

论著 · 实验研究

葡聚糖硫酸钠诱导炎症性肠病大鼠结肠黏膜
紧密连接蛋白表达及其通透性的改变

饶艳霞 陈洁 陈蕾蕾 顾伟忠 舒小莉

(浙江大学医学院附属儿童医院消化科, 浙江 杭州 310003)

[摘 要] 目的 建立葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的大鼠炎症性肠病(IBD)模型,观察其肠上皮紧密连接蛋白表达以及结肠黏膜通透性的变化。方法 将雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为对照组和 IBD 模型组,每组 27 只,通过使用 3% DSS 持续经饮水途径饲养大鼠 6 d 后恢复正常饮水 14 d 建立 IBD 模型,对照组自由饮水。分别于 DSS 处理后第 7 天、第 14 天和第 21 天观察结肠黏膜病理变化,第 21 天取结肠组织标本检测髓过氧化物酶活性;采用 Ussing chamber 检测结肠上皮通透性;通过 real-time PCR 和 Western blot 从转录水平和翻译水平分析肠上皮紧密连接蛋白表达。结果 IBD 模型组大鼠出现腹泻、便血、体重下降,炎症集中在远端结肠,表现为隐窝脓肿,炎症细胞浸润。与对照组比较,IBD 模型组大鼠结肠髓过氧化物酶活性显著增加($P<0.01$),肠上皮跨膜电阻抗值和跨膜电势差显著降低($P<0.01$),短路电流值明显增加($P<0.01$);Real-time PCR 和 Western blot 的结果均提示正常大鼠尚未检测出 claudin2 的表达,IBD 模型组 claudin2 mRNA 及蛋白表达阳性;IBD 模型组 occludin、claudin3、ZO-1 mRNA 及蛋白表达水平均显著低于对照组($P<0.01$)。结论 IBD 大鼠结肠黏膜屏障功能受损,多种紧密蛋白表达改变,其中紧密连接蛋白表达变化可能在慢性修复期 IBD 屏障受损发病机制中起到重要作用。

[中国当代儿科杂志,2012,14(12):976-981]

[关 键 词] 葡聚糖硫酸钠;炎症性肠病;肠黏膜屏障;紧密连接;大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)12-0976-06

Changes in tight junction protein expression and permeability of colon mucosa in rats with dextran sulfate sodium-induced inflammatory bowel disease

RAO Yan-Xia, CHEN Jie, CHEN Lei-Lei, GU Wei-Zhong, SHU Xiao-Li. Department of Gastroenterology, Children's Hospital Affiliated to Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Chen J, Email: hzcjie@zju.edu.cn)

Abstract: Objective To develop an experimental rat model of inflammatory bowel disease (IBD) by administration of dextran sulfate sodium (DSS), and to observe changes in the tight junction protein expression and permeability of colon mucosa. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control ($n=27$) and IBD model groups ($n=27$). In the IBD model group, IBD was induced by 6-day administration of 3% DSS in water followed by 14-day administration of water only. The control group was fed with water only. Pathological changes in colon mucosae were observed on days 7, 14 and 21 after DSS administration. Colon tissue specimens were collected on day 21 for measuring myeloperoxidase (MPO) activity. The transepithelial electric resistance (TEER), transepithelial potential difference (TEPD) and short circuit current (Isc) of the specimens were measured by Ussing chamber. Real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of tight junction proteins in colon epithelia. **Results** In the IBD model group, diarrhea, hemafecia and weight loss were seen. Inflammation occurred mainly in the distal colon and was characterized by crypt abscess and inflammatory cell infiltration. The IBD model group showed significantly increased MPO activity ($P<0.01$), significantly decreased TEER ($P<0.01$) and TEPD ($P<0.01$), and significantly increased Isc ($P<0.01$) compared with the control group. No claudin 2 expression of mRNA and protein was detected in the control group, and they were expressed in the IBD model group. The expression levels of claudin 3, occludin and ZO-1 in the IBD model group were significantly decreased compared with in the control group ($P<0.01$). **Conclusions** IBD rats show colonic barrier dysfunction and changes in the expression of tight junction proteins. The changes in the expression of tight junction proteins may contribute to colonic barrier dysfunction in cases of IBD in the chronic recovery stage.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(12):976-981]

