论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1364-03

血管扩张刺激磷蛋白调节失血性休克大鼠小肠屏障功能与闭锁连接蛋白1的关系

张 晔[1],徐 竞[2],刘建仓[2],张连阳[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]创伤外科,全军战创伤中心,[2]第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 观察血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator stimulated phosphoprotein, VASP)调节失血性休克大鼠小肠屏障功能与闭锁连接蛋白1(ZO-1)的关系。**方法** 采用失血性休克大鼠模型,以血浆D-乳酸含量反映肠屏障功能,观察失血性休克后大鼠小肠上皮黏膜VASP表达和磷酸化的变化、ZO-1的表达变化以及肠屏障功能变化,比较变化趋势,并观察失血性休克加入VASP磷酸化激动剂后对上述分子表达和肠屏障功能的影响。**结果** ①与正常对照组相比,失血性休克后大鼠小肠黏膜VASP蛋白表达明显降低($P<0.01$),VASP蛋白磷酸化在正常时表达量低,休克1 h时增高,2~4 h迅速降低($P<0.01$);ZO-1表达随着休克时间的延长显著降低,在休克2 h时降低明显($P<0.01$);血浆D-乳酸含量在休克1 h改变不明显,2~4 h显著增高($P<0.01$)。②VASP磷酸化激动剂cAMP可明显增强失血性休克2 h大鼠小肠上皮VASP蛋白表达和VASP磷酸化、ZO-1的表达,降低失血性休克2 h大鼠血浆D-乳酸含量增高幅度($P<0.01$)。**结论** ZO-1可能与VASP对失血性休克大鼠肠屏障功能的调节作用有关。

关键词: 闭锁连接蛋白1; 血管扩张刺激磷蛋白; 肠屏障功能

中图法分类号: R329.26;R574.502;R605.971 **文献标识码:** A

ZO-1 may participate in regulatory effect of VASP on intestinal barrier function during hemorrhagic shock in rats

ZHANG Ye[1], XU Jing[2], LIU Jian-cang[2], ZHANG Lian-yang[1] ([1]Trauma Center of PLA, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To observe the relationship between zonula occludens protein subunit 1 (ZO-1) and the regulatory effect of vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) on the intestinal barrier function in rats of hemorrhagic shock (HS). **Methods** The intestinal barrier function was reflected by the hematoplasma D-lactic acid content, and the mucous membrane of small intestine from HS rats at different time after shock (1, 2 and 4 h) were adopted to determine the expressions of VASP, phospho-VASP and ZO-1. cAMP, the agonist of VASP phosphorylation, was employed to observe the change of the above mentioned molecules and the intestinal barrier function following HS. **Results** (1) VASP expression of small intestine mucous membrane was decreased significantly after HS ($P<0.01$), phospho-VASP was mildly expressed in normal control group, and exhibited a time-dependent change following HS, increased at 1 h ($P<0.01$) and decreased to a low level after 2 h ($P<0.01$). ZO-1 expression was decreased following HS, significantly after 2 h ($P<0.01$). The hematoplasma D-lactic acid content did not change much 1 h after shock, while significantly increased after 2 h ($P<0.01$). (2) cAMP increased the expressions of VASP, phospho-VASP and ZO-1, and decreased hematoplasma D-lactic acid content at 2 h shock. **Conclusion** ZO-1 may be involved in the regulatory effect of VASP on intestinal barrier function in HS rats.

Key words: ZO-1; vasodilator stimulated phosphoprotein; intestinal barrier function

肠屏障功能障碍(intestinal barrier disfunction)是严重创伤/休克后肠道损伤的一种重要形式,主要表现为肠黏膜通透性增高,可引起肠道细菌移位(bacterial translocation, BT)和肠源性脓毒血症,最终导致全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)[1,2]。肠黏膜上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)之间的紧密连接是维持肠黏膜屏障最重要的结构基础,闭锁小带蛋白(zonula occludens protein, ZO)是位于细胞质内膜表面的紧密连接的重要结构性蛋白,ZO-1是其重要亚型之一。研究表明,肠屏障血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator stimulated phosphoprotein, VASP)是维持和调节紧密连接及肠屏障功能的

作者简介:张 晔,男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事严重创伤后肠道损伤的病理生理方面的研究。E-mail: flyingwing_zy@sina.com

