

## 同型半胱氨酸影响 Caco-2 细胞通透性的机制研究

姚成云, 丁少桢, 杨青, 刘晓昌, 徐张巍, 梅俏, 许建明

**摘要** 目的 探讨同型半胱氨酸(Hcy)对Caco-2细胞通透性的影响及其机制。方法 Caco-2结肠癌细胞分为空白对照组、Hcy处理组(10、20、50 μmol/L)、Hcy+不同抑制剂处理组(ERK抑制剂PD98059、MLCK抑制剂ML-7、P38MAPK抑制剂SB203580、Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin抑制剂KN62、Rho抑制剂Y27632及PKC抑制剂Staurosporine)。通过检测跨上皮电流阻抗(TEER)及异硫氰酸荧光素(FITC)跨膜转运量评估Caco-2细胞模型通透性,Western blot法检测Caco-2细胞中MEK、ERK、MLCK、p-ERK、p-MLCK、ZO-1、Occludin、Claudin-1及Claudin-2蛋白表达水平。结果 与空白对照组相比,使用50 μmol/L Hcy预处理的Caco-2细胞通透性改变速率最快。Claudin-1、Occludin、ZO-1表达降低,MEK、ERK、MLCK、p-ERK、p-MLCK、Claudin-2蛋白表达升高。与Hcy处理组相比,使用ML-7及PD98059处理Caco-2细胞,可减弱Hcy预处理引起的Caco-2细胞通透性增加,降低MEK、ERK、MLCK、p-ERK、p-MLCK、Claudin-2蛋白表达,提高Claudin-1、Occludin及ZO-1蛋白表达。结论 Hcy可能通过MEK-ERK-MLCK细胞信号通路,调控细胞紧密连接(TJ)相关蛋白表达,影响Caco-2细胞通透性。

**关键词** 同型半胱氨酸; 通透性; 肌球蛋白轻链激酶; 紧密连接

中图分类号 R 574.5; R 333.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)01-0095-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.020

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种发病机制尚不明确的肠道炎症性疾病<sup>[1]</sup>,肠黏膜屏障通透性改变在IBD的发生与发展中有重要作用。紧密连接(tight junction, TJ)是肠黏膜上皮机械屏障中的重要结构<sup>[2]</sup>,TJ损伤引起的肠上皮通透性增加,参与了IBD病理生理过程。跨膜蛋白(包括Claudin及Occludin)和外周蛋白是TJ的主要结构蛋白,受肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)调控,引起TJ通透性改变,参与肠黏

膜通透性的调节<sup>[3]</sup>。

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸,可通过多种机制参与血管内皮细胞屏障损伤过程。IBD患者血浆及结肠中Hcy水平升高,且Hcy能够损伤肠上皮细胞线粒体功能<sup>[4]</sup>,但Hcy是否通过调控MLCK蛋白影响肠上皮TJ通透性目前尚不明确。该研究在建立Caco-2模型基础上,研究Hcy是否参与调控MLCK蛋白表达影响肠黏膜通透性及其机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞与试剂

**1.1.1 实验细胞** Caco-2细胞,购于中国科学院上海生命科学研究院。

**1.1.2 药品与试剂** 同型半胱氨酸、异硫氰酸荧光素、ML-7、SB203580、DEME高糖培养基、非必需氨基酸、胰蛋白酶均购于美国Sigma-Aldrich公司;MLCK、MEK、ERK、p-ERK、Claudin-1、Claudin-2购于南京Bioworld公司;Occludin购于美国Proteintech公司;p-MLCK购于美国Santa Cruz公司;KN62、PD98059、Staurosporine、Y27632购于美国Selleck公司;胎牛血清购于杭州四季青公司;L-谷氨酰胺购于美国Gibco公司;青霉素-链霉素混合溶液购于上海笃玛生物科技有限公司。

