

[文章编号] 1000-4718(2019)05-0900-07

细胞角蛋白 8 在促肾上腺皮质激素释放因子诱导的肠上皮通透性改变中的作用*

胡 玥, 陈超英, 张 梦, 吕 宾[△]

(浙江中医药大学附属第一医院消化科, 浙江 杭州 310006)

[摘要] **目的:** 探讨细胞角蛋白 8(CK8)在促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)诱导的肠上皮细胞间通透性改变中的作用及机制。**方法:** 培养人结肠腺癌 HT29 细胞株建立肠上皮屏障模型,采用免疫荧光法检测 HT29 细胞表面 CRF 受体 1(CRFR1)及 CRFR2 的表达情况,并将其分为对照组和 CRF 组,CRF 组以 100 nmol/L CRF 处理细胞 72 h。采用 Transwell 小室检测 2 组细胞 FITC 标记的 dextran 透过率,透射电镜观察 2 组细胞紧密连接结构变化,并用 Western blot 法检测 2 组细胞 CK8 及紧密连接相关蛋白(ZO-1 和 occludin)的表达,免疫荧光检测 CK8 表达微结构变化,ELISA 检测加药 5 min、10 min、30 min、1 h 及 2 h 后蛋白激酶 C(PKC)活性。采用 sh-CK8 慢病毒构建 CK8 低表达 HT29 细胞,检测给予 CRF 处理后相应蛋白表达量、FITC 标记的 dextran 透过率及 PKC 活性的改变。**结果:** HT29 细胞表面存在 CRFR1 及 CRFR2 受体,而 CRF 处理后,FITC 标记的 dextran 透过率高于对照组($P < 0.05$),透射电镜观察可见对照组细胞紧密连接通道关闭,CRF 处理后紧密连接开放。同时,CRF 可引起 HT29 细胞 CK8 的荧光强度增高,呈颗粒样浓聚,其蛋白表达明显增加($P < 0.05$),而 occludin 和 ZO-1 表达下调($P < 0.05$)。此外,CRF 处理 1 h 时,PKC 的活性下降($P < 0.05$)。sh-CK8 慢病毒转染 HT29 细胞后成功建立低表达 CK8 细胞株,与阴性对照组相比,CRF 刺激后肠上皮细胞通透性并未明显降低,occludin 蛋白表达仍下调($P < 0.05$),而 ZO-1 则无明显改变。同时,与阴性对照组相比,CK8 低表达后,CRF 刺激并未引起 PKC 活性的下降。**结论:** CK8 可能通过抑制 PKC 活性参与 CRF 诱导的肠上皮通透性的增加,同时可能存在其它信号通路共同参与。

[关键词] 肠易激综合征; 细胞角蛋白 8; 促肾上腺皮质激素释放因子; 紧密连接; 蛋白激酶 C

[中图分类号] R574.4; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.05.020

Role of cytokeratin 8 on changes of intestinal epithelial permeability induced by corticotropin-releasing factor

HU Yue, CHEN Chao-ying, ZHANG Meng, LÜ Bin

(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China. E-mail: drlvbin@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the role of cytokeratin 8 (CK8) on the change of intercellular permeability of intestinal epithelial cells induced by corticotropin-releasing factor (CRF). **METHODS:** The expression levels of CRF receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 on human colon adenocarcinoma HT29 cell surface were determined by immunofluorescence staining. After treatment with 100 nmol/L CRF for 72 h, the translocation of FITC-labelled dextran was measured in a Transwell chamber. The structural changes of tight junctions were observed under transmission electron microscope. The expression levels of CK8, and tight junction proteins ZO-1 and occludin were determined by Western blot. The activity of protein kinase C (PKC) was detected by ELISA. Furthermore, the effects of CRF on intestinal epithelial permeability were examined in CK8-silencing HT29 cells, which were constructed by infection with sh-CK8 lentivirus. **RESULTS:** CRF treatment increased the permeability of FITC-labelled dextran ($P < 0.05$), caused the opening of tight junctions, and induced increased fluorescence intensity of CK8. The expression levels of occludin and ZO-1 were down-regulated ($P < 0.05$). PKC activity was decreased at 1 h after CRF treatment ($P < 0.05$). CRF-induced increase in the permeability and down-regulation of occludin were not blocked by CK8 silencing. Nevertheless, CK8 silencing blocked the effects of CRF regarding

[收稿日期] 2018-06-11 [修回日期] 2018-10-20

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81470814; No. 81770535)

△通讯作者 Tel: 0571-87032028; E-mail: drlvbin@163.com

the decrease in the expression levels of ZO-1 and the increase in PKC activity ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** CK8 may be involved in CRF-induced increase in intestinal epithelial permeability by inhibiting the activity of PKC, and there may be other signaling pathways involved.