Key words: Dextran sulfate sodium; Inflammatory bowel disease; Barrier function of colon mucosa; Tight junction; Rats

[收稿日期]2012-06-15;[修回日期]2012-07-26
[项目基金]中华儿科杂志百利儿科科研基金(HT1203011);浙江省自然基金(LY12H023009)。
[作者简介]饶艳霞,女,硕士,住院医师。
[通信作者]陈洁,主任医师。

选择和建立合适的动物模型是研究炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)不可缺少的手段,IBD动物模型虽然众多,但至今尚不理想,国内目前比较广泛采用的IBD模型是葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导性结肠炎,病变部位主要在结肠,其病理表现符合人IBD的特点^[1]。

肠上皮是肠道的重要防御屏障,阻止肠道病原菌、抗原、毒素等的自由通过,是维持肠组织免疫平衡的前提条件;肠黏膜屏障破坏,通透性增加,允许肠道抗原以及微生物跨过屏障进入肠黏膜,活化固有层免疫细胞,触发炎症反应^[2]。为进一步了解肠黏膜损伤的可能机制,本实验使用DSS诱导大鼠建立IBD动物模型,研究慢性修复期IBD大鼠结肠黏膜通透性以及肠黏膜紧密连接蛋白的表达变化,为进一步研究提供理论基础。

1 材料及方法

1.1 研究对象

54只健康、清洁级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,由浙江大学实验动物中心提供,使用许可证号SYXK(浙)2007-0098,体重130~150 g。每3只饲养于室温22±2℃、相对湿度55%~65%的笼中,12 h昼夜交替。饮水经高温高压灭菌处理,大鼠可自由饮食饮水。

1.2 主要试剂与仪器

DSS(MW: 5000 Da)购自美国AMRESCO公司,髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;AxyPrep小量RNA提取试剂盒购自美国Axygen Biosciences公司;逆转录以及荧光定量PCR(real-time PCR)试剂盒购自日本Takara公司;β-actin抗体购自江苏碧云天生物技术有限公司;兔抗occludin抗体(ab31721)、兔抗claudin3抗体购自美国Abcam公司;兔抗ZO-1(Mid)、小鼠抗claudin2抗体购自美国Life Technologies公司;HRP标记二抗购自江苏碧云天生物技术有限公司;FITC标记二抗购自日本DAKO公司;7500荧光定量PCR仪购自美国ABI公司;Ussing chamber购自美国WPI公司;SDS-PAGE电泳仪、电泳槽以及转膜仪购自美国Bio-Rad公司。

1.3 主要实验方法

1.3.1 IBD模型的建立 54只大鼠适应环境1周后,记为第0天,随机分为对照组和IBD模型组,每组27只。按照Okayasu等^[3]的方法制备IBD模型:每日配置新鲜3% DSS(w/v)经饮水途径饲养6 d,第7天以

灭菌水替换DSS,自由饮水14 d。对照组全程自由饮水。分别在DSS处理后第7天、14天和21天取材,留取抗凝血、血清及肠道标本,其中血清标本于-20℃保存,结肠标本于-80℃低温保存,用于Western blot和real-time PCR检测。

1.3.2 大鼠模型的评价 (1)症状、体征:记录每天动物的一般状况,包括毛发、饮食、饮水、体重。综合评价动物的生长状态。每隔2 d收集粪便,采用粪便隐血试剂盒测定大便隐血分数,依照Cooper疾病活动度指数(disease activity index, DAI)评分方法评价动物模型一般生长状况^[4]。(2)肠道组织病理变化:分别在第7天($n=6$)、第14天($n=6$)、第21天($n=9$)处死大鼠,10%水合氯醛(400 mg/kg)麻醉后,取距离肛门4 cm处2 cm结肠于12%中性甲醛固定,石蜡包埋,制作5 μm厚连续切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察。

