

1,25(OH)₂D₃通过调控连接蛋白的表达缓解DSS诱导的小鼠结肠炎

朱文静¹, 颜家耀², 周倩雯¹, 龚子旋², 袁小琴^{1,3*}

¹南京医科大学人体解剖学系, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第一临床医学院临床医学系, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学衰老与相关疾病研究重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:利用葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的急性结肠炎小鼠模型探讨活性维生素D[1,25(OH)₂D₃]缓解结肠炎的作用及机制。方法:利用DSS诱导小鼠急性结肠炎,分析炎症表型,检测杯状细胞变化情况以及肠道通透性的改变,通过实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)、免疫蛋白印迹试验(Western blot, WB)及免疫荧光分析各组小鼠结肠组织连接蛋白的表达差异。利用CaCO-2单层细胞模型,检测1,25(OH)₂D₃对连接蛋白的保护作用。通过染色质免疫共沉淀、荧光素酶报告基因实验探讨1,25(OH)₂D₃调控Claudin 4表达的机制。结果:1,25(OH)₂D₃可明显缓解DSS诱导的结肠炎症,其可能通过增加连接蛋白表达,维持杯状细胞结构,提高肠道上皮屏障作用,减轻肠道通透性,进而减少炎症反应发挥保护作用。结论:1,25(OH)₂D₃可在小鼠急性结肠炎中发挥抗炎作用,维持肠道通透性稳定,增强细胞连接蛋白的表达水平,并且通过维生素D受体转录调控Claudin 4的表达。

[关键词] 炎症性肠病;1,25(OH)₂D₃;连接蛋白;闭合蛋白4

[中图分类号] R574.62

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)06-745-08

doi:10.7655/NYDXBNS20180606

1,25(OH)₂D₃ alleviate DSS-induced acute colitis via regulating tight junction proteins

Zhu Wenjing¹, Yan Jiayao², Zhou Qianwen¹, Gong Zixuan², Yuan Xiaoqin^{1,3*}

¹Department of Anatomy, NMU, Nanjing 211166; ²First Clinical Medicine College, NMU, Nanjing 211166; ³Key Laboratory for Aging & Disease, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of 1,25(OH)₂D₃ on ameliorating dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Methods:** With DSS-induced colitis mice model established, inflammatory phenotype and goblet cells were detected and analyzed among model groups. The expression levels of tight junction proteins (TJs) among colonic tissues from different model groups were detected by RT-qPCR, Western blot and immunofluorescence staining. Using Caco-2 monolayer cell model, the protection of 1,25(OH)₂D₃ for TJs was detected *in vitro*. The mechanism of 1,25(OH)₂D₃ regulating expression of Claudin 4 was investigated *via* Chromatin immuno-precipitation (ChIP) and luciferase reporter assay. **Results:** 1,25(OH)₂D₃ could enhance the intestinal epithelial barrier by promoting the expression of TJs, maintaining the structure of goblet cells and decreasing the intestinal permeability, thus relieving inflammation in DSS-induced acute colitis in mice. **Conclusion:** 1,25(OH)₂D₃ plays a protective role in acute colitis mouse model *via* preserving intestinal permeability, promoting the expression levels of TJs and regulating the expression of Claudin4 through Vitamin D receptor.

[Key words] inflammatory bowel disease; 1,25(OH)₂D₃; tight junction proteins; Claudin4

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06): 745-752, 773]

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是慢性且易反复发作的胃肠道疾病,主要包括溃疡性结

[基金项目] 国家自然科学基金(81572386)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yuanxq@njmu.edu.cn

肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),均可伴有反复腹泻症状,肠道上皮屏障表现为不同程度的缺损^[1-2]。咬合蛋白 Occludins、闭合蛋白 Claudins 和闭锁小带 Zonula Occludens-1

(ZO-1)参与构成肠道上皮屏障^[3-4],维持肠道内液体运输稳态,其表达上调可减少肠上皮受损,降低肠道通透性,Claudin 4(CLDN-4)属于闭合蛋白家族,参与构成细胞间紧密连接结构^[5-6]。1,25(OH)₂D₃作为维生素D(vitamin D,VD)的活性形式,可通过维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)参与物质代谢调控,被称为“类激素”^[7-8],已有文献表明1,25(OH)₂D₃在DSS诱导的急性结肠炎中参与肠上皮屏障的修复^[9]。本研究拟探讨1,25(OH)₂D₃对细胞连接蛋白表达水平的影响,并初步探讨其在缓解DSS诱导的小鼠结肠炎中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

8~10周C57BL/6 SPF级雄性小鼠(北京维通利华公司),VDR基因敲除雄鼠(Jackson Lab,美国)。动物饲养条件为:恒温(20~26℃),恒湿(30%~50%),昼夜交替12h/12h。动物实验符合南京医科大学实验动物福利伦理审查要求(动物实验伦理证号:IACUC1601080)。

葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS, MP-bio公司,加拿大),1,25(OH)₂D₃,异硫氰酸荧光素葡聚糖(FITC-D, Sigma Aldrich公司,美国),DMEM(Gibco公司,美国),TRIZOL, Lipo2000(Life Invitrogen公司,美国),ChIP试剂盒(Millipore公司,美国),双荧光素酶检测试剂盒(Promega公司,美国)。一抗:抗Occludin抗体、抗Claudin 4、抗ZO-1、抗VDR抗体(Abcam公司,英国),抗GAPDH抗体、抗IL-1 α 、抗IL-6、抗IL-10抗体(Santa Cruz公司,美国),抗F4/80抗体、抗CD3抗体(Bio-Rad公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

