DOI:10.16016/j.1000-5404.201501120

论著

甘露糖结合凝集素对肠上皮细胞屏障功能的影响

许 超,彭 科,王文生,于 敏,孙力华,杨 桦 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院普通外科)

[摘要] **目的** 观察甘露糖结合凝集素(mannose binding lectin,MBL)对人结肠癌细胞株 Caco-2 屏障功能的影响并探讨其分子机制。**方法** 体内实验:取 14 只 C57 小鼠,按随机数字表法分为假手术组和 LPS 组(经腹腔注射 LPS,构建肠炎症损伤模型),通过免疫组化和 Real-time PCR 观察 MBL 的变化情况,HE 染色观察肠黏膜的损伤情况。体外实验:Caco-2 细胞分为对照组、空转染组和 MBL shRNA 组(应用 MBL 干扰质粒转染 Caco-2 细胞),采用 Real-time PCR、Western blot 检测紧密连接蛋白的表达情况,并检测其跨上皮电阻(TER)。**结果** 体内实验 TER 显示 LPS 组肠黏膜通透性(80.32 ± 5.43)比假手术组(140.45 ± 4.78)明显增加($P<0.01$),HE 染色显示 LPS 处理后肠黏膜完整性比假手术组降低,免疫组化和 Real-time PCR 检测结果显示 LPS 处理组 MBL 表达升高($P<0.05$)。在体外实验中,我们成功构建 MBL shRNA 质粒模型,MBL shRNA 组细胞中 MBL 的蛋白和 mRNA 表达[(0.34 ± 0.09),(0.42 ± 0.12)]较对照组及空转染组明显降低($P<0.05$)。MBL shRNA 组的紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 的蛋白[(0.43 ± 0.10)、(0.53 ± 0.11)]和 mRNA 水平[(0.43 ± 0.08)、(0.45 ± 0.10)]明显低于其余组($P<0.05$);MBL shRNA 组 TER 值(80.33 ± 7.64)降低较其余组明显($P<0.05$)。**结论** 下调 MBL 基因可减少肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 mRNA 及蛋白水平的表达,减弱肠上皮细胞的屏障保护功能。

[关键词] 甘露糖结合凝集素;紧密连接蛋白;LPS
[中图法分类号] R-322; R363.21; R574.6 [文献标志码] A

Role of mannose binding lectin in regulation of intestinal epithelial barrier *in vivo* and *in vitro*

Xu Chao, Peng Ke, Wang Wensheng, Yu Min, Sun Lihua, Yang Hua (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of mannose binding lectin (MBL) on the epithelial barrier function of Caco-2 cells and investigate the underlying mechanism. **Methods** In the *in vivo* study, 14 C57Bl/6 mice were randomly divided into 2 groups, sham-operation and LPS groups. The LPS mice received intra-peritoneal injection of LPS to induce acute barrier injury. The expression of MBL at protein and mRNA levels in the intestinal mucosa was detected by immuno-histochemical assay and PCR, respectively. The morphological change of intestinal mucosa was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. In the *in vitro* study, Caco-2 cells were transfected with MBL-shRNA plasmid. Then, the expression of tight junction protein at protein and mRNA levels was measured by Western blotting and real-time PCR, respectively, and transepithelial electrical resistance (TER) was determined. **Results** *In vivo* study found that LPS group increased intestinal permeability compared with sham group (TER value: 80.32 ± 5.43 *vs* 140.45 ± 4.78, $P<$

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81330013);国家自然科学基金面上项目(81270451);国家教育部创新团队项目基金(教技函[2013]59号);国家自然科学基金青年科学基金(81200288)

[通信作者] 杨 桦,E-mail: hwbyang@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.1035.018.html(2015-04-21)