1.3.3 MPO酶活性测定 分别测量第7天、第14天、第21天结肠组织MPO酶活性,各取100 mg结肠组织,冰上匀浆,12000 g,4℃离心15 min取上清,按照MPO试剂盒说明书提供的步骤操作,最后37℃孵育30 min显色,于460 nm波长下测量其吸收峰,制作标准曲线,计算每个样本酶活力。

1.3.4 结肠黏膜通透性测试 第21天测试通过Ussing chamber方法检测各组大鼠结肠黏膜跨膜电阻抗(trans epithelial electric resistance, TEER)、短路电流(short circuit current, I_{sc})和电势差(potential difference, Pd)。SD大鼠麻醉后截取长约1.5 cm的结肠,剥除浆膜层和肌层。将分离好的结肠黏膜固定于Ussing chamber装置中,即刻于装置的黏膜侧加入5 mL生理盐水,浆膜侧加入5 mL Krebs液(2.25 mmol/L KH₂PO₄, 108 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 22 mmol/L NaHCO₃, 8.9 mmol/L葡萄糖,调整pH至7.4),有效渗透面积为0.504 cm²。整个装置置于37℃恒温环境中,并不断于两侧的介质中通入95% O₂、5% CO₂的混合气体至实验结束。待系统稳定后记录TEER、I_{sc}、Pd并进行分析。

1.3.5 Real-time PCR检测结肠上皮紧密连接蛋白的表达 总RNA的提取:选用AxyPrep总RNA小量制备试剂盒,按照试剂盒的说明进行RNA的提取,反转录合成DNA第一链。Real-time PCR用QuantiTect SYBR Green PCR试剂盒,取1 μL cDNA用于反应。扩增条件:95℃变性30 s,65℃退火30 s,35~40次循环。引物采用Primer 5.0软件进行设计(表1),由美国Life Technologies公司合成。每次每样本重复3次,采用2^{-ΔΔC_t}方法进行半定量分析。

表 1 引物序列表

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
ZO-1	CCATCTTTGGACCGATTGCTG	TAATGCCCCGAGCTCCGATG
Occludin	TCTTTGTATAAGTCACCGCCTC	GTTTCATAGTGGTCTGGGTCTG
Claudin1	TCGTGACTGCTCAGGCCATC	ATGCCAATGGTGGACACAAAGA
Claudin2	ATCTTCACGGCATTCTCC	AACTCACTCTTTGGCTTTGG
Claudin3	CATCGCAGCTACTTGCCAGT	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCAAAAACGA
Claudin4	CACCAACTGCATGGAGGA C	CTTGCCACGATGAACACG
Claudin5	AAATTCTGGGTCTGCTGCTG	GCCGGTCAAGGTAACAAAGA
Claudin7	GTAGCATGCTCCTGGATTG	CACCGAGTCGTACATTTTGC
GAPDH	CCATTTGATGTTAGCGGGATCTC	TGCTCTACATGTTCCAGTATGACT

1.3.6 Western blot 检测 occludin、claudin3、claudin2 和 ZO-1 蛋白的表达 取 50 μg 总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,通过电转移法将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭、一抗 (β-actin 抗体 1:4000; 兔抗 occludin 抗体 1:400; 小鼠抗 claudin2 抗体 1:700; 兔抗 claudin3 抗体 1:1500; 兔抗 ZO-1 抗体 1:600) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤,二抗 (山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG) 孵育 1 h, TBST 洗涤,增强 ECL 放射自显影。用 Image Pro Plus 软件半定量分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组比较采用两独立样本 *t* 检验;多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IBD 模型组大鼠一般情况

