

• 基础论著 •

非酒精性脂肪肝大鼠小肠黏膜上皮屏障及紧密连接蛋白表达的变化

任卫英 沈继平 潘刚 罗蔓 胡予

【摘要】 目的 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 与肠道屏障功能受损密切相关, 本研究探讨非酒精性脂肪肝时肠上皮紧密连接蛋白 Zonula Occluden-1 (ZO-1) 和 Occludin 的表达变化及其在肠黏膜屏障功能减退中的作用。方法 30 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组 (普通饮食) 和高脂模型组, 分别于造模的 12 周、16 周检查肝指数 (肝湿重/体重)、血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、血清胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、肝组织匀浆丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 水平, 光镜下观察末端回肠黏膜形态, 透射电镜下观察小肠上皮细胞紧密连接超微结构, 免疫组化方法检测小肠紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达。结果 16 周模型组大鼠肝脏脂肪变性明显, 肝指数 [(6.3 ± 0.18)% vs. (5.8 ± 0.12)%], 血清 ALT [(68.61 ± 12.12) U/L vs. (25.10 ± 9.06) U/L], 血清 TG [(1.30 ± 0.14) mmol/L vs. (0.72 ± 0.06) mmol/L] 和肝组织匀浆 MDA 水平 [(6.02 ± 0.92) μmol/g vs. (2.15 ± 0.66) μmol/g] 均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 肝组织匀浆 SOD 水平显著低于对照组 [(5.12 ± 1.88) U/g vs. (10.52 ± 2.2) U/g, $P < 0.01$]; 模型组大鼠末端回肠黏膜形态和小肠上皮细胞紧密连接超微结构未见明显异常, 但肠上皮细胞凋亡增加。与对照组比较, 16 周模型组大鼠小肠 ZO-1 及 Occludin 蛋白的表达皆显著下降 (0.65 ± 0.12 vs. 1.08 ± 0.08; 0.62 ± 0.08 vs. 0.95 ± 0.10, $P < 0.01$)。结论 非酒精性脂肪肝时肠黏膜上皮屏障功能减退可能与小肠上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达异常有关。

【关键词】 非酒精性脂肪肝; 肠黏膜屏障功能; 紧密连接; ZO-1; Occludin

Changes of intestinal tight junction protein expression and small intestinal mucosa epithelial barrier in NAFLD rats REN Wei-ying, SHEN Ji-ping, PAN Gang, LUO Man, HU Yu. Department of Geriatrics, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: HU Yu, Email: Hu.yu@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Objective To assess the changes of ZO-1 and Occludin protein expression in NAFLD and elucidate the mechanism of intestinal barrier injury. **Methods** Totally 30 male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into 3 groups: Control group with normal diet, NAFLD model group with 12 weeks high-fat diet and NAFLD model group with 16 weeks high-fat diet. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and liver tissue oxygen index (MDA and SOD) were detected respectively. The intestinal mucosa architecture examination was examined by light microscopy. The ultra-structure of small intestine, especially the tight junction, was observed by transmission electron microscope. The expresses of tight junction protein ZO-1 and Occludin were detected by immunohistochemistry. **Results** Model rats presented with simple steatosis at the 16th week. The liver index in the model group was significantly higher than that in the control group [(6.3 ± 0.18)% vs. (5.8 ± 0.12)%] with higher levels of ALT [(68.61 ± 12.12) U/L vs. (25.10 ± 9.06) U/L], TG [(1.30 ± 0.14) mmol/L vs. (0.72 ± 0.06) mmol/L], MDA [(6.02 ± 0.92) μmol/g vs. (2.15 ± 0.66) μmol/g] and lower level of SOD [(5.12 ± 1.88) U/g vs. (10.52 ± 2.2) U/g, $P < 0.01$]. Transmission electron microscope revealed that there were few changes in the architecture of tight junction between intestinal epithelial cells. But the model animals (both 12th week and 16th week) showed the decreased protein expression of Zonula Occludens -1 (ZO-1) and Occludin in small intestine, and the changes were more obvious in the 16th week model animals (0.65 ± 0.12 vs. 1.08 ± 0.08; 0.62 ± 0.08 vs. 0.95 ± 0.10, $P < 0.01$). **Conclusion** The small intestinal epithelial barrier function injury in NAFLD may be related to the decreased mRNA and protein expression of ZO-1 and Occludin.