**1.1.3 主要仪器** F2700型荧光分光光度计,购于日本岛津公司;Transwell小室(型号3413),购于美国Corning公司;Millicel<sup>®</sup>-ERS细胞电阻仪,购于德国Millipore公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 Caco-2细胞通透性模型的建立及分组** Caco-2细胞通透性模型的建立: Caco-2结肠癌细胞培养条件为37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%空气湿度,培养基使用含15%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%L-谷氨酰胺及1%青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养基培养。每2~3天进行换液,当细胞生长至80%连续时,使用含0.05% EDTA的0.25%胰蛋白酶消化细胞,收集细胞悬液,以5×10<sup>5</sup>个/孔的密度接种于12孔Transwell inserts(孔径0.4 μm)的上槽中。

2019-10-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81470809)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介: 姚成云,男,硕士研究生;

梅俏,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-

mail: meiqiao@hotmail.com

接种后,每 2 天换液,1 周后改为每天换液,直至 21 d。Caco-2 结肠癌细胞分为空白对照组、Hcy 处理组 (10、20、50 μmol/L)、Hcy + 信号通路抑制剂处理组 (ERK 抑制剂 PD98059、MLCK 抑制剂 ML-7、P38MAPK 抑制剂 SB203580、Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin 抑制剂 KN62、Rho 抑制剂 Y27632 及 PKC 抑制剂 Staurosporine)。

**1.2.2 Caco-2 细胞通透性检测** Caco-2 细胞模型的通透性通过检测跨上皮电流阻抗 (trans epithelial electrical resistance, TEER) 及异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 跨膜转运量改变来评估。弃去 12 孔板中培养基,加入含不同浓度 Hcy (10、20、50 μmol/L) 的 PBS 液孵育后,通过对 TEER 及 FITC 转运进行检测来确定 Hcy 的最优浓度。TEER 采用 Millicell ERS 细胞电阻仪测量,实验开始后每 30 分钟检测 TEER 并记录,同时于下槽取样并保存于 4 °C 冰箱中,直至第 180 分钟实验结束。收集的样品经稀释、离心后使用荧光分光光度计检测样品上清液中 FITC 荧光值 (设置激发波长为 380 nm,吸收波长为 425 nm),并根据标准曲线方程计算出样品中 FITC 浓度,即 FITC 跨膜转运量,借此评估 Caco-2 细胞模型的通透性。实验结束后将 Caco-2 细胞用胰酶消化并收集细胞悬液,保存于液氮中用于 Western blot 检测。

**1.2.3 Western blot 法检测 Caco-2 细胞中 MEK、ERK、p-ERK、MLCK、p-MLCK、ZO-1、Claudin-1、Claudin-2、Occludin 蛋白表达水平** 从 Caco-2 细胞中提取蛋白质,使用 SDS-PAGE 分离并转移至 PVDF 膜。在室温下用封闭液 (5% 脱脂乳) 封闭 2 h。将膜与一抗在 4 °C 温育过夜。一抗包括抗 MEK (1 : 500)、ERK (1 : 1 000)、p-ERK (1 : 2 000)、MLCK (1 : 500)、p-MLCK (1 : 200)、ZO-1 (1 : 500)、Claudin-1 (1 : 500)、Claudin-2 (1 : 500)、Occludin (1 : 600) 和 beta-actin (1 : 1 000)。TBST 洗涤,将 HRP 连接的二抗在室温下与膜温育 2 h。再次洗涤,使用 ECL 蛋白质印迹检测系统和 Image J 软件检测分析结果。

**1.3 统计学处理** 计数资料采用 SPSS 16.0 软件分析,两两组间比较采用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Hcy 对 Caco-2 细胞通透性的影响** 使用不同浓度 Hcy (0、10、20、50 μmol/L) 处理 Caco-2 细胞,记录 TEER 和 FITC 跨膜转运量随时间的改变,结果

显示 随 Hcy 浓度的增加 Caco-2 细胞 TEER 逐渐降低, FITC 跨膜转运量逐渐增加。当使用 50 μmol/L Hcy 处理 Caco-2 细胞时, TEER (图 1A) 及 FITC 跨膜转运量 (图 1B) 改变速率最快。表明 Hcy 能够增加 Caco-2 细胞的通透性且具有浓度依赖性,后续采用 50 μmol/L Hcy 进行作用机制研究。