IBD 模型组在第 2 天开始出现水样腹泻,相继出现隐血阳性、黏液血便、脓血。第 5 天和第 6 天 IBD

模型组大鼠均出现直肠便血;大鼠倦怠懒动、消瘦、拱背、皮毛皱乱无光泽,伴有饮食、饮水明显减少;在第 12 ~ 13 天左右,体重下降达到顶点,随后体重缓慢上升,伴便血、腹泻症状逐渐缓解,大鼠饮水、饮食逐渐增加。实验结束时,IBD 模型组大鼠体重 (218 ± 11 g) 显著低于对照组 (306 ± 9 g, *t* = -12.27, *P* < 0.01)。

2.2 DAI 评分

DSS 处理后,IBD 模型组大鼠 DAI 评分逐渐增加,在第 11 ~ 12 天左右达到最大值,后逐渐减小,2 ~ 3 只大鼠在实验结束时,仍有稀便或隐血测试阳性。

2.3 大鼠结肠组织学变化

显微镜观察到对照组大鼠结肠上皮各层结构清晰。IBD 模型组大鼠肠道炎症主要集中在远端结肠,第 7 天肠道炎症表现为黏膜下层水肿,肠上皮糜烂、溃疡,中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润达黏膜下层尚未及肌层,黏膜层多处出血灶;第 14 天炎症加重、肠上皮严重坏死,杯状细胞消失,隐窝紊乱、脓肿,炎症细胞浸润范围扩大至肌层,黏膜层广泛出血;第 21 天可见再生肠细胞以及少量异型增生,新生不规则隐窝,黏膜层浆细胞浸润,肠上皮损伤周围组织可见多个淋巴滤泡形成。见图 1。

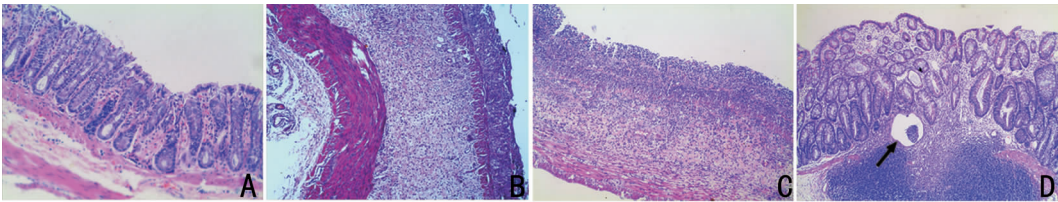


图 1 不同阶段大鼠远端结肠组织学变化 (苏木精-伊红染色, ×400) A: 对照组肠黏膜, 黏膜完整; B: 第 7 天 IBD 模型组大鼠标本, 炎症局限在黏膜下层; C: 第 14 天 IBD 模型组大鼠标本, 隐窝结构消失, 炎症细胞浸润到浆膜层; D: 第 21 天 IBD 模型组大鼠标本, 可见新生隐窝 (箭头所示), 淋巴细胞浸润。

2.4 大鼠结肠组织 MPO 酶活性和血 WBC 计数

第 7 天即观察到 IBD 模型组大鼠结肠组织 MPO 酶活性和外周血 WBC 计数显著高于对照组 (*P*

< 0.01), 第 14 天达到高峰 (*P* < 0.01), 第 21 天有明显降低的趋势,但仍明显高于对照组 (*P* < 0.01), 见表 2。

表 2 不同时间点各组 MPO 酶活性及外周血 WBC 计数 ($\bar{x} \pm s$)

	例数	MPO 酶活性(U/g)		t 值	P 值	WBC 计数($\times 10^9/L$)		t 值	P 值
		对照组	IBD 模型组			对照组	IBD 模型组		
第 7 天	6	0.62 $\pm$ 0.32	4.66 $\pm$ 1.99	6.67	<0.01	4.0 $\pm$ 1.3	18.0 $\pm$ 3.0	8.88	<0.01
第 14 天	6	0.52 $\pm$ 0.05	5.16 $\pm$ 1.53 ^a	7.21	<0.01	3.4 $\pm$ 0.9	26.5 $\pm$ 6.6 ^a	8.23	<0.01
第 21 天	9	0.60 $\pm$ 0.23	3.25 $\pm$ 1.66 ^{a,b}	5.95	<0.01	4.4 $\pm$ 0.8	13.1 $\pm$ 2.7 ^{a,b}	6.75	<0.01
F 值		0.667	4.921			0.442	14.098		
P 值		0.74	0.02			0.85	<0.01		

