

文章编号:1005-6947(2008)02-0140-05

· 基础研究 ·

# 梗阻性黄疸大鼠肠黏膜上皮紧密连接蛋白和 MLCK 的研究

陈振勇, 冯贤松, 周有生

(华中科技大学附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 探讨梗阻性黄疸肠黏膜屏障破坏的机制。方法 建立梗阻性黄疸大鼠的动物模型, 分别于胆管结扎 10 d 和 20 d 后, 采用免疫组化、Western blot 方法检测末端回肠黏膜的紧密连接蛋白成员 ZO-1 和 Occludin 与肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 的分布和表达。结果 正常回肠黏膜层 ZO-1 和 Occludin 的分布相似, 主要位于上皮细胞的边缘, 细胞膜顶端, 沿绒毛下方均匀连续分布; MLCK 主要分布在细胞浆内。梗阻性黄疸时 ZO-1 和 Occludin 分布不均, 染色变淡, 线条模糊, 边缘粗糙有毛刺状突起; MLCK 分布散乱, 染色稀疏。与对照组相比 20 d 组和 10 d 组的 ZO-1, Occludin, MLCK 数量明显减少, 强阳性表达率分别从 70.0%, 80.0%, 70.0% 降至 10 d 组的 28.6%, 28.6%, 28.6% (均  $P < 0.05$ ) 和 20 d 组的 ZO-1 从 10 d 组的 28.6% 降至 14.3%, 35.7%, 21.4% (均  $P < 0.05$ )。20 d 组的 ZO-1 下降较 10 d 组更为明显 ( $P < 0.05$ ), 而 Occludin 和 MLCK 变化不明显。Western blot 检测的结果与之相似。结论 梗阻性黄疸时大鼠小肠黏膜上皮 ZO-1, Occludin, MLCK 分布紊乱, 表达下降, 小肠黏膜上皮屏障的完整性破坏。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(2):140-144]

**关键词:** 黄疸, 阻塞性/病理学; 紧密连接蛋白; 肌球蛋白轻链激酶; 肠黏膜屏障

中图分类号: R 657.4

文献标识码: A

## The study on tight junction proteins and myosin light chain kinase in obstructive jaundice in rats

CHEN Zhenyong, FENG Xiansong, ZHOU Youshen

(Department of General Surgery, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract: Objective** To elucidate the mechanisms of disruption of intestinal mucosa barrier in obstructive jaundice. **Methods** The obstructive jaundice model of rats was set up. At 10 d and 20 d after operation, immunohistochemistry and Western-blot techniques were used to examine the distribution and expression of tight junction proteins (ZO-1, Occludin) and myosin light chain kinase (MLCK) in intestinal mucosa.

**Results** In normal control groups, the staining of ZO-1 and occludin was predominantly localized to the margins of the epithelial cells and the apex of the cell membrane, and displayed a continuous and uniform distribution along the under surface of the villae. MLCK was distributed mainly in cytoplasm. In obstructive jaundice groups, ZO-1 and occludin staining appeared discontinuous and vague, with rough edges and spiculate processes. The staining of MLCK was also discontinuous and scanty. The strong positive express ratio of ZO-1, Occludin and MLCK were obviously lower in two experiment group than those in the control group all  $P < 0.05$ . ZO-1 was significantly decreased in 20 d group than that in 10 d group (14.3% vs 28.6%,  $P < 0.05$ ), but no significant difference in occludin and MLCK staining between 10 d group and 20 d

收稿日期: 2007-09-28; 修订日期: 2007-12-08。

作者简介: 陈振勇, 男, 华中科技大学附属协和医院主治医师, 主要从事胃肠疾病方面的研究。

通讯作者: 陈振勇 E-mail: xhcz@126.com

group. Similar outcomes were obtained by quantitative analysis of Western blot images. **Conclusions** Obstructive jaundice rats have distribution of ZO-1, occludin and MLCK in ileum mucous membrane epithelium, and is associated with breakdown of the integrity of the intestinal barrier.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(2): 140 - 144 ]

**Key words:** Jaundice, Obstructive/pathol; Tight Junction Protein; Myosin Light Chain Kinase; Intestinal Mucosa Barrier