【Key words】 Nonalcoholic fatty liver disease; Intestinal barrier function; Tight junction; Zonula Occludens-1; Occludin

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的代谢应激性肝损伤,已成为隐源性肝硬化的主要病因之一^[1]。研究证实 NAFLD 时存在肠道菌群失调、小肠通透性增加以及肠道细菌易位,肠源性内毒素血症的出现成为加重肝脏炎症的“二次打击”^[2-3]。近年来,肠道黏膜屏障功与 NAFLD 的关系正受到越来越多地关注,但是 NAFLD 时肠黏膜屏障功能受损情况及其相关机制仍不清楚。因此本研究通过高脂饮食诱导大鼠脂肪肝,观察小肠黏膜形态学和超微结构的变化,以及肠上皮紧密连接蛋白 Zonula Occludens-1(ZO-1)和 Occludin 的表达,旨在探讨肠黏膜上皮屏障功能减退在 NAFLD 中的作用。

材料与方 法

1. 实验动物分组与脂肪肝模型制备:清洁级雄性 SD 大鼠 30 只,体重 180 ~ 200 g,购自复旦大学上海医学院实验动物中心。随机分为三组:正常对照组(基础饲料,热量为 350 kcal/100 g)、12 周高脂饮食模型组和 16 周高脂饮食模型组(高脂饲料,热量为 460 kcal/100 g,由上海斯莱克公司供应),每组 10 只。高脂饲料配方参考既往报道^[4-5]:80% 基础饲料加 5% 蛋黄粉和 15% 猪油,碳水化合物、脂肪和蛋白质分别占总热量的 51%、31% 和 18%。干预结束后,称取所有大鼠体重,处死大鼠后立即摘取肝脏,称湿重后切去 0.2 cm × 0.2 cm 组织块经甲醛固定、HE 染色后光镜下观察病理形态学改变。

2. 血清学及肝脏氧化应激指标检测:腹主动脉取血,采用 Beckman CX 系列全自动生化分析仪(Beekman CX59PRO)检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)水平,肝脏组织匀浆检测丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量。

3. 小肠病理形态学观察:取 0.2 ~ 0.3 cm 远端回

肠组织 2 份,1 份经甲醛固定、HE 染色后光镜下观察形态学改变,包括测量肠黏膜上皮层厚度、绒毛高度、绒毛宽度和绒毛密度^[6];另 1 份经戊二醛固定,透射电镜下观察小肠上皮细胞超微结构和紧密连接形态^[7]。

4. 免疫组化法检测小肠紧密连接蛋白表达:采用 EnVision 二步法:组织切片脱蜡,3% H₂O₂ 灭活内源酶,抗原修复,滴加一抗(1:200),4 °C 过夜,0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min × 3 次,滴加 EnVision 工作液(包括辣根过氧化物酶偶联第二抗体),37 °C 孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min × 3 次,室温下进行二氨基联苯(DAB)显色反应。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。用 GD-8 型图像分析系统对肠组织 ZO-1 和 Occludin 免疫反应阳性物质的含量进行平均光密度(IOD 值)分析,IOD 值越高表明阳性产物的表达量越多。

5. 统计学分析:采用 SPSS 17 软件进行统计分析,数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用 ANOVA 分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 高脂诱导的 NAFLD 大鼠血清学指标和肝脏组织病理学改变:高脂模型组大鼠的体重、肝脏指数(肝湿重/体重 × 100%)皆明显高于对照组,血清 TC、TG 和 ALT 升高,与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),肝脏脂质过氧化损伤增强,MDA 升高,SOD 降低($P < 0.05$)(表 1)。

