会议专题讲座汇编. 天津: 中国中西医结合学会, 2006.
- [43] YANG P, HU H B, LIU Y, et al. Dietary stachyose altered the intestinal microbiota profile and improved the intestinal mucosal barrier function of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. [J]. *Aquaculture*, 2018, 486: 98-106.
- [44] YANG P, HU H B, L Y X, et al. Effect of dietary xylan on immune response, tight junction protein expression and bacterial community in the intestine of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734361.
- [45] CEREZUELA R, MESEGUER J, M. ESTEBAN M Á. Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 843-848.
- [46] WU C, SHAN J F, FENG J C, et al. Effects of dietary *Radix rehmanniae preparata* polysaccharides on the digestive enzymes, morphology, microbial communities and mucosal barrier function of the intestine of *Luciobarbus capito* [J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(3): 1026-1037.
- [47] 黎原谷, 李慷, 刘利平. 人工繁殖条件下日本鳗鲡鱼卵营养成分分析及评价 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(2): 190-199.
- [48] 黄妍君. 维生素 E 及其衍生物对肠道屏障结构蛋白的保护作用研究 [D]. 硕士学位论文. 长沙: 湖南师范大学, 2018.
- [49] 肖露. 维生素 A 补充改善乳糖诱导的腹泻大鼠肠黏膜屏障功能 [D]. 硕士学位论文. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [50] 徐慧君. 维生素 C 对生长中期草鱼生产性能、肠道、机体和鳃健康以及肉质的作用及其作用机制 [D]. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学, 2016.
- [51] 潘加红. 维生素 E 对生长中期草鱼生长、肠道、机体和鳃健康以及肌肉品质的影响及作用机制 [D]. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学, 2016.
- [52] JIANG W D, ZHOU X Q, ZHANG L, et al. Vitamin A deficiency impairs intestinal physical barrier function of fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 546-558.
- [53] WU P, ZHENG X, ZHOU X Q, et al. Deficiency of dietary pyridoxine disturbed the intestinal physical barrier function of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 459-473.
- [54] LI S A, JIANG W D, FENG L, et al. Dietary myo-inositol deficiency decreased the growth performances and impaired intestinal physical barrier function partly relating to nrf2, jnk, e2f4 and mlck signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 475-492.
- [55] FENG L, LI S Q, JIANG W D, et al. Deficiency of dietary niacin impaired intestinal mucosal immune function via regulating intestinal NF- $\kappa$ B, Nrf2 and MLCK signaling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49: 177-193.
- [56] 刘志伟, 陈佳琳, 陈秉衡. 铜对 Caco-2 细胞单层屏障功能的影响 [J]. *中华预防医学杂志*, 2004, 38(6): 406-410.
- [57] 周桂莲, 公衍玲, 薛鹏, 等. 微量元素铁、铜、锌与仔猪肠道健康研究新进展 [J]. *养猪*, 2013(5): 9-10.
- [58] 卢穗琳, 钟文, 李淑珏, 等. 草酸钙晶体引起肾小管上皮细胞紧密连接损伤与 TRPV5 变化的调节机制 [J]. *广东医学*, 2017, 38(14): 2109-2113.

- [59] 苟钟勇,蒋守群,蒋宗勇,等. 饲料高水平铁对黄羽肉鸡血液和空肠黏膜中氧化应激相关指标及肠道黏膜屏障功能的影响研究[C]//中国畜牧兽医学会2013年学术年会论文集.北京:中国畜牧兽医学会,2013.
- [60] JIANG W D, TANG R J, LIU Y, et al. Manganese deficiency or excess caused the depression of intestinal immunity, induction of inflammation and dysfunction of the intestinal physical barrier, as regulated by NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signalling, in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 406-416.
- [61] SONG Z X, JIANG W D, LIU Y, et al. Dietary zinc deficiency reduced growth performance, intestinal immune and physical barrier functions related to NF- $\kappa$ B, TOR, Nrf2, JNK and MLCK signaling pathway of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 497-523.

## Research Progress of Effects of Diet Nutrients on Intestinal Tight Junction Protein Zonula Occludens-1 of Fish

KONG Yaoyao<sup>1</sup> MA Xiuhua<sup>1</sup> MAI Kangsen<sup>1,2</sup> ZHANG Yanjiao<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feeds, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

**Abstract:** The intestinal tight junction structure of fish is an important component of intestinal mucosal barrier. Tight junction forms complex protein structure maintained by transmembrane proteins (eg. Claudin and Occludin) and cytoplasmic proteins [eg. zonula occludens-1 (ZO-1)] between adjacent epithelial cells. Cytoplasmic tight junction protein ZO-1 is a member of the membrane associated guanosine kinase (MAGUK) family, it is one of the most important proteins in tight junction. ZO-1 plays an important role in maintaining cell polarity and tight junction barrier function, which is closely related to the occurrence of intestinal diseases. As it was known, the nutrients in diet can affect and regulate the expression of ZO-1 to some extent. Therefore, the review presents the effects of the five nutrients, such as protein, fat, carbohydrate, vitamins and minerals, on intestinal tight junction protein ZO-1 and the potential mechanism in fish, which will be helpful to maintain the integrity of fish intestinal barrier and improve the feed utilization efficiency. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(11): 5081-5088]

**Key words:** feed nutrient; tight junction protein; ZO-1; fish