通信作者:张连阳, E-mail: hpzhangly@163.com,电话:(023)68757991

收稿日期:2008-01-03;修回日期:2008-04-21

重要分子[3]。本实验室前期研究表明,大鼠小肠上皮 VASP 蛋白及其磷酸化在失血性休克肠屏障功能障碍中有重要作用,但是否与紧密连接蛋白有关,尚不清楚。本实验采用失血性休克大鼠模型,以环磷腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)磷酸化 VASP,探讨 VASP 调节失血性休克小肠屏障功能与 ZO-1 的关系。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

cAMP、小鼠抗大鼠 β-actin 抗体购自 Sigma 公司、兔抗大鼠 VASP 抗体、兔抗大鼠 phospho-VASP(Ser157)抗体购自 Cell signal 公司、兔抗大鼠 ZO-1 抗体购自 Santa Cruz 公司、羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗、增强发光底物反应试剂盒、洗膜液 Restore™ Western blot stripping buffer 购自 Pierce 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　动物模型制备及实验分组　　清洁级 Wistar 大鼠(40 只,雌雄各半),体质量(218.0 ± 29.1)g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。分组为:正常对照组、休克 1、2、4 h 组及休克 2 h + cAMP 组,每组 8 只。戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,于右侧股动脉插管并接血压计(休克 2 h + cAMP 组右侧股静脉插管接输液泵),肝素钠抗凝,使平均动脉压降至 40 mmHg,分别维持 1、2、4 h。休克 2 h + cAMP 组在平均动脉压降至 40 mmHg 后,以输液泵缓慢输入 cAMP(0.3 mg/100 g),维持平均动脉压 40 mmHg 水平 2 h。

1.2.2　Western blot 检测 VASP 蛋白表达、VASP 蛋白磷酸化、ZO-1 蛋白表达　　参考文献[4]中的方法,分别以兔抗大鼠 VASP 抗体(1∶1 000)、兔抗大鼠磷酸化 VASP(Ser157)抗体(1∶1 000)、兔抗大鼠 ZO-1 抗体(1∶200)4 ℃孵育过夜,洗膜,羊抗兔二抗(1∶8 000)室温孵育,增强发光底物反应试剂盒处理膜,暗室中 X 线胶片感光、显影及定影。然后用洗膜液室温下洗膜,小鼠抗大鼠 β-actin 抗体(1∶2 000)4 ℃孵育过夜,洗膜,羊抗小鼠二抗(1∶5 000)室温孵育,按上述步骤显影。扫描胶片,用 BandScan 5.0 软件分析条带。

1.2.3　血浆 D-乳酸含量测定　　抽取大鼠循环血 400 μl 加入 5.8 mol/L 高氯酸 40 μl,混匀冰浴 10 min,4 000 r/min 4 ℃离心 10 min。取上清液 200 μl 加入 11.6 mmol/L 氢氧化钾 20 μl,混匀冰浴 10 min,3 200 r/min 4 ℃离心 10 min。取上清液 125 μl 加入辅酶Ⅰ-甘氨酸缓冲液 375 μl 以及 D-乳酸脱氢酶 25 μl,置 25 ℃水浴 90 min,采用分光光度计(波长 340 nm)测定吸光度值[D(340)],并以不同浓度的 D-乳酸作标准曲线,查对标准曲线求得 D-乳酸含量。

1.3　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件处理,组内自身对照和配对实验数据用 t 检验。组间比较采用方差分析。

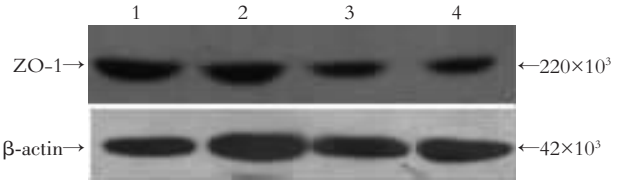
2　结果

2.1　不同休克时间点小肠上皮组织 VASP 表达和 VASP 磷酸化变化

与正常组相比,休克后小肠上皮组织 VASP 蛋白表达明显降低,休克 1 h 时 VASP 的表达由正常对照的(0.338 ± 0.051)降至(0.075 ± 0.017)($P < 0.01$),休克 2 h 时为(0.050 ± 0.010)($P < 0.01$),休克 4 h 时最低,为(0.006 ± 0.002)($P < 0.01$)。正常组 VASP 蛋白磷酸化水平很低,仅为(0.021 ± 0.004),失血性休克后 VASP 蛋白磷酸化呈先增高后降低的双相变化趋势,休克 1 h 小肠黏膜上皮组织 VASP 蛋白磷酸化明显增高,为(0.145 ± 0.011)($P < 0.01$),休克 2 h 开始降低至(0.108 ± 0.010)($P < 0.01$),休克 4 h 时最低,为(0.059 ± 0.006)($P < 0.01$)。