肝组织病理学检查显示,对照组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,肝细胞质呈细密颗粒状,门管区无炎症细胞浸润(图 1A);高脂模型组(12 周)大鼠肝细胞轻至中度脂肪变性,以大泡性脂肪变为主,可见肝细胞气球样变,小叶间炎症和(或)汇管区轻度炎症细胞浸润,未见碎屑样坏死(图 1B),高脂模型组(16 周)大鼠肝细胞脂肪变性程度加重,小叶间和汇管区炎

表 1 大鼠肝脏指数、血清学及氧化应激指标($\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏指数(%)	血 ALT(U/L)	血 TC(mmol/L)	血 TG(mmol/L)	肝脏 MDA(μmol/g)	肝脏 SOD(U/g)
对照组	5.8 ± 0.12	25.10 ± 9.06	1.31 ± 0.19	0.72 ± 0.06	2.15 ± 0.66	10.52 ± 2.2
模型组 12 周	6.0 ± 0.09	49.26 ± 10.06 ^b	1.47 ± 0.18 ^a	1.02 ± 0.12 ^a	4.80 ± 0.52 ^a	7.45 ± 1.38 ^a
模型组 16 周	6.3 ± 0.18 ^a	68.61 ± 12.12 ^b	1.68 ± 0.28 ^b	1.30 ± 0.14 ^b	6.02 ± 0.92 ^b	5.12 ± 1.88 ^b
<i>F</i> 值	4.384	11.881	9.524	10.061	10.553	9.198
<i>P</i> 值	0.021	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

症细胞浸润明显(图1C)。

2. NAFLD大鼠小肠黏膜形态的变化:光镜下可见各组大鼠末端回肠黏膜形态学未见明显变化,肠绒毛排列整齐,黏膜上皮厚度无明显差异。与对照组比较,12周模型组大鼠的绒毛高度和宽度皆未见减少,16周模型组大鼠的绒毛高度和宽度略有减少(表2,图2)。模型组大鼠的回肠黏膜固有层内见单核细胞和浆细胞等慢性炎症细胞浸润略增多,中性粒细胞浸润未见明显增多。

表2 小肠黏膜形态学指标($\bar{x} \pm s$)

组别	黏膜厚度 (μm)	绒毛高度 (μm)	绒毛宽度 (μm)	绒毛密度
对照组	160.19 \pm 7.28	108.12 \pm 6.42	13.22 \pm 3.55	0.15 \pm 0.06
模型组 12周	152.08 \pm 6.22	99.76 \pm 5.40	12.64 \pm 4.02	0.14 \pm 0.09
模型组 16周	150.68 \pm 6.32	95.64 \pm 5.38 ^a	11.82 \pm 3.32 ^a	0.12 \pm 0.08 ^a
F值	1.248	5.063	4.883	6.144
P值	0.218	0.038	0.042	0.021

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

3. NAFLD大鼠小肠超微结构和紧密连接的变化:透射电镜下观察到正常大鼠末端回肠上皮细胞排列规则、紧密,上皮细胞表面微绒毛丰富、排列整齐,微绒毛下方可见完整的紧密连接复合体及肌动蛋白,细胞间靠腔面的紧密连接结构清晰、完整,连接缝隙小(图3A)。12周和16周模型组大鼠回肠上皮细胞排列、微绒毛形态和上皮细胞间的紧密连接结构皆无明显改变(图3B,3C),但模型组大鼠肠上皮细胞凋亡易见(图4A,4B),胞质内线粒体肿胀、内质网稍扩张。

4. NAFLD大鼠小肠ZO-1和Occludin蛋白表达的变化:免疫组化染色显示,ZO-1和Occludin蛋白皆呈棕褐色信号,沿大鼠的小肠黏膜细胞膜的顶端呈线状分布,也可见于肠隐窝处,对照组大鼠小肠绒毛上阳性染色分布多而均匀,12周模型组大鼠的阳性染色明显减少,16周模型组大鼠的阳性染色更少(图5~7)。