[**KEY WORDS**] Irritable bowel syndrome; Cytokeratin 8; Corticotropin-releasing factor; Tight junctions; Protein kinase C

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)作为一种临床常见的胃肠功能紊乱性疾病^[1],其发病机制尚未完全明确,目前研究指出腹泻型 IBS 患者存在小肠和结肠肠黏膜屏障的损伤^[2-4]。因此,保护肠黏膜屏障的结构和功能完整在防治腹泻型 IBS 中有着重要的意义。同时,应激在 IBS 的发病中的作用被日益关注,促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF)作为应激反应中最重要 的内分泌激素,已被发现可以引起肠上皮细胞通透性的改变^[5-6],参与 IBS 的发病。此外,在我们前期研究中,应激 IBS 大鼠结肠黏膜存在细胞角蛋白 8(cytokeratin 8, CK8)的表达上调^[7],且伴有肌动蛋白重构及紧密连接蛋白闭锁小带蛋白 1(zonula occludens-1, ZO-1)分布紊乱。由此,本研究旨在明确 CRF 是否是通过上调 CK8 破坏肠上皮细胞紧密连接引起肠上皮通透性改变及其可能的调节机制,为阐明腹泻型 IBS 的发病机制及其临床有效诊治提供科学依据。

材 料 和 方 法

1 细胞培养及处理

人结肠腺癌细胞株 HT29 购自中国科学院上海典型培养物保藏委员会细胞库。细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育培养。细胞为贴壁生长,2~3 d 传代 1 次。当 HT29 细胞生长并融合形成单层约 60%~70% 左右,给予 100 nmol/L CRF 处理,72 h 后行相关指标检测。

2 主要试剂

RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco;用于细胞转染的慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司;抗 CK8 抗体及 PKC 活性试剂盒购自 Abcam;抗 ZO-1 抗体购自 Life;抗 occludin 抗体购自 CST;抗 CRF 受体 1(CRF receptor 1, CRFR1)及 CRFR2 抗体购自 Anbobio;Cy3 标记的山羊抗兔 IgG (H + L) II 抗购自 Sigma;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自 Southern Biotech;CRF 购自 Tocris Bioscience;抗兔 II 抗购自上海明睿

生物技术有限公司;TRIzol 及 PCR 试剂购自 TaKaRa;M-MLV 逆转录试剂盒购自 Promega。

3 主要方法

3.1 sh-CK8 慢病毒转染 取处于对数生长期的细胞经胰酶消化,完全培养基制成 $(3 \sim 5) \times 10^7/L$ 细胞悬液,将 2 mL 细胞悬液接种到 6 孔板中,继续培养保证感染时铺板量达到 15%~30% 左右。待细胞密度为每孔 20% 时更换感染培养基(Eni. S + polybrene),将 CK8 干扰慢病毒 LV-KRT8-RNAi (37991-1)和阴性对照(negative control, NC)病毒 CON053 按 MOI 值 20 分别加入培养体系中进行感染。感染后 16 h 更换为常规培养基继续培养,并分为 sh-NC 组和 sh-CK8 组。感染后 72 h,给予 100 nmol/L CRF 处理,72 h 后行相关指标检测。

3.2 免疫荧光检测 HT29 细胞表面 CRFR1 和 CRFR2 的表达情况 将各组 HT29 细胞调整至每孔 5×10^5 ,接种于已放圆形爬片的 24 孔板,37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育,去培养基,按固定、洗涤、封闭、洗涤的顺序处理爬片,分别孵育抗 CRFR1 (1:50)、CRFR2 (1:50)和 CK8(1:25 000)的 I 抗在湿盒中 4 °C 过夜,洗涤后在避光环境中,以 1:400 比例孵育 Cy3 标记的 II 抗,PBS 洗涤,加入 DAPI 及抗淬灭剂封片,随后在激光共聚焦显微镜下观察。

3.3 Real-time PCR 将各组 HT29 细胞以 TRIzol 法提取总 RNA,逆转录试剂盒合成 cDNA,以此 cDNA 为模版用荧光定量 PCR 试剂盒检测 CK8 的 mRNA 表达情况。GAPDH 的上游引物序列为 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3',下游引物序列为 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3',扩增片段为 121 bp;CK8 的上游引物序列为 5'-ACAAGTTTGCCTCCTTCATAGA-3',下游引物序列为 5'-GAGGACAAATTCGTTCTCCAT-3',扩增片段为 287 bp。反应参数为:95.0 °C 30 s;95.0 °C 5 s;60.0 °C 34 s,扩增 40 个循环,60 °C~95 °C 缓慢升温,产生溶解曲线。实验结果以目的基因和内参照 GAPDH 的 Ct 比值来描述。