培养CaCO-2细胞(中国科学院上海生物生化及细胞生物研究所)于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃5%CO₂的培养箱中培养。将CaCO-2细胞接种于transwell小室中,利用上皮跨膜细胞电阻仪(MERS00002 Millicell-ERS, Millipore公司,美国)检测跨细胞电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER),构建单层细胞模型。分别给予细胞2 \times 10⁻⁸ mol/L浓度的1,25(OH)₂D₃或PBS刺激1h后,加2%DSS处理1h,吸取上清,并PBS清洗,继续在含1,25(OH)₂D₃或者PBS的培养基里培养24h,然后行细胞免疫荧光检测。其中仅有PBS刺激的为Ctrl组,仅有DSS刺激的为DSS组,有DSS和1,25-

(OH)₂D₃刺激的为DSS+VD组。

1.2.2 DSS诱导的小鼠急性结肠炎模型建立

8~10周的C57BL/6雄鼠分为3组,分别是对照组(Ctrl组)5只,模型组(DSS组)10只和治疗组(DSS+VD组)10只。其中DSS组以及DSS+VD组分别给予7d的2.5%DSS饮水和3d的正常饮水进行急性结肠炎造模实验。DSS+VD组小鼠从第1天起同时给予1,25(OH)₂D₃(0.5 μ g/kg)腹腔注射, Ctrl组和DSS组分别给予PBS(10 μ L/g)腹腔注射作为对照。同时每日测量小鼠体重、饮水量,观察小鼠粪便性状及检测隐血程度(造模见图1)并进行疾病活动指数评分(DAI评分)^[9]。造模结束后,比较3组小鼠体重、DAI评分、结肠长度、结肠组织结构和炎症进展。粪便隐血通过尿粪隐血测试盒(南京建成生物公司)检测。

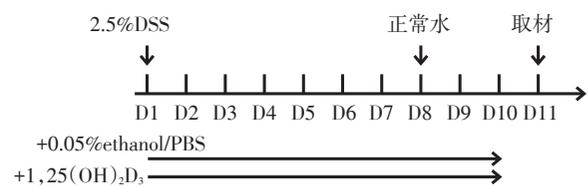


图1 DSS诱导的小鼠急性结肠炎模型

Figure 1 Establishment of the mouse model of acute colitis induced by DSS

1.2.3 造模小鼠取材

取材前一晚小鼠禁食不禁水,麻醉前15min小鼠FITC-D药物(50mg/mL,剂量0.6mg/g)灌胃,腹腔注射2%水合氯醛(0.02mL/g)进行麻醉,眼球摘除采血,部分全血浆用来做异硫氰酸荧光素葡聚糖(FITC-Dextran, FITC-D)实验,其他部分静置后离心分离血清,-80℃保存;取结肠组织,一部分置于液氮迅速冷冻后,-80℃保存:分别用于做髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)实验,提取蛋白行Western blot实验,提取RNA行逆转录和real-time RT-PCR实验;一部分用4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋后5 μ m切片,冰冻需5~10 μ m切片,行组织学染色、免疫组织化学染色和组织免疫荧光等实验。

1.2.4 组织学评估

小鼠造模完成后取材,取结肠组织制作石蜡切片,进行HE染色、PAS染色、AB-PAS染色,并根据HE镜下表现进行病理学评分。根据评分标准^[9]对对照组(Ctrl组)、模型组(DSS组)和治疗组(DSS+VD组)均取结肠组织制作石蜡切片后,进行免疫组织化学检测CD3、F4/80、IL1- α 、IL-6、IL-10表达,同时进行统计分析。

1.2.5 MPO 检测

取小鼠结肠组织匀浆,根据MPO试剂盒(南京建成生物公司)说明书处理样本,通过分光光度计在460 nm处,1 cm光径,检测吸光度值,并计算MPO值。

1.2.6 体内荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(FITC-D)渗透实验

小鼠FITC-D药物(50 mg/mL,剂量0.6 mg/g)灌胃,腹腔注射2%水合氯醛(0.02 mL/g)进行麻醉,眼球摘除采血,采集全血浆,利用酶标仪检测并计算FITC-D含量,激发光波长485 nm,辐射光波长528 nm。

1.2.7 实时荧光定量RT-qPCR实验

TRIzol试剂提取组织RNA后,取1 μL RNA样本在Nano Drop上测量RNA浓度,检测其在260 nm,280 nm和230 nm下的吸光度,将合格RNA样本利用TaKaRa逆转录试剂盒进行逆转录反应得到cDNA,利用RT-qPCR仪进行PCR反应得到特定片段并定量分析。研究中所用基因的引物如下:ZO-1:F:5'-GAGCGGGCTACCTTACTGAAC-3',R:5'-GT-CATCTCTTTCCGAGGCATTAG-3';Occludin:F:5'-TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA-3',R:5'-CCGGA-TAAAAAGAGTACGCTGG-3';Claudin 4:F:5'-GTC-CTGGGAATCTCCTTGGC-3',R:5'-TCTGTGCCGTG-ACGATGTTG-3';GAPDH:F:5'-TGGCCTTCCGTG-TCCTAC-3',R:5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'。

1.2.8 免疫蛋白印迹试验(Western blot)

RIPA裂解液提取组织蛋白,BCA法检测蛋白浓度,30 μg蛋白行SDS-PAGE电泳和转膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗4℃过夜,二抗室温1 h后,ELC显影拍照。

1.2.9 免疫荧光染色

组织切片免疫荧光:制作冰冻切片,10%羊血清37℃封闭1 h;加一抗4℃过夜;次日,闭光室温孵育荧光二抗(0.5%BSA-PBST液稀释羊抗兔1:1 000)1 h;DAPI染料(PBS稀释1:1 000)染核,室温闭光8 min;用抗荧光淬灭液封片将切片于荧光显微镜下观察,调整荧光模式,拍照摄取不同倍数的图像。细胞免疫荧光:取出DSS处理及未处理的CaCO-2细胞贴附生长的transwell内室,3.7%多聚甲醛固定,0.1% Triton处理打孔,10%小牛血清封闭30 min;滴加特异性一抗4℃孵育过夜,次日滴加与第一抗体种属匹配的荧光素标记二抗37℃孵育1 h用抗荧光淬灭液封片共聚焦显微镜下观察。