2.2　不同休克时相点小肠黏膜上皮组织 ZO-1 蛋白表达变化

与正常组相比,休克后小肠上皮组织 ZO-1 蛋白表达明显降低,休克 1 h 时 ZO-1 的表达由正常对照的(0.170 ± 0.043)降至(0.139 ± 0.027),休克 2 h 时为(0.071 ± 0.018)($P < 0.01$),休克 4 h 时最低,为(0.044 ± 0.013)($P < 0.01$)。见图 1。



1:正常对照; 2: 休克 1 h; 3: 休克 2 h; 4:休克 4 h

图 1　ZO-1 蛋白在不同休克时间点的表达

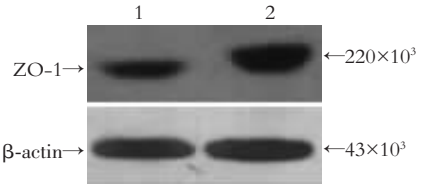
2.3　不同休克时相点肠屏障功能的变化

采用血浆 D-乳酸含量反应肠屏障功能变化,与正常对照组的(27.22 ± 2.56) mg/L 相比,失血性休克 1 h 时血浆 D-乳酸含量无明显变化,为(28.53 ± 1.82) mg/L,休克 2 h 增高至(32.03 ± 2.85) mg/L($P < 0.01$),休克 4 h 时最高,为(37.57 ± 3.19) mg/L($P < 0.01$)。

2.4　VASP 蛋白磷酸化激动剂 cAMP 对休克 2 h 小肠黏膜 VASP 表达和磷酸化、ZO-1 表达及肠屏障功能的影响

cAMP 可明显增高休克大鼠小肠上皮组织 VASP 蛋白表达水平,休克 2 h 组为(0.050 ± 0.010),而休克 2 h + cAMP 组为(0.326 ± 0.043)($P < 0.01$)。cAMP 作用下休克 2 h 大鼠小肠上皮组织 VASP 蛋白磷酸化水平显著增高,由休克 2 h 组的(0.108 ± 0.010)增高至休克 2 h + cAMP 组的(0.169 ± 0.030)($P < 0.01$)。

Western blot 结果显示,cAMP 可明显增高休克大鼠小肠上皮组织 ZO-1 蛋白表达水平,休克 2 h 组为(0.071 ± 0.018),而休克 2 h + cAMP 组为(0.127 ± 0.025)($P < 0.01$,图 2)。



1: 休克 2 h; 2: 休克 2 h + cAMP

图 2　休克 2 h 同时给予 cAMP 后 ZO-1 表达的变化

cAMP 可明显降低休克 2 h 大鼠血浆 D-乳酸含量,使大鼠血浆 D-乳酸含量由休克 2 h 组的(32.03 ± 2.85) mg/L 降至休

克 2 h + cAMP 组的(29.44 ± 2.61) mg/L($P < 0.01$)。

3 讨论

VASP 是维持和调节肠上皮细胞间紧密连接及肠屏障功能的重要分子。我们的前期实验显示,在失血性休克过程中,VASP 蛋白及其磷酸化在肠屏障功能障碍中有重要作用。然而其是否与紧密连接蛋白有关,目前尚不清楚。

肠黏膜屏障是肠屏障最基本,也是起主要作用的组成部分,由 IEC 及其间的连接构成,相邻 IEC 间的连接有多种方式,如紧密连接、缝隙连接、黏附连接以及黏着斑等。其中,紧密连接位于相邻的 IEC 间,是一个由多种蛋白质组成的、动态变化的复合体,是 IEC 间最重要的连接方式,其功能是允许离子及小分子可溶性物质通过,而阻挡毒性大分子及微生物通过。按分布部位的不同,可将紧密连接蛋白分为两类:①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,如咬合蛋白(occludin)、闭合蛋白(claudin)、连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM)等;②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,如 ZO。ZO 位于细胞质内膜表面,是紧密连接的结构性蛋白,N 末端连接细胞膜蛋白如 occludins 蛋白,C 末端结合肌动蛋白和应激纤维,从而将细胞膜蛋白和骨架系统连接在一起,构成稳定的连接系统。ZO 有 3 种异构体,即 ZO-1、ZO-2 和 ZO-3,其中 ZO-1 相对分子质量较大[5]。

