

蒙脱石对大肠杆菌 K₈₈ 感染 Caco-2 细胞的屏障功能和紧密连接蛋白表达的影响

胡彩虹* 刘海萍 胡向东¹ 徐勇 夏枚生²

(浙江大学动物科学学院, 动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029;

¹ 浙江皇冠科技有限公司, 杭州 310012; ² 浙江大学理学院地球科学系, 杭州 310027)

摘要 采用 Caco-2 细胞培养模型, 分析大肠杆菌 K₈₈ 感染 Caco-2 后的单层细胞跨膜电阻值 (TEER)、甘露醇透过率、紧密连接蛋白 occludin 分布的变化, 并在培养液中加入蒙脱石, 探讨蒙脱石对大肠杆菌 K₈₈ 感染 Caco-2 后的屏障功能和紧密连接蛋白表达的影响。结果表明: 大肠杆菌 K₈₈ 感染 Caco-2 细胞后, 细胞单层 TEER 值随时间的延长而降低, 感染 3 h 后 TEER 值显著低于正常组 ($P < 0.05$), 而添加蒙脱石组 TEER 值与正常组无显著差异 ($P > 0.05$)。蒙脱石剂量在 0~1 g/L 的范围内, 感染 Caco-2 细胞单层 TEER 值随着蒙脱石剂量的增加而急剧增加; 蒙脱石剂量在 1~1.67 g/L 的范围内, TEER 值变化趋平。感染 Caco-2 细胞的 ³H 甘露醇表观渗透系数随着时间的延长而增加, 各个时间点均显著高于正常组 ($P < 0.05$), 而蒙脱石组各时间点 ³H 甘露醇表观渗透系数均显著低于大肠杆菌 K₈₈ 感染组 ($P < 0.05$)。大肠杆菌 K₈₈ 感染后, 相邻 Caco-2 细胞间紧密连接结构遭到破坏, occludin 的表达减少, 而蒙脱石处理后可使大肠杆菌 K₈₈ 引起的紧密连接结构受损减轻, occludin 表达增多。结果提示蒙脱石可有效抑制大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 细胞引起的通透性增加、屏障功能损坏, 改善紧密连接的结构和 occludin 的表达分布。

关键词 蒙脱石; Caco-2 细胞; 屏障功能; 紧密连接; occludin

蒙脱石作为药用矿物始载于《本草纲目拾遗》, 1982 年被 WHO 列入腹泻病控制规划用药^[1]。蒙脱石作为一种新型的黏膜保护剂, 在多种消化系统疾病的治疗中取得了很好的效果^[2]。胡彩虹等^[3]研究了蒙脱石对细菌黏附 Caco-2 细胞的影响, 发现蒙脱石可有效阻断病原菌黏附, 防治肠道细菌感染和细菌移位。

腹泻是仔猪的一种多发病, 腹泻使仔猪的死亡率达 11.5%~29.5%, 其中大肠杆菌 K₈₈ 引起的发病率和死亡率占整个发病率和死亡率的 56.2% 和 24.7%^[4]。本试验拟采用 Caco-2 细胞培养模型, 探讨蒙脱石对大肠杆菌 K₈₈ 感染 Caco-2 后的屏障功能和紧密连接蛋白表达的影响, 揭示蒙脱石的作用机制, 为蒙脱石应用于防治仔猪腹泻提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蒙脱石矿属火山沉积岩系热液蚀变型, 为钙基蒙脱石, 矿石蒙脱石含量达 97% 以上, 化学式为 $[\text{Na}_{0.158}\text{K}_{0.082}\text{Ca}_{0.256}\text{Mg}_{0.063}][\text{Mg}_{0.376}\text{Fe}^{2+}_{0.014}\text{Fe}^{3+}_{0.136}\text{Al}_{1.474}][\text{Si}_{3.87}\text{Al}_{0.13}\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$ 。蒙脱石矿 80 °C 干燥, 研