0.01). HE staining showed LPS group had enhanced disruption of intestinal morphological structure than the sham group. Immuno-histochemical assay and real-time PCR assay indicated that the expression levels of MBL were apparently increased after LPS exposure ($P<0.05$). After Caco-2 cells were transfected with MBL-shRNA plasmid, the expression of MBL at protein and mRNA levels was significantly decreased in MBL-shRNA cells (0.34 ± 0.09, 0.42 ± 0.12) than the control-shRNA cells and the blank cells ($P<0.05$). The protein and mRNA expression levels of Occludin (0.43 ± 0.10, 0.43 ± 0.08) and Claudin-1 (0.53 ± 0.11, 0.45 ± 0.10) were obviously lower in MBL-shRNA cells than in control-shRNA and blank cells ($P<0.05$). The TER was 80.33 ± 7.64 in the MBL-shRNA cells, significantly lower than the other cells ($P<0.05$). **Conclusion** Down-regulation of MBL decreases the expression of tight junctions proteins Occludin and Claudin-1 at mRNA and protein levels, and attenuates the epithelial barrier function.

[**Key words**] mannose-binding lectin; tight junction proteins; LPS

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81330013), the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270451), the Program for Innovative Team of Ministry of Education (2013-59), and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81200288). Corresponding author: Yang Hua, E-mail: hwbyang@126.com

肠黏膜屏障在维持肠道的完整性和机体稳态中发挥重要作用。多种病理过程如严重创伤、烧伤、败血症、失血性休克和慢性炎症疾病等,都能引起肠屏障破坏,导致肠道细菌移位入血,加重肠道损伤。同时肠道菌群破坏肠壁组织,并释放 LPS 向肠道周围组织和血液移位,进一步损伤紧密连接蛋白,LPS 促进肠道细胞释放大量的炎性因子,加重肠黏膜屏障损伤,引起体内稳态失衡[1]。

甘露糖结合凝集素(mannose binding lectin,MBL)是一种模式识别分子,在固有免疫防御及维持机体稳态中起重要作用。它主要由肝脏产生,释放入血液循环后,其可以直接识别并结合病原微生物发挥调理素作用,同时也可以通过凝集素途径激活补体形成膜攻击复合物,清除病原微生物,维持机体的稳态[2-3]。近来研究发现在肠上皮细胞有 MBL 特异性表达[2]。但对于 MBL 肠道特异性表达发挥的作用及机制并不清楚。有研究发现 MBL 基因缺陷小鼠在烧伤和细菌接种模型中,发展成脓毒血症的比例更高并有更高的死亡率[3]。在 DSS 诱导的急性结肠炎中,MBL/c1q 基因缺陷小鼠的内毒素水平较野生小鼠明显增高,屏障通透性也增加,屏障功能受到破坏[4]。这些研究提示,MBL 可能直接参与了肠屏障功能的调控。本实验拟通过 shRNA 质粒干扰 MBL 的表达,观察肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达,探讨 MBL 对肠屏障功能的影响,为探讨其作用分子机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠癌上皮 Caco-2 细胞株购自中国科学院细胞库,常规细胞培养箱购自日本 Sanyo 公司,胎牛血清 MEM 培养基购自美国 HyClone 公司,胰蛋白酶购自美国 BBI 公司,Bax、Bcl-2 抗体、聚偏二氟乙烯(PDVF)膜购自美国 Millipore 公司,垂直电泳仪和湿转电转仪购自美国 Bio-Rad 公司,RIPA 裂解液、蛋白测定试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司,凝胶成像分析系统购自美国 KODAK 公司,质粒序列来源于 Sigma 公司。

1.2 实验动物及分组

14 只 6~8 周龄雄性 C57 小鼠,体质量(21±2)g。按随机数字表法分为 2 组($n=7$):假手术组、LPS 组。处理前 12 h 禁食,自由饮水。LPS 组经腹腔注射 LPS 溶液 10 mg/kg[5];假手术组给予同等体积的 0.9% 氯化钠注射液。观察 6 h 后腹腔注射 0.15 mL 0.1% 的戊巴比妥钠麻醉后,腹正中线切开,暴露肠段并取其小肠组织。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 Caco-2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗、1% 非必需氨基酸的 MEM 培养基中置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的条件下培养,直至细胞融合 80%,用 0.2% 含 EDTA 胰酶消化,Hanks 液吹均匀后,将 Caco-2 细胞以 1.0×10^6/孔接种至 6 孔板中并分对照组和 LPS 处理组,向 LPS 组中加入 100 μg/mL 的 LPS 处理 Caco-2 细胞,24 h 后提取蛋白[6]。