1.2.10 细胞转染

转染前1 d将1×10⁵的CaCO-2细胞接种于24孔

板中,待细胞长满80%~90%左右,通过Lipo2000脂质体将pcDNA3.1和VDR高表达的质粒(上海吉凯基因)pcDNA-VDR转染至细胞,6 h后换液,24 h收集细胞,提取RNA。

1.2.11 ChIP实验

分别收集1,25(OH)₂D₃刺激及PBS刺激的1×10⁷的CaCO-2细胞,根据ChIP试剂盒说明书进行ChIP实验。主要步骤为,固定交联细胞后,超声处理至DNA片段集中在200~1 000 bp之间,加VDR抗体及protein A-Agarose 4℃孵育过夜,解交联后收集DNA片段,并设计引物行PCR检测。所用引物为:F:5'-GCCAACCCCTGTACTCTCTGAC-3',R:5'-CCTCTTCCCAAAGCCCGAAG-3'。

1.2.12 荧光素酶基因报告实验

化学合成含有Claudin 4启动子区VDRE序列TGTACTCTCTGACCC在内的200 bp核苷酸序列连接到pGL3载体,构建pGL-CLDN4质粒(上海吉凯基因)。将空白质粒pGL-blank和pGL-CLDN4质粒通过Lipo2000转染至CaCO-2细胞,24 h后,收集细胞,根据双荧光检测试剂盒说明书裂解细胞,并检测荧光强度。

1.3 统计学方法

定量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS13.0软件进行单因素方差分析和SNK法两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1,25(OH)₂D₃缓解DSS诱导的小鼠急性结肠炎症状

为明确1,25(OH)₂D₃是否改善DSS诱导的小鼠急性结肠炎,8~10周的C57BL/6雄鼠被分为3组:对照组(Ctrl组)5只,模型组(DSS组)10只和治疗组(DSS+VD组)10只进行动物实验,实验过程中观察各项指标变化,包括小鼠体重、大便性状、大便隐血程度等。DSS+VD组小鼠体重降低程度明显好于DSS组(图2A);相较于DSS组,DSS+VD组的疾病活动指数评分明显降低(图2B);结肠长度统计显示:DSS组小鼠结肠长度缩短至DSS+VD组小鼠结肠长度的75.0%(图2C~D);DSS组小鼠结肠组织切片表现为黏膜缺损、杯状细胞减少,腺体破坏或消失,而DSS+VD组小鼠结肠黏膜上皮比较完整,上皮、固有层和黏膜肌层组成的肠腺排列相对规整,病理评分较低(图2E~F),表明两者炎症浸润程度差异,与之一致的是,DSS+VD组的MPO活性明显低于DSS组

(图2G),表明DSS+VD组的中性粒细胞浸润程度低于DSS组。以上结果表明 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能有效减轻DSS诱导的小鼠急性结肠炎症状。

2.2 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 下调DSS诱导的炎症因子表达水平

除了小鼠体征以及小鼠结肠组织学变化外,炎症细胞浸润,炎症因子包括促炎、抑炎因子在结肠炎中也有明显变化。炎症相关因子免疫组化染色显示:DSS+VD组小鼠结肠中的促炎因子(IL-1 α 、IL-6)相较于DSS组,表达水平明显下调(图3C),而抗炎因子IL-10的表达水平相对于DSS组明显上调(图3C)。F4/80标记的巨噬细胞和CD3标记的T细胞免疫组化染色结果显示:DSS+VD组CD3、F4/80阳性细胞百分率明显低于DSS组(图3A~B),这与炎症相关因子表达趋势一致,表明 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能通过减少炎症细胞浸润,下调促炎因子表达并增强抗炎因子水平,进而减轻DSS诱导的小鼠结肠组织炎症。

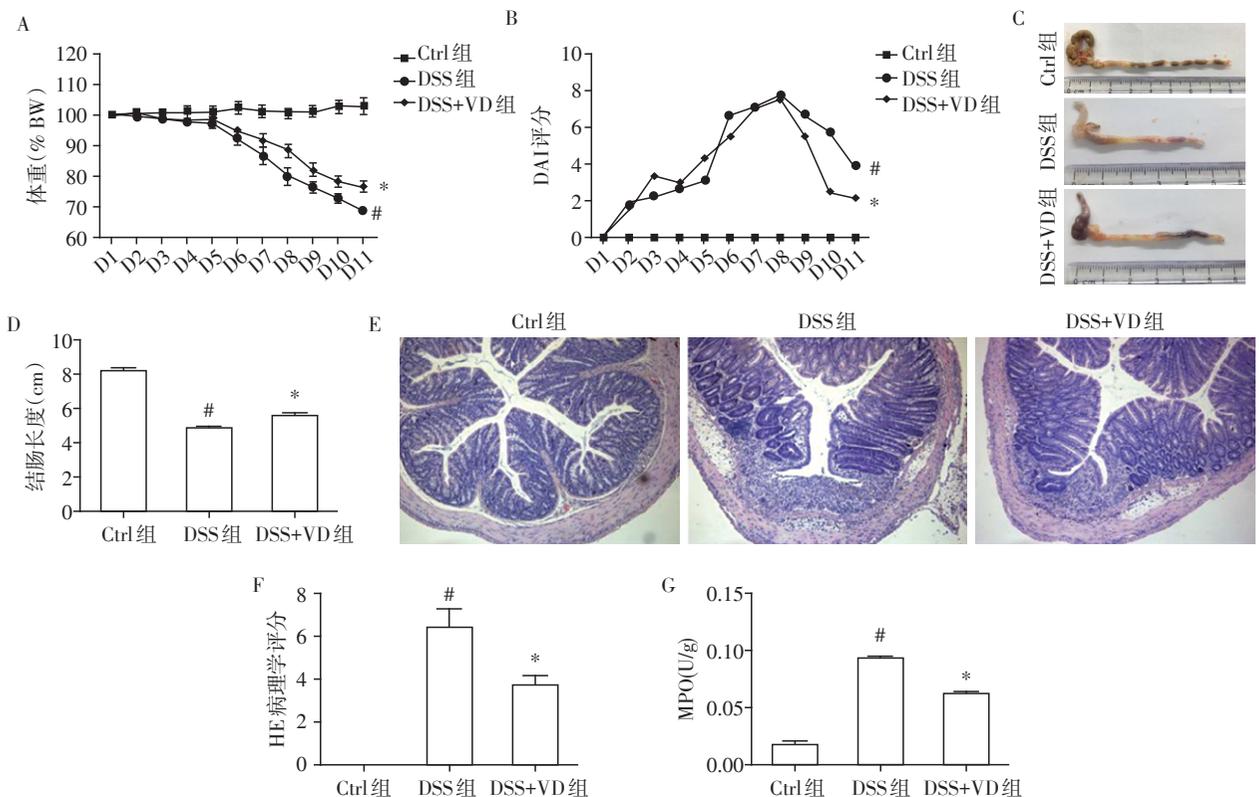
2.3 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 缓解DSS对小鼠结肠上皮屏障的破坏