磨至小于 300 目; 加水配制成浓度为 10% 的悬浮液, 高速搅拌机中打浆; 沉淀除去粒度大于 1 μm 的组分; 按重量比为蒙脱石: 氯化钠为 10:1, 加水并在高速搅拌机中打浆, 制成浓度 20% 的悬浮液矿浆, 水洗 5~7 次至无 Cl⁻, 离心, 得到的钠化蒙脱石 80 °C 干燥, 研磨至小于 300 目备用。试验前准确称取 0.5 g 蒙脱石, 用 100 ml Hanks 缓冲溶液 (Hanks buffer salt solution, HBSS) 制成 5 g/L 蒙脱石悬液。

菌株和细胞系: 大肠杆菌 K₈₈ 菌株 C83903 (O141:K85, K88ab) 购自中国兽药监察所。Caco-2 细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所。

主要试剂: DMEM 培养液、胎牛血清、非必需氨基酸、青链霉素、胰蛋白酶、EDTA 消化液和 HBSS 购自 Gibco 公司。LB 培养液购自 Difco 公司。单克隆兔抗人 Occludin 抗体, HRP 羊抗兔二抗购自 Zymed Laboratories (San Francisco, CA)。³H 甘露醇 (250

收稿日期: 2008-01-04 接受日期: 2008-05-12

浙江省自然科学基金 (No. Y306028) 和浙江省教育厅 (No. 20061322)

资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-86985607, Fax: 0571-86961553, E-mail:

chhu@zju.edu.cn

μCi, Sigma 公司)。0.4 μm 孔径 Millicell™ 膜(Millipore 公司)。

主要仪器: Millicell®-ERS 电阻仪(Millipore 公司), Leica QWin 图像分析系统(德国), 液闪仪(Wallac MicroBeta® TriLux, 芬兰)。

1.2 Caco-2 细胞培养

应用 DMEM 培养液(高糖): 包括 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 谷氨酰胺和 1% 青链霉素。细胞培养在 75 cm² 卡氏培养瓶, 置于 37 °C 培养箱中, 通入 5% CO₂(相对湿度 90%)。2 天换 1 次培养液, 每 5 天按 1:3 的比例传代, 实验所用细胞在 10 代以内。Caco-2 细胞以 5×10⁴ 个/cm² 接种到 Millicell™ 膜上, 在细胞接种 24 h 后更换培养液 1 次, 以后每 2 天换液 1 次, 1 周后每日换液, 培养 21~24 天。

1.3 细菌培养及计数

大肠杆菌在 LB 培养液中 37 °C 摇床培养 24 h, 4 000 r/min 离心 15 min, 用含 1 g/L 叠氮化钠的 Hank's 液洗 2 次, 用 HBSS 悬浮细菌, 调整菌液浓度为 1×10⁸ CFU/ml, 备用。

1.4 跨膜电阻(TEER)测定

本实验分为正常组、大肠杆菌 K₈₈ 感染组和蒙脱石组。将正常组(1.5 ml HBSS)、感染组(1.4 ml HBSS+100 μl 菌液)、蒙脱石组(1 ml HBSS+100 μl 菌液+400 μl 蒙脱石悬液, 蒙脱石浓度为 1.33 g/L)的上述溶液分别加入到 Caco-2 细胞单分子层的细胞单侧顶端(apical, AP)侧, 2 ml 空白 HBSS 加入到细胞单层底端(basolateral, BL)侧。将 Millicell™ 膜置 37 °C 培养箱中, 分别在不同时间用跨膜电阻仪测定细胞单分子层的 TEER, 每个处理做 3 个重复。为研究蒙脱石是否会改变 Millicell™ 膜的电阻值, 本实验采用没有生长细胞的空白 Millicell™ 膜, 加入 HBSS 或蒙脱石悬液, 在不同时间测定 Millicell™ 膜的电阻值。

蒙脱石剂量对大肠杆菌 K₈₈ 感染的 Caco-2 细胞单层 TEER 的影响: 本实验分为 6 组, 分别为 100 μl 菌液+0、100、200、300、400、500 μl 蒙脱石悬液+1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9 ml HBSS, 相应的蒙脱石剂量分别为 0、0.33、0.67、1.0、1.33、1.67 g/L, 将上述 6 组混合液分别加入到 Caco-2 细胞单分子层的 AP 侧, 2 ml 空白 HBSS 加入到 BL 侧。37 °C 培养 12 h, 测定细胞单分子层的跨膜电阻。