1.3.2 细胞转染质粒 Caco-2 细胞以 1.0×10^6 接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,分为 3 组:对照组、空转染组和 MBL shRNA 组,用 Lipfectamine 2000 进行质粒瞬转。

1.3.3　Western blot 检测 MBL、Occludin、Claudin-1 蛋白表达水平　　提取不同处理过后的蛋白样，用蛋白测定试剂盒测定上清液蛋白水平。蛋白上样，恒压电泳，恒流湿转至 PVDF 膜（用甲醇浸泡），转膜后，用 5% TBST 脱脂奶粉室温封闭 2 h，加入一抗 4 ℃冰箱过夜。TBST 洗膜，然后加入对应二抗，37 ℃温箱孵育 1 h，TBST 洗膜。加入 ECL 发光试剂显影，采集发光信号，经 Kodak Molecular Imaging 软件行密度分析，实验重复 3 次。

1.3.4　免疫组化染色　　石蜡切片脱蜡，二甲苯、乙醇各浸泡 10 min，PBS 冲洗 3 次，阻断内源性过氧化物酶的活性，枸盐酸缓冲液，一抗室温下孵育 2 h。DAB 液显色，苏木精复染，自来水冲洗、蓝化，中性树胶封固，晾干后观察，实验重复 3 次以上。

1.3.5　实时荧光定量 PCR 分析 MBL mRNA 水平变化　　用 TRIzol（Invitrogen）按试剂盒说明提取细胞总 RNA，用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以合成的 cDNA 第 1 链为模板进行扩增（按 SYBR Green 试剂盒说明进行）。$\triangle Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{\beta\text{-actin}}$，$\triangle\triangle Ct = \triangle Ct_{处理组} - \triangle Ct_{对照组}$。不同样本的目的基因表达的相对差异量 $=2^{-\triangle\triangle Ct}$，引物序列见表 1，实验重复 3 次以上。

表 1 Real-Time PCR 引物核苷酸序列

引物名称	引物序列	产物长度（bp）
mouseMBL	上游：5′-GGACAGAGCAGAATTTGATACTAGCG-3′ 下游：5′-ACTCAGAGAGAAGAGCACCCAGTTTC-3′	100
HumanMBL	上游：5′-CCCTGTTTCCATCACTCCCTC-3′ 下游：5′ -GTGCCATCACGCCCATCTT -3′	160
Occludin	上游：5′-AGCAGCGGTGGTAACTTTGAGA-3′ 下游：5′-ACTCGCCGCCAGTTGTGTAG-3′	118
Claudin-1	上游：5′-GGTACGAATTTGGTCAGGCTCTC-3′ 下游：5′-CTTGGTGTTGGGTAAGAGGTTGTT-3′	118
β-actin	上游：5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′ 下游：5′-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3′	147

1.3.6　肠黏膜跨上皮电阻测定　　取出两组小肠组织，沿系膜细膜方向剖开肠管，轻轻冲洗肠管，在显微操作镜下剥离肠黏膜，并将其安装在调试好的尤斯灌流仪器上，测取电流值。实验重复 3 次[7]。

1.3.7　肠上皮细胞跨上皮电阻（transepithelial electrical resistance，TER）测定　　接种细胞后的 Transwell 小室，用 MillicellERS-2 电阻测定仪测定 TER，待 TER 数值稳定后，用质粒瞬转 48 h 构建 MBL 基因干扰模型，分别检测处理前后的 TER 值。测得 TER 值需减去空白对照（Transwell 小室内未接种细胞）后记录为每组电阻值，结果以处理后的 TER 值占处理前的百分比表示。每组做 1 复孔，实验重复 3 次[8]。