3.4 Western blot 收集各组 HT29 细胞,用 RIPA 裂

解液裂解细胞收集蛋白;以 BCA 法测定样本蛋白浓度,上样于 10% SDS-PAGE,后转移至 PVDF 膜,分别孵育 CK8 (1 : 25 000)、ZO-1 (1 : 125) 及 occludin (1 : 50 000) 的 I 抗 4 °C 过夜,次日抗兔 II 抗室温孵育 2 h,凝胶成像分析仪进行 ECL 化学发光显影。实验结果由凝胶成像系统采集图像,数据由 Quantity One 软件分析。

3.5 细胞旁通透性的检测 取对数生长期的各组 HT29 细胞,按 1×10^5 的密度接种到 Transwell 培养板上,待 Transwell 板中细胞形成紧密单层后,按 100 nmol/L 的 CRF 加入培养基中,72 h 后于 Transwell 上室加入 1 g/L dextran-FITC 100 μ L,下室加入 500 μ L PBS,避光置于 37 °C 恒温细胞培养箱中,分别于 0.5 h、1 h 和 2 h 后从 Transwell 板底部取 100 μ L PBS,置于 96 孔板上,利用荧光分光光度计测量浓度,激发波长设定在 488 nm,发射波长设定在 525 nm。根据标准曲线计算 dextran-FITC 浓度。

3.6 电镜观察 将 2 组细胞调整至每孔 1×10^5 接种于 6 孔板,加药 72 h 后用细胞刮器将细胞刮下后固定细胞于 2.5% 戊二醛内 (>48 h)。按漂洗、固定、脱水、包埋、聚合、修块和切片染色顺序处理细胞。染色后将超薄切片放至单孔铜网上,电镜观察条件:Tecnai 10 透射电镜,高压 80 kV,照相。

3.7 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 活性的测定 对 HT29 细胞培养至 90% 融合,加 100 nmol/L CRF 分别于 5 min、10 min、30 min、1 h 和 2 h 收集细胞样本,加入裂解液裂解细胞,收集并测定蛋白浓度。按照 PKC 活性试剂盒说明书进行检测,并计算 PKC 活性。并根据此次结果,采用 100 nmol/L CRF 处理慢病毒感染后的各组 HT29 细胞并收集细胞样本,进行 PKC 活性检测。

4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件对实验数据进行处理,符合正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。两组样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 HT29 细胞表面 CRF 受体的表达

激光共聚焦显微镜显示,红色为 CRFR1 及 CRFR2 特异荧光,蓝色为 DAPI 核染,提示 HT29 表面存在 CRFR1 及 CRFR2 表达,见图 1。

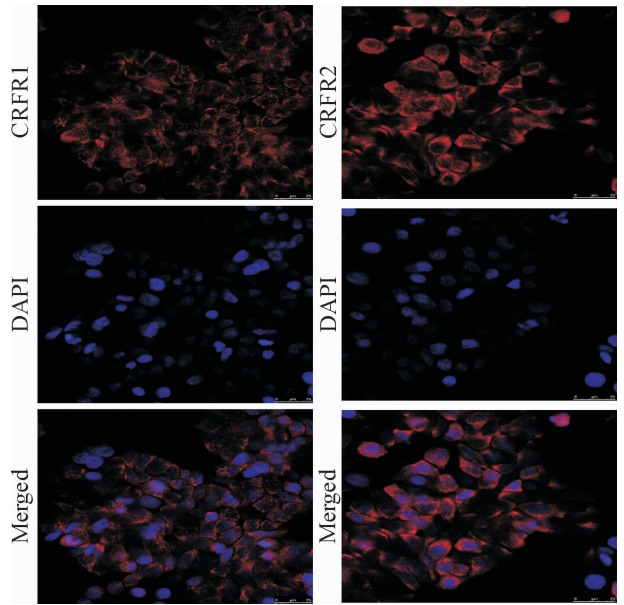


Figure 1. The expression of CRFR1 and CRFR2 in the HT29 cells was examined by immunofluorescence staining ($\times 200$). CRFR1 and CRFR2 expression on the HT29 cell membrane was examined after stained with Cy3-labelled antibodies (red). DAPI was used to counterstain the nucleus (blue).