**CLC number:** R 657.4

**Document code:** A

梗阻性黄疸时肠道黏膜屏障受损。环绕黏膜上皮细胞顶侧的紧密连接是维持肠黏膜屏障的重要结构基础,是决定细胞间通透性大小的主要因素。紧密连接系由一系列的细胞质蛋白,细胞骨架元素和几种跨膜蛋白组成。由肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)的磷酸化引起的细胞骨架的收缩是肠上皮屏障破坏的必需因素<sup>[1]</sup>。笔者通过建立梗阻性黄疸动物模型,利用免疫组化和免疫印迹 Western blots 等方法检测肠黏膜紧密连接蛋白成分 ZO-1 和 Occludin 及其与 MLCK 间的表达及其关系,探讨肠黏膜紧密连接及其受损的调控因素。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

单克隆兔抗 ZO-1 抗体, Occludin 抗体, (美国 Zymed Laboratories 公司), 抗 MLCK 抗体 (monoclonal anti-MLCK, Sigma 公司), 四甲基异硫酸罗丹明 (TRITC)-山羊抗兔 IgG (北京中山生物技术有限公司), TranswellTM 聚碳酸酯膜和聚乙烯膜 (美国 Costar 公司)。SP 免疫组化染色试剂盒 (即用型免疫组化 Elivision™ plus 广谱试剂盒, 福州迈新生物技术公司), OLYMPUS BX41 图像采集系统 (Image-Pro plus, ver-sion 4.5, USA)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 健康 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 体重 250 ~ 330 g, 由同济医学院实验动物中心提供, 动物随机分为 4 组: 对照组 ( $n = 10$ ), 不作任何操作。假手术组 ( $n = 10$ ), 开腹手术后仅解剖胆总管而不结扎。实验组采用 10% 水合氯醛 (0.3 g/kg) 腹腔注射麻醉, 行上腹正中切口, 结扎并切断胆总管, 手术后均经口给予联合广谱抗生素治疗, 并分别于成模术后 10 d (实验甲组,  $n = 14$ ) 和 20 d (实验乙组,  $n = 14$ ) 放血处死动物, 在距回盲部 10 cm 处环形切取回肠。取 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块组织, 于 40 g/L 甲醛溶液中固定, 行 HE 染色, 石蜡包埋切片。另无菌取部分组织冷冻备用。

1.2.2 免疫组化技术 (SP 法) 检测回肠 ZO-1 和 Occludin 与 MLCK 的表达 采用常规 SP 法测定后 DAB 显色, 实验步骤按试剂盒说明书进行, 阴性对照用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗, 同法进行染色。反应终浓度抗 ZO-1 (1:200), Occludin 抗体 (1:200), MLCK 抗体 (1:1 000), 每一种切片随机选取染色清晰者切片 5 ~ 8 张, 于光镜下 (40×) 随机选取 3 个视野, 并在高倍镜下 (200×) 观察在阳性颗粒在细胞内的分布。免疫染色的结果判读: 一个半定量模式, 由两个独立的无临床知识的观察者进行染色评分。细胞中出现棕褐色颗粒为阳性。≥ 75% 的细胞染色判为 (+++), 50% ~ < 75% 染色为 (++) , 10% ~ ≤ 50% 为 (+), ≤ 10% 为阴性。所有实验均重复 3 次, 以保证可重复性。

1.2.3 Western blot 分析 另取黏膜组织 100 mg, 加入 1 mL 裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Na3VO4, 1 mmol/L PMSF) 和 10 mL 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mmol/L 脱氧胆酸钠, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF), 组织粉碎, 匀浆, 冰浴 30 min; 4℃ 离心, 取上清液, 采用 BCA 法用紫外可见分光光度仪测定蛋白浓度, 并用蒸馏水将各样本统一稀释为 5 μg/μL, -70℃ 保存。各取样本 10 μL 及 5 μL 的预染 Marker, 加入上样缓冲液; 混合后 100℃ 煮沸蛋白变性 5 min, 分别经 7.5% 和 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离 1 h 或 2 h。电转 30 min; 取出硝酸纤维膜, 转移至染色液中染色 1 min, 标记, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 洗膜数次。浸入封闭液中封闭 1 h。分别加一抗 ZO-1, Occludin 和 MLCK 抗体, 均以 1:1 000 稀释; 以 β-actin (武汉博士德产品) 为内参, 1:2 000 稀释, 4℃ 孵育过夜。加入 1:2 000 的二抗 [四甲基异硫酸罗丹明 (TRITC)-山羊抗兔 IgG] 室温下孵育 1 h。将

膜放入显色液中,震荡孵育 5 ~ 10 min,暗室下胶片显影,扫描。以  $\beta$ -actin 蛋白进样对照。采用 Adobe Photoshop 软件定量测量平均光密度(OD 值)。