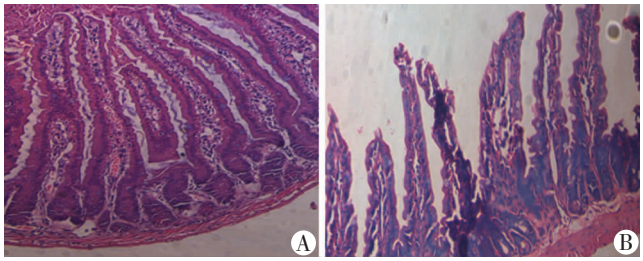
1.4　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　小肠黏膜 TER 值变化和组织形态学改变

腹腔注射 LPS 后，取下小肠黏膜安装到 Ussing chambers 上，待仪器运作平稳后开始记录仪器的电阻值，假手术组与 LPS 处理组 TER 结果分别为（140.45 ± 4.78）、（80.32 ± 5.43）。LPS 处理后，小肠 TER 值较假手术组明显降低（$P < 0.01$）。HE 染色也显示假手术组肠绒毛形态完整性较好，LPS 组肠绒毛完整性较差，部分出现绒毛断裂（图 1）。

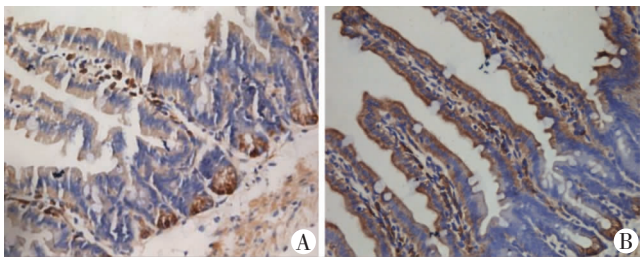


A：假手术组；B：LPS 组

图 1　两组小鼠小肠组织形态学观察　（HE ×200）

2.2　小肠上皮 MBL 表达情况

假手术组中肠绒毛表达少量 MBL，LPS 组中肠上皮和隐窝上皮表达 MBL 明显增高（图 2）。Real-time PCR 结果显示 LPS 处理组 MBL 的 mRNA 相对表达量（12.67 ± 4.85）比假手术组明显升高（$P < 0.01$）。



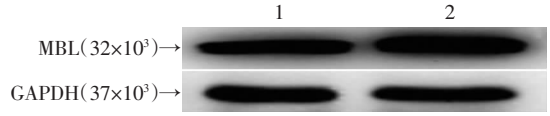
A：假手术组；B：LPS 组

图 2　两组免疫组化小鼠小肠组织 MBL 表达情况
（SABC ×200）

2.3　Caco-2 细胞中 MBL 表达的变化

在体外，100 μg/mL 的 LPS 处理 Caco-2 细胞 24 h

后,Real-Time PCR 检测结果显示,LPS 组 MBL 的 mRNA 相对表达量(2.24 ± 0.67)比对照组高($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,LPS 组 MBL 蛋白相对表达量(2.46 ± 0.89)显著高于对照组($P < 0.05$,图3)。

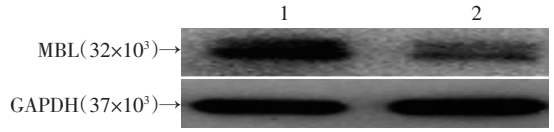


1:对照组;2:LPS 组

图3 Western blot 检测两组单层肠上皮细胞 MBL 的蛋白表达

2.4 shRNA 瞬转对 Caco-2 细胞 MBL 基因的影响

应用 MBL-shRNA 质粒瞬时转染 Caco-2 细胞 48 h 后,Western blot(图4)和 Real-Time PCR 法测量 MBL 表达,结果显示,MBL shRNA 组蛋白水平(0.34 ± 0.09)和 mRNA 水平(0.42 ± 0.12)均较空转染组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