a:与同组第 7 天比较, $P < 0.05$;b:与同组第 14 天比较, $P < 0.05$

2.5 大鼠结肠通透性

第 21 天测试 2 组大鼠结肠黏膜 Pd、TEER 和 Isc 值,结果显示,与对照组比较,IBD 模型组大鼠结肠黏膜 TEER 值显著减少($P < 0.01$),同时结肠黏膜 Pd 值也显著下降($P < 0.01$),而 IBD 模型组大鼠结肠黏膜 Isc 值显著高于对照组($P < 0.01$),见表 3。

表 3 第 21 天大鼠离体肠上皮 TEER、Isc、Pd 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TEER (Ωcm^2)	Isc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Pd (mV)
对照组	9	47 $\pm$ 4	31 $\pm$ 6	-3.4 $\pm$ 0.6
IBD 模型组	9	28 $\pm$ 7	140 $\pm$ 5	-2.3 $\pm$ 0.8
t 值		-8.642	9.905	-6.05
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

2.6 IBD 大鼠结肠黏膜上皮紧密连接蛋白 mRNA 的表达

第 21 天,对照组几乎没有检测到 claudin2 mRNA 的表达,IBD 模型组大鼠肠上皮表达 claudin2 mRNA。对照组大鼠结肠上皮 claudin3 mRNA 的表达量是 IBD 模型组大鼠的 5.1 倍($t = 9.26, P < 0.01$);occludin mRNA 表达量是 IBD 模型组大鼠的 13.06 倍($t = 9.18, P < 0.01$);ZO-1 mRNA 水平是 IBD 模型组的 8.03 倍($t = 6.14, P < 0.01$)。IBD 模型组大肠 claudin5 mRNA 的表达量高于对照组,但差异无统计学意义($t = 1.08, P = 0.31$)。两组 claudin1, claudin4, claudin7 mRNA 表达水平差异无统计学意义。见图 3。

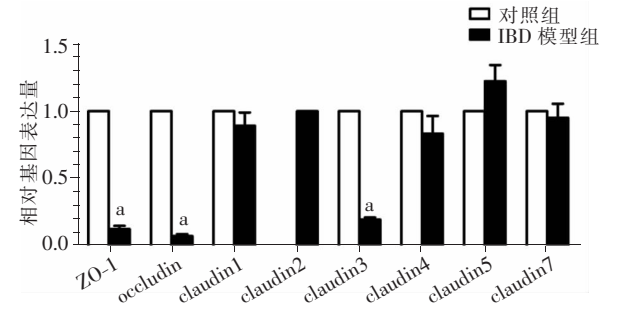


图 3 Real-time PCR 检测第 21 天大鼠肠上皮多种基因的表达结果($n = 9$) a:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.7 Western blot 检测 ZO-1、claudin2、claudin3、occludin 蛋白的表达

以 β -actin 为内参,Western blot 检测第 21 天大鼠肠黏膜上皮各蛋白的表达水平,结果经 Image Pro Plus 软件定量分析提示 DSS 显著影响大鼠结肠黏膜上皮紧密连接蛋白的表达。同 real-time PCR 的结果相似,对照组没有检测到 claudin2 蛋白的条带,IBD 模型组 claudin2 蛋白表达阳性,对照组大鼠 ZO-1 蛋白表达量是 IBD 模型组大鼠的 2.2 倍($t = 38.15, P < 0.01$),occludin 蛋白表达量是 IBD 模型组大鼠的 2.3 倍($t = 11.54, P < 0.01$),claudin3 蛋白表达量是 IBD 模型组大鼠的 2.8 倍($t = 20.51, P < 0.01$)。见图 4。

