

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、Ca²⁺/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^[1],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^[2],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^[3]。

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^[4],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[®]-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% CO₂、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5×10⁵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、Ca²⁺/Calmodulin 抑制剂 KN62、Rho 抑制剂 Y27632 及 PKC 抑制剂 Stau-rosporine)。

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 (transepithelial 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。

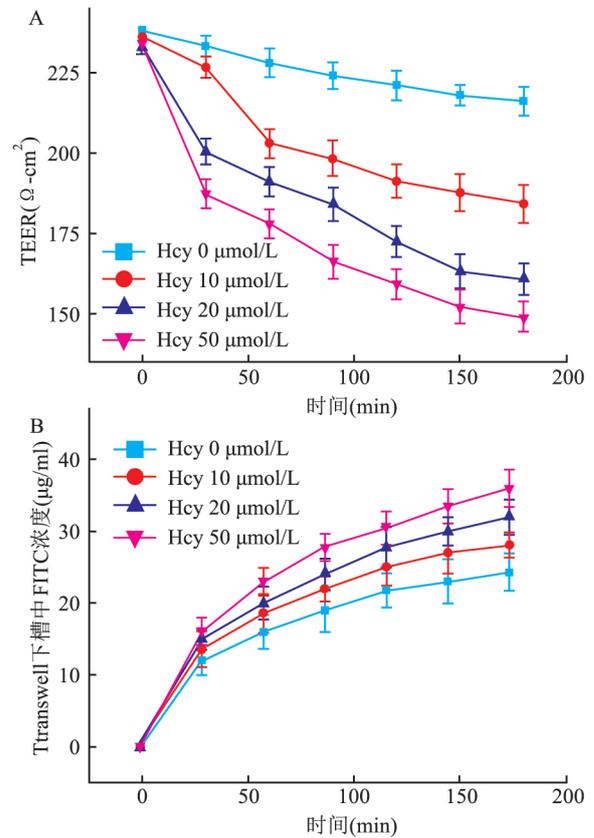


图 1 不同浓度 Hcy 对 Caco-2 细胞 TEER 和 FITC 跨膜转运量的影响

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,

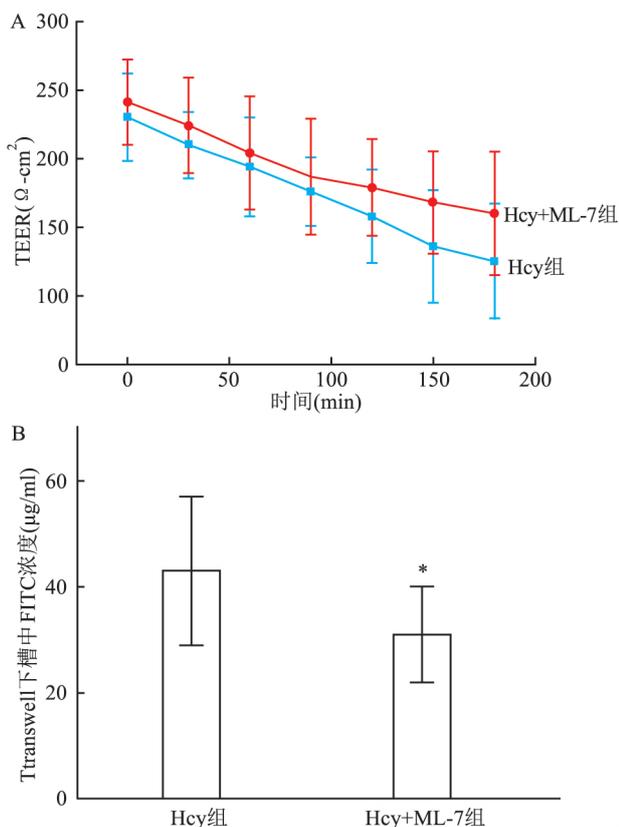


图2 ML-7抑制Hcy引起的Caco-2细胞通透性增加

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

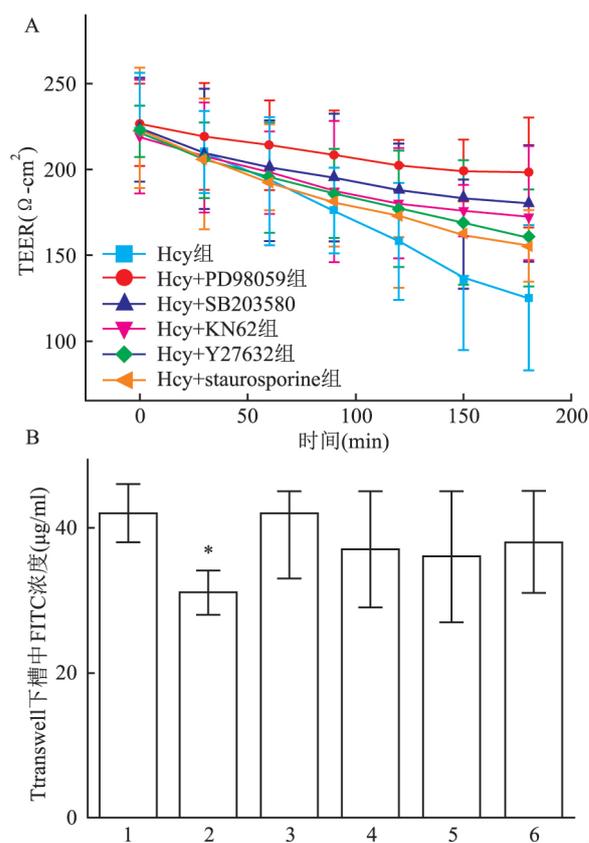


图3 不同信号通路抑制剂对Caco-2细胞TEER和FITC跨膜转运量的影响

