

再议肠道屏障功能分子机制的研究进展

刘志华, 秦环龙

刘志华, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233

秦环龙, 教授, 主要从事胃肠外科和外科营养方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81070293

作者贡献分布: 本文综述由刘志华与秦环龙共同完成; 秦环龙审核。

通讯作者: 秦环龙, 主任医师, 教授, 博士生导师, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院普外科。

hlqin@live.cn

电话: 021-64361349 传真: 021-64368920

收稿日期: 2010-10-13 修回日期: 2010-11-17

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-11-28

Recent progress in understanding the molecular mechanisms underlying intestinal epithelial barrier function

Zhi-Hua Liu, Huan-Long Qin

Zhi-Hua Liu, Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070293

Correspondence to: Professor Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. hlqin@live.cn

Received: 2010-10-13 Revised: 2010-11-17

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-11-28

Abstract

Intestinal barrier dysfunction is related to the development of various clinical diseases. Recent probiotic studies have shown that the adhesive domain of surface layer proteins of lactobacillus can exert protective effects on intestinal epithelial cells. The role of tight junctions between intestinal epithelial cells in regulating intestinal epithelial barrier function has been established. Besides, intestinal alkaline phosphatase (IAP), protein phosphatase 2A (PP2A), and intraepithelial intestinal lymphocytes (IEL) are implicated in regulating intestinal epithelial barrier function. In addition, great attention has been paid to the association between intestinal stem cells and intestinal epithelial barrier function.

Key Words: Intestinal barrier; Probiotics; Tight

junction; Protein phosphatase 2A; Intestinal intraepithelial lymphocyte; Intestinal alkaline phosphatase; Intestinal stem cell

Liu ZH, Qin HL. Recent progress in understanding the molecular mechanisms underlying intestinal epithelial barrier function. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(33): 3501-3507

摘要

肠屏障功能受损与临床多种疾病的发生发展有密切的关系。近几年来国内外对益生菌的研究表明, 在发挥其益生作用时, 其表面蛋白的黏附结构域起着核心作用。肠上皮细胞间紧密连接蛋白的作用及地位已得到了充分的肯定, 肠上皮细胞绒毛刷状缘的碱性磷酸酶(IAP), 胞质内蛋白磷酸酶2A(PP2A)的保护作用及肠上皮细胞内淋巴细胞(IEL)免疫调节作用备受关注。此外, 小肠干细胞(ISC)所起的作用也备受研究者的重视。

关键词: 肠屏障; 益生菌; 紧密连接; 蛋白磷酸酶2A; 上皮内淋巴细胞; 碱性磷酸酶; 小肠干细胞

刘志华, 秦环龙. 再议肠道屏障功能分子机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(33): 3501-3507

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3501.asp>

0 引言

肠道上皮黏膜屏障是肠道最重要的一道屏障, 他由完整的肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)和相邻IEC之间的连接构成, 并调控着水和溶质的跨上皮转运。人肠道内含有500-1 000种不同的微生物, 尤其是结肠内细菌的数量达到 1×10^{12} /g粪便, 面临着最高的细菌负荷。临床上, 肠屏障功能障碍在创伤致器官功能障碍的病理进程中起着“火花”或“燃料”作用。机体经受“第一次打击”后, 出现先天性免疫系统和中性粒细胞系统的激活, 细胞因子大量释放; 继而出现休克, 肠黏膜通透性增加局部缺血水肿等。不恰当的液体复办, 外科手术带来“第二次打击”将会导致缺血-再灌注损伤和全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syn-

■背景资料

肠道上皮黏膜屏障是肠道最重要的一道屏障, 由肠上皮细胞及其间的紧密连接结构构成。近年来其保护作用的相关研究主要集中在益生菌方面。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

■研究前沿

乳酸杆菌表面蛋白的研究为本研究领域的重点和热点。近年来,关于肠上皮细胞绒毛刷状缘的碱性磷酸酶,胞质内蛋白磷酸酶2A,肠上皮细胞内淋巴细胞以及小肠干细胞的研究也越来越多。

drome, SIRS)的发生,同时肠黏膜通透性增加将导致肠道菌群易位,即“第三次打击”,最终形成急性肠屏障损害综合征(acute intestinal barrier distress syndrome)。可见,肠屏障功能研究及防治具有十分重要的意义^[1]。

近几年来IEC本身具有屏障保护作用及机制研究日趋重视,如IEC绒毛刷状缘碱性磷酸酶(intestinal alkaline phosphatase, IAP),胞质内蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)磷酸化后诱导紧密连接(tight junction, TJ)改变及IEC凋亡,肠上皮细胞内淋巴细胞(intestinal intraepithelial lymphocyte, IEL)免疫调节功能和小肠干细胞(intestinal stem cell, ISC)的损伤修复作用备受关注。肠道屏障功能受损与临床多种疾病的发生发展有密切的关系,了解其作用机制对临床疾病的防治有重要的意义。

