

C3 胞外酶抑制乙醇诱导的肠黏膜屏障功能紊乱

佟静 王颖 王炳元

【摘要】 目的 探讨 RhoA 特异性抑制剂 C3 胞外酶对乙醇诱导的肠上皮细胞通透性增加过程中的抑制作用。方法 予乙醇及 C3 胞外酶作用肠上皮细胞屏障后,测定跨上皮细胞电阻值 (TEER),分析肠上皮细胞屏障的通透性的变化。应用 Western blot 检测紧密连接跨膜蛋白 occludin 的表达;应用免疫荧光染色法检测紧密连接蛋白 occludin 表达和分布。结果 予 C3 胞外酶预处理后,可显著抑制乙醇诱导的 TEER 值降低及 occludin(S/IS)比值的增加,同时可部分恢复细胞膜上 occludin 的表达。结论 RhoA 特异性抑制剂 C3 胞外酶可抑制乙醇诱导肠上皮细胞屏障通透性增加的过程。

【关键词】 C3 胞外酶; 乙醇; 跨上皮细胞电阻; 紧密连接部

The inhibition of C3 extracellular enzymes on ethanol-induced intestinal epithelial cell barrier dysfunction

TONG Jing, WANG Ying, WANG Bing-yuan. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: WANG Bing-yuan, Email: wangby0908@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of C3 extracellular enzymes, RhoA specific inhibitor, on ethanol-induced increase in intestinal epithelial cell barrier permeability. **Methods** Caco2 cells were pretreated with C3 extracellular enzymes, then treated with ethanol for 50 min. The transepithelial electrical resistance value (TEER) assays were employed to reveal the permeability of the intestinal epithelial barrier. The tight junction protein occludin was observed by western blot. Distribution of the tight junction protein occludin was assessed by immunofluorescence microscopy. **Results** C3 extracellular enzymes could partially inhibit intestinal leakage and restored normal TEER values and occludin (S/IS) ratio in the intestinal epithelial barrier. The C3 extracellular enzymes restored the expression of the occludin protein in the membrane partially. **Conclusion** RhoA signaling molecules involve in ethanol-induced increase in intestinal epithelial barrier permeability.

【Key words】 C3 extracellular enzymes; Ethanol; Transepithelial electrical resistance; Tight junctions

Rho 是一种重要的小 G 结合蛋白 (small GTP-binding protein), 简称小 G 蛋白^[1]。目前认为 Rho 家族成员的主要功能是调节细胞骨架重组以及调节基因转录^[2]。人们了解最多的是 RhoA, 研究发现, Rho 家族及其 Rho 相关转导通路的下游信号分子, 参与紧密连接 (tight junction) 的开放、炎性细胞的浸润等多方面过程。RhoA 可影响紧密连接蛋白的分布, 开放紧密连接^[3]。紧密连接作为细胞间通路最主要的屏障直接影响肠黏膜屏障的通透性^[4-5]。RhoA 特异性抑制剂 C3 胞外酶是一种从肉毒梭状芽孢杆菌提取的一种生物毒素, 能将 Rho-GTP 转化成 Rho-GDP, 从而抑制了 Rho-GTP 与 ROCK 的 RBD 结合, 抑制 Rho 的活化, 同时也产生 ROCK 的抑制作用^[6]。我们应用 Caco-2 细胞建立体外肠上皮

细胞屏障模型, 观察 C3 胞外酶对乙醇诱导的肠黏膜屏障通透性增加的影响, 并进一步研究其作用机制。

材料与方法

一、材料

Caco-2 细胞株, 购自南京凯基公司; DMEM 高糖培养液、胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; RhoA 抗体、MLC 及 p-MLC 抗体, 美国 Santa Cruz 公司; occludin、zonula occludens-1 (ZO-1) 抗体, 美国 Santa Cruz 公司; RhoA 特异性抑制剂肉毒梭菌 C3 胞外酶, 美国 Sigma 公司; FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体, 北京中山生物技术公司。

二、方法

1. 体外肠上皮细胞屏障模型的建立: 分化良好的 Caco-2 细胞接种于 transwell 板上 (孔径 3 μm , 有效膜面积 1.12 cm^2), 接种密度为 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$, 隔天换液 (Transwell 上层加入 100 μl 培养液, 下层加入 600 μl)