### 1.3 统计学处理方法

实验数据用均数  $\pm$  标准差表示,用简明医学统计软件进行统计学分析。组内多样本计量资料用方差分析;样本均数的组间比较采用精确概率  $q$  检验(Newman-Keuls 法)。 $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化检测回肠 ZO-1 蛋白和 Occludin 蛋白的表达

对照组光镜下观察 ZO-1 均匀一致地连续分布于小肠上皮细胞的边缘,细胞膜顶端,沿绒毛下

方均匀连续分布,呈强阳性表达(7/10,70.0%)。假手术组与之相似(7/10,70.0%)( $P > 0.05$ )。实验组中的甲、乙组的 ZO-1 蛋白分布不均,染色变淡,线条模糊,边缘粗糙有毛刺状突起(图 1),表达下降。两实验组强阳性表达率与对照组相比均显著降低( $P = 0.045, P = 0.010$ ),且实验乙组显著低于实验甲组( $P = 0.008$ )(表 1)(图 1)。

Occludin 类似 ZO-1,连续分布于小肠上皮细胞的边缘,主要定位于细胞膜和细胞质,对照组强阳性表达率为 80.0%(8/10),假手术组表达略有下降为 70.0%(7/10),但差异无统计学意义( $P = 1.000$ )。光镜下观察实验甲、乙组染色散乱,强阳性表达率均显著低于对照组( $P = 0.036, P = 0.047$ ),尽管甲组的表达率低于乙组,但差异无显著意义( $P = 1.000$ )(表 1)。

表 1 小肠黏膜 ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达变化

组别	例数	ZO-1 蛋白染色分析		强阳性率(%)	Occludin 蛋白染色分析		强阳性率(%)
		(-)~(+)	(++)~(+++)		(-)~(+)	(++)~(+++)	
对照	10	3	7	70.0	2	8	80.0
假手术	10	3	7	70.0	3	7	70.0
实验甲	14	10	4	28.6 <sup>1),2),3)</sup>	10	4	28.6 <sup>1),2)</sup>
实验乙	14	12	2	14.3 <sup>1),2)</sup>	9	5	35.7 <sup>1),2)</sup>

注:1)与对照组比, $P < 0.05$ ;2)与假手术组比  $P < 0.05$ ;3)与实验乙组比  $P < 0.05$

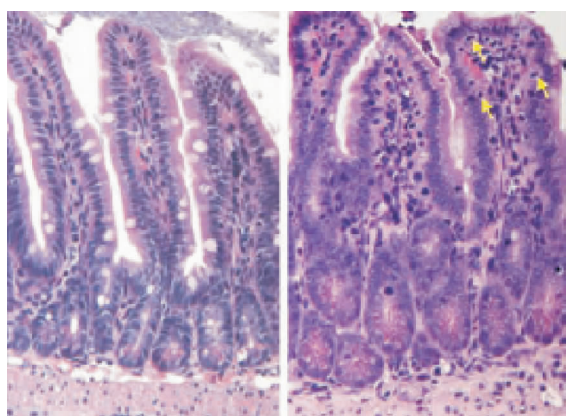


图 1 ZO-1 的染色图片(HE  $\times 200$ ) 左侧图片为对照组 ZO-1 染色连续分布于小肠上皮细胞的边缘;右侧为实验组染色稀疏,分布不均

### 2.2 免疫组化检测 MLCK 蛋白的表达

对照组 MLCK 表达主要定位于肠黏膜上皮细胞胞浆内。实验甲、乙组的染色稀疏,强阳性表达均明显低于对照组和假手术组,差异有统计学

意义( $P = 0.045, P = 0.035$ )。实验乙组强阳性表达率低于甲组,但差异无统计学意义( $P = 1.000$ )(表 2)。

表 2 小肠黏膜 MLCK 蛋白的表达变化

组别	例数	MLCK 蛋白染色分析		强阳性率(%)
		(-)~(+)	(++)~(+++)	
对照	10	3	7	70.0
假手术	10	4	6	60.0
实验甲	14	10	4	28.6 <sup>1),2)</sup>
实验乙	14	11	3	21.4 <sup>1),2),3)</sup>

注:1)与对照组比, $P < 0.05$ ;2)与假手术组比  $P < 0.05$ ;3)与实验甲组比  $P > 0.05$

### 2.3 ZO-1, Occludin 和 MLCK 的 Western blot 检测结果

以  $\beta$ -actin 为内参,ZO-1 蛋白条带在 210 kD 左右, Occludin 蛋白条带在 70 ~ 90 kD 之间(图 2),MLCK 条带主要集中在 170 kD 左右(图 3)。