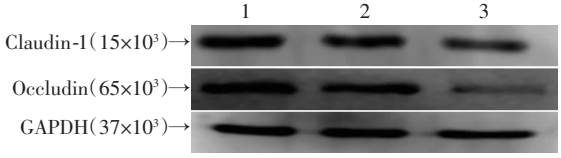


1:空转染组;2:MBL shRNA 组

图4 Western blot 检查两组单层上皮细胞 MBL 的蛋白表达

2.5 肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 的蛋白和基因水平变化

Western blot 检测紧密蛋白的表达:MBL shRNA 组紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1[分别为(0.43 ± 0.10)、(0.53 ± 0.11)]表达均低于对照组、空转染组($P < 0.05$),对照组与空转染组差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时观察其 mRNA 水平变化情况,MBL shRNA 组紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1[分别为(0.43 ± 0.08)、(0.45 ± 0.10)]低于对照组、空转染组($P < 0.05$),对照组与空转染组差异无统计学意义($P > 0.05$,图5、表2)。



1:对照组;2:空转染组;3:MBL shRNA 组

图5 Western blot 检测紧密连接蛋白 Claudin-1 和 Occludin 的蛋白表达

表2 肠上皮细胞紧密连接蛋白的变化水平($n = 3$)

组别	蛋白表达水平		mRNA 相对表达水平	
	Occludin	Claudin-1	Occludin	Claudin-1
对照组	0.88 ± 0.14	0.88 ± 0.08	1	1
空转染组	0.94 ± 0.22	0.88 ± 0.07	0.84 ± 0.11	0.90 ± 0.08
MBL shRNA 组	0.43 ± 0.10[a]	0.53 ± 0.11[a]	0.43 ± 0.08[a]	0.45 ± 0.10[a]
F 值	8.719	16.539	36.38	47.08
P 值	0.017	0.004	<0.001	<0.001

a:$P < 0.05$,与对照组及空转染组比较

2.6 肠上皮 TER 的变化

对照组、空转染组和 MBL shRNA 组的 TER 分别为(133.67 ± 9.07)、(120.67 ± 6.66)、(80.33 ± 7.64),MBL shRNA 组明显低于其余2组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

肠黏膜屏障是由生物屏障、免疫屏障和机械屏障组成,肠上皮构成的机械屏障是重要屏障之一。单层肠上皮细胞之间由紧密连接蛋白连接,可以防止病原微生物、抗原和毒素入血。然而在许多病理情况下,如严重感染、休克、急慢性炎症疾病等,可造成肠上皮细胞凋亡脱落,导致屏障功能衰竭。肠道炎症损伤,诱导肠上皮细胞损伤及凋亡,加重了屏障功能衰竭[1,9]。

众所周知,MBL 在机体固有免疫防御中起到重要作用——通过凝集素途径活化激活补体,同时还起到调理素的作用。MBL 主要由肝脏产生和分泌,分为血清 MBL(分泌进入血液循环)和胞内 MBL,同时 MBL 在肺、睾丸、肾、胸腺和小肠内也有表达,被认为起到相应的免疫防御功能[2-4]。文献[4]研究显示 MBL/C1q 基因缺陷型小鼠在 DSS 诱导急性结肠炎模型中,肠屏障功能受损更严重,血清内毒素水平较高。近年来在肠道围绕 MBL 的补体功能研究报道较多,而对 MBL 自身与肠上皮细胞之间关系尚少见报道。为了深入研究 MBL 对肠屏障功能的影响,我们构建了 MBL 干扰质粒,观察肠上皮细胞屏障功能的变化。

本实验发现,在 LPS 刺激下,肠上皮细胞高表达 MBL。为了排除体内复杂的免疫反应干扰,我们选用 Caco-2 细胞作为研究肠上皮屏障功能的模型。我们成功转染 MBL shRNA 后,发现 MBL 表达下调,上皮细胞间紧密连接蛋白 mRNA 及蛋白表达均明显受到抑制。TER 检测显示 MBL shRNA 组屏障通透性增加,肠道屏障功能损伤程度更大。表明 MBL 可能参与调控紧密连接蛋白的表达,改善肠黏膜的通透性,从而起到保