培养液), 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 同时测定跨上皮细胞电阻 (TEER)。约 21~24 d, 细胞形成紧密单层, 融合达 90%以上, TEER 明显升高, 证明肠上皮细胞屏障形成。Caco-2 细胞形成单层上皮细胞屏障后, 在 Transwell 基底侧加入乙醇孵育, 观察加入乙醇前后 Caco-2 细胞 TEER 的变化情况。

2. 乙醇及 RhoA 特异性抑制剂 C3 胞外酶的作用和分组: 我们既往研究发现, 5%乙醇处理肠上皮细胞屏障 60 min 时, 其通透性达到峰值, 以后逐渐恢复^[7]。我们将实验随机分为 6 组: 对照组 (等量的无菌生理盐水 1 $\mu\text{mol/L}$)、5%乙醇 0 min 组、5%乙醇 15 min 组、5%乙醇 30 min 组、5%乙醇 60 min 组、5%乙醇 60 min+C3 胞外酶组 (经前期试验选择 C3 胞外酶浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 进行后续试验, 将其加入 Transwell 小室的上室中作用 4 h 后移去, 再加入 5%乙醇作用 60 min)。

3. Western blot 检测紧密连接相关蛋白表达和分布: 样品制备: 当 Transwell 小室的上室的细胞生长到融合时, 用含有 0.1 mmol/L EDTA (不含有钙镁离子) 的 PBS 冲洗, 用细胞铲小心刮取下来, 加入 NP-40 裂解液, 并将细胞吹打成单细胞悬液, 冰上裂解。将离心管置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\times g$ 离心 30 min, 收集上清为可溶性蛋白。沉淀置于 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 弃上清, 加入 SDS 裂解液冰上裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\times g$ 离心 30 min, 所得上清为非可溶性蛋白。

4. 免疫荧光观察紧密连接跨膜蛋白 occludin 的分布: 依照不同的实验组, 将生长在盖玻片上 Caco-2 单层用 4%的多聚甲醛固定 30 min, 用 0.5% TritonX-100 透化 5 min, 用 5% BSA 封闭 1 h。

间接免疫荧光技术步骤进行操作, 抗体稀释度: occludin (1:60), 阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗, 应用 FITC 标记的荧光二抗 (1:100) 孵育 1 h, 避光操作, 甘油封片, 荧光显微镜观察, 采集图像。

三、统计学处理

所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验。 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 乙醇及 C3 胞外酶对 Caco-2 细胞的屏障功能的作用: 根据前期实验结果, 5%乙醇浓度作用 60 min 时 Caco 细胞的肠上皮细胞屏障通透性最高, 故选用 5%浓度乙醇作用 60 min 为时限进行后期实验。为了确定不破坏 Caco-2 细胞膜的情况下, 乙醇对细胞的屏障功能有直接的破坏作用及 C3 胞外酶的抑制作用, 本实验

观察了 5%乙醇及 C3 胞外酶作用后的 TEER。见图 1。

2. C3 胞外酶抑制乙醇介导肠上皮细胞跨膜蛋白 occludin 可溶性片段与不可溶性片段比值增高: 如图 2 所示, 5%乙醇作用 60 min 后, occludin 可溶性片段 (s) 和不可溶性片段 (IS) (IDV) 比值升高, 显著高于乙醇 0 min 组 ($P<0.01$); 予 C3 胞外酶预处理 4 h 后, 再加入 5%乙醇作用 60 min, occludin 可溶性片段 (s) 和不可溶性片段 (IS) IDV 比值降低, 显著低于 60 min 组 ($P<0.01$)。

3. C3 胞外酶抑制乙醇诱导肠上皮细胞屏障紧密连接相关蛋白 occludin 蛋白的重分布: 免疫荧光分析显示, 在未处理的细胞中, occludin 位于上皮细胞膜上, 且呈连续分布, 见图 3A。乙醇处理后, occludin 在细胞膜上表达水平降低, 由细胞膜向细胞质内转移, 部分断裂消失, 见图 3B。C3 胞外酶预处理后, 再予乙醇作用, occludin 在细胞膜上表达增强, 部分恢复连续分布状态, 见图 3C。

