

# 紧密连接蛋白与烧伤后肠道屏障功能障碍研究进展

刘行 王凤君

紧密连接(tight junction)是维护肠道屏障功能的主要因素。严重烧伤后多种原因可破坏肠上皮紧密连接,引起肠道屏障功能损害,细菌和(或)内毒素入血,引发肠源性感染、全身性炎症反应、MODS或MOF等。了解紧密连接在烧伤后肠道屏障功能障碍中的作用,可为今后防治工作提供新思路。

## 1 紧密连接与肠道屏障

肠道屏障分为机械屏障、免疫屏障、生物屏障、化学屏障,其中以机械屏障最为重要,而肠上皮细胞及细胞间连接是机械屏障的决定因素。细胞间连接有紧密连接、缝隙连接、黏附连接及桥粒连接等,尤以紧密连接最为重要<sup>[1-2]</sup>。作为跨上皮转运的限速结构,紧密连接只允许离子及可溶性小分子通过,不允许大分子物质及微生物通过。紧密连接主要由紧密连接蛋白组成,包括咬合蛋白(occludin)、闭合蛋白(claudin)家族、带状闭合蛋白(zonula occludens, ZO)家族、连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM)等。紧密连接处于相对稳定的动态重塑过程中,且受多种因素的调节,如Ca<sup>2+</sup>-E-钙黏素、Rho-鸟苷三磷酸(GTP)酶、磷脂酶C、蛋白激酶A、酪氨酸激酶-磷酸酶、MAPK等。

咬合蛋白为II型跨膜蛋白,胞内C端与ZO等连接。它对维持细胞间通透性及跨上皮电阻(trans epithelial resistance, TER)有重要意义,其功能依赖于丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化,蛋白激酶C(PKC)、小GTP酶信号通路参与了咬合蛋白磷酸化的调控。闭合蛋白家族包括20多个成员,均含有易变氨基酸残基的回形结构及胞内短尾结构,相邻细胞的闭合蛋白胞外环可相互作用。闭合蛋白形成细

胞间离子门孔,决定肠上皮屏障的细胞旁途径特性。ZO是膜相关鸟苷酸激酶(GUK)家族成员,有ZO-1、ZO-2、ZO-3异构体,含GUK样结构域、PDZ结构域、富含脯氨酸结构域等保守序列,这些序列参与ZO与其他蛋白的连接。通过PDZ结构域,ZO与闭合蛋白的C端连接,对紧密连接的形成尤其是闭合蛋白在胞膜的定位和聚集起关键作用;通过GUK结构域和酸性结构域,ZO与咬合蛋白相连;通过C端的富含脯氨酸结构域,ZO结合肌动蛋白和应力纤维再与肌动蛋白骨架系统相连,使信号在胞内的细胞骨架与胞外的连接蛋白间传递。ZO的N端与缝隙连接等相连。JAM为免疫球蛋白超基因家族成员,由2个胞外的免疫球蛋白回形结构、1个跨膜区、1个带有PDZ绑定序列的胞内区构成,发挥细胞间黏附、结合装配等作用。

## 2 烧伤后肠道紧密连接屏障功能障碍的机制

### 2.1 应激反应

烧伤后的应激反应在肠道屏障功能障碍的发生中具有重要作用。接受应激刺激的C<sub>57</sub>BL/6J小鼠结肠通透性、肠道细菌移位及γ干扰素等炎症介质明显增加,而重度联合免疫缺陷及γ干扰素基因敲除小鼠在接受应激刺激后无上述反应,表明CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和γ干扰素参与了应激后肠道屏障功能障碍。肌球蛋白轻链激酶(MLCK)抑制剂能明显减轻应激后肠道屏障功能障碍及肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化,提示MLC磷酸化可能是应激后肠道屏障功能障碍的分子机制之一。应激能引起肠上皮细胞分化改变,ZO-2及咬合蛋白mRNA表达减少而致屏障功能障碍,其机制与肥大细胞脱颗粒有关。肥大细胞脱颗粒释放类胰蛋白酶,裂解肠上皮细胞基底外侧膜的蛋白酶活化受体2(protease-activated receptor 2),引起抑制蛋白依赖性细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)活化,ZO-1、咬合蛋白及纤维状肌动蛋白重新排列,肠上皮通透性增加<sup>[3]</sup>。