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: * $P < 0.05$

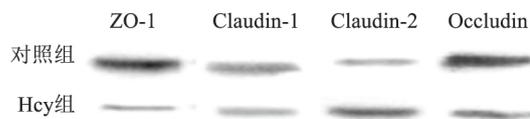


图4 Hcy对Caco-2细胞中细胞连接蛋白表达的影响

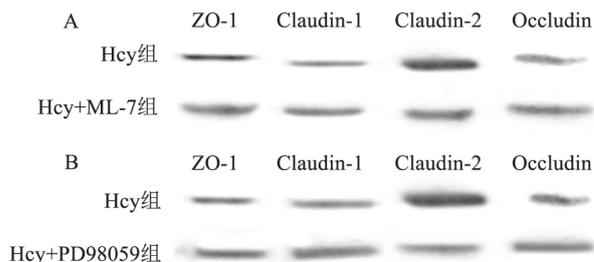


图5 ML-7和PD98059对Hcy处理后Caco-2细胞中细胞连接蛋白表达的影响

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。

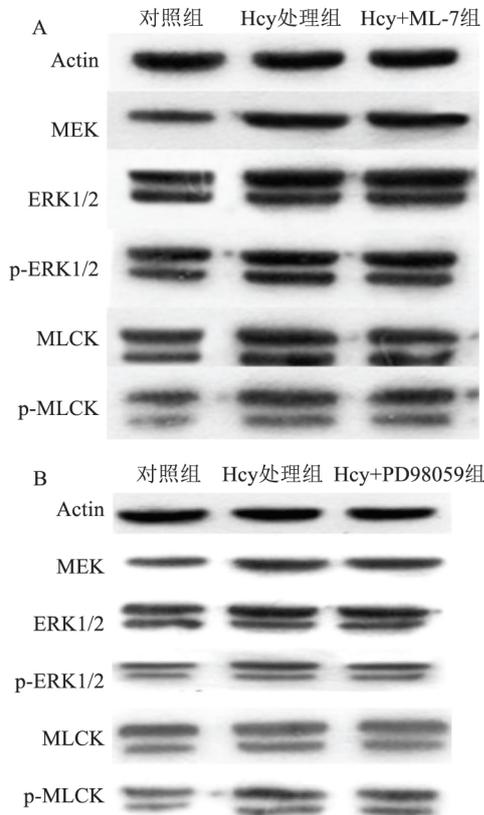


图 6 ML-7 和 PD98059 对 Hcy 处理后 MEK-ERK-MLCK 信号通路蛋白表达的影响

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- α , IL-6 和 IFN- γ , 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^[5], 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^[6]。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^[7], 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^[8]。Claudin-2 基因敲除可使 MDCK 细胞 TEER 增加^[9]。Occludin 敲除小鼠的细胞旁通透性与野生型相比没有明显增加^[10]。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^[11], 敲除 ZO-1 会引起 TJ 结构与功能的破坏^[12]。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^[13]。Hcy 作用于血管内皮细胞, 可以促进其 MLCK 的表达^[14]。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^[15]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, 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