1 益生菌(乳酸杆菌)及其表面蛋白对肠道屏障功能的保护作用

肠上皮作为乳酸杆菌最重要和最直接的靶细胞,可通过多种机制引起黏液素分泌、加强TJ功能、上调细胞保护性热休克蛋白和防止IEC凋亡等。乳酸菌黏附于肠上皮样细胞,可改善TJ的结构变化和相关蛋白的表达分布,对致病性大肠杆菌引起的肠屏障损伤具有保护作用^[2]。研究表明,益生菌不仅能刺激肠道内有益菌的生长,且还能经多种途径抑制致病菌的生长、黏附和侵袭,使失调的菌群正常化;同时,还能增强IEC间的紧密连接,降低肠道通透性,抑制IEC凋亡,改善肠道物理屏障功能。研究发现,益生菌能抑制NF- κ B的活化,减少上皮组织内T淋巴细胞的数量,通过Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)信号途径及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)调节抗炎作用,上调抗炎细胞因子(如IL-21、TGF β 2)等的表达,下调促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、INF- γ 等的表达。乳酸杆菌对梗阻性黄疸所致的肝屏障功能障碍也具有一定的保护作用,对大鼠胆总管结扎后所致黄疸具有明显的缓解作用,不但能减轻其外周血的胆红素水平,诱导葡萄糖醛基转移酶(uridine diphosphate glucuronosyl transferase-1A1, UGT-1A1)合成,而且对肝脏及小肠的通透性和紧密连接具有保护作用,其作用机制可能与IEC内蛋白激酶c(protein kinase C, PKC)被激活有关^[3,4]。植物乳酸杆菌下调黏附分子(mucosal addressin cell adhe-

sion molecule, MAdCAM-1)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)在IL-10基因敲除所致的溃疡性结肠炎小鼠中的高表达,并降低其肠道炎症病理学评分及炎症因子TNF- α 和INF- γ 的分泌^[5]。

近几年关于乳酸杆菌黏附机制的研究认为,乳酸杆菌表面蛋白(surface layer protein, SLP)对人类IEC的黏附进而发挥其保护性生物学功能起着关键性的作用。SLP不但可以介导细菌对靶细胞的黏附,激发细胞内的信号转导途径,还可通过竞争抑制等机制阻断具有相似受体结构的细菌的黏附活性。目前乳酸杆菌SLP研究多集中在对相对分子量较大的蛋白质直接进行研究^[6],其片段较大,结构域不清,作用机制尚不明,故其抗病能力仍然较弱。我们的前期研究通过提取、纯化及鉴定得到的乳酸杆菌表层黏附蛋白IMP2(序列455-755aa),后者黏附于Caco-2细胞后,可以改善TJ相关蛋白的表达和F-actin形态,同时抑制了致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC)引起的肠上皮的通透性增加,其中ERK/MAPK信号转导途径起到了至关重要的作用^[7]。随后,通过构建突变蛋白得到具有黏附活性的微小片段(micro integral membrane protein, MIMP),共包含61个氨基酸,相对分子质量为6 950 Da,分子式为C₃₁₅H₅₀₂N₈₆O₈₇S₂,其酸性氨基酸数量较多,为13.1%,等电点9.90。进一步研究发现,MIMP受体与位于IEC上的凝集素受体相一致。且MIMP能刺激抗炎因子IL-10, IL-6增加,促炎因子IL-12p70减少,并促进T淋巴细胞分化为更多的辅助性T细胞1(T helper 1, Th1)细胞^[8,9]。

国内外对寻找具有高效价和特异性的SLP结构域的片段备受重视。深入开展此方面的分子生物学研究,可望获得若干新的发现,有利于从分子水平寻求乳酸杆菌对肠屏障功能障碍防治的新思路和新方法。

2 TJ对维持肠道屏障功能具有重要作用

TJ普遍存在于IEC靠近管腔端的相邻细胞膜间,是IEC连接的主要形式,其对胃肠道多种病原体均具有选择性屏障功能^[10,11]。体外研究发现,EPEC能破坏细胞间TJ,从而损伤IEC的屏障功能,引起炎症介质如TNF- α 、INF- γ 等的分泌增加^[2]。IL-10基因敲除小鼠可导致肠道TJ结构破坏,IEC通透性增加,从而引起肠屏障破坏^[8]。TJ本身的信号调控及信号通路较为复杂,包括经典的PKC,细胞外信

