

# 封闭蛋白与炎症性肠病相关性研究进展

王许平, 耿丽, 王丹丹, 杨贝贝, 杜晓博, 高闯, 冯百岁

(郑州大学第二附属医院 消化内科, 郑州 450014)

**摘要:** 肠黏膜上皮细胞与细胞间的紧密连接(tight junction, TJ)是构成肠黏膜机械屏障的结构基础, 封闭蛋白(occludin)是 TJ 相关蛋白, 对 TJ 有重要的调节作用, 但具体机制尚不清楚。有研究表明, 封闭蛋白可以通过调节 TJ 改变肠黏膜屏障功能, 而肠黏膜屏障功能的改变参与了炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生、发展。文章就封闭蛋白与 IBD 的相关性作一综述, 以期对 IBD 的治疗提供新思路。

**关键词:** 封闭蛋白; 紧密连接; 炎症性肠病

**中图分类号:** R392.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2019)01-0082-04

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是胃肠道慢性反复发作性疾病, 包括 UC 和 CD。目前 IBD 的病因尚不明确, 主要涉及遗传、环境、微生物及宿主的免疫因素。肠黏膜上皮细胞与细胞间的紧密连接(tight junction, TJ)是构成肠黏膜机械屏障的结构基础, 可阻止有害物质通过肠黏膜进入血液。多项研究结果表明, 各种原因所致的肠黏膜屏障功能破坏在 IBD 的发生与发展中起到了关键作用。IBD 患者伴随着肠道屏障功能完整性破坏, 主要表现为肠黏膜通透性增加, 致使肠黏膜对抗原等物质的通透性增加, 启动免疫应答, 造成组织损伤。肠上皮细胞间的 TJ 是维持肠黏膜屏障功能的基础, 在细胞侧面形成调控屏障, 发挥保护作用。炎性因子及内毒素可作用于 TJ, 从而影响 TJ 蛋白的表达, 使 TJ 复合体受损, 肠黏膜通透性增加, 肠上皮 TJ 的破坏已被证实为肠道炎症性疾病的重要致病因素<sup>[1-2]</sup>。封闭蛋白(occludin)是 TJ 相关蛋白, 也是重要的结构蛋白, 其不仅能通过细胞外环所形成的拉链式结构封闭细胞旁间隙, 而且能够与多种分子结合, 参与 TJ 形成的信号调节。有研究表明, 封闭蛋白在 UC 及 CD 患者中表达明显下降, 封闭蛋白表达下调可能是肠上皮

TJ 通透性增加的重要机制。近年来也有多项研究表明封闭蛋白对 TJ 的调节具有重要作用, 主要通过封闭蛋白的磷酸化来调节 TJ 的完整性, 但具体机制尚不清楚<sup>[3-4]</sup>。探究封闭蛋白对 TJ 的调节作用及其与 IBD 的相关性, 有助于人们对 IBD 的理解和探寻新的治疗方法。

## 1 TJ 及封闭蛋白的生物学特性

TJ 位于上皮及内皮细胞顶端侧面, 连接相邻的细胞并封闭细胞间隙, TJ 复合体包括跨膜蛋白和膜外周蛋白, 跨膜蛋白包括封闭连接蛋白和封闭蛋白家族, 膜外周蛋白包括连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM)、封闭小带(zonula occluden, ZO)。一方面, TJ 在上皮通透性调节中发挥重要作用, 其可严格控制离子、小分子及溶质通过, 同时阻止肠腔中的内毒素、过敏原及致病原进入组织, 从而防止继发的炎症; 另一方面, TJ 在肠上皮细胞极化过程中发挥重要作用, 将上皮细胞的质膜分为顶端侧和基底侧, 同时对细胞的生长和分化也有一定的作用。TJ 自身具有可塑性, 在疾病条件下, 各种病理刺激可加速 TJ 动力学改变而去组装, 进而使上皮通透性发生改变。事实上, 上皮通透性增加是包括 IBD 在内的黏膜炎症性疾病的典型病理生理学改变。大量数据表明, UC 和 CD 患者均表现出肠黏膜屏障功能受损、通透性增加的特点, IBD 所致的屏障功能的改变伴随着 TJ 结构的破坏, 与 TJ 相关蛋白的改变有关<sup>[2, 5]</sup>。