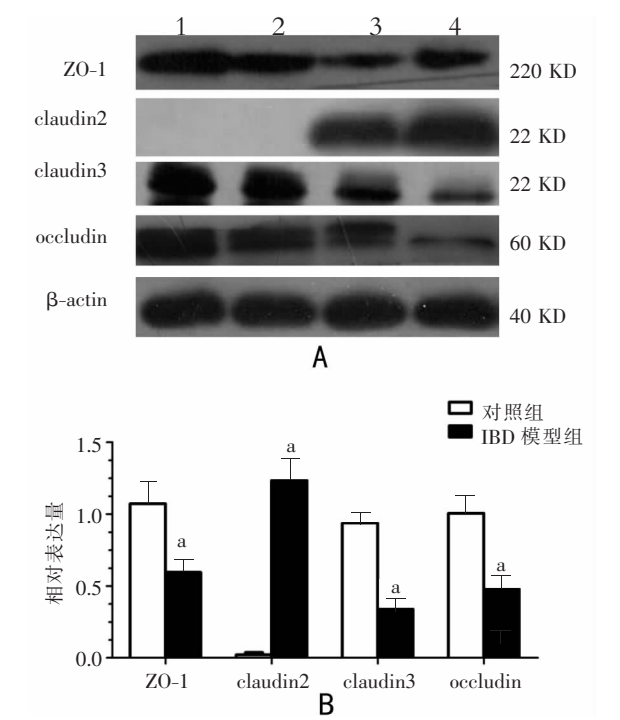


图 4 Western blot 检测结果($n = 9$) A:条带图,1~2 为对照组,3~4 为 IBD 模型组;B:柱状图,a:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来,肠黏膜屏障功能在 IBD 的病理生理过程中的作用逐渐引起重视。机械屏障是肠黏膜屏障中重要的组成部分,由单层肠上皮细胞和细胞间的连接(包括紧密连接、黏附连接和缝隙连接)组成,紧密连接通透性具有大小和电荷选择性,是决定肠道通透性的关键因素,维持完整的紧密连接形态和功能对保护肠黏膜屏障、防止细菌移位有着重大的意义^[5-6];急性期 IBD 患者肠黏膜屏障受损,肠道通透性增加,肠上皮完整性受损,如溃疡、糜烂等肉眼可见病变是引起屏障功能受损的主要原因,在上皮组织完整的肠黏膜区同样检测到紧密连接受损,通透性增加。

Solomon 等^[7]综述了 DSS 诱导动物制备 IBD 模型的特点:短期(3~10 d)DSS 诱导动物肠道出现急性损伤;正常饮水替换 DSS 后,大鼠肠黏膜经历 14~21 d 的慢性修复期;DSS 与饮水相互交替 3~4 个周期诱导动物肠道持续性损伤,制备的动物模型具有慢性肠道炎症的特点。本研究中,IBD 模型组大鼠出现体重下降、便血;肠上皮水肿、隐窝扩张、脓肿,炎症细胞的浸润等表现,与 Okayasu 等^[3]和 Cooper 等^[4]一些实验室研究结果相同,同人类 IBD 相似。此外,本研究中病理结果提示 6 d 持续 3% DSS 诱导肠道急性损伤,正常饮水替换 DSS 后,大鼠肠黏膜损伤逐渐修复,大鼠 DAI 评分、MPO 酶、WBC 计数测试结果同样提示制备的 IBD 大鼠经历急性炎症和炎症逐渐消退的过程,与 Okayasu 等^[3]和 Whitem 等^[8]实验结果相同。由此可知给予 SD 大鼠短期 3% DSS 结合 2 周饮水诱导的 IBD 模型符合经典的 IBD 模型,IBD 大鼠经历急性肠黏膜损伤后进入慢性修复期。