号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK), AHC途径及特殊的紧密连接蛋白(ZO-1)相关核酸连接蛋白(ZO1-associated nucleic acid-binding protein, ZONAB), 泛核蛋白NaCo, 细胞周期蛋白, Ras, 磷酸化和甲基化调控途径等, 其中以PKC的可逆性磷酸化调控为主^[2]。

近年来研究表明, TJ相关蛋白的磷酸化对IEC屏障的功能有重要的影响。正常情况下, 封闭蛋白occludin的丝氨酸和苏氨酸位点高度磷酸化, 而其酪氨酸位点并未出现明显的磷酸化, 但其磷酸化失活后则会引起肠道屏障功能的损伤, IEC通透性增加和凋亡加重^[12]。另有学者研究发现, 各种致病因子引起PKC激酶或ERK等信号分子激活后, 引起骨架蛋白F-actin的收缩, 导致occludin磷酸化失活^[13], ZO-1与TJ的相互作用减弱, TJ受损, 肠道屏障功能破坏。但对occludin磷酸化位点的报道并不一致, 可能位于人的Tyr-398和Tyr-402蛋白位点^[14], 也有报道位于Tyr-403和Tyr-404位点^[15]。另一项研究发现, Tyr-402, Tyr-400以及Ser-408也参与TJ的磷酸化调节, 其调节可能与磷酸化激酶CK1和CK2有关^[16]。occludin磷酸化调节与蛋白激酶PKC- η 有关, PKC- η 能促进TJ相关蛋白occludin的合成, 及与ZO-1, ZO-2和ZO-3的相互作用, 引起细胞骨架蛋白, 如扣带蛋白cingulin, Par-3和Par-6的收缩^[17]。Claudin转录后修饰主要包括磷酸化, 甲基化, 乙酰化, 十六烷酰化等^[18]。Claudin经调控后形成离子通道, 从而调节细胞内外的离子平衡^[19]。Claudin第一个外环与其所带电荷的多少有关, Claudin-3和Claudin-4的第二个环与其TJ的形成和维持有关。而Claudin-1的第一个外环的后段即Claudin-1 53-80对TJ的调节起着重要的作用, 体外实验进一步证明其能够降低肠道上皮细胞的通透性, 从而发挥其细胞保护作用^[19]。氧化应激等有害刺激可刺激ZO-1发生磷酸化, 导致肠道上皮细胞的电阻降低以及occludin-ZO-1和钙黏附素/连环素(E-cadherin-beta-catenin)复合物的重新分布, 进一步影响肠上皮细胞TJ的正常结构, 而加用ZO-1磷酸化阻滞剂后对防治TJ损伤具有重要的作用^[20]。

但TJ相关蛋白在维持IEC屏障功能中相关紧密连接基因表达及信号调控的相关研究仍有待深入^[21]。

3 PP2A可逆性磷酸化与IEC凋亡和再生关系密切
PP2A与肠TJ及正常屏障功能的维持呈负相关。

PP2A是IEC内重要的丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白磷酸酶, 在细胞凋亡、增殖与分化中起重要作用, 参与细胞内众多信号通路和生理生化过程的调节^[22]。作为一种多功能酶, PP2A在维持IEC正常的凋亡与再生、保持其动态平衡中具有重要作用, 其生理活性的改变与IEC损伤后凋亡、再生的发生密切相关。尤其在炎症、缺血、创伤等因素作用下, IEC凋亡增多, PP2A在这一过程中发挥着十分重要的调控作用, 可能是IEC凋亡与再生达到平衡的一个调节因子。