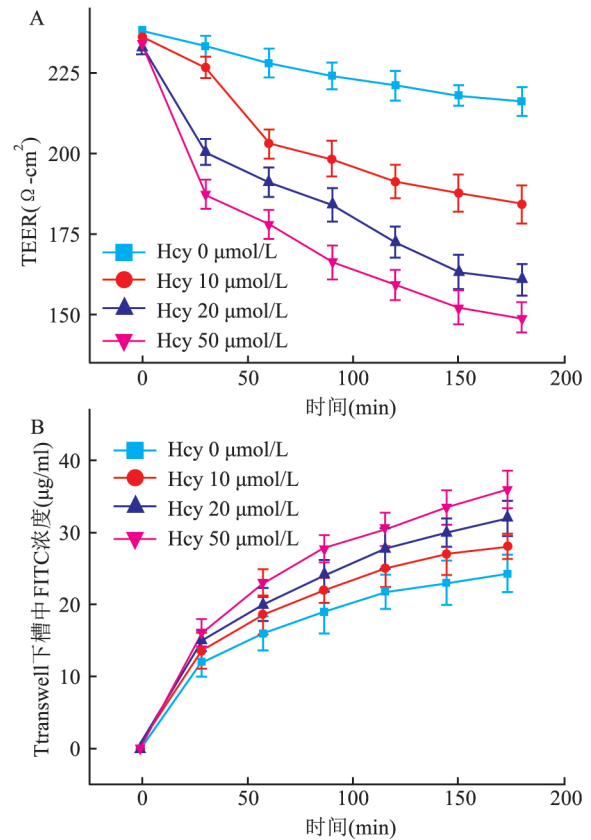


图 1 不同浓度 Hcy 对 Caco-2 细胞 TEER 和 FITC 跨膜转运量的影响

A: Caco-2 细胞 TEER 随 Hcy 浓度的变化; B: Caco-2 细胞 FITC 跨膜转运量随 Hcy 浓度的变化

**2.2 MLCK 抑制剂 ML-7 对 Hcy 增加 Caco-2 细胞通透性的影响** 与 Hcy 处理组比较, Hcy + ML-7 处理组 Caco-2 细胞 TEER 增加 (图 2A), FITC 跨膜转运量显著减少 [(31.23 ± 9.01) μg/ml vs (43.05 ± 14) μg/ml, t = 2.459, P < 0.05] (图 2B), 提示 MLCK 抑制剂具有抑制 Hcy 引起 Caco-2 细胞通透性增加的作用, MLCK 可能在 Hcy 增加 Caco-2 细胞通透性过程中发挥作用。

**2.3 PD98059、SB203580、KN62、Y27632 和 staurosporine 对 Hcy 增加 Caco-2 细胞通透性的影响** 与 Hcy 组比较, Hcy + PD98059 处理组 Caco-2 细胞 TEER 增加, FITC 跨膜转运量显著减少 [(30.83 ± 5.96) μg/ml vs (41.9 ± 8.29) μg/ml, t = 3.756,