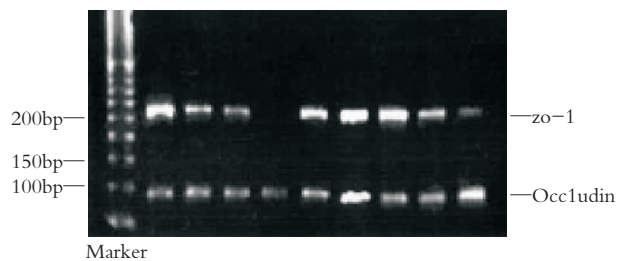


图2 ZO-1 和 Occludin 的 Western blot 图

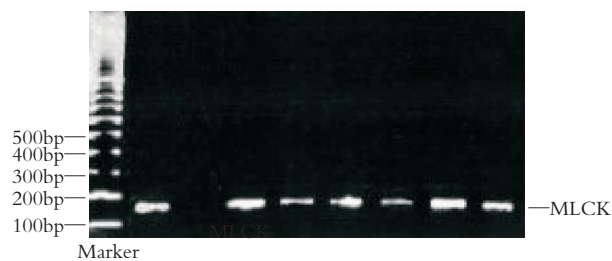


图3 MLCK 的 Western blot 图

## 2.4 Western blot 图像定量处理结果

Western blot 图像 OD 值的定量分析显示,实验甲、乙组的 ZO-1, Occludin 和 MLCK 的表达较对照组和假手术组均有不同程度的明显下降 ( $P < 0.01$ )。且实验乙组较甲组下降更明显 (表 3)。

表3 ZO-1, Occludin 和 MLCK 的图像定量分析结果 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	OD 值		
		ZO-1	occludin	MLCK
对照	10	0.2522 ± 0.0186	0.5597 ± 0.0221	0.8770 ± 0.0119
假手术	10	0.2461 ± 0.0365 <sup>1)</sup>	0.5615 ± 0.0204 <sup>1)</sup>	0.8776 ± 0.0138 <sup>1)</sup>
实验甲	14	0.2217 ± 0.0195 <sup>2)</sup>	0.4728 ± 0.0172 <sup>2)</sup>	0.8378 ± 0.0156 <sup>2)</sup>
实验乙	14	0.2026 ± 0.0136 <sup>2),3)</sup>	0.4320 ± 0.0214 <sup>2)</sup>	0.8219 ± 0.0113 <sup>2)</sup>

注:1)与对照组比较  $P > 0.05$ ;2)与对照组比较  $P < 0.05$ ;3)与实验甲组比较  $P < 0.05$

## 3 讨论

研究表明,肠上皮紧密连接以一种腰围的形式环绕细胞的外侧缘,通过电子显微镜和冷冻蚀刻技术分析,其侧面具有抵抗细胞外渗透的作用<sup>[2]</sup>。动物实验及临床观察<sup>[3]</sup>均已证实在梗阻性黄疸时,小肠通透性增加,并且与梗阻的严重程度和时间成正比。

肠黏膜上皮紧密连接是由一系列的细胞质蛋白、细胞骨架元素和几种跨膜蛋白组成。细胞质蛋白包括 ZO 等, ZO 有 3 种异构体 (ZO-1, ZO-2 和 ZO-3), ZO-1 与 ZO-2 形成稳定的复合物,它直接结合于 Occludin 的胞浆尾端的一个 150 个氨基酸区域,形成一个网络支架,将 Occludin 和肌动蛋白骨架系统连接在一起构成稳定的连接系统,是构成肠黏膜上皮紧密连接的重要成分之一。在信号传导过程中起转化作用,从而控制细胞周围屏障<sup>[4]</sup>。

MLCK 是由 mylk1 基因编码的产物,至少 4 个

蛋白产物,这些蛋白产物可调节非平滑肌和平滑肌肌球蛋白活性,参与调节多种收缩性程序,包括平滑肌收缩,细胞黏附,迁移和增殖<sup>[5]</sup>。MLCK 有 2 个亚型,短链的 MLCK108,广泛表达于平滑肌细胞;长链的 MLCK210 主要位于内皮细胞<sup>[6]</sup>。而本实验中 MLCK 条带主要集中在 150 kD 附近。说明发生改变的主要是长链 MLCK。