研究表明, PP2A对小鼠IEC的生长具有抑制作用, 其机制可能与PKC调节真核起始因子4E(eukaryotic initiation factor 4E, eIF-4E)结合蛋白1(4E binding protein 1, 4E-BP1)的去磷酸化有关, PKC可以诱导PP2A成倍增加, 从而抑制PKC对4E-BP1的磷酸化作用, 并降低细胞周期素D1的表达, 参与对促分裂原活化的蛋白激酶/胞外信号调节激酶(MAPK/ERK kinase, MEK)信号通路的调节, 阻断由死亡受体诱导的细胞凋亡途径, 并使Bid蛋白(Bcl-家族中促凋亡类的蛋白)活化从而促进IEC凋亡增加^[23]。氧化应激可以增强PP2A与Caco-2细胞的相互作用, 而加用PP2A抑制剂可明显缓解氧化应激对Caco-2细胞肠屏障功能的损伤, 包括增加IEC电阻值, 降低其通透性, 诱导ZO-1的表达和重新分布等^[24]。PP2A与occludin的作用位点主要集中在其C末端的蛋白片段, 此片段受Src信号分子调控, 发生酪氨酸磷酸化后其作用大增^[24]。此外, PP2A可以调节IEC胞质内Akt的活性, 使Akt的两个活性位点Ser308和Ser473去磷酸化而抑制其活性, 从而使Ras-PI3K-Akt抗凋亡途径受阻^[25]。实验表明, 过氧亚硝酸盐(peroxynitrite, PN)能激活IEC内p38进而使PP2A活化, 后者再抑制Akt的活性, 诱导IEC损伤凋亡^[25]。PP2A在调控IEC胞内STAT3的磷酸化、其亚细胞分布以及其与DNA的结合中也具有重要作用。PP2A抑制剂能诱导STAT3上丝氨酸、苏氨酸的磷酸化, 与丝氨酸/苏氨酸激酶共同作用从而保持STAT3的磷酸化水平动态平衡, 对修复肠黏膜具有至关重要的作用^[26]。此外, STAT5b缺失或失活的IEC能够上调TLR2而活化NF- κ B, 导致IEC损伤凋亡增加、肠黏膜免疫炎症反应加重。且在T84肠上皮细胞系中STAT5b的活化能抑制TNF- α 介导的胱冬肽酶-3(caspase-3)和NF- κ B的活化, 从而抑制IEC凋亡^[27]。PP2A是Wnt信号传导系统中主要的负性调节蛋白, 可以通过对Wnt信号通路的调节影响IEC的增殖与

■创新盘点
肠屏障功能的相关研究从肠腔内微生态的改变和致病菌的调控研究逐渐过渡到肠上皮自身实体功能的研究。

■应用要点

乳酸杆菌表面蛋白的应用, 肠上皮细胞绒毛刷状缘的碱性磷酸酶和胞质内蛋白磷酸酶2A分子的调控, 小肠干细胞移植对肠屏障功能障碍的防治具有重要的意义。

分化。PP2A活性增加可使内皮细胞一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)上的Ser1177脱磷酸化, 抑制其活性, 从而使NO合成减少, 从而调节IEC的凋亡^[28]。PP2A通过调控细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, Cdk1)和细胞分裂周期蛋白(cell division cycle protein 25C, Cdc25C)而控制细胞的有丝分裂, 细胞内PP2A B56 δ 能抑制Cdc25C的活化, 阻碍细胞的正常分裂, 促进IEC凋亡^[29]。

当IEC胞质内Ca²⁺快速增多时能活化PP2A并使PP2A/C和PP2A/A表达增多, 而PP2A的激活又能抑制NF- κ B的活性调节IEC的凋亡进程, 对维持肠黏膜中IEC凋亡与再生的平衡具有重要作用^[30]。PP2A与14-3-3蛋白竞争性结合组蛋白脱乙酰基酶(histone deacetylases, HDAC)氨基末端具有保守的14-3-3蛋白结合序列, 可其丝氨酸位点去磷酸化, 从而抑制PP2A对该位点的去磷酸化作用, 使HDACs在细胞质中聚集, 降低目的基因的表达, 影响IEC的生长增殖与凋亡^[31]。此外, PP2A为Ras信号途径的正调节因子, 可使Raf-1的Ser259去磷酸化, 其PR55能作用于Raf-1的Ser259位点, 再通过PP2Ac使该位点去磷酸化而消除该位点的自抑制作用, 对Raf-1及其下游的ERK起正性调节作用, 促进IEC损伤后的修复^[32]。

总之, PP2A可逆性磷酸化与IEC凋亡和再生, 以及正常肠道屏障功能的维持有着密切的关系, 可作为IEC损伤防护的一个重要靶分子。PP2A抑制剂能保护IEC的正常功能, 对肠道屏障功能的防治有着重要的意义。

4 IAP能够减轻炎症反应, 保护肠屏障功能

碱性磷酸酶分布于人体的各个器官, 肠道特异性IAP是传统肠道成熟标志物, 但其在肠道生理功能目前尚不清楚^[33]。该蛋白定位于小肠上皮绒毛刷状缘, 以表面活性剂样颗粒的形式分泌入肠腔, 受肠道正常菌群内毒素的调控^[34]。人体发育后期肠道菌群建立时, IAP活性急剧增加, 可能与肠道的消化和吸收功能有关, 对维持正常的肠屏障功能具有重要的意义^[35]。虽然IAP缺陷小鼠没有明显的消化功能障碍, 仅出现因肠壁脂肪滴运输速度加快而导致食欲增加出现肥胖, 但IAP对于减轻肠道炎症反应, 维持正常肠道功能有重要作用^[36,37]。炎症性肠病患者可出现肠上皮IAP mRNA表达减少, 而口服IAP的大鼠显著降低了肠道炎症水平^[38]。实验证明, IAP缺乏的(突变型)斑马鱼对LPS的敏感性增加, 通过

