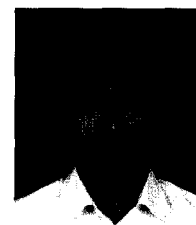


· 论著 ·

γ 干扰素与肿瘤坏死因子 α 对肠上皮屏障功能影响的实验研究

刘行 王裴 王凤君



【摘要】 目的 观察炎症介质 γ 干扰素及 TNF-α 联合作用对肠上皮屏障功能的影响并探讨其分子机制。方法 建立人肠上皮细胞株 Caco-2 单层细胞培养模型,分别在预处理的 24 孔板与 6 孔板中采用 DMEM 培养基培养。将 2 种培养板中细胞均按随机数字表法分为对照组(常规培养)、γ 干扰素组(加入终浓度为 10 ng/mL γ 干扰素培养)、TNF-α 组(加入终浓度为 10 ng/mL TNF-α 培养)、γ 干扰素 + TNF-α 组(加入终浓度均为 10 ng/mL 的 γ 干扰素与 TNF-α 培养)。24 孔板细胞处理后 0 h (即刻)及 6、12、24、36、48 h,用电阻测定仪检测肠上皮细胞跨上皮电阻(TER);于 48 h 分别采用异硫氰酸荧光素-葡聚糖荧光示踪法与免疫荧光法,检测肠上皮细胞通透性及紧密连接咬合蛋白的分布与形态变化。6 孔板细胞处理 24 h 时,用蛋白质印迹法检测咬合蛋白、磷酸化肌球蛋白轻链(pMLC)、肌球蛋白轻链激酶(MLCK)蛋白表达。对数据进行单因素方差分析与 *t* 检验。结果 (1)对照组各时相点肠上皮细胞 TER 无明显变化($F = 0.86, P > 0.05$);γ 干扰素组与 TNF-α 组 TER 虽逐渐降低,但与处理后 0 h 比较差异均无统计学意义(F 值分别为 1.69、2.47, P 值均大于 0.05);γ 干扰素 + TNF-α 组 TER 从 24 h 起显著低于处理后 0 h ($t = 4.97, P < 0.05$),并明显低于其余 3 组($F = 11.54, P < 0.05$)。(2)γ 干扰素 + TNF-α 组的肠上皮细胞通透性[(1197 ± 215) pmol]显著高于对照组、γ 干扰素组与 TNF-α 组[(303 ± 93)、(328 ± 76)、(797 ± 177) pmol, t 值分别为 4.8、5.0、6.9, P 值均小于 0.01]。(3)24 h 时各组咬合蛋白表达量无明显变化($F = 0.26, P > 0.05$)。48 h 时对照组咬合蛋白排列规则;γ 干扰素组及 TNF-α 组咬合蛋白排列不规则;而 γ 干扰素 + TNF-α 组咬合蛋白排列不连续,发生明显重分布,胞质内分布增加。(4)γ 干扰素 + TNF-α 组 pMLC 蛋白表达量(0.95 ± 0.05)显著高于对照组、γ 干扰素组与 TNF-α 组(0.57 ± 0.12、0.56 ± 0.07、0.59 ± 0.10, $F = 17.97, P < 0.01$),MLCK 蛋白表达量(1.57 ± 0.36)也显著高于其余 3 组(0.85 ± 0.18、1.04 ± 0.23、1.00 ± 0.07, $F = 9.05, P < 0.05$)。结论 γ 干扰素与 TNF-α 联合作用通过增加 MLCK 及 pMLC 蛋白表达,引起肠上皮屏障功能损害。

【关键词】 干扰素 II 型; 肿瘤坏死因子 α; 肌球蛋白轻链; 肠上皮细胞; 屏障功能; 咬合蛋白

An experimental study on intestinal epithelial barrier dysfunction induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha LIU Hang, WANG Pei, WANG Feng-jun. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: WANG Feng-jun, Email: wangfj@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68754176