1.5 ³H 甘露醇通透性测定

取符合转运条件且细胞生长形态完好的 Millicell™ 膜, 用空白 pH 7.4 HBSS 等渗溶液 37 °C 共

浴 20 min, HBSS 润洗 3 遍。将按 1.4 所述的正常组、大肠杆菌 K₈₈ 感染组和蒙脱石组的 3 个处理液或含有 ³H 甘露醇的 HBSS 加入到 AP 侧, 空白 HBSS (pH 7.4) 加入到 BL 侧。Millicell™ 膜置 37 °C 培养箱中, 分别在不同时间吸取接受液 0.1 ml, 同时补加 37 °C 空白 0.1 ml HBSS (pH 7.4)。采用液闪计数的方法测定样品的放射性。³H 甘露醇的表现通透系数根据以下公式计算。

$$P_{app} = (dQ/dt)/(C_0 \times A)$$

其中 dQ/dt 为单位时间甘露醇转运量(Bq/min); A 为转运膜的面积, A 为 4.2 cm²; C₀ 为甘露醇初始放射计数浓度(Bq/L)。

1.6 免疫组化检测紧密连接蛋白 occludin

按 1.4 分组和处理方法, 各处理组 37 °C 培养 12 h 后, 沿器壁小心地从孔中吸出液体, 然后加入 PBS, 润洗 3 次。加入 2.5% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液, 室温温育 30 min 固定细胞, 吸去固定液, 用 PBS 充分润洗去除残留固定液。采用两步法免疫组化染色, 单抗 4 °C 过夜, 二抗 37 °C 温育 30 min, PBS 漂洗、DAB 显色、苏木精对比染色, 脱水封固后, 光镜下观察, 摄片, DAB 染色处呈棕褐色。设阴性对照(不加一抗)。

1.7 统计学处理

各处理间平均值的比较采用方差分析中的 Duncan's 多重比较。计算程序采用 SAS(6.12)中的一般线性模式进行。

2 结果

2.1 Caco-2 细胞单层跨膜电阻(TEER)

图 1 为在没有生长细胞的空白 Millicell™ 膜上加入 HBSS 液或蒙脱石悬液, 在不同时间测定的 Millicell™ 膜的 TEER 值, 结果显示, HBSS 组和蒙脱石组的 Millicell™ 膜的 TEER 值在不同时间均没有显著差异 ($P < 0.05$), 表明蒙脱石不会改变 Millicell™ 膜的电阻值。

图 2 为各组处理后不同时间用跨膜电阻仪测定的 Caco-2 细胞单分子层的跨膜电阻。Caco-2 细胞培养 21~24 天后, 其 TEER 值稳定在 550 Ω/cm² 左右。大肠杆菌 K₈₈ 感染后, Caco-2 细胞 TEER 值随着时间的延长而逐渐下降, 在 1~9 h 内下降最为明显, 随后 TEER 下降趋缓。大肠杆菌 K₈₈ 感染 3 h 后 Caco-2 细胞的 TEER 值显著低于正常组 ($P < 0.05$)。蒙脱石组 3 h 后的各时间点 Caco-2 细胞 TEER 值显著高于大肠杆菌 K₈₈ 感染组 ($P < 0.05$), 而与正常组的 TEER 值无显

著差异($P>0.05$)。

图3为蒙脱石剂量对大肠杆菌 K_{88} 感染的 Caco-2 细胞单层 TEER 的影响, 由图可见, 蒙脱石剂量在 0~1 g/L 的范围内, 大肠杆菌 K_{88} 感染的 Caco-2 细胞单层 TEER 值随着蒙脱石剂量的增加而急剧增加; 蒙脱石剂量在 1~1.67 g/L 的范围内, TEER 值变化趋平。