MyD88的和肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)引起肠道中性粒细胞聚集及相应的炎症。而在无菌条件下突变型斑马鱼肠道内中性粒细胞则呈缺乏状态^[33]。因此, IAP对于防止炎症反应, 维持肠道正常菌群及肠道正常的屏障功能起着至关重要的作用。由于IAP位于刷状缘, 能够对内毒素进行修饰和灭活, 防止细菌入侵肠道上皮屏障, 而当LPS及大量炎症因过度聚积超过一定的阈值浓度则会抑制IAP的产生, 从而导致更加严重的炎症和抗炎反应综合征^[39]。研究表明, 肠道pH对于活性有重要的作用, HCO₃⁻可以增加IAP对内源性磷酸化合物的水解活性, 活化ATP后通过P2受体可进一步增加HCO₃⁻的分泌^[40]。饥饿和疾病状态能够引起肠道屏障功能损害, 而正常的肠内营养对维持IAP功能有重要作用, 饥饿状态下IAP的表达可能被沉默, 是导致危重患者肠道黏膜屏障功能障碍重要原因^[41]。体内外实验均表明, 加用IAP能够抑制NF- κ B的活性, 从而解除LPS对IEC的毒性, 抑制致病菌对IEC的侵袭和移位, 维持正常的肠屏障功能, 而IAP敲除小鼠则对LPS的毒性较为敏感, 服用外源性IAP后LPS的毒性则明显缓解^[41]。病理学检查发现IAP敲除小鼠经糖酐酯钠处理后, 肠道组织明显受到慢性炎症侵害, 而其饮用水中加用外源性IAP后肠道炎症得到明显缓解, 并缓解炎症因子及髓过氧化物酶的水平^[42]。应激状态如氧化应激, 毒素等能刺激Caco-2, HT29和IEC18xc细胞IAP的分泌并增强其活性, 其机制与MAPK, NF- κ B, calcium, 以及环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路无关, 其作用可被放线菌素D(actinomycin D, AMD)增强^[43]。因此, IAP对维持正常肠道屏障功能有重要的作用, 对肠屏障功能障碍的防治具有潜在的意义。

5 IEL具有抗感染, 保护肠屏障功能的作用

近年来, 肠免疫屏障的研究也取得了一定进展。IEL是位于肠道黏膜上皮组织细胞间或上皮细胞与基底膜相接处的一群异质性淋巴细胞, 在肠免疫屏障中起着重要的作用^[44], 主要见于小肠黏膜绒毛基底部上皮细胞之间, 表达 γ - δ 二聚体, 包括 γ - δ T淋巴细胞受体, 而缺乏CD4⁺和CD8⁺标志。Hayday等^[45]将肠道IEL分为两种细胞类型。A型细胞发育和抗原识别等特点与外周淋巴样组织中的T淋巴细胞类似, 包括CD8- α - β TCR- α - β IEL; B型淋巴细胞在发育场所、细胞