结肠炎除了明显的炎症表型外,其肠道通透性

也明显增高^[10]。FITC-Dextra(FITC-D)肠道渗透实验结果显示:与DSS组相比,DSS+VD组血浆FITC-D含量明显降低(图4B),表明FITC-D穿过肠上皮屏障进入循环血的量显著降低。说明 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可以降低DSS诱导的肠道高通透性。

通透性的增加主要来自肠道上皮屏障的破坏。肠上皮屏障是由单层柱状上皮细胞(包括吸收细胞、杯状细胞和潘氏细胞等)、上皮细胞分泌的黏液及其紧密连接组成,是肠黏膜屏障具有选择性通透的基础。其功能不仅能够阻挡致病原的入侵,还能促进肠蠕动增加,清除细菌,从而达到抑制结肠炎IBD的作用^[11-12]。利用PAS染色及爱先蓝糖原染色法(AB-PAS)分别检测肠上皮黏蛋白及杯状细胞变化,结果显示:相比DSS组,DSS+VD组的黏膜上皮细胞相对完整,黏蛋白水平较丰富,杯状细胞数量增多(图4A),表明 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 有效缓解DSS对杯状细胞的破坏作用。

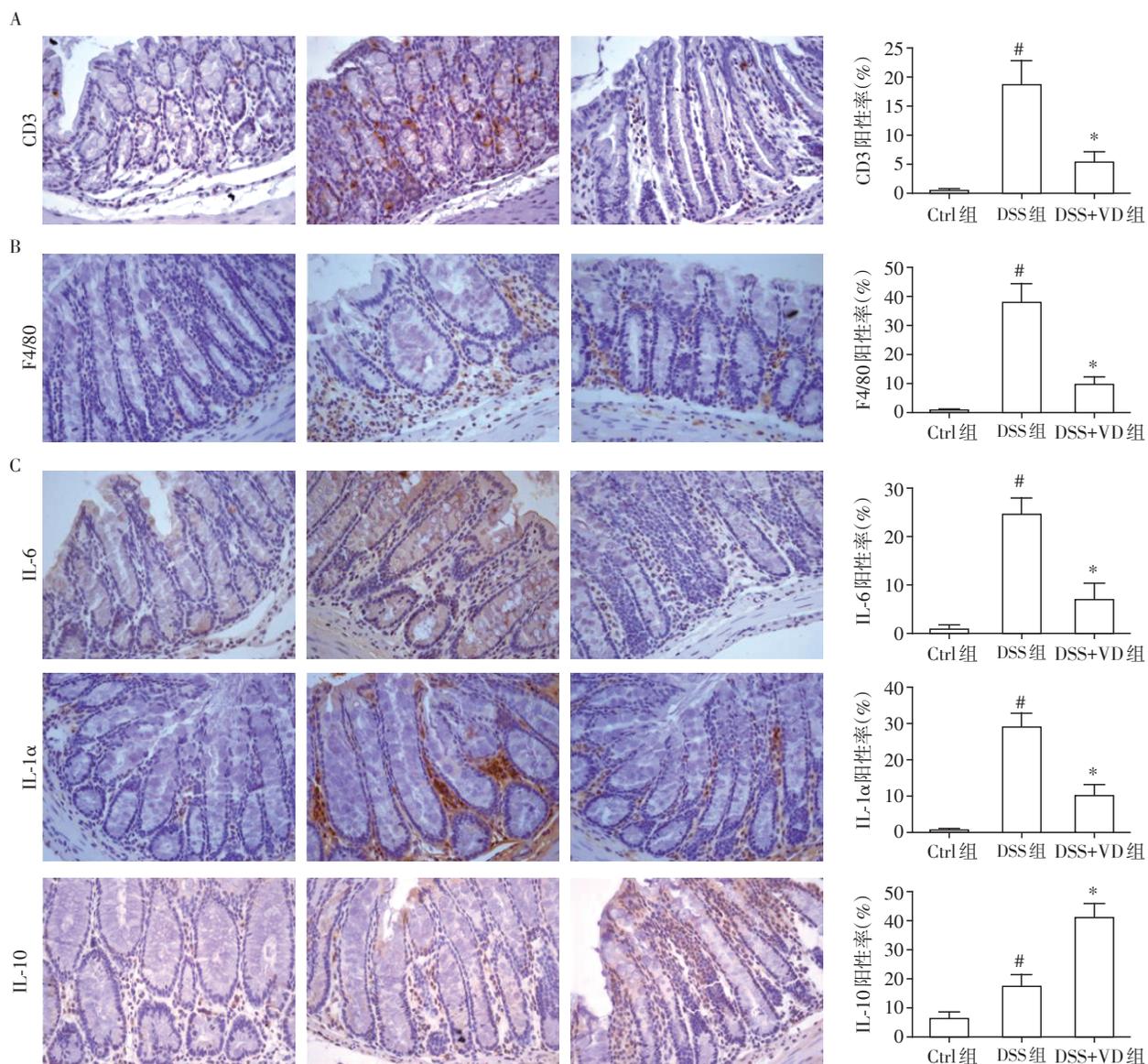
RT-qPCR检测细胞间连接蛋白mRNA结果显示:DSS+VD组ZO-1、Occludin及Claudin 4表达明显增强,而在DSS组中三者均显著表达低下(图5A)。