讨 论

肠黏膜屏障功能减退在急、慢性肝病时常见。我们先前的研究显示肝硬化大鼠肠黏膜形态学改变和小肠屏障功能受损^[6-7],主要包括肠绒毛稀疏或脱落、小肠细菌过度生长,肠通透性增加和肠上皮紧密连接结构受损等,提示小肠黏膜上皮屏障功能受损是肝病时肠源性内毒素血症发生的重要机制。近年来非酒精性脂肪肝成为肝病研究的新热点,研究表明NAFLD时存在肠道菌群失调、小肠黏膜通透性增加,肠源性内毒素血症发生率高^[8-9],但肠道屏障功能减退的具体机制仍

未完全阐明。本研究通过光镜和电镜观察到12周脂肪肝大鼠远端小肠黏膜厚度、小肠绒毛及肠上皮紧密连接结构未见明显异常,16周脂肪肝大鼠仅肠绒毛高度和宽度略见减少,未见绒毛明显稀疏或缺失,提示NAFLD时肠道屏障功能减退的机制与肝硬化时肠道屏障功能减退的机制不完全相同,这与NAFLD包括一系列病理过程有关,即从初始阶段的肝脂肪变性(脂肪肝)到进展阶段的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和肝硬化,肠道屏障结构改变和功能减退的程度也可能随之进展。虽然脂肪肝模型组大鼠小肠形态学在光镜和电镜下未见明显异常,但小肠黏膜固有层内可见以淋巴细胞和浆细胞为主的慢性炎症细胞浸润,上皮细胞凋亡增加,提示肠道慢性炎症的存在。

肠道黏膜上皮屏障功能的解剖基础源于肠上皮细胞间的紧密连接(tight junctions, TJs), TJs由多种紧密连接蛋白组合构成,如ZO-1、Occludin和Claudin等,对维持上皮细胞极性调节肠道通透性起重要作用。这些紧密连接蛋白的表达异常或由于细胞骨架结构改变引起的紧密连接蛋白分布异常皆可导致TJs破坏^[10]。在NAFLD患者的十二指肠隐窝和肠绒毛中ZO-1蛋白的表达明显低于正常人,并且与肠道通透性增加和小肠细菌过度生长密切相关^[9],NAFLD大鼠小肠中ZO-1和Occludin蛋白表达也明显减少^[11-12],提示NAFLD时肠道屏障功能受损可能与紧密连接蛋白的表达减少有关。本研究采用免疫组化方法检测了NAFLD大鼠肠道紧密连接蛋白的表达情况,结果显示脂肪肝模型组小肠黏膜细胞ZO-1和Occludin蛋白的表达均比对照组减少,且16周模型组的减少比12周模型组更明显,提示小肠黏膜上皮屏障功能的降低与肝脏脂肪变性程度平行,但紧密连接蛋白表达减少的分子机制以及在NAFLD不同病变阶段的变化尚需进一步研究阐明。

NAFLD发病机制复杂,涉及胰岛素抵抗、氧化应激、凋亡易感性增加以及细胞损伤的反应异常等方面,其中持续存在的慢性低度炎症反应起重要作用。口服益生菌起到维持肠道菌群稳态和保护肠道屏障功能的作用^[13],还可通过抑制肝脏TLR4信号通路介导的TNF- α 的产生和减少氧化应激介导的ROS的生成,从而有助于减轻早期实验性NAFLD^[14]。一些细胞因子如TNF- α 可以诱导肠上皮细胞凋亡和细胞间紧密连接蛋白结构及功能的异常,导致肠道屏障功能受损^[15],由此引起细菌易位和内毒素血症,成为构成“二次打击”的因素参与NAFLD的进展^[16]。本研究结果和既往研究结果均表明轻度脂肪肝时已出现肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的异常,提示在NAFLD病程的早期已影响肠道屏障功能,倘若在发病早期即采取保护肠道屏障