表型、抗原识别和生物学功能等方面均有别于普通的外周T淋巴细胞, 主要包括CD8- α - α TCR- α - β IEL和TCR- γ - δ IEL, 这群细胞在机体其他部位极其少见. 小鼠外周循环中TCR- γ - δ IEL只占T淋巴细胞总数的1%-5%, 而在肠道, TCR- γ - δ IEL可高达30%-40%^[44]. IEL具有重要的免疫监视和防御功能, 不但能够辅助B淋巴细胞的体液免疫功能, 而且在受到体内外刺激时能分泌多种细胞因子, 如IL-2、IL-4、IL-3、IL-5、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、TGF- β 等. 此外, IEL还有不同的细胞毒作用, 包括异常反应和病毒特异性的细胞毒作用, NK细胞活性以及自发的细胞毒作用, 对于维持肠道正常的屏障功能具有重要的作用. γ - δ IEL可产生IL-5、INF- γ 、TNF- α 、TGF- β 等细胞因子, 具有溶细胞活性, 而Fas和穿孔素则可介导 α - β IEL和 α - α IEL的细胞毒作用. 研究发现, IEL可以表达紧密连接蛋白分子ZO-1, occludin, 以及缝隙连接分子connexin 26, 表达CD3抗体可以刺激occludin的合成, 有助于保护肠屏障功能^[46]. CD4-Cre重组酶能够调节c-Myc的失活, 减少小肠上皮CD8- α - β TCR- α - β 的IEL细胞的成熟, 其胸腺中的前体中存在CD8- α - β TCR- α - β 的IEL细胞, 但并不能发挥其可遗传的免疫活性, 其增殖能力下降, 凋亡率增加, 其机制可能与IL-15受体亚单位降低和抗凋亡蛋白Bcl-2的减少有关, 因为将BCL-2基因转入c-Myc缺陷细胞中, CD8- α - β TCR- α - β 的IEL数量增加^[47]. IEL与IEC关系密切, 对肠上皮屏障功能具有重要的调节作用, T淋巴细胞受体 γ - δ 亚型的IEL能够保护肠屏障的抗损伤能力, TCR- α - β CD8- α - β IEL细胞活化后能分泌INF- γ 能损伤肠上皮屏障功能, 包括降低电阻值, 增加对大分子物质甘露醇的通透性, 而其作用对INF- γ 敲除小鼠则不明显^[48]. 研究表明, IL-15能够通过信号通路IL-15R β 、Jak3和STAT5的可逆性磷酸化调节抗凋亡因子Bcl-2和Bcl-x的作用, 而与PI3K、ERK和STAT3无关, 从而调节肠道的炎症反应及屏障功能^[49]. 因此, IEL对维持正常的肠道屏障功能, 及保护IEC不受损伤均具有重要的作用, IEL及相关细胞因子也可能作用肠道屏障功能障碍治疗的方向之一.

6 ISC可能作为治疗肠道屏障功能障碍的新方法

ISC是位于肠黏膜隐窝内的具有自我更新和增殖分化为成熟IEC功能的细胞. ISC存在于小肠上皮基质中, 能够分化成各种不同细胞类型, 在

遇到外界有害刺激可能发生凋亡, 而其子代细胞很难再发挥其多源性分化潜能^[50]. ISC是一种多能干细胞, 一个隐窝内各种表型已分化细胞的数量及比例是恒定的, 其作为治疗肠屏障功能障碍的新方法已经有了初步的研究^[51]. 动物实验研究表明, 小肠造血ISC移植能够减少病理性T淋巴细胞的数量, 通过与IEC相互作用, 保护肠屏障功能^[52,53]. 且小肠ISC能够下调博来霉素诱发的小鼠肠道和肝脏炎症反应及纤维化反应, 并能抑制自身免疫性T淋巴细胞的产生, 而对小鼠肾脏则无明显作用^[54]. 临床病例报告及相关临床试验表明, 肠道屏障功能障碍的患者如炎症性肠病的患者在接受小肠ISC移植后肠道感染得到一定的控制, 但也有少数患者在接受移植后发生较为严重的肠道感染, 而出现这种不良反应的患者可能与其肠道的手术史有关^[52]. I期临床试验证明, 输注外源性小肠ISC无明显不良反应出现, 其在血液中存在的时间<1 h, 并能通过旁分泌刺激生长因子的产生, 并能抑制自身免疫反应, 对改善肠道与肝脏功能具有一定的帮助^[52]. 研究表明, ISC的分化成熟与Snail基因的表达, 定位以及Wnt信号通路的调控有关, 其可以调节成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、TGF- β 、TNF- α 、以及肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的合成与分泌, 以及参与p53、c-fos、c-jun、p38和wtp53等的表达与调控, 从参与对IEC损伤的修复^[55]. 通过干细胞技术和组织工程技术定向诱导ISC使其分化为特定的细胞或组织替代功能障碍的细胞或组织缺损, 或通过ISC直接直接促进伤口局部细胞创伤修复能力是ISC对IEC损伤修复的重要途径. 通过干细胞技术和组织工程定向诱导肠道干细胞使其分化成为特定的细胞以替代功能障碍的细胞或组织缺损, 可能成为治疗肠屏障功能障碍的有效方法. 总之, 小肠干细胞对肠道屏障功能障碍的防治有一定的作用, 但目前相关研究仍处于起步阶段, 其作用及机制仍需要进一步深入研究.

7 结论

肠道屏障功能受损与临床多种疾病有密切的关系, 其发生、发展及调控机制较为复杂, 各种信号分子之间存在着复杂的作用关系. 目前肠屏障功能的相关研究从肠腔内微生态的改变和致病菌的调控研究逐渐过渡到肠上皮自身实体功能的研究. 相信随着分子生物学技术的发展, 肠

同行评价

本文选题恰当, 论据充分, 科学性较好.