讨 论

紧密连接的功能特性主要是选择性屏障, 只允许离子及可溶性小分子物质通过, 而不允许大分子物质及微生物通过, 这一特性也就决定了紧密连接在肠道屏障功能中的重要性^[8]。在紧密连接相关蛋白中, occludin 蛋白是主要维持肠黏膜上皮细胞间的通透性、保持细胞间的跨上皮电阻。乙醇对肠上皮细胞屏障通透性的作用呈时间-浓度依赖性升高, 作用至 60 min 时 TEER 值及荧光黄透过率达峰值, 此后逐渐恢复^[7]。本实验发现乙醇可短暂地降低 TEER 值, 予 C3 胞外酶预处理后可部分恢复 TEER 值, 显著抑制肠黏膜屏障通透性的增加。

Rho GTPases 属于小 G 蛋白 Ras 超家族的成员之一, 相对分子量为 20~30 kD, 根据其序列和功能可分为 Rho 亚族等八个亚族^[9]。RhoA 是 Rho 亚族的主要成员, 以结合 GDP (无活性) 和结合 GTP (有活性) 的方式发挥重要的分子开关作用。RhoA 有 GTP 结合的活化型、GDP 结合的非活化型和空载三种状态, 其作用与细胞骨架的结构改变有关, 同时与细胞形态、极性、细胞黏附、转移、信号转导和细胞凋亡等生物学行为有密切关系^[10]。而 C3 胞外酶是一种从肉毒梭状芽孢杆菌提取的一种生物毒素, 能将 Rho-GTP 转化成 Rho-GDP, 从而可显著抑制 RhoA 活性^[6]。已有报道证实, C3 胞外酶抑制缓激肽诱导的血肿瘤屏障通透性的增加, 但其对乙醇诱导的肠黏膜上皮屏障通透性的影响尚无报道。本研究证明 5%乙醇作用后, RhoA 的活

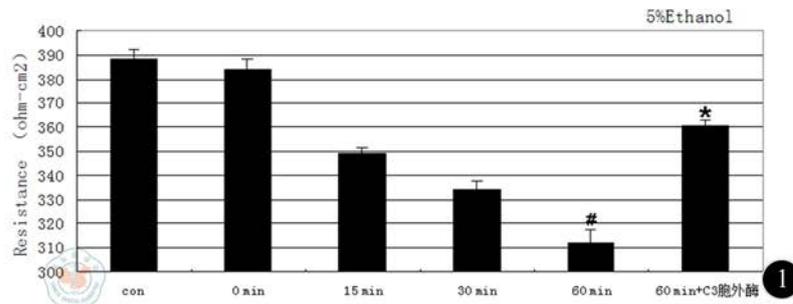


图1 C3胞外酶对乙醇诱导的肠上皮细胞屏障TEER值变化的影响。由左至右为对照组、5%乙醇处理0 min组、15 min组、30 min组、60 min组、抑制剂组（Caco-2细胞应用C3胞外酶预处理4 h后予5%乙醇处理60 min）。与0 min组比较， $P<0.01$ ；与60 min组比较， $*P<0.05$

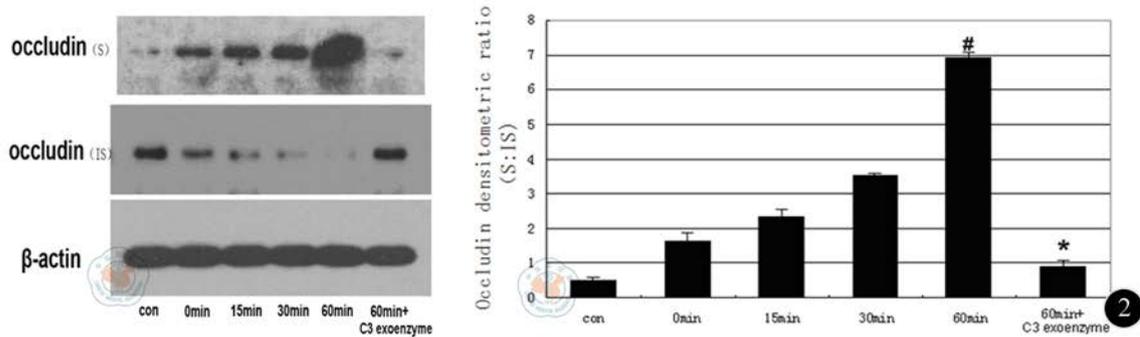


图2 应用western blot方法检测occludin可溶性片段(S)与非可溶性片段(IS)IDV比值。由左至右为对照组、5%乙醇处理0 min组、15 min组、30 min组、60 min组、抑制剂组（Caco-2细胞应用C3胞外酶预处理4 h后予5%乙醇处理60 min）。与0 min组比较， $P<0.01$ ；与60 min组比较， $*P<0.01$