图 1 HT29 细胞株 CRFR1 及 CRFR2 免疫荧光染色观察

2 CRF 对 HT29 细胞旁通透性及细胞紧密连接超微结构的影响

Transwell 实验结果提示,与对照组相比,HT29 细胞在给予 100 nmol/L CRF 0.5 h,细胞通透性改变的差异无统计学显著性,而给药 1 h 和 2 h 时,细胞通透浓度均增加 ($P < 0.05$),见图 2A。电镜观察结果提示,对照组的 HT29 细胞间的紧密连接结构完整,通道关闭,连接致密(黄色剪头所示),而 100 nmol/L CRF 处理后细胞紧密连接结构不完整,连接疏松,通道开放(红色剪头所示),见图 2B。

3 CRF 对 HT29 细胞 CK8 及紧密连接蛋白表达的影响

Western blot 结果提示,与对照组对比,CRF 处理后 HT29 细胞 CK8 的蛋白表达上调,而 occludin 及 ZO-1 的蛋白表达均下调 ($P < 0.05$),见图 3A。共聚焦显微镜提示,红色为 CK8 特异荧光,蓝色为 DAPI 核染,与对照组相比,CRF 处理后,HT29 细胞表面 CK8 荧光强度增加,并在细胞膜上聚集,见图 3B。

4 PKC 活性的变化

与对照组相比,HT29 细胞在 CRF 处理后 1 h PKC 活性降低最为显著 (0.44 ± 0.05 vs 0.27 ± 0.05 , $P < 0.05$)。

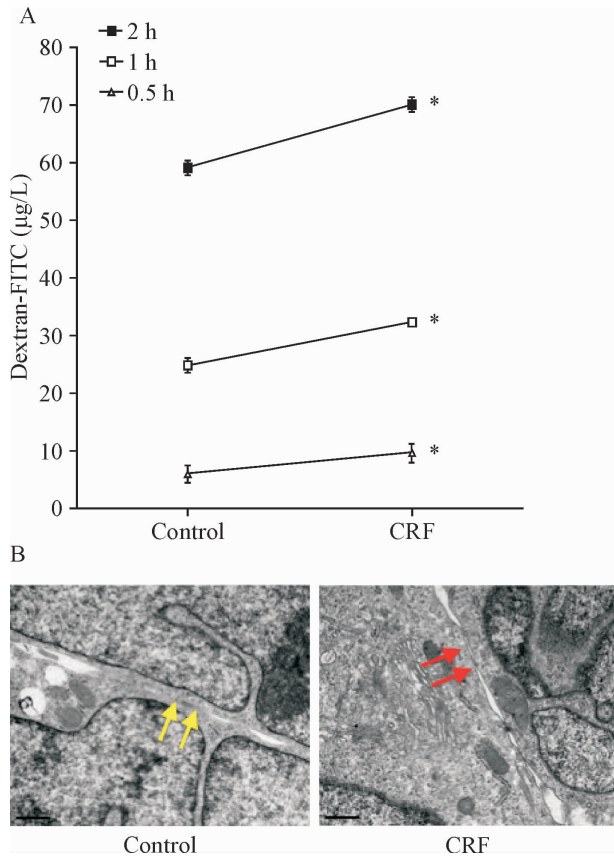


Figure 2. The effects of CRF on the paracellular permeability and ultrastructure of tight junctions (TJs) in the HT29 cells. A: the paracellular permeability of HT29 cells, as indicated by dextran-FITC, was measured using a fluorescence spectrophotometer; B: the ultrastructure of TJs was observed under a transmission electron microscope ($\times 8\ 300$). The cells in CRF group were treated with 100 nmol/L CRF for 72 h. TJs were shown by arrows. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs the respective control group.

图2 CRF对HT29细胞旁通透性及紧密连接结构的影响

5 CK8 基因沉默

Real-time PCR 结果显示,sh-CK8 组 CK8 mRNA 的表达水平(0.12 ± 0.004)显著低于对照组(1.24 ± 0.05)和 sh-NC 组(1.00 ± 0.08) ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,sh-CK8 组 CK8 蛋白的相对表达量显著低于对照组和 sh-NC 组 ($P < 0.05$),见图 4。这提示感染 sh-CK8 慢病毒可显著降低 CK8 的蛋白表达水平。

6 CK8 沉默后 CRF 对 HT29 细胞旁通透性及相关蛋白的影响

Transwell 结果提示,CK8 沉默后,sh-NC 和 sh-CK8 组给予 100 nmol/L CRF 处理 72 h,在 2 h 细胞通透浓度分别为 (41.04 ± 1.33) mg/L 和 ($40.58 \pm$