封闭蛋白是构成 TJ 的重要的跨膜蛋白, 基因定位于人染色体 5q13.1 上, 相对分子质量为

**收稿日期:** 2017-12-01

**基金项目:** 国家自然科学基金(81070288; 81270452); 河南省卫生计生科技创新型人才特聘学科带头人(豫卫科[2016]32号); 河南省自然科学基金(162300410268); 河南省医学科技攻关计划项目(201502015)

**作者简介:** 王许平(1990—), 女, 硕士生, 主要从事炎症性肠病的基础与临床研究

**通信作者:** 冯百岁(E-mail: fbs163@163.com)

65 000。封闭蛋白所具有的4次跨膜螺旋将其分成5个部分,包括2个细胞外环、1个细胞内环及胞内较长的C末端和较短的N末端<sup>[6]</sup>。目前,N末端结构域的功能尚不十分清楚,而C末端结构域的功能已有所了解,其有助于封闭蛋白的转运和内化,且对TJ的装配和功能发挥具有重要的作用,尤其是C末端结构域与ZO蛋白相互作用,促进了TJ的形成并介导了相关的信号转导<sup>[7]</sup>。

## 2 封闭蛋白对 TJ 的调节作用

封闭蛋白是 TJ 的重要组成部分,有研究发现其在 TJ 的调节中可能发挥重要作用。在马丁达比狗肾(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞中检测到封闭蛋白过表达时跨上皮细胞电阻(trans epithelial resistance, TER)增加<sup>[8]</sup>,而在封闭蛋白基因敲除的小鼠中,TJ的形态结构保持完整,跨上皮转运及屏障功能仍正常<sup>[9]</sup>。近年来认为封闭蛋白在细胞旁通透性调节方面发挥重要作用,体内和体外试验均证实封闭蛋白可通过影响 TJ 实现对细胞旁通透性的调节<sup>[8, 10]</sup>。

封闭蛋白对 TJ 的调节涉及到多种机制,其中最重要的机制是磷酸化,但调控机制比较复杂。其中封闭蛋白的C末端存在多个磷酸化结合位点,这些位点的磷酸化状态对 TJ 的调节发挥重要作用。近年来研究发现C末端的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的磷酸化状态有助于维持 TJ 的功能稳定。在正常的上皮中,封闭蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基处于高度磷酸化状态,Seth等<sup>[11]</sup>在Caco-2细胞中应用蛋白磷酸酶抑制剂与基因沉默技术,使蛋白磷酸酶2A与蛋白磷酸酶1表达水平下降,检测到TER及TJ装配的增强。封闭蛋白对 TJ 的影响主要与蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)信号有关,在MDCK细胞中应用PKC激活剂可促进封闭蛋白的磷酸化并促进其插入 TJ,而在应用抑制剂后封闭蛋白发生去磷酸化,在离体条件下通过质谱法测定PKC的磷酸化位点为C末端的Ser<sup>338</sup><sup>[12]</sup>。Suzuki等<sup>[13]</sup>证实PKC $\eta$ 可直接与封闭蛋白的C末端结构域发生作用,在Caco-2细胞及MDCK细胞中抑制或敲除PKC $\eta$ 会破坏封闭蛋白与ZO-1的联系,从而使上皮屏障功能受损,同时证明PKC $\eta$ 的磷酸化位点为封闭蛋白的苏氨酸残基(T403和T404)。同样在上述模型中抑制PKC $\zeta$ 的表达会使 TJ 发生损伤及装配障碍,在离体小鼠的回肠组织中抑制其表

达产生同样的结果,而且PKC $\zeta$ 的主要磷酸化位点为封闭蛋白的酪氨酸残基(Thr<sup>424</sup>和Thr<sup>438</sup>)<sup>[14]</sup>。PKC家族在封闭蛋白功能的维持中发挥重要作用,但PKC家族存在多种亚基,调节机制比较复杂,未来还需要更多的研究来探寻具体的机制。