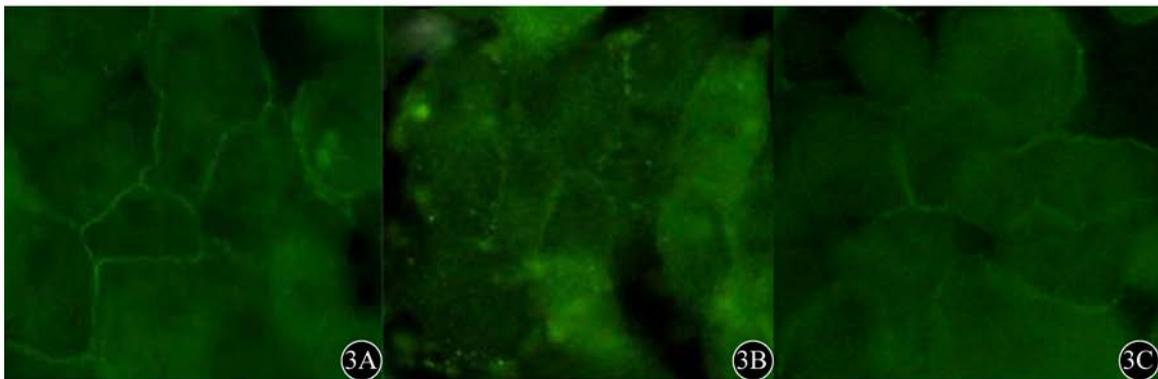


图3 各组occludin蛋白免疫荧光染色($\times 400$)：3A图为对照组，可见occludin蛋白沿细胞膜呈连续性分布；3B图为乙醇作用60 min组，可见荧光信号呈点状异常分布；3C图为抑制剂组时，可见细胞膜上occludin蛋白表达部分恢复

性形式 RhoA-GTP 显著增加，与紧密连接跨膜蛋白 occludin 可溶性片段与非可溶性片段 (IDV) 比值升高趋势一致。乙醇诱导紧密连接跨膜蛋白 occludin 水解，进而使肠上皮细胞通透性增加，从而导致肠黏膜屏障功能紊乱。C3 胞外酶预处理后，可显著抑制 RhoA 的活性形式 RhoA-GTP 的表达，降低乙醇诱导的 occludin 可溶性片段与非可溶性片段 (IVD) 比值，进而使紧密连接跨膜蛋白 occludin 水解减少，抑制乙醇诱导的肠上皮细胞通透性增加。结果证实 RhoA 特异性抑制剂 C3 胞外酶可抑制乙醇诱导肠上皮细胞屏障通透性增加的过程。

参 考 文 献

- [1] Chardin P. GTPase regulation: getting a Rnd Rock and Rho inhibitor. *Curr Biol*, 2003, 13: R702-704.
- [2] Offermanns S. G-Proteins as transducers in transmembrane signaling. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003, 83: 101-130.
- [3] Ma T, Liu L, Wang P, et al. Evidence for involvement of ROCK signaling in bradykinin-induced increase in murine blood-tumor barrier permeability. *J Neurooncol*, 2012, 106: 291-301.
- [4] Cerejido M, Contreras RG, Flores-Bentez D. New diseases derived or associated with the tight junction. *Arch Med Res*, 2007, 38: 465-478.
- [5] Keita AV, Söderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22:718-733.
- [6] Chen J, Guerriero E, Sado Y, et al. Rho-mediated regulation of TGF-beta1- and FGF-2-induced activation of corneal stromal keratocytes. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50: 3662-3670.

[7] Tong J, Wang Y, Chang B, et al. Evidence for the involvement of RhoA Signaling in the ethanol-induced increase in intestinal epithelial barrier permeability. Int J Mol Sci, 2013, 14: 3946-3960.

[8] Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. J. Invest. Dermatol, 2007, 127: 2525-2532.

[9] Sorokina EM, Chemoff J. Rho-GTPases: New Members, New Pathways. J Cell Biochem, 2005, 94: 225-231.

[10] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. Physiol Rev, 2001, 81: 153-208.

(收稿日期: 2013-07-30)

(本文编辑: 马超)

佟静, 王颖, 王炳元. C3 胞外酶抑制乙醇诱导的肠黏膜屏障功能紊乱 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (19): 8774-8777.



中华医学会