A: 3组C57BL/6小鼠体重统计图; B: DAI评分; C: C57BL/6小鼠结肠长度大体图; D: C57BL/6小鼠结肠长度统计图; E: 结肠组织HE染色图($\times 100$); F: HE病理学评分; G: C57BL/6小鼠结肠MPO统计。DSS+VD组与DSS组相比, $P < 0.05$; DSS组与Ctrl组相比, $P < 0.05$ 。

图2 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 缓解DSS诱导的小鼠结肠炎症状

Figure 2 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alleviate DSS-induced acute colitis



A: 结肠组织CD3免疫组织化学染色及阳性细胞百分率统计图($\times 400$);B: 结肠组织F4/80免疫组织化学染色及阳性细胞百分率统计图($\times 400$);C: 结肠组织促炎因子IL-1 α 、IL-6免疫组织化学染色及阳性细胞面积百分率统计图($\times 400$),结肠组织抗炎因子IL-10免疫组织化学染色及阳性细胞面积百分率统计图($\times 400$)。DSS+VD组与DSS组相比,* $P < 0.05$;DSS与Ctrl组相比,# $P < 0.05$ 。

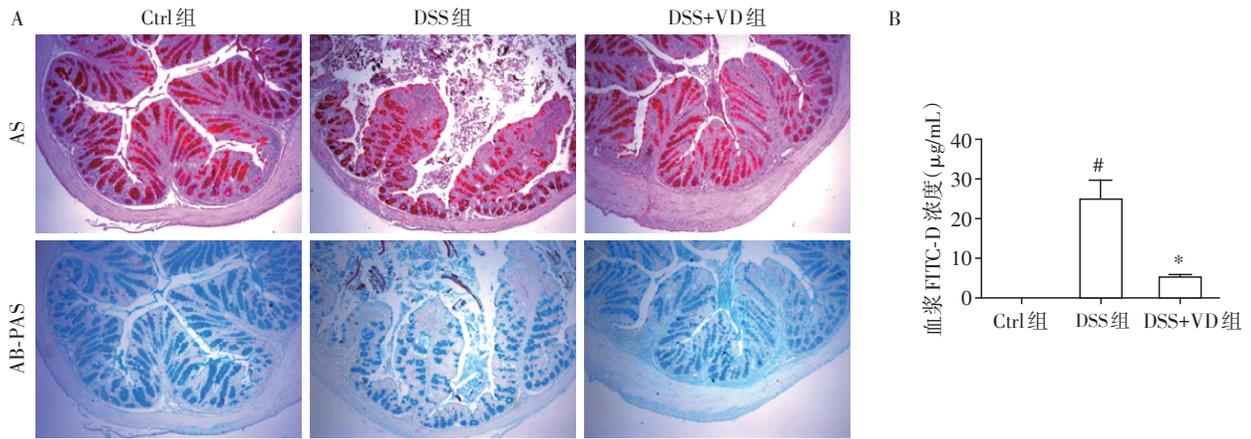
图3 1,25(OH)₂D₃降低DSS诱导的小鼠结肠炎症表型

Figure 3 1,25(OH)₂D₃ decreased inflammation of DSS-induced acute colitis

Western blot 结果同样显示:相比于DSS组,DSS+VD组明显高表达 Occludin 及 Claudin 4 蛋白(图5B)。组织免疫荧光结果显示:DSS+VD组 ZO-1、Claudin 4 的荧光强度均明显高于DSS组(图5C)。通过给予CaCO-2单层细胞模型DSS以及DSS联合1,25(OH)₂D₃处理,也显示DSS+VD组ZO-1、Claudin 4的荧光强度均明显高于DSS组,结合mRNA水平差异及Western blot蛋白检测结果,表明1,25(OH)₂D₃可以上调细胞间连接蛋白表达水平,减轻DSS对肠上皮屏障完整性的破坏。