1.63) mg/L,且差异无统计学意义。Western blot 结果表明,sh-CK8 + CRF 组 ZO-1 的表达对比 sh-CK8 组无明显差异,而 sh-NC + CRF 组 ZO-1 的表达明显低于 sh-CK8 + CRF 组 ($P < 0.05$),见图 5A; CRF 处理后,各组 occludin 则表达下调 ($P < 0.05$),见图 5B。在 CRF 处理 1 h 后,sh-NC + CRF 组 PKC 活性对比 sh-NC 组及 sh-CK8 + CRF 组显著降低 (0.48 ± 0.01 vs 0.41 ± 0.01 , $P < 0.05$),sh-CK8 + CRF 组 PKC 活性较 sh-CK8 组无明显差异 (0.43 ± 0.004 vs 0.45 ± 0.04 , $P > 0.05$)。

讨 论

IBS 是临床常见的功能性胃肠病,其发病率呈现出逐年上升的趋势^[8]。近年来,精神心理因素在 IBS 发病中的作用日益受到人们的关注,作为机体应激反应的重要介质,CRF 广泛分布于人类胃肠道,并通过与其受体 CRFR1、CRFR2 以及 CRF 肽类家族相结合,参与应激相关胃肠道功能异常,包括内脏高敏感、肠道动力异常以及肠道黏膜通透性改变等^[9-11]。有研究证实,急性应激释放的 CRF 能够直接作用于肥大细胞脱颗粒,通过分泌炎症介质改变黏膜通透性,引起肠屏障功能的破坏以加重 IBS 腹泻症状^[12-13]。其中,肠上皮紧密连接作为肠黏膜屏障中最重要的连接方式,能够通过维持上皮细胞间的结构稳定及修复上皮细胞间物质运输来调节肠黏膜屏障的通透性^[14-16]。而跨膜蛋白 occludin 及细胞质蛋白 ZO-1 是形成肠上皮紧密连接的关键蛋白,通过与肌动蛋白结合而参与维持其功能稳定^[14, 17]。同时,应激 IBS 动物模型肠黏膜高表达的 CK8,属上皮细胞骨架蛋白,在维持胃肠道上皮的结构和功能方面扮演着重要的角色,与紧密连接相关蛋白之间存在紧密联系^[10, 18]。因此,探明 CRF-CK8 途径与 IBS 的肠黏膜通透性改变之间的关系,可以为明确 IBS 的病理生理机制提供新的视角。

本研究证实,CRF 能够引起肠上皮细胞旁通透性的梯度增加,紧密连接通道开放,结构疏松,同时伴随 CK8 的表达上调,并在胞质内呈颗粒样改变;而紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 均出现表达降低,表明应激相关因子 CRF 不仅可以引起 CK8 表达上调和分布改变,同时伴有紧密连接超微结构破坏,及其相关蛋白在表达水平的不同变化,最终引起肠上皮屏障通透性增高。然而 CK8 基因沉默却不能阻断 CRF 引起的肠上皮细胞通透性增加,细究其具体蛋