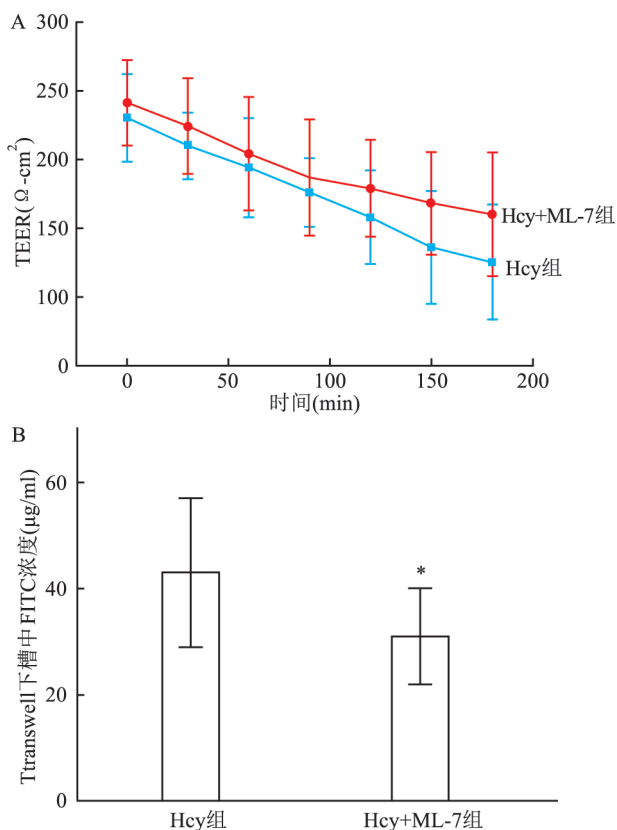


图2 ML-7抑制Hcy引起的Caco-2细胞通透性增加

A: ML-7增加Hcy处理后Caco-2细胞的TEER; B: ML-7降低Hcy处理后Caco-2细胞的FITC跨膜转运量;与Hcy组比较: \*  $P < 0.05$

$P < 0.05$ ; 而SB203580、KN62、Y27632、staurosporine对Hcy处理后Caco-2细胞的TEER和FITC跨膜转运量无显著影响,提示ERK-MLCK信号通路在Hcy增加Caco-2细胞通透性过程中发挥作用(图3)。

**2.4 Hcy对Caco-2细胞中细胞连接蛋白表达的影响** Western blot检测结果显示,与对照组比较,50 μmol/L Hcy处理的Caco-2细胞中细胞连接蛋白ZO-1、Claudin-1、Occludin蛋白表达减少,Claudin-2蛋白表达增加(图4)。

**2.5 ML-7和PD98059对Hcy处理后Caco-2细胞中细胞连接蛋白表达的影响** 与Hcy组比较,Hcy+ML-7处理组(图5A)和Hcy+PD98059处理组(图5B)Caco-2细胞中ZO-1、Claudin-1、Occludin蛋白表达均增加,Claudin-2蛋白表达均减少,提示抑制ERK-MLCK信号通路可能是Hcy调控Caco-2细胞中细胞连接蛋白表达的关键环节。

**2.6 MEK-ERK-MLCK信号通路在Hcy增加Caco-2细胞通透性中的作用** Western blot检测结果显示,50 μmol/L Hcy处理后Caco-2细胞中MEK、MLCK、p-MLCK、ERK1/2和p-ERK1/2蛋白表达增

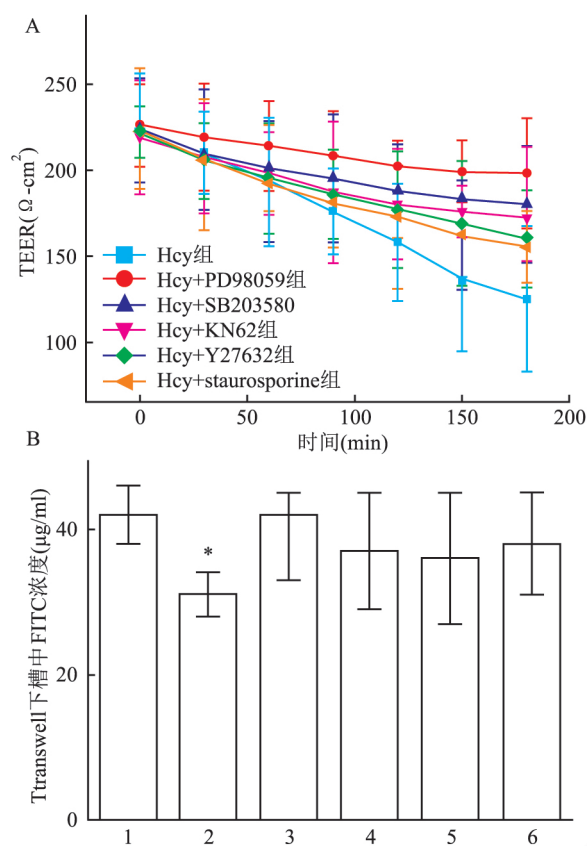


图3 不同信号通路抑制剂对Caco-2细胞TEER和FITC跨膜转运量的影响

A: Caco-2细胞TEER随Hcy浓度的变化; B: Caco-2细胞FITC跨膜转运量随Hcy浓度的变化; 1. Hcy组; 2. Hcy + PD98059组; 3. Hcy + SB203580组; 4. Hcy + Y27632组; 5. Hcy + KN62组; 6. Hcy + staurosporine组;与Hcy组比较: \*  $P < 0.05$