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of combination of interferon-gamma (IFN-γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) on intestinal epithelial barrier function. **Methods** The Caco-2 monolayers were cultured in DMEM nutrient solution, and then they were inoculated in 24-well or 6-well plate with Transwell inserts. They were divided into control group (ordinary treatment), IFN-γ group (with addition of 10 ng/mL IFN-γ), TNF-α group (with addition of 10 ng/mL TNF-α), and IFN-γ plus TNF-α group (with addition of 10 ng/mL TNF-α and 10 ng/mL IFN-γ). Monolayers inoculated in 24-well plate were collected for determination of transepithelial electrical resistance (TER) with an ohmmeter at post treatment hour (PTH) 0, 6, 12, 24, 36, and 48, the permeability of monolayers with fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran) tracer method at PTH 48, the distribution and morphological change of

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.02.019

基金项目:国家自然科学基金(81070290);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主研究课题(SKZZ200818)

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

tight junction occludin with immunofluorescence assay at PTH 48. Monolayers inoculated in 6-well plate were collected for determination of protein expression of occludin, myosin light chain kinase (MLCK), and phosphorylated MLC (pMLC) with Western blot at PTH 24. Data were processed with one-way analysis of variance and *t* test. **Results** (1) There was no obvious difference in TER in control group at each time point ($F = 0.86, P > 0.05$). TER in IFN- γ group and TNF- α group were gradually decreased during PTH 6-48, but showed no statistical difference as compared with that at PTH 0 (with *F* value respectively 1.69, 2.47, *P* values all above 0.05). TER in IFN- γ plus TNF- α group was significantly decreased from PTH 24 as compared with that at PTH 0 ($t = 4.97, P < 0.05$) and that in each of the other three groups ($F = 11.54, P < 0.05$). (2) The permeability of monolayers in IFN- γ plus TNF- α group [(1197 \pm 215) pmol] was significantly higher than that in control group, IFN- γ group, and TNF- α group [(303 \pm 93), (328 \pm 76), (797 \pm 177) pmol, with *t* value respectively 4.8, 5.0, 6.9, *P* values all below 0.01]. (3) There was no statistical difference in occludin expression at PTH 24 among four groups ($F = 0.26, P > 0.05$). The occludin in control group at PTH 48 was regular in arrangement, while that in IFN- γ and TNF- α groups was irregular in arrangement. The arrangement of occludin in IFN- γ plus TNF- α group at PTH 48 was interrupted, with obvious redistribution in cytoplasm. (4) The protein expression of pMLC in IFN- γ plus TNF- α group (0.95 \pm 0.05) was significantly higher than that in control group, IFN- γ group, or TNF- α group (0.57 \pm 0.12, 0.56 \pm 0.07, 0.59 \pm 0.10, respectively, $F = 17.97, P < 0.01$). The protein expression of MLCK in IFN- γ plus TNF- α group (1.57 \pm 0.36) was also significantly higher than that in control, IFN- γ , TNF- α groups (0.85 \pm 0.18, 1.04 \pm 0.23, 1.00 \pm 0.07, respectively, $F = 9.05, P < 0.05$). **Conclusions** Combination of IFN- γ and TNF- α can induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating MLCK protein expression and promoting MLC phosphorylation.

【Key words】 Interferon type II; Tumor necrosis factor-alpha; Myosin light chains; Intestinal epithelial cell; Barrier function; Occludin

尽管严重烧伤早期发生的肠上皮屏障功能损害、通透性增加以及由此引起的全身性病理生理变化已得到普遍认识,但肠上皮屏障功能损害及通透性增加的分子机制至今仍未探明。严重烧伤早期损害的实质主要是缺血缺氧性损害及全身失控性炎症反应,伴有全身及肠道等局部组织中多种炎症介质,如 γ 干扰素、TNF- α 、IL-1、IL-6 等^[1-2] 的大量产生。这些炎症介质是否影响以及如何影响严重烧伤早期肠上皮屏障功能及通透性,目前尚未完全清楚。本实验中,笔者利用体外单层肠上皮细胞模型,观察 γ 干扰素及 TNF- α 对肠上皮屏障功能的影响,并探讨其分子机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胰蛋白酶(美国 BBI 公司), γ 干扰素、TNF- α (美国 R&D 公司),异硫氰酸荧光素(FITC)-葡聚糖(相对分子质量 4×10^3)、鼠尾胶原、抗人 β 肌动蛋白抗体、抗人肌球蛋白轻链激酶(MLCK)抗体(美国 Sigma 公司),兔抗人咬合蛋白抗体(美国 Invitrogen 公司),抗人肌球蛋白轻链(MLC)抗体(美国 Santa Cruz 公司),抗人磷酸化肌球蛋白轻链(pMLC)抗体(美国 Cell Signaling 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(美国 Southern Biotech 公司),Alexa Fluor 488