2.4 1,25(OH)₂D₃通过VDR调控Claudin 4的表达

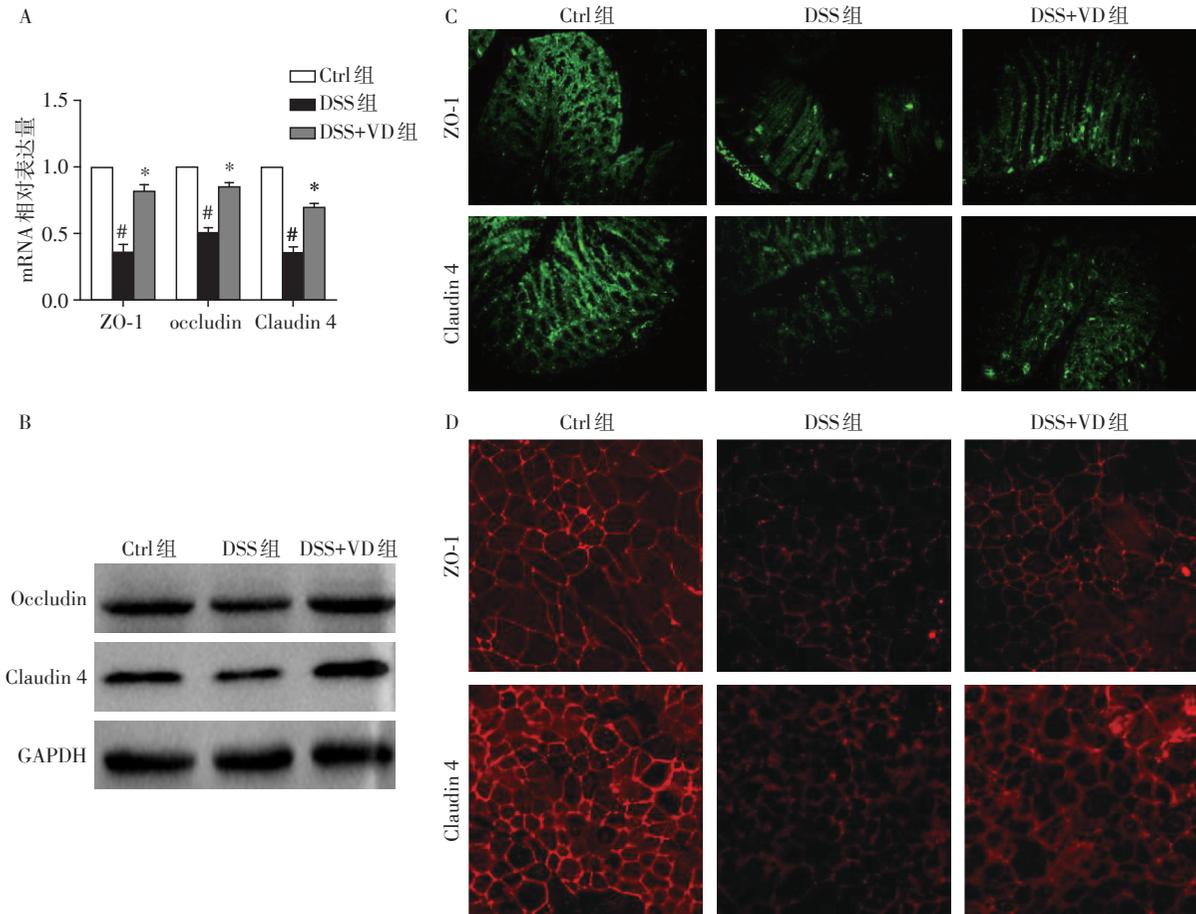
之前已有文献报道1,25(OH)₂D₃可以转录调控Claudin 2的表达^[13]。本研究通过对Claudin 4、ZO-1、Occludin基因启动子序列的生物信息学分析发现,Claudin 4的启动子区有VDR结合的VDRE序列TG-TACTCTGACCC。提示1,25(OH)₂D₃可能直接调控Claudin 4的表达。CaCO-2细胞在VDR质粒转染后发现,Claudin 4的mRNA水平高于对照质粒(图6A),同时,VDR基因敲除小鼠(VDR KO)结肠组织中Claudin 4的表达明显低于正常野生型(WT)小鼠



A: 结肠组织PAS、AB-PAS染色图($\times 200$); B: 外周循环血浆FITC-D浓度变化;与DSS组相比, $^*P < 0.05$;与Ctrl组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

图4 1,25(OH)₂D₃降低DSS诱导的小鼠结肠通透性

Figure 4 1,25(OH)₂D₃ attenuated the mucosal permeability induced by DSS



A: RT-qPCR检测小鼠结肠组织中连接蛋白(ZO-1、Occludin、Claudin4)mRNA表达水平; B: Western blot检测小鼠结肠组织中连接蛋白(Occludin、Claudin4)表达水平, GAPDH为内参; C: 结肠组织免疫荧光检测ZO-1、Claudin4($\times 200$); D: DSS以及DSS联合活性维生素D处理后的CaCO-2细胞ZO-1、Claudin4进行荧光染色($\times 200$)。与DSS组相比, $^*P < 0.05$;与Ctrl组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

图5 1,25(OH)₂D₃减少DSS诱导的小鼠结肠上皮细胞屏障的丢失

Figure 5 1,25(OH)₂D₃ prevented the loss of epithelial barrier induced by DSS

(图6B), VDR ChIP实验发现, 1,25(OH)₂D₃刺激增加了VDR与Claudin 4的VDRE结合(图6C)。荧光素

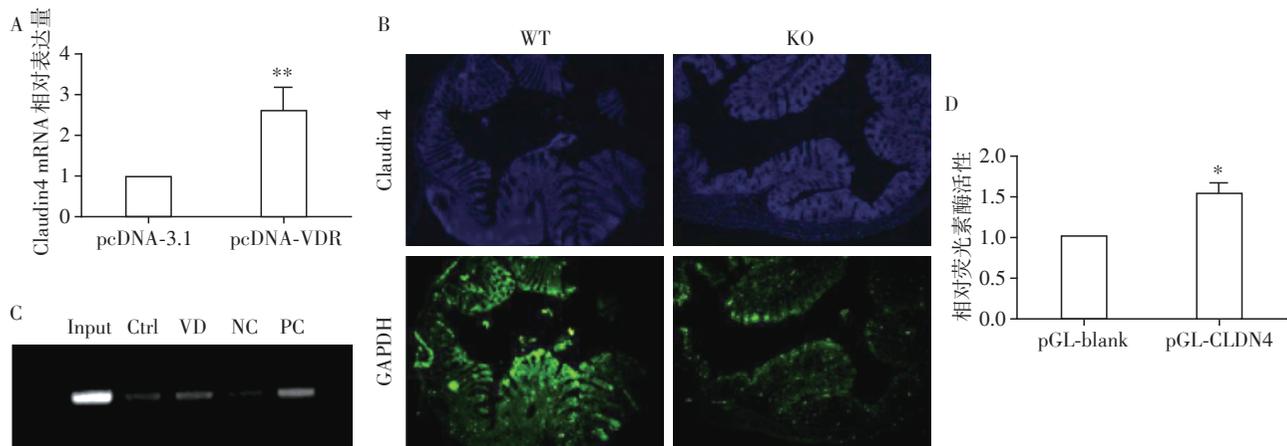
酶报告基因实验也发现, 与对照相比, 1,25(OH)₂D₃刺激可以明显增加荧光强度(图6D)。这些结果提示