护肠道屏障的作用。但是 MBL 如何发挥功能尚不清楚。目前研究报道内肽酶 meprin 可以裂解紧密连接蛋白,增加屏障的通透性,从而破坏肠黏膜屏障[10]。而 MBL 可以直接与内肽酶 meprin 结合,作为内肽酶的天然抑制剂,起到减少蛋白质水解和基质降解[11]。本实验发现干扰 MBL 基因表达后,紧密连接蛋白的表达下调。因此,我们考虑 MBL 可能是通过抑制内肽酶功能,从而保护肠黏膜屏障。Nonaka 等[12]研究发现,胞内 MBL 可能作为蛋白从内质网到高尔基体的转运载体,控制蛋白分子的形成。Wang 等[13]报道,通过筛查 MAPK 信号途径,发现 MBL 可以通过活化 P38 使其磷酸化增加,调控细胞的增殖及凋亡。上述通路均可以以不同形式发挥调节紧密连接蛋白表达,影响屏障功能,但 MBL 调节紧密连接蛋白表达的具体机制尚需进一步研究。

综上所述,干扰 MBL 基因后紧密连接蛋白表达下调,屏障功能受损,考虑 MBL 可能通过调节紧密连接蛋白的表达,参与保护肠屏障功能的作用。该研究为 MBL 基因缺陷的患者在急性炎症时期肠道保护提供了可能的靶点及理论依据。

参考文献:

[1] Lei Q, Qiang F, Chao D, *et al*. Amelioration of hypoxia and LPS-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by emodin through the suppression of the NF-κB and HIF-1α signaling pathways[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(6): 1629 – 1639.

[2] Ip W K, Takahashi K, Ezekowitz R A, *et al*. Mannose-binding lectin and innate immunity[J]. Immunol Rev, 2009, 230(1): 9 – 21.

[3] Takahashi K. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(12): 1179 – 1790.

[4] Schepp-Berglind J, Atkinson C, Elvington M, *et al*. Complement-dependent injury and protection in a murine model of acute dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. J Immunol, 2012, 188(12): 6309 – 6318.

[5] Cai Y, Wang W, Liang H, *et al*. Keratinocyte growth factor improves epithelial structure and function in a mouse model of intestinal ischemia/reperfusion[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44772.

[6] Xiao W D, Chen W, Sun L H, *et al*. The protective effect of enteric glial cells on intestinal epithelial barrier function is enhanced by inhibiting inducible nitric oxide synthase activity under lipopolysaccharide stimulation[J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46(2): 527 – 534.

[7] Williams J M, Duckworth C A, Watson A J, *et al*. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide[J]. Dis Model Mech, 2013, 6(6): 1388 – 1399.

[8] 曹敏, 黄家君. 小檗碱减轻炎症反应时肠上皮屏障功能损害的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 447 – 450.

[9] 张晔, 徐竞, 刘建仓, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(14): 1364 – 1366.

[10] Bao J, Yura R E, Matters G L, *et al*. Meprin A impairs epithelial barrier function, enhances monocyte migration, and cleaves the tight junction protein occludin[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(5): F714 – F726.

[11] Hirano M, Ma B Y, Kawasaki N, *et al*. Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin alpha and beta[J]. J Immunol, 2005, 175(5): 3177 – 3185.

[12] Nonaka M, Ma B Y, Ohtani M, *et al*. Subcellular localization and physiological significance of intracellular mannan-binding protein[J]. J Biol Chem, 2007, 282(24): 17908 – 17920.

[13] Wang Y, Chen A D, Lei Y M, *et al*. Mannose-binding lectin inhibits monocyte proliferation through transforming growth factor-beta1 and p38 signaling pathways[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e72505.

(**收稿**:2015-01-17;**修回**:2015-03-04)

(编辑 龙 亮)