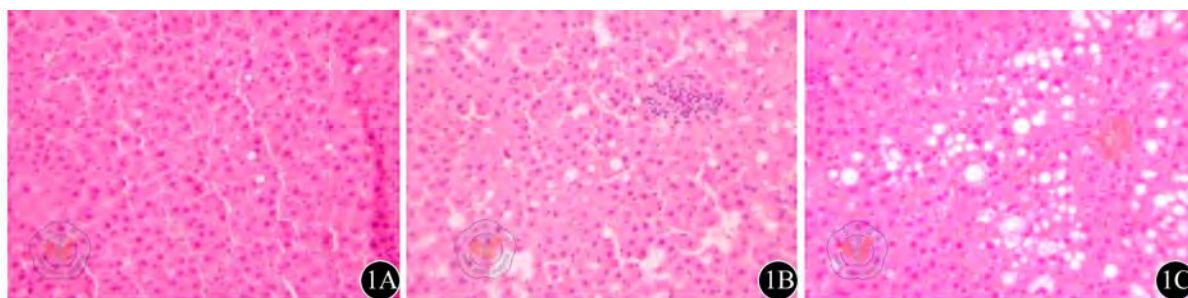


图1 大鼠肝脏光镜下表现 (HE ×100)。1A: 对照组; 1B: 模型组12周; 1C: 模型组16周

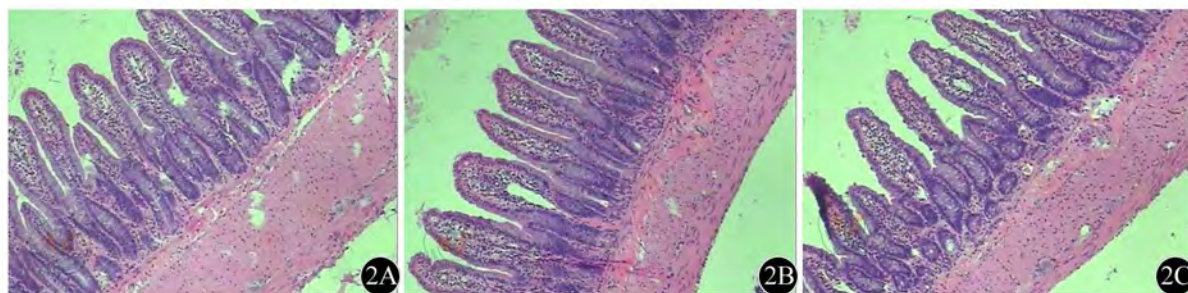


图2 大鼠末端回肠黏膜光镜下表现 (HE ×100)。2A: 对照组; 2B: 模型组12周; 2C: 模型组16周

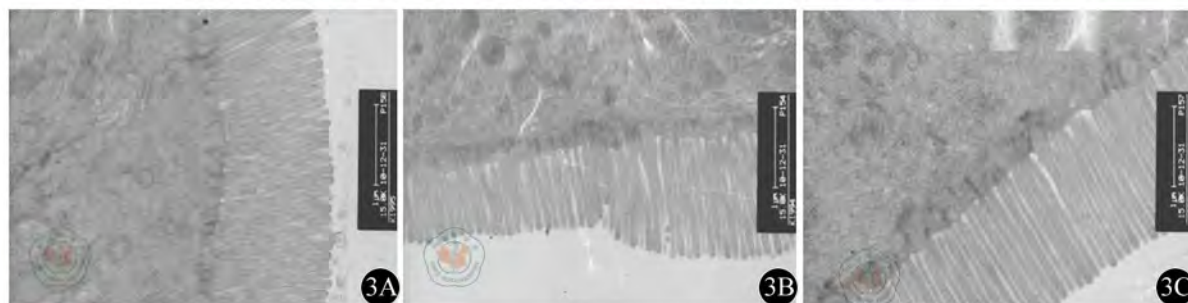


图3 大鼠小肠上皮细胞间紧密连接结构 (透射电镜 ×5000)。3A: 对照组; 3B: 模型组12周; 3C: 模型组16周

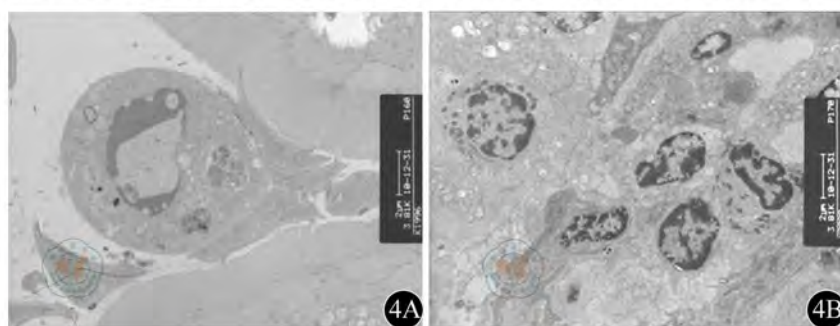


图4 大鼠小肠上皮细胞超微结构的改变 (透射电镜 ×3000)。4A: 模型组12周; 4B: 模型组16周

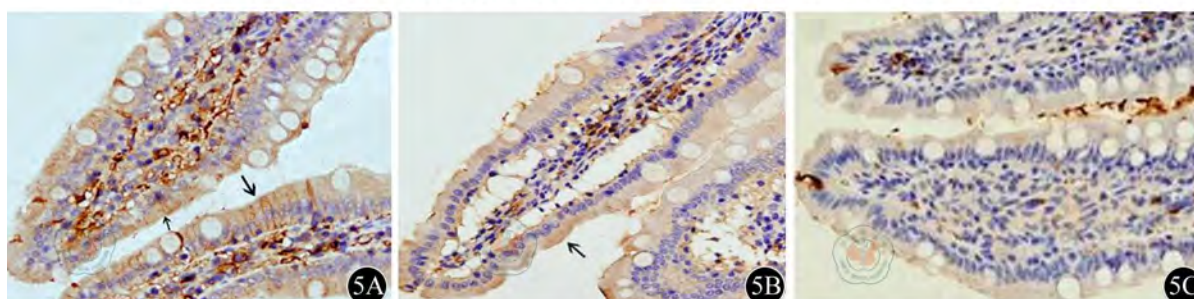


图5 ZO-1 (免疫组织化学染色 ×200)。5A: 对照组; 5B: 模型组12周; 5C: 模型组16周

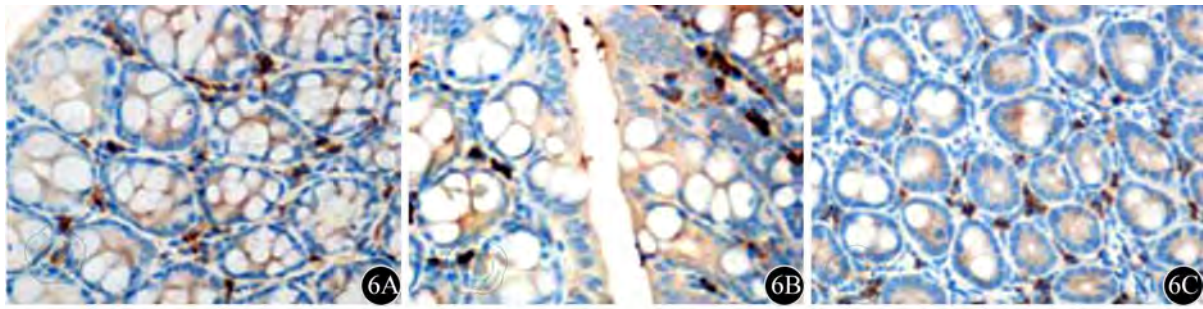


图6 Occludin (免疫组织化学染色 ×200)。6A: 对照组; 6B: 模型组12周; 6C: 模型组16周

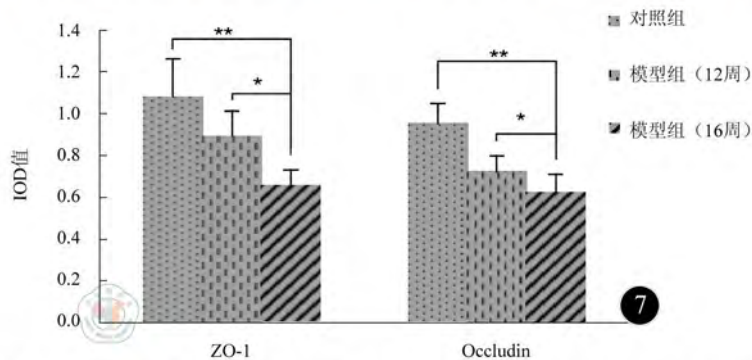


图7 小肠紧密连接蛋白ZO-1和Occludin蛋白表达, 与对照比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

功能的措施,将有助于减缓或逆转 NAFLD 的进程。

综上所述,非酒精性脂肪肝时肠黏膜屏障功能减退可能与肠道慢性炎症和小肠上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达异常有关,且紧密连接蛋白的表达减少与肝脏脂肪变性程度平行。因此注重肠道屏障功能的早期维护可能有助于防治 NAFLD,应引起临床重视。