标记的二抗(美国 Molecular Probes 公司),超敏增强型化学发光(ECL)试剂盒(美国 Pierce 公司),蛋白质印迹相关试剂甘氨酸、丙烯酰胺等(上海生工生物工程技术有限公司)。蛋白测定试剂盒及 ChemiDoc XRS 型凝胶图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),聚偏氟乙烯(PVDF)膜、Millicell-ERS 型电阻测定仪(美国 Millipore 公司),Transwell 培养板(美国 Corning 公司),TCS SP5 型激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 细胞培养、分组与处理

用 DMEM 培养基培养人肠上皮细胞株 Caco-2(美国 ATCC 公司)^[3],将细胞以 5×10^4 个/cm² 接种至 24 孔板的 Transwell 聚碳酸酯膜(预先以 1 g/L 鼠尾胶原包被)及 6 孔板的未包被 Transwell 聚碳酸酯膜上,每 2 天更换 1 次培养液。用电阻测定仪每天测定细胞跨上皮电阻(TER)1 次,待 TER 稳定时进行下述实验。

将 24 孔板与 6 孔板中单层肠上皮细胞均按随机数字表法分为对照组、 γ 干扰素组、TNF- α 组、 γ 干扰素 + TNF- α 组。对照组仅用 DMEM 培养基培养; γ 干扰素组加入终浓度为 10 ng/mL γ 干扰素培养;TNF- α 组加入终浓度为 10 ng/mL TNF- α 培养; γ 干扰素 + TNF- α 组同时加入 γ 干扰素和 TNF- α 培养,终浓度均为 10 ng/mL。24 孔板细胞用于 TER 和通透性测定以及紧密连接咬合蛋白的免疫荧光分析;

6 孔板细胞用于蛋白表达分析。

1.3 检测指标

1.3.1 肠上皮细胞 TER 变化 参照文献[3-4], 测定各组细胞处理后 0 h(即刻)及 6、12、24、36、48 h 的 TER。为便于不同批次间实验结果比较,TER 结果以原始数值的百分数表示。实验重复 5 次。

1.3.2 肠上皮细胞通透性 各组细胞处理 48 h 时,参照文献[4]采用 FITC-葡聚糖荧光示踪法进行检测。预热 D-Hank 液至 37 °C,清洗 Transwell 顶室及底室各 1 次,底室加入 D-Hank 液 500 μL,顶室加入 100 μL FITC-葡聚糖(1 mg/mL),于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下孵育 2 h。取底室液体,用多功能读板仪(芬兰 Thermo 公司)以激发光波长 480 nm、发射光波长 520 nm 测定各种样品荧光强度。按标准曲线计算出 FITC-葡聚糖通过的摩尔量,反映单层肠上皮通透性。实验重复 5 次。

1.3.3 肠上皮细胞紧密连接咬合蛋白的分布与形态变化 各组细胞处理 48 h 时,采用免疫荧光法^[3]检测。用 10 g/L 多聚甲醛固定细胞 30 min,含 1 mmol/L 氯化钙 PBS 漂洗 5 min,加入含 50 mmol/L 氯化铵的 PBS,室温孵育 15 min。漂洗后加入含 25 g/L 牛血清白蛋白、体积分数 0.1% Triton X-100 的 PBS,室温孵育 30 min。加入按 1:50 稀释的兔抗人咬合蛋白抗体 50 μL,4 °C 孵育过夜。用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入 50 μL Alexa Fluor 488 标记的二抗(1:100),室温避光孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。切取聚碳酸酯膜置于载玻片上,指甲油封片。采用激光扫描共聚焦显微镜观察并照相。