TEER 值是反映细胞质经胞旁途径转运速率常用的生理指标,用于评估细胞旁路通透性的大小,反映紧密连接复合体通透性,具有很高的特异性;细胞旁路通透性的增加,表现为 TEER 的下降,反之,则 TEER 增加^[9]。Pd 值是反映肠上皮完整性的指标,IsC 是细胞 Na、Cl、K、Ca、Mg 离子跨膜转运的总和,反映肠上皮离子以及营养物质的吸收状况^[10-11]。本研究结果表明 IBD 大鼠结肠上皮 TEER 值降低提示 IBD 大鼠结肠紧密连接复合体通透性增加,肠黏膜屏障功能受损。临床上,IBD 患者黏膜上皮也存在电导增加,TEER 值降低的现象^[12]。肠道电生理变化与肠道致炎症物质释放密切相关,Shimizu

等^[13]的研究证实 DSS 诱导的 IBD 模型大鼠结肠缓激肽分泌增加,缓激肽可以诱导肠道 Cl 的分泌,影响 Na⁺ 和水的吸收,导致肠道 TEER、IsC 值变化,进而肠通透性增加,进而腹泻发生。总之,IBD 大鼠肠道紧密连接复合体功能受损,肠黏膜屏障功能下降。

紧密连接复合体由 occludin、claudin 及膜周蛋白 JAM 和 ZO 蛋白以及相关激酶组成^[14-16]。过表达 occludin 蛋白增加细胞 TEER 值^[17];溃疡性结肠炎患者肠上皮 occludin 荧光染色光密度值显著下降^[18];而 occludin 蛋白缺失的小鼠肠上皮结构和细胞旁转运正常^[19]。claudin 蛋白是组成紧密连接复合体的功能和结构基础,claudin 蛋白可直接影响上皮/内皮组织 TEER,决定紧密连接复合体的离子选择性,并调节紧密连接复合体的通透性,一部分 claudin 加固细胞之间的连接,其表达上调可以降低紧密连接复合体的通透性,称这一类为“封闭性”claudin 蛋白,包括 claudin1、claudin3、claudin4、claudin5 和 claudin8 等^[20-21]。另一部分的 claudin 分子可以形成特异性离子通道而增加紧密连接复合体的通透性,可以称这一类为“渗漏性”claudin,如 claudin2 增加紧密连接结构孔的数量,增加经细胞旁物质运输,尤其是 Na⁺ 离子的吸收^[21-22]。ZO-1 蛋白将 occludin、claudin 蛋白与细胞骨架相连,在组装成熟的紧密连接结构和维持紧密连接复合体的完整性方面发挥重要的作用^[23]。

本研究第 21 天 real-time PCR 和 Western blot 结果皆提示正常大鼠结肠上皮没有 claudin2 蛋白的表达,而 IBD 模型组大鼠结肠上皮 claudin2 蛋白表达阳性,occludin、ZO-1、claudin3 蛋白表达水平显著降低。正常大鼠结肠组织不表达具有孔道特性的紧密连接蛋白 claudin2,但在 IBD 大鼠可见 claudin2 在转录水平和翻译水平的表达,“封闭性”紧密连接蛋白 claudin3、组装蛋白 ZO-1 的表达显著下降,由此推测这些紧密连接蛋白表达变化是引起 IBD 大鼠结肠紧密连接复合体受损、肠黏膜屏障功能下降的主要机制。在临床上同样观察到 IBD 患者疾病活动期 claudin 表达显著变化^[18, 24];动物实验中,DSS 诱导的急性 IBD 大鼠模型 ZO-1 蛋白表达显著下降^[25]。

除此以外,细胞骨架也影响紧密连接复合体的功能,肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)激活肌球蛋白轻链是调节紧密连接复合体最重要的细胞骨架途径^[26]。经 MLCK 调节紧密连接复合体的途径是快速且可逆转的,相反紧密连接蛋白对紧密连接复合体的调节稳定而持久^[27-28]。本研究在 IBD 大鼠黏膜愈合期也观察到紧密连接蛋白表达的变化,也进一步支持了紧密连接蛋白对紧密