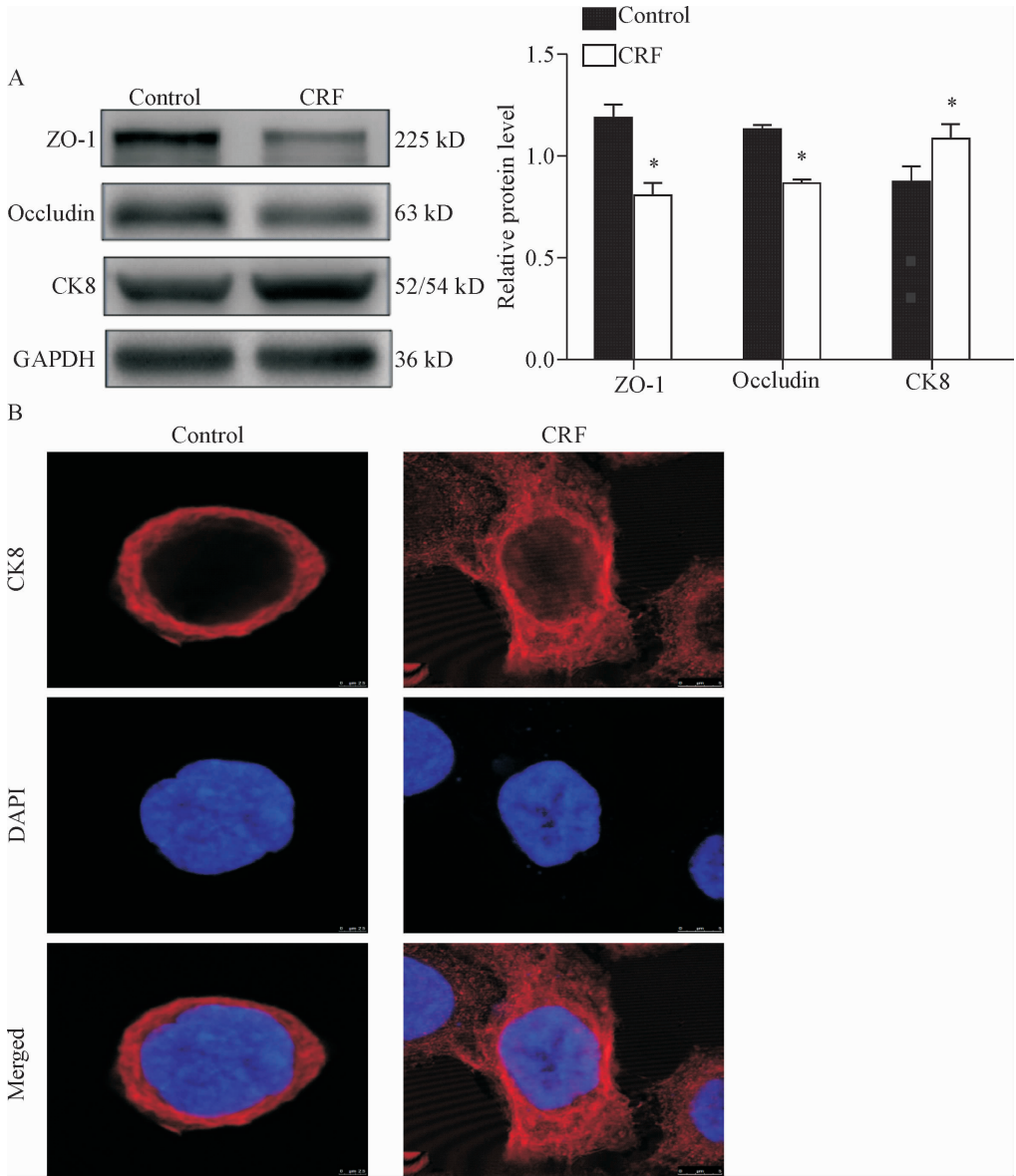


Figure 3. The effects of CRF (100 nmol/L for 72 h) on the expression and distribution of CK8 and tight junction proteins in HT29 cells. A: Western blot analysis of CK8, occludin, and ZO-1 expression in the HT29 cells with or without CRF treatment; B: the expression levels of CK8 in the HT29 cells examined under confocal microscope (×3 000). The HT29 cells were stained with Cy3-labelled antibody against CK8 (red). DAPI was used to counterstain the nucleus (blue). Mean ± SD. n = 4. * P < 0.05 vs control group.

图3 CRF对HT29细胞CK8及紧密连接蛋白表达的影响

白变化,我们发现 occludin 的蛋白表达仍下调,但 ZO-1 的表达下降被成功抑制。我们知道,紧密连接蛋白按分布部位的不同,分为2类:一类为细胞膜蛋白,存在于细胞膜上,通常为跨膜结构,是构成选择性屏障功能的结构蛋白;另一类为细胞质蛋白,位于细胞质内,能与多种蛋白质结合,起连接膜蛋白与细胞骨架或传递信号分子的作用^[14]。有研究指出,胞质蛋白 ZO-1 在稳定上皮紧密连接中具有关键作用,其 PDZ 区域可与跨膜蛋白 occludin 相互连接并相互

作用,一旦 ZO-1 发生破坏,紧密连接的功能多随之改变^[15, 19-21]。结合本研究结果,我们推测 CRF 能够通过上调 CK8 介导肠上皮紧密连接 ZO-1 低表达来增加肠上皮通透性。但本研究中,occludin 在给予 CRF 刺激后蛋白表达仍下调,同时,肠上皮细胞通透性也未见明显差异,这说明 CRF 对肠上皮细胞紧密连接的破坏是多途径的,即使阻断了 CRF-CK8 途径,但由于仍存在跨膜紧密连接蛋白的破坏,因此并不能逆转 CRF 刺激后肠上皮通透性的增加。