1.3.4 肠上皮细胞咬合蛋白、pMLC、MLCK 的表达

各组细胞处理 24 h 时,采用蛋白质印迹法^[3-4]检测。以 4 °C 预冷 PBS 漂洗细胞,加上样缓冲液裂解并超声破碎,以离心半径 82 mm,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 100 °C 水中浸浴 5 min。用蛋白测定试剂盒测定蛋白含量,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜。以 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入抗人 MLCK、MLC、pMLC、咬合蛋白抗体(稀释度均为 1:1000)和 β 肌动蛋白抗体(稀释度为 1:5000),4 °C 孵育过夜。含吐温的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBST)洗膜 4 次,加入按 1:5000 稀释的 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 4 次。用超敏 ECL 试剂盒显影,图像分析系统采集发光信号,以 Quantity One 软件进行灰度分析,目的蛋白与 β 肌动蛋白灰度比值为目的蛋白相对表达量(pMLC 蛋白表达量以其与 MLC 灰度比

值表示)。实验至少重复 4 次。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行多组间比较单因素方差分析、两两比较 *t* 检验。

2 结果

2.1 肠上皮细胞 TER 变化

对照组肠上皮细胞 TER 无明显变化,各时相点间比较,差异无统计学意义($F = 0.86, P > 0.05$)。γ 干扰素组与 TNF-α 组 TER 虽呈缓慢降低趋势,但各时相点与处理后 0 h 比较,差异均无统计学意义(F 值分别为 1.69、2.47, P 值均大于 0.05)。γ 干扰素 + TNF-α 组 TER 也呈逐渐降低趋势,降低幅度大于 γ 干扰素组与 TNF-α 组,24 h 时明显低于 0 h ($t = 4.97, P < 0.05$),36、48 h TER 下降更显著(t 值分别为 7.32、7.41, P 值均小于 0.05)。组间比较显示,γ 干扰素 + TNF-α 组 TER 24 h 时明显低于其余 3 组($F = 11.54, P < 0.05$),持续至 36、48 h(F 值分别为 12.31、8.35, P 值均小于 0.05)。见表 1。

表 1 各组肠上皮细胞跨上皮电阻变化比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	处理后时间				
		6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
对照组	25	100.2 ± 0.7	103.4 ± 1.8	107.0 ± 3.4 ^a	104.7 ± 4.4 ^a	102.5 ± 5.8 ^a
		98.2 ± 1.6	98.3 ± 2.0	100.2 ± 4.0 ^a	98.2 ± 4.3 ^a	87.7 ± 6.1 ^a
γ 干扰素组	25	93.3 ± 3.7	92.1 ± 1.8	89.5 ± 3.3 ^a	84.4 ± 5.6 ^a	84.6 ± 5.1 ^a
		90.7 ± 2.7	82.7 ± 6.3	73.5 ± 4.6 ^b	66.8 ± 4.1 ^b	64.0 ± 4.9 ^b
TNF-α 组	25	93.3 ± 3.7	92.1 ± 1.8	89.5 ± 3.3 ^a	84.4 ± 5.6 ^a	84.6 ± 5.1 ^a
		90.7 ± 2.7	82.7 ± 6.3	73.5 ± 4.6 ^b	66.8 ± 4.1 ^b	64.0 ± 4.9 ^b
γ 干扰素 + TNF-α 组	25	90.7 ± 2.7	82.7 ± 6.3	73.5 ± 4.6 ^b	66.8 ± 4.1 ^b	64.0 ± 4.9 ^b
		90.7 ± 2.7	82.7 ± 6.3	73.5 ± 4.6 ^b	66.8 ± 4.1 ^b	64.0 ± 4.9 ^b

注:处理后即刻(0 h)各组细胞跨上皮电阻均为 100.0%;与 γ 干扰素 + TNF-α 组比较,^a $P < 0.05$;与 0 h 比较,^b $P < 0.05$