除了PKC家族,也有研究表明Src家族也参与封闭蛋白的磷酸化,调节屏障功能。Basuroy等<sup>[15]</sup>发现在氧化应激条件下,Caco-2细胞中的c-Src被激活,致使封闭蛋白重分布,TER下降,细胞对菊粉的通透性增加,而在应用抑制剂蛋白磷酸酶2后细胞的通透性有所恢复。Rho为小的G蛋白,Rho激酶可以通过调节细胞骨架蛋白影响封闭蛋白的功能,进而调节 TJ 的功能。Hopkins等<sup>[16]</sup>在极化的T84单层细胞中应用大肠埃希菌细胞毒性坏死因子1(cytotoxic necrotizing factor 1, CNF-1)激活Rho家族(Rho、Rac、Cdc42)信号转导,从而使肠上皮屏障功能受损,这可能与它引起的封闭蛋白与ZO蛋白以囊泡或内体的形式从 TJ 上脱离有关。Rho激酶可作用于封闭蛋白C末端结构域的氨基酸残基T382和S507上,且先前有研究证明激活的Rho激酶可引起封闭蛋白及封闭连接蛋白5的磷酸化,从而影响 TJ 的结构及功能。

除了磷酸化机制,还存在其他的封闭蛋白调控机制。在来源于大鼠腮腺永生的上皮细胞Pa4中,致癌基因*Raf1*过表达能够下调封闭蛋白,从而减弱细胞间的联系,*Raf1*还可以抑制锌指转录因子Slug,进而抑制封闭蛋白启动子,下调封闭蛋白的转录<sup>[17]</sup>。分离缺陷蛋白3(partitioning defective protein 3, Par-3)能够与Par-6及aPKC形成复合体,对 TJ 的装配及上皮细胞的极化有重要作用<sup>[18]</sup>。在葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠模型中,肠上皮细胞Par-3的表达明显下降,在用TNF- $\alpha$ 处理的Caco-2细胞中Par-3表达同样下调。Par-3可能是通过调节肠上皮细胞封闭蛋白的转运来维持 TJ 完整性的,用基因沉默的方法使Par-3表达缺失后,封闭蛋白不能装配到 TJ 上,TER的恢复也出现延迟<sup>[19]</sup>。Wapenaar等<sup>[20]</sup>发现UC与Par-3基因*PARD3*有一定的关系。

## 3 封闭蛋白与 IBD

IBD的病因尚不明确,在实验性结肠炎模型及IBD患者中均存在肠黏膜屏障的破坏,其病理生理

改变表现为上皮通透性增加。而 TJ 控制着细胞旁路功能, 封闭蛋白作为肠上皮 TJ 的重要组分, 在上皮屏障功能的调节中发挥重要作用。已证实在 IBD 患者中封闭蛋白的表达水平明显下调, 封闭蛋白可能与 IBD 的发生、发展存在密切的关系。

体内与体外的实验均显示, 在炎症条件下肠黏膜中封闭蛋白表达下调。在葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎模型中, 与对照组相比, 第 7 天时小鼠结肠组织封闭蛋白的表达明显下降。在离体条件下, 用 IFN- $\gamma$  处理的 T84 细胞出现 TER 的降低及细胞通透性增加, 测其封闭蛋白的表达, 总体处于下调状态, 而磷酸化的封闭蛋白表达上调<sup>[21]</sup>。在 IBD 患者中封闭蛋白的表达同样处于下调状态, Yamamoto-Furusho 等<sup>[22]</sup>对活动期与缓解期的 UC 患者及健康人结肠组织的封闭蛋白表达水平进行分析, 发现活动期 UC 患者结肠组织封闭蛋白及其 mRNA 的表达高于缓解期 UC 患者及健康人, 提示封闭蛋白与 IBD 发病具有相关性。