2.2 ^3H 甘露醇通透性

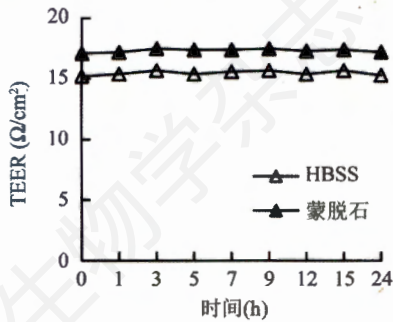


图1 HBSS 或蒙脱石的空白 Millicell™ 膜 TEER 值

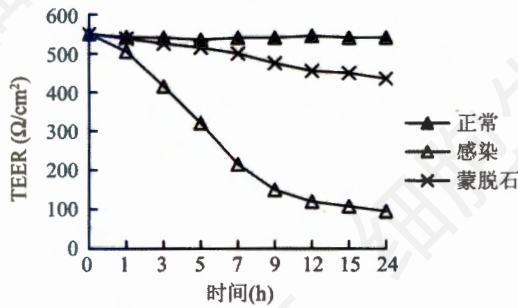


图2 正常、感染、蒙脱石组 Caco-2 细胞单层 TEER 值

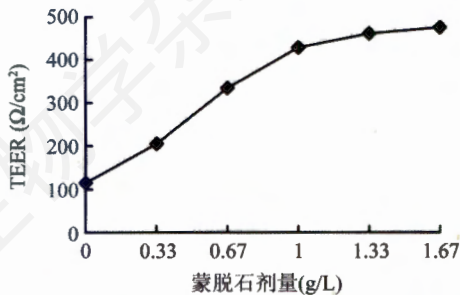


图3 蒙脱石剂量对感染 Caco-2 细胞单层 TEER 的影响

表1为各组处理后不同时间 Caco-2 细胞 ^3H 甘露醇表观渗透系数。大肠杆菌 K_{88} 感染后, Caco-2 细胞 ^3H 甘露醇表观渗透系数随着时间的延长而逐渐增加, 各个时间点均显著高于正常组($P<0.05$)。蒙脱石组各时间点 Caco-2 细胞 ^3H 甘露醇表观渗透系数显著低于大肠杆菌 K_{88} 感染组($P<0.05$), 而与正常组无显著差异($P>0.05$)。

2.3 紧密连接蛋白 occludin 表达的变化

紧密连接结构位于相邻细胞之间。紧密连接相关蛋白 occludin 染色后呈棕褐色, 沿细胞膜连续分布。由图4可见, 正常组相邻细胞间连接较紧密, 棕褐色颗粒沿细胞膜分布, 边界较清晰。Caco-2 细胞在大肠杆菌 K_{88} 感染后, 细胞间棕褐色颗粒明显减少, 表明 occludin 表达减少, 细胞结构变模糊。而蒙脱石组与正常组相比, 棕褐色颗粒也稍有减少, 但与感染组相比有非常明显差异。

3 讨论

蒙脱石是由硅氧四面体和铝氧八面体组成的二八面体层状硅酸盐粘土矿物, 铝和镁对结构中硅和铝的随机取代造成的电荷不平衡, 赋予它遇水特有的膨胀、吸附、带电和离子交换特性。水化膨胀的蒙脱石是带负电的板块表面与带正电的边缘相连接, 被称之为“表面-边缘”的“车厢”式悬浮物, 具有“凝胶-溶胶-凝胶”的“触变性”, 这种“触变性”非常有利于将细菌锁在“车厢”内, 从而吸附、固定细菌^[5]。胡彩虹等^[3]研究了蒙脱石对细菌黏附 Caco-2 细胞的影响, 发现蒙脱石可有效阻断病原菌黏附, 其中对大肠杆菌 ATCC 25922 黏附的阻断率为 54.22%。本实验发现的蒙脱石可有效抑制大肠杆菌 K_{88} 黏附 Caco-2 细胞引起通透性增加的结果显然与蒙脱石可有效阻断大肠杆菌 K_{88} 黏附 Caco-2 有关。

紧密连接(tight junction)是肠上皮细胞间的主要连接方式, 对维持上皮细胞极性、调节肠屏障的通透性、防止细菌、内毒素和毒性大分子物质进入体内发挥着重要的作用, 它不仅将细胞顶部与基侧膜分