2.2 肠上皮细胞通透性

对照组、γ 干扰素组、TNF-α 组、γ 干扰素 + TNF-α 组处理 48 h 时,对 FITC-葡聚糖通透量分别为(303 ± 93)、(328 ± 76)、(797 ± 177)、(1197 ± 215)pmol。γ 干扰素 + TNF-α 组通透量较对照组明显增加($t = 4.8, P < 0.01$),约为对照组的 4 倍;也显著高于 γ 干扰素组与 TNF-α 组(t 值分别为 5.0、6.9, P 值均小于 0.01)。

2.3 肠上皮细胞咬合蛋白的分布与形态变化

免疫荧光染色结果显示,处理 48 h 时,对照组肠上皮细胞紧密连接咬合蛋白主要沿细胞膜分布,圆滑、连续、排列规则(图 1a);γ 干扰素组及 TNF-α 组咬合蛋白亦沿细胞膜分布,但排列不规则,圆滑程

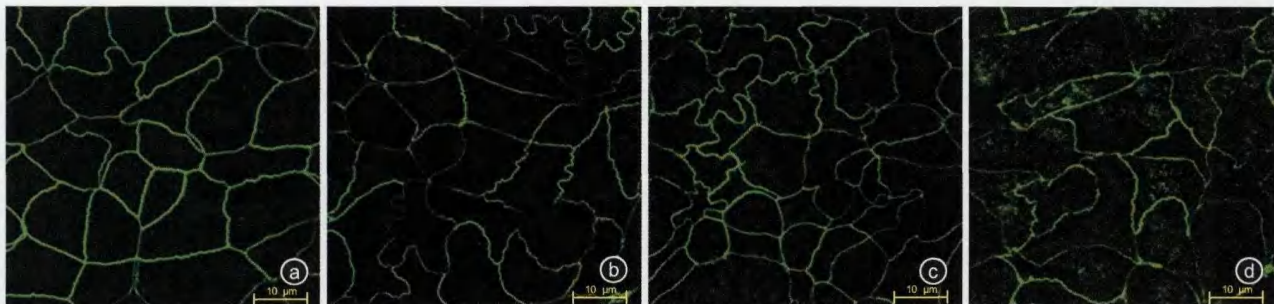
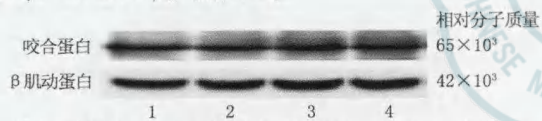


图 1 各组肠上皮细胞处理 48 h 时紧密连接咬合蛋白(绿色标染处)的分布与形态变化 激光扫描共聚焦显微镜,图中标尺全长 10 μm。
a. 对照组咬合蛋白沿细胞膜呈圆滑、连续、规则排列;b、c. γ 干扰素组、TNF-α 组咬合蛋白排列不规则,偶有断裂和卷曲;d. γ 干扰素 + TNF-α 组咬合蛋白排列明显不连续、不规则,胞质内分布显著增多

度减弱,偶有断裂和卷曲(图 1b, c); γ 干扰素 + TNF-α 组咬合蛋白出现断裂、锯齿状等不连续排列,同时表现为重新分布,即胞质内咬合蛋白显著增多(图 1d)。

2.4 肠上皮细胞咬合蛋白、pMLC、MLCK 的表达

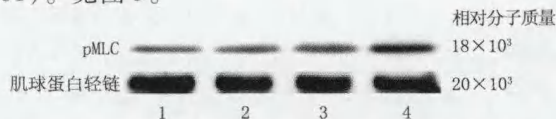
对照组、γ 干扰素组、TNF-α 组、γ 干扰素 + TNF-α 组细胞处理 24 h 时,肠上皮细胞咬合蛋白表达量分别为 1.01 ± 0.19 、 0.97 ± 0.05 、 1.05 ± 0.21 、 1.04 ± 0.18 , 组间比较差异无统计学意义 ($F = 0.26, P > 0.05$)。见图 2。