屏障功能障碍机制的研究对于临床相关疾病的防治有着更为重要的意义。

8 参考文献

- Mannon P. Gut permeability and colitis. *Gastroenterology* 2009; 137: 732-734
- Qin H, Zhang Z, Hang X, Jiang Y. L. plantarum prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol* 2009; 9: 63
- Zhou Y, Qin H, Zhang M, Shen T, Chen H, Ma Y, Chu Z, Zhang P, Liu Z. *Lactobacillus plantarum* inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction induced by unconjugated bilirubin. *Br J Nutr* 2010; 104: 390-401
- Zhang M, Wang XQ, Zhou YK, Ma YL, Shen TY, Chen HQ, Chu ZX, Qin HL. Effects of oral *Lactobacillus plantarum* on hepatocyte tight junction structure and function in rats with obstructive jaundice. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 2989-2999
- Chu ZX, Chen HQ, Ma YL, Zhou YK, Zhang M, Zhang P, Qin HL. *Lactobacillus plantarum* prevents the upregulation of adhesion molecule expression in an experimental colitis model. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2505-2513
- 沈通一, 秦环龙. 乳酸杆菌对肠上皮黏附机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 16: 2631-2636
- 沈通一, 张明, 周玉坤, 陈红旗, 张鹏, 杭晓敏, 秦环龙. 基于生物信息学的植物乳酸杆菌表层黏附蛋白的筛选及鉴定. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1626-1631
- Liu Z, Zhang P, Ma Y, Chen H, Zhou Y, Zhang M, Chu Z, Qin H. *Lactobacillus plantarum* prevents the development of colitis in IL-10-deficient mouse by reducing the intestinal permeability. *Mol Biol Rep* 2010 Jun 23. [Epub ahead of print]
- Liu ZH, Ma YL, Shen TY, Chen HQ, Zhou YK, Zhang P, Zhang M, Chu ZX, Qin HL. Identification of DC-SIGN as the receptor during the interaction of *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1258 and dendritic cells. *World J Microbiol Biotechnol* 2010
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-1920
- Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 207-235
- Friis LM, Keelan M, Taylor DE. *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2009; 77: 1553-1560
- Kim HG, Kim NR, Gim MG, Lee JM, Lee SY, Ko MY, Kim JY, Han SH, Chung DK. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits lipopolysaccharide-induced TNF- α production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice. *J Immunol* 2008; 180: 2553-2561
- Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L, Turner JR, Naren A, Desiderio DM, Rao R. Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J Biol Chem* 2009; 284: 1559-1569
- Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, Desiderio D, Guntaka R, Rao R. PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 61-66
- Dörfel MJ, Westphal JK, Huber O. Differential phosphorylation of occludin and tricellulin by CK2 and CK1. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 69-73
- Castaldo C, Vastano V, Siciliano RA, Candela M, Vici M, Muscariello L, Marasco R, Sacco M. Surface displaced α -enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb Cell Fact* 2009; 8: 14
- Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci* 2005; 118: 1427-1436
- Mrsny RJ, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB, Quan C, Koval M, Nusrat A. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. *Am J Pathol* 2008; 172: 905-915
- Seth A, Yan F, Polk DB, Rao RK. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1060-G1069
- 秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 443-447
- Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 2001; 353: 417-439
- Guan L, Song K, Pysz MA, Curry KJ, Hizli AA, Danielpour D, Black AR, Black JD. Protein kinase C-mediated down-regulation of cyclin D1 involves activation of the translational repressor 4E-BP1 via a phosphoinositide 3-kinase/Akt-independent, protein phosphatase 2A-dependent mechanism in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 14213-14225
- Sheth P, Samak G, Shull JA, Seth A, Rao R. Protein phosphatase 2A plays a role in hydrogen peroxide-induced disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. *Biochem J* 2009; 421: 59-70
- Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11598-11603
- Neufert C, Pickert G, Zheng Y, Wittkopf N, Warn-tjen M, Nikolaev A, Ouyang W, Neurath MF, Becker C. Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell Cycle* 2010; 9: 652-655
- Han X, Ren X, Jurickova I, Groschwitz K, Pasternak BA, Xu H, Wilson TA, Hogan SP, Denson LA. Regulation of intestinal barrier function by signal transducer and activator of transcription 5b. *Gut* 2009; 58: 49-58
- Gookin JL, Rhoads JM, Argenzio RA. Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G157-G168
- Forester CM, Maddox J, Louis JV, Goris J, Virshup DM. Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19867-19872
- Marasa BS, Xiao L, Rao JN, Zou T, Liu L, Wang J, Bellavance E, Turner DJ, Wang JY. Induced TRPC1 expression increases protein phosphatase 2A sensitizing intestinal epithelial cells to apoptosis through inhibition of NF- κ B activation. *Am J Physiol*