VASP 调节肠屏障功能可能与 ZO-1 有关。首先,VASP 具有结合并在磷酸化后调节紧密连接所需的分子结构,可通过在 PKA 作用下的磷酸化调节细胞 - 细胞间的紧密连接,从而调节细胞间通透性。从分子结构上看,ZO-1 蛋白含有 3 个 PDZ 结构域,而 VASP 至少有 3 个结合 PDZ 结构域;另外,ZO-1 含有 SH3 结构域,并可与富含 Proline 序列特异结合,恰好 VASP 就含有 1 个中央的富含 Proline 结构域。而且,VASP 的 PKA 磷酸化位点 Ser157 与 VASP 中结合 Proline 的区域(可结合 ZO-1 的区域)毗邻[6]。其次,VASP 与 ZO-1 的表达高低、分布疏密与屏障功能高低有密切关系。在细胞通透性低、屏障功能高的 T84 柱状 IEC,VASP 在紧密连接处与 ZO-1 结合,表达量多,呈经典的"鸡爪样"分布;而在细胞通透性高、屏障功能低的 KB 鳞状颈上皮细胞,VASP 虽也在紧密连接处与 ZO-1 结合,但表达量少,分布弥散[6]。在人脐静脉内皮细胞,正常对照中磷酸化 VASP 散在分布于细胞质,而 PKA 作用后,VASP 磷酸化,磷酸化 VASP 在细胞连接处与紧密连接蛋白 ZO-1 结合明显增强,紧密连接聚合增强,内皮细胞通透性显著降低[7]。

在创伤/休克过程中,VASP 调节肠屏障功能障碍是否与 ZO-1 有关目前尚不清楚。仅有少量文献报道,休克后肠屏障功能降低与紧密连接蛋白的表达降低和从细胞膜紧密连接复合体脱离有关。在胆管结扎的失血性休克大鼠的回肠和结肠,发现紧密连接蛋白细胞膜分布降低和肠黏膜通透性增高[8]。在失血性休克大鼠的回肠和结肠,发现紧密连接蛋白 ZO-1 丢失,同时出现肠黏膜通透性增高和细菌移位[9]。我们的研究发现,正常组有一定量的 VASP 蛋白表达,而 VASP 磷酸化水平很低,失血性休克后 VASP 蛋白表达明显降低,VASP 蛋白磷酸化呈先增高后降低的变化趋势,休克 1 h 时增高,2 h 后迅速降低;ZO-1 的表达随着休克时间的延长显著降低。失血性休克 1 h 大鼠血浆 D-乳酸含量改变不明显,2 h 后显著增高。VASP 磷酸化激动剂 cAMP 可明显增强失血性休克 2 h 时大鼠小肠上皮 VASP 蛋白表达和 VASP 磷酸化、ZO-1 的表达,减轻失血性休克 2 h 大鼠肠屏障障碍程度,降低血浆 D-乳酸含量。因此我们认为 VASP 调节失血性休克大鼠肠屏障功能可能与 ZO-1 有关。

参考文献:

[1] Gatt M, Reddy B S, MacFie J. Review article: bacterial translocation in the critically ill——evidence and methods of prevention[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2007, 25(7): 741 - 757.

[2] Alberda C, Gramlich L, Meddings J, *et al*. Effects of probiotic therapy in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(3): 816 - 823.

[3] Utech M, Bruwer M, Nusrat A. Tight junctions and cell-cell interactions[J]. Methods Mol Biol, 2006, 341: 185 - 195.

[4] Mei J, Xu R J. Transient changes of transforming growth factor-beta expression in the small intestine of the pig in association with weaning [J]. Br J Nutr, 2005, 93(1): 37 - 45.

[5] 张中伟, 秦环龙. 肠上皮细胞紧密连接的结构及功能研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2005, 12(6): 367 - 369, 381.

[6] Lawrence D W, Comerford K M, Colgan S P. Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca^{2+} switch[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282(6): C1235 - C1245.

[7] Comerford K M, Lawrence D W, Synnestvedt K, *et al*. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability[J]. FASEB J, 2002, 16(6): 583 - 585.

[8] Luyer M D, Buurman W A, Hadfoune M, *et al*. High-fat enteral nutrition reduces endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and gut permeability in bile duct-ligated rats subjected to hemorrhagic shock[J]. J Hepatol, 2004, 41(3): 377 - 383.

[9] Luyer M D, Buurman W A, Hadfoune M, *et al*. Pretreatment with high-fat enteral nutrition reduces endotoxin and tumor necrosis factor-alpha and preserves gut barrier function early after hemorrhagic shock [J]. Shock, 2004, 21(1): 65 - 71.

(编辑 汪勤俭)