表1 各组 ^3H 甘露醇表观渗透系数 P_{app}

组别	^3H 甘露醇表观渗透系数						
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	8 h	12 h
正常	0.21±0.03	0.28±0.04 ^b	0.40±0.05 ^b	0.58±0.07 ^b	0.74±0.10 ^b	0.95±0.11 ^b	1.25±0.14 ^b
感染	0.21±0.03	1.25±0.15 ^a	2.67±0.31 ^a	4.15±0.52 ^a	5.74±0.72 ^a	8.25±1.02 ^a	10.92±1.21 ^a
蒙脱石	0.21±0.03	0.38±0.06 ^b	0.65±0.08 ^b	0.92±0.12 ^b	1.26±0.18 ^b	1.81±0.23 ^b	2.12±0.28 ^b

同一列中肩标小写字母不同者差异显著($P<0.05$), $n=3$ 。

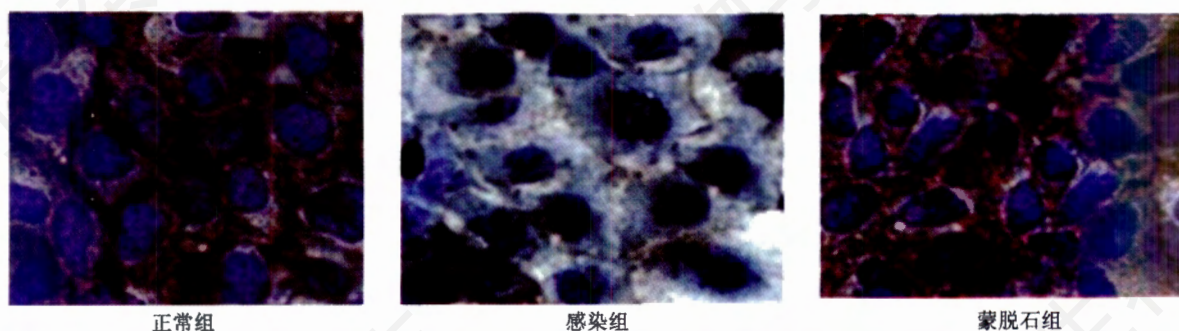


图4 各组紧密连接蛋白 occludin 表达(免疫组化染色, 400×)

开(栅栏功能), 而且还是调节肠上皮细胞旁路流量的限速屏障(门控功能); 同时紧密连接也调控着细胞的生长和分化过程, 其多种蛋白质参与协调信息转导过程^[6]。紧密连接具有相当大的可控性, 其开放和关闭受肠腔内物质、细胞因子等各种生理及病理刺激的调节。紧密连接是一个动态变化的、由结构蛋白及各类连接蛋白分子共同组成、具有多种功能的复合体。紧密连接蛋白 occludin 是一种相对分子质量约为 65 000 的 II 型跨膜蛋白, 存在于细胞膜上, 是构成选择性屏障功能的结构蛋白^[7]。肠道上皮间紧密连接结构一旦受损, 上皮细胞间的通透性就会增高, 毒素或微生物代谢产物可经肠黏膜进入体循环, 引起肠道局部感染或脓毒症等全身性反应。肠道致病菌影响紧密连接功能的途径有: ①改变紧密连接蛋白结构及功能; ②破坏细胞骨架结构; ③其他如蛋白激酶 C (PKC) 途径等。目前, 体外实验中能够反映肠道通透性的指标主要是 TEER 值和小分子物质的透过率^[8]。

已有研究表明, 侵袭性大肠杆菌(EIEC)黏附于肠道上皮细胞后, 可分泌效应分子, 通过各种途径作用于细胞引起其功能紊乱, 如电解质分泌紊乱、紧密连接屏障破坏、细菌移位感染等, 或诱导细胞凋亡^[9]。大肠杆菌 K₈₈ 是最常见的引起仔猪腹泻的血清型, 有很强的侵袭性, 其引起仔猪腹泻发病率和死亡率占整个发病率和死亡率的 56.2% 和 24.7%^[4]。本实验发现, 大肠杆菌 K₈₈ 感染 Caco-2 细胞后, 单层细胞跨膜电阻值和甘露醇的透过率随时间延长而升高, 这表明大肠杆菌 K₈₈ 感染的 Caco-2 细胞完整性已遭到破坏,