- 31 Martin M, Potente M, Janssens V, Vertommen D, Twizere JC, Rider MH, Goris J, Dimmeler S, Kettmann R, Dequiedt F. Protein phosphatase 2A controls the activity of histone deacetylase 7 during T cell apoptosis and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 4727-4732
- 32 Adams DG, Coffee RL Jr, Zhang H, Pelech S, Strack S, Wadzinski BE. Positive regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes. *J Biol Chem* 2005; 280: 42644-42654
- 33 Bates JM, Akerlund J, Mittge E, Guillemin K. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe* 2007; 2: 371-382
- 34 Alpers DH, Zhang Y, Ahnen DJ. Synthesis and parallel secretion of rat intestinal alkaline phosphatase and a surfactant-like particle protein. *Am J Physiol* 1995; 268: E1205-E1214
- 35 Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, Guillemin K. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol* 2006; 297: 374-386
- 36 Nakano T, Inoue I, Koyama I, Kanazawa K, Nakamura K, Narisawa S, Tanaka K, Akita M, Masuyama T, Seo M, Hokari S, Katayama S, Alpers DH, Millán JL, Komoda T. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene Akp3 impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1439-G1449
- 37 Narisawa S, Huang L, Iwasaki A, Hasegawa H, Alpers DH, Millán JL. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7525-7530
- 38 Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, Dijkstra G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut* 2009; 58: 379-387
- 39 Vaishnava S, Hooper LV. Alkaline phosphatase: keeping the peace at the gut epithelial surface. *Cell Host Microbe* 2007; 2: 365-367
- 40 Akiba Y, Mizumori M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD. Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G1223-G1233
- 41 Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, Warren HS, Narisawa S, Millán JL, Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 3551-3556
- 42 Ramasamy S, Nguyen DD, Eston MA, Nasrin Alam S, Moss AK, Ebrahimi F, Biswas B, Mostafa G, Chen KT, Kaliannan K, Yammine H, Narisawa S, Millán JL, Warren HS, Hohmann EL, Mizoguchi E, Reinecker HC, Bhan AK, Snapper SB, Malo MS, Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase has beneficial effects in mouse models of chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010 Jul 19. [Epub ahead of print]
- 43 López-Posadas R, González R, Ballester I, Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, Sánchez de Medina F. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis* 2010 Jul 19. [Epub ahead of print]
- 44 Cheroutre H. IELs: enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium. *Immunol Rev* 2005; 206: 114-131
- 45 Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2001; 2: 997-1003
- 46 Inagaki-Ohara K, Sawaguchi A, Suganuma T, Matsuzaki G, Nawa Y. Intraepithelial lymphocytes express junctional molecules in murine small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 977-983
- 47 Jiang W, Ferrero I, Laurenti E, Trumpp A, MacDonald HR. c-Myc controls the development of CD8alpha TCRalpha beta intestinal intraepithelial lymphocytes from thymic precursors by regulating IL-15-dependent survival. *Blood* 2010; 115: 4431-4438
- 48 Zufferey C, Erhart D, Saurer L, Mueller C. Production of interferon-gamma by activated T-cell receptor-alpha beta CD8alpha beta intestinal intraepithelial lymphocytes is required and sufficient for disruption of the intestinal barrier integrity. *Immunology* 2009; 128: 351-359
- 49 Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N, Martin-Lannerée S, Dusanter-Fourt I, Verkarre V, Mention JJ, Rahmi G, Kiyono H, Butz EA, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Meresse B. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest* 2010; 120: 2131-2143
- 50 Suzuki A, Sekiya S, Gunshima E, Fujii S, Taniguchi H. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Lab Invest* 2010; 90: 1425-1436
- 51 Yan L, Cai C, Li J, Xu S, Chang Q, Li Y, Wu B. Present status and perspectives of stem cell-based therapies for gastrointestinal diseases. *Stem Cell Rev* 2009; 5: 278-282
- 52 García-Bosch O, Ricart E, Panés J. Review article: stem cell therapies for inflammatory bowel disease - efficacy and safety. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 939-952
- 53 Al-Toma A, Mulder CJ. Review article: Stem cell transplantation for the treatment of gastrointestinal diseases--current applications and future perspectives. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 Suppl 2: 77-89
- 54 Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8407-8411
- 55 Horvay K, Casagrande F, Gany A, Hime GR, Abud HE. Wnt Signaling Regulates Snai1 Expression and Cellular Localization in the Mouse Intestinal Epithelial Stem Cell Niche. *Stem Cells Dev* 2010 Sep 9. [Epub ahead of print]

编辑 李薇 电编 何基才