传统的 MLCK 属于  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白依赖的蛋白激酶家族,在  $Ca^{2+}$  和钙调蛋白存在下,MLCK 对肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 进行磷酸化作用,并促进肌球蛋白与肌动蛋白丝间相互作用<sup>[5]</sup>,诱导连接周围的肌动蛋白和肌球蛋白丝收缩,对紧密连接和细胞表面产生张力,开放紧密连接<sup>[7]</sup>。通过使用肌动蛋白解聚剂能开放细胞间紧密连接<sup>[8]</sup>。在 MLCK 与肠黏膜屏障关系的研究中发现,由肌球蛋白 II 调控的轻链的磷酸化引起的细胞骨架的收缩是肠上皮屏障破坏的必要因素<sup>[9]</sup>。

体外实验证实抑制 MLCK 能恢复屏障功能<sup>[7]</sup>。其中可能的机制是:(1)  $Ca^{2+}$  依赖的 MLCK 活化致 MLC 磷酸化,使肌动蛋白收缩,跨膜电阻下降及旁细胞通透性升高;(2) Rho 亚家族的小三磷酸鸟苷 (GTP) 结合蛋白,与靶蛋白共同作用从而控制肌动蛋白的动力学,增强 MLC 的磷酸化及其收缩张力;(3) 蛋白激酶 C、酪氨酸激酶等,其中后者的拮抗剂所介导的连接蛋白的酪氨酸磷酸化的增加,伴随旁细胞通透性增加。但对此确切的调控机制仍未明了。

梗阻性黄疸时肠黏膜上皮通透性是如何改变的? 本文通过建立胆道梗阻的动物模型,证明梗阻性黄疸时肠黏膜通透性的变化与肠黏膜紧密连接蛋白的一系列改变有关。检测显示,胆道梗阻时实验甲、乙组与肠黏膜通透性密切相关的紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的强阳性表达率均有明显下降 (均  $P < 0.05$ ),且分布紊乱,染色变淡,线条模糊。ZO-1 随着梗阻时间的延长下降更

显著,实验乙组(14.3%)与实验甲组(28.6%)差异具有显著性。参与细胞收缩的主要成分之一的MLCK的强阳性表达率亦从对照组的70%下降至实验甲组28.6%,与ZO-1, Occludin的改变具有一致性。说明ZO-1, Occludin, MLCK均参与了肠黏膜通透性的改变。Western blot检测及图像分析系统进行定量研究,也得到相同的结果。

综上所述,本实验发现梗阻性黄疸时肠上皮的紧密连接破坏,是由各种原因引起的紧密连接蛋白(ZO-1, Occludin等)的改变所致,它诱导MLCK变化,从而激活MLC,引起细胞骨架重排,最终造成细胞皱缩,细胞间间隙增大,细胞通透性增加。

#### 参考文献:

[1] Michel A, Boivin, Dongmei, John C. *et al.* Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier [J]. *Am J Physio Gastro Liver Physiol*, 2007, 292(2): G590 - G598.

[2] Anderson JM, Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability 1 [J]. *Am J Physio*, 1995, 269(4): 497 - 475.

[3] 刘俊,张寿熙,吕坤章,等. 阻塞性黄疸对肠道细菌及小肠粘膜组织的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 1998, 7(6): 326 - 327.

[4] Matter Ka, Balda MS. Signaling to and from tight junctions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(3): 225 - 236.

[5] Paul H, Omar E, Patricia J, *et al.* Regulation of myosin light chain kinase and telokin expression in smooth muscle tissues [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(5): 817 - 827.

[6] Patrick O, Angela T, Cécile L, *et al.* Deletion of MLCK 210 induces subtle changes in vascular reactivity but does not affect cardiac function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(6): H2342 - H2349.

[7] Fabeha F, Lianzhi G, Ivanna I, *et al.* Inhibiting myosin light chain kinase induces apoptosis in vitro and in vivo [J]. *Mol Cel Biol*, 2005, 25(14): 6259 - 6266.

[8] Madara JL. Relationships between the tight junctions and the cytoskeleton [A]. In: M Cerrejido. *Tight Junctions* [M]. Boca Raton, FL: CRC, 1992. 105 - 120.

[9] Wang F, Graham WV, Wang Y, *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(2): 409 - 419.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

近来本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用,为了维护本刊的声誉和广大读者的利益,本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定:凡属原始研究的报告,同语种一式两份投寄不同的杂志,或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿,分别投寄不同的杂志,属一稿两投;一经为两杂志刊用,则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志,以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志,不属一稿两投。但作者若要重复投稿,应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满3个月未接到退稿通知,表明稿件仍在处理中,若欲投他刊,应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时,由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实,则立即退稿,对该作者作为第一作者所撰写的论文,2年内将拒绝在本刊发表;一稿两用一经证实,将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告,对该作者作为第一作者所撰写的论文,2年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。