1,25(OH)₂D₃可能通过结合VDR调控Claudin 4的表达。

3 讨论

目前流行病学研究发现活性维生素D的缺乏与

IBD的发生和发展关系密切,活动期溃疡性结肠炎患者血清活性维生素D水平显著低于健康人群^[14-15]。临床研究也表明,维生素D对于临床患者有一定的治疗效果,可以减轻和改善IBD疾病的症状及发展^[16-17],但有关活性维生素D的抗炎机制尚不清楚。目前普



A: VDR质粒转染CaCo-2细胞后Claudin 4的mRNA的表达水平;与pcDNA-3.1相比,** $P < 0.01$; B:免疫荧光实验检测Claudin 4表达($\times 200$); C:染色质免疫共沉淀; D:荧光素酶报告基因实验。与pGL-blank组相比,* $P < 0.05$ 。

图6 1,25(OH)₂D₃通过VDR调控Claudin 4的表达

Figure 6 1,25(OH)₂D₃ regulated Claudin 4 expression via VDR

遍观点认为维生素D对IBD的抑制作用是通过调节免疫系统实现的^[18]。本研究也证实,相比DSS诱导的急性结肠炎模型组,补充1,25(OH)₂D₃的治疗组小鼠体重下降不明显、结肠长度无明显变化、结肠黏膜结构较完整且肠腺排列相对规整、CD3和F4/80阳性细胞表达少,DAI和HE病理评分增高等炎症症状和体征较轻,中性粒细胞的功能标志MPO的活性降低,促炎因子IL-1 α 、IL-6炎症表达下调,促炎因子IL-10的表达上调,小鼠结肠组织整体炎症水平得到缓解,同时补充1,25(OH)₂D₃治疗组小鼠结肠黏膜结构相对完整也提示1,25(OH)₂D₃在结肠炎中的抗炎作用,也有可能与保护肠黏膜屏障的完整性有关。

肠上皮屏障是由单层柱状上皮细胞(包括吸收细胞、杯状细胞和潘氏细胞等)、上皮细胞分泌的黏液及其紧密连接组成^[3-4]。若肠屏障损伤功能失常,破损的黏膜暴露于肠腔,增加与抗原和病原体的接触时间和机会,导致炎症发生^[19-20]。已有文献表明,1,25(OH)₂D₃可以增强胃肠黏膜的防御机制,防止黏膜损伤引起炎症性肠病IBD^[21]。本研究中,通过PAS染色、AB-PAS染色及体内FITC-D渗透实验,证实1,25(OH)₂D₃治疗可以保持肠黏膜上皮细胞相对完整,黏蛋白分泌水平增强,杯状细胞数量增多,且明显降低DSS处理的小鼠血浆中FITC-D浓度,表明

1,25(OH)₂D₃通过保护肠道上皮屏障作用,减轻高通透性进而缓解DSS诱导的结肠炎症。

除了包括杯状细胞等上皮细胞的结构和功能的完整外,肠上皮细胞间的紧密连接是维持肠上皮屏障的主要因素之一。紧密连接是细胞间连接复合体的主要组成,位于肠上皮细胞间的顶端,形成的顶端闭锁结构,负责细胞与细胞间的黏附、细胞间分子转运和维持细胞极性,创造了一个半渗透的屏障^[3-4]。有研究显示肠上皮细胞间的紧密连接能被TNF- α 、IFN- γ 等多种细胞因子调控^[22-23]。更有研究指出肠上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1、Claudin 1的减少,成孔蛋白Claudin 2的增加与肠道黏膜屏障破坏和功能失常有关^[24-25]。本研究发现1,25(OH)₂D₃能明显提高DSS诱导的上皮连接蛋白如ZO-1、Occludin、Claudin 4的表达。提示1,25(OH)₂D₃可以通过诱导细胞连接蛋白的表达,提高上皮屏障作用。Claudin家族是紧密连接蛋白的重要组成,参与构成肠道上皮屏障,具有决定紧密连接通透性的作用。本研究利用qPCR、Western blot以及组织免疫荧光实验检测DSS诱导的小鼠结肠组织中的连接蛋白表达,结果显示,1,25(OH)₂D₃能显著上调紧密连接蛋白Claudin 4的表达。VDR作为1,25(OH)₂D₃的核受体,可以结合下游基因启动子区域的VDRE序列调

控基因的转录表达^[26]。已有研究发现 Claudin 2 作为 VDR 的靶基因,受到活性维生素 D 的调控^[13]。本研究证实,VDR 高表达质粒可以提高 Claudin 4 的 mRNA 水平,提示 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可能通过 VDR 调控 Claudin 4 的表达。此外,VDR 敲除的小鼠结肠组织中 Claudin 4 的表达明显低于野生型小鼠,通过染色质免疫共沉淀及荧光素酶报告基因实验进一步发现, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可通过结合 VDR 增强 Claudin 4 的表达水平。