### 2.2 缺血缺氧与缺血再灌注损伤

缺血缺氧引起的代谢性酸性环境能使肠上皮细

DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2010.05.008

基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主研究课题(SKLLZ200818)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:王凤君,Email:wangfj@mail.tmmu.com.cn,电话:023-68754176

胞紧密连接结构变得疏松。研究表明,烧伤休克期肠道通透性增加的同时,肠上皮细胞连接处 ZO-1 减少并重新分布,细胞骨架纤维状肌动蛋白也重新排列<sup>[4]</sup>。另有学者观察到,烧伤后早期肠道通透性增加的同时有 ZO-1 及咬合蛋白重新分布,细胞连接处 ZO-1 及咬合蛋白减少<sup>[5]</sup>。失血性休克后 30 min 肠道通透性及细菌移位即增加,肌动蛋白解聚因子丝切蛋白(cofilin)被激活,纤维状肌动蛋白解聚,ZO-1 和闭合蛋白 3 减少<sup>[6]</sup>。紧密连接蛋白改变,可能是烧伤后早期缺血缺氧时肠道屏障功能障碍的重要机制之一。缺氧能引起培养的肠上皮细胞单层屏障功能障碍,ZO-1 形态改变,分子机制与 MLCK 所介导的 MLC 磷酸化增加有关<sup>[7]</sup>。

缺血再灌注时产生大量氧自由基,既直接损伤肠上皮,又通过激活补体、介导炎症介质释放、诱导细胞凋亡等引起肠道屏障功能损害。自由基引起肠上皮细胞骨架纤维状肌动蛋白解聚并重新排列,损害肠上皮屏障,其机制与 PKC-λ 激活有关。缺血再灌注大鼠回肠屏障功能损害与 ZO-1、咬合蛋白及闭合蛋白 1、2、3、4、5 表达改变有关<sup>[8]</sup>。新近研究显示,ZO-1、咬合蛋白及闭合蛋白 1、3、5 的重分布参与了缺血再灌注引起的肠道屏障功能障碍,窖蛋白 1 介导了紧密连接蛋白的重新分布<sup>[9]</sup>。

### 2.3 炎症介质

烧伤后 γ 干扰素、TNF-α、IL-1β、IL-6 等炎症介质大量释放可影响肠上皮紧密连接,引起肠道屏障功能障碍。研究表明,γ 干扰素单独或与其他细胞因子联合作用,均可引起肠上皮屏障功能障碍,但与细胞凋亡关系不大<sup>[10-11]</sup>。紧密连接蛋白表达减少和(或)重新分布,可能是 γ 干扰素引起肠上皮屏障功能障碍的重要机制。γ 干扰素激活 Rho-GTP 酶,诱导 Rho 相关激酶(ROCK)表达上调,经 RhoA/ROCK 信号途径引起紧密连接蛋白被内吞,咬合蛋白、JAM-A 和闭合蛋白 1 重新分布,肠上皮屏障功能受损。研究表明,γ 干扰素通过诱导 TNF 受体 2 表达而与 TNF-α 协同引起 MLCK 蛋白表达增加,通过 MLCK-MLC 磷酸化通路使 ZO-1、咬合蛋白及闭合蛋白 1 重新分布,导致肠上皮屏障功能受损<sup>[12]</sup>。此外,γ 干扰素通过活化腺苷-磷酸激活的蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase),引起 ZO-1 及咬合蛋白表达降低致肠上皮屏障功能损害<sup>[13]</sup>。由此可见,γ 干扰素通过多种信号通路引起紧密连接蛋白改变,继而损害肠上皮屏障功能。