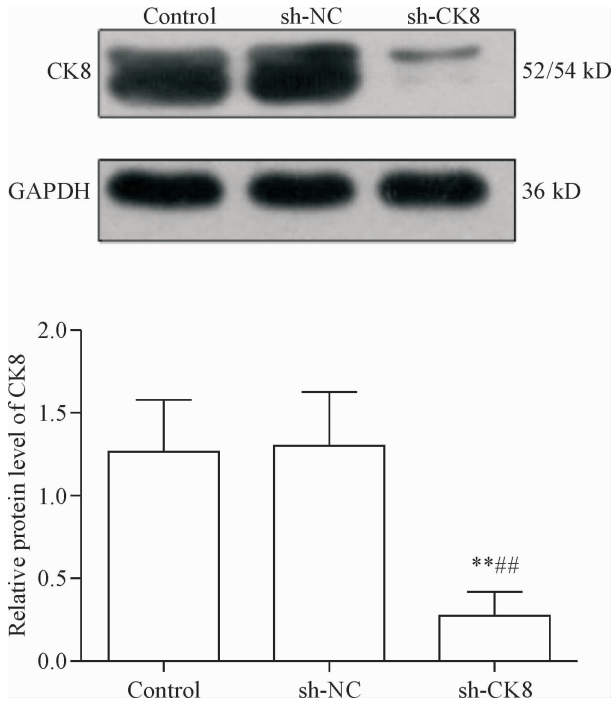


Figure 4. The protein expression of CK8 in the HT29 cells infected with sh-CK8 lentivirus. Western blot analysis revealed the significant down-regulation of CK8 protein expression in the sh-CK8 group. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group; *** $P < 0.01$ vs sh-NC group.

图4 基因沉默后 CK8 蛋白的表达

PKC 属于丝氨酸/苏氨酸激酶超家族一员,通过介导下游信号通路,参与细胞活化、增殖及分化等多种生物学功能。而大量研究显示,PKC 介导的信号通路通过诱导紧密连接蛋白表达分布改变,直接调节紧密连接而在上皮屏障中发挥重要作用,同时,ZO-1 和 occludin 等紧密连接相关蛋白上存在 PKC 的定位点^[22]。有研究报道,佛波酯刺激人结肠癌上皮细胞 T84 细胞株 24 h 后,可以引起 PKC 活性下调并与其上皮通透性增加相关^[23]。而本研究亦发现,CRF 刺激 1 h 后 PKC 活性明显下降。同时,CK8 被报道可能参与 PKC 信号通路调控肌动蛋白的改变^[24],因此,在 CK8 基因沉默后 CRF 并不能引起 PKC 活性的下调。由此,我们推测,CRF 可能通过上调 CK8 抑制 PKC 途径介导紧密连接 ZO-1 低表达及结构紊乱参与调节肠上皮通透性改变。

结合已有的研究结果,我们认为 CRF 引起的肠上皮通透性增加可能与 CK8 表达增加有关,即 CRF 作用于肠上皮细胞可上调 CK8 表达,从而抑制 PKC 信号通路,降低紧密连接蛋白 ZO-1 的表达。同时亦存在其它途径共同参与 CRF 导致的肠上皮屏障受损,具体机制待进一步阐明。