目前, 多项研究表明封闭蛋白在维持肠道屏障的完整性中具有重要作用。在体外条件下, 应用小干扰 RNA (small-interfering RNA, siRNA) 使 Caco-2 细胞中的封闭蛋白表达沉默, 发现单层 Caco-2 细胞对尿素、甘露醇、菊粉、葡聚糖的通透性增加。在小鼠体内, 应用同样的方法敲除封闭蛋白后, 得到了同样的结果。也有研究发现封闭蛋白的缺失并没有引起 TJ 及 TER 的改变, 可能在病理刺激下, 封闭蛋白的表达下调, 从而使肠黏膜屏障对大分子物质如抗原等的通透性增加, 进而触发肠道炎症<sup>[3, 23]</sup>。在野生型小鼠给予酒精喂养后, 结肠黏膜中封闭蛋白的表达明显下降。封闭蛋白敲除的小鼠与野生型小鼠相比, 酒精诱导的肠道通透性增加更加明显, 其 TJ 的破坏更加严重, 证明了在外来刺激下, 结肠组织中的封闭蛋白对肠黏膜可能有一定的保护作用<sup>[24]</sup>。在另一项小鼠结肠炎模型的研究中, Sunuwar 等<sup>[25]</sup>发现锌受体 (zinc sensing receptor, ZnR/GPR39) 能促进结肠细胞中 Ca<sup>2+</sup> 信号转导, 从而上调封闭蛋白的表达, ZnR/GPR39 敲除的小鼠经葡聚糖硫酸钠处理后, 结肠炎的进展加快, 且恢复过程缓慢, 反映了封闭蛋白在肠道炎症期间的积极作用。多项研究也表明, UC 和 CD 患者结肠组织中的封闭蛋白是处于下调状态的, 益生菌能够通过增加结肠炎小鼠模型肠道封闭蛋白的表达来增强肠道的屏障作用<sup>[1, 26]</sup>。

促炎因子在 IBD 肠黏膜屏障的损害方面有至关重要的作用, 在细胞、动物模型及 IBD 患者中均存在细胞因子诱导的 TJ 改变及肠道屏障功能的障碍, 而封闭蛋白参与了细胞因子诱导的屏障功能调节<sup>[27-28]</sup>。促炎因子 IFN- $\gamma$  可破坏肠黏膜屏障, 促进结肠炎发生、发展, 它能够降低离体的单层 T84 细胞 TER 并增加细胞对菊粉的通透性, 同时伴有封闭蛋白表达下调。进一步的研究发现, IFN- $\gamma$  可激活 PI3K, 进而激活转录因子 NF- $\kappa$ B, 使封闭蛋白表达下调, 提示其在 TJ 功能及肠黏膜屏障通透性的改变中可能具有重要作用<sup>[29]</sup>。在 UC 患者肠黏膜中也存在 IFN- $\gamma$  表达增加, 并有 TJ 封闭蛋白及 ZO-1 的表达下降, 提示它在 UC 的发病中可能起重要作用, 但具体的调节机制尚不清楚<sup>[30]</sup>。而 Marchiando 等<sup>[27]</sup>进一步研究发现, 在小鼠肠上皮细胞中过表达封闭蛋白后可使 TNF 所致的肠道屏障功能损伤及腹泻症状减轻, 同时发现 TNF 可激活肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK), 继而加强小窝蛋白 1 对封闭蛋白的内吞作用。

#### 4 结语

目前, IBD 的病因及发病机制尚不清楚, 现阶段的研究结果表明肠黏膜屏障功能障碍尤其是 TJ 损伤是 IBD 的重要病理生理表现, 而封闭蛋白是维持 TJ 结构完整及上皮屏障功能正常的重要调节蛋白, 通过磷酸化等机制能否对肠道上皮细胞封闭蛋白的表达和功能产生影响, 从而加强肠道上皮细胞的 TJ, 促进 IBD 患者的肠道屏障功能修复, 仍需要进一步深入研究。深入探讨正常及炎症条件下封闭蛋白对 TJ 的调节作用有助于人们对 IBD 发生和发展的理解, 为 IBD 的治疗提供新思路。

#### 参考文献

- [1] Landy J, Ronde E, English N, *et al.* Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(11): 3117-3126.
- [2] Konig J, Wells J, Cani PD, *et al.* Human intestinal barrier function in health and disease [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7(10): e196.
- [3] Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, *et al.* Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(6): 1054-1064.