TNF-α 既可单独作用,也可与其他细胞因子协

同作用损害肠上皮屏障功能。其机制包括诱导肠上皮细胞凋亡、改变细胞膜脂质组成、通过 Ca<sup>2+</sup>-钙调蛋白激活 MLCK 活性,诱导 MLCK 蛋白表达而引起 MLC 磷酸化、抑制紧密连接蛋白表达并重新分布等,其中 MLCK 在 TNF-α 引起的肠上皮屏障功能障碍中起重要作用。TNF-α 激活 NF-κB,活化的 NF-κB 与 MLCK 基因启动子的 NF-κB 结合位点结合,启动 MLCK 基因转录,MLCK 蛋白表达及酶活性增加,导致肠上皮屏障功能障碍<sup>[14]</sup>。研究表明,TNF-α 与 γ 干扰素协同引起肠上皮屏障功能损害,TNF-α 的作用有剂量依赖性,由 TNF 受体 2 介导,其作用机制是通过激活蛋白 1 诱导 MLCK 基因转录,使 MLCK 蛋白表达及 MLC 磷酸化增加,引起 ZO-1、咬合蛋白及闭合蛋白 1 重分布,致肠上皮 TER 降低及通透性增加<sup>[12,15-16]</sup>。窖蛋白 1 依赖性的咬合蛋白内吞,可能是 TNF-α 引起紧密连接结构和功能损害的另一重要机制<sup>[17]</sup>。有学者观察到,TNF 家族成员 LIGHT(即 TNFSF14)也能通过 MLCK 引起肠上皮屏障功能障碍,LIGHT 的作用由淋巴毒素 β 受体介导,并与窖蛋白 1 依赖性的咬合蛋白内吞有关<sup>[18]</sup>。

IL 能损害肠上皮屏障功能。IL-1β 引起肠上皮紧密连接通透性增加,主要与咬合蛋白基因和蛋白表达降低以及发生重新分布有关。NF-κB 激活所引起的 MLCK 基因转录增加,是 IL-1β 损害肠上皮屏障功能的部分机制<sup>[19]</sup>。IL-1β 还引起 ERK1/2 活化,进而激活下游核转录因子 Elk-1 使其转位入核,与 MLCK 基因启动子中的顺式作用元件结合,引起 MLCK 基因转录及蛋白表达增加,导致肠上皮屏障功能障碍<sup>[20]</sup>。IL-4 可通过磷脂酰肌醇-3 激酶损害肠道屏障功能。IL-6 的作用存在争议,有 IL-6 能直接引起肠上皮 TER 降低及通透性增加的报道;也有研究认为,IL-6 通过诱导细胞骨架中间丝角蛋白 8 及 18 表达,对肠道屏障功能有保护作用<sup>[21]</sup>。IL-13 在肠道屏障功能障碍的发生中也有一定作用<sup>[22]</sup>。

### 2.4 细菌及内毒素

肠道致病性大肠杆菌(EPEC)对肠道屏障功能损害的研究较多。EPEC 利用其 III 型分泌系统,将致病性效应蛋白 EspF、EspG、EspH、Map 等注入肠上皮细胞,引起细胞骨架塌陷、紧密连接蛋白重分布<sup>[23]</sup>。EPEC 感染后肠上皮 TER 降低、通透性增加,紧密连接超微结构及 ZO-1、咬合蛋白、闭合蛋白 1 间的相互作用受损。EPEC 感染小鼠的肠道屏障功能受损,且 ZO-1、咬合蛋白、闭合蛋白 1 发生重分布,EPEC 的作用依赖于致病性效应蛋白 EspF<sup>[24]</sup>。

值得注意的是, EPEC 对肠道屏障功能的损害也与 MLCK-MLC 磷酸化通路的激活有关。新近研究表明, 侵袭性大肠杆菌也可引起肠上皮 ZO-1、咬合蛋白、闭合蛋白 1 及 JAM-1 蛋白表达降低及重分布, 导致肠上皮屏障功能障碍<sup>[25]</sup>。

从紧密连接蛋白角度研究内毒素损害肠道屏障功能的报道较少, 但有学者观察到, 受 LPS 攻击小鼠的肠道通透性及细菌移位增加, 肠上皮紧密连接开放, LPS 损害肠道屏障功能的作用依赖于 MLCK。LPS 能引起 ZO-1、咬合蛋白、闭合蛋白 1 及闭合蛋白 4 重分布, ZO-1 表达减少, 而 c-Src、Toll 样受体 4 及 LPS 结合蛋白介导了 LPS 的作用<sup>[26]</sup>。