综上所述, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在 IBD 中能够发挥抗炎作用的原因,一是它可以通过调节免疫细胞抑制促炎细胞因子的表达;二是由于对肠上皮屏障的功能维护,一方面可以直接通过 VDR 上调 Claudin 4 的表达,另一方面也可通过抑制炎症因子间接调控连接蛋白的表达,进而维持肠道通透性的稳定。但是在短时治疗、病理变化缓慢的疾病过程当中, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是否依旧能够有效发挥抗炎作用,有待进一步研究。本研究结果不仅阐述了 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 治疗结肠炎症的部分作用机制,而且也为 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在防治 IBD 中提供了理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] de Lange KM, Barrett JC. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics [J]. *J Autoimmun*, 2015, 64:91-100
- [2] Rigoli L, Caruso RA. Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients: a biomolecular and histopathological review [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(30):10262-10278
- [3] Buckley A, Turner JR. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(1):a029314
- [4] Capaldo CT, Powell DN, Kalman D. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2017, 95(9):927-934
- [5] Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36:166-176
- [6] Kumar A, Chatterjee I, Anbazhagan AN, et al. Cryptosporidium parvum disrupts intestinal epithelial barrier function via altering expression of key tight junction and adherens junction proteins [J]. *Cell Microbiol*, 2018, 14:e12830
- [7] Pike JW, Christakos S. Biology and mechanisms of action of the vitamin D hormone [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2017, 46(4):815-843
- [8] Makishima M. Update on recent progress in vitamin D research. Vitamin D receptor and the nuclear receptor superfamily [J]. *Clin Calcium*, 2017, 27(11):1533-1541
- [9] Chen S, Zhu J, Chen G, et al. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ preserves intestinal epithelial barrier function from TNF- α induced injury via suppression of NF- κ B p65 mediated MLCK-P-MLC signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3):873-878
- [10] Liu C, Liu ED, Meng YX, et al. Keratin 8 reduces colonic permeability and maintains gut microbiota homeostasis, protecting against colitis and colitis-associated tumorigenesis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57):96774-96790
- [11] Sina C, Kemper C, Derer S. The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping intestinal barrier function [J]. *Semin Immunol*, 2018, doi:10.1016/j.smim.2018.02.008
- [12] Hering NA, Schulzke JD. Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease [J]. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*. 2009;27(4):450-454
- [13] Zhang YG, Wu S, Lu R, et al. Tight junction CLDN2 gene is a direct target of the vitamin D receptor [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:10642
- [14] Du J, Chen Y, Shi Y, et al. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D protects intestinal epithelial barrier by regulating the myosin light chain kinase signaling pathway [J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2015, 21(11):2495-2506
- [15] Tan B, Li P, Lv H, et al. Treatment of vitamin D deficiency in Chinese inflammatory bowel disease patients: a prospective, randomized, open-label pilot study [J]. *J Dig Dis*, 2018, doi:10.1111/1751-2980.12590. [Epub ahead of print]
- [16] Schäffler H, Herlemann DP, Klinitzke P, et al. Vitamin D administration leads to a shift of the intestinal bacterial composition in Crohn's Disease patients, but not in healthy controls [J]. *J Dig Dis*, 2018, doi:10.1111/1751-2980.12591. [Epub ahead of print]
- [17] Schattenfroh S, Bartels M, Nagel E. Early morphological changes in Crohn's disease. Transmission electron-microscopic findings and their interpretation: an overview [J]. *Acta anatomica*, 1994, 149(4):237-246
- [18] Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK. Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease [J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2015, 21(9):2188-2193
- [19] Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(36):31263-31271
- [20] Chichlowski M, Westwood GS, Abraham SN, et al. Role of

(下转第 773 页)

- [8] Bonello L, Tantry US, Marcucci R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(12):919-933
- [9] Chesebro JH, Knatterud G, Roberts R, et al. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge [J]. *Circulation*, 1987, 76(1):142-154
- [10] Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, et al. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study [J]. *Circulation*, 2007, 115(6):708-716
- [11] Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: The GRAVITAS randomized trial [J]. *JAMA*, 2011, 305(11):1097-1105
- [12] 朱 辉,李济民,徐 可,等. 替格瑞洛对氯吡格雷低反应患者血小板聚集率的影响 [J]. *江苏医药*, 2016, 42(5):516-518
- [13] Anitman EM, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Early and late benefits of prasugrel in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: a TRITON-TIMI 38 (TRial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel-Thrombolysis) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(21):2028-2033
- [14] Stone GW, Witzenbichler B, Weisz G, et al. Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study [J]. *Lancet*, 2013, 382(9892):614-623
- [15] Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, et al. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(11):1314-1322
- [16] Bliden KP, Tantry US, Storey RF, et al. The effect of ticagrelor versus clopidogrel on high on-treatment platelet reactivity: combined analysis of the ONSET/OFFSET and RESPOND studies [J]. *Am Heart J*, 2011, 162(1):160-165
- [17] Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW, et al. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): A randomised factorial trial [J]. *Lancet*, 2010, 376(9748):1233-1243
- [18] Breet NJ, Van Werkum JW, Bouman HJ, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation [J]. *JAMA*, 2010, 303(8):754-762
- [收稿日期] 2018-01-17

(上接第752页)

- mast cells in inflammatory bowel disease and inflammation-associated colorectal neoplasia in IL-10-deficient mice [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8):e12220
- [21] Martinesi M, Ambrosini S, Treves C, et al. Role of vitamin D derivatives in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases [J]. *Journal of Crohn's & Colitis*, 2014, 8(9):1062-1071
- [22] Matsuhisa K, Watari A, Iwamoto K et al. Lignosulfonic acid attenuates NF- κ B activation and intestinal epithelial barrier dysfunction induced by TNF- α /IFN- γ in Caco-2 cells [J]. *J Nat Med*, 2018, 72(2):448-455
- [23] Ruummele FM, Garnier-Lengline H. Transforming growth factor and intestinal inflammation: the role of nutrition [J]. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 2013, 77(1):91-98
- [24] Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, 14(27):4280-4288
- [25] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(11):799-809
- [26] Dimitrov V, White JH. Vitamin D signaling in intestinal innate immunity and homeostasis [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 15(453):68-78
- [收稿日期] 2018-02-13