注:1. 对照组;2. γ 干扰素组;3. TNF-α 组;4. γ 干扰素 + TNF-α 组

图 2 各组肠上皮细胞处理 24 h 时咬合蛋白表达比较

对照组、γ 干扰素组、TNF-α 组、γ 干扰素 + TNF-α 组细胞处理 24 h 时,肠上皮细胞 pMLC 蛋白表达量分别为 0.57 ± 0.12 、 0.56 ± 0.07 、 0.59 ± 0.10 、 0.95 ± 0.05 。与对照组比较,γ 干扰素组 pMLC 蛋白表达无明显变化 ($t = 0.17, P > 0.05$); TNF-α 组 pMLC 表达虽有略微增加,但差异无统计学意义 ($t = 0.36, P > 0.05$)。γ 干扰素 + TNF-α 组 pMLC 蛋白表达显著高于其余 3 组 ($F = 17.97, P < 0.01$)。见图 3。

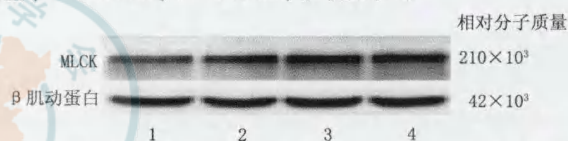


注:1. 对照组;2. γ 干扰素组;3. TNF-α 组;4. γ 干扰素 + TNF-α 组

图 3 各组肠上皮细胞处理 24 h 时磷酸化肌球蛋白轻链(pMLC)蛋白表达比较

对照组、γ 干扰素组、TNF-α 组、γ 干扰素 + TNF-α 组细胞处理 24 h 时,MLCK 蛋白表达量分别

为 0.85 ± 0.18 、 1.04 ± 0.23 、 1.00 ± 0.07 、 1.57 ± 0.36 。与对照组比较,γ 干扰素组、TNF-α 组 MLCK 蛋白表达虽均有轻微增加,但差异均无统计学意义 (t 值分别为 1.52、1.81, P 值均大于 0.05)。γ 干扰素 + TNF-α 组 MLCK 蛋白表达水平,显著高于其余 3 组 ($F = 9.05, P < 0.05$)。见图 4。



注:1. 对照组;2. γ 干扰素组;3. TNF-α 组;4. γ 干扰素 + TNF-α 组

图 4 各组肠上皮细胞处理 24 h 时肌球蛋白轻链激酶(MLCK)蛋白表达比较

3 讨论

严重烧伤所致感染、休克、多器官功能障碍等与肠道屏障功能障碍关系密切。现有资料显示,炎症介质 γ 干扰素和 TNF-α 在肠道屏障功能障碍的发生过程中起重要作用^[5],但是这 2 种炎症介质是如何参与损害肠道屏障功能的,其分子机制值得进一步探讨。我们将人肠上皮细胞株接种于 Transwell 聚碳酸酯膜,形成单层肠上皮细胞,体外研究 γ 干扰素或(和)TNF-α 对肠上皮屏障功能的影响。结果显示,单独用 γ 干扰素或 TNF-α 处理后,反映肠上皮屏障功能完整性的敏感指标 TER 虽有轻微降低,通透性有所增加,但均未发生具有统计学意义的变化;但用 γ 干扰素与 TNF-α 联合处理后,单层肠上皮细胞的 TER 明显降低,通透性显著增加。有学者在器官水平的研究中观察到,正常大鼠肠段在体外经过 γ 干扰素与 TNF-α 联合处理后,肠黏膜组织学结构及屏障功能均受到明显损害^[6]。以上结果提示,虽然单独使用 γ 干扰素或 TNF-α 并不能引起肠上皮屏障功能的明显损害,但在严重烧伤或炎症反应等