连接复合体的调节稳定而持久的观点。

总之,本研究通过短期DSS处理后正常饮水2周诱导SD大鼠的临床症状、体征以及病理表现和经典实验性IBD模型相似,是可重复以及应用的实验性IBD动物模型。IBD大鼠在肠道炎症慢性修复期肠紧密连接复合体通透性增加,肠黏膜屏障功能下降,肠道通透性增加,在表达和翻译水平,紧密连接蛋白表达发生显著变化。由此推测紧密连接蛋白表达变化在慢性修复期IBD屏障功能受损发病机制中起到重要作用。但是需要进一步了解在炎症早期紧密连接的通透性,肠上皮紧密连接的表达,以及研究紧密连接蛋白表达量和IBD疾病活动度之间的关系。此外,紧密连接蛋白表达是引起肠黏膜屏障受损的原因还是结果,以及紧密连接蛋白与IBD的疾病进展的关系是目前亟待解决的科学问题。上述研究将对了解IBD的病因,以及寻找治疗方向具有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] Chen Y, Si JM, Liu WL, Cai JT, Du Q, Wang LJ, et al. Induction of experimental acute ulcerative colitis in rats by administration of dextran sulfate sodium at low concentration followed by intracolonic administration of 30% ethanol[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2007, 8(9): 632-637.

[2] Mennigen R, Bruewer M. Effect of probiotics on intestinal barrier function[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1165: 183-189.

[3] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice[J]. Gastroenterology, 1990, 98(3): 694-702.

[4] Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-249.

[5] Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk[J]. Gastroenterology, 2000, 119(6): 1740-1744.

[6] Kullmann F, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Schölmerich J, et al. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats[J]. Int J Colorectal Dis, 2001, 16(4): 238-246.

[7] Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview[J]. Comp Clin Pathol, 2010, 19(3): 235-239.

[8] Whitem CG, Williams AD, Williams CS. Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS)[J]. J Vis Exp, 2010, 35: 6-8.

[9] Sutton SC, Forbes AE, Cargill R, Hochman JH, LeCluyse EL. Simultaneous in vitro measurement of intestinal tissue permeability and transepithelial electrical resistance (TEER) using Sweetana-Grass diffusion cells[J]. Pharm Res, 1992, 9(3): 316-319.

[10] Ewe K. Intestinal transport in constipation and diarrhoea[J]. Pharmacology, 1988, 36(Suppl 1): 73-84.

[11] Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes[J]. J Appl Toxicol, 2001, 21(1): 15-23.

[12] Zeissig S, Bojarski C, Buergel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, et al. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment[J]. Gut, 2004, 53(9): 1295-1302.

[13] Shimizu T, Kitamura T, Suzuki M, Fujii T, Shoji H, Tanaka K, et al. Effects of alpha-linolenic acid on colonic secretion in rats with experimental colitis[J]. J Gastroenterol, 2007, 42(2): 129-134.

[14] Bruewer M, Samarin S, Nusrat A. Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1072: 242-252.

[15] Lapierre LA. The molecular structure of the tight junction[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 41(3): 255-264.

[16] Madara JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions[J]. Annu Rev Physiol, 1998, 60: 143-159.

[17] Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, Matter K. 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.

[18] Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(Suppl 2): S146-S150.

[19] Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions[J]. J Cell Biol, 1998, 141(2): 397-408.

[20] Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 12): 2435-2447.

[21] Amasheh S, Fromm M, Günzel D. Claudins of intestine and nephron-a correlation of molecular tight junction structure and barrier function[J]. Acta Physiol (Oxf), 2011, 201(1): 133-140.

[22] Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 24): 4969-4976.

[23] Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton[J]. J Biol Chem, 1998, 273(45): 29745-29753.

[24] Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease[J]. Gut, 2007, 56(1): 61-72.

[25] Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis[J]. J Surg Res, 2007, 140(1): 12-19.

[26] Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression[J]. Am J Pathol, 2005, 166(2): 409-419.

[27] Feighery LM, Cochrane SW, Quinn T, Baird AW, O'Toole D, Owens SE, et al. Myosin light chain kinase inhibition: correction of increased intestinal epithelial permeability in vitro[J]. Pharm Res, 2008, 25(6): 1377-1386.

[28] Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(6): 715-720.

(本文编辑:万静)