通透性增高。而经蒙脱石处理后, 可使大肠杆菌 K₈₈ 引起的 TEER 值升高趋缓、甘露醇透过率降低, 提示蒙脱石对肠道上皮的屏障功能起到了保护作用。进一步研究发现, 大肠杆菌 K₈₈ 感染后, 相邻细胞间原本正常的膜结构发生紊乱, occludin 的表达明显减少, 而经蒙脱石处理后, occludin 表达较感染组明显增多。蒙脱石作为一种新型的黏膜保护剂已广泛应用于临床, 蒙脱石服用后, 不吸收入血, 仍以其细小颗粒形式存在, 约 6 h 后连同所固定的病菌、病毒及毒素排出体外。蒙脱石通过与肠黏液糖蛋白识别、结合、定位, 可在消化道形成胶体保护膜, 还可提高黏液的质和量, 能与黏液蛋白结合从而增强黏液的凝集性和内聚力, 达到黏液屏障的作用^[10,11]。本实验发现蒙脱石修复大肠杆菌 K₈₈ 引起的肠屏障破坏作用, 涉及细胞间紧密连接, 其详细机制尚有待进一步阐明。

参考文献(References)

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典, 上海: 科学技术出版社, 1985
- [2] 赵秀红. 现代中西医结合杂志, 2003, 12: 2263
- [3] 胡彩虹等. 细胞生物学杂志, 2006, 28: 76
- [4] 李玉华等. 中国畜牧杂志, 2007, 43: 1
- [5] 胡秀荣等. 药学学报, 2002, 37: 718
- [6] 秦环龙等. 世界华人消化杂志, 2005, 13: 443
- [7] Musch MW et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290: G222
- [8] 张中伟等. 肠外与肠内营养, 2006, 13: 237
- [9] Shifflett DE et al. Lab Invest, 2005, 85: 1308
- [10] Albengres E et al. Eur J Clin Pharmacol, 1985, 28: 601
- [11] Madkour A A et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1993, 17: 176

Effects of Montmorillonite on the Intestinal Barrier Function and Tight Junction Protein of Caco-2 Cells in Response to *Escherichia coli* K₈₈

Cai-Hong Hu*, Hai-Ping Liu, Xiang-Dong Hu¹, Yong Xu, Mei-Sheng Xia²

(College of Animal Science; The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ¹Zhejiang Crown Technology Co., Ltd, Hangzhou 310012, China;

²Department of Earth Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Caco-2 cell line was used as an *in vitro* model to investigate the effects of montmorillonite (MMT) on the intestinal barrier function and tight junction protein of Caco-2 cells in response to *E.coli* K₈₈. The transepithelial electrical resistance (TEER) and permeability of the paracellular transport marker mannitol were measured to evaluate the intestinal barrier function. Changes in subcellular localization of the tight junction protein Occludin protein by Immunohistochemistry were also assessed after treatment of MMT. The results showed that the TEER and the transmissivity of mannitol increased after infected by *E.coli* K₈₈, and the increase was decreased after dealing with MMT ($P<0.05$). The TEER of Caco-2 cell infected by *E.coli* K₈₈ was increased with the concentration of MMT at the concentration range of 0–1 g/L and remained steady at the concentration range of 1–1.67 g/L. The structure of tight junction was destroyed and the expression of Occludin was diminished after infected with *E. coli* K₈₈. But MMT can prevent the damage induced by *E.coli* K₈₈. The results indicated that MMT exerts a protective effect against the damage to integrity of Caco-2 monolayer cells and the tight junction structure and distribution of tight junction proteins induced by *E.coli* K₈₈ infection.

Key words montmorillonite; Caco-2 cell; intestinal barrier function; tight junction; occludin

Received: January 4, 2008 Accepted: May 12, 2008

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y306028) and the Zhejiang Educational Office (No.20061322)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86985607, Fax: 86-571-86961553, E-mail: chhu@zju.edu.cn