多种细胞因子大量释放的情况下,二者可能通过联合作用参与肠上皮屏障功能损害的发生。

细胞紧密连接及其相关蛋白是调控肠上皮机械屏障及细胞旁路通透性的主要决定因素^[5,7]。我们在观察到 γ 干扰素与 TNF- α 能联合引起肠上皮屏障功能损害的基础上,又研究了这 2 种细胞因子对肠上皮紧密连接咬合蛋白的影响。结果表明, γ 干扰素与 TNF- α 无论是单用还是联用,对咬合蛋白表达均无明显影响;但 2 种细胞因子对咬合蛋白的排列形态与分布有一定影响,尤其是二者联合作用能引起咬合蛋白在胞内发生重分布。该结果提示,引起紧密连接蛋白重分布可能是 γ 干扰素与 TNF- α 联合引起肠上皮屏障功能损害的重要机制之一。除紧密连接蛋白重分布外, γ 干扰素与 TNF- α 引起肠上皮屏障功能损害的机制还涉及细胞凋亡、紧密连接蛋白 mRNA 与蛋白表达的降低、紧密连接蛋白磷酸化减少以及细胞膜脂质成分发生改变等^[8-10]。至于 γ 干扰素与 TNF- α 是如何引起紧密连接蛋白发生重分布的,尚不明确。有研究认为, γ 干扰素激活 Rho-鸟苷三磷酸酶,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,发生重分布^[11]。新近研究认为,TNF- α 可通过窖蛋白 1 引起紧密连接咬合蛋白被内吞及重分布,从而影响紧密连接结构和功能损害^[12]。

由 MLCK 调控的 pMLC 在肠上皮紧密连接屏障功能的调控中具有非常重要的作用^[5],MLC 发生磷酸化后可引起肌动-球蛋白环收缩,细胞间隙形成,紧密连接屏障功能损害。为此,我们进一步研究了 γ 干扰素与 TNF- α 联合作用对肠上皮细胞 pMLC 及 MLCK 蛋白表达的影响。结果表明, γ 干扰素或 TNF- α 单独作用对肠上皮细胞 pMLC 及 MLCK 蛋白表达均无显著影响,但二者联合作用则引起 pMLC 及 MLCK 蛋白表达显著增加,与前述 TER、通透性以及紧密连接咬合蛋白重分布的结果相吻合。本课题组曾用 γ 干扰素处理单层肠上皮细胞 24 h 后,弃去 γ 干扰素用 TNF- α 处理,观察到 γ 干扰素通过诱导 TNF II 型受体表达,协同 TNF- α 引起 MLCK 及 pMLC 蛋白表达增加,导致肠上皮屏障功能损害^[13]。另有文献报道,TNF- α 通过活化 NF- κ B 或激活蛋白 1,诱导 MLCK 基因转录增加,从而引起 MLCK 蛋白表达增加^[14-15]。MLCK-pMLC 信号通路可能是 γ 干扰素与 TNF- α 联合作用引起肠上皮屏障功能损害的重要分子机制。是否还有其他影响因素,值得进一步深入研究。

本研究结果提示, γ 干扰素与 TNF- α 联合作用可通过诱导 MLCK 蛋白表达,引起 MLC 磷酸化,导致肠上皮屏障功能损害。这对进一步了解严重烧伤早期肠上皮屏障功能障碍的发生机制有重要意义。

参考文献

- [1] Finnerty CC, Herndon DN, Chinkes DL, et al. Serum cytokine differences in severely burned children with and without sepsis. *Shock*, 2007,27(1):4-9.
- [2] 袁建成,肖光夏,周立新,等. 肿瘤坏死因子 mRNA 在严重烧伤大鼠小肠中的表达及细胞定位的研究. *中华整形烧伤外科杂志*,1996,12(3):163-166,插页 9.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 刘行,王凤君. 紧密连接蛋白与烧伤后肠道屏障功能障碍研究进展. *中华烧伤杂志*,2010,26(5):351-353.
- [6] Amasheh M, Grotjohann I, Amasheh S, et al. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scand J Gastroenterol*, 2009,44(10):1226-1235.
- [7] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009,9(11):799-809.
- [8] Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci*, 2009,14:2765-2778.
- [9] Li Q, Zhang Q, Wang M, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin Immunol*, 2008,126(1):67-80.
- [10] Cui W, Li LX, Sun CM, et al. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz J Med Biol Res*, 2010,43(4):330-337.
- [11] Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, et al. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 2005,16(10):5040-5052.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Ma TY, Boivin MA, Ye D, et al. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005,288(3):G422-430.
- [15] 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.

(收稿日期:2010-11-17)

(本文编辑:谢秋红)