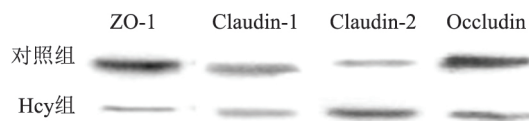


图4 Hcy对Caco-2细胞中细胞连接蛋白表达的影响

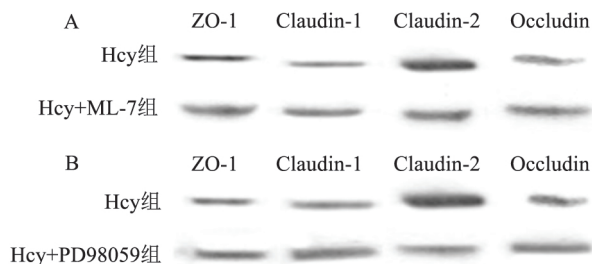


图5 ML-7和PD98059对Hcy处理后Caco-2细胞中细胞连接蛋白表达的影响

A: ML-7促进Hcy处理后Caco-2细胞中ZO-1、Claudin-1、Occludin的表达,抑制Claudin-2的表达; B: PD98059促进Hcy处理后Caco-2细胞中ZO-1、Claudin-1、Occludin的表达,抑制Claudin-2的表达

加。而再分别使用 ML-7 (图 6A) 和 PD98059 (图 6B) 处理后 Caco-2 细胞中 MEK、MLCK、p-MLCK、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达均下降。提示 Hcy 可能通过 MEK-ERK-MLCK 信号通路抑制细胞连接蛋白的表达,促进细胞通透性增加。

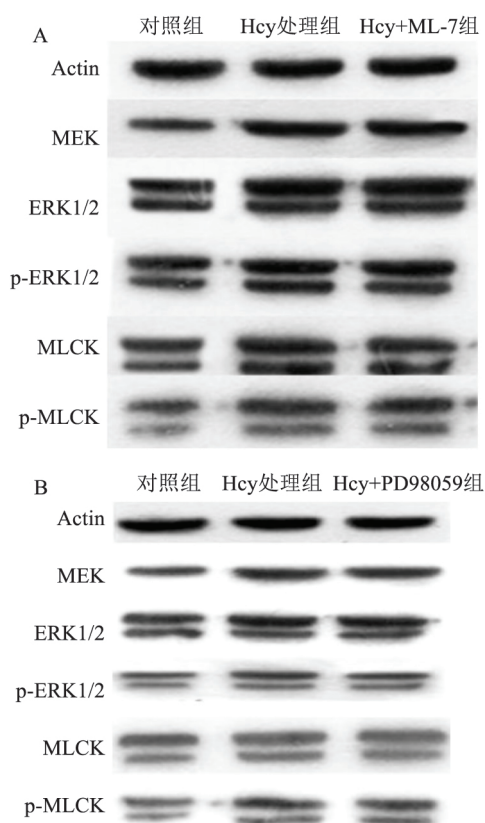


图 6 ML-7 和 PD98059 对 Hcy 处理后 MEK-ERK-MLCK 信号通路蛋白表达的影响

A: ML-7 抑制 Hcy 处理后 Caco-2 细胞中 MEK-ERK-MLCK 信号通路蛋白的表达; B: PD98059 抑制 Hcy 处理后 Caco-2 细胞中 MEK-ERK-MLCK 信号通路蛋白的表达

### 3 讨论

IBD 是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病,其病因和发病机制目前尚不完全清楚,肠黏膜免疫调节异常引起的炎症在 IBD 发病过程中起着重要作用。同型半胱氨酸是一种含硫氨基酸,是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中的重要中间产物。Hcy 通过刺激 MMP 合成,促进炎症因子表达如 TNF- $\alpha$ , IL-6 和 IFN- $\gamma$ , 激活 NADPH 和 p38MAPK, 调控心血管内皮细胞的通透性。同时发现 IBD 患者结肠组织及血浆中 Hcy 水平较健康对照相比明显升高<sup>[5]</sup>, 血管内皮细胞屏障与肠黏膜上皮屏障存在结构上的相似性, Hcy 是否通过对肠道黏膜屏障通透性产生影响, 参与 IBD 发病机制目前相关研究较少。