综上所述, 参与严重烧伤后肠道屏障功能障碍发生的因素很多, 而 MLCK-MLC 磷酸化通路介导的肠上皮紧密连接改变可能是重要环节。因此, 针对 MLCK-MLC 磷酸化通路改变寻找有效的防治措施, 可能是调控烧伤后肠上皮紧密连接改变、维护肠道屏障功能的一个努力方向。

#### 参考文献

- [1] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(11):799-809.
- [2] Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5:119-144.
- [3] Jacob C, Yang PC, Darmoul D, et al. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem*, 2005, 280(36):31936-31948.
- [4] 陈传莉, 刘依凌, 王裴, 等. 严重烧伤后肠黏膜肌球蛋白轻链磷酸化表达改变及其意义. *第三军医大学学报*, 2008, 30(15):1434-1437.
- [5] Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, et al. Burn-induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition; effects on tight junction structural proteins. *Shock*, 2009, 31(4):416-422.
- [6] Thuijls G, de Haan JJ, Derikx JP, et al. Intestinal cytoskeleton degradation precedes tight junction loss following hemorrhagic shock. *Shock*, 2009, 31(2):164-169.
- [7] 王裴, 陈传莉, 李牧, 等. 肌球蛋白轻链激酶介导缺氧后肠上皮屏障功能紊乱的研究. *中华烧伤杂志*, 2009, 25(1):57-60.
- [8] Inoue K, Oyamada M, Mitsufuji S, et al. Different changes in the expression of multiple kinds of tight-junction proteins during ischemia-reperfusion injury of the rat ileum. *Acta Histochem Cytochem*, 2006, 39(2):35-45.
- [9] Li Q, Zhang Q, Wang C, et al. Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(9B):4061-4076.
- [10] Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*, 2003, 171(11):6164-6172.
- [11] Beaupaire C, Smyth D, McKay DM. Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability. *J Interferon Cytokine Res*, 2009, 29(3):133-144.
- [12] Wang F, Schwarz BT, Graham WV, et al. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology*, 2006, 131(4):1153-1163.
- [13] Scharl M, Paul C, Barrett KE, et al. AMP-activated protein kinase mediates the interferon-gamma-induced decrease in intestinal epithelial barrier function. *J Biol Chem*, 2009, 284(41):27952-27963.
- [14] Ye D, Ma TY. Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumor necrosis factor-alpha-induced regulation of myosin light chain kinase gene activity. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(4):1331-1346.
- [15] Wang F, Graham WV, Wang Y, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol*, 2005, 166(2):409-419.
- [16] Graham WV, Wang F, Clayburgh DR, et al. Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events. Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter. *J Biol Chem*, 2006, 281(36):26205-26215.
- [17] Marchiando AM, Shen L, Graham WV, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol*, 2010, 189(1):111-126.
- [18] Schwarz BT, Wang F, Shen L, et al. LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms. *Gastroenterology*, 2007, 132(7):2383-2394.
- [19] Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, et al. Mechanism of IL-1 beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*, 2008, 180(8):5653-5661.
- [20] Al-Sadi R, Ye D, Said HM, et al. Cellular and molecular mechanism of interleukin-1 beta modulation of CACO-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J Cell Mol Med*, 2010, E1[2010-04-27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. [published online ahead of print April 7, 2010].
- [21] Wang L, Srinivasan S, Theiss AL, et al. Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *J Biol Chem*, 2007, 282(11):8219-8227.
- [22] Weber CR, Raleigh DR, Su L, et al. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem*, 2010, 285(16):12037-12046.
- [23] Guttman JA, Finlay BB. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(4):832-841.
- [24] Zhang Q, Li Q, Wang C, et al. Enteropathogenic Escherichia coli changes distribution of occludin and ZO-1 in tight junction membrane microdomains in vivo. *Microb Pathog*, 2010, 48(1):28-34.
- [25] Qin H, Zhang Z, Hang X, et al. L. plantarum prevents enteroinvasive Escherichia coli-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol*, 2009, 9:63.
- [26] Sheth P, Delos Santos N, Seth A, et al. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(1):G308-318.

(收稿日期:2010-04-27)

(本文编辑:张红)