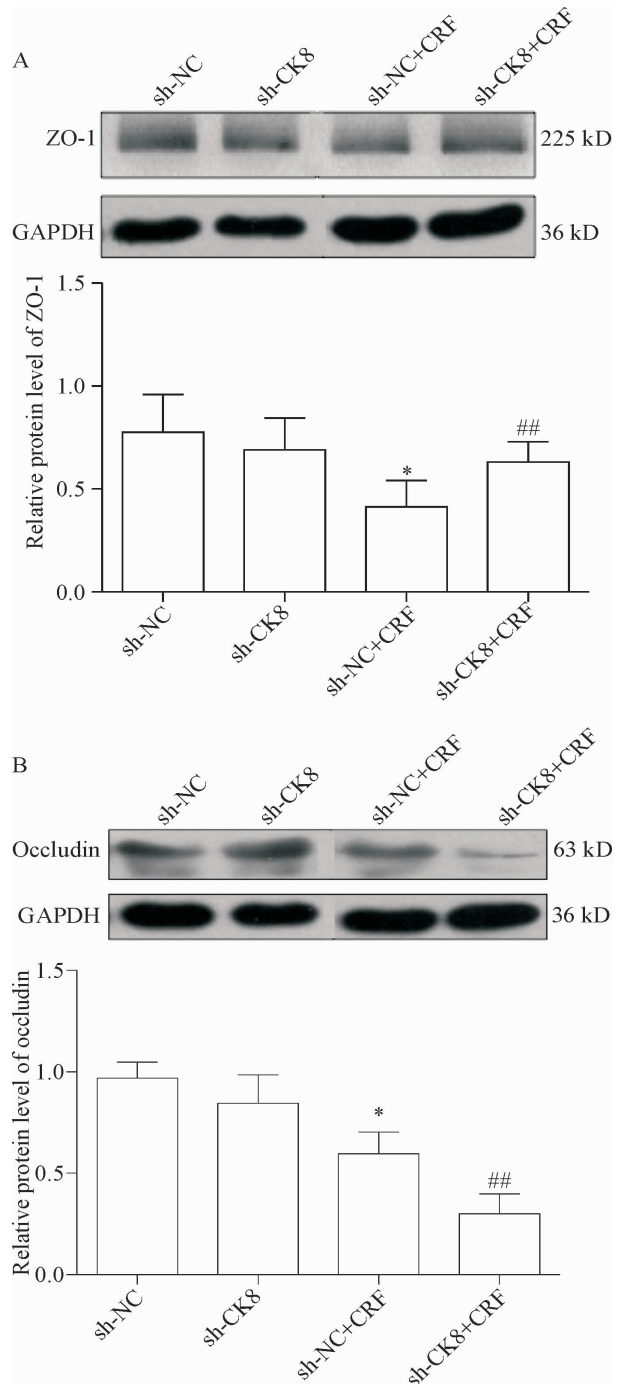


Figure 5. The effects of CRF (100 nmol/L for 72 h) on the expression of tight junction-related proteins in CK8-silencing HT29 cells were detected by Western blot analysis. A: Western blot analysis was used to determine the protein expression of ZO-1 in sh-NC and sh-CK8 HT29 cells with or without CRF treatment; B: Western blot analysis was used to determine the protein expression of occludin in the sh-NC and sh-CK8 HT29 cells with or without CRF treatment. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs sh-NC group; ** $P < 0.05$ vs sh-NC + CRF group.

图5 CRF 对 CK8 基因沉默后 HT29 细胞 ZO-1 及 occludin 蛋白表达的影响

[参 考 文 献]

- [1] Chang JY, Locke GR, McNally MA, et al. Impact of functional gastrointestinal disorders on survival in the community [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(4):822-832.
- [2] Piche T, Barbara G, Aubert P, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators [J]. *Gut*, 2009, 58(2):196-201.
- [3] Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation [J]. *Gut*, 2014, 63(5):744-752.
- [4] Martínez C, Rodiño-Janeiro BK, Lobo B, et al. miR-16 and miR-125b are involved in barrier function dysregulation through the modulation of claudin-2 and cingulin expression in the jejunum in IBS with diarrhoea [J]. *Gut*, 2017, 66(9):1537-1538.
- [5] Wallon C, Persborn M, Jönsson M, et al. Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2011, 40(5):1597-1607.
- [6] Buckley MM, O' Halloran KD, Rae MG, et al. Modulation of enteric neurons by interleukin-6 and corticotropin-releasing factor contributes to visceral hypersensitivity and altered colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome [J]. *J Physiol*, 2014, 592(23):5235-5250.
- [7] Ding Y, Lu B, Chen D, et al. Proteomic analysis of colonic mucosa in a rat model of irritable bowel syndrome [J]. *Proteomics*, 2010, 10(14):2620-2630.
- [8] Lovell RM, Ford AC. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(7):712-721.
- [9] Larauche M, Mulak A, Taché Y. Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies [J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1):49-67.
- [10] Wallon C, Persborn M, Jönsson M, et al. Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2011, 40(5):1597-1607.
- [11] Gourcerol G, Wu SV, Yuan PQ, et al. Activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 mediates the colonic motor coping response to acute stress in rodents [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(5):1586-1596. e6.
- [12] Keita AV, Söderholm JD, Ericson AC. Stress-induced barrier disruption of rat follicle-associated epithelium involves corticotropin-releasing hormone, acetylcholine, substance P, and mast cells [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22(7):770-778.
- [13] Teitelbaum AA, Gareau MG, Jury J, et al. Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(3):G452-G459.
- [14] Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(1):55-70.
- [15] Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(6):1901-1909.
- [16] Xiao L, Rao JN, Cao S, et al. Long noncoding RNA SPRY4-IT1 regulates intestinal epithelial barrier function by modulating the expression levels of tight junction proteins [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(4):617-626.
- [17] Citi S, Denisenko N. Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(Pt 8):2917-2926.
- [18] Fortier AM, Asselin E, Cadrin M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(16):11555-11571.
- [19] Gonzalez-Mariscal L, Quiros M, Diaz-Coranguéz M. ZO proteins and redox-dependent processes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(5):1235-1253.
- [20] van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function [J]. *J Anat*, 2002, 200(6):549-560.
- [21] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation [J]. *Cell*, 2006, 126(4):741-754.
- [22] Sjöä, Magnusson KE, Peterson KH. Protein kinase C activation has distinct effects on the localization, phosphorylation and detergent solubility of the claudin protein family in tight and leaky epithelial cells [J]. *J Membr Biol*, 2010, 236(2):18118-18119.
- [23] Hecht G, Robinson B, Koutsouris A. Reversible disassembly of an intestinal epithelial monolayer by prolonged exposure to phorbol ester [J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(2 Pt 1):G214-G221.
- [24] Ridge KM, Linz L, Flitney FW, et al. Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(34):30400-30405.