Caco-2 细胞与人的肠道黏膜上皮细胞屏障在形态、极性以及转运体的表达上相似, 被广泛用于研究肠道黏膜屏障功能调节的相关机制<sup>[6]</sup>。TJ 是肠道黏膜屏障的关键结构, 是顶端连接复合体的重要组成部分, 控制细胞旁转运和调节肠上皮的通透性。Claudin-1 在上皮细胞周围形成连续的封闭结构, 起到固定 TJ 结构的关键作用。细胞中 Claudin-1 的过度表达有助于增加 TEER<sup>[7]</sup>, Claudin-2 参与形成跨膜通道运输水和小分子物质以及上皮细胞通透性调节<sup>[8]</sup>。Claudin-2 基因敲除可使 MDCK 细胞 TEER 增加<sup>[9]</sup>。Occludin 敲除小鼠的细胞旁通透性与野生型相比没有明显增加<sup>[10]</sup>。ZO-1 连接跨膜蛋白与细胞骨架, 细胞骨架对形成 TJ 结构起着重要作用<sup>[11]</sup>, 敲除 ZO-1 会引起 TJ 结构与功能的破坏<sup>[12]</sup>。本研究中, 对 Hcy 处理 Caco-2 细胞的检测表明, Hcy 可降低 Caco-2 细胞中 ZO-1、Claudin-1、Occludin 蛋白表达, 增加 Claudin-2 表达, 提示 Hcy 可通过影响 Caco-2 细胞 TJ 蛋白影响 Caco-2 细胞通透性。

MLCK 介导肌球蛋白轻链磷酸化通路是调控 TJ 结构及功能的重要信号通路。磷酸化的肌球蛋白轻链发生构象改变, 引起肌动蛋白与肌球蛋白丝收缩, 引起上皮细胞 TJ 开放, 参与调节上皮细胞黏膜通透性的调节过程。MLCK 表达增加可以上调 MLC 磷酸化水平, 导致血管内皮细胞收缩加剧, 通透性增加, 细胞形态和功能完整性遭到破坏<sup>[13]</sup>。Hcy 作用于血管内皮细胞, 可以促进其 MLCK 的表达<sup>[14]</sup>。本研究结果显示 Hcy 增加 Caco-2 细胞中 MLCK、p-MLCK 的蛋白表达, 使用 ML-7 抑制剂预处理 Caco-2 细胞可明显改善 Hcy 引起的 TEER 降低, 提示 Hcy 可以影响 Caco-2 细胞中 MLCK 磷酸化过程, 调节 Caco-2 细胞通透性改变。

MLCK 受 P38MAPK、Rho 激酶、ERK、钙调素依赖激酶、PKC 等多种信号通路调控。研究<sup>[15]</sup>表明, MEK/ERK/MAPK 信号通路参与 MLCK 功能调控, MEK 可激活 ERK 促进 ERK 磷酸化, 最后激活 MLCK。本研究通过使用不同工具药 (ERK 抑制剂 PD98059, P38MAPK 抑制剂 SB203580, Rho 激酶抑制剂 Y27632, 钙调素依赖激酶抑制剂 KN62, PKC 抑制剂 Staurosporine, MLCK 抑制剂 ML-7) 干预 Hcy 处理的 Caco-2 细胞, 结果提示 Hcy 主要通过 MEK-ERK 蛋白调节 MLCK 磷酸化, 参与调节 TJ 功能。

本研究结果显示 Hcy 增加 Caco-2 细胞中 MEK、ERK、p-ERK、MLCK、p-MLCK 的蛋白表达, 使用 PD98059 及 ML-7 抑制剂预处理 Caco-2 细胞可明显

改善 Hcy 引起的 TEER 降低,下调 MLCK、Claudin-2 蛋白表达,ZO-1、Claudin-1 及 Occludin 表达有较大幅度回升,提示 Hcy 可能通过促进 MEK-ERK-MLCK 蛋白磷酸化过程,影响 TJ 结构蛋白表达,损伤肠上皮细胞 TJ,引起肠黏膜通透性增加,加重肠道炎症过程,为阐明 IBD 中 Hcy 影响肠黏膜通透性的作用机制提供实验依据。