参 考 文 献

- [1] 范建高. 非酒精性脂肪性肝病研究进展. 中华肝脏病杂志, 2008, 16: 801-803.
- [2] Volynets V, Kuper MA, Strahl S, et al. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci*, 2012, 57: 1932-1941.
- [3] Brun P, Castagliuolo I, Leo VD, et al. Increased intestinal permeability in obese mice; new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292: G518-G525.
- [4] Uno M, Kurita S, Misu H, et al. Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2008, 48: 109-118.
- [5] 苏琳, 刘玉兰. 高糖饮食及高脂饮食建立非酒精性脂肪肝大鼠模型比较. *实验动物科学*, 2009, 26: 14-17.
- [6] 任卫英, 张顺财, 周昭彦, 等. 肝硬化大鼠小肠壁结构改变与小肠细菌过度生长和细菌转位的关系的研究. *中国临床医学*, 2004, 11: 168-170.
- [7] 任卫英, 张顺财, 涂传涛, 等. 肝硬化大鼠小肠微绒毛形态和超微结构的改变与肠源性内毒素血症的关系. *复旦学报: 医学版*, 2008, 35: 125-127.
- [8] Wigg AJ, Roberts-Thomson I, Dymock R, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 2001, 48: 206-211.
- [9] Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2009, 49: 1877-1887.
- [10] Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9: 715-720.
- [11] 许腊梅, 孙丹莉, 张子蜀, 等. 紧密连接蛋白 Occludin 在非酒精性脂肪肝大鼠肠上皮细胞中的表达及其与 TNF- α 的关系. *世界华人消化杂志*, 2010, 18: 981-986.
- [12] Endo H, Niioka M, Kobayashi N, et al. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS One*, 2013, 16: e63388.
- [13] Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 2009, 58: 1091-1103.
- [14] Waqnerberger S, Spruss A, Kanuri G, et al. Lactobacillus casei Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. *J Nutr Biochem*, 2013, 24: 531-538.
- [15] Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter AH, et al. Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 915: 270-274.
- [16] De Gottardi A, McCoy KD. Evaluation of the gut barrier to intestinal bacteria in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 2011, 55: 1391-1399.

(收稿日期: 2013-05-09)

(本文编辑: 戚红丹)