- [4] Rao R. Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1165(1): 62-68.
- [5] Ivanov AI. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: Current concepts and unanswered questions[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 763(763): 132-148.
- [6] Aitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, *et al.* Mammalian occludin in epithelial cells: Its expression and subcellular distribution[J]. *Eur J Cell Biol*, 1997, 73(3): 222-231.
- [7] Cummins PM. Occludin: One protein, many forms[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 32(2): 242-250.
- [8] McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, *et al.* Occludin is a functional component of the tight junction[J]. *J Cell Sci*, 1996, 109(Pt 9): 2287-2298.
- [9] Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, *et al.* Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1669(1): 34-42.
- [10] Balda MS, Whitney JA, Flores C, *et al.* Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein[J]. *J Cell Biol*, 1996, 134(4): 1031-1049.
- [11] Seth A, Sheth P, Elias BC, *et al.* Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11487-11498.
- [12] Andreeva AY, Krause E, Müller EC, *et al.* Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38480-38486.
- [13] Suzuki T, Elias BC, Seth A, *et al.* PKC  $\epsilon$  regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(1): 61-66.
- [14] Jain S, Suzuki T, Seth A, *et al.* Protein kinase C $\zeta$  phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions[J]. *Biochem J*, 2011, 437(2): 289-299.
- [15] Basuroy S, Sheth P, Kuppuswamy D, *et al.* Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 11916-11924.
- [16] Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, *et al.* Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(4): 725-742.
- [17] Wang Z, Wade PK, Akyildiz A, *et al.* Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug[J]. *Oncogene*, 2007, 26(8): 1222-1230.
- [18] Chen J, Zhang M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(10): 1357-1364.
- [19] Min Y, Songwei Y, Yuan Q, *et al.* Par-3 modulates intestinal epithelial barrier function through regulating intracellular trafficking of occludin and myosin light chain phosphorylation[J]. *J Gastroenterol*, 2015, 50(11): 1103-1113.
- [20] Wapenaar CM, Monsuur JA, Van AAB, *et al.* Associations with tight junction genes *PARD3* and *MAGI2* in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2008, 57(4): 463-467.
- [21] Poritz LS, Sundstrom J, Iii LH, *et al.* 37: Alteration of occludin expression in intestinal inflammation[J]. *J Surg Res*, 2009, 151(2): 188-188.
- [22] Yamamoto-Furusho JK, Mendivil EJ, Fonseca-Camarillo G. Differential expression of occludin in patients with ulcerative colitis and healthy controls[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(10): e1999.
- [23] Saitou M, Furuse M, Sasaki H, *et al.* Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands[J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(12): 4131-4142.
- [24] Mir H, Meena AS, Chaudhry KK, *et al.* Occludin deficiency promotes ethanol-induced disruption of colonic epithelial junctions, gut barrier dysfunction and liver damage in mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(4): 765-774.
- [25] Sunuwar L, Medini M, Cohen L, *et al.* The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, triggers metabotropic calcium signaling in colonocytes and regulates occludin recovery in experimental colitis[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, 371(1700).
- [26] Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, *et al.* Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis[J]. *AM J Physiol-Gastr L*, 2009, 296(5): G1140-1149.
- [27] Marchiando AM, Shen L, Graham WV, *et al.* Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation *in vivo* [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(1): 111-126.
- [28] van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, *et al.* Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(16): 2844-2852.
- [29] Boivin MA, Roy PK, Bradley A, *et al.* Mechanism of interferon-gamma-induced increase in T84 intestinal epithelial tight junction[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2009, 29(1): 45-54.
- [30] Zhang X, Lai P, Dong K, *et al.* Expressions and correlations of interferon- $\gamma$ , occludin and zonula occluden-1 in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis[J]. *Chin J Gastroenterol*, 2014, 19(10): 588-592.