### 参考文献

- [1] Uniken Venema W T, Voskuil M D, Dijkstra G, et al. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality [J]. *J Pathol* 2017, 241: 146–58.
- [2] Bhat A A, Uppada S, Achkar I W, et al. Tight junction proteins and signaling pathways in cancer and inflammation: a functional crosstalk [J]. *Front Physiol* 2018, 9: 1942.
- [3] Yang M, Jia W, Wang D, et al. Effects and mechanism of constitutive TL1A expression on intestinal mucosal barrier in DSS-induced colitis [J]. *Dig Dis Sci* 2019, 10(5): 2390–8.
- [4] 杨青,袁静静,石海,等. 同型半胱氨酸影响 Caco-2 细胞线粒体功能的实验研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(6): 810–4.
- [5] Babayeva G H, Babayev Z M. Frequency of detection of some markers of endothelial dysfunction in patients with inflammatory bowel diseases [J]. *Ter Arkh*, 2018, 90(4): 12–6.
- [6] Zhang Y. Overview of transporters in pharmacokinetics and drug discovery [J]. *Curr Protoc Pharmacol*, 2018, 82(1): e46.
- [7] Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, et al. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice [J]. *J Dermatol Sci*, 2013, 70(1): 12–8.
- [8] Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation [J]. *Tissue barriers* 2015, 3(1/2): e977176.
- [9] Tokuda S, Furuse M. Claudin-2 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: claudin-2 independently determines the leaky property of tight junctions in MDCK cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119869.
- [10] Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(12): 4131–42.
- [11] Van Itallie C M, Anderson J M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 157–65.
- [12] Tomavaca O, Chia M, Dufton N, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation [J]. *J Cell Biol*, 2015, 208(6): 821–38.
- [13] 高峻岭,杜勇,左莉,等. 胰岛素对糖尿病大鼠动脉壁肌球蛋白轻链激酶表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(6): 519–23.
- [14] 吴燕,王怡,江巧玲,等. 同型半胱氨酸对内皮细胞肌球蛋白轻链激酶表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(1): 12–5.
- [15] 丁少桢,丁浩,梅俏,等. 同型半胱氨酸调控 MEK-ERK-MLCK 通路影响结肠炎大鼠肠黏膜通透性的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(4): 498–502.

## Mechanisms of homocysteine on Caco-2 cell permeability

Yao Chengyun, Ding Shaozhen, Yang Qing, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effect of homocysteine (Hcy) on the permeability of Caco-2 cells and its mechanism. **Methods** Caco-2 cells were divided into blank control group, treated with different concentrations of Hcy (10, 20, 50  $\mu\text{mol/L}$ ), treated with Hcy + different signaling transduction inhibitors (ERK inhibitor PD98059, MLCK inhibitor ML-7, P38MAPK inhibitor SB203580,  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin inhibitor KN62, Rho inhibitor Y27632 and PKC inhibitor Staurosporine). The permeability of Caco-2 cells was detected by transepithelial electrical resistance (TEER) and fluorescein isothiocyanate (FITC). The expression levels of MEK, ERK, MLCK, p-ERK, p-MLCK, ZO-1, Occludin, Claudin-1 and Claudin-2 in Caco-2 cells were detected by Western blot. **Results**

Compared with the blank control group, the permeability of Caco-2 cells pretreated with 50  $\mu\text{mol/L}$  Hcy had the faster change. The expression of Claudin-1, Occludin and ZO-1 decreased, while the expression of MEK, ERK, MLCK, p-ERK, p-MLCK and Claudin-2 increased. Compared with Hcy group, pretreatment with ML-7 and PD98059 could reduce the permeability alteration of Caco-2 cells induced by Hcy, which resulted in decreased expression of MEK, ERK, MLCK, p-ERK, p-MLCK, Claudin-2 while increased expression of Claudin-1, Occludin and ZO-1. **Conclusion** Hcy may regulate the expression of tight junction-related proteins through MEK-ERK-MLCK signaling pathway and affect the permeability of Caco-2 cells.

**Key words** homocysteine; permeability; myosin light chain kinase; tight junction